

(2A) バイオ高次構造形成プロセス技術

(2A)-1 ハイドロゲルの高次構造形成プロセスの開発

(2A)-1-1 グルコース応答性を有する蛍光ゲルビーズ作製条件の検討

(2A)-1-1-1 概要

糖尿病はパンデミックと呼ばれるほどに世界中で患者数が増加しており、その数は20年以内に、2億8500万人から4億3800万人にまで増加すると言われている。糖尿病患者は、網膜症、腎症、神経障害などの合併症発生の抑制・遅延のため、血糖計により自らの血糖値を測定し制御する必要がある。しかし、糖尿病により合併症を引き起こす患者が減少していないのが現状である。なぜなら、現在の針刺しにより採取した血液が必要な測定方法では、採取時の血糖値しかわからず、その後の血糖値の変化を知ることはできない。これでは異常血糖値を防ぐことは困難である。また、そもそも就寝時は血糖値を測定することもできない。さらには、針刺しの痛みによる患者の治療の不摂生、針刺しによる感染リスクなどの問題がある。そのため、血糖値をモニタリング可能で、かつ痛みも感染リスクも少ないものが求められている。

ここで、本研究では、周囲の糖濃度に応じた蛍光を発するゲルをマイクロサイズのビーズ形状にするプロセスの開発を試みた。糖濃度応答性蛍光ゲルをマイクロサイズのビーズ形状にすることができれば、注射により生体に埋め込むことが可能であり、埋め込んだビーズの蛍光を生体外から観察することで体内の糖濃度、すなわち血糖値を光学的手法で痛みなくモニタリングすることが可能となる。また、生体への針刺しは埋め込み時の注射のみであるため、感染リスクも最小限に抑えることが可能となる。

これらを踏まえ、本項目では、低侵襲での埋め込みが可能で、侵襲と感染リスクのない血糖値測定のための、グルコース応答性蛍光マイクロゲルビーズ作製プロセス開発を行っている。

前年度、糖応答性蛍光ゲルをビーズ形状とすることに成功していた。しかし、ビーズ形状とすることで、糖濃度応答性が失われており、作製条件について検討する必要があった。

そこで本年度は、以下の実施項目について研究を行ったので、ここに報告する。

【実施項目】

3D-AFFD法などにより粒形約300 μm 以下の粒径分布の狭い蛍光ゲルビーズを作

製可能なゲルモノマー溶液の組成・濃度、外層溶液の組成、流速、温度などの条件を導く。

(2A)-1-1-2 実験方法

a. 蛍光ゲルビーズ作製条件の検討

蛍光ゲルビーズは、3D-AFFDにより油溶媒中に作製できる、蛍光色素を含むモノマー水溶液の液滴を、その形状のまま重合することによって、得ることができる。ここでは、まず油溶媒中の液滴がゲル化するまで、その形状を安定に保つことが可能な油溶媒について検討した。次に、この油溶媒中にて、液滴をゲル化するための重合条件について検討した。方法を以下に示す。

ア. 溶媒の検討

1. 各種有機溶媒と界面活性剤からなる油溶液を調整した。
2. 微量分注器を用いて、ゲルモノマー水溶液を滴下し、油溶液中にゲルモノマーの液滴を作製した。
3. 液滴の安定性や合一の有無などを観察した。

イ. 重合条件の検討

蛍光ゲルビーズの作製方法検討は3D-AFFDを用いて以下のように行った。

1. 各種濃度で、アクリルアミド(AAm)、*N,N'*-メチレンビスアクリルアミド(Bis-AAm)を溶解させた 60 mM リン酸緩衝液(PB buffer, pH7.4), 1.0 mM EDTA 溶液を 500 μ L 調整した。

2. 1の溶液に対し窒素バブリングを行い、脱酸素した。

3. シリコンオイル 12.5 mL を窒素バブリングを行いながら、37 $^{\circ}$ Cに加熱した。

4. 3の溶液からシリンジに 2.5mL だけ分取し、これを 3D-AFFD デバイスの外層流路に接続した。残りの 10mL のシリコンオイルは、内層溶液の液滴分取のための溶液として使用した。

5. 2の溶液を 250 μ L 分取し、これにグルコース応答性蛍光色素を 12.5mg 加え、所定の濃度となるように、過硫酸ナトリウム(SPS)溶液を加えた。

6. 5の溶液を、シリンジに採取し、3D-AFFD デバイスの内層流路に接続した。

7. 内層溶液の流速を 5, もしくは 10 μ L/min、外層溶液の流速を 150 μ L/min とし、窒素バブリングを行っている 37 $^{\circ}$ Cの 3の溶液に、内層溶液の液滴作製を開始した。

8. 7にて、内層溶液の液滴が安定に得られはじめたら、液滴を分取しているシリコンオイル溶液に *N,N,N',N'*-テトラメチルエチレンジアミン(TEMED)を所定の濃度となるように加え、液滴の重合を開始した。

9. 重合により得られた蛍光ゲルビーズを、ヘキサン、エタノール、milli Q、60mMリン酸バッファー(pH 7.4)にて3回ずつ洗浄し、リン酸バッファー中に分散した蛍光ゲルビーズを得た。

b. 作製した蛍光ゲルビーズの蛍光スペクトル及びグルコース応答性の評価

蛍光ゲルビーズ作製条件((2A)-1-1-2-a-イ)において、内層溶液の組成を 15wt% AAm, 0.3wt% Bis-AAm, 0.135wt% SPS、シリコンオイル中の TEMED 濃度が 0.04wt%、流速を 5 μ L/min の条件で、蛍光ゲルビーズを作製した。

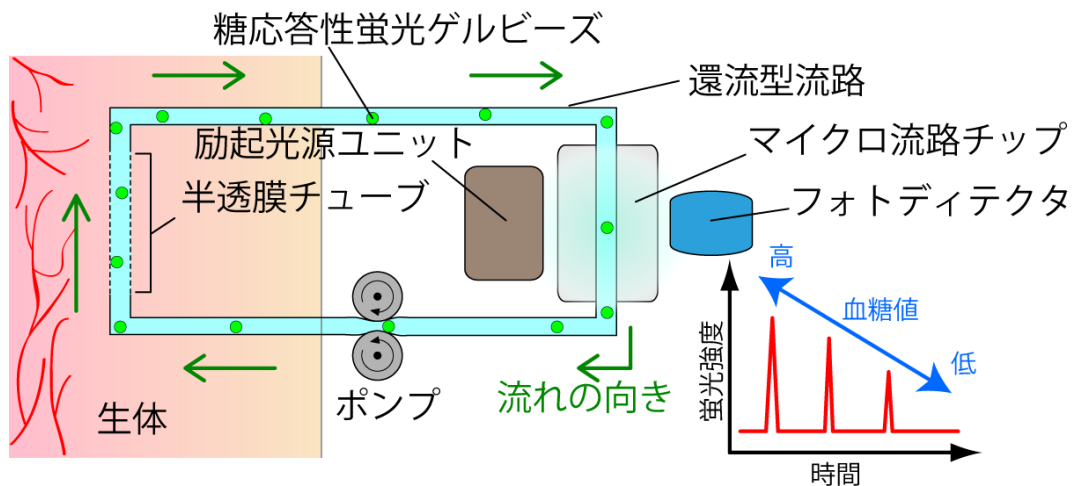
次に、この蛍光ゲルビーズを適量、シャーレ上に分取し、3次元バイオ試料観察装置を用いて、蛍光ゲルビーズの蛍光スペクトルを 9.7nm の間隔で取得した。励起波長は 405nm とした。

同様に、シャーレ上の蛍光ゲルビーズが分散している 60mM リン酸バッファーを、62.5, 125, 250, 500, 1000 mM の各グルコース濃度で溶解させた 60mM リン酸バッファーに交換し、その時の蛍光スペクトルを各濃度にて測定した。

c. 観察系の小型化の検討

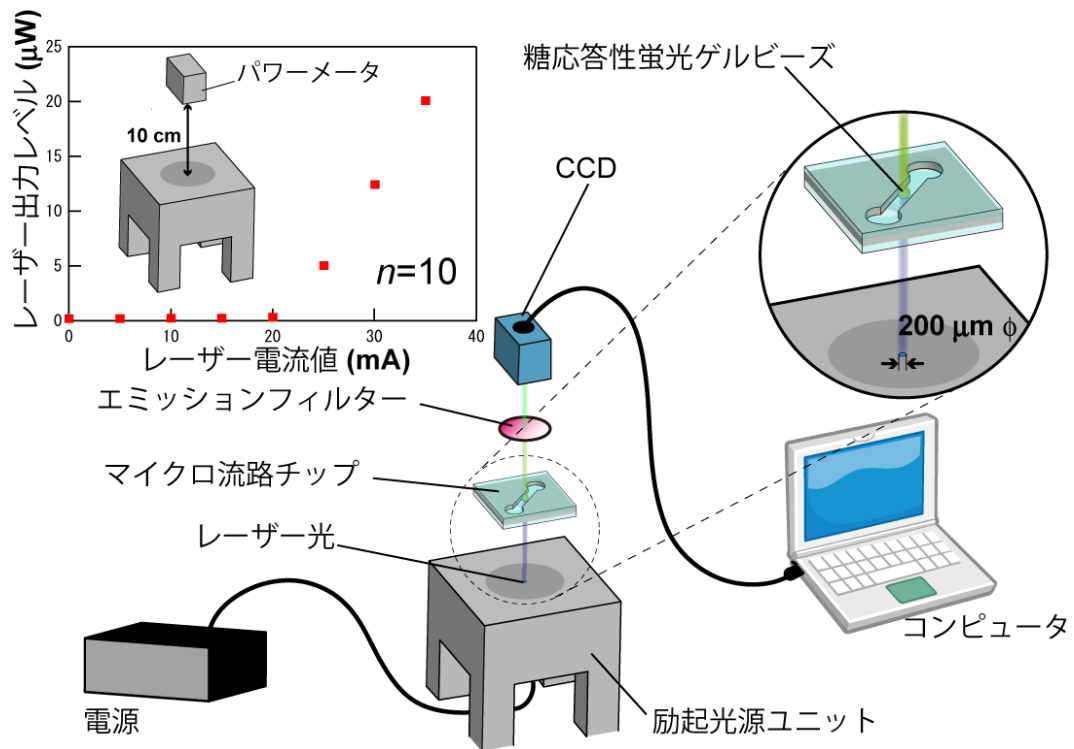
蛍光ゲルビーズの糖応答の観察実験は現在、主に顕微鏡下で行っているが、体内への半埋め込み型もしくは透析装置のようなルート型の装置に応用する場合、検出系の小型化が必須である。そこで、適した励起波長を有する小型の光源装置と受光素子を用いて検出系小型化の検討を行った。今回、光源装置と受光素子としてそれぞれ青紫色半導体レーザー出力装置 (Blu-ray) と電荷結合素子 (CCD) を利用した。

検出モデルとして図①-(2A)-1-1.1 に示すような系を想定し、経時変化の検出が可能なモニタリングシステムの構築を目的としている。これにより体内の血糖値変化の連続計測装置が例えば透析装置への付帯可能なデバイスとして利用できると考えている。



図①-(2A)-1-1.1 体内の血糖値変化の検出が可能なルート型モニタリングシステムの概念図

はじめに、利用した Blu-ray の励起光源ユニットの電流とレーザー出力の評価を行い、20 mA 以上で使用可能であることを確認している(図①-(2A)-1-1.2 挿入図)。また図①-(2A)-1-1.2 に示すセットアップでマイクロ流路中に流した糖応答性蛍光ゲルビーズの観察を行った。使用したエミッションフィルターは約 460 nm から約 560 nm の波長領域を 90%以上の透過率で通すバンドパスフィルターを採用した。



図①-(2A)-1-1.2 糖応答性蛍光ゲルビーズのマイクロ流路を応用した検出系セットアップ

d. マウスへの蛍光ゲルビーズ埋め込み実験

生体における蛍光ゲルビーズのグルコース応答性の評価のため、蛍光ゲルビーズをヌードマウスの耳に埋め込み、マウスの血糖値変化と、蛍光強度の変化を観察した。

まず、蛍光ゲルビーズ作製条件((2A)-1-1-2-a-イ)において、内層溶液の組成を15wt% AAm, 0.3wt% Bis-AAm, 0.135wt% SPS、シリコンオイル中の TEMED 濃度が0.04wt%、流速が10 μ L/min の条件で、蛍光ゲルビーズを作製した。

次にヌードマウス(BALB/c Slc-nu/nu, 7~9 週, オス)を吸入麻酔にて眠らせた後、留置針を用いて、蛍光ゲルビーズを右耳の皮下に埋め込んだ。生体内環境で平衡化させるため、3 時間ほど置いたのち、再度、ヌードマウスを麻酔で眠らせ、腹腔にグルコース溶液投与のためのルートを導入した。次に、糖負荷用のルートから、50% グルコース溶液を、マウスの体重に対しグルコースが3.75mg/g となるように投与することで、糖負荷試験を行った。それと同時に、マウスの尾血から簡易血糖計を用いてマウスの血糖値を5~10 分置きに、マウスの耳の蛍光を蛍光顕微鏡を用いて、30 秒~1 分置きに観察した。

(2A)-1-1-3 実験結果と考察

a. 蛍光ゲルビーズ作製条件の検討

前年度の実験報告においては、3D-AFFD デバイスを用いて、グルコース応答性蛍光色素を含む水溶液の液滴を、シクロヘキサン中に作製し、これを重合させることで、蛍光ゲルビーズを作製していた。しかし、シクロヘキサン中においては、蛍光色素を含む液滴は不安定であるため、液滴同士が重合前に合一し、粒径が一定でない問題があった。そのため、AFFD デバイスの出口を動かしながら液滴を採取することで液滴同士の接触を抑制し、さらに重合開始剤、促進剤濃度を高く設定することで合一する前に重合するよう、実験条件を設定した。しかし、AFFD デバイス出口を動かすことで、AFFD デバイス内の圧が微妙に変化し、結果、得られる液滴の粒径がやはり不均一となってしまった。また、高い重合開始剤・促進剤濃度は、重合時の蛍光色素が劣化を引き起こし、蛍光ゲルビーズを得ることができたものの、グルコース応答性がみられない、という問題が生じていた。

ア. 溶媒の検討

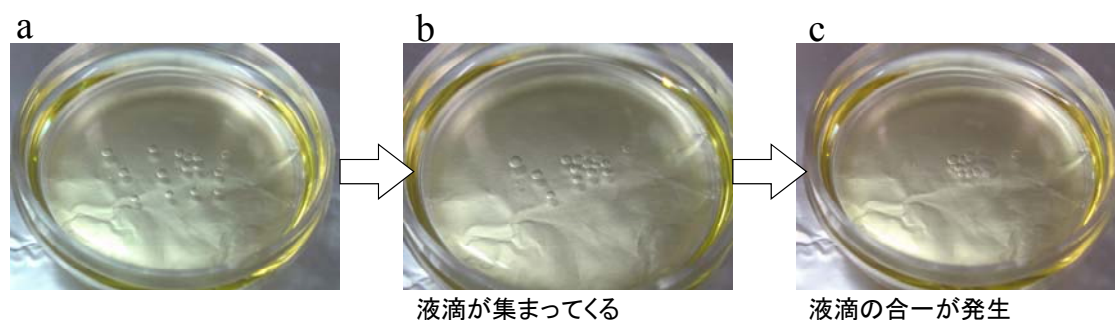
そこで、ここではまず、グルコース応答性蛍光色素を含む水溶液滴が合一などを起こさず、安定に形状を保つことができる油溶媒の検討を行った。各種油溶媒中に、ピペットマンなどの微量分注器を用いて、アクリルアミドを含む水溶液

(15wt% アクリルアミド(AAm)、0.3wt% N, N' -メチレンビスアクリルアミド (Bis-AAm)、10wt% ポリエチレングリコール(PEG) : Mw=3,400)を数マイクロリットルずつ滴下して液滴を作製し、これら液滴の安定性を各種油溶媒中にて比較検討した。用いた油溶媒の組成と、液滴安定性の観察結果を表①-(2A)-1-1.1 に示す。

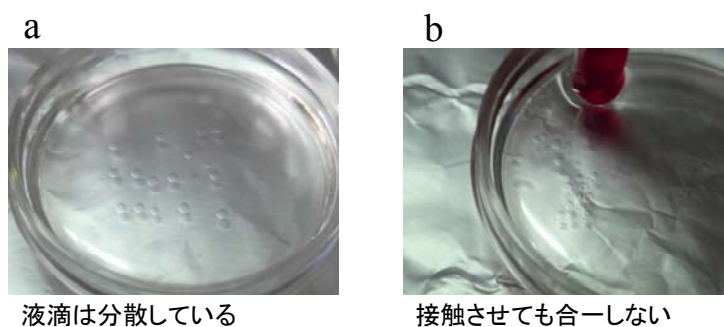
表①-(2A)-1-1.1 溶媒検討条件と観察結果

溶媒1	界面活性剤1	観察結果
98.5wt% n-ヘキサデカン	1.5wt% span80	不安定。合一する。
90.0wt% n-ヘキサデカン	10wt% span80	不安定。合一する。
85wt% n-ヘキサデカン	15wt% span80	壊れにくい、合一する。
80wt% n-ヘキサデカン	20wt% span80	壊れにくい、合一する。
90wt% トルエン	9.35wt% span83 0.65wt% tween 85	不安定。
45wt% シクロヘキサン		
45wt% 流動パラフィン	10wt% span83	壊れにくい、有機溶媒臭いがする。
コーンオイル	-	すぐに合一した。
ミネラルオイル	-	形状は安定しているが、合一する。
		液滴形状、長時間安定。
シリコンオイル	-	液滴重なっても合一しない。

表①-(2A)-1-1.1 の結果から、検討した溶媒においては、シリコンオイル中の液滴が最も安定であり、シリコンオイル中の液滴は、20 分以上も合一することなく安定であった。ミネラルオイル中に滴下した液滴が、集まってきて凝集する様子を図①-(2A)-1-1.3 に、シリコンオイル中における液滴の様子と、液滴同士が接触しても合一しない様子を図①-(2A)-1-1.4 に示す。



図①-(2A)-1-1.3 ミネラルオイル中の液滴 : (a)ミネラルオイル中に分散させた液滴、(b)凝集する液滴、(c)合一した液滴



液滴は分散している

接触させても合一しない

図①-(2A)-1-1.4 シリコンオイル中の液滴 : (a)シリコンオイル中に分散させた液滴、(b) 接触させても合一しない液滴

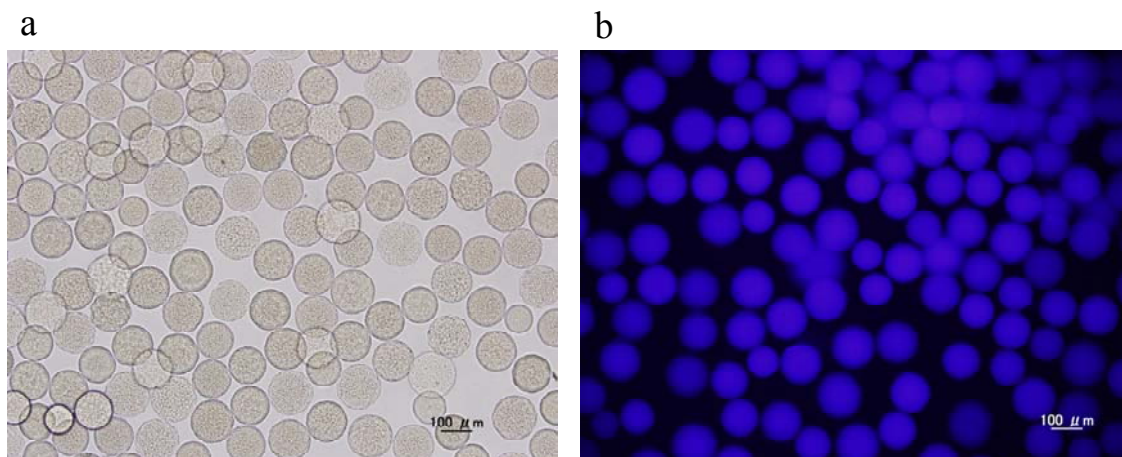
これらの結果から、蛍光ゲルビーズの作製に用いる油溶媒として、液滴が長時間安定していたシリコンオイルを用いることとした。

イ. 重合条件の検討

次に、シリコンオイル中にてアクリルアミド水溶液の液滴を重合させるための条件について検討した。

まず、15 wt% AAm, 0.3wt% Bis-AAm, 10wt% PEG を 1.0mM EDTA、60mM リン酸バッファー(PB) に溶解させ、これに、重合の確認のための蛍光ポリスチレンビーズ溶液を 0.2 μ L、18wt% 過硫酸ナトリウム溶液を 2.5 μ L 加えて攪拌し、窒素バブリングにより脱酸素を行った。12mL シリコンオイルに TEMED 4.8 μ L 加え、約 37 $^{\circ}$ C に熱した油溶媒中に、これを滴下し、重合するかどうか評価した結果、約 3 分で液滴が重合し、ゲルビーズが得られることが確認できた。

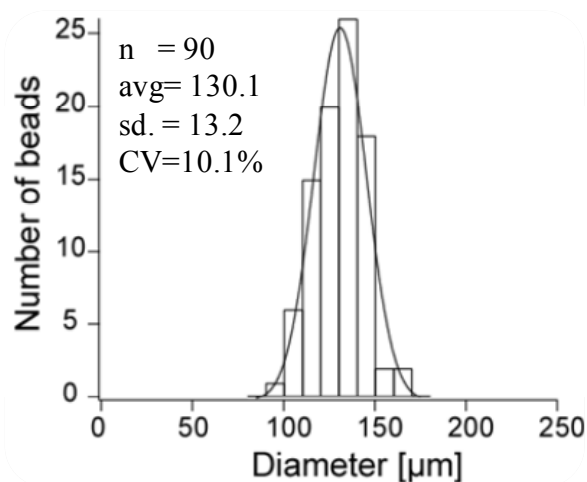
これを踏まえ、蛍光ゲルビーズ作製条件((2A)-1-1-2-a-イ)において、内層溶液の組成が 15wt% AAm, 0.3wt% Bis-AAm, 0.09wt% SPS、シリコンオイル中の TEMED 濃度が 0.05wt%、内層溶液の流速が 10 μ L/min の条件で、蛍光ゲルビーズを作製した。得られた蛍光ゲルビーズの顕微鏡像を図①-(2A)-1-1.5 に示す。



図①-(2A)-1-1.5 作製した蛍光ゲルビーズ、(a)明視野像、(b)蛍光像

図①-(2A)-1-1.5 から確認できるように、蛍光ゲルビーズは凝集することなく、水溶液中にて分散していることが確認できた。これによりシリンジなどで吸い取って使用できると期待される。また、蛍光像から、本作製方法にて、グルコース応答性蛍光色素がゲルビーズ中に固定可能であることが確認された。

また、顕微鏡像の解析から平均粒径 $130.1\mu\text{m}$ 、分散値を示す CV(標準偏差/平均粒径)が 10.1%と求まった。懸濁重合法では一般的に、CV 値が 20%を超えるため、本実験条件は、粒径分布の狭い蛍光ゲルビーズを作製することが可能であると実証された。粒径分布解析結果を図①-(2A)-1-1.6 に示す。

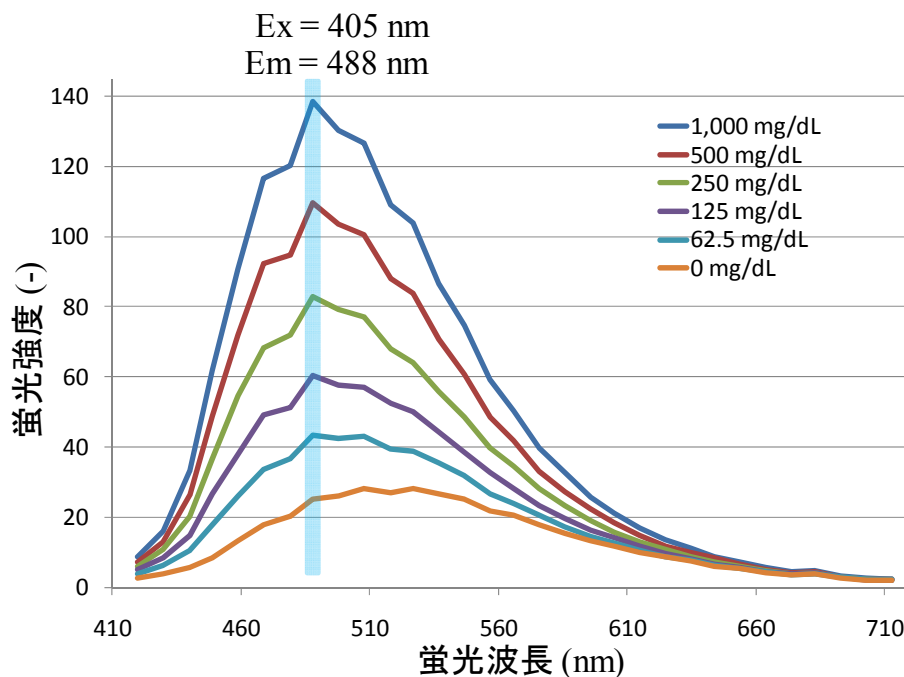


図①-(2A)-1-1.6 作製した蛍光ゲルビーズの粒径分布

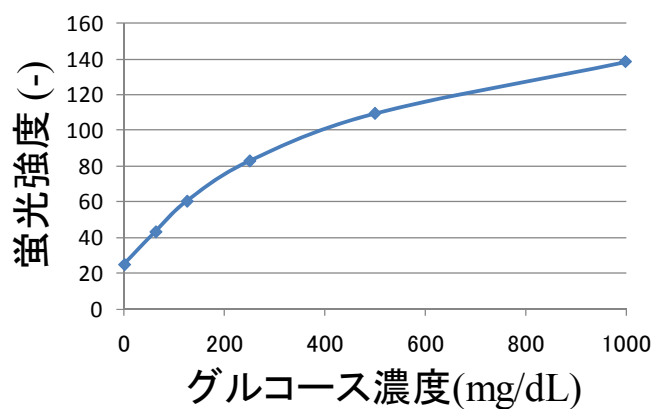
b. 作製した蛍光ゲルビーズの蛍光スペクトル及びグルコース応答性の評価

励起光が 405nm のときの、蛍光ゲルビーズの蛍光スペクトルを測定した結果を

図①-(2A)-1-1.7 に示す。蛍光のピークトップ波長である、488nm 付近の蛍光強度を各グルコース濃度でプロットした結果を図(2A)-1-1-8 に示す。



図①-(2A)-1-1.7 蛍光ゲルビーズの蛍光スペクトル



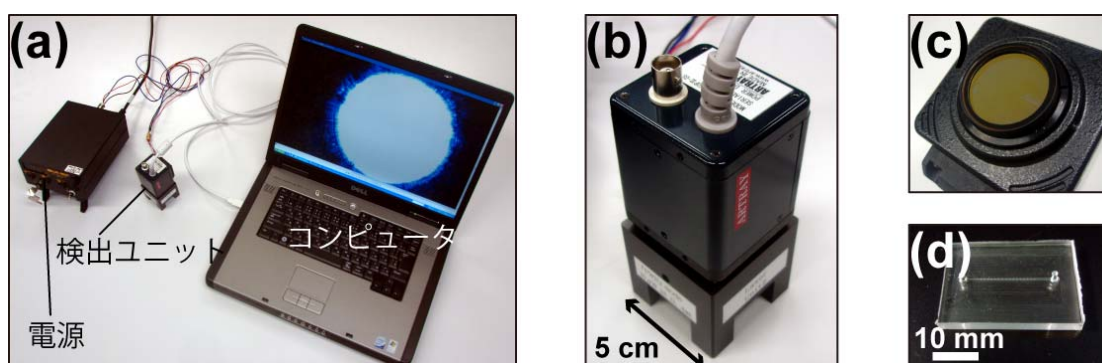
図①-(2A)-1-1.8 蛍光ゲルビーズのグルコース応答性

図①-(2A)-1-1.7 の結果から、低グルコース濃度時(0mg/dL)とグルコースを加えたときのスペクトルを比較すると、ピークトップの値が、527nm 付近から 488nm 付近へと変化していることが確認できた。これはすなわち、蛍光スペクトル、特に 527nm 付近と 488nm 付近の蛍光強度の比をモニタリングすることで、低グルコース濃度であるかどうかを識別できることを意味している。約 50mg/dL の低血糖状態になると、意識の消失などが起こり、場合によっては死に至る場合もあるため、低血糖状態の検出は非常に有用である。

図①-(2A)-1-1.8の結果から、ゲルビーズは周囲のグルコース濃度に応じた強度の蛍光を、可逆的に再現性よく発することが確認できた。生体内におけるグルコース濃度はおおよそ、健康な人で、60-180mg/dL、糖尿病患者で 600mg/dL 以下、重篤なケースでも 1,000mg/dL であるため、蛍光ゲルビーズのグルコース濃度応答範囲は、生体内のグルコース濃度を測定するためには十分であると言える。

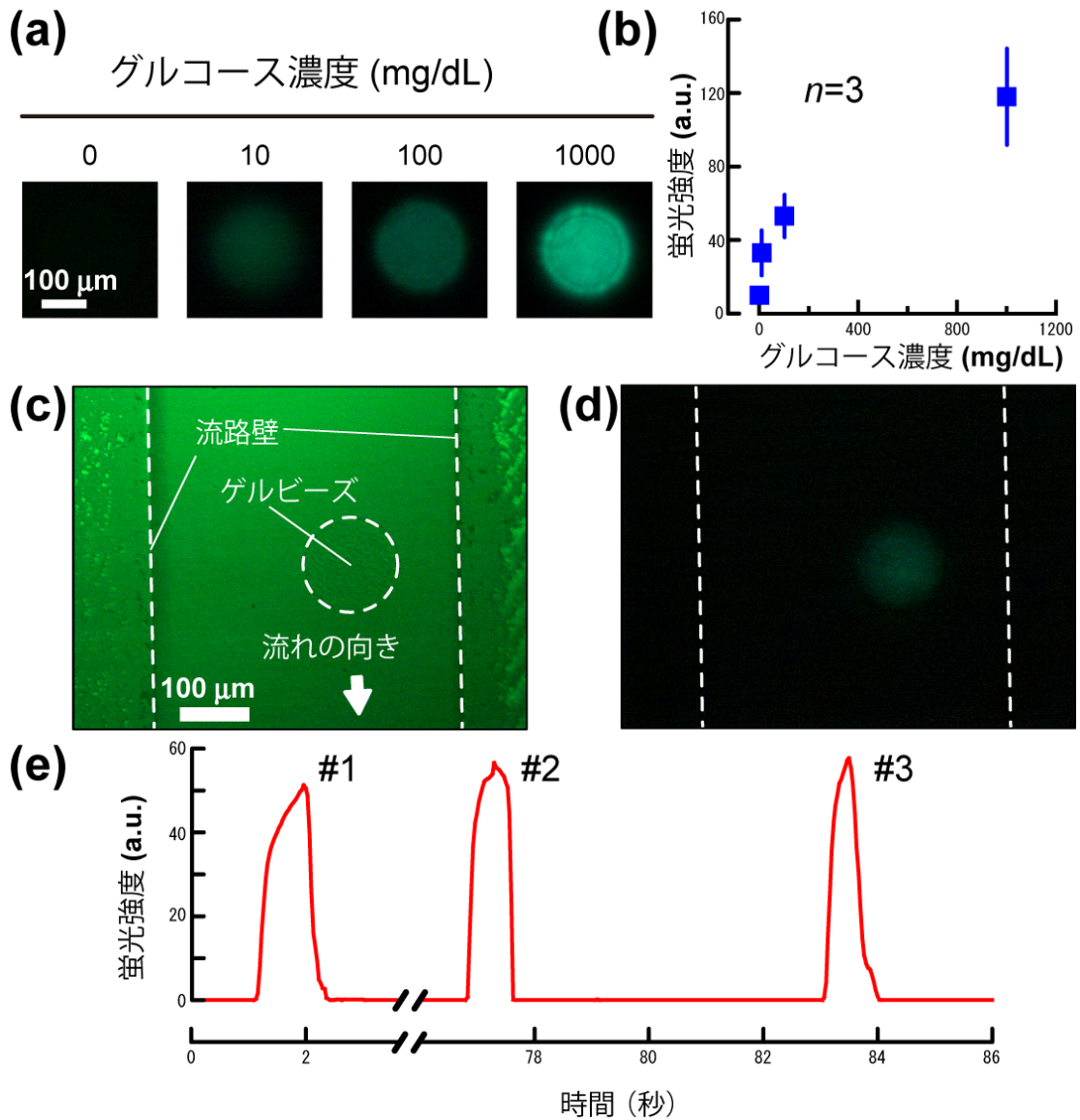
c. 観察系の小型化の検討

図①-(2A)-1-1.9に示す通り、電源とコンピュータを除いた検出ユニット本体は約 5 cm×5 cm×10 cm の体積に収まる大きさで構築することが可能であった。マイクロ流路は従来のフォトリソグラフィプロセスで作製したものであり、数 cm 角で厚みが数 mm の大きさである。このマイクロ流路は PDMS（ポリジメチルシロキサン）とガラス基板で作製したため、観察波長領域には支障のない光透過性を有している。



図①-(2A)-1-1.9 提案検出系のセットアップ写真 (a)全体像、(b)検出ユニット本体、(c)フィルター装着部分、(d)PDMS マイクロ流路

本提案デバイスとそのセットアップを利用してグルコース濃度と蛍光強度の確認を行った結果が図①-(2A)-1-1.10 (a)および(b)である。相対蛍光強度の測定結果は本システムがグルコース濃度の変化に応じた蛍光強度の増減を検出可能であることを示唆している。また PDMS マイクロ流路に糖応答性蛍光ゲルビーズ（直径約 100 μm ）を流した際のイメージングの結果が図①-(2A)-1-1.10(c)および(d)である。間隔をあけて流れてくる 3 個の蛍光ゲルビーズの蛍光観察に成功したことから、本提案システムが流路を利用した経時的変化の小型観察系に応用可能であると考えている。以上から透析設備に付随可能な小型の検出系としての利用が期待できる。



図①-(2A)-1-1.10 (a)グルコース濃度に対応した蛍光変化の観察結果、(b)グルコース濃度と蛍光強度の相関、流路内蛍光ゲルビーズの(c)明視野画像と(d)蛍光画像、(e)流れてくる蛍光ゲルビーズの蛍光強度測定結果 (3個の蛍光ゲルビーズが通過する際の蛍光強度を観測している)

d. マウスへの蛍光ゲルビーズ埋め込み実験

まず、右耳に蛍光ゲルビーズが埋め込まれたマウスの一例を図①-(2A)-1-1.11に示す。



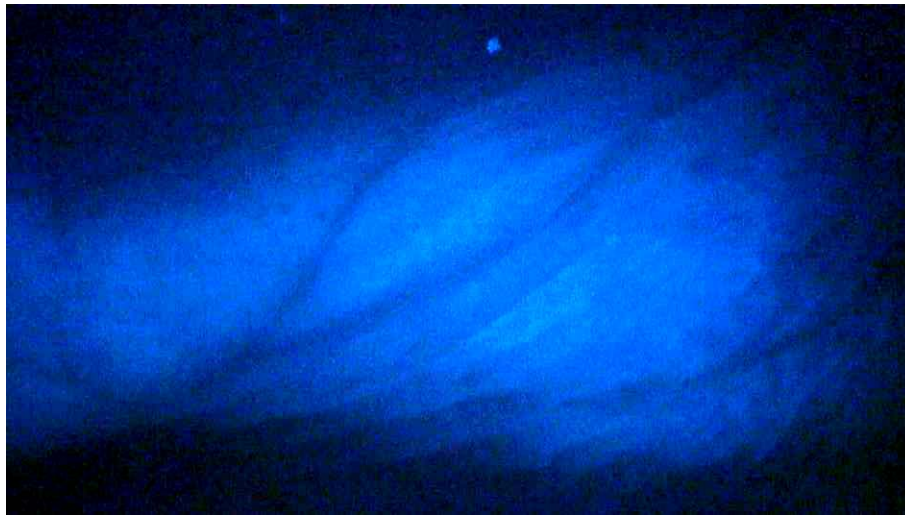
図①-(2A)-1-1.11 右耳に蛍光ゲルビーズが埋め込まれたマウス

このとき、皮膚を通した蛍光観察の確認のため、高濃度の糖溶液とともに、蛍光ゲルビーズを埋め込んだ。マウスの耳に励起光として、ブラックライトを照射することで、皮下の蛍光ビーズの蛍光が、皮膚を通して観察可能であることを確認した。図①-(2A)-1-1.11 のマウスの蛍光ゲルビーズは、スパチュラを用いてビーズを埋め込んだが、注射針を用いて埋め込むことも可能であったことから、作製した蛍光ゲルビーズは低侵襲で埋め込みが可能であると言える。

次に、蛍光顕微鏡により、蛍光ゲルビーズを埋め込んだマウスの耳の明視野像を図①-(2A)-1-1.12 に、蛍光像を図①-(2A)-1-1.13 に示す。この時の蛍光ゲルビーズは留置針を用いて埋め込んだ。



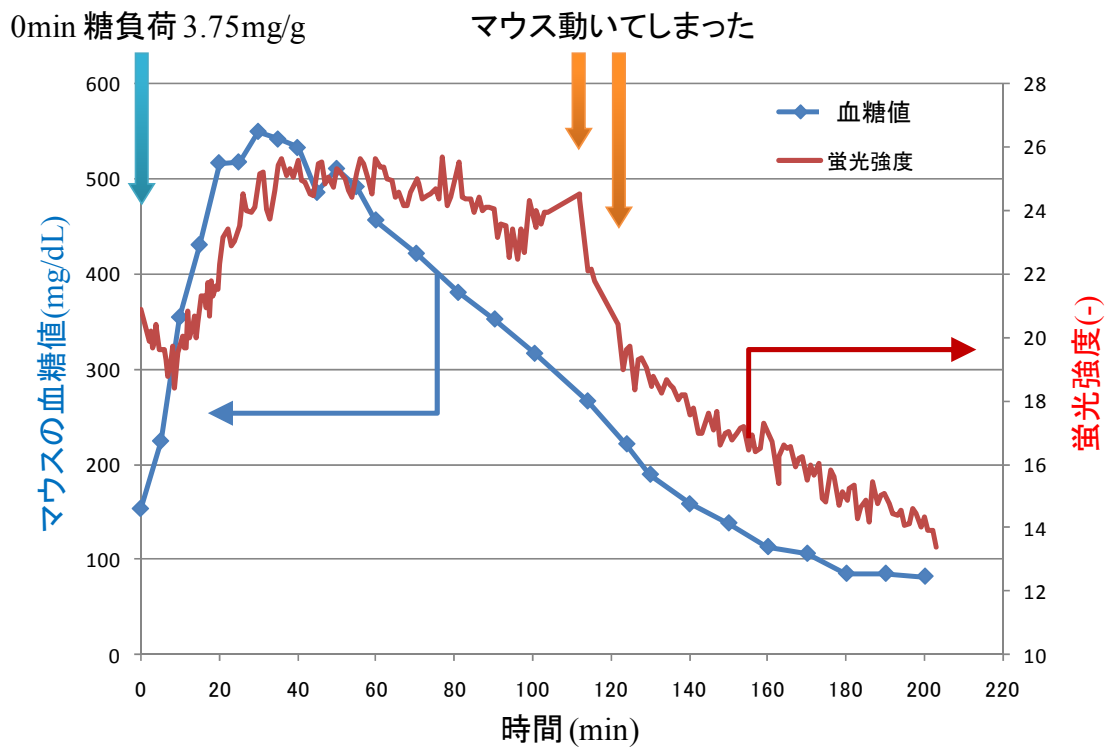
図①-(2A)-1-1.12 蛍光ゲルビーズが埋め込まれたマウスの耳の明視野像



図①-(2A)-1-1.13 蛍光ゲルビーズが埋め込まれたマウスの耳の蛍光像

マウスの耳に埋め込まれた蛍光ゲルビーズの蛍光強度は、図①-(2A)-1-1.13 のような蛍光観察像を Image J を用いて解析した。

糖負荷後のマウスの血糖値の変化、および、マウス耳に埋め込まれた蛍光ゲルビーズの蛍光強度の変化の観察結果を図①-(2A)-1-1.14 に示す。



図①-(2A)-1-1.14 蛍光ゲルビーズのグルコース応答性 in vivo

図①-(2A)-1-1.14 から、糖負荷によりマウスの血糖値が急激に上昇し、その後、代謝やインスリンの分泌などにより、マウスの血糖値は穏やかに減少したことがわかった。また、マウスの耳に埋め込んだ蛍光ゲルビーズの蛍光強度も、それを追従するような形で、増加・減少した。

111 分と 114 分付近で蛍光強度が大きく変化してしまったが、これはマウスの血糖値を採取する際に、マウスの体が動いてしまい、観察していた部位がずれてしまったためである。このような測定の失敗は、マウスの耳に直接固定できるような蛍光検出器を用いることで、容易に解決できると考えられる。

これらの結果より、本研究により作製した蛍光ゲルビーズは、そのサイズと形状より、注射針を用いて低侵襲で埋め込むことが可能であり、また、*in vitro* のみならず、*in vivo* においても、グルコース応答能を発揮することが確認された。

(2A)-1-1-4 まとめ

【実施項目】

3D-AFFD 法などにより粒形約 300 μm 以下の粒径分布の狭い蛍光ゲルビーズを作製可能なゲルモノマー溶液の組成・濃度、外層溶液の組成、流速、温度などの条件を導く。

【結果】

3D-AFFD を用いて、平均粒径 130 μm 、分散値 CV が 10.1%と粒径分布の狭い蛍光ゲルビーズの作製条件を導きだした。また、生体内のグルコース濃度範囲において、グルコース濃度に応じた蛍光強度を可逆的に発することが確認できた。次にブルーレイと CCD により小型検出系を構築し、流路を流れる蛍光ゲルビーズの蛍光観察に成功した。また、蛍光ゲルビーズをマウスの耳に低侵襲で埋め込み、またその蛍光強度が生体内においても可逆的に変化することにも成功した。

(2A)-1-2 ゲルカプセル化プロセスの開発

(2A)-1-2-1 概要

本研究では、産業分野において創薬スクリーニングや臨床・健康診断に役立てられるマイクロ・ナノデバイスの開発に結び付き、健康で安全な国民生活を増進させることを目指したプロセス技術の開発を行う。ここでは、バイオ・有機材料をハイドロゲルで固定化し、高次構造をマイクロ・ナノデバイス中に形成させるプロセスを開発する。具体的には、本項目では、医薬品候補化合物の代謝経路や他の薬物代謝酵素に与える阻害・誘導効果を予測するための試験デバイス開発につなげるため、薬物代謝酵素をターゲットとして、i)薬物代謝酵素の活性を失わず酵素活性や構造を安定して固定化するプロセス、ii)マイクロ流路上に自由自在に配置するための均等なマイクロカプセルの作製プロセス、そして、最終的には iii) 産生された代謝物の微量測定ができるマイクロチップへ配置するプロセス開発を行う。

前年度は CYP3A4 の活性を指標として、薬物代謝酵素を固定化することができる素材の検討を行ったところ、アルギン酸カルシウム PLL およびアクリルアミドゲルが薬物代謝酵素の固定化に有用である可能性を見出した。

(2A)-1-2-2 今年度実施項目

【実施項目】アルギン酸カルシウム PLL およびアクリルアミドゲル等について、CYP に対する活性への影響と漏出性の評価を行う。

a. アルギン酸カルシウムPLLカプセルの漏出性評価

前年度の検討から、アルギン酸カルシウム PLL カプセルによる CYP3A4 の固定が有効であることが見出された。そこで、今年度はアルギン酸カルシウム PLL カプセルの固定可能な分子量の検討を行った。

b. マイクロゲルカプセル作製プロセスのCYP1に対する活性への影響

前年度の検討から、アルギン酸カルシウム PLL およびアクリルアミドによる CYP3A4 の固定が有効であることが見出された。そこで、今年度はアルギン酸カルシウム PLL およびアクリルアミドのマイクロゲルカプセル作製プロセスに用いるオイルが未固定および固定 CYP3A4 に及ぼす影響を解析した。

なお、今年度導入した三次元ヘテロ関連実験装置 (B) のマイクロプレートリーダーは、本課題の CYP3A4 活性の測定に活用した。

(2A)-1-2-3 実験操作

a. アルギン酸カルシウムPLLカプセルの漏出性評価

FITC デキストラン (分子量=4000、20000、70000、150000) を MilliQ に溶解し、それぞれ 250mM, 50mM, 25mM, 25mM 溶液を作製した。これを等量の 5%アルギン酸溶液と混合し、アルギン酸デキストラン溶液を調製した。次にこれをスターラーによって攪拌されている 5%塩酸カルシウム溶液中に受取ることで、瞬時にゲル化することができた。5 分間、攪拌を続けた後、カプセルの一部を 20%EDTA 溶液で溶解したものをカプセル化後の 100%蛍光量とした。残りは 50mM Hepes によってカルシウムの除去を兼ねた洗浄を行ったあと、50mM Hepes バッファ中の 0.05% poly-L-lysine 溶液中に移し、5 分間室温で置いた。その後、50mM Hepes バッファ中の 0.1%アルギン酸ナトリウム中に移し、さらに 5 分間室温で置いた。作製した CYP アルギン酸ポリリジン複合体カプセルを 50mM Hepes によって洗浄を行った。100%蛍光量を与えるゲルの量とほぼ同量のゲルを 50mM Hepes 内で室温に放置し、経時的にゲル外液を分取してその蛍光量をマイクロプレートリーダー(励起：405nm、蛍光：510nm)で測定した。これにより、漏出前の蛍光量に対する漏出蛍光割合を算出した。

b. マイクロゲルカプセル作製プロセスのCYP1に対する活性への影響

ア. 測定サンプル作製

Oil としては corn oil を用いた。まず、未固定 CYP3A4 に対する oil の影響を調べるため、固定していない CYP3A4 と corn oil を等量ずつ混合したあと、水層を分取して oil-CYP3A4 溶液を作製した。

一方、固定 CYP3A4 に対する oil の影響を調べるため、CYP3A4 アルギン酸カルシウム PLL カプセルを作製した。等量の CYP3A4 溶液と 5%アルギン酸溶液を混合し、アルギン酸 CYP 溶液を調製した。次にこれをシリンジ内に充てんして、二重円管ノズルと接続する。二重円管ノズルには窒素ガスの配管が繋がれており、アルギン酸 CYP 溶液が通る管の外側を流れる。アルギン酸 CYP 溶液の流速はシリンジポンプによって調節した。また、窒素ガスの流量は流量計によって調節した。押し出されるアルギン酸 CYP 溶液は、スターラーによって攪拌されている 1%塩酸カルシウム溶液中に受取ることで、瞬時にゲル化することができた。作製した CYP アルギン酸カプセルを 50mM Hepes バッファ中の 0.05% poly-L-lysine 溶液中に移し、5 分間室温で置いた。その後、50mM Hepes バッファ中の 0.1%アルギン酸ナトリウム中に移し、さらに 5 分間室温で置いた。作製した CYP アルギン酸ポリリジン複合体カプセルを 50mM Hepes によって洗浄を行ったあと、活性測定に用いた。

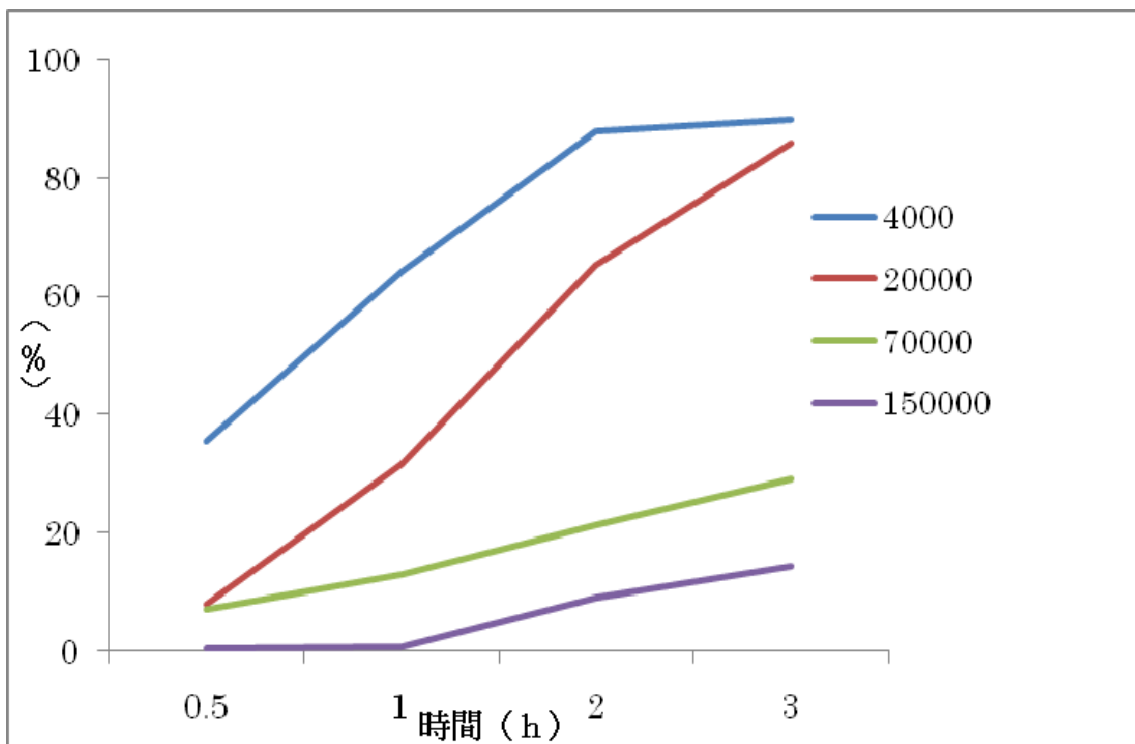
イ. 活性測定

同等量の CYP3A を含む溶液またはカプセルを、以下の CYP3A4 反応バッファ (50mM HEPES buffer, 0.65mM NADP⁺, 6.6mM MgCl₂, 6.6mM グルコース-6-リン酸, 80μM 7-benzyloxyquinoline) 200μL 中 37 度で反応させ、経時的に代謝物の 7-Hydroxyquinoline による蛍光をマイクロプレートリーダー(励起：405nm、蛍光：510nm)で計測をした。

(2A)-1-2-4 実験結果

a. アルギン酸カルシウムPLLカプセルの漏出性評価

FITC 標識されたデキストランをアルギン酸カルシウム PLL カプセルに固定化した直後の蛍光量を 100%としたとき、固定化後に浸漬溶液中に漏出する蛍光量を経時的にあらわしたのが図①-(2A)-1-2.1 である。分子量 4000 および 20000 のデキストランは反応後 3 時間ではほぼ全量が漏出してしまったが、分子量 70000 および 150000 のデキストランは 3 時間後でも 70%から 80%程度はカプセル内に固定化されていることがわかった。このことからアルギン酸カルシウム PLL に固定化する分子は分子量 70000 以上であることが望ましい。



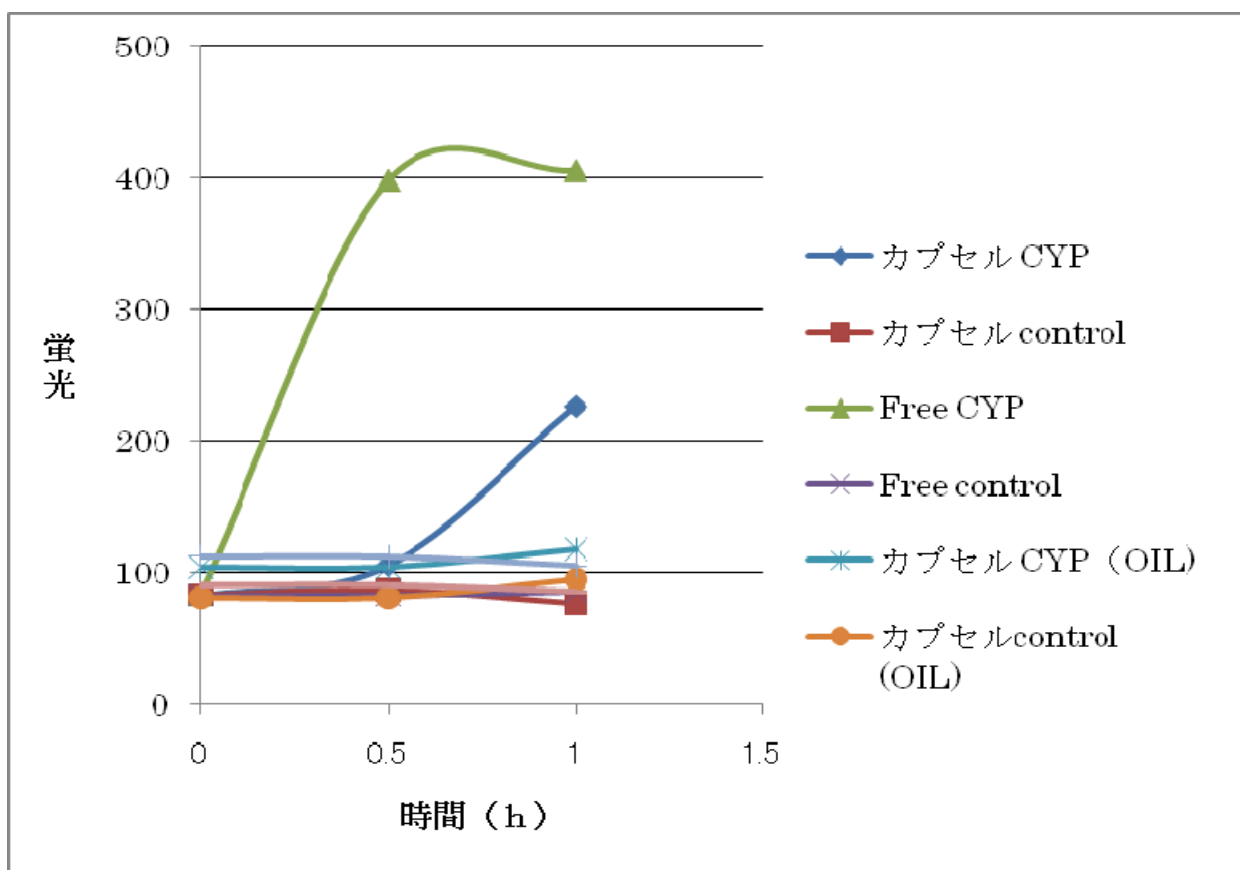
図①-(2A)-1-2.1

今後は、より長時間での漏出性や 20000 から 70000 の間の分子量をもっと細か

く調べる必要がある。

b. マイクロゲルカプセル作製プロセスのCYPに対する活性への影響

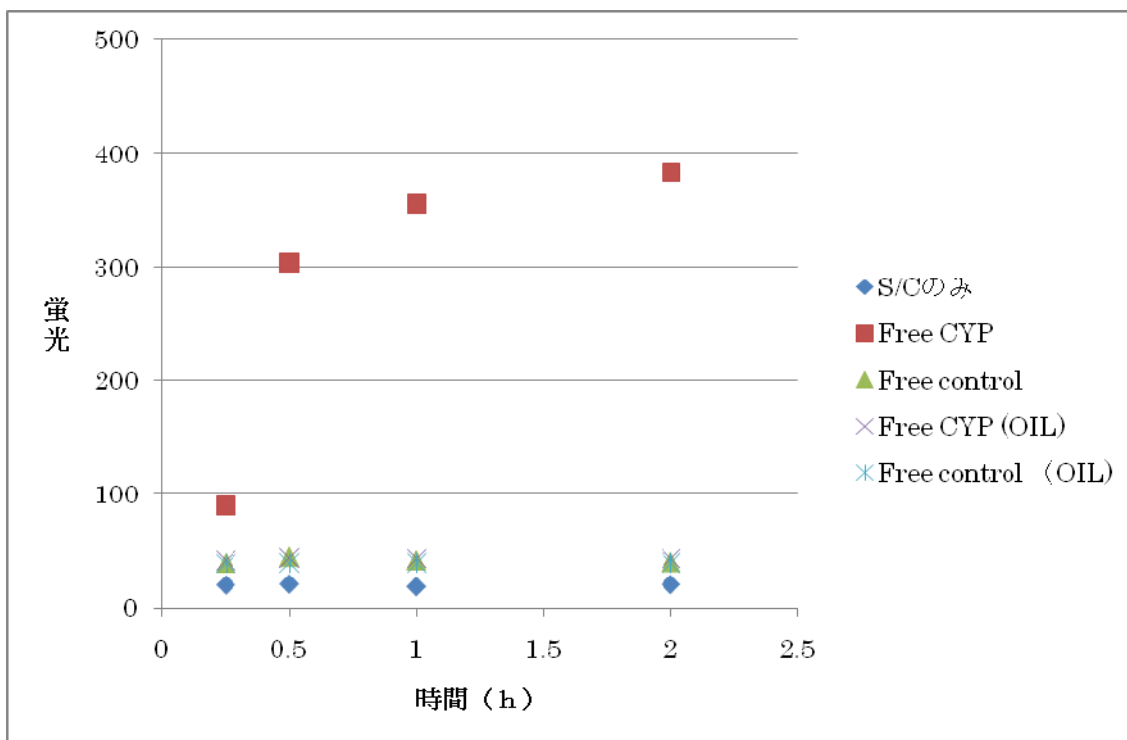
CYP 3A4 をアルギン酸カルシウム PLL カプセルに固定化し、そのカプセルをコーンオイル内で放置した。そのあと、カプセルをオイルから取り出し、カプセルと基質を反応させて、生成される代謝物の定量を行った結果を図①-(2A)-1-2.2に示す。対照として、カプセル化していない free の CYP3A4 の活性、およびカプセル化 CYP3A4 活性を同時に計測し、比較した。Free の CYP3A4 およびカプセル化 CYP3A4 の活性と比較して、オイル内で放置したカプセル化 CYP3A4 の活性はほとんど検出されず、コントロールマイクロゾームとほぼ同程度の活性だった。このことから、アルギン酸カルシウム PLL ゲルを作製するプロセスにコーンオイルを用いることはふさわしくないことがわかった。



図①-(2A)-1-2.2

オイルが直接 CYP3A4 におよぼす影響を調べるため、コーンオイルと CYP3A4 を混合した後の水層の活性を測定した。対照として、カプセル化していない free

の CYP3A4 の活性を同時に計測し、比較した (図①-(2A)-1-2.3)。Free の CYP3A4 の活性と比較して、オイルと混合した後の水層に CYP3A4 の活性はほとんど検出されず、コントロールミクロゾームとほぼ同程度の活性だった。このことから、微小カプセルを作製するプロセスにコーンオイルを用いることは適切ではないことがわかった。



図①-(2A)-1-2.3

今後は、微小なアルギン酸カルシウム PLL カプセルやアクリルアミドカプセルを作製するには、オイルを用いないプロセスを検討する。また、他のオイルを用いることによって活性検出にどのような影響があるか検討する。

(2A)-1-2-5 まとめ

【実施項目】アルギン酸カルシウム PLL およびアクリルアミドゲル等について、CYP に対する活性への影響と漏出性の評価を行う。

【結果】 1)アルギン酸カルシウム PLL には分子量約 70000 以上の分子がよく固定化される。2)アルギン酸カルシウム PLL カプセルやアクリルアミドカプセルの微小作製に必要なオイルは CYP3A4 活性の測定を妨害する。

(2A)-1-3 生体に適応可能なハイドロゲルの形成プロセス検討と機能評価

(2A)-1-3-1 血管誘導を目的とした生体に適応可能な徐放性を有するゲルのin vitroでの検討

a. 概要

血糖感受性蛍光ハイドロゲルを生体へ適応する際に、低侵襲かつ効果的な適応部位として皮下が考えられるが、皮下は血流が乏しく、皮下の組織液中のブドウ糖レベルと血液中のブドウ糖レベルの間には乖離が存在する。その乖離を最小限とするため、皮下に挿入したハイドロゲル周囲の血流を豊富にすることを目的として、皮下局所に血管新生を促進することが重要であると考えられる。そのため的手段として、血管増殖因子を生体内分解性ゲルに包含させて皮下に注入するという方法が有力である。既に入手可能な、生体内で分解する性質を有するゲルの特性を *in vitro* の系で評価した。

生命現象として血管新生を促進する増殖因子の存在が明らかとなって以来、増殖因子投与による意図的な血管新生の可能性が示唆された。そのなかでも、塩基性線維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor: FGF-b) は血管新生 angiogenesis および動脈形成 arteriogenesis (小動脈レベルの血管拡張, リモデリング) を促進する性質を持つことが知られている。しかしながら、FGF-b は生物学的活性が短く、局所で一定期間有効な濃度を保つには困難な側面があった。そこで、FGF-b の徐放化を目的とした生体内分解性ゲルの利用が有用であるとの報告があり、そのための候補として既に市販されている3種類の生体内分解性ゲル (アテロコラーゲン、PuraMatrix、MedGel) の *in vitro* での b-FGF の保持能力の検討を行った。

アテロコラーゲン (Koken Aterocollagen Implant) は高研株式会社により研開発され、生理温度 (37° C) でゲル化する。既に臨床使用されている。生理活性物質との適切な混合比を決定することが不可欠である。親水性の試薬、各種増殖因子、抗体の投与に向いている。

BDTM PuraMatrixTM ペプチドハイドロゲルは、様々な細胞培養に対し、三次元 (3D) のマイクロ環境を提供する合成マトリックスである。外科手術時の止血剤としての治験開始が計画されている。生理活性分子 (例: 成長因子、細胞外基質 [ECM] タンパク質や他の分子) との適切な混合比を決定することが不可欠である。BD PuraMatrix ペプチドハイドロゲルは、標準アミノ酸 (1% w/v) と 99%の水から構成されている。生理学的条件下(中性)におくと、ペプチドが自己重合し、ナノメートル単位の線維構造を持った 3D ハイドロゲルを形成する。このハイドロゲルは、ディッシュ、プレート、またはセルカルチャーインサート上で簡単に形成

することができる。

MedGel はゼラチンベースの生理活性物質の徐放用ハイドロゲルである。徐放化させたい生理活性物質を滴下するだけで、生体内で分解・失活しやすい生理活性物質を安定化する。生理活性物質の局所投与を可能にし、親水性の試薬、各種増殖因子、抗体の投与に向いている。

本研究の目的は FGF-b に最適な徐放剤を選択することである。FGF-b をそれぞれの三つの徐放剤と混合し、in vitro 系を用いて徐放剤の FGF-b 保持性を評価した。

b. 材料と機械



図①-(2A)-1-3-1.1 実験材料

A: Recombinant Human FGF-basic(Catalog#100-18B Lot# 120908 PeproTech)

B: MedGel(Code#p15-95MS)

C: BDTM PuraMatrixTM Peptide Hydrogel(1%w/v Lot.A0201A102)

D: 3.5% Koken Aterocollagen Implant(Lot.810815)



図①-(2A)-1-3-1.2 実験材料及び測定機械

E: Human bFGF ELISA Kit (Cat#:ELH-bFGF-001 RayBiotech, Inc.)

F: Microplate Manager PC 5.1 (Cat#:170-6930J1 BIO-RAD)

c. 方法

ア. Human FGF-b液の調整 :

試薬 human FGF-basic(容量: 50 μ g) チューブ open 前に軽く遠心し、100 μ l 5mM Tris(pH7.6)で溶かす。保存濃度は 50 μ g/100 μ l(0.5mg/ml)に調整する。2-8 $^{\circ}$ Cで保存する。実験直前に 0.5mg/ml FGF-b 液 40 μ l を取り、5mM Tris 60 μ l で FGF-b 濃度を 2 μ g/10 μ l に希釈する

イ. ゲル化実験 :

■ Aterocollagen (AC)ゲル化 :

10 μ l(2 μ g) FGF-b 液を 1.5ml チューブに入れてから、100 μ l 3.5% AC を FGF-b 入れたチューブに入れ、速やかによく混ぜる。一晩、37 $^{\circ}$ Cで静置してゲル化する。

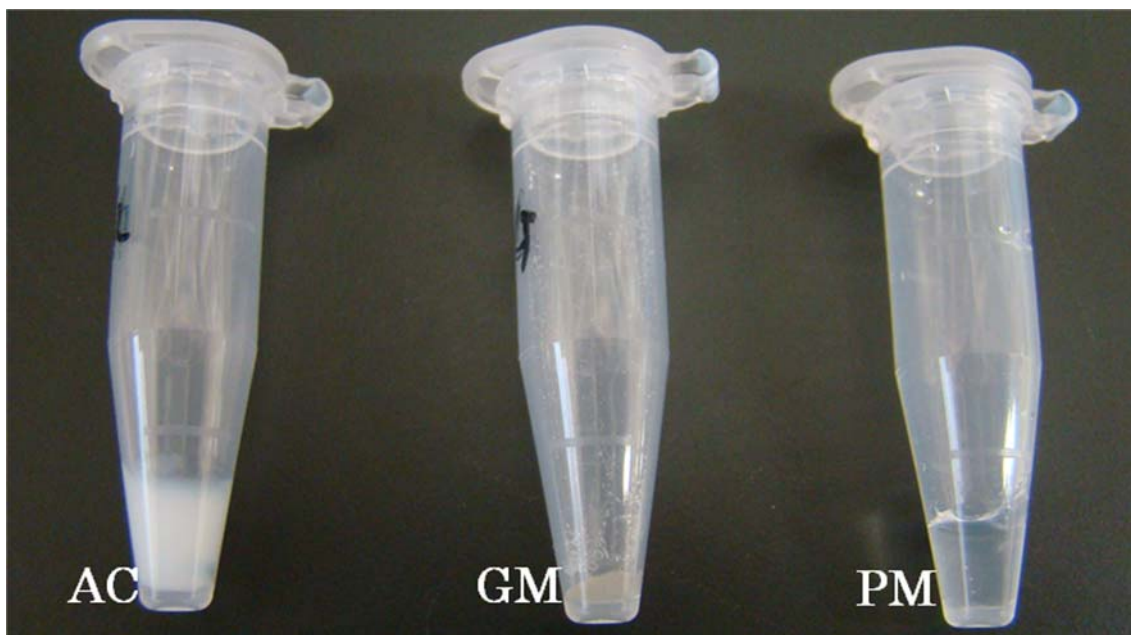
■ MedGel(MG)ゲル化 :

1mg MG を 1.5ml チューブに入れてから、10 μ l(2 μ g)FGF-b 液を MG の上に滴下する。一晩、4 $^{\circ}$ Cで静置して FGF-b を MG に完全に含浸させる。

■ BDTM PuraMatrixTM Peptide Hydrogel(PM)ゲル化 :

10 μ l(2 μ g) FGF-b 液を 1.5ml チューブに入れてから、50 μ l PM と 50 μ l PBS(-)を FGF-b の入れたチューブに入れ、速やかによく混ぜる。一晩、4 $^{\circ}$ Cで静置してゲル化する。

上記のようにゲル化された AC, GM, PM を図①-(2A)-1-3-1.3 に示す。



図①-(2A)-1-3-1.3 ゲル化された AC、GM、PM

ウ. 24 時間徐放実験 :

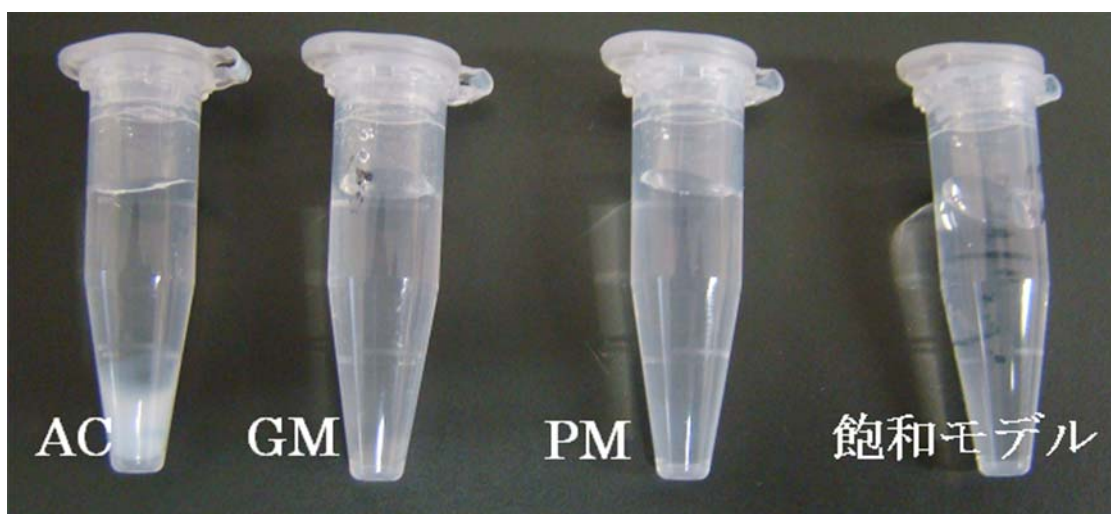
■ 24 時間徐放実験 :

チューブの複合体ゲルの上に 1000 μ l PBS(-)を重層する。37 $^{\circ}$ Cで静置して、徐放実験開始する。24 時間後に上清を取り、サンプルとして-80 $^{\circ}$ C保存する。

■ 放出飽和モデル(=100%)サンプル :

10 μ l(2 μ g) FGF-b 液を 1.5ml チューブに入れてから、990 μ l PBS(-)を添加し、よく混ぜる。37 $^{\circ}$ C、24 時間で静置する。サンプルとして -80 $^{\circ}$ C保存する。

上記のように作製されたサンプルを図①-(2A)-1-3-1.4 に示す。



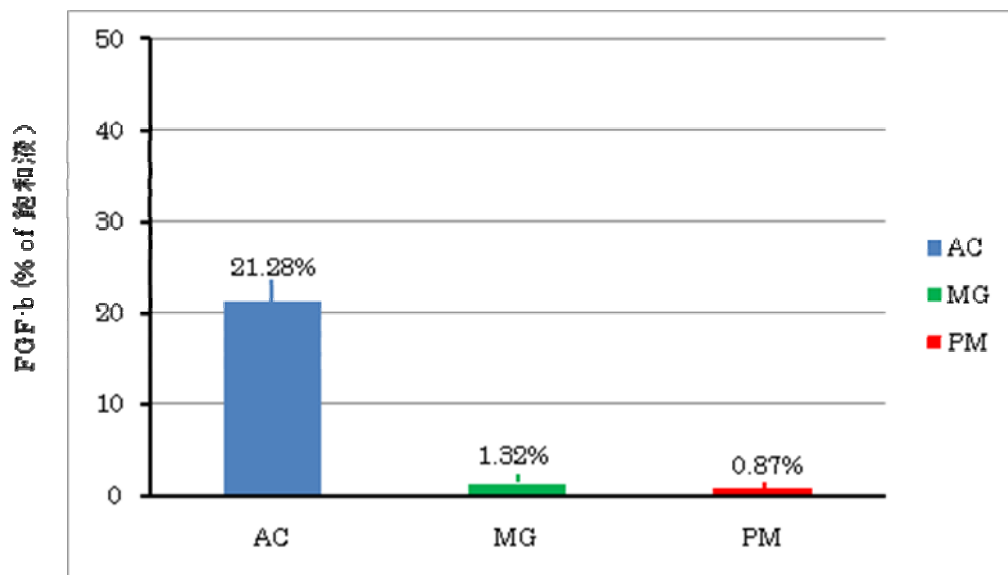
図①-(2A)-1-3-1.4 PBS(-)で重層されたサンプル

■ ELISA Kit による上清に徐放された FGF-b 定量実験 :

サンプルを適正測定範囲である 41.14-10,000pg/ml になるよう kit 付属の wash buffer で希釈する。測定は kit のプロトコールに従い、マイクロプレートリーダー (BIO-RAD)を用いて定量した。

d. 結果・考察

ア. 結果：



図①-(2A)-1-3-1.5 24時間の FGF-b の放出率

イ. 考査：

24時間徐放実験の結果から、FGF-b量が $2\mu\text{g}$ では、ACに比較してMGとPMがより高い保持性を示した。ただし今回は24時間であり、より長い時間で保持性を考慮する必要がある。

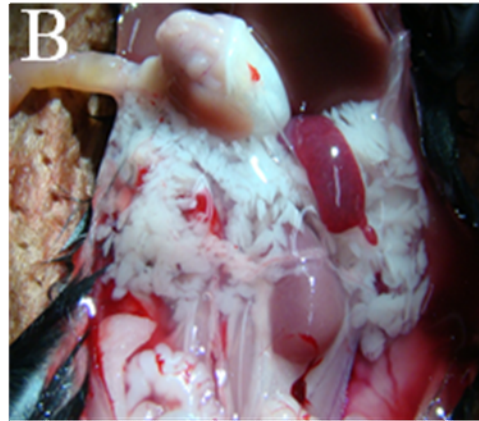
今回は3.5%ACを用いての検討の結果であり、ACを希釈して（例えば：1%、2%AC）検討すれば、FGF-bの保持性が変わる可能性がある。さらなる検討が必要である。

(2A)-1-3-2 血糖感受性蛍光ハイドロゲルの生体内での機能評価を可能とする小動物モデル（マウス）の作成

a. コラゲナーゼ法を用いた、マウスからの膵臓分離

ア. 膵臓分離：

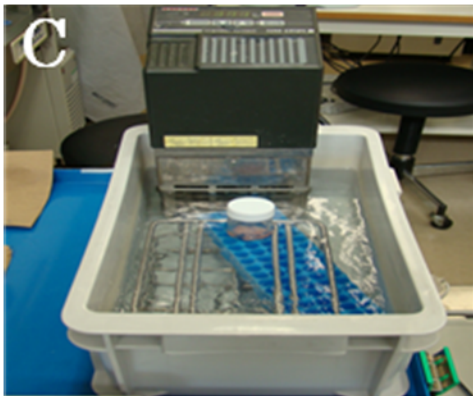
マウス膵管から1匹あたり 0.5mg/ml (HBSS)のコラゲナーゼを入れて膨化してから、膵臓を摘出し、cold HBSSの入れた50mlガラスバイアル瓶に移す。膵臓分離の実験の様子を図①-(2A)-1-3-2.1に示す。



図①-(2A)-1-3-2.1 A:マウス膵管からコラゲナーゼの注入 B: 膨化された膵臓

イ. incubation、濾過：

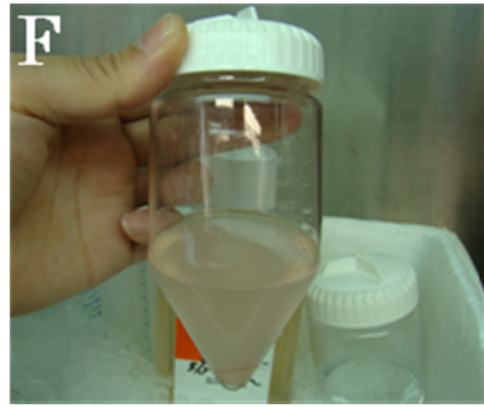
21 分間、37°Cで incubation する。10ml の 5%FBS/HBSS を添加し 20 秒間強く shake し、500 μ m の格子辺のメッシュで濾過する。濾過の実験の様子を図①-(2A)-1-3-2.2 に示す。



図①-(2A)-1-3-2.2 C: incubation D: 濾過

ウ. 洗浄、濃縮:

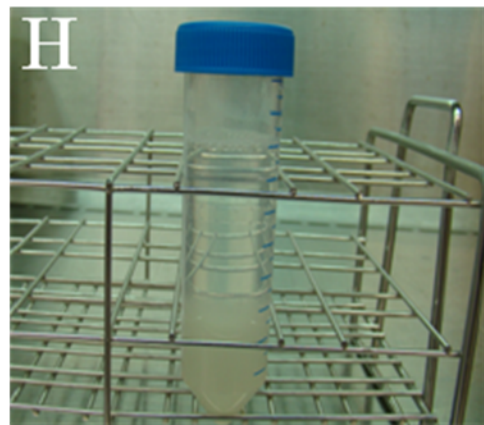
1000rpm(200g)、3 分間、4 °Cで遠心し、上清を捨て、再び cold 5%FBS/HBSS を添加し、3 回繰り返して 1000rpm(200g)、3 分間、4 °Cで遠心し、洗浄する。洗浄、濃縮の実験の様子を図①-(2A)-1-3-2.3 に示す。



図①-(2A)-1-3-2.3 E: 遠心機 F: 遠心後、脾臓は遠心管底に残る

エ. 脾臓純化:

50ml 遠心管にいた脾臓に比重 1.100 純化溶液を添加し、比重 1.007 純化溶液を 15ml ずつゆっくり重層し、最後に HBSS を 10ml 重層する。1500rpm(400g)、20 分間、4℃で遠心する。最下層をピペットで回収し、50ml 遠心管に移す。脾臓純化の実験の様子を図①-(2A)-1-3-2.4 に示す。



図①-(2A)-1-3-2.4 G: 純化溶液の添加 H: 重層された脾臓

オ. 洗浄、濃縮:

脾臓が入っている 50ml 遠心管に cold 5%FBS/HBSS を添加し、懸濁して 50mg までメスアップする。1000rpm(200g)、3 分、4℃で遠心する。上清を捨て、50ml まで cold 5%FBS/HBSS を添加する。もう 2 回、同様に遠心し、洗浄する。

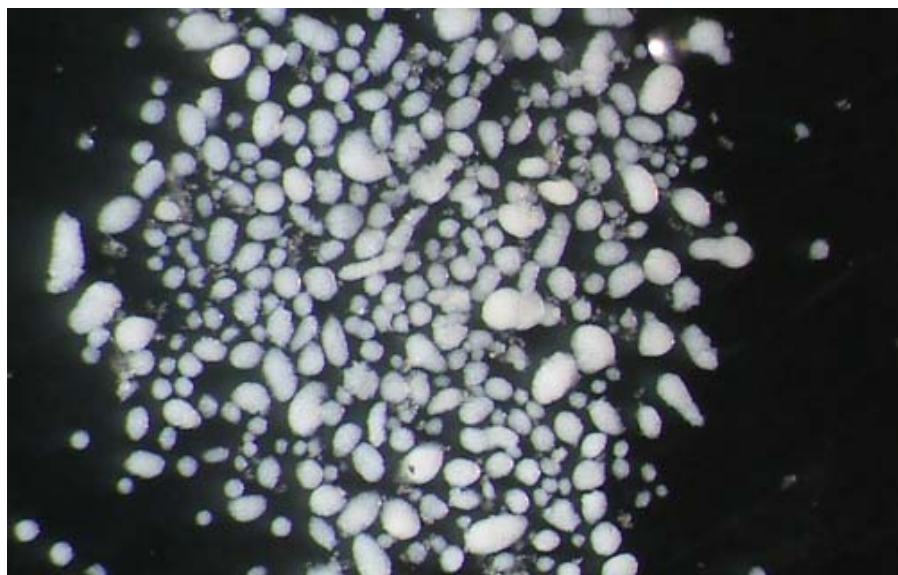
カ. ピックアップ:

5%FBS/HBSS でコートしたディッシュに脾臓を入れてパスツールピペットでピックアップする。ピックアップの実験の様子および分離されたマウス脾臓を図①

-(2A)-1-3-2.5 および図①-(2A)-1-3-2.6 に示す。



図①-(2A)-1-3-2.5 IとJ: 顕微鏡下での膵島のピックアップ



図①-(2A)-1-3-2.6 分離されたマウス膵島

b. ストレプトゾシン(streptozotocin; STZ)を用いたマウス糖尿病モデルの確立:

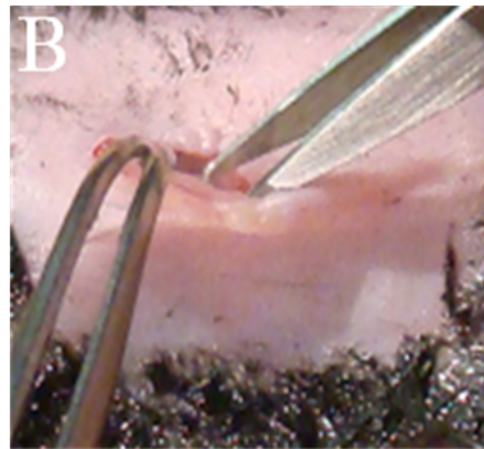
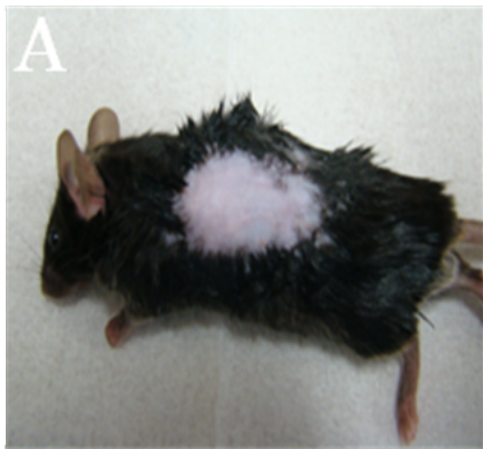
ア. STZ液の調製:

12 mg STZ/ml Sodium Citrate buffer で溶かす。

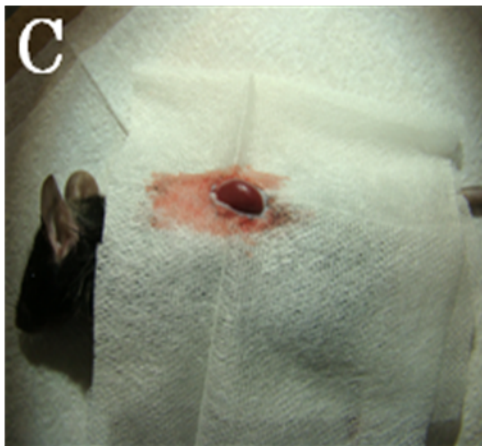
イ. STZ投与

まず、マウスを 20 時間、絶食する(水は与え、ケージは新しくする)。その後、体重 10g 当たり 100 μ l STZ 液を腹腔内投与する (すなわち 120 mg/kg WT)。投与後すぐに餌を与える。血糖値が 2 日間連続 200mg/dl 以上になることで糖尿病と診断する。

c. STZ誘導糖尿病マウスへの膵島移植法（腎被膜下）の確立：



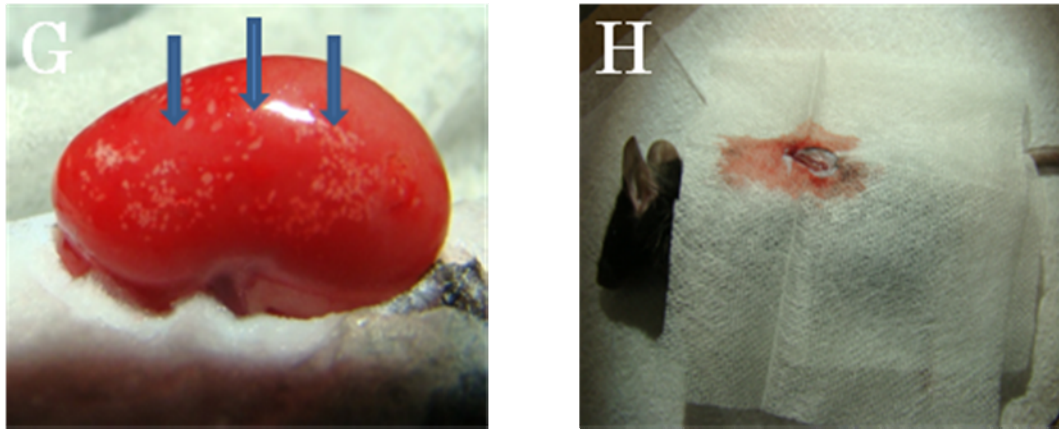
図①-(2A)-1-3-2.7 (A,B) マウス背中中の除毛、皮膚切開



図①-(2A)-1-3-2.8 (C,D) 腎臓の露出、膵島の翼状針への吸引



図①-(2A)-1-3-2.9 (E,F)腎被膜下への膵島の注入



図①-(2A)-1-3-2.10 (G,H)腎被膜下の出血かないかを確認して、腎臓を腹腔内に戻す

d. STZ誘導糖尿病マウスへの移植膵島量を変えての移植実験:

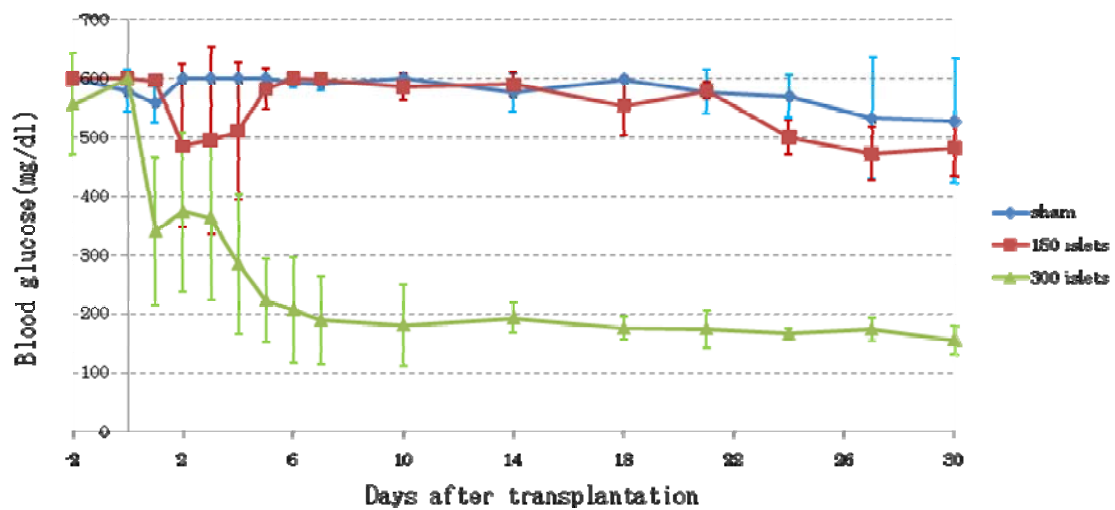
ア. 方法:

- i) マウスへの糖尿導入は(2A)-1-3-1 の b の方法に従う。
- ii) 膵島の分離は(2A)-1-3-1 の a の方法に従う。
- iii) 移植は(2A)-1-3-1 の c の腎被膜下移植方法に従う。
- iv) 本実験では糖尿病マウスの腎被膜下にそれぞれ 150 個、300 個膵島を移植した。コントロール群は開腹のみで移植しないもの (sham ; 仮手術) を用いた。移植後 30 日まで随時血糖値を測定した。

イ. 結果:

膵島移植された糖尿病マウスの随時血糖値の測定結果を図①-(2A)-1-3-2.11 に示す。図①-(2A)-1-3-2.11 から以下のことがわかった。

- i) 150 個膵島移植されたマウスの随時血糖値は移植後正常化しなかった。
- ii) 移植後一周間経過した後に、300 個膵島移植されたマウスの随時血糖値が下がっていた。



図①-(2A)-1-3-2.11 膵島移植された糖尿病マウスの随時血糖値

e. 移植膵島量を変化させた膵島移植を受けたSTZ糖尿病マウスでの耐糖能の検討：

ア. 腹腔内ブドウ糖負荷試験(intraperitoneal glucose tolerance test;IPGTT)

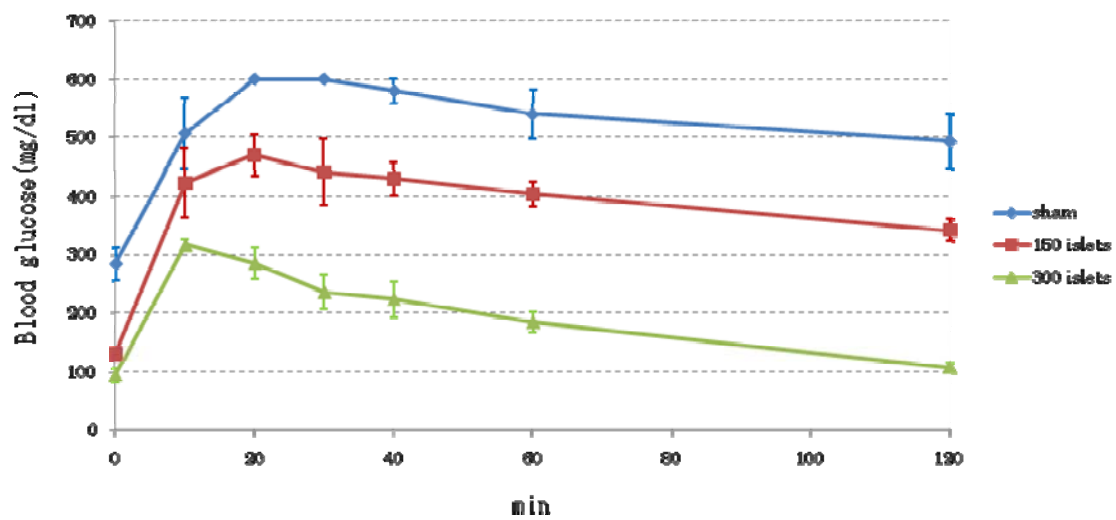
方法：

移植後 35 日目に膵島移植されたマウスを絶食 16 時間後、腹腔内にブドウ糖を 1g/kg 体重投与し、投与前と投与後 20、40、60、120 分の血糖値を測定した。

イ. IPGTT結果：

マウスの IPGTT の血糖値測定結果を図①-(2A)-1-3-2.12 に示す。図①-(2A)-1-3-2.12 より以下のことがわかった。

- i) 300 個膵島移植されたマウスと比べ、150 個膵島移植されたマウス及び仮移植手術(sham)のマウスの糖負荷後の血糖が高かった。
- ii) 糖負荷 120 分後、300 個膵島移植されたマウスの血糖が通常血糖に戻ったが、150 個膵島移植されたマウス及び仮移植手術のマウスの血糖値は上昇したままであった。



図①-(2A)-1-3-2.12 マウスの IPGTT の血糖値

f. 考査：

本研究にて血糖感受性蛍光ハイドロゲルの生体内での機能評価を可能とする小動物（マウス）モデルを確立した。このマウスモデルを用いて糖負荷後の異なる血糖推移を示すマウスに蛍光ハイドロゲルを装着させることでハイドロゲルの血糖感受性のより詳細な解析が可能になる。

(2A)-1-4 マイクロ液滴形成プロセスのモデリング・シミュレーション

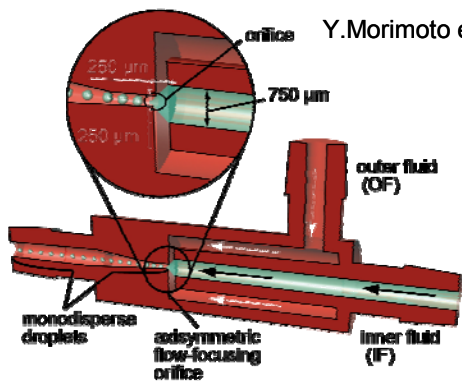
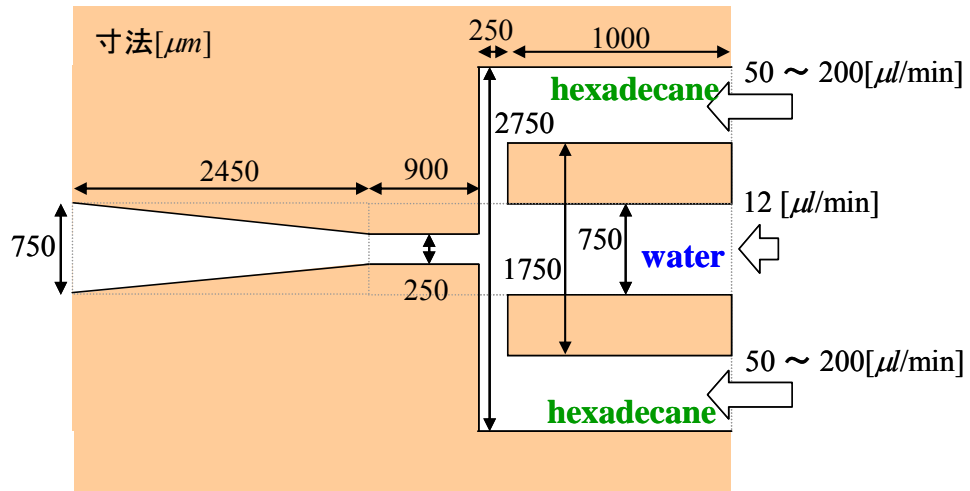
本開発項目では、ハイドロゲルの高次構造形成プロセス条件についての検討を行うため、マイクロ液滴形成プロセスのモデリング・シミュレーションを実施する。

本年度は、AFFD 等によるマイクロ液滴形成プロセスにおいて、デバイス形状・材質、流量などの稼動条件、流体物質の物性値に応じて形成される液滴の径・分散予測のための基本手法を確立した。

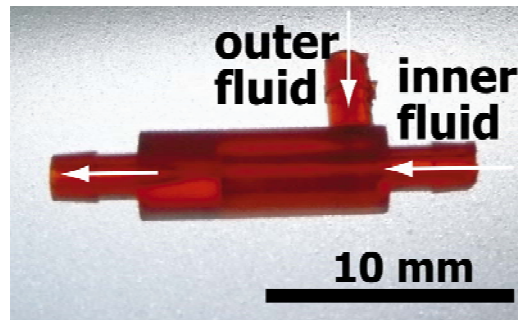
(2A)-1-4-1 AFFDでの予備計算

昨年度実施した液滴形成プロセスに対するシミュレーション手法の検討により、VOF (Volume of Fluid) 法による 2 相流の 3 次元シミュレーションを AMR (Adaptive Mesh Refinement) を用いて実施することとした。

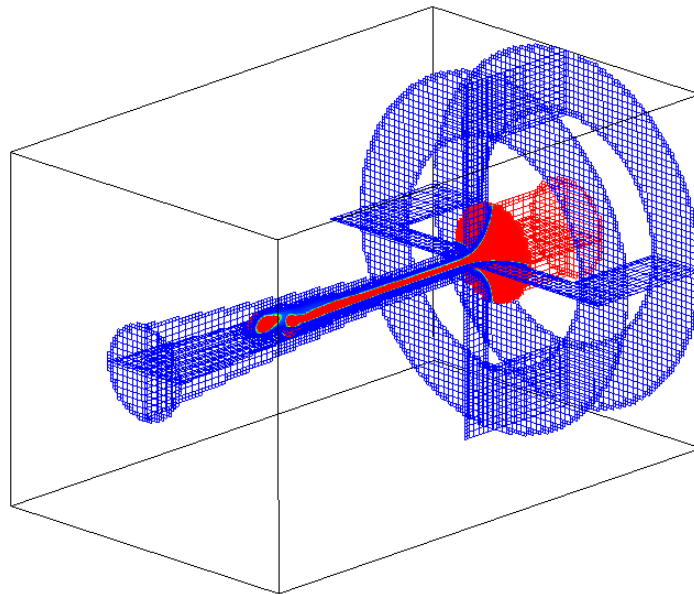
AMR法を用いたとしても現象の複雑さのため計算コストが多大にかかることが予測されるため、計算時間および液滴形成状況を把握するため、まず、AFFDデバイスの全体系（図①-(2A)-1-4.1）に対するシミュレーションを実施した。図①-(2A)-1-4.2に示す程度のメッシュを用いた。分散相と連続相（水とヘキサデカン）の界面については、AMRにより、25、12.5、6.25[μm]の3段階で、メッシュを適合的に細分化した。また、シミュレーションを実施する際の稼動条件は、実験が実施されている状況（表①-(2A)-1-4.1）を考慮して設定した。



Y. Morimoto et al. (2009) *Biomedical Microdevices* 11, 369-377.



図①-(2A)-1-4.1 実デバイスとシミュレーション体系

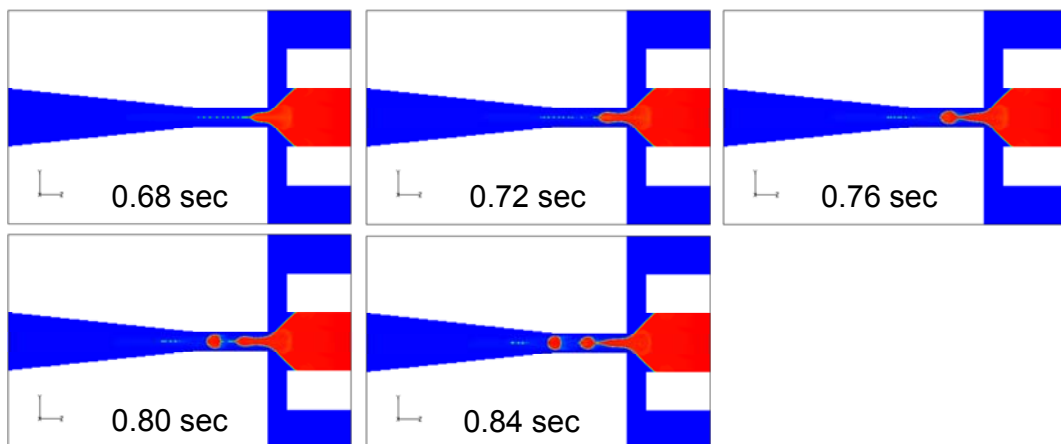


図①-(2A)-1-4.2 計算時間把握のためのシミュレーションに用いたメッシュ (メッシュ数 43 万)

表①-(2A)-1-4.1 稼働条件と物性値

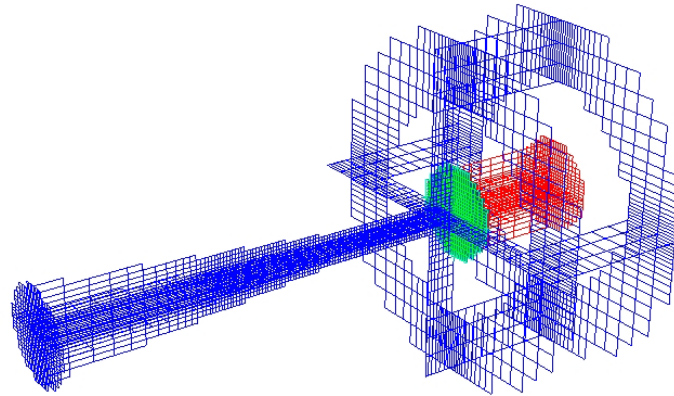
流体	稼働条件	物性値		
	流量[$\mu\text{l}/\text{min.}$]	密度 ρ [kg/m^3]	粘性係数 μ [$\text{Pa} \cdot \text{s}$]	表面張力 σ [N/m]
水	12	998.2	0.001	0.03
ヘキサデカン	50~200	773.3	0.0033	

drippingによる液滴形成が生じるとされている稼働条件（ただし、実際の稼働条件より連続相の速度が10倍程度速い条件に相当）において、液滴の形成が観察された(図①-(2A)-1-4.3)。実時間に換算して0.84秒間のシミュレーションを実施し、0.76秒および0.84秒の時点で液滴が形成され、連続的な液滴形成をシミュレーションすることが可能であることが示唆された。実際の計算にはハイエンドPCWSを使い45日間かかった。メッシュ数は43万メッシュであった。



図①-(2A)-1-4.3 AFFDでのシミュレーションによる液滴形成

計算時間の低減が可能であるかどうかを評価するため、デバイス形状の再現性を下げ（メッシュを荒くして）シミュレーションを実施した(図①-(2A)-1-4.4)。分散相と連続相（水とヘキサデカン）の界面については、最初のものと同様に、AMRにより、25、12.5、6.25[μm]の3段階で、メッシュを適合的に細分化した。



図①-(2A)-1-4.4 計算時間把握のためのシミュレーションに用いたメッシュ（メッシュ数7万）

最初のシミュレーションと同等の稼動条件（ただし、実際の稼動条件より連続相の速度が10倍程度速い条件）にて、シミュレーションを実施したところ液滴の形成が確認された。実際の計算でのメッシュ数は7万メッシュであり、計算時間は10日間となり、計算時間が削減された。しかしながら、シミュレーション実施による検討の結果、対象とする現象のシミュレーションでは、表面張力の効果を再現するようにシミュレーションの時間刻みを設定する必要があることが判明しており、連続相の速度を下げた場合でも時間刻みを大きくすることはできない。そのため実際の稼動条件程度のシミュレーションを実施する場合には、10倍程度（100日）の時間がかかると推測される。

(2A)-1-4-2 平行一様流でのシミュレーション

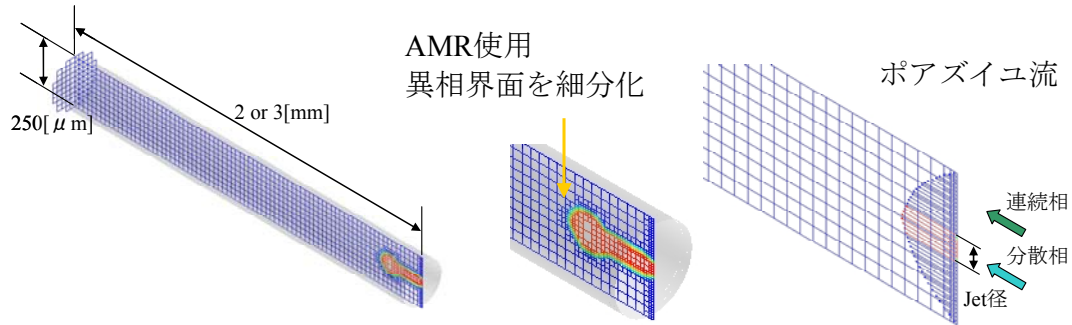
シミュレーションがプロセス検討のツールとして有用であるかどうかは、稼動条件・物性値を様々に変えたときの実験での液滴形成状況の変化を再現できるかどうかにかかっている。

前述のようにデバイス全体のシミュレーションはかなりの時間的なコストを必要とするため、稼動条件・物性値にバリエーションを与えて数多くのシミュレーションを実施するのは実際上困難である。そこで、オリフィスの狭窄部分を理想的に表現しており、より少ない時間で計算が可能だと想定される平行一様流にて液滴形成のシミュレーションを実施した。

a. シミュレーション体系

シミュレーション体系は、円筒（直径250[μm]）：オリフィスの狭窄部の直径と同

一、長さ 2 または 3[mm]）であり、流入部分の境界条件は円筒内で十分発達したポアズイユ流の流速分布を仮定した（図①-(2A)-1-4.5）。この仮定により、物性値を固定したとき、分散相の流速、連続相の流速、ジェット径のうち 2 つが独立な変数であり、2 つの値を決定すると残りの 1 つの値が決定される。



図①-(2A)-1-4.5 平行一様流のシミュレーション体系

b. 平行一様流のジェット径・代表速度・無次元数

円筒内の二種類の流体により円筒軸方向に一様な速度での層流が生成すると仮定すると、その流れの動径速度分布について次の式が成り立つ。

$$u(r) = \begin{cases} -\frac{1}{4} \left(\frac{(d/2)^2 - r_{\text{jet}}^2}{\mu_2} + \frac{r_{\text{jet}}^2 - r^2}{\mu_1} \right) \frac{\partial p}{\partial z} & (0 < r < r_{\text{jet}}) \\ -\frac{1}{4\mu_2} \left((d/2)^2 - r^2 \right) \frac{\partial p}{\partial z} & (r_{\text{jet}} < r < d/2) \end{cases} \quad (①-17)$$

ここで、 d は円筒の直径、 r_{jet} はジェットの半径、 r は円筒中心軸からの距離、 μ_1 、 μ_2 は分散相（添え字 1）、連続相（添え字 2）の粘性係数、 $\partial p / \partial z$ は流れ方向の圧力勾配である。

この速度分布より、ジェットの半径 r_{jet} は次のように与えられる。

$$r_{\text{jet}}^2 = \frac{-\beta + \sqrt{\beta^2 + \alpha\beta}}{1 - \beta + \sqrt{\beta^2 + \alpha\beta}} \left(\frac{d}{2} \right)^2, \quad \alpha = \frac{Q_1}{Q_2}, \quad \beta = \frac{\mu_1}{\mu_2} \quad (①-18)$$

ここで、 Q_1 、 Q_2 は、それぞれ、分散相（添え字 1）、連続相（添え字 2）の流量である。このとき、流量と断面積から分散層と連続層の流速 U_1 、 U_2 は次のように計算される。

$$U_1 = \frac{4Q_1}{\pi d^2} \left(\frac{1}{-\beta + \sqrt{\beta^2 + \alpha\beta}} + 1 \right) \quad (①-19)$$

$$U_2 = \frac{4Q_2}{\pi d^2} \left(1 - \beta + \sqrt{\beta^2 + \alpha\beta} \right)$$

また、Utada et al.¹⁾では、分散相の Weber 数と連続相の Capillary 数によって、液滴形成での jetting-dripping 遷移を整理している。Weber 数は慣性力と表面張力の比を、Capillary 数は粘性力と表面張力の比を表す無次元数である。この分散相の Weber 数と連続相の Capillary 数は、次のようになる。

$$We_1 = \frac{2r_{\text{jet}}\rho_1 U_1^2}{\sigma} = \frac{16\rho_1 Q_1^2}{\sigma \pi^2 d^3} \left(\frac{1 - \beta + \sqrt{\beta^2 + \alpha\beta}}{-\beta + \sqrt{\beta^2 + \alpha\beta}} \right)^{3/2} \quad (①-20)$$

$$Ca_2 = \frac{\mu_2 U_2}{\sigma} = \frac{4\mu_2 Q_2}{\pi d^2 \sigma} \left(1 - \beta + \sqrt{\beta^2 + \alpha\beta} \right)$$

ここで、 ρ_1 、 σ は、分散相の密度と、分散相と連続相の界面での表面張力である。

C. 液滴形成状況

シミュレーションでは、前項のシミュレーションと同様、AMR により、25、12.5、6.25[μm]の3段階で、水-ヘキサデカン界面付近のメッシュを適合的に細分化した。

この平行一様流のシミュレーションにおいて稼動条件・物性値にバリエーションを与え、既存実験の再現状況を確認した。

平行一様流でのシミュレーションを表①-(2A)-1-4.2に示すケースについて実施した結果を示す。液滴形成状況は、図①-(2A)-1-4.6のようになる。

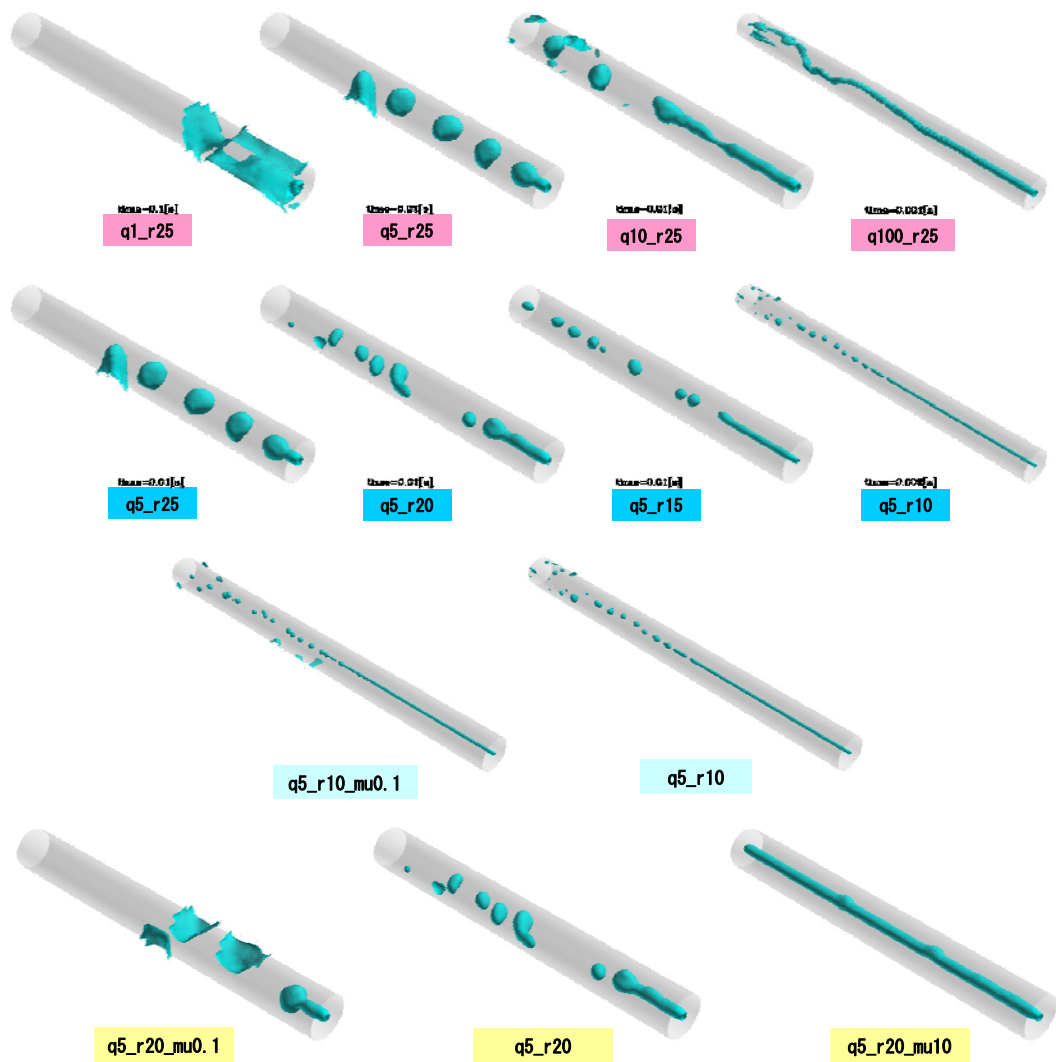
表①-(2A)-1-4.2 平行一様流シミュレーション実施ケース

ケース名	流量(分散相/連続相) [$\mu\text{l}/\text{min}$]	粘性係数(分散相/連続相) [Pa·s]	密度(分散相/連続相) [kg/m^3]	表面張力 [N/m]	jet径 [μm]	C_{out} [-]	W_{in} [-]
(デバイス稼動条件)	12 / 100	0.001 / 0.0033	998.2 / 773.3	0.03	28.54	3.94E-03	1.16E-02
q1_r25	12 / 134.7	0.001 / 0.0033	998.2 / 773.3	0.03	25	5.24E-03	1.73E-02
q5_r25	60 / 673.7	0.001 / 0.0033	998.2 / 773.3	0.03	25	2.62E-02	4.32E-01
q10_r25	120 / 1347	0.001 / 0.0033	998.2 / 773.3	0.03	25	5.24E-02	1.73E+00
q100_r25	1200 / 13470	0.001 / 0.0033	998.2 / 773.3	0.03	25	5.24E-01	1.73E+02
q5_r20	60 / 1094	0.001 / 0.0033	998.2 / 773.3	0.03	20	4.19E-02	8.43E-01
q5_r15	60 / 2005	0.001 / 0.0033	998.2 / 773.3	0.03	15	7.60E-02	2.00E+00
q5_r10	60 / 4809	0.001 / 0.0033	998.2 / 773.3	0.03	10	1.73E-01	6.74E+00
q5_r20_mu10	60 / 796.6	0.001 / 0.033	998.2 / 773.3	0.03	20	3.05E-01	8.43E-01
q5_r20_mu0.1	60 / 1137	0.001 / 0.00033	998.2 / 773.3	0.03	20	4.36E-03	8.43E-01
q5_r10_mu0.1	60 / 4653	0.001 / 0.00033	998.2 / 773.3	0.03	10	1.75E-02	6.74E+00
q5_r20_fine	60 / 1094	0.001 / 0.0033	998.2 / 773.3	0.03	20	4.19E-02	8.43E-01

- 流入時のジェット径を固定したまま分散相の流量を増加させた場合、AFFD の稼動条件に近いところ (q1_r25) では液滴が形成されないが、

流量の増加に伴いドリッピングにより液滴が形成される (q5_r25)。分散層の流量を更に増加させるとジェットは形成されるが、液滴は形成されない (q100_r25)。

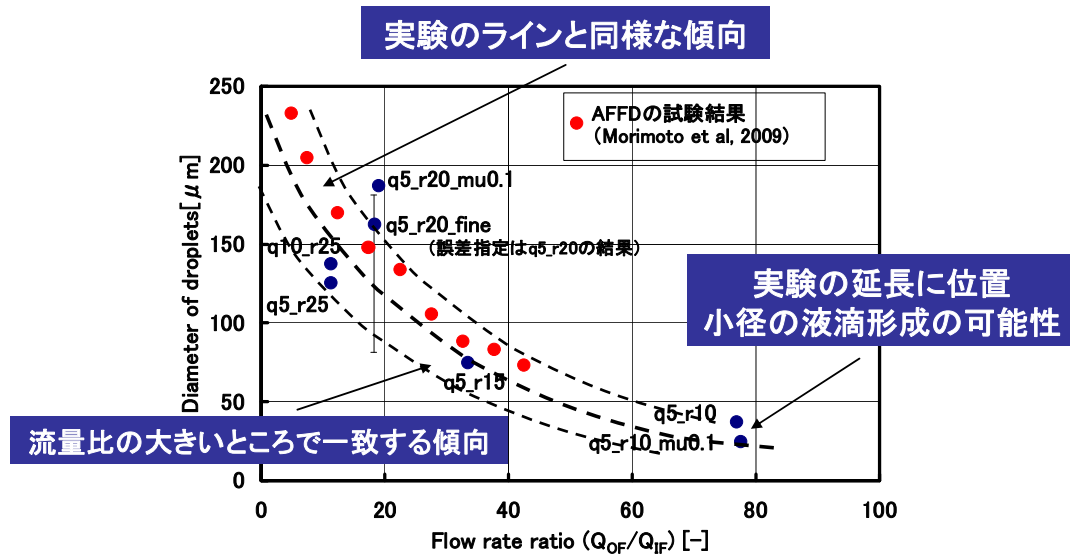
- ドリッピングにより液滴が形成される状態 (q5_r25) から、分散相の流量を固定したままジェット径を減少させると、ドリッピングからジェットティングによる液滴形成への遷移が起こる (q5_r20、q5_r15、q5_r10)。
- ジェットティングによる液滴形成状態 (q5_r10) から、連続相の粘性を小さくしても液滴形成状態に大きな変化はない (q5_r10_mu0.1)。
- ドリッピングにより液滴が形成される状態 (q5_r20) から、連続相の粘性を大きくした場合 (q5_r20_mu10) ジェットは形成されるが液滴は形成されない。一方、連続相の粘性を小さくした場合 (q5_r20_mu0.1)、より大きな液滴が形成され壁面に付着する。



図①-(2A)-1-4.6 平行一様流での液滴形成状況 (1 段目：ジェット径一定－分散相流量指定、2 段目：分散相流量一定－ジェット径指定、3・4 段目：分散相流量・ジェット径一定－連続相粘性指定)

d. dripping/jetting遷移

シミュレーションを実施したケースを、Utada et al.¹⁾による分散相のWeber数と連続相のCapillary数によって整理すると、図①-(2A)-1-4.7のようになる。



図①-(2A)-1-4.8 AFFD での実験 (Morimoto et.al.²⁾) との対応

(2A)-1-4-3 まとめと課題

AFFD と円筒系での平行一様流によるシミュレーションを実施した。一様平行流のシミュレーションによる液滴形成において、dripping-jetting 遷移の傾向は実験の傾向を大まかに再現している。また、AFFD での連続層・分散層流量比と液滴径との関連もほぼ実験結果と同様の傾向を示している。これらの実際の測定状況との対応をもって、液滴径や分散の予測のための基本的な手法が確立された。ただし、粘性が大きいところのシミュレーションの状況や、液滴の挙動については、実験状況との対応関係を明らかにする必要がある。

シミュレーションでは、液滴径同士の結合や液滴の壁面への付着現象がみられるが、実際の実験では界面活性剤が利用されており、液滴同士や液滴と壁面が接近しても結合や付着現象はおきにくくなっている。現状のモデルでは、界面活性剤の効果はモデル化されていない。また、シミュレーションでの液滴の形の変化についても、流路の大きさ・流路形状の再現性、および、界面活性剤の使用の効果との関連についての検討が必要である。

AFFD でのシミュレーションについては、実際の稼動条件より連続相の速度が 10 倍程度速い場合にシミュレーションを実施し、液滴の形成が再現できている。しかしながら、計算時間がかかりプロセス条件の検討に用いるのが実際上難しい。AFFD でのシミュレーションは、連続相の流速が速い場合の液滴形成や粒子形成部分に限定した状況を把握する場合に限定して実施するのが望ましい。