

# 3次元誘電泳動分離デバイスにおける 細胞挙動の数値解析

佐藤 健太\*, 内田 諭<sup>\*,1</sup>, 朽久保 文嘉\*, 円城寺 隆治\*\*, 脇坂 嘉一\*\*

(2016年9月29日受付; 2017年1月13日受理)

## Numerical Analysis of Cellular Behavior in Three Dimensional Dielectrophoretic Separation Device

Kenta SATO\*, Satoshi UCHIDA<sup>\*,1</sup>, Fumiyoshi TOCHIKUBO\*,  
Takaharu ENJOI\*\* and Yoshikazu WAKIZAKA\*\*

(Received September 29, 2016; Accepted January 13, 2017)

Effective separation and condensation processes are essential for precise detection of circulating tumor cells in early diagnosis of cancer. In this study, we proposed a dielectrophoretic device with micro pillar electrodes as cell separator. Also, we simulated the spatio-temporal behavior of model cells on the basis of microfluidics and electrokinetics. The particle trajectory in a flow direction was changed by dielectrophoretic force generated between the pillars. In addition, we applied cell levitation technology by dielectrophoretic force from electrodes. This result suggests the tumor cells can be purified from real blood under adequate electrical condition.

### 1. はじめに

血中循環腫瘍細胞 (circulating tumor cells: CTC) は、腫瘍組織から血中に遊離した細胞であり、がんの進行とともに増加する。そのため、CTC の迅速な検出は、がん転移の早期診断に極めて有用である。現行の検出法としては、免疫磁気<sup>1,2)</sup> やフィルタ濾過法<sup>3)</sup> などがある。ただし、CTC は血中に極微量しか存在しないため、より高精度な検出には分離濃縮工程の確立が不可欠である。

そこで、著者らは電気的特性およびサイズを利用する誘電泳動 (dielectrophoresis: DEP) 法に着目した。不均一電界下で誘電体微粒子を操作する DEP 法は、CTC など希少細胞の選択的分離に対する有効な手段の一つである<sup>4,9)</sup>。しかしながら、平面電極では処理有効体積が小さく、処理能力に制限があるという問題がある<sup>10)</sup>。

本研究の目的は、立体的な微小円柱 (ピラー) を電極として用い、DEP の有効領域を増加させることで、CTC 分離の性能向上を数値的に検証するものである。本報告

では既報<sup>11)</sup> で構築した試行モデルおよび構造パラメータを修正した実験モデルのそれぞれにおいて、DEP デバイス内におけるピラー電極群付近の流速および電界分布を数値的に導出した。また、交流電圧下における Clausius-Mossotti 関数の周波数依存性および DEP 力を考慮した流体の流れに対する粒子軌跡を検証した。血中において白血球は 9 -15  $\mu\text{m}$  程度であるため、粒径による CTC との分離は困難である。Re  $[K(\omega)]$  のクロスオーバー周波数は正常細胞が 80 kHz, CTC が 20 kHz とされている。そのため、第一段階として粒径の違いにより赤血球画分、二段階目にクロスオーバー周波数の違いによって白血球画分を想定している。本報では初期検討として粒径の違いを利用した赤血球画分を検討する。

### 2. 解析手法

DEP による細胞分離の解析モデルとして初めに 図 1 (a) に示すデバイス構造 (試行モデル) を考案した。デバイスの寸法は、幅 1.5 mm, 奥行き 6 mm, および高さ 300  $\mu\text{m}$  である。給電線の厚さを 5  $\mu\text{m}$ , ピラー径を 60  $\mu\text{m}$ , 流れ方向に対するピラーの配置角度を 15° とし, x 方向に 90  $\mu\text{m}$  の間隔で配置した。計算量を低減するため、本構造の中心軸 ( $x = 1500 \mu\text{m}$ ) を対称として、半面を計算領域とした。また、ピラー電極と給電線の材料は Ni とした。給電線および接地電極を交互に配置し、それぞれ 20 V および 0 V を印加した。媒質の導電率および比誘電率をそれぞれ 40 mS/m および 80, 流体粘度を 1.0 mPa·s, 流入速度を  $5.0 \times 10^{-5}$  m/s (2.7  $\mu\text{l/min}$ ) に設定した。

**キーワード:** 誘電泳動, マイクロ流体デバイス, 数値シミュレーション, 血中循環腫瘍細胞

\* 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

\*\* 株式会社 AFI テクノロジー

(〒602-0841 京都府京都市上京区梶井町 448-5)

AFI Corporation, 448-5, Kajii-tyo, Kamigyo-ku, Kyoto 602-0397, Japan

<sup>1</sup> s-uchida@tmu.ac.jp

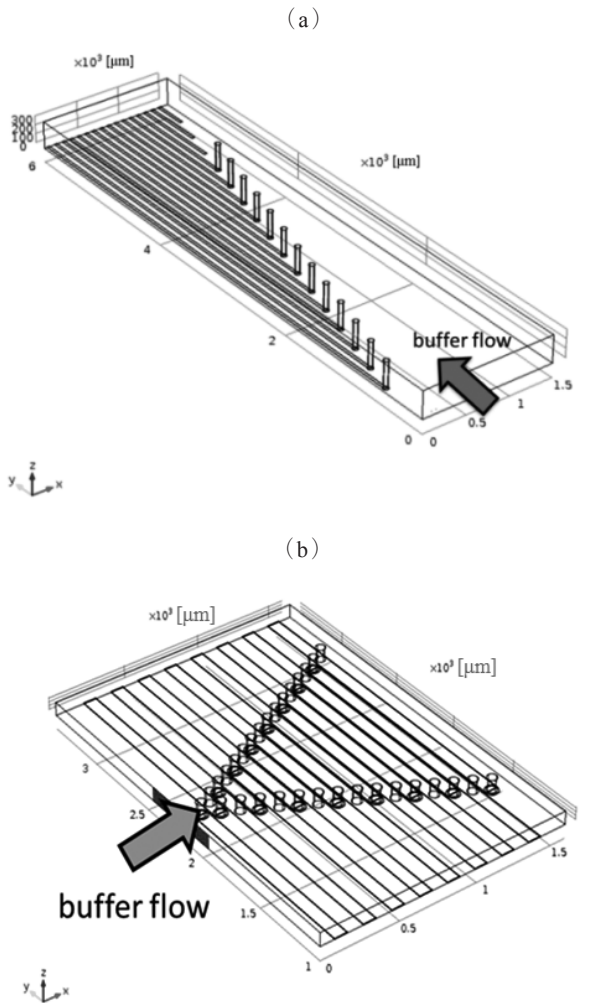


図1 電極構造の概略 (a) 試行モデル, (b) 実験モデル  
Fig.1 Schematic of electrode configuration. (a) trial and (b) experimental models.

一方, 試作したデバイスについては重力および浮力を考慮した計算を試みた. 図1(b)に実験モデルを示す. デバイスの寸法は, 幅3 mm, 奥行き1.6 mm, および高さ70  $\mu\text{m}$  である. 給電線の厚さを5  $\mu\text{m}$ , ピラー径を60  $\mu\text{m}$ , ピラーはx軸方向に50  $\mu\text{m}$ , y軸方向に90  $\mu\text{m}$ の間隔で配置した. なお, 細胞挙動に対する影響を詳細に検証するため, 計算領域をデバイス全体とした. また, 媒質の導電率および比誘電率は変更せず, 流入速度は $3.57 \times 10^{-4} \text{ m/s}$  (4.5  $\mu\text{l/min}$ ) とした.

本解析では, 分離対象細胞として赤血球およびCTC細胞を想定し, そのモデルである細胞Aおよび細胞Bを仮定した. 関連文献<sup>12-14)</sup>に基づき, それぞれの推定粒径, 比重および電気定数を決定した.

細胞Aおよび細胞Bのそれぞれにおいて粒径が5 - 7.5  $\mu\text{m}$  および10  $\mu\text{m}$ , 比重が1090  $\text{kg/m}^3$  および1050  $\text{kg/m}^3$ , 細胞質導電率がともに1.0 S/m, 細胞質比誘電率が80および45, 細胞膜導電率がともに1.0  $\mu\text{S/m}$ , 細胞膜比誘

電率がともに5, 膜厚はともに1 nm とした.

本解析に用いた支配方程式を以下に示す.

$$\nabla \varepsilon_m \mathbf{E} = 0 \quad (1)$$

$$\mathbf{F}_{\text{DEP}} = 2\pi r^3 \varepsilon_m \text{Re} [K(\omega)] \nabla E^2 \quad (2)$$

$$\mathbf{F}_{\text{drag}} = 6\pi\mu r (\mathbf{v}_m - \mathbf{v}_p) \quad (3)$$

$$m \frac{d\mathbf{v}_{\text{DEP}}}{dt} = \mathbf{F}_{\text{DEP}} + \mathbf{F}_{\text{drag}} \quad (4)$$

$$\rho \frac{\partial \mathbf{v}_m}{\partial t} + \rho (\mathbf{v}_m \cdot \nabla) \mathbf{v}_m = -\nabla p + \mu \nabla^2 \mathbf{v}_m \quad (5)$$

$$\nabla \cdot \mathbf{v}_m = 0 \quad (6)$$

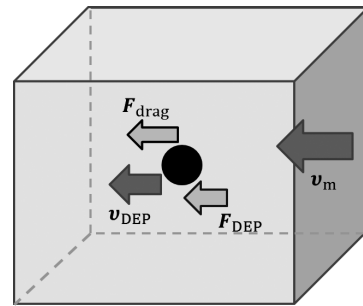


図2 本解析で考慮した力のモデル  
Fig.2 The model of considered forces in the present analysis.

ここで $\varepsilon_m$ は媒質誘電率,  $\mathbf{E}$ は印加電界,  $r$ は粒子半径,  $\omega$ は角周波数,  $\mu$ は流体粘度,  $\mathbf{v}_m$ は流体速度,  $\mathbf{v}_p$ は粒子速度,  $m$ は粒子質量,  $\rho$ は流体密度,  $p$ は圧力である.

空間内の電界分布をポアソン式(1)から求め, DEP力 $\mathbf{F}_{\text{DEP}}$ および粘性力 $\mathbf{F}_{\text{drag}}$ を式(2)および(3)から計算した. これらの値を式(4)で示した粒子の運動方程式に代入して, 各時刻の誘電泳動速度を導出し, ナビエ・ストークス方程式より計算した流体速度(式(5)および(6)参照)を加味して粒子軌跡を導出した(図2参照).

なお, 電界, 流速分布,  $\mathbf{F}_{\text{DEP}}$ , および粒子軌跡の計算には, 汎用物理シミュレーションソフトウェアCOMSOL Multiphysics 5.0を使用した.

### 3. 解析結果および考察

#### 3.1 $\text{Re} [K(\omega)]$ の周波数依存性調査

本解析では, n-DEPを利用した細胞分離を検証した. 式(2)内の $\text{Re} [K(\omega)]$ の値は印加周波数により-0.5 - 1.0の間を変動するため, 分離に適切な周波数を設定する必要がある.  $\text{Re} [K(\omega)]$ は式(7), (8)および(9)から求められ<sup>4)</sup>, 本値が正の場合は強電界領域へ力が作用する正の誘電泳動(p-DEP), 負の場合は弱電界領域へ力が作用する負の誘電泳動(n-DEP)を得る. ここで,  $\varepsilon_p$ は細胞質誘電率,  $\varepsilon_s$ は細胞膜の誘電率,  $\varepsilon_{eq}$ は細胞を一層に置

き換えた際の誘電率,  $r_i$  は細胞内径,  $r_o$  は細胞膜厚を表す.

$$\varepsilon_{eq}^* = \varepsilon_s^* \frac{\left(\frac{r_o}{r_i}\right)^3 + 2 \left(\frac{\varepsilon_p^* - \varepsilon_s^*}{\varepsilon_p^* + 2\varepsilon_s^*}\right)}{\left(\frac{r_o}{r_i}\right)^3 - \left(\frac{\varepsilon_p^* - \varepsilon_s^*}{\varepsilon_p^* + 2\varepsilon_s^*}\right)} \quad (7)$$

$$K(\omega) = \frac{\varepsilon_{eq}^* - \varepsilon_m^*}{\varepsilon_{eq}^* + 2\varepsilon_m^*} \quad (8)$$

$$\varepsilon^* = \varepsilon + \frac{\sigma}{j\omega} \quad (9)$$

各細胞において媒質導電率を 0.1, 40, および 1000 mS/m とした場合におけるそれぞれの  $\text{Re}[K(\omega)]$  の周波数依存性を図 3 に示す. 導電率が高く, 周波数が低いほど, n-DEP の効果が顕著であった.

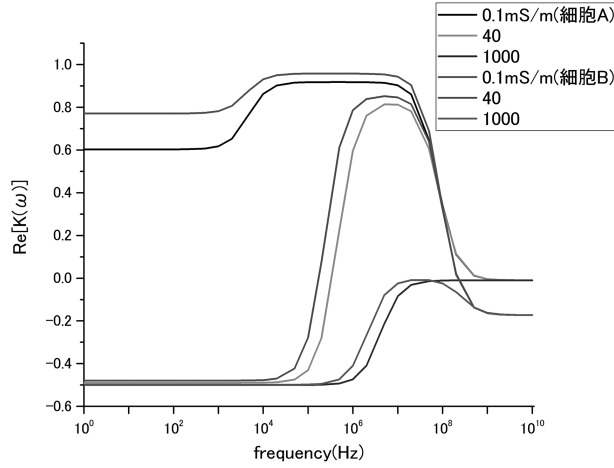


図 3  $\text{Re}[K(\omega)]$  の周波数依存性  
Fig.3 Dependency of  $\text{Re}[K(\omega)]$  on frequency.

n-DEP が  $F_{\text{drag}}$  よりも大きい場合, 細胞はピラー近傍の強電界領域から力を受け, ピラー間を通過しない. 逆に  $F_{\text{drag}}$  の方が大きい場合, ピラー間を通過する事になる.  $F_{\text{DEP}}$  は  $r$  の 3 乗および電圧の 2 乗に, また  $F_{\text{drag}}$  は  $r$  および  $v_m$  に比例するため, これらのパラメータ比を適切に調整することで捕集制御が可能となる.

本報では, 上記の検証結果から周波数を 10 kHz とし て以下の解析計算を行った.

### 3.2 試行モデルにおける分離性能評価

試行モデルにおいて, 流入速度を  $5.0 \times 10^{-5}$  m/s とした場合における流速分布を図 4 に示す. また, 給電線およびピラーに振幅 20 V および 0 V の交流電圧を交互に印加した際の電位および電界分布を図 5 および 6 に示す. 媒質の導電率および比誘電率はそれぞれ 40 mS/m および 80 とし, 各計算は高さ方向中央である  $z = 150 \mu\text{m}$  において導出した.

図 4 よりデバイスの中心軸付近の流速は  $8.0 - 9.3 \times 10^{-5}$

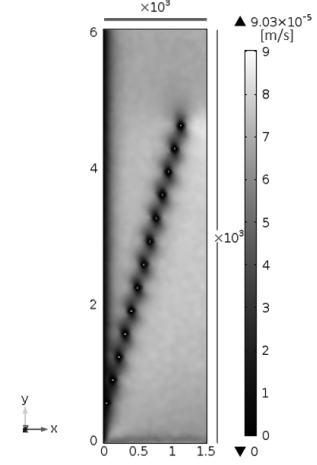


図 4 試行モデルにおける流速分布  
Fig.4 Spatial distribution of flow velocity in trial model.

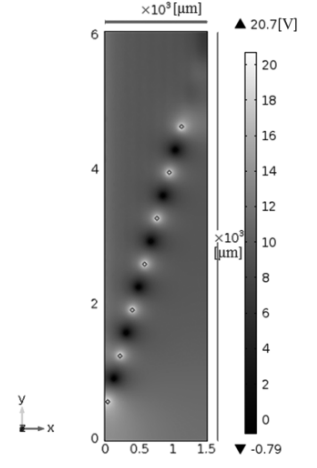


図 5 試行モデルにおける電位分布  
Fig.5 Spatial distribution of electric potential in trial model.

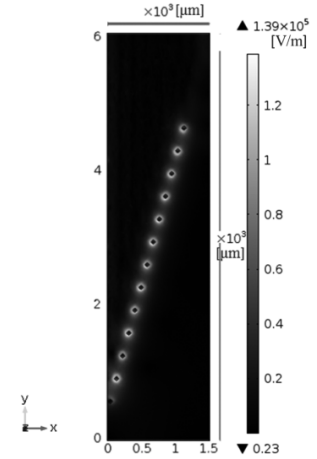


図 6 試行モデルにおける電場分布  
Fig.6 Spatial distribution of electric field in trial model.

m/s 程度であり, 近似的に平面ポアズイユ流となっている. また, デバイス全体では, ピラーが「ハ」の字に配置されており, デバイス中央は広く開いている. ベルヌ

ーイの定理より、低圧下の流体は狭いピラー間よりも広いデバイス中央へ流れやすい。結果として、ピラー間の流速は遅くなっていると推察される。図5および6からは本設計においてピラー間で対称な電位分布が形成され、ピラー付近の電場分布が均一となった。本電場分布をもとに式(2)を用い、粒子に働く $F_{\text{DEP}}$ を導出した。細胞が分離している6本目のピラーの手前約200  $\mu\text{m}$ において、細胞Bはx軸正方向に $3.5 \times 10^{-12}$  Nの $F_{\text{DEP}}$ を受ける。同位置における $F_{\text{drag}}$ は、x軸負方向に $9.0 \times 10^{-13}$  Nの大きさで作用した。そのため、細胞分離に十分な $F_{\text{DEP}}$ が作用し、細胞Bはn-DEPの影響によってピラー列に沿って泳動すると推察される。一方、細胞Aは細胞Bに比べて $F_{\text{DEP}}$ が1/8倍、 $F_{\text{drag}}$ が1/2倍となり、それぞれ $4.4 \times 10^{-12}$  Nおよび $4.5 \times 10^{-12}$  Nとなる。細胞の位置によっては $F_{\text{DEP}}$ よりも $F_{\text{drag}}$ が大きくなり、ピラー間を通過できる。

図7は $x = 100 \mu\text{m}$ 、平均流速となる $z = 43.9 \mu\text{m}$ の位置を初期位置として、粒径5  $\mu\text{m}$ および10  $\mu\text{m}$ の各粒子を流入した時の粒子軌跡を計算したものである。

粒径10  $\mu\text{m}$ の細胞B(白丸)はピラー近傍でn-DEPの影響を受けて、デバイスの中央へ移動した。一方、粒径5  $\mu\text{m}$ の細胞A(黒丸)は $F_{\text{DEP}}$ の影響を受けながらもピラー間を通過した。

本条件下で、 $F_{\text{DEP}}$ を用いた粒径による粒子分離が可能であることを示している。

本分離条件を定量化するために、x軸方向に関して $F_{\text{DEP}}$ の値を $F_{\text{drag}}$ の大きさを除算した結果を図8に示す。

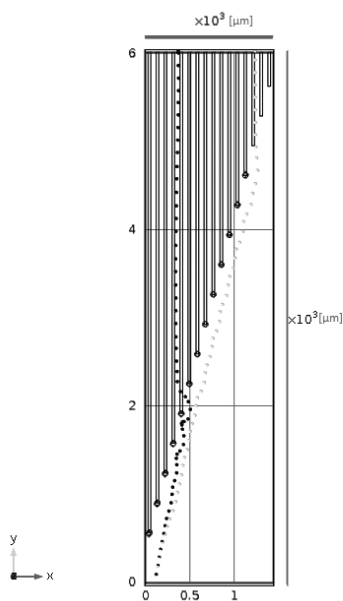


図7 試行モデルにおける粒子軌跡  
Fig.7 Particle trajectory in trial model.

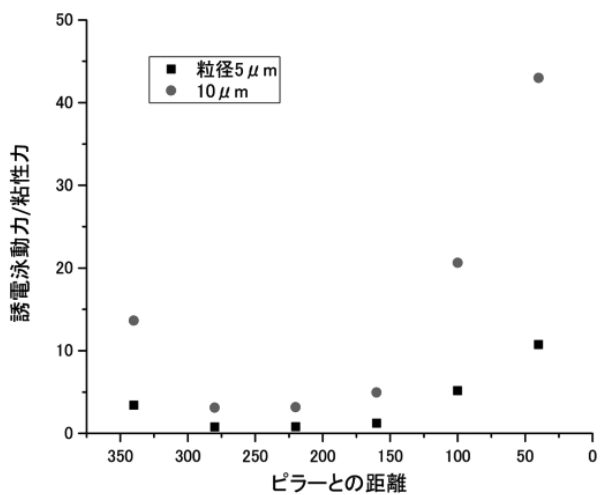


図8 誘電泳動力と粘性力の定量的相関  
Fig.8 Quantitative comparison between dielectrophoretic and viscous force.

横軸のピラーとの距離は手前から6本目のピラーと細胞とのy方向の距離とする。値が1よりも大きければ $F_{\text{DEP}}$ が支配的となり細胞はx軸正方向へ泳動する。値が1よりも小さい場合は $F_{\text{drag}}$ が支配的となり細胞はx軸負方向へ流され、ピラー間を通過する。

細胞Aの場合、ピラーまでの距離が280  $\mu\text{m}$ の位置で0.779、220  $\mu\text{m}$ の位置では0.794となり $F_{\text{drag}}$ が支配的となった。そのため、約200  $\mu\text{m}$ 以上ピラーとの距離がある位置では $F_{\text{drag}}$ が $F_{\text{DEP}}$ を上回ることが示唆される。なお、ピラーはy軸方向に336  $\mu\text{m}$ の間隔で配置しているため、約350  $\mu\text{m}$ 離れた位置では手前のピラーによる $F_{\text{DEP}}$ の影響を受けることで値が増加したと推察される。

### 3.3 実験モデルにおける分離性能評価

実験モデルではz方向の力も考慮した軌跡を導出する。細胞が沈降、もしくは浮上するとポワズイユ流れより $F_{\text{drag}}$ が極めて小さくなる。相対的に $F_{\text{DEP}}$ が大きくなるため、全ての細胞がピラー列に沿って泳動する。そのため、細胞の高さ位置の変化は小さいほど良い。また、より高精度な分離を目指し、細胞Aの粒径を7.5  $\mu\text{m}$ として分離の難易度を上げて検討を行った。細胞に対して浮力も考慮した正味重力(重力および浮力の合力) $F_g$ を式(10)で表す。

$$F_g = \frac{4}{3} \pi r^3 g (\rho_p - \rho) \quad (10)$$

$g$ は重力加速度、 $\rho_p$ は細胞の比重を表す。細胞Aの正味重力は $3.9 \times 10^{-13}$  Nであり、細胞Bでは $5.1 \times 10^{-13}$  Nとなる。図9に流入速度を $3.6 \times 10^{-4}$  m/sとした場合の高さ35  $\mu\text{m}$ の位置における流速分布を示す。また、給電線お



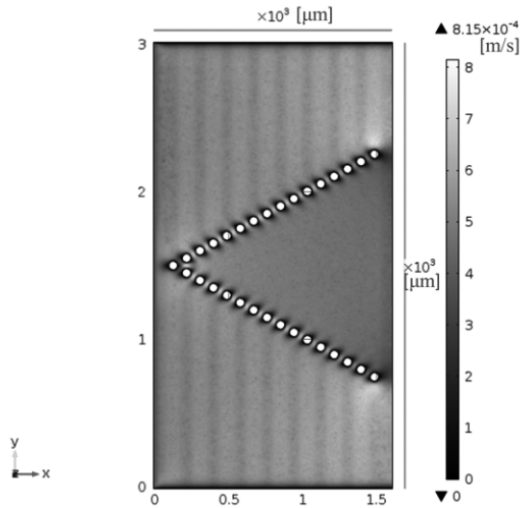


図9 実験モデルにおける流速分布  
Fig.9 Spatial distribution of flow velocity in experimental model.

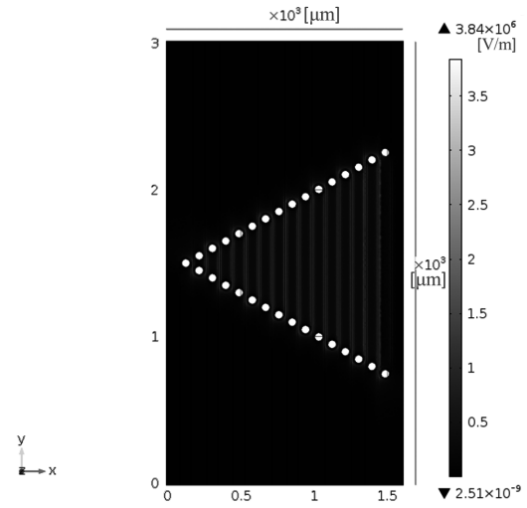


図11 実験モデルにおける電場分布  
Fig.11 Spatial distribution of electric field in experimental model.

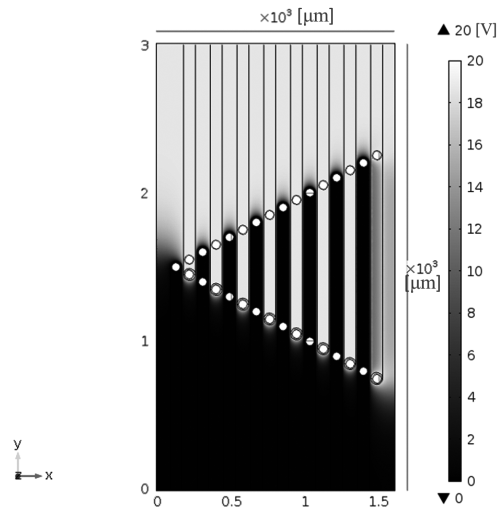


図10 実験モデルにおける電位分布  
Fig.10 Spatial distribution of electric potential in experimental model.

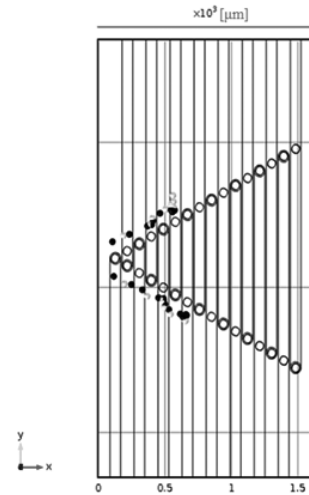


図12 実験モデルにおける粒子軌跡 x-y 座標 (20 V 印加時)  
Fig.12 Particle trajectory in experimental model. (apply 20 V in x-y coordinate)

よびピラーに振幅 20 V および 0 V の交流電圧を交互に印加した場合の給電線の厚さである  $z = 5$  の位置における電位および電界分布を図 10 および 11 に示す。

図 9 に示した通り、ピラー外側の広範囲において流速が速く、 $6.0 \times 10^{-4}$  m/s 程度となった。そのため、本構造でも近似的に平面ポアズイユ流とみなす事ができる。図 10 および 11 の電位および電場分布からは初期構造とは異なり、ピラー付近における電場勾配の大小が交互に存在する事が分かる。

図 12 に平均流速となる高さ  $11.9 \mu\text{m}$  の位置から流入させた粒径  $10 \mu\text{m}$  (白丸) と  $7.5 \mu\text{m}$  (黒丸) のそれぞれの粒子軌跡を示す。

本モデルでは、試行モデルと比較してピラーが近接し

ているため、ピラー周辺に生じる n-DEP 力の影響が大きい。その結果、両細胞はピラー間を通過できずにピラー外側に沿って泳動した。また、細胞は底面からの n-DEP の影響によって浮上した。しかし、それぞれの細胞に働く n-DEP が大きいため、細胞がデバイス上面へ泳動し、非常に動きが遅くなった。次に、 $z = 5$  (黒)、35 (灰)、65 (白)  $\mu\text{m}$  の位置から細胞 A を流入させた場合の軌跡を x-z 面から解析した結果を図 13 に示す。20 V 印加の際、ピラー付近で細胞 A に作用する z 方向の  $F_{\text{DEP}}$  は  $5.0 \times 10^{-13}$  -  $5.0 \times 10^{-12}$  N 程度であるため、細胞が浮上したと推察される。しかし、40 V 印加した場合、z 方向の  $F_{\text{DEP}}$  は大きくなるが、細胞は 20 V 印加の時よりも流れに沿って移動した。これは、ピラーからの x および

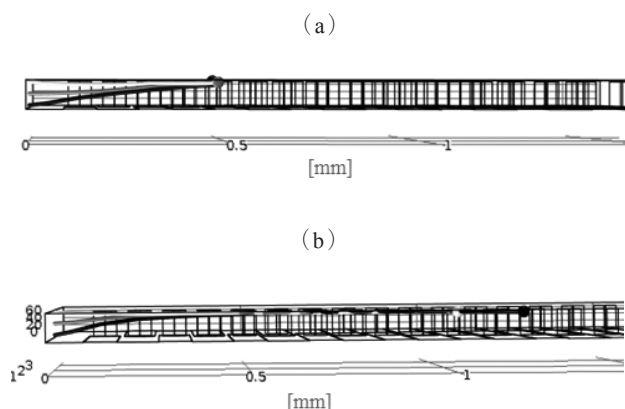


図13 粒子軌跡 x-z 座標 ((a):20 V 印加, (b):40 V 印加)  
Fig.13 Particle trajectory in cell levitation device. (apply (a) 20 V and (b) 40 V in x-z coordinate)

y 方向への n-DEP によって細胞がよりピラーから離れた位置を流れるためであると考えられる。

#### 4. まとめ

本報では、平面電極による DEP 分離の課題を解決するため、ピラー型電極を用いた DEP 分離デバイスを考案し、二種類のデバイスにおける n-DEP を利用した血中細胞分離性能について検証をした。試行モデルでは流体流入速度を  $5.0 \times 10^{-5}$  m/s、印加電圧を 20 V、周波数を 10 kHz とした際に、導電率 40 mS/m、比誘電率 80 の媒質中で粒径  $5 \mu\text{m}$  と  $10 \mu\text{m}$  の細胞分離が可能であることを数値的に確認した。また、重力および浮力を考慮した新たなデバイス（実験モデル）も考案した。本モデルに対する解析結果から、給電線からの n-DEP により細胞が浮上する事が確認された。本解析条件では n-DEP が大きく、細胞がデバイス上面へ泳動し、動きが遅くなることも示唆された。その原因として、デバイスの高さが低いために n-DEP がほぼ一定になってしまう事が推察される。

今後のデバイス設計では、底面からの n-DEP のみを小さくする、もしくはデバイスを高くする必要がある。また、印加電圧と粒子軌跡の相関調査や給電線の誘電体コーティング、およびピラーのピッチ変更等により、CTC に対する血液中からの選択的分離デバイスの構築に必要な基本的解析データを整備していく予定である。

#### 参考文献

- 1) K. Hoshino, Y. Hung, N. Lane, M. Huebschman, J. W. Uhr, E. P. Frenkel and X. Zhang: Microchip-based Immunomagnetic Detection of Circulating Tumor Cell. *Lab Chip*, **11** (2011) 3449-3457
- 2) K. Hoshino, P. Chen, Y. Huang, and X. Zhang: Computational Analysis of Microfluidic Immunomagnetic Rare Cell Separation from a Particulate Blood Flow. *Anal Chem*, **84** (2012) 4292-4299
- 3) S. Zheng, H. K. Lin, B. Lu, A. Williams, R. Datar, R. J. Cote, and Y. Tai: 3D Microfilter Device for Viable Circulating Tumor Cell (CTC) Enrichment from Blood. *Biomed Microdevices*, **13** (2010) 203-213
- 4) P. R. C. Gascoyne, and S. Shim: Isolation of Circulating Tumor Cells by Dielectrophoresis. *Cancers*, **6** (2014) 545-579
- 5) R. Aoki, N. Shirai, S. Uchida, and F. Tochikubo: Numerical Investigation of the Correlation between Electrode Structure and Number of Captured Particles in a Dielectrophoretic Device. *IEEE Transaction on Sencors and Micromachines*, **134** (2014) 235-240
- 6) N. Piacentini, G. Mernier, R. Tornay, and P. Renaud: Separation of Platelets from Other Blood Cells in Continuous Flow by Dielectrophoresis Field Flow Fractionation. *Biomicrofluidics*, **5** (2011) 034122.
- 7) H. J. Mulhall, F. H. Labeed, B. Kazmi, D. E. Costea, M. P. Hughes, and M. P. Lewis: Cancer, Pre-cancer and Normal Oral Cells Distinguished by Dielectrophoresis. *Anal Chem*, **401** (2011) 2455-2463
- 8) T. Enjoji, E. Amano, S. Uchida, and F. Tochikubo: Analysis of Dielectric Characteristics for Injured Escherichia coli Using Impedance Measurement Method. *Journal of the Institute of Electrostatics Japan*, **31** (2007) 8-13
- 9) T. Yasukawa, J. Yamada, H. Shiku, F. Mizutani, and T. Matsue: Positioning of Cells Flowing in a Fluidic Channel by Negative Dielectrophoresis. *Sensors and Actuators*, **186** (2013) 9-16
- 10) F. Fabbri, S. Carloni, W. Zoli, P. Ulivi, G. Gallerani, P. Fici, E. Chiadini, A. Passardi, G. L. Frassinetti, and A. Ragazzini, D. Amadori: Detection and recovery of circulating colon cancer cells using a dielectrophoresis-based device: KRAS mutation status in pure CTCs. *Cancer Letters*, **335** (2013) 225-231
- 11) 佐藤健太, 白井直機, 内田 諭, 朽久保文嘉, 円城寺隆治, 脇坂嘉一: 3次元誘電泳動デバイス内における腫瘍細胞の挙動シミュレーション, 平成 27 年静電気学会全国大会, **39** (2015) 151-152
- 12) A. Di Biasio, and C. Cametti: The Effect of the Membrane Electrical Conductivity. *Biointerfaces*, **84** (2011) 433-441
- 13) F. S. Hamdi, O. Francais, E. D. Gergam, and B. L. Pioufle: How Medium Osmolarity Influences Dielectrophoretically Assisted On-chip Electrofusion. *Bioelectrochemistry*, **100** (2014) 27-35
- 14) K. Heileman, J. Daoud, and M. Tabrizian: Dielectric Spectroscopy as a Viable Biosensing Tool for Cell and Tissue Characterization and Analysis. *Biosensors and Bioelectronics*, **49** (2013) 348-359
- J. D. Brown and S. M. Satoh: Using static charge on crystals to produce electron and ion beams. *J. Electrostat.*, **61** (2003) 149