シースフローチャンバの研究*

(第2報, マイクロマシニングによる低圧力損失フローチャンバ)

三宅 亮^{*1}, 大木 博^{*2}
山崎 功夫^{*1}, 高木 武夫^{*1}

Investigation of Sheath Flow Chambers for Flow Cytometers (2nd Report, Micro machined Flow Chamber with Low Pressure Loss)

Ryo MIYAKE, Hiroshi OHKI,
Isao YAMAZAKI and Takeo TAKAGI

A new type of sheath flow chamber with low pressure loss is developed using micro machining. The chamber is formed by laminating three 100- μm -thick, photo etched, metal plates. The device uses sheath-flow geometry; particles in suspension, which enter the chamber via an axial specimen nozzle, are enveloped by a buffering sheath-flow and transported to a capillary tube with cross section of 300 μm $\times$ 300 μm . A finite-element viscous-flow analysis is used to examine the flow behavior in the quasi-two-dimensional passage configuration to which produces fluid-dynamic focusing flow. Experimental measurement shows a smooth constricted sheath-flow and pressure loss was reduced to one-tenth in comparison with the conventionally used glass flow chamber.

Key Words: Flow Cytometer, Sheath Flow, Micro machining, Viscous Flow Analysis, Medical Equipment

1. 緒 言

血球, がん細胞, 尿中粒子など生体粒子を対象とした臨床検査分野では, 従来の顕微鏡観察に代わり, フローサイトメータによる診断が注目されている。フローサイトメータは, 生体粒子を含んだ試料液を細く絞って顕微鏡下に流し, 次々に通過する粒子に対しレーザ等を照射して, 各粒子の濃度・サイズ・性状などを短時間のうちに計測する装置である⁽¹⁾⁽²⁾。粒子群の統計的・集団的性質が取扱えるようになるため, 計測の精度が飛躍的に向上するほか, わずらわしい顕微鏡検査の手間が省けるため, 省力化に著しい効果がある。しかしながら研究用として開発されたフローサイトメータを, 臨床検査分野に広く普及させていくには, 装置の小形化, 低価格化, 単位時間あたりに検査できるサンプル数(処理速度)の向上等が重要な課題となる。これらの課題はフローサイトメータの流路システムに深くかわかり, 中でも試料液を顕微鏡下に導く流体デバイス, シースフローチャンバの性能に左右されるところ

ろが大きい⁽³⁾。シースフローチャンバは, 図1に示すように, 試料液をシース液で包みこんで毛細管に縮流させ, シースフローと呼ばれる直径数十 μm の非常に細い試料液の流れを作り出し細胞一つ一つを順次顕微鏡下に導く(流体力学的焦点合せ: Fluid-dynamic focusing と呼ばれる)装置である。現状のフローサイトメータでは, 図1に示すような, ガラス製の毛細管をもつチャンバが一般的に用いられているが⁽³⁾⁽⁴⁾, 高価なうえ, 製作精度の管理が難しく, またガラス製の

Fig. 1 Sheath flow chamber⁽³⁾⁽⁴⁾

* 原稿受付 1995年9月22日.

^{*1} 正員, (株)日立製作所機械研究所 (〒300 土浦市神立町502).

^{*2} 正員, (株)日立製作所笠度工場 (〒744 下松市大字東豊井794).

ため破損しやすく取扱いに注意が必要である。さらに毛細管での大きな圧力損失のため、送液に 100 kPa 以上の圧力が必要で、そのため高圧・大形のポンプ⁽⁴⁾および高耐圧の流路システムを必要としている。そこで本研究では、このガラス製フローチャンバの製作性・使い勝手の悪さ、圧力損失の問題などを解決することを目的に、マイクロマシニングを利用した新しいシースフローチャンバ(以下マイクロフローチャンバと呼ぶ)を提案・試作し、その有用性について検討した。以下2章では、マイクロフローチャンバの構成について説明し、次に流れ解析による流路形状の検討、最後に試作したマイクロフローチャンバでシースフローが形成されているかなど、基本的な性能の評価について述べる。

2. マイクロフローチャンバ

第1報では、試料液の放出ノズルを毛細管入口に近接させると、広い試料液の流量範囲で安定なシースフローが実現するという結果を得た⁽³⁾。ノズルを毛細管入口に近づけると、チャンバ全体をコンパクトにでき、フローチャンバが扱いやすくなる。しかし一方で、ノズルを毛細管入口に近づけていくと、ノズル周囲のシース液流れが加速していくため、ノズル先端で流れがはく離し、渦を放出してシースフローに乱れを与え始める。これを避けるためには、ノズルを微小化するのが有効であるが、現状のガラス加工技術では精度よく

微小なノズルを作ることは難しい。そこでノズルを含めたシースフローチャンバ全体を近年注目されている微細加工技術・マイクロマシニングを利用して製作することを検討した。マイクロマシニングを利用すると、微細な流路を高精度に製作できるほか、量産性が増すため、製造コストの点でも現状のガラス加工に比べて有利となる。

図2にマイクロマシニングによるフローチャンバの製法および概要寸法を示す。100 μm 厚きのステンレス板(SUS 304)に図2に示すような形状の穴をエッチング加工により形成させる。ステンレス板どうしの接合はNi Pを板の表面にめっきして、高温下で約60 min 圧着(950°C, 10 kPa)させて行う。これに上下から厚さ1 mmのガラス板を密着させる。この状態で内部に300 μm 角の断面をもつ毛細管が形成される。試料液をノズル出口まで導く微細流路は2番めのステンレス板にのみ設けられている。

図3に接合後の流路形状を示す。図3に示すように、幅200 μm (先端)の微小な試料液ノズルが毛細管入口から1.4 mmのところから形成される。またノズル内での試料液のつまりを防ぐためにノズルの長さを1 mmまで短くしている。ノズルが短くなったために、試料液入口を二つのシース液入口の間に配置する必要がある。シース液の流路は、図3に示すように両側から曲がりながら毛細管につながる形状とした。流路の曲線は流体素子の設計方法等⁽⁵⁾を参考に決めた。ノズルから放出された試料液は図3にあるように、両側からシース液に包まれ毛細管に向かって縮流する。毛細管では下方よりレーザー光が試料液中の粒子に対して照射され、粒子からの散乱光、蛍光、像などが上方の光検知器でとらえられる。

エッチング加工した板を積層してつくる流路の特徴は形状が準二次元的になるという点である。微細な流路が容易に実現できる一方で、従来の機械加工のよう

Fig. 2 Geometry and fabrication of micro flow chamber

Fig. 3 Configuration of flow channel

になめらかな三次元の流路を製作することが難しい。したがって準二次元的な流路で、三次元的な流れを発生させ、毛細管中央に細いシースフロー、すなわち流体力学的焦点合せを可能とするためには、流路形状に流れの特徴を考慮に入れた新しい工夫が必要となる。そこでまずマイクロフローチャンバ内の流れを把握する目的で粘性流解析を実施し、そこで得られた知見を元に流路形状の検討を行った。

3. 流れ解析による流路形状の検討

3・1 試料液ノズル周辺の形状 マイクロフローチャンバの内部流れのようすを把握する目的で、有限要素法による三次元粘性流解析を行った⁽⁶⁾。フローチャンバ内の流路は、最も広い部分でも2 mm程度と小さく、実験的に速度分布や圧力分布を調べることはかなり困難である。一方、最も流速の大きい毛細管内の流れにおいてもレイノルズ数は数百程度のため、層流を仮定した粘性流解析で実際の流れをうまく予測できる場合が多い。

図4にフローチャンバ内流路のメッシュ構成図を示す。要素数は4870要素である。流入境界として2箇所のシース液入口、1箇所の試料液入口、さらに流出口境として毛細管端に1箇所の出口が設けられている。座標系は毛細管入口の流路中心上面を原点に図4に示す方向に採る。解析で与えるシース液流量 Q_{se} と試料

液流量 Q_s は以下のように決めた。まず毛細管における試料液の断面直径が、細胞など生体粒子が通過できる30 μm 程度となるように、第1報で求めた実験式

$$d_s/B = 1.05\sqrt{Q_s/Q_t} \quad \dots\dots\dots (1)$$

から試料液流量 Q_s と総流量 $Q_t (= Q_{se} + Q_s)$ の流量比 Q_s/Q_t を得た⁽³⁾。 B は毛細管の幅、 d_s は毛細管での試料液流れの断面径を示す。次に単位時間あたりの計測粒子数を考慮して、毛細管での中心流速が3 m/s程度になるように総流量 Q_t を与え、次いで上記流量比から各流量を求めた。その結果、試料液流量 Q_s として1 $\mu\text{l/s}$ 、シース液流量 Q_{se} として120 $\mu\text{l/s}$ を得た。この場合、最も流速の大きい毛細管において、レイノルズ数は流路幅を代表寸法とすると403である。

解析の結果を図4(a)、(b)に示す。図4は毛細管入口 ($x=0$) での流速ベクトルの断面内成分(a)およびシース液流路での流速ベクトルの断面内成分(b)を示す。図4(a)から明らかなように、毛細管入口にて中心から上下に広がる四つの旋回流が発生している。この流れは上流のシース液流路での二次流れが下流に伝搬して生じたものと考えられる。図5にシース液流路での二次流れの発生と、毛細管入口での旋回流の関係をモデル化したものを示す。シース液流路は、 z 方向に0.3 mmと非常に薄い、曲率2 mm程度の曲がり流路である。このように薄い流路では、流入後、層流境界層が即座に流路を満たし、放物線上の速度分布を呈する。この状態で曲がり流路に入ると流速の速い中心部分と遅い壁面近くとで、遠心力の差が顕著にあらわれ、その結果境界層は図5に示すようにねじれて二次流れを発生させる。片方の流路で上下一対の旋回流が生じるため、左右から流れが合流した後の毛細管入口では四つの対称な旋回流が生じるものと考えられる。この解析結果によると旋回流の大きさは、主流方向の平均

Fig. 4 Mesh configuration and numerical results (Sample fluid flowrate $Q_s = 1 \mu\text{l/s}$, Total flowrate $Q_t = 121 \mu\text{l/s}$)

Fig. 5 Secondary flow at bent passage

Fig. 6 Numerical results for flow channel with guides (Sample fluid flowrate $Q_s = 1 \mu\text{l/s}$, Total flowrate $Q_t = 121 \mu\text{l/s}$)

流速の5~10%になるため、ノズルから放出される試料液は上下方向に分散され、毛細管において流体力学的焦点合せが難しいと予測される。

シース液流路の二次流れを抑制する一つの方法は、整流用ガイドをシース液流路の、特に遠心力の強い部分に、遠心力と逆の方向に流れを押し戻すように設けることである。この考え方による流路の形状を図6に示す。ノズル出口の両側に厚さ $100 \mu\text{m}$ 、間隔 $300 \mu\text{m}$ のガイドを設けた。このガイド付きのチャンバについても有限要素法による流れ解析を実施し、その有効性について検討した。図6の結果は図4と同様に毛細管入口での流速ベクトルの断面方向成分である。旋回流の大きさは主流方向の平均流速に対しておよそ1%程度まで低減されており、ノズル両側のガイドが有効であることを示している。

さらに本ガイドの別の効果であるシース液流れの上下への回り込みについても検討した。準二次元的な流路で三次元的な縮流を実現させるためには、いかに効果的にシース液を試料液の上下に配分し、全方向から包み込むような流れとするかが重要である。ガイドの上下を開放した状態にしているのは、シース液の回り込みを促し、上下から試料液を押しつける流れを誘起するためである。図7に $z = -66 \mu\text{m}$ 、すなわちガイドの上端面を延長した平面での z 方向(上下方向)の流速分布の解析結果を示す。流速が正の領域は上昇流れを表し、負の領域は下降流れを示す。これによればガイドの手前でシース液が上昇し、ガイドの間で下降していることがわかる。同様の流れがノズルの下側においても反対方向に生じる。この上下の流れにより、ガイド間の試料液は上下からも縮流されることが予測さ

Fig. 7 Flow of z -direction around guides
Velocity distribution of z direction in cross-section at $66 \mu\text{m}$ from upper wall ($\times 10^2 \text{ m/s}$)

Fig. 8 Computational simulation of sample fluid

れる。

以上の二つの効果により、試料液がどのように流れるかを解析結果から予測した。図8にノズル出口からの試料液の流れを斜め横と、真横から見た図を示す。試料液が上下方向に分散せず、毛細管中央に細く流れており、ガイドが有効であることを示している。

3.2 毛細管の長さ 図1に示したフローチャンバでは内径 $125 \mu\text{m}$ から $300 \mu\text{m}$ 、長さ 25 mm から 40 mm 程度の長い毛細管が使用されている⁽³⁾⁽⁴⁾。シースフローチャンバでの圧力損失の大部分はこの毛細管で発生する。著者らの経験によれば、長い毛細管が必要な理由の一つとして、計測用の集光レンズとフローチャンバの取合い上の問題が挙げられる。すなわち感度を向上させるために通常、高 N. A. (Numerical Aperture) の対物レンズが用いられるが、作動距離が小さくなるため、毛細管表面にレンズを接近させて設置する必要がある。その際、レンズを縮流部および毛細管出口の拡管部と接触せずに、接近させるには、平坦な毛細管部の長さとして、最低でもレンズ外径以上必要となるからである。これに対しマイクロフローチャンバの上面は完全に平坦であるため、毛細管の

Fig. 9 Growth of center velocity in capillary-tube

長さに関して、上記のような取合いによる制限はない。ただし毛細管には、境界層が管断面を満たすまでの助走区間において、中心流速の増速とともに試料液流れを加速させる役割もあるため、毛細管の長さとして、この助走区間以上の長さが望まれる。そこでマイクロフローチャンバにおける毛細管の長さを決めるために、助走区間の長さについて検討する。

試料液が流れる毛細管断面中心での流速は、助走区間が終了すると次式で表されるように、平均流速の2.1倍に到達する⁽³⁾。

$$v_{\max} = k_n v_{\text{mean}} = k_n \frac{Q_t}{B^2}, k_n = 2.096 \dots \dots \dots (2)$$

Q_t は総流量、 B は毛細管(正方形断面)の幅を示す。したがって解析結果から中心流速の変化を調べ、平均流速との比を調べることで助走区間の長さを予測する。図9に解析結果から求めた毛細管入口からの中心流速の変化を示す。ただし、この場合、総流量 Q_t として $133 \mu\text{l/s}$ を与えた計算結果である。横軸は毛細管からの距離 x 、縦軸は解析により求めた中心流速と平均流速($=3.1 \text{ m/s}$)の比を示す。この結果が示すように、中心流速は毛細管入口からわずか 2 mm 程度で平均流速の2.1倍に到達しているため、助走区間は流路入口から 2 mm 程度のところまでと予測される。そこでマイクロフローチャンバでは、余裕をみて、毛細管入口から 3 mm の位置に計測位置を設け、毛細管の長さを 4 mm にした。この長さはガラス製フローチャンバと比べると $1/6 \sim 1/10$ 程度であり、大幅な圧力損失の低減が期待される。

以上の検討結果によりノズル両側にガイドを設け、さらに毛細管の長さを 4 mm としたマイクロフローチャンバを試作した。図10はマイクロフローチャンバのノズル周辺のSEM写真である。全体のサイズは $4 \text{ mm} \times 15 \text{ mm} \times 15 \text{ mm}$ までコンパクトになった。

次に試作したマイクロフローチャンバにおいて、上

Fig. 10 SEM view of micro flow chamber
Channel width between guides: $300 \mu\text{m}$
Thickness of guide: $100 \mu\text{m}$

記で予測した所定の性能が得られているかについて調べた。まず上下に分散せずにシースフローが形成されているかどうか、また毛細管入口から 3 mm の位置で、試料液は十分に加速されているかどうか、さらに毛細管短縮による圧力損失低減の効果について述べる。

4. マイクロフローチャンバの性能検討

4.1 シースフローの可視化 まず本マイクロフローチャンバにて、細い試料液流れが実現しているかを可視化により確認した。シース液と試料液の送液は、圧縮空気を用い、シース液の流量計測は面積式流量計($30 \sim 300 \mu\text{l/s}$)で行い、試料液の流量計測は層流流量計($0.1 \sim 5 \mu\text{l/s}$)を自作し、これを用いた⁽³⁾。試料液の可視化には微小な流れであっても視認性に優れる蛍光色素溶液(ウラニン $\text{C}_{20}\text{H}_{10}\text{O}_5\text{Na}_{20}$)を用いた。シース液には純水を用いた。照明にはファイバ式の光源を用い、撮影はカメラ付きの顕微鏡で行った。

図11にノズルから放出される試料液の可視化写真を示す。試料液の上下方向の広がりを確認するために少し斜めより撮影している。試料液の流量は $1 \mu\text{l/s}$ 、シース液の流量は $120 \mu\text{l/s}$ で、解析の境界条件と同じ値に設定している。図11(a)はガイドの付いていないフローチャンバ、(b)はガイド付きのフローチャンバである。解析で予測したように、図11(a)の場合には、ノズルから出た試料液はすぐに上下方向に広がり、縮流がうまく行われていないのがわかる。一方図11(b)の場合には、ガイドの効果により、シース液流路での二次流れの抑制および上下方向からの縮流が有効に働き、図8で予測したように、毛細管中に細い試料液の流れが実現しており、流体力学的焦点合せがうまく行われているのが確認される。

図12(a)にノズルから毛細管にかけてのシースフ

Fig. 11 Sample fluid flow near guides (effect of guides)

ローの可視化写真を示す。試料液がガイドの中央部分と両側のガイドに付着して流れており、ガイドの先端中央で離れて毛細管へ縮流している。毛細管では幅数十 μm の細い試料液流れが実現している。参考のために図 12(b) に解析による試料液の流れを示すが、忠実に実際の流れを予測していることがわかる。通常 1 mm 以下の微小な流路での液体の流れを計測することは非常に困難であるが、その一方で流路サイズが小さいためにレイノルズ数が小さくなり、有限要素法による流れ解析が有効なツールとして利用できることを示している。

4・2 圧力損失の計測 まず毛細管入口から 3 mm の位置で、助走区間が終了し、十分な中心流速が得られているかを確認した。計測は以下の要領で行った。試料液の中に直径 3 μm の粒子を懸濁させ、これに短い間隔で連続するパルス光を照射する。この像を顕微鏡に取付けられた CCD カメラで撮像する。一つのフレーム画像中に同じ粒子の残像が異なる位置に 2 箇所記録される。この残像間の距離が連続するパルス光の時間間隔に粒子が移動した距離である。パルス光間隔を Δt 、残像間距離を L とすると、流速は $L/\Delta t$ で求まる。

図 13 は実際に取得した粒子残像画像である。パルス光間隔を 20 μs に設定している。実験時の総流量 Q_t は 133 $\mu\text{l/s}$ で、式(2)より計算される中心流速は 3.1 m/s である。画像から残像間距離を計測したところ 60 μm であった。したがって実際の流速は 3.0 m/s と求まり、ほぼ予定の流速が得られている。毛細管入口から 3 mm の位置において試料液は十分に加速されており、流れは安定しているものと考えられる。

(a) experiment

(b) Numerical simulation

Fig. 12 Flow visualization of sheath flow (Sample fluid flowrate $Q_s = 1 \mu\text{l/s}$, Total flowrate $Q_t = 121 \mu\text{l/s}$) Fig. 13 Measurement of center velocity in capillary tube (Particle diameter : 3 μm , Predicted center velocity : 3.1 m/s, Interval of pulse lights : 20 μs)

次に毛細管の長さの短縮による圧力損失低減の効果について調べた。シース液入口と毛細管出口の圧力差を圧力変換器(ENTRAN DEVICE 社, Miniature pressure transducer)を用いて計測した。比較のため

Fig. 14 Measurement of pressure loss

に、図1で示したガラス製のフローチャンバの圧力損失も計測した。図14に計測結果を示す。横軸にはシース液流量を縦軸に圧力損失を採る。 P_1-P_0 は試料液入口と出口との圧力損失、 P_2-P_0 はシース液入口と出口との圧力損失を示す。この結果から流量に比例して圧力損失も増加することがわかる。総流量 $60 \mu\text{L/s}$ における圧力損失 P_1-P_0 を比較するとマイクロフローチャンバでは 1.8 kPa 、ガラス製のフローチャンバでは 17.5 kPa であり、およそ $1/10$ まで低減されている。圧力損失の低減により、低圧かつ小形のポンプと低耐圧の流路エレメントの利用が可能となり、シンプルで小形のフローサイトメータの実現性が高まった。

5. 結 言

フローサイトメータ(細胞分析装置)用のシースフローチャンバとして、マイクロマシニングによる低圧力損失の微小フローチャンバを開発した。フォトエッチングで加工したステンレス板(厚さ $100 \mu\text{m}$)を積層してつくるため、従来の手作りによるガラス製のチャンバに比べ量産性、製作精度、取扱いやすさも向上する。内部に構成される準二次元的な流路に対し、有限要素法による流れ解析を実施、試料液を三次元的に縮流させ毛細管で細い試料液の流れを実現するための流路形状、および圧力損失低減のための毛細管長さについて検討した。試作したフローチャンバについて評価実験を行い、幅数十 μm の細い試料液流れの形成、および圧力損失が、典型的なガラス製フローチャンバと比較して、約 $1/10$ に低減されていることを確認した。

文 献

- (1) Crosland-Taylor, P. J., A Device for Counting Small Particles suspended in Fluid through a Tube, *Nature*, **171** 4340 (1953), 37-38.
- (2) 山崎功夫・大木博・三宅亮・金子紀夫・片岡慶二, レーザによる微小粒子分析技術の改良, *機論*, **60**-573, C (1994), 1608.
- (3) 三宅亮・大木博・山崎功夫, シースフローチャンバの研究(第1報, シースフローの安定化), *機論*, **61**-591, B(1995), 4039.
- (4) Shapiro, H. M., *Practical Flow Cytometry*, 2nd ed., (1988), 211-215, Alan R. Liss, Inc.
- (5) 尾崎省太郎・原美明, 純流体素子入門, (1970), 21-26, 日刊工業新聞社.
- (6) Ikegawa, M., Shikano, Y., Katoh, C. and Nakao, S., *Proc. 1st Int. Symp. Supercomput. Mech. Eng. JASME*, (1988), 58-65.