

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：11101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K12515

研究課題名(和文)血液接触型医療機器の評価に迅速・簡便に対応できる新規溶血試験法の確立

研究課題名(英文) Simple and rapid method for the hemolysis tests of blood-contacting medical devices

研究代表者

矢野 哲也 (Yano, Tetsuya)

弘前大学・理工学研究科・准教授

研究者番号：70404853

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：血液循環補助に用いられる埋込型補助人工心臓や体外式血液ポンプなどの血液接触型医療機器の血液適合性試験の一つである溶血試験の改善，すなわち，高い血液適合性を有する低溶血量の高性能デバイスの評価への対応および迅速，簡便化を目指して研究を推進してきた．本課題で提案する方法は，等張液に赤血球を微量分散した試料液に純水を追加注入することにより，赤血球を低張曝露して急速に膨潤，崩壊させ，その過程における試料液の光学特性の時間変化に基づき血球の膜性状を評価するものである．

研究成果の概要(英文)：Hemolysis test of medical devices is a test to investigate the blood compatibility of blood-contacting devices. This test has a potential problem that the test results depend on the initial quality of the blood used for the test. In this study, a simple and rapid optical method has been proposed to assess the fragility of the blood cells contained in the test blood. When the blood cells are exposed to low osmotic pressure, damaged cells collapse faster than normal cells. Consequently, the fragility of cells can be estimated from the change speed of the optical properties of the cells. Slight change of cell membrane damage caused by shear loading and atmospheric plasma irradiation could be detected by the proposed method. This method enables fast screening of test blood and provide a solution to one of the problem on hemolysis tests.

研究分野：生体医工学

キーワード：人工心臓 血液ポンプ 溶血試験 赤血球 細胞膜損傷 光学計測 せん断負荷 大気圧プラズマ

1. 研究開始当初の背景

血液ポンプをはじめとする血液接触型の医療機器の血液適合性試験として、溶血試験が行われる。これは、当該機器の実使用環境に近い条件（流量、揚程）での血球破壊を実験的にシミュレートするものである。試験に用いる血液の初期性状が、溶血試験の結果に影響を及ぼすことは定性的に知られている。動物由来の試料を無作為に用意して試験を行う限り、個体差に起因する問題は不可避である。そこで、試料個体差の影響を排除するために、一般的には、試験対象の機器のほかに、溶血特性が既知の市販製品を用意し、同一血液を用いて同一条件で溶血試験を行い、両者を比較評価する方法が採用される。しかしながら、2 台同時の試験の実施には多大な労力を要する。このような背景から、可能な限り初期性状を揃えた血液を用いて溶血試験を行えるよう、迅速、簡便な血球性状評価法が有用である。

近年開発されている血液ポンプの溶血性能の向上は目覚ましく、従来の溶血試験法での対応が困難になりつつある。しかしながら、現状で最高性能に近いとされる装置でも、レシピエントの術前の状態によらず装置使用に伴う溶血が認められることから (Madden, et al., ASAIO Journal 2014), さらなる性能向上が求められている。このような中で新しいコンセプトの溶血試験法が必要不可欠であると考えられる。ここでは、赤血球内部からのヘモグロビン漏出を伴わない、いわゆる血球崩壊前 (sublethal hemolysis) の状態の損傷度に基づく新しい溶血性能評価法を提案する。より高性能な機器開発に不可欠な評価方法となりうると考えている。具体的には、血球の損傷度を光学的手法により評価する方法を検討することとした。既に、低張条件下での希釈血球溶液の光学特性の変化をもとに膜性状を評価できることを確認しており、原理についても、細胞を球体と仮定し、ミー散乱理論に基づき、細胞の膨潤、崩壊に伴う散乱特性の変化から説明できることを確認している。本研究では、基礎的な検討として、まず、膜性状を意図的に変化させた血球を含む血液試料を用意し、力学特性評価とともに溶血試験を実施し、両者の相関を確認する。さらに、この手法を基本とし、溶血試験用血液のスクリーニング、新規溶血性能試験法としての適用可能性について検討することとした。

2. 研究の目的

血球の損傷度、力学的特性を迅速、簡便に評価する方法を確立し、これを基に新規溶血試験法を開発することを目的とする。近年の血液接触型医療機器の性能の向上は目覚ましいにもかかわらず、デバイス運転開始後、十分に時間が経過するまでの間、溶血性能の指標となる循環血液中の血漿遊離ヘモグロビン濃度が一般的な測定法の検出限界以下

であることもしばしばである。このような状況から、新たな溶血試験法が求められている。ここでは、いわゆる血球崩壊前の状態の損傷度に基づく溶血性能評価法を提案し、問題の解決を目指すものである。従来法を補完あるいは代替する新規溶血試験法として確立することにより、更なる高性能医療機器の開発を促すことにつながる。

3. 研究の方法

(1) 浸透圧溶血過程における赤血球径変化の光学計測と血球損傷度評価への応用概要

血液ポンプの性能評価試験の一つである溶血試験は、試験対象のポンプを接続した循環回路に動物血を充填し、一定条件でポンプを運転しながら、血漿遊離ヘモグロビン濃度の時間変化を調べるものである。すなわち、ポンプ使用による赤血球膜損傷に伴い血漿中にヘモグロビンが漏出した量をもとに、ポンプの血液適合性を評価するものである。この試験方法には動物血を使用することから、血液の初期の品質により試験結果が左右されてしまうという根本的な問題がある。このような状況から、試験に使用する血液の初期性状を光学的手法により迅速かつ簡便に評価する方法について検討してきた。この方法は、血液から採取した赤血球を低張液に曝露し、浸透圧溶血を誘起し、その間の血球の膨潤過程における光学特性の変化を調べる方法であり、数分間の試験で評価可能であることを示してきた。本研究では、血球性状評価の更なる迅速化を目指し、浸透圧溶血の極初期の過程に注目し、その間の血球径変化を散乱光計測により調べる方法について検討した。

血液試料

クエン酸添加により抗凝固処理したブタ血を孔径 20 μm のフィルターに通した後、遠心分離して採取した赤血球 3 μL をリン酸緩衝液 (PBS) 0.75 mL に添加し、赤血球液を調整した。ここでは、採血後 1 日間の冷蔵輸送期間を経たブタ血を使用した。

光学計測

実験に用いた光学系を図 1 に示す。キュベット内の試料液にレーザダイオード (波長 532 nm) からの光を入射し、透過散乱光を測定した。ここでは散乱角 16° の位置に直径 1 mm のピンホールを設置し、その後ろにフォトダイオードを配置して散乱光強度を測定した。実験手順は次のとおりである。キュベットにあらかじめ蒸留水 0.75 mL を入れた状態にし、そこに試料の赤血球液 0.75 mL を追加注入した。これにより、試料中の赤血球は低張環境に曝露され、膨潤、崩壊していく。この浸透圧溶血過程における血球の変形、直径変化による光学特性の変化に伴う散乱光強度の変化を調べた。

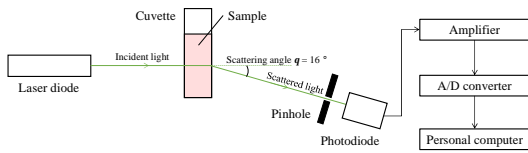


図1 実験装置の概略図

赤血球膨潤過程の観察

低張曝露された赤血球の変形，膨潤過程を観察した． に記した方法で調整した赤血球液の液滴をスライドガラス上に設けた幅2 mm，深さ50 μm の狭い浅溝に滴下し，そこに蒸留水液滴を接触させることにより，試料中の赤血球を急速に低張曝露した．このときの赤血球の変形の様子をスライドガラス下面から倒立型顕微鏡を通してデジタルカメラ (EX-F1, CASIO) を用いて動画撮影した．

(2) プラズマ照射による細胞損傷度変化

大気圧低温プラズマ装置

大気圧低温プラズマ照射装置を作製した．装置構成の概略図を図2に示す．装置はガラス管 (内径5 mm，外径7 mm) と電極，高周波電源 (LHV-13AC, ロジー電子)，ヘリウムガスボンベおよび流量調整バルブ，流量計から成る．本装置によりプラズマジェットを安定的に形成できることを確認した．

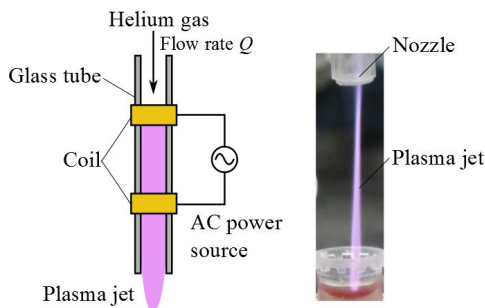


図2 プラズマ照射装置の概略図および大気圧プラズマジェット

細胞分散液へのプラズマ照射

プラズマ照射による細胞損傷度を評価するため，ブタ赤血球をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に分散した試料液の液面にプラズマジェットを一定時間照射し (図3)，その後，純水を追加注入して細胞を低張曝露することにより膨潤，崩壊させ，その過程における試料液の透過光強度の時間変化を調べた．試料液中の光散乱体である血球の数が減少することにより透過光強度は時間経過とともに増加する．この透過光強度の時間変化の速さが細胞膜脆弱性に依存することを事前に確かめており，細胞膜の脆弱性が高いほど時定数が短くなる．

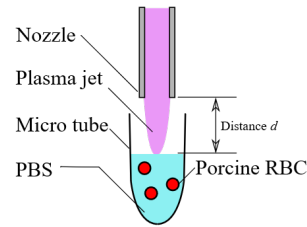


図3 細胞浮遊液へのプラズマ照射に用いた実験装置概略図

プラズマ照射による細胞損傷と液面振動により誘起される流動との関係

クエン酸により抗凝固処理し，1日間冷蔵保存したブタ血液から遠心分離により採取した赤血球をPBSに添加して作成した血球分散液をキュベットに入れ，その液面に大気圧低温プラズマジェットを連続照射した．ここでは，電源電圧8 kV，周波数10 kHz，ヘリウムガス流量20 L/min，とした．

4. 研究成果

(1) 浸透圧溶血過程における赤血球径変化の光学計測と血球損傷度評価への応用

光学計測

散乱光強度の時間変化を図3に示す．低張曝露を開始した時刻を $t_{\text{exp}} = 0$ としている．散乱光強度は血球の低張曝露を開始した直後の $t_{\text{exp}} = 0.8$ s までの間に増加しピークを迎えた後，減少，増加，減少という特徴的な傾向を示した．図4において，散乱光強度の初期の増加は，散乱体の注入によるものと考えられる．その後の減少は，血球形態の両凹円盤形から球形への変化，さらに，それに続く増加および減少は，球形赤血球の体積増加によるものと考えられる．

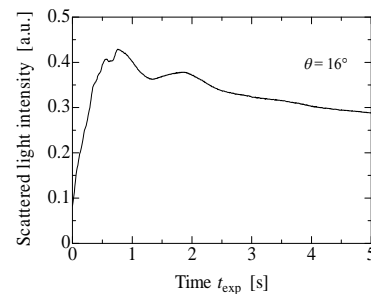


図3 散乱光強度の時間変化

顕微鏡観察

低張曝露による赤血球の形態変化を図5に示す．観察開始時刻 $t_{\text{obs}} = 0$ としている．低張曝露により赤血球は球形に変化した後，徐々に直径増加し，その後収縮していく様子が観察された．とくに球形に変化した後の直径増加の期間には，徐々に血球像がぼやけていき，背景と同化していくように見える．これは外部流体の流入に伴い，血球内のヘモグロビン濃度が減少し，膜内外の屈折率差が小さくなったことによるものと考えられる．

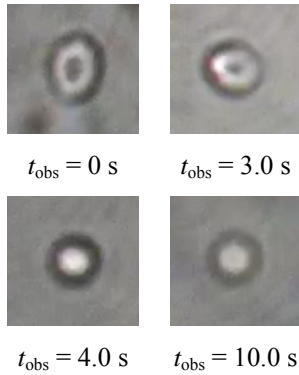
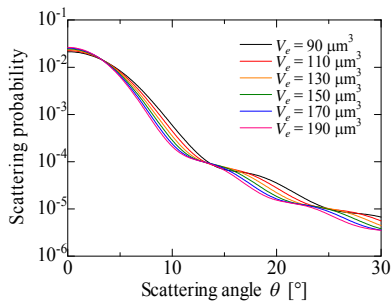


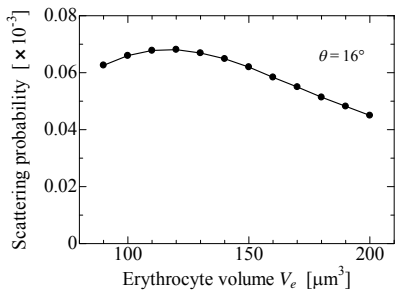
図4 低張液中における赤血球の形態変化

光散乱

赤血球の容積を $V_e = 90 \mu\text{m}^3$ 、内部ヘモグロビン濃度 (MCHC) を 34.0 g/dL として適切な光学特性 (屈折率 1.397 , 消衰係数 2.201×10^{-3}) を与えた球形粒子を仮定し、ミー散乱理論に基づき光散乱のパターンを計算した。そこから、赤血球内への外部流体の流入に伴うヘモグロビン濃度の減少による光学特性の変化と血球径増加を考慮し、膨潤過程における光散乱パターンの変化を調べた。容積変化した赤血球を模擬した粒子の散乱パターンを図5(a)に示す。このうち散乱角 $\theta = 16^\circ$ に注目し、血球径の増加に伴う散乱確率の変化を調べたところ (図5(b)), 特定のサイズ ($V_e = 120 \mu\text{m}^3$) において極大値を取ることがわかった。このことから、図3の計測結果と照合することにより、血球容積が単調に増加する膨潤過程において血球径変化をキャリブレーションなしで計測することが可能であると考えられる。



(a) 散乱パターン



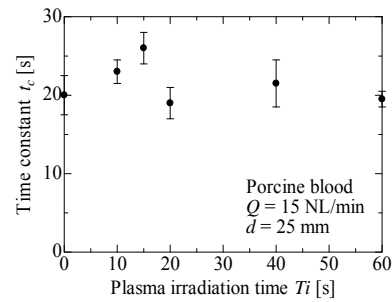
(b) 球形粒子の体積変化に伴う散乱確率密度の変化

図5 球形粒子の光散乱

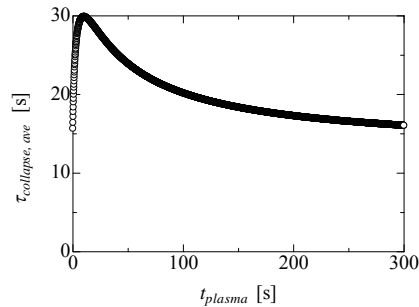
(2) プラズマ

プラズマ照射による細胞損傷度の変化

透過光強度の時間変化の時定数がプラズマ照射時間 15 s までは増加し、その後、減少に転じる傾向が示された (図 6a). この実験結果については次のように考察される。試料中に分散している細胞は加齢度の異なる多数の細胞が含まれるため、細胞の初期損傷度にばらつきがある。そのため、プラズマ照射により初期損傷度の高い細胞から優先的に崩壊に至る過程において、残存細胞の平均的な膜脆弱性が照射前よりも低下したものと考えられる。その後、残存赤血球の崩壊が徐々に進み、細胞脆弱性が全体的に亢進したものと考えられる。脆弱性のばらつきを考慮したモデルによる数値解析の結果を図 6(b) に示す。



(a) 実験



(b) 解析

図6 プラズマ照射した血球分散液の低張曝露による透過光時間変化の時定数

プラズマ照射による細胞損傷と液面振動により誘起される流動との関係

プラズマ照射中の細胞分散液の光透過率の時間変化を調べた結果、プラズマ照射開始から 80 s まで透過率はほぼ単調に増加し、その後定常に達した (図7). プラズマによって生成される活性化学種の中でも特に脂質過酸化反応により細胞膜を損傷させるヒドロキシルラジカルの寿命は極めて短いことから、細胞に影響を与える領域は液面付近に限定されるものと考えられる。しかしながら、プラズマジェット照射により液面が振動することにより内部に生成される流動により細胞が循環して、次々に新しい細胞がプラズマ影響領域に供給されることになると考えられる。そこで、Nyborg の音響流モデルを用

いて液面振動による流動を数値流体解析 (CFD 解析) により調べた。その結果, キュベット上部において循環が生じていることがわかった (図 8)。

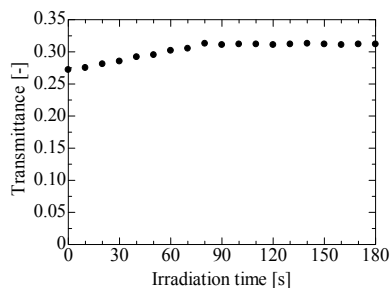


図 7 プラズマ照射中の細胞浮遊液の透過率変化

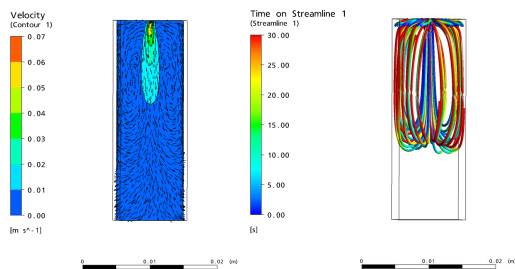


図 8 プラズマジェットを液面に照射することにより誘起されるキュベット内流動の解析結果

プラズマ照射による細胞膜穿孔における試料液流動の影響の確認

- ・試料液全体 (試料上層・下層とも含む)
プラズマ照射により上記評価指標の時定数が増加し, その後減少に転じる傾向が示された (図 9(a)). また, 電極間電圧が高いほど, 時定数の増加から減少に遷移するまでの時間が短く (図 9(a)), 電極間電圧がプロセスの速度に寄与していることが確認された。これは, 電極間電圧の増加により気体の電離度が上昇し, 液中に輸送される活性化学種の量が増加したことによるものと考えられる。

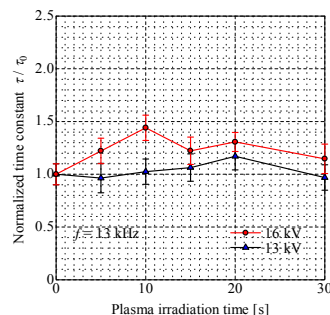
- ・試料液上層 (プラズマ照射領域付近)
プラズマ照射後, 膜脆弱性は一時的に低下した後に亢進する傾向が確認された (図 9(b)). この傾向は試料液全体と同様の傾向であるが, 膜脆弱性の一時的な低下がより顕著であった。

- ・試料液下層
プラズマ照射による膜脆弱性の変化はほぼ無かった (図 9(b)).

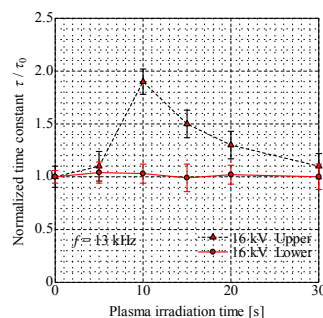
試料液面へのプラズマジェット衝突により誘導される流動

液面振動によって誘導される流れが緩やかである。実際にプラズマジェットの液面衝突による液面振動振幅および周波数をレーザ変位計で計測し, その値に基づき音響流モデルにより内部流動を計算すると, 最大流速をとる容器中心軸の下向き流速でも 0.5 mm/s であり, 極めて緩やかな流れであることが確認された。プラズマにより生成される活性化

学種の寿命が μs から ms のオーダーであるので, 影響領域が液面付近に限定される。



(a) 電極間電圧による変化



(b) 試料上層・下層の比較

図 9 プラズマ照射時間による時定数 (細胞脆弱性) の変化

(3)まとめ

迅速かつ簡便な血液損傷度評価法を提案した。力学的負荷や薬剤添加による膜性状の変化を検出することが可能であることを確認し, 血液接触型医療機器の血液適合性試験への適用可能性を示した。

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 4 件)

Tetsuya Yano, Kakeru Watanabe, Numerical simulation of cell stirring and separation in a micro droplet using surface acoustic wave-driven flow, Transactions of Japanese Society for Medical and Biological Engineering, Vol.55(Proc), 2017 pp.578-281.

doi: 10.11239/jsmbe.55Annual.578

Eiji Okamoto, Tetsuya Yano, Hidekazu Miura, Yasuyuki Shiraishi, Tomoyuki Yambe, Yoshinori Mitamura, Measurement of hemodynamic changes with the axial flow blood pump installed in descending aorta, Journal of Artificial Organs, Vol.20, 2017, pp.390-393.

doi: 10.1007/s10047-017-0985-2

Eiji Okamoto, Tetsuya Yano, Yasuyuki

Shiraishi, Hidekazu Miura, Tomoyuki Yambe, Yoshinori Mitamura, Initial acute animal experiment using a new miniature axial flow pump in series with the natural heart, *Artificial Organs*, Vol.39, 2015, pp.701-704.

doi: 10.1111/aor.12558

矢野哲也, 佐藤陵介, 齋藤敬, 杉本尚哉, 須藤誠一, 大気圧プラズマ照射による細胞膜脆弱性の変化と細胞内物質導入への利用, *秋田県立大学ウェブジャーナル B*, Vol.2, 2015, pp.11-15.

〔学会発表〕(計12件)

矢野哲也, 小笠原知里, 八尾谷亮太, 大気圧低温プラズマの短時間照射による赤血球膜性状変化の評価, 第30回代用臓器・再生医学研究会, 2018年2月, 北海道大学大学院歯学研究院(札幌市)

Tetsuya Yano, Daisuke Sakota, Yoshinori Mitamura, Simple and rapid optical assessment of blood cell damage caused by electroporation, 39th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, 2017年7月11-15日, Jeju International Conference Center(韓国西帰浦市)

Tetsuya Yano, Eiji Okamoto, Yoshinori Mitamura, Computational fluid dynamics based design of artificial heart - An axial flow pump as a right ventricular assist device -, 56th Annual Conference of Japanese Society for Medical and Biological Engineering, 2017年5月3-5日, 東北大学星稜キャンパス(仙台市)

Ryota Yaotani, Tetsuya Yano, Numerical simulation for the design of a cell separation micro fluidic device using standing surface acoustic wave (SSAW), 56th Annual Conference of Japanese Society for Medical and Biological Engineering, 2017年5月3-5日, 東北大学星稜キャンパス(仙台市)

渡邊翔, 矢野哲也, 表面弾性波により誘起される流動の解析, 日本機械学会東北支部第47回学生会卒業研究発表講演会, 2017年3月8日, 東北学院大学工学部(多賀城市)

八尾谷亮太, 矢野哲也, 表面弾性波による微小流路内の粒子分離の数値シミュレーション, 日本機械学会東北支部第47回学生会卒業研究発表講演会, 2017年3月8日, 東北学院大学工学部(多賀城市)

Tetsuya Yano, Ryosuke Sato, Daisuke Sakota, Yoshinori Mitamura, A simple and rapid method for assessing the quality of blood used for hemolysis

test, 24th Congress of the International Society for Rotary Blood Pumps, 2016年9月20日, Hotel Lake View Mito, Mito, Japan

矢野哲也, 佐藤陵介, 黒川諒, 齋藤敬, 杉本尚哉, 大気圧低温プラズマ照射による赤血球脆弱性の変化と細胞内への物質導入, 第55回日本生体医工学会大会, 2016年4月26日, 富山国際会議場, 富山市民プラザ(富山市)

矢野哲也, 佐藤陵介, 須藤誠一, 三田村好矩, 浸透圧溶血過程における赤血球径変化の光学計測と血球損傷度評価への応用, 日本機械学会第28回バイオエンジニアリング講演会, 2016年1月9日, 東京工業大学大岡山キャンパス(東京)

佐藤陵介, 矢野哲也, 須藤誠一, 岡本英治, 三田村好矩, 大動脈基部に設置される小型軸流血液ポンプの設計および性能評価, 日本機械学会第28回バイオエンジニアリング講演会, 2016年1月9日, 東京工業大学大岡山キャンパス(東京)

矢野哲也, 佐藤陵介, 須藤誠一, 三田村好矩, 血液性状検査のための光学計測溶血試験の改善に向けて, 日本実験力学学会第10回機能性流体に関する公開研究会, 2015年12月4日, 静岡大学浜松キャンパス(浜松市)

矢野哲也, 佐藤陵介, 須藤誠一, 岡本英治, 三田村好矩, 循環系へ直列に接続される軸流型血液ポンプの数値設計および評価, 日本定常流ポンプ研究会2015, 2015年11月19日, 東京ドームホテル(東京)

〔その他〕

(1)アウトリーチ活動

「医用治療・検査機器開発のためのシミュレーション」平成29年度弘前大学オープンキャンパス, 2017年8月8日

(2)ホームページ等

弘前大学大学院理工学研究科矢野研究室
<http://www.mech.hirosaki-u.ac.jp/~yano/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

矢野 哲也 (YANO, Tetsuya)
弘前大学・大学院理工学研究科・准教授
研究者番号: 70404853

(2)研究協力者

岡本 英治 (OKAMOTO, Eiji)
東海大学・札幌教養教育センター・教授
迫田 大輔 (SAKOTA, Daisuke)
産業技術総合研究所・研究員