

機関番号：32689

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21700474

研究課題名(和文) 高速マイクロ流れを用いた赤血球破壊リアルタイム可視化と溶血力学モデルの実験的構築

研究課題名(英文) Modeling of flow-induced hemolysis using single-cell real-time imaging in conjunction with high-speed microfluidic technology

研究代表者

八木 高伸 (YAGI TAKANOBU)

早稲田大学・理工学術院・研究員

研究者番号：00468852

研究成果の概要(和文)：

人工物の血液接触面で流体力により誘発される細胞破壊のメカニズム解明を目指している。人工心臓や心臓代用弁の流動研究より、「高速流動する浮遊細胞の衝突破壊」という全く新しい仮説を立ち上げ、本研究では、この仮説の実証に挑戦するなかで、赤血球破壊の単一細胞リアルタイムイメージングに成功した。赤血球の衝突・破壊動態の様式を、流速に応じて体系化することを達成し、人工臓器の血液適合性を飛躍させる新たな知見を取得することができた。

研究成果の概要(英文)：

This study aims to gain better understanding of flow-induced blood cell destruction on a man-made blood-contacting surface. Based on a previous study of modeling of fluid flow in artificial organs, a new hypothesis of red blood cell destruction was proposed, and verified in this study. This study for the first time succeeded in a single-cell real-time imaging of collision-induced hemolysis of high-speed-flowing cells. The data contribute to enhance the blood compatibility of man-made devices.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：赤血球 溶血 細胞破壊 マイクロ流体 高速流体 可視化

1. 研究開始当初の背景

循環器疾患の診断、予防、治療の高度化が推進されるなか、これまで連続体として扱われてきた血液の流れは個々の細胞さらには細胞間の物理・生化学的な干渉にも踏み込んだシミュレーション型の研究が国内外で展開されはじめた。その実用化には、個々の血球細胞の挙動や変形をベースとした実験研究

により、細胞異常の発現を数値モデル化していくことが必要である。動脈疾患の病変部や治療後の合併症を患うケースには健常状態には見られない複雑な血流様式をよく観察できる。これまでの連続体スケールでの解析では、複雑流動のモデル化を達成することはできるが、時空間に局所的・過渡的に現れる渦や衝突といった要素流れのなかで、いつ、どこで、どのように細胞障害が発生している

のかを見極めることができない。これまでの血流試験法では、クエット流れなどの理想流れを用いたものが大部分であり、細胞とのインタラクションを追及する際にも、実験系そのものの限定により、せん断応力を中心とした定常単一負荷が主流となり、渦や衝突といったより現実的な非定常複合負荷に対する細胞応答に対しては知見が皆無に等しい。そこで、本研究では、要素流れのもつダイナミクスをマイクロチップ内に再現し、細胞スケールで現象をありのままに可視化するという新しい提案を行う。本研究では赤血球に着目し、個々の細胞が溶血（内包溶液の放出）に至る血流パターンを検証し、関連する物理因子とともに赤血球の破壊力学とその数値モデルの構築に向けたデータを蓄積する。

2. 研究の目的

赤血球の溶血は、通常、遊離ヘモグロビン（膜破壊により膜外放出された細胞内溶液）の濃度をエンドポイント的に光学計測する方法が主流である。しかしながら、この手法では、個々の細胞ベースで、いつ、どこで、どのように破壊が進行していくのかを時系列で計測することができない。それに対して、本研究では、溶血を画像解析する方法論を採用するが、これは世界に先駆けた新たな挑戦である。すなわち、高速度レーザー・カメラを駆使することで、個々の細胞スケールで、赤血球の膜破壊をリアルタイム計測する実験基盤を構築する。本研究に先駆けて、研究代表者は、ステレオ画像粒子計測法、連続ウェーブレット変換を駆使して、人工臓器内の乱流のモデル化を行ってきた。乱流による細胞破壊は、その研究の歴史は古いが、細胞スケールでの物理的解釈には到達しきれていない。この研究により、「高速流動する赤血球の衝突破壊」という新たな仮説を提唱した。半世紀に及ぶ研究史のなかで、赤血球破壊はせん断応力によるものと仮説が提唱されているが、近年のデータ（例えば、*Artificial Organs* 27(6): 517-529, 2003, *Biorheology*, 43: 747-765, 2006)を見ても、単純せん断応力のみで赤血球が破壊されるとは言い難い。本研究では、「高速流動する赤血球の衝突破壊」という仮説の実証を命題とし、衝突赤血球の破壊力学をモデル化することを目的とする。

3. 研究の方法

図1に本研究で使用した実験装置の概略図を示す。異なる健康者ボランティア（20~30歳、3名）の静脈より採血した赤血球を使用した。実験は採血後5時間以内に完了している。遠心分離により赤血球を抽出したのちに、リン酸緩衝水溶液（PBS）で個々の赤血球が

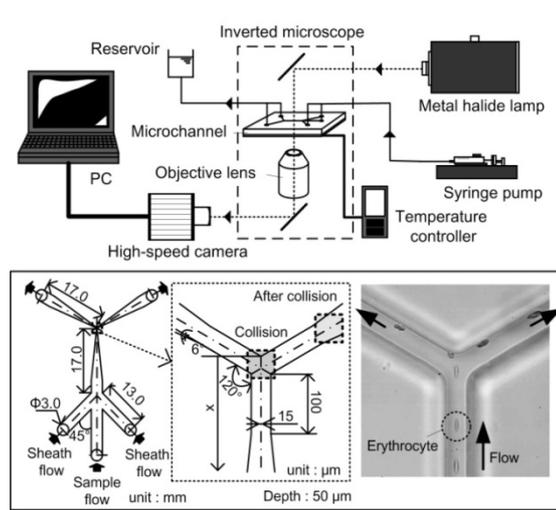


図1 実験装置図

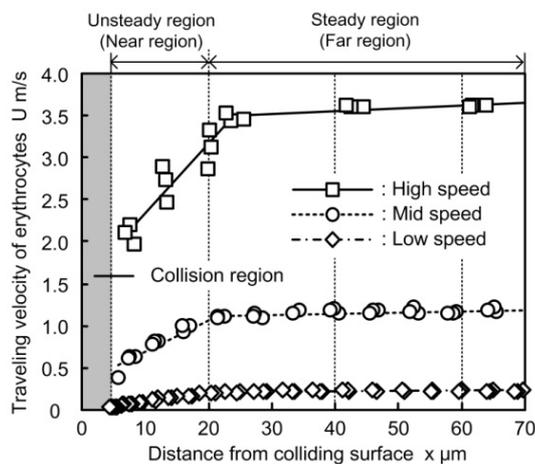


図2 赤血球の対流速度

識別可能なヘマトクリット値 1.0%に調整した。シリンジポンプ(PHD 22/2000, Harvard Apparatus)を用いてマイクロ流路内で赤血球を高速流動させる。流路にはシーフローが組み込まれており、赤血球同士が干渉することなく、一様に壁面に衝突させることができる。実験温度は37°Cに設定し、100倍対物レンズ(N.A=0.5, CFI Planfluor, Nikon)を取り付けた倒立型光学顕微鏡(ECLIPSE Ti-U, Nikon)と高速度カメラ(263Kfps, FASTCAM SA5, Photron)を用いて衝突動態のリアルタイムイメージングを行った。なお、ヒト血液の使用に関しては、早稲田大学倫理委員会の承認を得て行った。

4. 研究成果

(1) 高速流動する赤血球の形態

図2に赤血球の対流速度の分布を示す。壁遠方にて3.5(高速)、1.2(中速)、0.2 m/s(低速)

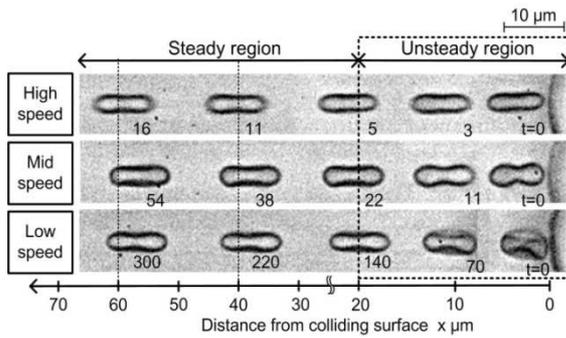


図3 対流速度に応じた赤血球動態の変化 (衝突直前まで、流れは左から右へ)

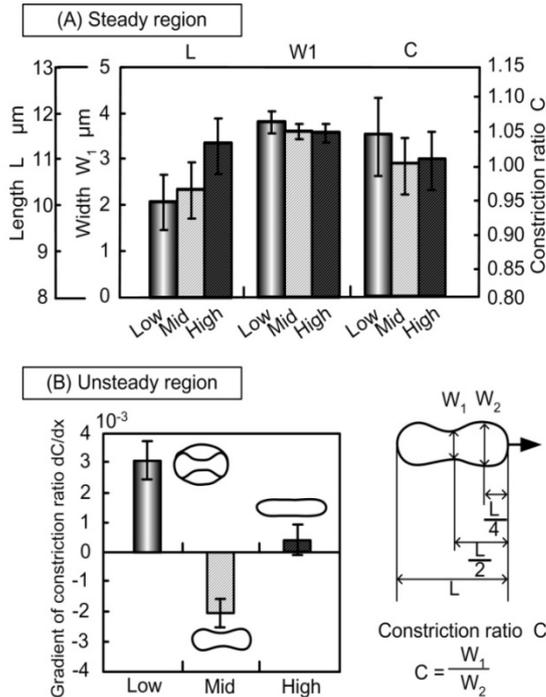


図4 対流速度に応じた赤血球形態の比較

の流速を比較した。高速は機械式心臓代用弁の閉鎖時に生じる逆流の最高速度に相当し、中速は一般的な血流速度、低速は健康者大動脈弁の閉鎖速度に相当する。以下、壁遠方(20 < x μm)で赤血球形態は定常的であったことから当該領域を定常領域とし、壁近傍(5 < x < 20 μm)を非定常領域と定義する。図3に衝突前の典型的な動態変化をまとめる。図中に示す数値は、衝突直前の時刻を t=0 としたときの時間(単位 μs)を表している。図4に定常・非定常領域における赤血球形状をまとめる。

①定常領域 (20 < x μm)

赤血球長さは低速に比して中速で 3%、高速で 13%増加するが、幅はほぼ一定の値を示しており、赤血球の伸長度は流速に応じて高くなることが明らかとなった。また、高・中速では共にくびれ率 $C \approx 1.00$ と膜が直線状の伸長状態を示しているのに対し、低速では $C \approx 1.05$ と丸みを帯びた非伸長状態を示した。

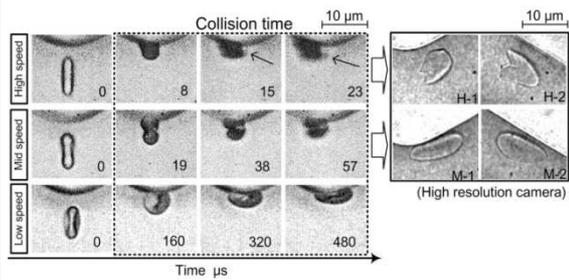


図5 対流速度に応じた赤血球の衝突動態

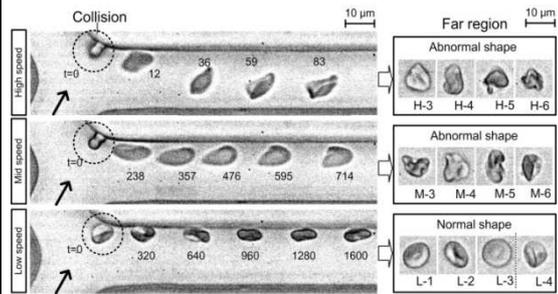


図6 対流速度に応じた衝突後赤血球の動態変化

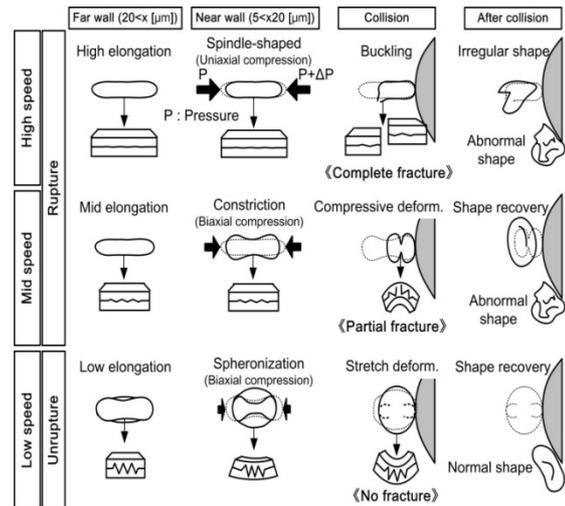


図7 衝突する赤血球の動態変化

表1 定常領域での E.I. (Elongation index)

	High speed	Mid speed	Low speed
E.I.	0.54	0.48	0.45

②非定常領域 (5 < x < 20 μm)

高速の場合、衝突壁近傍まで伸長状態を維持し赤血球は、長さ方向のみに圧縮される紡錘変形を示した。中速の場合、定常領域で伸長状態にあった赤血球は、長さ方向へ圧縮されるが、その時中央部の幅を一定にしながら、端部の幅が急激に増加する衝突形態をしめし、これをくびれ変形と定義した。一方、低速の場合、高・中速とは異なり、定常領域で丸みを帯びていた赤血球は圧縮とともに中

中央部の幅が急激に拡大していく衝突形態を示し、これを球状変形と定義した。非定常領域における赤血球の動態変化を識別するパラメータとしてくびれ率の変化 dC/dx を定義した。高速では当値は 0 に近い値を示しており、赤血球は幅方向への変形がみられないことを意味する。中速では負の値を示すことから、赤血球は圧縮と共にくびれを発達させ、低速では、正の値を示すことから、赤血球は幅方向に拡大変形することを意味する。これらにより、赤血球衝突動態を定量的に識別するパラメータの導出に成功した。

(2) 赤血球の衝突動態

図 5 に衝突時の赤血球動態を示す。高速では、壁近傍まで伸長を維持していた赤血球は、衝突時に座屈し内包溶液を放出しながら崩壊していく様子が確認された。中速では、壁近傍にてくびれ形状を示した赤血球は、衝突時には長さ方向に圧縮すると共にくびれ形状が顕著になった。一方低速では、壁近傍にて幅が急増し球形化した赤血球は、衝突時には幅方向にさらに伸展しながら圧縮される柔軟な変形挙動を示した。衝突直後の赤血球形状を高感度カメラにより高精細に観察したところ、高速で赤血球膜の破断が明らかになり、中速では、高速のような膜の破断は観察されなかった（後述するが、衝突後赤血球は異常形態を示していた）

図 6 に衝突後の赤血球動態と流路後方における赤血球形状を示す。図中に示す数値は、衝突時の時刻を $t=0$ としたときの経過時間(単位 μs)を表している。衝突後においても赤血球は流速に応じて異なる動態を示した。高速では壁面衝突した赤血球は反射し、輪郭がいびつな薄膜状になりながら流動する様子が確認された。中速では壁面衝突した赤血球は、高速に比して僅かであるものの反射し、急激に膜形状が薄膜状になりながら拡大するという動態を示した。低速では高・中速とは対照的に、赤血球は反射せずに衝突壁に沿いながら流動し、膜の輪郭も明確で立体的な形状を示していた。さらに流路後方における赤血球形状の観察を行った。高・中速では共に、膜が幾重にも折り畳まれたような形状を示す赤血球が全体の 9 割以上を占めており、赤血球の破壊が明らかとなった。一方低速では、両凹面型を有する赤血球が全体の 7 割以上を占めていた。

(3) まとめ

図 7 に衝突速度に応じた動態変化をまとめる。表 1 に定常領域における赤血球の E.I. (Elongation index)を示す。E.I.は赤血球の伸長度を表す指標として用いられ、次式により表

される (L :長さ, W :幅)。

$$E.I. = (L - W) / (L + W) \quad (1)$$

Zhao ら (Biorheology, 43: 747-765, 2006) は、E.I.をせん断応力 τ と関連づけ、 $\tau < 123$ Pa の領域ではせん断応力の増加に応じて E.I.が増加するのに対し、 $123 < \tau < 5170$ [Pa]の領域では約 0.54 で一定の値を示し、それ以上は増加しないと報告している。本実験における E.I.の値を確認すると、高速の場合には E.I.=0.54 という値を示しており、赤血球は極限伸長状態にあったと解釈することができる。

高伸長状態にある赤血球は膜に張力が働き、剛性が高まると考えられる。赤血球の伸長が膜の力学的特性にもたらす影響については赤血球膜骨格構造の分子シミュレーションにより解析が行われている。オハイオ大学の Ju Li ら (PNAS vol.104, 4937-4942, 2007) は、スペクトリン(膜骨格構造の一部)に歪みを与え、膜の伸長に伴い赤血球の剛性が高まるというデータを報告している。そのため、赤血球が高伸長状態にある高速の場合には、剛性が高まった状態で赤血球は流動していると考えられる。非定常領域においても伸長状態を維持した赤血球は、本来持つ柔軟性を失ったために衝突とともに座屈し、瞬時の膜崩壊に至ったと考えられる。これより、赤血球の伸長による剛性の高まりが衝突破壊を誘発する要因であることが示唆される。中速の場合には、定常領域で伸長状態にあった赤血球は、壁近傍でくびれ形状を示しながら衝突し、膜が部分的に破壊されたことで衝突後に膜の巨大化や異常形状を示したと考えられる。このような破壊動態の差異は、中速における赤血球の剛性が高速の場合に比して低いことに起因し生じたと考えられた。一方、低速の場合、定常領域において丸みを帯びた低伸長状態の赤血球は、膜張力が低く柔軟性に富んでいると考えられる。そのため衝突時に赤血球は膜を損傷することなく圧縮力を緩和し、衝突後には正常な両凹面型へと形状を回復したと考えられる。以上より、赤血球の衝突破壊は、せん断応力による膜の伸長による剛性の高まりから赤血球の本来持つ柔軟性が失われることに起因し生じると考えられた。本研究により、ヒト赤血球の衝突破壊動態を体系化することに成功した。赤血球破壊に関する実験研究は、本研究開始前まで旧態依然として、せん断応力が主因子であるという仮説に基づいていた。本研究により、世界で初めて赤血球破壊動態が明らかになり、赤血球破壊の因果関係を明らかにしていく準備が整ったと言える。本研究の途中成果を国際会議で発表したところ 600 人の候補者の中から Young Investigator Award 1st Prize を受賞することができた。赤血球の破壊の可視化に初め

て成功するという先駆的な研究成果を達成した。また、本研究の成果を足がかりに、計算力学との比較も開始されており、実験・計算の両輪による当該分野の更なる進展が期待される。

5. 主な発表論文等
〔雑誌論文〕(計3件)

- (1) T. Yagi, M. Umezu et al., Single-cell real-time imaging of flow-induced hemolysis using high-speed microfluidic technology, IFMBE Proceedings 25/IV, pp.2337-2340, 2009. (Young Investigator Award 1st Prize) 査読有
- (2) T. Yagi, M. Umezu et al., New challenge for studying flow-induced blood damage: macroscale modeling and microscale verification, ICBME 2008, Proceedings 23, pp.1430-1433, 2009. 査読有
- (3) S. Wakasa, T. Yagi, M. Umezu et al., Microscale visualization of erythrocyte deformation by colliding with a rigid surface using a high-speed impinging jet, ICBME, 2008, Proceedings 23, pp.1422-1425, 2009. 査読有

〔学会発表〕(計5件)

- (1) 秋元祐紀, 八木高伸, 関裕子, 木田大輔, 梅津光生, 超高速イメージングによる衝突速度に応じたヒト赤血球のリアルタイム破壊動態解析, 第23回バイオエンジニアリング講演会講演論文集, pp383-4, 第23回バイオエンジニアリング講演会, 2011, 熊本
- (2) T. Yagi, M. Umezu et al., High-speed microfluidic study of colliding human erythrocytes at a single-cell real-time scale, Proceedings of 6th World Congress on Biomechanics, 2010, Singapore
- (3) 徳永夏子, 八木高伸, 秋元祐紀, 関裕子, 梅津光生, 壁面衝突により座屈を伴い瞬時膜破壊に至る赤血球破壊のリアルタイム可視化計測, 第22回バイオエンジニアリング講演会講演論文集, pp208, 第22回バイオエンジニアリング講演会, 2010, 岡山
- (4) 八木高伸, 若狭翔太郎, 徳永夏子, 秋元祐紀, 梅津光生, 高速マイクロジェットを用いた壁面衝突する赤血球の圧縮変形と破壊現象の可視化計測, 計算工学講

演会論文集 Vol.14, 2009. 5, 東京

- (5) 八木高伸, 徳永夏子, 秋元祐紀, 関裕子, 梅津光生, 高速リアルタイムイメージングによる壁面衝突する個々の赤血球の衝撃・破壊解析, 第47回日本人工臓器学会大会予稿集, Vol.38, No.2, 2009, 仙台

〔その他〕

<http://www2.atword.jp/wasedahrc/archives/359>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

八木 高伸 (YAGI TAKANOBU)

早稲田大学・理工学術院・次席研究員

研究者番号: 00468852