

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：12301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2017

課題番号：26630417

研究課題名(和文) 交流電圧と直流電圧を併用した斬新な細胞分離法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel cell separation method using both AC voltage and DC voltage

研究代表者

箱田 優 (HAKODA, Masaru)

群馬大学・大学院理工学府・准教授

研究者番号：00302456

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、各種スリットを有する絶縁膜型誘電泳動セパレータを用いたDC電圧オフセット/交流電圧による2種類のセルの分離特性を評価した。この装置は、細胞懸濁液が流れる流路に平行平板電極と絶縁性多孔質膜のみを配置した構造を採用することにより、異なるDEP特性を有する細胞を分離した。このデバイスの分離効率は、スリット数、スリット幅、交流周波数、交流電圧、オフセット電圧、膜透過流量の影響を受けることが立証された。

研究成果の概要(英文)：In this study, the separation characteristics of two kinds of cells by DC voltage offset / AC voltage using an insulating film type dielectrophoresis separator with various slits were evaluated. In this device, cells having different DEP characteristics were separated by adopting a structure in which only parallel plate electrodes and insulating porous membranes were arranged in a flow channel through which a cell suspension flows. The separation efficiency of this device was proved to be affected by the number of slits, slit width, AC frequency, AC voltage, offset voltage and membrane permeation flow rate.

研究分野：生物分離工学

キーワード：細胞分離 誘電泳動 電気泳動 直流重畳交流電圧

1. 研究開始当初の背景

(1) 本研究は、FACS、MACS等の高性能な解析装置を用いないと不可能であった異種細胞の解析・分離をローコストで実施可能なプロセスの構築が切望されていた。

(2) 著者らは、誘電泳動現象を用いて、細胞等のバイオ粒子の電気的特性の相違を立証してきた。その相違は、細胞の種類、細胞の大きさ、細胞周期、細胞活性などにより生じることを立証した。その電気的な相違を利用することにより新規で斬新な分離装置の考案に至った。

2. 研究の目的

(1) 本装置は、スリット(細長い切込)のある絶縁膜を挟む位置に平行平板電極を設置し、直流重畳交流電圧(交流電圧をオフセットした電圧)を印加することにより不均一電場を形成させ、細胞に誘電泳動力と電気泳動力の両方を作用させる。電圧・周波数を制御することにより、一方の細胞群Aを誘電泳動力により絶縁膜のスリット部から遠ざけ、もう一方の細胞群Bを電気泳動力により絶縁膜のスリット部を透過させ、分離する方法である。

(2) 本分離装置を用いて二種細胞をそれぞれ90%以上の純度で分離することを目標として、ハードとしては、絶縁膜の厚さ、スリット幅、スリット本数、電極間距離等の影響、ソフトとしては、交流周波数、交流電圧、オフセット電圧、膜透過流量、保持液側及び透過液側の循環流量等の影響を検討する。本研究の目的は、それらの検討項目の結果より、細胞分離装置としての有効性を検証し、製品化への基盤を構築することである。

3. 研究の方法

(1) 電磁界シミュレーションソフトによる電場傾度・電場強度の解析：誘電泳動力は電場傾度に比例し、電気泳動力は電場強度に比例する。一対の平行平板電極間に設置した絶縁膜のスリット付近における電場傾度および電場強度を解析し分離条件について検証する。電場傾度および電場強度の解析における装置形状の影響は、絶縁膜のスリット幅、スリット数、スリット間の距離、絶縁膜厚さ、電極間距離などがパラメータとなる。また、電磁界シミュレーションソフトは COMSOL Multiphysics 4.1 を用いた。

(2) 装置形状及び操作条件の影響：Fig.1 にスリット付き絶縁膜を設置した誘電泳動分離装置の概略図を示す。厚さ 100 μm のポリイミド膜にスリットを開けた絶縁膜を平行平板電極の間に設置し、交流電圧印加条件での細胞の保持率、回収率、生存率を測定した。スリットの幅は、100 μm 、300 μm 、500 μm の3種類、スリット本数は、1、2、3、4本の

4種類とした。更に、スリットの開口面積を同じにするため、スリット幅 500 $\mu\text{m} \times 4$ 本、スリット幅 300 $\mu\text{m} \times 7$ 本、スリット幅 100 $\mu\text{m} \times 21$ 本の3種類を用いた。操作条件は、交流電圧の周波数は 1 kHz~50 MHz、印加電圧 0~90 V_{pp}、オフセット電圧 0~7 V_{DC} で実施した。実験サンプルは、マウスハイブリドーマ 3-2H3 細胞、馬赤血球、粒径 15 μm のポリビーズを用いた。

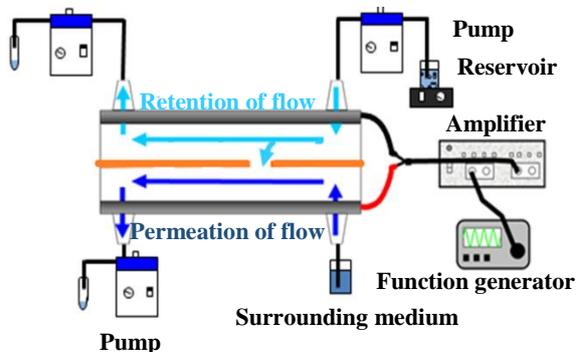


Fig.1 スリット付き絶縁膜を設置した誘電泳動分離装置の概略図

4. 研究成果

スリット付絶縁板型誘電泳動装置における装置内の電場解析、及び直流重畳交流電圧を用いた細胞・粒子及び異種細胞の連続分離における装置形状及び操作条件の検討を行い、以下の知見を得た。

(1) 電磁界シミュレーション

電磁界シミュレーションソフトを用い、電極間距離、絶縁膜厚さ、スリット幅、スリット数を変化させた場合の電場傾度 ∇E^2 ・電場強度 E を解析した。その結果、スリット幅が狭くなるのに伴い、電場強度 E 、電場傾度 ∇E^2 が増大し、スリット数が少ないほど、 E 、 ∇E^2 が増大した。また、 ∇E^2 は E に比べてスリット数の増加による減少割合が大きく、この減少傾向は、スリット幅 100 μm のものより 300 μm の方が顕著であった。

(2) スリット幅の影響

スリット幅 100 μm 、300 μm 、500 μm のそれぞれ1本の場合のポリビーズ、3-2H3 細胞の保持率について Fig. 2 に示した。実験条件は図説明と共に記述した。その結果、スリット幅が小さいほど、ポリビーズと 3-2H3 細胞の保持率は共に増大する結果となったが、それぞれの保持率の差は、300 μm のスリットの時に最大分離効率が得られ、58.3%であった。この結果は、細胞への誘電泳動力とポリビーズへの電気泳動力の作用がスリット幅の相違により異なったためである。

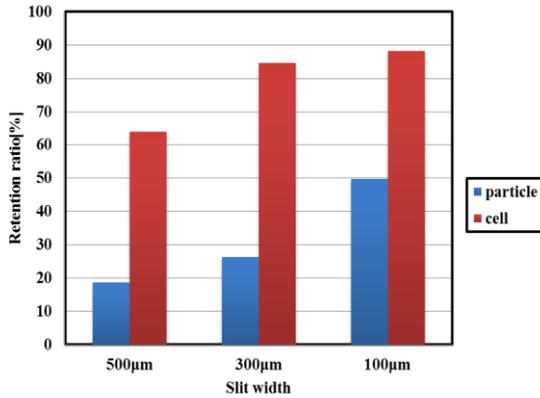


Fig.2 ポリビーズと細胞の分離に及ぼすスリット幅の影響

サンプル:3-2H3細胞, $\Phi 10.0\ \mu\text{m}$ ポリビーズ, 周囲媒質:8.5 wt%スクロース+0.3 wt%グルコース溶液, 16.0 wt%スクロース+0.02 wt% Tween20, 周波数:5 kHz, 交流電圧:90 V_{pp}, オフセット電圧:2.0 V_{DC}, 膜透過流量:0.1 ml/min

(3) スリット本数の影響

ポリビーズの保持率に及ぼすスリット本数の影響を Fig.3 に示す。この実験は、電圧無印加のものであり、膜透過流量の影響を検討した。その結果、スリット本数の増加に伴い保持率が低下する結果となった。この結果より、スリット本数を増やすことにより、除去対象のサンプルが膜透過しやすくなることが明らかとなった。また、スリットの本数に依らずスリット1本当たり0.05ml/minの膜透過流量の条件の方が、0.1 ml/minの場合より保持率が低い結果となった。これは保持液側の送流量が小さいために、サンプルの装置内での滞留時間が長くなり、重力により多くのサンプルがスリット付近まで沈降し、膜透過流量の影響によってスリットを透過したためであると考えられる。

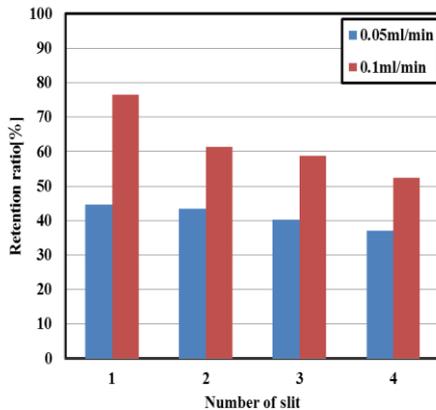


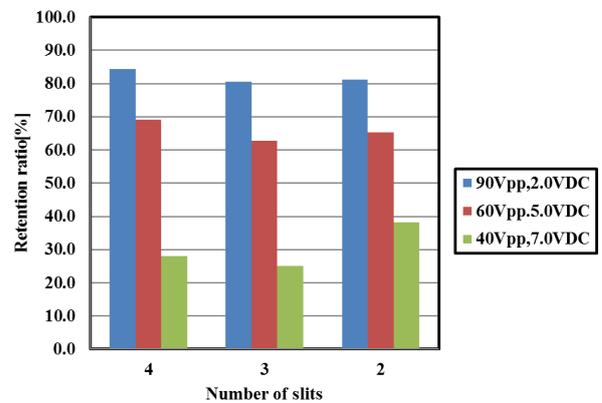
Fig.3 粒子の保持率に及ぼすスリット本数の影響

サンプル: $\Phi 10.0\ \mu\text{m}$ ポリビーズ, 周囲媒質:8.5 wt%スクロース+0.3 wt%グルコース溶液, スリット幅:300 μm , 印加電圧無し

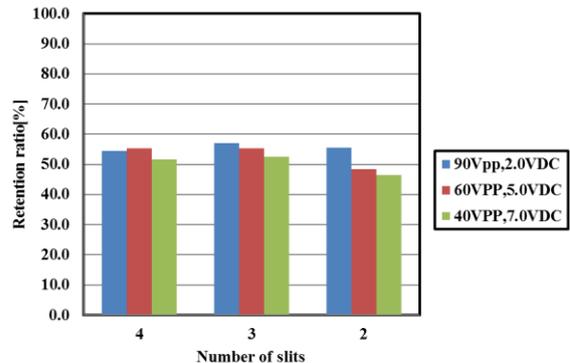
(4) 異種細胞の分離に及ぼすスリット本数, 交流電圧, オフセット電圧の影響

3-2H3細胞と馬赤血球の分離を、スリット幅100 μm , スリット本数2, 3, 4本, 90 V_{pp}-2.0 V_{DC}, 60 V_{pp}-5.0 V_{DC}, 40 V_{pp}-7.0 V_{DC}の電圧条件で分離実験を行った結果を Fig.4 に示す。

3-2H3細胞, 馬赤血球の結果は、それぞれ(a)と(b)に示す。3-2H3細胞の保持率は、スリット本数の影響を受けずに、電圧の影響を顕著に受け、40 V_{pp}-7.0 V_{DC}の電圧条件では30%程度の保持率であった。これは、大き過ぎるオフセット電圧のため、スリットを透過したと考えられる。赤血球の保持率は、スリット本数の影響を受けずに、電圧の影響も小さいが、40 V_{pp}-7.0 V_{DC}の電圧条件では僅かに保持率が低下した。



(a) 3-2H3細胞



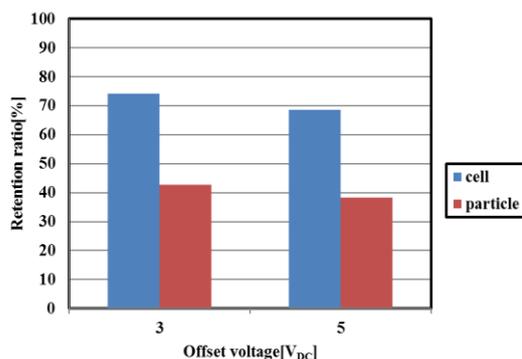
(b)馬赤血球

Fig.4 異種細胞の分離結果に及ぼすスリット本数, 印加電圧, オフセット電圧の影響
スリット幅:100 μm , 周波数:1 kHz, 交流電圧:40~90 V_{pp}, オフセット電圧:2.0~7.0 V_{DC}, 膜透過流量:スリット1本に対し0.1ml/min

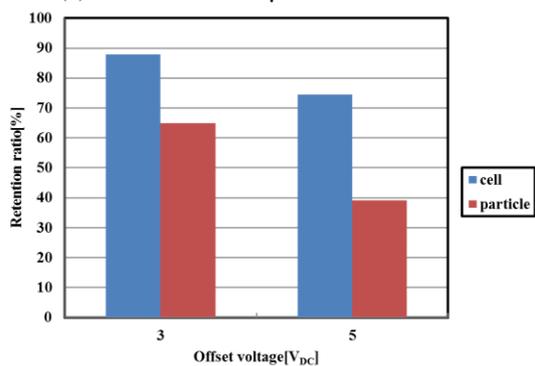
(5)スリット開口面積を同一にした場合の分離に及ぼすスリット幅と本数の影響

スリット数とスリット幅をそれぞれ変化させ、スリット面積を同面積として、スリット幅500 μm ×4本, スリット幅300 μm ×7本, スリット幅100 μm ×20本の3種類について3-2H3細胞とポリビーズの分離実験を検討し

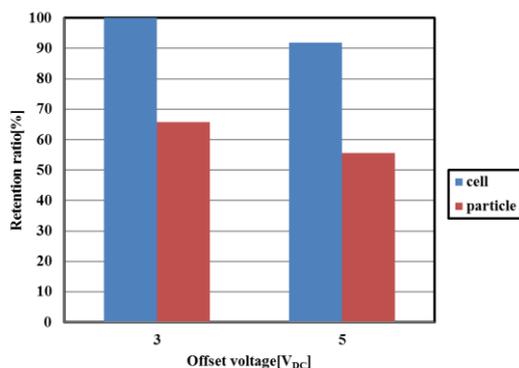
た。オフセット電圧を 3, 5 V_{DC} で行った。Fig.5 (a), (b), (c)は、それぞれスリット幅 500 μm×4 本, スリット幅 300 μm×7 本, スリット幅 100 μm×20 本である。その結果, スリットの開口面積は同じでも, スリット幅が狭い方が細胞とポリビーズの保持率は共に大きくなることが明らかとなった。さらに, オフセット電圧に関しては, 3 V_{DC} よりも 5 V_{DC} の方が保持率は減少した。粒子及び細胞の挙動に及ぼす各々の因子の影響は理論通りであったが, 電場強度 E , 電場傾度 ∇E^2 が増大する操作条件では, 死細胞数が増加する傾向が見られた。



(a)スリット幅 500μm×4 本



(b)スリット幅 300μm×7 本



(c)スリット幅 100μm×21 本

Fig.5 スリット幅と本数を制御して同スリット面積にした場合の分離への影響
サンプル: 3-2H3 細胞, Φ15.0 μm ポリビーズ, 周波数: 1 kHz, 交流電圧: 90 V_{pp}, オフセット電圧: 3.0, 5.0 V_{DC}, 膜透過流量: スリット 1 本に対し 0.1 ml/min

以上の結果より, 最適な分離効率のための装置形状と操作条件の決定は, 分離対象物の電気的特性及び細胞活性へのダメージが異なるため, 分離対象物を考慮したデータベースを構築する必要性が有り, 今後, そのデータベースを構築することにより本装置の有効性が示唆できると確信している。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① 桜庭一樹, 脇坂嘉一, 中島崇仁, 箱田優: “誘電回転法による人工多能性幹細胞の分化評価”, 静電気学会誌, 査読有, 42, 1, 2018, pp.9-14
- ② 桜庭一樹, 古澤尚也, 脇坂嘉一, 箱田優: “誘電回転法による動物細胞の識別と活性評価”, 静電気学会誌, 査読有, 41, 1, 2017, pp.57-62
- ③ 小林研斗, 古澤尚也, 脇坂嘉一, 中島崇仁, 箱田優: “マイクロ流路型誘電泳動分離装置を用いた iPS 細胞とフィーダー細胞の連続分離”, 静電気学会誌, 査読有, 41, 1, 2017, pp.39-44
- ④ Hakoda M.: “Development of Dielectrophoresis Separator with an Insulating Porous Membrane Using DC-Offset AC Electric Fields.”, Biotechnol. Prog., 査読有, 32, 5, 2016, pp.1292-1300

[学会発表] (計 16 件)

- ① 本多 剛之, 桜庭一樹, 中島崇仁, 箱田優: “誘電泳動浮揚法を用いた iPS 細胞の分化評価”, 化学とマイクロナノシステム学会, (2018, つくば)
- ② 関口 諄, 桜庭一樹, 脇坂嘉一, 箱田優: “エレクトロローテーションを用いたヒト癌細胞の同定”, 第20回化学工学会学生発表会, (2018, 東京)
- ③ 桜庭一樹, 脇坂嘉一, 中島崇仁, 箱田優: “誘電泳動現象を用いた iPS 細胞の分化過程評価”, 化学とマイクロナノシステム学会, (2017, 群馬)
- ④ 小林 研斗, 古澤尚也, 脇坂嘉一, 中島崇仁, 箱田優: “マイクロ流路型誘電泳動分離装置を用いた iPS 細胞とフィーダー細胞の連続分離”, 静電気学会, (2016, 群馬)
- ⑤ 小林 研斗, 脇坂嘉一, 中島崇仁, 箱田優: “傾斜櫛歯状電極を有した誘電泳動分離装置による MEF, iPS 細胞の分離”, 化学工学会第47回秋季大会, (2015, 北海道)
- ⑥ 桜庭一樹, 古澤尚也, 脇坂嘉一, 箱田優: “誘電回転法による動物細胞の識別と活性評価”, 静電気学会, (2016, 群馬)
- ⑦ 小林 研斗, 脇坂嘉一, 中島崇仁, 箱田優: “傾斜櫛歯型誘電泳動電極を用いたフィーダー細胞と iPS 細胞の分離”, 化学工学会第81年会, (2016, 大阪)
- ⑧ 古澤尚也, 脇坂嘉一, 中島崇仁, 箱田

優：“誘電泳動浮遊法を用いた分化，未分化iPS細胞の同定”，化学工学会第81年会，(2016, 大阪)

- ⑨ 一場 裕太, 北島 信義, 田島 創, 箱田 優：“直流重畳交流電圧を用いたスリット付絶縁板型誘電泳動装置における連続分離特性”，化学工学会第81年会，(2016, 大阪)
- ⑩ 桜庭 一樹, 古澤 尚也, 脇坂 嘉一, 箱田 優：“誘電回転法を用いた細胞活性評価のための操作条件の検討”，化学工学会第81年会，(2016, 大阪)
- ⑪ 桜庭 一樹, 古澤 尚也, 箱田 優：“誘電回転法を用いた細胞の同定”，第18回化学工学会学生発表会，(2016, 静岡)
- ⑫ 古澤 尚也, 箱田 優：“様々なストレスを付与した動物細胞の増殖活性と誘電特性の相関”，化学工学会群馬大会，(2015, 群馬)
- ⑬ 桜庭 一樹, 脇坂 嘉一, 中島 崇仁, 箱田 優：“誘電回転法による人工多能性幹細胞の分化評価”，静電気学会，(2017, 大阪)
- ⑭ 一場 裕太, 古澤 尚也, 北島 信義, 田島 創, 箱田 優：“直流重畳交流電圧を用いたスリット付絶縁板型誘電泳動装置における分離特性”，化学工学会第47回秋季大会，(2015, 北海道)
- ⑮ 古澤 尚也, 脇坂 嘉一, 中島 崇仁, 箱田 優：“誘電泳動現象を用いた分化，未分化，iPS細胞の電気的特性の解析”，化学工学会第47回秋季大会，(2015, 北海道)
- ⑯ 古澤 尚也, 箱田 優：“誘電泳動現象を用いたフィーダー細胞と iPS 細胞の分離”，化学工学会第 80 年会，(2015, 東京)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

箱田 優 (HAKODA, Masaru)

群馬大学・大学院理工学府・准教授

研究者番号：00302456