C203

高速共焦点スキャナを用いた マイクロPIVシステムの開発とその応用*

木下 晴之[○], 大島 まり, 金田 祥平, 藤井 輝夫(東大生研)

Development and Application of Micro-PIV System Using High-speed Confocal Scanner

Haruyuki KINOSHITA, Marie OSHIMA, Shohei KANEDA and Teruo FUJII

ABSTRACT

We have developed a confocal micro-PIV system that enables us to measure and visualize the velocity field in a thin planar region of micro flows. The confocal slice images can be captured with up to 2,000 fps using the high-speed laser-scanning confocal microscopy and a high-speed camera. We can measure the micro flow in the horizontal region of $240\ \mu\text{m} \times 180\ \mu\text{m}$ with the in-plane resolution of $9.6\ \mu\text{m} \times 9.6\ \mu\text{m}$ and the out-of-plane resolution of $1.9\ \mu\text{m}$ using the present system. The confocal micro-PIV system is applied to the internal flow measurement of a small droplet that is transported in a square microchannel with the size of $100\ \mu\text{m} \times 100\ \mu\text{m}$. The result shows the fluid inside a droplet circulates three-dimensionally and intricately.

Keywords: Confocal microscopy, High-speed confocal scanner, Micro-PIV, Droplet

1. 結 論

近年, さまざまな科学分野においてマイクロ流体デバイス¹⁾の研究や開発, およびその応用がさかんに行われている. マイクロ流体デバイスは, とくに生物学, 生化学の分野における活躍がめざましい. μTAS (Micro-Total Analysis Systems)²⁾に代表されるような総合的な生化学分析を目指したマイクロ流体デバイスには, マクロな分析装置を用いた場合に比べて, 装置がコンパクトで必要なサンプルや試薬が少なくすむことに加えて, 分析時間が短い, 高精度の分析が可能, 同時並列処理が容易である, といった数多くのメリットがある. それゆえにマクロスケールの機器に代わる将来の新しい生化学分析デバイスとしての期待も大きい.

μTAS 等のマイクロ分析デバイスでは, そのほとんどの操作・処理を, 流体を媒介して行うため, デバイス内部での流体の挙動がその性能や効率を左右する重要な要因となっている. そこで, 最近のデバイス開発の現場では, マイクロ環境下での流動現象を知ることへの要求が高まっている. 筆者らの研究グループではこれまでに, マイクロ流路内の流動を調べるための可視化・計測ツールとして, マイクロPIVの開発を行ってきた³⁾. 本研究では, マイクロPIVの発展技術として, 共焦点顕微鏡法を利用した「共焦点マイクロPIV」に注目し, その開発および構築を行うことを目的とする.

共焦点マイクロPIVを用いることで, 従来のマイクロPIVの抱える問題点の一つである被写界深度の問題を,

光学的に解決することができる. $1\ \text{mm}$ 以下の計測領域を対象にするマイクロPIVでは, マクロスケールでのPIVのように薄いシート状のレーザ光を利用した二次元断面撮影が事実上不可能である. したがって, 落射または透過照明により流れ場全体をボリューム照明し, 顕微鏡光学系のもつ被写界深度内に含まれるトレーサ粒子のみを断面像として記録し, 任意の深さ位置での流速分布測定を行っている. 共焦点マイクロPIVでは, マイクロPIV手法に共焦点顕微鏡法を導入することで, 計測体積の任意の深さ位置において, ボリューム照明の場合に比べて, より鮮明な二次元断面内トレーサ粒子像を取得できる. 共焦点顕微鏡法をPIVに応用する場合, 最大の障害となるのはその時間分解能の低さであった. 共焦点顕微鏡法では, 共焦点スポットで平面あるいは三次元空間内を走査することで, 断面像あるいは立体像を再構築するという方法が一般的である⁴⁾. したがって一つの対象を走査するのに数秒から数分の時間を要することになり, 移動するトレーサ粒子群の分布像を瞬時に, かつ連続的にとらえなければならないPIVには不向きであった. しかしながら高速共焦点スキャナの登場⁵⁾により, ある任意の一断面内を短時間で走査することが可能になり, 共焦点顕微鏡法を利用した共焦点マイクロPIVが実現できるようになった⁶⁾.

本研究ではまず, 高速共焦点スキャナを用いた共焦点マイクロPIVシステムを構築する. つぎに, 実際のマイクロ流れへの適用例として, マイクロチャネル内を移動する微小液滴の内部流動の可視化・計測を行う.

2. 共焦点マイクロ PIV

2.1 高速共焦点スキャナの原理

共焦点マイクロ PIV システムにおけるもっとも重要な構成要素は、高速共焦点スキャナである。本システムでは、ニボウディスク方式共焦点スキャナ CSU22 (横河電機)⁵⁾を採用している。ここでは高速共焦点スキャナ CSU22 の原理、構成、仕様について説明する。CSU22 では、ニボウディスクから射出される約 2,000 本のビームを利用したマルチビーム走査を実現しているため、高速スキャニングが可能となっている。

ニボウディスク方式のマルチビーム走査の原理を Fig. 1 に示す⁷⁾。共焦点スキャナは、多数のマイクロレンズが配置されたマイクロレンズアレイディスク (以下、MLD)、それと同一パターンでピンホールが配列されたピンホールアレイディスク (以下、PHD)、ダイクロイックミラーという三つの基本要素で構成される。MLD と PHD は対向する形で結合されており、5,000 rpm で回転運動している。入射したレーザ光は、各マイクロレンズで集光されてダイクロイックミラーを透過した後、対応するピンホール位置において焦点を結ぶ。ピンホール面は観察標本面と光学的に共役な位置関係にあるため、レーザ光は対物レンズを通過したあと観察標本面でも集光する。集光したレーザ光で照明された標本 (PIV の場合はトレーサ粒子) は蛍光を発し、その蛍光は対物レンズで集光されて再びピンホール面で集光する。ピンホールを通過した蛍光は、ダイクロイックミラーで反射され、光学フィルターを通ったあと観察側へ伝達され、共焦点画像として観察または記録される。マイクロレンズとピンホールは、らせん曲線上に等間隔で密に配置されており、そのパターン配置を工夫することで、一断面を撮影するのに要する時間がわずか 0.5 msec (毎秒 2,000 コマ) という高速共焦点撮影を実現することに成功している。

2.2 計測システム

高速共焦点スキャナを用いて共焦点マイクロ PIV システムの構築を行った。Fig. 2 にその計測システムの構成図を示す。計測システムは主に、顕微鏡、高速共焦点スキャナ、CW レーザ、高速度カメラの四つの要素で構成されている。顕微鏡には、高 NA 油浸対物レンズ (PL APO CS 40x/1.25-0.75 HCX, Leica Microsystems) を搭載した倒立型顕微鏡 (DMIRE2, Leica Microsystems) を用いている。共焦点スキャナ (CSU22, 横河電機) の照明光源として、波長 532 nm の高輝度 CW グリーンレーザ (Excel 1500, Laser Quantum Ltd.) を採用している。トレーサ粒子として用いたのは、直径 0.5 μm の蛍光ポリスチレン粒子 (R500, Duke Scientific Corp.) で、励起波長 542 nm、蛍光波長 612 nm の蛍光スペクトル特性をもつ。共焦点スキャナには、レーザ光波長とトレーサ粒子の蛍光特性にあわせたダイクロイックミラ

Fig. 1 Nipkow disk-based confocal scanner

ーと光学フィルターがセットされている。共焦点スキャナで形成された共焦点画像は、高速度カメラ (Phantom v7.1, Vision Research Inc.) で撮影される。フルフレーム 800 x 600 pixel の高感度 CMOS カメラで、最大撮影速度は 4,800 fps である。ただし、共焦点スキャナの画像形成速度 2,000 fps と同期させるため、本システムでは 2,000 fps で動作させている。高速度カメラで撮影された時系列共焦点画像は、PC へ転送された後、PIV 解析される。ニボウディスク方式の共焦点スキャナでは、走査方向が二次元平面内に限定されているため、深さ方向へ走査することができないが、本システムでは、対物レンズ・対物レボルバー間にピエゾ駆動振動デバイス (RT3D, 横河電機) を組み込むことでその欠点を補っている。RT3D を用いることで、焦点面を深さ方向へ分解能 0.1 μm 、最大ストローク 100 μm 、最大周波数 10 kHz で精密移動させることができる。

共焦点マイクロ PIV システムの仕様は以下のとおりである。上記の顕微鏡光学系構成における観察領域 (計測領域) は約 240 μm x 180 μm (= 800 pixels x 600 pixels)、画像解像度は 0.29 μm /pixel、PIV 解析手法として最も単純な相関領域 32 pixels x 32 pixels の直接相互相関法を用いた場合で、計測解像度 9.6 μm x 9.6 μm で速度分布を測定することができる。一方、時間分解能については、一画像の掃引を完了するのに要する時間は 0.5 msec、よって PIV 画像としての時間間隔は 0.5 msec 以上となり、計測可能な流速範囲は概算で 1

Fig. 2 Schematic illustration of confocal micro-PIV system

mm/sec 以下の比較的低速域の流れに限られることがわかる。それ以上の速い流れに対しては走査が追いつかず、移動するトレーサ粒子の瞬時静止画像を取得できないために、PIV 計測は困難になる。

共焦点マイクロ PIV の最大の利点は、レーザシート光でスライス撮影したような、鮮明な流路の断面粒子分布画像を得られることである。Fig. 3 (a) に示すように、従来のマイクロ PIV では、落射あるいは透過照明によって、計測したい流路全体をボリューム照明しているために、焦点面以外のトレーサ粒子も励起されて蛍光を発生し、焦点の合っていない不鮮明な像として撮影されてしまう。マイクロ PIV では、焦点面を中心にして、そこにある粒

Fig. 3 Depth-of-field of micro-PIV measurement

子の像が画像相関法に影響を及ぼす深さ方向の範囲のことを計測深度 (Measurement depth, MD)⁹⁾ として定義し、深さ方向の計測解像度と見なすのが一般的である。高倍率、高 NA の対物レンズを用いた場合、計測深度は $2\sim 3\ \mu\text{m}$ 程度にまで小さくなるものの、計測深度外の粒子の影響を完全に除去することはできず、とくに流路が深く焦点面前後にトレーサ粒子が多く存在する場合は、画像コントラストの低下や S/N 比の悪化は避けられない。

共焦点マイクロ PIV では、Fig. 3 (b) のように、焦点面のごく近傍の粒子のみが照明されて、さらにその狭い領域のトレーサ粒子から発生された蛍光のみが観察される。それ以外の粒子からの光は光学的に遮断される仕組みになっているため、高い画像コントラスト、良好な S/N 比の粒子画像を得ることができる。したがって、共焦点マイクロ PIV においては、トレーサ粒子を標本としたときの被写界深度がすなわち計測深度であると定義することができる。実際に直径 $0.5\ \mu\text{m}$ のトレーサ粒子を用いて被写界深度を測定した結果、本計測システムの被写界深度は $1.88 \pm 0.11\ \mu\text{m}$ となった。この被写界深度が共焦点マイクロ PIV システムの深さ方向計測解像度となる。

Fig. 4 Schematic diagram of droplet formation in a T-shaped microchannel

3. 液滴内部流れへの適用

3.1 実験システム

共焦点マイクロ PIV システムを用いた計測例として、マイクロチャンネル内を移動する微小液滴の内部流動の計測を行った。はじめに計測対象であるマイクロチャンネル内を移動する微小液滴の生成について述べる。計測対象の概略図を Fig. 4 に示す。用いた流路は、PDMS (polydimethylsiloxane) によるソフトリソグラフィ法で作成した幅 $100\ \mu\text{m}$ 、深さ $100\ \mu\text{m}$ の T 字型マイクロチャンネルである。メインチャンネルには連続相として流量一定 ($0.167\ \mu\text{L}/\text{min}$) でシリコンオイル (KF-6002, 信越シリコン) が流れており、T 字路部分で同じく流量一定 ($0.100\ \mu\text{L}/\text{min}$) の蒸留水-グリセリン混合液と合流する。合流部分では、流体の駆動圧力と表面張力のバランスによって、蒸留水-グリセリン混合液が周期的に液滴を形成し、分散相となる。液滴は周期 $0.36\ \text{Hz}$ で連続的に生成され、その移動速度は $0.25\ \text{mm}/\text{sec}$ である。液滴の移動速度を代表速度に、液滴の大きさを代表長さにした場合の Reynolds 数は約 3×10^{-3} となる。連続相と分散相の液液界面での光の屈折の影響を無視できるように、両相ともに屈折率を流路の PDMS と同一の 1.412 に調整している。分散相には PIV 用のトレーサ粒子 R500 を体積濃度 0.4% で分散させているため、液滴内部の流動のみを可視化計測することができる。計測は T 字分岐部からメインチャンネルに沿って約 $2\ \text{mm}$ 後流へ下った位置で行った。

共焦点マイクロ PIV の計測条件を以下に示す。共焦点撮影は、フレームレート $500\ \text{fps}$ 、露光時間 $1\ \text{msec}$ で行った。本共焦点システムを用いると、最大フレームレート $2,000\ \text{fps}$ 、最短露光時間 $0.5\ \text{msec}$ での撮影も可能であるが、本実験の実験条件下では、流れは低速域に限られるため、上記の計測条件で十分 PIV 計測が可能である。

3.2 計測結果

共焦点マイクロ PIV によって得られた粒子画像を Fig. 5 に示す。マイクロチャンネル内を移動する液滴の中央断面での粒子画像である。Fig. 5 より、共焦点マイクロ PIV では、鮮明で良好な S/N 比の粒子画像を得られるこ

Fig. 5 Particle image obtained by confocal micro-PIV system

とがわかる。次に、液滴内部の流動を計測した結果を Fig. 6 に示す。液滴内部の流動構造を調べるために合計 6 断面で計測を行った。相關領域 32 pixels x 32 pixels の直接相互相関法で速度解析している。微小液滴が撮影領域を右から左へ移動しているときの液滴内部の瞬時速度場である。液滴内部の相対的な挙動を見るために、液滴移動速度を差し引いた相対速度分布を示している。Fig. 6 より、液滴内部には複雑な循環流が発生し、壁面近くの断面と中央付近の断面ではその回転方向も異なっていることがわかる。したがってマイクロチャンネル内を移動する液滴の内部では、複雑で三次元的な流動になっていると推察される。

4. 結論

本研究では、マイクロ PIV の顕微鏡光学系に高速共焦点スキャナを用いた共焦点マイクロ PIV を開発、構築した。最大で毎秒 2,000 コマの撮影速度で共焦点画像を取得することができ、 $240\ \mu\text{m} \times 180\ \mu\text{m}$ の領域を流れる流速 $1\ \text{mm/sec}$ 以下の低速マイクロ流れの二次元断面速度分布を計測することが可能である。さらに共焦点マイクロ PIV を幅 $100\ \mu\text{m}$ 、深さ $100\ \mu\text{m}$ のマイクロチャンネル内を移動する微小液滴の内部流動の計測に適用し、従来のマイクロ PIV では得られなかった鮮明な断面粒子分布画像を得ることに成功した。さらに共焦点マイクロ PIV で異なる深さの断面流速分布を計測することで、液滴内部の複雑な三次元的流動を捉えることができた。共焦点マイクロ PIV は、マイクロ流体デバイス内の流動現象を調べるための有効なツールである。

参考文献

- 1) 例えば, Hong, J. W., Quake, S. R.: Integrated nanoliter systems, *Nature Biotechnology*, Vol. 21, No. 10 (2003), pp. 1179-1183.
- 2) 例えば, Burns, M. A., Johnson, B. N., Brahmamandra, S. N., Handique, K., Webster, J. R., Krishnan, M., Sammarco, T. S., Man, P. M., Jones, D., Heldsinger, D.,

Fig. 6 Relative velocity distribution inside a moving droplet

Mastrangelo, C. H., Burke, D. T.: An integrated nanoliter DNA analysis device, *Science*, Vol. 282 (1998), pp. 484-487.

- 3) Kinoshita, H., Oshima, M., Kaneda, S., Fujii, T., Saga, T., Kobayashi, T.: Application of micro PIV to measurement of flow in various designs of microchip, *Proceedings of 7th International Symposium on Fluid Control, Measurement and Visualization* (2003), 216.
- 4) Webb, R. H.: Confocal optical microscopy, *Reports on Progress in Physics*, Vol. 59, No. 3 (1996), pp. 427-471.
- 5) Kawamura, S., Negishi, H., Otsuki, S., Tomosada, N.: Confocal laser microscope scanner and CCD camera, *Yokogawa Technical Report*, Vol. 33 (2002), pp. 17-20.
- 6) Park, J. S., Choi, C. K., Kihm, K. D.: Optically sliced micro-PIV using confocal laser scanning microscopy (CLSM), *Experiments in Fluids*, Vol. 37 (2004), pp. 105-119.
- 7) Tanaami, T., Otsuki, S., Tomosada, N., Kosugi, Y., Shimizu, M., Ishida, H.: High-speed 1-frame/ms scanning confocal microscope with a microlens and Nipkow disks, *Applied Optics*, Vol. 41, No. 22 (2002), pp. 4704-4708.
- 8) Meinhardt, C. D., Wereley, S. T., Gray, M. H. B.: Volume illumination for two-dimensional particle image velocimetry, *Measurement Science and Technology*, Vol. 11 (2000), pp. 809-814.