

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26820083

研究課題名(和文) 光電子デバイスによる局所温度制御マイクロ流体システムの構築

研究課題名(英文) Microfluidic Device using Local Thermal Control by Optoelectronics

研究代表者

竹内 大 (Takeuchi, Masaru)

名古屋大学・工学研究科・特任助教

研究者番号：20713374

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)：本研究では細胞やモデル生物の操作，解析を行うために，局所加熱を用いた新たなラボオンチップの創製を目指した．微細加工技術を用いたマイクロ電極をガラス基板上に作製し，ヒータとして用いることで局所加熱を実現した．

流路を作製するための材料として，ゼラチン・寒天混合ハイドロゲルを用いた．ガラス基板上の電極を用いてハイドロゲルを局所的に融解し，チャンネル形状を作製可能であることを確認した．また，チャンネル径を加熱時間により制御可能であることを明らかにした．さらに，作製したチャンネルに再びハイドロゲルを流し込むことで，チャンネルを閉じることも可能とした．これにより，可変なマイクロチャンネルの作製に成功した．

研究成果の概要(英文)：In this research, new microchannel fabrication method has been developed using local heating of hydrogels. The micro-electrodes were fabricated on a glass substrate to generate Joule heat.

The gelatin-agar mixed hydrogel was prepared to locally melt and fabricate microchannels. The hydrogel was placed on the micro-electrodes and locally melted by the generated Joule heat. The channel size is controlled by the heating duration. The fabricated channel can be closed by filling the hydrogel again. Hence, the microfluidic device which has changeable channel patterns was achieved by controlling the melting pattern of hydrogels.

研究分野：マイクロマニピュレーション

キーワード：マイクロチャンネル 局所加熱 ハイドロゲル 細胞構造体 マイクロ電極

### 1. 研究開始当初の背景

近年、半導体デバイス作製に用いられるMEMS(Micro Electro Mechanical Systems)技術を用いたマイクロ流体デバイスの開発が盛んに行われている。マイクロ流体デバイスでは層流や表面張力、熱伝導といったマイクロスケールにおいて効果的な現象、原理を用いることで1) 高効率、2) 高感度、3) 高精度の分析を行うことが可能となる[1]。そのため、マイクロ流体デバイス内に細胞やモデル生物を導入し、環境を精密に制御することで新薬の創生や外部刺激に対する細胞内の神経細胞の活性評価など生物学、医学分野への応用が期待されている。

従来用いられてきたマイクロ流体デバイスは、基本的にガラスもしくはPDMS(ポリジメチルシロキサン)と呼ばれるシリコン系樹脂によって作製されており、一度作製してしまえばその形状を変更することはできない。しかし、流体デバイス内の細胞やモデル生物は状態が時々刻々と変化するため、状態に応じて流路パターンをダイナミックに変化させ環境を制御できるマイクロ流体デバイスが求められている。そこで、最近では任意の形状に動的に変化させられるマイクロ流路を実現したマイクロ流体デバイスの開発が行われるようになってきている[2]。

### 2. 研究の目的

本研究では細胞やモデル生物の操作、解析を行うために、局所加熱を用いた新たなラボオンチップの創製を目指す。特に、局所加熱による材料の融解を用いることで、精密な流路を持ち、かつ流路形状をダイナミックに変化させることが可能なマイクロ流体デバイスを作製する。

### 3. 研究の方法

研究当初は光電子デバイスを用い、光を熱エネルギーへと変換することで局所加熱を行うことを試みた。しかしながら、作製した光電子デバイスでは十分な発熱量を得ることが困難であった。そこで、微細加工技術を用いたマイクロ電極をガラス基板上に作製し、ヒータとして用いることで局所加熱を行い、可変マイクロチャンネルをハイドロゲル内に実現する方法を用いた。図1にマイクロ電極を用いた局所加熱によるチャンネル作製のコンセプトを示す。マイクロチャンネルを作製

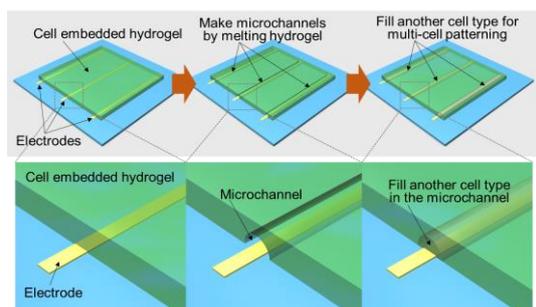


図1 研究コンセプト

するための材料としては融点の比較的低いハイドロゲルを採用し、ハイドロゲル内に細胞を埋め込むことで細胞構造体として用いる応用も可能とした。

### 4. 研究成果

ガラス基板上の電極としては、フォトリソグラフィのリフトオフプロセスを用い、クロム・金の薄膜電極を作製した。また、流路を作製するための材料として、ゼラチン・寒天混合ハイドロゲルを用いた。ガラス基板上の電極を用いてハイドロゲルを局所的に融解し、チャンネル形状を作製可能であることを確認した。また、チャンネル径を加熱時間により制御可能であることを明らかにした。図2にその結果を示す。この実験においては、2つの異なる実験条件に対して行った。一方は電極を有するガラス基板底面を冷却せず室温状態に置いた場合、他方はガラス基板底面を保冷材により冷却した場合である。図2(b)のグラフから分かるように、作製されるチャンネル高さには大きな違いはないが、チャンネル幅は冷却した条件の方が小さくなることが分かった。これは、電極で発生したジュール熱のうちガラス基板内を伝達する熱の一部が保冷材によって吸収されたためと考えられる。

ハイドロゲルの融解量に対しては、式(1)に示す1次元熱伝導方程式を用いたシミュレ

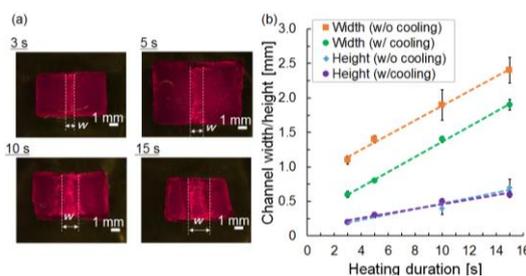


図2 チャンネル作製結果 (a) 作製されたチャンネル (b) ヒーティング時間とチャンネル幅・高さの関係

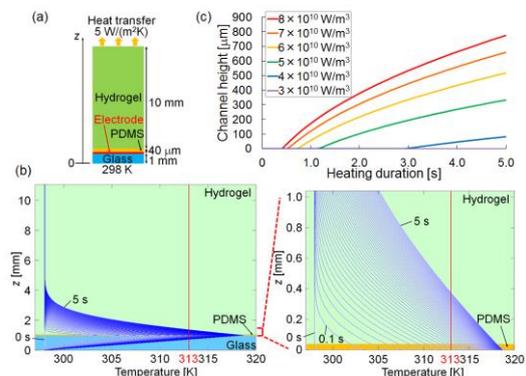


図3 1次元熱伝導方程式を用いたハイドロゲル融解シミュレーション (a) シミュレーションモデル (b)  $5 \times 10^{10} \text{ W/m}^3$ におけるハイドロゲル内の温度変化 (各曲線は0.1秒毎の温度を表す) (c) 電極からの発熱量を変化させた場合のチャンネル高さ変化

ーションも行った。

$$\frac{\partial T(z,t)}{\partial t} = D \frac{\partial^2 T(z,t)}{\partial z^2} + q \quad (1)$$

$T(z,t)$ は時間  $t$ , 位置  $z$  における温度を表し,  $q$  は電極からの発熱を表している。

シミュレーションに用いたモデルを図 3 (a)に示す。モデルでは, ガラス基板上に金電極があり, その上に厚さ  $40 \mu\text{m}$  の PDMS 膜が絶縁層としてある。この PDMS の上にヒドロゲルが置いてある。本研究では, 融点約  $40$  度であるゼラチン - 寒天を  $8:2$  の割合で混合した濃度  $7\%$  のヒドロゲルを用いた。そのため, シミュレーションでは温度が  $40$  度以上になった位置が融解しチャンネルを形成するとした。図 3 (b)にシミュレーション結果の一例として,  $5 \times 10^{10} \text{ W/m}^3$  が電極から発熱している場合の結果を示す。このシミュレーションでは, 初期状態としてモデル全体が室温 ( $25$  度) 状態から始まり, 電極から発生するジュール熱に従って増加する温度を  $0.1$  秒毎に曲線で表している。図 3 (c)に電極からの発生ジュール熱量を変化させた場合のチャンネル高さの時間変化について示す。このように, 発熱量が小さすぎる ( $3 \times 10^{10} \text{ W/m}^3$ ) とチャンネルが作製され始めるまでに  $3$  秒以上の時間を要してしまう。また, 発熱量が大きすぎる ( $8 \times 10^{10} \text{ W/m}^3$ ) と  $0.5$  秒以下でチャンネルが作製され始め, チャンネル高さが急激に増加してしまう。このように, チャンネルを  $1$  秒程度で作製でき, 高さ (幅) を調整可能とするには適切なジュール熱量を選ぶ必要があることが分かる。

また, 電極形状を網目状にすることで, チャンネル形状を選択的に変化させることもできる。例えば, 図 4 に示すように縦に  $3$  本, 横に  $1$  本の直線電極を用意すると, 電源を接続する箇所によって選択的にヒドロゲルを溶かし, チャンネルを作製することが可能である。この電極を用いて作製したチャンネルを図 5 に示す。この実験では, 電極に電圧を印可しチャンネルを作製した後, チャンネルを可視化するためにコンゴローッドによって赤色に染色した純水をチャンネルに流している。こ

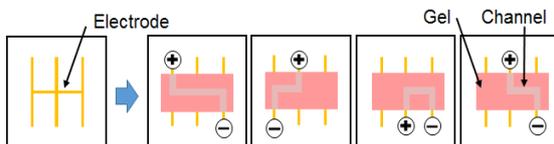


図 4 選択的チャンネル作製のための電極

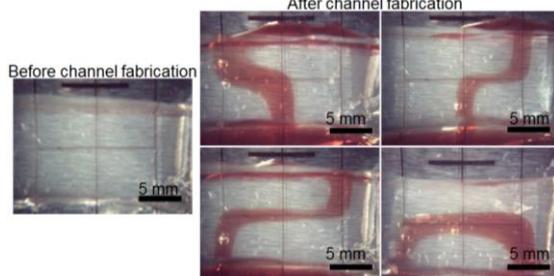


図 5 選択的チャンネル作製結果

のように, 単純な直線形状だけでなく, 曲がったチャンネルについても本手法を用いて作製可能である。

本研究で用いた手法では, 作製したチャンネルに再びヒドロゲルを流し込むことで, 作製したチャンネルを埋め元の状態に戻すことも可能である。これにより, 可変なマイクロチャンネルをヒドロゲル内に作製可能である。さらに, チャンネルの作製及び埋め戻しを繰り返すことで, 内壁が多層構造となったチャンネル構造を作製することも可能である。図 6 (a)に作製手順を示す。まずヒドロゲルを電極上に配置し, 電極に直流電源を接続することでヒドロゲルを局所的に溶かしチャンネルを作製する。その後, 再びヒドロゲルをチャンネル内に導入し固める。再び電極を用いてヒドロゲルを融解させる。このとき, 加熱時間を  $1$  回目のチャンネル作製時より短くすることで小さなチャンネルを作製し, 内壁に流し込んだヒドロゲルを残すことで層構造とすることができる。これを繰り返すことで, 内壁が多層構造となったチャンネルを作製することが可能となる。図 6 (b)に  $2$  層のチャンネル構造を作製した結果を示す。この実験では, まず  $15$  秒の加熱によりチャンネルを作製し, そこに赤色に染色したヒドロゲルを流し込む。赤色のヒドロゲルを固めた後に  $2$  回目の加熱を  $10$  秒間行い, 赤色のヒドロゲルの一部を融解してチャンネルを作製する。作製したチャンネル内に青色に染色したヒドロゲルを流し込み, 固める。最後に  $5$  秒間の加熱を行うことで, 青色のヒドロゲルの一部を融解してチャンネルを作製する。このようにして, 赤色及び青色のヒドロゲルが層状になったチャンネル構造を得ることができた。表 1 に各層及びチャンネルの高さ・幅について示す。また, 図 2 (b)のグラフを基に予想され

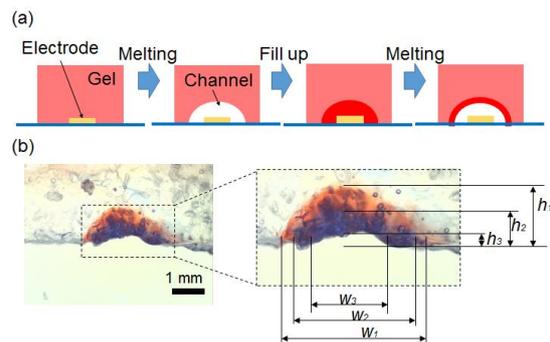


図 6 多層チャンネル形状の作製

表 1 多層チャンネルの形状

	$h_1$	$h_2$	$h_3$
Heating duration [s]	15	10	5
Measured height [mm]	1.1	0.7	0.3
Expected height [mm]	0.7	0.4	0.3
	$w_1$	$w_2$	$w_3$
Heating duration [s]	15	10	5
Measured width [mm]	2.5	2.1	1.3
Expected width [mm]	2.4	1.9	1.4

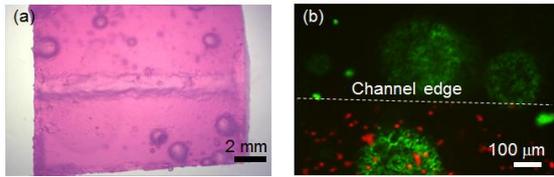


図 7 作製したチャンネルを用いた異種細胞のパターニング (a) 作製されたチャンネル (b) チャンネル境界面における蛍光観察結果 (緑色：ラット肝臓細胞, 橙色：マウス平滑筋細胞)

るチャンネルの高さ・幅についても示している。このように、多層構造を有するチャンネルに対しても、図 2 (b) のグラフを用いることで層の厚さやチャンネル高さ・幅を予測可能であることを明らかにした。

さらに、本研究では細胞をハイドロゲル内に埋め込むことで、異種細胞の培養が可能な細胞構造体の構築も実現した。特に、作製したチャンネルを用いてハイドロゲル内での異種細胞のパターニングに成功した。図 7 にその結果を示す。この実験では、予めラット肝臓細胞 (RLC-18) を埋め込んだ状態のハイドロゲルを用いる。このハイドロゲルを局所過熱し、直線形状のチャンネルを作製した (図 7 (a))。作製されたチャンネル内にマウス平滑筋細胞 (SMC) を流し込むことで、RLC-18 と SMC の 2 種の細胞がパターニングされたハイドロゲル構造体を実現した。RLC-18 と SMC は予め緑色及び橙色蛍光を発するように CellTracker を用いてそれぞれ染色した。図 7 (b) に蛍光顕微鏡による観察結果を示す。このように、チャンネル部分にのみ SMC が存在し、細胞がパターニングされていることがわかる。この研究結果により、生体外にて臓器等の細胞構造体を模した細胞システムを実現可能なシステムを構築可能であることが示された。

#### <引用文献>

- [1] G. M. Whitesides, Nature, 442: 368-373 (2006).  
 [2] A. Banerjee et al., Lab on a Chip, 12: 758-764 (2012).

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 2 件)

- ① M. Takeuchi, T. Oya, A. Ichikawa, A. Hasegawa, M. Nakajima, Y. Hasegawa, T. Fukuda, Multi-layered Channel Patterning by Local Heating of Hydrogels, Peer-reviewed, IEEE Robotics and Automation Letters, Vol. 2, pp. 958-963, 2017.  
 ② M. A. Mansor, M. Takeuchi, M. Nakajima, Y. Hasegawa, M. R. Ahmad, Electrical Impedance Spectroscopy for Cell Detection in Suspensions using Microchannels with Integrated Microneedle, Applied Sciences, vol. 7, p. 170, 2017.

〔学会発表〕 (計 7 件)

- ① M. Takeuchi, T. Oya, A. Ichikawa, A. Hasegawa, M. Nakajima, Y. Hasegawa, T. Fukuda, Multi-layered Channel Patterning by Local Heating of Hydrogels, 2017 IEEE International Conference on Robotics and Automation Accepted, 2017.  
 ② T. Oya, M. Takeuchi, K. Ohara, A. Ichikawa, M. Nakajima, T. Fukuda, Selective Channel Fabrication by Local Heating for Cell Patterning, 2016 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science, DOI: 10.1109/MHS.2016.7824202, 2016.  
 ③ 大矢智之, 竹内大, 大原賢一, 市川明彦, 中島正博, 長谷川泰久, 福田敏男, 局所的熱融解による生体親和性ゲルの選択的チャンネルパターニング, ロボティクス・メカトロニクス講演会 2016, 横浜, 2016.  
 ④ M. Takeuchi, T. Oya, A. Ichikawa, K. Ohara, M. Nakajima, T. Fukuda, Y. Hasegawa, Microchannel Fabrication by Local Melting of Hydrogel toward *in vitro* 3D Cell Structures, 9th IEEE International Conference on Nano/Molecular Medicine and Engineering, pp. 23-28, 2015.  
 ⑤ T. Oya, M. Takeuchi, A. Ichikawa, K. Ohara, M. Nakajima, Y. Hasegawa, T. Fukuda, Local Melting of Hydrogel for Microchannels Fabrication in Cell Structures, 2015 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science, pp. 333-335, 2015.  
 ⑥ 大矢智之, 竹内大, 市川明彦, 大原賢一, 中島正博, 長谷川泰久, 福田敏男, 局所的熱制御による生体親和性ゲル内での細胞パターニング, ロボティクス・メカトロニクス講演会 2015, 京都, 2015.  
 ⑦ 大矢智之, 竹内大, 市川明彦, 大原賢一, 中島正博, 長谷川泰久, 福田敏男, 生体親和性ゲルの局所的熱融解によるマイクロチャンネル作製, 第 33 回日本ロボット学会 学術講演会, 東京, 2015.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.mein.nagoya-u.ac.jp/research.html>

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹内 大 (TAKEUCHI, Masaru)

名古屋大学・工学研究科・特任助教

研究者番号：20713374

(2) 研究分担者

なし。

(4) 研究協力者

福田 敏夫 (FUKUDA Toshio)

名城大学・理工学部・教授

研究者番号：70156785

中島 正博 (NAKAJIMA Masahiro)

名古屋大学・工学研究科・助教

研究者番号：80377837