

## 誘電泳動速度計測による加熱処理酵母の膜変性評価

高澤 晋\*, 白井 直機\*, 内田 諭<sup>\*,1</sup>, 朽久保 文嘉\*

(2013年9月10日受付; 2013年10月28日受理)

Investigation of Membrane Degeneration for Heat-Treated Yeast  
by Dielectrophoretic VelocimetryShin TAKAZAWA\*, Naoki SHIRAI\*, Satoshi UCHIDA<sup>\*,1</sup> and Fumiyoshi TOCHIKUBO\*

(Received September 10, 2013; Accepted October 28, 2013)

Constant monitoring and detailed inspection of microbial metabolism have been required for advanced quality control in food industry and medical practice. In the present work, the change in membrane states for injured *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) with heat treatment was investigated using dielectrophoretic (DEP) velocimetry in a micro-cell. Fluorescent observation of stained *S. cerevisiae* showed gradual destruction of the membrane structure by heat treatment. Numerical analyses of Clausius-Mossotti function for various electrical parameters clarified that DEP velocity depends strongly on inner-wall conductivity from 0.1 to 1 MHz and cytoplasmic conductivity from 1 to 10 MHz. These results suggest that DEP velocimetry would be available for rapid and simple estimation of the metabolic states.

## 1. はじめに

醸造や燃料生成などのバイオ製造業では、品質保持や性能向上を目的とした発酵工程の精密制御において、菌代謝状態の常時管理が必須となっている。また、医療現場においては、薬剤耐性菌への対応として、薬種薬量の感受特性を菌体ごとに十分把握する必要がある。これらの各課題における効率化の観点から、菌体の代謝状態を迅速かつ簡便に監視できる自動化システムの開発が望まれている。

微生物試験の公定法は現在のところ、培養法を基本としている。しかしながら、本手法では測定に多大な時間を要する。生化学手法であるアデノシン三リン酸 (Adenosine Triphosphate; ATP) 法は、短時間での簡易的な代謝判定を可能とするが、周辺環境に存在する ATP と区別することが困難である。他に、フローサイトメトリなどの蛍光分光法があるが、高精度な計測には高価な試薬及び分析装置が不可欠となる。

最近、効果的な菌検出法として、誘電泳動 (Dielectrophoresis; DEP)<sup>1-3)</sup> を利用した電氣的計測法に期待が集まっている。実際に本手法は簡易な代謝計測技術として用いられている。Jen らは、誘電泳動力の違いを

利用した生死菌分離<sup>4)</sup>、Villanueva らは、生死微細藻類の分離<sup>5)</sup>を行っている。Gascoyne らは血液細胞から同径のがん細胞を誘電特性の違いから分離精査している<sup>6)</sup>。また、円城寺らは、誘電泳動により捕集した大腸菌や酵母のインピーダンス計測値から、その代謝状態を間接的に評価している<sup>7-9)</sup>。これらの手法は、従来の代謝計測法と比較して、選択性、迅速性及び簡便性に極めて優れている。ただし、十分な検出感度を得るためには一定以上の捕集量が必要であり、高導電媒質への適用は難しいといった問題点がある。

そこで筆者らは誘電泳動力と代謝状態のより直接的な相関について検討するため、画像解析による誘電泳動速度計測に着目した。本手法は原理的に単一粒子から適用でき、様々な泳動方向の計測が可能であるため、極微量検体や高導電媒質に対しても有効である。

本研究では、誘電泳動速度計測から菌体の代謝状態を評価できる新たな生体粒子計測システムの構築を目的としている。本報では、その基礎的段階として、加熱処理により代謝状態の異なる酵母を実験的に調整し、誘電泳動速度の処理温度特性を調査した。また、蛍光染色による膜代謝計測及び電気定数変化の数値解析から、酵母の膜活性及び膜損傷度と誘電泳動速度の相関を定量的に検証した。

キーワード：誘電泳動、速度計測、加温処理、酵母、マイクロセル

\* 首都大理工

(〒192-0397 東京都八王子市南大沢 1-1)

Tokyo Metropolitan University, 1-1 Minami-Osawa, Hachioji,  
Tokyo 192-0397, Japan<sup>1</sup> s-uchida@tmu.ac.jp

## 2. 原理

## 2.1 誘電泳動

誘電泳動とは、不均一電界中において分極した誘電粒子が電界勾配に沿って泳動する動電現象である。誘電泳動力は次式で表せる。

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

ここで,  $r$  は粒子半径,  $E$  は電界の平均二乗根である. また,  $\hat{K}(\omega)$  は界面の分極状態を表す Clausius-Mossotti (CM) 関数であり, 以下の式で表せる.

$$\hat{K}(\omega) = \frac{\hat{\epsilon}_p - \hat{\epsilon}_m}{\hat{\epsilon}_p + 2\hat{\epsilon}_m} = \frac{\epsilon_p - \epsilon_m - j(\sigma_p - \sigma_m)/\omega}{\epsilon_p + 2\epsilon_m - j(\sigma_p + 2\sigma_m)/\omega} \quad (2)$$

ここで,  $\hat{\epsilon}$ ,  $\hat{\sigma}$  及び  $\hat{\sigma}$  は複素誘電率, 誘電率及び導電率である. なお, 添字 p 及び m は粒子及び媒質を表す.  $\text{Re}[\hat{K}(\omega)]$  が正值の場合, 電界強度の強い方へと力が働く正の誘電泳動が, 負値では逆方向に負の誘電泳動が生じる.

## 2.2 誘電泳動速度

対象粒子に対する重力や浮力の影響が十分に小さいと見なせるとき, 流体中における粒子の運動方程式は以下のとおりとなる.

$$m \frac{v(t)}{dt} = F_{\text{DEP}} - F_{\text{drag}} \quad (3)$$

なお,  $m$  は粒子質量,  $F_{\text{drag}}$  は粘性力である.  $F_{\text{drag}}$  は次式で表せる.

$$F_{\text{drag}} = 6\pi r \eta v \quad (4)$$

ここで,  $\eta$  は媒質の粘性率である. 速度の緩和時間が十分に短いとき,  $F_{\text{DEP}}$  と  $F_{\text{drag}}$  が釣り合うため, 誘電泳動速度  $V_{\text{DEP}}$  は以下のように表せる.

$$V_{\text{DEP}} = \frac{r^2 \epsilon_m \text{Re}[\hat{K}(\omega)]}{3\eta} |\nabla E|^2 \quad (5)$$

上式より, 誘電泳動速度は二乗電界勾配及び二乗半径に比例する. よって, 誘電泳動速度, 電界分布及び粒子径が得られれば,  $\text{Re}[\hat{K}(\omega)]$  が導出され, 細胞状態を電気定数変化として間接的に評価できる.

## 3. 実験方法

### 3.1 菌種及び調製方法

対象菌種として, *Saccharomyces cerevisiae* JCM 7255 (*S. cerevisiae*, 理研バイオリソースセンター) を選定した. 培地にはポテトデキストロス寒天培地 (Potato dextrose agar, MERCK) を使用し, 301 K (28°C), 72 h の条件で増菌培養した. 培養酵母を滅菌済み 0.1 M D-マンニトール (DM) 溶液 1 mL に適量混和させた後, 遠心分離 (6,000 rpm × 10 min) を行い, 分離沈殿した酵母を同 DM 溶液で 2 回洗浄した. 洗浄済み酵母を, 新たな DM 溶液に混和したものを懸濁原液とした. なお, 懸濁原液の菌濃度は分光光度計 (UV mini 1240, 島津製作所) における吸光特性から導出し,  $2.5 \times 10^5$  CFU/mL であった. この時, DM 溶液及び懸濁原液の導電率は, 0.2 mS/m 及び 0.25

mS/m となった.

### 3.2 加熱処理工程

本実験では, 代謝活性の異なる菌を調製する手段として, 加熱処理によるストレス負荷を用いた. 28°C で保管した懸濁原液 1.5 mL を, 滅菌済みスクリーチューブに分取した後, ウォーターバス (HWA-50D, AS ONE) で加熱した.

### 3.3 誘電泳動速度計測

図 1 に本実験で用いた誘電泳動速度計測装置を示す. 本装置は誘電泳動デバイスを中心に電気回路系, 媒質送液系及び光学計測系で構成されている. 電源として, DEP デバイスの電極端子にファンクションジェネレータ (AFG3012, Tektronix) を接続した. また, DEP デバイス内への懸濁液搬送には, シリンジポンプ (KSP-111, KYOTO CHROMATO) を使用した. なお, 泳動濃縮による初期菌濃度変化の影響を除外するため, 送液路は循環型とせず, 通過型とした. DEP デバイス内における菌挙動撮影のために, 工業顕微鏡 (LV-100D-U, Nikon), 高速度 CCD カメラ (HAS-220, DITECT) 及び画像解析用パーソナルコンピュータを設置し, 菌挙動部へ焦点が合うように調整した.

図 2 に本実験で用いた誘電泳動デバイスを示す. 本デバイスは, 電極基板, マイクロ流路及びデバイスホルダからなる. 電極は石英基板上へ酸化インジウムスズ (Indium Tin Oxide; ITO) を蒸着形成してあり, さらに  $\text{SiO}_2$  の絶縁薄膜を積層している. 電極構造としては, 図 3 に示すように  $500 \mu\text{m}$  (L) ×  $240 \mu\text{m}$  (W) の薄膜電極が電極間隔  $20 \mu\text{m}$  で二枚配置されているものを使用し

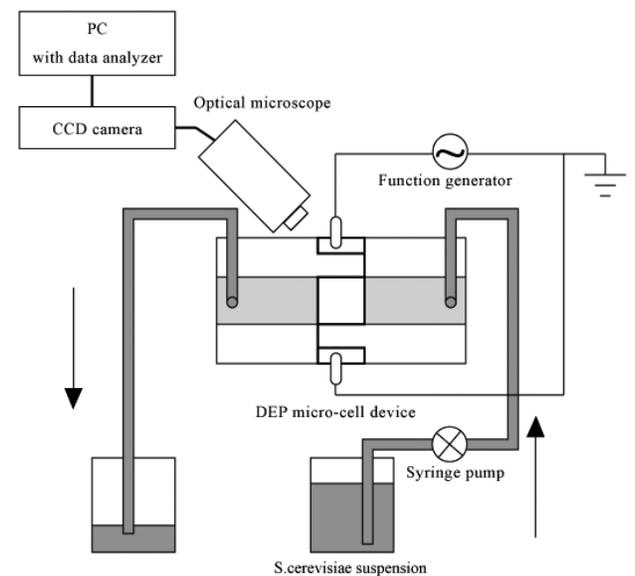


図 1 実験装置の概略図

Fig. 1 Schematic of the present experimental apparatus.

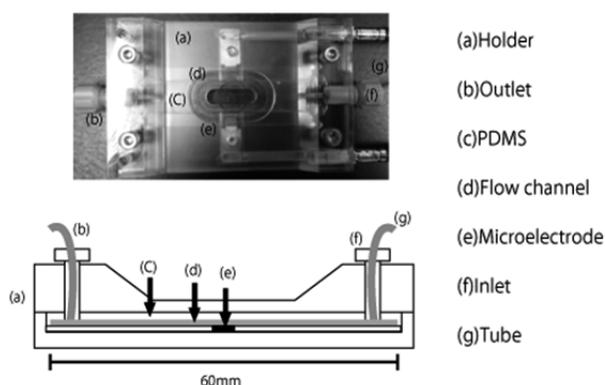


図2 誘電泳動デバイス  
Fig. 2 Dielectrophoretic microdevice.

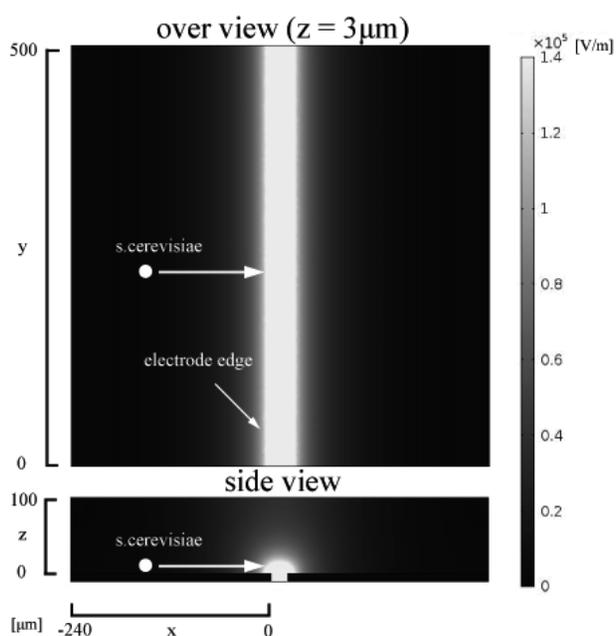


図3 電極上の電界分布  
Fig. 3 Spatial distribution of electric field on electrodes.

た。流路は軟性ポリジメチルシロキサン製で、設計仕様は 55 mm (L) × 2.4 mm (W) × 0.5 mm (T) である。

実験手順としては、初めに加熱処理を施した酵母懸濁液を誘電泳動デバイスの流路内に通流して充満させた。次に通流を止めて、レンズの焦点を流路底面に合わせた後、酵母が電極上に到達するのを確認した。そして、ファンクションジェネレータを用いて、振幅 10 Vpp の電圧を印加した。CCD カメラで酵母の挙動を撮影後、図3に示すように、電極端より 55 μm の位置から電極間方向へ 10 μm 移動した距離を計測し、解析画像ソフトウェア (DIPP Motion PRO 2.2, DITECT) により速度を導出した。その後、連成物理解析ソフトウェア (COMSOL Multiphysics 4.3, COMSOL) を用いて、電極付近の電界分布を求めた。なお、各処理条件に対して 10 サンプルの平均値を取り、2 回以上の工程を繰り返して測定した。

### 3.4 蛍光染色による膜代謝計測

LIVE/DEAD<sup>®</sup> 染色キット (L13152, Invitrogen) を用いて菌染色を行い、前出の顕微鏡で蛍光観察した。本キットは、SYTO<sup>®</sup>9 及び propidium iodide (PI, C<sub>27</sub>H<sub>31</sub>I<sub>2</sub>N<sub>4</sub>) の核酸染色剤からなり、一般には生死菌判別に用いられる。菌に膜損傷がない場合、膜透過性のある SYTO<sup>®</sup>9 のみが内部に取り込まれ、DNA が緑染色される。膜損傷がある場合、膜透過性のない PI も内部に取り込まれ、核 DNA が赤染色される。

具体的な手順としては、初めに各処理試料 1.45 mL に純水で調整した 30 μL の SYTO<sup>®</sup>9 と 20 μL の PI を混和した。次に遮光して常温保管した試料を誘電泳動デバイスの流路内に充満させて顕微鏡観察した。観察時の蛍光色から膜活性及び膜損傷度を推定した。なお、各処理における酵母の膜損傷度は、デジタル画像色解析システム (Feelimage Analyzer 1.3.2.3, VIVA Computer) を用いて、撮影画像内の SYTO<sup>®</sup>9 と PI の発光色割合から評価した。

## 4. 結果及び考察

### 4.1 誘電泳動速度計測の妥当性評価

本実験条件下における誘電泳動速度計測の妥当性を評価するために、本節では二乗電界勾配 ( $\nabla E^2$ ) と二乗半径 ( $r^2$ ) に対する依存性を検証する。まず、電極端からの距離と  $\nabla E^2$  の関係を導出した。図4に示す通り、電極端に近づくにつれて  $\nabla E^2$  は指数関数的に増加した。未処理 (28°C) 時における各位置での誘電泳動速度を計測し、図4を基準に  $\nabla E^2$  依存性として表したものが図5である。ここで、駆動周波数は 100 kHz とし、粒子半径 2.5 μm の酵母のみを選定した。  $\nabla E^2$  の増加にともない、誘電泳動速度が線形的に増加することがわかる。なお、速度分

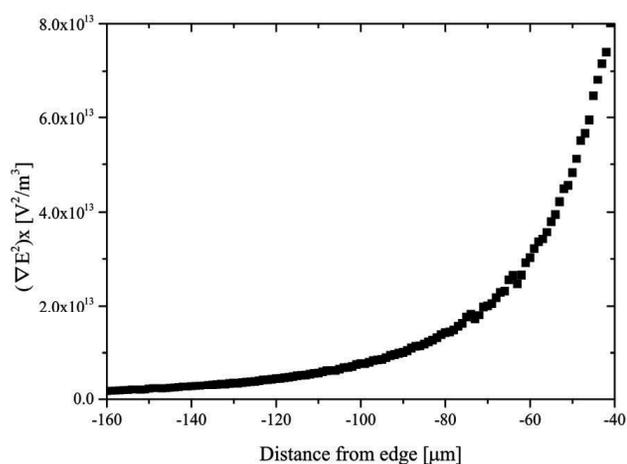


図4 電極端からの距離と  $\nabla E^2$  の関係  
Fig. 4 Relationship between  $\nabla E^2$  and distance from edge of electrode.

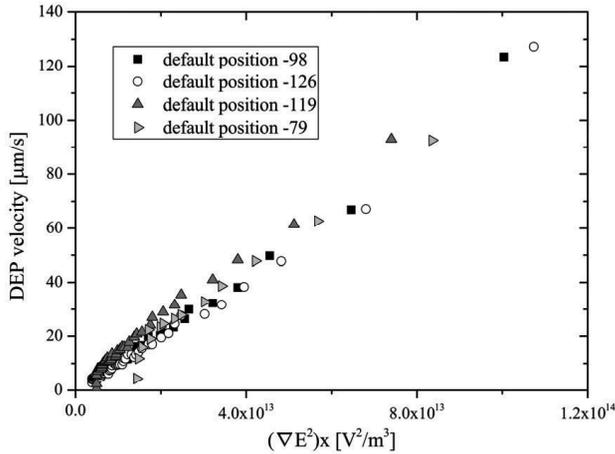


図5 誘電泳動速度の  $\nabla E^2$  依存性  
Fig. 5 Dependence of DEP velocity on  $\nabla E^2$

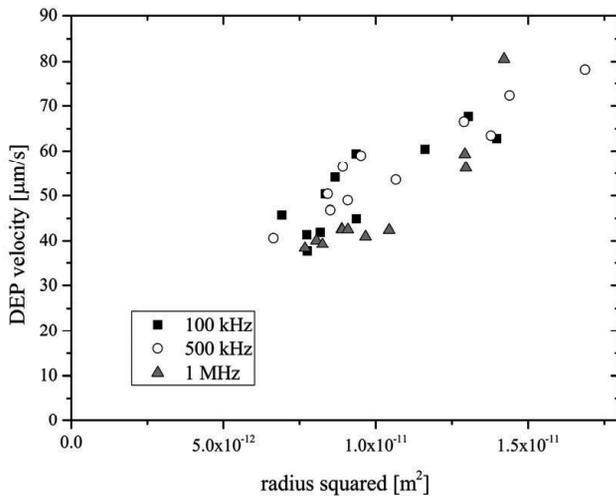


図6 誘電泳動速度の二乗半径依存性  
Fig. 6 Dependence of DEP velocity on radius squared.

布は電圧印加開始時の位置に依存しなかった。図6に未処理 (301K, 28°C) 時の酵母における誘電泳動速度の  $r^2$  依存性を示す。  $r^2$  の増加とともに誘電泳動速度は線形的に増加した。

以上の結果より、速度の緩和時間が十分に短く、基板上における摩擦の影響も小さいと推察される。すなわち、本実験条件下における誘電泳動速度計測では、式(5)を満たしている。そこで次節以降では、速度実測値に対して粒子半径  $2.5 \mu\text{m}$  を基準に規格化補正した結果について考察する。

#### 4.2 誘電泳動速度の加熱処理特性

本節では、加熱処理により酵母の代謝状態を変化させて誘電泳動速度を計測した結果を考証する。図7は301 K (28°C, 未処理), 320 K (47°C), 333 K (60°C) 及び 353 K (80°C) で 15 min 加熱処理した場合の周波数特性である。

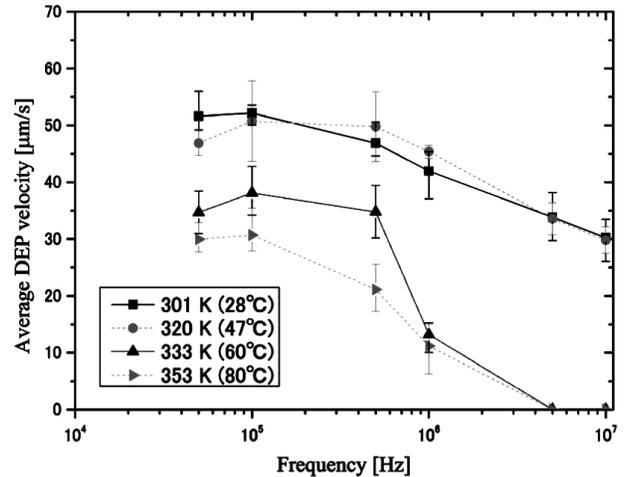


図7 各処理温度における平均誘電泳動速度の周波数特性  
Fig. 7 Frequency characteristics of average DEP velocity for various heat treatment temperatures

未処理では、100 kHz で速度が最大となった後、周波数の増加とともに減少した。処理温度が 47°C の場合は、100 kHz で僅かな減少が見られるものの、本実験条件下では加熱処理時間を増やしても未処理時と大きな違いはなかった。60°C では、計測した周波数領域全体で速度が大きく減少した。なお、5 MHz 以降では酵母が動かなかったか、負の誘電泳動により電極の逆方向へ移動したため、速度は  $0 \mu\text{m/s}$  とした。80°C では、60°C と比較して低周波領域の速度が更に減少した。高周波領域では 60°C の場合とほぼ同じ速度となった。なお、各条件の誤差は低速度 (80°C, 1 MHz) の場合を除き 0 - 20% の範囲内であり、一定の再現性が確認された。

次に、低周波領域と高周波領域における速度変化の違いを検証するため、処理温度に対する誘電泳動速度の経時変化を調査した。処理温度は各周波数とも 301 K (28°C, 未処理), 309 K (36°C), 320 K (47°C), 333 K (60°C) 及び 353 K (80°C) とした。図8及び図9に周波数 100 kHz 及び 1 MHz における速度変化を示す。100 kHz において、28°C から 47°C までは処理時間を増加させても速度に大きな変化が見られなかった。60°C では、10 min 以降で速度の減少が確認された。80°C では、5 min から 10 min にかけて僅かな速度上昇が見られるが、加熱直後と 15 min の速度が  $30 \mu\text{m/s}$  で一定となったので、誤差範囲と考えられる。

1 MHz の場合、28°C から 36°C では 100 kHz と比べて若干速度が減少しているが経時変化は見られなかった。47°C では、加熱直後から緩やかな速度減少が始まり、10 min 以降では減少が僅かなものとなった。60°C では、加熱直後から急激に速度が減少し、15 min 処理時では

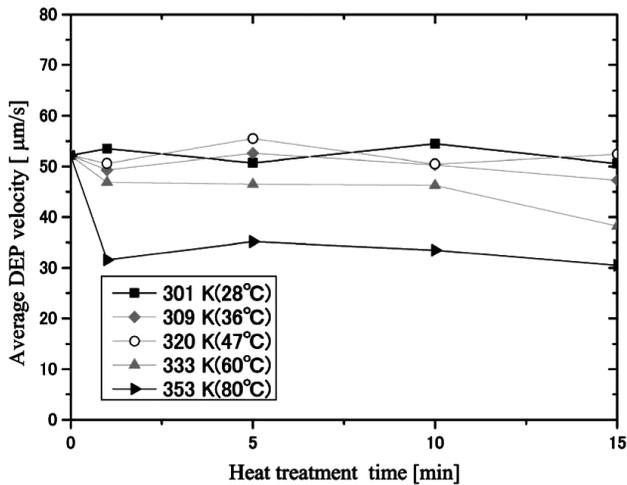


図8 各処理温度における平均誘電泳動速度の経時変化 (100 kHz)

Fig. 8 Temporal change in average DEP velocity at 100 kHz for various treatment temperatures.

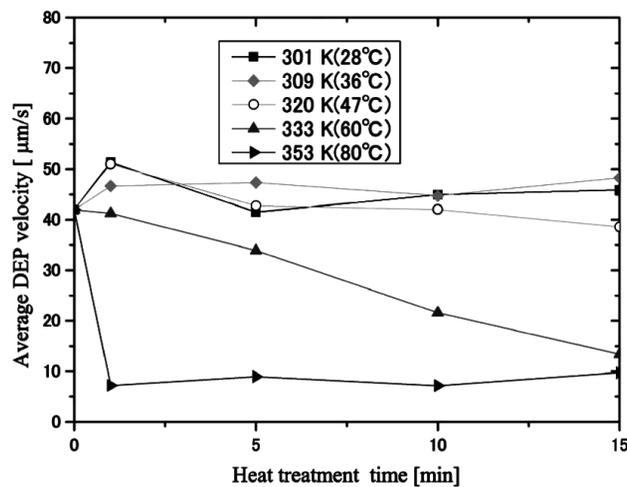


図9 各処理温度における平均誘電泳動速度の経時変化 (1 MHz)

Fig. 9 Temporal change in average DEP velocity at 1 MHz for various treatment temperatures.

80°C の速度とほぼ同じ値となった。80°C では加熱直後から速度が 10  $\mu\text{m/s}$  となり、経時変化は見られなかった。

以上より、誘電泳動速度は加熱処理時間や温度、及び駆動周波数によって異なることが示された。本結果から、加熱処理による菌電気定数の変化が、式(5)の  $\text{Re}[\hat{R}(\omega)]$  の変動として検出できていると考えられる。

また、60°C 処理時における誘電泳動速度の規格化度数分布を図 10 に示す。図 10(a) は 60°C、100 kHz 時の分布である。分布は広がりを持っていることが分かる。10 min 処理以降では高速域が急激に減少し、分布が低速域に移動している。図 10(b) の 1 MHz 時では速度分布が徐々に低速側へ変化している。初期速度は 40 – 50  $\mu\text{m/s}$  に集中しているが、5 min 処理時で一次的に 30  $\mu\text{m/s}$  付

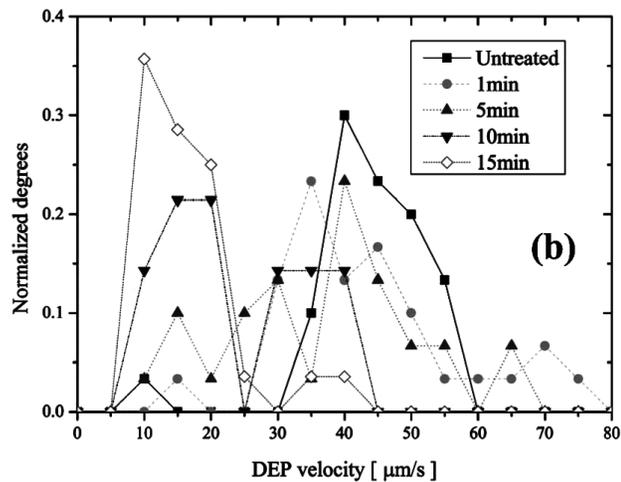
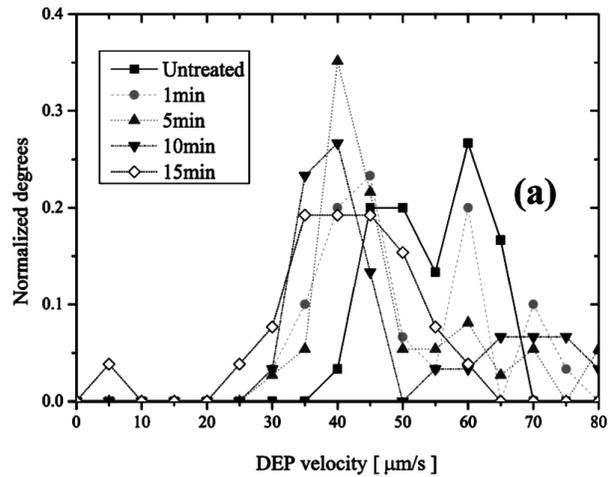


図 10 誘電泳動速度の規格化度数分布 (60°C)

Fig. 10 Normalized degrees of DEP velocity at 60°C, (a) 100 kHz, and (b) 1 MHz.

近の速度が増加している。その後 10 min 処理以降では 10 – 20  $\mu\text{m/s}$  の低速域に分布を持っている。図 10 (a) と図 10 (b) を比較すると、100 kHz の場合よりも 1 MHz 時の速度分布の方が狭くなっている。分布の変位は酵母の異なる部位の変化によるものだと考えられる。

### 4.3 膜活性及び膜損傷度の実験的検証

加熱処理温度と代謝状態の相関を精査するために、蛍光染色による膜活性及び膜損傷度を計測した。図 8 及び 9 より、60°C において 100 kHz と 1 MHz において速度変化に大きな差が出たため、本温度の蛍光観察を行った。加熱処理を施した酵母の LIVE/DEAD<sup>®</sup> 染色画像を図 11 に示す。60°C、1 min 処理時には生菌の割合が多いが、10 min 以降は PI により赤発色する死菌の増加が確認された。これは細胞壁及び細胞膜に損傷が生じ、細胞膜を介しての物質流動が殆ど行われなくなったためである。

図 12 は、蛍光画像における菌の発色状態から生菌、死菌、及び損傷菌の存在割合を定量化したものである。緑色発光しているものを生菌、赤色発光のものを死菌、

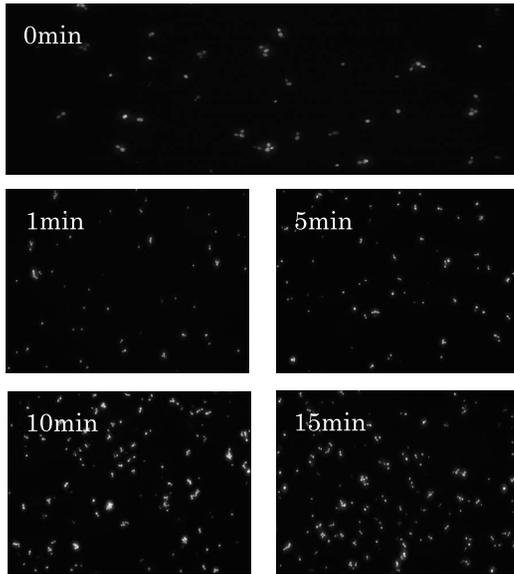


図 11 加熱処理を施した酵母の LIVE/DEAD® 染色画像  
Fig. 11 Image series of heat-treated *S.cerevisiae* dying by Live/Dead® BacLight™ Bacterial Viability Kit. (60°C)

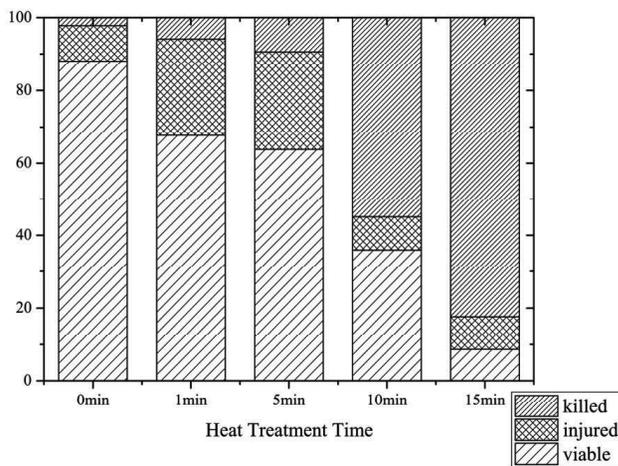


図 12 膜損傷菌の存在割合 (60°C)  
Fig. 12 The proportion of membrane-injured *S.cerevisiae*. (60°C)

それ以外を損傷菌とした。生菌の割合は、未処理時で約 90%以上の割合を占めたが、1 min, 5 min, 10 min, 及び 15 min では 67%, 63%, 35%, 及び 9%と減少していった。大きく減少したのは 10 min 処理時であった。死菌の割合は、生菌とは逆に 2%, 6%, 10%, 54%, 及び 82%と処理時間とともに増加した。本観測結果は、加熱処理により酵母は外側から徐々に損傷を受け、最終的に細胞質まで破壊されたことを示している。

#### 4.4 細胞電気定数の変動解析

誘電泳動速度と電気定数の相関を精査するため、 $\text{Re}[\hat{R}(\omega)]$ を数値的に導出した。酵母は細胞質、細胞膜、細胞内壁、及び細胞外壁で構成される四層球体としてモデル化した。各層の電気定数 (誘電率及び導電率) と厚み

表 1 四層細胞モデルの電氣的及び幾何学的パラメータ  
Table 1 Electrical and geometrical parameters of the four shelled yeast cell model from Ref. [10].

Region	Radius	$\epsilon_r$	$\sigma$ (S/m)
Cytoplasm	2.500	51	1
Membrane	2.508	5	$10^{-7}$
Inner wall	2.708	60	0.01
Outer wall	2.758	6	0.02
Suspension conductivity			0.2 mS/m

を Table 1 に示す。上記パラメータを個々に変化させて数値解析を行った結果、本実験における周波数領域 (50 kHz – 10 MHz) において細胞外壁、細胞内壁、及び細胞質の導電率に強く依存することを確認した。図 13 に細胞外壁、細胞内壁、及び細胞質の導電率が減少した場合における、 $\text{Re}[\hat{R}(\omega)]$ の周波数特性を示す。 $\text{Re}[\hat{R}(\omega)]$ の減少は、周波数 100 kHz – 1 MHz では細胞内壁の導電率変化が、1 MHz – 10 MHz では細胞外壁と細胞質の導電率が支配的となった。

4.2 及び 4.3 節の結果も踏まえて、加熱処理時の菌体における誘電泳動速度と細胞電気定数の相関について考察する。60°C の加熱処理において、処理時間が 5 min の時、高周波領域で速度が減少している。これは、加熱後すぐに細胞外壁が損傷を受けた結果、膜タンパクの変性や空隙の形成に起因して、その導電率が減少したと考えられる。これは、図 10(b)において 30  $\mu\text{m/s}$  の速度数が増加している事に対応している。10 min から 15 min の加熱では細胞内壁の損傷も生じ、測定周波数領域全体で速度が減少したと推察される。すなわち加熱処理において、酵母は外側から順次損傷し、外部媒質の流入により各層の導電率が変化したと言える。図 10(a)は細胞内壁の導電率変化に対応していると見られ、実際に 10 min 以降で高速度の酵母が減少している。

処理後 15 min では、誘電泳動速度は高周波側になるにつれて減少し、10 MHz では反転して負の誘電泳動が生じた。10 MHz では細胞質導電率の減少が著しい事から、高温処理により細胞膜及び細胞壁が完全に破壊されて、内部物質の漏洩及び外部媒質の流入が生じたと考えられる。本事象は蛍光染色実験による菌損傷割合の結果とも一致する。図 10(b)の 1 MHz における速度分布の変化も同様の影響によるものと推察される。

ただし、今回の結果では加熱時間 1 min における誘電泳動速度の低減や細胞膜の誘電率変化に対する影響までは十分に検証できなかった。今後、電気定数や厚みなどのパラメータ相互の複合的影響も精査してモデル化する必要がある。

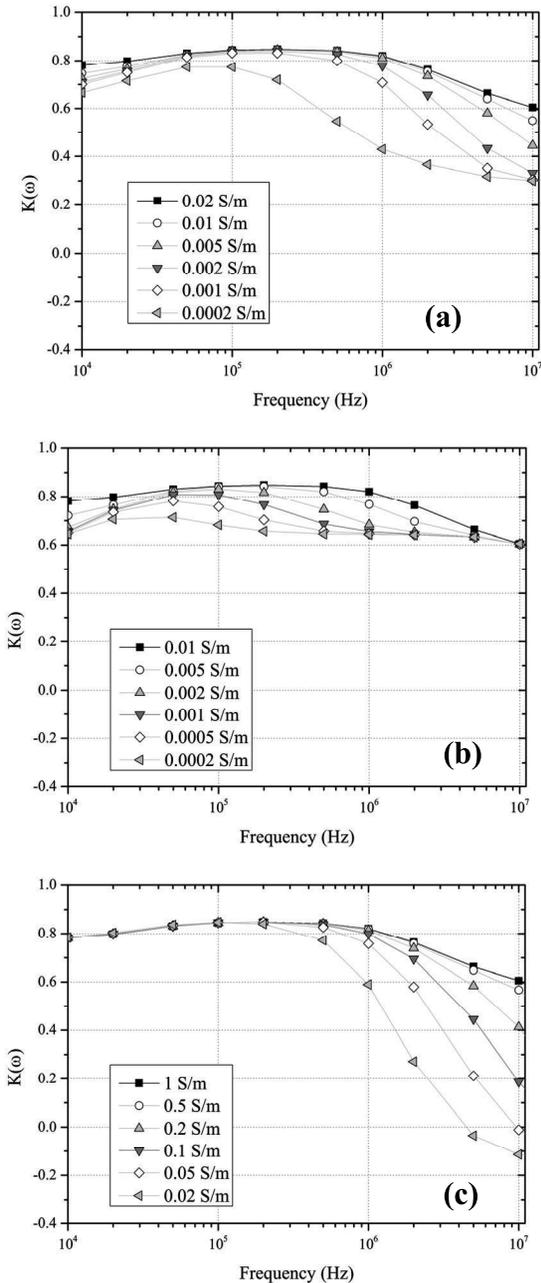


図13 導電率変化に対する  $\text{Re}[\bar{R}(\omega)]$  の駆動周波数特性 (a) 細胞外壁, (b) 細胞内壁, 及び (c) 細胞質

Fig. 13 Frequency Characteristics of  $\text{Re}[\bar{R}(\omega)]$  under various conductivities (a) outer wall, (b) inner wall, and (c) interior.

## 5. まとめ

誘電泳動速度計測を用いた微生物の代謝活性評価システムの構築を目的として, 加熱処理により酵母の代謝状態を変化させて誘電泳動速度計測を行い, その加熱処理温度に対する平均速度及び速度分布特性を調査した. さらに, 加熱処理に対する細胞壁及び細胞質損傷度を精査するため, 各処理を施した酵母に蛍光染色実験を行った. その結果, 加熱処理温度や時間を増加させると平均速度は減少し, 速度分布は低速側へ移動した. 蛍光染色実験

により酵母の膜構造は加熱処理により外側から徐々に破壊されることがわかった. また, 数値解析から, 細胞壁及び細胞質の損傷度による誘電泳動速度への影響が顕著になる周波数領域が存在することを定量的に示した. 本結果は, 評価対象に合わせて駆動周波数を適切に選択することにより, 菌の状態を高精度に評価できる可能性を示唆している.

今後, ATP 法や他の蛍光染色法などでも酵母の膜活性及び膜損傷度を計測し, 誘電泳動速度と代謝状態の相関について更に精査していく. また, 細胞壁及び細胞膜に影響を与えずに代謝状態を変化させる処理法を模索し, 同様の実験を行って本報の考察を検証する予定である.

## 参考文献

- 1) H. A. Pohl: The Motion and Precipitation of Suspensoids in Divergent Electric Fields. *J. Appl. Phys.*, **22** (1951) 869-871
- 2) H. A. Pohl and I. Hawk: Separation of Living and Dead Cells by Dielectrophoresis. *Science*, **152** (1966) 647-649.
- 3) H. A. Pohl : Dielectrophoresis, Cambridge Univ. Press, New York (1978) 350
- 4) C. P. Jen and T. W. Chen: Selective trapping of live and dead mammalian cells using insulator-based dielectrophoresis within open-top microstructures. *Biomedical Microdevices*, **11** (2009) 597-607
- 5) R. C. G. Villanueva, N. M. J. Pérez, J. I. M. López, A. Pacheco and B. H. L. Encinas : Assessment of microalgae viability employing insulator-based dielectrophoresis, *Microfluid Nanofluid*, **10** (2011) 1305-1315
- 6) P. R. C. Gascoyne, S. Shim, J. Noshari, F. F. Becker, and K. S. Hale: Correlations between the dielectric properties and exterior morphology of cells revealed by dielectrophoretic field-flow fractionation, *Electrophoresis*, **34** (2013) 1042-1050
- 7) 円城寺隆治, 尼子恵里, 内田 諭, 朽久保文嘉: インピーダンス計測法による損傷大腸菌の誘電特性解析. *静電気学会誌*, **31** (2007) 8-13
- 8) 尼子恵里, 圓城寺隆治, 内田 諭, 朽久保文嘉: 誘電泳動インピーダンス計測法を応用した熱損傷菌の代謝評価に関する基礎検討. *電気学会論文誌 E*, **128** (2008) 499-504
- 9) 圓城寺隆治, 内田 諭, 朽久保文嘉: 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. *静電気学会誌*, **35** (2011) 139-144
- 10) J. L. Sebastián, S. Muñoz, M. Sancho, and G. Martínez : Electromechanical effects on multilayered cells in nonuniform rotating fields, *Phys. Rev. E*, **84** (2011) 011926