

平成 31 年 4 月 17 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K18759

研究課題名(和文)血液レオロジーの起源：単体から二体、多体の相互作用の包括的理解へ

研究課題名(英文)Origin of blood rheology: Toward comprehensive understanding of single-, two- and many-body mechanics

研究代表者

伊藤 弘明(Ito, Hiroaki)

大阪大学・工学研究科・特別研究員(PD)

研究者番号：10783186

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：血液はたくさんの柔らかい血球細胞が分散した溶液である。このような溶液の流動性は単純な粘性流体とは大きく異なる。本研究では、マイクロ流路と呼ばれる、毛細血管と同じくらい細い管を用いた実験を行い、個々の赤血球が流れの中で作る空間パターンを調べた。その結果、赤血球の密度(ヘマトクリットとも呼ばれる、血液中の赤血球体積分率)が生体内と同程度の条件において、赤血球周囲に生じる流れにより赤血球の攪拌が激しくなり、また特徴的な速度相関の空間構造をつくることが実証された。さらに高密度では、密なパッキングによりこの空間構造が消失することもわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血液はたくさんの柔らかい血球細胞が分散した溶液であり。このような溶液がどのように流れるのか、どのようにサラサラ・ドロドロ(粘性)の性質が現れるのかを知ることは、医療の進展にもつながる基礎科学の目標の一つである。本研究結果では、赤血球の密度に応じて流れ方が質的に異なり、特に生理濃度以上の赤血球密度では流体よりも粒子としての性質が流れに強く影響することがわかった。ここで得られた成果は、貧血や多血症、脱水症状などの異常時における血液の流れ方の理解に向けた大きな手がかりとなる。

研究成果の概要(英文)：Blood is a fluid in which many soft blood cells are dispersed. Fluidity of such solutions is largely different from that of simple viscous fluid. In this study, we performed microfluidic experiments with a microchannel, whose diameter is similar to that of microvasculature, to investigate the spatial pattern of red blood cells (RBCs) in blood flow. In the consequence, we found that stirring of red blood cells (RBCs) by the flow formed around other RBCs becomes more vigorous at the physiological RBC density (called hematocrit, which indicates the amount of RBCs in blood). Moreover, the specific spatial structure of velocity correlation is observed. At higher density, the spatial structure disappears due to the dense packing.

研究分野：ソフトマター物理学

キーワード：赤血球 細胞力学 ヘモレオロジー マイクロ流体工学

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

血液は血球細胞が高密度に分散した溶液であり、全身をくまなく循環し、酸素や栄養物、老廃物の運搬を担っている。生体内で見られる様々な血管径や圧力差の環境を鑑みると、スムーズな循環機能の実現のためには、血液が多様な流れ環境の下で優れた流動特性を保っていることが重要である。その血液の流動特性を理解するためには、これまでに数多くの研究が行われてきた「単一赤血球の粘弾性」や「液体としての血液の流動性（ヘモレオロジー）」の間の長さスケールに相当する、メソスコピックな視点での現象の理解が必要不可欠である。しかしながら、その長さスケールのギャップのためにそれらは従来別個の研究として扱われることが多く、理解が不十分となっている。特に、高速で流れるマイクロメートルスケールの細胞群の観察の難しさや、流速や密度が適切に制御された流れを構築することの難しさのために、実験的研究は非常に少ないのが現状である。

また、赤血球は通常の真核細胞等と比べて非常にやわらかく、壁や周りの赤血球がつくる流れ場にさらされたときに、容易に形状の変形が生じる。その単一赤血球の形状変形とメソスコピック～マクロスコピックな流れの関係を理解することや、そもそも微小な変形を観察可能な時間分解能・空間分解能で細胞群の流れを実験的に実現することも、チャレンジングな課題となっている。

### 2. 研究の目的

本研究では、高密度の細胞多体流れとして赤血球集団の流れや変形を実験的に制御し、その流れの特性や起源の解明を行う。そのために、まずはマイクロ流体デバイスを用いた新たな実験系の構築を目指す。次に、その実験系を用いた赤血球多体系の流動実験を行い、得られた赤血球の配置や形状を解析する。これにより、血液の流動特性の起源を個々の赤血球の力学的性質やそれらの間に働く多体相互作用までの、マルチスケールの観点から明らかにすることが本研究の目的である。

### 3. 研究の方法

まず時間分解能・空間分解能で細胞群の流れを観察可能な実験系を構築するために、マイクロ流体デバイスの設計を行う。具体的には、顕微鏡の観察焦点面内の赤血球の2次元流れの実現を目指した。そのために、まずは血液サンプルにわずかに含まれる白血球や血小板等をフィルタリングして取り除き赤血球のみの流れを作製する機構と、その赤血球密度を段階的に濃縮し調整する機構をもったマイクロ流路を作製する。マイクロ流路の作製は、SU-8 フォトリソグラーフによって作製した鋳型を用いたソフトリソグラフィーで行った。この鋳型を polydimethylsiloxane (PDMS) で型取ったものをガラス基板と貼り合わせることでマイクロ流路チップを作製し、そこに血液や希釈血液のサンプルを様々な駆動圧力で流して観察を行う。ここで観察された流れをハイスピードカメラで撮影し、動画解析を行うことで各赤血球の位置と速度が得られる。それらの相関関数を計算することで、様々な赤血球密度における流れの構造を特徴づける。実験に用いたマイクロ流路のデザインを図1に示す。

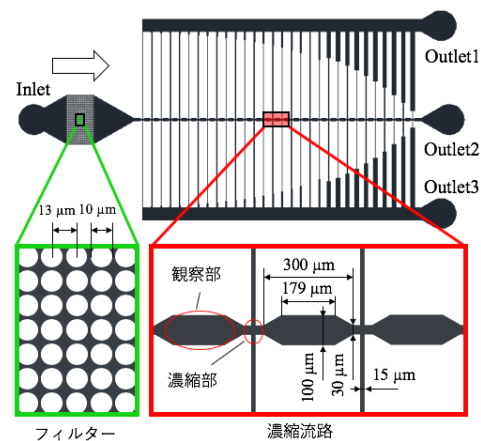


図1. マイクロ流路の設計。不要物のフィルタリングの後、赤血球密度の段階的な濃縮を行いながら観察部を流れる。

### 4. 研究成果

前述のマイクロ流路を用いることにより、赤血球の2次元流れを実現し、定常流れの中での個々の赤血球を観察可能になった。得られた定常流れの一例を図2に示す。このような動画を解析することで、時々刻々の全赤血球の配置と形状を認識することに成功した。

#### (1) 主流に垂直な方向への動き

赤血球は、平均的に主な流動の方向である図2中の左から右へ向かって押し流されているが、溶媒のみの流動で見られるポアズイユ流とは異なり、主流方向と垂直な方向への赤血球の動きも観察された。これは、赤血球どうしが流体を介した相互作用をしているためであり、血流が純粋な流体ではなく粒子流としての性質をもつことの現れと言える。この主流とは垂直な方向への動きを定量化するために、得られた赤血球の軌跡

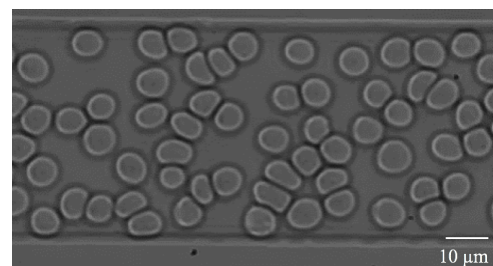


図2. 赤血球の2次元流れのスナップショット。左から右へ向かって流れる。

から主流に垂直な方向への平均自乗変位 (mean square displacement; MSD) を計算した。その結果、赤血球密度が中間程度となる面積分率 $\sim 0.3$ の前後でMSDの代表値が最大となり、ピークを持つことがわかった。この中間密度より低い密度や高い密度においては、主流垂直方向への変位は小さく抑えられている。また、このMSDの代表値を主流垂直方向へ動く赤血球の数に換算すると、赤血球の生理濃度 (ヘマトクリット $\sim 0.45$ ) 付近で最大のピークを持つことになる (図3)。この主流垂直方向へ動く赤血球の数は、この方向に沿った運動による赤血球配置の交換 (入れ替え) 効率とみなすことができる。したがって、生理濃度では血管内壁面へ到達する赤血球の数が最大化されている可能性が示唆される。

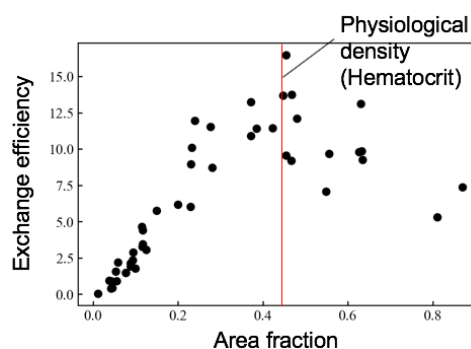


図3. 赤血球の主流垂直方向に沿った運動に由来する配置交換効率。

## (2) 速度の空間相関

次に、主流垂直方向に沿った速度の空間相関を計算した。この結果を図4に示す。これより、低密度 $\sim$ 中間密度の密度領域では4回回転対称となる速度相関が得られた。一方で、高密度領域においては等方的な相関関数となっている。この原因は、低密度領域から中間密度領域までは押し流される赤血球周りに生じる双極子型の流れ場が周囲の赤血球の運動方向を決めているのに対し、高密度領域では排除体積相互作用が支配的になり密にパッキングされた状態で赤血球群がクラスター化して流れていくためである。低密度領域と高密度領域ではともに小さいMSDが得られていたが、それぞれ流体相互作用と排除体積相互作用が支配的となっており、流れの構造は大きく異なっていることが定量化された。実際に、赤血球間距離に対する速度相関関数の減衰を解析すると、中間密度領域までは遠方で双極子型の流れ場描像で記述される通り実験データが距離の2乗に反比例しているのに対し、高密度領域の実験データは関数形が異なることがわかった。この減衰から相関長を定義すると、相関長は密度の増加にとまない、特に生理赤血球濃度付近の直後で急激に増大している。また、動径分布関数の解析からは、同様の密度の増加に対して配置の結晶性が増大することもわかった。今回中間密度で見られた4回回転対称の速度相関は、水中に分散した油滴の擬2次元流れにおいて報告がある[引用①]。このような粒子群の流れに対する普遍的な性質は、血液の流動特性にも直接関連付くものであり、興味深い。今後は変形状の詳細な解析も行い、赤血球の流れの構造の理解を深めていきたい。

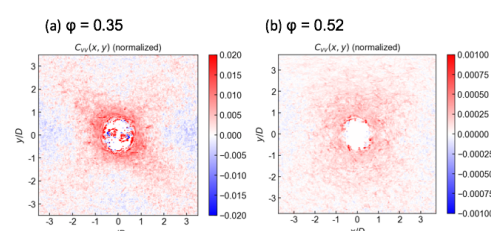


図4. 速度相関の赤血球密度依存性。(a) 中間密度領域 (面積分率 $\sim 0.35$ )、(b) 高密度領域 (面積分率 $\sim 0.52$ )。

## <引用文献>

- ① Itamar Shani, Tsevi Beatus, Roy H. Bar-Ziv, Tsvi Tlusty, Nat. Phys., 10, 140-144 (2014).

## 5. 主な発表論文等

### [雑誌論文] (計 4 件)

- ① Naoki Takeishi, Hiroaki Ito, Makoto Kaneko, Shigeo Wada, Deformation of a red blood cell in a narrow rectangular microchannel, Micromachines (査読あり), 10, 199:1-15 (2019). doi:10.3390/mi10030199
- ② 伊藤弘明, 小宮拓也, 洞出光洋, 高山俊男, 金子真, 自動細胞品質評価のためのOn-chip対象物位置制御システムの最適化, 再生医療とリハビリテーション(査読あり), 1, 1-8 (2018). <http://saiseireha.com/img/publications/itoh.pdf>

### [学会発表] (計 20 件)

- ① Hiroaki Ito, Naoki Takeishi, Atsushi Kirimoto, Misato Chimura, Tomohito Ohtani, Yasushi Sakata, Mitsuhiro Horade, Toshio Takayama, Makoto Kaneko, How to measure cellular shear modulus inside a chip: Detailed correspondence to the fluid-structure coupling analysis, The 32nd International Conference on IEEE Micro Electro Mechanical System (MEMS 2019, Seoul, Korea), 2019.
- ② Hiroaki Ito, On-Chip Measurement of Red Blood Cell Mechanics, 2018 International

- Workshop on Bio/Medical/Cognitive Science -Current and Future Direction-, 2018.
- ③ Hiroaki Ito, Yuji Higuchi, Naofumi Shimokawa, Coarse-grained molecular dynamics simulation of phase separation and morphological dynamics of a charged lipid vesicle, Soft Matter Physics: from the perspective of the essential heterogeneity (SMPH2018), 2018.
  - ④ Hiroaki Ito, Takuya Komiya, Mitsuhiro Horade, Toshio Takayama, Makoto Kaneko, Automatically optimized on-chip feedback manipulation toward clinical use, The 22nd International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS2018, Kaohsiung, Taiwan), 2018.
  - ⑤ Hiroaki Ito, Chia-Hung Dylan Tsai, Makoto Kaneko, Integration of fluctuation spectroscopy into a microfluidic platform for novel cellular viscoelastic measurement, The 31st International Conference on IEEE Micro Electro Mechanical System (MEMS 2018, Berfast, UK), 2018.

[その他]

解説・総説 (計 1 件)

- ① 伊藤弘明、非平衡界面現象の観点からみる生細胞の力学応答 (査読なし)、印刷中

国際会議プロシーディングス論文 (計 9 件)

- ① Hiroaki Ito, Naoki Takeishi, Atsushi Kirimoto, Misato Chimura, Tomohito Ohtani, Yasushi Sakata, Mitsuhiro Horade, Toshio Takayama, Makoto Kaneko, How to measure cellular shear modulus inside a chip: Detailed correspondence to the fluid-structure coupling analysis, The 32nd International Conference on IEEE Micro Electro Mechanical System (MEMS 2019), in press.
- ② Atsushi Kirimoto, Hiroaki Ito, Mitsuhiro Horade, Toshio Takayama, Misato Chimura, Tomohito Ohtani, Yasushi Sakata, Makoto Kaneko, On-chip dynamic mechanical measurement, The 32nd International Conference on IEEE Micro Electro Mechanical System (MEMS 2019), in press.
- ③ Takayuki Akai, Hiroaki Ito, Makoto Kaneko, Deep learning assisted analysis of multiple individual red blood cells in blood flow, The 22nd International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS2018), in press.
- ④ Hiroaki Ito, Takuya Komiya, Mitsuhiro Horade, Toshio Takayama, Makoto Kaneko, Automatically optimized on-chip feedback manipulation toward clinical use, The 22nd International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS2018), in press.
- ⑤ Hiroaki Ito, Chia-Hung Dylan Tsai, Makoto Kaneko, Integration of fluctuation spectroscopy into a microfluidic platform for novel cellular viscoelastic measurement, The 31st IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS2018), 137-140 (2018). DOI: 10.1109/MEMSYS.2018.8346502
- ⑥ Atsushi Kirimoto, Hiroaki Ito, Chia-Hung Dylan Tsai, Makoto Kaneko, Measurement of both viscous and elastic constants of a red blood cell in a microchannel, The 31st IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS2018), 388-391 (2018). DOI: 10.1109/MEMSYS.2018.8346569

受賞 (計 4 件)

- ① SI2018 優秀講演賞「短時間微小変形における赤血球粘弾性評価」
- ② SI2018 優秀講演賞「血液の 2 次元流れにおける赤血球機械特性の効果」
- ③ 第 69 回コロイドおよび界面化学討論会 若手口頭講演賞
- ④ ロボティクス・メカトロニクス講演会 2017 (ROBOMECH2017) ROBOMECH 表彰

ホームページ等

<http://nonlinear.s.chiba-u.jp/~ito/>

※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。