

平成22年 5月12日現在

研究種目：	若手研究(A)
研究期間：	2007~2009
課題番号：	19680024
研究課題名(和文)	個々の赤血球流動挙動に着目した溶血シミュレータの開発
研究課題名(英文)	Development of a Hemolysis Simulator based on the Deformation Analysis of individual Red Blood Cells
研究代表者	
	中村 匡徳 (NAKAMURA MASANORI)
	大阪大学・臨床医工学融合研究教育センター・特任准教授(常勤)
研究者番号：	20448046

## 研究成果の概要(和文)：

赤血球の変形挙動を計算機上で再現する赤血球モデルを構築した。これにより、単純な定常平行流中においては、既存の溶血指標は赤血球の変形量とほぼ一対一の関係があるものの、非定常平行流や複雑な流れ場になった場合には赤血球変形量を全く反映しないことがわかった。また、溶血は赤血球膜面の面積ひずみを評価することで予測できる可能性が示された。以上より、赤血球変形の解析を考慮した溶血シミュレータの基盤を構築できた。

## 研究成果の概要(英文)：

Studies have been conducted for the aim of developing a hemolysis simulator based on the deformation analysis of a single red blood cell (RBC). The dynamic motion of an RBC in a flow field is calculated based on the minimum energy principle. The results for simple steady and unsteady shear flows well agreed with experimental results, corroborating the proposed RBC model. We then simulated RBC in bifurcated flows where a RBC was experimentally observed to lyse upon impingement against the apex of bifurcation. A careful investigation of the RBC deformation revealed buckling of the membrane upon collision against the wall. It was found that the area strain reached 1.81 at maximum, larger than the reported value at which a pore is formed in the lipid bilayer membrane. Those results suggested the possibility of estimating hemolysis by evaluating the area strain. In conclusion, the results address the necessity to consider deformation of RBCs for better evaluation of hemolysis and this model would be useful to build the RBC-based hemolysis simulator.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	14,900,000	4,470,000	19,370,000
2008年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2009年度	2,400,000	720,000	3,120,000
年度			
年度			
総計	19,700,000	5,910,000	25,610,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：赤血球，溶血，計算力学，数値流体力学，メソスコピック解析

## 1. 研究開始当初の背景

赤血球は血液中に含まれる細胞の一種で

ある。赤血球は体内の細胞に酸素を運搬し、また、二酸化炭素を回収するという代謝において重要な役目を担っている。

ヒトの赤血球は成熟途中で脱核するため、細胞核を持たない。また、顆粒を持たないため、赤血球は外力に対して容易に変形することができる。また、赤血球は著しく変形した後でも、周囲の環境が落ち着けば膜の弾性によって速やかに両凹円盤形状に戻る。このように赤血球は柔軟な構造を有しており、周囲の流れ場にに応じてしなやかに変形する。しかしながら、赤血球はそのしなやかさ故、高せん断応力に曝されると、過大に変形し、赤血球膜が破れて内包するヘモグロビンが流出してしまう。これは機械的溶血（以下、溶血）と呼ばれる。人工心臓などの血液の高速流動を伴う人工臓器や医療機器の設計開発においては、溶血は最も重要な評価要素の1つである。

溶血の評価方法には実験によるものと計算によるものがある。実験的アプローチとしては、同一規格の人工臓器を複数台準備し、同じ動物血を供給して、溶血量を比較評価する手法が一般的である。しかし、得られる評価結果は相対値でしかないこと、更に、動物の血液は同一種類においても産地や個体差によって異なることから、他の文献値と比較できないという問題点がある。また、得られた溶血結果は人工臓器全体としての結果であるため、溶血が発生する箇所の特定や溶血の原因を特定できず、設計へのフィードバックが困難である。

一方、計算的アプローチでは、血流を数値流体解析し、得られた巨視的な流れ場からせん断応力などの流体力学的な物理量を抽出し、それを溶血予測式に適用する評価法が一般的である。しかしながら、使用される溶血予測式は、回転粘度計など単純な流れ場から得られた実験結果に基づくものであり、実際、人工心臓内など複雑な流れ場での溶血評価では実用上求められる精度としては不十分な場合がある。特に複雑な形状を有する人工臓器内においては流れの剥離や渦が随所に発生するため、赤血球の分布は決して空間的に一様ではなく、巨視的な流れ場に対して等しく溶血予測式を適用することについては問題がある。これに鑑みて、現在、赤血球の流跡を考慮しようとする研究もあるが、これらは赤血球を質点として扱っているため、溶血の直接的な原因と考えられる赤血球の瞬間的な変形挙動を表すことができず、根本的な解決策とはいえない。

力学的観点に立てば、溶血は過度な変形による赤血球膜の破壊である。それゆえ、溶血を予測するためには、まず、赤血球の変形動態を調べる必要がある。その第一の手段としては、実験による可視化が考えられる。しか

しながら、溶血が生じるほど高速に流動し、かつ、急激に変形する赤血球を追尾しながら、その三次元形状を計測することは、現在の計測機器では困難である。

## 2. 研究の目的

本研究では、赤血球の変形量が過大になる部分からヘモグロビンが漏出すると考え、流動する赤血球の面積、赤血球膜面上の力学状態を調べることにより、溶血が生じる直接的な原因を調べ、個々の赤血球変形を考慮した溶血シミュレータを構築することを目指す。そこで、まず、流動する赤血球の変形を再現する力学モデルを構築する。次に、実際に溶血が生じる高速せん断流中の赤血球の変形動態を解析し、膜の面積ひずみと溶血との関係を明らかにする。

## 3. 研究の方法

計算機上で実際の赤血球の振る舞いを表現できる力学モデルを構築する。実験結果と比較して、モデルの妥当性を検証する。実際に溶血した赤血球の変形挙動をモデルによって具現化することにより、赤血球の力学的環境を明らかにし、溶血の主原因を突き止める。

## 4. 研究成果

### (1) 赤血球モデルの構築

赤血球は内部構造を持たないため、その力学特性は膜の弾性特性から主に決定される。そこで、赤血球膜を微小な三角形要素に分割し、節点間および隣接する要素間をバネで接続することで膜の弾性特性をモデル化した。変形によって生じる弾性エネルギーを、節点間の伸展、要素間の曲げ、膜の面積変化の3つに分けてモデル化した。また、体積変化に対する弾性エネルギーを導入することにより内外圧力差による変形を表現した。これらの弾性エネルギーの総和が最小となるように赤血球の形状を決定した。流動する赤血球には、外部および内部流体と赤血球膜の移動速度の差により流体力が作用する。ここでは、流体力を膜面の法線方向成分と接線方向成分に分解し、それぞれ運動量保存則とニュートンの粘性法則に基づき算出した。赤血球が剛体壁に近接した際の圧力上昇に伴う力学的相互作用を赤血球膜と壁との距離に関するポテンシャル関数によって表現した。各節点に赤血球の質量を等分配した質点をおき、弾性力、流体力および壁面からの反発力の合力を外力として与え、各質点の運動方程式を解くことにより、赤血球の運動を表した。

半径  $3.25 \mu\text{m}$  の真球を赤血球の膨満状態とし、その状態から体積を徐々に減少させていき、自然状態における赤血球の形状を求めた。せん断に対する抵抗を線形および非線形ば

ねのいずれにした場合でも、赤血球が通常有する体積になるまで初期の体積に対して体積を40%減少させると、赤血球は自然界で見られるような両凹面形状になった (Fig. 1).

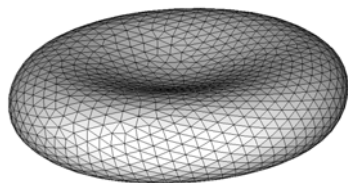


Fig. 1 RBC at a natural state.

## (2) 赤血球モデルの検証

### ①定常平行流中の赤血球挙動

平行平板間の定常せん断流れ中に本赤血球モデルを置くと、膜は回転し、赤血球は流れ方向に配向しながら、楕円形状に伸展した。その模式図を Fig. 2 に示す。図において、 $L$  と  $W$  は上部方向から見たときの赤血球の形状を楕円形と近似したときの長軸長と短軸長である。周囲流体のせん断応力を徐々に変化させた場合におけるせん断応力と  $L/W$  との関係を示す。横軸は周囲流体のせん断応力、縦軸は  $L/W$  である。黒印●、▲を実線で結んだものがそれぞれ線形ばね、非線形ばねモデルによる解析結果であり、白抜き印○、△、▽はそれぞれ Schauf ら (Lasers Med. Science, 18:45-50, 2003), Baskurt ら (Am. J. Resp. Critical Care Medicine, 157:421-427, 1998), Watanabe ら (Biophys J, 91:1984-1998, 2006) によって行われた実験の結果である。Fig. 3 より、線形ばねモデルにおいては、流体のせん断応力が大きくなるにつれ、 $L/W$  は線形的に増加することがわかる。一方、非線形ばねモデルにおいては、実験結果(前述の Schauf ら, Baskurt ら, Watanabe ら)と類似するように、数 Pa 以下のせん断応力の領域では線形的に増加し、その後、一定値に漸近するような非線形的変化を示した。

せん断速度に対する赤血球膜の回転周期の変化を Fig. 4 に示す。横軸はせん断速度、縦軸は膜回転の周期である。黒印が解析結果であり、白抜き印が Fischer らによる実験結果である。Fig. 4 より、せん断速度が大きくなるにつれ、膜の回転周期は線形的に増加することがわかる。この傾向は、実験結果

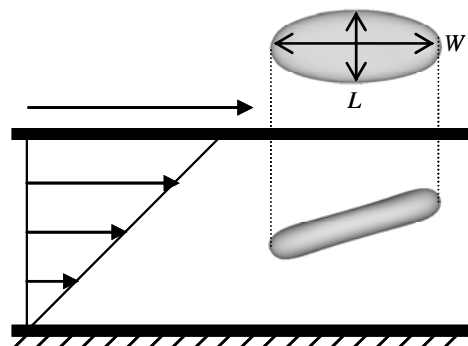


Fig. 2 Schematic drawing of a parallel shear flow and definition of  $L$  and  $W$ .

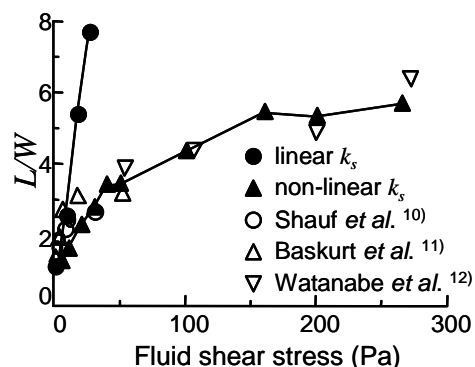


Fig. 3 The relationship between the fluid shear stress and  $L/W$  in a steady shear flow.

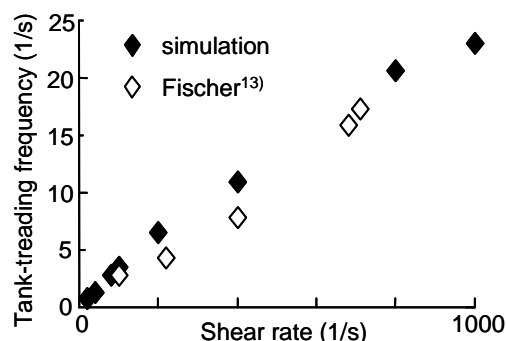


Fig. 4 The relationship between the shear rate and frequency of tank-treading in a steady shear flow.

(Science, 202:894-896, 1978)と一致するものである。

人体を流動する赤血球に作用するせん断応力は通常数 Pa 程度である。せん断応力が数 Pa である領域に限定すれば、実験結果も線形的変化であるので、本モデルにより変形挙動を再現できる。一方、高せん断場に限定し、実験結果を線形的変化であると仮定すれば、本モデルにより変形を再現することが可能である。しかし、弾性係数を変更するだけでは、せん断応力が数 Pa の領域での急激な  $L/W$  の増加から、高せん断場における緩やか

な増加へと移行する非線形的な赤血球の変形挙動を再現することはできなかった。本モデルでは、赤血球が大変形をすると、弾性バネが伸展方向に配向し、伸展に対する抵抗が増加する。それにより、変形が大きくなるにつれ、巨視的な弾性特性に非線形的変化が生じ、それがせん断応力と  $L/W$  との関係に非線形性をもたらすと考えられるが、結果を見るとその影響は少なく、両者の関係はほぼ線形的であった。実際の赤血球では、面積制約がより強く働くことによってせん断応力と  $L/W$  との間に非線形性が生じると考えられるが、ここでは、面積制約の条件を厳しくするのではなく、せん断変形に対して非線形ばねを導入することにより、高せん断流れ場においても赤血球の変形挙動を現象論的に再現できるようにした。以下では全て非線形ばねを用いた結果を示す。

### ②非定常平行流の赤血球の変形挙動

Fig. 2 に示した平行平板の上面板を周波数 3 Hz で流れ方向に対して平行に振動させ非定常平行流を誘起し、その中に赤血球を流動させた。この場合における流体のせん断応力と  $L/W$  の時間的変化を Watanabe ら (Biophys J, 91:1984-1998, 2006) の実験結果と共に Fig. 5 に示す。横軸は経過時間、縦軸に  $L/W$ 、および流体のせん断応力をそれぞれ示す。計算結果より、せん断応力は周期的に変化し、その変化に追従して  $L/W$  も周期的に変化することがわかる。また、流体のせん断応力がゼロになる瞬間と、 $L/W$  が最小になる瞬間とは位相差が存在したことがわかる。このズレは実際の赤血球を用いた実験 (Biophys J, 91:1984-1998, 2006) でも認められるものであり、赤血球の粘弾性特性に起因するものである。本モデルでは、膜自身のもつ粘弾性特性は考慮していないので、計算結果に現れた位相差は周囲の流体力と赤血球の相互作用が原因だと考えられる。つまり、本モデルでは膜の粘弾性特性を考慮せずに、流体の粘性力を取り入れることで赤血球の粘弾性特性を表現している。計算と実験の結果とを比較すると、全ての周期に渡って変形量  $L/W$  はほぼ等しくなっており、本赤血球モデルによって非定常流れにおいても変形状態を再現できている可能性が示唆された。

### (3) 流動赤血球の面積ひずみと溶血との関係

幅 100  $\mu\text{m}$ 、高さ 50  $\mu\text{m}$  の矩形断面を有し、分岐角 45° で対称に分岐する分岐管に赤血球を流動させた。解析条件は八木らの実験条件 (計算工学講演会論文集 14: 17-18, 2009) に合わせ、流入部に平均流速 1.0 m/s の十分に発達した流れを与えた。赤血球は入口の断面

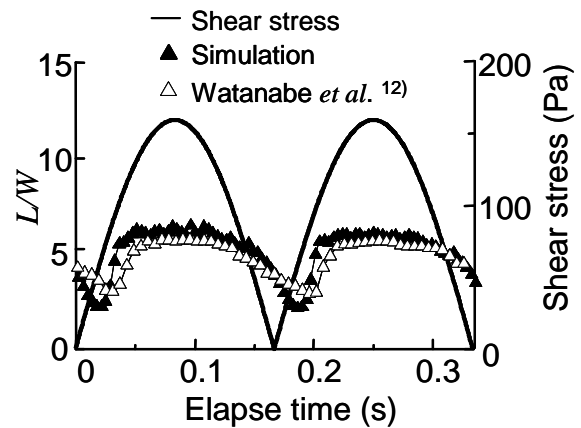


Fig. 5 The relationship between the fluid shear stress and  $L/W$  in an unsteady shear flow.

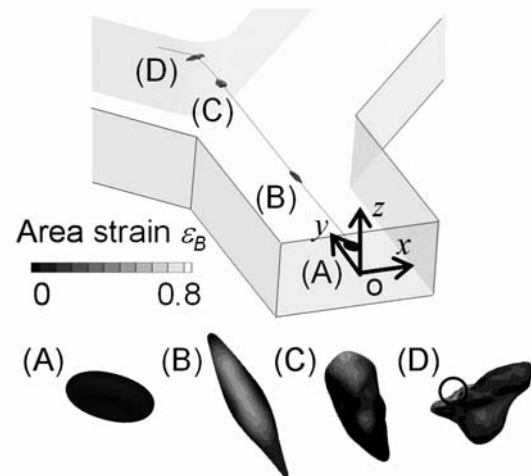


Fig. 6 Snapshots of RBC flowing in the bifurcation

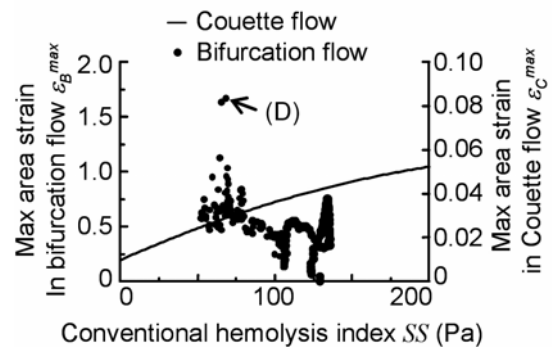


Fig. 7 Plot of the maximum of the area strain  $\epsilon_B^{\max}$  in a bifurcation tube and  $\epsilon_c^{\max}$  in a Couette flow against the conventional hemolysis index SS.

中心から  $x = 1.8 \mu\text{m}$ 、 $z = 12.5 \mu\text{m}$  ずらした位置に配置した。流動する赤血球の流跡線および流跡線上の(A)~(D)点での形状と膜の面積ひずみ  $\epsilon_B$  の分布を Fig. 6 に示す。Fig. 6 に

示すように、入口に置かれた両凹円盤型の赤血球(A)は、紡錘型(B)に伸展しながら分岐部に至り、壁に近づくにつれ、膜が屈曲し始め(C)、壁面に衝突する時には膜全体が折れ曲がるように変形した(D)。

流跡線上の各位置における流体のせん断応力をスカラー化した既存の溶血指標 SS と膜面全体での面積ひずみの最大値 $\varepsilon_B^{\max}$ との関係を Fig. 7 に示す。図中の実線は同程度の SS を示すクエット流中で得られた SS と面積ひずみの最大値 $\varepsilon_C^{\max}$ との関係を表したものである。図に示すように、クエット流中では、SS の増加に伴い $\varepsilon_C^{\max}$  は単調に増加するが、流跡線上においては SS が小さな場合でも $\varepsilon_B^{\max}$  が大きくなることもあり、両者の間には一定の関係が見られなかった。これは、流動中の赤血球には常に流体から時々刻々変化する流体力が作用し、動的かつ連続的に形状が変化する赤血球の変形量はその位置における流体力のみでは決定されないためである。また、 $\varepsilon_B^{\max}$  と $\varepsilon_C^{\max}$  の値には 20 倍程度の差が見られた。これは、クエット流中での赤血球は単に紡錘型に伸長するのに対し、分岐管内を流動する赤血球は複雑に変形し、局所的に面積ひずみが大きくなるためである。したがって、複雑な流れ場での赤血球の変形を評価するためには、本手法のように流動する赤血球の変形を直接的に取扱うことが必要であることがわかった。

八木らの報告(計算工学講演会論文集 14: 17-18, 2009)によると、ここで示した実験条件では、赤血球の壁面衝突時に溶血する。本解析結果によると、衝突の瞬間の赤血球膜の面積ひずみの最大値は、屈曲するところで局所的に高くなり、その値は 1.76 に達した。これは、Fig. 7 に示されるように、他の状況に比べ突出して大きい。Koshiyama ら(Proc SJB 2009, 2009)の分子動力学法による赤血球膜の変形解析によると、面積ひずみが 1.4 以上で膜に小孔が生じることが示されている。以上のことから、赤血球膜が過大に変形し、面積ひずみがある閾値以上になれば溶血が生じると考えられる。

#### (4) まとめ

本研究で得られた成果を以下に示す。

- ① エネルギー最小化原理に基づいて赤血球の変形動態を再現する力学モデルを構築した。
  - ② 複雑な流れ場における赤血球の変形はその位置の流体力のみでは決定されず、赤血球の変形を直接評価することが必要である。
  - ③ 赤血球膜の面積ひずみが局所的にある閾値を越えると溶血が起こる。
- 以上より、構築したモデルで流動する赤血球の面積ひずみを評価することにより溶血予測が可能になると考えられる。

#### 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 2 件)

- ① Masanori Nakamura, Sadao Bessho, Shigeo Wada, “Simulation of erythrocyte deformation in a high shear flow.” Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc. 2009, 2009:2358-2361. (査読有り)
- ② 中村 匡徳, 別所 貞雄, 和田 成生 “溶血シミュレータ構築に向けた赤血球変形挙動の数値解析と可視化” 可視化情報, 29, 114, pp. 27-32, 2009 (査読無し)

[学会発表] (計 20 件)

- ① 別所貞雄, 中村匡徳, 越山頭一朗, 和田成生 “流動する赤血球の変形解析と面積ひずみに基づく溶血予測” 第 85 期定時総会講演会, 2010.3.16-17, 兵庫
- ② 中村匡徳, 別所貞雄, 和田成生 “溶血シミュレータ構築に向けた分岐管路内を流れる赤血球の変形解析” 第 22 回バイオエンジニアリング講演会, 2010.1.9-10, 岡山
- ③ Sadao Bessho, Masanori Nakamura, Shigeo Wada, “Computational analysis on the deformation of a red blood cell in a branched pipe” 3rd East Asian Pacific Student Workshop on nano-Biomedical Engineering, 2009.12.20-23, Singapore
- ④ 別所貞雄, 中村匡徳, 和田成生 “壁に向かって高速流動する赤血球の変形解析” 第 20 回バイオフロンティア講演会, 2009.11.7-8, 和歌山
- ⑤ Masanori Nakamura “Multi-scale modeling of blood flow for the analysis of red blood cell behaviors in a micro-circulation” XXXVI International Congress of Physiological Sciences, 2009.7.27-8.1, Kyoto, Japan
- ⑥ Masanori Nakamura, Sadao Bessho, Shigeo Wada “Analysis of red blood cell deformation for the development of hemolysis simulator” XXII Congress International Society of Biomechanics, 2009.7.5-9, Cape Town
- ⑦ 中村匡徳, 別所貞雄, 田中雄大, 和田成生 “溶血シミュレータ構築に向けた赤血球流動および変形解析” 第 48 回日本生体医工学会大会, 2009.4.23-25, 東京
- ⑧ 田中雄大, 別所貞雄, 中村匡徳, 宮崎浩, 越山頭一朗, 和田成生 “赤血球変形能が微小循環血流に与える影響” 関西学生会学生員卒業研究発表講演会, 2009.3.15, 大阪
- ⑨ Masanori Nakamura “Computational

modeling of a red blood cell towards the development of hemolysis simulator”

Modeling and Simulation of Complex Systems, 2009.2.18, Tokyo

- ⑩ 中村匡徳 “個々の赤血球挙動に着目した溶血シミュレータ構築に向けて” 日本機械学会 第21回バイオエンジニアリング講演会, 2009.1.23-24, 札幌
- ⑪ 別所貞雄, 中村匡徳, 和田成生 “流動する赤血球の変形解析とそれに基づく容血指標の提案” 第21回バイオエンジニアリング講演会, 2009.1.23-24, 札幌
- ⑫ Masanori Nakamura “Multi-scale modeling of blood flow for the establishment of hemolysis simulator on the basis of the deformation analysis of an individual red blood cell” The 3rd ME International Symposium, Physiome and Systems Biology for Integrated Life Sciences and Predictive Medicine, 2008.11.30-12.1, San Francisco, CA, USA
- ⑬ 中村匡徳, 別所貞雄, 和田成生 “流動する赤血球の変形動態の解析 ～変形量と既存の溶血指標との関係～” 第21回計算力学講演会, 2008.11.1-3, 沖縄
- ⑭ 中村 匡徳 “流動する赤血球変形挙動の数値解析 ～個々の赤血球変形を考慮した溶血シミュレータ構築へ向けた取り組み～” 日本機械学会関西支部第9回秋季技術交流フォーラム, 2008.10.11, 京都
- ⑮ Masanori Nakamura, Sadao Bessho, Shigeo Wada “Red blood cell deformation behavior in a high-shear flow” International Congress of Theoretical and Applied Mechanics, 2008.8.24-29, Adelaide, Australia
- ⑯ Sadao Bessho, Masanori Nakamura, Kenichiro Koshiyama, Shigeo Wada “Dynamic deformation analysis of a red blood cell in a steady and unsteady shear flow” ASME 2008 Summer Bioengineering Conference, 2008.6.25-29, Marco island, FL, USA
- ⑰ Masanori Nakamura, Sadao Bessho, Shigeo Wada “Red blood cell behavior in an intra-ventricular flow” Workshop on Multi-scale Modelling of the Heart, 2008.3.27-29, Auckland, New Zealand
- ⑱ 別所貞雄, 中村匡徳, 宮崎浩, 越山顕一郎, 和田成生 “定常・非定常せん断流における赤血球の変形動態の数値解析” 関西学生会 平成19年度学生員卒業研究発表会, 2008.3.17, 大阪
- ⑲ 別所貞雄, 中村匡徳, 和田成生 “定常・非定常平行流における赤血球の変形動態の解析” 第20回バイオエンジニアリング講演会, 2008.1.25-26, 東京
- ⑳ 別所貞雄, 中村匡徳, 和田成生 “流動す

る赤血球の変形挙動” 第20回計算力学講演会, 2007.11.26-28, 京都

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中村 匡徳 (NAKAMURA MASANORI)

大阪大学・臨床医工学融合研究教育センター・特任准教授 (常勤)

研究者番号: 20448046

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: