

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 14 日現在

機関番号：12401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26560201

研究課題名(和文)微量ヘモグロビンの触媒化学発光ピコフォトセンシングによる単体赤血球溶血条件の定量

研究課題名(英文)Quantification of hemolytic conditions using pico-photo sensing of chemoluminescence caused by hemoglobin leakage

研究代表者

中村 匡徳 (NAKAMURA, Masanori)

埼玉大学・理工学研究科・准教授

研究者番号：20448046

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：1)赤血球破断ひずみ：赤血球を顕微鏡下にて単体で引張り試験を行った。破断ひずみは、平均で3～4程度であり、最大で5.32であった。

2)赤血球引張り試験の把持位置が破断ひずみに与える影響：赤血球を正対する位置から把持する場合に比べて、ずらして把持した場合は、膜面上の最大第一主ひずみは3倍以上大きくなり、赤血球の中央以外に応力集中することがわかった。

3)溶血の可視化：赤血球をルミノール溶液中で破壊した。光をEM-CCDカメラで捉えたところ、赤血球の位置と発光位置が重なった。これにより、EM-CCDカメラによりルミノール反応から溶血発生位置を検知することができることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：1) Fracture strain of a red blood cell (RBC): Tensile tests of a RBC were implemented under a microscope. The fracture strain was mostly ranged from 3 to 4, and was 5.32 at maximum.

2) Effects of the hold position on RBC strain behavior during tensile tests: Numerical examinations of tensile tests revealed that significant variations in the deformed geometry of RBC during the tensile test, as well as variations in strain distribution. Of the hold patterns examined, with an applied strain of 0.8, the misaligned stretch increased the maximum of the first principal strain by 65-85% in comparison to the aligned stretch.

3) Visualization of hemolysis: Luminol reaction was utilized to visualize the occurrence of hemolysis. A hypotonic luminol solution was then injected to the channel where RBCs were placed. An EM-CCD camera showed strips of light extending downstream from the positions where the RBCs had been, indicating the success of capturing the instance of hemolysis at a RBC scale.

研究分野：バイオメカニクス

キーワード：溶血 赤血球 引張り試験

## 1. 研究開始当初の背景

溶血とは赤血球からのヘモグロビン漏出である。ヘモグロビンは一酸化窒素と不可逆的に結びついてそれを無能化することから、溶血は血栓症、嚥下障害、肺高血圧症、男性機能不全などを引き起こすことが明らかになってきた (Rother et al. JAMA 2005)。このことから、溶血は長期使用を目的とした医療機器において看過できない問題として捉えられ、設計上の重要項目となっている。

これまでに、一定の流体負荷を血液に与えた際のヘモグロビン漏出量を計測することにより、流体負荷と溶血量との関係を記述する実験式を求め、これを溶血予測に用いる研究が多くなされてきた。しかしながら、この溶血予測は定量的精度に問題があり、実用上使用に耐えない。

近年、溶血は赤血球の完全断裂ではなく、膜の局所過伸展によって生成される微小な裂孔からヘモグロビンが漏出することでも生じることが明らかになった (Koshiyama et al. J Biomech, 2011)。すなわち、溶血発生の力学的条件を同定するためには、赤血球が完全に破断する破断強さを調べるのではなく、膜裂孔生成の力学的条件を定量化しなければならない。

## 2. 研究の目的

赤血球単体に対して引張り試験を行うことで、膜破断ひずみを明らかにする。しかしながら、溶血が生じる微小膜裂孔を直接可視化することは不可能である。そこで、ルミノール反応を利用して、裂孔から漏出するヘモグロビンにより誘起される化学発光を捉え、裂孔生成を検知する方法を考案し、将来的に引張り試験での膜破断検知に使用できないか検討する。また、計算力学的解析により、引張り試験時の把持位置が破断ひずみ等に与える影響について明らかにする。これらにより、溶血が生じる力学的条件について、赤血球単体にて定量的に明らかにすることを試みる。

## 3. 研究の方法

### (1) 赤血球引張り試験による膜破断条件の検討

赤血球引張り試験の模式図を Fig. 1 に示す。倒立顕微鏡 (IX71, オリンパス) の一方に粗動マニピュレータ (MN-4, ナリシゲ), もう一方には液圧マニピュレータ (MMO-202ND, ナリシゲ) が取り付けられている。液圧マニピュレータの先には、赤血球吸引のための空圧式マイクロインジェクタ (IM-11-2, ナリシゲ) が取り付けられている。接眼レンズ部には CMOS カメラ (DMK22BUC03, The Imaging Source) が取り付けられ、試験の様子はモニタにて観察される。

本実験において、主に赤血球の固定にガラスニードル (以下、ニードル), 把持にマイクロピペット (以下ピペット) を用いた。以下、ニードルを取り付けた側を固定側、ピペ

ットを取り付けた側を操作側と呼ぶ。ピペットとニードルは、材料であるガラス管 (G-1, ナリシゲ) をプーラ (G-10, ナリシゲ) とマイクロフォージ (MF-900, ナリシゲ) で加工を施すことで作製した。ピペットは、赤血球を吸い込んでしまわないように先端内径が  $2\sim 3\ \mu\text{m}$  になるように加工した。ニードルは、先端の外径が  $5\sim 10\ \mu\text{m}$  になるように加工した。

健康人から血液を採取し、PBS を加え遠心分離機で数回洗浄した。洗浄後、上澄みを取り除いたものから  $5\ \mu\text{l}$  の赤血球を取り、これを  $7\ \text{ml}$  の PBS に加え、赤血球懸濁液を作製した。本実験は埼玉大学におけるヒトを対象とする研究に関する倫理規則 (承認番号 H26-10) に則って行った。

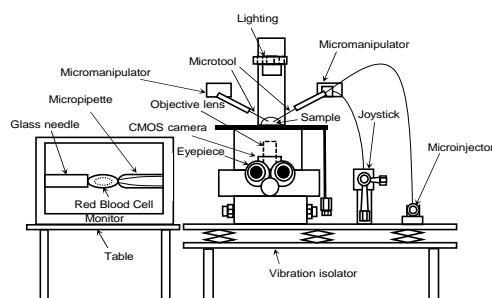


Fig. 1 A tensile test system

マニピュレータに取り付けたニードルとピペットの先端に接着剤を塗布した後、両者を赤血球懸濁液に挿入した。空圧式マイクロインジェクタを操作してピペットの先端に微弱な吸引圧を発生させ、懸濁液中に浮遊している赤血球を吸引・把持した。把持した赤血球を固定側に押し付け両端から固定した。その状態で数分間接着剤の硬化を待たせた後、操作側のみを移動させて引張りを行った。一連の実験手順の中で、接着剤を空気に触れさせてから懸濁液中に挿入するまでの時間を空气中硬化時間  $T_a$ , ピペットとニードルが懸濁液中に挿入されてから赤血球を固定するまでの時間を水中硬化時間  $T_w$ , 赤血球を固定してから引張りを行うまでの時間を赤血球固定時間  $T_f$  とした。

赤血球の変形量の指標として、赤血球全体のひずみ  $\varepsilon$  を  $\varepsilon = (L - L_0) / L_0$  として評価した。ここで  $L_0$  は引張りを始める直前の赤血球の長さを示し、 $L$  は赤血球がピペットやニードルから剥離する直前の長さを示している。

### (2) ルミノール発光反応発生条件の同定

化学発光を用い個々の赤血球より漏洩するヘモグロビンを発光として検出することを試みた。ルミノール反応は、ルミノールと過酸化水素の混合溶液にヘモグロビンを加えるとルミノールがアミノフタル酸の励起状態となり、これが基底状態に戻る時に青色発光を示す化学発光現象である。この原理に基づくと、ルミノール溶液中で赤血球が溶血した際に膜外に漏洩するヘモグロビンが触

媒となり化学発光がおきる。即ち、この発光を計測することでヘモグロビンの漏洩を検知することができる。

Fig.2 に本研究で使用した実験装置の概略図, Table1 に実験条件を示す。Fig. 3 に本研究で使用した実験装置の概略図, Table1 に実験条件を示す。本実験では Fig. 4 に示すマイクロ流路内において個々の赤血球を浸透圧により溶血させ、高感度カメラ (ixonDU897E-CSO, Andor Technology)を用い発光検出を行った。等張液(リン酸緩衝水溶液)で満たされたマイクロ流路に健常者ボランティアの静脈血より抽出した赤血球(採血後5時間以内)を入れ、流路底面に静置固定した。これにシリンジポンプ (PHD22/2000, Harvard Apparatus)を用いて浸透圧を 80mOsm 以下に調整した低張ルミノール溶液を流入した。流入溶液との浸透圧差により赤血球は溶血した。これにより漏洩するヘモグロビンを触媒とした発光は倒立型光学顕微鏡 (ECLIPSE Ti-U, Nikon)と高感度カメラを用いて検出した。

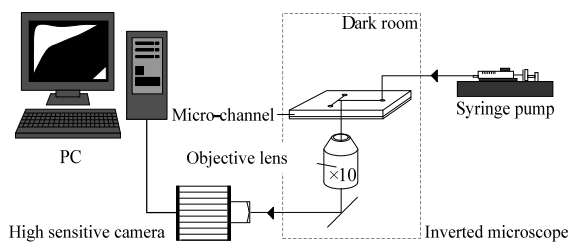


Fig.2 Schematic diagram of experimental setup

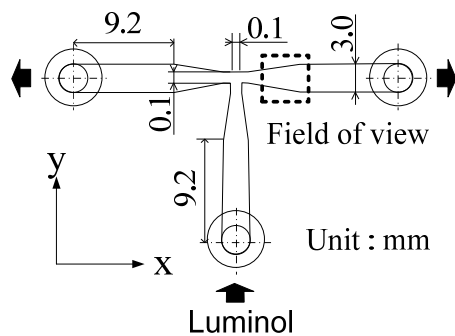


Fig.3 Schematic diagram of micro-channel

Table1 Experimental condition

Blood sample		healthy human blood	
Influent	Solute	Luminol	1 mmol/L
		Hydrogen peroxide	10 mmol/L
	pH	12.6 (±0.2)	
	Osm. Pre.	under 80 mOsm	
Observation magnification		10	
Velocity		1mm/sec at observation domain	
Exposure time		1 sec	
Field of view		819*819 μm	

(3)把持位置が赤血球膜面状態に与える影響  
赤血球引張り実験において、把持位置を正確にコントロールすることは困難である。そこで、赤血球を引っ張るとき、把持する位置によって赤血球の変形がどのように変化するか調べた。

赤血球の力学モデルには、ばね - 質点系で表される力学モデル (Nakamura et al IJNMBE, 2014) を用いた。流体及び赤血球の運動は、流れの支配方程式である連続の式と Navier-Stokes 方程式に従うとし、これらを解くことにより連成計算を行った。

Fig. 4 に示すように、赤血球モデルの厚さ方向に  $x$  軸、幅方向に  $y$  軸、高さ方向に  $z$  軸を有する直交座標系  $(x, y, z)$  を定義する。この赤血球を (a)  $y$  座標が最大値、最小値をとる両端の 2 点、(b)  $y$  座標の最小値と、 $+y$  方向の把持位置を  $+z$  方向にずらした 2 点、(c)  $y$  座標の最小値と、 $+y$  方向の把持位置を  $+x$  方向にずらした 2 点で把持し、両側から、 $y$  の正と負の方向に同時に赤血球を引っ張った。

外部流体及び赤血球内部流体の密度を  $1.0 \times 10^3 \text{ kg/m}^3$ 、動粘性係数を  $1.0 \times 10^{-6} \text{ m}^2/\text{s}$  とした。赤血球の外部には  $19.5 \times 54.5 \times 19 \text{ μm}$  の直方体を構成するように流体粒子を配置した。粒子間距離は  $5.0 \times 10^{-7} \text{ m}$  とした。引張速度は  $2.0 \times 10^{-2} \text{ m/s}$  を与え、準静的計算を行った。流体計算における境界条件として、 $x, y, z$  軸方向に周期境界条件を設定した。変形した赤血球の  $y$  座標の最大値と最小値の差から算出した赤血球膜面全体のひずみを、引張りひずみ  $\epsilon$  として解析を行った。

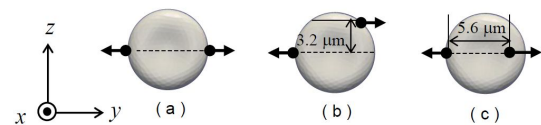


Fig. 4 Holding positions of the red blood cell

#### 4. 研究成果

##### (1) 赤血球引張り試験による膜破断条件の検討 接着条件の検討

###### A. 接着剤の選定

細胞とガラスを接着させる目的ではウレタン樹脂系接着剤(以下、ウレタン)とエポキシ樹脂系接着剤(以下、エポキシ)が主に使用される。本実験では、それら2種類の接着剤を使用し、引張り試験を行った。それぞれの結果の中で最も大きな  $\epsilon$  の値を比較することにより、接着条件の良し悪しを評価した。

B. ウレタン接着剤による引張り試験の結果及び考察  
ウレタン(発泡ウレタン, ボンド商事)を用いて引張り試験を行った。そのとき最も赤血球を伸長できた例を Fig. 5 に示す。(a) は引張り直前、(b) は赤血球がニードルから剥離する直前の様子である。この時の条件は  $T_a = 300$  秒、 $T_w = 60$  秒、 $T_f = 600$  秒であった。また、 $\epsilon$  の値は 3.44 であった。しかしながら、この他の実験では  $\epsilon = 3$  以上の結果は得られなかつ

た．本実験において，操作側で把持した赤血球を固定側に押し付ける工程を円滑かつ正確に行うには，実験者に技量や経験が必要となる．その他に，接着剤の塗布量などが接着条件に影響を及ぼす．これらの要因のために，全く同じ接着条件で引張試験を行うことは困難であったことが実験の再現性に欠けた原因であったと考えられる．

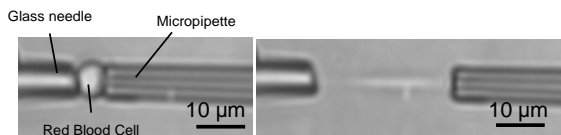


Fig. 5 Snapshots of a red blood cell during the tensile test when urethane is used for a glue. (left) before stretch (right) before detachment

### C．エポキシ接着剤による引張試験の結果及び考察

二液混合型のエポキシ（ハイスーパー5，セメダイン）を用いた．このエポキシは主剤と硬化剤を混合することで硬化反応が開始する．空気中では混合後約300秒で硬化が開始した．

混合後のエポキシをすぐにニードルとピペットへ塗布し，懸濁液中で赤血球の接着を行ったが，接着力が得られなかった．エポキシは硬化反応中に過剰な湿気に晒されると接着性を失う．そのため，混合直後に水に触れたエポキシでは，強固な接着が得られなかったと考えられる．そこで，空気中におけるエポキシの硬化反応の進行と水中での接着性について検討を行った． $T_w$ をおよそ90秒， $T_f$ を600秒に統一し， $T_a$ を210秒から390秒に変化させて引張試験を行った．そのときの $T_a$ と $\varepsilon$ の関係をFig. 3に示す．Fig. 6において，横軸が $T_a$  [sec]，縦軸が $\varepsilon$  [-]である．このとき， $T_a$ と $\varepsilon$ の寄与率は0.564となり，両者の間に正の相関が認められた． $T_a=270$ 秒以下の場合， $\varepsilon=1.5$ 以上の変形は得られず，すぐに固定側から赤血球が剥がれてしまった． $T_a=330$ 秒の時， $\varepsilon=2.0$ 以上の変形が観察された．これは，懸濁液中にニードルとピペットを挿入した際，硬化反応がある程度進行していたためだと考えられる．

エポキシによる赤血球引張試験において， $T_a$ が長いほど接着力が高く，300秒から360秒付近において最も接着力が高くなる可能性が見られた．

#### 赤血球固定用治具の検討

##### A．固定側治具の検討

のいずれの接着条件においても，赤血球がニードルから剥がれることが多く，ピペットの接着力がニードルを上回っていた．ピペットは赤血球をある程度吸引しており，赤血球周囲をチャッキングするように接着がなされていたことが原因の一つと考えられる．このことから，固定側のニードルをピペットに変更し，赤血球の両端をピペットで

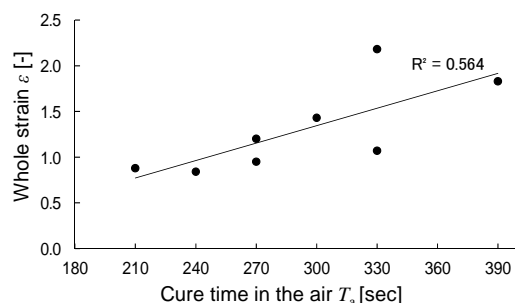


Fig. 6 Plots the whole strain against the cure time in the air when an epoxy is used for a glue

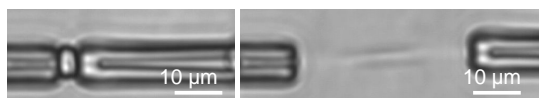


Fig. 7 Snapshots of a RBC during the tensile test when a pipette is used for fixation (left) (a) before stretch and (b) Before detachment

固定して引張試験を行った．接着剤はウレタン，エポキシの両方を使用し，それぞれについて検討を行った．

##### B．実験結果及び考察

はじめにエポキシを用いて実験を行った． $T_a=330$ 秒で実験を行ったところ，毛細管現象によって固定側のピペットに塗布したエポキシの塊を懸濁液が貫通してしまった．その結果，固定側のピペットに吸引力が発生し，赤血球が吸い込まれてしまった．原因として，エポキシの硬化反応が不足し，粘度が低かったことが考えられる．そこで， $T_a$ を長く確保して実験を行った． $T_a=480\sim540$ 秒のとき，毛細管現象によって固定側のピペットに懸濁液が侵入したが，エポキシの塊を貫通せず，ピペットが水中に挿入されてから4分以上をかけて吸引は停止した．固定側のピペットの吸引が停止してから赤血球の接着を試みたが，接着させることはできなかった．この固定方法にエポキシを用いるには， $T_a$ を更に長く確保する必要があると考えられる．

ウレタンを用いた場合， $T_a$ をおよそ300秒， $T_w$ を90～120秒， $T_f$ を600秒として引張試験を行ったとき，固定側でほとんど接着力が得られなかった． $T_f=900$ 秒のとき， $\varepsilon=1.27$ の変形が見られたが， $T_f=600$ 秒の場合と同様に固定側から赤血球が剥離し，赤血球膜の破断には至らなかった． $T_f=1200$ 秒，1800秒のとき， $\varepsilon$ が3を超える赤血球の変形が観察された．赤血球を最大に伸長できたときの様子をFig. 7に示す．これは $T_f=1800$ 秒で引張った結果であり， $\varepsilon=5.32$ であった．剥離後，数秒で赤血球は薄くなり観察できなくなった．これは，赤血球の一部が損傷したことによって内部のヘモグロビンが漏出した結果であると推察される．

##### まとめ

接着剤としてウレタンとエポキシを使用し，固定側治具としてニードルとピペットを



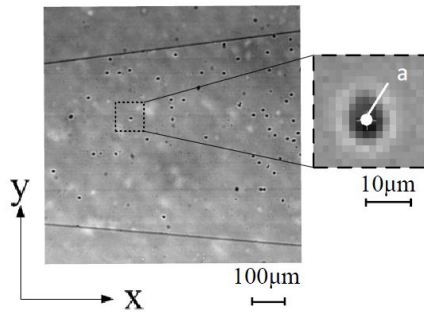


Fig. 8 RBCs at the bottom of the channel.

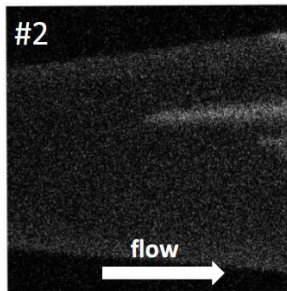


Fig. 9 Luminescent image

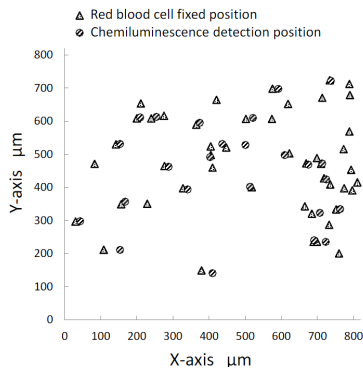


Fig. 10 Comparison of the position between RBCs and chemiluminescence detection

使用し、これらを組み合わせた4つの固定方法で引張試験を行った。この中で、固定側と操作側の両方にピペットを、接着剤にウレタンを用いて、かつ、 $T_f = 30$ 分とした場合に、最も赤血球を長く引張ることができた。

## (2) ルミノール発光反応発生条件の同定 単体赤血球溶血可視化実験

Fig. 8 に等張液中において流路底面に静置固定された赤血球位置を示す。流路底面に赤血球が分散していることが確認された。

Fig. 9 に流路内において発光を検出した画像の一例を示す。流路が存在する位置の特定領域において、帯状の発光現象が取得されていることが確認された。また、発光領域は流れ上端を起点とし流れ方向へと拡散していることが確認された。

発光検出位置と赤血球固定位置の関連について検討を行った。Fig. 8 a 部のように各赤血球の中心座標を赤血球固定位置とした。また、Fig. 9 部のような発光画像における流れ上流方向の端点座標を発光検出位置とし、発

光が確認された全画像より位置座標を取得した。以上より得られた位置座標の解析結果を Fig. 10 に示す。これを見ると、何れの発光検出位置も赤血球固定位置と近接していることが確認された。また、近接する発光検出位置と赤血球固定位置の平均距離は  $16\mu\text{m}$  であった。以上の結果から、本実験において取得された発光は個々の赤血球より漏洩するヘモグロビンを触媒とした発光であると考えられた。

### まとめ

化学発光を用い個々の赤血球より漏洩するヘモグロビンの検出を行った。その結果、流路の特定領域における発光画像を取得した。また、発光起点は個々の赤血球が存在する位置にて平均  $16\mu\text{m}$  の誤差範囲内で確認された。これより、化学発光を用いた溶血可視化法は個々の赤血球より漏洩するヘモグロビンの検出が可能であると推定された。

## (3) 把持位置が赤血球膜面状態に与える影響 結果と考察

把持位置を変化させて、赤血球の引張シミュレーションを行った時の、赤血球膜面上の第一主ひずみの分布を Fig. 11 に示す。Fig. 11 における(a), (b), (c)は、Fig. 4 に示した(a), (b), (c)にそれぞれ対応している。共通して、第一主ひずみは赤血球の中央部よりも、把持部に近い位置に集中している。Fig. 11(b)では  $+z$  方向に第一主ひずみが特に集中しており、 $-z$  方向には第一主ひずみはあまり見られなかった。また、Fig. 11(c)では、 $+x$  方向に第一主ひずみが特に集中しており、 $-x$  方向には第一主ひずみはあまり見られなかった。(a)の把持位置における引っ張りに比べると、(b), (c)の把持位置における引っ張りでは、把持位置がずれた方向に第一主ひずみが集中することがわかった。つまり、把持位置の偏りは、第一主ひずみの分布に遍在性を生むことが示唆された。

(a), (b), (c)の把持位置における、赤血球膜面上の最大第一主ひずみの値を比較する。各把持位置において、赤血球膜面全体のひずみに対する膜面上の最大第一主ひずみ  $\varepsilon_1$  の値を Fig. 12 に示す。Fig. 12 における(a), (b), (c)も、Fig. 4 に示した(a), (b), (c)にそれぞれ対応している。膜面全体のひずみが 0.8 のときの最大第一主ひずみの値は、(a)1.41, (b)2.61, (c)2.32 であった。(a)のように赤血球の両端を一直線に把持した状態を基準に考えた場合、膜面全体のひずみが 0.8 のときの最大第一主ひずみの値は、(b)で 85.1%, (c)で 64.5% 大きな値を示した。最大第一主ひずみの増加傾向を見ても、(a)の把持位置に比べると、(b), (c)の方が膜面の最大主ひずみの方が大きくなっている。つまり、把持する位置に偏りがある場合、赤血球引張試験から計測される膜面全体のひずみは同じであっても、膜面に生じている第一主ひずみの値に差が生じることがわかった。

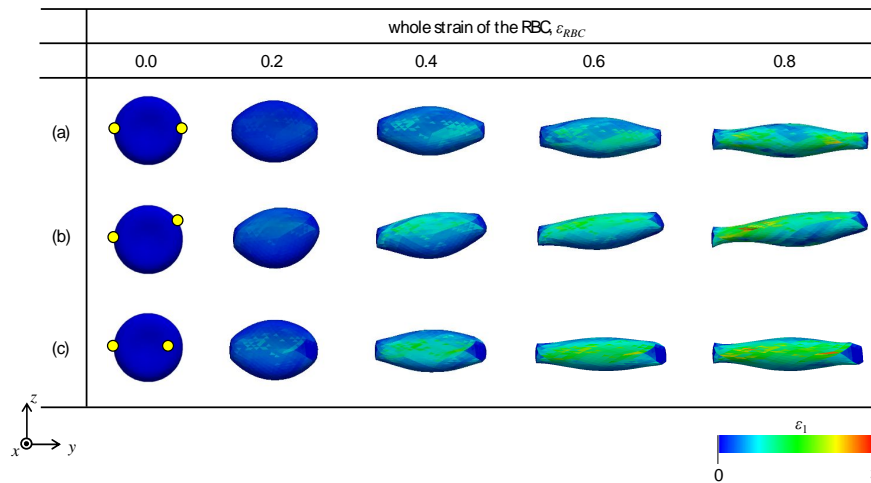


Fig. 11 Contour plots of the first principal strain over the RBC membrane at the whole strain of 0, 0.2, 0.4, 0.6 and 0.8 during the tensile test. (a)-(c) correspond to the hold positions shown in Fig. 4.

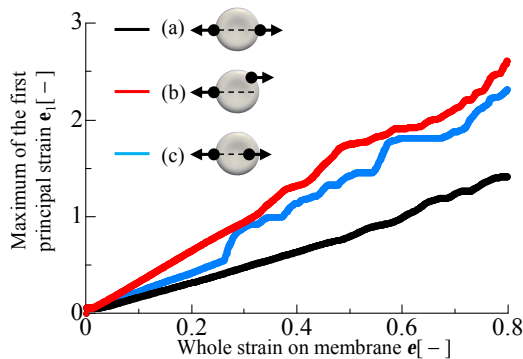


Fig. 12 A change in the maximum of the first principal strain for different hold positions.

### まとめ

赤血球引張試験を行うとき、把持位置が同一直線上でないと、赤血球の膜面に生じるひずみの分布にも偏りが生じることがわかった。赤血球膜面上で主ひずみが最大となる箇所から膜破断が生じると仮定すると、膜面全体のひずみが同じであっても、破断が生じる場合と生じない場合があると考えられる。すなわち、赤血球引張試験には、赤血球の膜面に以上のような力学状態が存在することを考慮しておく必要があることが示唆された。

### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1件)

Nakamura M, Ujihara Y: Numerical simulations of tensile tests of red blood cells: effects of the hold position, *Micro and Nanosystems*, 7, 135-141, 2016 (査読有)

〔学会発表〕(計 4件)

池田拓郎, 中村匡徳, 引張りによる赤血球破壊 ~ 固定方法の検討 ~, 関東学生会第55回学生員卒業研究発表講演会, 2016.3.10, 東京工業大学(東京都目黒区)

Nakamura M, Okamura K, Umetani K, Yagi T, Visualization of a hemolysis at a cellular scale

towards the development of a hemolysis simulator based on the deformation analysis of a red blood cell, 15th International Congress of Biorheology, May 24-28, 2015, Seoul, Malaysia

岡村河以人, 大久保裕貴, 氏原嘉洋, 木村直行, 平原裕行, 中村匡徳, 膜破断条件の定量化に向けた単体赤血球の引張試験法の確立, 関東学生会第54回学生員卒業研究発表講演会, 2015.3.20, 横浜国立大学(横浜)

梅谷康太郎, 八木高伸, 中村匡徳, 手塚諒, 梅津光生, 化学発光を用いたヘモグロビン漏洩の可視化法に関する検討, 日本機械学会第27回バイオエンジニアリング講演会, 2015.1.9~10, 朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター(新潟)

〔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〕なし

### 6. 研究組織

(1)研究代表者

中村 匡徳 (NAKAMURA, Masanori)

(埼玉大学・理工学研究科・准教授)

研究者番号: 20448046

(2)研究分担者

氏原 嘉洋 (UJIHARA, Yoshihiro)

(川崎医科大学・医学部・助教)

研究者番号: 80610021

木村直行 (KIMURA, Naoyuki)

(自治医科大学・医学部・講師)

研究者番号: 20382898

(3)連携研究者

なし