

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19H02061

研究課題名（和文）非焦点粒子像と光干渉を用いたナノ空間3次元3成分超解像度流速分布計測法の開発

研究課題名（英文）Development of a 3D3C super-resolution measurement method for flow velocity distribution in nanospace utilizing defocusing particle image with light interference

研究代表者

嘉副 裕（Kazoe, Yutaka）

慶應義塾大学・理工学部（矢上）・准教授

研究者番号：20600919

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：流体工学が光の波長より小さいナノ空間へと進展している。空間サイズが数100 nm以下になると液体の物性変化など様々な特異現象が発現するため、この空間の物質輸送を明らかにする超解像度（10 nm分解能）の流速分布計測が重要となる。本研究では、レンズの結像で問題となる球面収差を活用して、非焦点領域の粒子像からナノ粒子の位置を10 nm分解能で検出するデフォーカス・ナノ粒子画像流速計（PIV）を開発した。球面収差を伴うナノ粒子の非焦点像の特性を明らかにして、計測システムを構築することで、ナノ空間の圧力駆動流における粒子速度分布計測を実現した。ナノ流体工学をはじめ様々な分野への波及効果が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

数10 nm～数100 nmのナノ空間における輸送現象は、ナノ流体工学といった先端研究分野だけではなく、細胞内・細胞間空間における機能の理解や、透析膜といった多孔質材料の開発など、様々な分野で重要なトピックである。本研究は、このようなナノ空間の中の現象を光の回折限界を超える10 nm分解能（超解像度）で捉えるための計測法を開発するものであり、生物物理、膜工学など様々な分野の発展に大きく寄与するものである。また、近年、超解像度計測法の開発が世界中で加速する中、本研究はこれらの計測法で実際の現象を捉えるための1つの設計指針を提案しており、超解像度計測法の発展に寄与できる点でも学術的意義が大きい。

研究成果の概要（英文）：The field of fluid engineering has expanded to nanospaces smaller than the light wavelengths. When the space size becomes smaller than 1000 nm, various specific phenomena such as changes of liquid properties appear. Therefore, super-resolution measurements of flow velocity distribution with 10 nm spatial resolution become important for understanding of transport phenomena in nanospaces. In this study, by utilizing spherical aberration, which is a problem in the imaging, we developed defocusing nano-particle image velocimetry (PIV) to determine the position of nanoparticles with 10 nm spatial resolution based on particle images in the defocused region. Characteristics of defocused nanoparticle images with spherical aberration was revealed and a measurement system was constructed. We realized measurements of velocity distribution of nanoparticles migrating with pressure-driven flow in nanospace. This work will greatly contribute to advancements of various fields such as nanofluidics.

研究分野：マイクロ・ナノ流体工学

キーワード：ナノ流路 粒子画像流速計 超解像 ナノ流体工学

### 1. 研究開始当初の背景

流体デバイスを微小化・高機能化する工学が発展し、100 nm のナノ空間へと進展している。支配的な表面効果と超微量体積 (aL-fL) を利用することで、イオン/分子の超高効率分離・選択的輸送や生体 1 分子検出/計測等が実現し、分離工学やバイオ・医療分野の発展に繋がると期待される。しかし、ナノ空間はマイクロの分子挙動が顕在化する領域であり、バルクとは現象が全く異なる。申請者らは、幅・深さとも数 100 nm のナノ空間では水が構造化して物性も変化することを見出した (Kazoe *et al.*, *J. Phys. Chem. Lett.*, 3, 2447-2452, 2012 など) よって、ナノ空間流動現象の解明が極めて重要である。

ナノ空間流動現象の理解には流速分布計測が課題となるが、空間が光の波長より小さいため通常の顕微鏡法での達成は極めて難しい。そこで申請者は、光の全反射に伴うエバネッセント波と 10 nm 蛍光ナノ粒子を利用することで、100 nm より小さい分解能でナノ粒子の位置と速度を求める粒子画像流速計 (PIV) を開発した (Kazoe *et al.*, *Anal. Chem.*, 85, 10780-10786, 2013)。ナノ粒子の速度が流速を反映するため、流速分布を得ることができる。しかし、全反射面を形成する原理的制約のため、幅  $\mu\text{m}$ ・深さ 100 nm のナノ流路の計測に限定されるという問題があった。

そこで申請者は、図 1 のように、レンズの結像で問題となる球面収差を積極活用して非焦点粒子像に回折環を発生させ、回折環のサイズからナノ粒子の深さ位置を求めることで、数 10 nm の分解能を有する“デフォーカス・ナノ PIV”を実現できると着想した。本手法は直入射による同軸照明が可能のため、流路幅に対する光学的原理上の制約がない。よって、幅・深さとも数 100 nm のナノ空間における 3 次元 3 成分流速分布計測にも適用できる。

### 2. 研究の目的

本研究では、デフォーカス・ナノ PIV の開発と原理検証を目的とした。球面収差を伴う非焦点ナノ粒子像の特性を明らかにして、計測システムを構築した。また、ナノ粒子挙動の統計力学的解析により計測条件を検討し、流速分布計測の原理検証に取り組んだ。具体的には、以下の研究項目に取り組んだ。

研究項目 A) ナノ粒子のデフォーカス像の解析と超解像度分解能の検証

研究項目 B) 計測システムの構築と条件の検討

研究項目 C) ナノ流路の流速分布計測の検証

### 3. 研究の方法

#### (1) A) ナノ粒子のデフォーカス像の解析と超解像度分解能の検証

対物レンズの球面収差と非焦点領域のナノ粒子像との関係を明らかにして、粒子位置検出における超解像度分解能を検証した。図 2 のように、顕微鏡、対物レンズ、ピエゾステージ、高感度 EMCCD カメラによる非焦点ナノ粒子像の可視化システムを構築した。対物レンズの球面収差と開口数 (NA) が直径 24 nm ~ 100 nm のナノ粒子の非焦点像に及ぼす影響を評価した。ここで、対物レンズの補正環を利用して球面収差を制御した。得られた結果にもとづき可視化条件を最適化し、更に非焦点粒子像の画像処理アルゴリズムを構築して、非焦点像を用いた粒子位置検出の超解像度分解能を検証した。

#### (2) B) 計測システムの構築と条件の検討

波長 532 nm の高出力レーザー、音響光学素子 (AOM) による計測システムを構築し、上述の可視化系を組込んだ。AOM により連続光レーザーをパルス光に変換して、パルス幅と間隔を制御することで計測の時間分解能を制御した。

PIV により流速分布を得るには、可能な限りサイズの小さなトレーサ粒子の使用が望ましい。しかし、粒子サイズが小さくなると、粒子から生じる蛍光が微弱となり S/N 比が低下し、空間分解能の低下を招く。また、トレーサ粒子のサイズが 10 nm まで小さくなると、粒子のブ

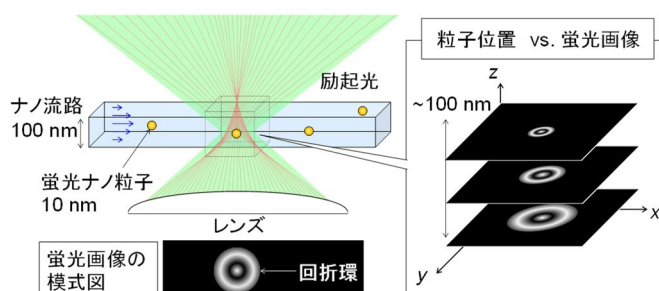


図 1 デフォーカス・ナノ PIV の原理

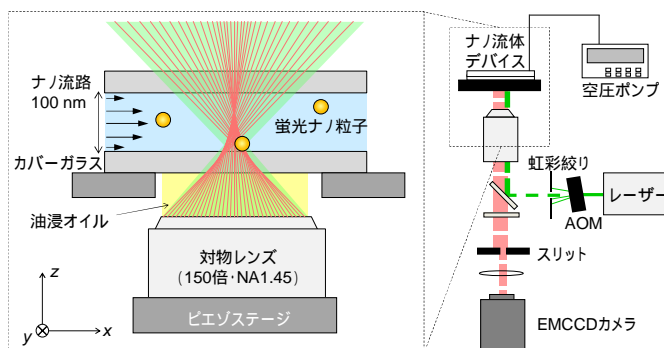


図 2 デフォーカス・ナノ PIV の計測システム

ラウン運動の移動量 ( $(2D\Delta t)^{1/2}$ ,  $D$ : 拡散係数,  $\Delta t$ : 時間分解能) がナノ流路と同程度にまで大きくなり、計測誤差の要因となる。そのため、時間分解能を小さくする必要はあるが、計測システムの制約上限界がある。以上から、対象とするナノ流路と使用するトレーサ粒子について、流速分布を取得するために十分な時空間分解能を確保できているかを検討する必要がある。

そこで、ランジュバン方程式を用いたナノ粒子挙動の解析にもとづき PIV のデータを数値計算し、時空間分解能が計測結果に及ぼす影響を評価した。

### (3) C) ナノ流路の流速分布計測の検証

構築したデフォーカス・ナノ PIV の計測システムを用いて、幅  $50\mu\text{m}$ 、深さ  $400\text{ nm}$  のナノ流路の流速分布を計測した。

## 4. 研究成果

### (1) A) ナノ粒子のデフォーカス像の解析と超解像度分解能の検証

図 3 に 150 倍、 $\text{NA} = 1.45$  の対物レンズを用いて得られた  $67\text{ nm}$  ナノ粒子の非焦点像を示す。

ナノ粒子の位置  $z$  の変化に対する非焦点粒子像の回折環の半径  $R$  の変化  $|dR/d\Delta z|$  を求めた。ここで、 $|dR/d\Delta z|$  が大きいほど回折環の半径  $R$  を用いて高い空間分解能でナノ粒子位置  $z$  が得られることを意味している。得られた結果から、 $|dR/d\Delta z|$  を最大化するための最適な球面収差  $0.21\lambda$  を見出した。また、対物レンズの  $\text{NA}$  が大きいほど  $|dR/d\Delta z|$  が大となることが判った。更に、ナノ粒子径を変化させても  $|dR/d\Delta z|$  はほぼ一定であった。これは  $24\text{ nm} \sim 100\text{ nm}$  のナノ粒子が光の波長よりも十分小さく蛍光の点光源とみなせるため、ナノ粒子径が非焦点粒子像の特性に及ぼす影響が無視できるほど小さいことを意味している。以上から、デフォーカス・ナノ PIV によるナノ流路の流速分布計測には 150 倍、 $\text{NA} = 1.45$ 、球面収差  $0.21\lambda$  の対物レンズと直径  $67\text{ nm}$  の蛍光ナノ粒子を用いることとした。

上記の対物レンズを用いて得た非焦点粒子像から回折環の半径  $R$  を求めるため、二値化およびガウシアンフィッティングで構成される画像処理アルゴリズムを構築した。これにより、光の波長よりも小さい  $40\text{ nm}$  の超解像度空間分解能を実現した。

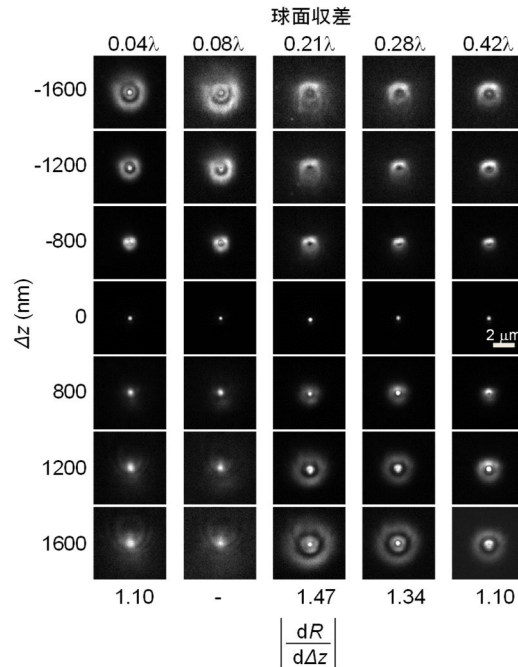


図 3 67 nm ナノ粒子の非焦点像

### (2) B) 計測システムの構築と条件の検討

項目 A で開発した可視化系を組込んだ計測システムを構築し、時間分解能  $160\mu\text{s}$ 、空間分解能  $40\text{ nm}$  のデフォーカス・ナノ PIV を実現した。

構築した計測システムによる時空間分解能が十分かを検討するために、図 4 のように深さ  $400\text{ nm}$  のナノ流路における圧力駆動流と直径  $60\text{ nm}$  のナノ粒子を想定し、PIV のデータを数値計算した。ナノ粒子は流体の流れとブラウン運動によりナノ流路の中を移動する。このとき、PIV 計測は有限の時間分解能を伴うため、得られる粒子速度は時間分解能内での平均値となる。また、計測に伴う有限の空間分解能に起因して、得られるデータにはランダム誤差が生じる。数値計算により得られた結果から、ナノ空間の流動現象 (理論値) を反映した計測結果を得るには、時間分解能  $160\mu\text{s}$ 、空間分解能  $20\text{ nm}$  という超高性能の計測が必要であることが判った。また、分解能が不足する場合、理論値の流速分布を平坦化した速度分布が計測結果として得られることも判った。即ち、ナノ空間の超解像度流動計測では、分解能が不足する場合、アーチファクトが生じて実際の現象を捉えることが難しくなることを意味している。

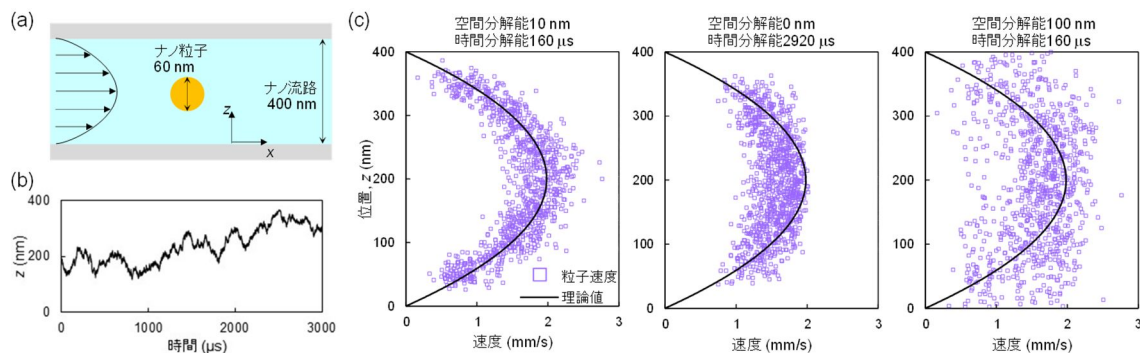
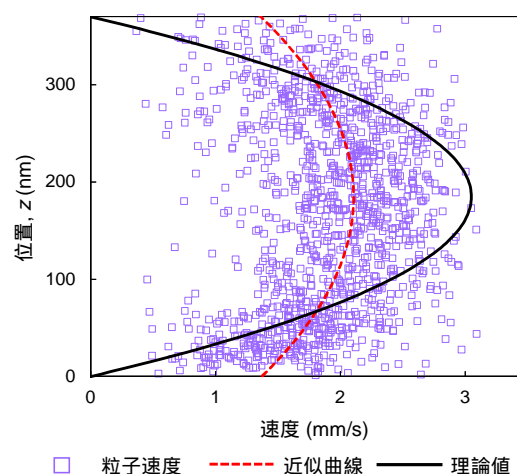


図 4 ナノ粒子挙動の統計力学的解析による PIV の数値計算: (a) 想定する流動場、(b) ナノ粒子挙動の計算結果、(c) 異なる分解能における PIV の数値計算データ

### (3) C) ナノ流路の流速分布計測の検証

図5に計測で得られた深さ400 nmのナノ流路の圧力駆動流におけるナノ粒子の速度分布を示す。計測により得られたナノ粒子の速度分布は、壁面すべりなしの境界条件における流速分布の理論値と比較して平坦であることが判る。ここで、ナノ粒子挙動の統計力学解析の結果を踏まえると、本研究で実現した時間分解能 $160\mu\text{s}$ は実現現象を捉えるために必要な要求( $160\mu\text{s}$ )を満たす一方、空間分解能40 nmは必要な要求(20 nm)を満たしていない。そのため、得られた結果には、計測分解能の不足によるアーチファクトの影響が含まれると考えられる。実際に、画像処理アルゴリズムを改善して空間分解能を向上させ再度測定を行ったところ、理論値に近い結果が得られた。

以上より、本研究により、デフォーカス・ナノPIVによるナノ空間の粒子速度分布計測に初めて成功した。得られた結果を踏まえ、今後更なる計測システムの開発を進めて時空間分解能を向上させることで、ナノ空間の流動現象解明に繋がると期待される。また、数100 nmのナノ空間の流動計測に必要な時空間分解能の指針を示した本研究の成果は、近年開発が盛んな超解像度の粒子追跡法における1つの設計指針となる重要な成果である。



□ 粒子速度    - - - 近似曲線    — 理論値  
図5 デフォーカス・ナノPIVにより得られたナノ流路における粒子速度分布

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 7件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yuki Kuwano, Minoru Tanaka, Yutaka Kazoe	4. 巻 131
2. 論文標題 Motion of submicrometer particles in micrometer-size channel measured by defocusing nano-particle image velocimetry	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Applied Physics	6. 最初と最後の頁 104701
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1063/5.0080473	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Minoru Tanaka, Itsuo Hanasaki, Yutaka Kazoe	4. 巻 -
2. 論文標題 Development of Measurement Technique for Nanochannel Flows by Defocusing Nano-particle Image Velocimetry	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of MicroTAS2021	6. 最初と最後の頁 1781-1782
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kensuke Mino, Yutaka Kazoe	4. 巻 -
2. 論文標題 Drag Reduction in Nanofluidic Channels by Integration of Nanopillars with Controlled Dimension and Geometry	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of MicroTAS2021	6. 最初と最後の頁 1403-1404
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yutaka Kazoe, Minoru Tanaka, Itsuo Hanasaki	4. 巻 -
2. 論文標題 Measurement of Pressure-Driven Flow in a Nanochannel by Defocusing Nano-Particle Image Velocimetry	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proceedings of MicroTAS2022	6. 最初と最後の頁 1223-1224
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Koki Shoda、Minori Tanaka、Kensuke Mino、Yutaka Kazoe	4. 巻 11
2. 論文標題 A Simple Low-Temperature Glass Bonding Process with Surface Activation by Oxygen Plasma for Micro/Nanofluidic Devices	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Micromachines	6. 最初と最後の頁 804 ~ 804
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/mi11090804	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yutaka Kazoe、Kazuki Shibata、Takehiko Kitamori	4. 巻 93
2. 論文標題 Super-Resolution Defocusing Nanoparticle Image Velocimetry Utilizing Spherical Aberration for Nanochannel Flows	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 13260 ~ 13267
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.analchem.1c02575	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yutaka Kazoe、Yan Xu	4. 巻 12
2. 論文標題 Advances in Nanofluidics	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Micromachines	6. 最初と最後の頁 427 ~ 427
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/mi12040427	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 田中美典、花崎逸雄、嘉副裕	4. 巻 2020年12月号
2. 論文標題 粒子追跡法によるナノ空間流速分布計測に向けたナノ粒子挙動の統計力学的解析	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 流れ	6. 最初と最後の頁 5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shu Matsuura, Yutaka Kazoe, Takehiko Kitamori	4. 巻 -
2. 論文標題 Femto-liter protein purification by parallel two-phase nanofluidics	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proceedings of MicroTAS2019	6. 最初と最後の頁 616-617
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 桑野湧輝, 田中美典, 嘉副裕
2. 発表標題 デフォーカスナノ粒子画像流速計によるマイクロ流路の粒子速度分布計測
3. 学会等名 日本機械学会第12回マイクロ・ナノ工学シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 嘉副裕
2. 発表標題 ナノ流体工学による超高感度1分子分析技術の開発
3. 学会等名 第5回 Skin Disease Research Conference (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 嘉副裕, 美濃賢佑
2. 発表標題 撥水・撥油ナノ構造の集積化によるナノ流路の流体抵抗低減
3. 学会等名 日本機械学会第100期流体工学部門講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Minori Tanaka, Itsuo Hanasaki, Yutaka Kazoe
2. 発表標題 Development of Measurement Technique for Nanochannel Flows by Defocusing Nano-particle Image Velocimetry
3. 学会等名 The 25th International Conference on Minituarized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kensuke Mino, Yutaka Kazoe
2. 発表標題 Drag Reduction in Nanofluidic Channels by Integration of Nanopillars with Controlled Dimension and Geometry
3. 学会等名 The 25th International Conference on Minituarized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yutaka Kazoe, Minori Tanaka, Itsuo Hanasaki
2. 発表標題 Measurement of Pressure-Driven Flow in a Nanochannel by Defocusing Nano-Particle Image Velocimetry
3. 学会等名 The 26th International Conference on Minituarized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2022) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中美典、花崎逸雄、嘉副裕
2. 発表標題 粒子追跡法によるナノ流路の流速分布計測に向けたナノ粒子挙動の統計力学的解析
3. 学会等名 日本機械学会2020年度年次大会
4. 発表年 2020年



1. 発表者名 Shu Matsuura, Yutaka Kazoe, Takehiko Kitamori
2. 発表標題 Femto-liter protein purification by parallel two-phase nanofluidics
3. 学会等名 The 23rd International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (&micro;TAS 2019), Basel, Switzerland (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 マイクロ・ナノ熱工学の進展編集委員会、丸山 茂夫、稲田 孝明ほか17名	4. 発行年 2021年
2. 出版社 エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 808
3. 書名 マイクロ・ナノ熱工学の進展	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>熱流体工学研究室  <a href="http://www.tfe.sd.keio.ac.jp/">http://www.tfe.sd.keio.ac.jp/</a>          Researchmap  <a href="https://researchmap.jp/read0137087/misc/32556128">https://researchmap.jp/read0137087/misc/32556128</a></p>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	花崎 逸雄  (Hanasaki Itsuo)  (10446734)	東京農工大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授    (12605)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------