

研究開発成果 実装支援プログラム  
平成23年度 報告書

実装活動の名称 「急性白血病の早期診断を目的とした誘電泳  
動による細胞検出・同定法の臨床応用」

採択年度 平成23年度  
実装機関名 一般財団法人ファジィシステム研究所  
実装責任者 今里 浩子

## 1. 概要

本年度の目標は誘電泳動環境の整備であり、以下2点を実施した。

- ① 細胞にダメージ1（細胞破壊や細胞内容の流失）を与えない溶液（等張液）を創出。
- ② 細胞にダメージ2（ゲノムおよびエピゲノムレベルのダメージまでを含む）を与えない印加高周波電圧の許容範囲を調べた。（H24.12.まで）  
正常白血球（正常7種類のうち、好中球とB-リンパ球）を対象とした。

<内容>

- ① 電界をかけない状態で細胞を長時間入れ放置しても細胞死を起こさない溶液の創出を行った。

Zimmerman 溶液（導電率：低）および細胞培養液 RPMI1640（導電率：高）を用いて血液を系統希釈（血液：溶液=1:9~10:0）した。溶液中において細胞破壊が生じるか否かを顕微鏡下で 1~6 時間観察した。どの血漿希釈溶液においても細胞破壊は起こらなかった。

- ② 実験に使用した電極はクリーク・ギャップ電極である。この電極に電圧を印加すると電極間に電位勾配が生じるように設計されている。  
この電極を有するデバイスに白血球浮遊液を注入し、電圧を印加し、細胞破壊を顕微鏡下で観察した。血液細胞が負の誘電泳動を呈する場合はほとんど問題ないが、正の誘電泳動を呈する場合には、電界の集中する電極エッジにおいて細胞膜が破壊されて細胞が消失することもあることが確認された。したがって、現在、電界集中の生じない対向平行平板電極で好中球および B-リンパ球を対象として、印加電圧に対する耐性の周波数依存性を調べている。

上記の実験に付随して、リアルタイムPCRを用いたゲノム解析を行ってみたが、装置の借用が共同利用のために十分な時間がとれず、満足な結果は得られていない。これについては次年度に購入するリアルタイムPCRに期待したい。

## 2. 実装活動の具体的内容

本年度の目標は誘電泳動環境の整備であり、以下2点を実施した。

- ① 細胞にダメージ1（細胞破壊や細胞内容の流失）を与えない溶液（等張液）を創出。  
電界をかけない状態で細胞を長時間入れ放置しても細胞死を起こさない溶液の創出を行った。

<実験方法>

1. 血漿（抗凝固剤 EDTA-2K を使用）を Zimmermann 細胞融合液（導電率：25.9mS/m, 浸透圧 305mOsm/KgH<sub>2</sub>O）および RPMI1640 細胞培養液（導電率：1391mS/m, 浸透圧 279mOsm/KgH<sub>2</sub>O）で希釈したものを、ここでは血漿希釈溶液と呼ぶことにする。この血漿希釈溶液の浸透圧および導電率を、種々の希釈比率（血漿：各希釈溶液=1:9~10:0）に対して計測した。浸透圧計は Osmotic Pressur AUTO&STAT OM-6030（京都第一化学株式会社）、導電率計は導電率メータ Navi@ COND（堀場製作所）を使用した。
2. 0.5ml の血漿に 2~5 万個の白血球とその約 10 倍の赤血球を入れ、これを血液原液とした。白血球の内訳は好中球約 65%，リンパ球約 30%，その他 5%である。

3. 血液原液 50 $\mu$ l を血漿希釈溶液 1.0ml に混和して、測定用サンプルとした。
4. 測定用サンプルとしては、2 種類の希釈溶液（Zimmermann 細胞融合液，RPMI1640 細胞培養液）に対して
  - ① 血漿：希釈溶液＝1:9,
  - ② 血漿：希釈溶液＝1:2,
  - ③ 血漿：希釈溶液＝10:0,
  - ④ 血漿：希釈溶液＝2:8,
  - ⑤ 血漿：希釈溶液＝3:7,
  - ⑥ 血漿：希釈溶液＝4:6,
  - ⑦ 血漿：希釈溶液＝5:5,
  - ⑧ 血漿：希釈溶液＝6:4,
  - ⑨ 血漿：希釈溶液＝7:3,
  - ⑩ 血漿：希釈溶液＝8:2,
  - ⑪ 血漿：希釈溶液＝9:1の 11 種類の希釈率を適用した。したがって、測定用サンプルは 22 種類用意した。
5. 血液原液・血漿希釈溶液混和後の経過時間による赤血球および白血球の細胞破壊を調べるために、測定用サンプル① (1:9), ④ (2:8), ⑤ (3:7), ⑥ (4:6), ⑦ (5:5), ⑧ (6:4), ⑨ (7:3), ⑩ (8:2), ⑪ (9:1) の 18 種類について、1 時間、顕微鏡観察（映像記録）を行った。
6. 血液原液・血漿希釈溶液混和後、どの程度の時間が経過して細胞死が生じるかを調べるために、測定用サンプル① (1:9), ② (1:2), ③ (10:0) の 6 種類について、混和直後および 1 時間毎に 6 時間経過まで染色・顕微鏡観察を行った。染色にあたっては、測定用サンプルの 3 倍容積の染色液（0.4W/V%トリパン青溶液）で実施した。染色処理後の測定用サンプルを計算盤に注入し、顕微鏡下で細胞死の割合を算定した。それ以外の測定用サンプル④ (2:8), ⑤ (3:7), ⑥ (4:6), ⑦ (5:5), ⑧ (6:4), ⑨ (7:3), ⑩ (8:2), ⑪ (9:1) の 16 種類については、混和直後および 1 時間後に同様の観察を行った。

#### <結果>

実験結果を表 1～5 にまとめて示す。

1. 測定用サンプルの浸透圧および導電率の希釈率依存性は表 1 に示すとおりである。
2. 血液原液・血漿希釈溶液混和後の経過時間による赤血球および白血球の細胞破壊は、測定用サンプル① (1:9), ④ (2:8), ⑤ (3:7), ⑥ (4:6), ⑦ (5:5), ⑧ (6:4), ⑨ (7:3), ⑩ (8:2), ⑪ (9:1) の 18 種類について、いずれも確認されなかった。なお、Zimmermann 細胞融合液による測定用サンプル①については、赤血球凝集により赤血球および白血球の独立した観察が不能となり、細胞破壊は確認できなかった。（図 1 参照）

測定用サンプルの浸透圧については、RPMI1640 細胞培養液の場合、ほぼ血液と同等で問題なく、一方、Zimmermann 細胞融合液の場合、血液よりも若干高い値を示したが、細胞破壊は生じていない。
3. 染色・顕微鏡観察の結果、血液原液・血漿希釈溶液混和後時間経過とともに細胞死が増加する傾向はみられなかった。むしろ、測定毎に細胞死割合にばらつきが

みられた。(表2～5参照)

4. 希釈溶液の如何に関わらず、希釈率が低い場合は、赤血球が連銭を形成することがわかった。図2に希釈率0% (血漿：希釈溶液=10:0) の場合の赤血球連銭形成を示す。これは、誘電泳動による細胞分離やハンドリングの障害となりうるので、避けるべきである。

#### <結論>

1. 血液正常細胞における死細胞が1.0%以下に関しては、溶液による影響ではないと判断する。その理由は、死細胞を経過時間観察するなか、死細胞率の高低が逆転している場合(希釈溶液Zimmermann細胞融合液を用いた場合の1:2および9:1, RPMI1640培養液を用いた場合の1:9および1:2)があるとから、これは細胞算定法のばらつき、もしくは各白血球の測定サンプル調整時の余命のばらつきによるものと考えられるからである。
  2. 誘電泳動に使用する電極形状によって、導電率の高い溶液および低い溶液を使い分ける必要がある。また、血液の希釈倍率を高くすればするほどその溶液中に存在する細胞数が減少するので好ましくない。さらに、Zimmermann細胞溶液の割合が多くなると赤血球凝集が起りやすく、血漿の割合が多くなると赤血球の連銭形成が生じる。よって、導電率の低い溶液(Zimmermann細胞融合液)を使用する場合は、赤血球の凝集を起こさない4:6以上が好ましく、導電率の高い溶液(RPMI1640細胞培養液)を使用する場合は、血漿と溶液の混合比は6:4, 7:3, 8:2が好ましいと考えられる。
- ② 細胞にダメージ2 (ゲノムおよびエピゲノムレベルのダメージまでを含む) を与えない印加高周波電圧の許容範囲を調べた。(H24.12.まで実施予定)
- 正常白血球(正常7種類のうち、好中球とB-リンパ球)を対象とした。

#### <実験方法>

1. 実験に使用した電極はクリーク・ギャップ電極である。この電極に電圧を印加すると電極間に電位勾配が生じるように設計されている。この電極を有するデバイスに白血球浮遊液(希釈溶液はZimmermann細胞融合液を用い、血漿：溶液は4:6とした)を注入し、交流電圧を印加し、細胞破壊を顕微鏡下で観察した。  
白血球浮遊液は比重遠心法および磁気ビーズによる分離を使用して得た。

#### <経過報告>

1. 血液細胞が負の誘電泳動を呈する場合はほとんど問題ないが、正の誘電泳動を呈する場合には、電界の集中する電極エッジにおいて細胞膜が破壊されて細胞が消失することもあることが確認された。  
したがって、現在、電界集中の生じない対向平行平板電極を作製し、好中球およびB-リンパ球を対象として、印加電圧に対する耐性の周波数依存性を調べている。  
上記の実験に付随して、リアルタイムPCRを用いたゲノム解析を行ってみたが、装置の借用が共同利用のために十分な時間がとれず、満足な結果は得られていない。これについては次年度に購入するリアルタイムPCRに期待したい。

表 1. 各希釈液の浸透圧および導電率

Zimmermann細胞融合液の希釈液(血漿:溶液)

血漿:溶液	0:10	1:9	2:8	1:2	5:5	10:0
浸透圧(mOsm/KgH <sub>2</sub> O)	305	313	311	310	307	288
導電率(ms/m)	25.9	159.7	318.0	474.0	703.0	1359.0

RPMI1640細胞培養液の希釈液(血漿:溶液)

血漿:溶液	0:10	1:9	2:8	1:2	5:5	10:0
浸透圧(mOsm/KgH <sub>2</sub> O)	279	280	276	283	286	288
導電率(ms/m)	1391.0	1350.0	1342.0	1382.0	1391.0	1359.0

表 2. Zimmermann細胞融合液を用いた測定用サンプルの死細胞濃度 (単位:%)  
(6時間経過まで)

血漿:溶液	1:9	1:2	10:0
0 hr	0.00	0.00	0.00
1 hr	0.00	0.00	0.00
2 hr	0.44	0.37	0.00
3 hr	0.42	0.38	0.00
4 hr	0.41	1.16	0.00
5 hr	0.40	2.38	0.00
6 hr	0.79	1.06	0.91

表 3. Zimmermann細胞融合液を用いた測定用サンプルの死細胞濃度 (単位:%)  
(1時間経過まで)

血漿:溶液	2:8	3:7	4:6	5:5
0hr	0.00	0.00	0.00	0.00
1hr	0.00	0.00	0.00	0.00
血漿:溶液	6:4	7:3	8:2	9:1
0hr	0.00	0.00	0.00	1.00
1hr	0.00	0.97	0.00	0.00

表 4. RPMI1640細胞培養液を用いた測定用サンプルの死細胞濃度 (単位:%)  
(6時間経過まで)

血漿:溶液	1:9	1:2	10:0
0 hr	0.00	0.00	0.00
1 hr	0.55	0.00	0.00
2 hr	0.55	0.50	0.00
3 hr	0.00	0.00	0.00
4 hr	1.07	0.00	0.00
5 hr	0.48	0.55	0.00
6 hr	1.23	0.52	0.00

表 5. RPMI1640細胞培養液を用いた測定用サンプルの死細胞濃度 (単位: %)  
(6時間経過まで)

血漿:溶液	2:8	3:7	4:6	5:5
0hr	0.00	0.71	0.89	0.00
1hr	0.00	0.60	2.13	2.70
血漿:溶液	6:4	7:3	8:2	9:1
0hr	0.63	0.00	0.00	0.00
1hr	0.81	0.00	0.00	0.72

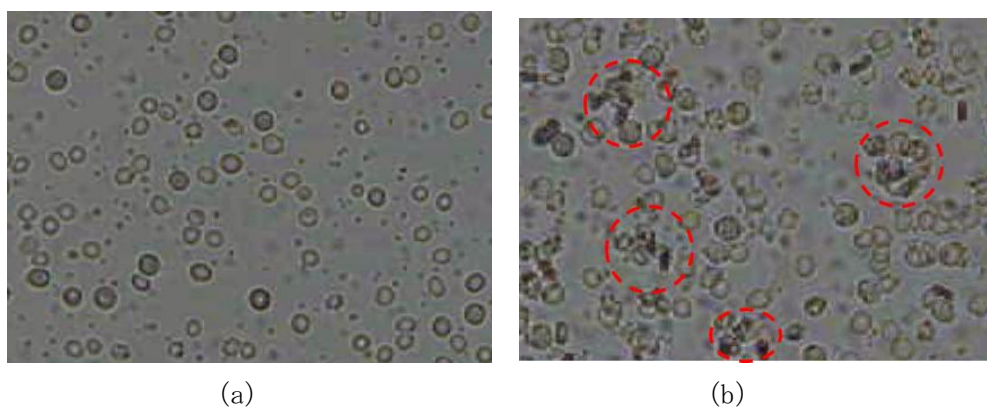


図 1. (a) Zimmermann細胞融合液による希釈率の低い場合は、赤血球および白血球が均一に分散しているが、(b) Zimmermann細胞融合液による希釈率の高い場合は、赤血球の凝集が起こるので、赤血球および白血球の細胞破壊が確認困難である。

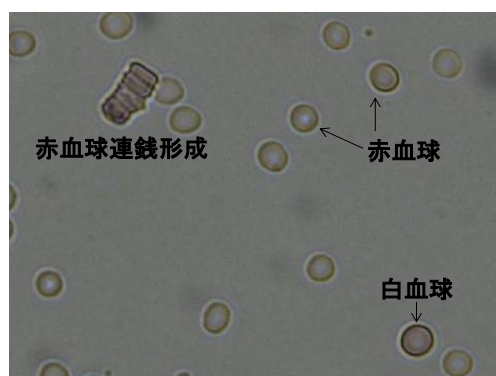


図 2. 血漿のみによる測定サンプルを調整した場合、赤血球の連鎖形成が生じる。

### 3. 理解普及のための活動とその成果

#### (1) 口頭発表（国際学会発表及び主要な国内学会発表）

① 口頭講演 （国内会議  2  件、国際会議  0  件）

バイオメディカル・ファジィ・システム学会 第24回年次大会（山口県，2011年10月29・30日）

・今里浩子，山川 烈

Method for measuring the specific gravity of a particle to calculate its dielectrophoretic force.

・江口正徳，山川 烈

Separation of particles by combining dielectrophoresis and traveling-wave electroosmosis under inclined gravity.