

高速セルソータにおける液滴生成の最適化*

宮崎 康次^{*1}, 塚本 寛^{*1}

Rapid Droplet Generation by Cell Sorters

Koji MIYAZAKI^{*2} and Hiroshi TSUKAMOTO^{*2} Department of Bio-func. & Engineering, Kyushu Institute of Technology,
2-4 Hibikino, Wakamatsu-ku, Kitakyushu-shi, Fukuoka, 808-0196 Japan

An experimental study on droplet generation for the rapid detection of cells by using cell sorters was conducted. Cell sorters create micro-droplets by controlling waves at surface of a micro-jet which consists of samples and sheath fluid. In this paper the optimum wave number was observed by microscope. The ratio of sample flow rates to sheath flow rates and frequency of the wave are also controlled in order to investigate those effects on droplet generation. In addition to the experimental studies linear instability analysis for droplet generation and numerical simulations for the flow distribution in the chamber of the cell sorter were carried out to obtain optimum parameters to maximize the rate of droplet generation. Analytical solutions agree well with the experimental results of droplet generation.

Key Words: Axisymmetric Flow, Stability, Free Surface Flow, Numerical Analysis, Cell Sorter, Micro-jet

1. 緒 論

特定の細胞を選択的に集める医療機器であるセルソータは医療分野のみならず生体工学の分野でも細胞からDNAの検出まで広い範囲にわたって、盛んに利用されるようになってきた^{(1)~(3)}。作動原理が提案されて久しく、セルソータに関する技術はほぼ確立されたように見える。しかし現在においても常に測定精度の向上と高速化、さらには細胞検出確率の向上が求められている。運転条件設定の最適化は細胞検出を行う場において、テーブル化された最適運転条件⁽⁴⁾に従って装置の作動結果を見ながら検出確率が上がるよう各々のユーザーがジェット流速と滴形成のためのピエゾ素子振動数を設定しなければならず、ユーザーの経験に頼っているのが現状である。流速とピエゾ素子の振動周波数を最適に設定し、単位時間に多くの滴を形成できた場合、セルソータによる細胞測定スピードが直接最大となるため、滴生成における最適条件を追うことはセルソータの検出速度向上のため重要な課題となる。本研究では、領域が狭いため速度分布計測が困難なセル

ソータ内部の流れを数値シミュレーションにより把握、続いて起こる外部へのジェット放出を対物レンズを取り付けたCCDカメラを通して観察、観察結果に対し、表面形状変化を解析する手法としてよく利用される微小変形理論^{(5)~(7)}によるジェットから液滴生成に関する考察を併せて行い、セルソータ動作に最適なサンプル・シース液流量、ピエゾ素子周波数を実験ならびに解析を通して求めることを目的とする。

おもな記号

- a : ジェット半径[m]
- f : ピエゾ素子に与える周波数[kHz]
- k : 波数[1/m]
- l : 液滴形成距離[m]
- p : ジェット内圧力[Pa]
- P : 気相圧力[Pa]
- Q : 流量[l/min]
- t : ノズル噴出口から液滴形成までの時間[s]
- u : ジェット流速[m/s]
- U : ジェット平均流速[m/s]
- x : 無次元波数
- z : 吐き出し口からの距離[mm]
- α : 振幅成長率[1/s]

* 原稿受付 2002年12月24日。

^{*1} 正員, 九州工業大学大学院生命体工学研究科(☎808-0196
北九州市若松区ひびきの2-4)。

E-mail: miyazaki@life.kyutech.ac.jp.

- δ : 表面変形の振幅[m]
 η : 粘度[Pa·s]
 ν : 動粘度[m²/s]
 ρ : 密度[kg/m³]
 σ : 表面張力[N/m]

上付き記号

- ' : 微小擾乱

下付き記号

- r : 半径方向
 z : ジェット長手方向
 i : サンプル液
 o : シース液

2. セルソータの作動原理

セルソータはマイクロメートルオーダーの粒子(細胞やDNA)を1秒間に10⁶個と極めて高速で回収する装置である。70 μm の先細のノズルからサンプルとそれを保護するシース液からなる直径100 μm 程度のジェットを噴出し、装置に取り付けた piezo 素子により任意の周波数で振動を与えることでジェット表面に波を形成する。その後、流体自身の表面張力効果によりジェット表面の波の振幅がある条件下で成長し、サンプルを含む滴が形成される。任意の液滴を帯電させ(もしくは既に粒子が帯電している)、電界中にジェットを放出、帯電した目的粒子のみの運動方向を変えることで、それらを回収する。現状では安定に滴を得るための piezo 素子の振動周波数条件、サンプル液とシース液の流量の設定については、装置を使用する研究者の経験とデータベースに頼っているのが現状である⁹⁾。

3. 実験装置

本実験においてはセルソータが通常に使用される条件を想定し、作動流体としてシース液・サンプル液ともに生理食塩水(Becton Dickinson FACSSlow, 0.9%NaCl水溶液)を用いた。セルソータ本体から噴出したジェット内部と滴形成の詳細を観察するため、セルソータ出口近傍に CCD カメラ (Donpisha 3CCD Camera Vision) および LED 照明装置を配置 (図

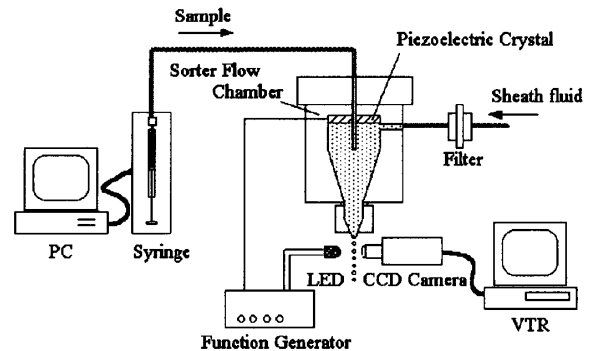


Fig. 1 Experimental setup

1), CCDカメラを通してジェット生成の様子をVTRに録画、後にPCへ画像を取り込み、データを整理した。画像内での長さを同定するため、マイクロメーターも同時に録画した。

3・1 セル・ソータ本体 セルソータ本体にはコンピュータで流量を制御されたシース液、サンプル液が供給される。シース液は流量が大きいため、シース液ポンプ内で圧力が一定になるように流量を制御するしくみとなっている。安定な作動を保つため脱気装置を通すことでシース液中の気泡を取り除き、さらにフィルタを通して粉塵を取り除いた後、セルソータチャンバー部に送り出した。フィルタを設置することで同時にシース液の脈動を抑えることができた。サンプル液の流量制御は、マイクロシリンドジをコンピューター制御したモータにより一定速度で押し上げることで行った。本実験で使用した装置チャンバー形状を図2に示す。ノズル出口直径は70 μm である。流量を制御したサンプル液はセルソータチャンバー中心部から200 μm の毛細管を通し、シース液中に噴出する仕組みとなっている。装置内部に piezo 素子を取り付けてあり、ファンクションジェネレータ(YOKOGAWA FG200)により、表面に任意の波長をもつ波を生成、滴を生成した。

3・2 ジェット可視化装置 CCDカメラ、モニタ、LED光源によりジェットから滴が形成される様子を可視化した。観察対象が100 μm 程度であるため CCDカメラ先端には50倍対物レンズを取り付け、一方、現象が高速であるためLED照明を piezo 素子の振動と同期させるストロボ撮影を行った。流れが定

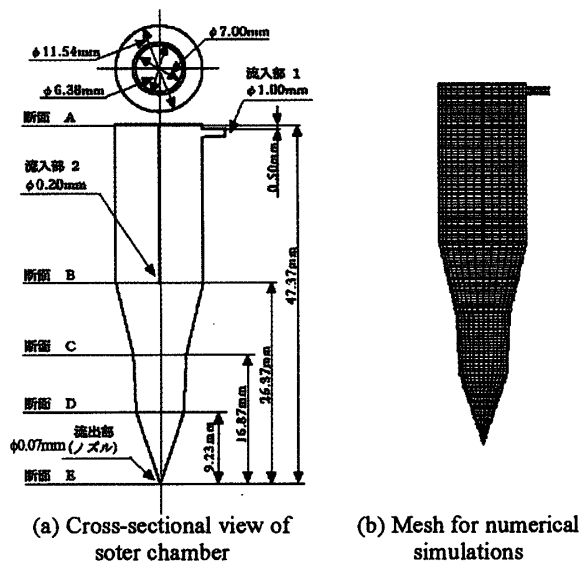


Fig.2 Flow chamber of cell sorter

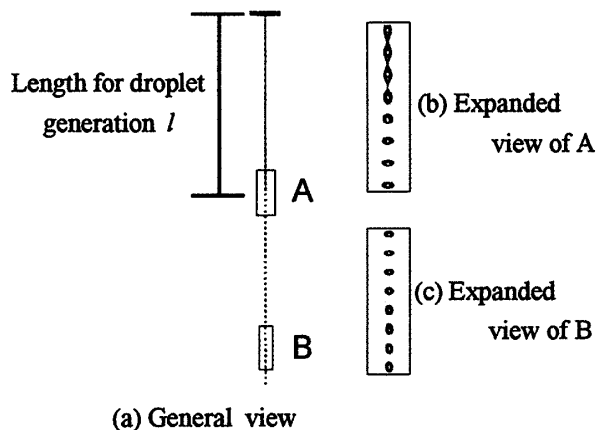


Fig.3 Pictures of droplet generation
($Q_1+Q_0=5000\mu\text{l}/\text{min}$, $f=90\text{kHz}$)

常になった後、ノズル先端から液滴が形成するまでの距離 l (図 3) を測定した。

4. 数値シミュレーション

セルソーターから噴出されるジェットのサンプル液とシース液の混合状態の詳細を知るため、装置ノズル部分に対して汎用熱流体解析プログラム StarCD(CD-adapco JAPAN)を用いて3次元解析数値シミュレーションを行った。特にノズルの側面から流入するシース液の流れ、サンプル液流入部におけるサンプル液の流れ変化に着目した。計算メッシュを図 2(b)に示す。シミュレーションから得られる結果の数値に違いが見られなくなるまでメッシュ数を増加させたことでシミュレーションの妥当性を確認し

Table 1 Physical properties of a working fluid

ρ kg/m ³	σ mN/m	μ Pa·s
1.0046×10^3	73.04	1.019×10^{-3}

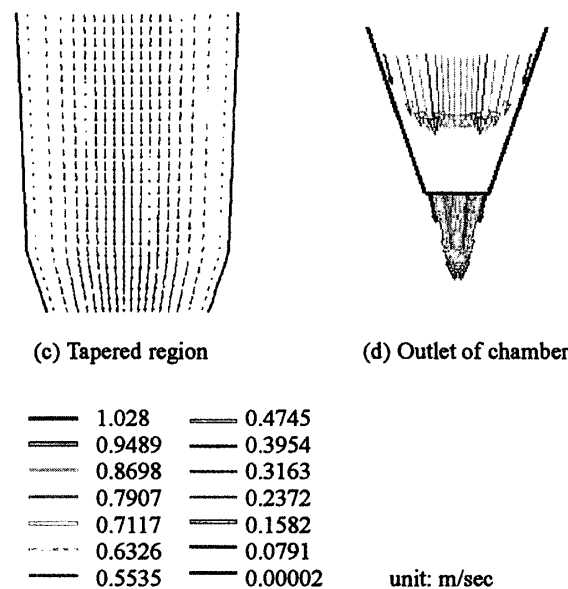
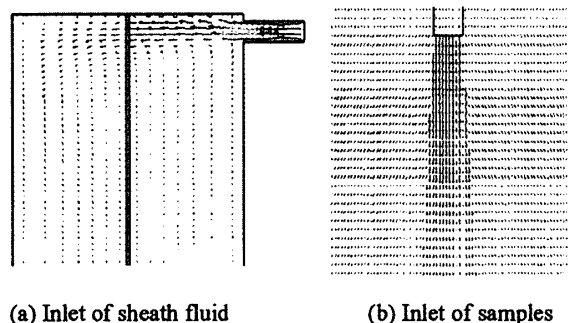


Fig. 4 Simulation results for a flow chamber

た。シミュレーションに使用した生理食塩水は実験に用いたものと同じあり、その物性値を表1に示す。入口の境界条件として、代表的な装置の作動運転範囲(層流)であるサンプル液量 $Q_1=3000\mu\text{l}/\text{sec}$ 、シース液量 $Q_0=50\mu\text{l}/\text{sec}$ となるように一様速度を設定、壁面において速度0、出口の境界条件には大気圧を設定した。

数値計算結果を部分ごとに分けて図4に示す。図中の矢印の長さや色が流れの向きと速度に対応している。シース液流入口は流れ方向に直角となる位置に存在しているため、装置上部では渦を形成(図4(a))、その後下流部で流れの向きが下向きに整うことがわかった。サンプル液流入部(図4(b))では、シース液と流速の全く異なるサンプル液が流れこむた

め、中心部のみが周りと比較して早い流れを形成する。その後、チャンバ中間部(図4(c))を経てシース液とサンプル液で十分な運動量の交換が行われ、出口部(図4(d))では速度分布は完全な放物線分布となることが確かめられた。中間部での運動量交換は、穏やかに行われていた。本装置で設定される代表的な流速では渦が発生せず、サンプル液はシース液中に強く混合されることなく、流れの中心部分のみに残り、装置からジェットとして放出されることが確認できた。サンプル液がジェット中心に保持されるということは、サンプルの保護とサンプルの検出という観点から必須の条件である。数値シミュレーションにより装置内部の詳細な流れ場を調べた結果、サンプル液とシース液は穏やかに運動量の交換を行い、出口部で放物線速度分布となるまで、本装置のチャンバ部分が十分に長いことが確認できた。

5. 実験結果および考察

先の数値シミュレーションより、装置出口部での速度分布がサンプル液とシース液の全流量で形成される放物線速度分布となっていることから、サンプル液とシース液の流量比ではなく、総流量がジェット形成と関係があることがわかり、実験結果からも同様の結果が得られた(図5)。滴を生成するためにジェット表面を振動させるピエゾ素子の周波数は40kHzと一定に保ち、横軸にサンプル液とシース液の総量、縦軸に滴が形成された位置(チャンバ出口を基準として測定)をジェット直径で無次元化してプロットした。図中にプロットした点印の違いは、それぞれシース液量の異なるものを示しているが、総流量が同じ場合にはそれぞれの滴形成位置の違いはほとんど確認されなかった。数値シミュレーション結果および実験結果を踏まえ、今後ジェット形成にはサンプル液とシース液の流量比は考慮しないものとする。

空气中へ放出されたジェットが滴を生成する条件は、これまでも線形安定性理論⁹⁾を用いた解析が行われている^{10)~12)}。表面に微小な擾乱 δ' が加えられた場合にその擾乱が成長($\alpha > 0$)または減衰($\alpha < 0$)するかを速度、圧力、形状を平均的な量と微小擾乱の項の和で表すことで調べる手法である(図6)。これ

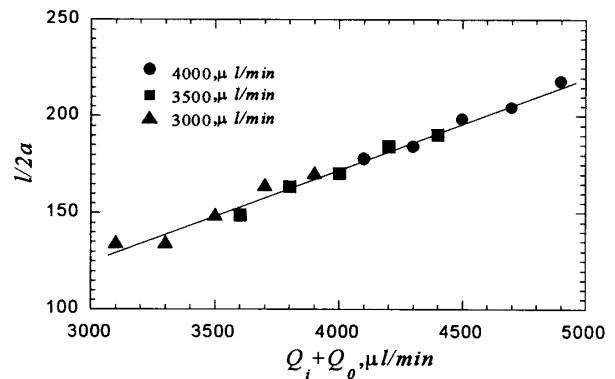


Fig.5 Effects of total flow rate on the length of drop generation ($f=40\text{kHz}$)

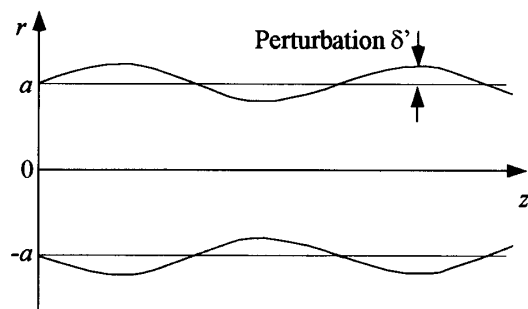


Fig.6 The model of linear analysis of liquid jet instability

までも十分に扱われている問題であるため手法の詳細は省略し、簡略化して説明する。

はじめにジェット内の基礎方程式として軸対称を仮定した円筒座標系の連続の式(1)、N-S方程式(2)(3)を考える。

$$\frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} (r \rho u_r) + \frac{\partial}{\partial z} (\rho u_z) = 0 \quad \dots (1)$$

$$\begin{aligned} \frac{\partial u_r}{\partial t} + u_r \frac{\partial u_r}{\partial r} + u_z \frac{\partial u_r}{\partial z} + \frac{1}{\rho} \frac{\partial p}{\partial r} \\ = \nu \left(\frac{\partial^2 u_r}{\partial r^2} + \frac{1}{r} \left(\frac{\partial u_r}{\partial r} \right) + \frac{\partial^2 u_z}{\partial z^2} - \frac{u_r}{r^2} \right) \end{aligned} \quad \dots (2)$$

$$\begin{aligned} \frac{\partial u_z}{\partial t} + u_r \frac{\partial u_z}{\partial r} + u_z \frac{\partial u_z}{\partial z} + \frac{1}{\rho} \frac{\partial p}{\partial z} \\ = \nu \left(\frac{\partial^2 u_z}{\partial r^2} + \frac{1}{r} \left(\frac{\partial u_z}{\partial r} \right) + \frac{\partial^2 u_z}{\partial z^2} \right) \end{aligned} \quad \dots (3)$$

半径方向の速度 u_r 、ジェット長手方向の速度を u_z 、

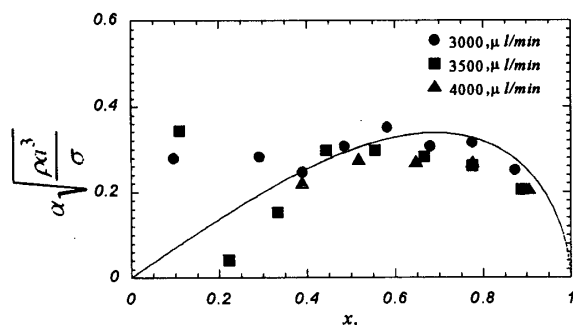


Fig.7 Growth rate of disturbances on jets

ジェット内の圧力を p とした。 $r=a$ の自由境界面では表面張力と圧力の平衡を考え、自由境界面の接線方向および法線方向の力の釣り合いおよび境界面の移動による半径変化を考慮すると

$$\mu \left(\frac{\partial u_z}{\partial r} + \frac{\partial u_r}{\partial z} \right) = 0 \quad \dots (4)$$

$$p = P - \sigma \frac{\partial^2 \delta}{\partial r^2} \quad \dots (5)$$

$$u_r = \frac{\partial \delta}{\partial t} + u_z \frac{\partial \delta}{\partial z} \quad \dots (6)$$

が成り立つ。一方、ジェット中心 $r=0$ では速度 u_r, u_z を有限とする境界条件とする。

ジェット中の流れの速度 u_r, u_z 、圧力 p 、ジェット半径 δ が次式のように平均的な項と微小擾乱の項で表されるとすると

$$u_r = U_r + u_r'(r) \exp(\alpha t + ikz) \quad \dots (7)$$

$$u_z = U_z + u_z'(r) \exp(\alpha t + ikz) \quad \dots (8)$$

$$p = P + p'(r) \exp(\alpha t + ikz) \quad \dots (9)$$

$$\delta = a + \delta'(r) \exp(\alpha t + ikz) \quad \dots (10)$$

と表せる。以上を連続の式(1)、N-S方程式(2)(3)に代入、境界条件よりジェット内部の u_r, u_z, p の解が得られ、圧力の垂直方向成分の釣り合い式(5)を考えることで最終的にWeberらの導いた以下の式(11)が得られる。

$$\alpha^2 + \alpha \frac{3\nu x^2}{\rho a^3} = \frac{\sigma}{2\rho a^3} (1-x^2)x^2, \quad x = ka \quad \dots (11)$$

式(11)を導く際に ka が十分に小さいことを仮定した。非粘性流体ジェットを仮定した場合、上記の式はレイリーの導いた式に一致する。

本研究で使用した生理食塩水の物性値(表1)を代入して得られる無次元化した擾乱の成長速度を縦軸に、無次元波数を横軸にとり図7に実線で示す。無次元波数 x が1より大きい場合には振幅の成長率が負となる絶対安定領域であるため表面の微小擾乱が成長することなく、滴は形成されない。すなわちジェット表面の波長がジェット半径よりも大きいときのみ滴が生成されることがわかる。本実験条件下では、 $x=0.72$ で擾乱の成長速度は最大値をとる。これはレイリーの安定性理論の結果から得られる結果($x=0.70$)よりやや大きい値となっており、滴形成に関して粘性の効果を考慮しなければならないことが分かる。特に粘性が大きい流体ではその差は大きくなる。一方、粘性を考慮して解析したことで、滴生成高速化のためには表面張力が大きくかつ粘性が小さい流体が滴の高速生成に適している(擾乱の成長速度のピークが小さい波数へシフトする)ことも式(11)から考察できる。

表面に形成される波の波長を実測することでジェット表面の波数を計測、その一方で振幅が大きくなってその成長速度が一定であることを仮定すると、滴が形成される位置およびジェットの流速から、微小擾乱の成長速度 α を見積もることができる。解析結果の実線と比較のため、成長速度 α の実測値を無次元化して図7にプロットした。実験から見積もった成長速度 α は、擾乱の振幅に関係なく一定であると仮定していること、線形安定性理論では擾乱振幅が限りなく小さいと仮定していること、正確に特定の波長のみをもつ擾乱を設定することが困難なことから解析値とは正確には一致しない。しかし解析から得られた成長速度の極大を与える無次元波数付近において、実験においても滴形成が早くなるといった傾向が得られ、双方に定性的な傾向の一致が見られる。実験結果からプロットした点においては波数が小さいとき、すなわち擾乱波の波長が長いときに計測値の幅が広がるが、これは実際には波長の長い純粋な正弦波をつくるのが難しいことに起因している。すなわち波長が長い擾乱波を用いる実験において、波長が短い波も擾乱に含まれていたため、成長速度の速い短波長の擾乱が卓越して成長

し、大きな成長速度 α が実測されたと考えられる。このことは正弦波の代わりに矩形波を用いた場合、周波数が小さいとき（波長が長い擾乱を加えるとき）には、常に正弦波信号よりも早く滴が生成されることでも確認できた。

6. 結 論

セルソータを高速作動させる上で重要な滴形成に関する実験ならびに解析を行った。ジェットが噴出される出口部まで装置内部の流れ分布を数値シミュレーションしたところ、通常のセルソータの運転範囲では流れ場は層流であり、サンプル液とシース液の混合が激しくないこと、出口での速度分布が放物線になるほど十分装置が長いことを確認した。装置出口は常に総流量に対応した放物線速度分布となるため、滴形成においてサンプル液とシース液の比は影響を及ぼさないことを数値シミュレーションから求め、それぞれの流量比を変化させた滴生成実験においてもその考察が正しいことを確認した。それらの結果を踏まえ、粘性の効果を考慮した線形安定性解析により表面に形成された微小擾乱の成長速度を求め、実験結果を無次元波数、無次元擾乱成長速度で整理した。結果、滴を形成するにあたり最適な擾乱の波数（最適な流量とピエゾ素子振動周波数の組み合わせ）が存在することが求められ、実験においても解析から求められた最適値にあたる波数において滴生成速度（擾乱振幅の成長速度）が増

加する結果が得られた。これら運転条件は通常セルソータを操作する者の経験に強く頼ったパラメータであったが、本論文によりその物理的な意味を解釈、作動パラメータの設定にあたり指針を与えることができた。

謝 辞

本研究は旭テクネイオン(株)との共同研究結果の一部をまとめたものである。研究の遂行にあたり、九州共立大学宇野美津夫助教授より有益なご意見を頂いたこと、九州工業大学機械知能工学科伊東智延技官、九州工業大学設計生産工学科を卒業した山本貴広君、松野真愛君、森本誠君、柴山大樹君の学生諸君には、大いに研究に協力して頂いたことをこの場に記して謝意を表す。

文 献

- (1) H. Lodish et al., *Molecular Cell Biology* (2000), W.H. Freeman and company.
- (2) A. Radbruch, *Flow Cytometry and Cell Sorting* (1999), Springer.
- (3) M.A. Van Dilla, P.N. Dean, O.D. Laerum, M.R. Melamed, *Flow Cytometry: Instrumentation and Data Analysis* (1985), Academic Press.
- (4) 土方邦夫, 宮崎康次, 井上剛良, 中別府修, *機論*, 63-605(1997), pp.261-266.
- (5) S. Chandrasekhar, *Hydrodynamic and Hydromagnetic Stability* (1961), Dover.
- (6) V.C. Weber, *Z. Angew Math. Mech.*, 11-2 (1931-4), pp.136-154.
- (7) G. Brenn, Z. Liu, F. Durst, *International Journal of Multiphase Flow*, No.26 (2000), pp.1621-1644.