

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 26 日現在

機関番号：34416

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700466

研究課題名(和文) マイクロ流体システムによる赤血球変形能評価法の開発 - 病的赤血球の検出と診断 -

研究課題名(英文) Development of evaluation method for erythrocyte deformability by using micro-TAS(Screening and detection of pathological erythrocytes)

研究代表者

田地川 勉 (Tajikawa, Tsutomu)

関西大学・システム理工学部・専任講師

研究者番号：80351500

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、赤血球変形能の定量評価を目的として、毛細血管サイズのマイクロチャンネル通過後の赤血球の形状回復過程を粘弾性力学モデルを適応して評価した。

様々なドナーの赤血球に対し、血液検査と形状回復時定数を測定した。その結果、健常者と比べると糖尿病患者等はより小さな値を示し、ばらつきが小さくなる傾向にあった。また、血液サンプル中の形状回復時定数の最小値は全てのドナーでほぼ一定の値を示したことから、脾臓による赤血球回収能力や毛細血管での赤血球微小循環能に相当していることが示唆された。

以上の結果から、本手法を糖化により膜硬化した赤血球をスクリーニングする方法として応用できる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：In this study, the relaxation time constant of shape recovery process of each erythrocyte was measured and analysed based on a visco-elastic theory to evaluate quantitatively erythrocyte deformability by using micro-channel flow system as a model of capillary.

As the result of the time constant measurement and blood test of various blood from both healthy and diabetic donors, the time constant of diabetic cells became shorter than the healthy cells. And the shortest time constants of each donors were almost same regardless of blood test result. Therefore, it was suggested that the lower range of the time constant distributions of each donor showed the filtration performance of the red pulp in spleen and lower limit of erythrocyte deformability in the human circulatory system.

As a consequence, this micro-channel technique will be applied screening and detection method for hardened erythrocyte membrane directly.

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 変形能 マイクロチャンネル法 形状回復時定数 糖尿病 スクリーニング

1. 研究開始当初の背景

近年、細胞や血球など 10 μ m 以下の微粒子やマイクロカプセルのメカニクスとその応用に関する研究が盛んである。特に血球については、本研究でも取り扱うマイクロチャンネル(以下、MC)法やマイクロピペット吸引法、メッシュフィルトレーション法等の方法で、力学特性が評価されている。中でもマイクロチャンネル法は、MEMS 技術の成長と共に発展しており、血液サラサラ測定装置として誰もが知る検査となっているが、実際には血液のレオロジーに関する理解不足から、定量測定法として定着していない。

一方、特にアフリカ諸国で猛威をふるうマラリアの感染を簡便に見極める方法として、マイクロ流体システムを使った方法が提案されているが、それ以外の研究の多くは、血球の力学的特性のみを評価・理解しようという研究が多く、疾患の診断や疾患による変形能への影響解明を目的とした測定・評価は行われていない。一方コンピュータシミュレーションでは、力学・化学モデルの基で、実験では観察することが不可能/極困難な現象を再現出来るようになっており、赤血球膜に働く応力やそれによる血球破壊が再現されているが、疾患による影響の評価や、診断への応用は未だこれからである。

これまで研究代表者は、シリコンや PDMS 製 MC アレイを作製し、これにヒト血液を流すことで、生体内の微小循環で起きている赤血球の変形を再現し、その変形を詳細に観察したり、MC 通過後の赤血球が元の両凹円盤形状に回復している様子を観察・評価することで、赤血球サンプルの保存日数(老化度)と変形し易さの関係等を調べてきた。また、変形後の血球が形状回復に要する時間を計測し、それを基本的な粘弾性モデルでモデル化可能であること、形状回復時定数で変形能を評価出来る可能性がある事を示してきた。

現在日本では食生活の欧米化により生活習慣病患者とその予備軍が増えてきており、特に糖尿病は患者数約 1,000 万人、疑いがある人を含めると約 2,500 万人と国民の 5 人に 1 人が関係する国民病となりつつある疾患である。糖尿病は高血糖そのものによって症状が起こることは希で、多くは長期にわたることで血管が徐々に破壊されて目や腎臓を含む種々の臓器に重大な傷害が出ることから、糖尿病により誘発された合併症が原因で死亡に至ることが圧倒的に多い。この血管破壊のメカニズムは、血管のタンパク質が糖化されることで、それらが硬く脆くなることで起きるが、赤血球内ヘモグロビン(以下、Hb)や血球膜の糖化によっても変形能は低下し循環動態が悪化するため、これらの解明は重要にも関わらず未だ不明な点が多く、糖化による赤血球の力学的特性の変化を直接的に捉え、簡便に評価することが望まれていた。

2. 研究の目的

本研究では、MCを用いて、赤血球の変形能としての粘弾性特性を、形状回復に関する時定数を、個々の血球に対して計測することで、赤血球内Hb濃度(貧血の程度)やHbA1cを代表とするグリコHb量(糖尿病の程度)との相関をとり、血流障害を引き起こすこれら疾患が形状回復能におよぼす影響

マイクロマニピュレータを用いた血球や赤血球膜の単軸引張試験を行うことで、各血球膜の弾性特性の変化

血球に対して過度な引張変形を与えることで膜を疲労させ、この過度な変形が膜の粘弾性特性におよぼす影響を明らかにし、最終的には「糖尿病による高血糖の影響を受けた血球の力学的粘弾性特性」と「赤血球膜とヘモグロビン(Hb)の糖化度」、および「変形能としての形状回復の時定数」の関係から、糖尿病疾患による血球変形能の変化、特に粘弾性特性への影響を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

健常者および血糖値および HbA1c が高値である患者から採血を行った。血液検査後の全血を遠心分離することで赤血球のみを取り出し、PBS で洗浄し、PBS で Hct=1% に希釈して血液サンプルとして用いた。なお、本研究は関西大学先端技術機構の研究倫理委員会および大阪医科大学の倫理委員会の承認を得て実施した。血糖値の基準値は 60 ~ 90 mg/dl、HbA1c(国際標準値)の基準値は 4.6% ~ 6.2%(大阪医科大学付属病院中央検査部規定に準拠)である。

PDMS 製 MC チップをガラスに密着させ漏れのない流路を形成した。血球サンプルを MC に通過させ、通過後の形状回復していく様子を撮影した。図 1 に、MC 通過後の赤血球が形状回復していく様子の連続表示した画像を示す。赤血球幅 d_y を、MC から赤血球が出た直後を $t=0$ ms とし、2 ms 間隔で $t=300$ ms($d_y=d_{y\infty}$)まで測定した。

MC 通過後の赤血球の形状回復過程を一般的な粘弾性力学モデルである Kelvin モデルでモデル化した。赤血球が MC 内で受ける一定の圧縮外力をステップ関数で表し、Kelvin モデルの構成方程式を解くと、式(1)の赤血球の圧縮ひずみは式(2)に示す時定数を緩和時間として指数関数的に減少する。

$$\varepsilon_y = \frac{d_{y\infty} - d_y}{d_{y\infty}} \tag{1}$$

$$\tau_\sigma = \mu_2 \left(\frac{1}{k_1} + \frac{1}{k_2} \right) \tag{2}$$

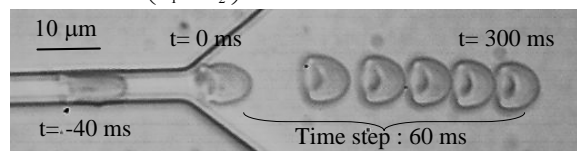
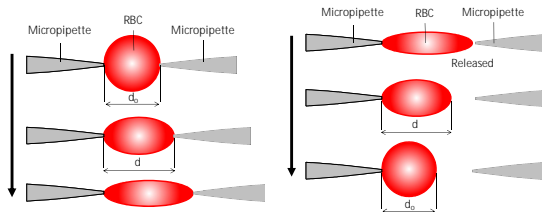


図 1 MC 通過直後の赤血球の形状回復挙動のスーパーインポーズ画像

また、赤血球に対する単軸引張試験と疲労試験は、図2に示すように顕微鏡観察下で赤血球を単軸引張変形させ、その時の引張応力とひずみの関係から赤血球の見かけのヤング率を算出し、引張応力除荷時の形状回復時定数を測定、同一血球に対して繰返変形を与えた時の血球状態を観察した。



見かけのヤング率の引張変形の緩和時間計測と繰返変形負荷の測定の様子

図2 顕微鏡観察下での単軸引張試験概略図

4. 研究成果

結果の一例として糖尿病指標として良く用いられる HbA1c と時定数の幾何平均値および変動係数の関係を図3に示す。なお、HbA1c(国際標準値)の基準値は 4.6~6.2%である。この基準値は大阪医科大学附属病院中央検査部の規定に準ずる。HbA1c と幾何平均値の間には有意な負の相関が認められたが、変動係数との間の相関は、有意ではなかった。

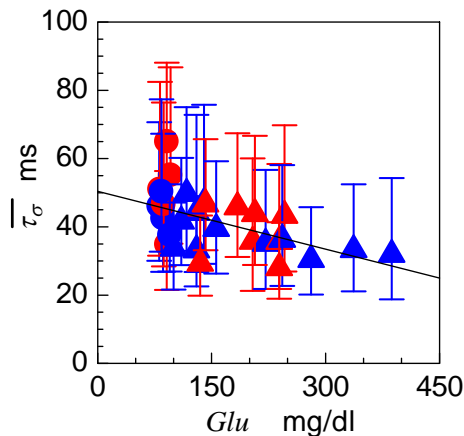


図3 糖尿病指標としての HbA1c と形状回復時定数の関係

腎機能指標としてクレアチニン(CRN)検査値から求めた推算糸球体濾過量(eGFR)を用いた。なお eGFR の基準値は $eGFR > 90 \text{ mL/min/1.73m}^2$ である。eGFR と時定数の幾何平均値および変動係数の関係を図4示す。eGFR と幾何平均値との相関は有意ではなかったが、変動係数との間には有意な正の相関が認められた。

図3より、時定数の幾何平均値は HbA1c の増加に伴い短縮する傾向がみられた。HbA1c が2倍上昇すると赤血球内部液体の粘度が1.13倍上昇することが報告されている。一方で、糖尿病患者の赤血球膜のばね定数およびヤング率

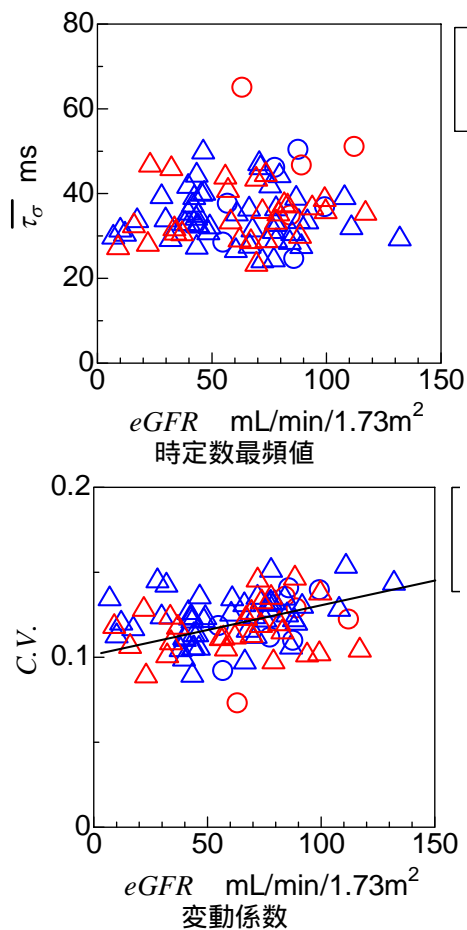


図4 推算糸球体濾過量と時定数の変動係数の関係。

は健常な赤血球膜のそれよりも1.5倍高くなるという報告がある。これまでの本研究で、血球膜硬さと血球内部の Hb 濃度を変えた血球の時定数が、Kelvin モデルで予測された傾向と一致していた。Kelvin モデルにおいて時定数の短縮は、ダッシュポットの粘性係数の低下、またはばね定数の増加を意味することから、血中グルコースによる Hb 溶液の粘度増加よりも、血球膜の硬化の方が形状回復時定数に対して支配的である可能性が示唆された。

図4より、eGFR と幾何平均値の間には相関関係が認められなかった。糖尿病性合併症群では、合併症の重症度に比例して、変形能が低下するという報告があるが、そのような傾向はみられなかった。しかしながら、eGFR と変動係数の間には正の相関が認められたことから、腎機能の低下により時定数のばらつきが小さくなるのがわかる。腎不全病態では赤血球寿命が健常者の 1/2~1/3 に短縮していると報告されていることから、赤血球寿命の低下により加齢により変形能が低下した赤血球が減少し、時定数のばらつきが小さくなったと考えられる。

次に、マイクロピペットで吸引・保持した赤血球に単軸引張ひずみを与えたとき、ピペット内の圧力は赤血球の伸展変形に伴い低下する。この圧力変動 Δp は、弾性的な性質をもった赤血球を伸展変形させたときに生じた抵抗力とみなすことができる。このときの応力値 σ を測定すること

でフックの法則より赤血球の見かけのヤング率 E を算出することができる。計測された応力と赤血球のひずみの関係の一例を図 5 に示す。図の結果では赤血球の見かけのヤング率は 28.8 Pa となり、今回測定した赤血球の見かけのヤング率の平均値は 25.5 Pa となった。また、個々の赤血球に対して見かけのヤング率と形状回復時定数を測定し、その関係を表したものを図 6 に示す。これらの結果より、赤血球の見かけのヤング率は非常に小さい値を持つため、わずかな圧力差で自身の形状を柔軟に変形させ毛細血管を容易に通過できると考えられる。

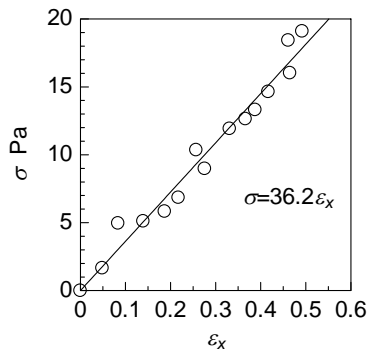


図 5 応力ひずみ線図の例

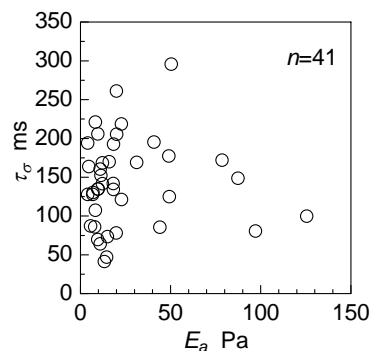


図 6 見かけのヤング率と引張ひずみの緩和時定数の関係

次に赤血球の膜が破壊され溶血するまで、引張負荷と緩和挙動の観察を繰り返した。各赤血球に与えたひずみは平均 0.5、その標準偏差 0.16 であった。それぞれの単軸引張試験において形状回復時定数 τ_c を測定し、引張試験の回数 N との関係性を求めた結果の例を図 7 に示す。

この結果より、単軸引張の回数が増すにつれて形状回復時定数が低下する傾向が見られた。また、(a)、(b) のように 10 回以上引張試験を行えたものもあったが、(c)、(d) のように少ない回数で溶血した赤血球も見られた。今回作製した赤血球サンプルは赤血球の年齢による分画を行っていないので、若い赤血球と老化した赤血球が混在している。老化した赤血球は変形能が低下し脆弱なことから、(c)、(d) のように少ない回数で溶血した赤血球は老化が進んでいる赤血球だと考えられる。

実験中に、繰り返し引張負荷を与えた赤血球サンプルを観察していると、その前後で明らかに

形状に差異が確認できた。図 8 に繰り返し試験前後の赤血球の様子を示す。試験前の赤血球は中央の凹みをはっきりと観察できるのに対して、繰り返し負荷後の赤血球は中央の凹みが不鮮明となっている様子が見られる。実験中、赤血球はリン酸緩衝生理食塩水に浸しているため、浸透圧差によって赤血球が膨張・収縮することは無く、赤血球の体積は一定である。一方、赤血球の膜骨格は外部の力に応じて構造を変化させ、外力が除荷されると元の形状に回復する。しかし膜に対して過度のひずみを与えると構造の一部に不可逆的な変化を生じることがわかっている。今回の実験においては、赤血球に繰り返し過度のひずみを与えたことで膜の一部が欠損し、欠損した箇所を補うように赤血球膜が修復したために表面積が減少し球形状に近づいたと考えられる。このように赤血球の表面積/体積比が減少し球形状に近づくと、赤血球自体の剛性が高まるために赤血球の変形能は失われ、その結果、図 7 のように形状回復時定数が短縮したと考えられる。

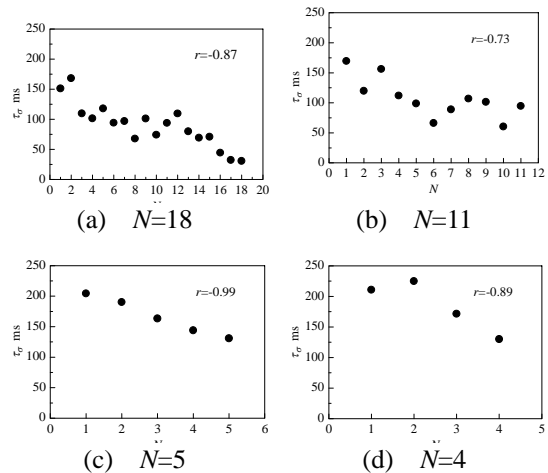
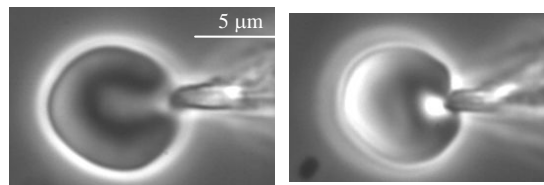


図 7 引張の繰返負荷が引張変形の緩和挙動におよぼす影響



繰返負荷印可前 7回繰返負荷後

図 8 引張の繰返負荷が赤血球形状におよぼす影響

実際に繰り返し負荷を与えることで、赤血球が球状化するような形態変化が見られた。一般的に赤血球が老化すると、小球化することが知られており、その変化に近いアクションが起きることが分かった。本研究で、赤血球に対して与えた繰り返しの引張負荷は、実際に生体内で血球に起こりうる変形やひずみでは無いが、赤血球の膜構造とその力学的特性を考えると、膜骨格タンパク質に繰り返し伸長変形を与え、疲労させていると考え

られることから、生体内で繰り返し折り曲げ変形することで生じる膜骨格の疲労の一つのモデルになり得ると考えられる。

しかしながら、本単軸引張試験に関する実験からは、赤血球の粘弾的な性質を定量化する事は難しかった。これは、MCを用いた実験でも示されているように、生体内に存在する血球に大きなばらつきがある為と考えられる。一般的にデータの信頼性を上げるためには、実験データ点数を増やすことが必要だが、マイクロピペットを用いた本実験方法ではその測定は困難を極めることから、奇しくも本実験によって MC 法の利点が証明される結果となった。

その他、データ解析のための画像処理プログラムの最適化を行うことで、MC 法によるデータ取得が容易になり、1 検体あたりに要する検査時間を大幅に短縮し、サンプル数 100 個程度を数時間で処理することが可能となった。今後、更なる高速化・自動化を行うために、MC チップの改良とデータ解析方法の改善が必要と考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

久保田麻紀, 田地川勉, 池本敏行, 田窪孝行, 大場謙吉, マイクロチャンネル法によるヒト赤血球変形能の測定 形状回復時定数に対する MCV, MCHC, 糖化度の影響, 日本検査血液学会誌, 査読有, 14(3), pp.274-281, (2013.11).

T. Tajikawa, Y. Imamura, T. Ohno, F. Muranishi, M. Kubota, K. Ohba, Measurement and analysis of shape recovery process of each erythrocyte for estimation of its deformability by using micro-channel technique -Influence of softness of cell membrane and viscosity of hemoglobin solution inside cell-, Journal of Biorheology, 査読有, 27(1-2), pp.1-8, (2013),

DOI:10.1007/s12573-012-0052-9.

with Erratum

DOI:10.1007/s12573-012-0054-7.

〔学会発表〕(計 11 件)

永井勇大, 加藤陽介, 板東潔, 加瀬篤志, 郡慎平, 田地川勉, 赤血球の単軸引張に関する変形解析および実験, 第 18 回関西大学先端科学技術シンポジウム, 2014/1/24, 関西大学 100 周年記念会館.

加藤陽介, 郡慎平, 田地川勉, 板東潔, 単軸引張によるヒト赤血球の変形能の測定 過度の繰り返し伸展変形が形状回復過程に及ぼす影響, 日本機械学会第 26 回バイオエンジニアリング講演会, 2014/1/12, 東北大学片平キャンパス.

能田卓弥, 田地川勉, 池本敏行, 田窪孝行, マイクロチャンネル法によるヒト赤血球変形能の評価 糖尿病性腎症と形状回復

時定数の関係, 日本機械学会第 26 回バイオエンジニアリング講演会, 2014/1/12, 東北大学片平キャンパス.

加藤陽介, 郡慎平, 田地川勉, 板東潔, 山本恭史, 単軸引張試験によるヒト赤血球の静的・動的力学特性の測定 形状回復時定数と見かけのヤング率の関係, 生体医工学シンポジウム 2013, 2013/9/20, 九州大学伊予キャンパス.

能田卓弥, 久保田麻紀, 田地川勉, 池本敏行, 田窪孝行, マイクロチャンネル法によるヒト赤血球変形能の定量評価 (形状回復時定数に対する糖尿病指標の影響), 第 36 回日本バイオレオロジー学会年会, 2013/6/8, 九州大学西新プラザ.

加藤陽介, 郡慎平, 田地川勉, 板東潔, 単軸引張から解放されたヒト赤血球の形状回復時定数の測定 引張力から求めた見かけのヤング率と時定数の関係, 第 17 回関西大学先端科学技術シンポジウム, 2013/1/29, 関西大学 100 周年記念会館.

久保田麻紀, 田地川勉, 池本敏行, 田窪孝行, 大場謙吉, マイクロチャンネル法によるヒト赤血球変形能の測定 赤血球の糖化が形状回復時定数に与える影響, 日本機械学会 第 25 回バイオエンジニアリング講演会, 2013/1/9, 産業技術総合研究所つくばセンター.

加藤陽介, 郡慎平, 田地川勉, 板東潔, 単軸引張から解放されたヒト赤血球の形状回復時定数の測定 引張力から求めた見かけのヤング率と時定数の関係, 日本機械学会第 23 回バイオフィロンティア講演会, 2012/10/5, 弘前文化センター.

久保田麻紀, 田地川勉, 池本敏行, 田窪孝行, 大場謙吉, マイクロチャンネル法によるヒト赤血球変形能の測定 -形状回復時定数に対する MCV, MCHC, 糖化度の影響-, 生体医工学シンポジウム 2012, 2012/9/7, 大阪大学基礎工学部.

久保田麻紀, 加藤陽介, 田地川勉, 大場謙吉, 池本敏行, 田窪孝行, マイクロチャンネル法によるヒト赤血球の形状回復時定数の測定 健常赤血球と糖尿病赤血球の比較, 第 13 回日本検査血液学会学術集会, 2012/7/28, 高槻現代劇場.

田地川勉, 久保田麻紀, 大場謙吉, 池本敏行, 田窪孝行, マイクロチャンネル法によるヒト赤血球の形状回復時定数の測定 健常赤血球と糖尿病赤血球の比較, 第 35 回日本バイオレオロジー学会年会, 2012/5/31, 朱鷺メッセ.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田地川 勉 (TAJIKAWA, Tsutomu)

関西大学・システム理工学部・専任講師

研究者番号: 80351500