

オンチップ微小液滴電気穿孔の数値解析と実験による検証

Numerical Analysis and Experimental Verification of On-chip Microdroplet Electroporation

○学 小佐々 拓巳^{*1}, 中島 賢治^{*1}, 松山 史憲^{*1}

城野 祐生^{*1}, 柴田 隆行^{*2}, 手島 (石井) 美帆^{*2}

Takumi KOZASA^{*1}, Kenji NAKASIMA^{*1}, Huminori MATSUYAMA^{*1},

Yuuki JOHNO^{*1}, Takayuki SHIBATA^{*2} and Miho ISHII-TESHIMA^{*2}

^{*1}佐世保工業高等専門学校 National Institute of Technology, Sasebo College

^{*2}豊橋技術科学大学 Toyohashi University of Technology

We are generating basic data for the development of a device that can efficiently introduce genes into cells. Based on the electroporation method using microdroplets developed by Shibata et al., we will store the data necessary for the development of the device through numerical analysis. This system is expected to be applied to advanced medical technologies, especially mass production of induced pluripotent stem cells (iPS cells) and intracellular delivery methods for genome editing. In this study, we simulated how the physical properties of the fluid, especially the change in surface tension between the two liquids and the change in viscosity of the insulating oil, affect the droplet diameter in the formation of droplets in a cross-shaped channel, and investigated the control of the droplet diameter. In addition, to confirm the consistency of the numerical analysis, we will conduct actual verification through experiments and reconcile them to create a more reliable database.

Key Words : Droplet diameter, Surface tension, Viscosity, Numerical analysis, Level set method

1. 結 言

マイクロ流体チップを用いた液滴形成技術は、工業生産や生物化学、医療への応用技術として注目を集めている。中でも、細胞への遺伝子導入システムは、人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) を利用した再生医療などの高度先進医療技術及び革新的医薬品開発における基盤技術として、重要な役割を担っている。しかし、人工多能性幹細胞の利用における問題点として、従来利用されてきたウイルスベクター系の遺伝子導入法では、長期発現が期待でき、大量生産が容易であるというメリットがある反面、細胞のがん化のリスクが高いことや作成効率が 0.1%程度と極めて低いというデメリットがあり、再生医療への適用が困難であるといえる。そこで、細胞のがん化リスクが低く、高効率な遺伝子導入技術の開発が求められる。

そのような課題を解決する遺伝子導入技術の一つとして、オンチップ微小液滴電気穿孔法⁽¹⁾の開発が進められている。この手法は、遺伝子と細胞、培養液からなる懸濁液を螺旋型の流路へ注入し、ディーン流れと慣性集束の流体力学的効果を利用し、細胞を流路内で等間隔に整列させる。その後、十字流路において懸濁液流路の両側から絶縁油を注入することで、細胞が 1 個含まれる液滴を形成する。最後に作成した液滴に短周期高電圧パルスの印加による細胞膜の穿孔および、長周期低電圧パルスの印加による電気泳動で遺伝子を細胞内へ導入する。この手法は、従来利用されてきた電気穿孔法や液滴電気穿孔法⁽²⁾に比べ、細胞と遺伝子の物理的距離を大幅に短縮できるため、遺伝子導入効率の向上が期待できる他、細胞や遺伝子、試薬の量を大幅に削減できるというメリットがある。

本研究は、同プロセスにおける十字流路での液滴形成に含まれる流体现象について数値解析を行い、懸濁液と絶縁油間の表面張力と変化と液滴直径および絶縁油の粘度の変化と液滴直径の関係性について数値解析により調査していく。また、数値解析を行うとともに、実験による検証を行い、解析結果の整合性を確かめたうえでさらに十字流路設計のための基盤データを蓄えていく。

2. 数値解析理論

2・1 現象の支配方程式

解析対象は生理食塩水（分散相：流体1）とシリコンオイル（連続相：流体2）であり、それらは密度と粘度が異なる非溶解の非圧縮性粘性流体である。そのため、連続相中に分散する液滴の形成と移動を、レベルセット法を用いて計算した。

2流体の運動は、次に示す非圧縮性粘性流体の連続の式と Navier-Stokes 方程式で計算する。

$$\nabla \cdot \vec{u} = 0 \quad (1)$$

$$\rho \frac{\partial \vec{u}}{\partial t} + \rho \nabla(\vec{u}\vec{u}) = -\nabla p + \nabla(2\mu\mathbf{D}) + \gamma\kappa\delta(\varphi)\nabla\varphi + \rho\vec{g} \quad (2)$$

ただし、 ρ ：密度、 u ：速度、 t ：時間、 p ：圧力、 μ ：粘性係数、 g ：重力とする。右辺第2項は粘性応力項で、 \mathbf{D} を歪テンソル、 ∇ を勾配、 T を転置とすると、 \mathbf{D} は次式で表せる。

$$\mathbf{D} = \frac{1}{2}(\nabla\vec{u} + \nabla\vec{u}^T) \quad (3)$$

右辺第3項は表面張力項である。 γ は再初期化パラメーター（デフォルトで1に設定）、 φ はレベルセット関数（後述）、 κ は境界の曲率を表す。 $\delta(\varphi)$ は、 $\varphi=0$ のとき1、 $\varphi \neq 0$ のとき0をとる関数である。

$$\delta(\varphi) := \begin{cases} 1, & \text{if } \varphi = 0 \\ 0, & \text{otherwise} \end{cases} \quad (4)$$

レベルセット法は、流体運動とともに移動するレベルセット関数 φ の移流を式(5)で計算する。 φ は、任意の点から2流体間境界までの距離を表す関数で、境界面で0、流体1で正数、流体2で負数をとる。

$$\frac{\partial \varphi}{\partial t} + u\nabla\varphi = \gamma\nabla\left\{\varepsilon\nabla\varphi - \varphi(1-\varphi)\frac{\nabla\varphi}{|\nabla\varphi|}\right\} \quad (5)$$

γ は再初期化パラメーター（デフォルトでは1に設定）、 ε はインターフェースの厚さ制御パラメーター（ $h_{\max}/2$ に設定、 h_{\max} はコンポーネントの最大要素サイズ）である。そして、 φ は各計算格子における密度 ρ と粘性 μ の決定に用いる。このとき、2流体間境界で ρ や μ が不連続変化すると計算が発散してしまうため、次に示す Heaviside 関数 $H_\varepsilon(\varphi)$ により平滑化する。

$$\begin{aligned} \rho(\varphi) &= \rho_2 + (\rho_1 - \rho_2)H_\varepsilon(\varphi) \\ \mu(\varphi) &= \mu_2 + (\mu_1 - \mu_2)H_\varepsilon(\varphi) \end{aligned} \quad (6)$$

$$H_\varepsilon(\varphi) = \begin{cases} 0 & \varphi < -\varepsilon \\ \frac{1}{2}\left[1 + \frac{\varphi}{\varepsilon} + \frac{1}{\pi}\sin\left(\frac{\pi\varphi}{\varepsilon}\right)\right] & |\varphi| \leq \varepsilon \\ 1 & \varphi > \varepsilon \end{cases} \quad (7)$$

式(2)の表面張力項について、 κ は境界の曲率を表しており、これを境界面の単位法線ベクトル $\nabla\varphi/|\nabla\varphi|$ の勾配として表す。式(2)と式(4)は、 φ と κ によって連立する。

$$\kappa = -\nabla\vec{n} = -\nabla\left(\frac{\nabla\varphi}{|\nabla\varphi|}\right) \quad (8)$$

2・2 解析条件

数値解析においては、主流路に懸濁液、その両脇の流路から絶縁油をそれぞれ0.012m/sで注入し液滴形成の解析を行った。図1(a)は、計算空間である。幅50 μm ×高さ30 μm の矩形流路で懸濁液および絶縁油の流入口から合流部までに200 μm の助走距離を設けた。合流部から流出部までは、液滴直径の測定および液滴内部の流体の流れを観察するために550 μm とっている。

図1(b)は、数値解析における初期状態を表している。赤色で表されている懸濁液を左側から、その両側から青色で表されている絶縁油を注入し解析を行う。

表1は、懸濁液および絶縁油の物性値を表しており、絶縁油は解析により種類を変更し解析を行った。

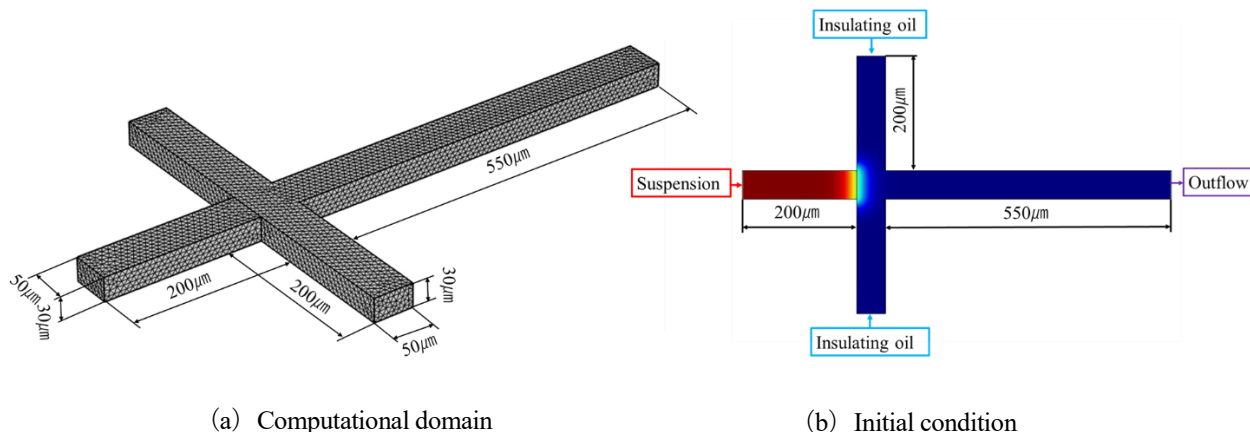


Fig. 1 Computational geometry and analysis conditions

Table 1 Various physical characteristics

	Suspension	Insulating oil
Density [kg/m ³]	997.062	757.767~967.150
Viscosity coefficient [Pa·s]	0.00089	0.00086~0.31019
Flow velocity [m/s]	0.012	
Surface tension [mN/m]	72.0	15.9~21.1

3. 解析結果と考察

電気穿孔において、液滴直径のコントロールは効率の向上に必要な要素の1つであると考えられる。そこで本研究では、表面張力と液滴直径および絶縁油の粘度と液滴直径の関係について数値解析を通して調査する。

3・1 表面張力と液滴直径

自由空間における表面張力と液滴直径の関係は、 $\sigma = \Delta p d / 4$ になることを考慮すると表面張力の値を操作することで液滴直径をコントロールできると考えられる。そこで解析方法として、密度、流速、粘度を固定し表面張力のみを変更して解析を行った。図 2(a)は界面の決定の仕方を表している。図に示すように解析結果に流線を描き、渦がきれいに界面に収まるようにレベルセット関数の値を定める。図 2(b)は液滴直径の計測の仕方を示している。図 2(a)で描いた界面を基準として液滴直径の計測を行う。

図 3 は、解析条件に基づいた計算結果で、表面張力と液滴直径の関係を示している。結果より、表面張力を小さくしていくと液滴形成ができない領域が発生した。また、表面張力と液滴直径には、大きな相関関係が得られず、表面張力を操作することによる液滴直径のコントロールは困難であると考えられる。

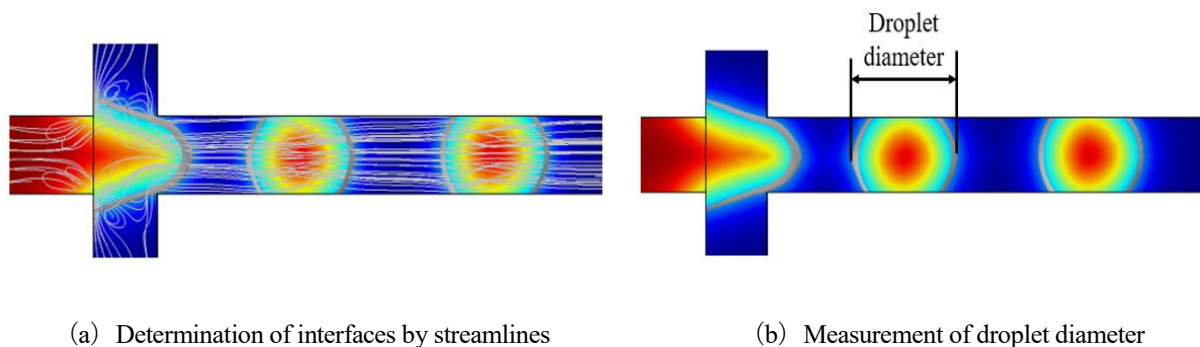


Fig. 2 Droplet diameter measurement method

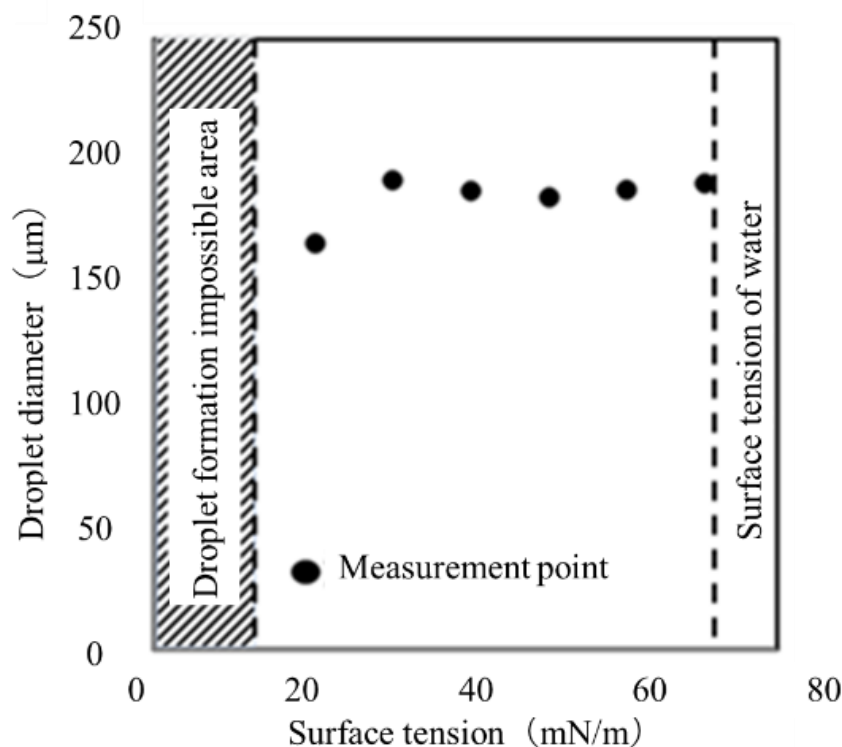


Fig. 3 Relationship between droplet diameter and surface tension

3・2 絶縁油の粘度と液滴直径

前節の解析により、表面張力の操作による液滴直径のコントロールは、困難であると予測された。そこで次に絶縁油の粘度と液滴直径の関係性について調査することにした。解析条件としては、実験で使用しているメーカーのカタログ（信越シリコン）を参照して物性値を定めた。表1に解析に用いたオイルの物性値を示す。表の上からオイル名、動粘度、密度、表面張力を示している。図4の(a)、(b)、(c)、(d)はそれぞれオイル1、3、8、11の解析結果である。解析結果から動粘度が低いもののほうが液滴を形成する際に伸びが発生し、液滴の直径も大きくなっていることがわかる。図5のグラフは、使用するシリコンオイルを変化させていった際の液滴直径の変動を示したグラフである。結果より、粘度と液滴直径の間には関係性があり、液滴直径は約80～160 μmの間で制御することが可能であると考えられる。また、粘度が300 mm²/sを超えると液滴が形成されないことが解析結果より得られた。

Table 2 Physical properties of insulating oil

	Oil 1	Oil 2	Oil 3	Oil 4	Oil 5	Oil 6	Oil 7	Oil 8	Oil 9	Oil 10	Oil 11	Oil 12
mm ² /s	0.65	1.0	1.5	2.0	5.0	6.0	10	20	30	50	100	200
kg/m ³	757.8	815.9	849.5	870.4	912.3	922.3	932.3	947.2	952.2	957.2	962.2	967.2
mN/m	15.9	16.9	17.7	18.3	19.7	19.8	20.1	20.6	20.7	20.8	20.9	21.1

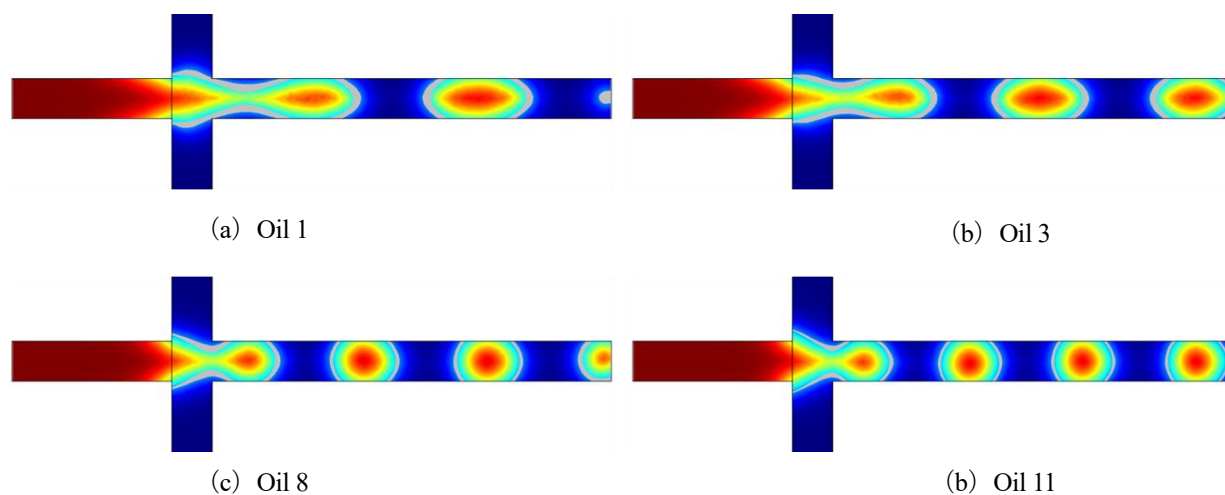


Fig. 4 Droplet formation at various viscosities

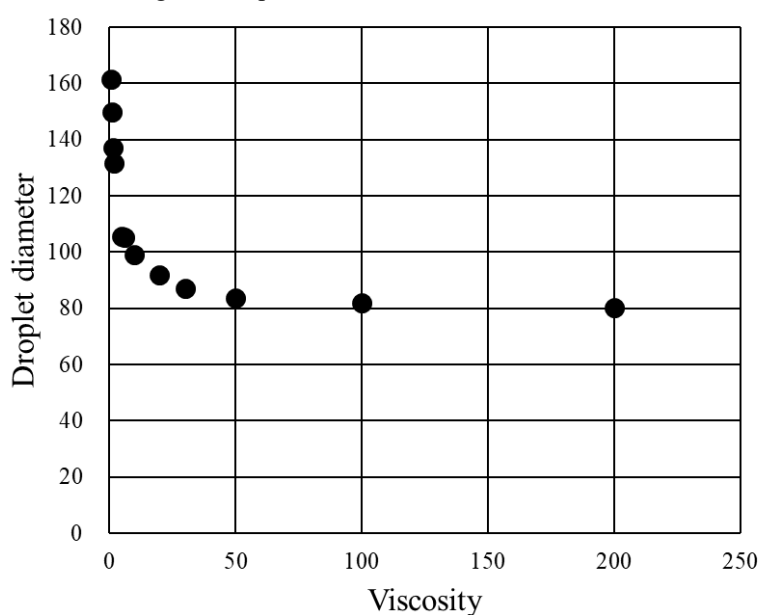


Fig. 5 Relationship between viscosity and droplet Diameter of insulating oil

7. 結 言

オンチップ微小液滴電気穿孔を実現する条件を探索するため液滴形成の数値解析を試みた。解析結果より、液滴直径のコントロールには、界面活性剤を用いた表面張力の操作より、絶縁油の粘度の変更によるコントロールがより有用性が高いと考えられる。今後は、今回の解析結果をもとに実験との整合性の確認及び、流量比の変更による液滴直径のコントロール、流路形状と液滴形成の関係性について解析と実験により更なる設計基盤の蓄積を行っていく。

文 献

- (1) Hirofumi Kurita, Shota Takahashi, Atsushi Asada, Minako Matsuo, Kenta Kishikawa, Akira Mizuno, Rika Numano, Novel Parallelized Electroporation by Electrostatic Manipulation of a Water-in-Oil Droplet as a Microreactor, PLoS One, 2015
- (2) T. Shibata, A Chip-based Platform for Cell Manipulation and Cellular Function Analysis, The International Conference on Interdisciplinary Research and Global Outlook, Tahara, Japan, 2015.