超音波定在波による液中気泡の制御とその応用

正員 梶山 智 晴 (日立製作所 中央研究所)

非会員 富田 裕 之 (日立製作所 中央研究所)

正員 宮原 裕 二 (日立製作所 中央研究所)

Manipulation of micro air bubbles in a flow-through cell using US standing waves

Tomoharu Kajiyama, Member (Central Research Lab., Hitachi Ltd.)

Hiroyuki Tomita, Non-member (Central Research Lab., Hitachi Ltd.)

Yuji Miyahara, Member (Central Research Lab., Hitachi Ltd.)

We have developed a new method for cleaning flow-through cells by using microbubbles and ultrasonic (US) standing waves. A standing wave generated by US transducers at 1 MHz was used to trap microbubbles at node positions of the sound pressure. We were also able to control the microbubbles' positions spatially through frequency modulation. We found that these microbubbles were very effective for washing microbeads out of flow-through cells, particularly when frequency-modulated US irradiation was used. The proposed method promises to be very useful for cleaning the flow-through cells in small analytical instruments.

キーワード：超音波定在波，周波数変調，マイクロビーズ，フローセル
(US standing waves, frequency modulation, micro beads, flow-through cell)

1. はじめに

化学分析において、固相としてマイクロビーズを利用する方法がよく知られている。これらの例の多くは、試験管壁にマイクロビーズを凝集し、不要成分を除去後、検出試薬を注入して発光等を測定する方法（バッチ処理法）が用いられている。

マイクロ化学分析システム（ μ TAS）では、試料・試薬の取り扱いの簡便化や、測定の連続処理・並列処理の必要性などから、フロースルーシステムの応用が求められている⁽¹⁾。そのため、マイクロビーズ技術とフロースルーシステムとの融合が重要である。

マイクロビーズ技術をフロースルーシステムに応用する場合、測定時にはビーズを流路内の検出器部分に捕捉し、測定後には流路外に排出する。この場合、マイクロビーズをフローセル流路外に排出する効率、即ちフローセルの洗浄効率は、試料間のキャリーオーバーと密接に関係する。従来では、フローセルに溶液を流し、その流体圧力によりマイクロビーズを押し流す洗浄方法が行われていた（従来法⁽¹⁾）。しかし、溶液の流圧のみを用いる方法は、効率が良いとはいえず、限られた時間では十分な洗浄効果が得られない。そのため、洗浄効率を向上する技術が必要である。

超音波は、水溶液中の伝達効率が良く、フロースルーシ

ステムの流路外部から力を作用して流路中のビーズを操作することが可能である^{2, 3)}。この技術では、ビーズが、流路中に形成された超音波定在波場の節部分に集合する性質を応用している。しかし、ビーズに作用する力は半径の3乗に比例するため、直径数マイクロメートルのビーズでは直接作用する力は十分大きいとは言えない。

そこで我々は、超音波の定在波と溶液の電気分解により発生させた気泡を用いた、新しいマイクロビーズの排出方法を検討した。検討結果を以下に報告する。

2. フローセルの構造

図1は、本検討で試作したフローセルの概略図及び波線部分における断面図である。フローセルは、作用電極（WE）、作用電極に対向する対向電極（CE）及び1組の超音波発生素子で構成されている。フローセルの流路幅 D 及び高さ h は、それぞれ5mm及び0.5mmである。2つの超音波発生素子は、流路と厚さ $d=1.5$ mmのガスケットを介して、お互い向き合って配置されている。この超音波発生素子は、矢印方向に分極した縦0.4mm、横10mm、厚さ2mmのPZT系圧電セラミック（型式C-6、富士セラミック社）であり、1MHzの厚み共振モードを有する。

この試作フローセルを用い、従来のフローセル洗浄方法と、超音波定在波と気泡を用いる洗浄方法について、その

洗浄効率を比較した。洗浄効率の評価は、以下の通りである。

まず、発光物質で標識化したマイクロビーズをフローセルの上流側より導入し、作用電極面で捕捉してビーズの発光を測定した（測定値 S_1 ）。次に、比較する各方法でフローセルの洗浄を行い、洗浄後に作用電極表面に残留するビーズの発光を測定した（測定値 S_2 ）。従来法は、セルに洗浄用溶液（水酸化カリウム水溶液）を流しながら作用電極表面で溶液の電気分解を行い、気泡（ O_2 ）を生成させた。この気泡と洗浄溶液の流圧により、電極表面のマイクロビーズを押し流した。

3. 定在波場形成のしくみと気泡への作用

試作フローセルでは、流路に超音波の定在波場を形成することが可能である。超音波発生素子1及び素子2を、それぞれ次式で示す正弦波形状の交流電流 V_1 、 V_2 で駆動する。

$$V_1 = V_0 \sin(2\pi f_1 t + \alpha_1) \quad (1)$$

$$V_2 = V_0 \sin(2\pi f_2 t + \alpha_2) \quad (2)$$

V_0 は駆動交流の電圧、 t は時刻、 f_1 及び f_2 はそれぞれ素子1及び素子2の駆動周波数、 α_1 及び α_2 は位相である。 f_1 と f_2 が等しい条件において、フローセルの流路に定在波が形成される。定在波の節の位置を、 y 座標を用いて記述すると、

$$y = N_{\pm k} \\ = \pm \frac{1}{4}(2k-1) \frac{V_s}{f_1} + \frac{1}{4\pi}(\delta\alpha) \frac{V_s}{f_1} \quad (3)$$

$$\text{ただし、} \delta\alpha = \alpha_2 - \alpha_1 \quad (4)$$

ここで、 $k=1, 2, 3, \dots$ である。また V_s は、流路内における超音波の音速であり、簡単のため周波数に依らず一定であると仮定する。素子間の位相差が無い（ $\delta\alpha=0$ ）場合、式（3）の第2項はゼロとなり、図2で示す定在波場が形成される。

気泡発生時にフローセル流路に超音波を照射すると、気泡と超音波は相互作用する。超音波の周波数が気泡の共振周波数に近い場合、気泡は超音波のエネルギーを吸収して強く振動し、キャビテーション現象を起こすことが知られている⁴⁾。また、気泡の共振周波数以下の超音波を用いて図2の様な超音波定在波を形成すると、堅いビーズの例^{2, 3)}と異なり、気泡は定在波の腹部分にあつま。液中気泡の共振周波数は、気泡の径に依存する。半径 $R[\text{cm}]$ の気泡の共振周波数 $f_{\text{res}}[\text{Hz}]$ は、次の Minneart の近似式で得られる。

$$f_{\text{res}} * R = 332 \quad [\text{Hz} \cdot \text{cm}] \quad (5)$$

図1 フローセルの概略

Fig.1. Device structure.

図2 超音波定在波場

Fig.2. US standing waves in the cross-section of the device.

電気分解で得られる気泡の大きさは、溶液の起泡性、電気分解により供給される気体量、溶液の流速等に依存し、正確な推定は難しい。そのため、洗浄用溶液として水酸化カリウム水溶液をフローセルに流し、作用電極-溶液間電位を、 $V_{WE}=3.0[\text{V}]$ と設定して、その電気分解の様子を観察した。その結果、作用電極表面より直径 $20\mu\text{m}$ 以上の大きさの気泡が多数発生することを確認した。

試作セルの超音波発生素子は、共振周波数 1.0MHz を有する。従って、本実験では、周波数 1.0MHz 付近の定在波を利用する。一方、直径 $20\mu\text{m}$ 以上の気泡の共振周波数は、式(5)より 332kHz 以下である。従って、定在波場の周波数条件は、発生する気泡の共振周波数に対し十分高周波であると言える。この場合の気泡と超音波の相互作用は、キャビテーション領域の場合と著しく異なり、以下の結果を得た。

図3 フローセル洗浄過程の様子
Fig.3. Control of the microbubbles through US irradiation.

4. 超音波定在波による液中気泡の捕捉

フローセルの洗浄過程において、超音波素子1及び素子2を、素子の共振周波数である1.0MHzの正弦波（出力40[W]）で駆動し、流路内に定在波を形成した。図3は、フローセルの洗浄過程をセル上部より撮影した結果である。図3（1）は、流路内に定在波場を形成した場合である。図中の矢印で示す数本の筋は、電気分解で生成した気泡の流れ（気泡流）である。気泡流は、ほぼ定在波場の節の位置に相当する部分に形成されており、超音波の半波長（1.0MHzの場合、約0.75mm）間隔で分布している。ただし、溶液の流れは完全な層流ではなく、多少の乱れが含まれているため、気泡流は厳密な直線性を示してはいない。なお、作用電極表面には、捕捉したマイクロビーズ（写真の白く見えるもの）が見られる。図3（2）は、従来の超音波を照射しない場合である。電気分解で生成する気泡は、作用電極表面に広く薄く分布しており、顕著な集合は見られない。従って、図3（1）で見られた気泡流の筋は、定在波場により形成されたものであるとわかる。図3（3）は、図3（1）の状態から洗浄溶液を取り除いて撮影した結果である。図中の矢印部分は、電極表面に捕捉されていたマイクロビーズが部分的に無くなり、電極表面が露出したため、黒い線として見えている部分である。この部分は、図3（1）の気泡流が定在波に捕捉されていた位置に相当する。また、超音波を照射しない場合、（3）の様な顕著にビーズが無くなる領域は出現しない。そのため、図中の黒い部分に捕捉されていたビーズは、定在波による気泡流によって押し流されて除かれ、セル外に排出されたと考えられる。

この結果、定在波により気泡を捕捉し、その気泡をビーズに作用させることにより、ビーズの除去に利用できることがわかった。そこで、従来の洗浄法と、超音波により定在波場を形成した場合で、洗浄効率を比較した。洗浄効率 η は、ビーズの残留率 C ($C \equiv S_2/S_1$) の逆数として、次式で定義した。

$$\eta = 1/C = S_1/S_2 \quad (6)$$

比較実験により、以下の結果を得た。図4は、フローセルの洗浄時間 T と、洗浄効率 η の測定結果である。図5は、 $T=4.0$ [sec]において、電気分解の電位 V_{WE} を低下させた場合の洗浄効率の変化を示している。電気分解の電位は、流路で生成される気泡量を決定しているため、図5は洗浄効率と気泡量の関係を表している。図6は、 $T=4.0$ [sec]において、超音波素子の駆動電源のパワーを低下させた場合の洗浄効率の変化を示している。これより、以下のことがわかる。

まず、洗浄時間 $T=4.0$ [sec]における比較では、超音波定在波を用いた方法は、従来の洗浄方法に対し約3.3倍の洗浄効率を得られた。また洗浄効率は、生成される気泡量に大きく依存することがわかった。特に、気泡があまり発生しない条件 ($V_{WE}=2.0$ [V]) では、超音波照射の有る場合と無い場合で、洗浄効率がほぼ等しくなることがわかった。また洗浄効率は、照射する超音波の出力にはあまり依存しないことがわかった。

図4 洗浄効率 η の洗浄時間依存性
Fig.4. Time dependence of the washing efficiency.

図5 電気分解電位 VWE と洗浄効率 η

Fig.5. Relationship between the electrolysis potential and the washing efficiency.

以上より、超音波定在波を用いた洗浄方法により、洗浄効率が向上することがわかった。またこの効果は、超音波が直接ビーズに作用した結果ではなく、液中気泡が作用したためであることがわかった。

5. 周波数変調による洗浄効率の改善

定在波の節に捕捉された気泡流は、節に沿って下流に流れて行き、節近辺のビーズを押し流す作用を有する。そこで、定在波の節の位置を流れと垂直方法に移動させ、気泡流の通過する面積を増加させることにより、更に洗浄効率を向上させる検討を行った。

節の位置を周期的に変化させる方法として、周波数変調がある。例えば、素子1及び素子2を駆動する交流の周波数を次式で変調させる。

$$F(t) = f_a + (f_b - f_a) \left\{ \frac{t}{T_M} - \text{INT} \left(\frac{t}{T_M} \right) \right\} \quad (7)$$

ただし、関数 $\text{INT}(x)$ は、実数 x の小数部を切り捨てる関数である。図7は、 $f_a < f_b$ として式(7)を図示したものである。周波数 $F(t)$ は、始点周波数 f_a - 終点周波数 f_b 間を、周期 T_M で単調変化する。

この様に周波数を変調する場合、定在波の節の位置は図8の様に周期的に変化する。縦軸は、節の位置を図2の y 座標で示している。節の位置が、外側から中心に向かって周期 T_M で変化する事がわかる。

以上の方法で、定在波の節位置を周期的に変化させ、気泡流の動きを観察した。図9は、周波数変調を行った場合の気泡流の動きを、セル上部よりビデオカメラを用いて撮影した結果である。図中の矢印は、気泡流の位置を示している。変調条件は、 $f_a = 0.7\text{MHz}$ 、 $f_b = 1.3\text{MHz}$ 、 $T_M = 0.25[\text{sec}]$ とした。各図の説明には、撮影時のおおよその周波数を示した。また、図9(6)は、周波数変調の様子を示した。

図6 照射超音波電力と洗浄効率 η

Fig.6. Relationship between the driving power of the US device and the washing efficiency.

図7 変調した駆動周波数

Fig.7. Time course of the modulated frequency.

図8 節位置の変化

Fig.8. Change in the node positions.

図9 フローセル洗浄過程の様子

Fig. 9. Photographs of the flow-through cell during the washing process.

各撮影結果より、以下のことがわかる。(1)では、気泡流は平行に形成されている。これは、駆動周波数が素子の共振周波数(1.0MHz)と近いため、超音波の照射効率が良く、定在波が確実に形成されているからである。(2)では、駆動周波数が高周波条件となり、気泡流が中心に移動した後、駆動周波数が低周波条件にジャンプするため、その形状が崩れて行く様子が見られる。(3)では、周波数の低い条件で定在波が徐々に形成される様子が見られる。(4)では、気泡流が間隔の広がった状態で現れている。(5)では、(1)と同様な気泡流が形成されている。ただし、(1)と(5)では、撮影時の周波数に差異(TVレート0.5フレーム分:約40kHz)があるため、気泡流の形状は一致しない。以上より、超音波を周波数変調し、定在波の節位置を変化させ、気泡流を動かすことができることを確認できた。

超音波定在波を用いるフローセル洗浄方法に、周波数変調の改良を行い、洗浄時間ごとの洗浄効率を測定した。図10は、図4と周波数変調による洗浄効率の測定結果を、比較したものである。変調条件は、 $f_a=0.7\text{MHz}$ 、 $f_b=1.3\text{MHz}$ 、 $T_M=0.25[\text{sec}]$ とした。これより、以下のことがわかる。

周波数変調法は、洗浄時間 $T=2.0[\text{sec}]$ において、従来法に対し約6.6倍の洗浄効率を得られた。洗浄効率は、試料

図10 洗浄効率 η の洗浄時間依存性

Fig. 10. Time dependence of the washing efficiency.

間のキャリーオーバーと密接に関係し、分析システムの濃度分解能を決定する項目の1つである。そのため、周波数変調法を応用することにより、マイクロビーズを用いるフローセル分析システムの濃度分解能を6倍以上向上することが可能であると言える。また、従来と同等の洗浄効率を得るために必要な洗浄所要時間は、1.5[sec]以下であった。そのため、周波数変調法は、洗浄所要時間の短縮にも有効であることがわかった。

6. まとめ

超音波の定在波と溶液の電気分解により発生させた気泡を用いた、新しいマイクロビーズの排出方法を検討した。

フローセルの流路に、気泡の共振周波数より十分高周波な条件の定在波を、溶液の流れと垂直な方向に形成すると、気泡は定在波の節に集合し、節に沿って気泡流を形成することがわかった。また、その気泡流は、流路中のマイクロビーズの排出に寄与することを確認した。その結果、フローセルの洗浄過程において、流路中に定在波を形成し、気泡流を発生させることにより、フローセルの洗浄効率を向上できることを確認した。

さらに、周波数変調を用いて、定在波の節位置を周期的に変化させた場合、気泡流の位置を周期的に移動させることが可能であることを確認した。その結果、フローセルの洗浄過程において、流路中に周波数変調した定在波を形成し、周期的に位置の変化する気泡流を発生させることにより、フローセルの洗浄効率をさらに向上できることを確認した。

本技術は、マイクロビーズを利用するマイクロ化学分析システムに有効である。

謝 辞

本研究において、様々なご助言をいただきました日立製作所 中央研究所 メディカルシステム研究部 梅村晋一郎氏、ならびに日立製作所 基礎研究所 安田賢二氏に感謝いたします。

(平成11年2月15日受付, 平成11年6月4日再受付)

文 献

- (1) Cy H. Pollema, J. Ruzicka, and et al.: "Sequential Injection Immunoassay Utilizing Immunomagnetic Beads", Anal. Chem., 64, 1356-1361 (1992)
- (2) K. Yasuda, S. Umemura, and et al.: "Concentration and Fractionation of Small Particles in Liquid by Ultrasound", Jpn. J. Appl. Phys., Vol.34, 2715-2720 (1995)
- (3) K. Yasuda and S. Umemura: "Particle separation using acoustic radiation force and electrostatic force", J. Acoust. Soc. Am. Vol.99, No.4, Pt.1, 1965-1970 (1996)
- (4) K. Yosioka and Y. Kawasima: "Acoustic radiation pressure on a compressible sphere", Acustica 5, 167-173 (1955)

梶山 智晴 (正員) 1966年10月2日生。'92年3月筑波大学大学院修士課程理工学研究科修了。同年(株)日立製作所中央研究所入社。主としてX線デジタルラジオグラフィ、生化学分析装置、遺伝子検出技術の研究開発に従事。現在、中央研究所バイオシステム研究室研究員。

富田 裕之 (非会員) 1967年2月3日生。'96年東京大学工学系研究科システム量子工学専攻博士課程修了。工学博士。同年、(株)日立製作所中央研究所入社。生化学分析装置、遺伝子診断の研究開発に従事。現在、中央研究所バイオシステム研究室研究員。

宮原 裕二 (正員) 1956年9月12日生。'85年東京工業大学電気電子工学科博士課程修了。同年、(株)日立製作所入社。'88年から'89年、スイス連邦工科大学客員研究員。現在、中央研究所バイオシステム研究室主任研究員。半導体化学センサ、バイオセンサ、化学センサシステム、 μ TASの研究に従事。工博。