

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 23 日現在

機関番号：77103

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2015

課題番号：25700025

研究課題名(和文)白血球細胞を特徴付ける誘電泳動特性の探索とそれに基づく細胞同定法の開発

研究課題名(英文)Dielectrophoretic characterization and Identification of leukemia cells

## 研究代表者

江口 正徳(EGUCHI, Masanori)

一般財団法人ファジィシステム研究所・研究部・主任研究員

研究者番号：60613594

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,900,000円

研究成果の概要(和文)：白血球細胞の誘電泳動特性測定の高速度化を目指し、ハイスループットで測定可能な新規デバイスの開発を目的とする。開発したデバイスは、周囲にエレクトロローテーションを発生可能な四重極電極を有するマイクロウェルをマトリクス状に配置した構造である。開発したデバイスを用いて、PC-9細胞株をマイクロウェル内に単離し、各ウェル内に格納された細胞のエレクトロローテーションによる自転角速度を測定し、その有効性を示した。

研究成果の概要(英文)：We developed an electrorotation microwell array for high-throughput dielectric characterization of leukemia cells. The device consists of a microwell array and electrorotation chip. The practicality of the device was evaluated using tumor cells. The tumor cells were captured single cells in the microwells and measured electrorotation spectrum, which reflects its dielectric properties.

研究分野：電磁気学，微細加工技術

キーワード：誘電泳動 エレクトロローテーション 細胞計測

1. 研究開始当初の背景

血液細胞などの生体細胞は、固有の誘電特性（誘電率および導電率）を持つ事が知られている。研究代表者はこれまでに、誘電泳動（不均一電界下の溶液中の細胞に誘電特性に基づいた力が生じる現象）による、誘電特性に基づいた血中白血病細胞検出の有効性を示した。しかしながら、血中白血病細胞の誘電泳動特性の測定に多大な時間を要するので、さらなる高速化が必要である。

2. 研究の目的

本研究は、白血病細胞の誘電泳動特性測定の高速度を目指し、誘電泳動に用いる電極の最適化および設計指針の確立と、ハイスループットに測定可能な新規デバイスの開発を目的とする。

3. 研究の方法

誘電泳動特性の測定に用いる電極及びデバイスは、ガラス基板にアルミ電極をフォトリソグラフィによりパターンニングし、試作した。試作した電極上に、厚さ 100 μm のシリコンゴム膜をスペーサーとした角形のチャンバーを配置し、チャンバー内に細胞懸濁液を滴下後、カバーガラスを用いて封入した。なお、誘電泳動用デバイスは血液細胞の付着を防ぐため、ガラス表面をリン脂質 (NPC) ポリマー (Lipidure CM-5206E, NOF Corp.) でコーティングした。また試作した電極には、ファンクションジェネレータ (Model WW2074 型, Tabor Electronics Ltd.) により交流電圧を印加し、細胞の挙動は、デジタルマイクروسコープ (VHX-1000, キーエンス) により観察した。

誘電泳動による細胞の挙動は、誘電泳動用電極によって生じる電界分布により決定される。そこで、本研究では、電磁界シミュレーションソフト (HFSS, ANSYS) を用いて電磁界解析を行い、試作した電極の評価を行った。

4. 研究成果

(1) 誘電泳動力測定用電極形状の検討

研究代表者はこれまでに、斜面重力を利用することで、クリークギャップ電極(図 1)によって細胞に生じる誘電泳動力の測定に成功した。しかしながら、測定に用いる電極形状の設計指針は確立しておりず、経験的に設計するよりほかなかった。そこで、クリークギャップ電極間において曲線形状に生じる電気力線を直線近似することにより、電極形状の設計指針の確立を試みた。試作したクリークギャップ電極を図 1 に示す。クリークギャップ電極の曲線形状は、下記の式で表される。

$$y = \pm \frac{1}{2\sqrt{\frac{a}{2}x^2 + b}} \quad (1)$$

図 2 に試作したクリークギャップ電極の電

極ギャップ(d)と  $\nabla 1/d^2$  の分布を示す。誘電泳動力は、電界強度の 2 乗の傾き ( $\nabla |E|^2$ ) に比例する。ここで、クリークギャップ電極間の電気力線が、直線形状で生じると見なすと、 $\nabla |E|^2$  は  $\nabla 1/d^2$  に比例する。つまり、試作したクリークギャップ電極間において、誘電泳動力は線形に増加する。図 3 に、クリークギャップ電極中心線上において、純水中に分散させたガラス粒子 (直径: 11.5 μm, 比重: 2.55) に生じる誘電泳動力の測定結果及び解析結果を示す。図 3 より、誘電泳動力の測定結果は、電磁界シミュレーションソフトによる解析結果とほぼ一致しており、100 μm < x < 400 μm において、線形の特性を示すことが確認された。

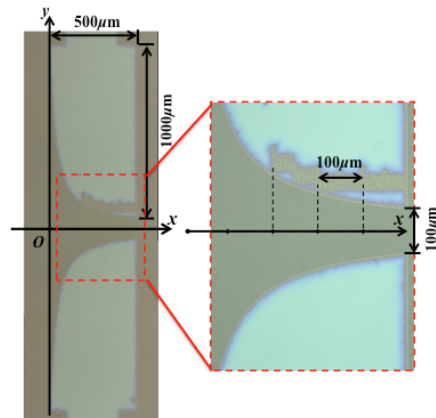


図 1. 試作したクリークギャップ電極の形状

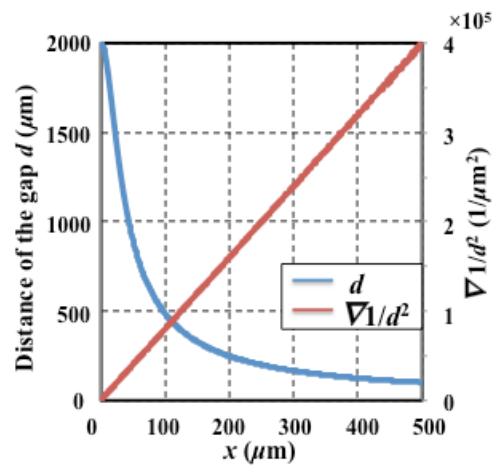


図 2. 電極ギャップ及び  $\nabla 1/d^2$  の分布

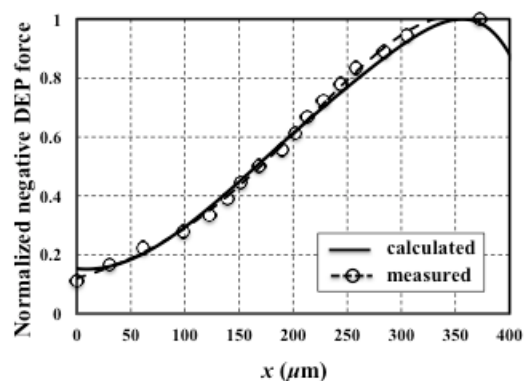


図 3. 試作したクリークギャップ間中心(y=0)で生じる誘電泳動力の分布

(2) エレクトロローテーションマイクロウェルアレイの開発

白血病細胞の判別には、細胞に生じる誘電泳動力の周波数特性を測定する必要があるが、①複数の細胞の誘電泳動力測定に工夫が必要、②誘電泳動力の周波数特性測定に多大な時間を要するといった課題があり、臨床応用にはこれらの課題を克服しなければならない。そこで、本研究では誘電泳動現象の一つであるエレクトロローテーション（回転電界下で、誘電特性に基づいて細胞が自転する現象）に注目し、エレクトロローテーションを発生可能な四重極電極を有するマイクロウェルをマトリクス状に多数配置することで、ハイスループットで誘電泳動特性の測定が可能なデバイスを開発した。開発したデバイスの構造図と顕微鏡写真をそれぞれ図4、5に示す。マイクロウェルの直径及び高さは、格納する細胞の大きさに合わせて設計した。

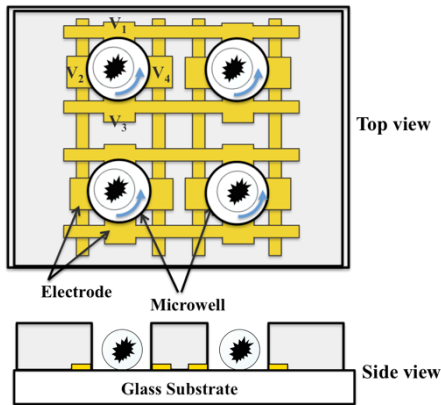


図4. エレクトロローテーションマイクロウェルアレイの構造図

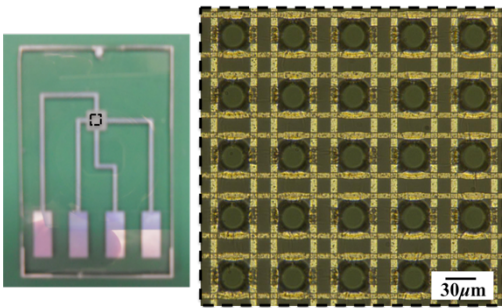
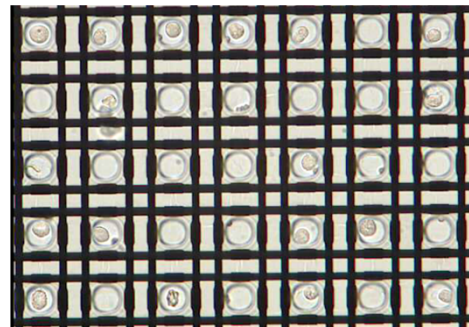


図5. エレクトロローテーションマイクロウェルアレイの顕微鏡写真

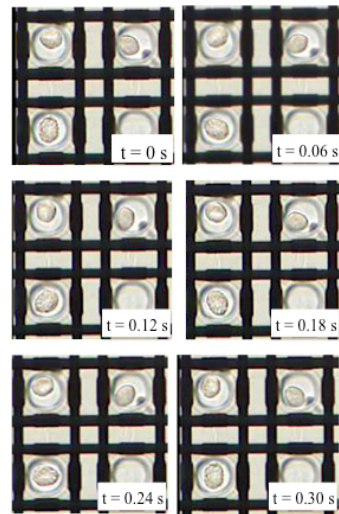
開発したデバイスの有効性を評価するために、がん細胞（PC-9 直径：約 20~25 $\mu\text{m}$ ）を用いて、誘電泳動特性の測定実験を行った。PC-9 は、8.75%のショ糖液にリン酸緩衝液を1%加えた溶液中（導電率:17mS/m）に分散させ、その懸濁液を開発したデバイスに滴下した。開発したデバイスを用いた単一細胞の誘電特性測定の様子を図6に示す。滴下したPC-9を、単離された状態で各マイクロウェル内に格納し（図6(a)）、その後、四重極電極に90度ずつ位相をずらした交流電圧（6 V<sub>pp</sub>, 30 MHz）を印加した。図6(b)よりPC-9がエ

レクトロローテーションによって、マイクロウェル内でほぼ同じ速度で回転していることが確認できた。エレクトロローテーションによって回転するPC-9の回転速度の周波数特性を図7に示す。図7より30 MHzにおいて回転速度は最大となり、高周波もしくは低周波数になるに従い、回転速度は0となるのがわかる。

以上のことから、開発したデバイスは短時間に複数の細胞の誘電泳動特性を測定することができ、ハイスループットで細胞判別が可能であると考えられる。今後は、動画像処理を用いて細胞自転角速度推定の自動化および並列処理を行うことで、さらなる高速化が期待できる。



(a)



(b)

図6. 開発したデバイスによる細胞単離及び細胞回転の様子

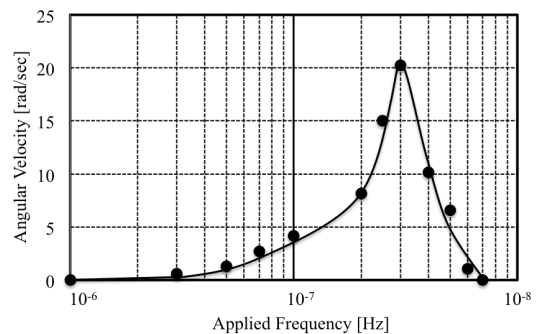


図7. エレクトロローテーションによる細胞回転速度の周波数特性

## 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1件)

- ① Masanori Eguchi, Futoshi Kuroki, Hiroko Imasato, and Takeshi Yamakawa, "Design of Electrode Shape for Measuring Dielectrophoretic Force at High Frequency Bands," Research Activities of Investigative Committee on "Innovative Electromagnetic Technologies and Their Applied Developments" pp. 47-51, 2015. (解説論文)

[学会発表] (計10件)

- ① Masanori Eguchi, Futoshi Kuroki, Hiroko Imasato, and Takeshi Yamakawa, "Development of Microwell Array for Dielectric Characterization of Circulating Tumor Cells," World Automation Congress (WAC) 2016, 2016年7月31日 - 8月4日, Puerto Rico (USA). (発表確定)
- ② 江口 正徳, 今里 浩子, 山川 烈, "誘電特性の違いに基づいた細胞分離に関する研究," 科学とマイクロ・ナノシステム学会第32回研究会, 2015年11月26-27日, 北九州国際会議場(北九州市).
- ③ Kengo Nakajima, Futoshi Kuroki, Masanori Eguchi, and Takeshi Yamakawa, "Consideration on Mounting Structure for MEMS Switch at 60 GHz Band," Thailand-japan MicroWave 2015, 2015年8月5-7日, Bangkok (Thailand).
- ④ Futoshi Kuroki, Kengo Nakajima, Masanori Eguchi, and Takeshi Yamakawa, "Consideration on Grounded Coplanar Waveguide for RF-MEMS Integration," IEEE International Symposium on Antennas and Propagation and North American Radio Science Meeting, 2015年7月19-24日, Vancouver (Canada).
- ⑤ 中島 健吾, 黒木 太司, 江口 正徳, 山川 烈, "60GHz帯MEMSスイッチの実装に関する考察," 電子情報通信学会マイクロ波研究会, 2015年4月16-17日, 機会振興会館(東京都)
- ⑥ Masanori Eguchi, Futoshi Kuroki, Hiroko Imasato, and Takeshi Yamakawa, "Design and Evaluation of Electrode for Dielectrophoretic Characterization of Blood Cells," IEEE Topical Conference on Biomedical Wireless Technologies, Networks & Sensing Systems, 2015年1月25-28日, San Diego (USA).
- ⑦ Futoshi Kuroki, Ayumu Akashi, Masanori Eguchi, and Takeshi Yamakawa, "Numerical and Experimental Approach on Separation of Cells Using Dielectrophoresis for Early Detection of Leukemic Disease at High Frequency Bands," The 44th European

Microwave Conference, 2014年10月6-9日, Rome (Italy).

- ⑧ Masanori Eguchi, "Microwave Technologies for Biomedical Systems," The 3rd Smart City Workshop in Chennai, 2014年9月11-12日, Chennai (India). (招待講演)
- ⑨ Masanori Eguchi, Futoshi Kuroki, Hiroko Imasato, and Takeshi Yamakawa, "Design of Ceiling Electrode for Cell Separation using Positive Dielectrophoresis and Inclined Gravity," World Automation Congress (WAC) 2014, 2014年8月3-7日, Hawaii (USA). (招待講演)
- ⑩ 江口 正徳, 山川 烈, "誘電泳動と進行波電界を用いた血液細胞の分離," 電子情報通信学会マイクロ波研究会, 2013年6月28日, 名古屋工業大学(名古屋市).

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

[http://flsi.cird.or.jp/personal\\_page/eguchi/index.html](http://flsi.cird.or.jp/personal_page/eguchi/index.html)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

江口 正徳 (EGUCHI, Masanori)

一般財団法人ファジィシステム研究所・研究部・主任研究員

研究者番号：60613594