

O2-4

逆レオメータ法を用いた赤血球の力学特性推定法に関する検討

Study on an estimation method of erythrocyte mechanical properties by an inverting rehometer method

○安田利貴 (東京工専), 横山直幸 (医科歯科大), 高谷節雄 (医科歯科大)

○Toshitaka YASUDA, Tokyo National College of Technology.

Naoyuki YOKOYAMA, Setsuo TAKATANI, Tokyo Medical and Dental University

Abstract: In this study, we investigated a relationship between Deformation Index (DI) and elastic modulus. RBCs samples (porcine) were adjusted to 0.15% of hematocrit with 31wt. % of dextran solution. RBCs subjected to reciprocally shear rate of $66.7s^{-1}$ (2Hz) was recorded by a high speed camera (200fps) mounted microscope (60 times). RBC's Length (L) and Width (W) were measured using a configuration of RBC in a time course. DI is indicated to $(L-W)/(L+W)$. Elastic modulus of RBC is estimated from an average level of shear stress, strains of L and W. Poisson's ratio was calculated from an average of DI. In resultants, the elastic modulus is estimated to 6.52Pa. The correlation between theoretical DI and experimental DI is $R=0.71$. The level of this modulus was an intermediately level in comparison with previous reports. In conclusion, we suggest that the DI model is possible to estimate RBC's mechanical properties.

Key Words: Red Blood Cells, Deformation Index, Elastic modulus

1. 緒言

赤血球の変形能は、循環器系人工臓器の血液適合性評価や生活習慣病予防のための指標になると考えられている。我々は、可視的手段を用いて周期的せん断応力負荷下における赤血球の形状変化から、赤血球の力学的特性を推定するシステム開発を進めている。

これまでのせん断応力負荷機構は、2枚の平行板のうち1枚を固定、1枚を周期的に動かすことで2枚の平行板間にせん断速度を発生させていた。そのため、せん断速度を大きくすると赤血球の移動速度も大きくなるため、形状変化を撮影するには高性能な高速度カメラが必要不可欠である。そこで我々は、赤血球の力学特性計測システムの低コスト化および可視領域内で特定の赤血球の形状変化を観察するために、逆レオメータ法によるせん断応力負荷機構(以下、逆レオメータ法と記す)の開発を行った¹⁾。

Fig.1 に試作した逆レオメータ内の速度勾配の分布を示す。逆レオメータ法は、2枚の平行-平板を同時に逆方向に動かし、平行板間の中央(h/2)で速度がゼロとなる。そのため、片側振動のせん断速度負荷機構に比べ、下振動部から平行板間中央、上振動部から平行板間中央のそれぞれは、2倍のせん断速度、ゼロ点は、4倍のせん断速度が生じる。そのため、可視領域内で観察される少ない移動量で赤血球は従来の片側駆動と同様なせん断速度負を受けることが可能となる。

本試作機の特徴は2つの平板で2つのローラで挟み込み、その平板1枚をリニア・アクチュエータで周期的に動かし、せん断速度を発生させる仕組みである(Fig.2)。

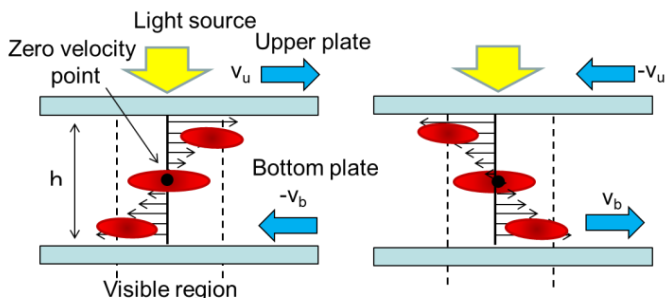


Fig.1 The distribution of shear rate in the between two plates

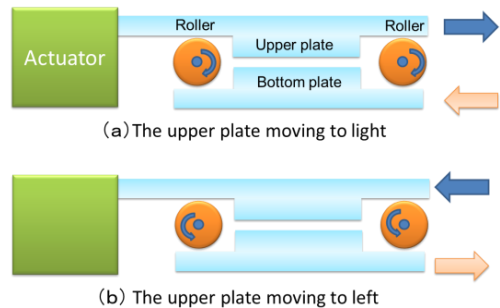


Fig.2 The reciprocally shear stressor by reversing rehoscope method

本報告では、試作した装置で赤血球の変形画像を撮影し、歪み、Deformation Index(DI)などを求めた弾性係数推定法について検討する。

2. 実験方法

Fig.3 に実験装置概要を示す。実験装置は、逆レオメータ(間隙 60[μm])、高速度カメラ(200[fps])、光学顕微鏡(×40、領域 192×144[μm])、中間レンズ(×1.5[倍])、メタハラ光源、リニア・アクチュエータ、リニア・アクチュエータ制御および画像データ収集用パソコン、レーザ変位計などで構成されている。

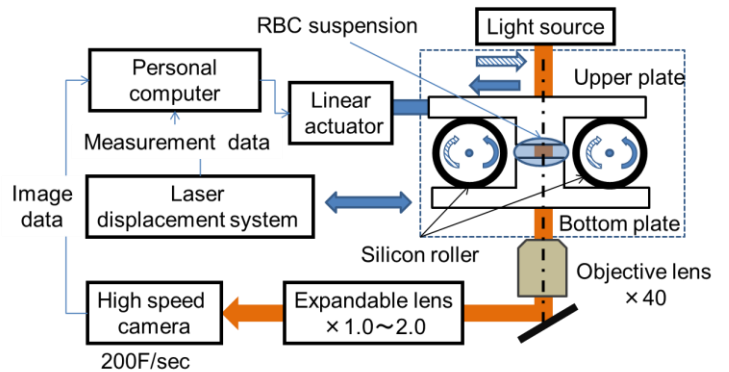


Fig.3 The schematic diagram of experimental setup

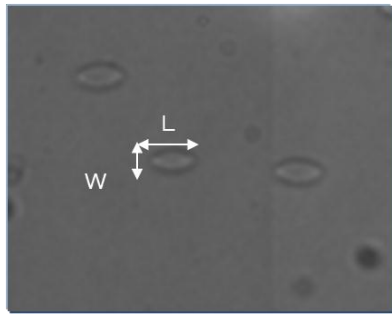


Fig.4 The example of the picture of sheared erythrocytes

赤血球試料は、屠殺後 24 時間以内の豚血液から調整を行った。血液は、2600×g、15 分間で遠心分離後、血漿成分およびバフィーコートを除き、PBS(Phosphate Buffered Solution)で希釈により 2 回洗浄を行った。洗浄した豚赤血球の Ht. が 0.1[%] になるように、デキストラン (31[wt.%]) PBS 溶液で調整を行った。

平板の駆動条件は、周期 f は 2[Hz]、振幅 0.5[mm]、最大せん断応力 σ_0 は 6.67[Pa] とした。

次に、画像解析方法を示す。撮影された画像の一例を Fig.4 に示す。撮影された画像は、背景処理、フィルタ処理を行い 2 値化処理後、可視領域内で周期的変形が測定可能な赤血球のみにラベルを付け、せん断速度負荷の 1 周期内の各時間における赤血球の長軸長さ L (Length) および短軸長さ(流れに垂直方向) W (Width) の測定を行った。

そして、力学的な解析方法を示す。高せん断応力下における赤血球は、流れ方向に長軸となる楕円形状に変形する。そこで、赤血球を薄い円盤と仮定すると、長軸の長さ L 、短軸(流れに垂直方向)の長さ W となり、赤血球の変形能を示す DI は、以下のように仮定する。

$$DI = \frac{L - W}{L + W} = \frac{\frac{\sigma_0 \sin(2\pi ft)}{E} (1 - \gamma)}{2 + \frac{\sigma_0 \sin(2\pi ft)}{E} (1 + \gamma)} \quad \cdot \cdot (1)$$

ただし、 γ はポアソン比、 E は弾性係数とする。 E の推定値は、せん断応力負荷の平均値 ($t=1/8$ [s])、画像データの L と W の歪みおよび DI の平均値からポアソン比 γ を求めた。

最後に、 DI の理論値と実験値の相関係数 R について示す。

$$R = \frac{\sum(x_t - \bar{x})(y_t - \bar{y})}{\sqrt{\sum(x_t - \bar{x})^2 \sum(y_t - \bar{y})^2}} \quad \cdot \cdot (2)$$

ただし、 x_t は各時間の DI 平均値(実験値)、 \bar{x} は DI の 1 周期分の平均値(実験値)、 y_t は各時間の DI 計算値、 \bar{y} は計算値 DI の 1 周期分の平均値とする。

3. 実験結果

Fig.5 に実験結果を示した。本実験条件では、1 枚の画像で約 20 個程度の赤血球が同時に観察されたが、視野領域内で変形が観察できた赤血球数は 4 個であった。そこで 4 個の赤血球数について、各時間で測定された DI を Mean±SD で示した。

一方、理論値から算出される DI は、実験結果から式 (1) およびその条件から求めた。

理論値と実験値の平均値と比較すると、相関係数 $R=0.71$ となり、高い相関性を示した。

Table 1 Results of RBCs mechanical properties

E[Pa]	$\bar{\epsilon}_x$	$\bar{\epsilon}_y$	\bar{DI}	$\bar{\gamma}$
6.52	0.735	0.265	0.155	0.36

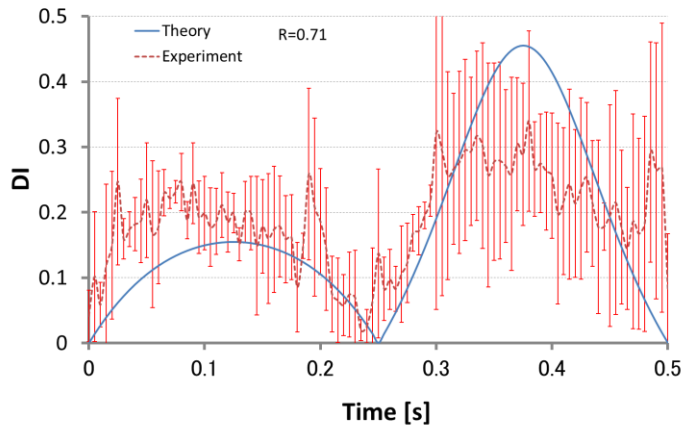


Fig.5 The comparison of between experimental DI and theoretical DI.

4. 考察

本報告では、逆レオメータ法を取り入れたせん断応力負荷装置を試作し、可視視野内で周期的に変形する赤血球から、赤血球の力学的特性を推定する方法について検討を行った。

Fig.2 に実験結果を示す。 DI は赤血球が右方向に流れるとき(前期: 0-0.25s)と、左方向に流れる時(後期: 0.25-0.5s)と比較すると、実験値および理論値共に後期が大きくなる傾向になった。また、実験値と理論値の相関係数 $R=0.71$ となり高い相関性を示した。測定された実験結果から、赤血球の力学的特性である弾性係数の推定を行った (Table1)。

南谷らの原子間力顕微鏡を使った実験⁽²⁾では、赤血球の弾性係数 E は 0.123 ± 0.126 [MPa] としている。

一方、マイクロピペット法は、弾性を示す曲げ、伸長特性などは、10[mPa] のオーダーであり赤血球が容易に変形することを示している⁽³⁾。

今回の実験から求めた弾性係数 E は、これらの値に対して中間的な値であった。これらの値の違いは、赤血球に力学負荷を与える手段の違いに依存すると考えられる。

逆レオメータ法では、赤血球全体を変形させて、その時の歪から弾性係数を推定する方法を取り入れている。原子間力顕微鏡法、マイクロピペット法のそれぞれで測定条件を確立して行えば、相対的な評価により赤血球の力学的特性測定が可能となる。原子間力顕微鏡法やマイクロピペット法は、局所的な赤血球の膜特性などを測定するには非常に優れた手段であるが、簡便な血液検査法は向いてない。そのため、逆レオメータ法のような可視化的手段から、赤血球の力学的特性を推定する手段は、採血後、直ちに行える血液検査として有効であると考えられる。

今後、測定条件を変え赤血球の力学的特性の推定法について検討を行う必要があると考えられる。また、実験値は、ばらつきが大きくなっているため、測定対象を増やし再現性について検討をする必要があると考えられた。

参考文献

- (1) T. Yasuda, et al, Study on estimation method of viscoelastic parameter for erythrocyte, Proceedings of the 48th annual conference of the JSMBE, 47(24),2009
- (2) 南谷ほか、原子間力顕微鏡による赤血球弾性計測、T.IEE Japan,122-C(9),1664/16671,2002
- (3) 菅原ほか、血液のレオロジーと血流、日本エム・イー学会編、コロナ社、2003