

令和元年6月10日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H03915

研究課題名(和文) 血球バイオメカニクスに基づく微小管網内レオロジーと急性循環障害機序の理解

研究課題名(英文) Rheology in network microchannel based on biomechanics of blood cells and its application to acute circulatory failure

研究代表者

坪田 健一 (Tsubota, Ken-ichi)

千葉大学・大学院工学研究院・教授

研究者番号：10344045

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：血球単体の変形運動および血球群の運動から微小管路網全体の血流に渡る微小循環挙動に対して、*in vitro*実験モデルおよび計算機シミュレーションモデルを構築し、血流のバイオメカニカルな仕組みを調べた。その結果、せん断流れ下における赤血球の変形運動において、赤血球膜の粘弾性に応じた力学特性が重要な役割を果たすことが分かった。また、微小管路網では、分岐部の血流は、その部分の流量分配と、その周囲の流れの影響との相互作用に応じて決まることが分かった。これらの点は、微小循環が病的な状態へ急激に変化していく際に重要と考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

微小循環の血流において、赤血球の力学特性や血管網の幾何学的構造は重要な役割を果たすと考えられてきたが、どのように重要かは不明であった。この点の一端を、本研究では明らかにすることが出来た点で、微小循環の理解をバイオメカニクスの観点から一歩進めることが出来た成果といえる。このことは、急性を含む病的な微小循環の変化の総合的な理解にも役立つと考えられる。このように、循環挙動を深く理解していくことで、最終的には、循環挙動の予測が可能になり、急性循環障害の簡便かつ高度な診断方法の開発にも繋がる。

研究成果の概要(英文)：Using *in vitro* and computer modeling from biomechanical viewpoints, we investigated the blood flow mechanism in network microchannel that ranges from single blood cell's motion and deformation, motions of an assemblage of blood cells, and up to blood flow in entire network channel. We clarified that mechanical properties of a red blood cell from membrane's viscoelasticity play an important role in motion and deformation in shear flow. We also demonstrated that in a network microchannel, a blood flow at bifurcation was determined by interaction between flow rate distribution at the bifurcation and flows in the surrounding channels. These points are considered important in acute failure of microcirculation.

研究分野：バイオメカニクス

キーワード：バイオメカニクス 血流 微小循環 血球 細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

微小循環は、細動静脈、毛細管、リンパ管および間質などを流路とする血液流れであり、細胞・組織への物質輸送において主要な役割を果たす。急性循環障害では、物質輸送機能に異常が生じており、結果として脳、心臓、消化器などにおける重篤な機能障害を高い確率で直ちに引き起こす。これまでに、冠動脈閉塞、糖尿病、腎障害、高血圧などの病気や環境ストレスが急性循環障害と密接に関係することが知られているが、循環障害の機序そのものは明らかでない。その理由の1つとして、微小循環の振る舞いが流れの観点から十分に理解されていないこと、そのために正常な振る舞いの破綻に起因する循環障害の機序理解の研究へ十分に進めないこと、の2点が考えられる。

### 2. 研究の目的

血球単体の変形運動および血球群の運動から微小管路網全体の血流に渡る微小循環挙動に対して、マルチスケールなバイオメカニクスシステムと捉えて、*in vitro* 実験モデルおよび計算機シミュレーションモデルを構築する。このモデルを用いて、正常な循環挙動の仕組みを定量的に示す。さらに、この仕組みの異常がどのように循環障害に繋がるのかを検討する。

### 3. 研究の方法

個々の赤血球の変形運動(3(1)節)が膜の特性に応じてどのように決定されるかを明らかにした。また、微小管路網内の血流(3(2)節, 3(3)節)が、赤血球の変形運動に応じてどのように決定されるかを明らかにした。これらの結果から、細胞から管路内のレオロジーに至る微小循環の血流の仕組みと、それに基づく循環障害の仕組みを考察した。

#### (1) せん断流れ下における単一赤血球の変形運動の計算機シミュレーション

血流に影響を与える個々の赤血球の変形運動は、赤血球膜の粘弾性に大きな影響を受ける。これまで、膜の弾性が赤血球の変形運動に与える影響が明らかとなってきたが、粘性の効果については、十分にわかっていない。そこで、計算機モデリングを用いて、細胞膜の粘性がせん断流れ下の赤血球の膜回転(TT)運動に与える影響を調べた。ここでは、粘弾性膜と内部流体でモデル化した赤血球を単純せん断流れ場  $\mathbf{u} = (\dot{\gamma}y, 0, 0)$  に置いた。細胞膜の弾性変形は膜の面内せん断、面外曲げおよび膜面積の非圧縮性を考慮した。膜の面内弾性には Skalak 則を、面外曲げには Helfrich 則を、それぞれ用いた。ニュートンの粘性法則を仮定して膜の面内粘性をモデル化した。Stokes 流れを仮定し、膜の粘弾性変形と赤血球内外の粘性流れとの連成解析を境界要素法を用いて行った。赤血球の膜は三角形要素に離散化した。せん断流れによる粘性力と細胞膜の弾性力の比(キャピラリー数)は  $Ca = 0.1 \sim 10$  程度で変化させた。

#### (2) 微小管路網内血流の *in vitro* 計測実験

赤血球の変形運動と血管の幾何学的な構造は、微小循環において血流を決定づける力学的な因子であるが、生体内でそれらがどのように作用しているのかについては明らかでない。そこで、実際の血管網形状を忠実に反映した *in vitro* 実験により、この2つの因子によって血流が決定される様子を調べた。ここでは、家兔腹膜の微小血管網を参照して、長方形断面を持つ微小流路を作製した(図1)。流路基盤の製作にはフォトリソグラフィを用いた。白色干渉法を使用した非接触表面形状測定機を用いて流路基盤の高さを数ヶ所で測定した結果、 $10.4 \sim 10.6 \mu\text{m}$  であった。この流路基盤に PDMS を流し込み、オープン加熱で硬化させた PDMS をカバーガラスに貼り付けることで管路にした。作動流体として精製水と兔保存血液の2種類を使用した。作動流体を入れたシリンジと微小流路をガラス管とシリコンチューブを用いて接続し、シリンジポンプにより作動流体を微小流路内に灌流させた。シリンジポンプの流量は  $0.1 \mu\text{l}/\text{min}$  に設定した。倒立顕微鏡下でハイスピードカメラを用いて流路内のトレーサー粒子を撮影し、粒子の位置の時間変化から速度を計算した。トレーサー粒子として、精製水では予め懸濁させた直径  $1 \mu\text{m}$  の蛍光粒子を、血液では赤血球を、それぞれ用いた。解像度は、空間について  $1 \mu\text{m}/\text{pixel}$  (対物レンズの倍率は40倍)、時間について  $1/4000 \text{ s}$  (シャッタースピード)とした。流路内部の流量分布を調べるため、流路を小セグメントに分割し、各セグメントについて、トレーサー粒子の

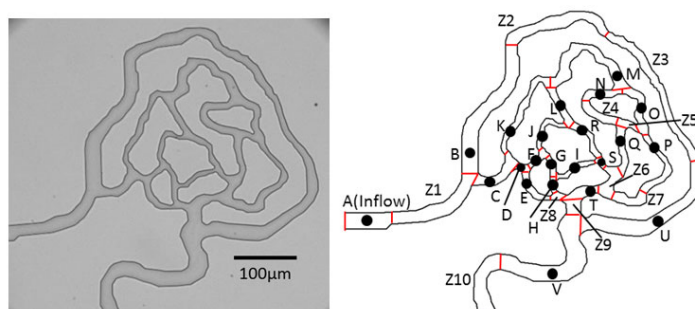


図1 PDMS微小流路(左)と計測に用いた小セグメント(右)

速度と断面積から流量を求めた。また、瞬時のヘマトクリットを赤血球数から計算した。一方、流路の形状を用いて、0次元モデルを用いた流体解析を行い、流路内部の圧力値を計算した。この際、血液については、ヘマトクリット値に対して単調増加するように見かけの粘度を決定した。

### (3) 微小流路網内血流の計算機シミュレーション

3 (1)節に対応した計算機シミュレーションを行うことで、血流の力学的な振る舞いの詳細な検討を試みた。ここでは、赤血球は表面の弾性細胞膜と内部の粘性流体に分けてモデル化した。非圧縮粘性流れを仮定し、連続の式およびNS方程式に基づいて、粒子法の1種であるLSMPS法を用いて流れを計算した。弾性細胞膜は三角形要素を用いて分割し、要素の頂点に流体粒子を配置した。膜の弾性力を粒子に関するNS式に外力項として代入することで、非圧縮粘性流れと膜弾性変形との連成解析を行った。管路の形状として、単純な2分岐管および微小血管路網を対象とし、それぞれについて、管断面が円形となるように作成した。流入部に一定速度を与え、流出部を自由境界とし、管壁は剛体とした。このとき、流入部において赤血球を $5.0\ \mu\text{m}$ 間隔で規則的に配置して流入させた(ヘマトクリット値0.24)。赤血球の内部流体の粘度を血しょうの5倍とした。血しょうによる粘性力と細胞膜の弾性力の比(キャピラリー数)は $\text{Ca} = 0.35$ 、レイノルズ数は流入部で0.1とした。

## 4. 研究成果

### (1) 膜の粘弾性に応じた単一赤血球の変形運動

せん断流れにおいて、赤血球はTT運動しながら伸張変形をする。この際、伸張変形を表す形状パラメタ $D_{xz}$ は、膜のせん断弾性 $G$ が大きいほど減少し、同時に、TT運動の無次元周期 $f_{\text{TT}}/\dot{\gamma}$ は増加した(図2)。この $f_{\text{TT}}/\dot{\gamma}$ の増加は、赤血球膜面の回転移動距離が小さくなることを反映している。また、膜面の粘性 $\eta$ が大きいほど、 $D_{xz}$ と $f_{\text{TT}}/\dot{\gamma}$ は小さくなった。このように、 $G$ と $\eta$ ではTT運動に与える影響が異なった。従来の実験観察で報告された $D_{xz}$ と $f_{\text{TT}}/\dot{\gamma}$ を再現するためには、膜の面内弾性についてSkalak則よりも大きいひずみ硬化が必要であり、また、面内粘性についてせん断速度に対する粘度の減少(shear-thinning)が必要であることも分かった。

以上の結果から、面内弾性( $G$ )と粘性( $\eta$ )を正確に評価するためには、本研究で示したように、伸張変形とTTの周期の両方に着目することが必要であることが分かった。また、赤血球膜の粘弾性の非線形性の程度が、流れ下の赤血球の変形運動特性において重要なことが示された。

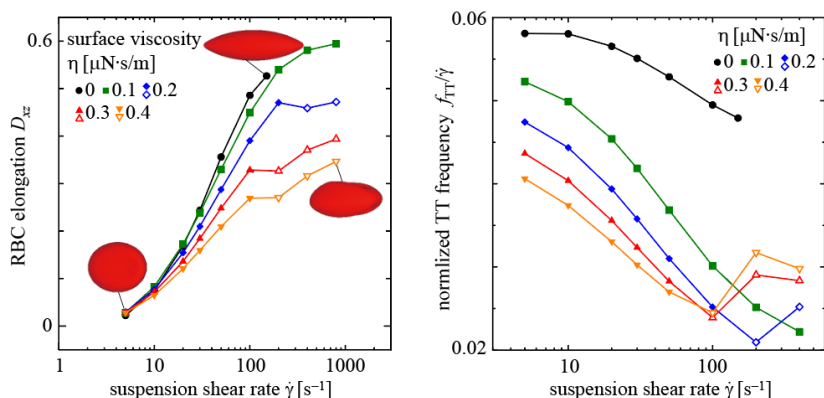


図2 せん断流れ下における赤血球の伸張変形 $D_{xz}$  (左) とTT運動の周期 $f_{\text{TT}}/\dot{\gamma}$  (右)

### (2) 微小流路網内血流における分岐部の効果と周囲流路の効果

精製水、血液どちらの場合も、流入部から最初の分岐であるB点、C点間の分岐では、外側を取り囲むように流れる流路(B点方向)よりも、流路の内側へ流れ込む流路(C点方向)の方が流量が高くなった。ヘマトクリット値は、最大値は20%(D点)、最小値は0%(J点)であった。精製水と血液の各点の流量を、それぞれ流入流量で無次元化し、更に0次元モデルによる流体解析の結果と比較すると、22の計測点の内の18点で精製水と血液の流量比の大小関係が一致した。このように、実験結果と流体解析の結果は良く対応しており、流路の作製および実験計測は首尾良く行われたものと考えられる。B、C点間の分岐に注目すると、精製水の場合では24:76であるのに対して、血液の場合では39:61と、C点に分配される割合が小さくなった。分岐部では、流量が大きい管に赤血球がより多く流れ込むという現象が発生する(Zweifach-Fung効果)。この現象によって、流量が大きいC点側の流路の赤血球による抵抗の増加は、流量が低いB点側の流路よりも大きくなり、この様な変化が発生したと考えられる。実際に、B点とC点でヘマトクリット比較すると、C点の方がヘマトクリットが高くなった。一方、ヘマトクリットに応じた抵抗の変化だけでは説明できない流量分配の変化も確認された。G点、J点間の分岐では、G点のヘマトクリットが16%、J点のヘマトクリットが0%であるにもかかわらず、この2点間の分配比は精製水と血液どちらの場合でも81:19であった。これは、J点付近の流路が、ブリッジ回路の様な構造をしているからであり、周囲の流路における圧力(着目する流路にとつ

での出口圧力) が影響を与えたことが分かった. これらの結果から, 微小血管網における血流の流れを理解するためには, 赤血球による影響と併せて, 微小血管網に特有の分岐・合流構造の影響が重要であることが示された. その内の1つとして, 本研究では, 着目する流路に周囲流路がどのように影響を与えるのかを示した.

### (3) 赤血球の変形と運動が微小流路網内血流に与える影響

微小2分岐管の計算機シミュレーションにおいては, 弾性膜の変形が運動に与える影響が明らかになった. この場合, 赤血球は流入時の間隔を保ったまま親管部を移動した後, 分岐部の壁面に衝突し停留する場合 (図3左), および停留せずに娘管へと流れる場合 (図3右) の2種類の運動パターンを非定常に繰り返した. 赤血球が停留する場合には, 赤血球が2本の娘管方向に引っ張られることで分岐部壁面に沿った形状に変形し, 後続の赤血球が近づくことによって凝集した. 分岐部に停留した赤血球は, この凝集による流れの変化に応じて, どちらか一方の娘管へと移動し, その結果赤血球の凝集は崩壊した.  $Ca=0.035$  と  $Ca=0.35$  の場合を比較すると,  $Ca$  が大きい場合の方がより停留することが示された.

微小血管網の計算機シミュレーションにおいては, 流入部から流出部への最短距離である内側の血管により多くの赤血球が流れた (図4左). これは, 最も圧力勾配が大きく, 流量の大きな経路でもある. 赤血球の流入が進むと, 流入部に最も近い分岐部で赤血球は停留, 衝突し, その一部は圧力勾配が小さい方の血管へと流れた. 流入部から流出部への最短距離である血管の軸上に座標  $L'$  を定義し, 見かけの粘度と血しょうの粘度の比である粘度比  $\mu^*$  を図4右に示す. 粘度比  $\mu^*$  は流入部から流出部に至るまで 1.0 以上の値となり, 赤血球の存在によって見かけの粘度が増加することが示された. 特に流量の大きな分岐部と合流部で見かけの粘度は大きくなった. このように, 特定の血管内を大部分の赤血球が移動することにより, 流出部側の娘管の流量比が減少した. この結果は, 4.2節で示した **Zweifach-Fung** 効果に応じた見かけの粘度変化とそれに伴う流量変化と同じものと考えられる.

以上の結果から, 微小血管網内における赤血球の変形運動と, それに応じた血流挙動の一端が示された. 特に, 分岐部および合流部における変形運動は, 赤血球の停留に起因する凝集を引き起こす可能性があり, 時空間的な変化に大きな影響を与える可能性がある. 一方, 変形運動の詳細がどのように血流を決定するのかについて, より詳細な解析を行う必要があることも示唆された.



図3 2分岐部における赤血球の変形運動. 停留する場合 (左) と停留しない場合 (右)

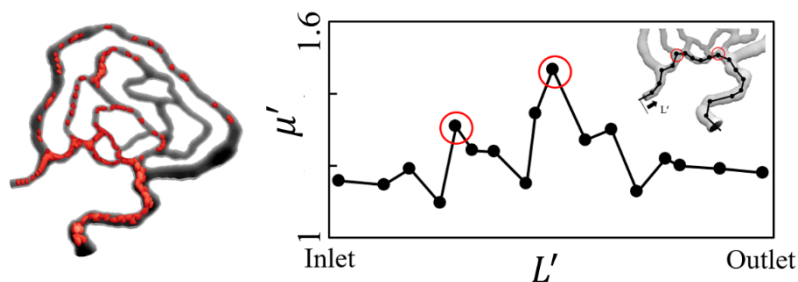


図4 微小血管網における赤血球の分配の様子 (左) と見かけの粘度 (右)

以上のように, 微小循環における血流挙動に着目し, 実験モデルと計算機モデルを用いて, 正常な循環挙動の仕組みを調べた. その結果, 正常な循環挙動について, 赤血球個々の力学特性とその変形運動, 複数の赤血球の運動挙動, および血管網の幾何学的な構造の役割を具体的に示すことが出来た. この結果から, 血流が病的な状態へ変化する際に, 個々の各種血球の力学特性の変化や壁への粘着などに応じた流量分配の変化などが原因になる可能性が考えられた. 今後の課題として, 実際に観察される循環障害時の血流挙動のモデリングや, 血管構造網の変化則の検討を進める. 同時に, 特定の臓器を対象とした血流モデリングを進めることで, 正常な循環挙動の仕組みの理解も進める.

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計3件)

- ① Kodama, Y., Aoki, H., Yamagata, Y. and Tsubota, K., In vitro analysis of blood flow in a microvascular network with realistic geometry, *Journal of Biomechanics*, Vol. 88, pp. 88-94, 2019,

doi:10.1016/j.jbiomech.2019.03.022, 査読有

- ② Sugawara, M., Miyoshi, H., Miura, T., Tanaka, H., Tsubota, K. and Liu, H., Dynamics of actin stress fibers and focal adhesions during slow migration in swiss 3T3 fibroblasts: intracellular mechanism of cell turning, *BioMed Research International*, Vol. 2016, #5749749 (16 pages), 2016, doi:10.1155/2016/5749749, 査読有
- ③ Sughimoto, K., Okauchi, K., Zannino, D., Brizard, C., Liang, F., Sugawara, M., Liu, H. and Tsubota, K., Total cavopulmonary connection is superior to atriopulmonary connection Fontan in preventing thrombus formation: computer simulation of flow-related blood coagulation, *Pediatric Cardiology*, Vol. 36, pp. 1436-144, 2015, doi:10.1007/s00246-015-1180-y, 査読有

[学会発表] (計8件)

- ① 小玉裕八, 坪田健一, 赤血球および血管網構造が微小循環に与える影響, 日本機械学会第29回バイオフロンティア講演会, 千葉市, 2018年
- ② Tsubota, K., Effects of membrane surface viscoelasticity on the tank-treading motion of a red blood cell under shear flow, 8th World Congress of Biomechanics (WCB2018), Dublin, Ireland, 2018年
- ③ Tsubota, K., Kodama, Y. and Kanai, R., Effects of red blood cells on blood flow in micro vessel network: In vitro experiment and computer simulation, Joint Meeting of the European Society for Clinical Hemorheology and Microcirculation, The International Society for Clinical Hemorheology and The International Society of Biorheology, Krakow, Poland, 2018年
- ④ 金井陵真, 坪田健一, 赤血球の粘弾性に応じた微小管網内血流の計算機シミュレーション, 日本機械学会第30回バイオエンジニアリング講演会, 京都市, 2017年
- ⑤ 金井陵真, 坪田健一, 赤血球を考慮した微小血管網内レオロジーの粒子法シミュレーション, 日本機械学会第29回バイオエンジニアリング講演会, 名古屋市, 2017年
- ⑥ Tsubota, K., Computer simulation of cellular shape based on elastic deformation, The 7th International Conference on Computational Methods (ICCM2016), Berkeley, CA, USA, 2016年
- ⑦ Koike, K., Tsubota, K. and Liu, H., Experimental Measurements of Thrombus Formation under Fluid Flow in Micro Channel, 8th Asian-Pacific Conference on Biomechanics (APBiomech2015), 札幌市, 2015年
- ⑧ Tsubota, K., Computer simulation of blood cell motion based on viscoelastic deformation, The 7th International Conference on Computational Methods (ICCM2016), Auckland, New Zealand, 2015年

[図書] (計1件)

- ① Tsubota, K., Sughimoto, K., Okauchi, K., Liu, H., Particle method simulation of thrombus formation in Fontan route, In: *Advances in Computational Fluid-Structure Interaction and Flow Simulation: New Methods and Challenging Computations*, pp. 387-396, 2016年

[その他]

ホームページ等

千葉大学・バイオメカニクス研究室 HP

<http://www.em.eng.chiba-u.jp/~bml/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究協力者

研究協力者氏名：劉浩；菅原路子

ローマ字氏名：LIU, Hiroshi；SUGAWARA, Michiko

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。