

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 26 日現在

機関番号：13904

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22760207

研究課題名（和文）

静電界を利用した油中液滴生成技術のバイオ応用

研究課題名（英文）

Water-in-oil droplet formation by electrostatic atomization and its application to biotechnology

研究代表者

栗田 弘史（KURITA HIROFUMI）

豊橋技術科学大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号：70512177

研究成果の概要（和文）：

静電界を用いた微小油中液滴の生成方法・操作方法の検討とバイオ分野への応用を目的として研究を実施した。静電霧化現象を油中液滴生成に適用した結果、溶液に直流高電圧を印加することで油中に微小な液滴を生成し、液滴粒径の制御に成功した。また、不平等電界に着目し、連続相の流れを必要としない液滴の搬送および融合方法を開発した。さらにこの原理を用いて、油中液滴中での遺伝子導入を試みた結果、大腸菌に対して遺伝子導入が可能であることが示された。

研究成果の概要（英文）：

Water-in-oil (W/O) droplet formation by electrostatic atomization and manipulation of the individual droplet by electrostatic force were studied. A method to generate W/O droplets using electrostatic field was investigated. The method can control the size of water droplets by adjusting the applied DC high voltage and these water droplets are stable without a surfactant due to electrical charge. In addition, a novel method to transport and fuse W/O droplets using non-uniform electrostatic field was also investigated. Furthermore, gene transformation by using DC electric field was carried out. This method can reduce sample volume smaller than that of conventional method. In conclusion, these methods are expected to be a new tool in miniaturized bioengineering.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：電気電子工学・電力工学・電力変換・電気機器

キーワード：静電噴霧、油中液滴、バイオ応用

## 1. 研究開始当初の背景

バイオエンジニアリングにおいて、water-in-oil(W/O)エマルジョンに代表される微小油中水滴への関心が高まっている。エマルジョンは、均一に溶解しない二つの溶液の一方が微粒子化し、もう一方の溶液中に分散している状態である。このようにして生成した微小液滴の一つ一つをマイクロリアクターとして利用し、それぞれの液滴に別々の試料を入れて反応を行うことができる。この性質により、試料や試薬の節約・溶液の体積が小さいことによる反応時間の短縮・副生成物が少ないといったメリットがある。これらの利点を利用した方法として、エマルジョンPCRなどが挙げられる。このように微小油中液滴はより多くのデータを迅速に取得することが求められるバイオ分野において極めて利用価値が高いと考えられる。一方で、Micro-Total Analysis Systems ( $\mu$ TAS)や“Lab on a chip”といったキーワードに代表されるマイクロ化学分野においてもW/Oエマルジョンが注目されており、特にマイクロ流路中での油中液滴生成技術の開発が行われている。マイクロ流路中で油中液滴を生成する方法としては、電気浸透流を用いる方法・T字構造を用いる方法などが挙げられる。しかし、生成される液滴の粒径は流路の微細構造に依存し、精密微細加工技術を要する。本研究では新規液滴生成・操作技術の開発とそのバイオ分野への応用を目的として研究を進めることとした。

## 2. 研究の目的

本研究では、静電霧化現象に基づく油中液滴生成技術および静電気力を用いた液滴操作技術の開発と、油中液滴生成・操作技術を用いたバイオ分野における新技術の創生を目指した。静電霧化現象は、表面あるいは界面に誘導された電荷が互いに反発しあって外向きの力を生じ、その結果表面(界面)を引っ張り、さらに過剰な電荷が誘導されることにより先端から液滴が噴出する現象である。このようにして生成した液滴はそれぞれ同極性の電荷を帯び、自発的に融合することはない。また液滴サイズは印加電圧を変化させることで容易に制御できる。自動車の塗装に代表されるように静電微粒化のほとんどは液-気系で行われているが、液-液系での報告は少ない。液-気系と比較し、液-液系では比較的低い電圧で微粒化が可能で、生成された液滴の粒径制御が容易かつ粒径分布が狭く正規分布に近いなどの特徴がある。本研究では、水-油系における静電微粒化を用いて微小油中液滴を形成する方法について検討した。また生体高分子を含んだ液滴を生成し、内部の分子への影響を確かめた。

また、本研究で生成される液滴が帯電して

いることから、静電界による非接触操作も試みた。電界によって働く力のひとつである誘電泳動力は、微小液滴の操作に関して有効な手段であることがよく知られている。電界とそれにより誘起された電荷との相互作用を利用し、粒子の並進・回転・非接触保持などの様々な現象を引き起こす可能性が高いからである。またクーロン力は電気泳動に代表されるように、生体高分子やコロイド粒子の分離・分析に広く使用されている。電界中に電荷を用いた粒子を置くと、粒子が持つ電荷とは逆極性の電極に移動する。このとき、粒子は電気力線に沿って移動する。これら2つの静電気力を組み合わせることで新規な液滴輸送技術になり得ると考えた。

## 3. 研究の方法

### (1) 静電霧化現象による微小油中液滴生成

本研究課題では、まず静電霧化現象の油中液滴生成への適用について、基礎的特性の検討を行った。内径100  $\mu$ mのガラスキャピラリーの内部に蒸留水を満たし、蒸留水と接するようにステンレスワイヤを接地電極として挿入した。プラスチック製シャーレにシリコンオイル(粘度100 cSt, 電気抵抗率1 T $\Omega$ m以上)を注ぎ、オイル深さを5 mmとした。シャーレの中心に蒸留水を充填したガラスキャピラリー先端を1 mm挿入した。アルミニウム板をシャーレの下部に設置し、直流高電圧を印加した。

また、液滴生成が生物学的試料に与える影響について調べるため、水相にDNAを含んだ試料を用い液滴生成を行った。DNA試料に環状プラスミドDNA(2686 bp)と長鎖直鎖状DNA(48.5 kbp)をそれぞれ用いた。これらのDNAをPCRバッファーに50 ng/ $\mu$ lとなるように溶解した。油相には上記と同様のシリコンオイルを用い、印加電圧+4 kV、印加時間60秒で液滴生成を行った。また、液滴生成後シャーレ内の液滴を含むオイルを遠心分離し、水相を回収した。回収したDNAはアガロースゲル電気泳動およびPCRによって解析した。

### (2) 不平等電界を用いた液滴輸送・融合

図1に液滴輸送のための電極配置図を示す。プラスチック製シャーレ上に、ナイフ状に加工した導電テープを互いが向き合うように設置して電極とした。その後、電極を設置したシャーレに疎水処理を施し、十分に乾燥させた後、油相としてシリコンオイルをシャーレに注いだ。電極が弧を描く部分にキシレンシアノールで青色に着色した液滴を滴下し、電極間に直流高電圧を印加した。また、液滴融合は、図1に示す電極を、弧を描く部分が左右対称となるように設置して行った。実験条件は上記と同様とした。

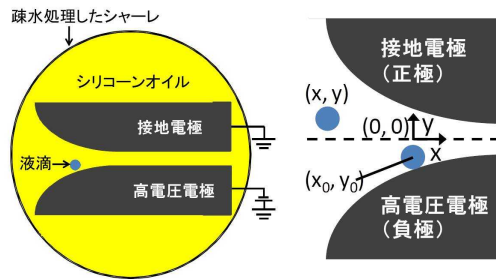


図 1: 不平等電界を用いた液滴輸送と解析のための座標系

#### 4. 研究成果

図 2 に印加電圧+4 kV、印加時間 10 sec の条件において生成した液滴の様子を示す。生成した液滴同士が約 400  $\mu\text{m}$  程度の間隔で規則的に配列した。また、生成された液滴は 24 時間放置後も形や位置を保っていた。生成した液滴は、電荷を保持しているため静電氣的斥力により互いが融合することなく規則的に配列したと考えられる。またこの条件で得られた液滴の平均粒径と標準偏差は  $81 \pm 6 \mu\text{m}$  であった。また、同様の実験を異なる印加電圧・異なる内径のキャピラリーに対して行ったところ、印加電圧が高く、内径の小さい場合に粒径が小さくなったが、バラつきも大きくなった。これは電界集中による界面の不安定性に起因するものと考えられる。

続いて、液滴生成が DNA に及ぼす影響についてアガロースゲル電気泳動により検証した。DNA 溶液を用いて+4 kV を 60 秒間印加して液滴を生成し、回収した水相を電気泳動に供した。その結果、環状プラスミド DNA、長鎖直鎖状 DNA のいずれにおいても顕著な変化は見られなかった。また、回収した環状プラスミド DNA を鋳型として PCR 反応を行ったところ、通常の鋳型を用いた場合と同様に増幅産物が得られた。以上のことから、本実験の条件では液滴生成による DNA への影響やその後の生化学反応への影響はほとんどないと考えられる。

また静電気力を用いて油中液滴を非接触操作する技術について検討した。液滴の搬送は機械的ポンプで駆動する連続相の流れを利用する方法が一般的だが、本研究では不平等電界に着目し、連続相の流れを必要としない液滴の移動および融合方法の開発を試みた。不平等電界を用いた液滴輸送・融合は、油中に設置したナイフ状電極間に直流高電圧を印加することで、滴下した液滴を往復運動させながら強電界側または、弱電界側へ移動させることで実現できた。すなわち、適当な条件下では印加電圧を変化させることで移動速度と進行方向を制御することが可能

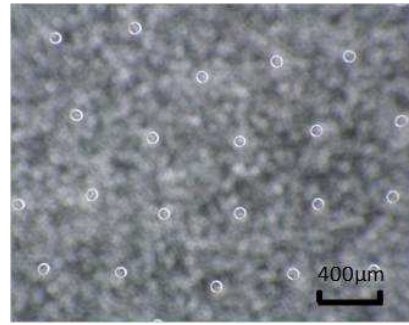


図 2: 生成した液滴の様子

であることを示した。また、電極対を対向に配置することで、液滴が往復運動しながら互いに近づき融合することを確認した。この方法では水溶液の流れを必要せず電気的エネルギーを液滴の運動エネルギーに変換することで液滴のみを移動・融合させることができる。

また、この方法では電極と液滴が触れ合うことで、液滴の極性が逆極性へ変わり、クーロン力によって逆側の電極へ移動する。この時、液滴が電極と接触することで、電気パルスが印加されていると考えられる。本研究ではこのことに着目して、微小油中液滴中での遺伝子導入を試みた。遺伝子導入は外来性遺伝子を細胞内に導入する方法として、分子生物学において広く用いられている。遺伝子導入法には物理的手法と化学的手法、ウイルスなどを用いて感染させる方法などがある。エレクトロポレーション法は物理的な手法の一つであり、電気パルスを細胞に印加することで細胞膜の透過性を増し、DNA、RNA、などを細胞内に導入する方法である。そこで本研究では、大腸菌とプラスミド DNA を含んだ油中液滴を電極間で往復運動させることで遺伝子導入が可能であるか検討を行った。その結果、従来法と比較して導入効率は低いものの、大腸菌や培養細胞に対して遺伝子導入が可能であることが示された。このように液滴内で遺伝子導入を行えることより、微小なスケールでの遺伝子導入が可能であることが示唆された。

本研究により、静電霧化現象を用いた油中液滴生成がバイオ分野に適用可能であること、不平等電界を用いて液滴を非接触操作できること、油中液滴と直流高電圧を用いて遺伝子導入できることが示された。

#### 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 6 件)

① 青木 博則, 栗田 弘史, Thierry Paillat,

高島 和則, 水野 彰, "静電微粒子化を用いたエマルジョン生成," 静電気学会誌, vol. 34, pp. 25-30, 2010. 査読有

[学会発表] (計 6 件)

- ① 浅田 淳, 青木 博則, 栗田 弘史, 安田 八郎, 高島 和則, 水野 彰, "直流電界と油中液滴を用いた遺伝子導入法の開発", 第 34 回日本分子生物学会年会, 2011 年 12 月 13 日, パシフィコ横浜, 横浜市
- ② Atsushi Asada, Hironori Aoki, Hirofumi Kurita, Hachiro Yasuda, Kazunori Takashima, and Akira Mizuno, "Water-in-oil droplet generation and manipulation using an electrostatic field for miniaturized reaction systems", 2nd ISNPEDADM-2011 New electrical technologies for environment, Nov. 17, 2011, Noumea, New Caledonia, France
- ③ Atsushi Asada, Hironori Aoki, Hirofumi Kurita, Hachiro Yasuda, Kazunori Takashima, and Akira Mizuno, "A Novel Gene Transformation Technique using Water-in-oil Droplet in an Electrostatic Field", IEEE Industry Applications Society Annual Meeting, Oct. 10, 2011, Orland, USA
- ④ 浅田 淳, 青木 博則, 栗田 弘史, 安田 八郎, 高島 和則, 水野 彰, "電界中の油中液滴を用いる遺伝子導入法の開発", 第 35 回静電気学会全国大会, 2011 年 9 月 13 日, 東京理科大学, 東京都
- ⑤ Hironori Aoki, Hirofumi Kurita, Thierry Paillat, Kazunori Takashima, and Akira Mizuno, "Generation of Water Droplet in Fluorocarbon using Electrostatic Atomization", IEEE Industry Applications Society Annual Meeting, Oct. 5, 2010, Houston, USA
- ⑥ 青木 博則, 栗田 弘史, 安田 八郎, 高島 和則, 水野 彰, "不平等電界を用いた油中液滴輸送・融合技術の開発", 第 34 回静電気学会全国大会, 2010 年 9 月 15 日, 鳥取大学, 鳥取県

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]  
○出願状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

[その他]  
ホームページ  
<http://ens.tut.ac.jp/electrostatics/>

6. 研究組織  
(1) 研究代表者

栗田 弘史 (HIROFUMI KURITA)  
豊橋技術科学大学・大学院工学研究科・助教  
研究者番号 : 70512177