

論文

生死細胞分離のための誘電泳動フィルターの開発

箱田 優^{*1}, 脇坂 嘉一^{*}, 三井 信一^{**}, 北島 信義^{***}

(2004年8月23日; 2004年11月8日)

Development of Dielectrophoretic Filter for Viable-Nonviable Cell Separation

Masaru HAKODA^{*1}, Yoshikazu WAKIZAKA^{*}, Shinichi MI^{**} and Nobuyoshi KITAJIMA^{***}

(Received August 23, 2004; Accepted November 8, 2004)

In the cell culture, non-viable cells that inhibit the culture increase with the cultivation time. However, it is very difficult to separate only the non-viable cells from the mixture of viable cells and non-viable cells. In this paper, the effectiveness of cell separation by the novel dielectrophoretic (DEP) filter using the wire-wire electrode was examined. The polystyrene standard particles with various sizes were used as model particle of viable cell and non-viable cell. As the results, the separation of particles of the different size was accomplished by controlling the applied voltage and the filtration flow rate. The applied voltage, which retained particles on the filter surface, agreed well with the critical applied voltage calculated from both of the dielectrophoretic velocity and the filtration flow rate. Moreover, the electrical characteristics of viable cells and non-viable cells of mouse hybridoma 3-2H3 cells were examined. The dielectric properties of the cells were examined by the various frequencies, and the electrical characteristics of the cells were analyzed according to single-shell model. It was clarified that the conductivity of the cytoplasm of the non-viable cell decreased in comparison with that of the viable cell.

1. はじめに

誘電泳動現象は1960年代からPohl¹⁾によって詳細に研究された。誘電泳動とは、不均一交流電界中において電界により分極した粒子が、電界の勾配によって強電界側あるいは弱電界側へ泳動する現象である。誘電泳動力の強さは、周囲媒質と粒子の誘電特性、粒子の大きさ、電界の勾配に大きく依存することが報告されている^{1, 2)}。

近年、誘電泳動現象を利用した生体粒子の操作や分離、誘電特性の解析に関する研究が行われている³⁾。酵母の生菌・死菌の分離に関する研究⁴⁻⁶⁾、DEP-FFF (DEP - field flow

fractionation)法を利用した分離に関する研究、ラテックス粒子やウイルスなどのサブミクロン粒子のマニピュレーションおよび分離に関する研究などが行われてきた。しかしながら、そのほとんどの研究は回分操作により分離を行うもので、工業的に応用できるレベルではない。さらにDocoslisら⁷⁻⁸⁾は、バイオリアクター内の生細胞のみを系内に留め、古くなった培地とともに死細胞のみを選択除去する装置を開発したが、分離速度は極めて遅いという欠点を有している。

そこで、本研究は実用的なスケールでの細胞分離装置の開発を目指し、モデル粒子としてポリスチレン標準粒子を用いて、ワイヤー・ワイヤー型誘電泳動フィルターを作成し、粒子分離における操作因子の影響を検討した。さらに、動物細胞の誘電特性における周波数特性を測定することにより、生細胞と死細胞の電気的な相違を明らかにした。

2. 理論

2.1 誘電泳動理論

不均一交流電界中の粒子に加わる、時間平均の誘電泳動力 F_{DEP} は理論的に以下の式で表される⁹⁾。

$$F_{DEP} = 2\pi r^3 \epsilon_M \text{Re}[K(\omega)] \cdot \nabla E^2 \quad (1)$$

キーワード: 誘電泳動, フィルター, 生死細胞, 細胞分離, 不均一電界。

^{*} 群馬大学工学部 生物化学工学科 (376-8515 群馬県桐生市天神町 1-5-1)

Department of Biological and Chemical Engineering,
Gunma University, Kiryu, Gunma 376-8515, Japan.

^{**} (株)増田研究所 (113-0033 東京都文京区本郷 2-40-11)

Masuda Research, Inc., Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan

^{***} 群馬県繊維工業試験場 (376-0011 群馬県桐生市相生町 5-46-1)

Textile Research Institute of Gunma, Kiryu, Gunma 376-0011,
Japan

¹ hakoda@bce.gunma-u.ac.jp

ここで r は粒子の半径, ε_M は周囲媒質の誘電率, E は電界強度を示す. $\text{Re}[K(\omega)]$ は, 次式で表される Clausius-Mossotti 関数の実数部分を示す.

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

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, ω は周波数を示す. $\text{Re}[K(\omega)]$ は, 印加する電界の周波数, 粒子および周囲媒質の誘電特性に依存する. 粒子が $\text{Re}[K(\omega)] > 0$ のとき強電界側へ泳動し(positive DEP), $\text{Re}[K(\omega)] < 0$ のとき弱電界側へ泳動する(negative DEP). 一方, ∇E^2 は, 電界強度, 電極形状および分離装置の形状により決定される.

2.2 Single-shell モデル⁹⁾

近年, 様々な方法で粒子や細胞などの誘電特性を解析する試みがなされている. 細胞は内部に核, 小胞体, ミトコンドリアなど様々な細胞内小器官を持つ誘電体(細胞質)であり, 細胞膜によって隔てられた構造をしていることから, その誘電特性は均質な球体とは異なる. Archer ら⁹⁾は, 細胞を均一な誘電液体を薄い膜で覆った Single-shell モデルで近似し, 動物細胞やプロトプラストの誘電特性がほぼ正確に表現できることを報告している. 細胞質を薄い膜が取り囲んでいる細胞の Clausius-Mossotti 関数は以下のように表すことができると報告されている⁹⁾.

$$K(\omega) = \frac{\omega^2(\tau_m \tau_m - \tau_c \tau_m') - 1 + j\omega(\tau_m' - \tau_m - \tau_m)}{2 - \omega^2(\tau_c \tau_m' + 2\tau_m \tau_m) + j\omega(\tau_m' + 2\tau_m + 2\tau_m)} \quad (3)$$

$$\tau_c = \frac{\varepsilon_c}{\sigma_c}, \quad \tau_m = C_m \frac{r}{\sigma_c}, \quad \tau_m' = \frac{\sigma_m}{\varepsilon_M}, \quad \tau_m'' = C_m \frac{r}{\sigma_M} \quad \text{は, 緩和時間}$$

を示す. また, C_m は膜のキャパシタンス, ε_c , ε_M は細胞内部および周囲媒質の比誘電率, σ_c , σ_M は細胞内部および周囲媒質の導電率を示す. この式を利用することで $\text{Re}[K(\omega)]$ の周波数特性から比誘電率や導電率などのパラメータを解析することができる⁹⁾.

2.3 誘電泳動速度

細胞のような非常に小さい粒子が誘電泳動によって泳動するとき, 粒子に関するレイノルズ数 Re_p は十分小さい ($Re_p < 2$) ためストークスの法則を適用できる. ブラウン運動や浮力の影響を無視すると誘電泳動力と粒子に働く抵抗力は等しいと仮定できるので次式のようになる.

$$F_{DEP} = F_{drag} = 6\pi\eta r v_{DEP} \quad (4)$$

ここで, F_{drag} は粒子に働く粘性抵抗力, η は周囲媒質の粘度, v_{DEP} は周囲媒質に対する粒子の相対泳動速度である.(1) および(4)式から以下の式が得られる.

$$v_{DEP} = \frac{r^2 \varepsilon_M \text{Re}[K(\omega)]}{3\eta} \cdot \nabla E^2 \quad (5)$$

この式から, 誘電泳動速度は ∇E^2 に比例することがわかる. 著者らは, ピン・プレート型電極およびワイヤー・ワイヤー型電極を用いて誘電泳動速度を測定した. その結果, 誘電泳動速度 v_{DEP} は電極形状が変化しても ∇E^2 に比例し, 蒸留水中の $10 \mu\text{m}$ のポリスチレン粒子に 10 MHz の交流電界を印加した場合の実験式として(5)式を満足する次式が得られている¹²⁾.

$$v_{DEP} = 3 \times 10^{-18} \cdot \nabla E^2 \quad (6)$$

また, 0.3 M グルコース水溶液中の 3-2H3 生細胞に 10 MHz の交流電界を印加した場合の実験式として次式が得られている¹²⁾.

$$v_{DEP} = 8 \times 10^{-18} \cdot \nabla E^2 \quad (7)$$

3. 実験方法

3.1 誘電泳動速度の測定法

本報では, 細胞として 0.3 M グルコース溶液に懸濁したマウスハイブリドーマ 3-2H3 細胞 (RCB0867, 理研ジーンバンク), 大きさや誘電特性にばらつきのある細胞の代わりにポリスチレン標準粒子($d_p = 9.63 \pm 1.13 \mu\text{m}$) (Polysciences, Inc., USA)を蒸留水中に懸濁したものをモデル粒子として分離実験に使用した. すべての実験は $298 \pm 1 \text{ K}$ の恒温室内で行った. 図1にピン・プレート型電極を示す. ピン・プレート型電極における ∇E^2 の y 方向成分は, y 軸上において理論的に以下の式で表される^{10, 11)}.

$$\frac{\partial E^2}{\partial y} = \frac{-16V^2 Y}{h^3 (1 - Y^2)^3 \cdot [\ln \{(1 + Y_{\min}) / (1 - Y_{\min})\}]^2} \quad (8)$$

$$Y = y/h, \quad h = y_{\min} / \cos(\theta/2), \quad Y_{\min} = y_{\min} / h$$

ここで, V は印加電圧, y は原点からの距離, $y_{\min}$ は電極間距離, θ はピン電極の角度を示す. また, ワイヤー・ワイヤー型電極の断面の概略図を図2に示す. この電極は $200 \mu\text{m}$ のニッケル製ワイヤーを垂直に4本並べたもので電極間距離は $200 \mu\text{m}$ である. この電極の ∇E^2 は2次元有限要素法解析ソフト(Maxwell 2D, Ansoft Corp., USA)を使用し解析した. 図3は有限要素法により解析された ∇E^2 である. 色の濃い方が高い ∇E^2 を示し, 各座標の ∇E^2 の大きさは解析的に算出した¹²⁾. 誘電泳動速度は粒子の泳動の軌跡を $20 \mu\text{m}$ の微小区間に分割し, その微小区間を泳動するのにかかる時間を測定することで算出した.

3.2 誘電泳動フィルター装置

図2に示した誘電泳動フィルターのワイヤー電極近傍の

粒子誘電泳動速度の測定は、図4に示す実験装置により行った。また、デッドエンド型誘電泳動フィルターによる分離実験は図5に示す実験装置により行った。用いたフィルター電極は図2と同じ電極間距離とワイヤー径である。誘電泳動フィルターの透過面積は 39.3 mm^2 であり、流れに直角に配置した。粒子の懸濁液をペリスタポンプにより供給することで一定流速 U の流れを保持した。粒子濃度は血球計算盤により測定することで次式の保持率を算出した。

$$\text{保持率} [\%] = \frac{X_{In} - X_{Out}}{X_{In}} \times 100 \quad (9)$$

ここで、 X_{In} と X_{Out} は誘電泳動フィルターを透過前の粒子濃度と透過後の粒子濃度をそれぞれ示す。

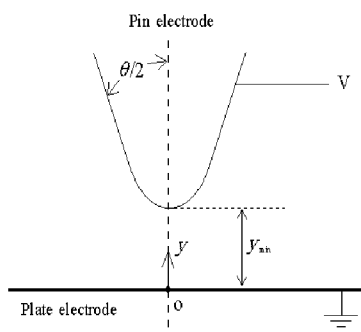


図1 針-平板型電極の概略図

Fig. 1 Schematic diagram of pin-plate type electrode.

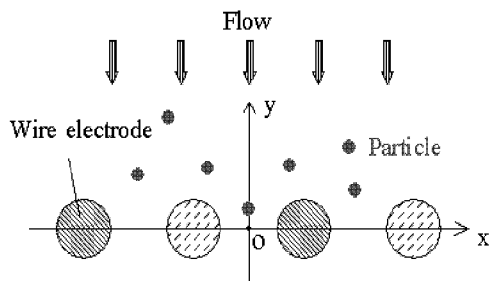


図2 ワイヤー・ワイヤー型電極の断面図
Fig. 2 Schematic diagram of the wire-wire type electrode (cross-sectional view).

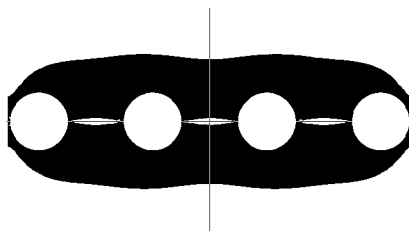


図3 ワイヤー・ワイヤー電極の解析された電界
Fig. 3 Calculated electric field strength for wire-wire type electrode.

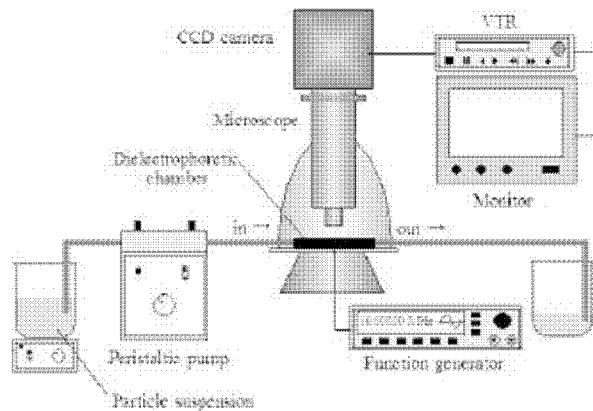


図4 顕微鏡観察のための実験装置の概略図

Fig. 4 Schematic diagram of the experimental apparatus for the microscopy.

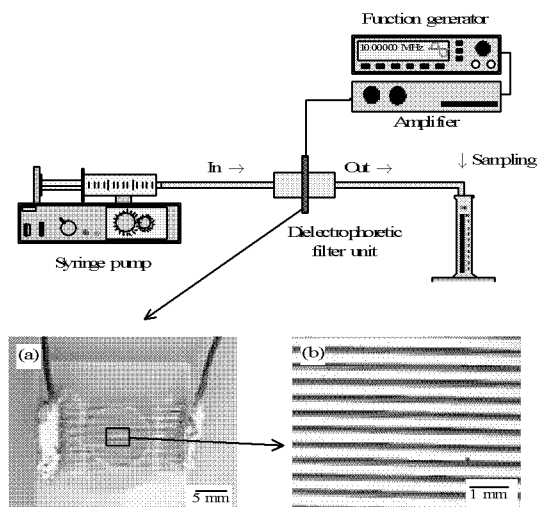


図5 誘電泳動分離装置図

(a) 誘電泳動フィルター写真, (b) 電極の拡大写真
電極間距離, ワイヤー径: $200 \mu\text{m}$.

Fig. 5 Schematic diagram of dielectrophoretic separation apparatus. (a) is the photograph of the dielectrophoretic filter and (b) is the enlarged view of the electrode. Electrode gap and wire diameter are $200 \mu\text{m}$ respectively.

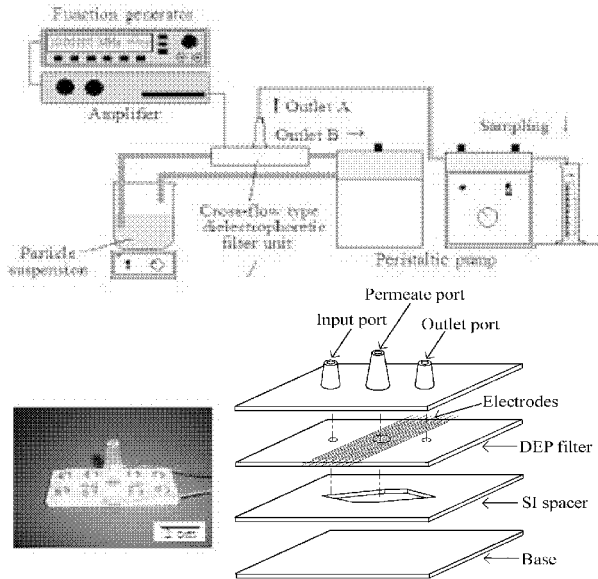


図6 クロスフロー型誘電泳動分離装置図とろ過装置

Fig. 6 Schematic diagram of the cross-flow DEP separation apparatus and the photograph of the filter unit.

3.3 クロスフロー型誘電泳動フィルター装置

保持液の流れを十字流にしたクロスフロー型誘電泳動フィルターの装置の概略図とデバイスの構造と組立の写真を図6に示す。フィルターユニットは上部の液流入口、透過液出口、フィルター電極部分、シリコンゴムスペーサー、基板で構成されている。フィルター電極部分は前述と同様である。シリコンゴムスペーサーの厚みは 2mm である。粒子の保持率を次式の通り定義した。

$$\text{保持率}[\%] = \frac{X_0 - X_f}{X_0} \times 100 \quad (10)$$

ここで、 X_0 と X_f はそれぞれ0V印加時の粒子濃度、任意の印加電圧のときの粒子濃度を示す。

4. 結果および考察

4.1 誘電泳動フィルターによるポリスチレンビーズの分離

誘電泳動フィルターの分離特性を検討するため、粒子径および誘電率の均一なポリスチレンビーズをモデル粒子として用いた。生細胞と死細胞に及ぼす誘電泳動力を考慮して、 $10 \mu\text{m}$ φの粒子を生細胞、 $4.5 \mu\text{m}$ φの粒子を死細胞と仮定して分離実験に用いた。著者ら¹²⁾は、フィルター電極のモデル電極としてワイヤー・ワイヤー型電極を用いて、流れ場における粒子を負の誘電泳動によって保持できる最低電圧（臨界印加電圧 V_c ）を測定した。その結果、粒子はワイヤー電極とワイヤー電極の間隙中央部分が最も ∇E^2 が小さいため、間隙中央部分が最も膜透過し易く、さらに

電極間隙中央部分の延長線上において ∇E^2 の値が最大となる部分が、粒子の透過を防ぐ最終的なバリアとなることが明らかにされた。図4における実験装置を用いて、ポリスチレン粒子の誘電泳動を観察した。図7は誘電泳動力とバルク流れにより粒子が受ける力とのバランスを検討するため、粒子が保持される臨界印加電圧を示した。ポリスチレン粒子の場合、(6)式より臨界印加電圧と流速との関係は以下の式で表すことができる。

$$V_c = 4.71 \times 10^3 \cdot U^{0.5} \quad (11)$$

式(11)による理論線と実験結果の関係は良く一致した。このことから、流れ場においても(5)~(7)式を適用できることがわかった。

4.2 デッドエンド型誘電泳動フィルターの分離特性

流路にワイヤー・ワイヤー電極を取り付けたデッドエンド型誘電泳動フィルターにおける分離について印加電圧と粒子保持率との関係を図8に示す。泳動速度測定実験で得られた実験式と透過面積および流量から算出した100%の保持率を得るのに必要な印加電圧は $8.2V_{\text{rms}}$ であった。実験結果は $14 V_{\text{rms}}$ で保持率90%に達したが、理論値よりもかなり高い電圧（ $28V_{\text{rms}}$ ）を印加しても保持率は95%にとどまった。これは、保持液側の粒子濃度が時間に伴って増大したことが原因と考えられる。

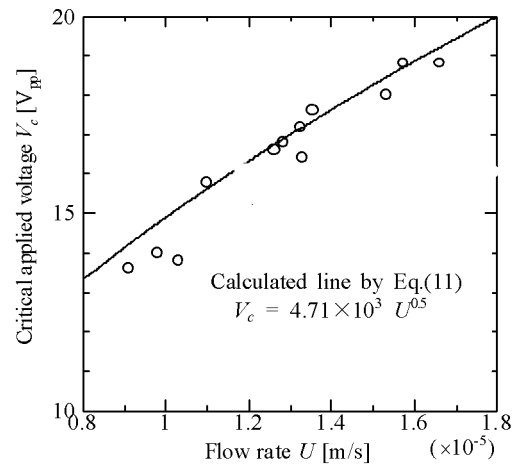


図7 臨界印加電圧と流速の関係

Fig. 7 Relationship between the critical applied voltage and the flow rate. Frequency: 10MHz.

4.3 クロスフロー型誘電泳動フィルターの分離特性

保持液側の粒子濃度の増加を回避するため、クロスフロー型誘電泳動フィルターについて検討した。その結果を図9に示す。印加電圧と $10 \mu\text{m}$ φの粒子保持率との関係は、デッドエンド型誘電泳動フィルターでは保持率100%に満

たなかったが、クロスフロー型では印加電圧 $17.5 V_{rms}$ で保持率はほぼ 100 % となった。また、電極間隙中央部分における最終バリアの位置における誘電泳動速度と液流速から計算した臨界印加電圧は $18.3 V_{rms}$ であり、実験結果はそれと良く一致している。 $6 \mu m \phi$ と $4.5 \mu m \phi$ の粒子の場合、この条件においては、保持率 100 % に達しなかった。また、透過流量を変化させた場合の結果を図 10 に示す。この結果から、粒子径 $4.5 \mu m \phi$ と $10 \mu m \phi$ の粒子を分離するには、印加電圧 $25 V_{rms}$ において、 $200 \sim 300 \mu L/min$ の流量が適当であることが明らかとなった。以上の結果から、クロスフロー型の誘電泳動フィルターを利用した場合でも、誘電泳動速度測定実験で得られた実験式(6)の適用が可能であり、 y 軸上での ∇E^2 の最大値が、流速を決定する際に考慮すべき値であることが確認された。

4.4 生死細胞の電気特性の解析

細胞の電気的特性を検討するため、3-2H3 細胞を用いて誘電泳動速度に及ぼす交流電界の周波数の影響について検討した。その結果は、図 11 に示され、生細胞と死細胞では誘電泳動速度の周波数依存性が異なった。生細胞の誘電泳動速度にばらつきがあるのは、生細胞でも誘電特性が異なることが考えられる。それぞれの周波数毎に誘電泳動速度の平均値を求め、その平均値から $Re[K(\omega)]$ を算出した結果が図 12 である。この結果をもとに Single-shell モデルを適用することにより、生細胞と死細胞のパラメータを求め、表 1 に示す。生細胞と死細胞では細胞質の導電率が大きく異なることがわかった。これは、生死により細胞膜でのイオンチャンネルにおけるイオンの透過性に起因していると考えられる。

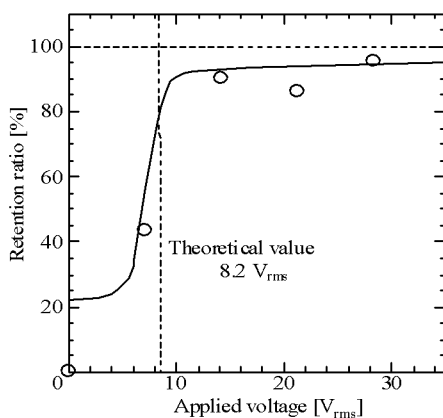


図 8 粒子保持率に及ぼす印加電圧の影響

Fig. 8 Effect of applied voltage on the retention ratio.

Flow rate: $40 \mu L/min$.

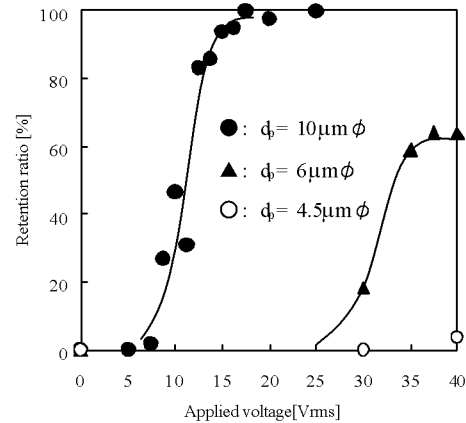


図 9 粒子保持率に及ぼす粒子径の影響

Fig. 9 Effect of applied voltage on the retention ratio. Permeation rate: $200 \mu L/min$.

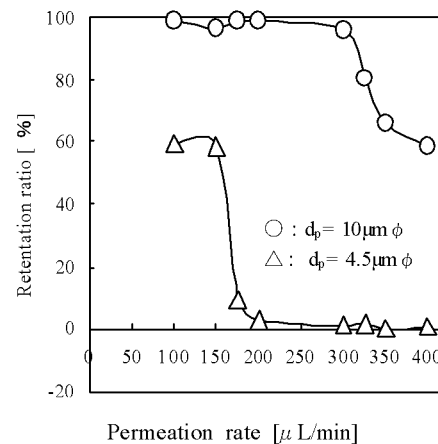


図 10 粒子保持率に及ぼす透過流速の影響

Fig. 10 Effect of permeation rate on retention ratio of particles. Applied voltage: $25 V_{rms}$.

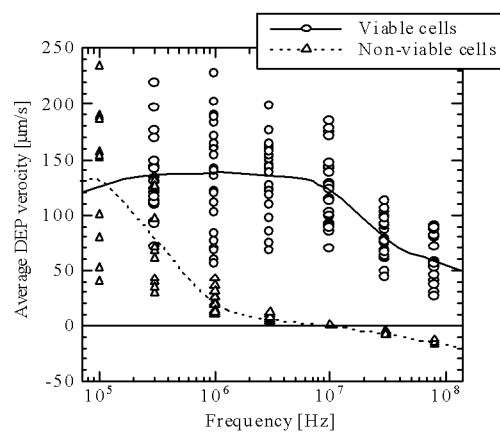


図 11 3-2H3 細胞の誘電泳動速度に及ぼす周波数の影響

Fig. 11 Effect of frequency on DEP velocity for 32H3 cells in 0.3M glucose aqueous solution. Pin-plate electrode ($d=300 \mu m$, $\theta = \pi/6$ rad). Applied voltage: $20 V_{pp}$.

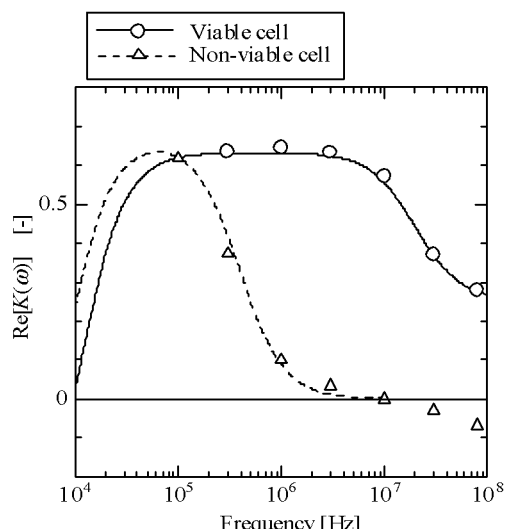


図 12 3-2H3 細胞の誘電泳動速度から計算された $\text{Re}[K(\omega)]$ の周波数依存性及び single-shell モデルによる近似曲線

Fig. 12 The value of $\text{Re}[K(\omega)]$ calculated from measured DEP velocity of 3-2H3 cells and fitting curve using single-shell model.

表 1 誘電泳動速度と single shell モデルから計算された因子

Table 1 Calculated parameter from dielectrophoretic velocity measurement and single-shell model.

Parameter	Viable cell	Non-viable cell
Relative cytoplasmic permittivity : ϵ_c [-]	180	89
Cytoplasmic conductivity : σ_c [mS/m]	300	4.5
Membrane capacitance : C_m [mF/m ²]	0.7	1
Relative medium permittivity : ϵ_m [-]	89	
Medium conductivity : σ_m [mS/m]	0.22	

5. まとめ

本報では、誘電泳動フィルターの基礎特性について議論するため、生細胞の代わりに誘電特性の均質なポリスチレン標準粒子を用いてモデル電極と実際の誘電泳動フィルターによる粒子分離実験を行った。ワイヤー・ワイヤー型電極における有限要素法による解析結果から、 ∇E^2 の値は電極間隙の中央部分で最も小さくなり、そのため粒子はその部分を透過するが、電極間隙の中央部分での ∇E^2 が最も大きい位置での ∇E^2 の大きさにより粒子がフィルターを透過するか否かが決定される。その臨界印加電圧を考慮し、誘電泳動フィルターの分離効率を検討した。その結果、一

定流速の流れ場中の粒子を阻止することのできる最低電圧は実験式から求められる値と一致することが明らかとなった。以上のことから、実験条件を制御することにより粒子や細胞の濃縮や分離が可能であることが明らかになった。本報による電極デバイスは従来の誘電泳動デバイスに比べれば大きく処理量も増大したものの、実用化するためには、更なる集積化等の工夫が必要となる。

さらに、マウスハイブリドーマ 3-2H3 細胞の誘電特性の周波数依存性の結果から Single shell モデルを用いることにより、生細胞と死細胞の電気的特性の違いを明らかにした。これらの結果は、生死細胞の分離、細胞種ごとの分離などに有用なデータであると考えられる。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり有益な助言を賜りました東京大学 鷲津正夫教授に感謝致します。また、資金的な援助を頂きました北関東産官学研究会および群馬大学サテライト・ベンチャー・ビジネス・ラボラトリーに感謝致します。

参考文献

- 1) H.A. Pohl: *Dielectrophoresis*, Cambridge University Press (1978)
- 2) T.B. Jones: *Electromechanics of particles*, Cambridge University Press (1995)
- 3) R. Pethig and G.H. Markx: Trends in Biotechnol. **15** (1997) 426
- 4) G.H. Markx, M.S. Talary and R. Pethig: J. Biotechnol. **32** (1994) 29
- 5) G.H. Markx and R. Pethig: Biotechnol. Bioeng. **45** (1995) 337
- 6) P.R.C. Gascoyne, Y. Huang, R. Pethig, J. Vykoukal and F.F. Becker: Meas. Sci. Technol., **3** (1992) 439
- 7) A. Docoslis, N. Kalogerakis, L.A. Behie and K.I.V.S.K. aler: Biotechnol. Bioeng. **54** (1997) 239
- 8) A. Docoslis, N. Kalogerakis and L.A. Behie: Cytotechnology, **30** (1999) 133
- 9) S. Archer, H. Morgan and F.J. Rixon: Biophys., J., **76** (1999) 2833
- 10) K.V.I.S. Kaler and T.B. Jones: Biophys., J. **57** (1990) 173
- 11) J. Yang, Y. Huang, X-B. Wang, F.F. Becker and P.R.C. Gascoyne: Biophys., J. **76** (1999) 3307
- 12) Y. Wakizaka, M. Hakoda, N. Shiragami: Biochim. Eng. J., **20** (2004) 13