

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：22604

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25420412

研究課題名(和文)パルス電界処理による細胞動態の定量評価および泳動診断システムの確立

研究課題名(英文)Quantitative evaluation of cell dynamics by pulsed electric field treatment and establishment of cell diagnostic system by dielectrophoresis

研究代表者

内田 諭 (Uchida, Satoshi)

首都大学東京・理工学研究科・准教授

研究者番号：90305417

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、パルス電界処理による酵母細胞の電気定数(誘電率および導電率)変化を誘電泳動速度から導出するとともに、マクロなモータ電気信号(細胞群の泳動集積によるインピーダンス変化)と膜活性・生育活性の相関を定量的に検証して、迅速かつ簡便な動態診断システムを構築するものである。

主要な成果として、核酸染色変化から膜損傷度を導出し、加熱とパルス電界印加による閾値の違いを特定した。酵母細胞の泳動速度や電極間のインピーダンスを計測し、等価電気回路モデルを用いた電気定数変化を示した。また、損傷酵母の遺伝子発現を検出し、生物学的変異の判断指標を決定した。さらにパルス条件の違いによる検出応答を精査した。

研究成果の概要(英文)：In the present work, we investigated the changes in permittivity and conductivity of the yeasts imposed by pulsed electric field with dielectrophoretic velocimetry. The relationship between interelectrode impedance due to integrated cells and the activities of membrane and growth was verified quantitatively. We also tried to establish a rapid and simple diagnostic system of cell dynamics.

As a major achievement, we quantified the damage degree of membrane using nucleic acid staining, and identified the difference of threshold against heating and applying of pulsed electric field. The electrical constants were deduced from the equivalent electrical circuit model in the comparison with dielectrophoretic velocity of yeast cells and interelectrode impedance. Further, the gene expression of damaged yeasts was detected and the judgment indicators of biological mutation were decided. In addition, the detection responses were reviewed under various pulse conditions.

研究分野：静電気学、計測・センサ工学、放電物理

キーワード：計測システム 誘電泳動 パルス電界 細胞動態 診断

## 1. 研究開始当初の背景

近年、電気電子技術の進展によって高電界パルスパワーの精密制御が容易になり、電気的な生体操作(バイオエレクトリクス)への応用が積極的に進められている。実用例として、非熱食品処理における電界殺菌や遺伝子導入法としての電気穿孔などが挙げられる。最近では、ナノパルス電界によるがん細胞の自壊(アポトーシス)誘導や血小板に対する凝固作用の促進など、先進的な医療効果も報告されている。

上記に示した細胞動態のメカニズムについては、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法や呈色反応(ホルマザン色素生成)法を用いた遺伝子発現レベルの解明が試みられており、本報告者らも関連課題において、同様な検証を行ってきた。

しかしながら、これらの分析は遺伝子増幅、蛍光染色、ならびに細胞培養といった生化学的手法を基盤としており、実施に当たって高度な専門知識と煩雑な特殊操作を必要とする。また、細胞動態の定量化手法は未だ確立されておらず、現時点において十分な検証データが整備されていない。実際の食品産業や医療現場において、パルス電界処理技術をいっそう普及させるためには、細胞動態を定量的に把握できる迅速診断システムの開発が必須である。

本報告者は、これまでに不均一電界における分極微粒子の動電現象である誘電泳動(dielectrophoresis: DEP)に着目し、微生物捕集および計測への応用に関する研究を行ってきた。特に、標的菌を泳動濃縮して迅速に計数する誘電泳動インピーダンス計測(DEPIM)や細胞の電気定数(誘電率および導電率)を評価する誘電泳動速度計測(DEPVM)によって、加熱や薬品投与による微生物の膜活性および生育活性の変化を定量的に精査しており、新たな診断技法としての見通しを得ている。

以上から、パルス電界処理による細胞動態の定量診断にもこれらの手法が応用できると判断した。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、パルス電界処理による細胞動態の変化を細胞電気定数から定量的に検証するとともに、マイクロ電極間に泳動濃縮された菌体群のインピーダンス値から細胞動態を迅速に把握できる診断システムを確立することである。

## 3. 研究の方法

本研究では、パルス電界処理による細胞動態の変化を細胞電気定数から定量的に検証するとともに、マイクロ電極間に泳動濃縮された菌体群のインピーダンス値から細胞動態を迅速に把握できる診断システムの確立を3カ年で計画した。以下に各到達項目の進め方を示す。

### (1) パルス電界に対する酵母細胞の膜活性および生育活性の生化学的評価

処理対象を酵母細胞とし、パルス電界処理用に作成したマイクロリアクタおよび可変パルス電源を用いて、ミリ秒からナノ秒までのパルス幅に対する高電界印加を行う。ここで、膜透過・非透過の核酸染色剤(Syto 9 および PI)により蛍光染色し、膜損傷率を算定する。また、還元呈色剤(WST-1)を導入して細胞培養を行い、対応する蛍光強度をマイクロプレートリーダーにより計測して、細胞増殖速度を導出する。上記の結果から、パルス幅に対する活性領域(通常、生育促進)、不活性領域(膜損傷、アポトーシス誘導)および共存領域を特定する。

### (2) パルス電界印加時における細胞電気定数の導出

上記領域における4動態(通常、生育促進、膜損傷、アポトーシス誘導)の細胞を選定し、高速度カメラを用いて誘電泳動速度および細胞径を画像計測する。次に細胞-溶媒間の

等価電気回路モデルを用い、誘電緩和の指標であるクラウジウス - モソッティ関数を計算する。泳動周波数に対する応答変化から細胞電気定数（誘電率、導電率）を導出し、細胞動態による相違を定量比較する。

### **（３）インピーダンス応答と膜損傷率・細胞増殖速度との定量相関**

泳動濃縮されたパルス処理酵母群の電極間インピーダンス値をインピーダンスアナライザにより計測する。次に全計測領域における細胞動態の数分布を細胞電気定数の比較から算出する。パルス幅および泳動周波数をパラメータとしたインピーダンス曲面を作成し、各動態検出に対する最適周波数を特定する。

### **（４）診断用検量線の作成およびリアクタの改良**

上記で得られた各相関データを基に４動態のインピーダンス検量線を作成する。また、複数周波数で同時計測が可能な電極配置にリアクタを改良する。同時にパルス印加と泳動計測のユニットを一体化して集積細胞数を増加させ、検出速度および感度の向上を図る。

### **（５）診断システムの性能評価**

電圧振幅、周期、パルス回数などパルス条件の違いによる検出応答を比較し、本診断システムにおける検量線およびリアクタ構造の妥当性を検証する。

本研究の遂行は、研究代表者（内田）及び２名の研究協力者（本学大学院生・高澤晋及び本学非常勤職員・加藤英子）によって行われた。基本的には、内田が細胞動態の定量評価と泳動診断システムの構築、ならびに研究全般の総括を行った。高澤は誘電泳動計測に関連した研究に従事しており、実験補助員として適宜参画することで、より効率的な研究推進を考慮した。加藤は微生物学を専門とする技術員であり、細胞の培養管理や蛍光染色

等の煩雑な生化学操作を支援した。

## **４．研究成果**

平成 25 年度は予備的な研究期間と位置付けて、以下の基礎実験を行った。【課題 1 加熱およびパルス電界印加に対する酵母細胞の膜活性および生育活性の生化学的評価】では、各処理条件において核酸染色による蛍光色度変化から膜損傷度を導出した。また、加熱とパルス電界印加による閾値の違いを特定した。【課題 2 加熱およびパルス電界印加時における細胞電気定数の導出】に関しては、処理条件の異なる酵母細胞の泳動速度を計測し、等価電気回路モデルから電気定数変化を定量的に示した。

以上の結果を踏まえ、平成 26 年度は、簡易診断の基盤としてインピーダンス応答を計測し、細胞動態との定量的な相関を検証した。すなわち、【課題 3 インピーダンス応答と膜損傷率・細胞増殖速度との定量相関】では、等価回路解析との比較からインピーダンス変化量と捕集菌量の定量的関係をより明確にした。また、損傷酵母の遺伝子発現を検出し、生物学的変位の判断指標を補強した。

平成 27 年度は、最終段階である細胞動態に対する迅速かつ簡便な泳動診断システムの構築を試みた。【課題 4 診断用検量線の作成およびリアクタの改良】の具体的な成果として、改良した等価回路解析との比較から、捕集時における泳動速度およびインピーダンス検量線を策定した。また、【課題 5 診断システムの性能評価】においては、電圧振幅、周期、パルス回数などパルス条件の違いによる検出応答を十分に精査し、検量線との関係性を検証した。

## **５．主な発表論文等**

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕(計 4 件)

1. R. Kataoka, H. Tokita, S. Uchida, R. Sano, and H. Nishikawa, "Frequency dependence and assembly characteristics

of Ag nanomaterials trapped by dielectrophoresis," Journal of Physics: Conference Series, Vol. 646, p. 012005 (2015) 査読有

DOI:

<http://dx.doi.org/10.1088/1742-6596/646/1/012005>

2. 渡部 涼, 内田 諭, 西川宏之, 「ソフトリソグラフィによる誘電体ピラーを利用した3次元誘電泳動効果」 電気学会論文誌A(基礎・材料・共通部門誌), Vol. 135, No. 9, pp. 548-552 (2015) 査読有

DOI:

<http://doi.org/10.1541/ieejfms.135.548>

3. 青木玲仁, 白井直機, 内田 諭, 朽久保文嘉, 「誘電泳動デバイスにおける電極構造と捕捉粒子数の数値相関」 電気学会論文誌E(センサ・マイクロマシン部門誌), Vol. 134, No. 7, pp. 235-240 (2014) 査読有

DOI:

<http://doi.org/10.1541/ieejsmas.134.235>

4. 高澤 晋, 白井直機, 内田 諭, 朽久保文嘉, 「誘電泳動速度計測による加温処理酵母の膜変性評価」, 静電気学会誌, Vol. 37, No. 1, pp. 2-8 (2014) 査読有

5. 高瀬亜希, 円城寺隆治, 内田 諭, 「泳動濃縮および画像解析を併用した飲料混入菌の定量計測」, 日本食品工学会誌, Vol. 14, No. 2, pp. 97-106 (2013) 査読有

〔学会発表〕(計21件)

1. 薄葉孝史, 白井直機, 内田 諭, 朽久保文嘉, 「マイクロギャップリアクタにおける酵母生育活性の電界パルス幅依存性」, 平成28年電気学会全国大会, 2016年3月16-18日, 東北大学川内北キャンパス(宮城県仙台市)

2. 佐藤健太, 白井直機, 内田 諭, 朽久保文嘉, 円城寺隆治, 脇坂嘉一, 「3次元誘電泳動デバイス内における粒子軌跡の数値的検証」, 平成28年電気学会全国大会, 2016年3月16-18日, 東北大学川内北キャンパス(宮城県仙台市)

3. 石田高広, 白井直機, 内田 諭, 朽久保文嘉, 「加熱処理酵母における誘電泳動速度

の数値評価」, 平成28年電気学会全国大会, 2016年3月16-18日, 東北大学川内北キャンパス(宮城県仙台市)

4. 久保田浩史, 内田 諭, 朽久保文嘉, 片山浩之, 「誘電泳動による捕集 T4 フェージのインピーダンス計測」, 平成28年電気学会全国大会, 2016年3月16-18日, 東北大学川内北キャンパス(宮城県仙台市)

5. 佐藤健太, 白井直機, 内田 諭, 朽久保文嘉, 円城寺隆治, 脇坂嘉一, 「3次元誘電泳動デバイス内における腫瘍細胞の挙動シミュレーション」, 平成27年静電気学会全国大会, 2015年9月24-25日, 首都大学東京南大沢キャンパス(東京都八王子市)

6. 片岡良介, 内田 諭, 佐野 遼, 西川宏之, 「三次元誘電泳動による金属ナノ粒子アセンブリ - ピット径及びピッチに対する捕集形状の影響 - 」, 第76回応用物理学会秋季講演会, 2015年9月13-16日, 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

7. R. Kataoka, H. Tokita, S. Uchida, R. Sano, and H. Nishikawa, "Frequency dependence and assembly characteristics of Ag nanomaterials trapped by dielectrophoresis," Programme and abstracts of Electrostatics 2015, Southampton, UK (April 12-16, 2015)

8. 香野健太郎, 白井直機, 内田 諭, 朽久保文嘉, 和田圭二, 「マイクロギャップリアクタを用いたパルス電界による酵母の生育活性評価」, 平成27年電気学会全国大会, 2015年3月24-26日, 東京都市大学世田谷キャンパス(東京都世田谷区)

9. 久保田浩史, 白井直機, 内田 諭, 朽久保文嘉, 片山浩之, 「誘電泳動による T4 フ

フェージの効率的捕集に関する定量評価」,平成27年電気学会全国大会,2015年3月24-26日,東京都市大学世田谷キャンパス(東京都世田谷区)

10. 石田高広,白井直機,内田 諭,朽久保文嘉,「誘電泳動速度計測による熱処理酵母の膜損傷診断」,平成27年電気学会全国大会,2015年3月24-26日,東京都市大学世田谷キャンパス(東京都世田谷区)

11. 片岡良介,時田寛也,内田 諭,佐野 遼,西川 宏之,「三次元構造誘電泳動デバイスを用いた金属ナノ材料の立体形成」,第62回応用物理学会春季講演会,2015年3月11-14日,東海大学湘南キャンパス(神奈川県平塚市)

12. 青木玲仁,白井直機,内田 諭,朽久保文嘉,「誘電泳動デバイスにおける捕捉粒子数の構造・制御因依存性値検証」,電気学会センサ・マイクロマシン部門大会第31回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム,2014年10月20-22日,くにびきメッセ(島根県松江市)

13. 片岡良介,内田 諭,白井直機,朽久保文嘉,「ナノ粒子の誘電泳動捕集における構造因子の影響」,第75回応用物理学会秋季学術講演会,2014年9月17-20日,北海道大学札幌キャンパス(北海道札幌市)

14. 時田寛也,内田 諭,佐野 遼,西川宏之,「誘電泳動による金属ナノ材料の立体配置の基礎検討」,第75回応用物理学会秋季学術講演会,2014年9月17-20日,北海道大学札幌キャンパス(北海道札幌市)

15. 内田 諭,久保田浩史,二戸愛仁,圓城寺隆治,「誘電泳動によるT4フェージの効率的捕集に関する検証」,日本食品工学会第

15回年次大会,2014年8月7-9日,つくば国際会議場(茨城県つくば市)

16. 香野健太郎,白井直機,内田 諭,朽久保文嘉,和田圭二,「マイクロギャップリアクタを用いたパルス電界による酵母の代謝変化の推定」,平成26年電気学会全国大会,2014年3月18-20日,愛媛大学城北キャンパス(愛媛県松山市)

17. 青木玲仁,白井直機,内田 諭,朽久保文嘉,「誘電泳動デバイスの捕捉粒子数における構造・制御因子の影響」,平成26年電気学会全国大会,2014年3月18-20日,愛媛大学城北キャンパス(愛媛県松山市)

18. 時田寛也,内田 諭,鮎瀬銀也,西川宏之,「ピラー構造誘電泳動デバイスの菌捕集分布における流量及びピラー高さの影響」,第61回応用物理学会春季講演会,2014年3月17-20日,青山学院大学相模原キャンパス(神奈川県相模原市)

19. 手嶋祐太,内田 諭,白井直機,朽久保文嘉,「誘電泳動デバイスにおける微粒子凝集のシミュレーション - 電極構造に対する捕集特性の評価 - 」,電気学会センサ・マイクロマシン部門大会第30回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム,2013年11月5-7日,仙台国際センター(宮城県仙台市)

20. 高澤 晋,白井直機,内田 諭,朽久保文嘉,「誘電泳動速度計測による加温処理酵母の代謝評価」,平成25年静電気学会全国大会,2013年9月10-11日,千葉大学西千葉キャンパス(千葉県千葉市)

21. 青木玲仁,白井直機,内田 諭,朽久保文嘉,「誘電泳動デバイスにおける電極構造と捕捉粒子数の相関の数値検証」,電気学会

センサマイクロマシン部門平成 25 年総合研究会(バイオ・マイクロシステム研究会),  
2013 年 8 月 8-9 日,東京工科大学蒲田キャンパス(東京都大田区)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

内田 諭(UCHIDA, Satoshi)  
首都大学東京・理工学研究科・准教授  
研究者番号: 90305417