

**Boxcar 型電極を用いた誘電泳動整列技術による 1 粒子 1 液滴封入の高収率化**馬淵 研一<sup>\*1</sup>, 巽 和也<sup>\*1</sup>, 栗山 怜子<sup>\*1</sup>, 中部 主敬<sup>\*2</sup>**Increase of one-to-one particle encapsulation yield using dielectrophoretic alignment technique with boxcar-type electrodes**Kenichi MABUCHI<sup>\*1</sup>, Kazuya TATSUMI<sup>\*1</sup>, Reiko KURIYAMA<sup>\*1</sup> and Kazuyoshi NAKABE<sup>\*2</sup><sup>\*1,\*2</sup>Department of Mechanical Engineering and Science, Kyoto University  
Kyotodaigakatsura, Nishikyo-ku, Kyoto 615-8540, Japan

Received: 28 September 2021; Revised: 17 November 2021; Accepted: 27 December 2021

**Abstract**

We developed a technique which can increase the yield of one-to-one particle encapsulation by applying the dielectrophoretic particle alignment technique using boxcar-type electrodes. Dielectrophoretic force generated by the boxcar-type electrodes accelerate and decelerate the particles periodically as they flow in the electrode region. Further, the dielectrophoretic force is turned on and off at constant frequency. The force exerted on the particle periodically over space and time can align them in the streamwise direction with even interval. In this study, the boxcar-type electrodes were installed in the microchannel in the region upstream of the flow-focusing channel in which the water-in-oil droplets were generated. By adjusting the on-off period of the applied voltage generating the dielectrophoretic force to the period of the droplet generation, each particle could be separately encapsulated in the droplets. The principle of particle alignment using periodic force was first described based on a one-dimensional model. The flow structure and the characteristics of the droplet generation in the flow-focusing channel was then discussed in relation to the surface tension of the fluids and the wettability of the wall. We measured the velocity distribution of the particles flowing in the boxcar electrode region to evaluate the effects of the droplet generation on the motion of the particles and the alignment performance. The results showed that the particle could be aligned in the fluctuating flow caused by the droplet generation, and each particle can be encapsulated in different droplets. This was further demonstrated by measuring the probability function of the droplets containing specific number of particles, which showed that 100% yield of one-to-one particle encapsulation can be achieved under the investigated condition of particle number density of 0.4. Moreover, the throughput increased 46% compared to the case of having the particles supplied randomly.

**Keywords** : Particle encapsulation, Particle alignment, Dielectrophoretic force, Boxcar-type electrode, Microchannel**1. 緒 言**

マイクロ流体デバイスにおいて、液滴に粒子や細胞を封入するカプセル化技術は (encapsulation), 1 細胞解析 (single cell analysis) や創薬技術の分野で研究開発が進められ、一部では実用化されている (Velasco et al., 2012, Schoeman et al., 2014, Hirama and Torii, 2015, Klein et al., 2015, Pellegrino et al., 2018, Liu et al., 2019, Delley and Abate, 2020, Ding et al., 2020, Li et al., 2021, Shahrivar and Giudice, 2021). この技術はマイクロスケールで流れを制御し、液滴生成と個々の粒子・細胞の操作を行うことで、高精度かつ安定して粒子を液滴に封入できるだけでなく、安価で製造することが可能で、省スペース性にも優れている。しかしながら、機器の処理能力と精度向上には更なる技術開発が期待される。液滴生成の制御については、マイクロ流路の形状、流量条件、表面張力等の影響に関する検討が多くされ、技術開発が進んでいる (Anna et al., 2003, Seo et al., 2007, Shang et al., 2017, Montanero and Gañán-Calvo, 2020, Lashkaripour et al., 2021, Nozakia et al., 2021). これに対して、粒子封入のカプセル化技術において課題となるのは液滴内の粒子数の制御である。個々の液滴に同じ数の粒子や細胞を封入するためには粒子同士

No.21-00300 [DOI:10.1299/transjsme.21-00300], J-STAGE Advance Publication date : 13 January, 2022

<sup>\*1</sup> 正員, 京都大学大学院工学研究科 (〒615-8540 京都府京都市西京区京都大学桂)<sup>\*2</sup> 正員, フェロー, 京都大学大学院工学研究科

E-mail of corresponding author: tatsumi@me.kyoto-u.ac.jp

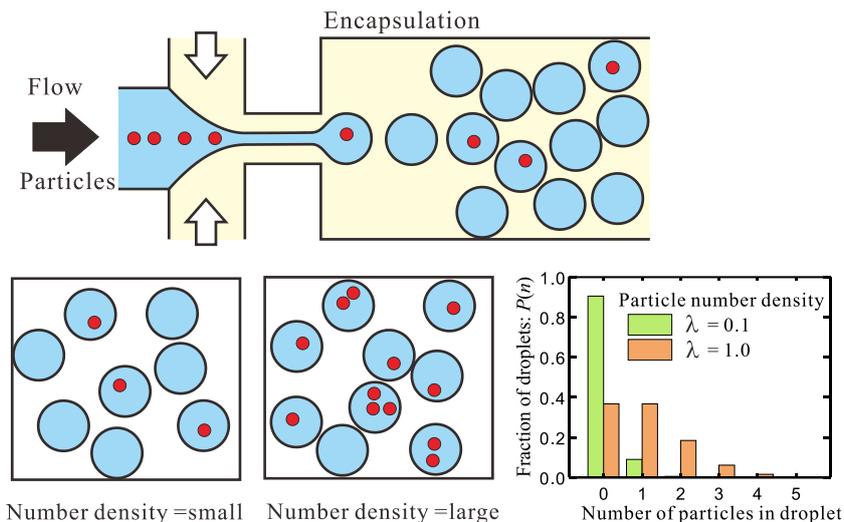


Fig. 1 Schematic of the particle encapsulation in droplets generated in microchannel, and the effect of the number density of particles in fluid on the fraction of the droplets which contain specific number of particles.

の間隔と通過タイミングを液滴生成のものと同期することが重要になる (Abate et al., 2009, Lagus and Edd, 2013, Mazutis et al., 2013, Collins et al., 2015, Brower et al., 2020).

図1にマイクロ流路を用いた液滴生成と粒子封入の模式図, および流体中の粒子の数密度と液滴に含まれる粒子数の関係を示す. 液滴となる流体に粒子を混合して流すと, 流体とともに流入する粒子の間隔はランダムであるため, 液滴内の粒子数にばらつきが存在する. この場合, 1液滴に1粒子を封入することを目的とすると, 収率を高めるには粒子の数密度を小さくする必要があるが, 同時に粒子を含まない液滴数が増大してカプセル化の効率が低下する. 一方, 粒子の数密度を大きくすると2個以上の粒子を含む液滴が形成され, 1粒子1液滴封入として不良率が増大する. したがって, 粒子の数密度を高めて収率を上げるには粒子同士の間隔を液滴生成のタイミングと同期することが重要になる.

マイクロ流路の粒子を一定間隔で液滴に封入するには, 粒子を一列に集中 (focus) させ, 主流方向に等間隔に整列する必要がある. 粒子を整列する方法として, 流れ場により粒子に作用する力, 光力, 音波の力, 電気力を用いた方法がある (Garcés-Chávez et al., 2005, Morgan et al., 1997, Wood et al., 2008, D'avino and Maffettone, 2020). その中で, 粒子間に形成される流れ場により両粒子に働く力を利用して粒子を整列する Inertial Microfluidics と呼ばれる手法は, 整列に必要な制御要素が流路形状と流量に基づくため, 数多く開発されている (Di Carlo et al., 2007, Gao et al., 2017, Dietsche et al., 2019). また, これらの技術を用いた液滴への粒子封入 (カプセル化) の精度向上に関する研究も行われている.

Kemna らは渦巻き形状の流路を用いてディーン渦を生成し, その2次流れにより粒子と細胞の流路断面内の位置と主流方向の間隔を制御した (Kemna et al., 2012). これにより下流に設けた液滴生成機構における1粒子 (1細胞) 1液滴封入の精度向上を報告している. Lagus らは直線流路のアスペクト比を調整して流れによる粒子整列を行った. この流路を2つ並列に配置して, 液滴生成機構に接続することで2粒子封入の精度向上を報告している (Lagus and Edd, 2013). この他に, Abate らは粒子が流れる主流路に対して直交する側流路を設け, 側流の流量を制御することで粒子間隔を整列する技術を開発し, 液滴生成機構に導入することで1粒子1液滴封入の収率を増大させた (Abate et al. 2009). 一方, これらの方法では流路寸法により粒子間隔が定まるため, デバイス製作後に粒子の速度や時間間隔を任意に設定することが難しい場合が多い. また, 流速を制御して粒子間隔を制御する場合は, 下流に設けた液滴生成機構の生成周期に影響するため, 流速の変化に合わせて液滴生成周期を調整する必要がある.

筆者らは粒子に作用する誘電泳動力を空間と時間にわたって周期的に変化させることでマイクロ流路を流れる粒子や細胞の流路断面内の位置, 主流方向の間隔, 速度, そしてタイミングを制御する技術を提案している

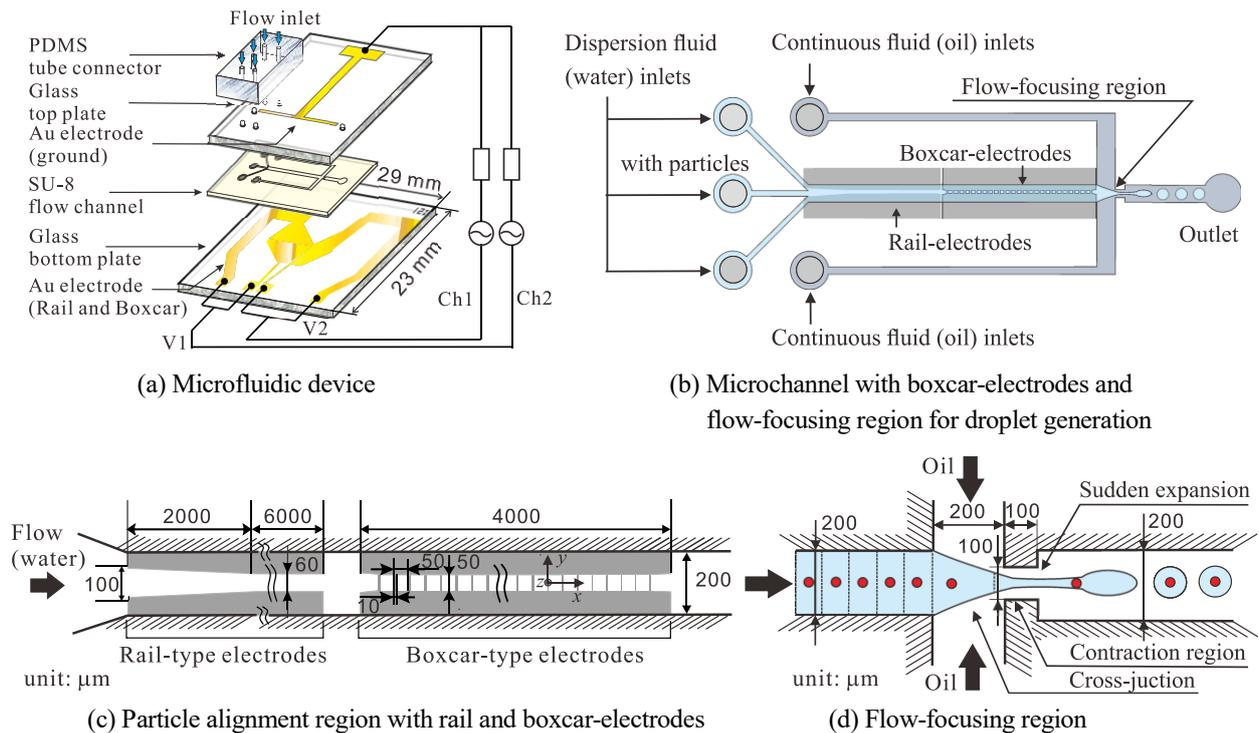


Fig. 2 Schematic of (a) the layer configuration of the microfluidic device with boxcar-type electrodes, (b) top view of the microchannel with rail-type and boxcar-type electrodes, and flow-focusing region for droplet generation, (c) particle focusing and alignment region in the center microchannel with the rail-type and boxcar-type electrode, and (d) flow-focusing channel for generating water-in-oil droplets.

(Tatsumi et al., 2019, 本間他, 2020, Tatsumi et al., 2021). この技術を液滴生成機構と組み合わせることで、高い収率と効率を有する 1 粒子 1 液滴のカプセル化技術の開発が可能であると考えている。この場合、誘電泳動力を粒子に作用する時間周期を変えることで粒子間隔を制御できるため、液滴生成周期に対して液滴に流入する粒子の間隔を合わせることができる。

本研究では、誘電泳動力を用いた粒子整列機構を、液滴生成機構を持つマイクロ流体デバイスに実装して、1 粒子 1 液滴封入の収率向上を検証することを目的とする。誘電泳動力はマイクロ流路に敷設した Boxcar 型電極を用いて生成する。Boxcar 型電極領域では誘電泳動力が主流方向に周期的に作用して粒子を加速、減速させるが、さらに通電を一定周期でオン・オフして粒子に作用する誘電泳動力を周期的に変化させることで、粒子を一定の時間・空間間隔で整列させることができる。粒子の間隔は、Boxcar 型電極の周期長さおよび通電のオン・オフ周期と等しくなるため、その周期を液滴生成の周期と一致させることで、1 液滴 1 粒子封入の収率を向上させる。はじめに Boxcar 型電極を用いた粒子整列の原理を示した後に、Flow-focusing 流路を用いた液滴生成機構の導入とその性能評価の結果を示す。そして、液滴生成が粒子整列性能に与える影響を検討した後に、1 液滴 1 粒子の収率と効率をランダムに粒子を流した場合の理論値と比較した。

## 2. 実験手法と条件

### 2.1 マイクロ流体デバイスと実験装置

本実験で用いたマイクロ流体デバイスの模式図を図 2 に示す。図 2(a)の構成図に示すように、デバイスは金 (Au) 電極をスパッタリングによりチタン (Ti) 接着層を挟んで成膜した 2 枚のガラス基板 (協同インターナショナルにて製作) と、それらの間に流路の形で成膜した SU-8 (MicroChem, SU-8 3050) 層、送液チューブを接続するためにガラス基板に取り付けた Polydimethylsiloxane (PDMS) 製のブロックから構成される。

ガラス基板には、超音波穿孔機を用いて流体の流入孔と流出孔を設けた。マスクアライナー露光機 (Nanotech, LA310S) で SU-8 層を下側のガラス基板に成膜した後に、上側のガラス基板を電極と流路の位置合わせをして接

着した。次に、熱プレス機（アズワン、MNP-001）を用いて温度 120°C で加熱しながら圧着させ、ガラスと SU-8 との間で熱ボンディングを行った。その後、孔を設けた PDMS ブロックの表面を、O<sub>2</sub> ガスを用いたプラズマ表面活性化処理（サムコ、コンパクトエッチャー FA-1）した後に、上側ガラス基板に接着させた。実験はデバイスを製作してから 24 時間以上経過した後に行った。

図 2(b) に流路の平面図を示す。後述する分散相と称する流体を流す主流路の上流に 3 つの入口を設け、中央入口から粒子を懸濁した水溶液を、自作した圧縮空気により駆動するポンプを用いて流量  $Q_1$  で送液した。2 本の側流の入口からはシリンジポンプ（日本光電、CFV-3200）を用いて水溶液のみを流し、その流量 ( $Q_2=Q_3$ ) を制御することで主流路の流量を調整した。主流路の幅  $W$  と高さ  $H$  は、それぞれ  $W=200\mu\text{m}$  と  $H=50\mu\text{m}$  である。

本研究では、Boxcar 型電極を主流流路に設置し、流れる粒子に誘電泳動力を付加し、主流方向の間隔と通過タイミングを制御した。Boxcar 型電極の寸法を図 2(c) に示す。Boxcar 型電極は、電極平面の中に、幅  $50\mu\text{m}$ 、長さ  $40\mu\text{m}$  の空白領域が主流方向に  $L_{\text{pitch}}=50\mu\text{m}$  間隔で周期的に並ぶ（空白領域間の幅方向の電極（以下では枕木電極と称す）が  $L_{\text{pitch}}=50\mu\text{m}$  間隔に並ぶ）構造を有する。Boxcar 型電極領域の長さは 4mm であり、周期領域の数は 80 である。さらに、この Boxcar 型電極の上流には Rail 型電極を設置した。Rail 型電極は主流方向に平行な 2 本の電極から形成され、電極領域の上流端での電極間隔は  $100\mu\text{m}$  であり、2mm の長さで間隔  $60\mu\text{m}$  まで狭まった後に 6mm の長さで平行に位置する。Rail 型電極により形成される誘電泳動力により、粒子のスパン方向位置と高さ方向位置を変化させ、粒子を流路下壁近傍で電極間の中心線上に集めることができる (Tatsumi et al., 2016)。このように、中央入口流路から流入する粒子は Rail 型電極により電極中心線上に集められ、下流に位置する Boxcar 型電極領域の入口へと誘導される。

Rail 型電極と Boxcar 型電極は、図 2(a) に示すように、流路の上壁全面にグラウンド電極を、下壁には図 2(c) に示す形の電極を敷設して構成される。これらの電極にはコンタクトプローブとハイブリッド IC 端子を用いて配線し、ファンクションジェネレータ（エヌエフ回路設計ブロック、WF1974）を用いて通電した。基板の配線部における電圧はオシロスコープを用いて測定した。

Boxcar 型電極を敷設した主流路は、下流にて図 2(d) に示す Flow-focusing 流路に接続する。Flow-focusing 流路では、2.3 節で述べるように、オイルの中に水の液滴を周期的に生成し、主流路を流れる粒子を液滴に封入する。Flow-focusing 流路に測流として流入する連続相と称するオイルは、図 2(b) に示す測流用の入口からシリンジポンプを用いて流量  $Q_{\text{oil},1}=Q_{\text{oil},2}$  で流した。

粒子と液滴の画像は倒立顕微鏡と高速度ビデオカメラ（Vision Research, Phantom V1610）を用いて撮影した。撮影の空間分解能と速度は、それぞれ  $1.40\mu\text{m}/\text{pixel}$  と 1000~5000fps である。撮影した動画から、2 次元粒子運動解析ソフト（ライブラリー、Move-tr/2D Ver7.90）を用いて粒子の位置と速度を求めた。粒子の中心位置は解析ソフトによって検出されたピクセル群の面積重心で決定し、粒子速度はその重心位置の時間変化から求めた。

## 2・2 Boxcar 型電極

図 3 に数値計算により求めた Boxcar 型電極に通電したときの電場強度分布と、粒子整列の原理に関する模式図を示す。Boxcar 型電極に電圧を印加すると粒子に誘電泳動力が発生する。図 3(a) にあるように、電場強度は電極の端で大きく、Boxcar 型電極の空白領域の下方にて値が小さい。これにより、枕木電極の下流と上流近傍において、粒子に働く主流方向の誘電泳動力  $F_{\text{DEP},x}$  は、それぞれ正と負の値を示す。さらに、枕木電極近傍では、高さ方向の誘電泳動力  $F_{\text{DEP},z}$  は正の値を示し、空白領域では負の値をとる。これにより、粒子は枕木電極にて高さ方向に上昇し、空白領域にて下降するが、流路内の流れ場により、各場合でそれぞれ粒子に加速と減速の力が作用する (本間他, 2020 ; Tatsumi et al., 2021)。このように、Boxcar 型電極における誘電泳動力分布は、粒子を加速と減速させる領域を主流方向に周期的に形成する。さらに周期  $t_{\text{on-off}}$  で通電、すなわち誘電泳動力を時間に対して周期的に発生することで、粒子の時間間隔を  $t_{\text{on-off}}$ 、空間間隔を  $L_{\text{pitch}}$  として整列することができる。また、これは粒子速度  $u_p$  が  $u_p=L_{\text{pitch}}/t_{\text{on-off}}$  と等しくなることを示す。

ここで、離散的な力が周期的に粒子に作用することで粒子の間隔が一定となることを簡易なモデルを用いて考える。図 3(b) に示すように、粒子を加速、減速させる力  $F$  が長さ  $L_{\text{pitch}}$  の領域にて線形に変化し、その領域が周期的に配置する場合を考える。今、流速  $u_m$  が  $L_{\text{pitch}}/t_{\text{on-off}}$  に等しいとし、粒子が Boxcar 型電極の各ユニットを通過する周期において粒子への仕事が 0 となるつり合いの位置にあるとする。この場合、粒子に力が作用する領域は-

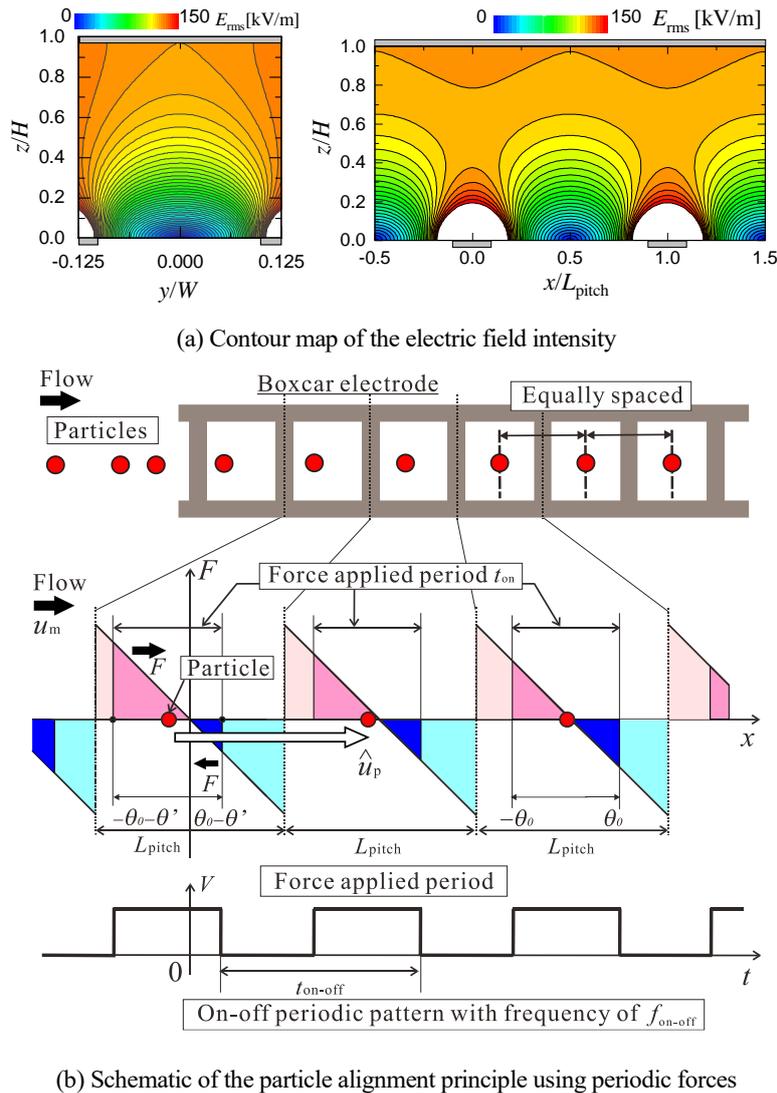


Fig. 3 (a) Contours of the intensity of the electric field generated by the boxcar electrodes, and (b) schematic of the alignment principle of the particles flowing in the boxcar-electrode region by exerting force periodically over time and space.

$\theta_0 \leq x \leq \theta_0$ とする。粒子がつり合いの位置から外れた場合（摂動が加わった場合）、1周期の間に粒子にされる仕事  $W_{\text{DEP}}$  は式(1)のように書ける。

$$\begin{aligned}
 W_{\text{DEP}} &= W_{\text{DEP},0} + \frac{\partial W_{\text{DEP}}}{\partial \theta} d\theta = W_{\text{DEP},0} + \frac{\partial W_{\text{DEP}}}{\partial \theta} (\varepsilon \theta^{(1)} + \varepsilon^2 \theta^{(2)} + \dots) \\
 &= W_{\text{DEP},0} - 2a\theta_0 \theta^{(1)} \varepsilon - 2a\theta_0 \theta^{(2)} \varepsilon^2 + \dots
 \end{aligned} \tag{1}$$

ここで  $\theta$  は粒子に正（または負）の力が作用する領域の長さである。  $\varepsilon$  と  $\theta^{(i)}$  ( $i=1, 2, 3, \dots$ ) は摂動係数と  $i$  次の項であり、  $\theta = \theta_0 + \varepsilon \theta^{(1)} + \varepsilon^2 \theta^{(2)} + \dots$  である。また  $W_{\text{DEP},0}$  は粒子がつり合いの位置にあるときの仕事で、ここではその値を 0 とする。また、  $-a(<0)$  は 1 周期領域における  $F$  の  $x$  に対する比例定数である。式(1)の 1 次の項のみを考えると、  $\theta' = \varepsilon \theta^{(1)}$  であるので式(2)が得られる。

$$W_{\text{DEP}} \cong -2a\theta_0 \theta' \tag{2}$$

つぎに粒子の運動エネルギーを  $K$  とすると、つり合いの位置にある粒子の 1 周期における平均流速を  $\hat{u}_{p,0}$  とすれば、  $K$  に関する近似式は式(3)のように表せる。

$$K = \frac{1}{2} m \hat{u}_{p,0}^2 + \frac{\partial K}{\partial \hat{u}_p} \bigg|_0 d\hat{u}_p = \frac{1}{2} m \hat{u}_{p,0}^2 + m \hat{u}_{p,0} (\varepsilon \hat{u}_p^{(1)} + \varepsilon^2 \hat{u}_p^{(2)} + \dots). \quad (3)$$

$m$  は粒子の質量である。  $K$  のつり合いの状態からの変化  $\Delta K$  は  $\Delta K \cong m \hat{u}_{p,0} \hat{u}_p'$  となる。ここで式(2)と同様に1次の項を考え、  $\hat{u}_p' = \varepsilon \hat{u}_p^{(1)}$  である。

$\hat{u}_p'$  の1周期の間での変動量を  $d\hat{u}_p'$  とすると、変動量  $d\hat{u}_p'$  による  $K$  の変化を  $dK$  で表すと式(4)のようになる。

$$dK \cong m \hat{u}_{p,0} d\hat{u}_p'. \quad (4)$$

$dK$  は1周期に粒子になす仕事  $W_{\text{DEP}}$  と等しいと考えると、  $m \hat{u}_{p,0} d\hat{u}_p' = -2a\theta_0\theta'$  と置くことができる。ここで、  $\theta$  は  $\hat{u}_{p,0} t_{\text{on-off}}$  に比例しその比例定数を  $\alpha$  であるとして、式(5)の関係が得られる。

$$d\hat{u}_p' = -\frac{2a\alpha t_{\text{on-off}}}{m} \theta'. \quad (5)$$

さらに、  $\theta'$  の1周期の間における変化を  $\Delta\theta'$  とすると、  $\Delta\theta' \cong \hat{u}_p' t_{\text{on-off}}$  のように近似できる。ここで、1周期領域の長さが対象とする系の長さと比較して十分小さい場合は  $d\hat{u}_p' = -(2a\theta'/m)dt$  となり、また、  $\hat{u}_p' = d\theta'/dt$  と表すことができるので、この  $\hat{u}_p'$  を式(5)に適用すれば、離散的に表した粒子の変位と作用する力の関係は、式(6)に示すように微分形で書くことができる。

$$\frac{d^2\theta'}{dt^2} = -\frac{2a\alpha}{m} \theta'. \quad (6)$$

式(6)からは  $\theta'$  に関する振動解が得られる。実際の流路では粒子には流体粘性等により減衰効果が付加され、  $\theta'$  は多くの場合で0に収束する。Boxcar型電極を用いた実験で粒子の運動を測定した場合でも、粒子の位置と速度は振動しながらつり合いの位置での値に収束した (Tatsumi et al., 2021)。このことから、本手法のように時間と空間に対して周期的な力を離散的に粒子に作用した場合でも、粒子はつり合いの位置に収束すると言える。つり合いの位置にある粒子同士の間隔は  $L_{\text{pitch}}$  と  $t_{\text{on-off}}$  の整数倍に等しくなることから、粒子を一定間隔で整列することができる。

前述の通り、式(6)の関係は、つり合いの位置が  $-\theta_0 < x < \theta_0$  にある場合、すなわち流速が  $L_{\text{pitch}}/t_{\text{on-off}}$  と等しいときに成り立つ。一方、流速が  $L_{\text{pitch}}/t_{\text{on-off}}$  と異なる場合でも、粒子の平均速度が  $L_{\text{pitch}}/t_{\text{on-off}}$  と等しくなるように、つり合いの位置が移動するだけで、  $\theta'$  の0への収束に関する同様の議論を適用することができる。すなわち、この場合は  $W_{\text{DEP},0}$  は0でなく、流速と  $L_{\text{pitch}}/t_{\text{on-off}}$  との差を補うのに必要な仕事に対応する値を持つと言える。これは流路の流速を一定に保ったまま、  $t_{\text{on-off}}$  を変えることで粒子の時間間隔を  $t_{\text{on-off}}$  に設定できることを表す。したがって、Boxcar型電極領域を以下に述べる液滴生成機構と組み合わせたときに、液滴生成の周期に  $t_{\text{on-off}}$  を合わせることで1粒子1液滴封入の収率を向上できると考える。

### 2・3 Flow-focusing 流路

図2(d)の模式図で示した Flow-focusing 流路の領域にて液滴を生成した。Flow-focusing 流路は、液滴となる分散相と呼ばれる流体が流れる主流路に対して、連続相と呼ばれる液体が直交して合流する。合流部の下流には、縮小部と急拡大部を流路に設けた。マイクロ流路で液滴を生成する代表的な方法として、T-junction, Co-flowing, Flow-focusing の名で知られる形の流路が挙げられる (Nunes et al., 2013, Shang et al., 2017, Montanero and Gañán-Calvo, 2020)。本研究では、主流と側流の流路および縮小・急拡大部の寸法、そして分散相と連続相の流量と界面張力を基にして液滴の生成周期と寸法が制御できる自由度の高さを理由に Flow-focusing 流路を用いた (Vega et al., 2010, Chen et al., 2011)。本実験では、連続相にはシリコンオイル (信越化学, KF96-50CS, 動粘度 50 cSt) を用いた。オイルを Flow-focusing 流路の側流から流し、主流路から流れる粒子を混合した分散相の水溶液の液滴をオイル中に周期的に生成した。

## 2・4 実験条件

実験で用いたマイクロ粒子は、公称直径  $d_p=12\mu\text{m}$ 、密度  $\rho_p=1.05\times 10^3\text{kg/m}^3$  のポリスチレン粒子 (Thermoscientific, 4212A) である。作動流体は、分散相はミリポア水 (Millipore) に、界面活性剤のラウリル硫酸ナトリウム (sodium lauryl sulfate: SLS) を 0.1wt% 混合した水溶液を用い、粒子の凝集および流路壁に付着するのを抑制した。流路に供給する懸濁液中の粒子体積比は  $\phi=0.1\%$  とした。この場合、測定において主流路から Flow-focusing 流路に、1 周期領域 (時間) に流入する粒子の数密度が約 0.4 となった。

粒子懸濁液を流す主流路の流量は  $Q_1+Q_2+Q_3=0.5\mu\text{L}/\text{min}$  とした。このときの主流路における断面平均流速は  $u_m=0.83\text{mm}/\text{s}$  である。Rail 型電極と Boxcar 型電極には 10MHz の交流電圧を  $V_{p-p}=8.5\text{V}$  で印加した。Boxcar 型電極では、ファンクションジェネレータの信号バースト機能を用いて、交流電圧を周波数  $f_{\text{on-off}}=14\text{Hz}$  ( $=1/t_{\text{on-off}}$ ) で間欠的に印加した。この設定値は液滴生成周期に関係し、後に詳述する。信号のデューティ比は 50% である。交流電圧の周波数 10MHz はファンクションジェネレータの最大値である。筆者らは先行研究にて Rail 型電極と Ladder 型電極に関する数値計算により、本周波数にて粒子に作用する誘電泳動力は数 nN の大きさを持ち、断面平均流速が数  $10\mu\text{m}\sim 10\text{mm}/\text{s}$  の条件でも粒子を操作できることを確認している (Tatsumi et al. 2019)。本研究で用いた Boxcar 型電極でも粒子操作できると考え、同じ周波数条件で実験を行った。

なお、 $u_m$  と主流路の水力直径を用いて求めた流路のレイノルズ数は  $Re=0.067$  であり、粒子直径基準のレイノルズ数は、粒子運動が収束し、収束したときの平均速度である制御目標速度  $u_p^*=0.70\text{mm}/\text{s}$  を用いて求めると  $Re_p=8.3\times 10^{-3}$  である。連続相 (オイル) の流量は、図 2(b) と (d) に示す側流 1 と 2 で等しく  $Q_{\text{oil},1}=Q_{\text{oil},2}=1.8\mu\text{L}/\text{min}$  とした。

## 3. 結果と考察

### 3・1 液滴生成

Flow-focusing 流路では、連続相と分散相の界面張力は、液滴生成の可否と液滴の径および周期を定める重要な要素である。このため、液滴生成の条件としてキャピラリー数  $Ca=\mu u_m/\sigma$  を用いて整理することが多い。ここで、 $\mu$  と  $\sigma$ 、それぞれは流体の粘度と表面張力、 $u_m$  は断面平均流速である。連続相と分散相それぞれのキャピラリー数  $Ca_c$  と  $Ca_d$  が共に増大すると Flow-focusing 流路における連続相の液柱が下流に伸び、拡大流路部下流にて液滴が形成される Jetting と呼ばれる状態になる (Nunes et al., 2013, Roumpea et al., 2019)。さらに  $Ca_d$  が増大すると Threading と呼ばれるように、液柱が下流に維持され液滴が形成されない。したがって、Flow-focusing 流路にて液滴形成可能な Dripping と呼ばれる状態にするには、流量と表面張力を調整して  $Ca_c$  と  $Ca_d$  をしきい値以下に設定する必要がある。

本実験では、 $Ca_c$  と  $Ca_d$  の計算には分散相 (水) が流れる主流路と連続相 (オイル) が流れる側流での  $u_m$  を用いた。また水とオイルの粘度は、それぞれ  $\mu=0.89\text{mPa}\cdot\text{s}$  と  $48\text{mPa}\cdot\text{s}$  とした。予備実験として、PDMS 製の流路にガラスを下壁として接着した場合の Flow-focusing 流路での流れを観測した。この場合、 $1.0\times 10^{-3}<Ca_c<0.2$  の範囲では、 $Ca_d$  が約  $4.0\times 10^{-4}$  以下である条件で流れは Dripping 状態となった。これに対して、流路壁の材質を変えると、 $Ca_d$  が  $4.0\times 10^{-4}$  以下でも液滴が形成されない場合が見られた。すなわち、流路壁の材質をガラス、PDMS, Pt, Au と変えると同じキャピラリー数でも Threading と Jetting の流れができる場合があった。これは流路の濡れ性が液滴生成に影響するためである (Bauer et al., 2010, Gu et al., 2011, Jose and Cubaud, 2014, Trantidou et al., 2019)。そこで、液滴生成を促進するために、シリコンオイルに界面活性剤である Span80 (東京応化工業) を 0.5wt% 混合し (Hashimoto et al., 2008)、さらに流路表面を撥水コーティング剤である Aquapel (Pittsburgh Glass Works) で処理することで (Kemna et al., 2012)、壁面における分散相の接触角を増大させた。O<sub>2</sub> ガスを用いたプラズマ表面活性化処理したガラスと、そのガラスを Aquapel で皮膜したガラスの表面に、オイルの中で水を滴下した場合の写真を図 4 に示す。プラズマ表面活性化処理したガラスについては、処理後 12 時間以上経過してから測定を行った。また、接触角計 (協和界面科学, DMo-601) を用いて測定した、ガラス, PDMS, Au, Aquapel 処理ガラスに関する、オイル中の水液滴の界面接触角を表 1 に示す。図および表の値から分かるように、ガラスを Aquapel で撥水化処理することで接触角を 24.9° から約 180° まで増大できた。

Table 1 Contact angle of water droplet on wall in oil.

Substrate	Glass	PDMS	Au	Glass treated by Aquapel
Contact angle [°]	24.9	180	110	180

Table 2 Capillary numbers of the continuous and dispersed fluid flows in channels with walls of different material, each corresponding to the results shown in Fig. 5.

Substrate	(a) PDMS wall	(b) Glass wall	(c) Pt wall	(d) Glass wall treated by Aquapel
$Ca_c$	$8.0 \times 10^{-3}$	$8.0 \times 10^{-3}$	$4.0 \times 10^{-3}$	$8.4 \times 10^{-2}$
$Ca_d$	$7.2 \times 10^{-5}$	$3.6 \times 10^{-5}$	$2.9 \times 10^{-5}$	$4.3 \times 10^{-4}$

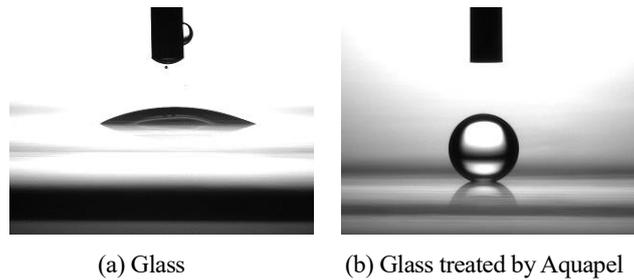


Fig. 4 Water droplet in contact with the glass and glass treated by Aquapel in oil.

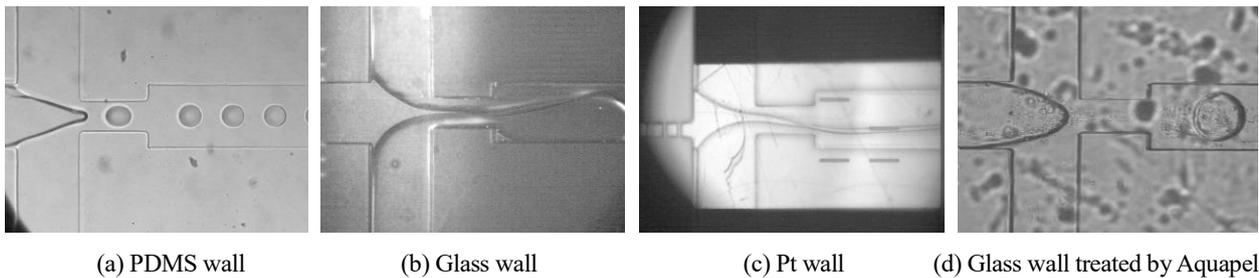


Fig. 5 Photographs of the flow pattern in the flow-focusing region in relation to the surface properties of the top-bottom walls.

図 5 に、Flow-focusing 流路における上壁の材料が(a) PDMS, (b) ガラス, (c) Pt である場合、そして上下壁が(d) Aquapel 処理したガラスである場合での流れの様子を示す。連続相と分散相それぞれのキャピラリー数  $Ca_c$  と  $Ca_d$  は、表 2 にも示すように、(a)  $Ca_c=8.0 \times 10^{-3}$ ,  $Ca_d=7.2 \times 10^{-5}$ , (b)  $Ca_c=8.0 \times 10^{-3}$ ,  $Ca_d=3.6 \times 10^{-5}$ , (c)  $Ca_c=4.0 \times 10^{-3}$ ,  $Ca_d=2.9 \times 10^{-5}$ , (d)  $Ca_c=8.4 \times 10^{-2}$ ,  $Ca_d=4.3 \times 10^{-4}$  である。近いキャピラリー数の条件でも、流路壁の表面性状により Dripping 流れから Threading 流れに変わることが分かる。図 5(c)の Pt の場合でも  $Ca_c$  と  $Ca_d$  の値は比較的小さいが、Threading 流れが形成されている。表 1 にて電極材料である Au の接触角は  $110^\circ$  と比較的大きいが、安定して液滴を生成するには表面を撥水化処理することが好ましいと考えられる。一方、図 5(d)にあるように Aquapel で処理したガラスでは、 $Ca_c$  と  $Ca_d$  の値が(b)と(c)の場合と比較して大きいにもかかわらず液滴が生成される。これらのことから、本実験では流路を Aquapel で 5min 間満たし、ガラスおよび電極表面を撥水化処理してから粒子封入に関する測定を行った。

### 3・2 Boxcar 型電極による粒子整列

本節では主流路を流れる分散相の流体に混合した粒子について、Boxcar 型電極による粒子整列の性能の評価、および Flow-focusing 流路での液滴生成による整列への影響について検討を行う。この場合、液滴の生成周期は  $t_d \sim 66\text{ms}$  であった。これに合わせて電極に印加する電圧のオン・オフ周期を  $t_{\text{on-off}}=72\text{ms}$  とした。

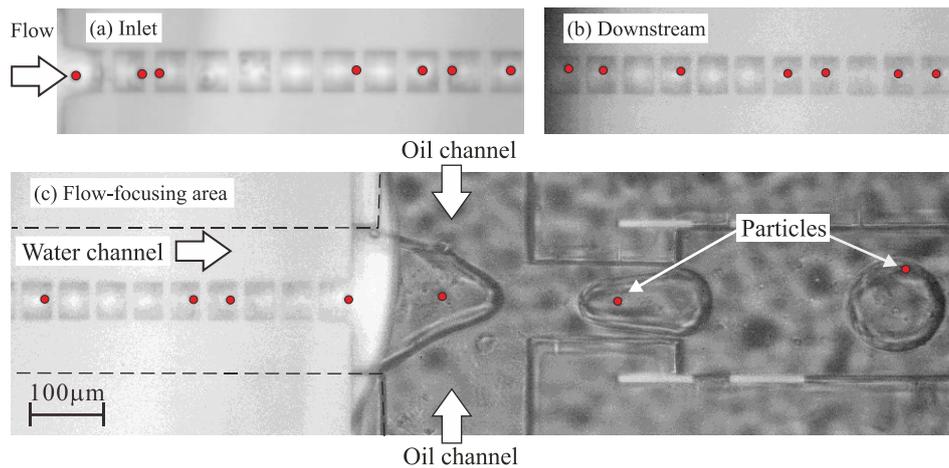


Fig. 6 Photographs of the particles flowing (a) at the inlet and (b) in downstream region of the boxcar-electrodes, and (c) the flow-focusing area at which the droplets are generated and the particles are encapsulated in the droplets. Red circles are superposed on the particles.

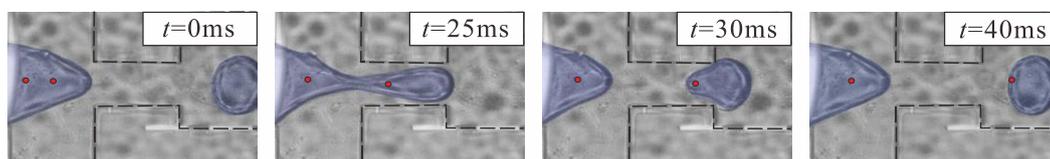


Fig. 7 Series of photographs showing the droplet generation and particle encapsulation at the flow-focusing region.

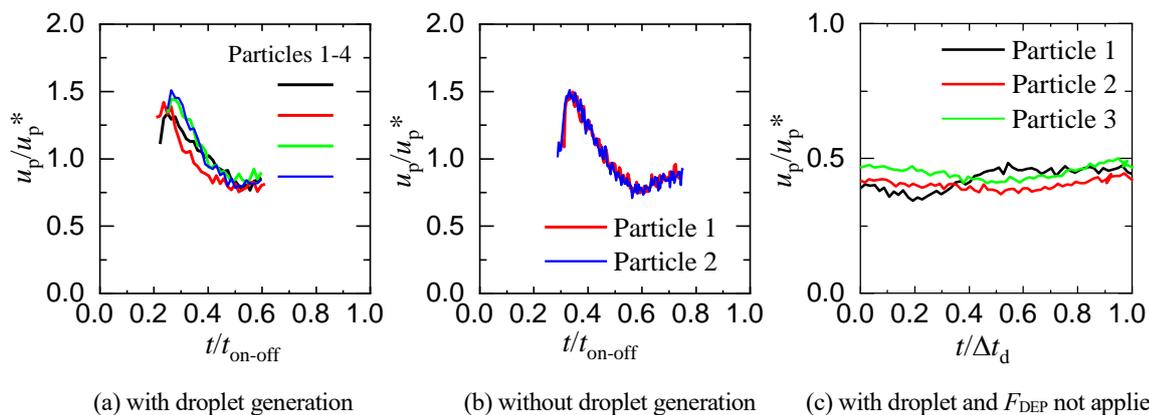


Fig. 8 Particle velocity distribution measured in the boxcar electrode region over one period of the on-off cycle under the conditions of (a) droplet generating in the flow-focusing region, (b) no droplet generated (steady state flow), and (c) droplet generated and voltage not applied to the electrodes.  $u_p^*$  is the target velocity ( $u_p^* = L_{pitch}/t_{on-off}$ ), and  $\Delta t_d$  is the interval of the droplet generation.

図 6 に Boxcar 型電極領域の入口と出口近く、および Flow-focusing 流路にて粒子と液滴生成の様子を撮影した写真を示す。また、図 7 に液滴生成の 1 周期にて撮影した一連の写真を示す。図 6(a)では、Boxcar 型電極の入口に流入する粒子は Rail 型電極により中心線上に集中するが、粒子の主流方向位置は周期的でなく、ばらつきがある。これに対して、Boxcar 型電極の出口近くでは粒子は電極 1 周期長さ  $L_{pitch}$  の整数倍と等しい間隔で整列することが分かる。ここで、流路のある位置を通過する粒子の時間間隔を  $\Delta t_p$  とし、 $\Delta t_p$  の  $t_{on-off}$  (またはその整数倍) との差を  $\delta t_p$  とする。図 6(a)に示す Boxcar 型電極領域に流入する粒子に関する  $\delta t_p/t_{on-off}$  の平均値は 0.58 であり、その標準偏差は 0.25 であった。これに対して、Boxcar 型電極領域の出口での  $\delta t_p/t_{on-off}$  の平均値と標準偏差は、それぞれ  $7.9 \times 10^{-4}$  と  $1.6 \times 10^{-2}$  であった。このことから Boxcar 型電極による粒子整列の精度の高さが分かる。

Boxcar 型電極領域の出口近傍の 1 周期領域で測定した、複数の粒子に関する主流方向速度  $u_p$  の分布を図 8(a)に示す。また比較のため、Flow-focusing 流路にて液滴を生成しない状態で Boxcar 型電極にて粒子を整列した場合の  $u_p$  分布を図 8(b)に示す。この場合、分散相である水溶液の流量は  $Q_{water} = 0.5 \mu\text{L}/\text{min}$  と液滴生成時の場合と等しく、

連続相であるオイルの流量は  $Q_{oil}=0 \mu\text{L}/\text{min}$  とした。また、測定は  $t_{on-off}=50\text{ms}$  と設定した場合の結果である。なお、粒子の像は枕木電極により遮られるため、図では  $u_p$  は粒子を撮影できた範囲にわたって示す。

図 8(b)では、それぞれ各粒子の  $u_p$  分布は一致するが、図 8(a)に示す液滴生成時では  $u_p$  分布にばらつきが見られる。これは、Flow-focusing 流路にて液滴が生成される際に、図 7 に示すように分散相が連続相のせん断流れにより伸長され、急拡大部にて先端部が成長し、液滴が切り離されたときに分散相の界面が上流に移動することにより流路内の圧力が変動するためである。本研究で用いたポンプは、流体に付加する圧力を制御することで流量を調整している。このため、流路内の流動抵抗や圧力が変化するとポンプの圧力制御が追従するまでは流量が変化する。これに加えて、流路内の圧力変動によりチューブや PDMS ブロックの孔での流路が変形し流量が変化する。図 8(c)に Boxcar 型電極に通電しない場合での粒子速度の時間分布を示す。横軸の時間は液滴生成周期  $t_d$  で規格化している。誘電泳動力による粒子高さ位置の制御がないため各粒子の平均速度は異なるが、速度変動の周期は  $t_d$  に近い。このように、液滴生成により流れに脈動が生じ、図 8(a)に示したように誘電泳動力により粒子を整列した場合でもその影響を受けて粒子速度は変動する。一方、前述の  $\delta t_p/t_{on-off}$  の標準偏差が  $1.6 \times 10^{-2}$  であることから、ここで示した流れの脈動の中でも Boxcar 型電極を用いて粒子を整列できることが分かった。

### 3・3 粒子封入収率の評価

1 粒子を封入した液滴の生成の精度を評価するため、液滴に封入される粒子の数を測定した。図 9 に封入粒子数に対する生成液滴の確率分布を示す。測定した液滴数は 52 個である。また、粒子を液滴生成領域にランダムな間隔で流した場合の確率分布として (Collins et al., 2015), 式(7)に示すポアソン分布から求めた値を、図 9 に散布図として示す。

$$P(n)=\exp(-\lambda) \lambda^n / n! \quad (7)$$

$n$  は粒子数であり、 $\lambda$  は 1 液滴あたりに含まれる平均粒子数である。緒言で述べたように 1 粒子封入の液滴数を増やすには粒子の数密度を増大させる必要があるが、例えば  $\lambda=1.0$  の場合では液滴が粒子を 2 個以上含む確率は  $P(n \geq 2)=0.26$  であり、1 液滴 1 粒子封入を目的とすると不良率が高い。一方、 $\lambda=0.1$  では  $P(n \geq 2)$  の値は 0.0047 と小さいが、 $P(n=1)=0.09$  となり、1 液滴 1 粒子封入の効率 (処理量) も小さい。

実験の平均粒子数  $\lambda=0.4$  では、ポアソン分布から求めた液滴が 2 個以上の粒子を含む確率は  $P(n \geq 2)=0.06$  である。これに対して、図 9 に示すように、Boxcar 型電極により粒子を整列した場合の実測結果では、液滴に封入される粒子数は 0 か 1 であり、2 個以上の粒子が液滴に含まれる割合は  $P(n \geq 2)=0$  である。このことから、Boxcar 型電極を用いることで本実験条件について 1 液滴 1 粒子封入の収率を 100%にできることを検証できた。なお、前述のポアソン分布の場合と比較すると、Boxcar 型電極を用いることで  $P(n=1)$  の値を 46%増大することができた。

3.2 節で述べたように、液滴生成周期が  $t_d \sim 66\text{ms}$  であることから Boxcar 型電極の通電周期を  $t_{on-off}=72\text{ms}$  とした。両者を完全に一致させることができなかったのは、 $t_d$  は実験ごとに送液経路と表面性状により約  $\pm 15\text{ms}$  の範囲でばらつき、また測定中にその周期を正確に見積もるのが難しかったためである。 $t_{on-off} \neq t_d$  の場合、液滴生成と粒子流入のタイミングの位相がずれる。ただし、粒子が整列されていれば、 $t_{on-off} \geq t_d$  の場合、位相がずれても 1 液滴に封入される粒子数が 2 個以上となることを防ぐことは可能である。

本実験では、平均粒子数  $\lambda=0.4$  となる粒子の数密度条件で収率を評価した。 $\lambda$  を大きくした場合でも、Boxcar 型電極を用いて粒子を整列することができれば、高い収率を維持し、液滴封入の効率を高められる可能性がある。今後、さらに大きい  $\lambda$  に関する実験を行い、性能を評価することが重要である。一方、Boxcar 型電極を用いて粒子を整列し、タイミングを制御する場合、整列できる粒子の数密度  $\lambda$  には上限がある。1 周期に 1 粒子が配置されるため、空間密度としては主流方向あたり 1 個/ $L_{pitch}$ 、また時間密度として 1 個/ $t_{on-off} = f_{on-off}$  が整列性能となり、流路内に供給する数密度を制御する機能は有しないため、 $\lambda=1$  が流路に供給する粒子の数密度の上限となる。

また、 $\lambda$  が増大すると Boxcar 型電極領域に入口にて、同一周期に 2 個以上の粒子が位置する場合がある。筆者らは Boxcar 型電極に関する先行研究にて、同一周期に 2 粒子が位置する場合に関する数値計算と計測を行い、誘電泳動力と流速の流路高さ方向分布により、2 粒子が離隔し、整列することを確認している (本間他, 2020)。こ

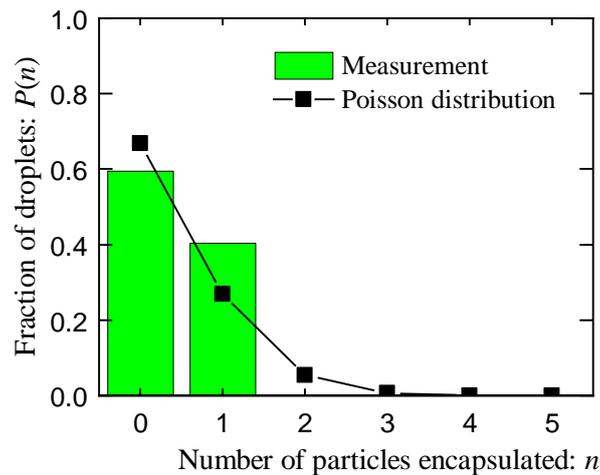


Fig. 9 Histogram presenting the normalized frequency (fraction) of droplets which encapsulates  $n$  particles. The number of droplets is 52, and the average number of particles encapsulated in the droplet is  $\lambda=0.4$ . The Poisson distribution gives the results of  $\lambda=0.4$ .

の場合、2粒子は互いに接近し、接触する。その後、高さ方向の誘電泳動力により、上流の粒子が下流の粒子を乗り越える。下流の粒子は枕木電極の上流側にて下壁に近づき、主流方向の誘電泳動力により減速することで1つ後の時間周期へと移動する。同一周期に2粒子が存在する場合、余剰粒子はこの運動を繰り返すことで空きの領域まで移動して、その位置に配置されることを示した。これにより、粒子の数密度が周期領域の数密度以下 ( $\lambda \leq 1$ ) であれば、粒子を離隔し等間隔に整列して液液生成部に供給できると考えられる。

#### 4. 結 言

本研究では、Boxcar型電極を用いて空間と時間に対して周期的に誘電泳動力を粒子に付加することで、マイクロ流路を流れる粒子を等間隔に整列し、Flow-focusing流路を用いた液滴生成の周期に同期することにより、平均粒子数 $\lambda=0.4$ の条件でも、収率100%で1粒子封入の液滴を生成することができた。これは、同条件でランダムに粒子を流した場合に関する理論式から求めた収率に対して改善した。また、本研究では1液滴に1粒子を封入することを目的として議論しているが、 $t_{\text{on-off}}=t_d/n$ と設定すれば、複数個( $n$ 個)の粒子を封入した液滴生成の収率も向上できる可能性がある。今後、 $\lambda$ の値を増大した場合の特性と収率を評価することが課題である。この他に本手法は流路の特定位置を通過する粒子のタイミングも高い精度で同期できる可能性がある。このことから、Boxcar型電極を並列に配置し、それぞれに別の粒子を流して整列することで、1液滴に異なる粒子を封入できる技術への展開を検証することも重要と考えている。

#### 謝 辞

本研究はJSPS科研費18H01381と18KK0306の助成を受けたものである。マイクロデバイス製作の一部は「低炭素研究ネットワーク」京都大学ナノテクノロジーハブ拠点の支援によるものである。記して謝意を表す。

#### 文 献

- Abate, A. R., Chen, C.-H., Agresti, J. J. and Weitz, D. A., Beating Poisson encapsulation statistics using close-packed ordering, Lab on a Chip, Vol.9, No.18 (2009), pp.2628-2631.
- Anna, S. L., Bontoux, N. and Stoneb, H. A., Formation of dispersions using “flow focusing” in microchannels, Applied Physics Letters, Vol.82, No.3 (2003), pp.364-366.

- Bauer, W.-A. C., Fischlechner, M., Abell, C. and Huck, W. T. S., Hydrophilic PDMS microchannels for high-throughput formation of oil-in-water microdroplets and water-in-oil-in-water double emulsions, *Lab Chip*, Vol.10 (2010), pp.1814-1819.
- Brower, K. K., Khariton, M., Suzuki, P. H., Still, C., Kim, G., Calhoun, S. G. K., Qi, L. S., Wang, B. and Fordyce, P. M., Double emulsion picoreactors for high-throughput single-cell encapsulation and phenotyping via FACS, *Analytical Chemistry*, Vol. 92, No.19 (2020), pp.13262-13270.
- Chen, J. M., Kuo, M.-C. and Liu, C.-P., Control of droplet generation in flow-focusing microfluidic device with a converging-diverging nozzle-shaped section, *Jpn. J. Applied Physics*, Vol.50 (2011), 107301.
- Collins, D.J., Neild, A., deMello, A., Liud, A.-Q. and Ai, Y., The Poisson distribution and beyond: methods for microfluidic droplet production and single cell encapsulation, *Lab Chip*, Vol.15 (2015), pp.3439-3459.
- D'Avino, G. and Maffettone, P. L., Numerical simulations on the dynamics of trains of particles in a viscoelastic fluid flowing in a microchannel, *Meccanica*, Vol.55 (2020), pp.317-330.
- Delley, C. L. and Abate A. R., Microfluidic particle zipper enables controlled loading of droplets with distinct particle types, *Lab Chip*, Vol.20 (2020), pp.2465-2472.
- Di Carlo, D., Irimia, D., Tompkins, R. G. and Toner, M., Continuous inertial focusing, ordering, and separation of particles in microchannels, *PNAS*, Vol.104, No.48 (2007), pp.18892-18897.
- Dietsche, C., Mutlu, B. R., Edd, J. F., Koumoutsakos, J. and Toner, M., Dynamic particle ordering in oscillatory inertial microfluidics, *Microfluidics and Nanofluidics*. Vol.23 (2019), 83.
- Ding, Y., Howes, P. D. and deMello, A. J., Recent advances in droplet microfluidics, *Analytical Chemistry*, Vol. 92 (2020), pp.132-149.
- Gao, Y., Magaud, P., Baldas, L., Lafforgue, C., Abbas, M. and Colin, S. Self-ordered particle trains in inertial microchannel flows, *Microfluidics and Nanofluidics*, Vol.21 (2017), pp.154-164.
- Garcés-Chávez, V., Dholakia, K. and Spalding G. C., Extended-area optically induced organization of microparticles on a surface, *Applied Physics Letters*, Vol.86 (2005), 031106.
- Gu, H., Duits, M. H. G. and Mugele, F., Droplets formation and merging in two-phase flow microfluidics, *International Journal Molecular Science*, Vol.12 (2011), pp.2572-2597.
- Hashimoto, M., Garstecki, P., Stone, H. A. and Whitesides, G. M., Interfacial instabilities in a microfluidic Hele-Shaw cell, *Soft Matter*, Vol.4 (2008), pp.1403-1413.
- Hirama, H. and Torii, T., One-to-one encapsulation based on alternating droplet generation, *Science Report*, Vol. 5 (2015), 15196.
- 本間怜人, 巽和也, 栗山怜子, 中部主敬, Boxcar 型電極を用いた誘電泳動力によるマイクロ流路内粒子の離隔と整列機構, *日本機械学会論文集*, Vol. 86, No.890 (2020), DOI:10.1299/transjsme.20-00117.
- Jose, B. M. and Cubaud, T., Formation and dynamics of partially wetting droplets in square microchannels, *RSC Advance*, Vol.4 (2014), 14962.
- Kemna, E. W. M., Schoeman, R. M., Wolbers, F., Vermes, I., Weitz, D. A. and van Berg, A., High-yield cell ordering and deterministic cell-in-droplet encapsulation using Dean flow in a curved microchannel, *Lab Chip*, Vol.12 (2012), pp.2881-2887.
- Klein, A. M., Mazutis, L., Akartuna, I., Tallapragada, N., Veres, A., Li, V., Peshkin, L., Weitz, D. A. and Kirschner, M. W., Droplet barcoding for single-cell transcriptomics applied to embryonic stem cells, *Cell*, Vol.161 (2015), pp.1187-1201.
- Lagus, T. P. and Edd, J. F., High-throughput co-encapsulation of self-ordered cell trains: cell pair interactions in microdroplets, *RSC Advances*, Vol.3, No.43 (2013), pp.20512-20522.
- Lashkaripour, A., Rodriguez, C., Mehdipour, N., Mardian, R., McIntyre, D., Ortiz, L., Campbell, J. and Densmore, D., Machine learning enables design automation of microfluidic flow-focusing droplet generation, *Nature Communications*, Vol.12, No.25 (2021), <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20284-z>.
- Li, M., Liu, H., Zhuang, S. and Goda, K., Droplet flow cytometry for single-cell analysis, *RSC Advances*, Vol.11 (2021), 20944.

- Liu, L., Dalal, C. K., Heineike, B. M. and Abate, A. R., High throughput gene expression profiling of yeast colonies with microgel-culture Drop-seq, *Lab Chip*, Vol.19 (2019), pp.1838-1849.
- Mazutis, L., Gilbert, J., Lloyd, U., Weitz, D. A., Griffiths, A. D. and Heyman, J. A., Single-cell analysis and sorting using droplet-based microfluidics, *Nature Protocols*, Vol.8 (2013), pp.870-891.
- Montanero, J. M. and Gañán-Calvo, A. M., Dripping, jetting and tip streaming, *Reports on Progress in Physics* Vol.83 (2020), 097001.
- Morgan, H., Green, N. G., Hughes, M. P., Monaghan, W. and Tan, T. C., Large-area travelling-wave dielectrophoresis particle separator, *Journal Micromechanics Microengineering*, Vol.7 (1997), pp.65–70.
- Nozakia, Y., Yoona, D.H., Furuyab, M., Fujitac, H., Sekiguchia, T. and Shoji, S., Validation of droplet-generation performance of a newly developed microfluidic device with a three-dimensional structure, *Sensors and Actuators A*, Vol.331 (2021), 112917.
- Nunes, J. K., Tsai, S. S., Wan, J. and Stone, H. A., Dripping and jetting in microfluidic multiphase flows applied to particle and fiber synthesis, *Journal Physics D Applied Physics*, Vol.46, No.11 (2013), 114002.
- Pellegrino, M., Sciambi, A., Treusch, S., Durruthy-Durruthy, R., Gokhale, K., Jacob, J., Chen, T. X., Geis, J. A., Oldham, W., Matthews, J., Kantarjian, H., Futreal, P. A., Patel, K., Jones, K. W., Takahashi, K. and Eastburn, D. J., High-throughput single-cell DNA sequencing of acute myeloid leukemia tumors with droplet microfluidics, *Genome Research*, Vol.28, No.9 (2018), pp.1345-1352.
- Roumpea, E., Kovalchuk, N. M., Chinaud, M., Nowak, E., Simmons, M. J. H. and Angeli, P., Experimental studies on droplet formation in a flow-focusing microchannel in the presence of surfactants, *Chemical Engineering Science*, Vol.195, No.23 (2019), pp.507-518.
- Schoeman, R. M., Kemna, E. W. M., Wolbers, F. and van den Berg, A., High-throughput deterministic single-cell encapsulation and droplet pairing, fusion, and shrinkage in a single microfluidic device, *Electrophoresis*, Vol.35, (2014), pp.385-392.
- Seo, M., Paquet, C., Nie, Z., Xua, S. and Kumacheva, E., Microfluidic consecutive flow-focusing droplet generators, *Soft Matter*, Vol.3 (2007), pp.986-992.
- Shahrivar, K. and Giudice, F. D., Controlled viscoelastic particle encapsulation in microfluidic devices, *Soft Matter*, Vol. 17, (2021), pp.8068-8077.
- Shang, L., Cheng, Y. and Zhao, Y., Emerging droplet microfluidics, *Chemical Reviews*, Vol.117, No.12 (2017), pp.7964–8040.
- Tatsumi, K., Kawano, K., Okui, H., Shintani, H. and Nakabe, K., Analysis and measurement of dielectrophoretic manipulation of particles and lymphocytes using rail-type electrodes, *Medical Engineering and Physics*, Vol.38, No.1 (2016), pp.24-32.
- Tatsumi, K., Kawano, K., Shintani, H. and Nakabe, K., Particle timing control and alignment in microchannel flow by applying periodic force control using dielectrophoretic force, *Analytical Chemistry*, Vol. 91, No.10 (2019), pp. 6462-6470.
- Tatsumi, K., Noma, A., Honma, R., Kuriyama, R. and Nakabe, K., Particle timing and spacing control in microchannel flow by applying periodic force over space and time, *Microfluidics Nanofluidics*, Vol.25 (2021), 15.
- Trantidou, T., Elani, T., Parsons, E. and Ces, O., Hydrophilic surface modification of PDMS for droplet microfluidics using a simple, quick, and robust method via PVA deposition, *Chemical Engineering Science*, Vol.195 (2019), pp.507–518.
- Vega, E. J., Montanero, J. M., Herrada, M. A. and Gañán-Calvo, A. M., Global and local instability of flow focusing: The influence of the geometry, *Physics of Fluids* Vol.22 (2010), 064105.
- Velasco, D., Tumarkin, E. and Kumacheva, E., Microfluidic encapsulation of cells in polymer microgels, *Small*, Vol.8, No.11 (2012), pp.1633–1642.
- Wood, C. D., Evans, S. D., Cunningham, J. E., O’Rorke, R., Wälti, C. and Davies, A. G., Alignment of particles in microfluidic systems using standing surface acoustic waves, *Applied Physics Letters*, Vol.92 (2008), 044104.

## References

- Abate, A. R., Chen, C.-H., Agresti, J. J. and Weitz, D. A., Beating Poisson encapsulation statistics using close-packed ordering, *Lab on a Chip*, Vol.9, No.18 (2009), pp.2628-2631.

- Anna, S. L., Bontoux, N. and Stoneb, H. A., Formation of dispersions using “flow focusing” in microchannels, *Applied Physics Letters*, Vol.82, No.3 (2003), pp.364-366.
- Bauer, W.-A. C., Fischlechner, M., Abell, C. and Huck, W. T. S., Hydrophilic PDMS microchannels for high-throughput formation of oil-in-water microdroplets and water-in-oil-in-water double emulsions, *Lab Chip*, Vol.10 (2010), pp.1814-1819.
- Brower, K. K., Khariton, M., Suzuki, P. H., Still, C., Kim, G., Calhoun, S. G. K., Qi, L. S., Wang, B. and Fordyce, P. M., Double emulsion picoreactors for high-throughput single-cell encapsulation and phenotyping via FACS, *Analytical Chemistry*, Vol. 92, No.19 (2020), pp.13262-13270.
- Chen, J. M., Kuo, M.-C. and Liu, C.-P., Control of droplet generation in flow-focusing microfluidic device with a converging-diverging nozzle-shaped section, *Jpn. J. Applied Physics*, Vol.50 (2011), 107301.
- Collins, D.J., Neild, A., deMello, A., Liud, A.-Q. and Ai, Y., The Poisson distribution and beyond: methods for microfluidic droplet production and single cell encapsulation, *Lab Chip*, Vol.15 (2015), pp.3439-3459.
- D'Avino, G. and Maffettone, P. L., Numerical simulations on the dynamics of trains of particles in a viscoelastic fluid flowing in a microchannel, *Meccanica*, Vol.55 (2020), pp.317-330.
- Delley, C. L. and Abate A. R., Microfluidic particle zipper enables controlled loading of droplets with distinct particle types, *Lab Chip*, Vol.20 (2020), pp.2465-2472.
- Di Carlo, D., Irimia, D., Tompkins, R. G. and Toner, M., Continuous inertial focusing, ordering, and separation of particles in microchannels, *PNAS*, Vol.104, No.48 (2007), pp.18892-18897.
- Dietsche, C., Mutlu, B. R., Edd, J. F., Koumoutsakos, J. and Toner, M., Dynamic particle ordering in oscillatory inertial microfluidics, *Microfluidics and Nanofluidics*. Vol.23 (2019), 83.
- Ding, Y., Howes, P. D. and deMello, A. J., Recent advances in droplet microfluidics, *Analytical Chemistry*, Vol. 92 (2020), pp.132–149.
- Gao, Y., Magaud, P., Baldas, L., Lafforgue, C., Abbas, M. and Colin, S. Self-ordered particle trains in inertial microchannel flows, *Microfluidics and Nanofluidics*, Vol.21 (2017), pp.154-164.
- Garcés-Chávez, V., Dholakia, K. and Spalding G. C., Extended-area optically induced organization of microparticles on a surface, *Applied Physics Letters*, Vol.86 (2005), 031106.
- Gu, H., Duits, M. H. G. and Mugele, F., Droplets formation and merging in two-phase flow microfluidics, *International Journal Molecular Science*, Vol.12 (2011), pp.2572-2597.
- Hashimoto, M., Garstecki, P., Stone, H. A. and Whitesides, G. M., Interfacial instabilities in a microfluidic Hele-Shaw cell, *Soft Matter*, Vol.4 (2008), pp.1403-1413.
- Hirama, H. and Torii, T., One-to-one encapsulation based on alternating droplet generation, *Science Report*, Vol. 5 (2015), 15196.
- Honma, R., Tatsumi, K., Kuriyama, R. and Nakabe, K., Particle separation and alignment technique in microchannel flow by dielectrophoretic force using boxcar-type electrode, *Transactions of the JSME (in Japanese)*, Vol. 86, No.890 (2020), DOI:10.1299/transjsme.20-00117.
- Jose, B. M. and Cubaud, T., Formation and dynamics of partially wetting droplets in square microchannels, *RSC Advance*, Vol.4 (2014), 14962.
- Kemna, E. W. M., Schoeman, R. M., Wolbers, F., Vermes, I., Weitz, D. A. and van Berg, A., High-yield cell ordering and deterministic cell-in-droplet encapsulation using Dean flow in a curved microchannel, *Lab Chip*, Vol.12 (2012), pp.2881-2887.
- Klein, A. M., Mazutis, L., Akartuna, I., Tallapragada, N., Veres, A., Li, V., Peshkin, L., Weitz, D. A. and Kirschner, M. W., Droplet barcoding for single-cell transcriptomics applied to embryonic stem cells, *Cell*, Vol.161 (2015), pp.1187-1201.
- Lagus, T. P. and Edd, J. F., High-throughput co-encapsulation of self-ordered cell trains: cell pair interactions in microdroplets, *RSC Advances*, Vol.3, No.43 (2013), pp.20512-20522.

- Lashkaripour, A., Rodriguez, C., Mehdipour, N., Mardian, R., McIntyre, D., Ortiz, L., Campbell, J. and Densmore, D., Machine learning enables design automation of microfluidic flow-focusing droplet generation, *Nature Communications*, Vol.12, No.25 (2021), <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20284-z>.
- Li, M., Liu, H., Zhuang, S. and Goda, K., Droplet flow cytometry for single-cell analysis, *RSC Advances*, Vol.11 (2021), 20944.
- Liu, L., Dalal, C. K., Heineike, B. M. and Abate, A. R., High throughput gene expression profiling of yeast colonies with microgel-culture Drop-seq, *Lab Chip*, Vol.19 (2019), pp.1838-1849.
- Mazutis, L., Gilbert, J., Lloyd, U., Weitz, D. A., Griffiths, A. D. and Heyman, J. A., Single-cell analysis and sorting using droplet-based microfluidics, *Nature Protocols*, Vol.8 (2013), pp.870-891.
- Montanero, J. M. and Gañán-Calvo, A. M., Dripping, jetting and tip streaming, *Reports on Progress in Physics* Vol.83 (2020), 097001.
- Morgan, H., Green, N. G., Hughes, M. P., Monaghan, W. and Tan, T. C., Large-area travelling-wave dielectrophoresis particle separator, *Journal Micromechanics Microengineering*, Vol.7 (1997), pp.65–70.
- Nozakia, Y., Yoona, D.H., Furuyab, M., Fujitac, H., Sekiguchia, T. and Shoji, S., Validation of droplet-generation performance of a newly developed microfluidic device with a three-dimensional structure, *Sensors and Actuators A*, Vol.331 (2021), 112917.
- Nunes, J. K., Tsai, S. S., Wan, J. and Stone, H. A., Dripping and jetting in microfluidic multiphase flows applied to particle and fiber synthesis, *Journal Physics D Applied Physics*, Vol.46, No.11 (2013), 114002.
- Pellegrino, M., Sciambi, A., Treusch, S., Durruthy-Durruthy, R., Gokhale, K., Jacob, J., Chen, T. X., Geis, J. A., Oldham, W., Matthews, J., Kantarjian, H., Futreal, P. A., Patel, K., Jones, K. W., Takahashi, K. and Eastburn, D. J., High-throughput single-cell DNA sequencing of acute myeloid leukemia tumors with droplet microfluidics, *Genome Research*, Vol.28, No.9 (2018), pp.1345-1352.
- Roumpea, E., Kovalchuk, N. M., Chinaud, M., Nowak, E., Simmons, M. J. H. and Angeli, P., Experimental studies on droplet formation in a flow-focusing microchannel in the presence of surfactants, *Chemical Engineering Science*, Vol.195, No.23 (2019), pp.507-518.
- Schoeman, R. M., Kemna, E. W. M., Wolbers, F. and van den Berg, A., High-throughput deterministic single-cell encapsulation and droplet pairing, fusion, and shrinkage in a single microfluidic device, *Electrophoresis*, Vol.35, (2014), pp.385-392.
- Seo, M., Paquet, C., Nie, Z., Xua, S. and Kumacheva, E., Microfluidic consecutive flow-focusing droplet generators, *Soft Matter*, Vol.3 (2007), pp.986-992.
- Shahrivar, K. and Giudice, F. D., Controlled viscoelastic particle encapsulation in microfluidic devices, *Soft Matter*, Vol. 17, (2021), pp.8068-8077.
- Shang, L., Cheng, Y. and Zhao, Y., Emerging droplet microfluidics, *Chemical Reviews*, Vol.117, No.12 (2017), pp.7964–8040.
- Tatsumi, K., Kawano, K., Okui, H., Shintani, H. and Nakabe, K., Analysis and measurement of dielectrophoretic manipulation of particles and lymphocytes using rail-type electrodes, *Medical Engineering and Physics*, Vol.38, No.1 (2016), pp.24-32.
- Tatsumi, K., Kawano, K., Shintani, H. and Nakabe, K., Particle timing control and alignment in microchannel flow by applying periodic force control using dielectrophoretic force, *Analytical Chemistry*, Vol. 91, No.10 (2019), pp. 6462-6470.
- Tatsumi, K., Noma, A., Honma, R., Kuriyama, R. and Nakabe, K., Particle timing and spacing control in microchannel flow by applying periodic force over space and time, *Microfluidics Nanofluidics*, Vol.25 (2021), 15.
- Trantidou, T., Elani, T., Parsons, E. and Ces, O., Hydrophilic surface modification of PDMS for droplet microfluidics using a simple, quick, and robust method via PVA deposition, *Chemical Engineering Science*, Vol.195 (2019), pp.507–518.
- Vega, E. J., Montanero, J. M., Herrada, M. A. and Gañán-Calvo, A. M., Global and local instability of flow focusing: The influence of the geometry, *Physics of Fluids* Vol.22 (2010), 064105.
- Velasco, D., Tumarkin, E. and Kumacheva, E., Microfluidic encapsulation of cells in polymer microgels, *Small*, Vol.8, No.11 (2012), pp.1633–1642.
- Wood, C. D., Evans, S. D., Cunningham, J. E., O’Rorke, R., Wälti, C. and Davies, A. G., Alignment of particles in microfluidic systems using standing surface acoustic waves, *Applied Physics Letters*, Vol.92 (2008), 044104.