

# 均一な人工細胞を構築するマイクロ流体デバイスの開発

## Development of microfluidic devices for construction monodisperse artificial cells

精密工学専攻 71号 山田寛己  
Tomoki Yamada

### 1. 緒言

巨大人工脂質膜小胞 (Giant Unilamellar Vesicle, GUV) を細胞サイズのマイクロバイオリクターとして用いた研究が近年多くなされている。GUV の中で、タンパク質の合成反応<sup>(1)</sup>や核酸の増幅反応<sup>(2)</sup>を行い、細胞内反応の特性を調べたり、分子の検出に利用することができる。その定量的な解析において、GUV の大きさの均一性は重要なパラメータの一つである。従来の GUV の作製法は、静置水合法やエレクトロフォーメーション法、液滴界面通過法などのバルクでの方法が主流である。これらの作製法は手順が簡単であるが、作製される GUV のサイズは多分散であり、多層膜のものも同時に作製されてしまうなど、再現性良く均質な GUV を作製するのは難しい。近年、マイクロ流体デバイスを用いた、water-in-oil-in-water droplet (W/O/W エマルジョン、ダブルエマルジョンとも呼ばれる) を基にした単分散 GUV の作製法が複数のグループから報告されている<sup>(3,4,5)</sup>。これらの先行研究では、脂質膜間の界面張力のつり合いから生じるオイル層の逆濡れ (dewetting) 現象を利用して、オイル層をドロップレットから分離させて GUV を得る。ここで、逆濡れが起こるためには、オイル層が薄いことが好ましく、そのためには流量の厳密な制御が必要である。また、オイル層が薄い場合、W/O/W 液滴が形成直後に壊れるという現象も起こりやすいため、安定した作製が行えず、再現性に課題があった。

本研究では、二段階フローフォーカス流路において比較的厚いオイル層を持つ W/O/W ドロップレットを作製し、その後オイル層を物理的に分離し、薄膜ドロップレットにすることで GUV 形成を促す方法を開発した。本研究ではマイクロ流体デバイスに設けた分岐や障害物による分離法と、流路形状によって発生する流体の剪断力を利用した分離法を試みた。また、後者のデバイスにおける分離性能の評価、および GUV 作製の安定性を評価した。

### 2. マイクロ流体デバイスの作製

#### 2.1. PDMS 流路の作製方法

本研究で使用するマイクロ流体デバイスは、フォトリソグラフィ技術によって作製した鋳型を透明シリコンゴム (PDMS) へ転写することで作製した。始めに、フォトリソグラフィによってシリコンウェハ上にフォトレジスト (SU-8 3010 または mr-DWL 40) を流路のデザイン通りになるように露光・現像し、鋳型を作製した。次に、PDMS の注型により構造を転写した後、マイクロ流路の送液口、およびドロップレット・GUV 回収口に直径 0.75 mm の穴を開けた。PDMS をスピコートしたスライドガラスとマイクロ流体デバイスに酸素プラズマ処理を施し、120°C に設定したホットプレートで加熱することで接合した。

#### 2.2. 実験方法

本研究では、W/O/W ドロップレットの内液成分と外液成分の二種類の水溶液、および GUV 膜の主成分である脂質を溶解させたオイルを、圧力ポンプを用いてマイクロ流体デバイスに送液した。顕微鏡の観察画面を見ながら PC によって印加する各溶液の圧力値を微調節し、適切な流動状態を得た。作製した液滴は、デバイス出口のチューブ先端から両面テープを貼り付けたカバーガラスに直接滴下し、小さいカバーガラスで閉じることで観察用サンプルを作製した。倒立顕微鏡または共焦点顕微鏡を用い、得られた液滴や GUV の明視野および蛍光観察を行った。

#### 2.3. 親水化

W/O/W ドロップレットを作製するためには、マイクロ流路内を部分的に親水性に塗り分ける必要がある。デバイスは PDMS で作製しているために流路の全面は疎水性である。そのため、親水性の高分子である PVA (ポリビニルアルコール) により PDMS 流路内壁を部分的にコーティングすることで親水性へと塗り分けた。本実験で用いる流路は、外液を流す流路のみ PVA を送液することで親水性に塗り分けた。この時、内液とオイルが流れる流路に PVA が侵入することを防ぐため、PVA の送液中には内液とオイルの送液口から空気を流した。10 分間インキュベートした後、空気の押し出しと吸引によって流路内の PVA 溶液を除去し、120°C に設定したホットプレート上で 10 分間乾燥させた。

### 3. W/O/W ドロップレットからのオイル層分離

#### 3.1. 流路分岐によるオイル層分離

##### 3.1.1. 流路デザインと溶液組成

マイクロ流路を用いた W/O/W ドロップレットの作製には二段階フローフォーカシング法 (二段階 FF 法) を用いた。実際の流路デザインを Fig. 1 に示す。第一段階の FF 部では、内液の流れがオイルで切断され、W/O ドロップレットが作製される。それが、第二段階の FF において外液で包みこまれ、比較的厚いオイル層をもつ W/O/W ドロップレットが作製される。以下の実験では、全てこの二段階 FF 法により W/O/W ドロップレットを作製した。FF 部の下流において、W/O/W ドロップレットのオイル層を分岐によって分離させ、出口から回収し、顕微鏡観察した。

W/O/W ドロップレットの内液には Pluronic F-68 5% と glycerol 15%、外液成分には Pluronic F-68 5% と glycerol 15%、脂質溶液として POPC 2.0 mg/ml と DSPE-PEG 1 mg/mL を溶解させた 1-octanol を使用した。

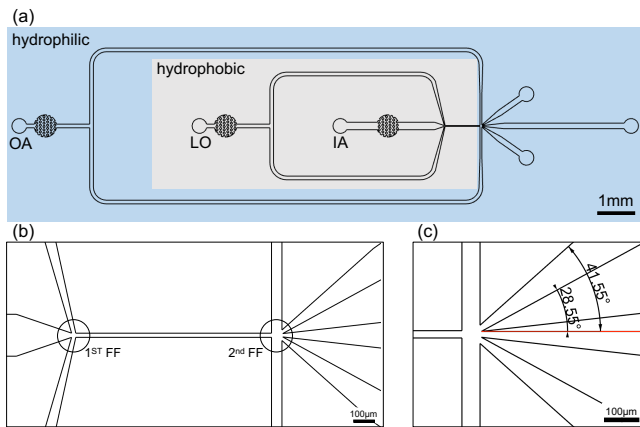


Fig. 1 (a) Design of two-stage flow focusing microfluidic channel with branches. (b) Close-up of the section for generation of W/O/W droplet droplets. (c) Detail of the branching section for oil separation.

### 3.1.2. 実験結果

この流路では FF 部で W/O/W ドロップレットが作製され、分岐部でオイルの一部が分割されることが確認された (Fig. 2 (a)). これは、流路内で W/O ドロップレットが外液に包まれる際、外液が三方向に広がって流れることで W/O ドロップレットが分岐形状に沿って変形し、分岐部に接触することで起きたと考えられる。また、得られたドロップレットを観察した結果、W/O/W ドロップレットと O/W ドロップレットの両方が観察された (Fig. 2(b)). O/W ドロップレットは、オイル液滴内に含まれている W/O ドロップレットが外液と融合した結果生じたと考えられる。また、本条件では明確な dewetting 現象は観察されなかった。オイル層が厚すぎたためか、使用した組成が適切でなかったことが考えられる。

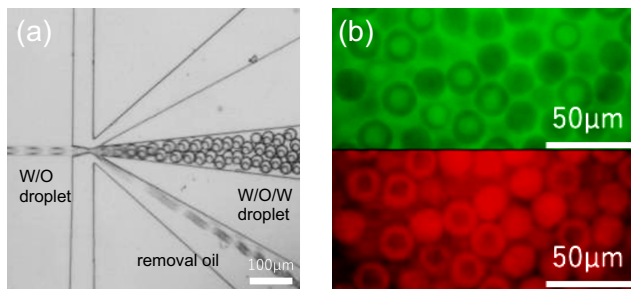


Fig. 2 (a) W/O/W droplet generation and removal of oil at the branching section. (b) Droplet droplet (top: inner liquid fluorescence, bottom: oil phase fluorescence)

## 3.2. 流路分岐+障害物によるオイル層分離

### 3.2.1. 流路デザインと組成

次に、W/O/W ドロップレットを作製後、まず分岐によりオイル層を分離させ、下流にある多数の障害物に衝突させることでさらなるオイル層の分離を行う流路を設計した。実際の流路のデザインを Fig. 3 に示す。この流路で薄膜の W/O/W ドロップレットを作製して回収し、顕微鏡観察を行った。溶液の組成は 3.1 と同様のものを用いた。

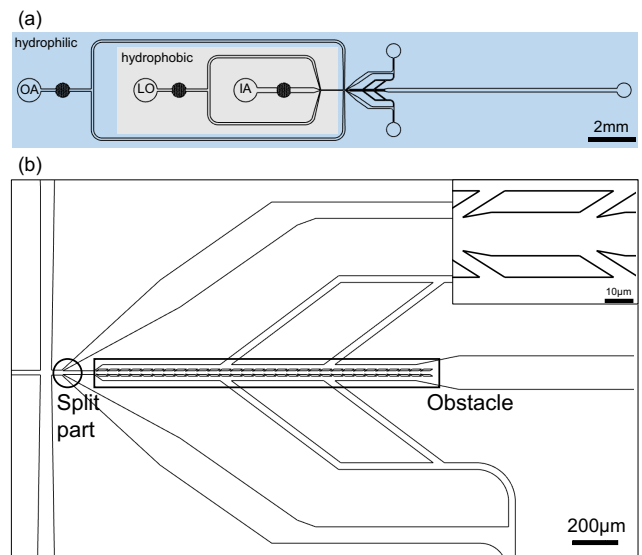


Fig. 3 (a) Design of two-stage flow focusing microfluidic channel with obstacles. (b) Close-up of the oil separation section.

### 3.2.2. 実験結果

この流路では、分岐部と障害物部において、W/O/W ドロップレットから分離されたオイルが流れるのが確認でき、下流で 3.1 よりオイル層が薄い W/O/W ドロップレットが得られた (Fig. 4 (a,b)). これは、3.1 と同様に分岐部でオイルが分離し、その後障害物に衝突することで、さらに余分なオイルが削られたためだと考えられる。回収した液滴の明視野観察の結果を Fig. 4(c) に示す。3.1 よりもオイル層の薄い W/O/W ドロップレットと O/W ドロップレットが観察された。後者は、分離されたオイルも同時に回収したためである。

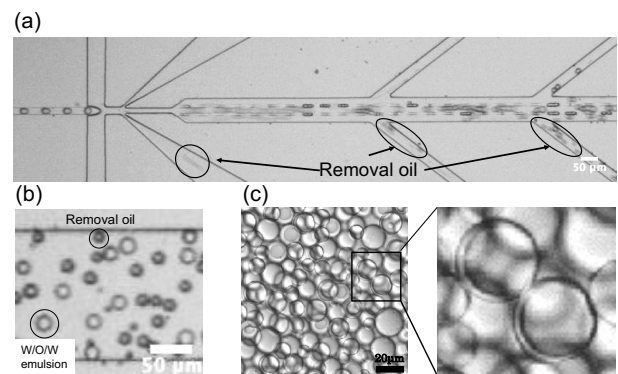


Fig. 4 (a) W/O/W droplet generation and removal of by branching and obstacles. (b) W/O/W droplet and oil droplets in the downstream. (c) Droplets collected from the outlet.

また、本条件では、オイルの dewetting 現象が確認されなかった。これは、作製した W/O/W ドロップレットのオイル層が、dewetting 現象が起きるにはまだ厚すぎるか、組成が適切でないことが予想された。

## 3.3. 流体のせん断によるオイル層分離

### 3.3.1. 流路デザインと組成

文献を参考に、W/O/W ドロップレットの作製の安定化の

ために二段階目のFF部直下に三角形のオリフィス構造を追加した流路を作製した。実際のデザインを Fig. 5 に示す。FFの十字ジャンクションの後方をオリフィス構造により広くすることで、ドロップレット形成部において流速が最大になる速度勾配が形成される<sup>(6)</sup>。W/O ドロップレットが外液層に包まれたのち、その下流においてオイル層が流れ方向に対して側方に広げられることにより、オイルの切断が促進され、W/O/W ドロップレットの形成が安定化される<sup>(7)</sup>。ドロップレットは、形成後に流路幅を拡大した部分 (dewetting area) に流入する。ここでは、流路幅の拡大により流速が局所的に下がり、dewetting が促され GUV への変換が行われる。流路出口から GUV を回収し、顕微鏡で観察した。組成は作製された GUV と分離されたオイルを回収後、糖の比重差によって分離させるために、GUV の内液として Sucrose 1 M と PVA 1% の水溶液、GUV の外液として Pluronic F- 68 5%、Glucose 1 M と PVA 1% の水溶液を使用し、脂質溶液として DOPC 15 mg/mL と DOPG 15 mg/mL を溶解させた 1-octanol を使用した。

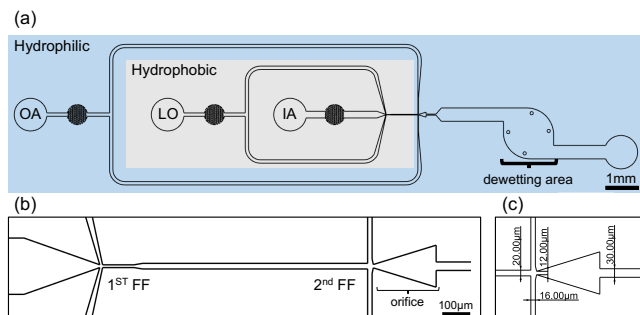


Fig. 5 (a) Design of two-stage flow focusing microfluidic channel with triangular orifice and narrowing channel. (b) Close-up of the FF section. (c) Close-up of the orifice section.

### 3.3.2. 実験結果

Fig. 6 (a) に、送液時の W/O/W ドロップレットおよび GUV 形成過程の顕微鏡写真を示す。第二段階の FF 部において、W/O ドロップレットを含むオイル層が外液に挟まれて流下する。そして、三角形オリフィス構造において流れが側方に広がって減速し、オイル層が比較的大きい W/O/W ドロップレットが形成された。そして、オリフィス構造の下流で流路が再度狭まった部分では、W/O/W ドロップレットのオイル層の分離が確認された。これは、一度広がった流路を狭めたことで流速が急激に増加し、W/O/W ドロップレットの厚いオイル層が流れ方向に沿って引き伸ばされ、分離が促されたと考えられる。下流では、W/O/W ドロップレットのオイル層が dewetting 現象により分離し、ドロップレットが GUV に変換されることが確認された (Fig. 6(b))。この結果より、単分散 W/O/W ドロップレットから GUV が作製されたと考えられる。さらに、流路出口から回収した GUV をレーザー共焦点顕微鏡で蛍光観察したところ (Fig. 6(c))、GUV と dewetting により分離された oil droplet の両方が確認された。画像中の直径 26µm 以上の液滴が GUV であり、5µm 程度の液滴が oil droplet である。また、GUV の各個体で輝度値に違いが見られた。これは、内液成分の蛍光試薬が GUV より漏出したためだと考えられる。Fig. 6(d) に、画像解析から求め

た GUV の サイズ分布を示した。グラフより、26~30µm の範囲の GUV が多く作製された。

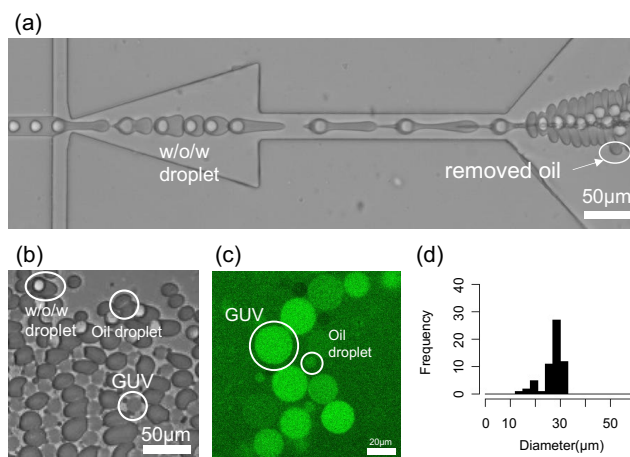


Fig. 6 (a) W/O/W droplet generation and oil layer removal processes at the 2nd flow-focusing section with a triangular orifice. (b) Dewetting process of the oil layer at the dewetting area. (c) Fluorescent confocal laser scanning micrograph of GUVs collected from the outlet of the microchannel. (d) Size distribution of the produced GUVs.

## 4. GUV 形成の安定性の評価

### 4.1. オリフィス後の狭窄のオイル分離への影響

3.3.節で述べた、オリフィスを使用した流路では、オイル分離と GUV 回収を最も高い効率で行うことができた。オイル分離は、オリフィスの狭窄による流速の急激な変化によって生じた剪断力によって促されたと考えられる。従って、本章では、狭窄部の幅 (3.3.では 30 µm) を狭窄なし、20, 30, 40 の 4 種類に変更し、オイル分離に与える影響を調べた。組成は 3.3.の脂質溶液に新たに cholesterol 1 mg/mL を加えたものを用いた。

狭窄なしの条件では、流路幅が広がった分、流路抵抗が減少したためオイルが連続的に流れ、W/O/W ドロップレットが作製されなかった。幅 (W) を 20 µm に狭めた場合は、W/O/W ドロップレットのオイル層が狭窄部にて引き伸ばされ分離の様子が確認された。30 µm と 40 µm の条件では、狭窄部でオイルが引き伸ばされる様子がそれぞれで確認されたが、オイル分離は起こらなかった。しかし、狭窄部通過後に分離されたオイルが確認された。これらの結果は、それぞれ、流路内での流速の急激な変化によって粘性の低いオイルが変形したためだと考えられる。また、余分なオイルを分離した後の W/O/W ドロップレットの残存オイルの量を W=20, 30, 40 µm の条件で比較したところ、W=20 の場合が最も少なかった。

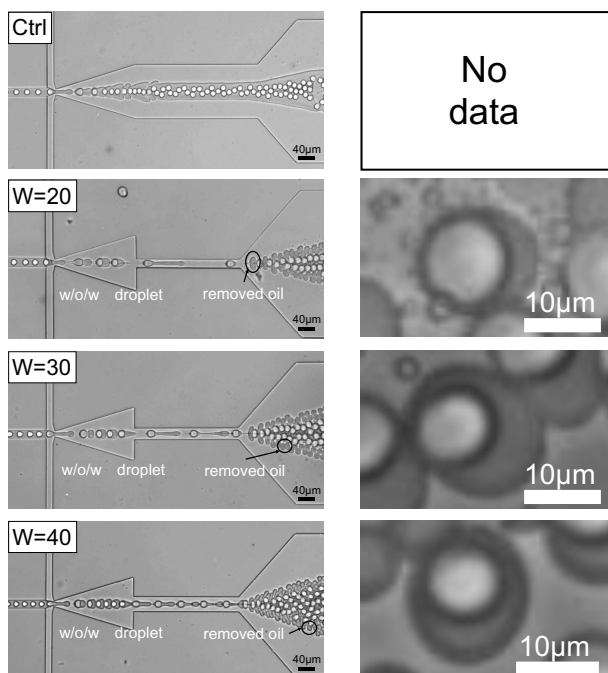


Fig. 7 Comparison of the droplet generation processes with various width of the narrowing flow channel. (left) Overview of the flow. (right) Closeup view of W/O/W droplet after oil separation.

#### 4.2. オリフィス入口部の幅の W/O 液滴の分裂への影響

GUV のサイズは、第一段階の FF で形成される W/O ドロップレットのサイズに依存している。そのため、均一な GUV を得るには、W/O/W ドロップレット形成部において W/O ドロップレットが分裂してはいけない。そのため、W/O ドロップレットが外液に包まれる部分の幅  $M$  (3.3.では  $12 \mu\text{m}$ ) を 12, 14, 16, 18,  $20 \mu\text{m}$  に変化させた場合で、W/O が分裂することなく W/O/W ドロップレットが形成できるのかを調べた。本実験では GUV を回収する際に 30 分程度必要とするため、W/O/W ドロップレット形成時の状態を、30 分間維持可能かを調べた。組成は 4.1.の cholesterol 濃度を  $15 \text{ mg/mL}$  に変更し使用した。

Fig. 8 に各  $M$  の値での結果を示す。  $M=12, 14$  の場合はそれぞれ 9 秒後、9 分後に W/O ドロップレットが分裂した。  $M=16$  では、W/O ドロップレットが分裂しない送液状態が少なくとも 30 分維持できた。  $M=18, 20$  では W/O ドロップレットが外液に包まれずにオイルが連続的に流れた。以上の結果から、  $M$  の値が小さければ水滴が変形して W/O ドロップレットが分裂し易く、大きければ流路抵抗が下がりオイルの液滴ができづらいため、最適なオリフィス入口部の幅があることが予想される。

#### 5. 結言

本研究では、二段階 FF 法を用いて、制御が容易で再現性の高い均一 GUV 作製法の確立を目指した。障害物や分岐、流路の狭窄による流速の剪断力のいずれの場合においても、W/O/W ドロップレットのオイル層を分離が可能であった。そのうち、FF 部の直下流でオリフィスの形状を導入することで W/O/W の形成を安定させ、その後の狭窄により分離さ

れるオイル量の調整および GUV 形成の安定性向上が可能であることを示した。オリフィスを用いた流路のみ GUV 作製に成功したことから、流体の剪断力を用いたオイル分離と用いた組成は GUV への変換を促進すると考えられる。今後は、本システムで作製した単分散 GUV をバイリアクターとして用いる応用に発展させる。

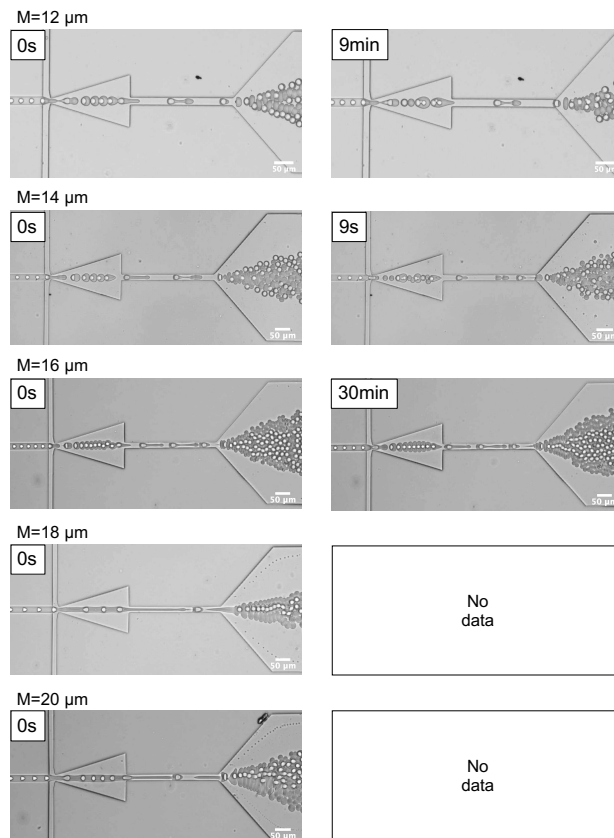


Fig. 8 Comparison of the droplet generation processes with various width of the opening of the orifice. (left) At the beginning of the experiment. (right) The time W/O droplet broke down and the results could be maintained for 30 minutes.

#### 6. 参考文献

- (1) Nishimura, Kz., Tsuru, S., Suzuki, H., Yomo, T., Stochasticity in Gene Expression in a Cell-Sized Compartment, *ACS Synth. Biol.*, **4-5** (2015) pp. 566-576.
- (2) Tsugane, M., Suzuki, H., Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction in Giant Unilamellar Vesicles, *Sci. Rep.*, **8-1** (2018) pp. 1-11.
- (3) Deng, N. N., Yelleswarapu, M., Huck, W. T. S., Monodisperse Uni- and Multicompartment Liposomes, *J. Am. Chem. Soc.*, **138-24** (2016) pp. 7584-7591.
- (4) Deshpande, S., Caspi, Y., Meijering, A. E. C., Dekker, C., Octanol-Assisted Liposome Assembly on Chip, *Nat. Commun.*, **7** (2016) pp. 1-9.
- (5) Ushiyama, R., Koiwai, K., Suzuki, H., Plug-and-Play Microfluidic Production of Monodisperse Giant Unilamellar Vesicles Using Droplet Transfer across Water-Oil Interface, *Sens. Act. B: Chemical.*, **355** (2021) 131281.
- (6) Teh, S., Khnouf, R., Fan, H., Lee, A., Stable, Biocompatible Lipid Vesicle Generation by Solvent Extraction-based Droplet Microfluidics, *Biomicrofluidics.*, **5-4** (2011).
- (7) Hidema, R., Ohashi, R., Muller, S., Suzuki, H., Effects of Channel Geometry and Physicochemical Properties of Solutions on Stable Double Emulsion Production in Planar Microfluidic Devices Having Triangular Orifices, *AIP Adv.*, **11-6** (2021).