

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：82723

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K04276

研究課題名（和文）4重極型キャピラリー誘電泳動デバイスによる細胞分離技術の新展開

研究課題名（英文）Development of cell separation technology using a quadrupole capillary dielectrophoretic device

研究代表者

多田 茂（Tada, Shigeru）

防衛大学校（総合教育学群、人文社会科学群、応用科学群、電気情報学群及びシステム工学群）・応用科学群・教授

研究者番号：70251650

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：細胞を高速・高精度に分離する技術として、誘電泳動を用いた細胞分離技術が注目を集めている。本研究では4重極型キャピラリー誘電泳動デバイスを新たな細胞分離デバイスとして提案した。始めに、デバイスの最適設計のために電場の数値シミュレーションを行った。提案デバイスの細胞分離効率を評価するため、設計内容に従いデバイスを製作し、ヒト乳腺上皮細胞の生・死細胞の混合溶液を流し、生・死細胞の分離実験を行った。その結果、細胞数が少ない状態では、細胞が適切に分離される様子が観察されたものの、細胞数が増加すると期待通りの分離効率は得にくくなり、動作条件の見直しやデバイス仕様の改善などが今後の課題とされた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

提案デバイスが持つ誘電泳動力がガラス管断面内全域の細胞に対して作用するため、高効率の分離が期待できる。電極との接触による細胞の損傷や溶液の電気分解、電圧降下、電極の劣化等のリスクがない。といった特徴は、従来型デバイスが抱える幾つかの問題点を発熱の問題を除き、解決出来る。本研究成果については、細胞分離率の向上など、今後解決されるべき課題点はあるが、新しい概念による誘電泳動型細胞分離デバイスの有効性が示され、誘電泳動技術を応用した臨床検査技術の発展に大きく貢献する。また誘電泳動デバイスの研究と臨床応用に大きな質的転換をもたらすことが期待出来る。

研究成果の概要（英文）：Cell separation technology based on the principle of dielectrophoresis has been attracting attention as a technology for separating cells at high speed and with high accuracy.

In this study, we proposed a quadrupole capillary dielectrophoresis device as a new cell separation device. Numerical simulations of the electric field were performed to optimize the device design and to evaluate its operating characteristics, and at the same time, the device specifications were determined. To evaluate the cell separation efficiency of the proposed device, the device was fabricated according to the design, and a mixed solution of live and dead human mammary epithelial cells was poured into the cell sample, and experiments were conducted to separate live and dead cells. As a result, it was observed that cells were properly separated when the number of cells was small, but when the number of cells increased, the separation efficiency was not as expected.

研究分野：生体流体工学

キーワード：細胞分離 誘電泳動 4重極電極 キャピラリー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

今日、先進医療分野で急務とされるのが多量かつ多種多様の細胞を含むサンプル溶液中にわずかに含まれる特定の希少細胞を、損傷させることなく短時間で正確に分離する技術の確立である。この技術は、例えば、転移性がん患者の末梢血中に現れる血中循環癌細胞の検出、白血病などの難治性疾患の治療に用いられる造血幹細胞の骨髄細胞からの分離、iPS 細胞における強い癌性を持つ未分化細胞の分化細胞群からの分離などの技術であり、がんの超早期診断、細胞移植や再生医療の現場で開発・実用化が強く望まれている。しかしながら、いずれの希少細胞においても存在頻度は 0.001% 未満という極めて低い値であり、分離・抽出が極めて困難である。このような希少細胞を分離するには、遠心分離やセルソーターに代表される従来の技術では検出精度の関係上、試料の前処理に多大な時間と手間、費用を要する。

2. 研究の目的

本研究の目的は、多量の細胞試料から特定の細胞を高速・高精度に分離する技術を開発することである。

現在広く用いられているマイクロ平行平板型 DEP 細胞分離デバイスが、本質的に次の問題点を抱えることも判明し、これらが解決されない限り DEP 技術の実用化への道も険しいと考える。

デバイス製造コストと細胞分離能力の関係

ここ数年細胞分離能力向上のためにデバイスの内部構造が 3 次元化されるなど、製造工程・技術が高コスト化・複雑化するものの、分離率の値は 98% 前後で足踏み状態が続いている。

電場による細胞生理状態・デバイス性能への影響

電極との接触による細胞の損傷、低周波数域 (~10kHz) の電場を用いた際の溶液の電気分解による pH 変化や発熱、金属薄膜電極の劣化・破損、電気 2 重層による電圧降下が避けられない。

無菌的操作の問題

デバイス構造・素材の複雑化に伴い、デバイスの滅菌処理に手間とコストがかかる。複雑な形状の PDMS やガラス、金属薄膜を構成部品に用いるデバイスは、簡便で低コストな滅菌処理が行えないため、デバイスの組付けや操作を行う際には特別な無菌環境が必要である。

これらの問題点の解決方法として、本研究では 4 重極型キャピラリー-DEP 細胞分離デバイスを提案する。

提案デバイスの概念図を図 2.1 に示す。細胞試料の流路には現在の主流である平行平板型とは大きく異なる微細ガラス管(以降、ガラスキャピラリーとする)を用い、ガラスキャピラリーの外周に沿って 4 本の電極ロッド(4 重極電極)を等間隔で配置する。電極ロッドを交互に電気的に接続し、交流電圧を負荷することで、ガラスキャピラリー内を流れる細胞には右下の図のように微細ガラス管の軸周りに強度が分布する DEP 力が生じる。すなわち、正の DEP 特性を持つ細胞がガラスキャピラリー内周部に、負の DEP 特性を持つ細胞がガラスキャピラリー中心部に集められることで効率的に細胞分離が達成される。

提案デバイスの特徴は、

細胞試料を流す流路は電極とは独立したガラス管であり、必要長さに切断する以外の工程は不要である。また、DEP 力が管断面内全域で作用するため高効率の分離が期待できる。

電極は微細ガラス管外周部に配置するので、電極との接触による細胞の損傷や溶液の電気分解、電圧降下、電極の劣化等のリスクがない。

デバイスの滅菌はガラス管とそれを接続するシリコンチューブ、シリンジを接続したままオートクレーブするだけで、無滅菌の外環境においても無菌的な細胞分離操作を容易に行える。

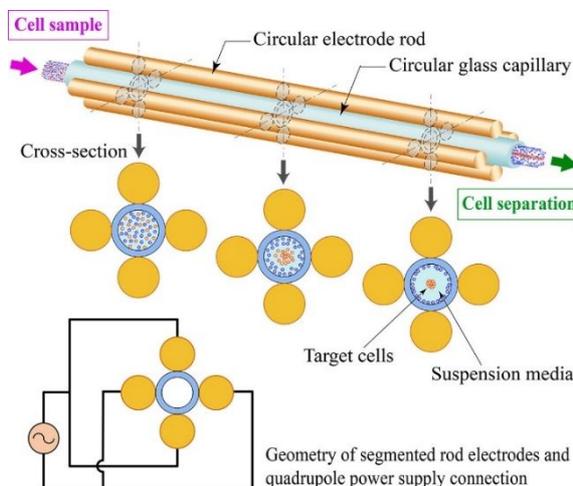


図 2.1 デバイス概念図

であり、提案デバイスのこれらの特徴は同時に、先に掲げた平行平板型デバイスの3つの問題点を発熱の問題を除き、全て解決する。本研究を遂行することにより、本研究課題で提案する新しい概念によるDEP細胞分離デバイスの有効性が示され、DEPを応用した臨床検査技術の発展に大きく貢献する。またDEPデバイスの研究と臨床応用に大きな質的転換をもたらすことが期待出来る。

3. 研究の方法

3.1 誘電泳動を用いた細胞分離の原理

印加電場が交流の場合、DEP力 F_{DEP} は

$$F_{DEP} = \pi \epsilon_f \left(\frac{d_c}{2} \right)^3 \text{Re}(\beta) \nabla E^2 \quad (3.1)$$

と表される。ここで ϵ_f は溶液の誘電率、 d_c は細胞の直径、 ∇E^2 は電場 E の2乗のこう配であり、 $\text{Re}(\beta)$ はClausius-Mossotti因子 β の実数部を表す。 F_{DEP} には $\text{Re}(\beta)$ の符号の違いにより、正と負の2種類が存在する。例えば細胞の分離を考える場合、正の F_{DEP} は電場こう配の向きに生じる力であり、 $\text{Re}(\beta) > 0$ である細胞はこの性質（正の誘電泳動特性）を持ち、電場こう配の値が最も高くなる電極端部に引き寄せられる。逆に負の F_{DEP} は電場こう配の逆方向に生じる力であり、 $\text{Re}(\beta) < 0$ である細胞はこの性質（負の誘電泳動特性）を持ち、電極から離れるかもしくは電場の極小領域に集まる（図3.1）。

さらに、式(3.1)の $\text{Re}(\beta)$ は周波数依存性を持つため、 F_{DEP} の向きと大きさは交流周波数によって変化する。図3.2は、本研究で用いたヒト乳腺上皮細胞の癌細胞（MDA-MB-231）について、溶液導電率 σ_f が $\sigma_f = 10 \text{ mS/m}$ の場合における交流周波数 f と $\text{Re}(\beta)$ の関係を示したものである。 $\text{Re}(\beta)$ の周波数特性は細胞の種類（細胞株）や状態によって様々に異なる。この細胞の場合では生細胞と死細胞の $\text{Re}(\beta)$ の周波数依存性が大きく異なる。特に $f = 18 \text{ kHz}$ 以下の場合、生・死細胞それぞれの $\text{Re}(\beta)$ の符号は互いに逆転し、それぞれの細胞には逆向きの F_{DEP} が作用する。これを応用することで細胞分離が可能になる。また、印加電圧の周波数範囲を $f = 18 \sim 100 \text{ kHz}$ に設定することで、移動中の細胞に対し、移動速度の差を利用した細胞操作・分離も可能になる。

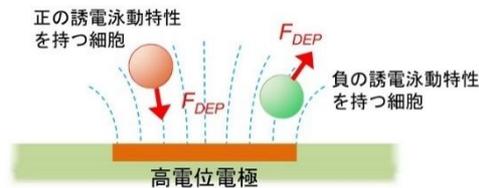


図 3.1 不均一電場内での細胞の挙動

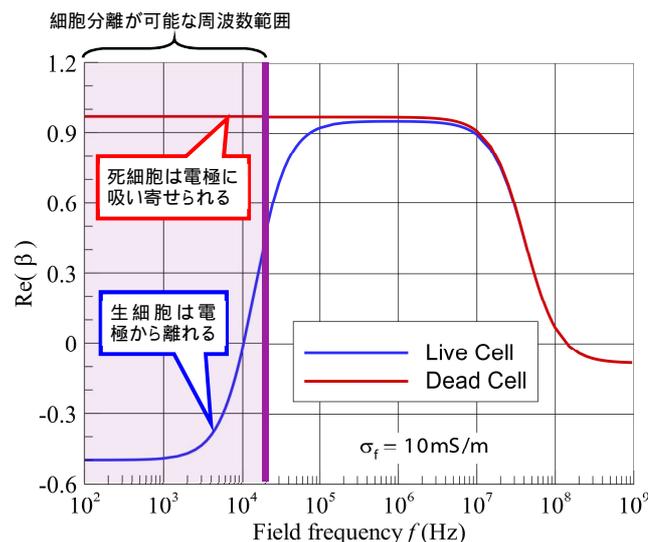


図 3.2 生・死細胞における $\text{Re}(\beta)$ の周波数スペクトル

3.2 4重極型キャピラリー誘電泳動デバイスの設計

提案デバイスの仕様の詳細について、デバイスの設計上重要な、細胞分離に最適な電場分布を得られる電極ロッド径、ガラスキャピラリー内・外径を電場の数値シミュレーションを行うことで決定した。

3.2 細胞サンプルおよびデバイスの作成

ヒト乳腺上皮癌細胞 (MDA-MB-231) の生・死細胞を用いた。細胞は初代細胞株を購入し、継代を行うことで実験に用いた。細胞の継代は提供元が推奨する方法で行い、死細胞については、生細胞を 80 °C 環境に 20 min 晒すことで作成した。細胞回収率の解析はフローサイトメトリーにより行った。生・死細胞の識別のために生細胞を蛍光色素 Calcein-AM を用いて標識した。また、細胞分離率の解析には生細胞を Calcein-AM で、死細胞を PI で染色した二重染色法を用いて計数した。細胞の分散媒にはマンニトール溶液を用いた。溶液の浸透圧を生理学的な値に合わせるため、300mM のモル濃度に調整して用いた。

3.3 実験装置および方法

実験装置主要部の概略を図 3.6 に示す。実験装置は、4 重極型キャピラリー誘電泳動デバイス、交流電圧を印加する波形発生装置、電圧の増幅器、LED 光源、シリンジポンプ、CCD カメラ、ズームレンズ、ビデオコンバーター、動画撮影用パソコンにより構成される。スタンドに装着した両開きクランプで組み立てた 4 重極型キャピラリー誘電泳動デバイス本体を縦方向が鉛直になるように固定した。次に、増幅器に接続した BNC ケーブル先端のワニ口クリップと 4 重極型キャピラリー誘電泳動デバイスのリード線をつないだ。細胞試料の流量はドレイン側流量を 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ 、ガラス細管側流量を 7 $\mu\text{L}/\text{min}$ に設定した。

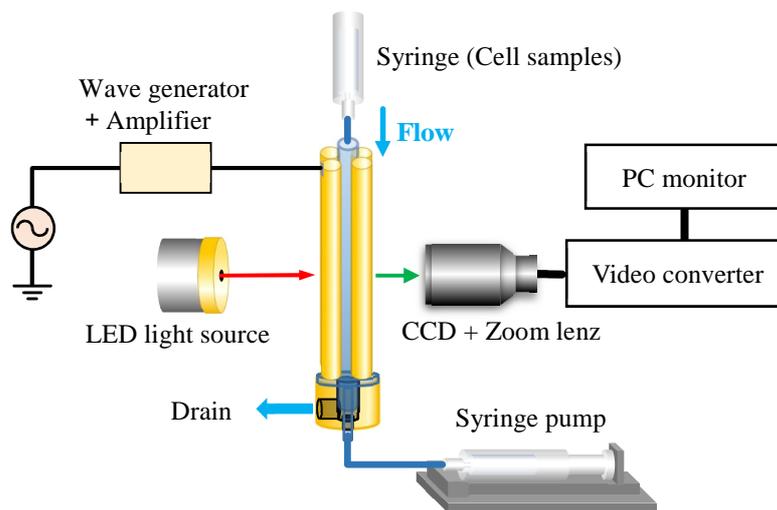


図 3.6 実験装置セットアップ図

3.4 実験条件

細胞については継代数が 15 ~ 20 継代目のものを使用した。細胞を 1 : 1 の比率で 300 mM のマンニトール溶液に懸濁させて実験を行った。マンニトール溶液の導電率 σ_f は、 $\sigma_f = 0.4, 10, 100$ mS/m に変化させ、細胞サンプル溶液は分離実験を行う直前に作成した。印加する交流電圧の周波数については $f = 3, 14$ kHz、電圧は $\psi = 1.8$ kV_{pp} に設定した。実験条件を表 3.1 に示す。

表 3.1 実験条件

MDA-MB-231	
継代数	P15 ~ P20
分散媒溶液	300 mM マンニトール等張溶液
実験パラメーター	数 値
溶液導電率 σ_f (mS/m)	0.4, 10, 100
交流周波数 f (kHz)	3, 14
端子電圧 ψ (kV _{pp})	1.8

3.5 統計解析

5 回の実験の平均値 $\pm 2 \times$ 標準誤差 (95% 信頼区間) で示し、有意差検定は One-way ANOVA 法、post hoc テストに Turkey-Kramer の多重比較を用いた。有意水準を 5% ($P < 0.05$) とした。

4. 研究成果

4.1 生細胞を用いた可視化実験

デバイスが設計通りの動作を行うか確認するため、細胞挙動を可視化実験により調べた。実験条件は、周波数を $f = 1.0, 20$ kHz の 2 通り、交流電圧は $\psi = 300$ V_{pp}、溶液導電率は $\sigma_f = 10$ mS/m、流量については動画の撮影の関係上、実験条件の値よりもやや小さく 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ とした。

図 4.1 は可視化実験の一例である。中央部の明るい部分がガラスキャピラリー内部であり、白く光っている粒子状の像が細胞であり、細胞は下に向かって流れている。交流周波数が $f = 1$ kHz

のとき、細胞はガラスキャピラリー中央部に集められ、交流周波数が $f = 20 \text{ kHz}$ のとき、細胞はガラスキャピラリーの内壁面近傍に集まることが観察された。

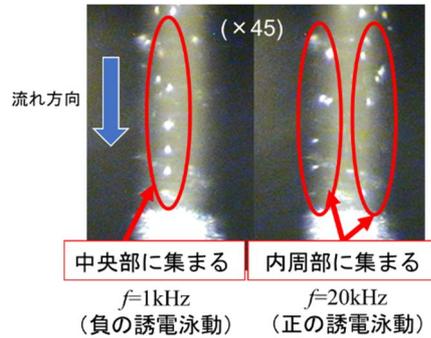


図 4.1 生細胞を用いた可視化実験

4.2 生・死細胞を用いた細胞回収率の評価

図 4.2 に溶液導電率 $\sigma_f = 100 \text{ mS/m}$ 、交流周波数 $f = 3 \text{ kHz}$ における生細胞、死細胞の細胞回収率の解析結果を示す。生細胞においてはガラス細管側において、死細胞についてはドレイン側において、それぞれ電圧無印加時 (Control) と比べ細胞回収率の上昇が確認された。

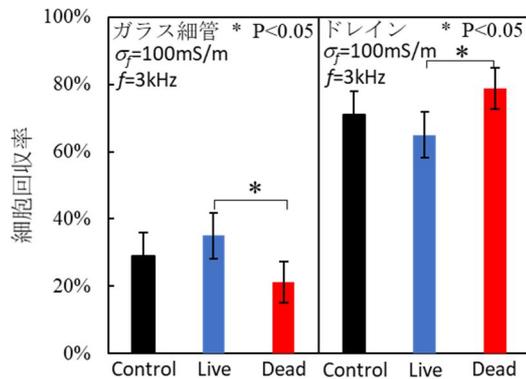


図 4.2 生・死細胞を用いた細胞回収率

4.3 生・死細胞の分離率の測定

実験結果を図 4.3 に示す。左がガラス細管側、すなわちガラスキャピラリー中央部での生・死細胞の存在割合を示したものであり、右はドレイン側、すなわちガラスキャピラリー内周部での生・死細胞の存在割合を示したものである。ドレイン側では生・死細胞の分離が行われたが、ガラス細管側での生・死細胞の分離では統計的な有意差は得られなかった。

この理由として、4重極電極に近いガラスキャピラリー内周部では、電極により生じる強い電場こう配により、正の誘電特性を持つ死細胞は引き寄せられ、負の誘電泳動特性を持つ生細胞は電極から遠ざけられるため、うまく細胞分離が行われ、死細胞の割合が増加する。その一方で、誘電泳動力の大きさが大きく減少する中央部では細胞に作用する誘電泳動力が弱いいため、死細胞の除去が十分に行われず、初期の生・死細胞の混合比 1 : 1 の比をほぼ保ったままのサンプル試料が採取されたと考えられる。

従って、細胞分離率の向上を目指すためには、印加電場を更に強くする、もしくは短くしたデバイスを多段式にして、ドレイン側から徐々に死細胞を分離するなどして、ガラスキャピラリー中央部の死細胞を効率よく内周部に異動させることなどが今後の検討課題としてあげられる。

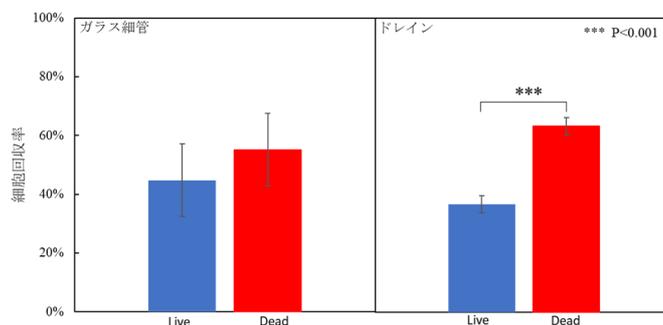


図 4.3 生・死細胞の分離率

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tada Shigeru	4. 巻 38
2. 論文標題 Numerical simulation of the electric field induced in a contactless dielectrophoretic quadrupole cell separator	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Engineering Computations	6. 最初と最後の頁 1076 ~ 1094
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1108/EC-04-2020-0188	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 関 哲典, 長坂 葵, 富山 寅, 江口正徳, 多田 茂
2. 発表標題 誘電泳動を用いた マイクロ流体デバイスによる細胞の分離
3. 学会等名 日本機械学会 2021年度 年次大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Y. SEKI, A. NAGASAKA, N. TOMIYAMA, U. MORI, M. EGUCHI, S TADA
2. 発表標題 Continuous Separation of Biological Cells Using a New Type of Dielectrophoresis-based Microfluidic Device
3. 学会等名 The 11th Asian-Pacific Conference on Biomechanics (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大地健吾, 多田茂, 江口正徳
2. 発表標題 4重極型キャピラリー誘電泳動デバイスによる細胞分離
3. 学会等名 第33回バイオエンジニアリング講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大地健吾, 多田茂, 江口正徳
2. 発表標題 4重極型キャピラリー誘電泳動デバイスによる細胞分離
3. 学会等名 日本機械学会2020年度年次大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	松元 藤彦 (Matsumoto Fujihiko) (10531767)	防衛大学校(総合教育学群、人文社会科学群、応用科学群、電気情報学群及びシステム工学群)・応用科学群・教授 (82723)	
研究分担者	江口 正徳 (Eguchi Masanori) (60613594)	呉工業高等専門学校・電気情報工学分野・准教授 (55401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------