J024052

交流平等電界中に置かれた細胞群の挙動*

山頭優大^{*1}, 夏谷智之^{*1}, 塚本 哲^{*2}, 多田 茂^{*2}

Behaviors of Cells in a Uniform AC Electric Field

Yuhdai SANTOH^{*1}, Tomoyuki NATSUYA^{*1}, Akira TSUKAMOTO^{*2}, Shigeru TADA^{*2}^{*1,*2} National Defense Academy. Dept. of Applied Physics
Hashirimizu 1-10-20, Yokosuka-city, Kanagawa, 239-8686 Japan

The AC electric field driven manipulation of suspensions becomes one of the major techniques in micro- and nano-devices in the field of biotechnology. In the present study, experimental and numerical studies of cells suspensions in a uniform high frequency AC electric field have been performed to explore the mechanism of the evolution of aggregation and clustering of cells under the exposure of the uniform high frequency AC electric field. In the uniform AC electric field, only forces of dipole-dipole attractive/repulsive interactions present between cells. This behavior of dielectric particles in the uniform AC field, which is differ from that in the non-uniform field, is markedly advantageous in applying DEP technology to positioning of particles in a suspension. Suspensions of HeLa cells in 10% sucrose solutions were used for the experiment while the method of molecular dynamics (MD) was employed to analyze the problem numerically. A theoretical model to compute the trajectories of individual cells under the action of dielectrophoretic (DEP), dipolar interparticle, viscous, and gravitational forces was newly developed. Results demonstrated that the cells began to aggregate locally depending on field frequency. In the present experiment, the lowest field frequency, 10 Hz, used in the experiment was found to effectively aggregate cells..

Key Words : Bio-fluid Mechanics, Bio-rheology, Dielectrophoretic force, Cellular engineering

1. 結 言

誘電体微粒子を液体に懸濁させ、交流の不等電界を負荷させると、誘電体微粒子には大きさが電界強度(E)の二乗の勾配(∇E^2)に比例する誘電分極力と、電界強度の二乗(E^2)に比例する多重極子相互作用力が同時に誘起される。この現象は誘電泳動(Dielectrophoresis)と呼ばれ、誘起される誘電泳動(DEP; Dielectrophoresis)力などの力の大きさと方向は交流周波数や微粒子の誘電分極特性に大きく依存する。微粒子の複素誘電率の実部の値が正であれば高電圧電極部からの引力が作用し微粒子が凝集する。逆に負の値であれば接地電極部、あるいは電位ポテンシャルの極小部に微粒子が凝集する。この原理を利用すれば、交流電界の周波数と強度を制御するだけで、装置に何らの複雑な機構を要せずに誘電体微粒子の分離・濃縮を行うことが出来る。そのため、近年のバイオテクノロジー分野では特定の細胞の分離・濃縮などの技術に活用する試みが盛んに行われている。しかしながら、これらの研究のほとんどは不等電界を用いたものであり、平等電界による誘電泳動法については、著者らの知る限り過去における報告例はない。著者らは高周波交流の平等電界に着目し、バイオテクノロジー分野への応用を目指して高周波交流の平等電界中での HeLa 細胞の振舞いについて、基本的な性質を明らかにしてきた。本研究では、HeLa 細胞の懸濁液に高周波交流の平等電界を負荷させた際の細胞群の挙動について、様々な実験パラメータを変化させた実験を行い、細胞操作のための最適な条件について検討を行った。

^{*1} 非会員, 防衛大学校 (〒239-8686 神奈川県横須賀市走水 1-10-20), ^{*2} 正員, 防衛大学校
E-mail: stada@nda.ac.jp

2. 実験装置および方法

2・1 実験装置

実験装置の概略を図1に示す。装置はITO 透明電極板(ジオマテック株式会社)、電極間ギャップを一定に保つためのシリコンゴムシート製スペーサー、電界生成用の波形発生装置(KENWOOD AG-203D; 現 TEXIO AG-203E)により構成される。電極板は厚さ0.7mm、縦横100mmの正方形のガラス板製で、片面のみ導電性を有する。また、電極板表面への細胞の接着を防ぐために表面のシリラン化を施した後、さらに0.1NのNaOH水溶液に10分ほど浸し表面を洗浄した。過去に得られた結果から⁽¹⁾、スペーサーには厚さが0.1, 0.3, 0.5mmの3通りで、さらに取り扱いを容易にするために縦横が75mmのシリコンゴムシートを用いた。スペーサーの中央部には細胞試料のトラップ用にφ15の円孔が開けられている。

実験装置のセットアップの手順としては、まず、純水で2度洗浄した後に乾燥させたスペーサーを、気泡が入らないように注意深く、同じように純水で2度洗浄して乾燥させたガラス電極板の上にセットする。次に、マイクロピペットで秤量したサンプル液 200μl を周囲に付着させないように注意しながら円孔中央に滴下させる。その後、スペーサーの上をもう一枚の電極板で電気的な短絡に注意しながら覆い、滴下したサンプル液が漏えいしない程度に全体を圧着させ、再度、導通の有無を確認した上で顕微鏡ステージにセットする。実験は周波数10Hz~1kHzの正弦波型交流電界を用いて行い、負荷する端子電圧については実効電圧を4Vの一定値に固定した。

2・2 細胞培養

細胞試料には HeLa 細胞(ヒト子宮頸癌由来細胞)を用いた。培地には DMEM(ダルベッコ改変基礎イーグル培地)に10%(v/v)FBS(ウシ胎児血清)、L-Glutamine, 10000U/ml のペニシリン・ストレプトマイシンを添加している。細胞培養はφ90 Petri Dish もしくは 75cm² 培養フラスコにて、5%CO₂ 雰囲気下の CO₂ インキュベーターを用いて行った。細胞の継代には 0.02%Trypsin-EDTA を使い、細胞回収時の遠心分離は 600rpm・10min で行った。

Fig.1 Schematics of the experimental setup

Fig.2 Coordinate system

3. 数値解析モデルおよび方法

図2に示す質量 m 、直径 d 、密度 ρ_c の微粒子 i が、細胞 j の存在により生じる局所の不平等電界による DEP 力と粒子間相互作用力とを受けるときの微粒子 i の運動は、微粒子の総数を N 、位置ベクトルを $\mathbf{r}_i$ として Langevin 方程式

$$m \frac{d^2 \mathbf{r}_i}{dt^2} = \mathbf{F}_i - \mathbf{S}_i + \mathbf{R}_i(t) + \frac{4}{3} \pi (\rho_c - \rho_f) \left(\frac{d}{2} \right)^3 \mathbf{g} \quad (i = 1 \dots N) \quad (1)$$

により記述される。ただし、 ρ_f は分散媒(disperse medium)の密度、 $\mathbf{F}_i$ 、 $\mathbf{S}_i$ は微粒子 i に作用する電気力と粘性力であり、 $\mathbf{R}_i(t)$ はランダム力、 $\mathbf{g}$ は重力加速度ベクトルである⁽¹⁾。数値解析は図3に示す、先に説明した実験装置での AC 電源に接続されたガラス製電極板の電極面に相当する上下面が一辺 0.3mm の正方形、高さが $H=0.1, 0.3, 0.5$ mm の 3 通りである直方体形状の単位セルを対象とした。単位セル側面には周期境界条件を適用し、電気的相互作用の力場のカットオフ半径を $10d$ とした。HeLa 細胞を想定した微粒子の直径は $d=10\mu\text{m}$ (HeLa 細胞の実測値) とし、分散媒については水を想定し、密度 ρ_f などの物性値は実測値を用いた。

3. 結果および考察

高周波交流の平等電界中での細胞の振る舞いについて調べるため、PBS(-)で洗浄した HeLa 細胞を濃度約 10% のショ糖の等張液(9.8% (w/v) sucrose, 0.37% (w/v) dextrose dissolved in MilliQ)に懸濁させて、端子電圧を実効電圧 4.0V で固定し、交流電界の周波数を 10Hz, 100Hz, 1kHz の 3 通りに変化させたときの細胞の振る舞いをビデオカメラ(Sony HandyCam HDR-CX120)で撮影した。電極間距離 0.3 mm の場合で、交流周波数 10Hz の電界を 3 分間負荷したときの実験結果を図 4 の上段に示す。始めはほぼ一様に懸濁されていた細胞(図 4 (a)上段)が、時間の経過とともに徐々にクラスター様の不均一分布を形成し、3 分後には図 4 (b)の上段に示すように徐々に不均一な分布が生じ始め、局所的なクラスターを形成し始める。これは平等電界中では、DEP 力がほとんど誘起されず、主に双極子相互作用力のみが細胞間に誘起されることに加え、この双極子相互作用力が細胞の配向により引力または斥力として作用するため、初期分布の不均一さが核となりクラスターが生成されたためであると考えられる。また、交流電界の周波数を 10Hz, 100Hz, 1kHz の 3 通りに変化させた今回の実験では、周波数が小さいほど細胞の動きが活発であり、クラスターを形成するまでの時間が短かった。細胞の移動をさらに速やかに行うことを想定して電圧をさらに上げた実験を行ったが、この場合では電界負荷開始から 10 分程度で溶液内に気泡が発生すると同時に、細胞にも損傷を与えることも判明した。これは溶液の電気分解と通電による加熱によるものと考えられる。

次に実験と同様の条件で数値シミュレーションを行い、実験結果との比較を行った。図 4 (a), (b)の下段にその結果を示す。シミュレーションは実験結果を比較的良好に再現していることが分かる。また、この図では判別しにくいですが、多数の細胞が電解に沿って(紙面垂直方向)数珠上に連なり、クラスターを生成することも予想された。数珠上クラスターの形成については、実験結果の図 4 (b)の上段で、凝集している細胞群の輪郭近辺に確認される、ピントのずれた細胞が存在することからも予想される。これらの細胞は深さ方向に互いに連なっていることが考えられる。

4. 結 言

HeLa 細胞をショ糖溶液に懸濁させ、高周波交流の平等電界を負荷させた時の細胞群の振る舞いについて調べた。平等電界であるため、電気力は細胞間でのみ作用するが、その力により細胞群はクラスターを局所に形成し、今回での実験では周波数が最も小さい 10 Hz で、凝集する速度が最も速いことが分かった。低い端子電圧で短時間のうちに細胞を凝集させることができれば、細胞への負担も軽く、より大きなクラスターに成長させることも可能であることも予想された。細胞群の凝集過程を適切に制御できれば、従来にはない厚みのある細胞シート作成技術への応用が期待できる。

文 献

- (1) 多田 茂, “交流平等電界中に置かれた誘電体粒子群の挙動の数値解析”, 日本機械学会年次大会 2011 予稿集 CD-ROM, J024032.

Fig.3 Cells suspension exposed to the uniform AC field

Fig.4 Top views of transient of aggregation of cells dispersed in sucrose-dextrose solution (10 v/v %) exposed to the AC field of 13kV/m & 10Hz with a 0.3mm gap between electrodes. Tops are, (a) Onset of the field application, (b) 3 min after the field application, and bottom panels are results of simulation.