

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02019/078311

発行日 令和2年11月5日(2020.11.5)

(43) 国際公開日 平成31年4月25日(2019.4.25)

(51) Int.Cl. F I テーマコード(参考)  
**BO1J 13/04 (2006.01)** BO1J 13/04 4G005

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 16 頁)

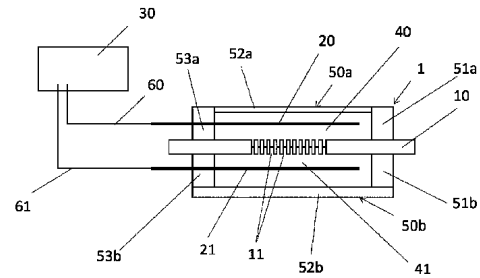
出願番号	特願2019-549346 (P2019-549346)	(71) 出願人	304024430 国立大学法人北陸先端科学技術大学院大学 石川県能美市旭台一丁目1番地
(21) 国際出願番号	PCT/JP2018/038900	(74) 代理人	110000109 特許業務法人特許事務所サイクス
(22) 国際出願日	平成30年10月18日(2018.10.18)	(72) 発明者	ピヤニ マニッシュ 石川県能美市旭台一丁目1番地 国立大学 法人北陸先端科学技術大学院大学内
(31) 優先権主張番号	特願2017-202950 (P2017-202950)	(72) 発明者	高村 禪 石川県能美市旭台一丁目1番地 国立大学 法人北陸先端科学技術大学院大学内
(32) 優先日	平成29年10月19日(2017.10.19)	(72) 発明者	シャルマ キルティ 石川県能美市旭台一丁目1番地 国立大学 法人北陸先端科学技術大学院大学内
(33) 優先権主張国・地域又は機関	日本国(JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 略 f Lカプセル化体の製造方法及びそれに用いる装置

(57) 【要約】

本発明は、マイクロホールアレイチップ10、マイクロホールアレイチップの各主表面に対向し、間隔を開けてそれぞれ設けた2つの電極20、21、2つの電極の間に電圧を印加するための電源30を含むエレクトロスプレー用デバイスに関する。本発明は、前記デバイスの空間1に被カプセル化液を満たし、かつ空間2に被カプセル化液難溶性液を満たし、2つの電極の間にパルス波電圧を印加して、前記被カプセル化液をマイクロホールアレイチップのマイクロホールを通過させ、空間2内の被カプセル化液難溶性液にカプセル化体を生成させることを含む、カプセル化体の製造方法に関する。本発明は、μLスケールセルフフリー反応をfLスケールのIVCにカプセル化するための方法であって、従来法より簡易にかつ効率的にfLスケールのIVCをカプセル化できる手段を提供する。



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

マイクロホールアレイチップ、  
前記マイクロホールアレイチップの各主表面に対向し、間隔を開けてそれぞれ設けた 2 つの電極、

前記 2 つの電極の間に電圧を印加するための電源  
を含む

エレクトロスプレー用デバイス。

**【請求項 2】**

前記マイクロホールアレイチップのマイクロホールはチップ基板を貫通する貫通孔であり、貫通孔の両方の開口の平面形状は略円形であり、一方の開口の直径は他方の開口の直径と同一又は異なる、請求項 1 に記載のデバイス。

10

**【請求項 3】**

前記 2 つの電極は、前記マイクロホールアレイチップの少なくともマイクロホールが存在する表面前面に設けられている、請求項 1 又は 2 に記載のデバイス。

**【請求項 4】**

前記マイクロホールアレイチップの少なくとも一方の主表面に導電性薄膜層をさらに有し、導電性薄膜層はマイクロホールの各開口に対応する位置にマイクロホールの開口と略同一形状および寸法の開口を有する、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載のデバイス。

20

**【請求項 5】**

前記マイクロホールアレイチップの一方の主表面と一方の電極（以下、電極 A）との間隔に形成された空間 1、及び前記マイクロホールアレイチップの他方の主表面と他方の電極（以下、電極 B）との間隔に形成された空間 2 は、それぞれ液体保持機能を有する、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載のデバイス。

**【請求項 6】**

前記空間 1 及び 2 は、密閉系であるか、あるいはそれぞれ液体の流入出口を有する流通系である、請求項 5 に記載のデバイス。

**【請求項 7】**

マイクロホールの電極 A 側の開口の直径が  $10 \sim 100 \mu\text{m}$  の範囲であり、マイクロホールの電極 B 側の開口の直径が  $1 \sim 10 \mu\text{m}$  の範囲である、請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載のデバイス。

30

**【請求項 8】**

前記電源は、 $10 \sim 10000$  ボルトの範囲の電圧のパルス波を供給できる電源である、請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載のデバイス。

**【請求項 9】**

請求項 5 ~ 8 のいずれかに記載のデバイスの空間 1 に被カプセル化液を満たし、かつ空間 2 に被カプセル化液難溶性液を満たし、

2 つの電極の間にパルス波電圧を印加して、前記被カプセル化液をマイクロホールアレイチップのマイクロホールを通過させ、空間 2 内の被カプセル化液難溶性液にカプセル化体を生成させることを含む、カプセル化体の製造方法。

40

**【請求項 10】**

印加するパルス波電圧は、電圧が  $100 \sim 10000 \text{V}$  の範囲であり、周波数が、 $10 \sim 100 \text{kHz}$  の範囲であり、デューティ比が  $10 \sim 90\%$  の範囲である、請求項 9 に記載の製造方法。

**【請求項 11】**

カプセル化体の平均体積が  $0.1 \text{fL} \sim 10 \text{fL}$  である、請求項 9 または 10 に記載の製造方法。

**【請求項 12】**

被カプセル化液がセルフリー反応（体）である請求項 9 ~ 11 のいずれかに記載の製造方法。

50

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は略1 f Lのカプセル化体の製造方法及びそれに用いる装置に関する。本発明は、例えば、被カプセル化液がフリー反応(体)であるIVCの製造方法及びそれに用いる装置に関する。

## 関連出願の相互参照

本出願は、2017年10月19日出願の日本特願2017-202950号の優先権を主張し、それらの全記載は、ここに特に開示として援用される。

## 【背景技術】

## 【0002】

合成生物学におけるIVC(*in vitro compartmentalization*(区画化))技術を用いた人工細胞のボトムアップ構造は、セルフリー系の効率の見直しを迫っている。セルフリー反応の生産率は、反応スケールサイズに逆比例すると考えられていた(非特許文献1)。これは主に、制限されていない空間でのバルクサイズの反応(ミリリットルからマイクロリットルの範囲)は、反応成分の非ポアソン分布によるノイズを生じるためである。第2に区画化は、外部環境からの内部活動的化学環境の分離によるセルライク界面現象を引き起し、区画のサイズ減少を増大させる。従って、制限された空間(フェムトリットルスケール)におけるセルフリー反応を行うことができるIVCの方法は、合成生物学における刺激的な可能性である。

## 【0003】

IVCは3つの主要なアプローチを用いて生成する。

1) 攪拌及びホモジネートを用いる油中水液滴のバルクエマルジョン化(非特許文献2)。単純であるが、相当量のポリ分散IVCを生じる(サイズp Lからn Lスケールの範囲)、従って収率は予測不能。

## 【0004】

2) マイクロ流体に基づくシステム(非特許文献3)は、単分散IVCを生成できるが、サブp Lまでの小さめのIVCの生成に限定され、生産効率も低い。

## 【0005】

3) エレクトロスプレー(特許文献1)は単分散サブf Lまでの極微小化IVCを生成できる。しかし、1 kHzの周波数を用いるエレクトロスプレーのシングルノズルは、約5万液滴/秒を生成でき、そのためこの系では、 $\mu$  Lスケールセルフリー反応のカプセル化のf LスケールのIVCにするには、数時間から数日必要になろう。例えば、10  $\mu$  Lのセルフリー反応の1 f LのIVCへのカプセル化には55時間を要するであろう。

## 【0006】

特許文献1: 特開2017-1018号公報

## 【0007】

非特許文献1: *Acs. Synth. Bio.* 2014;3,347

非特許文献2: *Biomacromolecules* 2005, 6, 1824-1828.

非特許文献3: *Anal. Chem.* 2008, 80, 3522-3529.

特許文献1および非特許文献1~3の全記載は、ここに特に開示として援用される。

## 【発明の概要】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0008】

本発明は、 $\mu$  Lスケールセルフリー反応をf LスケールのIVCにカプセル化するための方法であって、従来法より簡易にかつ効率的にf LスケールのIVCをカプセル化できる手段を提供することを目的とする。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0009】

本発明は、マイクロホールアレイチップに浸漬エレクトロスプレー技術を一体化したデ

10

20

30

40

50

バイスを用いることで、アトリットルスケールの容量で高度単分散I V Cのウルトラハイ - スループット生成を実現することができることを見出して完成した。

【 0 0 1 0 】

本発明は以下の通りである。

[ 1 ]

マイクロホールアレイチップ、

前記マイクロホールアレイチップの各主表面に対向し、間隔を開けてそれぞれ設けた2つの電極、

前記2つの電極の間に電圧を印加するための電源を含む

エレクトロスプレー用デバイス。

[ 2 ]

前記マイクロホールアレイチップのマイクロホールはチップ基板を貫通する貫通孔であり、貫通孔の両方の開口の平面形状は略円形であり、一方の開口の直径は他方の開口の直径と同一又は異なる、[ 1 ]に記載のデバイス。

[ 3 ]

前記2つの電極は、前記マイクロホールアレイチップの少なくともマイクロホールが存在する表面前面に設けられている、[ 1 ]又は[ 2 ]に記載のデバイス。

[ 4 ]

前記マイクロホールアレイチップの少なくとも一方の主表面に導電性薄膜層をさらに有し、導電性薄膜層はマイクロホールの各開口に対応する位置にマイクロホールの開口と略同一形状および寸法の開口を有する、請求項1~3のいずれかに記載のデバイス。

[ 5 ]

前記マイクロホールアレイチップの一方の主表面と一方の電極(以下、電極A)との間隔に形成された空間1、及び前記マイクロホールアレイチップの他方の主表面と他方の電極(以下、電極B)との間隔に形成された空間2は、それぞれ液体保持機能を有する、[ 1 ]~[ 4 ]のいずれかに記載のデバイス。

[ 6 ]

前記空間1及び2は、密閉系であるか、あるいはそれぞれ液体の流入出口を有する流通系である、[ 5 ]に記載のデバイス。

[ 7 ]

マイクロホールの電極A側の開口の直径が10~100 $\mu$ mの範囲であり、マイクロホールの電極B側の開口の直径が1~10 $\mu$ mの範囲である、[ 1 ]~[ 6 ]のいずれかに記載のデバイス。

[ 8 ]

前記電源は、10~10000ボルトの範囲の電圧のパルス波を供給できる電源である、[ 1 ]~[ 7 ]のいずれかに記載のデバイス。

[ 9 ]

[ 5 ]~[ 8 ]のいずれかに記載のデバイスの空間1に被カプセル化液を満たし、かつ空間2に被カプセル化液難溶性液を満たし、

2つの電極の間にパルス波電圧を印加して、前記被カプセル化液をマイクロホールアレイチップのマイクロホールを通過させ、空間2内の被カプセル化液難溶性液にカプセル化体を生成させることを含む、カプセル化体の製造方法。

[ 10 ]

印加するパルス波電圧は、電圧が100~10000Vの範囲であり、周波数が、10~100kHzの範囲であり、デューティー比が10~90%の範囲である、[ 9 ]に記載の製造方法。

[ 11 ]

カプセル化体の平均体積が0.1fL~10fLである、[ 9 ]または[ 10 ]に記載の製造方法。

10

20

30

40

50

[ 1 2 ]

被カプセル化液がセルフリー反応（体）である [ 9 ] ~ [ 1 1 ] のいずれかに記載の製造方法。

【発明の効果】

【 0 0 1 1 】

本発明によれば、従来法より簡易にかつ効率的に f L スケールの I V C をカプセル化できる方法及び装置を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 2 】

【図 1】本発明のエレクトロスプレー用デバイスの概略説明図。

10

【図 2】被カプセル化液（ $\mu$  L 規模の液滴）がマイクロホールアレイチップを透過することで、a L 規模の液滴（油相中）に転換されることの説明図。

【図 3】パルス波電圧を印加したマイクロホールアレイチップのマイクロホールを介して微粒化したカプセル化体の生成の説明図。

【図 4】マイクロホールアレイチップ作製説明図。

【図 5】実施例において得られたカプセル化液中の液滴の分布の I m a g e J による測定結果を示す。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 1 3 】

<エレクトロスプレー用デバイス>

20

本発明は、エレクトロスプレー用デバイスに関する。本発明のエレクトロスプレー用デバイスは、

( 1 ) マイクロホールアレイチップ、

( 2 ) 前記マイクロホールアレイチップの各主表面に対向し、間隔を開けてそれぞれ設けた 2 つの電極、及び

( 3 ) 前記 2 つの電極の間に電圧を印加するための電源を含む。

【 0 0 1 4 】

( 1 ) マイクロホールアレイチップ

マイクロホールアレイチップは、チップ基板を貫通する貫通孔であるマイクロホールを複数有する。チップ基板の材質、形状及び寸法には特に制限はないが、加工性が優れることから、シリコン基板であることができる。尚、シリコン基板は表面に酸化ケイ素からなる自然酸化膜また熱酸化などで意図的に形成した酸化膜を有することもできる。チップ基板の形状は、平面形状は方形、略円形、矩形等特に制限はない。厚さ方向の断面形状は、均一の厚みであることもできるが、周辺部は厚く、マイクロホールを有する中央部は、マイクロホールの長さに応じて周辺部より薄くすることができる。マイクロホールの長さは、エレクトロスプレーの性能（例えば、形成できる粒子の大きさや、エレクトロスプレー能力など）に影響することがある。チップ基板の寸法に関しては、平面の寸法は、デバイスの形状や複数設けるマイクロホールの数、配列などに応じて適宜決定できる。基板の厚みは、マイクロホールの長さを決定することになるので、エレクトロスプレーの性能と基板の強度を考慮して、適宜決定することができるが、例えば、50 ~ 1000  $\mu$  m の範囲であり、好ましくは 100 ~ 700  $\mu$  m の範囲である。但し、この範囲に限定される意図ではない。

30

40

【 0 0 1 5 】

マイクロホールは、チップ基板を貫通する貫通孔であり、貫通孔の両方の開口の平面形状は、特に制限はないが、例えば、略円形であることができる。さらに、一方の開口の直径は他方の開口の直径と同一又は異なることができる。一方の開口の直径が他方の開口の直径と異なる場合、入口側の開口の直径が、出口側の直径より大きいことが、例えば、マイクロホールの流れをスムーズするという観点、あるいはデバイスを用いたカプセル化体の調製が容易であるという観点から適当である場合がある。マイクロホールの入口側（後

50

述する電極 A 側)の開口の直径は、形成するカプセル化体のサイズにもよるが、例えば、 $10 \sim 100 \mu\text{m}$ の範囲であり、マイクロホールの出口側(後述する電極 B 側)の開口の直径が $1 \sim 10 \mu\text{m}$ の範囲であることができる。但し、この範囲に制限される意図ではなく、あくまでも例示である。

#### 【0016】

1つのチップ基板におけるマイクロホールの数は、特に制限はない。例えば、実施例では、一辺が $2.5 \text{ cm}$ である正方形の基板(厚み $300 \mu\text{m}$ )に $7 \text{ mm} \times 7 \text{ mm}$ の範囲に $24 \times 16$ 個(合計 $384$ 個)のマイクロホールを設けた。マイクロホールの開口径により、マイクロホール間の間隔などは適宜決定できる。

#### 【0017】

##### (2) 2つの電極

マイクロホールアレイチップの各主表面に対向し、間隔を開けて2つの電極をそれぞれ設ける。2つの電極は、マイクロホールアレイチップの少なくともマイクロホールが存在する表面前面に設けられることが、各マイクロホールに適正に電圧が印加されることから好ましい。電極の材質や形状には、特に制限はないが、液体に対して不活性な材質からなることが、形成するカプセル化体へのコンタミの問題を回避できることから好ましい。

#### 【0018】

##### (3) 電源

電源は、2つの電極の間に電圧を印加するための電源である。電源は、エレクトロスプレーを生成するために、例えば、 $10 \sim 10000$ ボルトの範囲の電圧のパルス波を供給できる電源であることができる。

#### 【0019】

##### (4) 液体保持機能を有するチャンバー

本発明のエレクトロスプレー用デバイスは、マイクロホールアレイチップの一方の主表面と一方の電極(電極 A)との間隔に形成された空間 1、及び前記マイクロホールアレイチップの他方の主表面と他方の電極(電極 B)との間隔に形成された空間 2 は、それぞれ液体保持機能を有することが適当である。具体的には、マイクロホールアレイチップの一方の主表面を一方の面とし、電極 A を含み、空間 1 を形成する、液体保持機能を有するチャンバー 1、及びマイクロホールアレイチップの他方の主表面を一方の面とし、電極 B を含み、空間 2 を形成する、液体保持機能を有するチャンバー 2 を有する。空間 1 及び 2 は、密閉系であるか、あるいはそれぞれ液体の流入出口を有する流通系であることができる。即ち、チャンバー 1 及び 2 は、密閉系であることもできるが、それぞれ液体の流入出口を有する流通系であることもできる。

#### 【0020】

##### (5) 導電性薄膜層

本発明のエレクトロスプレー用デバイスは、マイクロホールアレイチップの少なくとも一方の主表面に導電性薄膜層を有することができ、好ましくはマイクロホールアレイチップの一方の主表面に導電性薄膜層を有する。導電性薄膜層を有する場合、空間 1 は、マイクロホールアレイチップの一方の主表面上の導電性薄膜層と一方の電極(電極 A)との間隔に形成される。導電性薄膜層は、チップ基板を貫通する貫通孔であるマイクロホールの各開口に対応する位置にマイクロホールの開口と略同一形状および寸法の開口を有する。

#### 【0021】

導電性薄膜層は、被カプセル化液および/または被カプセル化液難溶性液に対して不活性である導電性材料からなるものであれば良く、例えば、金(Au)、白金(Pt)、銀(Ag)、クロム(Cr)、鉛(Pb)、チタン(Ti)等の金属や合金であることができる。但し、これらに限定される意図ではなく、金属および合金以外の導電性材料、例えば、導電性酸化物などであっても良い。導電性薄膜層の厚みは、導電性を発揮でき、かつ薄膜層への開口の形成が容易であるという観点からは、例えば、 $10 \text{ nm} \sim 1000 \text{ nm}$ の範囲であることができるが、この範囲に限定される意図ではない。導電性薄膜層の形成および開口の形成は、薄膜層形成の常法および薄膜への開口形成の常法により適宜実施で

10

20

30

40

50

きる。

【0022】

本発明のエレクトロスプレー用デバイスは、マイクロホールレイチップの被カプセル化液を保持するチャンパー1（空間1）側の主表面に導電性薄膜層を有することが好ましい。そうすることで、後述するカプセル化体の製造方法における、被カプセル化液をマイクロホールレイチップのマイクロホールを通過させて、チャンパー2（空間2）内の被カプセル化液難溶性液へのカプセル化体生成をより容易に安定的に実施することができるという利点がある。

【0023】

本発明のデバイスを、図1を参照してさらに説明する。

マイクロホールレイチップ10は複数のマイクロホール11を有する。2つの電極20及び21は、マイクロホールレイチップ11の各主表面に対向し、間隔を開けてそれぞれ設けられている。電極20は、マイクロホールレイチップ11の一方の面（図中の上面）と、51a、52a及び53aからなる壁部からなるチャンパー1（50a）に格納される。電極21は、マイクロホールレイチップ11の他方の面（図中の下面）と、51b、52b及び53bからなる壁部からなるチャンパー2（50b）に格納される。電極20とマイクロホールレイチップ11とは、53aの一部により所定の間隔を開けて配置される。チャンパー1は電極20とマイクロホールレイチップ11の一方の面との間に、40で示される空間1を有する。同様に、電源21とマイクロホールレイチップ11とは、53bの一部により所定の間隔を開けて配置される。チャンパー2は電極21とマイクロホールレイチップ11の他方の面との間に、41で示される空間2を有する。電極20及び21は、導線60及び61を介して電源30と接続される。

10

20

【0024】

図4には、本発明のマイクロホールレイチップの作製方法の一例の模式図を示す。詳細は実施例の(1)を参照。図4の(3)に示すマイクロホールレイチップは、基板であるSiの一方の主表面にSiO<sub>2</sub>層を介して導電性薄膜層であるCr薄膜層を有する。

【0025】

<カプセル化体の製造方法>

本発明は、上記本発明のエレクトロスプレー用デバイスを用いるカプセル化体の製造方法を包含する。この方法では、まず本発明のデバイスの空間1に被カプセル化液を満たし、かつ空間2に被カプセル化液難溶性液を満たす。次いで、2つの電極の間にパルス波電圧を印加して、前記被カプセル化液をマイクロホールレイチップのマイクロホールを通過させ、空間2内の被カプセル化液難溶性液にカプセル化体を生成させる。

30

【0026】

被カプセル化液は、カプセル化したい対象であれば特に制限はない。被カプセル化液は、例えば、セルフリー反応（体）であることができる。但し、これに限定される意図ではない。被カプセル化液難溶性液は、被カプセル化液に対して難溶性または不溶性であれば、特に制限はない。例えば、被カプセル化液が水性の液である場合には、被カプセル化液難溶性液は、油性の液であることができる。逆に、被カプセル化液が油性の液である場合には、被カプセル化液難溶性液は、水性の液であることができる。

40

【0027】

2つの電極の間に電圧のパルス波を印加する。印加するパルス波は、例えば、電圧が100～10000Vの範囲であり、周波数が10～100kHzの範囲であり、デューティー比が10～90%の範囲であることができる。但し、パルス波の電圧は0Vであることもでき、その場合、直流成分のみを印加することになる。直流成分のみの印加でもカプセル化体の製造は可能であり、直流成分のみを印加する場合の直流成分のための2つの電極間の電圧は、例えば、100～10000Vの範囲であることができる。パルス波は、例えば、直流成分と交流矩形波成分とからなることができる。例えば、500Vの直流成分と、ピーク to ピークで1000Vの交流矩形波成分を足すと、0V～1000Vのパルス波を生成することができる。パルス波の最低電圧は0V超であることもでき、例えば

50

、直流成分と交流矩形波成分の値を調整することで、100V～1000Vのパルス波を生成することもできる。

【0028】

パルス波の電圧、周波数及びデューティ比は、マイクロホールアレイチップの形状や構造及び寸法、被カプセル化液の組成、性状等、並びに生成させたいカプセル化体の粒子径等を考慮して適宜決定できる。

【0029】

被カプセル化液は、パルス波を印加したマイクロホールアレイチップのマイクロホールを通過することで微粒子化して、空間2内の被カプセル化液難溶性液にカプセル化体として到達し、カプセル化体を生成する。図2及び3にカプセル化体の状態を模式的に示す。図2に示すように、被カプセル化液(例えば、 $\mu\text{L}$ 規模の液滴)は、マイクロホールアレイチップを透過することで、 $a\text{L}$ 規模の液滴(油相中)に転換される。図3には、中央に示されたパルス波電圧を印加したマイクロホールアレイチップのマイクロホールを介して微粒子化したカプセル化体の生成が示されている。

10

【0030】

カプセル化体製造の温度は特に制限はなく、例えば、低温(例えば、 $-20$ )から高温(例えば、 $70$ )の範囲で実施することができる。但し、これらの温度に制限はない。カプセル化体製造の時間は、チャンパー1及び2の容量や、カプセル化体製造速度を考慮して適宜決定でき、チャンパー1及び2が閉鎖系の場合は、例えば、10秒～10分の範囲である。

20

【0031】

本発明の製造方法によれば、製造条件を制御することで、例えば、平均体積が $0.1\text{fL}$ ～ $10\text{fL}$ であるカプセル化体を製造することができる。

【0032】

本発明の装置及び方法は、極低容量かつ単分散のビーズの生成を可能にする。Ni-NTAアガロースビーズのようなサブマイクロメーター域の直径を有する機能性ポリマービーズの大量生産に用いることができる。そのようなビーズは、現状では数十マイクロメーター域の製造に限られている。

【0033】

本発明の装置及び方法は、例えば、より改善され、かつより制御された分析法のためのトップダウン人工細胞系に使用できる。例えば、 $25 \times 25$ マイクロホールのアレイを用いて、 $10\mu\text{L}$ セルフリー反応(体)を1フェムトリッターのIVCにカプセル化するのに、たった5分である。

30

【0034】

サブマイクロメーターの直径を有するIVC(アトリッター容量)は、より高い表面積-対-体積比を有するセルフリー反応体の実施するための新たなより機能的なプラットフォームを提供することができる。そのため、合成生物学において顕著な確率論的な効果を生じることができる。それは、 $\mu\text{L}$ スケールのセルフリー反応体においては一般に無視できるモノである(ノイズフリー合成生物学)。

【実施例】

40

【0035】

以下、本発明を実施例に基づいて更に詳細に説明する。但し、実施例は本発明の例示であって、本発明は実施例に限定される意図ではない。

【0036】

(1) マイクロホールアレイチップの作製

図4に方法の概略を示す。尚、図中にはSi基板の裏側の $\text{SiO}_2$ 膜は記載していない(下記工程17)で除去される)。以下の工程で、マイクロホールアレイチップを作製した。一边が $2.5\text{cm}$ である正方形の基板(厚み $300\mu\text{m}$ )に $7\text{mm} \times 7\text{mm}$ の範囲に $24 \times 16$ 個(合計 $384$ 個)のマイクロホールを設けた。

【0037】

50



- 1) シリコン基板 (厚さ 300  $\mu\text{m}$ 、両面に約 1  $\mu\text{m}$  の  $\text{SiO}_2$  膜を有する) を準備した。
- 2) アセトンに 5 分間浸漬した後に、水洗、 $\text{O}_2$  灰化 15W, 180sec, 30sccm.
- 3) Cr 膜 (700-800nm) をスパッタリング形成した。
- 4) 密着改善剤 OAP (東京応化工業株式会社製、主成分はヘキサ・メチル・ジ・シラザン) をコーティングした。
- 5) OFPR-800 (東京応化工業株式会社製フォトレジスト) をコーティングした。
- 6) ホットプレート上で加熱 (90 / 90sec)。
- 7) 暴露 5.3 sec (MEP-800, Union)。
- 8) 現像 (NMD-W 東京応化工業株式会社製、(90 sec)) 及び洗浄 DI 水
- 9)  $\text{O}_2$  灰化 15W, 180sec, 30sccm. 10
- 10) ホットプレート上で加熱 (120 / 5min)
- 11) 室温に冷却
- 12) ウェットエッチング Cr 10 min (KANTO CHEMICAL CO., INC. 混酸クロムエッチング液)
- 13) 水洗
- 14) ウェットエッチング  $\text{SiO}_2$  30min (BHF) [正面側]。
- 15) 水洗
- 16) ドライエッチング Si、(RIE-200-iPB, サムコ株式会社製使用)。
- 17) ウェットエッチング  $\text{SiO}_2$  30min (BHF) [裏側]。
- 18) 水洗 20

#### 【 0 0 3 8 】

(2) マイクロホールアレイチップを用いたエレクトロスプレーデバイスの組立  
(1) で作製したマイクロホールアレイチップを用いて、図 1 に示すエレクトロスプレーデバイスを見立てた。チャンパー 1 (50 a) は、1.5 cm  $\times$  1.5 cm  $\times$  2 mm のシリコンラバーを用い 1 cm  $\times$  1 cm の正方形の空間 1 を形成した。チャンパー 2 (50 b) は、3 cm  $\times$  3 cm  $\times$  3 mm のシリコンラバーを用い 1.5 cm  $\times$  1.5 cm の正方形の空間 2 を形成した。電極はいずれもタングステン線である。

#### 【 0 0 3 9 】

マイクロホールアレイチップの Cr 薄膜層がチャンパー 1 (50 a) 側になるようにして、チャンパー 1 (50 a) には、被カプセル化液として、約 160  $\mu\text{L}$  の 1% B-4 - F (Biotin-4-fluorescein) 1% アガロース水溶液を充填した。 30

チャンパー 2 (50 b) には、油相として、約 700  $\mu\text{L}$  の 50% ABIL EM 90、36% Tegosoft DEC 及び 14% 鉱油を充填した。

#### 【 0 0 4 0 】

エレクトロスプレー電圧印加条件

電圧：1000V

周波数：100Hz

デューティー比：50%

印加時間：約 5 分間 40

電圧は、チャンパー 1 (50 a) の電極 (タングステン線) から、チャンパー 2 (50 b) の電極 (タングステン線) に向けて印加した。

#### 【 0 0 4 1 】

上記条件でのエレクトロスプレーのよりチャンパー 1 (50 a) 中のアガロース水溶液がチャンパー 2 (50 b) 中の油相中に、マイクロホールアレイを介して、押し出し及びスプレーされた。得られたカプセル化液中の液滴の分布を、Image J を用いて測定した。結果を図 5 に示す。液滴の大きさは 1 ~ 11  $\mu\text{L}$  の範囲であり、平均粒径は 1 ~ 3  $\mu\text{L}$  の範囲であった。

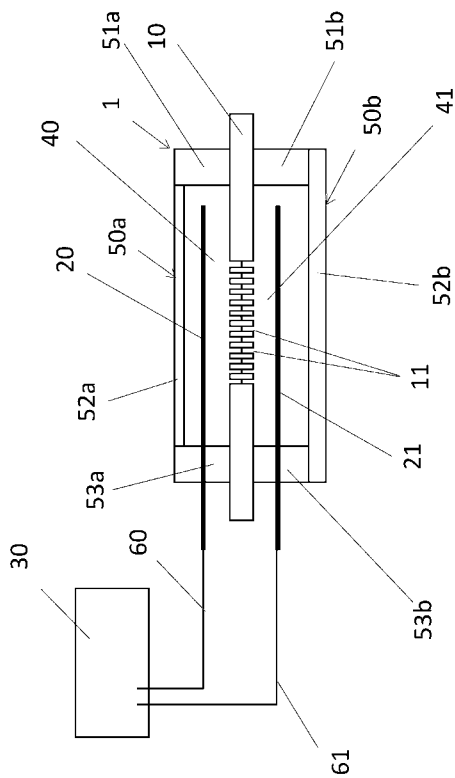
#### 【 産業上の利用可能性 】

#### 【 0 0 4 2 】

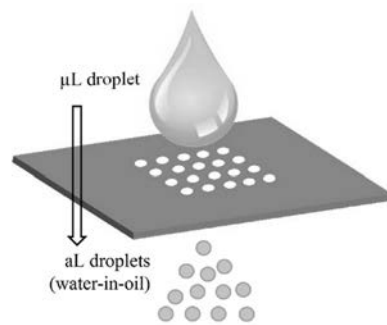
50

本発明は、極微細な液滴製造に関連する分野において有用である。

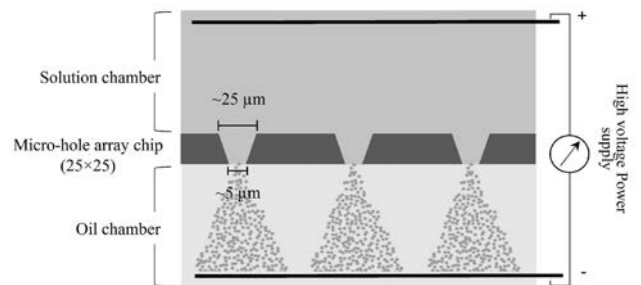
【図1】



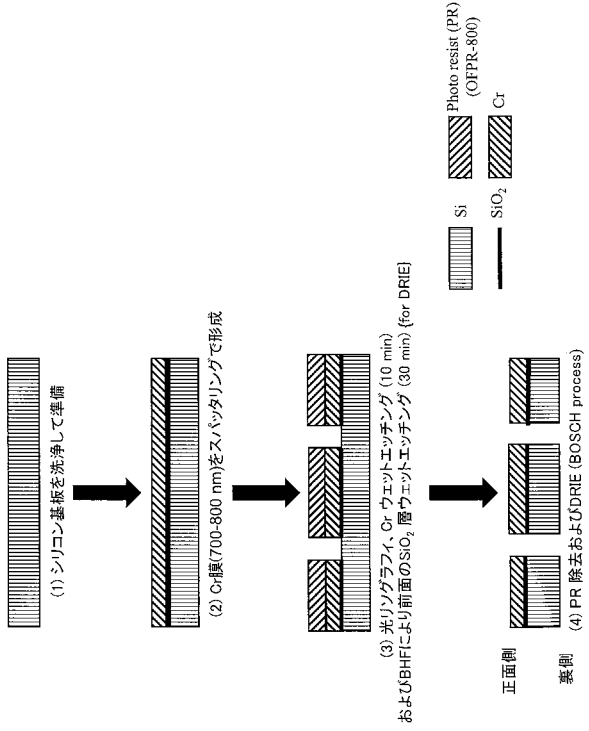
【図2】



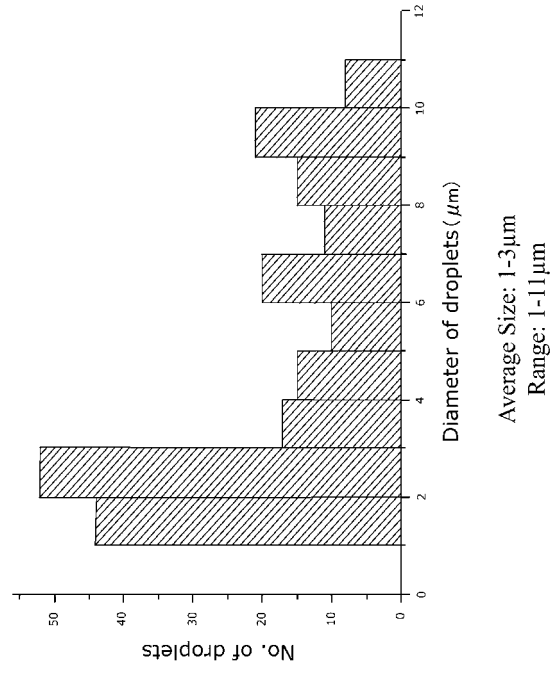
【図3】



【 図 4 】



【 図 5 】



## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2018/038900
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> Int.Cl. B01J13/04 (2006.01) i  According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl. B01J13/02-22, B05B5/00-16, B01J4/00  Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2018 Registered utility model specifications of Japan 1996-2018 Published registered utility model applications of Japan 1994-2018  Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII) CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS/FSTA (STN)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	WO 2002/068104 A1 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORP.) 06 September 2002, claims, page 11, line 15 to page 12, line 1, fig. 16 & US 2004/0068019 A1, claims, paragraphs [0088]-[0091] & US 2006/0077755 A1 & US 2006/0079583 A1 & US 2006/0079584 A1 & US 2006/0079585 A1 & US 2010/0327471 A1 & EP 1362634 A1 & EP 1447127 A1 & EP 1510251 A1 & EP 1721658 A2 & EP 1741482 A2 & EP 1745839 A1	1-3, 5-10, 12 4, 11
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 17 December 2018 (17.12.2018)		Date of mailing of the international search report 15 January 2019 (15.01.2019)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer  Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/038900

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2009-133687 A (THE UNIVERSITY OF TOKYO) 18 June 2009, claims, examples & US 2010/0307918 A1 & WO 2009/069609 A1 & EP 2216647 A1	1-12
A	ZOUOXIAN, Mai, et al., "Electrospray biodegradable microcapsules loaded with curcumin for drug delivery systems with high bioactivity", The Royal Society of Chemistry, 16 December 2016, vol. 7, pp. 1724-1734, in particular, fig. 1	1-12

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 8 / 0 3 8 9 0 0	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. B01J13/04(2006,01)i			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. B01J13/02-22, B05B5/00-16, B01J4/00			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2018年 日本国実用新案登録公報 1996-2018年 日本国登録実用新案公報 1994-2018年			
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII) CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS/FSTA (STN)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	
X A	WO 2002/068104 A1 (科学技術振興事業団) 2002.09.06, 請求の範囲、 第11頁第15行~第12頁第1行、第16図 & US 2004/0068019 A1、特許請求の範囲、段落[0088]~[0091] & US 2006/0077755 A1 & US 2006/0079583 A1 & US 2006/0079584 A1 & US 2006/0079585 A1 & US 2010/0327471 A1 & EP 1362634 A1 & EP 1447127 A1 & EP 1510251 A1 & EP 1721658 A2 & EP 1741482 A2 & EP 1745839 A1	1-3, 5-10, 12 4, 11	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献			
国際調査を完了した日 17.12.2018		国際調査報告の発送日 15.01.2019	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 吉岡 沙織	4Z 3646
		電話番号 03-3581-1101	内線 3480

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 8 / 0 3 8 9 0 0
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	JP 2009-133687 A (国立大学法人 東京大学) 2009.06.18, 特許請求の範囲、実施例 & US 2010/0307918 A1 & WO 2009/069609 A1 & EP 2216647 A1	1-12
A	ZOUOXIAN Mai, et al., Electrospray biodegradable microcapsules loaded with curcumin for drug delivery systems with high bioactivity, The Royal Society of Chemistry, 2016.12.16, Vol.7, p.1724-1734, 特に、図1	1-12

## フロントページの続き

(81)指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(72)発明者 ファン チェ チョン

石川県能美市旭台一丁目1番地 国立大学法人北陸先端科学技術大学院大学内

(72)発明者 南 礼孝

石川県能美市旭台一丁目1番地 国立大学法人北陸先端科学技術大学院大学内

Fターム(参考) 4G005 AA02 AB30 BA20 BB19 CA01 DB03Y DB12X DB22X DB27X DC32Y  
DC58Y

(注)この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。