

.....
 論 文

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

箱田 優^{*1}, 十枝内 元子^{*}, 脇坂 嘉一^{**}

(2005年8月1日受付; 2006年4月25日受理)

Continuous Separation of Cells Using Dielectrophoretic Device with Porous Insulation Membrane

Masaru HAKODA^{*1}, Motoko TOSHINAI^{*} and Yoshikazu WAKIZAKA^{**}

(Received August 1, 2005; Accepted April 25, 2006)

Dielectrophoresis (DEP) is a motion of dielectric particles caused by polarization effects in a non-uniform electric field. We apply the DEP to separate the viable and non-viable cells by considering the difference of permittivity between viable and non-viable cells. The development of the separator of the viable and the non-viable cell using DEP device which arranged a porous insulation membrane between the parallel plate electrodes was examined. Therefore, DEP velocities of cells were measured under the various conditions of the pore-diameter and the thickness of the membrane. Furthermore, DEP velocities of cells were analyzed by the simulation and it compared with the experimental value. Moreover, the separation of the viable and the non-viable cells was carried out using the continuous DEP separator. And the retention ratio of the viable cell was examined under the various conditions of flow rate, applied voltage, and electric field frequency. The retention ratio of the viable cell was greater than 90 % under the condition of 1 kHz, 70 V_{pp}, flow rate 0.3 mL/min. It is found that the porous insulation membrane type DEP separator was effective for the separation of the viable and the non-viable cell.

1. はじめに

細胞の培養には、バイオリアクターが利用されているが、培養過程で死細胞数が増加する。死細胞は、生細胞や培地へ悪影響を及ぼす可能性があるため、バイオリアクター内の死細胞を選択的に除去することは大変重要である。既往の研究より、生細胞と死細胞はそれぞれ誘電率が異なるため、誘電泳動を行うとその泳動状態に違いが見られることが報告されている¹⁻⁷⁾。しかし、それらの研究は薄膜電極によるもので、マイクロチップ上での分離を目的にしたものであり、大量処理する用途には向いていない。そこで、我々はワイヤー電極を用い

て実用的なスケールの誘電泳動フィルターを試作し、その有効性を検討している⁸⁻¹¹⁾。

そこで、本研究では誘電泳動による死細胞の連続分離装置の開発を目指し、細孔絶縁膜型誘電泳動デバイスの有効性を検討するため、単一の細孔における電場を様々な条件で解析し、細胞を用いて細孔近傍の誘電泳動速度を測定した。さらに、多孔性絶縁膜を用いた生細胞と死細胞の分離を行い、透過液流量、印加電圧、周波数などの操作条件を変化させて生細胞保持率および死細胞保持率を測定し、本装置による生死細胞分離の有効性を検討するとともに最適条件を明らかにすることを目的とする。

キーワード：誘電泳動, フィルター, 生死細胞, 細胞分離, 不均一電界

^{*} 群馬大学工学部 生物化学工学科 (376-8515 群馬県桐生市天神町 1-5-1)

Department of Biological and Chemical Engineering,
Gunma University, Kiryu, Gunma 376-8515, Japan

^{**} 大阪大学 CASI (大阪府吹田市山田丘 2-1)

Center for Advanced Science and Innovation,
Osaka University

¹ hakoda@bce.gunma-u.ac.jp

2. 誘電泳動理論¹²⁾

粒子を電場中におくと分極し、分極で生じた正および負の電荷は、電極の負電極および正電極とが引きつけあう。均一な電場の場合、正電極と粒子の負電荷が引き合う力と、負電極と粒子の正電荷が引き合う力は等しく、電荷を持たない粒子の電気力は相殺されるため粒子は移動しない。Fig.1 のように、不均一電場の場合、粒子の誘電率が周囲媒質の誘電率

より大きいとき、粒子は強電場側へ移動する(正の誘電泳動)。また、粒子の誘電率が周囲溶液の誘電率より小さい場合、粒子は弱電場側へ移動する(負の誘電泳動)。

誘電泳動力 F_{DEP} は理論的に次のように表される。

$$F_{DEP} = 2\pi r^3 \epsilon_m \frac{\epsilon_c^* - \epsilon_m^*}{\epsilon_c^* + 2\epsilon_m^*} \nabla E^2 \quad (1)$$

ここで、 r : 粒子の半径、 ϵ_m : 周囲媒質の比誘電率、 ϵ_m^* : 周囲媒質の複素誘電率、 ϵ_c^* : 細胞の複素誘電率、 E : 電場強度である。

ストークスの抵抗法則を利用することにより、理論的な誘電泳動速度を求めることができる。粘性率を η 、誘電泳動速度を v_{DEP} とすると、粘性力 F_d は次のように表される。

$$F_d = 6\pi\eta r v_{DEP} \quad (2)$$

$F_d = F_{DEP}$ と仮定すると、誘電泳動速度 v_{DEP} は次のように表される。

$$v_{DEP} = \frac{r^2 \epsilon_m \cdot \epsilon_c^* - \epsilon_m^*}{3\eta \epsilon_c^* + 2\epsilon_m^*} \nabla E^2 \quad (3)$$

二枚の板状電極の間に細孔絶縁膜を挟むことによって Fig.2 のような不均一電場が形成され、絶縁膜より大きな誘電率を持つ溶液を用いた場合には、細孔近傍が強電場になり、電極近傍が弱電場になる。

3. 実験装置及び方法

3.1 単一細孔絶縁膜付き誘電泳動セル

Fig.3 に誘電泳動速度測定のための装置の全体図を、Fig.4 に誘電泳動速度測定用デバイスの概略図を示す。アクリル板で電極間距離 1mm、高さ 3 mm、長さ 30 mm の流路を作り、二枚のプレート電極の間に細孔絶縁膜を挟むことにより不均一電場を形成した。プレート電極は 3 mm×10 mm、厚さ 0.2 mm のニッケル板を使用し、絶縁膜は 3 mm×30 mm、厚さ 0.2 mm のポリエチレン膜を使用した。また電極間距離は 1 mm、絶縁膜と電極の距離は 0.4 mm とした。Fig.3 に誘電泳動実験装置の概略図を示す。誘電泳動デバイスに交流電源 (33250A, Agilent, USA) を使用し、交流電場を印加した。そのときの誘電泳動デバイス内の様子を顕微鏡 (BHC, OLIMPAS Co, Japan) に接続された CCD カメラ (WV-CD20, National Co, Japan) を通し、モニター (WV-5410, National Co, Japan) で確認し、単位時間あたりの泳動距離より誘電泳動速度を測定した。その際、細孔の入口部に顕微鏡のフォーカスを合わせて入口付近の細孔中心線上の細胞の泳動速度を測定した。実験にはマウスハイブリドーマである浮遊性細胞、3-2H3 細胞 (RCB0867, 理研ジーンバンク) の生死細胞を使用し、0.3M グ

ルコース溶液に懸濁した。

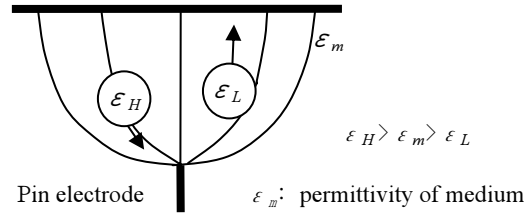


Fig.1 Dielectrophoretic mobility of bio-particles under non-uniform electric field.

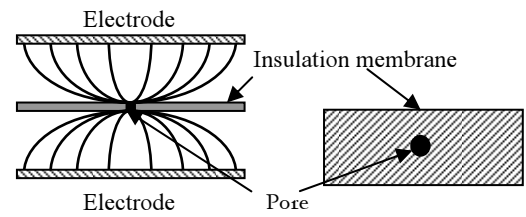


Fig.2 Non-uniform electric field by parallel plate electrodes and pore membrane.

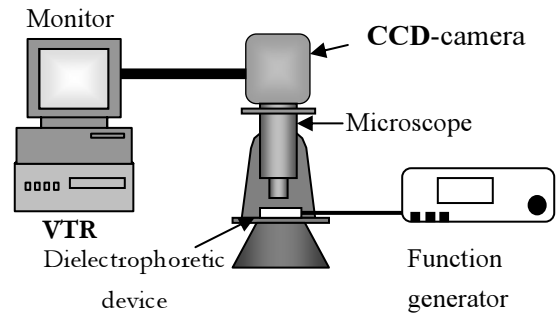


Fig.3 Schematic diagram of experimental apparatus of dielectrophoresis.

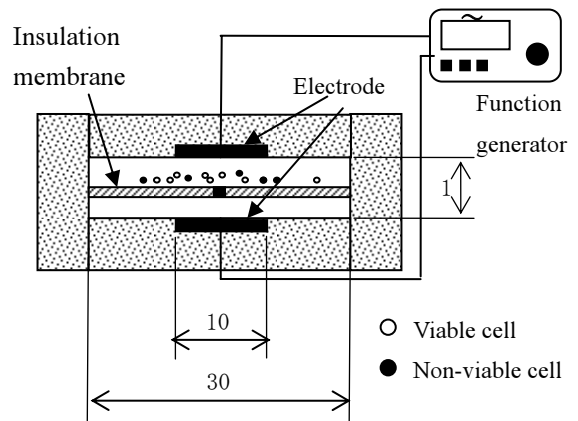


Fig.4 Device of dielectrophoresis with insulation membrane.

3.2 ∇E^2 の解析

二枚の平行平板電極間に細孔絶縁板を挟むことによりFig.2のような不均一電場が形成されると考えられる。そこで細孔の孔径や数、絶縁膜の厚さを変化させたときの ∇E^2 の変化を有限要素法によって解析した。有限要素法によって求められた電位から電場を求め、電場から ∇E^2 を求めた。解析には2次元有限要素法解析ソフト(Maxwell 2D, Ansoft Corp., USA)を使用した。

3.3 細孔絶縁膜付き誘電泳動デバイス

細孔絶縁膜付き誘電泳動デバイスを用いた生死細胞の連続式分離における実験装置の全体図をFig.5に示す。細胞懸濁液はポンプにより誘電泳動デバイスに供給され、保持液側と透過液側に分かれて排出される。細胞懸濁液と透過液側の流量はポンプにより設定した。細孔絶縁膜付き連続分離装置の写真と内部の図をFig.6に示す。電極の材質はニッケル、大きさは3cm×10cm×0.3mmとし、絶縁膜の材質はポリエチレン、大きさは3cm×8.6cm×0.2mmとした。厚さ1mmのシリコン板をくり抜き3mm×30cmの流路部を作成した。また、絶縁膜には約600 μ mの孔間距離で孔径200 μ m ϕ の細孔が1000個ある。細胞は3-2H3細胞を使用し、8.5wt%スクロース+0.3wt%グルコース溶液に懸濁した。約10⁶cells/mLの細胞懸濁液を注入し、保持液側と透過液側からそれぞれ懸濁液を回収し、血球計算盤により生細胞数と死細胞数を計数した。保持率は、保持液側 x_A と透過液側 x_B の生細胞と死細胞それぞれの細胞密度である。

$$\text{保持率}[\%] = \frac{x_A}{x_A + x_B} \times 100 \quad (1)$$

4. 実験結果および考察

4.1 単一細孔絶縁膜付き誘電泳動セル

単一細孔絶縁膜を用いて、細孔近傍における誘電泳動速度の測定を行った。単一細孔からの距離と誘電泳動速度の関係をFig.7に示す。ここで、用いた細胞は生細胞のみについて検討する。死細胞は誘電泳動力を殆んど受けないため誘電泳動は生じない。誘電泳動速度は細孔に近づくに従い増大した。また、電圧が高いほど誘電泳動速度が速くなるという結果が得られた。Fig.8に絶縁膜の厚さ0.3mmと0.5mmの場合における孔径と誘電泳動速度の関係についての実験結果を示す。誘電泳動速度を比較した位置は単一細孔の中心線上で絶縁膜から0.1mmのところの泳動速度を検討した。比較した絶縁膜の厚さ0.3mmの方が0.5mmよりも誘電泳動速度が大きいという結果が得られ、絶縁膜の厚さ0.3mmのとき、孔径300 μ mの誘電泳動速度が最大になり、絶縁膜の厚さ0.5mmのとき、孔径400 μ mの泳動速度が最大になった。

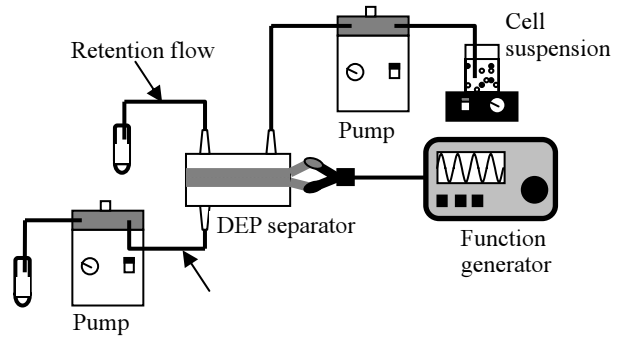


Fig.5 Schematic diagram of continuous dielectrophoretic separation apparatus.

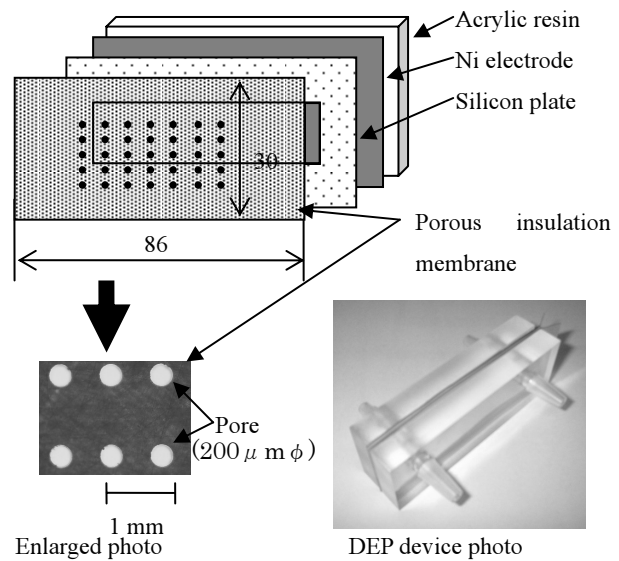


Fig.6 DEP device with porous insulation membrane.

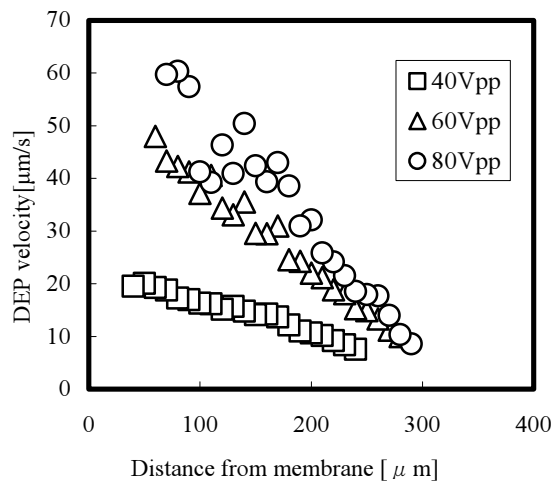


Fig.7 Correlation between dielectrophoretic velocity and distance from membrane (Pore diameter: 200 μ m, Thickness: 3mm, Frequency: 1MHz).

後述する解析結果では ∇E^2 は孔径が小さい方が大きい、誘電泳動速度は特定の孔径で最大値を示した。この原因は、液の流れがないため、孔径が小さい場合、細孔内へ細胞がつまり細孔の泳動が抑制されるためと考えられる。

4.2 ∇E^2 の解析

細胞分離の可能性を検討するため、細孔近傍の ∇E^2 のシミュレーションを行った。 ∇E^2 のシミュレーションは、細孔径、絶縁膜の厚さ、細孔間距離を変化させ、有限要素法により行った。Fig.9は、上下の電極に挟まれた細孔のある絶縁膜における ∇E^2 の分布図を示す。この解析は円筒座標で行い、中心線の片側を描いている。白いほど ∇E^2 が大きく、黒くなるほどが ∇E^2 小さいことを示している。その結果、 ∇E^2 は絶縁膜の細孔の角近傍が大きくなる。また、細孔の中心軸方向では、細孔の入口付近の ∇E^2 が最も大きくなる。この結果、 ∇E^2 は絶縁膜の細孔の角近傍が大きくなる。また、細孔の中心軸方向では、細孔の入口付近の ∇E^2 が最も大きくなる。この結果、 ∇E^2 は絶縁膜の細孔の角近傍が大きくなる。また、細孔の中心軸方向では、細孔の入口付近の ∇E^2 が最も大きくなる。

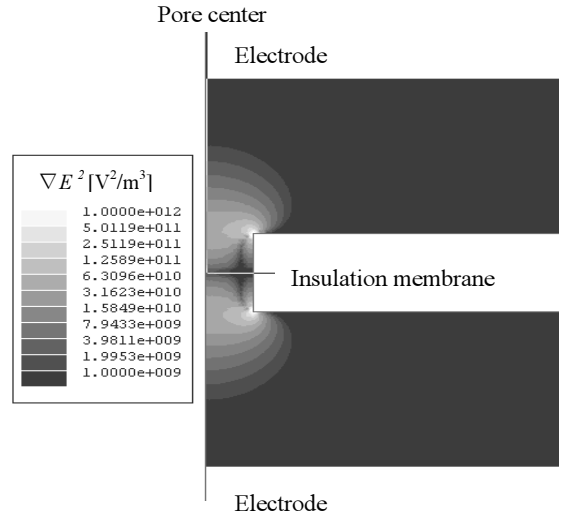


Fig.9 Distribution of ∇E^2 between electrodes.

Fig.10は ∇E^2 に及ぼす孔径の影響を示した。孔径 100, 200, 300, 400, 500 μm における細孔の中心の ∇E^2 を求めた。横軸は二つの電極間の位置を示している。結果より、孔径が小さいほど ∇E^2 の値が大きくなる。また、連続分離を行う場合、細孔近傍での反発力が重要となるため、孔径と細孔中心部の ∇E^2 の関係を Fig.11 に示す。細孔入口における細孔中心部では孔径が小さいほど ∇E^2 の値が大きくなり、孔径 200 μm 以下で急激に ∇E^2 が大きくなる。この結果、 ∇E^2 は絶縁膜の細孔の角近傍が大きくなる。また、細孔の中心軸方向では、細孔の入口付近の ∇E^2 が最も大きくなる。

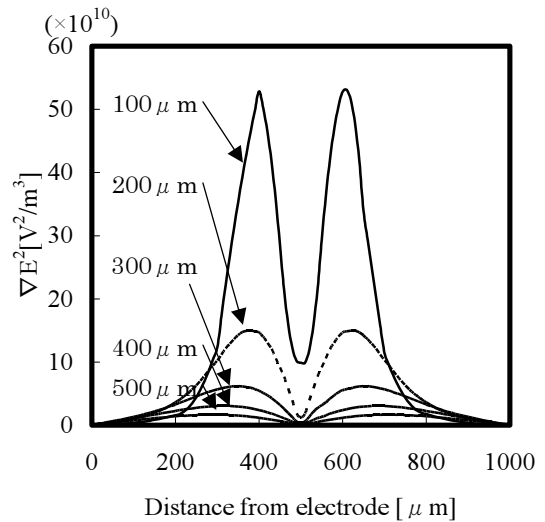


Fig.10 Effect of pore diameter on ∇E^2 between electrodes.

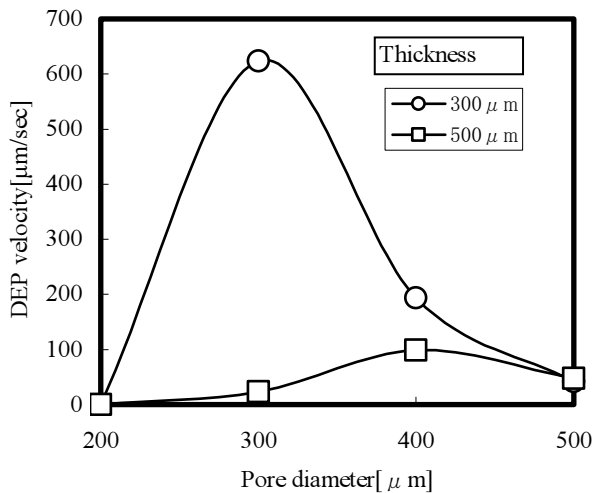


Fig.8 Effect of pore diameter on DEP velocity.

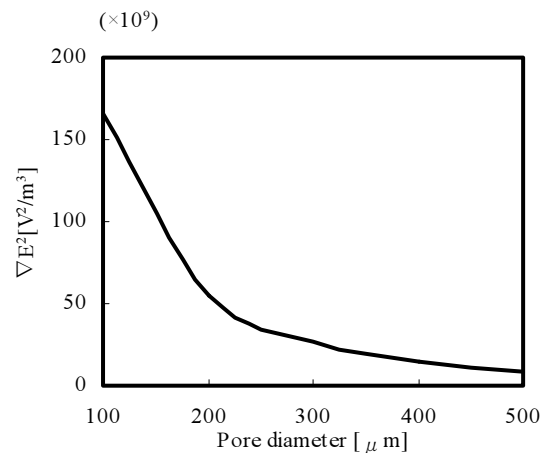


Fig.11 Effect of pore diameter on ∇E^2 .
(Thickness: 200 μm)

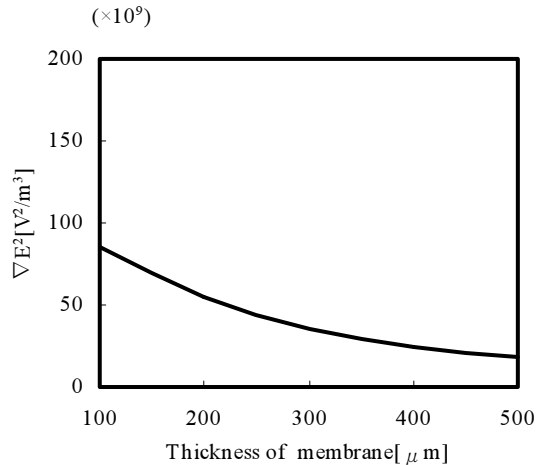


Fig. 12 Effect of membrane thickness on ∇E^2 .
(Pore diameter: 200 μm)

次に、絶縁膜の厚さ100, 200, 300, 400, 500 μm における細孔入口における中心線上の ∇E^2 を求めた。絶縁膜の厚さと細孔近傍における ∇E^2 の関係をFig. 12に示す。その結果、絶縁膜の厚さが薄いほど ∇E^2 の値が大きくなることがわかった。

更に、 ∇E^2 の値に及ぼす電極間における絶縁膜の位置、細孔間の距離の影響について検討を行った。その結果、絶縁膜の位置は二枚の電極の中心が最適であった。細孔間の距離は、距離が狭くなるほど ∇E^2 は小さくなるが、400 μm 以上ではほとんど変わらないということがわかった。

4. 3 細孔絶縁膜付誘電泳動デバイスによる細胞分離

単一細孔絶縁膜における ∇E^2 の解析結果と誘電泳動速度の測定結果をもとに細孔絶縁膜付き誘電泳動デバイスを用いた生死細胞の連続分離を行った。実験条件は周波数5 kHz, 懸濁液注入流量1 mL/min, 透過液側の流量を0.3 mL/minとした。電圧は40, 50, 60, 70, 80 V_{pp}と変化した。

細胞保持率に及ぼす電圧の影響をFig. 13に示す。その結果、電圧を高くするほど生細胞保持率は大きくなり、死細胞保持率は50%前後であった。この結果より、生細胞は60 V_{pp}以上では90%程度の保持率が得られた。また、膜の透過流速と誘電泳動速度が等しい場合、細胞は膜を透過しなくなる。そのときの印加電圧を理論印加電圧と定義し、理論印加電圧を算出した。理論印加電圧を求めるために必要な誘電泳動速度と ∇E^2 の関係は、ピン-ワイヤー電極を用いて実測し、次式を得た。

$$v_{DEP} = 4 \times 10^{-17} \cdot \nabla E^2 \quad (4)$$

その結果、Fig. 13の実験条件における理論印加電圧53.6 V_{pp}であり、実験結果と良く一致した。

次に、細胞分離に及ぼす周波数の影響について検討した。実験条件は電圧80 V_{pp}, 懸濁液注入流量1 mL/min, 透過液側の流量を0.3 mL/minとした。周波数は1, 10, 100, 1 k, 10 k, 50 kHzと変化した。Fig. 14は細胞保持率に及ぼす周波数の影響を示す。その結果、周波数の増大に伴って、生細胞保持率も増大し、1 kHzのとき生細胞保持率が最大となった。死細胞保持率は50%前後を示した。

更に、膜透過の流量について検討した。実験条件は、印加電圧60 V_{pp}と80 V_{pp}, 周波数1 kHzであり、懸濁液注入流量は1 mL/minで一定とし、透過液側の流量を0.2, 0.35, 0.5, 0.65 mL/minと変化した。Fig. 15は細胞保持率に及ぼす流量の影響を示す。その結果、印加電圧60 V_{pp}では、透過液側の流量を小さくするほど生細胞保持率も死細胞保持率も大きくなったが、80 V_{pp}では、ほぼ一定であった。

次に、より多くの死細胞を除去するために透過液側の流量を0.5 mL/min, 懸濁液注入流量を0.7 mL/minにし、保持液側の流量を低くした。実験条件は、電圧80 V_{pp}, 周波数1, 5, 10 kHzで行った。Fig. 16は、保持液側流量を低くした場合の細胞保持率に及ぼす周波数の影響を示す。その結果、周波数1 kHzでは、死細胞保持率を25%以下にすることができた。このような結果になった原因として、死細胞は生細胞の負の誘電泳動力に比べて小さいが正の誘電泳動力が働いているため、保持液側の流量を小さくすることによって死細胞を細孔へ引き寄せることができたのではないかと考えられる。

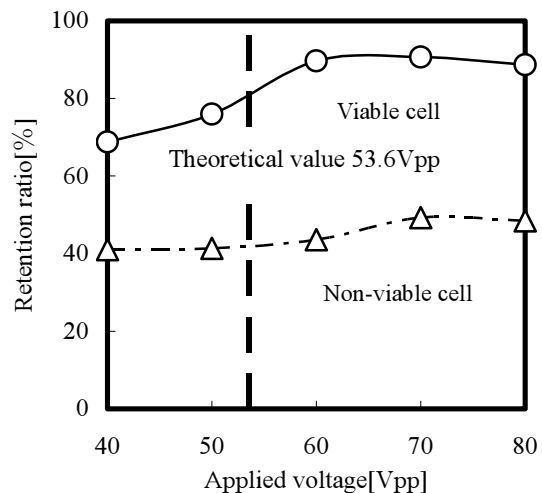


Fig. 13 Effect of applied voltage on cell retention ratio.

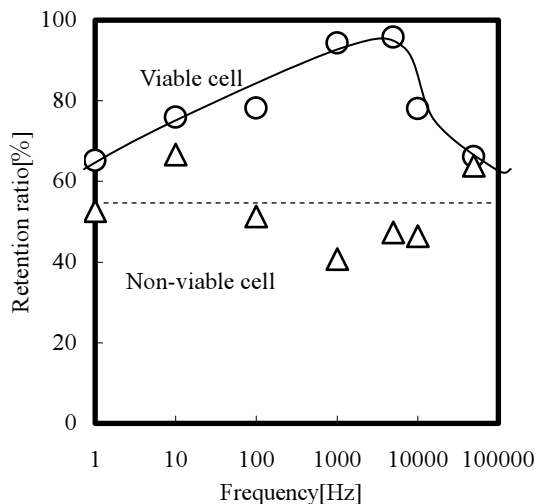


Fig. 14 Effect of frequency on cell retention ratio.

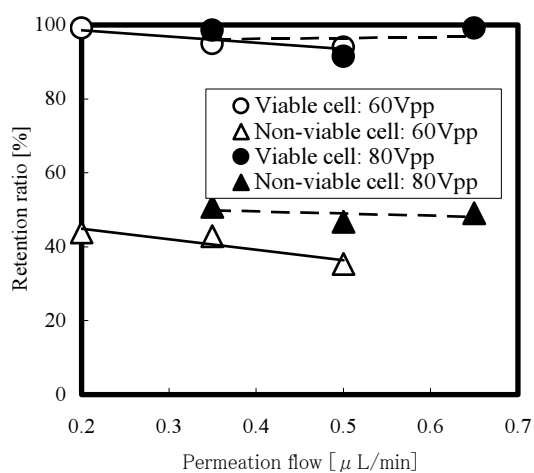
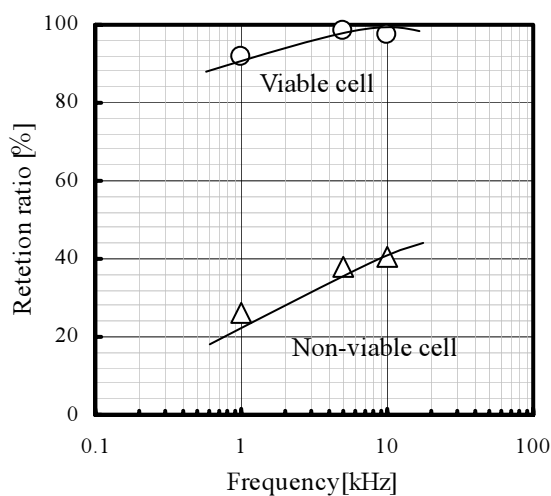


Fig. 15 Effect of permeation flow on cell retention ratio.

Fig. 16 Effect of frequency on retention ratio.
(Permeate flow rate: 0.5mL/min, Feed flow rate: 0.7mL/min)

5. まとめ

本研究は、細胞用バイオリアクター内の死細胞を選択的に除去できる実用的な分離装置の開発を目的として行われた。

平行平板電極間に細孔絶縁膜を設置することにより、不均一電場を形成し、細胞を誘電泳動できることが明らかになった。また、電場の解析より、細孔の孔径が小さいほど、また絶縁膜の厚さが薄いほど ∇E^2 が大きくなるという結果が得られた。

また、細孔絶縁膜付き誘電泳動デバイスを用いることによって、生細胞と死細胞の分離が可能であることが明らかになった。更に、膜透過流量、印加電圧、周波数などの操作条件を制御することによって、90%以上の生細胞保持率を得ることができた。

以上の結果より、細孔絶縁膜付き誘電泳動デバイスは実用的な生死細胞の分離装置であることが示唆された。

参考文献

- 1) J.S. Crane, H.A. Pohl: J. Electrochem. Soc., **115**, 6, (1968) 175
- 2) B.D. Manson, P.M. Townsley: Can. J. Microbiol., **17**, (1970) 879
- 3) H.A. Pohl, K. Kaler: Cell Biophys. **1**, (1979) 15
- 4) G.H. Markx, M.S. Talary, R. Pethig: J. Biotechnol. **32**, (1994) 29
- 5) G.H. Markx, R. Pethig: Biotechnol. Bioeng., **45**, 4, (1995) 337
- 6) A. Docosilis, N. Kalogerakis, L.A. Behie, K.V.I.S. Kaler: Biotechnol. Bioeng., **54**, 3, (1997) 239
- 7) A. Docosilis, N. Kalogerakis, L.A. Behie: Cytotechnology, **30**, (1999) 133
- 8) 箱田 優, 脇坂嘉一, 白神直弘: 化学工学論文集, **27(2)**, (2001) 159
- 9) Y. Wakizaka, M. Hakoda, N. Shiragami: Biochem. Eng. J., **20(1)**, (2004) 13
- 10) Y. Wakizaka, M. Hakoda, N. Shiragami: J. Chem. Eng. Japan, **37(7)**, (2004) 908
- 11) 箱田 優, 脇坂嘉一, 三井信一, 北島信義: 静電気学会誌, **29** (2005) 8
- 12) H.A. Pohl: *Dielectrophoresis*, Cambridge University Press (1978)