208 フェムト秒レーザ微細加工装置を用いて作製した毛細血管モデル内の 血液流れに関する実験

In vitro study of human blood flow using realistic model of capillary vessels fabricated by femtosecond laser microfabrication system

○学 山内 洋平 (関大院) 正 田地川 勉 (関大工) 正 大場 謙吉 (関大工)

Youhei YAMAUCHI, Graduate School of Kansai-University, Yamatechou 3-3-35, Suita-shi, Osaka

Tsutomu TAJIKAWA, Department of Mechanical and Systems Engineering, Kansai University

Kenkichi OHBA, Department of Mechanical and Systems Engineering, Kansai University

1. はじめに

血液は心臓のポンプ作用によって、絶えず体内を循環し、我々の生命活動を支えている⁽¹⁾。この血液の流路となるものが血管である。血管は分岐を繰り返すことで次第に血管径が細くなり、末梢の血管においてはその内径がおおよそ $5\sim 8\mu\text{m}$ と非常に小さくなる。この末梢血管を毛細血管といい、この毛細血管では、重要な働きであるガス交換や物質交換が行われている。故に、毛細血管血流がこれらの交換能に影響を与えることは明白である。しかし、その毛細血管での血液の流れは、毛細血管が微小で、複雑な3次元の血管構造をしているため、十分に解明されていないのが現状である⁽²⁾。

そこで、その毛細血管内血流を明らかにするために、生体外実験用モデルとなる微小流路を、フェムト秒レーザ微細加工装置によりガラス内部に加工する方法で作製し、そのモデル内を流れる血液の様子を可視化し、倒立顕微鏡を用いて観察し、ハイスピードビデオカメラによって撮影した。本報告では、そのモデルを作製する微細加工法と、モデル内を流れる血液の可視化実験について述べる。

2. フェムト秒レーザ微細加工装置の概要

本実験で、マイクロオーダーの毛細血管モデルの作製に用いた、フェムト秒レーザ微細加工装置について説明する。レーザの仕様を Table 1、概略図を Fig.1 に示す。

Table 1 Laser specifications.

Wavelength	800nm
Pulse width	90fs
Pulse energy	0.8mJ
Repetition rate	1kHz

Fig.1 Schematic of a fs laser microfabrication system.

使用した超短光パルスフェムト秒レーザは波長 800nm, パルス幅 90fs, パルスエネルギー 0.8mJ, 繰り返し周波数 1kHz で動作している。再生増幅によって得られた Ti:sapphire レーザが光学系を介して、N.A.0.55 の顕微鏡対物レンズに入り、ステージ上の試料に集光される。光学系はシャッター、 $\lambda/2$ 板、偏光板、二つの ND フィルタ、 $\lambda/4$ 板および、対物レンズで構成されている。そのうち、シャッター、 $\lambda/2$ 板、ND1 フィルタと試料を固定しているステージは、モータドライバを介して、パソコンにより任意に制御が可能であり、それぞれ、試料に照射されるレーザの ON/OFF, エネルギー調整、試料の XYZ 方向への移動を行っている。レーザを対物レンズで集光した際のビームウェスト直径 D とビームウェスト長さ L はそれぞれ $1.8\mu\text{m}$, $6.4\mu\text{m}$ である。

今回、モデルを作製した試料には、屈折率 1.524 のシリカガラスを用いた。加工はガラスの下面に蒸留水を接触させて、その下面から加工を行う方法を採用した⁽³⁾。この方法により、微小な流路部で加工により生じた加工屑を流路外に排出することができるため、三次元穴あけ加工が可能となる。加工の様子は、顕微鏡に取り付けている CCD カメラによって撮影され、モニターで観察された。

また、加工データは、3次元 CAD で作製した形状を用いることができるため、毛細血管の様な複雑な形状をしたモデルの加工が可能である。

3. 毛細血管モデルの作製方法

Fig.1 で示したフェムト秒レーザ微細加工装置を用いて、毛細血管モデルを作製する加工手順を説明する。加工データは加工する構造の輪郭をレーザの集光部の軌跡として描き、その軌跡上に、点を任意に指定した間隔ごとに並べていく。試料を固定したステージは、その点が持つ三次元座標に対して移動し、任意のレーザパルスが照射されると次の点へ移動する。これを繰り返すことで加工が行われていく。今回はその点と点の間隔を $1\mu\text{m}$ とした。

フェムト秒レーザを用いて加工した毛細血管モデルの概略図を Fig.2 に示す。加工したモデルは毛細血管サイズの微小モデルと、そのモデルへ血液を導くための2つの溝で構成されている。溝は横 5mm 縦 $100\mu\text{m}$ 深さ $50\mu\text{m}$, 2つの溝が $200\mu\text{m}$ の間隔を隔てて横に並んでいる。その $200\mu\text{m}$ の間隔に、毛細血管モデルがガラスの内部に形成されている。毛細血管モデルは深さ $50\mu\text{m}$ の溝から、 $50\mu\text{m}$ ガラスの内部に作製した。

Fig.3 に実際に加工した毛細血管モデルを示す。加工条件は溝部がパルスエネルギー $48\mu\text{J}$ 、直線的にステージを移動させる速度 $200\mu\text{m/s}$ 、微小流路部がパルスエネルギー $8\mu\text{J}$ パルス数 100 pulses/point とした。今回、加工した毛細血管モデルは最小流路直径 $10\mu\text{m}$ 、最小直径流路部長さ $50\mu\text{m}$ である。加工したモデル形状は分岐や合流のない単純な直管モデルとした。この微小モデル部の構造は Y 字分岐や、実際の毛細血管に見られる網目構造を作製することも可能である。加工はガラスの背面から -Z 軸方向に直径 $60\mu\text{m}$ の円筒状の穴を開け、次に X 軸方向に流路部分を内部加工した。そして、さらにその左側からも同様の加工を行い、左右の流路を結合した。直径が微小な部位で流路同士を結合するとステージの位置精度の影響により、左右が対称に繋がらないという問題が生じたため、片側には直径の大きい流路を加工した。

Fig.2 Schematic of a micro capillary model.

Fig.3 Micro capillary model in silica glass.

4. 毛細血管モデル内を流れる赤血球の流れ

Fig.3 で作製した毛細血管モデルにヒト血液を流し、このモデルの有効性を確認するためのモデル内を流れる赤血球の可視化実験を行った。

作製したモデル内にヒト血液を流すために、毛細血管モデルを加工したガラスと 10mm の間隔を設けた 2 つの穴を有するカバー用ガラスを、厚さ $100\mu\text{m}$ の透明両面接着テープを用いて張り合わせた。カバーガラスにあけた 2 つの穴にチューブを取り付けることで微小実験モデルを構築し、この微小実験モデルを用いて、赤血球流れの可視化実験を行った。

実験方法は微小実験モデルにチューブを取り付け、その先に血液送液用のシリンジを接続した。そのシリンジを押すことで、実験モデル内に赤血球を導いた。溶液には遠心分離した血液から得られた赤血球を用いて作製した赤血球 MAP を、生理食塩水で希釈したものを用いた。溶液中

の赤血球の観察には、倒立顕微鏡を用い、40 倍対物レンズを使用した。また、モデル内を赤血球が流れている様子はハイスピードビデオカメラにより撮影され、PC に取り込まれた。

Fig.4 に毛細血管モデル内を流れる赤血球の可視化画像を示す。赤血球を図中に矢印と囲み線で示す。撮影は 2000 frame/sec で行った。赤血球が直径 $25\mu\text{m}$ の流路から直径 $10\mu\text{m}$ の流路へ流れ込んだ際に、赤血球の移動速度が速くなることが確認できた。更に加工時に発生する加工クズが排出されずに流路内に付着している部分では、流路が詰まりやすく細くなっているにもかかわらず、赤血球が変形しながら流れている様子も確認できた。

Fig.4 Human blood flowing in capillary model fabricated by fs laser microfabrication system.

5. 毛細血管モデルの評価

今回の撮影画像では、毛細血管径に近い流路部分で、移動する赤血球を観察することができた。しかし、赤血球の輪郭や形状を十分に捉えることができていないため、今後は加工条件の改善や加工後の加工面処理を施す必要があると考えられる。

また、このフェムト秒レーザー微細加工装置を用いることにより、ガラスのような透明材料内部に、実際の毛細血管網に近い構造を作製することができたことから、今度は血管壁の構造という点に着目して、半透膜などに毛細血管モデルを作製することで、実際の毛細血管での物質交換を生体外で再現できるのではないかと考えられる。

謝辞

本研究の一部は、文部科学省 学術フロンティア推進事業「ナノ・サブマイクロ技術を用いた模擬/人工生体組織の創製と新診断・治療法の開発」によって行われた。ここに付記し、謝意を表する。

参考文献

- (1) 関真佐子: 混層流, 16(2), pp120-129, 2002
- (2) 林紘三郎: バイオメカニクス, コロナ社 2000
- (3) 渡辺歴, 伊藤一良: Opt. Lett., 26(23), pp1912-1914, 2001