

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年6月10日現在

機関番号：32657

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23700543

研究課題名（和文）

多様な検体の作用を生細胞を用いて測定するための微小流体デバイス

研究課題名（英文）

Microfluidic device for cellular assay of various samples.

研究代表者

二井 信行 (FUTAI NOBUYUKI)

東京電機大学・総合研究所・助教

研究者番号：10508378

研究成果の概要（和文）：

離散化壁面の駆動による動的再構成可能な微小流体チップは、一般的な微小流体の動的再構成法と比較して、駆動できる対象が多いため、多様な検体に対応できるという利点がある。しかし、毛細管力によりピンの間隙を介して外部と液絡する問題（吸い出し）と、メニスカス力により、隣接するピンがつられて動く問題（重ね送り）がある。そこで、重ね送りを防ぎつつ適切に液体をシールする方法として、加熱プローブと温度により粘度変化をもたらすピン間封止材を開発した。具体的には、ポリオレフィン混合体にシリカ系ならびにフッ素樹脂系のフィラーを混合することにより、ピン駆動時の封止剤加熱中にも粘度が過剰に低下せず、かつ駆動対象のピン近傍のみ有意に粘度を低下させられるフィラーの組成を見出した。

次に、上記の微小流体チップを用いて、異なる組成のアクリルアミドゲルを、1つの流路内に隣接させ、かつ互いに混合することのないようにパターンニングすることにも成功した。

研究成果の概要（英文）：

Reconfigurable microfluidic channel with movable sidewalls by mechanically descriptizing the sidewalls using miniature pins has advantages in the transporting difficult-to-flow objects within the channels, and thus it is useful in analyzing various analytes/samples. The device, however, has problems in multiple feeding of the pins, and suctioning the fluid in the channel into the gaps. We have developed a probe that heats single pins to an elevated temperature and that feeds them with friction, and a sealant that changes its viscosity steeply with the temperature. We found a mixture of polyolefins with silica or fluororesin fillers reduced the viscosity drop by heat while it significantly lower the viscosity only near the heated pin. We also successfully patterned multiple gel blocks of different formulation of acrylamide in line within one channel.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：マイクロ流体デバイス

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：システムオンチップ，生物・生体工学，マイクロナノデバイス，細胞・組織，バイオリアクター

## 1. 研究開始当初の背景

マイクロ流体システムは、微細加工技術あるいは印刷技術を応用して基板上にパターンしたマイクロサイズの溝形状または凸形状の転写によって構成されるのが一般的である。この場合、製作時点で流路のレイアウトは固定されるため、完成したシステムは設計時に特定した代表的な状況以外を実現できないことが多い。そのため、設計プロセスの汎用化と、動作時のマイクロ流路の動的再構成が可能な方法として、近年注目されているのが、電場による液滴駆動を用いたいわゆる **digital microfluidics** である。しかし、この方法には、液への電場印加を嫌う用途には適用不可なことに加え、マイクロ流路と違い側壁がないため、多層流の生成など従来のマイクロ流路と同じ利点をすべて共有できないという問題がある。

そこで、この問題に対処するため、マイクロ流路の壁面を機械要素に置き換えることで、電場を用いずに、使用時にあっても動的に再構成できる微小流路を実現することを提案した。このマイクロ流路は、その再構成可能性において有利なだけでなく、気泡やハイドロゲルなど、マイクロ流体内を移動させることが難しい物体を、側壁の移動により発生する大きい力により輸送できる点でも有用である。

しかし、図1に示すように：毛細管力により、ピンの間隙へ流体が吸い出されて外部と液絡してしまう。また、メニスカス力により、隣接するピンがつられて動く（重ね送り）。という問題があった。現在までに、ピンの間隙をゲルで満たし、メニスカスの生成を抑えることで、これらの現象も抑えられ、微小流体チップとしての応用が可能となった。しかし、この方法では、ゲルや、ゲルを介した流路内の流体の蒸発が顕著であり、特に長期的なマイクロ流路の使用には適さないことがわかった。

## 2. 研究の目的

当初は、ゲルの粘度を一定にするため、ゲルを「保湿」することが有効と考え、ゲルの周囲をシリコーンエラストマーからなる水分子・炭酸ガス透過性の容器で覆い、水分子と炭酸ガスを外部から拡散導入する方法（オンチップ  $\text{CO}_2$  インキュベーション）を組み合わせることを検討した。ここで、系全体を容器で覆い、かつピンを駆動できるようにするために、特殊な加工を施したピンを製作することを前提としていた。しかし、検討をすすめるうちに、このような形状の加工自体が困難で、それを、多くのチップに多数導入する

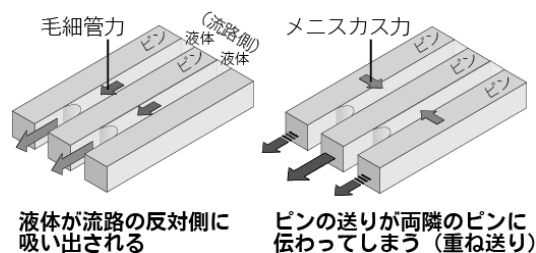


図1 ピン間空隙の液体による力の問題。ピン間の狭い空隙には流路から液体が浸入し、毛細管力によりピンの外側に液体が送り出される。また、ピン間にメニスカスが残存している場合、ピン同士を引き寄せる方向に力がはたらき（メニスカス力）、ピンを引き離すのが困難になる。

ことはなお困難であった。そのため、当初の方針を変更し、ハイドロゲルの代わりに疎水性の封止材を用いることで流路内の蒸発を防ぎ、さらに、熱その他の物理的エネルギーを駆動対象のピンにのみ与えることで、選択的に封止材の物性を変化させ、重ね送りを防ぐことを検討することとした。

## 3. 研究の方法

### (1) 微小流体チップ

微小流体チップの構造を図2Aに示す。ガラス基板上に、ポリメタクリル酸メチル樹脂 (PMMA) 製の射出成形加工品を接着剤で固定した。この PMMA 部品は、基板に接着させる側に高さ 0.3mm の段差が形成されているため、PMMA 層と基板との間に 0.3mm の間隙があく。また、PMMA 部品には貫通穴が形成され、流路への液体導入口となる。この PMMA 部品下面と基板との間の間隙に、図2Bに示すように、ピン(□0.3×7mm)を挿入した。基板上面・PMMA 部品下面・各ピンの端面に囲まれた領域が、動作させたい流路となる。流路壁面を構成する各ピンは、両端の封止固定された2本以外は、長さ方向に直動可能なため（ストローク最大 2mm）、流路壁面は離散化され、動的再構成が可能となる。上記の組立後、両端のピンは、シリコーン接着剤で封止固定し、液体等が漏れないようにした。また、全ピンと PMMA 部品・基板との間隙に、炭化水素系ワックスをワックスペンにて溶解したものを導入した。

### (2) ピン駆動システム

一般的な実体顕微鏡のステージに、粗動3軸手動マニピュレータを介してワックスペンを固定した。ワックスペンのペン先には、

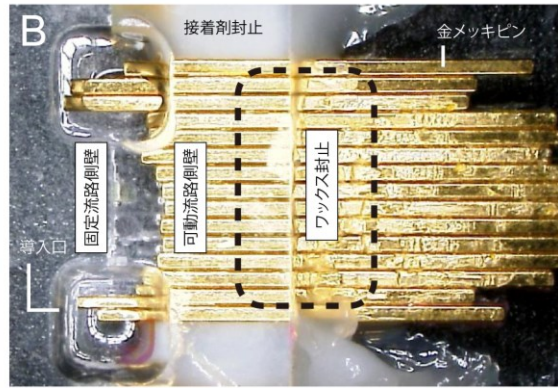
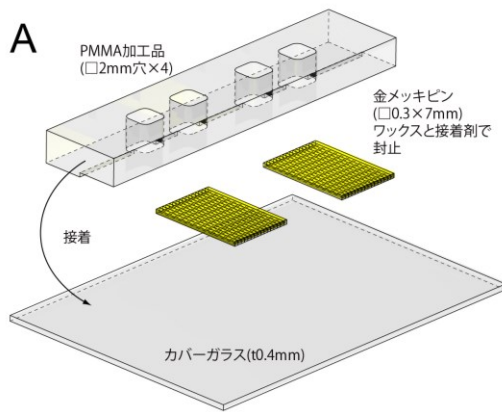


図 2 動的再構成可能微小流体チップの構造. A) 組立図. 基板 (カバーガラス) と、下部に段差があった PMMA 部品を接着し、流路の上下壁と片側側壁をなす溝形状を構成する. もう片側の側壁を、その溝に挿入したピン (写真では金メッキピン) の端面の並びで表現する. B) 上面写真. 流路の固定側壁 (PMMA の段差部分) に垂直になるようにピンを挿入し、PMMA 部品とガラスの隙間に、接着剤とワックスを導入し、ピン周囲に残る間隙を封止し、流路に導入した液体が外部に漏れるのを防ぐ.

機械加工により先端をピンの幅と同じ 0.3 mm にし、実体顕微鏡とマニピュレータによる位置決めを容易とした. ピンの駆動は、ワックスペンを設定温度 60°C にした状態で、マニピュレータを用いてペン先端を駆動対象のピンの直上かつ露出している部分に接触させ、そのままピンの長手方向にワックスペン先端を平行移動することによって行った. ワックスペン先端の位置決めは、実体顕微鏡でマイクロ流体チップを観察しながらマニピュレータを操作することにより行った.

### (3) 動的再構成流路内の流体操作

まず、流路の固定側壁 (PMMA) と、ピン端面との距離が 0.3 ~ 0.5 mm となるようにピンを駆動し、流路を形成した. 続いて、液体導入口に純水をピペットで導入し、流路を純水で満たした状態で、流路中央部に位置するピン 1 個を固定側壁に接触させ、すなわち流路を閉じた. この状態で、フォトマスクをガラス基板下面に接触させ、流路を閉じているピンを参照しておおまかに位置合わせした. その後、ピン操作により、流路を閉じているピンの片隣の辺約 0.3mm の区画に、フルオレセインナトリウムを含む感光性アクリルアミドゲル前駆体を導入し、閉じ込めた. 前駆体を封入された区画の直下には、フォトマスクの開口が位置している. 紫外スポット光源からの紫外光をチップ下側から照射し、ゲル前駆体が封入された区画周辺を露光し、ゲル前駆体を硬化した. 続いて、上記と同様に、ローダミン WT を含むゲル前駆体を封入し、露光により硬化した. 最後に、ゲル周辺の流体を純水に置換した.

## 4. 研究成果

図 3 に、図 2 に示すマイクロ流体内に形成されたハイドロゲル片の偏斜照明による顕微鏡像を示す. 異なる組成のゲル、すなわちフルオレセインナトリウムとローダミン WT それぞれを含むゲルが隣接して配置できている. これらのゲルを流路内に形成する過程を通じて、流路内の液体が外部に漏出し、または重ね送りが生じることはなく、2 種類の異なる溶液を操作する比較的複雑な流体操作をスムーズに行うことができた. ゲル形成にあたっては、光重合方式の前駆体を用い、フォトマスクも用いたが、これらは、ゲルの形状を定義するのに直接は寄与していない. あくまで、流路側壁の形状コントロールにより、ゲルの位置とサイズを任意の位置に設定することができた.

ピンの表面粗さやひずみによっては、ゲルの形状の崩れや、ピン間を封止するワックスが流路内に移行する現象がみられる. 図 2 に示すピンは電子回路の表面実装用のために大量生産の方法で製作されたものであり、この表面実装用ピンを用いた場合、ゲルの形状には図 3 に示すものより形状の崩れがみられ、また、異物が流路内に多く混入した. この問題は、金属の除去加工により面粗さ・平行度・垂直度を向上させたピンを用い、デッドスペースを減少させるとともに、チップ本体とよりよい摺動面をなすことで解決した. また、ピン駆動時のワックスペンの先端の温度を温度センサと温度調節器を用いて正確に制御することにより、ピン間シールの機能を維持しつつも、ピン加熱時の急激な粘度低



図 3 再構成可能マイクロ流路内に形成された 2 種類の組成のアクリルアミドゲル片の偏斜照明像. 流路中の左側にローダミン WT を含むゲル, 右側にフルオロセインナトリウムを含むゲルの小片が, 固定流路壁に沿って形成されている.

下を抑え, ワックスの流路側への流入を防ぐことにも成功した.

その後, 本チップの想定用途として, 細胞培養の長期継続(継代などの操作の省略)を挙げていることより, 実際に細胞を播種して細胞の培養を試みたが, 細胞の接着性と **viability** の低下がみられた. PMMA 部品, ピン, ワックス, 接着剤など, チップを構成する各部品を入れたディッシュ内での培養においては, 目立った接着性低下や死滅等の減少がみられないことは確認されたので, チップ内の培地量の少なさに起因する培地の劣化あるいは細胞毒性の顕在化, もしくは播種操作自体の問題が考えられるが, 現時点では, 検証中であり, 原因を特定するには至っていない. そのため, 本研究期間内においては, 図 2 に示すマイクロ流体チップの, 細胞培養デバイスとしての有効性を示すには至らなかった.

本研究期間終了後においては, 引き続き細胞培養デバイスとしての特性向上を図りたい. 具体的には, チップ内培地容積の増加と播種操作の最適化を試みるとともに, ワックスを毒性の少ない高分子の樹脂に含浸させたものを封止材に用い, より精度の高い摺動をもたらすことを試みる.

## 5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 1 件)

遠藤己季代, 高野温, 田中真人, 二井信行, リンフィグラブル微小流体チップによるハイドロゲルのパターンニング, 生体医工学シンポジウム 2012, 大阪, 2012 年 9 月

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: マイクロ流体チップ及びそれを用いたマイクロ流体システム

発明者: 二井 信行

権利者: 学校法人東京電機大学

種類: 特許

番号: 特願 2012-110473

出願年月日: 平成 24 年 5 月 14 日

国内外の別: 国内

○公開状況 (計 1 件)

名称: マイクロ流体チップ及びそれを用いたマイクロ流体システム

発明者: 二井 信行

権利者: 学校法人東京電機大学

種類: 特許

番号: 特開 2012-194062

年月日: 平成 24 年 10 月 11 日

国内外の別: 国内

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

二井 信行 (FUTAI NOBUYUKI)

東京電機大学・総合研究所・助教

研究者番号: 10508378