

令和元年6月12日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K18841

研究課題名(和文) ゆらぎの確率過程を用いたマイクロ流体デバイス内の現象予測と信頼性評価技術の開発

研究課題名(英文) Reliability evaluation and characteristic prediction in microfluidic devices applying stochastic process of random fluctuation problem

研究代表者

巽 和也 (Tatsumi, Kazuya)

京都大学・工学研究科・准教授

研究者番号：90372854

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：現在、個々の細胞の特性を診断して高速に分取する技術の開発はバイオや医療の分野での高度な診断と創薬では不可欠である。本研究では、マイクロ流路とマイクロ電極を用いて誘電泳動力により流路を流れる粒子と細胞の位置、速度、間隔、そしてタイミングを制御し分取する技術を開発した。開発では決定論により物理特性と確率論によりランダム性を考慮し、数値解析における粒子・細胞の運動予測に活用することで粒子位置のばらつきを予測し、電極形状の開発に適用した。その結果、Boxcar型電極を設計して粒子と細胞の位置とタイミング制御を5%で行えることを確認し、梯子型電極と比較して50～100%の性能向上を達成できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超微小な流路を用いたマイクロ流体技術により医療、バイオ、化学の分野において粒子、液滴、細胞の生成、分析・診断、分取する技術の開発が進められている。本研究で開発した粒子と細胞の整列とタイミング制御技術は、粒子と細胞のセンシングと操作の高精度化が可能な要素技術である。開発では粒子と細胞の“ゆらぎ”を含めた運動予測の解析を用いてBoxcar型電極を設計することで、500nmと0.1msの精度で粒子と細胞の位置決めとタイミング制御が可能となり、カプセル化技術等、多くのマイクロ流体技術の開発に役立てることができる。また、開発した数値解析モデルもナノスケールや超高精度の制御技術の設計と開発に活用できる。

研究成果の概要(英文)：Developing a technology which can analyze and diagnose the cell characteristics and sort the cells with high throughput is an essential problem for developing the advance diagnosis and drug designing systems in the fields of biology and medicine. In the present study, we developed a technique that can control the position, velocity, spacing, and timing of the particles and cells flowing in the microchannel using dielectrophoretic force generated by microelectrodes. In the developing process, we have considered the physical characteristics and randomness of the particle motion by employing the determinism and stochastic methods, and applied it to the numerical simulation to predict the uncertainty of the particle position and design the electrode shape. We were able to develop the boxcar-type electrode which could control the particle and cell position and timing with accuracy of 5% variation and showing performance enhancement by 50～100% compared to the ladder-type electrodes.

研究分野：伝熱工学，マイクロ流体工学

キーワード：粒子と細胞 誘電泳動力 位置決めとタイミング制御 分取技術 マイクロ流路 ゆらぎと確率論

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

1 細胞ごとを分析して選り分ける(分取)技術は医療診断だけでなく、新薬開発や細胞に処理を施して体内に戻して治療する再生医療や免疫学的医療においても重要な技術である。医学や細胞学の分野で求められる処理性能は、処理細胞数と(機能)生存率を考慮した場合、100,000細胞/秒以上である。これを達成するためにはセンサの分解能だけでなく、細胞の位置や運動を機器内にて数100nmのレベルで制御する必要があるがその技術開発は難しい。その原因の1つは流れにおける細胞運動の予測が難しいことにある。細胞は個々に形状や力学的特性が異なる他、デバイス内の流体力や電気力にも時間的・空間的ばらつきが存在する。そのため細胞運動と位置には“ゆらぎ”が発生する。これらを正しく予測できなければ機器の設計ができないだけでなく、仕様と性能評価すなわち技術と機器の信頼性を正確に求めることができない。半導体の分野では分子・原子衝突確率に伴う“ゆらぎ”を確率論で表し、それを確率微分方程式で解いて統計学的解釈と融合することで飛躍的に格子欠陥・空孔形成による電気性能・材料強度の低下の予測精度を向上させる手法の研究開発が始まっている。この手法をマイクロ流体デバイスの開発と評価にも適用することを試みる。

2. 研究の目的

代表者は寸法が数十 μm のマイクロ流路や電極から成るマイクロ流体デバイスにおいて、個々の細胞特性を電気特性や蛍光標識により分析し、電気力と流体力により高速で分取する技術を開発している。本課題では、1節の研究開始当初の背景で述べた半導体の分野で開発が進められている手法をマイクロ流体デバイス内の細胞運動に融合し、運動とそのばらつきを予測する精度を向上させ、代表者が開発したマイクロ流体デバイスの粒子と運動解析に導入し、それを基にしてデバイスを設計と製作することで粒子と細胞の位置決めやタイミング制御技術の精度向上を図る。本申請では“ゆらぎ”の確率過程を伊藤論に基づく確率微分方程式で解き、決定論的統計論に基づくデータと組み合わせることで“ゆらぎ”を持つ流体内の細胞運動の高度予測技法ひいては高度信頼性評価法の確立を図る。モデル開発は共同研究者と連携して行い、さらにナノスケールの運動予測と性能評価へのモデル適用を検討するため、半導体材料表面における1原子運動と欠陥形成過程についても解析と予測を行い、実験計測結果と比較することで本評価手法の妥当性を検討する。

3. 研究の方法

形状や力学性状が異なる細胞が流路内を流れ、流体力と誘電泳動力により位置決めおよび高速分取される場合、その位置・速度・分取性能は不確定要素によりばらつきを持つ。機器の設計では、このばらつきも考慮して寸法と条件等の仕様を設定する必要があるが、その分布を予測するモデルの開発が必要である。本課題では確率論の“ゆらぎ”を確率微分方程式で解き統計データと組み合わせることで高度予測技法の確立を図った。この場合、個々の粒子と細胞の運動における“ゆらぎ”と統計分布のモデル化に必要なモデル定数は、数値解析や実験計測から求めた粒子と細胞運動と位置の確率密度分布と時間経過のデータを用いた。

解析では伊藤論だけでなく、“ゆらぎ”の確率論と分布は Polynomial Chaos Expansion 法(PCE)を適用も試みた。PCE法は確率分布を外挿する手法を用いて数値解析であり、計算負荷が大幅に縮小できることから、実用化の段階における設計に活用できる。PCEをそのまま移流と拡散の方程式に適用してそのまま時間微分を解くことで細胞運動の時間予測を行う事が可能である。適用例は、研究目的でも述べたように、細胞分取のマイクロデバイスにおける粒子と細胞の位置決めとタイミング制御の技術とし、これまでの代表者が開発した技術と比較して、どこまで正確に運動を予測できるか、より高精度な装置の設計をしめすことができるかを、デバイスを製作して実験することで実証する。さらに、共同研究者側でも材料表面の欠陥形成過程の予測と材料の信頼性評価にも適用しモデルの検証を行った。

粒子や細胞運動予測モデルにおけるモデル定数の算出には、粒子と細胞の運動に関する3次元数値解析を活用する。粒子や細胞の形状や寸法による粒子や細胞に作用する流体力や誘電泳動力のモデル化と計算コードの開発を行った。この場合、力学的には細胞の変形特性や見かけ上の非ニュートン特性を考慮した。さらに多重層から成る細胞がマイクロスケールの電場内に位置する場合、従来の Clausius-Mossotti 関数による近似では力が正しく計算できない。そのため高精度モデルの開発(CM関数の高次元化もしくは直接細胞内電場解析)を適用して計算を行った。

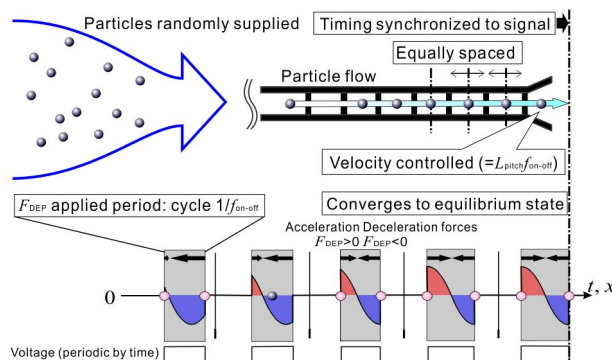
これらの解析手法を用いてマイクロ流路内の粒子と細胞の運動および位置決め・整列機構における粒子と細胞の変形と回転・並進運動の解析を行い、形状、表面性状、力学特性、流れと電場の摂動が運動に与える影響を求めた。計算で得られた特性から、細胞運動の“ゆらぎ”が起因する要素を求め、その確率分布と確率過程のモデル化と粒子と細胞の運動解析を行った。

代表者は誘電泳動力(非一様な電場分布内の細胞に働く力)を用いて、粒子と細胞の流路断面内の高さや幅方向の位置制御(レール型電極)と主流方向の流れながらの整列(梯子型電極)を創案し、デバイスの開発を行っている。この機器について、マイクロ流路内での粒子と細胞運動を高速度・高感度ビデオカメラを用いて撮影し、粒子と細胞の運動解析の精度と位置決め性能の評価を行った。このデバイスでの誘電泳動力生成のための電極について、その形状設計に対して前述の粒子と細胞の運動に関する数値解析の結果をフィードバックさせた。得られた

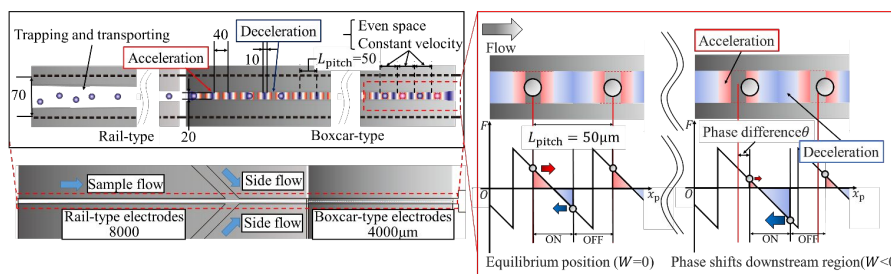
最適な電極形状についてデバイスを製作して粒子と細胞の位置，速度，間隔，タイミングの制御の精度に関する評価を行い，設計による効果と有効性を示した．

4．研究成果

粒子と細胞の流れの中における位置，相互の間隔，速度，タイミングを制御するために，図 1 に示すような Boxcar 型電極の開発を行った．電極機構は，マイクロ流路の上壁全面に接地電極を，下壁に Boxcar 形状（または梯子型形状）の電極を付設する．電極間に 1MHz の交流電圧を印加することで，流路幅と高さ方向の特定位置に収束するように粒子に誘電泳動力が付加される．さらに粒子を主流方向に加速と減速させる誘電泳動力が主流方向に周期的に生成される．これに加えて印加電圧を周期的にオン・オフすることで粒子を平衡位置に収束させ，粒子が流れる中で整列できる．粒子が平衡状態にあり，整列したときは粒子が Boxcar 型電極の 1 周期領域を通過する間の通電する時間帯で粒子に誘電泳動力が作用して加速・減速するが，その仕事は図 1(a)と(b)の右図に示すように $W = 0$ となる．この平衡状態から粒子の速度，通電時との相対位置（時間）が変化すると，位相がずれることによる付加的な力が粒子にかかり，粒子が加速・減速する（図 1 参照）．粒子が平衡位置より下流に変位した場合，主流方向に負の力が働く領域が増大し，1 周期領域内で粒子に働く力による仕事の総和は $W < 0$ となり，粒子は減速する．その結果，粒子の相対位置（位相）は上流方向に移動し，位相のずれが修正される．逆に，上流方向に位相がずれた場合，仕事の総和は $W > 0$ となり，粒子は加速する．さらに，粒子が Boxcar 型電極の 1 周期を通過する時間と電圧のオン・オフの周期は連動するため，粒子の速度が設定できるだけでなく，オン・オフの変動に対しても粒子の主流方向位置が同期することから，信号の位相を変えることで粒子の流路の特定位置を流れるタイミングを制御できる．これらにより，粒子は特定の相対位置に収束し，速度，間隔，同期の制御が行える．



(a) 粒子と細胞の整列とタイミング制御の概略図



(b) Boxcar 型電極の模式図と動作原理

図 1：(a) 本手法による粒子と細胞の間隔・位置・タイミングの制御技術の概略図と
(b) Boxcar 型電極の模式図と整列とタイミング制御機構の概略図．

ここで重要なのは粒子と細胞の位置制御を行うための精度である．技術として 1 秒間に 1,000~10,000 個/s 以上の粒子と細胞の位置制御と分取を可能とするためには，空間および時間分解能として 100~500nm と 10~100 μ s 以上の制御精度が要求される．それを満たすために本課題で開発した粒子と細胞の運動解析モデルを用いて電極設計を行った．解析では誘電泳動力と粒子運動を 3 次的に解くものであるが，その中に確率論に基づくランダム性を考慮したモデルを導入して粒子の運動と位置のばらつきを予測し，効果的な電場を形成する電極形状の検討を行った．その結果，代表者が開発した従来の電極は梯子形状型のものであるが，粒子と細胞の流れの中で振動する場合があります，制御がやや不安定であった．そこで解析の結果，図 1 に示す Boxcar 型電極を提案し，その寸法設計も行った．その設計に基づき電極とマイクロ流体デバイスを製作し，実験により精度と性能の検証を行った．

図 2 に Boxcar 型電極を流れるときの粒子速度 u_p と制御信号との位相差 θ の変化を示す．周期領域数 i が 1 のときが電極領域（制御領域）の入口である．入口では u_p は一定のばらつきを

持ち、 θ はランダムな値を示す．それが下流では共に一定の値に収束することが分かる． u_p は 6.25mm/s に収束するが、これはオン・オフ周波数 f_{on-off} と電極周期領域の主流方向のピッチ L_{pitch} としたときの制御値である $f_{on-off} \cdot L_{pitch}$ の値と一致する．また、 θ に関しては一定の値に収束することから、制御信号に対して特定のタイミングで位置決め（同期制御）出来ることが確認できる．

図3にBoxcar型電極の入口と出口近傍における Δt に関する確率密度分布を示す． t_s は $1/f_{on-off}$ であり制御時の時間間隔であり Δt は計測における粒子同士の時間間隔の t_s に対する差である．図3(a)に示す入口では $\Delta t/t_s$ は一様な分布を示し、粒子がランダムな間隔で流入することが分かる．それに対して出口では $\Delta t/t_s$ は0を中心として集中しており、そのばらつきも $\pm 3\%$ 以下である．このように粒子同士の間隔も高精度で制御できる．

ここでは示さないが、粒子径(5~10 μm)や流速を変化させた場合でも実験を行い、それぞれ同一の速度、間隔、タイミング(位相)に収束することを確認できた．このことからマイクロ流体デバイスを通る粒子と細胞について、運動に影響し得る要素にばらつきがあっても目標値に高精度で制御できることを示せた．これは事前に数値解析による精度良く粒子と細胞の運動を予測できたためであると言える．これらの成果は国際雑誌 Analytical Chemistry にて発表した．

また、共同研究者でもナノスケールにおける材料格子の表面にイオンが衝突する場合の侵入経路を確率微分方程式を用いて解析を行い、それによる得られる材料の欠陥形成やダメージの予測と測定による検証を行った．その成果は IEEE Transactions on Electron Devices にて発表した．

今後は、本技術を液滴形成機構と組み合わせて液滴への粒子、細胞、試薬封入の技術開発を行い、精度と性能を数十倍に向上させることで創薬や診断への応用と発展を図る他、プラズマクラスター生成や、ナノ粒子や高分子群の制御による対流熱物質輸送と伝熱への応用など、分野に広く展開を開始している．

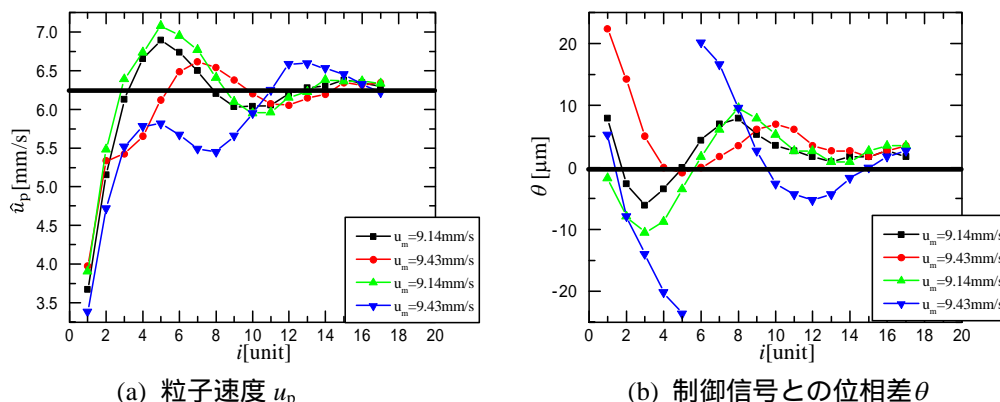


図2：各粒子の速度 u_p と制御信号（電圧の on-off 周期）との位相差 θ に関して電極の周期領域数 i に対して目標値に収束の様子．

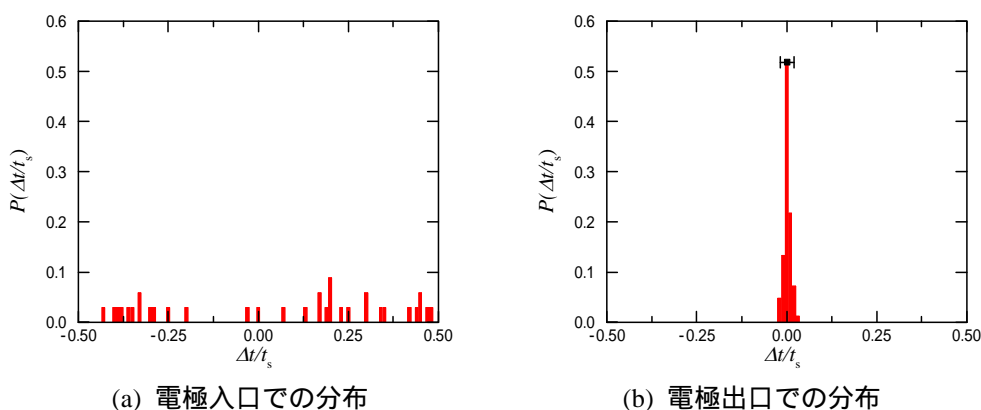


図3：粒子同士の時間間隔 Δt に関するBoxcar電極領域の入口と出口における確率密度分布

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. K. Tatsumi, K. Kawano, H. Shintani, K. Nakabe, Particle Timing Control and Alignment in Microchannel Flow by Applying Periodic Force Control Using Dielectrophoretic Force, Analytical

Chemistry, Vol. 91, Issue 10 (2019), pp. 6462-6470.

2. Z. Wei and K. Eriguchi, Analytic Modeling for Nanoscale Resistive Filament Variation in ReRAM With Stochastic Differential Equation, IEEE Transactions on Electron Devices 64, (2017) 2201-2206. (10.1109/ted.2017.2681104)

〔学会発表〕(計 7件)

1. 本間怜人, 野間淳志, 巽和也, 栗山怜子, 中部主敬, 誘電泳動力を用いたマイクロ流路内粒子ピッチングマシンの制御特性評価, 機械学会 第9回マイクロ・ナノ工学シンポジウム 2018, 2018/10/30.
2. A. Noma, K. Tatsumi, R. Kuriyama, K. Nakabe, Evaluation of Particle Motion Characteristics in Microchannel Flow Alignment System with Ladder-type Electrodes, 6th Micro and Nano Flows Conference (2018), September 9, Atlanta.
3. 野間淳志, 本間怜人, 巽和也, 栗山怜子, 中部主敬, Boxcar型電極を用いたマイクロ流路内流れにおける粒子の速度・間隔・同期制御, 日本流体力学会年会 2018, 2018/9/3.
4. 巽和也, マイクロ流路強制対流輸送 - 粒子・細胞のセンシングと分取機構 -, 第13回学術交流講演会(招待講演), 2018/6/13.
5. 野間淳志, 巽和也, 栗山怜子, 中部主敬, 梯子型電極を用いた誘電泳動力によるマイクロ流路流れでの粒子の速度・間隔・同期制御, マイクロ・ナノバイオ医療デバイス研究会, 2018/3/5.
6. 野間淳志, 榎坂武彦, 巽和也, 栗山怜子, 中部主敬, 誘電泳動力によるマイクロ流路内流れにおける粒子の間隔と同期制御, 第30回バイオエンジニアリング講演会, 2017/12/14.
7. K. Tatsumi, Microfluidic convection: convection and alignment control of particles in micro-channel flows using dielectric force, Invited lecture in Polish-Japanese Seminar on Innovative Technologies in heat transfer, fluid mechanics and thermodynamics, (2017), September 12, Krakow.

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://mtfm.me.kyoto-u.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 江利口浩二

ローマ字氏名: Koji Eriguchi

所属研究機関名: 京都大学

部局名: 工学研究科

職名: 教授

研究者番号(8桁): 70419448

(2)研究協力者

研究協力者氏名:

ローマ字氏名:

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。