

シーリング・クリークギャップ電極における 正の誘電泳動力の測定と白血病細胞分離への応用

Measurement of Positive Dielectrophoretic Force in the Ceiling Creek Gap Electrode and Its Application to Separation of Leukemia Cell

江口 正徳^{1, 3}, 今里 浩子^{2, 3}, 山川 烈^{1, 3},

- 1) 九州工業大学大学院生命工学研究科
- 2) 産業医科大学病院・臨床検査・輸血部
- 3) 財団法人ファジィシステム研究所

Masanori EGUCHI^{1,3}, Hiroko IMASATO^{2,3}, Takeshi YAMAKAWA^{1,3}

- 1) Graduate School of Life Science and Systems Engineering, Kyushu Institute of Technology
- 2) Department of Laboratory and Transfusion Medicine, University Hospital of Occupational and Environmental Health
- 3) Fuzzy Logic Systems Institute

Abstract: In recent years, dielectrophoresis has attracted much interest because of its effective method to achieve the separation, detection and characterization of particles such as biological cells and virus. Dielectrophoresis (DEP) is a movement of particles in a given medium by a force, which is generated in non-uniform electric fields. In this paper, we measured the positive dielectrophoretic force (DEP force) in the Ceiling Creek Gap electrode. The measuring method is employed the inclined gravity, which is a component of gravitational force along the inclined floor. It is expected that the Ceiling Creek Gap electrode could separate Leukemia cells in blood by difference in dielectric property.

Keywords: Dielectrophoresis, Positive Dielectrophoretic Force, Ceiling Creek Gap Electrode, Inclined Gravity, Leukemia cell

Masanori EGUCHI

Hibikino 2-4, Wakamatsu, Kitakyushu, 808-0196, Japan

Tel: 093-695-6123, E-mail: eguchi-masanori@edu.brain.kyutech.ac.jp

1. はじめに

急性白血病は、骨髄中で癌化した白血球(白血病細胞)が異常に増加する病気であり、その病状進行は極めて速いので、血中から白血病細胞を早期に発見する必要がある。しかしながら、臨床検査で使用されているフローサイトメトリーは、血液中に白血病細胞が微少数しか存在しない場合、炎症細胞や大型の白血球を白血病細胞と誤認したり、白血病細胞を見落とししたりする危険性があり、なかなか確定診断につながらない。誘電泳動現象は、電極の形状および電圧(周波数・単相もしくは多相)を設計すること

で、任意の物質を分離・検出・同定が可能であり、生体試料検査法に極めて有効な手段として期待されている[1-3]。誘電泳動現象は、不均一電界下におかれた溶液中の物質に誘電泳動力が生じることで移動する現象である[4]。誘電泳動力の大きさと方向は、物質および溶液の誘電特性(誘電率、導電率)によって決定され、電界がより強い方向へ移動することを正の誘電泳動、電界がより弱い方向へ移動することを負の誘電泳動と呼ばれる。この現象を利用して急性白血病細胞の検出・同定を実現するためには、細胞に生じる誘電泳動力を直接測定し、その特性を理解しなければならない。筆者らは、斜面重力を利用して、クリークギャップ電極でポリスチ

レンビーズに生じた負の誘電泳動力を測定した[5]. 白血病細胞や赤血球など血中細胞は通常, 数十 kHz~数十 MHz の周波数帯において, 正の誘電泳動力が生じる. しかしながら, チャンバーのフローリング (床) にクリークギャップ電極を配置した測定方法では, 電極エッジ部に電界が集中し, 粒子が付着してしまうことから, 正の誘電泳動力の測定が極めて困難であった.

そこで本研究では, クリークギャップ電極をチャンバーのシーリング (天井) に配置することによって, チタン酸バリウム粒子に生じる正の誘電泳動力を測定した. また, この測定技術を利用した白血病細胞分離の基礎実験を行ったので報告する.

2. 誘電泳動力と斜面重力

2.1 誘電泳動力

誘電泳動は以下の式によりあらわされる.

$$\langle F_{DEP} \rangle = 2\pi r^3 \epsilon_m \operatorname{Re} [f_{CM}^*] \nabla |E_{rms}|^2 \quad (1)$$

ただし, ϵ_m は溶液の誘電率, r は粒子の半径, E_{rms} は電界の実効値である. f_{CM} は Clausius-Mossotti factor であり, 下記の式であらわされる.

$$f_{CM} = \frac{\epsilon_p^* - \epsilon_m^*}{\epsilon_p^* + 2\epsilon_m^*} \quad (2)$$

ϵ_p^* と ϵ_m^* はそれぞれ粒子と溶液の複素誘電率である. 複素誘電率は

$$\epsilon^* = \epsilon + \frac{\sigma}{j\omega} \quad (3)$$

であらわされる. ここで, ϵ と σ はそれぞれ誘電率と導電率である.

2.2 斜面重力を利用した誘電泳動力の測定法

斜面重力は, 物質を斜面に置いた場合に生じる重力の斜面成分であり, 誘電泳動力の逆向きに力を作る (図 1). 球体に生じる斜面重力は, 式(4)であらわされる.

$$F_G(\theta) = \frac{4}{3} \pi r^3 (\rho_p - \rho_m) g \sin \theta \quad (4)$$

ただし, ρ_p と ρ_m はそれぞれ粒子と溶液の密度, g は重力加速度, θ は斜面角度である. 誘電泳動力は, 斜面角度 θ を調整することで測定する[5].

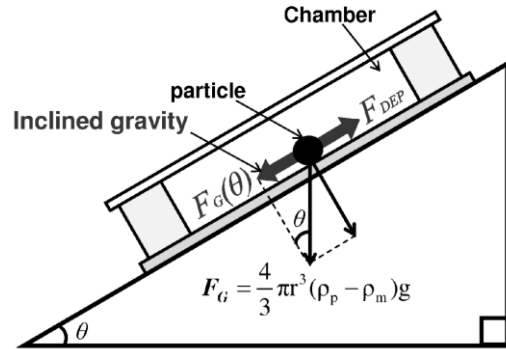


図 1. 斜面重力による誘電泳動力測定

3. 提案デバイスおよび測定装置

3.1 シーリング (天井) クリークギャップ電極

図 2 に誘電泳動デバイスの構造を示す. フォトリソグラフィにより, クリークギャップ型の透明(ITO)電極をスライドガラスに作成した. 実験試料は, 厚さ $50 \mu\text{m}$ のシリコンゴム膜をスペーサとした角形のチャンバーに滴下し, カバーガラスを用いて封入される. クリークギャップ電極はチャンバーのシーリング (天井) に配置させる. 本論文では, これをシーリング・クリークギャップ電極と呼ぶ.

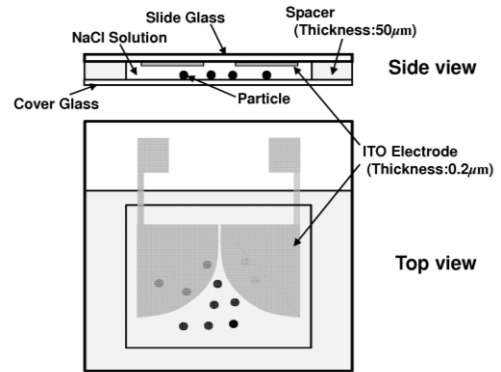


図 2. 誘電泳動デバイスの構造

3.2 シーリング (天井) 電極配置による正の誘電泳動力測定法

クリークギャップ電極間の中心に粒子が存在する場合, 誘電泳動力は電極間中心線上に生じる. 図 3 (a) のように, クリークギャップ電極がチャンバーのフローリング (床) に配置された場合, 電界は電極エッジに集中する. したがって, 粒子に正の誘電泳動力が生じると, 図 3 (b) のように, 粒子は電極エッジに付着し, 誘電泳動力の測定が極めて困難となる. 本研究で用いた電極配置を図 4 (a) に示す. クリークギャップ電極はチャンバーのシーリングに配置される.

これをシーリング・クリークギャップ電極と呼ぶ。粒子の重力が正の誘電泳動による浮遊力より大きい場合、粒子はフローリング上で電極間の中心に移動する(図4(b))。電極間中心線上において正の誘電泳動力は、図4(b)の上方に発生するため、その逆向きの斜面重力と釣り合わせることで測定することが出来る。

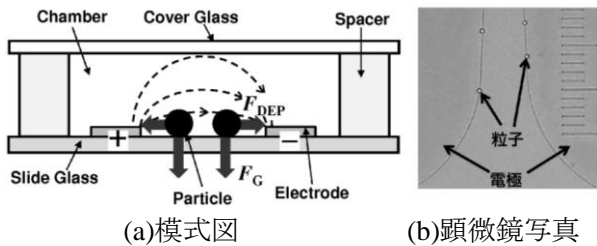


図3. フローリング電極配置時の正の誘電泳動

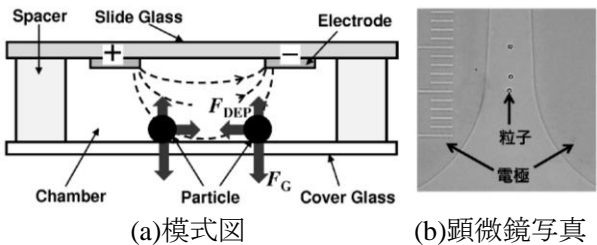


図4. シーリング電極配置時の正の誘電泳動

3.3 誘電泳動力測定装置

図5に誘電泳動力測定装置を示す。誘電泳動力の測定を顕微鏡下で行うために、デバイスを顕微鏡にセットし、斜面角度 θ が調整可能な顕微鏡架台に固定した。

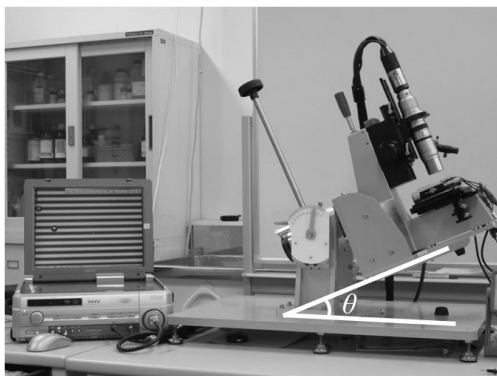


図5. 誘電泳動力測定装置の外観

4. 正の誘電泳動力の測定結果

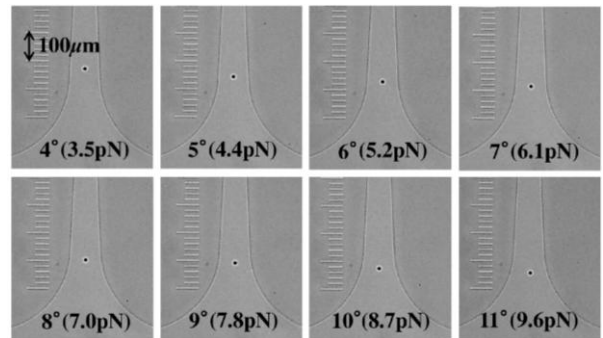
4.1 実験試料

正の誘電泳動力測定実験には、チタン酸バリウム粒子(直径 $12.5 \mu\text{m}$, 比重 6.0, 日本化学工

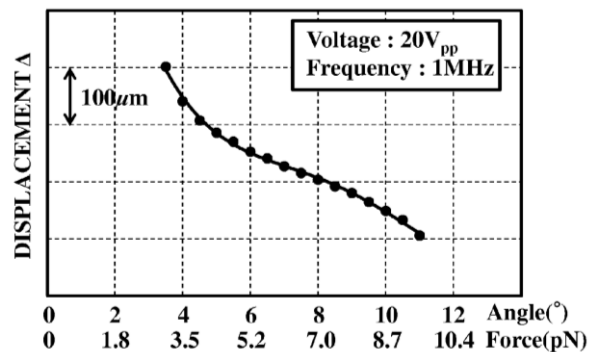
業)を用いた。0.2 mM NaCl 水溶液に 0.1 % の Tween20 (東京化成工業) を加えた溶液の中に、チタン酸バリウム粒子を浮遊させた。

4.2 変位量の斜面角度特性

正の誘電泳動力における斜面角度 θ のステップ応答を 3.5° から 11° , または 11° から 3.5° に変化させることによって測定した。電極に印加した電圧及び周波数はそれぞれ 20 V_{pp} , 1 MHz である。過渡応答の時定数は、 0.3 min と 0.5 min であり、約 3 分で定常状態に達する。この結果を踏まえて、斜面角度 θ を変化された場合のチタン酸バリウム粒子の変位量を測定した。結果を図6に示す。正の誘電泳動力は中心線上の上方、斜面重力は下方に生じる。図6(a)より、粒子は常に電極間の中心に位置しており、斜面角度 θ が増加すると、チタン酸バリウム粒子が下方に移動していることがわかる。正の誘電泳動力はチタン酸バリウム粒子が静止した斜面角度 θ を用いて、(4)式より算出した。例えば、斜面角度 $\theta = 5^\circ$ では 4.4 pN , $\theta = 10^\circ$ では 8.7 pN であり、極めて微少な正の誘電泳動力の測定に成功した。斜面角度 θ によるチタン酸バリウム粒子の変位量特性を図6(b)に示す。電極間中心線上の任意点で生じる正の誘電泳動力は、下方であるほど増加していることがわかる。



(a)各斜面角度における顕微鏡写真



(b)傾斜角度特性

図6. 粒子変位量の斜面角度特性

4.3 変位量の印加電圧特性

4.2と同様に、印加電圧のステップ応答を $11.2 V_{pp}$ から $20 V_{pp}$, $20 V_{pp}$ から $11.2 V_{pp}$ に変化させることで測定した。ここで、斜面角度 θ は 3.5° 、周波数は 1MHz である。過渡応答の時定数は、それぞれ 0.21min , 0.83min であり、およそ 5min で定常状態に達する。印加電圧を変化された場合のチタン酸バリウム粒子の変位量の特性を図7に示す。印加電圧が増加すると、正の誘電泳動力が増加するため、チタン酸バリウム粒子は、電極間中心線上のより上方で、停止していることがわかる。

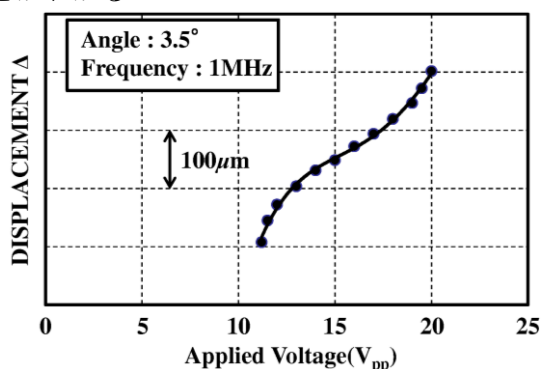


図7. 粒子変位量の印加電圧特性

5. 白血病細胞分離への応用

血液中の正常細胞と白血病細胞の誘電特性に違いがあれば、斜面重力と釣り合う電極間中心線上の静止位置が異なり、分離することが可能である。白血病細胞分離の基礎実験として、BALL-1細胞の静止実験を行った。

5.1 実験試料

BALL-1 (ヒト白血病性B細胞株) は、RIKEN CELL BANK から提供を受けた。BALL-1 は、10%FBS を添加した RPMI1640 培地を用い、5%CO₂, 37度の条件下で培養を行った。実験は8.75% (w/v) のショ糖液に1%のPBSを加えた溶液を用いて、3回洗浄後、同溶液中に浮遊させた。

5.2 白血病細胞分離のための基礎実験

印加電圧、周波数、斜面角度 θ はそれぞれ、 $3 V_{pp}$, 1MHz , 25° とした。図8より、BALL-1細胞はパールチェーンを形成し、平衡点で静止していることが確認できる。これからは、白血病細胞及び正常血中細胞の停止位置特性を明らかにし、白血病細胞の分離を試みる。

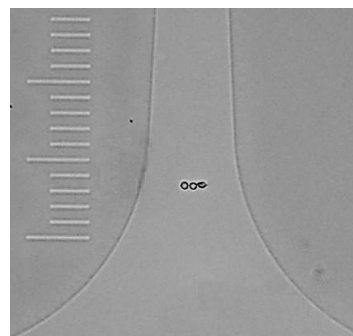


図8. BALL-1細胞による静止実験

6. おわりに

シーリング・クリークギャップ電極を用いて、正の誘電泳動力によるチタン酸バリウム粒子の変位量を測定した。この電極を用いれば、誘電特性の違いから、血液中の白血病細胞を分離することが可能であると期待される。

謝辞

この研究の一部は、科学研究費補助金平成20年度採択特別推進研究「ソフトコンピューティング技術による『てんかん』原性域の特定と低侵襲治療法の確立」(課題番号20001008, 研究代表者 山川 烈)の推進事業として実施した。

参考文献

- [1] J. Yang, et al. : Dielectric properties of human leukocyte subpopulations determined by electrorotation as a cell separation criterion, *Biophysical Journal*, Vol. 76, pp. 3307-3314, 1999.
- [2] F. F. Becker, et al. : Separation of Human Breast Cancer Cells from Blood by Differential Dielectric Affinity, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 92, pp. 860-864, 1995.
- [3] M. S. Ttalary, et al. : Electromanipulation and Separation of Cells Using Travelling Electric Fields, *Journal of Applied Physics*, Vol. 29, pp. 2198-2203, 1996.
- [4] H. A. Pohl : *Dielectrophoresis*, Cambridge University Press, Cambridge, 1978.
- [5] 今里浩子, 山川烈: 生体細胞の同定・分離・ハンドリングに適した誘電泳動力の測定方法, 第21回バイオメディカル・ファジィ・システム学会年次大会講演論文集(高知), pp.76-79, 2008.