

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23655063

研究課題名(和文)単分散マイクロバブルを利用した連続分離システムの構築

研究課題名(英文)Development of continuous separation systems using monodisperse microbubbles

研究代表者

関 実 (SEKI, MINORU)

千葉大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：80206622

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：単分散なマイクロバブルや液滴を利用して、連続的な分離・精製を可能とする新規システムの開発を行った。マイクロ流体デバイスを利用して、分散相として気泡あるいは液滴を形成し、その界面にターゲット分子を吸着させる。そして、水力学的濾過法に基づき、担体として利用した液滴や気泡を連続相から分離・濃縮して回収する、という一連の操作を行うことで、ターゲット分子の連続的な分離が可能となる。実験では主に色素分子を用いて、この手法の有効性を検討したほか、抽出時間をミリ秒～数秒のオーダーで変化させることによって、吸着あるいは抽出の速度論的解析を行うことが可能となった

研究成果の概要(英文)：We developed new methods for continuously separating/concentrating target molecules using monodisperse microbubbles or microdroplets. We fabricated microfluidic devices and produced monodisperse bubbles or oil-in-water droplets, and used them as the carriers for target molecules. Then by utilizing the principle of hydrodynamic filtration, we recovered concentrated bubbles/droplets from the continuous phase, resulting in the continuous separation of target molecules. In experiments, we investigated the effectiveness of the presented systems for the recovery of target molecules, primarily using dyes as model targets. In addition, by changing the extraction periods from milliseconds to several seconds, we were able to examine the extraction kinetics using droplets or bubbles.

研究分野：マイクロ流体工学

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学 マイクロ・ナノデバイス

キーワード：マイクロ流路デバイス 分離 マイクロバブル 液滴 分析化学 マイクロ・ナノデバイス

1. 研究開始当初の背景

イオン交換・疎水・アフィニティークロマトグラフィー等の各種吸着クロマトグラフィーは、化学物質の定量分析や、タンパク質の生産・精製など、実験室レベルから工業生産に至る幅広い分野において頻用されている必須のプロセスである。これらのクロマトグラフィーシステムでは、通常は移動相として液体、固定相として微粒子等の担体を用い、担体に対する吸着性の違いを利用し、溶出液の濃度や組成を経時的に変化させることで、目的分子の分離・精製が可能となる。このような LC システムはほぼ完成された技術であると言えるが、大量の微粒子担体が必要となる一方で、ファウリング（汚れ）による分離能の低下が起りやすく、また連続的な処理を行うことが難しい、といった問題点がある。そのため、微粒子等の固体担体を必要とせず、連続的な分離操作を可能とする、新規な原理に基づくバイオセパレーションシステムが構築されれば、より高速・安価かつ環境負荷の低いプロセスとして、既存の技術分野に革新をもたらすことができるのではないかと考えられる。

近年、たとえば数十秒で試料の分離・分析を可能とするマイクロチップ電気泳動装置に代表されるように、マイクロ・ナノ流体デバイス技術は分離科学・分析化学に急速な進歩をもたらしてきた。マイクロ・ナノ流体デバイスにおける利点としては、微細加工技術を利用することによる装置の並列化・微小化、単位操作の統合による高機能化、微小スケールに特長な物理現象（拡散律速・安定な層流）等があり、これらを巧みに利用することで初めて実現された分離・分析プロセスも数多い。さらに、流路構造と同程度の大きさを持つ微小な液滴や気泡を、簡便かつ正確に形成することができるため、単分散の液滴を利用した生化学分析システム（Ismagilov, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2003; Chiu, *Anal.*

Chem., 2005 など）や、気泡の形成と操作のためのシステム（Whitesides, *Science*, 2007）など、既存の手法では考えられないような新規手法が多数報告されている。さらにまた、細胞や微粒子、生体高分子など、微小な流路と同程度の大きさの物質を正確に操作・分離・分析するためのシステムとしての利用も活発であり、本研究者らもこれまでに、マイクロ流体デバイスを用い、粒子や細胞を大きさによってソーティングするための「水力学的フィルトレーション」技術の開発を行ってきた（Seki, *Lab Chip*, 2005 など）。この手法では、流れの抵抗を精密に制御した、流路構造分岐を有するマイクロ流路に対し、連続的に粒子懸濁液を導入するだけで、大きさによる粒子の分級が可能になる。この原理を応用することで、特定の大きさの細胞のみを選抜する流体回路や、細胞に対しミリ秒程度の一定時間、化学的な処理を施すための流路ネットワーク（Seki, *Lab Chip*, 2008）などの開発を行ってきた。この手法の最も本質的な点は、分岐する流れの中に、大きさを持つ、つまり分割されない存在である「粒子」を導入すると、それらを特定の方向のみに導くことができ、細胞や粒子のソーティングが可能となる、ということである。

2. 研究の目的

本研究では、マイクロ流路技術の有する、微小な気泡や液滴を正確に生成する能力と、微小なマテリアルを流れの中で特定の方向に導く能力、の2点に着目した、新しい連続的バイオセパレーションシステムを提案した。まず流路の上流部において、連続相（水相）と分散相（気相あるいは油相）を連続的に導入し、サイズの揃った、単分散な液滴あるいは気泡を生成する。そして、下流においてサンプル溶液を連続的に導入し、ターゲット分子を気液界面あるいは液液界面に吸着させる。さらにその下流において、段階的に異なる組成の溶液（溶離液）を連続的に導入

し、メイン流路内に連続相液体の濃度勾配を形成する。ここで、「水力学的フィルトレーション」の原理を応用することで、ターゲット分子を吸着した分散相液滴/気泡を、メイン流路内の濃度勾配中を通過させる。そして、気液あるいは液液界面に吸着した分子は、周囲の溶出液の組成（塩濃度・界面活性剤濃度・pHなどが異なる）に応じて界面から脱着する。そのため、ターゲット分子を吸着力の違いによって異なる出口から回収できる、連続的かつ高速な分離精製システムが実現されると考えた。

そこで本研究は、本原理の実証による、新規連続分離システムを構築し、またその応用を行うことを目的とした。分離対象となるモデル分子として、アルブミン、カゼイン等のタンパク質や、低分子量の色素分子を用いることとした。

3. 研究の方法

水力学的濾過法では、抵抗回路とみなした流路設計を行うことによって、分岐流路へと導入される対象物の大きさを任意に制御することが可能である。本研究では、生成した気泡や液滴が分岐流路に導入されないような設計を行うことで、分岐流路（出口2）からは連続相のみを排出し、メイン流路出口（出口1）から濃縮された液滴を回収することが可能となる。実験では、主にソフトリソグラフィーを用いて作製したPDMSガラス製のマイクロ流体デバイスを用いた。マイクロバブルを担体とする実験および液滴を担体とする実験では、どちらの場合にも、モデルターゲット化合物として、メチルオレンジ・rhodamine B等の色素を用いた。連続相としてこれらの色素を含む水溶液を、分散相として窒素ガスあるいは油相（1-octanol）をそれぞれ連続的に流路に導入し気泡あるいは液滴を作製し、rhodamine Bの分散相への抽出挙動を観察した。抽出部の滞留時間が10ミリ秒～10秒程度となる3種類のデバイスを

用いて抽出を行い、出口2から回収された連続相の吸光度（ $\lambda = 544 \text{ nm}$ ）を測定することで、抽出量を算出した。

また、本抽出プロセスの応用として、ターゲット成分を含む連続相に塩や界面活性剤を添加した際の抽出速度の変化を評価した。添加物による液滴形成への影響を抑えるために、液滴を用いる実験においては、液滴形成部において水と1-octanolによって1-octanolの液滴を形成した後、rhodamine B水溶液の導入を行うデバイスを作製した。この際、連続相となる水とrhodamine B水溶液の混合を促進するための2層流路構造を作製し、上層の流路からrhodamine B水溶液を導入した。また、単一の流路であっても、抽出時間の大幅な変更を可能とする、マルチインレット・アウトレット型マイクロ流路の設計を行った。

4. 研究成果

まず、マイクロ流路内に形成したマイクロバブルを利用した連続分離システムについては、以下の検討を行った。(1)単分散な直径数十 μm 程度のマイクロバブルを連続的かつ安定的に生成するための最適な条件の検討を行った。ポリジメチルシロキサン（PDMS）を用いたソフトリソグラフィーによるレプリカモールドイングによって作製した微細流路に、窒素ガスと水相（界面活性剤として臭化セチルトリメチルアンモニウム（CTAB）を含む）を導入し、発生した気泡の流れを倒立型（蛍光）顕微鏡下で高速度ビデオカメラを利用して記録し解析した。その結果、液相および気相の流路バランスを最適化することにより、直径16-38 μm 程度の安定な単分散気泡流れの生成条件を見出すことができた。(2)次に、液相と気泡の接触時間と溶質分子・粒子の界面吸着量の関係の解明を行った。分離対象のモデル分子として、負電荷を有する色素メチルオレンジを選択し、吸着の選択性を制御するために、正電荷を有する界

面活性剤臭化セチルトリメチルアンモニウムを用いて、両者の静電的な相互作用を利用した分離を試みた。その結果、界面活性剤を含有する気泡が回収される出口側からは、色素が約 10%濃縮されることが見出された。この結果は、提案した原理による分離が実現可能であることを示したものと考えられる。なお分離対象となる物質と界面の接触時間および接触界の面積を向上させる必要があるため、気泡径の減少、気泡数の増加、滞留時間の延長などを試み、またアルブミン等のタンパク質の濃縮・分離を試みたが、現時点では、抽出量の大幅な増加および選択性の向上を達成するには至っていない。濃縮が十分に進んでいない原因として、分離に寄与する気液界面積が不十分である点が考えられるため、より効率的な分離を可能とする系の開発が必要であると言える。(3)HDF 法による液相中からの気泡の分離・濃縮挙動の解明を行った。気泡を安定に生成し、さらに連続相から分離するためには、流路表面の濡れ性の制御が重要であり、シラン処理などの化学的表面処理が効果的であることを見出した。一方、界面活性剤による界面活性の変化によって、気泡が変形し、さらに一部の気泡がリークする場合もあるため、気液分離に影響があることも明らかとなった。

次に、より効率性および選択性の高い連続的分離プロセスの構築を目指し、界面のみならず内部への物質の抽出を可能とする、単分散液滴を用いた液液抽出系の開発を目指し、以下の検討を行った。(1)マイクロバブルを用いた実験と同様に、PDMS をデバイス材質として利用し、水力学的濾過法による液滴の濃縮を可能とする流路構造を設計・作製した。表面の濡れ性、流路幅、導入流量などを調節することにより、流路合流点において単分散な液滴（例えばオクタノール）を連続相である水中に形成させることができた。そして、連続相中に含まれるターゲット成分（たとえば

色素）を抽出した後に濃縮する、という連続的分離プロセスが可能であることが確認された。(2)気泡と比較した場合に、液滴を用いた抽出系では非常に短い時間スケール（0.1 秒以下）であっても、効率的にターゲット成分を抽出することが可能であることが見いだされ、さらにその抽出時間をミリ秒オーダーで正確に制御することが可能であった。また、共存物質の存在下における抽出実験を行い、その影響の評価にも成功した。(3)また、これまでの流路システムでは、界面への物質吸着に必要となる滞留時間を変化させるために、それぞれの滞留時間に応じた複数種の流路構造が必要であったが、単一の流路構造であっても滞留時間を 10 ミリ秒～数秒程度と大幅に変更できる、可変型マイクロ流路構造の作製を行い、その有用性を実証することができた。(4)また、抽出時間の正確に制御可能であることを利用して、抽出プロセスの評価を行ったところ、通常の液液抽出系と比較して境膜の厚みが劇的に薄くなることが確認された。

以上をまとめると、単分散マイクロバブルあるいは微小液滴を利用した、新規分離システムの基礎技術を開発することができた。流路の内部において、これら微小な液滴あるいは気泡を担体として利用し、その表面に吸着させたターゲット分子を、液滴あるいは気泡の周囲の環境に応答してリリースするというアイデアは独自性が高く、既存の分離法とはことなる手法として、今後も発展するものと考えられる。現在、多段階連続的抽出プロセスの開発についても取り組みを継続しており、気泡あるいは液滴を利用したターゲット分子の新規分離生成プロセスとしての応用を行っている。また一方で、本研究において提案したシステムは、液液抽出あるいは気液吸着プロセスを詳細に解析するためのツールとしても有用であると考えられる。

(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1件)

(1) **Development of Subsecond Time-scale Liquid-liquid Extraction Processes Utilizing Monodisperse Microfluidic Droplets**, Shunta Kakegawa, Masumi Yamada, Masahiro Mizuno, Natsuki Nakajima, and Minoru Seki, *Proceedings of the 17th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2013)*, 1974-1976 (2013).

(査読有り)

[学会発表](計4件)

(1) **Development of Subsecond Time-Scale Liquid-Liquid Extraction Processes Using Monodisperse Microfluidic Droplets**, Shunta Kakegawa, Masumi Yamada, Masahiro Mizuno, Natsuki Nakajima, and Minoru Seki, 17th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2013), Freiburg, Germany, Oct. 27-31, 2013.

(2) **Microfluidic Systems for Continuous Liquid-Liquid Extraction Using Monodisperse Microdroplets**, Natsuki Nakajima, Shunta Kakegawa, Masahiro Mizuno, Masumi Yamada, and Minoru Seki, RSC Tokyo International Conference 2013 - Analytical Biochemistry & Biophysics - (JASIS 2013), Makuhari Messe, Chiba, Japan, Sep. 5-6, 2013.

(3) **Rapid and Precise Particle Manipulation in Microfluidic Devices**, Masumi Yamada, Sari Sugaya, and Minoru Seki, The 23rd International Congress of Theoretical and Applied Mechanics (ICTAM2012), Beijing, China, August 19-24, 2012.

(4) **マイクロ流路内液滴を用いた時間制御型液液抽出プロセスの開発**, 掛川駿太, 山田真澄, 関実, 化学工学会第78年会, 大阪大学豊中キャンパス, 2012年3月19日.

[その他]
ホームページ
<http://chem.tf.chiba-u.jp/gacb01/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

関実 (SEKI MINORU)
千葉大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号: 80206622

(2) 研究分担者

山田真澄 (YAMADA MASUMI)
千葉大学・大学院工学研究科・准教授
研究者番号: 30546784