

※課題番号 : F-12-KT-0087
※支援課題名 (日本語) : マイクロ流路を用いた強磁場環境下における赤血球の磁気特性解明
※Program Title (in English) : Measurement of magnetic characteristics of red blood cell using microchannels
※利用者名 (日本語) : 巽 和也
※Username (in English) : Kazuya Tatsumi
※所属名 (日本語) : 京都大学
※Affiliation (in English) : Kyoto University

※概要 (Summary) :

近年、医療分野における更なる磁場の活用に伴い(1)(2)、生体への磁場の影響に関する知見の収集と生体シミュレータを念頭にした数値解析モデルの開発は重要な課題である。本研究は、赤血球の磁化率の測定と数値解析モデルの開発を目的とする。はじめに、一様磁場下で働く回転磁気トルクに伴う赤血球の磁場方向に対する配向運動の可視化と、その運動を模擬できる数値解析モデルの開発について報告を行う。実験ではマイクロ流路と高速度カメラを用いて単一赤血球の運動を可視化した。赤血球モデルにはばねネットワークモデルを用い、これに赤血球膜を構成するリン脂質や膜貫通蛋白質の磁気異方性を考慮したモデルを導入する。このモデルを用いて静止流体中での赤血球運動特性について検討を行うとともに、実験結果と比較することでモデルの妥当性の確認を行う。次に、赤血球の体積磁化率を測定するために、流路壁の一部をニッケルにより作成し、磁場勾配を形成することで赤血球に並進磁気力を印可するマイクロ流路を製作した。流路内における磁気力と重力の釣り合いに伴う赤血球静止位置を測定し、その位置から体積磁化率を求める。

本申請においては、ナノテクノロジープラットフォームの装置を用いて実験で使用するマイクロ流路の製作を行った。

※実験 (Experimental) :

ナノテクノロジープラットフォームの使用機器と目的

・ A3 : レーザー描画装置 DWL2000

マイクロ流路製作において必要であるエッチングに用いる光学マスクの製作に使用した。

・ B19 : ダイシングソー

マイクロ流路のガラス基板作成のために使用した。

・ C25 卓上顕微鏡(SEM)

マイクロ流路内に設けたニッケル壁の多孔特性と表面粗さの測定を行った。

・ C15 : 触針式段差計

製作した SU-8 (マイクロケム) 製および PDMS 製の流路の高さと平滑度を測定するために使用した。

本実験で用いた磁場発生装置 (JASTEC: JMTD-10T100KDK) は、装置中央に位置する円筒を取り巻くように超伝導コイルが設置され、円筒内に均一な磁場分布が形成される。この円筒内にマイクロ流路を設置し、高速度カメラと倍率 20 倍の対物レンズを用いて測定を行う。撮影における露光時間は 2ms であり、撮影速度は 50fps および 25fps に設定した。対物レンズおよび高速度カメラの組み合わせによる平面分解能は、 $0.156\mu\text{m}/\text{pixel}$ である。また、本実験における被写界深度は、約 $1.77\mu\text{m}$ である。

本実験では、マイクロ流路上流の流体注入口に設置した赤血球懸濁液を、流路下流の流体排出口からシリンジポンプを用いて吸引することにより、流路内に懸濁液を流す。マイクロ流路は幅 1mm、高さ $200\mu\text{m}$ 矩形断面を持つ直線流路である。溶液はリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) にポリビニルピロリドン (PVP:分子量 3.6×10^5) を 10wt%混合した水溶液に赤血球を懸濁したものを用いた。この時の流体の粘性は、 $\mu=6.2\times 10^{-3}\text{ Pa}\cdot\text{s}$ であった。

流路内の赤血球の配向運動を測定するためには、流れの影響を除去するため静止状態で撮影する必要がある。そこで、シリンジポンプと流路をつなぐチューブにバルブを挿入し、撮影直前にバルブを閉じて流れを停止させた。

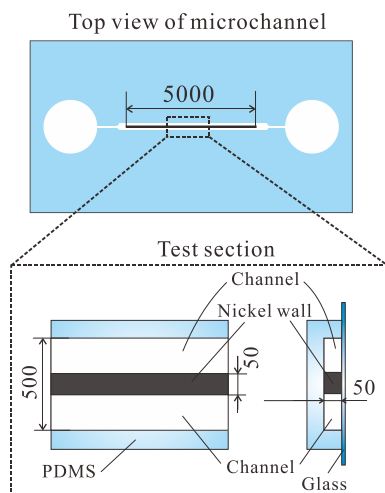


図1：磁場勾配環境下における赤血球の磁気特性を測定するためのマイクロ流路の概観図

磁場強度は 8T で測定を行った。高速度カメラに流路上面から撮影した赤血球の投影像の長軸と短軸から赤血球の配向角 φ を求め、 $t=0$ の時の初期配向角を φ_0 として、時間 t に対する φ の分布を求めた。

これに加えて、本節では、磁場勾配が存在する流体内において、赤血球の並進運動の可視化と、その結果から赤血球の体積磁化率の測定について述べる。細胞や粒子などの磁化率を測定する代表的な手法としては磁気泳動法等が挙げられる。磁気泳動法は、磁場によって並進する粒子の速度を測定し、流体抗力との釣り合いから磁化率を計算する方法である。この場合の流体抗力はストークス抗力などから計算されるが、ストークス抗力は球を元にモデル化されているため、赤血球のような特異な形状を有する細胞にそのまま適用するのは適切ではない。

本実験では、赤血球に作用する磁気並進力と重力の釣り合いを考え、赤血球を静止流体中に浮遊させた場合の静止位置から赤血球の磁化率を測定する手法を

用いた。この場合、重力との釣り合いから直接磁化率が求まるため、磁場勾配の分布が正しく求められれば、並進速度から求める方法よりも精度が高いと考えられる。

図1に流路の概念図と寸法を示す。流路は電気めっきを用いてニッケル流路壁をガラス基板上に生成し、マイクロ流路がパターンニングされた PDMS と基板を貼り合わせることで流路を構築する。測定では、重力と磁気力との釣り合いを取るため、ニッケル壁を流路下壁となるようにマイクロ流路を磁場装置内に設置し、流路側面から赤血球の運動を観察する。

実験手順は一樣磁場における測定と同様に行う。磁場をあらかじめ印加した状態にてシリンジポンプで吸引することでマイクロ流路内に赤血球懸濁液を供給する。その後、バルブを閉じて流れを停止させてから赤血球の運動と釣り合いの位置を測定する。撮影における露光時間は 1.5ms であり、撮影速度は 10fps に設定した。

※結果と考察 (Results and Discussion) :

図2に示す実験で撮影された赤血球運動の一例を示す。各画像の時刻はバルブにより流れが停止した時刻 $t=0s$ からの経過時間を示す。流路内には z 軸正方向の磁場が発生しているため、磁力線の向きは図中に置いて紙面垂直方向手前向きである。また、図中において、注目する赤血球には白丸で印をつけている。 $t=0s$ での赤血球は、磁場に対して初期角度 $\varphi_0=43.6^\circ$ で傾斜しているが、時間の経過とともに磁力線と円盤面が平行になるように配向することがわかる。この結果は、計算結果や Higashi ら⁽⁵⁾による実験結果とも傾向が一致する。したがって、これらの図から、一樣静磁場環境下の静止流体中における赤血球の配向について、数値解析及び測定の妥当性を示せた。

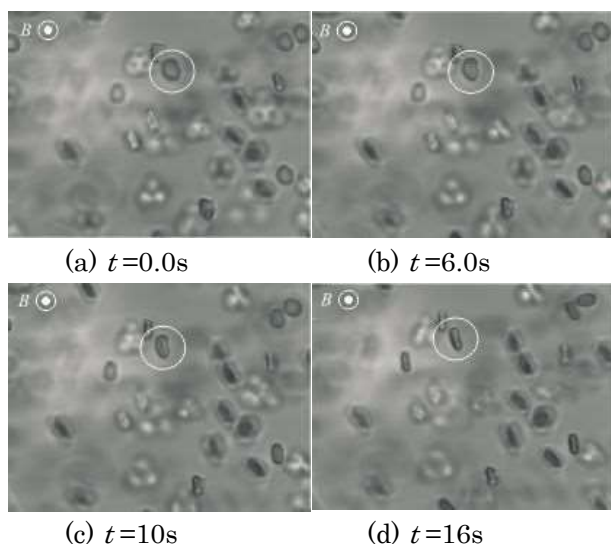


図 2 : $B=8\text{T}$ で $\varphi_0=43.2^\circ$ における赤血球配向運動に関する時系列静止画像.

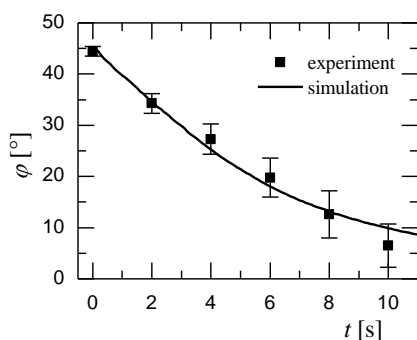


図 3 : 一様磁場環境下における赤血球の配向角 φ 分布 ($B=8\text{T}$ で初期角度 $\varphi_0=45^\circ$).

次に、図 3 に赤血球の配向角 φ と時間 t の関係を示す。図中の■は実験結果を示し、実線は数値解析結果を示す。磁場印加開始直後は、赤血球に大きな磁気トルクが発生して回転運動を開始し、 φ が小さくなるにつれて赤血球に働く磁気トルクは減少し、流体の粘性の影響を受けて次第に減速する。十分時間が経過し定常状態となった時には、 $\varphi=0^\circ$ に漸近し、完全に赤血球が磁界の方向に配向していることがわかる。また、実験と計算は共に良好な一致を示し、数値解析モデルの妥当性が確認できる。

次に、図 4 に磁場勾配環境下における赤血球運動測定における赤血球の可視化画像を示す。磁場強度は 8T であり、画像中央の黒い領域はニッケルである。動画の撮影を開始した時刻を $t=0\text{s}$ と定義する。

図では、(a) $t=0$ において流れにより高さ方向にばらついて浮遊していた赤血球は、時間が経過するにし

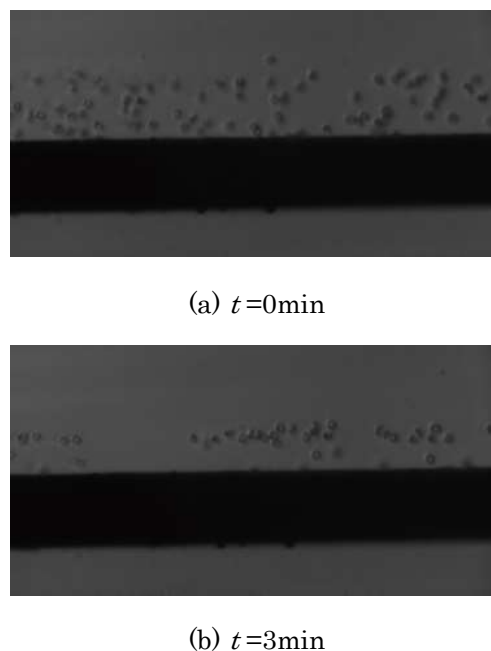


図 4 : ニッケル壁近傍に浮遊する赤血球。(黒色部はニッケル壁を示す.)

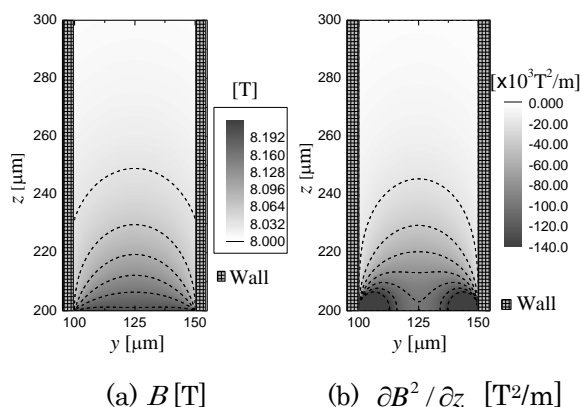


図 5 : マイクロ流路内の磁場強度分布 (数値解析結果).

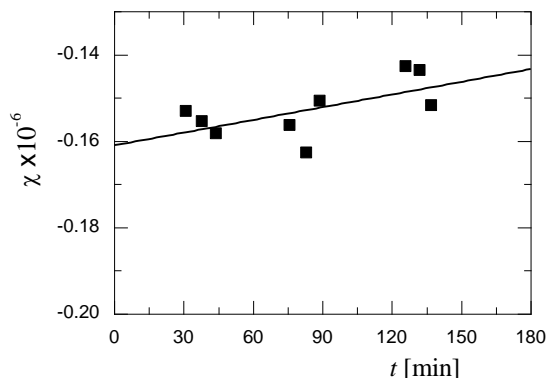


図 6 : 重力と磁気力の釣り合いによる赤血球の静止高さ位置から求めた赤血球の磁化率と測定時間との関係.

たがって重力によって沈降するが、十分時間が経過した後には、磁気力により赤血球はニッケル壁から一定の高

さの位置で静止する ((b) $t=3\text{min}$).

ここで, (b)における赤血球の円盤面が紙面と垂直方向に向いていることから, 赤血球が壁面に付着していると考えられる. また, 紙面垂直方向の赤血球の位置によって赤血球に作用する磁気並進力が変化するが, 撮影画像からはその位置が求められない. これらが赤血球の高さ方向位置の精度に影響を及ぼすと考えられる.

次に, 解析ソフト COMSOL Multiphysics を用いて求めた流路内におけるニッケル壁周りに形成される 3 次元磁場分布を示す. 図 5 (a)と(b)にそれぞれ磁場強度分布と z 方向の磁場勾配分布を示す. $z=200\mu\text{m}$ にニッケル壁が位置し, $y=100, 150\mu\text{m}$ に流路側壁が位置する.

ニッケル壁 ($z=200\mu\text{m}$) 近傍に生成する磁場分布は $y=125\mu\text{m}$, $z=175\mu\text{m}$ の各面に対して対称な分布となるため, 生成する磁場勾配の分布も対称となる. (b)では, 流路全域に亘って負の向きの磁場勾配が形成される. 実験に用いた赤血球は反磁性を示すため, 赤血球には z 正方向, すなわち重力とは逆方向に磁気並進力が作用することが分かる. 磁場勾配の値が正なら負の向きに, 値が負なら正の向きにそれぞれ磁気並進力が作用する.

特にニッケル壁近傍の磁場勾配分布では, $y = 100$ と $150\mu\text{m}$ 近くの領域で強い磁場勾配が形成されていることが分かる. これは, ニッケルの形状に起因し, ニッケルの角部に磁束が集中したために, 勾配の値が大きくなった (エッジ効果) ためである. このため, ニッケルの近傍では同一高さであっても, y 方向の位置が異なると, 赤血球に作用する z 方向の磁気並進力は大きく異なることが分かる.

最後に上記の結果を用いて赤血球の体積磁化率を算出する. 体積磁化率を求めるには, 赤血球の静止位置とその位置における磁場勾配の大きさが必要である. 力の釣り合いは z 方向のみを考慮すればよいため, 図 5 (b)の磁場勾配を用いて計算する. ここで注意すべきことは, 求まる体積磁化率の値が赤血球と溶媒の体積磁化率の差となることである. 一般的に報告されている値も溶媒との差をとったものがほとんどであることから, ここでも赤血球と溶媒の体積磁化率の差である χ を用いる.

図 6 に赤血球の体積磁化率 χ の解析結果を示す. 図では時間が経過するにしたがって赤血球の χ の絶対値が減少することが分かる. これは, 赤血球内部流体中のヘモグロビン分子が酸素分子をかき離したことで赤血球の磁化率が低下したためだと考えられる.

赤血球の体積磁化率は経時変化は周囲の酸素分率に依存するため, 試料の保存環境の影響を受ける前 ($t=0\text{min}$) の体積磁化率を求める. 図 8 の赤血球の磁化率の分布は, 最小二乗法で近似した直線とほぼ一致することが分かる. そこで, 赤血球の磁化率は時間に比例して減少すると仮定し, 得られた直線の $t=0$ における磁化率を求めた. その値は $\chi = -0.161 \times 10^{-7}$ である. これは, Zborowski ら⁶⁾が報告した値 -0.185×10^{-7} と非常に近く, 妥当な値が得られたものと考えられる.

※その他・特記事項 (Others) :

・今後の課題

流路壁およびニッケル壁の製作精度を上げるためにメッキ後の CMP 加工が必要である. しかしながら, この装置が納品されていないため外注する予定である.

・参考文献

- (1) Wada. H., and Ikehira H., "High-field Magnetic Resonance Imaging", *TEION KOGAKU*, Vol.4 (2007), pp.180-187.
- (2) P.K. Gupta, and C.T. Hung, "Minireview Magnetically Controlled Targeted Micro-carrier Systems", *Life Sciences*, Vol.44 (1989), pp.175-186.
- (3) 和田成生, 小林涼, "膨潤赤血球の体積減少に伴う形状変化の数値シミュレーション", *日本機械学会論文集(A編)*, Vol. 69 (2003), pp.14-21.
- (4) C. S. Peskin, "Numerical analysis of blood flow in the heart", *J. Comput. Phys.*, Vol. 25 (1977), pp.220-252.
- (5) Higashi, T., Yamaguchi, A., Takeuchi, T. and Date, M., "Effects of Static Magnetic Fields on Erythrocyte Rheology", *Bioelectrochemistry and Bioenergetic*, Vol.36 (1995), pp.101-108.
- (6) Zborowski, M., Oстера, G.R., Moore, L.R., Milliron, S., Chalmers, J.J., and Schechter, A.N., "Red

Blood Cell Magnetophoresis”, *Biophysical Journal*, Vol.84 (2003), pp.2638-2645.

共同研究者等 (Coauthor) :

小森優輝, 中部主敬

論文・学会発表

(Publication/Presentation) :

(1) K. Tatsumi, Y. Komori, T. Arakawa, K. Nishitani and K. Nakabe, Development of a Numerical Model for Single Red Blood Cell Motions in Stationary Fluid in the Presence of Uniform Magnetic Field, *Progress in Computational Fluid Dynamics*, Vol. 13, No. 3/4, (2013), pp. 228-241.

(2) K. Tatsumi, Y. Komori, T. Arakawa, K. Nishitani and K. Nakabe, Modeling of Single Red Blood Cell Motions in Stationary Fluid in the Presence of Uniform Magnetic Field, *Proc. 12th Kyoto - Seoul National - Tsinghua University Thermal Engineering Conference*, (2012), pp. , November 10-11, Kyoto.

(3) 巽和也, 小森優輝, 荒川智樹, 西谷幸祐, 中部主敬, 磁場環境下における赤血球運動の可視化と磁気特性の計測, 第5回流体理工学研究部門公開セミナー, 2013/3/12.