

令和 5 年 6 月 27 日現在

機関番号：57403

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K04416

研究課題名（和文）疑似進行波を用いた誘電泳動の運動解析による細胞等の非接触インピーダンス計測

研究課題名（英文）Non-contact impedance measurement of cells by dielectrophoretic motion analysis using quasi-travelling waves

研究代表者

須田 隆夫（Suda, Takao）

熊本高等専門学校・拠点化プロジェクト系地域協働プロジェクトグループ・嘱託教授

研究者番号：10163031

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：溶液中に浮遊する細胞に交流電界を印加した際、細胞および周囲溶液の誘電率、誘電率から算出されるクラウジウス・モソッティ因子 $K(\)$ に関連した誘電泳動力が発生する。この泳動力から細胞の誘電率、導電率を計測するシステムの実現のため、様々な電界分布の発生を可能にする電気八重極システムの開発を行った。直径100 μm の領域の周囲に8つの平面電極を配置したシステムにより、赤血球やiPS細胞等を任意の点から点へ移動できた。さらに細胞群から目標の細胞のみを測定空間に残す手法を確立できた。またこの電極システムにより疑似進行波の発生が可能であることを確認し、疑似進行波電界における誘電泳動力のモデル構築を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、電極によるインピーダンス測定とは全く異なる、誘電泳動力の解析から細胞の等価な誘電率、導電率を求めようとするものであり、微量の細胞試料を対象とした細胞識別への応用が可能となる。根本的にはこれまで測定が不可能であった、浮遊細胞など媒質中にある粒子の誘電率、導電率を力学的な、しかも非接触である運動の解析により計測する手法の確立であり、様々な分野への応用が期待できる。

研究成果の概要（英文）：When an alternating electric field is applied to cells suspended in solution, dielectrophoretic forces related to the Clausius-Mossotti factor $K(\)$, which is calculated from the conductivity and dielectric constant of the cells and surrounding solution, are generated. To realize a system to measure the dielectric constant and conductivity of cells from this dielectrophoretic force, a novel electric octupole system that can generate various electric field distributions was developed. The system, which consists of eight planar electrodes arranged around a 100- μm -diameter region, enabled the movement of red blood cells, iPS cells, and other cells from arbitrary point to point. Furthermore, a method was established to leave only target cells in the measurement space from a group of cells. It was confirmed that the developed electrodes system can also generate quasi-traveling waves, and a new model of the dielectrophoretic force in the quasi-traveling wave electric field was constructed.

研究分野：電気電子工学

キーワード：誘電泳動 疑似進行波 クラウジウス・モソッティ因子 電気八重極電極

1. 研究開始当初の背景

iPS 細胞を中心とした再生医療の進展や早期癌診断・癌予後診断の確立への社会的要請に伴い、分化細胞群や末梢循環腫瘍細胞などを、1 細胞レベルで単離解析する必要が増大している。現在この目的で用いられるものとして、蛍光標識とシース流、電界ゲーティングによるセルソーターがある。しかし、高性能なセルソーターでも細胞濃度が 10^6 個/ml 以上、総量として 0.5 ml 以上の試料が必要であり、目的細胞が極めて少量である場合は自動解析、分別は困難である。また、このようなセルソーターでは、蛍光分子を標識(ラベル)として細胞へ導入すること、目的細胞回収時に、細胞を約 30 m/s の高流速や数千 V に達する高電圧に曝すことなどが、脆弱な細胞には大きな影響を及ぼす。

極微量の試料から、ラベルフリーで細胞分別を目指すものとして、マイクロ流路におけるインピーダンス計測が注目され¹⁾、実用装置も開発されているが、統計的な手法により細胞種の判別を行っているに過ぎない。細胞が通過する際の電極間のインピーダンス計測による現在の手法では、細胞そのもののインピーダンスに加えて、電極 - 溶液間、溶液 - 細胞膜間など様々なインピーダンス要素を含めた系を計測せざるを得ないため、細胞 1 個のインピーダンスを正確には知ることができないからである。

ラベルフリーで電気的特性を利用した細胞分別の手法として、誘電泳動力²⁾を用いたセルソーターが研究されている。これは不均一電界中にある誘電体粒子に働く力が、粒子および周囲の媒質の誘電率、導電率によって異なることを利用するものである。細胞を均一な誘電率、導電率を持つ球状粒子とした場合、印加電界とその勾配によって働く誘電泳動力は以下で表わされる。

$$F_{DEP} = 4\pi a^3 \varepsilon_s \operatorname{Re}[K(\omega)] E \nabla E \quad (1.1)$$

$$K(\omega) = \frac{\varepsilon_p^* - \varepsilon_s^*}{\varepsilon_p^* + 2\varepsilon_s^*} \quad (1.2)$$

$$\varepsilon_p^* = \varepsilon_p - j \frac{\sigma_p}{\omega} \quad (1.3)$$

$$\varepsilon_s^* = \varepsilon_s - j \frac{\sigma_s}{\omega} \quad (1.4)$$

ここで a は粒子半径、 ε_p^* 、 ε_s^* は誘電体粒子と溶液の複素誘電率であり、 σ_p 、 σ_s 、 ε_p 、 ε_s はそれぞれの誘電率及び導電率である。 ω は電界 E の角周波数である。 $K(\omega)$ はクラウジウス - モソッティ因子 (Clausius-Mossotti factor) と呼ばれ、 $\operatorname{Re}[K(\omega)]$ はその実数部を表す。

一方、電界が空間的・時間的に変化する進行波の場合、誘電体粒子に働く力は以下のように $K(\omega)$ の虚数部に比例する。ここで λ は進行波の波長である。

$$F_{tw} = 4\pi a^3 \varepsilon_s \operatorname{Im}[K(\omega)] \frac{2\pi}{\lambda} E^2 \quad (1.5)$$

これまで提案されているセルソーターの多くは、マイクロ流路と微小電極を組み合わせ、細胞種によって誘電泳動力が異なることを利用して細胞種ごとに流動方向を変化させ、同一種を収集するものである³⁾。その他の誘電泳動をバイオデバイスへ応用した例としては、DNA 操作⁴⁾、細胞の生死判定⁵⁾、細菌計測⁶⁾⁷⁾、電圧可変電気 6 重極による細胞操作⁸⁾などがある。

以上の誘電泳動を応用した研究では、泳動力そのものを計測することはしていない。電界強度とその勾配、および溶液の誘電率、導電率が既知である場合、同一細胞について F_{DEP} 、 F_{tw} の 2 種類の泳動力を知ることができれば、 $K(\omega)$ の実数部と虚数部を算出でき、これらから細胞の誘電率と導電率を算出できる。即ち、通常の電極によるインピーダンス測定とは全く異なる、誘電泳動力の解析から細胞の等価な誘電率、導電率を求めることができる。

2. 研究の目的

本研究は、浮遊細胞など媒質中にある粒子の誘電率、導電率を誘電泳動力による運動の解析から計測する手法の確立を目指す。このためには同一の空間で、電界極小点の発生と疑似進行波の発生が可能な多電極システムの開発がまず必要である。これまでの知見を活かして、電気八重極電極⁹⁾を用いた電界極小点操作と疑似進行波発生を可能にするシステムの開発を行う。同時に簡単化したモデルにより算出できる電界分布と実験との比較検討を行う。電界分布を制御し、電界の極小点を発生させ、この時の細胞の運動を動画記録して解析し、電界・電界勾配と粘性抵抗力を考慮した運動方程式から実際に働く誘電泳動力を求め、これより Clausius-Mossotti ファクター $K(\omega)$ の実部を算出する。同じ、多電極システムに位相をずらした電圧を印可することにより、疑似進行波を発生させる。疑似進行波による誘電泳動力は (1.5) とは若干異なるため、疑似進行波誘電泳動の理論式を導出する。最終的に疑似進行波誘電泳動力の解析から $K(\omega)$ の虚部を算出するし、 $K(\omega)$ の実数部と既知である周囲溶液の誘電率、導電率を用いて、細胞の等価な誘電率、導電率を求める手法を確立する。

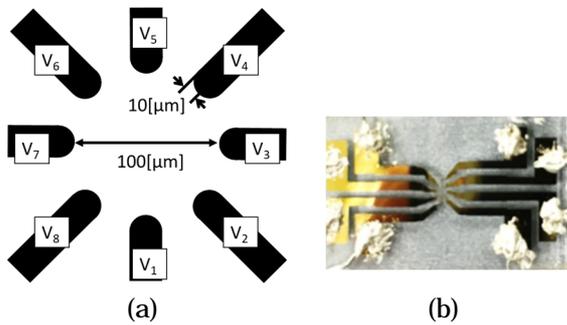


図1 平面電気八重極電極の形状
(a) 先端部分の形状、(b)ガラス基板上に作製された金電極の様子

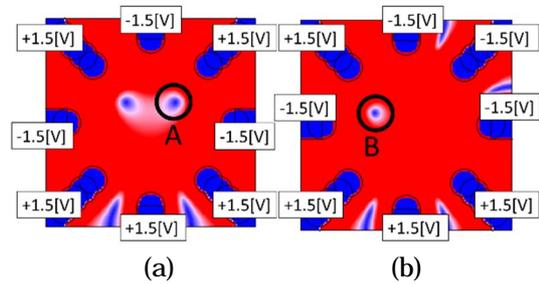


図2 電界の極小点の位置（計算値）
電圧は正弦波のピーク電圧、負は逆相であることを表す。

3. 研究の方法

(1) 電界の極小点移動による誘電体粒子および細胞の泳動速度測定

図1に電気八重極電極の形状を示す。図1(a)に示すように電極先端の曲率半径 $10[\mu\text{m}]$ 、対向電極間距離 $100[\mu\text{m}]$ の八重極電極をガラス基板上に形成した。作製にあたってはクロム、金の真空蒸着及びリフトオフ法を用いた。金電極を形成したガラス基板の上に直径 $3[\text{mm}]$ の穴をあけたPDMS樹脂を試料用の液だめとして貼り合わせ、液だめに投入した溶液中の粒子や細胞の動きを倒立顕微鏡により観測した。細胞等の操作対象の粒子として 粒径 $6[\mu\text{m}]$ 及び $10[\mu\text{m}]$ のポリスチレンビーズ(フナコシ, Polybead Carboxylate Microsphere)、ヒト iPS 細胞(理研 HPS0001 201B7: 無血清・無フィーダ培養 を凍結保存から解凍後使用)を用い、周囲溶液は導電率約 $1.4[\text{S/m}]$ のリン酸バッファおよび、これを 300mOS のグルコース溶液で希釈した導電率 $80[\text{mS/m}]$ のリン酸バッファを用いた。図2(a)に示すA点に粒子を捕捉した状態から(b)の電圧配置として電界の極小点位置をB点にしたとき二点間の移動に要する時間をそれぞれの粒径において計測し、泳動力の比較を行った。なお、各電極に印加した交流電圧は、ポリスチレンビーズにおいては周波数 2.0MHz 一定とし、iPS 細胞においては 50kHz , 100kHz , 2MHz とした。ピーク電圧は $0[\text{V}] \sim 3.0[\text{V}]$ の間で変化させた。

(2) 電気八重極電極による選択的細胞分離

操作対象の細胞として(1)と同様のヒト iPS 細胞を用いた。周囲溶液は導電率約 $1.4[\text{S/m}]$ のリン酸バッファとした。印加電圧の周波数は 2.0MHz とした。まず、図2(a)と同様の電圧配置とし、左右に二つ形成した電界極小点付近に細胞を数個ずつ捕捉する。この状態から V_4 の電圧を変化させて、右側の電界極小点を操作して捕捉されている細胞を操作範囲外へ搬送する。この操作を繰り返すことで、最終的に単一の細胞のみを操作範囲内に残すことを試みた。

(3) 正負の誘電泳動による細胞分離

印加電界の周波数によって、細胞もしくは粒子の $\text{Re}[K(\omega)]$ の符号が変化する。正の場合は電界の強い方向へ、負の場合は電界の極小点へ誘電泳動力が働く。この原理によって粒子や細胞の分離が可能か以下の条件で確認した。血液とポリビーズを導電率 $80[\text{mS/m}]$ のリン酸バッファに懸濁し、印加電界の周波数を 1.0MHz とし、各電極 $V_1 \sim V_8$ に $+3.0[\text{V}]$ 、 $-3.0[\text{V}]$ を交互に印加させる平衡状態とした。導電率 $80[\text{mS/m}]$ のリン酸バッファに血液のみを懸濁して試料とし、電圧配置は $+ - 1.5[\text{V}]$ 交互の平衡状態とした。電圧配置は一定のまま、周波数のみを 30kHz から 1.0MHz に徐々に変化させ、白血球と赤血球が正と負の誘電泳動に分かれる周波数の条件を探索した。

(4) 電圧可変平面八重極電極を用いた疑似進行波誘電泳動

電極に囲まれた領域の電界分布パターンを、各電極先端の半径 $10[\mu\text{m}]$ の円の中心に置いた点電荷 $Q_1 \sim Q_8$ による簡易的なモデルにより求めた。各電荷量と各電極電位の関係から $V_1 \sim V_8$ を求めることができる。 $(Q_8 - Q_7)$, $(Q_1 - Q_6)$, $(Q_2 - Q_5)$, $(Q_3 - Q_4)$ を4対の対向電極として使用し、それぞれの電極に $1/2$ ずつ位相を遅らせた電荷 $\pm q \sin(\omega t - \phi)$ を与え電界分布を求めた。また、疑似進行波による誘電泳動力は(1.5)とは異なるため正確な理論式を導出し、これを用いて $80[\text{mS/m}]$ の溶液中にある好中球を想定して誘電泳動力を算出した。

4. 研究成果

(1) 電界の極小点移動による誘電体粒子および細胞の泳動速度測定

A-B 点間は実測値で $55.9[\mu\text{m}]$ であった。各粒径のビーズにおいて、この二点間の移動に要した時間を計測し、平均の移動速度を計算した結果、 $6[\mu\text{m}]$ で $1.64[\mu\text{m/s}]$ 、 $10[\mu\text{m}]$ で $2.35[\mu\text{m/s}]$ となった。このとき働いた誘電泳動力が、ストークス近似による粘性抵抗力 $F_a = 6\pi a \eta v$ (a : 粒子

半径、 η :粘性係数、 v :粒子の速度)と釣り合っていると、その大きさを算出した。なお η は 20 mPa・s の水の値を用いた。その結果 6[μm]と 10[μm]でそれぞれ、0.093[pN]、0.22[pN]となった。

iPS 細胞については、細胞直径が約 14[μm]の場合、印加電圧 1.5[V]、周波数 2MHz において平均速度 5.87[$\mu\text{m}/\text{s}$]、印加電圧 2.5[V]、周波数 50kHz において平均速度 12.9[$\mu\text{m}/\text{s}$]となった。これらの誘電泳動力を算出すると、それぞれ 0.77[pN]、1.7[pN]となった。

ポリスチレンビーズの場合について、簡易モデルによる電界計算から A-B 点間の E^2 の平均変化率を E^2 として $\text{Re}[K(\omega)]$ を算出すると -0.04 ~ -0.09 となり、実験条件におけるポリスチレンビーズの約 -0.5 よりかなり小さくなった。これにはビーズがガラス基板と接触しているため何らかの抵抗を受けている事、また電界強度計算の精度に問題があることが考えられる。

(2) 電気八重極電極による選択的細胞分離

細胞集団を左右二つの電界極小点付近に捕捉した状態(図 3(a))から、電極 V_4 の電圧を +1.5[V] から徐々に小さくすると極小点が電極の方へ近づいていき、捕捉されていた細胞も移動する(図 3(b))。電圧ゼロ付近で電極上へと移動し、さらに電圧を逆位相にしていくと細胞は隣接電極との間に移動した。この状態から V_4 の電圧をもとの +1.5[V] に戻すと、電極間に捕捉されていた細胞はさらに外側へ向かって移動していった(図 3(c))。操作範囲内に残った細胞に対して同様の操作を繰り返すことで最終的に一細胞のみを取り出すことができた(図 3(d))。

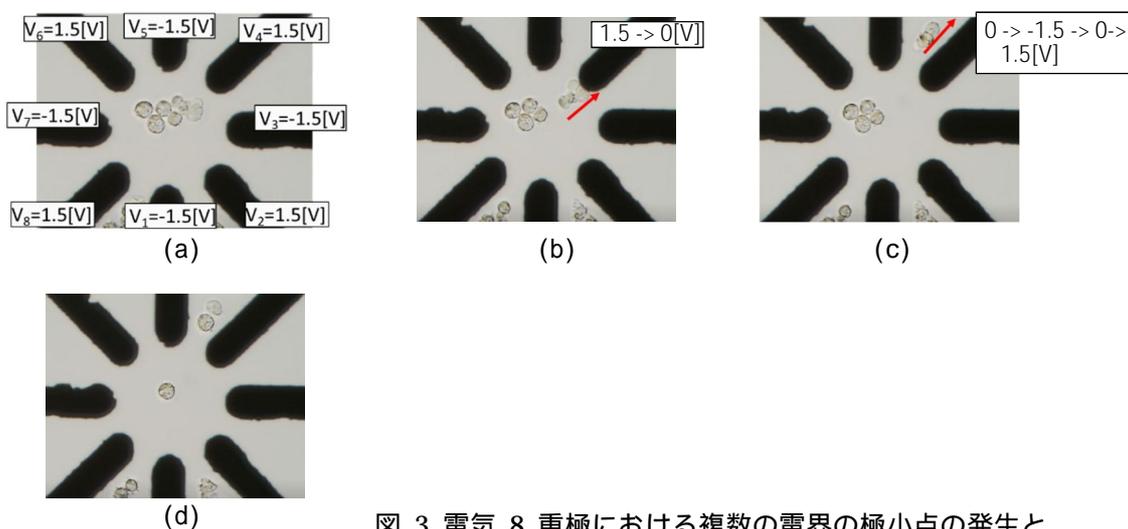


図 3 電気 8 重極における複数の電界の極小点の発生と位置操作による細胞の選択的分離の様子

(3) 正負の誘電泳動による細胞分離

図 4 に赤血球とポリスチレンビーズの混合懸濁液に電圧を印加したときの様子を示す。赤血球は電極先端に吸着し、ポリスチレンビーズは中央部に集まり分離できることが確認できた。このことから周囲溶液の導電率 80[mS/m]、周波数 1MHz においては赤血球に正の、ポリスチレンビーズに負の誘電泳動力が働くことが分かる。

血液のみを導電率 80[mS/m]のリン酸バッファに懸濁した場合については、白血球と赤血球の分離は観測されなかった。周波数 30kHz ではすべての血球が負の誘電泳動力により中央部に集まった。周波数の上昇により正の誘電泳動が発生する血球種が電極側へ移動することを期待したが、印加電界の条件では中央部の電界勾配が小さいためか、分離には至らなかった。

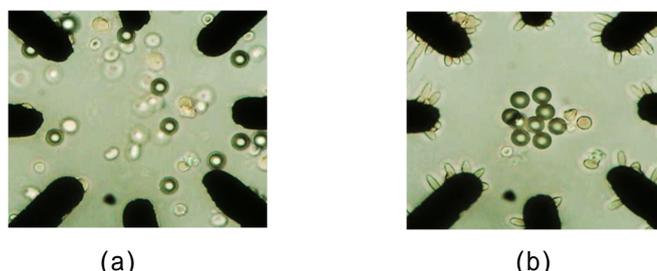


図 4 電気八重極電極における赤血球とポリスチレンビーズの分離

(a)電圧印加なし、(b)各電極に周波数 1MHz +3[V]、-3[V]の電圧を交互に印加した場合

(4) 電圧可変平面八重極電極を用いた疑似進行波誘電泳動

疑似進行波電界の様子を図5に示す。) Q_1-Q_6 ,) Q_2-Q_5 には $q=4.0 \times 10^{-13}$ [C]、) Q_6-Q_7 ,) Q_3-Q_4 には $q=1.0 \times 10^{-13}$ [C] とした。この時の各電極の電位は最大 ± 4.0 [V]である。図5(a)に示した座標のx軸上にある Clausius-Mosotti 因子 $K = -0.4 + j0.3$ の細胞 (80[mS/m]の溶液中にある好中球を想定) に働く x 方向の誘電泳動力を求めたものを図6に示す。八重極の両端では $\text{Re}[K]$ に由来する電界勾配による負の誘電泳動力により、細胞を内部へ向かわせる力が働いていることが分かる。中央部では $\text{Re}[K]$ による泳動力がほぼ0となり、 $\text{Im}[K]$ に由来する進行波誘電泳動力のみが発生していることがわかる。これより K の虚数部が優位となる周波数帯の違いによって特定の細胞のみ動かすことが可能と考えられる。

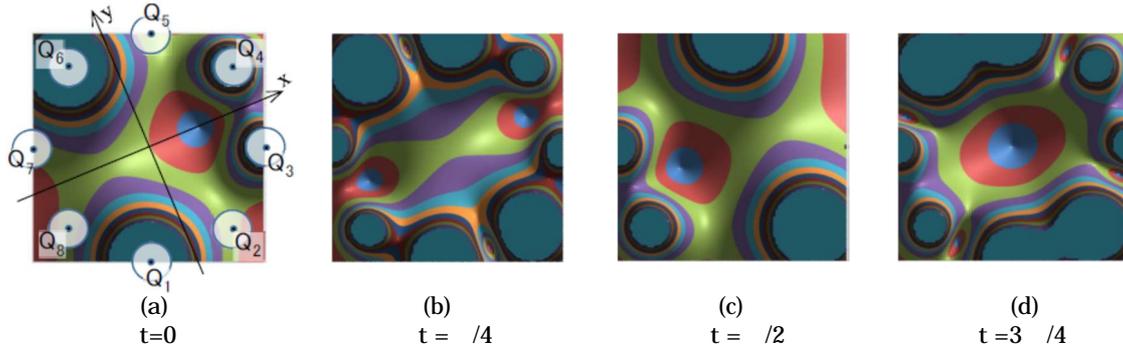


図5 電気八重極電極を4対の対向電極として用いた疑似進行波の電界強度分布の時間変化

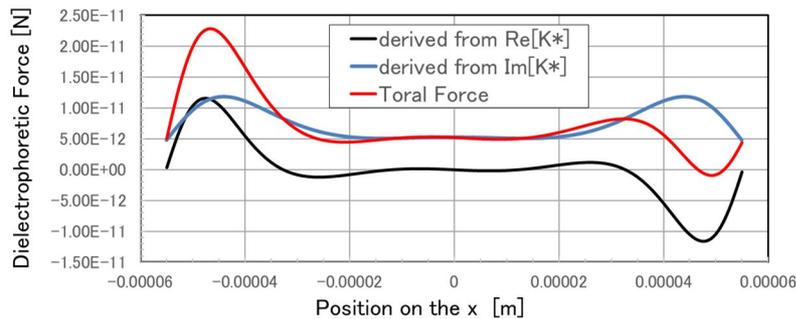


図6 電気八重極電極を4対の対向電極として用いた疑似進行波による誘電泳動力

< 参考文献 >

- 1) S.Emaminejad, M.Javanmard, R.W.Dutton1, R.W.Davis : Lab Chip. 2012 November 7; 12(21): 4499–4507
- 2) T.B.Jones : IEEE ENGINEERING IN MEDICINE AND BIOLOGY MAGAZINE NOVEMBER /DECEMBER 2003,33-42
- 3) S. v. Drieschea, V.Raoa, D. Puchberger-Enengla, W.Witarskib, M. J. Vellekoopa: Sensors and Actuators B 170 (2012) 207– 214
- 4) 鷺津、川端、黒澤、鈴木: 電子情報通信学会論文誌 C, Vol.J83-C, No.1 (2000), pp.1-8
- 5) 鈴木、安川、珠玖、末永: BUNSEKI KGAKU, vol.54, No.12, pp.1189-1195 (2005)
- 6) J. Suehiro, R. Yatsunami, R. Hamada and M. Hara : J. Phys. D, Appl. Phys., 32 (1999) 2814
- 7) 圓城寺、内田、朽久保: 静電気学会誌, 35, 3 (2011)139-144
- 8) 須田、西元、リファン、井上: 第 61 回応用物理学会春季学術講演会 講演予稿集 (2014 春 青山学院大学) 12-457 (講演番号 19a-E15-4)
- 9) 塚本、須田: 第 79 回応用物理学会秋季学術講演会 講演予稿集 (2018 名古屋国際会議場)11-012 (講演番号 18a-221C-1)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 塚本耕助、須田隆夫
2. 発表標題 八重極電極による誘電泳動力差を利用した細胞分離操作
3. 学会等名 第80回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 須田隆夫, 今村成明, 塚本耕助, 岡嶋里歩, 大沼清
2. 発表標題 八重極誘電泳動セルマニピュレータによる細胞分離操作
3. 学会等名 第73回電気・情報関係学会九州支部連合大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ohito Hamachi, Yusuke Nakashima, Masaki Yamaguchi, Nariaki Imamura, Takao Suda, Riho Okajima, Kiyoshi Ohnuma
2. 発表標題 CELL SEPARATION OPERATION BY USING OCTUPOLE DIELECTROPHORETIC CELL MANIPULATOR
3. 学会等名 5th STI-Gigaku 2020 (International Conference on "Science of Technology Innovation") (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 塚本耕助、須田隆夫、岡嶋里歩、大沼清
2. 発表標題 八重極誘電泳動マニピュレータによる選択的細胞分離
3. 学会等名 第67回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 須田隆夫、大沼清
2. 発表標題 誘電泳動セルマニピュレータを目的とした電圧可変平面型八重極電極による電界分布の検討
3. 学会等名 第83回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------