A 3 1 5   2 色 LIF 法を用いたマイクロチャネル流れにおける スカラー量分布計測

佐伯 壮一[○] (山口大医), 兼田 幹也(モリテックス), 秋元宏之 (山口大医)
斉藤 俊 (山口大医), 西田 輝夫 (山口大医), 中村 和行 (山口大医)

Visualization of Scalar Distribution in Microchannel Using 2-Color LIF

Souichi SAEKI, Motoya KANETA, Hiroyuki AKIMOTO, Takashi SAITO,
Teruo NISHIDA and Kazuyuki NAKAMURA

ABSTRACT

This paper presents a novel scalar field measurement for microfluidic devices; “2-Color Laser-induced Fluorescence (2-Color LIF)”. In general, a conventional method (1-Color LIF) strongly depends on the excitation intensity distribution, which is generated by spatio-temporal intensity fluctuation of light itself and configuration of microchannel. In contrast, the proposed method can eliminate the undesirable influence using a ratio-metric technique with two fluorescence images, because fluorescence intensity can be approximately a linear function of the excitation light intensity. Therefore, it is possible to measure the scalar distribution quantitatively and simplify its calibration. In this experiment, this was applied to calibrate between either temperature or pH and normalized ratio value by division between two fluorescence images. Consequently, spatial intensity error can be reduced to about 95% as compared with 1-Color LIF image. The scalar distribution in microchannel was visualized with high resolution $0.24 \mu\text{m} \times 0.24 \mu\text{m}$.

Keywords: Visualization, Microfluidics, Laser-induced Fluorescence, Temperature, pH

1. 緒 論

近年 μ -TASやLabs-on-a-chipなどマイクロオーダーでの化学反応装置や分析装置が発展している⁽¹⁾⁽²⁾。マイクロ流れの駆動には一般に電気泳動が用いられるため、発熱の影響を強く受ける。このためタンパク質の電気親和度を計測するアフィニティー・マイクロチップ⁽³⁾などでは、温度やpHなどのスカラー量の定量的な計測技術が必要不可欠となる⁽⁴⁾。マイクロ流れ場におけるスカラー量計測にはレーザー誘起蛍光法 (LIF) が用いられている⁽⁴⁾⁽⁵⁾。一般に1色の蛍光強度を利用しており (1色蛍光法), 流路形状や壁面反射の影響も含めた励起光強度分布の時空間的な変化に大きく依存するため, リファレンス画像を用いた規格化や各ピクセルにおけるキャリブレーションが提案されている⁽⁴⁾⁽⁵⁾。しかし, 計測位置や流路形状が異なる実験ではキャリブレーションの再施行が必要となる。本研究では, マイクロ流れにおけるスカラー量の定量分布計測法として2色レーザー誘起蛍光法を提案する。マイクロ流

路内におけるpHや温度のスカラー量分布計測に本手法を適用し, その有効性について報告する。

2. 2 色レーザー誘起蛍光法

2 色レーザー誘起蛍光法 (2 色蛍光法)⁽⁶⁾では, 計測スカラー量に対し蛍光強度依存性の異なる蛍光染料を混合した溶液を用いる。照射光により励起された2色の蛍光を分離取得することにより, その蛍光強度比からスカラー量分布を計測する。2種類の染料に対する蛍光強度を I_1, I_2 とすると, 近似的にLambert-Beerの法則に基づき(1),(2)式で表される。ここで, $I_0(x, y, z, t)$ は照射光強度であり時空間的に変動している。 C_1, C_2 は蛍光染料の濃度である。 ϵ_1, ϵ_2 は蛍光染料の吸収係数, ϕ_1, ϕ_2 は蛍光染料の量子収率を表し, 一般的にそれぞれpHおよび温度に依存性を持つ。 z は計測対象上面から計測面までの距離, $\Delta z(x, y)$ は光学系の被写界深度であり, 空間分布を持つと考えられる。また $e^{-(\epsilon_1 C_1 + \epsilon_2 C_2)z}$ は励起光が計測対

Fig. 1 Schematic view of experimental setup. 1. Excitation Filter 470-490nm, 2. Dichroic Mirror 505nm, 3. Dichroic Mirror 565nm, 4. Absorption Filter 510-530nm, 5. Absorption Filter 580nm-

象上部から計測面に到達するまでに蛍光染料に吸収される影響を考慮したものである。

$$I_1 = I_0(x, y, z, t) e^{-(\epsilon_1 C_1 + \epsilon_2 C_2)z} \epsilon_1(pH) C_1 \phi_1(T) \Delta z(x, y) \quad \dots\dots(1)$$

$$I_2 = I_0(x, y, z, t) e^{-(\epsilon_1 C_1 + \epsilon_2 C_2)z} \epsilon_2(pH) C_2 \phi_2(T) \Delta z(x, y) \quad \dots\dots(2)$$

$$\frac{I_1}{I_2} = \frac{\epsilon_1(pH) C_1 \phi_1(T)}{\epsilon_2(pH) C_2 \phi_2(T)} = R(pH, T) \quad \dots\dots(3)$$

1種類の蛍光強度を用いた場合、照射光 $I_0(x, y, z, t)$ の時空間的变化による計測誤差が生じるだけでなく、流路形状に依存した壁面反射、計測深さに依存する蛍光染料の吸収など、結像面における正味の励起光強度が蛍光強度に大きく影響を与える。2色蛍光法では I_1 と I_2 の比 R を計測量とし(3)式で表され、 $I_0(x, y, z, t)$ と $\Delta z(x, y)$ 、さらに励起光吸収の影響 $e^{-(\epsilon_1 C_1 + \epsilon_2 C_2)z}$ をキャンセルすることができる。(3)式より明らかなように、割り算値 R はスカラー量(T, pH)にのみ依存した関数となる。これより、キャリブレーション処理を簡素化するだけでなく、誤差の低減が可能である。しかし、2つの蛍光染料の選定には、スペクトル特性と計測スカラー量に対する蛍光特性を考慮する必要がある。本実験では、温度計測の際には Rhodamine B と Rhodamine 110, pH 計測の際には Rhodamine B と Fluorescein を使用した。

3. 実験方法

図1に計測装置の概略を示す。水銀照明ランプ付き落射型蛍光顕微鏡(BX-51, Olympus)に2カメラアダプタを接続している。蛍光顕微鏡および2カメラアダプタ

Fig. 2 Schematic view of microchannel and observation area

には、それぞれ光学フィルタとダイクロイックミラーを取り付けており、分離された2波長領域の蛍光を2台の冷却CCDカメラ(Cool SNAP cf, Roper Scientific, B/W, 1392×1040 pixels, 12bit)に同時取得できる。本実験では各染料のスペクトル分布を考慮し、470nm~490nmの波長光により蛍光励起する。励起蛍光をダイクロイックミラーにより565nmにおいて分離し、Rhodamine 110およびFluoresceinの蛍光は510nm~530nm, Rhodamine Bの蛍光は580nm以上の波長の蛍光画像として同時取得する。なお2台のカメラの画像アライメントは、実験前にマイクロ校正プレパラートを利用し、手動および画像の平行移動によって一致させた。蛍光顕微鏡の対物レンズには、水浸レンズ(Uapo/340 20×W, N.A=0.7)と油浸レンズ(UplanApo 20×Oil, N.A.=0.8)を使用した。被写界深度 Δz は水浸レンズおよび油浸レンズに対し、それぞれ約1.7μmと約1.5μmと算出され⁽⁷⁾、後述する計測対象流路の深さ(40μm)に対して十分小さい。計測位置はマイクロ流路上面から約10μmに固定した。暗電流ノイズとショットノイズの画像処理を行った後、(3)式よりRhodamine Bの蛍光像をRhodamine 110もしくはFluoresceinの蛍光像で除した割り算強度により算出した。なお、撮影シャッタースピードは撮影蛍光強度を考慮して300msに設定した。

図2に示すパイレックスガラス製T字型マイクロチャネル(幅100μm, 断面深さ40μm)を使用した。流路下面は等方性ウェットエッチングのため半円の断面形状である。流入側両端から500μlシリッジとマイクロシリッジポンプ(kd Scientific; IC3101)を用いて溶液を流入し、流路内に溶液が満たされたのち流出側を密封する。観察領域は流路合流部付近の334μm×250μmであり、CCDカメラの空間分解能は1画素分の0.24μm×0.24μmである。実験溶液は蛍光染料と蒸留水を混合して作成した。Lambert-Beer則を満たすため、染料濃度は低く設定する必要があるだけでなく、計測感度は染料濃度比にも依存する。このため本実験では、温度実験およびpH実験においては、それぞれ以下のように設定しキャリブレーションを行った。

温度計測実験においては、アクリル製小型水槽内にマイクロチャネルを固定し水没させ、恒温槽で一定温度に保たれた水をマイクロポンプによって小型水槽に環流させることにより、マイクロチャネル内温度を恒温化した。

Rhodamine 110 と Rhodamine B の濃度を 0.002 m mol / l と 0.02 m mol / l に固定し、濃度比を 0.1 に設定しキャリブレーションを行った。一方、pH 計測実験においては、蒸留水と蛍光染料これに酢酸またはアンモニア水を混合し、各 pH 値の溶液を 7 つ作成した。作成溶液の pH 値はデジタル pH 計測器 (Hanna, Piccolo II ; pH 誤差 ± 0.01) を用いて測定した。pH 計測の際には、Fluorescein と Rhodamine B の濃度を 0.01 m mol / l と 0.02 m mol / l に固定し、濃度比を 0.5 としキャリブレーションを行った。

4. 実験結果および考察

20.0℃の温度条件における Rhodamine B の規格化蛍光強度分布と規格化割り算強度分布を、それぞれ図 3(a)(b) に示す。Rhodamine B の蛍光強度は流路中心部で大きく、壁面へ向かうにつれて減少している。これは励起光および蛍光自体が壁面反射により、流路中央部において強度が高くなるためである。1 色蛍光法では、多点の画像位置におけるキャリブレーションを施行しなければならないことが理解できる。一方、図 3(b)より、割り算強度分布では、蛍光強度の空間的なばらつきが大幅に低減されている。同様な結果は pH 計測においても確認できた。これより、各ピクセルに対応したキャリブレーションや流路形状に応じたキャリブレーションを行う手間が省け、簡素化することが可能となるだけでなく、画像邊緣部においてもスカラー量分布の計測が可能である。

4.1 温度計測 図 4 に、流路内全体における割り算値を用いて温度校正曲線を算出した結果を、標準偏差 (95% 包括) の誤差バーと共に示す。図 4(a)より、高温になるにつれて Rhodamine B の蛍光強度が下降するのに対し、Rhodamine 110 の蛍光強度はほとんど変化しない。これにより、割り算値は温度依存性を有する (図 4(b))。また、誤差バーで表されるばらつき誤差が大幅に低減されており、1 色の蛍光強度のばらつき誤差と比較して平均 95% 低減している。割り算値の温度校正曲線を線形近似することにより、20℃から 55℃の温度範囲において 1.48 %/K の温度感度を有している。この温度感度は Sakakibara ら⁽⁶⁾によって算出されたマクロ条件下におけるキャリブレーション結果とほぼ同等であり、2 色蛍光法はマクロやマイクロオーダーの計測条件を問わない手法であることがわかる。更に、温度計測の誤差解析として、キャリブレーションカーブによって算出された計測値と真値との標準偏差を、全ピクセルから算出した結果、温度計測精度を $\pm 0.66^\circ\text{C}$ に抑えることが可能であった。

4.2 pH 計測 図 5 に各 pH に対する、Fluorescein と Rhodamine B の蛍光強度のキャリブレーション結果を示す。図 5(a)より、高 pH になるにつれて Fluorescein の蛍光強度は上昇するのに対し、Rhodamine B の蛍光強度はほとんど変化しな

Fig. 3 Normalized intensity distribution, (a) Rhodamine B (b) RATIO (T=20.0℃)

いことが分かる。また、蛍光強度が大きくなるにつれて誤差も大きくなっているが、これは流路壁面での反射の影響が大きくなり、蛍光強度のばらつきが大きくなるためと考えられる。一方、図 5(b)より、2 色蛍光の割り算値の場合 pH 感度は Fluorescein 単体より若干低減するものの、その強度の空間ばらつき誤差は 80% 以上低減している。割り算値に対する pH のキャリブレーションカーブを 3 次多項式で近似し、計測精度の平均値を求めたところ ± 0.14 であり、計測領域として重要である中性領域 (pH=6.05 ~ 8.26) では ± 0.1 以下に抑えることが可能であった。

これらの結果から、本提案手法はピクセル毎である $0.24 \mu\text{m} \times 0.24 \mu\text{m}$ の空間分解能を有するため、従来の計測手法⁽⁴⁾⁽⁵⁾と比較して高分解能であるだけでなく、励起光強度分布の影響を軽減した計測量 R を用いるため、画像位置ごとのキャリブレーション処理を省き誤差を低減可能である。また 1 色蛍光法では、キャリブレーション測定時とスカラー量計測の際に計測対象位置をマイクロオーダーで一致させることは不可能であるため、画像位置ごとのキャリブレーションカーブを対応する画像位置に適用することは、実際上困難であると考えられる。更に、計測面の奥行き位置を変化させた場合や、奥行き方向にスカラー量分布がある体系では、(1)(2)式から明らかなように、計測面までの励起光吸収量が変化するため計測誤差が生じると考えられる。これに対し、本提案手法

Fig.4 Calibration curve between temperature and normalized intensity, (a) Rhodamine B and Rhodamine 110 (b) RATIO

は同時に2つの蛍光画像を取得し、励起光強度分布だけでなく奥行き方向の励起光吸収の影響もキャンセルすることが可能であるため、攪拌制御⁽⁸⁾などの奥行き方向にスカラー量分布が発生する非定常な計測対象に対しても適用可能であると考えられる。

5. 結 言

マイクロ流れにおけるスカラー量分布計測に対して、2色レーザ誘起蛍光法を提案し、マイクロチャネル内における温度計測および pH 分布計測の有効性について検討を行った。本提案手法により、励起光の空間分布をキャンセルし計測誤差を低減できることが分かった。その計測精度は、pH 計測の平均確度 ± 0.14 、温度計測の平均確度 $\pm 0.66^\circ\text{C}$ 、温度感度 $1.48\%/\text{K}$ を有する。空間分解能は $0.24\ \mu\text{m} \times 0.24\ \mu\text{m}$ であり、高精度な定量分布計測が実現できる。従来の1色蛍光法と異なり流路形状が異なる場合のキャリブレーションの再試行や、多点の画像位置におけるキャリブレーション処理などを、簡略化することが可能であった。上記の結果より、本提案手法はマイクロチャネルにおける可視化定量計測として有効な手法であることが分かった。

Fig.5 Calibration curve between pH and normalized intensity, (a) Rhodamine B and Fluorescein (b) RATIO

参 考 文 献

- 1) Darwin R. Reyes, et al., "Micro Total Analysis Systems: 1. Introduction, Theory and Technology", Anal. Chem., Vol. 74, 2002, pp.2623-2636.
- 2) P. A. Auroux, et al., "Micro Total Analysis Systems: 2. Analytical Standard Operations and Applications", Anal. Chem., Vol. 74, 2002, pp.2637-2652.
- 3) K. Nakamura and K. Takeo, "Affinity electrophoresis and its applications to studies of immune response", J. Chromatography B, 715 (1998), pp.125-136.
- 4) D. Ross, M. Gaitan and L. E. Locascio, "Temperature Measurement in Microfluidic Systems using a Temperature-dependent Fluorescence Dye", Anal. Chem., Vol.73, 2001, pp.4117-4123.
- 5) K. Shinohara, et al., "Rapid proton diffusion in microfluidic devices by means of micro-LIF technique", Experiments in Fluids, Vol.38, 2005, pp.117-122.
- 6) J. Sakakibara and R. J. Adrian, "Whole Field Measurement of Temperature in Water using Two-Color Laser Induced Fluorescence", Experiments in Fluids, Vol.26-1/2, 1999, pp.7-15.
- 7) C. D. Meinhart, S. T. Wereley and J. G. Santiago, "PIV measurement of a microchannel flow", Experiments in Fluids, Vol.27, 1999, pp.414-419.
- 8) M. H. Oddy, J. G. Santiago and J. C. Mikkelsen, "Electrokinetic Instability Micromixing", Anal. Chem., Vol. 73, 2001, pp.5822-5832.