シースフローを用いたマイクロチャネル内磁性粒子流れの可視化*

三宅 亮^{*1}, 山崎 功夫^{*2}
保田 健二^{*2}, 都築 浩一^{*3}Flow Visualization of Magnetic Particles in a Micro-Channel
by using a Sheath Flow MethodRyo MIYAKE^{*4}, Isao YAMAZAKI,
Kenji YASUDA and Koichi TSUZUKI^{*4} Mechanical Engineering Research Laboratory, Hitachi, Ltd.,
502 Kandatsu, Tsuchiura-shi, Ibaraki, 300-0013 Japan

The movement of magnetic particles in a micro-separation channel with a cross-section of 0.5×5 mm was investigated for the purpose of improving the separation efficiency. Since it is hard to observe the particles (diameter: about $3 \mu\text{m}$) movement sideways because the separation channel is shallow, a sheath flow chamber specialized for microscopic-flow visualization was developed. It can make the flow velocity profile in the chamber similar to that between the upper and bottom walls in the separation channel. In addition, to check the velocity vector of the particles, a stroboscopic illumination with two sub-micro-second pulse lights was combined with the chamber. This combined system clearly showed the particle movement in the small gap between the channel walls. Moreover, the particles were captured closer to the bottom of the chamber, but conglomerated and piled up at the front of the magnet position as flow speed decreased.

Key Words: Flow Visualization, Measurement, Internal Flow, Magnetic Particles, Sheath Flow, Micro-Channel

1. 緒 言

近年、化学分析において、微小な磁性粒子を用いた分離技術の利用が盛んになりつつある⁽¹⁾。磁性粒子の表面に、サンプル液中の目的物質と特異的に結合する反応基（例えば抗体）がコートされており、サンプル液と磁性粒子を混ぜ合わせた後に磁石で磁性粒子のみを捕捉・回収することで、比較的簡便に目的物質を単離できる。一方、化学分析の前処理自動化法として、一本に繋がった流路の中で順次、流しながら行うフロー方式がある。複雑な機構系を必要としないため、マイクロファブリケーション技術による小形化に向いている^{(2), (3)}。本研究では上記磁性粒子を用いた分離をフロー方式で行うための分離用微小流路（以下分離用マイクロチャネルと呼ぶ）を研究対象とした。分離性能を向上させることを目的に、まずその第1ステップとして分離用マイクロチャネル内での磁性粒子の挙動の観測を行った。

2. 磁性粒子分離用マイクロチャネル

2.1 磁性粒子分離用マイクロチャネル 図1に磁性粒子分離用マイクロチャネルの形状を示す。流路に対し下方から磁石を設け、磁石上部の流路底面に磁性粒子を捕捉・付着させる。したがって迅速に磁性粒子を捕捉するためには、流れの方向と垂直な深さ方向（ z 方向）には流路寸法は小さい方がよい。また磁性粒子が一個所に集中して堆積すると

Fig.1 Micro-separation channel for magnetic particles

* 原稿受付 2000年4月28日。

^{*1} 正員, (株)日立製作所機械研究所(☎300-0013 土浦市神立町502)。^{*2} 正員, (株)日立製作所計測器グループ(☎312-8504 ひたちなか市市毛882)。^{*3} 正員, (株)日立製作所研究開発本部(☎100-8220 東京都千代田区丸の内1-5-1 新丸ビル)。

E-mail: miyake@merl.hitachi.co.jp

流れによって再び剥離して捕捉効率が悪くなるため、流路は幅方向（ y 方向）には広い方が良い。以上の理由から本研究で用いた分離用マイクロチャネルは図 1 にあるように深さ方向（ z 方向）に浅く、幅方向（ y 方向）に広い形状となっている。磁性粒子を用いる化学分析では、サンプル液量としては最大でも数 100 μL 程度なので、ほぼ同等の容積になるように寸法を与えた。 z 方向に 0.5 mm、 y 方向が 5 mm である。本実験では、直径 2.8 μm （標準偏差 < 0.1 μm ）、密度 1.3 g/cm^3 、磁化率 8×10^{-3} の磁性粒子（ポリスチレンと針状の鉄の混合体）を利用した。まず磁性粒子が重力によってどの程度沈降するかを概算した。微小な粒子であるため、粘性力が支配的であるため、沈降を開始し、すぐに終速度に達するものと考えられる。終速度 v_0 は下記の式で与えられる。ここで r は磁性粒子の半径、 μ は水の粘性係数、 ρ は水の密度、 ρ' は磁性粒子の密度を現わす。

$$v_0 = \frac{2}{9} \frac{r^2}{\mu/\rho} (\rho'/\rho - 1) g \quad (1)$$

μ/ρ として水の動粘性係数 1.0 mm^2/s (20 度)、及び磁性粒子半径 r として 0.14 μm 、 ρ'/ρ として 1.3 を代入すると終速度として 1.3 $\mu\text{m}/\text{s}$ が得られた。フローセル内の流路方向の平均流速としておよそ 10~30 mm/s 、フローセルの流路長さとして 10~30 mm を想定すると、粒子が流れに乗ってフローセル内を通過する時間は約 1 秒。この間に沈降する距離は上記概略計算値から 1 μm 程度である。したがって本実験では重力による影響は、無視して良いと判断した。

図 1 に示すように磁場は磁石上部から周囲に広がるように伸びている。したがって磁性粒子は、磁石直上に至る前

Fig. 2 Visualization method of particle flow under microscope

から、徐々に下方に引かれ、磁石上部に到達したところで流路底部に捕捉される。磁場により磁性粒子へ働く力 F は次式で与えられる⁽¹⁾。

$$F = \chi \cdot v \cdot \left(\frac{\bar{B}}{\mu_0} \cdot \nabla \right) \bar{B} \quad (2)$$

$\bar{B}$ は磁束密度で、 χ は磁性粒子の磁化率、 μ_0 は真空の透磁率、また v は磁性粒子の体積を表す。図 1 に示すように磁束密度の絶対値が大きく、かつ磁束密度の勾配の大きい磁石直上、すなわち流路底面近くでは、(2) 式から、相乗効果により最も大きな力が磁性粒子に作用することがわかる。反対に磁石から遠い場所、すなわち流路の上流、下流側や、磁石上方であっても流路上面付近では作用する力は急減する。特に流路の上面付近を流れる磁性粒子については、流動速度が大きくなると、流路下面に引き寄せられる前に磁場の影響圏から離脱し、捕捉されずに下流へ流れ去る。したがって磁性粒子の捕捉の度合いと、流速、磁場、流路の寸法には好適な関係が存在するものと予測される。そこでまず図 1 に示した系で磁性粒子がどのような挙動を示すかを観測することを目的とした。この観測を行うにあたり、以下の問題を解決する必要がある。

磁性粒子が磁場の作用で流動方向を変えるのは図 1 の流れ方向と深さ方向が作る面内（ $z-x$ 面）である。したがって $z-x$ 面内の挙動を観測しようとした場合、流路の側

Fig. 3 Sheath flow chamber for particle flow visualization

面のさらに外側から幅方向（ y 方向）に顕微鏡を向けて観察する必要がある。このような長作動距離でミクロンオーダーの磁性粒子を観察できる顕微鏡レンズはない。また磁性粒子の流れに伴う速度は、毎秒数十 mm 程度を想定しているため、顕微鏡視野では瞬時に横切ることになり、通常の観測方法では流動像を捉えることはできない。そこで筆者らは、側面からの観察を容易とするためにフローサイトメータに用いられるシースフロー技術^{(4)~(8)}を、また高速で動く磁性粒子の挙動を捕らえるために連続する2つのパルス光によるストロボ撮影を組み合わせ、磁性粒子の挙動観測を行った。以下この可視化方法について述べ、次に磁性粒子の挙動を観測した結果を示し、上記可視化方法の有効性について検証する。

2.2 磁性粒子の挙動可視化方法 ストロボ撮影による磁性粒子の挙動観察方法について図2を用いて説明する。流動している粒子の瞬間像を捉えるためには、粒子の移動に伴う残像ボケを最小限に抑える必要がある。直径 $2.8\ \mu\text{m}$ の微粒子の場合は、 $1\ \mu\text{m}$ 程度のボケも致命的になる。そこで照明に発光間隔の短い ($1\ \mu\text{s}$ 以下) パルス光を用いる。次に粒子の瞬間の移動速度・方向を捉えるために、上記パルス光を連続して2回発光させ、同じ画像中に粒子の残像を2個所記録させて、この2点間の距離と、発光間隔から移動速度・方向を求めた。ただしこの場合2つの連続するパルス光の間隔を短くする工夫が必要となる。通常 $1\ \mu\text{s}$ 以下の短パルス発光ランプは、高いエネルギーを蓄積・放出を繰り返すため、その繰り返し発光周波数は $100\ \text{Hz}$ 程度が上限

Fig. 5 Formation of layered sheath flow geometry

である。そのため発光間隔が $10\ \text{ms}$ にもなり、数 mm/s の速さで流れる粒子の2つの残像を顕微鏡下でひとつの視野に収めることは困難である。発光間隔を短くするために、光学系に以下に述べる工夫を行った。図2に示すように、2つのパルスランプを用い、遅延させて発光させる。2つのパルスランプによる光はハーフミラーにより一つの光路に集められ光ファイバで照明される。ひとつのパルスランプを基準にして、もう一方のパルスランプの発光トリガ信号を遅延させる。これにより発光間隔を $1\ \mu\text{s}$ から数十 ms まで任意に変更できるようになった。

Fig. 4 Experimental setup

図3に磁性粒子の $z-x$ 面内の挙動を観測するために作ったフローチャンバの概要を示す。流路中を流れる磁性粒子までの作動距離を短縮するために、流路の幅を0.5 mmまで狭めている。ただし流路手前や奥の壁面近くを流れる速度の違い磁性粒子の挙動も同時に観測してしまうため、以下の工夫を行った。図に示すようにこのフローチャンバは、磁性粒子懸濁のサンプル液を導入するためのノズル、およびそれを挟んで縮流するシース液流路、それに続く毛細流路からなる。サンプル液はシース液で両側から挟みこまれながら、横方向のみ縮流されるため、毛細流路では、一方の壁からもう一方の壁まで広がる薄く幅広い層状のシースフローが形成される。このようにすることで、幅の狭い断面内を流れる磁性粒子のみをスリット状に照明したのと同様の効果が得られる。このシースフロー中を流れる磁性粒子に対して、側方より磁石を近接させて、その挙動を顕微鏡で観察する。

可視化用フローチャンバの毛細流路中央断面での流速分布はほぼ放物線状になるので、流量を調整することで、図1で示した分離用マイクロチャンネルの $z-x$ 面内の流速分布をほぼ再現できる。

ストロボ撮影と可視化用フローチャンバからなる可視化実験装置を図4に示す。脈動を抑えるためにシース液の送液は空気圧で行い、またサンプル液の送液はシリンジ型ポンプをコンピュータで制御することにより行った。シース液の流量の調整は面積式流量計およびニードルバルブで行った。また微小流量範囲では随時メスシリンダで廃液体積

Fig. 6 Check of inlet length

Fig. 7 Observation points along separation channel

の時間変化を計量して流量を求めた。実験に用いた磁石の寸法は流れ方向の幅が3 mm、流れと垂直方向の幅が5 mm、高さは5 mmである。磁束密度は上面で1.2 T、磁石上面から2 mm離れたところで実測したところ0.24 Tであった。

3. 可視化方法の検証

3.1 層状シースフローの形成確認 製作した可視化用フローチャンバで層状のシースフローが得られているかどうかをサンプル液として色素を用い確認実験を行った。結果を図5に示す。図中(a)は縮流部での試料液の流れを z 方向から見た写真(図3の指示(a)の個所)、(b)は毛細管での流れを横方向(図3の指示(b)の個所)から見た写真である。(a)に示すようにノズルを出たサンプル液は y 方向には流路の縮小とともに幅を狭め、毛細流路ではおよそ2~30 μm 程度の幅まで縮小している。一方 z 方向には、(b)で示すようにサンプル液が片方の壁からもう一方の壁まで薄く広く広がっており、以上から層状のシースフロー

Fig. 8 Flow condition

一が形成されていることがわかる。

3.2 助走区間の確認と計測位置の設定 可視化用フローチャンバの毛細流路での助走区間の位置について実験的に求めた。毛細流路に流入した流れは壁面から境界層が立ち上がり、徐々に流路を満たしていく。最終的には放物状の流速分布を呈するようになる。この流速分布が変化する区間は助走区間と呼ばれるが、磁性粒子の挙動の可視化には放物状の流速分布のところを利用するため、観測対象領域として助走区間を除外する必要がある。そこで毛細流路に流入した後の x 方向の流速分布の遷移を調べた。サンプル液にラテックス微粒子（直径約 $6\ \mu\text{m}$ ）を混在させ、ストロボ撮影により流路内各位置での微粒子の速度を得た。それを結んで各位置での流速分布とした。毛細流路入口 $10\ \text{mm}$ から $30\ \text{mm}$ までの流速分布を図 6 に示す（入口から $10\ \text{mm}$ までの間はフローチャンバの縮流部にかかり明確な粒子像を捉えることができなかった）。 $l = 10\ \text{mm}$ の位置での流速分布は既に放物線に近い形状をしており、 $l = 30\ \text{mm}$ に至る間、分布形状に変化はないことがわかる。 $l = 10\ \text{mm}$ の位置で既に、助走区間は終了しているものと考えられる。そこで $l = 10\ \text{mm}$ より下流を観察対象領域とすることにした。また放物状の速度分布が得られたため、このフローチャンバのサンプル流れにより、平板間の流れとほぼ同じ流動条件を与えることができると判断した。次では、磁場中での磁性粒子の挙動を上記の可視化方法を用いて観測した結果について述べる。

4. 磁性粒子の挙動可視化

流動する磁性粒子に磁場が加わった場合の挙動の変化に

Fig. 9 Microscopic photograph under double pulse lights

ついて磁石中心から上流 $14\ \text{mm}$ 、下流 $8\ \text{mm}$ までの挙動の可視化を行った。計測位置を図 7 に示す。磁石中心を零点 ($x = 0$) として、上流方向を負、下流を正の座標で表す。上流から下流まで $1\ \text{mm}$ 毎に画像を取得した。実験で利用した磁性粒子のサンプル液中での濃度は約 8×10^5 個/mL である。図 8 に本実験で磁性粒子に与えた流速分布を示す。前者を Case 1、後者を Case 2 とする。与えた流速分布は 2 通りで、中心流速で $17\ \text{mm/s}$ および $7\ \text{mm/s}$ である。これを図 1 の分離用マイクロチャネルでの流量に換算すると換算流量 Q_c は各々 $2\ \mu\text{L/s}$ と $11\ \mu\text{L/s}$ に相当する。

図 9 に Case 1 の上流 $2\ \text{mm}$ の可視化写真を示す。図中矢印で示した二対の粒子残像が同一の粒子で、所定時間に移動した距離を表す。図 10 に上流 $x = -14\ \text{mm}$ から下流 $x = 8\ \text{mm}$ までの磁性粒子の挙動をベクトル表示したものを示す。

Fig. 10 Particle movement along channel
(Case 1: $Q_c = 27\ \mu\text{L/s}$)

Fig. 11 Particle movement along channel
(Case 2: $Q_c = 11 \mu\text{L/s}$)

上流 $x = -13 \text{ mm} \sim -5 \text{ mm}$ までは顕著な磁場の影響は見られなかったので省いた。-3 mm の位置で、図中右下側にある磁性粒子が僅かに降下しているのが確認される。-2 mm では明らかに速度の遅い底面付近の磁性粒子が真っ先に降下しているのがわかる。また上面近くの流速の遅い粒子も降下が認められる。中央から少し下の磁性粒子の速度は、このベクトルから換算すると 20 mm/s になる。流れて与えられている速度は 17 mm/s なので、2 mm 下流にある磁石からの吸引力による加速も加わっているものと推察される。一方、下流 3 mm、4 mm の位置の磁性粒子に着目すると、磁場の影響で流路下方にまで降下してきたが、そのまま捕捉されずに流れ去る様子が見られる。磁場の影響範囲は上流・下流ともに 3 ~ 4 mm の範囲である。磁石の流れ方向の大きさが 3 mm であるから、ほぼその倍程度の位置まで影響を及ぼしている。磁性粒子は、磁石上方に差し掛かった時に、突然降下して捕捉されるのではなく、磁石から少し離れた上流から徐々に降下が始まり、捕捉されていくことがわかった。

次に Case 2 の流動条件における磁性粒子の流動ベクトルを図 11 に示す。Case 1 と同様 -4 mm より上流、4 mm より下流においては磁性粒子の挙動に対する磁場の顕著な影響は確認されなかった。-2 mm の位置での流動方向は Case 1 と比較すると、より下方へ向いている。これは流量が減り磁性粒子の流れ方向の速度成分が小さくなった分、ベクトルが下側に向いたことを表す。流速が遅くなると、磁性粒子はより早い時期に流路下面に到達する。その結果、 $x = -1 \text{ mm}$ の底面に示したように、Case 1 と比べると相対的に磁性粒子が厚く堆積し始める。ただし捕捉されずに下流に流れ

去る磁性粒子はほとんど認められず、捕捉効率は向上することがわかった。

5. 結 言

底面に磁石を近接させたマイクロチャネル（幅 5 mm、深さ 0.5 mm）内での磁性粒子（直径 $2.8 \mu\text{m}$ ）の挙動を観測するために、層状のシースフロー技術と、連続する 2 つのパルス光によるストロボ撮影を組み合わせた方法を提案・評価した。その結果、以下の結論を得た。

(1) 上記可視化方法により深さ 0.5 mm の微小隙間内での磁性粒子の挙動観察が可能となった。その結果、磁性粒子が降下していく方向は、サンプル液の流速と、磁場による吸引速度の相互作用で決まり、流速の大きい流路中央では降下は遅く、流速の小さい上下壁面では降下が速い。

(2) 流路底面への捕捉効率はマイクロチャネル内でのサンプル液流量に依存しており、流量が大きいと捕捉されずに流れ去る粒子数が増大する。また流量が小さいと、捕捉される数は増加するが、底部の磁石前縁の狭い個所に集中して堆積する傾向が現れることがわかった。

文 献

- (1) George M. Whitesides, Romas J. Kazlauskas and Lee Josephson, *Magnetic separations in biotechnology*, Trends in Biotechnology, Vol. 1, No. 5 (1983), 144-148, Elsevier Science Publishers B.V.
- (2) 三宅亮・都築浩一・高木武夫・今井一成、集積化マイクロ吸光度セルによる小形高感度フロー式分析装置、電学論 E, Vol117-E, No.3(1997), 147.
- (3) Chong H. Ahn and Mark G. Allen, *A Fully Integrated Micromachined Magnetic Particle Manipulator and Separator*, Proceedings of Micro Electro Mechanical Systems '94, (1994)91-96, IEEE.
- (4) Crossland-Taylor, P. J., *A Device for Counting Small Particles Suspended in Fluid through a Tube*, Nature, 171-4340(1953), 37-38.
- (5) 三宅亮・大木博・山崎功夫、シースフローチャンパの研究（第 1 報、シースフローの安定化）、機論、60-573, C(1994), 1608.
- (6) 三宅亮・大木博・山崎功夫・高木武夫、シースフローチャンパの研究（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パ）、機論、62-597, C(1996), 1530.
- (7) 三宅亮・大木博・山崎功夫・高木武夫、マイクロフローチャンパによる細胞分析、機論、65-629, B(1999), 223.
- (8) R. Miyake, I. Yamazaki, Y. Kojima, M. Kurimura, and H. Horiuchi, *High-Throughput Pretreatment System in Automated Urinary Sediment Analyzer*, Cytometry, 39:67-71(2000), Wiley-Liss, Inc.