

研究開発成果 実装支援プログラム
平成24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24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4点を実施した。さらに、計画には入っていなかったが、白血球密度の測定法を確立した。白血球密度は誘電泳動力算定に必要なファクターであるが、特定白血球の密度を誘電泳動デバイスから取り出すことなく測定する方法が必要である。よって、その測定法を確立した。

- 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。
細胞内容物溶出の有無確認を追加し、それを実施した。
- 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ている（実施中）。（H25.9.まで）
- ③ 細胞にダメージ3（電界集中部接触による細胞破壊）を与えず、効率よく分離可能な電極の設計を行った。
- ④ 冷却機能付き高周波用デバイスの設計を行った。→マイルストーン②
- ⑤ 白血球密度測定法を確立した。

<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。前年度では、血液と希釈溶液の比率 1:9~9:1 の9通りで実験を行い、その結果、血液と Zimmermann 溶液の比率は 4:6, 5:5, 6:4, 3:7, 2:8, 1:9 が好ましいという結果を得ていた。本年度はこれらの比率をさらに絞り込むため、追加実験として、細胞内容物溶出の有無を、溶液の抵抗を測定することにより確認した。血液と Zimmermann 溶液の比率において、3:7, 2:8, 1:9 では赤血球の凝集が起こるので当初から除外することにした。本年度の実験の結果、血液と Zimmermann 溶液の比率は少なくとも 5:5 および 6:4 の範囲であれば十分であるということがわかった。
- ② 実験に使用した電極は自作の対向平行平板電極（インピーダンス測定用セル）である。この電極を有するデバイスに白血球浮遊液を注入し、交流電圧を印加後の溶液抵抗を測定している。印加交流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いる。
- ③ 高周波電圧を印加するので、その際に問題となる寄生インダクタンス、寄生抵抗、寄生容量の考慮し、電極設計を行った。
- ④ 白血球の活性化を防止するため、温度コントロールが可能な高周波対応デバイスの設計を行った。
- ⑤ 白血球1個の密度を測定できる方法を確立した。この方法は、誘電泳動デバイスから白血球を取り出すことなく、デバイス内で測定可能である。

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4点を実施した。さらに、誘電泳動力測定に必要な白血球密度測定法の確立を行った。

- 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。
前年度の活動結果から、細胞にダメージを与えない溶液比率の最適条件を絞り込むため、細胞内容物溶出の有無確認を追加し、それを実施した。

<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/KgH₂O）で希釈したものを血漿希釈溶液とした。この血漿希釈溶液の比率は以下の3種類を用意した。
 - ① 血漿：Zimmermann 細胞融合液=4:6
 - ② 血漿：Zimmermann 細胞融合液=5:5
 - ③ 血漿：Zimmermann 細胞融合液=6:4
2. 3それぞれの血漿希釈溶液 500 μl に約2万個の白血病細胞(BALL-1細胞)を入れ、よく混和した。これを以下では、サンプル液①, ②, ③と呼ぶことにする。
3. 溶液中における細胞内容物溶出の有無を確認するために上記サンプル液を図1に示すインピーダンス測定セルに注入し、注入直後から10分ごとに溶液の抵抗を測定した。抵抗測定に用いた装置は PRECISION IMPEDANCE ANALYZER 4294A (アジレント社)である。

<結果> (図2参照)

各溶液抵抗の変化量を正規化変動値 (N.V.) とし、以下の式で計算した。

$$N.V. = \frac{R(t) - R(0)}{R(0)}$$

ここで $R(0)$ は初期抵抗値, $R(t)$ は時刻 t における抵抗値である。

各サンプル液の抵抗変動はサンプル液①で -1.4 から 2.7%, サンプル液②で -0.3 から 1.4%, サンプル液③で -0.3 から 0.9%であった。

したがって、血漿と Zimmermann 細胞融合液の混合比率 4:6 以外はほとんど変化なしとみなすことができる。混合比率 5:5, 6:4 では、細胞内容物の溶出が見られないと判断できる。

<結論>

血漿と Zimmermann 細胞融合液の比率は 6:4 が最適であるということがわかった。

- 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電圧値および周波数に関する許容範囲を調べている (H25.9. まで実施)。これを以下では、「細胞無侵襲条件」と呼ぶ。

<実験方法> (実験過程：図3参照)

1. 血漿と Zimmermann 細胞融合液の混合比率を 6:4 とした血漿希釈溶液を準備し、この溶液に正常白血球 (顆粒球, リンパ球) および異常白血球 (HL-60, BALL-1) をそれぞれ別個に約1万個加えたものをサンプル溶液として実験中。
2. サンプル溶液を図1のインピーダンス測定セルに注入し、種々の電圧値および種々の周波数の高周波電圧をインピーダンス測定セルに印加し、10分ごとに溶液の抵抗値を初期状態から1時間測定する。
3. 溶液の抵抗値が変化すれば、細胞内容物が溶出したとして、その周波数および電圧値を無侵襲条件から除外する。一方、溶液の抵抗値が変化しない場合は、遺伝子解

析を行い、細胞のダメージの有無を確認する。ダメージが有れば、その周波数および電圧値を無侵襲条件から除外し、ダメージが無ければ、それを無侵襲条件とする。

<経過報告>

1. 現在、低周波（数十 Hz）・低電圧（数 V 以下）領域で実験中である。また、リアルタイム PCR を用いたゲノム解析に関しても実施中であるが、インピーダンス測定セル中の細胞が少数であるので、データにばらつきが生じている。現在、実験方法の見直しを行い、改良しているところである。

③ 細胞にダメージ 3（電界集中部接触による細胞破壊）を与えず、効率よく分離可能な電極の設計を行った。

今までに使用してきた電極（図 4 参照）の課題として、血液細胞が正の誘電泳動を呈する場合に、電界の集中する電極エッジに吸着し、時に細胞膜が破壊されて細胞が消失するということがあった。これを解決する方法として、電極を平面ではなく厚膜電極（図 5 参照）とすることを考え、メーカーに作製を依頼していたが、技術的に困難であることがわかったので、以下のように実験方法を変更した。

<実験方法>

1. 平面電極の配置を誘電泳動デバイスの下部（底）ではなく、上部（図 6. (a)）とすることにより、電界集中部に細胞が吸着されることがなくなったので、厚膜電極を使用する必要がなくなった。
2. 高周波電圧を印加するので、その際に問題となる寄生インダクタンス、寄生抵抗、寄生容量などを考慮して電極を作製した。

<結果>

1. 平面電極の配置を上部とすることで、細胞が正の誘電泳動を呈した場合であってもエッジに吸着することなく、電極間を移動させることが可能となった（図 6. (b) 参照）。
2. 作製した電極を図 7 および図 8 に示す。

④ 冷却機能付き高周波用デバイスの設計を行った。→マイルストーン②

環境温度の上昇により、白血球が活性化し、その形状が変化する。白血球に生じる誘電泳動力を測定したり、その密度を測定したりするには、その形状を球形に維持する必要がある。

<実験方法>

環境温度を一定にし、高周波測定にも対応できる加熱冷却ステージを設計した。

<結果>

作製したデバイスを図 9 に示す。

⑤ 白血球密度測定法の確立。

1 個の白血球に生じている誘電泳動力を計算するためには、その白血球自体の密度の

値が必要である。誘電泳動デバイス内にある特定の白血球の密度を測定する方法がなかった。そこで、流体中の物体に生じる終端速度を利用して、その物体の密度を測定する方法を確立した。この方法により、正常もしくは異常白血球 1 個の密度を測定することができた。

<実験方法>

1. 誘電泳動デバイス内に粒子を注入し、デバイスを垂直に倒立するのみでは、その粒子の終端速度を測定することはできない。したがって、図 10 に示すように、デバイスを一旦 0° から 120° に起こし、一定時間後（粒子の大きさにより異なるが数十秒～数百秒）に垂直にすることにより終端速度を測定する。その値から粒子の密度を求める方法を提案した。そこで、3 種類の大きさのポリスチレンビーズを用いた実験結果からその有用性を確認する。
2. 4 種類の白血球をそれぞれ別個に浮遊させた溶液（RPMI1640 細胞培養液中に白血球を浮遊させたもの）を誘電泳動デバイス内に注入し、図 10 に示す手順で、各白血球の終端速度からその密度を測定する。ここでは、正常および異常の顆粒球・B-リンパ球を使用する。

<結果>

1. 大きさの異なる 3 種のポリスチレンビーズの終端速度を測定し、それらの密度を求めた。その結果、粒子のサイズが大きいほど得られた密度の精度がよいことがわかった。（図 11 および表 1 参照）
2. 正常および異常の顆粒球・B-リンパ球の密度測定結果を図 12 および表 2 に示す。正常顆粒球の密度は平均 $1.076\text{g}/\text{cm}^3$ 、異常顆粒球（HL-60 細胞）は平均 $1.042\text{g}/\text{cm}^3$ 、正常 B-リンパ球は平均 $1.052\text{g}/\text{cm}^3$ 、異常 B-リンパ球（BALL-1 細胞細胞）は平均 $1.043\text{g}/\text{cm}^3$ であった。

<結論>

この方法により、厚さ $100\mu\text{m}$ の液の層内にある特定の細胞 1 個をデバイスから取り出すことなく、その密度を測定することができた。

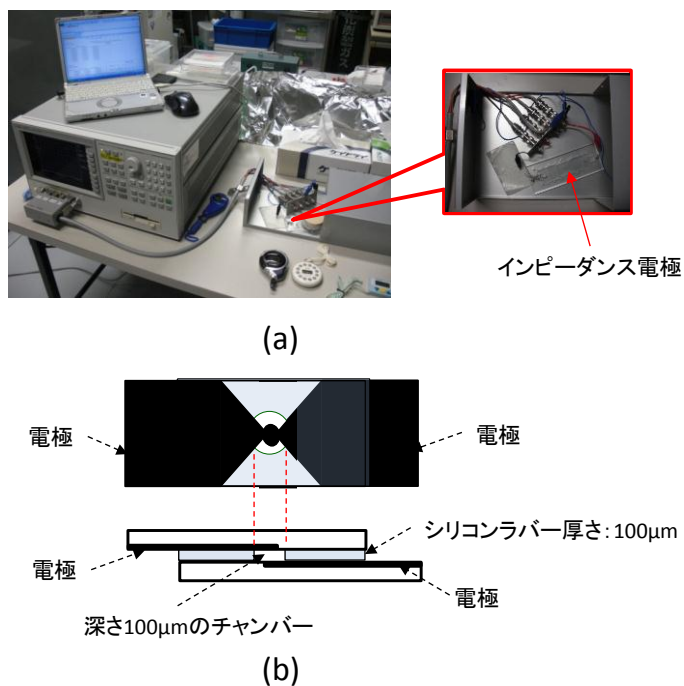
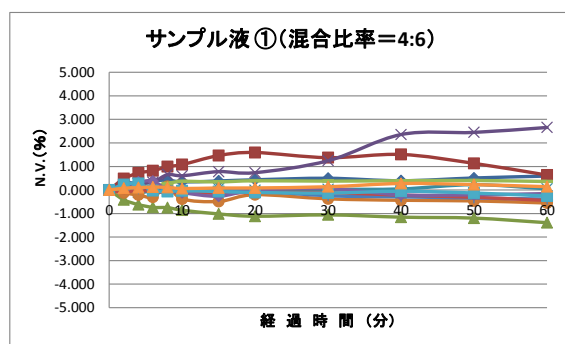
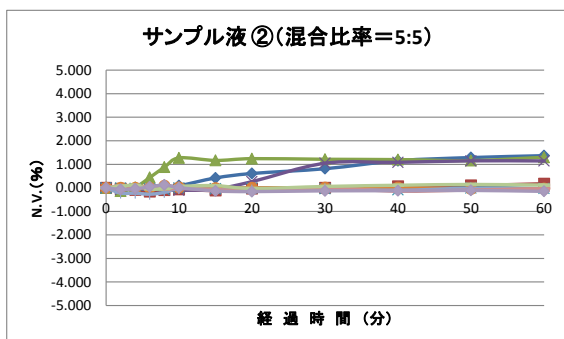


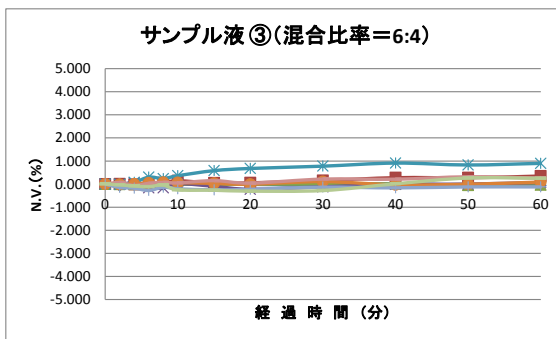
図1. 溶液抵抗実験装置 実験装置外観 (a), インピーダンス測定セル上面図 (上段) および側面図 (下段) (b)



(a)



(b)



(c)

図2. 各サンプル液抵抗の変化量 サンプル液① (a), サンプル液② (b), サンプル液③ (c)

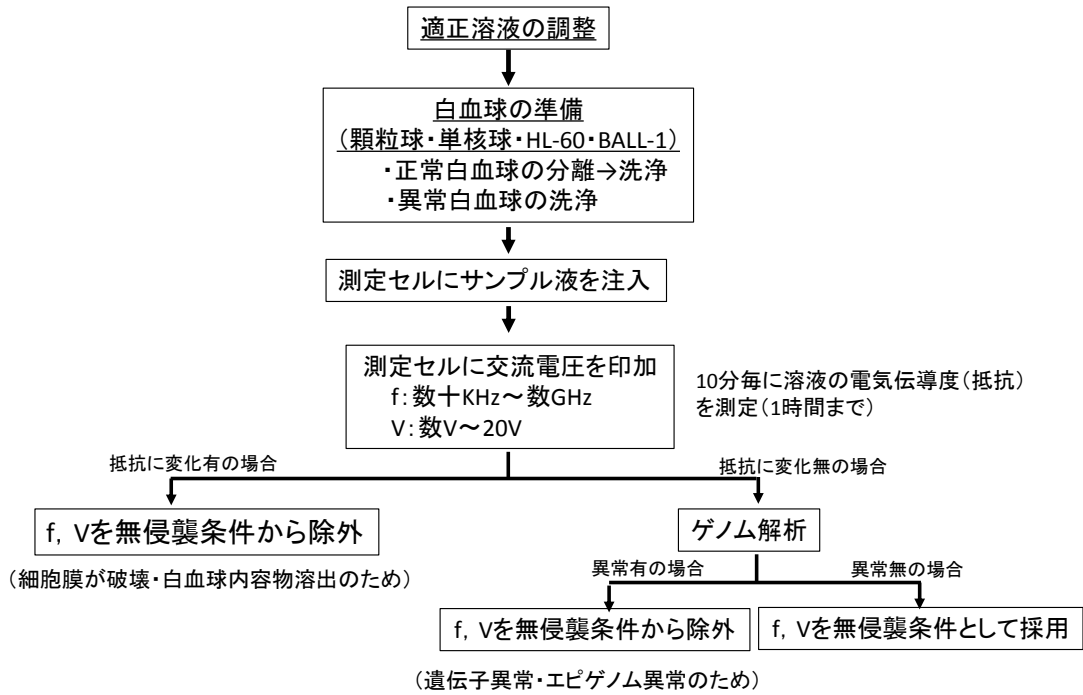


図3. 細胞にダメージを与えないための無侵襲条件を周波数および電圧値について求めるプロセス

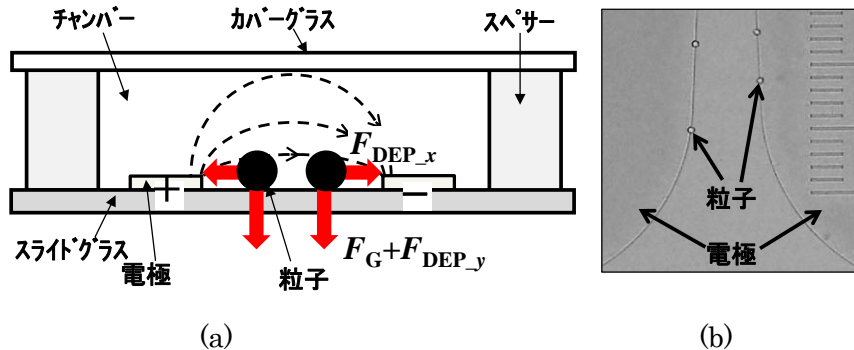


図4. これまで使用していた誘電泳動デバイスの断面図 (a), およびこれを利用した場合の電極エッジへの細胞の吸着 (正の誘電泳動) (b)

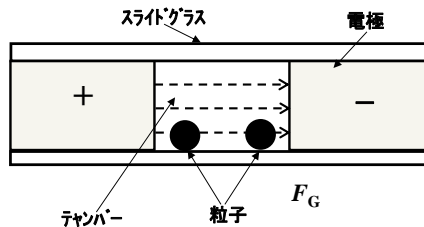


図5. 厚膜電極

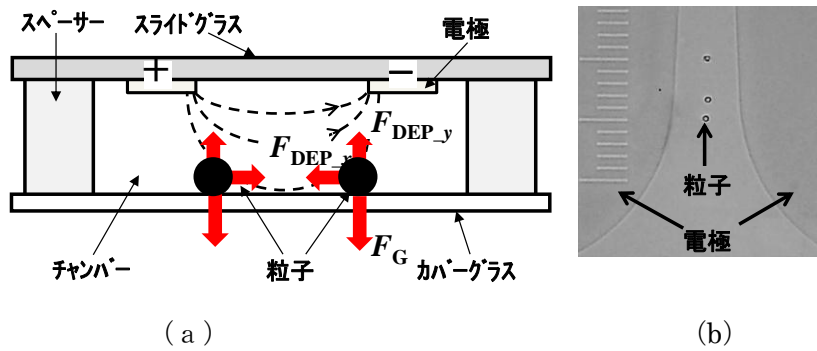


図6. シーリング電極 電極断面図 (a), 粒子の移動図 (b)

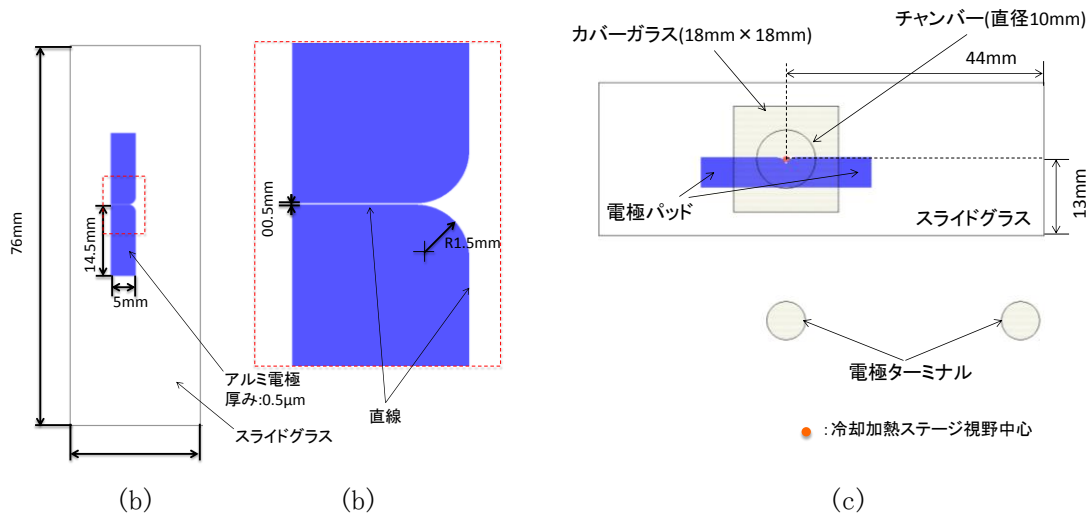


図7. 細胞ダメージ3（電界集中部接触による細胞破壊）を与えず，効率よく分離可能な電極の設計図(a),(b), および冷却加熱ステージ内での電極配置 (c)

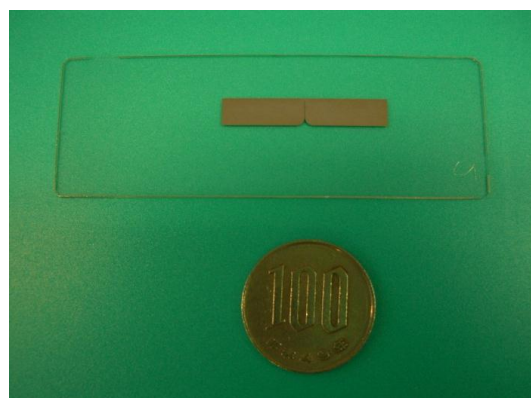


図8. 作製した電極

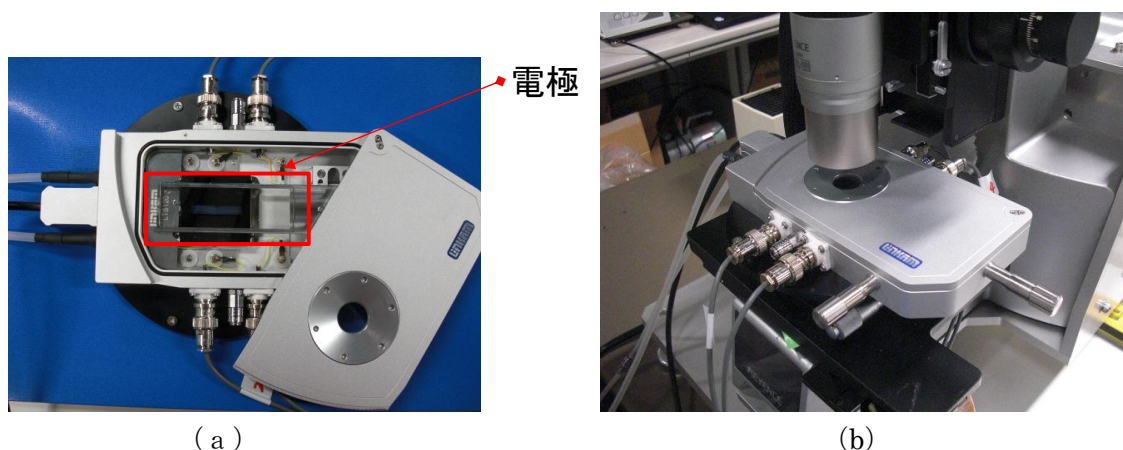


図9. 高周波用デバイス（加熱冷却用ステージ）の内部構造 (a), および顕微鏡に配置した高周波用デバイス (b)

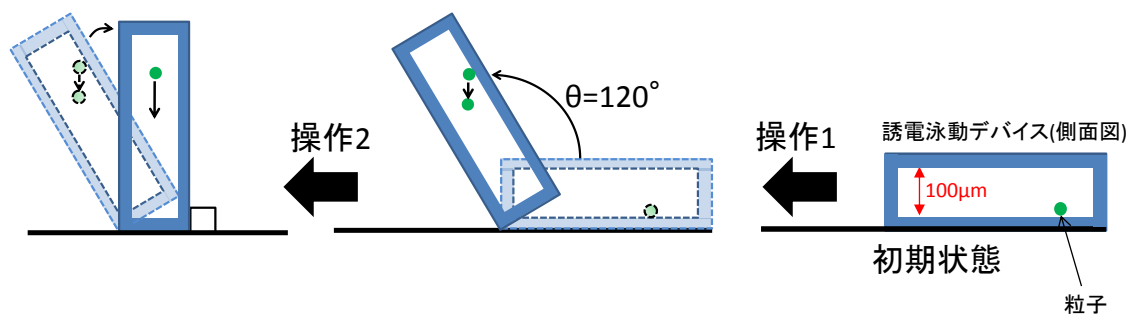


図10. 粒子の密度測定法

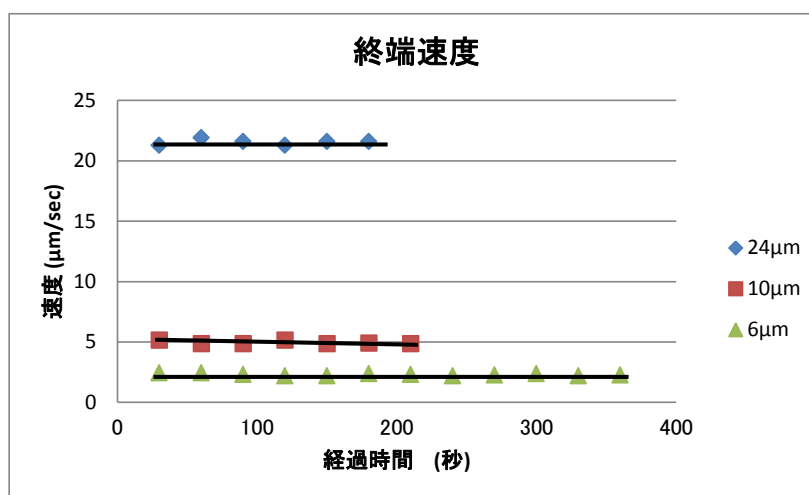


図11. 3種類ポリスチレンビーズの終端速度

表1. 3種ポリスチレンビーズの密度

直径 (μ m)	密度 (g/cm ³)		差	誤差 (%)
	測定値	真値		
24	1.060	1.060	0	0
10	1.079	1.060	1.019	1.79
6	1.101	1.060	0.041	3.87

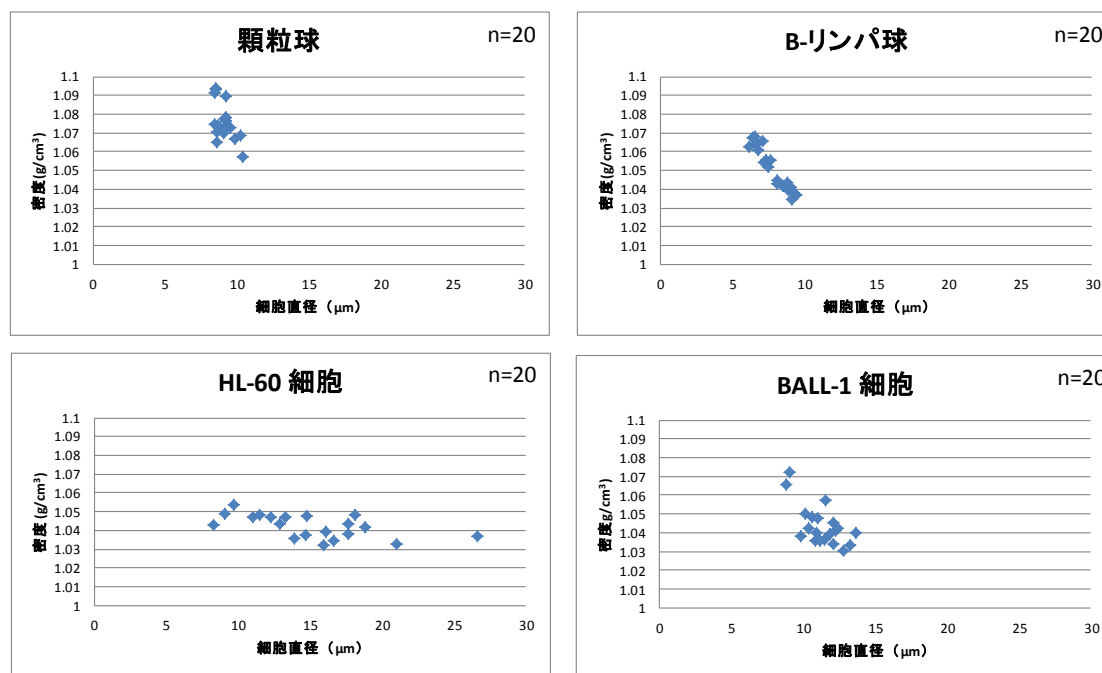


図12. 正常および異常の顆粒球・B-リンパ球の密度分布図

表2. 正常および異常の顆粒球・B-リンパ球の密度

		平均密度 (g/cm ³)	標準偏差 (g/cm ³)	変動計数 (CV%)
正常	顆粒球	1.076	0.0096	0.9
	B-リンパ球	1.052	0.0012	1.1
異常	HL60 細胞	1.042	0.0061	0.6
	BALL-1細胞	1.043	0.0105	1.1

3. 理解普及のための活動とその成果

(1) 論文発表（国内誌 0 件、国際誌 2 件）

- ① Hiroko Imasato, Takeshi Yamakawa, Masanori Eguchi, "Separation of Leukemia Cells from Blood by Employing Dielectrophoresis", Intelligent Automation and Soft Computing, Vol. 18, No. 2, pp. 139-152, 2012.
- ② Masanori Eguchi, Hiroko Imasato, Takeshi Yamakawa, " Separation of Particles by Combining Dielectrophoresis and Traveling-wave Electroosmosis under Inclined Gravity, " Intelligent Automation and Soft Computing, Vol. 18, No. 2, pp. 121-137, 2012.

(2) WEBサイトによる情報公開

一般財団法人ファジィシステム研究所のホームページ
<<http://flsi.cird.or.jp/DEP.html>>

(3) 口頭発表（国際学会発表及び主要な国内学会発表）

- ・ 口頭講演（国内会議 0 件、国際会議 2 件）
- ① Hiroko Imasato, Takeshi Yamakawa, " Measuring the Mass Density of a Target Blood Cell to Calculate Its Dielectrophoretic Force," World Automation Congress 2012 (WAC2012), MEXICO, 2012.
 - ② Masanori Eguchi, Hiroko Imasato, Takeshi Yamakawa, " Separation of Blood cells by employing Dielectrophoresis and Traveling-wave Electric Fields, " World Automation Congress 2012 (WAC2012), MEXICO, 2012.