

マイクロピラー周りの振動誘起流を利用したポンプレスミキサの開発

Development of a pumpless mixer utilizing the vibration-induced flow around micro-pillars

精密工学専攻 16号 金子完治
Kanji Kaneko

1. 緒言

バイオメディカル診断や細胞アッセイ等においては、微小な流体中の粒子を特異的吸着により回収するアプリケーションが多く存在する⁽¹⁾。例として、血液中に少数存在するがん細胞の回収や、バイオマーカーとしての細胞外小胞の回収は、疾病診断上の重要性が高い。多くの場合、表面を修飾したポリスチレンビーズや磁気ビーズをサンプルに加えてこれらの標的粒子を回収する。このとき、直径が数十 nm 以上の粒子は小分子に比べて拡散係数が小さいため、吸着を促進するために強制的な攪拌を行う必要がある。一般的には回転攪拌機により試験管内の溶液を転倒混和させるが、流体中の局所的な混合が生じないので、数時間以上を要するが多い。マイクロ流体チップを用いた各種のマイクロ混合器が開発され、上記のような標的粒子の回収率向上が示されている^(1,2)。しかし、多くの場合は外部ポンプによる圧力駆動が必要なため、チューブの接続やデッドボリュームが生じるという難点がある。

ポンプを用いない流体制御方法として、微小な構造物を有する基板に周期振動を与えて平均的な流れを生じさせる振動誘起流がある⁽³⁾。この手法を用いることで駆動システムの小形化が期待される。一方、振動誘起流は、その非定常性から、流れ場の予測が困難である。これまでに振動誘起流の理論解析及び実験との比較が行われてきたが、その多くは、流れ場の奥行き方向に流れが一樣と仮定した2次元流の仮定に基づいたものであった^(3,4)。一方、マイクロ流路への応用では、流路厚さが小さく振動により上下壁面に形成されるストークス層が無視できない。更に、今後、より複雑な3次元構造を有するピラーを用いることも想定されるため、流れの3次元性を考慮した解析ツールの構築が必要不可欠である。

本研究では、振動誘起流を3次元的に再現可能な数値解析ツールを開発し、円柱周りに誘起される非定常3次元流れ場の解析を行った。また、数値解析により得られた結果を、同様の条件で行った実験の粒子画像速度場計測(Particle Image Velocimetry; PIV)結果と比較することにより、解析の妥当性を検証した。加えて、振動誘起流のアプリケーションとして、ポリスチレンビーズをモデル微粒子として用いた捕捉性能の評価を行った。局所的な流れにより、一般的な回転攪拌(転倒混和)に比べて、短時間で高い結合率達成可能であることを示した。

2. 振動誘起流の予測ツールの開発

2.1. 数値計算手法

2.1.1. 計算領域と支配方程式

回旋振動するピラーの周囲の流れを数値シミュレーションにより再現した(Fig. 1 (a, b)). 流れの支配方程式は以下の3次元ナビエ・ストークス方程式と連続の式である。

$$\frac{\partial u_i}{\partial t} + u_j \frac{\partial u_i}{\partial x_j} = -\frac{\partial p}{\partial x_i} + \frac{1}{Re} \frac{\partial^2 u_i}{\partial x_j \partial x_j} + f_i \quad (1)$$

$$\frac{\partial u_i}{\partial x_i} = 0 \quad (2)$$

振動の影響は、座標系の加減速に伴う慣性力として流体に体積力 f_i を付与することで考慮した。ピラー基板に固定した座標系における流れ場を求めた後、外部の観測者からみた(基板が相対的に運動する)座標系に変換を行うことで、移動境界の導入を回避した。

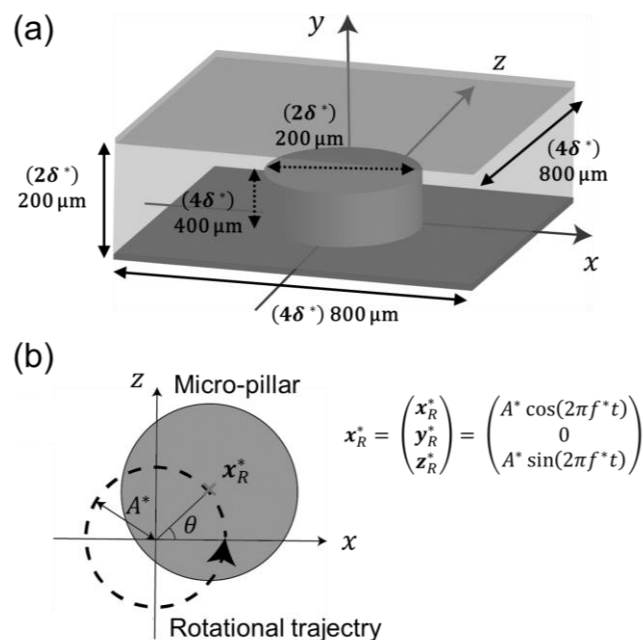


Fig. 1 (a) Schematic of coordinate system and computational domain. (b) Circular vibration of the micro-pillar.

2.1.2. 計算手法と条件

水平方向には周期境界条件、上下壁面とピラーの表面では粘着条件を与えた。数値計算手法としては、 x, z 方向にはフーリエ級数、 y 方向にはチェビシェフ多項式を用いる擬スペクトル法を適用した。ピラーの幾何学的パラメータ及び振動条件については、 $\delta^* = 100 \mu\text{m}$ とし、直径 $2\delta^* = 200 \mu\text{m}$ 、高さ $\delta^* = 100 \mu\text{m}$ の円柱に振幅 $A = 3.25 \mu\text{m}$ 、周波数 $f = 1000 \text{ Hz}$ の回旋振動を与えた場合を対象とした。

2.1.3. 流れ場の平均方法

最終的に得た周期的非定常流れ場において仮想トレーサをラグランジュ追跡し、それらの一定周期毎の変位ベクトルから、時間平均流れ場を求めた。

2.2. PIV 計測方法

2.2.1. マイクロピラー基板の作製

DRIE プロセスによりシリコン基板上にマイクロピラーの鋳型を作製した。ピラーとなる円柱の直径は $200\ \mu\text{m}$ 、高さ（鋳型の場合は深さ）は $100\ \mu\text{m}$ とし、 5×5 のマトリクス状に $800\ \mu\text{m}$ の間隔で配置した。また、基板の4隅に直径 $1.4\ \text{mm}$ 、高さ $200\ \mu\text{m}$ の円柱をスペーサとして配置した。作製した鋳型に PDMS (KE-106, 信越化学) を流し込み、硬化させた後に剥がすことで、マイクロピラー基板を得た (Fig. 2)。

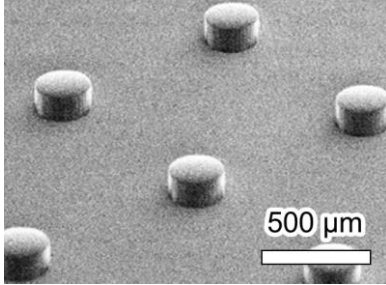


Fig. 2 SEM image of the micro-pillars.

2.2.2. 実験のセットアップと条件

作製したピラー基板中央にトレーサとしての蛍光ビーズ (F8813, Thermo Fisher SCIENTIFIC, $0.5\ \mu\text{m}$, $1.055\ \text{g/cm}^3$) を含む純水を $10\ \mu\text{L}$ 滴下し、その上からカバーガラスを被せた。基板の4隅に設置したスペーサにより、流体層の厚さが $200\ \mu\text{m}$ となる (Fig. 3 (a))。この系を XY ピエゾ駆動ステージ (ML-20XYL, MESS-TEK) に貼付し (Fig. 3 (b))、波形発生器 (AG1022F, OWON) より、位相が 90° 異なる2チャンネルの正弦波信号を、増幅器を介してピエゾステージに送ることで回転振動を実現した (Fig. 3 (b))。振幅と周波数はそれぞれ $A = 3.25\ \mu\text{m}$ 、周波数 $f = 1000\ \text{Hz}$ とした。

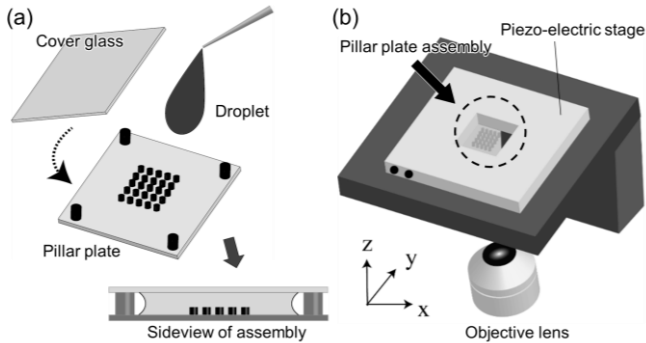


Fig. 3 (b) Assembly of the micro-pillar plate. (b) Experimental setup for application of circular vibration.

2.2.3. PIV 計測

共焦点マイクロ PIV によりピラー周囲の速度場を計測した。共焦点スキャナ (CSU-X1, 横河電機) の照明光源として、DPSS グリーンレーザ (Sapphire SF, COHERENT) を使用した。粒子画像を高速度カメラ (Mi-2000, Photron) により撮影し、PC に保存後、PIV 解析を行った。マイクロピラーの回転振動数は $1000\ \text{Hz}$ であるため、粒子運動の瞬間速度を解像できるように、シャッタースピードを $21000\ \text{fps}$ ($\sim 48\ \mu\text{s}$)、撮影のフレームレートを $2000\ \text{fps}$ に設定した。取得した画像を基に、PIV 解析ソフトウェア (Koncerto II, 西華デジタルイメージ) を用いて2次元の速度場を求めた。

2.3. 数値計算と PIV 計測結果の比較

2.3.1. 2次元平面内の速度分布

数値計算結果の2次元速度ベクトルプロット、及び PIV 計測結果から得られた2次元速度ベクトルプロットを Fig. 4 (a, b) に示した。濃淡マップは平均速度の水平方向成分の絶対値 $|V_{hor}| (= \sqrt{u_1^2 + u_2^2})$ を表している。いずれのケースでもピラー周囲を旋回する平均的な流れを得た。また、両者における流れ場の全体の分布と速度の大きさが一致した。

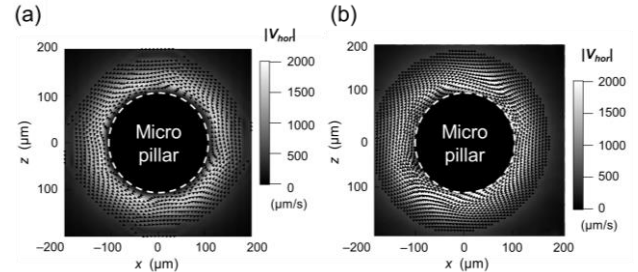


Fig. 4 2D vector plot of the averaged velocity flow field obtained with (a) the numerical simulation and (b) PIV measurement.

Fig. 4 (a, b) で求めた平均速度 $|V_{hor}|$ を半径方向にプロットをした分布を Fig. 5 に示す。実験計測と数値解析により求めた速度分布はピラー側壁付近では差があるものの、ピーク位置は両者で $r = 130\ \mu\text{m}$ (ピラー壁より $30\ \mu\text{m}$ 離れた位置) と一致しており、ピーク位置以遠では、速度分布の定量的な一致を確認できた。

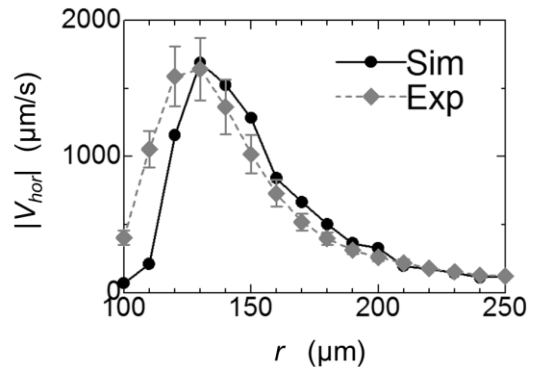


Fig. 5 Distribution of the mean velocity magnitude of particles in radial direction.

2.3.2. 異なる高さにおける速度分布

速度のピークが生じた半径方向位置 $r = 130\ \mu\text{m}$ での、両者の平均速度の水平方向成分の絶対値 $|V_{hor}|$ に関しての垂直高さ (y -) 方向分布を Fig. 6 に示した。両者の分布はよく一致しており、基板面 ($y = 0\ \mu\text{m}$) 付近では速度は $0\ \mu\text{m/s}$ に近いが、ピラーの先端に向かって速度が増加し、 $y = 70 \sim 80\ \mu\text{m}$ 付近でピーク値をとる分布傾向がみられた。ピラーの頂点付近 ($y = 80 \sim 100\ \mu\text{m}$) では速度が減少しており、これは次項で述べるピラー頂点付近における流れの3次元性によるものだと考えられる。

以上の結果より、数値計算と PIV 計測により得られた平均速度の水平方向成分についての結果が高さ方向の分布についても定量的に一致しており、ピラー周囲の流れ場が数値解析により3次的に正しく求められていることが示された。

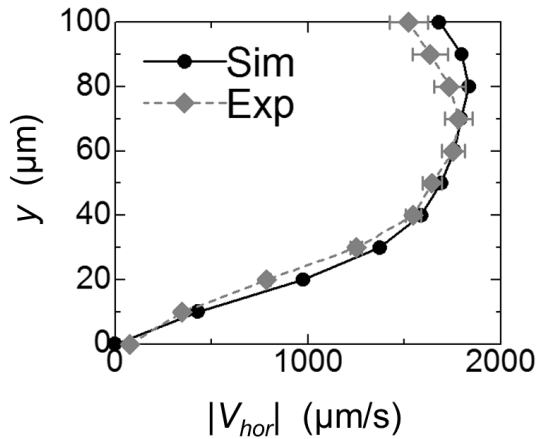


Fig. 6 Comparison of vertical distributions of mean horizontal velocity magnitude $|V_{hor}|$.

2.3.3. 流れの3次元性の調査

最後に、ピラー周囲平均速度場の3次元性を調べた。数値計算結果における、速度の x - y 成分 (垂直成分) についての時間平均速度場 $|V_{ver}| (= \sqrt{u_x^2 + u_y^2})$ のベクトルと濃淡マップを Fig. 7 に示した。固体壁 (上下壁面) の近傍では流れは上下動がほとんどなく2次元である。しかし、上下壁面間の中間付近 ($r = 130 \sim 150 \mu\text{m}$, $y = 50 \sim 150 \mu\text{m}$) では最大 $200 \mu\text{m/s}$ 程度の速度が生じ、3次元的な流れ場となっている。特にピラーの角から外側・上方に離れた位置に渦が発生しており、循環する流れが生じていることがわかる。 x - y 平面における特徴的な平均速度の大きさは x - z 平面における平均速度の $1/10$ 程度であるが、この循環流が前項の Fig. 6 においてピラー頂点付近で水平方向の平均速度が減少した要因であると考えられ、流れの三次元性が系の挙動に無視できない影響を持っていることがうかがえる。

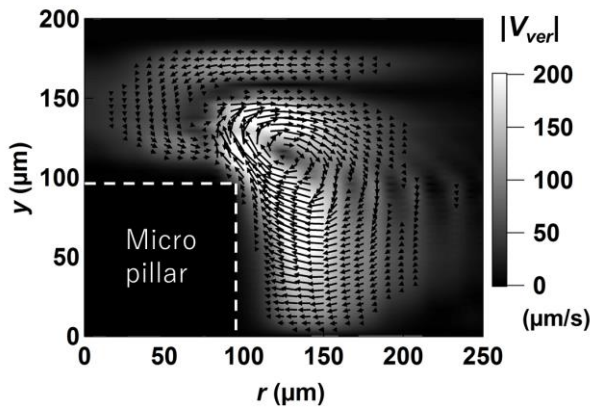


Fig. 7 Vector plot of the averaged velocity flow in the vertical plane.

数値計算でみられた上記の流れの3次元性を実際の流れ場において確かめるために、ピラー基板の横側に長作動対物レンズを水平に設置し、流れ場中のトレーサ粒子軌跡の側面観察像を得た。一例として、ピラー中ほどの高さから開始したトレーサ粒子が、ピラー円周に沿って移動しながら上昇し、ピラー上部の空間へ抜けていった (Fig. 8 (a))。定性的に同様のトレーサの軌跡は、数値解析においても得られた (Fig. 8

(b))。この例以外にも、同一平面内の周回軌道ではなく、三次元的な軌跡がシミュレーションで再現できたことから、振動誘起流の3次元挙動の予測が可能になったと言える。

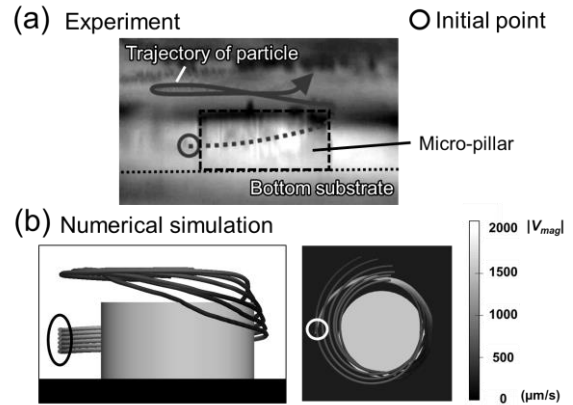


Fig. 8 Comparison of particle trajectories obtained in the (a) experiment and (b) the numerical simulation.

3. 振動誘起流を利用した混合性能評価

振動誘起流のアプリケーションとして粒子の捕捉実験を行った。

3.1. 実験手順

3.1.1. マイクロピラー基板の作製

フォトリソグラフィプロセスにより、SU-8 (SU8 3025, MICRO CHEM) を用いて円柱型のマイクロピラーの鋳型を作製した。ピラーの直径は $100 \mu\text{m}$ 、高さ (鋳型の場合は深さ) は $50 \mu\text{m}$ とし、 10×10 のマトリクス状に $200 \mu\text{m}$ の間隔で配置した。作製した鋳型に PDMS を流し込み硬化させた後に剥がすことで、マイクロピラー基板を得た (Fig. 9)。

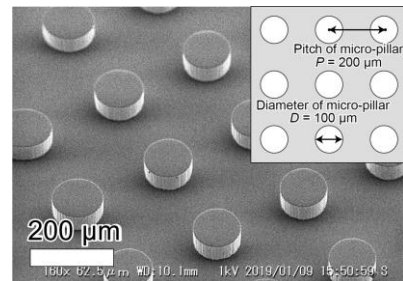


Fig. 9 SEM image of the micro-pillar and dimension of micro-pillar array.

3.1.2. セットアップと条件

上記で作製したピラー基板の上に2種類のビーズを含む懸濁液を $2 \mu\text{L}$ 滴下し、上からカバーガラスを被せた。基板の四隅に設置したスペーサにより、流体層の厚さが $50 \mu\text{m}$ となる。Small particle と Capture bead として、それぞれアビジンコートビーズ (VFP-2052-5, Spherotech, $1.7\text{-}2.2 \mu\text{m}$) とビオチンコートビーズ (TPX-150-5, Spherotech, Cross-linked, $13.0\text{-}17.9 \mu\text{m}$) を使用した。アビジンはビオチンに対して非常に高い特異的親和性を示し、両者は複合体が形成することにより結合する。ここで、PDMS 及びカバーガラス表面とビーズが吸着するのを防ぐために $5\% \text{ w/v}$ の BSA 溶液をピラー基板とカバーガラスの表面に塗布した。この系に対し、2.2.2 節と同様の方法により、旋回振動を与えた

3.2. 実験結果

旋回振動を10分間基板全体に与え、その後止めるという操作を繰り返し行った。各時刻で画像を取得したうちの、最初と最後の画像をFig. 10に示す。攪拌前にピラー周囲に均一に分散していたSmall particleが、時間経過とともにCapture beadに吸着し、回収されている様子が確認された。

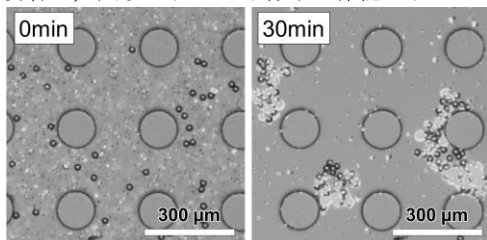


Fig. 10 Microscope images of Capture beads and Small particles taken at 0 and 30 min ($f = 500$ Hz, $A = 1.8$ μm) vibration.

次に、振動パラメータがビーズの吸着に与える影響を検討した。蛍光 Small particle の蛍光画像を取得し、各 Capture bead の外周より半径が4 μm 大きい円内の蛍光輝度強度の平均値を求め、吸着率の指標とした。複数の周波数において、異なる振動条件下で求めた平均輝度の時間変化を Fig. 11 に示す。各条件において、時間とともに結合率が増加した。本実験系では、 $f = 500$ Hz で高い吸着率が達成された。周波数を大きくすると誘起流の平均速度が増加するため、吸着率が増加すると予想したが、実際には $f = 600$ Hz 以上で吸着率が減少した。

対照実験として通常回転攪拌装置を用いて20 rpm の回転速度で攪拌を行ったところ、この条件では吸着率の増加が小さかった。以上の結果より、振動誘起流を用いた攪拌方法において流体中のビーズを効果的に動かすことができ、通常数時間程度を要する従来の攪拌法と比較して、30分程度の短時間で高い吸着率を達成することが可能であった。

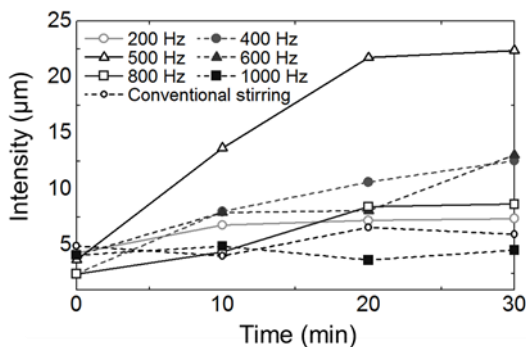


Fig. 11 Time evolution of the averaged intensity within capture beads.

ここで、結合率の周波数依存性の要因を調べた。流れ場における Capture bead と Small particle の挙動を確かめるために、それぞれのビーズの速度および相対速度を求めた(Fig. 12)。解析には、ピラー周囲を流れ方向に沿って旋回するビーズの連続画像を用いた。その結果、相対速度の分布は500 Hz 付近の周波数でピークとなり、結合率の分布傾向と類似した。この原因として、ピラー周囲を旋回する Capture bead と Small particle の相対速度差が大きくなることにより、流れ場中での

衝突頻度が増加したからであると考えられる。一方、両者の相対速度が小さくなる高周波数では、両ビーズが並行した状態でピラー周囲を旋回するため、衝突頻度が減少する。相対速度は、Small particle が流れに追従しながら旋回するのに対し、基板底面付近に沈んだ Capture bead が転がりながら低速で運動したことで生じたことが確認された。

以上の結果より、本実験系において高いビーズ捕捉率を達成するためには、両ビーズの相対速度が重要となるため、大きな速度で激しく攪拌するのではなく、適切な条件設定が必要であることが明らかになった。

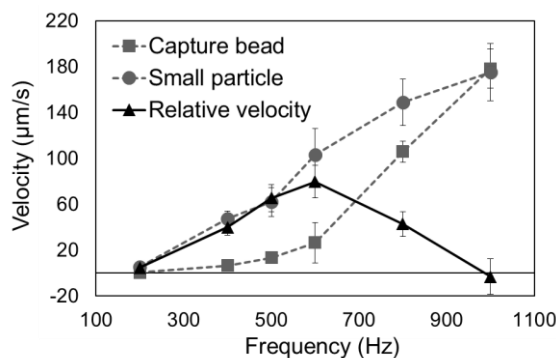


Fig. 12 Relationship between beads velocity and vibration frequency.

4. 結論

本研究では、振動誘起流をマイクロミキサの駆動源として用い、ターゲット微粒子を Capture bead に効率的に吸着させて回収する系の構築に向けた基礎研究を行った。はじめに、振動誘起流に対して3次元的な流れ場を予測可能な数値解析手法を構築した。数値解析結果が実験計測で得られた速度分布と定量的に一致したことにより、数値解析手法の妥当性を確認した。並行して、モデルビーズを用いた吸着実験を行った。吸着率は誘起速度の大きさに依存し、効率的な結合に向けた振動パラメータは、回収目的となる生体サンプルの結合親和性に応じて選択すべきであることが示唆された。現在、数値シミュレーション上で微粒子のトラッキングと吸着率を予測するツールの開発を進めており、実験結果との比較検討を進めることで、本ミキサの最適化を図る。

参考文献

- (1) Suzuki, H., Ho, C. M. & Kasagi, N., A chaotic mixer for magnetic bead-based micro cell sorter, *J. Microelectromechanical Syst.*, **13**-5 (2004) pp.779–790.
- (2) Petkovic, K. et al., Rapid detection of Hendra virus antibodies: an integrated device with nanoparticle assay and chaotic micromixing, *Lab Chip*, **17**-1 (2017) pp.169–177.
- (3) Hayakawa, T. et al., A single cell extraction chip using vibration-induced whirling flow and a thermo-responsive gel pattern., *Micromachines*, **5**-3 (2014) pp.681–696.
- (4) Lieu, V. H., House, T. A. & Schwartz, D. T., Hydrodynamic tweezers: impact of design geometry on flow and microparticle trapping, *Anal. Chem.*, **84**-4 (2012) pp.1963–8.