

誘電回転法による人工多能性幹細胞の分化評価

桜庭 一樹*, 脇坂 嘉一**, 中島 崇仁***, 箱田 優*.¹

(2017年9月11日受付; 2017年12月5日受理)

Differentiating Evaluation of Induced Pluripotent Stem Cells Using Electrorotation Method

Kazuki SAKURABA*, Yoshikazu WAKIZAKA**,
Takahito NAKAJIMA*** and Masaru HAKODA*.¹

(Received September 11, 2017; Accepted December 5, 2017)

We examined the differentiation of mouse iPS cells by dielectrophoresis (DEP). We induced the differentiation into osteoblasts and cardiomyocytes and confirmed differentiation by fluorescent staining. The imaginary parts of the Clausius-Mossotti function $\text{Im}[K(\omega)]$ of the differentiated cells were measured using electrorotation (EROT) which is a type of DEP. $\text{Im}[K(\omega)]$ of the differentiated cells were different in the stage. Furthermore, $\text{Im}[K(\omega)]$ was analyzed using a single shell model. It was demonstrated that this EROT method enables the identification of the undifferentiated cells or the differentiated cells.

1. はじめに

近年, 種々の細胞への分化能を有する ES 細胞や iPS 細胞等, 多能性幹細胞の研究が盛んに行われている^{1, 2)}. 特に iPS 細胞は患者から摘出した細胞に, Oct 3/4, Sox 2, Klf 4, c-Myc の 4 遺伝子を導入することで作製されるため, 倫理上の問題や移植の際の拒絶反応が抑えられるという点から注目されている³⁾. しかし, iPS 細胞から目的細胞への分化は多段階のステップを必要とし, 細胞分化を安全にかつ確実に制御しなければ目的細胞以外への分化や未分化細胞の癌化が生じる. そのため, 細胞分化の仕組みの解明や細胞分析の技術開発の重要性が高まっている.

従来の細胞や生体高分子などの計測や分離には, 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や磁場を利用した MACS が挙げられる⁴⁾. これらの分析法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る. また, 非侵襲的な分析法としてマイクロ流路を使った流体力による分離や, 電気泳動や誘電泳動など電場を用いた分析法がある⁵⁻⁸⁾. しかし, 流体力のみの分離精度は, 細胞径や密度差に起因し, それらが極端に異なる場合のみに使用が限定される. また電場を用いる電気泳動は, 負の電荷を有する DNA やタンパク質の同定に限定されている. 一方, 誘電泳動は不均一な交流電場に細胞を置くことで, 細胞内の分極の強さで分析する. そのため分離対象が電気的に中性なものまでをカバーできる. そこで, 本研究は電場を利用した誘電泳動現象の 1 つである誘電回転法を使用し細胞分析を行った. 誘電回転法はこれまでに, 金属微粒子やマウス卵細胞, 細胞凝集体, 魚卵の分化状態の電気特性評価などの研究で用いられている⁹⁻¹⁴⁾. また著者らは, 誘電回転法を用いて, 細胞の同定および活性の評価を行った¹⁵⁾. その際に細胞の状態変化から誘電特性が変化することを明らかにした.

本研究では iPS 細胞の分化の仕組み解明の一環としてマウス iPS 細胞を, 中胚葉を介し骨芽細胞と心筋細胞に分化させ, 分化過程での誘電特性の評価を目的とした. なお, 細胞分化の確認は従来の選別法である蛍光染色法で確認し, 細胞内電気的特性は Single-shell model による解析から算出した.

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

***群馬大学大学院医学研究科
(〒371-8511 群馬県前橋市昭和町 3-39-22)
Graduate School of Medicine, Gunma University, 3-39-
22, Showa-machi, Maebashi-shi, Gunma 371-8511, Japan

¹ hakoda@gunma-u.ac.jp

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¹⁶⁾。

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

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^{17, 18)}。

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

3. 実験方法と手順

3.1 分化培養

本実験ではマウス iPS 細胞から胚葉体を介し、骨芽細胞、心筋細胞へ分化培養させた。中胚葉誘導期は共通して5日間とした。その後各分化細胞への誘導を開始し、骨芽細胞への分化誘導は中胚葉誘導期と合計して19日間、同様に心筋細胞への分化誘導は17日間とし37℃、5.0% CO₂ 下のインキュベータ (BNA-111, ESPEC) で培養した¹⁹⁻²¹⁾。培養培地は DMEM (D6429, Sigma) 500 ml を基本とし、10% FBS (BRL, GIBCO)、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2.0%, NEAAS (M7145, Sigma) 5 ml, モノチオグリセロール (195-15791, Wako) 0.5 ml を添加した混合培地を使用した。マウス iPS 細胞の未分化培養には、分化抑制剤として LIF (199-16051, Wako) 0.5 ml を上記混合培地に加えた。次に iPS 細胞から中胚葉への分化培養には上記混合培地に 30 μM CHIR (034-23103, Wako) と 5 μM Cyc (038-19311, Wako) を添加した。中胚葉から骨芽細胞分化培養時には 1 μM SAG (ALX-270-426-M001, Enzo) と 50 $\mu\text{g/ml}$ アスコルビン酸 (A4034, Sigma), 10 mM β -グリセロリン酸 (G9422, Sigma), 0.1 μM デキサメタゾン

(047-18863, Wako) を添加した。心筋細胞への分化培養には 10 μM KY02111 (SML0948, Sigma) と 10 μM XAV939 (247-00951, Wako) を添加した。

3.2 蛍光染色

マウス iPS 細胞の分化確認のために細胞染色を行った。未分化確認には GFP (緑色蛍光タンパク質)、細胞の生存確認には DAPI (D9542, Sigma) による蛍光染色を行った。骨芽細胞への分化確認は ALP (アルカリホスファターゼ) 染色キット (武藤化学株式会社) による青色染色の有無で確認した。また、心筋細胞への分化確認は 4.0% ホルムアルデヒド (163-20145, Wako) による固定処理、0.5% ポリオキシエチレン (10) オクチルフェニルエーテル (168-11805, Wako) による浸透処理、3.0% ウシ血清アルブミン (011-07493, Wako) 溶液によるブロッキング処理後に Troponin T (SAB4200717, Sigma) 抗体染色 (以降 TnT 染色と呼称) を行い赤色染色した。なお、観察には蛍光顕微鏡 (CKX41, OLYMPUS) と一眼レフカメラ (EOSKiss X8i, CANON) を使用し、蛍光強度の算出にはフリーソフト Image J (アメリカ国立衛生研究所) を使用した。

3.3 装置形状と電圧印加

図1(a)に本実験の装置概略図と四重電極の拡大図を示す。

本実験はスライドガラスに蒸着した薄膜 Au 電極デバイス (AFI テクノロジー製) を使用した。図1(b)は電極の拡大図であり、電極幅は 75 μm 、電極間距離は 300 μm である。電極の周囲はシリコンカバーで覆い、電極デバイス

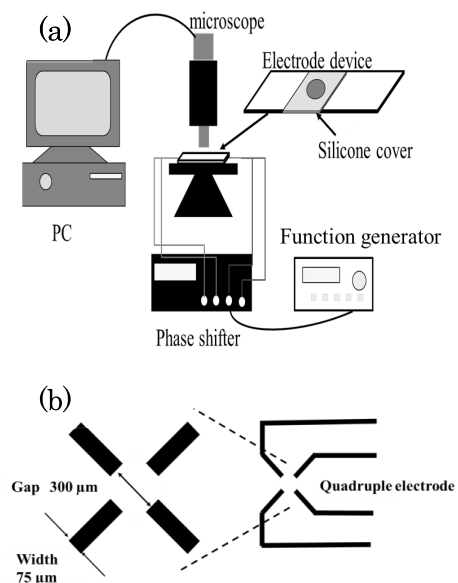


図1 装置図 (a) および四重電極形状 (b)
Fig.1 Schematic diagram of experimental apparatus (a) and quadruple electrode shape (b).

を顕微鏡（MT5310L, MEIJI TECHNO Co.）上に配置した。配置後に細胞懸濁液を滴下し電圧を印加した。電圧印加はファンクションジェネレーター（33220A, Agilent）で出力し、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印加した。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、電極間に配置した細胞は回転電場の影響を受け回転する。なお細胞の回転挙動は PC（Compaq 6000 Pro SF, 日本 HP）に動画として保存し測定した。

3.4 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。回転速度は各周波数で 10~30 個のデータを測定し平均値とした。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。なお、分化実験は未分化 iPS 細胞（培養 0 day）、中胚葉誘導期（培養 5 days）、骨芽細胞誘導期（9, 13, 17, 19 days）、心筋細胞誘導期（8, 12, 17 days）の日数で行った。

4. 実験結果及び考察

4.1 細胞染色

iPS 細胞の分化過程における誘電特性を測定するにあたり、目的の細胞への分化の有無を細胞染色にて調べた。その結果が図 2 である。図 2(a) は培養 0 day、図 2(b) は培養 5 days における GFP 染色画像である。GFP は未分化の iPS 細胞にみられるタンパク質を緑色蛍光させた。よって、図 2(a) では細胞が未分化のため緑色蛍光を確認した。一方、図 2(b) では分化が進行し GFP が失活したことを確認した。図 2(c) は培養 0 day、図 2(d) は培養 5 days、図 2(e) は骨芽細胞へ分化誘導時の 19 days、図 2(f) は心筋細胞へ分化誘導時の 17 days の DAPI 染色画像である。GFP は分化が進行すると染色がなくなり、細胞の存在を確認できなくなった。そこで生細胞の核を染色し、分化誘導後も細胞の存在を確認するために DAPI 染色を行った。図 2(c), (d), (e), (f) の全てで染色がみられたことから、分化誘導後も細胞が存在していると確認した。また、図 2(g) は培養 0 day、図 2(h) は骨芽細胞へ分化誘導時の 19 days の ALP 染色画像である。ALP は肝臓、小腸、骨などに広く分布している酵素であるが、特に骨形

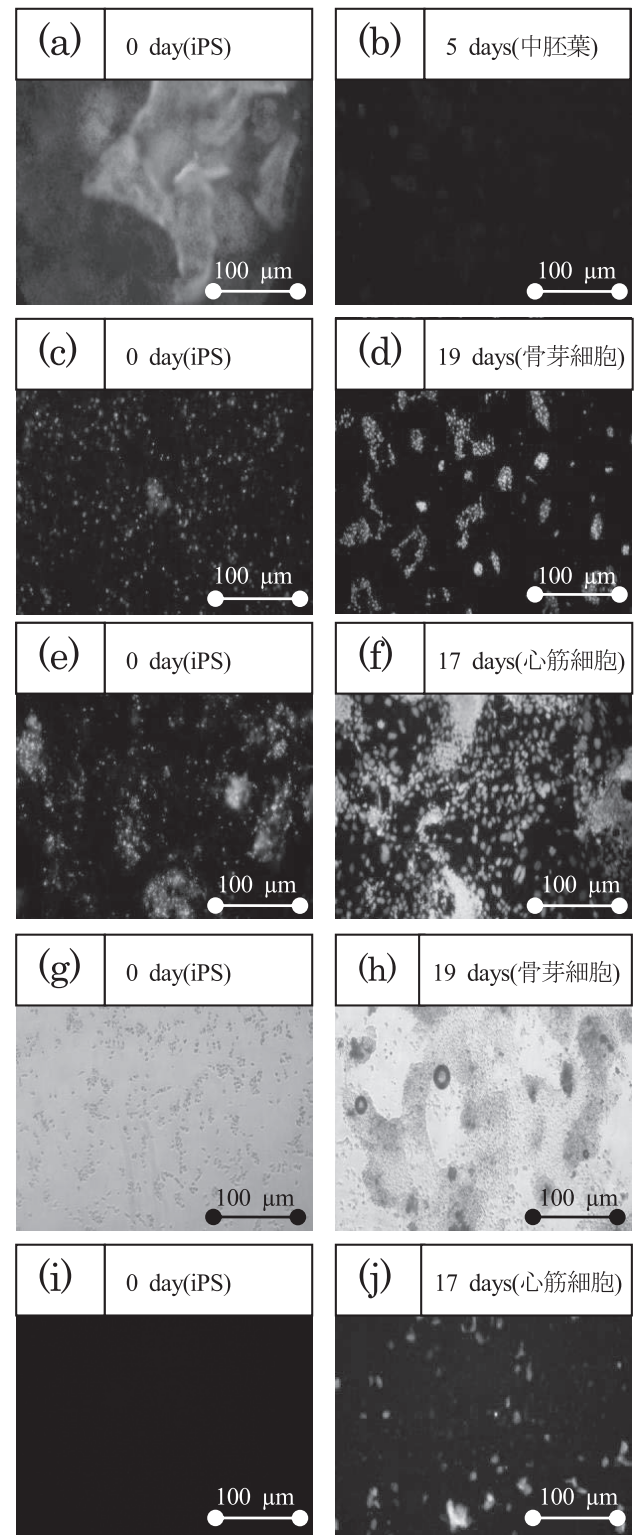


図 2 分化、未分化細胞の染色画像

Fig.2 Stained image of differentiated cells and undifferentiated cells.

GFP staining of (a) culture 0 day, (b) culture 5 days.
DAPI staining of (c) culture 0 day, (d) culture 5 days,
(e) culture 19 days of differentiated osteoblast,
(f) culture 17 days of differentiated cardiomyocyte.
ALP staining of (g) culture 0 day, (h) culture 19 days.
TnT staining of (i) culture 0 day, (j) culture 17 days.

成のマーカーとして用いられている。ALPを持つ細胞は青色染色されるため、図2(h)で青色染色を確認したことからiPS細胞が骨芽細胞に分化したことを確認した。加えて、図2(i)は培養0 day, 図2(j)は心筋細胞へ分化誘導時の17 daysのTnT染色画像である。TnTは筋肉を構成する蛋白質の一つで心筋特異性が高く、心筋マーカーの代表例である。図2(i)の未分化細胞では赤色を確認できず、図2(j)では赤色染色を確認したことからiPS細胞が心筋細胞に分化したことを確認した。

4.2 蛍光強度

図2の染色結果を、ImageJによって数値化した結果を図3に示す。図3(a)は骨芽細胞へ誘導時のGFP, DAPI染色の結果である。GFPは培養5 daysで急激に低下し、DAPIはバラつきがあるものの一定の値をとった。これはGFPの低下が分化の進行を表している。一方のDAPIは、分化誘導後も細胞が存在していることを表している。図3(b)は心筋細胞へ誘導時のGFP, DAPI, TnT染色の結果である。図3(a)同様GFPは培養5 daysで急激な低

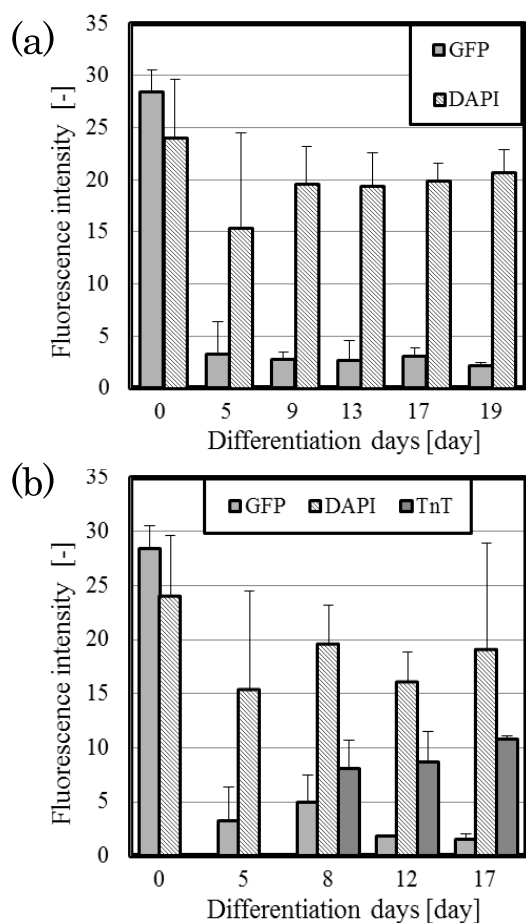


図3 分化による蛍光強度への影響

(a) 骨芽細胞誘導 (b) 心筋細胞誘導

Fig.3 Effect of fluorescence intensity by differentiation.

(a) Differentiated osteoblast

(b) Differentiated cardiomyocyte

下を示し、DAPIは一定の値をとった。また、TnT染色は中胚葉から心筋細胞への分化誘導8 days以降に発現した。これは中胚葉から心筋細胞へ正しく分化が進行したことを表している。

4.3 分化による誘電特性の変化

分化培養日数毎に細胞の誘電特性を求めた結果を図4に示す。なお、図中のnは測定した細胞数を示している。未分化iPS細胞(0 day)は100 kHzで $\text{Im}[K(\omega)]$ の最大値を示し、中胚葉誘導期(5 days)は20~50 kHzで最大値を示した。図4(a)の骨芽細胞誘導期(9~19 days)はピーク周波数が50 kHzのまま、 $\text{Im}[K(\omega)]$ の値が低下していった。一方、図4(b)の心筋誘導期(8~17 days)はピーク周波数が20~100 kHzの広範囲に広がり、分化が進行しても $\text{Im}[K(\omega)]$ の値は変化しなかった。この結果より、未分化細胞と骨芽、心筋細胞で $\text{Im}[K(\omega)]$ の値に違いが生じ、未分化細胞と分化細胞の同定が可能であると示唆された。

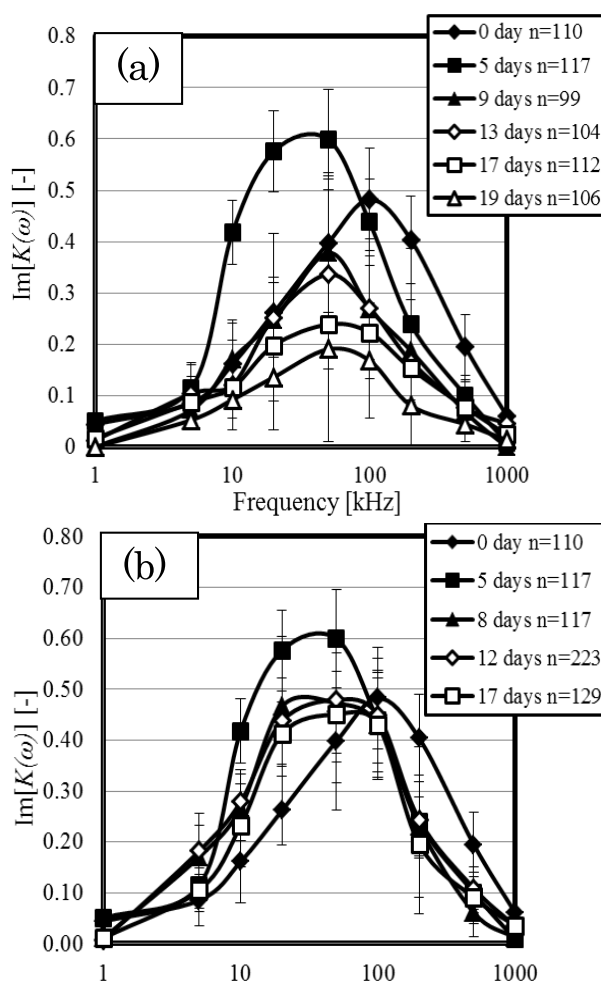


図4 分化による $\text{Im}[K(\omega)]$ の変化

Fig.4 Change of $\text{Im}[K(\omega)]$ by differentiation.

(a) Differentiated osteoblast

(b) Differentiated cardiomyocyte

4.4 Single-Shell modelによる解析

分化による $\text{Im}[K(\omega)]$ の違いが何に起因するものかを調べるため Single-Shell model を使い、計算した結果を表 1 に示す。Single-Shell model とは細胞の細胞質を均質な電解質溶液とし、その電解質溶液を絶縁性の薄い膜で囲んだ単純なモデルである。解析モデルは、植物プロトプラストや動物細胞において測定結果と良く合致することが報告されている^{22, 23)}。解析結果から導出された細胞質比誘電率、細胞質電気伝導度、細胞膜キャパシタンスを図 5 に示し、細胞質比誘電率、細胞質電気伝導度、細胞膜キャパシタンスの文献値については表 2 に示す²⁴⁻²⁹⁾。表 1 と図 5 より骨芽細胞は心筋細胞に比べ低い値を記録した。これは分化の進行とともに細胞内の物性が変化したためだと考察した。生体組織の中で、骨は木材と同程度のヤング率を有し、変形しにくい物質である³⁰⁾。これにより電気抵抗率が高くなり表 1 の電気的物性も分化とともに低下したと考察した。一方の心筋細胞は、筋組織に分類され、組織の中でも特異的な興奮性組織にあたる。興奮性組織は細胞自身の能動的な収縮と電気信号の受動的な伝達という性質を併せ持っている。この特徴から心筋細胞の電気的物性は高い値を示したと考察した。また、今回の解析結果は文献値と 10～15% 程度の誤差を有したが、これは実験による偏差も含めれば無視できる範囲であると考察した。

表 1 Single-Shell model 解析 (a) 骨芽分化 (b) 心筋分化
Table1 Single-Shell model analysis.

(a) Differentiated osteoblast
(b) Differentiated cardiomyocyte

(a)			
Differentiation days [day]	Cytoplasm relative permittivity [-]	Cytoplasm electric conductivity [S/m]	Cell Membrane capacitance [F/m^2]
0 day	94.8	5.59×10^{-2}	6.52×10^{-4}
5 days	97.0	1.11×10^{-1}	2.30×10^{-3}
9 days	76.6	1.98×10^{-3}	6.88×10^{-4}
13 days	70.0	1.35×10^{-3}	6.04×10^{-4}
17 days	67.6	1.40×10^{-3}	3.10×10^{-4}
19 days	52.6	1.37×10^{-3}	3.95×10^{-4}

(b)			
Differentiation days [day]	Cytoplasm relative permittivity [-]	Cytoplasm electric conductivity [S/m]	Cell membrane capacitance [F/m^2]
0 day	94.8	5.59×10^{-2}	6.52×10^{-4}
5 days	97.0	1.11×10^{-1}	2.30×10^{-3}
8 days	300.1	1.15×10^{-2}	1.66×10^{-3}
12 days	311.2	1.03×10^{-2}	1.53×10^{-3}
17 days	321.1	8.18×10^{-3}	1.34×10^{-3}

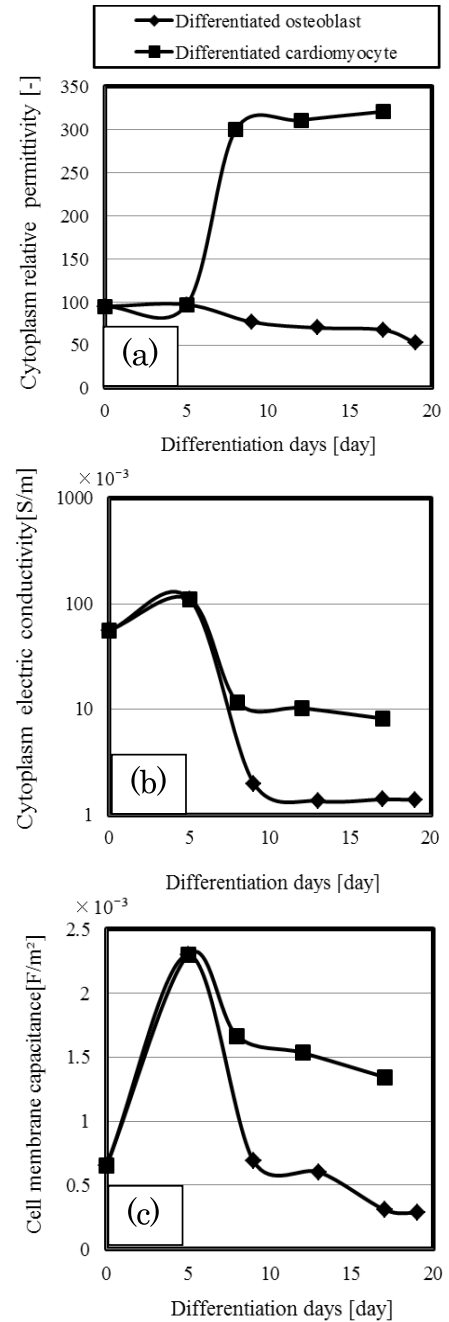


図 5 分化による各パラメータの変化
(a) 細胞質比誘電率 (b) 細胞質電気伝導度
(c) 細胞膜キャパシタンス
Fig.5 Change of each parameter by differentiation.
(a) Cytoplasm relative permittivity
(b) Cytoplasm electric conductivity
(c) Cell membrane capacitance

表 2 各パラメータの文献値
Table2 Literature value of each parameter.

Cytoplasm relative permittivity [-]	Cytoplasm electric conductivity [S/m]	Cell membrane capacitance [F/m^2]
44.9～270	$2.3 \times 10^{-3} \sim 4.7$	$3.8 \times 10^{-4} \sim 1.2 \times 10^{-2}$

5. 結言

誘電泳動現象の1つである誘電回転法を用いた分化過程での $\text{Im}[K(\omega)]$ を測定した結果, 以下の結論を得た.

- (1) 分化過程に伴って分化細胞の $\text{Im}[K(\omega)]$ の変化を明らかにした.
- (2) $\text{Im}[K(\omega)]$ の違いから未分化細胞と骨芽細胞, 心筋細胞の同定が可能であることが示唆された.
- (3) Single-shell model 解析から分化過程における細胞の細胞質比誘電率, 細胞質電気伝導度, 細胞膜キャパシタンスを明らかにした.

参考文献

- 1) M. J. Evans and M. H. Kaufman :Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, **202** (1981) 154
- 2) G. R. Martin: Isolation of a pluripotent cell line from earlymouse embryos cultured in medium conditioned by teretocarcinoma stem cell, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **78** (1981) 7634
- 3) K. Takahashi : Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblast by defined factors. *Cell*, **131** (2007) 861
- 4) 静電気学会：静電気ハンドブック, p.841, オーム社 (1988)
- 5) R. G. Daniel and M.W. Westbrook, J. M. Albert: Label-free cell separation and sorting in microfluidic systems. *Anal Bioanal Chem*, **397** (2010) 3249
- 6) M. L. Caroline and M. Yunan, G. L. Robert: Partial Purification of a Megadalton DNA Replication Complex by Free Flow Electrophoresis. *PLOS ONE*, **11** (2016) 1
- 7) L. Nuttawut and Y. Chun: Continuous separation of multiple particles by negative and positive dielectrophoresis in a modified H-filter. *Electrophoresis*, **35** (2014) 714
- 8) D. Yagmur and K. Aziz, E. Murat: Label-free detection of multidrug resistance in K562 cells through isolated 3D-electrode dielectrophoresis. *Electrophoresis*, **36** (2015) 1149
- 9) S. Garcia and R. Yukun, J. Juan, M. Hywel, R. Antonio: Alternating current electrokinetic properties of gold-coated microspheres. *American Chemical Society*, **28** (2012) 13861
- 10) N. Tsukada, K. Kudoh, M. Budiman: Development Auto Nuclear Transplantation System. *Mammalian ova research*, **18** (2001) 106
- 11) 白樫 了, ウラジミール スコルコフ :Electrorotation による魚卵の電気特性の測定. *生産研究*, **65** (2013) 343
- 12) C. Trainito and E. Bayart, F. Subra, O. Franc: The Electrorotation as a Tool to Monitor the Dielectric Properties of Spheroid During the Permeabilization. *J Membrane Biol*, **249** (2016) 593
- 13) R. Yukun and W. Hongchi, F. Guojing, H. Likai, J. Hongyuan: Effects of Chip Geometries on Dielectrophoresis and Electrorotation Investigation. *Chinese jornal of mechanical engineering*, **27** (2014) 103
- 14) L. Huang and L. Tu, X. Zeng, L. Mi, X. Li, W. Wang: Study of a Microfluidic Chip Integrating Single Cell Trap and 3D Stable Rotation Manipulation. *Micromachines*, **7** (2016) 1
- 15) 桜庭一樹, 古澤尚也, 脇坂嘉一, 箱田 優 :誘電回転法による動物細胞の識別と活性評価. *静電気学会誌*, **41**[1] (2017) 57
- 16) T. B Jones: *Electromechanics of particles*, p.42, Cambridge University Press (1995)
- 17) D. Christopher: 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
- 18) Ying Huang: Membrane dielectric responses of human T-lymphocytes following mitogenic stimulation. *Biochim Biophysica Acta*, **1417** (1999) 51
- 19) K. Takasiro and M. Inamura, K. Kawabata, F. Sakurai, K. Yamanishi, T. Hayakawa, H. Mizuguchi: Efficient adipocyte and osteoblast differentiation from mouse induced pluripotent stem cells by adenoviral transduction. *Stem Cells*, **27** (2009) 1802
- 20) K. Kanke and H. Masaki, T. Saito, Y. Komiyama, H. Hojo, H. Nakauchi, C. L. Alexander, T. Takato, U. Chung, S. Ohba: Stepwise differentiation of pluripotent stem cells into osteoblasts using four small molecules under serum-free and feeder-free conditions. *Stem Cell Reports*, **2** (2014) 751
- 21) I. Minami and K. Yamada, T. Otsuji, T. Yamamoto, Y. Shen, S. Otsuya, S. Kadota, N. Morone, M. Barve, Y. Asai, T. T. Heuser, J.E. Heuser, M. Uesugi, K. Aiba, N. Nakatsuji: A small molecule that promotes cardiac differentiation of human pluripotent stem cells under defined, cytokine- and xeno-free conditions. *Cell Reports*, **2** (2012) 1448
- 22) A. Docosilis and N. Kalogerakis, L.A. Behie, K.V. Kaler: A Novel Dielectrophoresis-Based Device for Selective Retention of Viable cells in Cell Culture Media. *Biotechnol Bioeng*, **54** (1997) 239
- 23) K.V. Kaler and T.B. Jones: Dielectrophoretic spectra of single cells determined by feedback-controlled levitation. *Biophys. J.*, **57** (1990) 173
- 24) J. Yang and Y. Huang, X. Wang, X. Wang, F. Becker, P. Gascoyne: Dielectric Properties of Human Leukocyte Subpopulations Determined by Electrorotation as a Cell Separation Criterion. *Biophysical Journal*, **76** (1999) 3307
- 25) C. I. Trainito and E. Bayart, F. Subra, O. Francais, B. Le Pioufle: The Electrorotation as a Tool to Monitor the Dielectric Properties of Spheroid During the Permeabilization. *Membrane Biol*, **249** (2016) 593
- 26) A. Docoslis and N. Kalogerakis, L. A. Behie, S. Kaler: A Novel Dielectrophoresis-Based Device for the Selective Retention of Viable Cells in Cell Culture Media. *Biotechnology and bioengineering*, **54** (1997) 239
- 27) T. Zhou and Y. Ming, S. F. Perry: Estimation of the physical properties of neurons and glial cells using dielectrophoresis crossover frequency. *Biological Physics*, **42** (2016) 571
- 28) 廣田祐輔 : 誘電泳動現象を用いた細胞活性評価法および細胞分離法の開発, p.33, 群馬大学博士論文 (2010)
- 29) 嶋津秀昭 : 医用工学概論, p.111, 医歯薬出版株式会社 (2005)