

機関番号：12601  
 研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2009～2010  
 課題番号：21760121  
 研究課題名（和文） 血球を模擬した柔軟粒子の作成とそれを含むマイクロ固液混相流の可視化計測  
 研究課題名（英文） Visualization and measurement of the micro-multiphase flow with deformable particles which represent the red blood cells  
 研究代表者  
 大石 正道（OISHI MASAMICHI）  
 東京大学・生産技術研究所・技術専門職員  
 研究者番号：70396901

研究成果の概要（和文）：血球を模擬した球形粒子をマイクロ流路法にて作成し、平均直径 $\phi 95 \mu\text{m}$ 、CV値で7.8%を達成した。粒子画像流速測定法（PIV）にて可視化計測を行うため、粒子内部と周囲流体の屈折率調整を行った。PIV計測の結果、粒子の剛体回転運動と周囲流体の挙動の相互作用を定量的に把握する事が可能となった。また、比較対象として赤血球の挙動計測も行い、球形粒子との形状や構造、剛性の違いによる挙動の差異を考察した。

研究成果の概要（英文）：We made spherical microbeads, which represent the red blood cells, by droplet formation method using microjunction. The microbeads had the diameter of  $95 \mu\text{m}$  and the variation coefficient of 7.8%. The refractive index matching of microbeads and surrounding fluid for PIV measurement was successfully conducted. As a result, the interaction between the rigid rotation motion of microbeads and surrounding flow was investigated quantitatively. The measurement of red blood cells was also conducted as a target for comparison. The difference of the motions between rigid sphere and red blood cell are investigated from the viewpoint of their geometry, structure and stiffness.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：機械工学・流体工学

キーワード：柔軟粒子，血球，混相流，マイクロPIV，マイクロ流路

## 1. 研究開始当初の背景

高齢化が進む我が国では、認知症に代表される老人性疾患が社会的な問題であり、その原因として、特に脳の細動脈で発生する多発性小脳梗塞が血管性認知症の約半数を占めている[小林ら，血栓と循環，2005]。このような血流の微小循環のメカニズムを調べるために、血球のマイクロ流動を再現、観察できるマイクロ流体デバイスを用いた研究が

盛んになっており、デバイスのファブリケーション技術やマイクロPIV（Particle Image Velocimetry：粒子画像流速測定法）などの計測技術の向上もあいまって、高精度な実験検証を可能とするツールが揃いつつある。

国内外の実験的研究動向としては、Limaら[J Biomech, 2007]は共焦点マイクロPIVを用いて血液のヘマトクリットが流れ場の流速プロファイルに及ぼす影響を計測して

おり、有意な差があることを示した。また、Abkarian ら [Phys rev lett, 2007] は赤血球膜にポリスチレン粒子を付着させることで、せん断流れ場における膜回転運動を可視化する事に成功した。ただし、流れと血球の相互作用を定量的に検証するという目的からは、前者は血球の位置や血球近傍の流れが把握できておらず、後者は赤血球の持つ生体細胞としての不確定要素に由来する実験再現性の低さが疑問として残っているのが現状である。数値計算を用いた研究では、張が格子ボルツマン法を用いた手法により、膜を持つ血球モデルが素早く軸集中を起こす現象や、見かけの粘性係数（流動抵抗）が血球の体積率に応じて変化するなどの特異な現象を再現したが、定性的なものであり、実験による定量的な検証が必要であると締めくくられている [東京大学博士論文, 2007]。

以上の例からも分かるように、血球挙動を検証できる血球と周囲流体の同時計測のためには、主に以下のような技術的ハードルがある。

- (1) 血球自体の挙動を可視化するための蛍光粒子・色素などによる染色手法
- (2) 周囲流体計測用の PIV 粒子像と血球の像を区別できる光学的あるいは画像処理手法
- (3) 血球が持つ生体細胞としての個体差
- (4) 実験の再現性を高めるための、血球が流れる位置の制御

(1)、(2)に関しては、代表者の研究においてその実現可能性が示されているが [藪崎ら, 可視化情報, 2007] [Oishi et al, ISFV12, 2006]、(3)、(4)に関しては現段階では有効な手段がないのが現状である。生体細胞の固体差を解消する手段として、代表者は過去の研究において、血球の代わりにアルギン酸カルシウムゲルビーズを作成してマイクロ固液混相流の多波長共焦点マイクロ PIV 計測を行っており [Oishi et al, PIV07, 2005]、この分野で唯一の成果を挙げている。ただし、この手法においては、均一で真球度の高いゲルビーズを作り、それを流れ場の同じ位置に流す再現性が欠けており、定量的な固液相互作用の検証には至らなかった。

## 2. 研究の目的

本研究では、これまでの研究成果を進展させ、「再現性を確保したビーズの生成と流動条件の確立」を第一目的とし、申請者が過去に開発した「血球を模擬した人工ビーズを含むマイクロ固液混相流の多波長共焦点マイクロ PIV 計測」を行うことを第二の目的として研究を進める。

## 3. 研究の方法

前項で挙げた2つの目的をそれぞれステージに分けて達成目標を設定した。具体的な作業とその手順を以下に示す。

### 【Stage I】再現性を確保したビーズの生成と流動条件の確立

#### (1) ビーズ材料の選定と生成装置の開発

均一マイクロビーズの生成には主にマイクロ流路法とパターン露光法の2つの手法がある。前者はマイクロジャンクションやスリット構造を用い、混ざり合わない2種の液体を流してビーズとしたい相の液滴を作り、その後、紫外線照射や温度変化・イオン交換等により硬化させる方法である [Xu et al, Angew Chem, 2005]。後者は紫外線硬化樹脂を流路に流し、マイクロパターンを転写したマスクを通して紫外線を照射して、自由な形のビーズを作る方法である [Dendukuri et al, Lab Chip, 2007] [Haghoosie et al, MicroTAS2008, 2008]。形状の自由度や均一性の観点から後者の方が優れていると考えられるため、本研究では後者を優先して開発する。材料としては、樹脂、アルギン酸、ゼラチンなど、硬さをコントロールできて、硬化後に安定であるものが望ましい。さらに、ビーズはPIV計測が可能な透明度と屈折率を有する必要がある。

#### (2) パラメータ設定と生成メカニズムの解明

マイクロ流路法であれば、2液の流速バランスおよび界面張力が、パターン露光法であれば、光学的条件と露光時間がビーズ形状、サイズを決定する。これらのパラメータがビーズ形状に及ぼす影響を調べるとともに、均一なビーズを再現性良く作製できる手法・装置を検討する。

#### (3) 様々な形状、特性を持つビーズの開発

作成したビーズを計測実験に用いるにあたり、あらかじめ形状や弾性、蛍光特性などの性状を計測しておく。形状は共焦点スキヤナを用いてビーズ断面画像を取得し、それらを3次元的に積み上げることで計測できる。弾性は流れを与えてそのせん断応力に対する変形から求める。

#### (4) ビーズの流れる位置を再現性良くコントロールできる流路デザインの開発

流路内のビーズ位置を制御するには、チャネル内にスリットなどの障害物を作りこんで壁面との接触により軌道を変える方法と、シースフローや曲がり流路による遠心力を用いて流体力をビーズに作用させる手法が考えられる。前者では3次元的に複雑なチャネル形状を製作する必要があることや、壁面との接触によるビーズの変形・破壊、流路の

閉塞などの恐れがある。それに対し、後者では簡単なジャンクションと曲がりを組み合わせた流路での可能性が示されており [Mao et al, MicroTAS2008, 2008]、流速をコントロールすることで同じチャンネルを用いて位置制御できる利点がある。これらの手法を、共焦点マイクロ PIV 計測への適用性を加味して流路デザインを決定する。

#### (5) ビーズ生成と位置制御、観察機能のワンチップ化

ビーズ生成の時間間隔は流量条件や露光のタイミングでコントロールできるため、位置制御流路を下流に設置することでビーズが流れてくるタイミングを制御でき、また、非球形ビーズの場合は生成時の向きが同一であることから姿勢制御にも有利である。観察位置をその下流に設けてワンチップに機能を集積化することで、接続部などの外的な不安定要因を排除する効果をねらう。

【Stage II】: 血球を模擬した人工ビーズの多波長共焦点マイクロ PIV 計測

#### (6) 再現性を生かした、人工ビーズ計測条件の設定

混相流の流れ場では界面が 3 次元形状を持ち、流れ場も 3 次元となる。よって、異なる高さでの計測データを積み上げて 3 次元の流動場を再構築する手法が理想的である。本システムは高さ方向に焦点面をスキャンできるピエゾ装置を備えているが、特に、球形でないビーズは回転により時々刻々とその位置と姿勢を変えるため、高さ方向に焦点面をスキャンして同一のビーズと周囲流を計測し、3 次元的に積み上げても流れ場の再構築は不可能である。しかし、(5)で流動とビーズ位置の再現性を確保することにより、異なるビーズの異なる断面の計測値を積み上げることが可能となる。

#### (7) 人工ビーズを含む固液混相流の同時計測

実際の血流を模擬したパラメータスタディとして、血球自体が持つ【特殊な形状】、【柔軟性】を評価するためにビーズ形状と硬さを、流動条件の違いとして流路サイズ、バルク流速、血球の体積率（ヘマトクリット）を変化させた計測を行う。

#### (8) 細動脈を模した複雑血管形状への応用

追加的な実験として、実際の細動脈が有する分岐や曲がり、先へ進むに従って細くなるという複雑な流路形状での挙動を計測し、流動場の過渡的な変化に対する血球挙動を明らかにする。また、病変に伴う特異的な形状として、狭窄した流路をモデル化することで、血球が詰まって梗塞する現象を検証できると考えられる。

#### (9) マイクロ固液混相流の計測結果から細動脈内血流のレオロジーを解明

上記の計測結果から、固相（ビーズ）の回転・並進速度および変形量、3 次元的位置情報、液相（周囲流）の流速分布が得られる。これらのデータからビーズの速度勾配や流れのせん断力分布を計算し、さらに時系列データの差分を用いて加速度や変形の変化量を求める。これにより、ビーズと流れ場の間で相互に作用する力を見積り、個々のビーズの形状・柔軟性がマクロな流動現象に及ぼす影響を考察する。次に、多数のビーズを混入した実験から、血流のレオロジーに特有な軸集中挙動や見かけの粘性係数の変化と、周囲流体の速度場、分散しているビーズの向きや変形、回転挙動との関連性を明らかにし、個々のビーズ挙動の考察と照らし合わせて検証する。

### 4. 研究成果

前節の方法に照らし合わせて実験を行った結果を以下に記す。

#### (1) ビーズ材料の選定と生成装置の開発

まず、ビーズ材料となる紫外線硬化樹脂として参考論文で実績のあるポリエチレングリコール・ジアクリレートを採用した。この樹脂で満たしたマイクロ流路にマイクロパターンを転写したマスクを通して紫外線を照射することにより、自由な形状のビーズを均一に作る「パターン露光法」の確立を目指して開発を行った。顕微鏡対物レンズ直前に設置できる円形マスクを作成し、落射光学系より LED-UV 光源を照射したところ、マスクのパターンを転写した円盤型のビーズ生成に成功した (図 1)。しかし、図にあるように、対物レンズの集光形状に沿って厚み方向にくびれのある、複雑すぎる形状になってしまう傾向が見られた。

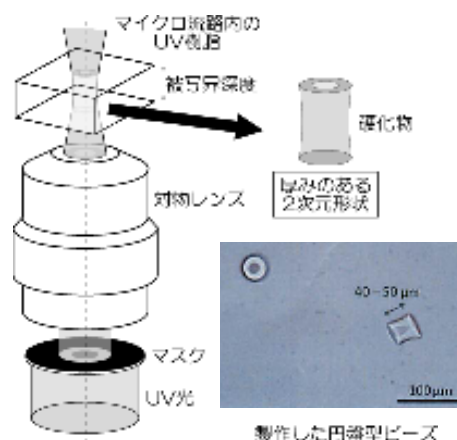


図 1 パターン露光法による円盤型ビーズ生成

そこで、まず最も単純な血球モデルとして

球形ビーズの生成を試みた。パターン露光法で球形を作るのは至難であるため、マイクロ流路法による球形液滴の硬化を試みた。装置として配慮すべき点は、流量制御による液滴サイズのコントロールや、不必要な位置に紫外線が当たらないような照射方法を検討した。

### (2) パラメータ設定と生成メカニズムの解明

パターン露光法では、露光時間や光源の集光度合いなどのパラメータがビーズ形状を決定するため、再現性の良いビーズを生成するためにこれら光学的条件の調査を行った。特に対物レンズ倍率によって光源の絞り角が異なるため、何種類かのレンズを用いて生成したビーズの3次元形状を解像度の高い共焦点顕微鏡で測定して、生成条件の検討を行った。その結果、狙っているサイズ(数十 $\mu\text{m}$ )のビーズにおいては、どの倍率でも厚み方向に曲率が生じ、位置あわせの難しさから上下対称なビーズを再現性良く作ることは困難であった。

マイクロ流路法では連続相と分散相(硬化樹脂)の流速調整、およびチャンネル形状のパラメータを振って、ビーズ生成を試みた。特に分散相は濃度100%の樹脂液では送液の圧力損失が大きすぎる事や、ジャンクションで液滴にちぎれずにシースフローになってしまう傾向が見られた。そこで、界面活性剤の添加による界面張力のコントロールや、樹脂液に水を添加して濃度を下げて粘度を調整することでより安定な液滴生成を可能とした。結果として得られた球形ビーズを図2に示す。平均直径は $\phi 95\mu\text{m}$ で、均一性はCV値で7.8%であった。このばらつきは20倍の倍率でのPIV計測においては解析グリッドの解像度未満であるため、十分な精度であると考えられる。また真球度は共焦点顕微鏡により断面をスライスした画像より求め、長軸と短軸の差はおおよそ10%あったが、計測誤差の範囲内であった。

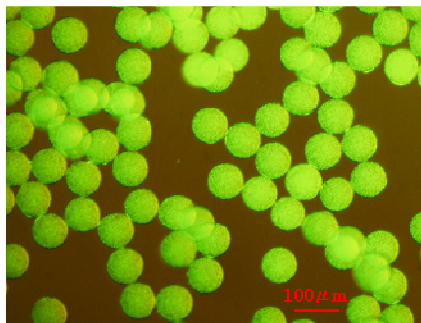


図2 マイクロ流路法で生成した球形ビーズ

### (3) 様々な形状、特性を持つビーズの開発 ビーズ材料の樹脂は水溶性のため、硬化前

にPIV計測用の蛍光トレーサ粒子を分散させておくことにより、内部にトレーサを含んだビーズの生成に成功した(図2)。これをPIV計測に用いる事で、ビーズの回転挙動などを捉える事ができる。また、樹脂に添加する水の割合でビーズ硬さを変化させる実験を行った。樹脂:水=1:1.2~1.5とした場合にバルクでは柔らかい樹脂が形成できたが、ビーズサイズでは流れによるせん断力のみでは変形させる事が困難であることが確認された。今後は、ゲルのようなより軟らかい他の材料を検討するとともに、ビーズサイズでの物理的な硬さを計測する手法を確立する必要がある。

### (4) ビーズの流れる位置を再現性良くコントロールできる流路デザインの開発

パターン露光法においては、UV光源を落射で照射しながら、ダイクロイックミラーで分光した画像をカメラで捉える事により、ビーズの出現位置を確認することができた。画像で流路を確認しながらピクセル単位で位置合わせを行うことができるため、下流計測域でのビーズ位置制御が可能になると考えられる。

[Mao et al, MicroTAS2008, 2008]の遠心力とシースフローを用いたビーズ位置制御については、若干の改善は見られたが、PIVの計測可能流速域に対して数十倍速い流速を必要であったこと、また、位置のばらつきがPIV計測グリッドに比べてまだ数倍大きいことから現時点では実用に至っていない。今後は分岐流路による減速などの改善と、流路形状の検討を行っていく。

### (5) ビーズ生成と位置制御、観察機能のワンチップ化

ワンチップ化にはビーズ生成領域と流動観察領域が別々かつ近接していることが望ましいが、光学系の物理的干渉を避けるため、それぞれの光学系を流路チップに対して対向する配置を試みた。しかし、パターン露光法では流路チップの逆側からの照射では作動距離が足りない、露光が屈折するなどの問題点が多く、現実的ではない。

マイクロ流路法では計測箇所の上流でピンポイント露光できる流路を設計し、ワンチップ化を可能とした。

### (6) 再現性を生かした、人工ビーズ生成と計測条件の設定

マイクロ流路法にて作成したビーズのパターン露光法ではより小さいCV値で円盤などの形状が生成できており、問題はない。さらに、生成されたPIV用人工ビーズを流路内の狙った位置に流すことのできる流路を設計した。また、流路近傍に光ファイバを挿入

してビーズの通過を検出する機構を開発し、再現性の良い計測を可能とした[Oishi et al, MicroTAS2009, 2009]。

(7) 人工ビーズを含む固液混相流の同時計測  
共焦点マイクロ PIV を行う際に重要な条件として、ビーズ内部の屈折率の一様性と周囲流体との屈折率の一致が求められる。これは計測時に光学的に対象物を 2 次元平面でスライスするため、この条件の欠如に起因する光学的ひずみは計測結果に悪影響を及ぼしてしまう。図 3 右はビーズと同じ屈折率に調整した液体中にマイクログリッドを浸し、その上にビーズを置いて撮影した画像である。屈折率調整前の左画像に対し、グリッドが歪まらずに撮影できていることが分かる。また、波長分離した PIV 画像 (図 4) からもビーズ内部の蛍光粒子が歪まらずに撮影できている。

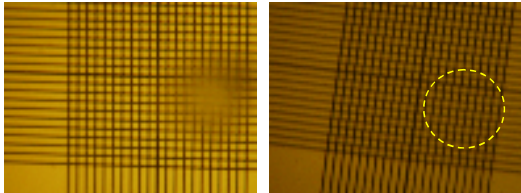


図 3 ビーズと周囲液体の屈折率マッチング

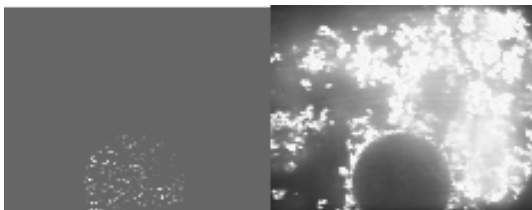


図 4 PIV 画像 (左) ビーズ内部 (右) 周囲液体

PIV による剛体球形ビーズの計測から、ビーズ 2 次元断面内の速度成分が一様であり、それがスライス高さに応じて異なる様子が観察された (図 5)。これは剛体の回転運動を正確に計測できている証であり、以前作成したアルギン酸ビーズの計測結果に比べてもビーズの製作精度、計測精度の面から飛躍的に改善した。

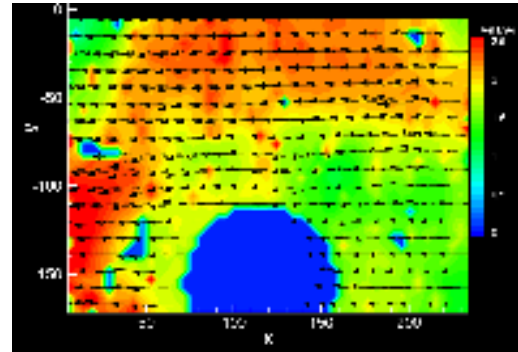
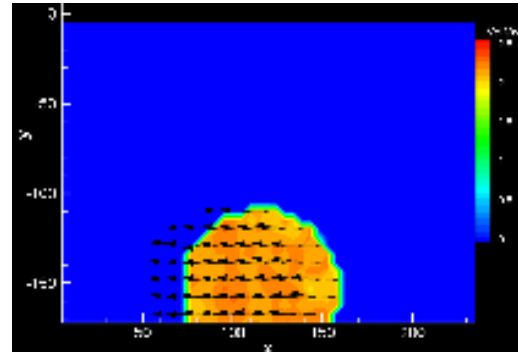


図 5 PIV 解析結果 (上) ビーズ内部 (下) 周囲液体

(8) 細動脈を模した複雑血管形状への応用

人工ビーズの計測はビーズ径から 1 辺約  $300 \mu\text{m}$  の矩形断面チャンネルを用いたが、比較対象として行った赤血球の PIV 計測は実際の細動脈スケールの約  $30 \mu\text{m}$  矩形断面チャンネルを用いた。また、ビーズ位置制御用の曲がり流路を用いて、遠心力が粒子の挙動に与える影響を計測した。

(9) マイクロ固液混相流の計測結果から細動脈内血流のレオロジーを解明

比較実験として、赤血球と周囲流体の同時計測を行った[Oishi et al, ISFV14, 2010]。血球膜上に蛍光粒子を付着させ、周囲流体を生体内に近い環境とすることで、周囲流体が血球の挙動の及ぼす影響の計測に成功した。また本計測に必要な追従計測システムも新たに構築している。図 6 が PIV の結果である。赤血球は周囲流体のせん断力勾配に応じて変形、配向し、膜のみが回転する (タンクトレッド運動) を示した。

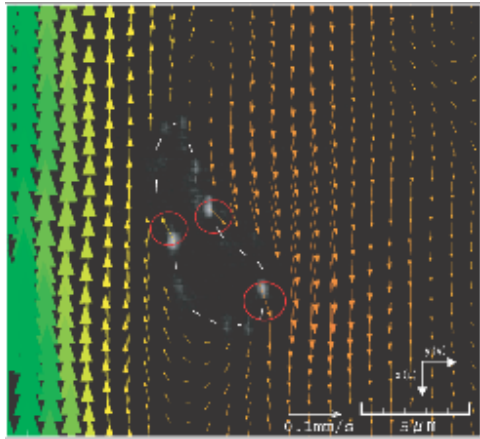


図6 赤血球と周囲流体のPIV同時計測

人工ビーズと赤血球の比較から、周囲流体のせん断応力に依存した粒子の回転・変形・膜の回転（タンクトレッド運動）挙動の違いを明らかにすることができた。例えば球形剛体ビーズは回転しながら流路軸中心から一定の距離の位置に落ち着くのに対し、赤血球は変形と膜の回転を伴いながら軸中心へ向かっていく様子が観察された。

今後の予定としては、血球と剛体球の間となる剛体円盤、柔軟球、柔軟円盤などの計測を進めていく。単純な剛体円盤はマイクロ流路法で作成し、より複雑な形状をパターン露光法で作成する手法も開発中である。

本研究で開発したビーズ生成技術、光ファイバセンサによる粒子通過検出技術、追従計測システムは今後の研究に大いに役立つものであり、継続的な研究を可能としている。

##### 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計5件）

- ① 大石正道、大島まり、木下晴之、藤井輝夫、小林敏雄、多波長共焦点マイクロPIVによるマイクロ液滴生成過程の計測、可視化情報学会論文集、査読有、Vol. 30、No. 9、2010、pp. 55-64
- ② M. Oishi, H. Kinoshita, T. Fujii, M. Oshima, Measurement of Three Dimensional Flow Structure of Droplet Formation Mechanism in T-shaped Junction using Phase-locked Confocal Micro-PIV, Proceedings of The 14th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (microTAS 2010), 査読有, 2010, pp. 569-571
- ③ M. Oishi, K. Utsubo, H. Kinoshita, T.

Fujii, M. Oshima, Target Tracking Confocal Micro-PIV for Continuous Measurement of Red Blood Cells, Proceedings of The 14th International Symposium on Flow Visualization, 査読無, No. ISFV14-1A-4, 2010, CD-R

- ④ 大石正道、大島まり、木下晴之、藤井輝夫、小林敏雄、多波長共焦点マイクロPIVによるマイクロT字ジャンクションにおける液滴生成機構の解明、可視化情報学会論文集、査読無、Vol. 29、Suppl. No. 2、2009、pp. 241-242
- ⑤ M. Oishi, H. Kinoshita, T. Fujii, M. Oshima, Three-Dimensional Reconstruction of Confocal Micro-PIV Data with Phase Adjusting Technique Using Optical Proximity Sensor, Proceedings of The 13th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (microTAS 2009), 査読有, 2009, pp. 749-751

〔学会発表〕（計2件）

- ① M. Oishi, Continuous Measurement of Red Blood Cells using Target Tracking Confocal Micro-PIV, International Workshop on Flow-Structure Interactions in Large and Small Scale Mechanics, 2010. 6. 25, 韓国・釜山
- ② M. Oishi, H. Kinoshita, T. Fujii and M. Oshima, Investigation of Droplet Formation Mechanism in Micro T-shaped Junction using Confocal Micro-PIV Measurement, 10th International Conference of Fluid Control, Measurements, and Visualization, 2009. 8. 19, ロシア・モスクワ

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.oshimalab.iis.u-tokyo.ac.jp/Research\\_eng.html](http://www.oshimalab.iis.u-tokyo.ac.jp/Research_eng.html)

##### 6. 研究組織

###### (1) 研究代表者

大石 正道 (OISHI MASAMICHI)

東京大学・生産技術研究所・技術専門職員  
研究者番号：70396901

