B212 マイクロ PIV を用いた血流場可視化計測

奥田 玲美[○](東京大学), 杉井 康彦(東京大学), 岡本 孝司(東京大学)

In vitro Experiment of Blood Flow Using Micro PIV Technique

Remi OKUDA, Yasuhiko SUGII and Koji OKAMOTO

ABSTRACT

Biophysical behavior of blood in the vasculature is of importance in microcirculation researches. Especially, rheological properties of blood flow have been studied using *in vivo* and *in vitro* experiments. This paper describes flow characteristics of *in vitro* blood flow. In order to obtain velocity distributions with high spatial resolution, a micro PIV technique, which consists of a fluorescent microscope, double-pulsed YAG laser and cooled CCD camera, was applied to *in vitro* blood flow experiment through a micro round tube of a diameter 100 μm . Velocity distributions with spatial resolutions of $5.9 \times 0.73 \mu\text{m}$ were obtained even near the wall region. The results showed typical characteristics of Non-Newtonian fluid that the axial velocity profiles of blood flow were blunt around the center region of a tube.

Keywords: Blood flow, Micro PIV technique, Micro round tube, Fluorescent particle

1. 緒 論

微小循環は酸素や栄養分の物質交換を行うことにより細胞や組織を恒常的に維持する役割を果たす。微小血管内の詳細な血流速度分布計測は、微小循環内における血液のレオロジーを評価する上で重要であり、*in vivo* (生体内) と *in vitro* (生体外) の両観点から多くの研究がなされてきた^{1), 2)}。これまで主に、ガラス管や単離された微小血管などの人工流路においてレーザードップラー法や画像計測法などの計測手法が用いられてきたが、空間的・時間的に詳細な速度分布を得ることは困難であった。近年、マクロスケールで発展してきた PIV (Particle Image Velocimetry) が、マイクロ PIV として、光学顕微鏡などを用いることにより、微小領域での速度分布計測に応用されている^{3), 4)}。

これまでに著者らは、生体顕微鏡と高速度カメラを用いてラットの腸間膜の細動脈流場の *in vivo* 可視化計測を行っており、得られた速度分布が、血液の非ニュートン性、2相流、脈動などによる影響を含んだ複雑なものとなっている事を確認した^{5), 6)}。さらに、微小循環におけるスケール効果について調べるために、蛍光顕微鏡、高感度 CCD カメラ、ダブルパルスレーザーを用いた、マイクロ PIV システムを構築し、マイクロチューブ内に水を流して、流れ場の可視化計測を行った⁷⁾。本研究では、微小循環における基礎的な血液の流動特性を解明するため、細動脈を模擬したマイクロチューブに血液を流し、マイクロ PIV システムを適用して、その詳細な流速分布を求めた。

2. 実験概要

血管壁の形状、拍動の有無、流量などのパラメータを自由に設定し、血流の基本的なレオロジーを調べるため、マイクロチューブを用いて *in vitro* 血流場可視化実験を行った。

2.1 マイクロ PIV システム

Fig.1 Schematic View of experimental Set up

Fig.2 Experimental Set up

内径100 μm 、外径300 μm の断面形状が真円で、水の屈折率とほぼ同じ値を持つ FEP (Fluorinated Ethylene Polymer) で作成されたマイクロチューブを水中に沈め、水浸レンズを用いて血流場の速度分布計測を行った。Fig.1 にマイクロ PIV システムの概略図を、Fig.2 に装置の概観を示す。照明光源として波長が 532 nm、出力が 25 mJ/puls のダブルパルス Nd:YAG レーザーを用い、ステージ下部から透過照明として対象に入射させている。マイクロチューブ内を流れる蛍光粒子は、径が 0.5 μm であり、542 nm の波長で励起し 612 nm の波長の蛍光を発する。NA が 0.9、作動距離が 2.0 mm の 60 倍水浸レンズを持つ蛍光顕微鏡を透過した光は、550 nm 以上の光のみ透過する光学フィルターによって、粒子からの蛍光のみが 1280×1024 pixel、12 bit 階調、8 frame/sec の高感度冷却 CCD カメラによって記録される。

2.2 作動流体

作動流体として、ウサギの血液を凝固防止の為、ヘパリン処理し蛍光粒子を混入したものを使用した。また、マイクロチューブを 100 μl のマイクロシリンジに接続し、シリンジポンプを用いて血液を一定の設定流量(20 $\mu\text{l/h}$ 及び、100 $\mu\text{l/h}$)で流した。

作動流体として用いられる血液は、細胞成分として体積率が 40-45%の赤血球と 0.5%以下の白血球、血小板と液体成分の血漿からなる。血液の非ニュートン性の原因は、赤血球（ウサギの場合径が約 6 μm ）にあり、低ずり速度域ではわずかなせん断速度の増加により粘度が急激に低下し、赤血球が凝集して粘度が上昇するため、非ニュートン性が現れる。また、高ずり速度域では、せん断速度が増加しても粘度はほとんど変化せず、赤血球はせん断応力により変形して流れの方向にする配向することが知られている⁸⁾。赤血球は、血流が遅くそれに作用する外力が十分に小さいときは、双凹円板の形状をとる。一方、せん断応力が大きくヘマトクリットが低い時には、

流れの方向に頂部を出したパラシュート型になって移動する事が知られており⁸⁾、著者らもその様子を観察している⁹⁾。静止状態での双凹円板状の赤血球と、血液中を流れるパラシュート型の赤血球をそれぞれ Fig.3(a),(b) に示す。また、細動脈などの細い血管内では赤血球の大きさが管径に対して有意になり、管の中心に赤血球が集まり、壁面近傍に赤血球の存在しない、“血漿層”と呼ばれる数 μm の層が出来るなど、特徴的な流れとなる。

(a) Stationary state

(b) Flowing state

Fig.3 Red blood cell

3. 実験結果

3.1 血流場可視化画像

Fig.3 にハロゲンランプを照明として撮影されたマイクロチューブ内を流れる血流の画像を示す。観察領域は 242×192 μm であり、1 pixel は 0.18×0.18 μm に対応する。焦点面の位置はチューブのほぼ中央付近に合わせられているが、2.0 mm と長作動距離の対物レンズを使用しているため、この様に内部の流れを観察することが出来る。壁近傍では流速が小さいため、個々の粒子を観察できるが、軸集中の性質によってこの領域を通過しにくい赤血球は見られない。一方、流速の大きい管中央付近では、個々の粒子を捉えることは出来ず、粒子や赤血球は流跡線として観察される。Fig.4 にマイクロ PIV システムより得られた、マイクロチューブを流れる蛍光粒子画像を示す。蛍光粒子は明るく輝く微小な点として観察され、流れ全体に一樣に分布している様子が確認できる。一方、赤血球は蛍光を持たないため観察されにくく、この様な画像を解析して得られた速度場は、流体成分に追従する蛍光粒子の速度、つまり血漿など液体成分の流速であると言える。通常、血流場可視化計測では赤血球を染色しトレーサーとする為、赤血球のほとんど存在しない血漿層部分の流速は得られないが、FEP 製のチューブの利用により、屈折による影響が少なく、粒子画像を壁近傍まで観察できるため、壁近傍でも速度が得られる。

Fig.3 Blood flow image illuminated by halogen lamp

Fig.4 Fluorescent particle image illuminated by double-pulsed laser

3.2 速度分布

Fig.5 に PIV 法を適用した、設定流量 $20 \mu\text{l/h}$ の場合の血流場時間平均速度分布を示す。検査領域を 65×17 pixel とし、50%の重複を許して速度場を求めた。得られた速度場の空間解像度は、 $5.9 \times 0.74 \mu\text{m}$ である。また、得られた速度分布は管中央付近で最大値をとり、壁近傍に近づくにつれ小さくなる層流の特徴を示した。また、流れが十分に発達しているため、速度ベクトルの壁に垂直方向な成分はほぼ0となっている。得られた時間平均速度分布における断面中央部 ($X=106 \mu\text{m}$) での軸方向速度分布とその分散を Fig.4 に示す。流量は $20 \mu\text{l/h}$ と $100 \mu\text{l/h}$ に設定されており、流量から計算される平均流速はそれぞれ 0.7 mm/sec , 3.5 mm/sec , 得られ最大流速はそれぞれ約 1.3 mm/sec , 8.6 mm/sec となった。但し、

軸方向速度分布は、層流の理論解であるポアズイユ流の最大値で正規化している。得られた軸方向速度分布はそれぞれ、ほぼ左右対称で、ポアズイユ流とは異なり非ニュートン流体の特徴である管中央付近の速度勾配が平坦で広くなるという傾向を示した。得られた速度分布は血漿などの液体成分によるものであるが、液体成分も赤血球など血球成分からの作用を受け、非ニュートン流体としての特徴を示すと考えられる。与えられた流量の違いによる軸方向速度分布の比較により、流速が大きい場合の方がよりポアズイユ流に近くなり、流速が小さい場合にはより管中央部分が平坦になるという非ニュートン流体としての傾向が確認された。流速の小さい平均流速 0.7 mm/sec の場合では、平均流速 3.5 mm/sec の場合と比較して、特に管中央付近で軸方向速度分布の分散が大きくなった。流速が小さいほど中央部分を流れる赤血球が凝集し、不均一に凝集塊となって流れることによって、流速にばらつきが生じるためであると考えられる。一方、流速が大きい場合には、凝集はせん断応力によって離散するため、流速が小さい場合と比較して分散が小さくなると考えられる。これまでに、内径 $50 \mu\text{m}$ 程度の細静脈の計測結果において、流速が小さくなるにしたがって管中央付近が平坦になり非ニュートン性が顕著になるが、流速が大きくなるにつれてポアズイユ流に近づくこと、赤血球が凝集すると中央が平坦になる傾向があることが報告されている¹⁰⁾。その結果は、本計測で得られた結果とよく一致することが確かめられた。しかしながら、本計測では、特に壁付近の計測精度が十分でないために、血漿層内の流動特性を評価するには至っておらず、今後更なる計測制度の改善が求められる。

4. 結論

微小循環における血液の基礎的な流動特性解明のため、冷却 CCD カメラ、ダブルパルスレーザー、蛍光顕微鏡から構成されるマイクロ PIV システムを内径 $100 \mu\text{m}$ のチューブを流れる血液に適用し、速度分布を求めた。得られた速度分布の空間解像度は、 $5.9 \times 0.74 \mu\text{m}$ となり、軸方向の速度分布は層流の理論解であるポアズイユ流とは異なって非ニュートン流体の特徴を示した。

血液の採取に関して群馬大学の稲田 茂昭教授にご協力頂いたことをここに記し、感謝の意を表す。

Fig.5 Time-averaged velocity distribution of blood flow through micro tube

Fig.6 Time-averaged axial velocity profiles of blood flow through micro round tube

参考文献

- 1) Tsukuda K. et al.: Image correlation method for measuring blood flow velocity in microcirculation: correkation 'window' simulation and *in vivo* image analysis, *Physiol. Meas.* Vol.21 (2000), pp. 459-471.
- 2) Sergey, S. et al.: Prototype of an in vitro model of the microcirculation, *Microvascular Research*, Vol.65 (2003), pp.132-136.

- 3) Meihart N. et al.: PIV measurement of microchannel flow, *Exp. Fluids*, Vol. 27 (1999), pp414-419.
- 4) Koutsiaris A. K. et al.: Micro PIV for velocity-field measurement of particle suspension flowing inside glass capillaries. *Meas. Sci. Technol.*, Vol. 10 (1999), pp 1037-1046.
- 5) Sugii, Y. et al.: *In Vivo* PIV Measurement of Red Blood Cell Velocity Field in Microvessels Considering Mesenter+y Motion, *Physiol. Meas.*, Vol.23 (2002) pp. 403-416.
- 6) 杉井康彦: 高精度画像計測法を用いた微小血管内の速度分布計測, *機論 (B編)*, 67-662, (2001), pp. 2431-2436.
- 7) Sugii, Y. et al.: Study on Micro PIV in Micro Round Tube -Effects of the Interaction Between A Particle and Wall-, *Proc, 10th Int. Symp. on Flow Visualization*, Kyoto (2002)
- 8) 前田信治: 赤血球の微小循環とレオロジー, *ながれ*, 21巻 (2002), pp.129-134.
- 9) Okuda, R. et al.: Characterization of high spatial distributions of blood flow obtained by micro PIV technique, *Proc. 7th Int. Congress Biological and mechanical engineering*, Singapore (2002)
- 10) Bishop, J. J. et al.: Effect of erythrocyte aggregation on velocity profiles in venules, *Am J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, Vol.280 (2001), H222-H236.