

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 17 日現在

機関番号：34416

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350521

研究課題名(和文) 血液検査装置に組み込み可能な赤血球変形能測定・評価システムの開発

研究課題名(英文) Development of measurement and evaluation system of erythrocyte deformability embedded into a conventional blood test system

研究代表者

田地川 勉 (Tajikawa, Tsutomu)

関西大学・システム理工学部・准教授

研究者番号：80351500

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、微小循環障害を有する様々な疾患患者に対して、マイクロチャンネル法による赤血球形状回復過程を、粘弾性力学モデルに基づいて定量評価した。その結果、糖尿病性腎症患者については、透析が必要なG5ステージで有意な変形能低下を検出したが、それまでの移行期については検出することができなかった。糖尿病と同様に微小循環障害が見られる膠原病患者については、形状回復時定数が健常者と比べ低下し、各患者間のばらつきが大きくなる傾向にあり、疾患との関係をデータベースとすることができた。また高精度高速な検査を目指し、シースフロー型とすることで、変形能だけでなく懸濁液粘度も計測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 red blood cell from various peripheral circulatory failure was measured by based on the standard linear solid visco-elastic mode to evaluate red blood cell deformability by using micro-channel technique.

As the result, time constant of diabetic renal disease could detect only stage G5 as same as a person requiring dialysis, but there was not differences in the case of transitional phase of nephropathy progression. The time constant of the blood from collagen disease was shorter than healthy samples and its deviation in collagen disease sample was mach wider.

And the Sheath flow type micro-channel chip had been successfully developed and fabricated. This newly micro-channel had realized not only high throughput and high resolution testing for erythrocyte deformability but also possibility of measuring suspension viscosity with single erythrocyte in a micro channel.

研究分野：流体工学・バイオメカニクス

キーワード：赤血球変形能 粘弾性モデル 形状回復時定数 マイクロ流体システム シースフロー型マイクロチャンネル 糖尿病 膠原病 懸濁液粘度

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・評価したりすることで、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。

この評価法を応用するために、様々なドナーの赤血球に対して、一般的な血液検査指標と形状回復時定数を測定したところ、健常者と比べると HbA1c が高値な糖尿病等の患者の赤血球形状回復時定数は短く、その分布のばらつきが小さくなる傾向にあることがわかった。

一方で、糖尿病以外にも微小循環障害を伴う疾患が存在するが、それら疾患が必ずしも血球変形の低下と微小循環障害の相関を示すデータがあるわけではなく、それら疾患における赤血球の力学的特性を直接的に捉えることが望まれていた。

また、我々の研究で使用してきた MC チップを使った測定は、安定した実験を行うためにはノウハウが必要であったことから、より簡便かつ定量的な計測・評価法と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、

- (1) 血液検査によって計測できる赤血球構成要素に関する検査指標と形状回復時定数の関係の解明
- (2) より簡便かつ精度の高い実験が繰り返し行うことができ、さらに既存の血液検査機器などへの組み込みも容易な新たなマイクロチャンネルチップの開発

を行い、最終的には「各種疾患における血液検査値」と「変形能としての形状回復の時定数」の関係をデータベースにすることを目的とした。

3. 研究の方法

健常者および所定の血液検査指標が正常値を外れた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科学技術推進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。

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。

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

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

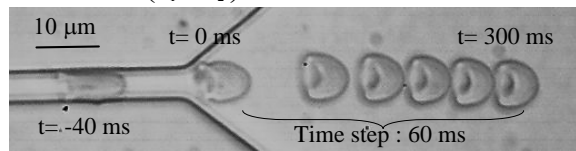


図 1 MC 通過直後の赤血球の形状回復挙動のスーパーインポーズ画像

4. 研究成果

腎機能指標としてクレアチニン(CRN)検査値、年齢、性別より算出した推算糸球体濾過量(eGFR)を用いた。なお算出式は

$$eGFR = 194 \times CRN - 1.094 \times \text{age} - 0.287 \tag{ただし女性は上式} \times 0.739$$

であり、eGFR の基準値は eGFR 90 mL/min/1.73m²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2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。

この結果より、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ことわかる。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、赤血球寿命が短くなることで、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。

腎症のステージごとの幾何平均値の平均値をまとめた結果を図3に示す。透析療法期(G5)において時定数の低下が見られ、Shinらの研究と同様に末期腎不全で赤血球変形能が低下することが確認された。

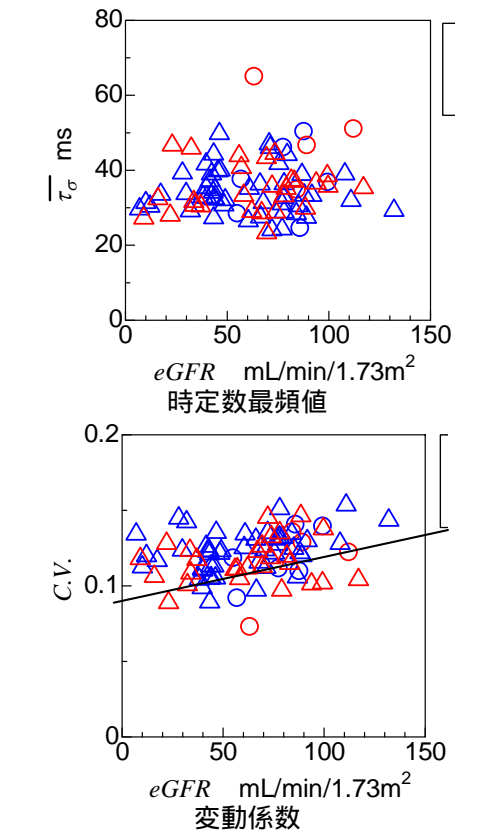


図2 eGFRと時定数の変動係数の関係。

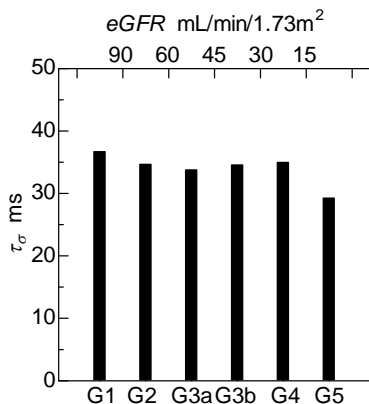


図3 腎症ステージと形状回復時定数の関係。

しかしながら、腎症ステージ移行期には明確な変化を捉えることはできなかった。これは、背血球が体内で120日毎に新しく作り替えられている一方、腎症のステージは疾患の各患者の病状の積分値を評価しているためと考えられた。

そこで、次に糖尿病と同様に微小循環障害が主な症状である膠原病患者を対象とした形状回復時定数の測定を行うこととした。

ここで、時定数測定の効率を上げ、より多くの血球サンプルを短時間で評価できる様にするために、赤血球がマイクロチャンネルを通過する速度を速くすることを試みた。

健常成人から得た赤血球サンプルの形状回復時定数とマイクロチャンネル通過前後の赤血球移動速度差の関係を図4に示す。この結果から、これまで使用してきたマイクロチャンネルでは、形状回復過程が急拡大流路となっていることから、マイクロチャンネル通過中と形状回復過程での移動速度の差が大きく、またその速度差が大きいほど形状回復時定数が短くなる傾向にあることが分かった。

これは、MC通過後の赤血球が急拡大部を通過する時、連続の式に従い急減速することとなり、運動法保存則から赤血球が進行方向とは反対方向の大きな力を受け、それが形状回復を促した可能性が示唆された。

このことから、より速くMC内を血球を通過させる場合、できるだけその速度が一定かつ制御しやすく、さらに形状回復中の血球移動速度が一定であるようなMCが望ましい事が分かった。

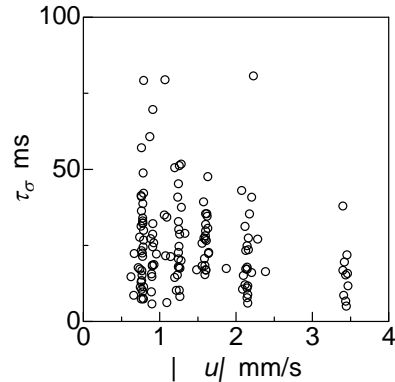


図4 MC通過前後の赤血球の速度変化と形状回復時定数の関係。

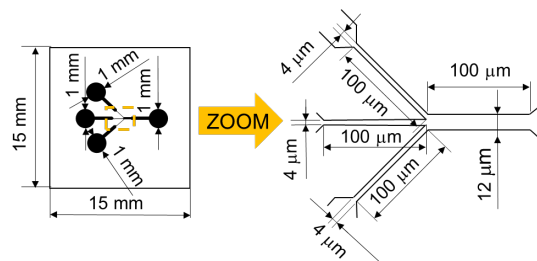


図5 MC通過前後の赤血球の速度変化と形状回復時定数の関係。

以上の結果を基に設計・試作した、シースフロー型マイクロチャンネルチップの概略図を図5に示す。

MCチップは、PDMS製で、3つの貫通

穴に繋がれた直線状流路の先端に、それぞれ流路幅が $4\ \mu\text{m}$ の MC に繋がっている。3本の MC は、シースフロー型の流路経常となっており、合流後幅 $12\ \mu\text{m}$ の MC を介して下流側の貫通穴に繋がる。すべての MC は深さ $6\ \mu\text{m}$ と一定であるため、MC 合流前後で断面積が変化しないこと、また3本の MC は水力平均直径と流路長さが同じであるため、同じ圧力差を与えると、作動流体の粘性が同じ場合に3本の MC の流量は一致し、合流前後で断面平均流速が変化しないように作られている。このチップをガラスに接着させ、漏れない流路を形成した。この MC に血球サンプルを通過させ、これまでと同様に赤血球の形状回復過程を倒立顕微鏡に接続したハイスピードカメラで撮影した。その一例を図6に示す。また、本チップに対して図4と同様の実験を行った結果を図7に示す。

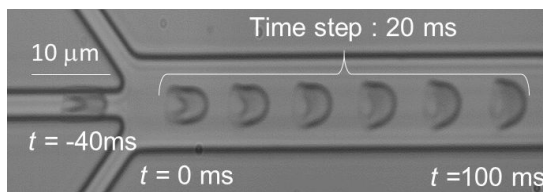


図6 シースフロー型マイクロチャンネルチップで観察される形状回復過程。

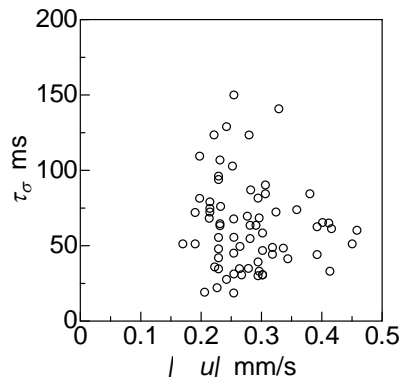


図7 MC 通過前後の赤血球の速度変化と形状回復時定数の関係。

この結果、シースフロー型マイクロチャンネルとすることで、血球通過速度の変動を小さく抑える事ができるようになっただけでなく、所定の速度に調整しやすいことが分かった。さらに、この通過速度条件では、従来の MC で計測した形状回復時定数と比べると、時定数が約2倍長くなることが分かった。このことから、形状回復中の赤血球移動速度の変化を小さくすることで、運動量保存則によって血球に働く流体力が小さくなり、赤血球の粘弾性特性だけで形状回復するようになったため、時定数が長くなったと考えられた。

そこで、膠原病患者の測定を行った。検体は、大阪医科大学附属病院を受診した患者のうち、膠原病と診断された患者91名の血液検査検体を使った。ただし、様々な病状および治療の関与度の異なる膠原病患者が混じっており、ここではその詳細については分類せず処理した。その測定結果を図8に示す。

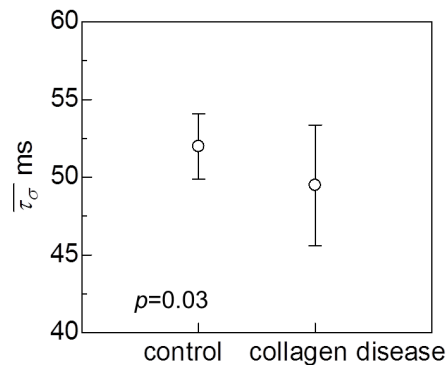


図8 健常者と膠原病患者の形状回復時定数の幾何平均値の比較。

この結果、膠原病患者の時定数は健常者のそれよりも短く ($p=0.03$)、また患者群におけるばらつきが非常に大きいことが分かった。いずれの群も、形状回復後の赤血球の平均直径はほぼ一緒であったことから、血球の加齢度に違いは無いと推察される。

一般的に膠原病患者は高頻度で貧血を併発すると言われており、赤血球内包ヘモグロビンの粘性が低いため、形状回復時定数が短くなったと考えられる。今後、各病態との相関を取ることで、より詳細な影響指標について考察する事となる。

また、図6を見ても分かるように、MC を通過したのち、合流部で形状回復する赤血球のほとんどは、形状回復しながらやや加速して流れる傾向にあることが分かった。本実験では、MC 内にシース液 (PBS) および体積分率1%の赤血球懸濁液をそれぞれ作動流体として満たし、上流端に大気圧を印加、下流端に水頭差による陰圧を負荷することで、流れを起こしている。全ての流路幅・高さは 0.1mm 以下であり、流速も 1mm/s 以下であることから、本チップ内の流れのレイノルズ数は 0.1 以下であり、合流部を含むチップ内の流れは層流ではなく離を伴わず、流れは直ぐに発達する事になる。

このことから、図9に示すように本チップ中の流れは、等価な1次元パイプ流れとして簡易モデル化できる。ここで、 R_s および R_c は、幅 $4\ \mu\text{m}$ のマイクロチャンネルをシース液(粘度 μ_s) および赤血球1個を含む PBS(粘度 μ_c) が流れるときの流路抵抗を示している。

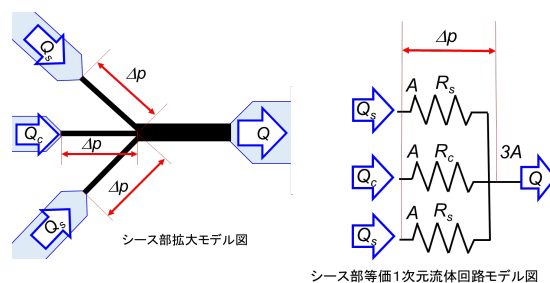


図9 実験中の MC 内の流れのパラメータとそれと等価な1次元パイプ流れモデル

本モデルに対して、連続の式、ハーゲンポアズイユの式、体積流量と断面平均流速の関係を定式化して整理し、赤血球は各流路の断面平均流速でMC中を移動していると仮定すると、シース部前後での赤血球移動速度差 Δu は

$$\frac{\mu_c}{\mu_s} = \frac{3}{2} \frac{\Delta u}{u_{in}} + 1$$

となり、理論的にはシース部前後の赤血球移動速度差を計測することで、MC内に赤血球1個が存在することに依る粘度変化が測定できる可能性が示唆された。今後、本手法を使って形状回復時定数と微小循環動態そのものを表すと考えられる単一血球懸濁液粘度の関係を調べる予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

郡慎平,加藤陽介, 田地川勉, 山本恭史, 板東潔, 単軸引張によるヒト赤血球の変形能の測定:-見かけのヤング率と形状回復時定数の測定-, 日本生体医工学会誌, 査読有, 53(1), pp.1-7, (2015.2).

田地川勉, 可視化による赤血球変形能の定量評価, 可視化情報学会誌, 査読無, 34(134), pp.16-21, (2014.7).

〔学会発表〕(計11件)

入野啓司, 山下雄士, 田地川勉, 大友涼子, 山本恭史, 板東潔, マイクとチャンネル法によるヒト赤血球変形能の定量評価(シースフロー型マイクロチャンネルによる高効率化), 日本機械学会関西支部平成28年度関西学生会学生院卒研発表講演会2017/3/11, 大阪大学吹田キャンパス(大阪府)。

山下雄士, 田地川勉, 池本敏行, 武内徹, マイクとチャンネル法によるヒト赤血球変形能の定量評価(膠原病と形状回復時定数の関係), 日本機械学会バイオエンジニアリング部門講演会, 2017/1/19, ウィンクあいち(愛知県)。

T. Tajikawa, T. Moriwaki, Y. Nakayama, In vitro Hemodynamical Performance Evaluation of Endvascular Devices for Treating Intracranial Aneurysm: Comparison of Our Developed NCVC Microporous Covered Stent v.s. Flow Diverter Stent, 13th International IntraCranial Stent Meeting, 2016/11/27, Kobe International Exhibition Hall(Hyogo)。

田地川勉, 田中雅之, 矢野良輔, 柳楽恭子, 過凝集性牛乳を使った血流停滞による血栓形成模擬実験系構築の試み, 第64回レオロジー討論会, 2016/10/30, 大阪大学豊中キャンパス(大阪府)。

田地川勉, 山下雄士, 池本敏行, 武内徹, マイクとチャンネル法によるヒト赤血球変形能の定量評価(膠原病患者に対する形状回復時定数の測定, 第39階日本バイオレオロジー学会年会, 2016/6/19, 東海大学校友会館(東京都)。

永井勇大, 郡慎平, 田地川勉, 板東潔, 単軸引張試験によるヒト赤血球の変形能の測定(硬化赤血球の見かけのヤング率と形状回復時定数の関係), 第38回日本バイオレオロジー学会年会, 2015/6/7, 学術総合センター(東京都)。

増田豊行, 田地川勉, 光ピンセットを用いた赤血球の粘弾性特性の測定, 日本機械学会関西支部 第90期定期総会講演会, 2015/3/17, 京都大学桂キャンパス(京都府)。

永井勇大, 郡慎平, 田地川勉, 板東潔, 山本恭史, 大友涼子, 加藤陽介, 単軸引張によるヒト赤血球の見かけのヤング率の測定 膜硬化の影響, 日本機械学会 第27回バイオエンジニアリング講演会, 2015/1/10, 朱鷺メッセ(新潟県)。

郡慎平, 加藤陽介, 田地川勉, 山本恭史, 板東潔, 単軸引張によるヒト赤血球の変形能の測定 見かけのヤング率と形状回復時定数の関係, 生体医工学シンポジウム2014, 2014/9/26, 東京農工大小金井キャンパス(東京都)。

T. Tajikawa, M. Kubota, T. Nohta, T. Ikemoto, T. Takubo, Measurement of erythrocyte deformability as a visco-elastic properties by micro-channel technique(Influence of MVC, MCHC and glycation on relaxation time), 7th World Congress of Biomechanics, 2014/7/8, Boston, USA.

能田卓弥, 田地川勉, 池本敏行, 田窪孝行, マイクとチャンネル法によるヒト赤血球変形能の評価(糖尿病患者における血液検査値と形状回復時定数の関係), 第37回日本バイオレオロジー学会年会, 2014/6/7, 大宮ソニックシティービル(埼玉県)。

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・准教授
研究者番号: 80351500

(2)研究分担者

田窪 孝行 (TAKUBO, Takayuki)
大阪医科大学・医学部・名誉教授
研究者番号: 60163359