

令和 6 年 6 月 8 日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K21104

研究課題名（和文）マイクロ多相流横断を介した機能性微粒子生成プロセス

研究課題名（英文）Functional particle generation process via micro multiphase flow traversal

研究代表者

西迫 貴志（Nisisako, Takasi）

東京工業大学・科学技術創成研究院・准教授

研究者番号：10431983

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、規則的に並べた支柱を持つマイクロ流路内で多相並行流を形成し、液滴や粒子を精密に制御して機能性微粒子を調製する新技術を提案し、その実証を行った。シリコン樹脂で作製した支柱配列マイクロ流路デバイスを使用し、まずアルギン酸ナトリウム水溶液の液滴を多相流中でカルシウムイオンと反応させてアルギン酸カルシウムゲル粒子の生成を確認した。次に、カルボキシル基修飾ポリスチレンビーズを高分子電解質水溶液の流れに対して斜行・横断させ、ゼータ電位測定により表面修飾を確認した。最後に、リン脂質で覆われた油中水滴の油水界面横断による二分子膜小胞体の生成試験に取り組み、今後の課題を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題は、従来は主に医療・バイオ分野で各種生体粒子向けに研究されてきたマイクロ流路を用いた分離技術を、材料科学分野での機能性微粒子の新規精密調製技術に応用し、全く異なる学術分野・用途でのイノベーションを目指したものである。当該学術分野の形成・発展により、今後さまざまな新奇ナノ・マイクロ粒子材料の創出が期待される。

研究成果の概要（英文）：This study proposed and demonstrated a new technology for forming multiphase parallel flows in a microchannel with regularly arranged pillars, enabling precise control of droplets and particles to prepare functional microparticles. Using a microfluidic device made of silicone resin with an array of pillars, we first confirmed the formation of calcium alginate gel particles by reacting sodium alginate solution droplets with calcium ions in the multiphase flow. Next, carboxyl-modified polystyrene beads were directed through the flow of a polyelectrolyte solution, and surface modification was verified through zeta potential measurements. Finally, we attempted to generate bilayer vesicles by traversing lipid-coated water-in-oil droplets across the oil-water interface, identifying challenges for future research.

研究分野：マイクロフルイディクス

キーワード：マイクロナノシステム マイクロフルイディクス

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 従来、微小液滴や粒子に各種反応・処理操作を施すことで、様々なナノ・マイクロ機能性粒子が創生されてきた。しかし、通常の操作はバルクに対するバッチ式作業であり、個別粒子に対して反応・処理条件を精密制御して機能を付与できる連続プロセス技術は存在しない。

(2) 本研究で活用する支柱配列による液滴・粒子の軌道制御法は従来、Deterministic Lateral Displacement (DLD, Science 2004, 304, 987) 法と呼ばれ、サイズの違いに基づく粒子分離技術として、DNA、エクソソーム、血球、血中循環腫瘍細胞 (Circulating Tumor Cell, CTC) などの生体由来ナノ・マイクロ粒子の分離に応用されてきた (Lab Chip 2014, 14, 4139; Nano-Micro Lett. 2019, 11, 77)。

(3) 研究代表者らは近年、生死細胞 (Biomicrofluidics 2016, 10, 014125) や主滴とサテライト滴 (RSC Adv. 2017, 7, 35516) の分離、並列化 (Sens. Actuator B-Chem. 2018, 260, 918) や脱気 PDMS による送液 (Anal. Chem. 2019, 91, 3093) を含む各種要素技術等、DLD 分離技術に関連した研究を行ってきた。その過程で、ある一定 (分離直径  $D_c$ ) 以上の大きさの粒子が支柱配列の傾きに沿って斜行する (図 1) という DLD 法の特徴が、単なる大小粒子の分離操作以外にも活用できると考えた。さらに、マイクロ流路内に形成した多相並行流に対して液滴・粒子を斜行・横断させることで、各種反応や処理を精密に制御し、高機能液滴・粒子を連続生成するプロセス技術が実現できると考えた。

### 2. 研究の目的

(1) 本研究では、多数の支柱を規則的に並べたマイクロ流路内に各種反応・処理液からなる多相並行流を形成し、規則的な支柱配列を用いて液滴や粒子を斜行・横断させ、各種反応・処理を精密制御して機能性微粒子を調製する、という新たな粒子・流体プロセス技術を提案する。本研究提案の概念実証のために、主として (a) ハイドロゲル粒子の架橋反応制御試験、(b) 微粒子表面の分子修飾試験、(c) 二分子膜小胞体 (リポソーム) 生成試験を実施する。

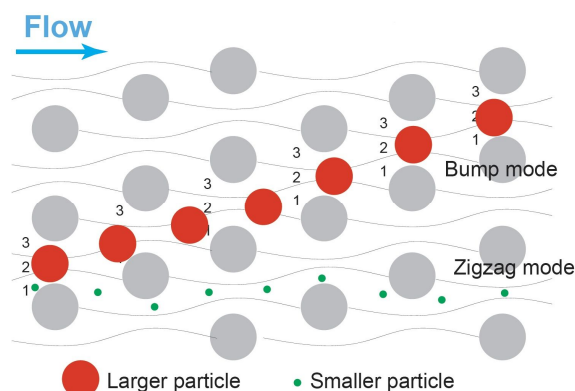


図 1. 支柱配列による粒子斜行軌道制御概念図。

(2) 本研究課題では、従来は主に医療・バイオ分野で各種生体粒子向けに研究されてきた分離技術を、材料科学分野での機能性微粒子の新規精密調製技術に応用し、全く異なる学術分野・用途でのイノベーションを目指した。当該学術分野の形成・発展により、今後のさまざまな新奇ナノ・マイクロ粒子材料の創出が期待される。

### 3. 研究の方法

(1) マイクロ流路デバイスの作製：液滴・粒子を斜行させるための規則的な支柱配列を有するマイクロ流路デバイスを設計・製作する。ネガ型フォトレジストに露光・現像して作製した微小凸型をシリコン樹脂 (PDMS) に転写し、酸素プラズマ処理によりガラス基板と強固に貼り合せ、デバイスを作製する。支柱径と間隔、流路高さを実験に合わせて 10-100  $\mu\text{m}$  の範囲で調整する。さらに、高さ・幅が 100  $\mu\text{m}$  を超える流路の作製には 3D プリンタの利用を検討する。

(2) 多糖類ハイドロゲル粒子の架橋反応制御：架橋前の水溶性高分子としてアルギン酸ナトリウムを含む直径 10-100  $\mu\text{m}$  の油中水型 (W/O) 液滴をマイクロ流路に導入し、カルシウムイオン ( $\text{Ca}^{2+}$ ) を含む反応液流内を斜行させ、イオン交換による架橋反応でアルギン酸カルシウムゲル粒子を生成し、洗浄水流まで斜行させて回収する。ゲル粒子のサイズ測定を行い、均一性を評価する。

(3) 微粒子表面の分子修飾：斜行軌道制御により、固体粒子表面への分子修飾を試みる。粒子として直径数十  $\mu\text{m}$  でカルボキシル基が修飾されたポリスチレン (PS) ビーズ、修飾分子として高分子電解質である poly(allylamine hydrochloride) (PAH)、および poly(sodium 4-styrenesulfonate) (PSS) を

用いる。PS ビーズを PAH 水相流, PSS 水相流に斜行させ PAH または PAH-PSS で被覆された PS ビーズを得られるかを確認する。被膜の有無をゼータ電位計測により評価する。

(4) 油水界面横断による二分子膜小胞体形成：リン脂質分子の単分子膜で覆われた W/O 液滴を斜行させて油水界面を横断させ、二分子膜小胞体 (リポソーム) の生成を試みる。例えば、先ず有機相としてリン脂質を含む有機相、水相として純水を用いて直径数十  $\mu\text{m}$  の W/O 滴を生成し、マイクロ流路内の油水並行流の油側に導入する。脂質分子で覆われた W/O 滴を支柱配列により斜行させ、油水並行流の界面を横断・通過させ、リポソームの連続生成を試みる。

#### 4. 研究成果

##### 4.1. マイクロ流路デバイスの作製

(1) 液滴・粒子を斜行させるための規則的な支柱配列を有する様々なマイクロ流路デバイスの設計・製作を行った。液滴生成部を支柱配列流路の上流部に組み込む場合は、液滴生成部としてフローフォーカシング流路を用いたデバイスとマイクロチャネル (MC) 乳化用ノズルを用いたデバイスの2種類を設計・制作した。高さ  $100 \mu\text{m}$  以下のマイクロ流路の場合、ネガ型フォトリソ SU-8 に露光・現像して作製した微小凸型をシリコン樹脂 (PDMS) に転写し、酸素プラズマ処理により PDMS 薄膜を形成したガラス基板と強固に貼り合せ、マイクロ流路デバイスを作製した。高さ、幅が  $100 \mu\text{m}$  を超えるマイクロ流路の場合、3D プリントを用いて作製できることを確認した。MC 乳化ノズルを組み込んだデバイスでは、後述のアルギン酸カルシウム粒子作製試験 (図2) の他、主滴とサテライト滴の連続分離、および主滴への蛍光ラベル付与試験を実施した。

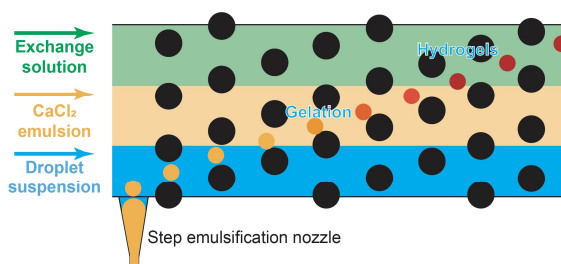


図2.ゲル粒子架橋反応制御試験の概念図。

##### 4.2. 多糖類ハイドロゲル粒子の架橋反応制御

(1) マイクロ流路デバイスの作製：水中油 (W/O) 滴生成を目的とした、MC 乳化用ノズルアレイと DLD 支柱配列を組み合わせたデバイスの設計・製作を行った (図3)。ソフトリソグラフィにより、ノズル (開口部最大幅  $175 \mu\text{m}$ 、深さ  $9 \mu\text{m}$ ) と DLD ピラー (深さ  $90 \mu\text{m}$ 、直径  $100 \mu\text{m}$ 、ギャップ  $80 \mu\text{m}$ 、分離直径  $37 \mu\text{m}$ ) の3次元構造を持つ PDMS デバイスを作製した。型取りした PDMS 片と PDMS 薄膜をコーティングしたスライドガラスを酸素プラズマ処理により接合することで、流路内壁の全てを W/O 液滴生成に適した疎水性壁面とした。

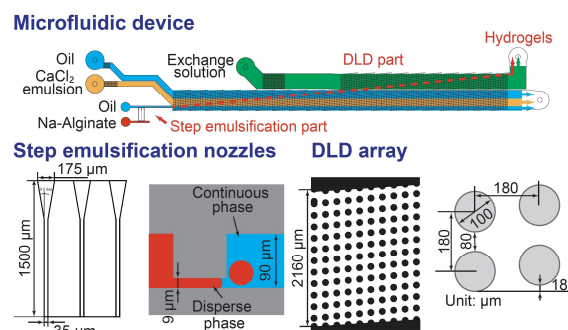


図3.ゲル粒子架橋反応制御試験用マイクロ流路デバイスの概念図。

(2) ハイドロゲル粒子の生成試験：上記デバイスの MC 乳化用ノズルアレイに分散相としてアルギン酸ナトリウムの 2wt% 水溶液を送液し、連続相として、コーン油、30wt% のカルシウムイオン ( $\text{Ca}^{2+}$ ) を含む W/O エマルジョン、コーン油を3つの並行流として導入した。ノズルにおいて直径約  $80 \mu\text{m}$ 、CV 値 3% のアルギン酸ナトリウム水滴の主滴がサテライト滴と共にコーン油中に生成する様子を確認した。さらに、サテライト滴はコーン油の流れに沿って流路側壁近傍のピラー間を縫うように流動するのに対し、主滴は斜行軌道を取り、W/O エマルジョンの並行流に侵入してい

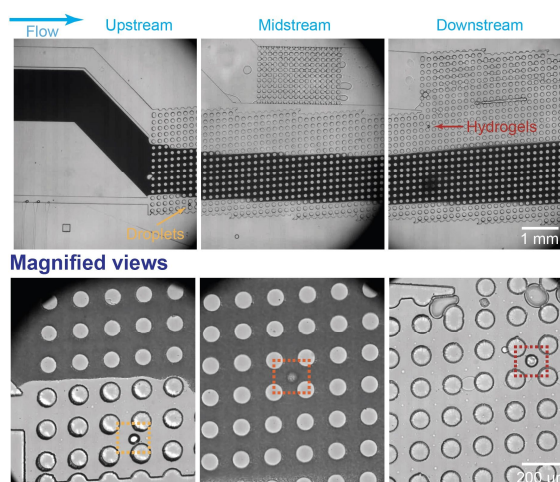


図4. Na-alginate 水滴の斜行の様子。

く様子を確認した。W/O エマルション流からさらにその隣のコーン油流に侵入した主滴を観察したところ、イオン交換反応による架橋されたアルギン酸カルシウムゲル粒子が水滴内部に含まれていることを確認した(図4)。

(3) ハイドロゲル粒子の溶液置換試験：上記試験の設定において、MC ノズルから遠い側のコーン油流の隣にグリセロール水溶液(80wt%)を並行流として追加導入し、アルギン酸カルシウム粒子の生成と溶液置換が連続的に行えるかの検討を行った。W/O エマルション流内におけるゲル化反応を経て生成したゲル粒子が、そのまま斜行軌道を継続し、コーン油とグリセロール水溶液の界面を通過できることを確認した。回収した粒子の形状とサイズを測定したところ、形状は球形のものが多く観察されたがサイズ分布は多分散状であった。ゲル化の過程で粒子が互いに合っていることが原因と考えられ、改善には合を抑制する流路構造が必要と考えられる。

#### 4.3. 微粒子表面の分子修飾

(1) マイクロ流路デバイスの作製：設計・作製したデバイスは3つの流路入口とDLD支柱配列、2つの流路出口で構成される。図5に示すように、PSビーズとNaCl水溶液は送液用のInlet 3から送られるNaCl水溶液中のPSビーズはDLD支柱配列に進入した後、支柱配列の傾きに沿って斜行する。この過程で、PSビーズはPAH水溶液の平行流の中でPAH修飾され、さらに洗浄液のNaCl水溶液の平行流に進入し、洗浄された後、洗浄液と共にOutlet 1から回収される。一方、PAHの平行流とPSビーズが分散していたNaCl水溶液の平行流はOutlet 2から回収される。横断させるPSビーズの直径を50 $\mu\text{m}$ と想定し、流路高さを100 $\mu\text{m}$ と設定した。洗浄液供給流路幅を1140 $\mu\text{m}$ 、PAH水溶液供給流路幅を300 $\mu\text{m}$ 、PSビーズ供給流路幅を260 $\mu\text{m}$ 、洗浄液ドレイン流路幅を810 $\mu\text{m}$ 、修飾液ドレイン流路幅を730 $\mu\text{m}$ として構成した。さらに、分離直径 $D_c$ が35-40 $\mu\text{m}$ となるよう、支柱直径( $D_p$ )は70 $\mu\text{m}$ 、支柱間距離( $G$ )を80 $\mu\text{m}$ および支柱配列の傾きを0.1と設定し、その結果 $D_c$ は37 $\mu\text{m}$ となった。また、修飾に必要な横断時間を考慮して支柱配列を10セクションに構成した。

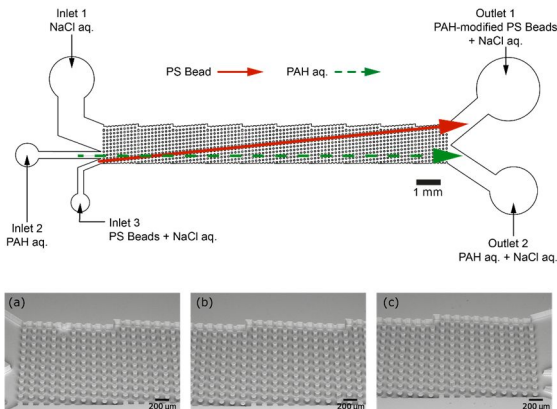


図5. 微粒子表面の分子修飾用マイクロ流路デバイスの概念図と流路SEM写真。

(2) バッチ実験：マイクロ流路デバイスを用いた実験に先立ち、PAHおよびPSSを用いたPSビーズのバッチ式表面処理を行い、ゼータ電位測定を実施した。今回使用したPSビーズは表面がカルボキシル基で修飾されており、NaCl水溶液中ではカルボキシル基が $-\text{COO}^-$ として存在し、負のゼータ電位を示す。陽イオン高分子のPAH、陰イオン高分子のPSSを順次表面修飾させることでゼータ電位が負から正に、また正から負に変わることが予測される。バッチ処理の時間を1分間と8分間に設定したところ、いずれもゼータ電位測定の結果は予想通りであり、PSビーズ表面のPAHおよびPAH-PSS修飾を確認できた(表1)。しかし、1分間のPAH修飾でのゼータ電位は8分間のPAH修飾よりゼータ電位が低かったが、その後PSS修飾ではゼータ電位が一致していた。このことから、PAH修飾のためには修飾時間のより詳しい検討が必要である。

表1. バッチ処理粒子のゼータ電位測定結果

Sample	Zeta potential (mV)	Standard deviation (mV)
PS bead	-8.1	9.1
PAH (8 min)	21.2	12.4
PAH-PSS (8 min)	-18.0	9.0
PAH (1 min)	12.3	12.9
PAH-PSS (1 min)	-18.5	10.2

(3) DLD マイクロ流路によるPSビーズの表面処理試験：デバイスを用いた実験で、PSビーズが支柱配列の傾斜に沿って斜行軌道で移動することを確認できた(図6)。この観察結果から、設計した支柱配列のパラメータはビーズの横断に適合していると考えられる。さらに、Outlet 1から回収したPSビーズがPAH水溶液と分離されていることを確認するために、UV-Visを用いて0.1 wt%のPAH水溶液とOutlet 1から回収した溶液の吸光度を測定し、比較した(図7)。PAH水溶液では212

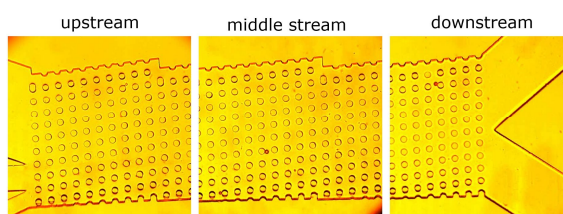


図6. PSビーズがDLD流路を斜行する様子。

nm で吸光度のピークが確認でき、その波長で吸光度を比較したところ、Outlet 1 から回収した水溶液では吸光度のピークが見られなかったため、Outlet 1 からの回収液には PAH が混合しなかったと考えられる。表 2 にデバイス実験後の PS ビーズのゼータ電位測定の結果を示す。PS-PAH 1 は流量条件 1，PS-PAH 2 は流量条件 2 で実験した後の PS ビーズのゼータ電位を表す。ゼータ電位は負のままであったが、その値が約-20 mV から約-11 mV に変わっていたことにより、陽イオン性高分子である PAH が部分的に表面修飾されたと考えられる。2つの流量条件の間では大きな差は見られなかったことから、2つの流量条件では修飾時間の差が小さかったと考えられる。また、バッチ実験のように正のゼータ電位になるまでは修飾できておらず、修飾時間が短かった可能性が考えられる。設定流量による予想修飾時間は、流量条件 1 では約 0.3 秒、流量条件 2 では約 0.2 秒と予想される。そのため、今後の課題としては、より小さい流量での操作や平行流の幅を大きく設定すること、さらに支柱配列の傾きをより小さくして流路を長くすることで修飾にかかる時間を延長するなど、PS ビーズの修飾条件をさらに検討する必要があると考えられる。

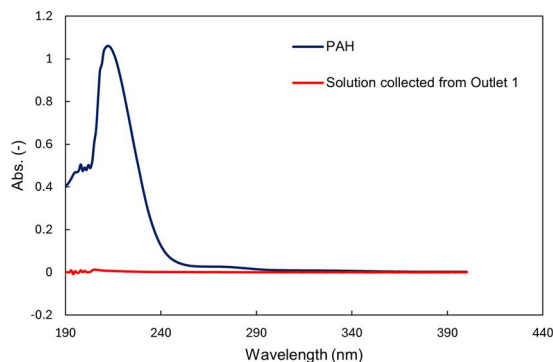


図 7. Outlet 1 からの回収液の吸光度測定結果と PAH 水溶液の測定結果の比較。

表 2. 流路処理粒子のゼータ電位測定結果

Sample	Zeta potential (mV)	Standard deviation (mV)
PS bead	-20.5	6.6
PS-PAH 1	-11.6	6.0
PS-PAH 2	-11.5	7.8

#### 4.4. 油水界面横断による二分子膜小胞体形成

(1) マイクロ流路デバイスの作製：フローフォーカシング流路と DLD 流路が直列につながった流路デバイスの設計・制作を行った。フローフォーカシング流路の絞り幅は 20  $\mu\text{m}$ 、他の流路幅は 50  $\mu\text{m}$  とし、DLD 流路の支柱径は 50  $\mu\text{m}$ 、支柱間隔は 50  $\mu\text{m}$  とし、分離直径  $D_c$  を 23.2  $\mu\text{m}$  とした。流路深さは全域 50  $\mu\text{m}$  とした (図 8,9)。ソフトリソグラフィにより PDMS に型取りしたものを PDMS 薄膜で覆われたスライドガラスと貼り合わせ、デバイスを作製した。

(2) 内水相として 600 mM スクロース溶液、有機相としてレシチンを 1wt% 含有するスクアレンと 1-オクタノールの混合液を、それぞれ 0.4  $\mu\text{L}/\text{min}$ 、8.0  $\mu\text{L}/\text{min}$  の流量で送液したところ、フローフォーカシング流路で直径約 40  $\mu\text{m}$  の W/O 液滴が規則正しく連続生成される様子が観察された (図 10)。生成された W/O 液滴は順次 DLD 流路に侵入し斜行を開始したが、有機相と 2wt% PVA 水溶液の合流により形成される油水界面が支柱配列に乱され、エマルション化して界面が安定して形成されない様子が観察された。その結果、W/O 液滴の油水界面横断が安定して行われなかった。今後、DLD 流路域における油水界面を安定化させるためには、支柱配列流路の親水性および疎水性の部分修飾が必要であることが示唆された。

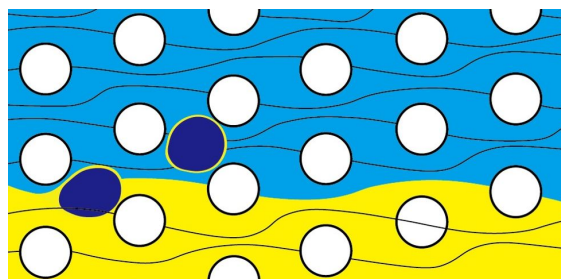


図 8. W/O 液滴の油水界面横断によるポソーム生成法の概念図。

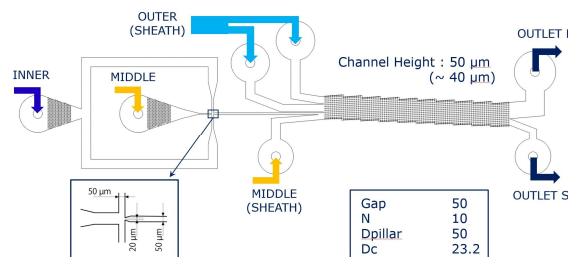


図 9. 油水界面横断試験用マイクロ流路デバイスの概念図。

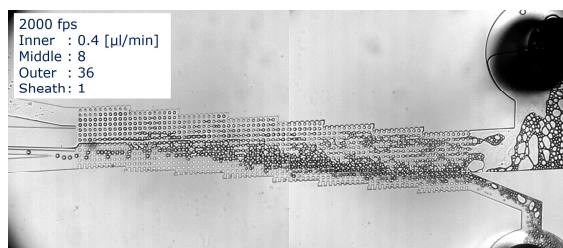


図 10. W/O 液滴の油水界面横断試験の様子。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Guangchong Ji, Yusuke Kannno, and Takasi Nisisako	4. 巻 14
2. 論文標題 Microfluidic coupling of step emulsification and deterministic lateral displacement for producing satellite-free droplets and particles	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Micromachines	6. 最初と最後の頁 622
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/mi14030622	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Guangchong Ji, Yusuke Kanno, Takasi Nisisako
2. 発表標題 On-chip production of alginate hydrogel microparticles using step emulsification and deterministic lateral displacement
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会第47回研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yeyi Tang, Guangchong Ji, Yusuke Kanno, Takasi Nisisako
2. 発表標題 Formation and separation of large droplets in a 3D-printed microfluidic device
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会第47回研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yeyi Tang, Guangchong Ji, Yusuke Kanno, and Takasi Nisisako
2. 発表標題 Evaluating particle separation in a 3D-printed deterministic lateral displacement device
3. 学会等名 The 10th International Conference of Asian Society for Precision Engineering and Nanotechnology（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yeyi Tang, Guangchong Ji, Yusuke Kanno, and Takasi Nisisako
2. 発表標題 A 3D-printed microfluidic device for integrated droplet generation and sorting
3. 学会等名 2023年度精密工学会春季大会学術講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Guangchong Ji, Yusuke Kanno, and Takasi Nisisako
2. 発表標題 Inhibition of droplet clustering in step emulsification using deterministic lateral displacement
3. 学会等名 2023年度精密工学会春季大会学術講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Guangchong Ji, Yusuke Kanno, and Takasi Nisisako
2. 発表標題 Microfluidic synthesis of polymer particles using step emulsification and deterministic lateral displacement
3. 学会等名 19th International Conference on Precision Engineering (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Guangchong Ji, Yusuke Kanno, and Takasi Nisisako
2. 発表標題 Synthesis of functional polymeric microspheres via step emulsification and deterministic lateral displacement
3. 学会等名 26th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 季広沖, 菅野佑介, 西迫貴志
2. 発表標題 Microfluidic step emulsification and deterministic lateral displacement
3. 学会等名 2022年度精密工学会春季大会学術講演会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関