

研究開発成果 実装支援プログラム  
平成25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、および異常白血球を精度よく分離・検出するための印加交流電圧の電圧値および周波数を求めることである。具体的には以下3点を実施した。

- ① 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。
- ② 血液細胞分離・同定のための電圧値および周波数を求めた。
- ③ 正常および異常白血球に生じる誘電泳動の周波数依存性を調査した。

### <内容>

- ① 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 (細胞無襲条件) の検討

本研究の目的は、抹消血液中から生きたまま白血病細胞 (異常白血球) を抽出し、その細胞の培養状況から確定診断を行うということである。よって、本来、白血病細胞に存在した白血病関連遺伝子が消失しない印加交流電圧の設定が必要となる。そこで、異常白血球それぞれの浮遊液に交流電圧を印加し、白血病関連遺伝子に与える影響の有無を確認した。

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、交流電圧を印加した後、その細胞を取り出した。その細胞を用いて、リアルタイムPCRを実施し、負荷 (交流電圧印加) 前後の遺伝子発現の相対定量解析を行った。

エピゲノムに関しては、DNAメチル化酵素 : DNMT3A, および脱メチル化関連酵素 : TLL2, IDH1/IDH2について検討し、プライマーの設計を終了し、現在、実験手技について検討しているところである。

- ② 血液細胞分離・同定のための条件設定  
赤血球・血小板と白血球 (正常・異常白血球) を効率よく分離するための条件を検討した。
- ③ 正常および異常白血球に生じる誘電泳動の周波数依存性を調査した。  
正常および異常白血球を効率よく分離するための条件を検討した。

## 2. 実装活動の具体的内容

- ① 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の検討

### <実験方法>

1. 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として、血漿 (抗凝固剤 EDTA-2K を使用) : Zimmermann 細胞融合液 (導電率 : 25.9mS/m, 浸透圧 305mOsm/KgH<sub>2</sub>O) = 4:6 を採用した。この溶液の導電率は 557mS/m, 浸透圧 308mOsm/KgH<sub>2</sub>O, 比重は 1.031 はである。

この溶液に、培養保存している白血病細胞 (BALL-1 細胞 : 急性リンパ性白血病

- 細胞、HL-60細胞：急性前骨髄性白血病細胞）をそれぞれ浮遊させた。
2. 培養細胞および正常白血球はそれぞれ PBS（リン酸緩衝液）で1回洗浄後した。その後、上記溶液で1回洗浄し、同溶液 100 $\mu$ l に約2万個の割合で混和した。  
準備した細胞浮遊液は、BALL-1細胞浮遊液・HL-60細胞浮遊液の2種類である。
  3. 各細胞浮遊液を図1に示すインピーダンス測定セル（体積：約3.85 $\mu$ l）に注入した。  
交流電圧を1時間印加した。  
印加条件は、以下の通りである。
    - ① 30KHz $\cdots$ 3Vpp, 7Vpp, 10Vpp
    - ② 500KHz $\cdots$ 3Vpp, 7Vpp, 10Vpp
    - ③ 1MHz $\cdots$ 3Vpp, 7Vpp, 10Vpp※HL60細胞は30KHz $\cdot$ 10Vppと1MHz $\cdot$ 10Vppのみである。
  4. 交流電圧を印加後、測定セルから細胞を取り出す。
  5. 取り出した細胞をPBSで洗浄し、細胞数2万 $\sim$ 3万個でペレット化する。
  6. ペレット化した細胞を用いて、リアルタイムPCRを実施した。  
対象とした遺伝子は白血病関連遺伝子のWT1遺伝子 $\cdot$ p53遺伝子 $\cdot$ c-myc遺伝子である。また、リファレンス遺伝子としてACTB遺伝子を採用した。
  7. リアルタイムPCR実施後、負荷前後の相対定量解析を行った。

#### <結果>

リアルタイムPCRの結果を表1および表2に示す。  
 $\Delta\Delta Cq$ 値から負荷前後の遺伝子量を比較し、相対定量としてその増減を確認した。

$$\text{相対定量} = \frac{\text{負荷後}}{\text{負荷前}} = 2^{-\Delta\Delta Cq} \quad (\text{単位：倍})$$

各細胞の遺伝子発現量を比較したグラフを図2、3に示す。負荷前の遺伝子発現量を1として比較した。

BALL-1細胞は、p53遺伝子とc-myc遺伝子が発現しており、WT1遺伝子は発現していない。また、HL-60細胞は、WT1遺伝子とc-myc遺伝子が発現しており、p53遺伝子は発現していない。

BALL-1細胞においては、p53遺伝子発現は、負荷後（交流電圧印加後）、2倍近く亢進しており、c-myc遺伝子の発現は、平均約1.4倍亢進していた。一方、HL-60細胞においては、負荷後、WT1遺伝子発現はやや亢進傾向する場合とやや減少傾向する場合が確認されたが、c-myc遺伝子発現は減少していることが分かった。

上記のごとく、周波数範囲（30KHz $\sim$ 1MHz） $\cdot$ 電圧範囲（3Vpp $\sim$ 10Vpp）の交流電圧印加では、BALL-1,HL-60ともに遺伝子発現が消失することはなかった。

#### <結論>

高周波電圧印加（印加条件：30KHz $\cdot$ 3Vpp $\sim$ 1MHz $\cdot$ 10Vpp）において、それぞれの細胞で遺伝子発現が消失することはなかった。

よって、現段階では、細胞無襲条件を30KHz $\cdot$ 3Vpp $\sim$ 1MHz $\cdot$ 10Vppと判断する。

## ② 血液細胞分離・同定のための条件設定

赤血球・血小板と白血球（正常・異常白血球）を効率よく分離するための条件を検討した。

### <実験方法>

1. 血漿と Zimmermann 細胞融合液の混合比率を 4:6 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）および血小板および赤血球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た。  
正常血球類（赤血球・白血球・血小板）は，EDTA 加静脈血を遠心分離して準備した。
2. それぞれのサンプル溶液を別個に，図 4 の高周波用デバイス（加熱冷却用ステージ）内の電極チャンバーに注入し，30KHz～1MHz，10Vpp の電圧を印加した。
3. 各周波数におけるそれぞれの細胞の誘電泳動挙動を確認した。

### <結果>

赤血球・血小板と白血球を効率よく分離する高周波電圧が設定できない状況にある。溶液による白血球へのダメージを生じさせないようにするため，なるべく血液に近い環境での分離を考えている。よって，その溶液を血液：Zimmermann細胞融合液=4:6とした。しかし，溶液の電気伝導度が高く，数MHzオーダーまでに赤血球・血小板と白血球の誘電泳動特性の違いが確認できていない。

### <結論>

対応策として，電極やデバイスの改良を行いGHzオーダーまでの実験を行うか，もしくは，電気伝導度の低いショ糖溶液とPBS（リン酸緩衝液）の混合液を利用するか，である。後者については，本プログラム開始前にすでに実証済みである。また，この溶液を用いた場合，チップ外に白血病細胞を抽出して培養することによる確定診断は難しくなるが，逆に，マイクロフルイディクスと誘電泳動を利用して，チップ内で短時間のうちに白血病細胞の種類を推定することができそうである。

## ④ 正常および異常白血球に生じる誘電泳動の周波数依存性を調査した。

正常および異常白血球を効率よく分離するための条件を検討した。

### <実験方法>

1. 血漿と Zimmermann 細胞融合液の混合比率を 4:6 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（白血病細胞：BALL-1 細胞および HL-60 細胞）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た。よって，準備したサンプル溶液は，4 種類である。  
正常血球類は，EDTA 加静脈血を遠心分離して準備した。また，白血病細胞は，培養し，凍結保存していたものを使用した。
2. サンプル溶液をそれぞれ別個に，図 4 の高周波用デバイス（加熱冷却用ステージ）内の電極チャンバーに注入し，30KHz～1MHz，10Vpp の電圧を印加した。
3. 各周波数におけるそれぞれの細胞の誘電泳動挙動を確認した。

<結果>

選出した誘電泳動用溶液中において、数十KHz～数十MHzの範囲では、正常・異常白血球のほとんどが負の誘電泳動を呈した。

<結論>

正常および異常細胞（白血病細胞）には、誘電泳動力の大きさに違いが確認されるので、誘電泳動力の違いによる検出・同定は可能である。しかし、誘電泳動力が弱く、その力の測定に時間を要するという問題が生じた。溶液中において、白血球がダメージを受けないようにするためには、1時間以内に測定を終了しなければならない。チップ外培養を考えなければ、血漿希釈溶液ではなく、ショ糖溶液とPBS（リン酸緩衝液）の混合液を使用することができる。この混合液を使用した実験では、私どもは既に、正常リンパ球と異常リンパ球（BALL-1細胞：急性リンパ性白血病細胞）、あるいは、正常顆粒球と異常顆粒球（HL-60細胞：急性前骨髄性白血病細胞）とを正・負の誘電泳動で分離しているのので、他の白血病細胞も分離できるのではないかと推測する。

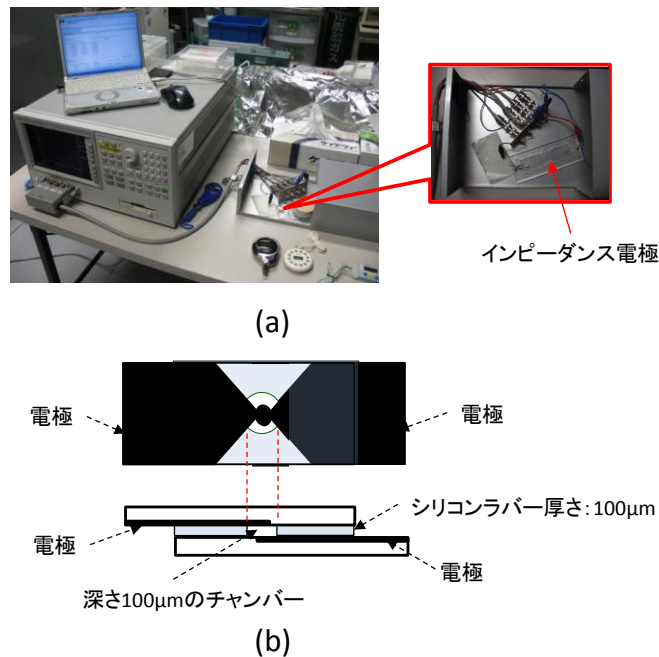


図1. 溶液抵抗実験装置。

(a) 実験装置外観。

(b) インピーダンス測定セル上面図（上段）および側面図（下段）。

表1：BALL-1細胞 各遺伝子におけるリアルタイムPCR結果。  
(a) p53遺伝子, (b) c-myc遺伝子.

	遺伝子名	Cq	$\Delta Cq$	$\Delta\Delta Cq$	相対定量
負荷なし	ACTB	23.22			
	p53	28.72	5.50		1.00
30KHz 3V	ACTB	23.26			
	p53	27.67	4.41	-1.09	2.12
30KHz 7V	ACTB	23.97			
	p53	28.55	4.58	-0.91	1.89
30KHz 10V	ACTB	23.53			
	p53	28.25	4.72	-0.78	1.71
500KHz 3V	ACTB	24.94			
	p53	29.41	4.47	-1.03	2.03
500KHz 7V	ACTB	24.43			
	p53	29.01	4.58	-0.92	1.89
500KHz 10V	ACTB	23.39			
	p53	28.05	4.66	-0.84	1.78
1MHz 3V	ACTB	23.05			
	p53	27.96	4.91	-0.59	1.50
1MHz 7V	ACTB	25.80			
	p53	30.45	4.65	-0.85	1.80
1MHz 10V	ACTB	23.86			
	p53	28.66	4.80	-0.70	1.62

(a)

	遺伝子名	Cq	$\Delta Cq$	$\Delta\Delta Cq$	相対定量
負荷なし	ACTB	23.22			
	c-myc	26.99	3.77		
30KHz 3V	ACTB	23.26			
	c-myc	26.44	3.18	-0.59	1.50
30KHz 7V	ACTB	23.97			
	c-myc	27.23	3.26	-0.50	1.42
30KHz 10V	ACTB	23.53			
	c-myc	26.55	3.02	-0.75	1.68
500KHz 3V	ACTB	24.94			
	c-myc	28.03	3.09	-0.68	1.60
500KHz 7V	ACTB	24.43			
	c-myc	27.42	2.99	-0.78	1.71
500KHz 10V	ACTB	23.39			
	c-myc	27.01	3.62	-0.15	1.11
1MHz 3V	ACTB	23.05			
	c-myc	26.45	3.40	-0.37	1.29
1MHz 7V	ACTB	25.80			
	c-myc	28.97	3.17	-0.60	1.51
1MHz 10V	ACTB	23.86			
	c-myc	27.38	3.52	-0.25	1.19

(b)

表2：HL60細胞 各遺伝子におけるリアルタイムPCR結果.  
(a) WT1遺伝子, (b) c-myc遺伝子.

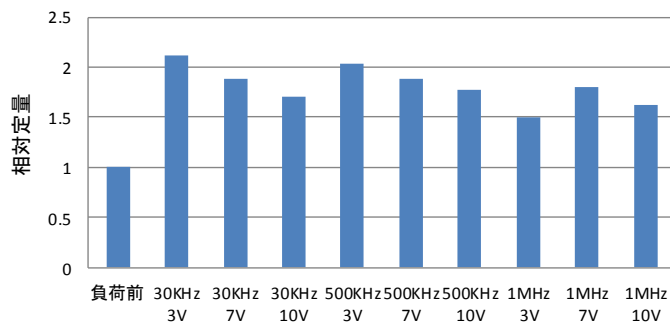
	遺伝子名	Cq	$\Delta$ Cq	$\Delta\Delta$ Cq	相対定量
負荷なし	ACTB	24.87			
	WT1	30.93	6.06		1.00
30KHz 10V	ACTB	24.87			
	WT1	30.68	5.81	-0.25	1.19
1MHz 10V	ACTB	24.86			
	WT1	31.30	6.45	0.39	0.76

(a)

	遺伝子名	Cq	$\Delta$ Cq	$\Delta\Delta$ Cq	相対定量
負荷なし	ACTB	24.87			
	c-myc	25.52	0.65		1.00
30KHz 10V	ACTB	24.87			
	c-myc	26.13	1.26	0.62	0.65
1MHz 10V	ACTB	24.86			
	c-myc	26.45	1.60	0.95	0.52

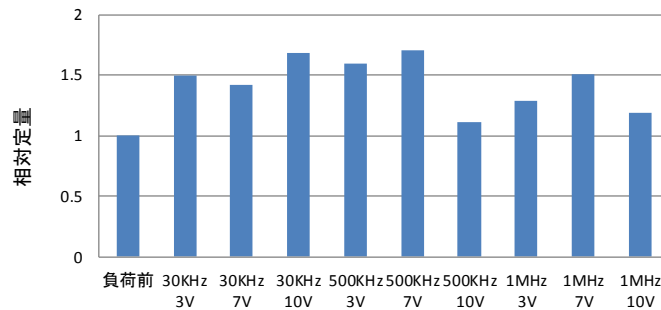
(b)

### BALL-1 p53



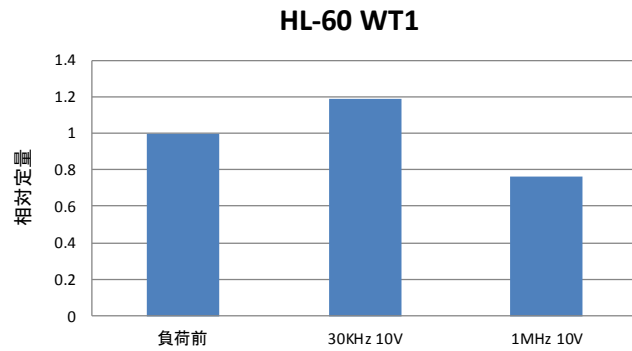
(a)

### BALL-1 c-myc

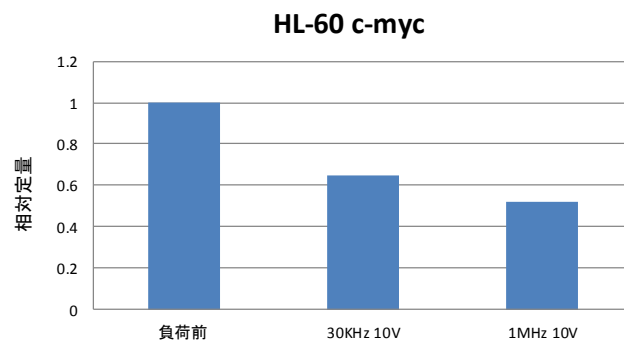


(b)

図2. 負荷前後におけるBALL-1細胞の遺伝子発現量比較.  
(a) p53遺伝子, (b) c-myc遺伝子.

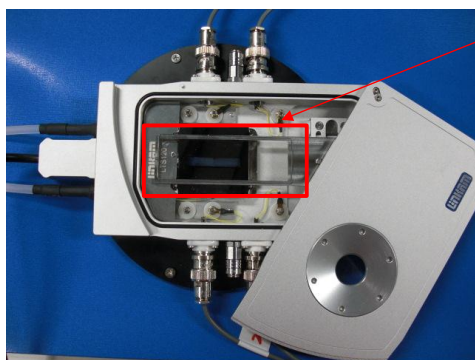


(a)

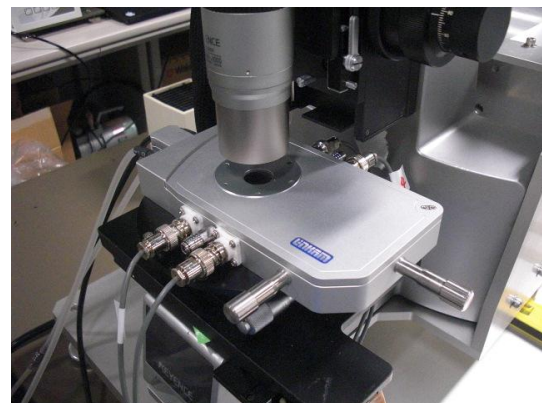


(b)

図3. 負荷前後におけるHL60細胞遺伝子の発現量比較.  
(a) WT1遺伝子, (b) c-myc遺伝子.



(a)



(b)

図4.高周波用デバイス (加熱冷却用ステージ) . (a) 内部構造, (b) 顕微鏡に配置した高周波用デバイス.



### 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 1 件)

Takeshi Yamakawa and Hiroko Imasato, “Dielectrophoresis : Integrated Approaches for Understanding the Cell,” in Springer Handbook of Bio-/Neuro-Informatics, edited by Nikola K. Kasabov, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp.29-42, 2014.

(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 1 件、国際会議 0 件)

今里浩子, 山川 烈, “誘電泳動泳動現象を利用した血液細胞の分離・同定,” 電気学会, バイオ・マイクロシステム研究会, pp. 9-13. 東京, 2013.