

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25年 6月18日現在

機関番号： 12401
 研究種目： 基盤研究（B）
 研究期間： 2010～2012
 課題番号： 22300155
 研究課題名（和文） 赤血球膜損傷のマルチスケール力学解析と溶血観察実験による溶血シミュレータの構築
 研究課題名（英文） Towards the establishment of hemolysis simulator by a multi-scale analysis and experimental observations of damages on a red blood cell membrane and
 研究代表者
 中村 匡徳（NAKAMURA MASANORI）
 埼玉大学・大学院理工学研究科・准教授
 研究者番号：20448046

研究成果の概要（和文）：

本課題では、（1）連続体レベルにおける赤血球の変形動態解析、（2）分子動力学レベルにおける脂質膜破断解析、（3）化学蛍光法による溶血可視化実験の3つを行なった。1）より、単純な定常中において、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、非定常流など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。（2）より、引張による膜破断機序を明らかにした。（3）より中性下にてルミノール反応を生じさせる条件を見出し、赤血球個体レベルにおける溶血発生を可視化する実験系の基礎を築いた。

研究成果の概要（英文）：

The present study mainly carried out the following three projects; (1) deformation analysis of a red blood cell at continuum scale, (2) molecular dynamics simulations of the rupture of a red blood cell membrane and (3) establishment of the visualization technique of hemolysis by chemiluminescence. From project (1), it is revealed that conventional hemolysis indices is not well correlated with the amount of red blood cell deformation in complex flows including unsteady flow, addressing the necessity of the analysis of RBC deformation for better prediction of hemolysis. Project (2) clarified the mechanism and conditions of breaking open of a red blood cell membrane at the molecular level. In project (3), we identified the condition that luminol can be activated in neutral media, serving as a base for visualizing hemolysis occurring from one red blood cell.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	7,000,000	2,100,000	9,100,000
2011年度	6,000,000	1,800,000	7,800,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	14,000,000	4,200,000	1,8200,000

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，メゾスコピック解析

1. 研究開始当初の背景

溶血とは赤血球の崩壊であり、赤血球膜が破れてヘモグロビンが漏出することを言う。溶血が頻発すると、赤血球数が不足し、貧血を引き起こす。これに加え、溶血によって漏出するヘモグロビンは血管弛緩因子かつ抗血液凝固因子である一酸化窒素(NO)と瞬間的かつ不可逆的に結びついてNOを無能化するため、長期的な溶血は高血圧などの慢性疾患や血栓症を引き起こす。

溶血は過度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。その手段として、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、現実的には困難である。

計算力学モデルによって赤血球の変形を再現することができれば、赤血球膜面上の力学状態を詳細にすることが可能であり、溶血が生じる直接的な原因を調べることができる。本研究の最終的な目標は、この溶血シミュレータの構築である。

溶血シミュレータでは、生理学的な低せん断応力場だけでなく、溶血が生じるような高せん断応力場においても、赤血球の変形を定量的に再現できる必要がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、個々の赤血球の変形解析に基づく溶血シミュレータの構築である。特に本課題においては、連続体レベルにおいて流れと赤血球変形量との関係を、分子動力学レベルにて赤血球膜の破断機序をそれぞれ明らかにする。また、化学蛍光法により溶血発生を捉えるための実験系の確立を目指す。

3. 研究の方法

本課題では、研究を(1)連続体レベルにおける赤血球の変形動態解析、(2)分子動力学レベルにおける赤血球膜破断解析、(3)化学的蛍光イメージングによる溶血可視化実験の3つに分けて、並行的に進めていった。

4. 研究成果

(1)連続体スケールにおける赤血球膜変形の解析

赤血球のモデルとして、エネルギー最小化原理に基づいて赤血球の変形を表現する3次元赤血球モデルを用いた。膜面を三角形要素に分割し、隣り合う質点同士を線形ばねでつなぐことにより膜の伸びに対する抵抗を、また、隣接する伸びばね同士を曲げばねでつなぐことにより膜の曲げに対する抵抗をそれぞれ表現した。赤血球が運動する際には、体積を一定に保っていることを仮定し、膜が取

り囲む面積を一定値にするような制約条件を与えた。流体力のモデル化に際しては、一方向連成の概念を導入し、周りの流れ場から赤血球にかかる力を推定した。具体的には、膜の法線方向については運動量の保存側から、接線方向についてはニュートンの粘性法則によって力を記述した。ただし、接線方向力のモデル化については、等価境界層厚さという概念を導入し、一定速度で落下する球体周りのストークス流れにおける流体抵抗力と表面せん断応力の総計の釣り合いからそれをモデル化した。最終的には赤血球膜面を構成する各質点について運動方程式を解くことにより、流動に伴う赤血球の運動を解いた。

作成した赤血球モデルを一様せん断流中に入れたところ、赤血球モデルはせん断速度に応じて、種々の振る舞いを示した。具体的には、低せん断流れ下では赤血球は剛体回転し、高せん断流れ下では赤血球は姿勢を保ったまま膜だけが回転するような挙動を示した。剛体回転運動から膜回転運動にはせん断速度 $20 \sim 40 \text{ s}^{-1}$ 程度で切り替わり、これは過去の実験データ(Goldsmith and Marlow, Proc R Soc Lond B 182, 351, 1972)と一致した。同様に、非定常せん断流中에서도赤血球運動を表現できるか否かについて検討するために、周期的に速度が変動するようなせん断流れ中にモデルを入れて計算を行った。結果として、計算結果は実験結果(Watanabe et al, Artif Organs, 31, 352, 2007)とよく一致し、本モデルは定常流れだけでなく、非定常流れ中においてもその変形を表現できることがわかった。

せん断速度と赤血球の変形との間に相関関係があるのか否かについて検討した。定常せん断流中に赤血球モデルを入れたところ、赤血球の変形度(最大主ひずみ)はせん断速度の増加に伴って大きくなり、両者には一定の関係があることがわかった(Fig. 1)。

より複雑な流れ場でのせん断速度と赤血球の変形との関係を調べるために、 $Re = 800$ の狭窄管内流れに赤血球を流した。その際の赤血球変形の様子をFig. 2に示す。赤血球膜面の色は第一主ひずみを示し、管内の色はせん断応力をスカラー化したものを示す。図より、赤血球が狭窄部を通過する際に大きく変形し、膜面には局所的に高いひずみが生じていることがわかる。赤血球の流跡に沿ったせん断速度と赤血球の変形(膜面最大主ひずみ)との関係をFig. 3に示す。この図に示されるように、狭窄流れでは、両者の間には一定の関係が認められなかった。これは、赤血球が流動することにより、周囲の流れ場が変わることで外部流体と赤血球間に速度差が生じ、絶えず流体から粘性力が赤血球に作用するため、赤血球が粘弾性的な変形をするためだと考えられる。このことは赤血球の形状

はその位置における流体場から一意には決まらないことを示しており、既存の溶血指標のように流体場と溶血とを直接的に結び付けようとする試みには溶血の予測精度に限界が生じることを示している。以上より、溶血量をより正確に予測するためには赤血球の変形を解析に取り入れる必要があることが示された。

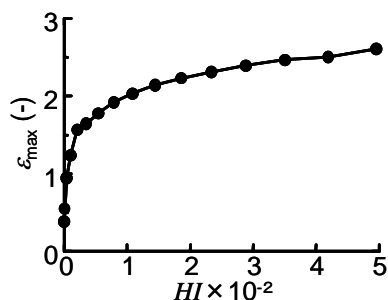


Fig. 1 Relationship between τ_{max} and shear stress in a steady shear flow

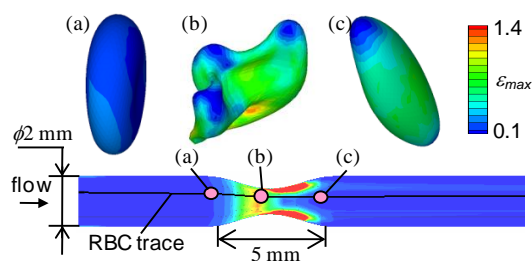


Fig. 2 Snapshots of the RBC shape with a contour plot of the strain distribution along the flow trace

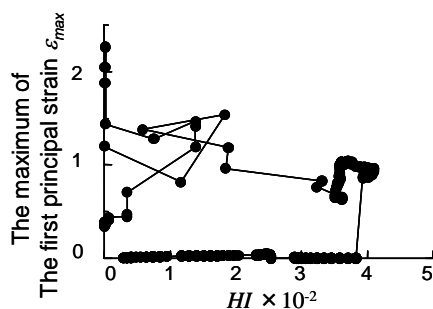


Fig. 3 Relationship between τ_{max} and shear stress in a stenosed flow

(2) 赤血球膜変形の分子動学的解析

分子動力学法により、コレステロールを含んだ脂質二重膜の引張シミュレーションを非定常および準静的に行い、赤血球膜の破断機序について調べるとともに、膜中のコレステロールが破断に与える影響について検討した。

まず、赤血球膜モデルとして、脂質分子の

ジパルミトイルフォスファチジルコリン (DPPC) のみによる純粋な脂質二重膜系 (0 mol%) と DPPC とコレステロールによる混合二重膜系を用いた。混合二重膜については、コレステロールの含有率を 20 と 40 mol% の 2 種類の系に設定した。全方向に周期境界を設けた。膜面に垂直な方向の周期境界イメージセルの影響を軽減するため、十分なサイズの水分子の層を挿入した。系は温度、圧力がそれぞれ 323 K, 0.1 MPa の状態で安定化されている。

膜に引張を与えると、膜の面積が増加し厚さが減少した。面積がある値を超えると、膜面に孔が形成された。その後、更なる引張に伴って、膜孔は拡大し、やがて破断に至った。非定常引張シミュレーションにおける膜破断時の面積ひずみの平均は 1.15 (0 mol%), 1.40 (20 mol%), 1.33 (40 mol%) であった。一方、準静的引張では、破断面積ひずみは 0.8 (0 mol%), 1.2 (20 mol%), 1.4 (40 mol%) であった。なお、ここで、破断面積ひずみは引張前の平衡状態における系の 50 ns 間での xy 平面の平均面積を初期膜面積 A_0 、引張過程の系の面積を A として、面積ひずみを $A/A_0 - 1$ として評価したものであり、膜を貫通する定常的な水で満たされた通路に発展する水分子の単列侵入が形成されたときを破断したときと定義した。

非定常および準静的引張のいずれにおいても、純粋な脂質二重膜系より混合二重膜系の方が大きい面積ひずみが生じた状態でも膜構造を維持していた。非定常引張では 20 mol% で最大の破断面積ひずみを示し、準静的引張では 40 mol% が最大であった。準静的引張における破断面積ひずみとコレステロール含有率との関係の傾向はマイクロピペット吸引法による実験結果と一致した (Needham and Nunn, Biophys. J. 58, 997, 1990)。

次に膜が破断へ至る過程とコレステロールのそれに対する関与について調べた。非定常引張において、引張前の状態ではコレステロールは明確な二層構造をとっており (Fig. 4(a)), それぞれのコレステロールの長軸が膜に対して垂直な方向を指していた。しかし、引張に伴い膜厚さが減少すると、上下の層のコレステロール同士が接近し、それぞれのコレステロールの長軸の向きが乱れた。その後、水分子が脂質二重膜の疎水性部分に侵入して、水分子で満たされた孔が形成され、上下の水分子の層が繋がることにより、膜の破断

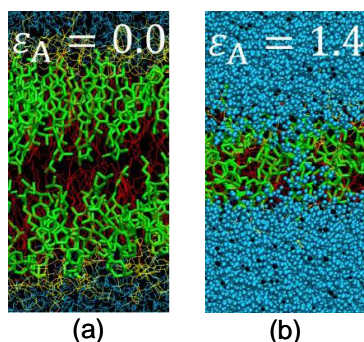


Fig. 4 Snapshots of the rupture process of a DPPC membrane (a) before stretch and (b) after stretch where water molecules penetrate the membrane, creating a pore.

へとつながった (Fig. 4(b)). 一方、面積ひずみ 1.0 での準静的引張では、初期状態で膜中のコレステロールの長軸の向きが乱れているのに対し、100 ns 後ではコレステロールの配向が整っていた。すなわち、同じ面積ひずみを与えても、非定常引張中と準静的引張では、コレステロールの配向に関して、膜の構造が異なっていることが示され、これが膜の破断に影響している可能性が示唆された。

以上、本研究より、純粋な脂質二重膜系より混合二重膜系の方が大きい面積ひずみが生じた状態でも膜構造を維持できることがわかった。また、非定常引張では 20 mol%、準静的引張では 40 mol% で最大の破断面積ひずみを示すことが明らかとなった。更に、同じ面積ひずみを与えても、準静的引張過程を経た場合では、コレステロールの配向が整っていることが示された。

(3) 化学的蛍光法による溶血可視化実験

ルミノール反応の光学・溶血特性を明らかにし、溶血現象の可視化での使用に向けルミノール反応溶液を最適化することを目的として実験を行った。

はじめに、化学発光を用いる手法による溶血可視化の実現可能性に関する知見を得るために以下の 4 つの実験を行った。

①ルミノール反応に関する基礎検討

ルミノール反応を観察し、ルミノール反応はヘモグロビンを触媒とし瞬時的に反応し、発光は数分間継続することを確認した。以上よりルミノール反応は溶血の可視化に使用可能な発光特性があることを確認した。

②ルミノール発光検出の実現性検討

溶血発生の瞬間を撮像することを想定した高速度の撮影条件(露光時間 10[μ s])において EMCCD カメラを用いることでルミノール発光による信号を検出した。これよりルミノール反応による発光は EMCCD カメラを用いることで検出可能となるということが示

唆された。

③ルミノール反応による溶血発生の確認

赤血球はルミノール反応溶液と 5[min]以上触れると溶血が発生し、形状が維持されないことが確認された。

④ルミノール反応溶液による溶血要因

ルミノール反応溶液による溶血要因検討の結果、ルミノール反応溶液の pH が強アルカリ性であることが溶血の主要因であることが示唆された。またルミノール反応溶液を構成するルミノール、過酸化水素は溶血の主要因でないと考えられた。以上より、溶液の pH を生体値である pH7.4 にすることで溶血しないルミノール反応溶液を作成可能だと考えられた。

次に、中性 pH のルミノール反応溶液の発光量を増強する物質を検討し、中性 pH におけるルミノール反応溶液の構成物質を選定した。中性 pH において減少する発光量を増大させる方法として次亜塩素酸が有効であると考えられた。次亜塩素酸が、ヘモグロビンを触媒として用いた反応系においても有効であるか検討した。発光量測定の結果ヘモグロビンを触媒として用いる反応系においては次亜塩素酸による発光増強は得られない事が明らかとなり、本研究におけるルミノール反応溶液は、ルミノール/過酸化水素の混合溶液が適切であると考えられた。

3 つ目として、中性 pH における溶血可視化手法の確立に向け、ルミノール反応溶液の最適化を以下の 4 つの実験より行った。

①発光特性の検討

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。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。

②溶血度の検討

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。

③形状変化の検討

赤血球に形状変化の生じ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、

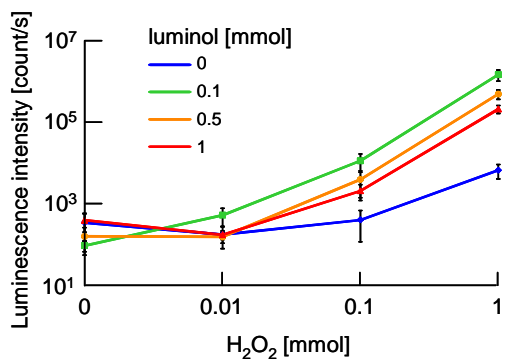


Fig. 5 Chemiluminescence intensity depends on concentration of hydrogen peroxide and Luminol.

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を明らかにした。

④酸素ガスの発生有無

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。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を明らかにした。

実験 1 から実験 4 で得られた知見を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。

以上よりルミノール濃度 0-1[mmol/L]過酸化水素濃度 0-1[mmol/L]の範囲内であれば、溶血が発生せず且つ酸素ガスも発生しないといえる。この濃度の範囲において実験 1 で得られた発光特性から最も高い発光量を示す溶液濃度を選択する。Fig. 5 にルミノール濃度 0-1[mmol/L]過酸化水素濃度 0-1[mmol/L]の範囲における発光量を示す。グラフより図中 A 部で示した過酸化水素濃度 1[mmol/L], ルミノール濃度 0.1 [mmol/L] の濃度において最も高い発光量を得られることが明らかとなった。

以上、ルミノール反応の光学・溶血特性を明らかにし、溶血現象の可視化での使用に向けルミノール反応溶液の最適化を行った。結論として、ルミノール濃度 0.1 [mmol/L] 過酸化水素濃度 1 [mmol/L] の反応溶液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。今後は本実験で示されたルミノール反応溶液を用いて溶血現象の可視化

を行う

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 10 件)

1. Hiroki Kamada, Yohsuke Imai, Masanori Nakamura, Takuji Ishikawa, Takami Yamaguchi, Computational study on thrombus formation regulated by platelet glycoprotein and blood flow shear, *Microvascular Research*, in press, 査読有, 2013, in press
2. Masanori Nakamura, Sadao Bessho, Shigeo Wada, Spring-network based model of a red blood cell for emulating a meso-scopic blood flow, *International Journal for Numerical Methods in Biomedical Engineering*, 29, 114-128, 査読有, 2012
3. Hiroki Kamada, Yohsuke Imai, Masanori Nakamura, Takuji Ishikawa, Takami Yamaguchi, Computational analysis on the mechanical interaction between a thrombus and red blood cells: Possible causes of membrane damage of red blood cells at microvessels, *Medical Engineering and Physics*, 34, 1411-1420, 査読有, 2012
4. Masanori Nakamura, Haruka Takimoto, Shigeo Wada, Computational fluid dynamics of blood flow in an extracorporeal blood circuit for the analysis of thrombogenic hemodynamic factors, 6, 89-100, 査読有, 2011
5. Hiroki Kamada, Kenichi Tsubota, Masanori Nakamura, Shigeo Wada, Takuji Ishikawa, Takami Yamaguchi, Computational study on effect of stenosis on primary thrombus formation, *Biorheology*, 48, 99-114, 査読有, 2011
6. Kenichiro Koshiyama, Shigeo Wada, Molecular dynamics simulations of pore formation dynamics during the rupture process of a phospholipid bilayer caused by high-speed equibiaxial stretching, *Journal of Biomechanics*, 44, 2053-2058, 査読有, 2011
7. Yoshihiro Ujihara, Masanori Nakamura, Hiroshi Miyazaki, Shigeo Wada, Proposed spring network cell model based on a minimum energy concept, *Annals of Biomedical Engineering*, 38, 1530-1538, 査読有, 2010
8. Yoshihiro Ujihara, Masanori Nakamura, Hiroshi Miyazaki, Shigeo Wada, Effects of the initial orientation of actin fibers on global tensile properties of cells, *Journal of*

Biomechanical Science and Engineering,5, 515-525, 査読有, 2010

9. Masanori Nakamura, Shigeo Wada, Mesoscopic blood flow simulation considering hematocrit-dependent viscosity, Journal of Biomechanical Science and Engineering, 5, 578-590, 査読有, 2010
10. 別所貞雄, 中村匡徳, 和田成生, 非定常高せん断流れ場における変形挙動を再現する赤血球モデルの構築, 日本機械学会論文集 B 編, 76, 2118-2126, 査読有, 2010

[学会発表] (計 10 件)

1. 重松大輝, 越山頭一朗, 和田成生, 力学的要因による溶血現象の解明に向けた赤血球膜破断の分子動力学シミュレーション, 第 23 回バイオフロンティア講演会, 2012.10.5-6, 弘前
2. 中村匡徳, 赤血球変形の解析による溶血シミュレータ構築への取り組み, 日本機械学会 2012 年度次大会, 2012.9.9-12, 金沢
3. 中村匡徳, 医療支援に向けた血流シミュレーション, 旭川医科大学第 2 回教育研究推進センター講演会, 2012.8.20, 旭川
4. Masanori Nakamura, Shigeo Wada, Deformation Analysis of a Red Blood Cell for the Development of Hemolysis Simulator, 10th World Congress of Computational Mechanics, 2012.7.8-13, Sao Paulo, Brazil
5. Masanori Nakamura, Shigeo Wada, Numerical Analysis of the Deformation of Red Blood Cell, The 15th International Symposium on Flow Visualization, 2012.6.25-28, Minsk, Belarus
6. 中村匡徳, 赤血球流動の計算と可視化, 第 50 回 CG・可視化研究会, 2012.1.18, 埼玉
7. 中村匡徳, 医療応用を念頭においた生体流動シミュレーション, 第 8 回機械学会研究分科会 JWFS, 2012.1.16-17, 静岡
8. Masanori Nakamura, Shigeo Wada, Does fluid shear stress represent the degree of a red blood cell deformation?, VIPIImage, 2011.10.12-14, Portugal
9. Masanori Nakamura, Sadao Bessho, Shigeo Wada, Deformation analysis of a red blood cell for the development of hemolysis simulator, 6th World Congress of Biomechanics, 2010.8.1-6, Singapore
10. 中村匡徳, 田中雄大, 別所貞雄, 和田成生, 赤血球の硬さが微小循環血流に与える影響, 第 15 回計算工学講演会, 2010.5.26-28, 福岡

[図書] (計 2 件)

1. Masao Tanaka, Shigeo Wada, Masanori Nakamura, Computational Biomechanics, Springer, 87-177, 2012
2. 中村匡徳, 和田成生, 血流シミュレーション, 大阪大学出版会, 臨床医工学スキルアップ講座, 208-219, 2010

[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
無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 匡徳 (NAKAMURA MASANORI)
埼玉大学・大学院理工学研究科・准教授
研究者番号 : 20448046

(2) 研究分担者

和田 成生 (WADA SHIGEO)
大阪大学・大学院基礎工学研究科・教授
研究者番号 : 70240546

宮崎 浩 (MIYAZAKI HIROSHI)
大阪大学・大学院基礎工学研究科・教授
研究者番号 : 00263228

越山 頭一朗 (KOSHIYAMA KENICHIRO)
大阪大学・大学院基礎工学研究科・助教
研究者番号 : 80467513

(3) 連携研究者

()
研究者番号 :