界面近傍のナノスケール流動の可視化*

小方 聡**

Flow Visualization near the Solid-Liquid Interface

Satoshi OGATA

1. 緒 論

近年，工学的スケールの微小化と計測技術の発達とともに，微小スケールの流れ場における流体の流動が注目されている．生物・化学分野においては，物質間の反応促進，実験・製造施設の小型化を目指し，MEMS 技術などを用いたマイクロデバイスが多用されるようになってきた．このような微小スケールではマクロスケールと比較して，流れに及ぼす固液界面の影響が無視できないほど大きい．これは，微小スケール流れが慣性力や重力よりも粘性力や表面張力の影響を強く受けることによる．また，マイクロデバイス内の反応の多くは壁面上で行われることを考慮すれば，壁面極近傍での流体の挙動を知ることは重要であるといえる．

一方，壁面近傍の流動を観察する手法として，エバネッセント光顕微鏡を用いた研究が行われている．エバネッセント光顕微鏡は光の全反射時にしみだす光場（エバネッセント場）を利用することで，壁面から数百 nm の領域のみを背景光なしに観察出来る利点を持つ．このエバネッセント光を用いて，今まで観察が困難であった壁面近傍の流体挙動の観察結果が報告されている．Yoda ら¹⁾は，循環クエット流れの壁面近傍流れを計測し，Kihm ら²⁾は三次元的にナノ粒子を追跡する方法を示している．Jin ら³⁾，小方⁴⁾は壁面近傍の粒子速度を，神田⁵⁾は粒子偏り分布を測定している．また，Pouya ら⁶⁾は従来の蛍光粒子の代わりに量子ドットを用いた壁面近傍での速度測定の可能性について紹介している．さらに，Li ら⁷⁾は親水性および疎水性壁面を流れるニュートン流体のすべり長さを測定している．さらに，嘉副⁸⁾はナノ流路の速度分布を計測している．

本記事では，エバネッセント顕微鏡システムを用い，著者らの研究グループが行ってきた蒸留水の固体壁極近傍（壁面から数百 nm 以内）流動の観察手法と測定結果について解説する⁴⁾．

2. 実験装置および実験方法

光学顕微鏡は回折限界により入射光の波長より小さいスケールの領域に光の焦点を合わせることが不可能であるが，この回折限界を超える画像化技術の一つが全反射蛍光顕微鏡法（TIRFM）であり，界面から数 100nm の領域のエバネッセント場と呼ばれる電磁波を用いる．TIRFM は細胞生物学分野で広く用いられるようになっている．前述したように，近年ではこれをマイクロ流体工学に応用し，壁面極近傍における流動の可視化が可能となることが報告されている．

2.1 顕微鏡システム

Fig. 1 にエバネッセント顕微鏡システムを示す．装置はエバネッセント顕微鏡（Olympus Inc., IX-71），対物レンズ（60 倍 N.A.1.45 W.D. 0.15mm (oil immersion lens)），アルゴンレーザ（波長 $\lambda_0 = 488\text{nm}$ ），ICCD カメラ（Hamamatsu Co., C5909），マイクロチャンネル（Fig. 3），シリンジポンプ（Harvard, PHD-2000），シリンジ（Hamilton Gastight Syringe, 500 μl ）から構成されている．直径 100nm のポリスチレンの蛍光粒子（Molecular Probe, carboxylate-modified microspheres, yellow-green）が供試流体中に体積濃度で $10^{-4}\%$ の割合で混入されている．粒子直径のばらつきは $\pm 2.5\%$ 以内

Fig. 1 Experimental apparatus.

* 原稿受付 2013 年 1 月 7 日

** 正会員 首都大学東京 理工学研究科 (〒 192-0397 東京都八王子市南大沢 1-1, E-mail : ogata-satoshi@tmu.ac.jp)

(a) For transmitted illumination.

(b) For evanescent field illumination $h_n=175.6\text{nm}$.

Fig. 2 Comparison of particles image photo obtained in transmitted illumination and that obtained in the evanescent illumination.

である。

この装置において、アルゴンレーザが臨界角以上で観察面の界面に入射すると、マイクロチャンネル内のガラス表面近傍にエバネッセント光がしみだす。このエバネッセント照明中を流れる蛍光粒子は励起され、生じた蛍光は ICCD カメラに取り込まれる。

上記顕微鏡のマイクロチャンネルの部分のカバーガラスに置き換え、蛍光粒子を混入させた蒸留水をカバーガラスに滴下し、エバネッセント光照明中の蛍光粒子の様子を観察した写真を、通常の透過光と合わせて Fig. 2 (a) および Fig. 2 (b) に示す。Fig. 2 (b) の場合のしみだし深さは $h_n = 175.6\text{nm}$ である。通常の照明の場合 (Fig. 2 (a)), 多くの背景光が観察されるのに対し、エバネッセント照明では図に示すように背景光は観察されず粒子のみのきれいな画像が得られる (Fig. 2 (b))。

Fig. 3 にマイクロチャンネルの詳細と座標系を示す。実験に使用したマイクロチャンネルは高さ $51\mu\text{m}$ 、幅 1mm 、長さ 20mm で観察面はカバーガラス、流路は PDMS である。カバーガラスの測定領域内の表面粗さ

Fig. 3 Test microchannel.

は $Ra = 1.75\text{nm}$ であり、測定領域に対して十分滑らかである。供試流体はシリンジポンプにより一定流量で供給される。実験は流量 $Q = 0.3 \sim 1.4\mu\text{l/min}$ ($Re = 5 \times 10^{-3} = 23 \times 10^{-3}$) で行った。ニュートン流体の場合、この流量範囲では供試マイクロチャンネル内の流れはマクロ的には二次元ポアズイユ流れである。

2.2 速度分布測定方法

Fig. 4 にエバネッセント光照明の輝度の z 方向変化およびエバネッセント光照明中の蛍光粒子の概念図を示す。

エバネッセント光の強度 I はガラス-供試流体の界面からの距離 z に従って指数関数的に減衰する。それは以下の式に示される^{1)~9)}。

$$I = I_0 e^{-z/h_n} \quad (1)$$

ここで、 I_0 は界面における光強度、 h_n はエバネッセント光のしみだし深さを示す。ここで、しみだし深さは以下のように計算される。

$$h_n = \frac{\lambda_0}{4\pi} (n_1^2 \sin^2 \theta_n - n_2^2)^{-1/2} \quad (2)$$

ここで、 λ_0 は入射光の波長、 n_1 はガラスの n_2 は供試流体の屈折率、 θ_n は入射角である。

カバーガラスの屈折率は $n_1 = 1.525$ 、蛍光ポリスチレン粒子が混入した供試流体の屈折率は水と同等の $n_2 = 1.333$ とした。

Fig. 4 に示すようにエバネッセント光の強度 I は界面からの距離の関数で表すことが可能である。蛍光粒子の蛍光強度がエバネッセント光の蛍光強度と同じであると仮定すれば、その粒子の界面からの位置が式 (1) から計算できる。当然のことながら、この状態で得られた画像を PTV 解析すれば、 xy 方向の速度だけでなく、輝度の変化から z 方向の速度を求めることが可能である。

前述したように、エバネッセント光照明を用いて得た粒子画像から粒子の輝度情報を組み合わせれば、流れ方向の速度分布を得ることは可能である。しかしながら、

Fig. 4 z direction dependence of the intensity of the evanescent illumination intensity.

Fig. 5 Concept of velocity profiles measurement using evanescent field illumination.

粒子を輝度ごとに分け解析する必要などがあり、速度分布を得るには手間がかかる。もう少し簡単で視覚的に分かりやすい方法で速度分布を得る手法の開発が必要と考え、入射光の角度でエバネッセント光のしみだし深さが変化する点に着目した。

Fig. 5 に著者らによる本速度分布測定方法の概念図を示す。式(2)から入射角 θ_n を変えることで h_n を変えることが可能であることが分かる。Fig. 6 (a)および Fig. 6 (b)にしみだし深さが $h_n=300.9\text{nm}$ と 124.2nm のときの流動場におけるエバネッセント光照明中の蛍光粒子の写真を示す。Fig. 6 (a)のしみ出し深さ $h_n=300.9\text{nm}$ と比較し、Fig. 6 (b)のしみ出し深さ $h_n=124.2\text{nm}$ の場合、蛍光粒子の輝度が全体的に減少しており、測定される粒子数も非常に少なくなる。これら得られた画像をPTV解析することで、前述したように蛍光粒子の3次元の速度を得ることが出来る。

速度分布は以下のようにして求める。①エバネッセント光のしみだし深さを変化させ、それぞれのしみだし深さで蛍光粒子画像を取得する。②得られた蛍光粒子画像を xy 方向に対してのみPTV (PIV) 解析し、エバネッセント光照明のしみだし深さ内のトレーサ粒子の積算流

(a) $h_n = 300.9\text{nm}$, $\theta = 61.36^\circ$

(b) $h_n = 124.2\text{nm}$, $\theta = 63.81^\circ$

Fig. 6 Particle images in the flow field ($Q=1.0\mu\text{l/min}$).

速の平均値を求める。③得られた積算流速をしみだし深さごとにプロットすることで速度分布が得られる。

2.3 粒子位置検定

前述したようにエバネッセント光のしみだし深さは式(2)で与えられる。しかしながら、エバネッセント光の蛍光強度と実際の粒子の蛍光強度は一致しないことが考えられる。つまり、測定された粒子輝度と実際の粒子位置（壁面からの距離）を検定しなければ、正確な速度分布を得ることは出来ない。そこで、Fig. 6 に示すような検定装置を作製して検定を行った。

Fig. 7 に粒子位置（観察範囲）の検定実験に用いた装置を示す。直径2 mm のステンレス製のボールベアリングがピエゾステージ (Jena GmbH, piezo system TRIOR 100 CAP; 分解能0.8nm) に接続されたピンに取り付けられている。球を蛍光粒子が混入された供試流体に約10秒間浸漬させ、蛍光粒子を球に吸着させた。球表面に吸着した蛍光粒子は全体で十数個程度であり、球のほぼ中心に付着した粒子を検定に用いた。付着位置によって粒子の z 位置が異なるため、検定対象とする粒子が壁面に接触した状態を壁面とし、ピエゾが上下に移動する量と輝度の関係を計測した。本検定ではベアリン

Fig. 7 Experimental apparatus for calibration of the particle position.

Fig. 8 Particle image for calibration.

グ（プローブ）の絶対位置ではなく、基準（接触した位置）からの相対位置を測定していることになる。また、一回の実験は 30s 以内で行っており、蛍光の退色の影響はほとんどないものと考えられる。

Fig. 8 に検定時の粒子画像を示す。蛍光粒子が壁面に接した状態で最大輝度を示し、粒子位置の増加とともに輝度は減少している。得られた粒子の最大輝度と壁面からの距離の関係を測定した。

Fig. 9 に蒸留水における粒子の蛍光強度 I とガラス壁面から粒子中心までの距離 z の関係を示す。粒子が壁面と接触している状態が $z = 50\text{nm}$ である。図より、粒子の蛍光強度はエバネッセント光のしみだし深さに依存し、それは壁面からの距離に対減少することがわかる。また、粒子の観察可能な範囲は入射角の増加とともに減少する。Kanda ら⁹⁾は、しみだし深さが $193\text{nm} < h_n < 306\text{nm}$ の場合に対して、蛍光強度と壁面からの距離の関係を同様の実験により次式のように求めた。

$$z = -0.55 h_n \log(I_0 / I) \quad (3)$$

式(3)は蛍光強度が $(I_0 \times 1/e) < I < I_0$ の範囲で適用できる。比較のため、図中に $\theta_n = 61.40^\circ$ の場合の式(3)の値を破線で示す。図より、本実験結果は従来の式(3)とほぼ一致していることが分かる。Fig. 9 の校正曲線を最

Fig. 9 Calibration results of illuminated intensity and distance from the wall.

Fig. 10 Illumination depth used in this study.

小二乗法で近似し、光強度が $I = 10$ となった位置 z をそれぞれの入射角で求め、しみだし深さ $h_{nr}(=z|_{I=10})$ と定義した。

Fig. 10 にしみだし深さ h_{nr} の測定結果を示す。また、この蛍光強度のばらつきとピエゾステージの分解能をしみだし深さ h_{nr} に換算した結果をエラーバーで示す。図より、しみだし深さの誤差は壁面から離れるほど大きくなるが（最大 3 %）、十分な分解能を持っていることがわかる。しみだし深さ h_{nr} は壁面から離れた位置を除いて式(2)によく一致することを考慮して、後述するしみだし深さ h_{nr} と入射角の関係は前述した式(2)を用いた。

3. 実験結果および考察

Fig. 11 に $h_{nr} = 350\text{nm}$ の場合において約 8000 個の粒子の PTV 解析結果から得られた流れ方向の速度成分 v_x およびスパン方向の速度成分 v_y の分布を示す。PTV 解析においても粒子構成画素中の最大輝度値を用いて h_{nr} を決定している。図中の棒グラフは静止状態における相対頻度を、白抜きのドットは流動状態の相対頻度を示している。また、速度は $0.1\mu\text{m/s}$ の解像度で測定されているが、図は見やすいように $1\mu\text{m/s}$ ごとにデータを集

(a) Streamwise (v_x). (b) Spanwise (v_y).

Fig.11 Histogram of measured velocities in the illuminated area.

計しプロットしてある。

流動条件下では、 v_x の分布は流れ方向に全体的に移動し、ヒストグラムのピークが減少する。このピークの減少はJinら⁵⁾の結果と一致する。このときの平均速度は $v_x=2.57\mu\text{m/s}$ であった。また、 v_y の分布には違いは見られない。

Fig.12に、それぞれのしみだし深さで平均速度を求め重ね合わせ、平均速度分布として表現した結果を示す。図中の実線はニュートン流体の二次元ポアズイユ分布である。この図において、エバネッセント光のしみだし深さ（粒子の観察領域）はFig.10を用いて求めている。

エバネッセント領域内の画像は壁面から校正されたしみだし深さまで（ $0 < z < h_{nr}$ ）のすべての粒子速度を含んでいる。横軸 v はこのしみだし深さで得られた速度を積算し平均した値であるため、平均した壁面からの距離は $h_{nr}/2$ となる。よって、縦軸の z_n は以下のように定義される。

$$z_n = h_{nr}/2 \quad (4)$$

Fig.12より、流量（0.3～1.4 $\mu\text{l/min}$ ）に対する蒸留水

Fig.12 Velocity profiles using the evanescent wave illumination for distilled water.

の平均速度分布は二次元ポアズイユによく一致し、流量の増加とともに速度分布の傾きも増加することがわかる。神田ら⁵⁾はエバネッセント光のしみだし深さ内の蛍光粒子の z 方向分布を測定し、粒子の分布に偏りがあることを明らかにした。流動場での粒子分布の測定は非常に難しく有効なデータはないが、静止流体中と比較し大きく変化しないと仮定し、偏りが z_n に及ぼす影響を求めた。Fig.12の $Q = 0.3\mu\text{l/min}$ の場合に対して、この偏りを考慮した平均位置の変化量（ $z_n = 224\text{nm}$ で最大 -8nm ）にFig.10の検定から得られたしみだし深さに関する誤差の最大値（ $\pm 3.0\%$ ）を加えた範囲を縦軸方向のエラーバーで示す。この結果から明かなように、粒子分布の偏りやしみだし深さに関する誤差が本実験結果に及ぼす影響はほとんどなく、壁面近傍ほど z 方向の誤差の影響が小さくなることが分かる。

速度測定誤差に関して複数回（計10回）の実験による測定データのばらつきの最大値を、Fig.12中の $Q = 0.3\mu\text{l/min}$ 、 $Q = 0.6\mu\text{l/min}$ の場合に対して横軸方向のエラーバーとして示す。エラーバー中の一回り小さい凡例は平均値である。速度に関するばらつきは $z_n = 224\text{nm}$ の位置で最大を示し z の減少とともに小さくなった。これらの結果より、実験データのばらつきが速度測定に及ぼす影響はほとんどなく、速度に関しても十分な分解能で測定が可能であると考えられる。一方、 $0.8\mu\text{l/min}$ 以上の流量に関しては同一しみだし深さでの繰り返し実験はしていないが、データに測定ごとの大きなばらつきはほとんど認められなかった。

Fig.12より、エバネッセント光のしみだし深さを变化させ、そのしみだし深さ内の粒子の積算流速の平均を深さごとに重ね合わせる本研究手法は、壁面極近傍の平均速度分布を得るのに非常に有用な手法であることが示されたと考えられる。本研究では 250nm 以下の領域に対して直径 100nm の粒子を用いた速度分布測定を行っているが、Fig.10の z 方向の測定誤差を考慮すれば、その分解能は測定領域に対して十分であると考えられる。特に、壁面に近づくほど誤差の影響は小さくなる。しか

Fig.13 Velocity profiles using 20 nm tracer particles.

しながら、本研究で測定が不可能であった壁面から100nm以内の領域の流体挙動を明らかにするためには、より小さいトレーサ粒子を用いた測定を行わなければならない。

これを解決するために、直径20nmのトレーサ粒子を用いて同様の測定を行った結果をFig.13に示す。蒸留水の速度分布は壁面極近傍(50nm < z < 200nm)の領域において、二次元ポアズイユとほぼ一致する結果を得た。さらに、Fig.12の粒子径100nmの結果と比較し、より壁面近傍の領域まで速度分布が測定可能であることが分かる。よって、20nm粒子を用いた速度測定は壁面近傍でより有用であることがわかった。しかしながら、100nmの粒子で行った粒子位置検定実験は粒子径が小さすぎるため行えていないため、 z 位置はエバネッセント光のしみだし深さをそのまま用いている。また、流動状態では壁面極近傍にトレーサ粒子がほとんど存在しないため、 $z < 50$ nmの領域のデータは取得できておらず、濃度分布の偏りに関しても考慮しておらず、これに関しても今後の課題であると考えているが、より小さい粒子をトレーサ粒子として使用することで、より壁面近傍の流速が測定可能であることは明らかである。

4. まとめ

エバネッセント光を用い蒸留水のマイクロチャンネル内壁面極近傍の流動特性を実験的に明らかにした。そして、エバネッセント光照明のしみだし深さ内のトレーサ粒子の積算流速の平均値を用いた速度分布測定手法を用いることで、壁面極近傍(100nm < z < 250nm)において、蒸留水の速度分布はニュートン流体の二次元ポアズイユの速度分布とよく一致するという結果を得ることが出来た。

参考文献

- 1) Zettner, C.M., Yoda, M. : Particle velocity field measurements in a near-wall flow using evanescent wave illumination, *Experiments in Fluids*, Vol. 34 (2003) pp. 115-121.
- 2) Kihm, K.D., Banerjee, A., Choi, C.K., Takagi, T. : Near-wall hindered Brownian diffusion of nanoparticles examined by three-dimensional ratiometric total internal reflection fluorescence microscopy, *Experiments in Fluids*, Vol. 37 (2004) pp. 811-824.
- 3) Jin, S., Huang, P., Park, J., Yoo, J.Y., Breuer, K.S. : Near-surface velocimetry using evanescent wave illumination, *Experiments in Fluids*, Vol. 37 (2004) pp. 825-823.
- 4) 小方聡, 神田健介, 小野塚拓也, 楊明: エバネッセント光による壁面極近傍の流動測定に関する研究(高分子添加がマイクロチャンネル内流れに及ぼす影響), *日本機械学会論文集*, B編, Vol. 74, No. 748 (2008) pp. 2452-2458.
- 5) 神田健介, 八木恭平, 楊明: エバネッセント光を用いた壁面近傍の溶液中高分子の可視化, *可視化情報学会論文集*, Vol. 25 (2005) pp. 78-83.
- 6) Pouya, S., Koochesfahani, M., Snee, P., Bawendi, M., Nocera, D. : Single quantum dot (QD) imaging of fluid flow near surfaces, *Experiments in Fluids*, Vol. 39 (2005) pp. 784-786.
- 7) Huang, P., Guasto, J.S., Bureuer, K.S. : Direct measurement of slip velocities using three-dimensional total internal reflection velocimetry, *Journal of Fluid Mechanics*, Vol. 566 (2006) pp. 447-464.
- 8) 嘉副裕, 馬渡和真, 杉井康彦, 北森武彦: エバネッセント波を用いたナノ流路の速度分布計測, *可視化情報*, Vol. 32, (2012) pp. 145-148.
- 9) Kanda, K., Ogata, S., Jingu, K. and Yang, M., Measurement of Particle Distribution in Microchannel Flow Using a 3D-TIRFM Technique, *Journal of Visualization*, Vol. 10, No. 2 (2007), pp. 207-216.