

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：13903

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K12867

研究課題名(和文) MEMS技術と化学発光反応を利用した非接触引張試験による赤血球破壊力学条件の定量

研究課題名(英文) Quantification of failure conditions of a single red blood cell by non-contact mechanical tests using MEMS and chemiluminescence reactions

研究代表者

中村 匡徳 (Nakamura, Masanori)

名古屋工業大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20448046

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：衝突流の流体力による引張試験を提案し、流動中の赤血球変形量と内包するヘモグロビン量との関係の定量化を試みた。マイクロ流路は十字型である。赤血球を流路に流し、変形挙動を観察するとともに、回収した赤血球からランバートベールの法則に基づいて、残留ヘモグロビン量を推定した。流動中の赤血球の最大変形量と残留ヘモグロビン量の相関を調べたところ、相関が認められなかった。一方、赤血球が十字交差部に進入する際の圧縮変形速度と残留ヘモグロビン量との関係を調べたところ、両者には負の相関関係が認められた。以上より、赤血球は流れの衝突によって生じる圧縮により膜が損傷して、より多くの溶血が生じることがわかった。

研究成果の概要(英文)：The present study attempted to determine the fracture strain of a single red blood cell (RBC) using non-contact mechanical tests. A crossed microchannel with a width of 50 μm at the junction was fabricated. RBCs were introduced to the microchannel with expectations that RBCs are instantaneously stretched at the junction by colliding flows. The deformation behavior was observed with a microscope and recorded with a high speed camera. The amount of residual hemoglobin was estimated from the collected red blood cells based on the Lambert-Beer's law. Correlation between the maximum amount of deformation of RBCs during flow and the amount of residual hemoglobin was examined, and no correlation was found. On the other hand, a negative correlation was found between the compressive deformation rate and the residual amount of hemoglobin. These results suggested that RBCs are damaged more by compression than stretch.

研究分野：生体医工学

キーワード：赤血球 溶血 破壊条件

1. 研究開始当初の背景

溶血とは赤血球からのヘモグロビン漏出である。ヘモグロビンは一酸化窒素と不可逆的に結びついてそれを無能化することから、溶血は血栓症、嚥下障害、肺高血圧症、男性機能不全などを引き起こす (Rother et al. JAMA 2005)。このことから、溶血は長期使用を目的とした医療機器において看過できない問題として捉えられ、設計上の重要項目となっている。これまでに設計支援を目的として、医療機器内で生じるせん断応力などの流体力学的物量から溶血量の予測がなされてきた。しかしながら、これまでの方法では定量的精度に問題があり、実用上使用に耐えない。

これまでに、赤血球の変形解析に基づく溶血予測法の開発が行われてきた。しかしながら、赤血球の破壊力学条件 (降伏応力等) が不明であるため、その完成には至っていない。そこで、引張り試験により、破断ひずみの定量が試みられてきたが、把持位置を精確に制御することが困難であることや赤血球は弾性に富むため、エポキシ等による接着では破断する前に赤血球が支持体から剥離してしまうことから精度の高い結果が出ないという問題点があった。

2. 研究の目的

溶血が生じる力学条件を明確化することが本研究の目的である。そのために、MEMS技術による対抗流を使用して把持なしに非接触で赤血球の引張破壊試験を行うとともに、裂孔から漏出するヘモグロビンにより誘起される化学発光を捉え、裂孔生成 (膜破壊) を検知する方法の確立を目的とする。

3. 研究の方法

赤血球を非接触にて破壊するための流路を作製する (Fig. 1 上図)。流路は十字管になっており、左側より赤血球を投入する。赤血球はシース流によって姿勢を制御されて、十字部に運ばれる。対抗流によって、赤血球は縦方向に過伸張して、破壊される。

赤血球変形挙動を可視化・解析するための実験系を確立する (Fig. 1 下図)。赤血球は $8 \mu\text{m}$ ほどであるので、顕微鏡に高速度ビデオカメラを組み合わせて使用する。また、伸張度を解析するための画像処理法を検討する。

ヘモグロビンが光吸収物質であることを利用し、赤血球の透過光強度分布からランベルト・ベールの法則に基づいて、破壊された赤血球内に残存するヘモグロビン量を推定する。

以上を組み合わせ、作製した流路に赤血球を流動させて、顕微鏡を介して高速度ビデオカメラにより変形を可視化する。その後、光学的手法により溶血量を定量化する。流量を変更することで種々の変形速度にて赤血球を破壊し、赤血球が壊れる条件 (伸張度、伸張速度) と溶血量との関係を見出す。

4. 研究成果

【赤血球単体レベルでの溶血実験】

衝突流による赤血球引張試験装置の全体図を Fig. 1 に示す。十字型で交差部が直交するマイクロ流路を用いた。交差部分において、流路幅は 0.05 mm 、高さは 0.05 mm である。一方から赤血球懸濁液、向かい側から衝突流が流入し、十字管交差部で衝突して赤血球が伸張変形する。赤血球の挙動を顕微鏡 (IX-71, Olympus) でハイスピードカメラ (FASATCAM Mini-AX200, Photron) を介して撮影・記録した。衝突後の赤血球を含む廃液を流量条件毎に回収した。赤血球引張試験終了後、回収した赤血球をスライドガラス上で撮影した。

赤血球が撮影範囲外に出る直前の画像における赤血球の変形量および残留ヘモグロビン量を計測した。取得画像から赤血球を楕円近似した長軸 a と短軸 b から、

$$EI = \frac{a-b}{a+b} \quad (1)$$

を求め、赤血球の変形量を評価した。

赤血球に照射された光は、赤血球に内包されているヘモグロビンによって吸光される。この吸光の度合いを定式化したものが Lambert-beer の法則である。具体的にはバックグラウンドの代表輝度値を I_0 、赤血球内各ピクセルの輝度値を I_i 、ヘモグロビンのモル吸光係数を $\varepsilon [\text{m}^2/\text{mol}]$ 、1 ピクセルあたりの面積 $S [\text{m}^2]$ 及びヘモグロビンの分子量を $M [\text{g}/\text{mol}]$ とすると、赤血球内の残留ヘモグロビン質量 $m_{\text{Hb}} [\text{g}]$ としたとき、

$$m_{\text{Hb}} = \sum_N \left(-\frac{\log_{10}(I_i/I_0)}{\varepsilon} MS \right) \quad (2)$$

として求めた。マイクロ流路に流していない赤血球に含まれるヘモグロビン量を Control とし、結果では Control で正規化した残留ヘモグロビン量を示す。

十字交差部に進入する際の赤血球の進む方向を y 方向とし、赤血球が撮影範囲内に進入してから交差部中央で変形するまでの赤血球の y 軸長を測定した。その測定値から y 方向ひずみ ε_y を算出した。 t と ε_y に関して、

$$\varepsilon_y = ae^{-\beta t} + b \quad (3)$$

で近似して、式(3)の β を変形速度として評価した。

撮影は 60 倍シリコン対物レンズ (UPLSAP060XS2, Olympus) を使い、撮影速度は $100,000 \text{ fps}$ に設定した。A と C から流す流量の総和と、B から流す PBS(-) の流量 Q は等しく設定し、A と C から流す流量の比は 1:7 とした。 $Q = 15, 25, 50, 75, 100 \mu\text{l}/\text{min}$ とした。赤血球の残留ヘモグロビン量の推定において、 $\varepsilon = 43,088 \text{ m}^2/\text{mol}$ 、 $S = 1.0541 \times 10^{-13} \text{ m}^2$ 、 $M = 6,4450 \text{ g}/\text{mol}$ とした。データは平均値 \pm 標準偏差で示した。また、群間で不等分散が

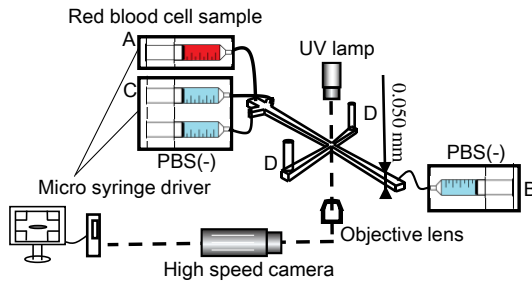
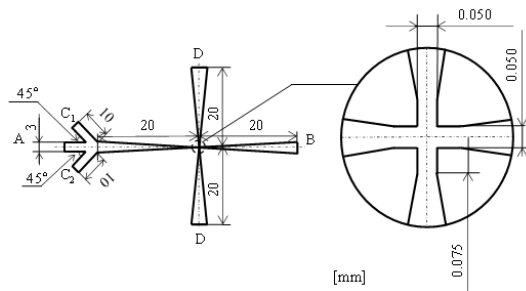


Fig. 1 (up) An experimental system to observe deformation of red blood cells in the crossed microchannel. (low) Design of the microchannel

見られたため、ノンパラメトリック法の Steel-Dwass 法による多重比較を統計解析ソフトである R (3.4.3) を用いて行った. 有意水準は $p = 0.05$ とした.

交差部を流動中の赤血球の様子を Fig. 2 に示す. 画像は $Q = 15 \mu\text{l}/\text{min}$ のものであり, 赤血球は伸張した楕円形で侵入後, 交差部で球状になり伸張変形しながら移動した.

流量と EI との関係を図 3 (A) に示す. 流動時の EI は Control と比較して有意に大きく, 流量が $75 \mu\text{l}/\text{min}$ までは増加の傾向にあったが, $100 \mu\text{l}/\text{min}$ で減少した. 各流量に対する赤血球内の残留ヘモグロビン量との関係を Fig. 3 (B) に示す. 図において, ●は流動中に撮影した画像から推定したもので, ○は流動後回収した赤血球の画像から推定したものである. 図に示されるように, 全ての流量条件において流動中に撮影した画像から推定したヘモグロビン量は, Control と比較して有意に大きかった. 一方, 回収した赤血球において推定したヘモグロビン量は全ての流量条件において, Control と比較して有意に小さく, 流量の増加に伴って, 減少する傾向にあった.

EI と回収した赤血球の残留ヘモグロビン量との関係を Fig. 4 に示す. 回収した赤血球においては, EI と残留ヘモグロビン量には一定の傾向が認められなかった. このことから, 最大変形量では, 赤血球の溶血量を説明できないことがあきらかとなった.

流量と赤血球の交差部中央への進入速度との関係を Fig. 5 に示す. 流量の増加に伴い, 赤血球の進入速度が大きくなるが, 飽和傾向にあることがわかる. 変形速度 β と正規化残留ヘモグロビン量 ϕ との関係を Fig. 6 に示す.

β を求める際のサンプル数は $n = 10$, 残留ヘモグロビン量 ϕ を求める際のサンプル数は $n = 50$ である. Fig. 5 より, β の増加に伴い, 残留ヘモグロビン量 ϕ は減少傾向にあることがわかる. このことより, ひずみ速度が大きくなると, 膜がより破壊され, ヘモグロビン漏出量が多くなることがわかる.

以上より, 赤血球に対して, 急激な圧縮ひずみが生じると, 膜破壊が生じ, より多くの溶血が生じることがあきらかとなった.

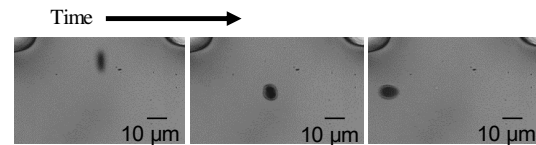


Fig. 2 A series of snapshots of an RBC that entered the crosssection of the microchannel

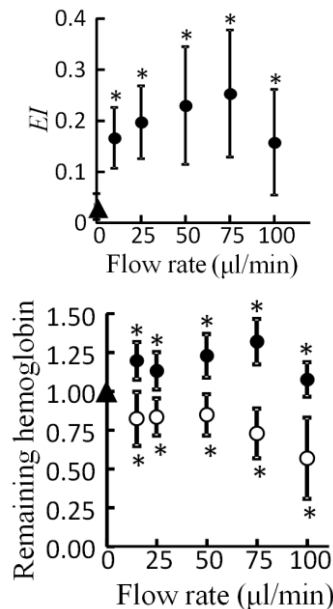


Fig. 3 (up) EI and (B) the amount of hemoglobin are plotted against flow rate. Symbols ● and ○ in (low) represent data obtained from the images taken during flowing and after collection, respectively. Symbol ▲ stands for control. $*P < 0.05$ (w.r.t. control)

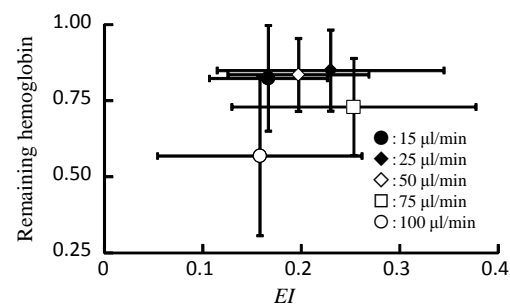


Fig. 4 The relationship between EI and the amount of remaining hemoglobin

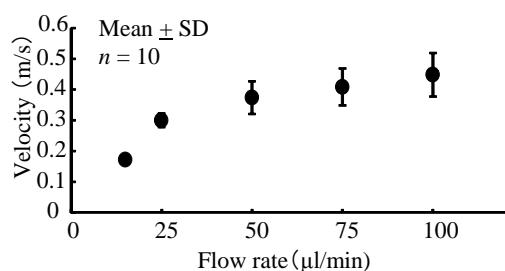


Fig. 5 RBC velocity vs flowrate

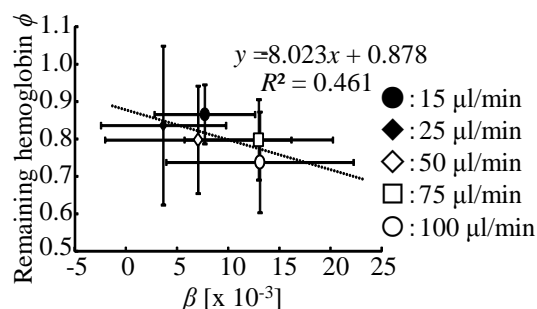


Fig. 6 Remaining hemoglobin vs β

【ルミノール反応による溶血検知法の検討】
ルミノール反応を用い、単体の赤血球より漏洩するヘモグロビンを発光として検出することを試みた。

ルミノール・過酸化水素の濃度に応じた発光量を測定し、物質濃度に応じた発光特性を得た (Fig. 7). 過酸化水素濃度が 50-500 mmol の間に発光量のピークがあることが確認された。また、過酸化水素が低濃度の領域 (0-10 mmol) ではルミノール濃度 0.1 mmol, 過酸化水素が高濃度の領域 (50-500 mmol) ではルミノール濃度が 0.5-1.0 mmol において高い発光量が確認された。以上より物質濃度に応じた発光特性を明らかにすることができた。

ルミノール反応溶液を構成するルミノール、過酸化水素の各物質濃度に応じた平均ヘモグロビン量を測定することで、溶血が発生しない物質濃度の範囲を検討した。ルミノール濃度に関わらず、過酸化水素濃度が 10 mmol/L 以下においては平均ヘモグロビン量は 25 ± 2 pg であった。過酸化水素濃度 500 mmol/L においては、ルミノール濃度に関わらず、平均ヘモグロビン量は 50% 以上の低下がみられた。以上より溶血の発生しない物質濃度の範囲が明らかとなった。

赤血球形状の観察し、形状変化のおきない物質濃度の範囲を検討した (Fig. 8). ルミノール濃度に関わらず、過酸化水素濃度が 10 mmol/L 以下において、正常赤血球比率は 96% 以上であった。過酸化水素濃度 500 mmol/L においては、ルミノール濃度に関わらず、正常赤血球は観察されなかった。以上より形状変化を引き起こさない物質濃度の範囲が明らかとなった。

赤血球と過酸化水素の反応による酸素ガスが発生しない過酸化水素濃度を検討した

(Fig. 9). 過酸化水素濃度が 10-500 mmol/L では酸素ガスの発生が確認された、一方で過酸化水素濃度が 0-1 mmol/L では酸素ガスは確認されなかった。以上より酸素ガスの発生しない過酸化水素濃度が明らかとなった。

以上より溶血の可視化で使用するルミノール反応溶液における物質濃度を選択した。ルミノール濃度 0.1 mmol/L 過酸化水素濃度 1 mmol/L であれば酸素ガスの発生を抑え赤血球を正常に保ちつつ最も高い発光量を得られることが明らかとなった。

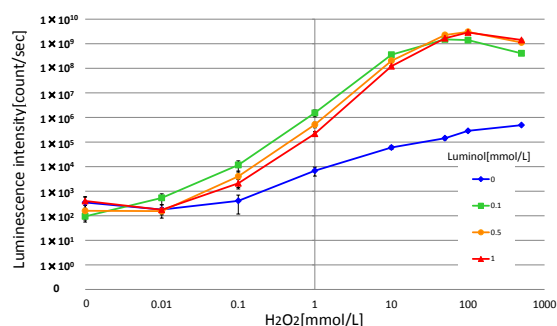


Fig. 7 Chemiluminescence intensity depending on concentration of hydrogen peroxide and Luminol

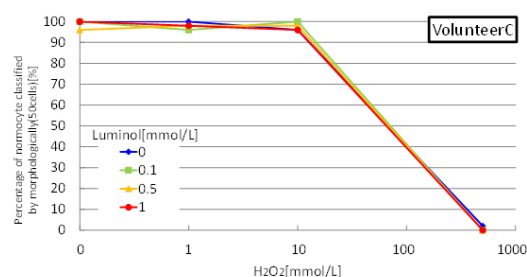


Fig. 8 Percentage of normocyte classified depending on concentration of hydrogen peroxide and Luminol

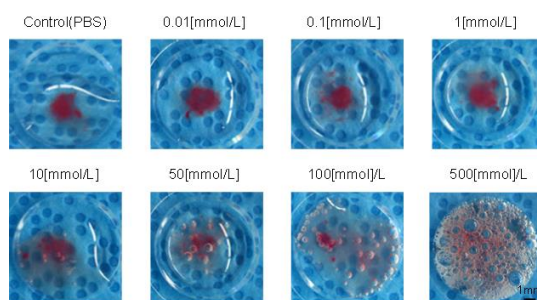


Fig. 9 Oxygen gas generation depending on concentrations of hydrogen peroxide

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 0 件)

〔学会発表〕(計 3件)

眞木敬太, 石井克宗, 木村直行, 中村匡徳,
衝突流による赤血球破壊とそれに伴うヘモ
グロビン漏出の定量, 日本機械学会 関東支
部第 23 期総会・講演会, 東京, 2017.3

Nakamura M, Yagi T, Visualization and
quantification of hemolysis at a single cellular
scale, 5th Japan-Switzerland joint Biomechanics
Conference, Switzerland, 2017.9

和田悠, 杉田修啓, 中村匡徳, 衝突流を用い
た非接触型引張試験における赤血球最大変
形量と漏出ヘモグロビン量との関係, 日本機
械学会東海学生会第 49 回学生員卒業研究発
表講演会, 2018.3

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況 (計 0件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

(1)研究代表者

中村 匡徳 (NAKAMURA, Masanori)
名古屋工業大学・工学研究科・准教授
研究者番号 : 20448046

(2)研究分担者

木村 直行 (KIMURA, Naoyuki)
自治医科大学・医学部・准教授
研究者番号 : 20382898

吉川 洋史 (YOSHIKAWA, Hiroshi)
埼玉大学・理工学研究科・准教授
研究者番号 : 50551173

(3)連携研究者

()

研究者番号 :

(4)研究協力者

八木 高伸 (YAGI, Takano)bu)
早稲田大学・理工学術院・研究院准教授
研究者番号 : 00468852