

令和元年5月28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：17K18854

研究課題名(和文)Cell Pinballメカニズムの解明

研究課題名(英文)Clarification of the mechanism of Cell Pinball

研究代表者

金子 真 (KANEKO, MAKOTO)

大阪大学・工学研究科・教授

研究者番号：70224607

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)：Cell Pinball現象は幅50 μm 、高さ4 μm のマイクロ流路を用いて生理食塩水で薄めた赤血球を流したときに観察される。そこで直径6～8 μm 、中央部厚さ1 μm 、外周部厚さ2 μm という赤血球独特な形状に解決のヒントが潜んでいると考え、可視化を試みたが、挙動に明快な結果がでるまでには至らなかった。塩分濃度が低い液体中にある赤血球の内圧増加に伴って、赤血球の形状が球状に近くなり、結果として赤血球がマイクロ流路上下面で同時に面接触し、流体力学的効果との連成によって回転トルクが生成され、回転しながら主流と直交方向に運動する力成分を作り出しているという考察に至った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

体内の細胞の3分の1は赤血球である。心臓から出た赤血球は動脈を通して毛細血管に到達し、付近の細胞に酸素を与え、それと引き換えに二酸化炭素を取り込み、肺で酸素と交換して再び心臓に戻ってくる。この赤血球に異常が起こると生命は維持できなくなってしまう。Cell Pinballは赤血球でしか起こらない現象で、低塩分濃度になったときに発生する。Cell Pinballが生体内で起こったという報告は未だないが、赤血球は生命維持に最も重要な細胞であるため、Cell Pinballがどのようなメカニズムの下で起こっているのかを明らかにすることは学術的にも社会的にも意義深いと考えている。

研究成果の概要(英文)：Cell Pinball can be observed when red blood cells diluted by saline are flowed in the channel where the width and the height are 50 μm and 5 μm , respectively. Cell Pinball has never been reported for other cells except red blood cells. By considering this fact, we believe that a hint to make clear this phenomenon should be the shape of red blood cell where the central part is concave. Though we tried to find the contact point between the channel and the red blood cell being in Cell Pinball, no clear results obtained through visualization. After all, our considerations are as follows: Red blood cell becomes sphere under low salinity. Those cells make contact with both top and bottom plates in the channel. The contact should be area but not pinpoint. As a result, cells receive rotational moment in coupling with fluid force, by which a rotational motion is induced.

研究分野：メカトロニクス

キーワード：赤血球 回転運動 並進運動 マイクロ・ナノデバイス モデル化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

申請者らは7年以上にわたって赤血球の特性計測の研究を行い、赤血球変形能試験、赤血球疲労試験、および最新超精密細胞駆動システムを用いた赤血球操作等を行ってきた。Cell Pinball 現象は、マイクロ流路を使った赤血球の特性計測実験を行っている過程で申請者らが偶然発見した現象である。幅 50 μm 、厚さ 4 μm のマイクロ流路を用いて生理食塩水で薄めた血液を流し、赤血球の変形能を調べる実験を行っている際、多くの赤血球は血液流線に沿って移動するのに対し、あたかも弾性ボールのような振る舞いをする赤血球を見つけ出した。一方で、そのメカニズムの正体がなかなか見えてこない中で、Cell Pinball 現象が赤血球でしか起こらないという点、及び塩分濃度を下げるほど Cell Pinball 現象の発生率が増加する点等をヒントにすれば解明の糸口が見出だせないだろうかという考えに至った。赤血球はヒトの体の細胞の3分の1を占め、心臓から排出された赤血球は約一分間で再び心臓に帰ってくる。赤血球は肺で二酸化炭素を離して酸素を受け取り、全身の細胞に酸素を渡して二酸化炭素を肺まで持ち帰るといった重要な任務を背負っている。したがって、もし赤血球に疾患が発生すると生命を脅かしかねない。そのため些細な現象であっても、たとえそれが生体外で観察されたとしても、見過ごすことなく、その原因究明を行うという姿勢が重要であろう。以上がこの研究申請に至った背景と経緯である。

2. 研究の目的

幅 50 μm 、厚さ 4 μm のマイクロ流路内に生理食塩水で薄めた血液を流し、赤血球の変形能を調べる実験を行っている際、95%以上の赤血球は血液流線に沿って移動するのに対し、あたかも弾性ボールのように流路壁面にぶつかっては跳ね返るといった振る舞いを繰り返す赤血球を見つけた。この現象を Cell Pinball と命名し、その動作メカニズムの解明を試みてきた。Cell Pinball 現象は生理食塩水濃度に依存すること、主流に対して直交方向に移動する運動成分を有すること、赤血球に取り付けたマイクロビーズを追跡することにより、主流に対して右手方向に移動するときには時計回り、左手方向に移動するときには反時計方向に回転することなどがわかってきた。さらに Cell Pinball 現象中の複数の赤血球同士が衝突したときには互いの赤血球があたかも反発し合うかのような振る舞いも観察できた。一方、回転中心がどこで、回転がどのようなメカニズムで持続できているのか、よくわかっていない。その大きなネックになっているのが、赤血球と流路壁面がどこで互いに接触しているのか、またどのような面接触が発生しているのか、実験的なエビデンスがないことである。本研究の目的は、予備実験で得られた事実を踏まえたうえで、Cell Pinball 現象の運動メカニズムを解明することを目的としている。

3. 研究の方法

生理食塩水濃度を下げ、Cell Pinball 現象を起こした状態において接触点がどのような位置に存在するのか可視化により考察する。可視化法としては低輝度高速カメラ画像重ね合わせ法及び反射干渉顕微鏡 (RICM) を用いる。特に、反射干渉顕微鏡は赤血球とガラス面との接触状態を調べる上で、鍵を握るツールになり得る。この反射干渉顕微鏡に関しては、京都大学田中求教授研究室に設置されているシステムを使わせていただく。これにより Cell Pinball 現象中の赤血球が流路壁面との接触状態が明らかになれば、その実験結果を踏まえて新しい運動モデルの構築を試みる。さらに Cell Pinball 現象が摩擦によってどのような振る舞いをするのかについて調べるため、マイクロ流路内の摩擦を途中で意図的に変化させて実験を行う。そのため、マイクロ流路の設計段階から見直し、流路の一部をマスクし、マスク以外の部分に対して界面処理を施して、マスク部分とマスク以外の部分で摩擦条件を激変させることを試みる。このマイクロ流路をうまく製作することができれば、摩擦が Cell Pinball 現象に与える影響を吟味することができる。

4. 研究成果

Cell Pinball 現象は幅 50 μm 、高さ 4 μm のマイクロ流路を用いて生理食塩水で薄めた赤血球を流したときに観察される。そこで直径 6 ~ 8 μm 、中央部厚さ 1 μm 、外周部厚さ 2 μm という赤血球独特な形状に解決のヒントが隠されていると考え、反射干渉顕微鏡を用いて接触状態の可視化を試みたが、偶発的に発生する Cell Pinball 状態にある赤血球を反射干渉顕微鏡内に取り込むことがむづかしい上、たまたま顕微鏡内に捉えられたとしても、直径 6 ~ 8 μm の赤血球とガラス面の接触位置、接触面積等が明快に説明できるエビデンスの取得までには至らなかった。さらに流路内の摩擦条件を変えるため、一部に界面処理を施したマイクロ流路の試作を試みたところ、界面処理を施したことにより、PDMS チップ部とガラス板との接着がうまくいかず、希釈された血液が漏れ出してしまおうというトラブルに見舞われ、接触条件を意図的に変える方法も結果が出るまでには至らなかった。赤血球形状はクレータ状に窪んだ形をしていることを考えると、生理食塩水濃度を下げることによって、赤血球の内圧増加に伴って赤血球の形状が球状に近くなるものの、完全に球になることはなく、流路壁面との接触は点接触ではなく、円環状態での面接触になることが予想される。結果として赤血球がマイクロ流路上下面で同時に円環形状を保った面接触となり、流体力学的効果との連成によって回転トルクが生成され、回転しながら主流と直交方向に運動する力成分を作り出していると解釈するのが一番自然

であるという考察に至った。赤血球の大きさは直径6～8 μm とばらつきがある中で、Cell Pinball 現象は一般に小さな赤血球で起こらない。このことは、比較的大きな赤血球が塩分濃度の低下によって球状に近くなり、マイクロ流路上下面に面接触することが Cell Pinball 発生の必要条件になっているという考察を後押ししている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Naoki Takeishi, Hiroaki Ito, Makoto Kaneko and Shigeo Wada, Deformation of a Red Blood Cell in a Narrow Rectangular Microchannel, *Micromachines*, 10 巻, 査読有, 2019, 199, DOI:10.3390/mi10030199.

Chia-Hung Dylan Tsai, Toshio Takayama, Yuta Shimozyo, Takayuki Akai, Makoto Kaneko, Virtual vortex gear: Unique flow patterns driven by microfluidic inertia leading to pinpoint injection, *Biomicrofluidics*, 12 巻, 査読有, 2018, 034114 ~ 034114, DOI:10.1063/1.5031082.

Toshio Takayama, Hiroki Miyashiro, Chia-Hung Dylan Tsai, Hiroaki Ito, Makoto Kaneko, On-chip density mixer enhanced by air chamber, *Biomicrofluidics*, 12 巻, 査読有, 2018, 044108 ~ 044108, DOI:10.1063/1.5033482.

〔学会発表〕(計 6 件)

Hiroaki Ito, Yakuya Komiya, Mitsuhiro Horade, Toshio Takayama, and Makoto Kaneko, Automatically optimized on-chip feedback manipulation toward clinical use, The 22nd International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS2018) (国際学会) 査読有, 2018 年.

Takayuki Akai, Hiroaki Ito and 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) (国際学会) 査読有, 2018 年.

Toshio Takayama, Mitsuhiro Horade, Chia-Hung Dylan Tsai and Makoto Kaneko, Push/Pull Inequality Based On-Chip Density Mixer with Active Enhancer, The 22nd International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS2018) (国際学会) 査読有, 2018 年

Toshio Takayama, Naoya Hosokawa, Chia-Hung Dylan Tsai and Makoto Kaneko, On-Chip Super High Speed Mixer, The 22nd International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS2018) (国際学会) 査読有, 2018 年.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

下記 U-tube に申請者らが撮影した Cell Pinball がアップされている。赤血球が主流に対して斜め方向に回転しながら動いている様子が観察できる。なお95%以上の赤血球は主流に乗って動いているが、移動速度が顕微鏡の倍率分拡大されているため、目視ではわかりにくい。このように実際に Cell Pinball 状態にある赤血球数は確率的には多くなく、限られた条件を満足した赤血球でしか発生していないことは、この映像からも見てとれる。この動画は英国、独をはじめ世界の研究機関から多くの反響が寄せられた。

<https://www.youtube.com/watch?v=EUI tngCsPWQ>

<https://www.youtube.com/watch?v=Eer IJICwnEA>

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし。

(2)研究協力者

なし。

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。