

誘電回転法による動物細胞の識別と活性評価

桜庭 一樹*, 古澤 尚也*, 脇坂 嘉一**, 箱田 優*¹

(2016年9月29日受付; 2016年12月16日受理)

Animal Cell Identification and Active Evaluation Using
Electrorotation MethodKazuki SAKURABA*, Naoya FURUSAWA*,
Yoshikazu WAKIZAKA** and Masaru HAKODA*¹

(Received September 29, 2016; Accepted December 16, 2016)

We investigated the identification and activity evaluation of animal cells by dielectrophoresis (DEP). The imaginary part of Clausius-Mossotti function $\text{Im}[K(\omega)]$ of five kinds of animal cells was measured using electro-rotation (EROT), which is a type of DEP. As a result, it was revealed that $\text{Im}[K(\omega)]$ was different in the kind of cells. In addition, the cells were exposed to three kinds of stress, and the correlation of $\text{Im}[K(\omega)]$ and the activity of the cells was shown. Furthermore, $\text{Im}[K(\omega)]$ was analyzed using Single-Shell model. We showed that this EROT device is effective as an activity evaluation device and enables identification of the cells.

1. はじめに

近年, 医療の分野において細胞培養は高い安全性が要求され, 細胞の分離分析技術は非常に重要な役割を担っている. 細胞や生体高分子などの計測や分離には主に光, 磁場, および電場が用いられた技術が使われている¹⁾. 光を利用した技術には, レーザーと蛍光標識を用いて細胞の選択的な分離を可能とするセルソーターがあり, 磁場を利用したものには, MACSが挙げられる. 電場を利用する現象として電気泳動や誘電泳動, 誘電回転法があり, 遺伝子導入などに用いられている. 誘電泳動は, 不均一電場中において, 電場により分極した粒子が, 電場の勾配によって強電場側あるいは弱電場側へ泳動する現象である.

誘電回転法は, 回転している不均一電場中にある分極した粒子が, 電場に引きずられるように回転する現象である. これらの方法は, 粒子が持つ電荷を利用する電気泳動と異なり, 粒子の分極によるため, 電氣的に中性な対象物まで適用することができる. また, セルソーター

や MACS は高精度な分析が可能である反面, 蛍光色素及び磁気チップを分析対象物に注入しなければならず, 分析対象物への影響が懸念されている. 一方で, 電場を利用した分析は細胞の電氣的特性のみを利用するため, 細胞への非侵襲的な分析が可能である. 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い, 細胞の特性を Clausius-Mossotti 関数の実部 $\text{Re}[K(\omega)]$ で整理した^{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⁾.

本研究では誘電泳動の1つである, 誘電回転法を利用し細胞の分析を行い, 細胞の特性を Clausius-Mossotti 関数の虚部 $\text{Im}[K(\omega)]$ で整理した. その際, より精度の高い分析を行うために本装置の最適分析条件を検討した. その後, 分析対象の細胞を 3-2H3 細胞, MEF 細胞, iPS 細胞, MDCK 細胞, HeLa 細胞の5種類とし各細胞の誘電特性を測定した. また, 3-2H3 細胞に培養日数を増やした場合のストレス, 強電場に長時間さらした電場ストレス, 培養温度を上昇させた温度ストレスの3種類を加えて誘電特性の変化を測定し, 増殖活性と誘電特性の相関について検討した.

2. 理論

誘電回転法は4つの電極間で回転する回転電場を利用し, 粒子を回転させる. 回転電場に置かれた粒子は, 粒子表面に回転トルクが生じることで回転を開始する. この回転トルク $\Gamma(\omega)$ は粒子径 r , 周囲媒質の誘電率 ϵ_m , 電場強度 E 及び, 粒子と周囲媒質の誘電率に関する複

キーワード: 誘電泳動, 誘電回転法, シングルシェルモデル

* 群馬大学大学院理工学府環境創生部門

(〒376-8515 群馬県桐生市天神町 1-5-1)

Department of Environmental Engineering Science,
Graduate School of Science and Technology, Gunma
University, 1-5-1, Tenjin-cho, Kiryu-shi, 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

¹ hakoda@gunma-u.ac.jp

素関数 Clausius-Mossotti 関数の虚部 $\text{Im}[K(\omega)]$ で(1)式のように表される¹⁵⁾.

$$\Gamma(\omega) = -4\pi r^3 \varepsilon_m \text{Im}[K(\omega)] E^2 \quad (1)$$

粒子の回転速度 Ω は、粒子の表面摩擦抵抗 R が回転トルクとつり合うことで定常状態となる。表面摩擦抵抗 R は(2)式、回転速度 Ω は(3)式のようになる。

$$R = 8\pi r^3 \eta_m \quad (2)$$

$$\Omega = \frac{\Gamma(\omega)}{R} \quad (3)$$

なお、 η_m は周囲媒質の粘度である。(1)式中の $\text{Im}[K(\omega)]$ は細胞の誘電特性を表す因子であるため、(1)-(3)式を使い $\text{Im}[K(\omega)]$ について整理したのが(4)式である^{16,17)}.

$$\text{Im}[K(\omega)] = -\frac{2\eta_m \Omega}{\varepsilon_m E^2} \quad (4)$$

3. 実験方法と手順

3.1 各細胞の培養

本実験では浮遊性細胞のマウスハイブリドーマ 3-2H3 細胞、足場付着性細胞のヒト子宮頸癌細胞 HeLa 細胞、マウス線維芽細胞 MEF 細胞、マウス iPS 細胞、イヌ腎臓細胞 MDCK 細胞を用いた。培地には DMEM (Sigma D6429) 500 ml を基本とし、10%FBS (GIBCO BRL)、硫酸ストレプトマイシン (明治製薬) 100 mg/ml (力価) とペニシリン G カリウム (萬有製薬) 100 U/ml からなる抗生物質を 5% 添加した混合培地を使用した。また、マウス iPS 細胞に関しては分化抑制剤として、NEAAS (Sigma M7145) 5 ml、モノチオグリセロール (Wako 195-15791) 0.5 ml、LIF (Wako 199-16051) 0.5 ml を上記培地へ更に加えた。各種細胞はコンフルエントになるまで 37 °C、5.0% CO₂ 下のインキュベータ (ESPEC BNA-111) で培養した。

3.2 装置形状と電圧印加

図1に本実験の装置概略図と四重電極の拡大図を示す。本実験はファンクションジェネレーター (33220A, Agilent) で電気信号を出力し、フェーズシフター (AFI テクノロジー製) を介して四重電極に電圧を印加する。フェーズシフターは、ファンクションジェネレーターから受け取った電気信号の位相を変化させる。位相の変化した電圧が四重電極に伝わるため、強電場領域が電極間を回転する。これによって回転電場が形成される。電極間に配置した粒子は回転電場の影響を受け回転する。この回転の様子を顕微鏡 (MT5310L, MEIJI TECHNO Co.) で観察し、PC (Compaq 6000 Pro SF, 日本 HP) に動画として保存した。

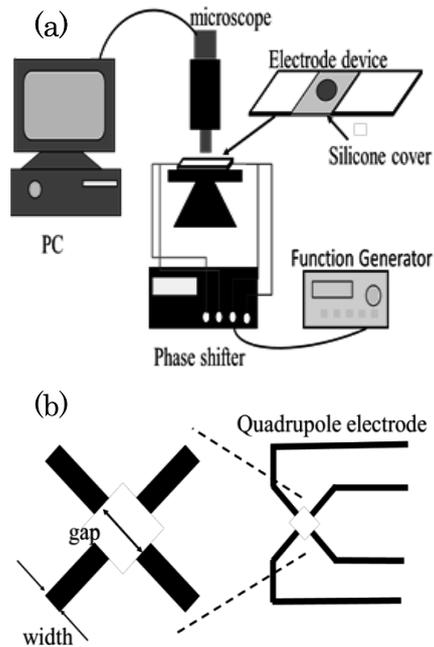


図1 装置図 (a) および四重電極形状 (b)
Fig.1 Schematic diagram of experimental apparatus (a) and quadruple electrode shape (b).

3.3 回転速度測定と $\text{Im}[K(\omega)]$ の算出

$\text{Im}[K(\omega)]$ を算出するため、細胞の回転速度を測定した。細胞の回転速度は周波数に依存するため、周波数を 1 kHz から 1 MHz まで変化させて検討した。各周波数で、回転速度はおおよそ 10 個のデータの平均値とした。回転の計測は、1 回転を 3~20 sec 程度で測定した。回転速度の速い場合は動画の再生速度を落とすことで測定誤差を抑え、計測した。なお、細胞懸濁液には浸透圧とジュール熱の発生を抑える条件で調整した 8.5 wt% スクロース + 0.3 wt% グルコース溶液を使用した。

3.4 各ストレス付加方法及び生存率、比増殖速度測定

細胞へのストレスと誘電特性 $\text{Im}[K(\omega)]$ の関係を検討するため、3-2H3 細胞をサンプル細胞として、培養日数、電場印加、温度付与の 3 種類のストレスを加えた。培養日数は、通常 2 日間でコンフルエントになる細胞を 2, 3, 4, 5 日間と培養した。電場ストレスは 1.0×10^6 cells/ml に濃度調製した細胞懸濁液を、強電場発生装置に注入し電場強度を 6.6, 13.3, 20.0, 26.7 kVp-p/m とし、各条件ともに 30 分間電圧を印加した。強電場発生装置は図 2 に示す。強電場装置は厚さ 1 mm のチタン板を電極とした。電極の横を厚さ 5 mm のアクリル板、周囲を厚さ 1 mm のアクリル板で覆った。電極間距離 3 mm の空間に細胞懸濁液を注入した。なお強電場発生装置は、ジュール熱の発生を防ぐために周囲を氷水で浸し温度の上昇を抑えた。温度ストレスはインキュベータの温度を 39, 41, 43, 45 °C に昇温し 2 時間静置培養した。各ストレ

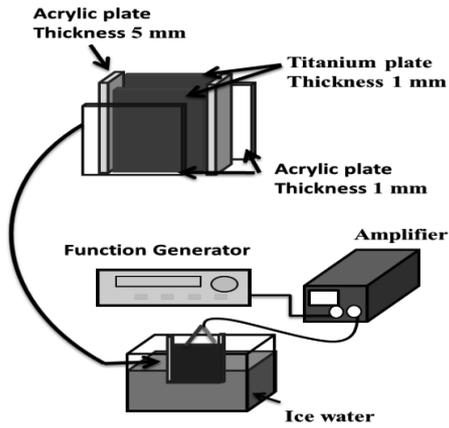


図2 強電場発生装置
Fig.2 Schematic diagram of strong electric field generator.

ス付加後、細胞数計測の際には、トリパンブルー染色を用いて生細胞と死細胞をカウントし、その割合から生存率を算出した。培養日数ストレスの細胞は播種濃度と培養後の細胞濃度、経過日数から比増殖速度を算出した。電場、温度ストレスはストレス付加後の細胞を2日間培養し、播種濃度と培養後の細胞濃度から比増殖速度を算出した¹⁸⁾。

4. 実験結果及び考察

4.1 電場解析

誘電回転法では $Im [K(\omega)]$ の算出の際に電極間の電場強度が必要となる。そこで、四重電極間の電場強度は COMSOL MULTIPHYSICS (Ver.4.2) を使用して解析した。解析結果を図3に示した。なお、図3の電極形状は電極幅が $75 \mu m$ 、電極間距離が $300 \mu m$ である。電場強度の平均値算出にあたり電極付近は強電場領域が回転するため、平均を算出しても偏差が大きくなる。よって、細胞の測定には電場の時間変化による影響が少ない電極間の

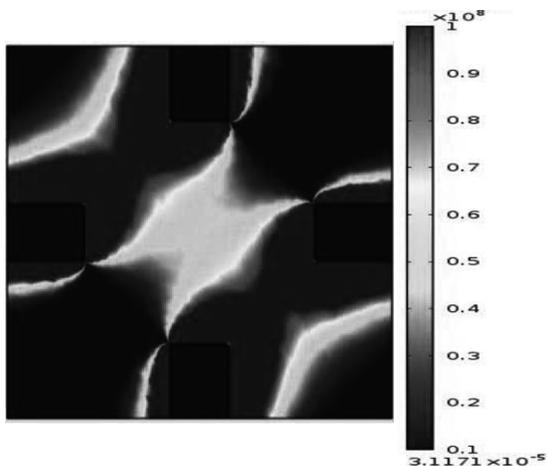


図3 電場解析
Fig.3 Electric field analysis.

中心部分に限定した。解析値は4つの電極の中心線が交差する点を中心とし、中心から上下左右 $50 \mu m$ まで $10 \mu m$ 毎に算出した結果を平均化した。

4.2 分析条件の最適化

本装置は細胞分析装置であるため、より高精度な分析結果を得るために、電極間距離と印加電圧を変化させ最適実験条件を検討した。サンプル細胞には 3-2H3 細胞を使用した。電極間距離を $200 \mu m$ 、電極幅 $50 \mu m$ と電極間距離 $300 \mu m$ 、電極幅 $75 \mu m$ の2条件で検討し、その結果を図4に示した。図4(a)より電極間距離が短くなることで細胞の回転速度が増加した。一方、図4(b)の $Im [K(\omega)]$ のグラフでは電極間距離に依存せず同じ値を取った。この結果は、電場強度の2乗 E^2 と回転速度が比例関係にあるためと考察した。(4)式において回転速度 Ω と電場強度 E^2 の関係より、電極間距離の短縮で増加した分は、互いの増加分で相殺されるため $Im [K(\omega)]$ が同じ値になったと考えられる。また、細胞のカウントは手動で計測するため、回転速度の増加に伴い標準誤差が大きくなった。加えて、電極間距離の短縮は測定範囲の減少にも繋がるため電極間距離は $200 \mu m$ よりも 300

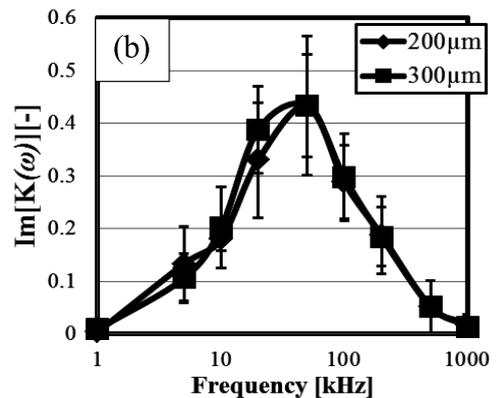
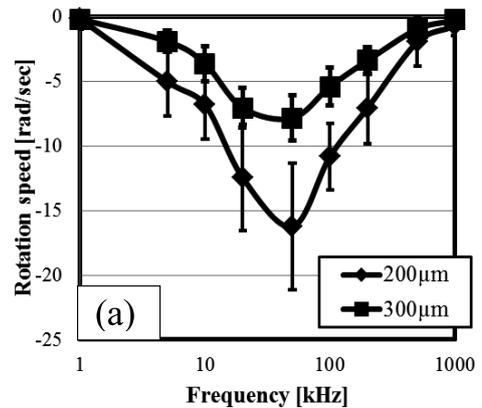


図4 (a) 回転速度, (b) $Im [K(\omega)]$ に及ぼす電極間距離の影響
Fig.4 Effect of the distance between the electrodes (a) rotation speed, (b) $Im [K(\omega)]$.

μm が適切である。さらに電圧を変えた場合に関しても、電圧を大きくすることで電場強度は増加し回転速度も増加した。この結果、電極間距離と同様標準偏差が大きくなったため、本装置では電極間距離 $300 \mu\text{m}$ 、印加電圧 $5 \text{V}_{\text{p-p}}$ が最適条件である。

4.3 細胞種毎の誘電特性

測定した細胞は 3-2H3 細胞, iPS 細胞, MDCK 細胞, HeLa 細胞, MEF 細胞の 5 種類であり, その結果を図 5 に示す。図より $\text{Im}[K(\omega)]$ の最大値を取る周波数や, 最大値の大きさが細胞種によって異なることが分かった。 $\text{Im}[K(\omega)]$ は細胞の導電率や誘電率に依存している。細胞の導電率は細胞質の組成に, 誘電率は細胞膜の絶縁効果に依存すると考えられる。よって, 細胞質の組成と細胞膜の状態が細胞種によって異なるために $\text{Im}[K(\omega)]$ も異なると考察した。

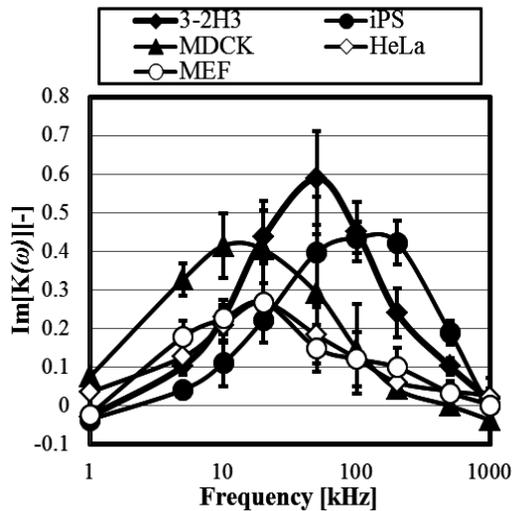


図 5 各細胞種の誘電特性
Fig.5 Dielectric properties of each cell type.

上記の結果より, $\text{Im}[K(\omega)]$ の最大値を取る周波数や最大値の大きさ利用することで特定の細胞を同定することが可能であると示唆された。また, HeLa 細胞と MEF 細胞の $\text{Im}[K(\omega)]$ が類似しているが, この 2 種類に関しては粒子径の違いが明らかに異なることから判別は可能である。

4.4 ストレス付加による誘電特性の変化

3-2H3 細胞をサンプルとして, 細胞の誘電特性に及ぼす各ストレスの影響を検討し, その結果を図 6 に示す。培養日数を増やした場合は, 培養 3 日目に $\text{Im}[K(\omega)]$ は急激に低下し, その後も低下した。電場によるストレスを加えた場合は, $\text{Im}[K(\omega)]$ のピークが 6.6kVp-p/m で高周波側にシフトし, 電場強度の増加に伴いピークの値

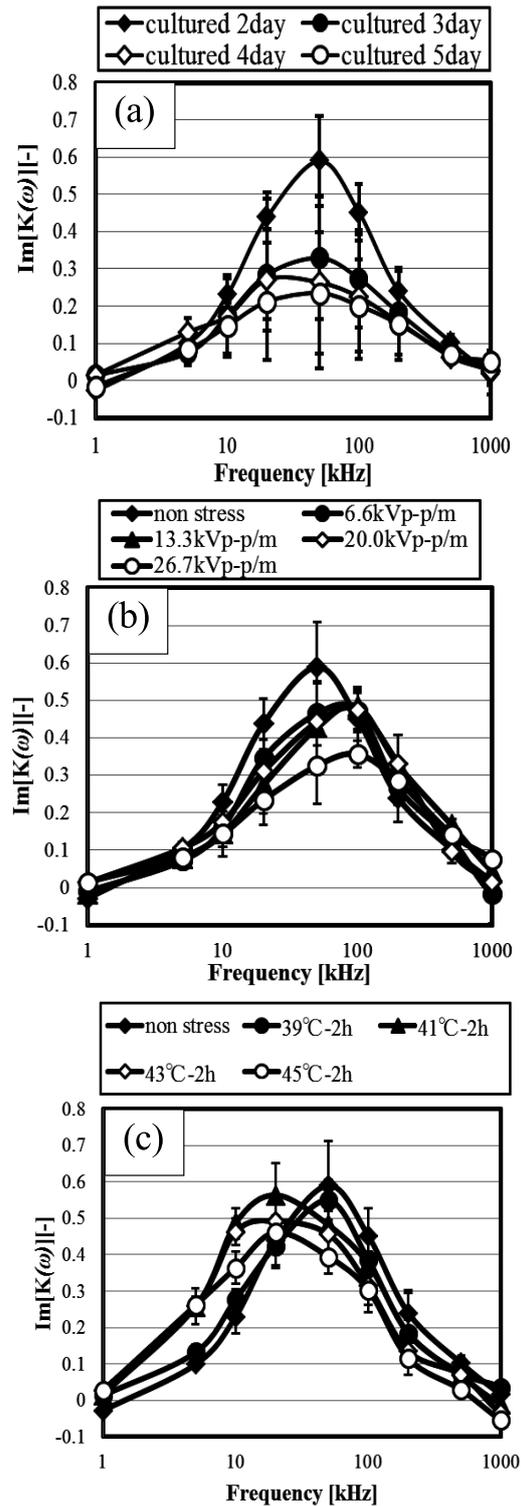


図 6 各ストレスによる $\text{Im}[K(\omega)]$ の変化 (a) 培養日数 (b) 電場ストレス (c) 温度ストレス
Fig.6 Change of $\text{Im}[K(\omega)]$ by each stress. (a) Cultured day (b) Electric field stress (c) Temperature stress

が低下した。温度によるストレスは 41°C , 2 時間培養で $\text{Im}[K(\omega)]$ のピークが低周波側にシフトし, 温度の上昇に伴ってピークの値が低下した。ストレスの付加方法が

表1 Single-Shell model による各ストレス
 (a) 培養日数 (b) 電場ストレス (c) 温度ストレス
 Table1 Each stress by Single-Shell model.
 (a) Cultured day (b) Electric field stress
 (c) Temperature stress

(a)

Cultured day	Cytoplasm relative permittivity [-]	Cytoplasm electric conductivity [S/m]	Cell membrane capacitance [F/m ²]
2day	100	3.15×10^{-1}	1.50×10^{-3}
3day	150	3.68×10^{-3}	1.05×10^{-3}
4day	120	2.88×10^{-3}	8.46×10^{-4}
5day	110	2.28×10^{-3}	8.36×10^{-4}

(b)

Added electric field [kV _{r-p} /m]	Cytoplasm relative permittivity [-]	Cytoplasm electric conductivity [S/m]	Cell membrane capacitance [F/m ²]
Non stress	100	3.15×10^{-1}	1.50×10^{-3}
6.6	180	1.90×10^{-2}	9.00×10^{-4}
26.7	190	4.00×10^{-3}	5.98×10^{-4}

(c)

Temperature stress [°C-2h]	Cytoplasm relative permittivity [-]	Cytoplasm electric conductivity [S/m]	Cell membrane capacitance [F/m ²]
Non stress	100	3.15×10^{-1}	1.50×10^{-3}
41	295	1.68×10^{-2}	2.61×10^{-3}
43	300	1.30×10^{-2}	2.61×10^{-3}
45	299	8.76×10^{-3}	2.55×10^{-3}

異なることで $\text{Im}[K(\omega)]$ の推移に違いが生じた。この違いが何に起因するものかを調べるため、細胞を細胞膜と細胞質のみで考えた解析モデル Single-Shell model を使い、計算した結果を表1に示す⁶⁾。なお、Single-Shell model でのフィッティングカーブの値と実験結果との誤差は1~15%程度である。培養日数の影響は他に比べ細胞質の電気伝導度が培養3日目まで急激な低下を引き起こした。コンフルエントに達した後の培養は、代謝による乳酸の蓄積等によって培地のpHを変化させ培養環境を悪化させる。培地が酸性側に傾くことで、細胞膜がダメージを受け $\text{Im}[K(\omega)]$ が低下したと考えられる¹⁹⁾。次に、電場ストレスの影響は他のストレス付加方法に比べて、細胞膜キャパシタンスが最も低下した。これは電場によって細胞膜が薄くなり、やがて膜破壊を起こすことに関係していると考えられる¹⁾。温度ストレスの影響は他の二つのストレスに比べ細胞質比誘電率の上昇が大きく、また細胞膜キャパシタンスが唯一増加した。これはタン

パク質の熱変性に依る所が大きいと考えられる。一般にタンパク質は、50℃以上で変性を起こし、高温になるほど短時間で変性を起こす。

一方で50℃に満たない温度でも長時間培養すれば、変性を起こす。このことからタンパク質が変性したことで、細胞内の誘電率、電気伝導度が変化したと考えられる。

上記結果から、3種のストレスで $\text{Im}[K(\omega)]$ の変化に違いが生じた。また、Single-Shell model を使い細胞内の組成を解析することで、それぞれのストレスが細胞の部位に及ぼす影響を検証することができた。

4.5 誘電特性と増殖活性の関係

ストレスを付加することで細胞の増殖活性に起因する生存率、比増殖速度と誘電特性 $\text{Im}[K(\omega)]$ の関係を検討した。図7は、図6で使用した各ストレス実験50 kHz 時の $\text{Im}[K(\omega)]$ と生存率(a)、比増殖速度(b)の関係を示す。図7より細胞の生存率と比増殖速度は、 $\text{Im}[K(\omega)]$ の低下に伴って低下した。また、ストレスの種類

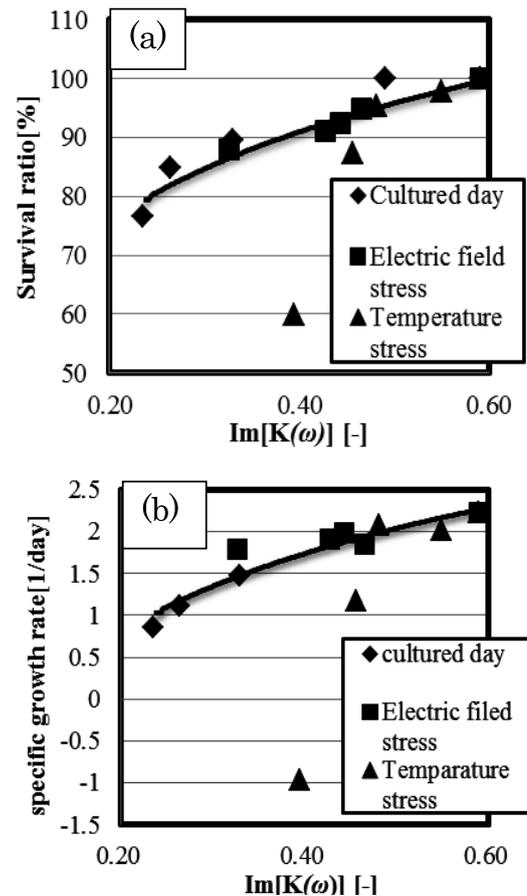


図7 誘電特性と増殖活性の関係
 (a) 生存率 (b) 比増殖速度
 Fig.7 Relationship of dielectric properties and growth activity.
 (a) Survival ratio (b) Specific growth rate

に依らず、 $\text{Im}[K(\omega)]$ と生存率、比増殖速度の関係は、一本の近似曲線で引くことができた。これは $\text{Im}[K(\omega)]$ が細胞の増殖活性と相関があることを証明しており、本装置は細胞の活性評価も行うことができると示唆された。一方、近似曲線から外れた温度ストレスの結果は、タンパク質が変性することで細胞内の増殖が低下した可能性がある。その結果、通常の細胞の組成から著しく外れてしまったと考えられる¹⁹⁾。

5. 結言

誘電泳動現象の1つである誘電回転法を用いた動物細胞の $\text{Im}[K(\omega)]$ の測定の結果、以下の結論を得た。

- (1) 5つの細胞種で $\text{Im}[K(\omega)]$ の最大値の大きさ、最大値をとる周波数が異なることが明らかとなった。この結果と粒子径の違いを利用することで細胞種の同定が可能である。
- (2) 細胞にストレス（培養日数、電場、温度）を付加するとその付加方法で $\text{Im}[K(\omega)]$ の低下推移に相違が生じた。この違いを、解析モデルを用い数値化することで細胞内の変化を解析することができた。
- (3) ストレス付加による細胞の生存率と比増殖速度の低下が $\text{Im}[K(\omega)]$ の低下と相関関係にあることを立証した。これにより細胞の $\text{Im}[K(\omega)]$ による活性評価が可能であると示唆された。

参考文献

- 1) 静電気学会編：静電気ハンドブック，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** (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) T.B. Jones: *Electromechanics of particles*, p.42, Cambridge University Press (1995)
- 16) Christopher D. Falokun: AC electrokinetic characterisation and separation of cells with high and low embryogenic potential in suspension cultures of carrot (*Daucus carota*) *Plant Cell. Tissue and Organ Culture* **75** (2003) 261
- 17) Y. Huang: Membrane dielectric responses of human T-lymphocytes following mitogenic stimulation. *Biochimica Biophysica Acta*, **1417** (1999) 51
- 18) 小林 猛, 本多裕之：生物化学工学, p.52, 東京化学同人 (2002)
- 19) 山本英樹：Wnt シグナル伝達経路の活性制御と発がんとの関連。生化学 **80** (2008) 1079