J. Inst. Electrostat. Jpn.
論　文
静電気学会誌，**41**, 1（2017）39-44

マイクロ流路型誘電泳動分離装置を用いたiPS細胞とフィーダー細胞の連続分離

小林　研斗*，古澤　尚也*，脇坂　嘉一**，中島　崇仁***，箱田　優*, 1

（2016年9月29日受付；2016年12月7日受理）

Continuous Separation of MEF and iPS Cells Using a Dielectrophoresis Device with an Inclined Comb-shaped Electrode

Kento KOBAYASHI*, Naoya FURUSAWA*,
Yoshikazu WAKIZAKA**, Takahito NAKAJIMA*** and Masaru HAKODA*, 1

（Received September 29, 2016; Accepted December 7, 2016）

In this study, we examined the development of a cell separation device using a dielectrophoresis（DEP）phenomenon and the optimum conditions of the separation device were considered. DEP has two types of N-DEP and P-DEP, it can be controlled by the frequency of the AC voltage. The advantages of the DEP device are that the device is inexpensive and that a sample can be used without a label, such as fluorescence. The used DEP device consists of inclined comb-shaped electrodes and a micro-flow channel. The influences of the applied voltage, frequency and flow rate on the separation were considered. In this experiment, the mouse iPS cells and feeder cells（MEF）as sample cells were used. As a result of the experiment, the maximum difference of the recovery rate of two kinds of cells was 0.5.

1. はじめに

近年，山中らによる iPS 細胞を用いた再生医療などを始め，医療分野の発展が進んでいる．また，医療の発展に伴って，細胞培養や分離・分析操作には高い安全性が求められている．

細胞や生体分子を対象とする従来の分離・分析には，レーザーと蛍光標識を利用したセルソータなどの自動細胞分析装置が広く使用されている[1]．セルソータは分離・分析精度が高く，細胞処理速度が非常に速い利点を有している．しかし，これらの分析装置には，①装置の操作が複雑である ②装置コストが高い ③細胞の染色が必要である，などの問題点が挙げられる．

一方で，誘電泳動現象は細胞の特性評価や細胞分離技術として近年，注目されている技術である．誘電泳動現象を利用した細胞分離では細胞を非染色，非侵襲で分離が可能であること，装置コストが安価といった利点がある．しかし，分離性能の低さが問題となっている．著者らは，誘電泳動現象を利用した誘電泳動浮揚法を用いて，細胞の同定および活性の評価を行った[2-6]．さらに，誘電泳動を利用した分離装置を考案し，異種細胞の分離や生死細胞の分離の有効性を明らかにしている[7-14]．

他の研究者による誘電泳動の分離研究では，サンプルを電極に捕捉する方法であるため，比較的高い分離性能を達成できるが，連続的な分離操作は不可能であった．連続操作の研究例としては，供給流量を操作因子としてマイクロサイズの粒子の位置を制御するといった研究例が報告されている[15]．また，本報で使用した装置と類似した櫛歯状電極を用いた研究では，細胞の分離よりも分析に特化した研究が多い[16-19]．

そこで，本報では，傾斜櫛歯状電極を有した誘電泳動分離装置を用いて連続的な分離を行い，分離性能を向上させる実験条件の検討と将来の医療分野で使用可能な装置であるかの検討を行った．iPS 細胞は将来の再生医療において，様々な細胞への分化が可能なことから注目されている．しかし，iPS 細胞の培養にはフィーダー細胞と共培養することが必要である．そこで，マウス iPS 細胞とフィーダー細胞である MEF 細胞との 2 細胞を実用的なサンプルとして検討を行った．

キーワード：誘電泳動，マウス iPS 細胞，MEF 細胞

* 群馬大学大学院理工学府
（〒376-8515　群馬県桐生市天神町 1-5-1）
Graduated School of Science and Technology, Gunma University, 1-5-1, Tenjin-cho, Kiryu, Gunma, 376-8515, Japan
** 株式会社 AFI テクノロジー
（〒602-0841　京都市上京区梶井町 448-5）
AFI Technology Co. Ltd., 448-5, Kajii-cho Kamigyo-ku, Kyoto, 602-0841, Japan
*** 群馬大学大学院医学研究科
（〒371-8511　前橋市昭和町 3-39-22）
Graduated School of Medicine, Gunma University, 3-39-22, Showa, Maebashi, Gunma 371-8511, Japan
[1] hakoda@gunma-u.ac.jp

2. 誘電泳動現象の原理

誘電泳動現象（DEP）とは，不均一電場における粒子と周囲媒質の誘電率，電場勾配により粒子が泳動する現象のことである．誘電泳動力は印加する電場の大きさと周波数および粒子と周囲媒質の誘電率に依存する．

媒質より粒子の誘電率が大きいとき，粒子は強電場側に泳動し（正の誘電泳動；P-DEP），粒子より媒質の誘電率が大きいとき，粒子は弱電場側へ泳動する（負の誘電泳動；N- DEP）．

誘電泳動を受ける力 F_{DEP} は以下の(1)式から求めることができる．

$$F_{DEP} = 2\pi r^3 \varepsilon_m \mathrm{Re}[K(\omega)]\nabla E^2 \qquad (1)$$

ここで，r は粒子半径，ε_m は周囲媒質の誘電率，Re[$K(\omega)$]は Clasuius-Mossotti 関数の実部，∇E^2 は電場勾配である．

粒子の挙動を示す電極断面図を図 1 に示す．薄膜電極間に交流電圧を作用させると，粒子は N-DEP あるいは P-DEP を受けて泳動する．

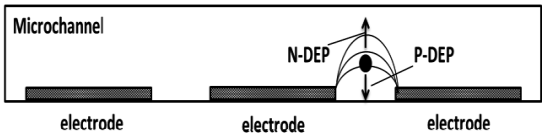

図 1　電極断面図
Fig.1　Electrode cross-sectional view.

3. 実験方法と手順

3.1　各細胞の培養

本実験ではサンプル細胞としてマウス iPS 細胞とフィーダー細胞であるマウス胎児線維芽細胞（MEF 細胞）を用いた．フィーダー細胞とは増殖や分化を起こさせようとする目的の細胞の培養条件を整えるために用いられ，補助役を果たす細胞を指す． MEF 細胞の培養には，DMEM（RNBF2905，SIGMA）に 10% FBS と硫酸ストレプトマイシン（PGLD，Meiji Seika ファルマ株式会社）100 mg/l およびペニシリン G カリウム（SSDN，Meiji Seika ファルマ株式会社）100 U/ml を 1%添加した培地を使用した． マウス iPS 細胞の培養には，MEF 細胞と同様の 500 ml 培地に細胞の増殖や生命活動の補助剤として NEAA（RNBF1070，SIGMA）を 5 ml，モノチオグリセロール 0.5 ml，未分化の状態に保持するための分化抑制剤として LIF（199-16051，Wako）0.5 ml 添加した培地を使用した． いずれの細胞も培養は 3 日間とし，毎日培地交換を行い，コンフルエントとなった状態で実験に使用した．また，37℃，5% CO_2 インキュベーターで培養を行い，細胞は群馬大学医学部より提供された．

3.2　傾斜櫛歯状誘電泳動分離装置

本実験では傾斜櫛歯状電極を設置した誘電泳動分離デバイス（㈱ AFI テクロノジー）を用いた．使用したデバイスのイラスト図を図 2(a)に，実際のデバイスを(b)に示す．本デバイスは表 1 に示された 2 つのタイプのデバイスを用いて実験を行った．いずれも合流部分の流路幅は 1.5 mm である．

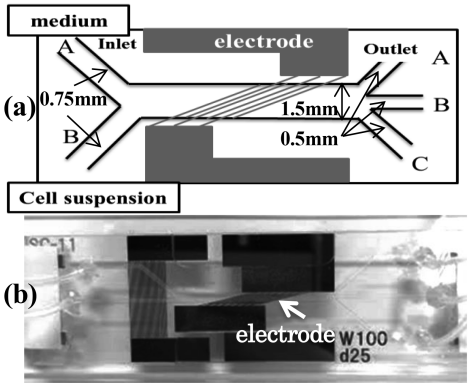

図 2　（a）傾斜櫛歯状電極デバイスのイラスト図
　　（b）傾斜櫛歯電極デバイス
Fig.2　（a）Illustration of the inclined comb-shaped electrodedevice.
　　（b）Actual view of inclined comb-shaped electrode device.

表 1　2 つのデバイスの各パラメーター
Table 1　Each parameter of the two devices.

Each parameter	Device Ⅰ	Device Ⅱ
Distance between electrodes［μm］	50	25
Electrodes width［μm］	100	100
Angle of inclination［°］	15.26	15.26
Electrodes thickness［nm］	100	100
Channel height［μm］	25	50
Number of electrodes［-］	16	16

3.3　実験装置および評価方法

実験装置全体図は図 3 の構成で実験を行った．本実験方法は，まずシリンジポンプ（780100J，KD SCIENTIFIC）を用いて流量設定を行う. そして一定流量で細胞懸濁液，周囲媒質をデバイス内へと供給した．デバイス電極部にファンクションジェネレーター（33220A，Agilent

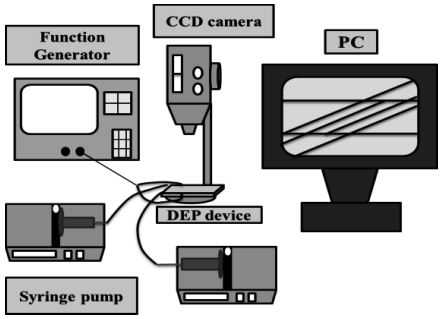

図 3　実験装置全体図
Fig.3　Experimental apparatus overall view.

Technologies）によって設定した周波数，交流電圧を印加した．電極部分で細胞が誘電泳動を受けている様子はCCD カメラ（Inf-500SG，Moritex Co.）を用いて観察し，同時にパソコンで動画を保存した．

傾斜櫛歯状電極部に交流電圧を印加することで細胞に誘電泳動を与え，細胞の偏向を行った．まず，実験装置Ｉで周波数を変化させた場合の実験を行った．誘電泳動現象には強電場側へ引きつけられる正の誘電泳動（P-DEP）と弱電場側へ反発する負の誘電泳動（N-DEP）の 2 種類があり, 周波数によって制御することが可能である．

実験に使用した細胞の調整方法は，iPS 細胞と MEF のいずれにおいても付着しているディッシュから 0.05％トリプシン処理を施し，細胞を取り出し，細胞濃度 0.5×10^6 cells / ml となるように濃度調整を行った．

また，本実験の評価方法としては，パソコンによって保存した動画から各出口（A, B, C）の細胞をカウントした．そして各出口での回収率は以下の式を用いて算出した．測定位置は傾斜櫛歯電極の終点を測定領域と設定した．

回収率 =（各出口の細胞数）/（全出口の細胞数）　(2)

4. 実験結果及び考察

4.1　電場印加時の粒子の挙動

本装置において粒子が誘電泳動を受ける様子を図 4(a) および(b)に示す．粒子挙動の観察には 10 μm ポリスチレンビーズを使用した．実験条件は周波数 1kHz，印加電圧 6 V_{pp} である．

図 4(a)は電圧印加前，(b)は印加後であり，電圧を印加する前の細胞は流路を分散して流れているが，電圧を印加することにより誘電泳動を受ける細胞は傾斜櫛歯状電極に沿って矢印の方向へ泳動している．

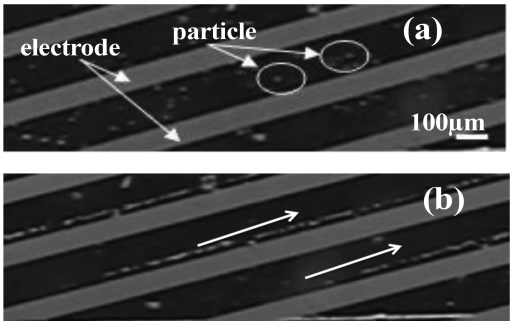

図 4　電圧印加（a）前，（b）後
Fig.4　（a）before applied voltage,（b）after applied voltage.

4.2　iPS細胞とMEF細胞の誘電泳動力に及ぼす周波数の影響

実験を行うにあたり，誘電泳動浮揚法[6]を用いてマウス iPS 細胞とフィーダー細胞（MEF）の誘電泳動力と周波数の関係を測定し，誘電泳動力に及ぼす周波数の影響を図 5 に示す．

図 5 より，マウス iPS 細胞と MEF 細胞の誘電泳動力の差が最も大きいのは 300 kHz であった．300 kHz は P-DEP の領域内であり，N-DEP の働く領域として 10 kHz を設定して実験を行った．細胞種によって周波数特性が異なる理由は，形状や細胞膜や細胞質などの組成が異なり，誘電率に差があるためである．

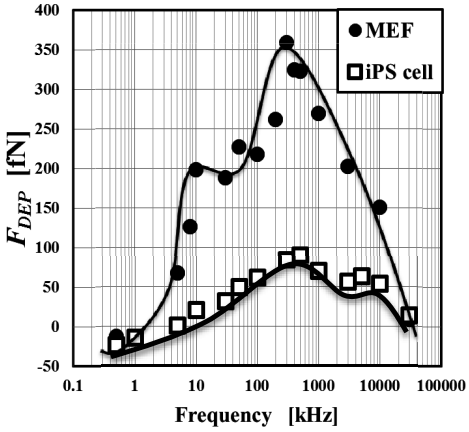

図 5　マウス iPS 細胞と MEF 細胞の誘電泳動力に及ぼす周波数の影響
Fig.5　Effect of dielectrophoretic force on frequency of mouse iPS cells and MEF cells.

4.3　マウスiPS細胞とMEFの回収率に及ぼすP-DEP, N-DEPへの影響

誘電泳動による分離の最適操作条件を明らかにするため，P-DEP と N-DEP によるマウス iPS 細胞と MEF 細胞の分離実験に関してデバイスＩを用いて行った．周波数 300 kHz，細胞懸濁液側流量 1.5 μl/min の実験条件における P-DEP の分離結果を図 6 に示す．

図 6(a)はマウス iPS 細胞と MEF 細胞の各 Outlet の回収率に及ぼす印加電圧の影響を示す．マウス iPS 細胞と MEF 細胞の Outlet A での回収率は太線でプロットした．図 6(a)の結果より，電圧を印加しない場合（0 V）ではデバイスに入った細胞の大部分は Outlet C から流出している．また，印加電圧を高くすることで，Outlet A および Outlet B での回収率が増加する結果となった．印加電圧 6 V_{pp} では iPS 細胞と MEF 細胞の両細胞の回収率がピークとなった．また，図 6(b)は Outlet A と B の合計をグラフに示した結果である．図 6(a)，(b)より，マウス iPS 細胞と MEF 細胞のいずれも誘電泳動を受け泳動方向が変化する結果を得た．しかし，両者が誘電泳動を受けているために，2 細胞の回収率の差は小さい結果となった．P-DEP を用いた結果より，マウス iPS 細胞と

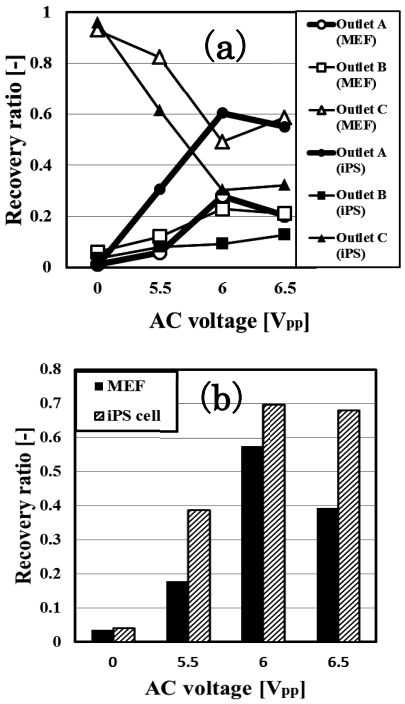

図6 P-DEP（300 kHz）における回収率（a）各 Outlet
（b）Outlet A+B に及ぼす印加電圧の影響
Fig.6 Effect of applied voltage on recovery ratio
（a）each Outlet（b）Outlet A+B in P-DEP.

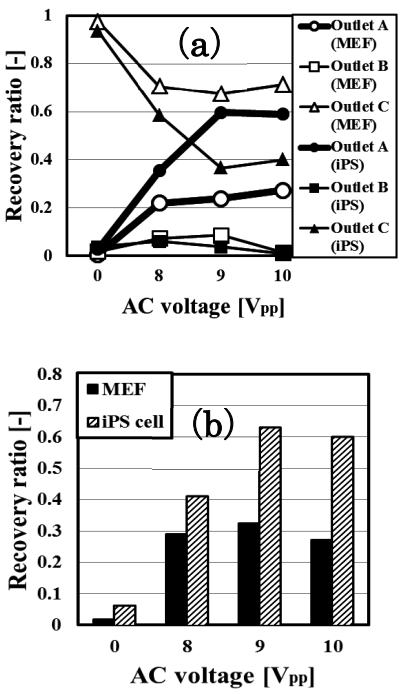

図7 N-DEP（10 kHz）における回収率（a）各 Outlet
（b）Outlet A+B に及ぼす印加電圧の影響
Fig.7 Effect of applied voltage on recovery ratio
（a）each Outlet（b）Outlet A+B in N-DEP.

MEF の回収率の差が低いこと，MEF は電極部での細胞付着が生じることが明らかとなった．

次に N-DEP となる周波数 10 kHz における実験結果を図 7 に示す．実験条件は周波数 10 kHz，細胞懸濁液側流量 1.0 μl/min である．

図 7(a)はマウス iPS 細胞と MEF 細胞の各 Outlet の回収率に及ぼす印加電圧の影響を示す．印加電圧 9 V_{pp} では iPS 細胞と MEF 細胞の両方で回収率がピークになった．また，図 7(b)は Outlet A と B の合計をグラフに示した結果である．図 7(a)および(b)より，N-DEP を用いた場合も P-DEP と同様に，マウス iPS 細胞の方が MEF と比較すると Outlet A および B で回収される割合が高い結果となった．

N-DEP を用いた場合，電極部での細胞付着を抑え，マウス iPS 細胞と MEF の回収率の差を大きくできることが示された．

4.4 MEF細胞の回収率に及ぼす流量の影響

MEF 細胞の回収率に及ぼす流量の影響についてデバイスⅡを用いて検討を行った．なお，デバイスⅡでは電極間距離を 50 μm から 25 μm に，流路高さを 25 μm から 50 μm へ改良した．デバイスⅠでは iPS 細胞，MEF の両者に誘電泳動が働いており，2細胞の回収率の差を大きくするためには片方の細胞が誘電泳動を受け難い装置形状にする必要があるため，iPS 細胞が誘電泳動を受け難く，多くの細胞が Outlet C へ回収することを目的として，デバイスⅡでは流路高さを高く改良した．

また，細胞懸濁液側，周囲媒質側の流量は同量に設定した．流量における MEF の回収率に及ぼす流量の影響を図 8 に示す．実験条件は周波数 10 kHz，図(a)は流量 1.5 μl/min，（b）は 2.0 μl/min，（c）は 2.5 μl/min である．この流量は，細胞懸濁液側，周囲媒質側の片側の流量を記述した．

図 8 の結果から，流量 2.0 μl/min の条件で最も Outlet A での回収率が高い結果を得た．図 8(b)の 2.0 μl/min の条件では印加電圧 6 V_{pp} でピークとなり，約半数の MEF が Outlet A 側へ誘電泳動を受けたことがわかる．また，7 V_{pp} 印加時で Outlet C が急激に増加した理由は，負の誘電泳動を使用した場合でも入口付近の電極部で細胞付着が顕著に見られ，初期段階において高電場により死細胞もしくは活性が低下した細胞が誘電泳動を受けずに Outlet C で回収されたためと考えられる．

流量が遅い場合では，細胞が誘電泳動を受ける時間が長くなるために，Outlet A での回収率が増大すると考えたが，図 8(a)のように流量を遅く設定した場合でも回収率の増加は認められなかった．これは，N-DEP を用いた場合でも少なからず細胞付着が生じてしまうためであった．

図 8(c)のように流量を大きくした場合では細胞の誘

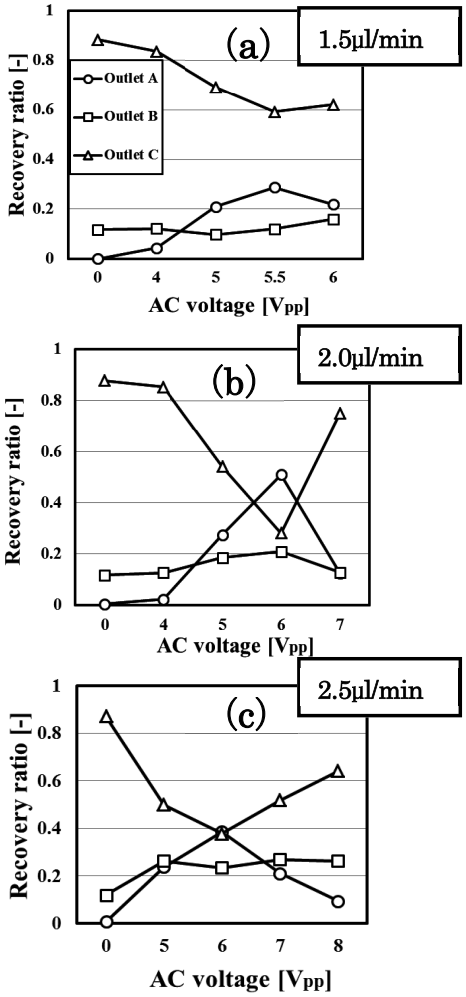

図 8　MEF の回収率に及ぼす流量の影響
Fig.8　Effect of flow rate on recovery ratio of MEF.

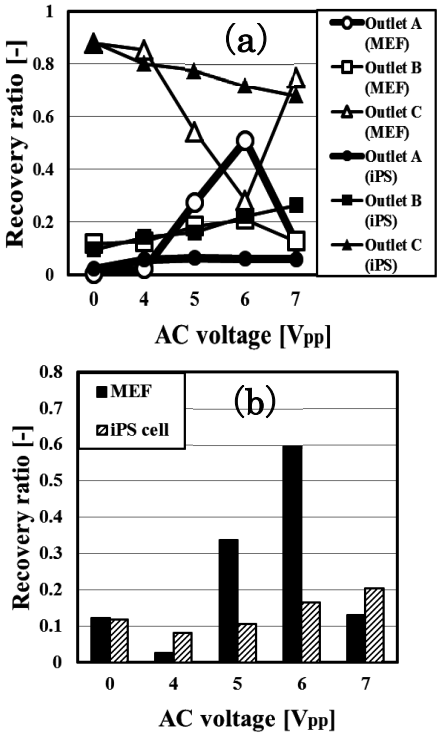

図 9　印加電圧と回収率の（a）各 Outlet（b）Outlet A+B での関係
Fig.9　Relationship between applied voltage and recovery ratio（a）each Outlet（b）Outlet A+B .

電泳動力よりもデバイス内の流れの力が勝ったために A と B の回収率が低い結果であったと考察した．

供給流量に対して印加電圧が大きすぎると，細胞へのストレスや電極付着を生じてしまい，供給流量が大きすぎると，細胞は誘電泳動を受けずに流れてしまうことが明らかとなった．以上の結果より，細胞が誘電泳動力と流体から受ける力とのバランスの取れる条件が存在し，回収率が高くなることが示唆された．

次に，MEF およびマウス iPS 細胞の 2.0 μl/min における実験結果を図 9 に示す．周波数は 10 kHz を設定した．図 9(a)の結果より，6 V_{pp} 印加時が Outlet A および B での回収率の差が最も大きい結果となった．また，マウス iPS 細胞の Outlet A での回収率は低い結果となり，印加電圧を変えてもほとんど回収率に差はみられなかった．MEF の回収率に及ぼす流量の影響で明らかとなったように，誘電泳動力と流体から受ける力とのバランスを取るような条件が存在し，その条件では回収率の向上が見込めることが明らかになった．

4.5　MEF細胞の回収率に及ぼす流量比の影響

前述の結果は，細胞懸濁液と周囲媒質の流量比が 1：1 であったが，本条件は流れをより制御するために周囲媒質側と細胞懸濁液側の流量比を 2：1 に設定した．媒質側流量を細胞懸濁液側流量の 2 倍にすることにより，誘電泳動が作用しない場合では細胞懸濁液は Outlet C で回収され，Outlet A および B には回収されないことが推測され，誘電泳動の効果が顕著に現れることを想定して流量比を変更した．

回収率に及ぼす結果を図 10 に示す．実験条件は周波数 10 kHz，細胞懸濁液側の流量 1.5 μl/min，周囲媒質側の流量は 3.0 μl/min である．

図 10(a)の結果より，6 V_{pp} 印加時が Outlet A および B において MEF 細胞と iPS 細胞の回収率の差が最も大きい結果となった．また，流量比を変化させることで図 9 の結果と比較し，より多くの MEF 細胞が Outlet A で回収される結果となった．これは流量比を変化させたことで入口では，細胞懸濁液が Outlet C 側を流れるため，誘電泳動を受けにくい iPS 細胞が Outlet A，B に泳動しなかった．そのため，MEF は誘電泳動を受け，Outlet A 側へ泳動したためであると考察した．図 10(a)のOutlet A のみの結果では 2 細胞の回収率の差は，約 0.5 であり最大であった．この結果から，流量比の影響も分離に影響を与え，分離性能の向上が見られた．

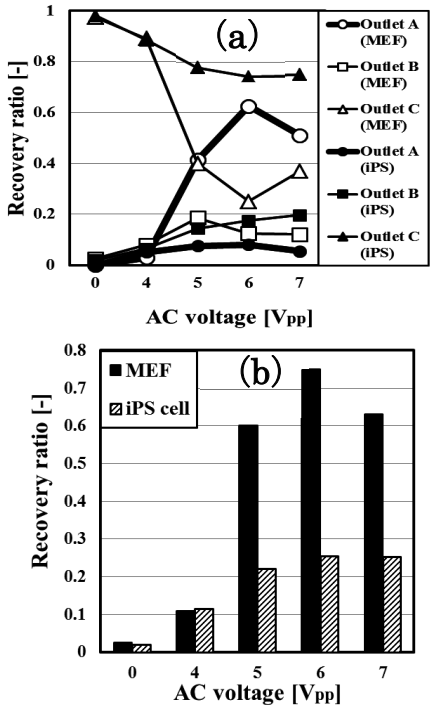

図 10　印加電圧と回収率の（a）各 Outlet（b）Outlet A+B での関係

Fig.10　Relationship between applied voltage and recovery ratio（a）each Outlet（b）Outlet A+B.

5. 結言

傾斜櫛歯状電極を有した誘電泳動分離装置におけるマウス iPS 細胞と MEF の実験から以下の知見が得られた.

(1) P-DEP と N-DEP の結果の比較より，N-DEP を使用することにより電極部での細胞の付着を抑えられることが明らかとなった.

(2) 細胞の連続分離においては誘電泳動力と流体から受ける力とのバランスを取る条件が存在し，電極部に付着することなく，分離が行える最適条件が明らかとなった.

(3) 流量比などのパラメーターを変化させることで異種細胞の誘電泳動力に影響を与え，分離性能を上げることができた.

参考文献

1）静電気ハンドブック：静電気学会編 p.841，オーム社，（1988）

2）M. Hakoda, T.Hachisu, Y.Wakizaka, S.Mii, N.Kitajima : Development of a method to analyze single cell activity by using dielectrophoretic levitation. Biotechnology progress, **21**（2005）1748

3）廣田祐輔，箱田　優：ラット間葉系幹細胞の分化活性と誘電泳動浮揚法による誘電特性の関係．静電気学会誌，**34**［1］（2010）8

4）Y.Hirota, M. Hakoda: Relationship between Dielectric characteristic by DEP Levitation and Differentiation Activity for Stem Cells. Key Engineering Materials, **459**（2011）84

5）M. Hakoda, Y. Hirota: Correlation between Dielectric Property by Dielectrophoretic Levitation and Growth Activity of Cells Exposed to Electric Field, Bioprocess. Biosyst. Eng., **36**（2013）1219

6）O. Kobayashi, Y. Umezawa, S. Kanai and M. Hakoda: Analysis of electrical property of the animal cell using dielectrophoresis levitation. Key Engineering Materials, **534**（2013）93

7）Y. Wakizaka, M. Hakoda, N. Shiragami: Effect of Electrode Geometry on Dielectrophoretic Separation of Cells. Biochem. Eng. J., **20**［1］（2004）13

8）Y. Wakizaka, M. Hakoda, N. Shiragami: Numerical Simulation of Electrode Geometry and Its Arrangement of Dielectrophoretic Filter for Separation of Cells. J. Chem. Eng. Japan, **37**［7］（2004）908

9）箱田　優，脇坂　嘉一, 三井　信一，北島　信義：生死細胞分離のための誘電泳動フィルターの開発．静電気学会誌，**29**［1］（2005）8

10）箱田　優，十枝内　元子，脇坂　嘉一：“細孔絶縁膜付き誘電泳動デバイスによる細胞の連続分離”，静電気学会誌．**30**［3］（2005）140

11）Y. Hirota, M. Hakoda, K. Wakizaka: Separation characteristic of animal cells using a dielectrophoretic filter. Bioprocess and Biosystem Eng., **33**（2010）607

12）M. Hakoda, Y. Wakizaka, Y. Hirota, N. Kitajima: Separation of viable cells and nonviable cells using dielectrophoretic filter. Biotechnology Progress, **26**［4］（2010）1062

13）M. Hakoda, T.Otaki: Analytical Characteristic of Chromatography Device Using Dielectrophoresis Phenomenon. Key Engineering Materials, **497**（2012）87

14）Y. Umezawa, O. Kobayashi, S. Kanai and M. Hakoda: Development of particle packed bed type chromatography using Dielectrophoresis. Key Engineering Materials, **534**（2013）88

15）B. Mathew, A. Alazzam, G. destgeer and H. J.Sung: Dielectrophoresis based cell switching in continuous flow microfluidic devices. Journal of Electrostatics, **8**（2016）463

16）W. Zewen, L. Xueming, Z. Deyao, Y. Hao, H. Zhiyuan, L. Zicai, L. Zhihong: Flow through cell electroporation microchip integrating dielectrophoretic viable cell sorting, Anal. Chem, **86**（2014）10215

17）T. Horii, M. Yamamoto, T. Yasukawa, F. Mizutani :Rapid formation of cell particle complexes via dielectrophoretic manipulation for the detection of surface antigens. Biosensors and Bioelectronics, **6**（2014）215

18）C.J. Maria, H. Mario, M.A. Juan, H.C. Antomi, S. Josep, T. Eduard, J. Antonio: Dielectrophoresis chips improve PCR detection of the food-spoiling yeast. Electrophoresis, **36**（2015）1471

19）K. Myonggon, J. Taekeon, K. Youngjin, L. Changgeun, W. Kyungchul, H. Jae, Y. Sung: A microfluidic device for label-free detection of Escherichia coli in drinking water using positive dielectrophoretic focusing, capturing, and impedance measurement. Biosensors and Bioelectronicd, **74**（2015）1011