

公開資料

研究開発成果実装支援プログラム
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」

実装支援プロジェクト終了報告書

実装期間 平成 23年10月～平成 26年 9月
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
氏 名 今里 浩子

目次

I	実装活動の名称と目標、3年間の活動要約	3
	(1) 実装活動の名称	3
	(2) 最終目標	3
	(3) 支援期間終了後の目標（到達点）	4
	(4) 3年間の活動実績（要約）	4
II	実装活動の計画と実装活動	5
	(1) 全体計画	5
	(2) 各年度の実装活動の具体的内容	5
III	実装支援活動の成果	11
	(1) 目標達成及び実装状況	11
	(2) 実装された成果の今後の自立的継続性	12
	(3) 実装活動の他地域への普及可能性	12
	(4) 実装活動の社会的副次成果	12
	(5) 人材育成	12
	(6) 実装活動で遭遇した問題とその解決策	12
IV	実装活動の組織体制	13
	(1) 体制	13
V	理解普及のための活動とその評価	14
	(1) 展示会への出展等	14
	(2) 研修会、講習会、観察会、懇談会、シンポジウム等	14
	(3) 新聞報道、TV放映、ラジオ報道、雑誌掲載等	14
	(4) 論文発表	14
	(5) WEBサイトによる情報公開	14
	(6) 口頭発表	14
	(7) 特許出願	15
	(8) その他特記事項	15
VI	結び	15

I 実装活動の名称と目標、3年間の活動要約

(1) 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」

(2) 最終目標

実装責任者らは、所有する技術（「誘電泳動力の測定法とその装置」）を基本原理とする白血病細胞の検出・同定法を確立し、白血病細胞を高感度に検出する臨床用検査機器を開発する。急性白血病の超早期発見を健康診断の血液検査レベルで実施するためには、この機能を自動血球計数器に付加するか、安価（100万円以内）なパーソナルユーズ仕様の機器にしなければならない。図1は開発機器（白血病細胞検出器）内で実施される白血病細胞の分離（検出）・同定過程を示している。また、図2は誘電泳動とマイクロフルーイデイクスを利用した白血病細胞の分離の原理図を示している。自動血球計数器の開発は大手臨床検査機器メーカーと交渉を行う予定である。

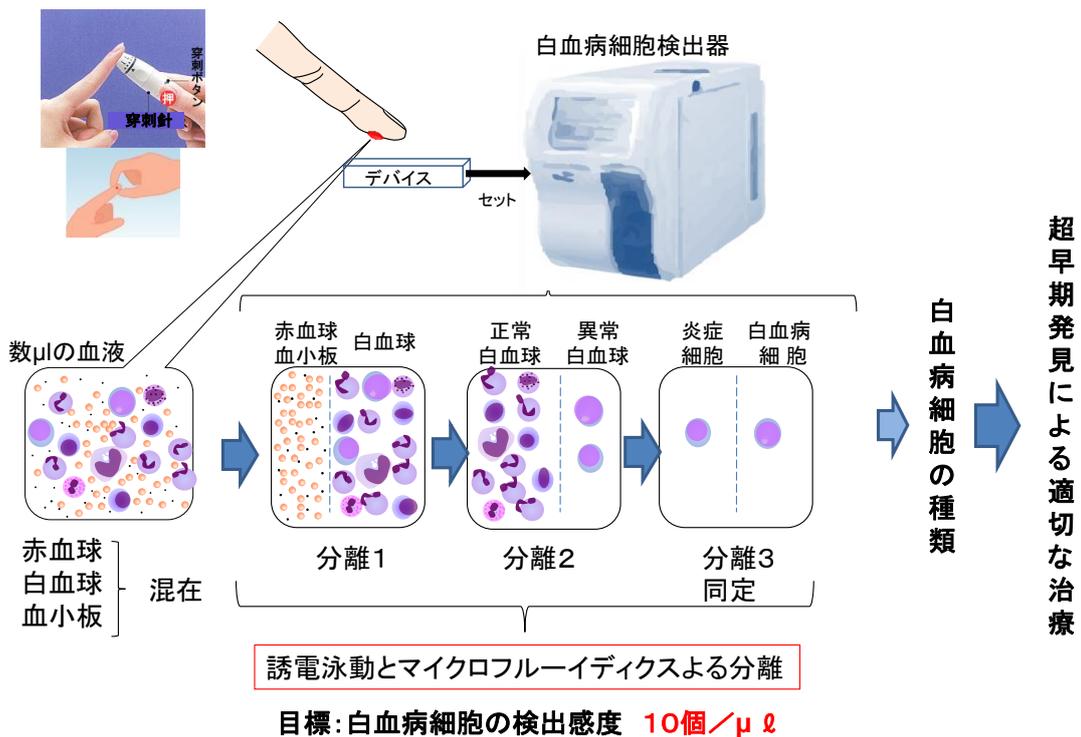


図1. 開発機器内で実施される過程.

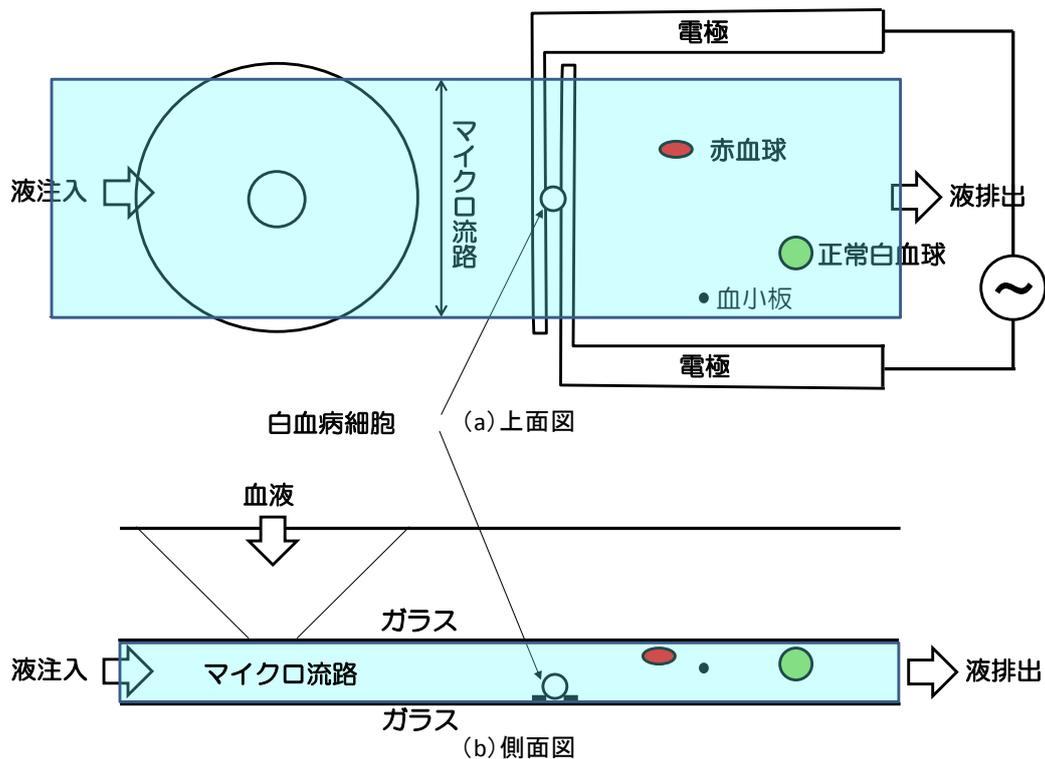


図 2. 誘電泳動とマイクロフルーイディクスによる白血病細胞の分離. 周波数を変えることにより, 負の誘電泳動を呈する赤血球や正常白血球等を分離し, さらに周波数と液の注入速度を制御することにより, 白血病細胞のタイプを同定する.

(3) 支援期間終了後の目標 (到達点)

白血病細胞の検出・同定法を確立するために, ①誘電泳動環境の整備, ②血液細胞分離・同定のための条件設定を行い, ③平成23年度プロジェクト開始時は, 臨床応用のための異常細胞同定マップを作成する予定であったが, 細胞の同定法をマイクロフルーイディクスによる方法に変更したので, そのための電気的およびマイクロ流体工学的条件設定を行う.

(4) 3年間の活動実績 (要約)

急性白血病細胞の検出・同定法に誘電泳動現象を利用する. そのために必要な誘電泳動環境の整備として, 細胞に効率よく誘電泳動を生じさせるための溶液を創出し, その溶液中に高周波電圧を印加しても細胞にダメージを与えない条件を求めた. さらに, 細胞が球形を維持でき, 電界集中も生じないデバイスの設計および作製を行った. また, デバイス内にある1個の白血球に働く誘電泳動力を求めるために必要な密度測定法を確立した. しかし, 白血病細胞の同定法を誘電泳動力による方法から, 誘電泳動とマイクロフルーイディクスによる方法に変更したので, 以下の検討を実施した.

- ① 誘電泳動の溶液を8.75%のショ糖溶液にリン酸緩衝液を1%添加したものに變更し、白血病細胞の同定を行うための環境整備を行った。
- ② マイクロフルーイディクス機能を有するデバイスの設計・作製を行った。
- ③ 上記溶液中に、血液細胞と白血病細胞を混和したものを浮遊させ、白血病細胞をそれ以外から分離し、その白血病細胞のタイプを同定する方法を確立した。それは、デバイス内で負の誘電泳動を呈する血液細胞（正常白血球を含む）と正の誘電泳動を呈する白血病細胞を溶液の流れにより分離し、正の誘電泳動を呈している白血病細胞に特異的な流速を加えることにより、そのタイプを同定することができる方法である。

II 実装活動の計画と実装活動

(1) 全体計画

大項目	中項目	H23年度		H24年度			H25年度				H26年度		
		10	3	4	9	10	3	4	9	10	3	4	10
誘電泳動の環境整備	溶液の創出		①										
	許容印加高周波電圧の調査(ゲノム解析等を含む)			②									
	電極設計			③									
	高周波対応デバイスの設計			④									
分離・同定のための条件設定	分離条件の設定					⑤							
	周波数依存誘電特性の調査							⑥					
	周波数域の特定								⑦				
細胞検出・同定法の確立	異常細胞判定マップ作成												
	マイクロフルーイディクスと組合わせた白血病細胞の同定												
	有用性チェック												
その他	白血球密度測定法												

(2) 各年度の実装活動の具体的内容

[平成23年度]

平成23年から平成24年12月までに、誘電泳動の環境整備を行うために、以下のような実験を行った。

白血病細胞の検出・同定に誘電泳動現象を利用する。誘電泳動現象は、不均一電界下において、細胞とそれらを浮遊させる溶液との誘電特性の違いを利用するので、細胞に効率よく誘電泳動現象を生じさせるための溶液を創出する必要がある。また、その溶液は、細胞にダメージ（細胞死：細胞破裂や細胞内容物の流出など）を与えるものであってはならない。よって、初年度は、電界をかけずに、細胞を長時間入れ、放置しても細胞死を起こ

さない血液ベースの溶液を創出する実験を行った（図3参照）。さらに、創出した溶液中に細胞を浮遊させ、高周波電圧を印加した際、ゲノムおよびエピゲノムに新たな‘傷（遺伝子多型やエピジェネティックな変化）’が生じることのない、印加周波数および電圧の許容範囲調査を行う予定であったが、種々の問題解決に時間を要し、実装活動に支障が生じた。

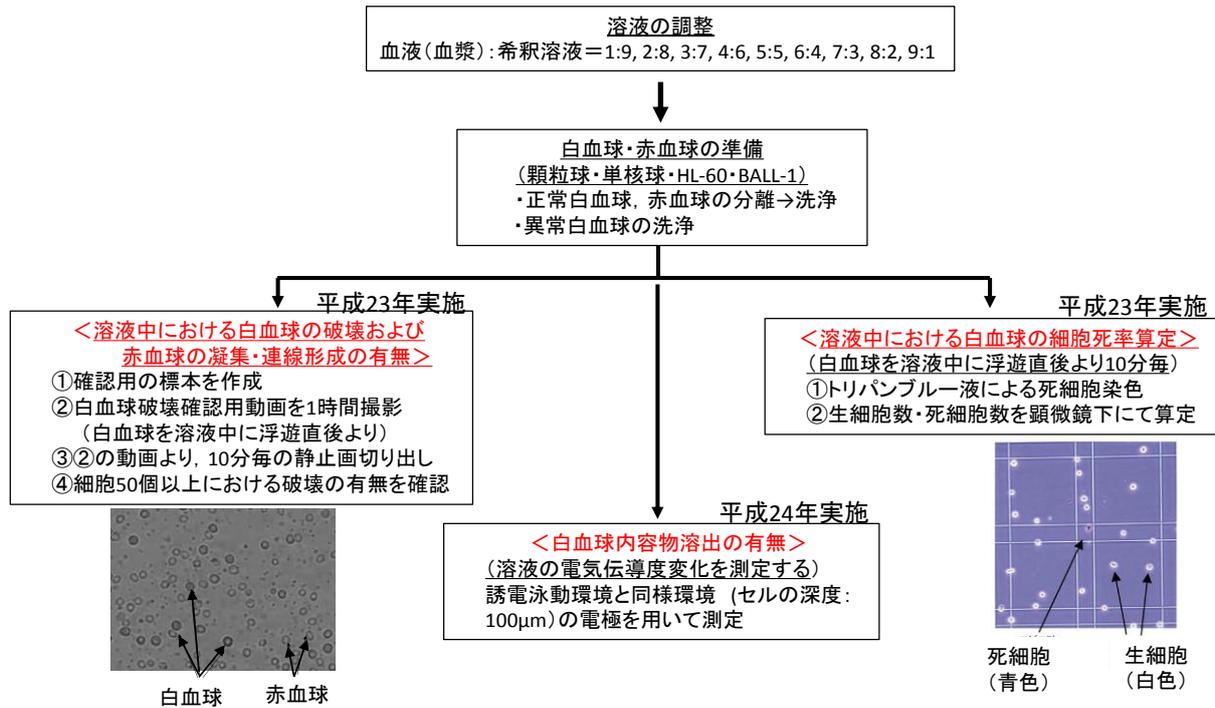


図3. 誘電泳動用溶液の創出方法フローチャート。

[平成24年度]

前年度に引き続き、誘電泳動の環境整備を行った。また、これらの環境を整備した後、白血病細胞分離・同定のための条件設定を行なう予定であった。しかし、誘電泳動環境整備の溶液抵抗測定およびゲノム関連実験の際、当初使用を考えていたデバイスでの実験が困難であることが分かったので、新たに、この実験に使用するデバイスの設計（図4）および作製を行った。このデバイスを用いて細胞浮遊液に高周波電圧を印加し、溶液抵抗測定を行った。そのフローチャートを図5に示す。

細胞に誘電泳動現象を生じさせるための環境整備は、溶液のみならず、電極を含むデバイスの形状が適切である必要があるため、これらの設計を行い、作製した（図6・7）。

さらに、実施予定ではなかったが、デバイス内にある1個の白血球に生じている誘電泳動力を求めるために必要な（その白血球自体の）密度を測定する方法を検討することにした。密度を知ることができなければ、誘電泳動力による白血病細胞の同定は行うこと

ができないので、これを先に検討することにした。その方法を図8に示す。

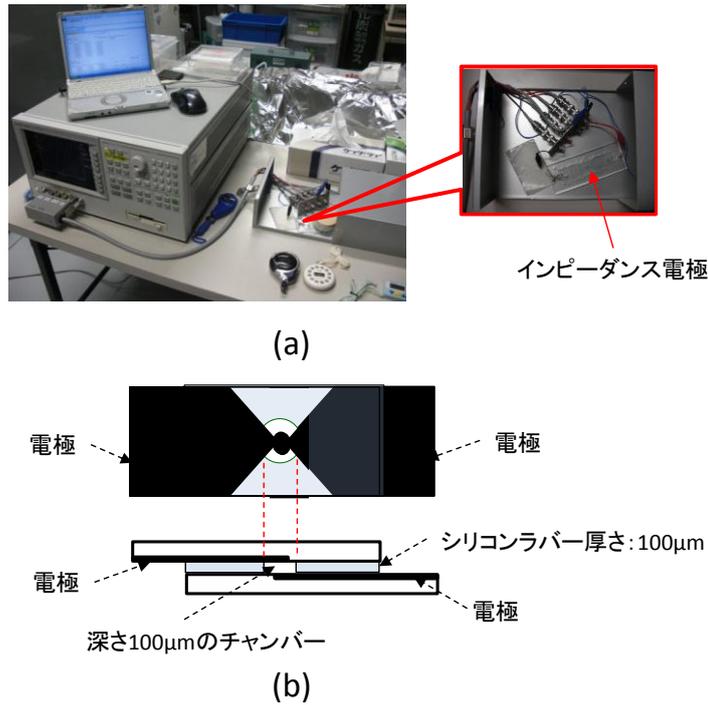


図 4. 溶液抵抗測定装置. 実験装置外観 (a), インピーダンス測定セル上面図 (上段) および側面図 (下段) (b).

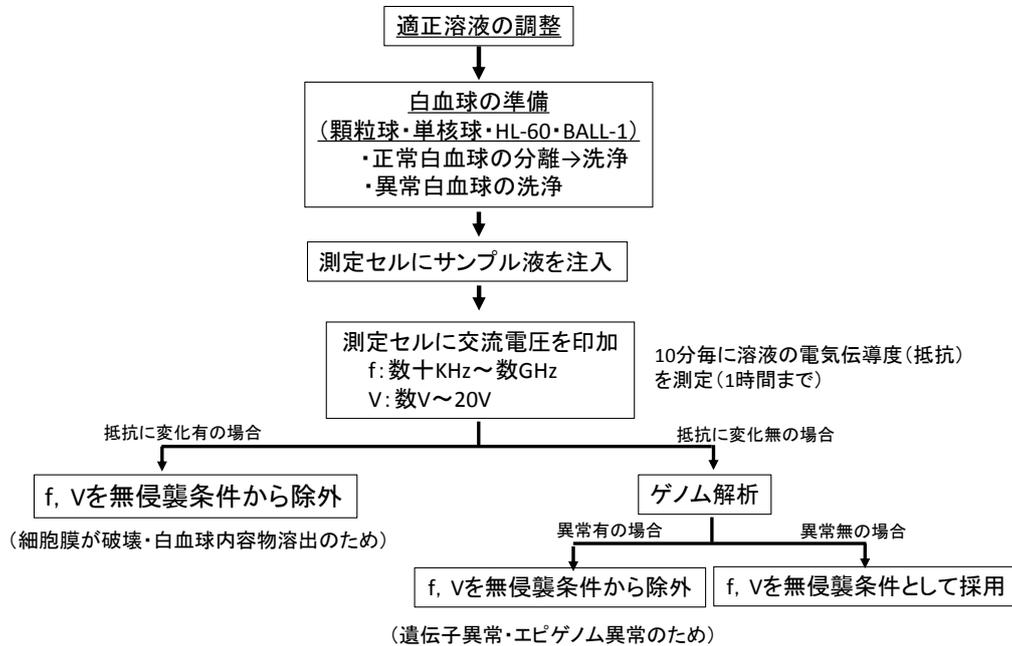


図 5. 細胞のゲノムレベル領域にダメージを与えないための無侵襲条件を周波数および電圧値について求めるプロセス.

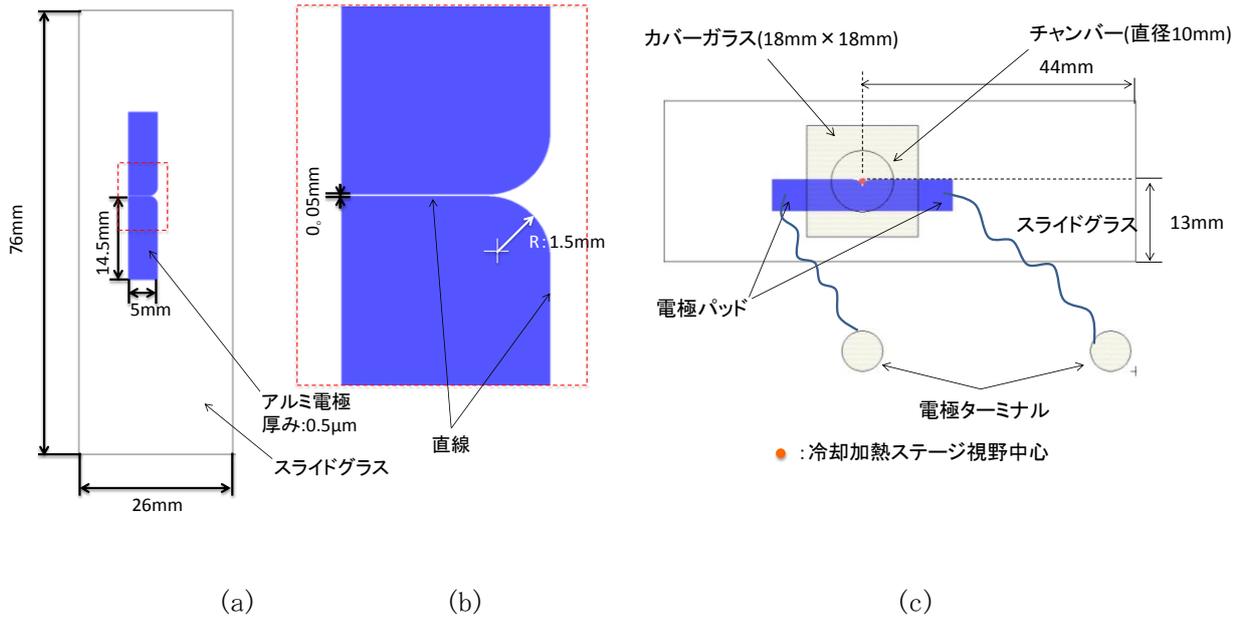


図 6. 細胞に電界集中部接触による細胞破壊を与えず，効率よく分離可能な電極の設計図 (a), (b)，および冷却加熱ステージ内での電極配置 (c)，電極の天井配置 (d)，電極の天井配置により，正の誘電泳動をする粒子（細胞）が電極間を移動する様子 (e)。

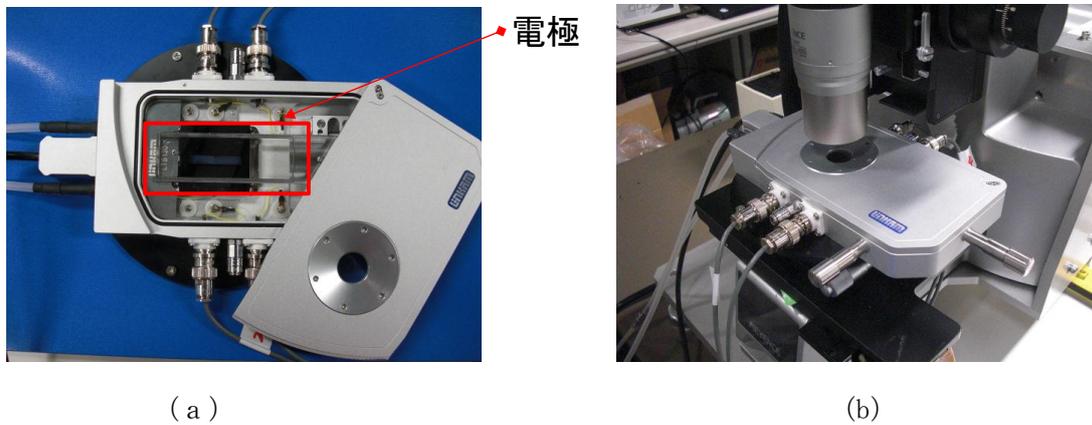


図 7. 高周波用デバイス（加熱冷却用ステージ）の内部構造 (a)，および顕微鏡に配置した高周波用デバイス (b)。

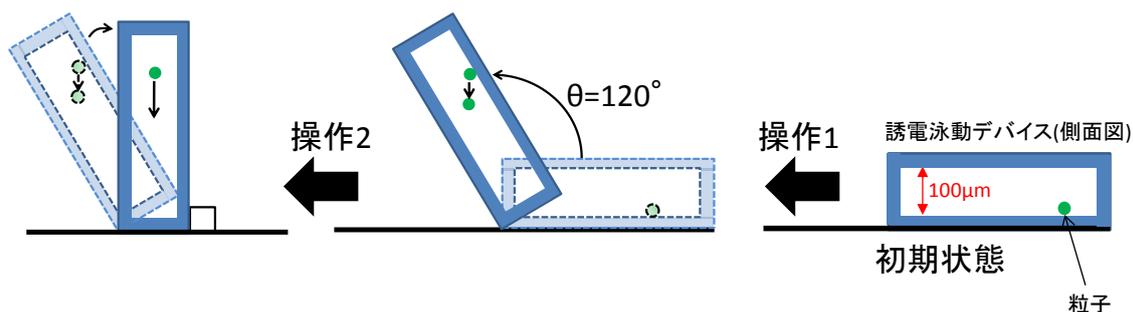


図8. デバイス内の粒子（正常・異常白血球）の終端速度測定による密度測定法.
操作1でデバイスを120°に傾斜させ、粒子をデバイスの底（壁）から脱離させ、操作2でデバイスを垂直に配置することにより、粒子はデバイス壁に接触することなく落下する。その終端速度を測定し、密度計算を行う。

[平成25年度]

実装活動当初はこの年度に誘電泳動の環境整備のうち、細胞に印加する高周波電圧のゲノムレベルに与える影響の検討を行う予定であったが、前年度に引き続き、誘電泳動環境整備のゲノム関連実験に、新たな問題（実験環境に関する問題）が生じたので、この問題の解決に時間を要した。したがって、白血病細胞（HL-60細胞およびBALL-1細胞）の発現遺伝子に消失が起こるか否かに関する実験のみに止めた。

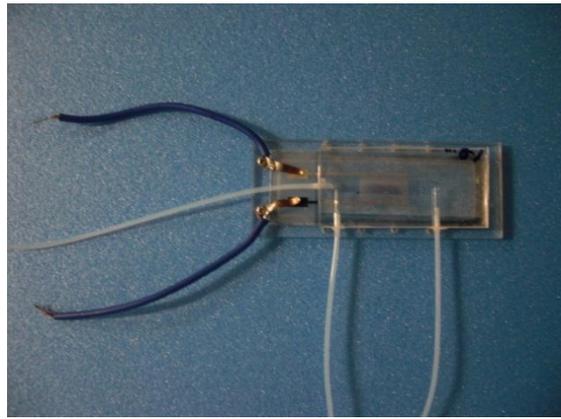
白血病細胞を血液細胞（正常白血球を含む）から分離し、白血病細胞同定のための条件を求めた。

[平成26年度]

異常細胞同定のためのマップ作成が当初の予定であったが、この方法は誘電泳動力を測定した値をマップに入力することで白血病細胞を同定するという間接的な方法であったので、ここでは、直接的な方法である誘電泳動とマイクロフルーイディクスを組み合わせた同定法に変更した。したがって、後者に関し、デバイスの設計・作製（図9参照）および誘電泳動条件の検討を行った。血液細胞（正常白血球を含む）と白血病細胞を分離し、白血病細胞の同定を行うためには、細胞に正および負の誘電泳動を効率よく生じさせることが必要である。そのために、細胞を浮遊させる溶液を8.75%のショ糖溶液にリン酸緩衝液を1%添加した溶液に変更した。その溶液中における血液細胞や白血病細胞の誘電泳動特性を調査し、細胞分離および同定に必要な条件の設定を行った。



(a)



(b)

図9. マイクロフルーイディクスと誘電泳動の組合せによる白血病細胞同定装置.
装置外観 (a) , デバイス (b) .

III 実装支援活動の成果

(1) 目標達成及び実装状況

<p>【支援期間の目標】 ＜誘電泳動の環境整備＞ ①適切な溶液の創出 ②許容印加高周波電圧の調査 ③高周波対応デバイスの設計</p> <p>＜分離・同定のための条件設定＞ ⑤赤血球・血小板と白血球（正常白血球および異常白血球（白血病細胞））の分離条件設定 ⑥正常白血球と異常白血球（白血病細胞）の分離条件設定 ⑦効率よく白血病細胞を同定するための印加周波数条件の選定 ⑧正常白血球および異常白血球（白血病細胞）に生じる誘電泳動力の周波数特性の測定</p> <p>＜細胞検出・同定法の確立＞ ⑨ 異常白血球（白血病細胞）同定用マップの作成 ⑩ マイクロフローディクスと誘電泳動の組合せによる同定法の確立 ⑪有用性の確認</p> <p>＜その他＞ ⑫白血球1個の密度測定法の確立</p>	<p>【実装状況】 ＜誘電泳動の環境整備を実施＞ ①細胞破壊および細胞内容物の溶出を起さない溶液を創出した。 血液を導電率の低い溶液（Zimmermann 細胞融合液）で希釈する場合、血漿と Zimmermann 細胞融合液の混合比は 4:6 が好ましく、この溶液に浮遊させた細胞は、少なくとも 1 時間までは、細胞破壊も細胞内容物の溶出も起こらないことを確認した。 ②上記溶液中の細胞に高周波電圧（印加条件：30KHz・3Vpp～1MHz・10Vpp）を印加しても、白血病細胞で発現している遺伝子を消失しないことがわかった。 ③誘電泳動用の電極配置を天井とすることで、細胞が正の誘電泳動を呈する場合であっても電極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。さらに、環境温度が上昇すると、白血球が活性化し、球形を維持できなくなる。これを防止するために、冷却機能付きの高周波用デバイスを設計した。</p> <p>＜分離・同定のための条件設定を実施＞ ⑤～⑪誘電泳動力を測定することにより、白血病細胞を分離・同定する方法を止め、誘電泳動とマイクロフルーイデックスとの組み合わせに変更した。よって、細胞浮遊液をショ糖とリン酸緩衝液の混合液に変更して実験を実施した。赤血球・血小板と正常・異常白血球の分離は、100KHz で可能であり、正常白血球と白血病細胞の分離は、48KHz で実施可能であることがわかった。さらに、48KHz, 15Vpp で正の誘電泳動を呈している白血病細胞のタイプ同定がマイクロフルーイデックスの流速を調整することで行えることを確認した。（例：骨髄性白血病細胞の剥離流速は 0.6～1.0mm/min. であり、T-リンパ球性白血病は 2.0～3.0mm/min.）白血病細胞の検出・同定法の見通しがついたことを確認した。</p> <p>＜その他＞ ⑫白血球1個の密度測定法を確立した。誘電泳動力の計算には、デバイス内にある1個の白血球そのものの密度が必要であるので、ここでは、「終端速度」を利用して測定する方法を確立した。</p>
--	--

(2) 実装された成果の今後の自立的継続性

マイクロフルーイディクスと誘電泳動の組合せによる方法で、血液中の白血病細胞を検出・同定する可能性を見出すことができたが、実用化に向けてはまだ解決すべき問題が多く存在するので、それらを解消し、精度良い検査を迅速に行うための検討を行う。

今後、自動血球計数器の開発は大手臨床検査機器メーカーと交渉を行う予定である。

(3) 実装活動の他地域への普及可能性

現在、重篤にならないと見えない状況にある急性白血病を早期発見でき、白血病患者の再発も早期に発見することができるので、患者のQOLを向上できるだけでなく、国家的見地から、医療費を大幅に軽減できる可能性がある。

(4) 実装活動の社会的副次成果

実装活動を行う上で、必要となった少量サンプルによる溶液の導電率測定法や特定粒子の密度測定法は、他分野においても利用することが可能である。

(5) 人材育成

当研究所の若手研究員や九州工業大学大学院生命体工学研究科の学生に生化学的測定法などの技術を教えた。また、呉高等専門学校の学生の教育を行った。

(6) 実装活動で遭遇した問題とその解決策

《問題①》 誘電泳動用電極であるクリーク・ギャップ電極は、電極エッジに電極が集中するので、細胞が正の誘電泳動を呈する場合、細胞は、そのエッジに吸着され、破壊されてしまう。よって、正の誘電泳動力を測定することは困難である。

[解決策] 上記の原因は、電極が平面電極であるので、血液細胞が沈んで電極のエッジに吸着されることである。しかし、電極を底ではなく、天井に配置することにより、これを回避することが可能であることがわかったので、これを採用した。

《問題②》 誘電泳動力を測定するためには、白血球が球形でなければならない。環境温度が上昇すると、白血球が不定形となる。

[解決策] 環境温度を5℃程度に維持するために、冷却機能付きのデバイスを設計し、作製した。

《問題③》 誘電泳動力を測定（計算）するためには、デバイス内（厚さ100μmのチャンパー内）の1個の特定白血球の密度が必要である。

[解決策] デバイス内にある1個の特定白血球の密度を測定するために、流体中の物質に生じる終端速度を利用して、その物質の密度を測定する方法を考案し、その方法を確立

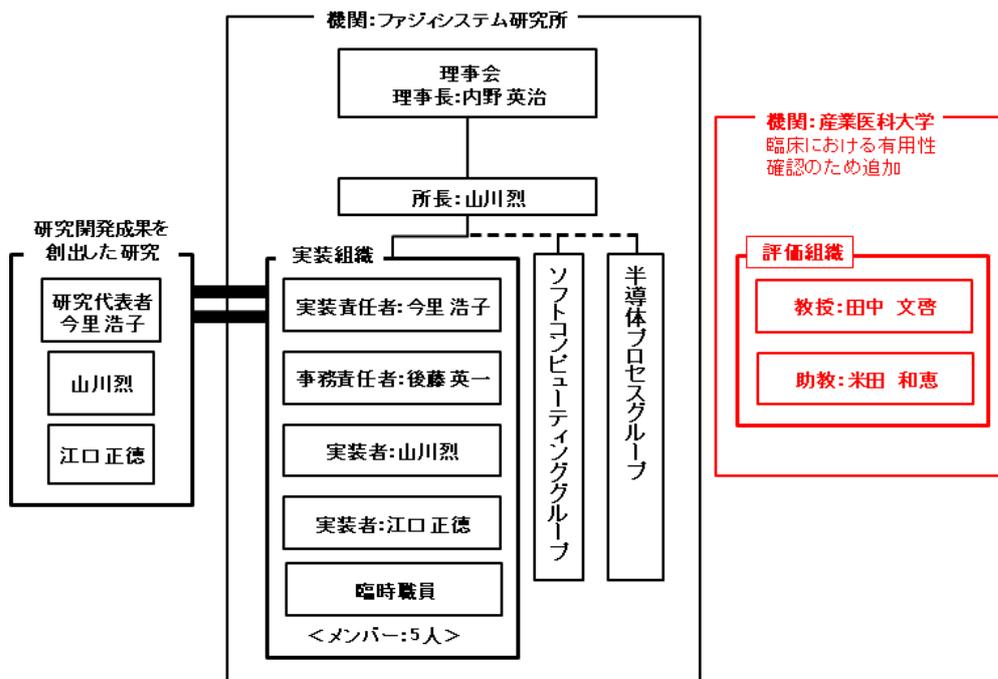
した。

《問題④》 少量（数 μ lオーダー）の溶液や細胞浮遊液に一定の刺激を与え，導電率の経時変化をリアルタイムに測定したり，細胞の遺伝子解析を行うために細胞を取り出したりすることが可能であるデバイスが存在しない。

[解決策] これらを可能にするデバイスを設計・作製した。厚さ100 μ mのシリコンラバーに5mmの穴を開け，対向平行平板電極の間に配置した。上部の電極（ガラス）には，直径1mmの小孔を2カ所開け，ここから，溶液の注入および取り出しを行うことができる。

IV 実装活動の組織体制

(1) 体制



V 理解普及のための活動とその評価

(1) 展示会への出展等

年月日	名称	場所	概要	ステークホルダー	社会的インパクト
	なし				

(2) 研修会、講習会、観察会、懇談会、シンポジウム等

年月日	名称	場所	概要	ステークホルダー	社会的インパクト
2013.4.4-4.5	誘電泳動に関する国際ワークショップ	北九州学術研究都市内	生体細胞の誘電特性および誘電泳動に関する先駆者を招集し、講演いただいた。さらに、ディスカッションを行った。(参加者約90名)	研究者および企業の開発担当者	誘電泳動に関する最初の国際ワークショップ

(3) 新聞報道、TV放映、ラジオ報道、雑誌掲載等

- ① 新聞報道 なし
- ② TV放映 なし
- ③ ラジオ報道 なし
- ④ 雑誌掲載 なし

(4) 論文発表 (国内誌 0 件、国際誌 2 件)

1. 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. Takeshi Yamakawa and Hiroko Imasato, "Chapter 3. Dielectrophoresis: Approach to Squeeze Out Natural Information of a Single Biological Cell," Springer Handbook , 2014.of Bio-/Neuro-Informatics (Nik Kasaov ed.), pp.29-42, 2014.

(5) 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>>

(6) 口頭発表 (国際学会発表及び主要な国内学会発表)

- ① 招待講演 (国内会議 0 件、国際会議 0 件)
- ② 口頭講演 (国内会議 3 件、国際会議 3 件)

<国内会議>

1. 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.

2. Hiroko Imasato, Takeshi Yamakawa, "Method for measuring the specific gravity of a particle to calculate its dielectrophoretic force," バイオメディカル・ファジィ学会, 第24回年次大会, 山口, 2012. 10. 29-10. 30.
3. Masanori Eguchi, Takeshi Yamakawa, "Separation of particles by combining dielectrophoresis and traveling-wave electroosmosis under inclined gravity," バイオメディカル・ファジィ学会, 第24回年次大会, 山口, 2012. 10. 29-10. 30.

<国際会議>

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.
3. Masanori Eguchi, Futoshi Kuroki, Hiroko Imasato and Takeshi Yamakawa, "Design of Ceiling Electrode for Cell Separation using Positive Dielectrophoresis and Inclined Gravity," World Automation Congress 2014, CD Proceedings, August 3-7, Hawaii, 2014.

③ ポスター発表 (国内会議 0 件、国際会議 0 件)

④ 基調講演 (国内会議 0 件、国際会議 1 件)

<国際会議>

1. Takeshi Yamakawa, "Early Diagnostics of Leukemia by Employing Dielectrophoresis (Kenote Speech),"ECAI 2014, 23-25 October, Bucharest, Romania, 2014.

(7) 特許出願

①国内出願 (0 件)

②海外出願 (0 件)

(8) その他特記事項

なし

VI 結び

誘電泳動現象を利用した白血病細胞の検出および同定法の確立するために、誘電泳動の環境整備やデバイスの設計・作製を行ったが、生体細胞を取り扱う難しさを痛感した。生体外に取り出すことや温度環境の変化で形態や活性度を変化させたり、浮遊させる溶液によっては細胞破壊が生じたり、細胞内要物が溶出し、溶液の導電率を変化させたりという現象を目の当たりにした。種々の多くの問題解決に時間を要し、実装活動予定を大幅に変

更せざるを得なかったことが残念な点である。しかし、誘電泳動とマイクロフローディクスの組合せによる方法により、白血病細胞の検出・同定が可能であることを確認することができたことは、今後の急性白血病診断に大きな意義をもつのではないかと考える。

1日も早く、急性白血病の早期診断を可能にする装置の開発を実現したく思う。