

泳動濃縮マイクロフィルタにおける菌捕捉領域の数値的検討

今 福 慎太郎*, 内 田 諭^{*,1}, 朽久保 文 嘉*

(2008年8月20日受付; 2008年12月29日受理)

Numerical Investigation of Bacterial Capture Region in Dielectrophoretic Microfilter

Shintaro IMAFUKU,^{*} Satoshi UCHIDA^{*,1} and Fumiyoshi TOCHIKUBO^{*}

(Received August 20, 2008; Accepted December 29, 2008)

Dielectrophoretic devices are powerful equipment in bioscience and bioengineering, since the electrostatic force is dominant for the behavior of bioparticles in micro space. Numerical simulations of dielectrophoresis in micro region are essential for further improvement of the devices. In the present work, we modeled the capture region of bacteria in dielectrophoretic microfilter and analyzed the behavior of single *Escherichia coli* numerically. The spatial distribution of ∇E^2 was calculated at the present electrode configuration and ∇E^2 was quantitatively shown to be a decision factor for the trajectory of bacteria. If a flow rate is risen from 6.0 mL/h to 60 mL/h, the capture height reduced to 50% at a maximum. The capture height increased to 50% at a maximum when voltage is raised from 5 V to 10 V and increasing voltage disappeared blind spot region above electrodes. These results suggest that control of the operating parameters are effective for optimization design of microfilter.

1. はじめに

溶液中に存在する微生物を操作し, 選択的に分離及び抽出する技術は, 生化学研究にとどまらず, 食品の衛生管理, 病原菌の感染診断, 飲料水の品質保持など様々な分野で利用されている重要な基盤技術である^{1,2)}.

従来法としては, 培養法, PCR 法, 免疫測定法などがあるが, それぞれ, 検出時間が長い, 試薬が高価である, 装置系が複雑かつ大型である, といった問題がある. そのため, 標的菌を高速かつ高感度に分離・検出できる簡素で安価な手法が切望されている. 最近では, 半導体プロセス技術を基盤とした極微細加工の進展により, 微生物操作におけるマイクロセルの応用が容易となっている. 特に, 電界勾配を利用した誘電泳動デバイスは, 微小空間において大きな静電力を発生できるため, DNA のハンドリング³⁾や細菌の選択的濃縮⁴⁾を可能としている. 更には, 捕集菌群による電極間インピーダンスの変化から菌密度推定⁵⁻⁷⁾も行われている. これらの計測に用いる装置は, 一般に小型かつ安価なものである.

しかしながら, 誘電泳動デバイスを設計する上で, 各種用途に応じた最適構造を実験的かつ詳細に調査することは,

製造期間及びコストの増加を招く. そのため, 最適構造をシミュレーションによって事前に検証することが極めて有効である. 誘電泳動デバイスにおけるシミュレーションは, デバイス内における電界, 流速及び誘電泳動力の分布などを中心に精査されはじめている^{8,9)}. 著者らは, これらに粒子の挙動解析を組み合わせることによって, 更に現実的な設計指針データが導出できると考えた.

本研究の目的は, 電界及び流体場の定常分布計算と粒子の運動力学解析を組み合わせることにより, 基本的な電極構造を有するマイクロセル内での菌挙動特性や菌捕捉領域を精査するとともに, より複雑な3次元構造設計も検証可能な簡易解析コードの基礎を構築することである. 本解析では, 単一の大腸菌 (*Escherichia coli*: *E. coli*) の挙動を数値的に模擬し, 基本操作パラメータとして流量, 電圧及び周波数の3つに焦点を絞り, 菌捕捉領域に対する影響を調べる. さらに, 上記3条件におけるフィルタ性能の評価も行う.

2. 解析手法

2.1 力学的作用

マイクロセル内における液体中の微粒子には, 主に誘電泳動力, 粘性力及び流体圧力が作用する.

誘電泳動とは, 不均一電場中に置かれた誘電微粒子によって, 粒子と周囲媒質の分極と電場の勾配により, 誘起双極子が及ぼす力の差が発生し, 微粒子に力が作用する現象である. 誘電泳動力 F_{DEP} は次式で表せる.

キーワード: 誘電泳動, マイクロフィルタ, 大腸菌, シミュレーション, 泳動特性

* 首都大学東京大学院理工学研究科 (192-0397 東京都八王子市南大沢 1-1)

Tokyo Metropolitan University, 1-1 Minami-Osawa, Hachioji-shi, Tokyo 192-0397, Japan

¹ s-uchida@tmu.ac.jp

$$F_{DEP} = 2\pi\epsilon_m \operatorname{Re}[\hat{K}(\omega)]R^3\nabla E^2 \quad (1)$$

ここで, R は粒子の半径, ϵ は誘電率, E は電界, $\operatorname{Re}[K(\omega)]$ は Clausius-Mossotti 関数であり, 複素誘電率 $\hat{\epsilon}$ を用いて,

$$\hat{K}(\omega) = \frac{\hat{\epsilon}_p - \hat{\epsilon}_m}{\hat{\epsilon}_p + 2\hat{\epsilon}_m} \quad \text{ただし, } \hat{\epsilon} = \epsilon - \frac{\sigma}{\omega}j \quad (2)$$

で与えられる. なお, 添え字の p 及び m は誘電粒子及び媒質を表す.

また, 媒質中の粒子はストークスの定理によって以下のような粘性力を受ける.

$$F_{drag} = -6\pi\eta Rv \quad (3)$$

ここで, η は媒質の粘度, v は粒子速度である.

流体圧力には, ポアズイユの流れを仮定している. 流速 v_z と流量 Q の関係式は式(4)となる. ここで, a は平行平板間距離の半分, y は平板からの距離である.

$$v_z = \frac{3Q\{a^2 - (y-a)^2\}}{8a^4} \quad (4)$$

2.2 解析モデル

本解析では, 筆者らが開発した泳動濃縮マイクロフィルタ¹⁰⁾の菌捕捉領域部をモデル化した. 図1に解析モデルを示す. 図中の電極の内端をA点, 電極の中央をB点及び電極の外端をC点とする(以下, 文中に使用する). 2枚の金属薄膜電極は底面に配置され, その上面を大腸菌懸濁液が流通しているとする. ここで電極幅は $20 \mu\text{m}$, 電極厚は $2 \mu\text{m}$, 電極長は 1 cm , 電極間隔は $10 \mu\text{m}$ である. 電極間には高周波正弦電圧が印加されており, z 方向は $E = 0$ と仮定した.

2.3 支配方程式

本解析における支配方程式を以下に示す. x, y 方向の

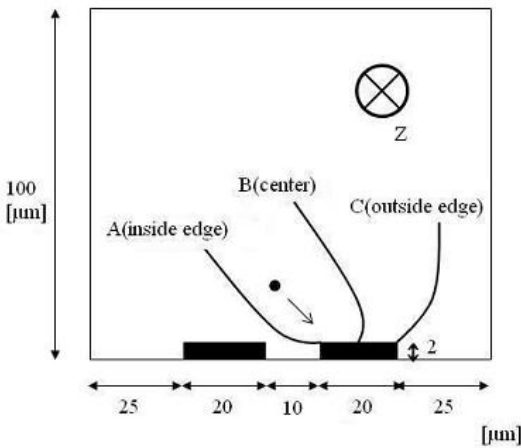


図1 解析モデル

Fig. 1 The present analytical model.

誘電泳動力及び粘性力は式(1)及び式(3)を用い, 式(5)及び式(6)の運動方程式を解くことにより, 粒子の挙動を解析する. また, z 方向には式(7)に示したように, 式(4)の速度分布を考慮する. 電位及び電界の計算はラプラスの式(8)及び式(9)により行う.

$$m \frac{d^2x}{dt^2} = F_{DEP,x} + F_{drag,x} \quad (5)$$

$$m \frac{d^2y}{dt^2} = F_{DEP,y} + F_{drag,y} \quad (6)$$

$$\frac{dz}{dt} = v_z \quad (7)$$

$$\frac{\partial^2 V}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 V}{\partial y^2} = 0 \quad (8)$$

$$E_x = -\frac{\partial V}{\partial x}, \quad E_y = -\frac{\partial V}{\partial y} \quad (9)$$

2.4 解析条件

本解析で用いる典型的なパラメータ値を表1に示す. 本解析では, 粒子を大腸菌, 媒質を純水とし, 文献から各パラメータ値^{11,12)}を採用した. ただし, 大腸菌の固有比誘電率及び導電率については式(2)が実験データと整合するように, 文献値を参考にして設定調整した.

表1 本解析で用いるパラメータ値

Table 1 Parameter value used by this analysis.

Property	SI unit	Condition
Particle		Model <i>E.coli</i>
Medium		Water
Particle radius	μm	2
Particle conductivity ^{*11)}	mS/m	323
Particle permittivity ^{*11)}	F/m	7.08×10^{-10}
Medium conductivity ^{*12)}	$\mu\text{S/m}$	10
Medium permittivity ^{*12)}	F/m	6.95×10^{-10}

電位の境界条件として, 電極部には印加電圧の実効値を, 電極部以外では電極間の電位差を線形補間して与えている. また, 流路の高さ $y = 100 \mu\text{m}$ における電位は電極から十分遠いので $V = 0$ とした. なお, 左右両端は周期境界を仮定している.

2.5 計算手法

前述の式(5)及び式(6)の運動方程式及び式(7)の速度はラグランジュ系で解いている. また, 式(8)のラプラスの式は有限差分近似により差分方程式に変形し, 逐次過緩和 (Successive Over Relaxation: SOR) 法を用いて計算している. 式(9)で表わされる電界も直交座標上で差分化す

ることにより導出している。

3. 結果及び考察

3.1 マイクロフィルタにおける基礎特性

本項では、泳動濃縮マイクロフィルタにおける基本的な諸特性として、セル内の電界及び自乗電界勾配の空間分布、大腸菌の泳動軌跡及び電極到達時間を検証する。

3.1.1 電界及び自乗電界勾配

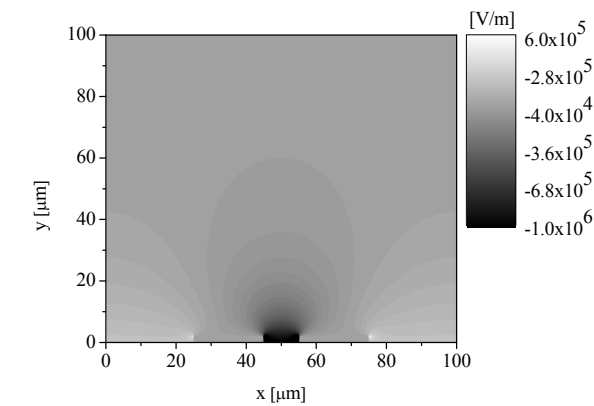
基本的な電場計算の例として、高周波正弦電圧（振幅 10 V）の最大振幅印加時における x 及び y 方向の電界分布を図 2 に示す。また、図 3 に同条件での x 方向及び y 方向の自乗電界勾配 (∇E^2) の分布 ($x = 50 \mu\text{m} - 100 \mu\text{m}$) を示す。

図 2(a)より、 x 方向では、電極間で特に強く、電極内端 (Fig.2 内 A 点) で最大値となる。そのため、A 点及び B 点近傍の電界分布は A 点のエッジ効果を受けやすい。図 2(b)より、 y 方向では、電極に近づくにつれ強くなり、特に

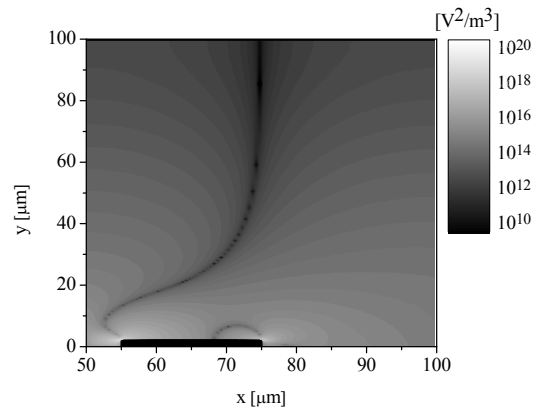
C 点で最大値をとる。そのため、電極上方の電界分布は C 点のエッジ効果を受けやすい。

一方、図 3(a)において、C 点上方から A 点に向かって ∇E^2 の値がほぼ 0 の境界線が形成され、この境界線より左側では右向きに、右側では左向きに誘電泳動力が働く。また、図 3(b)より、 y 方向では、C 点上面で値が大きくなっており、C 点で最大値をとる。よって、C 点のエッジ効果は主に y 方向の ∇E^2 により形成され、空間上方も y 方向の ∇E^2 の影響を受ける。

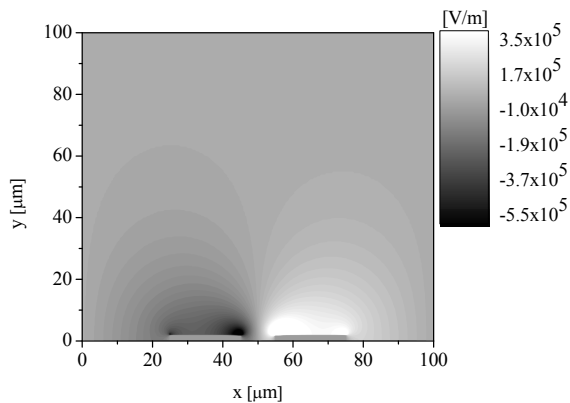
図 2 と図 3 を見て分かるように、電界分布と ∇E^2 の分布は全く違う分布形状となる。また、電圧振幅を変えた時、電界の分布形状は変わらないが、 ∇E^2 は電界の自乗で効いてくるため形状が異なる。従って、誘電泳動力に比例する ∇E^2 の値は、空間部位によって差異が生じやすいため、粒子の捕捉領域を計算する上で重要な因子となる。



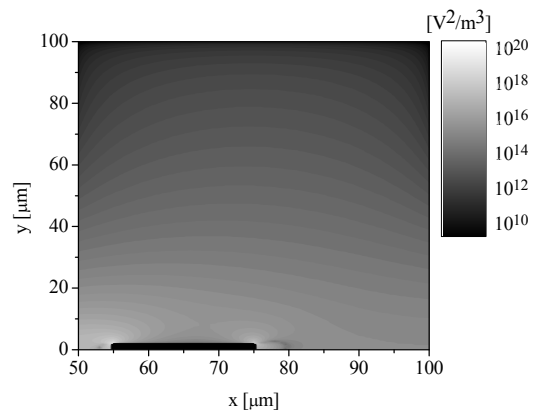
(a) x -direction.



(a) x -direction.



(b) y -direction.



(b) y -direction.

図 2 電界の空間分布

Fig. 2 Spatial distribution of electric field.

図 3 自乗電界勾配の空間分布

Fig. 3 Spatial distribution of ∇E^2 .

3.1.2 大腸菌の泳動軌跡

粒子の軌跡は、場の計算と粒子の運動力学解析を組み合わせることにより計算される。なお、本項以降では対称性を考慮して、図2の右側半分のみ表示している。3.1.1と同条件で、流量6.0 mL/h (流体の中心速度 $V_{zmax} = 0.25$ m/s) における大腸菌の泳動軌跡を図4に示す。

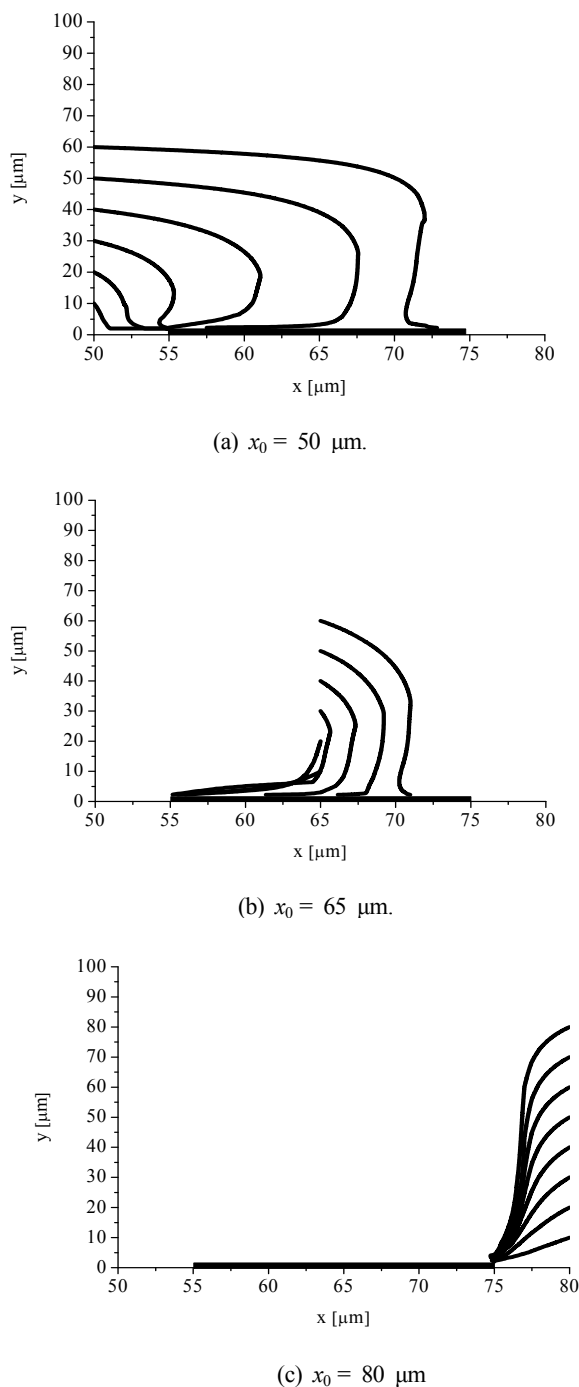


図4 捕捉領域における単一微生物の挙動
Fig. 4 Behavior of single *E.coli* in capture region.

ここでは、 $z = 0$ における初期位置の x 座標を A 点近傍、B 点、C 点近傍として、 $x_0 = 50 \mu\text{m}$ 、 $65 \mu\text{m}$ 及び $80 \mu\text{m}$ における軌跡を示した。ここで、 x_0 及び y_0 は粒子初期位置の x 座標及び y 座標を表わしている。なお、図4(a)(b)の $y_0 = 65 \mu\text{m}$ 以上及び(c)の $y_0 = 65 \mu\text{m}$ 以上の粒子は $z = 1 \text{ cm}$ の時点で捕捉されなかった。 $x_0 = 50 \mu\text{m}$ 及び $65 \mu\text{m}$ においては、 $y_0 = 30 \mu\text{m}$ 以内では A 点に、 $y_0 = 30 \mu\text{m} - 50 \mu\text{m}$ では AB 間に、 $y_0 = 50 \mu\text{m}$ 以上では C 点に捕捉される。これは、 $y_0 = 50 \mu\text{m}$ 以内では x 方向の電界の影響を受けるためである。一方、 $x_0 = 80 \mu\text{m}$ においては、C 点に捕捉される。これは、 y 方向の ∇E^2 の影響を受けるためである。また、大腸菌の泳動軌跡が図3(a)の境界線に沿っている傾向がある。従って、この境界線を正確に把握することにより、泳動軌跡も正確に検証できる。また、構造パラメータを変化させた時の軌跡を検証することで、最適なセル構造設計の指針となる。

3.1.3 電極到達時間

電極到達時間は初期位置から電極面上に粒子が到達した時間を表す。3.1.2と同条件で、各初期位置での電極到達時間を図5に示す。C点上面では y 方向の ∇E^2 の影響により、滞在時間がやや短い。また、電極上面では x 方向の ∇E^2 のひずみの影響により、捕捉できない領域(以下、死角域)が現れる。この死角域は操作パラメータあるいは構造パラメータを変えることにより解消できると考えられ、その条件を精査することによって、より捕捉率を向上させるセル構造を設計できると思われる。本条件では電極到達時間が0.04秒以内の菌を捕捉でき、図5の黒い部分は滞在時間が0.06秒(平均滞在時間)以上となるため、捕捉できない領域とみなす。また、0.04-0.06秒の菌は $z = 1 \text{ cm}$ まで流れても電極に到達する前にセルから流出する。

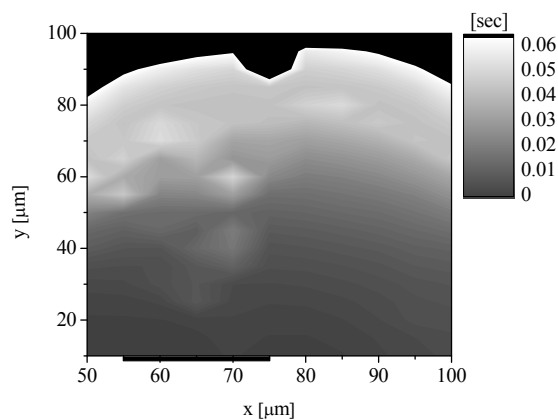


図5 電極到達時間の分布
Fig. 5 Distribution of arrival time at electrode.

3.2 捕捉距離に対する操作パラメータの影響

本項では、泳動濃縮マイクロフィルタの基本操作パラメータとして流量、電圧及び周波数の3つに焦点を絞り、捕捉距離に対する各パラメータの影響を検証する。なお、本論文では、電極面上から垂直方向に大腸菌が捕捉可能な高さを捕捉距離と定義している。また、捕捉領域は、図2の右半分 ($x = 50 - 100 \mu\text{m}$) の領域 ($50 \times 100 \mu\text{m}^2$) を100%とした時、代表3点 $x_0 = 50 \mu\text{m}$, $65 \mu\text{m}$ 及び $80 \mu\text{m}$ における捕捉距離の平均に $50 \mu\text{m}$ をかけた領域の占める割合と定義する。

3.2.1 流量

流量 6.0 mL/h の時を基準にし、流量を変化させた時の捕捉領域の増減から、流量がもたらす影響を検証する。図6に流量を 0.6 mL/h から 60.0 mL/h まで変化させた時の、 $x_0 = 50 \mu\text{m}$, $65 \mu\text{m}$ 及び $80 \mu\text{m}$ における捕捉距離の変化を示す。なお、電圧振幅 10 V 、周波数 100 kHz である。流量が 0.6 mL/h の時、 $x_0 = 50 \mu\text{m}$, $65 \mu\text{m}$ 及び $80 \mu\text{m}$ における捕捉距離はそれぞれ1.3倍、1.2倍、1.18倍と微増する。 60.0 mL/h の時、それぞれ0.67倍、0.53倍、0.56倍と激減する。流量 60.0 mL/h では流速最大付近より上では捕捉不可能となる。

流量が多いと1回当たりの処理量は小さいが、数回循環することで、処理量が増えると考えられる。そこで、循環回数に対する菌捕捉率を考え、その結果を図7に示す。ここで、循環回数とはフィルタ上を通過する回数であり、 0.6 mL/h の時を1回とし、流量を10倍、100倍にした時、経路長を無視すれば理想的な循環可能な最大回数はそれぞれ10回、100回となる。なお、毎回の捕捉率は一定とする。図7より、 6.0 mL/h の時は2回循環することで、 $60.$

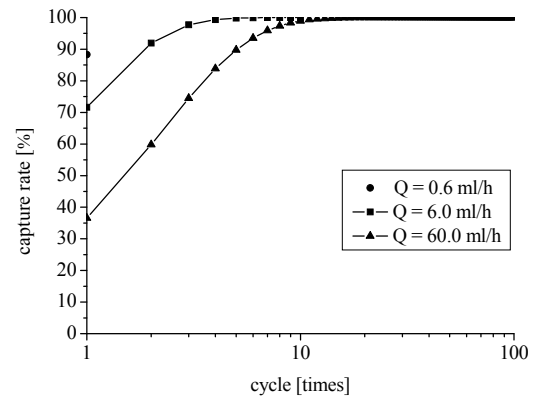


図7 循環回数に対する菌捕捉率

Fig. 7 Capture rate as a function of cycle time.

0 mL/h では5回循環することで、 0.6 mL/h の時の捕捉率を超える。また10回循環すればほぼすべての領域で捕捉可能となる。もし循環が可能であれば、無理に流量を変える必要がなく、数回循環することにより捕捉率を向上させることができる。図7の結果は、予定処理量から最適な流量を示せるので、最適設計の指標として利用できる。

3.2.2 電圧

電圧 10 V の時を基準にし、電圧を変化させた時の捕捉距離の増減から、電圧の影響を検証する。図8に電圧を 5 V から 40 V まで上げた時の $x_0 = 50 \mu\text{m}$, $65 \mu\text{m}$ 及び $80 \mu\text{m}$ における捕捉距離の変化を示す。なお、流量 6.0 mL/h 、周波数 100 kHz である。電圧 5 V の時、 $x_0 = 50 \mu\text{m}$, $65 \mu\text{m}$ 及び $80 \mu\text{m}$ における捕捉距離はそれぞれ0.83倍、0.67倍、0.75倍に、 20 V の時はそれぞれ1.16倍、1.13倍、1.12倍に、 40 V の時はそれぞれ1.25倍、1.2倍、1.18倍になる。電圧が $5 - 10 \text{ V}$ ではB点上面の死角域が存在するが、

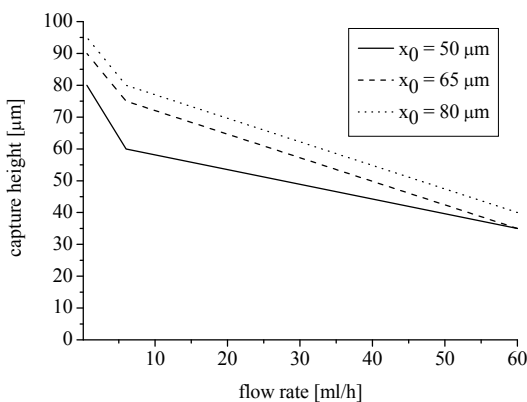


図6 捕捉距離に対する流速依存性

Fig. 6 Dependence of capture height on flow rate.

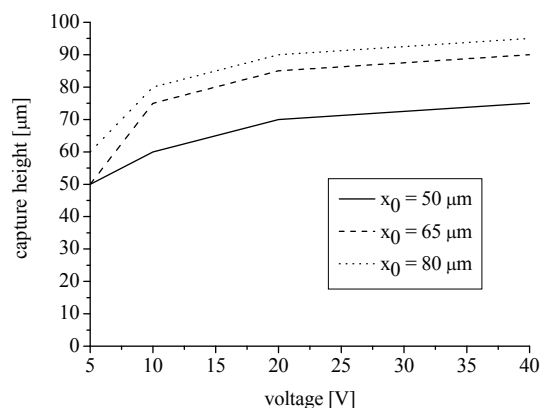


図8 捕捉距離に対する電圧依存性

Fig. 8 Dependence of capture height on voltage.

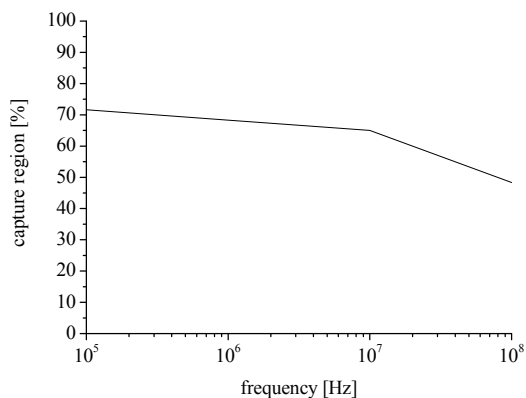
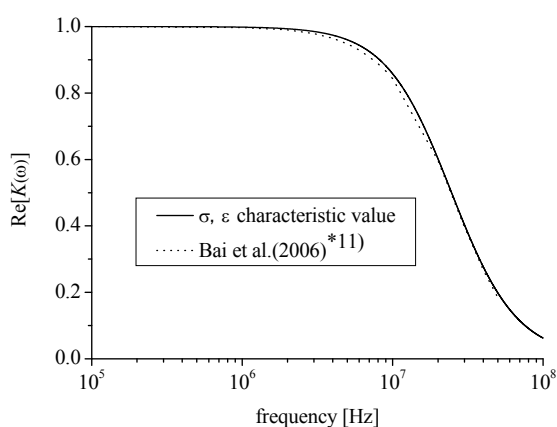


図9 捕捉領域に対する周波数依存性

Fig. 9 Dependence of capture region on frequency.

図10 $\text{Re}[K(\omega)]$ の周波数依存性Fig. 10 Frequency dependence of $\text{Re}[K(\omega)]$.

20 V 以上では改善される。これは電圧増加に伴い、 ∇E^2 の値が増加したためである。しかし、電圧 20 V 以上ではどの場所においても捕捉距離の増加率が低い。従って、捕捉領域を大幅に増加させるには、電圧の増加のみではなく、構造パラメータの変化を考慮する必要がある。

3.2.3 周波数

周波数を上げた時の捕捉領域の変化から、周波数がもたらす影響を検証する。図9に周波数 100 kHz から 100 MHz まで変化させた時の捕捉領域の変化を示す。なお、流量 6.0 mL/h、電圧振幅 10 V である。周波数が 100 kHz 時の捕捉領域は 71.6%、1 MHz の時は 68.3%、10 MHz の時は 65%、100 MHz の時は 48.3% となり、流量 6.0 mL/h では菌種に対して選択的に分離及び濃縮するためのセパレータとして十分機能してない。そこで、周波数の変化により F_{DEP} の正負や増減を決定づける $\text{Re}[K(\omega)]$ の値を検証した。図10に周波数に対する $\text{Re}[K(\omega)]$ の変化を示す。

なお、本解析条件及び文献⁸⁾での実験値使用時を比較している。汎用周波数発生装置の出力上限周波数 100 MHz 程度では $\text{Re}[K(\omega)]$ が 90% 以上減少しているが、捕捉領域は最大で 20% 程度しか減少していない。よって、セパレータとして利用するにはより捕捉領域に違いが生じる流量を選択する、または媒質の導電率を調整して負の誘電泳動を作用させる必要がある。

4. まとめ

本報では、マイクロセル内での菌挙動特性や菌捕捉領域に対する操作パラメータの影響を検証した。 ∇E^2 は捕捉領域を計算する上で重要な因子であり、 x 方向の分布における境界線を正確に把握することにより、泳動軌跡も正確に検証できる。流量の違いによる捕捉率の差は循環することによって解消でき、電圧を上げると電極上方の死角域が改善される。また、流量や媒質の導電率をうまく調整して周波数を変化させれば、セパレータとして利用できる可能性を示した。以上のように、本解析によって、操作パラメータのフィルタ性能に対する評価を行い、基本的な簡易解析コードの構築を確認した。さらに、捕捉領域に対する構造パラメータ（電極幅や電極厚など）の影響を検証することで、より複雑な 3 次元構造設計にも利用できる。

今後は、他の菌種や媒質、縦型や立体構造の電極に対する捕捉領域の検証を行い、誘電泳動マイクロフィルタのより効率的な構造を検討する。

参考文献

- 1) E. De Boer and R. R. Beumer: Int. J. Food Microbiol., **50** (1999) 119
- 2) D.I. Ellis and R. Goodacre: Trends Food Sci. Technol., **12** (2001) 414
- 3) 鷲津正夫, 川端智久, 黒澤 修, 鈴木誠一: 電子情報通信学会論文誌 C, **J83-C** (2000) 1
- 4) L. Yang, and R. Bashir: Biotechnol. Adv., **26** (2008) 135
- 5) D.W.E. Allsopp, K.R. Milner, A.P. Brown and W.B. Betts: J. Phys. D: Appl. Phys., **32** (1999) 1066
- 6) J. Suehiro, R. Yatsunami, R. Hamada and M. Hara: J. Phys. D: Appl. Phys., **32** (1999) 2814
- 7) J. Suehiro, R. Hamada, D. Noutomi, M. Shutou and M. Hara: J. Electrostat., **57** (2003) 157
- 8) C.X. Song, G. Liu, H. Li and X. Han: Eng. Anal. Bound. Elem., **30** (2006) 994
- 9) S.H. Molla, J.H. Masliyah, Subir Bhattacharjee: J. Colloid Interface Sci., **287** (2005) 338
- 10) 円城寺隆治, 尼子恵里, 内田 諭, 朽久保文嘉: 静電気学会誌, **31** (2007) 8
- 11) W. Bai, K.S. Zhao and K. Asami: Biophys. Chem., **122** (2006) 136
- 12) 国立天文台: 「理科年表 平成 16 年版」