

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月29日現在

機関番号：52601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21700468

研究課題名（和文） 複合的な力学定数を組み合わせた新規な赤血球変形能の実験的・理論的提案

研究課題名（英文） A proposal of newly erythrocyte deformability based on multiple mechanical properties with an experimental and a theoretical

研究代表者

安田 利貴（YASUDA TOSHITAKA）

東京工業高等専門学校・電子工学科・准教授

研究者番号：90318163

研究成果の概要（和文）：

赤血球変形能は、食生活の影響を受けるための、メタボリックシンドロームなどの生活習慣予防診断の指標としての有効性が期待されている。本研究では、周期的なせん断応力を赤血球に加える機構を新規に開発し、また、赤血球の変形量と力の関係から、赤血球の物性値である粘弾性を推定する原理を提案することが出来た。

研究成果の

概要（英文）：

Erythrocyte deformability is affected to custom of daily life related on meal and fitness. An evaluation of erythrocyte deformability would be expected to be a diagnosis method of metabolic syndrome. In this study, a newly prototype of shear stressor which is subjected erythrocytes to periodic shear stress is developed and a theory of mechanical property model for estimation of erythrocyte deformability is proposed. It is clarified that the newly shear stress and the erythrocyte impedance model is possible to indicate the erythrocyte deformability.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：バイオメカニクス

1. 研究開始当初の背景

近年の健康ブームを背景に、「サラサラ・ドロドロ血液」など、赤血球変形能が直接的に塞栓症などを誘発するような言葉が独り歩きしている。一方、赤血球の変形能は、血漿内の脂質含有量により変化するのは生化的に明らかであり、赤血球の変形能を改善させる医薬品などが臨床で活躍している。血液循環の改善薬（赤血球変形能）の開発の現場では、1960年代に提案された Reid 法と呼ばれる膜通過法が未だに基礎となっている。しかしながら、本手法原理を可視的手段へ適

学的に明らかであり、赤血球の変形能を改善させる医薬品などが臨床で活躍している。血液循環の改善薬（赤血球変形能）の開発の現場では、1960年代に提案された Reid 法と呼ばれる膜通過法が未だに基礎となっている。しかしながら、本手法原理を可視的手段へ適

応することで、「サラサラ・ドロドロ血液」という定性的な評価をもたらしている。そこで本研究では、従来のような評価手段とは異なり、赤血球に周期的なせん断応力を加え楕円形に赤血球を変形させ、その応力負荷に対する赤血球形状の歪として、長軸方向の長さ L (Length) と短軸方向の長さ W (Width) を時系列で計測し (図 1), その歪と応力の関係から、赤血球の物性値を推定するシステムを開発している。

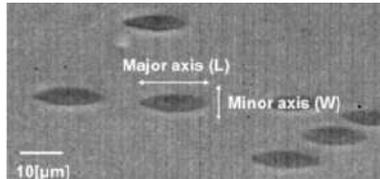


図 1 せん断応力で変形する赤血球

2. 研究の目的

本研究では、赤血球への周期的な力学負荷における形状変化の応答特性から、粘性、弾性、慣性、抵抗力の 4 つの項目を定量化し、in-vitro 実験による実験的解析手段を用いて、新規な赤血球変形能の指針への可能性について検討することを目的とした。

3. 研究の方法

顕微鏡下で測定される赤血球は、2次元的に変形が生じている。そこで、まずは、赤血球の変形を示す 1 次元モデルでの評価を行い、次に、2 次元構造として考慮した赤血球モデルを構築し、慣性、粘性、弾性、抵抗係数の定数化を試みる予定であった。しかし、使用可能な高速度カメラの機材変更に伴い、手配した高速度カメラの性能の最大画素領域 640×480 [pixels] において、最高撮影速度は 200 [f/sec] であった。そこで、この撮影条件で、赤血球の形状変化が撮影できるように、流れ場の改良に時間を費やした。そのため本報告は、1 次元モデルでの赤血球力学的特性の推定方法について報告を行う。

(1) せん断応力負荷機構

従来のせん断応力負荷機構を図 1 に示す。せん断応力は、2 枚の平行平板において、1 枚を固定、もう 1 枚を周期的に動かすことで、平行平板間の隙間にせん断速度を発生し、隙間内の流体 (赤血球浮遊液) の粘性の積で与えられる。

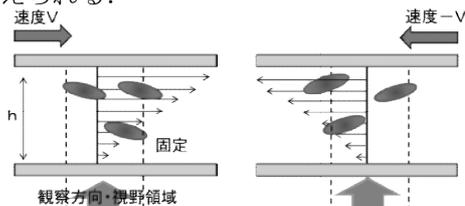


図 2 片側振動せん断応力負荷機構

片側振動せん断応力負荷機構 (以下、片側振動機構と記す) は、せん断速度を得るために、上側平板の振幅は、 0.5 [mm] 以上としている。そのため、40 倍の対物レンズの視野 (約 0.25 [mm]) を超え、観察視野内から赤血球が消えてしまう。さらには、高せん断速度負荷および高周波数条件では、高速度カメラの高性能化および光源の高輝度化が要求される。

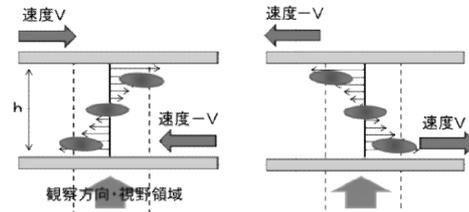


図 3 両側逆相振動せん断応力負荷機構

本研究では、図 3 のように平行平板を同時に逆相かつ同じ振幅量で動かし、平行平板の間隙中央付近で、赤血球がせん断速度受け、変形するせん断応力負荷機構を開発した。

両側逆相振動せん断応力負荷機構 (以下、両側逆相振動機構と記す) のせん断度は、以下で示される。

$$\gamma(t) = \frac{v_u(t) - (-v_b(t))}{h} = 2 \frac{v(t)}{h} \quad \dots (i)$$

ただし、 $v_u(t)$ は上部プレート移動速度、 $v_b(t)$ は下部プレート移動速度、 h は平行平板間の隙間距離、 $v(t) = v_u(t) = v_b(t)$ とした。

両側逆相振機構は、周期的に赤血球が隙間中心付近で変形するだけでなく、2 枚の平板が同時に逆方向に動くため、隙間内のせん断速度は、1 枚の振動方式に比べ、2 倍の大きさのせん断速度が発生する。そのため、片側振動機構に比べ、高周波数、高せん断速度で赤血球に負荷を与えることが可能となる。

両側逆相振機構の評価は、リニア・アクチュエータに直付けされた上側平板の変位に対して、シリコンローラを経由して逆相に駆動する下側平板の変位についてレーザ変位計で計測し、上部と下部プレートの振幅と周期について比較検討を行った。

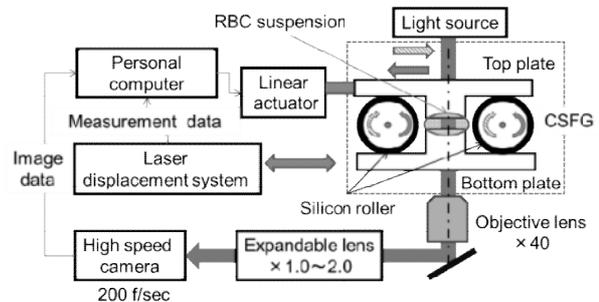


図 4 両側逆相振動せん断応力負荷機構の評価実験装置構成

また、顕微鏡視野内で、個別に観察できる赤血球の個数、1周期当たりの初期位置からのズレについて画像処理を用いて測定を行った。

装置の評価実験は、図4のように、両側逆相振動機構、高速度カメラ、光学顕微鏡、光源、リニア・アクチュエータ制御および画像データ収集用パソコン、レーザ変位計などで構成されている。レーザ変位計は、下側駆動平板の移動量が計測できる位置に設置した。

リニア・アクチュエータと直結された上側平板の駆動条件は、周期 f は 2~5[Hz]、振幅 0.5[mm]とした。

本研究で使用した赤血球試料は、食肉処理時に得られる食肉用の豚から採取された血液とした。赤血球浮遊液の調整方法は、遠心分離およびPBS(Phosphate buffered saline)による洗浄後、デキストラン 31[wt%]で希釈を行った。

(2) 赤血球の物性値推定モデル

赤血球の粘弾性特性を推定は、赤血球の質量、弾性、粘性の物性係数を用いた1次元機械インピーダンスモデルで表した(図5)。ここで、赤血球に加わるせん断応力を τ とすると、

$$\tau = \mu dy(t) = \frac{M \frac{d^2x}{dt^2} + B \frac{dx}{dt} + Kx + C}{A} \quad \dots (i)$$

となる。

ただし、 μ は赤血球浮遊液の粘度、 x は流れ方向の赤血球の変形量、以下は赤血球の物性として、 M は質量、 B は粘性、 K は弾性、 C は抵抗、 A は面積とする。

また、赤血球は高粘度溶媒に浮遊した状態でせん断応力を受けるため、粘性の影響は表れにくいことも考えられる。そこで、赤血球を薄板平板モデルと仮定し弾性係数の推定を行った。

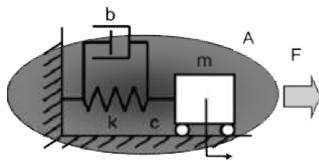


図5 赤血球機械インピーダンスモデル

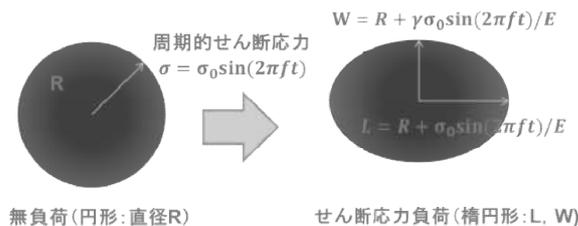


図6 赤血球薄板円板モデル

赤血球の変形能を示すDI (Deformation Index)は、以下ようになる。

$$DI = \frac{L-W}{L+W} = \frac{\frac{\sigma_0 \sin(2\pi ft)}{E}(1-\gamma)}{2 + \frac{\sigma_0 \sin(2\pi ft)}{E}(1+\gamma)} \quad \dots (ii)$$

ただし、 γ はポアソン比、 E は弾性係数とする。 E の推定値は、せん断応力負荷の平均値 ($t=1/8[s]$)、流れ方向の歪みを示すLおよびDIの平均値からポアソン比、 γ を求めた。また、DIの計算値と実験値の相関性について以下の式により、評価を行った。

$$R = \frac{\sum(x_t - \bar{x})(y_t - \bar{y})}{\sqrt{\sum(x_t - \bar{x})^2 \sum(y_t - \bar{y})^2}} \quad \dots (iii)$$

ただし、 x_t は各時間のDI平均値(実験値)、 \bar{x} はDIの1周期分の平均値(実験値)とする。 y_t は各時間のDI平均値(計算値)、 \bar{y} は計算値DIの1周期分の平均値とする。

(3) 画像処理アルゴリズム構築

従来、赤血球の画像処理は、半自動で行ってきた。そのため画像処理の作業に多くの時間を費やしてしまい、様々な実験条件(せん断応力の大きさ、周期および血液条件)を変更させることに制約があった。そこで、試作した片側振動および両側逆相振動機構および高速度カメラ、光学装置において、自動で適切な画像処理が可能なアプリケーションを構築した。画像処理の手順は、背景の固定ノイズ除去、画像全体のノイズ除去、赤血球の大きさを考慮した部分的2値化処理、赤血球のL、W、面積、重心位置などの計算プログラムを作成した。

4. 研究成果

(1) せん断負荷機構

両側逆相振動機構の評価計測結果を表1に示す。視野領域内で10個程度の赤血球について、4~6回程度の繰り返し変形を計測することが出来た。上側平板の周波数が2.0[Hz]、振幅0.5[mm]において、下側平板は振幅0.43[mm]、周波数1.95[Hz]で動くことが確認された。また、赤血球の移動量は、1つの赤血球に注目すると、初期位置からX軸方向へ14[μm]移動し、Y軸方向へ-17[μm]内に収まることが確認出来た。今後、視野内における左右の移動量を少なくするために、平行平板間の間隙調整方法について工夫する必要があると考えられた。

表1 上下プレートの追従性計測結果

Setting Parameter	Bottom Plate Motion (BPM)		Displacement Deviation of Erythrocyte Position (DDEP)	
	Frequency [Hz]	Amplitude [mm]	Horizontal movement [μm]	Vertical movement [μm]
1 (33.33)	1.03±0.02	0.49±0.01	69.33±1.24	-46.68±0.59
2 (66.67)	1.95±0.03	0.49±0.01	17.07±2.78	-13.75±0.4
3 (100)	2.99±0.01	0.46	26.22±3.00	-15±0.28
4 (133.33)	4.03±0.01	0.47	13.29±2.5	-10.64±0.61

(2) 赤血球の物性値推定モデル

片側振動機構を用いた実験では、最大せん断速度が一定 (1200S^{-1}) となるように振幅の大きさを調整し、赤血球のLおよびWを行った。測定結果例を図7に示す。

図8は、せん断速度の周波数に対する振幅倍率 (5.2[Hz]の流れ方向の振幅を基準とした増幅率) と位相差の計測結果を示す。最大せん断速度は、一定でとしたため、増幅率はほぼ一定値を示した。このことから、せん断応力が同じ大きさで物性値が同じであれば、歪は同じ値になるので、本システムは、赤血球の変形度を正しく測定出来ていることが示唆された。次に、計測された歪を用いて、仮定した機械インピーダンスモデルから、物性値の推定を行った (図9)。推定された慣性M、弾性K、抵抗Cは16[Hz]まで、ほぼ一定値を示した。しかし、粘性Bの値はマイナスを示し、周波数の増加に伴い小さくなることが確認された。この原因は、せん断速度と変形量の相関性が低いことが考えられた。

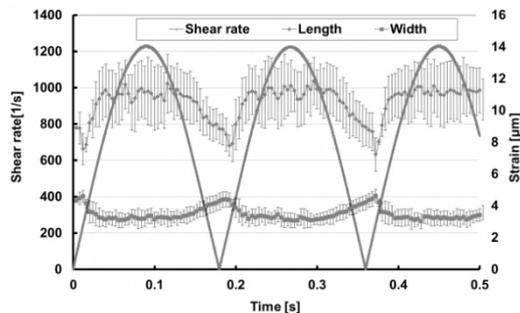


図7 5.2Hzのせん断速度負荷 (40Pa)

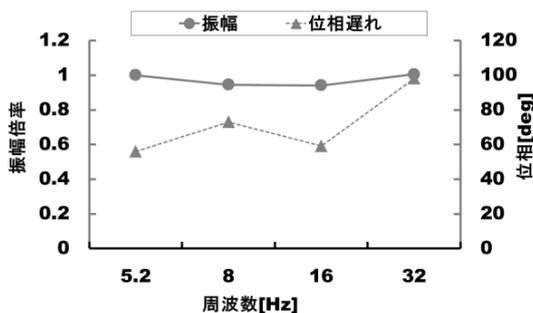


図8 周波数応答特性

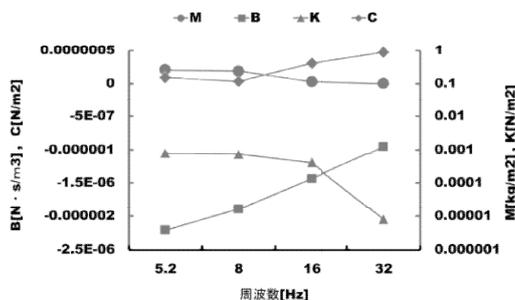


図9 物性値推定結果

今後、赤血球モデルの変更等を行い赤血球の形状変化から物性値を算出するアルゴリズムの構築を目指す予定である。

両側逆相振動機構および赤血球薄板円板モデルを用いて推定した弾性係数Eの結果例を図10に示す。本推定結果は、直接法である原子間力顕微鏡 (カンチレバーによる弾性係数測定) や、マイクロピペット法の実験報告と比較すると、本実験結果は、これらの値に対して中間的な値を示した。そのため、間接的に測定した方法でも、直接的な手段と同様な計測精度を得られることが明らかとなった。今後、測定条件を変え赤血球の力学的特性の推定法について検討を行う必要があると考えられる。

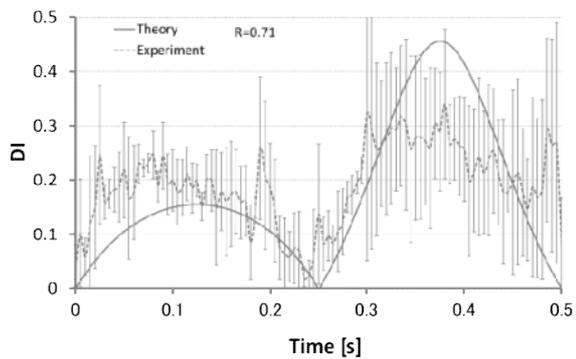


図10 2Hzのせん断速度応力負荷 (6.52Pa)

(3) 画像処理について

画像処理では、測定領域に内に存在する赤血球を追跡して、周期的な形状変化を測定するプログラミングを行った。これに伴い、解析時間が大幅に削減された。

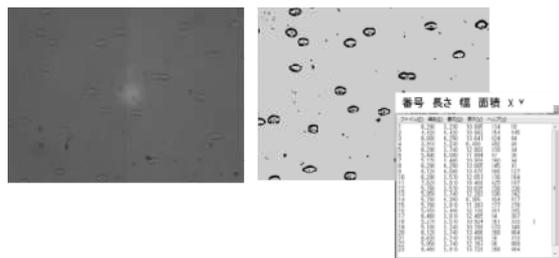


図11 画像解析結果

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9件)

①安田利貴, 横山直幸, 高谷節雄, 逆レオメータ法を用いた赤血球変形能推定システムの開発, 第49日本人工臓器学会大会,

S-60(40), 2011

②安田 利貴, 横山 直幸, 高谷 節雄, 逆レオメータ法を用いた赤血球の力学特性推定法に関する検討, 第 11 回生活支援工学系学会連合大会, CD-ROM, 2011

③安田 利貴, John Gates, 横山 直幸, 高谷 節雄, 逆レオメータ法を基礎とした周期的せん断速度負荷装置の開発, 第 50 回日本生体医工学会大会, vol. 51, 221, P2-6-4, May. 2011.

④ 横山 直幸, 迫田 大輔, 長岡 英気, 安田 利貴, 高谷 節雄, 連続流補助循環に伴う赤血球変形能と抗溶血特性の変化に関する in-vivo 評価, 第 50 回日本生体医工学会大会, vol. 51, 321, 03-12-4, Apr. 2011.

⑤横山 直幸, 迫田 大輔, 安田 利貴, 高谷 節雄, Age Dependent Dynamic Deformability of RBCs Evaluated using a Cyclically Reversing Shear Flow Generator, 第 49 回日本生体医工学会大会, vol. 50, FC-18-3, June. 2010.

⑥ N. Yokoyama, D. Sakota, T. Yasuda, S. Takatani, Age Dependent Deformability Changes of RBCs Evaluated using a Cyclically Reversing Shear Flow Generator, Biophysical Society 54th Annual Meeting Abstract, 20-24 Feb 2010, San Francisco, California, USA.

⑦N. Yokoyama, D. Sakota, T. Yasuda, N. Watanabe, S. Takatani, Age Dependent Deformability Changes of RBCs Evaluated using a Cyclically Reversing Shear Flow Generator, The 4th international symposium on Biomechanics in Vascular Biology and Cardiovascular Disease, 16-17th April 2009, Rotterdam, Holland.

⑧安田 利貴, 中本 順一, 横山 直幸, 高谷 節雄, 齊藤 俊, 赤血球粘弾性推定法に関する基礎的研究, 第 48 回日本生体医工学会大会, vol. 47, 24-pm0-21-5, Apr. 2009.

⑨横山 直幸, 安田 利貴, 齊藤俊, 高谷 節雄, 機械的せん断による赤血球の形態学的特性変化の定量化に関する研究, 第 48 回日本生体医工学会大会, vol. 47, 24-pm0-21-6, Apr. 2009.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安田 利貴 (YASUDA TOSHITAKA)
東京工業高等専門学校・電子工学科・准教授

研究者番号 : 90318163

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

高谷 節雄 (TAKATANI SETSUO)
東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・人工臓器部・教授

研究者番号 : 40154786