

せん断流れ場における血液接触材料の表面粗さが溶血量増加に及ぼす定量評価

Quantitative Evaluation of Hemolysis Amount Resulting from Surface Roughness of Blood-contacting Materials under Shear Flow Field

○ 丸山 修 (産総研), 伊藤大輝 (茨大工), 西田正浩 (産総研), 山根隆志 (神戸大),
松田健一 (茨大工), 足立吉数 (茨大農), 増澤 徹 (茨大工)

Osamu MARUYAMA (AIST), Daiki ITOU (Ibaraki Univ.), Msahiro NISHIDA (AIST), Takashi YAMANE (Kobe Univ.),
Kenichi MATSUDA (Ibaraki Univ.), Yoshikazu ADACHI (Ibaraki Univ.), Toru MASUZAWA (Ibaraki Univ.)

Abstract: It is important to clarify the relationship between the hemolysis and degree of surface roughness under blood shear fields. From our previous study, we have obtained that the increasing hemolysis was related to the increasing shear stress using a cone-cylinder-cone type rotational shear stressor based on the surface roughness. However we have not yet measured the increasing shear stress with this stressor due to a problem of its torque sensor sensitivity. In this study, we used a new double-cylinder type rheometer with a highly sensitive torque sensor. As a result, since hemolysis amount increased with the increase of shear rate and exposure time, we consider that this rheometer is applicable to measure the torque value due to the surface roughness, which may cause hemolysis under shear flow fields.

Key Words: Hemolysis, Surface roughness, Shear stress, Bovine blood, Rheometer

1. 緒言

人工心臓をはじめとする遠心血液ポンプの開発において、血球破壊(溶血)特性を調べることは重要である。溶血を引き起こす原因として、高せん断応力、発熱、摺動などが挙げられるが、血液接触面の表面粗さも溶血の要因であることがわかっている。我々は、これまでにコーン・シリンダー・コーン型の回転型せん断負荷装置を使用して血液にせん断応力を負荷し、このせん断流れ場において、表面粗さの大きさおよび面積が溶血に及ぼす影響について調べてきた。溶血を引き起こす表面粗さの大きさの閾値や、粗さ面積が溶血に与える影響を解明できれば、遠心血液ポンプを開発する上で、血液接触材料表面加工の有益な目標値を示すことができる。これまでの研究により、層流のせん断流れ場においては、表面粗さの大きさが、 $Ra0.6\mu m$ 以上で溶血量が急増し、 $Ra0.8\mu m$ の溶血量は、 $Ra0.1\mu m$ における溶血量と比較すると、約2倍に上昇することがわかっている(図1)¹⁾。この溶血量の増加は、流れの可視化解析結果²⁾や溶

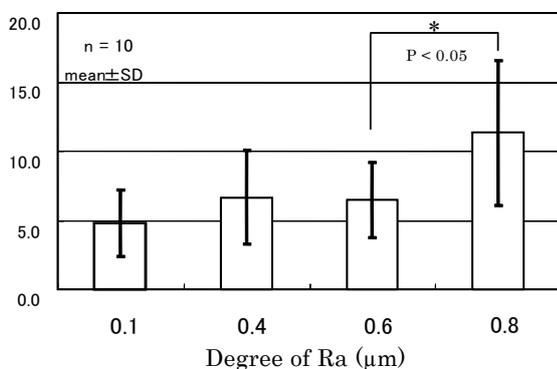


Fig.1 Hemolysis due to inner cylinders with surface roughnesses ranging from $Ra0.1\mu m$ (without roughened surface) to $0.8\mu m$ applied to an area of 10% of the cylindrical section, under a laminar shear flow of $3,750s^{-1}$. The tests were repeated 10 times ($n = 10$).

血試験結果¹⁾から、表面粗さに基づいて局所的にせん断応力上昇の可能性が示唆された。この実験で使用した回転型せん断負荷装置には、回転粘度計と同様のトルクセンサーが装備され、せん断負荷によって生じているせん断応力に加えて、せん断流れ場に何らかの粘度変化が生じれば、トルク値上昇が検出できる機能を備えている。しかし、これまで表面粗さ増加に基づいて増加するせん断応力は、回転型せん断負荷装置実機では測定できていない。また、数値流体力学解析においては、この増加するせん断応力は表面粗さ付近に限定されており、さらに $Ra0.1\mu m$ から $0.6\mu m$ 以上に上昇したときの溶血量の2倍増加を引き起こすせん断応力増加は生じてないことがわかっている²⁾。このことから、せん断流れ場において、表面粗さが、どのようなメカニズムで溶血を発生させるのか、また表面粗さに基づくせん断応力増加がどの程度関与するのかを詳細に調べる必要がある。本研究では、せん断流れ場において、表面粗さの大きさ、せん断応力、溶血量の定量的相関を求め、表面粗さが溶血を引き起こすメカニズムを明らかにすることを目標としている。そのためには、微小なせん断応力増加でも検出できるせん断負荷装置が必要となる。そこで、新規のせん断負荷装置を使用し、まずせん断流れ場におけるせん断応力の大きさ、およびせん断負荷時間に伴う溶血量を定量評価した上で、表面粗さが溶血に及ぼす影響を調べる。

2. 目的

新規の二重円筒型レオメーターを使用して、せん断流れ場において、せん断速度およびせん断負荷時間に伴う溶血量の増加を確認する。また、表面粗さによって溶血量が増加するとき、せん断応力が発生し、溶血発生に関与するかを明らかにすることを目的とする。

3. 実験方法

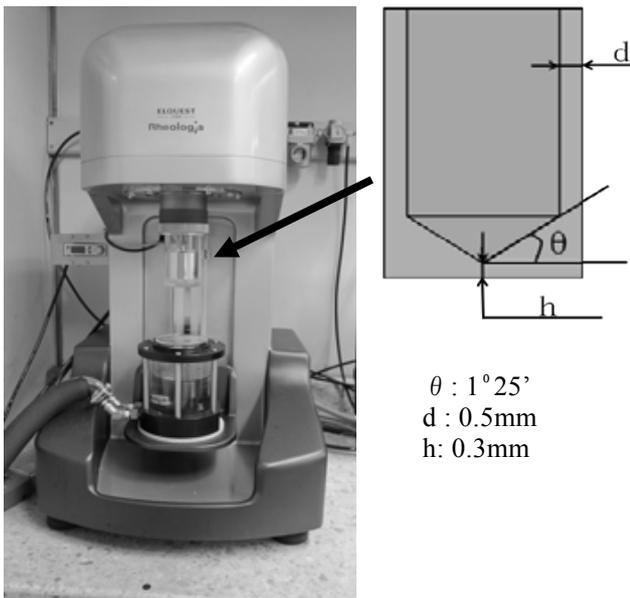
3-1 試験血液の調製

茨城大学農学部フィールドサイエンス教育研究センターにおいて、成ウシの頸静脈に滅菌した特注14Gの注射針

(夏目製作所)を穿刺し、リン酸クエン酸デキストロースアデニン (CPDA) 液を含む血液バッグに約 300~400mL の血液を採取した。ただちにクーラーボックスで冷却して実験室へ運搬し、ヘマトクリット値が 30%となるように、採血した血液の血漿を添加して調整した。この作業は、採血を開始してから 1 時間以内に行った。

3-2 レオメーターによる溶血試験

レオメーターのせん断負荷部の外観・断面図を図 2 に示した。内筒と外筒の二重円筒からなっており、シリンダー下部は円錐型となっている。すなわち、内筒側面では、二重円筒型の構造によって、内筒下面ではコーン・プレート型の構造によって、内筒・外筒間の隙間に、同一のせん断負荷がかかるように設計されている。内筒を固定し、外筒を回転させることで、せん断流れを安定させる構造となっている。この内筒の円筒側面全周にサンドブラスターを使用



$\theta : 1^{\circ}25'$
 $d : 0.5\text{mm}$
 $h : 0.3\text{mm}$

Fig.2 Observation and Cross-section of the shearing portion of a new rheometer

して、Ra1.0 μm および 5.0 μm となるように表面粗さを加工した。表面粗さの実測値は、表面粗さ計で測定した。表面粗さをつけた内筒をレオメーターにセットし、内筒と外筒の隙間に試験血液を充填し、せん断速度 0~2,880 s^{-1} (600rpm), 0~120 分, 37 $^{\circ}\text{C}$, 窒素雰囲気下の条件でせん断負荷をかけ、実験後の溶血量を測定した。また、せん断負荷時に生じるトルクを、せん断応力の指標として計測した。

3-3 レオメーターによる溶血試験

せん断負荷後の血液を外筒から回収し、10,000 $\times g$ で 10 分間遠心分離をかけて血漿を採取した。この血漿 5 μL を、0.5% 3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン-90%酢酸水溶液 1.0mL に添加し、次いで 0.3%過酸化水素水 1.0mL を添加して、正確に 10 分後に分光光度計を使用して水対照 600nm で吸光度を測定した。30mg/dL の標準ヘモグロビン水溶液を基準として、吸光度の相対値から、試験血液中のヘモグロビン濃度を算出した。

4. 実験結果

表面粗さ加工をしていない内筒を用いて、せん断負荷時間を 30 分とし、せん断時間を変化させた時の溶血量、およびトルク値の結果を図 3 に示した。

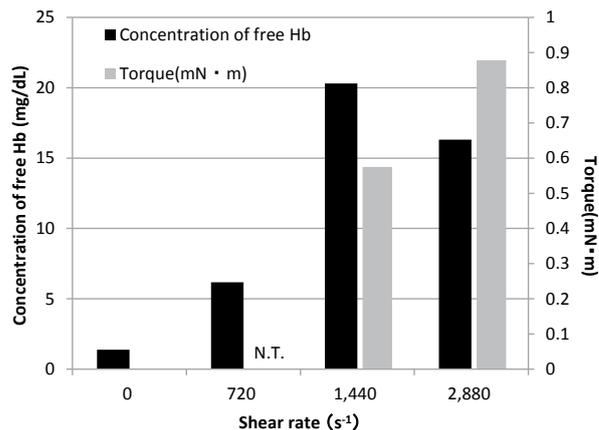


Fig.3 Relationship between shear rate and hemolysis amount by new rheometer

0 から 2,880 s^{-1} まで、せん断速度の上昇に伴って溶血量は増加傾向にあった。せん断無負荷、すなわち 0 s^{-1} における溶血量は 1.4mg/dL, 720 s^{-1} における溶血量は 6.2mg/dL であった。1,440 s^{-1} における溶血量は 20.3mg/dL であり、この数値は 2,880 s^{-1} における溶血量 16.3mg/dL と比較して高く、せん断速度の増加に対して溶血量の増加は対応していなかった。一方、トルク値については、2,880 s^{-1} におけるトルク値は 0.878 $\text{mN}\cdot\text{m}$ であり、1,440 s^{-1} におけるトルク値 0.575 $\text{mN}\cdot\text{m}$ と比較して 1.5 倍高く、溶血量の結果とは異なり、せん断速度の増加に対してトルク値は増加した。

次に、表面粗さ加工をしていない内筒を用いて、せん断速度を 2,880 s^{-1} とし、せん断負荷時間を変化させた結果を図 4 に示した。せん断無負荷、すなわち 0 分における溶血量は 7.5mg/dL であり、30 分における溶血量は 10.4mg/dL, 60 分では 19.0mg/dL, 120 分では 30.0mg/dL となり、時間経過とともに溶血量は上昇した。また、トルク値については、30 分で 0.922 $\text{mN}\cdot\text{m}$, 60 分で 0.968 $\text{mN}\cdot\text{m}$, 120 分では 1.04 $\text{mN}\cdot\text{m}$ であり、時間経過とともにわずかに増加した。

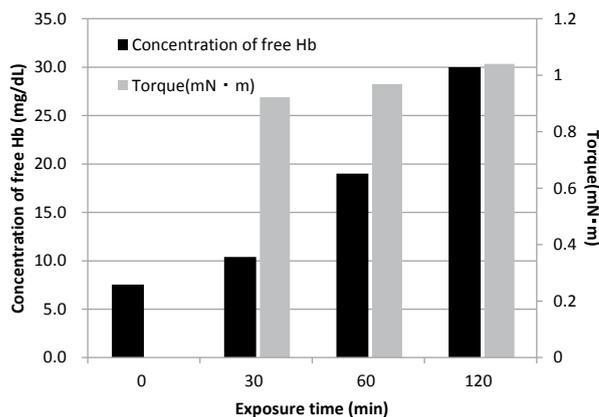


Fig.4 Relationship between exposure time and hemolysis amount by new rheometer

内筒表面に加工した表面粗さの外観を図5に示した。

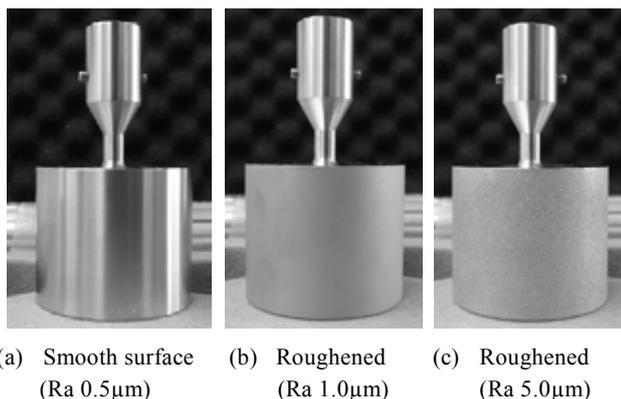


Fig.5 Observation of surface roughness of inner cylinder of new rheometer

内筒に加工した表面粗さは、サンドペーパー状の凹凸形状となり、表面光沢が Ra の増加に伴い減少した (図6)。それぞれの Ra を測定した結果、表面粗さ加工をしていない内筒では Ra0.5µm であり、目標 Ra1.0µm および 5.0µm で加工した表面粗さの実測は、目標値と同一のそれぞれ Ra1.0µm および 5.0µm であった。これらの内筒を使用して、

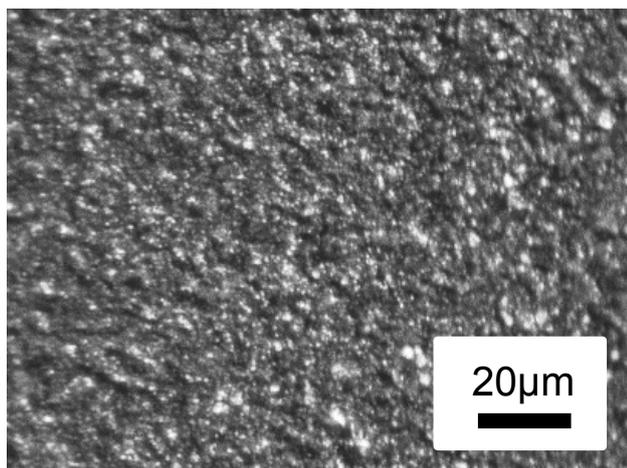


Fig.6 Photograph of the surface roughness created by a by a blaster.

せん断速度 $2,880\text{s}^{-1}$ 、せん断負荷時間 30 分における溶血量の結果を図7に示した。表面粗さをつけていない Ra0.5µm における溶血量は $13.3 \pm 3.1\text{mg/dL}$ 、トルクは $0.957\text{mN} \cdot \text{m}$ であった。Ra1.0µm における溶血量は $19.8 \pm 15.7\text{mg/dL}$ 、トルクは $0.992\text{mN} \cdot \text{m}$ 、Ra5.0µm では溶血量は $12.6 \pm 2.8\text{mg/mL}$ 、トルク値は $0.993\text{mN} \cdot \text{m}$ であった。溶血量は2回の繰り返し実験の平均値である。

5. 考察

図3の結果で、 $1,440\text{s}^{-1}$ における溶血量の方が、 $2,880\text{s}^{-1}$ での溶血量よりも高かった。 $2,880\text{s}^{-1}$ での溶血量の値 16.3mg/dL は、Ra0.5µmの内筒を使用し、せん断負荷時間が30分の条件で得られているので、図4の30分の溶血量 (10.4mg/dL) および図7の Ra0.5µm の溶血量 (13.3mg/dL) と同条件である。これらの値が図3の $1,440\text{s}^{-1}$ での溶血量 20.3mg/dL よりも低いことから、この溶血量の信頼性は低いと考えている。また、図3において、 $1,440\text{s}^{-1}$ でせん断負荷したときのトルク $0.575\text{mN} \cdot \text{m}$ は、 $2,880\text{s}^{-1}$ でのトルク

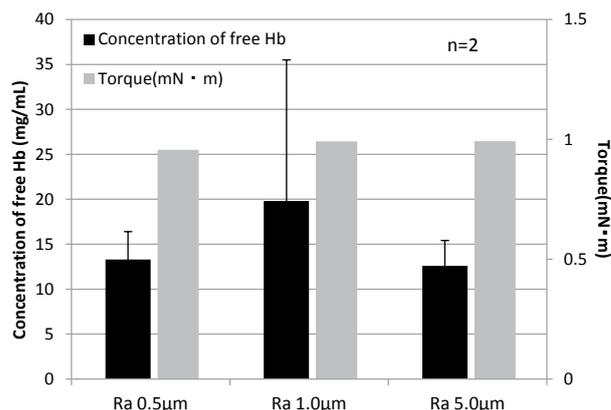


Fig.7 Relationship between surface roughness and hemolysis amount by new rheometer

$0.878\text{mN} \cdot \text{m}$ よりも低いことから、試験血液にかかっていたせん断応力が低いということの実証であり、すなわち $1,440\text{s}^{-1}$ における溶血量の信頼性が低いことが裏付けられると考えている。さらに 720s^{-1} におけるトルク値の計測も出来ておらず、この点を含めて再実験が必要である。図4では、せん断負荷時間の増加に伴って、溶血量は増加した。しかしながら、トルク値がせん断負荷時間に伴って若干増加する結果が得られた。その増加量は、30分と120分で比較すると、12.8%であった。せん断速度は $2,880\text{s}^{-1}$ 一定で負荷しているので、試験血液の粘度が変化しない限り、トルク値は増加しない。従って、このトルク値の増加は、試験血液の粘度の増加によるものと考えられる。新規せん断負荷装置によって、せん断負荷を続けていると、外筒上部内面に水滴の付着が見られた。せん断負荷部は窒素雰囲気となっているので、この水滴は試験血液が 37°C で加温されたことにより蒸発し、内筒上部内面に付着したと考えられる。従って、血液の水分が少なくなり、すなわちヘマトクリット値が減少したことで粘度が高くなり、これがトルク値の増加につながったものと考えているが、今後検証が必要である。図3および図4の結果から、本レオメーターがせん断速度の増加、およびせん断負荷時間の増加に伴って溶血量は増加し、また、せん断速度の増加に伴って、トルク値、すなわちせん断応力が上昇したことから、本レオメーターは、せん断流れ場における溶血特性を調べるための回転型せん断負荷装置として有益であると考えている。

図7の結果より、表面粗さ加工なしの Ra0.5µm と比較して、Ra1.0µm の溶血量は49%増加したが、Ra5.0µm では4%の減少となった。Ra1.0µm での溶血量は標準偏差が大きく、再現性を確認する必要がある。現時点では溶血量が増加したとは考えていない。我々のこれまでの研究により、表面粗さが Ra0.8µm 以上になると、Ra9.2µm までの実験では、Ra0.8µm と変わらず一定であると結果が得られている (図8)¹⁾。この結果は、本レオメーター以前に使用していた回転型せん断負荷装置を用いた結果であるが、Ra0.8µm から Ra9.2µm まで一定であれば、図7の結果でも Ra1.0µm と Ra5.0µm の溶血量は、同じになると考えると、Ra5.0µm での溶血量の値の方が、標準偏差を示すエラーバーが小さく、繰り返し再現性が高いと考えられる。この Ra5.0µm における溶血量と Ra0.5µm の溶血量がほぼ同じで、また標準偏差も同等であったことから、本実験における Ra 増加に伴う溶血量の増加は生じていないと考えられる。この原因の1つとして、せん断速度の大きさの影響が考えられる。

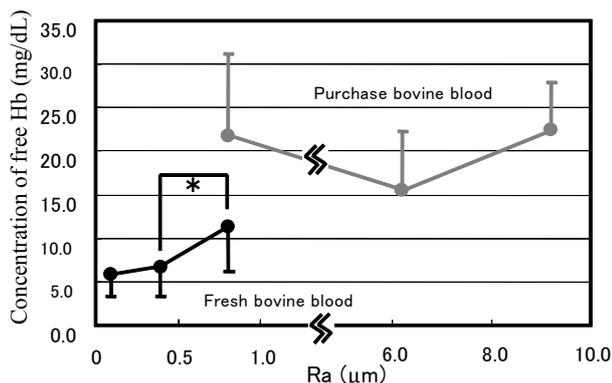


Fig.8 Hemolysis with inner cylinders with various surface roughness under $3,750s^{-1}$ of the shear rate. The experiments on fresh bovine blood were repeated 10 times ($n=10$), and on the purchase blood was $n=6$ for $Ra0.8\mu m$, $n=7$ for $Ra6.2\mu m$, and $n=3$ for $Ra9.2\mu m$ ¹⁾.

図8の結果は、せん断速度が $3,750s^{-1}$ において得られた結果であるが、本実験での図7は、 $2,880s^{-1}$ において得られた結果である。 $2,880s^{-1}$ で本実験を実施した理由は、本レオメーターの最高回転速度の仕様によるものである。しかしながら、図3および図4の結果の2つの平均から、 $2,880s^{-1}$ 、30分でせん断負荷をかけたときの溶血量は、 $8.9mg/dL$ の増加が見られている。一方、これまでの実験結果(図1)により、 $3,750s^{-1}$ 、30分でせん断負荷をかけた時の溶血量は、表面粗さ加工無しの $Ra0.1\mu m$ で $5.8mg/dL$ 、 $Ra0.8\mu m$ で $14.9mg/dL$ であり、 $9.1mg/dL$ の増加で、本実験結果と同等の値である。これまでの回転せん断負荷装置によって $3,750s^{-1}$ 、30分でせん断応力をかけても、本レオメーターで $2,880s^{-1}$ 、30分でせん断応力をかけてもほぼ同等の溶血量である。しかし、本実験では表面粗さによる影響は見られていないことから、表面粗さによる影響のあるせん断速度域があると考えられる。

トルク値であるが、 $Ra0.5\mu m$ から $Ra1.0\mu m$ まで 3.7% 、 $Ra0.5\mu m$ から $Ra5.0\mu m$ まで 3.8% の増加であったが、溶血量の増加は確認できなかったため、このトルク値の増加が溶血増加に影響を与えたとは、現時点では判断できない。しかしながら、せん断負荷時間はすべての Ra で同じであるので、図4で見られた血液中の水分の蒸発に基づく粘度の増加によるトルク値の増加とは別の要因と考えられ、表面粗さに基づいて表面粗さ近傍のせん断応力が増加していることは考えられる。しかし、少なくとも本実験では溶血には影響していなかった。表面粗さの形状も、溶血量発生にも影響すると考えられる。本実験では、サンドブラスターによって、表面粗さを加工した。一方、図1および図8で得られた結果は、表面粗さ形状の加工に、スロッターを用いて、血流に対して垂直方向に粗さを加工してある(図9)。図6のサンドブラスターによる加工痕も図10のスロッターによる加工痕も、 Ra は同一であるが、異なる粗さ形状がせん断流れ場の流体環境に影響して、表面粗さに基づく溶血に関連している可能性もある。

本実験から、表面粗さの増加に基づく溶血量の増加、およびそのメカニズムを明らかにすることは十分でなかったが、新規せん断負荷装置である本レオメーターは、この問題を解決するのに有用な実験装置であることが確認された。また、表面粗さに基づく高せん断応力の発生については、局所的に微増することは十分考えられるが、このせん断応

力が溶血の増加に直接的に関与している可能性は低いと思われる。せん断流れ場における表面粗さが及ぼす溶血への影響については、別のメカニズムがある可能性が考えられる。

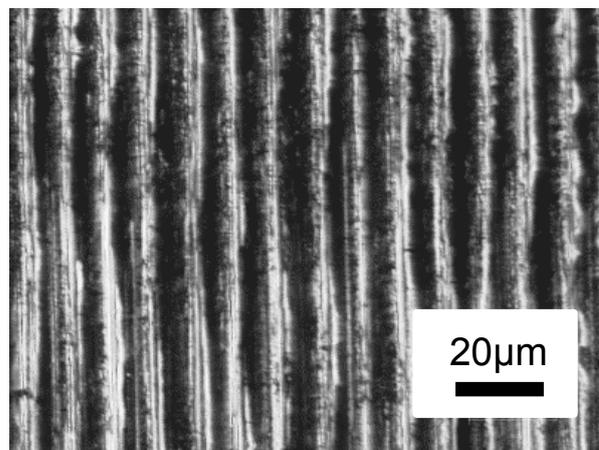


Fig.9 Photograph of the surface roughness created by a slotter.

6. 結論

二重円筒型レオメーターを利用した溶血試験において、本装置がせん断速度の増加、およびせん断負荷時間の増加に伴って、溶血量が定量的に増加することが確認された。表面粗さに関する知見については、今後詳細に検討する。

参考文献

- 1) Maruyama O, et al, *Artif Organs*, 30; 365-370 (2006)
- 2) 西田ら, 茨城講演会論文集, 269-270 (2009)
- 3) Maruyama O, et al, *J Artif Organs*, 8; 228-236 (2005)