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

題目(和文)	マイクロピラーアレイを用いた湿式粒子分離技術に関する研究
Title(English)	
著者(和文)	鳥取直友
Author(English)	Naotomo Tottori
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第10997号, 授与年月日:2018年9月20日, 学位の種別:課程博士, 審査員:西迫 貴志,初澤 毅,進士 忠彦,青野 祐子,石田 忠
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第10997号, Conferred date:2018/9/20, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	要約
Type(English)	Outline

Powered by T2R2 (Science Tokyo Research Repository)

東京工業大学

平成 30 年度　学位論文

マイクロピラーアレイを用いた湿式粒子分離技術に関する研究

工学院 機械系

鳥取 直友

目次

第 1 章　序論

1.1 緒言 1-1
1.2 分離技術 1-2
1.2.1 はじめに 1-2
1.2.2 従来の粒子分離手法 1-2
1.2.3 マイクロ流路デバイスによる粒子分離手法 1-5
1.2.3.1 能動的粒子分離手法 1-5
1.2.3.2 受動的粒子分離手法 1-9
1.3 Deterministic Lateral displacement (DLD) 1-14
1.3.1 概要 1-14
1.3.2 DLD による粒子分離の原理 1-14
1.3.3 DLD による粒子分離事例 1-17
1.3.3.1 既報の分離対象 1-17
1.3.3.2 粒子の硬さ・形状による分離 1-18
1.3.4 DLD の課題 1-20
1.4 本研究の目的 1-20
1.5 論文構成 1-20
1.6 参考文献 1-22

第 2 章　主滴とサテライト滴の分離

2.1 序論 2-1
2.1.1 マイクロ流路分岐構造を用いた液滴生成技術 2-1
2.1.2 マイクロ流路内での主滴とサテライト滴の生成 2-2
2.1.3 マイクロ流路を用いた液滴分離手法 2-2
2.1.4 DLD 流路を用いた液滴分離の事例 2-6
2.1.5 本研究の目的 2-6
2.1.6 本章の構成 2-7
2.2 デバイス設計 2-8
2.2.1 デバイス概要 2-8
2.2.2 液滴サイズ測定用マイクロ流路 2-8
2.2.3 主滴とサテライト滴分離用 DLD デバイス 2-8
2.2.4 主滴およびサテライト滴のサイズ別分離用 DLD デバイス 2-10

2.3 実験 2-11
2.3.1 デバイス作製 2-11
2.3.2 マイクロ流路の親水化処理 2-11
2.3.3 材料 2-12
2.3.4 重合処理 2-12
2.3.5 装置と実験手順 2-12
2.4 結果と考察 2-13
2.4.1 生成液滴サイズ測定による DLD パラメータの選定 2-13
2.4.1.1 十字型マイクロ流路による液滴生成の様子 2-13
2.4.1.2 流量と生成液滴サイズの関係 2-14
2.4.2 1 段階 DLD による主滴とサテライト滴の分離 2-15
2.4.2.1 Device-1A による主滴とサテライト滴の生成と分離 2-15
2.4.2.2 分離可能な流量範囲の検討 2-17
2.4.2.3 Device-1B と Device-2 による主滴とサテライト滴分離 2-19
2.4.2.4 液滴生成位置の分離への影響 2-23
2.4.3 3 段階 DLD による主滴およびサテライト滴のサイズ別分離 2-25
2.5 まとめ 2-28
2.6 参考文献 2-29

第 3 章　並列化流路による主滴とサテライト滴の分離

3.1 序論 3-1
3.1.1 はじめに 3-1
3.1.2 液滴生成流路の並列化手法 3-1
3.1.3 並列化 DLD 流路デバイス 3-4
3.1.4 本研究の目的 3-5
3.1.5 本章の構成 3-5
3.2 デバイス設計 3-6
3.2.1 デバイス概要 3-6
3.2.2 マイクロ流路部（下層） 3-6
3.2.3 液体供給用リザーバ（上層） 3-7
3.3 実験 3-7
3.3.1 デバイス作製 3-7
3.3.2 材料 3-10
3.3.3 CFD シミュレーション 3-10
3.3.4 装置と実験手順 3-10
3.4 結果と考察 3-10

3.4.1 リザーバ内の３次元流体シミュレーション 3-10
3.4.1.1 はじめに 3-10
3.4.1.2 リザーバと接続ポートの流れの評価 3-10
3.4.1.3 流量分配モデル 3-12
3.4.1.4 マイクロ流路を接続した場合の流れの評価 3-15
3.4.2 並列化液滴生成流路による主滴とサテライト滴の生成 3-16
3.4.2.1 並列化液滴生成流路における液滴生成 3-16
3.4.2.2 各並列化液滴生成流路に分配される分散相流量の推定 3-19
3.4.3 並列化 DLD 流路による主滴とサテライト滴の分離 3-20
3.5 まとめ 3-28
3.6 参考文献 3-29

第 4 章　PDMS 脱気駆動流を用いた粒子の濃縮と分離

4.1 序論 4-1
4.1.1 マイクロ流路への送液手法 4-1
4.1.2 外部ポンプを用いないマイクロ流路への送液手法 4-2
4.1.2.1 様々な駆動源を用いた送液事例 4-2
4.1.2.2 外部ポンプフリーDLD デバイスの事例 4-4
4.1.3 本研究の目的 4-5
4.1.4 本章の構成 4-5
4.2 デバイス設計 4-6
4.2.1 デバイス概要 4-6
4.2.2 DLD 流路内での粒子軌道および DLD パラメータの設定 4-6
4.2.3 粒子濃縮用 DLD デバイス 4-7
4.2.4 粒子分離用 DLD デバイス 4-8
4.3 実験 4-9
4.3.1 デバイス作製 4-9
4.3.2 材料 4-10
4.3.3 溶液導入手順 4-10
4.3.4 観察系とデータ解析方法 4-10
4.4 結果と考察 4-11
4.4.1 単一入力型 DLD 流路による粒子濃縮 4-11
4.4.1.1 脱気駆動流による DLD 流路への液体導入 4-11
4.4.1.2 粒子懸濁試料導入による流速変化の評価 4-13
4.4.1.3 理論値と実験値の比較 4-14
4.4.1.4 DLD 流路によるビーズ濃縮 4-15

4.4.1.4.1 気液界面の進行時の粒子軌道への影響 4-15
4.4.1.4.2 DLD 流路内での粒子軌道および空間分布評価 4-16
4.4.1.4.3 回収用リザーバにおける粒子空間分布の評価 4-18
4.4.1.4.4 粒子懸濁試料の処理量評価 4-22
4.4.2 シース入力型 DLD 流路デバイスによる粒子分離 4-22
4.4.2.1 ビーズ分離実験 4-22
4.4.2.1.1 シース入力型 DLD 流路への試料導入 4-22
4.4.2.1.2 DLD 流路でのビーズ軌道および空間分布評価 4-23
4.4.2.1.3 回収ビーズの純度および回収効率の評価 4-26
4.4.2.1.4 回収ビーズの粒子形状と空間分布評価 4-27
4.5.2.1.5 試料処理量の評価 4-31
4.4.2.2 血球分離実験 4-31
4.4.2.2.1 血液試料導入手順 4-31
4.4.2.2.2 DLD 流路内を流れる赤血球と白血球の様子 4-32
4.4.2.2.3 白血球の分離効率評価 4-34
4.4.2.2.4 血液試料の DLD 流路における処理量 4-35
4.4.2.2.5 脱気駆動型 DLD デバイスの応用先 4-35
4.5 まとめ 4-36
4.6 参考文献 4-37

第 5 章　慣性フォーカスとマイクロピラーアレイによる粒子分離

5.1 序論 5-1
5.1.1 シースフローによる粒子フォーカス 5-1
5.1.2 シースフローを用いない粒子フォーカス方法 5-2
5.1.3 シースフローを用いない DLD デバイス 5-4
5.1.4 本研究の目的 5-6
5.1.5 本章の構成 5-6
5.2 直線型マイクロ流路内における粒子フォーカス 5-7
5.2.1 断面形状と粒子フォーカス位置 5-7
5.2.2 直線流路での粒子フォーカスの原理 5-8
5.3 デバイス設計 5-12
5.3.1 デバイス概要 5-12
5.3.2 粒子フォーカス用流路の形状と寸法 5-13
5.3.3 DLD 流路内での粒子軌道および DLD パラメータの設定 5-13

5.3.4 中央フォーカスデバイス 5-13
5.3.5 側壁フォーカスデバイス 5-14
5.4 実験 5-15
5.4.1 デバイス作製 5-15
5.4.2 材料 5-15
5.4.3 送液装置と観察系 5-16
5.4.4 データ解析方法 5-16
5.5 結果と考察 5-17
5.5.1 中央フォーカスデバイスによる粒子分離 5-17
5.5.1.1 粒子フォーカス用流路内で粒子の流れの評価 5-17
5.5.1.2 DLD 流路での粒子分離の評価 5-20
5.5.1.3 導入流量の粒子分離への影響 5-23
5.5.1.4 血液試料の分離 5-31
5.5.2 側壁フォーカスデバイスによる粒子分離 5-36
5.5.2.1 DLD 流路への粒子流入位置および粒子分離の評価 5-36
5.5.2.2 導入流量の粒子分離への影響 5-38
5.6 まとめ 5-41
5.7 参考文献 5-42

第 6 章　温度応答性高分子を用いた分離直径制御

6.1 序論 6-1
6.1.1 DLD 流路の分離直径 6-1
6.1.2 分離直径制御可能な DLD デバイス 6-1
6.1.3 刺激応答性高分子 6-5
6.1.4 本研究の目的 6-6
6.1.5 本章の構成 6-7
6.2 デバイス設計 6-9
6.2.1 デバイス概要 6-9
6.2.2 温度応答性 DLD 流路での粒子軌道と DLD パラメータの設定 6-9
6.3 実験 6-10
6.3.1 デバイス作製 6-10
6.3.2 材料 6-12
6.3.3 周辺装置 6-12
6.3.4 データの処理と解析方法 6-13
6.4 結果と考察 6-13
6.4.1 温度による DLD 支柱形状変化 6-13

6.4.2 温度調節による粒子軌道の制御 6-18
6.4.3 温度調節による粒子分離の ON・OFF 制御 6-19
6.5 まとめ 6-22
6.6 参考文献 6-23

第 7 章　結論と展望

7.1 結論 7-1
7.2 今後の展望 7-4
7.2.1 デバイスの処理量の向上 7-4
7.2.2 汎用性の向上 7-5
7.2.3 分離性能の向上 7-5
7.2.4 ナノ粒子の分離 7-6
7.2.5 DLD デバイスの応用範囲の拡大 7-6
7.3 参考文献 7-6

Appendix

A.1 マイクロ流路デバイスの作製 A-1
A.1.1 ソフトリソグラフィによるデバイス作製 A-1
A.1.2 作製デバイスの寸法評価 A-4
A.2 周辺装置 A-5
A.2.1 実験装置の構成 A-5
A.2.2 周辺機器 A-6
A.3 参考文献 A-8

謝辞

本論文に関連する業績

第1章　序論

1.1 緒言

標的物質の分離は，様々な分野において基本的なプロセスであり，重要な位置を占めている．科学技術振興機構においても，2015 年度戦略プロポーザルとして「分離工学イノベーション　～持続可能な社会を実現する分離の科学技術～」を掲げており [1]，分離技術の発展が将来の社会・産業の発展の上で非常に重要であると認識されている．本提言の中で取り扱っている分離対象課題は，図 1.1 に示した気体・液体の分離，鉱物資源・固体の分離，バイオ・医薬食農系の分離の 3 つに大別され，各分野において活発な研究が行われている．

上記で述べた分離工学の社会的意義や背景も踏まえ，本論文では，特に，マイクロ流路を用いた粒子分離技術について取り扱い，その中でも，マイクロピラーアレイによって生じる流れ場を利用した湿式粒子分離に関する研究成果を述べる．　図 1.1 に示した JST の戦略プロポーザルの中において，マイクロ流路を用いた粒子分離技術は，バイオ・医薬食農系の分離のための技術として分類されているが，本論文では，特に分離対象を限定せず，様々な分野への応用の可能性を想定している．

本章では，微粒子分離の従来技術について解説した後，近年研究が盛んに行わ

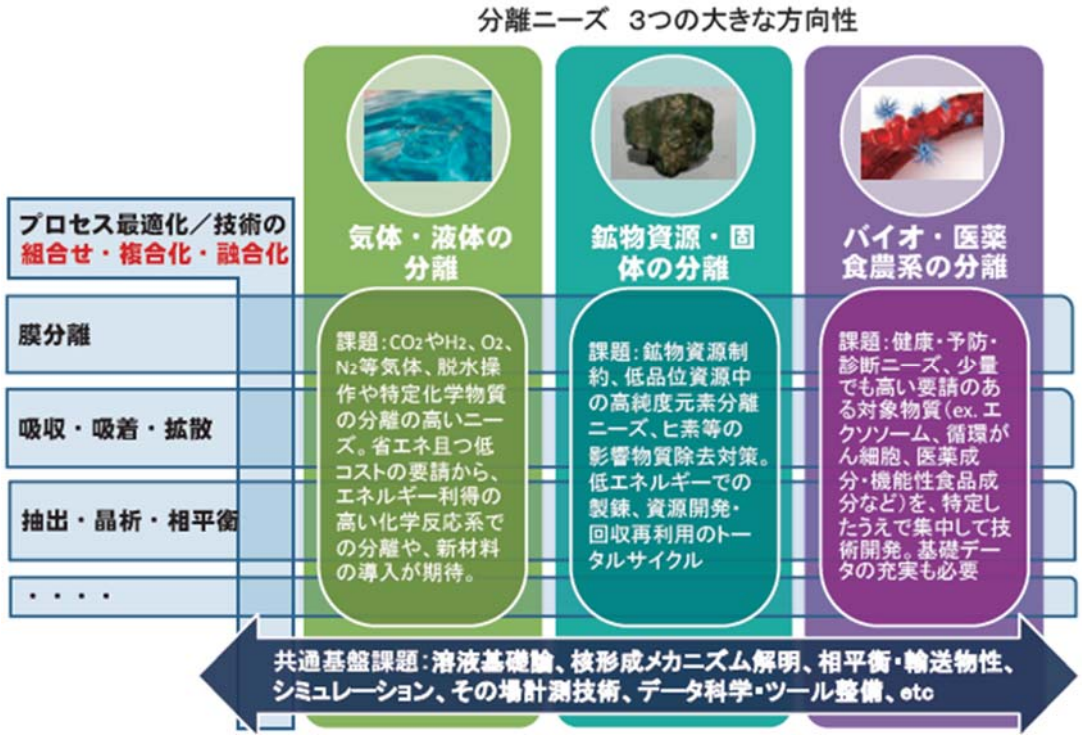

図 1.1 分離ニーズごとの課題と分離技術．　文献 [1]より引用

れているマイクロ流路を用いた微粒子分離技術について紹介する．また，本研究の目的，本論文の構成について述べる．

1.2 分離技術

1.2.1 はじめに

分離は多岐にわたる分野で必要とされる基本的なプロセス技術であり，図 1.1 に示すように，分離対象によって用いられる分離技術も様々である．本節では，特に，従来の湿式粒子分離技術およびこれまで報告されているマイクロ流路を用いた湿式粒子分離技術について紹介する．

1.2.2 従来の粒子分離手法

既存の粒子分離手法として，遠心分離，濾過法が最も一般的に用いられている．また，細胞分離においては，蛍光細胞分離法（Fluorescence activated cell sorting：FACS），磁気細胞分離法（Magnetic activated cell sorting：MACS）が広く利用されている．以下で各手法の概要を述べる．

（a）遠心分離法

遠心分離は，粒子分離手法として最も一般的に用いられている．以下に遠心分離の原理 [2]について概説する．

遠心液体中の粒子に作用する半径方向外側の遠心力 F_r は次式で表される．

$$F_\mathrm{r} = (2\pi\nu)^2 z_\mathrm{p} V_\mathrm{p}\left(\rho_\mathrm{p} - \rho_\mathrm{l}\right) \tag{1-1}$$

ここで，液体密度はρ_l，粒子体積は V_p，粒子密度はρ_p，粒子の径方向位置は z_p，回転周波数は ν で表している．もし，液体密度ρ_l が粒子密度ρ_p よりも大きい場合，粒子は外側へと移動し，小さい場合は，内側に留まる．

層流状態下において，半径 r_p の粒子が速度 u_d で粘性η_lの液体媒体中をドリフト運動する場合に作用するストークス抵抗 F_s は次式で表される．

$$F_\mathrm{s} = -6\pi\eta_1 r_\mathrm{p} u_\mathrm{d} \tag{1-2}$$

遠心力 F_r とストークス抵抗 F_s が等しくなると，粒子は終端速度 u_de となる．

$$u_\mathrm{de} = s_\mathrm{p} z_\mathrm{p} (2\pi\nu)^2 \tag{1-3}$$

ここで，質量 m_p の粒子の沈降係数 s_p は次式で表される．

$$s_\mathrm{p} = \frac{m_\mathrm{p}}{6\pi\eta_1 r_\mathrm{p}}\left(1 - \frac{\rho_\mathrm{l}}{\rho_\mathrm{p}}\right) \tag{1-4}$$

上述した式のように，粒子の物理的特性の違いによって，粒子の沈降速度に違いが生じるため，粒子の分離が可能となる．しかしながら，大型な装置である点，粒子分離の分解能はあまり高くない点，分離した粒子を回収する際に粒子損失が生じる点などの課題もある．

（b）濾過

濾過とは，多孔性の物体に固体粒子懸濁溶液を通過させることによって，流体から固体粒子を分離する操作のことである [3,4]．特に，濾材として，数 μm 以下の多孔質膜を用いる膜濾過技術は，微粒子を分離するために広く用いられている．また，用いられる膜は，分離対象のサイズにより，精密濾過膜，限外濾過膜，ナノ濾過膜に分類される [4]．各膜の特徴を以下に示す．

精密濾過膜：膜の孔径が約 0.01 μm～1.0 μm であり，液中の微粒子，微生物，菌類，コロイドなどの分離および除去のために用いられる．

限外濾過膜：液中の中・高分子量の溶質およびコロイドの分離に用いられ，分離対象の溶質の分子量は数千～数十万 Da である．精密濾過膜よりも緻密な表面層を持ち，膜の孔径を表す指標として分画分子量（molecular weight cut-off, MWCO）が用いられている．

ナノ濾過膜：液中の 1 nm 程度のサイズまたは，分子量が数 100～1000 の分子や溶質を分離するために用いられる．

濾過による粒子分離では標的粒子がフィルタ内に留まり試料損失が生じる点，粒子分離の分解能が高くない点，目詰りによって分離効率の低下が生じる点などの課題がある．

（c）蛍光細胞分離法（Fluorescence activated cell sorting：FACS） [5]

FACS では，蛍光標識された各細胞に対し，レーザー光を照射し，その際に得られる散乱光および蛍光パラメータに基づき，細胞の種類を判別する．判別結果に従って，下流部で静電場を印加し，標的細胞の軌道を変化させることにより分離が行われる（図 1. 2）．細胞単位での抗原量や細胞の機能解析ができ，最先端の機器では 10^5 cell/s での分離が理論上可能とされている [2]．しかしながら，FACS はレーザーなどの光学機器を使用するため，システムが大型かつ高価である点や，細胞を蛍光で標識する必要があるという点など課題が挙げられる．

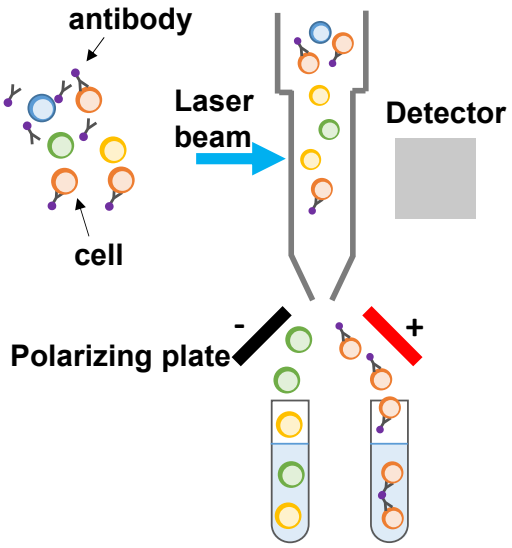

図 1. 2 蛍光細胞分離法の概念図.

（d）磁気細胞分離法（Magnetic activated cell sorting：MACS） [6,7]

磁気細胞分離とは，特定の細胞集団に特異的に発現している表面抗原を認識する抗体が修飾された磁気ビーズを用いて，細胞を標識した後，細胞懸濁液に磁場を印加することによって特定の細胞を高い選択性で分離可能な手法である [2]（図 1. 3）．分離操作には，標的細胞に磁気標識し分離するポジティブフラクションと，標的細胞以外に磁気標識し分離するネガティブフラクションがある．一方で，本手法は FACS と同様に標識が必要であるという点で課題がある．

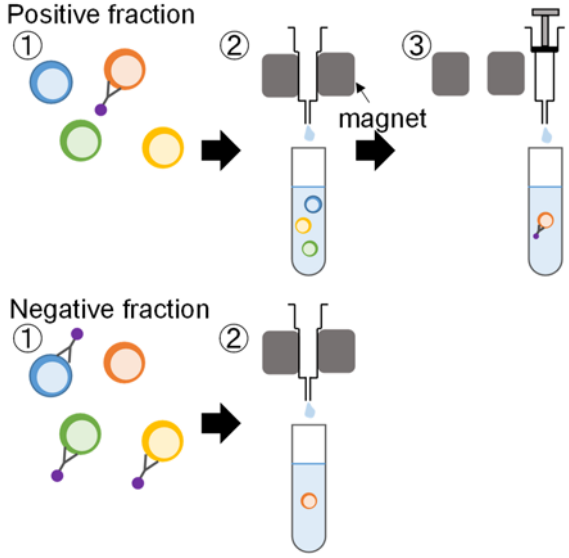

図 1. 3 磁気細胞分離法の概念図.

1.2.3 マイクロ流路デバイスによる粒子分離手法

近年，マイクロ流路を用いた様々な粒子分離手法が報告されている [8–11]．マイクロ流路による粒子分離手法では，従来の分離手法と比較して，少量試料を処理可能である点，操作が単純である点，複数の要素を組み合わせることで包括的な分析が可能である点などの特長がある．また，マイクロ流路による粒子分離は，能動的手法と受動的手法の大きく 2 つに分類される．以下で，それぞれの手法について概説する．

1.2.3.1 能動的粒子分離手法

これまでに，電場，音場，磁場，光などを用いた能動的粒子分離デバイスが提案されている [8–10]．以下で，各デバイスの概要について述べる．

（a）誘電泳動（Dielectrophoresis, DEP）による分離

誘電泳動（DEP）[12,13]とは，局所的に形成された不均一電場と，その中におかれた粒子および溶媒に誘起される双極子モーメントとの相互作用によって，粒子に力が作用する現象のことである． DEP を用いた粒子分離マイクロ流路デバイスでは，粒子を大きさ，電気特性に基づき，無標識で分離可能であり，これまでに多くの研究事例が報告されている [10]. 以下で，誘電泳動の原理 [2,12–14] を概説する（図 1. 4）.

粒子懸濁液に電場を印加すると，溶液と粒子の界面の両側に電荷が移動する．粒子の分極率が溶媒よりも大きい場合は，外部電場と同方向に誘起双極子が形成されるが，微粒子の分極率が溶媒よりも小さい場合は，外部電場とは逆向きに誘起双極子が形成される．この時，外部電場が不均一であれば粒子の両端の電荷分布に差が生じ，粒子が移動する駆動力（誘電泳動力）になる．誘電泳動には，粒子の分極率が溶媒よりも大きく，電場強度の強い方向に粒子が移動する正の誘電泳動（p-DEP）と，粒子の分極率が溶媒よりも小さく，電場強度の強い方から遠ざかる向きに移動する負の誘電泳動（n-DEP）がある．球状微粒子が溶媒中に分散している際に外部電場を印加した場合，微粒子に作用する時間平均誘電泳動力は次式で表される．

$$F_{\mathrm{DEP}} = 2\pi\varepsilon_{\mathrm{m}} a^3 \mathrm{Re}[K]\nabla|E|^2 \tag{1-5}$$

ここで，a は粒子半径，ε_{m} は溶媒の誘電率，E は電場強度を表している．K は Clausisus-Mossotti 因子（CM 因子）と呼ばれ，溶媒と粒子の複素誘電率である$\varepsilon_{\mathrm{m}}^*$と$\varepsilon_{\mathrm{p}}^*$を用い，次式で表される．

$$K(\omega) = \frac{\varepsilon_{\mathrm{p}}^* - \varepsilon_{\mathrm{m}}^*}{\varepsilon_{\mathrm{p}}^* + 2\varepsilon_{\mathrm{m}}^*} \tag{1-6}$$

溶媒と粒子の複素誘電率は次式で表される．

$$\varepsilon^* = \varepsilon - \frac{\sigma}{\omega} j \tag{1-7}$$

ここで，σは導電率，ωは各周波数，j 虚数単位を表している．

CM 因子は周波数によって変化するため, 印加する交流電圧の周波数を調節することで, 粒子に作用する誘電泳動力を制御可能である．一方で，誘電泳動法は粒子懸濁溶媒の特性が誘電泳動力に影響するため，使用可能な溶媒が限られる点や，流量が高い場合に分離効率が低下する点などの課題がある．

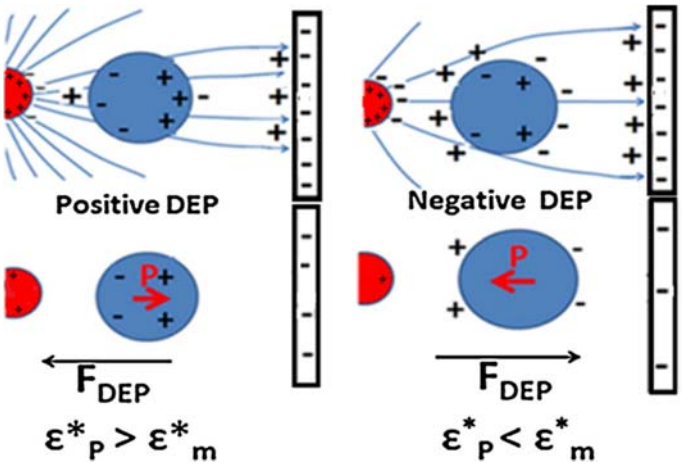

図 1. 4 誘電泳動法の原理．p-DEP と n-DEP．文献 [10]より引用．

（b）音場による分離

音場による粒子分離には，表面弾性波（Surface acoustic wave, SAW）が用いられている [15]．また，使用する表面弾性波は，定在波（standing surface acoustic wave, SSAW）[16,17]と進行波（traveling surface acoustic wave, TSAW）[18]の 2 つに分類される．例えば，SSAW を用いたデバイスでは，マイクロ流路に対して対称に配置された 2 つの櫛歯電極によって，マイクロ流路内に定在波を発生させる．粒子は，発生した定在波の節へと移動するが，その時の移動速度は，粒子のサイズ，密度，圧縮性などのパラメータによって異なるため，粒子の分離が可能となる．以下で，SSAW による粒子分離の簡単な原理 [17]を説明する．

定在表面弾性波の中に置かれた粒子に作用する音場による力 F_{r} と粘性力 F_{v} は次式を用いて表される．

$$F_{\mathrm{r}} = -\left(\frac{\pi p_0^2 V_{\mathrm{p}} \beta_{\mathrm{m}}}{2\lambda}\right) \Phi(\beta, \rho) \sin(2kx) \tag{1-8}$$

$$\Phi = \frac{5\rho_{\mathrm{p}} - 2\rho_{\mathrm{m}}}{2\rho_{\mathrm{p}} + \rho_{\mathrm{m}}} - \frac{\beta_{\mathrm{p}}}{\beta_{\mathrm{m}}} \tag{1-9}$$

$$F_{\mathrm{v}} = -6\pi\eta r v \tag{1-10}$$

ここで，p_0 は圧力振幅，V_{p} は粒子の体積，λは波長，k は波数ベクトル，x は節点からの距離，ρ_{m} は溶媒の密度，ρ_{p} は粒子の密度，β_{m} は溶媒の圧縮性，β_{p} は粒子の圧縮性，ηは溶媒の粘度，r は粒子半径，vは相対速度を表している．例えば，デバイスに導入したすべての粒子の密度や圧縮性が同じであり，粒子の大きさのみが異なる場合では，F_{r} は r^3 に比例する．すなわち，大きい粒子には，小さい粒子よりも節点の方向に大きな力が作用するため，大きな粒子は小さい粒子よりも速く節点へと移動する．このため，サイズに基づいた粒子分離が可能になる（図 1. 5） [17]．一方で，デバイス構造やシステムの複雑化が生じるという問題点がある．

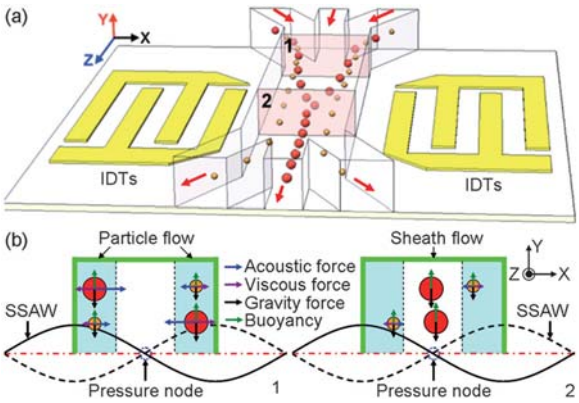

図 1. 5 SSAW デバイスによる粒子分離の原理．文献 [17]より引用．

（c）磁場による分離

磁気による粒子分離手法は，主に細胞分離に応用されている．当該手法では，磁気ビーズで標識した細胞をマイクロ流路へと導入し，磁場によって標識された細胞と無標識の細胞の分離が行われる [8]．従来の MACS のようなマクロスケールでの分離と比較して，連続的な分離が可能であるほか，同時に複数の粒子分離も可能である（図 1. 6） [19,20]．また，細胞が特異的に発現しているマーカを用いた分離法であるため，分離選択性が高い点や，特別な流路構造が不要である点，粒子同士の相互作用が分離に影響しにくい点などの特長がある [9]．一方で，標的細胞を分離するためには，予め目的の細胞が発現しているマーカーの情報が必要であるため，マーカーが発現していない亜集団や，未知の種類の生体粒子を分離する場合には適していない．また，適切な流量条件でないと分離性能が

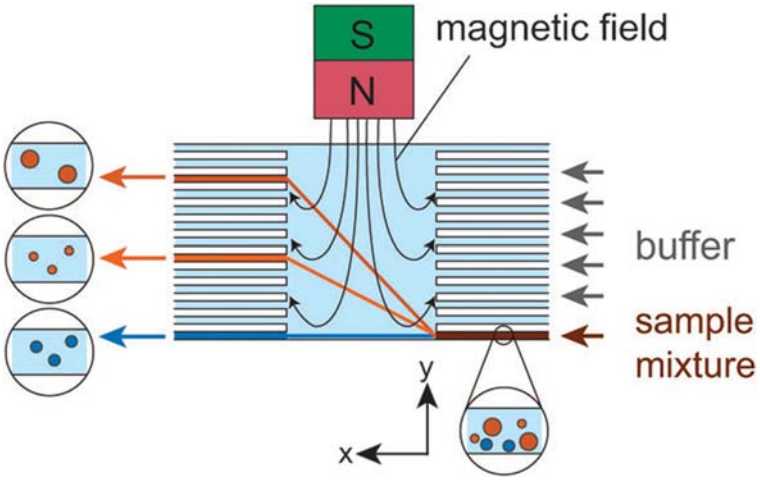

図 1. 6 磁場による粒子分離.　文献 [19]より引用.

低下するという課題もある.

（d）光による分離

光を物体に照射した際の相互作用の一つとして，光が物体に与える光圧の作用がある [15]. マクロスケールでは，光圧の作用は無視できるほど小さいが，ミクロスケールの場合には，光圧の作用が大きくなり，物体に力が作用する．この現象の応用例として，光ピンセットが広く知られており，粒子や細胞のトラップ，運搬，ソーティングなどの操作に用いられている．また，この光圧作用を粒子分離に応用した事例も報告されている [21]. 図 1. 7 は，光パターンをマイクロ流路に格子状に照射することによって，粒子をサイズおよび光学特性に基づいて分離した事例である. 一方で, 本手法では, 光パターンが粒子に及ぼす力が小さく, 分離可能な流速は数十 μm/s 程度であり，高流量での分離は難しい.

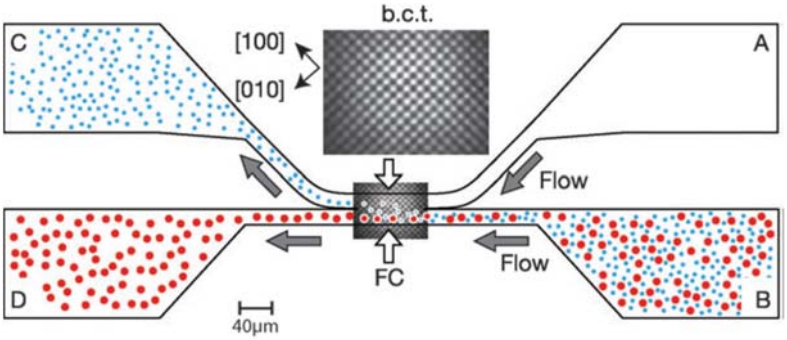

図 1. 7　光圧を利用した粒子分離．文献 [21]より引用.

1.2.3.2 受動的粒子分離手法

流路構造により生じる流れ場のみを用いた受動的粒子分離デバイスが数多く報告されている．以下では，いくつかの代表的な粒子分離手法について紹介する．

（a）構造物を利用した濾過

図 1. 8 に示すように，流路内の構造物を用いて粒子を大きさに基づき分離する方法が報告されている [8]．本手法では，従来の繊維膜フィルタと比べて，孔径などが均一であるため，粒子をより高効率で分離可能である．一方で，目詰まりが生じるなどの課題がある．

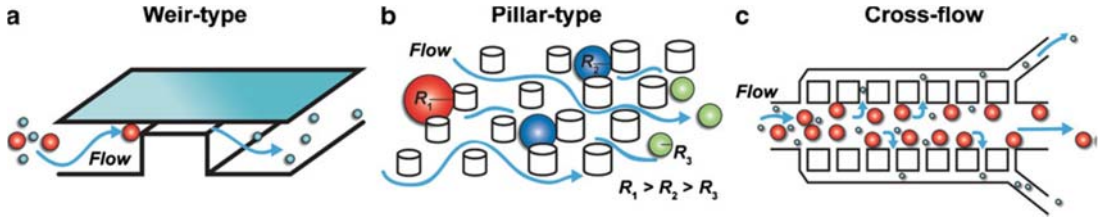

図 1. 8　構造物を用いた粒子分離．文献 [8]より引用．

（b）Pinched flow fractionation（PFF） [2,22]

PFF デバイスは，2 つの溶液導入口，それらの合流部において流路幅が狭くなるピンチ部，およびピンチ部の下流に連結された幅広の流路（ブロード流路）から構成される（図 1. 9）．片方の導入口から粒子懸濁液，もう片方の導入口から粒子が未懸濁の溶液(シース液)を導入し，シース液の流量を粒子懸濁液の流量よりも十分に大きくすることで，粒子をピンチ部の片側側壁に整列させた状態で流すことが可能になる．この時，片側壁面に一様に整列した粒子の中心から壁面までの距離は，粒子の大きさごとに異なる．そのため，壁面から粒子中心までの僅かな距離を，ブロード流路において増幅することで，粒子は大きさの違いに基づき，流れと垂直な方向へと分離される（図 1. 9）．ブロード流路の代わりに分岐流路を多数配置すれば，大きさごとに分離された粒子を別々に分取することも可能である．しかしながら，本手法では，ピンチ部の流路幅が粒子の大きさに近いほど分離性能が向上するため，高い処理量を実現することは困難である点，粒子を壁面に整列させるために多量のシース液を導入する必要があるため粒子濃度が低下する点，適切な流量制御が必要である点が課題として挙げられる．

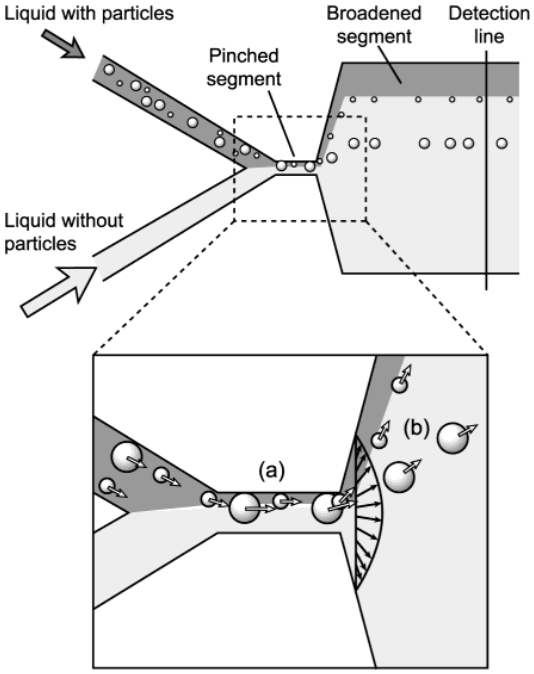

図 1. 9 Pinched flow fractionation（PFF）の原理．文献 [22]より引用．

（c）水力学的濾過（Hydrodynamic Filtration :HDF） [2,23]

HDF デバイスは，主流路と主流路から左右に分岐する枝流路から構成される（図 1. 10）．ある分岐点において分岐流路へと流れこむ流量が十分に小さい場合，粒子が分岐流路へと流れこむことはない（図 1. 10 a）．これは，流路を流れる粒子の中心位置が，分岐流路に流れ込む流体の流線よりも外側に位置していることを意味している．一方，分岐流路へと流入する流量の増加に伴い，分岐流路へと流入する粒子直径の範囲も大きくなる．これは，分岐流路に流れ込む流体の流線の幅が広がるためである（図 1. 10bc）．このような流れの状態を適切に組み合わせることで，粒子の濃縮と分級が可能となる．図 1. 10d に粒子濃縮と分級の様子を示す．まず，主流路の上流で，溶媒のみを分岐流路から引き抜き粒子の濃縮及び壁面付近への位置合わせを行う．その後，小さい粒子と溶媒が分岐流路へと流れるように主流路と分岐流路の流量比を設定する．最後に大きな粒子が分岐流路へと流れこむように段階的に分岐流路へ流れこむ流量を増加させる．これによって，粒子の分離・選別が可能となる．

本手法は，シース液によって試料希釈が生じない点や，流路幅が粒子サイズよりも大きく目詰りが生じにくいという特長がある．しかしながら，本手法では，シース液を用いないため，完全に壁面へと粒子を整列させることができず，粒子混合物のうち小さい粒子の一部が大きい粒子の分画に混入してしまうという課題がある．

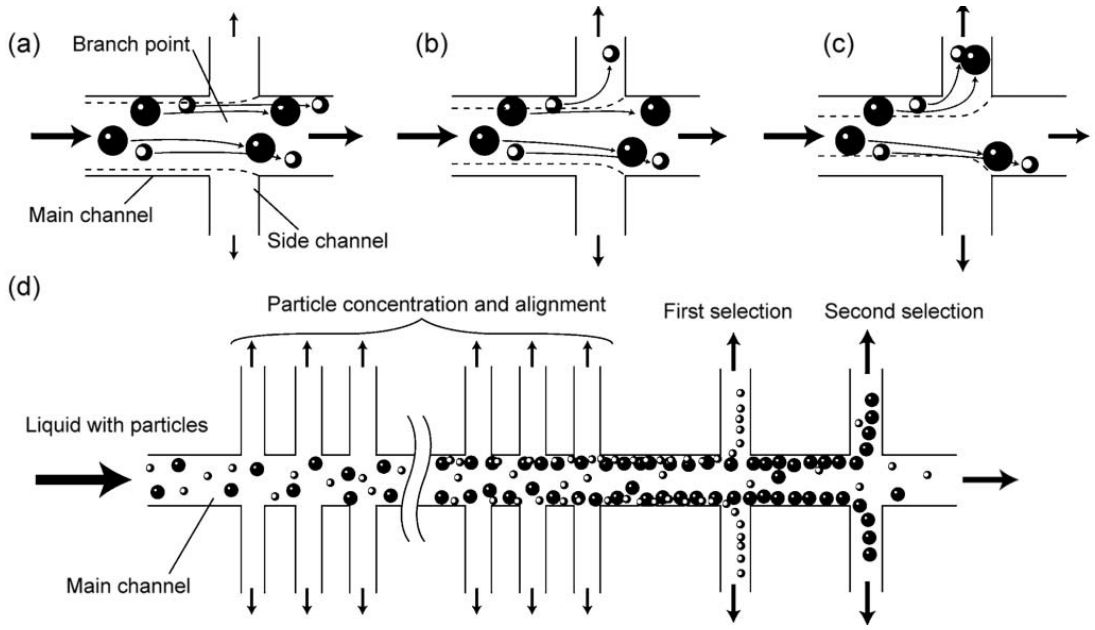

図 1. 10 Hydrodynamic Filtration（HDF）の原理．（a–c）枝流路へ流れこむ流量と粒子の軌道；枝流路への流れこむ流量（a）低，（b）中，（c）高．（d）流路内での粒子の濃縮と分離の模式図．文献 [23]より引用．

（d）慣性揚力

マイクロ流路内を流れる粒子に作用する揚力を利用した，粒子のフォーカス，濃縮および分離に関する研究が多数報告されている [24–28]（図 1. 11）．マイクロ流路デバイスは，一般的にレイノルズ数（Re）が非常に低い領域（Re<<1）で使用されるため，粒子に作用する慣性揚力は無視できる．一方で，高レイノルズ数（Re>1）の流れにおいて粒子に作用する揚力により，流路断面に対して特定の位置に粒子が移動することが報告されている．詳細は，第 5 章で述べる．

また，慣性揚力と二次流れを組み合わせたデバイスも多数報告されている [24–27]．2 次流れは，曲線状の流路（図 1. 11b） [26,29]や，直線流路に収縮部と拡張部（図 1. 11c） [30,31]などを設けることによって生じる流れであり，例えば，曲線状の流路の場合では，半径方向の圧力勾配によって 2 次流れが発生する．これは流路中央と壁面近傍における流体の運動量が釣り合わなくなるためだと考えられている．慣性力が支配的な状態で，2 次流れを発生させることで，以下に示すいくつかの利点が生まれる．

・粒子の収束位置を変化させることができる．

・慣性揚力（F_L）と，2 次流れによる抗力（F_D）の比（F_L/F_D）に従って，粒子が大きさごとに異なる位置に収束するため，分離が可能となる．

・2 次流れにより，粒子の収束位置への移動が促進されるため，流路長を短くできる．

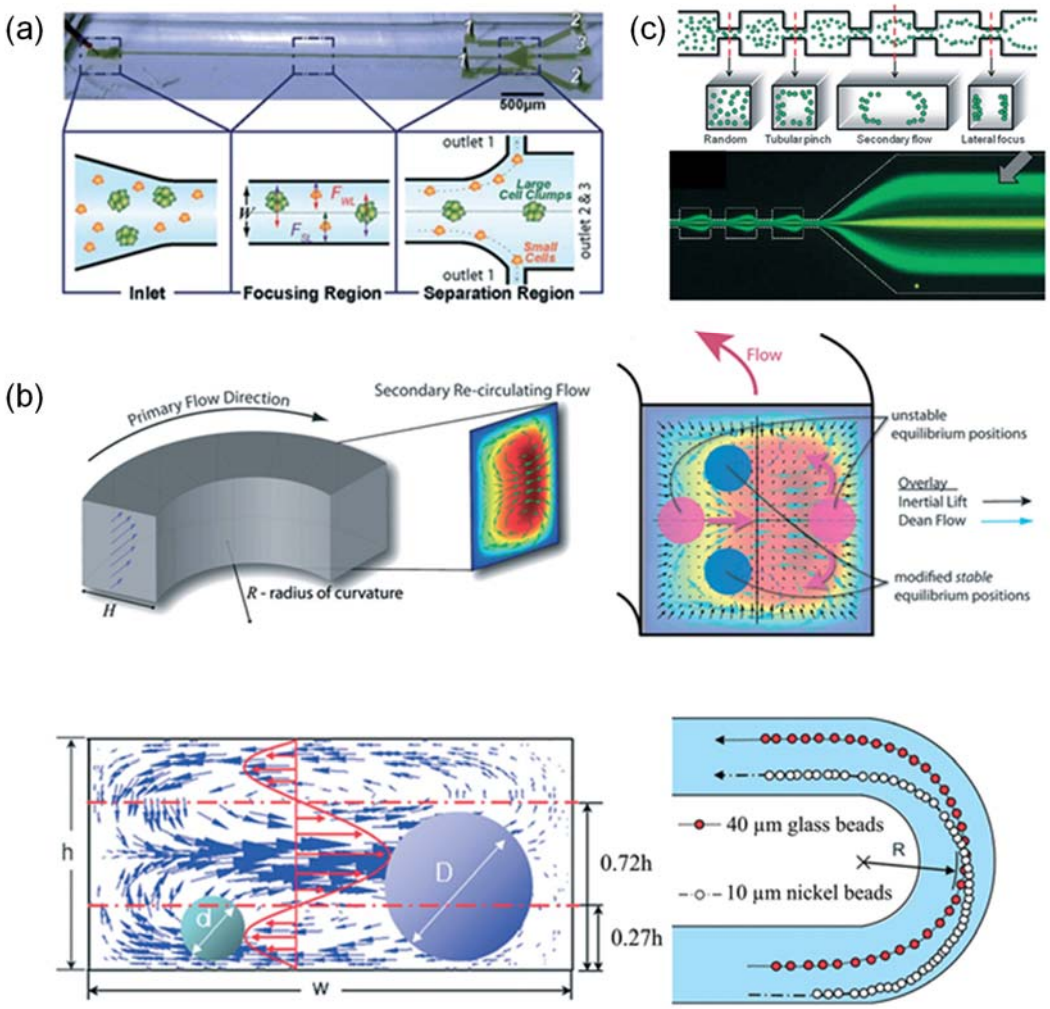

図 1. 11 慣性揚力を用いた粒子分離デバイス．(a) 直線流路による副腎皮質前駆細胞の濃縮．文献 [28]を引用．(b) 曲線流路による粒子のフォーカスと，粒子サイズに基づいた分離．文献 [26,29] を引用．(c) マルチ・オリフィスによる粒子サイズに基づいた分離．文献 [30,31]を引用．

(e) その他の分離手法

上記の粒子分離手法以外にも流路構造によって生じる流れを利用して，粒子を分離する手法が報告されている [32,33]（図 1. 12）

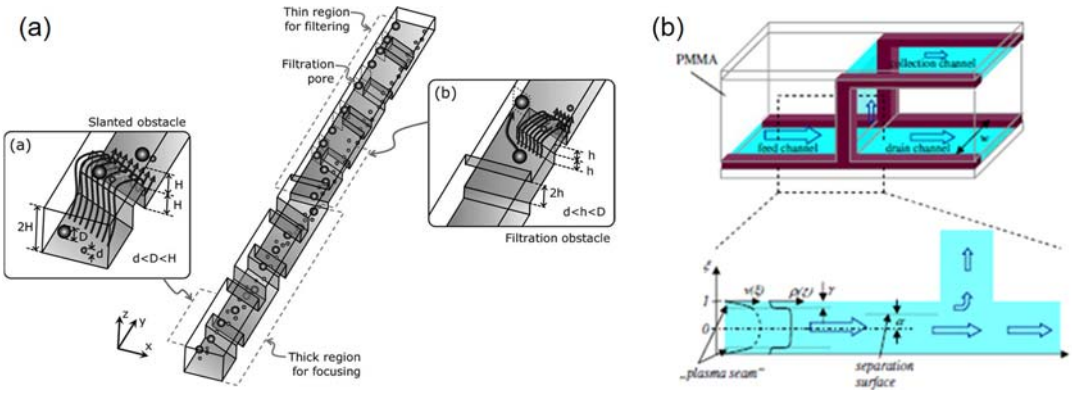

図 1. 12（a）傾斜構造物を利用した分離．文献 [32]を引用．（b）逆 T 字型マイクロ流路を用いた分離．文献 [33]を引用．

表 1. 1 に前述した粒子分離手法の特徴を示す．

表 1. 1　各粒子分離手法の特徴

粒子分離手法	利点	欠点
遠心分離	無標識，簡便，安価	精度が低い
膜濾過		目詰り，精度が低い
FACS	高精度	標識が必要，大型，高価
MACS		標識が必要
誘電泳動	粒子サイズ，電気特性による分離可，無標識	溶媒が限定 高流量で分離効率低下
音場	粒子サイズ，密度による分離可，無標識	複雑なデバイス構造
磁場	高い選択性で分離	標識が必要
光	物理的な構造が不要 無標識	装置が複雑
濾過	無標識，簡便	目詰まり
PFF		処理量が低い
HDF		分離精度が低い
慣性揚力		長い流路が必要，幅が制限

1.3 Deterministic Lateral displacement (DLD)

1.3.1 概要

2004 年に L. R. Huang らによって初めて報告された Deterministic Lateral Displacement（DLD）は水力学的分離手法の一つであり [34]，2006 年に Inglis らによって DLD に関するより詳細な原理が報告された [35]．DLD は，マイクロ流路中に規則的に支柱を配置することによって生じる流れ場を利用し，粒子を大きさに基づいて分離できる．粒子分離の境界となる直径（分離直径，D_c）は，DLD の幾何形状によって定まり，D_c より大きい粒子と小さい粒子が異なる軌道をとることで分離される．DLD による粒子分離は，層流状態において流速に依存しないという特長がある．但し，ブラウン運動が支配的なスケールでは，流速に依存することが報告されている [34]．既報の DLD デバイスにて，10 nm という高い分離分解能[34]や，10 ml/min の高処理量 [36]が実現されており，近年では，粒子を硬さ [37–42]や形状 [38,43–45]の違いにより分離する事例も報告されている．

1.3.2 DLD による粒子分離の原理

まず, DLD の原理 [35]について概略する. DLD 流路に導入された流体は, DLD の支柱間の隙間（d）で流れが n（$= 1/\varepsilon$）分割され，分割された各区間における流量が等しくなる．ここで，流体の流れ方向を x，流れに垂直な方向を y とすると，εは前後の支柱の y 方向の移動率，n はεの逆数を表している．分割された各流線は周期的に位置が移動し，支柱を n 列通過すると初期位置へと戻る．例えば，$n = 3$ の時の流れ場を模式的に表すと図 1. 13 のようになる．図 1. 13 において, 流線上に記している数字は, 支柱間で分割された流線の位置を表しており, 支柱の側近にある流線 1 は次の列では位置 3 へと移動し, その次の列では位置 2 へと移動する．最終的に，3 列通過後に流線は初期位置へと戻る．

粒子半径が支柱の側近にある第 1 流線の幅（β）よりも大きい場合，粒子は第 1 流線を超えて第 2 流線へと移動する．その結果，粒子は支柱を通過するごとに流れと垂直方向に移動する displacement mode の軌道をとる．一方，粒子半径が第 1 流線の幅よりも小さい場合，粒子は周期的に繰り返される流れに沿って移動する zigzag mode の軌道をとる．

次に, 粒子分離の境界となる直径（分離直径, D_c）と DLD 流路パラメータ（図 1. 14）との関係を示す．D_c はβを用いて次式で表される．

$$D_c = 2\beta \tag{1-11}$$

また，βは d とεを用いて次式で表される．

$$D_c = 2\eta d\varepsilon \tag{1-12}$$

ここで，ηは支柱間隙間の不均一な流れを考慮するための係数を表している．支柱隙間の流れのプロファイルを $u(x)$とすると，n 分割された支柱間の隙間において各区間の流量は等しいため，$u(x)$を 0 からβまで積分した値と，0 から d まで積分し n で割った値は等しくなる．すなわち以下の関係が成り立つ．

$$\int_0^{\beta} u(x)dx = \varepsilon \int_0^{d} u(x)dx \tag{1-13}$$

また，$u(x)$を放物線流れとすると，$u(x)$は次式で表される．

$$u(x) = \left[\frac{d^2}{4} - \left(x - \frac{d}{2}\right)^2\right] \tag{1-14}$$

(1-13)式に(1-14)式を代入すると，D_c，d，εの関係は次式となる．

$$\varepsilon = \frac{3}{4}\left(\frac{D_c}{d}\right)^2 - \frac{1}{4}\left(\frac{D_c}{d}\right)^3 \tag{1-15}$$

式（1-15）より，所望の D_c となる DLD パラメータ（ε, d）を決定できる．

一方で，DLD デバイスを設計する際に，簡便に分離直径を見積もることができるように，次式も提案されている [46].

$$D_c = 1.4d\varepsilon^{0.48} \tag{1-16}$$

（1-16）式は実験的に分離直径を求めた式である．本論文では，所望の D_c となる DLD パラメータを計算する際は，式（1-16）を用いた．

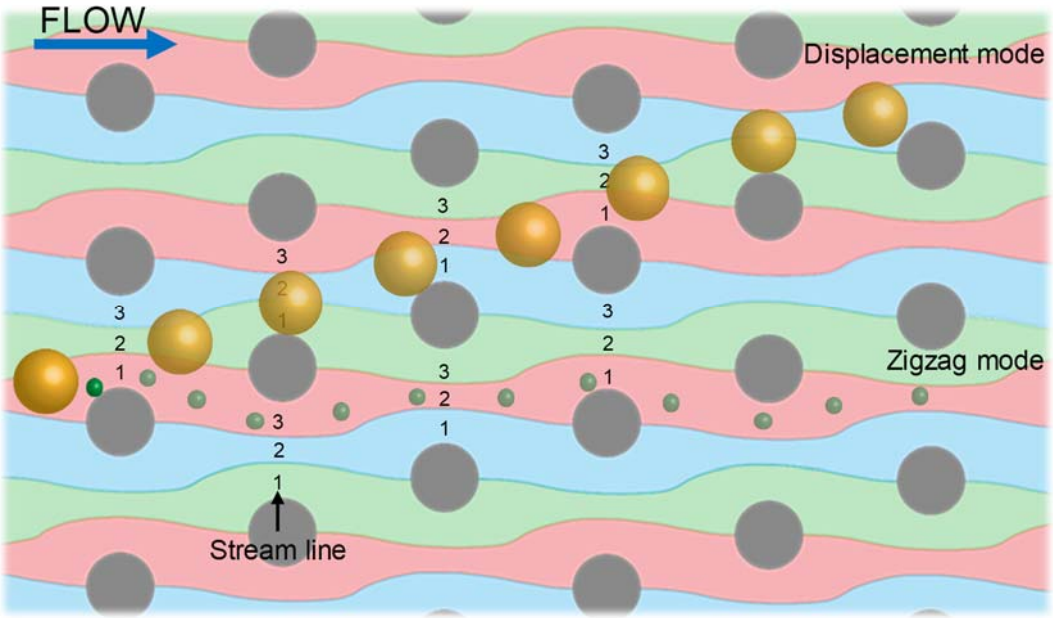

図 1. 13 DLD 流路内での粒子軌道の模式図．D_c よりも大きい粒子は，displacement mode の軌道で流れ，D_c よりも小さい粒子は zigzag mode の軌道で流れる．

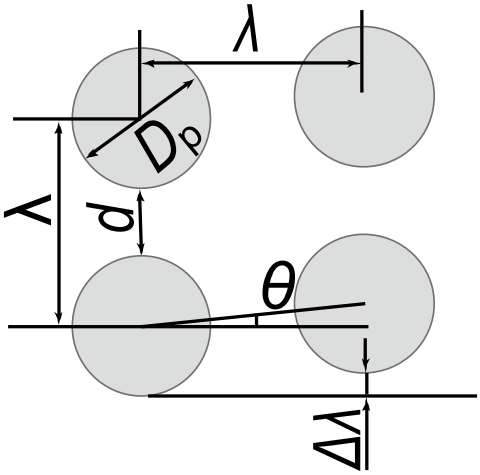

図 1. 14 DLD のパラメータ．支柱間の隙間：d，支柱中心間の距離：λ，支柱直径：D_p，支柱配列の傾き：θ，支柱の移動量：$\Delta\lambda$（$= \varepsilon\lambda = \lambda\tan\theta$）

・壁面近傍の流れ場による分離効率低下の抑制

上述した DLD の原理では，支柱配列が無限に広がっていることを仮定している．一方，実際のデバイスでは，流路壁面があるため，上述した理論的な流れ場とは異なる．この流れ場の違いによって，分離直径の理論値と実験値との間に乖離が生じており，壁面近傍の流れ場の影響を低減する設計方法が Inglis によって提案されている [47]．DLD 流路内の流れ方向が上から下の場合において，左側と右側の壁面近傍の d を補正する計算式は以下で表される．

$$d_{\mathrm{L}} = d\sqrt{n\varepsilon} \tag{1-17}$$

$$d_{\mathrm{R}} = d\sqrt{2 - n\varepsilon} \tag{1-18}$$

ここで左側と右側壁面の各列での支柱間の間隔をそれぞれ d_L と d_R，n は列番号を表している．

図 1. 15 は，式（1-17，1-18）を適用した場合（図 1. 15a）と，未適用の場合（図 1. 15b）の粒子軌道を示している．導入された粒子直径（10 μm）は分離直径（6.5 μm）より十分に大きいが，式（1-17，1-18）を未適用の場合，粒子が displacement mode の軌道ではなく，zigzag mode の軌道で流れている（図 1. 15a）．この時の DLD パラメータは $d = 19.5$ μm，$D_p = 43$ μm，$\varepsilon = 0.05$，$D_c = 6.5$ μm である．一方，式（1-17，1-18）を適用したデバイスでは，粒子（8.4 μm）が壁面近傍において displacement mode の軌道で流れている（図 1. 15b）．この時の DLD パラメータは $d = 17.5$ μm，$D_p = 25.5$ μm，$\varepsilon = 0.05$，$D_c = 5.8$ μm である．

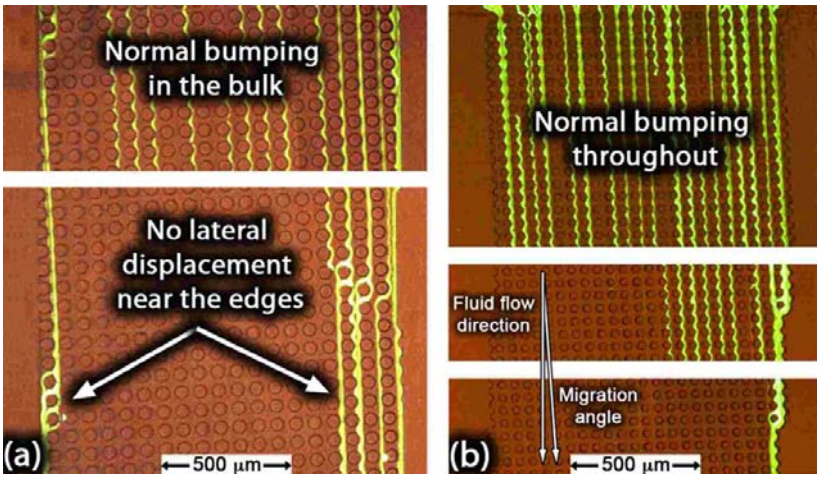

図 1. 15 壁面の流れへの影響（a）補正なし，（b）補正あり．文献 [47]より引用.

1.3.3 DLD による粒子分離事例

1.3.3.1 既報の分離対象

これまでに，ポリスチレンビーズ（マイクロビーズ，ナノビーズ）[34,48]，液滴 [49,50]，生体粒子など様々な種類の粒子の分離に，DLD デバイスが応用されている．生体粒子 [34,36,43,45,48,51–66]の種類に関しては，表 1. 2 に示す.

表 1. 2 DLD による生体粒子の分離

分離対象	Ref.
DNA	[34,62]
エクソソーム	[48]
血球	[43,63–65]
トリパノソーム	[66]
血中循環腫瘍細胞	[36,51–58]
上皮系細胞と繊維芽細胞	[59]
菌類胞子	[60]
生細胞と死細胞	[61]
肺炎球菌	[45]

1.3.3.2 粒子の硬さ・形状による分離

DLD 流路を用いて，粒子を硬さ [37–42]や形状 [38,43–45]の違いによって分離する事例が近年報告されている（図 1. 16）．以下で，粒子の硬さ，形状を指標とした分離について概説する．

（a）粒子の硬さによる分離

これまでに，粒子の硬さに基づいた粒子分離事例がいくつか報告されている [37–42]．柔らかい粒子の場合，DLD 流路内を流れる粒子はせん断力によって変形するため，粒子の有効直径は，静止状態の時よりも小さくなる（図 1. 16a）．低流量時においては，せん断力による粒子の変形は小さいため，粒子の有効直径が分離直径よりも大きい状態であれば，displacement mode の軌道で流れる．一方，高流量時においては，せん断力による粒子の変形が大きくなり，粒子の有効直径が分離直径よりも小さくなれば，zigzag mode の軌道に変化する．このような粒子変形に伴う，粒子軌道の変化を利用すれば，粒子の大きさが同じ場合であっても，硬さの違いによって粒子を分離することが可能となる．

（b）粒子形状による分離

近年，粒子形状に基づいた粒子分離事例がいくつか報告されている [38,43–45]．例えば，赤血球の場合，形状は円盤（直径が約 7.5 μm，厚みが約 2.5 μm）であるため，DLD 流路内を流れる赤血球の姿勢によって有効直径が変化し，分離に影響する．そのため，これまでに DLD 流路構造を工夫することで，高効率に分離する手法が提案されている．以下で既報の方法について述べる．

・流路高さによる赤血球の姿勢制御

流路高さが赤血球の直径よりも大きい場合，赤血球の有効直径は 2.5 μm（赤血球の厚み）となり，流路高さが赤血球の直径よりも小さい場合，赤血球の有効直径は約 7.5 μm（赤血球の直径）となることが報告されている [38]．このように，マイクロ流路の高さによって赤血球の姿勢を制御し，赤血球の有効直径を固定することが可能となる（図 1. 16a）．

・DLD 支柱形状

DLD の支柱形状を I 型とすることで，赤血球に回転を生じさせ，赤血球を高効率で分離する事例が報告されている [43]（図 1. 16b）．

赤血球の分離以外にも，肺炎球菌の鎖長の違いに基づいた分離事例についても近年報告されている[45]（図 1. 16c）．

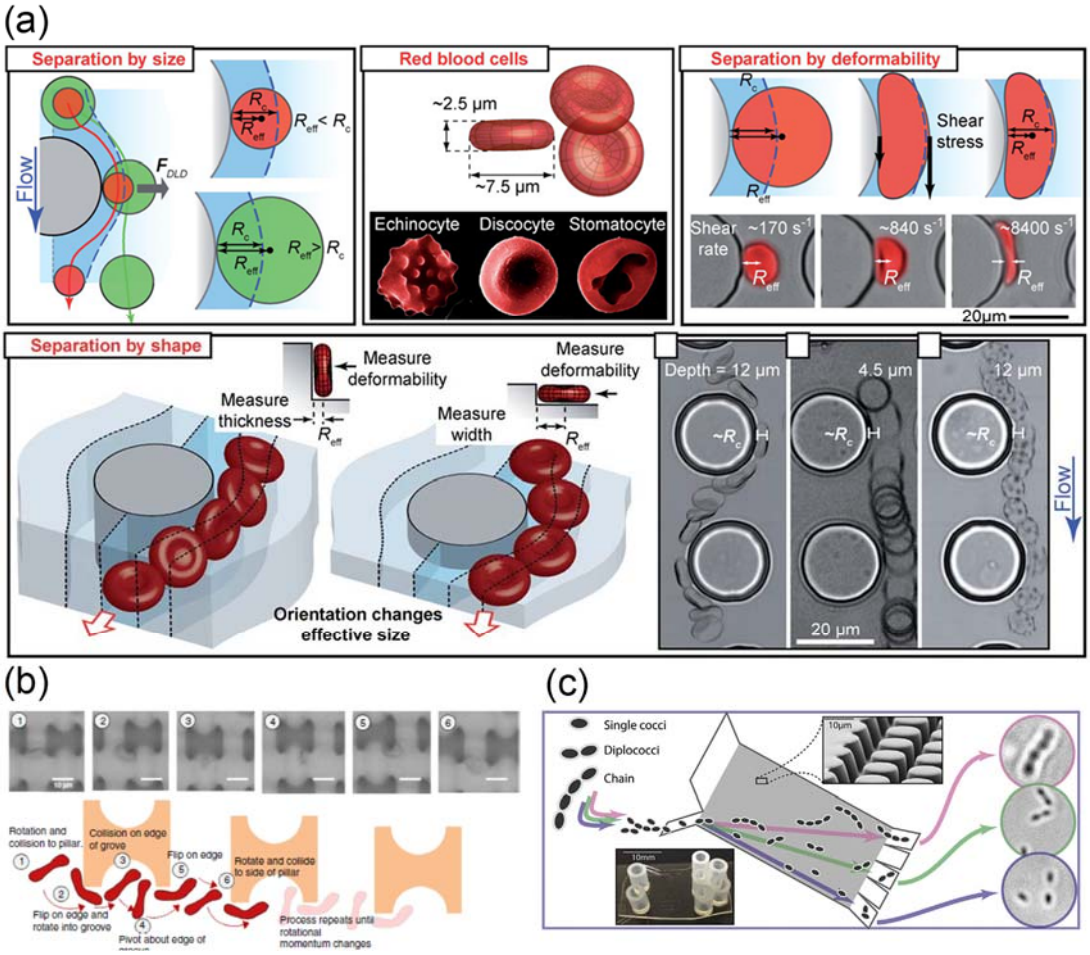

図 1.16 粒子の硬さ・形状に基づく分離事例．(a) 赤血球の硬さ・形状に基づいた分離事例．文献 [38]より引用．(b) 回転を利用した赤血球の分離事例．文献 [43]より引用．(c) 肺炎球菌の鎖長の違いによる分離事例．文献 [45]より引用．

1.3.4 DLD の課題

上述したように，DLD に関する数多くの研究事例がこれまで報告されている．一方で，DLD での主な分離対象は，生体粒子であり，他の粒子分離への応用事例は少ない．また，以下に示す課題も挙げられる．

（1）DLD デバイスにて，試料を大量に処理する場合や，DLD を生産技術へと応用する場合，単一流路での処理量は不十分である．

（2）DLD デバイスへの送液には，一般的に外部ポンプとチューブを用いているため，携帯性の低下，装置の大型化，試料損失が生じている．

（3）DLD で粒子を分離する際，粒子が懸濁されていない溶液（シース溶液）を粒子懸濁試料の両側または片側から導入するため，試料希釈，デバイス構造の複雑化，周辺機器の増加が生じている．

（4）DLD の分離直径は，マイクロピラーの幾何形状により定まるため，動的且つ柔軟に分離直径を調節できない．そのため，目的の分離対象に応じて，適切な幾何形状の DLD デバイスを作製する必要がある．

1.4 本研究の目的

DLD の原理やその応用事例に関して数多くの研究が報告されているが，上述したような課題も挙げられる．そこで，本研究では，上記の課題を解決する，新規 DLD マイクロ流路デバイスの開発を目的とした．具体的には，まず，マイクロ流路分岐構造にて生成される主滴とテライト滴の分離を可能とする，新規 DLD デバイスについて検討した．次に，生産技術への応用を目的とし，並列化デバイスによる処理量の向上を試みた．さらに，デバイス構造の単純化と汎用性の向上を目的として，外部ポンプを用いないデバイス，シース液を用いないデバイス，分離直径を調整可能なデバイスの開発を実施した．

1.5 論文構成

第 1 章　「序論」では，粒子分離の意義，従来の粒子分離技術，マイクロ流路による粒子分離技術について概説した後，本研究での研究対象である DLD による粒子分離技術の背景と，その課題について述べ，本研究の目的の所在を明らかにした．

第 2 章　「主滴とサテライト滴の分離」では，十字型マイクロ流路内の対称流れ場中で生成される主滴とサテライト滴の分離を可能とする DLD デバイスについて報告する．

第 3 章　「並列化流路による主滴とサテライト滴の分離」では，生産技術への応用を目的とした並列化液滴分離デバイスについて報告する．

第 4 章　「PDMS 脱気駆動流を用いた粒子の濃縮と分離」では，PDMS のガス溶解性を利用した外部ポンプフリーDLD デバイスについて報告する．

第 5 章　「慣性フォーカスとマイクロピラーアレイによる粒子分離」では，シースフローを用いない，DLD 粒子分離デバイスについて報告する．

第 6 章　「温度応答性高分子を用いた分離直径制御」では，温度調節によって分離直径を動的かつ柔軟に制御可能な DLD デバイスについて報告する．

第 7 章　「結論と展望」第 1 章で述べた目的に従って実施した一連の研究について総括する．また，本研究で得られた知見をもとに，今後の展望について述べる．

1.6 参考文献

[1] 科学技術振興機構, 2015年度戦略プロポーザル「分離工学イノベーション」 (2015).

[2] 福田敏夫，新井史人 (監修), 「細胞分離・操作技術の最前線」，シーエムシー出版 (2015).

[3] 相良紘, 「分離技術」日刊工業新聞社 (2008).

[4] 世界濾過工学会日本会, 「濾過工学ハンドブック」，丸善株式会社 (2009).

[5] W. A. Bonner, H. R. Hulett, R. G. Sweet, and L. A. Herzenberg, Rev. Sci. Instrum. **43**, 404 (1972).

[6] R. S. Molday and L. L. Molday, Fed. Eur. Biochem. Soc. FEBS **170**, 232 (1984).

[7] H. Abts, M. Emmerich, S. Miltenyi, A. Radbruch, and H. Tesch, J. Immunol. Methods **125**, 19 (1989).

[8] D. R. Gossett, W. M. Weaver, A. J. MacH, S. C. Hur, H. T. K. Tse, W. Lee, H. Amini, and D. Di Carlo, Anal. Bioanal. Chem. **397**, 3249 (2010).

[9] A. Lenshof and T. Laurell, Chem. Soc. Rev. **39**, 1203 (2010).

[10] P. Sajeesh and A. K. Sen, Microfluid. Nanofluid. **17**, 1 (2014).

[11] M. Antfolk and T. Laurell, Anal. Chim. Acta **965**, 9 (2017).

[12] H.A.Pohl, Cambridge Univ. Press (1978).

[13] T. B. Jones, Cambridge Univ. Press (1978).

[14] H. M. H. and N. G. Green, A Res. Stud. Press B. (2003).

[15] 新井史人（編著），「細胞の特性計測・操作と応用」，コロナ社 (2016).

[16] J. Shi, X. Mao, D. Ahmed, A. Colletti, and T. J. Huang, Lab Chip **8**, 221 (2008).

[17] J. Shi, H. Huang, Z. Stratton, Y. Huang, and T. J. Huang, Lab Chip **9**, 3354 (2009).

[18] D. J. Collins, A. Neild, and Y. Ai, Lab Chip (2015).

[19] N. Pamme and A. Manz, Anal. Chem. **76**, 7250 (2004).

[20] J. D. Adams, U. Kim, and H. T. Soh, Proc. Natl. Acad. Sci. **105**, 18165 (2008).

[21] M. P. MacDonald, G. C. Spalding, and K. Dholakia, Nature **426**, 421 (2003).

[22] M. Yamada, M. Nakashima, and M. Seki, Anal. Chem. **76**, 5465 (2004).

[23] M. Yamada and M. Seki, Lab Chip **5**, 1233 (2005).

[24] J. Zhang, S. Yan, D. Yuan, G. Alici, N.-T. Nguyen, M. Ebrahimi Warkiani, and W. Li, Lab Chip **16**, 10 (2016).

[25] J. M. Martel and M. Toner, Annu. Rev. Biomed. Eng. **16**, 371 (2014).

[26] D. Di Carlo, Lab Chip **9**, 3038 (2009).

[27] H. Amini, W. Lee, and D. Di Carlo, Lab Chip **14**, 2739 (2014).
[28] S. C. Hur, T. Z. Brinckerhoff, C. M. Walthers, J. C. Y. Dunn, and D. Di Carlo, PLoS One **7**, (2012).
[29] D. H. Yoon, J. B. Ha, Y. K. Bahk, T. Arakawa, S. Shoji, and J. S. Go, Lab Chip **9**, 87 (2009).
[30] J. S. Park, S. H. Song, and H. Il Jung, Lab Chip **9**, 939 (2009).
[31] J.-S. Park and H.-I. Jung, Anal. Chem. **81**, 8280 (2009).
[32] S. Choi, S. Song, C. Choi, and J.-K. Park, Lab Chip **7**, 1532 (2007).
[33] R. D. Jäggi, R. Sandoz, and C. S. Effenhauser, Microfluid. Nanofluid. **3**, 47 (2006).
[34] L. R. Huang, E. C. Cox, R. H. Austin, and J. C. Sturm, Science **304**, 987 (2004).
[35] D. W. Inglis, J. a Davis, R. H. Austin, and J. C. Sturm, Lab Chip **6**, 655 (2006).
[36] K. Loutherback, J. D'Silva, L. Liu, A. Wu, R. H. Austin, and J. C. Sturm, AIP Adv. **2**, 042107 (2012).
[37] R. Quek, D. V. Le, and K. H. Chiam, Phys. Rev. E - Stat. Nonlinear, Soft Matter Phys. **83**, 1 (2011).
[38] J. P. Beech, S. H. Holm, K. Adolfsson, and J. O. Tegenfeldt, Lab Chip **12**, 1048 (2012).
[39] S. Ye, X. Shao, Z. Yu, and W. Yu, J. Fluid Mech. **743**, 60 (2014).
[40] T. Krüger, D. Holmes, and P. V. Coveney, Biomicrofluidics **8**, 054114 (2014).
[41] D. Holmes, G. Whyte, J. Bailey, N. Vergara-Irigaray, A. Ekpenyong, J. Guck, and T. Duke, Interface Focus **4**, 20140011 (2014).
[42] Z. Zhang, E. Henry, G. Gompper, and D. A. Fedosov, J. Chem. Phys. **143**, 243145 (2015).
[43] K. K. Zeming, S. Ranjan, and Y. Zhang, Nat. Commun. **4**, 1625 (2013).
[44] S. Ranjan, K. K. Zeming, R. Jureen, D. Fisher, and Y. Zhang, Lab Chip **14**, 4250 (2014).
[45] J. P. Beech, B. D. Ho, G. Garriss, V. Oliveira, B. Henriques-Normark, and J. O. Tegenfeldt, Anal. Chim. Acta **1000**, 223 (2018).
[46] J. A. Davis, Dr. Philos. Princet. Univ. (2008).
[47] D. W. Inglis, Appl. Phys. Lett. **94**, 013510 (2009).
[48] B. H. Wunsch, J. T. Smith, S. M. Gifford, C. Wang, M. Brink, R. L. Bruce, R. H. Austin, G. Stolovitzky, and Y. Astier, Nat. Nanotechnol. **11**, 936 (2016).
[49] H. N. Joensson, M. Uhlén, and H. A. Svahn, Lab Chip **11**, 1305 (2011).
[50] T. Jing, R. Ramji, M. E. Warkiani, J. Han, C. T. Lim, and C.-H. Chen, Biosens. Bioelectron. **66**, 19 (2015).

[51] Z. Liu, F. Huang, J. Du, W. Shu, H. Feng, X. Xu, and Y. Chen, Biomicrofluidics **7**, 011801 (2013).
[52] Z. Liu, W. Zhang, F. Huang, H. Feng, W. Shu, X. Xu, and Y. Chen, Biosens. Bioelectron. **47**, 113 (2013).
[53] H. Okano, T. Konishi, T. Suzuki, T. Suzuki, S. Ariyasu, S. Aoki, R. Abe, and M. Hayase, Biomed. Microdevices **17**, 59 (2015).
[54] M. G. Ahmed, M. F. Abate, Y. Song, Z. Zhu, F. Yan, Y. Xu, X. Wang, Q. Li, and C. Yang, Angew. Chemie Int. Ed. **56**, 10681 (2017).
[55] X. Jiang, K. H. K. Wong, A. H. Khankhel, M. Zeinali, E. Reategui, M. J. Phillips, X. Luo, N. Aceto, F. Fachin, A. N. Hoang, W. Kim, A. E. Jensen, L. V. Sequist, S. Maheswaran, D. A. Haber, S. L. Stott, and M. Toner, Lab Chip **17**, 3498 (2017).
[56] J. Jiang, H. Zhao, W. Shu, J. Tian, Y. Huang, Y. Song, R. Wang, E. Li, D. Slamon, D. Hou, X. Du, L. Zhang, Y. Chen, and Q. Wang, Sci. Rep. **7**, 42612 (2017).
[57] S. H. Au, J. Edd, A. E. Stoddard, K. H. K. Wong, F. Fachin, S. Maheswaran, D. A. Haber, S. L. Stott, R. Kapur, and M. Toner, Sci. Rep. **7**, 2433 (2017).
[58] F. Fachin, P. Spuhler, J. M. Martel-Foley, J. F. Edd, T. A. Barber, J. Walsh, M. Karabacak, V. Pai, M. Yu, K. Smith, H. Hwang, J. Yang, S. Shah, R. Yarmush, L. V. Sequist, S. L. Stott, S. Maheswaran, D. A. Haber, R. Kapur, and M. Toner, Sci. Rep. **7**, 10936 (2017).
[59] J. V. Green, M. Radisic, and S. K. Murthy, Anal. Chem. **81**, 9178 (2009).
[60] D. W. Inglis, N. Herman, and G. Vesey, Biomicrofluidics **4**, 024109 (2010).
[61] N. Tottori, T. Nisisako, J. Park, Y. Yanagida, and T. Hatsuzawa, Biomicrofluidics **10**, 014125 (2016).
[62] Y. Chen, E. S. Abrams, T. C. Boles, J. N. Pedersen, H. Flyvbjerg, R. H. Austin, and J. C. Sturm, Phys. Rev. Lett. **114**, 198303 (2015).
[63] J. A. Davis, D. W. Inglis, K. J. Morton, D. a Lawrence, L. R. Huang, S. Y. Chou, J. C. Sturm, and R. H. Austin, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **103**, 14779 (2006).
[64] D. W. Inglis, M. Lord, and R. E. Nordon, J. Micromech. Microeng. **21**, 054024 (2011).
[65] K. K. Zeming, T. Salafi, C.-H. Chen, and Y. Zhang, Sci. Rep. **6**, 22934 (2016).
[66] S. H. Holm, J. P. Beech, M. P. Barrett, and J. O. Tegenfeldt, Lab Chip **11**, 1326 (2011).

第2章　主滴とサテライト滴の分離

2.1 序論

2.1.1 マイクロ流路分岐構造を用いた液滴生成技術

近年，マイクロ流路分岐構造を用いた液滴生成技術が様々分野へと応用されている．例えば，デジタルポリメラーゼ連鎖反応（digital PCR） [1,2]，単一細胞解析 [3,4]等の化学・生化学分析用途 [5–7]にて既に社会実装が進んでいるほか，機能性微粒子の調製事例 [8–11]なども数多く報告されている（図 2. 1）．マイクロ流路による液滴生成法は，従来のエマルション滴の生成技術とは異なり，エマルション滴のサイズ，形状，化学組成，時空間的な配列を極めて正確に制御可能であるという特長を有しており，これまでに，マイクロ流路分岐構造 [12]（T 字型マイクロ流路，フローフォーカス型マイクロ流路，3 次元の同軸キャピラリ構造）による液滴生成技術（図 2. 2）を用いた数多くの研究が報告されている．

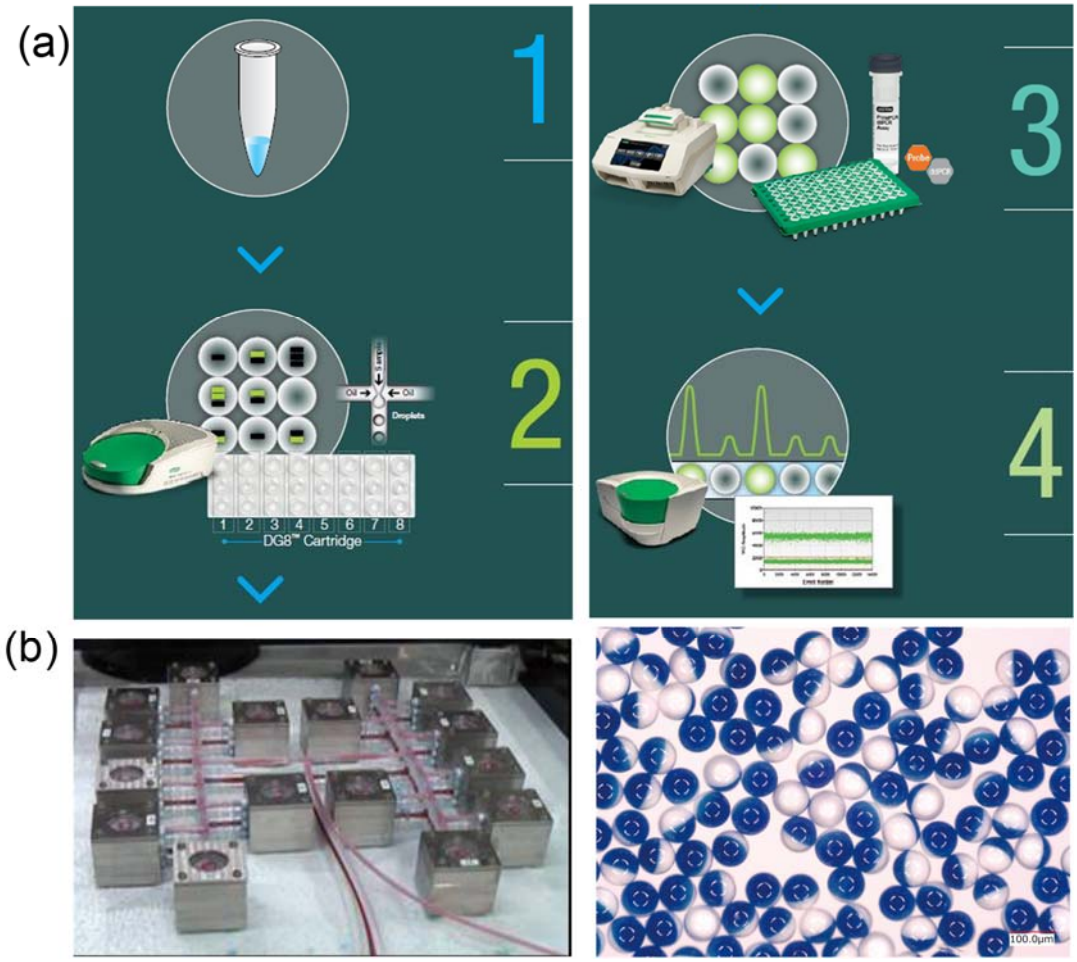

図 2. 1 マイクロ流路分岐構造を用いた液滴生成技術の応用例．（a）digital droplet PCR．文献 [2]より引用．（b）二色粒子の生成．文献 [11]より引用．

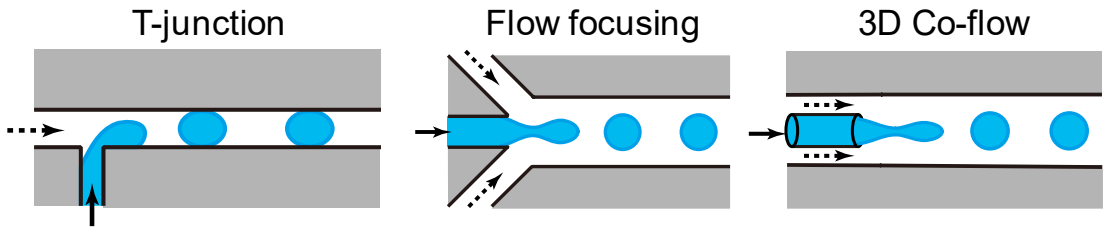

図 2. 2 マイクロ流路分岐構造による液滴生成技術．T 字型，フローフォーカス型マイクロ流路，3 次元同軸キャピラリによる液滴生成．

2.1.2 マイクロ流路内での主滴とサテライト滴の生成

上記で述べたマイクロ流路による液滴生成手法は，様々な利点を有している一方で，主滴と同時に副産物としてサテライト滴が生成される．このようなサテライト滴の生成現象は，特に，インクジェットプリンタにおける印刷解像度の低下を招くため，プリンタ技術に関連して広く知られている [13]．液体がせん断されることによって，液滴（主滴）が生成される直前，液滴になる部分（主滴）はもとの液体と液柱を介して繋がった状態となっている．この細い液柱は，界面張力の作用によって自発的に不安定化（レイリー不安定）し，1 個または複数の小さな液滴に分裂する [14]．マイクロ流路による液滴生成においても，こうしたサテライト滴の存在は通常，不必要な副産物であり，生成物（主滴）の単分散性の低下や生化学分析におけるコンタミネーションが生じるため，分離することが望まれる．一方で，単分散なサブミクロン液滴生成では高いエネルギーを必要とするため，大きさの異なる小さいサテライト滴を分級できれば，サイズの小さい単分散液滴を生成する有用な手段であると考えられる．

2.1.3 マイクロ流路を用いた液滴分離手法

マイクロ流路による液滴分離は，能動的手法と受動的手法に大別される．以下，能動的手法と受動的手法による液滴分離事例および液滴分離の中でも，特に主滴とサテライト滴の分離を扱った事例について詳しく述べる．

（A）能動的手法による液滴分離

液滴分離の手法の 1 つとして，音場，電場，熱，空気圧などを液滴分離の駆動源する能動的手法が多数報告されている [15]．特に，主滴とサテライト滴の分離においては，誘電泳動力による分離事例が報告されている（図 2. 3） [16]．光により誘起される誘電泳動力を用いて，大きさの異なる水中油滴（O/W）型エマルション滴を分離した事例や，フローフォーカス型のマイクロ流路を用いて生成された主滴（25 μm）とサテライト滴（2–5 μm）を分離（図 2. 4）した事例が報告されている．レーザースキャン速度 30 μm/s で 40 s 以内に主滴とサテライト滴の分離が可能である．

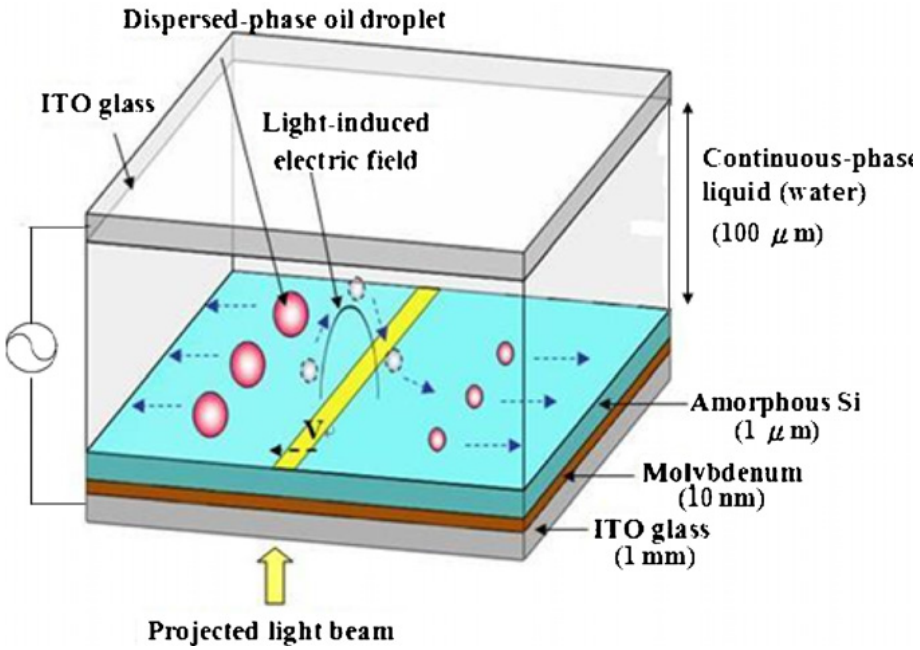

図 2. 3 光誘起型誘電泳動を用いた液滴分離．文献 [16]より引用.

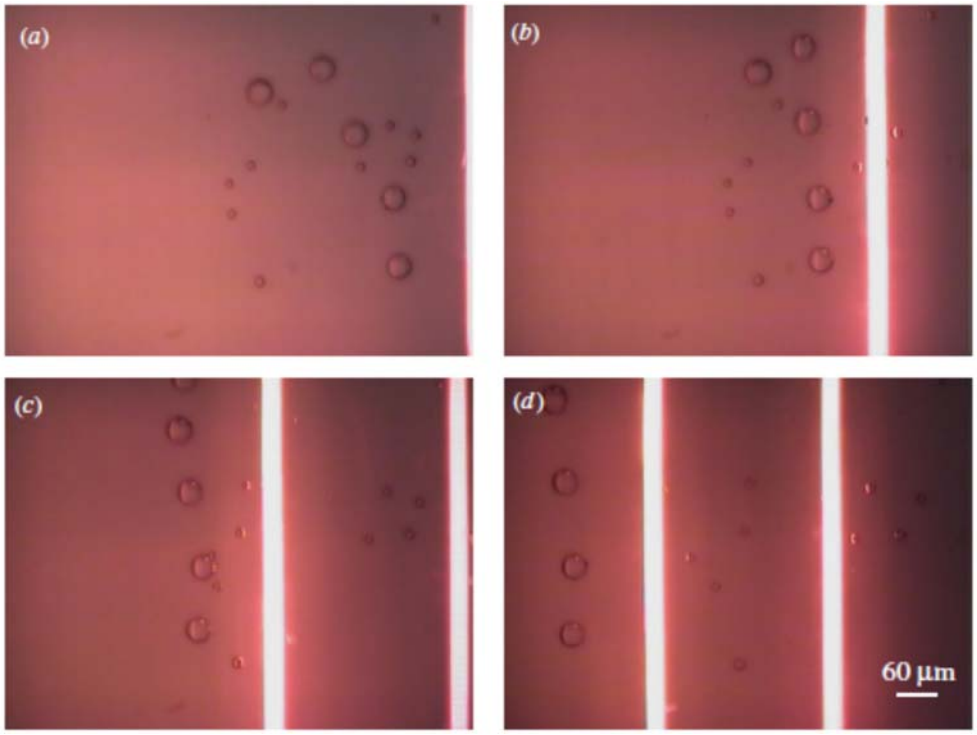

図2. 4光誘起型誘電泳動を用いた主滴とサテライト滴の分離の様子. 文献 [16]より引用

（B）受動的手法による液滴分離

上述したような外部エネルギー用いず，流路内の水力学的作用によって液滴を分離する受動的手法も報告されている．例えば，非対称分岐流路 [17–22] pinched flow fractionation (PFF) [23]，hydrodynamic size fractionation [24]，split-flow thin (SPLITT) fractionation [25]，重力場 [26]，deterministic lateral displacement (DLD) [27,28] を用いた液滴分離事例が報告されている．以下では，T 字型，十字型流路で生成される主滴とサテライト滴の分離事例に関して述べる．

（1）T 字型流路にて生成される主滴とサテライト滴の分離

これまでに，T 字型マイクロ流路で生成された油中水滴型（W/O）または O/W の主滴とサテライト滴を下流部に接続されたディフューザ及び分岐流路によって分離する手法が報告されている [17]（図 2. 5）．また，同様の手法を用いて，キトサンまたはアルギン酸の単分散微粒子を生成した事例もある [21,22]．T 字型流路での液滴生成では，主滴に対してサテライト滴は流路側壁近傍に生成さ

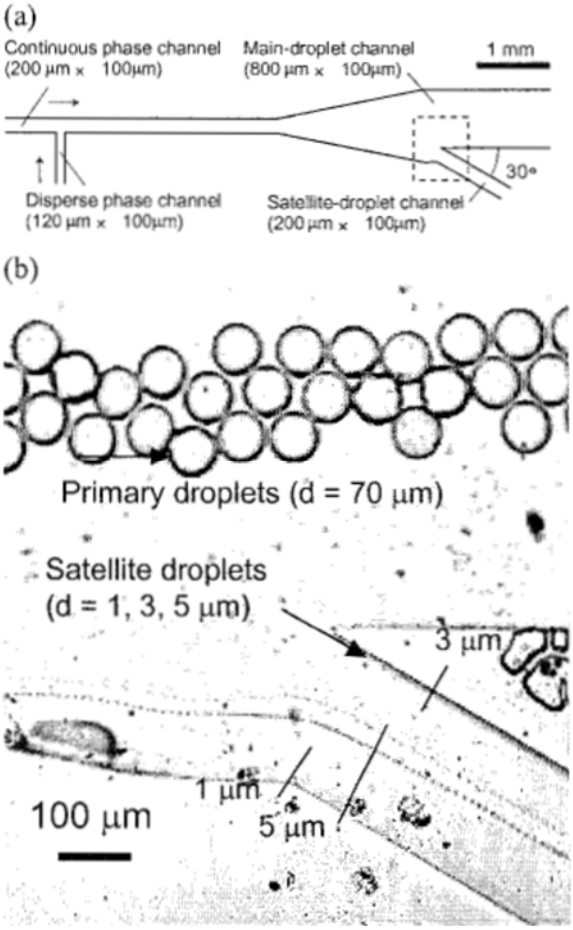

図 2. 5 T 字型流路で生成される主滴とサテライト滴の分離．文献 [17]から引用．

れるため，下流部における流路幅を拡大した場合，主滴は流路中央を直進するのに対して，サテライト滴は壁面に沿って輸送される．その結果，主滴とサテライト滴は分離され，各分岐流路へと回収される（図 2. 5）．

(2) 十字型流路にて生成される主滴とサテライト滴の分離

十字型マイクロ流路にて生成される主滴とサテライト滴を下流部に接続した非対称な分岐流路部で分離する手法（図 2. 6） [18]や，分散相の両側から導入す

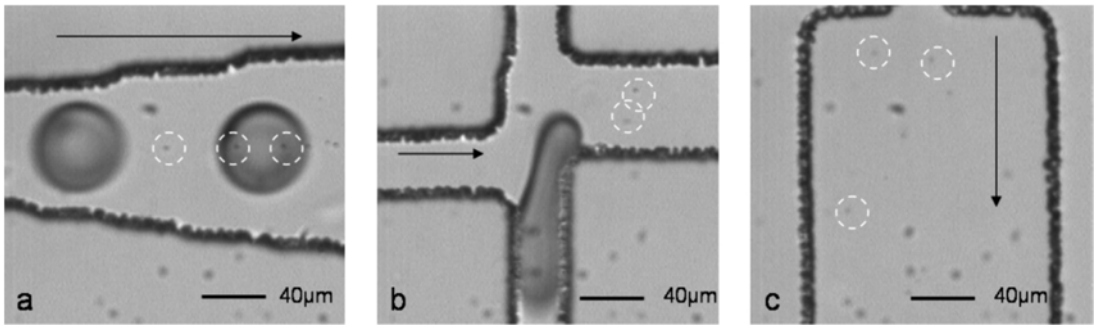

図 2. 6 十字型流路で生成される主滴とサテライト滴が分岐流路で分離される様子．白い破線円はサテライト滴を示している．文献 [18]から引用．

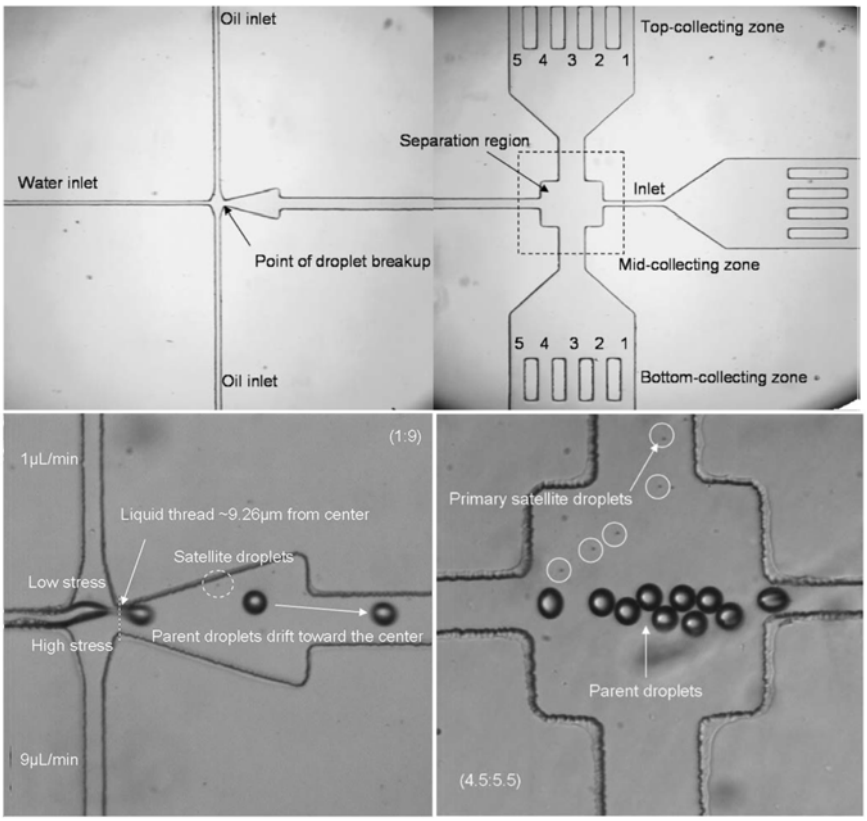

図 2. 7 分散相の両側から供給される連続相流量を非対称にすることで，サテライト滴を壁面近傍に生成し，下流の分岐流路部で主滴とサテライト滴が分離される様子．文献 [29]から引用．

る連続相流量を非対称にし，サテライト滴を流路壁面近傍で生成する（図 2. 7）など，主滴とサテライト滴の非対称な位置関係を利用して分離する手法が報告されている [29,30].

2.1.4 DLD 流路を用いた液滴分離の事例

これまでに，DLD 流路を用いた液滴分離事例が報告されている [27,28]（図 2. 8）. 既報の事例では，細胞が内包されている液滴と，内包されていない液滴を分離するために DLD 流路が用いられているが， DLD 流路を主滴とサテライト滴の分離に応用した事例は未報告である.

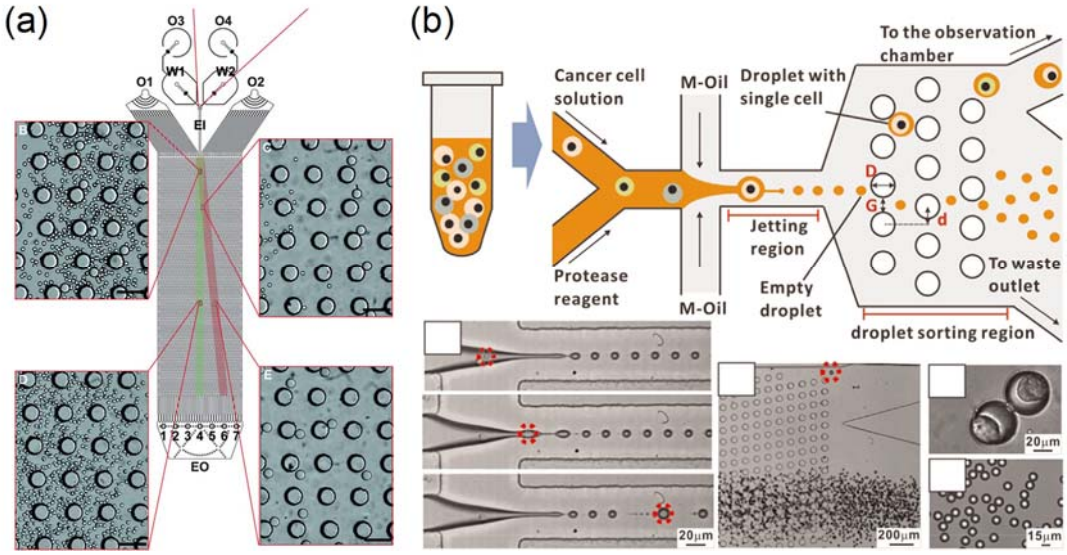

図 2. 8 DLD 流路による液滴分離事例. （a）文献 [27]から引用. （b）文献 [28]から引用.

2.1.5 本研究の目的

既報の主滴とサテライト滴の分離では，壁面近傍をサテライト滴が流れているか，非対称に枝分かれした分岐流路が下流部に設けられている必要がある. また，液滴生成の際には，主滴の生成と同様に，サイズの互いに異なるサテライト滴が規則正しく繰り返し生成されるが，これまでにサテライト滴を大きさごとに分離・回収した事例は報告されていない. サテライト滴を大きさごとに分離することができれば，複数サイズの単分散液滴を同時に生成することも可能になる. そこで，本研究では，対称流れ場において，十字型マイクロ流路の中央に生成される主滴とサテライト滴の分離，さらには，サテライト滴のサイズ別分離による複数サイズの単分散液滴の同時生成の実現を目的とする.

2.1.6 本章の構成

2.1 では，マイクロ流路を用いた液滴生成技術および液滴生成時に副産物として生成されるサテライト滴に関して概要を述べた．また，既報のマイクロ流路による液滴分離技術および主滴とサテライト滴の分離に関する事例について紹介した．最後に，従来手法の課題について述べ，本研究の目的の所在を明らかにした．

2.2 では，(1) 主滴とサテライト滴分離用 DLD デバイス，(2) 主滴とサテライト滴およびサテライト滴のサイズ別分離用 DLD デバイスの設計に関して述べる．

2.3 では，デバイス作製方法，液滴生成に使用する材料，およびマイクロ流路への送液や流路内の流れの観察に用いた装置の概要について述べる．

2.4 では，2.4.1「生成液滴サイズ測定による DLD パラメータの選定」，2.4.2「1 段階 DLD による主滴とサテライト滴の分離」，および 2.4.3「3 段階 DLD による主滴およびサテライト滴のサイズ別分離」についての結果及び考察を述べる．

2.5 では，本章で得られた研究結果について総括する．

2.2 デバイス設計

2.2.1 デバイス概要

本研究では，十字型マイクロ流路による液滴生成部と DLD 流路から構成される 3 種類のデバイス（Device-1，Device-2，Device-3）を設計した．これらのデバイスでは，まず，液滴生成部で，W/O または O/W の主滴とサテライト滴が生成される．その後，生成された液滴が下流部に接続された DLD 流路へと流入し，サイズの違いに基づいて分離される．各デバイスの詳細については以下で述べる．

2.2.2 液滴サイズ測定用マイクロ流路

主滴とサテライト滴の分離用 DLD 流路を設計するために，まず，DLD 流路が下流部に接続されていない十字型液滴生成用流路を設計し（図 2. 9），生成される液滴のサイズを測定した．十字型液滴生成流路において，分散相と連続相の導入用流路幅は 100 μm，ドレイン流路の幅は 200 μm，流路高さは一様に 80 μm とした．

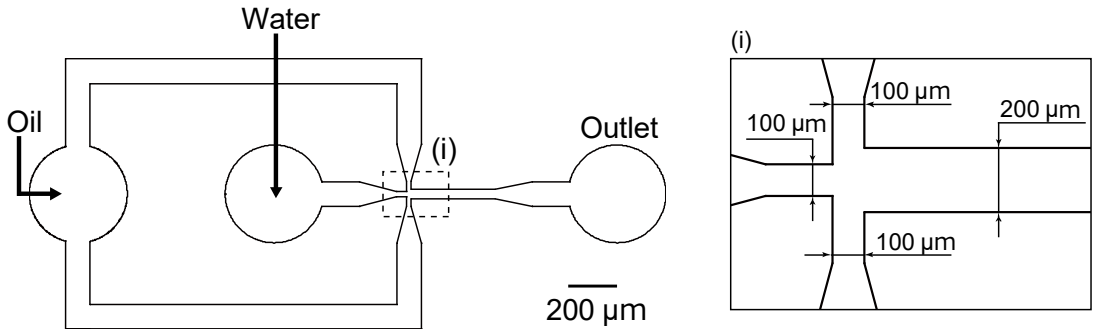

図 2. 9 生成液滴のサイズ測定用十字型マイクロ流路デバイス．

2.2.3 主滴とサテライト滴分離用 DLD デバイス

主滴とサテライト滴の分離用デバイス(Device-1，Device-2)は，液滴生成部（十字型流路）および単一の分離直径（D_c）を有する DLD 流路部から構成される（図 2. 10，図 2. 11）．Device-2 では，二相性の液滴を生成するために，Y 字型の流路を分散相供給流路として用いたほかは，Device-1 と同じ形状および寸法とした．なお，液滴生成部の形状と寸法は，上記の液滴サイズ測定用流路と同一である．これら 2 つのデバイス（Device-1，Device-2）では，液滴生成部で主滴とサテライト滴が生成された後，ドレイン流路の中央を生成液滴が流れ，下流部に接続された DLD 流路の中央から流入する．液滴が DLD 流路に流入した後，D_c よりも

大きなサイズの主滴は DLD 支柱の配列の傾きに沿って進む displacement mode の軌道をとり，D_c よりも小さなサイズのサテライト滴は，全体の流れ方向に進む zigzag mode の軌道をとるため，DLD 流路の下流部に設けられた分岐流路から主滴が outlet-M へと回収され，サテライト滴が outlet-S へと回収される（図 2. 10，図 2. 11）.

また，DLD パラメータの計算には，第 1 章 1.3.2 に示した式（1-16）を用い，予め測定した主滴とサテライト滴のサイズ（2.4.1 で詳細について述べる）に従って，所望の D_c になるように DLD のパラメータを決定した．本デバイスでは，DLD のパラメータを $d = 80$ μm，$D_p = 100$ μm，$\Delta\lambda/\lambda = 0.1$ とし，D_c を主滴とサテライト滴の間の値（=37.1 μm）に設定した.

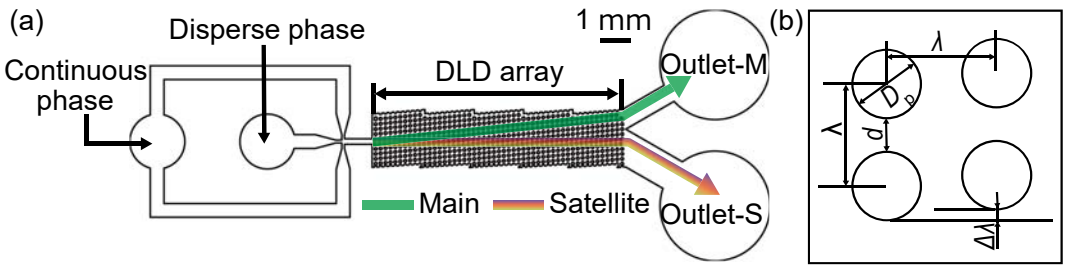

図 2. 10　(a) 主滴とサテライト滴分離用 1 段階 DLD デバイス（Device-1）. 緑色と多色の線はそれぞれ，DLD 流路内での主滴とサテライト滴の軌道を表している．(b) DLD のパラメータ.

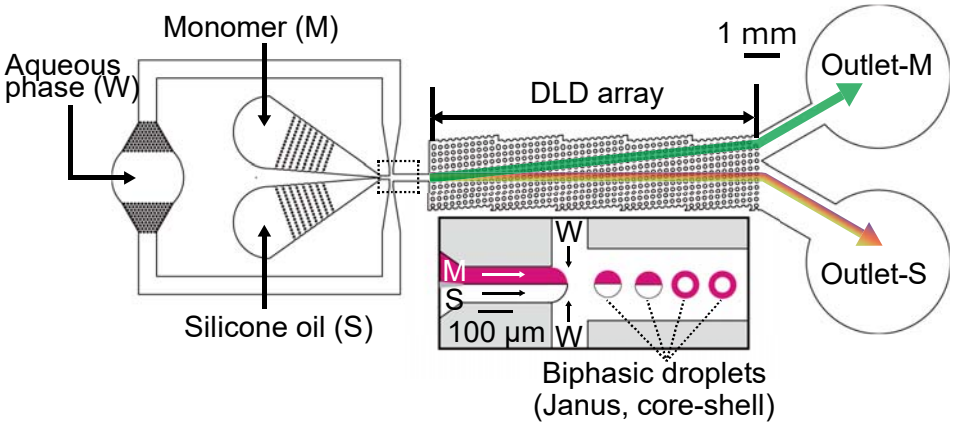

図 2. 11 二相性の主滴とサテライト滴分離用 1 段階 DLD デバイス．緑色と多色の線はそれぞれ，DLD 流路内での主滴とサテライト滴の軌道を表している.

2.2.4 主滴およびサテライト滴のサイズ別分離用 DLD デバイス

主滴とサテライト滴およびサテライト滴のサイズ別分離用デバイス（Device-3）は，液滴生成部（十字型流路）および 3 つの分離直径（D_c）を有する DLD 流路部から構成される（図 2. 12）．Device-1,2 と同様に，液滴生成部で生成された主滴とサテライト滴は DLD 流路へと流入し，まず，DLD 流路の区間 1 で主滴とサテライト滴が分離される．その後，区間 2 にて，一番大きいサテライト滴がその他の小さいサテライト滴から分離され，区間 3 にて，二番目に大きいサテライト滴がより小さなサテライト滴から分離される（図 2. 12）．以下に示す，各区間の DLD のパラメータは，予め測定した主滴とサテライト滴のサイズ（2.4.1 で詳細について述べる）に基づき，所望の D_c になるように決定した．各区間の DLD パラメータの詳細は，表 2. 1 に示す．

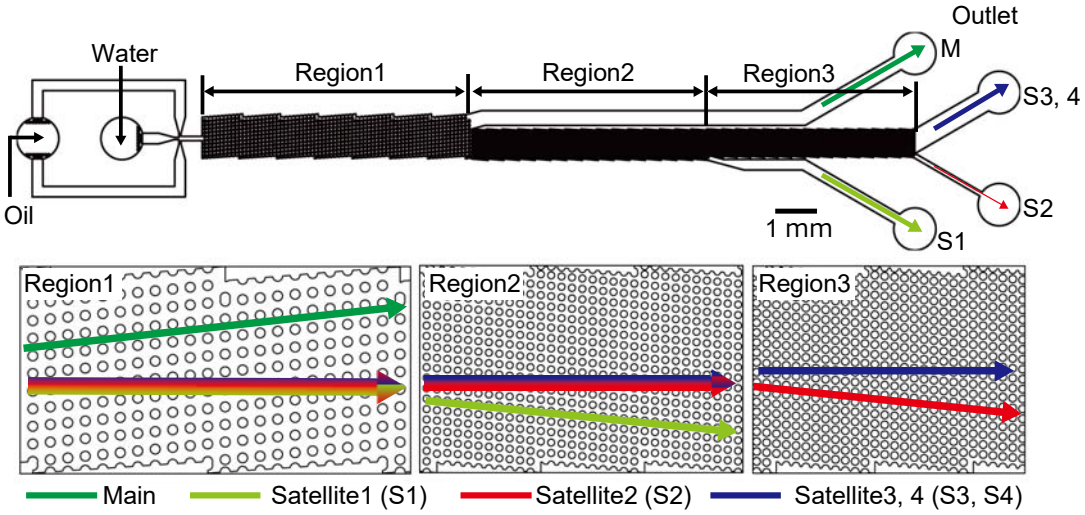

図 2. 12 主滴とサテライト滴およびサテライト滴のサイズ別分離デバイス．

表 2. 1　各デバイスの DLD パラメータおよび流路表面の濡れ性

	Region	D_p (μm)	$\Delta\lambda/\lambda$ (–)	d (μm)	D_c (μm)	Surface property
Device-1A	-	100	0.1	80	37.1	Hydrophobic
Device-1B	-	100	0.1	80	37.1	Hydrophilic
Device-2	-	100	0.1	80	37.1	Hydrophilic
	1st	100	0.1	80	37.1	
Device-3	2nd	50	0.1	25	11.6	Hydrophobic
	3rd	50	0.1	15	7.0	

2.3 実験

2.3.1 デバイス作製

微細溝を有する PDMS 基板は，Si 基板上にネガ型フォトレジストである SU-8 を用いて作製したパターンから PDMS に構造を転写する，ソフトリソグラフィ法により作製した．詳しい作製プロセスは Appendix を参照．作製した PDMS 基板に，溶液導入および回収用のポートを作製するために，直径 1 mm のパンチ（Harris Uni-Core, Ted Pella, CA, USA）を使用した．次に，PDMS 基板の微細溝を密閉するために，PDMS 基板と平板を酸素プラズマ処理によって接合した．なお，液滴の生成および分離には，流路表面の濡れ性が大きく影響するため，W/O または O/W 液滴を生成する場合において，以下で述べる異なる平板を用いた．

（1）W/O 液滴の生成及び分離実験の場合

W/O 液滴の生成および分離には，疎水性流路表面が必要であるため，平板には，疎水性である PDMS をコートしたガラス基板（76 mm × 26 mm, 厚み：0.9–1.2 mm）を用いた．また，PDMS 基板と平板を酸素プラズマ処理によって接着した後，80℃で 24 時間以上加熱することで，酸素プラズマ処理にて一時的に親水性に改質された表面を疎水性に戻した．

（2）O/W 液滴の生成及び分離実験の場合

O/W 液滴の生成および分離には，親水性流路表面が必要であるため，平板として，親水性であるガラス基板を用いた．また，PDMS 流路表面は以下の方法で親水性に改質した．

2.3.2 マイクロ流路の親水化処理

PDMS 基板とガラス基板を酸素プラズマ処理により接合した後，O/W 液滴の生成・分離用デバイス（Device-1B, Device-2）の PDMS 流路表面を交互積層（layer-by-layer）法 [31]により親水性に改質した．親水化に用いた溶液は以下である．

（1）0.1 M の塩化ナトリウム水溶液（NaCl, 和光純薬工業）.

（2）0.5 M の NaCl 水溶液に，濃度 0.1%(w/v)で poly(allylamine hydrochloride)（PAH, M_w 17500, Sigma-Aldrich, USA）を溶解した水溶液.

（3）0.5 M の NaCl 水溶液に，濃度 0.1%(w/v)で poly(sodium 4-styrenesulfonate)（PSS, M_w 70000, Sigma-Aldrich, USA）を溶解した水溶液.

これら 3 つの水溶液を（1），（2），（1），（3）の順番を 1 セットとし，マイクロ流路に 3 セット導入した．なお，（2）と（3）の溶液はマイクロ流路に送液後，約 30 分間静置した．最後に，流路に純水を導入し洗浄を行った．

2.3.3 材料

W/O 液滴，O/W 液滴，二相性 O/W 液滴の実験に使用した材料を以下に示す.

W/O 液滴 : 連続相として，コーン油（和光純薬工業）に界面活性剤（SY-Glyster CRS-75, 坂本薬品工業）を 1.0wt%の濃度で添加して用いた. 分散相として, 1wt.%のアルギン酸ナトリウム水溶液（和光純薬工業）を用いた.

O/W 液滴 : 連続相として，2wt.%ポリビニルアルコール（PVA, M_w 300 g/mol; degree of hydrolysis, 87–89%）を用いた．分散相として，アクリルモノマー（1, 6-hexanedioldiacrylate (HDDA), dynamic viscosity η_m, 6.35 mPa s; density ρ_m, 1.02 g/cm^3, 新中村化学工業）に光重合開始剤（Darocur 1173, BASF, Japan）を 3wt%の濃度で添加して用いた.

二相性 O/W 液滴 : 連続相として，0.3wt.%ドデシル硫酸ナトリウム（SDS, 和光純薬工業）水溶液，または 2wt.%ポリビニルアルコール（PVA, M_w 300 g/mol; degree of hydrolysis, 87–89%）を用いた. 分散相として, シリコーンオイル（SH200, 10CS, 東レ・ダウコーニング）およびアクリルモノマー（1, 6-hexanedioldiacrylate (HDDA), 新中村化学工業）を用いた．また，シリコーンオイルとアクリルモノマーの境界を明確に区別するために，アクリルモノマーに赤色染色液（Oil Red O, Sigma-Aldrich, MO, USA）を添加した.

2.3.4 重合処理

O/W 液滴の重合処理には，UV 光源（SUPERCURE-201S, 三永電気製作所）を用いた．UV 光は，マイクロ流路の外へと排出された液滴に対して，約 10–15 cm の距離から照射した．重合処理後の粒子の観察には，光学顕微鏡と電子顕微鏡（SEM, JSM-6610LA, JEOL, Japan）を用いた.

2.3.5 装置と実験手順

デバイスへの送液はガラスシリンジ（1000 series, Hamilton Company, USA）およびシリンジポンプ（KDS200, KD Scientific, USA）を用い，ポンプとデバイスの接続にはポリエチレンチューブ（外径：1.0 mm，内径：0.5 mm）を用いた．液滴生成および主滴とサテライト滴の分離の様子の観察には，倒立顕微鏡（CKX41, オリンパス）と高速度ビデオカメラ（Fastcam Mini WX100 or Fastcam Mini AX50, フォトロン）を用いた. 液滴および粒子のサイズ測定は, ImageJ（NIH, NY, USA）を用いて手動で行った.

2.4 結果と考察

2.4.1 生成液滴サイズ測定による DLD パラメータの選定

まず，DLD パラメータを決定するために，十字型液滴生成流路を用いて，主滴とサテライト滴のサイズ測定を実施した．

2.4.1.1 十字型マイクロ流路による液滴生成の様子

図 2. 13 に示すように，十字型マイクロ流路内で，主滴と同時にサテライト滴が生成される様子が確認できる．このときの連続相流量（Q_c）は，3.0 ml/h，分散相流量（Q_d）は，0.05 ml/h であり，液滴生成速度は約 110 個/s であった．主滴が生成される際に，レイリー不安定により，細い液柱から様々な大きさのサテライト滴が生成された．生成された主滴とサテライト滴のサイズ測定結果を図 2. 13b に示す．主滴の平均直径±標準偏差は，59.5±2.0 μm であり，変動係数（CV）は 3.4%であった．一方，サテライト滴は，サイズが大きい順に S1（24.0±1.0 μm），S2（13.8±0.9 μm），S3（7.9±0.6 μm），S4（3.4±1.1 μm）の 4 つに分類された．

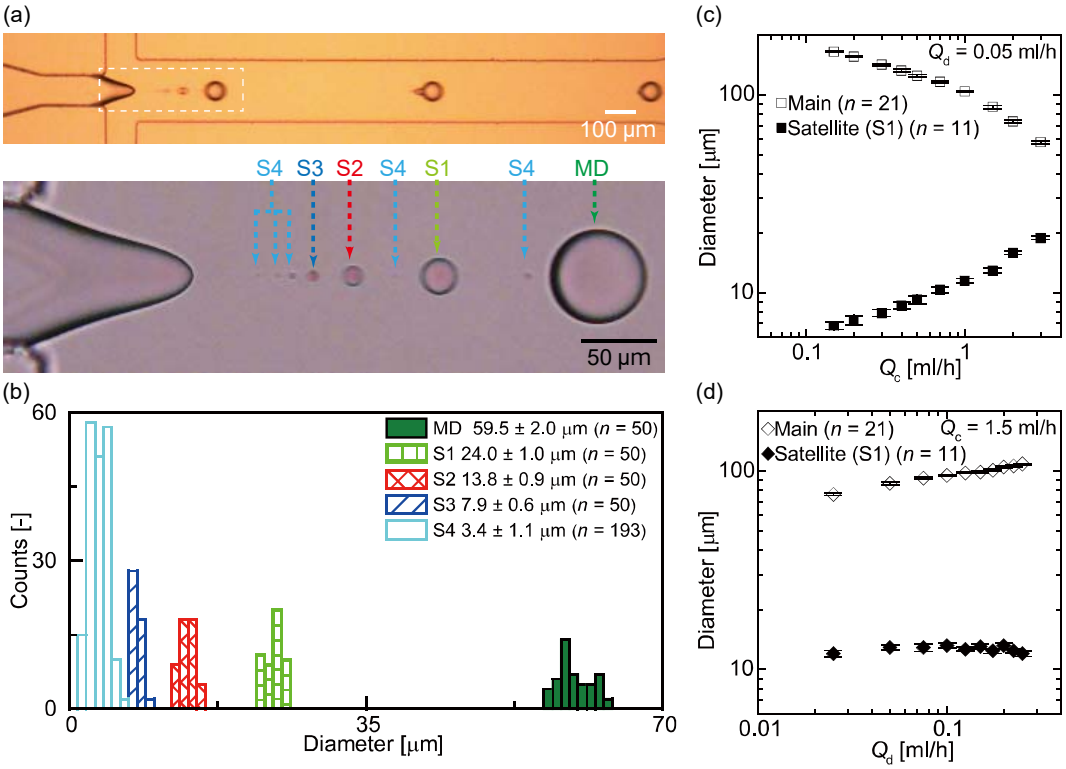

図 2. 13 主滴とサテライト滴の生成の様子．（a）液滴生成の顕微鏡写真．白い点線は，拡大部分を表している．（b）主滴とサテライト滴のサイズ分布．（c）連続相（Q_c）を変化させた際の主滴とサテライト滴の直径変化．分散相（Q_d）は 0.05 ml/h に固定．（d）Q_d を変化させた際の主滴とサテライト滴の直径変化．Q_c は 1.5 ml/h に固定．

2.4.1.2 流量と生成液滴サイズの関係

単分散液滴の生成可能流量範囲を図 2. 14 に示す．液滴生成可能流量範囲は山型領域で表されることがこれまでの研究で報告されており [32]，本実験でも，同様に，液滴生成可能範囲が山型領域で表されることが確認された．また，流量変化に伴い，液滴の生成状態が変化する様子も確認された（図 2. 14）．Q_d を 0.05 ml/h に固定し，Q_c を 0.15–3.0 ml/h の範囲で変化させた場合，主滴の直径が 57–164 μm，サテライト滴の直径が 7–19 μm の範囲で変化した（図 2. 13c）．一方，Q_c を 1.5 ml/h に固定し，Q_d を 0.025–0.25 ml/h の範囲で変化させた場合，主滴の直径が 76–109 μm，サテライト滴の直径が 12–13 μm の範囲で変化した（図 2. 13d）．

以上の結果に基づき，表 2. 1 に示した DLD 流路のパラメータを決定した．Device-1 と Device-2 では，流量が Q_c = 3.0 ml/h，Q_d = 0.05 ml/h の場合に生成される主滴とサテライト滴の直径の間に D_c 設定し，Device-3 も同様に，主滴とサテライト滴およびサイズの異なるサテライト滴（S1–S4）の直径の間に区間

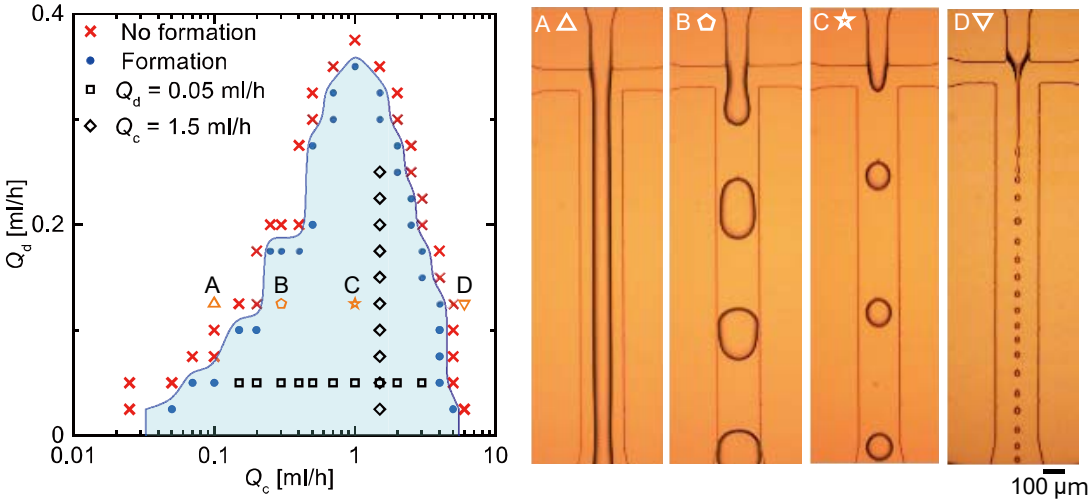

図 2. 14 流量と単分散液滴生成可能範囲の関係．横軸は連続相流量 Q_c．縦軸は分散相流量 Q_d. 赤いバツ印は，多分散液滴が生成される流量，青い丸印は，単分散液滴が生成される流量を表している．青い実線は，液滴生成状態が変化する境界条件を表す．中抜きの三角形，丸，星，逆三角形はそれぞれ異なる液滴生成状態を表している．また，中抜きの四角形，ひし形は，主滴とサテライト滴の直径を測定した際の流量条件を表している（図 2. 13cd）．

（Region1–3）ごとの D_c を設定した．

2.4.2 1 段階 DLD による主滴とサテライト滴の分離

2.4.2.1 Device-1A による主滴とサテライト滴の生成と分離

・主滴とサテライト滴の生成

まず，Device-1A で生成される W/O エマルション滴の主滴とサテライト滴のサイズの測定を行った．上述した十字型マイクロ流路での液滴生成実験と同流量（Q_c = 3.0 ml/h，Q_d = 0.05 ml/h）に設定した際，主滴とサテライト滴が同様に生成される様子が観察された（図 2. 15）．

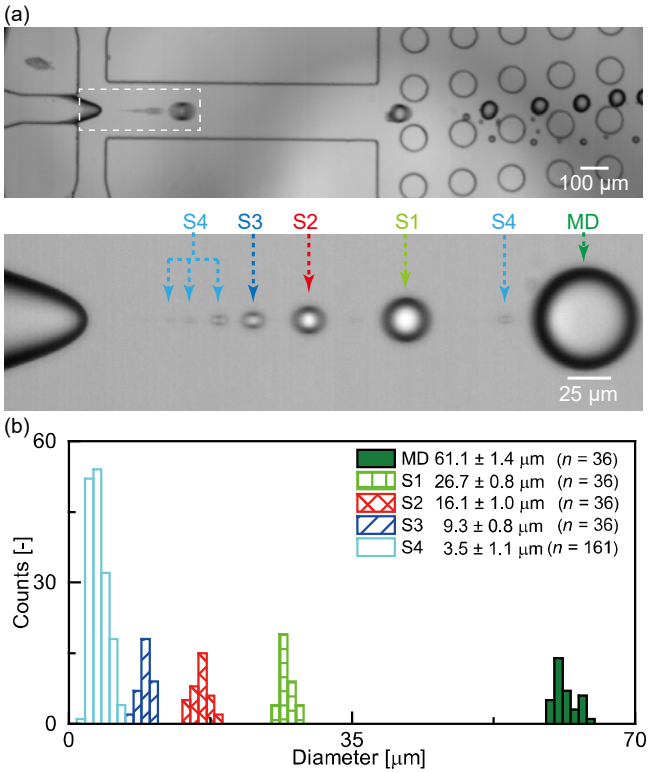

図 2. 15　(a) W/O 液滴生成の様子．白い点線の矩形領域は，拡大部分を示す．(b) 液滴サイズ分布．Q_c = 3.0 ml/h，Q_d = 0.05 ml/h，液滴生成速度~110 個/s.

・DLD 流路内での主滴とサテライト滴分離

Q_c = 3.0 ml/h，Q_d = 0.05 ml/h の時，生成された主滴とサテライト滴は，ドレイン流路中央の位置を維持した状態で流れ，下流に接続された DLD 流路へと流入する様子が観察された．DLD 流路の中央から流入した主滴とサテライト滴のうち，主滴は DLD 支柱配列の傾きに沿って displacement mode の軌道で流路壁面近傍へと移動し，outlet-M から回収された．一方で，サテライト滴は，流れ方向に zigzag mode の軌道で移動し，outlet-S から回収された（図 2. 16）．また，DLD 支柱間にて生じるせん断力によって主滴が変形し，有効直径が僅かに小さくなったが，主滴は D_c よりも大きく displacement mode の軌道を維持して流れた．せん断力による液滴の分裂は観察されなかった．

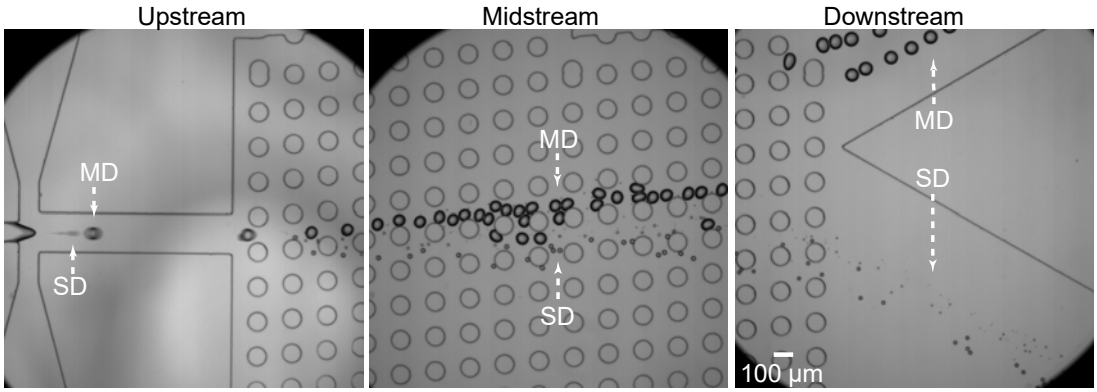

図 2. 16 主滴とサテライト滴の分離．　Q_c = 3.0 ml/h，Q_d = 0.05 ml/h

・回収液滴の評価

各 outlet から回収された液滴の観察結果を図 2. 17 に示す．outlet-M に回収された液滴直径は，54–67 μm の範囲に分布（平均直径：60.9 μm，CV=4.8%）しており（図 2. 17a），液滴生成部での主滴直径（図 2. 15b）に対応していた．一方で，outlet-S に回収された液滴を観察すると，少なくとも 3 つに分類され，それぞれの直径は，23.0±0.8 μm，12.4±0.7 μm，6.6±1.3 μm であり（図 2. 17b），液滴生成部での S1，S2，S3/S4 のサイズに対応していた．以上の結果より，主滴とサテライト滴を 100%の純度，回収効率で分離可能であることが確認された．

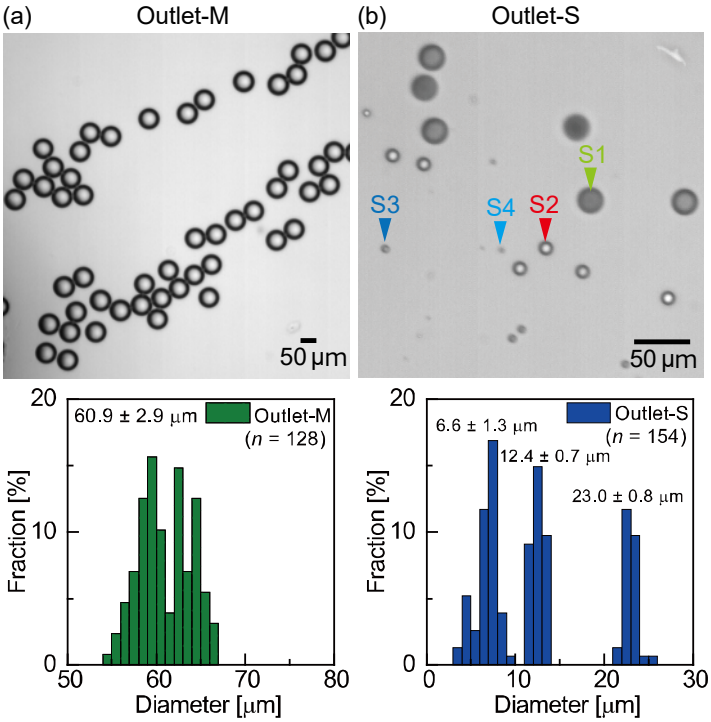

図 2. 17（a）outlet-M と（b）outlet-S に回収された液滴の顕微鏡写真および液滴サイズの分布．Q_c = 3.0 ml/h，Q_d = 0.05 ml/h

2.4.2.2 分離可能な流量範囲の検討

次に，DLD 流路で主滴とサテライト滴を分離可能な流量範囲を検討した．図 2. 18 に主滴とサテライト滴を分離可能な流量範囲を示す．緑色の領域内の星印は主滴とサテライト滴を完全に分離可能な流量範囲を表しており，一方で，分離できない領域は，条件別に以下の（1）～（3）の 3 つに分類された．ここで（1）と（3）は設計段階で分離を意図していなかった領域，（2）は分離を意図していた領域を表している．

（1）赤色の斜線部で示した領域

生成される主滴の大きさが DLD の支柱間の隙間よりも大きく，主滴が DLD 支柱によって分裂する様子が観察された（図 2. 18，挿入写真 A）．

（2）橙色の横線部で示した領域

生成される主滴の直径は D_c よりも大きいが，すべての主滴が outlet-M に回収されなかった．この流量範囲では，Q_d と Q_c の流量比が大きいため DLD 流路接

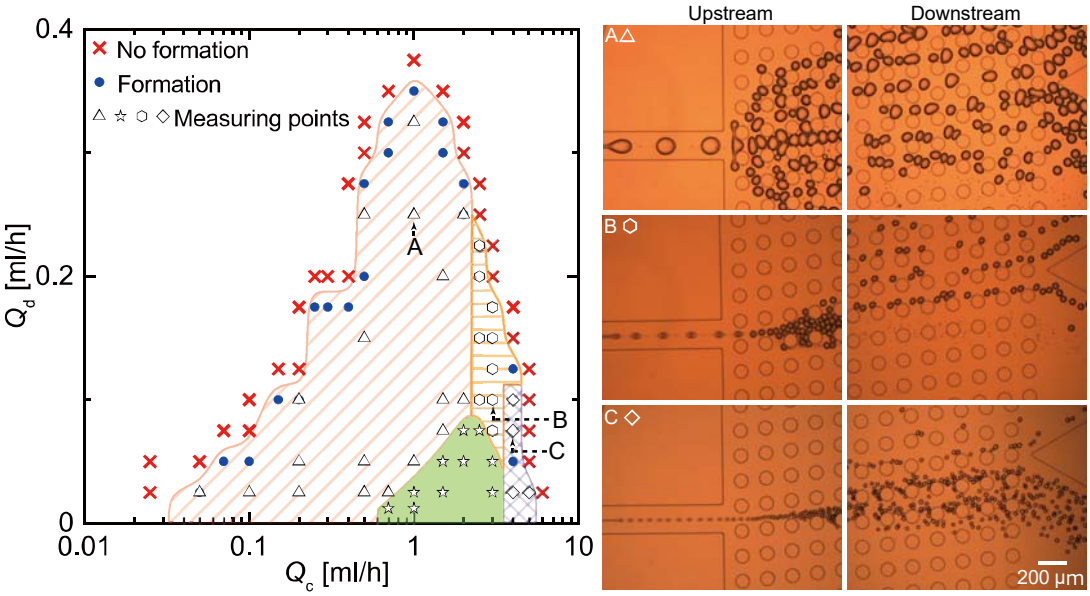

図 2. 18 主滴とサテライト滴の分離可否流量範囲．緑色の領域内にある中抜きの星印は，主滴とサテライト滴を分離可能な流量範囲．3 種類の網掛け領域は，主滴とサテライト滴を分離できない流量範囲．赤色の斜線領域内の中抜きの三角印は，主滴が DLD の支柱によって分裂する流量範囲（挿入写真 A）．橙色の横線領域の中抜き丸印は，上流部で主滴の分布が広がり，全ての主滴が outlet-M に回収できない流量範囲（挿入写真 B）．紫色の格子領域内のひし形印は，生成される主滴が D_c よりも小さくなり zigzag mode の軌道をとるため分離できない流量範囲（挿入写真 C）．

続部近傍にて，主滴同士の不規則な衝突が生じ [33]，主滴の分布が広がる様子が観察された．その後，主滴は displacement mode の軌道で DLD 流路を移動したが, 一部の主滴は移動量が十分ではなく, outlet-M に回収されなかった（図 2. 18, 挿入写真 B）.

（3）紫色の格子で示した領域

生成される主滴の直径（~25.1±0.9 μm，Q_c = 4.0 ml/h，Q_d = 0.075 ml/h）が D_c（=37.1 μm）よりも小さく，主滴が zigzag mode の軌道で DLD 流路内を流れることで，outlet-M から回収されない様子が確認された（図 2. 18，挿入写真 C）.

以下で，分離可能領域を拡大する方法について考察する.

（1）赤色の斜線部で示した領域を小さくする方法

主滴の分裂を抑制し, 赤色の斜線部の領域を小さくする方法として以下の 2 つが考えられる.

1 つ目は，D_c を維持した状態で，DLD の支柱間の隙間を大きくし，主滴の分裂を抑制する方法である．D_c を決定する変数は，式（1-16）に表されるように，DLD の支柱間の隙間（d）と移動率（ε）である．そのため，図 2. 19 に示すように，移動率を小さくすることで，D_c を維持した状態で支柱間の隙間を大きくすることが可能である.

2 つ目は, D_c の変数ではない, DLD 流路の高さを大きくする方法である．DLD 流路の高さよりも大きい主滴は, 流路内で変形しているが, 流路高さを大きくすることで，球形へと戻る．結果として，支柱間の隙間よりも液滴が小さくなり，

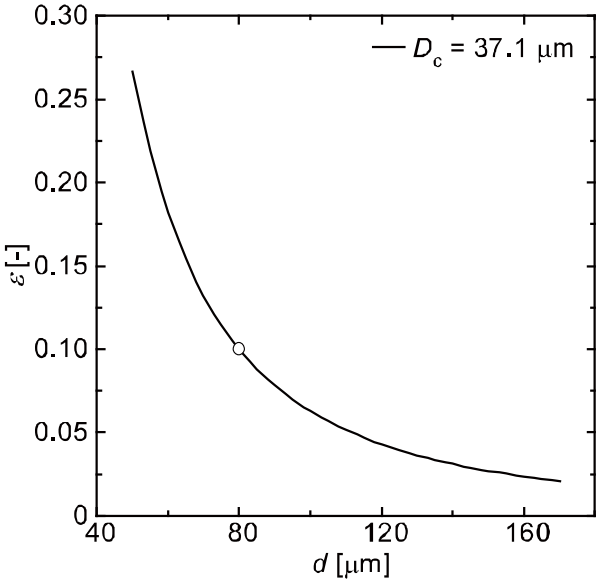

図 2. 19 支柱間の隙間（d）と移動率（ε）の関係（D_c = 37.1 μm）.

分裂の抑制が期待される．

（2）橙色の斜線部で示した領域を小さくする方法

橙色の斜線部の領域を小さくする方法として以下の 2 つが考えられる．

1 つ目は，DLD 流路をより長くすることによって，全ての主滴を流路壁面近傍まで移動させ，outlet-M から回収する方法である．

2 つ目は，DLD 流路に連続相を追加で導入することによって，DLD 流路接続部での主滴同士の衝突に伴う DLD 流路幅方向への分布拡大を抑制し，全ての主滴を outlet-M から回収する方法である．

2.4.2.3 Device-1B と Device-2 による主滴とサテライト滴分離

上述した W/O 液滴の分離に限らず，単相および二相性 O/W 液滴の分離の可否を検証するために，流路表面を親水性に改質した Device-1B と Device-2 を用いた主滴とサテライト滴の分離試験を実施した．

・O/W エマルション滴の生成と DLD 流路による主滴とサテライト滴分離

$Q_c = 20.0$ ml/h，$Q_d = 0.1$ ml/h での，液滴生成の様子を図 2. 20a に示す．O/W 液滴が規則正しく繰り返し生成され，生成速度は約 214 個/s であった．また，主滴の直径は，59.7±0.9 μm，サテライト滴の直径は，2 つに分類され，それぞれ

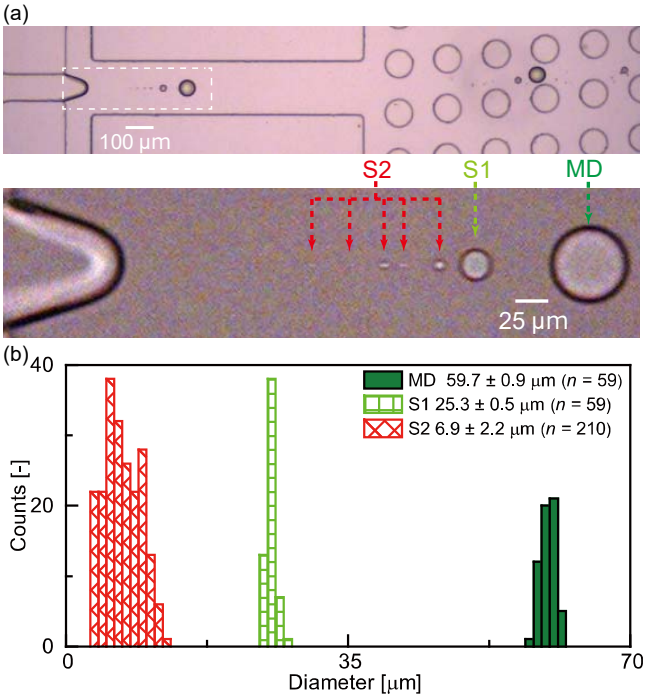

図 2. 20（a）O/W 液滴生成の様子．白い点線の矩形領域は，拡大部分を表している．撮影速度：37500 fps．$Q_c = 20.0$ ml/h，$Q_d = 0.1$ ml/h，液滴生成速度~214 個/s．（b）液滴サイズ分布．

25.3±0.5 μm と 6.9±2.2 μm であった（図 2. 20b）.

生成された主滴とサテライト滴は，DLD 流路内で Device-1A と同様に分離される様子が確認された（図 2. 21a）. outlet-M に回収された液滴の大きさは，59.0±2.0 μm，outlet-S に回収された液滴の大きさは，2 つに分類され，それぞれ 23.8±0.8 μm と 7.0±2.2 μm であった（図 2. 21bc）. 各 outlet に回収された液滴は，液滴生成部で生成された主滴とサテライト滴の大きさに概ね一致しており，主滴とサテライト滴を 100%の純度，回収効率で分離可能であった.

・O/W 液滴の重合処理による粒子生成

各 outlet に分離・回収された O/W 液滴に紫外線を照射することで，液滴を重合処理し，粒子を生成した. 各 outlet から回収された O/W 液滴と，重合処理後の粒子の様子およびその粒径分布を図 2. 22 に示す. outlet-M に回収された液滴から生成した粒子の直径は，57.6±2.9 μm（CV=5.0%）であった. また，outlet-S に回収された液滴から生成した粒子の大きさは 2 つに分類され，それぞれ，22.6±1.4 μm と 5.6±2.0 μm であった. 以上のように，サテライト滴が除去された単分散な粒子を生成することが可能であることも確認できた.

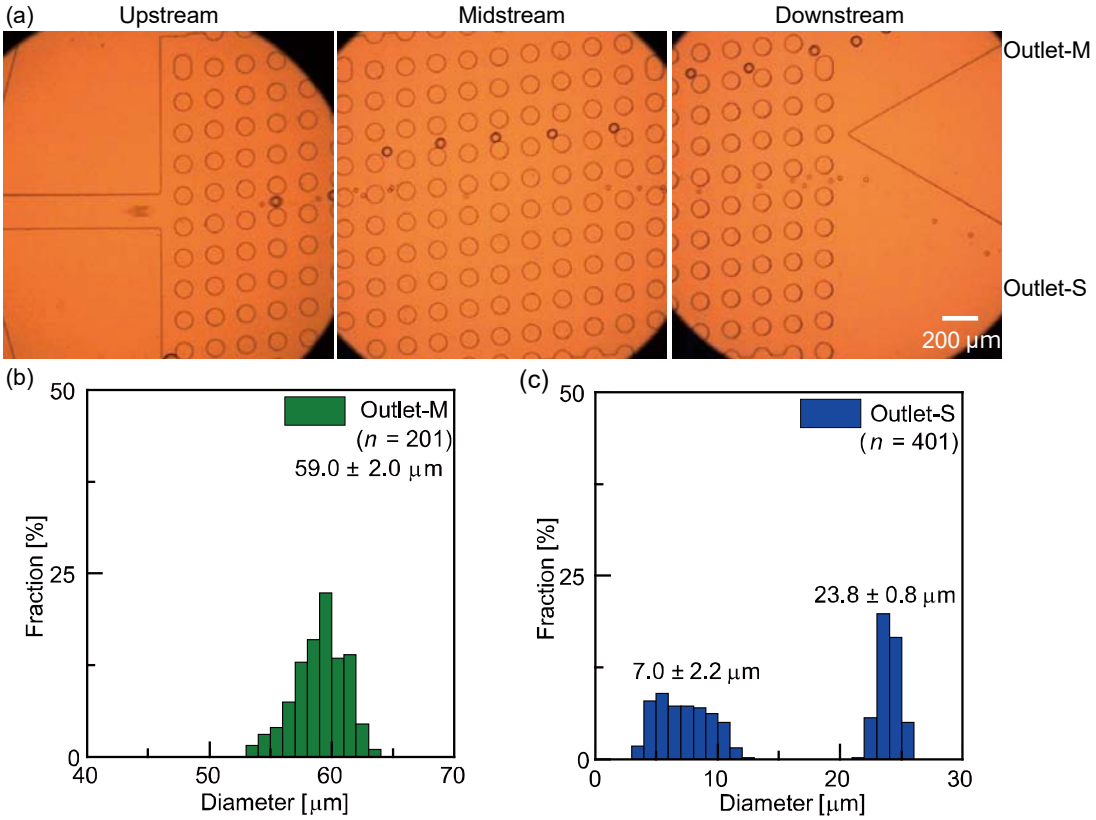

図 2. 21　（a）O/W 液滴の主滴とサテライト滴の分離. 撮影速度：5000 fps. Q_c = 20.0 ml/h，Q_d = 0.1 ml/h.（b, c）各 outlet に回収された液滴サイズの分布.

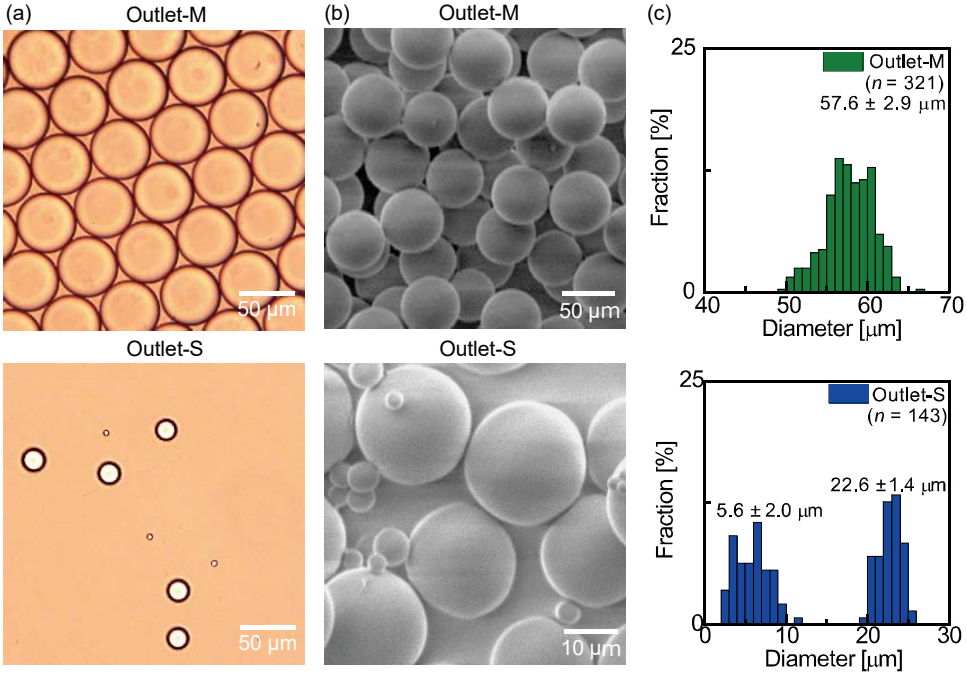

図 2. 22　(a) 各 outlet から回収された O/W 液滴の顕微鏡写真．(b) O/W 液滴の重合処理により生成された粒子の電子顕微鏡画像．(c) 粒子サイズ分布．

・二相性 O/W エマルション滴の生成と主滴とサテライト滴分離

次に，Device-2 を用いて，二相性の O/W 液滴（Janus [32]，コアシェル液滴 [34]）においても同様に主滴とサテライト滴の分離が可能か検証した．分散相として，互いに混じり合わないアクリルモノマーとシリコーンオイル（10cSt）を用い，連続相として SDS 水溶液を用いることで Janus 液滴の分離を行った（図 2. 23，図 2. 24）．また，連続相として SDS 水溶液の代わりに，PVA 水溶液を用いることで，コアシェル液滴の分離も行った（図 2. 25，図 2. 26）．図 2. 23～図 2. 26 に示すように，二相性の液滴の場合においても，主滴とサテライト滴を DLD 流路で分離可能であることが確認できた．

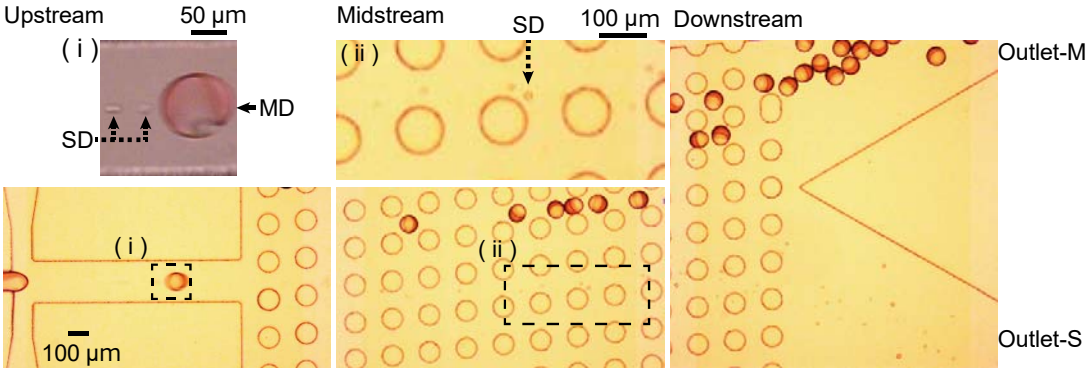

図 2. 23 Janus 液滴の分離．分散相の流量（モノマーQ_m，シリコーンオイル Q_s）は，$Q_m = Q_s = 0.1$ ml/h，$Q_c = 15.0$ ml/h．黒い点線領域は，拡大部分を表す．

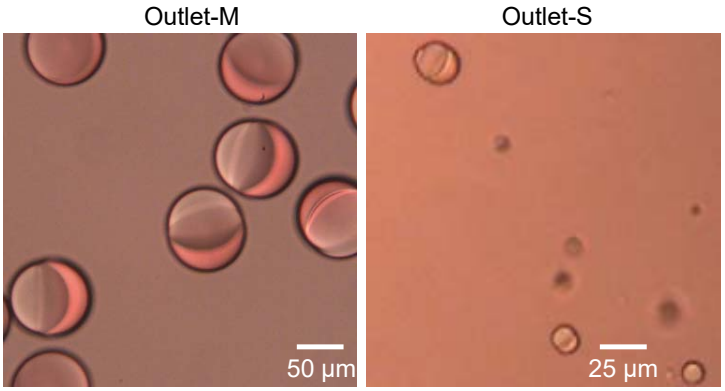

図 2. 24　各 outlet から回収された Janus 液滴の様子.

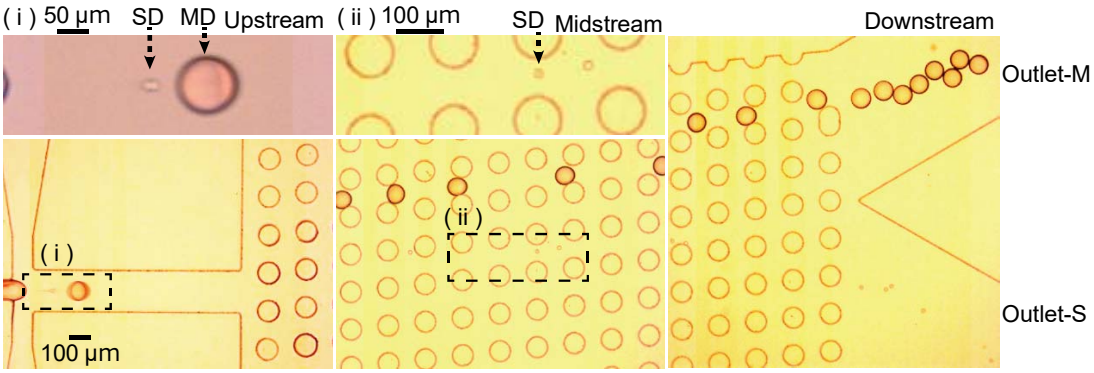

図 2. 25　コアシェル液滴の分離.，$Q_m = Q_s = 0.05$ ml/h，$Q_c = 15.0$ ml/h．黒い点線の矩形領域は，拡大部分を表す.

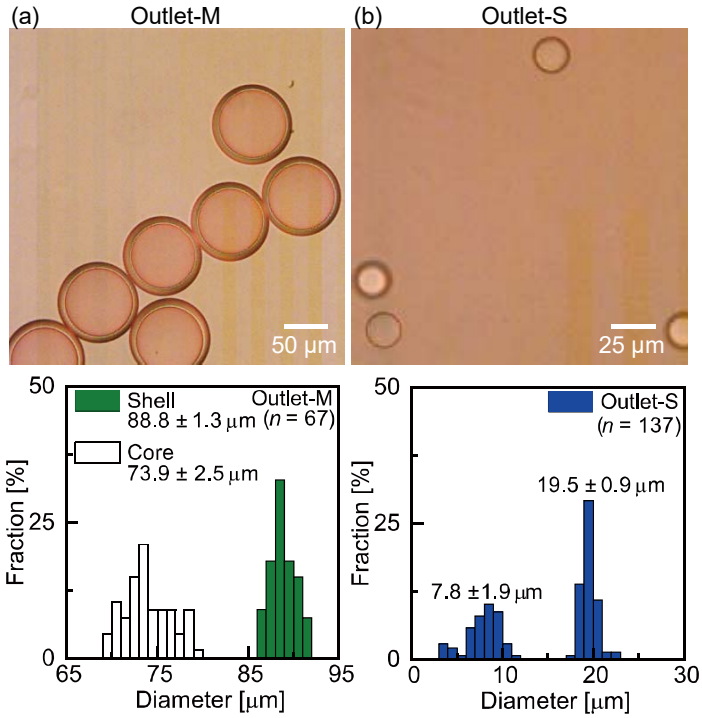

図 2. 26　（a）各 outlet から回収されたコアシェル液滴．（b）サイズ分布.

2.4.2.4 液滴生成位置の分離への影響

次に，液滴生成位置が DLD 流路内での主滴とサテライト滴の分離に与える影響について検討を行った．

・T 字型マイクロ流路による液滴生成と DLD 分離への影響

本実験では，Device-1A の分散相と連続相の導入位置を入れ替え， 2 つの T 字型流路が DLD 流路前段に配置された状態とした．T 字型マイクロ流路での液滴生成の場合，主滴とサテライト滴がドレイン流路の壁面近傍で生成され，主滴はサテライト滴よりも流路中央付近に位置していた（図 2. 27a）．また，液滴が DLD 流路へと導入される際，接続部の流路幅拡大に伴う流線の広がり（図 2. 28）によって，液滴が DLD 流路中央からではなく壁面付近から導入される様子が確認された（図 2. 27a）．その後，主滴は支柱配列の傾きに沿って displacement mode の軌道で流れ，サテライト滴は流れに沿って zigzag mode の軌道で流れる様子が観察された（図 2. 27b）．以上の結果より，T 字型マイクロ流路に DLD 流路を接続した場合，主滴とサテライト滴を分離できないことが確認された．

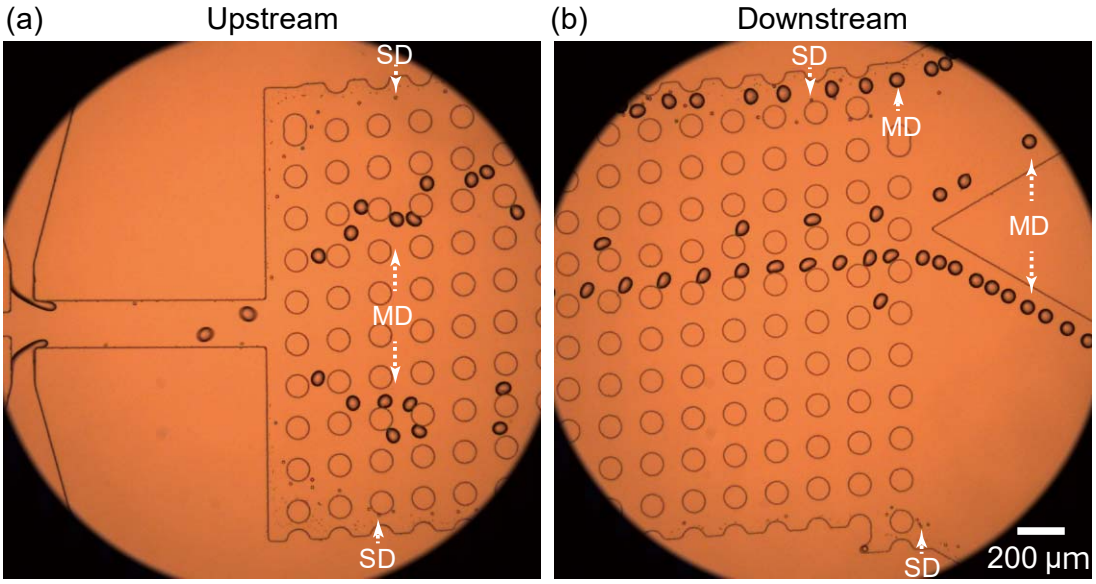

図 2. 27 T 字型マイクロ流路での液滴生成および主滴とサテライト滴が DLD 流路内を流れる様子．Q_c = 3.0 ml/h，Q_d = 0.1 ml/h.

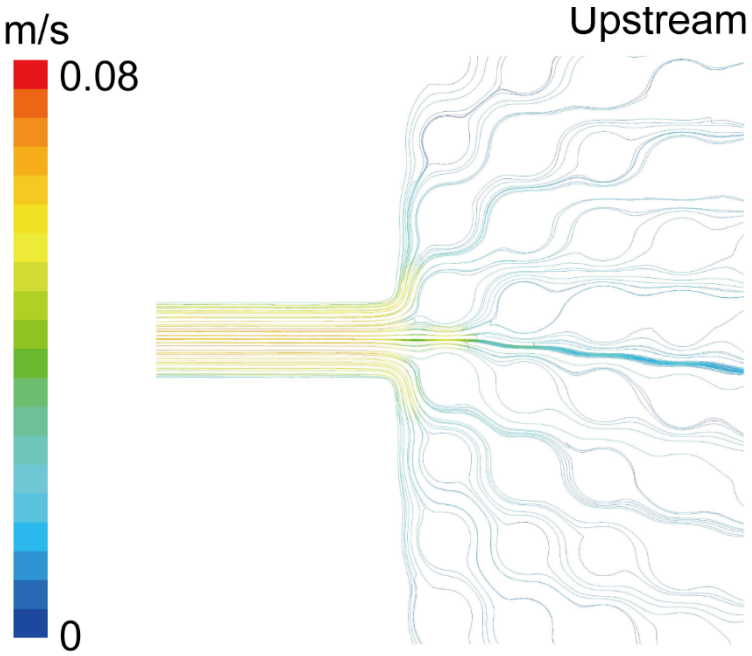

図 2. 28 シミュレーション結果．実線は，ドレイン流路から DLD 流路への流線を表している．2 つの入口から導入する液体は水とし，流量は 0.05 ml/h と 3.0 ml/h とした．シミュレーションソフトには ANSYS Fluent を使用．

・ドレイン流路幅による液滴分離への影響

次に, 十字型マイクロ流路のドレイン流路幅が Device-1A よりも狭い（100 μm）デバイス（図 2. 29a）を用いて，液滴分離実験を行った．なお，ドレイン流路幅以外のデバイス形状と寸法はすべて Device-1A と同じである．

Q_c = 1.0 ml/h，Q_d = 0.05 ml/h に流量を設定すると，主滴（61.3 μm）とサテライト滴が規則正しく繰り返し生成される様子が観察された．主滴とサテライト滴がドレイン流路中央に生成された後，主滴はドレイン流路中央の位置を維持した状態で流れていたが, サテライト滴は壁面近傍へと移動し, 主滴とサテライト滴は異なる位置から DLD 流路へと流入した（図 2. 29b）．その後，主滴とサテライト滴は, DLD 流路内を異なる軌道で流れたが, 分離されなかった（図 2. 29c）．

ドレイン流路内で，サテライト滴が壁面近傍へと移動したのは，2 つの主滴によって挟まれる区間で生じる対流によるものだと考えられる．以上の結果より，DLD 流路で主滴とサテライト滴を分離するためには，サテライト滴がドレイン流路中央に沿って流れる必要があることが明らかとなった．

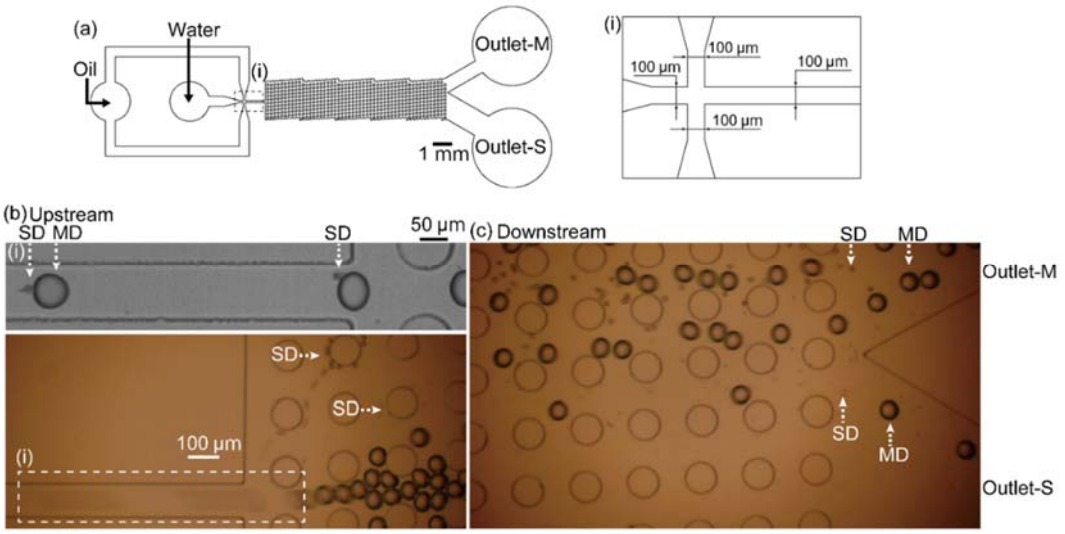

図 2. 29 ドレイン流路幅が液滴分離に与える影響．（a）Device-1A のドレイン流路幅を 100 μm に変更したデバイス．（b，c）主滴とサテライト滴が DLD 流路内を流れる様子．Q_c = 1.0 ml/h，Q_d = 0.05 ml/h．白い点線の矩形領域は，拡大部分を示す．

2.4.3 3 段階 DLD による主滴およびサテライト滴のサイズ別分離

上述した主滴とサテライト滴の分離に限らず，サテライト滴をサイズ別に，連続的に分級することで，単分散液滴の複数同時生成が可能か検証した．

・Device-3 による W/O エマルション滴の生成

まず，3 つの異なる D_c を有する DLD デバイス（Device-3，図 2. 12）による液滴生成の様子を確認した．Q_c = 3.0 ml/h，Q_d = 0.05 ml/h に設定した際，主滴とサテライト滴が規則正しく繰り返し生成される様子が観察され（図 2. 30a），液滴生成速度は 70 個/s であった．生成された主滴の直径は，71.5±1.6 μm，サテライト滴の直径は，4 つ（S1–S4）に分類され，それぞれ 22.5±0.4 μm，11.4±0.4 μm，6.3±0.3 μm，3.0±0.9 μm であった（図 2. 30b）．

・3 段階 DLD 流路による主滴およびサテライト滴のサイズ別分級

次に，DLD 流路における液滴分離の様子を観察した．生成された主滴とサテライト滴は，ドレイン流路中央に沿って流れ，DLD 流路の区間 1（D_c = 37.1 μm）に導入された後，主滴は流路壁面方向へと displacement mode の軌道で移動し，outlet-M へと回収された（図 2. 31a）．一方，サテライト滴は，zigzag mode の軌道で移動し，DLD の区間 2 へと導入された（図 2. 31a）．DLD 区間 2（D_c = 11.6 μm）では，一番大きいサテライト滴（S1）が displacement mode の軌道で流れた後，outlet-S1 から回収され，その他の小さいサテライト滴（S2～S4）は zigzag

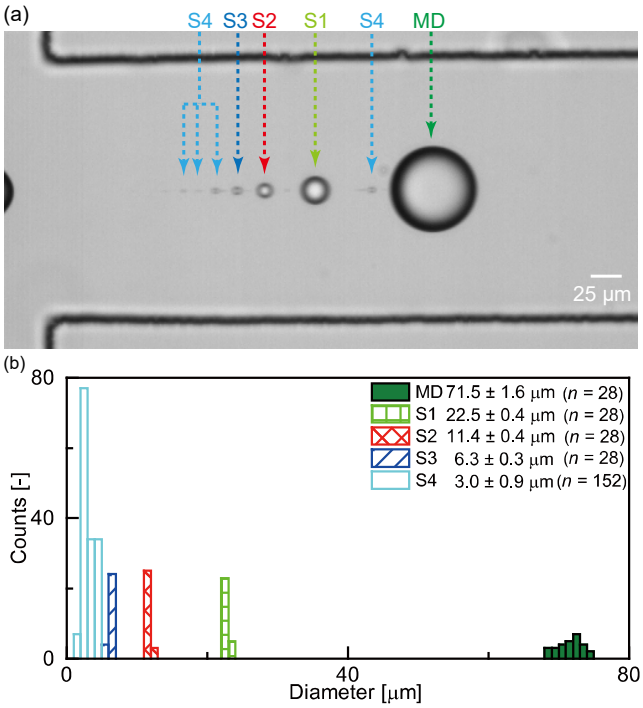

図 2. 30　(a) Device-3 での W/O 液滴生成の様子．(b) 主滴とサテライト滴のサイズ分布．Q_c = 3.0 ml/h，Q_d = 0.05 ml/h，液滴生成速度~70 個/s.

mode の軌道で移動し，DLD の区間 3 へと導入された（図 2. 31b）．DLD 区間 3（D_c = 7.0 μm）では，二番目に大きいサテライト滴（S2）が displacement mode の軌道で流れた後，outlet-S2 から回収され，その他の小さいサテライト滴（S3, S4）は zigzag mode の軌道で流れた後，outlet-S3,4 から回収された（図 2. 31c）．各 DLD の区間 1～3 にて，主滴およびサテライト滴（S1~S4）は D_c の境界に従い，displacement mode と zigzag mode の軌道で流れる様子が確認された．

・回収液滴の評価

各 outlet から回収された液滴の様子とサイズ分布を図 2. 32 に示す．outlet-M から回収された液滴直径は，72.6±2.4 μm（CV=3.3%）であり，液滴生成部で生成された主滴の直径と一致している．この結果より，主滴とサテライト滴を 100% の純度と回収効率で分離可能であることが確認された．一方で，outlet-S1，outlet-S2, outlet-S3 から回収された液滴直径を測定したところ，それぞれ 21.4±0.6 μm，10.1±0.5 μm，4.9±0.9 μm であり，各 outlet から回収されたサテライト滴は液滴生成部で生成されたサテライト滴 S1，S2，S3/S4 に一致している．この結果より，サテライト S1 と S2 は他の小さいサテライト滴（S3，S4）から 100%の純度と回収効率で分離可能であることが確認された．

このように，主滴とサテライト滴の分離に限らず，サテライト滴をサイズ別に，分級でき，単分散液滴の複数サイズ同時生成が可能であることが実証された．

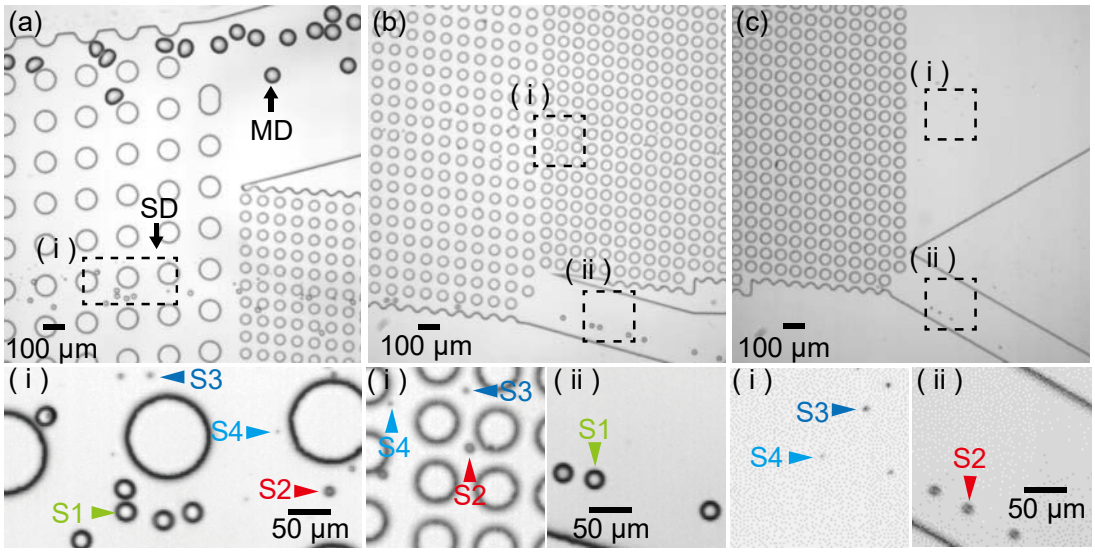

図 2. 31 3 段階 DLD 流路による主滴とサテライト滴の分離．（a）区間 1 における主滴とサテライト滴の分離．（b）区間 2 におけるサテライト滴（S1）とサテライト滴（S2～S4）の分離（c）区間 3 におけるサテライト滴（S2）とサテライト滴（S3，S4）の分離．黒い点線の矩形領域は，拡大部分を表す．Q_c = 3.0 ml/h，Q_d = 0.05 ml/h.

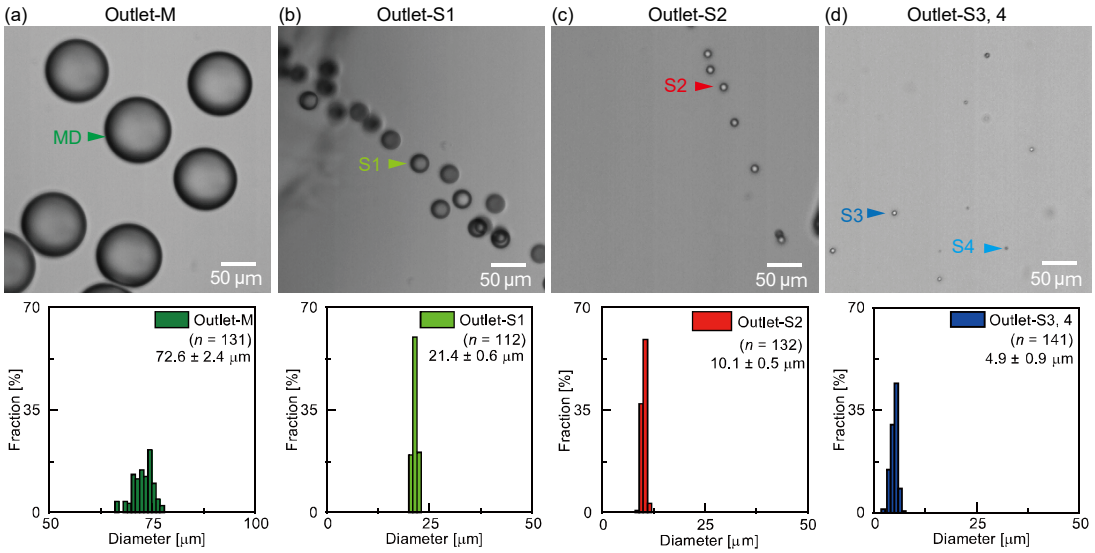

図 2. 32 各 outlet から回収された液滴の顕微鏡写真とサイズ分布.

2.5 まとめ

第 2 章では，対称流れ場の中で生成される主滴とサテライト滴を分離可能な DLD デバイスを提案した．以下に，各節の内容について総括する．

2.1 の「序論」では， マイクロ流路を用いて液滴を生成する際に，主滴と共に副産物として生じるサテライト滴の弊害について述べ，これまで提案されている主滴とサテライト滴の分離デバイスについて紹介した．その上で，対称流れ場の中で生成される主滴とサテライト滴の分離，サテライト滴のサイズ別分離は未だ実現されていないことに言及し，本研究での目的の所在を明らかにした．

2.2 の「デバイス設計」では，液滴生成部である十字型マイクロ流路の下流に DLD 流路が配置されたデバイスの設計について述べた．

2.3 の「実験」では，デバイスの作製方法，流路表面の親水化処理方法，液滴生成に用いた材料，生成液滴の重合方法，実験装置の詳細について述べた．

2.4 の「結果と考察」では，2.4.1「生成液滴サイズ測定による DLD パラメータの選定」，2.4.2「1 段階 DLD による主滴とサテライト滴の分離」，2.4.3「3 段階 DLD による主滴およびサテライト滴のサイズ別分離」についての結果と考察を述べた．以下，各項ごとに総括する．

2.4.1 の「生成液滴サイズ測定による DLD パラメータの選定」では，十字型マイクロ流路による液滴生成試験を行い，連続相と分散相流量を変化させた際に生成される液滴サイズの測定および液滴生成可能流量範囲について検討した．

2.4.2 の「1 段階 DLD による主滴とサテライト滴の分離」では，まず，生成された W/O 液滴の主滴とサテライト滴が DLD 流路で 100%の回収効率および純度で分離可能であることを確認した．また，主滴とサテライト滴を分離可能な流量範囲を検討し，分離可能領域を拡大する方法についても考察した．次に，O/W 単相液滴および二相性液滴も同様に分離可能であることを確認した．最後に，DLD 流路に液滴が流入する際の位置が分離に影響することを確認した．

2.4.3 の「3 段階 DLD による主滴およびサテライト滴のサイズ別分離」では，3 つの異なる分離直径が直列に配置された DLD 流路を用いて，主滴とサテライト滴およびサテライト滴をサイズ別に分離できることを確認した．

2.6 参考文献

[1] Y.-Q. Fan, M. Wang, F. Gao, J. Zhuang, G. Tang, and Y.-J. Zhang, Chinese J. Anal. Chem. **44**, 1300 (2016).

[2] BIO-RADウェブサイト, http//www.bio-rad.com/ja-jp/product/qx200-droplet-digital-pcr-system?ID=MPOQQE4VY (Accessed June 2018).

[3] A. Rakszewska, J. Tel, V. Chokkalingam, and W. T. Huck, NPG Asia Mater. **6**, e133 (2014).

[4] D. J. Collins, A. Neild, A. DeMello, A.-Q. Liu, and Y. Ai, Lab Chip **15**, 3439 (2015).

[5] A. K. Price and B. M. Paegel, Anal. Chem. **88**, 339 (2016).

[6] N. Shembekar, C. Chaipan, R. Utharala, and C. A. Merten, Lab Chip **16**, 1314 (2016).

[7] T. S. Kaminski, O. Scheler, and P. Garstecki, Lab Chip **16**, 2168 (2016).

[8] D. Dendukuri and P. S. Doyle, Adv. Mater. **21**, 4071 (2009).

[9] J. H. Kim, T. Y. Jeon, T. M. Choi, T. S. Shim, S. H. Kim, and S. M. Yang, Langmuir **30**, 1473 (2014).

[10] K. D. Seo, D. S. Kim, and S. Sánchez, Lab Chip **15**, 3622 (2015).

[11] T. Nisisako, Curr. Opin. Colloid Interface Sci. **25**, 1 (2016).

[12] S.-Y. Teh, R. Lin, L.-H. Hung, and A. P. Lee, Lab Chip **8**, 198 (2008).

[13] S. Middleman, Acad. Press. Sn Diego (1995).

[14] D. de Gennes, Pierre-Gilles, Brochard-Wyart, Francoise, Quere, Springer, New York (2004).

[15] H.-D. Xi, H. Zheng, W. Guo, A. M. Gañán-Calvo, Y. Ai, C.-W. Tsao, J. Zhou, W. Li, Y. Huang, N.-T. Nguyen, and S. H. Tan, Lab Chip **17**, 751 (2017).

[16] S.-H. Hung, Y.-H. Lin, and G.-B. Lee, J. Micromech. Microeng. **20**, 045026 (2010).

[17] T. Nisisako, T. Torii, and T. Higuchi, Proc. Micro Total Anal. Syst. 312 (2004).

[18] Y.-C. Tan, J. S. Fisher, A. I. Lee, V. Cristini, and A. P. Lee, Lab Chip **4**, 292 (2004).

[19] Y.-C. Tan, Y. L. Ho, and A. P. Lee, Microfluid. Nanofluid. **4**, 343 (2008).

[20] M. Chabert and J.-L. Viovy, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **105**, 3191 (2008).

[21] C.-H. Yang, Y.-S. Lin, K.-S. Huang, Y.-C. Huang, E.-C. Wang, J.-Y. Jhong, and C.-Y. Kuo, Lab Chip **9**, 145 (2009).

[22] K.-S. Huang, Y.-S. Lin, C.-H. Yang, C.-W. Tsai, and M.-Y. Hsu, Soft Matter **7**, 6713 (2011).

[23] H. Maenaka, M. Yamada, M. Yasuda, and M. Seki, Langmuir **24**, 4405 (2008).
[24] L. Mazutis and A. D. Griffiths, Appl. Phys. Lett. **95**, 204103 (2009).
[25] C. B. Fuh and J. C. Giddings, J. Microcolumn Sep. **9**, 205 (1997).
[26] D. Huh, J. H. Bahng, Y. Ling, H.-H. Wei, O. D. Kripfgans, J. B. Fowlkes, J. B. Grotberg, and S. Takayama, Anal. Chem. **79**, 1369 (2007).
[27] H. N. Joensson, M. Uhlén, and H. A. Svahn, Lab Chip **11**, 1305 (2011).
[28] T. Jing, R. Ramji, M. E. Warkiani, J. Han, C. T. Lim, and C.-H. Chen, Biosens. Bioelectron. **66**, 19 (2015).
[29] Y.-C. Tan and A. P. Lee, Lab Chip **5**, 1178 (2005).
[30] Y.-C. Tan, V. Cristini, and A. P. Lee, Sens. Actuator B-Chem. **114**, 350 (2006).
[31] W.-A. C. Bauer, M. Fischlechner, C. Abell, and W. T. S. Huck, Lab Chip **10**, 1814 (2010).
[32] T. Nisisako and T. Tonii, Adv. Mater. **19**, 1489 (2007).
[33] R. Vernekar and T. Krüger, Med. Eng. Phys. **37**, 845 (2015).
[34] T. Nisisako and T. Hatsuzawa, Sens. Actuator B-Chem. **223**, 209 (2016).

第3章　並列化流路による主滴とサテライト滴の分離

3.1 序論

3.1.1 はじめに

第 2 章で述べたように，マイクロ流路分岐構造による液滴生成技術は，従来の液滴生成技術とは異なり，単分散性の高いエマルション滴を生成可能であるほか，形状，化学組成などを正確に制御可能である．一方で，液滴生成時に主滴と同時に副産物として生じるサテライト滴は，生成物（主滴）の単分散性の低下や生化学分析におけるコンタミネーションを招くため，分離することが望まれる．そのため，これまでに能動的または受動的手法を用いた主滴とサテライト滴の分離デバイスがいくつか報告されており（詳細は第 2 章参照），既報の主滴とサテライト滴の分離デバイスでは，高い分離効率（～100%）が実現されている．しかしながら，すべてのデバイスにおいて，単一の液滴生成部しか組み込まれていないため，処理量は約 0.01–1.8 ml/h 程度と低い．そのため，当該手法を生産技術へと応用する場合，所要の生産量（例えば，数トン/年）を従来のデバイスで実現することは困難である．

3.1.2 液滴生成流路の並列化手法

一方で，液滴生成量を大幅に増加（スケールアップ）させ，生産技術への応用を実現するために，液滴生成マイクロ流路を多数並列配置する試みが多数報告されている [1,2]．マイクロ流路の分岐構造を用いた液滴生成では，分散相と連続相の流量によって生成液滴サイズが変化するため，並列配置されたマイクロ流路に，各液体を均等に分配することが，単分散液滴を得るために必要となる．各液体を均一に分配するために，多数並列配置された各液滴生成流路に対して個別にチューブを介して液体を導入し，生成物を回収すると膨大な数の接続ポートが必要となるため，現実的ではない．そのため，最小限の接続ポート数で，並列配置された各液滴生成流路に対して，均等に液体を供給するための手法がこれまでに報告されており（図 3. 1），以下の（1）「対称分岐構造を利用した流量分配手法」，(2)「液滴生成流路と液体供給流路の圧力損失比を利用した流量分配手法」に大別される．

（1）対称分岐構造を利用した流量分配手法

1 つ目は，液滴生成流路に対して，対称に枝分かれさせた液体分配用流路を接続する方法である [3–6]（図 3. 1a, b）．これまでに，対称分岐構造による液体分配流路を用いて，4–512 個の十字型液滴生成流路を円環状または行列状に並列化した PDMS 製 [3–5]または PMMA 製 [6]のデバイスが報告されている．

（2）圧力損失比を利用した流量分配手法

2 つ目は，液滴生成部の流路抵抗に対して，十分に抵抗が小さい液体供給流路を接続する手法である．以下に，これまでに報告されている事例について種類別に紹介する．

・リザーバ，環状スリットを用いた液体分配

円環状に 16–256 個の T 字型または Y 字型液滴生成流路が並列配置されたガラス製のチップに対して，流体抵抗が十分に小さく，着脱可能なリザーバまたは，環状スリット装置を接続するデバイスが報告されている [7,8]（図 3. 1c, d）．

・はしご状構造を用いた液体分配

液滴生成流路のサイズに比べて十分に大きいサイズの流路を液滴生成流路に対してはしご状に接続する方法が報告されている [9–14]（図 3. 1e, f）．これまでに，当該手法を用いた PDMS 製のデバイスでは，最大 1000 個 [12]（図 3. 1e），Si 製のデバイスでは，最大 10260 個 [14]（図 3. 1f）の液滴生成流路を行列状に並列化した事例が報告されている．

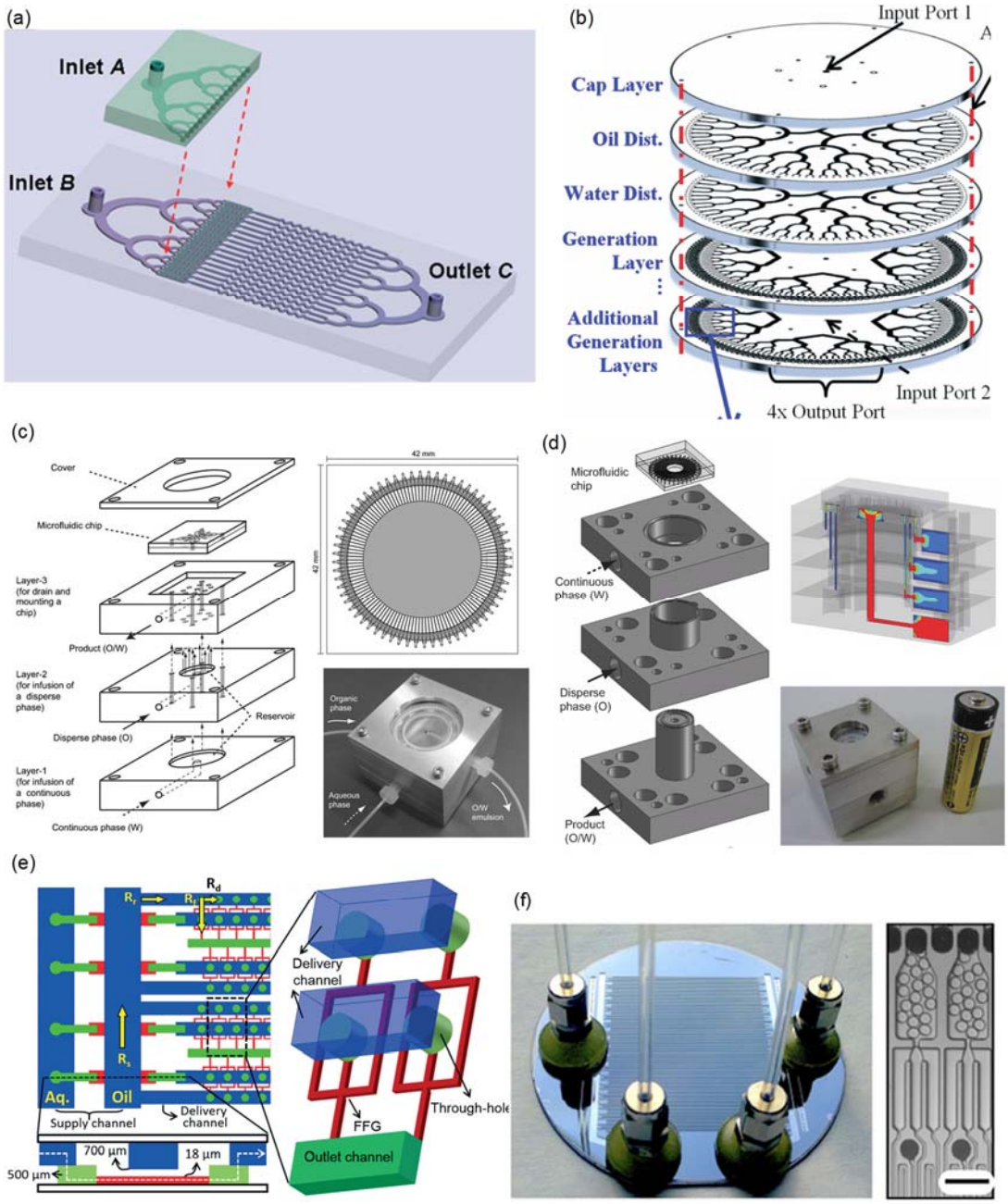

図 3. 1 液体分配手法．（a, b）対称分岐構造を用いた流量分配．（a）行列状に配列．並列数 : 16．文献 [4]より引用．（b）円環状に配列．並列数 : 512．文献 [6]より引用．（c）リザーバを用いた流量分配．並列数 : 256．文献 [7]より引用．（d）環状管を用いた流量分配．並列数 : 128．文献 [8]より引用．（e, f）はしご状構造を用いた流量分配．（e）PDMS デバイス．並列数 : 1000．文献 [12]より引用．（f）Si デバイス．並列数 : 10260．文献 [14]より引用．

3.1.3 並列化 DLD 流路デバイス

血液分離の高処理化を目的とした，並列化 DLD 流路デバイスが報告されている [15,16]．しかしながら，主滴とサテライト滴の分離の高処理化を実現するために，液滴生成流路と DLD 流路から構成されるユニットを並列配置した事例は報告されていない．

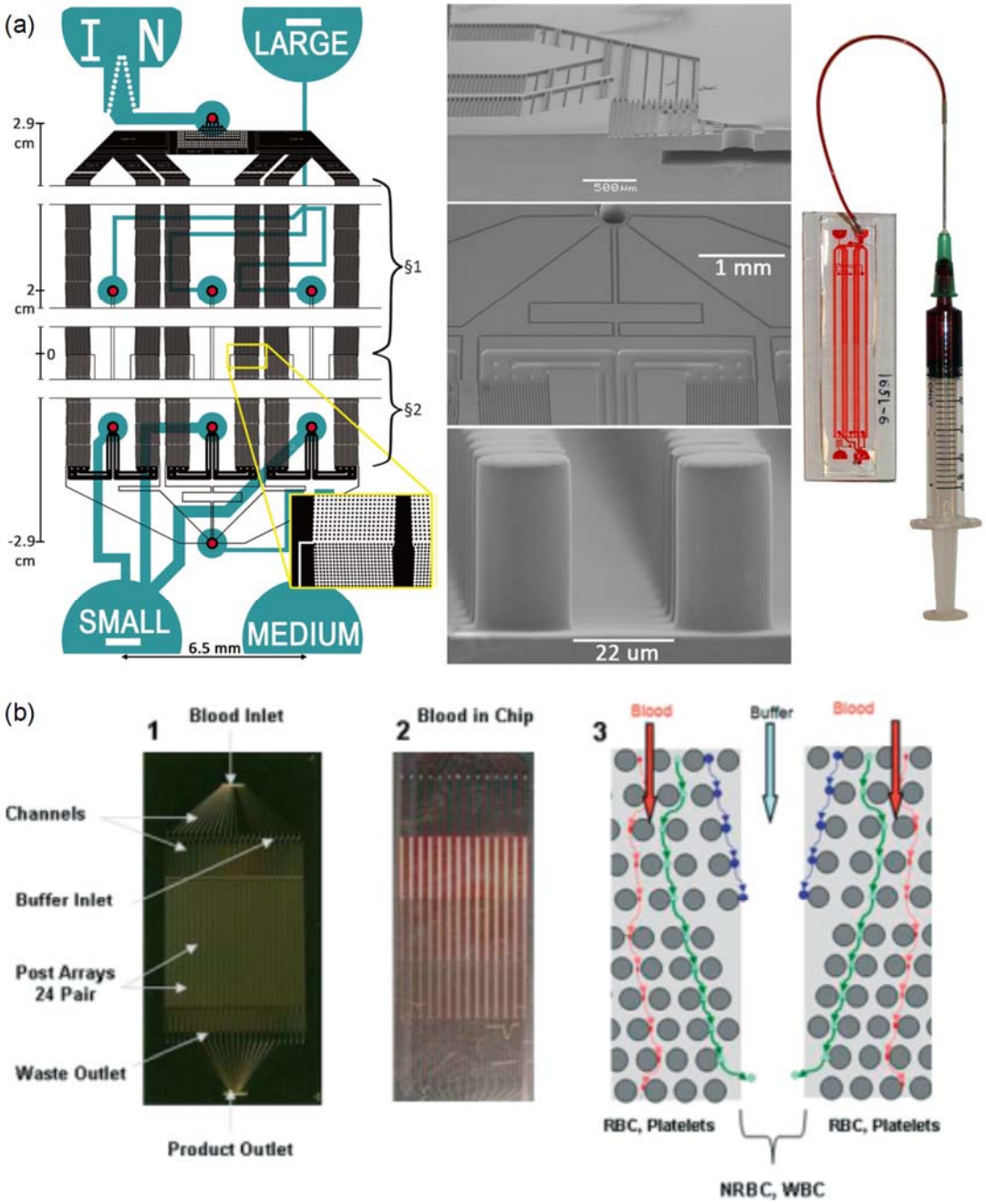

図 3.2　(a, b) 並列化 DLD 流路デバイスによる血液分離．(a) 文献 [16] より引用．(b) 文献 [15]より引用．

3.1.4 本研究の目的

上述した並列化液滴生成デバイスでは，単分散性の高い液滴を生成することが可能であるが，通常，生成された液滴サイズを測定する際には主滴のみを測定し，サテライト滴の存在は無視されている．そのため，サテライト滴が除去された単分散液滴を得るためには，並列化液滴生成流路に主滴とサテライト滴の分離用素子が組み込まれたデバイスが必要となるが，これまでにそのようなデバイスは報告されていない．そこで，本研究では，サテライト滴が除去された単分散なエマルション滴生成の高処理量化を目的とする．具体的には，並列配置した各液滴生成流路に対して，主滴とサテライト滴を分離するための DLD 流路を組み込んだ新規デバイスを試作し，サテライト滴が除去された単分散エマルション滴の生成を試みた．

3.1.5 本章の構成

3.1 では，主滴とサテライト滴の分離デバイスを，生産技術へと応用する場合に課題となる生産量の低さについて言及した．一方で，液滴生産量を大幅に増加させるために，液滴生成流路を多数並列配置したデバイスが近年報告されており，その技術概要について述べた．最後に，本研究における目的の所在を明らかにし，本研究で提案するデバイスの概要について述べた．

3.2 では，並列化マイクロ流路を用いた主滴とサテライト滴分離デバイスの設計について述べる．各並列化流路に均等に液体を分配するためのリザーバ構造や，液滴生成部と DLD 流路部の配置構造に関する詳細について述べる．

3.3 では，デバイス作製，液滴生成に用いる材料，3 次元シミュレーションおよびマイクロ流路への送液や流路観察に用いた装置概要について述べる．

3.4 では，3.4.1「リザーバの内の 3 次元流体シミュレーション」，3.4.2「並列化液滴生成流路による主滴とサテライト滴の生成」，3.4.3「並列化 DLD 流路による主滴とサテライト滴の分離」についての結果および考察について述べる．

3.5 では，本章で得られた研究結果について総括する．

3.2 デバイス設計

3.2.1 デバイス概要

マイクロ流路デバイスは，下層のマイクロ流路層と上層の液体分配層からなる二層重ね合わせ構造とした（図 3. 3，図 3. 4a–c）．下層には，十字型液滴生成部と DLD の連結流路が 8 つ並列配置されており，上層には，分散相と連続相を下層の並列流路に供給するためのリザーバおよび分離された主滴とサテライト滴を回収するためのリザーバが配置されている．上層にある 4 つのリザーバは全て同一形状（幅 5 mm，高さ 5 mm，長さ 30mm）とし，各リザーバの中央部には，チューブ接続用の貫通孔（直径 0.5 mm）があり，また，リザーバは，下層のマイクロ流路と複数の貫通孔（導入用リザーバは 8 個，回収用リザーバは 4 個）を介して接続されている．上層の回収用リザーバと下層のマイクロ流路を接続する貫通孔の数を少なくし，デバイスの面積を小さくするために，隣り合う DLD 流路は対称に配列した [15–17]. 以下で, 各層の構造について詳細を述べる．

3.2.2 マイクロ流路部（下層）

・十字型液滴生成部

下層に並列配置された十字型液滴生成部において，分散相と連続相の導入用流路幅は 100 μm，ドレイン流路の幅は 200 μm，流路高さは一様に 100 μm とした. 各液滴生成流路間で生じるクロストークを低減し, 各液滴生成部において安定した液滴生成を実現するために, 分散相供給流路の形状を蛇行流路にし, 十分に長い流路とした [4,5].

・主滴とサテライト滴分離用 DLD 流路

液滴生成流路で生成された主滴とサテライト滴は，ドレイン流路の中央から下流に接続された DLD 流路へと導入されることで分離される．主滴とサテライト滴の直径が分離直径（D_c）よりも，それぞれ大きい場合と小さい場合，主滴は displacement mode の軌道で対称に配列した DLD アレイの中央壁面方向へと移動し，サテライト滴は zigzag mode の軌道で DLD 流路の中央付近を移動する．その結果，主滴とサテライト滴はそれぞれ異なる回収用リザーバに分離される．

DLD パラメータの計算には，第 1 章 1.3.2 に示した式（1-16）を用い，予め測定した主滴とサテライト滴のサイズ（第 2 章，2.4.1 を参照）に従って，所望の D_c になるように DLD のパラメータ（図 3. 3b）を決定した．本デバイスでは，DLD のパラメータを $d = 80$ μm，$D_p = 100$ μm，$\Delta\lambda/\lambda = 0.1$ とし，D_c を主滴とサテライト滴の直径の間（=37.1 μm）に設定した．

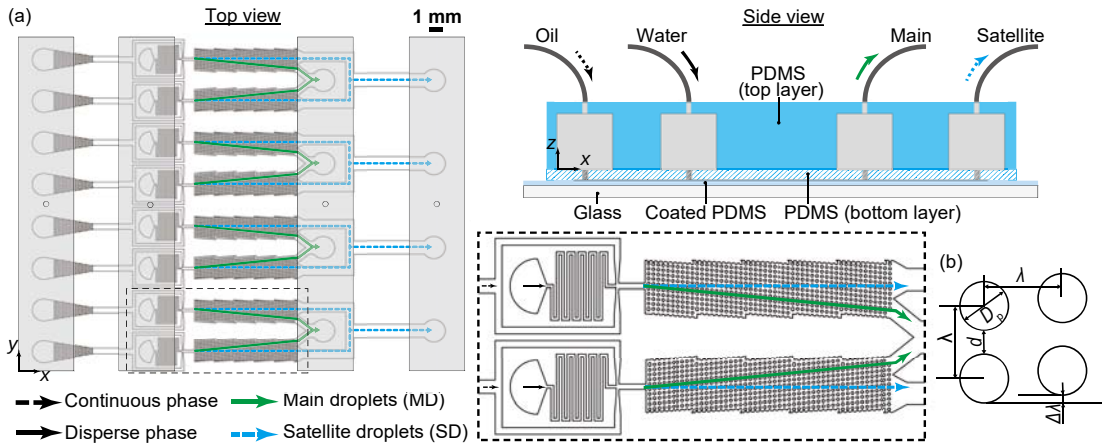

図 3. 3　(a) サテライトフリー単分散エマルション生成用並列化流路デバイス．点線で示した矩形領域は，拡大部分を表している．(b) DLD 流路のパラメータ．

3.2.3 液体供給用リザーバ（上層）

上層の長方形型の液体供給用リザーバと下層のマイクロ流路を接続する構造（図 3. 3）は，これまでに報告されている，円形リザーバ [7]または環状管 [8]から構成される液体分配用装置と，液滴生成用流路チップを接続する構造に類似している（図 3. 1c, d）が，本研究では，リザーバと接続貫通孔が非対称に配置された構造であるという点において従来のデバイスとは異なる．また，以下で詳細について述べるが，3D 流体シミュレーションソフトを用いて，各液滴生成流路に対して均等に流量分配可能なリザーバ形状の検討を行った．

3.3 実験

3.3.1 デバイス作製

・下層のマイクロ流路部の作製方法

下層の微細溝を有する基板は，Si 基板上にネガ型フォトレジストである SU-8 を用いて作製したパターンから PDMS に構造を転写する，ソフトリソグラフィ法により作製した（図 3. 4d–f）．詳しい作製プロセスは Appendix を参照．その後，微細溝を有する PDMS 基板に，パンチ（Harris Uni-Core, Ted Pella, CA, USA）を用いて，上層のリザーバとの接続用ポート（直径~0.5 mm）を作製した．

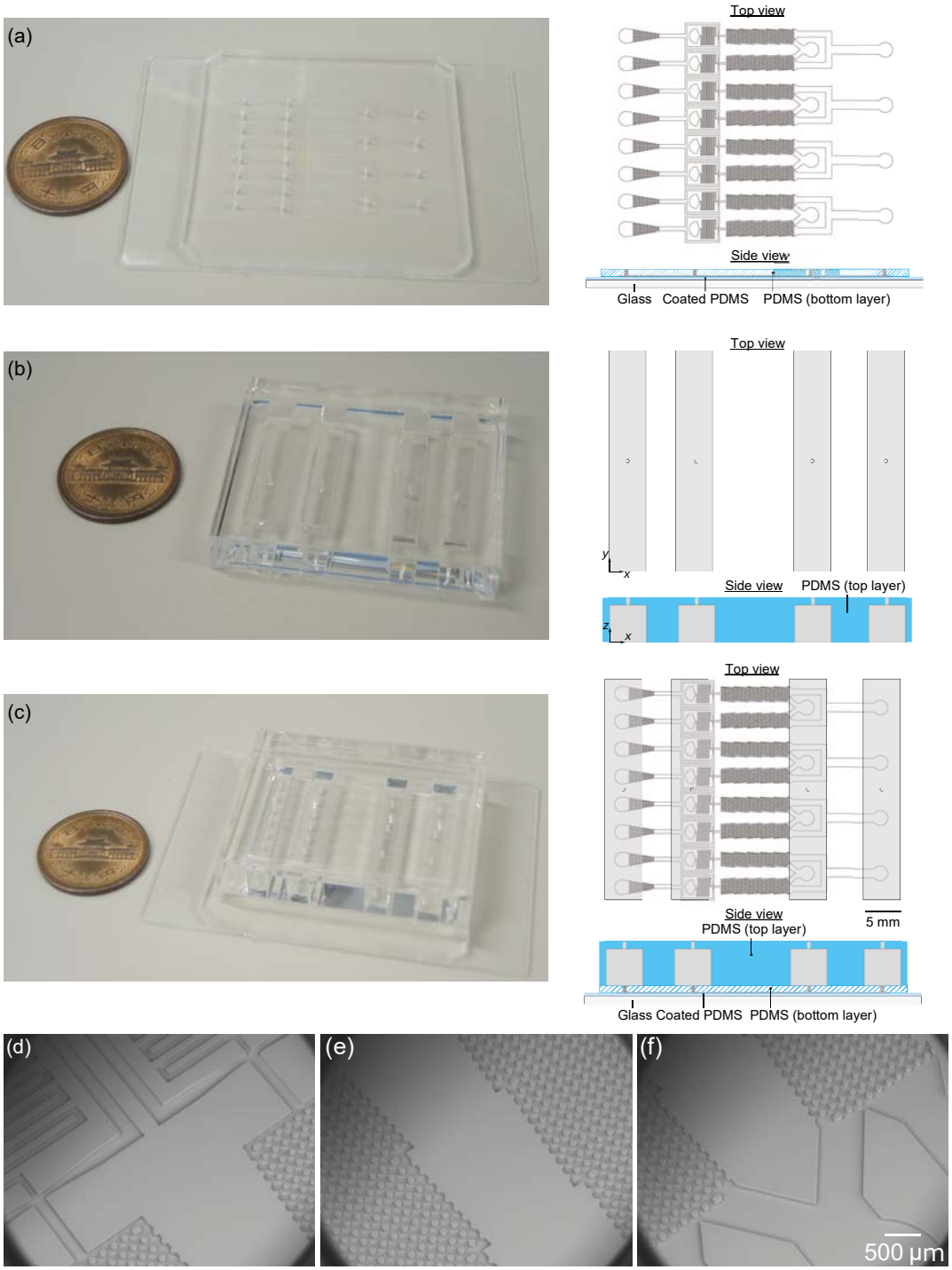

図 3. 4 作製した並列化流路デバイス．（a）下層のマイクロ流路，（b）上層のリザーバ，（c）下層と上層を組み合わせた後のデバイス．（d-f）マイクロ流路の（d）上流，（e）中流，（f）下流部の SEM 画像．

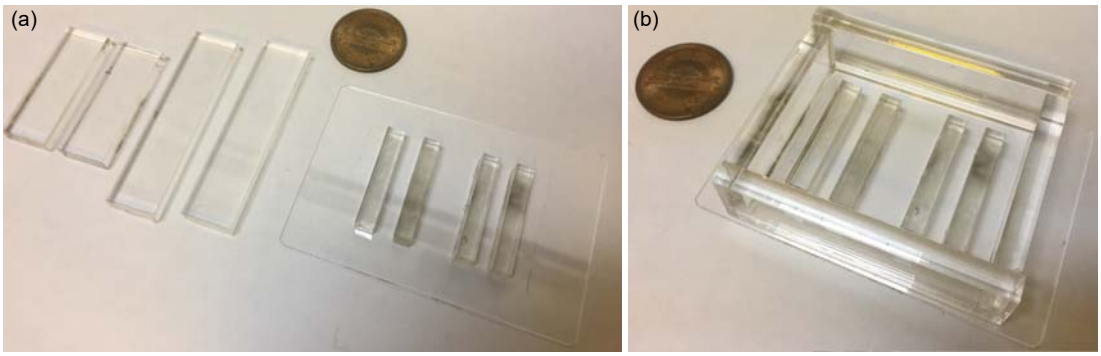

図 3.5 アクリル部品とガラス基板から構成されるリザーバ作製用の鋳型.（a）組み立て前と，（b）組み立て後の写真.

・上層のリザーバ部の作製方法

上層の PDMS 製のリザーバを作製するために，まず，アクリル部品とガラス基板から構成される鋳型を用意した（図 3.5）. アクリル部品の作製には，CO_2 レーザー加工機（L-906PC, 飯田工業）を使用した．リザーバ部分のアクリル部品は，厚み 5 mm のアクリル基板を幅 5 mm，長さ 30 mm で切断した．また，作製したアクリル部品の周りを囲うために，幅 5 mm，長さ 40 mm，高さ 15 mm および幅 5 mm，長さ 60 mm，高さ 15 mm のサイズの部品をそれぞれ 2 つずつ切断した. これらの作製したアクリル部品をガラス基板上に配置し, 両面テープを用いて接着することで鋳型とした（図 3.5b）. 用意した鋳型に, PDMS を流し込み, 80℃で 1 時間加熱することで PDMS を硬化させ，離型した後，リザーバの中央部にパンチを用いて，チューブ接続用の貫通孔（直径~0.5 mm）を作製した（図 3.4b）.

・下層と上層部品の接合

次に, 作製した PDMS 製の上層と下層の部品を接合し, デバイスを形成した. まず，微細溝を有する PDMS 基板を密閉し，マイクロ流路を形成するために, PDMS 基板と PDMS がコートされたガラス基板を酸素プラズマ処理によって接合した．ガラス基板に PDMS をコートしたのは，流路表面全体を疎水性にすることで, W/O 液滴の生成および分離を行うためである. 次に, 上層と下層の PDMS を酸素プラズマ処理後に位置合わせを行い接合した. また, 酸素プラズマ処理で接合後，一時的に親水性に改質された表面を疎水性に戻すために，90℃で 24 時間以上加熱した.

3.3.2 材料

連続相として，コーン油（和光純薬工業）に界面活性剤（SY-Glyster CRS-75, 坂本薬品工業）を 1.0 wt%の濃度で添加して用いた．分散相として，1wt%のアルギン酸ナトリウム水溶液(和光純薬工業)を用いた．

3.3.3 CFD シミュレーション

3 次元流体シミュレーションソフト（Fluent17.2，ANSYS，USA）を用いて，リザーバおよび接続ポートの流れを評価した．モデルの作成とメッシュの自動生成には，それぞれ Space Claim と ANSYS Meshing を用いた．計算機には，デスクトップ PC または，スーパコンピュータ（TSUBAME）を使用した．流体には，水を選択した．

3.3.4 装置と実験手順

デバイスへの送液はガラスシリンジ（1000 series, Hamilton Company, USA）およびシリンジポンプ（KDS200, KD Scientific, USA）を用い，ポンプとデバイスはポリエチレンチューブ（外径：1.0 mm，内径：0.5 mm）を介して接続した．流路内での液滴生成および主滴とサテライト滴の分離の様子の観察には，倒立顕微鏡(CKX41，オリンパス)と高速度ビデオカメラ（Fastcam Mini AX50，フォトロン）を用いた．液滴サイズの測定は，ImageJ（NIH, NY, USA）を用いて手動で行った．

3.4 結果と考察

3.4.1 リザーバ内の３次元流体シミュレーション

3.4.1.1 はじめに

マイクロ流路分岐構造による液滴生成では，生成液滴のサイズと液滴生成速度は流量に依存する．そのため，並列化液滴生成流路で単分散液滴を生成するには，各液滴生成流路への均等な流量分配が必要となる．そこで，まず，3D シミュレーションソフトを用いて，均等に流量分配可能なリザーバ形状を検討した．2 種類の異なるサイズのリザーバのモデルを用意し，サイズの違いが，流量分配に与える影響について評価した．

3.4.1.2 リザーバと接続ポートの流れの評価

・大きいリザーバの場合

大きいリザーバ（5 mm × 30 mm × 5 mm）（図 3. 6a）に，流量（Q_{in}）30 ml/h で液体を導入した際のリザーバ中央断面における速度分布を図 3. 6c に示す．導入口近傍では，流れが速いが，他の領域では，均一な流れが形成されている様子が

確認された．また，各接続ポートでは，均一な放物線状の流速分布が形成されており，最大流速も 8 つのリザーバで概ね一致していることが確認された（図 3. 6e）．8 つの接続ポートでの平均流量は，3.7 ml/h （CV~0.9%）であり（図 3. 7），レイノルズ（Re）数は，2.61 であった．また，導入流量が低い場合であっても，同様に各接続ポートへと均等に流量が分配される様子が確認された（図 3. 8a, c）．

・小さいリザーバの場合

小さいリザーバ（2 mm × 30 mm × 1 mm）（図 3. 6b）に，流量 30 ml/h で液体を導入した際のリザーバ中央断面における速度分布を図 3. 6d に示す．大きいリザーバと同様に，導入口近傍では，流れが速い様子が確認された．一方で，大きいリザーバとは異なり，導入口と流路底面までの距離が近いため，流路底面付近においても流れが速い状態であった．また，リザーバ内での，Re 数は十分に小さく（~2.77），層流状態が保たれていることが確認された．図 3. 6f は，8 つの接続ポートにおける流速分布を表している．8 つの接続ポートのうち，導入口に最も近い接続ポート（4 と 5）で最も流速が高く，導入口から距離が遠くなるほど，流速が低下した．また，流路中央に対して対称に配置されている接続用ポートにおいて，概ね流量が一致していた．8 つの接続ポートにおける，平均流速は 3.72 ml/h であり，CV は 11.01%であった（図 3. 7）．また，低流量の場合も同様に，

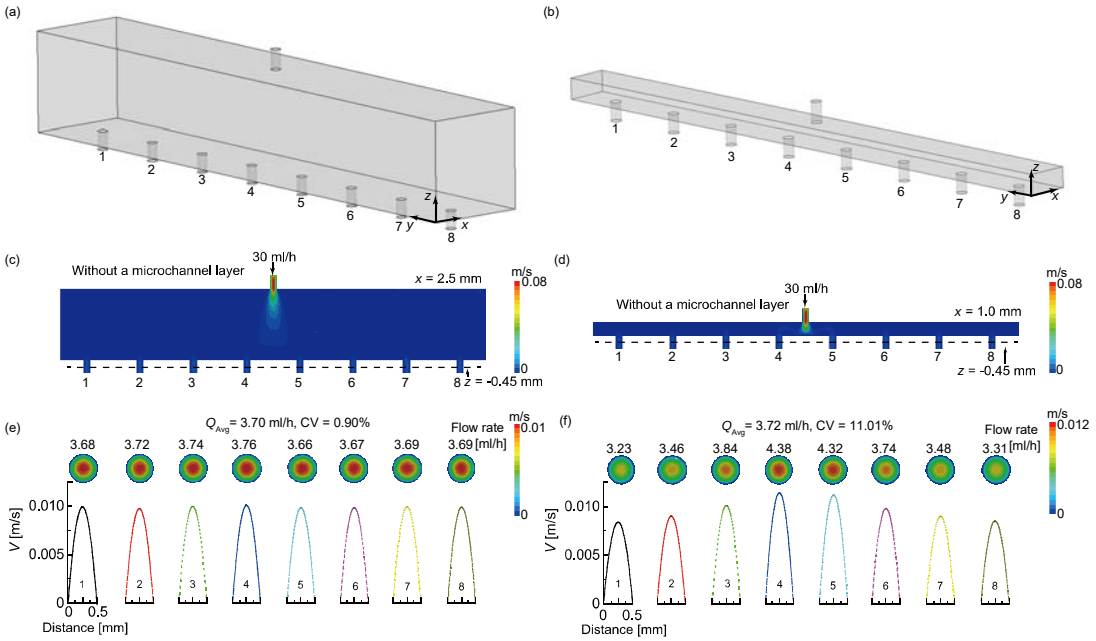

図 3. 6 高流量時（30 ml/h）のシミュレーション結果．マイクロ流路が未接続の，（a）大きいリザーバ（5 mm × 30 mm × 5 mm）と（b）小さいリザーバ（2 mm × 30 mm × 1 mm）における 3D 流体シミュレーションの結果．（c, d）リザーバ内の速度分布を表した断面図．（e, f）8 つの接続ポート内の流速分布．

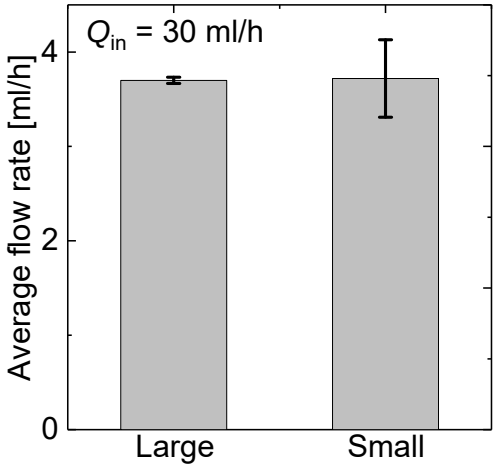

図 3. 7 大きいリザーバ（5 mm × 30 mm × 5 mm）と小さいリザーバ（2 mm × 30 mm × 1 mm）から，8 つの接続ポートに分配される流量の平均と標準偏差.

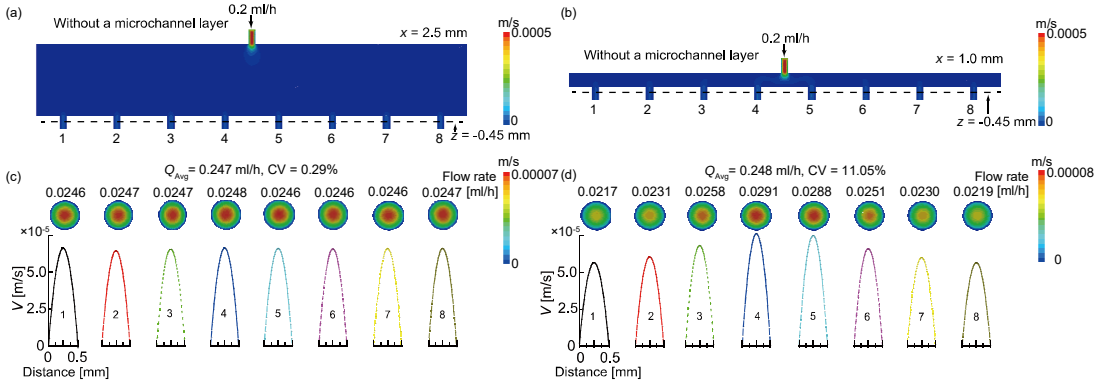

図 3. 8 低流量時（0.2 ml/h）のシミュレーション結果．マイクロ流路が未接続の，(a) 大きいリザーバ（5 mm × 30 mm × 5 mm）と (b) 小さいリザーバ（2 mm × 30 mm × 1 mm）における 3D 流体シミュレーションの結果．(c, d) リザーバ内の速度分布を表した断面図．(e, f) 8 つの接続ポート内の流速分布.

各接続ポートへの分配流量にばらつきがあることが確認された（図 3. 8b, d）.

3.4.1.3 流量分配モデル

次に，リザーバと接続ポートから構成される液体分配用流路を，ハーフラダー回路と等価であると仮定し，モデル化した（図 3. 9a）．このモデルにおいて，2 つの隣り合う接続ポートによって挟まれた流路部が $2N$（$R_{h1}, R_{h2},\ldots, R_{h(2N)}$）個あるとした場合，1 つの流路抵抗要素は R_{hN} として表される．今回は，単純化のために，全ての流路抵抗（$R_{h1}, R_{h2},\ldots, R_{h(2N)}$）は R_h に等しいと仮定した（図 3. 9b）．また，R_v の流路抵抗を有する接続用貫通孔が $2N$ 個配置されている場合，最大流量比（Q_1/Q_N）は以下のように導出される．なお，以下の導出過程では，R_h は R_v よりも十分に小さく(i.e. $R_h << R_v$)，$(R_h/R_v)^N = 0$, ($N = 2, 3, 4, \ldots$)と仮定した.

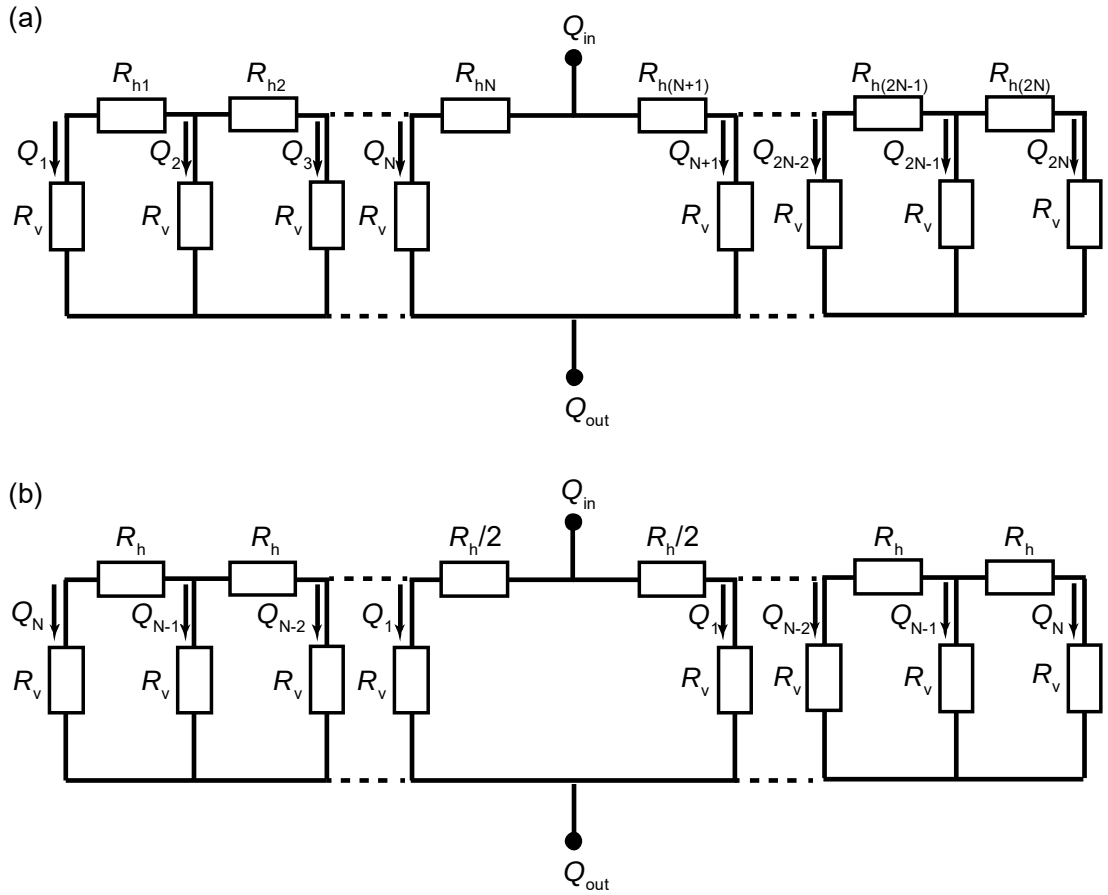

図 3.9 接続ポートを 2*N* 個有するリザーバの流体抵抗モデル．(a) $R_{h1}, R_{h2}, \ldots, R_{h(2N)}$は，リザーバ内での各区間の流路抵抗．$R_v$ は，接続ポートの流路抵抗．$Q_1, Q_2, \ldots, Q_{2N}$ は，各接続ポートに導入される流量．(b) 単純化した流体抵抗モデル．リザーバ内での各区間における流路抵抗は全て等しく R_h と仮定．$Q_1, Q_2, \ldots, Q_N$ は，各接続ポートに流入する流量．

$$Q_{N-1} = \frac{R_\mathrm{h} + R_\mathrm{v}}{R_\mathrm{v}} Q_N = (1 + a) Q_N$$

$$Q_{N-2} = \frac{R_\mathrm{h}(Q_N + Q_{N-1}) + R_\mathrm{v} Q_{N-1}}{R_\mathrm{v}} Q_N = \ a(Q_N + Q_{N-1}) + Q_{N-1} = (1 + 3\mathrm{a}) Q_N$$

$$Q_{N-3} = \ a(Q_N + Q_{N-1} + Q_{N-2}) + Q_{N-2} = (1 + 6\mathrm{a}) Q_N$$

$$Q_{N-4} = \ a(Q_N + Q_{N-1} + Q_{N-2} + Q_{N-3}) + Q_{N-3} = (1 + 10\mathrm{a}) Q_N$$

$$Q_{N-5} = \ a(Q_N + Q_{N-1} + Q_{N-2} + Q_{N-3} + Q_{N-4}) + Q_{N-4} = (1 + 15\mathrm{a}) Q_N$$

$$\ldots$$

$$Q_1 = a(Q_N + Q_{N-1} + Q_{N-2} + \cdots + Q_3 + Q_2) + Q_2 = \left(1 + \frac{N(N-1)}{2}a\right)Q_N$$

$$\therefore \frac{Q_1}{Q_N} = 1 + \frac{N(N-1)}{2}\left(\frac{R_\mathrm{h}}{R_\mathrm{v}}\right) \tag{3–1}$$

ここで, a は R_h と R_v の比(R_h /R_v)を表している.

もし，R_h が R_v と比較して十分に小さい場合，（例えば，$\{N(N–1)/2\}(R_\mathrm{h}/R_\mathrm{v})<0.01$） [10]，（$Q_1$/ Q_N）は 1 に漸近する．すなわち，導入口から各接続ポートまでの流路抵抗のばらつきは無視できるほど小さくなり，結果として，均等な流量分配が実現される．

接続用貫通孔の抵抗（R_v）は，円管内でのハーゲン・ポアズイユ流れを仮定すると，次式（3–2）で表される [18].

$$R_\mathrm{v} = \frac{128\eta L}{\pi d^4} \tag{3–2}$$

ここで, L と d は管の長さと直径をそれぞれ表し, ηは流体の粘性を表している.

また, 小さいリザーバの場合には, 長方形流路内の平行方向に層流が形成されていると仮定でき，流路抵抗 R_h は，次式（3–3）で表すことができる [8,18].

$$R_\mathrm{h} = \frac{12\eta L_\mathrm{c}}{h^3 w}\left(1 - \frac{192h}{\pi^5 w}\right)^{-1} \tag{3–3}$$

ここで，h と w はそれぞれ，長方形流路の高さと幅をそれぞれ表しており（$h < w$），L_c は流路長さを表している．

小さいリザーバにおける実験値を式（3–2）と式（3–3）に代入した後，$\{N(N–1)/2\}(R_\mathrm{h}/R_\mathrm{v})$を計算すると，0.34>>0.01 となるため，各接続ポートに均等に流量分配できないことが示唆された．また，式（3–1），（3–2），（3–3）から計算される最大流量比（Q_1/Q_4）は 1.34，シミュレーション結果から得られる最大流量比（Q_1/Q_4）は 1.36 であり，流量分配モデルとシミュレーション結果が概ね一致した．一方で，大きいリザーバの場合，リザーバの平行方向の流れがハーゲン・ポアズイユ流れであるとは仮定するのは難しいが，十分に寸法が大きいリザーバであるため，R_h が R_v と比較して十分に小さいと考えられる．

3.4.1.4 マイクロ流路を接続した場合の流れの評価

下層のマイクロ流路を上層のリザーバに接続した場合における，リザーバと接続ポート内の流れについて評価した（図 3. 10，図 3. 11）．マイクロ流路を接続した場合，小さいリザーバにおいても，導入流量に関係なく各接続ポートへ均等に流量分配された（図 3. 10bd，図 3. 11bd）．

この理由として，マイクロ流路がリザーバに接続されることにより，上記のモデルの R_v の値が R_h の値よりも十分に大きくなったためと考えられる．

以上の結果より，十分に大きなサイズのリザーバ（例えば，5 mm × 30 mm × 5 mm）を使用すれば，下層に接続される流路の抵抗値に関わらず，各並列化された流路に均等に流量分配可能であることが確認された．そのため，本研究においては，汎用性がより高い，大きなリザーバを採用した．

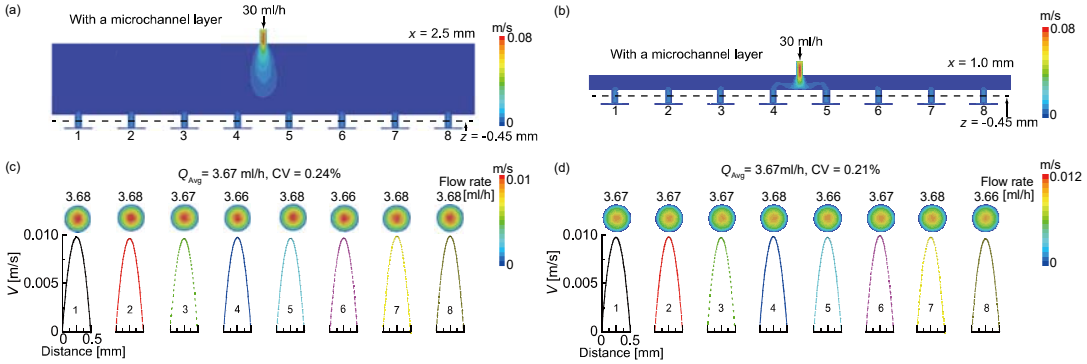

図 3. 10 高流量時（30 ml/h）のシミュレーション結果．マイクロ流路が接続された，（a）大きいリザーバ（5 mm × 30 mm × 5 mm）と（b）小さいリザーバ（2 mm × 30 mm × 1 mm）における 3D シミュレーションの結果．（c, d）リザーバ内の速度分布を表した断面図．（e, f）8 つの接続ポート内の流速分布．

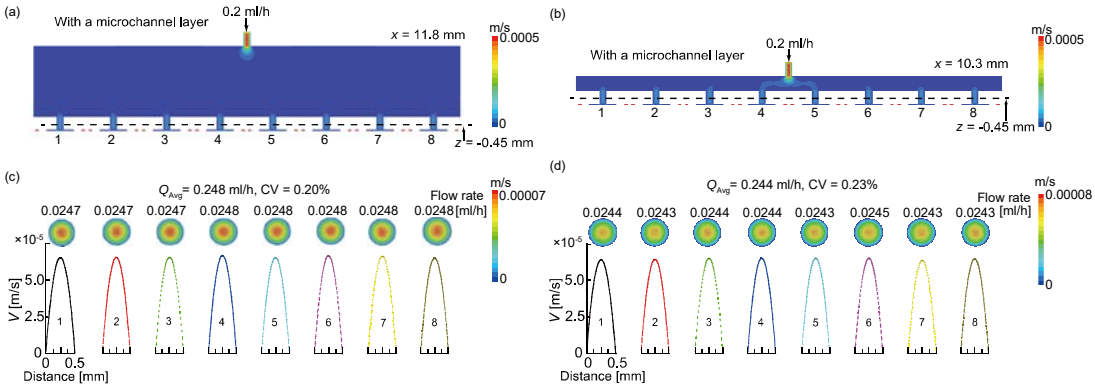

図 3. 11 低流量時（0.2 ml/h）のシミュレーション結果．マイクロ流路が接続された，（a）大きいリザーバ（5 mm × 30 mm × 5 mm）と（b）小さいリザーバ（2 mm × 30 mm × 1 mm）における 3D シミュレーションの結果．（c, d）リザーバ内の速度分布を表した断面図．（e, f）8 つの接続ポート内の流速分布．

3.4.2 並列化液滴生成流路による主滴とサテライト滴の生成

作製した並列化流路デバイスを用いて W/O 液滴の生成試験を実施し，並列化した各液滴生成流路における液滴生成の様子の観察，生成液滴サイズの測定，および並列配置された各液滴生成流路への分配流量の評価を行った．

3.4.2.1 並列化液滴生成流路における液滴生成

・並列化流路における液滴生成の様子

まず，並列化液滴生成流路における液滴生成の様子を観察した．連続相流量（Q_c）と分散相流量（Q_d）をそれぞれ， 25 ml/h と 0.2 ml/h に設定した際の，液滴生成過程を図 3. 12 に示す．主滴が生成される際に，主滴と供給液体の間に細い液柱が形成された後，レイリー不安定により液柱が分裂することで，複数のサテライト滴が生成される様子が観察された．また，生成されたサテライト滴はサイズ別に 3 つに分類（S1，S2，S3）された．各液滴生成流路における，主滴とサ

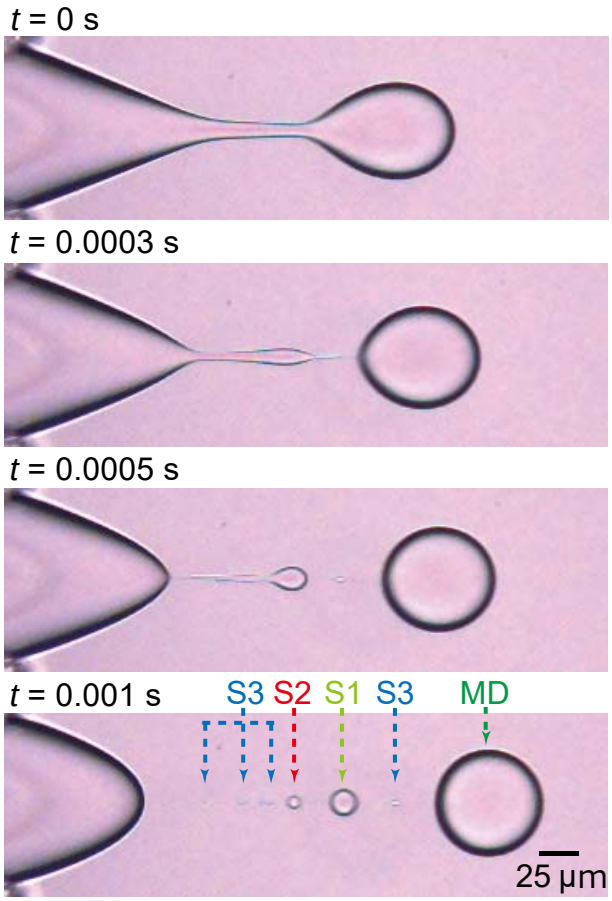

図 3. 12 主滴（MD）とサテライト滴（S1，S2，S3）の生成過程を表したタイムラプス画像．8 つの並列化液滴生成流路うち，1 つの液滴生成流路を観察．撮影速度は 10000 fps．液滴生成速度は 37 個/s．連続相流量（Q_c）は 25 ml/h，分散相流量（Q_d）は 0.2 ml/h．

テライト滴の生成の様子を図 3. 13a に示す．すべての液滴生成流路において，同様に主滴とサテライト滴（S1，S2，S3）が生成される様子が確認された．各液滴生成流路で生成された主滴直径の変動係数（CV 値）は 0.6%であり，単分散であった（図 3. 13b）．一方で，各液滴生成流路において液滴は同時に生成されず，液滴生成流路間での同期現象は観察されなかった．また，液滴生成流路間でのクロストークの様子も確認されなかった．

・生成液滴のサイズ分布

各液滴生成流路にて生成された液滴を全て合計し，デバイス全体で生成された液滴のサイズ分布を評価した（図 3. 13c）．生成された主滴の直径は，67±1 μm であり，CV 値は 1.6%（$n = 160$）であった．デバイス全体で生成された主滴直径の CV 値（1.6%）は，各液滴生成流路で生成された主滴直径の CV 値（0.6%）と比較して，僅かに大きくなったが，デバイス全体で生成された主滴も十分に単分散であった．一方で，生成されたサテライト滴である S1，S2，S3 の大きさは，それぞれ，17±1 μm，9±1 μm，3±1 μm であった．

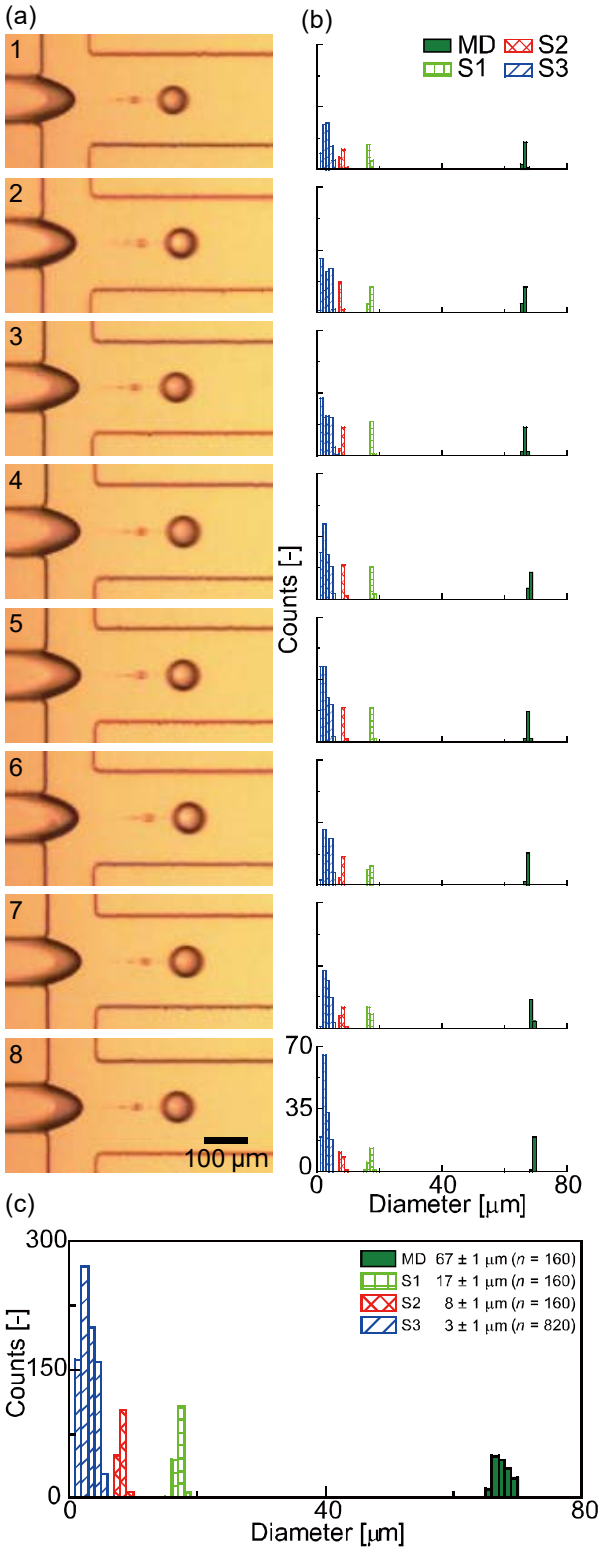

図 3. 13 （a）各液滴生成流路における主滴とサテライト滴の生成の様子と（b）生成液滴のサイズ分布．（c）並列化液滴生成流路で生成された全液滴のサイズ分布．　Q_c = 25 ml/h,　Q_d = 0.2 ml/h.

3.4.2.2 各並列化液滴生成流路に分配される分散相流量の推定

次に，各液滴生成流路に供給される分散相流量の推定を行った．高速度カメラで撮影した映像から，全ての液滴生成流路での液滴生成速度（$F_{b,1}$）を測定した後，測定した $F_{b,1}$ と生成された液滴直径から，各液滴生成流路における分散相流量（$Q_{d,1}$）を計算した（図 3. 14）．棒グラフ及び四角形の中に示したエラーバーは，各液滴生成流路における測定時間内での，$Q_{d,1}$ と $F_{b,1}$ のばらつきを表してる．個別の液滴生成流路における $Q_{d,1}$ のばらつきは小さかったが，各液滴生成流路間における $Q_{d,1}$ の CV 値は 6.7%となった．

・各液滴生成流路に供給される分散相流量のばらつきの原因

3D シミュレーションの結果と比較して，実験結果における $Q_{d,1}$ のばらつきが大きいことが確認された．$Q_{d,1}$ のばらつきの原因として，並列配置されたマイクロ流路間での，寸法誤差が考えられるため，まず作製した PDMS 流路の高さを測定した．3D 形状計測機器（VR-3200，キーエンス）を用いて高さを測定した結果，マイクロ流路の一部で高さ方向にばらつきが生じていることが確認され

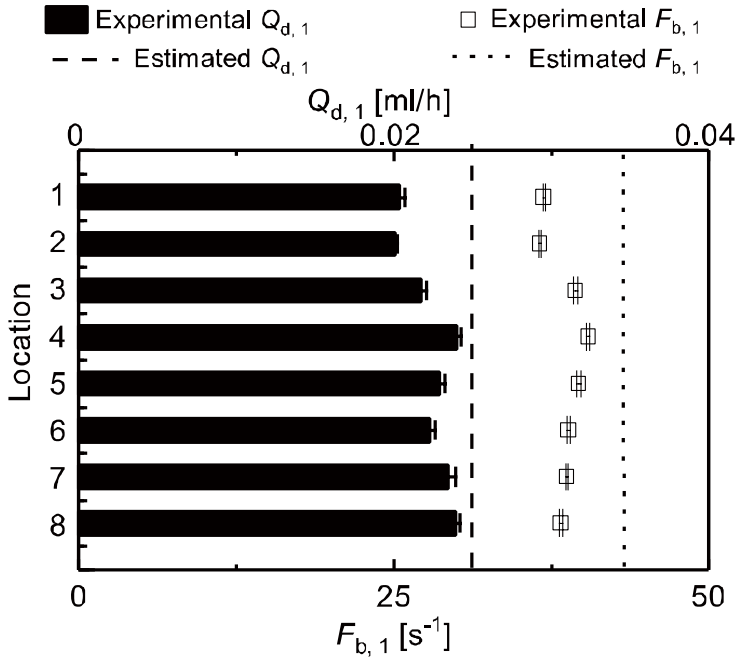

図 3. 14 各液滴生成流路における分散相流量（$Q_{d,1}$）と液滴生成速度（$F_{b,1}$）の評価．縦軸は各液滴生成流路の位置を表している．中抜きの四角形は測定した液滴生成速度（$F_{b,1}$）を表している．黒い棒グラフは，推定した各液滴生成流路における $Q_{d,1}$ を示している．破線は，設定した分散相流量 Q_d（= 0.2 ml/h）から予測される各液滴生成流路への $Q_{d,1}$（= 0.025 ml/h）．点線は，Q_d と生成液滴直径から予測される $F_{b,1}$.

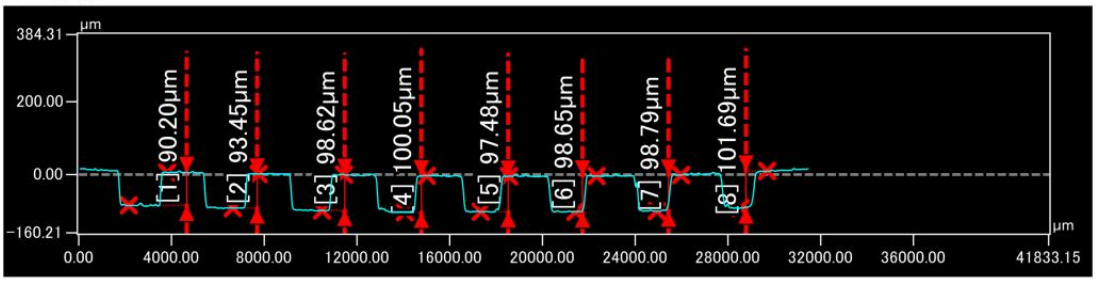

図 3. 15 3D 形状計測器（VR-3200，キーエンス）を用いた PDMS 流路の高さ測定結果.

た（図 3. 15）．流路高さと分配流量の測定結果を比較すると，高さが大きい流路に，より多く液体が分配されている傾向が確認された．これは，流路の高さが大きくなると，流路抵抗が小さくなるためだと考えられる．

この影響を低減する方法として，例えば，鋳型を作製する際に，液体レジストの代わりに，高さが均一なフィルムレジストを使用することが考えられる．また，流路高さ方向のばらつきが生じる他の原因として，手動で PDMS を接合する際に生じる不均一な変形も考えられる．また，デバイスに圧力が負荷された際に生じるリザーバやマイクロ流路の不均一な変形も，$Q_{d,1}$ のばらつきに影響を与えていると考えられる．

3.4.3 並列化 DLD 流路による主滴とサテライト滴の分離

次に，並列化 DLD 流路内での主滴とサテライト滴の流れの観察（図 3. 16）および分離効率に関する評価を行った．

・並列化 DLD 流路内での主滴とサテライト滴の分離

各液滴生成流路で生成された主滴とサテライト滴は，ドレイン流路中央の位置を維持した状態で流れ，下流に接続された DLD 流路へと流入する様子が確認された（図 3. 16）．全ての並列化 DLD 流路において，主滴は DLD の支柱配列の傾きに沿って，対称に配列された DLD 流路の中央壁面方向へと移動し（displacement mode），主滴回収用のリザーバへと流入する様子が確認された（図 3. 16）．一方で，サテライト滴は DLD 支柱の間を流れ方向に沿って移動し（zigzag mode），サテライト滴回収用リザーバへと流入する様子が観察された（図 3. 16）．また，第 2 章での主滴とサテライト滴の分離実験と同様に，DLD 支柱間にて生じるせん断力により，主滴が変形する様子が観察された．液滴の変形により，有効直径は僅かに小さくなったが，主滴は D_c よりも大きい状態を維持しており，displacement mode の軌道で流れた．せん断力による液滴の分裂は観察されなかった．

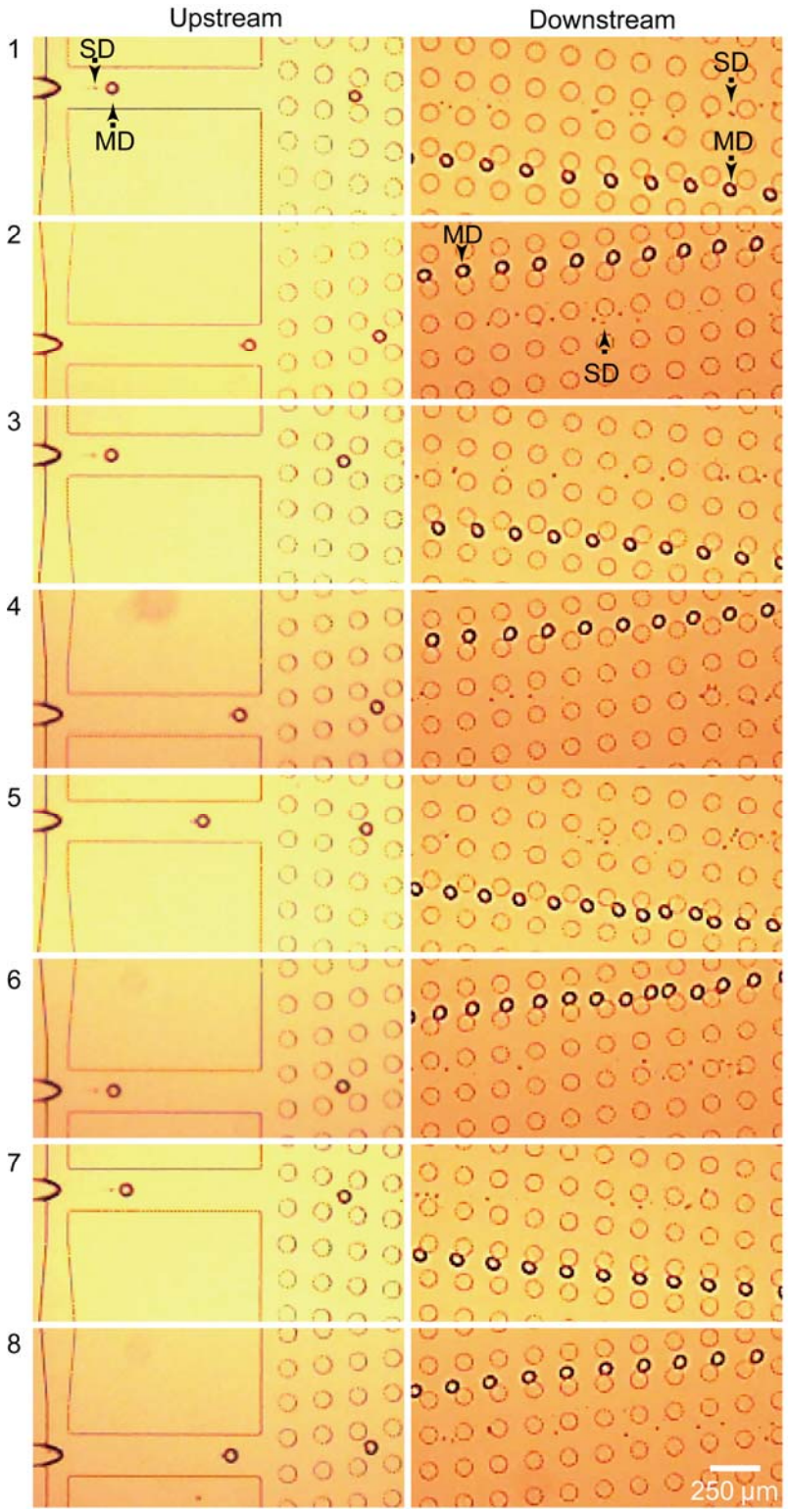

図 3. 16　並列化 DLD 流路での主滴とサテライト滴の分離の様子. $Q_c = 25$ ml/h, $Q_d = 0.2$ ml/h

・回収液滴の評価

DLD 流路で分離され，各リザーバへと回収される液滴サイズの分布を評価した（図 3. 17）．液滴直径の測定は，DLD 流路終端に設けられた分岐流路内で行った．主滴回収用リザーバへと流入する液滴の直径は，65–75 μm の範囲に分布（平均直径：68±1 μm，CV = 1%）しており（図 3. 17b），並列化液滴生成流路で生成された主滴の直径（図 3. 13c）に一致していた．また，回収される液滴の中に，小さなサイズの液滴は観察されなかった．一方で，サテライト滴回収用リザーバ

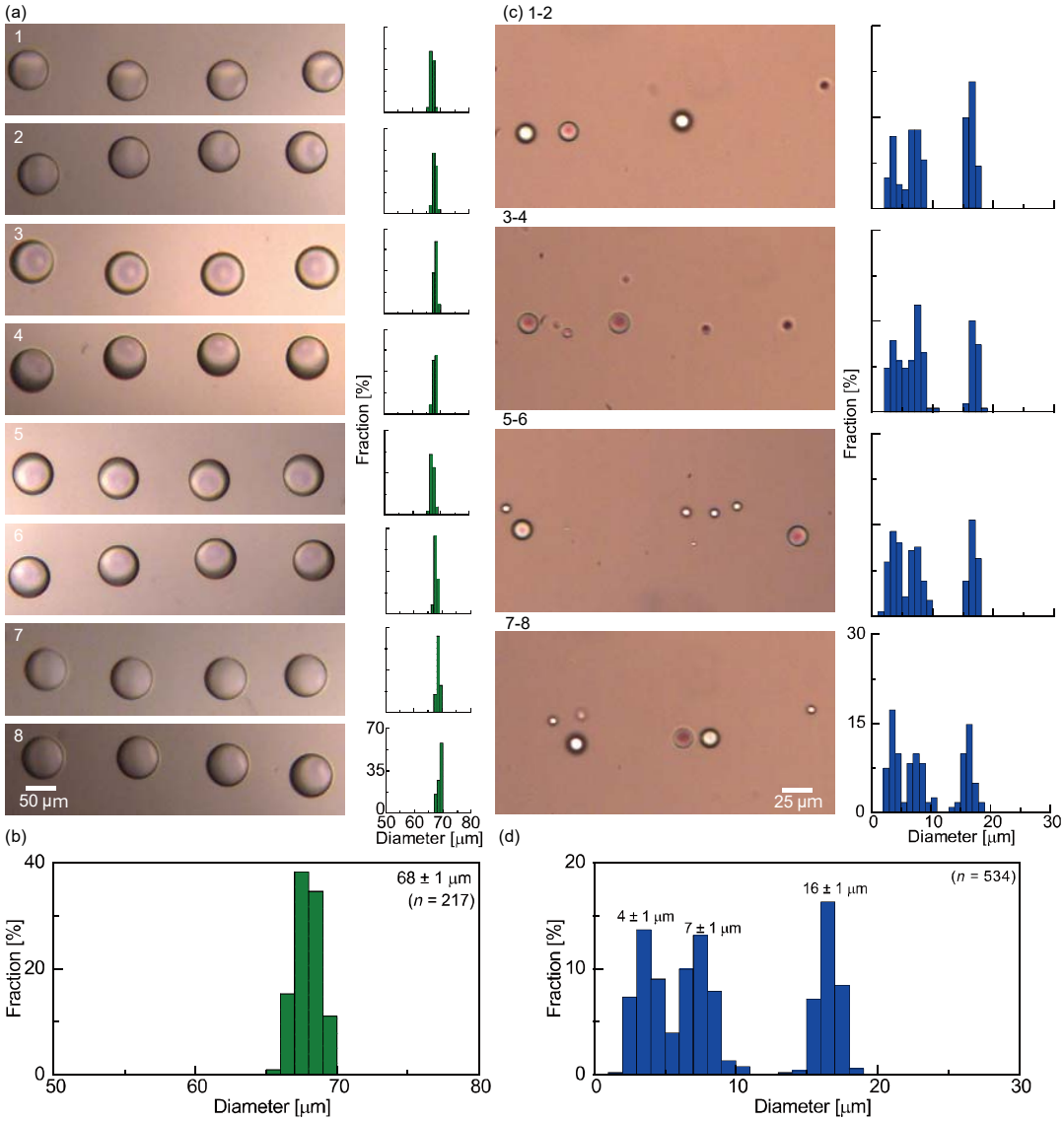

図 3. 17 並列化 DLD 流路で分離された液滴の評価．（a）主滴回収用リザーバへと流入する液滴の様子およびサイズ分布．（b）主滴回収用リザーバに回収された液滴サイズ分布．（c）サテライト滴回収用リザーバへと流入する液滴の様子とサイズ分布．（d）サテライト滴回収用リザーバに回収された液滴サイズ分布．Q_c = 25 ml/h，Q_d = 0.2 ml/h.

へと流入する液滴直径は，3 つに分類され，大きい順に，16±1 μm，7±1 μm，4±1 μm であった（図 3. 17d）．これらの液滴直径は，並列化液滴生成流路で生成されたサテライト滴（S1，S2，S3）の直径（図 3. 13c）に一致しており，回収液滴は全てサテライト滴であった．すなわち，並列配置された全ての DLD 流路において，主滴とサテライト滴が 100%の純度と回収効率で分離可能であることが確認された．

・流量が分離に与える影響

第 2 章の 2.4.2.2 では，単一の DLD デバイスにおいて，分散相と連続相の流量変化が主滴とサテライト滴の分離に影響することを述べた．並列化 DLD デバイスにおいても，同様に分散相と連続相の流量変化が主滴とサテライト滴の分離に影響をすることが確認された．分散相と連続相の流量によって，主滴とサテライト滴を分離できない領域は，条件別に以下の（1）～（3）の 3 つに分類された．

（1）生成される主滴の大きさが DLD の支柱間の隙間よりも大きく，主滴が DLD 支柱によって分裂する領域（図 3. 18）．

（2）生成される主滴の直径は D_c よりも大きいが，一部の主滴が主滴回収用リザーバに回収されない領域（図 3. 19）．

（3）生成される主滴の直径（~29.9 μm，Q_c = 55.0 ml/h，Q_d = 1.0 ml/h）が D_c（=37.1 μm）よりも小さく，主滴が zigzag mode の軌道で DLD 流路内を流れる領域（図 3. 20）．

分散相と連続相の流量の変化に伴う，これら 3 つの分離不可能な領域への遷移は，全ての並列化液滴生成流路にて同時に生じる様子が確認された．これは，上層のリザーバから下層の各液滴生成流路へと均等に流量が分配されているためだと考えられる．また，流量変動が分離性能に与える影響に関して，単一流路デバイスと，並列化流路デバイスの間で違いは確認されなかった．

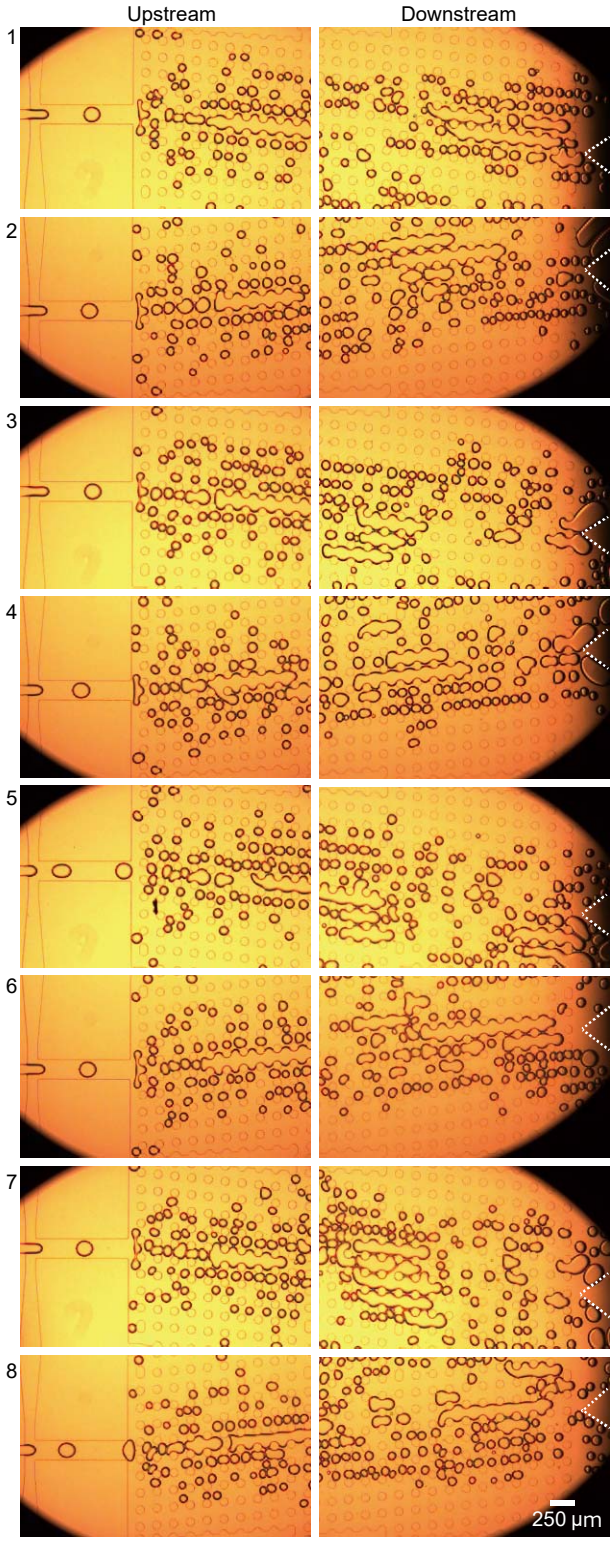

図 3. 18　並列化 DLD 流路にて主滴が分裂および合一する様子．Q_c = 5.0 ml/h, Q_d = 1.0 ml/h.

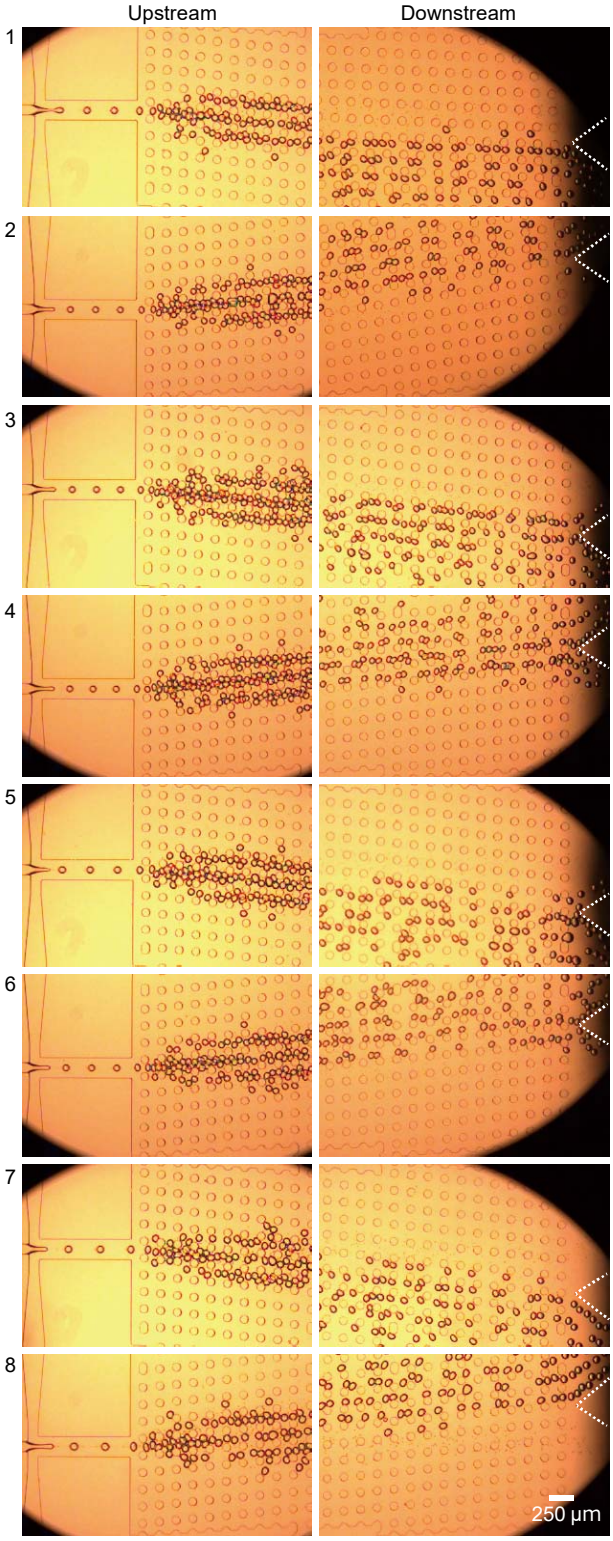

図 3. 19　並列化 DLD 流路の上流部にて主滴の分布が広がる様子. $Q_c = 30$ ml/h, $Q_d = 2.0$ ml/h.

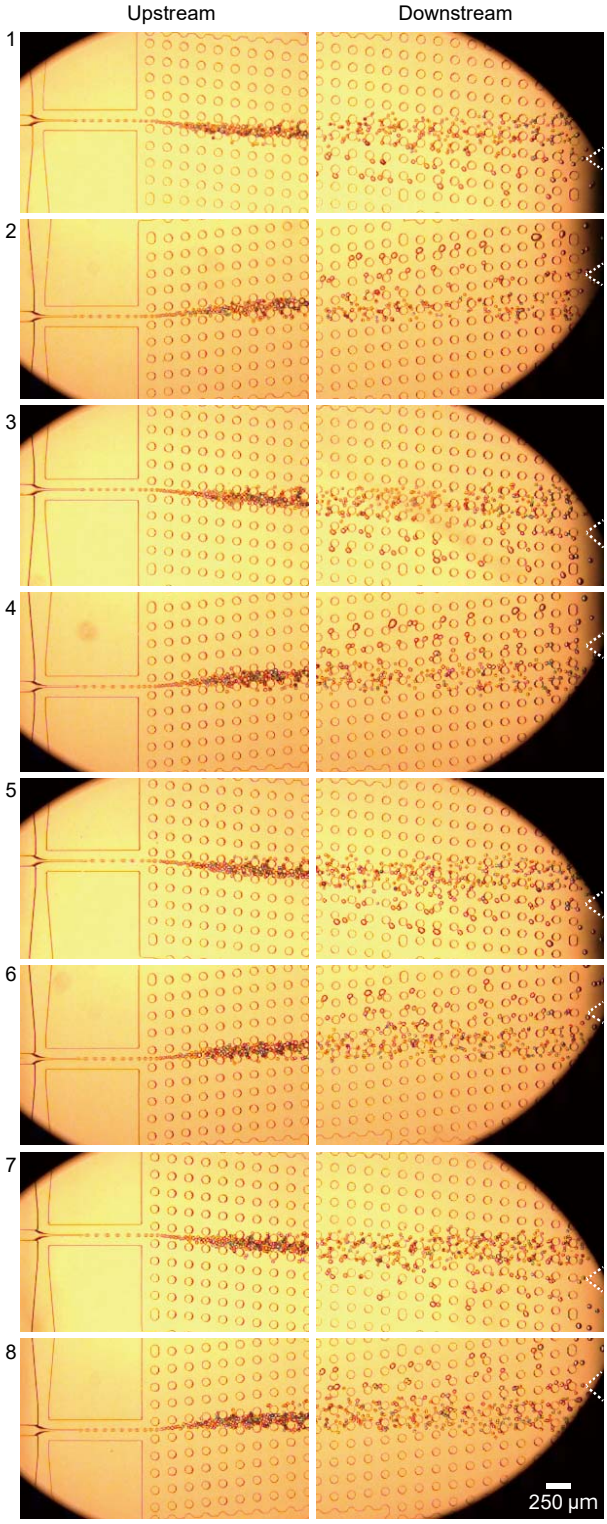

図 3. 20　並列化 DLD 流路での主滴が zigzag mode の軌道で流れる様子．Q_c = 55 ml/h，Q_d = 1.0 ml/h.

・並列化流路数を増加させる方法

単一チップあたりの生産量をさらに向上させるためには，液滴生成流路と DLD 流路を多数複製し，チップ上に高密度に配置することが求められる．高密度な並列配置を実現するには，液滴生成流路と DLD 流路の面積を最小化しなければならない．しかしながら，本研究でのデバイス作製では，手動で上層と下層の接続用ポートを作製しており，小さい面積の上に多数の貫通孔を正確あけることは困難であったため，並列化密度は最大になっていない．正確に PDMS 上に貫通孔を作製する方法として，これまで，鋳型を挟み込む方法 [12]，レーザーを使用する方法 [11]などが提案されており，本研究におけるデバイス作製においても，これらの手法を利用すれば，より高密度に並列配置可能になると考えられる．例えば，現在のデバイスの DLD 流路幅（1.9 mm）を維持した状態で，液滴生成流路幅を 3.5 mm から 1.9 mm に小さくすれば，液滴生成流路と DLD 流路のユニットをスライドガラス基板上（76 mm × 52 mm）に 64 個並列化することが可能である（図 3. 21）．また，先行研究 [6,10]でも報告されているように，液滴生成流路と DLD 流路が配置されている層を垂直方向に積層することによって，さらに生産性を向上させることが可能だと考えられる．

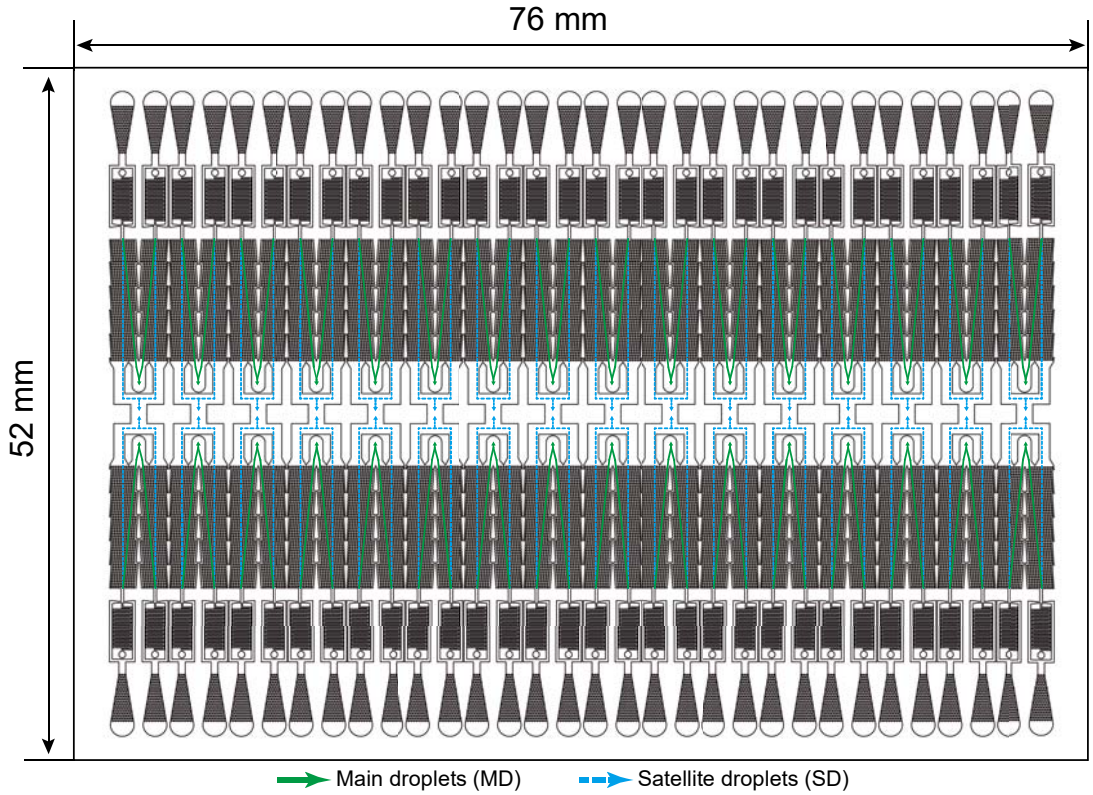

図 3. 21 スライドガラス（76 mm × 52 mm）上に液滴生成流路と DLD 流路のユニットを 64 個並列配置したデバイスの概要図.

3.5 まとめ

第 3 章では，サテライト滴が除去された単分散エマルション滴の生産量向上を目的とした並列化デバイスを提案した．以下に，各節の内容について総括する．

3.1 の「序論」では，既報の主滴とサテライト滴分離デバイスを生産技術へ応用する場合，処理量が不十分であることについて述べた後，液滴生産量の大幅な増加を目的とした，並列化デバイスの研究事例について紹介した．その上で，既報の並列化デバイスにおいて，主滴とサテライト滴の分離は未報告であることに言及し，本研究の目的の所在を明らかにした．

3.2 の「デバイス設計」では，下層に液滴生成流路と DLD 流路が直列に接続されたユニットを 8 つ並列配置し，上層に液体を均等に分配するためのリザーバを配置したデバイスの設計について述べた．

3.3 の「実験」では，デバイス作製方法，材料，シミュレーション，実験装置について詳細を述べた．

3.4 の「結果と考察」では，3.4.1「リザーバ内の 3 次元流体シミュレーション」，3.4.2「並列化液滴生成流路による主滴とサテライト滴の生成」，3.4.3「並列化 DLD 流路による主滴とサテライト滴の分離」についての結果と考察を述べた．以下，各項ごとに総括する．

3.4.1 の「リザーバ内の 3 次元流体シミュレーション」では，3D シミュレーションソフトを用いて液体を均等に分配可能なリザーバ形状の検討を行った．また，液体分配用リザーバのモデル化と，均等に流量分配可能なリザーバを設計する際の計算方法について提案した．

3.4.2 の「並列化液滴生成流路による主滴とサテライト滴の生成」では，リザーバから各液滴生成流路に概ね均等に流量分配可能であり，並列化流路で単分散な液滴（直径~67 μm，CV=1.6%）が生成可能であることを確認した．

3.4.3 の「並列化 DLD 流路による主滴とサテライト滴の分離」では，分散相と連続相の流量を適切に設定した際に，並列化 DLD 流路内で主滴がサテライト滴から 100%の純度と回収効率で分離され，単一のデバイスと比較して 8 倍の生産量を得ることができた．

3.6 参考文献

[1] T. Nisisako, Curr. Opin. Colloid Interface Sci. **25**, 1 (2016).
[2] H.-H. Jeong, D. Issadore, and D. Lee, Korean J. Chem. Eng. **33**, 1757 (2016).
[3] W. Li, E. W. K. Young, M. Seo, Z. Nie, P. Garstecki, C. a. Simmons, and E. Kumacheva, Soft Matter **4**, 258 (2008).
[4] W. Li, J. Greener, D. Voicu, and E. Kumacheva, Lab Chip **9**, 2715 (2009).
[5] D. Bardin, M. R. Kendall, P. A. Dayton, and A. P. Lee, Biomicrofluidics **7**, (2013).
[6] D. Conchouso, D. Castro, S. A. Khan, and I. G. Foulds, Lab Chip **14**, 3011 (2014).
[7] T. Nisisako and T. Torii, Lab Chip **8**, 287 (2008).
[8] T. Nisisako, T. Ando, and T. Hatsuzawa, Lab Chip **12**, 3426 (2012).
[9] G. Tetradis-Meris, D. Rossetti, C. P. De Torres, R. Cao, G. Lian, and R. Janes, Ind. Eng. Chem. Res. **48**, 8881 (2009).
[10] M. B. Romanowsky, A. R. Abate, A. Rotem, C. Holtze, and D. A. Weitz, Lab Chip **12**, 802 (2012).
[11] M. Muluneh and D. Issadore, Lab Chip **13**, 4750 (2013).
[12] H.-H. Jeong, V. R. Yelleswarapu, S. Yadavali, D. Issadore, and D. Lee, Lab Chip **15**, 4387 (2015).
[13] T. Femmer, A. Jans, R. Eswein, N. Anwar, M. Moeller, M. Wessling, and A. J. C. Kuehne, ACS Appl. Mater. Interfaces **7**, 12635 (2015).
[14] S. Yadavali, H. H. Jeong, D. Lee, and D. Issadore, Nat. Commun. **9**, (2018).
[15] R. Huang, T. A. Barber, M. A. Schmidt, R. G. Tompkins, M. Toner, D. W. Bianchi, R. Kapur, and W. L. Flejter, Prenat. Diagn. **28**, 892 (2008).
[16] D. W. Inglis, M. Lord, and R. E. Nordon, J. Micromech. Microeng. **21**, 054024 (2011).
[17] N. Tottori, T. Nisisako, J. Park, Y. Yanagida, and T. Hatsuzawa, Biomicrofluidics **10**, 014125 (2016).
[18] F.M. White, McGraw-Hill, New York (1974).

第4章　PDMS 脱気駆動流を用いた粒子の濃縮と分離

未公表部

第5章　慣性フォーカスとマイクロピラーアレイによる粒子分離

未公表部

第6章　温度応答性高分子を用いた分離直径制御

未公表部

第7章　結論と展望

7.1 結論

・第 1 章「序論」

第 1 章では, 粒子分離の重要性および, 既存の粒子分離技術について紹介し, 本論文の第 2 章から第 7 章で述べた研究を実施するに至った背景および，研究目的について述べた.

・第 2 章「主滴とサテライト滴の分離」

第 2 章では，十字型マイクロ流路内の対称流れ場中で生成される主滴とサテライト滴の分離を目的とし，十字型マイクロ流路の下流部に DLD 流路を配置したデバイスを開発した．以下に得られた結果および知見を示す.

・1 段階 DLD デバイス

（1）W/O の液滴生成および分離実験において，連続相と分散相の設定流量が特定の範囲内であれば，主滴とサテライト滴を分離離可能であった.

（2）主滴とサテライト滴を分離可否領域について詳細に検討したところ，分離不可能な領域は状態別に 3 つに分類されることが明らかになった.

（3）W/O 実験と同様に，単相および二相性 O/W の主滴とサテライト滴も分離可能であることを明らかにした.

（4）主滴とサテライト滴の生成位置の分離への影響を検討したところ，主滴とサテライト滴がともにドレイン流路中央に位置していることが重要であるということが明らかになった.

・3 段階 DLD デバイス

主滴とサテライト滴，およびサテライト滴をサイズ別に連続分離可能な DLD デバイスを試作し, 主滴とサテライト滴, およびサテライト滴をサイズ別に分離可能であるということを実証した.

本章で提案したデバイスは，分離に外部エネルギー（電場，音場など）を必要とせず, デバイス構造が単純であるという特長がある．また，液滴の生成と分離が連続的なプロセスであるため，流路外での濾過工程も必要ない．そのため，工業生産や化学・生化学分析における, サテライト滴が除去された単分散な液滴の生成や，異なる大きさの単分散液滴の同時生成への応用が期待される.

・第 3 章「並列化流路による主滴とサテライト滴の分離」

第 3 章では，サテライト滴が除去された単分散エマルション滴の生成量の向上を目的としたデバイスの開発を行った．提案したデバイスは，下層に十字型マイクロ流路と DLD 流路が接続されたユニットが並列配置され，上層に液体を各流路に均等分配するためのリザーバが配置されている．本章では，3 次元シミュレーションおよび，試作デバイスによる液滴生成・分離実験において，以下の結果が得られた．

・3 次元シミュレーションによるリザーバ形状の検討

リザーバの容積が十分大きい場合，下層のマイクロ流路へと均等に流量分配可能であることが明らかになった．さらに，リザーバをモデル化し，均等に流量分配可能なリザーバを設計するための計算式を提案した．また，計算式から算出される最大分配流量比がシミュレーション結果と概ね一致する結果が得られた．

・試作デバイスによる液滴生成と分離

液滴生成実験では，分散相と連続相が並列化流路に概ね均等に供給され，単分散なエマルション滴が生成された．また，特定の流量範囲内において，第 2 章で提案したデバイスと同様に，主滴とサテライト滴を分離可能であり，単一のデバイスと比較して 8 倍の液滴生成量を得ることができた．

・第 4 章「PDMS 脱気駆動流を用いた粒子の濃縮と分離」

未公表部

・第 5 章「慣性フォーカスとマイクロピラーアレイによる粒子分離」

未公表部

・第 6 章「温度応答性高分子を用いた分離直径制御」

未公表部

7.2 今後の展望

7.2.1 デバイスの処理量の向上

粒子分離マイクロ流路デバイスで，大量のサンプルを処理する場合や，当該デバイスを生産技術へ応用する場合には，処理量の飛躍的な向上が必要不可欠である．例えば，医療分野において，血液検査の際に血球分離が行われるが，診断結果を迅速に得るためには，分離処理時間の短縮化が非常に重要となる．また，化学分野においては，生成物の単分散性を向上させるために粒子分級が行われるが，生産性を高めるために，多量の粒子を短時間で分離できるという条件は必須である．

本論文で得られた結果を踏まえ，今後の展望について以下に述べる．

（1）液滴分離デバイス

本論文の第 3 章では，サテライト滴が除去された単分散 W/O 液滴の生成量の向上を目的とした並列化デバイスの開発について述べた．以下に，その結果を踏まえた今後の展望を示す．

（a）単分散液滴の同時生成

第 2 章では，分離直径が異なる DLD 流路を直列に配列することによって，サテライト滴をサイズ別に分離し，異なる大きさの単分散液滴の同時生成を実施した．並列化デバイスでも同様に，複数の分離直径を有する DLD 流路を用いれば，異なるサイズの単分散液滴の生成量の向上が期待できる．

（b）O/W 液滴の生成

第 3 章では，W/O 液滴の生成を実施したが，流路表面を親水化処理することによって，サテライト滴が除去された O/W 液滴の生成量の向上も期待される．

（c）分離可能な液滴サイズ

第 3 章で分離した液滴サイズは，数マイクロメートルから数十マイクロメートルであったが，これまでに DLD 流路による，数十ナノメートル [1,2]から数ミリメートルサイズ [3]の粒子分離事例が報告されている．そのため，提案したデバイスにおいても，ナノメートルからミリメートルサイズの液滴分離へ応用できると考えられる．

（d）並列化数の向上

第 3 章で詳細は述べたが，デバイスの作製方法を変更することによって，液滴生成流路と DLD 流路のユニットを高密度に並列配置可能となり，生産量の増加が期待される．例えば，高密度な配置によって，スライドガラス基板上（76 mm × 52 mm）にユニットを 64 個並列化できる．

（e）粒子分離への適用

第 3 章で提案したデバイスは連続相と分散相の代わりに，それぞれシース液と粒子懸濁試料を導入すれば，粒子分離への応用も期待される．

（2）粒子分離デバイス

第 5 章で提案した，慣性フォーカスを用いた DLD デバイスでは，シースフローを用いておらず，既存のデバイスよりも構造が単純という特長がある．そのため，単一流路あたりの面積が小さくなり，既報の並列化 DLD デバイスよりも DLD 流路を高密度に並列配置できると考えられ，処理量向上に繋がることが期待される．

7.2.2 汎用性の向上

・粒子分離デバイスの POCT および環境計測への応用

第 4 章で提案した脱気駆動型 DLD デバイスを予め真空パックに保存すれば，携帯することが可能となる [4,5]．もし，使用したい場所で真空パックを開封し，試料を滴下するという非常に単純な操作で粒子濃縮・分離が可能となれば，POCT や環境計測への応用可能性は十分にあると考えられる．

・他の刺激応答性高分子を利用した分離直径制御デバイス

第 6 章では，刺激応答性高分子の 1 つである温度応答性高分子を用いた DLD 流路デバイスを提案したが，例えば，光や磁場などに応答する刺激応答性高分子を用いた分離直径制御可能なデバイスの開発も有用だと考えられる．

7.2.3 分離性能の向上

既に実用化されている装置（例えば FACS）では，細胞を蛍光で標識することにより分離を行うため，100%に近い分離効率が実現されているが，装置が大型・高価であるほか，煩雑な操作が必要であるという課題がある．一方で，受動的分離手法を用いたマイクロ流路デバイスの場合，デバイスの構造が単純であり，簡単な操作で分離が可能という特長はあるが，上記の手法と比べて分離効率が低

いという課題がある．そのため，単純な構造かつ簡単な操作にて，実用化されている装置と同等の効率で粒子分離可能なデバイスの実現が望まれる．

7.2.4 ナノ粒子の分離

本論文で取り扱った粒子サイズはマイクロメートルオーダーであるが，ナノメートルサイズの粒子分離技術が今後重要になると考えられる．例えば，医療・生化学分野では，近年，ナノメートルサイズの細胞外微粒子であるエクソソームが注目されており，分離が試みられているほか，化学分野では，ナノメートルサイズの粒子分離の需要も高い．一方で，現在，ナノ粒子分離のための確固たる技術は存在せず，新たな分離技術の開発が求められている．技術開発の上で，ナノ粒子分離の高処理量化は実用上必要不可欠であるほか，ナノ粒子の形状別分離技術の開発も望まれる．

また，本論文では，主に 2 つの異なるサイズの粒子の分離を実施したが，粒子の単分散性を向上させるために，ブロードな粒径分布を有するナノ粒子から，特定のバンド幅に分布するナノ粒子のみ分離することも有用だと考えられる．その他にも，ブロードな分布を持つ粒子を分離することによって，より正確な分離直径を評価できると考えられる．

7.2.5 DLD デバイスの応用範囲の拡大

本論文では，DLD 流路による粒子分離に関する研究ついて述べたが，DLD は粒子分離だけではなく，他の用途に応用が期待される．例えば，DLD 流路を反応場として利用することによる，機能性微粒子の調製などが考えられる [6].

7.3 参考文献

[1] L. R. Huang, E. C. Cox, R. H. Austin, and J. C. Sturm, Science **304**, 987 (2004).

[2] B. H. Wunsch, J. T. Smith, S. M. Gifford, C. Wang, M. Brink, R. L. Bruce, R. H. Austin, G. Stolovitzky, and Y. Astier, Nat. Nanotechnol. **11**, 936 (2016).

[3] T. Bowman, J. Frechette, and G. Drazer, Lab Chip **12**, 2903 (2012).

[4] D. Y. Liang, A. M. Tentori, I. K. Dimov, and L. P. Lee, Biomicrofluidics **5**, 024108 (2011).

[5] G. Li, Y. Luo, Q. Chen, L. Liao, and J. Zhao, Biomicrofluidics **6**, 014118 (2012).

[6] N. Tottori and T. Nisisako, Proc. Micro Total Anal. Syst. -Accepted (2018).

Appendix

A.1 マイクロ流路デバイスの作製

A.1.1 ソフトリソグラフィによるデバイス作製

マイクロ・ナノ構造を作製する際の加工手法には，多種多様な手法が用いられている．例えば，ウェットエッチング，ドライエッチング，レーザー加工，機械加工，ソフトリソグラフィなどが挙げられる．適用可能な加工手法は使用材料（ガラス，シリコンウェハ，ポリマー材料など）によって異なるので，目的に合わせて適切に材料と加工手法を選択する必要がある．

本研究では，ソフトリソグラフィ法にてデバイスを作製した [1]．ソフトリソグラフィとは，鋳型の構造をシリコーン樹脂(PDMS など)に転写することによって，マイクロ・ナノ構造物を作製する手法のことである．本手法では一度鋳型を作製すれば，容易に微細構造が転写されたシリコーン樹脂基板を作製可能であるという利点がある．

・鋳型作製 プロセス

まず，本研究における鋳型の作製手順に関して述べる．鋳型作製手順の概要を図 A. 1 に示す．

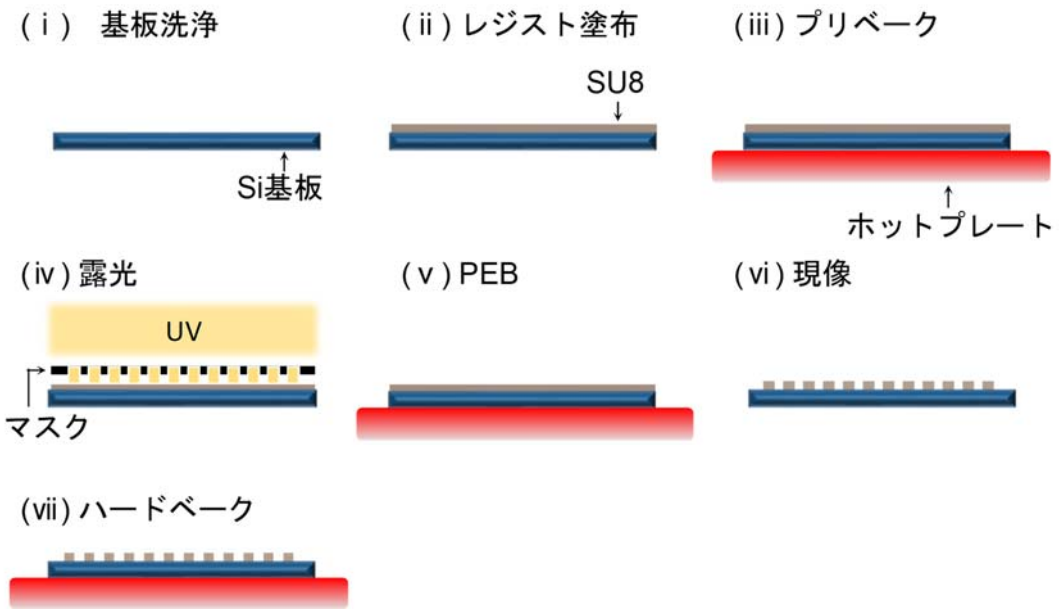

図 A. 1 SU-8 を用いた鋳型作製プロセスの概要図.

(ⅰ)基板洗浄

超音波洗浄機（US-2，iuchi）を用いて，アセトン，エタノール，純水の順番にSi 基板を各 5 分間洗浄した後，基板をホットプレートで加熱して乾燥させた.

(ⅱ)レジスト塗布

Si 基板上にネガ型レジストである SU8（日本化薬）をスピンコーター（1H-D7，ミカサ株式会社）を用いて塗布した. スピンコーターの回転条件は所望の膜厚に応じて調節した. 露光時におけるマスクと基板の密着性を高めるために，レジスト塗布後，基板の縁に盛り上がっているレジストは予め除去した.

(ⅲ)プリベーク

余剰溶媒を揮発させるために，ホットプレート上で加熱（65℃で 5 分間，95℃で 40 分間）した後，室温まで冷却した.

(ⅳ)露光

マスクアライナー（MA-10，ミカサ株式会社）を用い，レジストが塗布されたSi 基板をガラス基板上に固定されたフィルムマスク(厚み，0.175 mm ; 解像度，12700 dpi または 25400 dpi ; 海野技研)を介して露光した. 露光の際には垂直な壁面を作製するために 350 nm 以下の波長をカットする短波長カットフィルター（LU0350，朝日分光）を用いた.

(ⅴ)ポストエクスポージャーベーク(PEB)

露光した基板をホットプレート上で加熱（65℃で 1 分，95℃で 15 分）した.

(ⅵ)現像

パターンを露光した基板を SU8 現像液に浸し，振盪機（Wave-SIslim，TITEC）を用いて 10 分間撹拌しながら現像した後，イソプロピルアルコールにてリンスを行った.

(ⅶ)ハードベーク

最後に，ホットプレート上で加熱（150℃，10 分間）した.

・PDMS 流路作製プロセス

次に，PDMS 流路の作製手順を図 A. 2 に示す.

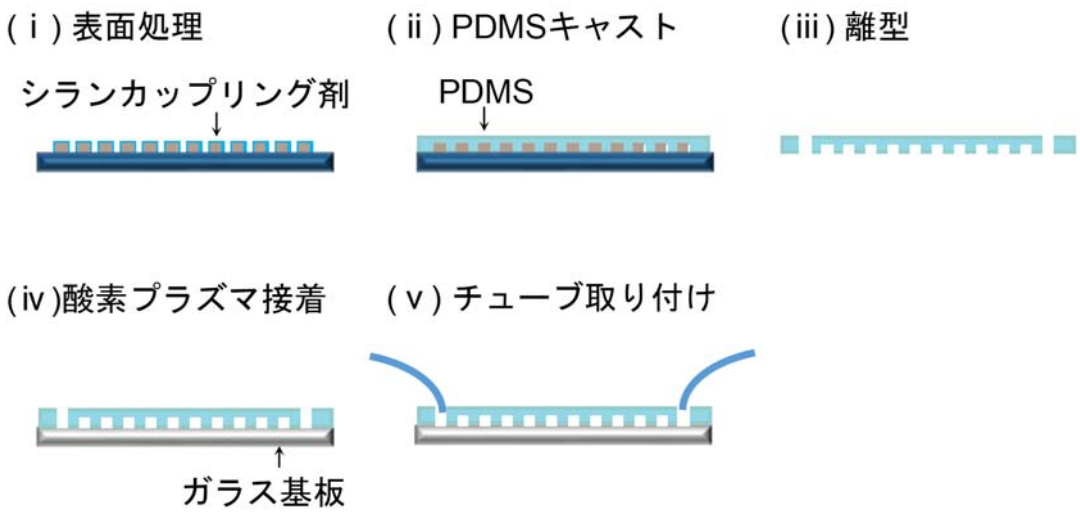

図 A. 2 PDMS 流路作製プロセス.

（i）鋳型の表面処理

作製した鋳型の表面を疎水化するために，シャーレの中に置いた鋳型の周囲に, クロロトリメチルシラン(0.5 mL ; 東京化成工業)を滴下し, 10 分間静置した. その後，ホットプレート（120℃，5 分）で加熱した.

（ii）PDMS キャスト

PDMS（SILPOT 184 W/C，東レ・ダウコーニング)の基材と硬化剤を 10 : 1 w/w の割合で混合した後，気泡を取り除くために真空デシケーター（MVD-100，アズワン）を用いて脱気を行った．その後，鋳型上に作製した PDMS を注ぎホットプレート上で加熱（80℃，1 時間）し硬化させた.

（iii）離型

硬化した PDMS を鋳型から剥がした後，流路部分のみを切り取り，Inlet と Outlet 部分にパンチ（穴直径 1.2 mm, 3.0 mm, 4.0 mm, Ted Pella, Harris Uni-Core）を用いて穴を開けた．穴を開ける際は，PDMS に亀裂が入らないように留意した.

（iv）接合

PDMS とガラス基板を接合する際は，デバイスの仕様に応じて，以下の 2 つの方法を用いた.

・酸素プラズマ接合

PDMS とガラス基板を不可逆的に接合する際は，酸素プラズマ処理による接合を行った．まず，プラズマ装置（BP-1，サムコインターナショナル）を用いて PDMS とガラス基板（76 mm×26 mm, 厚み 0.9-1.2 mm）に酸素プラズマ処理を施した. その後, PDMS とスライドガラスを接着させ, ホットプレート上にて 85℃, 1 時間加熱することで，PDMS とガラスを不可逆的に接合した．プラズマ処理の条件は，酸素流入量 20 ccm，出力 20 W，チャンバー内圧力 1000 mTorr とした．

・PDMS の自己吸着性

デバイスに付加される圧力が低い場合は，PDMS の自己吸着性を用いてガラス基板と接合した．この方法であれば, PDMS 基板をガラス基板から容易に脱着可能であるという特長がある．

（v）チューブの取り付け

デバイスの inlet と outlet には，ポリエチレンチューブ(外形 1.0 mm，内径 0.5 mm)を接続した．

A.1.2 作製デバイスの寸法評価

鋳型および，微細溝が転写された PDMS 基板を作製した後，それぞれの寸法測定を行った．鋳型と PDMS 流路の平面寸法の測定には光学顕微鏡（BX-51 または CKX-41，オリンパス）とカメラ（Fastcam Mini AX50，フォトロン）を用いた．高さ寸法の測定には，触針式表面形状測定器（Dektak150，アルバック）を用いた．また，鋳型および PDMS 表面の微細構造を観察するために，走査電子顕微鏡（JSM-6610LA、JEOL）を用いた．

A.2 周辺装置

A.2.1 実験装置の構成

本研究での主な実験装置の構成を図 A. 3，図 A. 4 に示す．実験装置の構成要素は，(a) マイクロ流路デバイス，(b) 観察系，(c) 送液系，(d) その他の 4 つに分類される．

(a)マイクロ流路デバイス
(b)観察系：光学顕微鏡，デジタルビデオカメラ，高速度カメラ．
(c)送液系：シリンジポンプ，シリンジ，チューブ．
(d)その他：フィルター，画像処理ソフトなど．

以下でマイクロ流路デバイス以外の要素（b～d）に関して述べる．

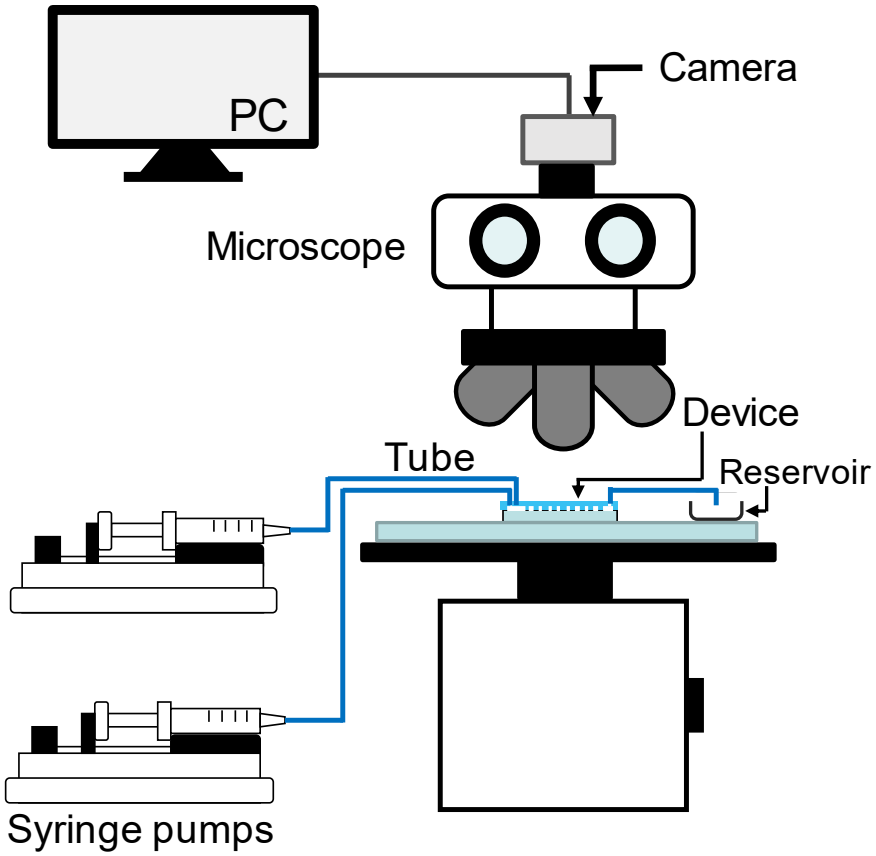

図 A. 3 実験装置の構成図（正立顕微鏡）．

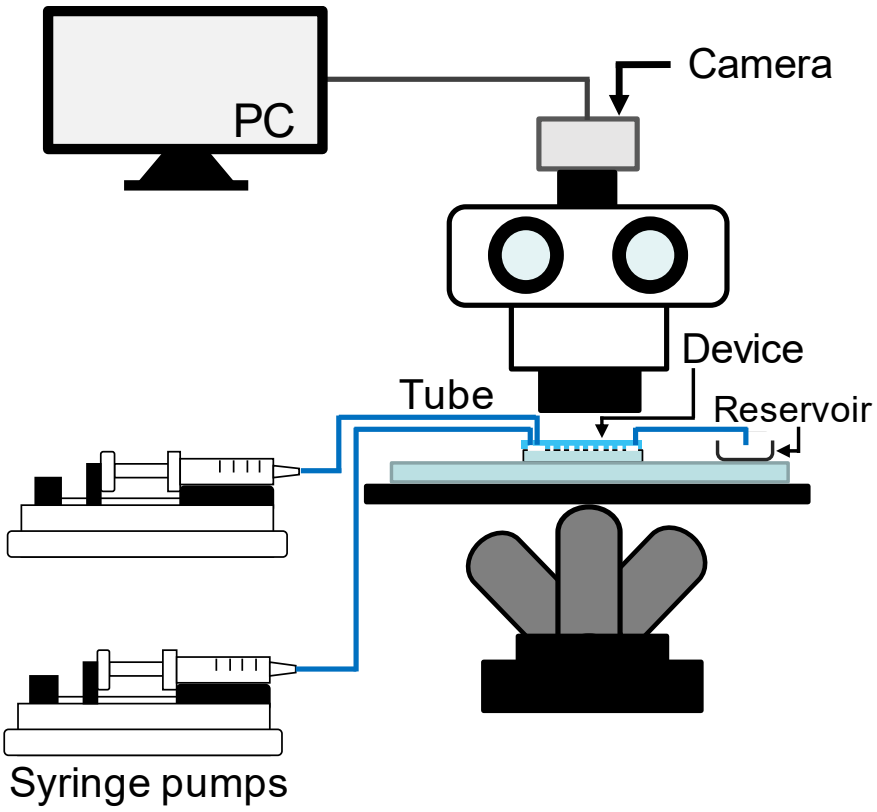

図 A. 4 実験装置の構成図（倒立顕微鏡）.

A.2.2 周辺機器

（i）観察測定系

・光学顕微鏡

光学顕微鏡には正立顕微鏡（BX-51，オリンパス）または倒立顕微鏡（CKX-41，オリンパス）を用いた.

・デジタルビデオカメラ

マイクロ流路内を観察，記録するために，光学顕顕微鏡にビデオカメラ（HC-750M，パナソニック）を取り付け，使用した.

・高速度ビデオカメラ

マイクロ流路内での高速現象を観察，記録する際は，光学顕顕微鏡に高速度ビデオカメラ（Fastcam Mini AX50 or Fastcam Mini WX100，フォトロン）を取り付け，使用した.

（ⅱ）送液制御系

本研究の第 4 章以外の章では, マイクロ流路に溶液を送液する際にチューブ, シリンジ，シリンジポンプを用いた.

・チューブ，継ぎ手

送液用のチューブとしてポリエチレンチューブ（内径 0.5 mm，外径 1.0 mm, ヒビキ）を用いた. チューブとシリンジを接続する際は, シリンジニードル（22G, 武蔵エンジニアリング）を用いた．また，チューブとマイクロ流路デバイスを接続する際は，チューブをデバイスのポートに直接挿入した.

・シリンジ

シリンジの材質にはガラス製又はプラスチック製のものが広く用いられている．プラスチック製のシリンジの場合，安価で，使い捨てが可能であるため取り扱いも容易であるという利点がある．一方で，プラスチック製のシリンジは圧力によって内容積が変動するため，応答性や精度の面ではガラス製のシリンジより劣る．そこで，本研究では，ガラスシリンジ（1000 Series; Hamilton Company, Reno, NV, USA）を用いた.

・シリンジポンプ

送液にはシリンジポンプ（KDS 200, KD Scientific, MA, U.S.A.）を用いた．シリンジポンプは, 内蔵されたモータをコントロールし，シリンジプランジャーを一定の速度で押すことによって所定の流量の制御を行っている．シリンジポンプを用いて溶液を低流量で送液する場合はモータの精度によって脈流が顕著になるため, 使用する条件によっては, 圧力制御による送液システムを利用する方が良い場合もある．本研究で用いたシリンジポンプの性能を表 2. 1 に示す.

表 2. 1 シリンジポンプの性能.

	KDS 200
ポンプの種類	押し出し
使用可能なシリンジの最大本数	2 本
シリンジサイズ	10 μl~140 ml
寸法	28×23×15 cm
質量	4 kg
押し出し力	176 N (18 kgf)
作動距離	0.165 μm (1/16 ステップ)
最大ステップ数	毎秒 800 ステップ
最小ステップ数	100 秒当たり 1 ステップ
精度	±1%未満
再現度	±0.1%
最小流量	0.001 μl/h (10 μl)
最大流量	8824 ml/h (140 ml)

（iii）その他

・シリンジフィルタ

溶液中のゴミによるマイクロ流路の目詰りを低減するために，シリンジフィルタ（CP020，ADVANTEC）を用いて予め溶液中に含まれるゴミを取り除いた.

A.3 参考文献

[1] D. C. Duffy, J. C. McDonald, O. J. A. Schueller, and G. M. Whitesides, Anal. Chem. **70**, 4974 (1998).

謝辞

指導教員である東京工業大学 科学技術創成研究院 未来産業技術研究所 西迫貴志准教授には，研究生活の様々な場面において，数多くの貴重な御助言，御指導をいただきました．研究を進める上で大切にすべきことなど，研究者のあるべき姿をはじめとして，論文執筆など研究者として生きる上で必要となる基礎的なスキルにいたるまで，数多くのことを学ばせていただきました．また，国内・国外での学会発表など貴重な機会をいただいたことで，自身の視野を広げることができ，本研究の進展の上でも，非常に有益なものとなりました．心より深く感謝申し上げます．

本研究を行うにあたり，副指導教員である東京工業大学 科学技術創成研究院 未来産業技術研究所 初澤毅教授には，実験室や実験装置をはじめ，素晴らしい研究環境を提供していただくとともに，数多くの貴重な御助言，ご指導をいただきました．心より深く感謝いたします．

メカノマイクロプロセス室および分析支援センターの技術職員の方々には，デバイスの作製および測定に関する有用な助言をいただきました．ここに深く感謝いたします．

日産化学工業株式会社　片山淳子　様，岸岡高広　様には，本論文の「第 6 章」にて記述したマイクロ流路の製作に関して，有用な助言をいただきました．また，無償にてサンプルも提供いただきました．ここに深く感謝いたします．

ご多忙の中，以下の諸先生方には，本論文の審査員をお引き受けいただくとともに，数多くの貴重な御助言，ご指導をいただきました．厚く御礼申し上げます．

東京工業大学 科学技術創成研究院 未来産業技術研究所　初澤毅 教授
東京工業大学 科学技術創成研究院 未来産業技術研究所　進士忠彦 教授
東京工業大学 工学院 機械系　石田忠 准教授
東京工業大学 工学院 機械系　青野祐子 准教授

最後になりましたが，長い間ご援助くださり，私をいつも支えて下さった友人や家族に深く感謝の意を表したいと思います．

2018 年 8 月
鳥取直友

本論文に関連する業績

1. 査読付き国際論文誌（掲載済み 2 報，投稿中 1 報）

1. **N. Tottori**, and T. Nisisako, "*Degas-driven deterministic lateral displacement in polydimethylsiloxane microfluidic devices*", *submitted*. （第 4 章の内容）

2. **N. Tottori**, and T. Nisisako, "*High-throughput production of satellite-free droplets through a parallelized microfluidic deterministic lateral displacement device*", ***Sens. Actuator B-Chem.***, 260, 918–926, 2018. （第 3 章の内容）

3. **N. Tottori**, T. Hatsuzawa and T. Nisisako, "*Separation of main and satellite droplets in a deterministic lateral displacement microfluidic device*", ***RSC Adv.***, 7, 35516–35524, 2017.（第 2 章の内容）

2. 国際会議発表（6 件）

査読有

1. ○**N. Tottori**, and T. Nisisako, "*Degas-driven microfluidic deterministic lateral displacement*", **The 22nd International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2018)**, Kaohsiung, Taiwan, Nov. 2018. (ポスター発表，発表決定済)

2. ○**N. Tottori**, and T. Nisisako, "*Hands-off particles separation using a deterministic lateral displacement microfluidic device*", **The 7th International Conference of Asian Society for Precision Engineering and Nanotechnology (ASPEN 2017)**, MEM-O-01, Seoul, KOREA, Nov. 2017. (口頭発表)

3. ○**N. Tottori**, and T. Nisisako, "*Sheathless deterministic lateral displacement for continuous particle separation in viscoelastic fluid*", **The 21st International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2017)**, pp.1409–1410, Savannah, GA, USA, Oct. 2017. (ポスター発表)

4. ○**N. Tottori**, and T. Nisisako, "*Particles separation via sheath-free deterministic lateral displacement with inertially focused single input*", **The 21st International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2017)**, pp. 1373–1374, Savannah, GA, USA, Oct. 2017. (ポスター発表)

査読無

5. ○T. Nisisako, and **N. Tottori**, "*Microfluidic separation of main and satellite emulsion droplets through micropillar arrays"*, **EMN Orlando Meeting 2017**, pp.87–88, Orlando, FL, USA, Dec. 2017. (口頭発表)

6. ○**N. Tottori**, T. Hatsuzawa, and T. Nisisako, "*Separation of biphasic main and satellite droplets using micropillar arrays*", ***RSC Tokyo International Conference 2016***, p. 37, Makuhari, Japan, Sep. 2016. (ポスター発表)

3. 国内会議発表（11 件）

1. ○鳥取直友，西迫貴志，脱気 PDMS 駆動型 DLD マイクロ流路による微量血液分離，化学工学会第 50 回秋季大会，EF218，鹿児島大学郡元キャンパス（鹿児島），9/18–20（2018）.（発表決定済）

2. ○鳥取直友，西迫貴志，慣性フォーカスと DLD マイクロピラーによる微粒子分離，第 46 回可視化情報シンポジウム，明治大学駿河台キャンパス（東京），9/14–16（2018）.（発表決定済）

3. ○鳥取直友，西迫貴志，脱気 PDMS 駆動流を用いた DLD マイクロ流路デバイス，化学とマイクロ・ナノシステム学会第 37 回研究会，2P22，p. 54，産業技術総合研究所つくばセンター（茨城），5/21–22（2018）.

4. ○鳥取直友，西迫貴志，PDMS 脱気駆動流を用いたポンプフリーDLD 微粒子分離，2018 年度精密工学会春季大会, H20，pp.485–486，中央大学後楽園キャンパス（東京），3/15–17（2018）.

5. ○鳥取直友，西迫貴志， 慣性力を用いた単一入力型 DLD 分離デバイス， 化学とマイクロ・ナノシステム学会第 36 回研究会，1P15，p.19，桐生市市民文化会館（群馬），10/4–5 （2017）.

6. ○鳥取直友，西迫貴志， 慣性力によるフォーカスとマイクロピラーを用いた微粒子分離， 2017 年度精密工学会秋季大会, N25, pp.909–910, 大阪大学豊中キャンパス（大阪），9/20–22 （2017）.

7. ○鳥取直友，西迫貴志，温度応答性 DLD マイクロ流路による微粒子軌道の制御，化学工学会第 82 年会，PE360，芝浦工業大学（豊洲），3/6–8 （2017）.

8. ○鳥取直友，西迫貴志， 慣性力とマイクロピラーアレイによるバッファレス微粒子分離，化学工学会第 82 年会, G116, 芝浦工業大学（豊洲）, 3/6–8 （2017）.

9. ○鳥取直友，初澤毅，西迫貴志，DLD マイクロ流路デバイスによる主滴とサテライト滴の分離，第 33 回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム，25pm4-PS-098，平戸文化センター（長崎），10/24–26 （2016）.

10. ○鳥取直友，初澤毅，西迫貴志，並列化 DLD マイクロ流路デバイスを用いた主滴とサテライト滴の分離, 第 34 回化学とマイクロ･ナノシステム学会, p.63, 幕張メッセ（千葉），9/6–7 （2016）.

11. ○鳥取直友，初澤毅，西迫貴志，温度応答性マイクロピラーアレイを用いた微粒子分離，化学工学会第 48 回秋季大会，Q117, 徳島大学常三島キャンパス（徳島），9/6–8 （2016）.

4. 特許（2 件）

1. 特願 2016-233582，微粒子分離デバイスおよび微粒子の分離方法，出願日 2016.11.30

2. 特開 2018-030057, 微粒子分離デバイスおよび微粒子の分離方法, 公開日 2018. 3. 1

5. 受賞歴（2 件）

1. 2017 年度精密工学会秋季大会，ベストプレゼンテーション賞，2017 年 9 月

2. 化学工学会第 82 年会，優秀学生賞，2017 年 3 月