

報告番号	甲 第 13142 号
------	-------------

主論文の要旨

論文題目 **Ultra-High-Speed and High-Resolution
Microfluidic Flow Control
(超高速・高分解能マイクロ流体制御)**

氏 名 笠井 宥佑

論文内容の要旨

マイクロ流体工学は、生物学、化学、機械工学、物理学、農学、および医学の分野に関連の深い学際的な学問であり、微細粒子および微量溶液の制御・操作等の応用に広く貢献してきた。しかし、従来のマイクロ流体の研究において、マイクロ流体制御の高速化・高分解能化のための設計指針に関する知見は乏しく、そのため、単一細胞レベル（ピコリットルオーダー）の微小流体をミリ秒の応答速度で制御する技術は未踏の領域であった。マイクロ流体制御技術の高速化・高分解能化は、単一細胞の操作・解析を可能とするだけでなく、システムのスループットを向上させる上で非常に重要である。そこで本論文では、第2章で従来のマイクロ流体システムモデルの一般化を行い、マイクロ流体システム中の構成要素が流体制御における応答速度および体積分解能に与える影響を検討し、応用に応じたマイクロ流体システムの設計指針を提案し、超高速・高分解能なマイクロ流体制御技術の構築を行った。構築したマイクロ流体システムの応用として、第3章で細胞単離用マイクロピペット、第4章で高速オンチップ細胞ソーティングシステム、高速オンチップミキシングシステム、およびオンチップキャビテーションシステムを開発し、それぞれの応用において、従来研究に対するブレークスルーを達成した。本論文の構成は以下のとおりである。

第1章では、各学術領域におけるマイクロ流体工学の貢献と、マイクロ流体制御技術の応用例について議論を行い、最後に研究目的および論文の構成について述べた。マイクロ流体工学は生物学、化学、機械工学、物理学、農学、および医学を横断する学際的な学問であり、例えば、N. Nitta らが開発した画像活性型細胞分取装置 (Intelligent image-activated cell sorter) は、機械工学、光学、電気工学、細胞学等の分野の融合によって開発された装置であり、今まで人が目視で時間をかけて観察してきた細胞を、機械を用いて高速かつ正確

に計測・判別・分取することができるため、生物学、農学、医学の分野への非常に大きな貢献が期待されている。マイクロ流体制御技術の応用を決める重要な点として、流体制御の流速が挙げられる。従来の多くのマイクロ流体デバイスは、低速の定常流をデバイスに与え、マイクロ流路の特徴である層流環境を利用して、細胞フォーカシング、細胞フィルタリング、溶液ミキシングなどの応用を示してきた。近年では、マイクロ流体デバイスに動的な流体制御機構を付与するといった、時分解的なマイクロ流体制御技術が注目されている。しかし、マイクロ流体デバイスと流体制御システムの統合の難しさから、高速かつ高分解能なマイクロ流体制御技術は困難であった。そこで本論文では、超高速・高分解能なマイクロ流体制御技術の構築方法を提案し、その応用例を示す。

第2章では、マイクロ流体システムのモデル化を行い、超高速・高分解能なマイクロ流体制御技術の構築方法の議論を行った。超高速・高分解能なマイクロ流体制御技術を構築するためには、マイクロ流路と外部アクチュエータの構成を検討する必要がある。そこで我々は、S. Sakuma らが提案したマイクロ流体システムモデルである“Flow reduction mechanism”をベースに、マイクロ流体システムモデルの一般化を行った。本モデルでは、マイクロ流体デバイスと外部アクチュエータ間の部材が、マイクロ流体デバイスに並列に配置された仮想弾性部と仮想粘性部として仮定されている。我々は、上記モデルに加えて、マイクロ流路中に直列に弾性部と粘性部が配置されているモデル (“Extended flow reduction mechanism”) を提案し、外部アクチュエータの駆動面を入力とし、マイクロ流路中の特定の位置の変位を出力とした際の静特性および動特性の考察を行った。考察の結果、今回新しく考慮された直列の弾性部は、弾性部の根本と先端の面積を大きくすることによって、変位制御の分解能を向上させられるということがわかった。また、高速なマイクロ流体制御のためには、弾性部および粘性部は出来る限り小さい方が良いため、アクチュエータとマイクロ流体デバイスは出来る限り直結した構造を有すことが望ましいという帰結を得た。導出したモデルと上述の設計論を基に、マイクロ流体デバイス中に直列に弾性部材を配置した構造を有する高速・高分解能マイクロ流体制御技術 (第3章)、およびマイクロ流体システム中の弾性部・粘性部が小さくなるような構造を有する超高速マイクロ流体制御技術の開発を行った (第4章)。

第3章では、高速・高分解能マイクロ流体制御技術の応用例として、遊泳細胞の単離のためのマイクロピペットの開発を行った。近年、遊泳する細胞を単一分取する技術の需要が高まっている。例えば、遊泳細胞である藻類細胞のユーグレナは、脂質の量に個体差があることが知られており、脂質の多い個体を選択的に単離・培養することによる高効率なバイオ燃料の生産が期待されている。単一細胞分取技術の中でも、培養皿中から直接細胞を観察・分取・分注可能という利点から、ピペットを用いた単一細胞ピックアップ技術が注目されている。遊泳する細胞を対象とするとき、以下の2点、①細胞群の中から目的の細胞のみをピックアップするためのピコリットルオーダーの高い分解能、および、②ピペット先端を通過する細胞をピックアップするためのミリ秒オーダーの高い応答速度、を両立した流体制御技

術が要求される。従来のピペット操作技術において、電気浸透流を用いた高分解能な流体制御や、メンブレンポンプを用いた高速な流体制御が報告されてきたが、高速かつ高分解能なピペット操作技術は困難とされてきた。そこで我々は、キャピラリー先端に弾性要素として泡を有する piezoelectric 直動型のマイクロピペットを提案した。ガラスキャピラリーと piezoelectric アクチュエータを直結することによってマイクロ流路に並行な弾性要素を小さくし、一方でキャピラリー先端に泡を配置し流路に直列な弾性要素を設けることで、高速かつ高分解能なマイクロピペットを実現した。実験の結果、応答時間 3.9 ms、体積分解能 0.42 pL という高速・高分解能ピペット操作を達成した。ユーグレナの対象とした遊泳細胞の単離実験では、ユーグレナの単一ピックアップおよび個別ウェルへの分注に成功し、99.1%という高い生存率を確認した。本技術は、従来困難とされていた遊泳細胞の単一解析を可能とするだけでなく、細胞培養ウェルというマクロスケールの実験系と、マイクロ流体デバイスというマイクロスケールの実験系の間を結ぶ重要な技術となると考えられる。

第4章では、超高速マイクロ流体制御技術の応用例として、(1) 高速オンチップ細胞ソーティングシステム、(2) 高速オンチップミキシングシステム、および(3) オンチップキャビテーションシステムの開発を行った。これらの応用を可能とする超高速流体制御のプラットフォームとして、我々は高剛性マイクロ流体チップを用いた piezoelectric アクチュエータ駆動型のオンチップメンブレンポンプを提案した。ガラス製のメンブレンを piezoelectric アクチュエータで変形させることによって、メンブレンポンプ内部の流体を瞬間的かつ局所的にメイン流路に吐出することが可能である。piezoelectric アクチュエータに入力する電圧値および立ち上がり時間を制御することにより、局所流の流速を制御することが可能になる。各応用について、局所流の流速の順に下記に述べる。(1) 局所流が 0.1~1 m/s の比較的低速な領域においては、局所流をメイン流に対して垂直方法に与えることで、左から右に流れるメイン流を上下方法にシフトする働きを持つ。我々はこの現象をオンチップ細胞ソーティングに応用した。従来のオンチップ細胞ソーティング技術においては、ミドリムシなどの 100 μm 程度の大きな細胞を 10 kHz 以上の高速なスループット条件下でソーティングすることは困難とされていた。本研究では、提案するオンチップメンブレンポンプを用いることで、最速応答速度 16 μs (等価スループット 31 kHz)、ソーティング幅 147 μm の流体制御を達成し、大きさ約 100 μm のユーグレナを対象として、最大スループット 23 kHz のソーティングに成功し、また、90.8%という高い生存率を達成した。(2) 局所流が 1~10 m/s の高速な領域においては、レイノルズ数が高くなることによって、マイクロ流路中に渦を時空間的に生成することが可能となる。我々はこの現象をオンチップミキシングに応用した。ミキシング技術において、混合のスループットを向上させるために、高流量条件で溶液を混合する技術が求められてきた。しかし、低レイノルズ数による層流環境が原因となり、マイクロ流体チップ中で高流量条件下で溶液を高速に混合することは困難であった。そこで本研究では、オンチップメンブレンポンプによる高速局所流を用いることで渦を数十マイクロ秒オーダーで生成可能であることに着目し、渦を攪拌子をして利用することで高速ミキシング

をする手法を提案した。実験の結果、1.2 ml/min という非常に高い流量条件下で、混合時間 0.5 ms という高速オンチップミキシングを達成した。(3) さらに高速な局所流を与えると、速度上昇に伴う圧力低下によって流体中に負圧が発生し、マイクロ流体チップ中でキャビテーションを生成することが可能となる。オンチップキャビテーション生成は、マイクロ流体制御における制御流速の限界を示すとともに、タンパク質の結晶化やドロップレットの均質化などに応用が可能な基礎技術として注目されている。しかし、従来技術において、流体制御を用いてマイクロ流体チップ中で時分解的にキャビテーションを生成する技術は報告されてこなかった。そこで本研究では、オンチップメンブレンポンプを用いて約 20 m/s の超高速流を生成し、押しと引きの流れタイミングを制御することによって、流体制御のみで時分解的にマイクロ流体チップ中でキャビテーションを生成することに成功した。さらに実験結果を有限要素法解析結果と照らし合わせ、キャビテーション発生点において流体中の圧力が流体の飽和蒸気圧を下回っていることが確認出来た。上述のオンチップメンブレンポンプを用いた超高速流体制御技術は、従来技術の性能を向上させるだけでなく、従来のマイクロ流体デバイスに新しい機能を付与することを可能とし、マイクロ流体工学の応用を拡げるための重要な基盤技術となると考えられる。

第5章では、本研究の結論および今後の展望を記述している。本研究では、マイクロ流体システムモデルの一般化を行い、超高速・高分解能なマイクロ流体制御技術の構築方法を提案し、高速・高分解能マイクロピペットを用いた遊泳細胞の単離、超高速オンチップメンブレンポンプを用いた高速オンチップ細胞ソーティング、高流量条件下での高速オンチップミキシング、および時分解的なオンチップキャビテーションを達成した。これらの技術は従来困難とされていた細胞や溶液の高速・高分解能操作を可能にし、新しいマイクロ流体デバイスの応用を切り拓くと考えられる。今後、オンチップソーティングを基軸として、対象のマルチモーダルな情報に基づくオンチップマルチソーティングや、大型の微粒子の高速オンチップソーティングへの発展を行う。