

平成 22 年 5 月 12 日現在

研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20760156  
 研究課題名（和文） 多相エマルジョンによるドナー細胞・卵細胞のカップリング輸送及び融合システムの創製  
 研究課題名（英文） Transportation and Fusion of Donor Cell or Oocyte-Laden Multiphase Emulsion Droplet On a Chip  
 研究代表者  
 山西 陽子 (YAMANISHI YOKO)  
 東北大学・大学院工学研究科・助教  
 研究者番号：50384029

## 研究成果の概要（和文）：

本研究は液滴の中にブタ卵子とドナー細胞を一個ずつ封じこめカップリング及び融合を実現させることを目標とし、磁気駆動マイクロツール(MMT)による液滴生成技術開発を行った。

(1)バルブ機能を有する MMT によってマイクロ流路内の混相流体を chopper の仕組みで分割し、オンデマンドで個々の液滴サイズを能動的に制御して輸送するシステム開発した。50  $\mu$  m 粒子 1 個 1 個を内包した液滴生成実験に成功し、幅広いサイズの液滴生成技術が確立された。

(2)めっき加工 Ni を用いてハイブリッド MMT を開発し、局所的な剛性と磁性を制御し従来比 6 倍の変位量獲得に成功した。また層流内分散相に粒子を流し、chopper MMT よりオンデマンド液滴生成が可能となった。

## 研究成果の概要（英文）：

This work is targeting to produce a single oocyte or donor cell laden droplet on a chip by means of droplet dispensing techniques. The novelty of the present work is that we produce particle-laden droplet by using magnetic micro-actuator (MMT) to achieve the fusion of the oocyte and donor cell on a chip. The main achievement of the work is summarized as follows:

(1) Valve-functioned MMT was successfully chopped droplet and produced size-controlled droplet together with enclosing a particle whose size of 50  $\mu$  m and transported them one by one. Therefore a wide range of the size of particles or cells can be enclosed in a droplet on a chip.

(2) Hybrid type MMT was successfully fabricated by using high-accuracy Ni metal by electroplating technique. Local rigidity and magnetic property of MMT was successfully controlled and obtained 6 times displacement as large as conventional setting. The revised design chip could have laminar sheath flow or pressure balance which provided on-demand droplet production on a chip successfully.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	3,100,000	930,000	4,030,000
2009 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：機械工学・5007 知能機械学・機械システム

キーワード：マイクロ・ナノデバイス，フォトリソグラフィ，精密部品加工

### 1. 研究開始当初の背景

家畜産業における繁殖分野の研究として、発生工学を利用した卵子や初期胚の顕微操作が行われている。これらの研究によって、受精卵の分割による一卵性双子牛生産や受精卵クローン牛、受精卵の性判別、顕微授精などが実用化レベルに達している。さらに体細胞クローン技術は 1997 年クローン羊ドリー誕生をきっかけに世界中で牛、羊、ブタ等の家畜や実験動物で体細胞クローンが誕生し、最近では日本で始めて第 4 代クローン豚が誕生し、同じ遺伝子を持つクローンの反復生産が可能になったことで、糖尿病の治療法開発や、再生医療の有効性や安全性に大きく貢献することが期待されている。またこのようなクローン技術はドナー細胞となる体細胞に遺伝子操作を施すことにより、効率的に遺伝子組み換え家畜を生産することが可能であり、国内外のベンチャー企業などが積極的に実用化を目指している。このように胚の顕微操作技術は畜産分野のみならずクローン動物を利用した製薬や、ES 細胞利用の医療応用など、発展性の高いバイオ分野の重要な鍵である。一方でこれらの動物の作成には複雑な顕微胚操作技術が必須であり、技術者の熟練度によって、クローン動物の発生成成功率に大きく影響するため、その安定化と自動化技術は重要な課題となっている。

### 2. 研究の目的

本研究では最近マイクロ流体技術で盛んに行われている、分岐流路を利用した微粒子作成技術を応用して、PEG 相のドロップの中に卵子とドナー細胞を一個ずつ封じこめ、ドナー細胞の流路中の輸送を簡易にさせ、マイクロ回転子の中で穏やかな回転運動を与えることで、着実に卵子とドナー細胞を融合させることを目的とする。

### 3. 研究の方法

図 1 に多相エマルジョンを用いた細胞融合システムの概念図を示す。具体的な工夫としてはまずポリエチレングリコールをエマルジョン相として扱いドロップを作成し、同時に細胞融合促進剤にも用いている点である。また 10  $\mu\text{m}$  程度の小さなドナー細胞を 1 個ずつ送るために流路先端を絞った形にして両脇をシースフローにより押さえ込むことにより 1 個ずつバラバラにし難いドナー細胞のドロップを生成し易くした点などがあ

る。

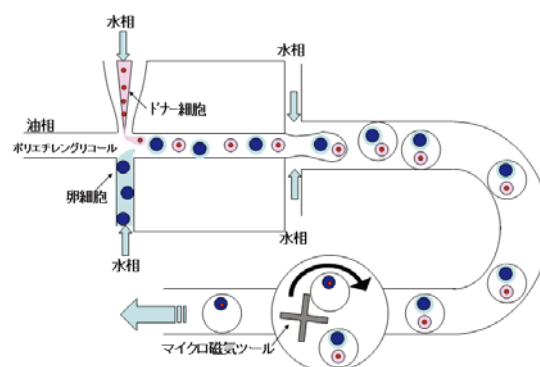


図 1. 多相エマルジョンを用いた細胞融合システムの概念図

### 4. 研究成果

本研究では最近マイクロ流体技術で盛んに行われている連続相・分散相流路上の交差流路より発生させる液滴生成技術を応用して、液滴の中にブタ卵子とブタドナー細胞を一個ずつ封じこめ、ブタ卵子とブタドナー細胞のカップリング及び融合を実現させることを目的とする。この目的のもと多相エマルジョンを用いたマイクロチップ内における細胞融合システムの構築を目的とし、磁気駆動マイクロツール(MMT)による液滴生成技術開発を行った。主な研究成果は以下の通りである。

- (1) マイクロチャンネル内にバルブ機能を有する MMT をアセンブリし、MMT の開閉機構を用い、非接触駆動を行うことでマイクロ流路内の混相流体を chopper の仕組みで分割し、オンデマンドで個々の液滴サイズを能動的に制御して輸送するシステム開発した。これにより、従来マイクロ流路内での輸送が困難であった細胞などの脆い物質等を液滴に内包し、内包する液滴を最適なサイズに制御できる利点や、分散相の流路のみを選択的に開閉できることから、細胞ストッパーとして使用できる利点を獲得し、液滴生成に大きな拡張性を与えた。実際に 50  $\mu\text{m}$  粒子 1 個 1 個の内包した液滴生成実験に成功した。したがって、マイクロ流路内を流れる卵子やドナー細胞などの幅広いサイズに対応できる液滴生成技術が確立され、オンチップ細胞操作の自動化に大きく貢献することが可能になった。
- (2) また、めっきプロセスで高精度マイクロ加工した高透磁率を有する Ni を埋め込ん

で MMT を製造する手法を確立した。これはハイブリット MMT として、柔軟性を持ち、かつ強磁性を持つマイクロツールであり、より大きな変位量と駆動力を持つ chopper として開発した。また層流シースフローで挟み込んだ分散相に粒子を流し、粒子ターゲットに向かって chopper を動かすことで、オンデマンドに粒子内包液滴生成を行う新しいデザインのチップを開発した。このハイブリット MMT を使用することで変位量が 6 倍向上することがわかり、液滴生成を確認した。

- (3) 従来作成した液滴生成チップにおいて分散相である密度の大きい疎水流体の圧力が MMT に打ち勝ちマイクロツールからの液滴の漏れを生じることが多かったが、これを防ぐためにマイクロ流路内に圧力を逃がすバイパス流路を設け、さらに上下対称に流路を設計することで、疎水流体と親水流体の圧力バランスを獲得することができ、MMT からの流体の漏れの問題を完全に克服した。
- (4) また、上記設計の流路による液滴生成のダイナミックレンジは圧力バランスがとれていることから、従来の流路よりも飛躍的に向上し、40-180  $\mu\text{m}$  の従来比 3 倍のサイズ範囲で液滴生成を達成することができた。また上下で 2 倍の液滴生成ができることより、ハイスループットで液滴生成を行うことが可能になり、また液滴の漏れの問題も解決したことよりオンデマンドでかつ必要な数だけサイズ制御された液滴生成が可能となった。

以上により細胞内包を目的とする液滴生成技術は、前後の細胞操作などの処理信号などの送受信により必要な数だけ、その内包する細胞の大きさに合わせた液滴の生成が可能となった。現在開発途中の MMT を用いた卵子とドナーの融合技術と液滴生成合併し融合システムの構築を目指す。

#### 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 3 件)

1. Yoko Yamanishi, Lin Feng and Fumihito Arai, "On-demand Production of Emulsion Droplet in Size Over a Wide Range", *Advanced Robotics*, (査読有), (Accepted), 2010.
2. Yoko Yamanishi, Yuki Kihara, Shinya Sakuma and Fumihito Arai, "On-demand Production of Emulsion Droplets Using Magnetically Driven Microtool", *International Journal of Automation and Technology*, (査読有), Vol.3, No.5,

2009, p. 502-508.

3. Yoko Yamanishi, Yuki Kihara, Shinya Sakuma, and Fumihito Arai, "On-chip Droplet Dispensing by Magnetically Driven Microtool", *Journal of Robotics and Mechatronics*, (査読有), Vol.21, No.2, 2009, p. 229-235.

[学会発表] (計 7 件)

1. Yoko Yamanishi, Lin Feng and Fumihito Arai, "On-demand and Size-controlled Production of Emulsion Droplet in Microfluidic Devices", 23rd IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical System (MEMS), p.1087-1090, January 27, 2010, The Hong Kong Convention & Exhibition Centre, (香港, 中国).
2. Yoko Yamanishi, Lin Feng, Yuki Kihara, Shinya Sakuma and Fumihito Arai, "Formation of Microdroplets Utilizing Hybrid Magnetically Driven Microtool on a Microfluidic Chip", ROBO2009, p.159-164, December 20, 2009, Gulin Lijiang Waterfall Hotel, (Guilin, 中国).
3. Yoko Yamanishi, Yuki Kihara, Shinya Sakuma and Fumihito Arai, "Active Control of Micro-Droplets by Hybrid Magnetically Driven Microtool", SI international 2009, A01, November 29, 2009, 芝浦工業大学, (東京都江東区).
4. Lin Feng, Yoko Yamanishi and Fumihito Arai, "On-demand Generation of Droplet in Size Over a Wide Range by Microfluidic Control", MHS2009 (2009 International Symposium on Micro-Nano Mechatronics and Human Science), p.139-144, November 10, 2009, Toyoda Auditorium, 名古屋大学, (愛知県名古屋市).
5. Yoko Yamanishi, Yuki Kihara, Shinya Sakuma and Fumihito Arai, "Hybrid Magnetically Driven Microtools for On-demand Droplet Dispensing on a Chip", The 13th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Science ( $\mu$ TAS2009), p.752-754, November 4, 2009, (Jeju, Korea).
6. 山西 陽子, 木原 勇輝, 佐久間 臣耶,

新井 史人, ハイブリット磁気駆動マイクロツールによるマイクロドロプレットのオンチップ生成, 日本機械学会 2009 年度会年次大会, , Vol. 8, T1501-2-3, p. 225, 2009 年 9 月 14 日, 岩手大学, (岩手県盛岡市).

7. 山西 陽子, 木原 勇輝, 佐久間 臣耶, 新井史人, “オンチップ細胞操作システムに関する研究—その 6 : 磁気マイクロツールによるマイクロドロプレットの生成—”, (社)日本機械学会ロボティクス・メカトロニクス部門, p. 130, 2008 年 6 月 7 日, 長野ビッグハット, (長野県長野市) .

[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://www.biorobotics.mech.nagoya-u.ac.jp/>

Best Paper Award

Lin Feng, Yoko Yamanishi and Fumihito Arai, “On-demand Generation of Droplet in Size Over a Wide Range by Microfluidic Control”, MHS2009 (2009 International Symposium on Micro-Nano Mechatronics and Human Science), p.139-144, November 10, 2009, Toyoda Auditorium, 名古屋大学, (愛知県名古屋市).

日本機械学会若手優秀フェロー賞

木原勇輝

オンチップ細胞操作システムに関する研究—その 6 : 磁気マイクロツールによるマイクロドロプレットの生成—, (社)日本機械学会ロボティクス・メカトロニクス部門, p. 130, 2008 年 6 月 7 日長野ビッグハット (長野県長野市).

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山西 陽子 (YAMANISHI YOKO)

東北大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号 : 5 0 3 8 4 0 2 9

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号 :