

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：17104

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2021

課題番号：20K20983

研究課題名(和文) 運動性微生物を含むマイクロ液滴の非接触マニピュレーション

研究課題名(英文) Noncontact Manipulation of Microdroplets Containing Motile Microorganism

研究代表者

川原 知洋 (Kawahara, Tomohiro)

九州工業大学・大学院生命体工学研究科・准教授

研究者番号：20575162

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、運動性微生物の刺激応答計測のために開発された、乾燥しないマイクロ液滴中で微生物を維持する方法をさらに発展させ、液体供給位置を変化させることでマイクロ液滴自体を移動(操作)するための方法論を探索した。結果的に、新たに開発した実験システムにより液滴の精密な観察・制御が可能になったことで、液滴を効果的に移動させるための方法論を見出すことができ、自動化にも成功した。さらに、実際の運動性微生物への応用可能性についても検証を行い、非接触マニピュレーションの学理構築や実用のための道筋を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究プロジェクトによって、マイクロ液滴を基板(平面)上で非接触操作するための基本的な知見が獲得できた。また、得られた結果より効果的に液滴を移動させるための方法を見出すことに成功した。特に、メカトロニクス技術の積極的な導入により、操作を自動化するための要素技術を構築できたため、個々の微生物を精密に搬送・操作するだけでなく、複数の液滴を操作したり結合するような応用も可能になる。今後は、このような方法をさらに発展させることで、マイクロ液滴の力学操作を行うための学理構築に加え、バイオエネルギー分野における微生物機能解明のための全く新しい実験手法創出に取り組む。

研究成果の概要(英文)：Investigation of the stimulus responses of motile microorganisms is valuable to understand their functions. Conventionally, it is quite difficult to examine their behavior under a high-magnified view due to the motility of microorganisms. We have proposed new approach for investigating the stimulus response of swimming-microorganisms in a microdroplet. By using an inkjet mechanism, the size of the microdroplet with microorganisms is precisely controlled without drying out of the liquid. As a result, we have succeeded in maintain the motile cell inside the microdroplet for a long time and in applying the stimulation to the single cell using the microtools under the highly magnified view. In addition, we found that if we change the ejection point of the inkjet mechanism, the position of the microdroplet could be changed. In this project, we have investigated how to manipulate single microdroplet using the high-speed ejection control by using the developed experimental system.

研究分野：バイオメディカルロボティクス

キーワード：運動性微生物 非接触マニピュレーション インクジェット マイクロ液滴

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、水棲の単一運動性微生物(体長 100 μm レベル)の運動モードや記憶プロセスを調査するために、水中を遊泳させながら刺激応答計測を行うことが求められている。しかしながら、微生物の俊敏性により高倍率観察が本質的に困難である。一方で、マイクロ流路を用いれば、観察条件は緩和されるものの操作や局所刺激は依然として難しい。そこで、我々は微生物を高速ビジョンで追跡しながら、マイクロツール($\phi 50 \mu\text{m}$)を位置決めすることで局所力学刺激を加えることができる実験系を確立した[IEEE RA-L, 2020]。しかしながら、流体力によってツールの変形や微生物の移動が生じてしまい、様々な方策を講じたとしても液中での細長いツールの精密位置決めを行うことは非常に困難であった。

以上の点を踏まえ、微生物周辺の液量を極限まで減らすという新しい着想に至った(図 1 a)。この方法では、撥水コーティングされたガラス基板上に配置された液滴に対し、その中の微生物が乾燥しないように、インクジェット機構で液体の供給量とタイミングを制御することで、液滴サイズを維持しながら長時間の実験が可能である。これにより、微生物の運動性は確保しつつも、高倍率観察と高いアクセス性を両立できるようになった[μ -TAS Conf., 2019] (図 2)。さらに、インクジェットから液体を供給する位置を微妙に変化させると、微生物が配置されている液滴自体の位置を変更(非接触マニピュレーション)できることが分かってきた(図 1 b, 図 3)。

2. 研究の目的

そこで本研究課題では、基板上に維持されたマイクロ液滴に対し、1 次元的さらには 2 次元の移動を実現するための操作方法に関する学理を構築することを目的としている。具体的には、液滴サイズを維持するという制約条件の下で(微生物の生存・観察性を保持しつつ)、液滴全体の移動距離を最大化するための液体の供給条件について明らかにする。また、運動性微生物への応用可能性や非接触搬送、微量薬剤反応試験の発展性についても探索を行う。

3. 研究の方法

従来より、直径が数 100 μm の液滴同士が結合する際のダイナミクスや、インクジェットで高速に吐出した液体が基板に衝突する際の挙動が実験的・理論的に数多く解析されている。しかしながら、本研究のように液滴を容器に見立てて基板上での移動(操作)方法を確立しようとする研究はほとんど見られない。また、運動性微生物を含んだ液滴の移動に関する研究は行われていない。以上を踏まえ、下記の 3 点について重点的に研究を実施した。

- (1) **実験システム構築と液滴挙動の計測**: インクジェット機構の射出タイミングとその射出位置、及びカメラでの撮影タイミングの同期制御をリアルタイムで行うことができる実験システムを構築する。次に、顕微鏡と高速度カメラを組み合わせて、液体同士の結合の際の高速かつダイナミックな相互作用について高倍率観察する。また、俯瞰的な視野において、インクジェット機構から射出する液体の量・位置・タイミングの条件を様々に変化させた際の液滴移動の振る舞いについて調査する。最終的には、液滴サイズを維持するという制約条件の下で、液滴全体の移動距離を最大化するための液体の供給条件について明らかにする。
- (2) **液滴のモデル化と操作方法の確立**: 微小液体同士の結合によってもたらされる液滴の移動について合理的な説明を行うためのモデルを構築する。具体的には、液滴が移動する際に、どのように液滴の表面張力と液滴-基板間接着力のつり合いが変化しているか? という点について着目して解析を行う。また、実験データを活用し、液滴表面のダイナミックな振動も踏まえた操作方法についても検討を行う。最終的には、液滴をガラス基板上において任意の場所に位置決めするための液体供給戦略についての指針を確立する。
- (3) **運動性微生物への応用**: 運動性微生物(ゾウリムシなど)を含む液滴(培養液)の移動を試みる。また、その際微生物が受ける影響(形態と運動機能の変化)や対策について検討する。また、液滴移動(操作)の発展性についても探索を行う。

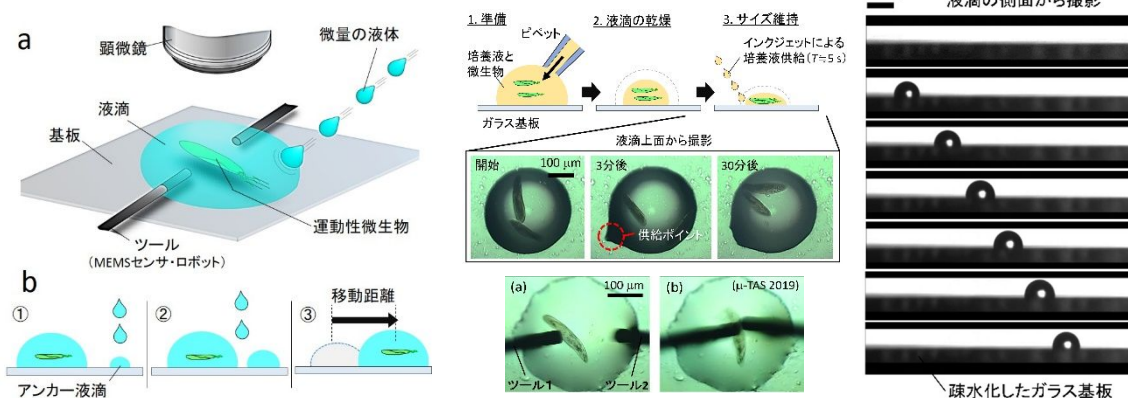


図 1: 提案手法と液滴の移動(操作)

図 2: 液滴の維持と微生物への刺激

図 3: 液滴の移動

4. 研究成果

(1) 実験システム構築と液滴挙動の計測に関して

システムの構築：事前検討では、液滴の供給位置を変化させて液滴移動を行うという基本的な現象は確認できていたものの、手動で行っていたため正確な操作や評価が難しかった。そこで、まずインクジェット機構からの液滴射出をPCからのパルス信号で1滴ずつ調整できるようにシステムを構成し、ガラス基板上に接触する際の挙動を高速カメラで計測できるようにした。この際、射出と撮影タイミングの同期制御を行うことができるようにソフトウェアを開発した。また、射出位置を変化させるためにXY電動ステージを実験システムに統合し、液滴の着弾位置を1 μm 以下の精度で微調整できるようにした。

液滴挙動の計測：構築した実験システムを用いて、高さ10mmの位置から液滴を射出した際の接地の様子や液滴同士の結合の様子を観察した(図5)。この際、撮影速度は10,000FPS程度として、液滴形状がダイナミックに変化してから整定するまでの様子を詳細に観察した。また、映像をオフライン解析し、液滴直径などの特徴量を抽出できるようにした。

(2) 液滴のモデル化と操作方法の確立に関して

液滴挙動の解析：まず、簡素な数理モデルについて検討を行ったが、実際は複数の未知パラメータが関与する事により、液滴挙動の予測誤差が大きくなったため、実験的に液滴操作方法を探索した。具体的には、構築した実験システムを用い、ターゲット液滴(複数液滴、直径300 μm 程度)を作成した後に、近傍に液滴(1滴)を精密に配置した際の液滴挙動を調査した。結果として、図6aに示すようにターゲット液滴端部に着弾させることで、ターゲット液滴を10 μm 前後移動させることができることを確認した。一方で、端部に正確に着弾させることが難しく、少しでも条件が変わると移動距離や成功率が大きく低下してしまう問題が生じた。そこで、図6bに示すようにターゲット液滴から少しだけ離れた場所にアンカー液滴(1滴)を配置した後、それらの間に液滴を落として結合させ、ターゲット液滴を移動させる方法を考案した。この場合、液滴の着弾位置が多少ずれたとしても、確実に移動距離を稼ぐことができ、また移動距離も数10 μm 程度と大きくできることが分かった(図7)。さらに、これを発展させ、複数のアンカー液滴を利用したり、液滴変形時のダイナミクスを積極的に利用する液滴移動方法も可能であることを新たに見出した。

液滴マニピュレーション：以上の結果や知見を踏まえ、実際に液滴位置を操作することを試みた。まず、フィードフォワード制御により全自動かつ連続的に液滴位置を変化させることができることを確認した。また、液滴吐出エラーや温湿度の変化といった外乱の影響を排除するため、上面から撮影した液滴を画像処理によりオンラインで認識し、フィードバック制御によって位置決めすることも可能になった。

(3) 運動性微生物への応用に関して

ゾウリムシへの応用：運動性微生物の一種であるゾウリムシに応用し、液滴射出が微生物に与える影響について調査を行うとともに、単一ゾウリムシ含む液滴を移動させることが可能であることを確認した(図8)。また、長時間実験を行っている際に不純物が堆積してしまう問題が生じたが、液滴移動により不純物が堆積した場所を回避できることを示した。

今後は、2次元操作へと発展させるとともに、複数液滴の並列操作などのマニピュレーションを検討する。また、操作条件や数理モデル確立に関する取り組み、微生物の機能調査等への応用についても引き続き進めていく予定である。

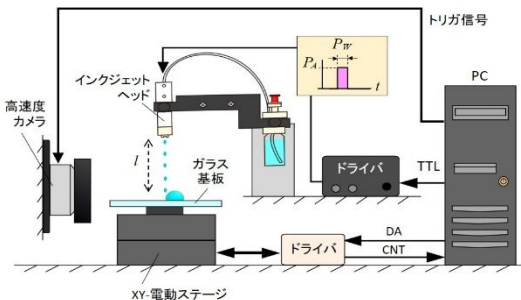


図4：液滴挙動観察のための実験システム

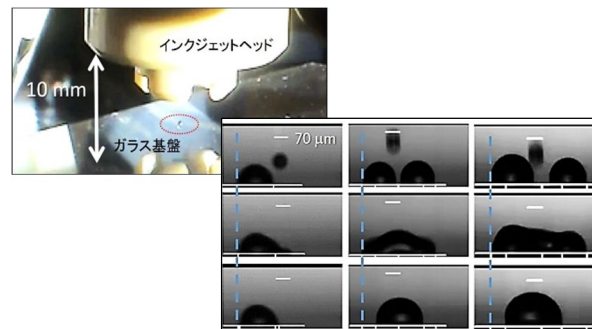


図5：液滴挙動の観察と解析

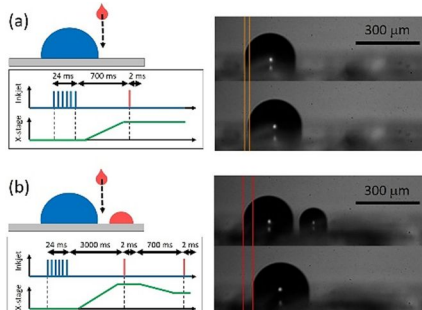


図6：アンカー液滴を用いた移動

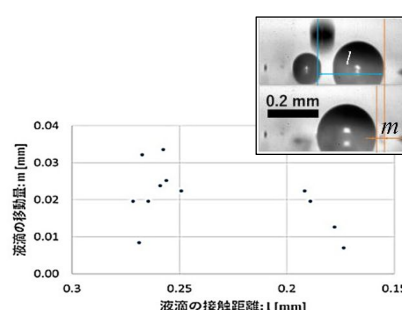


図7：液滴射出位置と移動距離の関係

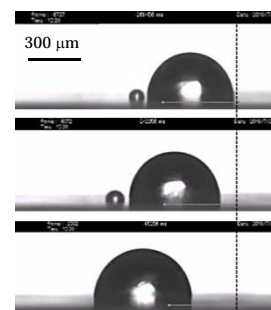


図8：微生物への応用

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 川原知洋
2. 発表標題 ロボメカ技術を活用したバイオ医療プラットフォームの開発と応用
3. 学会等名 Cellink社 Webinar Series (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川原知洋
2. 発表標題 いきものに寄り添ったシステム統合～計測から制御まで
3. 学会等名 CREST-さきがけ複合領域「情報計測」ライフサイエンス情報計測クラスタ会議 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hayato Yoshimura, Tomohiro Kawahara
2. 発表標題 Noncontact Manipulation of Microdroplets using High-Speed Spatiotemporal Ejection Control
3. 学会等名 7th International Conference on Advanced Mechatronics (ICAM) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川原知洋
2. 発表標題 インクジェット高速射出制御によるマイクロ液滴の維持と微生物操作への応用
3. 学会等名 第42回化学とマイクロ・ナノシステム研究会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------