

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 14 日現在

機関番号：77103

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011 ～ 2012

課題番号：23800072

研究課題名（和文）ソフトコンピューティングと誘電泳動による超早期白血病診断法の確立

研究課題名（英文）Development of early detection of leukemia cells by employing soft computing and dielectrophoresis

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・研究員

研究者番号：60613594

研究成果の概要（和文）：白血病細胞検出用デバイスのチャンバー内に存在するすべての血液細胞を搬送・分離可能な Bottle neck Fork-Trace (BF) 電極を開発した。BF 電極は、チャンバー内の血液細胞を進行波電界により、細胞分離エリアであるクリアフィールドへ搬送し、その後誘電泳動により分離をすることができる。開発した BF 電極を用いて、血液細胞の分離実験を行い、その有効性を確認した。また、白血病細胞（HL-60, BALL-1）の誘電泳動特性を測定し、その特性をもとに正常な白血球との分離を行い、誘電特性の違いによる血中の白血病細胞検出の可能性を確認した。

研究成果の概要（英文）：The Bottle neck Fork-Trace (BF) electrode which can transport and separate all blood cells in chamber have been developed for early detection of leukemia. The BF electrode is possible to transport all particles from the entire chamber to the electrode gap by Traveling-wave electric fields at first, and then separate them by dielectrophoresis. Leukocytes in medium were separated from erythrocytes by using the electrode. The dielectrophoretic characteristics of leukemia cells (HL-60, BALL-1) were measured, and the leukemia cells were separated from normal leukocytes by difference in dielectric property.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：電磁気学，微細加工技術

科研費の分科・細目：情報学，感性情報学・ソフトコンピューティング

キーワード：誘電泳動，進行波電界，血液細胞，白血病

## 1. 研究開始当初の背景

急性白血病は、その症状が顕著になると急激に異常な白血球（白血病細胞）が末梢血中に増殖する疾患である。現在、臨床検査で使用されている最新の自動血球計数機は、大型の白血球を白血病細胞と誤認したり、白血病細胞を見落とししたりする危険性がある。

一方、血液細胞などの生体物質は、固有の誘電特性（誘電率・導電率）を持つ事が知ら

れており、この特性の違いを利用して、血液中に存在する白血病細胞の検出することが出来るはずである。

## 2. 研究の目的

急性白血病患者の白血病細胞を、血管内で増殖する前の早い段階（超早期）での検出を目指し、血液細胞の誘電特性（誘電率・導電率）の違いを利用した誘電泳動による効率的

な細胞分離法を開発する。具体的には、進行波電界により、白血病細胞検出デバイスのチャンパー内に存在するすべての血液細胞を分離スペース（クリアフィールド）へ搬送し、その後、誘電泳動によって分離可能な Bottle neck Fork-Trace (BF) 電極を開発する。

### 3. 研究の方法

血液中に存在する白血病細胞を高感度で検出するためには、検出デバイスチャンパー内のすべての血液細胞を捕集後、白血病細胞を分離しなければならない。これを実現するために、本研究では、BF 電極を試作し、血液細胞の分離実験を行う。

### 4. 研究成果

BF 電極は、微細加工技術を用いて、石英基板上に2層配線構造のアルミ電極を試作した（図1参照）。アレイ状の電極幅およびギャップ間隔は  $10\mu\text{m}$  である。BF 電極とは、ボトルネックの形状をした中央のクリアフィールド（電極のない領域）を有するアレイ電極である（図2参照）。BF 電極は、各アレイ電極の配線によって進行波電気浸透と誘電泳動を発生させることができるので、チャンパー内に存在するすべての血液細胞を搬送・分離可能であるという特徴を持つ。

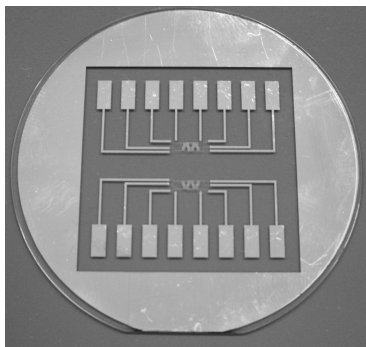


図1. 試作した BF 電極

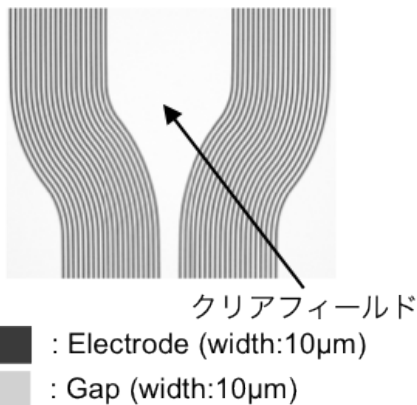
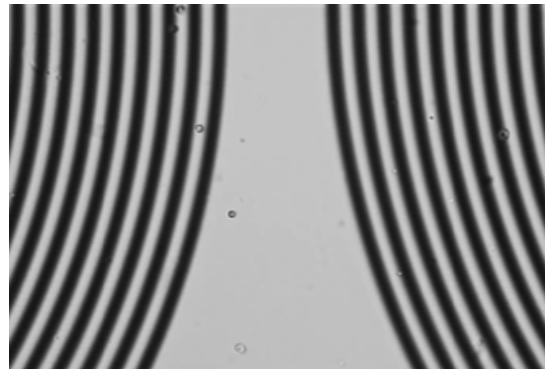


図2. BF 電極の顕微鏡写真

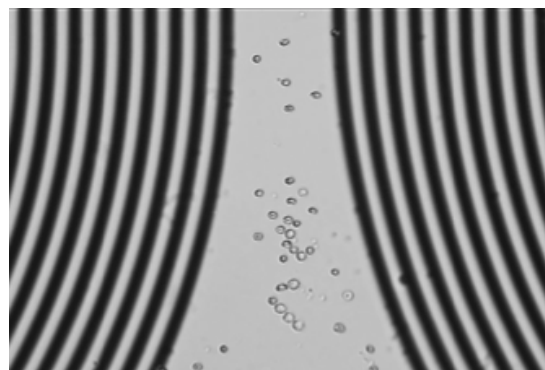
血液細胞（赤血球・白血球）分離実験には、抗凝固剤として EDTA を添加した末梢血から比重遠心法により分離し、これらの細胞を 8.75% ショ糖液にリン酸緩衝液を 1% 加えた溶液（浸透圧  $284\text{mOsm/kg/H}_2\text{O}$ ）で洗浄し、同溶液中に浮遊させた。細胞浮遊液は、BF 電極を有する石英基板上に、厚さ  $50\mu\text{m}$  のシリコンゴム膜をスペーサとした角形のチャンパーに滴下し、カバーガラスを用いて封入した。なお、カバーガラスは血液細胞の付着を防ぐため、ガラス表面を血液適合性ポリマー（Lipidure CM-5206E, NOF Corp., Japan）でコーティングしたものを使用した。

BF 電極を用いた血液細胞の分離実験は、下記の手順で行った。

[手順 1] BF 電極の配線を進行波電界モードにし、チャンパー内のすべての血液細胞（赤血球、白血球）を進行波電気浸透によりクリアフィールドへ搬送した。ここで BF 電極に印加した電圧および周波数（4 相交流）は、それぞれ  $3\text{Vpp}$ 、 $50\text{kHz}$  である。図3に細胞搬送の様子を示す。図3(b)より、進行波電界印加 4.5 分後に、チャンパー内に存在するすべての赤血球および白血球が、クリアフィールドに搬送されたことが観察された。



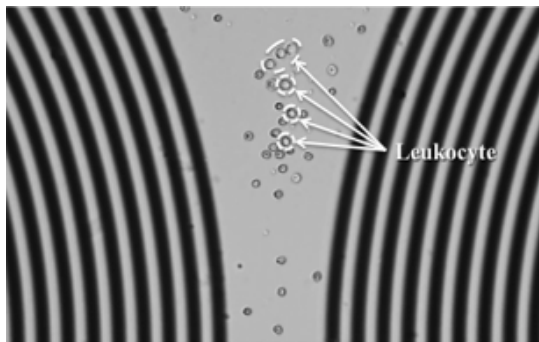
(a) 初期状態



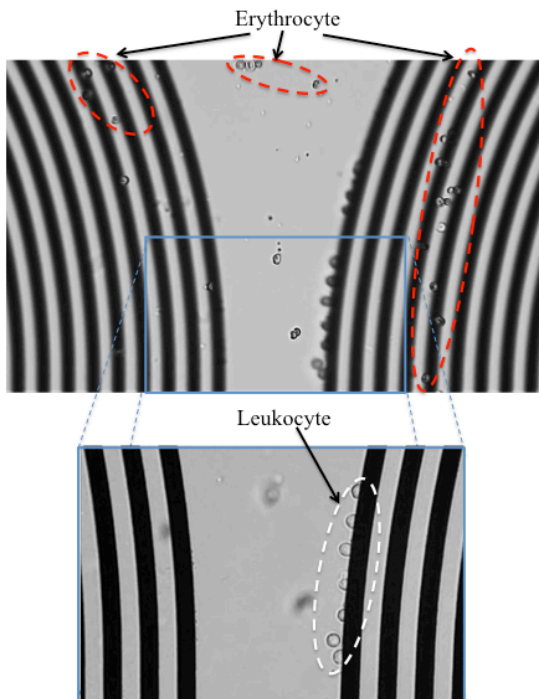
(b) 4.5 分後

図3. 進行波電界による血液細胞搬送の様子

[手順 2] 進行波電界モードによる細胞搬送後、BF 電極を誘電泳動モードに再配線し、誘電泳動による細胞分離を行った。ここで、印加電圧および周波数（単相交流）はそれぞれ 10Vpp, 50MHz とした。図 4 に細胞分離の様子を示す。図 4(b)より、周波数 50MHz において、白血球は正の誘電泳動、赤血球は負の誘電泳動を示している事が分かる。白血球は、電界印加 16 分後に、電界が集中している電極のエッジ部分に付着していることが観察された。以上のことから、チャンバー内に存在するすべての血液細胞を搬送および分離可能な BF 電極を作製し、赤血球と白血球の分離実験により、その有効性を確認した。



(a) 初期状態



(b) 16 分後

図 4. 誘電泳動による血液細胞分離の様子

また、誘電泳動により正常な白血球と白血病細胞 (HL-60: 前骨髄性白血病細胞, BALL-1: B リンパ球性白血病細胞) の分離に成功した。

一方で、白血病細胞の高精度同定を行うためには、昨年度の成果により、高周波数帯域 (50MHz~1GHz) で使用可能な誘電泳動用電極の設計および誘電泳動特性 (誘電泳動力もしくはエレクトロローテーションによる回転数の周波数特性) の高周波測定が必要となったため、高周波用 BF 電極を設計し、その電極の電磁界シミュレーションによる特性評価を行った。シミュレーションにより、設計した高周波用 BF 電極の自己共振周波数は、約 2GHz であるという結果を得た。これにより、高周波用 BF 電極を用いることで、白血病細胞の高周波数帯域における誘電泳動特性測定が可能であると考えられる。

##### 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 2 件)

- ① Masanori Eguchi, Hiroko Imasato, and Takeshi Yamakawa, “Particle Separation by Employing Non-uniform Electric Fields, Traveling-wave Electric Fields and Inclined Gravity,” Intelligent Automation and Soft Computing, Vol.18, No.2, pp.121-137, 2012, 査読有.  
DOI:10.1080/10798587.2008.10643231
- ② Hiroko Imasato, Takeshi Yamakawa, and Masanori Eguchi, “Separation of Leukemia Cells from Blood by Employing Dielectrophoresis,” Intelligent Automation and Soft Computing, Vol.18, No.2, pp.139-152, 2012, 査読有.  
DOI:10.1080/10798587.2008.10643232

[学会発表] (計 4 件)

- ① 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, 発表確定。
- ② 黒木 太司, 明石 歩, 江口 正徳, 山川 烈, “誘電泳動を用いた細胞分離用電極の高周波特性の計算,” 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, 発表確定。
- ③ Masanori Eguchi, Hiroko Imasato, and Takeshi Yamakawa, “Separation of Blood Cells by Employing Dielectrophoresis and Traveling-wave

Electric Fields,” Proc. of World Automation Congress, in CD-ROM, 2012, Puerto Vallarta(メキシコ), 2012年6月25日, 査読有.

- ④ Masanori Eguchi, Hiroko Imasato, and Takeshi Yamakawa, “Separation of Particles by Combining Dielectrophoresis and Traveling-wave Electroosmosis under Inclined Gravity,” Proceedings of the 24<sup>th</sup> Annual Conference of Biomedical Fuzzy Systems Association, pp. 195-200, 2011, 山口, 2011年10月30日, 招待講演.

[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・研究員

研究者番号：60613594

### (2)研究分担者

なし