

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25630048

研究課題名(和文) マルチアングルマイクロPIV法を用いた血流と白血球の運動の同時計測

研究課題名(英文) Measurement technique for velocity distribution of blood flow and dynamics of rolling leukocyte using multi angle micro PIV

研究代表者

杉井 康彦 (Sugii, Yasuhiko)

東京大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90345108

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：循環器系疾患の原因のひとつと考えられている血管内皮上の白血球のローリングや細胞間に浸潤のメカニズム解明のため、マイクロ流路側方より白血球の回転・並進運動を計測するための長焦点マイクロPIVシステムを開発し、白血球を模擬した蛍光粒子の並進・回転運動を計測した。また、白血球の運動計測のためのマイクロフローフォーカシングデバイスを作成し白血球の位置制御を可能とした。さらに、共焦点マイクロPIVシステムを用いて白血球を模擬した粒子周りの3次元速度分布を計測した。

研究成果の概要(英文)：Arteriosclerosis is a serious disease to cause cerebral infarction and myocardial infarction although the cause is still unclear. It is known that leukocyte rolls over the vascular endothelial cell and subsequently adheres to the cell mediated by some receptors as an early stage of the arteriosclerosis. In this study, we developed a technique to measure the rolling behavior of a cell flowing in a microchannel which mimicked blood vessel. To control leukocyte position for ensemble averaging, micro focusing device was developed. Three dimensional velocity distribution of fluorescence particle model for leukocyte in the micro focusing device was measured using confocal micro particle image velocimetry (PIV) technique.

研究分野：流体工学

キーワード：バイオ流体 流体計測 マイクロデバイス 白血球

1. 研究開始当初の背景

現代社会において、循環器系疾患による死亡率が国民死亡原因の約 30% となっているが、抜本的な治療法は未だ確立されておらず、予防が極めて重要である。これまでに、動脈硬化性疾患の患者は、血液中の特定のたんぱくが発現して血管内皮細胞が活性化し、白血球の接着因子が発現し、白血球が血管内皮上を転がるローリングや細胞間に侵入する浸潤が有意に増加することが報告されている。一方、血管中では赤血球が管中央付近を流れるに対し、白血球は血管壁近傍を流れることが報告されている。しかしながら、接着因子、接着力・血液による流体力と白血球のローリングや浸潤との関係は未だ明らかになっていない。

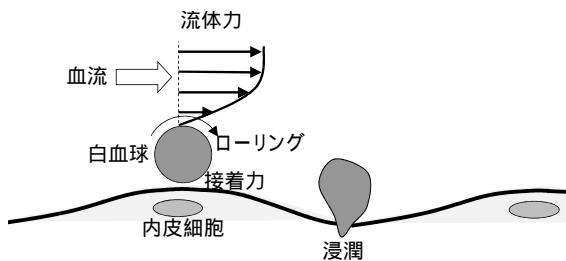


図 1 血管内皮細胞上の白血球のローリング・浸潤

2. 研究の目的

血管内皮細胞近傍の速度場と内皮細胞上をローリングする白血球の回転・並進運動とを同時に可視化計測する手法を開発し、血管内皮細胞を培養したマイクロチップ内に白血球を流して、白血球のダイナミクスを計測し、流体力と接着力の推定、および接着因子との関係を明らかにする。白血球のダイナミクスの解明のため

1. マルチアングルマイクロ PIV 法を用いた血流の速度場と白血球の運動の同時計測法の開発

2. 血流の速度分布と白血球の回転・並進運動の計測

を行い、血管疾患の原因解明にとって重要な力学的な因子の解明を目指す。

3. 研究の方法

白血球のダイナミクスの解明のため、血流の速度場と白血球の運動の同時計測法可能なマルチアングルマイクロ PIV 法を開発し、マイクロ流路内で培養した血管内皮細胞の上をローリングする白血球の運動を計測する。マルチアングルマイクロ PIV 法は、マイクロ流路下方に高速共焦点マイクロ PIV システムを設置し、ピエゾアクチュエータを用いて焦点位置を走査して白血球の周りの 3 次元流れ場を計測するとともに、マイクロ流路側方から長焦点マイクロ PIV システムを設置し、白血球の回転・並進運動を計測する手法である。

(1) 白血球の運動計測のためのマイクロフローフォーカシングデバイスの開発

マイクロフローフォーカシング法を用いて、流路内での任意の位置に白血球を供給するデバイスの設計・作成を行う。4 大学ナノ・マイクロファイブレーションコンソーシアムにて所有しているクリーンルーム、レーザー描画装置、マスクアライナなどを用いて、PDMS (polydimethylsiloxane) 製マイクロ流路を作成する。白血球のモデル粒子として粒径 $10\mu\text{m}$ のポリスチレン製蛍光粒子と粒径 $1\mu\text{m}$ 程度の蛍光粒子を混入した培養液とを流し、高速共焦点マイクロ PIV システムを用いて、速度分布を計測する。

(2) マイクロ流路側方より白血球の回転・並進運動を計測するための長焦点マイクロ PIV システムの開発

血管内皮細胞上をローリングする白血球の運動を計測するため、マイクロ流路側方より観察可能な長焦点マイクロ PIV システムを開発する。長焦点マイクロ PIV システムは、共焦点マイクロ PIV との融合による同時計測が可能となるように、その光学素子の配置に留意して開発を行う。また、流路側壁を通じて観察・計測を行うため、PDMS 製の流路側壁の表面性状が非常に重要となるため、光学的に平坦な流路側壁を製作するための Deep RIE などのマイクロファブリケーションプロセスや側壁厚みなどの最適化を行い、粒径 $1\mu\text{m}$ の蛍光粒子を流してマイクロ流路内の流速分布を計測して検証実験を行う。開発したシステムをマイクロ流路内の白血球の運動計測に適用し、その有効性を確認する。白血球の運動の計測のため、粒径 $1\mu\text{m}$ 程度の蛍光粒子に表面処理を行い、白血球に接着させる方法を検討する。白血球に接着させた蛍光粒子の挙動から血管内皮細胞上を流れる白血球の並進・回転移動を計測する。

(3) 白血球周りの 3 次元速度分布計測

白血球のモデル粒子として粒径 $10\mu\text{m}$ 程度のポリスチレン製蛍光粒子を用いて、開発した計測法の精度検証を行う。側方観察法を用いて、粒子の並進・回転運動の計測を行う。共焦点マイクロ PIV 法を用いて、白血球周りの 3 次元速度分布の計測を行う。

4. 研究成果

(1) 白血球の運動計測のためのマイクロフローフォーカシングデバイス

シースフローを用いたマイクロフローフォーカシング法を用いて、流路内での任意の位置に白血球を供給するデバイスの設計・作成を行った。図 2 に作成したデバイスを示す。白血球を流すための流路は、幅 $100\mu\text{m}$ 、高さ $120\mu\text{m}$ であり、その両側に幅 $100\mu\text{m}$ 、高さ $120\mu\text{m}$ の流路を配置し、流量を変化させることによって白血球の位置を制御することができる。直径 $10\mu\text{m}$ の蛍光ポリスチレン

ン粒子を用いて流路中央に位置制御可能であることを確認した。

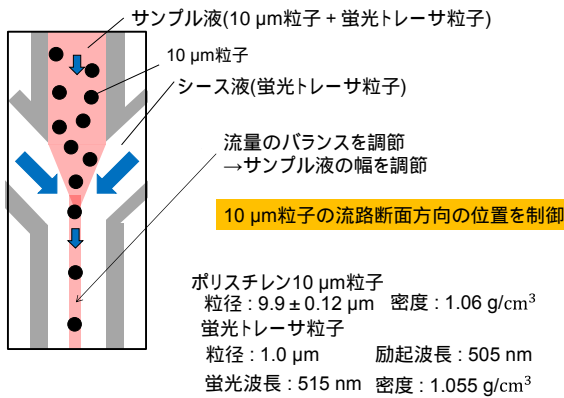


図2 マイクロフローフォーカシングデバイス

(2) マイクロ流路側方より白血球の回転・並進運動を計測するための長焦点マイクロPIVシステム

図3に側方観察用PDMS製マイクロ流路の概要を示す。白血球の回転運動を計測するためには、20倍程度の倍率が必要であるが、レンズ先端と計測対象までの距離をレンズの作動距離以下にする必要がある。そこで、PDMS側壁の厚さを120 μmと薄くし、流路側壁越しの観察を可能とした。流路の幅は100 μm、高さは130 μmである。図4に側方観察用長焦点マイクロPIVシステムを示す。倒立顕微鏡の対物レンズとマイクロ流路との間に、反射角45度のプリズムを設置し、側壁越しにマイクロ流路内の観察を行った。水銀ランプを励起光源として、流路内を照明し、超長焦点距離を有する20倍の対物レンズ、蛍光フィルタおよびsCMOSカメラを用いて蛍光画像を取得した。

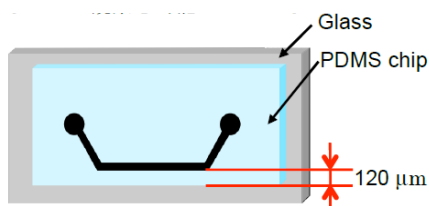


図3 側方観察用流路

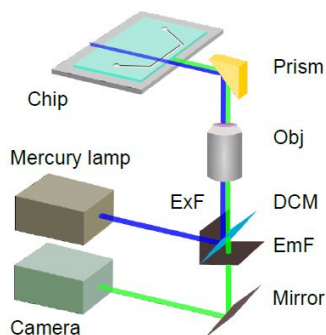


図4 側方観察用長焦点マイクロPIVシステム

本手法を用いた並進・回転運動計測の評価のため、白血球を模した粒子を作製した。白血球と同程度の大きさである直径10 μmの表面にアミノ基(-NH₂)を持つ非蛍光粒子と直径1 μmのカルボキシル基(-COOH)を持つ蛍光粒子を縮合重合により化学的に結合させて蛍光標識化した粒子を作成した。作成した粒子を図5に示す。直径10 μmの非蛍光粒子表面に直径1 μmの蛍光粒子が4個程度結合しており、この4個の粒子の運動を解析することによって、並進・回転運動を求めることができる。

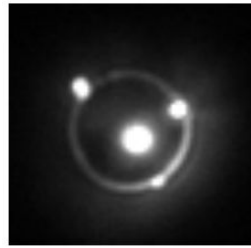


図5 並進・回転運動計測用粒子

作製した粒子を用いて、マイクロ流路内での並進・回転挙動の計測を行った。側方観察用長焦点マイクロPIVシステムによって得られた可視化画像を図6(a)、接着した蛍光粒子の軌跡を図6(b)に示す。非蛍光粒子は流路底面付近を転がりながら流れていることが確認できる。非蛍光粒子に付着した蛍光粒子から非蛍光粒子の中心を求め、並進速度を求めた。並進速度は約170 μm/sとなった。また、蛍光粒子の運動から非蛍光粒子の回転速度を求めた。

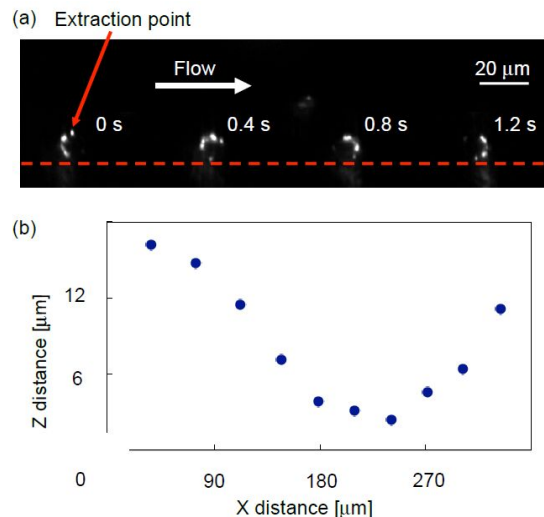


図6 並進・回転運動計測用粒子

(3) 白血球周りの3次元速度分布計測

白血球のモデル粒子として粒径10 μm程度のポリスチレン製蛍光粒子を用いて、共焦点マイクロPIV法により白血球周りの3次元速度分布の計測を行った。図7に共焦点マイ

クロ PIV システムを示す。40 倍の水浸対物レンズ(Plan Fluor; Nikon, NA = 1.25)を取り付けた倒立顕微鏡(Ti-U; Nikon)に共焦点スキャナ(CSU-X1; 横河電機)を装着した。共焦点スキャナには波長 488 nm、出力 100 mW の CW レーザ(SAPPHIRE; Coherent)および最大フレームレートが 2000 Hz であるイメージ・インテンシファイア搭載の高速カメラ(SV-200i; Photron, 512×512 pixel, 10bit)を接続した。撮像領域は 204.8 × 204.8 μm である。焦点面の深さ方向への移動は対物レンズに備え付けたピエゾアクチュエータ(P-721K120; PI)によって制御した。

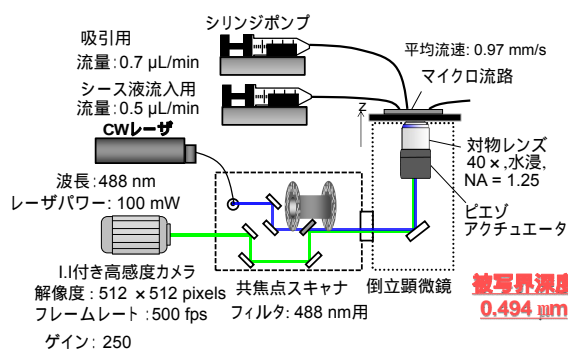


図 7 共焦点マイクロ PIV システム

シース液に直径 1.0 μm の蛍光トレーサ粒子(505/515 nm、密度 1.055 g/cm³)、サンプル液に直径 10 μm 粒子(密度 1.06 g/cm³)と直径 1.0 μm 蛍光トレーサ粒子をそれぞれ混入し、シース液の流量 0.5 μL/min、サンプル液の流量 0.35 μL/min で流し、白血球を模擬した直径 10 μm 粒子が流路中央を流れるように制御した。レーザパワーを 100 mW、高速カメラのフレームレートを 500 fps とし、模擬粒子の周りの 3 次元速度分布を計測した。流路底面からの距離 3 と 5 μm における速度分布を図 8 に示す。図中の黒点が模擬粒子の位置を示す。模擬粒子の運動を解析し、その平均速度は 0.325 ± 0.003 mm/s であった。粒子周りの液相速度と比較すると模擬粒子の速度は液相速度より大きくなっている。

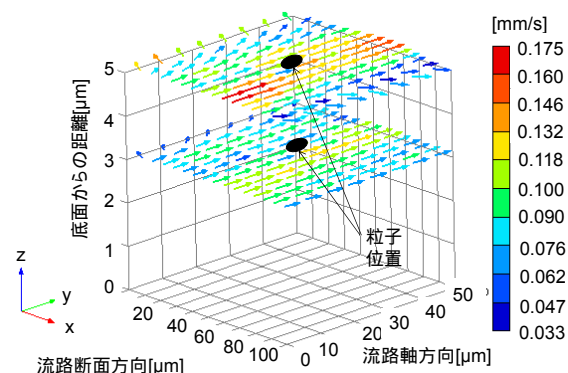


図 8 模擬粒子の周りの 3 次元速度分布

(4) まとめ

血管内皮細胞上をローリングする白血球速度およびその周りの速度計測のため、マイクロ流路側方より白血球の回転・並進運動を計測するための長焦点マイクロ PIV システムを開発した。また、白血球の運動計測のためのマイクロフローフォーカシングデバイスを作成し、共焦点マイクロ PIV システムを用いて白血球を模擬した粒子周りの 3 次元速度分布を計測した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 5 件)

Y. Yoshida, M. Motosuke, Measurement of particle rolling behavior in microchannel by lateral observation 16th International Symposium on Flow Visualization (ISFV16) Jun.24-27, 2014, Okinawa Convention Center, Okinawa

K. Nishiwake, H. Wakayama, M. Motosuke, A simple 3D3C velocimetry in microscale using single camera based on anisotropic defocus method 16th International Symposium on Flow Visualization (ISFV16) Jun.24-27, 2014, Okinawa Convention Center, Okinawa

吉田 佳広, 元祐 昌廣, 微小流路内を流れる粒子の並進及び回転挙動の計測, 第 42 回可視化情報シンポジウム Jul. 21-22, 2014, 東京都・新宿区, 工学院大学

西分 康次郎, 若山 寛武, 亀谷 雄樹, 元祐 昌廣, 結像異方性を利用したマイクロ 3D3C 流速測定法の校正関数に関する検討, 日本流体力学学会年会, Sep. 15-17, 2014, 宮城県・仙台市, 東北大学

西分 康次郎, 重田 晃佑, 亀谷 雄樹, 元祐 昌廣, 結像異方性を利用した粒子の 3 次元追跡法の開発, 化学とマイクロ・ナノシステム学会第 30 回研究会, Oct. 2-3, 2014, 北海道・札幌市, 北海道大学

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)
取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉井 康彦 (SUGII, Yasuhiko)
東京大学・大学院工学系研究科・特任准教

授

研究者番号：90345108

(2)研究分担者

元祐昌廣 (MOTOSUKE Masahiro)

東京理科大学・工学部・講師

研究者番号：80434033