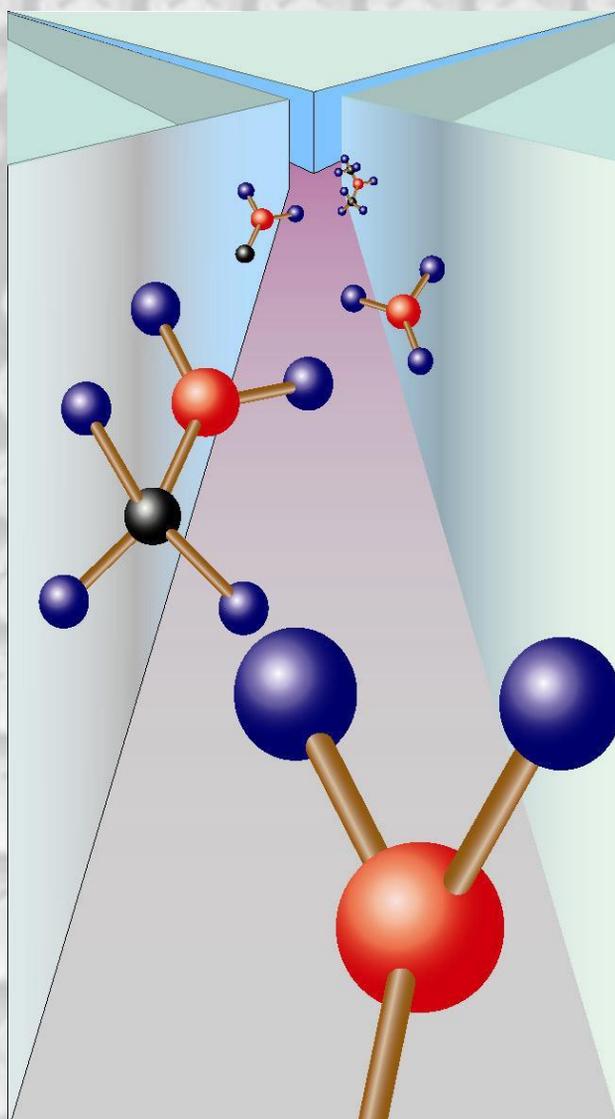


化学とマイクロ・ナノシステム研究会誌

化学とマイクロ・ナノシステム



2010. 3

Journal of the Society for Chemistry and Micro-Nano Systems, Vol. 9, No.1

誘電泳動機能を有するダイナミックマイクロアレイ

石原宏尚¹, 竹内昌治^{*1, 2}¹東京大学生産技術研究所, ²神奈川科学技術アカデミーDynamic Microarray with a Dielectrophoretic Function
for Selective Trapping of MicroparticlesHirotaka ISHIHARA^{*1}, Shoji TAKEUCHI^{1, 2}¹Institute of Industrial Science, The University of Tokyo²Kanagawa Academy of Science and Technology (KAST)

Received February 26, 2010 ; Accepted March 9, 2010

Abstract

This paper describes a method for the selective trapping of different kinds of microparticles in a microarray. By adding dielectrophoresis (DEP) function into a previously developed dynamic microarray device, we successfully change the flow stream of a particle by DEP force and control “trapping” or “bypassing” operations selectively. Using this device, we demonstrate trapping of 100 μm -sized multi colored polystyrene (PS) particles in a microarray. This device will be useful in various types of microarray applications where the sorting or trapping of microparticles is needed.

Keywords: Dynamic Microarray; Dielectrophoresis, Beads-based Microfluidic devices

1. はじめに

細胞研究や創薬スクリーニングにおいて、細胞程度の大きさの粒子を固定、アレイ化し、継続的に観察できる実験系が期待されている。これまでに、筆者らのグループではマイクロ流体技術を用いて、粒子をトラップし、アレイ化するダイナミックマイクロアレイを報告した [1-2]。このシステムは、トラップ流とバイパス流の2層の流れを持つ流路からなり、粒子の中心がトラップ流に沿って流れる場合はトラップスポットに粒子が捕捉され、バイパス流に沿う場合は、トラップスポットに粒子は捕捉されずに通過する (Fig.1(a))。このデザインの場合、トラップ流とバイパス流の流量比は、溶液の粘性や流速に依存せず、流路の長さや幅などによって幾何学的に決定される。すべての粒子がトラップ流に沿うように流路を設計すれば[1]、効率的にアレイ化ができるため、同種の粒子を高速に配置する場合に用いられてきた。一方

で、デザインの性質上、異なる種類の粒子を任意の順に並べ、アレイ化することができないという課題があった。すなわち、個々の粒子を選別して、選択的にトラップ流やバイパス流に沿わせる機構がないため、任意の順でアレイ化することは難しかった。

これまで粒子や細胞をハンドリングし、または、選別する方法として誘電泳動 (Dielectrophoresis; DEP) 法は盛んに利用されている [3-11]。この方法では、空間内に不均一電場をかけることで、粒子や溶液を分極させ、粒子が力を受ける。また、粒子や溶液の性質または周波数により、電場勾配の大きい方向 (positive-DEP; p-DEP) や小さい方向 (negative-DEP; n-DEP) に粒子は力を受ける。

そこで本研究では、従来のダイナミックマイクロアレイデバイスに誘電泳動の機能を追加し、異なる種類の粒子を選択的にトラップする手法を提案する。具体的には、n-DEP の性質を示すポリスチレン (PS) 粒子を能動的にトラップ流またはバイパス流にシフトさせることで異種粒子を選択的にアレイ化する方法を検討する。

*Corresponding author. Address: 4-6-1 Komaba, Meguro-ku, Tokyo 153-8505, Japan. Tel.: +81-3-5452-6650; Fax: +81-3-5452-6649. E-mail: takeuchi@iis.u-tokyo.ac.jp

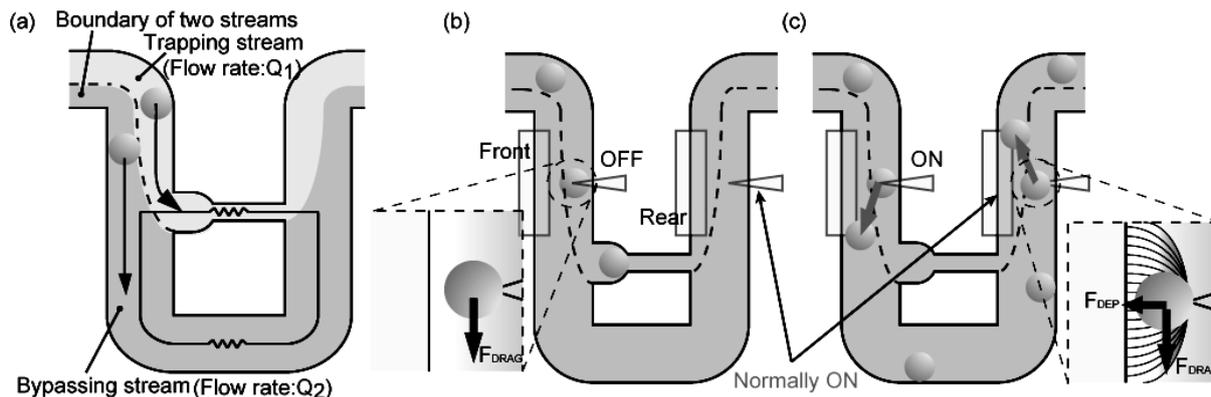


Figure 1. Concept figures of DEP dynamic microarray device. (a) A conventional dynamic microarray scheme of trapping particles. (b, c) Dynamic microarray device with DEP electrodes.

2. 方法

2.1. DEP 理論

DEP は、不均一な電場内で分極した粒子が受ける力で、球状の粒子が受ける力 F_{DEP} は、次の式で表される。

$$F_{DEP} = 2\pi r^3 \epsilon_m \text{Re}[f_{CM}] \nabla(E^2) \quad (1)$$

ただし

$$\left. \begin{aligned} f_{CM} &= \frac{\epsilon_p^* - \epsilon_m^*}{\epsilon_p^* + 2\epsilon_m^*} \\ \epsilon_p^* &= \epsilon_p - j \frac{\sigma_p}{\omega} \\ \epsilon_m^* &= \epsilon_m - j \frac{\sigma_m}{\omega} \end{aligned} \right\} \quad (2)$$

ここで、 E は電界（実効値）、 ω は印加電圧の角周波数、 $\epsilon_m, \sigma_m, \epsilon_p, \sigma_p$ はそれぞれ溶媒（添字 m ）、粒子（添字 p ）の誘電率（ ϵ ）と導電率（ σ ）である。これらの式で*がついた量は複素数である。 r は粒子の半径、 $\text{Re}[f_{CM}]$ は、Clausius-Mossoti (CM) 因子の実数部である。この CM 因子の実数部の正負によって、粒子に働く DEP の力が、電場勾配の高い方（p-DEP）に働くか低い方（n-DEP）に働くかが決まる。本研究で用いたポリスチレン（PS）粒子は、印加電圧の周波数が 100 kHz では n-DEP を受ける。

2.2. 選択的配置の原理

Figure 1(b, c) に、誘電泳動を用いた PS 粒子の選択的配置の原理を示す。電極は、先端が尖っている電極パターンと長方形の電極パターンをひとつの対とし、トラップの一つのユニットに二つの電極対がトラップスポットの前と後に配置してある。電圧を印加すると、電極対間には不均一電場が生じる。n-DEP の性質を示す PS 粒子は、電場勾配の小さい長方形の電極パター

ンの方向へ力を受ける。トラップスポット前の電極対を粒子が通過したときに、常に粒子がトラップ流に沿って流れるために、後ろの電極対は常に電圧を印加し、n-DEP が PS 粒子に常に働くようにした。電極対に電圧を印加しなければ、粒子はトラップ流に沿って流れるので、トラップスポットで補足される（Figure 1(b)）。逆にトラップスポット前側の電極対に電圧を印加すると、トラップ流を流れる粒子が DEP の力を受けバイパス流を流れることになる。その結果、トラップスポットに補足されることなくバイパス流の流れに沿って粒子は進むことになる（Figure 1(c)）。つまり、トラップスポット前側の電極対をコントロールすることで、各トラップスポットに補足するか、しないかを定めることができる。この原理を用い、目的の粒子を順に流しつつ、各トラップスポットをコントロールすることで、異なる粒子の選択的アレイ化が可能となると考えられる。

2.3. シミュレーション

FEMLAB (Comsol, Inc., Burlington, MA) を用いて、電極付近の電場シミュレーションを行った。電極間には、

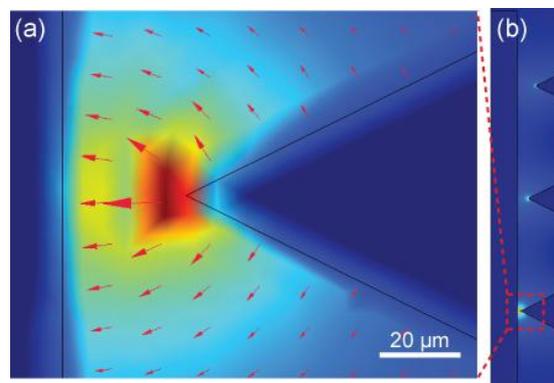


Figure 2. Simulation of electric fields between electrodes by FEMLAB. (a) Enlargement view of electrodes around the third point electrode and (b) Over view of patterned electrodes

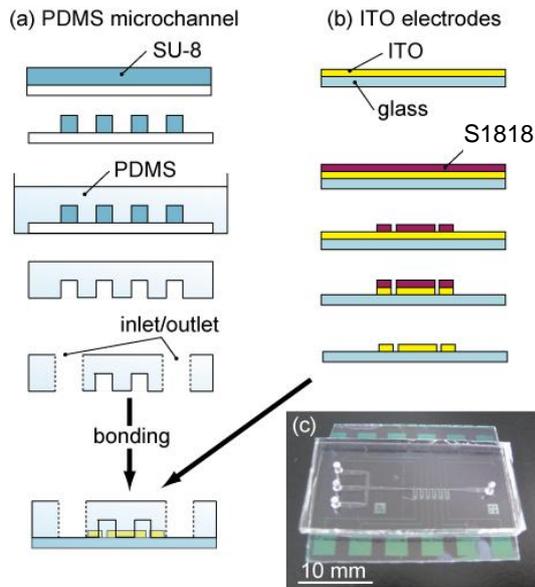


Figure 3. Fabrication process

10 V の電圧をかけた。電極の先端付近が最も電場勾配が大きく、他の領域では電場勾配は、先端付近に比べると小さいことがわかる (Figure 2(a)). また、電極対の距離が近ければ近い程、電場勾配が大きくなるのがわかる (Figure 2(b)). 式(1)によると、DEP は電場の2乗の勾配に比例した大きさの力を受ける。そのため、粒子が電極先端付近を通過したときに、最も DEP の影響を受けると考えられる。以上の結果から、電圧を印加したときに、バイパス流上の粒子が DEP の力を受け、徐々にトラップ流にシフトされるように流路と ITO 電極のパターンを設計した。

2.4. 作製プロセス

PDMS 流路は、Si ウェハ上に SU-8 (SU-8 Series; MicroChem Co.) をフォトリソグラフィーでパターンニングしたものを PDMS 流路のモールドとした (Figure 3(a)). このモールドに PDMS (Sylgard 184; Dow Corning) を流し込み流路を作製した。流路の高さは、100 μm の PS 粒子を補足することを目的とし、115 μm 程度とした。Figure 3(b) に ITO 電極パターン付きガラス基板の作製プロセスを示す。ITO は透明電極であるため、流路内の様子を観察が可能となる。ITO 基板上に S1818 (Rohm and Haas Electronic Materials) をスピンコートし、フォトリソグラフィーにより電極をパターンした。その後、1:0.16:1 の割合で塩酸、硝酸、水を混合したものを ITO のエッチャントとして使用し、ITO のエッチングを行った。両者の表面を、酸素プラズマ装置 (Compact Etcher FA-1, Samco International Inc.; エッチング条件は 75 W, 20 sccm, 5 sec) を用い、

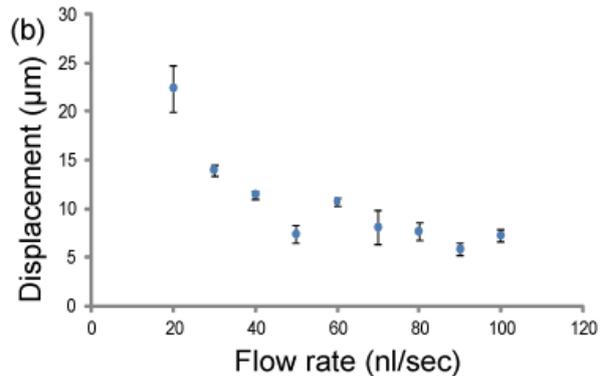
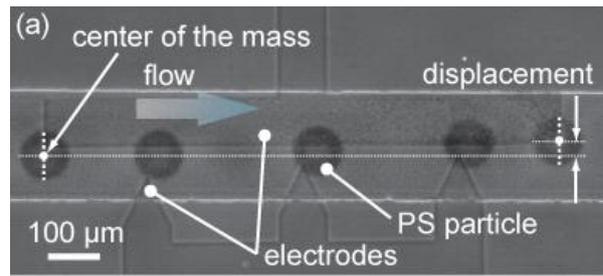


Figure 4. (a) A superimposed image of a DEP induced particle. (b) Displacement of DEP induced PS particles according to the flow rate.

表面を活性化させ、ITO 電極と PDMS 流路のアライメントしながら、ボンディングを行った。Figure 3(c) に作製したデバイスの全体図を示す。本研究では、3種類の PS 粒子を選択的に補足させることを目的としたので、inlet の穴は3つとした。

3. 結果と考察

はじめに、DEP の影響による PS 粒子の変位とその流速依存性について調べた。具体的には、PS 粒子が ITO 電極付近を通過する際、PS 粒子の流れに対して垂直な方向の変位を計測した。Figure 4(a) に示すように、粒子は ITO 電極の先端部分を通過した際に、DEP の影響を受けて変位している様子がわかる。Figure 4(b) は、流速と変位量の関係をグラフにしたものである。印加電圧は 10 Vpp, 周波数は 100 kHz とした。流速が速くなるに従い、DEP の影響は少なくなり、PS 粒子の変位が小さくなるのがわかる。十分な変位が得られない流速条件では、バイパス流からトラップ流にシフトすることが困難になり、粒子の選択的アレイ化の成功率は低下すると考えられる。

次に、Figure 5 に PS 粒子のトラップ操作とバイパス操作を行った様子を示す。Figure 5(a) は、トラップスポット前側の電極対に電圧を印加していないので、トラップ流に乗った粒子はそのままトラップスポット

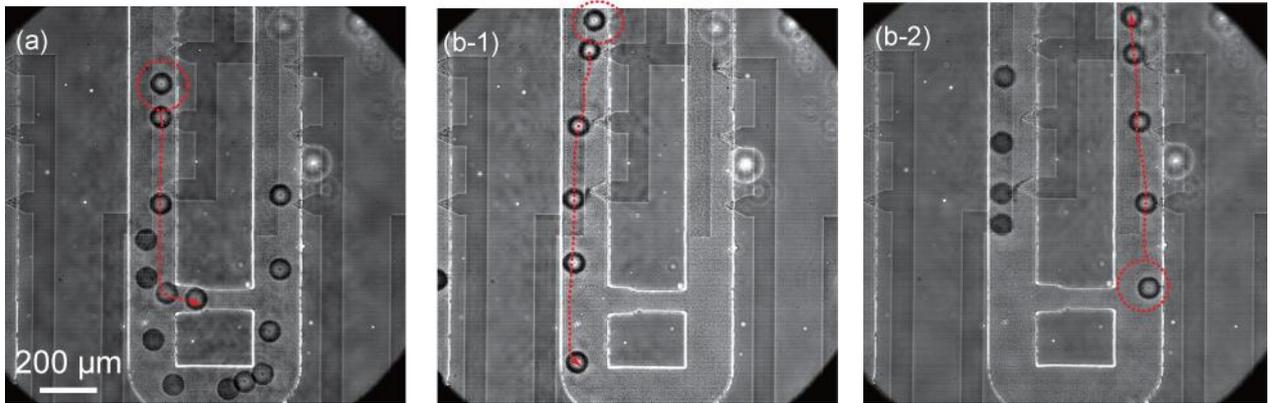


Figure 5. Superimposed images of PS particles in DEP (a) inactive or (b) active mode. (a) A particle in a trapping stream flows in the same stream and ends in trapping at the spot. (b) DEP induces a particle to flow into a bypassing stream (b-1). Then the particle is forced to flow a trapping stream for the next spot in turn (b-2).

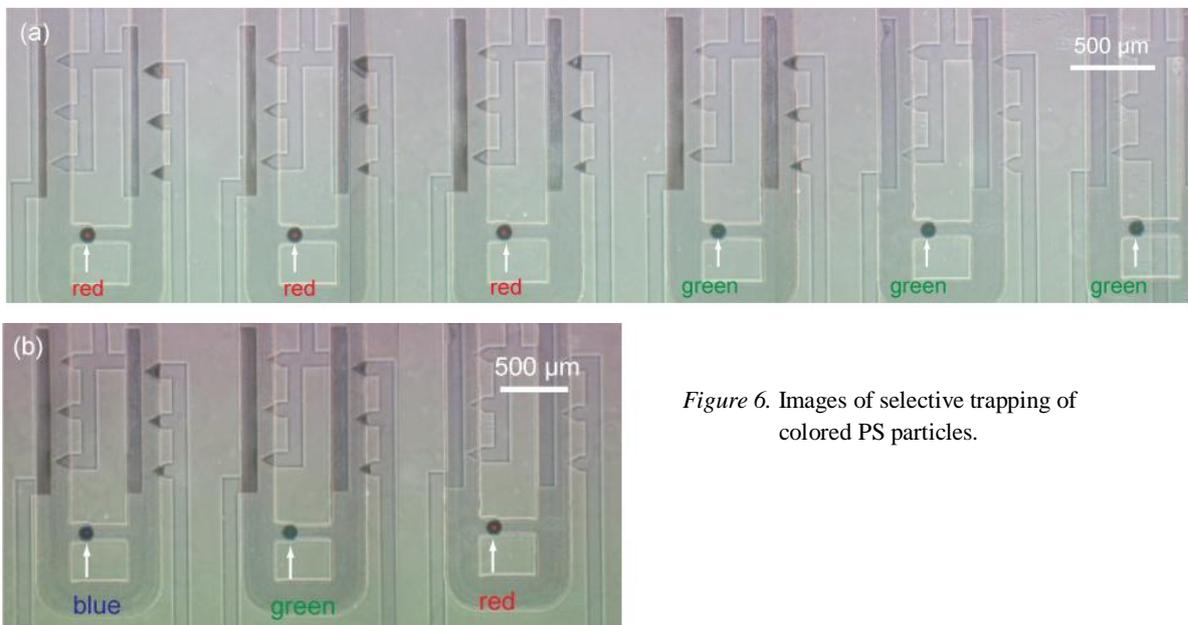


Figure 6. Images of selective trapping of colored PS particles.

にトラップされた。次に、電圧を印加させるとトラップスポット直前で粒子はバイパス流にシフトし、トラップされることはなかった (Figure 5(b-1))。また、後ろ側の電極対によって、粒子は DEP の力を受け、トラップ流に戻される様子がわかる (Figure 5(b-2))。

最後に、赤、青、緑の 3 種類の PS 粒子を用意し、それぞれの inlet から順次流しつつ、トラップさせたいトラップスポットの電極に電圧を印加させることで、Figure 6(a, b) のように選択的に並べることができた。以上の実験結果から、ダイナミックマイクロアレイに DEP 機能を組み合わせることで、異なる種類の粒子を選択的に配置できることが示された。

4. まとめ

粒子をアレイ化できるダイナミックマイクロアレイデバイスと粒子を能動的にコントロールできる DEP を組み合わせることで、粒子の選択的配置が可能なデバイスを作製し、3 色の PS 粒子を選択的に配置することに成功した。ここでは、流速のみを変化させて粒子の変位を測定したが、DEP は式(1)に示されるように、溶液の性質、印加電圧、及びその周波数にも依存するため、それらをコントロールすることで、選択的配置の成功率の向上が望める。また、PS 粒子だけではなく、例えばゲルビーズ化した細胞 [12] の選択的配置、または、DEP に対する応答性の違いを利用して、混在した粒子の選別、さらに、アレイ化といった応用が考えられる。

謝 辞

本研究の一部は、科学研究費補助金特定領域研究（膜超分子モーターの革新的ナノバイオサイエンス）および科学技術振興機構戦略的創造研究推進事業 CREST の支援を受けた。

文 献

1. W. H. Tan and S. Takeuchi: "Trap-and-release Integrated Microfluidic System For Dynamic Microarray Applications", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol.104, pp. 1146-1151 (2007)
2. K. Iwai, W. H. Tan and S. Takeuchi: "A resettable dynamic microfluidic device", *Proc. of MEMS 2008*, Tucson, USA, pp. 649-652 (2008).
3. N. G. Green, H. Morgan and J. J. Milner: "Manipulation and trapping of sub-micron bioparticles using dielectrophoresis", *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, pp. 89-102 (1997)
4. C-H. Tai, S-K. Hsiung, C-Y. Chen, M-L. Tsai and G-B. Lee, "Automatic microfluidic platform for cell separation and nucleus collection", *Bio. Microdev.*, pp. 533-543, (2007)
5. S. Archer, T-T. Li, A. T. Evans, S. T. Britland, and H. Morgan, "Cell Reactions to Dielectrophoretic Manipulation", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 257, pp. 687-698, (1999)
6. R. Pethig, "Dielectrophoresis: Using In homogeneous AC Electrical Fields to Separate and Manipulate Cells", *Crit. Rev. Biotechnol.*, vol. 16, pp. 331-348 (1996).
7. Y. Huang, R. Holzel, R. Pethig and X-B. Wang, "Differences in the AC electrodynamic of viable and non-viable yeast cells determined through combined dielectrophoresis and electrorotation studies", *Phys. Med. Bid.*, vol. 37, pp. 1499-1517 (1992)
8. Y. Huang, K. L. Ewalt, M. Tirado, R. Haigis, A. Forster, D. Ackley, M. J. Heller, J. P. O'Connell, and M. Krihak, "Electric Manipulation of Bioparticles and Macromolecules on Microfabricated Electrodes", *Anal. Chem.*, vol. 73, pp. 1549-1559, (2001)
9. R. S. Thomas, H. Morgan and N. G. Green, "Negative DEP traps for single cell immobilisation", *Lab Chip*, vol. 9, pp. 1534- 1540 (2009)
10. G. H. Markx, C. L. Davey, "The dielectric properties of biological cells at radiofrequencies: Applications in biotechnology", *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 25, pp. 161-171, (1999)
11. J-Y. Jung and H-Y. Kwak, "Separation of Microparticles and Biological Cells Inside an Evaporating Droplet Using Dielectrophoresis", *Anal. Chem.* vol. 79, pp. 5087- 5092 (2007)
12. W. H. Tan and S. Takeuchi, "Monodisperse Alginate Hydrogel Microbeads for Cell Encapsulation", *Adv. Mat.*, vol. 19, pp. 2696-2701 (2007)

今号より投稿論文を受け付けることとしました。報文 (Original paper)として受け付ける論文は未発表の新知見を含むものであり、他の学術誌に発表予定のないもので、和文または英文で書かれたものに限り、また、総説および博士論文要録も受け付けます。いずれも査読・審査の上、編集委員会の議により採否を決定します。詳しくは投稿規定をご覧ください。