

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 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22860030

研究課題名（和文）

単一微生物のインピーダンスセンシング

研究課題名（英文）

Mechanical Impedance Sensing of Single Microorganism by Microtool

研究代表者

川原 知洋 (KAWAHARA TOMOHIRO)

名古屋大学・工学研究科・COE 特任助教

研究者番号：20575162

研究成果の概要（和文）：本研究では、閉じられた流体バイオチップ環境下において、単一の微生物に対してマイクロツールを用いて機械的な刺激を加え、その時の微生物の挙動を計測することを達成した。具体的には、単細胞性の藻類である珪藻を対象とし、チップ内において磁気で非接触駆動可能なマイクロツールに力計測機構を搭載し、このツールで珪藻を押しつけることで、その時の印加力に対する挙動の因果関係を定量的に評価することに初めて成功した。

研究成果の概要（英文）：In this research, we newly propose an untethered type of magnetically driven microtool (MMT) with a force sensing function to investigate the stimulus characteristics of aquatic microorganisms in a microfluidic chip. The microchip is composed of the proposed MMTs, a transparent cover, a glass substrate, and a microspacer. Finally, we succeeded in on-chip manipulation and sensing of microorganisms (*Pleurosira laevis*) using this MMT, which we found to be easy to use.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,260,000	378,000	1,638,000
2011年度	1,160,000	348,000	1,508,000
総計	2,420,000	726,000	3,146,000

研究分野：マイクロ・ナノメカトロニクス

科研費の分科・細目：工学，知能機械学・機械システム

キーワード：マイクロマシン，微生物，計測工学生物・生体工学

1. 研究開始当初の背景

単細胞性藻類の1つである珪藻は、数億年前から存在するにもかかわらずその生態については未だ不明な点が多いため、特にバイオ分野において研究が行われている。本研究で取り扱う珪藻(*Pleurosira laevis*)は図1のように直径 $50\mu\text{m}$ 、長さ $100\mu\text{m}$ 程の円筒形で、図2のように外部から光・電気・力学刺激を受けると、細胞内の葉緑体が凝集し、さらに、刺激を受けていない離れた細胞にも凝集反応が連鎖的に伝播するというユニークな特性があることが知られている。従来、特に狙った単一の個体に力学刺激を与えるた

めに、ヒトが顕微鏡下で微細なプローブを押し当てていたが、印加力と凝集反応との因果関係を定量的に評価することが難しく、その伝搬機能について十分に解明されていなかった。

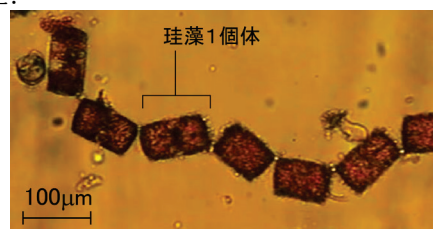


図1：珪藻の構造

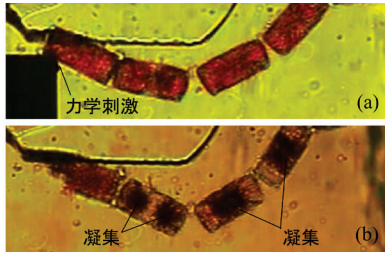


図2：珪藻の葉緑体凝集現象

2. 研究の目的

以上の点を踏まえ、本研究ではバイオチップ内において、磁気で非接触に駆動可能なマイクロツールを用いて珪藻を任意の力で押しつけることで、その時の印加力に対する挙動の因果関係を定量的に評価することを目指す。さらに、計測した印加力と変位の情報から機械インピーダンス特性、及び電気的な刺激を加えることで電気インピーダンス特性を同時に測定することも試みる。このように、閉じられたチップ内で計測系を構築することで、汚染なしに安定した測定を行うことが可能となる。従来、微生物に対するこのようなアプローチ方法は国内外でもほとんど行われていない。

3. 研究の方法

①力センサ付きマイクロツールの開発：マイクロツールを用いて力を加えた場合、オンチップで印加力を計測するセンサはこれまでに開発されていないため、新たに開発を行うことが必要となる。そのため、マイクロツールの先端をスリット状に微細加工し、この部分のたわみをカメラで計測することで、珪藻に加わっている力を推定する手法を検討する。従来開発してきたマイクロツールは数 mN の力を発生できることを見積もっており、100 段階程度で印加力の評価を行うために力センサの目標精度は数 $10 \mu\text{N}$ オーダーを目指す。

②印加力と反応の定量評価：力センサを実装したマイクロツールで単一の珪藻に力を加え、その時の印加力と反射の関係性について調査を行う。具体的には、印加力を増減させた場合の反射速度の変化、刺激をすばやく行った場合の反応、細胞壁が壊れる刺激量の評価などについて考察を行う。さらに、連結した複数の珪藻に刺激を加えた場合、どのように刺激が伝播するかについて同様に調査を行い、伝播メカニズムを調査する。

③インピーダンス特性の評価：②において計測した印加力と変位の関係から機械インピーダンス特性を推定する。また、電気刺激を印加した場合の電気インピーダンス測定も同様に測定する。最終的には、珪藻の個体差や刺激に対する反応について定量的に評価を行う。

4. 研究成果

①力センサ付きマイクロツールの開発：マイクロツールの先端に力計測機構を配置するため、図3のようにモデルを用いた構造解析を行い、設計パラメータの最適域を求めた。また、その際に梁の変形を拡大して感度を高めることのできる変位拡大機構についても設計を行った。結果として、解析結果に基づきフォトリソグラフィを用いて、図4に示すようなポリマー (SU-8) を用いて分解能 $100 \mu\text{N}$ を有する力計測機能付きマイクロツール開発に成功した。さらに、このツールを内包するバイオチップについても作製した。この際、力計測機構がチップ底面の摩擦を受けないようにマイクロスペーサで間隔を補償するチップ作製方法についても導入し、その効果を確認した。一方で、精度向上を目指し、図5のように Si と Ni のハイブリッド構造のマイクロツールを新たに作製することで、計測部分の幅が $5 \mu\text{m}$ 、分解能が $80 \mu\text{N}$ 程度で、繰り返し精度が 10 倍向上したものを作製することに成功した。また、マイクロチップにツールをダメージレスでアセンブリする方法を新たに提案し、従来は可動範囲が限定されていたツールをマイクロ流体チップ内で自由に動き回れるようにすることを実現した。

従来、マイクロツールは永久磁石を手動操作で動かすことで駆動していたためツールの精密位置決めは難しかった。そこでコンピュータによって、先端にネオジウム磁石を取り付けたリニアステージを動作させてマイクロツールを 3 自由度駆動し、 $1 \mu\text{m}$ オーダーで精密位置決めを行うシステムを新たに開発した。以上のような取組により、計測のスループットが従来の手作業やロボットなどを用いた方法と比較して大幅に向上した。

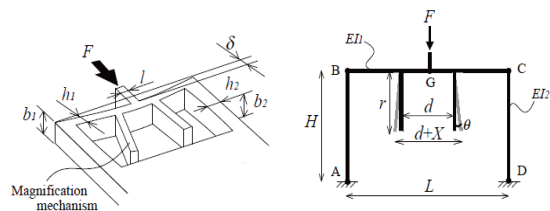


図3：力計測機構の設計

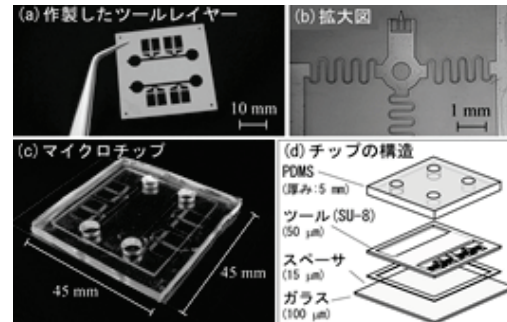


図4：マイクロツール (SU-8) の外観と作製方法

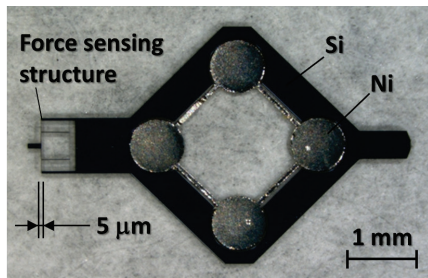


図5：力計測機構を有するマイクロツール
(Ni と Si から構成される)

②印加力と反応の定量評価：力計測を行うために事前に力をキャリブレーションするための実験を行い発生力の評価を行った。また、最終的に図6のように珪藻を押し付ける実験を行い、マイクロツールで珪藻の押しつけに成功するとともに、ツールでの刺激によって葉緑体の凝集が起こることも確認した。さらに、連結された珪藻から細胞を切り離すことができるようになり、単一の細胞に力を加えることで、図7のように印加力の履歴を世界で初めてオンチップ計測することに成功した。このような実験を複数の個体に対して行い、押しつけ方向で破壊の強度が異なることや1 mN程度の押しつけ力で葉緑体の凝集が起こるといった知見が得られ、印加力の差によって凝集の様子が異なることも確認できた。

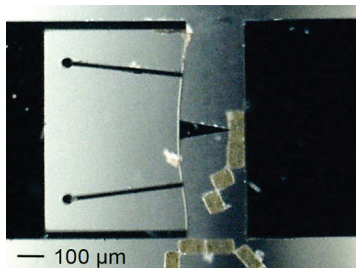


図6：珪藻の計測の様子及び印加力

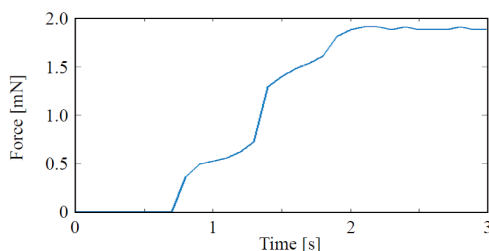


図7：計測した印加力

③インピーダンス特性の評価：珪藻に加えた際の印加力を計測することには成功したが、珪藻の剛性が高く、変化が小さいためインピーダンス特性を計測するには至らなかった。これに対しては、珪藻の変形を捉えるカメラをもう1台用意し、拡大視野で変位を計測する対策が考えられる。今後は、計測する個体数を増やす点、得られたデータから実際に高精度な機械インピーダンスパラメータを算

出することを試みるともに、電気的なインピーダンスを計測するためにツールに電極を構成することにも挑戦する予定ある。

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6件)

- ① 川原知洋, 杉田真邦, 萩原将也, 山西陽子, 新井史人, 河野弘幸, 石川依久子, 宮脇敦史, 磁気駆動マイクロツールによる珪藻のオンチップ刺激特性評価, 日本ロボット学会誌, 査読有, Vol. 29, No. 7, 2011, pp. 650–657.
- ② M. Hagiwara, M. Niimi, T. Kawahara, Y. Yamanishi, H. Nakanishi, and F. Arai, On-Chip Particle Sorting into Multiple Channels by Magnetically Driven Microtools, Journal of Robotics and Mechatronics, 査読有, Vol. 23, No. 3, 2011, pp. 370–377.
- ③ M. Hagiwara, T. Kawahara, Y. Yamanishi, and F. Arai, Precise Control of Magnetically Driven Microtools for Enucleation of Oocytes in a Microfluidic Chip, Advanced Robotics, 査読有, Vol. 25, 2011, pp. 991–1005, DOI:10.1163/016918611X568611.
- ④ M. Hagiwara, T. Kawahara, Y. Yamanishi, T. Masuda, L. Feng, and F. Arai, On-Chip Magnetically Actuated Robot with Ultrasonic Vibration for Single Cell Manipulations, Lab on a Chip, 査読有, Vol. 11, 2011, pp. 2049–2054, DOI: 10.1039/C1LC20164F.
- ⑤ M. Hagiwara, T. Kawahara, Y. Yamanishi, and F. Arai, Driving Method of Microtool by Horizontally-arranged Permanent Magnets for Single Cell Manipulation, Applied Physics Letters, 査読有, Vol. 97, 2011, pp. 013701-1–013701-3, <http://dx.doi.org/10.1063/1.3459040>.
- ⑥ Y. Yamanishi, T. Kawahara, T. Iyanagi, M. Hagiwara, T. Mizunuma, N. Inomata, S. Kudo, and F. Arai, 2DOF Magnetically Driven Microtool for Soft Peeling of Zona Pellucida, Journal of Robotics and Mechatronics, 査読有, Vol. 22, No. 5, 2010, pp. 623–630.

〔学会発表〕(計15件)

- ① T. Kawahara, M. Sugita, M. Hagiwara, Y. Yamanishi, F. Arai, H. Kawano, I.

- Shihira-Ishikawa, and A. Miyawaki, On-Chip Manipulation and Sensing of Microorganisms by Magnetically Driven Microtools with Force Sensing Structure, IEEE Int. Conf. on Robotics and Automation, St. Paul (USA), 2012. 5. 17 .
- ② M. Sugita, T. Kawahara, M. Hagiwara, Y. Yamanishi, and F. Arai, Robotic-Investigators for Microorganisms in a Microfluidic Chip, 25th IEEE Int. Conf. on Micro Electro Mechanical Systems, Paris (France), 2012. 2. 2.
- ③ T. Kawahara, M. Sugita, M. Hagiwara, Y. Yamanishi, and F. Arai, Ultra-High-Speed Robot Hand and Eye for Investigation of Microorganisms in a Chip, 15th Int. Conf. on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences, Seattle (USA), 2011. 10. 5.
- ④ T. Kawahara, M. Sugita, M. Hagiwara, Y. Yamanishi, F. Arai, H. Kawano, I. Shihira-Ishikawa, and A. Miyawaki, Micro-Aquatic-Farm: On-Chip Stimulation and Evaluation System for Microorganisms by Magnetically Driven Microtools, 16th Int. Conf. on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems, Beijing (China), 2011. 6. 8.
- ⑤ 川原知洋, 杉田真邦, 萩原将也, 山西陽子, 新井史人, 河野弘幸, 石川依久子, 宮脇敦史, オンチップバイオトープ マイクロロボットによる珪藻の力学的刺激応答計測一, 日本機械学会ロボティクス・メカトロニクス講演会' 11, 岡山コンベンションセンター (岡山県), 2011. 5. 27.
- ⑥ 川原知洋, 萩原将也, 山西陽子, 新井史人, 超高速オンチップロボット Part I 一単一細胞操作を行う磁気駆動マイクロツールのための超高速計測制御一, 日本機械学会ロボティクス・メカトロニクス講演会' 11, 岡山コンベンションセンター (岡山県), 2011. 5. 27.
- ⑦ T. Kawahara, M. Sugita, M. Hagiwara, Y. Yamanishi, F. Arai, H. Kawano, I. Shihira-Ishikawa, and A. Miyawaki, On-Chip Force Sensing by Magnetically Driven Microtool for Measurement of Stimulant Property of *P. laevis*, IEEE Int. Conf. on Robotics and Automation, Shanghai (China), 2011. 5. 10.
- ⑧ T. Kawahara, M. Hagiwara, Y. Yamanishi, and F. Arai, Stimulus Response Measurement of Microorganisms by

Magnetically Driven Microtool in a Microfluidic Chip, Nano-Biomedicine Symposium, Noyori Conference Hall (Japan), 2011. 2. 21.

- ⑨ 川原知洋, 杉田真邦, 萩原将也, 山西陽子, 新井史人, 河野弘幸, 石川依久子, 宮脇敦史, オンチップ力計測機能を有する磁気駆動マイクロツール, 第22回化学とマイクロ・ナノシステム研究会, 名古屋大学医学部附属病院 (愛知県), 2010. 11. 17.
- ⑩ T. Kawahara, M. Hagiwara, Y. Yamanishi, and F. Arai, Control and Sensing Platform of Magnetically driven Microtool for On-Chip Single Cell Evaluation, I IEEE Int. Symp. on Micro-Nano Mechatronics and Human Scien, Noyori Conference Hall (Japan), 2011. 11. 9.
- ⑪ 川原知洋, 杉田真邦, 萩原将也, 山西陽子, 新井史人, 河野弘幸, 石川依久子, 宮脇敦史, 磁気駆動マイクロツールの高精度位置決め制御と珪藻の刺激特性計測への応用, 第28回日本ロボット学会学術講演会, 3M1-2, 名古屋工業大学 (愛知県), 2010. 9. 24.

〔図書〕 (計1件)

- ① 川原知洋, オーム社, ロボコンマガジン: 高速で精密な細胞操作を実現するマイクロロボット~磁気駆動オンチップマイクロロボットの開発とその応用, Vol. 79, 2012, pp. 82-85.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計1件)

名称: マイクロ流体チップ内における磁気駆動マイクロツールの駆動機構
 発明者: 新井史人, 萩原将也, 川原知洋, 山西陽子
 権利者: 同上
 種類: 特許
 番号: 特許公開 2011-255364
 出願年月日: 23年11月4日
 国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

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

<http://www.lsse.kyutech.ac.jp/~kawahara>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川原 知洋 (KAWAHARA TOMOHIRO)

名古屋大学・工学研究科・COE 特任助教

研究者番号: 20575162

(2) 研究分担者なし

(3) 連携研究者なし