

# 博士論文

幹細胞を対象とする誘電泳動デバイスに関する研究

吉岡 純矢

# 目次

略語 .....	1
要旨 .....	2
<b>第 1 章 序論 .....</b>	<b>3</b>
1.1 緒言 .....	3
1.2 誘電泳動 .....	4
1.2.1 誘電泳動 .....	4
1.2.2 誘電泳動の基本式 .....	8
1.2.3 誘電泳動の応用例 .....	10
1.3 幹細胞の種類と性質 .....	12
1.3.1 幹細胞 .....	12
1.3.2 間葉系幹細胞 .....	14
1.4 間葉系幹細胞の分離 .....	17
1.4.1 細胞分離の種類と重要性 .....	17
1.4.2 誘電泳動を用いる細胞分離例とデバイスの構造の重要性 .....	20
1.5 本研究の目的 .....	24
1.6 本論文の構成 .....	25
<b>第 2 章 鋸型電極を有する誘電泳動デバイス .....</b>	<b>26</b>
2.1 緒言 .....	26
2.1.1 実験の目的 .....	26
2.2 実験の方法 .....	27
2.2.1 細胞・試薬・装置 .....	27

2.2.2	電極作製用フォトマスク設計と有限要素解析 .....	29
2.2.3	鋸型電極を有する誘電泳動デバイスの設計 .....	33
2.2.4	フォトリソグラフィによる誘電泳動デバイスの作製 .....	36
2.3	結果と考察 .....	42
2.3.1	有限要素解析による鋸型電極の電場密度分布の評価 .....	42
2.3.2	誘電泳動デバイスの作製 .....	44
<b>第 3 章</b>	<b>誘電泳動デバイスを使用した間葉系幹細胞の迅速な分離.....</b>	<b>48</b>
3.1	緒言 .....	48
3.1.1	実験の目的 .....	48
3.2	実験方法 .....	50
3.2.1	細胞・試薬・装置 .....	50
3.2.2	細胞培養 .....	53
3.2.3	誘電泳動準備 .....	56
3.2.4	誘電泳動デバイスにおける細胞の誘電泳動挙動の観察 .....	58
3.2.5	誘電泳動デバイスによる間葉系幹細胞の迅速分離 .....	59
3.2.5.1	誘電泳動による前骨髄球の除去 .....	59
3.2.5.2	プロトプラストモデルを用いる細胞泳動挙動のシミュレーション .....	60
3.2.5.3	誘電泳動後の細胞培養と Live-Dead 染色.....	64
3.2.5.4	Real-time PCR を用いる遺伝子発現量の評価 .....	66
3.3	結果と考察 .....	71
3.3.1	誘電泳動デバイスにおける細胞の誘電泳動挙動の観察 .....	71
3.3.2	誘電泳動デバイスによる間葉系幹細胞の迅速分離 .....	75

3.3.2.1	細胞分離後の細胞の存在割合, 濃縮率, 回収率の評価 .....	75
3.3.2.2	プロトプラストモデルを用いる細胞泳動挙動の考察 .....	79
3.3.2.3	誘電泳動後の間葉系幹細胞の接着挙動と生存率の評価 .....	87
3.3.2.4	誘電泳動後の間葉系幹細胞の遺伝子発現量の評価 .....	91
<b>第 4 章</b>	<b>結論 .....</b>	<b>95</b>
	<b>参考文献 .....</b>	<b>97</b>
	<b>謝辞 .....</b>	<b>103</b>

## 略語

ITO : 酸化インジウムスズ indium tin oxide

PEG : ポリエチレングリコール polyethylene glycol

CM 因子 : Clausius-Mossotti factor

## 要旨

ヒト骨髄由来間葉系幹細胞は、様々な細胞へと分化することができる多分化能と自己複製能をあわせ持つため、再生医療分野において有用であり、一般的には回収した骨髄の組織から密度勾配遠心分離法によってサイズや密度を利用して分離される。しかし、密度勾配遠心分離法は得られる細胞の存在割合や再現性に課題があるため、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞を分離するための高い選択性を有する技術の開発が望まれている。

本研究では、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞と同組織由来の前骨髄球の混合物から、自作した鋸型電極を有する誘電泳動デバイスを使用して、迅速で非標識に間葉系幹細胞を分離することに成功した。誘電泳動デバイスのマイクロ流路には、流路底面にフォトリソグラフィを用いて加工した本研究独自の鋸型デザインを有する ITO 電極コート済みガラス基板を配置した。鋸型電極は、先行研究でしばしば用いられる直線電極と比べ同電圧を印加した際により大きな電場勾配を生み出すことができ、効率の良い誘電泳動が可能である。間葉系幹細胞のモデル細胞である UE7T-13 と前骨髄球のモデル細胞である HL-60 は、誘電泳動によってそれぞれ鋸型電極上と鋸型電極間に泳動された。その後、泳動をおこないながら誘電泳動デバイスの流路内に泳動用溶液である 250 mM スクロース溶液を加えて流路内を洗浄すると、UE7T-13 は鋸型電極上に捕捉されたままであったのに対し、鋸型電極の間に集められていた HL-60 は選択的に流路外に排出された。洗浄後には、分離前に 33% であった UE7T-13 の存在割合は 83.5% になり、誘電泳動デバイス内で分離に要した時間は約 5 分であった。さらに、分離時と同条件の周波数を使用して誘電泳動をおこなった UE7T-13 は高い生存率を維持しており、分化関連遺伝子の発現量にも変化はなかった。

本結果は、鋸型電極を有する誘電泳動デバイスを使用した迅速で非標識な細胞分離システムが、骨髄由来間葉系幹細胞の分離において優れたポテンシャルを有することを示唆している。

## 第 1 章 序論

### 1.1 緒言

生物は感覚器官を使って外部からの刺激を受容し、意思の介入・不介入に関わらずその都度適切な応答をしながら活動している。生命活動をする上で、生体内では様々な化学反応によって体内の恒常性を維持しており、そのメカニズムの解明は、生物学者にとって重要なミッションである。近年、コンピュータの普及・処理能力の向上により、人類は膨大なデータを処理することが可能になり、サイエンスの発展が大きく後押しされている。生物学の分野においては、複雑且つ高度なゲノム解析、遺伝子解析、分子構造シミュレーションなどが可能になり、生体内メカニズムの解明は着実に前進している。

生物を構成する上で、最も基本的な構造上・機能上の最小単位は細胞である。したがって、生体内で起こる現象を解明し、有効利用するためには細胞に関する深い知識が必要となる。ヒトにおいて生体内に存在する細胞の種類は一般的に 250 種類以上にも及ぶとされており、遺伝子の数は 20000 種類以上あるといわれているため、細胞は非常に多様で複雑な役割を担っていることがわかる。生物学が発展することによって、細胞内の現象解明や研究成果の応用には生物学的知識だけでなく、化学、物理学、工学などの分野横断的な研究が必要不可欠となってきた。例えばマイクロパターニングされたポリエチレングリコール (PEG) ゲルを利用して培養基板上の細胞の接着領域を制御し、細胞を 3 次元的に凝集させながら培養する研究や<sup>1</sup>、細胞を培養する基板の硬さを制御することで細胞の分化に影響を与えるという研究などがあり<sup>2</sup>、分野横断的な研究の数は多い。本研究では、数ある細胞の中でも特に再生医療への利用を期待される幹細胞に注目し、幹細胞を分離するための工程を改良することを目的として、泳動方法の 1 種である誘電泳動の使用を提案し、工学的手法を用いて独自のデバイスを作製・評価した。

## 1.2 誘電泳動

### 1.2.1 誘電泳動

絶縁性の液体中に懸濁した小さなプラスチック粒子に対して不均一な交流または直流電場を印加すると、印加された電場に応答して粒子は移動する。本現象を見出した Pohl は、新たな用語を生み出す必要性を感じ、ギリシャ語の力学用語「phoresis」を誘電体という意味の単語「dielectric」と組み合わせて「Dielectrophoresis：誘電泳動」という新しい用語を造った<sup>3</sup>。溶液中において不均一電場にさらされた粒子は、溶液と粒子の界面に分極電荷が発生し双極子モーメントが誘起される。そして、溶液と粒子の電気的性質（導電率や誘電率）の違いによって粒子が電場の強い部分、もしくは弱い部分へと泳動される。本現象が誘電泳動のメカニズムである。誘電泳動の性質は以下のようまとめられている。(I) 粒子は、電場が不均一な場合にのみ誘電泳動力を受ける。(II) 誘電泳動力は電場の極性に依存せず交流と直流電場の励起によって観測される。(III) 粒子は、粒子の誘電率  $\epsilon_p$  が懸濁溶液の誘電率  $\epsilon_m$  を超えるとき、すなわち  $\epsilon_p > \epsilon_m$  のときにより強い電場の領域に引きつけられる (図 1-1)。(IV) 粒子は、粒子の誘電率  $\epsilon_p$  が懸濁溶液の誘電率  $\epsilon_m$  よりも小さいとき、すなわち  $\epsilon_p < \epsilon_m$  の場合、より強い電場の領域からはじかれ電場の弱い領域に泳動される。(V) 誘電泳動は、直径が約 1~1000  $\mu\text{m}$  の粒子で最も顕著に観察される。なお、均一電場中に存在する微粒子には、微粒子を中心とした両側の粒子表面に形成される電場は均一であり、正反対で同じ大きさの力が作用し力が釣り合うため、微粒子に駆動力が加わることはない。また、 $\epsilon_p = \epsilon_m$  である場合にも駆動力は発生しない。本研究で用いた電場は交流電場であり、周波数依存的に溶液と粒子の誘電率は変化する。

物質の分極には大きく分けて電子分極、イオン分極、配向分極がある (図 1-2)。電子分極は、原子内の電子（雲）が印加された電場によって原子核の位置に対し相対変位する現象である。通常、電場のない状態では原子核の位置と電子雲の中心が同位置であ

り電子の偏りがなく極性は生じないので中性の状態となっている。イオン分極は、印加された電場がイオン性物質（NaCl など）内にあるプラスイオンとマイナスイオンが構成する規則的な格子を歪ませることによって生じる。電子分極とイオン分極は電子やイオンの変位によって生じるため、変位分極の一種である。配向分極は分子が持つバラバラな方向を向いていた双極子モーメントが印加された電場によって向きを揃えられることによって生じる現象である。以上のように、物質が電場にさらされている時に生じる分極には様々なスケールがある。スケールの小さい順から電子分極、イオン分極、配向分極が生じる。印加する電場の周波数が高くなるに連れてスケールの大きい分極から、次第に電場の変化に分極の変化が追いつかなくなる。分極が追いつかなくなる周波数はそれぞれの物質によって異なるため、交流電場中の誘電泳動現象が複雑化する要因となっている。

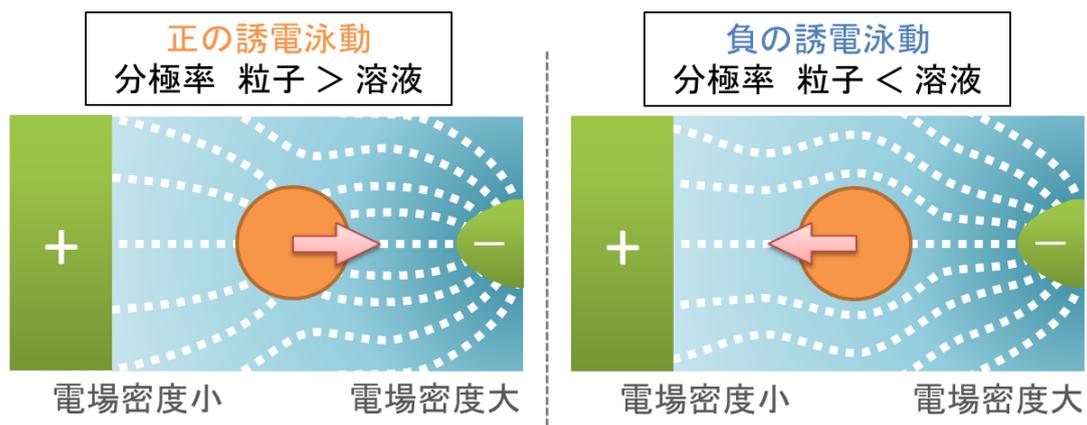


図 1-1 誘電泳動の原理図.

誘電泳動は粒子と粒子懸濁溶液の誘電率のバランスによって電場密度の高い領域へ細胞が泳動される正の誘電泳動と、電場密度の低い領域へ細胞が泳動される負の誘電泳動の 2 種類がある。誘電率は、交流電場の場合周波数によって変化するため、本図では分極率という表現を用いた。交流電場中では、左右に配置した電極の正負は高速に入れ替わっている。

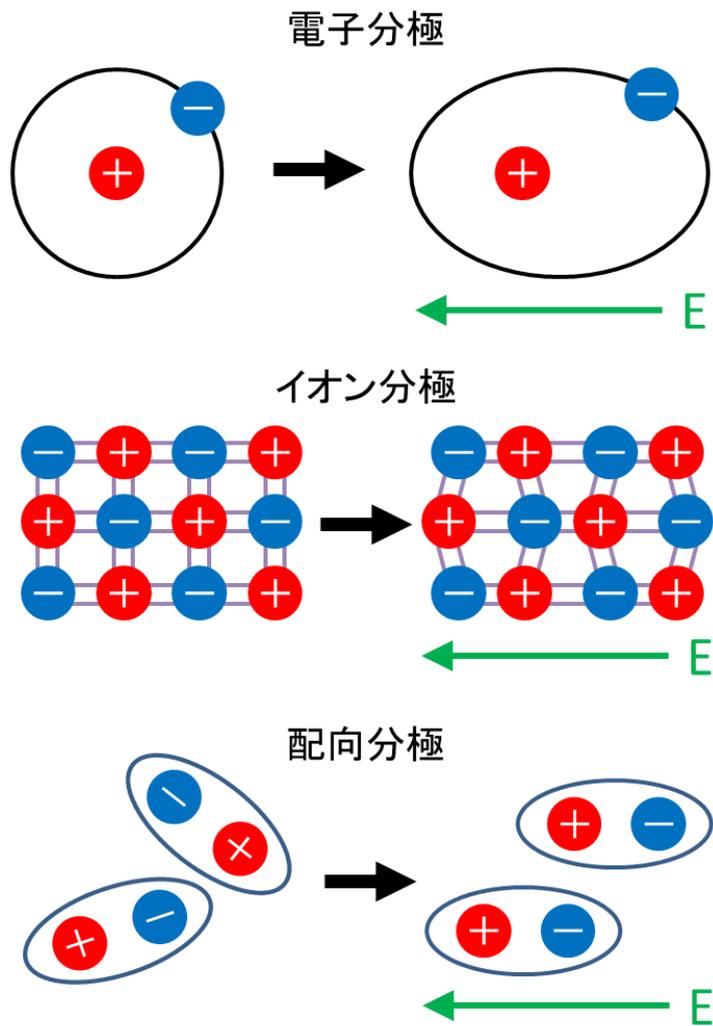


図 1-2 物質の分極の例.

物質が電場にさらされている時に生じる分極には、様々なスケールの現象がある。スケールの小さい順から電子分極，イオン分極，配向分極が生じる。

### 1.2.2 誘電泳動の基本式

本研究では、交流電場を用いて細胞に誘電泳動をおこなった。溶媒中に分散している単体の球状微粒子に外部電場を印加した際に作用する時間平均誘電泳動力  $F_{\text{(DEP)}}$  は式 (1) のように表わされる<sup>4,5</sup>。

$$F_{\text{(DEP)}} = 2\pi r^3 \varepsilon_m \text{Re}[K(\omega)] \cdot \nabla E^2 \quad \dots (1-1)$$

( $r$  : 粒子半径,  $\varepsilon_m$  : 溶液の誘電率,  $\omega$  : 角周波数,  $E$  : 電場強度)

式 (1) の,  $\text{Re}[K(\omega)]$  は Clausius-Mossotti factor (CM 因子) の実部を示しており, さらに  $K(\omega)$  は下記のように表すことができる。

$$K(\omega) = \frac{\underline{\varepsilon}_p - \underline{\varepsilon}_m}{\underline{\varepsilon}_p + 2\underline{\varepsilon}_m} \quad \dots (1-2)$$

( $\underline{\varepsilon}_p$  : 粒子の複素誘電率,  $\underline{\varepsilon}_m$  : 溶液の複素誘電率)

ここで,

$$\underline{\varepsilon} = \varepsilon - \frac{\sigma}{\omega} j \quad \dots (1-3)$$

( $\varepsilon$  : 粒子または溶液の誘電率,  $\sigma$  : 粒子または溶液の導電率,  $j$  : 虚数単位)

とした。

方程式 (1) より, 以下の 4 つの性質が分かる。(I) 誘電泳動力は粒子の体積に比例する。(II) 誘電泳動力は粒子が懸濁している溶液の誘電率に比例する。(III) 誘電泳動力ベクトルは電界強度の勾配  $\nabla E^2$  に沿う方向性を有している。(IV) 誘電泳動力は Clausius-Mossotti factor である  $\text{Re}[K(\omega)]$  の大きさと符号に依存する。正の誘電泳動は  $\text{Re}[K(\omega)] > 0$  (または  $\underline{\varepsilon}_p > \underline{\varepsilon}_m$ ) において生じ, 粒子は電場密度の高い領域へと泳動

され, 電場密度の低い領域から遠ざかる. 負の誘電泳動は  $\text{Re}[K(\omega)] < 0$  (または  $\underline{\epsilon}_p < \underline{\epsilon}_m$ ) において生じ, 粒子は電場密度の低い領域へと泳動され, 電場密度の高い領域から遠ざかる.

### 1.2.3 誘電泳動の応用例

誘電泳動は元々粒子の分離・配列化・分析・操作をするための技術として用いられてきた。例えば近年では、Freer らが誘電泳動を用いて、単結晶クリスタルナノワイヤーを方向制御しつつサブミクロンスケールで配列化したという報告がある<sup>6</sup>。また、Blanca らは、誘電泳動を用いてウシ血清アルブミンを操作・捕捉することに成功した<sup>7</sup>。細胞を対象とした研究においても同様に幅広い用途で使用されている。例えば、Albrecht らは誘電泳動によって細胞を大量かつ精密に凝集化し、ポリエチレングリコール (PEG) ゲルに内包して培養することに成功した。その後、凝集化した細胞はそうでないものとは比べ、硫酸化グリコサミノグリカンの蓄積量が少ないことが明らかにした<sup>8</sup>。Ahadian らは、誘電泳動で凝集化した ES 細胞を PEG ゲル内に内包し、胚様体を作製することに成功した (図 1-3)<sup>9</sup>。また、Yasukawa らは、誘電泳動を使って細胞表面抗原と基板に固定化した抗体との反応を促進するという研究をおこなった<sup>10</sup>。

以上のように、誘電泳動は微粒子や細胞などを扱う様々な研究に使用されており、安価なデバイスで迅速かつ非侵襲的に微粒子や細胞を操作することができる。応用の幅が広く今後も様々な分野において使用され得るポテンシャルを有しているといえる。

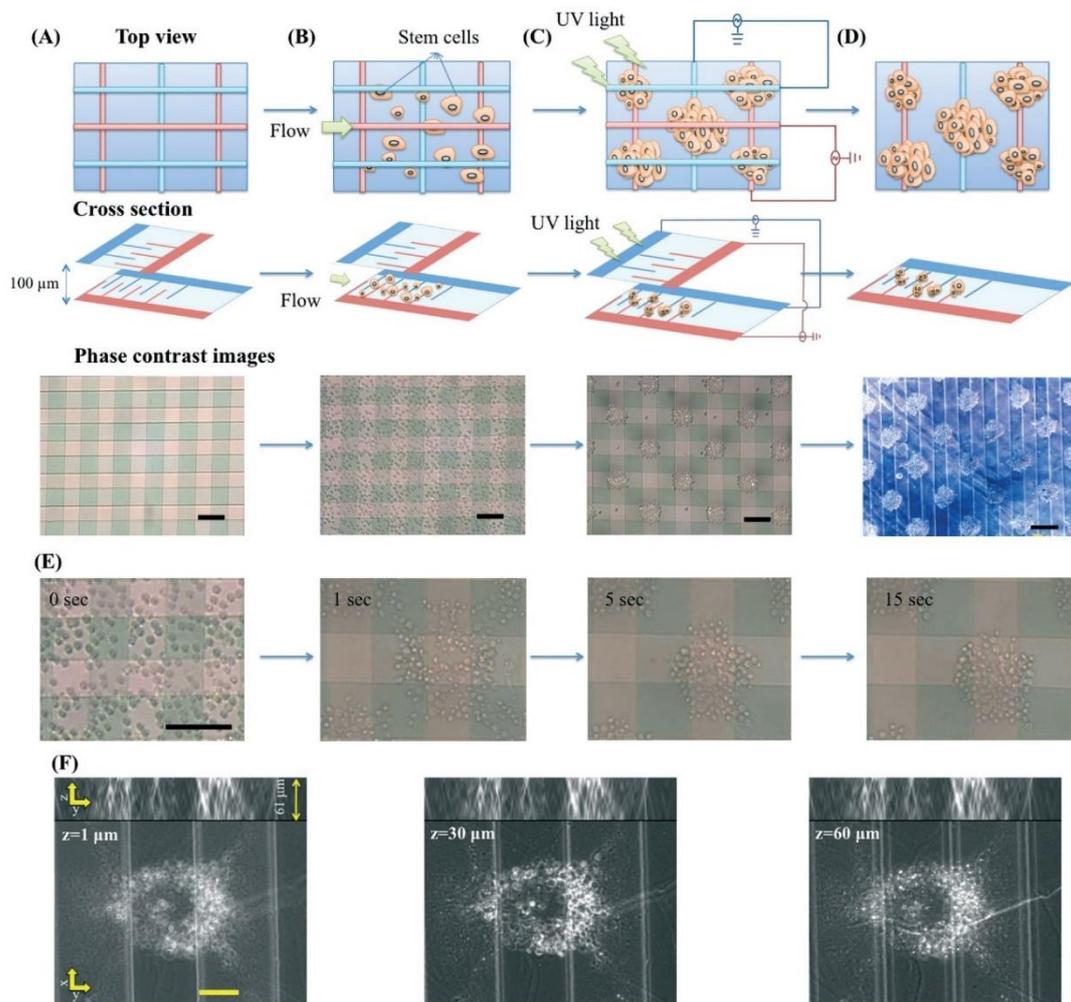


図 1-3 直線電極を交差させた誘電泳動デバイスで胚性幹細胞を集めて作製した胚様体. 参考文献 [9] より引用. Reproduced from Ref. 9 with permission from The Royal Society of Chemistry.

(A) 楕形の直線電極を 2 セット用意し上下から流路を挟んだ. (B) 続いて流路に胚性幹細胞を流し込んだ. (C) その後, 図中の赤色と青色の電極にそれぞれ逆位相の交流電圧をかけた. すると, 不均一電場が発生し上下で違う色の電極が重なり合った部分で強電場となり, 正の誘電泳動によって細胞が強電場領域に集まった. (D) 作製した細胞の凝集体はハイドロゲルに内包し, 上側の電極は取り外された. (E) には誘電泳動時の 15 秒間の細胞の動きを示した. (F) は, 異なる高さにピントを合わせた時の位相差顕微鏡像と  $z$  軸方向に細胞を観察したときの画像である.

## 1.3 幹細胞の種類と性質

### 1.3.1 幹細胞

幹細胞とは、様々な細胞へと分化することができる多分化能と自己複製能をあわせ持つ細胞のことを指す。近年、幹細胞の有する多分化能を再生医療に利用することを目的とした研究が活発におこなわれており、幹細胞はあらゆる組織の細胞源として非常に有望視されている。幹細胞はその起源によっていくつかの種類に分類され、例えば胚性幹細胞 (embryonic stem cells: ESCs)、人工多能性幹細胞 (induced pluripotent cells: iPSCs)、間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cells: MSCs) がある (図 1-4)。胚性幹細胞は、マウスの早期着床前胚盤胞の内部細胞塊より単離された多能性幹細胞であり<sup>11</sup>、内胚葉・中胚葉・外胚葉と呼ばれる 3 つの細胞系統のほとんどすべてに分化することができる幅広い多分化能を持つ。後に Thomson らによってヒト由来の胚性幹細胞も単離され<sup>12</sup>、研究者らは胚性幹細胞の利用に強い興味を持っているが、ヒトの 1 個体として発生し得る細胞を実験用に取り扱う研究は倫理的な問題がある。また、品質の高いヒト卵子の入手が困難であることも研究を制限する要因の 1 つであり、マウス由来の胚性幹細胞の方が盛んに研究されている。人工多能性幹細胞はマウスの線維芽細胞において、転写因子である Oct4/3 (octamer-binding transcription factor 4/3), Sox2 (sex determining region Y), Klf4 (kruppel-like factor 4), c-Myc (Avian Myelocytomatosis virus oncogene cellular homologue) の 4 つの遺伝子を過剰発現させることで得られることが Takahashi らによって初めて報告された<sup>13</sup>。その後、Takahashi らと Nakagawa らはヒトの線維芽細胞からも人工多能性幹細胞を作製することに成功した<sup>14,15</sup>。人工多能性幹細胞は自己複製能力や分化能力において胚性幹細胞とほとんど同等の能力を持っており、また、受精卵を用いずに得られるため倫理的問題が少なく非常に注目されている。しかし、遺伝子操作をして細胞を作製する工程が必要であり、生体移植への安全性を保証することは難しく、再生医療へ利用する上で大きな課題となっている。

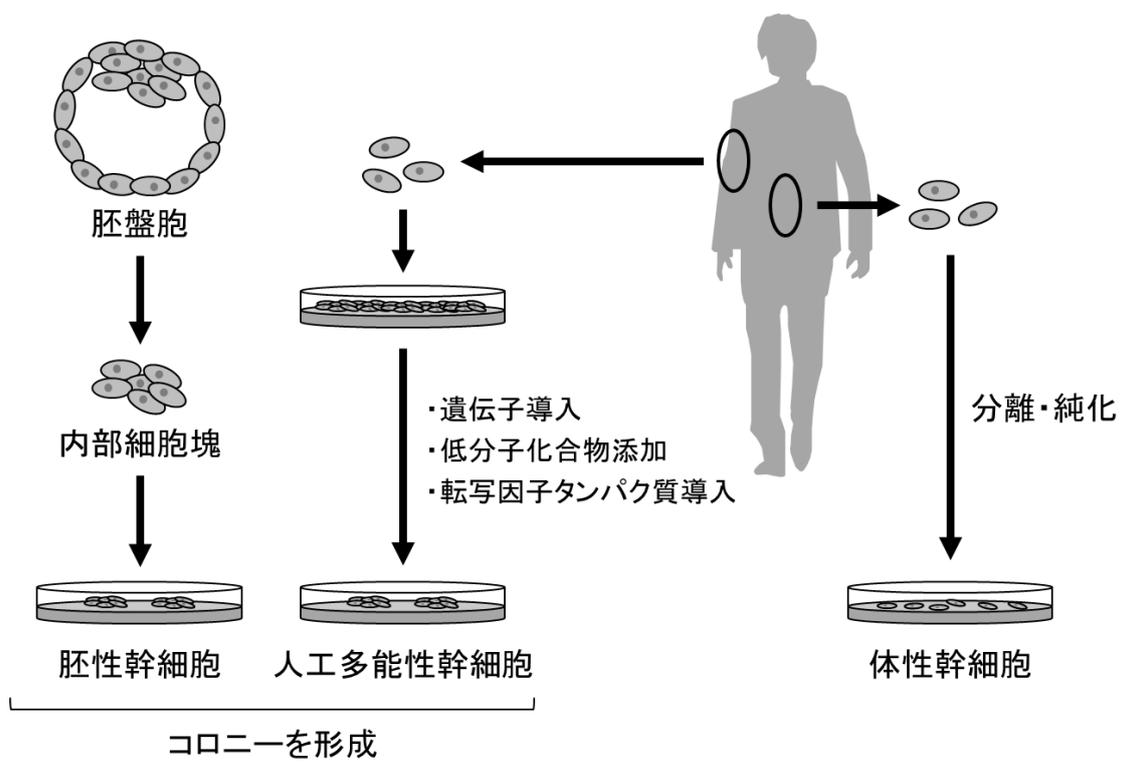


図 1-4 主な幹細胞の種類と取得方法. 文献 [16] を参考に作成.

### 1.3.2 間葉系幹細胞

間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cells: MSCs) は、1960 年代に Friedenstein らによってマウスの骨髄液から線維芽細胞様の接着細胞として発見され<sup>17,18</sup>、1990 年代には Lazarus らによって初めて臨床で自家細胞を血液悪性疾患患者へ注射したことが報告された<sup>19</sup>。間葉系幹細胞は、脂肪細胞、骨芽細胞、軟骨細胞などの中胚葉由来の細胞に分化する能力がある細胞とされ<sup>1,20,21</sup>、胚性幹細胞や人工多能性幹細胞に比べると多分化能は低い (図 1-5)、臨床応用が最も進んでいる幹細胞である。さらに、近年の研究において、間葉系幹細胞は内胚葉<sup>22-24</sup> や外胚葉<sup>21,25-27</sup> など胚葉を超えた分化可塑性を有することが明らかとなり、ヒトの体の中に天然に存在するため倫理的問題も少なく、最も安全な細胞源であると考えられている。これまで多くの研究がおこなわれてきた理由には、比較的容易に骨髄から入手でき、生体外で増殖や分化誘導をおこないやすく、分化能の維持が簡単であることが挙げられる。また、間葉系幹細胞は組織損傷後の炎症部位へのホーミング能力<sup>28,29</sup>、損傷を受けた細胞の回復を刺激し、炎症を抑制することができる複数の生体分子を分泌する能力<sup>28,30,31</sup>を有しているといわれている (図 1-6)。

米国国立医学図書館 (NLM) が運営する世界中で行われた臨床研究のデータベースである ClinicalTrials.gov (<https://clinicaltrials.gov/>) によれば、"mesenchymal stem cells" で検索した場合、本論文執筆時点で 901 件もの臨床研究が登録されている。間葉系幹細胞の臨床応用例には、移植片対宿主病の治療に間葉系幹細胞注射が効果的であったという報告<sup>32,33</sup>や、肝硬変患者への間葉系幹細胞注射が患者の肝機能を改善したという報告<sup>34</sup>などがあり、幅広い症状において治療効果が見出されている。2000 年代には脂肪組織<sup>35</sup>、臍帯血中<sup>36</sup>、骨格筋組織中<sup>37</sup>など体内の様々な組織から間葉系幹細胞が得られることが報告された。異なる組織から得られた間葉系幹細胞は生物学的な機能は非常に類似しているものの、得られる組織によって異なる特性を有していることがわかっている。中でも、最も研究例が多いのは骨髄由来の間葉系幹細胞である。

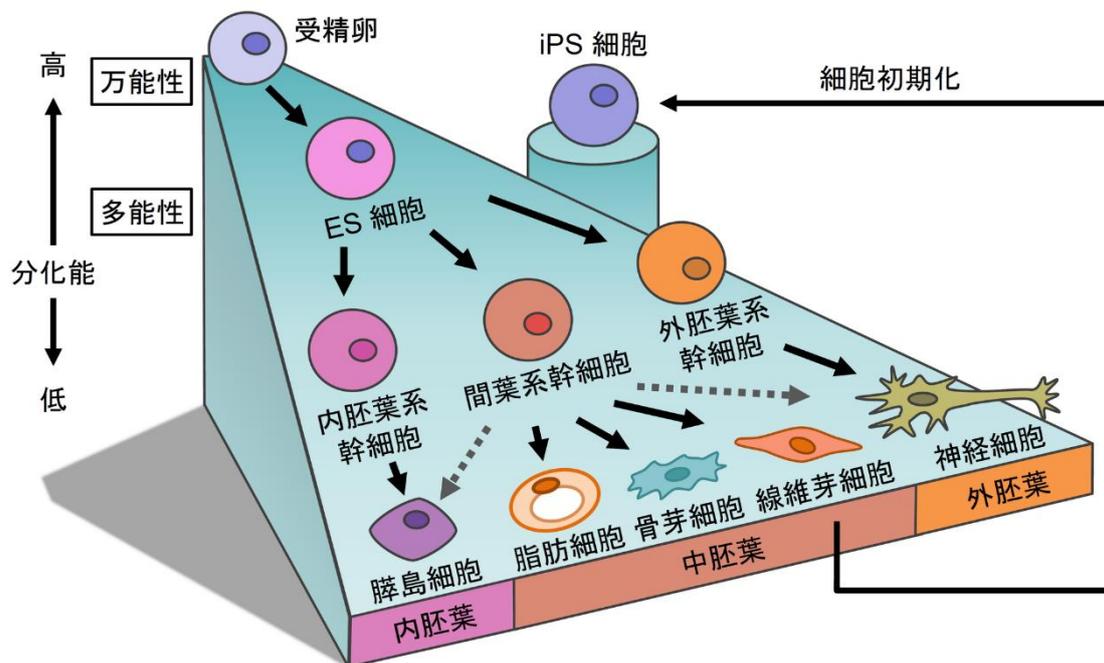


図 1-5 幹細胞と分化多能性.

位置が高いほど高い多分化能を有し、様々な細胞に分化し得ることを示している.

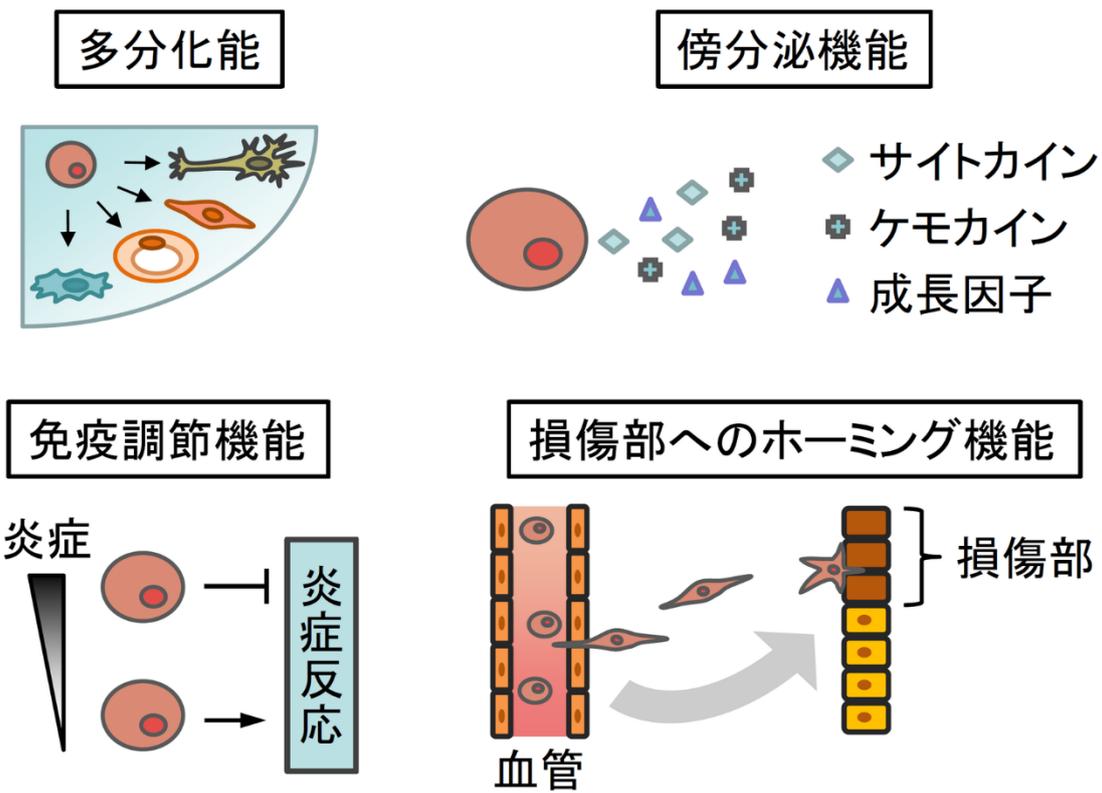


図 1-6 間葉系幹細胞が有する生物学的特性の概略図. 文献 [38] を参考に作成.

## 1.4 間葉系幹細胞の分離

### 1.4.1 細胞分離の種類と重要性

1.3 で述べたとおり，間葉系幹細胞は再生医療分野において有用であり，使用するためには体内から採取した細胞を分離する必要がある．異種細胞懸濁液から純粋な間葉系幹細胞集団を分離する技術に求められる要素は，高効率，簡便性，迅速性，汎用性である．表 1-1 には，いくつかの主な細胞分離法の特徴をまとめた．細胞分離技術は，サイズや密度などの物理変数に基づく手法と，化学的，電磁気学的な親和性に基づく手法の 2 つに大別される．前者の技術の中で特に有名な方法は，密度勾配遠心分離法である．密度勾配遠心分離法は，予め密度勾配を形成するように調製した溶液をチューブ内に用意し，遠心によってチューブ垂直方向に細胞を移動させ，細胞と溶液が当密度の位置に細胞を集めることができる．本手法は，予め分離したい細胞種の密度情報が必要となる．有名な密度勾配調製用溶液には Ficoll-paque™，Percoll™ などがあり，密度勾配遠心分離法は比較的簡単で非標識に細胞分離が可能であることから，現在の臨床においても広く使用されている<sup>39-41</sup>．しかし，細胞のサイズや密度に頼った本方法を用いて骨髓組織から間葉系幹細胞を分離した際には，分離後に得られた細胞液中に間葉系幹細胞を含む単核細胞 (monocyte) と樹状細胞 (dendritic cell) が約 10% 程の存在割合であったという報告があり<sup>41</sup>，密度勾配遠心分離法によって得られる細胞の存在割合はあまり高くないという問題点がある．化学的，電磁気学的な親和性に基づく手法としては，細胞表面に存在する抗原を利用して抗原と抗体の親和性に基づく細胞分離をおこなう fluorescence-activated cell sorting (FACS) や，magnetic-activated cell sorting (MACS) と呼ばれる技術がある．FACS では，蛍光色素でタグ付けされた抗体を細胞に混ぜて細胞を標識し，蛍光と光散乱によって細胞が分離される．FACS は，95% 以上の高い存在割合を実現できるが，高価で持ち運びができない装置を使用する必要があることや，分離速度が $\sim 10^7$  cells/hour に限られているという問題がある<sup>42-44</sup>．MACS 法は抗体を固

定化した磁気ビーズで細胞抗原を特異的に認識し捕捉・分離する方法であり、同手法は複数のサンプルを並行して処理できるため FACS よりも分離速度が期待できるが、サンプルに磁気ビーズが混入するため分離後の細胞の精製に手間がかかり、得られる細胞の存在割合は 75% 程度であるという問題点がある<sup>42,44-47</sup>。また、FACS も MACS も標識が必要なため、細胞の活動や機能に影響を与えてしまう可能性がある。

以上のように、間葉系幹細胞を単離するための技術は既にいくつか存在しているが、どの方法も未だ選択性が低い点や標識が必須な点で課題がある。間葉系幹細胞を単離することは、基礎研究や臨床応用において必要不可欠な技術であり、増え続ける間葉系幹細胞への需要によって、新しい間葉系幹細胞単離技術開発の必要性は高まっている。

表 1-1 幹細胞分離法の比較.

方法	利点	欠点
密度勾配遠心分離法	大量サンプルに適用可能, 非標識, 簡単, 安価 スケールアップ可能,	長時間の遠心(約 40 分), 専用の溶液に細胞を懸濁, 低い選択性
Fluorescence-activated cell sorting (FACS)	高い選択性, 正確性	標識が必要, 高価, 特殊な装置が必要, スケールアップ不可, 長時間の前処理(1~2 時間)
Magnetic-activated cell sorting (MACS)	やや高い選択性, 並行して適用可能	回収物に磁性粒子が混入, 標識が必要

#### 1.4.2 誘電泳動を用いる細胞分離例とデバイスの構造の重要性

誘電泳動による細胞分離では、細胞のサイズのみならず細胞固有の電気物理学的な性質を利用して細胞を分離することができる。さらに、細胞への標識をおこなう必要がなく、迅速で非侵襲に分離可能あることが知られており、分離技術として優れたポテンシャルを有しているといえる。誘電泳動による細胞分離をおこなう上で重要となるのは、デバイスの構造である。誘電泳動デバイスをどのように設計するかによって、細胞をデバイス中のどこに、どのように分離するかを予め予想することができる。例えば Deng らは誘電泳動を用いて脂質含有量の異なる藻類を分離した（図 1-7）<sup>48</sup>。本研究は脂質含有量の違いを見分けて細胞を分離できる誘電泳動の選択性の高さを示しているが、シンプルな直線電極を用いておこなわれた研究であり、デバイスの構造に改良の余地がある。また、Yildizhan らは、三次元に構築された誘電泳動用電極を使用してヒトのリンパ球を生死で分離したことを報告した<sup>49</sup>。誘電泳動デバイスを三次元化することで一度に分離できる細胞数は多くなる。しかし、誘電泳動デバイスの作製方法自体も複雑になってしまうという問題点がある。その他に、絶縁体ベース誘電泳動と呼ばれる特殊な誘電泳動手法を用いた例もある（図 1-8）<sup>50</sup>。絶縁体ベース誘電泳動は一般に直流電場を用いることが多く、流路の途中に絶縁体のピラーを配置することで不均一な電場を生み出し誘電泳動を生じさせる技術である。絶縁体ベース誘電泳動は、デバイスの作製が比較的簡単であるという利点があるが、大きな電位を使用し、高い導電性を有する溶液を使用するため、ジュール熱と電熱流が生じてしまうという問題点がある。

以上より、誘電泳動デバイスを利用した細胞分離法はこれまで様々なデバイスが提案されてきたが、構造が比較的単純かつ高い分離効率を実現できる誘電泳動デバイスの設計は、未だ開発途上であるといえる。また、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞の分離において、誘電泳動の有効性を示した報告は未だない。したがって、誘電泳動によってヒト骨髄由来の間葉系幹細胞分離が可能であれば、誘電泳動による分離技術の新しい応用先として

期待できる．そこで，本研究ではヒト骨髄由来間葉系幹細胞と同組織由来の前骨髄球のモデルとしてそれぞれ UE7T-13 と HL-60 を使用し，独自に設計した鋸型電極を有した誘電泳動デバイスの作製と評価をおこなった．

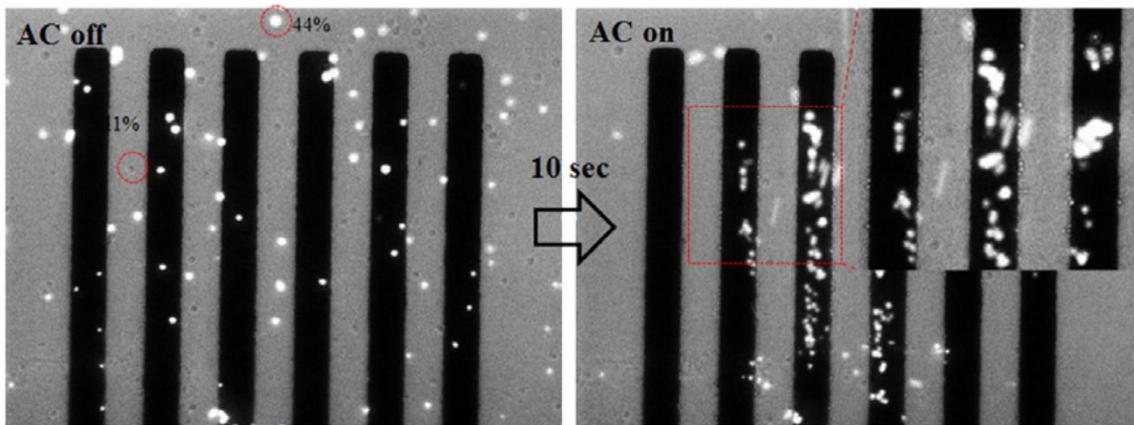


図 1-7 脂質含有量が 11 wt% (透明な細胞) と 44 wt% (Nile Red で染色済みの細胞) の藻類をそれぞれ電極縁と電極上に分離したときの顕微鏡図. 文献[48]より引用.

Reprinted from *Bioresource Technology*, 135, Deng, Y.-L., Chang, J.-S. & Juang, Y.-J., Separation of microalgae with different lipid contents by dielectrophoresis, 137–141, Copyright (2013), with permission from Elsevier.

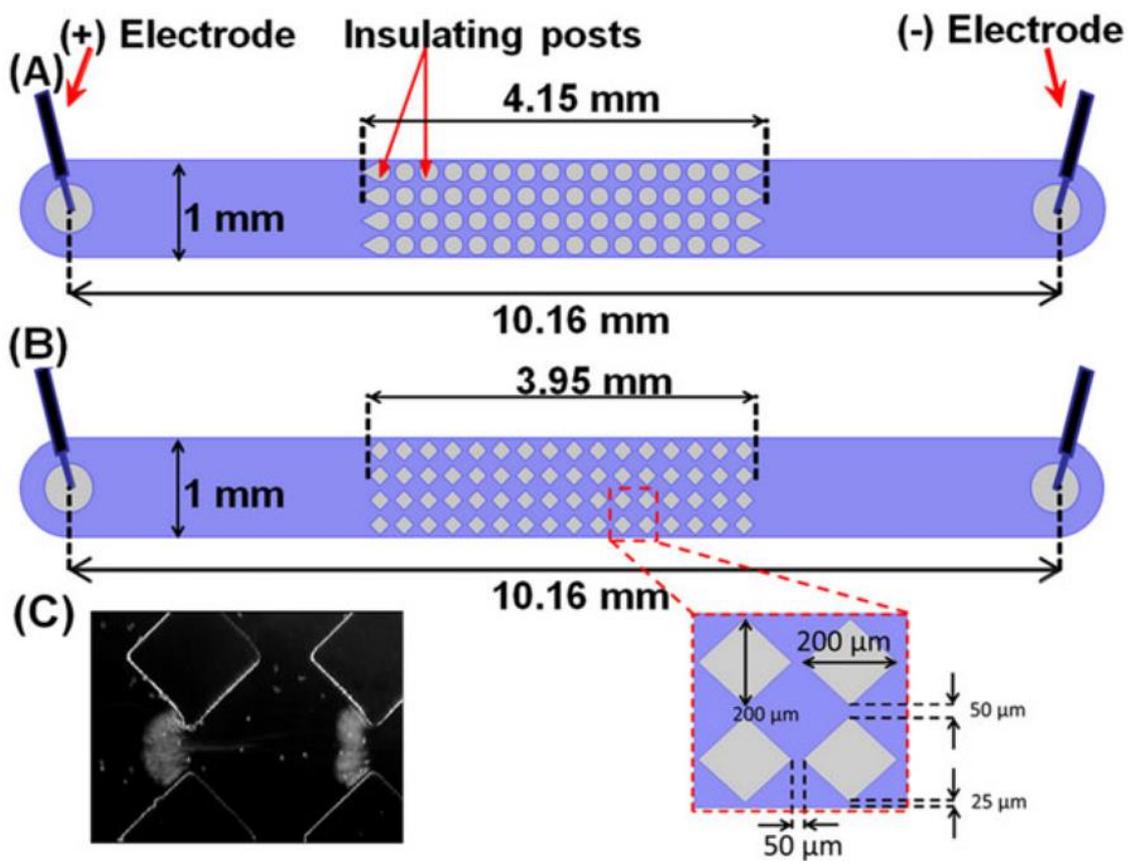


図 1-8 絶縁体ベース誘電泳動を用いた (A, B) デバイスの概略図と (C) *S. cerevisiae* を誘電泳動でトラップしている様子. 文献 [50] より引用. Reproduced from Ref. 50 with permission from Wiley.

(C) の写真でひし形の絶縁性構造の間にアーチ型に白く見えるのは絶縁体ベース誘電泳動によって凝集させられた *S. cerevisiae* 細胞である.

## 1.5 本研究の目的

前項において述べたとおり，骨髄由来の間葉系幹細胞は再生医療分野において有用であり，生体内から分離するための手段はいくつか存在しているが，選択性が低い点や標識が必須な点で課題がある．また，ヒト骨髄由来間葉系幹細胞の分離において，誘電泳動の有効性を示した報告は未だない．したがって，本研究では高効率で迅速，簡便，非標識に間葉系幹細胞分離できるデバイスを独自に設計・作製し，デバイスの性能を評価することを目的とした．

## 1.6 本論文の構成

第 2 章では独自に設計した鋸型電極を有するヒト骨髄由来間葉系幹細胞分離用の誘電泳動デバイス作製に関する内容を紹介し、第 3 章では作製したデバイスを用いて実際にヒト骨髄由来間葉系幹細胞を同組織由来の異種細胞から分離し、デバイスを評価した結果を報告する。

## 第2章 鋸型電極を有する誘電泳動デバイス

### 2.1 緒言

#### 2.1.1 実験の目的

第1章で述べたとおり，間葉系幹細胞は再生医療分野において有用であり注目されているが，間葉系幹細胞を分離する技術は選択性が低い点や標識が必須な点で課題がある．したがって，新たな分離技術の開発が非常に重要である．本研究では，間葉系幹細胞を分離するための技術として誘電泳動に注目した．

誘電泳動による細胞分離をおこなう上で重要となるのは，デバイスの構造である．誘電泳動デバイスをどのように設計するかによって，細胞をデバイス中のどこに，どのように分離するかを予想することができる．本章では，高効率で迅速，簡便，非標識に間葉系幹細胞分離できる鋸型電極を有したデバイスを独自に設計・作製することを目的とした．

## 2.2 実験の方法

### 2.2.1 細胞・試薬・装置

#### 電極作製および誘電泳動用材料・試薬

- 2-Propanol (166-04831, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Ltd., Japan)
- Acetone (011-00357, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Japan)
- CARBON PASTE TU-10S (Asahi Chemical Research Laboratory Co., Ltd., Japan)
- Contaminon® AC (031-10381, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Japan)
- ITO 膜付きガラス (スパッタ品) (0006, GEOMATEC Co., Ltd., Japan)
- MF CD-26 DEVEROPER (The Dow Chemical Company, USA)
- PET 基材薄手両面テープ (No.5603, NITTO DENKO CO., Japan)
- S1818G PHOTORESIST (The Dow Chemical Company, USA)
- SU-8 Developer (KAYAKU CO., LTD., Japan)
- アラルダイトラピッド AR-R30 (NICHIBAN CO., LTD., Japan)
- スクロース (196-00015, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Japan)
- ネガティブフォトレジスト SU-8 3005 (KAYAKU CO., LTD., Japan)
- パスツールピペット (73-0001, AGC TECHNO GLASS CO., LTD., Japan)
- 混酸 ITO-02 (KANTO KAGAKU, Japan)
- 免疫学的測定用ブロッキング試薬 N102 (NOF CORPORATION., Japan)

#### 器具・装置・ソフトウェア

- AS 超音波洗浄器 US-4R (TRUSCO NAKAYAMA Corporation, Japan)
- AutoCAD (Autodesk Inc., USA)
- Compact Water Quality Meter (B-771, HORIBA, Ltd., Japan)
- COMSOL Multiphysics (COMSOL, Inc., Burlington, MA, USA)

- ImageJ (National Institutes of Health, USA)
- SP-7 SPOT CURE (USHIO INC., Japan)
- Waveform Generator 33500B Series (AGILENT TECHNOLOGIES, INC., USA)
- アナログテスター CX-03 (CUSTOM corporation, Japan)
- スピンコーター K-359S1 (KYOWA RIKEN CO., LTD., Japan)
- テーブルトップ冷却遠心機 2800 (KUBOTA CORPORATION., Japan)
- ホットプレート付マグミキサ MH800 (YAMATO SCIENTIFIC CO., LTD., Japan)
- ワンセルカウンター (OC-C-S02, Fine Plus International Ltd. Japan)
- 位相差・蛍光顕微鏡 (IX5158F-3, Olympus Corporation, Japan)
- 位相差顕微鏡 (Motic AE31, Shimadzu RIKKA Corporation, Japan)
- 純水製造装置オートスチル WG222 (YAMATO SCIENTIFIC CO., LTD., Japan)
- 真空プラズマ卓上タイプ YHS-R (SAKIGAKE-Semiconductor Co., Ltd., Japan)

## 2.2.2 電極作製用フォトマスク設計と有限要素解析

1.2 において述べたとおり電場の密度勾配の大きさは誘電泳動力の大きさ、すなわち泳動の効率へと影響する。また、誘電泳動デバイスには、電極の形状が尖った形をしていると高い電場密度勾配を生み出せるという性質があり、本性質を用いて誘電泳動デバイス内の電場密度の分布を調節することが重要となる。本研究で作製した幹細胞分離用の誘電泳動デバイスは、流路の底面に独自に設計した鋸型の電極構造を有している（図 2-1）。図 2-1A には鋸型の電極デザインの寸法情報を示した。デバイスは左右の下部にリード線を接続するための領域を円状に設け、中央の上部に鋸型電極領域を配した。誘電泳動デバイス内では、鋸型電極領域の真上にいる細胞に対して誘電泳動をおこなう。電極形状の製図は商用ソフトウェアである AutoCAD (Autodesk Inc., USA) を用いておこない、dwg を拡張子とする CAD ファイルとして作製した。作製した CAD ファイルは東京プロセスサービス (TOKYO PROCESS SERVICE CO., LTD.) に送付し、ポリエステルベースのフィルムマスクを購入した。フィルムマスクは、石英やガラスマスクに比べ透明度や耐久性が劣るが安価であるため選択した。予備検討の結果から、東京プロセスサービスから購入したフィルム製フォトマスクを用いた場合、当研究室が所有する紫外光照射光源 SP-7 SPOT CURE (USHIO INC., Japan) を用いたフォトリソグラフィーが十分に可能であることを予め確認した。電極形状を設計する際には、(1) 電極に印加する交流電圧の位相に伴う細胞の配列像が予めイメージしやすいこと、(2) 細胞を効率よく捕捉できること、(3) 流路の壁の部分となる両面テープ (スペーサー) の形状が単純で加工が容易なこと、(4) 電極の構造が単純で扱いやすいこと、(5) 流路内の細胞の大部分が誘電泳動の作用領域内に収まるようにすることを考慮した。図 2-1B には、鋸型の ITO 電極基板の真上に細胞を乗せ、アースへ繋いだ平板状の ITO 電極基板で上から蓋をした後、細胞懸濁液を上下の基板間に注入し誘電泳動をおこなった際に予測される細胞の泳動時の様子を示した。1.2 で述べたとおり、誘電泳動には負の誘電泳動と

正の誘電泳動 2 つのパターンがあり、本誘電泳動デバイス内における正の誘電泳動時には、細胞は鋸型電極の真上に引き寄せられ、負の誘電泳動時には、細胞は鋸型電極の間に引き寄せられる。図 2-3C には、電極部の保護と誘電泳動作用部以外の絶縁処理を目的としたネガティブフォトレジストのコーティング部を示した。

誘電泳動時には、前述したように電場の密度勾配が大きいほど誘電泳動力が強くなる。また、大きな電場勾配は電極の尖ったデザインの部分において生じやすい。本研究で設計した鋸型の電極は、電極デザインに鋭利な角部分が多いため細胞の操作を効果的にこなうことができると予想した。そこで、電場の密度勾配をシミュレーションするために有限要素解析法を使用した。有限要素解析は、あらゆる物理現象を合成してシミュレートすることができる商用ソフトウェア COMSOL Multiphysics (COMSOL, Inc., Burlington, MA, USA) を使用しておこなった。図 2-2A, B には、それぞれ COMSOL Multiphysics 上で作成した誘電泳動デバイスの流路内部のジオメトリとメッシュを示した。ジオメトリとは、解析をおこなう空間の 3D モデリングデータであり、メッシュとはジオメトリを小さな領域に分割したものであり、電場の密度勾配をシミュレーションする際の最小単位となる。ジオメトリのデータは、設計した電極の CAD データを参考に作製した。鋸型は繰り返しパターンであるため、解析は流路内部の一部分に関しておこない、今回シミュレーションした領域外部分においてもおおよそ同様の電場分布があると考えた。図 2-2 では表示されていないが、ジオメトリの上下には ITO 電極がコートされているガラス基板層もシミュレートされており、また、図中の流路底面の鋸型 ITO 電極には 10 V peak-to-peak (Vpp) の交流電圧を印加し、天井には一様な平板状の ITO 電極を配置しアースに接続してあるという条件を設定した。

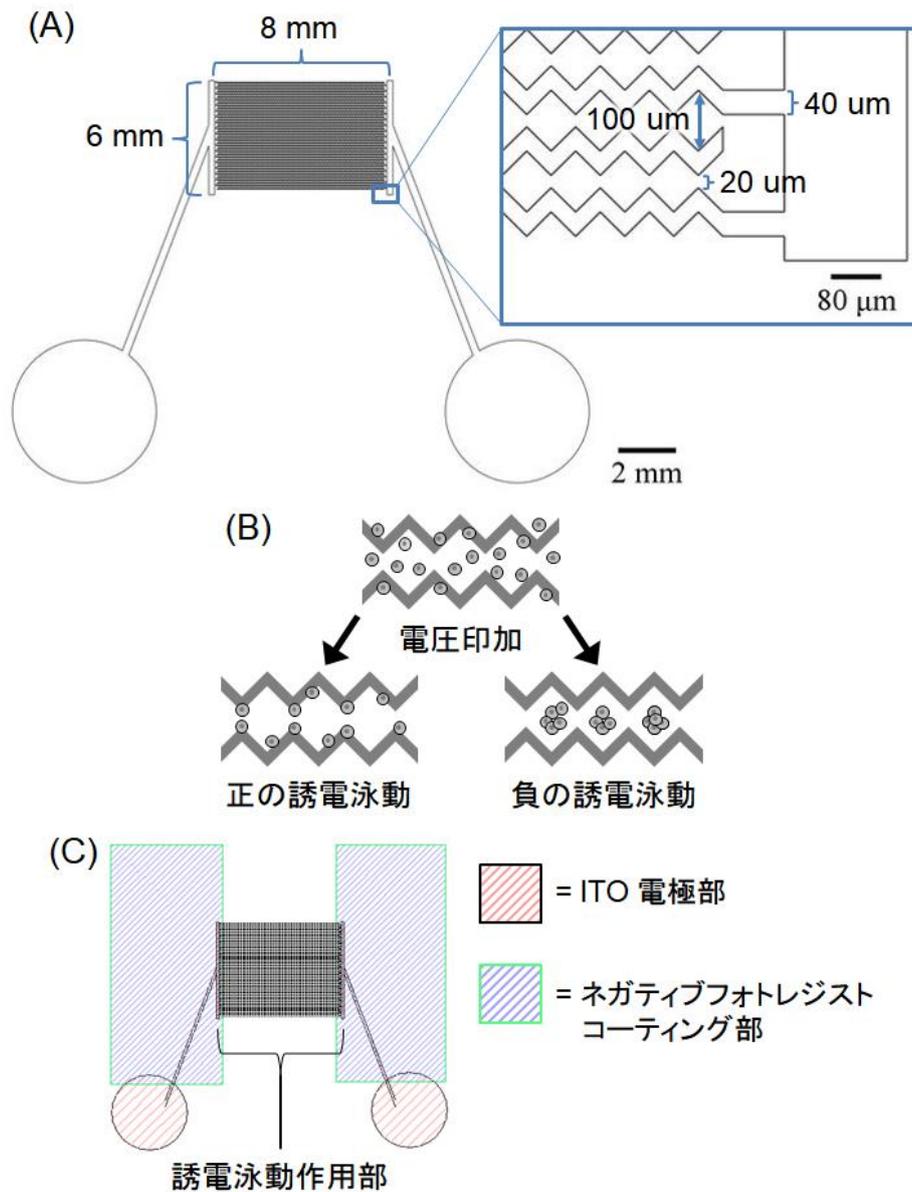


図 2-1 ヒト間葉系幹細胞分離用の誘電泳動デバイス内流路底面の電極デザイン。

(A) 誘電泳動デバイス底面に配置した電極デザインの全体図。電極中央部には鋸型形状領域を有しており、それぞれの寸法を図に示した。誘電泳動作用部は中央の鋸型電極部の真上のみである。(B) 細胞が正の誘電泳動と負の誘電泳動にさらされたときの誘電泳動挙動。(C) 電極の保護と誘電泳動作用部以外の絶縁処理を目的としたネガティブフォトリソのコーティング部。

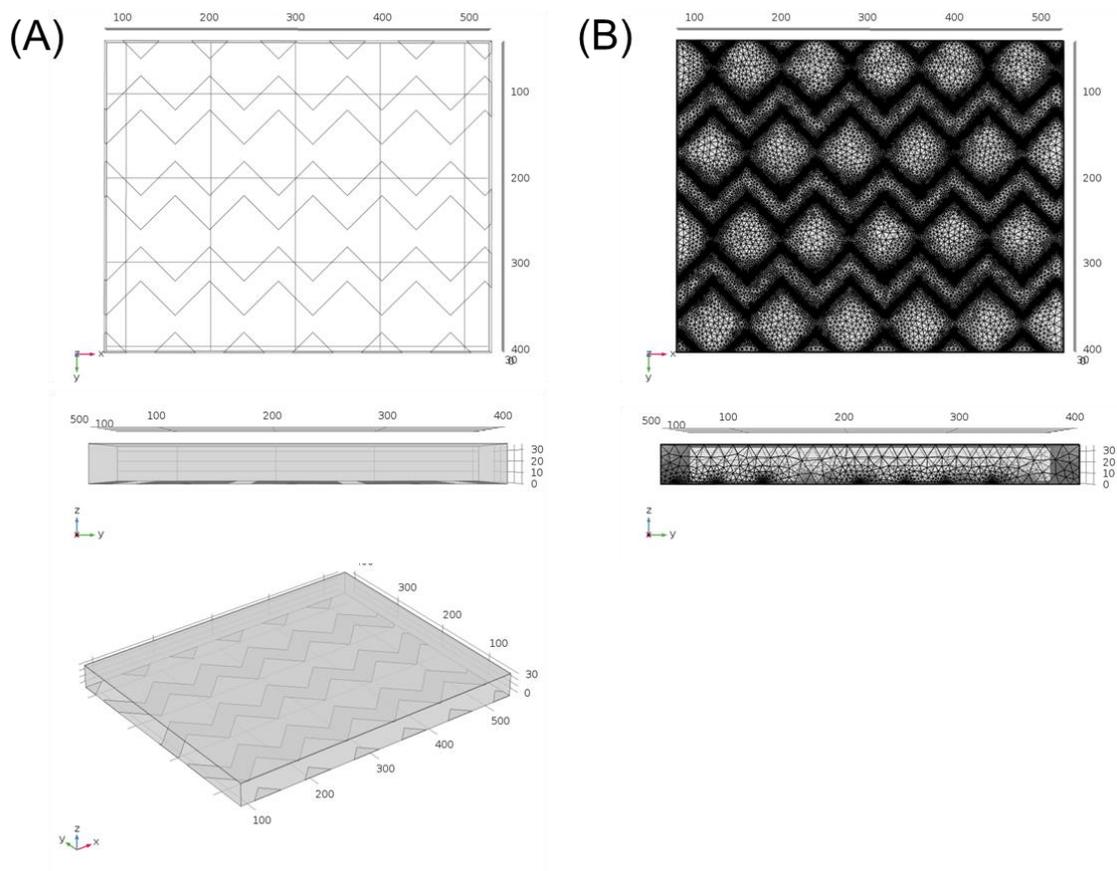


図 2-2 有限要素解析のために作成した 3D の (A) ジオメトリと (B) メッシュ.

ジオメトリとは誘電泳動デバイスの 3D モデリングデータである. ジオメトリ内の電場密度分布解析は, メッシュ単位で計算される. メッシュはソフトウェア上で自動作成し, メッシュの大きさは最小になるように設定した. 図中の寸法の単位は,  $\mu\text{m}$  である.

### 2.2.3 鋸型電極を有する誘電泳動デバイスの設計

本研究で設計した鋸型電極を有する細胞分離用の誘電泳動デバイスの概略図を図 2-3 に示す。図 2-3A, B には、それぞれデバイスの断面図、俯瞰図を示した。本デバイスでは酸化インジウムスズ (Indium-Tin-Oxide: ITO) 膜付きガラス (スパッタ品) (0006, GEOMATEC Co., Ltd., Japan) を使用した。ITO は、導電率と透明度が高いため、誘電泳動中に細胞の観察をするのに適した電極材料である。誘電泳動デバイスは、上下を ITO 膜付きガラス基板によって挟まれた構造を有しており、ITO 電極がデバイスの内側を向くように配置されている。流路天井面に配置した ITO 膜付きガラス基板は加工せずそのまま使用し、流路底面に配置したものは ITO 電極を予め鋸型の形状に加工した。上下の ITO 膜付きガラス基板で挟んだのは、流路に 30  $\mu\text{m}$  の厚みを出し流路壁の役割をする PET 基材薄手両面テープ (No.5603, NITTO DENKO CO., Japan) と電極の誘電泳動作用部以外を保護、絶縁する役割をするフォトレジストである。PET 基材薄手両面テープは上下の基板を接着する役割も有している。上下の ITO 膜付きガラス基板にはそれぞれリード線を取り付け、誘電泳動時には電圧を印加するために Waveform Generator 33500B Series (AGILENT TECHNOLOGIES, INC., USA) に繋いで交流電圧を印加した。

図 2-4 には、作製した誘電泳動デバイスの流路断面図における細胞の泳動予想を示した。本誘電泳動デバイスが流路底面に有する鋸型電極の構造に応じて、電極の真上に電場の強い領域が生じる。正の誘電泳動が生じた場合には流路中に懸濁された細胞は電場の強い鋸型電極の真上領域へ移動し、負の誘電泳動が生じたときには流路中に懸濁された細胞は電場の弱い鋸型電極の間へ移動する。

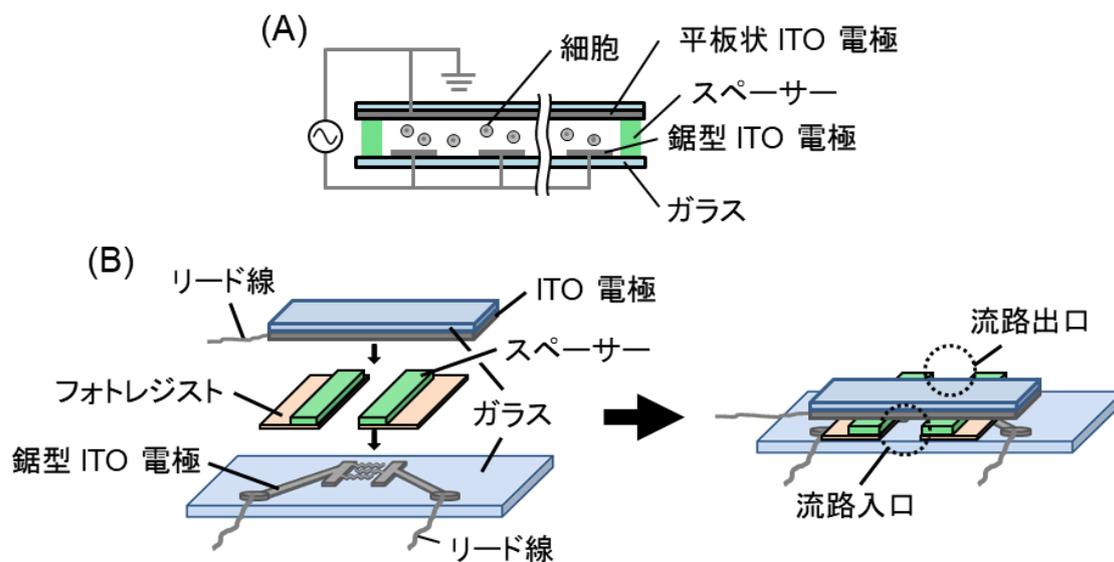


図 2-3 本研究で作製したヒト骨髄由来間葉系幹細胞分離用の誘電泳動デバイス概略図.

デバイスは Indium-Tin-Oxide (ITO) コート済みガラス基板でスペーサーとフォトレジストを挟み込んだ構造の流路を有している. (A) は流路の断面図を示しており, (B) は誘電泳動デバイスの俯瞰図を示している.

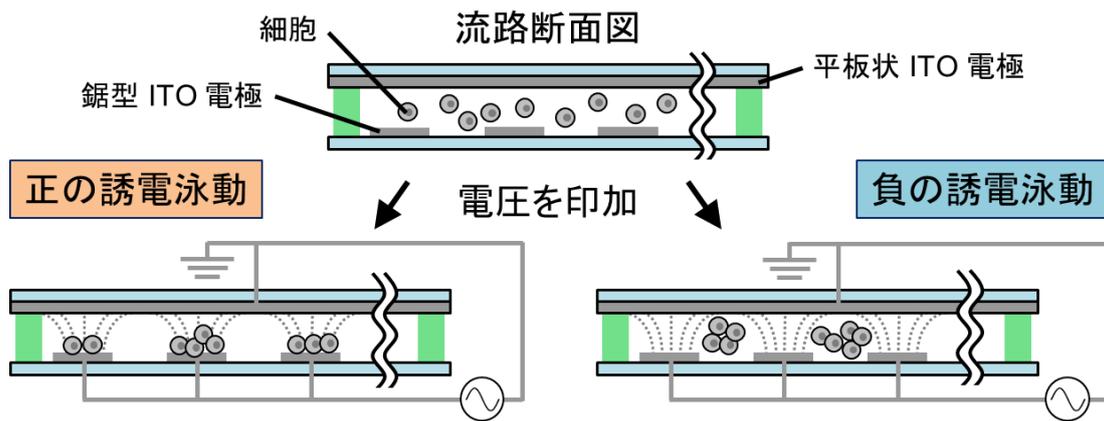


図 2-4 本実験で構築する電極デバイスの断面図と予想される細胞の泳動.

正の誘電泳動が生じた場合, 細胞が電場密度の高い電極デバイス流路底面の鋸型 ITO 電極の上に集まる. 負の誘電泳動が生じた場合, 電場密度の高い鋸型 ITO 電極から遠ざかるように細胞が泳動される.

## 2.2.4 フォトリソグラフィーによる誘電泳動デバイスの作製

細胞分離用の誘電泳動デバイスの流路底面に配置する鋸型電極作製工程の概略図を図 2-5 に示した。下記には、ITO 膜付きガラスにフォトリソグラフィーおよびケミカルエッチングを施すことによって、ITO 電極を鋸型に加工する図 2-5A-I の工程について詳細を記述した。

### 工程 図 2-5A-B

フォトリソグラフィーをおこなう前処理として、図 2-5A-B に示した操作をおこなった。購入した ITO 膜付きガラス（スパッタ品）（0006, GEOMATEC Co., Ltd.）を、Acetone（011-00357, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Japan）と 2-Propanol（166-04831, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Japan）に浸しながらそれぞれ 10 分間ずつ AS 超音波洗浄器 US-4R（TRUSCO NAKAYAMA Corporation, Japan）を用いて超音波洗浄をおこなった（図 2-5A）。次に、パスツールピペット（73-0001, AGC TECHNO GLASS CO., LTD., Japan）を用いて ITO 膜付きガラスにポジティブフォトレジスト S1818G PHOTORESIST（The Dow Chemical Company, USA）をたらし、スピンのコーター K-359S1（KYOWA RIKEN CO., LTD., Japan）を用いて 500 rpm で 5 秒間、3000 rpm で 5 秒間のプログラムでスピンコートした。その後、ホットプレート付マグミキサ MH800（YAMATO SCIENTIFIC CO., LTD., Japan）を使用して 100°C で 8 秒間ソフトバークし、空冷した（図 2-5B）。以後、処理をおこなった ITO 膜付きガラスを ITO 電極基板と称する。

### 工程 図 2-5 C-D

上記の操作で得られたフォトレジストスピンコート済み ITO 電極基板に対し、設計・発注したポリエステルベースのフィルム製フォトマスクを介して ultraviolet (UV)

光照射をおこなった (図 2-5C). UV 光照射時はフィルムマスクの表裏に注意し SP-7 SPOT CURE (USHIO INC., Japan) を使用して UV 光を  $0.33 \text{ mW/cm}^2$  (50% 出力, 距離 10.5 cm) で 4 秒間照射した. 続いて, ポジティブフォトレジスト S1818 の現像液である MF CD-26 DEVEROPER (The Dow Chemical Company, USA) を満たしたシャーレを 2 枚用意し, 現像液をパスツールピペットでかけ流しながら UV 光照射後の ITO 電極基板を 2 度洗浄することで, フィルムマスクに隠され UV 光照射されなかった部分のポジティブフォトレジストを除去した. 加工されたポジティブフォトレジストの電極デザインの太さは, オープンソースの画像処理ソフトウェアである ImageJ (National Institutes of Health, USA) を用いて測定した. 最後に, 現像停止処理として蒸留水で同様に 2 度洗いし, ホットプレートを用いて  $100^\circ\text{C}$  で 2 分間ポストバークし空冷した (図 2-5D). バーク終了時には, レジストの色が黄色から薄い赤色に変色したことを確認し, 顕微鏡でコーティングされた電極のパターンを観察した. なお, 現像時にフォトレジストが意図せず基板に残ってしまう際には, 最初のソフトバーク時間を短くする必要がある.

#### 工程 図 2-5E-F

ポジティブフォトレジストで覆われていない ITO 電極基板上の領域を酸で溶かして削り取る操作 (エッチング) をおこなった (図 2-5E). まず, ITO 電極用エッチング液である混酸 ITO-02 (KANTO KAGAKU, Japan) をビーカーに注ぎ, ITO 電極基板をビーカーの底に沈め超音波洗浄器を使って攪拌した. エッチングの終了時間は, 両端のリード線接続予定部のポジティブフォトレジストを一部 acetone で拭いて剥がし, アナログテスター CX-03 (CUSTOM corporation, Japan) を当てて導通がないことで判断した. エッチング完了後は, ITO 電極基板を acetone に浸して洗い, 不要となったポジティブフォトレジストを除去 (リフトオフ) した. (図 2-5 F). ポジティブフォトレジスト

が無傷にも関わらずエッチング後の ITO 電極基板にひっかき傷のような跡が入ってしまう場合には、基板に対するポジティブフォトリソの吸着が甘いのが原因であり、基板を予めシラン処理することで、ITO 電極基板に対するポジティブフォトリソの親和性を高めた。シラン処理は、容器に入れた 100  $\mu\text{L}$  の 1,1,1,3,3,3-Hexamethyldisilazane (HDMS) と、予め 100°C で 15 分間脱水ベークし、ポジティブフォトリソコート面を上へ向けた ITO 電極基板を共にデシケーターに入れて脱気し数時間静置（ベーパー処理）しておこなった。

#### 工程 図 2-5G-I

構築した鋸型電極デバイスのうち、誘電泳動作用部以外の領域の保護と絶縁化を目的とし、ネガティブフォトリソ SU-8 3005 (KAYAKU CO., LTD., Japan) のコーティングをおこなった (図 2-5G-I)。最初に、2-Propanol を用いてコーティング対象の ITO 電極基板を 10 分間超音波洗浄した。次に、真空プラズマ卓上タイプ YHS-R (SAKIGAKE-Semiconductor Co., Ltd., Japan) を用いて ITO 電極基板の表面をプラズマ洗浄することにより、コーティングするネガティブフォトリソの ITO 電極基板への親和性を大きくした。その後、パストゥールピペットを用いて ITO 電極基板にネガティブフォトリソをたらし、スピncerを用いてスピncerコートした。スピncerコート時の条件には、500 rpm で 5 秒間、3000 rpm で 30 秒間のプログラムを使用し、コート後の厚みは製品のプロトコルによると約 5  $\mu\text{m}$  である。そして、100°C のホットプレートで 30 秒間ソフトベークし、空冷した後 SP-7 SPOT CURE を使用して UV 光を 0.33 mW/cm<sup>2</sup> (50% 出力, 距離 10.5 cm) で 30 秒間照射した。続けて 100°C ホットプレートで 1 分間ポストベークし空冷した。

現像工程では、ネガティブフォトリソの現像液 SU-8 Developer (KAYAKU CO., LTD., Japan) を満たした 2 枚のシャーレに ITO 電極基板を浸し、現像液をスポイトで

かけ流しながら 2 度洗浄した後、停止液であるイソプロパノールで同様に 2 度洗いした。続いて 140°C で 15 分間ハードベークし、得られたネガティブフォトレジストのパターンを位相差顕微鏡 (Motic AE31, Shimadzu RIKA Corporation, Japan) で観察した。

上記の工程を終えた後、構築した ITO 電極基板と Waveform Generator を接続するためのリード線を取り付ける作業をおこなった。予め、用意したリード線用のエナメル線を適当な長さでカットし、その両端をライターで炙った後にヤスリで削り、絶縁用被覆部を除去した後、CARBON PASTE TU-10S (Asahi Chemical Research Laboratory Co., Ltd., Japan) でエナメル線を ITO 電極基板に密着させリード線を接続した。その後、100°C のホットプレートで約 90 分間ベークして CARBON PASTE を固め、その上から、アラルダイトラピッド AR-R30 (NICHIBAN CO., LTD) を塗って一晩静置しさらに強力な接着、絶縁処理を施した。なお、購入した ITO 膜付きガラスを適当な大きさに切り、加工をせずにそのままリード線を取り付けた ITO 電極基板を流路天井面として使用した。リード線が接着しているかどうかは、リード線の先と ITO 基板にアナログテスターを当て、導通があることを確認して判断した。以上の工程によって、電極基板の作製と配線を完了した。

#### 誘電泳動デバイスの組み立て

キムワイプで Contaminon® AC (031-10381, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Japan), 2-Propanol, 純水を使って作製した電極デバイスを優しく擦りながら洗浄し、手動のブロアーで水気を飛ばして流路部分表面に汚れがないことを確認した。次に、誘電泳動デバイスの流路壁の形状に切り抜いた PET 基材薄手両面テープ (No.5603, NITTO DENKO CO., Japan) を 30 µm 厚のスペーサーとして、流路底面に配置する鋸型の電極形状を有する ITO 電極基板に貼り付け、流路天井に配置する無加工の平板状 ITO 電極基板と合わせて 1 セットとして真空プラズマ卓上タイプ YHS-R

(SAKIGAKE-Semiconductor Co., Ltd., Japan) の中に入れた。その後、真空プラズマ卓上タイプ YHS-R を使用して流路内側になる面にプラズマ処理を施し、ITO 電極基板の親水性を向上させた。親水性を向上させることで流路を組み立てた後に細胞懸濁溶液を注入する際に気泡が入りにくくなる効果がある。続いて、前述した 1 セットの ITO 電極基板をプラズマ処理前に接着しておいた PET 基材薄手両面テープで貼り合わせた。なお、リード線の先はプラズマ洗浄の影響で酸化して接触不良を起こす危険性があるため、誘電泳動前に先端をやすりで削り直した。

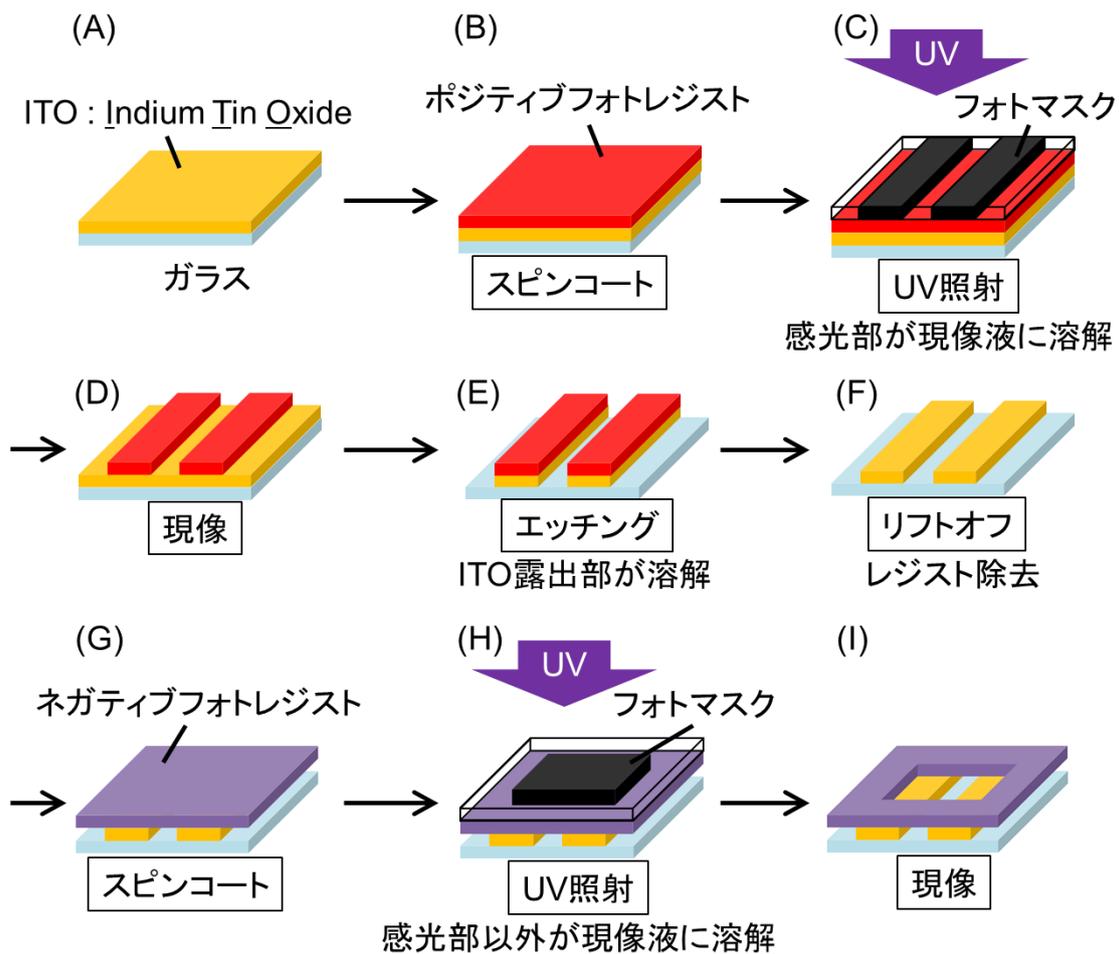


図 2-5 誘電泳動デバイス流路底面に配置する、鋸型形状を有する ITO 電極基板の加工工程概略図.

ITO 膜付きガラスにフォトリソグラフィおよびケミカルエッチングを段階的に施すことによって、設計した鋸型の形状を有する ITO 電極をガラス表面上に作製した。

## 2.3 結果と考察

### 2.3.1 有限要素解析による鋸型電極の電場密度分布の評価

設計した鋸型電極が効率の良い誘電泳動をおこなうために適しているのかを調べるため、有限要素解析を用いてデバイス流路内の電場密度分布をシミュレーションした(図 2-6)。有限要素解析には商用ソフトウェア COMSOL Multiphysics (COMSOL, Inc., Burlington, MA, USA) を使用した。鋸型電極部の電圧は 10 Vpp に設定して解析をおこない、本電場密度分布図は流路底面から高さ 4  $\mu\text{m}$  地点の電場密度分布を示している。図 2-6 では、結果が赤色に近いほど電場密度が強く、青色に近いほど電場密度が弱いことを示している。図 2-6 の上図は、誘電泳動デバイス中の流路底面の ITO 電極の形状が直線状であるときの解析結果であり、図 2-6 の下図は鋸型の電極形状をしているときの電場密度の分布を示している。図 2-6 から明らかなように、直線のデザインよりも多く尖った構造を有している鋸型のデザインは、同じ電圧を印加した際により電場勾配が大きく、効率的に誘電泳動を生じさせられることがわかった。

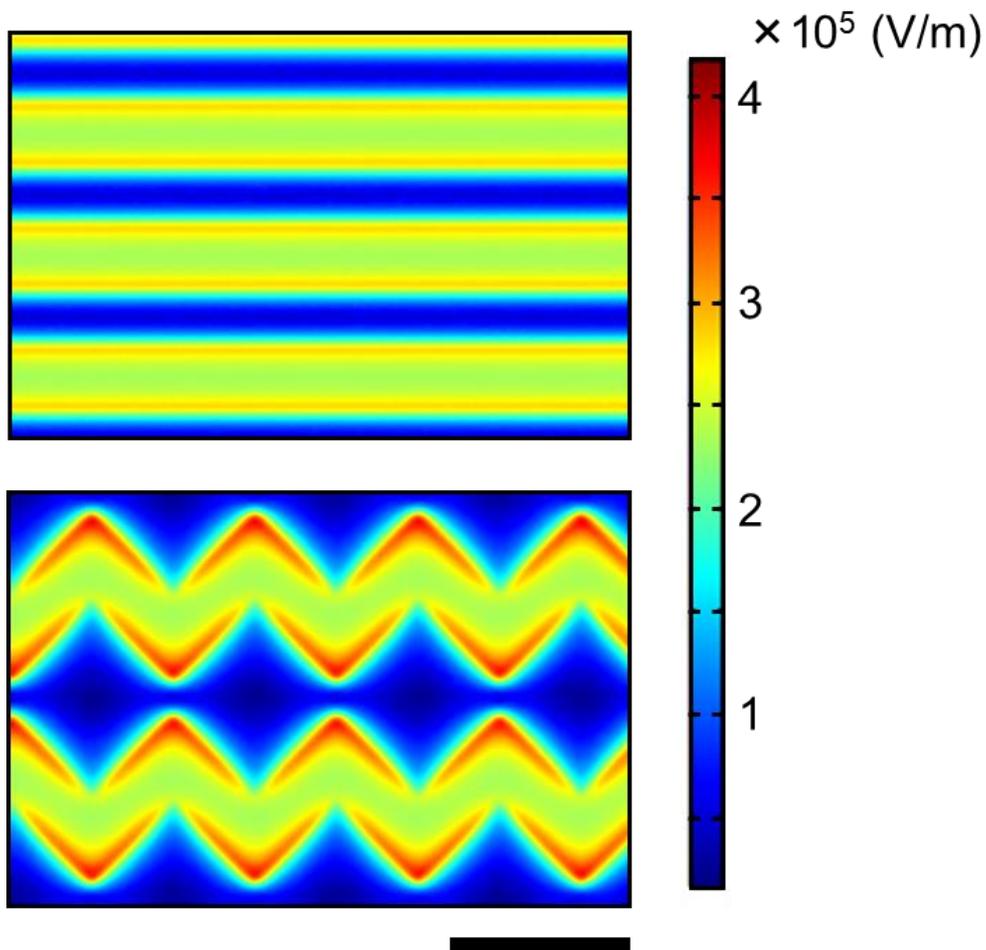


図 2-6 有限要素解析による誘電泳動用の ITO 電極近傍の電場密度分布図.

電場密度は COMSOL Multiphysics を用いてシミュレーションした. 電極部の電圧は  $10 \text{ Vpp}$  として解析をおこない, 本分布図は流路底部から高さ  $4 \mu\text{m}$  地点の電場密度分布を示している. 上段には誘電泳動デバイスで一般的に見られる直線電極の結果を示し, 下段には本研究において用いた鋸型電極の結果を示した. スケールバーの大きさは  $100 \mu\text{m}$  である.

### 2.3.2 誘電泳動デバイスの作製

鋸型電極を有する誘電泳動デバイス作製の際には、UV 光の露光時間を最適化し、ポジティブフォトリソ加工した。フォトマスクを通した UV 光の露光時間によって、現像後にはポジティブフォトリソ加工の電極模様の太さに変化が見られた (図 2-7)。露光時間が長いと鋸型電極が細くなったのは、フォトマスクの鋸型デザイン部真下に漏れた遮光されるはずである UV 光による影響が大きくなったからと考察した。また、4 秒未満の露光時間だと UV 光照射時間が十分でなく、現像後も鋸型電極のデザイン以外の領域にポジティブフォトリソ加工が残ってしまった。本結果から、露光時間は 4 秒間が適切であると考えられた。また、ITO 電極を加工する操作であるエッチング時には、超音波洗浄機の稼働時間によってエッチング液の温度が上昇しエッチング時間が短くなる現象が見られた。図 2-8 の結果より、エッチング時間は 40 °C 未満の温度帯で比較的安定していることがわかり、その後は 40 °C 未満でエッチングをおこなった。

前述した検討を経て、細胞分離用の誘電泳動デバイスを作製した。デバイスのスケール、および写真は図 2-9 に示した。図 2-9A にはデバイス底面に配置される、鋸型に電極が加工された ITO 電極基板を示した。図 2-9B には厚さ 30  $\mu\text{m}$  でスペーサーの役割を担う PET 基材薄手両面テープを、図 2-9A の ITO 電極基板に真上から 2 本貼り付けたデバイスを示した。図 2-9C には流路の位置を視認しやすいように両面テープの上面シールを剥がさずそのまま、上蓋となる ITO 電極が平板状にコートされた無加工の ITO 電極基板を図 2-9B に乗せたときの様子を示した。誘電泳動デバイスの流路部は上下を ITO 電極基板セットで挟まれた領域内の、2 本のスペーサーの間を指す。

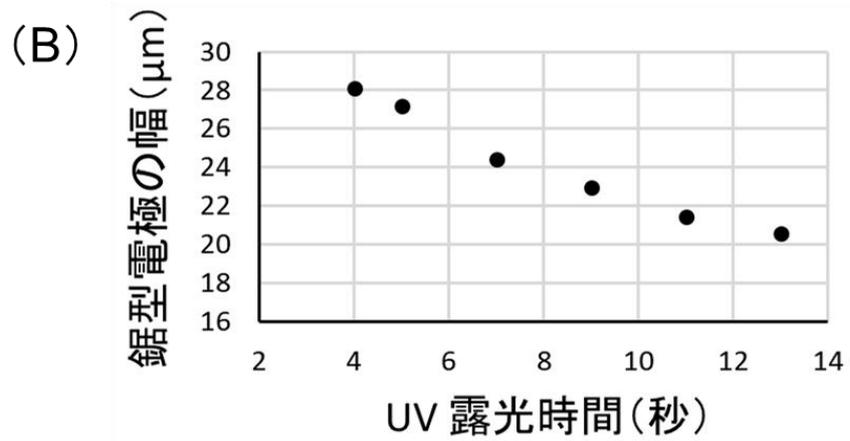
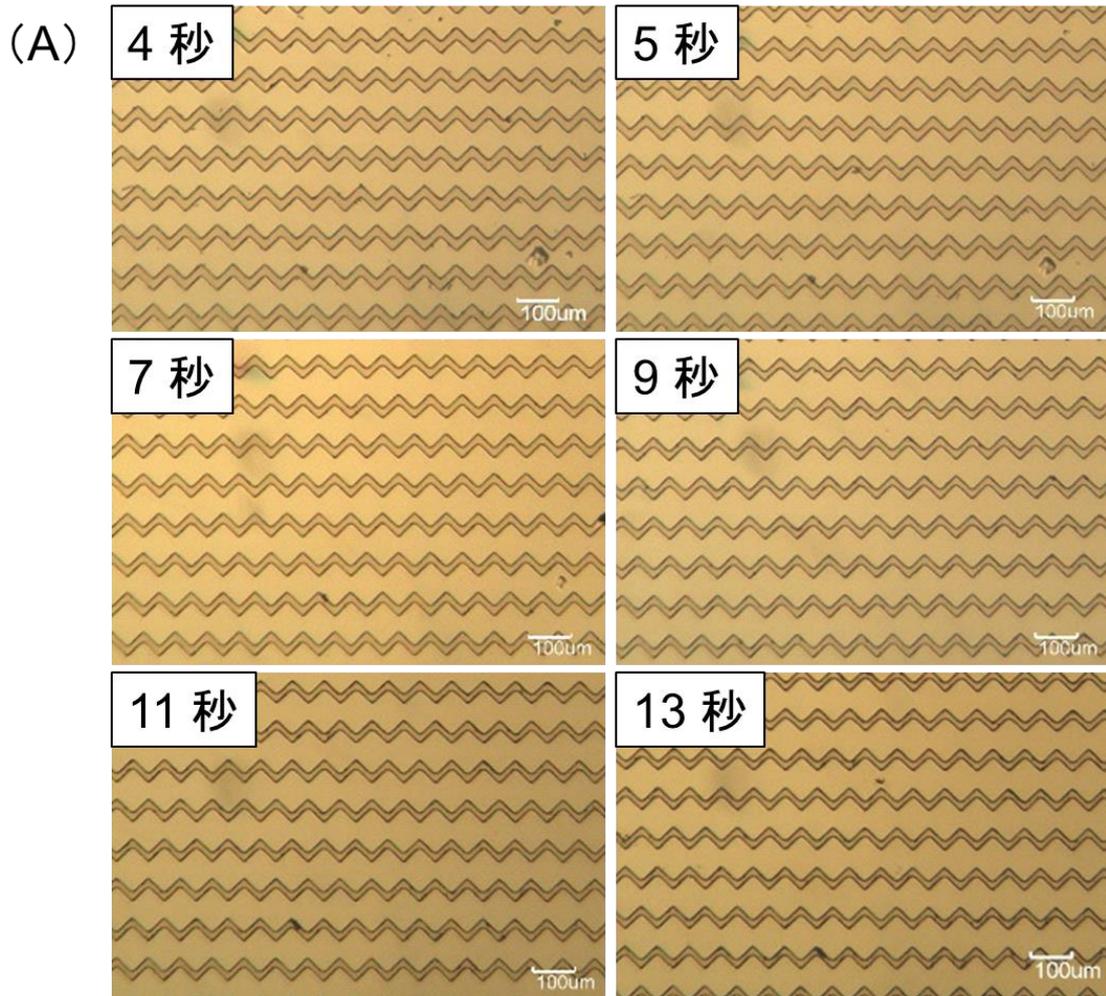


図 2-7 ポジティブフォトリソへの露光時間と現像後の鋸型電極の幅.

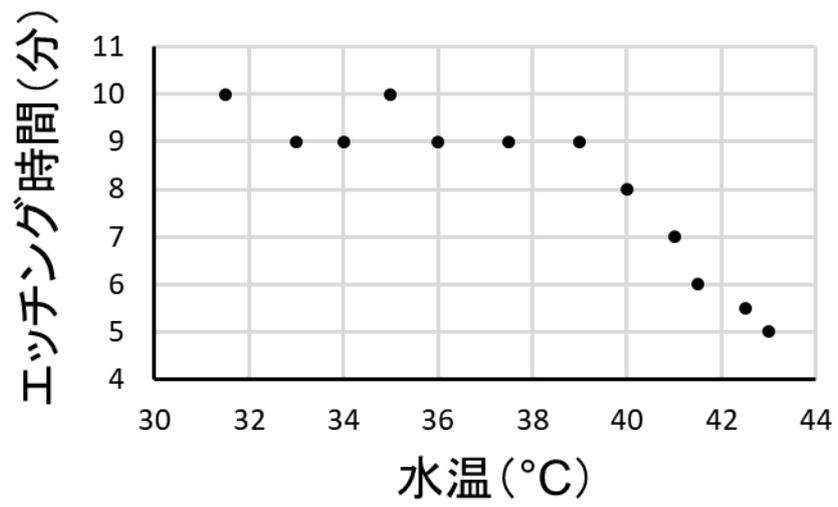


図 2-8 エッチング時の水温とエッチング所要時間.

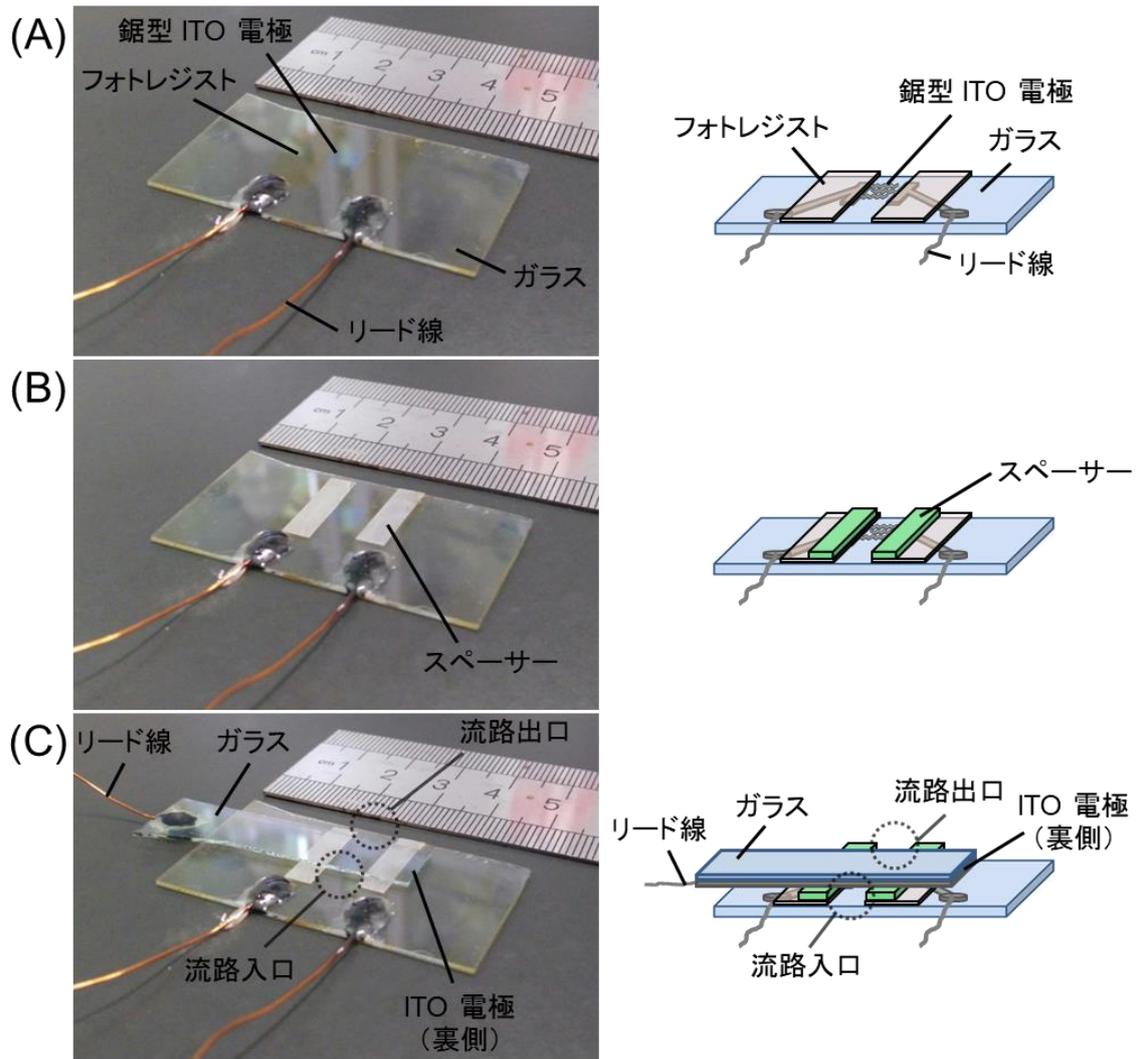


図 2-9 完成した誘電泳動デバイスの写真.

(A) 誘電泳動デバイス底面の鋸型電極を有する ITO 電極基板. フォトレジストは透明で厚みは  $5\ \mu\text{m}$  程度であるため写真では位置の判断が難しい. (B) 厚さ  $30\ \mu\text{m}$  のスペーサー (両面テープ) を (A) に貼り付けたときの誘電泳動デバイス. (C) 流路の位置を視認しやすいようにスペーサー (両面テープ) 上面にあるシールを剥がさずそのまま上蓋となる ITO 電極基板 (B) の上に乗せた時の様子. 誘電泳動デバイスの流路部は上下を ITO 電極基板で挟まれた領域内の, 2 本のスペーサーの間部分を指す.

## 第3章 誘電泳動デバイスを使用した間葉系幹細胞の迅速な分離

### 3.1 緒言

#### 3.1.1 実験の目的

第1章で述べたとおり，再生医療分野において間葉系幹細胞は有用であるが，間葉系幹細胞を分離する技術は選択性が低い点や標識が必須な点で課題がある．したがって，新たな分離技術の開発が非常に重要である．本研究では，間葉系幹細胞を分離するための技術として誘電泳動に注目した．本章では，第2章において独自に設計・作製した間葉系幹細胞分離用の誘電泳動デバイスの性能の評価をおこなうことを目的とした．

骨髄液の中での間葉系幹細胞の存在割合は，年齢によっても前後するが 0.01% ～ 0.1% 程度と言われている．また，前骨髄球はヒトから採取した骨髄液の中で最も存在割合の多い骨髄球系の細胞である（図 3-1）<sup>51</sup>．以上より，本誘電泳動デバイスのデモンストレーションとして骨髄由来のヒト間葉系幹細胞と同由来のヒト前骨髄球の混合液から間葉系幹細胞を分離し，存在割合，濃縮率，回収率を評価した．誘電泳動後には，細胞の生存率と遺伝子発現率の変化を調査した．

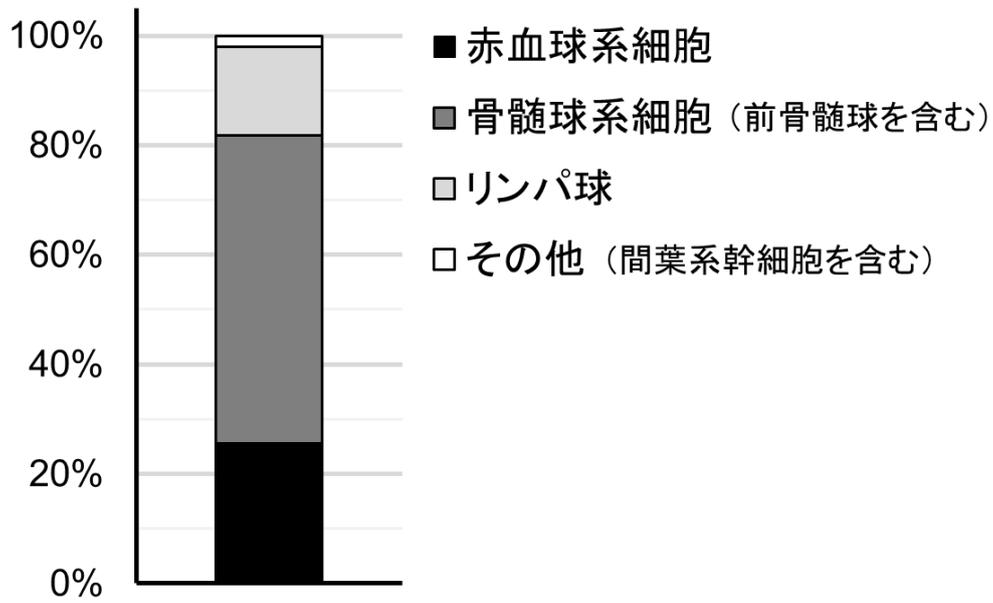


図 3-1 骨髓液中に存在する細胞の比率.

## 3.2 実験方法

### 3.2.1 細胞・試薬・装置

#### 細胞および細胞培養関連試薬

- 0.5% Trypsin-EDTA (10X) (15400-054, Thermo Fisher Scientific Inc., USA)
- 100 mm Non-Treated Dish (1020-100, AGC TECHNO GLASS CO., LTD., Japan)
- 100 mm/Tissue Culture Dish (3020-100, AGC TECHNO GLASS CO., LTD., Japan)
- CELLBANKER® 1 (Nippon Zenyaku Kogyo Co.,Ltd., Japan)
- D-MEM (High Glucose) with L-Glutamine and Phenol Red (044-29765, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Japan)
- Dulbecco's PBS (-) (041-20211, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Japan)
- Fetal Bovine Serum (FB-1061/500, biosera, France)
- PSN (100X) (15640-055, Thermo Fisher Scientific Inc., USA)
- RPMI-1640 (L-グルタミン, フェノールレッド, HEPES 含有) (189-02145, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Japan)
- ヒト骨髄性白血病細胞株 HL-60 (RIKEN Bio-Resource Center, Japan)
- ヒト骨髄由来間葉系幹細胞株 UE7T-13 (Japanese Collection of Research Bioresources, Japan)

#### 電極作製および誘電泳動用材料・試薬

- 2-Propanol (166-04831, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Ltd., Japan)
- Contaminon® AC (031-10381, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Japan)
- ITO 膜付きガラス (スパッタ品) (0006, GEOMATEC Co., Ltd., Japan)
- PET 基材薄手両面テープ (No.5603, NITTO DENKO CO., Japan)
- スクロース (196-00015, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Japan)

- 免疫学的測定用ブロッキング試薬 N102 (NOF CORPORATION., Japan)

#### 生存率評価用試薬

- D-MEM (High Glucose) without L-Glutamine and Phenol Red (040-30095, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Japan)
- Live-Dead Cell Staining Kit (#501-100, BioVision, Inc., USA)

#### Real-time PCR 関連試薬

- ultraAmp PCR Plates FastPlate 96 (38800, Sorenson BioScience, Inc., USA)
- QPCR Adhesive Clear Seals 4ti-0560 (4titude, Ltd., UK)
- ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (FSQ-301, TOYOBO CO., LTD., Japan)
- RNeasy Micro Kit (74004, QIAGEN., Germany)
- THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix (QPS-201, TOYOBO CO., LTD., Japan)

#### 器具・装置・ソフトウェア

- Centrifuges 5424 R (Eppendorf AG, Germany)
- Compact Water Quality Meter (B-771, HORIBA, Ltd., Japan)
- ImageJ (National Institutes of Health, USA)
- NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc., USA)
- StepOne™ Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific Inc., USA)
- Thermal Cycler GeneQ TC-24/H (B) (Biochrom Corp., USA)
- Waveform Generator 33500B Series (AGILENT TECHNOLOGIES, INC., USA)
- アナログテスター CX-03 (CUSTOM corporation, Japan)

- スピンコーター K-359S1 (KYOWA RIKEN CO., LTD., Japan)
- テーブルトップ冷却遠心機 2800 (KUBOTA CORPORATION., Japan)
- ワンセルカウンター (OC-C-S02, Fine Plus International Ltd. Japan)
- 位相差・蛍光顕微鏡 (IX5158F-3, Olympus Corporation, Japan)
- 位相差顕微鏡 (Motic AE31, Shimadzu RIKA Corporation, Japan)
- 純水製造装置 オートスチル WG222 (YAMATO SCIENTIFIC CO., LTD., Japan)
- 真空プラズマ卓上タイプ YHS-R (SAKIGAKE-Semiconductor Co., Ltd., Japan)

### 3.2.2 細胞培養

本研究では、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞と同組織由来の前骨髄球のモデル細胞としてそれぞれヒト骨髄由来間葉系幹細胞株 UE7T-13 とヒト前骨髄性白血病細胞株 HL-60 を使用して実験をおこなった。

UE7T-13 は、D-MEM (High Glucose) with L-Glutamine and Phenol Red (044-29765, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Japan) に Fetal Bovine Serum (S1820-500, biowest, France) を 10%, PSN (100X) (15640-055, Thermo Fisher Scientific Inc., USA) を 1% の割合になるように混合した培地で培養した。培地量は 100 mm/Tissue Culture Dish (3020-100, AGC TECHNO GLASS CO., LTD., Japan) に 10 mL 使用し、4 日に 1 度の頻度で培地交換をおこなった。継代の際には、2 mL の Dulbecco's PBS (-) (041-20211, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Japan) で 2 度洗浄をした後に、0.5% Trypsin-EDTA (10X) (15400-054, Thermo Fisher Scientific Inc., USA) を 10 倍希釈して 0.05% にした Trypsin-EDTA を 1.5 mL 加え、5 分間室温で静置した後、シャーレの底を叩いて剥がした。そして、D-MEM (High Glucose) with L-Glutamine and Phenol Red を Trypsin-EDTA と同量の 1.5 mL 加えて Trypsin-EDTA の働きを阻害し、 $200 \times g$  で 4 分間遠心した後に上澄み液を培地に交換し 100 mm シャーレに、 $4 \times 10^5$  cells/dish となるよう、細胞を播種した。

HL-60 は、RPMI-1640 (L-グルタミン、フェノールレッド、HEPES 含有) (189-02145, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Japan) に Fetal Bovine Serum を 10%, PSN を 1% の割合になるように混合した培地で培養した。培地量は 100 mm Non-Treated Dish (1020-100, AGC TECHNO GLASS CO., LTD., Japan) に 10 mL 使用し、4 日に 1 度の頻度で継代をおこなった。継代の目安として、細胞数が  $1 \times 10^6$  cells/mL 以上の濃度になっていることを判断基準とした。継代の際には、1.5 : 8.5 の割合になるよう細胞培養液と新しい RPMI-1640 (L-グルタミン、フェノールレッド、HEPES 含有) 培地を混合

し、100 mm シャーレ内で培養した。

培養中の UE7T-13 と HL-60 の様子を図 3-2 に示した。両細胞とも、インキュベーター内の条件は 37°C, 5% CO<sub>2</sub> であった。細胞の凍結保存時には CELLBANKER® 1 (Nippon Zenyaku Kogyo Co., Ltd., Japan) を使用し、添付の説明書通りの方法で操作をおこなった。凍結保存溶液内の細胞数は UE7T-13 と HL-60 の両細胞とも約 1 × 10<sup>6</sup> cells/tube になるように調整した。UE7T-13 を凍結状態から起こす際には、1 × 10<sup>6</sup> cells/tube の濃度でストックしてある UE7T-13 を 37°C で温めた 10 mL の培養用 D-MEM 培地で瞬時に溶かし、300 × g で 6 分間遠心した後に上清を新しい培養用 D-MEM 培地に置換し、希釈せずにそのまま 100 mm シャーレに播種した。HL-60 を凍結状態から起こす際には、1 × 10<sup>6</sup> cells/tube の濃度でストックしてある HL-60 を 37°C で温めた 10 mL の培養用 RPMI-1640 培地で瞬時に溶かし、300 × g で 6 分間遠心した後に上清を新しい培養用 RPMI-1640 培地に置換し、希釈せずにそのまま 60 mm シャーレに播種した。HL-60 は、培養を再開してから安定して増殖を始めるまで 2 週間程度の時間を要する。それまでの間は、細胞濃度を高めに維持し Fetal Bovine Serum は通常培養時の 2 倍量を培地に混ぜて使用した。

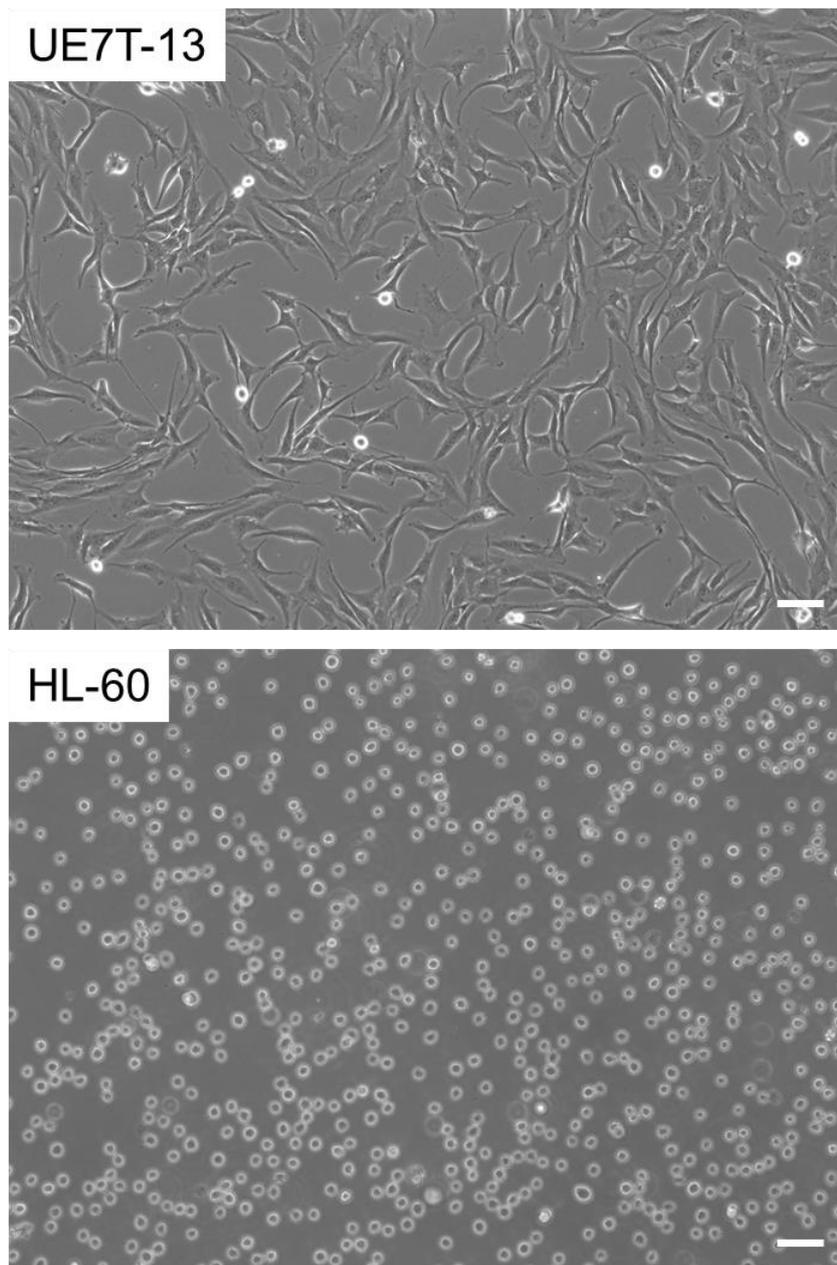


図 3-2 ヒト骨髄由来間葉系幹細胞株 UE7T-13 とヒト前骨髄性白血病細胞株 HL-60 の培養時の顕微鏡画像.

スケールバーは 100  $\mu\text{m}$  である. 本研究では, ヒト骨髄由来間葉系幹細胞と同組織由来の前骨髄球のモデル細胞としてそれぞれヒト骨髄由来間葉系幹細胞株 UE7T-13 (Japanese Collection of Research Bioresources, Japan) とヒト骨髄性白血病細胞株 HL-60 (RIKEN Bio-Resource Center, Japan) を使用して実験をおこなった

### 3.2.3 誘電泳動準備

誘電泳動をおこなう際には、専用の溶液に細胞を懸濁する必要がある。溶液の条件として必要なことは、導電率がなるべく低いこと、細胞との浸透圧差が小さいこと、細胞の生存率に影響しないことが挙げられる。本研究では、誘電泳動中の細胞懸濁溶液としてスクロース (196-00015, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Japan) を純水に溶解して調製した 250 mM のスクロース溶液を使用した。導電率を測定する際には、導電率計 Compact Water Quality Meter (B-771, HORIBA, Ltd., Japan) を使用した。具体的な誘電泳動の方法は後述の通りである。

#### 細胞の準備・導入

ヒト前骨髄性白血病細胞株 HL-60 は浮遊細胞であるため優しくピペッティングをして混合した後に培養していた 100 mm シャーレから直接採取した。UE7T-13 は継代の操作と同じ手順を用いて剥がした。具体的には、100 mm シャーレ内の細胞を 2 mL の PBS (-) で 2 度洗浄し、PBS (-) を綺麗に取り除いた後で 0.05% に希釈した 0.5% Trypsin-EDTA (10X) (15400-054, Thermo Fisher Scientific Inc., USA) を 1.5 mL 加え 5 分間室温において細胞を剥がした。そして、トリプシンの効果を停止させるため培養用 D-MEM 培地を Trypsin-EDTA と同量である 1.5 mL 加え、 $200 \times g$  で 4 分間遠心をおこない上清を取り除いた後、1 mL の誘電泳動用 250 mM スクロース溶液に希釈することで洗浄し、再び  $200 \times g$  で 4 min 遠心をおこない上清を取り除いた。その後、誘電泳動用スクロース溶液を加えて得られた細胞懸濁液をサンプルとした。Compact Water Quality Meter (B-771, HORIBA, Ltd., Japan) を用いて測定した誘電泳動用スクロース溶液の導電率は 0.2 mS/m であった。続いて、流路の壁や床に細胞が付着してしまわないように予め免疫学的測定用ブロッキング試薬 N102 (NOF CORPORATION., Japan) を 5 倍希釈した溶液を誘電泳動デバイスの流路内に流し、約 10 分間室温で静置した。その

後, N102 を流路の出口からキムワイプで吸い取りつつ, 入口から誘電泳動用 250 mM スクロース溶液を流し入れ流路内の溶液を置換した. 最後に, 細胞懸濁液を流し入れた. なお, 組み立て前後の電極デバイス全体の概略図は図 2-3 にて既に記載した.

#### 電圧の印加と細胞の回収

細胞と誘電泳動デバイスの用意ができた後, デバイスの ITO 電極に接続されているリード線に Waveform Generator 33500B Series (AGILENT TECHNOLOGIES, INC., USA) を繋いで交流電圧を印加した. 電圧や周波数は各々の実験項目においてその都度最適条件を検討し使用した. 細胞を誘電泳動デバイスに注入する際や, デバイス内を洗浄する際には, 流路口の片一方からマイクロピペットで溶液を加えつつ, 必要に応じて他方からはみ出た液をマイクロピペットで少しずつ吸い取るという方法を用いた.

### 3.2.4 誘電泳動デバイスにおける細胞の誘電泳動挙動の観察

作製した誘電泳動デバイスにおける UE7T-13 と HL-60 の誘電泳動挙動を個別に調べた。細胞を誘電泳動する際には、どちらの細胞も濃度が  $1 \times 10^7$  cells/mL になるように調製した。測定した周波数条件は、30 k, 50 k, 100 k, 300 k, 500 k, 1 M, 3 M, 5 M, 10 MHz であり、電圧と溶液導電率の条件はそれぞれ 20 V peak-to-peak (Vpp), 0.2 mS/m である。観察に使用したのは、位相差・蛍光顕微鏡 (IX5158F-3, Olympus Corporation, Japan) と位相差顕微鏡 (Motic AE31, Shimadzu RIKKA Corporation, Japan) である。

次に、溶液の導電率と UE7T-13 の誘電泳動挙動にどのような関係性があるのかを、前述した周波数条件と観察条件において調べた。導電率を調整する際には、誘電泳動用溶液である 250 mM のスクロース溶液に Dulbecco's PBS (-) を混合した。また、UE7T-13 の細胞濃度と誘電泳動挙動の関係性についても、同様にして調査した。

続いて、周波数に依存して誘電泳動力が変化することを確認するために、泳動をおこなった時の動画を使用して相対誘電泳動力を以下の式を参考に算出した<sup>52</sup>。

$$F_{DEP} = \frac{2mS}{t^2} \quad (3-1)$$

( $m$  : 粒子の質量,  $S$  : 粒子移動距離,  $t$  : 移動に要した時間)

得られた結果は Tukey-Kramer 法によって統計検定した。

### 3.2.5 誘電泳動デバイスによる間葉系幹細胞の迅速分離

#### 3.2.5.1 誘電泳動による前骨髄球の除去

第 2 章において作製した誘電泳動デバイスを使用して、HL-60 と UE7T-13 の混合液から UE7T-13 を分離しデバイスの能力を評価した。初めに、分離時の状態を判断しやすくするために両細胞をデバイスに注入する前に HL-60 のみ染色した。HL-60 の染色は以下の手順でおこなった。培養中の 100 mm シャーレから培養液を 10 mL 全て取り出し 15 mL 遠心管に入れ、 $200 \times g$  で 4 分間遠心した後に、上清の培地のみを 9 mL 取り除き、残りの 1 mL に細胞を再懸濁した。そして、懸濁液 1 mL に対して染色液を 1  $\mu$ L 入れて室温で 12 分間静置して染色をおこなった。染色液には Live-Dead Cell Staining Kit に含まれる Live-Dye を使用した。HL-60 の染色後に UE7T-13 と混合した際には、UE7T-13 と HL-60 の細胞濃度はそれぞれ  $1 \times 10^7$  cells/mL と  $2 \times 10^7$  cells/mL になるように調製した。UE7T-13 の分離時の周波数条件は、誘電泳動中の UE7T-13 と HL-60 がそれぞれ正の誘電泳動と負の誘電泳動を示すように最適化した。周波数条件を最適化した結果、印加する交流電圧の周波数は 30 kHz に設定した。また、印加した電圧は、5 Vpp であった。分離の際には、まず UE7T-13 と HL-60 の混合懸濁液をデバイスの流路内に注入し、交流電圧を印加して誘電泳動を生じさせて両細胞に正・負の誘電泳動をおこない、誘電泳動を維持しながらマイクロピペットを使って流路中に水流を発生させることで分離をおこなった。分離後の存在割合、濃縮率、回収率は 3 回の実験結果をもとに算出した。分離時の様子は、位相差・蛍光顕微鏡 (IX5158F-3, Olympus Corporation, Japan) および位相差顕微鏡 (Motic AE31, Shimadzu RIKI Corporation, Japan) で観察した。

### 3.2.5.2 プロトプラストモデルを用いる細胞泳動挙動のシミュレーション

3.3.2.1 の結果より、UE7T-13 と HL-60 の混合液から UE7T-13 を分離することに成功した。本実験では、両細胞を分離できた理由を考察するため、プロトプラストモデルを使用し、HL-60 の誘電泳動挙動をシミュレーションした。一般的に、動物細胞は絶縁性の脂質二分子膜に覆われた導電性の細胞質によって多層構造を有しており、電気的に不均一な構造を有している。各層の境界には界面分極 (Maxwell-Wagner 効果) が生じているため、電気的に均一な粒子に比べ泳動挙動のシミュレーションが複雑になる。単体の細胞の誘電泳動挙動をシミュレーションするための方法として、先行研究でしばしば用いられているモデル化方法の 1 つにプロトプラストモデルがある。

プロトプラストは、植物細胞や微生物の細胞壁を特殊な酵素で処理して分解することによって得られる非常に脆弱なバルーン様の粒子である。細胞壁を除去したことにより、プロトプラストは導電性の溶液で充填されている細胞質が極めて薄い絶縁膜 (脂質二分子膜) により被覆された構造となっている。多くの動物細胞はプロトプラストに比べ強度は高いものの、細胞壁を持たずプロトプラストと極めて類似した粒子構造を取るため、動物細胞の誘電泳動現象の解析にはプロトプラストモデルが汎用されている。プロトプラストモデルは厚みのある細胞壁を考慮しないため比較的計算が簡単であり、プロトプラストを均一な粒子に近似した際の粒子の複素誘電率である有効複素誘電率は  $\underline{\epsilon}_p^*$  を以下のように表すことができる<sup>5</sup>。

$$\underline{\epsilon}_p^* = c_m r \left[ \frac{j\omega\tau_c + 1}{j\omega(\tau_m + \tau_c) + 1} \right] \quad \dots (3-2)$$

$$\tau_m = \frac{c_m r}{\sigma_c} \quad \dots (3-3)$$

$$\tau_c = \frac{\epsilon_c}{\sigma_c} \quad \dots (3-4)$$

(各パラメータの意味は、図 3-3 を参照)

膜容量 (membrane capacitance:  $c_m$ ) とは, 細胞外液と細胞内液を絶縁している細胞膜をコンデンサと見立てた時の電気容量を表している. なお, モデル化したプロトプラストが示す誘電泳動挙動の周波数依存性を決定するためには, Clausius-Mossotti factor (CM 因子) と呼ばれる  $K(\omega)$  の実数部分の  $\text{Re}[K(\omega)]$  を求める必要があり,  $K(\omega)$  は以下のように示すことができる<sup>5</sup>.

$$K(\omega) = - \frac{\omega^2(\tau_1\tau_m - \tau_c\tau_m^*) + j\omega(\tau_m^* - \tau_1 - \tau_m) - 1}{\omega^2(\tau_c\tau_m^* + \tau_1\tau_m) - j\omega(\tau_m^* + 2\tau_1 + \tau_m) - 2} \quad \dots (3-5)$$

$$\tau_1 = \frac{\varepsilon_m}{\sigma_m} \quad \dots (3-6)$$

$$\tau_m^* = \frac{c_m r}{\sigma_m} \quad \dots (3-7)$$

(各パラメータの意味は, 図 3-3 を参照)

本研究で使用した UE7T-13 と HL-60 のプロトプラストモデルによる誘電泳動挙動のシミュレーションには, 表 3-1 に示す値を使用した. 接着培養である UE7T-13 は線維芽細胞様の形態をしており, 浮遊細胞である HL-60 は血球系細胞であるため, 両細胞の物性値はそれぞれ先行研究にてヒト非腫瘍形成乳腺上皮細胞株 MCF10A<sup>53-56</sup> とヒト白血病 T リンパ芽球細胞株 Jurkat<sup>53,54</sup> のプロトプラストモデルに使用されていた物性値を参考に設定した. 細胞半径は, UE7T-13 と HL-60 が浮遊している際の顕微鏡画像からオープンソースの画像処理ソフトウェアである ImageJ (National Institutes of Health, USA) を使用して細胞の周囲の長さを 20 細胞分計測し, 半径の平均値を計算することによって求めた. なお, プロトプラストモデルは溶液中に漂う 1 つの細胞に適用できるが, 実際の溶液中にはたくさんの細胞が浮遊しており, 細胞周囲の溶液環境が均質ではないはずである. そこで, 本研究では溶液中の細胞濃度が溶液導電率にどのような影響を及ぼすのか実際に測定し, プロトプラストモデル式に適用した. 回帰直線は最小二乗法を使用して求め, 決定係数  $R^2$  は

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_i (y_i - f_i)^2}{\sum_i (y_i - \bar{y}_i)^2} \quad \dots (3-8)$$

より求めた. ここで  $y_i$ ,  $f_i$ ,  $\bar{y}_i$  はそれぞれ実測値, 回帰直線による推定値, 実測値の平均を表す. 誘電泳動用の細胞懸濁溶液である 250 mM スクロース溶液の導電率は, 導電率計 Compact Water Quality Meter (B-771, HORIBA, Ltd., Japan) を使用して測定し, 真空の誘電率は  $8.85 \times 10^{-12}$  F/m とした.

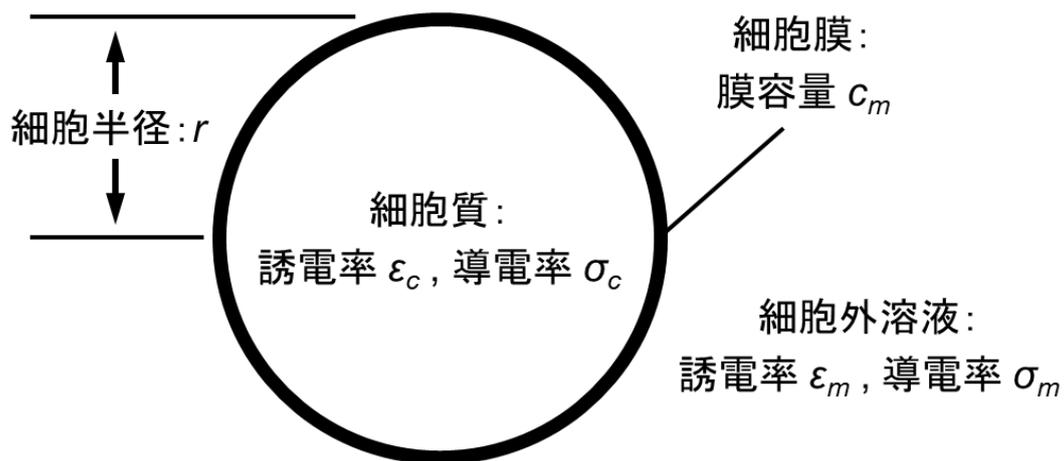


図 3-3 プロトプラストモデルにおける各変数.

表 3-1 プロトプラストモデルによる誘電泳動挙動予測に使用した物性値

対象の細胞	物性値を 参考にした細胞株	細胞半径 ( $\mu\text{m}$ )	細胞膜容量 ( $\text{F}/\text{m}^2$ )	細胞質 比誘電率	細胞質導電率 ( $\text{S}/\text{m}$ )
HL-60	Jurkat	5.65	0.005	67	0.32
UE7T-13	MCF10A	9.12	0.019	60	0.91

### 3.2.5.3 誘電泳動後の細胞培養と Live-Dead 染色

間葉系幹細胞を分離する上で、分離前後に細胞の生存率が変化しないことは重要である。作製した誘電泳動デバイスが UE7T-13 の生死に与える影響を調査するため、正の誘電泳動後の UE7T-13 に対して Live-Dead Cell Staining Kit (#501-100, BioVision, Inc., USA) を用いて生存率を調べた。

生存率の測定は以下の手順でおこなった。自作した誘電泳動デバイス上で間葉系幹細胞を分離するのに必要な時間である 5 分間の正の誘電泳動を UE7T-13 に対しておこなった。周波数、電圧条件はそれぞれ 100 kHz, 7.5 Vpp とした。続いて細胞懸濁液を少しずつ 250 mM スクロース溶液から D-MEM (High Glucose) with L-Glutamine and Phenol Red (044-29765, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Japan) 培地に置換した。その後、デバイスを 100 mm ディッシュに満たした D-MEM 培地に浸し 2 時間 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 濃度のインキュベータ内で細胞を伸展させた。細胞が増殖を始めてしまうと正確な生存率を評価することが難しくなるため、細胞の伸展が終わった直後であるインキュベート 2 時間後に Live-Dead 染色をおこなった。染色時は、キット中の Solution A (1 mM Live-Dye) と Solution B (1mg/mL PI) の終濃度がそれぞれ 1 μL/mL になるように D-MEM (High Glucose) without L-Glutamine and Phenol Red (040-30095, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Japan) に加えた溶液を誘電泳動デバイスの流路中に満たし、15 分間室温でインキュベートした。細胞の生存率は、

$$1 - \frac{\text{インキュベート後に Live - Dead 染色した際に死んでいた細胞数}}{\text{インキュベート直前に観察した細胞数}}$$

を計算して求めた。染色結果は位相差・蛍光顕微鏡 (IX5158F-3, Olympus Corporation, Japan) で観察した。

次に、長時間の誘電泳動が細胞に与える影響を調査するため、UE7T-13 のみを使用して 1 時間の正の誘電泳動後の生存率を同様にして確認した。UE7T-13 が正の誘電泳

動挙動を示し鋸型電極のラインの上に細胞が集まるように周波数、電圧条件はそれぞれ 250 kHz, 20 Vpp とした。UE7T-13 の懸濁液は、誘電泳動用溶液である 250 mM スクロース溶液中に Live-Dead Cell Staining Kit の Solution A (1 mM Live-Dye) と Solution B (1mg/mL PI) の終濃度がそれぞれ 1  $\mu$ L/mL になるように混合した溶液を使用した。サンプルは、1.5 mL エッペンチューブの中で静置したもの、デバイスに流し入れ誘電泳動をおこなわなかったもの、デバイスに流し入れ誘電泳動をおこなったものの 3 つの条件に分け、各条件は 1 時間維持した。その後、染色結果は位相差・蛍光顕微鏡 (IX5158F-3, Olympus Corporation, Japan) で観察した。本実験では、全て 3 回の試行をもとに評価をおこなった。

#### 3.2.5.4 Real-time PCR を用いる遺伝子発現量の評価

間葉系幹細胞を分離する上で、分離前後に細胞の性質は変化しないことが望ましい。作製したデバイス内における誘電泳動が UE7T-13 の遺伝子発現量に与える影響を、real-time PCR を用いて調査した。初めに、細胞の分離に必要な時間である 5 分間、30 kHz（負の誘電泳動）と 250 kHz（正の誘電泳動）の周波数で 10 Vpp の交流電圧を使用して誘電泳動をおこなった。また、長時間の誘電泳動が遺伝子発現量に与える影響も調べるため、1 時間、250 kHz（正の誘電泳動）の周波数で 20 Vpp の交流電圧を使用して誘電泳動をおこなったサンプルも用意した。評価に使用したサンプルは、いずれも誘電泳動用溶液として 250 mM スクロース溶液を使用した。

#### プライマーの設計

実験に使用した real-time PCR 用のプライマーは、National Center for Biotechnology Information (NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) で公開されている塩基配列情報を元に設計した。本実験で用いた遺伝子のプライマー配列情報と参考にしたデータベースへの Accession No. は表 3-2 に示した。プライマー設計の際には、ゲノム DNA のコンタミネーションによる遺伝子の非特異増幅を防ぐため、増幅予定の配列が可能な限りイントロン部分をまたぐように設定し、オンライン上のプライマー設計ソフト Primer3web (<http://bioinfo.ut.ee/primer3/>) を用いて候補配列を列挙した。ソフトウェア上のプライマー配列選抜に関する条件設定には、市販の参考書を参考にした<sup>55</sup>。候補配列の絞り込みには、NCBI が提供する Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) を使用してターゲット以外の配列に非特異結合しないかどうかを検討した。本実験で遺伝子発現量を評価した遺伝子は、runt-related transcription factor 2 (*RUNX2*)、peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (*PPAR $\gamma$* )、nestin (*NES*)、adhesion G protein-coupled receptor E5 (*ADGRE5*) の 4 つの遺伝子であり、それぞれ骨芽細胞分化マーカー、脂肪細胞分

化マーカー, 神経細胞分化マーカー, 物理刺激応答遺伝子として用意した.

## RNA 抽出

誘電泳動後の細胞の RNA 抽出には RNeasy Micro Kit (74004, QIAGEN., Germany) を使用し, 抽出操作はキットのプロトコルに従って次のようにおこなった. まず, マイクロピペットを使用して誘電泳動デバイスから回収した細胞懸濁液に RNeasy Micro Kit 中の Buffer RLT 75  $\mu$ L を加え, 細胞を効率よく破碎するために 1 分間ボルテックスによってホモジナイズした. 次に, エタノールを蒸留水で希釈し調製した 70% エタノールを, Buffer RLT と同容量の 75  $\mu$ L ライセートに添加しピペットでよく混和した. そして形成した沈殿物を含むサンプル全てを素早くキット付属の RNeasy MinElute Spin Column にアプライし, Centrifuges 5424 R (Eppendorf AG, Germany) で 10000 rpm, 15 秒以上遠心してろ液を捨てた. 続いて, 700  $\mu$ L のキット付属 Buffer RW1 を添加して 10000 rpm で 15 秒遠心操作し, ろ液とコレクションチューブを捨てた. その後 RNeasy MinElute Spin Column を新しい 2 mL コレクションチューブにセットし, Buffer RPE 500  $\mu$ L を添加してから 10000 rpm で 15 秒間遠心した. 次に, RNeasy MinElute Spin Column に RNase フリー水でエタノールを希釈して調製した 80% エタノールを 500  $\mu$ L 加え, 10000 rpm で 2 分間遠心した. 遠心が終わったら, RNeasy MinElute Spin Column を新しい 2 mL コレクションチューブにセットし, スピнкаラムの蓋を開けた状態を保ったまま 15000 rpm で 5 分間遠心し乾燥させた. 最後に, RNeasy MinElute Spin Column を新しい 1.5 mL コレクションチューブにセットし, RNase フリー水 14  $\mu$ L をスピнкаラム・メンブレンの中央に直接添加し, 15000 rpm で 1 分間遠心し, ろ液である RNA 溶液を回収した. 回収した RNA 溶液の濃度は NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) にて測定した. 測定の際には, NanoDrop 2000 付属のソフトウェアを用いて値を算出し Abs260/Abs280 の値によって RNA の純度・品質が十分に

あると判断した.

### cDNA 逆転写

抽出した RNA 溶液の濃度を任意に希釈した後, RNA をテンプレートとする cDNA の逆転写反応をおこなった. 使用したキットは, ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (FSQ-301, TOYOBO CO., LTD., Japan) であり, 操作は付属のプロトコルに従い次のようにおこなった. まず, 対象の RNA 溶液を Thermal Cycler GeneQ TC-24/H (B) (Biochrom Corp., USA) で 65°C まで加熱し 5 分間静置した後氷上にて急冷し, RNA の高次構造形成を抑制した. 続いて, 6  $\mu$ L の RNA 溶液に対してキット付属の 4 $\times$ DN Master Mix (gDNA Remover 添加済み) を 2  $\mu$ L 加えた後, Thermal Cycler GeneQ TC-24/H (B) を使って 37°C で 5 分間インキュベートすることでゲノム DNA を選択的に分解した. 最後に, 5 $\times$ RT Master Mix II を 2  $\mu$ L 加え, サーマルサイクラーを使用し 37°C で 15 分, 50°C で 5 分, 98°C で 5 分間の温度条件で逆転写反応を進行させた.

### Real-time PCR

Real-time PCR の基本的な操作は THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix (QPS-201, TOYOBO CO., LTD., Japan) 付属のプロトコル通りにおこなった. 初めに, 滅菌水 5.6  $\mu$ L/well, THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix 10  $\mu$ L/well, 50 $\times$ ROX reference dye 0.4  $\mu$ L/well を, 96 well plate 上の使用 well 数よりも多めの量で調製しマスターミックスとした. 続いて, マスターミックスをプライマーの数だけ分注し, 各チューブに 6  $\mu$ M のフォワードプライマーとリバースプライマーをそれぞれ 1  $\mu$ L/well になるように加えた. その後, 調製した溶液を ultraAmp PCR Plates FastPlate 96 (38800, Sorenson BioScience, Inc., USA) の 96 well の中に 18  $\mu$ L/well となるようアプライし, 各 well に 0.5 ng/ $\mu$ L の

cDNA テンプレートを 2  $\mu\text{L}$  ずつ加え、反応液が計 20  $\mu\text{L}/\text{well}$  になるよう調製した。続いて、96 well のプレートの上から隙間ができないよう注意深く QPCR Adhesive Clear Seals 4ti-0560 (4titude, Ltd., UK) を用いてシーリングした後、StepOne™ Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) に挿入して PCR 反応中の蛍光強度測定をおこなった。PCR 反応時の条件は、初めに 95°C の温度を 10 分間保った後、95°C で 15 秒、60°C で 1 分の核酸伸長反応を 40 サイクルおこなった。さらに、PCR 反応後に増幅産物の融解曲線を作成するために 15 秒間 95°C にした後 60°C を 1 分間保ち、温度を徐々に 95°C まで上昇させるという工程を加えた。得られた real-time PCR 結果の解析は、StepOnePlus™ 付属のソフトウェアを用いて相対定量法の 1 種である  $\Delta\Delta\text{Ct}$  法を利用して計算した。統計検定には、Tukey-Kramer 法を使用した。

表 3-2 使用したプライマー配列と Accession No. の一覧

遺伝子名	プライマー配列	Accession No.
<i>RUNX2</i>	(F) CACTGGCGCTGCAACAAGA	NM_001278478
	(R) CATGACAGTAACCCACAGTCCCATC	NM_001015051 NM_001024630
<i>PPAR<math>\gamma</math></i>	(F) CAAGAAGACGGAGACAGACATGAG	NM_138712 NM_015869
	(R) ACTGGAAGAAGGGAAATGTTGG	NM_138711 NM_005037
<i>NES</i>	(F) CAACGTACACCCCGATCCT	NM_006617
	(R) AGAACCCAACTCCTCCTGCTC	
<i>ADGRE5</i>	(F) TGTGGTGC GCGTGTTCCAA	NM_001784
	(R) TGCTCAAAGTCCAACCAGCAGTATC	
<i>GAPDH</i>	(F) AGCAAGAGCACAAAGAGGAAGAGA	NM_002046 NM_001289745
	(R) GAGGGGAGATTCAGTGTGGTG	NM_001289746 NM_001256799

### 3.3 結果と考察

#### 3.3.1 誘電泳動デバイスにおける細胞の誘電泳動挙動の観察

図 3-4 には、作製した誘電泳動デバイス内で様々な周波数において実際に HL-60 と UE7T-13 を個別に泳動した時の様子を示し、表 3-3 にはその結果をまとめた。本観察結果から、HL-60 は 100 kHz から 300 kHz の間に誘電泳動挙動が負から正に移り変わり、UE7T-13 は 50 kHz から 100 kHz の間に誘電泳動挙動が負から正に移り変わったことがわかった。以上より、両細胞の泳動挙動は同じ周波数で誘電泳動をおこなった条件でも異なっていることがわかった。

次に、溶液の導電率と UE7T-13 の誘電泳動挙動にどのような関係性があるのかを、前述した周波数条件と観察条件を使用して調べた結果を表 3-4 に示した。表 3-4 より、誘電泳動溶液の導電率が高くなると、負の誘電泳動がより高い周波数帯で観察されるようになった。なお、導電率が 30 mS/m を超えると細胞の泳動挙動は極端に遅くなった。また、UE7T-13 の細胞濃度と誘電泳動挙動の関係性に関して調査した結果を表 3-5 に示した。表 3-5 より、誘電泳動溶液中の細胞濃度が高くなると、負の誘電泳動がより高い周波数帯で観察されるようになった。

続いて、誘電泳動時の動画から算出された UE7T-13 の様々な周波数時における誘電泳動力を 図 3-5 に示した。本結果より、周波数は低周波数側から 1000 kHz に近づくに連れ相対誘電泳動力が高くなり、10 MHz になると再び低くなる性質があることがわかった。

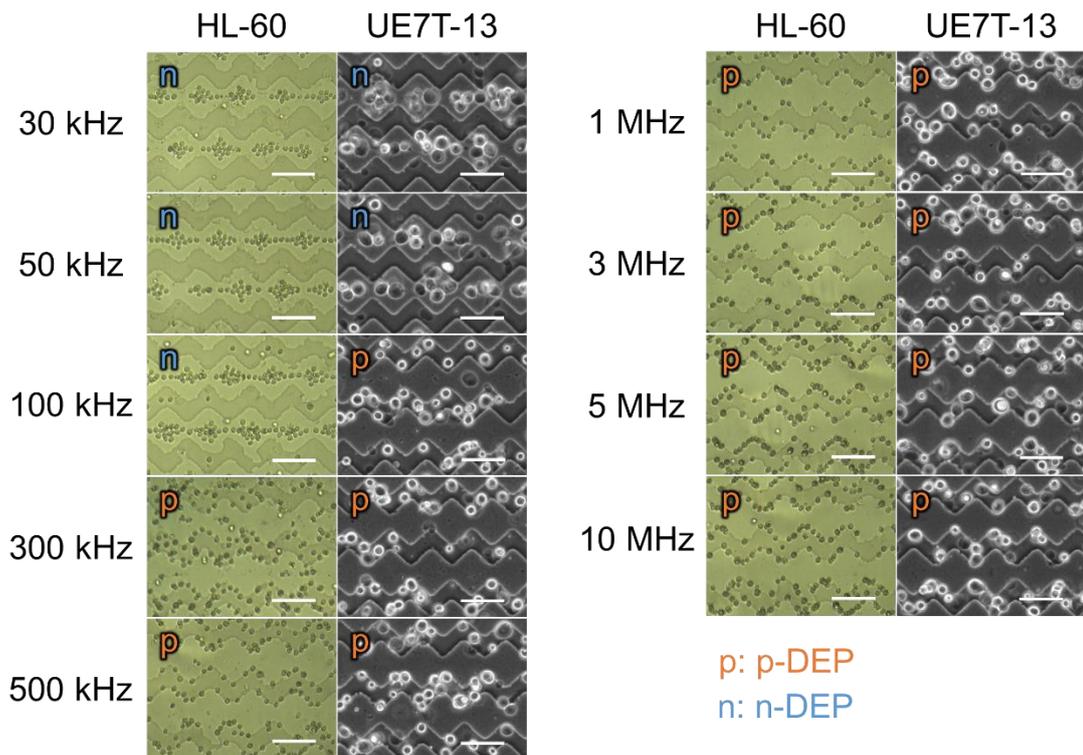


図 3-4 様々な周波数における HL-60 と UE7T-13 の泳動の様子。

100 kHz の周波数において、HL-60 と UE7T-13 は異なる誘電泳動挙動を示した。使用した電圧は 20 Vpp であり、スケールバーは 100  $\mu\text{m}$  である。

表 3-3 様々な周波数における HL-60 と UE7T-13 の泳動挙動 (20 Vpp)。

細胞種	周波数 (Hz)								
	30 k	50 k	100 k	300 k	500 k	1 M	3 M	5 M	10 M
UE7T-13	負	負	正	正	正	正	正	正	正
HL-60	負	負	負	正	正	正	正	正	正

負：負の誘電泳動，正：正の誘電泳動。

表 3-4 溶液の導電率と UE7T-13 の誘電泳動挙動 (電圧: 20 Vpp, 細胞濃度:  $1 \times 10^7$  cells/mL).

溶液導電率 (mS/m)	周波数 (Hz)								
	30 k	50 k	100 k	300 k	500 k	1 M	3 M	5 M	10 M
1	負	負	正	正	正	正	正	正	正
15	負	負	—	正	正	正	正	正	正
30	負	負	負	—	正	正	正	正	正

負: 負の誘電泳動, 正: 正の誘電泳動, —: 正負のどちらでもない場合.

表 3-5 UE7T-13 の細胞濃度と誘電泳動挙動 (電圧: 20 Vpp, 溶液導電率: 0.2 mS/m).

細胞濃度 (cells/mL)	周波数 (Hz)								
	30 k	50 k	100 k	300 k	500 k	1 M	3 M	5 M	10 M
$2.5 \times 10^6$	負	—	正	正	正	正	正	正	正
$1 \times 10^7$	負	負	正	正	正	正	正	正	正
$2 \times 10^7$	負	負	—	正	正	正	正	正	正
$4 \times 10^7$	負	負	負	—	正	正	正	正	正

負: 負の誘電泳動, 正: 正の誘電泳動, —: 正負のどちらでもない場合.

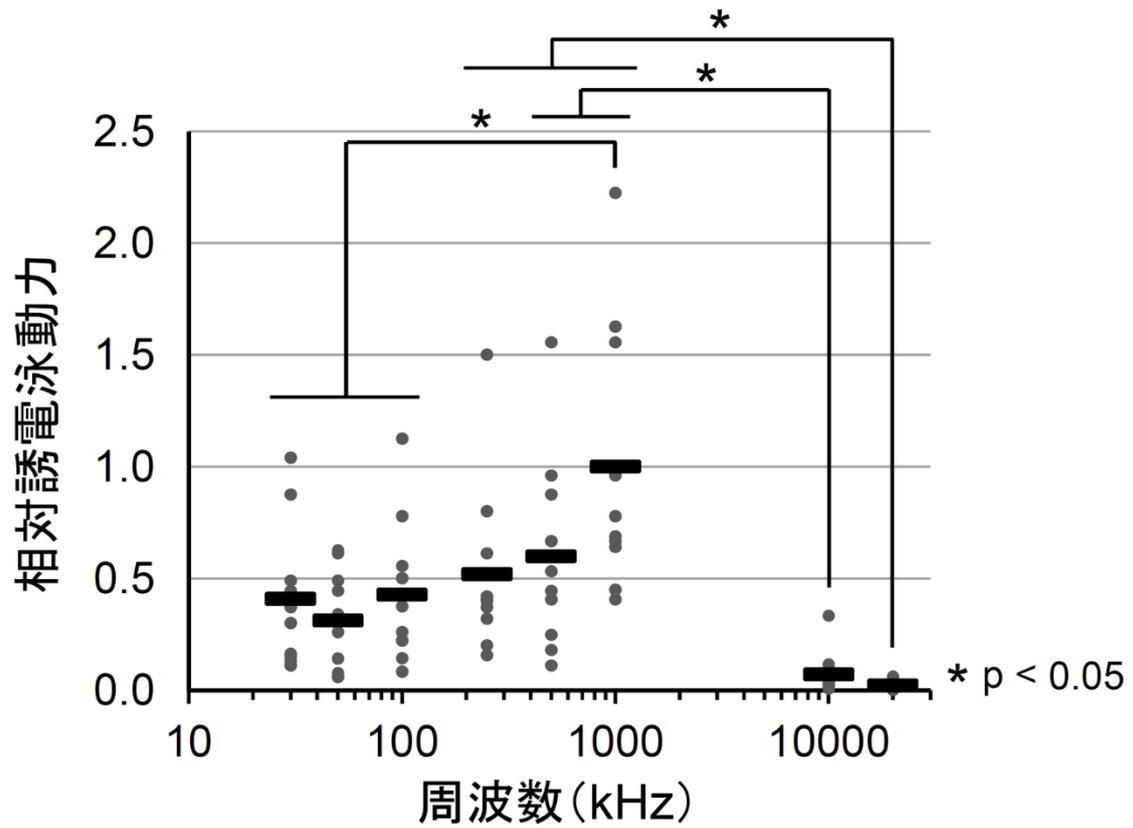


図 3-5 様々な周波数における UE7T-13 の相対誘電泳動力.

### 3.3.2 誘電泳動デバイスによる間葉系幹細胞の迅速分離

#### 3.3.2.1 細胞分離後の細胞の存在割合，濃縮率，回収率の評価

本研究で作製した間葉系幹細胞分離用の誘電泳動デバイスの性能を評価するため，ヒト骨髄由来間葉系幹細胞と同組織由来の前骨髄球のモデル細胞としてそれぞれヒト骨髄由来間葉系幹細胞株 UE7T-13 とヒト前骨髄性白血病細胞株 HL-60 を使用して誘電泳動実験をおこなった．まず，UE7T-13 と HL-60 の混合細胞溶液を流路に流し，静置させた時の様子を図 3-6A に示す．続いて，細胞の混合溶液の入ったデバイスに電圧を印加し UE7T-13，HL-60 にそれぞれ正の誘電泳動，負の誘電泳動をかけた時の様子が図 3-6B である．比較的細胞サイズが大きい UE7T-13 が鋸型電極上に多く集まっているのに対し，比較的細胞サイズが小さく緑色に蛍光染色された HL-60 は鋸型電極の間に集まっていることが分かる．図 3-6C には，誘電泳動を維持した状態のまま，デバイス内に水流を加え負の誘電泳動がかかっている HL-60 のみを選択的に流路外へ流し出し UE7T-13 を分離した時の様子を示した．細胞を流路内に導入してから分離が終わるまでの時間はおよそ 5 分程度であり，細胞をデバイスに注入する前の細胞懸濁液の置換を含めた全行程も 40 分以内に完了することができた．本分離を 3 度おこない解析した結果，分離前の UE7T-13 の存在割合が 33.3 % であったのに対し，分離後の UE7T-13 の存在割合は  $83.5 \pm 7.1\%$  に高められた(図 3-7)．なお，(分離後の存在割合) / (分離前の存在割合) の計算によって算出した濃縮率は 2.3 倍であった．また，UE7T-13 の回収率は  $29.1 \pm 4.1\%$  であった．

分離時に使用した 30 kHz の周波数は，3.3.1 で UE7T-13 と HL-60 に対して個別に誘電泳動挙動の確認をしたときに両細胞が異なる泳動挙動を示していた 100 kHz の周波数と異なっていた．溶液条件が同様であったにも関わらず UE7T-13 の泳動結果に違いが生じた原因は，細胞泳動挙動観察時には印加した電圧が分離実験時に比べ高かったために交流電気運動流 (AC electro-kinetic flow) が生じ，泳動結果に影響していた可能

性がある<sup>56,57</sup>.

本誘電泳動デバイスでは、分離後の UE7T-13 の存在割合を高めることに成功したが、UE7T-13 の回収率は  $29.1 \pm 4.1\%$  であり、回収率を上げることが課題となっている。現在、本デバイスへの細胞と溶液の導入は、マイクロピペットを用いて手動でおこなっている。そのため、分離操作において負の誘電泳動が生じている HL-60 と一緒に一部の UE7T-13 も流路外に流れ出てしまっている。今後、本デバイスでは、ポリジメチルシロキサン (Polydimethylsiloxane: PDMS) を使用した流路を組み込みシリンジポンプによる精密な送液をおこなうことで UE7T-13 の回収率を改善できる可能性がある。

実際に骨髓から抽出する骨髓液には赤血球系の細胞、リンパ球系の細胞、造血幹細胞、骨髓脂肪組織、支持性間質細胞などのたくさんの種類の細胞が含まれていることが想定される。したがって、1 度の誘電泳動では目的の間葉系幹細胞を分離できない可能性がある。しかし、周波数条件を最適化し誘電泳動を複数回に渡っておこなうことで、実際の生体サンプルを想定とした複数細胞種の混合液からの単一細胞分離も可能であると考えている。また、臨床で使用される密度勾配遠心分離法は細胞のサイズや密度によって細胞を分離するのに対し、誘電泳動は細胞の膜容量などの電氣的な性質による分離基準を有しているため、密度勾配遠心分離法と組み合わせて使用することで、より高い分離効率が実現できる可能性がある。

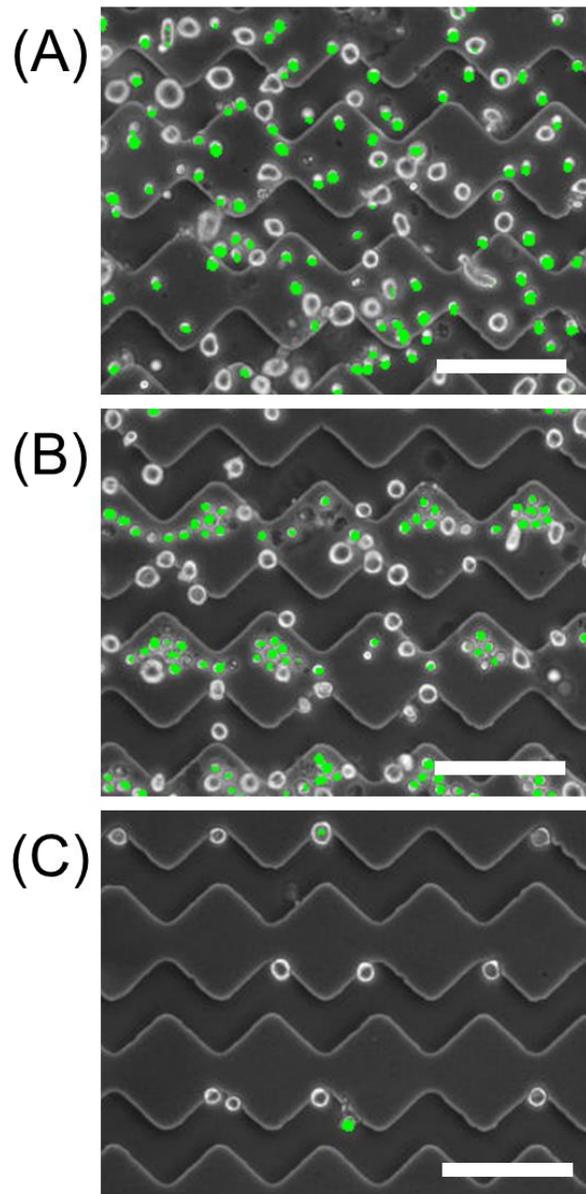


図 3-6 UE7T-13 と HL-60 の細胞混合溶液から UE7T-13 を分離した時の様子.

(A) UE7T-13 と HL-60 の細胞混合溶液を流路に流し、静置したときの様子. (B) 細胞混合溶液に 30 kHz で誘電泳動したときの様子. (C) 負の誘電泳動がかかっている HL-60 を選択的に流路外へ流し出し UE7T-13 を分離したときの様子. 誘電泳動条件は、5 Vpp であった. 細胞の判断を容易にするため HL-60 のみに緑色蛍光染色をおこなった. スケールバーは 100  $\mu\text{m}$  である.

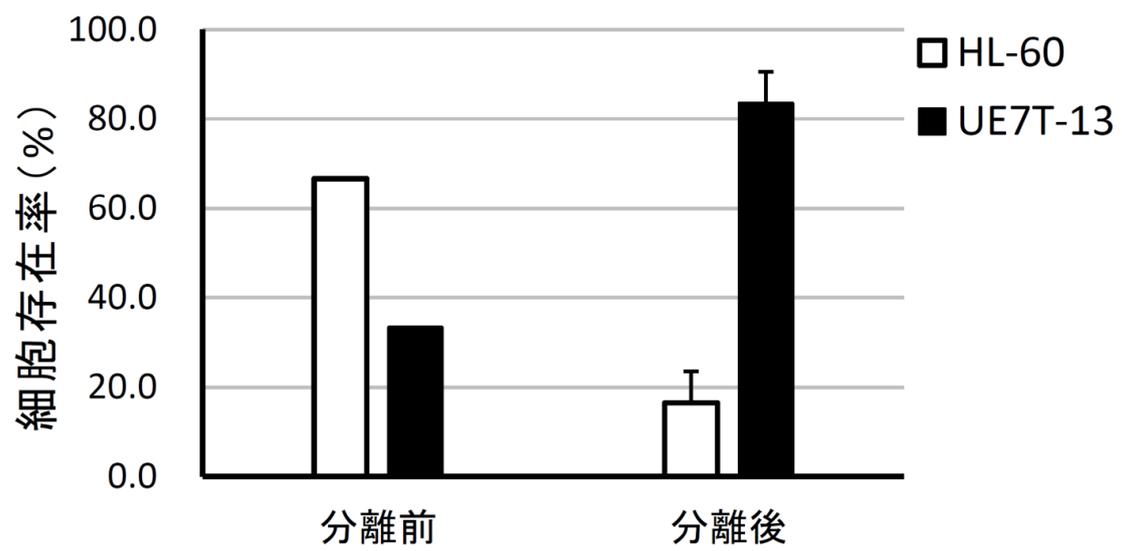


図 3-7 誘電泳動デバイスによる分離前後の UE7T-13 と HL-60 の存在率.

### 3.3.2.2 プロトプラストモデルを用いる細胞泳動挙動の考察

3.3.2.1 では、UE7T-13 と HL-60 の混合液から UE7T-13 を分離することに成功した。本実験では、両細胞を分離できた理由を考察するため、プロトプラストモデルを使用して UE7T-13 と HL-60 の誘電泳動挙動をシミュレーションした。プロトプラストモデルは溶液中に漂う単体の細胞に対して適用できるが、実際の溶液中には多くの細胞が浮遊しており、細胞濃度に依存して溶媒の電気的特性が変化する可能性が高いため、プロトプラストモデルの式 (3-6, 3-7) の溶液導電率  $\sigma_m$  の補正が必要であると考えた。そこで、本研究では誘電泳動用のスクロース溶液中の細胞濃度が溶液導電率にどのように影響するか導電率計を使用して実際に測定した (図 3-8)。その結果、UE7T-13 と HL-60 の懸濁液の導電率は細胞濃度の上昇によって増大し、それぞれ図 3-8 に示す線形近似式で表されることがわかった。以上の結果をもとに、本実験系における細胞濃度条件をプロトプラストモデルに適用した。以下のシミュレーション結果では、両細胞とも  $1 \times 10^7$  cells/mL の細胞濃度に設定し、UE7T-13 と HL-60 の導電率はそれぞれ図 3-8 に示した  $y = 1 \times 10^{-6} x + 1.3196$  と  $y = 2 \times 10^{-6} x + 0.6087$  に代入することで、11.32 mS/m, 2.61 mS/m として算出された。

3.2.5.2 で述べたとおり、プロトプラストモデルを用いた時の Clausius-Mossotti factor (CM 因子) である  $K(\omega)$  は以下のように表すことができる。

$$K(\omega) = -\frac{\omega^2(\tau_1\tau_m - \tau_c\tau_m^*) + j\omega(\tau_m^* - \tau_1 - \tau_m) - 1}{\omega^2(\tau_c\tau_m^* + \tau_1\tau_m) - j\omega(\tau_m^* + 2\tau_1 + \tau_m) - 2} \quad \dots (3-5)$$

$$\tau_1 = \frac{\varepsilon_m}{\sigma_m} \quad \dots (3-6)$$

$$\tau_m^* = \frac{cm^r}{\sigma_m} \quad \dots (3-7)$$

(各パラメータの意味は、図 33 を参照)

CM 因子の実部である  $\text{Re}[K(\omega)]$  は、誘電泳動力の式の中で誘電泳動の方向性を決める

上で特に重要な指標であり、正の値をとるとき粒子は正の誘電泳動、負の値をとるとき粒子は負の誘電泳動を示す。図 3-9 には、UE7T-13 と HL-60 のプロトプラストモデルの計算結果より、CM 因子と各周波数の関係性をグラフ化したものを示した。図 3-9 においてわかることは、本研究で取り扱った UE7T-13 と HL-60 は、低周波数帯では負の誘電泳動を示し、周波数が高くなるにつれ正の誘電泳動に切り替わるが、さらに周波数が上がると再び高周波数帯で負の誘電泳動を示すという傾向である。したがって、HL-60 はプロトプラストモデルを使用して今回計算をおこなった周波数の範囲内では、2 度正と負の誘電泳動が切り替わるポイントを有していると言える。誘電泳動の正負が切り替わる周波数を交差周波数と呼ぶ。以後、低周波数帯と高周波数帯の交差周波数をそれぞれ交差周波数（低）、交差周波数（高）と称する。3.3.2.1 の結果から、本実験で UE7T-13 と HL-60 を分離できたのは、交差周波数（低）の周波数の違いを利用したからであると考えられる。なぜなら、周波数が高くなるにつれて負の誘電泳動から正の誘電泳動に変わる交差周波数で分離をおこなったからである。

HL-60 のシミュレーションに使用した変数である溶液導電率、膜容量、細胞質誘電率、溶液誘電率、細胞質導電率、細胞半径がそれぞれ増減したときにどのような泳動挙動の変化が生じるかを確認し、図 3-10 ～ 図 3-15 に示した。図 3-10 には、HL-60 のプロトプラストモデルにおいて計算結果中の溶液導電率を増加もしくは減少させた場合の CM 因子を各周波数でグラフ化したものを示した。図 3-10 からは、細胞をとりまく溶液の導電率が 10 倍高くなると交差周波数（低）が高くなり、CM 因子の最大値がわずかに減少することが分かり、導電率が 10 倍低くなると交差周波数（低）が低くなることがわかった。図 3-11 には、HL-60 のプロトプラストモデルにおいて計算結果中の細胞の膜容量を増加もしくは減少させた場合の CM 因子を各周波数でグラフ化したものを示した。図 3-11 からは、細胞の膜容量が 10 倍高くなると交差周波数（低）が低くなり CM 因子の最大値がわずかに上昇することがわかった。また、膜容量が 10

倍低くなると交差周波数（低）が高くなり CM 因子の最大値が低下することがわかった。図 3-12 には、HL-60 のプロトプラストモデルにおいて計算結果中の細胞質誘電率を増加もしくは減少させた場合の CM 因子を各周波数でグラフ化したものを示した。図 3-12 からは、細胞質誘電率が 10 高くなると交差周波数（高）がわずかに高くなり高周波数帯での CM 因子が 0 に近づくことがわかった。一方で細胞質誘電率が 10 低くなると交差周波数（高）がわずかに低くなり高周波数帯での CM 因子がより小さくなることがわかった。図 3-13 には、HL-60 のプロトプラストモデルにおいて計算結果中の溶液誘電率を増加もしくは減少させた場合の CM 因子を各周波数でグラフ化したものを示した。図 3-13 からは、溶液誘電率が 10 高くなると交差周波数（高）がわずかに低くなり高周波数帯での CM 因子がより小さくなることがわかった。また、細胞質誘電率が 10 低くなると交差周波数（高）がわずかに高くなり高周波数帯での CM 因子が 0 に近づくことがわかった。図 3-14 には、HL-60 のプロトプラストモデルにおいて計算結果中の細胞質導電率を増加もしくは減少させた場合の CM 因子を各周波数でグラフ化したものを示した。図 3-14 からは、細胞質導電率が 10 倍高くなると交差周波数（高）が高くなり、一方で導電率が 10 倍低くなると交差周波数（高）が低くなり CM 因子の最大値が低下することがわかった。図 3-15 には、HL-60 のプロトプラストモデルにおいて計算結果中の細胞半径を増加もしくは減少させた場合の CM 因子を各周波数でグラフ化したものを示した。図 3-15 からは、細胞半径が 10 倍高くなると交差周波数（低）が低くなり CM 因子の最大値がわずかに上昇することがわかった。また、細胞半径が 10 倍低くなると交差周波数（低）が高くなり CM 因子の最大値が低下することがわかった。

以上の結果より、3.3.2.1 の実験で交差周波数（低）の差を利用して HL-60 と UE7T-13 を分離することができたのは、交差周波数（低）に影響を与える細胞の膜容量と細胞半径の違いによると考えられる。なお、溶液の導電率も交差周波数（低）に影響を与える

要因の 1 つであったが，分離時にどちらの細胞も同じ導電率の溶液中に存在しているため分離が可能であるための要因にはならない。

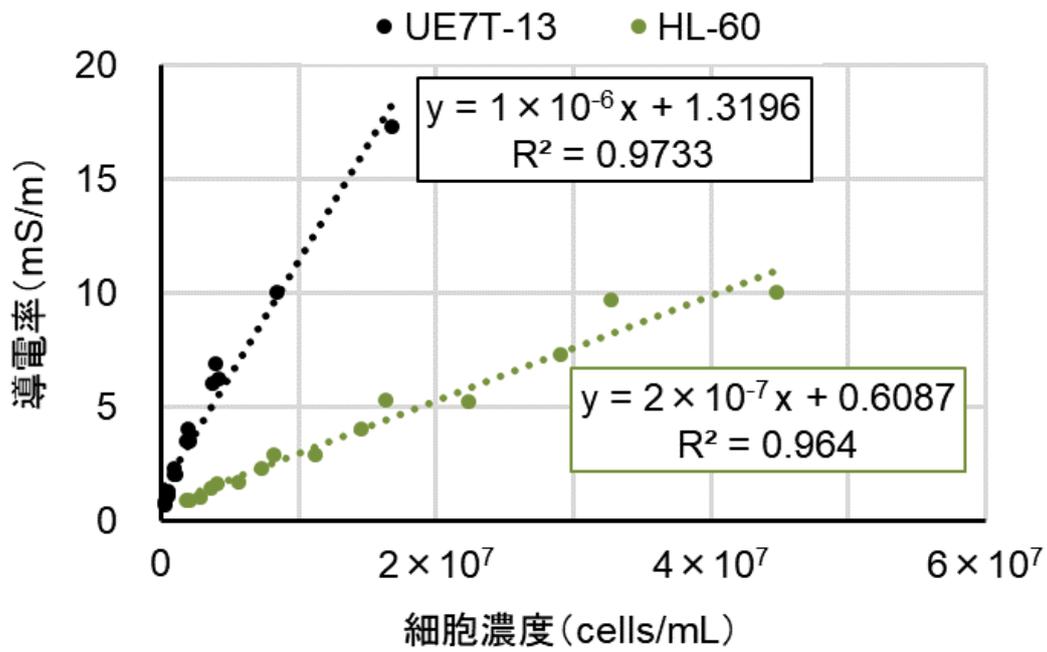


図 3-8 溶液導電率の細胞濃度依存性.

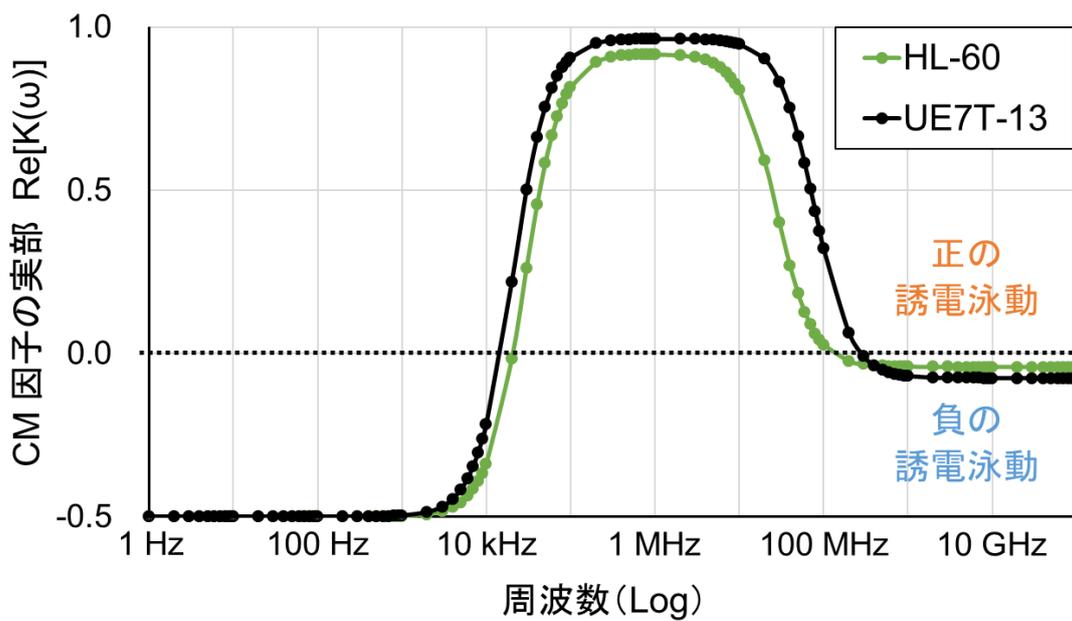


図 3-9 HL-60 と UE7T-13 の各周波数における CM 因子.

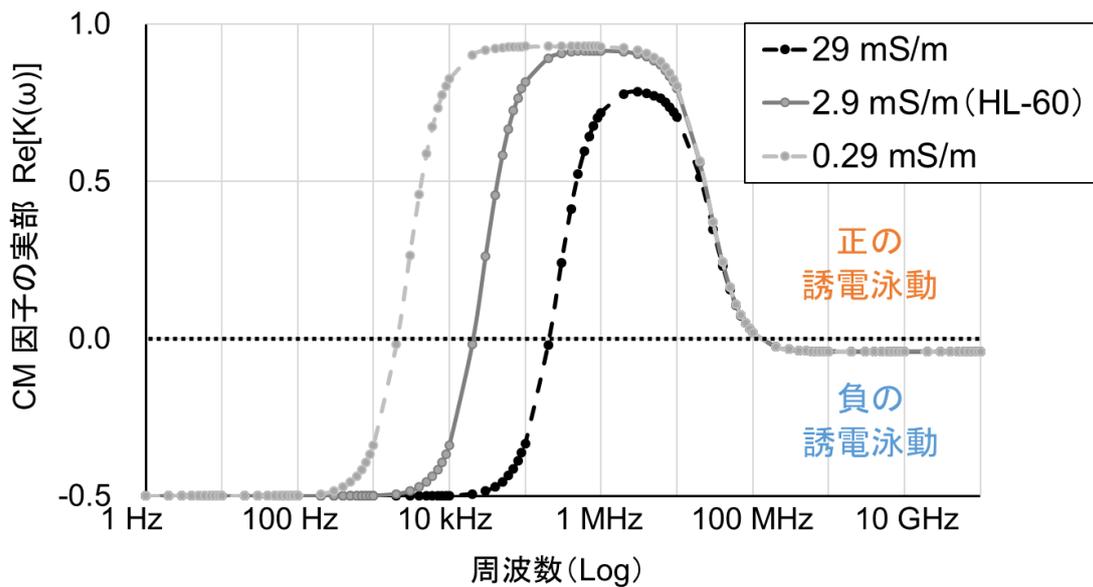


図 3-10 溶液導電率の増減に伴って変化する各周波数における CM 因子のシミュレーション.

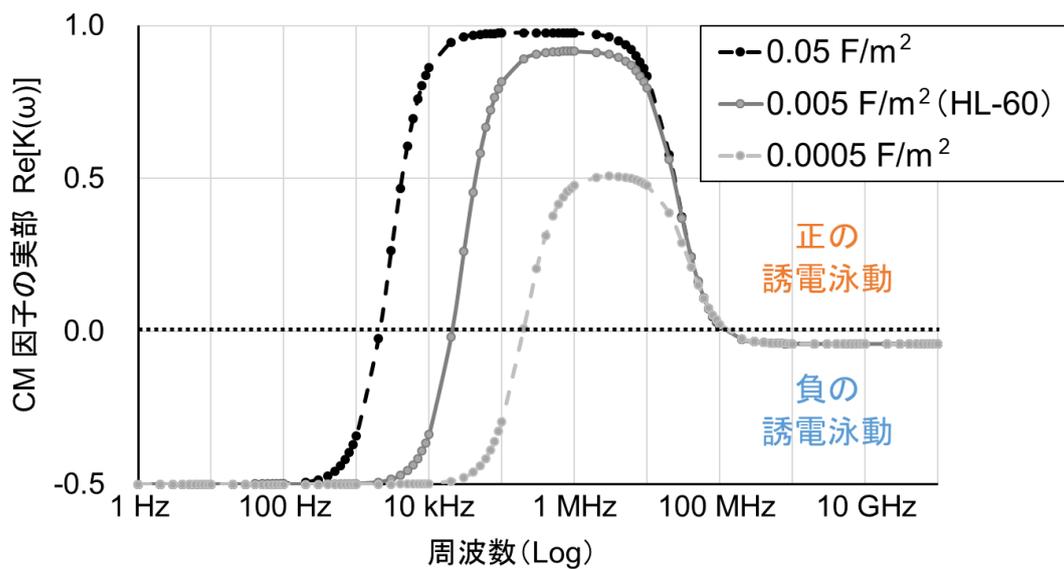


図 3-11 膜容量の増減に伴って変化する各周波数における CM 因子のシミュレーション.

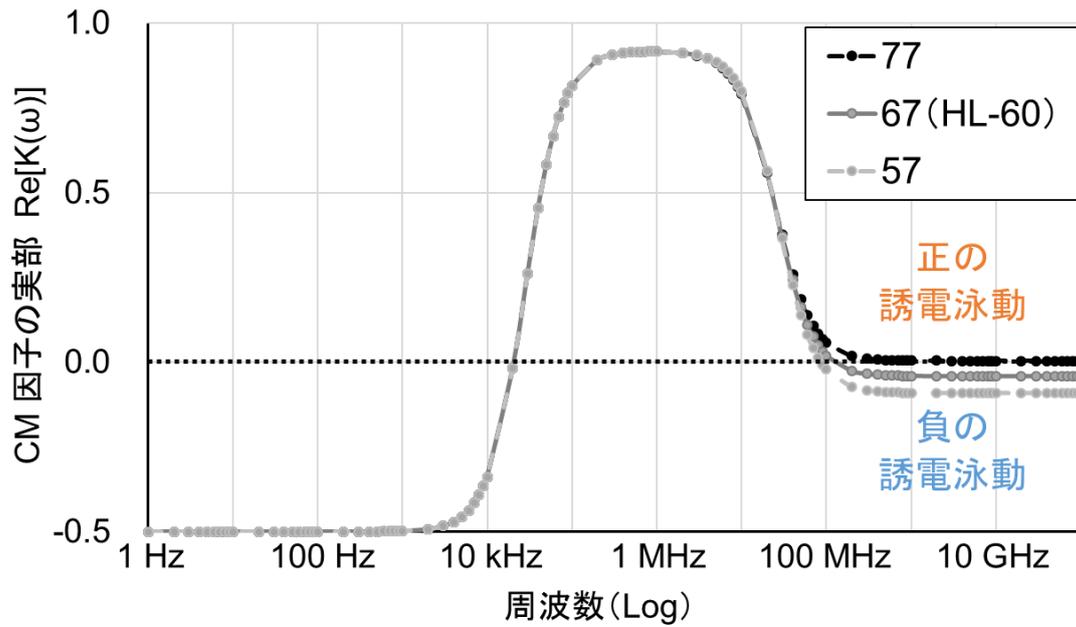


図 3-12 細胞質誘電率の増減に伴って変化する各周波数における CM 因子のシミュレーション.

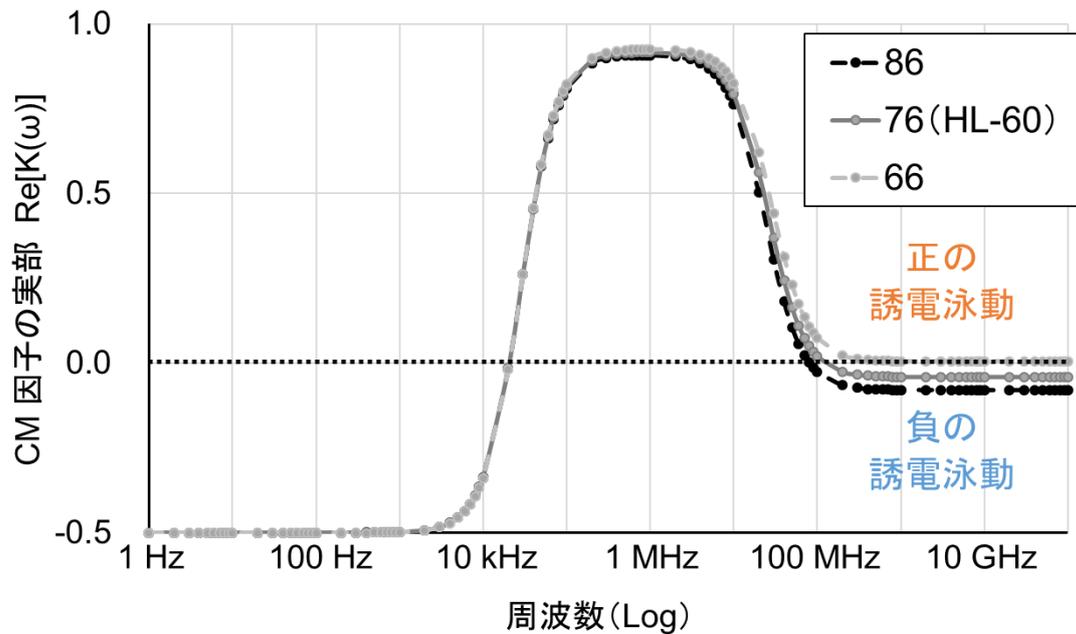


図 3-13 溶液誘電率の増減に伴って変化する各周波数における CM 因子のシミュレーション.

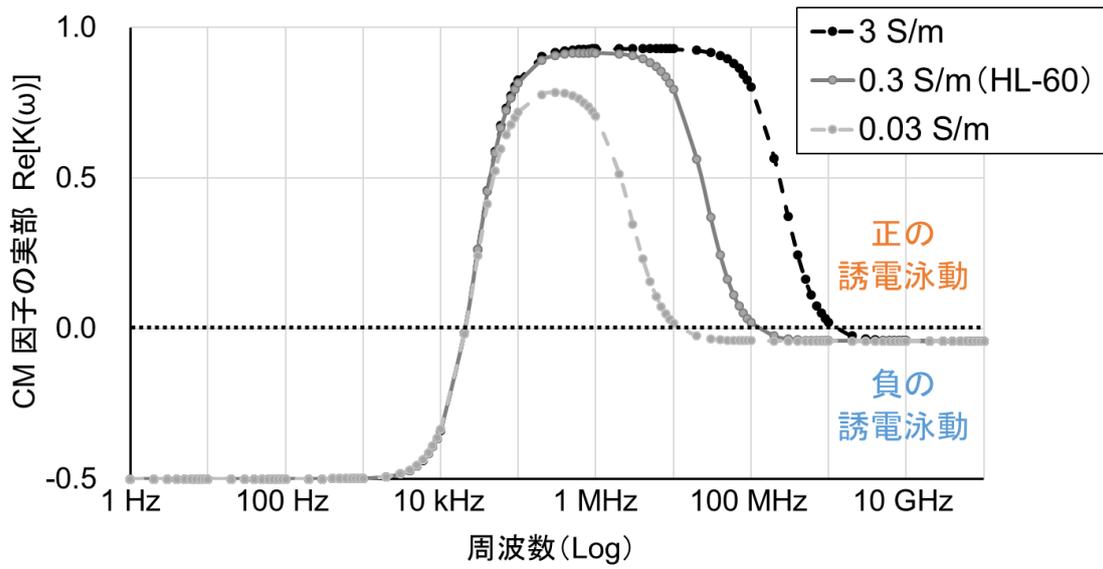


図 3-14 細胞質導電率の増減に伴って変化する各周波数における CM 因子のシミュレーション。

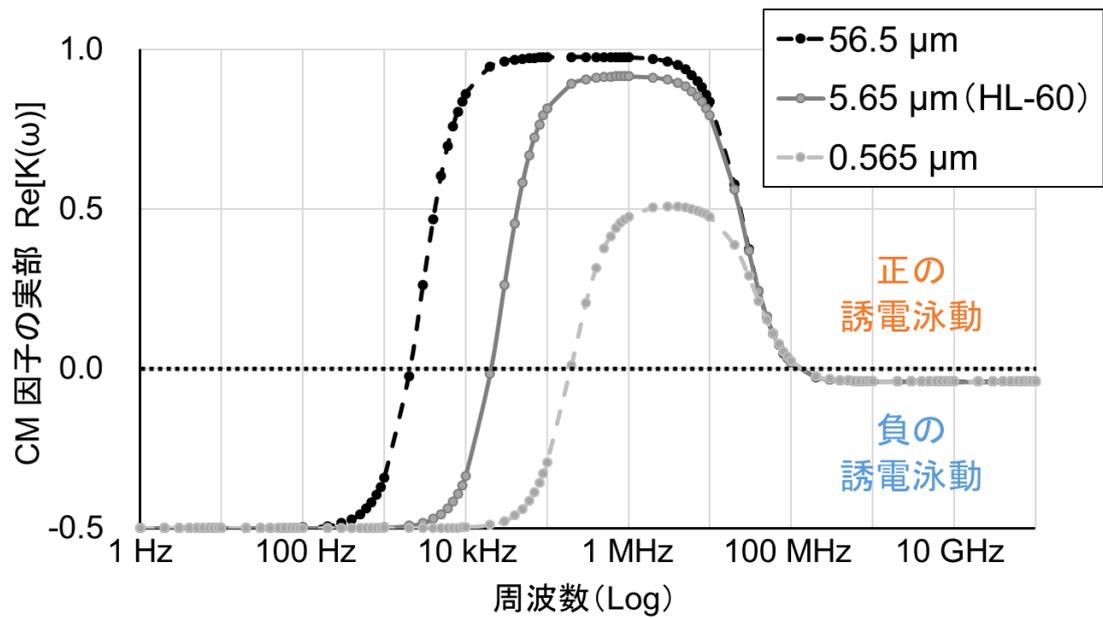


図 3-15 細胞半径の増減に伴って変化する各周波数における CM 因子のシミュレーション。

### 3.3.2.3 誘電泳動後の間葉系幹細胞の接着挙動と生存率の評価

UE7T-13 の分離時に要した 5 分間誘電泳動が、細胞の伸展能と生存率に与える影響を以下の手順で評価した。まず、7.5 Vpp, 100 kHz (正の誘電泳動) の条件で 5 分間誘電泳動をおこなった。その後、誘電泳動用スクロース溶液を培地に置換して 2 時間 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 条件下で静置した後に UE7T-13 の伸展を顕微鏡で観察し Live-Dead 染色をおこなった。次に、UE7T-13 の分離時よりも長時間である 1 時間の誘電泳動が細胞の生存率に与える影響を評価するため、UE7T-13 に 20 Vpp, 250 kHz (正の誘電泳動) の条件で誘電泳動をおこなった後に Live-Dead 染色をおこなった。サンプルは、1.5 mL エッペンチューブの中で静置したもの、デバイスに流し入れ誘電泳動をおこなわなかったもの、デバイスに流し入れ誘電泳動をおこなったものの 3 種の条件に分けて用意した。

図 3-16 には、UE7T-13 を流路に注入して 5 分間誘電泳動を加え、2 時間インキュベートした後に Live-Dead 染色した時の様子を示した。図 3-16A-F より、誘電泳動後も UE7T-13 は伸展能を有していることがわかる。図 3-16G では、生細胞と死細胞がそれぞれ緑と赤の蛍光色素で染色されている。染色結果から生存率を計算したところ、細胞は 5 分間の正の誘電泳動後に  $90.1 \pm 3.5\%$  の高い生存率を維持していることがわかった (図 3-16H)。したがって、細胞の分離時にもほとんど細胞の生存率に影響がないと考えられる。また、図 3-17 には UE7T-13 に 1 時間正の誘電泳動をおこなった後の Live-Dead 染色の結果を示した。細胞はスクロースに懸濁し 1 時間静置した場所が 1.5 mL エッペンチューブ内であっても誘電泳動デバイス内であっても 9 割以上の生存率を維持しており、誘電泳動デバイス自体に細胞毒性がないことがわかった。また、1 時間の正の誘電泳動後の生存率を、(誘電泳動後のサンプルの生存率 74.1%) / (デバイス内で静置したサンプルの生存率 92.4%) で計算したところ、80.2% の生存率を有していることがわかった。したがって、細胞は 1 時間の正の誘電泳動後も高い生存

率を有していた。なお、生存率は 3 回の実験結果より算出した。

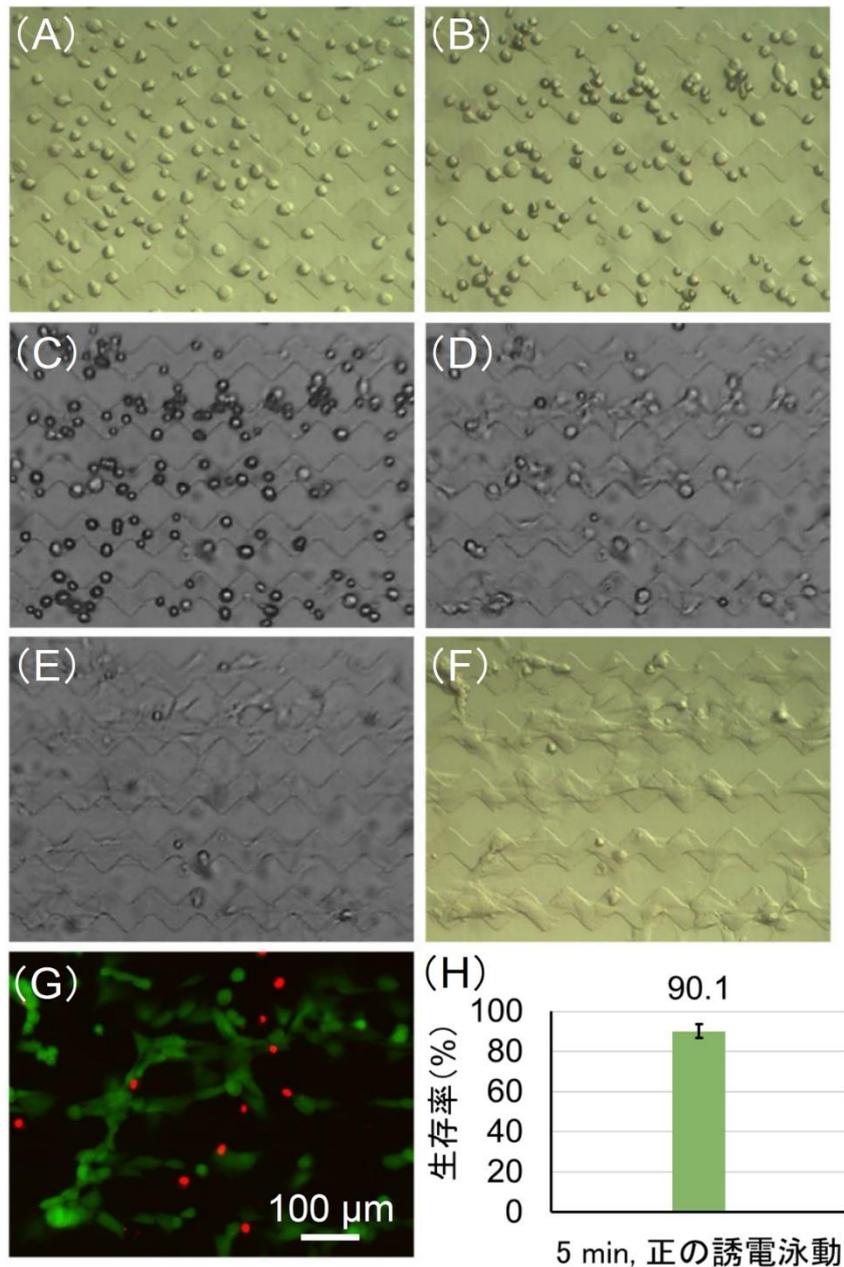


図 3-16 UE7T-13 に対して 5 分間正の誘電泳動をおこない、2 時間インキュベートした後の Live-Dead 染色と細胞生存率.

(A) 流路に UE7T-13 を流し入れた直後の様子. (B) 正の誘電泳動をかけた後の様子. (C) インキュベータに入れた直後, (D) インキュベータ中, (E) インキュベータから取り出す直前の様子. (F) インキュベータから取り出した直後の様子. (G) Live-Dead 染色後の様子. 緑: 生細胞, 赤: 死細胞. (H) 定量的に評価した生存率のグラフ.

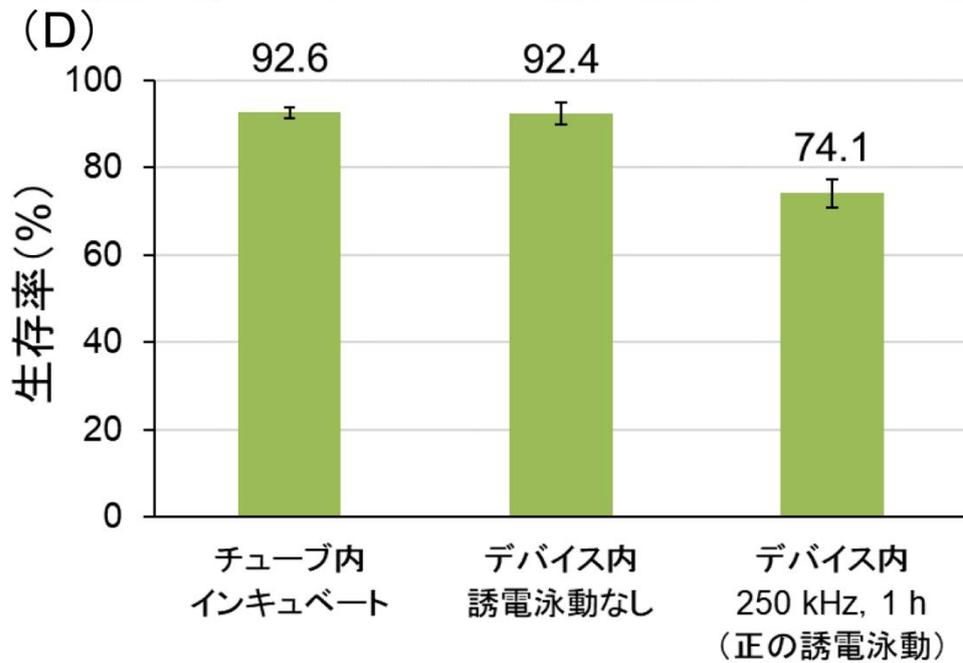
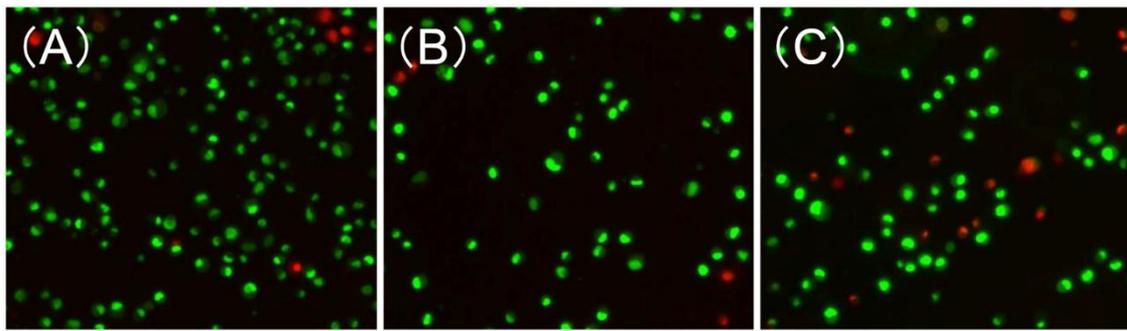


図 3-17 UE7T-13 に 1 時間 250 kHz で正の誘電泳動をおこなった後の Live-Dead 染色と細胞生存率.

(A) 1.5 mL チューブ内で 1 時間インキュベートしたサンプルと, (B) デバイス内に導入し誘電泳動をおこなわずに 1 時間インキュベートしたサンプルと, (C) デバイス内に導入し誘電泳動を 1 時間おこなったサンプルの Live-Dead 染色結果. 緑: 生細胞, 赤: 死細胞. (D) Live-Dead 染色結果を元に作成した生存率のグラフ.

### 3.3.2.4 誘電泳動後の間葉系幹細胞の遺伝子発現量の評価

本研究で作製したデバイス内における誘電泳動が UE7T-13 の遺伝子発現量に与える影響を、real-time PCR を用いて調査した。評価対象とする遺伝子には骨芽細胞分化マーカーとして runt-related transcription factor 2 (*RUNX2*), 神経細胞分化マーカーとして nestin (*NES*), 脂肪細胞分化マーカーとして peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (*PPAR $\gamma$* ), 物理刺激応答遺伝子として adhesion G protein-coupled receptor E5 (*ADGRE5*) の 4 つを選択した。*RUNX2* は、骨芽細胞へ分化する際に徐々に遺伝子発現量が上昇する転写因子の遺伝子であり、骨芽細胞分化マーカーとして知られている。*PPAR $\gamma$*  は脂肪細胞分化時に発現量が上昇する核内受容体の遺伝子であり、脂肪細胞分化マーカーとして知られている。*NES* は、神経幹細胞に発現している IV 型中間径フィラメントの遺伝子であり、ニューロン（神経細胞）や星状膠細胞（アストロサイト）などに分化が進むに連れ発現量が減少するため、神経幹細胞や神経前駆細胞のマーカーとして知られている。*ADGRE5* は、圧縮刺激を受けた場合に発現量が低下したとされる以下のような報告がある。Haudenschild らはヒト骨髄由来の間葉系幹細胞をゲル内に播種し、特殊な装置を用いて圧縮力をかけ、その後の遺伝子発現量の変化を網羅的に解析する実験をおこなった<sup>58</sup>。24 時間にわたって 0.1 Hz のスピードで 0~10% の体積ひずみ（圧縮力）を細胞に負荷した結果、細胞の形態変化や体積変化が観測された。遺伝子発現量の変化を調べた結果、*ADGRE5* の遺伝子発現量は圧縮力をかける前のおよそ 1/7 に低下した。*ADGRE5* は、細胞膜表面の抗原による分類（CD 分類）において CD97 とも呼ばれており、先行研究における報告から、同遺伝子の発現量が減少すれば力学刺激の負荷を細胞が認識している可能性を考察できる。

本研究では、UE7T-13 の分離時の条件と同様に 5 分間、30 kHz（負の誘電泳動）または 250 kHz（正の誘電泳動）の条件で誘電泳動を加え、*RUNX2*, *PPAR $\gamma$* , *NES*, *ADGRE5*

の遺伝子発現量を調べた。使用した電圧は 10 Vpp であった。得られた結果に対して Tukey-Kramer 法による統計検定をおこなった結果、全ての遺伝子において発現量に優位な差がみられなかった(図 3-18)。したがって、誘電泳動デバイスを使用する UE7T-13 の分離が細胞の分化に与える影響は低いということが示唆された。

次に、鋸型電極を有する誘電泳動デバイス内で、UE7T-13 に誘電泳動由来の物理刺激を分離時に必要な 5 分間よりも大幅に長い 1 時間、20 Vpp, 250 kHz (正の誘電泳動) の条件に加え、遺伝子発現量の変化を確認した。その結果、脂肪細胞分化マーカーの *PPAR $\gamma$*  の遺伝子発現量には変化がみられなかったが、*RUNX2* と *NES* の遺伝子発現量は有意に減少し、*ADGRE5* の遺伝子発現量は有意な減少傾向を示した(図 3-19)。以上より、1 時間の正の誘電泳動による細胞への物理刺激後は、UE7T-13 は脂肪細胞への分化に適した状態になっていることが示唆された。また、*ADGRE5* の遺伝子発現量に減少傾向がみられたことにより、UE7T-13 へ圧縮刺激を加わっていることが示唆された。したがって、本デバイスを使用して細胞を分離する際には、細胞の分化などに影響を与える可能性があるという点から、誘電泳動を長時間加えるのは避けた方が良いということがわかった。一方で、本結果は誘電泳動デバイスによる物理刺激によって細胞の分化を制御できる可能性を示しており、本デバイスが細胞力覚分析用ツールとしても有用である可能性があることが示唆された<sup>59</sup>。なお、本実験は全て 3 回おこなった。

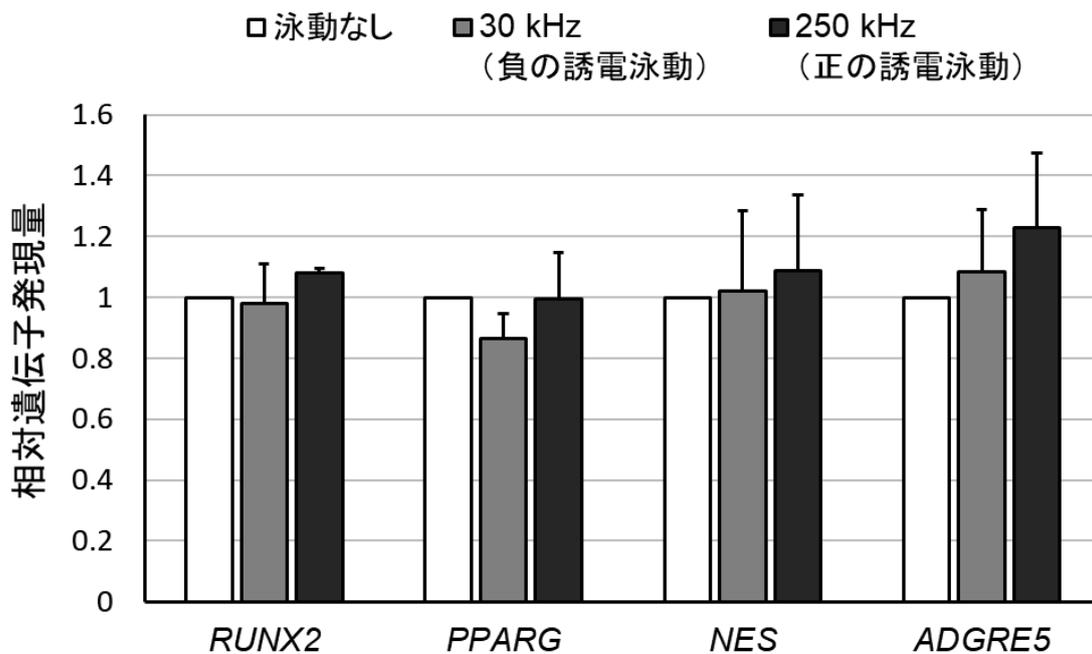


図 3-18 誘電泳動デバイスにおける UE7T-13 の分離条件時の遺伝子発現量の変化.

使用した電圧, 誘電泳動時間はそれぞれ 10 Vpp, 5 分間である. いずれのサンプル間においても有意差は認められなかった.

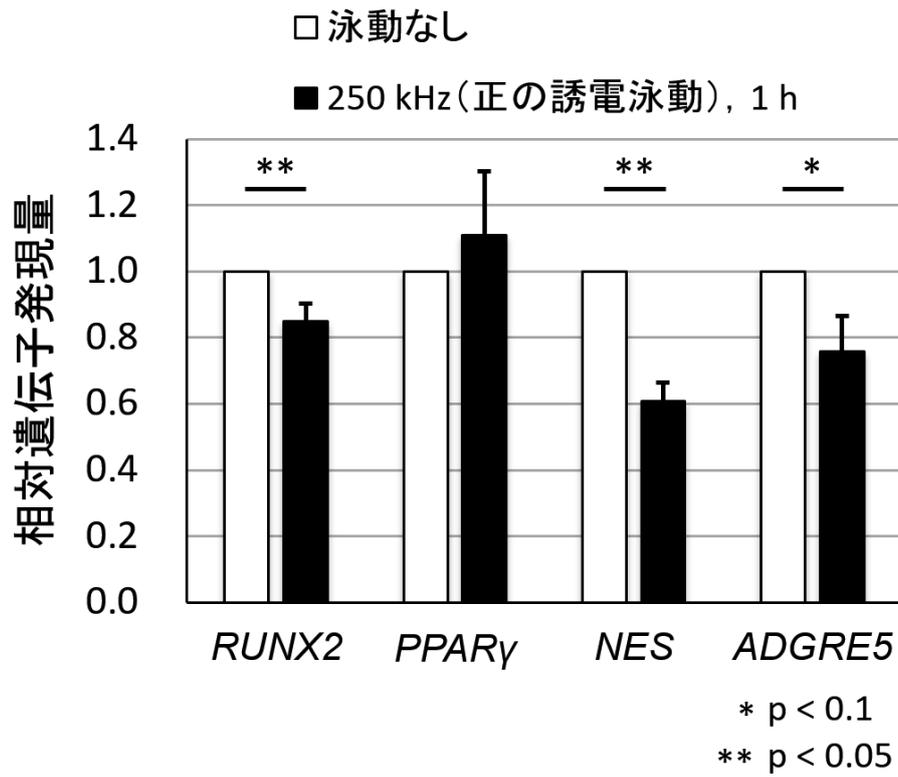


図 3-19 1 時間の正の誘電泳動後の UE7T1-13 の遺伝子発現量の変化.

使用した電圧は 20 Vpp であった. *RUNX2* と *NES* の遺伝子発現量は有意に減少し, *ADGRE5* の遺伝子発現量は有意な減少傾向を示した.

## 第4章 結論

ヒト骨髄由来の間葉系幹細胞と前骨髄球を分離するために、鋸型電極を有する誘電泳動デバイスを作製した。有限要素解析の結果、直線電極と比べ本研究において独自に設計された鋸型電極は同電圧を印加した際により大きな電場勾配を生み出すことがわかった。さらに、作製した鋸型電極を有する誘電泳動デバイスを用いると、周波数と印加電圧の最適化後には、骨髄由来間葉系幹細胞を迅速かつ高い生存率を保ったまま遺伝子発現量の変化を伴わずに非標識に分離できることがわかった。

本研究で得られた知見をもとに、従来の分離法を誘電泳動デバイスによる分離法と比較した結果を表 4-1 に示した。鋸型電極を有する誘電泳動デバイスが、ヒト骨髄由来の間葉系幹細胞を同組織由来の前骨髄球から分離するために有用であることを示すためには、デバイス内で流速を制御することによって分離した細胞の回収率を高め、生体内に近い細胞濃度比において間葉系幹細胞分離を達成することが重要である。また、本デバイスは密度勾配遠心分離法と組み合わせて使用することでより高い分離効率を実現できる可能性があり、鋸型電極を有する誘電泳動デバイスが、幹細胞を使用する研究や医療分野において優れたポテンシャルを有していることを示唆している。

表 4-1 幹細胞分離法の比較

方法	利点	欠点
密度勾配遠心分離法	大量サンプルに適用可能, 非標識, 簡単, 安価, スケールアップ可能, サイズ, 密度の違いで分離可能	長時間の遠心(約 40 分), 専用の溶液に細胞を懸濁, 低い選択性
Fluorescence-activated cell sorting (FACS)	高い選択性, 正確性, 細胞膜抗原によって分離可能	標識が必要, 高価, 特殊な装置が必要, スケールアップ不可, 長時間の前処理(1~2 時間)
Magnetic-activated cell sorting (MACS)	やや高い選択性, 並行して適用可能, 細胞膜抗原によって分離可能	回収物に磁性粒子が混入, 標識が必要
誘電泳動	分離時間が短い, 分離と同時に濃縮が可能, スケールアップ可能, 非標識, 安価, 電氣的性質の違いで分離可能	専用の溶液に細胞を懸濁, 電場が必要

## 参考文献

1. Furuhata, Y., Yoshitomi, T., Kikuchi, Y., Sakao, M. & Yoshimoto, K. Osteogenic lineage commitment of adipose-derived stem cells is predetermined by three-dimensional cell accumulation on micropatterned surface. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **9**, 9339–9347 (2017).
2. Engler, A. J., Sen, S., Sweeney, H. L. & Discher, D. E. Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification. *Cell* **126**, 677–689 (2006).
3. Pohl, H. A. The motion and precipitation of suspensoids in divergent electric fields. *J. Appl. Phys.* **22**, 869–871 (1951).
4. Yasukawa, T. & Mizutani, F. Separation of cells expressed specific antigen on the surface based on dielectrophoresis. *World Autom. Congr.* 13–18 (2014).
5. Jones, T. B. *electromechanics of Particles*. (Cambridge University Press, 2005).
6. Freer, E. M., Grachev, O., Duan, X., Martin, S. & Stumbo, D. P. High-yield self-limiting single-nanowire assembly with dielectrophoresis. *Nat. Nanotechnol.* **5**, 525–530 (2010).
7. Lapiçco-Encinas, B. H., Ozuna-Chacón, S. & Rito-Palomares, M. Protein manipulation with insulator-based dielectrophoresis and direct current electric fields. *J. Chromatogr. A* **1206**, 45–51 (2008).
8. Albrecht, D. R., Underhill, G. H., Wassermann, T. B., Sah, R. L. & Bhatia, S. N. Probing the role of multicellular organization in three-dimensional microenvironments. *Nat. Methods* **3**, 369–375 (2006).
9. Ahadian, S. *et al.* Rapid and high-throughput formation of 3D embryoid bodies in hydrogels using the dielectrophoresis technique. *Lab Chip* **14**, 3690–3694 (2014).
10. Yasukawa, T., Hatanaka, H. & Mizutani, F. Simple detection of surface antigens on living cells by applying distinct cell positioning with negative dielectrophoresis. *Anal. Chem.* **84**,

8830–8836 (2012).

11. Evans, M. J. & Kaufman, M. H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* **292**, 154 (1981).
12. Thomson, J. A. *et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* (80-. ). **282**, 1145–1147 (1998).
13. Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* **126**, 663–676 (2006).
14. Takahashi, K. *et al.* Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **131**, 861–872 (2007).
15. Nakagawa, M. *et al.* Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat. Biotechnol.* **26**, 101–106 (2008).
16. 石原一彦, 埴隆夫 & 前田瑞夫. バイオマテリアルの基礎. (日本医学館, 2011).
17. Friedenstein, A. J., Petrakova, K. V., Kurolesova, A. I. & Frolova, G. P. Heterotopic transplants of bone marrow. *Transplantation* **6**, 230–247 (1968).
18. Friedenstein, A. J., Gorskaja, J. & Kulagina, N. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp. Hematol.* **4**, 267–274 (1976).
19. Lazarus, H., Haynesworth, S. E., Gerson, S. L., Rosenthal, N. S. & Caplan, A. I. Ex vivo expansion and subsequent infusion of human bone marrow-derived stromal progenitor cells (mesenchymal progenitor cells): implications for therapeutic use. *Bone Marrow Transplant.* **16**, 557–564 (1995).
20. Tomita, S., Sakao, M., Kurita, R., Niwa, O. & Yoshimoto, K. A polyion complex sensor array for markerless and noninvasive identification of differentiated mesenchymal stem cells from human adipose tissue. *Chem. Sci.* **6**, 5831–5836 (2015).
21. Kopen, G. C., Prockop, D. J. & Phinney, D. G. Marrow stromal cells migrate throughout

- forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**, 10711–10716 (1999).
22. Seo, M. J., Suh, S. Y., Bae, Y. C. & Jung, J. S. Differentiation of human adipose stromal cells into hepatic lineage in vitro and in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **328**, 258–264 (2005).
23. Chen, L.-B., Jiang, X.-B. & Yang, L. Differentiation of rat marrow mesenchymal stem cells into pancreatic islet beta-cells. *World J. Gastroenterol.* **10**, 3016–3020 (2004).
24. Popov, B. V *et al.* Lung Epithelial Cells Induce Endodermal Differentiation in Mouse Mesenchymal Bone Marrow Stem Cells by Paracrine Mechanism. *Tissue Eng.* **13**, 2441–2450 (2007).
25. Woodbury, D., Schwarz, E. J., Prockop, D. J. & Black, I. B. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J. Neurosci. Res.* **61**, 364–370 (2000).
26. Sanchez-Ramos, J. *et al.* Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp. Neurol.* **164**, 247–256 (2000).
27. Deng, W., Obrocka, M., Fischer, I. & Prockop, D. J. In vitro differentiation of human marrow stromal cells into early progenitors of neural cells by conditions that increase intracellular cyclic AMP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **282**, 148–152 (2001).
28. Ortiz, L. A. *et al.* Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 8407–8411 (2003).
29. Spaeth, E., Klopp, A., Dembinski, J., Andreeff, M. & Marini, F. Inflammation and tumor microenvironments: defining the migratory itinerary of mesenchymal stem cells. *Gene Ther.* **15**, 730 (2008).
30. Foraker, J. E. *et al.* Cross-talk between human mesenchymal stem/progenitor cells (MSCs)

and rat hippocampal slices in LPS-stimulated cocultures: the MSCs are activated to secrete prostaglandin E2. *J. Neurochem.* **119**, 1052–1063 (2011).

31. Bartosh, T. J. *et al.* Aggregation of human mesenchymal stromal cells ( MSCs ) into 3D spheroids enhances their anti-inflammatory properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 13724–13729 (2010).
32. Müller, I. *et al.* Application of multipotent mesenchymal stromal cells in pediatric patients following allogeneic stem cell transplantation. *Blood Cells, Mol. Dis.* **40**, 25–32 (2008).
33. Prasad, V. K. *et al.* Efficacy and safety of ex vivo cultured adult human mesenchymal stem cells (Prochymal™) in pediatric patients with severe refractory acute graft-versus-host disease in a compassionate use study. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **17**, 534–541 (2011).
34. Kharaziha, P. *et al.* Improvement of liver function in liver cirrhosis patients after autologous mesenchymal stem cell injection: a phase I–II clinical trial. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **21**, 1199–1205 (2009).
35. Zuk, P. A. *et al.* Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol. Biol. Cell* **13**, 4279–4295 (2002).
36. Scherjon, S. A. *et al.* Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. *Stem Cells* **22**, 1338–1345 (2004).
37. Young, H. E. *et al.* Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors. *Anat. Rec. An Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* **264**, 51–62 (2001).
38. Squillaro, T., Peluso, G. & Galderisi, U. Clinical Trials With Mesenchymal Stem Cells: An Update. *Cell Transplant.* **25**, 829–848 (2016).
39. Pertoft, H. Fractionation of cells and subcellular particles with Percoll. *J. Biochem. Biophys. Methods* **44**, 1–30 (2000).

40. Grisendi, G. *et al.* GMP-manufactured density gradient media for optimized mesenchymal stromal/stem cell isolation and expansion. *Cytotherapy* **12**, 466–477 (2010).
41. Pösel, C. *et al.* Density gradient centrifugation compromises bone marrow mononuclear cell yield. *PLoS One* **7**, 1–10 (2012).
42. Pruszek, J., Sonntag, K.-C., Aung, M. H., Sanchez-Pernaute, R. & Isacson, O. Markers and Methods for Cell Sorting of Human Embryonic Stem Cell-Derived Neural Cell Populations. *Stem Cells* **25**, 2257–2268 (2007).
43. Will, B. & Steidl, U. Multi-parameter fluorescence-activated cell sorting and analysis of stem and progenitor cells in myeloid malignancies. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* **23**, 391–401 (2010).
44. Wognum, A. W., Eaves, A. C., Eaves, C. & Thomas, T. E. Identification and isolation of hematopoietic stem cells. *Arch. Med. Res.* **34**, 461–75 (2003).
45. Locke, M., Windsor, J. & Dunbar, P. R. Human adipose-derived stem cells: Isolation, characterization and applications in surgery. *ANZ J. Surg.* **79**, 235–244 (2009).
46. Wang, X. B. *et al.* Cell separation by dielectrophoretic field-flow-fractionation. *Anal. Chem.* **72**, 832–839 (2000).
47. Lv, X. J. *et al.* In vitro proliferation and differentiation of adipose-derived stem cells isolated using anti-CD105 magnetic beads. *Int. J. Mol. Med.* **30**, 826–834 (2012).
48. Deng, Y.-L., Chang, J.-S. & Juang, Y.-J. Separation of microalgae with different lipid contents by dielectrophoresis. *Bioresour. Technol.* **135**, 137–141 (2013).
49. Yildizhan, Y., Erdem, N., Islam, M., Martinez-Duarte, R. & Elitas, M. Dielectrophoretic separation of live and dead monocytes using 3D carbon-electrodes. *Sensors* **17**, 1–13 (2017).
50. Lalonde, A., Romero-Creel, M. F. & Lapizco-Encinas, B. H. Assessment of cell viability

- after manipulation with insulator-based dielectrophoresis. *Electrophoresis* **36**, 1479–1484 (2015).
51. Lee, G. R. & Wintrobe, M. M. *Wintrobe's clinical hematology*. **2**, (Lea & Febiger, 1993).
52. Zhu, H., Lin, X., Su, Y., Dong, H. & Wu, J. Screen-printed microfluidic dielectrophoresis chip for cell separation. *Biosens. Bioelectron.* **63**, 371–378 (2015).
53. Du, X. *et al.* Validation of clausius-mossotti function in single-cell dielectrophoresis. in *IMBioc 2018 - 2018 IEEE/MTT-S International Microwave Biomedical Conference* 94–96 (IEEE, 2018). doi:10.1109/IMBIOC.2018.8428917
54. Li, H. *et al.* Distributed Effect in High-Frequency Electroporation of Biological Cells. *IEEE Trans. Microw. Theory Tech.* **65**, 3503–3511 (2017).
55. 北條浩彦. *原理からよくわかるリアルタイムPCR実験ガイド*. (羊土社, 2008).
56. Castellanos, A., Ramos, A., González, A., Green, N. G. & Morgan, H. Electrohydrodynamics and dielectrophoresis in microsystems: Scaling laws. *J. Phys. D. Appl. Phys.* **36**, 2584–2597 (2003).
57. Sasaki, N. Recent applications of AC electrokinetics in biomolecular analysis on microfluidic devices. *Anal. Sci.* **28**, 3 (2012).
58. Haudenschild, A. K., Hsieh, A. H., Kapila, S. & Lotz, J. C. Pressure and distortion regulate human mesenchymal stem cell gene expression. *Ann. Biomed. Eng.* **37**, 492–502 (2009).
59. Yoshioka, J., Yoshitomi, T., Yasukawa, T. & Yoshimoto, K. Alternation of gene expression levels in mesenchymal stem cells by applying positive dielectrophoresis. *Anal. Sci.* **32**, 1213–1216 (2016).

## 謝辞

本研究は、東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻吉本研究室においておこなわれたものであり、研究テーマの設定から本論文の完成まで、終始一貫した御指導、御鞭撻を頂きました吉本敬太郎准教授に心から深く感謝いたします。また、研究をおこなうにあたり、たくさんの貴重な御指導を賜りました同研究室の吉富徹助教に深く感謝の意を表します。そして、御多忙の中、マイクロ流路及び電磁気学に関して貴重な御指導を賜りました兵庫県立大学大学院物質理学研究科の安川智之教授、東洋大学理工学部応用化学科の佐々木直樹准教授に感謝申し上げます。

本論文作成にあたり、ご精読、御指導を頂きました竹内昌治教授、道上達男教授、村田昌之教授、豊田太郎准教授に深く感謝致します。

研究において心の支えとなり苦楽を共にしてきた吉本研究室の卒業生と大学院博士課程の古旗祐一博士、和久井幸二さん、Hangyu Zheng さん、丸山亮さん、ならびに研究のみでなくあらゆる場面でお世話になりました大学院修士課程諸氏に深く感謝いたします。また、先輩として拙い面もあったかと思いますが、誘電泳動を使った研究と一緒にチャレンジしてくれた後輩の大杉悠さんに感謝いたします。

直接お会いする機会は多くありませんでしたが、メールでの様々な質問に親身に御返事頂きました、兵庫県立大学の吉村友希さん、守島麻さん、菅野尊公さんに心から感謝いたします。

日常研究において、事務的な面から支援して下さった秘書の田邊朋子さんと蒲池早苗さんにお礼申し上げます。

時につらい博士課程において、いつも私を励まし支えてくれた小林瑞季さんに感謝いたします。そして最後に、長い間学生生活に多大なる支援をして下さった家族に心から感謝します。

平成 30 年 12 月 10 日