

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 19 日現在

機関番号：24601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24650301

研究課題名(和文)異常赤血球の微小細管内流動形式とガス反応の計測法

研究課題名(英文)Microhemodynamic properties and gas reactions of abnormal RBCs in narrow tubes

研究代表者

酒井 宏水 (Sakai, Hiromi)

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：70318830

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：微小流路(内径25 μ m)を用い、赤血球凝集など異常な赤血球の流動現象の特徴、特に管壁近傍の血漿層の厚さ(cell free layer, CFL)を定量化した。高分子量デキストラン添加によって赤血球凝集モデルを作成した。凝集度の増大につれ、CFLは増大し、赤血球が管壁に接触する頻度も低下した。血管内皮への赤血球の接触は、血管壁に強い剪断応力を与えるので、凝集亢進は、NO産生にも影響する可能性がある。CFLの増大は、内皮由来NOの捕捉を低減させる方向に働くことも考えられる。赤血球から血管壁への酸素輸送は、CFL増大により低減されることが予想される。人工赤血球の共存の効果についても考察した。

研究成果の概要(英文)：Using a narrow capillary tube (inner diameter 25 μ m), the cell free layer (CFL) width nearby the wall was measured when perfused with abnormal erythrocytes of elevated aggregation. Aggregation of erythrocyte was induced by the addition of high molecular weight dextran. Increasing the aggregation level showed a wider CFL and an increased incidence of collision of erythrocytes to the tube wall. Contact of erythrocytes on the endothelium during flow induces a strong shear stress that may influence on the production of NO. On the other hand, a wider CFL will decrease NO consumption by erythrocytes. It is also expected that a wider CFL would affect on the oxygen unloading from erythrocytes to a vascular wall. Increased CFL will enhance plasma skimming which may also induce heterogeneous blood supply and decreased tissue oxygenation. It is expected that the presence of sub-micron sized artificial red cells, which disperse in the cell free layer, will improve the tissue oxygenation.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：医用システム

キーワード：ヘモレオロジー 赤血球凝集 微小循環

1. 研究開始当初の背景

研究代表者らは、内径 25 μm の微小血管モデルを用い、赤血球の流動挙動を検討し、偶然にも高粘性の分散媒では細管内の中央を一直線に並んで流れ、静止画像から血球の変形能が評価できる可能性を見出した(文献[1])。他方、海外研究協力者の Dr. S. Kim (シンガポール国立大学バイオエンジニアリング部門) は、病態モデルとしてラットに高分子量デキストランを静脈内投与することにより、赤血球の凝集を促進させると、赤血球の軸集中 (centralization) が促進され、微小血管壁側の血漿層が厚くなる現象を定量化した(文献[2,3])。これらの知見から、微小血管モデルを活用すれば、異常赤血球の解析など診断技術へ応用できるのではと考えた。また申請者らは、人工赤血球を開発し(文献[4,5,6])、これが血漿層に均一に分散し、赤血球が通過出来なくなった毛細管も通過出来るとの予測を立てており、各種病態において末梢への酸素供給を促進出来るものと予測してきた。

(文献)

- [1] Sakai H, et al., Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2009;297:H583-9.
- [2] Ong PK, Kim S, et al., Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2010;298:H1870-8.
- [3] Kim S, et al., Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2007;293: H1947-54.
- [4] Sakai H, et al., Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2010;298:H956-65.
- [5] Sakai H. et al., Methods Enzymol. 2009; 465:363-84.
- [6] Sakai H, et al., Microvasc Res. 2011;81: 169-76.

2. 研究の目的

微小流路(Microfluidic device)を用いることにより、(i) 糖尿病や心臓疾患で見られる赤血球凝集などにおける異常な赤血球流動現象の特徴、特に血管壁近傍の血漿層の厚さ(red blood cells free layer, または cell free layer, CFL) を定量化すること、また (ii) 血液疾患における異常な赤血球流動に起因する末梢循環不全において、人工赤血球を混在することにより末梢への酸素供給が促進される可能性について検討すること、以上の二点について明らかにすることを目的とする。

本研究は、シンガポール国立大学バイオエンジニアリング部門、Dr. S. Kim との共同研究として進められた。

3. 研究の方法

健常ヒト血液を採取し EDTA を添加、遠心

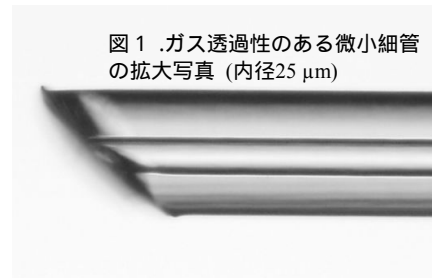


図1 .ガス透過性のある微小細管の拡大写真 (内径25 μm)

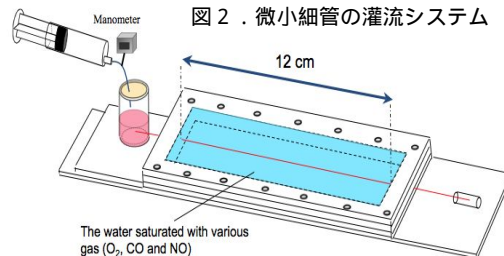


図2 . 微小細管の灌流システム

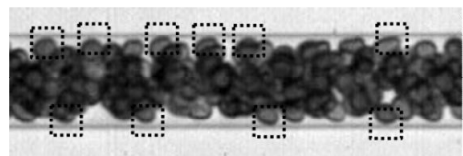


図3 . 微小流路内を流れる赤血球。点線で囲った箇所は、赤血球が管壁に接触した部位をしめす。

分離して血漿成分と buffy coat を除去、再度生理食塩水に分散させる操作を繰り返し、洗浄赤血球分散液を調製した。これに高分子量デキストラン (Mw. 500 kDa) を添加し (7.5-12.5mg/ml)、ヘマトクリットを 40%程度に調節した。赤血球の凝集度は、Myrenne aggregometer で計測した。高分子量デキストランを添加すると微粒子が凝集するのは、いわゆる Depletion interaction (枯渇性相互作用) に起因すると考えられている。つまり、赤血球表面に巨大分子デキストランが接近し得ない領域が形成されるため、デキストランの濃度勾配が発生し、これを最小限にするために凝集が惹起するという機序である。

実験に用いた微小細管は、内径 25 μm 、壁厚 37.5 μm 、長さ 150 mm (平河ヒューテック社製) であり、その材質は、フッ素化 ethylene-propylene copolymer で、撥水性、ガス透過性を呈する(図2)。細管の一端を赤血球が入っているリザーバータンクに連結させた。透明アクリル板とシリコン板を用いて水槽を作製し、細管を水槽の中に浸漬した(図2)。光学顕微鏡(倒立型, IX71)のステージに水平に置き、リザーバータンクにシリンジポンプにセットしたシリンジを用いてガス圧力をかけることで、液体を流動させた。先ずアルブミン溶液でフラッシュさせることで、管壁に赤血球が付着することを防止した。圧力は圧力センサーでモニターした。

細管内の中心流速の測定には、フォトダイ

オード相関法を用いた (Velocity Tracker Mod-102 B; Vista Electronics Co.)。或は、高速カメラ (FASTCAM 1024PCI) を用いて 3,000frames/s の速度で画像記録し、ビデオ再生から流速を算出した。Cell free layer (CFL) の厚さ、および Cell free area (CFA)面積は、ビデオ画像におけるピクセル数から算出した。また、赤血球が血管壁に接触する頻度 (frequency)も解析した(図3)。また、流動方向軸に対する CFA の対称性についても新たに定義し、算出を試みた。

4 . 研究成果

赤血球の凝集度 Index は、約 16(健常)から 25(デキストランによる凝集惹起)であった。赤血球は軸集中(centralization)して流れるが、そのとき最も外側を流れる(壁に最も近い位置を流れる)赤血球の流速(V_{edge})は、平均で 2.7 - 2.6 mm/s であった。

赤血球の凝集の度合いが増大するにつれ、CFL の厚さは増大し、平均値として約 1.2 μ m から 1.7 μ m にまで変化した(図4)。また、凝集の度合いが増大するにつれ、赤血球が管壁に接触する頻度も極端に低下した。ある時間における CFA 形状の管の軸に対する左右非対称性は、赤血球の凝集が促進されるにつれ低下した。また 1 秒間の平均としてノーマライズした CFA は、赤血球の凝集が促進するに従い増大した。

本実験で得られた CFL の厚さは、動物実験で得られた値に比較して大きいものであった。これは、管壁の柔らかさに起因していると考えら得る。実際の血管よりも今回用いたチューブの方が圧倒的に硬く、表面が滑らかであり、長さも長いので、より均一な CFL が形成されたものと考えられる。

血管では血流により血管壁に生じる剪断応力が増大するに従い、血管内皮弛緩因子である NO の産生量が増大することが知られている。血管壁内皮細胞の糖鎖(glycocalyx)に赤血球が接触することは、血管壁に非常に強い剪断応力を与えることが予想出来る。従って、

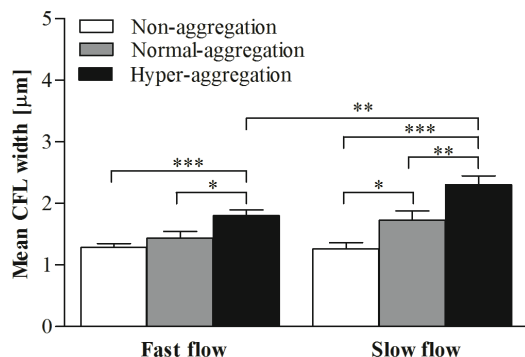


図4 . 赤血球の凝集が促進されるにつれCell Free Layerの厚みが増大する。

赤血球凝集の亢進は、NO の産生にも影響する可能性がある。

他方、生体内において、CFL の増大(血漿層の厚さの増大)は、赤血球と血管壁の距離が長くなることを意味するので、血管壁から産生される NO の捕捉は低減されることも考えられる。また、赤血球から血管壁への酸素供給の面では、血漿層の増大により低減されることが予想出来る。本実験系を使えば、そのようなガス反応についても解析が出来ると考えられる。

本研究では当初、異常赤血球として鎌型赤血球貧血病患者の赤血球など、将来的に、血液疾患についても検討することを視野に入れていた。血液疾患については遺伝学的、分子生物学的には十分に検証され、また血球形状についても静的観察から明らかになってはいるが、流動状態において赤血球がどのように形態変化をして、酸素授受や血行動態に異常をもたらすか、十分に解析されてはいない。また、人種が多様なシンガポールでは「異常ヘモグロビン症(タラセミア)」の発症が少なくない。近隣諸国では鎌形赤血球貧血症患者もみられる。本研究が開始した当時(平成 24 年度)、研究代表者は早稲田バイオサイエンスシンガポール研究所に所属していたが、平成 25 年度より急遽、奈良県立医科大学に異動したこともあり、血液疾患患者からの血液を得ることが困難となり、この実験の実施までは出来なかった。

しかし、本研究では、異常赤血球モデルとして凝集の亢進した赤血球分散液を用いた実験を実施した。ガス透過性を有する *in vitro* 微小血管モデルを用いる実験系の構築に成功し、また計測技術も確立したので、この実験系を活用することにより、様々な異常赤血球が流動中に変形する様子を動的解析することが可能になると考えられる。

今回の赤血球凝集はデキストランの添加によって惹起されたが、臨床的にも赤血球凝集が亢進する病態は、観察されている。このような状況において微小血管内で CFL が厚くなれば、分岐点における plasma skimming(血漿分離)が助長され、赤血球が均一に組織微小循環に到達せず、酸素供給にも影響が出てくるのが容易に予想できる。この場合、もし研究代表者らが開発して来た人工赤血球(ヘモグロビン小胞体)があれば、ヘモグロビン小胞体の粒子径は赤血球の 1/30 程度と小さく、CFL 層に均一に分散することが予想されるので、病態において酸素供給を改善することが予想出来る。

これらの仮説を実証する研究を継続して実施する計画である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

B. Namgung, H. Sakai, S. Kim. Quantification of cell-free layer width changes by erythrocyte aggregation in a 25- μ m tube (投稿中)

H. Sakai. Cellular-type hemoglobin-based oxygen carrier (hemoglobin-vesicles) as a transfusion alternative and for oxygen therapeutics. Current Drug Discovery Technol. 9, 188-193 (2012)

〔学会発表〕(計3件)

酒井宏水. 人工赤血球/代用血漿剤(水溶性高分子)分散系のレオロジー挙動. 第60回レオロジー討論会 / 名古屋大学 / 2012.9.27-28.

H. Sakai. Recent topics of Artificial Red Cells Project. The 3rd Annual Symposium of Waseda Bioscience Research Institute in Singapore. Biopolis, Singapore. 2012.11.2

酒井宏水. 人工赤血球(Hb小胞体)の新しい利用法の深求と、シンガポールにおける融合研究拠点の形成. 第6回生物学・化学・情報科学融合のための戦略的先進理工学研究基盤の形成支援事業シンポジウム. 早稲田大学西早稲田キャンパス. 2013.12.14.

〔図書〕(計1件)

H. Sakai. Biocompatibility of a highly concentrated fluid of Hemoglobin-vesicles as a transfusion alternative. In: Selective Topics in Nanomedicine (T.M.S. Chang ed.), pp. 133-147, World Scientific, Singapore (2013)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.naramed-u.ac.jp/~chem/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

酒井 宏水 (Sakai, Hiromi)
奈良県立医科大学医学部・教授
研究者番号：70318830