

財団法人 日中医学協会

2012 年度共同研究等助成金報告書－調査・共同研究－

2013 年 3 月 8 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った調査・共同研究について報告いたします。

添付資料：研究報告書

受給者氏名： 小野直樹 
所属機関名： 芝浦工業大学
所属部署名： 工学部 職名： 教授
所在地： 東京都江東区豊洲 3-7-5
電話： 03-5859-8061 内線： 8061

1. 助成金額： 900,000 円

2. 研究テーマ

「多孔質マイクロ流路による腫瘍血管内の血流力学挙動に関する研究」
3. 研究組織：

日本側研究者氏名： 小野直樹	職名：教授
所属機関名：芝浦工業大学	部署名：工学部
中国側研究者氏名：Ying He (賀 纓)	職名：教授
所属機関名：中国科学技術大学	部署名：近代力学系

4. 当該研究における発表論文等

1. Li, F., Hu, RQ, He, Y., Yamada, T. Ono, N., In-vitro Modeling of Red Blood Cell Distribution Basing on a Microchannel Network, Oral Presentation, The 10th National Conf. on Biomech. and the 12th National Conf. on Biorehology Chengdu, Oct. 11-15, 2012

2. Li, F., et al, J. Med. Biomech. 2013 (in Chinese) (予定)

多孔質マイクロ流路による腫瘍血管内の血流力学挙動に関する研究

研究者氏名 小野直樹

所属機関 芝浦工業大学 工学部教授

中国側共同研究代表者 賀纒

所属機関 中国科学技術大学 近代力学系 教授

要旨

腫瘍組織における流体流れは多孔質流れとされている。本報では、腫瘍血管をモデル化した多孔質マイクロチャンネルをシリコン樹脂で作製し、そこを通過する赤血球溶液の流れ挙動を観察し、体外で擬似腫瘍微小循環を構築することを目的としている。そのため、まず、 $250\mu\text{m}$ の多孔質マイクロチャンネルを半導体微細加工技術で加工した。次に、ラットの血液を採取し、遠心力装置によって赤血球を取り出し、生理塩水と混合し、異なるヘマトクリット(Hct)の赤血球溶液を作った。その次、人工多孔質マイクロチャンネル内の赤血球の流動分布状態を顕微鏡で観察した。さらに、マイクロチャンネルにおける流れの圧力損失測定も試みた。その結果、同じ流量に対し、ヘマトクリット(Hct)が大きくなるにつれ、マイクロチャンネル内の赤血球流速が大きくなることが示された。また、各分岐における赤血球流れの速度分布は Hct によって不均一性が示され、赤血球はより低い流速のチャンネルに集合する様子が示された。

Key Words 多孔質マイクロ流路、腫瘍微小循環、赤血球分布、不均一性、Fahraeus 効果

1. はじめに

癌組織は酸素と栄養を取るため、血管内皮細胞増殖因子を分泌し、新生血管を作り、周囲の血管から血液を引いてくるのである。新生血管は短時間で形成されたため、正常な血管とは異なり、血管の構造は不均一性を示している。すなわち、血管の分岐や太さなど不規則したり、ねじれがあったり、血管壁の浸透性が高かったりしている。このような異常な血管構造は腫瘍組織への血液供給に影響し、低酸素領域と高い間質流体圧力 (Interstitial Fluid Pressure) が生じてしまうケースが多い。結果として、抗がん剤の移流と拡散により癌組織への到達を妨げて、効果的ながん治療が得られない。

これまで、いろいろ新生阻害薬 (たとえば、**combretastatin**, **neffinavir**) が開発されてきたが、それらの効果は定量的に予測することは容易ではない。したがって、コンピューターあるいは体外モデリング手法によって腫瘍微小循環を模擬する必要がある。**Pozrikidis**^[1]は腫瘍組織を通す血管網を構築し、血液と間質流体流れを境界積分方程式により定式化し、間質流体圧力と血管浸透性のプラズマ流体に及ぼす影響を考察した。**Chapmann**^[2]は腫瘍組織における流体流れを考察するため、マルチスケールモデルを提案した。このモデルには、マクロスケールの腫瘍組織に対して、均一連続体として扱い、そこに毛細血管は極めてうすいため、その働きは流体の線ソースになる。一方、マイクロ領域に対して、毛細血管を囲む円柱形モデルを提案した。その解析の結果は血管ネットワークと間質における流れ挙動は多孔質流れと考えられる。**Jain**^[3]のモデルには浸透性と弾性のある微小血管は縦と横に四方形多孔質腫瘍組織に配列される。血管内の流れはポアズ流とし、血管壁面を通す流れは **Starling** 法則により定められ、腫瘍組織における流れは **Darcy** 流れとされる。

以上の研究から、腫瘍組織における流れは多孔質流れとして扱われることが多いことが分かった。これまで、Yamada ら^[4]はフォトリソグラフィ PDMS を利用してマイクロ混合器に関する研究を行ってきた。そこで、本研究では、腫瘍血管をモデル化した多孔質マイクロチャンネルをシリコン樹脂で作製し、そこを通過する赤血球浮遊液の流れ挙動を観察し、体外で擬似腫瘍循環を構築することを目的としている。本報では、赤血球浮遊液は多孔質マイクロチャンネルを通過する過程に着目し、その様子を画像解析から、赤血球の流速を測定した。その上、マイクロチャンネルにおける圧力損失の測定も試みた。

2. 実験装置と方法

2.1 多孔質マイクロチャンネル 本研究で用いた PDMS 製のマイクロチャンネルの流路部分は Fig. 1 に示す。この流路の断面は $250\mu\text{m} \times 35\mu\text{m}$ の長方形で、流路の中に $100\mu\text{m} \times 50\mu\text{m} \times 35\mu\text{m}$ のブロックが六つ配列され、ブロックとブロック間の幅は $50\mu\text{m}$ である。1 枚のチップに二つの多孔質流路を持つ。このチップをガラス基板に接着することにより、漏れの無い流路を形成した。

2.2 血液サンプルの作製 ラットから採血直後に、0.9%生理塩水を添加し、遠心分離装置に置き、1000 rpm の回転速度で 10 分間回転させた。赤血球のみを取り出し、再び生理塩水を添加し、Hct=1,2,3,5% の赤血球浮遊液を作製した。

2.3 実験方法と画像処理

赤血球浮遊液をシリンジポンプで多孔質流路に注入して、赤血球が流路を通過していく様子をハイスピードカメラで撮影した。実験パラメーターは表 1 に示す。収集された微小流路内に赤血球が流れる画像をもとに、画像解析ソフトを用いて解析し、流れ場を算出した。

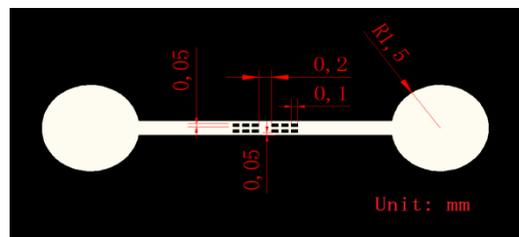


Fig.1 The Photograph of the Porous Micro-channel

表 1 多孔質流路に注入する赤血球浮遊液の流量と Hct

Hematocrit	Flow Rate (ml/h)		
Hct:1%	0.05	0.10	0.20
Hct:3%	0.05	0.10	0.20
Hct:5%	0.05	0.10	0.20

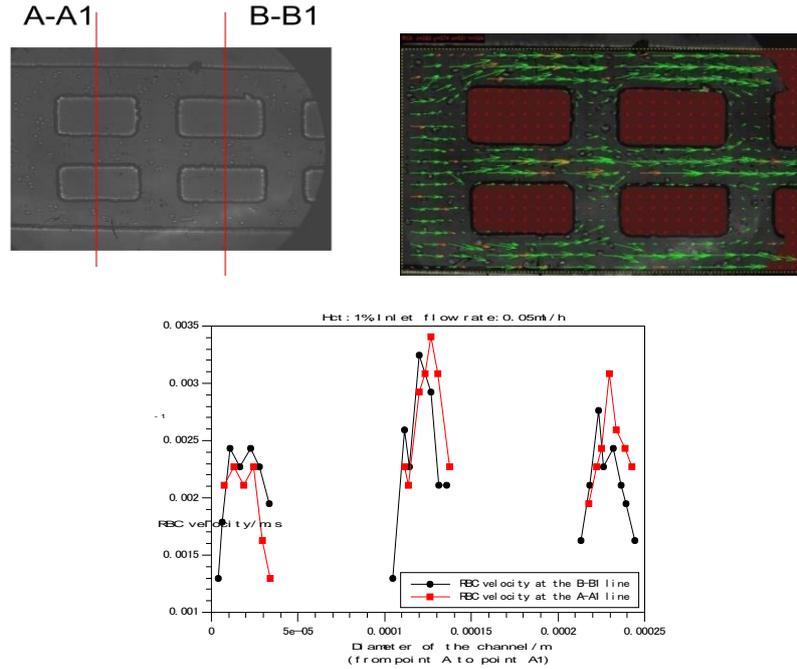


Fig. 2a. The Velocity Field of the RBCs Solution
 b. Velocity Profiles in Cross Sections of A-A1 and B-B1
 c. The image of RBCs through a Porous Microchannel
 (Hct=1%, $Q_{in}=0.05\text{ml/h}$)

3 実験結果

Fig. 2 a は $Hct=1\%$ 、入り口流量 $Q_{in}=0.05\text{ ml/h}$ を設定する時、赤血球浮遊液が多孔質流路を通過する時の画像を示す。赤血球流れ場は Fig.2b に示す。赤血球は流れ方向の三分岐チャンネルを通し、流れ方向に垂直するチャンネルに赤血球の流入は観察されなかった。Fig2 c は断面 A-A1 と B-B1 における赤血球速度分布を示す。断面 A-A1 における三分岐の溶液速度変化は小さく、中間断面と両側断面の最大速度差は約 0.001 m/s であり、断面 B-B1 における流速も A-A1 の流速とほぼ同じである。

Fig.3a は入口流量を 0.1 ml/h 、ヘマトクリットを 3 と 5% と設定する時、赤血球浮遊液は断面 A-A1 の各分岐を通過する時の赤血球速度分布を示す。 $Hct=1\%$ 時の均一な速度分布とは異なり、各分岐の赤血球流れ速度差が大きくなり、中間分岐における速度の上昇が一番大きいである。比較するため、断面 C-C1 の赤血球速度を Fig.3b に示す。断面 A-A1 と同じように、 $Hct=3\%$ と 5% の時の赤血球速度はかなり大きくなる。流量 Q をマイクロ流路断面積で割れば、赤血球溶液の平均速度を求められる。 $Hct=1\%$ 時の赤血球速度は溶液の平均速度とほぼ同じであることが分かる。しかし、ヘマトクリットは 3 と 5% の時の赤血球速度は溶液平均流速の約三倍になる。赤血球の相互作用が大きくなり、赤血球の Fahraeus 効果が表していると考えられる。

太い血管内のヘマトクリット (H_b) と細いヘマトクリット H_t の比は次式で表す^[5]

$$\frac{H_T}{H_D} = \frac{U_m}{U_c} \quad (1)$$

U_m と U_c はそれぞれ溶液と赤血球の平均速度である。 0.1 ml/h の入口流量に対して、ヘマトクリットが異なっても、断面 C-C1 の溶液平均速度は同じである。実験結果から、入口のヘマトクリットが大きくなるにつれ、断面 C-C1 の赤血球平均速度は大きくなる。したがって、入口のヘマトクリットが大きくなるにつれ、断面 C-C1 の H_T/H_D は小さくなる。また、Fig. 3a に示された

ように、Hct=5%の時、中間チャンネルの赤血球速度が一番早い。したがって、断面 A-A1 の中間チャンネルの H_T/H_D は両側チャンネルの H_T/H_D より小さいことが分かった。実験では、Hct=5%の時、赤血球は中間チャンネルから両側に流入する様子が観察された。

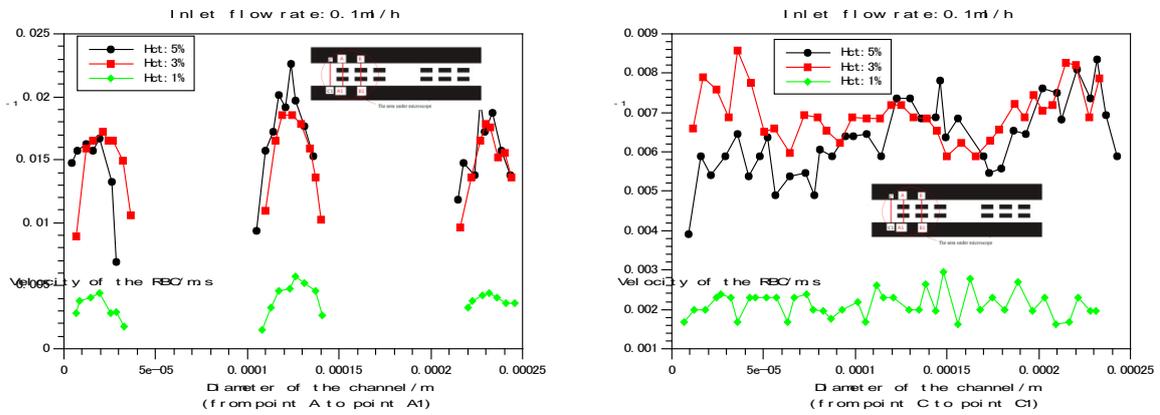


Fig. 3a. Velocity Profiles at Cross-section of A-A1
 b. Velocity Profiles at Cross-section C-C1
 (Hct=1,3,5%, $Q_{in}=0.1\text{ml/h}$)

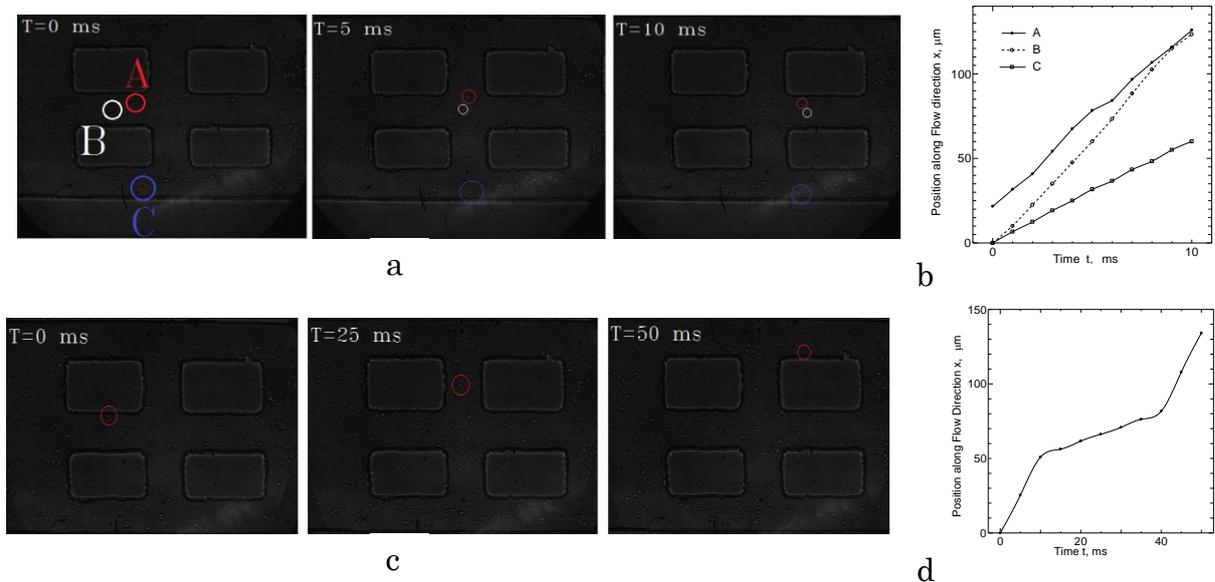


Fig. 4 a. Sequential Images of RBCs Flowing Straight Forward. b. Different Trajectories of RBCs in Fig. 4a
 c. Sequential Images of RBCs shifting toward the lateral channel d. Trajectory of the RBC shifting toward the lateral channel (Hct=2%, $Q_{in}=0.05\text{ml/h}$)

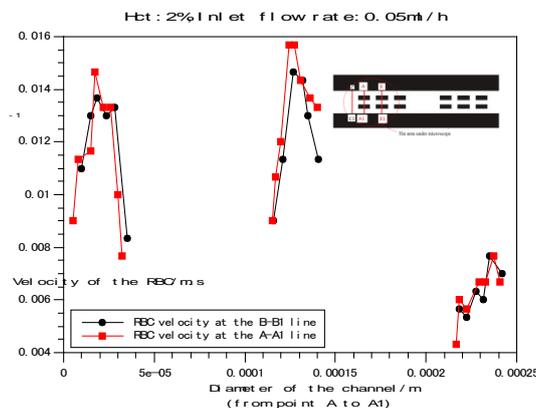


Fig. 5 Velocity Profiles of RBCs in the Cross-Section A-A1 and B-B1
 (Hct=2%, $Q_{in}=0.05\text{ml/h}$)

Fig 4 a と b に赤血球が多孔質マイクロチャンネルを通過する時の軌跡を示す。この時 Hct= 2 % である。色線で囲んだ赤血球の軌跡を注目すると、赤血球 A,B と C は全部下流の直線流路に入るが、下側のチャンネルの赤血球速度が一番遅いことが分かった。Fig 4 c には赤血球は横側のチャンネルを通す様子を示す。上側のチャンネルに流入したため、同じ時間で通す距離はかなり短くなる(Fig.4d)。この現象は Hct= 5 % の時にも観察された。Fig. 5 には Hct=2%時断面 A-A 1 と B-B1 の赤血球速度分布を示す。Fig.3a の Hct= 5 % 時の速度分布と同様に、中間チャンネルの赤血球速度と両側チャンネルの赤血球速度差は大きいことが分かった。分岐管の赤血球速度差は赤血球分布の不均一性に影響があると考えられる。今の段階では、赤血球の分布は一定の不規則性を示しているが、Zhang^[6]らは分岐血管における赤血球分離のシミュレーションを行った結果によると、変形しにくい赤血球は流量の低い分岐に入りやすく、プラズマ流体の粘性は高い時、赤血球は流量の高い分岐に入りやすいとされる。したがって、赤血球の分布は赤血球変形の影響もあると考えられる。今後には、両側チャンネルの圧力損失を測り、流体抵抗に対する粘性効果を考察する予定である。

4. 圧力特性評価の試み

圧力特性評価のための流動実験は赤血球流動分布実験と同様な流動システムに圧力差を測定するための差圧計 (Testo) を取り付けておこなう。本報では気液界面の表面張力を利用して、マイクロチャンネル内の流れの圧力測定方法を用いた^[7]。マイクロ流路に流入させる液体は赤色の色水を用い、主流流路と垂直する流路に空気を注入する。側面流路と主流流路との合流部での気液界面の様子を顕微鏡から観察し、気液界面の形状が同じになるように空気の注入を調整する。界面が安定してから、差圧計で圧力測定する。Fig. 5a は圧力を測定する時の気液界面を示す。Fig. 5b は純水をマイクロ流路を通す時、入り口流量による圧力差を示す。直線の勾配を表し、測定方法が妥当である。今後には、赤血球浮遊液を用い、マイクロ流路における圧力変化と赤血球分布の関係を考察することができる。

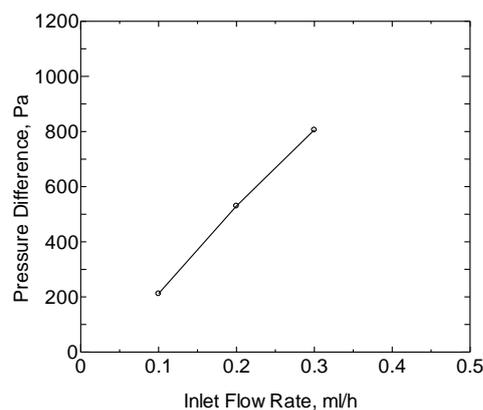
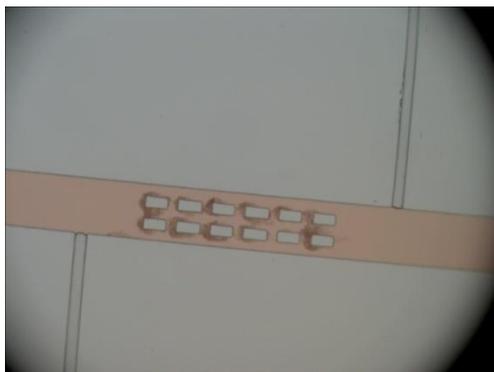


Fig. 5a Gas-liquid Interface for Measuring the Pressure Drop across the Microchannel
b Channel Pressure Drop versus Flow Rate for Water

5. まとめ

微小血管網をモデル化する多孔質マイクロチャンネルを用い、赤血球溶液の流動実験を行った結果、以下の通りになった。

- 1) ヘマトクリットが大きくなるにつれ、各分岐チャンネルの赤血球流速の差が大きくなる。流速の差がある程度大きくなる時、赤血球は側面チャンネルに集合する様子があった。し

かし、赤血球は側面流路に流入するケースは $Hct = 2$ と 5% の時であり、一定の不規則性が示されている。今後、赤血球の分布は溶液と赤血球の流速と赤血球の変形性などに対する依存性を考察し、腫瘍血管網内での赤血球の不均質分布を引き起こす原因をさらに探求する。

- 2) 同じ入り口流量に対して、ヘマトクリットが大きくなるにつれ、赤血球平均流速が大きくなる。赤血球溶液は太いチャンネルから細いチャンネルに流入する時、Fahreus 効果を紹介して、流動抵抗が緩和されたと考えられる。
- 3) 多孔質マイクロ流路内の圧力測定方法が確定され、赤血球溶液の流動実験に応用できる。したがって、マイクロ流路内での流動抵抗が定量的に測定できる。これまで得られた結果はまだ初期段階の結果であるが、今後、多孔質マイクロ流路における赤血球分布と圧力—流量関係をさらに考察する予定である。

参考文献

1. Pozrikidis, C., Numerical Simulation of Blood and Interstitial Flow through a Solid Tumor, *J. Math. Biol.*, 2010, 60: 75-94
2. Chapman, SJ, Shipley, TJ, Jawad, R, Multiscale Modeling of Fluid Transport in Tumors, *Bulletin Math. Biol.*, 2008, Vol. 70(8): 2334-2357.
3. Baish, JW, Netti, PA, Jain, RK, Transmural Coupling of Fluid Flow in Microcirculatory Network and Interstitium in Tumors, *Microvas. Research*, 1997, 53: 128-141.
4. Yamada, T., Osato, N., Watanabe, Y., Ono, N., Experimental and Numerical Study on Micromixing by Utilizing the Movement of Gas-liquid Free Interface, *J. Fluid Science and Technology*, 2011, Vol. 6(2): 128-138
5. Pozrikidis, C., Axisymmetric motion of a file of red blood cells through capillaries, *Physics of Fluids*, 2005, Vol. 17, 031503-1-14
6. Xiong, WJ, Zhang, J., Two-dimensional Lattice Boltzmann Study of Red Blood Cell Motion through Microvascular Bifurcation :Cell Deformability and Suspending Viscosity Effects, *Biomech. Model. Mechnobiol.*, 2012, Vol. 11: 575-583
7. 鈴木剛史、気液自由界面を利用したマイクロ混合に関する研究、芝浦工業大学大学院修士論文、2007年度。

(その他の活動報告)

2012年2月27日

中国科学技術大学／芝浦工業大学 合同研究報告会

企画 芝浦工業大学 小野直樹

日時:2013年2月28日(木) 15:00~17:40

場所:芝浦工業大学 豊洲校舎 405教室

参加者(予定):

杉山博士(理化学研究所), 賀櫻先生(中国科学技術大学), Changjin 氏(中国科学技術大学), 小野研究室学生3名(山田(D1), 竹田(M2), 野中(B4)), 小野

プログラム:

15:00~15:30(質疑応答含む)

賀櫻先生(中国科学技術大学):「中国科学技術大学／芝浦工業大学の共同研究報告」

*** 本共同研究は, (財)日中医学協会の支援を受けて実施したものです.**

15:30~16:25(質疑応答含む)

<招待講演>杉山博士(理化学研究所情報基盤センター):「Full Eulerian approach for solving fluid-structure interaction problems (toward multiscale thrombosis simulator)」

16:25~16:35 休憩

16:35~17:00(質疑応答含む)

Changjin 氏(中国科学技術大学博士課程):「On the modeling of pressure drop in stenotic flows」

17:00~17:20(質疑応答含む)

野中厚佑(芝浦工業大学小野研究室 B4):「液膜を利用したマイクロ混合器における流れの解析」

17:20~17:40(質疑応答含む)

小野直樹(芝浦工業大学):「小野研究室の研究テーマ紹介」

以上

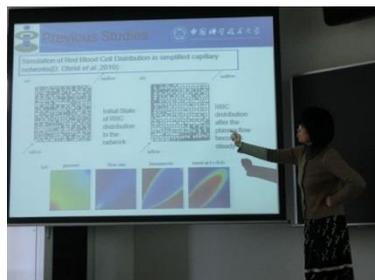
(その他の活動報告)

(1) 中国科学技術大学／芝浦工業大学 合同研究報告会

前頁のプログラムのように、2013年2月28日(木)に、今回の(財)日中医学協会殿からの助成によって展開した研究および関連の研究のまとめとして合同研究報告会を開催した。櫻教授のお知り合いの杉山博士(理化学研究所)にもご講演頂き、この分野の研究の知見を深めることができた。また日本(芝浦工業大学の小野研究室)および中国(中国科学技術大学の櫻研究室)の学部生および大学院生にも発表してもらい、学生間の交流も行い親交を深めることができた。



報告会の様子



櫻教授の講演



小野の講演

(2) 中国科学技術大学での共同実験作業

日本(芝浦工業大学の小野研究室)側の博士課程の学生(山田君)が2012年7月に、中国(中国科学技術大学の櫻研究室(中国合肥))側に行き、共同研究に必要な実験技術に関する議論と準備のための実験等を実施した。

(3) 芝浦工業大学での共同実験作業

中国(中国科学技術大学の櫻研究室)側から、修士課程の学生(Hu君)とポスドク研究員(Liさん)の2名が2012年8月に、日本(芝浦工業大学の小野研究室)側に来られ、小野研究室の実験施設にて、共同での実験と得られたデータに関する議論を実施した。

以上
文責 小野直樹