

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 8 月 22 日現在

機関番号：13901

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06268

研究課題名(和文) 振動誘起流れの周波数変調を用いたオープンチップでの細胞フィルター、トラップ操作

研究課題名(英文) On-Chip Cell Filter and Trap Manipulation by Using Frequency Modulation of Vibration-Induced Flow

研究代表者

早川 健 (Hayakawa, Takeshi)

名古屋大学・未来社会創造機構・特任助教

研究者番号：70759266

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：マイクロ構造体に振動印可した際に生じる振動誘起流れを用いた細胞操作法について研究を行った。マイクロピラーのパターン間隔を変えたアレイを作製し、細胞のサイズフィルターを行うことに成功した。実験にて、70 $\mu\text{m}$ サイズの粒子と約5 $\mu\text{m}$ サイズの粒子を分離するフィルター機能の原理確認を行った。

また、従来とは異なる非対称構造を作製し振動を印可した際に非対称な流れが生じることを観察した。これを用いて、印可する振動の方向を切り替えることによって、異なる流れパターンを誘起し、異なる操作を実現することが可能であることを示した。その応用として、細胞を一つずつ任意のタイミングで搬送する細胞ローディング操作を実現した。

研究成果の概要(英文)：We studied on on-chip cell manipulation method based on a vibration-induced flow. Vibration-induced flow is local flow induced around vibrating object. By using this flow, we can achieve various on-chip cell manipulations. In this study, we showed the feasibility of cell size filtering by using micropillar array with different pillar distances. By varying distances of micropillars, we succeeded in filtering of 70  $\mu\text{m}$  sized particles and 5  $\mu\text{m}$  sized particles. Furthermore, we proposed new method of cell manipulation based on vibration-induced flow. By using rotationally asymmetric structures, we found asymmetric flow pattern can be induced. Thus, by switching the direction of applied vibrations, we can switch different flow patterns. This phenomenon enables to realize switching of different manipulation mode on identical chip design. As an application of this method, we showed single cell loading, which enables to transport single cell continuously with constant timing and distance.

研究分野：マイクロ・ナノロボティクス

キーワード：マイクロ・ナノデバイス システムオンチップ 細胞・組織 バイオテクノロジー マイクロ流路

1. 研究開始当初の背景

近年、マイクロ流体チップ上で高精度、高効率、低コストに細胞操作を行うオンチップ細胞操作の需要が高まっている。従来のオンチップ細胞操作は、主にシリコン樹脂等でカバーされたクローズな流路内の流体制御を用いて行われているが、この方法では流路と外界の接続部（チューブ接続等）が必要となり、細胞がその接続部に頻繁に詰まって失われる、という問題があった。実際の細胞操作の用途としては、チップでの処理後に細胞を回収し、事後解析や細胞の培養を行うといったニーズが多くあり、細胞を失う問題はオンチップ細胞操作の実用化を著しく妨げる要因となっていると考えられる。

そこで研究代表者は、外界とのアクセスが容易で細胞を失うリスクの低いオープンチップで細胞操作を行う方法として、振動誘起流れを用いた方法を提案している。チップ上にマイクロピラーを作製し、チップに円振動を印可することにより、ピラー周囲に局所的な流れが生じる（図1）。この現象を利用し、チップ上のマイクロピラーの配置を変えるのみで、同一のシステム上で様々な細胞操作を行うことができる（図2）。申請者はこれまでに直線、らせん、三角形のピラー配置を用いて、細胞の搬送、濃縮、回転操作に成功している（図3）。また、これらの操作を用いた応用として、オープンチップにおける単一細胞分離デバイスと、マウス卵子の三次元回転・観察システムの構築を行った（研究業績[1][2]）

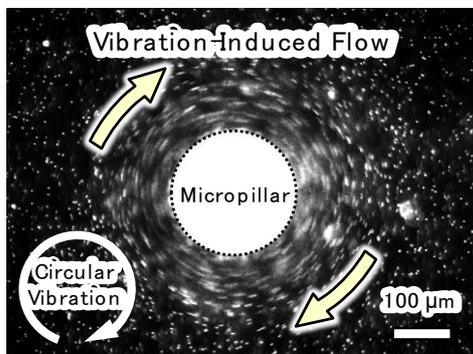


図1 マイクロピラー周囲の振動誘起流れ

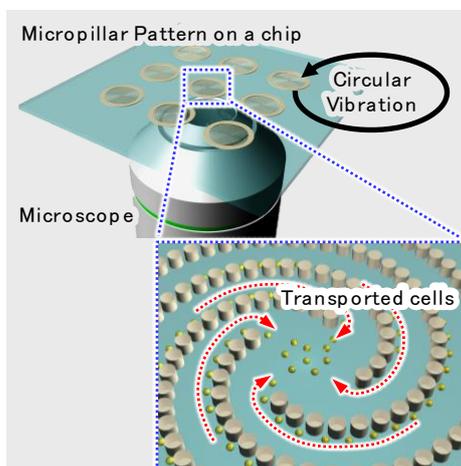


図2 振動誘起流れを用いた細胞操作

2. 研究の目的

本研究では、振動誘起流れを用いた細胞操作手法のさらなる応用を目指し、下記2点を目的として研究を遂行した。

(1) 振動誘起流れの流速分布と細胞操作軌道の周波数依存性を明らかにする。

(2) 上記で明らかにした特性を利用して細胞サイズフィルター、単一細胞のダイナミックトラップ等の新たな操作を実現する。

3. 研究の方法

研究代表者が研究業績[1]にて導出した解析式から、振動誘起流れの流速分布が印可振動の周波数に強く依存することが示唆されている。本研究では、まず(1)印可振動の周波数を変えた際の流速分布を実験的に計測し、その周波数依存性と操作する細胞の軌道の関係を明らかにする。

この結果に基づいて、(2)機械的なトラップ構造を用いない細胞サイズフィルターや、その他の細胞操作を提案する。マイクロ流体チップを用いた生体試料解析の際に、サイズに応じて細胞を分離するサイズフィルターが重要となるが、従来のフィルターではトラップ機構に細胞を流体力で押し付けて分離していたため、大量のサンプルを処理する際にフィルターが詰まってしまう、分離された細胞が流体力によりダメージを受けるといった問題があった。しかし提案方法を用いると、細胞サイズに応じてマイクロピラー間隔を設計することにより、大きい細胞Aと小さい細胞Bを、トラップ機構に押し付けることなく流体力のみで分離することが可能となる。さらにオープンチップの特性を生かし、分離された細胞を直接ピペットで回収することも可能である。

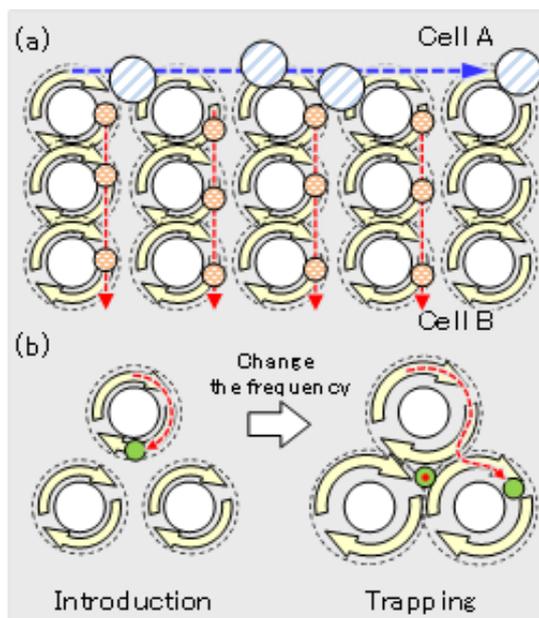


図3 振動誘起流れを用いた細胞操作。(a)細胞フィルター、(b)細胞トラップ

#### 4. 研究成果

まず、当初の目的としていた振動誘起流れの流速分布を定性的に確認し、異なるサイズの細胞を分離するフィルターの原理確認を行った。図4のように、マイクロピラーを直線に並べた際に、縦横の間隔を変えることによって、大きい細胞はピラー間を通らず図の左側へ搬送され、小さい細胞はピラー間を通過するため、図の下側に搬送されることを示した。従って、図4のようなマイクロピラーアレイを作製し、図の左側と下側に回収ポートを作製することによって、大小のサイズに分けた細胞を回収することが可能となる。今後は、対象となる細胞サイズに対して、ピラー径、ピラー間隔の設計を一般化し、具体的な細胞を対象として細胞分離実験を行う予定である。

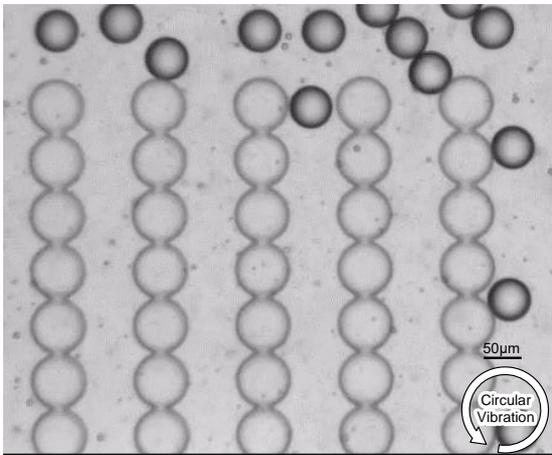


図4 振動誘起流れを用いた細胞サイズフィルター

また、振動誘起流れのさらなる応用として、従来は回転対称な形状のピラーを用いて細胞操作を行っていたが、非対称な構造を用いる方法を新たに提案した。図5に示す様に、非対称な構造を用いると、印可する円振動の方向によって、生じる流れパターンが変わることが分かる。この現象を利用して、流れパターンを切り替えることにより、異なる操作を一つのチップ上で実現できる可能性を示した。その応用例の一つとして、手裏剣形状のマイクロピラーアレイを用いることにより、搬送モードとアライメントモードの2つの操作モードを切り替え、細胞を一つずつ送り出す操作である。我々はこれをローディング操作と呼んでいるが、細胞を一つずつ決まったタイミング、決まった間隔で搬送することにより、細胞の凝集や処理時間のずれを無くした状態で、細胞の連続処理を行うことが可能となる。

このように、非対称構造を用いた振動誘起流れによる細胞操作法を新たに提案した。

さらに、振動誘起流れを用いた細胞操作の応用としてもう一つ、運動性細胞の並列トラップ手法も開発した。従来はチップに円振動を印可することにより細胞操作を行っていたが、直線振動を印可することにより、ピラー

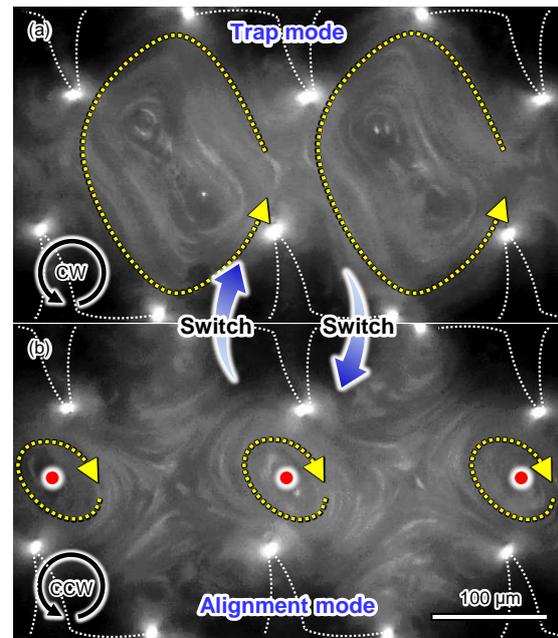


図5 非対称構造を用いた流れパターンの切り替え

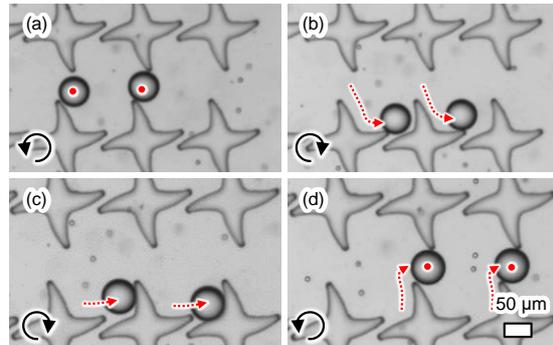


図6 細胞ローディング操作

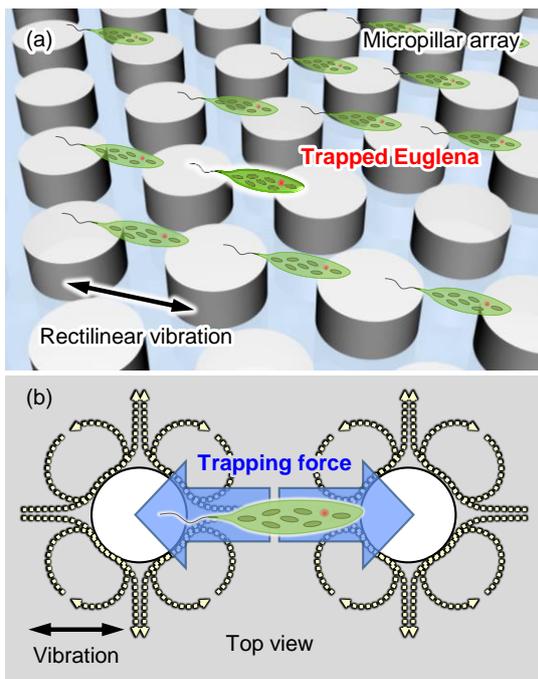


図7 振動誘起流れを用いた運動性細胞のトラップ操作のコンセプト

間に細胞をトラップする流れを引き起こし、それを用いて運動性細胞のトラップを行えることを示した(図7)。この手法を用いて運動性細胞であるユグレナをトラップし、さらにはトラップしている際の流速を変化させることにより、細胞の運動能力の評価を行える可能性を示した。これは、バイオ燃料や栄養食品、バイオアクチュエータの動力源として期待されている運動性細胞の運動能力を高効率に評価し、これらの応用研究を加速させる技術として期待される。

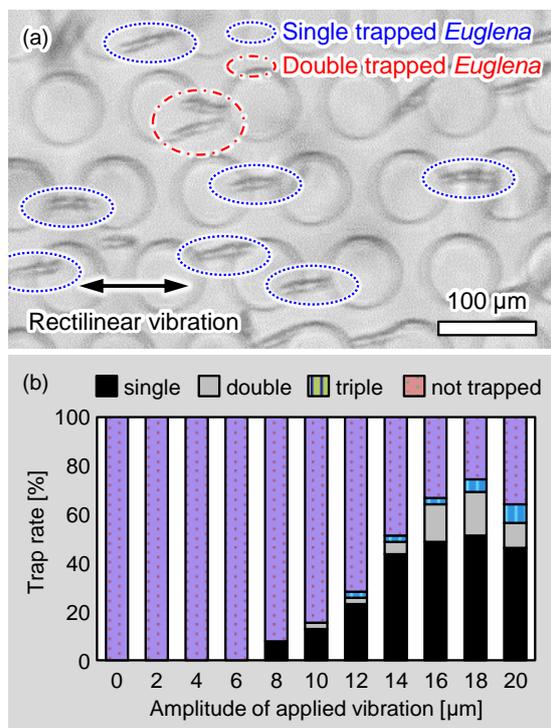


図7 振動誘起流れを用いた運動性細胞のトラップ操作。(a)トラップ時の顕微鏡画像、(b)印可振動の振幅の違いによる、トラップ率の違い。

#### <引用文献>

[1] Takeshi Hayakawa, Shinya Sakuma and Fumihito Arai, "On-Chip 3D Cell Rotation Based on a Vibration-Induced Local Whirling Flow", *Microsystems & Nanoengineering*, vol. 1, 15001 (2015).

[2] "A single cell extraction chip using vibration-induced whirling flow and a, thermo-responsive gel pattern", Takeshi Hayakawa, Shinya Sakuma, Takeshi Fukuhara, Yoshiyuki Yokoyama and Fumihito Arai, *Micromachines*, vol. 5, no. 3, pp. 681-696, (2014).

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 3件)

① Takeshi Hayakawa, Yuusuke Akita, Fumihito Arai, "Parallel Trapping of Single Motile Cells Using Vibration-Induced Flow on Microfluidic Chip", The 30th IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS 2017), Las Vegas USA, January 2017.

② Takeshi Hayakawa, Shinya Sakuma, Fumihito Arai, "Mode switching of on-chip manipulation method using vibration-induced flow for single particle loading", The 20th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS2016), Dublin Ireland, October 2016.

③ 早川 健, 秋田 祐甫, 新井 史人, 「振動誘起流れを用いた運動性細胞の並列トラップ操作」, 第34回日本ロボット学会学術講演会 (RSJ2016), 山形 日本.

[図書] (計 1件)

早川 健, 新井 史人 他, コロナ社, 「細胞の特性計測・操作と応用」, 2016年, ISBN: 978-4-339-07261-7

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

早川 健 (Takeshi Hayakawa)

名古屋大学 未来社会創造機構 助教

研究者番号: 70759266