

# 誘電泳動インピーダンス計測法による細菌誘電特性と 細胞膜活性状態及び流量依存性の相関検証

圓城寺 隆 治<sup>\*,1</sup>, 内 田 謰<sup>\*</sup>, 栄久保 文 嘉<sup>\*</sup>

(2010年9月14日受付; 2011年5月9日受理)

## Investigation of Relationship among Dielectric Characteristic of Microorganisms, Active Status of Cell Membrane and Flow Rate Dependence Using Dielectrophoretic Impedance Measurement Method

Takaharu ENJOJI,<sup>\*,1</sup> Satoshi UCHIDA\* and Fumiyoji TOCHIKUBO\*

(Received September 14, 2010; Accepted May 9, 2011)

Rapid and high sensitivity methods for microorganism detection and constant monitoring system have been required for advanced quality preservation in food and beverage industries. In the present work, the metabolic states of heat-injured *Escherichia coli* (*E. coli*) in a micro-cell were investigated using dielectrophoretic impedance measurement (DEPIM) method and various biological methods. Temporal change in the conductance between micro-gap ( $\Delta G$ ) was measured for various heat treatment temperatures (HTT). As a result, there is an obvious correlation among active status of cell membrane,  $\Delta G$  and HTT. These results suggest that DEPIM method should be available for an effective monitoring method for complex change in various biological states of microorganisms.

### 1. はじめに

平成21年に日本で発生した細菌由来の食中毒事件数は、778件、患者数10,331人、死者1人であり<sup>1)</sup>、食中毒は依然として深刻な社会問題である。このような実情を踏まえ、食品の衛生管理に関して、危害分析及び重要管理点（Hazard Analysis-Critical Control Point Inspection System : HACCP）方式が注目されている。HACCPとは、食品製造ラインにおける各工程及び各製品に対して衛生検査を要求する食品安全管理手法である。本手法における細菌検査には、主に公定法である培養法が用いられている。培養法は安価である半面、判定に時間を有するため、本方式で要求される膨大な検査数に即時対応することは困難である。このことから、より迅速な分析法の開発導入が必須とされる<sup>2)</sup>。有力な迅速・高感度検出法として、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）法、アデノシン三リン酸（ATP）法、酵素免疫測定法（ELISA）法などが既に採用されているが、これらは生死菌の判別が困難であるうえ、高度な専門知識が必要である。また、食中毒菌検査以外では、醸造業や乳加工業において発酵に関わる酵母や乳酸菌の代謝

活性を即時に把握することが品質保持の観点から重要とされている。しかしながら、大多数の工程は経験的知見に基づいた定時管理を前提としており、異常発生時の瞬時制御に対応していないことから、発酵菌の活性状態を工程内で連続的に計測し、フィードバック制御できる新システムの開発が望まれている。上記の細菌計測に関する諸課題に対し、電気計測法の一つである誘電泳動法<sup>3,4)</sup>は、原理的に高速性と簡易性を兼ね備えた有力な手法であり、誘電特性の違いによる菌種分離や生死菌判定に利用されている。細菌群橋絡による電極間のインピーダンス変化を利用した誘電泳動インピーダンス計測（Dielectrophoretic Impedance Measurement: DEPIM）法<sup>5)</sup>では、菌密度計測<sup>6,7)</sup>が可能となる。一方の活性状態については、細菌懸濁液の誘電率変化<sup>8,9)</sup>や細菌の成長過程における誘電特性の変動<sup>10)</sup>から間接的に評価した事例が報告されているが、細菌の生理状態と誘電泳動時における電極間インピーダンス変化との相関については十分な知見が得られていない。

これらを踏まえ著者らは、検体菌の生理活性評価を行う基礎段階として、加温処理を施した大腸菌を用いて、周波数に対するDEPIMの処理温度依存性を精査した<sup>11)</sup>。電極間コンダクタンスの経時変化（ $\Delta G$ ）は、低周波数において処理温度の影響を受けることがわかり、その解析結果から加温負荷菌の誘電特性変化は、導電率の変動が支配的であると推察した。さらに各蛍光染色法を用いて、膜損傷および代謝活性度の処理温度依存性を解析し、DEPIM法による $\Delta G$ との相関を検討

キーワード：誘電泳動、インピーダンス計測法、マイクロセル、微生物、細胞膜活性

\* 首都大学東京 理工学研究科 (192-0397 東京都八王子市南大沢 1-1)

Tokyo Metropolitan Univ., 1-1 Minami-Osawa, Hachioji-shi, Tokyo 192-0397, Japan

<sup>1</sup> enjoji-takaharu@ed.tmu.ac.jp

した結果、単に細菌の生育活性状態だけでなく、菌の生死、膜損傷および呼吸活性の複合的要因が  $\Delta G$  変動に反映していることが判明した<sup>12,13)</sup>。本報では、さらに新たな DEP 条件、処理温度条件及び菌染色法分析手法を導入し、 $\Delta G$  の変動要因を精査した。その結果、加温処理条件及び流量条件を変動させることにより、DEPIM 計測時の菌体内状態、細胞膜活性状態及び生死菌の混合状態は、 $\Delta G$  変動に対して複雑な影響を及ぼしていることが明確になった。さらに蛍光分光法を用いることにより、 $\Delta G$  と大腸菌の生物学的変化との相関性を定量的に評価することができた。

本研究成果は、DEPIM 法を導入することによって、細菌に対する実用的な計測システムの構築が可能であることを示唆している。

## 2. 誘電泳動インピーダンス計測法

誘電泳動 (dielectrophoresis: DEP) とは、不平等電界中に置かれた誘電微粒子において、粒子の対極に形成される電界強度の差に応じて、双極子モーメントが作用する現象である<sup>14-16)</sup>。媒質中に存在する細菌を DEP 力 ( $F_{\text{dep}}$ ) により電極近傍に捕捉すると、電極間において細菌は電界に沿って整列し、細菌鎖 (pearl chain) を形成する。pearl chain による電極間短絡の結果、電極間のインピーダンスが変化する。この電気変化量から細菌密度を計測する手法を誘電泳動インピーダンス計測 (DEPIM) 法と呼ぶ<sup>17)</sup>。DEPIM では、捕捉された細菌群を等価的に電気回路として扱う等価回路モデルと細菌が電極間に捕捉される過程をモデル化した菌捕捉モデルを併用する。等価回路モデルにおいて、捕捉細菌数  $N$  は次式で与えられる。

$$N = mn = m^2 \frac{G_T}{G_B} \quad (1)$$

ここで、 $m$  は pearl chain 1 本を形成する細菌数、 $n$  は pearl chain 総数、 $G_B$  は細菌単体のコンダクタンス、 $G_T$  は捕捉細菌群のコンダクタンスである。

電極における細菌捕捉面積及び未捕捉面積の総和  $S_E$  は、2 種類の領域からなる。すなわち、

$$S_E = S_1 + S_2 \quad (2)$$

ここで、 $S_1$  は細菌捕捉可能領域、 $S_2$  は既に細菌が捕捉された領域である。また、 $d_t$  の間、各領域での細菌捕捉数  $N_i$  の増加量は次式で与えられる。

$$dN_1 = k_1 S_1 \rho dt, \quad dN_2 = k_2 S_2 \rho dt \quad (3)$$

ここで、 $k_1$  及び  $k_2$  は、それぞれの捕捉領域に関する係数、 $\rho$  は初期溶液中細菌濃度である。

$F_{\text{dep}}$  による細菌捕捉モデルにおいて、総捕捉細菌数  $N$  は次

式で与えられる。

$$N = N_1 + N_2 \\ = k_2 S_E \rho t + \frac{S_E}{k_3} \left( 1 - \frac{k_2}{k_1} \right) \left\{ 1 - \exp \left( \frac{-t}{\tau} \right) \right\} \quad (4)$$

ここで、 $k_3$  は定数、 $\tau$  は次式で表わされる時定数である。

$$\tau = \frac{1}{k_3 k_1 \rho} \quad (5)$$

細胞膜活性及び菌体内状態は、菌体内的誘電率及び導電率に強く依存することが分かっている<sup>9)</sup>。結局、細菌の生物学的特徴は、DEPIM 法によって得られる  $G_T$  ( $\Delta G$ ) 変化量を計測することによって間接的に評価できる。

## 3. 実験装置及び実験方法

### 3.1 誘電泳動マイクロフィルタ電極

本実験において使用した DEP マイクロフィルタ電極 (以下、電極) セルの電極構造及び製造方法は既報<sup>11-13)</sup>のとおりであるが、本実験では電極材質として酸化インジウムスズ (ITO) を採用した。電極捕集部パターンを図 1 に示す。

### 3.2 菌種及び調製方法

実験菌種は *Escherichia coli* ATCC 11775 (*E. coli*) を用いた。菌の培養手順及び洗浄方法は既報<sup>11-13)</sup>に従った。洗浄済み *E. coli* を、滅菌済み 0.15 M D-マンニトール (DM) 溶液に混和したものを懸濁原液とした。分光光度計 (U-2810、日立ハイテック) で懸濁原液の菌濃度を計測した。吸収波長は 600 nm とした。懸濁原液濃度は  $6.2 \times 10^8$  CFU/mL であった。

### 3.3 加温処理工程

本実験では、膜活性能力及び損傷度合いの異なる *E. coli* を作成する手段として、既報<sup>11-13)</sup>と同様、ウォーターバスによる熱ストレス負荷法を用いた。394 K は、オートクレーブによる高圧蒸気滅菌条件 (20 min, 2 atom) を採用した。DEPIM 計測直前の最終希釀として、上記加温負荷試料 1 mL を 288 K

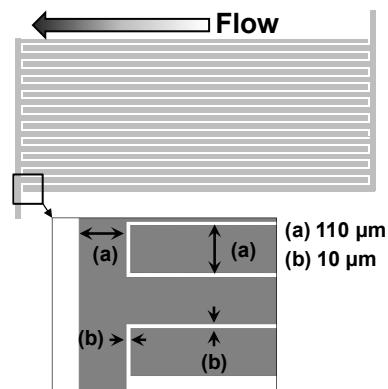


図 1 誘電泳動マイクロフィルタ電極捕集部概略図

Fig. 1 Schematic diagram of the interdigitated microelectrode array.  
(a) ITO Electrode, (b) Gap.

に保温した DM 14 mL に分注した。最終懸濁液濃度は、 $4.1 \times 10^7$  CFU/mL とした。

### 3.4 誘電泳動特性計測

各加温処理試料に対する DEP 実験を行い、菌の捕集特性を電極間インピーダンスの変化から定量的に測定した。分析装置、電気回路、電極上における捕捉菌の観察方法は既報<sup>11-13)</sup>と同様であるが、本実験では、菌液の通流は無循環方式とした。さらに流速依存性を検証するため、送液流量を 15, 30 及び 60 mL/h とした。正弦波電圧設定値の電圧幅及び駆動周波数を 10 V pp 及び 100 kHz に固定した。各 DM 希釀試料に対し、実験中は恒温スターーラー (CSB-900N, AS ONE) を用いて温度制御 (288 K) 及び攪拌を行った。ペリスタルティックポンプ (PSM050DA, Advantec) による送液開始後、溶液が電極捕集部上を通過したことを確認したうえで電圧を印加した。計測時間は最大 900 s とした。また、電極上に捕捉されている *E. coli* の膜状態を調査するため、LIVE/DEAD 染色剤 (L13152, Invitrogen) によって染色した *E. coli* に対し、DEP による捕捉状況を蛍光顕微鏡で観察した。本試薬は、SYTO9 及び Propidium Iodide (PI) からなる生死菌判別用の二重核酸染色剤である。膜正常菌に対しては、膜透過性のある SYTO9のみ内部に浸透し核が緑色に染色される。一方、膜損傷がある場合、非膜透過性の PI も浸透し、核が赤色染色されるのと同時に、SYTO9 由来の緑色発光は褪色する<sup>18)</sup>。DEP 実験条件及び流量は DEPIM 計測と同様とした。負荷温度は 309–353 K の範囲とした。観察時間は通気開始 60 s 後とした。

### 3.5 生物学的検証

加温処理による *E. coli* の生育活性に対する影響を調査するために、寒天培地法によるコロニーカウント計測を行った。実験手順は前報<sup>11)</sup>と同様とした。また、加温処理 *E. coli* に対して、上記 3.4 と同様の生死菌染色法を用いて、生死菌染色及び膜損傷検証の定量的な相関検証を行った。*E. coli* 懸濁原液と各 LIVE/DEAD 染色剤を同量混和したのち、加温負荷処理を行った。処理温度は、309, 320, 328, 333, 338, 343 及び 353 K とした。遮光状態で 15 min 加温した後、蛍光分光光度計 (FP-6600, 日本分光) を用いて蛍光スペクトル強度を計測した。励起波長は 470 nm とした。SYTO9 の蛍光強度は、蛍光波長 510–540 nm におけるスペクトル領域から、また PI は蛍光波長 620–650 nm におけるスペクトル領域から、それぞれ DM 試料で計測したプランクのスペクトル領域を差分して算出した。

## 4. 実験結果及び考察

### 4.1 DEPIM における $\Delta G$ と処理温度との相関

電圧印加開始からの  $\Delta G$  を計測し、加温処理温度に対する特性を評価した。流量 30 mL/h における印加開始からの適

時  $\Delta G$  計測結果を図 2 に示す。 $\Delta G$  は 278 K で最大となった。それ以降は減少傾向を示し、高圧蒸気処理により著しい菌体損傷が生じたと推測される 394 K において  $\Delta G$  の上昇は計測されなかった。これら  $\Delta G$  変動は、既報<sup>11-13)</sup>と同様、主に  $F_{dep}$  による電極間での菌捕捉量及び捕捉速度に依存することが DEPIM 計測時の顕微鏡観察により確認された。さらに本研究では、前報より詳細に加温処理温度を設定した結果、320 K 時に一時的な  $\Delta G$  低下が出現した (図 2 † 部参照)。333 K で再度増加に転じた後、処理温度上昇に従い  $\Delta G$  は再び減少した。加温処理により細胞膜に損傷あるいは破壊が生じると、膜を介した菌体内外物質の流入出が活性化されるため、菌体内の  $\sigma$  及び  $\varepsilon$  は、それぞれ菌体外の媒質のそれらに近似する。既報<sup>11-13)</sup>において、 $F_{dep}$  は Clausius-Mosotti 因子により、媒質及び細菌の複素誘電率に依存することを言及したが、加温負荷処理による膜損傷は、菌に作用する  $F_{dep}$  低下を惹起させる要因となりうる。

次に、各流量における 600 s 時の  $\Delta G$  ( $\Delta G_{600}$ ) 変動比較を図 3 に示す。ここでは、処理温度間における  $\Delta G$  変動を比較するため、各流量とも 278 K の  $\Delta G_{600}$  を基準とした相対値 ( $\Delta G/\Delta G_{278}$ ) で示した。60 mL/h 時における  $\Delta G/\Delta G_{278}$  は、処理

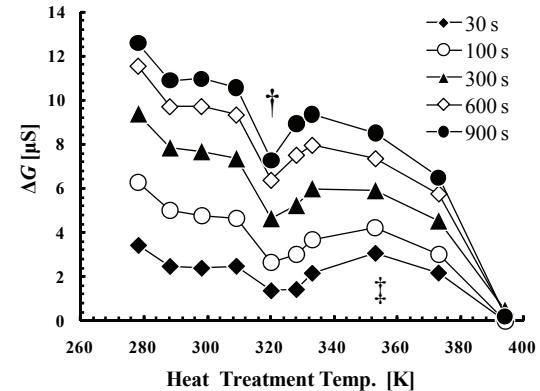


図 2  $\Delta G$  における加温処理温度依存性

Fig. 2 Dependence of  $\Delta G$  on heat treatment temperature.

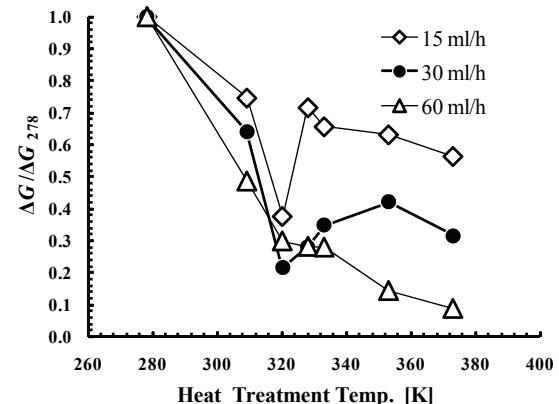
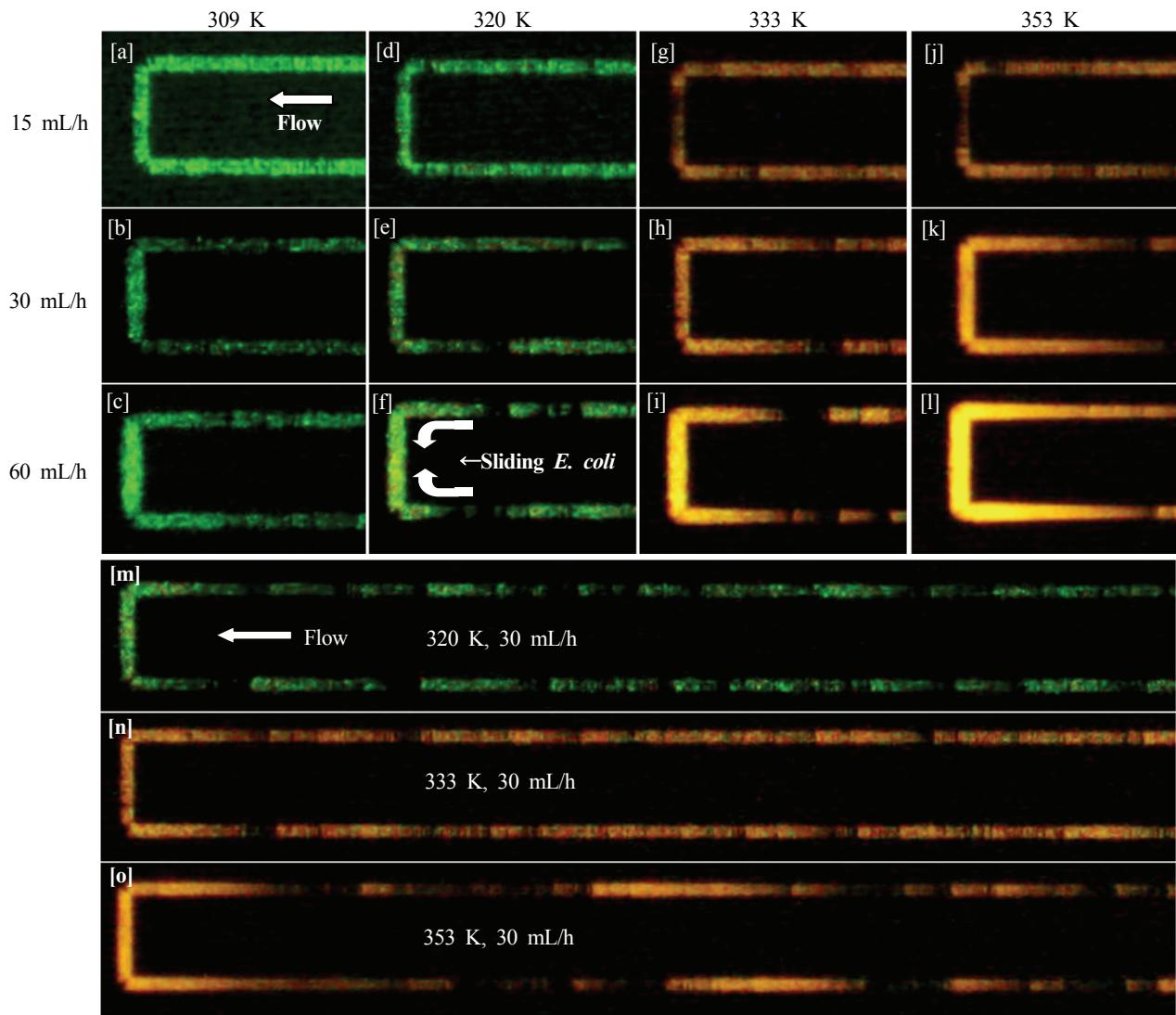


図 3  $\Delta G/\Delta G_{278}$  における流量依存性

Fig. 3 Flow rate dependence of  $\Delta G/\Delta G_{278}$  on heat treatment temperature.

図4 染色 *E.coli* に対するDEP捕集蛍光画像Fig. 4 Microscope images of heat treated and dying *E. coli*.

温度上昇に伴い減少した。高速流量の場合、 $F_{dep}$ と比較して、流速の作用が細菌の挙動に対して支配的になるため、高温処理 *E. coli* に対する電極上での保持力が低下したと推測される。一方、流量 15 mL/h の場合、 $\Delta G/\Delta G_{278}$  変動に対する処理温度依存性は比較的低いことが分かった。低速流量では、*E. coli* に作用する  $F_{dep}$  が支配的であるため、流速の影響による  $\Delta G/\Delta G_{278}$  変動要因は小さいといえる。ただし、30 mL/h 時と同様、320 K 時の  $\Delta G/\Delta G_{278}$  低下現象は当該流量でも発現した。

#### 4.2 染色 *E. coli* に対するDEP捕集特性

捕捉菌に対する生理活性状態を検証するため、LIVE/DEAD 染色した加温負荷 *E. coli* に対する DEP 捕集結果を図 4 に示す。309 K 処理試料[a]–[c]では、膜損傷・破壊を示す橙色または赤色蛍光 *E. coli* は殆ど確認されなかった。前項 4.1 と同様、*E. coli* は DEP 実験開始後から電極近傍に捕捉され、ギャップ間に pearl chain を形成した。

DEPIM 計測時に  $\Delta G$  低下が確認された 320 K 処理試料 [d]–[f] では、損傷菌と正常菌が混在した状態で電極間に捕捉された。ただし、30 mL/h 以上の流量において、捕捉 *E. coli* の一部が、液体の流れに従い電極折り返し部まで滑走し集積する現象が見られた。この現象は、正常細胞膜に対して不透過性である DM が細胞膜損傷によって菌体内へ流入した結果、 $F_{dep}$  低下を引き起こしたことに基づくと推測される。また、これらの結果は、 $F_{dep}$  による保持力が大きく作用する常菌と、 $F_{dep}$  による保持作用の小さい損傷菌が混在した状態で pearl chain を形成した場合、ギャップ間における総合的な菌保持力を低下させる事を示唆している。333 K 処理試料[g]–[i] では膜損傷菌の含有率が増加した。それと同時に滑走現象は大きくなる傾向を示し、電極上における菌保持力は低下した。さらに 353 K 処理試料[j]–[l] では、多数の損傷菌が観察され、15 mL/h の低速流量においても、滑走現象が確認された[j]。320 K 以降で発生した

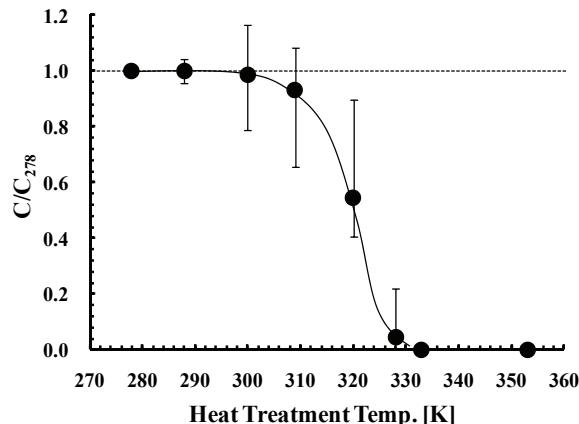
図 5 処理温度と *E. coli* の生育活性の関係

Fig. 5 Relationship between relative *E. coli* colony counts and heat treatment temperature.

滑走現象は、ギャップ間の各所で局在的に発生し、流速増加に従い顕著になることが観察結果から判明した[m]–[o]。低温処理(278–309 K)試料と比較して、333 K以降の高温処理試料における  $\Delta G$  挙動の特徴として、初期段階で  $\Delta G$  は上昇する一方で、最終的な  $\Delta G$  は低下する現象が挙げられる(図 2 ♪部参照)。このことから、顕著な菌滑走現象は電極間への保持力低下を誘発させる一方で、電極各所(特に電極折り返し部)において菌集積状態を発生させることにより、瞬発的な  $\Delta G$  増加を助長していると推測される。

前報において、 $\Delta G$  増加は電極間に捕捉される菌数に相關することが判明したが、捕捉菌の活性状態については不明であった。今回、染色菌を用いることにより、100 kHz という印加条件において、生死菌は混在状態で捕捉され、その割合は処理温度に相關することが明確になった。

#### 4.3 細菌生育能力と処理温度の相関

処理温度間の生育能力を比較するため、278 K時のコロニー生育数を基準とした相対コロニー生育数( $C/C_{278}$ )を図 5 に示す。278–298 K の範囲では生育数に大きな差異は見られず生育能力は保持された。その後 320 K における  $C/C_{278}$  は 0.55 となり、333 K 以上の温度では完全に失活し生育不能となった。培養法は単純な菌の生育活性を評価しているといえる。

#### 4.4 蛍光分光法による膜損傷の定量解析

加温処理 *E. coli* に対する LIVE/DEAD 染色法による蛍光強度スペクトル計測結果を図6に、各スペクトルから得られた各蛍光強度領域面積と 30 mL/h における  $\Delta G_{900}$  の関係を図7に示す。 $\Delta G$  低下が発現した320 Kにおいて、SYTO9 蛍光(○)及びPI 蛍光(◆)は、ともに高強度を示した。上述の培養法による生育活性実験から、生育不可となった多数の損傷菌が発生していることが分かる(図3)。その一

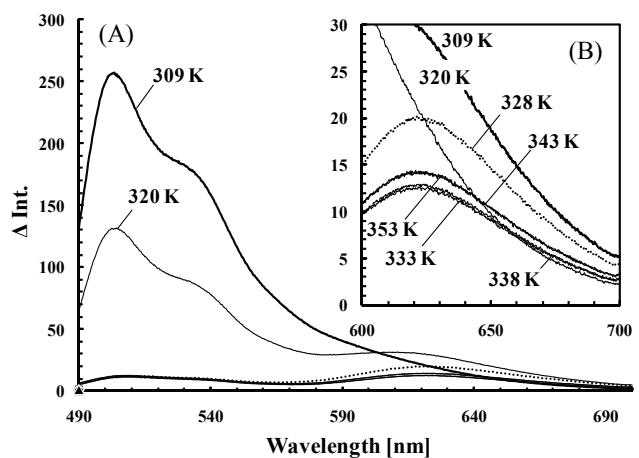
図 6 LIVE/DEAD 染色法による各加温処理 *E. coli* の蛍光スペクトル解析

Fig. 6 Fluorescence spectra of membrane viability of various heat treatment *E. coli* by LIVE/DEAD test.

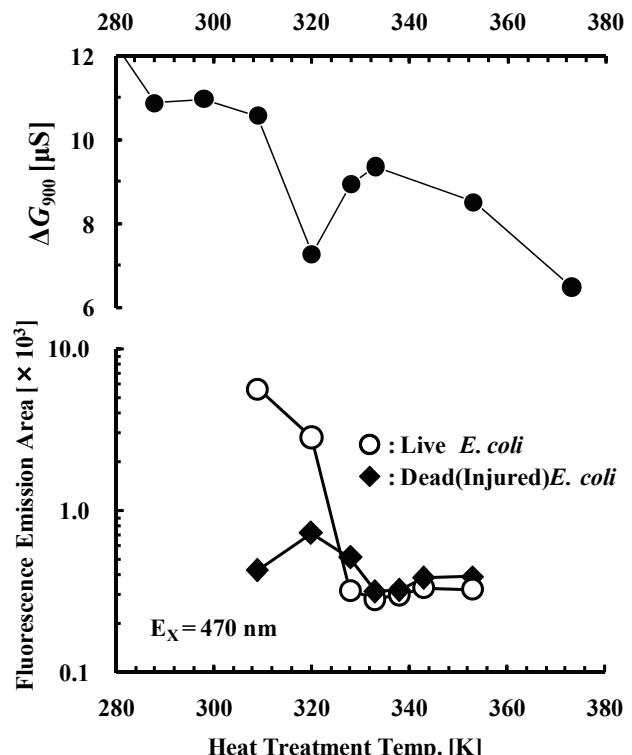
図 7 蛍光強度と DEPIM における  $\Delta G_{900}$  との相関

Fig. 7 Relationship between  $\Delta G_{900}$  and fluorescence intensity of LIVE/DEAD on heat treatment temperature.

方で、図7の結果は、膜正常菌については細胞膜を介した物質の流入出が活性化されていたことを示唆している。320 K 処理時における膜浸透性の増加傾向は、過去に実施した CTC 染色法による呼吸活性計測でも同様の結果を得ている<sup>12)</sup>。前項4.1において、生死菌の混在状態が  $F_{dep}$  による電極間の保持力低下を引き起こす可能性を示したが、320 K 処理における  $\Delta G$  低下現象は、これに加えて正常菌

の呼吸活性化による $F_{dep}$ 低下も複合要因として影響していると推測される。333 K処理ではSYTO9、PIとともに蛍光強度が低下した。**3.4**で示した通り、SYTO9は膜活性によって菌体内に流入し、PIは膜損傷が発生した際に菌体内へ取り込まれる。上記の分析結果は、当該加温処理工程の初期段階で膜活性能力が急激に低下したため、両染色剤が菌体内に十分取り込まれなかつたことを意味し、333 K処理では多数の *E. coli*において菌体内物質が初期段階から保持された可能性を示唆する。その結果、320 K時と比較して $\Delta G$ 低下が抑制されたと推測される。ただし、培養実験結果から、菌自体は不活されていることが分かる。一方、353 K処理では、333 K処理時と比較して、僅かにSYTO9、PIとともに蛍光強度は上昇した。本結果は、同様に加温処理初期の段階で急激な膜活性低下が発生した一方で、膜損傷を惹起された *E. coli*も多数発生したことを示唆しており、結局 $\Delta G$ は再度減少傾向を示している。

以上より、DEPIM計測における複雑な $\Delta G$ 変動は、単に細菌の生死状態を示すものではなく、計測時の膜浸透性作用を反映していると考えられる。さらに、電極上での流速を変動させることにより、培養法と同等の細菌の活性・不活(生死)状態をリアルタイムで解析することができると考えられる。

## 5. まとめ

筆者らは前報において、DEPIM法を応用した細菌の代謝活性評価システム構築を目的として、加温処理 *E. coli*に対するDEPIM計測を行い、周波数特性及び処理温度依存性を調査した。その結果、処理温度の増加に伴いDEPIMにおける $\Delta G$ は低下する傾向を示した。これは、 $\Delta G$ が *E. coli*の生育活性状態と相關することを示すものである。

本報では、DEPIMにおける $\Delta G$ 変動要因を更に精査するため、新たに加温処理条件、DEPIM計測条件、流量条件及び各種生物学的実験条件を加え、加温負荷が *E. coli*に与える影響を調査した。その結果、320 K処理試料において、一時的な $\Delta G$ 低下を見出した。ただし、この現象は高速流量では見られなかった。このことは、 $\Delta G$ 変動が $F_{dep}$ 及び流速要因の複合的な影響を受けることを意味している。

以上より、*E. coli*の生死のみならず、計測時における菌体内状態及び細胞膜を介した物質輸送活性等の複合的変化がDEPIM計測結果に反映されている事が明確になった。今後、菌株の異なる *E. coli*を用いて同様の実験を行

い、菌株の相違が $\Delta G$ に与える影響を調査する。更に、*E. coli*のほか、実際の発酵工程を想定し、麦酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae* JCM 7255)に対するDEP特性検証を実施している<sup>19)</sup>。各実験結果を検証することによって、将来的にはDEPIM計測を基礎とした、細菌の代謝活性状態をリアルタイムでモニタリングできるものと期待される。

## 参考文献

- 厚生労働省食中毒統計、平成20年食中毒発生状況、厚生労働省 (2010)
- L. Vanne, M. Karwoski, S. Karppinen and A.-M. Sjoberg : Food Control, **7** (1996) 263
- 箱田優、脇坂嘉一、三井信一、北島信義：静電気学会誌, **29** (2005) 8
- 鈴木雅登、安川智之、珠玖仁、末永智一：分析化学, **54** (2005) 1189
- J. Suehiro, R. Yatsunami, R. Hamada and M. Hara : J. Phys. D: Appl. Phys., **32** (1999) 2814
- J. Suehiro, R. Hamada, D. Noutomi, M. Shutou and M. Hara : J. Electrostat., **57** (2003) 157
- D. W. E. Allsopp, K. R. Milner, A. P. Brown and W. B. Betts : J. Phys. D: Appl. Phys., **32** (1999) 1066
- 米澤岳志：生物工学, **78** (2000) 152
- K. Asami and T. Yonezawa : Biochim. Biophys. Acta, **1245** (1995) 99
- K. Asami, T. Hanai and N. Koizumi : J. Membrane Biol., **28** (1976) 169
- 円城寺隆治、尼子恵里、内田 諭、朽久保文嘉：静電気学会誌, **31** (2007) 8
- 尼子恵里、圓城寺隆治、内田 諭、朽久保文嘉：電会誌E, **128** (2008) 499
- 圓城寺隆治、内田 諭、朽久保文嘉：平成21年電気学会全国大会講演論文集, **3** (2009) 188
- H. A. Pohl: *Dielectrophoresis*, Cambridge Univ. Press, New York (1978)
- 静電気学会：静電気ハンドブック、オーム社 (1998)
- H. A. Pohl: J. Appl. Phys., **22** (1951) 869
- 末廣純也：電学誌, **121** (2001) 547
- F. Joux, P. Lebaron: Microbes and Infection, **2** (2000) 1523
- 圓城寺隆治、内田 諭、朽久保文嘉：第22回バイオエンジニアリング講演会講演集, p.286 (2010)