

## [研究助成 (A)]

立体三次元配置多電極による微生物の高速電気イメージング  
フローサイトメトリーの実現Realization of High-Speed Electrical Imaging Flow Cytometry of Microorganisms Using  
Three-Dimensional Arrangement Multi-Electrodes

2231032



研究代表者

奈良先端科学技術大学院大学  
物質創成科学領域

准教授 ヤリクン ヤシャイラ

## [研究の目的]

生命科学, 疾病解析, 再生医療の分野のブレークスルー技術として, AI を用いて膨大な数からなる細胞の多様な状態を標識せずに1細胞毎に統合的に計測し, 生理状態や疾病性を実時間で分析・判定できる知能計測方法を実現する。

現在, 我々の提案する細胞計測システムに最も近い計測手法として, フローサイトメトリー法がある。医学や生命科学で実用化されているフローサイトメトリーは, 光学式 (図 1. A), 光イメージング式 (図 1. B), インピーダンス信号を計測する電気式 (図 1. C) に分類される。光学式と光イメージング式では細胞の抗原をあらかじめ蛍光標識抗体で染色するので, 計測項目は表面抗原が主なものになる。細胞内部の抗

原を検出するには細胞膜を壊して標識抗体の侵襲性を確保する必要がある。光学式はハイスループットに適する。光イメージング式では蛍光標識細胞の繊細な構造に関連する空間情報が得られる。最近ではラマン分光による非染色型で多項目のフローサイトメトリーも報告されているが, 光学系が複雑で装置が大型なためと, 莫大な演算処理が必要なため, 実用化には至っていない。

一方, 電気式は, 流路中の電極間を横切る細胞の平均径や誘電率とインピーダンス信号の特性相関を用いる。簡便なため細胞のサイズと体積の計測を行う血球カウンターとして臨床検査用に普及している。最近では印加を交流にして周波数を変えることで計測項目の選択が可能になり, 一度に多部位多特徴の測定ができる。光学式や光イメージング式に比べて小型化が容易で, システムの全体を A4 サイズに収めることも可能である。更に, 電気信号は光と異なり直接 A/D 変換できるので, 高速リアルタイム処理に向いている。

また, マイクロ流路型の細胞インピーダンス計測システムも開発されている (図 2)。しかし, 他項目計測の観点と高精細で高精度な計測の点でまだ開発途上である。既存手法では平面での電極配置を使用しており, 交流電場空間で電気力線の密度に勾配が生じるので, 細胞が電気力線のどこを横切るかで計測感度が異なる。

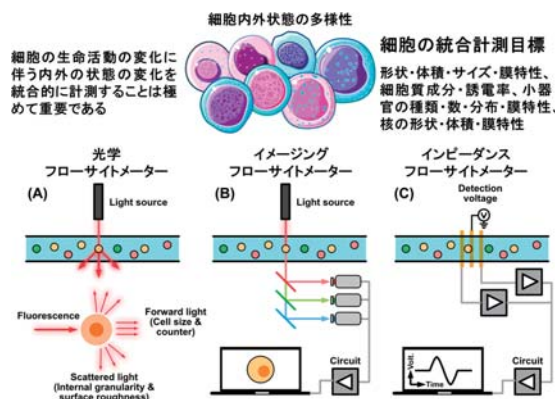


図1 従来の細胞のフローサイトメトリー分析手法と  
その特徴

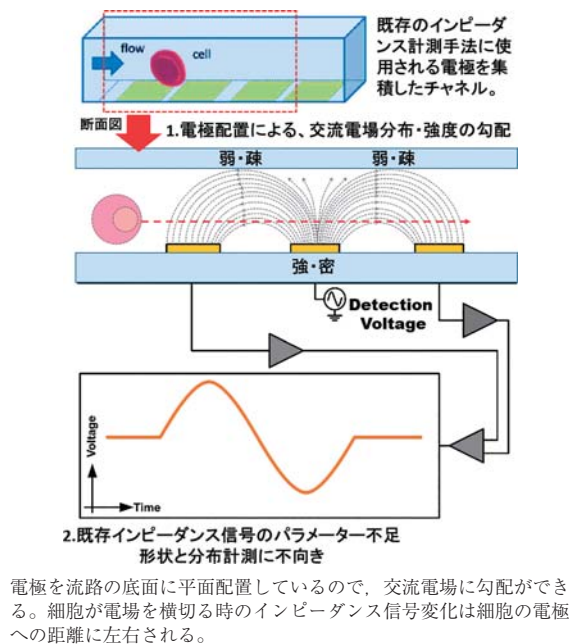


図2 既存のインピーダンス計測システム

色々な電解強度や周波数などの可変範囲が限られているため、細胞の具体的な形状、小器官の数、分布など複雑な空間情報を反映できず、細胞計測分野での活用が制限される。

本研究は、まず、申請者が独自で開発した平面電極でのインピーダンス信号偏心率の計測手法 [Y. Yalikun, et al. Biosens. Bioelectron., vol. 193, 2 Aug. 2021] を元に、最適化された電極配置を用いて、細胞内外の空間的な状態の違いにより誘起された多周波数でのインピーダンス信号の波形の偏りを表す偏心率測定を行い、リアルタイムの統合的な知能計測システムを構築する。その次、計測した電気インピーダンス信号の特徴をその場で分析・判断し、その特徴から、細胞内や細胞表面の多様な状態と結びつき、インピーダンス計測技術に基づく知能計測を創発することを目的とした。

## 【研究の内容、成果】

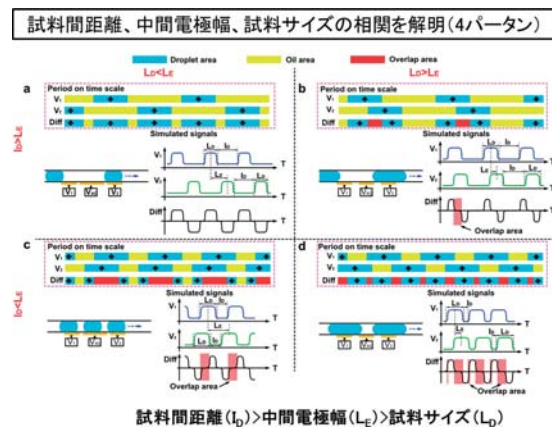
本研究の目的を実現するために、既存のインピーダンス電気信号の計測感度向上は最重要課題となっている。下記2つの方法でこの課題解決に挑んだ。

## 1. 電極設計の最適化

電極の寸法と電極同士のインターバル（間隔）が計測感度に大きく影響するため、それぞれについて実験にて調査した。

### 1.1 電極寸法の最適化

計測試料のサイズ、電極幅、試料と試料の間隔三者の関係について、調査した[業績論文1]、その結果の概要を図3に示す。結果として、試料より広めのサイズの電極幅を利用し、計測試料の間隔を電極幅よりも離れた距離にして計測したほうが感度が最も高いことがわかった。例えば、 $15\mu\text{m}$  サイズの白血球を計測目標にした場合、電極幅は  $20\mu\text{m}$  で、細胞同士の間隔が  $20\mu\text{m}$  以上であることが望ましい。



試料間距離が電極の幅より大きい場合 ( $L_D > L_E$ ) : (a) 電極の幅が試料サイズより大きい場合 ( $L_D < L_E$ ) (b) 電極の幅が試料サイズより小さい場合 ( $L_D > L_E$ )。試料間距離が電極の幅より小さい場合 ( $L_D < L_E$ ) : (c) 電極の幅が試料サイズより大きい場合 ( $L_D < L_E$ ) (d) 電極の幅が試料サイズより小さい場合 ( $L_D > L_E$ )

図3 電極の寸法と計測対象との関係性

### 1.2 電極同士のインターバル（間隔）の検討結果

電極間のインターバルも計測感度に大きく作用することはシミュレーションで検証し、インピーダンス信号の計測感度を一層向上させるために、最適な電極のナノスケールインターバルを作成した。

従来のフォトリソグラフィ加工手法よりも廉価で簡便な手法であるフェムト秒レーザー加工手法を用いた。具体的には、倒立顕微鏡の自動ステージに Cr と Au 成膜してあるガラス基板をセットし、フェムト秒レーザーを基板に集光

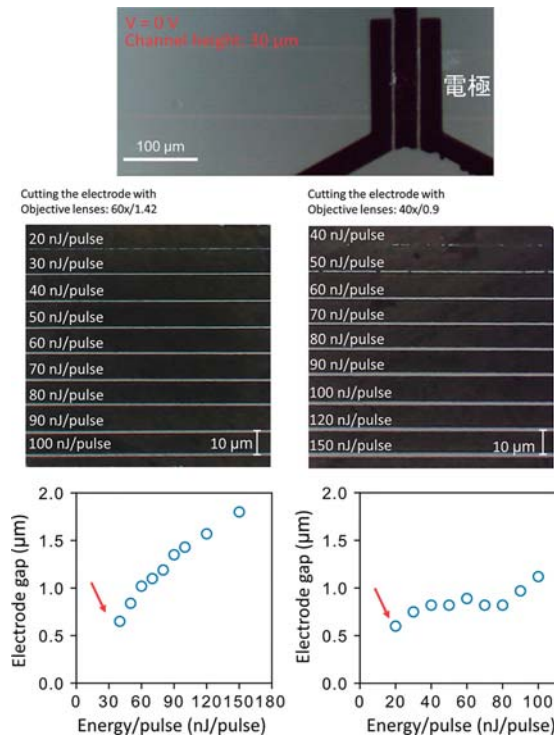


図4 フェムト秒レーザーを用いた電極間のナノインターバル加工手法の検討

しながら一定の速度で直線を描画した。加工条件として、異なる倍率の対物レンズとレーザーパルスエネルギーを検討した。具体的な加工条件と加工したインターバル結果は図4に示す。

図4に示しているように、40×の対物レンズ、40 nJ/pulse、と60×の対物レンズ、20 nJ/pulseを使用した場合、500 nm 前後のインターバルの加工ができた。

## 2. 均一な交流電場を実現するための流路寸法可変型マイクロ流路デバイスの開発

既存手法では平面での電極配置を使用しており、マイクロ流路中にある交流電場空間で電気力線の密度に大きな勾配が生じるので、試料が電気力線のどこを横切るかで計測感度が異なる。特に流路の高さ方向に電気力線の勾配が著しいため、計測感度に大きく影響する。そこで、本手法では流路の高さが制御可能なマイクロ流路

を開発し、試料のサイズまたは実時間の計測感度に応じて、流路の寸法を能動的に調整できる構造をしている。これにより、試料を常に電気力線が高密度で均一になっている電極に近い領域を通過させて計測するため、従来以上の高感度な計測が実現できた[業績論文4]。

本実験では、50 μm ストロークのピエゾ素子を利用し、最大約 50 μm 変形ができる電極付きのマイクロ流路の作製ができ、1 μm 試料の計測感度を 20 倍以上にできた(図5)。さらに、高感度インピーダンス計測に使用するマイクロ流路はよく流路の詰まる問題に直面する。本手法は流路寸法を能動的に制御するので、詰まる問題の解消が可能で、流路デバイスの使用寿命と汎用性も一層向上できた。

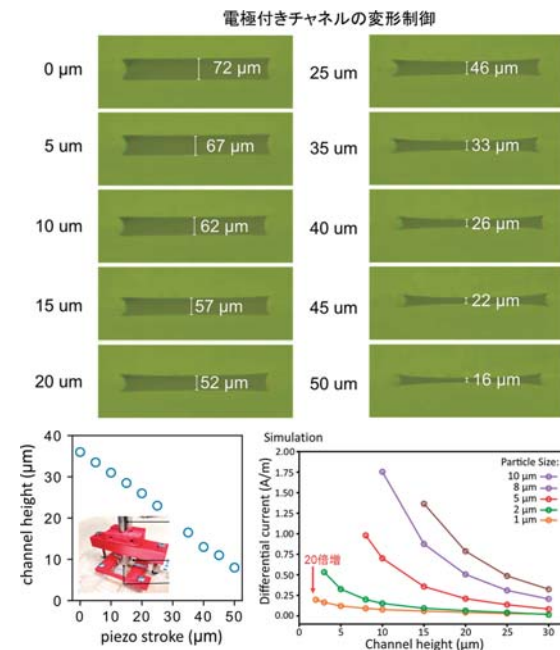
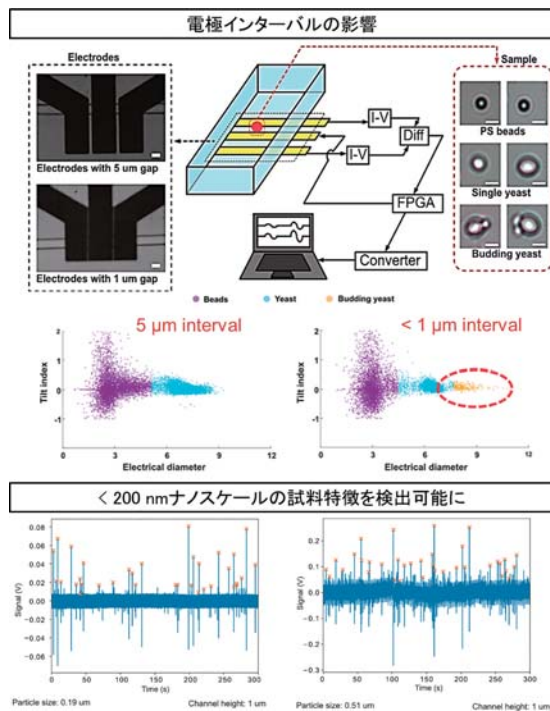


図5 上下寸法可変型マイクロ流路デバイスの開発

### 3. ナノインターバル電極と寸法可変型マイクロ流路デバイスを用いた試料のナノスケール特徴の測定

申請者これまでの研究では、ナノインターバル電極デバイスを用いて、従来数 $\mu\text{m}$ インターバルの電極の場合では全く測定できなかった発芽している酵母のナノスケール形態特徴の測定に成功し（図6）、インピーダンス計測手法を用いた生体試料ナノスケール形態特徴計測の可能性を示した。さらに、ナノインターバル電極と寸法可変型マイクロ流路デバイスとの組み合わせで、 $<200\text{ nm}$  直径の微粒子または生体試料の形態特徴の測定が可能であることがわかったため、細胞外小胞など極めて小さい生体試料の測定への応用の可能性も見えてきた。



上図：出芽酵母を $5\mu\text{m}$ とナノインターバル電極を用いて、それぞれ同条件でインピーダンス計測を行った。 $5\mu\text{m}$ インターバル電極の場合では、出芽している酵母と出芽していない酵母の違いが不明瞭であり、判別不能である。一方、ナノインターバル電極の場合では、明確な違いがわかるため、高い計測感度を示している。下図：ナノインターバル電極を用いた場合、 $500\text{ nm}$ 、 $190\text{ nm}$  直径の微粒子の測定も可能であることを示している。

図6 ナノインターバル電極と寸法可変型マイクロ流路デバイスを用いたナノスケール測定

### [今後の予定]

申請者のこれまでの研究実績を踏まえて、ナノインターバル電極と流路可変型マイクロ流体デバイスを用いて、信号波形の形態特徴と細胞の形態との相関関係を、ヒト循環系細胞を用いて明らかにし、電気信号の形態と細胞の形態と詳細に結びつき、さらに、種々の周波数における細胞由来の信号波形の特徴的な形態を機械学習利用することで、データで再現し、自動的に定量化、分析と判定する、光学顕微鏡を用いずに多種多様な循環系細胞（群）の状態と形態、とその相互作用を統合的に計測できる小型高速知能計測システムの構築を実現していく（図7）。

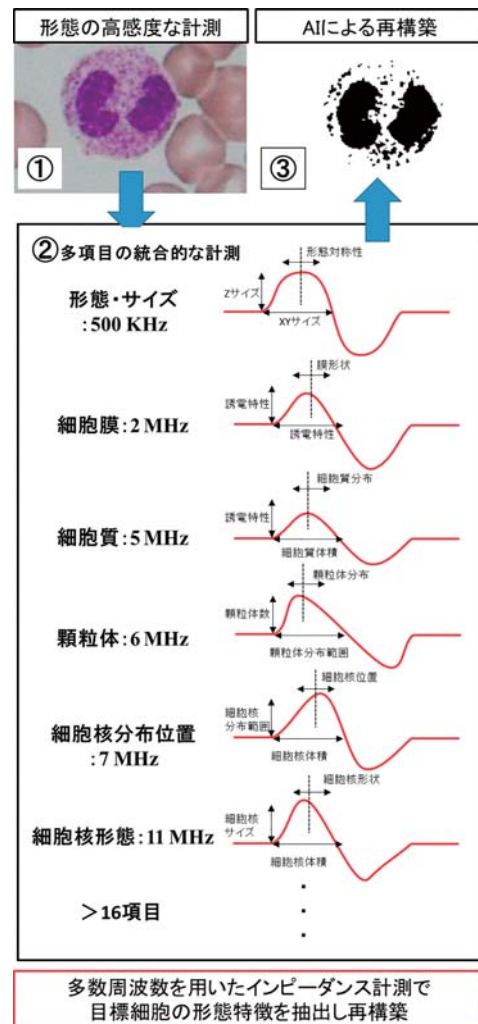


図7 高精度計測、形態特徴に対応する特徴周波数の特定概念

本手法は、循環細胞、血液、組織のみならず広く細胞の関わる生命現象の解明、複雑な疾病の診断と治療効果の高精度な評価などの要素技術となり、従来の計測手法で達成できなかった新しい機能群を提供し、未踏の循環細胞のマルチスケールで統合的な解析領域に光を当てると期待される。

[成果の発表、論文など]

学術論文：3件

1. The parameter investigation of electrical impedance cytometry for droplet measurement, Xun Liu, Tianlong Zhang, Tao Tang, Yapeng Yuan, Doudou Ma, Yang Yang, Guizhong Tian, Yoichiro Hosokawa, **Yaxiaer Yalikun**, *IEEE sensors journal*, 査読中
2. Passive microfluidic devices for cell separation, Tianlong Zhang, Dino Di Carlo, Chwee Teck Lim, Tianyuan Zhou, Guizhong Tian, Tao Tang, Amy Q. Shen, Weihua Li, Ming Li, Yang Yang, Keisuke Goda, Ruopeng Yan, Cheng Lei, Yoichiro Hosokawa, **Yaxiaer Yalikun**, *Biotechnology Advances*, 71, 108317, 2024.
3. A review on intelligent impedance cytometry systems: Development, applications and advances, Tao Tang, Trisna Julian, Doudou Ma, Yang Yang, Ming Li, Yoichiro Hosokawa, **Yaxiaer Yalikun**, *Analytica Chimica Acta*, 341424, 2023.

査読付き国際学会論文：3件

4. Enhancement of impedance cytometry signal with dimension-adjustable microfluidic channel, Trisna Julian, Tao Tang, Yoichiro Hosokawa, **Yaxiaer Yalikun**, The 27th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2023).
5. The effects of differential impedance signal on droplet measurement, Xun Liu, Tao Tang, Yoichiro Hosokawa, **Yaxiaer Yalikun**, The 27th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2023)
6. Ultra high-throughput cell imaging enabled by optimized microfluidic device with horizontal connection, Xun Liu, Jiehua Zhou, Tao Tang, Yoichiro Hosokawa, **Yaxiaer Yalikun**, Cheng Lei, The 27th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2023)