

周波数変調誘電泳動におけるクロスオーバー周波数と腫瘍細胞ミトコンドリア膜電位の関係

張 晴*, 加藤 英子*, 八木 一平*, 内田 諭^{*.1}

(2023年9月11日受付; 2023年12月11日受理)

Correlation of Mitochondrial Membrane Potential of Cancer Cell and Crossover Frequency in Frequency Modulated Dielectrophoresis

Qing ZHANG*, Eiko KATO*, Ippei YAGI* and Satoshi UCHIDA^{*.1}

(Received September 11, 2023; Accepted December 11, 2023)

As Japan's population ages, cancer deaths are becoming an increasing problem. Attention is being paid to early diagnosis of cancer and assessment of treatment status. Therefore, the detection of differences in physiological states within cells and the identification of cell types are essential. In this paper, we focused on Crossover frequency (COF) measurement methods using Frequency-Modulated Dielectrophoresis (FM-DEP), which utilizes the electrical properties of cells. As a result, the experimental results by different buffer conductivities showed that DEP using FM signals can detect cell behavior with high speed and accuracy in a homemade object tracking program and that the COF can also be measured with high accuracy. In addition, to detect the physiological state of tumor cells using the FM-DEP, experiments on the initial induction of cell apoptosis by drugs showed that the COF increased with a decrease in mitochondrial membrane potential. On the other hand, it was found that the COF could not be measured for drug-induced cells in the late apoptotic phase.

1. はじめに

がんの治療技術は未だ発展段階にあり、細胞医療に向けた技術である蛍光や吸光分析のフローサイトメトリー¹⁾や磁気ビーズ²⁾検出法が研究されている。しかしながら、上記手法ではラベリングによる細胞毒性があり、各操作工程が煩雑かつ時間を要し、装置の小型化などの課題が指摘されている³⁻⁵⁾。

そこで、著者らは電気的特性を利用する誘電泳動 (Dielectrophoresis: DEP) を用いたクロスオーバー周波数 (Crossover frequency: COF) 計測法⁶⁻¹⁰⁾に着目した。不均一電界下で誘電体の微粒子を操作する DEP は、力の向きが正から負に切り替わる周波数 (COF) により⁶⁻¹⁰⁾細胞死を評価し、がんの治療効果を評価する技術として期待される。

細胞死は、その形態学および生化学的な特徴などからネクロシスとアポトーシスに大別される。ネクロシス (壊死) は、細胞が膨張し、最後に細胞内容物が細胞外に

漏出することで周辺細胞に炎症を惹起する。これは抗がん剤や放射線治療によるがん治療において副作用として認識されている。一方、アポトーシス (プログラムされた自己死) を起こした細胞は縮小し、アポトーシス小体と呼ばれる細胞断片を形成した後、生体内で貪食細胞によって除去される¹¹⁾。ほとんどの抗腫瘍化学療法において、ミトコンドリア制御の内因性アポトーシスを起こすことによりがん細胞が退縮・消失する¹²⁾。

本論文では、周波数変調による誘電泳動 (Frequency Modulated-Dielectrophoresis: FM-DEP) による細胞挙動を解析するシステムを構築し、その処理・検出精度を評価した。また、薬剤によりアポトーシス誘導された細胞に対して、アポトーシス発生段階の COF およびアポトーシス発生初期の進行過程をミトコンドリア膜電位 $\Delta\Psi_m$ により測定し、FM-DEP 法による COF との関係进行调查したので、これらを報告する。

2. 理論

2.1 誘電泳動

細胞を均一電界に晒すと、表面に分極電荷が誘起される。一方、不均一電界の場合、細胞両端に係る力が異なるため細胞が移動する。本現象を誘電泳動 (Dielectrophoresis: DEP) と呼び、その力 F_{DEP} [N] は以下の式で表される¹³⁾。

$$F_{DEP} = 2\pi\epsilon_m r^3 \text{Re} [K(\omega)] \nabla |E|^2 \quad (1)$$

キーワード: 誘電泳動, 周波数変調, クロスオーバー周波数, 腫瘍細胞, ミトコンドリア膜電位

* 東京都立大学システムデザイン研究科
(〒191-0065 東京都日野市旭が丘 6-6)

Graduate School of Systems Design, Tokyo Metropolitan University, 6-6, Asahigaoka, Hino-shi, Tokyo 191-0065, Japan

¹ s-uchida@tmu.ac.jp

DOI: <https://doi.org/10.34342/iesj.2024.48.1.2>

ここで、 ϵ_m は溶媒の誘電率、 r は細胞半径、 ω は電界の角周波数、 E は電界の実効値であり、 $\text{Re}[K(\omega)]$ を Clausius-Mossotti 関数と呼び、式(2)により算出する。

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

$$\epsilon^* = \epsilon - \frac{i\sigma}{\omega} \quad (3)$$

ここで、 ϵ^* は複素誘電率、 σ は導電率、添え字の m は溶媒、 p は粒子を表す。

$\text{Re}[K(\omega)]$ は細胞の電気特性により変化し、負数の場合、負の誘電泳動 (nDEP) が働き、細胞は電場の弱い方へ移動し、細胞は電極から斥力を受ける。正数の場合、正の誘電泳動 (pDEP) が働き、細胞は電場の強い方へ移動し、細胞は電極から引力を受けて電極に近づく。実際の細胞は、細胞膜と細胞膜内部の細胞質について、それぞれ固有の電気特性を持つため、式(4)により 2層モデルとして扱う¹⁴⁾。

$$\epsilon_p^* = \frac{\left(\frac{r_0}{r_i}\right)^3 + 2\left(\frac{\epsilon_{int}^* - \epsilon_{mem}^*}{\epsilon_{int}^* + 2\epsilon_{mem}^*}\right)}{\left(\frac{r_0}{r_i}\right)^3 - \left(\frac{\epsilon_{int}^* - \epsilon_{mem}^*}{\epsilon_{int}^* + 2\epsilon_{mem}^*}\right)} \quad (4)$$

ここで、 ϵ_{int} は細胞質の誘電率、 ϵ_{mem} は細胞膜の誘電率、 r_i は細胞膜までの半径、 r_0 は細胞膜を含む細胞半径を表す。

2.2 クロスオーバー周波数

クロスオーバー周波数とは、 $\text{Re}[K(\omega)]$ の値が正負に切り替わる周波数を指し、これを閾値として誘電泳動力の向きが反転する¹⁴⁾。

図1は、浮遊がん細胞 Jurkat の諸特性 (表1) と式(2)、および式(4)よりバッファの導電率別に求めた $\text{Re}[K(\omega)]$ である。 $\text{Re}[K(\omega)] = 0$ となる点を COF と呼ぶ。

2.3 周波数変調誘電泳動

周波数変調誘電泳動 (Frequency Modulated-Dielectrophoresis: FM-DEP) とは、単一の交流電圧の代わりに FM 信号を用いた誘電泳動解析法である。先行研究で FM-DEP が新たな誘電特性を評価する手法として開発された¹⁶⁾。COF をまたぐ周波数帯の FM 信号を用いた場合、 $\text{Re}[K(\omega)]$ の符号反転により、細胞は pDEP および nDEP を受けるため、図2のように細胞の移動方向は、電極近傍で変調周期に同期して交互に電極を行き来する。先行研究によると pDEP が作用して細胞が電極に近づく時間 (Δt_p) を細胞の挙動から算出すると、下記の過程のより、細胞の固有の COF を求めることができる。

FM 信号の被変調波周波数 f_{FM} は次式で表される。

$$f_{FM} = f_c + f_d \sin(2\pi f_m t) \quad (5)$$

ここで、 f_c は FM 信号の中心周波数、 f_d は周波数偏差、 f_m は FM 周波数とする。クロスオーバー周波数 f_{COF} が f_{FM} 範

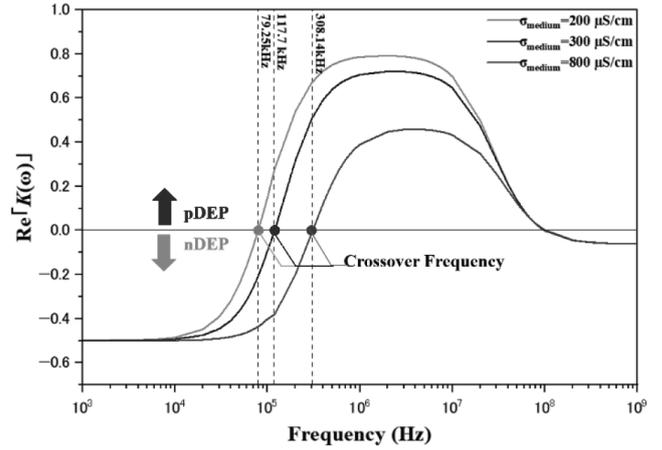


図1 バッファ導電率別の $\text{Re}[K(\omega)]$ の計算値
Fig.1 Simulated value of $\text{Re}[K(\omega)]$ with buffer conductivity.

表1 浮遊がん細胞 Jurkat の物理および電気特性
Table 1 Physical and electrical parameters of Jurkat cells.

Parameter	Value
Cell outer radius r_0 ¹⁵⁾	5.31×10^{-6} [m]
Cell inner radius r_i ¹⁵⁾	5.30×10^{-6} [m]
Cell membrane thickness r' ¹⁵⁾	1.00×10^{-8} [m]
Cytoplasmic permittivity ϵ_{int} ¹⁵⁾	5.93×10^{-10} [F/m]
Cytoplasmic conductivity σ_{int} ¹⁵⁾	3.00×10^{-1} [S/m]
Solvent permittivity ϵ_m ¹⁵⁾	7.08×10^{-10} [F/m]
Vacuum permittivity ϵ_0 ¹⁵⁾	8.85×10^{-12} [F/m]
Membrane conductivity σ_{mem} ¹⁵⁾	1.10×10^{-7} [S/m]
Cell membrane dielectric constant ϵ_{mem} ¹⁵⁾	1.04×10^{10} [F/m]

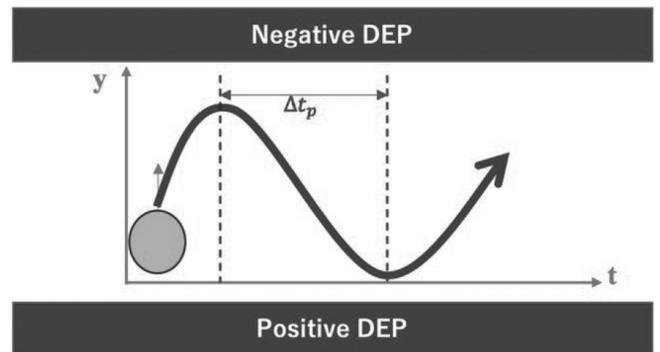


図2 FM-DEP 細胞ホッピングモデル
Fig.2 Cell hopping model FM-DEP.

囲に存在する場合、次のように変形が可能である¹⁶⁾。

$$f_{COF} = f_c + f_d \cos(\pi f_m \Delta t_p) \quad (6)$$

ここで、 Δt_p は正の誘電泳動作用時間とする。時間的に変化する FM 信号に対する COF および DEP 力の方向の関連を図3に示す。

2.4 細胞挙動の追跡法

本研究では、細胞の自動追跡および高精度化を実現するため、細胞追跡プログラムを作成した。画像処理ライブラ

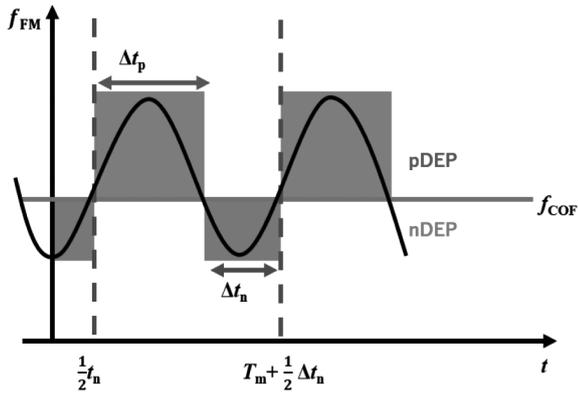


図3 FM信号とDEP, COFの関係
Fig.3 Correlation of FM signal DEP and COF.

りであるOpenCV¹⁷⁾に含まれるKernelized Correlation Filter (KCF)法を使用して、指定サンプルの特徴を学習し、サンプルをわずかに移動した画像を大量に生成することで、疑似的に学習量を増やした。また、フーリエ変換を用いることでメモリと計算量を削減したため、多くのサンプルを容易に追加し、手動計測と比較して高精度かつ高速な挙動追跡を実現した。

2.5 アポトーシス誘導におけるミトコンドリアの役割

ミトコンドリアは、アポトーシス制御において中心的な役割を果たす^{18,19)}。アポトーシス発生時に、小胞体からの放出されたCa²⁺イオンがミトコンドリアに流入することにより、膜透過性が亢進し、分子の漏出、膨化、ミトコンドリア膜電位 $\Delta\Psi_m$ の減少が生じ、ミトコンドリアの機能低下を誘導する¹⁹⁾。このようなミトコンドリアを介したシグナル伝達を介して内因性アポトーシスと呼ばれる細胞死が進行する。この際、ミトコンドリア膜電位の低下と同期して、細胞が縮小して、細胞各層の電気・幾何学定数が変化する。特に細胞膜の誘電率および細胞質導電率が正常細胞と比べて著しく変化するため²⁰⁾、当該細胞のCOFが変化する。

3. 実験方法

3.1 細胞株およびサンプル調製

実験にはヒトT細胞性白血病由来細胞株である浮遊がん細胞Jurkatを使用した。細胞培養液にはRPMI1640培地(富士フイルム和光純薬社, Osaka, Japan)に10%FBSと1%ペニシリン・ストレプトマイシンを加えた。Jurkat細胞を播種、均一に分散させ、5%CO₂, 37°Cのインキュベータで細胞密度が 1×10^6 cells/mL以上になるまで恒温培養した。

3.1.1 細胞懸濁液の調製

Jurkat細胞を含んだ培養液を遠心分離機による1800 rpm × 5 min後に上清を取り除き、バッファを加えて再度遠心分離を行い、上清を取り除いた後にバッファを4.5 ml加えて懸濁液を作製した。細胞濃度は 1.01×10^6 cells/mlとした。自作細胞追跡プログラムを用いてCOF測定精度を確認

するため、PBSを溶液に添加することで、誘電泳動特性に影響を与えるバッファ導電率を200, 300, 800 μS/cmに調整した。先行研究の知見により誘電泳動が観察可能な導電率を300 μS/cmを基準として設定した²¹⁾。

3.1.2 薬剤によるアポトーシス誘導

アポトーシス後期細胞のサンプル調製を行うために、脱共役剤であるFCCP(SML2959, シグマアルドリッチジャパン合同会社, Tokyo, Japan)を添加後48時間経過したのち、Annexin VとPropidium Iodide(PI)(Annexin V-FITC Kit, 医学生物学研究所, Tokyo, Japan)という2つのアポトーシス検出薬を入れたのち、暗室で15分間放置した。

迅速なアポトーシス誘導剤であるラプチナル(Raptinal, 東京化成工業社, Tokyo, Japan)により、ミトコンドリア膜電位 $\Delta\Psi_m$ の低下が発生した内因性アポトーシス細胞死を誘導することができる²²⁾。

節3.1.1で述べたPBSに対して、ミトコンドリア膜電位アッセイMT-1(MitoMP Detection Kit, 同仁化学研究所, Kumamoto, Japan)を細胞懸濁液で1/1000に希釈して、30分間インキュベーションした。その後、DMOSにより溶解済みのラプチナル3 μLを細胞懸濁液2 mLに添加し、直ちに細胞懸濁液の導電率を300 μS/cmに調製した。

3.2 実験手順

本研究で用いた実験装置の概略を図4に示す。

3.2.1 正常細胞のCOF測定

本実験は、小型落射顕微鏡(CM-10L, Nikon, Tokyo, Japan)と20倍対物レンズ、CCDカメラ、および流速制御機構を持つエレスタクロスソータ(ELESTA CROSSORTER ECS-001, 株式会社AFIテクノロジー, Kyoto, Japan)に対して、電極間隔200 μmのクロム材質の直線DEPデバイス、ファンクションジェネレータ、1 mLシリンジを設置した。シリンジは送液チューブを介してデバイス流入側方に接続した。細胞懸濁バッファを流した後、デバイスにFM信号を印加する。導電率別の条件に対して細胞10個の挙動

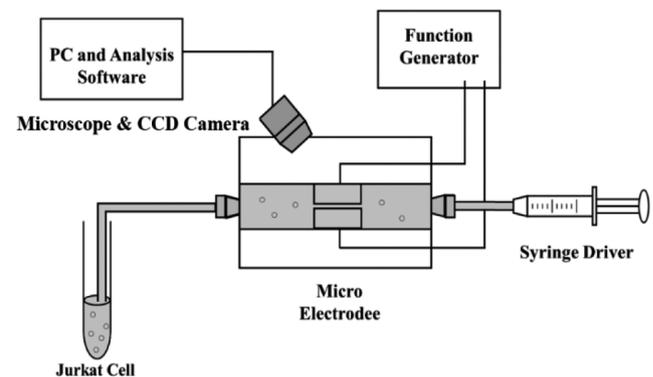


図4 実験装置概要
Fig.4 Schematic of experimental apparatus system.

を CCD カメラにより撮影した。保存した動画ファイルを細胞追跡プログラムにより、細胞の位置 - 時間情報を取得し、COF を導出した。一細胞ごとに約 20 回の COF を取得し、平均値および標準偏差を求めた。印加電圧が 8 Vpp, FM 周波数 f_m はすべて 0.5 kHz と設定し、FM 信号中心周波数 f_c が 80, 120, 300 kHz の場合、その偏差 f_a をそれぞれ 40, 60, 180 kHz として印加した。

3.2.2 アポトーシス細胞の $\Delta\Psi_m$ による COF 測定

本実験は蛍光観察機能を持つ倒立顕微鏡 (Eclipse Ts2, Nikon, Tokyo, Japan), CCD カメラ (FLOYD-4K, Sony, Tokyo, Japan), 電極間隔 150 μm の無色透明 ITO 材質の平行平板 DEP デバイス, ファンクションジェネレータ, 1 mL シリンジで構成されている。

実験手順は節 3.1.2 のサンプル 2 mL を DEP デバイスに流し, FM 信号を印加する。FM 変調中心周波数 f_c は 110 ~ 270 kHz の間を手動で調整して, 明視野で細胞挙動の動画

を保存して, 蛍光視野で同一細胞の画像を取得した。保存した動画ファイルを物体追跡プログラムに読み込み, COF 値を導出した。そして, ミトコンドリア膜電位 $\Delta\Psi_m$ の測定において, 同一細胞の蛍光強度を保存した tif ファイルを ImageJ²³⁾ で解析した。解析は, 大津の二値化により背景と蛍光部分のピクセル数を分離した。対象細胞に対して関心領域 (ROI) で囲み, 蛍光強度を算出した (図 5)。

4. 実験結果

4.1 FM 信号印加時の細胞挙動

FM 信号による細胞の周期的な挙動を観察し, 細胞の挙動軌跡から得られた正の誘電泳動時間から COF を算出した。電極内の細胞挙動から時間 - 位置情報を図 6 に示す。細胞軌跡の極大値は約 2 秒ごとに現れ, 変調周期 ($1/f_m$) と一致したため, FM-DEP による細胞挙動と判断された。

4.2 バッファの導電率別の細胞 COF 測定結果

図 7 のように, バッファ導電率を 200, 300, 800 $\mu\text{S}/\text{cm}$ とした COF 測定値はそれぞれ 82.27 ± 4.37 (5.3%), $119.03 \pm$

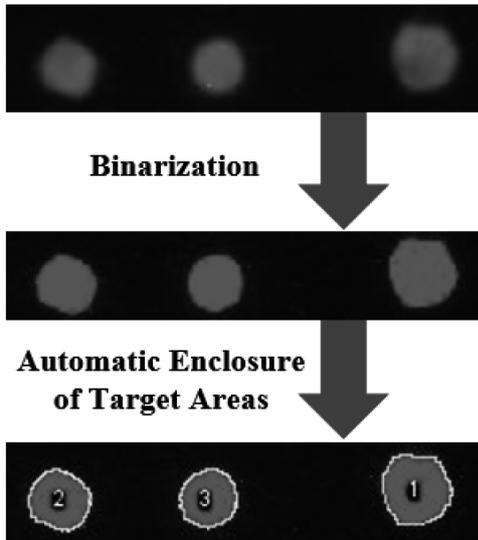


図 5 ImageJ による $\Delta\Psi_m$ の解析手順
Fig.5 Analysis procedure of $\Delta\Psi_m$ by ImageJ.

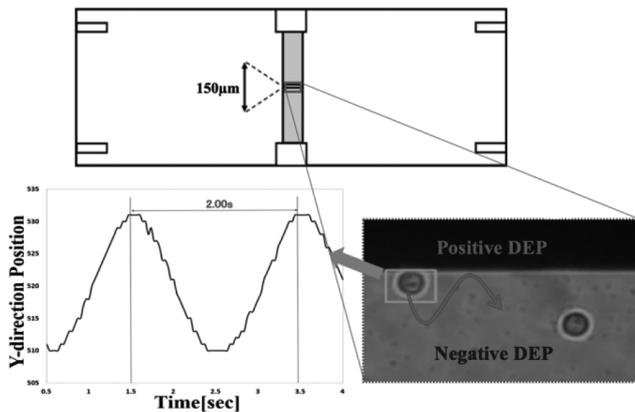


図 6 電極内細胞挙動軌跡の位置 - 時間特性
Fig.6 Trajectory of cell behavior between the electrodes.

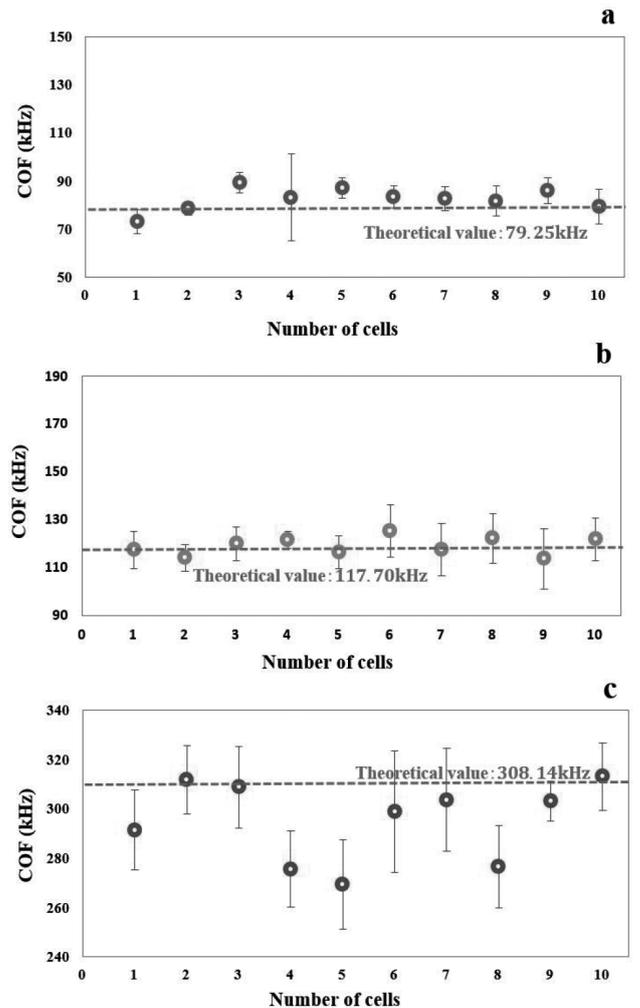


図 7 バッファ導電率別の COF 値
Fig.7 COF values by buffer conductivity.
(a) 200 $\mu\text{S}/\text{cm}$, (b) 300 $\mu\text{S}/\text{cm}$, and (c) 800 $\mu\text{S}/\text{cm}$.

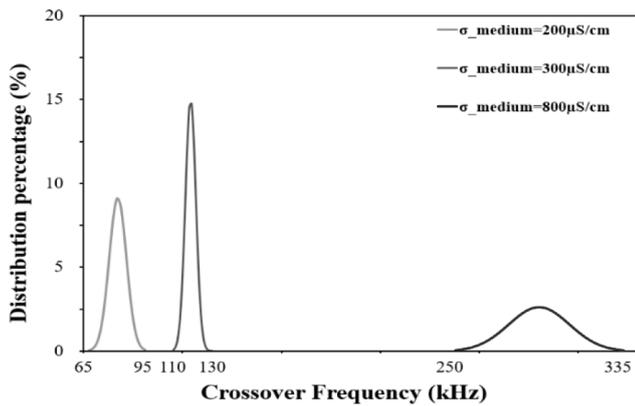


図8 バッファ導電率別のCOF値正規分布
Fig.8 Normal distribution of COF values according to buffer conductivity.

2.66 (2.2%), 295.12 ± 15.31 (5.2%) kHzであった。これらは、図1に示す $\text{Re}[K(\omega)]$ 計算から得られたCOFの理論値である79.25, 117.70, 308.14 kHzとほぼ一致した。

バッファ導電率別のCOFの測定結果を正規分布として図8に示す。バッファの導電率の増加に伴い、COFが増加すること、300 $\mu\text{S}/\text{cm}$ において最も標準偏差が少なく、測定精度が高いことが分かった。本実験装置を用いた場合、300 $\mu\text{S}/\text{cm}$ が最も標準偏差が小さくなったため、以降の実験では300 $\mu\text{S}/\text{cm}$ の導電率を採用した。

4.3 アポトーシス後期のCOF測定結果

アポトーシス誘導薬剤を使用したアポトーシス後期の細胞に対してFM-DEPによるCOFの計測実験を行った。50 μM FCCP (脱共役剤) を生存率9割以上の細胞懸濁液に添加することで、48時間直接作用させた。脱共役剤とは、生物の酸化的リン酸化において、電子伝達系およびATP合成反応のいずれも阻害せずに両反応の共役を阻害する化合物である。その結果、AnnexinVとPI染色により、およそ9割の細胞がアポトーシス後期であることが判明した。

一方、FM-DEPによる細胞のホッピング挙動は観察されなかった。つまり、アポトーシス後期においてCOFを測定することは困難であることが分かった。

4.4 アポトーシス初期 $\Delta\Psi_m$ とCOFの関係

薬剤によるアポトーシス後期のCOFの測定はできないことが判明したため、薬剤によるアポトーシス初期の $\Delta\Psi_m$ とCOFの測定実験のみを行った。

2.5節に述べたように、ミトコンドリア膜電位 $\Delta\Psi_m$ の低下が細胞のアポトーシス初期の特徴である¹⁷⁾。蛍光の経過時間による変化を図9に示す。最初にラプチナル15 μM と薬剤刺激なしのコントロール細胞をMT-1で染色し、経時変化による $\Delta\Psi_m$ の変化を確認した。結果としては、コントロールの $\Delta\Psi_m$ は緩やかに減少し、130分後に73.9%だったが、ラプチナル作用により、20分後までは $\Delta\Psi_m$ が

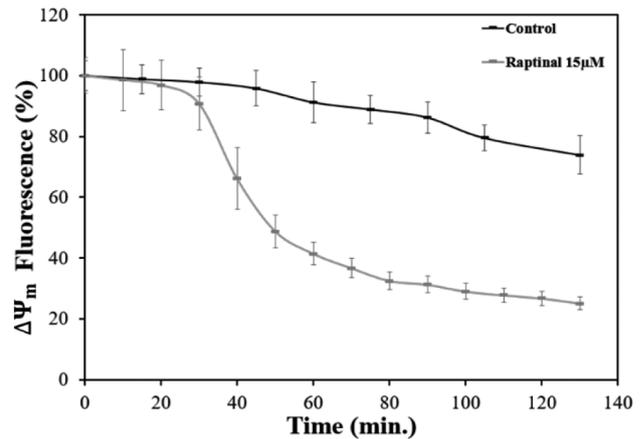


図9 $\Delta\Psi_m$ の時間変化
Fig.9 Time variation of $\Delta\Psi_m$ fluorescence.

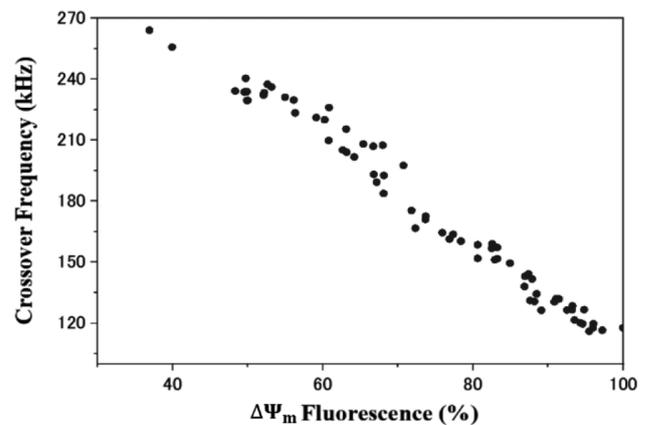


図10 $\Delta\Psi_m$ 蛍光強度とCOFの関係
Fig.10 Correlation of $\Delta\Psi_m$ fluorescence and COF.

わずかに減少し、20分から70分間に著しく減少した。従って、ラプチナル刺激によりアポトーシス誘導時の $\Delta\Psi_m$ をコントロールと比較し、著しい低下が観察された。

図10にアポトーシス誘導薬剤ラプチナルを作用した2時間の間に70個の細胞の $\Delta\Psi_m$ およびCOFを測定した結果を示す。正常状態のJurkat細胞のCOF理論値は117.70 kHzであり、その時の $\Delta\Psi_m$ を基準とした。 $\Delta\Psi_m$ は約60%まで低下し、COF値は約78%まで増加した。 $\Delta\Psi_m$ の低下に反比例するようにCOF値が上昇した。そのため、初期アポトーシスが誘導されることで、COF値は上昇することが示された。

5. 考察

腫瘍細胞Jurkatのアポトーシスによって、細胞膜の構造が変化し、原形質膜の外側の表面電荷の変化が引き起こされると²⁴⁾、細胞膜静電容量 C_{mem} および細胞質導電率 σ_{int} の電気特性が変化し²⁵⁾、COFが変化したことが考えられる。測定したアポトーシス細胞のCOFは正常状態と比較して増加したので、 C_{mem} および σ_{int} は減少したと考えられる²⁶⁾。細胞膜の構造が破壊される場合、細胞内イオンがバッファ中

に流出し, COF が非常に高くなることで, COF 測定ができないことが知られる²⁶⁾. アポトーシス後期においても細胞膜の構造が破壊されて, 細胞内部の導電率がバッファに近づくため, 誘電泳動力が働かなくなり COF が測定できなくなったと考えられる. ラプチナルによるアポトーシス細胞死が AnnexinV と PI で確認された一方, ミトコンドリア膜電位 $\Delta\Psi_m$ の低下も一連のアポトーシス細胞死に関連していると考えられる. しかし, これを断定するためには, 蛍光観察における細胞への断続的な励起光の照射による細胞ダメージおよび蛍光色素の退色の可能性を否定する必要がある. 今後, $\Delta\Psi_m$ 蛍光強度の測定結果に対する影響を評価する必要がある.

6. おわりに

本報告では, FM 信号を用いた誘電泳動において Jurkat 細胞のバッファ導電率により COF 測定精度が影響を受けることが示された. 細胞追跡プログラムによる細胞挙動の検出, および COF の算出の自動化により, 手動計測と比較して高速処理が可能なシステムを開発した. アポトーシス誘導薬剤によりミトコンドリア膜電位 $\Delta\Psi_m$ は低下し, COF 値は増加した. これら 2 つの現象には強い相関があることを示した. 一方で, アポトーシス後期の細胞の COF を測定することができないと判明した. 以上の事実により, FM 信号を用いた誘電泳動は, 腫瘍細胞のアポトーシス初期において, 個別の COF 値から細胞の生理状態を検出できる可能性がある結論付ける.

謝辞

ご助言を頂いた脇坂嘉一氏, 円城寺隆治氏に感謝する. また本研究は JSPS 科研費 JP23H03765, JP21H01317 の助成を受けた.

参考文献

- 山田秀直, 山内豊彦, 上田之雄, 山下 豊: 血中循環腫瘍細胞検出のためのトモグラフィック位相イメージングフローサイトメトリー. *Medical Imaging Technology*, **34** (2016) 95
- 松永 是, 吉野知子: バイオナノ磁気ビーズの医療応用. *表面技術*, **59** (2008) 377
- 伊野浩介, 珠玖 仁, 末永智一: 電気化学的手法を用いた細胞活性評価. *生物工学会誌*, **92** (2014) 176
- Y. Guo, I. Yagi, S. Uchida, F. Tochikubo, M. Takano, Y. Wakizaka and T. Enjoji: Basic Study of Dielectric Properties of Cancer Cells by Dielectrophoretic Velocimetry. *IEEE Transactions on Sensors and Micromachines*, **141** (2021) 108
- 佐々木康彦, 竹内郁雄, 渡邊祐介, 稲波久雄: フローサイトメトリー法による細菌数の簡便・迅速計測. *日本食品工学会誌*, **14** (2013) 131
- R. Manczak et al.: UHF-Dielectrophoresis Crossover Frequency as a New Marker for Discrimination of Glioblastoma Undifferentiated Cells. *IEEE Journal of Electromagnetics, RF and Microwaves in Medicine and Biology*, **3** (2019) 191
- T. Zhou, Y. Ming, S.F. Perry and S. Tatic-Lucic: Estimation of the physical properties of neurons and glial cells using dielectrophoresis crossover frequency. *Journal of Biological Physics*, **42** (2016) 571
- K.A. Michael, S.R. Hiibel and E.J. Geiger: Dependence of the dielectrophoretic upper crossover frequency on the lipid content of microalgal cells. *Algal Research*, **6** (2014) 17
- R. Pethig: Review article-dielectrophoresis: status of the theory, technology, and applications. *Biomicrofluidics*, **4** (2010)
- B. Yafouz, N.A. Kadri, H.A.Rothan, R.Yusof and F.Ibrahim: Discriminating dengue infected hepatic cells (WRL-68) using dielectrophoresis. *Electrophoresis*, **37** (2016) 511
- A. Sato: Novel anticancer strategy targeting switch mechanisms in two types of cell death: Necrosis and apoptosis. *Yakugaku Zasshi*, **137** (2017) 1315
- P.D. Bholra and A. Letai: Mitochondria-judges and executioners of cell death sentences. *Molecular Cell*, **61** (2016) 695
- A.Pohl, Herbert: Dielectrophoresis: The Behavior of Neutral Matter in Nonuniform Electric Fields, p. 350, Cambridge University Press, Cambridge (1978)
- P.R. Gascoyne and S. Shim: Isolation of circulating tumor cells by dielectrophoresis. *Cancers (Basel)*, **6** (2014) 545
- H. Li, et al.: Distributed effect in high-frequency electroporation of biological cells. *IEEE Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation*, **65** (2017) 3503
- H. Frusawa: Frequency-Modulated Wave Dielectrophoresis of Vesicles and Cells: Periodic U-Turns at the Crossover Frequency. *Nanoscale Research Letters*, **13** (2018) 169
- 門馬英一郎: はじめての Python と OpenCV による画像処理. *精密工学会誌*, **86** (2020) 761
- M.R. Duchon: Mitochondria in health and disease: perspectives on a new mitochondrial biology. *Molecular Aspects of Medicine*, **25** (2004) 365
- N. Zamzami and G. Kroemer: The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **2** (2001) 67
- H-C. Chang and L.Yeo: *Electrokinetically driven microfluidics and nanofluidics*, p. 316, Cambridge University Press, Cambridge (2009)
- R. Di Martino, et al.: Analysis of the role of elution buffers on the separation capabilities of dielectrophoretic devices. *Sensing and Bio-Sensing Research*, **7** (2016) 162
- R. Palchoudhuri, et al.: A small molecule that induces intrinsic pathway apoptosis with unparalleled speed. *Cell Reports*, **13** (2015) 2027
- J. Schindelin et al.: Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, **9** (2012) 676
- S. Sawai, N.A. Shukri, M.S. Mohhtar, W. Safwani and W.K. Zaman: Dielectrophoresis-based discrimination of hepatic carcinoma cells following treatment with cytotoxic agents. *Engineering Science and Technology, an International Journal*, **25** (2022) 1
- R.T.K. Kumar, S. Liu, J.D. Minna and S. Prasad: Monitoring drug induced apoptosis and treatment sensitivity in non-small cell lung carcinoma using dielectrophoresis, *Biochim. Biophys. Acta (BBA) -General Subjects*, **1860** (2016) 1877
- X. Wang, F.F. Becker and P.R.C. Gascoyne: Membrane dielectric changes indicate induced apoptosis in HL-60 cells more sensitively than surface phosphatidylserine expression or DNA fragmentation. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1564** (2002) 412