

令和 元年 6 月 25 日現在

機関番号：32641

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K14623

研究課題名（和文）振動誘起流れ現象の三次元流れ解析および三次元細胞操作への応用

研究課題名（英文）3D observation of vibration-induced flow and its application to 3D cell manipulation

研究代表者

早川 健（Hayakawa, Takeshi）

中央大学・理工学部・助教

研究者番号：70759266

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、マイクロ流体に特有な振動誘起流れの三次元的な観察と、その三次元細胞操作への応用を目的として研究を行った。

本研究では、まず三次元流れを観察するための観察系の構築を行い、三次元的な流れの観察を行った。特に、印加する振動が直線振動と円振動の場合をそれぞれ観察し、発生する流れパターンが異なることを観察した。次に、観察した三次元的な流れを利用して、微小物体の三次元回転操作を行った。回転操作を行うためのマイクロ構造体のパターンを設計し、そこに円振動と直線振動を印加することにより、水平方向の回転と鉛直方向の回転を行うことに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、従来の手法よりも簡便なシステム構成で細胞の三次元操作を行う方法を提案した。また、三次元操作の一例として、卵細胞の回転操作への適用可能性を示した。このような技術は、例えば畜産業や生殖医療における卵細胞の胚操作に適用可能であると考えられ、バイオメディカル分野への貢献が期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we evaluate three-dimensional (3D) flow induced around vibrating microobject. And also, we propose 3D cell manipulation method based on observed 3D vibration-induced flow.

We developed 3D observation system of microflow in microfluidic device. We succeeded in observing 3D microflows induced around vibrating microobject. Especially, we found that the flow around micropillar were different when we apply circular and rectilinear vibrations. Furthermore, we applied this flow to 3D manipulation of cells. As an example of 3D manipulation, we demonstrated 3D rotation of microparticles. We succeeded in rotating a microparticles with size of 70  $\mu\text{m}$ , in horizontal and vertical directions, by changing directions of applied vibrations.

研究分野：知能機械システム

キーワード：微細操作 細胞操作 マイクロ流体 マイクロロボティクス Lab on a chip

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

### 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おり、これまでに光圧・電磁気力・音響放射力等を用いた操作法が実現されている。しかし、これらの手法は、操作力が弱い、作業範囲が狭い、チップの作製プロセスが複雑である、といった課題があった。また、これらの手法では主にシリコーン樹脂等で封止されたクローズなマイクロ流体デバイスを用いる必要があり、チップと外界をチューブ等で接続する必要があるため、細胞がその接続部で失われる、という重大な実用上の問題があった。

そこで我々は、チップ上の広い範囲で強い操作力が発生可能であり、チップの作製プロセスが容易で、

かつ封止をしないオープンなチップ上での細胞操作を実現する方法として、振動誘起流れを用いた方法を提案している。マイクロ領域では流体の粘性が支配的となるため、チップ上にマイクロ構造体を作製し、 piezoアクチュエータを用いてチップに数百 Hz の高速な振動を印可することにより、ピラー周囲に局所的な流れを誘起することができる（図1）。我々はこの現象を利用し、チップ上に構造体を配置することによって、細胞の搬送・回転・単一細胞分離操作を実現してきた。

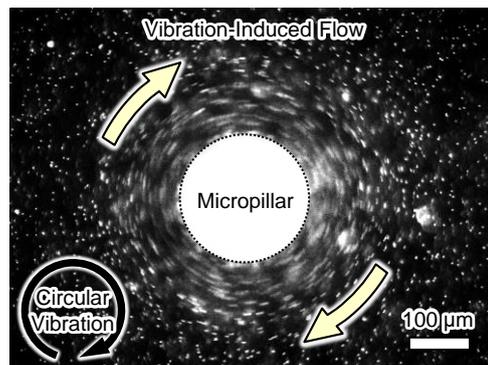


図1 振動誘起流れ

従来の振動誘起流れを用いた細胞操作では、主にチップに印可している振動面内に生じる二次元的な流れを利用した、二次元細胞操作に着目していた。例えば、細胞の三次元回転操作法も提案しているが、結局は印可している振動面内（ $xy$  もしくは  $yz$  平面）に誘起される流れを利用しており、三次元的な操作を実現するためには  $xyz$  の三自由度を持つアクチュエータを使用する必要があった。しかし、実際の実験では、 $xy$  面内の振動を印可した場合でも、 $z$  方向の垂直な流れが生じていることが確認されており、この三次元流れの細胞操作への利用が期待されている。そこで我々は、この三次元的流れを観察し、その特性を理解することにより、 $xy$  平面上の二自由度を持つアクチュエータを用いて振動印可条件を変えるのみで様々な三次元操作が実現できるのではと考え、本研究の着想に至った。

### 2. 研究の目的

本研究では、マイクロスケール特有の現象である振動誘起流れを用いて、マイクロ流体チップ上で細胞等の微小物体の三次元操作を行う方法を提案する。我々はこれまでに、マイクロ構造体に振動を印可した際に生じる振動誘起流れを用いて、チップ上での細胞の搬送・回転・単一細胞分離等の操作手法を提案してきたが、従来の方法では主に二次元的に生じる流れを利用した操作のみに着目していた。本研究では、まず（1）マイクロ構造体周囲に三次元的に生じる流れに着目し、この流れの方向・速度及び制御性の評価を行い、これを利用した（2）細胞の三次元回転操作及び三次元トラップ操作を実現する。

### 3. 研究の方法

前述のとおり、我々は直線振動をマイクロピラーに印加した際に、三次元的な流れが生じることを実験的に確認している。この流れの可視化に用いた粒子の軌跡から、マイクロピラー周囲に三次元的な流れが生じていることが予測されるが、この流れは顕微鏡の観察面に対して垂直方向であるため、通常の顕微鏡では流れの詳細評価を行うことが難しかった。

そこで本研究では、まず（1）振動により誘起される三次元的な流れを観察し、その流れパターンの形状、流速、制御性等の評価を行い基本的な特性を理解する。具体的には、三次元的な流れを観察するための観察系を構築し、微粒子を用いた流れの可視化実験を行うことにより、三次元的な流れの評価を行う。特に、印可振動の形状・マイクロ構造体の形状・振動数・振幅を変えた際に流れがどう変わるかを詳細に評価することによって、様々な三次元細胞操作の実現可能性を確認する。

次に、（2）この三次元流れを応用した三次元細胞操作の例として、細胞の三次元回転操作および三次元トラップ操作を実現する。三次元回転操作は、卵子のような構造異方性を持つ細胞において、任意方向からの観察や除核・遺伝子操作を行う際に非常に重要な操作となる。また、三次元トラップ操作は、三次元的に移動する運動性細胞を顕微鏡下で観察可能な領域に拘束し、その運動能を評価する際に必須となる操作である。

これらの三次元操作を実現するために、（1）の三次元流れの評価結果をもとに、どのような形状の構造体をチップ上にどう配置すればよいかを検討し、チップの設計・作製を行う。その後、作製したチップを用いた細胞操作実験を行う。回転操作においては、従来  $xyz$  の三自由度アクチュエータを用いて三次元回転を実現していたが、本手法を用いて  $xy$  面内の振動印可のみで三次元回転操作の実現を目指す。また、マウス卵子を用いて回転速度、応答速度や周波数応答等の制御性を評価する。トラップ操作（図5(b)）においては、三次元的に運動する運動細胞をトラップ可能なパターン形状を評価し、運動細胞の例としてミドリムシを用いた並列トラップの成功率の評価、および細胞の運動能の評価を行う。

#### 4. 研究成果

Z 方向の流れを評価するために、図 2 に示すマイクロ構造体を横から観察することが可能な観察系を構築した。観察系は、倒立顕微鏡(オリンパス, IX-73)の上に構築した。振動を印加するためにピエゾステージ(ナノコントロール, PK2H100-030U-N)を用い、作製したチップを接着剤で金属板の治具に固定し、ステージに取り付けた。ピエゾステージへの入力信号はファンクションジェネレータ(LeCroy, Wave Station2012)により生成し、高電圧アンプ(メステック, M-26110-3)により増幅してステージに入力した。観察された現象は CMOS カメラ(Advan Vision, Advan Cam E3R)を用いて撮影した。また、Z 軸方向の観察ではチップとレンズの距離が離れているため、長作動対物レンズ(シグマ光機, PAL-5)を用いた。また、横から観察する際に、曲面となる液面により光の屈折が生じ、観察像がぼける現象が見られる。これを低減するために、カバーガラスを用いて図 3 に示す様な観察用チャンバーを作製し、液面による屈折が生じないようにした。

構築された観察系を用いて、マイクロ流体チップに直線振動を印加した際の流れパターンを観察した結果を図 3 に示す。マイクロピラーの中腹部分では、これまで観察されていたような円形状の平面的な流れが観察されている。さらに、マイクロピラー上部では鉛直方向に渦流れが発生していることが観察された。

観察した流れをもとに、三次元細胞操作の一例として回転操作を行った。今回はマウス卵子と同程度のサイズである直径  $70\ \mu\text{m}$  のマイクロ粒子を対象として実験を行った。

粒子を回転させるためのマイクロパターンとして、マイクロピラーを 4 つ配置したパターンを作製し、直線振動を印加した。実験結果の一例として、直線振動を印加した際の連続写真を図 4 示す。 $70\ \mu\text{m}$  のマイクロ粒子の表面に付着した  $10\ \mu\text{m}$  の粒子に注目すると、図 5 (a) ~ (d) より、垂直方向において 1 秒間で約  $45^\circ$  回転していることが確認できる。また、同じデザインのマイクロパターンに回転振動をかけた際、水平方向において  $70\ \mu\text{m}$  のマイクロピラーが 1 秒間に約 3 回転する様子が確認された。

細胞の三次元操作のもう一つの例として、運動細胞の三次元トラップを行った。図 5 に示すようなマイクロピラーアレイを作製し、直線振動を印加したところ、ピラー上部にて運動細胞をトラップできることが分かった。今回はこの手法を用いて、運動性の微生物であるユーグレナ(サイズ: 約  $70\ \mu\text{m}$ ) をトラップすることに成功した。

本研究では、XY の 2 自由度のアクチュエータにより振動誘起流れを発生させ、その流れが三次元的な成分を持つことを確認した。また、その流れを用いて卵細胞と同程度のサイズの約  $70\ \mu\text{m}$  のマイクロピラーを三次元回転させることに成功した。また、運動細胞であるユーグレナを三次元的にトラップすることに成功した。今後は様々なマイクロ構造体を作製し、その周囲に起こる流れを観察することで、より様々な細胞操作への応用を行っていく予定である。さらに PIV 観察を用いた流れ場の定量評価を行い、流れ場から操作対象の物体がどのような力を受けているのかも解析を行う予定である。本研究により、マイクロ流体デバイス上での様々な三次元細胞操作が可能となり、微細操作技術の発展とともに、細胞解析技術への貢献が大いに期待される。

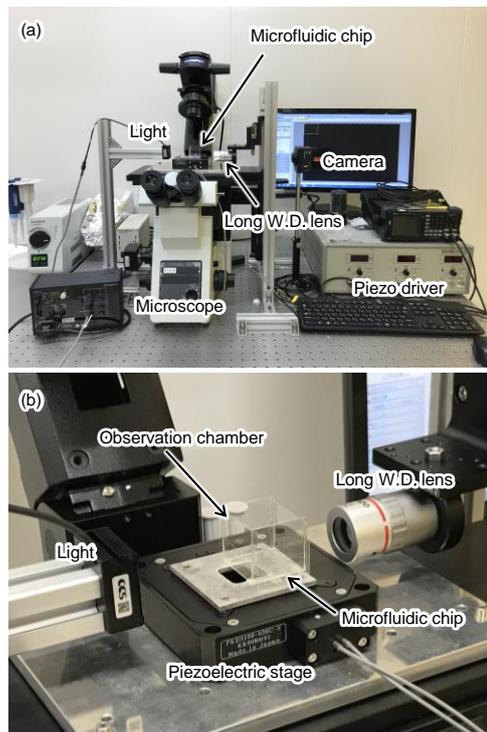


図 2 構築した三次元流れ観察系

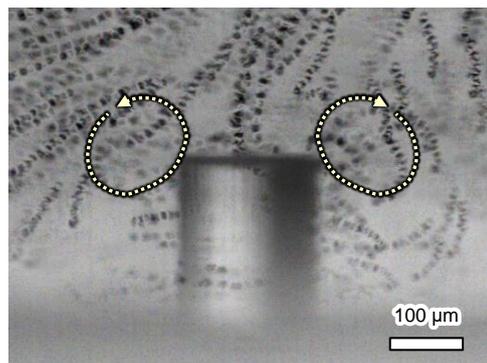


図 3 マイクロピラー周囲の三次元流れ

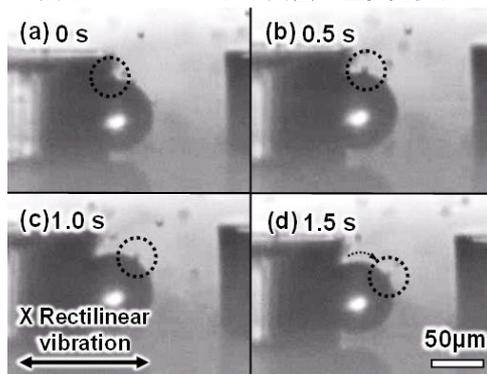


図 4 二次元振動による三次元回転操作

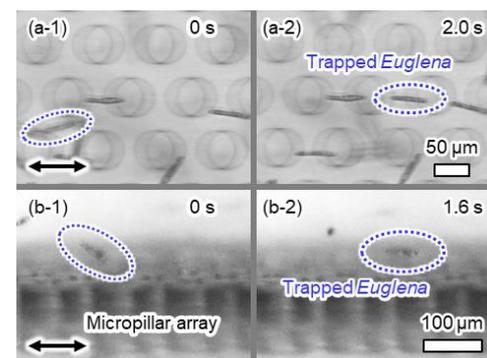


図 5 運動細胞のトラップ操作

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 1 件）

- [1] Takeshi Hayakawa, Yusuke Akita, Fumihito Arai, “Parallel trapping of single motile cells based on vibration-induced flow,” *Microfluidics and Nanofluidics*, vol.22, no. 4, 42, 2018. 査読あり.

〔学会発表〕（計 4 件）

- [1] 小林 勇太, 早川 健, 「振動誘起流れを用いた微小物体の三次元回転操作」, 日本機械学会ロボティクス・メカトロニクス講演会 2019 (ROBOMECH2019), 2A1-L09, 広島, 2019年6月.
- [2] Shun Nishimura, Takeshi Hayakawa, “Observation of Vertical Vibration-Induced Flow Towards On-Chip 3D Cell Manipulations,” The 22nd International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2018), pp.1725-1726, Taiwan, Nov. 15<sup>th</sup>, 2018.
- [3] 西村 駿, 早川 健, 「振動誘起流れの三次元観察」, 日本機械学会ロボティクス・メカトロニクス講演会 2018 (ROBOMECH2018), 2P2-J09, 北九州, 2018年6月.
- [4] Takeshi Hayakawa, Fumihito Arai, “On-Chip Micromanipulation Method Based on Mode Switching of Vibration-Induced Asymmetric Flow,” 2017 IEEE International Conference on Robotics and Automation (ICRA2017), pp.6631-6636, Singapore, May 29<sup>th</sup>, 2017.

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）  
該当なし.

○取得状況（計 0 件）  
該当なし.

〔その他〕

該当なし.

## 6. 研究組織

(1) 研究分担者  
該当なし.

(2) 研究協力者  
該当なし.

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。