

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：34416

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500532

研究課題名(和文) 赤血球の変形能の予測と評価モデルの開発

研究課題名(英文) Development of prediction and evaluation model of deformability of erythrocyte

研究代表者

板東 潔 (Bando, Kiyoshi)

関西大学・システム理工学部・教授

研究者番号：70156545

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：赤血球がマイクロチャンネルを通過する実験、および赤血球に対してマイクロピペットを用いた単軸引張実験のそれぞれに対応する数値シミュレーションを行った。その結果、前者では赤血球のマイクロチャンネル通過時間と形状回復時定数、後者では外力印加時の最大ひずみ、および外力からの解放後、変形が収束するまでの時定数より、赤血球の内部溶液の粘度や膜ヤング率の変化など、赤血球の変形能を評価できることを示した。また赤血球の生体外モデルとしてのマイクロカプセルを作製した。圧縮実験又は圧子押し込み実験と変形のモデリングを組み合わせることにより、マイクロカプセルの力学的特性(変形能)の評価が可能であることを示した。

研究成果の概要(英文)：Numerical simulations were performed corresponding to the following two experiments: an erythrocyte was passed through a micro-channel, and an erythrocyte was stretched uniaxially using micropipettes. As a result, it was shown that the evaluation of the change in the deformability of an erythrocyte is possible by examining the deformation behavior and that the deformability is influenced by the changes in the inner solution viscosity and the membrane Young's modulus of the erythrocyte. Microcapsule was produced as a model of in-vitro model of erythrocyte, and micro-plate compression experiment and indentation experiment using a sharp indenter were performed. It was shown that the mechanical properties, that is deformability, of a microcapsule are identified by fitting the force-displacement curves between the experiment and the deformation model calculation.

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：バイオメカニクス 医用工学 赤血球 マイクロカプセル 変形能 AFM マイクロマニピュレータ
力学特性評価

1. 研究開始当初の背景

赤血球の変形能とは、赤血球が自身より直径の小さな毛細血管などの微小血管を通過する時、自身を受動的に変形させる能力のことである。変形能が低下すると、微小血管における循環障害が起こり、そのため血液循環器系疾患が発症すると考えられる。現在社会問題となっている生活習慣病には高血圧、高脂血症、糖尿病があげられるが、これらの生活習慣病は赤血球の変形能が低下することと強い因果関係があるという報告が行われている。

赤血球の変形能を測定する方法としては、フィルター法がよく行われているが、研究室ではマイクロチャンネルを製作し、赤血球を通過させる実験を行っている。チャンネルの断面は1辺5 μm の正方形断面であり、赤血球はこの流路内をスリッパ状に変形しながら流路壁と準接触状態で通過するが、通過直後は広い空間内で流路通過前の初期自然形状に徐々に回復する。この形状回復過程において時定数を用いて変形能を評価すれば、赤血球の変形能を定量的に評価することが可能である。そして、この実験により、糖尿病患者の赤血球は健常者のそれと比べると変形能が低下しているという結果が得られた。一方、この実験に対応する数値シミュレーションを行っている。この計算では流れと赤血球膜の変形に対する連成問題を解く必要があるが、この計算を容易に行うことが可能な方法として、immersed boundary法を用いて赤血球の変形に関する数値シミュレーションを行っている。本計算は2次元計算である。そこで、この方法を3次元に拡張すれば、実際の赤血球の変形を模擬する数値シミュレーションが可能になり、赤血球の変形能を精度よく評価できると考えられる。

2. 研究の目的

赤血球は自身よりも直径の小さな毛細血管内を通過することが可能であるが、これは赤血球の高度に変形し得る能力に由来する。一方、高血圧、高脂血症、糖尿病など現在社会問題になっている生活習慣病は、赤血球の変形能が低下することと強い因果関係があるという報告が行われている。そこで、赤血球の変形能に関係する力学的メカニズムを解明することにより、変形能の予測と評価モデルを構築し、変形能を改善することが可能な医工学的方法を見出すことが本研究の目的である。

3. 研究の方法

赤血球の内部溶液の粘度と赤血球膜のヤング率の変化が赤血球の変形能に与える影響を調べるため、赤血球がマイクロチャンネルを通過する時間、およびマイクロチャンネル通過後に元の形状まで回復する時定数を数値シミュレーションにより求める。

静止流体中で赤血球の端をマイクロピペ

ットを用いて吸引して単軸引張りを行い、吸引を中止した後、赤血球が形状を回復する過程における時定数を求める計算と実験を行う。そして、赤血球膜のヤング率、赤血球内部溶液の粘度の変化が形状回復時定数に与える影響を調べる。

赤血球の生体外モデル、あるいは模擬赤血球としてアルギン酸-ポリエルリジン・マイクロカプセルを作製する。そして、変形能評価のため、マイクロマニピュレータに取り付けられた平板、および indenter によるマイクロカプセルの圧縮試験を実施する。同時に、変形の理論モデルを構築し、力と変位の関係、および変形形状について実験結果との比較を行う。

4. 研究成果

マイクロチャンネルを赤血球が通過する2次元数値シミュレーションを行った。赤血球の変形能を評価するための指標として、マイクロチャンネルを通過する時間 T 、およびマイクロチャンネルを通過した後の形状が回復する時定数 τ を選んだ。そして、赤血球の内部溶液の粘度 μ 、および膜のヤング率 E を変化させて計算を行った。その際、 μ と E の値の基準としては、健常者のそれらを用いた。そして、 μ および E とともに、これらが増加することは変形能の低下を意味する。計算の結果、 μ についてはこれが増加すると、 T および τ とともに増加する結果となった。一方、 E については、これが増加すると、 T は増加するが、 τ は減少する結果となった。なお、この τ の変化の傾向は、実験結果と同じ傾向を示した。以上の結果より、健常状態での T と τ を測定しておき、糖尿病などにより硬化の可能性が考えられる赤血球に対して T と τ の両方を測定すれば、両方の結果を組み合わせることにより、赤血球の硬化の程度が評価できる可能性があることを示した。

赤血球の両端をマイクロピペットで反対方向に吸引して引っ張る実験を行った。引っ張り力は、ピペット内部の圧力とピペット先端の面積の積により求めた。そして、力と変位の関係を測定した。このデータより赤血球全体の見かけのヤング率を求めた。また、吸引後に赤血球を離れた時の、形状が元に回復する過程での時定数を測定した。これらの値はともに大きいほど、変形能が低下していることを示す。したがって、マイクロピペットを用いた単軸引っ張りにより、赤血球の変形能が評価できることを示す。

赤血球の単軸引っ張りに対する、2次元および3次元の数値シミュレーションを行った。その際、赤血球膜のヤング率 E と赤血球内部溶液の粘度 μ を変化させて計算を行った結果、以下のことを明らかにした。(1)シミュレーションにおける赤血球の変形形状は、実験から得られた赤血球の可視化形状と同様であった。(2)健常を想定した赤血球に100pNの引張力を印加した場合、引っ張り方向の最

大ひずみは、二次元シミュレーションにおいては実験値より小さい値となったが、三次元シミュレーションでは二次元シミュレーションより大きな値となり、実験値と同程度の値となった。(3)引っ張り力を印加した時、あるいは解放した時の赤血球の変形はある時間経過後に収束した。そして、その時のひずみは赤血球膜のヤング率の増加に伴い減少し、赤血球内部溶液の粘度の影響はほとんどなかった。(4)変形の収束までに要する時間は、赤血球膜のヤング率の増加に伴い減少し、赤血球内部溶液の粘度の増加に伴い増加した。以上の結果より、変形が収束するまでの時定数と外力を与えた際の最大ひずみより、赤血球内部溶液の粘度と膜ヤング率の変化を推定できる可能性を示した。

赤血球の単軸引っ張りの三次元数値シミュレーションは精密な結果が得られるが、長い計算時間を必要とする欠点がある。そこで、軸対称変形と仮定した近似計算を行った。そして、得られた力と変位の関係を実験結果、および三次元の数値シミュレーションの結果と比較した。この計算による赤血球膜のヤング率の同定計算の結果によると、60%ほど過大に評価されることが明らかとなった。ただし、この補正を行うと、実用的な計算法により、赤血球膜の弾性特性が把握できることを示した。

赤血球の生体外モデルとして、あるいは人工赤血球への応用を目的として、アルギン酸-ポリエルリジン-アルギン酸 (APA) マイクロカプセルを作製した。作製したマイクロカプセルの直径は200-300 μm であるが、電気流体力学的噴霧法を用いて、コーンジェットモードでアルギン酸ゲル微粒子を作製する方法を用いれば、直径10 μm 程度のマイクロカプセルを作製することができた。そこで、これらのマイクロカプセルの力学特性を評価するため、原子間力顕微鏡 (AFM) を用いた円錐圧子の押し込み試験を行った。そして、得られた結果にHertzの接触理論を適用することにより、マイクロカプセル膜のヤング率を求めた。ただし、マイクロカプセルの膜は高分子ゲル膜であるため、そのポアソン比の値は0-0.5の値を取ると考えられる。そこで、この範囲でのポアソン比に対するヤング率を求めた。

次に、マイクロカプセルに対し、2枚の平行平板を用いた圧縮、および尖った圧子 (indenter) の押し込み実験を行った。そして、力と変位の関係、および変形形状を測定した。なお、直径がほぼ10 μm のマイクロカプセルの平板圧縮については、スケールの小さな平板を以下のように作製した。まずガラス管をマイクロピペットテンションを用いて加熱しながら針状に引き伸ばし、次にマイクロピペットファーネスを用いてピペット先端を融解して穴を塞ぎ、研磨機を用いて平面状に研磨を行った。

これらの圧縮および押し込み実験の測定

データを用いて、逆解析の手法により、マイクロカプセルの力学的特性評価を行った。

まず、直径200-300 μm のマイクロカプセルを平行平板で圧縮する場合の変形のモデリングを行った。計算を簡単化するため、膜張力は一様と仮定した。また、AFMの押し込み試験から求めた膜のヤング率を計算におけるデータとして用いた。計算から求めた力-変位の関係は、変位の小さな領域では実験結果を下回ったが、変位の大きな領域では、実験結果と一致する結果となった。また、変形形状については、実験と計算とで変位を一致させて比較すると、変形形状は両者でほぼ一致した。

次に、直径がほぼ10 μm のマイクロカプセルの平板圧縮のモデリングにおいては、膜の初期伸長を考慮した。この初期伸長は主にマイクロカプセル内外の浸透圧差によって生じると考えられる。したがって、初期伸長が同定されれば、ラプラスの式より浸透圧を推定することが可能となる。なお、マイクロカプセル内部の溶液の浸透圧は、そのスケールの小ささより測定することは困難である。実験より求められた力-変位の曲線に対して、計算より求まる力-変位曲線をフィッティングする。その際、モデリングでは膜の透過性を考慮していないため、両者の力-変位曲線は、変位が中程度の部分まで一致し、変位が大きな部分では実験値が計算値を下回るようにフィッティングを行った。これは変位の大きな領域では、大きな圧縮力によって生じる大きな経壁圧により内部流体が外部に透過し、圧縮力が減少するためである。

以上のような方法により、マイクロカプセルの膜のヤング率、初期伸長、さらには浸透圧の評価を行うことが可能であることを示した。直径が10 μm 程度のマイクロカプセルは人工赤血球として医療応用することが可能である。ただし、マイクロカプセル内部にヘモグロビンを内包させ酸素運搬機能を持たせることが必要であるが、これは今後の課題である。

次に、直径が200-300 μm のマイクロカプセルを先端が尖ったマイクロピペットで押し込む実験に対するモデリングを行った。その際、押し込まれたへこみ部は通常円周方向にリンクルし、周方向の張力がほぼゼロとなる。そこで、軸対称膜の平衡方程式において、このようなモデリングを行い、膜の変形解析を行った。なお、実験では無次元変位がほぼ0.3の時、圧子が膜を突き破った。そして、力-変位の実験曲線を計算によりフィッティングすることにより、膜の初期伸長が評価できることを示した。尖った圧子を用いたマイクロカプセルへの押し込みは、マイクロピペットを用いた細胞へのマイクロインジェクションと同様であるため、細胞の変形形状から力を推定する、あるいは細胞膜の貫通に必要な力を求めるという目的のために、本計算法を適用することが可能であると考えられる。

また、実験では力-変位の関係に負荷時と除荷時でのヒステシスが生じる。このヒステシスは膜からの流体透過に起因することがわかっている。従って、このヒステシスより膜の流体透過率を同定することが可能であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

- (1) K. Bando, Compressive deformation analysis of alginate-poly(L)lysine-alginate microcapsule, *Journal of Biomechanical Science and Engineering*, Vol.8, pp. 40-48, 2013, 査読あり.
- (2) K. Bando, Y. Oiso, Indentation analysis of microcapsule with initial stretch, *Journal of Biomechanical Science and Engineering*, Vol.8, pp. 268-277, 2013, 査読あり.
- (3) K. Bando, K. Ohba, Y. Oiso, Deformation analysis of microcapsules compressed by two rigid parallel plates, *Journal of Biorheology*, Vol. 27, pp. 18-25, 2013, 査読あり.
- (4) A. Kase, K. Bando, K. Ohba, Effects of inner solution viscosity and membrane stiffness on erythrocyte deformability on passing through a microchannel: prediction by two-dimensional simulation, *Journal of Biorheology*, Vol. 25, pp. 36-42, 2011, 査読あり.

〔学会発表〕(計14件)

- (1) 山口洋平, 板東潔, アルギン酸-ポリエルリジン・マイクロカプセルの弾性特性の測定と解析, 第26回バイオエンジニアリング講演会, 宮城(東北大学), 2014.1.11.
- (2) 永井勇大, 加藤陽介, 板東潔, 加瀬篤志, 郡慎平, 田地川勉, 赤血球の単軸引張に関する変形解析および実験, 第18回関西大学先端科学技術シンポジウム, 大阪(関西大学), 2014.1.24.
- (3) 加藤陽介, 郡慎平, 田地川勉, 板東潔, 単軸引張によるヒト赤血球の変形能の測定-過度の繰り返し伸展変形が形状回復過程に及ぼす影響-, 第26回バイオエンジニアリング講演会, 宮城(東北大学), 2014.1.11.
- (4) A. Kase, T. Ichikawa, K. Bando, Numerical simulation of erythrocyte deformation behavior under the uni-axial stretching in static fluid, The 12th International Conference on Fluid Control, Measurements, and Visualization, Nara (Nara Prefecture New Public Hall), Japan, 2013.11.21.
- (5) 市川智紀, 加瀬篤志, 板東潔, 単軸引張から解放された赤血球の変形挙動に関する3次元数値シミュレーション, 第24回バイオフロンティア講演会, 京都(同志社大学), 2013.11.2.

- (6) 板東潔, 弾性膜理論を用いたマイクロカプセルの圧縮変形の解析, 第62回理論応用力学講演会, 東京(東京工業大学), 2013.3.8.
- (7) 山口洋平, 田地川勉, 板東潔, アルギン酸-ポリエルリジン・マイクロカプセルの弾性特性の測定, 第17回関西大学先端科学技術シンポジウム, 大阪(関西大学), 2013.1.30.
- (8) 加藤陽介, 郡慎平, 田地川勉, 板東潔, 単軸引張から解放されたヒト赤血球の形状回復時定数の測定-引張力から求めた見かけのヤング率と時定数の関係-, 第17回関西大学先端科学技術シンポジウム, 大阪(関西大学), 2013.1.30.
- (9) 加瀬篤志, 市川智紀, 板東潔, 単軸引張の印加・解放時の赤血球の変形挙動に関する数値シミュレーション, 第17回関西大学先端科学技術シンポジウム, 大阪(関西大学), 2013.1.30.
- (10) 加瀬篤志, 板東潔, 大場謙吉, 赤血球の変形動態に関する数値シミュレーション-赤血球内部溶液の増粘および赤血球膜の硬化の影響-, 第16回関西大学先端科学技術シンポジウム, 大阪(関西大学), 2012.1.23.
- (11) 三島惇, 田地川勉, 板東潔, 大場謙吉, アルギン酸-ポリエルリジン・マイクロカプセルの球殻弾性率の測定, 日本機械学会関西支部第87期定時総会講演会, 大阪(関西大学), 2012.3.17.
- (12) 白井健司, 加瀬篤志, 田地川勉, 板東潔, 大場謙吉, 単軸引張から解放された赤血球の変形挙動に関する数値シミュレーション, 日本機械学会関西支部第87期定時総会講演会, 大阪(関西大学), 2012.3.17.
- (13) 板東潔, 大場謙吉, 大磯勇太, 九鬼弘平, マイクロカプセルの圧縮変形の解析, 第50回日本生体医工学会大会, 東京(東京電機大学), 2011.4.29.
- (14) A. Kase, K. Bando, K. Ohba, Two-dimensional numerical simulation of the behavior and deformation of erythrocyte passing through a microchannel, 8th International Conference on Flow Dynamics, Sendai (Hotel Metropolitan Sendai), Japan, 2011.11.10.

〔図書〕(計1件)

- (1) 板東潔(共著), ナノ・マイクロカプセルの調整・評価・応用, 技術情報協会, 2014(印刷中).

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
板東 潔 (BANDO, Kiyoshi)
関西大学・システム理工学部・教授
研究者番号: 70156545
- (2) 連携研究者
大場 謙吉 (OHBA, Kenkichi)

関西大学・システム理工学部・教授

研究者番号：30029186

(定年退職により 2012 年度より割愛)

田地川 勉 (TAJIKAWA, Tsutomu)

関西大学・システム理工学部・専任講師

研究者番号：80351500