誘電泳動マイクロデバイスを用いた微生物の捕集，計測及び処理

正 員 内 田 諭*

Collection, Measurement and Treatment of Microorganism Using Dielectrophoretic Micro Devices

Satoshi Uchida*, Member

Constant monitoring of manufacturing processes has been essential in food industry because of global expansion of microbial infection. Micro-scale dielectrophoretic method is an attractive technique for direct operation and quantitative detection of bioparticles. The electrical system is capable of rapid and simple treatments corresponding to severe legal control for food safety. In this paper, newly developed techniques are reviewed for bacterial concentration, detection and sterilization using dielectrophoresis in a micro reactor. The perspective to an integrated micro device of those components is also discussed.

キーワード：誘電泳動，マイクロデバイス，細菌，代謝活性，パルス電界殺菌

Keywords：dielectrophoresis, micro device, bacteria, metabolism activity, pulse electric field sterilization

1. まえがき

最近，我が国では，食品製造における偽装，衛生管理の不徹底，集団食中毒の慢性的発生，鳥インフルエンザの感染被害など，食に関する諸問題が多発している。食品産業全般に対して，安全を求める消費者の声が大きくなっており，食品管理体制の抜本的な見直しが求められている。

欧米では，危害分析・重要管理点（Hazard Analysis and Critical Control Point: HACCP）方式による法的な規制が実施されている⁽¹⁾。HACCP とは，食品の原料入荷から製造・出荷に至る全工程の危害予測を行い，特定した管理点を継続的に監視・記録することにより，異常が認められ次第，即座に対処する安全管理の考え方である。最終製品の抜き取り検査による従来の管理体制とは異なり，本方式では不良製品の出荷を未然に防ぐことができる。

しかしながら，HACCP 方式を導入する場合，検査・処理の項目及び回数は飛躍的に増加する。実際，従来の検査法及び処理技術のみで全工程に対応するのは極めて困難である。そのため，本方式に適合した，迅速・簡便かつ安価な新しい検査・処理技術の確立が急務である。

一方，半導体プロセスを発展させた極微細加工技術（マイクロマシーニング）が普及しつつあり，マイクロ領域における学際的基礎研究が盛んに行われている。同時に，流体力学及び電気力学的な作用による生体微粒子の制御といった工学的応用も図られている。

筆者らは，極小場における誘電微粒子の静電的操作に着目し，微生物の高速かつ効率的な捕集，定量的かつ選択的な計測及び即時的な処理を可能とする新技術の研究及び開発を行っている。

本稿では，極小場における静電的作用の一種であるマイクロスケール誘電泳動法の概略を説明した後，細菌の濃縮，検出及び殺菌技術に関する筆者らの研究を紹介する。

2. マイクロスケール誘電泳動法

誘電泳動（dielectrophoresis: DEP）とは，図 1 に示すとおり，不均一電界中に置かれた誘電微粒子において，粒子左右に形成される電界強度の差に応じて，誘起双極子が及ぼす力の差が発生し，結果的に誘電微粒子が移動する現象である⁽²⁾。誘電泳動力 F_{dep} は，以下の式で表わせる⁽³⁾。

$$F_{\text{dep}} = 2\pi\epsilon_m \text{Re}[\hat{K}(\omega)]R^3\nabla E^2 \dots\dots\dots (1)$$

ただし， ϵ_m は媒質の誘電率， ω は駆動角周波数， R は粒子半径， E は電界であり， $\hat{K}(\omega)$ は次式で表わされる

図 1 誘電泳動の原理

Fig. 1. Principle of dielectrophoresis.

* 首都大学東京
〒192-0397 東京都八王子市南大沢 1-1
Tokyo Metropolitan Univ.,
1-1 Minami-Oosawa, Hachioji, Tokyo 192-0397

Clausius-Mossotti 関数である。

$$\hat{K}(\omega) = \frac{\hat{\epsilon}_p - \hat{\epsilon}_m}{\hat{\epsilon}_p + 2\hat{\epsilon}_m} \quad (2)$$

$$\hat{\epsilon}_m = \epsilon_m + \frac{\sigma_m}{j\omega} \quad (3)$$

$$\hat{\epsilon}_p = \epsilon_p + \frac{\sigma_p}{j\omega} \quad (4)$$

なお、 $\hat{\epsilon}$ は複素誘電率、 ϵ は誘電率、 σ は導電率であり、添字 m 及び p は媒質及び粒子を表わす。

(1)式より、誘電泳動力の大きさは電界強度に強く依存することがわかる。ここで、ミクロンオーダーの極微細電極構造を用いれば、数 V の印加でも 1 MV m^{-1} 程度の高電界を容易に生成できる。そのため、極小場での誘電泳動法、すなわち、マイクロスケール誘電泳動法は、低電圧・低電力での微粒子操作を可能にする。実際、DNA やたんぱく質などの生体微粒子のハンドリングに応用されている⁽⁴⁾。

3. 微生物の捕集・濃縮

微生物の大きさは細菌類で $1 \mu\text{m}$ 程度であり、光学顕微鏡の検出限界に近い。そのため、分光的操作を必要とする多くの生化学的菌検出においては、選択的な捕集・濃縮工程が必須である。筆者らは抗原抗体反応を用いた免疫センサの高感度・高性能化を目的として、電気的前処理装置（泳動濃縮マイクロフィルタ）を開発した（図 2 参照）。

図 3 にヨーグルト希釈液における誘電泳動効果の一例を示す。ここで、電極間隔 $10 \mu\text{m}$ 、印加電圧振幅 5 V 、駆動周波数 100 kHz 、流速 $170 \mu\text{l min}^{-1}$ である。電圧の印加直後から、乳酸菌は電極端部に捕集され、数分以内に電極間を橋絡するまでに濃縮された。一方、脂質塊は電極に捕捉されず、流れとともにフィルタ外へ移動した。

これは、両者の複素誘電率の違いに起因する。細菌は、細胞膜と細胞壁及び細胞質で構成されており、それぞれ絶縁体及び導体と見なすことができる。本条件における駆動周波数程度であれば、導電率が複素誘電率の大きさを決める要因として支配的になる。そのため、乳酸菌の複素誘電率は媒質の複素誘電率より大きくなり、正の誘電泳動（電界勾配が大きくなる方向への移動）が生じる（(2)式参照）。結果として、乳酸菌は電極に捕集される。一方、脂質塊は絶縁体と見なされ、脂質塊と媒質の複素誘電率の大きさの比はそれぞれの固有な誘電率で決まる。媒質が水を主成分とする場合、比誘電率が 78（ 25°C の時）と高いため、脂質塊には負の誘電泳動（電界勾配が小さくなる方向への移動）が生じる。そのため、脂質塊は電極から離れる。

本結果は懸濁媒質中から細菌を選択的に分離できることを示している。さらに筆者らは、垂直方向の菌濃縮効果を向上させるため、微小柱状構造を有する誘電泳動マイクロデバイスの試作にも成功している（図 4 参照。写真は芝浦工業大学・西川宏之准教授より提供）。本デバイスにおいて、電圧振幅、駆動周波数、流量を適切に調整すれば、大きさ

図 2 泳動濃縮マイクロフィルタ

Fig. 2. Dielectrophoretic micro filter.

図 3 ヨーグルト希釈液における乳酸菌の分離

Fig. 3. Separation of lactobacillus from dilute solution of yogurt.

図 4 三次元構造を有する誘電泳動マイクロデバイス

Fig. 4. Three dimensional dielectrophoretic micro device.

や誘電率の僅かな相違が泳動力に反映され、様々な菌種に対する効果的な分離濃縮が可能となる。

4. 微生物の代謝活性評価

第3章で紹介したようなマイクロセルを用いて、直接的かつ定量的な菌計測に応用した研究が行われている⁽⁵⁾。誘電泳動により、電極近傍に捕集された細菌は数珠状に整列して電極間を橋絡する。細菌はキャパシタと抵抗で構成された等価回路として表わすことができるので、電極間のインピーダンス（または、コンダクタンス）の変化を測定すれば、捕集菌数や懸濁液中の菌濃度を算出することができる。このような手法は、誘電泳動インピーダンス計測（dielectrophoretic impedance measurement: DEPIM）法と呼ばれている⁽⁶⁾。

筆者らは、冷凍食品中で一時的に増殖活動を弱めた損傷菌の選別や醸造業における酵母の醗酵工程の管理を想定して、DEPIMを用いた細菌の代謝活性を評価する基礎実験を行った⁽⁷⁾。図5に本実験装置の概略を示す。電極セルと駆動用電源であるファンクションジェネレータ（AFG3022, Tektronix）の間に抵抗器（430 Ω ）が挿入しており、誘電泳動による菌濃縮時の微弱な電圧変化をロックインアンプ（SR844, SRS）により自動計測した。

上記の実験装置を用いて、大腸菌に対する加温処理温度とコンダクタンスの変化量 ΔG の関係を出力した結果を図6に示す。印加電圧振幅は5 V、電源周波数は100 kHzである。なお、酵素活性度、膜活性度及び生育割合（培養カウント）の関係も合わせて示した。加温処理温度が増加すると、最終的な ΔG は増加し、300.15 K（27℃）付近で最も高い値を示した。ただし、それ以降は減少した。 ΔG の差異は、測定時間内における大腸菌の捕集量が、加温処理条件によって変化したことに起因する。すなわち、誘電泳動力の大きさに違いが生じたことを意味する。低温域における ΔG の増加は、代謝活性状態の変化に伴う菌体内導電率の増加が、また、高温域における ΔG の減少は、膜損傷による菌体内イオンの流失が大きな要因であると考えられる。

図5 誘電泳動インピーダンス計測装置

Fig. 5. Experimental apparatus of dielectrophoretic impedance measurement.

図6 処理温度と各種実験結果の関係

Fig. 6. Relationship between heat treatment temperature and various experiments.

5. 微生物の濃縮殺菌

近年、薬剤耐性菌による院内感染や工業溶剤の腐食が大きな問題になっている。また、食品処理においては、品質保持の観点から加熱殺菌の適用に限界が生じている。このような現状において、パルス電界（pulsed electric field: PEF）殺菌法が再び注目されている。本手法では、細胞膜を直接破壊するため、原理的に耐性菌の発現を防ぐことができる。また、非熱処理法であるため、食品への適用が可能である。

筆者らは、これまでにマイクロギャップを用いた低電圧かつ低電力駆動の PEF 殺菌技術を確立しており⁽⁸⁾、マイクロスケール誘電泳動技術の導入によって更なる改善が可能であると考えた。すなわち、マイクロセル中を通過する菌群を誘電泳動により濃縮し、電極近傍の高電界部へ誘導した菌群に対して効果的なパルス印加を行う方法である。なお、本実験装置は、マイクロセル（電極間距離 30 μm ）、流路、パルス電源、ファンクションジェネレータ及び電源切替用半導体スイッチで構成されている。

図7に高周波電圧印加（DEP）時及びパルス電圧印加（PEF）殺菌）時における大腸菌の挙動を示す。ここで、DEP 時の電圧振幅は 10 V、駆動周波数は 100 kHz であり、PEF 殺菌時の印加電圧は 100 V、パルス幅は 100 μs 、パルス周期は 10 Hz である。誘電泳動によって電極を橋絡した大腸菌群は、パルス電圧の印加によって下端電極から徐々に離脱した。パルス幅が極めて短いので、単なる泳動ではなく、膜破壊を伴う大腸菌の変形が影響していると考えられる。

定量的な菌の状態変化を評価するために培養法によるコロニーカウントで処理後の菌濃度を計測した。その結果、殺菌数は連続してパルスを印加した場合とほぼ同等であった。ただし、30 分間のパルス回数は 1/25 となり、誘電泳動の併用による殺菌効率の大幅な向上が認められた。

(a)

(b)

図7 (a)誘電泳動及び(b)パルス電界下における大腸菌群の挙動

Fig. 7. Behavior of *Escherichia coli* under (a) dielectrophoretic and (b) pulsed electric.

6. まとめ

本稿では、微小反応場における微粒子操作の新たな潮流である、マイクロスケール誘電泳動法を概説した。続いて、著者らの研究成果の一部を紹介した。微生物に対する誘電泳動濃縮装置の開発事例を示し、捕集性能を評価した。また、誘電泳動インピーダンス計測法を用いることによって、菌の種別、大きさ、定量、代謝活性などの複合的な即時計測が可能であることを示した。さらに、誘電泳動による菌濃縮と低電圧のパルス印加を組み合わせたマイクロ殺菌法の有用性を示唆した。

今後の展望としては、捕集・計測・処理という一連の流れを1つのチップ上で全自動化することが挙げられる。このような統合システムが実現できれば、安全な飲料水の確

保、輸血感染などの医療事故の防止、工業溶剤の品質保持にも応用できる。

謝 辞

細菌の電氣的計測に関する研究の一部は、文部科学省科学研究費補助金（若手研究B, No. 17760340）の援助を受けて行われた。

（平成20年6月30日受付）

文 献

- (1) J. E. Ehir, G. P. Morris, and J. McEwen : "Implementation of HACCP in food businesses: the way ahead", *Food Control*, Vol.6, No.6, pp.341-345 (1995)
- (2) H. A. Pohl : "The Motion and Precipitation of Suspensoids in Divergent Electric Fields", *J. Appl. Phys.*, Vol.22, No.7, pp.869-871 (1951)
- (3) T. B. Jones : *Electromechanics of Particle*, Cambridge Univ. Press (1995)
- (4) M. Washizu, T. Kawabata, O. Kurosawa, and S. Suzuki : "Dielectrophoretic Handling of Bio-Molecules and Its Application to Bio-Separation", *Trans. IEICE, C-1: Electronics*, Vol.J83-C, No.1, pp.1-8 (2000-1) (in Japanese)
鷲津正夫・川端智久・黒澤 修・鈴木誠一 : 「誘電泳動による生体分子のハンドリング技術と分離分析への応用」, 通信学論 C, **J83-C**, 1, pp.1-8 (2000-1)
- (5) M. S. Talary and R. Pethig : "Optical technique for measuring the positive and negative dielectrophoretic behaviour of cells and colloidal suspensions", *IEE Proc. Sci. Meas. Technol.*, Vol.141, No.5, pp.395-399 (1994)
- (6) J. Suehiro, R. Yatsunami, R. Hamada, and M. Hara : "Quantitative estimation of biological cell concentration suspended in aqueous medium by using dielectrophoretic impedance measurement method", *J. Phys. D: Appl. Phys.*, Vol.32, No.21, pp.2814-2829 (1999)
- (7) T. Enjoji, E. Amako, S. Uchida, and F. Tochikubo : "Analysis of Dielectric Characteristics for Injured *Escherichia coli* using Impedance Measurement method", *J. Inst. Electrostat. Jpn.*, Vol.31, No.1, pp.8-13 (2007) (in Japanese)
円城寺隆治・尼子恵里・内田諭・朽久保文嘉 : 「インピーダンス計測による損傷大腸菌の誘電特性解析」, 静電気学誌, **31**, 1, pp.8-13 (2007-1)
- (8) S. Uchida, M. Houjo, and F. Tochikubo : "Efficient sterilization of bacteria by pulse electric field in micro-gap", *J. Electrostat.*, Vol.66, No.7-8, pp.427-431 (2008)

内 田 諭

（正員） 1970年7月14日生。1998年3月北海道大学大学院工学研究科博士後期課程中退。同年4月東京都立大学大学院工学研究科助手、2005年首都大学東京大学院工学研究科助教授、2007年同理工学研究科准教授、現在に至る。博士（工学）。放電プラズマ及び微小電気力学の基礎過程と応用に関する研究に従事。応用物理学会、静電気学会会員。