

薄膜ダブルエマルジョン作製用マイクロ流路デバイス

東京工業大学 工学院 ○前嶋完紀, 東京工業大学 科学技術創成研究院 ◎西迫貴志

要 旨

薄膜を有するダブルエマルジョンを生成するマイクロ流路技術が近年注目されている。そこで本研究では Water-in-Oil-in-Water (W/O/W) 型ダブルエマルジョンを薄膜化可能なマイクロ流路デバイスの開発に取り組んだ。2次元フローフォーカシング構造を連結したシリコン樹脂製の流路に、内水相として純水、中間相としてレシチン含有オレイン酸、外水相としてポリビニルアルコール水溶液を用い、直径の約7.6%の膜厚を有する単分散の単核 W/O/W エマルジョンを生成した。

1. 研究目的・意義

水と油のように互いに親和性の低い2つ以上の液体からなる液液分散系はエマルジョンと呼ばれ、医薬品、化粧品、農薬、食品、塗料等、幅広い産業分野にて用いられる。このエマルジョンが別の液体中に再分散され、Water-in-Oil-in-Water (W/O/W) 型や Oil-in-Water-in-Oil (O/W/O) 型といった具合に、分散液滴内に液滴が封入されたものをダブルエマルジョン（又は多相エマルジョン、複相エマルジョン等）と呼ぶ。ダブルエマルジョンは、内部に有効物質を包含させ外部環境から保護できるため、例えば二分子膜からなる小胞体^[1]や生分解性ポリマーからなる薬剤カプセル^[2]を調製する前駆体として有効とされ、その作製法が研究されてきた。

近年、サイズおよび内部構造を精密に制御した各種単分散ダブルエマルジョンをマイクロ流路を用いて生成できるようになり、^[1,3,4]本技術を応用した研究が盛んに行われている。そうした中、液滴径に対して殻の厚さを極力薄くした超薄膜の単核ダブルエマルジョンが、有効成分をより多く封入でき、且つ放出挙動を精密に制御できるとして注目されている。いくつか作製事例があるものの、その多くは複雑な3次元構造の流路を用いており、^[5,6]作製・拡張がより容易な2次元流路の事例は少ない。

そこで本研究では、単核型の単分散 W/O/W エマルジョンを生成でき、且つその外殻を構成する油膜をできるだけ薄くするためのマイクロ流路デバイスの設計・製作を行った。また、作製したデバイスを用いて単核型 W/O/W エマルジョンを生成し、内包液滴と外部液滴のサイズおよびサイズ分布、および膜厚の評価を行った。なお、本稿の内容のうち、登壇者は実験の実施および結果の解析に関する全ての作業を担当した。

2. 研究の方法

2.1 マイクロ流路デバイスの設計

本研究で設計・製作したマイクロ流路デバイスは、平面上に配置されたマイクロ流路部に加え、外水相、中間相（油相）、内水相を流入させる3つの供給孔、生成されたダブルエマルジョンを回収するための1つの排出孔を有する（Fig. 1a）。マイクロ流路部は、疎水性、親水性表面をもつ2つのフローフォーカシング（FF）型^[7]の液滴生成部を連結させた構造を有しており、疎水性である上流側FF部で生成された Water-in-Oil 型（W/O）液滴（Fig. 1b）が、親水性である下流側FF部に供給されて W/O/W 液滴が生成される、2ステップ型^[3,4]の機構となっている（Fig. 1c）。流路の断面は矩形であり、各FF部の入力流路はいずれも幅100 μm 、1段目FF流路の絞り幅は50 μm 、2段目FF流路の絞り幅は100 μm 、ドレイン流路幅は200 μm とし、深さは一律に100 μm とした。

2.2 マイクロ流路デバイスの作製

上記のマイクロ流路をソフトリソグラフィ法^[8]により作製した。まず、フィルムマスク（PET製、 $t=0.175\text{ mm}$ 、12,700 dpi、海野技研）を用いたフォトリソグラフィにより、シリコン基板（ $t=380\text{ }\mu\text{m}$ ）上にネガ型フォトレジスト SU-8-3050（日本化薬）からなる流路パターンを凸型を作製した。次に、PDMSの原料と硬化剤の混合液（重量比10:1、Silpot184、東レ・ダウコーニング）を流し込み、加熱して硬化させて剥離し、供給孔と排出孔をパンチ加工により作製した。その後、PDMSを薄くコートしたスライドガラス（76 mm \times 26 mm、 $t=0.9\text{--}1.2\text{ mm}$ ）と酸素プラズマ処理により接合することで、内壁四面が全てPDMSで構成されるマイクロ流路デバイスを得た。最後に、酸素プラズマ処理後に、PVA（Mw 31,000–50,000、87–89% hydrolyzed, Merck）の1wt%水溶液を送液することで、下流側FF部近傍の親水化処理^[9]を行った。

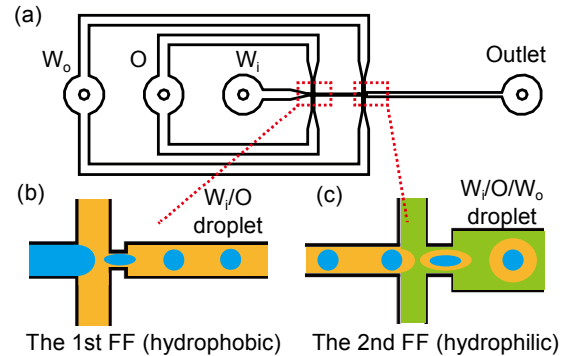


Fig. 1 Schematic illustration of the microfluidic device for making water-in-oil-in-water (W/O/W) double emulsions. (a) Top-view of the channels, three inlets (for inner aqueous phase W_i , middle phase O, and outer aqueous phase W_o) and an outlet. (b, c) Magnified views of the first and second flow-focusing (FF) channels.

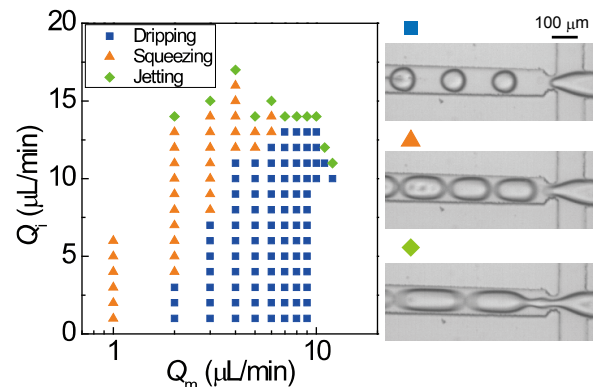


Fig. 2 A phase diagram showing flow conditions under which monodisperse droplets can form. Solid squares, triangles, and diamonds represents dripping, squeezing, and jetting regimes, respectively. Insets show droplet formation in the three regimes.

2.3 材料及び周辺装置

内水相、中間相、外水相として、超純水、レシチン（富士フィルム和光）を1wt%添加したオレイン酸（富士フィルム和光）、PVA（average Mw 85,000–124,000、87–89% hydrolyzed, Merck）の2wt%水溶液を用いた。各液体試料をガラス製1mLシリンジ（1001TLL, Hamilton Company, USA）に採取し、3台のシリンジポンプ（KDS200, KD Scientific, USA）を用いポリエチレンチューブ（内径0.5 mm、外径1.0 mm）を介してデバイスへの送液を行った。

液滴生成の様子を観察・記録のため、正立型光学顕微鏡（BX-51, オリンパス）と高速ビデオカメラ（Fastcam-1024PCI, フォトロン）を組み合わせて用いた。またデバイスから排出されたW/O/W液滴の顕微鏡画像を撮影し、画像解析ソフトウェアImageJ（NIH, USA）を用い、外部液滴と内包液滴のサイズおよび膜厚の測定を行った。

3. 研究の結果とその意味

3.1 一段目FFにおける液滴生成流量範囲の測定

単核 W/O/W エマルジョンを生成する場合、液滴径と膜厚の関係は内水相と中間相の流量比によって以下のように定まる：

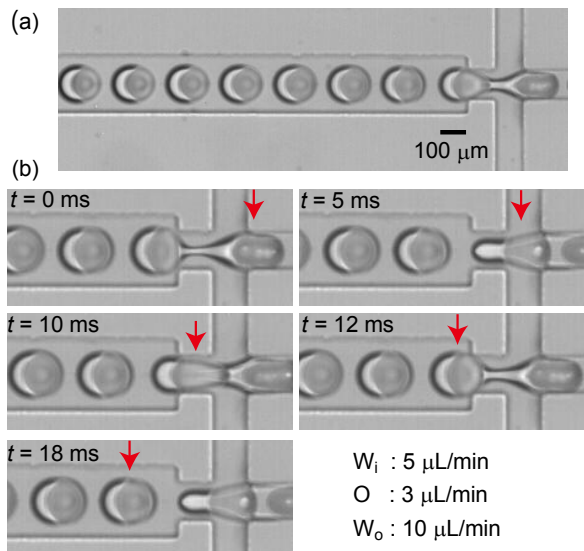


Fig. 3 Formation of monodisperse W/O/W droplets having single core. (a) Array of the single-core W/O/W droplets produced at the second FF junction. (b) Time-lapse frames showing the process of encapsulation of an aqueous droplet in an oil droplet. Red arrows are tracking an aqueous droplet. Flow rates of inner, middle, and outer phases are $5 \mu\text{L min}^{-1}$, $3 \mu\text{L min}^{-1}$, and $10 \mu\text{L min}^{-1}$, respectively.

$$\frac{t_{\text{avg}}}{R} = 1 - \left(1 + \frac{Q_m}{Q_i}\right)^{-\frac{1}{3}} \quad (1)$$

ここで t_{avg} は平均膜厚, R はダブルエマルジョン滴の半径, Q_m , Q_i はそれぞれ中間相, 内水相の流量である. 式(1)より薄膜化のためには中間相流量をより低く設定することが望ましいことがわかる一方で, マイクロ流路における液滴生成は分散相, 連続相に限られた流量範囲にて生じることが知られている^[10]. そこで先ず, 第1のFF流路における液滴生成流量範囲を調べた.

Figure 2 に得られた液滴生成流量範囲を示す. 内水相の流量, 中間相の流量を低レイノルズ数領域にて変化させることで, 流路サイズに比べ小さい液滴が生じる Dripping,^[11] 大きいプラグ状の液滴が生じる Squeezing,^[12] およびやや下流域にて液滴が生じる Jetting,^[11] の3状態が観察された. 既報のとおり, 単分散液滴が生じる領域は閉じた山型になることを確認した.

3.2 単核 W/O/W ダブルエマルジョンの生成と液滴サイズ評価

単核 W/O/W 液滴の生成および薄膜化試験を行った. 得られた相図 (Fig.2) を元に内水相と中間相の流量を決定して第1FF部にて水滴を生成する一方, 外水相の流量制御により第2FF部における油滴の生成レートを調節することで, 単核 W/O/W エマルジョンの生成を試みた.

Figure 3 に内水相, 中間相, 外水相の流量をそれぞれ $5 \mu\text{L min}^{-1}$, $3 \mu\text{L min}^{-1}$, $10 \mu\text{L min}^{-1}$ とした際の第2FF部の様子を示す. 第1, 第2FF部の液滴生成が同期することで, サイズの揃った単核 W/O/W 液滴が規則正しく連続生成する様子が観察された. 生成滴サイズを装置外で測定したところ, 外部液滴径, 内部液滴径がそれぞれ $145 \mu\text{m}$, $123 \mu\text{m}$, CV値が1.6%, 3.2%であり, 十分に単分散であった (Fig. 4). また膜厚は約 $11 \mu\text{m}$, 直径の約7.6%であった.

中間相の流量をより低く設定しさらなる薄膜化を試みたところ, 第1FF部で生成したプラグ状液滴が, 第2FF部を通過する際にせん断され, 単核 W/O/W 液滴の生成が乱される現象が頻発した. 対応策として, 例えば第2FF部の構造の拡大が挙げられる.

3.3 W/O プラグ滴断裂による超薄膜 W/O/W エマルジョン生成

第1FF部で Squeezing 状態下にてプラグ状水滴を生成し第2FF部に供給した際, プラグ状水滴の断裂に伴い, 超薄膜を有すると思われる W/O/W 液滴の生成が観察された. 例として内水相, 中間相, 外水相の流量を $9 \mu\text{L min}^{-1}$, $3 \mu\text{L min}^{-1}$, $30 \mu\text{L min}^{-1}$ とした際の様子を Fig.5 に示す. 第2FF部に両脇から流入する外水相により, 薄い油膜に覆われたプラグ状水滴がせん断され, 結果として, 超薄膜の単核 W/O/W 液滴と大小異なる大きさの水滴を包含した

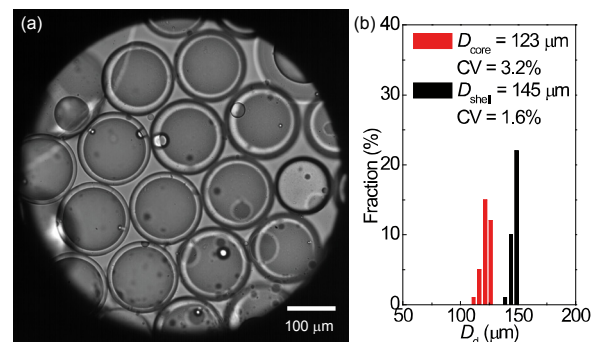


Fig. 4 Characterization of the collected single-core W/O/W droplets. (a) A bright-field photomicrograph of the obtained W/O/W droplets. (b) Size distributions of the outer (shell) droplets and inner (core) droplets.

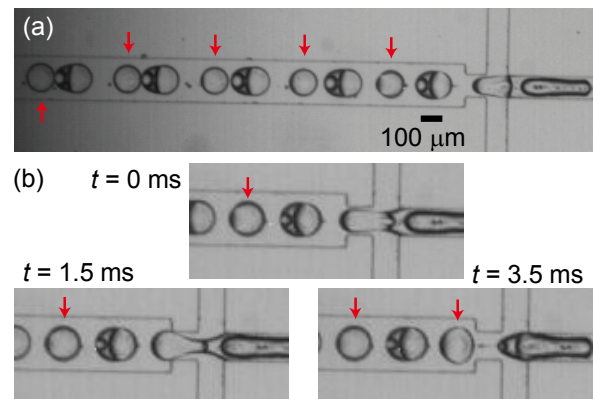


Fig. 5 W/O/W droplets with ultra-thin shell via breakup of an aqueous plug. (a) Alternately produced W/O/W droplets with ultra-thin shell. (b) Sequential images showing breakup of W/O/W droplets with ultra-thin shell. Flow rates of inner, middle, and outer phases are $9 \mu\text{L min}^{-1}$, $3 \mu\text{L min}^{-1}$, and $30 \mu\text{L min}^{-1}$, respectively.

W/O/W 滴が交互に生成される様子が観察された.

今後, 超薄膜 W/O/W 滴のみが規則正しく連続生成される流路パターンについて検討を行っていく.

4. 結言

平面型 FF 構造を2段連結させた PDMS 製マイクロ流路をソフトリソグラフィ法により作製し, PVA による局所的親水化処理を行って用いた. 最内相として純水, 中間相としてレシチンを添加したオレイン酸, 最外相として PVA 水溶液を送液し, 流量調整により, 2段目のFF流路における液滴生成を同期させることで, 外部液滴径が平均径 $145 \mu\text{m}$, CV値1.6%, 内部液滴径が平均径 $123 \mu\text{m}$, CV値3.2%である, 外部液滴と内包液滴がともに単分散である単核型 W/O/W ダブルエマルジョンが得られた. またこの際の平均膜厚は $11 \mu\text{m}$ となり, 外部液滴径の約7.6%の殻を有する薄膜であることを確認した.

さらに, 1段目の疎水性FFで生成したプラグ状 W/O 滴が2段目の親水性FFで断裂され, 不規則ながらも極薄の W/O/W ダブルエマルジョンが生成する様子を確認することができた. 今後, こうした超薄膜ダブルエマルジョンを再現性良く量産するための単一および並列流路の設計・製作および液滴生成試験に取り組む.

参考文献

- [1] A. S. Utada *et al.*, *Science*, 308, 537–541, 2005
- [2] S. W. Choi *et al.*, *Adv. Funct. Mater.*, 19, 2943–2949, 2009.
- [3] S. Okushima *et al.*, *Langmuir*, 20, 9905–9908, 2004
- [4] T. Nisisako *et al.*, *Soft Matter*, 1, 23–27, 2005
- [5] S.-H. Kim *et al.*, *Lab Chip*, 11, 3162–3166, 2011.
- [6] C.-X. Zhao *et al.*, *Chem. Phys. Chem.*, 17, 1553–1556, 2016.
- [7] S. L. Anna *et al.*, *Appl. Phys. Lett.*, 82, 364–366, 2003
- [8] D. C. Duffy *et al.*, *Anal. Chem.*, 70, 4974–4984, 1998
- [9] T. Trantidou *et al.*, *Microsys. Nanoeng.*, 3, 16091, 2017
- [10] T. Nisisako *et al.*, *Chem. Eng. J.*, 101, 23–29, 2004
- [11] A. S. Utada *et al.*, *Phys. Rev. Lett.*, 99, 094502, 2007
- [12] P. Garstecki *et al.*, *Lab Chip*, 6, 437–446, 2006