

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K17891

研究課題名(和文)液滴を用いた環境水試料の毒性計測技術の開発

研究課題名(英文)Analysis of low toxic aqueous samples using droplets

研究代表者

平間 宏忠(Hirama, Hirotada)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・集積マイクロシステム研究センター・研究員

研究者番号：40748779

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：低毒性環境水試料の定量的評価のため、これまで開発してきた液滴の収縮・ゲル化技術を適用し、液滴による低濃度試料溶液の有毒性の計測・評価系の開発を行った。本研究により、環境水試料を内包した液滴の安定生成に関する手法及び、試料液滴の濃縮に関する手法を開発した。液滴生成に関しては、安定な液滴を作製するための液滴生成デバイス(局所的濡れ性改質を施した微小流路)を開発した。また、液滴の濃縮に関する研究では、液滴界面を安定に保ちながら液滴が濃縮できる手法の開発と濃縮条件の探索を行った。

研究成果の概要(英文)：A droplet shrinkage and gelation method was used to develop a method of a quantitative analysis of low toxic aqueous samples from natural resources. In this project, two relevant methods were developed; (1) a method to stably form droplets enclosing aqueous sample and (2) a method to condense solute in sample droplets.

研究分野：微小流体工学

キーワード：Droplet microfluidics Microchannels Multiple emulsions Surface modification

1. 研究開始当初の背景

低毒性環境水試料（河川水など）における有害性は、バイオアッセイ系を用いて、計測・評価されている。また、計測対象となる環境水試料は、アッセイとは別の前工程において、濃縮されて用いられる。しかし従来法では、吸着や抽出などにより試料を非常に高倍率に濃縮するため、試料本来の有害性を厳密に定量化できない恐れがある。したがって、定量的な毒性の計測、評価が困難であった。

申請者はこれまでに、液滴の収縮・ゲル化技術を開発してきた。本技術では、高浸透圧の水溶液（ゲル化剤）を含むゲル基板上に、液滴を載せ静置する。静置後、液滴からゲル基板へと水が移動し、ゲル基板から液滴へとゲル化剤が移動する。その結果、液滴が収縮（濃縮）・ゲル化する。こうした基本的な液滴操作に加えて、本技術は、液滴中の懸濁・溶解物質を濃縮する手法としても応用可能である。そこで申請者は、液滴を、高浸透圧のゲル化能を持たない水溶液を含むゲル基板上に静置することで、液滴中の物質を濃縮でき、その濃度が制御できることを明らかにしてきた。

一方で液滴は、微小流路を用いて生成することで、サイズがそろった状態で高速（毎数千個）に生成することが可能である。また、化学・生化学反応を生じる物質（試薬、生体分子、微生物、細胞など）を内包した液滴は、内包物質の変化（代謝など）を迅速かつハイスループットに計測できる「小さな反応容器」として用いられている。近年では、液滴のサイズ変化によって、液滴中の内包物質の状態変化（細胞の代謝など）を計測する手法が開発されている（T. W. Hofmann et al, Lab on a Chip, 2012）。この手法では、分析対象となる物質（細胞など）を内包した液滴と、それと同じ浸透圧で分析対象物質を内包しない液滴を隣り合わせる。内包物質の活動により変化する液滴の浸透圧に応じて、液滴のサイズが変化するため、内包物質の状態が計測できる。

2. 研究の目的

本研究では、前述の低毒性環境水試料の定量的な計測における、現在の技術的課題に対して、液滴の収縮・ゲル化技術を適用し、液滴を用いた低濃度試料溶液の有毒性の計測・評価系の開発をおこなった。具体的には、微生物と環境水試料を内包した液滴の安定生成に関する研究及び、試料液滴の濃縮に関する研究を行なった。

3. 研究の方法

本手法では試料溶液を、界面が不安定な液滴として取り扱う。そのため、外部の環境に対して液滴を安定化する必要があった。そこで、水滴を油相で覆った構造もしくは油滴を水相で覆った構造（多相エマルション液滴と呼ばれる）を作製することとした。これらの液滴の生成には、局所的に濡れ性を改質した微小流路の分岐構造を利用できることが知ら

れている。そこで、疎水コーティング剤と局所的な紫外線照射により照射箇所のみを親水化する迅速簡便な方法により微小流路を改質し、多相エマルション液滴生成に適した改質条件を探索した（図1）。

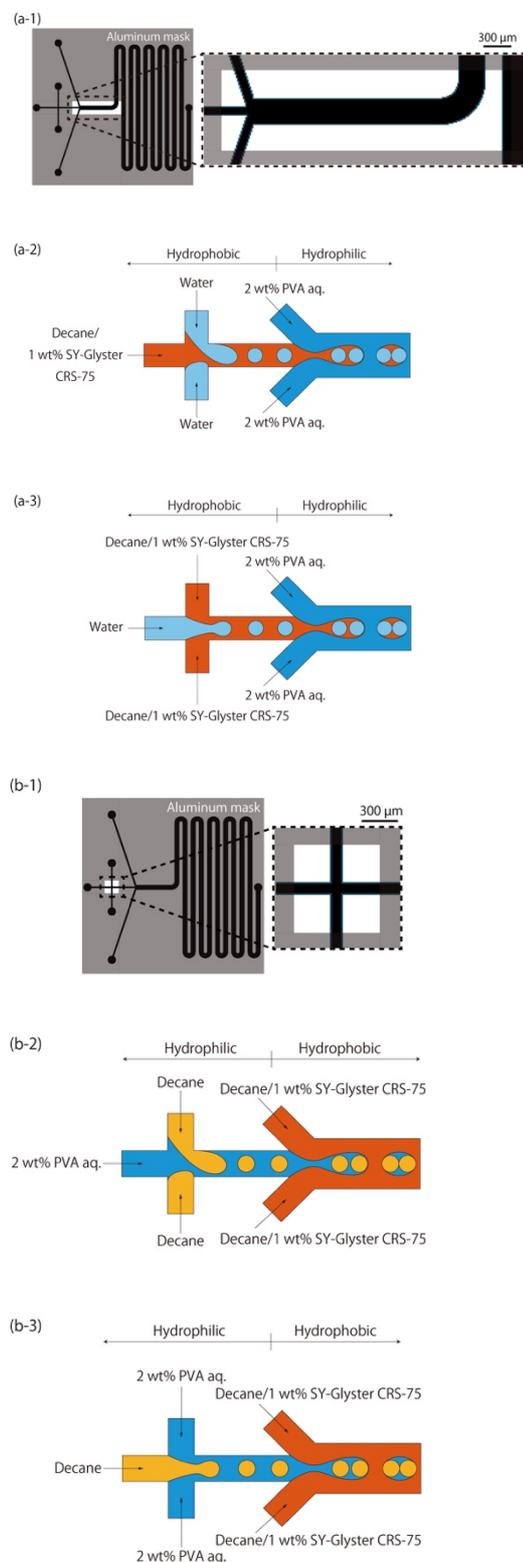


図1 局所的濡れ性改質の概念図

試料液滴の濃縮では、高浸透圧の板状のゲルに液滴を接触させることで、浸透圧差により液滴から溶媒である水を取り除く方法により、液滴濃縮を行った。また、液滴が安定に濃縮できる濃度条件を探索した (図2)。

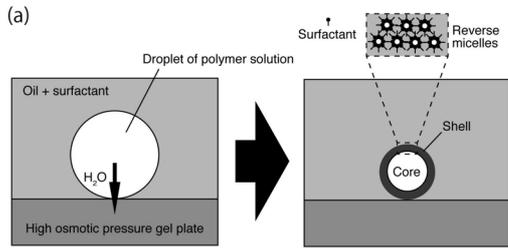
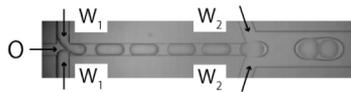


図2 液滴濃縮の概念図

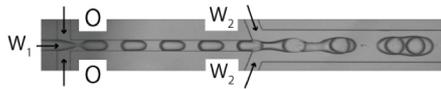
#### 4. 研究成果

局所的濡れ性改質手法を多相エマルションの生成に適用することで、サイズの揃った多相エマルション液滴を安定に生成することができた (図3)。また、さらなるハイスループット化のため、複数の分岐を持つ微小流路に

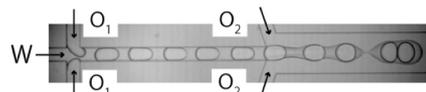
##### (a) Alternating W/O/W formation



##### (b) Flow focusing W/O/W formation



##### (c) Alternating O/W/O formation



##### (d) Flow focusing O/W/O formation

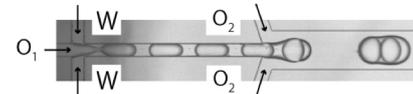


図3 局所的濡れ性改質を施した微小流路による液滴生成

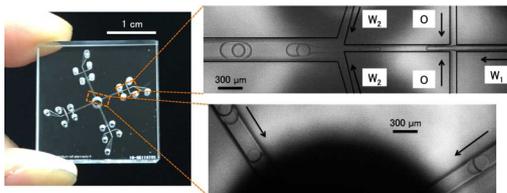


図4 複数の分岐を持つ微小流路における局所的濡れ性改質と液滴生成

本改質法を用いた。その結果、大量の多相エマルション液滴を生成可能なデバイスが実現できた (図4)。

続いて、試料液滴の濃縮における予備検討を行い、液滴に高分子を添加しておくことで、穏やかな液滴濃縮を進行させられることが確認できた。続いて、液滴にポリエチレングリコール (PEG) を、浸透圧差を調整するためゲル基板に電解質 (リン酸バッファー (PBS)) をそれぞれ添加し、PEG 濃度と PBS 濃度を適正な範囲に設定することで、液滴が安定に濃縮することを確認した (図5)。また、これらの条件下では、液滴の周りにミセルが凝集し、コアシェル状の構造が形成されることを発見した (図6)。本現象により形成された構造は、液滴界面をより安定に取り扱うための保護機能として働く可能性がある。

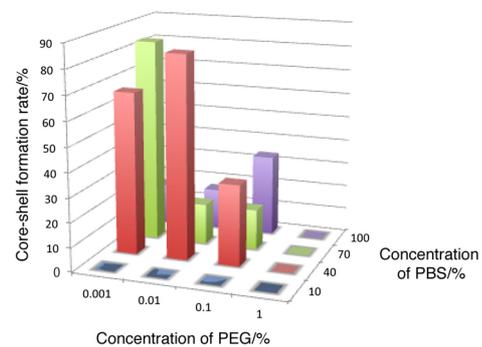


図5 試料液滴濃縮における各濃度の影響

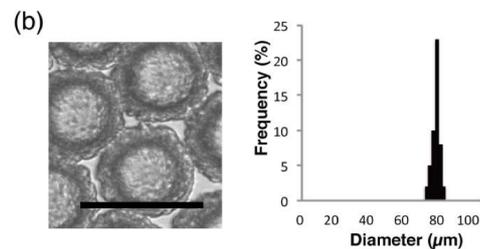
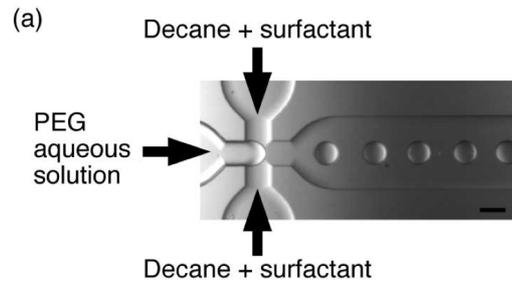


図6 濃縮に伴う液滴からのコアシェル状構造の形成

一方で、液滴に電解質を加えると液滴の濃縮途中で液滴界面が不安定化し、液滴が破裂し濃縮できないことが確認された。そのため、微生物 (浸透圧を制御するため培養液やバッファー液中に懸濁する必要がある) を内包し

た濃縮・分析試験を実施することができなかった。今後、電解質存在下で液滴界面を安定に取り扱う方法や、生きた微生物を使用しない分析試験方法を検討する必要があると考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

Hirotsada HIRAMA, Satoshi Wada, Jiro Shimamura, Yusuke Komazaki, Tomoya Inoue, and Toru Torii, Surface modification of a glass microchannel for the formation of multiple emulsion droplets, *Microfluidics and Nanofluidics*, 査読有, 21, 2017, 91

Hirotsada HIRAMA and Tomoya Inoue, Core-shell structure formation from droplets by droplet shrinkage and spontaneous emulsification, *Chemistry Letters*, 査読有, 46, 2017, pp. 460-462

[学会発表] (計 3 件)

Hirotsada HIRAMA, Tomoya Inoue, Core-shell formation from droplets by osmotic pressure difference and spontaneous emulsification, 5th International Conference on BioSensors, BioElectronics, BioMedical Devices, BioMEMS/NEMS & Applications 2016, 14-16 December 2016, Gold Coast, Australia

Hirotsada HIRAMA, Tomoya Inoue, Core-shell particle formation on a high osmotic pressure gel plate, 6th International Colloids Conference, 19-22 June 2016, Berlin, Germany

Hirotsada HIRAMA, Satoshi Wada, Jiro Shimamura, Yusuke Komazaki, Tomoya Inoue, Toru Torii, Formation of multiple emulsion droplets in glass microchannels with spatially controlled wettability, 8th International Symposium on Microchemistry and Microsystems, 30 May-1 June 2016, Hong Kong

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：コアシェル粒子製造方法とコアシェル粒子製造装置  
発明者：平間宏忠

権利者：国立研究開発法人産業技術総合研究所

種類：特許

番号：特願 2016-120801

出願年月日：2016年6月17日

国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

平間 宏忠 (Hirotsada HIRAMA)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・集積マイクロシステム研究センター・研究員  
研究者番号：40748779

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし

##### (4) 研究協力者

なし