

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 18 日現在

機関番号：13904

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22810012

研究課題名（和文） ツリガネムシの協調動作制御による生物融合型 MEMS デバイスの開発  
 研究課題名（英文） Development of Hybrid Cell MEMS by Controlling Coordinated Motion of *Vorticella*

研究代表者

永井 萌土 (NAGAI MOETO)

豊橋技術科学大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号：00580557

研究成果の概要（和文）：

生体の運動器官（バイオアクチュエータ）は、駆動回路を内蔵したアクチュエータであり、MEMS システム全体の小型化に有効である。バイオアクチュエータを活用したシステムとして、ツリガネムシの収縮・伸張運動を利用したフローレギュレータを開発した。流路内に導入したツリガネムシに  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を変化し、数十  $\mu\text{m}$  の動作範囲で収縮・伸長させた。伸長時には流路の流れが変化し、流体制御の可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：

We demonstrate flow regulation powered by a stalk of *Vorticella*. We introduced *Vorticella* into a channel and caused the stalks to contract and extend by changing calcium ion concentration. The extended cells transformed the flow through the channel, which shows the controllability of a flow rate.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,180,000	354,000	1,534,000
2011 年度	1,080,000	324,000	1,404,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,260,000	678,000	2,938,000

研究分野：マイクロ・ナノ工学，バイオ MEMS、マイクロ分析システム

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学 ・ マイクロ・ナノデバイス

キーワード：バイオアクチュエータ，マイクロ流体デバイス，ツリガネムシ，バイオ MEMS，フローレギュレータ，協調動作制御

## 1. 研究開始当初の背景

マイクロシステム全体を小型化にし、応用分野を大きくするためには、駆動回路を内蔵したアクチュエータが必要になる。生体の運動器官（＝バイオアクチュエータ）は自発的に動作し駆動源を内蔵するため、バイオアクチュエータの活用により、システム全体の小型化が可能となる。

## 2. 研究の目的

本研究では、MEMS（Micro Electro Mechanical Systems）技術で作製した人工物を生物アクチュエータ（ツリガネムシ）と融合し、生物融合型 MEMS デバイスを開発することを目的とした。この具体的な目標として、微小流路とツリガネムシを融合し、収縮・伸張運動により流量を制御するデバイスを作製した。

### 3. 研究の方法

ツリガネムシは釣鐘状の虫体とフィラメント状の“柄”と呼ばれる運動器官を保持する。柄は細胞膜を透過処理すると、 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の増減により意図的に収縮・伸長するリニアアクチュエータとなる。

本研究で提案するマイクロ流体制御素子は、軟質なシリコン樹脂の一種であるPDMS（ポリジメチルシロキサン）製である。上層に溶液流路層、下層に制御流路層の2層構造を有する。素子は3つの主要な要素で構成される：1) 流量制御部。ツリガネムシを格納し流量制御を行う。18個直列に配置されたボトルネック状の要素で構成する。単一要素の容積は $300 \times 100 \times 28 \mu\text{m} = 0.84 \text{ nL}$ である。2) 導入・排出用の流路。ツリガネムシと4種溶液（細胞膜除去用処理液、収縮、伸長用溶液、流量評価用蛍光微粒子懸濁液）を導入・排出する。3) 空圧バルブ及び制御用流路。流量制御部と各溶液の導入を選択的に行う。

バイオアクチュエータ融合型マイクロ流体制御素子の動作原理を図1に示す。流路内に流れる液体の流量を $Q$  ( $\text{m}^3/\text{s}$ )、液体導入への印加圧力 $\Delta p$  (Pa)、流体抵抗 $R$  ( $\text{Pa s}/\text{m}^3$ )とすると、関係式は次式 $Q = \Delta p / R$ になる。 $\text{Ca}^{2+}$ により柄を収縮・伸長させて、流路抵抗を2状態で切り替えて、流量を調整できる。

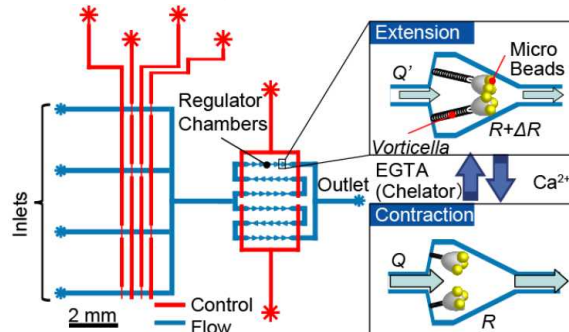


図1 ツリガネムシ駆動による流量制御原理

ここで要素の効果を増大かつ平均化するために、18要素を直列に配置して、各要素内で発生する流体抵抗を加算している。2系統の要素群を設け、異なる濃度でツリガネムシを定着して、1つの流体デバイスにて2種類の流量制御が可能である。

ツリガネムシを用いて流量制御を行うにあたり、マルチレイヤソフトリソグラフィ法により多層流路を作製した。作製した多層流路を図2に示す。流路中に空圧バルブを設けて、溶液種類の選択、系統の変更を行う。空圧バルブは、下層から圧力を印加して、上層の溶液流路を押し上げる Push-up 方式である。

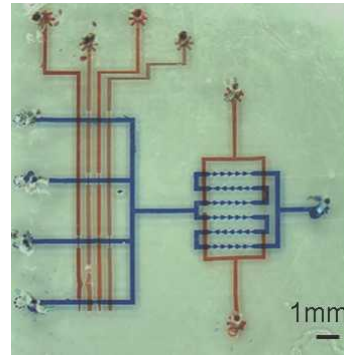


図2 作製した流体デバイス。

それぞれの流路の母型は、フォトリソグラフィ技術によって作製する。溶液流路にはリフロー可能なポジ型厚膜レジスト、制御流路型にはネガ型厚膜レジストを使用した。ポジ型レジストはさらに耐久性の高いエポキシ樹脂製の型へ転写して使用した。

### 4. 研究成果

#### (1) 多層流路の流れ特性評価

作製した多層流路の基本特性理解のために、流速を評価した。流れの可視化のために、蛍光微粒子を用いた。各色溶液を液溜めのチューブに充填し、内径 $300 \mu\text{m}$ の塩化ビニルチューブを介して多層流路入り口に接続した。懸濁液の導入には静水圧を用いた。空圧バルブを切り替えて、溶液を選択した。平均流速は、流路出口近傍を流れる蛍光微粒子の移動速度から算出した。

平均流速評価結果を図3に示す。静水圧を $0 \text{ cmH}_2\text{O}$  ( $=0 \text{ kPa}$ )から $10 \text{ cmH}_2\text{O}$  ( $=0.98 \text{ kPa}$ )に増加させると、平均流速は $1.8 \times 10^3 \mu\text{m/s}$ から $19.4 \times 10^3 \mu\text{m/s}$ まで線形的に増加した。流れは加圧圧力に比例する。

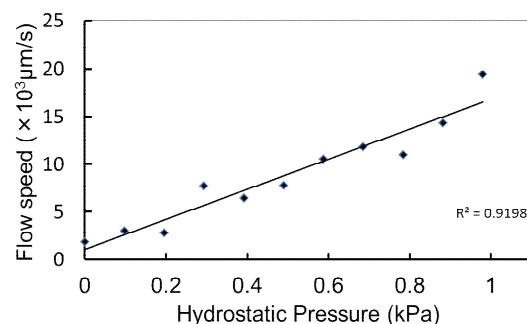


図3 静水圧と流速の関係

#### (2) 流路内におけるツリガネムシ導入

ツリガネムシが流量制御部に導入、定着を確認した。ツリガネムシ懸濁液を遠心加速度 $3,000g$ で遠心濃縮し、ミネラルウォーターで $5.0 \times 10^3 \text{ cells}/\mu\text{L}$ に調整した。シリンジを用いてツリガネムシの懸濁液を溶液流路内に導

入し、導入後空圧バルブで流量制御部を閉鎖した。これは流路幅が広い領域にツリガネムシが移動するのを防ぐためである。室温で12時間静置し、流路表面への接着と柄の成長を行わせた。

溶液流路内の導入後、ツリガネムシは4-5時間で流路内に定着した。導入後12時間後に、柄長は平均  $39 \pm 11 \mu\text{m}$  ( $n=20$ ) に成長した。導入したツリガネムシの定着数の分布評価結果を図4に示す。18要素のすべてにツリガネムシが定着した。2匹以上存在した要素は7/18である。デバイスを動作させるための目標数は2-3匹/要素であり、これを満たす。

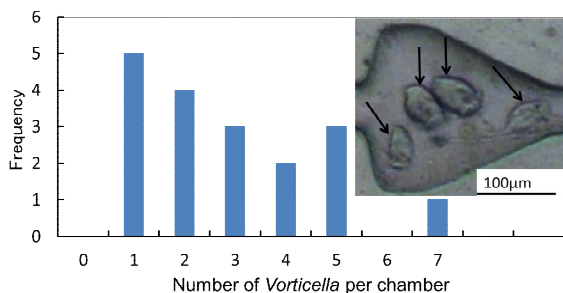


図4 要素内に接着した細胞数の分布

### (3) 流量制御部内での収縮伸長動作

流量制御部内でツリガネムシの収縮伸長制御を行った。界面活性剤で透膜処理、伸長液（兼リンス液）により処理液を洗い流し、つづいて収縮液を導入した。収縮・伸長動作は、倒立顕微鏡と×20対物レンズを使用して観察した。溶液導入の加圧は静水圧をもちいて  $10 \text{ cmH}_2\text{O}$  ( $=0.98 \text{ kPa}$ ) とした。空圧バルブを半開にし、流速をさらに減少させた。

図5に収縮液、伸長液導入時における柄長変化を示す。柄は約  $50\text{--}40 \mu\text{m}$  で変化し、収縮液導入直後から収縮までに約40秒を要した。柄の収縮も同様の時間を要した。10 kPa以上の印加で細胞体が脱離した結果に比べ、低圧力の印加により細胞の脱離を防ぐことができた。ツリガネムシを流量制御用アクチュエータとして機能させるためには、変位量は  $50 \mu\text{m}$  程度が望ましい。このため培養条件の改善によりツリガネムシの柄長を大きくすれば、より大きな流量変化を発生できる。

### (4) ツリガネムシ有無による流れ比較

流路出口近傍でツリガネムシ有無による流速変化を蛍光微粒子で計測した。平均粒径  $0.5 \mu\text{m}$  の蛍光微粒子懸濁液を溶液流路に導入した。倒立顕微鏡と10倍の対物レンズで観察した。流路出口近傍の単位時間あたりの微粒子移動距離を流速とした。流量制御部に定着したツリガネムシは自発的な収縮を防ぐために界面活性剤で処理した。蛍光微粒子懸濁液の導入時の印加圧力は  $0.98 \text{ kPa}$  に設定した。

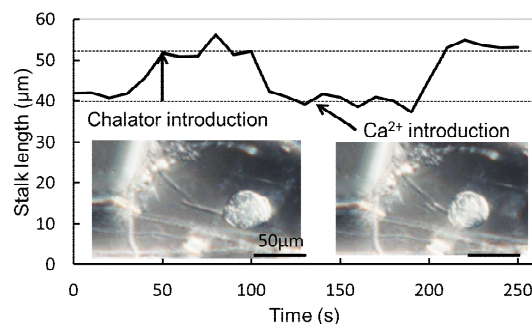


図5 収縮液と伸長液を利用した柄長制御

流速の評価結果、ツリガネムシが流量制御部に定着、伸長している場合、流速は約  $0.5 \times 10^3 \mu\text{m/s}$  であった。ツリガネムシ無しの場合、約  $10 \times 10^3 \mu\text{m/s}$  であった。流速は20倍程度変化し、ツリガネムシによって流量制御部の流体抵抗の増加を示している。ツリガネムシの有無で流量が変化させられる。この状態で収縮・伸長動作をさせれば、流量が変化することが期待される。

本研究では、ツリガネムシを人工物と融合させて、流量制御素子としての活用を提案した。またそれに向けた基礎技術を開発した。ツリガネムシをマイクロ流路内に導入し、さらに  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の増減によりバイオアクチュエータとして駆動させた。ツリガネムシの有無により、流速を評価した。本研究の成果はバイオアクチュエータを利用したマイクロシステムの発展につながると考えられる。

## 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)

[雑誌論文] (計4件)

1. N Matsumoto, M Nagai, Y Hayasaka, M Oguri, T Kawashima and T Shibata, "Flow Regulator Powered by the Stalk of Vorticella convarallia," Journal of Physics: Conference Series, vol. 352, p. 012030, 2012. 査読有
2. 早坂陽, 永井萌土, 松本伸賢, 川島貴弘, 柴田隆行, "ツリガネムシの繊毛運動を用いたマイクロミキサの流れ場解析", 電気学会 E 部門誌, vol.132, pp. 58-63, 2012. 査読有
3. Moeto Nagai, Hiroshi Asai, and Hiroyuki Fujita, "Contraction and extension of Vorticella and its mechanical characterization under flow loading," Biomicrofluidics, vol. 4, p. 034109, (2010). 査読有
4. Moeto Nagai, Sangjin Ryu, Todd Thorsen, Paul Matsudaira, and Hiroyuki Fujita, "Chemical control of Vorticella bioactuator using

microfluidics,” Lab on a Chip, vol. 10, pp. 1574-1578, 2010. 査読有

[学会発表] (計 5 件)

1. Moeto Nagai, “Cell Manipulation and Intracellular Delivery of Biomolecules for High-throughput Cell Analysis,” The 3rd International Symposium on LifeChips, University of California, Irvine, 2012 年 2 月 9, 10 日.
2. Yo Hayasaka, Moeto Nagai, Nobuyoshi Matsumoto, Takahiro Kawashima, and Takayuki Shibata, “Cilia of Vorticella for Active Microfluidic Mixing,” International Workshop on Micro-/Nano-Engineering, 京都大学桂キャンパス, 2011 年 12 月 17, 18 日.
3. Nobuyoshi Matsumoto, Moeto Nagai, Yo Hayasaka, Michihito Oguri, Takahiro Kawashima, and Takayuki Shibata, “Flow Regulator Powered by the Stalk of *Vorticella convallaria*,” *The Asia-Pacific Interdisciplinary Research Conference* 2011 年 11 月 17, 18 日.
4. 早坂陽, 永井萌土, 松本伸賢, 川島貴弘, 柴田隆行, “ツリガネムシの繊毛運動を用いたマイクロミキサの流れ場解析”, 第 28 回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム, pp.365-370, 2011 年 9 月 26, 27 日.
5. 松本伸賢, 早坂陽, 永井萌土, 川島貴弘, 柴田隆行, “ツリガネムシの運動器官を利用したマイクロ流体素子の開発”, 平成 23 年度電気学会センサ・マイクロマシン部門総合研究会, pp. 11-16, 2011 年 6 月 30 日, 7 月 1 日, 東京工業大学すずかけ台キャンパス, 神奈川県横浜市

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

<http://www.tut.ac.jp/teach/main.php?mode=detail&article=667>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永井 萌土 (NAGAI MOETO)

豊橋技術科学大学・大学院工学研究科・助教  
研究者番号 : 00580557

(2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者

( )

研究者番号 :