

平成21年 5月20日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19760527

研究課題名（和文）積層型誘電泳動電極による液中微小懸濁物の高効率分離装置の開発

研究課題名（英文）Development of high efficiency suspended particle separator consist of stacked type dielectrophoretic electrode

研究代表者

脇坂 嘉一（WAKIZAKA YOSHIKAZU）

大阪大学・産学連携推進本部・特任研究員

研究者番号：60379138

研究成果の概要：

不均一な電界中において生じる誘電泳動を利用した分離は分離対象物の選択性が高い反面、従来電極では分離処理能力が低く迅速に大量分離することが困難である。本研究では分離の場となる誘電泳動電極を多数積層し大量分離が可能となる電極とそれを用いた分離装置の開発を行った。本課題で積層型誘電泳動電極というこれまでにない方式で分離処理量を向上できる可能性を示したが、選択分離性の向上等課題も多い。しかし、従来の手法では分離のできない液中懸濁物に対する分離手法の一つとしての可能性を示した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,200,000	0	1,200,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,900,000	210,000	2,110,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・化工物性・移動操作・単位操作

キーワード：不均一電界、誘電泳動、細胞分離、誘電特性

1. 研究開始当初の背景

近年、誘電泳動（※）によって液中微小懸濁物を選択的に分離する研究が盛んに行われており、細胞の生・死や種類による分離、粒子径による分離、金属性と半導体性単層カーボンナノチューブの分離など、マイクロからナノメートルオーダーのスケールで多岐にわたり行われている。誘電泳動による細胞分離は既存の細胞分離技術と異なり標識等の前処理が必要ないため、新たな分離法として非常に注目されている。また、これまで不

可能であった金属性と半導体性単層カーボンナノチューブの分離は誘電泳動によって初めて成された。誘電泳動による分離は分離対象物の選択性が高いという特徴を持つが、既往の研究で主に用いられているチップ上の薄膜電極では分離処理能力が低く迅速に大量分離することができない。これは誘電泳動力が電極の近傍でしか効果的に働かないことに起因する。そのため誘電泳動は主にマイクロ空間における分離手法として注目されるにとどまっていた。

(※誘電泳動：不均一電界中の粒子に誘起された電気双極子と電界の相互作用によって粒子が泳動する現象。粒子の誘電特性によって泳動力が異なり、強電界あるいは弱電界方向へ泳動する現象である。電気泳動と異なり粒子自体に電荷を必要としない。また、交流電界印加時は粒子の物性と印加周波数によって泳動挙動が変化するため、泳動対象物を選択可能である。)

2. 研究の目的

誘電泳動を用いたマイクロチップ型の分離装置がいくつか製品化されており、そのポテンシャルは実証されつつあるが、分離効率が低いためにその用途は少量かつマイクロサイズの懸濁物の分離に限定されている。これは誘電泳動力が電極の近傍でしか効果的に働かないことに起因する。本研究は、主にマイクロチップ用途で研究され発展した誘電泳動による分離を電極構造の改善によってスケールアップすることを目的とした。具体的には、メッシュ電極を積層した三次元的な電極を用いることで分離の場となる電極の比表面積を増大させた積層型誘電泳動電極を用い、これをカラム状にした積層型誘電泳動フィルターの電極条件と操作条件に関して理論的に検討、設計・試作、試作機による大量分離可能性について検証を行うことを目的とする。本研究で提案する積層型誘電泳動フィルターは、これまで困難あるいは不可能であった液中懸濁物の大量分離を可能とするものであり、実用化されれば工学的意義は大きい。

3. 研究の方法

(1) 基本概念

基本的な方針として、本研究では実際に簡単に製造できることも考慮に入れ、図1に示すメッシュを積層した積層型誘電泳動電極を設計・試作した。

金属メッシュ電極を多数積層させた電極を使用することで電極の比表面積を増大させるとともに、メッシュという入り組んだ構造を利用することで装置内を滞留する間にナノスケールの物質も補足できると考えた。また、誘電泳動力は電極間距離の増大と共に大きく低下するため、金属メッシュ同士の距離（電極間距離）を極力狭める必要がある。金属メッシュ間にナイロン製の微細なメッシュを挿入することで電極間距離を狭めてもショートを起こさず、簡単に大型の装置を作製できるという工夫がなされている。

図2に示すように、針電極のような電界が集中し強電界側となる方向に泳動する場合を正の誘電泳動、逆に弱電界側に泳動する場合を負の誘電泳動と呼ぶ。誘電泳動力は粒子（つまり分離の対象物）や懸濁溶媒の誘電特性、

印加する電界の周波数によって正の誘電泳動や負の誘電泳動、あるいは泳動しない場合がある。積層型誘電泳動電極の場合は、電極表面が強電界側、電極から遠ざかった部分が弱電界側となる。分離の概念は、図1のように特定の分離対象物（粒子A）を正の誘電泳動により電極表面にトラップし、対象外である粒子（粒子B）は附着しないような条件設定を行う必要がある。

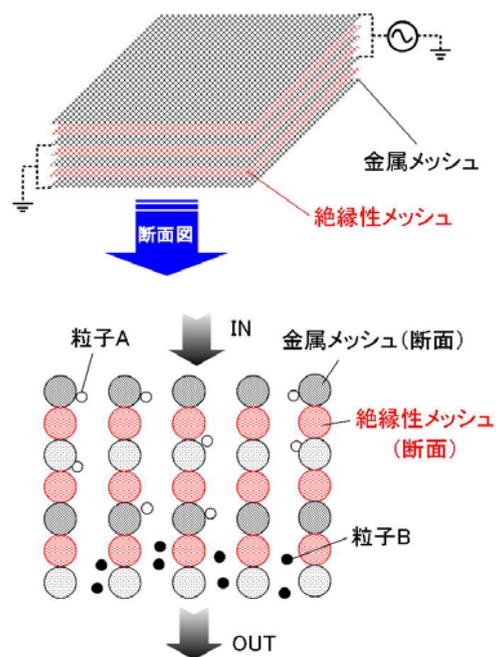


図1 積層型誘電泳動電極による分離の概念

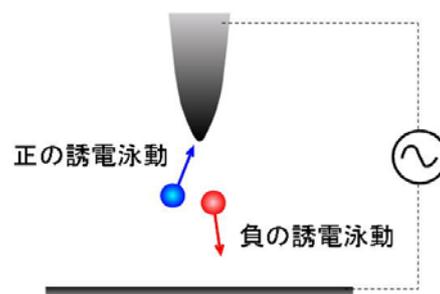


図2 不均一電界中で生じる誘電泳動

(2) 電極の理論設計

誘電泳動力は電界強度に依存するため、まず積層型誘電泳動電極の最適設計を行うため、有限要素法を用いた電界の理論解析から最適な電極の条件の算出を行った。

(3) 試験対象物の誘電特性評価

積層型誘電泳動フィルターの性能試験のため、酵母菌を用いることにしたが、まず酵母菌の誘電泳動特性を調べた。酵母菌の生菌と死菌がどの周波数帯で分離できるか、つまり誘電泳動力に差異があるのかを調べた。

酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の培養は、YPD 培地を用い、培養温度 30°C、振とう速度 150rpm の条件で 24 時間培養した。培養した酵母を蒸留水に懸濁させ、これを生菌懸濁液とした。また、生菌懸濁液をオートクレーブにより 121°C、15min で殺菌したものを死菌胞懸濁液とし、実験に用いた。

(4) 積層型誘電泳動フィルターの設計試作

電極の理論設計で得られた知見を元に、積層型誘電泳動フィルターの設計と試作を行った。

(5) 試作装置の分離特性評価

試作した積層型誘電泳動フィルターの性能試験のため、酵母菌の生菌と死菌の混合物を用い、分離性能や分離条件等の分離特性評価を行った。

4. 研究成果

(1) 電極の理論設計

図 1 に示したような形状の電極を想定し、有限要素法による電界解析を行った。簡単化のためメッシュ電極断面について 2 次元電界解析を行った。誘電泳動力は下記の式で表すことができる。

$$F_{DEP} = 2\pi r^3 \epsilon_M \operatorname{Re}[K(\omega)] \cdot \nabla E^2$$

ここで r は粒子の半径、 ϵ_M は周囲媒質の誘電率、 E は電場強度を示す。 $\operatorname{Re}[K(\omega)]$ は、以下の式で表される Clausius-Mossotti 因子の実数部分を示す。

$$K(\omega) = \frac{\epsilon_p^* - \epsilon_M^*}{\epsilon_p^* + 2\epsilon_M^*}$$

ここで、 ϵ_p^* と ϵ_M^* はそれぞれ粒子と周囲媒質の複素誘電率を示す。

誘電泳動力は ∇E^2 に依存するため、 ∇E^2 の大きさを理論解析した。電極となる金属メッシュおよび短絡防止用絶縁性メッシュの断面線径をそれぞれ $50 \mu\text{m}$ とした場合における ∇E^2 の分布を図 3 に示す。計算条件は印加電圧 1V、総メッシュ数約 36000 である。

図 3 から誘電泳動力が一番弱いのは電極や絶縁メッシュ間隙部分であり、分離対象物を流した場合を想定すると、液が流れる部分、つまりメッシュを構成するワイヤーとワイヤーの中間部分（図中破線部中央）において誘電泳動力が弱くなるのがわかる。よって

この部分の誘電泳動力が液流による剪断応力に耐えられなくなると捕集されずに粒子は流出すると考えられる。よって、この部分の ∇E^2 を大きくするような電極設計が必要である。

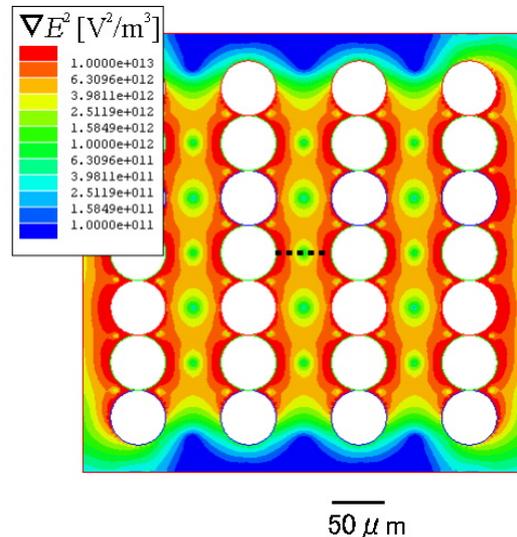


図 3 積層型電極断面における ∇E^2 の分布

図 4 に金属メッシュおよび絶縁性メッシュの断面線径をそれぞれ $50 \mu\text{m}$ 、 $100 \mu\text{m}$ 、 $200 \mu\text{m}$ とした場合について、図 3 破線部に当たる部分の ∇E^2 の分布を解析した結果を図 4 に示す。

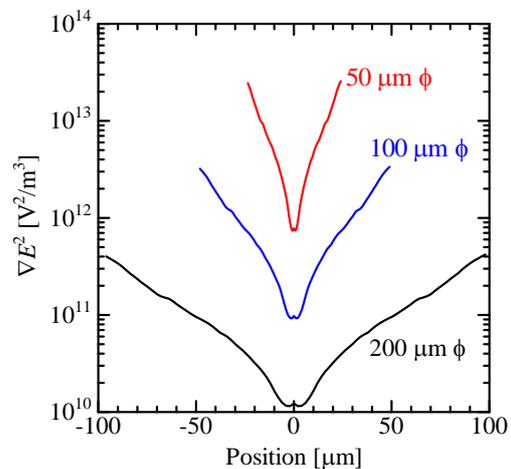


図 4 電極間隙における ∇E^2 の分布

図のように、メッシュ線径の値にかかわらず、電極間隙中央部分の ∇E^2 が小さいことがわかる。この部分の値を如何に大きくすることが重要であるが、線径を 1/2 にすると ∇E^2 は 1 桁変わることがわかる。このことから、細い線径のメッシュほど捕集効率が高いと考えられる。

(2) 試験対象物の誘電特性評価

ニッケル線を2本平行に並べた電極間における酵母の電極への付着の様子を、印加電界の周波数を変化させて観察した。その結果、生菌については実験を行った100k~10MHzのどの周波数帯域でも電極に付着し、死菌は100kHzをピークに高周波数帯域になるほど付着しなくなることがわかった。図5は酵母生菌と死菌それぞれに、周波数5MHzを5分間印加したときの電極への付着状態を撮影したものである。周波数5MHzでは生菌は電極にトラップされるが、死菌はほとんどトラップされず両者の分離が可能であることがわかる。

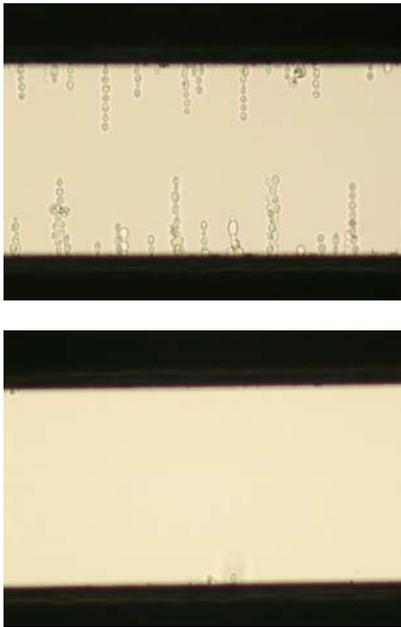


図5 酵母の誘電泳動挙動
(上段：酵母生菌、下段：酵母死菌、
印加交流電界の周波数は共に5MHz)

(3) 積層型誘電泳動フィルターの設計試作

ナイロン製絶縁メッシュ（線径77マイクロン）とSUS316製金属メッシュ（線径38マイクロン）を図6のように切り出したものを用いた。

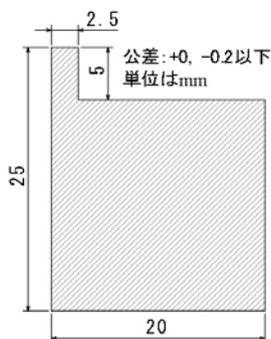


図6 メッシュ形状

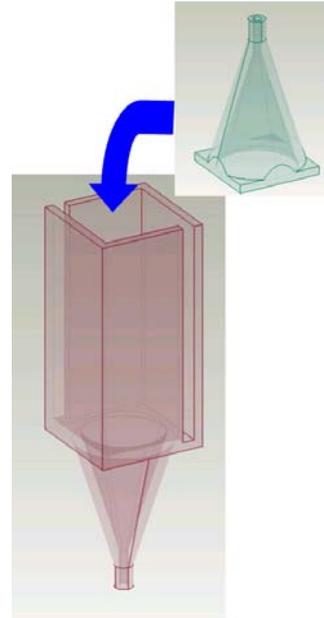


図7 メッシュハウジング

切り出したメッシュを図7に示すハウジング（流路内部サイズ20.2×20.2mm）に金属メッシュ100枚、絶縁性メッシュ99枚を図1のように交互に積層して入れ、流路入り口となるフタを取り付け、すべての金属メッシュを配線後、全体をエポキシ系接着剤にて覆うことで積層型誘電泳動フィルターを作製した（電極段数100）。ハウジングの側面切り込みおよびメッシュの突起は配線接続用である。

(4) 試作装置の分離特性評価

試作した積層型誘電泳動フィルターに周波数5MHz、電圧20Vppの交流電界を印加した状態で、酵母の生・死菌混合懸濁液（混合比1:1、細胞密度 1.5×10^6 cells/ml）を60ml/hの流量で注入したときの分離特性を評価した結果を図8に示す。ただし、流れを乱さないようにするため、酵母懸濁液を注入する前からフィルター中には分散溶媒である蒸留水を満たしている。

左軸は出口での細胞密度、右軸は注入した細胞に対してどの程度の割合を保持したかを示しており、グラフはその分離時間変化を示している。細胞密度は出口の液をサンプリングし、血球計算盤による計数により算出した。

分離初期に排出される細胞数は全体的に非常に少ないが、これは分離はじめに蒸留水を満たしているからであると考えられ、その値は時間経過と共に安定した。正の誘電泳動によりトラップされる生細胞の排出量はトラップされない死細胞よりも少なく、分離が成されていることがわかる。しかしながら、

時間経過と共に生細胞も多く排出された。これは電極表面に保持できなくなった生細胞が押し流されたためであると考えられる。

以上のように分離が可能であることが確かめられたが、現状では分離の進行と共に保持されるはずの生細胞も保持されなくなり、出口において選択分離性が低くなるという問題がある。定期的に逆洗するなどの処置が必要であると考えられる。

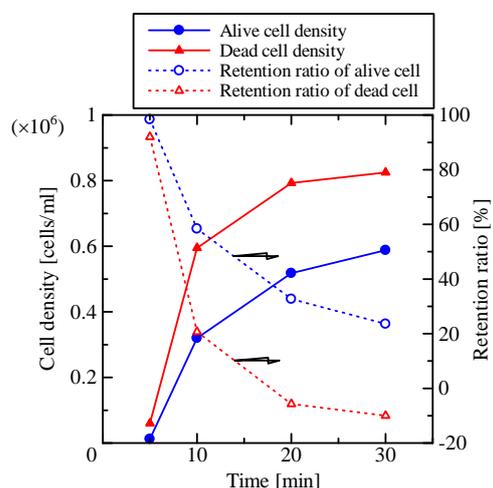


図8 試作機の分離特性

最後に、本課題で積層型誘電泳動電極というこれまでにない方式で分離処理量を向上できる可能性を示したが、目詰まりによる考えられる保持率低下、選択分離性の向上等の課題も多い。しかし、従来の手法では分離のできない液中懸濁物に対する分離手法の一つとしての可能性を示した。

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)

[学会発表] (計2件)

- ① 廣田 祐輔、脇坂 嘉一、箱田 優、桂 進司、エレクトロローテーションによる細胞の誘電特性測定、化学工学会第39回秋季大会、2007.9.14、北海道大学
- ② 吉田 暁、脇坂 嘉一、箱田 優、桂 進司、誘電泳動現象に及ぼす操作因子の影響、化学工学会第39回秋季大会、2007.9.14、北海道大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

脇坂 嘉一 (WAKIZAKA YOSHIKAZU)

大阪大学・産学連携推進本部・特任研究員

研究者番号：60379138