

令和元年6月5日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2018

課題番号：15K13919

研究課題名（和文）ミミズ体壁筋を用いた微小流路内流体制御・物質輸送システムの創出

研究課題名（英文）Creation of microfluidic and transportation devices using earthworm muscle

研究代表者

田中 陽（Tanaka, Yo）

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・ユニットリーダー

研究者番号：40532271

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：水の流れを制御する機械であるポンプやバルブは最先端研究分野において、小型化が求められているが、従来の機械工学では、電源やワイヤーなどが不可欠なため限界がある。そこで研究代表者らは、これらの問題のない生体筋肉組織の利用を考え、ミミズ筋肉を用いた小型ポンプを試作した。微細加工技術によりマイクロ流体チップ上に流路とポンプチャンバーを作製し、その上にミミズ筋肉を載せて固定した。電気パルスで連続的に刺激を与えたところ、シートの収縮によりチャンバー内の水が押し出されて送液を確認できた。また、同様の構造でミミズ筋肉を用いたバルブ、ロボットを作製することにも成功している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回試作したデバイスは、動作のためのエネルギー源はアデノシン三リン酸（ATP）である。神経組織なども含めて、人工的にミミズと同様の構造を作ることができれば、電気なしでも使える可能性があることから、本成果、超微小デバイスを開発していく上でのモデルになると考えられる。今後、より人工的なアクチュエータとして工学ないし医療など様々な用途に使えるものに発展させられることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Miniaturization of pumps and valves are required in many fields, but there has been a limit due to the electric power source and wire in case of using conventional machine engineering. Here, we use muscle tissue that has no such issues, and developed an earthworm muscle based small pump. By using microfabrication technique, a microchannels and chamber was fabricated. The earthworm muscle was fixed on it. Fluid pumping was confirmed when electric pulse stimulation was added. In a similar structure with a system completely clogging the channel by a membrane due to the muscle contraction, a valve was created. Earthworm based robots were also created.

研究分野：ナノ・マイクロ科学

キーワード：マイクロ・ナノデバイス マイクロマシン 流体力学 生物機能利用 筋肉 ミミズ ポンプ バルブ

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

クリーンテクノロジーの開発目標の一つに、外部からの電力供給に依存せず、材料自体も全て自然に還元される機械の構築が挙げられる。そこで、生物の持つシステムに目を向けると、その構成単位である細胞や組織は機能の詰まった機械素子と見なすことができる。電力ではなく栄養や酸素という化学エネルギーのみで機能を発現でき、材料は自然に還元されるという点で、生物を材料とする機械は一つの理想形といえる。

一方、水などを送る機械であるポンプは、エネルギーやスペースの低減が要求される、微量サンプルの分析や体内埋め込み装置開発などの最先端研究分野において、小型化が求められている。しかし、従来の機械工学による小型化では、電源やワイヤーなどが不可欠なため限界がある。そこで研究代表者らは、生体筋肉組織を利用することにより、従来の機械工学では困難な小型で高効率のポンプが実現できるのではないかと考えた。

研究代表者らの研究グループはこれまでに、新生ラットの心筋細胞を用いたポンプやシビレイを用いた発電機など、生物が持つ細胞・組織機能をマイクロ流体デバイスに実装する技術を開発してきた。マイクロ流体デバイスは、いわゆるフォトリソグラフィ技術ベースとして作製した数百 μm 以下のきわめて細い流路を数 cm 角の基板に加工したものである。ガラスもしくは高分子エラストマー製基板上に微細な流路を集積し、微量試料の分析・合成など化学・生化学実験を集約化したものであり、医療診断や環境分析等のための流体・化学デバイスの小型化・高速化および次世代化を可能にするものとして様々な応用が考えられている。

この分野で用いられるポンプについては、自在に伸縮操作ができる制御性、1秒以内の応答速度、1ミリニュートン (mN 、約 0.1g 重) 以上の収縮力、流体制御のために体積変化ができる環状または袋状の組織構造といった、さまざまな条件を満たす必要がある。しかしながら、研究代表者らが以前に開発した新生ラット心筋細胞を用いたポンプは、心筋が拍動するため制御性に欠け、収縮力もマイクロニュートン (μN 、 $1\mu\text{N}$ は 100 万分の 1 ニュートン、約 1000 万分の 1g 重) レベルと非常に弱く、既存デバイスを代替するには全く及ばないものであった。

2. 研究の目的

以上のような背景・経緯のもと、本研究では、ミミズの体表を構成する体壁筋に着目した。環状構造を持ちながらも制御性、応答速度、収縮力のいずれにも優れる体壁筋を材料とすることにより、集積性や機械性といった面で既存のポンプに匹敵ないし凌駕する、小型のミミズポンプが実現できるのではないかと考案した。また、これを応用したバルブ(弁)も作製可能ではないかと考え、本研究ではこれを目的とした。以下に詳細を述べる。

3. 研究の方法

微細加工技術により、ポンプの土台となるマイクロ流体チップ上に微細流路とポンプチャンバーを作製し、この上に筋肉の収縮力を伝えるプッシュバーという構造体を置き、ミミズ筋肉シートを載せて針で固定するというデザインである。ポンプ駆動の原理としては、ミミズ筋肉シートに比較的短周期の電気パルスで連続的に刺激を与えて収縮させることで、左側のマイクロ流路の水はポンプチャンバー内に入り、逆止弁から押し出されて右側の流路へ送られるというものである(図1)。これは、基本的なオンチップマイクロポンプのデザインであり、ドライバー部分を通常用いられる圧電素子等の電気素子からミミズの筋肉に変えたものとみることでもでき、以前ラットの心筋細胞でも作製した実績がある。これを実証するために、以下の実験を行った。

4. 研究成果

ミミズ筋肉の機械的特性の把握

まず、ポンプ作製のための基礎的知見を得るため、ミミズ筋肉シートの機械的特性の計測を行った。比較的大きなサイズのミミズの一つであるフトミミズを輪切りにして開き、幅が約 1cm の筋肉シート状にして使いやすいサイズとした。ここに、筋肉を動かすのに十分で、かつダメージの少ない電圧 6V の電気刺激に対する収縮力の測定を行った。安定化した直流 (DC) 電源を接続した約 1cm 幅のミミズ筋肉シートとひずみ測定器を糸で接続し、固定用に用いている金属針を通して電圧を印加することで、ミミズ筋肉を収縮させた。

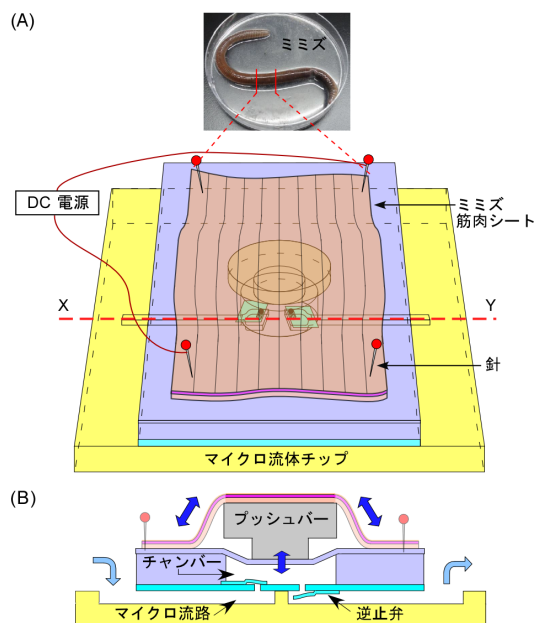


図1. ミミズポンプの構造と送液原理。
(A) ミミズポンプを俯瞰した模式図。
(B) (A)の直線 X-Y における断面図。

そして、ミミズ筋肉の収縮によるひずみ測定器の傾きから収縮力を計測した。直流6Vの電圧で収縮させたところ、瞬間的には最大で9.3 mN (0.95 g 重) の収縮力が得られた。また、電圧をかけてから収縮するまでの応答時間は0.3秒、という結果になった(図2)。これは一般に小型ポンプの駆動素子として用いられる同サイズの圧電素子と同程度の性能であるといえ、ミミズ筋肉シートからポンプの駆動素子として十分な力が得られるということが明らかになった。

また、ミミズ筋肉シートのより詳細な基礎的特性を調べるために、筋肉シートの長さや力の測定方向を変えたときに、どのくらい収縮力が変化するかという測定も併せて行った。ミミズ筋肉シートの縦の長さは1, 2, 3 cmと変えて、ここに上記実験と同じ直流6Vの電圧を印加し、それぞれの最大瞬間収縮力を測定した。その結果、収縮力は、横方向(体節線に沿った方向)の方が縦方向よりも大きく、またシートが長いほど大きいということが明らかになった。

ミミズ筋肉を搭載したポンプの試作

次に、上記の知見をもとに、ミミズ筋肉シートを用いた「ミミズポンプ」の試作を行った。まずは、微細加工技術により、ポンプの土台となるマイクロ流体チップの作製を行った。マイクロ流体チップの部品は、半導体加工技術として知られるフォトリソグラフィ法により作製したフォトレジストの鋳型を用いて、そこにポリジメチルシロキサン(PDMS)のプレポリマーを流し込み、加熱成型後に剥離回収するというモールドイング加工により作製した。マイクロチップには、幅と深さがいずれも0.2 mmのマイクロ流路、直径3 mmのポンプチャンバー、逆止弁などの部品があり、逆止弁の部分もPDMSの厚み10 μmの薄膜を流路穴の上にアセンブリして形成し、チップを組み立てた。このマイクロチップの上に筋肉の収縮力を伝えるプッシュバーという構造体を置いた。さらにミミズ筋肉シートを載せて針で固定した。この状態でミミズ筋肉シートに、電圧6Vの電気パルス(持続時間0.3秒)で3秒おきに連続的に刺激を与えたところ、シートの収縮によりチャンバー(液室)内の水が押し出されて送液を実証することができた。これは、図3において水が左側からポンプを通して右側へ押し出されていることから送液が確認できる。ポンプ流量は5マイクロリットル/分(μL/分、1 μLは100万分の1リットル)で、これまでの新生ラットの心筋細胞を用いたポンプに比べて1,000倍以上の量であった。このサイズのポンプとしては、既存の圧電素子を用いたものに匹敵する機能を持っていることが実証された。

ミミズ筋肉を搭載したバルブ

上記ポンプは、エネルギー源としては、生体の共通エネルギー源であるアデノシン三リン酸(ATP)、すなわち化学エネルギーを用い

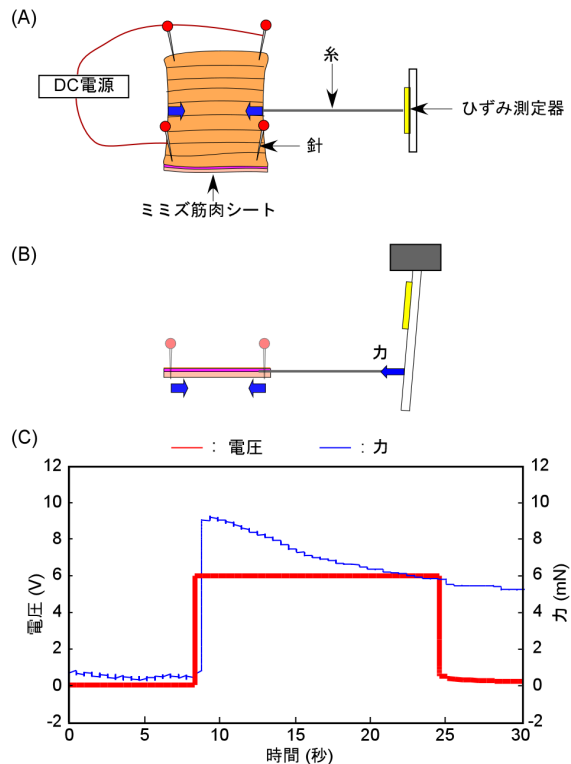


図2. ミミズ筋肉シートの機械的特性の測定。(A)今回の測定方法の模式図。(B)(A)の断面図。(C)測定結果。太線は電圧、細線は力を示している。

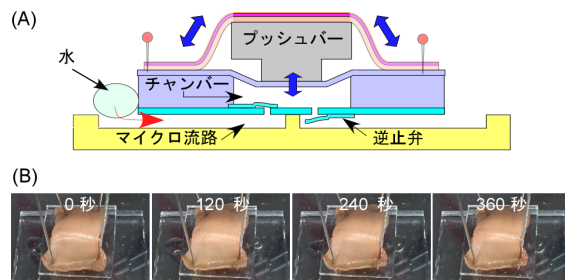


図3. ミミズポンプの実証実験。(A)ミミズポンプによる水の送液実証実験の模式図。(B)刺激開始後の各時間のビデオフレーム。

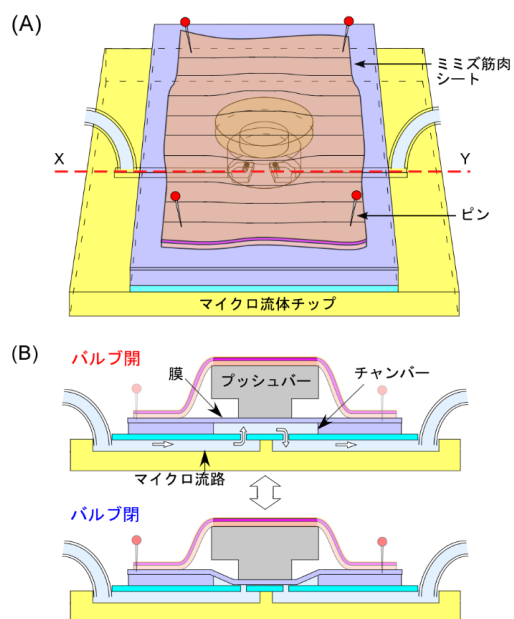


図4. ミミズバルブの構造と駆動原理。(A)ミミズバルブを俯瞰した模式図。(B)(A)の直線X-Yにおける断面図。

ているが、刺激には電気を用いており、完全に電力を用いていないとはいえない。一方、筋肉は化学刺激だけで持続的収縮を起こすことができるが、その動きはゆっくりである。このような持続的収縮の場合、ポンプとしては使いにくい、水の流れを制御する装置であるバルブとしては使える可能性がある。そこで、このような発想のもと、ミミズの筋肉で動き、なおかつ電力を使わずに制御可能なバルブの開発を試みた。

ミミズバルブのデザインは、**図4**のようなものとした。ポンプデザインに近いものだが、液室（チャンバー）の体積を増減させるだけでなく、ミミズ収縮時には完全に流路を塞いで外側からの流れを遮断するものとなっている。

実際に、筋肉を収縮させる化学物質アセチルコリンによる化学刺激でバルブを動作させる実験を行った。圧力0.1 kPaで送液し、アセチルコリン100 mM溶液をミミズ筋肉シートに滴下したところ、応答時間は平均約42秒とかなり要するものの、最終的に液が止まり、その状態を1分以上持続させることができ、バルブ動作を確認することができた。この応答時間の長さは化学刺激に応答し、かつ膜を十分に押し下げて流路を塞ぐまでに時間がかかることを示している。また、このバルブも刺激後緩衝液で洗浄し、再刺激というサイクルを繰り返すことで、3回以上は繰り返し使えることを確認した（**図5**）。各サイクルで初期流速が違うのは、毎回洗浄後に完全に弛緩状態に戻るとは限らないからと考えられる。

また、このバルブは、1.5 kPaまでの水圧の水を止めることができることが確認できた。したがって、本バルブを化学刺激のみで動作させた場合、1回の刺激でバルブが完全に閉じ、かつ十分な耐圧性能を持つこと、また繰り返し利用可能であるという点で、このサイズのバルブとしては圧電素子を用いた既存のものに匹敵する機能を持つことを実証できた。

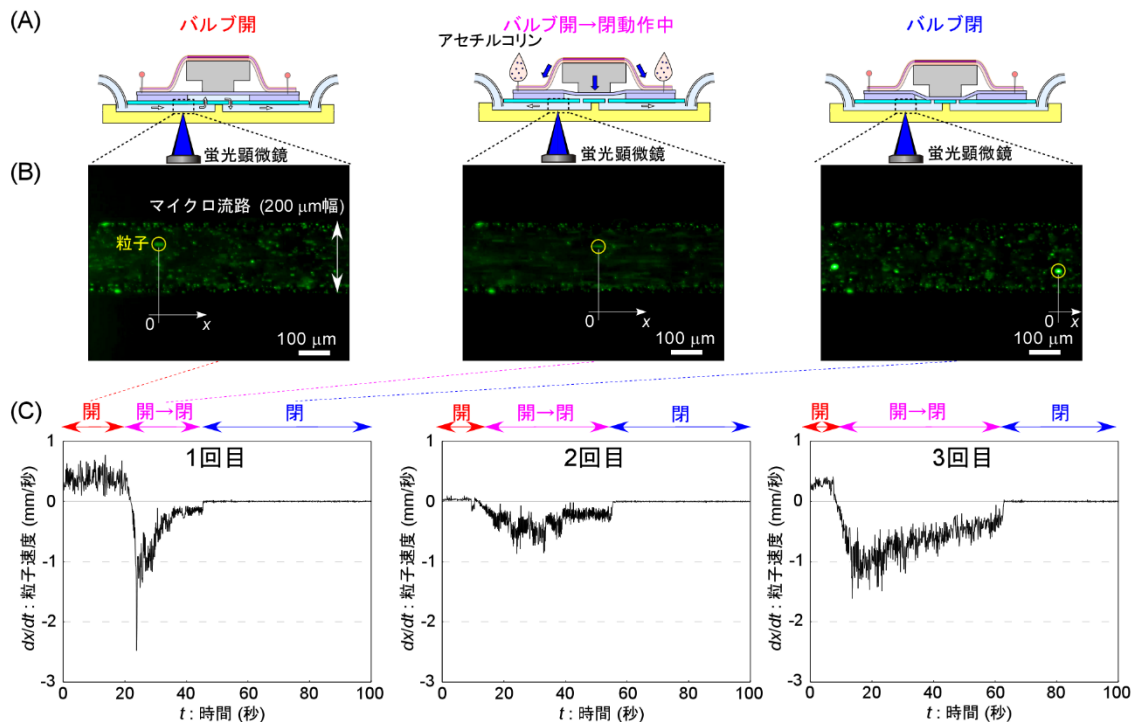


図5. 化学刺激によるバルブ動作の実証実験。(A)バルブ動作を示す模式図。(B)バルブ開状態(刺激前)、バルブが開から閉状態に移行する動作中の状態(刺激中～後)、および閉状態(刺激後)におけるマイクロ流路内の流れを蛍光観察・撮影した写真。(C) B写真中丸で囲んだ粒子の速度の時間変化をプロットしたもの。刺激・洗浄のサイクルを3回目まで行って測定したもの。グラフ上部に粒子が右に動いているとき(開)、逆流状態(開→閉)、止まっているとき(閉)の各状態を表示。刺激後緩衝液で洗浄のサイクルを3回目まで繰り返したときのグラフ。

本研究で試作したミミズポンプ・バルブは、動作のためのエネルギー源は生体の共通エネルギー源である ATP である。現在他にミミズ筋肉を用いたロボットも開発を進めており、神経組織なども含めて、人工的にミミズと同様の構造を作ることができれば、将来的には電気刺激なしで駆動できる可能性があるといえる。そのため本成果は、今後、超微小機械等を開発していく上でのモデルになるということが考えられる。また、電力不要の超小型ポンプができれば、電気使用に向かない下水管内のロボットや血管内ロボットなど、工業・医療などさまざまな分野での応用が期待できる。

生体組織は理想的なクリーンデバイスであるが、現在の機械システムテクノロジー同様の機能の実現は困難である。ここで述べたミミズデバイスのようなものは、生物の機能をうまく搭載してクリーンなデバイスを実現したものであり、今後の機械の一つのモデルにもなり得るであろう。

5. 主な発表論文等

(研究代表者には下線)

[雑誌論文] (計 11 件) すべて査読有

- ① Yo Tanaka, Shun-ichi Funano, Yuji Noguchi, Yaxiaer Yalikun, Norihiro Kamamichi
“A valve powered by earthworm muscle with both electrical and 100% chemical control”
Scientific Reports, in press (2019) DOI: 10.1038/s41598-019-44116-3
- ② Nobuyuki Tanaka, Tadahiro Yamashita, Yaxiaer Yalikun, Satoshi Amaya, Asako Sato, Viola Vogel, Yo Tanaka
“An ultra-small fluid oscillation unit for pumping driven by self-organized three-dimensional bridging of pulsatile cardiomyocytes on elastic micro-piers”
Sensors and Actuators B, Chemical, 293, 256-264 (2019) DOI: 10.1016/j.snb.2019.04.087
- ③ Yo Tanaka, Shun-ichi Funano, Yuji Noguchi, Yaxiaer Yalikun, Norihiro Kamamichi
“Earthworm muscle driven valve with both electrical and chemical controls”
Proceeding of Micro Total Analysis Systems 2018, 707-709 (2018)
- ④ Yaxiaer Yalikun, Yuji Noguchi, Norihiro Kamamichi, Yo Tanaka
“Earthworm muscle-tissue actuated atmospheric-operable 3D printed wheel runner”
Proceeding of Micro Total Analysis Systems 2018, 1012-1014 (2018)
- ⑤ Yo Tanaka, Yaxiaer Yalikun
“A foot-treading type electric power generator using micro/nano channels in a porous glass filter”
Proceeding of IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS 2018), 677-680 (2018)
- ⑥ Yo Tanaka, Kenta Sumiyama
“High-throughput ES cell aggregation microdevices for gene-incorporated mice creation”
Proceeding of Micro Total Analysis Systems 2017, 1090-1091 (2017)
- ⑦ Shun-ichi Funano, Nobutoshi Ota, Asako Sato, Yo Tanaka
“Development of a microchannel fabrication method keeping cell or molecule patterning formed in an open space using low/room temperature glass bonding”
Proceeding of Micro Total Analysis Systems 2017, 327-328 (2017)
- ⑧ Shun-ichi Funano, Nobuyuki Tanaka, Yo Tanaka
“Analysis of long-term morphological changes of micro patterned molecules and cells on PDMS and glass surfaces”
Analytical Sciences, 33, 723-725 (2017) DOI: 10.2116/analsci.33.723
- ⑨ Yo Tanaka, Yuji Noguchi, Yaxiaer Yalikun, Norihiro Kamamichi
“Earthworm muscle driven bio-micropump”
Sensors and Actuators B: Chemical, 242, 1186-1192 (2017) DOI: 10.1016/j.snb.2016.09.123
- ⑩ Yo Tanaka
“Development of integrated microfluidic devices for next-generation bioanalysis”
Bunseki Kagaku, 66, 487-494 (2017) DOI: 10.2116/bunsekikagaku.66.487
- ⑪ Yo Tanaka, Tadahiro Yamashita, Viola Vogel
“Self-organized 3D bridging of cardiomyocytes toward creation of ultra small cell-driven pumps integrated in microstructure”
Proceeding of Micro Total Analysis Systems 2015, 1773-1775 (2015)

[学会発表] (計 5 件)

- ① Yo Tanaka, Shun-ichi Funano, Yuji Noguchi, Yaxiaer Yalikun, Norihiro Kamamichi
“Earthworm muscle driven valve with both electrical and chemical controls”
22nd International Conference on Miniaturized Chemical and Biochemical Analysis Systems (μ TAS) (Kaohsiung, Taiwan, 14th, Nov. 2018)
- ② Yaxiaer Yalikun, Yuji Noguchi, Norihiro Kamamichi, Yo Tanaka
“Earthworm muscle-tissue actuated atmospheric-operable 3D printed wheel runner”
22nd International Conference on Miniaturized Chemical and Biochemical Analysis Systems (μ TAS) (Kaohsiung, Taiwan, 14th, Nov. 2018)
- ③ Yo Tanaka, Yaxiaer Yalikun
“A foot-treading type electric power generator using micro/nano channels in a porous glass filter”
31st IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS 2018) (Belfast, Northern Ireland, UK, Jan. 2018)
- ④ Yo Tanaka, Kenta Sumiyama
“High-throughput ES cell aggregation microdevices for gene-incorporated mice creation”
21st International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2017) (Savannah, Georgia, USA, Oct. 2017)
- ⑤ Shun-ichi Funano, Nobutoshi Ota, Asako Sato, Yo Tanaka
“Development of a microchannel fabrication method keeping cell or molecule patterning formed in an

open space using low/room temperature glass bonding”
21st International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS
2017) (Savannah, Georgia, USA, Oct. 2017)

〔図書〕 (計 1 件)

①田中陽

“ミミズを用いたポンプの作製”

クリーンエネルギー (日本工業出版), 28, 34-37 (2019)

〔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

研究代表者(PI)研究室ホームページ:

<http://ibd.riken.jp/>

6. 研究組織

研究代表者のみで遂行。

※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。