

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K14072

研究課題名（和文）電気インピーダンス誘電回転トモグラフィによる細胞イメージング技術の開発

研究課題名（英文）Development of Cell Imaging Technique by Electrical Impedance Electro-Rotation Tomography

研究代表者

川嶋 大介（Kawashima, Daisuke）

千葉大学・大学院工学研究院・特任助教

研究者番号：10813785

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、細胞の回転運動の運動方程式と流体運動方程式の連成解析による誘電回転を利用した細胞回転制御における数値解析モデルを構築し、細胞の回転制御とインピーダンス計測を可能とするマイクロ電極アレイセンサ（EleRTセンサ）を開発し、電気インピーダンス・誘電回転トモグラフィ（EleRT）システムを構築した。また、EleRTシステムを利用することで、細胞質や細胞核を反映した単一細胞の高解像度イメージングを実現し、非侵襲リアルタイム・細胞モニタリングの技術基盤を構築することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、誘電回転を利用した細胞回転制御に対する数値解析モデルを構築し、新たな細胞制御技術に関する物理的な知見を提供した。また、本イメージング手法の実現により、非侵襲リアルタイム・細胞モニタリングへの応用が期待され、細胞の内部構造や細胞を構成する細胞膜・小器官の性状を可視化する細胞イメージングにより、疾患や薬物の細胞動態を解析技術として、医療・創薬分野における革新的な技術としての基盤を築いた。

研究成果の概要（英文）：This study has built an electrical impedance electrorotation tomography (EleRT) system. A numerical analysis model for controlling cell rotation has been constructed by coupling the motion equations of cell rotation and fluid dynamics. Also, a microelectrode array sensor (EleRT sensor) capable of controlling cell rotation and measuring impedance has been designed and developed. By utilizing this system, we have successfully achieved high-resolution imaging of single cells, capturing details of the cytoplasm and cell nucleus. This accomplishment represents a significant milestone in establishing the foundation for non-invasive real-time cell monitoring.

研究分野：生体物質輸送

キーワード：電気トモグラフィ 誘電回転 細胞イメージング 逆問題解析

1. 研究開始当初の背景

細胞の内部構造や細胞を構成する細胞膜・小器官の性状を可視化する細胞イメージングは、医療・創薬分野において疾患や薬物の細胞動態を解析するために非常に重要な技術である。しかし、現状、蛍光標識を利用した侵襲的なイメージングが主流であるため、これに代わる非侵襲でリアルタイムの細胞イメージングが求められている。近年、非侵襲な細胞イメージングとして、電気インピーダンス・トモグラフィ(EIT)を応用した手法が着目されており、非侵襲リアルタイム・細胞モニタリングへの応用が期待される。EITは、数十 μm オーダーの微小空間に多電極を配置したセンサを利用して、複数の電極ペア間で計測された電気インピーダンスから、逆問題解析によりセンサ断面内の電気特性分布をイメージングする手法である。しかし、空間的要因による電極数の制約により、高解像度を担保できるほど十分な数の電極を配置することができず、現状、十分な解像度のイメージングができない。そこで、本研究では、回転電場を印加し標的である細胞に誘電回転を加え、各電極と細胞との相対位置を精密に制御、変化させることで、インピーダンス計測を行う電極ペア数を増加させることができる誘電回転制御(ERC)および、このERCとEITを統合した、高解像度な電気インピーダンス・誘電回転トモグラフィ(EIeRT)を提案する。ERCでは細胞と電極間の相対位置を精密に制御するために、誘電回転による細胞に加わるトルク T を経時的に変化させることで高精度な細胞の回転角 θ の制御を実現する必要がある。しかしながら、印加した回転電場により、どのような非定常な流体・電磁気の力場が細胞に与えられているのか、理論的・実験的な検証は行われておらず、どのような力場がどのような θ の経時的変化を引き起こすのかが不明である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、細胞の回転角 θ を制御する誘電回転制御(ERC)とEITを統合した電気インピーダンス・誘電回転トモグラフィ(EIeRT)を開発し、高解像度の細胞イメージングを実現させることである。この開発に必要な要素技術として、回転電場により細胞に与えられる流体・電磁気の力場を解析し、細胞の回転角 θ を高精度に制御する誘電回転制御(ERC)技術の開発を第一の目的とする。また、開発したERC技術を統合したEIeRT計測制御システムを構築し、単一細胞をイメージング可能とする高解像度イメージングを達成することを第二の目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、まず「細胞の回転制御技術の開発」について検討した。8電極を設けた微小センサのうち、直行する4つのERC電極に位相 $\pi/2$ ずつ異なる電位を印加することにより形成される回転電場と、標的細胞と周囲溶液の複素誘電率に起因して生じる電気双極子モーメントによるトルクおよび回転に伴う周囲溶液による粘性抵抗によるトルクを考慮した回転運動の運動方程式を定式化し、流体・電磁気の支配方程式との複合数値解析により、回転ステップ角を求める。

次に、「高解像度細胞イメージングの検証」では、「細胞の回転制御技術の開発」で開発したERC技術とEITを統合し、EIeRTシステムを構築する。そのシステムを利用して、実験用の株化細胞(MRC-5)を標的とした細胞イメージングを実施する。電流印加周波数を1kHzから5MHzまで掃引し、複素インピーダンスを計測し、周波数成分を考慮したEITを実施することで、単一細胞の細胞膜や細胞質などの細胞構成要素をそれぞれイメージングする。

4. 研究成果

本研究では、誘電回転を利用した細胞回転制御を実現するために、細胞に負荷される力として誘電回転力と、細胞回転によって発生する粘性抵抗力を考慮した細胞の回転運動の運動方程式と、流体抵抗を計算するために流体運動方程式を連立して、連成解析を実施した。この数値解析モデルを基に、誘電回転に要する電圧を最適化することで、理想的な細胞の回転ステップ角を導くための電圧制御パラメータ抽出に成功した。さらに、細胞の回転制御とインピーダンス計測を可能とするマイクロ電極アレイセンサ(EIeRT センサ)の開発を実施した。8 電極をガラス基板上に $50 \mu\text{m}$ 直径の同心円状に配置し、リード線は PCB 基板上にボンディングすることで作製した。上記数値解析モデルによる電圧制御パラメータの最適化とこのマイクロ電極アレイセンサを利用することで電気インピーダンス・誘電回転モグラフィ(EIeRT)システムを構築した。

この EIeRT システムを利用して、単一細胞のイメージング実験を実施した。ただし、誘電回転制御は行わず、EIeRT センサとモグラフィ計測システムのみを利用した。Fig.1 は、電極ペア 1-5(対向電極ペア)で計測したインピーダンスのナイキスト線図を示している(ナイキスト半円の右側は低周波数、左側は高周波数)。青色プロットは細胞イメージングの基準として使用したスクロース溶液(細胞なし)のインピーダンス、橙色プロットは細胞含有した状態のイン

ピーダンスをそれぞれ表している。両者のナイキスト半円を比較すると、細胞含有状態のレジスタンス(インピーダンス実部)の方が低周波数域で小さい。逆に、高周波数ではこれらの関係が逆転した。これらインピーダ

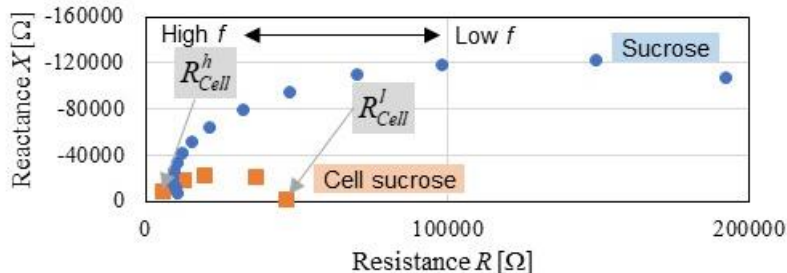


Fig.1 電極ペア 1-5 におけるナイキスト線図

ンスの周波数変化は、細胞膜や細胞質、細胞核の有する導電率・誘電率の周波数特性が、インピーダンスのナイキスト半円に反映されているものと考えられる。

さらに、EIeRT システムで得られた上述の低周波と高周波のレジスタンス(R_{Cell}^l と R_{Cell}^h)をもとに、逆問題解析を実施し、単一細胞の EIT イメージングを実施した(Fig.2)。同図には光学顕微鏡で撮像した画像も表示している。低周波数域において、電流は細胞外および細胞質を通過し、細胞核には核膜に阻まれて通過しない。一方、高周波数域では、電流は細胞

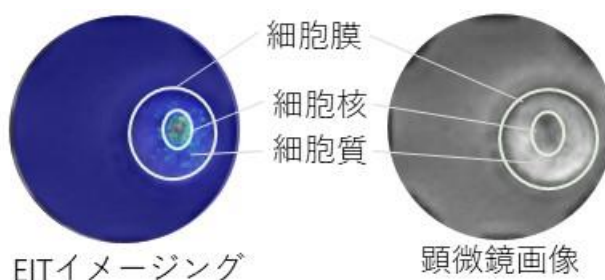


Fig.2 EIT 画像と顕微鏡画像

核内まで達し、細胞核内の DNA や核タンパク質による導電率を反映したと考えられる。EIT 画像(Fig.2 左)を顕微鏡画像(Fig.2 右)と比較すると、EIT 画像での細胞質と細胞核の位置とサイズは顕微鏡画像とよく一致している。以上のように、EIeRT システムを利用することで、細胞質や細胞核をそれぞれ反映したイメージングに成功した。今回の成果では、誘電回転制御を組み合わせるところまでは達成できなかったが、構築した EIeRT システムを利用することで、目的の単細胞可視化ができるほどの高解像度イメージングを実現し、非侵襲リアルタイム・細胞モニタリングの技術基盤を構築することに成功した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Li Songshi, Kawashima Daisuke, Sugawara Michiko, Obara Hiromichi, Okeyo Kennedy Omondi, Takei Masahiro	4. 巻 8
2. 論文標題 Study of transmembrane ion transport under tonicity imbalance using a combination of low frequency-electrical impedance spectroscopy (LF-EIS) and improved ion transport model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomedical Physics & Engineering Express	6. 最初と最後の頁 035024 ~ 035024
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1088/2057-1976/ac5fc5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kawashima Daisuke, Obara Hiromichi, Takei Masahiro	4. 巻 1
2. 論文標題 Multiple Regression Fitting Electrical Impedance Spectro-Tomography for Quantitative Image Reconstruction of Dead Cell Fraction and Cell Concentration	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 IEEE Open Journal of Instrumentation and Measurement	6. 最初と最後の頁 1~8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1109/OJIM.2022.3198476	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kawashima Daisuke, Yuki Tsubasa, Li Songshi, Takei Masahiro	4. 巻 212
2. 論文標題 Non-invasive imaging of ion concentration distribution around cell spheroids by electrical impedance tomographic sensor printed on circuit board under temporal compensation by ion transport impedance model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biosensors and Bioelectronics	6. 最初と最後の頁 114432 ~ 114432
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bios.2022.114432	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Li Songshi, Kawashima Daisuke, Gao Zengfeng, Takei Masahiro	4. 巻 1
2. 論文標題 Detection of Heterogeneous Cells in Cell Spheroids by Applying High-Frequency Second-Order Sensitivity Matrix Electrical Impedance Tomography (HSSM-EIT)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 IEEE Open Journal of Instrumentation and Measurement	6. 最初と最後の頁 1~9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1109/OJIM.2022.3212753	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Daisuke Kawashima, Tsubasa Yuki, Songshi Li, Hiromichi Obara, Masahiro Takei
2. 発表標題 Imaging of ion concentration around cell spheroid by electrical impedance tomography
3. 学会等名 The 11th Asian-Pacific Conference on Biomechanics (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Songshi Li, Daisuke Kawashima, Michiko Sugawara, Hiromichi Obara, Masahiro Takei
2. 発表標題 Cell identification based on ion transmembrane transport under tonicity imbalance by low frequency-electrical impedance
3. 学会等名 The 11th Asian-Pacific Conference on Biomechanics (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川嶋大介, 結城翼, 李淞什, 小原弘道, 武居昌宏
2. 発表標題 電気インピーダンストモグラフィを利用した細胞スフェロイド周囲のイオン拡散の定量分析
3. 学会等名 可視化シンポジウム2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Daisuke Kawashima
2. 発表標題 Application of Electrical Impedance Spectroscopy and Tomography to Cell Measurement and Evaluation
3. 学会等名 The 5th Africa International Biotechnology and Biomedical Conference (AIBBC 2021) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Daisuke Kawashima, Songshi Li, Masahiro Takei
2. 発表標題 Evaluation of transmembrane ion transport via ion channel by low-frequency electrical impedance tomography
3. 学会等名 9th World Congress of Biomechanics 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 李 湫什, 川嶋 大介, 青木 伸之, 武居 昌宏
2. 発表標題 マイクロ電気インピーダンストモグラフィーを利用した単一細胞の可視化
3. 学会等名 日本機械学会 第33回バイオフィロンティア講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 李 湫什, 川嶋 大介, 武居 昌宏
2. 発表標題 二次感度行列を利用した電気インピーダンストモグラフィーによる異種細胞混合スフェロイドの検出
3. 学会等名 日本機械学会第34回バイオエンジニアリング講演会
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
---------	---------