

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：82723

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26420130

研究課題名(和文)三次元不均一電界を用いた高効率・高精度細胞分離技術の開発

研究課題名(英文)High-efficiency and -accuracy cell separation using three-dimensional gradient AC electric field

研究代表者

多田 茂 (TADA, Shigeru)

防衛大学校(総合教育学群、人文社会科学群、応用科学群、電気情報学群及びシステム工・応用科学群・教授)

研究者番号：70251650

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：流路内全域に不均一の交流電場を生成させるため、上面に平板電極、底面に対向式櫛形電極を設置した平行平板型マイクロ流路構造のDEPデバイスを作成し、出芽酵母、ヒト乳腺上皮細胞(MCF10A)の生・死細胞を試料細胞に、懸濁溶液として超純水、300mMのマンニトール溶液を用いて実験を行った。実験を、負荷電圧、交流周波数、試料流量を適切な値に設定して行い、流路内での細胞の流動状態、分離過程について明らかにし、細胞分離の性能を評価した。その結果、数値シミュレーションともよく一致した設計通りの結果を得ることができた。特に細胞分離率に関しては非常に高い分離率を得ることが出来た。

研究成果の概要(英文)：In this study, a dielectrophoretic (DEP) cell-separation flow chamber having a parallel plate geometry was proposed. The flow chamber consisting of an interdigitated pair electrodes array at the bottom and a planar electrode on the top was developed to facilitate the separation of cells by creating a nonuniform AC electric field in the whole volume of the flow chamber. The operation and performance of the device was evaluated using live and dead yeast and Human epithermal breast (MCF10A) cells. The separation dynamics of suspended cells in the flow chamber was also investigated by simulating numerically the trajectories of individual cells under the action of combined DEP and dipole-dipole interparticle forces. Results demonstrated that cells were successfully separated with a remarkably high separation ratio under the appropriately-tuned field frequency. The numerically predicted behavior of the cell separation also showed a good agreement with those observed experimentally.

研究分野：生体流体力学

キーワード：誘電泳動 細胞分離 対向式櫛型電極 数値シミュレーション 交流電場

1. 研究開始当初の背景

近年、多種の細胞を高濃度を含む試料から特定の細胞を分離する方法として、交流不均一電場による誘電泳動(Dielectrophoresis ; 以下、DEP とする)の原理を応用した技術が注目を集めている。DEP とは、不均一電場に晒された懸濁液中の誘電体微粒子が電気力学的作用(DEP 力)により電場のこう配に沿って移動する現象である。

この原理を応用すると細胞を誘電泳動特性の違いにより素早く正確に分離出来るため、効率性の高い臨床検査技術の確立が期待出来る。その反面、細胞の損傷を避けるため、負荷電圧の強度には制約がある(~10V)。このため、DEP 力の作用範囲は電極面から数十μm 程度に留まり(Iliescu, C. et al., U.P.B.Sci.Bull. 2010)、電極を流路底面に設置した標準タイプの流路型 DEP デバイスでは流路高さをあまり高く出来ない(~100μm)という難点がある。また、流路内電極自体も、細胞には致命的な Joule 発熱(Kale,A. et al., Electrophoresis 2013)の効果を抑えるため、低い流路高さとの兼ね合いで面積を広く取ることが困難である。現在の DEP 技術ではデバイスの大型化が容易ではなく、多量の細胞試料の分離技術への適用に対し課題が残る。

一方、現在急務とされるのが、多量の細胞試料の中にわずかに含まれる特定の細胞を短時間で正確に分離する技術の確立である(Gascoyne,P. et al., Electrophoresis 2009)。この技術は正常細胞と異常細胞の迅速なスクリーニングが必要とされるがんの臨床検査では特に重要で、白血病の検査がその具体例として挙げられる。白血病の病状進行は極めて早い。そのため、血中から癌化白血球を早期に発見する必要があるが、疾病初期段階での癌化白血球が血中に占める割合は極めて低いため(<0.01%)、現在の技術では検査の前処理に多大な時間と手間を要する。ところが、DEP を応用した細胞分離が多量の細胞試料に対しても可能になれば状況は一変する。

元々の DEP による異常細胞の検出精度が、白血病の例を挙げれば、脊椎穿刺による病理検査と同等かそれ以上であること(Imasato,H. et al., Intel.Autom. Soft.Co. 2012)に加え、検査時間・手間の大幅な低減が期待出来、患者には通常の採血以上の苦痛を与えずに済む。まさに時代の要請に応えた画期的な臨床検査技術の確立が期待出来る。

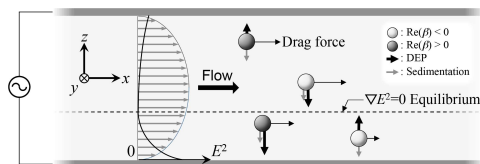


図1 細胞分離デバイスの概念図

2. 研究の目的

前述の当該分野での背景に鑑み、多量の細胞試料から特定の細胞を分離する効果的な

方法として、過去に研究代表者が提案した流路内全域に広がる3次元の不均一電場を生成する手法を応用し、細胞分離の処理能力を従来技術に比べ、最大で100倍程度に飛躍させる技術を提案する。図1に提案するDEPデバイスの概念図を示す。

3. 研究の方法

本研究課題で提案する流路内に3次的に不均一電場を生成するDEPデバイス(以下、提案デバイスとする)のプロトタイプとして、ITO(Indium Tin Oxide)電極を用いたDEPデバイスを製作し、その基本特性を明らかにした後、高速・高精度の細胞分離に必要な性能の最適条件を見出す。

流路高さが従来に比して数倍~十倍程度の、流路高さ1~2mmのDEPデバイスを製作し、その中に正・負それぞれの誘電泳動特性を有する細胞を一定割合で含む細胞試料を流し、交流電圧を負荷して細胞分離の実験を行う。実験は電場強度・周波数、流路寸法、流速などの現象の支配因子と細胞の分離速度・精度との相関を調べるため、これら支配因子の値をパラメトリックに変えて行う。

分離された負の誘電特性を有する細胞(異常細胞、死細胞)は分離・抽出率を測定する。また、実験系を模擬した数値シミュレーションを行い、電極配置、流路断面アスペクト比や流速の最適条件の決定と、提案デバイスをカスケード状に連結した装置(多段式分離)などのパフォーマンスの予測を行い、将来の実用を目指す。

(1) 出芽酵母細胞を用いた実験と数値解析

細胞の代替試料として、誘電特性や大きさが血球細胞とよく似ており、扱いが容易な出芽酵母(Saccharomyces cerevisiae)の生・死細胞を用いた。生細胞は正常血球細胞を、死細胞は腫瘍血球細胞をそれぞれ模擬している。酵母細胞の培養培地にはYPD培地(Sigma D6546)にAdenine hemisulfate(Sigma A9126)を添加したものをを用いた。

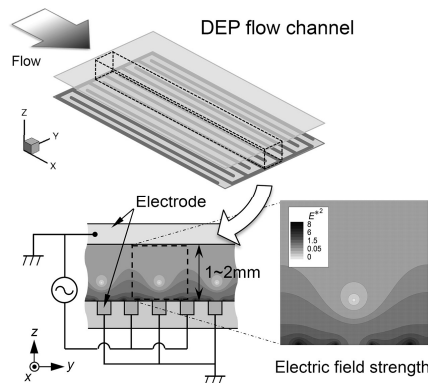


図2 提案デバイス構造の概略図(上) 楕型ITO電極を底面に配置した流路。(左下) 流路断面と電場分布の模式図。(右下)流路内に生成される3次元不均一電場の強度(E^2)分布の拡大図(値は無次元量)。

酵母細胞の培養は培養三角フラスコにて周囲温度 30°Cの大気中で振とう培養を約 30 時間行った。実験用の試料としては培養した細胞を超純水、もしくはショ糖等張溶液(9.8% (w/v) sucrose, 0.37% (w/v) dextrose)で 4 回洗浄後、これらに懸濁させ、最終濃度を約 4×10^6 cells/ml とした。死細胞については培養した酵母細胞を 80°Cに 15 分間晒し、さらに 0.2%(w/v) Methylene Blue 溶液(Sigma M4159)で 15 分間染色したものを予め用意した。

実験装置を図 3 に示す。装置は顕微鏡観察用のテストセクション部、高周波電源である波形発生装置(Tektronix AFG3101)と試料供給用のシリンジポンプ(KD Scientific KDS-100)により構成される。テストセクション部は流路底面に対向型楕円電極パターンを有する厚さ 0.7mm の ITO 透明電極板(ジオマテック株式会社)を設置し、上面には平坦な厚さ 0.7mm の ITO 透明電極板を用いた。電極間ギャップは厚さ 1.0mm のシリコンゴム製のスペーサーを挟むことで一定に保っている。実験は顕微鏡ステージにテストセクション本体をセットした後、高周波電源の端子電圧を一定値 $V_{pp}=3.0$ V に、off set 値を 1.5 V に保った状態で交流周波数を 1.0, 2.0, 10MHz の 3 通りに変化させた。実験は生・死細胞を 4:1 で混合した試料をシリンジポンプで流量 11.5ml/h (流速 0.32 mm/s)で流しながら生・死細胞の挙動を CCD カメラを設置した透過型正立顕微鏡を用いて明視野観察を行い、デジタルカメラ(Olympus PEN Lite E-PL6)を利用して動画撮影した。

数値シミュレーションについては、まず酵母細胞を質量 m 、直径 d 、密度 ρ_c の一様な誘電体球と仮定する。細胞 i に誘起される双極子が細胞 j の双極子により生じる電場から力を受けるとき、細胞 i の運動は位置ベクトルを r_i として運動方程式

$$m \frac{dr_i}{dt} = F_i - S_i + \frac{4}{3} \pi (\rho_c - \rho_f) \left(\frac{d}{2} \right)^3 g \quad (1)$$

により記述される。ただし ρ_f は溶液の密度、 F_i 、 S_i は細胞 i に作用する電気力と粘性力であり、 g は重力加速度ベクトルである。すなわち、デバイス内の酵母細胞には図 4 に示す DEP 力と双極子相互作用に加え、Stokes 粘性力 (Drag force) と重力が働く。これらの力のバランスを適切に制御することで、図 2 の電場強度のスポットに効率よく標的細胞を集

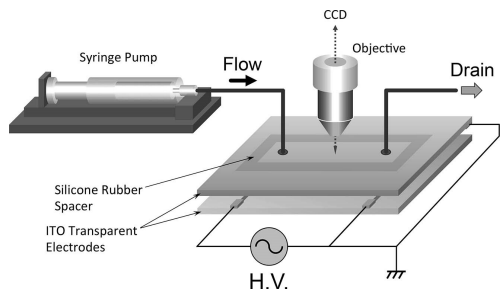


図 3 実験装置概略図

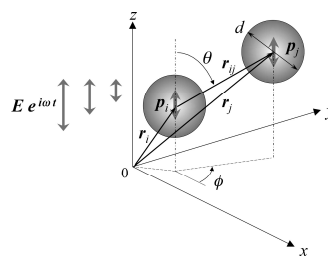


図 4 数値シミュレーションモデル

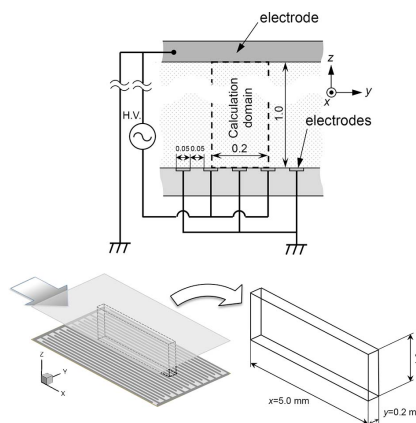


図 5 数値シミュレーションの条件

められる。そのため力のバランスの主要な決定因子である電場周波数を変化させた数値シミュレーションを行った。

計算領域は図 5 に示すように流路の一部を対象とし、1.0 (高さ) \times 0.2 (幅) \times 5.0 (長さ) mm の直方体単位セルとした。単位セルの上・下流端面および側面には周期境界条件を適用し、双極子相互作用および DEP 力の力場のカットオフ半径は $6d$ とした。このカットオフ半径は DEP 力がおよそ 10^{-8} 倍に減衰する距離である。細胞同士や細胞と固体壁との衝突・反射についてはソフトコアポテンシャルを仮定した。電場については計算格子の格子幅を細胞半径($d/2$)に取り、 y - z 面のみ Laplace 方程式を反復法で解いて求め、 x 方向には一様な分布を与えた。対象とする酵母細胞の直径は $d=6.0 \mu\text{m}$ 、密度は $\rho_c=1.11 \text{ g/cm}^3$ とした。溶液の粘性係数 η 、密度 ρ_f の値は常温の水の値を用いた。酵母細胞の Clausius-Mossotti 因子 β の実部 $\text{Re}(\beta)$ を周波数の違いにより生細胞は $\text{Re}(\beta)=-0.16 \sim 0.90$ 、死細胞は $\text{Re}(\beta)=-0.18 \sim 0.10$ の範囲で変化させた。数値解析のアルゴリズムは改訂 BBK 法を採用し、さらにプログラムの並列化を行った。計算の時間刻み幅 Δt は最大値 $\Delta t_{\text{max}} = 2 \times 10^{-6}$ s を定め、細胞の衝突の前後で Δt を小さく取る可変式とし計算効率を高めた。計算は防衛大学の共同利用設備である超並列クラスターシステムを用いて行った。

(2) ヒト乳腺上皮細胞を用いた実験
実験に用いるヒト細胞として入手し易く扱いが容易な MCF10A の生・死細胞を用いた。

培養培地には DMEM と F12 の 1:1 混合基礎培地に 5% CS (馬血清)、100ng/ml Cholera Toxin、10 μ g/ml Human insulin、500 ng/ml Hydrocortisone、20ng/ μ l EGF (上皮細胞増殖因子) を添加したものをを用い、8~10 継代目のものを実験に使用した。継代には 0.05% Trypsin + 0.5mM EDTA を用いた。細胞試料としては培養した細胞を 300mM のマンニトール等張溶液に懸濁させ、最終細胞密度を約 1×10^6 cells/ml とした。死細胞については培養した細胞を 80°C に 15 分間晒して用意した。明視野観察用には死細胞を 0.5%(w/v) Trypan Blue 溶液で 15 分間染色し、蛍光観察用には生細胞を Calcein-AM で、死細胞をヨウ化プロピジウム(PI)で標識した。実験装置、実験条件については先の出芽酵母細胞を用いた実験に準じた。

4. 研究成果

(1) 出芽酵母細胞を用いた実験と数値解析

図 6 に実験結果を示す。紙面の都合上、純水の懸濁液を用いて周波数 1.0MHz で行った結果のみを示す。図は出芽酵母細胞の試料を流している状態から(a)電場を负荷した直後($t=0$ s), (b)電場负荷後 $t=120$ s 経過時、(c)電場负荷後 $t=300$ s 経過時、のデバイス流路内の生・死細胞の分布を撮影したものである。流れ方向は左から右であり、白く示される細胞が生細胞で、黒く示される細胞が死細胞である。また、図中の H.V.は高電位側の電極、G は接地側の電極である。電場负荷後、生細胞は DEP 力により電場こう配が最も大きくなる電極のエッジ部分に引き寄せられて付着し

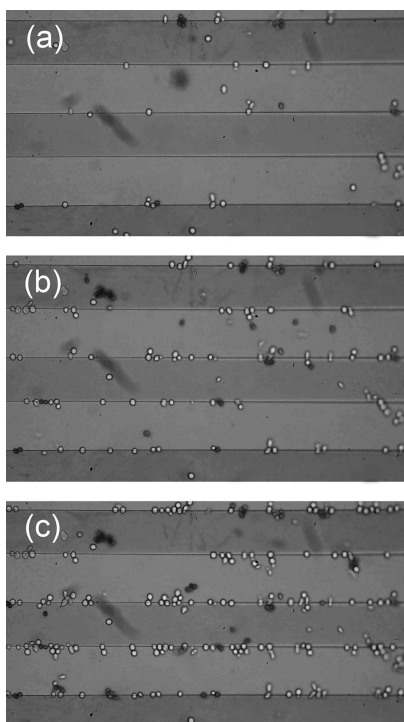


図 6 (a)電場负荷直後 (b)電場负荷から 120s 後 (c)電場负荷から 300 s 後の生・死細胞の挙動。上下端電極が高電位、中央が接地電極。

てゆく。一方、死細胞は負の誘電特性を持つため電極エッジ部分にはほとんど付着せず、下流に流されてゆく。これらの結果から、本研究で提案するデバイスにより出芽酵母の生・死細胞が比較的良好に分離可能であることが分かる。また、流路高さも従来の値を大きく超える 1.0mm まで拡張することが出来た。

図 7 は実験と同じ条件で行った数値解析結果である。ただし、 $Re(\beta)$ の値は酵母の生細胞で $Re(\beta)=0.63$ 、死細胞で $Re(\beta)=-0.18$ とした。図は○が酵母の生細胞を、●が死細胞を示している。電場を负荷した直後($t=0$ s)では、細胞の生・死状態に関わりなく細胞はランダムに流れている。電場负荷の開始から $t=300$ s 後には強い DEP 力により電極エッジ部分に生細胞が凝集する様子が分かる。この計算で用いた細胞総数は約 3000 個である。

(2) ヒト乳腺上皮細胞を用いた実験

図 8 に peak-to-peak の電圧 20.0V、周波数 10kHz の交流電圧を平行平板型マイクロ流路に负荷し、シリンジポンプの流量を 5.0ml/h (流路内流速 0.28mm/s)に設定したときの細胞分離の様子を示す。生・死細胞の混合比率は約 1:1 とし、最終細胞濃度は細胞分離の様子を詳細に観察するため低くし、約 1×10^6 個/ml にした。図中「G」は接地側電極、「H.V.」は高電位側電極であり、矢印は流れの方向である。白く見える粒子が生細胞であり、青く見える粒子がトリパンブルーで染色された死細胞である。

交流周波数 10kHz では生細胞は負の誘電泳動特性を持つ。従って、電場こう配の極小領域

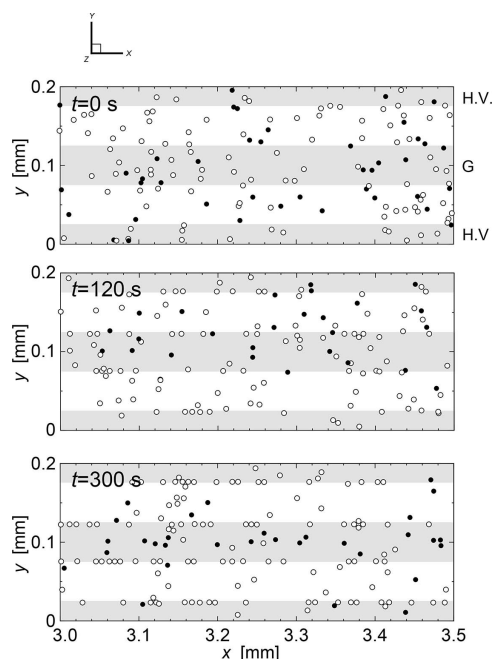


図 7 生・死細胞の挙動の数値シミュレーション結果。グレーの部分が電極を表す。上下端電極が高電位、中央が接地電極。

域が現れる接地電極の中央部のやや上部に集められ、電極に沿って流れる。これに対し、死細胞は交流周波数 10kHz では正の誘電特性を持つ。従って高電位・接地側にかかわらず、電場こう配の極大領域が現れる電極の端部に吸着するが、より電場こう配の値の大きい高電位側電極に吸着する傾向を持つ。すなわち、生細胞は流路底面から浮遊して流れるため、その流れが妨げられず、効率よく死細胞と分離させることが可能である事が分かる。

図 9 は実験で得られた細胞分離の様子(上)と数値シミュレーションで予想された細胞分離の様子(下)を比較して示している。数値シミュレーションの各種パラメーターは実験条件に合わせている。それぞれの図の中央部の電極が接地側電極であり、上下両端の電極が高電位側電極である。両者は良好な一致を示しており、数値シミュレーションが妥当な結果であることを示している。

図 10 は分離された生・死細胞の高さ方向の分布を見るため、蛍光標識された生・死細胞の試料を、流れを止めた状態で共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した結果である。DEP力が作用することにより、生細胞は死細胞よりも上部に分離されることがわかる。すなわち生細胞は接地電極上に浮遊し、流路底面に吸着している死細胞とは分離され、さらに流速を加えることによって、浮いている生細胞のみが下流へと流れてゆくという、本研究で仮説した細胞分離のメカニズムが実際に機能していることが確認された。

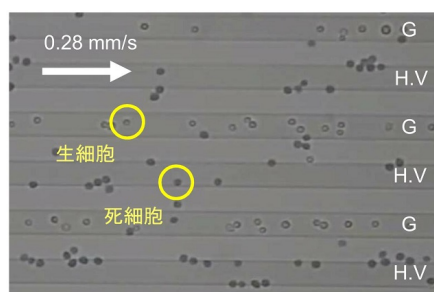


図 8 ヒト乳腺上皮細胞の生・死細胞の分離。H.V.は高電位電極、G は接地電極。

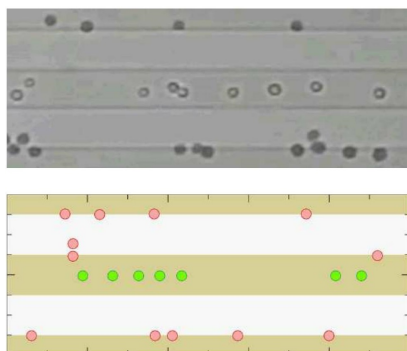


図 9 ヒト乳腺上皮細胞の生・死細胞の分離 (上)実験 (下)数値シミュレーション。H.V.は高電位電極、G は接地電極。

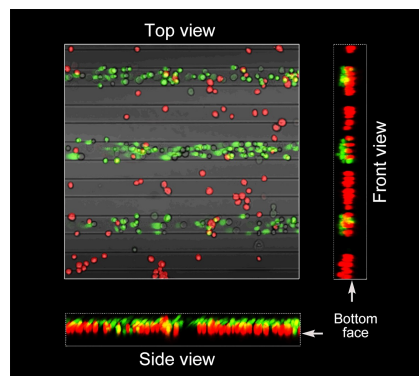


図 10 細胞分布の 3 次元蛍光画像

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 3 件)

- ① Shigeru Tada, Yan Shen and Zhiyong Qiu, Modeling and simulation of dielectrophoretic collective dynamics in a suspension of polarizable particles under the action of a gradient AC electric field, *Electrophoresis*, Vol.38, No.11, pp.1434-1440 (2017)
DOI: 10.1002/elps.201600572
- ② Shigeru Tada, Zhiyong Qiu, Yan Shen, Concentration-tuned structures in flowing suspensions under a gradient AC electric field, *Journal of Applied Physics*, Vol.120, No.17, pp. 174505-1 - 174505-11 (2016)
DOI: 10.1063/1.4966567
- ③ Shigeru Tada, Arisa Nakanishi, Masanori Eguchi, Kengo Ochi, Megumi Baba, Akira Tsukamoto, Enhancement of continuous-flow separation of viable/nonviable yeast cells using a nonuniform alternating current electric field with complex spatial distribution, *Biomicrofluidics*, Vol.10, No.4, pp.034110-1 - 034110-14 (2016)
DOI: 10.1063/1.4950999

[学会発表] (計 2 件)

- ① 多田 茂, 林 雅子, 逢見優衣, 塚本 哲, 三次元不均一電場での誘電泳動による細胞分離, 日本機械学会第 29 回バイオエンジニアリング講演会, 2017 年 1 月 20 日, ウィンクあいち (愛知県名古屋市)
- ② 多田 茂, 中西有咲, 大地健吾, 塚本 哲, 誘電泳動による細胞分離の高効率化, 日本機械学会第 28 回バイオエンジニアリング講演会, 2016 年 1 月 10 日, 東工大 大岡山キャンパス (東京都目黒区)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

多田 茂 (TADA, Shigeru)

防衛大学校・応用科学群・教授

研究者番号：70251650

(2) 研究分担者

江口正徳 (EGUCHI, Masanori)

(財)ファジィシステム研究所・主任研究員

研究者番号：60613594

塚本 哲 (TSUKAMOTO, Akira)

防衛大学校・応用科学群・講師

研究者番号：90511460

(3) 研究協力者

Qiu Zhiyong (Qiu, Zhiyong)