T2R2 東京科学大学 リサーチリポジトリ
Science Tokyo Research Repository

論文 / 著書情報
Article / Book Information

論題	マイクロ液滴と分析
Title	Microdroplet Operations and Applications
著者	福山真央, 火原彰秀
Author	Mao Fukuyama, Akihide Hibara
掲載誌/書名	ぶんせき, 2015, 1, 8-12
Journal/Book name	BUNSEKI, 2015, 1, 8-12
発行日 / Issue date	2015, 1

Powered by T2R2 (Science Tokyo Research Repository)

解　説

マイクロ液滴操作と分析

マイクロ・ナノ構造を用いた分析手法のなかで，液滴を利用した方法は分子（細胞）閉じ込めという観点から注目を集めている。例えば，マイクロ流路構造を用いて生成した液滴は，１つ１つが孤立した反応・分析場であり，状況を上手く設定していくと分子カウントに基づく新しい分析法へと発展していくことがわかる。本稿では，発展著しいマイクロ液滴の生成法，操作法，解析法，応用例を紹介する。

福　山　真　央，火　原　彰　秀

1　はじめに

1990 年代以来，マイクロ・ナノ加工技術を用いて作製した分析デバイスが注目を集めている[1)2)]。この研究分野は，MicroTAS あるいは Lab on Chip と呼ばれ，化学・生物・工学・医学・薬学など，幅広い分野の多くの研究者が集い研究が進展している[3)~5)]。マイクロ・ナノスケールに分析化学の操作・反応などを集積化することで，省試料・省廃棄物・自動化・高速化などが達成され，化学・生化学分析の世界を変えつつある。例えば，DNA 検出，電気化学検出，電気泳動，溶媒抽出，ガス分析，微粒子・細胞操作などの集積化が検討されている[6)~10)]。近年では，ナノ空間の物性解明[11)]やナノ流路を用いた単一分子解析[12)]なども報告されている。

マイクロ・ナノスケールの空間を用いることで，分析操作上様々な利点が期待できる。Y 字構造の流路を用いて，0.1～10 mm/s 程度の速度で水溶液同士を接触させると，慣性よりも粘性の支配的な（低レイノルズ数の）層流を形成する。このような状況では，拡散のみで溶質の混合が進行するが，数十 μm の空間では，撹拌などの特別な操作なしでも，拡散係数に依存して数秒から 1 分程度で混合が終了する。また，互いに不溶な二つの液相を接触させる場合には，重力（密度差）により各相の配置が決まるセンチメートルスケールの通常の実験と異なり，界面張力が支配的な空間となるため接触させた順に各相の配置が維持される[13)14)]。このような微小空間の効果を利用することで，様々な分析操作の集積化が検討されてきた。

粘性・界面張力が支配的な流れであることを，別の形で利用すると図 1 (a) に示すような直径数 μm～数十 μm のマイクロ液滴を形成することができる。マイクロ流路内の安定した流れを利用することにより，液滴系の分散の小さい単分散液滴を形成でき，規定された pL～μL の体積中に溶質分子・イオン・微粒子・細胞などを閉じ込め，孤立した分析場・反応場として利用できる。この孤立した空間というコンセプトは，定量操作など分析化学の基本的な考え方を大きく変える可能性がある。例えば，図 1 (b) 左のように，2 種類の溶質を含む溶液を考えたとき，それぞれの物質をスペクトルに基づき定量するためには，濃度と吸光（あるいは発光）の関係からそれぞれの濃度を決定する。同じ溶液を，図 1 (b) 右のように十分小さな体積の液滴とし，「液滴 1 個に溶質が一つ入るかは入らないか」という状況にすれば，それぞれの液滴の色を判別して計数（カウント）することで，「定量操作」ができる。このような操作には，単一分子検出可能な検出法，あるいは酵素反応や PCR のような増幅反応が必要であるが，このようなコンセプトが拡（ひろ）がりつつある。本稿では，マイクロ流路内のマイクロ液滴の応用の基盤となる生成法や操作を概観した後，近年のマイクロ液滴の応用例を紹介する。

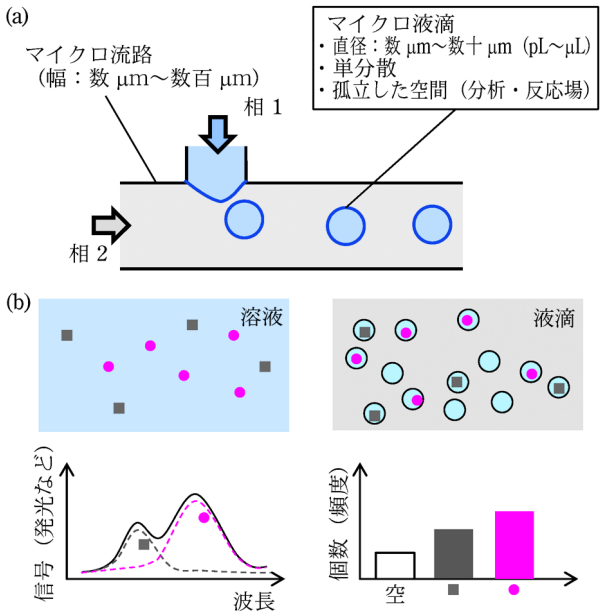


図 1　(a) マイクロ流路中のマイクロ液滴の概観，(b) 溶液中の定量操作（左）と液滴を用いる定量（右）の比較

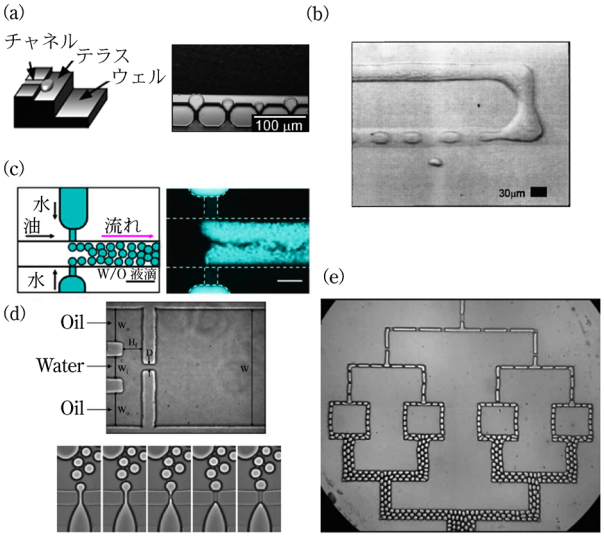
Microdroplet Operations and Applications.

2　マイクロ液滴の生成

マイクロ流路内で互いに不溶な2相を接触させるとき，流路形状や流速などの条件により，一方の相（分散相）が破断（breakup）して他方の相（連続相）中で液滴状あるいはプラグ状に流れる。生成した液滴の安定性向上のため，分散相または連続相中に界面活性剤を用いることが多い[15]。

図2(a)に示すような浅くて狭いマイクロ流路（MC）に油相を流すと，水相中に油滴が生成される[16)~18)]。その他にも，図2(b)に示すようなT字合流型流路の片側から水相，他方から油相を流すことにより，液滴を生成する手法がある[19)]。流速・流量比により様々な液滴流のパターンが形成されることが報告されている。図2(c)に示すように，これら二つの原理をあわせたような浅いT字合流構造をもつ液滴生成法もある[20)]。

分散相の破断に対してより積極的にせん断を加える手法として，図2(d)に示すようなフローフォーカス法が広く利用されている[21)]。図2(d)上の流路構造の左中段の流路から水相を，上下段の流路から油相を流し，それらを狭い流路を通すことで分散相(水相)を細く延ばし，油相のせん断により破断する。図2(e)のように，マイクロ流路の分岐構造で，水相プラグが同体積に分割することを利用し，複数回の分岐をもつ構造で液滴を生成する方法も用いられている[22)]。



(a) Adopted with permission from Ref 18. Copyright 2003 American Chemical Society. (b) Reprinted with permission from Ref 19. Copyright (year) by the American Physical Society. (c) Adopted with permission from Ref 20. Copyright (2011) by Japan Society for Analytical Chemistry. (d) Reprinted with permission from Ref 21. Copyright 2003, AIP Publishing LLC. (e) Reprinted with permission from Ref 22. Copyright 2004 by the American Physical Society.

図2　液滴生成法〔(**a**) 浅い部分（テラス）とマイクロ流路（チャネル）を利用した方法，(**b**) **T** 字型合流を利用した方法，(**c**) 浅い **T** 字型合流を利用した方法，(**d**) フローフォーカスを利用した方法，(**e**) 複数回の分岐構造を利用した方法〕

これらの方法により，直径数μm～数十μmの液滴が生成できる。さらに，図2(c)に類似の方法により，直径0.4μmという小さな液滴生成も報告されている。液滴径を決定する変数としては，粘度と界面張力の比を表す無次元数であるキャピラリー数（$Ca=\mu v/\gamma$，μ：粘度，v：流速，γ：界面張力）がよく用いられる。しかし，液滴生成はミリ秒スケールの高速現象で，界面活性剤吸着や流体界面変形など動的に扱うべき現象も多く，正確な液滴径予測モデル構築には，より詳細な解析が必要である[23)]。

3　マイクロ液滴の操作と解析

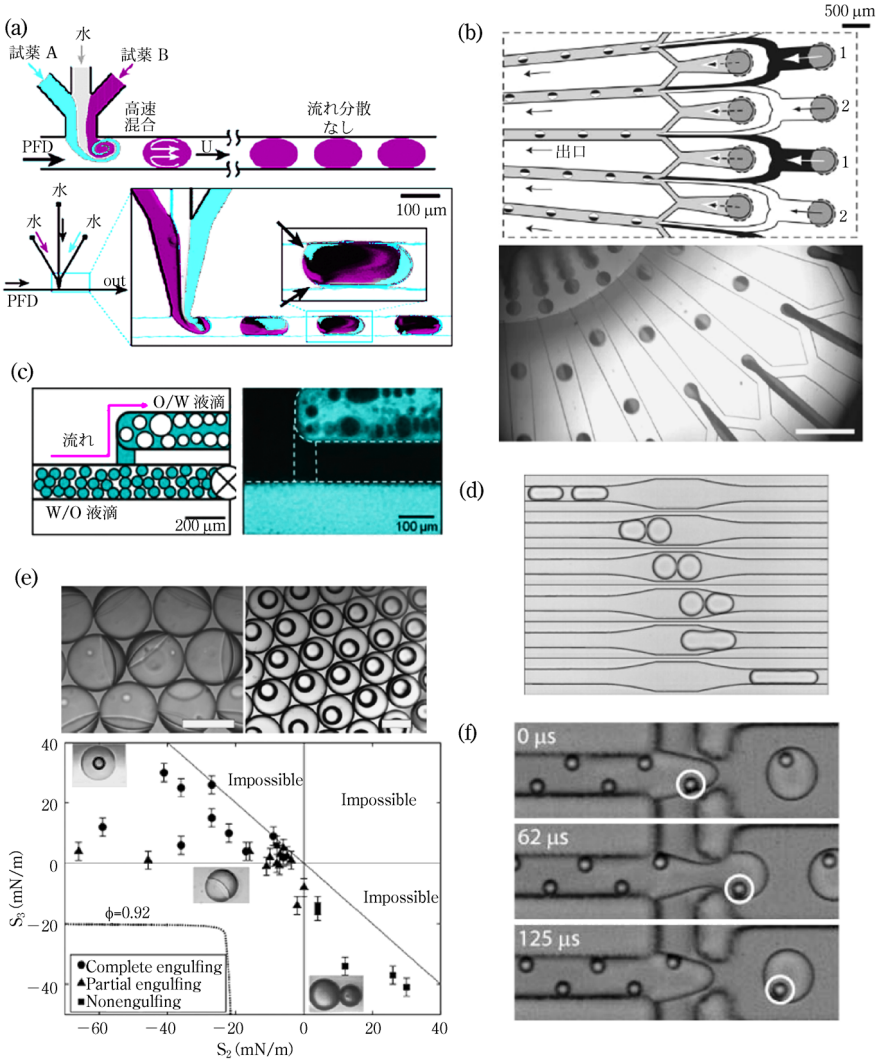
図1に示したようにマイクロ液滴の一つの特徴は，溶質を閉じ込めて孤立空間をつくることにある。マイクロ流体は，低レイノルズ数の層流であり，二つ以上の溶液の合流も制御しやすい。図3(a)に示すように，三の水溶液を一定の比率で混合したあと液滴化し，液滴内部流を利用してミリ秒スケールの高速混合を実現できる[24)25)]。逆に図3(b)のように，マイクロ流路内の対称性を高く保ち，内部流で混合が起こらないようにすることもできる。アクリル酸イソボルニル（モノマー）液滴を生成したのちに重合し，半球ごとに異なる成分をもつJanus型粒子を作製した例が報告されている[26)]。ここでは炭素微粒子とTiO_2微粒子が，それぞれの半球に閉じ込められている。

2種類以上の液滴をまず生成して，その後に液滴間での溶質混合をすることを考えると，図3(c)のように油中水滴（W/O液滴）を，表面濡れ性を利用して水中油滴（O/W液滴）へと変換することで実現した例がある[20)]。また，図3(d)のように2液滴を接触・合一させることで混合を実現する方法も広く研究されている[27)]。

3種の流体を合流したときに，Janus状態〔図3(e)左上写真〕，二重液滴状態（同右上写真），接触2液滴となるかは，それぞれの相間の張力バランスで決定する〔図3(e)下〕[28)]。マイクロ流体を用いることで，簡便にこのような状態を調べることが可能である。

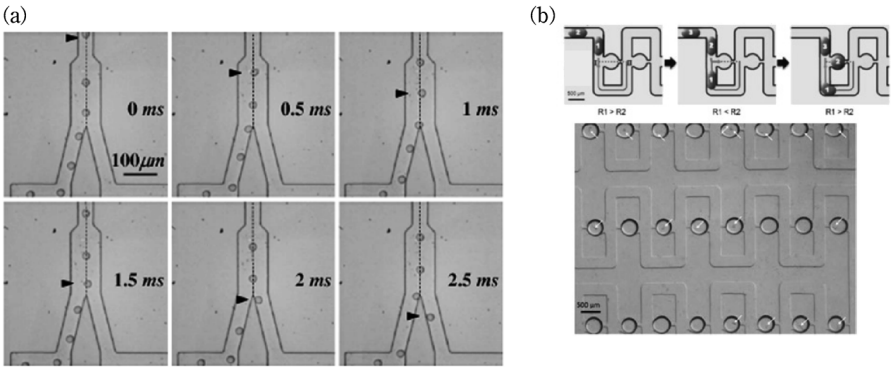
液滴生成前の水相中に粒子（あるいは細胞）を含む場合，この水相の液滴化により何個の粒子が液滴内に閉じ込められるかは，確率分布（ポアソン分布）に従う。しかし，マイクロ流体中の粒子にかかる揚力を利用すると，図3(f)のように粒子が規則的に並ぶことがある[29)]。このような状態から適切な条件で液滴を生成すると，決定論に近い1粒子（1細胞）閉じ込めを実現できる。

液滴における混合や接触のほかに，個別の液滴を分析・解析する技術も重要である。個別の液滴分析・解析には大きく分けて二つの考え方がある。一つは，図4(a)に示すような分取法（Sort法）である。分取部以前に蛍光法などで分取すべき液滴を定め，流路外の電極からの電場印加による誘電泳動により目的液滴を分取する



(a) Adopted with permission from Ref 25. Copyright (2003) American Chemical Society. (b) Adopted from Ref 26 with permission of The Royal Society of Chemistry. (c) Adopted with permission from Ref 20. Copyright (2011) by Japan Society for Analytical Chemistry. (d) Reprinted with permission from Ref 27. Copyright 2008 by the American Physical Society. (e) Reprinted with permission from Ref 28. Copyright 2008 by the American Physical Society. (f) Reproduced from Ref 29 with permission of The Royal Society of Chemistry.

図 3　(**a**) 液滴内部流を利用した高速混合，(**b**) 液滴内部混合を抑制下 **Janus** 型粒子生成，(**c**) 油中水滴から水中油滴への変換を利用した混合，(**d**) **2** 液滴の合一を利用した混合，(**e**) **3** 流体合流時の液滴形態変化，(**f**) 流体効果を利用した粒子閉じ込め



(a) Reprinted with permission from Ref 30. Copyright 2006, AIP Publishing LLC. (b) Reproduced from Ref 31 with permission of The Royal Society of Chemistry.

図 4　(**a**) 誘電泳動を利用した液滴分取法。(**b**) マイクロ構造を利用した液滴整列・保管

ことができる[30]。別の考え方は，図 4(b) のように，液滴を整列・保管したのちに画像解析などにより反応の有無などを調べる方法である[31]。図 3 に示したような操作と図 4 に示したような解析法を組み合わせて様々な分析応用が実現可能となる。

4　マイクロ液滴の分析応用

「単一細胞」の分析であれば，ある状態の細胞に特異的に集積して発色する蛍光試薬を用いれば，1 細胞に多数の蛍光分子が集まるためアッセイが比較的容易に実現できる。例えば，細胞の生死を見分ける蛍光色素を用いて，細胞を閉じ込めた液滴ごとに蛍光波長を計測することで，細胞の生存率を決定できる[32]。

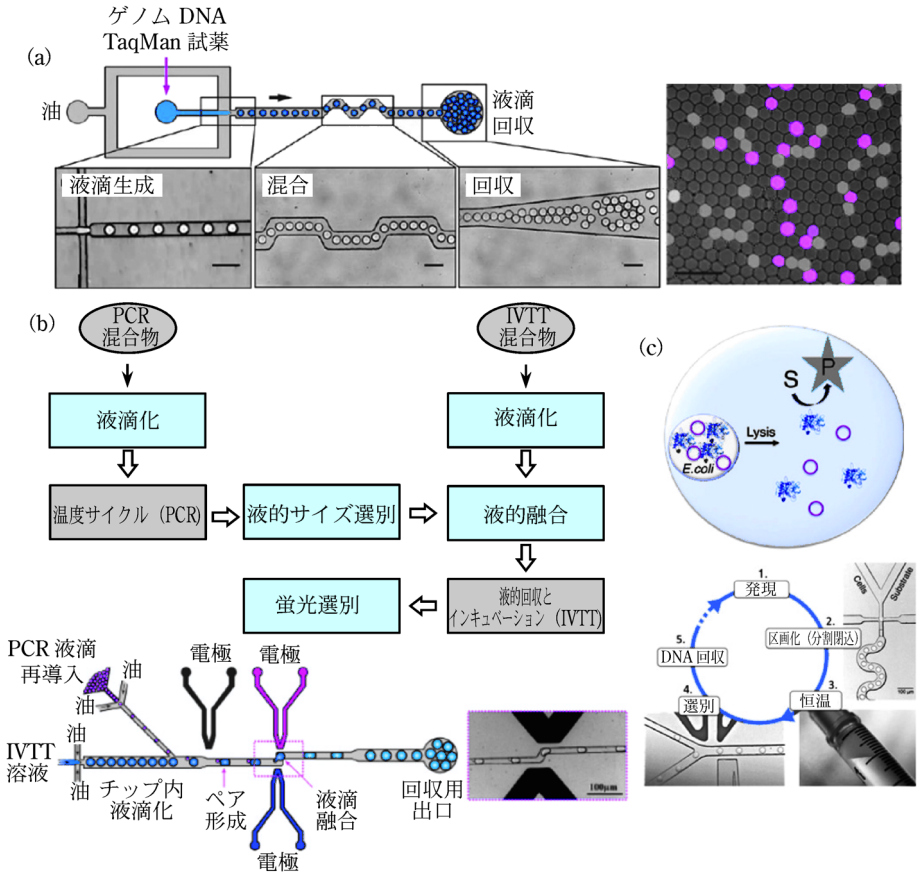
図 1 に示したような液滴への「単一分子」あるいは少数分子閉じ込めの場合には，解析法の感度・検出限界が問題となる可能性が高い。極限的な検出法では単一の小分子計測は実現している[33)34)]が，一般的な検出法としてはいまだ使いづらい面もある。なんらかの化学増幅を利用すると，より簡便に単一分子検出を実現できる。

まず DNA の増幅法である PCR 法を利用した方法が考えられる。図 5(a) に単一コピーの DNA を数える液滴 PCR 法の例を示す[35)36)]。対象とする溶液に，増幅用の溶液（プライマー，モノマー，酵素，検出用蛍光試薬など）を混合し，液滴化する。このとき，1 液滴に含まれる DNA 分子の平均数は十分小さく，確率分布から考えて 1 分子あるいは 0 分子という状況にしておく。十分蛍光が観測できる回数の反応サイクルを終えた後に，蛍光観察することで，DNA を数えることができる。従来の増幅時の蛍光増加を計測する定量法と比べて，高精度・高感度になることが期待できる。

化学的な増幅法として，酵素反応による基質から生成物への変換を用いる方法も考えられる。図 5(b) では，ライブラリーとなる DNA (*lacZ* 配列とその変異体) を，液滴に閉じ込め PCR で増幅したのち，無細胞転写・翻訳（in vitro transcption–translation, IVTT）を行う[37]。生成した酵素（β–galactosidase）の反応による蛍光増加を計測して，図 4(a) のように分取することで活性の高い配列を含む液滴を回収している。活性の高い酵素を高効率に選別するタンパク工学の手法としての発展が期待される。IVTT ではなく大腸菌による発現を利用した図 5(c) のような方法も同様に報告されている[38]。

5　おわりに

マイクロ・ナノ空間を用いる分析デバイスは，高度な



(a) Adopted from Ref 35 with permission of The Royal Society of Chemistry. (b) Adopted from Ref 37 with permission of The Royal Society of Chemistry. (c) Adopted from Ref 38, Copyright 2012, with permission from Elsevier.

図 5　(**a**) 液滴 **PCR** 法，(**b**) **IVTT** を用いた液滴タンパク工学，(**c**) 大腸菌を用いた液滴タンパク工学

発展を続けている。今後も生命科学分野を中心に多くの応用デバイスが提案され，実用化されると期待できる。

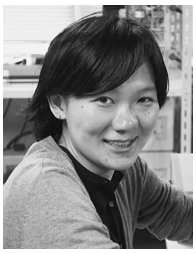
分析デバイスの発展の観点から振り返ってみると，図2(a) や図2(b) に示したような，一見単純な物理あるいは化学工学的な研究が，生命科学的な手法・アイデアと結びついて大きく進展してきたことがわかる。現在先進的な取り組みが行われているナノ構造を用いた操作・解析法[11)12)]も，他分野の手法・アイデアや本稿で示した液滴の手法などと融合して，大きな応用分野を生むと期待できる。

マイクロ・ナノ液滴を用いる分析法の今後の発展を考えてみると，本稿で例示した生命科学応用に加えて，より一般的な「ぶんせき」にも利用できる可能性をもつ。例えば，仮想的に直径が10 nmの液滴を考えると，体積は1 zL（10^{-21} L）程度であり，1 mM程度の溶液から単一分子閉じ込めが実現できる。このような状況でどんな操作・解析法が必要になるかは，今後の分野の発展を待たなければならないが，図1(b) で示したような「アナログ信号から分子カウントへ」という生命科学で起こっている変革が，一般の「ぶんせき」へと波及する可能性も高いと考える。

謝辞　科学研究費補助金（基盤研究B，挑戦的萌芽研究，特別研究員奨励費）からの助成に感謝する。

文　献

1) A. Manz, N. Graber, H. M. Widmer : *Sens. Act. B.*, **1**, 244 (1990).
2) A. Manz, J. C. Fettinger, E. Verpoorte, H. Lüdi, H. M. Widmer, D. J. Harrison : *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **10**, 144 (1991).
3) M. L. Kovarik, P. C. Gach, D. M. Ornoff, Y. Wang, J. Balowski, L. Farrag, N. L. Allbritton : *Anal. Chem.*, **84**, 516 (2012).
4) M. L. Kovarik, D. M. Ornoff, A. T. Melvin, N. C. Dobes, Y. L. Wang, A. J. Dickinson, P. C. Gach, P. K. Shah, N. L. Allbritton : *Anal. Chem.*, **85**, 451 (2013).
5) C. T. Culbertson, T. G. Mickleburgh, S. A. Stewart-James, K. A. Sellens, M. Pressnall : *Anal. Chem.*, **86**, 95 (2014).
6) 特集　マイクロチップを用いる分析化学，ぶんせき，**2002**, 227.
7) 岩崎　弦，林　勝義，丹羽　修：ぶんせき，**2005**, 227.
8) 北川文彦，末吉健志，大塚浩二：ぶんせき，**2011**, 143.
9) 戸田　敬：ぶんせき，**2012**, 685.
10) 小木　修：ぶんせき，**2013**, 27.
11) 塚原剛彦，馬渡和真，北森武彦：ぶんせき，**2008**, 454.
12) 加地範匡，安井隆雄，馬場嘉信：ぶんせき，**2014**, 348.
13) 火原彰秀，北森武彦：ぶんせき，**2006**, 242.
14) A. Hibara, M. Tokeshi, K. Uchiyama, H. Hisamoto, T. Kitamori : *Anal. Sci.*, **17**, 89 (2001).
15) J. C. Baret : *Lab Chip*, **12**, 422 (2012).
16) T. Kawakatsu, Y. Kikuchi, M. Nakajima : *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **74**, 317 (1997).
17) I. Kobayashi, M. Nakajima, H. Nabetani, Y. Kikuchi, A. Shohno, K. Satoh : *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **78**, 797 (2001).
18) S. Sugiura, M. Nakajima, N. Kumazawa, S. Iwamoto, M. Seki : *J. Phys. Chem. B*, **106**, 9405 (2002).
19) T. Thorsen, R. W. Roberts, F. H. Arnold, S. R. Quake : *Phys. Rev. Lett.*, **86**, 4163 (2001).
20) M. Fukuyama, A. Hibara : *Anal. Sci.*, 27, 671 (2011).
21) S. L. Anna, N. Bontoux, H. A. Stone : *Appl. Phys. Lett.*, **82**, 364 (2003).
22) D. R. Link, S. L. Anna, D. A. Weitz, H. A. Stone : *Phys. Rev. Lett.*, **92**, 054503 (2004).
23) M. Fukuyama, Y. Yoshida, J.C.T. Eijkel, A. van den Berg, A. Hibara : *Microfluid. Nanofluid.*, **14**, 943 (2013).
24) H. Song, J. D. Tice, R. F. Ismagilov : *Angew. Chem. Int. Ed.*, **42**, 768 (2003).
25) J. D. Tice, H. Song, A. D. Lyon, R. F. Ismagilov : *Langmuir*, **19**, 9127 (2003).
26) T. Nisisako, T. Torii : *Lab Chip*, **8**, 287 (2008).
27) N. Bremond, A. R. Thiam, J. Bibette : *Phys. Rev. Lett.*, **100**, 024501 (2008).
28) N. Pannacci, H. Bruus, D. Bartolo, I. Etchart, T. Lockhart, Y. Hennequin, H. Willaime, P. Tabeling : *Phys. Rev. Lett.*, **101**, 164502 (2008).
29) J. F. Edd, D. Di Carlo, K. J. Humphry, S. Koster, D. Irimia, D. A. Weitz, M. Toner : *Lab Chip*, **8**, 1262 (2008).
30) K. Ahn, C. Kerbage, T. P. Hunt, R. M. Westervelt, D. R. Link, D. A. Weitz : *Appl. Phys. Lett.*, **88**, 024104 (2006).
31) W. Shi, J. Qin, N. Ye, B. Lin : *Lab Chip*, **8**, 1432 (2008).
32) E. Brouzes, M. Medkova, N. Savenelli, D. Marran, M. Twardowski, J. B. Hutchison, J. M. Rothberg, D. R. Link, N. Perrimon, M. L. Samuels : *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **106**, 14195 (2009).
33) 火原彰秀，渡慶次 学，北森武彦：ぶんせき，**2000**, 591.
34) 馬渡和真，渡慶次 学，北森武彦：ぶんせき，**2004**, 506.
35) D. Pekin, Y. Skhiri, J.-C. Baret, D. Le Corre, L. Mazutis, C. Ben Salem, F. Millot, A. El Harrak, J. B. Hutchison, J. W. Larson, D. R. Link, P. Laurent-Puig, A. D. Griffiths, V. Taly : *Lab Chip*, **11**, 2156 (2011).
36) A. C. Hatch, J. S. Fisher, A. R. Tovar, A. T. Hsieh, R. Lin, S. L. Pentoney, D. L. Yang, A. P. Lee : *Lab Chip*, **11**, 3838 (2011).
37) A. Fallah-Araghi, J.-C. Baret, M. Ryckelynck, A. D. Griffiths : *Lab Chip*, **12**, 882 (2012).
38) B. Kintses, C. Hein, Mark F. Mohamed, M. Fischlechner, F. Courtois, C. Laine, F. Hollfelder : *Chemistry & Biology*, **19**, 1001 (2012).



福山真央（Mao Fukuyama）
東京工業大学大学院理工学研究科（〒152-8551 東京都目黒区大岡山2-12-1-W4-20）。東京大学大学院工学系研究科応用化学専攻博士課程修了。博士（工学）。≪現在の研究テーマ≫マイクロ・ナノ流体の界面化学。≪趣味≫観劇，水草水槽。
E-mail : fukuyama.m.aa@m.titech.ac.jp



火原彰秀（Akihide Hibara）
東京工業大学大学院理工学研究科（〒152-8551 東京都目黒区大岡山2-12-1-W4-20）。東京大学大学院工学系研究科応用化学専攻博士課程中退。博士（工学）。≪現在の研究テーマ≫マイクロ・ナノ流体化学，マイクロ・ナノ空間の分光。≪主な著書≫“分光測定入門シリーズ10 顕微分光法”（分担執筆）（講談社）。≪趣味≫サッカー観戦（サンフレッチェ），野球観戦（カープ）。
E-mail : ahibara@chem.titech.ac.jp