

博士論文

微小流路を用いた高機能マイクロカプセルの  
開発に関する研究

平間 宏忠

## 目次

|   |    |
|---|----|
| 目次.....   | 1  |
| 本論文の概要 .....  | 4  |
| 第1章 序論 .....  | 7  |
| 1.1 本研究の背景.....   | 8  |
| 1.1.1 機能性マイクロカプセル .....                                       | 8  |
| 1.1.2 微小流路を用いた機能性マイクロカプセルの開発 .....                            | 9  |
| 1.1.3 微小流路の rapid prototyping.....                            | 13 |
| 1.2 本研究の目的と位置付け.....  | 15 |
| 1.3 本論文の構成.....   | 18 |
| 第2章 高機能マイクロカプセルの開発1：ハイドロゲル/液滴界面における分子拡散を用いたアルギン酸ゲル微粒子の作製..... | 20 |
| 2.1 概要 .....  | 21 |
| 2.2 器具と試薬 .....   | 23 |
| 2.3 実験 .....  | 25 |
| 2.3.1 $\text{Ca}^{2+}$ を含むハイドロゲル基板の調製.....                    | 27 |
| 2.3.2 アルギン酸ナトリウム液滴の生成.....                                    | 28 |
| 2.3.3 液滴とハイドロゲル基板間の界面を介した $\text{Ca}^{2+}$ の可視化 .....         | 29 |
| 2.3.4 収縮・ゲル化によって生成されたゲル微粒子のマイクロカプセルとしての応用可能性 .....            | 33 |
| 2.4 結果と考察 .....   | 36 |

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 2.4.1 | アルギン酸ナトリウム液滴の収縮・ゲル化 .....  | 36 |
| 2.4.2 | 液滴収縮の経時変化.....   | 40 |
| 2.4.3 | 液滴収縮の濃度依存性.....  | 41 |
| 2.4.4 | Ca <sup>2+</sup> の移動の可視化 .....   | 44 |
| 2.4.5 | 液滴の収縮・ゲル化を用いた「微小流路によるゲル微粒子作製における問題」の解決 .....                               | 46 |
| 2.4.6 | 収縮・ゲル化によって生成されたゲル微粒子のマイクロカプセルとしての応用可能性 .....                               | 47 |
| 2.5   | 結論 .....   | 50 |
| 第3章   | 高機能マイクロカプセルの開発2：交互液滴生成法に基づく1対1カプセル化  | 52 |
| 3.1   | 概要 .....   | 53 |
| 3.2   | 器具と試薬 .....  | 55 |
| 3.3   | 実験 .....   | 57 |
| 3.3.1 | 微小流路の表面改質.....   | 57 |
| 3.3.2 | W/O/W エマルション液滴を安定的に生成するための界面活性剤選定 .....                                    | 59 |
| 3.3.3 | 蛍光粒子を内包した W/O/W エマルション液滴の生成.....   | 60 |
| 3.4   | 結果と考察 .....  | 61 |
| 3.4.1 | W/O/W エマルション液滴の生成：流量による内水相液滴の内包数の制御  | 61 |
| 3.4.2 | 各種界面活性剤に対する W/O/W エマルション液滴の安定性.....  | 63 |
| 3.4.3 | 1対1カプセル化に向けた粒子のカプセル化 .....   | 68 |
| 3.5   | 結論 .....   | 71 |
| 第4章   | 微小流路の rapid prototyping 手法の開発1：ゲル鋳型を用いた“lithography-free”の微小流路作製法の開発 ..... | 72 |
| 4.1   | 概要 .....   | 73 |
| 4.2   | 器具と試薬 .....  | 75 |
| 4.3   | 実験 .....   | 78 |
| 4.3.1 | ゲル鋳型を用いた PDMS 製微小流路の作製 .....   | 78 |
| 4.3.2 | 微小流路内の流れパターンの観察.....   | 84 |
| 4.3.3 | 微小流路内壁の濡れ性評価.....  | 85 |
| 4.3.4 | 液滴生成試験.....  | 87 |
| 4.3.5 | 液滴の収縮・ゲル化によるゲル微粒子の生成 .....   | 88 |
| 4.3.6 | W/O/W エマルション液滴を生成するためのガラス管理め込み型デバイスの                                       |    |

|  |     |
|--|-----|
| 作製   | 89  |
| 4.4 結果と考察  | 92  |
| 4.4.1 Hydrogel Molding で作製した微小流路の構造的特徴                       | 92  |
| 4.4.2 ゲル鋳型のサイズ変化   | 95  |
| 4.4.3 微小流路内の流れパターン   | 99  |
| 4.4.4 Hydrogel Molding で作製した PDMS 表面の濡れ性                     | 101 |
| 4.4.5 液滴生成   | 104 |
| 4.4.6 液滴の収縮・ゲル化によるゲル微粒子の生成                                   | 105 |
| 4.4.7 W/O/W エマルション液滴の生成                                      | 106 |
| 4.4.8 デバイス作製費用   | 108 |
| 4.5 結論   | 110 |
| 第5章 微小流路の rapid prototyping 手法の開発 2 : ゲル鋳型で作製した微小流路内での液滴生成挙動 | 112 |
| 5.1 概要   | 113 |
| 5.2 器具と試薬  | 114 |
| 5.3 実験   | 115 |
| 5.3.1 微小流路の作製  | 115 |
| 5.3.2 微小流路内での液滴生成  | 118 |
| 5.4 結果と考察  | 121 |
| 5.4.1 作製された微小流路  | 121 |
| 5.4.2 立体十字交差における流れのパターン                                      | 124 |
| 5.4.3 立体十字交差において生成される液滴のサイズ                                  | 127 |
| 5.4.4 平面 T 字合流部における液滴生成                                      | 129 |
| 5.5 結論   | 134 |
| 第6章 結論と展望  | 135 |
| 6.1 結論   | 136 |
| 6.2 展望   | 140 |
| 付録   | 143 |
| 本研究に関連する発表   | 149 |
| 謝辞   | 157 |
| 参考文献   | 158 |

## 本論文の概要

微小流路を用いて生成される機能性マイクロカプセルは生物学・医学・薬学分野などで重要である。当該分野では、機能性マイクロカプセルは、貴重かつ微量の試料を精密に操作する用途（例：ドラッグデリバリーシステム、ポイントオブケアテスト）で利用されている。またそれらは、微小流路を用いて作製することができるようになった。しかし、機能性マイクロカプセルは、研究・開発において以下の課題がある。

### （１）マイクロカプセルの機能性の向上

応用する際に高い性能を実現するため、マイクロカプセルは高い機能性をもつ必要がある。具体的には、以下の技術的問題とその克服に着目した。

- １）ゲル微粒子生成においては、次の技術的問題がある。（１）生成されるゲル微粒子サイズは微小流路径に依存するため、ゲル微粒子サイズを調製するには複数の微小流路を用意しなければならない。（２）小さなゲル微粒子を生成するには径の小さな微小流路を用いる必要があるが、径の小さな微小流路は容易に閉塞する。（３）微小流路内の流れの中で液滴をゲル化するため、ゲル微粒子は容易に変形し球形を保つことが困難。これらを解決するため、高機能マイクロカプセルとして利用できる新たなゲル微粒子とその生成法を開発する必要がある。

2) 1対1の細胞ペアの作製においては、以下の技術的問題がある。微細加工によって作製されたマイクロレイデバイスを用いる従来法では細胞のペアを増やすため、デバイスを集積化するもしくはデバイス面積を大きくしなければならない。この問題を克服し1対1の細胞のペアを作製するため、高機能マイクロカプセルとして利用できる新たな液滴（1対1カプセル化液滴）とその生成法を開発する必要がある。

## (2) 微小流路の rapid prototyping 手法の開発

高機能マイクロカプセルを生成するには、その生成装置である微小流路の検討が重要である。特に研究開発プロセスでは、フォトリソグラフィーで作製困難な形状を持つなどの新たな機能を持った微小流路を作製できる必要がある。また、設計・試作・試用を繰り返すため、微小流路を rapid prototyping により作製する必要がある。さらに微小流路の利用を発展促進するためにも、微小流路が rapid prototyping によって作製できることが望まれる。これらは、新たな高機能マイクロカプセルを開発する場合、マイクロカプセルの構造や組成によって必要となる微小流路の構造や組成も異なり、適した微小流路を作製する必要があるためである。

これらの課題を解決するためには、以下の2つの要素技術研究を行う必要があると考えた。

### (1) 新たな高機能マイクロカプセルの開発

### (2) 新たな微小流路の rapid prototyping 手法の開発

本研究では、生物学・医学・薬学分野などで利用されることを想定した高機能マイクロカプセル開発のために、以下の2つの要素技術開発を行った。

### (1) 高機能マイクロカプセルの開発

新規の高機能マイクロカプセルとして、液滴の収縮・ゲル化を用いた「ゲル微粒子生成法」と、「1対1カプセル化液滴生成法」を開発した。ゲル微粒子は single phase、1対1カプセル化液滴は double phase の機能性マイクロカプセルの開発として位置付けられる。

## （２）微小流路の rapid prototyping 手法の開発

マイクロカプセル生成装置である微小流路の rapid prototyping 手法を開発した。本手法ではハイドロゲルを鋳型として利用することで、従来法（フォトリソグラフィー）では作製困難であった流路構造が簡単に作製可能になった。また、作製した微小流路における、マイクロカプセル（液滴）の生成性能を評価した。

生物学・医学・薬学分野において解決困難とされてきた課題を解決可能にするため、高い機能性を持った新たな材料を開発することは重要である。また、当該分野における研究開発には時間がかかるため、研究開発プロセス全体の迅速化が重要である。それら課題に対して、上記の要素技術開発は、マイクロカプセルの高機能化と迅速化に貢献すると期待できる。

## 第 1 章 序論



## 1.1 本研究の背景

### 1.1.1 機能性マイクロカプセル

内包する機能性物質の保持や放出を制御するナノメートルからミリメートルサイズの粒子はマイクロカプセルと呼ばれる[1]。一般にマイクロカプセルは、機能性をもつ物質を内包するもしくは内包物質の保持・放出機能をもつという点で何らかの機能性を有している。そのため、マイクロカプセルは機能性マイクロカプセルとも呼ばれる[2-10]。世界で最初に実用化されたマイクロカプセルは、1950年代にアメリカのナショナルキャッシュレジスター社から商品化された、感圧複写紙（ノンカーボン紙）用の染料内包マイクロカプセルである[1]。以降、内包物質やカプセル材料、および内包物質の保持・放出性能を高機能化した機能性マイクロカプセルは、多方面で幅広く利用されるようになった。例えば、医薬用途では薬剤のマイクロカプセルによるドラッグデリバリーシステム[11, 12]、食品分野ではDHAやEPAのマイクロカプセルによる健康食品[13, 14]などとして利用されている。

マイクロカプセルの形態には、芯となる内包物質を膜（担体）で閉じ込める単核構造、および分散した内包物質を担体中に埋め込むように閉じ込める多核構造がある（図 1.1）。また、担体の材料には高分子や無機材料が用いられる。用途に応じて材料や形態を選択することで、外部刺激に対して内包物質をどのように保持もしくは放出するかを制御するこ

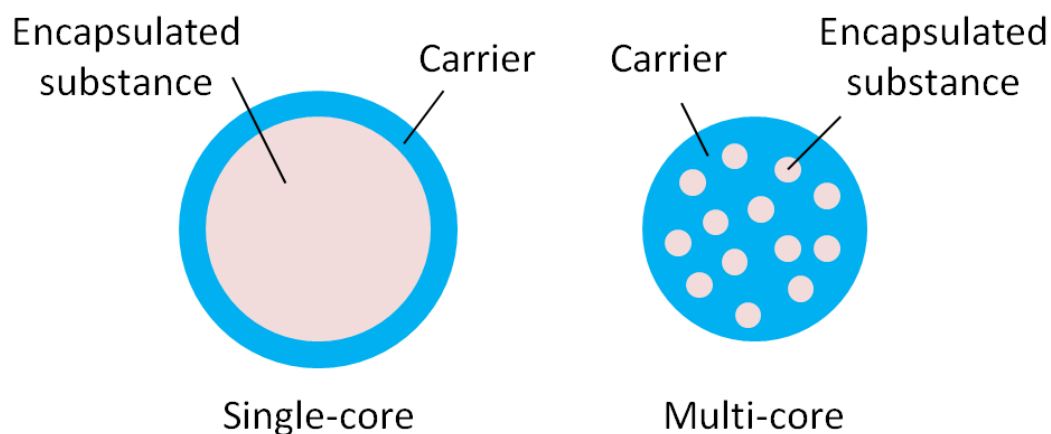


図 1.1 マイクロカプセルの形態

とができる。

マイクロカプセルの生成法は、(1) 重合反応を利用する化学的方法、(2) 相分離を利用する物理化学的方法、(3) 機械的操作を利用する機械的・物理的方法に大別される[1]。化学的方法では、重合槽に内包物質を含む溶液とそれと混ざり合わない溶液を入れ、その2液間で重合反応を生じさせることで、マイクロカプセルを得る。物理化学的方法では、内包物質を含むポリマー溶液を混合し、相分離や膜形成を促すことでマイクロカプセルを得る。機械的・物理的方法では、内包物質を気相中に噴霧し乾燥させてマイクロカプセルを得る。3つの方法の中でも化学的方法は、一般的な高分子のマイクロカプセルの生成法であり、サイズの揃った粒子を大量に生成できる[15]というメリットがある。しかし、粒子サイズが5マイクロメートルを超えるとサイズを揃えるのが困難[16]というデメリットを持っている。他方、近年では、化学的方法と次項で述べる微小流路による液滴生成を組み合わせることで、サイズの揃った5マイクロメートル以上のマイクロカプセルが生成可能になってきた[17, 18]。

### 1.1.2 微小流路を用いた機能性マイクロカプセルの開発

微小流路とは、数十マイクロメートルから数ミリメートル程度の幅および深さの流路を意味する。微小流路を構成する材料には、金属類、ガラス類、樹脂類、シリコーンゴム類が用いられる。これらの材料をエッチングやフォトリソグラフィーによって加工することで、微小流路を作製する。微小流路内部では、微小体積の流体を操作することが可能である。そのため、微小流路は、微量の液体試薬や試料を精密に操作し利用する研究分野である **microfluidics** において広く利用されている[19]。

微小流路を利用することで、マイクロメートルからミリメートルサイズのサイズの揃った(単分散な)液滴を生成することができる。液滴は、T字や十字の流路交差部で、微小流路の微小流路に導入した連続相(液滴を取り囲む液体)が分散相(液滴となる液体)をせん断することで生成する(図 1.2)。また、生成した液滴を固化(重合もしくは乾燥)す

ること、無機微粒子や高分子微粒子、さらには無機材料と高分子材料の両方からなる複合微粒子を生成することができる。

微小流路によって生成された液滴や微粒子は、マイクロカプセルとして利用されている。外部刺激に応答性のある材料によって作製されたマイクロカプセルは、内包物質の放出と保持を制御可能な機能性マイクロカプセルとして利用されている。代表的な微小流路により生成される機能性マイクロカプセル（液滴および微粒子）には、以下の2種類のものがある[20]。一つは、単一の水滴もしくは油滴、またはそれらを固化した微粒子（single phase）（図 1.3 a）である。これは、マイクロカプセルにそれよりも非常に小さな内包物質を高濃度に固定する場合に利用される。もう一つは、油滴に包まれた水滴もしくは水滴に包ま

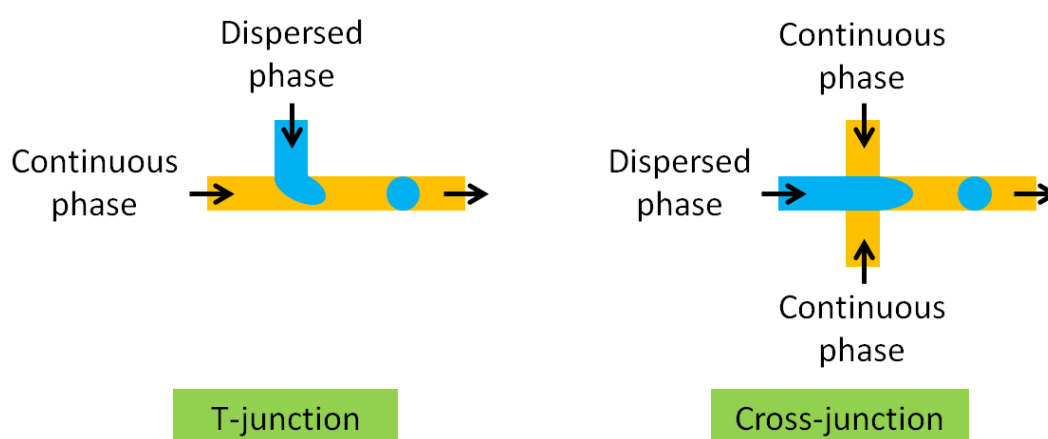


図 1.2 微小流路を用いた液滴生成の概念図

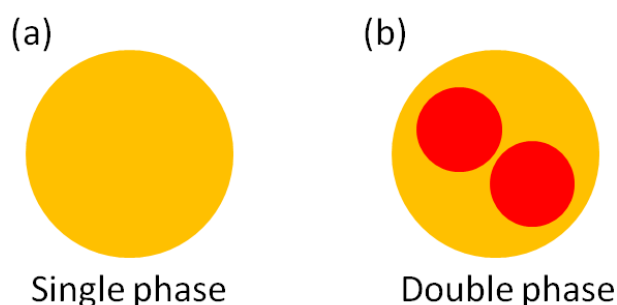


図 1.3 微小流路により生成される機能性マイクロカプセルの形態の例。(a) 単一の水  
滴もしくは油滴、またはそれらを固化した微粒子、(b) 油滴に包まれた水滴もしくは水  
滴に包まれた油滴、またはそれらを固化した微粒子

れた油滴、またはそれらを固化した微粒子 (double phase) (図 1.3 b) である。これは、前者の図 1.3 a のようなマイクロカプセルを、さらにそれよりも大きなマイクロカプセル中に閉じ込める場合に利用される。

single phase のマイクロカプセルは、図 1.2 の方法で生成される。一方、double phase のマイクロカプセルは、(1) 濡れ性 (親水性・疎水性) を局所的に変化させた微小流路を用いる方法 (図 1.4) [21]、(2) 同軸状に配置したガラス管を用いる方法 (図 1.5) [22] がある。前者では、微小流路の上流部を疎水性、下流部を親水性にすることで、マイクロカプセルの一種である水滴を内包した油滴 (Water-in-Oil-in-Water (W/O/W) エマルション液滴と呼ばれる) が生成できる。また、上流と下流の濡れ性をその逆にすると、油滴を内包した水滴 (Oil-in-Water-in-Oil (O/W/O) エマルション液滴と呼ばれる) が生成できる。後者では、濡れ性を変化させるのではなくガラス管に導入する液体の種類を変えることで、W/O/W エマルション液滴や O/W/O エマルション液滴が生成できる。

微小流路を用いて生成される単分散ゲル微粒子は、代表的な single phase の機能性マイクロカプセルの一つである。ゲル微粒子の生成には、微小流路内で液滴の生成とゲル化を同時に行う方法[23-32]が用いられる。本手法は、連続的にゲル微粒子を生成できるメリットがある。その一方で、以下の技術的な制限がある。(1) 生成されるゲル微粒子サイズは微小流路径に依存するため、ゲル微粒子サイズを調製するには複数の微小流路を用意しなければならない[33, 34]。(2) 小さなゲル微粒子を生成するには径の小さな微小流路を用いる必要があるが、径の小さな微小流路は容易に閉塞する[35, 36]。(3) 微小流路内の流れの中で液滴をゲル化するため、ゲル微粒子は容易に変形し球形を保つことが困難[37]。以上の制限のため、ゲル微粒子の形態や内包物質の精密な制御は困難であり、従来のゲル微粒子の生成法により得られたゲル微粒子の機能性は低いという問題がある。

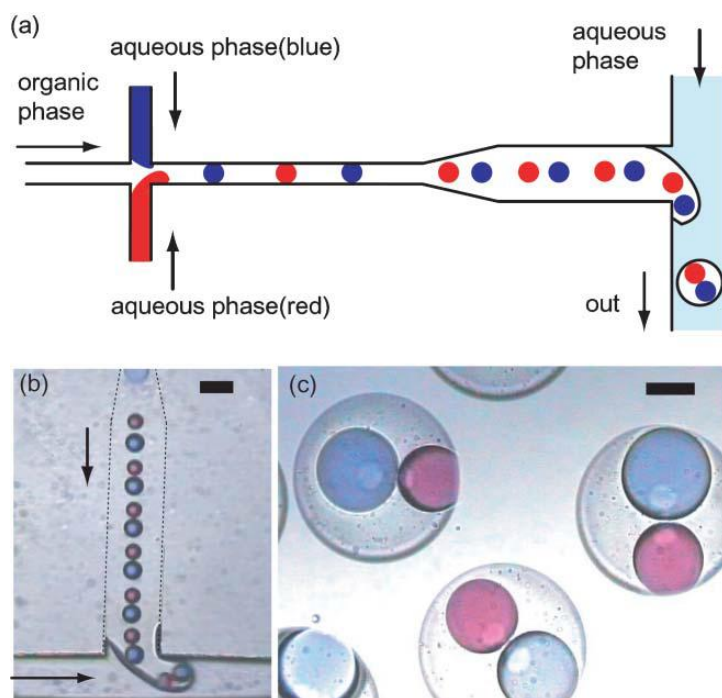


図 1.4 濡れ性を局所的に変化させた微小流路による double phase のマイクロカプセル生成の例

Reproduced in part from Ref. 21 with permission of The Royal Society of Chemistry.

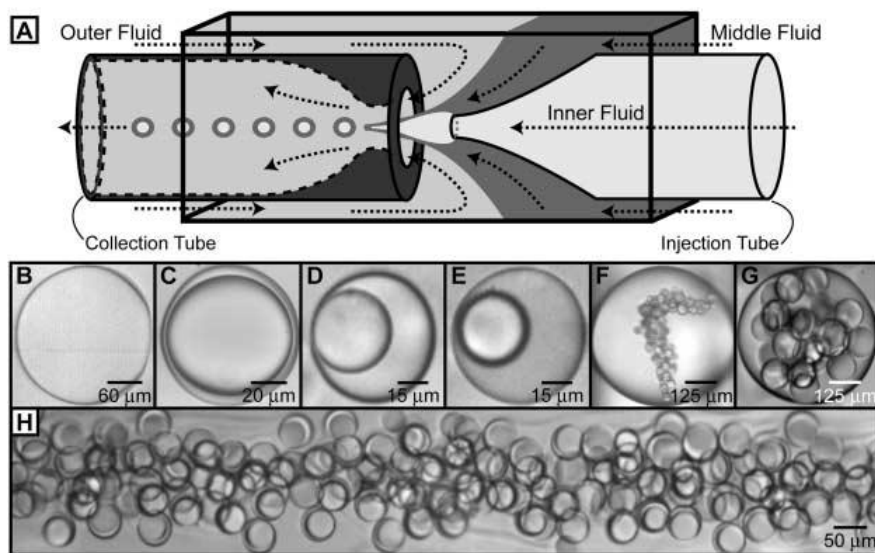


図 1.5 同軸状に配置したガラス管による double phase のマイクロカプセル生成の例

From A. S. Utada, E. Lorenceau, D. R. Link, P. D. Kaplan, H. A. Stone, and D. A. Weitz, "Monodisperse double emulsions generated from a microcapillary device," Science, vol. 308, pp. 537-541, 2005. Reprinted with permission from AAAS.

微小流路を用いて生成される単分散液滴は、1 細胞を内包可能な機能性マイクロカプセルとして利用されている[38-54]。1 個の液滴に 1 個の細胞を内包することで、この液滴は細胞を 1 個単位で操作し分析するための系として利用される。他方、異種細胞間の相互作用を 1 細胞レベル（1 個対 1 個）で操作もしくは分析するためには、1 対 1 の細胞のペアを作製する必要がある。従来、1 対 1 の細胞のペアの作製には、微細加工によって作製されたマイクロアレイデバイスが用いられている[55]。しかし、この方法では、細胞のペアを増やすためには、デバイスをさらに集積化する、もしくはデバイス面積を大きくしなければならないという技術的なハードルがある。一方で液滴は、こうした技術的なハードルを回避して、液滴中に 1 細胞を内包することが可能である。図 1.4 のような液滴（double phase のマイクロカプセル）を用いることで、異種細胞を 1 個ずつ同じ 1 個の液滴に内包する 1 対 1 のカプセル化に利用できると考えられる。

### 1.1.3 微小流路の rapid prototyping

微小流路の製作には、それぞれの材料特性に応じた作製工程が実施される。実験室レベルで微小流路を利用する場合には、デバイスの利用目的に応じて、利用者が設計から試作・試用を繰り返す必要がある。そのため、微小流路を使い捨ての可能な安価な材料で素早く作製することが求められてきた。その結果、微小流路の迅速簡便な試作法（rapid prototyping）が数多く開発されてきた。また、rapid prototyping は、微小流路の利用をさらに発展促進するために必要なものである。ここでは、比較的安価かつ成形が容易な材料として利用される、樹脂製の微小流路の rapid prototyping 法について述べる。

微小流路の材料として広く利用されている樹脂、および微小流路作製のための各樹脂の加工法には、以下のものが挙げられる。

#### 1) poly(dimethylsiloxane) (PDMS)

調製前の PDMS（オリゴマー）は液体であり、これに硬化剤を添加することで重合し透明なシリコーンゴムとなる。PDMS は鋳造によって成形される。まずフォトリ

ソグラフィによって、フォトレジスト製の構造物を作製する。これを鋳型として用いて PDMS を鋳造することにより、目的とする構造物を作製する。

## 2) poly(methyl methacrylate) (PMMA)

PMMA は、耐薬品性に優れた透明な樹脂であり、その成形には二通りの加工法が用いられる。一つ目は、樹脂を熱変形する方法（ホットエンボス）である。シリコンや金属製の鋳型を作製し、この鋳型に対して樹脂を加熱しながら押し付けて熱変形させることで、目的の構造物を作製する。二つ目は、樹脂を削る方法である。ドリルやレーザーを用いて樹脂を削ることで構造物を作製する。

## 3) polystyrene (PS)

細胞培養用途で一般的に古くから用いられてきた透明な材料である。熱変形するため、PMMA と同様にシリコンや金属製の鋳型に加熱しながら押し付ける（ホットエンボス）ことで、目的の構造物を作製する。

以上のように、いずれの加工法においても、微小流路の製作にはそれぞれの材料特性に応じた特別な微細加工設備が用いられる。数多くあるデバイス作製法のなかでも特によく用いられる方法は、Whitesides らによって報告されたフォトリソグラフィを用いた PDMS 製デバイスの rapid prototyping process[56]であった。本手法では、迅速・簡便に矩形断面をもつ微小流路を作製することができる。一方で、円形や三角形などの矩形以外の断面形状をもつ高機能な微小流路の作製は困難であるという技術的な課題がある。

近年では、より簡便なデバイス製作技術が提案され[17, 57-62]、様々な分野の研究者による微小流体プロセスの応用研究が効果的に加速されている。従来の rapid prototyping では、精度の良い Lab-on-a-Chip (LoC) デバイスを試作し利用するという観点が重視されてきた。そのため、前述のように、フォトリソグラフィに基づく方法が数多く提案されてきた。一方近年では、LoC デバイス作製の迅速簡便性をさらに追求したデバイス作製工程として、フォトリソグラフィを使用しない LoC デバイスの作製法が提案され[22, 63, 64]、応用されてきた[65-74]。これらの手法を用いることにより、特殊で高価な設備や装置を用いることなく、LoC デバイスの rapid prototyping が可能になってきた。

## 1.2 本研究の目的と位置付け

前述のように単分散ゲル微粒子や単分散液滴のような、機能性マイクロカプセルが求められるようになってきた。またそれらは、微小流路を用いて作製することができるようになった。しかし、機能性マイクロカプセルは、研究・開発において以下の課題がある。

### (1) マイクロカプセルの機能性の向上

応用する際に高い性能を実現するため、マイクロカプセルは高い機能性をもつ必要がある。微小流路を用いて生成されるマイクロカプセルには、主に **single phase** と **double phase** がある。本研究では、**single phase** のマイクロカプセルであるゲル微粒子、および **double phase** のマイクロカプセルである 1 対 1 カプセル化液滴に関して、以下の技術的問題とその克服に着目した。

- 1) ゲル微粒子生成においては、次の技術的問題がある。(1) 生成されるゲル微粒子サイズは微小流路径に依存するため、ゲル微粒子サイズを調製するには複数の微小流路を用意しなければならない。(2) 小さなゲル微粒子を生成するには径の小さな微小流路を用いる必要があるが、径の小さな微小流路は容易に閉塞する。(3) 微小流路内の流れの中で液滴をゲル化するため、ゲル微粒子は容易に変形し球形を保つことが困難。これらを解決するため、高機能マイクロカプセルとして利用できる新たなゲル微粒子とその生成法を開発する必要がある。
- 2) 1 対 1 の細胞ペアの作製においては、以下の技術的問題がある。微細加工によって作製されたマイクロアレイデバイスを用いる従来法では細胞のペアを増やすため、デバイスを集積化するもしくはデバイス面積を大きくしなければならない。この問題を克服し 1 対 1 の細胞のペアを作製するため、高機能マイクロカプセルとして利用できる新たな液滴 (1 対 1 カプセル化液滴) とその生成法を開発する必要がある。

### (2) 微小流路の **rapid prototyping** 手法の開発

高機能マイクロカプセルを生成するには、その生成装置である微小流路の検討が重要である。特に研究開発プロセスでは、フォトリソグラフィーで作製困難な形状を持つなどの

---



新たな機能を持った微小流路を作製できる必要がある。また、設計・試作・試用を繰り返すため、微小流路を **rapid prototyping** により作製する必要がある。さらに微小流路の利用を発展促進するためにも、微小流路が **rapid prototyping** によって作製できることが望まれる。これらは、新たな高機能マイクロカプセルを開発する場合、マイクロカプセルの構造や組成によって必要となる微小流路の構造や組成も異なり、適した微小流路を作製する必要があるためである。

これらの課題を解決するためには、以下の 2 つの要素技術研究を行う必要があると考えた。

- (1) 新たな高機能マイクロカプセルの開発
- (2) 新たな微小流路の **rapid prototyping** 手法の開発

そこで本研究では、図 1.6 に示すように、生物学・医学・薬学分野などで利用されることを想定した高機能マイクロカプセル開発のために、以下の 2 つの要素技術開発を行った。

- (1) 高機能マイクロカプセルの開発

新規の高機能マイクロカプセルとして、液滴の収縮・ゲル化を用いた「ゲル微粒子生成法」と、「1 対 1 カプセル化液滴生成法」を開発した。ゲル微粒子は **single phase**、1 対 1 カプセル化液滴は **double phase** の機能性マイクロカプセルの開発として位置付けられる(図 1.3 参照)。

- (2) 微小流路の **rapid prototyping** 手法の開発

マイクロカプセル生成装置である微小流路の **rapid prototyping** 手法を開発した。本手法ではハイドロゲルを鋳型として利用することで、従来法（フォトリソグラフィー）では作製困難であった流路構造が簡単に作製可能になった。また、作製した微小流路における、マイクロカプセル（液滴）の生成性能を評価した。

生物学・医学・薬学分野において解決困難とされてきた課題を解決可能にするため、高い機能性を持った新たな材料を開発することは重要である。また、当該分野における研究開発には時間がかかるため、研究開発プロセス全体の迅速化が重要である。それら課題に対して、上記の要素技術開発は、マイクロカプセルの高機能化と迅速化に貢献すると期待できる。

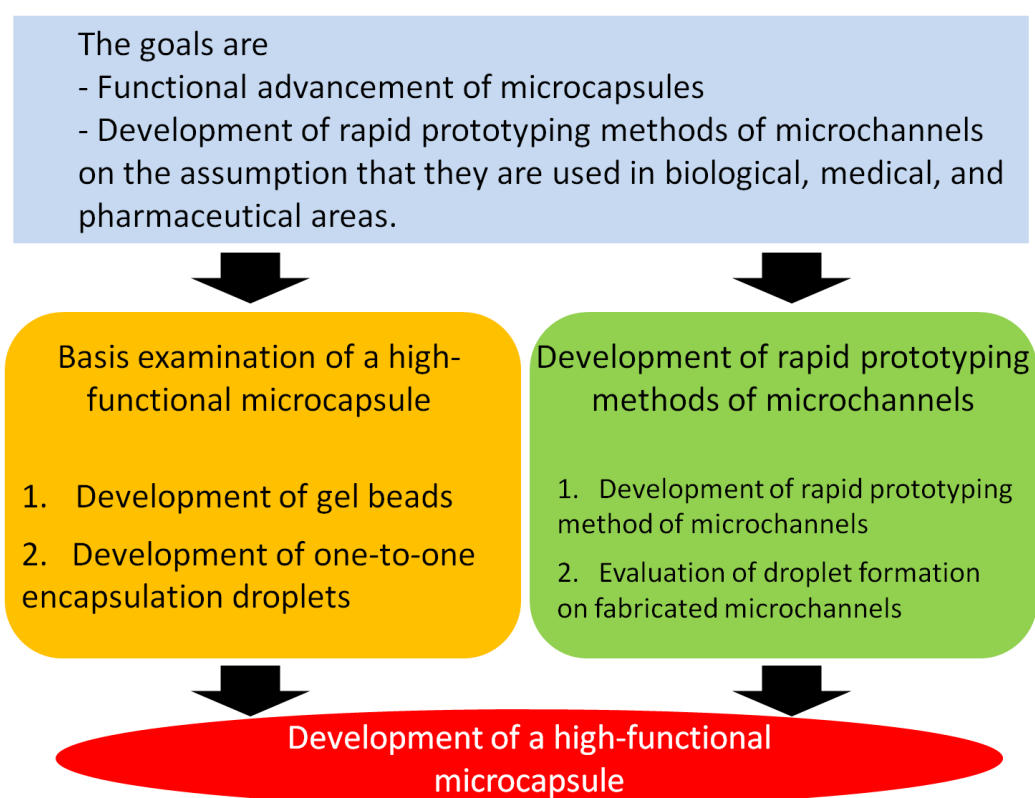


図 1.6 研究方針

### 1.3 本論文の構成

本論文は全 6 章で構成される。

「第 1 章 序論」では、本研究の背景となる、「機能性マイクロカプセル」、「微小流路を用いた機能性マイクロカプセルの開発」、「微小流路の rapid prototyping」に関する昨今の研究開発状況の代表例を挙げつつ整理した上で、それらを踏まえた本研究の目的と位置付けについて述べた。

「第 2 章 高機能マイクロカプセルの開発 1 : ハイドロゲル/液滴界面における分子拡散を用いたアルギン酸ゲル微粒子の作製」では、新規の高機能マイクロカプセルの開発として、微小流路によって生成した液滴をもとに得られるゲル微粒子 (single phase マイクロカプセル) の生成法について述べる。

「第 3 章 高機能マイクロカプセルの開発 2 : 交互液滴生成法に基づく 1 対 1 カプセル化」では、新規の高機能マイクロカプセルの開発として、微小流路によって生成される、粒子を 1 対 1 でカプセル化できる W/O/W エマルション液滴 (double phase マイクロカプセル) の生成法について述べる。

「第 4 章 微小流路の rapid prototyping 手法の開発 1 : ゲル鋳型を用いた "lithography-free" の微小流路作製法の開発」では、新規の微小流路の rapid prototyping として、ひも状のハイドロゲルを鋳型として特別な機器を一切使用せずに手作業だけで立体的な微小流路を自由に成型・試作する手法 (Hydrogel Molding) の開発について述べる。

「第 5 章 微小流路の rapid prototyping 手法の開発 2 : ゲル鋳型で作製した微小流路内の液滴生成挙動」では、新規の微小流路の rapid prototyping として、第 4 章で述べた Hydrogel Molding によって作製した微小流路を用いて行った、液滴生成挙動の評価について述べる。

「第6章 結論と展望」では、上記の一連の研究についての結論と今後の展望について述べる。

## 第2章 高機能マイクロカプセルの開発1：ハイドロゲル/液滴 界面における分子拡散を用いたアルギン酸ゲル微粒子の作製

## 2.1 概要

本章および次章では、微小流路を用いた、マイクロカプセルの作製法について述べる。これは、single phase マイクロカプセル（1.1.2 参照）の開発として位置付けられる。

マイクロカプセルは、内包される物質（内包物質）とそれを保持する媒体となるカプセル材料で構成される。このカプセル材料は、内包物質に適した性質の材料であることが求められる。本研究では、さまざまな物質（例えば、無機・有機材料（ナノ粒子など）や生体材料（細胞・タンパク質・DNA など））が内包可能であり食品材料としても用いられているアルギン酸カルシウムゲル（以下、アルギン酸ゲルと呼ぶ）をカプセルの構成材料として選択し、単分散なマイクロカプセルであるアルギン酸ゲル微粒子を作製した。

本研究では、アルギン酸ゲル微粒子は、微小流路を用いて生成された比較的大きいアルギン酸ナトリウム液滴を、小さなゲル微粒子へと、収縮およびゲル化させることで生成する。そこで、今回開発した本手法を、液滴の「収縮・ゲル化プロセス」と名付けた。以下にその概要を述べる。油相とゲル化剤（カルシウムイオン（ $\text{Ca}^{2+}$ ））を含むハイドロゲルの界面に、微小流路を用いて生成したアルギン酸ナトリウム液滴を静置すると、液滴とハイドロゲルの間に油の薄い膜（油膜）が形成される（図 2.2 a-c）。この時、ハイドロゲルの浸透圧を液滴よりも高くしておくことで、水分子は油膜を介して液滴からハイドロゲルに移動し、濃度勾配によって  $\text{Ca}^{2+}$  は液滴へと移動する（図 2.2 d）。結果として、液滴は、ハイドロゲルに水分を奪われることで収縮し、 $\text{Ca}^{2+}$  が流入することでゲル化する（図 2.2 e）。本章では、収縮・ゲル化プロセスによって生成されるゲル微粒子の評価、および液滴およびハイドロゲル間で生じると考えられた、物質移動の仕組みを確認し明らかにした。

従来、微小流路を用いたゲル微粒子生成法は、単分散なゲル微粒子を連続的に生成可能であるといった有用性を持つ反面、（1）生成する粒子サイズに応じた微小流路の作製の必要性、（2）微小流路の閉塞、（3）生成されるゲル微粒子の変形、といった技術的課題を

抱えていた。それに対し、本研究において開発した液滴の収縮・ゲル化プロセスを用いることで、これらの課題を克服することが可能となることが確認された。

## 2.2 器具と試薬

本実験では以下の器具および試薬を用いた。

試薬：

- ・ 界面活性剤 SY-グリスターCRS-75（阪本薬品工業）
- ・ アガロース L（和光純薬）
- ・ カルシウム感受性蛍光色素（Fluo-4、Invitrogen）
- ・ Octadecyl trichlorosilane（SIGMA）
- ・ アルギン酸ナトリウム（和光純薬）
- ・ デカン（和光純薬）
- ・ 塩化カルシウム（無水）（和光純薬）
- ・ スクロース（和光純薬）
- ・ トルエン（和光純薬）
- ・ アセトン（和光純薬）
- ・ エタノール（和光純薬）
- ・ 蛍光分子結合タンパク質（Albumin–fluorescein isothiocyanate conjugate (FITC-Albumin) , Sigma-Aldrich)

器具：

- ・ 石英ガラス製微小流路チップと連結器具一式（特注品、図 2.4 に詳述）
- ・ シリンジ（10 ml 容量、テルモ）
- ・ 35mm 細胞培養用ポリスチレンディッシュ（IWAKI）
- ・ 96well マイクロプレート（Round Bottom、IWAKI）
- ・ フタ付き三角フラスコ（IWAKI 4985FK100-28、旭硝子）
- ・ 1.5mL エッペンチューブ（Eppendorf）
- ・ マイクロピペット（リサーチ V、0.1～2.5  $\mu$ L、Eppendorf）
- ・ マイクロピペット（ピペットマン、20～200  $\mu$ L、Gilson）



- ・ マイクロピペット（ピペットマン、100～1000  $\mu\text{L}$ 、Gilson）
- ・ マイクロピペット（ピペットマン、500～5000  $\mu\text{L}$ 、Gilson）
- ・ ピペットチップ（200  $\mu\text{L}$  イエローチップ、Gilson）
- ・ ピペットチップ（1000  $\mu\text{L}$  ブルーチップ、Gilson）
- ・ ピペットチップ（5000  $\mu\text{L}$  ホワイトチップ、Gilson）
- ・ ガラス管（内径：0.60 mm、外径：1.0 mm）（G-1、ナリシゲ）
- ・ テフロンチューブ（外径 1.15 mm、内径 0.5 mm、アズワン）
- ・ 解剖用メス（Scalpel No. 11、Dumont）

機器：

- ・ 浸透圧計（Osmomat030、GONOTEC）
- ・ シリンジポンプ（KDS200、KD Scientific）

光学機器：

- ・ 倒立型顕微鏡（IX-71、オリンパス）（位相差観察および落射蛍光観察の設定で使用）
- ・ 正立型顕微鏡（BX-50、オリンパス）（透過光観察の設定で使用）
- ・ 顕微鏡装着型 CCD（Charge Coupled Device）カメラ（DP-70、オリンパス）
- ・ 冷却 CCD カメラ（C8800-21C、浜松ホトニクス）
- ・ 高速度カメラ（FASTCAM-MAX 120K、フォトロン）
- ・ 共焦点レーザー顕微鏡システム（FV-300、オリンパス）

### 2.3 実験

アルギン酸ナトリウムは、多価金属イオンを添加することでエッグボックス構造と呼ばれる構造を形成し（図 2.1）、水に不溶なゲル（アルギン酸カルシウムゲル）を形成する高分子である。本研究では、微小流路を用いて、大きいアルギン酸ナトリウム水溶液の液滴を生成し、これを微小流路の外で収縮しゲル化させることにより、単分散の小さなゲル微粒子を作製する手法を考案した。本手法の概念図を図 2.2 に示す。油相と  $\text{Ca}^{2+}$  を含むハイドロゲルの界面に、微小流路を用いて生成したアルギン酸ナトリウム液滴を静置すると、液滴とハイドロゲルの間に油の薄い膜（油膜）が形成される[75]（図 2.2 c, d）。この時、ハイドロゲルの浸透圧を液滴よりも高くしておくことで、水分子は油膜を介して液滴からハイドロゲルに移動し[76]、濃度勾配によって  $\text{Ca}^{2+}$  は液滴へと移動する[77]（図 2.2 d）。結果として、液滴は、ハイドロゲルに水分を奪われることで収縮し、 $\text{Ca}^{2+}$  が流入することでゲル化し、ゲル微粒子が得られる（図 2.2 e）。

以下に、本工程で用いた  $\text{Ca}^{2+}$  を含む板状のハイドロゲル（ハイドロゲル基板）の調製（2.3.1）、およびアルギン酸ナトリウム液滴の生成（2.3.2）について述べる。また、本微粒子作製工程は、液滴とハイドロゲル基板の間で  $\text{Ca}^{2+}$  が移動するためゲル化が生じるという仮定のもと行われた。そこで、仮定を実証するためにおこなった、液滴とハイドロゲル基板間の界面を介した  $\text{Ca}^{2+}$  の可視化（2.3.3）についても述べる。

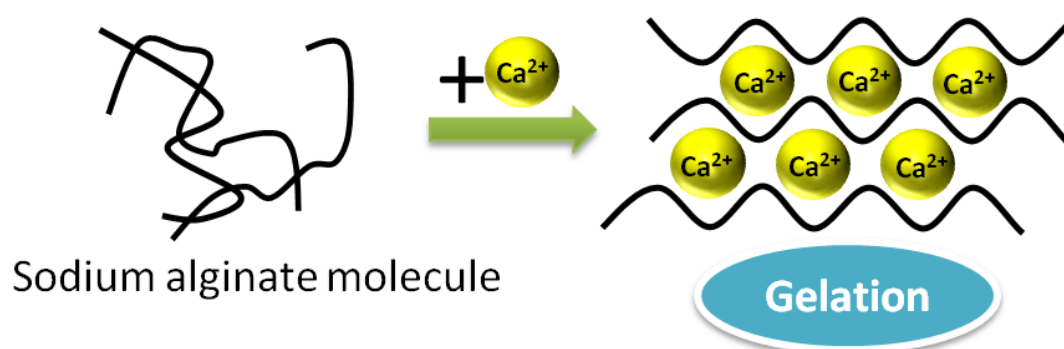


図 2.1 アルギン酸ナトリウムのゲル化の原理

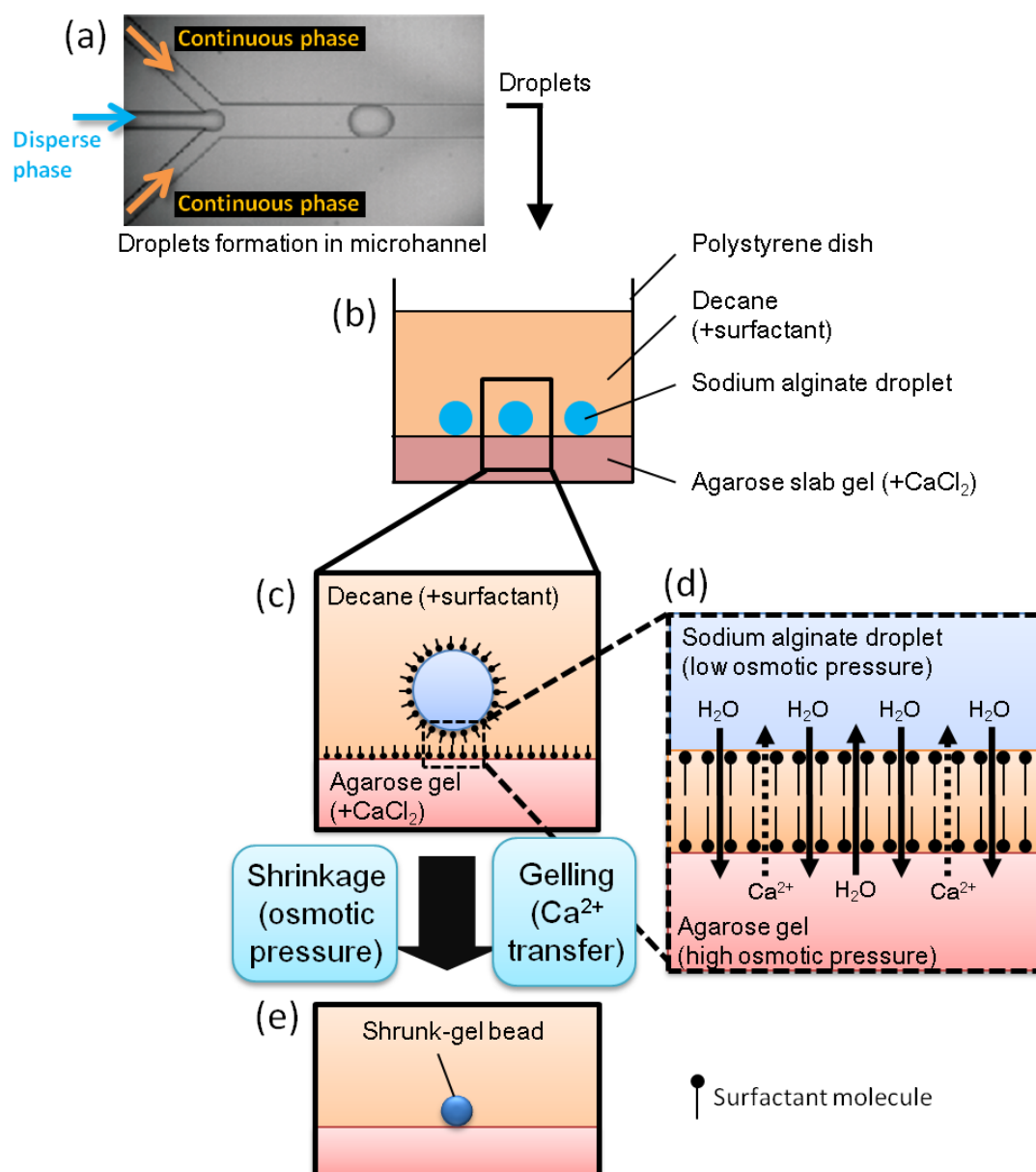


図 2.2 微小流路によって生成されたアルギン酸ナトリウム液滴の収縮・ゲル化の概念図。(a)高速度カメラで撮影した液滴生成の顕微鏡写真、(b)ハイドロゲル基板上に静置した液滴（断面図）、(c)液滴とハイドロゲル基板の界面、(d)液滴とハイドロゲル基板の界面で生じる物質移動現象、(e)収縮・ゲル化した液滴（ゲル微粒子）

Reprinted with permission from Hirama, H.; Kambe, T.; Aketagawa, K.; Ota, T.; Moriguchi, H.; Torii, T. Hyper Alginate Gel Microbead Formation by Molecular Diffusion at the Hydrogel/Droplet Interface. *Langmuir* 2013, 29, 519-524. Copyright 2013 American Chemical Society.

### 2.3.1 $\text{Ca}^{2+}$ を含むハイドロゲル基板の調製

液滴を収縮・ゲル化させるために用いる、ハイドロゲル基板を作製するため、カルシウム塩 ( $\text{Ca}^{2+}$ の供給源) として塩化カルシウム ( $\text{CaCl}_2$ ) を、ハイドロゲルとしてアガロースゲルを用いた。ハイドロゲル基板は、図 2.3 の手順で作製した。まず、2% (w/v) アガロースおよび  $\text{CaCl}_2$  水溶液 (0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0 mol/L) をそれぞれ調製し、これらを等量混合し混合物を得た。このとき、アガロースゲル (融点:  $65^\circ\text{C}$ ) は、 $100^\circ\text{C}$  付近まで加熱し溶解させ、水溶液の状態で取り扱われた。続いて、得られた混合物をポリスチレンディッシュに注いだ後、ディッシュごと冷蔵庫 ( $4^\circ\text{C}$ ) に入れることで、混合物をゲル化させた。最後に、ゲル化した混合物上に、SY-グリスターCRS-75 を 1% (w/w) 添加したデカン (分散相である液滴に対する連続相) を注いだ。なお、本実験で用いた水は、超純水システム (TORAYPURE LV-10T、東レ) によってイオン交換樹脂を通して精製された、 $\text{Ca}^{2+}$  を除去した約  $18\text{ M}\Omega/\text{cm}$  の純水である。

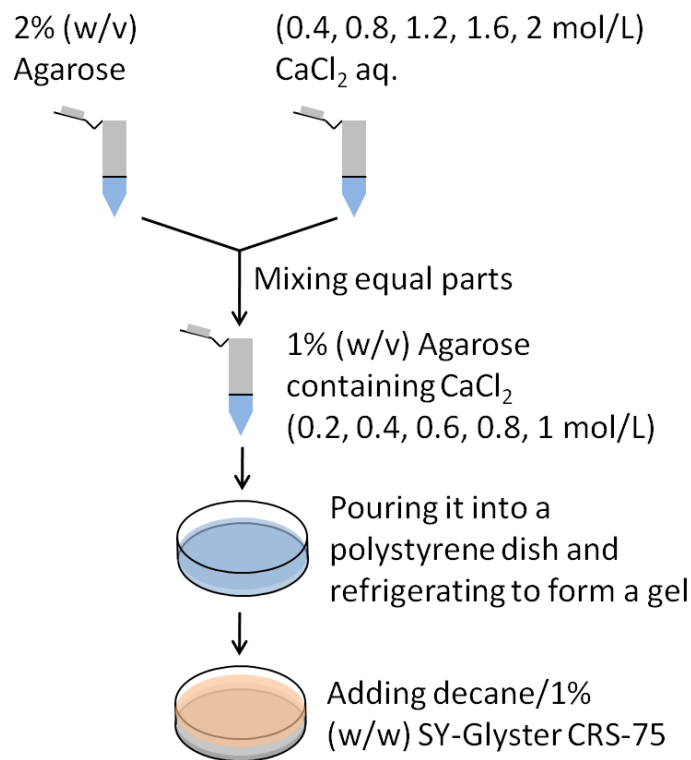


図 2.3 ハイドロゲル基板の作製方法

### 2.3.2 アルギン酸ナトリウム液滴の生成

アルギン酸ナトリウム液滴は、合成石英ガラス製の微小流路チップを内蔵した微小流路（図 2.4）を用いて生成した。親水性の液滴（水滴）を生成するためには、微小流路の内壁が水を弾く状態（疎水性）にする必要がある。そこではじめに、微小流路内壁を疎水化するため、トルエン/1% (v/v) octadecyl trichlorosilane (OTS)を微小流路内に導入することにより、微小流路内壁にシロキサン分子を結合させて疎水面を作製した。つづいて、アルギン酸ナトリウム液滴を生成するため、連続相としてデカン/1% (w/w) SY-グリスター CRS-75を、分散相としてアルギン酸ナトリウム水溶液（0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0 mol/L）をそれぞれシリンジポンプを用いて微小流路に一定流量で送液した。

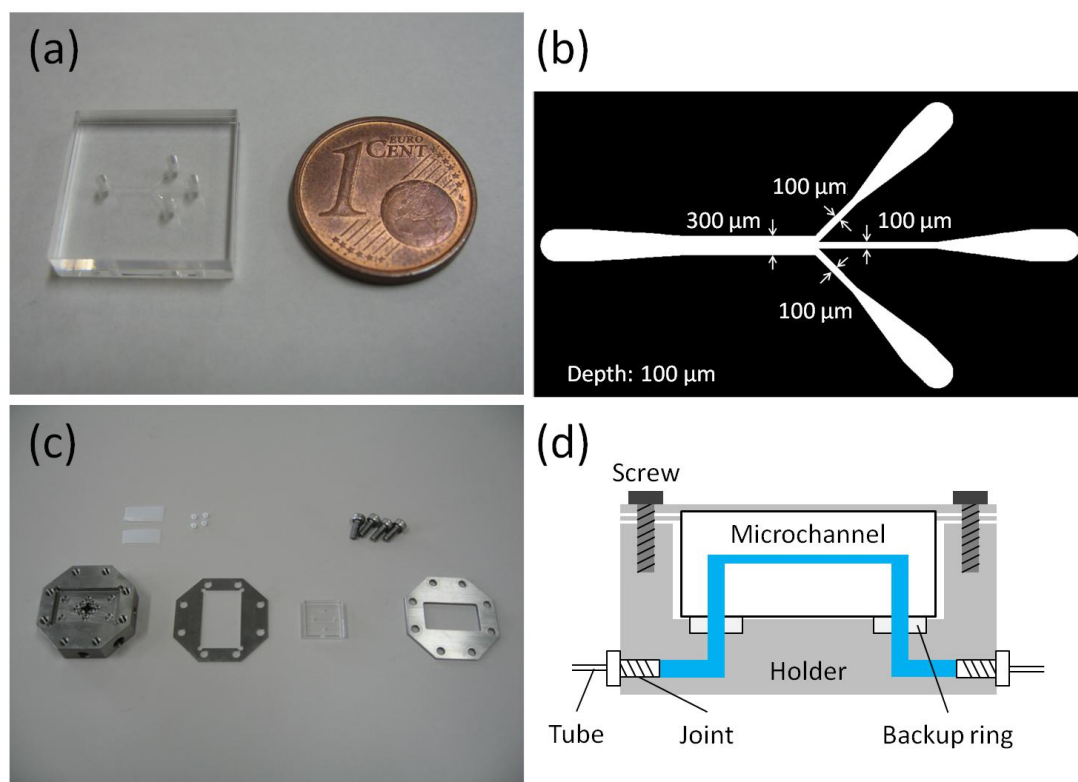


図 2.4 液滴生成に用いた微小流路。(a) 石英ガラス製微小流路チップ、(b) 流路の寸法と形状、(c) 流路チップとホルダーおよびその周辺部品、(d) 周辺機器との接続関係（断面図）

最終的に得られるゲル微粒子のサイズは、ゲル微粒子のもととなる液滴のサイズに影響を受けることが予想された。そこで、この影響を確認するため、いずれの実験においても、送液する連続相および分散相の流量を変化させることにより、3種類のサイズの液滴を生成した。

生成した液滴は、微小流路に接続したテフロンチューブ内部を通して外部に取り出し、ハイドロゲル基板上に静置した。液滴は、CCDカメラをセットした光学顕微鏡により位相差像を取得した。液滴およびゲル微粒子のサイズは、画像解析ソフト（Image-Pro Plus、Media Cybernetics）を用いて測定した。

### 2.3.3 液滴とハイドロゲル基板間の界面を介した $\text{Ca}^{2+}$ の可視化

ゲル化を生じる原因として考えられる、液滴とハイドロゲル基板の間での  $\text{Ca}^{2+}$  の移動については、Heron らが蛍光顕微鏡およびカルシウム感受性蛍光色素の fluo-4 を用いて  $\text{Ca}^{2+}$  の移動が可視化できることを報告している[78]。そこで今回の実験においても、液滴とハイドロゲル基板間の  $\text{Ca}^{2+}$  の移動を可視化するために、Heron らの知見・方法を参考にして、以下の工程でモデル実験系を作製した。

- 1) ハイドロゲル基板（ $\text{Ca}^{2+}$ を含む）に1個だけの液滴（fluo-4含む）を接触させた状態を用意（図 2.5）
- 2) 共焦点顕微鏡を用いて液滴内を観察することで、 $\text{Ca}^{2+}$ に対する液滴内の fluo-4 の蛍光強度変化を測定。ただし、fluo-4 は一波長励起の蛍光色素であるため、本研究では一波長の励起光を用い、退色しないように、計測時のみ励起光を照射した。

$\text{Ca}^{2+}$ の可視化のためのモデル実験系の作製にあたっては、使用する試薬について以下の検討をする必要があった。 $\text{Ca}^{2+}$ は、液滴の溶質である fluo-4 とアルギン酸ナトリウムの両方に結合する性質がある（ $\text{Ca}^{2+}$ の結合時、fluo-4 では蛍光、アルギン酸ナトリウムではゲル形成を示す）。そのため、アルギン酸ナトリウム液滴内の  $\text{Ca}^{2+}$ を可視化する実験系では、液

滴に移動した  $\text{Ca}^{2+}$  の総量のうち、アルギン酸ナトリウムに結合せずに残された  $\text{Ca}^{2+}$  だけが、fluo-4 に結合して蛍光を示すと予想された。これを回避し液滴に移動した  $\text{Ca}^{2+}$  の総量を蛍光強度の変化として計測するため、本モデル実験では、アルギン酸ナトリウム液滴の代わりにスクロース液滴を用いることにした。スクロース液滴は、前述の液滴生成実験で用いたアルギン酸ナトリウム水溶液と同様に、ハイドロゲル基板の浸透圧よりも非常に低い浸透圧（濃度）に調整した。なお、アルギン酸ナトリウム液滴の代わりにスクロース液滴を用いた予備実験では、スクロース液滴がアルギン酸ナトリウム液滴と同等の収縮率（＝収縮後の液滴径/収縮前の液滴径）を示すことが確認された。

以下に具体的な本モデル実験系の作製工程について述べる。はじめに、前述の方法（2.3.1を参照）と同様にして、0.5 mol/L の  $\text{CaCl}_2$  を含むアガロースの混合物を調製した。ただし本実験では先の方法とは異なり、加熱し溶解した混合物は、ポリスチレンディッシュではなく丸底の 96 well マイクロプレート（シグマコートにより予め疎水化した）に注がれた。これを冷蔵庫（4° C）に入れることにより、混合物をゲル化した。その後、図 4.5a のようにゲルの一部を解剖用メスで切断して取り除いた。最後に、ハイドロゲル基板の上に、SY-グリスターCRS-75 を 1% (w/w) 添加したデカン（連続相）を注いだ。一方、液滴の生成においては、まず fluo-4 を 0.1  $\mu\text{g/mL}$  添加した 0.1 mol/L のスクロース水溶液（10<sup>3</sup> kPa）を調製した。つづいて、作製したハイドロゲル基板の側面と接触する位置に、マイクロピペットを用いて、スクロース水溶液の液滴を 1 個滴下した（図 2.5 a）。

本実験では、拡散係数によって  $\text{Ca}^{2+}$  の拡散速度を評価するため、以下のフィックの法則を用いた。

$$\frac{\partial C(x,t)}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C(x,t)}{\partial x^2} \quad (2.1)$$

ただし、 $x$ ：液滴とハイドロゲル基板の接点から液滴の中心に向かって伸びる直線上の測定地点までの距離、 $t$ ：液滴とハイドロゲル基板を接触させた時間、 $C$ ： $\text{Ca}^{2+}$ 濃度、 $D$ ： $\text{Ca}^{2+}$ の拡散係数。

式 (2.1) を解くと、

$$\frac{C(x,t)}{C_0} = \frac{1}{2} \operatorname{erfc}\left(\frac{x}{2\sqrt{Dt}}\right) \quad (2.2)$$

ただし、 $C_0$ ：地点  $x$  における  $\text{Ca}^{2+}$  の初期濃度。

得られた蛍光強度は、以下の式を用いて  $\text{Ca}^{2+}$  へと変換した。

$$[\text{Ca}^{2+}] = K_d \frac{[F - F_{\min}]}{[F_{\max} - F]} \quad (2.3)$$

ただし、 $[\text{Ca}^{2+}]$ ： $\text{Ca}^{2+}$ 濃度、 $K_d$ ： $\text{Ca}^{2+}$ の解離定数、 $F$ ：計測された蛍光強度、 $F_{\min}$ ： $\text{Ca}^{2+}$ 不在下の蛍光強度、 $F_{\max}$ ： $\text{Ca}^{2+}$ 過剰存在下の蛍光強度

式 2.3 を用いて得られた  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度から式 2.2 を計算することにより、拡散係数が得られた。また、水分子の移動は、ゲル微粒子形成時の液滴の体積変化として観察した。



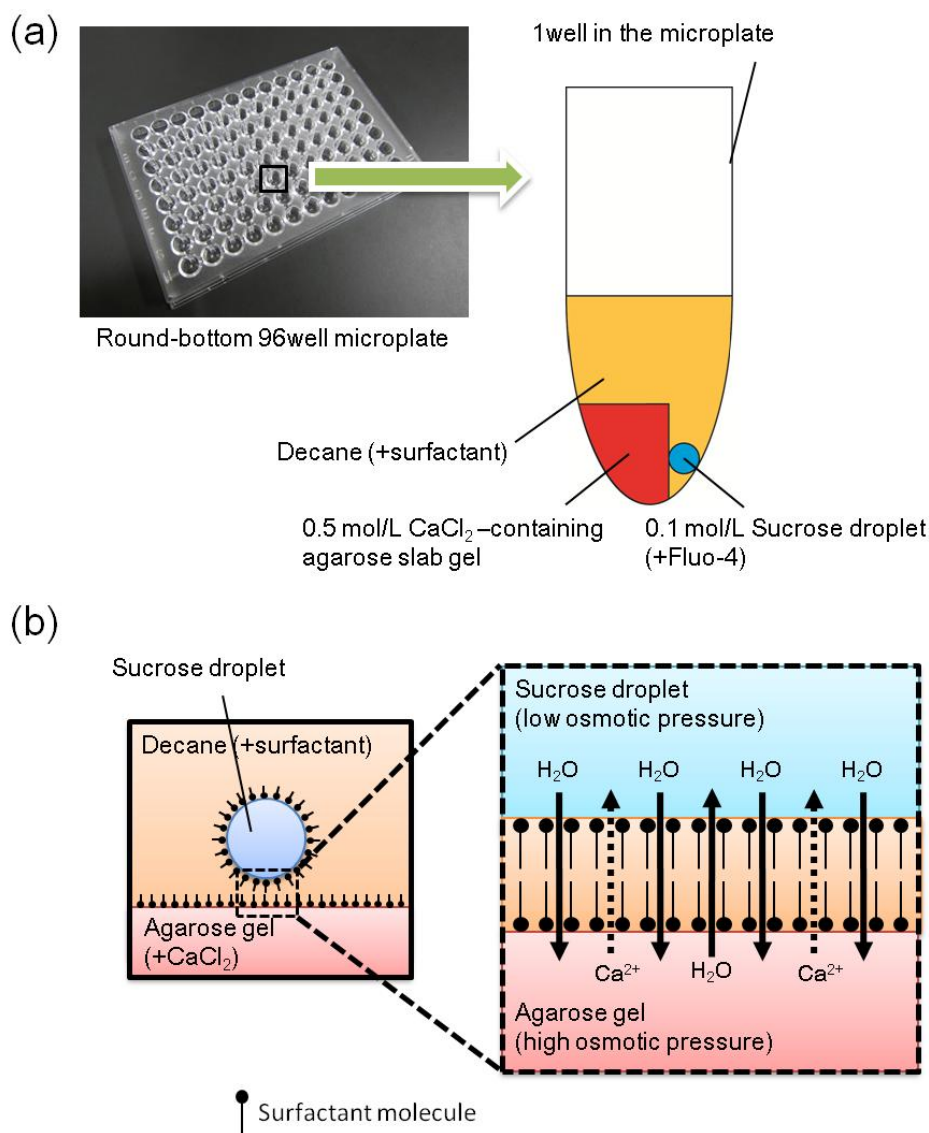


図 2.5 液滴とハイドロゲル基板間の界面を介した  $\text{Ca}^{2+}$  の可視化のためのモデル実験系。(a) 実験セットアップの概念図、(b) 液滴とハイドロゲル基板（アガロースゲル）における移動原理の概念図

Reprinted with permission from Hirama, H.; Kambe, T.; Aketagawa, K.; Ota, T.; Moriguchi, H.; Torii, T. Hyper Alginate Gel Microbead Formation by Molecular Diffusion at the Hydrogel/Droplet Interface. *Langmuir* 2013, 29, 519-524. Copyright 2013 American Chemical Society.

#### 2.3.4 収縮・ゲル化によって生成されたゲル微粒子のマイクロカプセルとしての応用可能性

本手法で生成したアルギン酸ゲル微粒子は、ゲル化前の液滴に内包したい対象物質を懸濁させておくことにより、それらの物質をゲル微粒子中に固定することができる。すなわち、ゲル微粒子がマイクロカプセルとして利用できる。以下に、本ゲル微粒子作製法を応用して作製した、生体分子内包カプセルについて述べる。

創薬分野では、生体分子であるタンパク質の三次元構造の情報が必要とされるため、その構造を理解することは重要とされている。既往研究では、タンパク質の性質を理解するため、タンパク質水溶液の液滴（タンパク質液滴）を用いて、貴重かつ高価なタンパク質の結晶化条件を探索（タンパク質の構造解析に必須）するためのスクリーニングが行われている[79]。また、連続的に生成された液滴は、タンパク質のハイスループットスクリーニングに用いられてきた[80]。こうした液滴ベースの分析手法は、少量しか利用できないタンパク質の分析において重要である。しかし、このような微量なタンパク質溶液中のタンパク質のスクリーニングに、液滴を用いた分析手法が有効である一方で、タンパク質水溶液が低濃度である場合にはスクリーニングが困難である。そこで本実験では、低濃度のタンパク質水溶液の分析を可能にすることを目指して、液滴の収縮・ゲル化による、ゲル微粒子中へのタンパク質の濃縮と固定を行った。

##### 2.3.4.1 高浸透圧の液滴を用いた単一液滴中のタンパク質濃縮

本実験では、前述の液滴の収縮・ゲル化法が、タンパク質液滴の濃縮・固定に利用可能であるかを確認するため、タンパク質液滴と高浸透圧に調整した  $\text{CaCl}_2$  液滴を1個ずつ隣り合わせる実験系を用いて予備実験を行った(図 2.6)。タンパク質液滴を生成するため、蛍光分子を結合させたタンパク質である FITC-Albumin をモデルタンパク質として選択し、これをアルギン酸ナトリウム水溶液に溶解させて、タンパク質水溶液 (0.5% (w/w) アルギン酸ナトリウム水溶液/0.5 mg/mL FITC-Albumin) を調製した。続いて、高浸透圧の  $\text{CaCl}_2$  液滴を生成するため、0.5 mol/L の  $\text{CaCl}_2$  水溶液を調製した。タンパク質液滴と  $\text{CaCl}_2$  液滴はいずれも、界面活性剤 SY-グリスターCRS-75 を 1% (w/w) 添加したデカンを注いだマイ

クロプレートの同一ウェル中に、マイクロピペットを用いて一滴ずつ分注することにより、互いに接触した状態で生成した（図 2.6 a）。タンパク質液滴のサイズと蛍光強度の変化を観察し測定するため、蛍光顕微鏡にセットした CCD カメラにより画像を取得し、画像解析ソフト（Image J）を用いて計測を行った。

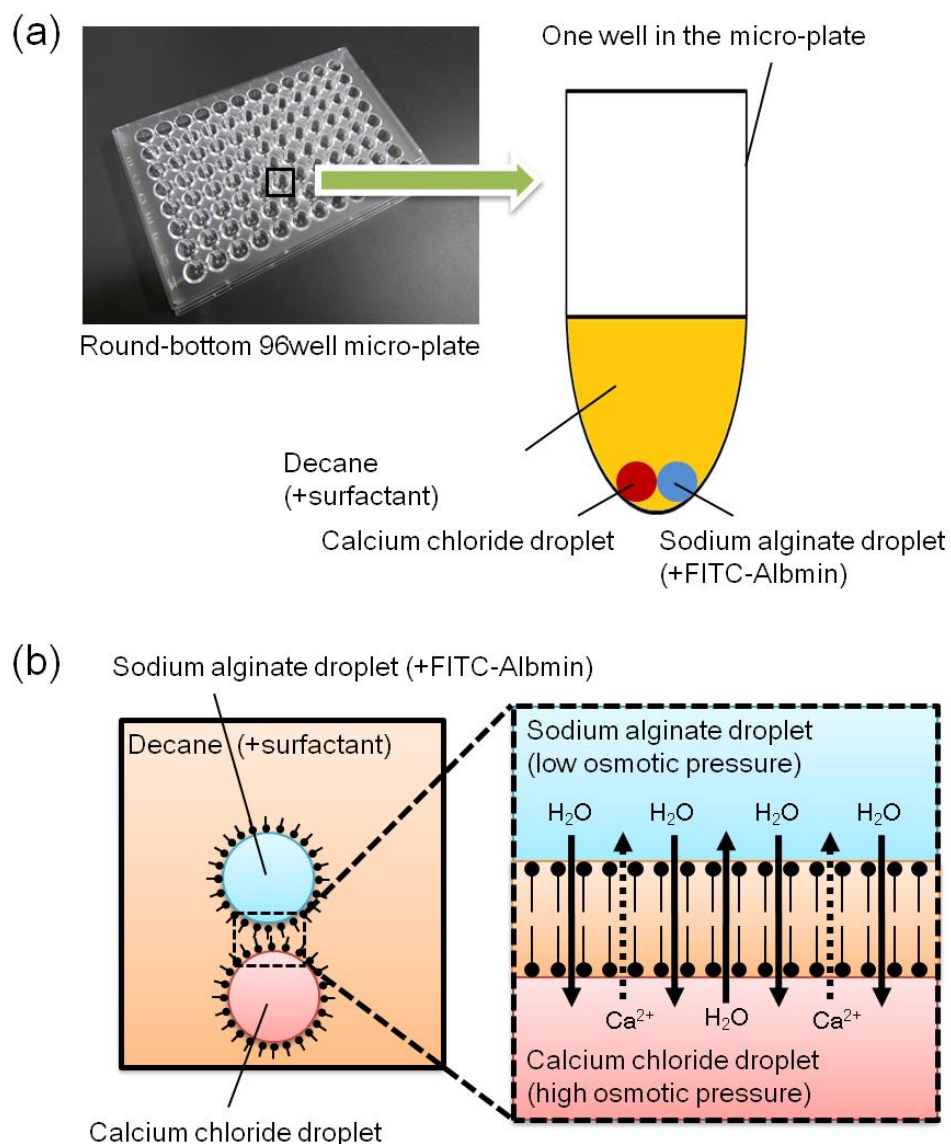


図 2.6 (a)単一液滴濃縮実験のための実験セットアップ。(b)液滴間の物質移動メカニズム

#### 2.3.4.2 濃縮されたタンパク質液滴の大量生成

タンパク質スクリーニングでは、タンパク質と様々な試薬（薬剤候補化合物）の組み合わせを大量に作製することが求められる。そのため、タンパク質スクリーニングにおいて液滴を利用するためには、タンパク質液滴を大量に生成する必要がある。そこで本実験では、微小流路（図 2.4 を参照）を用いて、タンパク質液滴を大量に生成した（図 2.2 と同様の方法）。具体的な実験操作を以下に示す（図 2.7）。タンパク質液滴を生成するため、タンパク質水溶液（0.5% (w/w) アルギン酸ナトリウム水溶液/0.5 mg/mL FITC-Albumin）を調製した。また、調製したタンパク質水溶液、および界面活性剤 SY-グリスターCRS-75 を 1% (w/w) 添加したデカンを充填したシリンジをそれぞれ用意した。各シリンジは、テフロンチューブを経由して微小流路に接続し、シリンジポンプを用いて一定流量で微小流路中の微小流路に各液体を送液した。液滴（ゲル微粒子）中にタンパク質を濃縮し固定化するため、高浸透圧のハイドロゲル基板（0.5 mol/L の  $\text{CaCl}_2$  を含む）を作製し（図 2.3 を参照）、このハイドロゲル基板の上に生成したタンパク質液滴を滴下し静置した。

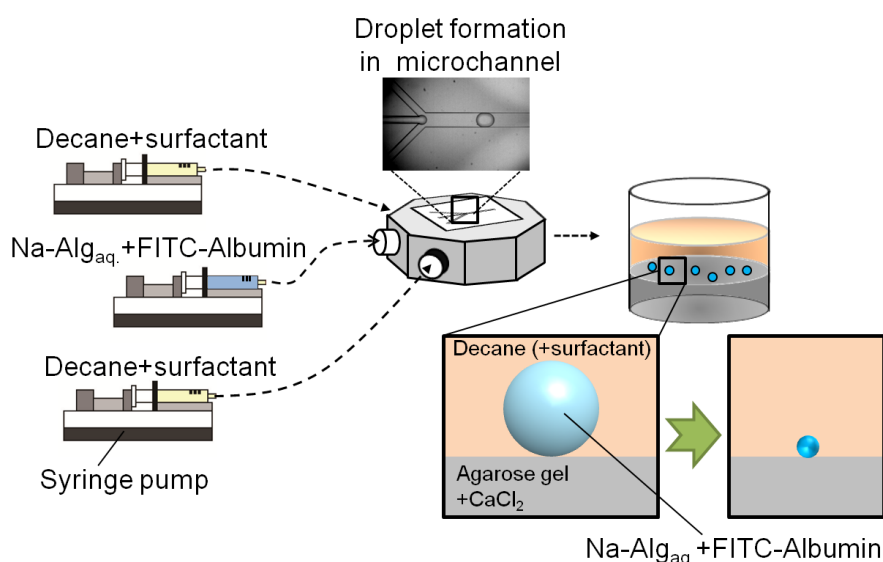


図 2.7 微小流路を用いたタンパク質液滴の生成、およびハイドロゲル基板を用いた液滴濃縮の概念図

## 2.4 結果と考察

### 2.4.1 アルギン酸ナトリウム液滴の収縮・ゲル化

微小流路を用いることで、単分散なアルギン酸ナトリウム液滴が生成した (図 2.2)。また、生成した液滴をハイドロゲル基板上に静置することで、元の液滴サイズよりも小さく単分散な球形のゲル微粒子が生成した (図 2.8 b)。既往研究では、 $\text{CaCl}_2$  aq.のようなゲル化剤溶液中に、微小流路によって生成したアルギン酸ナトリウム液滴を滴下する方法により、ゲル微粒子を作製する方法が報告されている[37]。この手法では、最終的に得られるゲル微粒子の形状を制御するため、ゲル化剤溶液に油相 (液滴の浮遊性を高めるために密度を調整している) を重層している。しかし本法では、ゲル化剤溶液を沈んでいく (進んでいく) 液滴の界面が非常に不安定で容易に変形してしまうため、得られるゲル微粒子は尾を引いたような形状になってしまう (図 2.8 a)。それに対し本実験では、ハイドロゲル基板上に液滴を静置することで液滴の界面を安定に保つことができ、その結果として、球形を保ったゲル微粒子が生成できたと考えられる。

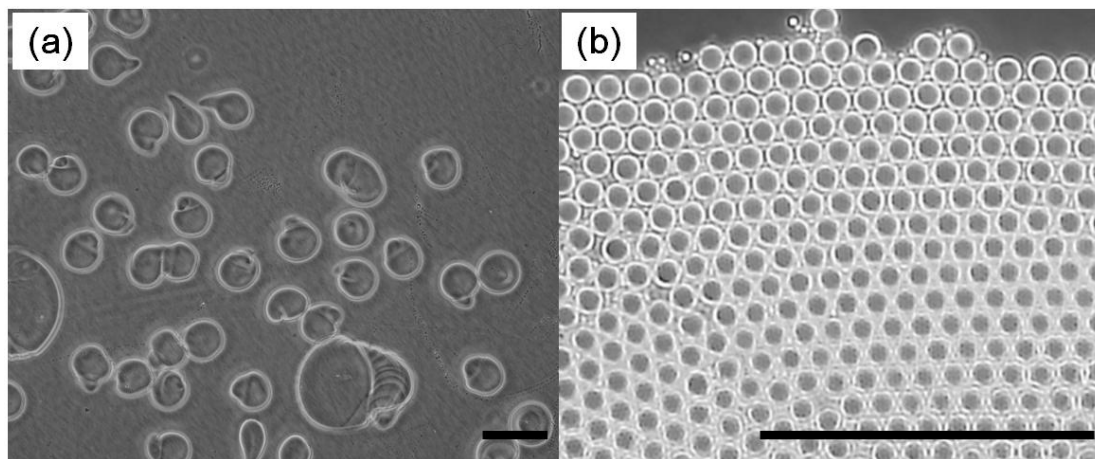


図 2.8 アルギン酸ゲル微粒子の顕微鏡写真 (位相差像)。(a) ゲル化剤溶液中で液滴をゲル化、(b)  $\text{Ca}^{2+}$ を含むハイドロゲル基板上で液滴をゲル化 (スケールバーは  $200\mu\text{m}$ )

Reprinted with permission from Hirama, H.; Kambe, T.; Aketagawa, K.; Ota, T.; Moriguchi, H.; Torii, T. Hyper Alginate Gel Microbead Formation by Molecular Diffusion at the Hydrogel/Droplet Interface. *Langmuir* 2013, 29, 519-524. Copyright 2013 American Chemical Society.

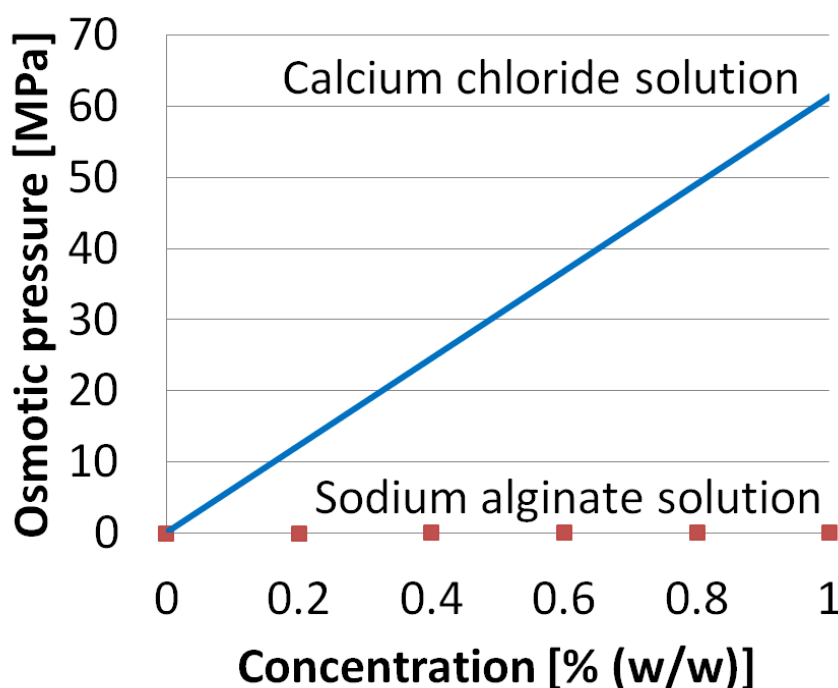


図 2.9  $\text{CaCl}_2$  水溶液およびアルギン酸ナトリウム水溶液の濃度と浸透圧の関係。

$\text{CaCl}_2$  水溶液の浸透圧は計算値、アルギン酸ナトリウム水溶液の浸透圧は測定値

ゲル化剤溶液中で液滴をゲル化する方法と比べて、ハイドロゲル基板上で液滴をゲル化する方法を用いた場合では、もとの液滴サイズよりも非常に小さなゲル微粒子を得ることができた。ハイドロゲル基板に含まれる  $\text{CaCl}_2$  aq. およびアルギン酸ナトリウム液滴との間に生じる浸透圧差は、それらの溶媒である水分子の移動を生じる。そのため、この浸透圧差を大きくすることで、液滴の著しい収縮を引き起こすことができる。本実験における浸透圧は、ハイドロゲル基板に含まれる  $\text{CaCl}_2$  aq. (0.2~1.0 mol/L) およびアルギン酸ナトリウム液滴 (0.2~1.0% (w/w)) では、それぞれ 1.4~6.8 MPa および 9.1~52 kPa であった (図 2.9)。よって、液滴の浸透圧よりも 2 桁高い  $\text{CaCl}_2$  aq. (ハイドロゲル基板に含まれる) の浸透圧の影響により、液滴からハイドロゲル基板へと水分子 (ハイドロゲル基板の媒質) が移動したことが確認された。

ハイドロゲル基板と液滴間の水分子の移動は、それらの間に形成される油膜[75]を介して生じた。本実験における  $\text{Water}_1/\text{Oil}/\text{Water}_2$  ( $\text{W}_1/\text{O}/\text{W}_2$ ) 界面における油膜を介した水分子の移動のメカニズムは、Wen らの報告[76]に基づき、以下のように進んだと考えられる（ハイドロゲル基板を水相とみなした）（図 2.10）[81, 82]。

- 1)  $\text{Water}_1/\text{Oil}$  ( $\text{W}_1/\text{O}$ ) 界面において水分子が油膜中の界面活性剤を水和する
- 2) 界面活性剤を水和している水分子が油膜を通ってもう一方の  $\text{Oil}/\text{Water}_2$  ( $\text{O}/\text{W}_2$ ) 界面へと拡散する
- 3) 水分子が界面活性剤分子を解離し水相 ( $\text{W}_2$ ) へと移動する

ハイドロゲル基板や液滴にはバッファ試薬を添加せずに、ゲル微粒子の生成を行ったが、収縮率（＝最終的な直径/元の直径）のばらつきは小さく（coefficient of variation (CV)<5%）、再現性のある収縮挙動が観察された（図 2.11）。よって、本手法は、バッファ試薬を添加することなしに行える、生成微粒子サイズに再現性のある、ゲル微粒子生成法であることが確認された。

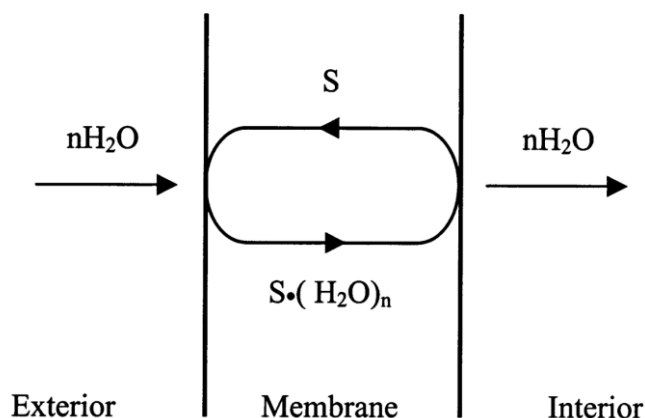


図 2.10 ハイドロゲル基板と液滴間の水分子の移動の概念図。図中の S は界面活性剤を示している。Exterior は液滴 ( $\text{Water}_1$ )、Membrane は界面活性剤を添加したデカン (Oil)、Interior はハイドロゲル基板 ( $\text{Water}_2$ ) にそれぞれ対応する

Reprinted from Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, Vol. 174, L. X. Wen and K. D. Papadopoulos, Visualization of water transport in  $\text{W}_1/\text{O}/\text{W}_2$  emulsions, pp. 159-167. Copyright 2000, with permission from Elsevier.

本手法に類似したゲル微粒子作製法として、微小流路内部において、生成したアルギン酸ナトリウム液滴を、極性溶媒に接触させた後、ゲル化剤溶液に接触させてゲル化する方法[30]がある。本手法を用いることで微小流路内部において迅速に液滴の溶媒（水）を取り除くことができ、液滴のサイズを微小化させたゲル微粒子を得ることができる。しかし、生成したゲル微粒子は、球形を保たず変形を生じてしまう。以上から、微小流路を用いて生成したアルギン酸ナトリウム液滴から、球形を保ったゲル微粒子を生成するためには、本研究の手法のように、液滴の界面を安定に保ちながら穏やかに溶媒である水を取り除くことが有効であったと言える。

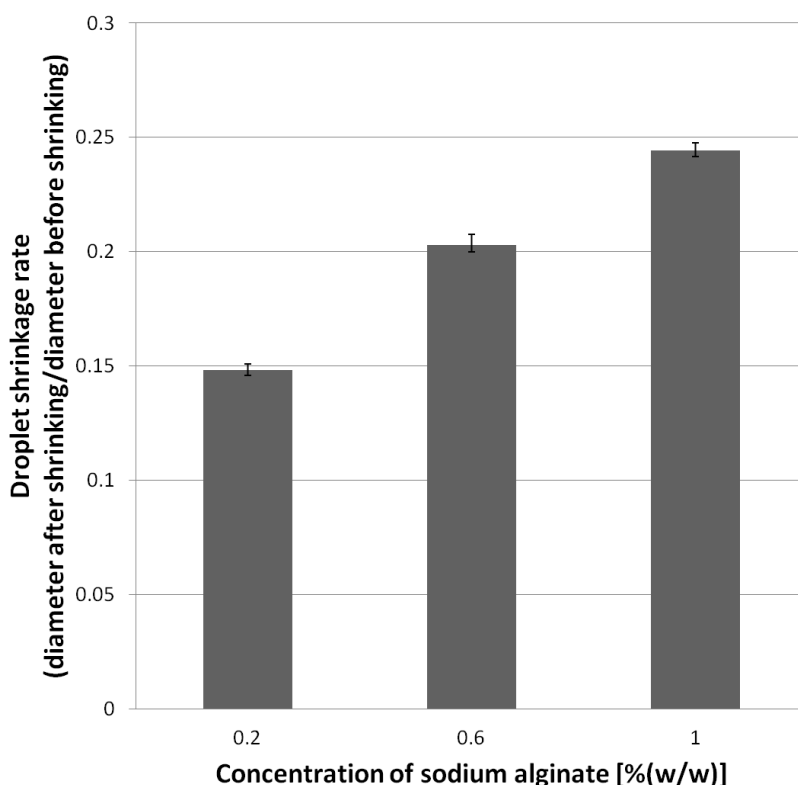


図 2.1 1 液滴収縮率のばらつき。0.5 mol/L CaCl<sub>2</sub> 含むハイドロゲル基板上で異なるアルギン酸ナトリウム濃度の液滴を収縮・ゲル化させた (CV=5%) (n=6)

Reprinted with permission from Hirama, H.; Kambe, T.; Aketagawa, K.; Ota, T.; Moriguchi, H.; Torii, T. Hyper Alginate Gel Microbead Formation by Molecular Diffusion at the Hydrogel/Droplet Interface. *Langmuir* 2013, 29, 519-524. Copyright 2013 American Chemical Society.



## 2.4.2 液滴収縮の経時変化

液滴収縮の経時変化を確認するため、0.5 mol/L の  $\text{CaCl}_2$  aq. を含むハイドロゲル基板上に微小流路によって生成された 1% (w/w) のアルギン酸ナトリウム液滴を静置し、光学顕微鏡で撮影・計測した。計測した 3 種類のサイズの液滴の直径変化を図 2.12 に示す。ハイドロゲル基板上に載せてから 3 時間以降では、いずれのサイズの液滴も元の直径の約 1/5 まで収縮し、直径はほぼ一定となった。直径が一定になった時点では、液滴およびハイドロゲル基板にとっての溶媒である水分子の移動が平衡状態に達していると考えられる。また、液滴の収縮率（＝最終的な直径/元の直径）は、元の液滴のサイズによらず、一定（元の直径の約 1/5）であった。以上から、平衡状態に達するまでの時間においては、経過時間と液滴直径の関係をもとに様々なサイズのゲル微粒子が生成可能であることが確認された。

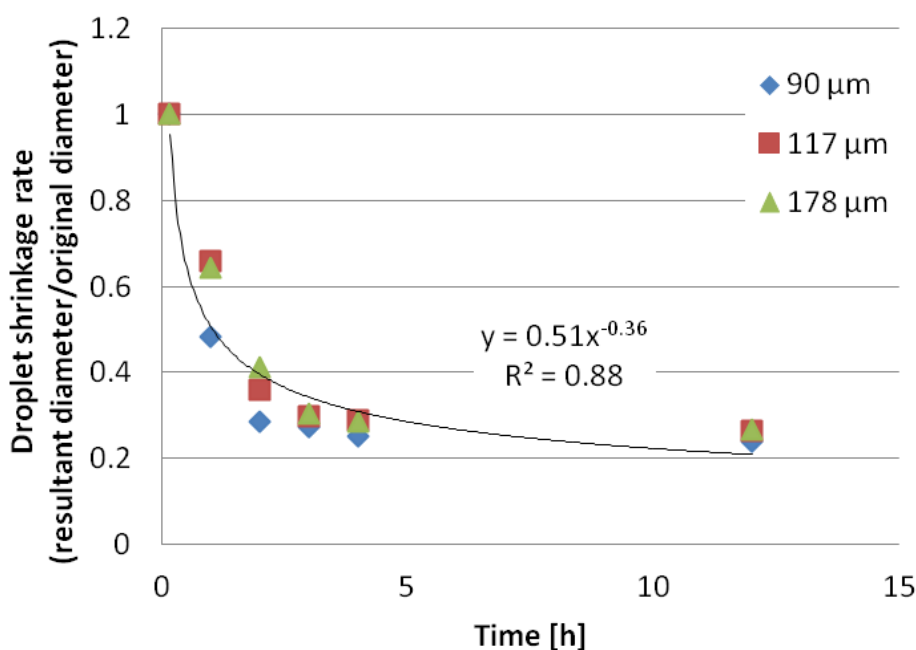


図 2.12 液滴サイズの経時変化。12 時間後の液滴の平均直径はそれぞれ、90  $\mu\text{m}$  の液滴は 22  $\mu\text{m}$ 、117  $\mu\text{m}$  の液滴は 31  $\mu\text{m}$ 、178  $\mu\text{m}$  の液滴は 48  $\mu\text{m}$  だった (n=50)

Reprinted with permission from Hirama, H.; Kambe, T.; Aketagawa, K.; Ota, T.; Moriguchi, H.; Torii, T. Hyper Alginate Gel Microbead Formation by Molecular Diffusion at the Hydrogel/Droplet Interface. *Langmuir* 2013, 29, 519-524. Copyright 2013 American Chemical Society.

### 2.4.3 液滴収縮の濃度依存性

液滴収縮に対する、ハイドロゲル基板内の  $\text{CaCl}_2$  濃度および液滴のアルギン酸ナトリウム濃度の依存性を確認するため、以下の2つの実験条件において、得られるゲル微粒子のサイズを計測した。

1) 一定の  $\text{CaCl}_2$  (ハイドロゲル基板中) 濃度下において、アルギン酸ナトリウム濃度のみに変化させた (0.2~1%(w/w)) (図 2.1 3 a)

2) 一定のアルギン酸ナトリウム濃度下において、 $\text{CaCl}_2$  (ハイドロゲル基板中) 濃度のみに変化させた (0.2~1 mol/L) (図 2.1 3 b)

ただし、いずれの条件においても、液滴はハイドロゲル基板上に12時間静置したものを計測した。

一つ目の実験条件では、図 2.1 3 a に示すように、アルギン酸ナトリウム (液滴) 濃度が高いほど、得られるゲル微粒子のサイズは大きくなった。一方で、二つ目の実験条件では、図 2.1 3 b に示すように、 $\text{CaCl}_2$  濃度が高いほど、得られるゲル微粒子のサイズは小さくなった。これらのサイズ変化は、濃度によって生じた浸透圧の影響によるものである。そのため、液滴とハイドロゲル基板の  $\text{CaCl}_2$  の浸透圧差が大きいほど液滴の収縮が促進された。また、いずれの条件においても、単分散性の高い ( $\text{CV}<5\%$ ) ゲル微粒子が生成された。以上より、図 2.1 3 のように濃度条件を調節することで、ゲル微粒子のサイズを元の液滴直径の  $1/6$  から  $1/4$  の範囲で調節できることが確認された。

高分子水溶液であるアルギン酸ナトリウム水溶液は粘性液体である。そのため、アルギン酸ナトリウム水溶液の粘度は、その濃度が増加するに連れて増加する (図 2.1 4)。既往研究[83]では、液滴を構成するアルギン酸ナトリウム水溶液の粘度によって、液滴の収縮率が変わることが報告されている。そこで本実験においても、液滴を構成するアルギン酸ナトリウム水溶液の粘度と、収縮率の関係を明らかにするため、図 2.1 5 のようにこれらをプロットした。その結果、よって、既往研究と同様に本実験系および本実験条件においても、液滴を構成する水溶液の粘度が高くなるほど収縮率が低くなり、6~58 cP の範囲

で液滴粘度を変化させることで、約 10%の範囲で収縮後の液滴サイズを調整できることがわかった。

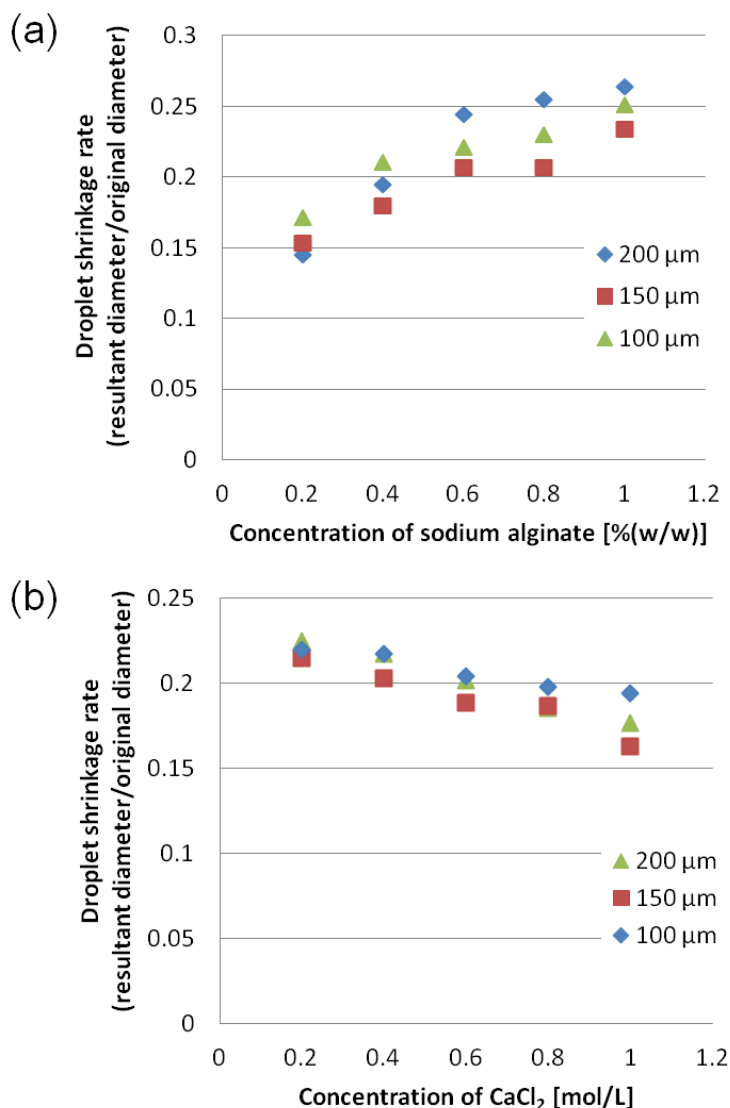


図 2.13 液滴収縮率の濃度依存性。(a) アルギン酸ナトリウム濃度ごとの液滴収縮率。CaCl<sub>2</sub>濃度は 0.5 mol/L、生成されたゲル微粒子の平均直径は 17~53 μm だった。(b) CaCl<sub>2</sub>濃度ごとの液滴収縮率。アルギン酸ナトリウム濃度は 0.5% (w/w)、生成されたゲル微粒子の平均直径は 19~45 μm だった (n=50)

Adapted with permission from Hirama, H.; Kambe, T.; Aketagawa, K.; Ota, T.; Moriguchi, H.; Torii, T. Hyper Alginate Gel Microbead Formation by Molecular Diffusion at the Hydrogel/Droplet Interface. *Langmuir* 2013, 29, 519-524. Copyright 2013 American Chemical Society.

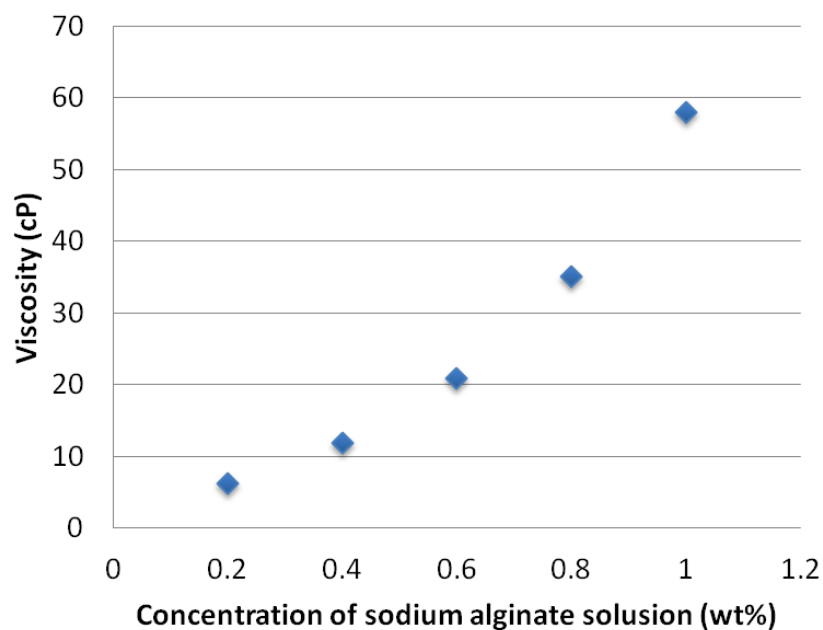


図 2.1 4 アルギン酸ナトリウム水溶液と粘度の関係。粘度計で測った測定値(n=5)

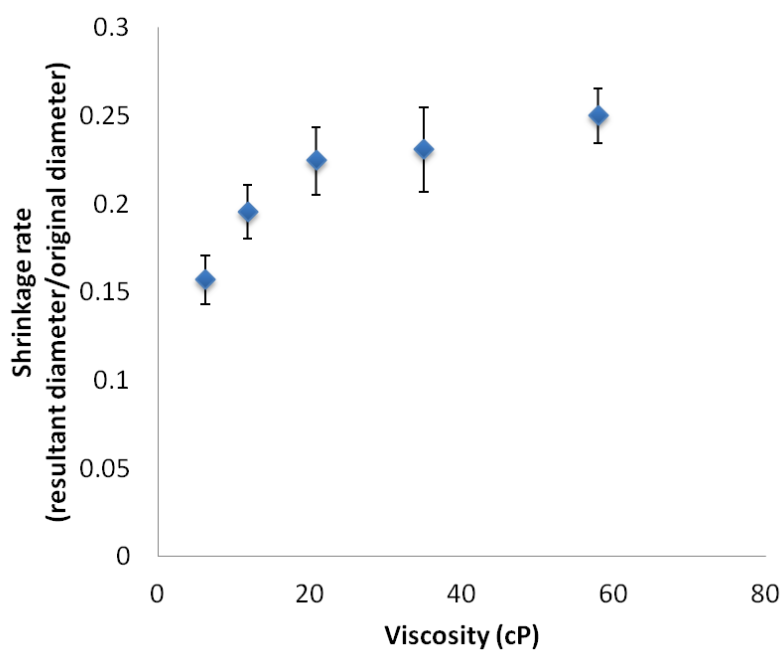


図 2.1 5 アルギン酸ナトリウム水溶液の粘度と液滴収縮率の関係。図 2.1 3 a および図 2.1 4 から作成した。3種類のサイズの液滴のデータを全て用いて平均化した。粘度が低いほど収縮率が増加した(n=3)

#### 2.4.4 $\text{Ca}^{2+}$ の移動の可視化

本微粒子作製工程は、液滴とハイドロゲル基板の間で  $\text{Ca}^{2+}$ が移動する結果としてゲル化が生じる、という仮定のもとで行われた。そこで、この仮定（仮説）を実証するため、 $\text{CaCl}_2$ を含むハイドロゲル基板に、カルシウム感受性蛍光色素（fluo-4）を添加した1個のスクロース液滴を接触させた、モデル実験系を作製し、 $\text{Ca}^{2+}$ の移動を可視化した（図 2.5 a）。 $\text{Ca}^{2+}$ の移動を液滴に添加した fluo-4 の蛍光強度の変化として観察するため、液滴をハイドロゲル基板に接触させて 30 秒経過時から 120 秒間隔で、共焦点顕微鏡による画像を取得した（図 2.1 6）。取得した画像を用いて、 $x=200\text{ }\mu\text{m}$ （ $x$ ：液滴とハイドロゲル基板の接点から液滴の中心に向かって伸びる直線上の計測地点までの距離）の地点の蛍光強度を測定した。その結果、ハイドロゲル基板に液滴を接触させてから 1 時間以内に、ハイドロゲル基板から液滴への  $\text{Ca}^{2+}$ の移動（拡散）が確認された。ハイドロゲル基板に液滴を接触させてから約 20 分後には蛍光強度は一定となり、 $\text{Ca}^{2+}$ の移動が平衡状態に達した。

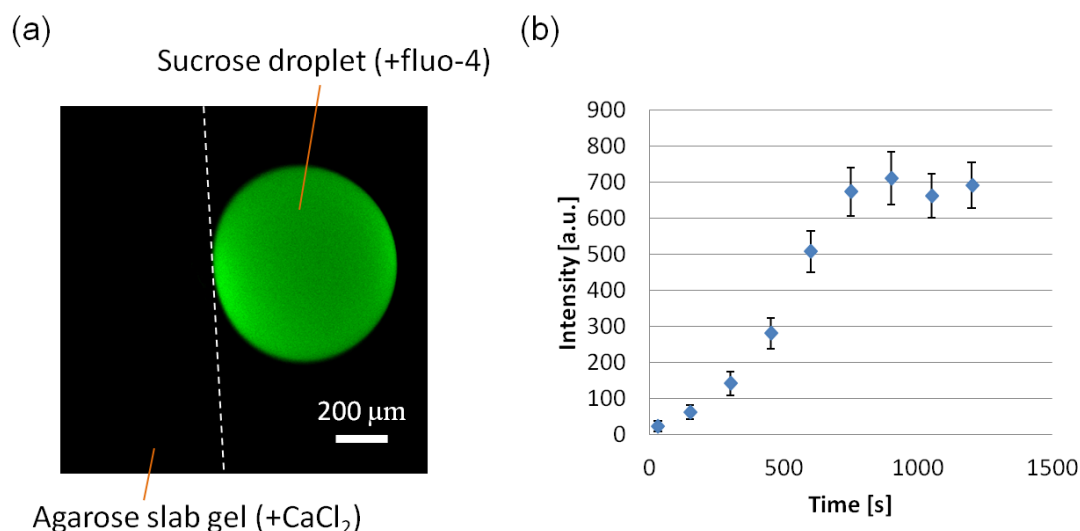


図 2.1 6 モデル実験系を用いた  $\text{Ca}^{2+}$ の移動の可視化。(a) 液滴およびハイドロゲル基板の位置関係（共焦点顕微鏡像）、(b) 液滴内の蛍光強度の経時変化（ $n=50$ ）

Reprinted with permission from Hirama, H.; Kambe, T.; Aketagawa, K.; Ota, T.; Moriguchi, H.; Torii, T. Hyper Alginate Gel Microbead Formation by Molecular Diffusion at the Hydrogel/Droplet Interface. *Langmuir* 2013, 29, 519-524. Copyright 2013 American Chemical Society.

図 2.5 のように、デカン中で液滴がハイドロゲル基板に接触すると、液滴とハイドロゲルの間に油膜が形成される[75]。油膜を通過して、ハイドロゲル基板から液滴へと移動した  $\text{Ca}^{2+}$  の移動速度を求めるため、蛍光強度および式 2.1 を用いて  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を算出し、これを式 2.2 に代入した。その結果、求められた拡散係数は、 $10^{-13}$  から  $10^{-12}$  のオーダーだった。一方、バルクの  $\text{CaCl}_2$  水溶液における  $\text{Ca}^{2+}$  の拡散係数は  $10^{-9}$  オーダー[84]であることから、本モデル実験系では  $\text{Ca}^{2+}$  がわずかにしか移動しないことが確認された。この原因には、以下の3つが複合的に影響したと考えられる。

- 1) 油膜が  $\text{Ca}^{2+}$  の移動を阻害している
- 2) 液滴とハイドロゲル基板 ( $\text{Ca}^{2+}$  供給源) の接する面積が非常に小さいため、液滴への  $\text{Ca}^{2+}$  の流入量が少ない
- 3) 液滴の収縮 (濃縮) による粘度増加によって、 $\text{Ca}^{2+}$  が拡散しにくくなった

まず、1)の油膜による影響を考察する。Cheng らの報告[77]によると、油膜中のイオンの移動は、イオンをトラップした逆ミセルによって、油膜中でイオンが輸送されることによって生じる。そのため、油膜を介したイオンの移動速度は、ミセルを形成せずに生じるバルク水溶液中の拡散よりも、低下すると考えられる。しかし、逆ミセルによる輸送原理を適応した場合でも、本モデル実験系における移動メカニズムを厳密に評価することは困難であった。そのため、今後さらなるモデルの最適化が必要である。続いて、2)の液滴とハイドロゲル基板の接地面積による影響を考察する。液滴をバルクのゲル化剤水溶液に滴下する場合では、液滴の表面全体から液滴中に  $\text{Ca}^{2+}$  が流入する。一方、本実験系では、液滴とハイドロゲル基板の接地面積は非常に小さいため、液滴に流入できる単位時間あたりの  $\text{Ca}^{2+}$  量が少なくなる。そのため、 $\text{Ca}^{2+}$  の流入速度が遅くなったと考えられる。最後に、3)の液滴の濃度増加による影響を考察する。溶液中の高分子の拡散速度を表す拡散係数  $D$  は、以下のストークス-アインシュタインの式で表される。

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r} \quad (2.4)$$

ただし、 $k_B$  : ボルツマン定数、 $T$  : 温度、 $\eta$  : 高分子水溶液の粘度、 $r$  : 溶質の流体力学的半径。この式が示すように、拡散係数は粘度に反比例する。本実験において液滴は、高分子 (アルギン酸ナトリウムもしくはスクロース) を含んでいた。そのため、 $\text{CaCl}_2$  を含む

ハイドロゲル基板にそれらの液滴を接触させると、液滴が収縮するにしたがって液滴の粘度は増加した。上式から、液滴の粘度の増加が拡散係数を小さくさせ、結果としてハイドロゲル基板から液滴へ  $\text{Ca}^{2+}$  が拡散しにくくなったと考えられる。

#### 2.4.5 液滴の収縮・ゲル化を用いた「微小流路によるゲル微粒子作製における問題」の解決

微小流路を用いて単分散かつ一様な形状のゲル微粒子を作製する従来法には、以下のような共通の技術的課題があった。

- ・生成できる液滴のサイズは微小流路サイズに依存するため、複数のサイズの微粒子を作製する際、サイズの種類に応じた複数の寸法の微小流路が必要である

- ・小さなゲル微粒子を得るために微小流路を小径化すると、微小流路が閉塞しやすくなる [85]

- ・バルクのゲル化剤水溶液中で液滴をゲル化すると生成される微粒子が変形してしまう [37]

以上の課題に対し、液滴の収縮・ゲル化プロセスを用いることで、微小流路の寸法に関係なく、液滴およびハイドロゲル基板の溶質濃度、ハイドロゲル基板上に液滴を静置する時間、ゲル化前の液滴サイズによって、ゲル微粒子のサイズが調整できるようになった。そのため、上記の課題は以下のように克服された。

- ・複数の寸法の微小流路を用いなくても、一種類の微小流路から複数のサイズのゲル微粒子が生成できる

- ・微小流路を小径化しなくても小さなゲル微粒子が得られるため、微小流路の閉塞リスクが軽減できる

- ・安定なハイドロゲル基板上でおだやかにゲル化するため、変形のない球形のゲル微粒子が生成できる

既往研究では、微小流路内部で液滴の生成およびゲル化の両方を一度に行うことにより連続的にゲル微粒子を生成する方法が報告されている[23]。本手法は、ゲル微粒子生成が一つの微小流路内部で完結するため、微小流路以外の付加的な構成要素が不要となる点において優れている。一方、微小流路内におけるゲル化は、微小流路を閉塞させる可能性を持っている。微小流路を用いてゲル微粒子を連続的かつ大量に生成する際に生じる微小流路の閉塞は、生成プロセスを停止させる原因となる。そのため、ゲル微粒子の連続的大量生産において、微小流路の閉塞を回避することはゲル微粒子生成のプロセス時間を短縮する上で非常に重要である。それに対し液滴の収縮・ゲル化法は、ゲル微粒子生成速度を律速する微小流路の閉塞の確率を減少させることができ、連続的かつ大量なゲル微粒子生成のプロセス時間を短縮することが可能である。以上から、本手法は、微小流路内部で液滴生成およびゲル化を行う方法に対して、用途に応じて相補的に利用できる手法の一つとして位置付けられるものである。

#### **2.4.6 収縮・ゲル化によって生成されたゲル微粒子のマイクロカプセルとしての応用可能性**

液滴の収縮・ゲル化の応用として行った、生体材料（タンパク質）内包カプセルの作製について述べる。また、共同研究者と共に作製した、粒子内包カプセルの作製についても合わせて述べる。

##### **2.4.6.1 生体材料内包カプセル**

液滴の収縮・ゲル化プロセスを用いて、ゲル微粒子中に生体材料であるタンパク質を濃縮・固定する実験を行った。まず、液滴の収縮・ゲル化プロセスが、タンパク質液滴の濃縮・固定に利用できることを確認するために行った、予備実験の結果と考察について述べる。続いて、微小流路を用いて行った、大量生成したタンパク質液滴の濃縮・固定について述べる。



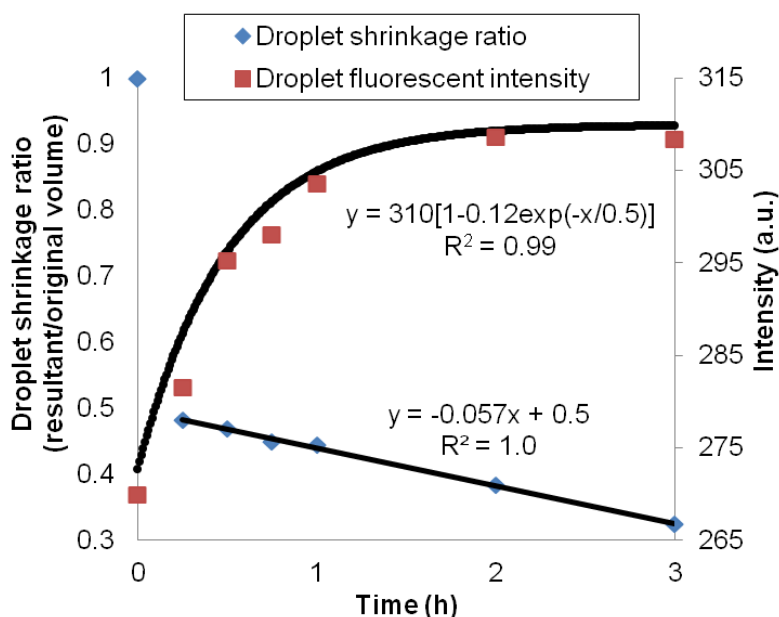


図 2.17 液滴の蛍光強度および直径の時間変化

予備実験では、界面活性剤を添加したデカン中で、マイクロピペットを用いて分注した 0.3  $\mu\text{L}$  のタンパク質液滴と高浸透圧の  $\text{CaCl}_2$  液滴を接触させた系を作製した（図 2.6）。その結果、タンパク質液滴から液滴へと水分子が移動し、タンパク質液滴は経時的に収縮した（図 2.17）。液滴サイズは、液滴同士を接触させた直後から 1 時間ほどで急激に減少し、その後、比例関数的に減少した。また、収縮の傾向は、タンパク質を内包しない液滴の場合（図 2.12）と比較して概ね類似していた。このことから、タンパク質液滴の収縮時に、液滴とハイドロゲル基板の界面間で生じる現象は、タンパク質を内包しない液滴の収縮時に生じる現象と同様であることが示唆された。液滴の収縮と同時に、タンパク質液滴内の蛍光強度が経時的に増加した。本実験で使用した試薬の中で、蛍光を示す物質はタンパク質分子のみであったことから、この結果は、液滴内のタンパク質が濃縮されたことを示している。このとき、液滴からの蛍光の漏れだけは観察されなかった。また、本実験においても、 $\text{CaCl}_2$  液滴からタンパク質液滴へと  $\text{Ca}^{2+}$  が移動したことによって、タンパク質液滴がゲル化した。

予備実験に続いて、微小流路を用いて大量にタンパク質液滴を生成し、液滴の収縮・ゲル化プロセスを利用してタンパク質を濃縮・固定した（図 2.18）。本実験においても、高浸透圧のハイドロゲル基板上に生成されたタンパク質液滴を滴下し静置することにより、水分子と  $\text{Ca}^{2+}$  の移動が自発的に生じることで、液滴の収縮・ゲル化が可能であった。液滴直径からタンパク質液滴の濃度を計算すると、液滴の収縮にともなって液滴中のタンパク質濃度は約 85 倍まで濃縮したことが確認された。また、液滴の収縮が一定になるまでにかかる時間は、単一の液滴を用いた予備実験と同様に数時間であった。よって、タンパク質液滴の個数、およびタンパク質液滴を接触させる高浸透圧の  $\text{CaCl}_2$  を含む物質が液滴であるかハイドロゲル基板であるかにかかわらず、本実験におけるタンパク質液滴の濃縮・固定化のプロセス時間は、数時間となることが確認された。

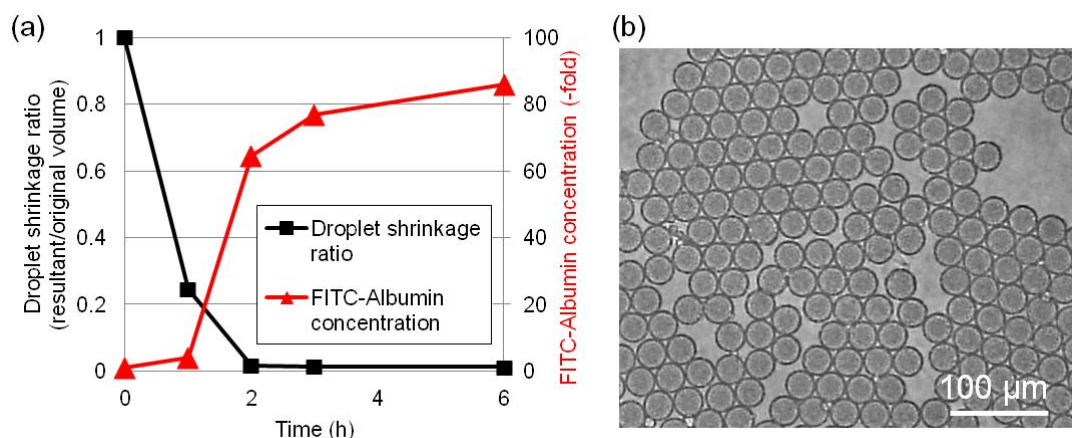


図 2.18 微小流路を用いて大量生成した液滴中におけるタンパク質濃縮。(a)液滴の収縮と濃縮の時間変化。FITC-Albumin 濃度は、液滴収縮率から計算により求めた。濃度を計算により求めた理由は、FITC-Albumin 水溶液が高濃度になるにつれて濃度消光（蛍光分子が高濃度になり凝集すると蛍光強度が減少する現象）を生じたためである。液滴内で明らかなタンパク質の凝集が観察されたことから、本実験における濃度消光は蛍光強度低下の主要な要因の一つであると言える。収縮前の液滴の平均直径は、127 μm だった。(b)6 時間の収縮・ゲル化操作によって得られたタンパク質が濃縮されたゲル微粒子の顕微鏡写真

## 2.5 結論

微小流路によって生成された液滴を収縮・ゲル化させることによりゲル微粒子を生成する手法（液滴の収縮・ゲル化プロセス）を開発した。本研究では、液滴を収縮・ゲル化させるために、高浸透圧の  $\text{CaCl}_2$  aq. (1.4~6.8 MPa) を含むハイドロゲル基板とアルギン酸ナトリウム液滴 (9.1~52 kPa) を接触させた系を利用した。また、本研究は、single phase マイクロカプセルの開発として位置付けられる。

本手法の特徴は、

- 1) アルギン酸ナトリウム液滴を  $\text{Ca}^{2+}$  を含むハイドロゲル基板上に静置することにより、一様な形状のゲル微粒子が生成できる
- 2) 元の液滴サイズの 1/5 程度に微小化した単分散ゲル微粒子が生成できる ( $\text{CV}<5\%$ )
- 3) 数時間のタイムスケールで物質移動が平衡状態に達し、ゲル微粒子生成のプロセスが完了する
- 4) 液滴の収縮・ゲル化現象は、液滴とハイドロゲル基板の間にできる油膜を介した水分子と  $\text{Ca}^{2+}$  の物質移動によって生じるプロセスである
- 5) 微小流路の閉塞リスクが軽減できるためゲル微粒子の連続大量生産に利用できる
- 6) さまざまな物質を内包させたマイクロカプセルとして利用できる

また、生成されるゲル微粒子のサイズについては、以下の要素を制御することで調整可能であることが確認された。

- 1) 液滴の溶質濃度（粘度）およびハイドロゲル基板の溶質濃度
- 2) ハイドロゲル基板上に液滴を静置する時間
- 3) ゲル化前の液滴サイズ

本手法を用いることで、ゲル微粒子生成における技術的な問題を以下のように解決できた。

- 1) 複数の寸法の微小流路を用いずに複数のサイズのゲル微粒子を生成できた

2) 細い流路を用いることなく小さなゲル微粒子が可能になったため細い流路を使用することによる流路の閉塞を生じることがなくなった

3) ゲル微粒子は変形せずに球形を保ったまま生成できた

さらに、 $\text{CaCl}_2$ を含むハイドロゲル基板に1個の液滴を接触させたモデル実験系を用いることで、バルク水溶液における  $\text{Ca}^{2+}$ の拡散と比較して、ハイドロゲル基板では非常にゆっくりと液滴への  $\text{Ca}^{2+}$ の拡散が進む（拡散係数： $10^{-13}$  から  $10^{-12}$  オーダー）ことが確認された。

本研究では、アルギン酸ナトリウムと  $\text{CaCl}_2$  を浸透圧調整物質として、液滴の収縮・ゲル化挙動の確認を行った。これらの物質以外にも多くの要素（例：ハイドロゲル基板として用いたアガロースゲルのポアサイズや界面活性剤の組成）が液滴の収縮ゲル化現象に影響与える可能性がある。そのため今後の研究では、ゲル微粒子の用途に応じて、それらの要素が検証される必要がある。また、液滴がハイドロゲル基板に静置されるとすぐに液滴中に  $\text{Ca}^{2+}$ の濃度勾配が生じると考えられることから、生成されたゲル微粒子全体の弾性の均一性についても今後評価される必要がある。

液滴の収縮・ゲル化法の応用として行った、タンパク質液滴の濃縮実験では、約85倍の濃度までタンパク質を濃縮することが可能であった。本手法は、生体材料や粒子などを内包することが可能な汎用なカプセル化技術として、生物学、医学、薬学、生化学、化学、化学工学といった幅広い分野での応用が期待できる。

### 第3章      高機能マイクロカプセルの開発2：交互液滴生成法に 基づく1対1カプセル化

### 3.1 概要

本章では、微小流路を用いた、マイクロカプセルの作製法について述べる。前章のマイクロカプセルは、液滴を収縮・ゲル化させることで得られる単分散な「ゲル微粒子」であった。これは、**single phase** マイクロカプセルの開発として位置付けられるものであった。それに対し本章で紹介するマイクロカプセルは、微小流路内の濡れ性を制御することで得られる単分散な「液滴」である。また本研究は、**double phase** マイクロカプセル（1.1.2参照）の開発として位置付けられる。

本研究では、微小流路を用いて異なる2種類の物質を1個ずつ内包した液滴を生成する手法である、1対1カプセル化法について述べる。1対1カプセル化法では、微小流路の上流で水滴（1個の粒子を内包）を生成し、下流部でその水滴を2個ずつ内包した油滴（以下、**Water-in-Oil-in-Water (W/O/W)** エマルション液滴と呼ぶ）（図3.1）を生成する。**W/O/W** エマルション液滴は微小流路外に取り出した後、内部の2個の水滴を自発的に合体（以下、合一）させることで、2個の微粒子を1対1で内包した状態を作り出すことができる。

実験では、1種類の微小流路チップを用いて **W/O/W** エマルション液滴を生成した（図3.2）。微小流路へ液体を導入する前に、**W/O/W** エマルション液滴内部の水滴を生成するため微小流路の上流を疎水化処理し、外部の油滴を生成するため微小流路の下流を親水化処

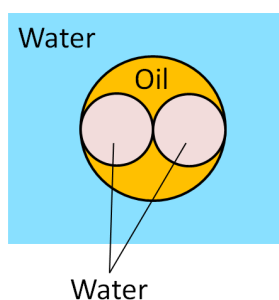


図 3.1 **Water-in-Oil-in-Water (W/O/W)** エマルション液滴の概念図。本研究では、最も外側に存在する水相を「外水相」、内側に存在する水相を「内水相（もしくはその液滴を内水相液滴）」と呼ぶ

理した。局所的に親水化および疎水化処理した微小流路を用いて、2種類の蛍光粒子を1個ずつ内包した W/O/W エマルション液滴を生成した。W/O/W エマルション液滴に内包される水滴の個数を制御するため、微小流路に導入する液体の流量に対する内包水滴数を確認した。また、生成した W/O/W エマルション液滴の安定性は、液滴の周囲に存在する液体中の界面活性剤の組成に影響を受けることが予想された。そこで、W/O/W エマルション液滴の安定性を制御するため、内水相液滴を包み込む油相に添加する界面活性剤の種類による影響を確認した。

液滴は、ウェットな環境で取り扱う必要のある物質（例：生きた細胞や各種生体材料）を内包することが可能なマイクロカプセルである。そのため、本研究で開発した1対1カプセル化法は、内包する物質を粒子から細胞に置き換えることにより、さまざまな細胞の相互作用を細胞1個レベルでハイスループットに計測することが可能なプラットフォームとしての応用が期待できる。特に、従来の1対1の細胞の相互作用を計測する実験系は、微細加工によって作製されたマイクロアレイデバイスに細胞をトラップする方法[55]が用いられるため、計測対象である細胞のペアを増やすには、デバイスサイズを大きくする、もしくは高精度の加工技術を用いてアレイを高密度化する必要があった。そのため、スループット向上に技術的な課題があった。一方で、W/O/W エマルション液滴を用いて連続的（kHz）に1対1の細胞ペアを作り出せる本手法では、既存の技術的問題を回避でき、スループットの向上を大幅に改善できることが期待できる。

### 3.2 器具と試薬

本実験では以下の器具および試薬を用いた。

試薬：

- ・ シグマコート (SIGMA)
- ・ 蛍光粒子 (Fluoresbrite Polychromatic Red 6.0 Micron Microspheres、Polysciences)
- ・ 蛍光粒子 (Fluoresbrite Yellow Green Microspheres 10  $\mu$ m、Polysciences)
- ・ Octadecyl trichlorosilane (東京化成)
- ・ デカン (和光純薬)
- ・ 細胞培養液 (Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)、Life Technologies)
- ・ 生理食塩水 (Phosphate buffered saline (PBS)、Life Technologies)
- ・ 界面活性剤 SY-グリスターCRS-75 (ポリグリセリン脂肪酸エステル、阪本薬品工業)
- ・ 界面活性剤 SPAN80 (Sorbitan Monooleate、和光純薬)
- ・ 界面活性剤 SPAN85 (Sorbitan Trioleate、和光純薬)
- ・ 界面活性剤 ポリビニルアルコール (PVA、日本合成化学)

器具：

- ・ 石英ガラス製微小流路チップ (図 3.1 b) と連結器具一式 (特注品、図 2.4 c,d 参照)
- ・ テフロンチューブ (内径：0.5 mm、外径：1.58 mm) (フロン工業)
- ・ シリンジ (10 ml 容量ガスタイトシリンジ、Hamilton)
- ・ マイクロピペット (ピペットマン、20 ~ 200  $\mu$ L、Gilson)
- ・ マイクロピペット (ピペットマン、100 ~ 1000  $\mu$ L、Gilson)
- ・ マイクロピペット (ピペットマン、500 ~ 5000  $\mu$ L、Gilson)
- ・ ピペットチップ (200  $\mu$ L イエローチップ、Gilson)
- ・ ピペットチップ (1000  $\mu$ L ブルーチップ、Gilson)
- ・ ピペットチップ (5000  $\mu$ L ホワイトチップ、Gilson)
- ・ ガラス管 (断面形状：正方形、内面辺：0.5 mm) (特注品、高尾製作所)



機器：

- ・ シリンジポンプ (KDS200、KD Scientific)
- ・ 紫外線照射装置 (L8222-02、浜松ホトニクス)

分析機器：

- ・ 自動表面張力計 (CBVP-Z、協和界面科学)

光学機器：

- ・ 倒立型顕微鏡 (IX-71、オリンパス) (位相差観察および落射蛍光観察の設定で使用)
- ・ 正立型顕微鏡 (BX-50、オリンパス) (透過光観察の設定で使用)
- ・ 顕微鏡装着型 CCD (Charge Coupled Device) カメラ (DP-70、オリンパス)
- ・ 高速度カメラ (FASTCAM-MAX 120K、フォトロン)
- ・ 共焦点レーザー顕微鏡システム (FV-300、オリンパス)

### 3.3 実験

#### 3.3.1 微小流路の表面改質

本実験では、石英ガラス製の微小流路チップを内蔵した微小流路を用いて、油滴内に水滴を内包した W/O/W エマルション液滴を生成する。W/O/W エマルション液滴の生成過程では、微小流路の上流で油中分散水滴が生成され、その下流でその水滴を内包した水中分散油滴が生成される（図 3.2 c）。水滴を生成するには微小流路内壁を疎水性に、油滴を生成するには微小流路内壁を親水性にする必要がある。本実験では、用いた微小流路の構造を図 3.2 a に示す。この微小流路の上流の十字部を疎水性（図 3.2 a（左側））および下流のシース部を親水性（図 3.2 a（右側））に処理した。親水・疎水性の処理を施した微小流路を用いることで、水滴と油滴およびそれらから構成される W/O/W エマルション液滴を生成した。微小流路の部分的な親水化および疎水化は、シラン化合物である octadecyl trichlorosilane (OTS) と紫外線照射器を用いて実施できることが知られている[21, 86, 87]。本手法では、ガラス製の微小流路が OTS 溶液に接触すると疎水化し、疎水化された部分に紫外線を照射するとその部分が親水化する。この表面処理方法を利用して、以下の順に微小流路内部の親水化および疎水化処理を行った。

- 1) 1% (v/v) OTS/トルエン溶液を調製
- 2) 純水、エタノール、アセトン、トルエンをこの順に微小流路に導入
- 3) 1% (v/v) OTS/toluene 溶液を微小流路内に導入し 15 分静置（全面的疎水化）
- 4) トルエン、アセトン、エタノール、純水をこの順に微小流路に導入
- 5) 微小流路内の純水をエアパージ
- 6) 疎水化する部分にアルミ箔でマスク
- 7) マスクされていない部分に 2 時間紫外線照射（部分的親水化）

本実験で用いた微小流路の寸法は、深さは全て 100  $\mu\text{m}$ 、幅は液体導入部が 100  $\mu\text{m}$ 、排出部が 300  $\mu\text{m}$  だった。微小流路の送液/排出口を、テフロンチューブを用いてシリンジと

---

接続した。液滴を生成するために用いた各液体を、シリンジに充填し、シリンジポンプによって一定流量で微小流路に導入した。

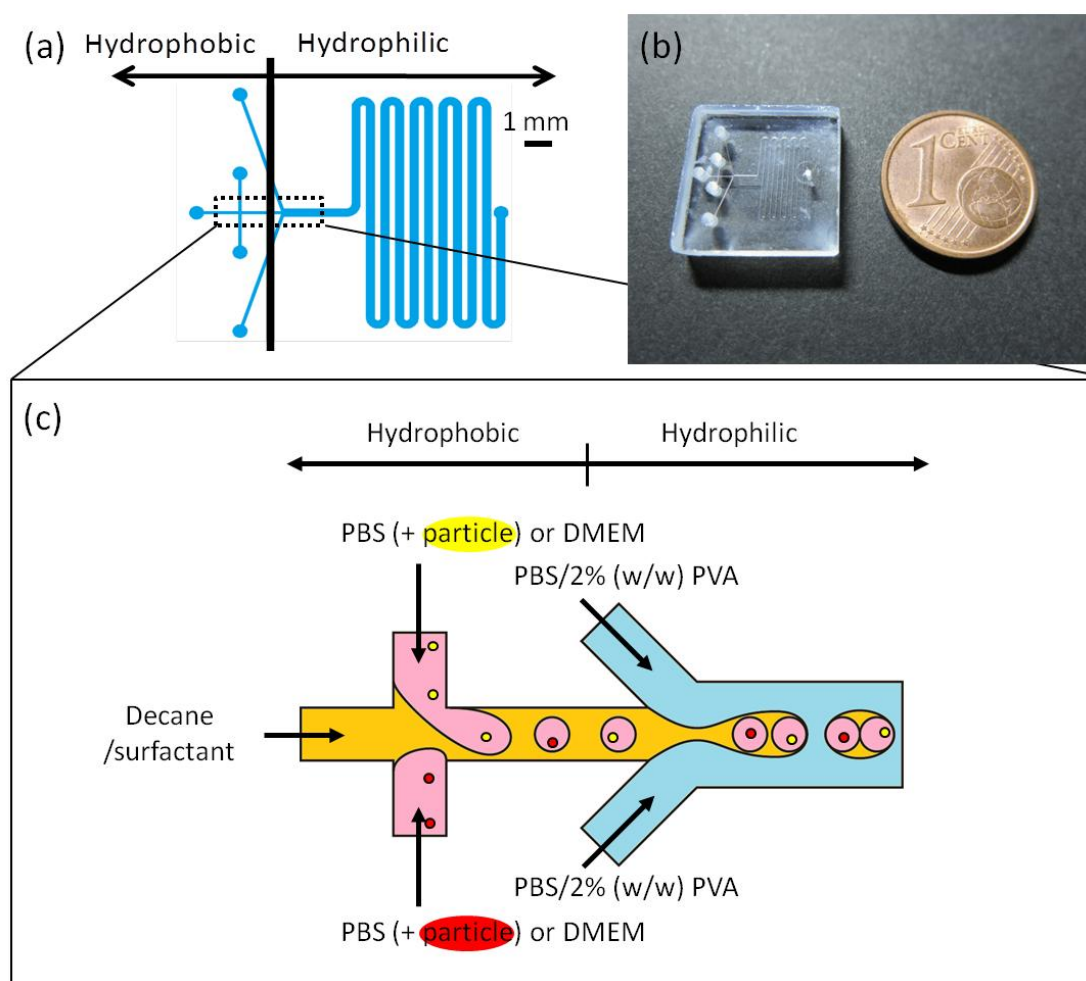


図 3.2 W/O/W エマルジョン液滴生成に用いた微小流路。(a)微小流路構造、(b)石英ガラス製微小流路チップ、(c)液滴生成概念図

### 3.3.2 W/O/W エマルション液滴を安定的に生成するための界面活性剤選定

異なる2種類の物質を1個ずつ内包した液滴を生成し1対1カプセル化を実現するには、微小流路により生成され回収された W/O/W エマルション液滴が以下の条件を満たす必要があった。

- ・油滴は合一させず、内水相液滴だけ合一させる
- ・内水相液滴を油滴内に保持する

これらを達成するため、異なる界面活性剤を油相に添加し、それぞれの界面活性剤における回収後の液滴の状態を確認した。油相に添加する界面活性剤は、界面活性剤の親水性・疎水性を示す指標である hydrophile-lipophile balance (HLB) 値の異なるもの、および重合の有無（モノマーもしくはポリマー）から選択した以下のものを用いた（表 3.1）。なお、HLB 値とは、Griffin によって提唱された、界面活性剤が水および油のいずれに溶けやすいかを示す指標である[88]。界面活性剤は、HLB 値が小さいほど水溶性、大きいほど油溶性を示す。

- ・SPAN 85 : HLB 値 1.8、モノマー
- ・SPAN 80 : HLB 値 4.3、モノマー
- ・SY-グリスターCRS-75 : HLB 値 3、ポリマー

界面活性剤を、それぞれ一 종류ずつ油相であるデカンに添加し、各界面活性剤を 1% (w/w) ずつ添加した三種類の油相を調製した。さらに、モノマーとポリマーの二種類の界面活性剤を添加した油相における液滴の状態を確認するため、1% (w/w) SPAN 80 および 0.5 % (w/w) SY-グリスターCRS-75 を添加したデカンを調製した。これらの油相を、シリンジに充填し、シリンジポンプにより微小流路へ送液した。本実験では、内水相として細胞培養液 (DMEM) を用いた。

表 3.1 油相に添加した界面活性剤の種類と HLB 値

| Surfactant added to organic phase                     | Hydrophile-lipophile balance (HLB) value |
|---|--|
| (a) None  | —  |
| (b) 1 % (w/w) SPAN 85                                 | 1.8                                      |
| (c) 1 % (w/w) SY-Glyster CRS-75                       | 3  |
| (d) 1 % (w/w) SPAN 80                                 | 4.3                                      |
| (e) 1 % (w/w) SPAN 80 + 0.5 % (w/w) SY-Glyster CRS-75 | 4.3, 3                                   |

### 3.3.3 蛍光粒子を内包した W/O/W エマルション液滴の生成

W/O/W エマルション液滴に内包する物質として、励起波長の異なる 2 種類の蛍光粒子(培養液中で懸濁された細胞のモデルとして)を用いた。それぞれの蛍光粒子の懸濁液を、それぞれ別のシリンジに充填した。図 3.2 c に、表面処理を施した微小流路内における W/O/W エマルション液滴の生成プロセスの概念図を示す。蛍光粒子を内包した W/O/W エマルション液滴生成するため、以下の試薬を調製した。なお、「内水相液滴」「油相」「外水相」は、図 3.1 の位置関係をとる。

- ・W/O/W エマルション液滴に内包される水滴(内水相液滴)：蛍光粒子 ( $10^5$  particles/mL) を懸濁した生理食塩水 (PBS)
- ・内水相液滴を包み込む油滴(油相)：界面活性剤 SY-グリスターCRS-75 を添加したデカン
- ・W/O/W エマルション液滴を包み込む水相(外水相)：界面活性剤の 2 % (w/w) ポリビニルアルコール (PVA) を添加した PBS

液滴が生成する様子を、正立型顕微鏡に設置した高速度カメラによって観察・撮影した。生成された蛍光粒子を内包する W/O/W エマルション液滴を、位相差顕微鏡に設置した CCD カメラおよび共焦点顕微鏡システムによって観察・撮影した。画像解析ソフト (Image-Pro Plus、Media Cybernetics) 用いて液滴サイズを測定した。

### 3.4 結果と考察

#### 3.4.1 W/O/W エマルション液滴の生成：流量による内水相液滴の内包数の制御

OTSにより微小流路内部全体が疎水化された。つづいて、微小流路の下流のみ親水化するため(図 3.2 a)、上流側をアルミ箔でマスクして下流のシース部へ2時間の紫外線照射を行った。紫外線照射を施すことで、OTSによって疎水化された微小流路内壁においてシラノール基(Si-OH)が形成される[89]。その結果、微小流路内の紫外線照射された箇所のみ親水化される。親水化・疎水化処理した微小流路を用いてW/O/Wエマルション液滴を生成した様子を図 5.2a に示す。液滴は以下の二段階の工程で生成された。

1) 微小流路上流の十字部において、内水相(DMEM)液滴が界面活性剤を添加したデカン中に生成

2) 微小流路下流のシース部において、内水相液滴を内包した油滴(W/O/Wエマルション液滴)が界面活性剤PVAを添加したPBS中に生成

上流の十字部では、液滴が交互に1個ずつ生成される「交互液滴生成」現象が観察された(図 3.3 a)。Hungらの報告によると、交互液滴生成では、向かい合った内水相が互いに"push-pull"を一定周期で繰り返す("push-pull"メカニズムと呼ばれる)[90]。本実験においても、push-pullが生じてそれが安定化されることにより、サイズの揃ったW/O/Wエマルション液滴が連続的に生成されたと考えられる。

油滴に内包される内水相液滴の数は、送液した各液体の流量によって制御できる[86]。そこで、一つの油滴に二つの内水相液滴を内包したW/O/Wエマルション液滴を生成するため、流量に対する内包される内水相液滴の個数を確認した。本手法を1細胞計測に応用する場合には内水相に懸濁させる物質が、特別な細胞や試薬などのように貴重もしくは高価なものになることが想定された。少量の試料液体から液滴を生成する場合、試料液体を微小流

路に送液してから液滴生成が安定するまでなどの待機時間では、生成された液滴は回収せずにそのまま排出する。排出されて無駄になってしまう試料液体の量を減らすためには、流量を低く設定する必要がある。既往研究[91]では、1.5~6 mL/h の内水相流量において、2個の内水相液滴を内包した W/O/W エマルション液滴を生成できることが報告されている。そこで本研究では、内水相流量を 1.5 mL/h に固定し、外水相および油相の流量のみ変化させることとした。内水相液滴の個数は、流量設定後から 5 分経過した時点で計測した。図 3.4 に、油相の流量を三段階にそれぞれ固定した条件における、外水相流量に対する内水相液滴の内包数を示す。内水相液滴の内包数が一定になる流量を確認するため、内水相液滴の内包数が不安定になる流量条件を除外した。なお、外水相が 8 mL/h 以下、および 20 mL/h 以上におけるデータは、以下の理由から図 3.4 に記載しなかった。(1) 外水相が 8 mL/h 以下では、それ以上の流量の時とは異なり、W/O/W エマルション液滴の生成 (せん断) が、

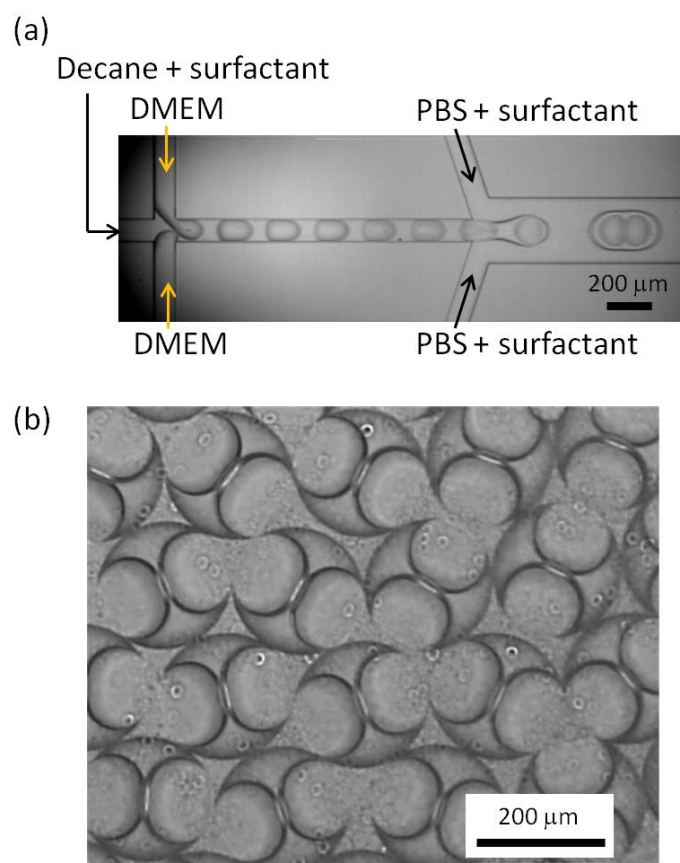


図 3.3 高速度カメラによって撮影した液滴生成の顕微鏡写真(a)、生成された W/O/W エマルション液滴(b)

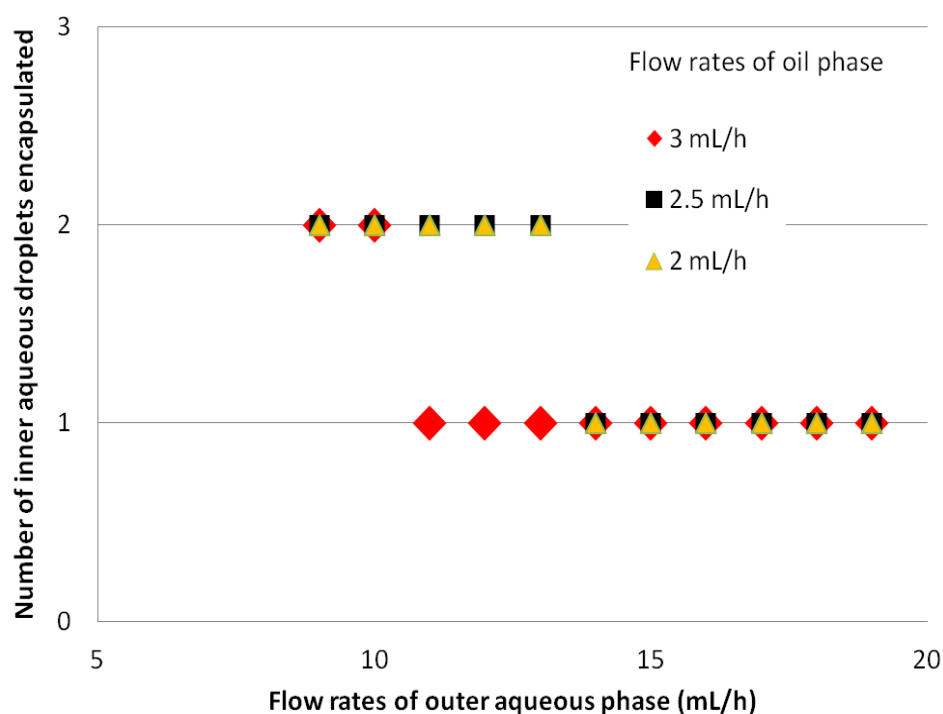


図 3.4 外水相流量に対する内水相液滴の内包数

下流の合流部よりもさらに数ミリメートル下流で生じた。この時、液滴生成は不安定となり、内包液滴数のばらつきが大きくなったためグラフには記載しなかった。(2) 外水相が 20 mL/h 以上では、内包液滴のサイズに差が見られるようになったためグラフには記載しなかった。得られた結果から、内水相、油相、外水相流量を適切に調節することで、2 個の内水相液滴が油滴に内包された W/O/W エマルション液滴が生成されることが確認された。

### 3.4.2 各種界面活性剤に対する W/O/W エマルション液滴の安定性

#### 3.4.2.1 HLB 値に基づく考察

油相に添加した界面活性剤の HLB 値による、W/O/W エマルション液滴の安定性の違いを確認した。表 3.2 に、油相に添加した界面活性剤に対する液滴生成の結果を示す。界面活性剤を添加した油相を用いた場合では、いずれの界面活性剤を添加した条件においても、



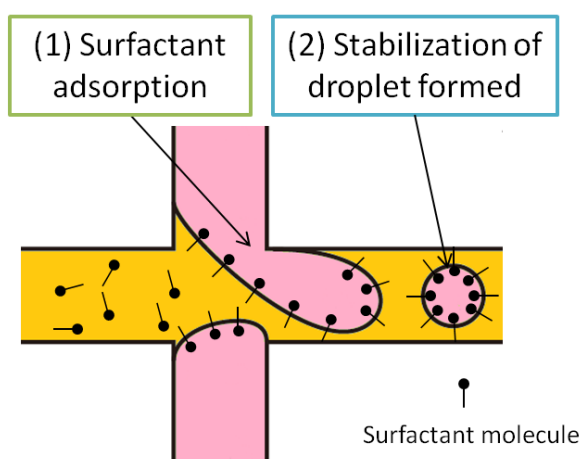


図 3.5 界面への界面活性剤の吸着と液滴の安定化を示した概念図

微小流路内では W/O/W エマルション液滴が連続的に生成された。一方、界面活性剤を添加していない油相を用いた場合では、W/O/W エマルション液滴は生成されなかった。以上の結果が得られたのは、界面活性剤分子が以下のような働きを示したためと考えられる（図 3.5）。

1) 連続相（本実験における油相）に添加された界面活性剤の分子は、液滴を形成する分散相（本実験における内水相）と連続相の界面に素早く吸着し、界面活性剤の分子膜を形成する

2) 形成された界面活性剤分子膜が、生成過程の液滴界面の機械的強度を高めながら、膜に包まれた液滴が安定して生成される

界面活性剤を油相に添加しない場合は、以上の現象が起こらないため、液滴が生成されなかったと考えられる。

以上のように、いずれの HLB 値の界面活性剤を用いた場合でも、微小流路内で W/O/W エマルション液滴が生成された。しかし、生成された液滴を、液滴に用いたものと同じ組成の外水相をあらかじめ注いだポリスチレンディッシュに回収する（付録 C 参照）と、回収後に以下の異なる現象が確認された。

1) HLB 値が比較的低い界面活性剤 (SPAN 85、HLB 値 : 1.8) を用いたとき、生成された W/O/W エマルション液滴は、回収後すぐに内水相液滴が外水相に飛び出して外水相に溶けこみ、外水相中に油滴だけが残された (表 3.2 右列上から 1 つ目の写真)

2) HLB 値が比較的高い界面活性剤 (SPAN 80 (HLB 値 : 4.3)、SY-グリスターCRS-75 (HLB 値 : 3)) をそれぞれ用いたとき、生成された W/O/W エマルション液滴は、回収後数十分以上、内水相液滴の飛び出しや合一を起こさずに安定に保たれた (表 3.2 右列上から 2 つ目の写真)

3) HLB 値が比較的高いモノマーの界面活性剤 (SPAN 80) およびポリマーの界面活性剤を (SY-グリスターCRS-75) を混合して用いたとき、生成された W/O/W エマルション液滴は、1)と同様に回収後数すぐに内水相液滴が外水相に飛び出して外水相に溶けこみ、外水相中に油滴だけが残された (表 3.2 右列上から 3 つ目の写真)

一般に、連続相 (本実験における油相) に添加した界面活性剤の HLB 値が大きいほど、液滴の合一が起こりにくくなる[92]。そのため 1)および 2)の結果から、本実験で生成された W/O/W エマルション液滴においては、液滴を合一させずに保持できる HLB 値の境界が 1.8 から 4.3 の間にあることが確認された。また、モノマーもしくはポリマーの界面活性剤分子が単独で存在する場合、液滴界面にその分子が集合して層を作ることで液滴界面を安定化する。その一方で、液滴の界面にモノマーおよびポリマーの界面活性剤分子が共存すると分子の集合を互いに阻害しあうため、液滴界面が不安定になることが知られている[92] (図 3.6)。そのため 3)の結果においても既存の知見と同様に、モノマーとポリマーの界

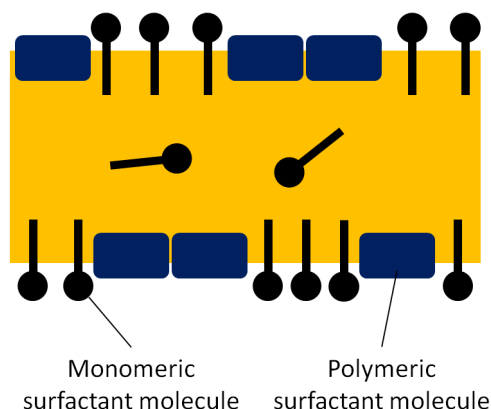

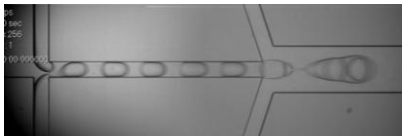
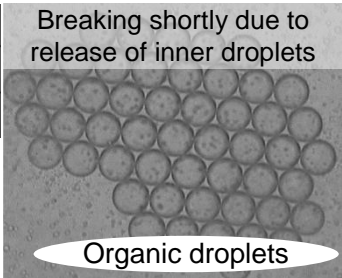
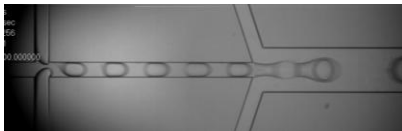
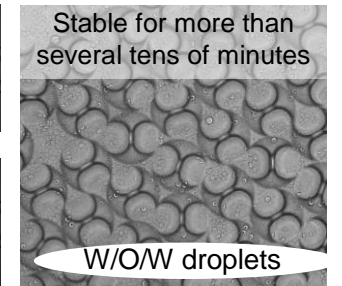
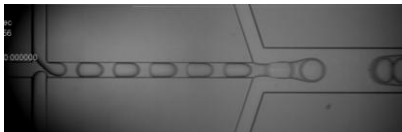
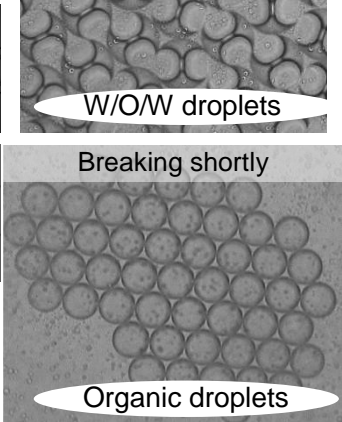
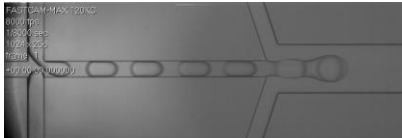


図 3.6 モノマー界面活性剤とポリマー界面活性剤が共存する界面の概念図

面活性剤による影響から液滴界面の不安定化させ、結果として W/O/W エマルション液滴の状態を保つことができなくなつたと考えられる。以上の HLB 値および重合の有無の観点から行った実験から、モノマーとポリマーのいずれの界面活性剤の場合でも、3 もしくは 4.3 の HLB 値をもつ一種類の界面活性剤を油相に添加することで、W/O/W エマルション液滴を安定に生成できることが確認された。

表 3.2 液滴生成および生成後の液滴の安定性に対する界面活性剤の影響

| Surfactant added to organic phase                     | Droplet generation   | Stability of droplets collected off chip (photographs show result examples on each condition)  |
|---|--|--|
| (a) None  |   |  |
| (b) 1 % (w/w) SPAN 85                                 |  | <p>Breaking shortly due to release of inner droplets</p>  <p>Organic droplets</p> |
| (c) 1 % (w/w) SY-Glyster CRS-75                       |  | <p>Stable for more than several tens of minutes</p>  <p>W/O/W droplets</p>        |
| (d) 1 % (w/w) SPAN 80                                 |  | <p>Breaking shortly</p>  <p>Organic droplets</p>                                  |
| (e) 1 % (w/w) SPAN 80 + 0.5 % (w/w) SY-Glyster CRS-75 |  |  |

### 3.4.2.2 拡張係数に基づく考察

既往研究では、平衡状態において三相系（例、W/O/W エマルション液滴）がとる形態を予測するため、界面張力により求められる拡張係数が用いられている[93, 94]。液体  $i$ 、 $j$ 、 $k$  における拡張係数 ( $S$ ) は、界面張力 ( $\gamma$ ) を用いて以下の式で表される。

$$S_i = \gamma_{jk} - (\gamma_{ij} + \gamma_{ik}) \quad (3.1)$$

また、以下のフォークスの式[95]を用いて、表面張力 ( $\sigma$ ) から界面張力が求められる。

$$\gamma_{ij} = \sigma_i + \sigma_j - 2(\sigma_i \times \sigma_j)^{\frac{1}{2}} \quad (3.2)$$

各界面張力から求められた拡張係数の正負から、三相系がとる形態を以下のように予想することができる（図 3.7）[93]。なお、ここでの「連続相」は本実験における外水相にあたる。

- 1)  $S_1 < 0$ 、 $S_2 > 0$ 、 $S_3 < 0$  のとき、相 1 の液滴と相 3 の液滴が相 2 の連続相中に独立して存在 (non-engulfing)
- 2)  $S_1 < 0$ 、 $S_2 < 0$ 、 $S_3 > 0$  のとき、相 1 の液滴と相 3 の液滴に内包された状態で相 2 の連続相中に存在 (complete engulfing)
- 3)  $S_1 < 0$ 、 $S_2 < 0$ 、 $S_3 < 0$  のとき、相 1 の液滴が相 3 の液滴に部分的に内包された状態で相 2 の連続相中に存在 (partial engulfing)

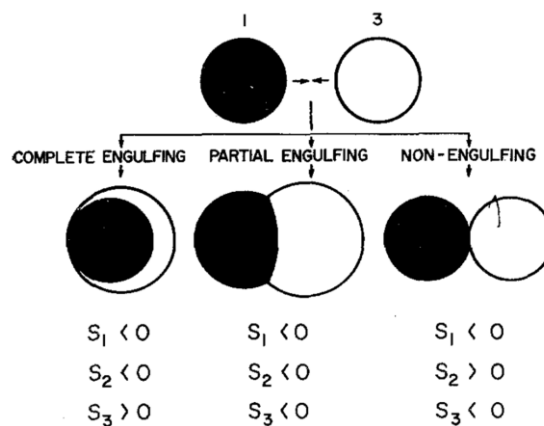


図 3.7 拡張係数に対して平衡状態の液滴が取りうる形態

Reprinted from Journal of Colloid and Interface Science, Vol. 33, S. Torza and S. G. Mason, Three-phase interactions in shear and electrical fields, pp. 67-83. Copyright 1970, with permission from Elsevier.

本実験では、生成された W/O/W エマルション液滴の平衡状態における安定性を評価するため、表面張力を測定し、拡張係数の正負を求めた。表 3. 3 に W/O/W エマルション液滴を生成するために用いた液体試薬の表面張力および求めた拡張係数を示す。いずれの組み合わせにおいても、平衡状態でとりうる形態は、**complete engulfing** であることが確認された。この結果から、本実験で用いた試薬の組み合わせ(表 3. 3)により生成された W/O/W エマルション液滴は、いずれも平衡状態では W/O/W エマルション液滴の形態をとることが確認された。一方で、油相に SPAN85 もしくは SPAN80 と SY-グリスターCRS-75 を添加して生成された W/O/W エマルション液滴は、拡張係数の正負からは **complete engulfing** の形態をとると予想されるが、先にも述べたように回収後すぐに **non-engulfing** の形態をとった(表 3.2 参照)。したがってこれらの条件では、界面張力(拡張係数)の影響よりも液滴界面における界面活性剤分子の挙動(3.4.2 参照)による影響が支配的になったと考えられる。以上から、一定以上の HLB 値をもつ単一の界面活性剤を用いて拡張係数の正負を適切に調整することで、2 個の内水相液滴を内包した W/O/W エマルション液滴を安定化できることが確認された。

### 3.4.3 1対1カプセル化に向けた粒子のカプセル化

内水相液滴に蛍光粒子を内包させた W/O/W エマルション液滴を生成するため、蛍光粒子を懸濁させた内水相(PBS)を用いて W/O/W エマルション液滴の生成実験を行った。本研究では、2 個の粒子を 1 対 1 で内包した状態を液滴中に作製することを目的としている。そこで、2 本のシリンジの内水相に 2 種類の蛍光粒子をそれぞれ懸濁させて、微小流路に送液した。流量条件は、3.4.1 と同様に既往研究[91]および図 3.4 の結果をもとに、内水相：1.5 mL/h、油相：3 mL/h、外水相：10 mL/h として各液体を微小流路に送液することで、平均直径：194  $\mu\text{m}$ 、coefficient of variation (CV)：2%以下、生成速度： $1 \times 10^3$  Hz の W/O/W エマルション液滴が生成した(図 3.8 a)。生成した W/O/W エマルション液滴のうち、蛍光粒子を内包した W/O/W エマルション液滴の 20%が 1 対 1 で蛍光粒子を内包していた(図 3.8 b)。また、W/O/W エマルション液滴を生成し回収後ただちに自発的な内水相液滴の合

個ずつ内包した状態が作り出された（図 3.8 c）。以上から、本実験における W/O/W エマルション液滴生成法が、ハイスループットな 1 対 1 カプセル化法として利用可能であることが確認された。

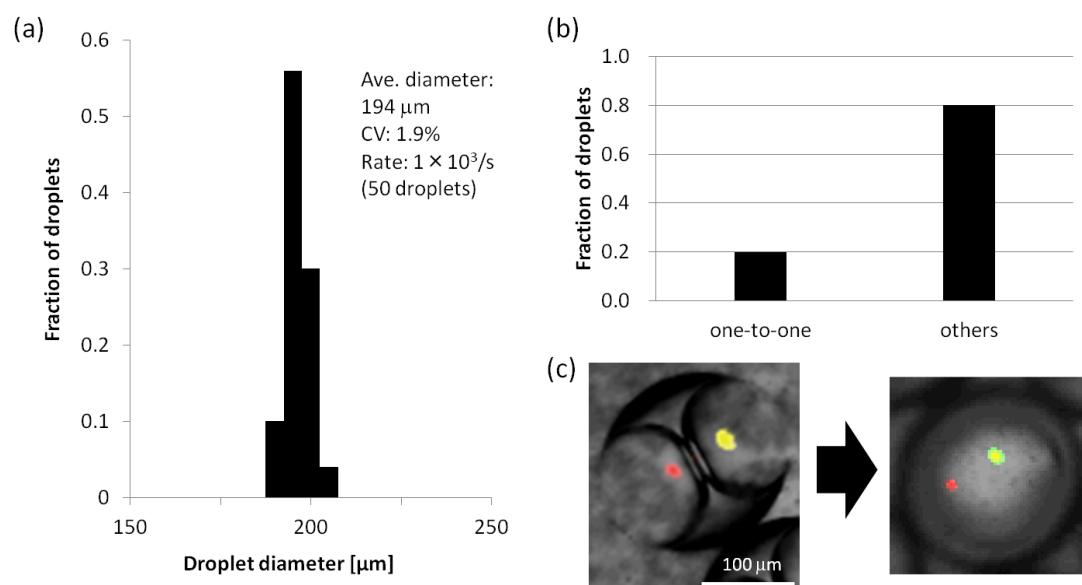


図 3.8 1 対 1 で蛍光粒子を内包した W/O/W エマルション液滴。(a)W/O/W エマルション液滴の直径のヒストグラム、(b)1 対 1 で蛍光粒子を内包した W/O/W エマルション液滴の割合、(c)1 対 1 カプセル化液滴の共焦点顕微鏡写真。内水相液滴合一の前後

表 3. 3 界面張力と拡張係数（界面張力は表面張力の測定値<sup>a</sup>から計算した）

| Phase 1        | Phase 2   | Phase 3          | $\gamma_{12}$ | $\gamma_{13}$ | $\gamma_{23}$ | $S_1$ | $S_2$ | $S_3$ | Morphology         |
|----------------|---|------------------|---------------|---------------|---------------|-------|-------|-------|--------------------|
| DMEM           | Decane/1% (w/w)<br>SPAN80                                   | PBS/2% (w/w) PVA | 13.3          | 4.24          | 2.53          | -15.0 | -11.6 | 6.55  | Complete engulfing |
| DMEM           | Decane/1% (w/w)<br>SPAN85                                   | PBS/2% (w/w) PVA | 13.3          | 4.24          | 2.53          | -15.0 | -11.6 | 6.55  | Complete engulfing |
| DMEM           | Decane/1% (w/w)<br>SY-Glyster CRS-75                        | PBS/2% (w/w) PVA | 13.5          | 4.24          | 2.61          | -15.1 | -11.9 | 6.65  | Complete engulfing |
| DMEM           | Decane/1% (w/w)<br>SPAN80 + 0.5% (w/w)<br>SY-Glyster CRS-75 | PBS/2% (w/w) PVA | 13.6          | 4.24          | 2.64          | -15.2 | -12.0 | 6.69  | Complete engulfing |
| PBS + particle | Decane/1% (w/w)<br>SY-Glyster CRS-75                        | PBS/2% (w/w) PVA | 13.3          | 4.12          | 2.61          | -14.8 | -11.8 | 6.56  | Complete engulfing |

<sup>a</sup> DMEM: 71.6 mN/m, PBS + particle: 71.1 mN/m, Decane/1% (w/w) SPAN80: 23.1 mN/m, Decane/1% (w/w) SPAN85: 23.1 mN/m, Decane/1% (w/w) SY-Glyster CRS-75: 22.9 mN/m, Decane/1% (w/w) SPAN80 + 0.5% (w/w) SY-Glyster CRS-75: 22.8 mN/m, PBS/2% (w/w) PVA: 71.6 mN/m (Temperature: 21° C)

### 3.5 結論

本章では、表面処理を施した微小流路から交互に生成された液滴を用いることにより、液滴中への粒子の1対1カプセル化法を開発した。本研究は、double phase マイクロカプセルの開発として位置付けられる。本手法の特徴は、微小流路による液滴生成法が得意とする精密な液滴生成制御技術を利用することにより、内包液滴数が精密に制御された液滴に内包物質を1個ずつ閉じ込め、外部環境から内包物質を隔離できることである。生成したW/O/W エマルション液滴は、直径：約 200  $\mu\text{m}$ 、CV：1.9%、生成速度： $1 \times 10^3$  Hz であった。また、蛍光粒子を内包した W/O/W エマルション液滴の 20%が 1 対 1 で蛍光粒子を内包することができた。さらに、生成した W/O/W エマルション液滴は油相に添加する界面活性剤の種類を適切に選ぶ（HLB：3 もしくは 4.3、かつ一種類の界面活性剤）ことで安定化することできた。以上のように、本手法を用いることで、微小流路の集積化や大面積化をせずに、1 対 1 カプセル化液滴をハイスループットに生成できた。

本手法は以下の応用が期待される。

- 1) 本実験における 2 種類の蛍光粒子を 2 種類の細胞に置き換えて 1 対 1 で液滴中に内包することにより、外部環境から隔離された単一細胞レベルの共培養系が実現できる
- 2) 上記の共培養系をセルソーターと組み合わせることでハイスループットスクリーニングが実現できる

前章および本章において、微小流路を用いた新規の機能性マイクロカプセルの開発を行った。機能性マイクロカプセルを開発するには、マイクロカプセルそのものだけではなく、マイクロカプセルを生成する装置である微小流路の検討もまた重要である。そこで次章では、新たな微小流路の rapid prototyping 手法について述べる。



## 第4章 微小流路の rapid prototyping 手法の開発 1 : ゲル鑄型 を用いた “lithography-free” の微小流路作製法の開発

## 4.1 概要

第2章、第3章では、微小流路を用いた新たな機能性マイクロカプセルの開発を行った。本章では、マイクロカプセルの生成に用いる微小流路の rapid prototyping 手法について述べる。具体的には、ゲルを鋳型として用いることにより、フォトリソグラフィーを必要とせずに("Lithography-free")、三次元的で滑らかな壁面を持つ微小流路を PDMS 中に作製する方法について述べる。ゲルの中でも特に加熱／冷却による溶解／ゲル化の操作が簡単に適用でき、安価でかつ化学的にも安定で手作業でも取り扱い易いゲル強度をもつ、低融点アガロースゲル（アガロース L（和光純薬）、融点：65° C 前後、ゲル化点：30° C 前後）を一連の技術開発のためのプロトタイプ材料として選択した。このゲルを鋳型として直接シリコンゴムに埋め込む方式による微小流路の作製法について検討した。

実験では、市販のガラス管（生理学実験などで多用される外径 1 mm 前後のガラスキャピラリー）からの押し出しや、ゲルのプレートからの切り出しによって、太さ数百  $\mu\text{m}$  のゲルのワイヤー（「マイクロところてん」ともいえるもの）やゲルのチップ（小片）を、全て手作業で調製した。これらを未硬化のシリコンゴム原液の中で繋ぎ合わせ、シリコンゴムを硬化させたうえで市販のバイオブシーパンチで流体の導入／排出のための穴を開け、そこから湯を流し込んでゲルを洗い流した。こうした方法で、さまざまな立体的形状の微小流路を作製できることを確認した。

以上の方法で作製した微小流路について、その内部の構造、内壁面の形状、ならびにゲルが、水分を含んだ材料であることに起因する鋳型の乾燥収縮について評価するとともに、実際に流体（着色した水）を流して流路中に形成される流れパターンを観察した。続いて、内壁面の表面の性質を、水への濡れ性、という観点から評価した。この濡れ性については、デバイスの構造材料そのものからの影響と、デバイス作製後のコート剤による表面処理の影響について確認した。また、デバイスの微小流体プロセスへの応用の一例として、これらのデバイスで液滴の生成が可能であること、ガラス管を埋め込むことで Water-in-Oil-in-Water (W/O/W) エマルション液滴が生成可能であることを確認した。最

後に、本プロセスを費用の観点からも評価し、本プロセスが低コストかつ環境に優しい "Lithography-free process" であることを確認した。本手法は、従来の微小流路作製法であるフォトリソグラフィーにはない技術的メリット（円形断面形状や立体交差の作製が可能であること）を持った、新しい微小流路の rapid prototyping 手法である。

## 4.2 器具と試薬

本実験では以下の器具および試薬を用いた。

試薬：

- ・ poly(dimethylsiloxane) (PDMS) 硬化キット (SILPOT 184、東レ・ダウコーニング)
- ・ 低融点アガロース (アガロース L、和光純薬)
- ・ グリセロール (和光純薬)
- ・ 食用色素 赤色 102 号 (東京化成)
- ・ 食用色素 青色 1 号 (東京化成)
- ・ 食用色素 黄色 4 号 (東京化成)
- ・ シグマコート (SIGMA)
- ・ シリコンオイル (KF-96 0.65 cSt、信越シリコン)
- ・ ミネラルオイル (SIGMA)
- ・ 界面活性剤 SY-グリスターCRS-75 (阪本薬品工業)
- ・ フルオレセインナトリウム (和光純薬)

器具：

- ・ 35mm 細胞培養用ポリスチレンディッシュ (Non-treated, Corning)
- ・ 60mm 細胞培養用ポリスチレンディッシュ (Non-treated, Corning)
- ・ 角型ポリスチレンケース (5 型, アズワン)
- ・ フタ付き三角フラスコ (IWAKI 4985FK100-28、旭硝子)
- ・ 1.5mL エッペンチューブ (Eppendorf)
- ・ 50mL 遠沈チューブ (アズワン)
- ・ ガラス管 (内径：1.16 mm、外径：2.00 mm) (B200-116-15、Sutter Instrument)
- ・ ガラス管 (内径：0.60 mm、外径：1.0 mm) (G-1、ナリシゲ)
- ・ ガラス管 (内径：0.30 mm、外径：1.0 mm) (特注品、サンエール)

- ・ バイオプシーパンチ（先端直径 1.5mm、Harris Uni-Core、GE ヘルスケア）
- ・ シリンジ（10 ml 容量、テルモ）
- ・ 手動型真空デシケーター（Desi-Vac Vacuum Pump Container, Fisher Scientific）
- ・ マイクロピペット（ピペットジーン 20 ~ 200  $\mu\text{L}$ , 東京硝子工業）
- ・ マイクロピペット（ピペットジーン 100 ~ 1000  $\mu\text{L}$ , 東京硝子工業）
- ・ マイクロピペット（ピペットジーン 500 ~ 5000  $\mu\text{L}$ , 東京硝子工業）
- ・ ピペットチップ（200 $\mu\text{L}$  イエローチップ, イナオプティカ）
- ・ ピペットチップ（1000 $\mu\text{L}$  ブルーチップ, イナオプティカ）
- ・ ピペットチップ（5000 $\mu\text{L}$  ホワイトチップ, イナオプティカ）
- ・ テフロンチューブ（外径 1.15mm, 内径 0.5 mm, アズワン）
- ・ シリコンチューブ（外径 2 mm, 内径 1 mm, アズワン）
- ・ はさみ
- ・ 解剖用メス（Scalpel No.11、秋山作製所）
- ・ ダイヤモンドペン（D-POINT-PEN、ケニス）
- ・ ピンセット（Dumostar Tweezers No.5、Dumont）
- ・ 方眼目盛付きカッティングボード
- ・ ダストブロワー
- ・ 洗瓶

機器：

- ・ 実験用オーブン（55° C, 75° C に設定可能な機種）
- ・ デジタルはかり（0.1 g 刻みで計量可能な機種）
- ・ 電気ケトル（家庭用）
- ・ シリンジポンプ（TE-351、テルモ）

光学機器：

- ・ 走査型電子顕微鏡（VE-8800、キーエンス）
- ・ 倒立型顕微鏡（IX-71、オリンパス）（位相差観察および蛍光観察の設定で使用）

- ・ 正立型システム顕微鏡 (BX-50、オリンパス) (透過光観察の設定で使用)
- ・ 双眼実体顕微鏡 (SZX-7、オリンパス)
- ・ デジタルカメラ ( $\mu$ -Tough 8010、オリンパス)
- ・ 顕微鏡装着型 CCD (Charge Coupled Device) カメラ (DP-70、オリンパス)
- ・ 高速度カメラ (Fastcam-Max 120KC、フォトロン)
- ・ 冷却 CCD カメラ (C8800-21C、浜松ホトニクス)

### 4.3 実験

#### 4.3.1 ゲル鋳型を用いた PDMS 製微小流路の作製

はじめに、今回新たに考案した、ゲル鋳型を用いた PDMS 製微小流路の作製工程の概略を述べる。図 4.1 に、微小流路の作製工程の全体像を示す。本工程は、以下の3つの工程からなる。

- 1) ゲルチップの作製 (図 4.1 a,b)
- 2) ゲルワイヤーの作製 (図 4.1 c-f)
- 3) PDMS の鋳造 (図 4.1 g-m)

全工程の概要は以下のようになる。まず、ゲル鋳型のパーツとなるゲルチップ（1辺の長さ：2 ～ 3 mm、厚さ：約 1 mm）およびゲルワイヤー（長さ：数 cm、直径 250  $\mu$ m 以上）を、それぞれ、切り出しと押し出しによって作製する（図 4.1 a,c-e）。次に、ピンセットや紙のこよりを使ってそれらをピックアップし（図 4.1 b,f）、細胞培養用ディッシュに移す（図 4.1 h,i）。そのディッシュに硬化前の PDMS を注ぐ（図 4.1 j）。ディッシュをオーブン内に移し、ゲルの融点（65° C 前後）以下の温度（55° C）で数時間加温静置することで PDMS を硬化した（図 4.1 k）。その後、さらに 75° C 前後まで加温してゲル鋳型を溶解する。加温したディッシュをオーブンから取り出し、硬化した PDMS にバイオプシーパンチで数個の穴（Inlet/outlet port）を開ける。そのうちの一つの穴からシリンジで湯を流し込むことでゲル鋳型を洗い去る（図 4.1 l）。結果として、ゲルワイヤーが占めていた部分が細長い空洞、つまり、微小流路として PDMS の内部に残る（図 4.1 m）。以下 4.3.1.1 ～ 4.3.1.4 に準備からデバイスの完成までの詳細を述べる。

なお、本実験で用いたゲルは、融点アガロースゲル（アガロース L（和光純薬）、融点：65° C 前後、ゲル化点：30° C 前後）であった。このゲルを選択した理由は、ゲルの中で

も特に加熱／冷却による溶解／ゲル化の操作が室温下でも簡単に実施でき、安価でかつ化学的にも安定で手作業でも取り扱い易いゲル強度をもつためであった。

#### 4.3.1.1 アガロースゲルの調製

アガロースゲル（厳密には、そのもととなるアガロース水溶液）は、濃度が 3% (w/v)（本濃度は予備実験により操作性しやすいゲル強度を検討した上で決定した）となるように、以下の方法で調製した。

1) 16% (v/v) グリセロール水溶液を調製し、そこへ 0.5 mg/mL となるように 食用色素（赤）を加える。これにより、色のついたグリセロール水溶液（50 mL）を調製する。グリセロール添加の理由は、調整するアガロースゲルの比重を増加させることで後述の工程 2.3.1.4 において PDMS 中でゲル鑄型が浮き上がらないようにするためと、実験操作中のゲル小片の乾燥をある程度防止するためである。また、食用色素の添加の理由は、以降の工程の全般に渡って PDMS 中に埋め込まれたゲル小片を視認し易くするためである。

2) 0.90 g のアガロース粉末を入れた蓋つき三角フラスコ（容量 100 mL）に 30 mL の着色グリセロール水溶液（1 で調製したもの）を注ぐ。ただちにふたを閉めてフラスコを激しく振ることで攪拌し、アガロース粉末に着色グリセロール水溶液を吸わせて膨潤させる。結果として、3% (w/v) のアガロース懸濁液が得られる。この時点ではアガロースは溶解していない。

3) 2) の懸濁液を電子レンジで加熱し、沸騰したらただちに取出して穏やかにフラスコを振る、という操作を数回繰り返す。懸濁したアガロース微粒子を完全に溶解し、透明で均一なアガロース水溶液を得る。このとき、必ず三角フラスコの蓋を外した状態で行い、ラテックス手袋を装着して手を火傷から守る。また、アガロース水溶液の突沸に注意する。

以上のようにして調製したアガロース水溶液は、室温以下 (< 30° C) に冷やすことでゲルを形成し、融点以上 (> 65° C) に温めることで再溶解する。三角フラスコ内に得られたアガロース水溶液は室温以下に冷やしてゲル化させ、蓋をして密閉した状態で室温で保存



し、必要に応じて電子レンジで再溶解して以下の工程 4.3.1.2 で使用した。また、工程 4.3.1.3 では、そのアガロース水溶液の一部をフラスコから 1.5 mL エッペンドルフチューブに取り分けて使用した。着色グリセロール水溶液の残り (20 mL) も必要に応じて工程 (4.3.1.3) で使用した。

#### 4.3.1.2 ゲルチップの作製

ゲル鋳型のパーツの一部として使用するゲルチップは、以下の方法で作製した。

1) 3 mL のアガロース水溶液 ( $> 40^{\circ}\text{C}$ ) を 60 mm 細胞培養用ディッシュ底面に広げ、冷蔵庫で冷やす ( $4^{\circ}\text{C}$ 、10 分間) ことで平らなゲルプレート (厚さ: 約 1 mm) を作製する。

2) ゲルプレートを解剖用メスで小片 (チューブ外径よりも大きいサイズ。例: 3 mmx3 mm) に切り分ける。

図 4.1 a は、すでに切り目を入れられたゲルプレートの写真である。これらの切片を図 4.1 b のようにピンセットでピックアップし、以下の工程 4.3.1.4 にて流路の端末部 (バイオプシーパンチによってデバイスへの流体の導入/排出口が開けられる場所) を鋳造するための鋳型として使用した。

#### 4.3.1.3 ゲルワイヤーの作製

ゲル鋳型のパーツの一部として、流路自体の鋳型となるゲルワイヤーは、以下の方法で作製した。

1) シリコンチューブの小片を介してピペットに連結したガラス管の端をエッペンドルフチューブ内のアガロース水溶液 ( $> 40^{\circ}\text{C}$ ) の中に差し込み、ピペットで吸引する形でアガロース水溶液をガラス管内に吸い入れる (図 4.1 c)。

2) ガラス管をシリコンチューブから取り外し、全体を冷蔵庫で冷やし ( $4^{\circ}\text{C}$ 、5 分間)、ガラス管内でゲルを形成させる。

3) ガラス管に再びシリコンチューブを介してピペットを連結し、ピペットから陽圧をかけることでガラス管内のゲルを押し出す (図 4.1 d)。ここで、ピペットチップにあらかじめ 4.3.1.1 で調製した着色グリセロール水溶液を少量 (100  $\mu\text{m}$ ) 充填しておくことで、スムーズにゲルを押し出すことができる。また、シリコンオイルの入ったディッシ

ュを受け皿とすることで、押し出したゲル（ゲルワイヤー）を直ちにシリコンオイル中に保存し乾燥から守ることができる。ゲルワイヤーは次の工程 2.3.1.4 で使用するまでシリコンオイル中で保存した。

なお、本実験では以下のように太・中・細の三種類のガラス管を用いた。全てのガラス管は、あらかじめダイヤモンドペンを使用して 5 cm 前後の長さに切り分けてからゲルワイヤー成型のための型として使用した。

- ・ 太ガラス管：内径：1.16 mm、外径：2.00 mm
- ・ 中ガラス管：内径：0.60 mm、外径：1.0 mm
- ・ 細ガラス管：内径：0.30 mm、外径：1.0 mm

また、本工程で得られたゲルワイヤーは、次の工程 4.3.1.4 でゲル鋳型のパーツとして使用する。その際には、あらかじめ保存用ディッシュ内で図 4.1 e のようにピンセットとメスで目的の長さに切断した上でピックアップして鋳型として使用した。ゲルワイヤーのピックアップは、ピンセットで挟むのではなく、図 4.1 f に示すように、工程 4.3.1.1 で調製した着色グリセロール水溶液で湿らせたキムワイプのこよりをシリコンオイル中のワイヤーの末端に触れさせて吸着させることによって行った。本実験では、長いもので長さ 5 cm ほどのゲルワイヤー（直径約 1 mm）を持ち上げることが可能であった（このとき約 0.4  $\mu$ N の力がキムワイプの先端にはたらく）。これは水の表面張力を利用することで、機械的に脆弱なゲルワイヤーを切断してしまうことなくハンドリングするために考案した独自の方法である。

#### 4.3.1.4 PDMS の鋳造

以上の工程で作製したゲルチップならびにゲルワイヤーをピックアップし、未硬化の PDMS 中に埋めてつなぎ合わせてゲル鋳型とし、PDMS 内に微小流路を鋳造した。本工程では、PDMS として、市販の PDMS 硬化キット（SILPOT184）のベース液、硬化剤、ならびに低粘度のシリコンオイルを 10 : 1 : 3 の割合でよく混ぜ合わせ軽く脱気したもの（PDMS 混合物）を使用した。ここで PDMS をシリコンオイルで希釈したのは、PDMS

混合物の粘性を低下させることで PDMS 混合物中でのゲル鋳型の組み立て作業を行い易くするためである。予備実験としてシリコンオイルで希釈していない PDMS でも同様のプロセスを試験した。ゲルワイヤーの太さが 300  $\mu\text{m}$  程度以下の場合には、ゲルワイヤーの高い柔軟性と周囲の PDMS の高い粘性のためにゲル鋳型の組み立て作業が困難な場合があった。

作業の詳細は以下のようであった。

1) 35mm 細胞培養ディッシュの底面をあらかじめ約 1 mL (厚さ : 約 3 mm) の PDMS でコートし、75° C で 1 時間静置して硬化させ、PDMS の底面をもったディッシュを作製しておく (図 4.1 g)。

2) 1) の PDMS の底面上にゲルチップおよびゲルワイヤーを置きピンセットを用いて目的とする微小流路の形状を組み立てる (図 4.1 h, i)。

3) 2) の上にさらに 4 mL の PDMS 混合物を穏やかに注ぎ入れ (図 4.1 j)、ディッシュをオーブンに移し、55° C で 2 時間静置し PDMS を硬化する。さらに 75° C に加温し、PDMS の中でゲル鋳型を溶解させる、(図 4.1 k)。

4) ディッシュをオーブンから取り出し、ゲルチップによって形成された流路の端末部の真上からバイオブシーパンチで穴を開ける。

5) 4) で開けた穴からシリンジで湯 (> 75° C) を注入し、ゲル鋳型を洗い流す (図 4.1 l)。

6) さらに純水で洗浄し、ブロワーでエアパージし (図 4.1 m)、流路内を空気中もしくはオーブン中 (< 75° C) で乾燥させた。

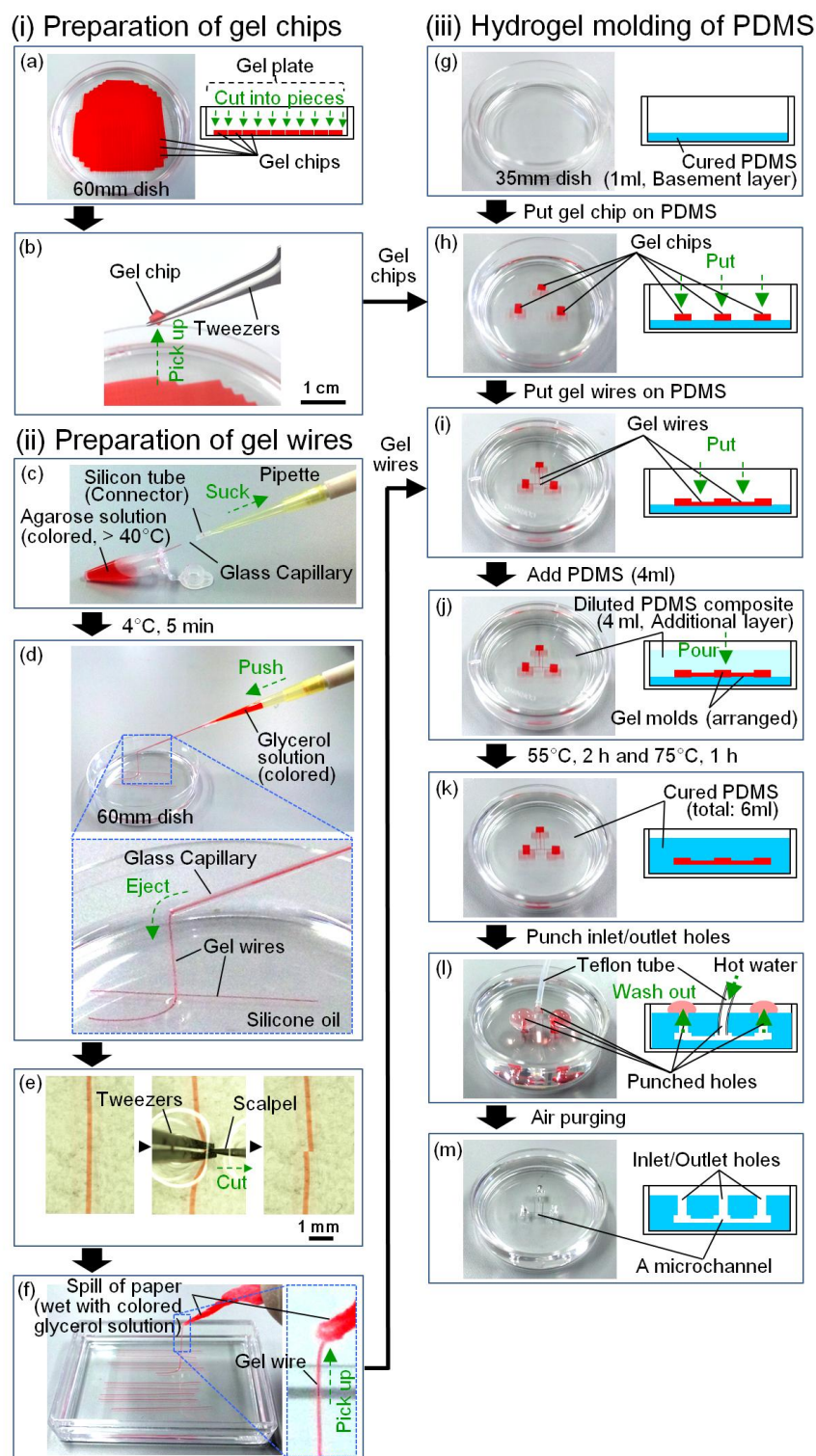


図 4.1 ゲル鋳型を用いた微小流路デバイスの作製工程

Adapted from Biomedical Microdevices, 14, 2012, pp. 689-697, A lithography-free procedure for fabricating three-dimensional microchannels using hydrogel molds, H. Hirama, T. Odera, T. Torii, H. Moriguchi, Fig. 1, with kind permission from Springer Science and Business Media.



### 4.3.3 微小流路内壁の濡れ性評価

微小流路の実際の使用にあたって重要なパラメーターの一つが流路内壁の濡れ性である。例えば流路内壁が親水性の場合、一般に、流路内を流れる水溶液中の溶質の疎水的相互作用によって壁面へ吸着することを抑制できる（図 4.3 a）。よって例えばタンパク質水溶液を流す場合には流路の壁面は親水的であることが望ましく（タンパク質の疎水基が水分子から逃げるようにして流路壁面に移動し吸着する現象を抑えられる）、そうでない場合はタンパク質水溶液中に目的外の多量のタンパク質（牛血清アルブミンやスキムミルクなど）を加えておいて流路壁面の疎水スポットをブロッキング（あらかじめ疎水スポットを目的外のタンパク質埋めてしまうこと）し、目的タンパク質の吸着を抑止する工夫が必要である。逆に、例えば微小流路内で油系の連続相の中に水滴（Water-in-Oil (W/O) エマルション液滴）を生成する場合、流路内壁面が疎水的であることが望ましい（図 4.3 b 上）。なぜなら、流路壁面が親水的であれば、流路内の油相と水相のうち水相の方が油相より小さな接触角で流路内壁面に接することになり、水相が流路内壁面に沿って広がってしまうか

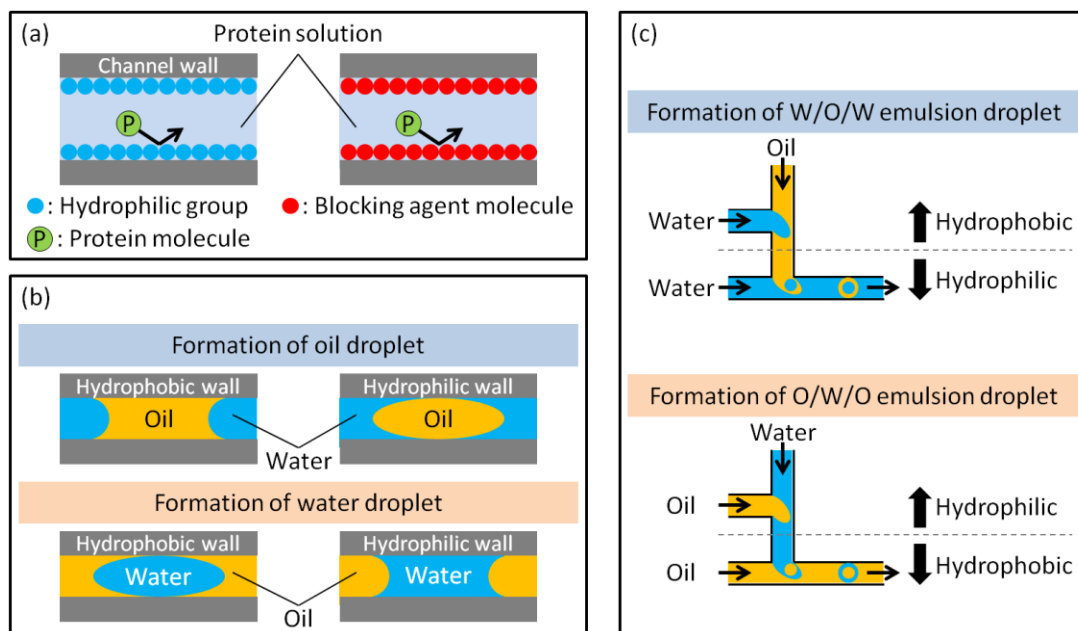


図 4.3 微小流路内壁の濡れ性を制御し応用した例。(a)微小流路へのタンパク質吸着を防ぐための代表的な 2 種類の流路内表面処理、(b)微小流路内における水滴・油滴生成と濡れ性の関係、(c)W/O/W および O/W/O エマルション液滴生成と濡れ性の関係

らである。このような状態では仮に水滴が生成されたとしても、やはりその水滴も流路内壁面上に付着し広がってしまう。他方、油滴（Oil-in-Water (O/W) エマルション液滴）の生成を目的とする場合はその逆の理由から流路内壁面が親水的である必要がある（図 4.3 b 下）。さらに、Water-in-Oil-in-Water (W/O/W) エマルション液滴やその逆相である Oil-in-Water-in-Oil (O/W/O) エマルション液滴などの多相エマルション液滴の生成には、水滴生成のための疎水的内壁を持つ流路と油滴生成のための親水的内壁を持つ流路の両方を組み込む必要がある（図 4.3 c）。つまり、一個のデバイスの中に部分ごとに正反対の濡れ性を有する流路を準備する必要がある。

このように、デバイスの流路内壁の濡れ性は、そのデバイスの用途を決定するものである。今回作製したデバイスの構造材料である PDMS はその単位化学構造から元来疎水的であり、得られたデバイスは、水滴の生成に使用できるものと推測される。そこで実際に水滴の生成実験を行うに先立ち、そのための最適条件（流路内壁が最も高い疎水性を示す条件）を明らかにするために、以下の2点の項目が流路内壁面の濡れ性にどう影響するか、あるいはしないか、ということ調べた。

1) デバイス作製時の PDMS へのシリコンオイル添加の有無

2) デバイス作製後の流路内壁面のシグマコート処理の有無

2) で用いられたシグマコート (SIGMA) は、生化学や分子生物学の実験で一般に用いられているシリコン系のコート剤であり、ガラスやプラスチック製の実験器具表面に撥水性を付与する目的で使用される。それによって、例えば、ピペットチップから微量の液体サンプルを吐出する際の液切れが良くなる。生物学系研究室に広く普及しているコート剤であることから、本実験でも、水滴生成プロセスに向けて PDMS 表面の疎水性を向上させることが期待される代表的なコート剤として採用した。シグマコート原液に PDMS を浸して室温で乾燥する、という方法で PDMS 表面をコートした。

微小流路内の濡れ性を評価するために一般的に用いられる方法は、流路内壁と同じ組成の平面基板の接触角を測定する方法[96]である。本研究でも、このような一般的な濡れ性の評価方法に基づいて、微小流路内壁の濡れ性を測定するため、PDMS の平面基板（切片）

を測定対象とした。また、PDMS 表面の濡れ性は、純水の接触角を計測することによって定量した。接触角を測定するため、厚さ数 mm の PDMS 切片を測定試料として、以下の手順で作製した。

1) 50 mm 細胞培養用ディッシュにゲル鋳型と同様の組成のアガロースを数 mm の厚みになるように注ぎ冷やしてゲル化

2) その上に未硬化の PDMS を数 mm の厚みになるように注ぎ 55° C のオーブンで 2 時間加熱することにより PDMS を硬化

3) 硬化後の PDMS を熱湯（純水）により洗浄し、ブロワーで純水を除去した後、室温で乾燥

作製した PDMS 切片に 5  $\mu$ L の純水を滴下し、CCD カメラを設置した顕微鏡を用いて画像を取得した。画像解析ソフト（Image-Pro Plus、Media Cybernetics）を用いて取得した画像から接触角を計測した。

#### 4.3.4 液滴生成試験

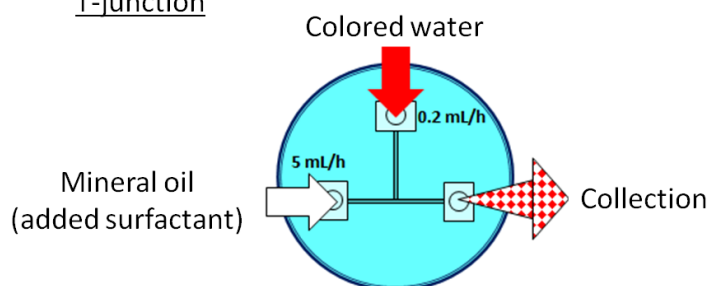
液滴生成は、微小流路の代表的な応用例のひとつである。本手法で作製したデバイスでも液滴生成が可能であることを確認するため、着色水を分散相として、ミネラルオイルの連続相で液滴生成する実験を行った（図 4.4）。微小流路の内壁は、少量のシグマコートを導入し、すぐにエアパージして乾燥させることで疎水化処理した後、液滴生成に用いられた。また、

- ・着色水には純水に食用色素（赤色 102 号、青色 1 号、黄色 4 号）を溶解させたものを、
- ・ミネラルオイルには界面活性剤 SY-グリスター CRS-75 を 1% (w/w) 添加したものを、

それぞれ使用した。全ての液体はシリンジに充填し、図 4.2 と同様の方法でシリンジポンプを用いて、デバイスに送り込まれた。このとき、デバイスの送液/排出口に短いテフロンチューブを継ぎ手として差し込み、それをテフロンチューブの継ぎ手（1.5 mm/0.5 mm（外径/内径）、長さ：1 cm）とシリンジをシリコンチューブ（2.0 mm/1.0 mm、長さ：40 cm）でつないだ。液滴生成プロセスは、顕微鏡に取り付けた高速度カメラ（Fastcam-Max 120KC、



A) Droplet formation 1:  
T-junction



B) Droplet formation 2:  
cross-junction

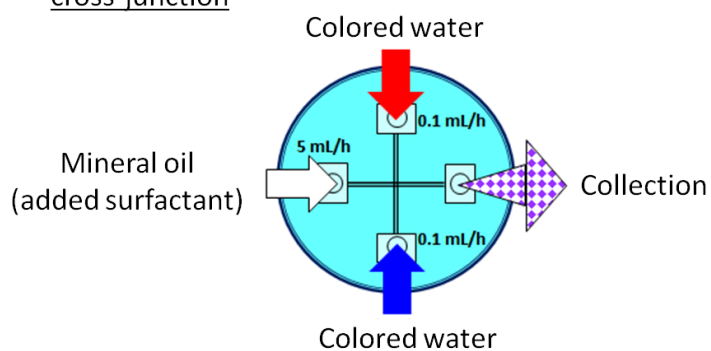


図 4.4 液滴生成試験の条件

フォトロン)により 3000 frames/sec で撮影した。生成した液滴は、画像解析ソフト (ImageJ) を用いて計測した。

#### 4.3.5 液滴の収縮・ゲル化によるゲル微粒子の生成

本手法により作製した微小流路を用いて、液滴を生成し、それを収縮・ゲル化することでゲル微粒子が生成できることを確認した。液滴の生成は、T字型の流路（流路径：約 250  $\mu\text{m}$ ）を用いて、4.3.4と同様の方法で行った。また、液滴の収縮・ゲル化によるゲル微粒子の生成は、第2章と同様の方法で行った。分散相には 0.5 wt%アルギン酸ナトリウム水溶液、連続相には界面活性剤（2 wt% SY-グリスター CRS-75）を添加したひまわり油を用いた。ハイドロゲル基板は、1 mol/L  $\text{CaCl}_2\text{aq.}$ を添加した 2% (w/v)アガロース S (wako) を調製し用いた。

#### 4.3.6 W/O/W エマルション液滴を生成するためのガラス管埋め込み型デバイスの作製

水滴を内包した油滴が水相に分散した系からなる Water-in-Oil-in-Water (W/O/W) エマルション液滴は、微小流路を用いることで、精密にサイズを制御して生成できる。W/O/W エマルション液滴を生成するためには、微小流路の上流で油中分散水滴を生成し、下流でその液滴を内包する水中分散油滴を生成する必要がある (図 4.3 c) [21]。水滴の生成には流路を疎水性に、油滴の生成には流路を親水性にする必要がある。そのため、ひとつづきの微小流路内で水滴と油滴の両方を生成する必要がある W/O/W エマルション液滴の生成では、微小流路の部分的な親水性および疎水性の表面状態を作製する必要がある。一方で前述の Hydrogel Molding によるデバイス作製工程では、流路全体が疎水性のデバイスしか生成できなかった。そのため、Hydrogel Molding によって作製したデバイスで W/O/W エマルション液滴を生成するには、流路を部分的に親水性にする必要があった。そこで本実験では、W/O/W エマルション液滴を生成できる微小流路を作製するために、デバイス中に、親水性であるガラス管を埋め込んだ微小流路を作製した。

作製工程は以下の通りである (図 4.5)。

- 1) 2.3.1.4 と同様にディッシュ底面に PDMS をコートした (図 4.5 a)。
- 2) 2.3.1.3 と同様にゲルワイヤーを作製した。ただし、液滴排出部には、ゲルワイヤーを少しだけ押し出した状態のガラス管をそのまま PDMS に埋め込む鑄型として用いた (図 4.5 b)。
- 3) ディッシュの側面にガラス管が通るように穴をあけ、微小流路の構造にゲルワイヤーを配置した (図 4.5 c)。
- 4) ゲルワイヤーを配置したディッシュ中に未硬化の PDMS を注ぎ、55° C で 1 時間加熱することで PDMS を硬化した。
- 5) PDMS 硬化後、流路末端部にバイオプシーパンチで穴を開け、湯 (>75° C) で注入しゲルワイヤーを洗い流した (図 4.5 e)。

6) 再度、ガラス管部分にのみ加熱し溶解したゲルを導入した。このとき、ゲルは図 4.5f の右側からゆっくりと送液することで、充填された。また、PDMS 部分は疎水性であり、ガラス管内部のみ親水性であるため、穏やかに送液することで、ガラス管部分にのみゲルを充填することが可能であった (図 4.5 f)。

7) 流路内 (ゲルを充填した箇所以外) に疎水処理剤であるシグマコートを導入し、ただちにエアページして乾燥させた (図 4.5 g)。

8) 充填したゲルを 5 と同様の操作で洗い流した (図 4.5 h)。

W/O/W エマルション液滴の生成試験を行うため、作製した微小流路にテフロンチューブを経由してシリンジを接続し、図 4.6 のように各液体を導入した。液体はシリンジポンプを用いて一定流量で微小流路に送液した。液滴生成は、顕微鏡に取り付けた高速度カメラにより 60 frames/sec で撮影した。

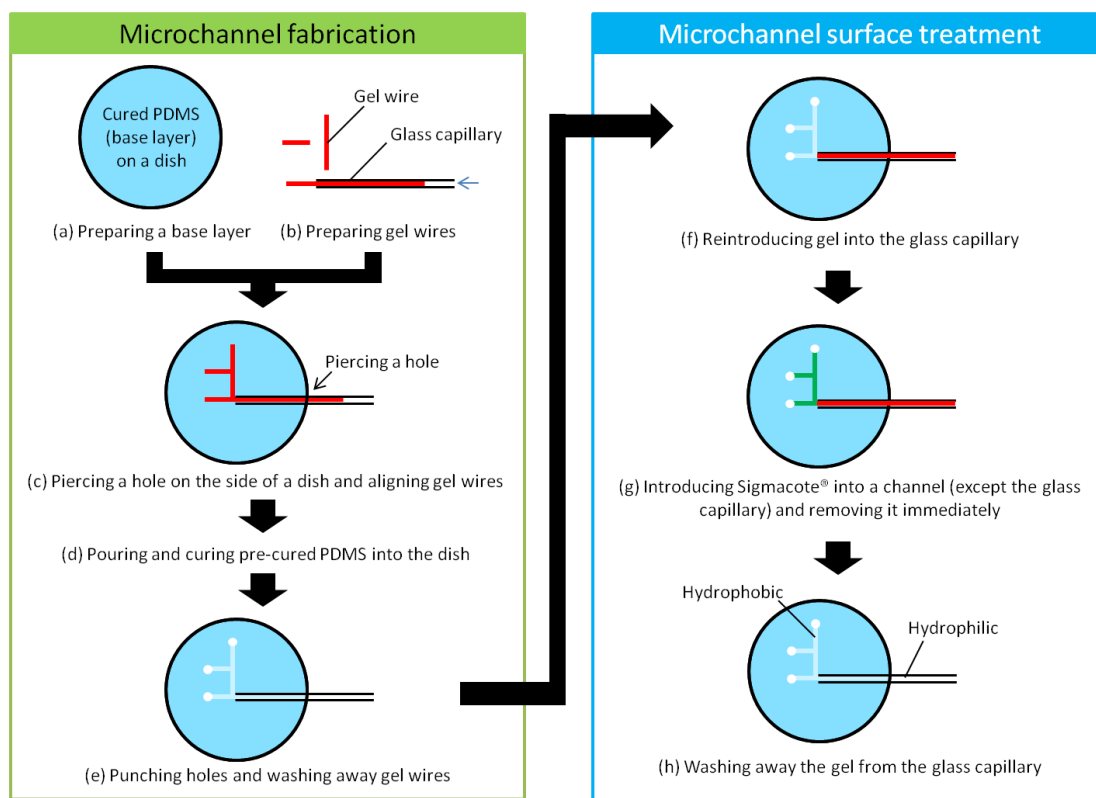


図 4.5 ガラス管を埋め込んだ W/O/W エマルジョン液滴生成用微小流路作製工程

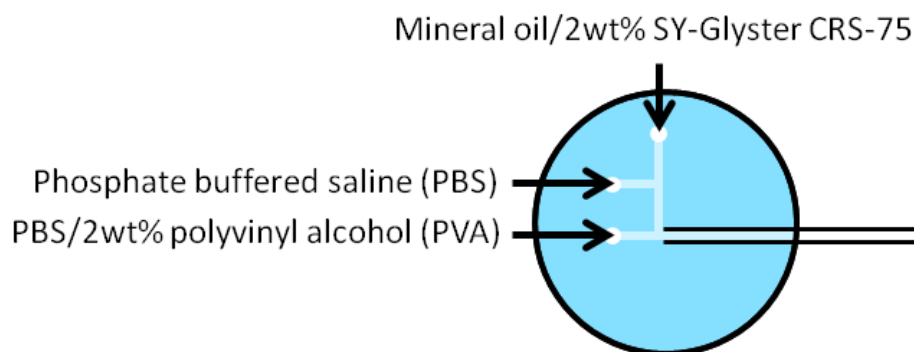


図 4.6 送液した各液体

## 4.4 結果と考察

### 4.4.1 Hydrogel Molding で作製した微小流路の構造的特徴

ゲル鋳型による PDMS の型取りによって滑らかな内壁面を持つ微小流路を作製した。作製工程および作製した微小流路の拡大写真の一例を図 4.7 に示す。この例では、ゲル鋳型（ゲルチップ 3 個とゲルワイヤー 2 本）を T 字型に配置したが、この際に、未硬化の PDMS 混合物中で 1 本のゲルワイヤーの側面にもう 1 本のゲルワイヤーの末端を接触させる、という操作を行うだけで、ゲルワイヤー同士が互いに吸着した（図 4.8）。その結果、結合部が形成された（図 4.7 a,b）。この結合部は PDMS の硬化プロセスを経ても壊れることが無く、ゲルワイヤー同士が付着し合った状態のまま維持されていた（図 4.7 c,d）。また、ゲル鋳型を溶解し洗浄除去した後に残された微小流路の T 字合流部（図 4.7 e,f）への PDMS の侵入も観察されなかった（図 4.7 h）。以上の現象は、疎水性の PDMS 混合物中で、ゲルワイヤー側面に接触したもう一本のゲルワイヤー先端に生じる毛管力と凝集力[97, 98]によって、ゲルワイヤーが引っ張られたことに起因する現象であると考えられる。これは、微小流路の鋳型となるゲルワイヤー同士を手作業で自由につなぎ合わせて流路の合流部を作れることを可能とするものであり、本手法を特徴づける最も重要な技術的ポイントである。このように、本手法は流路のトポロジーを 3 次元の自由度で設計しながら微小流路を作製できる技術であると言える。

互いに接触した 2 本のゲルワイヤーによって作製した立体十字合流の流路（図 4.11 b）では、十字部で比較的大きな開口が形成されるという、特徴的な結果が得られた。開口サイズは、ゲルワイヤーの径と同じくらい大きな径であった（形成される開口サイズは次章で詳細に計測した）。他方、従来研究においても、ワイヤー状の鋳型を用いて、立体十字合流の構造をもつ PDMS 製微小流路が作製されている[99, 100]。それらの従来研究では、立体十字合流を作製するため、ナイロン[99]やステンレス[100]のワイヤー（断面形状が円形）が用いられている。しかし、これらの材料を用いた場合では、十字部に大きな開口（流路

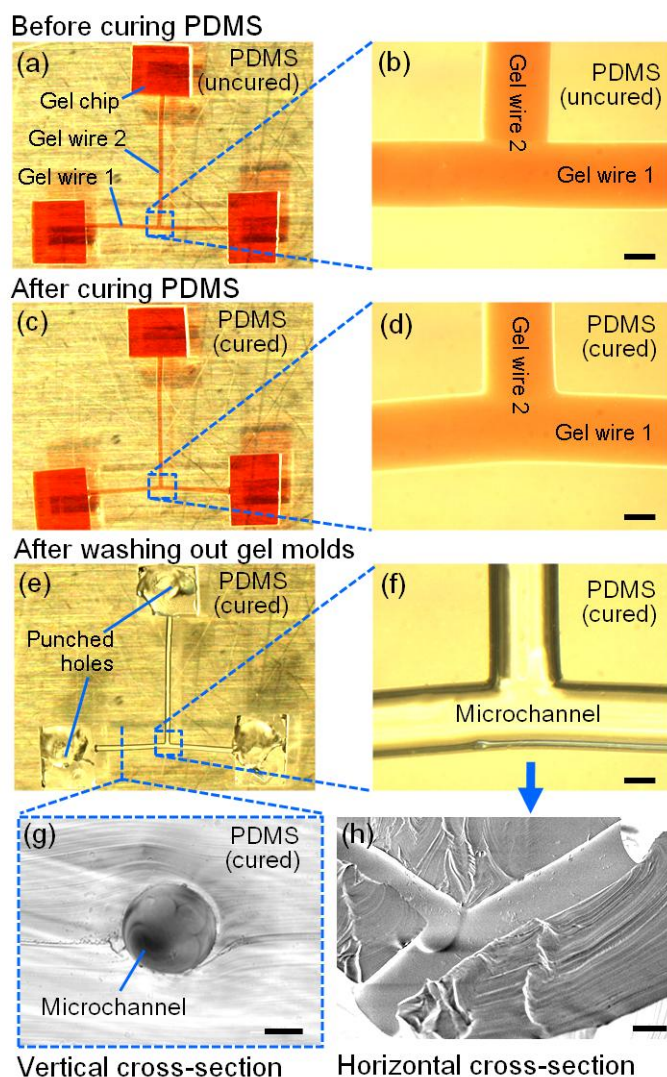


図 4.7 T字型の微小流路の作製工程の実体顕微鏡像(a-f)およびその結果得られた流路の断面の位相差像(g)と走査型電子顕微鏡像(h) (スケールバー : 100  $\mu\text{m}$ )

Reprinted from Biomedical Microdevices, 14, 2012, pp. 689-697, A lithography-free procedure for fabricating three-dimensional microchannels using hydrogel molds, H. Hirama, T. Odera, T. Torii, H. Moriguchi, Fig. 2, with kind permission from Springer Science and Business Media.

に液体を流すとき重要)を形成することはできないという技術的課題があった。一方、本研究では、ウェットで柔らかい材料であるハイドロゲルのワイヤーを用いることで、大きな開口部を形成することができた。この結果は、従来法では困難であった構造の作製を可能にした、本手法の重要な特徴の一つである。また、開口サイズは、立体的にゲル鋳型を接触させて十字に交差させるとき、接触する部分の形状を変えることで調整できると考え

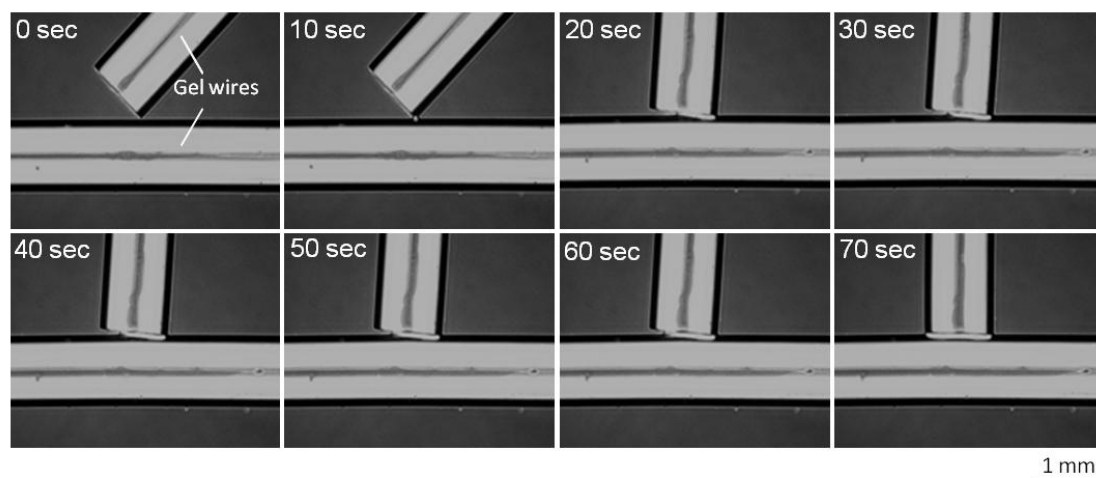


図 4.8 未硬化の PDMS 混合物中で 2 本のゲルワイヤー同士が自発的に吸着する様子  
Reprinted from Biomedical Microdevices, 14, 2012, pp. 689-697, A lithography-free procedure for  
fabricating three-dimensional microchannels using hydrogel molds, H. Hirama, T. Odera, T. Torii, H.  
Moriguchi, Fig. 3, with kind permission from Springer Science and Business Media.

られる（例、円形断面のゲルワイヤー側面に三角形断面のゲルワイヤーの頂点が接触する  
ように配置することで開口部の微小化が可能）。

また、図 4.7 g は、作製した微小流路が円形の断面（直径  $260\text{ }\mu\text{m}$ ）を持つことを示す。  
このような断面形状の流路の作製は、従来技術では半円形の断面を持つ流路を彫り込んだ  
2 枚の基板を位置合わせして貼り合わせる、などの特別な工夫が必要であった。また、フ  
ォトリソグラフィーで鋳型を作る場合、流線型の断面をもつ凸構造を作るには投光性にグ  
ラデーションを持たせたグラデーションマスクなどを用いた特殊な工程が必要であった。  
これに対し本手法では、鋳型の溶解除去という方法をとることで、鋳型の繰り返し使用が  
できなくなることと引き換えに、円形断面のような 3 次元の形状および立体交差を簡便に、  
単一プロセスで作製できるという特長を持つと言える。さらに複雑な形状をもつ構造を作  
製する方法としては、（1）金型の利用、（2）ゲルワイヤーを射出し積み重ねて配置でき  
るプリンター[101]の利用が有効と考えられる。

本手法のように鋳型を溶解させることで構造物を作製する手法の一つに、「ロストワックス」がある。ロストワックスでは金型を利用してワックス製の型を作製することで、自由な立体構造を大量に鋳造することができる。これと同様に、ゲル鋳型を用いる本手法でも金型を用いることで、自由な立体構造を大量に作製できると考えられる。ロストワックスとゲル鋳型の方法を比較すると、ゲル鋳型の方法のメリットは、ロストワックスより小さな寸法の構造を作製できることである。これは、溶解したゲルは溶解したワックスよりも低粘度であるため、微細な金型もしくはガラス管に閉塞することなく流すことができるためである。一方で、ゲル鋳型の方法のデメリットは、ロストワックスよりも形状を精密に制御することが困難であることである。これは、鋳型が柔らかいためである。しかし、これは、ゲルのネットワーク構造を改良した高強度のゲル[102]を利用することで克服できると期待される。また、rapid prototyping に用いられる 3D プリンターと本手法を比較すると、微小流路の設計時に 3D データを作成するための作業・スキル・ソフトウェアを必要としないことが大きく異なる点である。

#### 4.4.2 ゲル鋳型のサイズ変化

鋳型としてハイドロゲルを用いる際の懸念の一つが、作製過程における温度変化やハイドロゲルの膨潤媒（水）の出入り（乾燥あるいは吸湿）によって生じる、鋳型のサイズ変化（収縮あるいは膨張）である。具体的には、1つ目に、ゲルワイヤーが加熱によって膨張し、作製した微小流路をサイズアップさせることが予想された。2つ目に、ゲルワイヤーが空気中やシリコーン（未硬化 PDMS 混合物、シリコーンオイル）中で乾燥収縮し、作製した微小流路の微小化という結果を生じることが予想された。

これらのゲル鋳型のサイズ変化現象の有無と程度を調べるため、ガラス管内径と断面積の変化量（=ガラス管（図 4.9 a）の断面積－作製された微小流路（図 4.9 c）の断面積）を比較した。その結果、これらに明確な相関が得られなかった（付録 A）。そこで断面積ではなく直径を用いて比較するため、3種類の内径（1.16, 0.60, 0.30 mm）のガラス管を用いて、図 4.9 のように微小流路作製の各工程における、オリジナルのガラス管の内径（ $d_0$ ）、



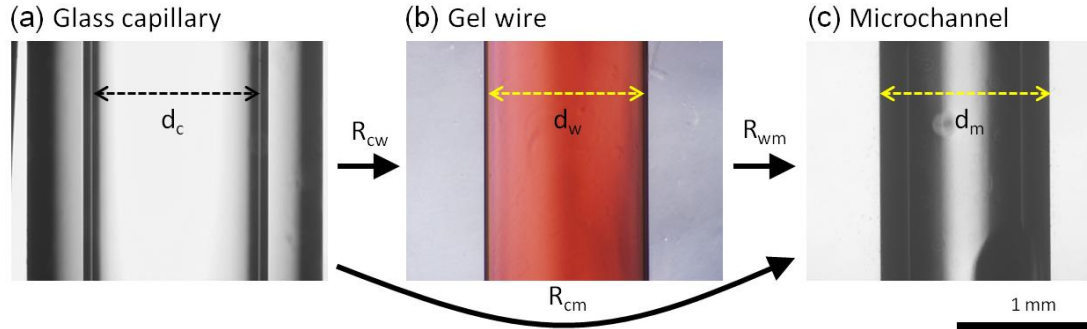


図 4.9 ガラス管(a)、ガラス管から作製されたゲルワイヤー(b)、ゲルワイヤーから作製された微小流路(c)の顕微鏡写真

Adapted from Biomedical Microdevices, 14, 2012, pp. 689-697, A lithography-free procedure for fabricating three-dimensional microchannels using hydrogel molds, H. Hirama, T. Odera, T. Torii, H. Moriguchi, Fig. 4, with kind permission from Springer Science and Business Media.

ゲルワイヤーの直径 ( $d_w$ )、微小流路の直径 ( $d_m$ ) を測定した。ここでは、ゲル鋳型の収縮率を以下のように定義した。

$$R_{cw} = \frac{d_c - d_w}{d_c} \times 100 (\%) \quad (4.1)$$

$$R_{wm} = \frac{d_w - d_m}{d_w} \times 100 (\%) \quad (4.2)$$

$$R_{total} = \frac{d_c - d_m}{d_c} \times 100 (\%) \quad (4.3)$$

ただし、

$R_{cw}$ : ゲルワイヤー作製時におけるゲルワイヤー収縮率

$R_{wm}$ : PDMS 硬化時におけるゲルワイヤー収縮率

$R_{total}$ : 作製工程全体におけるゲルワイヤー収縮率

測定の結果を図 4.10 に示す。微小流路の各作製工程において、ゲル鋳型のサイズの変化が観察された。ガラス管を用いたゲル鋳型の作製工程では、ゲル鋳型のサイズが減少した (図 4.10 a)。それに対し、PDMS 硬化時には、ゲル鋳型の膨張 (加熱のため) と収縮 (乾燥のため) が同時に生じた (硬化時に PDMS 自体も収縮する[103])。以上の結果か

ら、作製される微小流路の直径は、オリジナルのガラス管の内径とは異なることがわかった。また、全体の収縮率の値は、内径 1.16 mm のガラス管ではほぼ 0%であったが、内径 0.3 mm のガラス管では約 18%となり増加傾向が見られた。このように、全体の収縮率( $R_{total}$ )は、オリジナルのガラス管サイズに依存することがわかった。

ゲル鑄型のサイズ変化は、マイクロメートル単位の分解能で、微小流路の直径を精密に制御することを妨げるものであり、本手法の弱点の一つであると言える。しかし、逆の見方をすれば、この現象は、オリジナルのガラス管内径より細い微小流路を作製する手法として利用できる可能性がある。実際、現時点では、直径 200  $\mu\text{m}$  以下のゲルワイヤーは PDMS 混合物中で容易に縮れて糸毬状に自己凝集してしまうため手作業で配列させる操作は非常に困難である。そのため、本手法で作製できる流路の最小直径は内径 300  $\mu\text{m}$  のガラス管内で成型されたゲルワイヤーを用いた場合の約 250  $\mu\text{m}$  前後である。今後は、環境湿度の調節とゲルに混ぜ込む保湿剤（グリセロール）の濃度調整によるゲル膨潤媒の蒸気圧を制御することで、より扱いやすい丈夫なゲル鑄型を作製し、より細い流路を得ることができるようになると考えている。

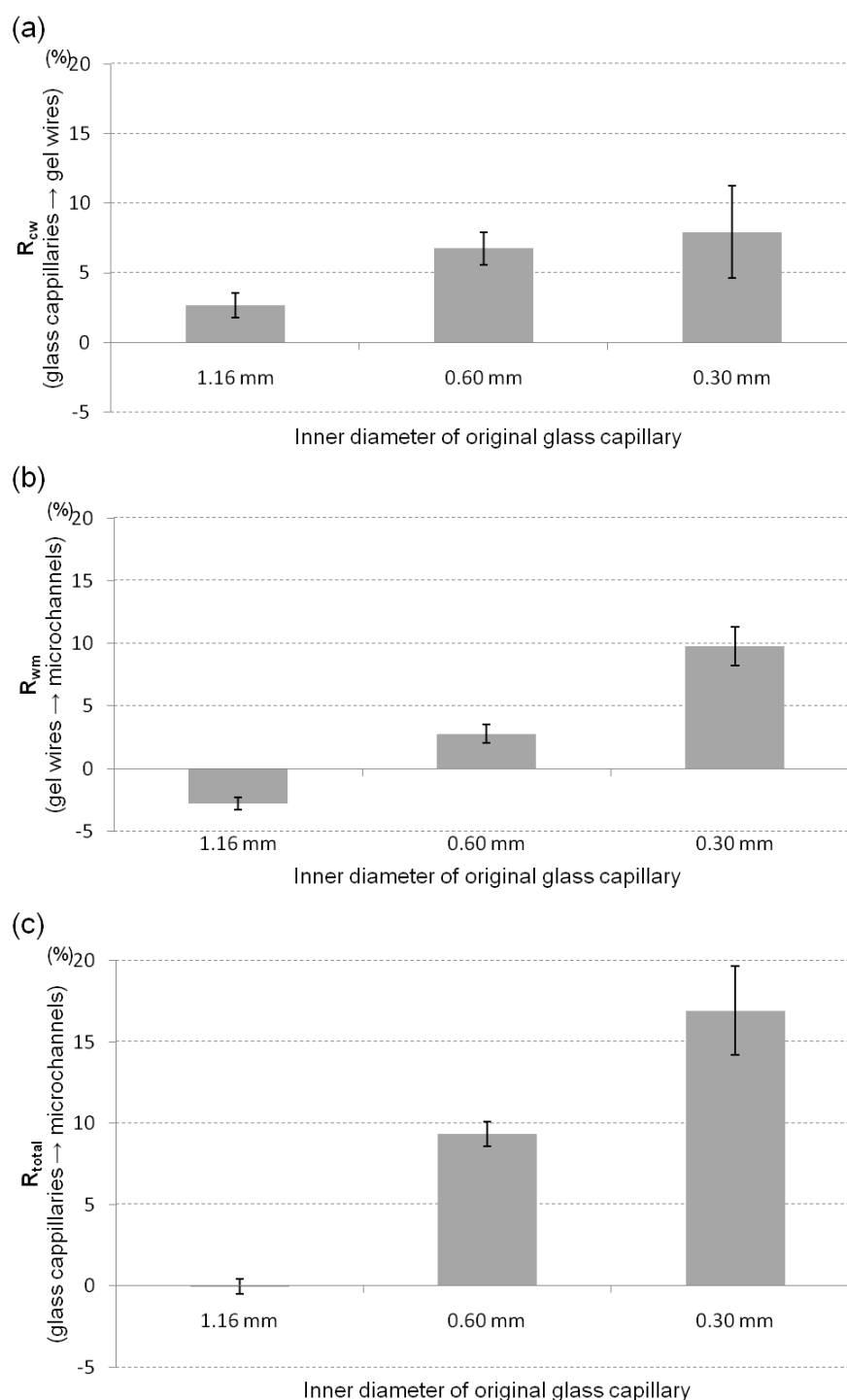


図 4.10 ゲルワイヤーの収縮率。(a)ゲルワイヤー作製時、(b)PDMS 硬化時、(c)作製工程全体。エラーバーは標準偏差(n=8)

Adapted from Biomedical Microdevices, 14, 2012, pp. 689-697, A lithography-free procedure for fabricating three-dimensional microchannels using hydrogel molds, H. Hirama, T. Odera, T. Torii, H. Moriguchi, Fig. 5, with kind permission from Springer Science and Business Media.

#### 4.4.3 微小流路内の流れパターン

2.4.1 にて、ゲル鋳型による鋳造では、硬化前のシリコーンゴム中でゲルワイヤーを互いに触れさせるだけで流路の合流部のゲル鋳型を作製できる、ということが明らかになった。この知見に基づいて、以下のような3種類の配置で2本のゲルワイヤーを配置し、それを元に3種類の流路構造を作製し、その中に着色水を流すことで、それらの微小流路としての性能を評価した。

構造 (a) : 2本のゲルワイヤーを平面上で、T字型に連結させる

構造 (b) : 2本のゲルワイヤーを上下に、十字型で交差させる

構造 (c) : 2本のゲルワイヤーの間に PDMS ゴムの薄膜小片を挟んで、十字型に交差させる

その結果得られた3種類のデバイスの写真とそれぞれに一定流量の着色水を流した結果形成された定常流の顕微鏡写真を図 4.11 に示す。それぞれの構造で特徴的な定常流パターンが形成された。(a) の T 字合流部では二次元的な層流が観察され、(b) の立体十字合流部ではおそらく三次元的に重なった層流が観察された。また、(c) の立体交差部では上下の流路間に開口は見られず、独立した流れが観察された。

これらの結果から、従来のデバイス作製技術ではその作製に多段階のプロセスを必要とした立体合流や立体交差といった3次元的な流路構造を簡単に作製できる技術であることが確認された。

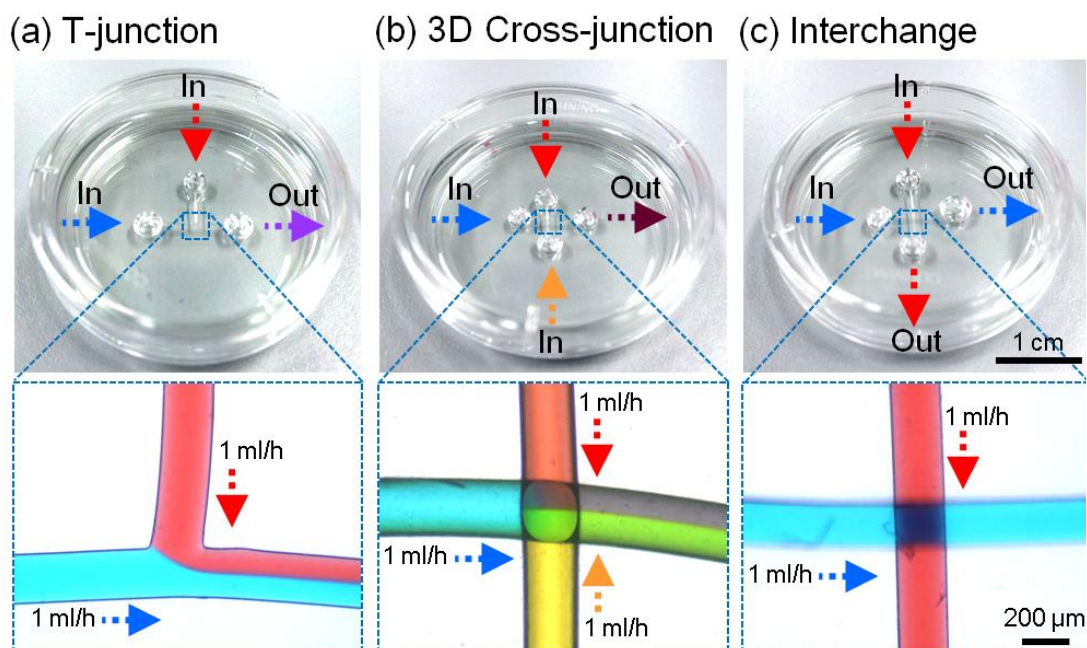


図 4.11 T字合流(a), 立体十字合流(b), 立体十字交差(c)の構造をもたせたデバイス  
(上) と、それぞれの内部で2または3色の水が形成した定常流れ (下)

Reprinted from Biomedical Microdevices, 14, 2012, pp. 689-697, A lithography-free procedure for fabricating three-dimensional microchannels using hydrogel molds, H. Hirama, T. Odera, T. Torii, H. Moriguchi, Fig. 6, with kind permission from Springer Science and Business Media.

#### 4.4.4 Hydrogel Molding で作製した PDMS 表面の濡れ性

Hydrogel Molding で作製した PDMS 表面の濡れ性の評価にあたっては、その構造材料と PDMS の後処理（コート処理）に関して以下の2通りの実験により PDMS／純水界面における純水の接触角を計測した。

実験1：構造材料による濡れ性の比較（いずれもシグマコート処理せず）

条件(a) アガロースゲルに接触させた状態で、シリコンオイルで希釈していない PDMS を硬化

条件(b) アガロースゲルに接触させた状態で、シリコンオイルで希釈した PDMS を硬化

条件(c) フォトレジスト SU-8 に接触させた状態で、シリコンオイルで希釈していない PDMS を硬化

条件(d) フォトレジスト SU-8 に接触させた状態で、シリコンオイルで希釈した PDMS を硬化

実験2：後処理（コート処理）による濡れ性の比較（いずれの PDMS もアガロースゲルに接触させた状態で硬化）

条件(a) シリコンオイルで希釈していない PDMS を硬化後、シグマコート未処理

条件(b) シリコンオイルで希釈していない PDMS を硬化後、シグマコート処理

条件(c) シリコンオイルで希釈した PDMS を硬化後、シグマコート未処理

条件(d) シリコンオイルで希釈した PDMS を硬化後、シグマコート処理

実験1について得られた結果を図 4.1 2 に示す。PDMS に接触させたものがゲルかフォトレジスト SU-8 であるかにかかわらず、PDMS にシリコンオイルを混ぜ込むことで、接触角が大きくなる、すなわち親水化することが確認された。続いて実験2について得られた結果を図 4.1 3 に示す。PDMS にシリコンオイルを混ぜ込むかどうかにかかわらず、シグマコート処理をすることで、アガロースゲルに接触させた状態で硬化した PDMS

表面の疎水性を向上させることが確認された。流路の構造材料である PDMS へのシリコーンオイルの混ぜ込みが、結果として得られる PDMS 表面の濡れ性に影響する理由としては、シリコーンオイル添加による PDMS ゴムの分子ネットワークレベルの構造変化が考えられる。この点についてはより分解能の高い電子顕微鏡による観察や、PDMS のガス透過性の測定などによる PDMS のポアサイズ (nm オーダー) の評価を行うことで確認できるのではないかと考えられる。

前述の PDMS 表面の濡れ性の変化の原因は、ゲル鋳型に含まれる親水性を示す官能基が転写され PDMS 表面に残留したことによる可能性が考えられた。そこで基礎検討としてフーリエ変換赤外分光法 (FTIR) を用いて PDMS 表面の官能基を分析した。その結果、官能基に関して、ゲル鋳型により作製された PDMS 表面とガラスおよびフォトレジスト SU-8 (PDMS 製の微小流路作製に用いられる鋳型材料) により作製された PDMS 表面における違いは見られなかった (付録 B 参照)。よって、FTIR では、PDMS 表面における親水性を示す付加的な官能基の存在は確認されなかった。

いずれにせよ、流路壁面が可能な限り疎水的であることが望ましい用途 (例えば水滴 (W/O エマルション液滴) の生成) にデバイスを使用する場合、以下の2つがわかった。

- 1) 作製過程における作業上の都合から導入した、PDMS をシリコーンオイルで希釈して粘度を下げる、というプロセスは、デバイスの表面特性 (界面張力) に変化を生じる
- 2) さらに変化した表面特性は、ゲル鋳造で作製する流路壁面の疎水性をさらに向上させるために生物学系の研究施設に広く普及している、シグマコートという市販のコート剤による簡単な流路内壁面処理によって制御できる

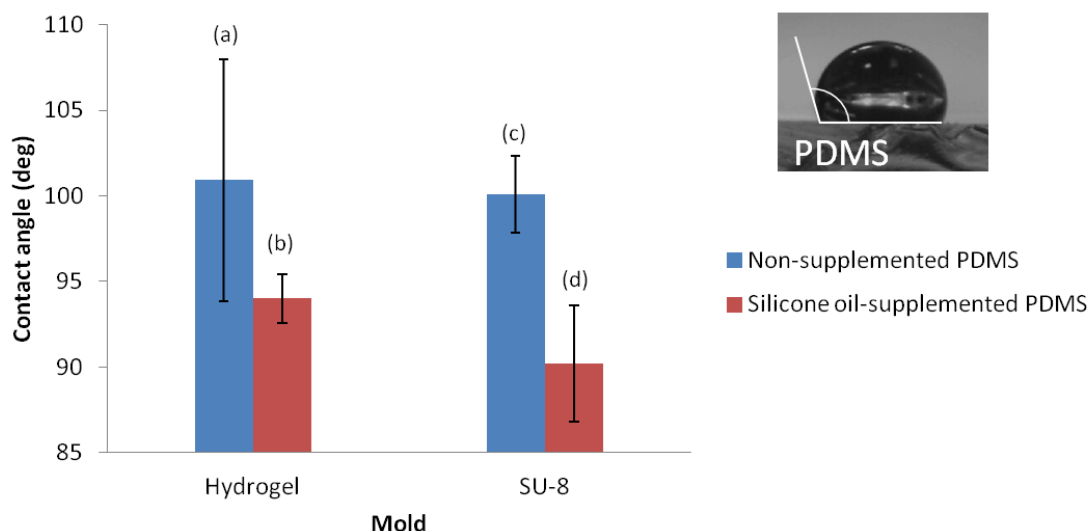


図 4.1.2 PDMS 表面の濡れ性に対するシリコンオイルの混ぜ込みによる影響。

Non-supplemented PDMS はベース液と硬化剤を 10 : 1 の割合で混合、Silicone oil-supplemented PDMS はベース液と硬化剤とシリコンオイルを 10 : 1 : 3 の割合で混合したもの。写真は撮影した顕微鏡画像の一例

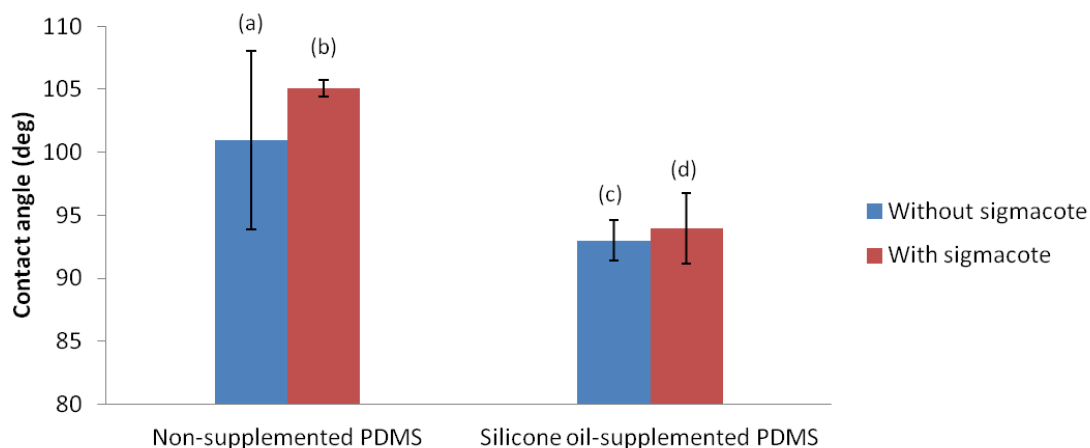


図 4.1.3 ゲル鋳造で作製した PDMS 表面の濡れ性に対するシグマコート処理による影響。Non-supplemented PDMS はベース液と硬化剤を 10 : 1 の割合で混合、Silicone oil-supplemented PDMS はベース液と硬化剤とシリコンオイルを 10 : 1 : 3 の割合で混合したもの



#### 4.4.5 液滴生成

微小流路を用いた単分散（サイズの揃った）の液滴および微粒子の生成技術は、様々な分野で利用されている重要な技術の一つである（例：ハイスループット分析、機能性材料の製造）。そこで、シグマコートで内壁の疎水性向上処理を施した流路に水相を分散相、油相を連続相として流すことで、流路の合流部で水滴（W/O エマルション液滴）が生成することを確認した。

図 4.1 4 a,b は、T 字合流部（図 4.1 4 a）ならびに立体十字合流部（図 4.1 4 b）での液滴生成プロセス中のデバイスの写真（左）、および高速度撮影したそれぞれの合流部での液滴生成プロセスのスナップショット（右）である。写真のように、いずれの合流部

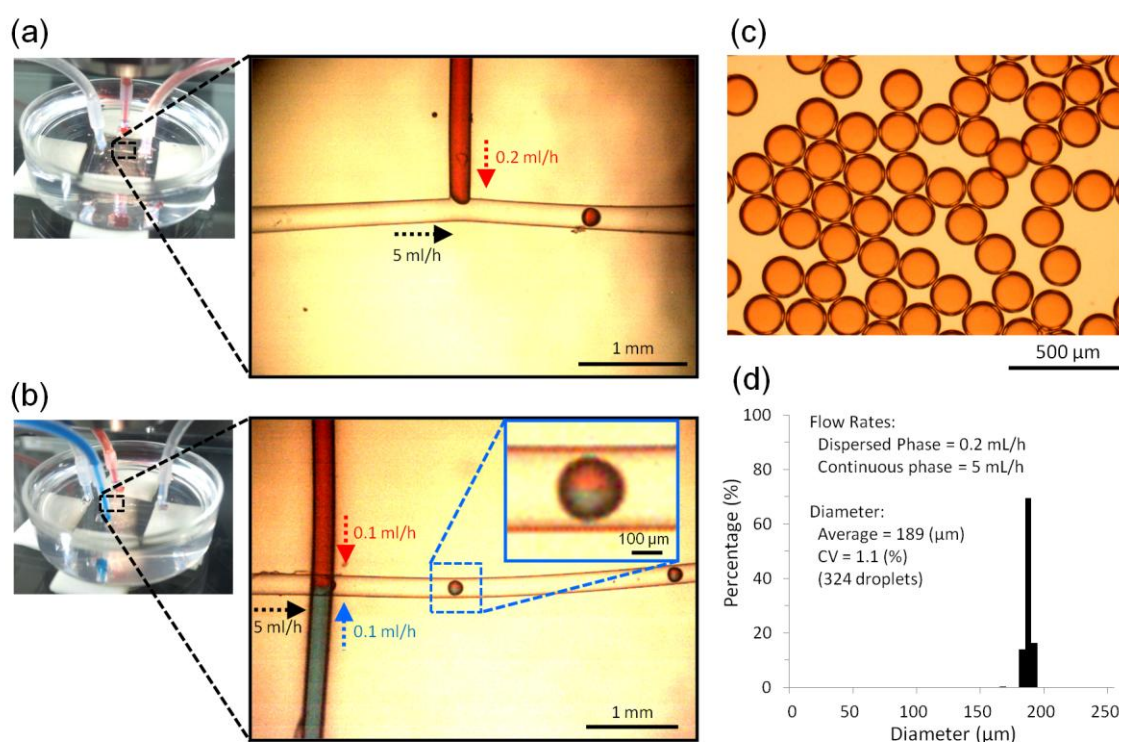


図 4.1 4 未硬化 PDMS 混合物中でゲルワイヤーを接触させる方法で作製した、T 字合流部(a)、立体十字合流部(b)における液滴生成、生成された液滴(c)および液滴径の分布(d)

Reprinted from Biomedical Microdevices, 14, 2012, pp. 689-697, A lithography-free procedure for fabricating three-dimensional microchannels using hydrogel molds, H. Hirama, T. Odera, T. Torii, H. Moriguchi, Fig. 7, with kind permission from Springer Science and Business Media.

においても単分散の W/O エマルション液滴が生成された (図 4.1 4 c,d)。このとき、液滴直径のばらつきを表す coefficient of variation (CV)は、1.1%であった。この値は、フォトリソグラフィーを用いて作製される従来型の微小流路による液滴生成の CV[21]よりも低い値であった (液滴サイズの CV が 5%未満のとき単分散性に優れていると見なされる [104])。また、(b)の立体十字合流部では、対面合流した赤青二色の着色水が混ざり合うことなく連続相 (界面活性剤を添加したミネラルオイル) によってせん断され、二色液滴が生成されるということが分かった。この二色液滴の生成は、同じく立体十字合流部で形成された層流パターン (図 4.1 1 b 下) のうち、向かって左方向からの青い流れが油相に置換された場合に相当する。これらの層流パターンは共に合流部の構造が立体的であることによって、上下方向からの流れがいったん合流してから一束の層流となった後に下層と合流する、という順序で合流が生じていることによるものと考えられる。

このように、ゲル鋳型による流路作製法の、立体的な形状・配置の流路を簡便に作製できる、というメリットは、単に工程の簡略化という面においてだけでなく、新しい流路構造を生み出すことで新しい機能を持った流路を生み出す、という創造的な面においても新たな可能性を提供するものであると言える。

#### 4.4.6 液滴の収縮・ゲル化によるゲル微粒子の生成

本手法により作製した微小流路を用いて生成した液滴は、第2章と同様の方法で収縮・ゲル化させることで、ゲル微粒子として生成できた。まず、一定流量で連続相と分散相を微小流路に導入することで、単分散なアルギン酸ナトリウム液滴が生成できた (図 4.1 5 a)。続いて、生成した液滴をハイドロゲル基板上で 20 時間静置することで、液滴を収縮・ゲル化させてゲル微粒子が生成できた (図 4.1 5 b)。本実験条件では、収縮・ゲル化プロセスによって、平均直径 108  $\mu\text{m}$  (CV=1.1%) の液滴から、平均直径 23  $\mu\text{m}$  (CV=1.9%) のゲル微粒子が生成された。本実験でも直径は元の液滴の約 1/5 まで収縮した。以上の結果から、ゲル鋳型を用いた微小流路作製法は、液滴の収縮・ゲル化法と組み合わせることでゲル微粒子を生成するために利用できることが確認された。

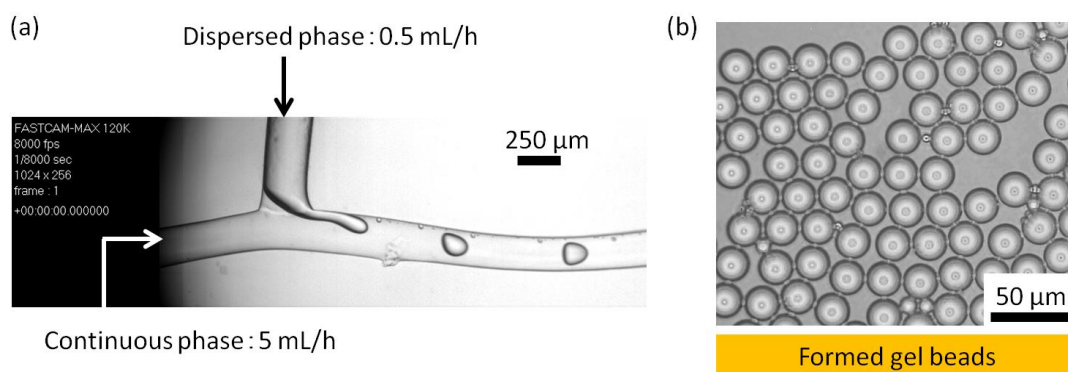


図 4.15 微小流路（ゲル鑄型により作製）を用いた液滴生成（a）、および生成した液滴を収縮・ゲル化させて得られたゲル微粒子（b）

#### 4.4.7 W/O/W エマルション液滴の生成

ガラス管を埋め込んだ微小流路を作製し、W/O/W エマルション液滴を生成した。本作製工程（図 4.5 参照）によって、ガラス管を埋め込んだ微小流路を作製することが可能であった（図 4.16）。また、一定流量で各液体を送液することで、W/O/W エマルション液滴を生成することができた（図 4.17）。本実験結果は、Hydrogel Molding が、単純な油滴や水滴だけではなく、W/O/W エマルション液滴が生成可能な微小流路の作製に利用できることを示している。本実験条件では、油滴中に 1 個の水滴を内包する W/O/W エマルション液滴を生成したが、微小流路径や流路構造、流量を調節することにより内包液滴数やサイズを制御することができる[21]。現状では Hydrogel Molding で作製できる微小流路の最小径は約 250  $\mu\text{m}$  前後という技術的限界があるが（4.4.2 参照）、その範囲内において、Hydrogel Molding によって作製した微小流路は、W/O/W エマルション液滴を用いる研究に幅広く利用されることが期待できる。さらに小さな W/O/W エマルション液滴を生成するためには、微小流路の内径をさらに細くすることが有効である。流路全体の微小化は 4.4.2 に述べた方法が考えられるが、それ以外の方法としては、T 字合流部を局所的に細くする方法がある。例えば、T 字合流部にのみ細かいゲル鑄型を用いる方法（図 4.18a）、矩形断面をもつ太いゲル鑄型の先端を斜めに切断して用いる方法（図 4.18b）が考えられる。

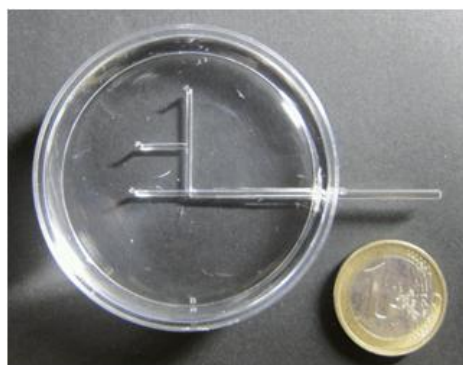


図 4.16 作製したガラス管を埋め込んだ微小流路

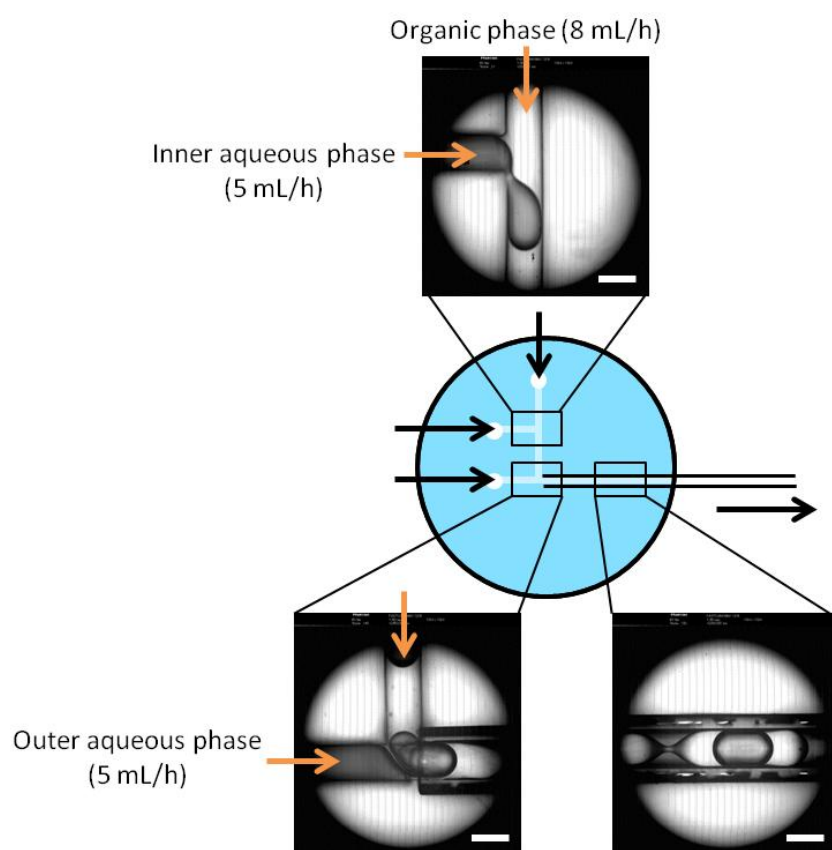


図 4.17 微小流路内における W/O/W エマルジョン液滴の生成（スケールバー：1 mm）

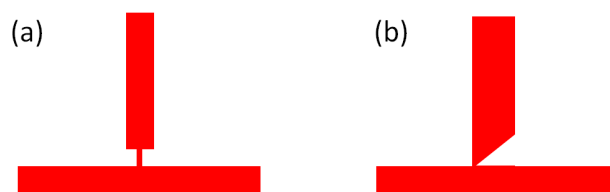


図 4.18 微小流路の T 字合流部を局所的に細くするために有効と考えられる工夫。

(a) T 字合流部のみに細いゲル鑄型を用いる。細くて長いゲル鑄型は表面積を小さくしようとしてそれ自体が凝集してしてしまうが、それと比べて細くて短いゲル鑄型は凝集しにくいと期待される。(b) 矩形断面をもつ太いゲル鑄型の先端を斜めに切断して用いる。ゲル鑄型は底面に吸着するため、太い矩形断面の流路を用いることで、“ゲルが底面に吸着する力>2本のゲルが引き合う力”となり、図 4.8 のような自発的なゲル鑄型の吸着が起こらずに、T 字の配置を維持することができるのではないかと考えられる

#### 4.4.8 デバイス作製費用

ゲルの調製からゲル鑄型の作製、PDMS 製微小流路の作製と実験までの一連の工程で使  
用した資材のうち、アガロースゲルの加熱に使用する電子レンジや PDMS 加熱硬化に使用  
するオーブンなどの大型機器、試薬計測用の天秤、微小流体プロセスの実験に必要なシリ  
ンジポンプと顕微鏡を除いた全ての材料・器具を図 4.19 に示す。シリンジポンプと顕微  
鏡を除いた全ての資材の調達に必要な費用は大まかに見積もって 10 万円前後であり、ゲ  
ル・ガラス管・PDMS・細胞培養皿・コート剤などデバイスの作製ごとに消耗する資材の  
費用は、その使用量を考慮するとデバイス 1 個あたり 100 円前後と見積もられる。さらに、  
実際には研究施設の多くが顕微鏡やシリンジポンプ、オーブンや電子レンジなどの設備を  
あらかじめ備えているという実状を考えると、本プロセスは、その導入のために必要な初  
期投資の面でも、そのランニングコストの面でも、低コストなプロセスであると言える。

また、本プロセスで使用する試薬はシグマコートを除いて全て安全・低毒性であり、そ  
のシグマコートも引火や蒸気の吸入に注意すれば安全に取り扱える試薬である。このよう  
に、使用する試薬や手法の安全性が高いことが本プロセスのもう一つの特長であり、研究



施設だけでなく、中学・高校・大学など各種学校における実験実習など、教材としての利用も可能であると考えられる。

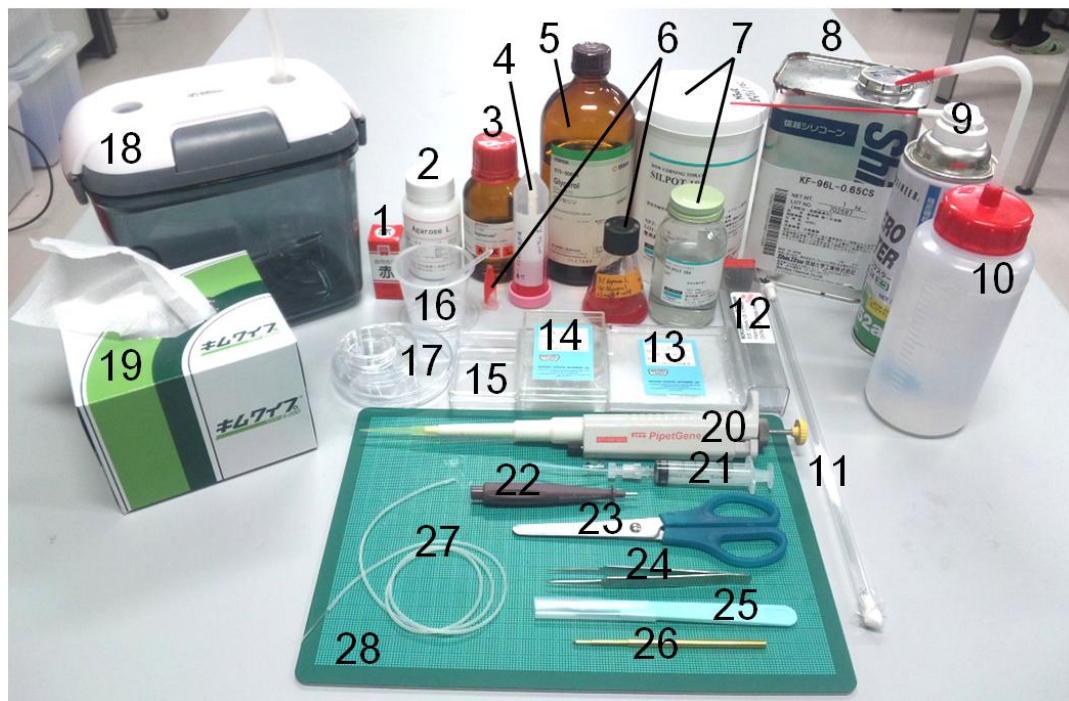


図 4.19 本実験で使用した試薬・器具。1: 食用色素、2: 低融点アガロース粉末、3: シグマコート、4: 50mL 遠沈チューブ（着色グリセロール水溶液が入っている）、5: グリセロール、6: エッペンチューブとフタ付き三角フラスコ（着色ゲルが入っている）、7: PDMS 硬化キット、8: シリコンオイル、9: ダストブロワー、10: 洗瓶（純水が入っている）、11-14: ゲルワイヤー作製のガラス管、15: ポリスチレン製ケース、16: ポリプロピレン製プリンカップ・スプーン（PDMS 原液を混ぜるために使用）、17: ポリスチレン製ディッシュ、18: 手動型真空ケース（PDMS 混合物の脱気に使用）、19: キムワイプ、20: ピペッター・ピペットチップ（200 $\mu$ L チップが付いている）、21: シリンジ（テフロンチューブを連結してある）、22: バイオプシーパンチ、23: はさみ（シリコンチューブ・テフロンチューブの切断に使用）、24: 精密ピンセット、25: 医療用メス、26: ダイヤモンドペン、27: シリコンチューブ（片方の末端に短いテフロンチューブを連結してある）、28: 方眼目盛つきカッティングボード（ゲルワイヤー切断の際に背景目盛として使用）

Reprinted from Biomedical Microdevices, 14, 2012, pp. 689-697, A lithography-free procedure for fabricating three-dimensional microchannels using hydrogel molds, H. Hirama, T. Odera, T. Torii, H. Moriguchi, Fig. 8, with kind permission from Springer Science and Business Media.

#### 4.5 結論

本章では、新規の微小流路の rapid prototyping 手法を開発した。具体的には、ハイドロゲルを微小流路に直接埋め込む、という手法の第1世代技術として、ゲル鑄型を用いたシリコーンゴム製の微小流路の作製法の開発を行った。

開発した手法の特長は、

- 1) シリコーンゴム原液中でゲルの小片同士を触れ合わせるだけでゲルの小片同士が吸着する現象を利用してデバイスを作製しながら微小流路のトポロジーを自由に設計することができる
  - 2) 直径  $250\ \mu\text{m}$  までの細さの微小流路を作製することができる
  - 3) これまで作製が困難であった3次元の形状（円形断面）と配置（立体交差）をもった微小流路を単一プロセスで作製することができる
  - 4) 疎水性の高い内壁をもった微小流路を作製することができる（接触角：約  $100^\circ$ ）
  - 5) 特徴的な立体的な構造の微小流路合流部を簡単に作製することができ、単分散な（ $\text{CV}=1.1\%$ ）液滴の生成が可能である
  - 6) 生成した液滴は、液滴の収縮・ゲル化法と組み合わせることで単分散ゲル微粒子を生成することが可能である（本実験条件では直径  $23\ \mu\text{m}$ 、 $\text{CV}=1.9\%$ ）
  - 7) 特別な機器・設備を一切使用せずに微小流路を作製することができ、初期費用・ランニングコストの両面でも経済的かつ安全なプロセスである
- という点にあり、様々な分野の研究・教育施設に簡易な微小流体プロセス実験法として取り入れられることで、微小流体工学技術のさらなる発展を広範囲に促進する基盤技術の一つとなることが期待される。

本手法が従来法であるフォトリソグラフィーの作製工程と比較して大きく異なる点は、（1）微細管で型どりして作製したゲルを鑄型として利用し、（2）その鑄型を溶解除去することで微小流路を作製する点である。

本手法の主要なメリットは、フォトリソグラフィーで作製困難な円形の断面形状および立体交差が作製できることであった。一方、デメリットは、ゲル鋳型が収縮するため（全体の収縮率は 0 から 13%）マイクロメートル単位の分解能で微小流路寸法を制御することが困難であること、また、数百マイクロメートルよりも微小な流路を作製することが困難であることであった。

本手法は、微小流路の作製技術としては、他の研究グループによって開発された親水／疎水パターン上の液体を鋳型として微小流路を鋳造する "Liquid Molding"[105, 106] を 3 次元に拡張したものとして位置付けられる。そこで、本手法を "Hydrogel Molding" と名付ける。

Hydrogel Molding に関して今回明らかになった課題、今後に残された課題としては、以下のような課題が挙げられる。

- 1) より細い微小流路（直径 200  $\mu\text{m}$  以下）を作製する手法の開発
- 2) 微小流路内壁面に親水性や化学修飾を付与する手法の開発
- 3) デバイス材料である PDMS の内部・表面のナノ構造の評価とその制御技術・機能化技術の開発
- 4) これまでにない立体的な形状・配置の微小構造の作製に基づいた新しい微小流体工学技術の開発
- 5) 既存デバイスとの液滴生成性能の比較

Hydrogel Molding で作製された微小流路は、マイクロカプセル（ゲル微粒子および液滴）の生成装置として利用できるものである。そこで次章では、Hydrogel Molding によって作製された微小流路における、液滴生成に関する詳細な評価について述べる。



## 第5章 微小流路の rapid prototyping 手法の開発 2 : ゲル鑄型 で作製した微小流路内での液滴生成挙動

## 5.1 概要

本章では、ゲルを鋳型として微小流路をシリコーンゴム中に作製する手法である Hydrogel Molding（第4章にて詳説した）を用いて、立体十字交差や様々な断面形状からなる平面 T 字合流（図 5.1 参照）を手作業で作製した。その微小流路内部における液滴の生成挙動について述べる。Hydrogel Molding で作製した微小流路を用いた液滴生成は、フォトリソグラフィー（従来の微小流路作製法）で作製された微小流路と比較して、どのように異なるかもしくは同等であるかを評価した。

立体十字交差や平面 T 字合流といった複雑な形状をもつ微小流路は、ひも状のゲル鋳型（ゲルワイヤー）を立体的および平面的に並べることで作製された。立体十字交差を持つ微小流路では、0.3、0.6、0.8 mm の3種類の太さ（内径）のガラス管もしくはテフロンチューブを用いてゲル鋳型を作製することで、流路サイズの異なる3種類の微小流路を作製した。また、平面 T 字合流部を持つ微小流路では、円、正方形、正三角形の3種類の断面形状からなるガラス管を用いてゲル鋳型を作製することで、流路の断面形状が異なる3種類の微小流路を作製した。

液滴生成に Hydrogel Molding で作製された複雑な形状の微小流路を用いることで、単分散性の高い（サイズの揃った）液滴を再現良く得られることを確認した。また、生成される液滴のサイズは、実験式から予測可能であった。本章で得られた知見から、工学的に液滴を応用する分野である droplet microfluidics、および、液滴ベースの微小流体工学技術である droplet-based lab on a chip 技術の開発において、Hydrogel Molding が基礎研究や技術開発を促進させる新たなツールとして利用可能であることが確認された。

なお本研究は、大寺貴裕氏との共同研究であるが、本論文著者が主体となって行われた。

## 5.2 器具と試薬

試薬、器具、機器、光学機器は、第4章と同一である（4.2を参照）。ただし、試薬・器具・測定機器については、第4章で用いたものに加えて以下を用いた。また、ガラス管の種類は第4章とは異なり、下記のように、断面形状が円形であり、内径が0.3、0.6、0.8 mmのもの（0.8 mmの管のみガラス管ではなくテフロンチューブを使用）および断面形状が正方形、正三角形からなるものを使用した。

試薬：

- ・増粘剤（メチルセルロース25、和光純薬）

器具：

- ・ガラス管（内径：0.3 mm、外径：1.0 mm）（特注品、サンエール）
- ・ガラス管（内径：0.6 mm、外径：1.0 mm）（G-1、ナリシゲ）
- ・テフロンチューブ（内径：0.8 mm、外径：1.59 mm）（フロン工業）
- ・ガラス管（断面形状：正方形、内面辺：0.5 mm）（特注品、高尾製作所）
- ・ガラス管（断面形状：正三角形、内面辺：0.5 mm）（特注品、高尾製作所）

測定機器：

- ・粘度計（SV型粘度計SV-10、エー・アンド・デイ）
- ・自動表面張力計（CBVP-Z、協和界面科学）

## 5.3 実験

### 5.3.1 微小流路の作製

平面的および立体的な微小流路のいずれにおいても、基本的な作製工程は、第4章で述べた作製工程（4.3.1を参照）と同一である。ただし、本実験では微小流路構造を PDMS の希釈なしに作製できると考えたため、シリコンオイルによる PDMS の希釈は行わなか

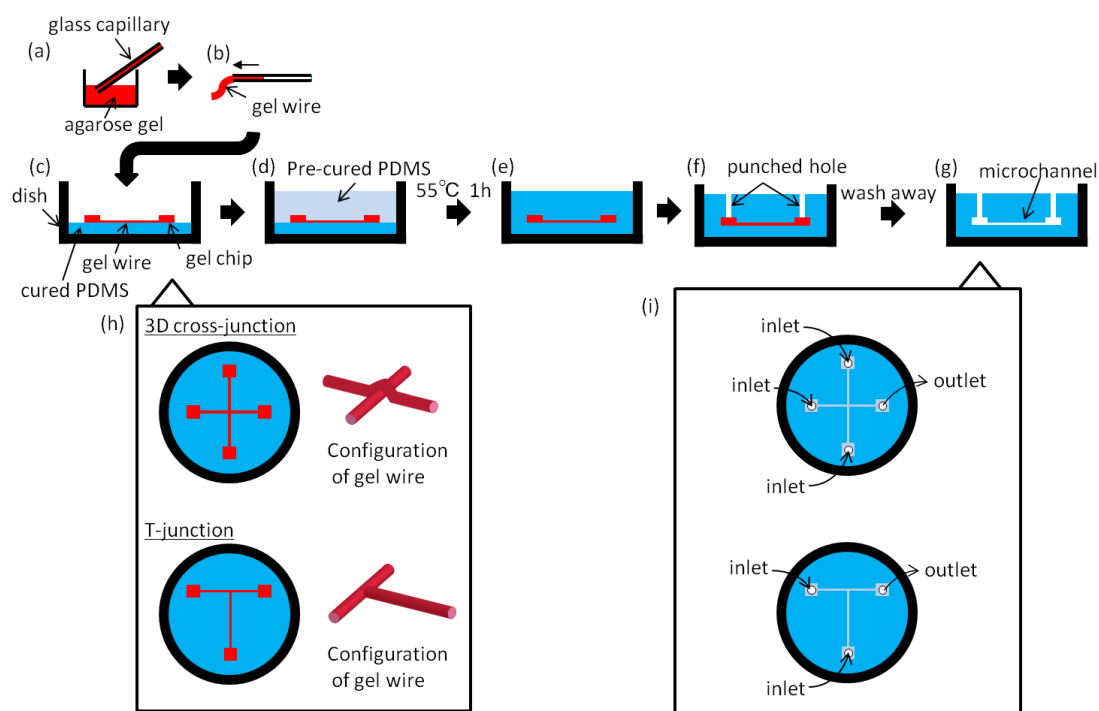


図 5.1 PDMS 製の平面的および立体的な微小流路の作製工程（概念図）。(a) アガロースゲルをガラス管に充填、(b) アガロースゲルを硬化しガラス管から取り出す、(c) 硬化した PDMS 上にゲルワイヤーおよびゲルチップを流路の形状に並べる、(d) 未硬化の PDMS を注ぐ、(e) 加熱により PDMS を硬化する、(f) 穴を開ける、(g) 残ったゲルを洗い流す。

(h) 作製した微小流路形状、(i) 送液/排出口のデザイン

Reprinted from Microfluids and Nanofluids, DOI: 10.1007/s10404-013-1327-1, 2014, Droplet formation behavior in a microfluidic device fabricated by hydrogel molding, T. Odera, H. Hirama, J. Kuroda, H. Moriguchi, T. Torii, Fig. 1, with kind permission from Springer Science and Business Media.

った。図 5.1 に簡略化した作製工程の概念図を示す。前章と同様に、本章でも、作製した微小流路を用いて水滴の生成実験を行うために、微小流路内壁を疎水化する必要があった。そこで、作製した微小流路に、シグマコートによる疎水化処理を行った（4.3.3を参照）。以下に、本章で作製し用いた、特徴的な構造（立体十字交差、様々な断面形状からなる平面 T 字合流）をもつ微小流路の作製工程について個別に述べる。

#### 5.3.1.1 立体十字交差を持つ微小流路

立体的な十字交差を持つ流路は、1 本のゲルワイヤーにもう 1 本のゲルワイヤーを交差するように配置することで作製した（図 5.1 h）。この時、2 本のゲルワイヤーの間には未硬化の PDMS が入り込まず、ゲルワイヤー同士が互いに接した状態となる（図 5.2 a）。これらのゲルワイヤーの作製には、太・中・細の三種類のガラス管もしくはテフロンチューブを用いた。

- ・細ガラス管：内径：0.3 mm、外径：1.0 mm
- ・中ガラス管：内径：0.6 mm、外径：1.0 mm
- ・太テフロンチューブ：内径：0.8 mm、外径：1.59 mm

#### 5.3.1.2 様々な断面形状からなる平面 T 字合流部を持つ微小流路

ゲル鋳型によって作製される微小流路の構造は、ゲルワイヤーの作製に用いる、ガラス管の断面形状に依存する。例えば、断面形状が円形のガラス管でゲルワイヤーを作製し、これを用いて微小流路を作製すると、最終的に得られる微小流路の断面形状は円形になる。本実験では、様々な断面形状からなる平面 T 字合流部を持つ微小流路を作製するため、分散相を導入する流路部分（分散相流路）の断面形状が円形、正方形、正三角形、連続相を導入する流路部分（連続相流路）はいずれも正方形となる微小流路を作製した（図 5.2 b、図 5.7 上）。円形、正方形、正三角形のガラス管を用いることで、異なる断面形状のゲルワイヤーを作製し、分散相流路の作製に使用した。これらのゲルワイヤーのうち、断面形状が正方形のものは、連続相流路の作製にも使用した。

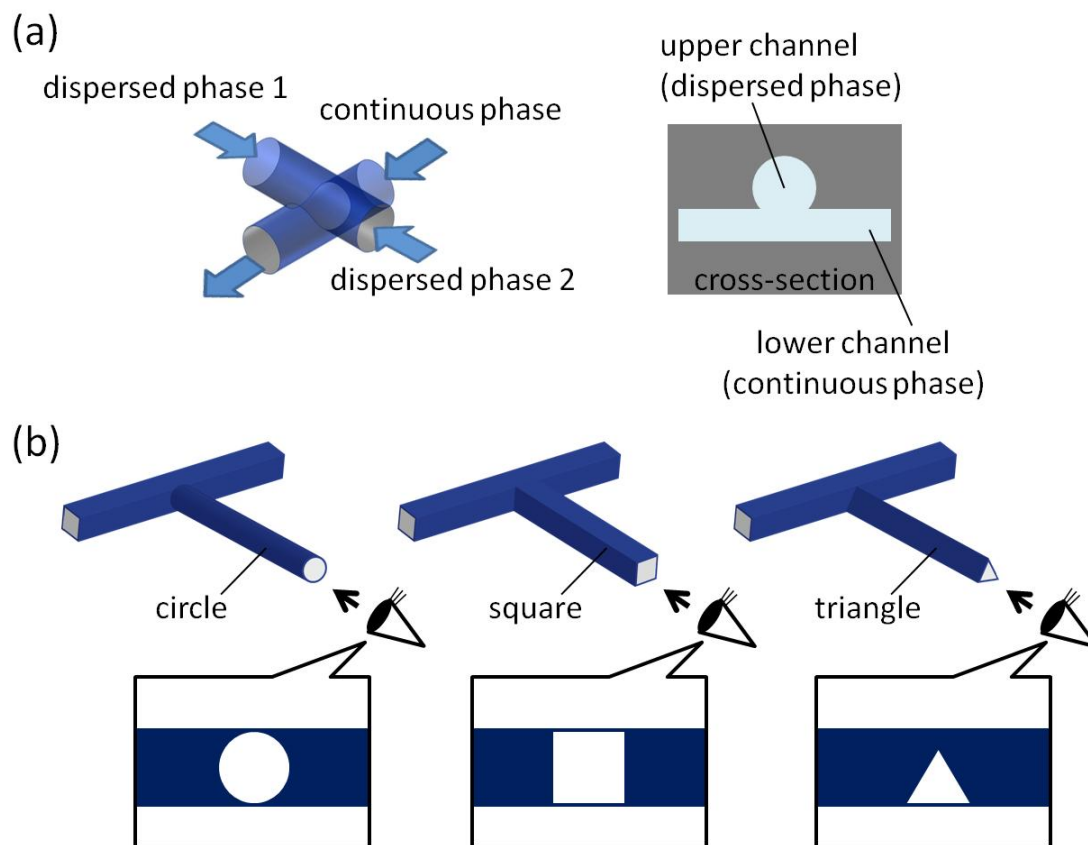


図 5.2 微小流路構造の概念図。(a) 立体十字交差を持つ微小流路を、上から（左図）、  
および断面方向から（右図）見た図。(b) 様々な断面形状からなる平面 T 字合流部をもつ  
微小流路を上から（上図）、およびある一方向から（下図）見た図

Adapted from Microfluids and Nanofluids, DOI: 10.1007/s10404-013-1327-1, 2014, Droplet formation behavior in a microfluidic device fabricated by hydrogel molding, T. Odera, H. Hiramama, J. Kuroda, H. Moriguchi, T. Torii, Fig. 2, with kind permission from Springer Science and Business Media.

5.3.2 微小流路内での液滴生成

5.3.2.1 立体十字交差を持つ微小流路

前章でも述べたように、立体十字交差をもつ微小流路を用いた液滴生成では、二相流（4.4.3を参照）および二色液滴（二相液滴）（4.4.5を参照）が生成できる。そこで本実験では、以下の3点を確認するため、立体十字交差をもつ微小流路を用いて実験を行った。

- 1) 連続相や分散相の流れのパターンの確認
- 2) 二相液滴（油中で分散する水滴）の生成の様子を観察
- 3) 生成される二相液滴のサイズ測定

実験条件として、微小流路へ導入する液体の物性（粘度）および流量、微小流路の直径を変化させて実験を行った（表 5.1、表 5.2）。なお、本実験で観察した「流れのパターン」とは、二相流、二相液滴、交互液滴が持続的に安定して形成されるパターン、およびそれらが不規則的に不安定化されるパターンを指す（5.4.2、図 5.5に詳述）。

表 5.1 立体十字交差を持つ微小流路を用いた流れのパターンの確認における実験条件  
Adapted from Microfluids and Nanofluids, DOI: 10.1007/s10404-013-1327-1, 2014, Droplet formation behavior in a microfluidic device fabricated by hydrogel molding, T. Odera, H. Hirama, J. Kuroda, H. Moriguchi, T. Torii, Table 1, with kind permission from Springer Science and Business Media.

|             | Diameter of Continuous phase microchannel<br>(inner diameter of the glass capillary) | Dispersed phase (viscosity [mPa・s]) |
|-------------|--|-------------------------------------|
| Condition 1 | 250 μm (300 μm)  | Mineral oil                         |
| Condition 2 | 500 μm (600 μm)  | Deionized (DI) water (1.29)         |
| Condition 3 | 500 μm (600 μm)  | DI water (1.29)                     |
|             |  | Methylcellulose (aq.) (21.6)        |

表 5.2 二相液滴の直径の計測における実験条件 Adapted from Microfluids and Nanofluids, DOI: 10.1007/s10404-013-1327-1, 2014, Droplet formation behavior in a microfluidic device fabricated by hydrogel molding, T. Odera, H. Hirama, J. Kuroda, H. Moriguchi, T. Torii, Table 2, with kind permission from Springer Science and Business Media.

| Diameter of the microchannel (inner diameter of the glass capillary) | Flow rate of the continuous phase (ml/h) (interval) | Flow rate of the dispersed phase (ml/h) |
|--|---|---|
| 250 $\mu\text{m}$ (300 $\mu\text{m}$ )                               | 0.1-1.0 (0.1)                                       | 0.2                                     |
|  | 0.1-1.0 (0.1)                                       | 0.4                                     |
|  | 1.0-10.0 (1.0)                                      | 1                                       |
| 500 $\mu\text{m}$ (600 $\mu\text{m}$ )                               | 0.4-4.0 (0.4)                                       | 0.2                                     |
|  | 0.4-4.0 (0.4)                                       | 0.4                                     |
| 750 $\mu\text{m}$ (800 $\mu\text{m}$ )                               | 1.0-10.0 (1.0)                                      | 1                                       |
|  | 2.0-20.0 (2.0)                                      | 2                                       |
|  | 2.0-20.0 (2.0)                                      | 4                                       |

連続相および分散相には、以下の液体を用いた。ただし、分散相の粘度が液滴生成に与える影響を確認するため、分散相には 2 種類の粘度の水溶液を用いた。

- ・連続相：界面活性剤 SY-グリスターCRS-75 を 1 wt% 添加したミネラルオイル
- ・分散相：食用色素を 1 wt% 添加した純水、もしくは、食用色素を 1 wt% 添加した 2%(w/v) メチルセルロース水溶液

連続相と分散相の粘度および液液界面張力は、粘度計および自動表面張力計により測定した (表 5.3)。また、図 5.2 a のように、連続相は底面側の流路に、分散相は上面側の流路に、それぞれ導入した。流量条件については、連続相の流量を固定し、分散相の流量のみを段階的に変化させて実験を行った。



表 5.3 分散相の粘度および界面張力

| Dispersed phase       | Viscosity (mPa・s) | Interfacial tension between the dispersed phase and continuous phase (mineral oil) (mN/m) |
|-----------------------|-------------------|---|
| Mineral oil           | 21.5              | —   |
| Water                 | 1.29              | 8.98  |
| Methylcellulose (aq.) | 21.6              | 1.97  |

### 5.3.2.2 様々な断面形状からなる平面 T 字合流部を持つ微小流路

様々な断面形状からなる平面 T 字合流部を持つ微小流路において生成される液滴の挙動を確認するため、円形、正方形、正三角形の断面形状を持つ微小流路を用いて、液滴生成実験を行った。実験条件として、微小流路に導入する液体の流量を変化させ（図 5.4）、各条件において生成される液滴のサイズを計測した。

本実験では、連続相および分散相に、以下の液体を用いた。

- ・連続相：界面活性剤 SY-グリスターCRS-75 を 1 wt% 添加したミネラルオイル
- ・分散相：食用色素を 1 wt% 添加した純水

流量条件については、分散相の流量を固定し、連続相の流量のみを段階的に変化させて実験を行った。

表 5.4 流量条件

| Flow rate of the continuous (ml/h)<br>(interval) | Flow rate of the continuous (ml/h) |
|--|------------------------------------|
| 0.4～4.0 (0.4)                                    | 0.4                                |
| 0.4～4.0 (0.4)                                    | 0.8                                |
| 1.0～10.0 (1.0)                                   | 2.0                                |

## 5.4 結果と考察

### 5.4.1 作製された微小流路

Hydrogel Molding に基づく微小流路作製工程によって、立体十字交差を持つ微小流路および様々な断面形状からなる平面 T 字合流部を持つ微小流路を作製した (図 5.3)。立体十字交差を持つ微小流路を評価するため、微小流路に着色した純水を満たし、顕微鏡にセットした CCD カメラで立体十字交差部を撮影した。撮影した画像から、画像解析ソフト (ImagePro Plus、Media Cybernetics) を用いて、立体十字交差部の直径を測定した (図 5.3 a)。その結果を以下に示す。

- ・ 250  $\mu\text{m}$  の微小流路の直径 : 245  $\mu\text{m}$  (標準偏差 : 9  $\mu\text{m}$ 、coefficient of variation (CV) : 4%、n=5)
- ・ 500  $\mu\text{m}$  の微小流路の直径 : 497  $\mu\text{m}$  (標準偏差 : 10  $\mu\text{m}$ 、CV : 2%、n=5)
- ・ 750  $\mu\text{m}$  の微小流路の直径 : 743  $\mu\text{m}$  (標準偏差 : 3  $\mu\text{m}$ 、CV : 0.4%、n=5)

いずれの微小流路においても、CV は 5% 以下という低い値が得られたことから、Hydrogel Molding は、寸法の高い再現性をもって立体十字交差を持つ微小流路を作製できることが確認された。

様々な断面形状からなる平面 T 字合流部を持つ微小流路を評価するため、微小流路の断面を切り出し、その切断面を顕微鏡にセットした CCD カメラで撮影した。撮影した画像から、画像解析ソフトを用いて、微小流路の断面積を測定した (図 5.3 b)。その結果を表 5.5 に示す。平面 T 字合流部を持つ微小流路においても、CV は 5% 以下と低い値が得られた。さらに、平面 T 字合流部において形成される角度の再現性を確認するため、T 字部の角度 (鋭角側) を撮影および測定した。その結果、角度は  $87^\circ$  (標準偏差 :  $4.6^\circ$ 、CV=5.3%、n=15) となった。以上より、Hydrogel Molding は、様々な断面形状からなる平面 T 字合流部を持つ微小流路においても、高い再現性をもって作製できることが確認された。

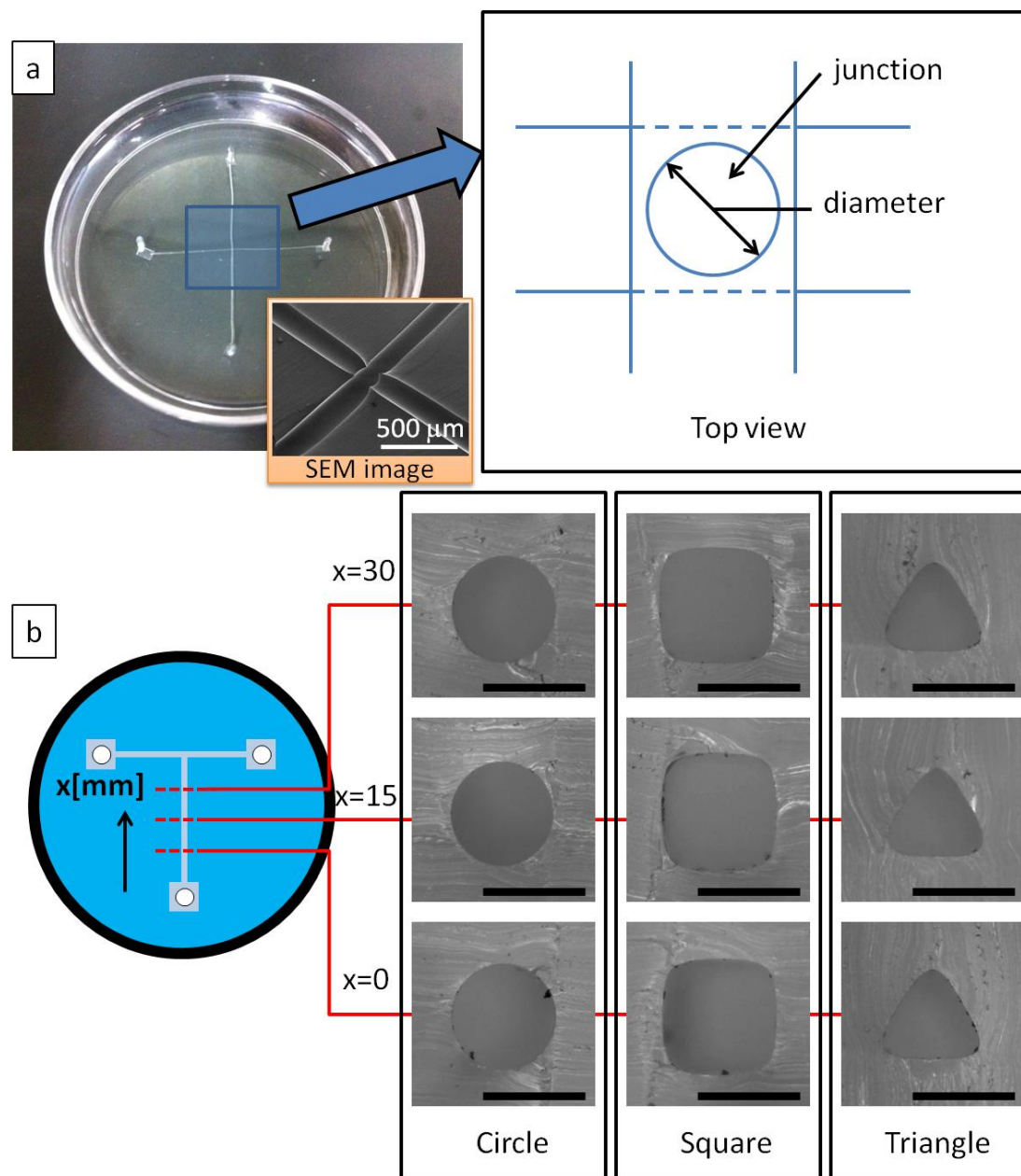


図 5.3 作製した微小流路。(a) 立体十字交差を持つ微小流路、(b) 様々な断面形状からなる平面 T 字合流部を持つ微小流路 (スケールバーは 500 μm)

Reprinted from Microfluids and Nanofluids, DOI: 10.1007/s10404-013-1327-1, 2014, Droplet formation behavior in a microfluidic device fabricated by hydrogel molding, T. Odera, H. Hirama, J. Kuroda, H. Moriguchi, T. Torii, Fig. 3, with kind permission from Springer Science and Business Media.

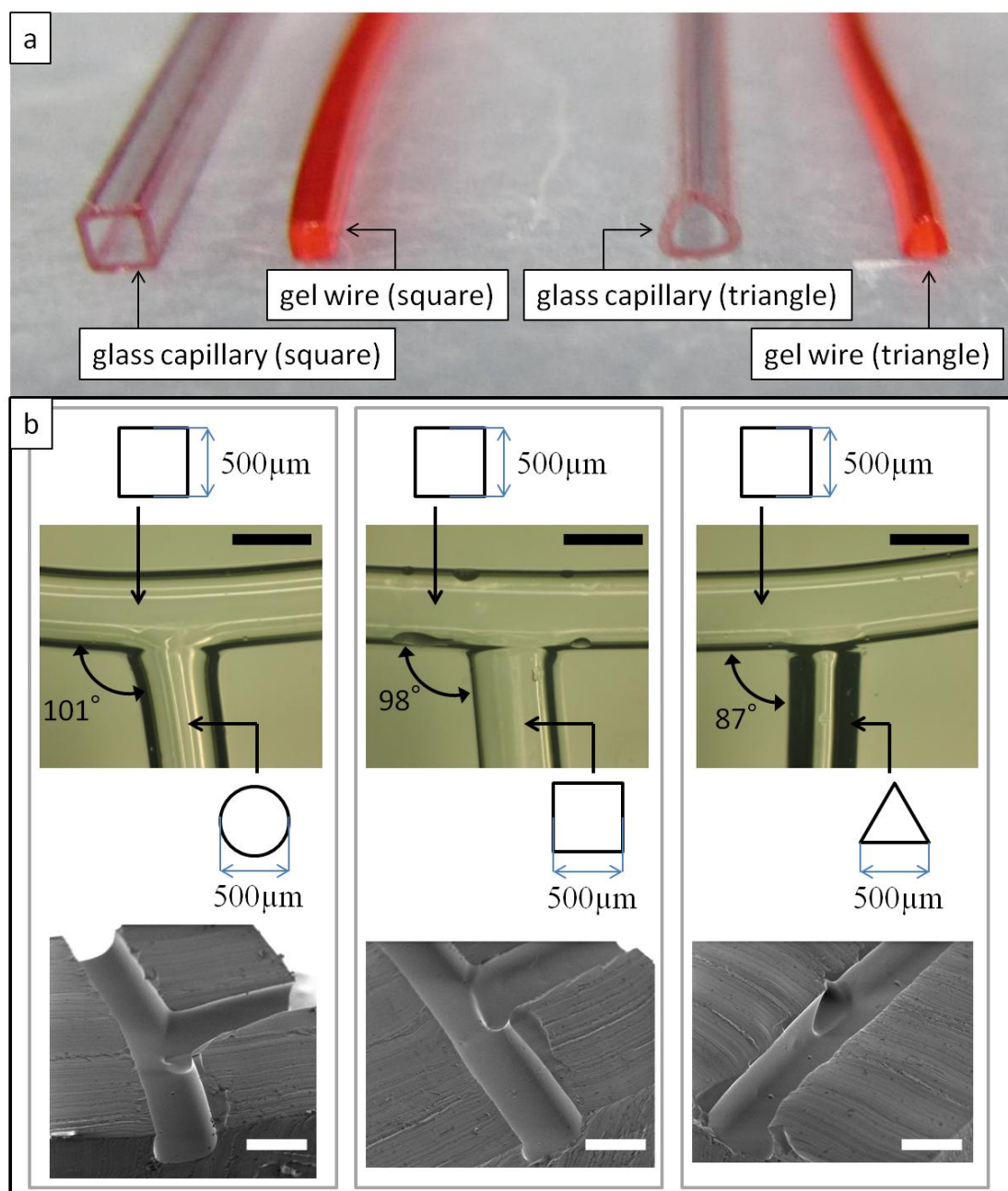


図 5.4 様々な断面形状からなる微小流路の T 字合流部。(a) 正方形および正三角形の断面形状をもつゲルワイヤー、(b) 作製された T 字合流部の位相差顕微鏡像 (上)、およびその切断面の電子顕微鏡像 (下) (スケールバーは 500 μm)

Reprinted from Microfluids and Nanofluids, DOI: 10.1007/s10404-013-1327-1, 2014, Droplet formation behavior in a microfluidic device fabricated by hydrogel molding, T. Odera, H. Hirama, J. Kuroda, H. Moriguchi, T. Torii, Fig. 4, with kind permission from Springer Science and Business Media.

表 5.5 様々な断面形状からなる平面 T 字合流部を持つ微小流路の断面積 Adapted from Microfluids and Nanofluids, DOI: 10.1007/s10404-013-1327-1, 2014, Droplet formation behavior in a microfluidic device fabricated by hydrogel molding, T. Odera, H. Hirama, J. Kuroda, H. Moriguchi, T. Torii, Table 3, with kind permission from Springer Science and Business Media.

| X (mm)             | Cross-sectional area (mm <sup>2</sup> ) |        |          |
|--------------------|---|--------|----------|
|                    | Circle                                  | Square | Triangle |
| 0                  | 0.175                                   | 0.241  | 0.121    |
| 7.5                | 0.172                                   | 0.246  | 0.119    |
| 15                 | 0.168                                   | 0.244  | 0.119    |
| 22.5               | 0.172                                   | 0.242  | 0.114    |
| 30                 | 0.173                                   | 0.244  | 0.12     |
| Average            | 0.172                                   | 0.244  | 0.119    |
| Standard deviation | 0.003                                   | 0.002  | 0.003    |
| CV (%)             | 1.48                                    | 0.76   | 2.27     |

#### 5.4.2 立体十字交差における流れのパターン

作製した立体十字交差を持つ微小流路における流れのパターンの特徴を確認した。なお本研究では、平面 T 字合流部を持つ微小流路における流れのパターンは、これまでに広く報告されているため[17, 107, 108]、議論しないこととした。

図 5.5 に、立体十字交差部で形成された、流れのパターンおよび液滴の種類を示す。流れ場に作用するパラメーターの大きさを比較する際、無次元数を用いて評価を行うことができる。特に微小流路内の流体挙動においては、粘性と界面張力が支配的となるため、粘度や界面張力の比である無次元数のキャピラリー数を用いて評価することができる。キャピラリー数は、以下の式で表される。

$$Ca = \frac{\eta U}{\sigma} \quad (5.1)$$

ただし、 $\eta$ ：粘度、 $\sigma$ ：界面張力、 $U$ ：流速

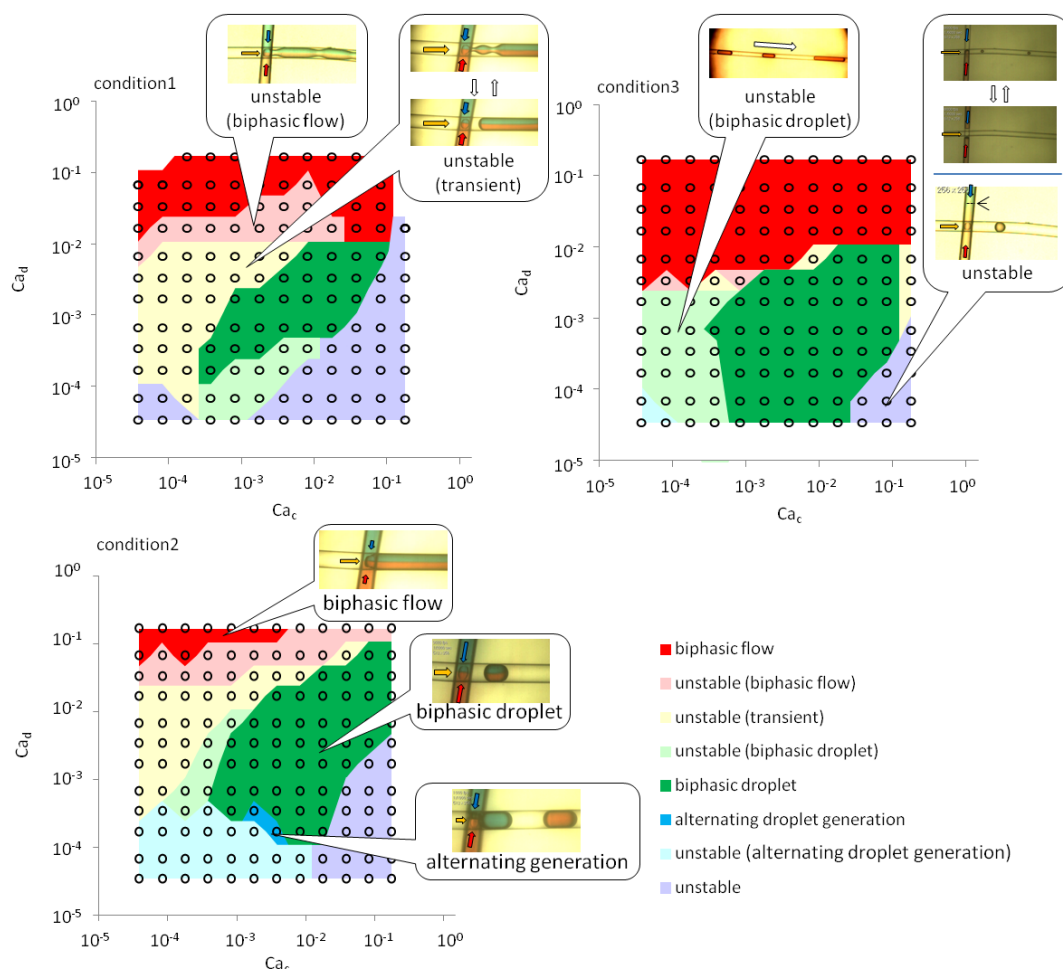


図 5.5 立体十字交差を持つ微小流路における流れのパターン（各 condition の詳細は、表 5.1 を参照）。unstable (biphasic flow) : 2 相の分散相が途切れずに下流まで伸びて連続相との界面が波打つ。unstable (biphasic droplet) : 二相液滴を生成するがサイズが不均一。unstable (transient) : unstable (biphasic flow) の状態と液滴生成の状態を交互に繰り返す。unstable : 分散相が交差部から出なくなったり分散相が連続相に押し戻されたりを繰り返す（上図）、もしくは 2 つの分散相間の界面が交差部から大きく移動し単相の液滴が生成（下図）

Adapted from Microfluids and Nanofluids, DOI: 10.1007/s10404-013-1327-1, 2014, Droplet formation behavior in a microfluidic device fabricated by hydrogel molding, T. Odera, H. Hirama, J. Kuroda, H. Moriguchi, T. Torii, Fig. 5, with kind permission from Springer Science and Business Media.

また、既往研究において、微小空間における流体の流れは、粘性力（粘性として記述される）と毛管力（キャピラリー数として記述される）のバランスによって制御されることが明らかになっている[109]。そこで本研究においても、粘度を含む無次元数としてキャピラリー数を用いて、流れのパターンを解析した。本実験では、流れのパターン（例：二相流）が 5 分間以上保持される場合はそのパターンが「安定」である、流れのパターンが 5 分までの間に遷移する場合はそのパターンが「不安定」とであると定義した。

いずれの実験条件（表 5.1 を参照）においても、混ざり合わない分散相の二相の流れからなる二相流および二相液滴が、一定のキャピラリー数の範囲で安定的に形成された。特に、二相液滴は、いずれの実験条件でも以下のキャピラリー数の領域で観察された。

- ・連続相キャピラリー数( $Ca_c$ ) :  $2 \times 10^{-4} < Ca_c < 1 \times 10^{-1}$
- ・分散相キャピラリー数( $Ca_d$ ) :  $3 \times 10^{-5} < Ca_d < 6 \times 10^{-4}$

この結果から、微小流路の直径や流体の物性に関係なく、上記のキャピラリー数（流量条件）の範囲を取るときに単分散な（サイズの揃った）二相液滴が生成されることが確認された。

二相流や二相液滴以外の流れのパターンとして、赤と緑の 2 種類の液滴が交互に生成する、交互液滴生成が観察された。この流れのパターンは、まず交差部に連続相であるミネラルオイルを満たした後、連続相と分散相である純水を流すことで、一定の流量範囲で 2 種類の分散相が合一することなく、それぞれの液滴が交互に生成することで生じた。また、交互液滴生成は、流量条件（キャピラリー数）によって、安定な領域と不安定な領域の二通り存在することが確認された。それぞれの特徴は以下のとおりであった。

安定な交互液滴生成（単分散な液滴が 5 分以上交互に生成されるときと定義）（図 5.5 の condition 2）：

- ・低粘度の分散相および広い微小流路を用いた時に観察された（表 5.1 の condition 2 を参照）

・このときキャピラリー数は、連続相キャピラリー数： $10^{-3} < Ca_c < 10^{-2}$ 、分散相キャピラリー数： $10^{-4} < Ca_c < 10^{-3}$  の領域をとった

不安的な交互液滴生成（5 分までの間に交互液滴生成以外のパターンに遷移するものと定義）：

・広い微小流路（直径 500 $\mu$ m）を用いた時のみ観察された（表 5.1、図 5.5 の condition 2、3）。

立体十字交差を持つ微小流路における液滴生成の挙動については、十分な調査や報告が行われていない（立体十字交差を持つ微小流路の作製が困難であるため）。そのため、既往研究の結果と本実験で得られた結果を直接比べるができなかった。そこで本研究では、以下の仮定および比較対象を設定することで、間接的に実験結果を比較することにした。

・仮定：立体十字交差を持つ微小流路（本研究）は平面十字合流部を持つ微小流路（既往研究）と同じような働きを示す

・比較対象：立体十字交差を持つ微小流路のキャピラリー数（本研究） vs. 平面十字合流部をもつ微小流路を用いた交互液滴生成のキャピラリー数（既往研究）

既報研究[110, 111]との比較の結果、交互液滴生成を生じるキャピラリー数の範囲（前述）は既往研究の範囲内にあり、Hydrogel Molding によって作製した微小流路を用いた交互液滴生成の挙動は、既往研究の結果と一致することが確認された。

#### 5.4.3 立体十字交差において生成される液滴のサイズ

立体十字交差を持つ微小流路を用いて、生成される液滴のサイズを確認した。実験には、3 種類の直径（250、500、750  $\mu$ m）の流路を用いて、流量を段階的に変えながら、液滴を生成した。生成された液滴は、顕微鏡にセットした CCD カメラで撮影し、画像解析ソフトを用いて測定した。図 5.6 に、縦軸に液滴直径を水力直径で割った無次元直径、横軸に分散相と連続相の比をキャピラリー数で表した（ただし、 $A=Ca_d/Ca_c$ ）。ここでは、生成される液滴のサイズを微小流路寸法に対する相対値として記述するため、直径を無次元化した



値を無次元直径( $d_{nd}$ )として用いた。無次元直径とそれに関連した値は以下のように定義した。

- ・ 無次元直径： $d_{nd}=d_m/d_h$
- ・ 水力直径： $d_h=4S/L$
- ・ 平均液滴直径： $d_m$
- ・ 微小流路の断面積： $S$
- ・ 微小流路断面の周長： $L$

図 5.6 に示す結果から、液滴直径（無次元直径）はキャピラリー数に対して指数関数的に増加することが確認された。また、得られた 3 つの実験式の決定係数 ( $R^2$  値) は、いずれも 0.9 以上であった。よって、予備実験により関係式を求めておくことによって、使用する微小流路の直径に応じて、液滴の直径を予測できることがわかった。

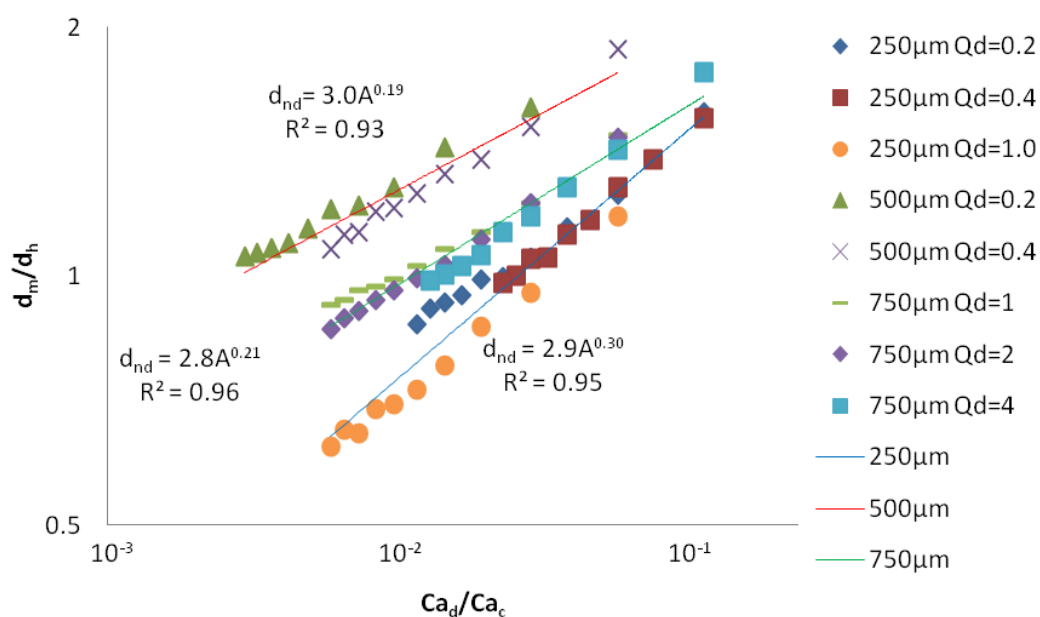


図 5.6 立体十字交差を持つ微小流路における液滴直径（無次元直径）とキャピラリー数の比の関係

Adapted from Microfluids and Nanofluids, DOI: 10.1007/s10404-013-1327-1, 2014, Droplet formation behavior in a microfluidic device fabricated by hydrogel molding, T. Odera, H. Hirama, J. Kuroda, H. Moriguchi, T. Torii, Fig. 6, with kind permission from Springer Science and Business Media.

続いて、Hydrogel Molding で作製した微小流路（本研究）と、他法で作製した既存の微小流路（既往研究）との性能比較を行った。具体的には、微小流路による液滴生成研究でよく議論されているパラメーターである、分散相流量と液滴サイズの関係を確認した。しかし、前項5.4.2と同様に、立体十字交差を持つ微小流路によって生成される液滴サイズの十分な議論や報告が行われていないため、既往研究の結果と本実験で得られた結果を直接比べることができなかった。そこで、ここでも仮定および比較対象を設定することで、間接的に実験結果を比較することにした。

- ・ 仮定：立体十字交差を持つ微小流路（本研究）は平面十字合流部を持つ微小流路（既往研究）と同じような働きを示す

- ・ 比較対象：立体十字交差を持つ微小流路を用いたときの分散相流量と液滴直径の関係（本研究） vs. 平面十字合流部をもつ微小流路を用いたときの分散相流量と液滴直径の関係（既往研究）

図 5.6 のように本実験では、液滴サイズは分散相流量に比例し、比例定数は 0.95～3.0 であった。この結果は、既往研究[112]における比例定数（1～2.52）とよく一致した。よって本実験からも、Hydrogel Molding によって作製した微小流路による液滴生成は、既往研究の結果と同等の挙動を示すことが確認された。

#### 5.4.4 平面 T 字合流部における液滴生成

様々な断面形状からなる平面 T 字合流部をもつ微小流路を用いて、生成される液滴のサイズを確認した。実験には、3 種類の断面形状（円形、正三角形、正三角形）の流路をそれぞれ用いて、流量を段階的に変えながら、液滴を生成した。生成された液滴は、顕微鏡にセットした CCD カメラで撮影し、画像解析ソフトを用いて測定した。図 5.7 に、縦軸に液滴直径を水力直径で割った無次元直径、横軸に分散相と連続相の比をキャピラリー数で表した（ただし、 $A=Ca_d/Ca_c$ ）。本実験においても、生成される液滴のサイズを微小流路寸法に対する相対値として記述するため、直径を無次元直径によって表した（5.4.3 を参照）。図 5.7 に示す結果から、液滴直径（無次元直径）はキャピラリー数に対して指数関数的に

増加することが確認された。また、得られた 3 つの実験式の決定係数 ( $R^2$  値) は、いずれもほぼ 0.9 以上であった。

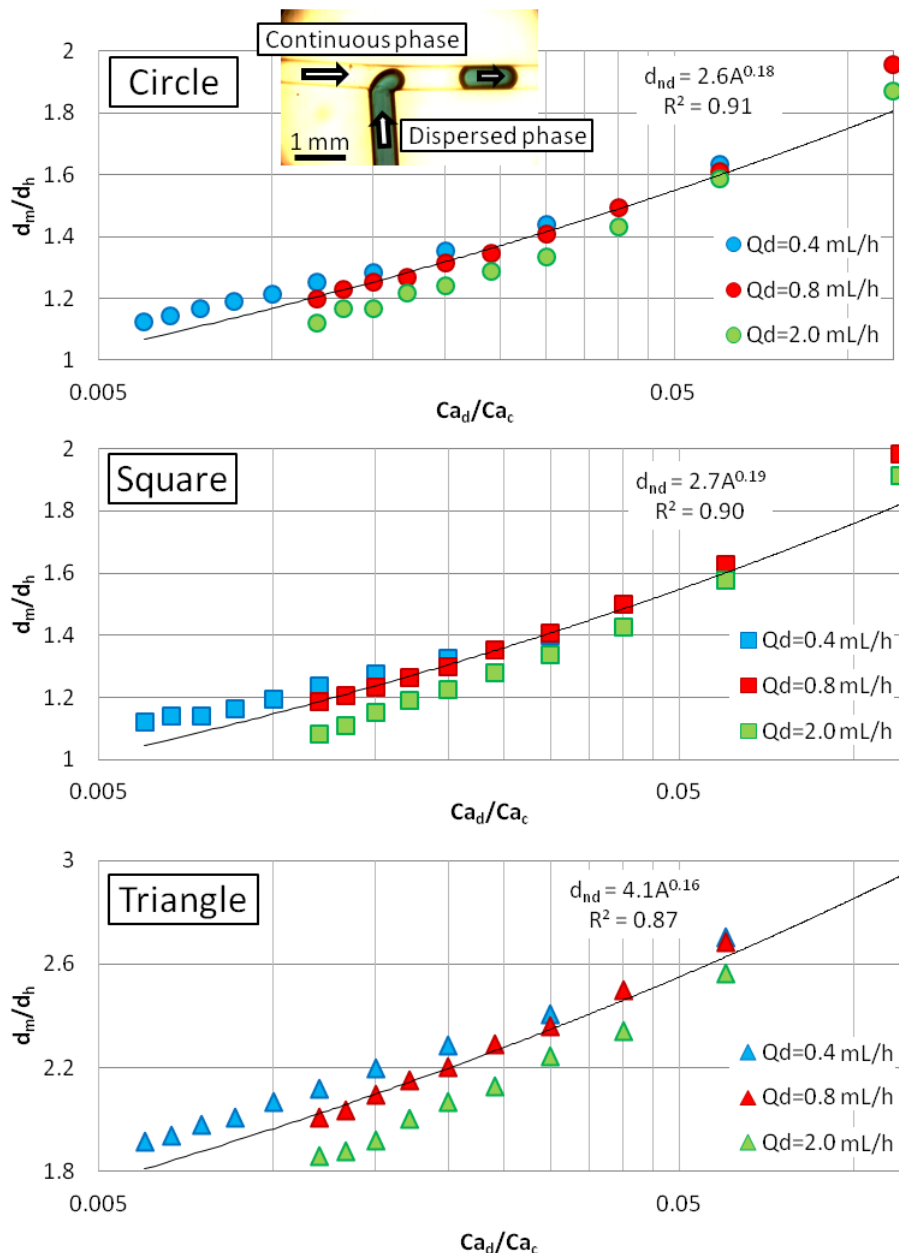


図 5.7 様々な断面形状からなる平面 T 字合流部を持つ微小流路における、液滴直径（無次元直径）とキャピラリー数の関係

Reprinted from Microfluids and Nanofluids, DOI: 10.1007/s10404-013-1327-1, 2014, Droplet formation behavior in a microfluidic device fabricated by hydrogel molding, T. Odera, H. Hirama, J. Kuroda, H. Moriguchi, T. Torii, Fig. 7, with kind permission from Springer Science and Business Media.

前項と同様に、本研究の微小流路と既往研究の微小流路との性能比較をするため、分散相流量と液滴サイズの関係を確認した。断面形状が正方形である微小流路は、既往研究で数多く作製・議論されているため、本研究の結果は既往研究の結果と直接比較できる。そこでまず、正方形の断面形状を持つ微小流路について検証を行った。本研究で作製した微小流路（正方形断面）では、液滴サイズは分散相流量に比例し、比例定数は 1.7 であった（図 5.8）。この結果は、既往研究における比例定数（1[108]および 1.82[113]）とよく一致した。よって本法によって作製される微小流路は、従来の rapid prototyping（迅速簡易作製）

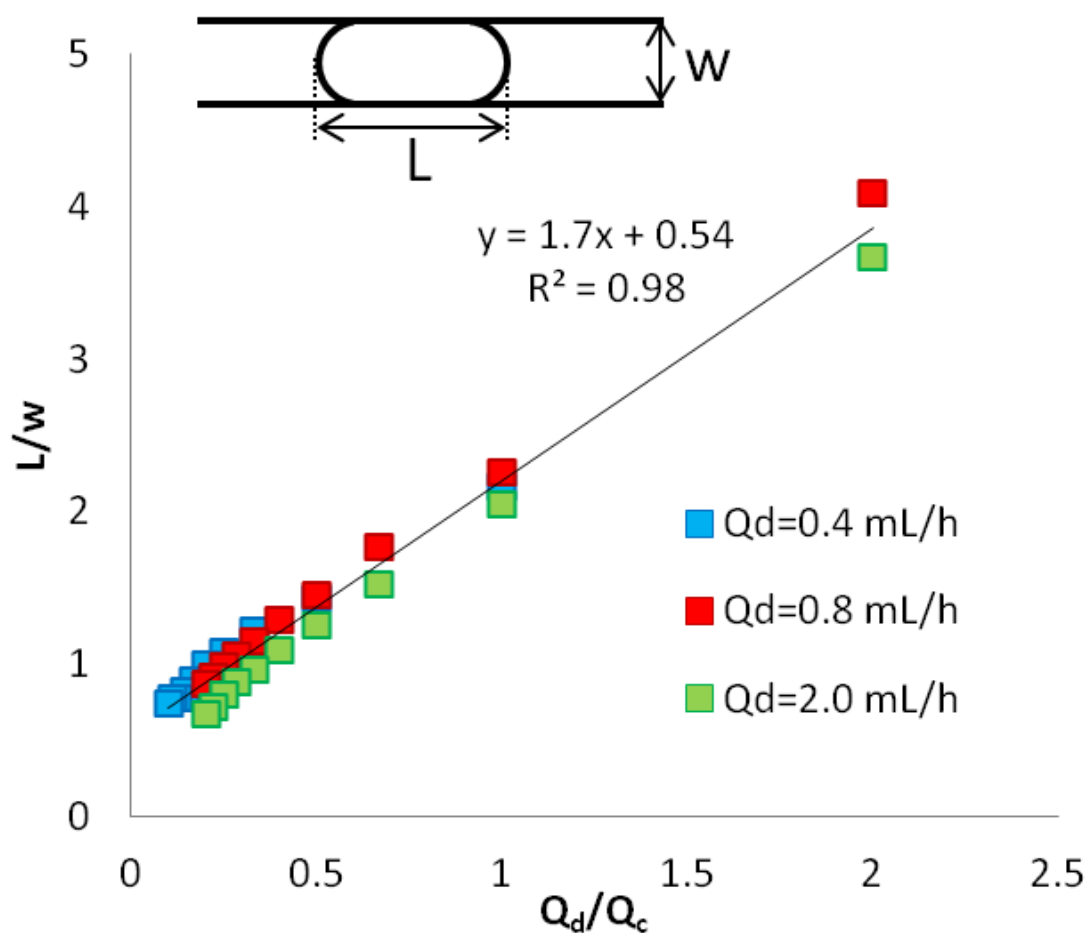


図 5.8 正方形の断面形状からなる平面 T 字合流部を持つ微小流路における、液滴サイズと流量比の関係。液滴サイズは  $L$  (=流路内のプラグ状の液滴の長径) /  $w$  (=流路幅)、キャピラリー数の比は  $Q_d/Q_c$  に換算した。本データでは、流路内の液滴が直方体であると仮定し、 $L/w = 4/3 \pi \times (\text{流路外の球形の液滴の半径})^3 / (\text{流路深さ} \times \text{流路幅})$  から、 $L/w$  を求めた

された微小流路と同等の信頼性を持って、液滴生成関連の用途に利用できることが確認された。結果を比較するために用いた Garstecki らによる既往研究 (Garstecki, 2006) では、本実験で使用した液体と同等のオーダーの粘度をもつ液体 (10 および 100 mPa·s) を使用して、液滴生成実験を行っている。その結果、いずれの粘度の液体を用いても、比例定数は 1 となることが報告されている。結果を比較するために用いた Liu らによる既往研究 (Liu, 2009) では、本実験と同様に比較的小さな Ca 数における液滴生成のシミュレーションを行っている。その結果、比例定数は 1.82 となることが報告されている。以上から、今回比較に用いた既往研究の実験とシミュレーションにおける実験条件は、本実験と同様であり、本実験と既往研究の比例定数を比較することが妥当であるといえる。

続いて、既往研究の微小流路 (正方形断面) とは異なる断面形状 (円形および三角形断面) をもつ微小流路について検証を行った。ここでは、先ほど既往研究と比較した、正方形の断面形状をもつ微小流路との比較を行った。図 5.7 の実験式から、断面形状が円形および正方形の微小流路から生成される液滴の直径とキャピラリー数においては、互いに類似した関係が見られた。本実験からは、液滴サイズは断面形状に影響を受けないことがわかった。

一方、これらの液滴直径を、断面形状が円形および正方形の微小流路と比較すると、断面形状が正三角形である場合の方が、小さい液滴が生成されることが確認された。このような違いが生じる理由には、微小流路の合流部の構造の違いが考えられた。前述のとおり、平面 T 字微小流路は正方形断面の微小流路の側面に、円形、正方形、正三角形断面の微小流路が合流するように接続することで作製される (図 5.2 b)。そのため、正三角形の断面形状をもつ微小流路では、正三角形断面の微小流路 (流路深さ : 約 430  $\mu\text{m}$ 。ただし流路内面辺は 500  $\mu\text{m}$ ) と正方形断面の微小流路 (流路深さ : 約 500  $\mu\text{m}$ ) との合流部で深さに大きな差ができるため (約 70  $\mu\text{m}$ )、段差構造ができる (図 5.2 b を参照)。一方、円形および正方形の断面形状を持つ微小流路では、T 字を構成する 2 本の微小流路 (円形断面流路 + 正方形断面流路、もしくは正方形断面流路 + 正方形断面流路) の流路深さが全て等しいため、T 字合流部に正三角形断面の流路で形成されるような段差はできない。段差構造をもつ

流路と持たない流路の間で、液滴生成の結果を直接比較することはできない。直接比較するには、段差構造を持たない三角形断面の微小流路を新たに作製して円形および正方形断面の流路の実験結果と比較する必要があると考えられる。

平面 T 字合流部を持つ微小流路では、T 字部の角度が液滴生成に影響を与える可能性を持っている。既往研究では、微小流路の T 字部の角度が  $60\sim 120^\circ$  の範囲にある場合、その流路によって生成される液滴のサイズは角度に影響を受けないと報告されている[114]。本研究で用いた微小流路の T 字部の角度は約  $90^\circ$ （5.4.1を参照）だったため、本実験では角度の影響は実質的に無視できるものであった。

また本実験においても、既往研究と同様に、生成された液滴はいずれも高い単分散性（CV <5%, n=50）を示した。このことから、既存の微小流路と同等に、Hydrogel Molding は、均一な液滴が生成できるデバイスの作製法であることが確認された。

## 5.5 結論

本章では、Hydrogel Molding で作製した微小流路を評価するため、Hydrogel Molding によって立体十字交差を持つ微小流路および様々な断面形状からなる平面 T 字合流部をもつ微小流路を作製し、その内部で生じる液滴生成の挙動について確認した。

Hydrogel Molding によって作製した微小流路と、従来法によって作製した微小流路の液滴生成挙動を比較した。その結果、以下について、本手法で作製した微小流路が従来法（フォトリソグラフィー）で作製した微小流路と同様の液滴生成の性能を示すことが確認された。

- ・作製した微小流路の寸法、および微小流路により生成された液滴は、いずれも CV が 5% 未満と、従来法と同様の再現性を示した。
- ・液滴サイズは分散相流量に比例し、比例定数は、立体十字交差をもつ微小流路では 0.93 から 3.0、平面 T 字合流部をもつ微小流路では 1.7 であり、従来法によって作製した微小流路の比例定数とよく一致した。
- ・立体十字交差をもつ微小流路では、従来法で作製した微小流路の場合と同様に、 $10^{-3} < Ca_c < 10^{-2}$ 、 $10^{-4} < Ca_c < 10^{-3}$  の範囲で安定な交互液滴生成を生じた。

本手法により作製した微小流路を用いて生成した液滴およびゲル微粒子は、機能性マイクロカプセルとして実際に利用可能であることから、Hydrogel Molding は微小流路の rapid prototyping 手法であるだけでなく、rapid manufacturing 手法として位置付けられる。また本手法は、droplet microfluidics の分野、および、droplet-based lab on a chip 技術の開発において、基礎研究や技術開発を促進させる新たなツールとしての貢献が期待できる。

## 第 6 章      結論と展望



## 6.1 結論

本研究では、生物学・医学・薬学分野で利用されることを想定した高機能マイクロカプセル開発のために、「マイクロカプセルの機能性の向上」と「微小流路の rapid prototyping 手法の開発」を目指した要素技術開発を行った。それぞれに関して以下の結論が得られた。

「第2章 高機能マイクロカプセルの開発1：ハイドロゲル/液滴界面における分子拡散を用いたアルギン酸ゲル微粒子の作製」で開発した、 $\text{Ca}^{2+}$ を含むハイドロゲル基板上に静置することでアルギン酸ナトリウム液滴を収縮・ゲル化しゲル微粒子を生成する手法は、ゲル微粒子内にタンパク質分子やナノ・マイクロスケールの粒子を濃縮し固定化できる手法であった。本研究は、single phase マイクロカプセルの開発として位置付けられるものであった。この収縮・ゲル化（およびそれを応用した濃縮・固定化）は、ゲル微粒子のもととなる液滴とハイドロゲル基板に含まれる水溶液の間の非常に大きな浸透圧差（約1000倍）および濃度差によって自発的に生じる物質移動を利用したものであった。本手法を用いることで、液滴は元の直径の1/5程度まで収縮させることが可能であった。また、液滴収縮率には、液滴濃度およびハイドロゲル基板中の水溶液濃度に対する濃度依存性があることが確認された。よって、それらの濃度を調整することで、目的とするゲル微粒子のサイズを制御できることが示唆された。本手法における液滴のゲル化は、ゲル化剤として働く  $\text{Ca}^{2+}$  が、ハイドロゲル基板から液滴へと移動することによって生じる。このときの  $\text{Ca}^{2+}$  の移動速度を拡散係数によって評価したところ、バルク系よりも小さな値である  $10^{-13}$  から  $10^{-12}$  のオーダーであることが確認された。また、本手法を用いることで、ゲル微粒子生成における技術的な問題を以下のように解決できた。（1）複数の寸法の微小流路を用いずに複数のサイズのゲル微粒子を生成できた。（2）細い流路を用いることなく小さなゲル微粒子が可能になったため細い流路を使用することによる流路の閉塞を生じることがなくなった。（3）ゲル微粒子は変形せずに球形を保ったまま生成できた。以上に加えて、液滴に生体分子や無機粒子を内包させることにより、ゲル微粒子のマイクロカプセルとしての応用可能性を確認した。生体分子であるタンパク質を添加した液滴を収縮・ゲル化させることにより、約85倍までタンパク質を濃縮することができた。また、無機粒子である酸化チ

タンおよび酸化鉄を添加した液滴を収縮・ゲル化し、それらを濃縮・固定化することが可能であることを確認した。本手法によって安定に大量生産したゲル微粒子は、生体物質や細胞を用いたハイスループットスクリーニングなどへの応用が可能になると考えられる。

「第3章 高機能マイクロカプセルの開発2：交互液滴生成法に基づく1対1カプセル化」で開発した、W/O/W エマルション液滴に2種類の粒子を1対1で閉じ込める手法は、添加する界面活性剤および各流量を適切に選択することで1粒子のハンドリングが可能となる手法であった。本研究は、double phase マイクロカプセルの開発として位置付けられるものであった。生成した W/O/W エマルション液滴は、直径：約 200  $\mu\text{m}$ 、coefficient of variation (CV)：1.9%、生成速度： $1 \times 10^3$  Hz であった。また、蛍光粒子を内包した W/O/W エマルション液滴の 20%が 1 対 1 で蛍光粒子を内包することができた。W/O/W エマルション液滴を安定に生成できる条件を確認するため、

- ・界面活性剤の親水疎水性を示す HLB 値、
- ・界面張力から導出される拡張係数

に関して検討を行った。これら二つの検討の結果、油相にモノマーもしくはポリマーの界面活性剤のどちらか一方のみを添加することで安定な W/O/W エマルション液滴を生成できることが確認された。以上のように、本手法を用いることで、微小流路の集積化や大面積化をせずに、1 対 1 カプセル化液滴をハイスループットに生成できた。本手法を細胞の 1 対 1 カプセル化に応用することで、さまざまな異種細胞間の相互作用をハイスループットに計測する系として利用可能となると期待される。

二つ目の要素技術研究である、新たな微小流路の rapid prototyping 手法の開発に関して、以下の結論が得られた（第4章、第5章）。

「第4章 微小流路の rapid prototyping 手法の開発1：ゲル鑄型を用いた "lithography-free" の微小流路作製法の開発」で開発した、Hydrogel Molding という手法は、ゲル鑄型によるシリコーンゴムの鑄造という独自の加工原理に基づいて3次元の微小流路を手作業だけで自由に設計して作製する微小流路の rapid prototyping 手法であった。

本手法は、以下の特徴をもつ。

- 1) 接着剤を用いることなく分岐構造をもつ微小流路が作製できる
- 2) 直径 250  $\mu\text{m}$  までの細さの微小流路が作製できる
- 3) 従来法では作製困難な 3 次元的な形状（円形断面）と配置（立体交差）をもつ微小流路を単一プロセスで作製できる
- 4) 作製した微小流路を用いて単分散液滴生成が実施できる
- 5) 安価で安全性の高い器具・試薬のみ用いて実施できる

また本研究成果は、実験系の導入やランニングコスト、試薬や手法の安全性の面から見ても、極めて低コストかつグリーンな技術であることから、微細加工設備を持たない一般の研究教育施設が微小流体工学技術を導入しその応用試験を行うことを広く促進するものと考えられる。

「第5章 微小流路の rapid prototyping 手法の開発 2：ゲル鋳型で作製した微小流路内の液滴生成挙動」で実施した、Hydrogel Molding で作製した微小流路の液滴生成の評価実験では、Hydrogel Molding によって作製した微小流路と、従来法（フォトリソグラフィ）によって作製した微小流路の液滴生成挙動を比較した。その結果、以下について、本手法で作製した微小流路が従来法（フォトリソグラフィ）で作製した微小流路と同様の液滴生成の性能を示すことが確認された。

- ・作製した微小流路の寸法、および微小流路により生成された液滴は、いずれも CV が 5% 未満と、従来法と同様の再現性を示した。

- ・液滴サイズは分散相流量に比例し、比例定数は、立体十字交差をもつ微小流路では 0.93 から 3.0、平面 T 字合流部をもつ微小流路では 1.7 であり、従来法によって作製した微小流路の比例定数とよく一致した。

- ・立体十字交差をもつ微小流路では、従来法で作製した微小流路の場合と同様に、 $10^{-3} < \text{Ca}_c < 10^{-2}$ 、 $10^{-4} < \text{Ca}_c < 10^{-3}$  の範囲で安定な交互液滴生成を生じた。

本手法により作製した微小流路を用いて生成した液滴およびゲル微粒子は、機能性マイクロカプセルとして実際に利用可能であることから、Hydrogel Molding は微小流路の rapid prototyping 手法であるだけでなく、rapid manufacturing 手法として位置付けら

れる。また本手法は、droplet microfluidics の分野、および、droplet-based lab on a chip 技術の開発において、基礎研究や技術開発を促進させる新たなツールとしての貢献が期待できる。

生物学を対象にした実験手法、医療機器、医薬品の開発では、それぞれの有用性や実用性を向上させるため、従来の技術的課題を克服できる高機能化された技術の開発が重要である。また一方で、当該分野における研究開発では、複雑な研究開発工程や多種の対象サンプルを取り扱う必要があるため時間がかかる。そのため、研究開発プロセス全体の迅速化は重要な要素である。それら課題に対して、上記の要素技術開発に関する研究により、当該分野において利用可能な、高機能化されたマイクロカプセルを開発した。また、高機能マイクロカプセルを生成するための微小流路の rapid prototyping 手法を開発した。本研究結果は、マイクロカプセルの高機能化と迅速化に貢献できると考えられる。本研究成果にもとづき、分析機器、医療機器、医薬品の開発が迅速促進されることが期待される。

## 6.2 展望

今後の展望として以下の事項が挙げられる。

### ゲル微粒子について

#### 1) 浸透圧調整物質の検討

本研究では、アルギン酸ナトリウムと  $\text{CaCl}_2$  を浸透圧調整物質として用いることで、液滴を収縮・ゲル化させた。液滴の収縮・ゲル化現象を起こす物質の組み合わせとして利用できるものには、この他にも、ゲル化させる高分子材料としてペクチン、カラギーナン、ジェランガムなど、ゲル化剤としてカルシウムやマグネシウムの塩が考えられる。用途に応じてこれらの材料を適宜選択することで、異なる機能を付与できると考えられる。

#### 2) 濃縮・固定化した物質の高感度分析

ゲル微粒子中にナノ・マイクロサイズの物質を高濃度で固定化できるという手法は、対象物質がほんのわずかだけ懸濁している溶液をもとにゲル微粒子を生成し、対象物質を濃縮・固定化することが可能である。そのため、事前に対象物質に蛍光などの標識を施しておくことで、懸濁液から検出するよりも高感度に対象物質が検出できるようになると考えられる。このような溶液中に懸濁した対象物質の高感度検出を実現するため、懸濁液の濃度について検出限界の検討を進めていきたい。また、対象物質の標識の方法も最適化が必要であると考えている。さらに、分析の対象物質がゲル微粒子から漏れ出さないようにするため、対象物質の物性に合わせたゲル微粒子の化学組成の検討が必要となると考えている。例えば、ゲル微粒子を構成する高分子の官能基を修飾することで親水/疎水性を制御することが有効となるかもしれない。

#### 3) ゲル微粒子の自己集積化による機能性材料の創成

ゲル微粒子は、ハイドロゲルで構成されているため外側は親水性である。そのため、任意の形状に親水/疎水性のパターンを施した基板上にゲル微粒子を載せると自己集積化によ

り、そのパターンに応じた形状（シートやファイバー状構造など）を作製することが可能であると予想される。例えば、無機ナノ粒子を内包させたゲル微粒子から、シート構造を作製することで孔が均一に配列した多孔質なシートが作製できると考えられる。

#### W/O/W エマルション液滴について

##### 1) 細胞の1対1カプセル化への応用

粒子ではなく実際に細胞をカプセル化することで、異種細胞の相互作用を1個対1個で観察できる系を構築する。1対1で細胞をカプセル化した細胞の観察を実現するためには、1対1で細胞をカプセル化した液滴のみを選別して集める工程が必要となる。この液滴の選別・回収には、セルソーターが利用できると考えられる。セルソーターを最適化することで、効率のよい液滴の選別・回収の実施が可能になると考えられる。

#### 微小流路について

##### 1) ゲル鑄型に含ませた薬剤によるデバイスの表面改質

鑄型材料としてのゲルは、多量の液体で膨潤しているという他の鑄型材料には無い特徴を有する。このことは「鑄型に含ませた薬品で成型相手の表面改質を行う」という新しい手法の可能性を示唆する。例えばPDMSを成型する場合、PDMSの架橋反応である「ヒドロシリル化反応」に参加して共有結合でグラフト化される可能性があるビニル基を有するシランカップリング剤をあらかじめゲル鑄型側に含ませておいて、さらにアミノ基など反応性の高い官能基を有するシランカップリング剤と共にオリゴマーを形成させておく。これによって、最終的に得られるPDMS表面にアミノ基を導入し、その後の表面修飾反応の足場とすることも可能ではないかと考えている。また、アミノ基が流路内壁に導入されたかどうかはFluorescein isothiocyanate (FITC)等を用いれば蛍光観察で簡単に検証できると考えられる。他には、アミノ基を有するキトサンやカルボキシル基を有するアルギン酸などを鑄型に混ぜ込んでおいて、高分子鎖の絡み合いによって成型される材料の表面に取り込ませる、などの可能性追求の余地があると考えている。

## 2) ゲル鑄型に埋め込んだ諸材料・諸機能のデバイスへの組み込み

ゲルを鑄型に用いて成型後にそれを溶解除去する、という方法を取ることから想定されるもう一つの具体的展開は、ゲル鑄型に金属・ガラスから他のゲル・生きた細胞までの諸材料・諸機能をあらかじめ埋め込んでおいてデバイスに組み込む・埋め込むという手法の開発である。例えば金属細線やガラス管をゲルに刺しておけばそれらが流路内に顔を出した状態を簡単に造ることができると思われ。これらは電気化学計測用の微小電極やゲル鑄型だけでは作製の難しい数百ナノメートルから数マイクロメートルオーダーの開口として利用できる。あるいは溶解条件の異なるゲルを混ぜ込んでおけば流路の内部にそのゲル充填剤としてそのまま残ることになり、フィルターや化学物質の濃度グラデーション形成の場として利用する、あるいはそれを足場として機能的生体膜を形成する、というような機能を実現できるのではないかと考えている。ゲルの種類によっては様々な生きた細胞の固定材として利用できる、比較的培養の易しそうなところでは目的に応じた遺伝子を導入した酵母や大腸菌等の微生物を希望する順に埋め込んだバイオリアクターデバイスをなどが作製できるのではないかと考えている。このようなプロセッシング機能の他にも、電極の埋め込みと組み合わせたゲルの組み込みによりゲル固定化酵素、あるいはゲルを足場とした生体膜形成とイオンチャネル共役型受容体等の膜タンパク質の組み込みなどにより高度の特異性や感度を備えたセンサ機能の実現の可能性もあると考えている。

## 3) 3次元微細構造の新しい機能の追求

ゲルを鑄型に用いて溶解除去する方式をとることから想定されるもう一つの展開は、従来法では作製が困難であった3次元的に入り組んだ構造や流線型の構造の作製とそれを生かした新機能の創成である。本研究で2色液滴を生成する流路構造がごく簡単な手技で作製されたことが示唆するように、新しい構造の作製は新しい機能の創成に直結するものである。例えば流路中にZ軸方向に漏斗型の吹き溜まり構造を作り、流れてくる微粒子を自動的にトラップする・回収する・フィルタリングする・ソーティングする、というようなことも可能ではないかと考えている。

## 付録



## 付録 A：ゲル鑄型のサイズ変化

ゲル鑄型のサイズ変化現象の有無と程度を調べるため、ガラス管内径と断面積の変化量（=ガラス管の断面積－作製された微小流路の断面積）を比較した。その結果を図 S 1 に示す。ガラス管内径と断面積の変化量に明確な相関が得られなかった。そこで本研究では、断面積ではなく直径を用いてサイズ変化を比較した（4.4.2 参照）。

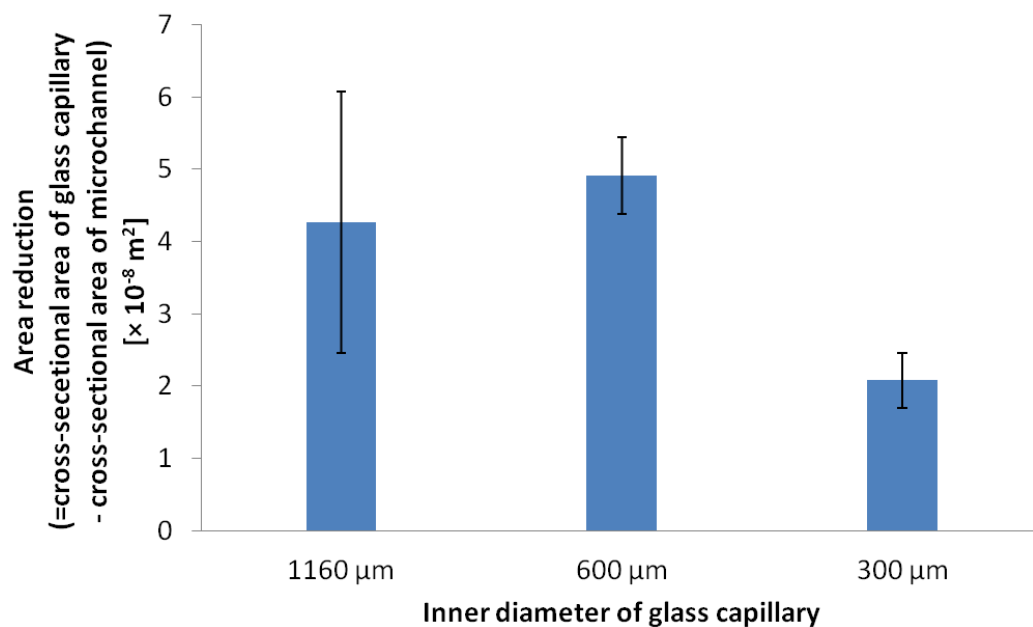


図 S 1 微小流路の作製工程における直径減少量の比較 (n=6)

## 付録 B : Hydrogel Molding により作製された PDMS の表面分析

フーリエ変換赤外分光法 (FTIR) を用いて、Hydrogel Molding により作製した PDMS の表面を分析した。本実験では、数 cm 角の板状の PDMS 薄片を測定試料として作製し、その表面を測定した。Hydrogel Molding によって作製した (アガロースゲルに接触させた状態で硬化した) PDMS 表面に存在する官能基を確認するため、フォトレジスト SU-8 (微小流路を作製する際に用いられる鋳型材料) によって作製した (フォトレジストに接触させた状態で硬化した) PDMS 表面、ガラス板 (比較のため) によって作製した (ガラス板に接触させた状態で硬化した) PDMS 表面を作製し比較した。図 S1 に測定結果を示す。FTIR によって測定されたスペクトルからは、顕著な違いが見られなかった。よって、Hydrogel Molding によって作製した PDMS 表面および SU-8 やガラスによって作製した PDMS 表面に、官能基に関する違いは見られなかった。

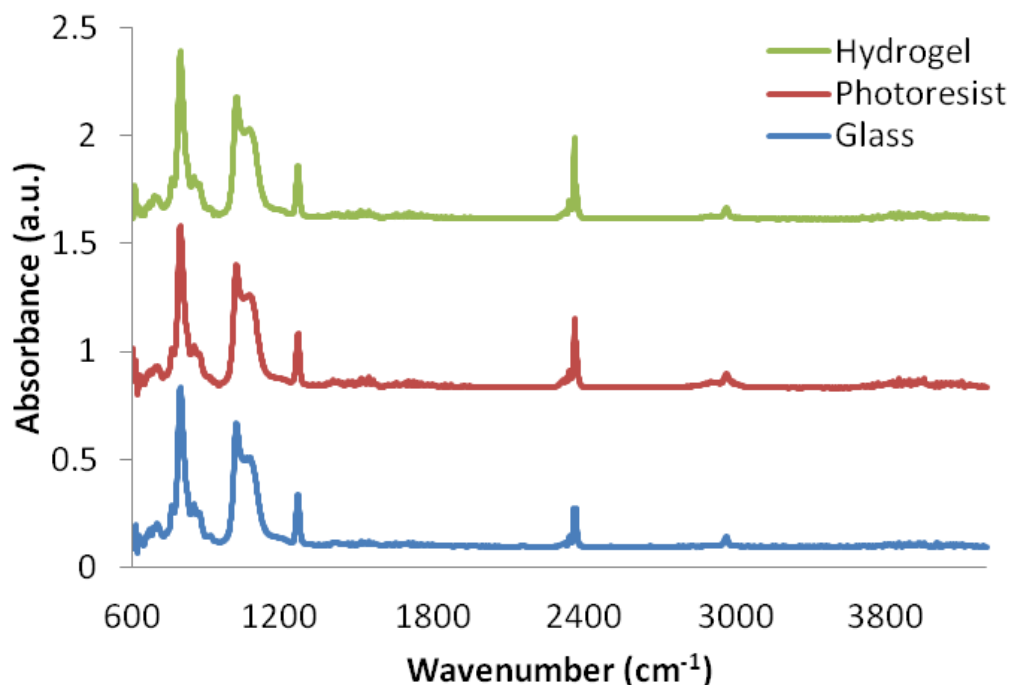


図 S2 FTIR により測定した PDMS 表面のスペクトル。FT/IR-6300typeA (日本分光) を用いて、全反射測定法によって測定した

## 付録 C : W/O/W エマルション液滴の回収法

生成された W/O/W エマルション液滴を安定的に回収するため、回収法を検討した。微小流路から生成された液滴は、図 S 3 a のように外水相に包まれた状態で排出された。液滴はポリスチレンディッシュ中に回収した。この液滴を回収後に安定に保つことができる条件を確認した。なお、安定な液滴とは、回収後も W/O/W エマルション液滴の状態を保つもの、不安定な液滴とは、回収後に内水相液滴が外水相（PBS/surfactant）に抜け出してしまい油滴だけの状態となるものと定義した（図 S 1 a）。

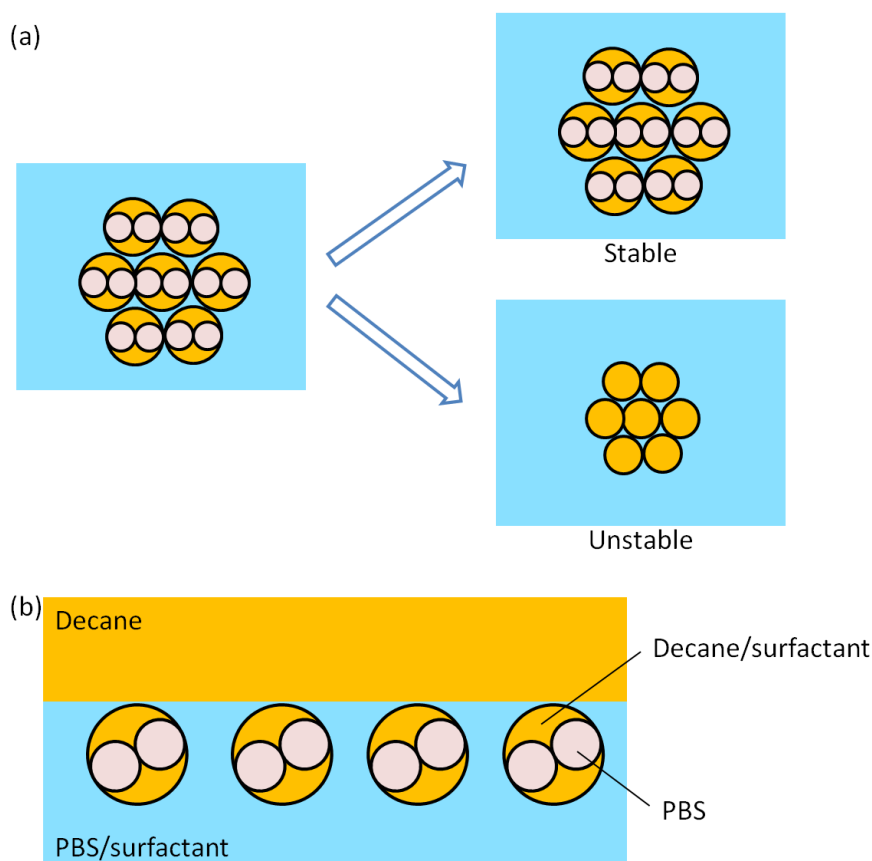


図 S 3 回収後の液滴の状態。(a)安定な液滴と不安定な液滴の概念図。生成時の液滴の形態（左）および回収後の液滴の形態（右）。(b)検討した条件のうち最も安定に液滴を保持できた条件の概念図。回収時のディッシュの断面図を示している

以下の条件で液滴を回収し、液滴が安定保持できる条件を検討した。

- 1) 何も加えていないディッシュに直接液滴を滴下
- 2) ディッシュに疎水性の PDMS を置き、液滴を滴下
- 3) ディッシュにデカンを注ぎ、液滴を滴下
- 4) ディッシュに PBS/2%界面活性剤ポリビニルアルコール (PVA) を注ぎ、液滴を滴下
- 5) ディッシュにデカン/1%界面活性剤 SY-グリスター CRS-75 を注ぎ、液滴を滴下
- 6) ディッシュに PBS/2%PVA を注ぎ、その上にデカンを重層し、液滴を滴下
- 7) ディッシュに PBS/2%PVA を注ぎ、その上にデカン/1%界面活性剤 SY-グリスター CRS-75 を重層し、液滴を滴下

上記の方法により、微小流路で作製された W/O/W エマルション液滴（表 3.2c の条件で生成）を回収した。その結果、条件 6 のみが、回収後数十分以上の間、安定的に液滴を保持することができた（図 S2b）。それ以外の条件では、数分以内に W/O/W エマルション液滴が壊れてしまった。各条件における違いを以下のように考察した。条件 1、2 では、滴下した液滴がディッシュや PDMS 表面に直接当たってしまうため、液滴に直接衝撃が伝わり液滴が瞬時に壊れたと考えられる。それに対し、条件 3、4、5、7 では、あらかじめディッシュに注いでおいた液体が、液滴に伝わる衝撃を軽減し、安定保持することが期待された。しかし、いずれも回収後の数分後に W/O/W エマルション液滴は壊れて油滴となってしまう。このような結果になった原因は、各条件でそれぞれ異なる理由が考えられる。条件 3 では、デカン中に滴下されることで、W/O/W エマルション液滴の表面を覆う界面活性剤分子（液滴の安定化に必須であり、外水相から供給される）が供給されずに不足し、液滴が不安定化したと考えられる。条件 4 では、界面活性剤を供給する PBS（外水相）が用意されているが、W/O/W エマルション液滴は外水相よりも比重が小さいため外水相表面に浮き、空気中に液滴の一部が露出する状態になった。その結果、液滴表面に界面活性剤分子が供給されずに不安定化したと考えられる。条件 5 では、デカンに界面活性剤分子が添加されているが、これはポリマー分子であり、液滴表面を覆っているモノマー分子からなる界面活性剤（PVA）と干渉する（図 3.6 参照）ため、液滴が不安定化したと考えら

れる。条件7でも同様に、ポリマーとモノマーの界面活性剤分子が干渉し合った結果、液滴が不安定化したと考えられる。以上に対し、液滴が安定化した条件6（図 S3b）では、デカンが重層されることで液滴が空気中に露出するのを防ぎ、さらに液滴を覆っているモノマー分子の界面活性剤が外水相から供給される状態にあるため（液滴表面を覆う界面活性剤分子が局所的に減少したとき、その箇所に界面活性剤分子が自発的に供給されること（マランゴニ効果）が知られている[115]）、液滴が最も安定化されたと考えられる。本結果を踏まえて、3.4.2.1の実験では、条件6の方法で液滴の回収を行った。

## 本研究に関連する発表

### 査読付き投稿論文

Takahiro Odera, Hirotsada Hirama, Jo Kuroda, Hiroyuki Moriguchi, Toru Torii,  
Droplet formation behavior in a microfluidic device fabricated by hydrogel molding,  
Microfluidics and Nanofluidics, 2014, DOI: 10.1007/s10404-013-1327-1

Kyouhei. Aketagawa, Hirotsada Hirama, Hiroyuki Moriguchi, Toru Torii,  
Hyper-miniaturization of monodisperse alginate-TiO<sub>2</sub> composite particles with densely  
packed TiO<sub>2</sub> nanoparticles,  
Microfluidics and Nanofluidics, vol. 17, pp. 217-224, 2014

Kyouhei. Aketagawa, Hirotsada Hirama, Toru Torii,  
Hyper-Miniaturisation of Monodisperse Janus Hydrogel Beads with Magnetic  
Anisotropy based on Coagulation of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticles,  
Journal of Materials Science and Chemical Engineering, vol. 1, pp. 1-5, 2013

Hirotsada Hirama, Taisuke Kambe, Kyouhei Aketagawa, Taku Ota, Hiroyuki Moriguchi,  
Toru Torii  
Hyper alginate gel microbead formation by molecular diffusion at the hydrogel/droplet  
interface,  
Langmuir, vol. 29, pp. 519-524, 2013

Hirotsada Hirama, Takahiro Odera, Toru Torii, Hiroyuki Moriguchi

A lithography-free procedure for fabricating three-dimensional microchannels using hydrogel molds,

Biomedical Microdevices, vol. 14, pp. 689-697, 2012

国際会議発表

2014

Hirotsada Hiramatsu and Toru Torii,

Micro-concentrator of protein in miniaturized droplets and gel beads,  
13th International Conferences on Microreaction Technology (IMRET 13), pp. 132-133,  
Budapest, Hungary, 23-25 June 2013

Hirotsada Hiramatsu and Toru Torii,

Protein concentration based on a droplet shrinkage-gelation method,  
The 7th International Symposium on Machinery and Mechatronics for Agriculture and  
Biosystems Engineering (ISMAB 2014), pp. 366-370, Yilan, Taiwan, 21-23 May 2013

2013

Kyouhei Aketagawa, Hirotsada Hiramatsu, and Toru Torii,

Fabrication of Janus hydrogel beads with magnetic anisotropy for electronic paper  
using shrinkage-gelation technique,  
The 17th International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems  
(Transducers' 2013), pp. 2652-2655, Barcelona, Spain, 16-20 June 2013

Yusuke Sugiura, Jo Kuroda, Hirotsada Hiramatsu, and Toru Torii,

Rapid Bacterial Count Device for Green Plant Factory,  
The 2013 IFAC Bio-Robotics Conference, P-9, Osaka, Japan, 27-29 March 2013

2012

Hirotsada Hiramatsu and Toru Torii,

Alternate droplet generation for one-to-one cell encapsulation,  
IEEE-EMBS Micro- and Nanoengineering in Medicine Conference (MNMIC 2012), paper  
No. 15, Hawaii, USA, 3-7 December 2012



Kyouhei Aketagawa, Hirotsada Hirama, Hiroyuki Moriguchi, and Toru Torii,  
Janus hydrogel beads for electronic paper using shrinkage-gelation technique,  
The 16th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life  
Sciences ( $\mu$ TAS 2012), pp. 890-892, Okinawa, Japan, 28 October-1 November 2012

Hirotsada Hirama, Yusuke Sugiura, Jo Kuroda, and Toru Torii,  
Fabrication of a microfluidic device with pneumatic valves using hydrogel molds,  
9th International Gel Symposium (Gelsympo 2012), p. 182, Tsukuba, Japan, 9-12  
October 2012

Hirotsada Hirama, Kyouhei Aketagawa, Hiroyuki Moriguchi, and Toru Torii,  
Gel microbeads formation using molecular diffusion at droplet-hydrogel interface,  
The 4th International Symposium on Microchemistry and Microsystems (ISMM 2012),  
pp. 456-457, Hsinchu, Taiwan, 10-13 June 2012

Kyouhei Aketagawa, Hirotsada Hirama, Hiroyuki Moriguchi, and Toru Torii,  
Shrinkage and gelation of sodium alginate droplets on an oil/hydrogel interface and  
application of gel trapping technique,  
The 4th International Symposium on Microchemistry and Microsystems (ISMM 2012),  
pp. 132-133, Hsinchu, Taiwan, 10-13 June 2012

2011

Hirotsada Hirama, Hiroyuki Moriguchi, and Toru Torii,  
A microfabrication-free procedure to fabricate 3-dimensional microfluidic devices using  
hydrogel molds,  
The 15th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life  
Sciences ( $\mu$ TAS 2011), pp. 975-977, Seattle, USA, 2-6 October 2011

Kyouhei Aketagawa, Hirotsada Hirama, Hiroyuki Moriguchi, and Toru Torii,  
Fabrication of titania microspheres using alginate microdroplets on an oil/hydrogel  
interface,  
The 15th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life  
Sciences ( $\mu$ TAS 2011), pp. 1615-1617, Seattle, USA, 2-6 October 2011

Hirotsada Hirama, Hiroyuki Moriguchi, and Toru Torii,

Development of a new method for microfluidic device fabrication and application to gel-beads formation,

The 3rd International Symposium on Microchemistry and Microsystems (ISMM 2011), F3-097, Seoul, Korea, 2-4 June 2011

Hirotsada Hirama, Hiroyuki Moriguchi, and Toru Torii,

Development of a new method for microfluidic device fabrication and application to single-cell encapsulation,

The 6th International Conference on Microtechnologies in Medicine and Biology (MMB 2011), pp. 257-258, Lucerne, Switzerland, 4-6 May 2011

Hirotsada Hirama, Jiro Shimamura, Hiroyuki Moriguchi, and Toru Torii,

Controlled production of isolated floating microcultures using microchannels,

International Conference on Biomaterials Science 2011 (ICBS 2011), pp. 520-521, Tsukuba, Japan, 15-18 March 2011

## 国内学会発表

2013

太田拓、平間宏忠、佐々木友理恵、小林史幸、小竹佐知子、鳥居徹

微小流路を用いた食品マイクロカプセルの生成

日本食品工学会第14回（2013年度）年次大会、3-1P-13、京都、2013年8月9-10日

平間宏忠、鳥居徹

交互液滴生成による1対1細胞カプセル化

化学工学会 第78年会、K118、大阪、2013年3月17-19日

太田拓、平間宏忠、小林史幸、佐々木友理恵、小竹佐知子、鳥居徹

微小流路を用いた食品マイクロカプセルの開発に関する研究

日本食品科学工学会 平成25年度関東支部大会、D4、東京、2013年3月9日

2012

平間宏忠、明田川恭平、森口裕之、鳥居徹

油 - ハイドロゲル界面における物質移動を利用したゲル微粒子生成

第23回高分子ゲル研究討論会、pp. 49-50、東京、2012年1月11-12日

2011

平間宏忠、森口裕之、鳥居徹

「油 - ハイドロゲル界面における液滴の収縮・ゲル化現象」の可視化を目的としたモデル系「液滴-液滴系」による物質移動計測

第24回化学とマイクロ・ナノシステム研究会（24th CHEMINAS）、p. 6、大阪、2011年11月17-18日

平間宏忠、森口裕之、鳥居徹

“ハイドロゲルモールドイング”によるPDMSの三次元微細加工

第3回マイクロナノ工学シンポジウム、MP-11、東京、2011年9月26-27日

平間宏忠、森口裕之、鳥居徹

液滴 - ハイドロゲル界面での物質拡散を利用した微小液滴の収縮とゲル

電気学会 センサ・マイクロマシン部門総合研究会、pp. 79-82、横浜、2011 年 6 月 30 日  
-7 月 1 日

平間宏忠、森口裕之、鳥居徹

ハイドロゲルを鋳型とした PDMS 製微小流路の作製法

第 23 回化学とマイクロ・ナノシステム研究会 (23th CHEMINAS)、p. 12、千葉、2011 年 6  
月 10-11 日

明田川恭平、平間宏忠、森口裕之、鳥居徹

油・親水性ゲル界面におけるゲル収縮を用いたチタニア粒子作製

第 23 回化学とマイクロ・ナノシステム研究会 (23th CHEMINAS)、p. 85、千葉、2011 年 6  
月 10-11 日

2010

平間宏忠、島村次郎、森口裕之、鳥居徹

マイクロチャネルによる孤立浮遊性マイクロカルチャーの生成を目指した微粒子内包多相  
エマルションの生成

第 22 回化学とマイクロ・ナノシステム研究会 (22th CHEMINAS)、p. 6、名古屋、2010 年  
11 月 17-18 日

## 特許申請

[発明者] 鳥居徹、森口裕之、平間宏忠

[特許権者] 株式会社東京大学 TL0

[発明の名称] ゲルビーズの固化装置及びゲルビーズの固化方法

[特許番号] 特開 2012-223726

[出願日] 2011 年 4 月 21 日

[公開日] 2012 年 11 月 15 日

## 謝辞

本研究を進めるにあたり、博士課程の指導教員である 東京大学大学院 新領域創成科学研究科 人間環境学専攻 鳥居徹 教授、修士課程の指導教員である 理化学研究所 生命システム研究センター 集積バイオデバイス研究ユニット 森口裕之 客員研究員、および留学時の指導教員である Universität Stuttgart, Institut für Zellbiologie und Immunologie, Prof. Peter Scheurich には、研究の基礎から多岐にわたる御助言、御指導をいただきました。心より感謝いたします。

本論文の審査にあたり、審査員の先生方には、お忙しい中数多くの貴重な御助言と御指導をいただきました。心より感謝の意を表します。

東京大学大学院 新領域創成科学研究科 人間環境学専攻 割澤 伸一 准教授

東京大学大学院 新領域創成科学研究科 人間環境学専攻 染矢 聡 客員准教授

東京大学大学院 工学系研究科 精密工学専攻 神保 泰彦 教授

東京大学 生産技術研究所 藤井 輝夫 教授

最後に、鳥居研究室および他研究室の皆様、また長い間支援とともに暖かく見守って下さった家族に、心からの感謝の気持と敬意を表します。

2014 年 8 月 20 日

平間 宏忠

## 参考文献

- [1] 小石真純, 江藤桂, and 日暮久乃, 造る+使うマイクロカプセル. 東京: 工業調査会, 2005.
- [2] H. Zimmermann, M. Hillgartner, B. Manz, P. Feilen, F. Brunnenmeier, U. Leinfelder, M. Weber, H. Cramer, S. Schneider, C. Hendrich, F. Volke, and U. Zimmermann, "Fabrication of homogeneously cross-linked, functional alginate microcapsules validated by NMR-, CLSM- and AFM-imaging," *Biomaterials*, vol. 24, pp. 2083-2096, May 2003.
- [3] H. L. Guo, X. P. Zhao, and J. P. Wang, "Synthesis of functional microcapsules containing suspensions responsive to electric fields," *J Colloid Interface Sci*, vol. 284, pp. 646-651, Apr 2005.
- [4] R. Qiao, X. L. Zhang, R. Qiu, and Y. S. Kang, "Synthesis of functional microcapsules by in situ polymerization for electrophoretic image display elements," *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 313, pp. 347-350, Feb 2008.
- [5] B. Fei, H. F. Lu, K. H. Qi, H. F. Shi, T. X. Liu, X. Z. Li, and J. H. Xin, "Multi-functional microcapsules produced by aerosol reaction," *Journal of Aerosol Science*, vol. 39, pp. 1089-1098, Dec 2008.
- [6] C. H. Yang, K. S. Huang, Y. S. Lin, K. Lu, C. C. Tzeng, E. C. Wang, C. H. Lin, W. Y. Hsu, and J. Y. Chang, "Microfluidic assisted synthesis of multi-functional polycaprolactone microcapsules: incorporation of CdTe quantum dots, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> superparamagnetic nanoparticles and tamoxifen anticancer drugs," *Lab Chip*, vol. 9, pp. 961-965, 2009.
- [7] Y. F. Pan, H. N. Xiao, and X. Jiang, "Functional microcapsules loaded with antibiotics for antimicrobial cellulose fibre-based products," *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*, vol. 244, Aug 2012.

- 
- [8] W. He, X. C. Gu, and S. Liu, "Surfactant-Free One-Step Synthesis of Dual-Functional Polyurea Microcapsules: Contact Infection Control and Drug Delivery," *Advanced Functional Materials*, vol. 22, pp. 4023-4031, Oct 2012.
- [9] K. Kanaya, S. Akao, R. Misumi, K. Nishi, and M. Kaminoyama, "Development of method for estimating drop diameter in the manufacturing process of functional O/W microcapsules," *Chemical Engineering Research & Design*, vol. 91, pp. 2098-2105, Nov 2013.
- [10] 小石真純, マイクロ/ナノ系カプセル・微粒子の開発と応用 vol. 305. 東京: シーエムシー出版, 2009.
- [11] Q. B. Xu, M. Hashimoto, T. T. Dang, T. Hoare, D. S. Kohane, G. M. Whitesides, R. Langer, and D. G. Anderson, "Preparation of Monodisperse Biodegradable Polymer Microparticles Using a Microfluidic Flow-Focusing Device for Controlled Drug Delivery," *Small*, vol. 5, pp. 1575-1581, Jul 2009.
- [12] U. O. Hafeli, K. Saatchi, P. Elischer, R. Misri, M. Bokharaei, N. R. Labiris, and B. Stoeber, "Lung Perfusion Imaging with Monosized Biodegradable Microspheres," *Biomacromolecules*, vol. 11, pp. 561-567, Mar 2010.
- [13] S. Torres-Giner, A. Martinez-Abad, M. J. Ocio, and J. M. Lagaron, "Stabilization of a Nutraceutical Omega-3 Fatty Acid by Encapsulation in Ultrathin Electrosprayed Zein Prolamine," *Journal of Food Science*, vol. 75, pp. N69-N79, Aug 2010.
- [14] S. H. Anwar and B. Kunz, "The influence of drying methods on the stabilization of fish oil microcapsules: Comparison of spray granulation, spray drying, and freeze drying," *Journal of Food Engineering*, vol. 105, pp. 367-378, Jul 2011.
- [15] 尾見信三, 佐藤寿弥, and 川瀬進, 高分子微粒子の技術と応用 vol. 170. 東京: シーエムシー出版, 2004.
- [16] 川井明, 松本進一, 桐谷英昭, 及川智之, 原克幸, 大川朋裕, 二見達, 片山晃治, and 西澤恵一郎, "分級不要ゲル製造用マイクロリアクターの開発," *TOSOH Research & Technology Review*, vol. 47, pp. 3-9, 2003.
- [17] T. Nisisako, T. Torii, and T. Higuchi, "Droplet formation in a microchannel network," *Lab Chip*, vol. 2, pp. 24-6, Feb 2002.
- [18] T. Nisisako, T. Torii, and T. Higuchi, "Novel microreactors for functional polymer beads," *Chemical Engineering Journal*, vol. 101, pp. 23-29, 2004.
- [19] P. Tabeling, *Introduction to Microfluidics*: OUP Oxford, 2005.
- [20] W. Wang, M. J. Zhang, and L. Y. Chu, "Functional Polymeric Microparticles Engineered from Controllable Microfluidic Emulsions," *Accounts of Chemical Research*, vol. 47, pp. 373-384, Feb 2014.
-



- 
- [21] S. Okushima, T. Nisisako, T. Torii, and T. Higuchi, "Controlled production of monodisperse double emulsions by two-step droplet breakup in microfluidic devices," *Langmuir*, vol. 20, pp. 9905-8, Nov 9 2004.
- [22] A. S. Utada, E. Lorenceau, D. R. Link, P. D. Kaplan, H. A. Stone, and D. A. Weitz, "Monodisperse double emulsions generated from a microcapillary device," *Science*, vol. 308, pp. 537-41, Apr 22 2005.
- [23] H. Zhang, E. Tumarkin, R. Peerani, Z. Nie, R. M. A. Sullan, G. C. Walker, and E. Kumacheva, "Microfluidic production of biopolymer microcapsules with controlled morphology," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 128, pp. 12205-12210, Sep 20 2006.
- [24] K. Liu, H. J. Ding, J. Liu, Y. Chen, and X. Z. Zhao, "Shape-controlled production of biodegradable calcium alginate gel microparticles using a novel microfluidic device," *Langmuir*, vol. 22, pp. 9453-7, Oct 24 2006.
- [25] K. S. Huang, T. H. Lai, and Y. C. Lin, "Manipulating the generation of Ca-alginate microspheres using microfluidic channels as a carrier of gold nanoparticles," *Lab Chip*, vol. 6, pp. 954-957, 2006 2006.
- [26] K.-S. Huang, M.-K. Liu, C.-H. Wu, Y.-T. Yen, and Y.-C. Lin, "Calcium alginate microcapsule generation on a microfluidic system fabricated using the optical disk process," *Journal of Micromechanics and Microengineering*, vol. 17, pp. 1428-1434, 2007.
- [27] E. Um, D. S. Lee, H. B. Pyo, and J. K. Park, "Continuous generation of hydrogel beads and encapsulation of biological materials using a microfluidic droplet-merging channel," *Microfluidics and Nanofluidics*, vol. 5, pp. 541-549, Oct 2008.
- [28] D. Saeki, S. Sugiura, T. Kanamori, S. Sato, and S. Ichikawa, "Formation of monodisperse calcium alginate microbeads by rupture of water-in-oil-in-water droplets with an ultra-thin oil phase layer," *Lab Chip*, vol. 10, pp. 2292-5, Sep 7 2010.
- [29] L. Capretto, S. Mazzitelli, G. Luca, and C. Nastruzzi, "Preparation and characterization of polysaccharidic microbeads by a microfluidic technique: application to the encapsulation of Sertoli cells," *Acta Biomater*, vol. 6, pp. 429-35, Feb 2010.
- [30] S. Sugaya, M. Yamada, A. Hori, and M. Seki, "Microfluidic production of single micrometer-sized hydrogel beads utilizing droplet dissolution in a polar solvent," *Biomicrofluidics*, vol. 7, Sep 2013.
- [31] A. Miyama, M. Yamada, S. Sugaya, and M. Seki, "A droplet-based microfluidic process to produce yarn-ball-shaped hydrogel microbeads," *RSC Advances*, vol. 3, pp. 12299-12306, 2013.
- [32] B. Cai, F. Guo, L. B. Zhao, R. X. He, B. R. Chen, Z. B. He, X. L. Yu, S. S. Guo, B. Xiong, W. Liu, and X. Z. Zhao, "Disk-like hydrogel bead-based immunofluorescence staining toward identification and observation of circulating tumor cells," *Microfluidics and Nanofluidics*, vol. 16, pp. 29-37, Jan 2014.
-

- 
- [33] C. D. Syme, C. Martino, R. Yusvana, N. M. Sirimuthu, and J. M. Cooper, "Quantitative Characterization of Individual Microdroplets using Surface-Enhanced Resonance Raman Scattering Spectroscopy," *Anal Chem*, vol. 84, pp. 1491-5, Feb 7 2012.
- [34] S. Sugiura, M. Nakajima, H. Itou, and M. Seki, "Synthesis of polymeric microspheres with narrow size distributions employing microchannel emulsification," *Macromolecular Rapid Communications*, vol. 22, pp. 773-778, Jul 2001.
- [35] J. M. Li, C. Liu, X. D. Dai, H. H. Chen, Y. Liang, H. L. Sun, H. Tian, and X. P. Ding, "PMMA microfluidic devices with three-dimensional features for blood cell filtration," *Journal of Micromechanics and Microengineering*, vol. 18, p. 095021, 2008.
- [36] D. Di Carlo, D. Irimia, R. G. Tompkins, and M. Toner, "Continuous inertial focusing, ordering, and separation of particles in microchannels," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 104, pp. 18892-7, Nov 27 2007.
- [37] L. Capretto, S. Mazzitelli, C. Balestra, A. Tosi, and C. Nastruzzi, "Effect of the gelation process on the production of alginate microbeads by microfluidic chip technology," *Lab Chip*, vol. 8, pp. 617-21, Apr 2008.
- [38] M. Y. He, J. S. Edgar, G. D. M. Jeffries, R. M. Lorenz, J. P. Shelby, and D. T. Chiu, "Selective encapsulation of single cells and subcellular organelles into picoliter- and femtoliter-volume droplets," *Analytical Chemistry*, vol. 77, pp. 1539-1544, Mar 2005.
- [39] J. F. Edd, D. Di Carlo, K. J. Humphry, S. Koster, D. Irimia, D. A. Weitz, and M. Toner, "Controlled encapsulation of single-cells into monodisperse picolitre drops," *Lab Chip*, vol. 8, pp. 1262-4, Aug 2008.
- [40] E. Brouzes, M. Medkova, N. Savenelli, D. Marran, M. Twardowski, J. B. Hutchison, J. M. Rothberg, D. R. Link, N. Perrimon, and M. L. Samuels, "Droplet microfluidic technology for single-cell high-throughput screening," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 106, pp. 14195-200, Aug 25 2009.
- [41] H. N. Joensson, M. L. Samuels, E. R. Brouzes, M. Medkova, M. Uhlen, D. R. Link, and H. Andersson-Svahn, "Detection and Analysis of Low-Abundance Cell-Surface Biomarkers Using Enzymatic Amplification in Microfluidic Droplets," *Angewandte Chemie-International Edition*, vol. 48, pp. 2518-2521, 2009.
- [42] M. Srisa-Art, I. C. Bonzani, A. Williams, M. M. Stevens, A. J. deMello, and J. B. Edel, "Identification of rare progenitor cells from human periosteal tissue using droplet microfluidics," *Analyst*, vol. 134, pp. 2239-2245, 2009 2009.
- [43] Y. Zeng, R. Novak, J. Shuga, M. T. Smith, and R. A. Mathies, "High-Performance Single Cell Genetic Analysis Using Microfluidic Emulsion Generator Arrays," *Anal Chem*, vol. 82, pp. 3183-3190, Apr 15 2010.
-

- 
- [44] J. J. Agresti, E. Antipov, A. R. Abate, K. Ahn, A. C. Rowat, J.-C. Baret, M. Marquez, A. M. Klibanov, A. D. Griffiths, and D. A. Weitz, "Ultrahigh-throughput screening in drop-based microfluidics for directed evolution," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 107, pp. 4004-4009, Mar 2 2010.
- [45] T. Konry, M. Dominguez-Villar, C. Baecher-Allan, D. A. Hafler, and M. L. Yarmush, "Droplet-based microfluidic platforms for single T cell secretion analysis of IL-10 cytokine," *Biosensors & Bioelectronics*, vol. 26, pp. 2707-2710, Jan 15 2011.
- [46] S. Q. Gu, Y. X. Zhang, Y. Zhu, W. B. Du, B. Yao, and Q. Fang, "Multifunctional picoliter droplet manipulation platform and its application in single cell analysis," *Anal Chem*, vol. 83, pp. 7570-6, Oct 1 2011.
- [47] E. W. M. Kemna, R. M. Schoeman, F. Wolbers, I. Vermes, D. A. Weitz, and A. van den Berg, "High-yield cell ordering and deterministic cell-in-droplet encapsulation using Dean flow in a curved microchannel," *Lab Chip*, vol. 12, pp. 2881-2887, 2012.
- [48] M. Najah, A. D. Griffiths, and M. Ryckelynck, "Teaching single-cell digital analysis using droplet-based microfluidics," *Anal Chem*, vol. 84, pp. 1202-9, Feb 7 2012.
- [49] T. D. Rane, H. C. Zec, C. Puleo, A. P. Lee, and T. H. Wang, "Droplet microfluidics for amplification-free genetic detection of single cells," *Lab Chip*, vol. 12, pp. 3341-3347, 2012.
- [50] A. Chen, T. Byvank, W.-J. Chang, A. Bharde, G. Vieira, B. L. Miller, J. J. Chalmers, R. Bashir, and R. Sooryakumar, "On-chip magnetic separation and encapsulation of cells in droplets," *Lab Chip*, 2013.
- [51] V. Chokkalingam, J. Tel, F. Wimmers, X. Liu, S. Semenov, J. Thiele, C. G. Figdor, and W. T. S. Huck, "Probing cellular heterogeneity in cytokine-secreting immune cells using droplet-based microfluidics," *Lab Chip*, 2013.
- [52] L. Mazutis, J. Gilbert, W. L. Ung, D. A. Weitz, A. D. Griffiths, and J. A. Heyman, "Single-cell analysis and sorting using droplet-based microfluidics," *Nat Protoc*, vol. 8, pp. 870-891, May 2013.
- [53] M. A. Khorshidi, P. K. P. Rajeswari, C. Wahlby, H. N. Joensson, and H. Andersson Svahn, "Automated analysis of dynamic behavior of single cells in picoliter droplets," *Lab Chip*, 2014.
- [54] S. L. Sjoström, Y. Bai, M. Huang, Z. Liu, J. Nielsen, H. N. Joensson, and H. Andersson Svahn, "High-throughput screening for industrial enzyme production hosts by droplet microfluidics," *Lab Chip*, 2014.
- [55] M. Gel, Y. Kimura, O. Kurosawa, H. Oana, H. Kotera, and M. Washizu, "Dielectrophoretic cell trapping and parallel one-to-one fusion based on field constriction created by a micro-orifice array," *Biomicrofluidics*, vol. 4, 2010.
-

- 
- [56] D. C. Duffy, J. C. McDonald, O. J. A. Schueller, and G. M. Whitesides, "Rapid prototyping of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane)," *Analytical Chemistry*, vol. 70, pp. 4974-4984, Dec 1998.
- [57] C. Khoury, G. A. Mensing, and D. J. Beebe, "Ultra rapid prototyping of microfluidic systems using liquid phase photopolymerization," *Lab on a Chip*, vol. 2, pp. 50-55, 2002.
- [58] K. Itoga, J. Kobayashi, M. Yamato, A. Kikuchi, and T. Okano, "Maskless liquid-crystal-display projection photolithography for improved design flexibility of cellular micropatterns," *Biomaterials*, vol. 27, pp. 3005-3009, May 2006.
- [59] L. W. Luo, C. Y. Teo, W. L. Ong, K. C. Tang, L. F. Cheow, and L. Yobas, "Rapid prototyping of microfluidic systems using a laser-patterned tape," *Journal of Micromechanics and Microengineering*, vol. 17, pp. N107-N111, Dec 2007.
- [60] J. Kim, R. Surapaneni, and B. K. Gale, "Rapid prototyping of microfluidic systems using a PDMS/polymer tape composite," *Lab on a Chip*, vol. 9, pp. 1290-1293, 2009.
- [61] N. J. Jenness, R. T. Hill, A. Hucknall, A. Chilkoti, and R. L. Clark, "A versatile diffractive maskless lithography for single-shot and serial microfabrication," *Optics Express*, vol. 18, pp. 11754-11762, May 2010.
- [62] J. Do, J. Y. Zhang, and C. M. Klapperich, "Maskless writing of microfluidics: Rapid prototyping of 3D microfluidics using scratch on a polymer substrate," *Robotics and Computer-Integrated Manufacturing*, vol. 27, pp. 245-248, 2011.
- [63] N.-N. Deng, Z.-J. Meng, R. Xie, X.-J. Ju, C.-L. Mou, W. Wang, and L.-Y. Chu, "Simple and cheap microfluidic devices for the preparation of monodisperse emulsions," *Lab on a Chip*, vol. 11, pp. 3963-3969, 2011.
- [64] O. Rahmanian and D. L. DeVoe, "Pen microfluidics: rapid desktop manufacturing of sealed thermoplastic microchannels," *Lab Chip*, 2013.
- [65] J. W. Kim, A. S. Utada, A. Fernandez-Nieves, Z. B. Hu, and D. A. Weitz, "Fabrication of monodisperse gel shells and functional microgels in microfluidic devices," *Angewandte Chemie-International Edition*, vol. 46, pp. 1819-1822, 2007.
- [66] L. Y. Chu, A. S. Utada, R. K. Shah, J. W. Kim, and D. A. Weitz, "Controllable monodisperse multiple emulsions," *Angew Chem Int Ed Engl*, vol. 46, pp. 8970-4, 2007.
- [67] R. K. Shah, J. W. Kim, and D. A. Weitz, "Janus Supraparticles by Induced Phase Separation of Nanoparticles in Droplets," *Advanced Materials*, vol. 21, pp. 1949-1953, May 18 2009.
- [68] H. Chen, Y. Zhao, J. Li, M. Guo, J. Wan, D. A. Weitz, and H. A. Stone, "Reactions in double emulsions by flow-controlled coalescence of encapsulated drops," *Lab Chip*, vol. 11, pp. 2312-5, Jul 21 2011.
-

- 
- [69] Y. J. Zhao, H. C. Shum, H. S. Chen, L. L. A. Adams, Z. Z. Gu, and D. A. Weitz, "Microfluidic Generation of Multifunctional Quantum Dot Barcode Particles," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 133, pp. 8790-8793, Jun 15 2011.
- [70] S. H. Kim, J. W. Kim, J. C. Cho, and D. A. Weitz, "Double-emulsion drops with ultra-thin shells for capsule templates," *Lab Chip*, vol. 11, pp. 3162-6, Sep 21 2011.
- [71] W. J. Duncanson, A. Abbaspourrad, H. C. Shum, S.-H. Kim, L. L. A. Adams, and D. A. Weitz, "Monodisperse Gas-Filled Microparticles from Reactions in Double Emulsions," *Langmuir*, vol. 28, pp. 6742-6745, 2012/05/01 2012.
- [72] S.-H. Kim, J. Nam, J. W. Kim, D.-H. Kim, S. H. Han, and D. A. Weitz, "Formation of polymersomes with double bilayers templated by quadruple emulsions," *Lab Chip*, 2013.
- [73] L. R. Arriaga, S. S. Datta, S.-H. Kim, E. Amstad, T. E. Kodger, F. Monroy, and D. A. Weitz, "Ultrathin Shell Double Emulsion Templated Giant Unilamellar Lipid Vesicles with Controlled Microdomain Formation," *Small*, vol. 10, pp. 950-956, 2014.
- [74] S. H. Kim, J. G. Park, T. M. Choi, V. N. Manoharan, and D. A. Weitz, "Osmotic-pressure-controlled concentration of colloidal particles in thin-shelled capsules," *Nature Communications*, vol. 5, Jan 2014.
- [75] R. Benz, O. Frohlich, P. Lauger, and M. Montal, "ELECTRICAL CAPACITY OF BLACK LIPID FILMS AND OF LIPID BILAYERS MADE FROM MONOLAYERS," *Biochimica Et Biophysica Acta*, vol. 394, pp. 323-334, 1975.
- [76] L. X. Wen and K. D. Papadopoulos, "Effects of osmotic pressure on water transport in W-1/O/W-2 emulsions," *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 235, pp. 398-404, Mar 2001.
- [77] J. Cheng, J. F. Chen, M. Zhao, Q. Luo, L. X. Wen, and K. D. Papadopoulos, "Transport of ions through the oil phase of W-1/O/W-2 double emulsions," *J Colloid Interface Sci*, vol. 305, pp. 175-182, Jan 1 2007.
- [78] A. J. Heron, J. R. Thompson, B. Cronin, H. Bayley, and M. I. Wallace, "Simultaneous Measurement of Ionic Current and Fluorescence from Single Protein Pores," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 131, pp. 1652-1653, 2009/02/11 2009.
- [79] B. Zheng, L. S. Roach, and R. F. Ismagilov, "Screening of protein crystallization conditions on a microfluidic chip using nanoliter-size droplets," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 125, pp. 11170-11171, Sep 17 2003.
- [80] W. K. Choi, E. Lebrasseur, M. I. Al-Haq, H. Tsuchiya, T. Torii, H. Yamazaki, E. Shinohara, and T. Higuchi, "Nano-liter size droplet dispenser using electrostatic manipulation technique," *Sensors and Actuators a-Physical*, vol. 136, pp. 484-490, May 1 2007.
- [81] M. P. Thien and T. A. Hatton, "Liquid Emulsion Membranes and Their Applications in Biochemical Processing," *Separation Science and Technology*, vol. 23, pp. 819-853, 1988.
-

- 
- [82] L. X. Wen and K. D. Papadopoulos, "Visualization of water transport in W-1/O/W-2 emulsions," *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 174, pp. 159-167, Nov 2000.
- [83] E. Mele, D. Fragouli, R. Ruffilli, G. L. De Gregorio, R. Cingolani, and A. Athanassiou, "Complex architectures formed by alginate drops floating on liquid surfaces," *Soft Matter*, vol. 9, pp. 6338-6343, 2013.
- [84] R. A. Robinson and R. H. Stokes, *Electrolyte solutions : the measurement and interpretation of conductance, chemical potential and diffusion in solutions of simple electrolytes*. London: Butterworths, 1968.
- [85] H. M. Wyss, D. L. Blair, J. F. Morris, H. A. Stone, and D. A. Weitz, "Mechanism for clogging of microchannels," *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys*, vol. 74, p. 061402, Dec 2006.
- [86] J. Shimamura, Y. Yokoyama, H. Moriguchi, and T. Torii, "Multiple emulsion formation in cross-shaped microchannel using alternative droplet generation technique," in *The 14th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences*, 2010, pp. 1820-1822.
- [87] S. Tamaki, S. Wada, H. Tsuchiya, M. Imran Al-Haq, and T. Torii, "Production of double emulsions on one chip by modifying surface properties," in *The 7th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences*, Paris, France, 2007, pp. 1459-1461.
- [88] W. C. Griffin, "Classification of surface-active agents by "HLB"," *Journal of the Society of Cosmetic Chemists*, vol. 1, pp. 311-326, 1949.
- [89] Y. Masuda, K. Tomimoto, and K. Koumoto, "Two-dimensional self-assembly of spherical particles using a liquid mold and its drying process," *Langmuir*, vol. 19, pp. 5179-5183, Jun 24 2003.
- [90] L. H. Hung, K. M. Choi, W. Y. Tseng, Y. C. Tan, K. J. Shea, and A. P. Lee, "Alternating droplet generation and controlled dynamic droplet fusion in microfluidic device for CdS nanoparticle synthesis," *Lab Chip*, vol. 6, pp. 174-178, Feb 2006.
- [91] 島村次郎, "十字型微小流路を用いた単分散液滴生成および多相エマルション生成に関する研究," 修士論文, 新領域創成科学研究科人間環境学専攻, 東京大学, 2010.
- [92] A. Aserin, *Multiple emulsions : technology and applications*. Hoboken, N.J.: Wiley, 2008.
- [93] S. Torza and S. G. Mason, "Three-phase interactions in shear and electrical fields," *J Colloid Interface Sci*, vol. 33, pp. 67-83, 1970.
- [94] J.-H. Xu, X.-H. Ge, R. Chen, and G.-S. Luo, "Microfluidic preparation and structure evolution of double emulsions with two-phase cores," *RSC Advances*, vol. 4, pp. 1900-1906, 2014.
- [95] F. M. Fowkes, "ATTRACTIVE FORCES AT INTERFACES," *Industrial & Engineering Chemistry*, vol. 56, pp. 40-52, 1964/12/01 1964.
-

- 
- [96] A. R. Abate, J. Thiele, M. Weinhart, and D. A. Weitz, "Patterning microfluidic device wettability using flow confinement," *Lab Chip*, vol. 10, pp. 1774-6, Jul 21 2010.
  - [97] 長田義仁 and 梶原莞爾, *ゲルハンドブック*. 東京: エヌ・ティー・エス, 2003.
  - [98] K. Nakajima, H. Yamaguchi, J. C. Lee, M. Kageshima, T. Ikehara, and T. Nishi, "Nanorheology of polymer blends investigated by atomic force microscopy," *Japanese Journal of Applied Physics Part 1-Regular Papers Short Notes & Review Papers*, vol. 36, pp. 3850-3854, Jun 1997.
  - [99] M. K. S. Verma, A. Majumder, and A. Ghatak, "Embedded template-assisted fabrication of complex microchannels in PDMS and design of a microfluidic adhesive," *Langmuir*, vol. 22, pp. 10291-10295, Nov 21 2006.
  - [100] Y. F. Jia, J. H. Jiang, X. D. Ma, Y. Li, H. M. Huang, K. B. Cai, S. X. Cai, and Y. P. Wu, "PDMS microchannel fabrication technique based on microwire-molding," *Chinese Science Bulletin*, vol. 53, pp. 3928-3936, Dec 2008.
  - [101] C. Norotte, F. S. Marga, L. E. Niklason, and G. Forgacs, "Scaffold-free vascular tissue engineering using bioprinting," *Biomaterials*, vol. 30, pp. 5910-5917, Oct 2009.
  - [102] J. P. Gong, "Materials both Tough and Soft," *Science*, vol. 344, pp. 161-162, Apr 11 2014.
  - [103] Y. N. Xia and G. M. Whitesides, "Soft lithography," *Annual Review of Materials Science*, vol. 28, pp. 153-184, 1998.
  - [104] S. N. Yin, C. F. Wang, Z. Y. Yu, J. Wang, S. S. Liu, and S. Chen, "Versatile Bifunctional Magnetic-Fluorescent Responsive Janus Supraballs Towards the Flexible Bead Display," *Advanced Materials*, vol. 23, pp. 2915-+, Jul 12 2011.
  - [105] X. Liu, Q. Wang, J. H. Qin, and B. C. Lin, "A facile "liquid-molding" method to fabricate PDMS microdevices with 3-dimensional channel topography," *Lab on a Chip*, vol. 9, pp. 1200-1205, 2009.
  - [106] Y. Lu, B. C. Lin, and J. H. Qin, "Patterned Paper as a Low-Cost, Flexible Substrate for Rapid Prototyping of PDMS Microdevices via "Liquid Molding"," *Analytical Chemistry*, vol. 83, pp. 1830-1835, Mar 2011.
  - [107] T. Thorsen, R. W. Roberts, F. H. Arnold, and S. R. Quake, "Dynamic pattern formation in a vesicle-generating microfluidic device," *Physical Review Letters*, vol. 86, pp. 4163-4166, Apr 30 2001.
  - [108] P. Garstecki, M. J. Fuerstman, H. A. Stone, and G. M. Whitesides, "Formation of droplets and bubbles in a microfluidic T-junction - scaling and mechanism of break-up," *Lab Chip*, vol. 6, pp. 437-446, Mar 2006.
  - [109] W. Lee, L. M. Walker, and S. L. Anna, "Role of geometry and fluid properties in droplet and thread formation processes in planar flow focusing," *Physics of Fluids*, vol. 21, Mar 2009.
-

- [110] B. Zheng, J. D. Tice, and R. F. Ismagilov, "Formation of droplets of in microfluidic channels alternating composition and applications to indexing of concentrations in droplet-based assays," *Analytical Chemistry*, vol. 76, pp. 4977-4982, Sep 2004.
- [111] M. Lee, W. Park, C. Chung, J. Lim, S. Kwon, K. H. Ahn, S. J. Lee, and K. Char, "Multilayer deposition on patterned posts using alternating polyelectrolyte droplets in a microfluidic device," *Lab Chip*, vol. 10, pp. 1160-1166, 2010.
- [112] J. H. Xu, S. W. Li, J. Tan, and G. S. Luo, "Correlations of droplet formation in T-junction microfluidic devices: from squeezing to dripping," *Microfluidics and Nanofluidics*, vol. 5, pp. 711-717, Dec 2008.
- [113] H. H. Liu and Y. H. Zhang, "Droplet formation in a T-shaped microfluidic junction," *Journal of Applied Physics*, vol. 106, Aug 2009.
- [114] S. Yeom and S. Y. Lee, "Dependence of micro-drop generation performance on dispenser geometry," *Experimental Thermal and Fluid Science*, vol. 35, pp. 1565-1574, Nov 2011.
- [115] J. C. Baret, "Surfactants in droplet-based microfluidics," *Lab Chip*, vol. 12, pp. 422-33, Feb 7 2012.