

論文内容の要旨

博士論文題目

Focusing and Separation of Particles and Cells Activated by
Passive Microfluidic Systems

(受動型マイクロ流体システムを駆使した微粒子と細胞の分取技術の開発)

氏 名 Zhang Tianlong

(論文内容の要旨)

Microfluidics is the science and technology of systems that studies fluid physics in channels with dimensions of tens to hundreds of micrometers. In microfluidics, many useful techniques have been developed for the separation and manipulation of particles and cells, which can be classified as either passive techniques or active techniques. The active techniques require the external actuations such as acoustic, magnetic, optical and thermal forces. While the passive techniques depend on the channel structures or fluidic properties for particle arrangement. In this study, passive microfluidic systems were developed for the focusing and separation of particles and cells.

First, a novel hydrodynamic focusing method is developed using open v-shaped microstructures engraved on a glass substrate by femtosecond pulse laser (fs laser) micromachining. The fs laser engraved microstructures are capable of focusing polymer particles and live cells in rectangular microchannels at relatively low Reynolds number (Re). The effects of groove depth, groove number and flow rate on the performance of the developed microfluidic device is explored. It demonstrates that 10- μm PS particles are directed toward the channel center under the effects of the groove-induced secondary flows in low- Re flows, e.g. $Re < 1$. Moreover, the device achieves continuous focusing of live cells with different sizes ranging from 10 to 15 μm , i.e. human T-cell lymphoma Jurkat cells, rat adrenal pheochromocytoma PC12 cells and dog kidney MDCK cells.

Second, focusing performance of the microfluidic device is further investigated using different types of groove designs. The focusing performance proves to be dependent on the angle of grooves and the middle open space between the grooves based on both experiments and simulation

Third, shape-based separation of drug-treated *Escherichia coli* (*E. coli*) by viscoelastic microfluidics is achieved. A proportion of *E. coli* treated with 1 $\mu\text{g/mL}$ of the antibiotic mecillinam are found to exhibit changes in shape from rod to sphere, and the heterogeneous *E. coli* populations after drug treatment with various aspect ratios (ARs) ranging from 1.0 to 5.5 are used for experiment. It shows that *E. coli* with a lower AR, i.e., spherical *E. coli* ($\text{AR} \leq 1.5$), are directed toward the middle outlet, while rod-shaped *E. coli* with a higher AR ($\text{AR} > 1.5$) are driven to the side outlets. Further, it demonstrates that the separation performance of the viscoelastic microfluidic device is influenced by two main factors: sheath-to-sample flow rate ratio and the concentration of poly-ethylene-oxide (PEO).

Further continuous separation and enrichment of *E. coli* clusters from its singlets using viscoelastic fluids is investigated. Here, polymer particles of two different sizes, 1 and 4.8 μm , are used to mimic *E. coli* singlets and clusters, respectively. Experimental results show that particles migrate toward the channel center in a size-dependent manner, due to the combined effects of inertial and elastic forces. 4.8- and 1- μm particles are found to have lateral equilibrium positions closer to the channel centerline and sidewalls, respectively. The size-dependent separation performance of the microdevice is demonstrated to be affected by three main factors: channel length, the ratio of sheath to sample flow rate, and PEO concentration.

In conclusion, focusing and separation of synthetic particles and cells are achieved. This research hopes to be helpful for researchers in the fields of laser fabrication, microfluidics, physics, biology and biomedicine to use as a reference to conduct low flow rate-based contact imaging and fluorescence lifetime-resolved imaging, or biological investigations, where *E. coli* shapes or clusters matter.

(論文審査結果の要旨)

本研究では、レーザーで加工した微小構造体および粘弾性流体を利用した流体デバイスを用いて、微小な流路中を流れる粒子、細胞または細菌の集束と分取が実現できるマイクロ流体デバイスを開発し、下記の成果を得た。

マイクロ流体デバイス技術は、数十から数百マイクロメートルの寸法を持つチャネル内の流体物理を応用した技術である。そこで、粒子や微小生体試料を操作する集束と分取は、マイクロ流体デバイス分野における極めて重要な要素技術であり、これまで様々な方法が開発されている。既存の粒子操作技術は主に受動的または能動的な技術に分類できる。能動的な方法には、複雑なシステム構成と効率の低さなど問題があり、普及のハードルが高い。一方、受動的な方法は、システム構成が簡便であり、効率も高いため、広く使われているが、低いレイノルズ数流体環境での利用、または多択分取では劣っている。そこで、本研究は、低いレイノルズ数流体環境での利用と、多択分取が可能な受動的な操作（集束と分取）方法の開発を目指した。

まず、フェムト秒パルスレーザーを用いて、ガラス基板上に複数の V 字型の微細構造を彫刻した。加工した微細構造の数、寸法、間隔が流体に及ぼす影響を数値シミュレーションと実験で明らかにし、粒子分取に適用した。結果として、比較的低いレイノルズ数の流体環境 ($Re < 1$) において、微小構造体に誘起された二次旋回流により、10 μm のポリスチレン粒子、10 ~ 15 μm の Jurkat 細胞、PC12 細胞、MDCK 細胞の連続的な集束効果を得ることに成功した。

さらに、より小さな生体試料（細菌）のサイズ・形状ごとの分取を実現するため、粘弾性流体を用いた方法に注目した。ニュートン性流体と違い、粘弾性流体で粒子は一様には分散せず、粒子の特徴（サイズ・形状）ごとに、せん断方向へ自ずと配列した。本研究では、マイクロ流体デバイスにおいて粘弾性流体による分取効果が、デバイスに流されるシース液とサンプル液の流量比と粘弾性流体（ポリエチレンオキシド (PEO)）の濃度に大きく依存することを明らかにした。実験により最適な条件を特定し、抗生物質メシリナムで処理した大腸菌を形状または長横アスペクト比 (AR) で分取することに成功した。

上記のとおり、本研究で開発されたシステムを利用することによって、微小

試料のサイズ・形状ごとの集束と分取が実現可能になり、創薬、疾病治療、生命科学研究の質や効率の向上が期待される。その成果は、学術的に新しい知見を見出していると判断され、審査委員一同は、本論文が博士（工学）の学位論文として価値あるものと認めた。