原子間力顕微鏡による赤血球弾性の計測

正員 南谷晴之 (慶応義塾大学理工学部)
 非会員 川村友美 (慶応義塾大学理工学部)
 非会員 塚田孝祐 (慶応義塾大学理工学部)
 非会員 飯島淳彦 (慶応義塾大学理工学部)
 非会員 関塚永一 (国立埼玉病院)
 非会員 大塩力 (大塩医院)

Measurement of Elasticity of Erythrocytes Using Atomic Force Microscope

Haruyuki Minamitani, Member, Tomomi Kawamura, Non-member, Kousuke Tsukada, Non-member, Atsuhiko Iijima, Non-member (Keio University), Eichi Sekizuka, Non-member (National Saitama Hospital), Chikara Osho, Non-member (Oshio Clinic)

Deformability of erythrocyte is a crucial factor to maintain smooth blood flow in the microcirculation supplying oxygen and nutriment to organic tissues. Decrease in the deformability depends on the elasticity of erythrocyte, especially on the cell membrane structure that leads to high shear stress on the blood vessel wall and significant increase in the flow resistance. In this study, microscopic elastic property of the erythrocyte under diabetic and another physical conditions were measured by using atomic force microscope (AFM) in the contact mode function. The spring constant k and the Young's modulus E of erythrocytes were derived from the so-called force curve applying the Hooke's law and the Hertz model. In case of the compressing force of AFM at 1.5 nN, k and E of healthy erythrocytes were 7~9 mN/m and 0.1~0.15 MPa while diabetic samples showed significantly higher elasticity than those of healthy samples. This implies the diabetic erythrocytes change to be stiff as the result of glycosylation of cell membrane that may induce microangiopathy.

キーワード：赤血球，糖尿病，原子間力顕微鏡，バネ定数，ヤング率

Keywords: erythrocyte, diabetes, atomic force microscope, spring constant, Young's modulus

1. はじめに

血液は心ポンプの働きで全身に行き渡り、組織に酸素や栄養素を運び、引き替えに二酸化炭素や老廃物を受け取り、組織から排出する役割を担っている。このようなガス交換や物質代謝が行われる領域は、非常に細い細動脈、細静脈、毛細血管などの微小循環で構成されている。ヒトの赤血球はおおよそ $7\sim 8\mu$ の大きさであり、自らの径よりも細い毛細血管中を、血管内壁に粘着することなく、パラシュート状あるいはスリッパ状に柔軟に変形して通過してゆく。赤血球の形状は、両面くぼみ円盤形 (biconcave disc shape) であり、表面積は同じ容積を持つ球に比べ 30~40% 大きく、酸素拡散面積が広く、赤血球膜の曲げの歪エネルギーを最小にするので変形に適している。この赤血球の変形しうる度合いを赤血球変形能と呼ぶが、変形能の低下は、血管壁

に高いシアストレスを与えると同時に組織への酸素供給能の低下をもたらす、様々な血管病変の原因となりうる。

赤血球膜の柔軟性、赤血球内の細胞質粘弾性、表面積対容積比などは、変形能に影響を与える諸因子であり⁽¹⁾⁽²⁾、血液全体の約半分を占める赤血球が何らかの原因でその柔軟性を失うことは、血液のレオロジー特性に大きな変化をもたらすばかりでなく、生体の調節系にも大きな影響を与えることになる。赤血球が変形しにくくなると、その流体力学的有効面積が増すので循環抵抗は増大し、流体力学的に増大した容積は酸素の拡散障害にもなる⁽³⁾。生活習慣病とも言われる糖尿病では血液レオロジーの異常の一つとして赤血球変形能の低下が報告されている⁽⁴⁾⁽⁵⁾が、測定法の違いによって否定されることもあり、未だにその真偽のほどは不明である。変形能低下による血管内皮へのシアストレスの増大や酸素運搬能の低下などが糖尿病性細小血管障

害の進展に何らかの影響を与えることは容易に想像できる。したがって、糖尿病の血液レオロジーと赤血球変形能との関係を明らかにすることは極めて重要であり、変形能に深く関わる個々の赤血球の硬さを定量的に計測し、その影響を解析することは医学的な観点からも必要不可欠な課題である。

従来、材料科学分野で利用されてきた原子間力顕微鏡 (Atomic Force Microscope, 以下 AFM) は、その改良により生物試料の形状観察のみでなく、生理的条件下で試料の弾性特性を計測できるようになってきた^{(6)~(11)}。本研究では、AFM を用いて赤血球変形能に深く関わる個々の赤血球の弾性計測を行い、細胞の硬さについて定量的な評価を試みた。まず、グルタルアルデヒド処理した硬化赤血球を用いて AFM の計測精度及び細胞の弾性を記述する解析モデル (Hooke's Law と Hertz Model) の妥当性について検討した。つづいて、糖尿病赤血球の弾性を計測し、糖尿病赤血球の弾性が微小循環血流に与える影響を考察した。これらの結果に基づき、AFM 計測プローブの力学的特性、細胞弾性の解析モデル、AFM による細胞の硬さ計測における適切な実験条件について考察した。

2. AFM による生物試料の弾性計測

図 1 に AFM の計測プローブ構造の略図と動作原理図を示す。AFM は高倍率の顕微鏡対物レンズの近傍に図に示すようなカンチレバーが設置されていて、カンチレバー先端部にあてたレーザ光の反射光を検出することにより、プローブの位置情報を得ることができる。AFM ではこの特徴を生かし、カンチレバーでサンプルの表面を走査することにより、その表面形状を描画することができる。本研究では、コンタクトモードでサンプルの表面にプローブを接触させた後、これを押し込んで、フォースカーブ測定を行うことにより、サンプルの弾性定数を求めた。

図 1 AFM 装置の計測プローブ構造と動作原理
Fig.1. Structure of sensing probe of AFM cantilever and principle of the operation in AFM.

〈2・1〉 フォースカーブの計測原理 フォースカーブは、カンチレバーを下方に移動させて、カンチレバー先端のプローブをサンプルに接触させ、更に押し込み力を加えてサンプルを変形させることによって得られる (図 2 (a))。フォースカーブの横軸はカンチレバーの移動距離 L 、縦軸はカンチレバーのたわみ量 S を表している。プローブがサンプルに接触してからのカンチレバーの実質的な移動量は、サンプルからの反力により Z となり、したがってサンプルの変位量は $(Z - S)$ となる。フォースカーブはカンチレバーを上方に移動させることにより応力緩和特性を示し、サンプルが線形特性を有する場合には、可逆的な特性を示すが、生物試料では一般にヒステリシスを示す。本研究では、安定な計測ができる応力緩和特性、すなわちプローブをサンプルに押し込んだ後、カンチレバーを上方に移動させるときのフォースカーブを評価の対象にした。このとき、サンプルとカンチレバーの接触面では

$$F = k_1 \cdot S \dots\dots\dots (1)$$

で表される力がかかっている。ここで、 k_1 はカンチレバーのバネ定数である。更にカンチレバーのたわみ量 S とサンプルの変位量 $(Z - S)$ の関係から、以下の解析モデルを用いてサンプルの弾性定数を求めることができる。なお、カンチレバー・プローブの押し込みおよび引き上げ速度は、150 nm の変位を 1 秒で往復するように設定してあるので、300 nm/sec の速度でフォースカーブが得られる。これより速いと良好なフォースカーブの計測が難しく、また、遅すぎてもスムーズなフォースカーブが得られにくいという問題があり、経験的に設定した値である。

図 2 フォースカーブ理論図
Fig.2. Theoretical illustration of the force curve in atomic force microscopy; (a) a sketch of the force curve and (b) relationship between cantilever position and sample deformation.

図3 プローブ先端部の模式図
Fig.3. Configuration of the probe tip of AFM cantilever.

〈2・2〉 解析モデル サンプルの弾性定数を求める解析モデルは幾つかあるが、本研究では二つのモデルを用いて各々の特長を考慮しつつ、赤血球弾性の評価を行った。各モデルの理論式を以下に示す。

(1) Hooke's Law

カンチレバーから力を受けて赤血球が変形している状態図を図2(b)に示す。このとき、赤血球に加わる力を F [nN]、赤血球のバネ定数を k_2 [N/m] とすると、次式が成り立つ。

$$F = k_2 \cdot (Z - S) \dots\dots\dots (2)$$

Z [nm], S [nm] はフォースカーブから得られ、また、 F は式(1)より求まる。このモデルでは、サンプルの弾性をバネ定数という形で評価するが、式(1)、(2)からわかるようにサンプルの弾性特性は線形な特性を仮定している。Hooke's Law は、力学的に最もシンプルなモデルであるため、フォースカーブからサンプルの弾性を求める際に、直観的に分かりやすいことが利点として挙げられる。一方で、赤血球のような軟らかいサンプルでフォースカーブを計測すると、サンプルへの荷重とその変位量の関係が非線形となり、厳密な弾性特性の評価はできない。本モデルを用いる場合は、得られたフォースカーブに対し、式(1)、(2)から得られる

$$S = (k_2/k_1) \cdot (Z - S) \dots\dots\dots (3)$$

を使って最小二乗近似でカーブフィッティングし、バネ定数 k_2 を求める。

(2) Hertz Model ⁽¹²⁾⁽¹³⁾

Hertz Model は、図3に示すようにサンプルに接触するプローブの形状を円錐形で近似し、カンチレバーとサンプルが面接触していることを仮定したもので、サンプルに加わる力とその変位量の関係を求めるモデルであり、次式で表される。

$$F = \frac{\pi \tan \alpha}{2(1 - \nu^2)} E(Z - S)^2 \dots\dots\dots (4)$$

ここで α はカンチレバー先端のプローブ角度の1/2、 ν はポアソン比 (Poisson's ratio) である。非圧縮性と等方性を考

えると、ポアソン比は1/2で与えられる。 F [nN], E [GPa], $(Z - S)$ [nm] 以外は定数項であり、サンプルのヤング率 E は、サンプルにかかる荷重とそれに対するサンプル変位量の二乗の比に比例する。本モデルを用いる場合は、得られたフォースカーブに対し、式(4)を最小二乗近似でカーブフィッティングし、サンプルの弾性をヤング率で評価する。なお、実際のプローブ形状はピラミッド形であり、*サンプルとの接触面積は円錐形より大きくなる。そのためサンプルに加わる力 F は大きくなり、得られたフォースカーブに Hertz Model を適用するとヤング率は小さく見積もられることになる。しかし、本研究ではピラミッド形プローブとサンプル間の接触面積と荷重密度に関する等方性の問題が解決されていないため、現在まで広く使われている等方性を考慮した Hertz Model を適用することにした。

3. 計測結果

本研究では透過照明一体型 AFM スキャナ (NVB100, Olympus) を用いたが、計測プローブのついたカンチレバーを水浸させて液中での観察を行うことができる。したがって、生体サンプルを生理条件下に近い状態で観察することが可能となった。また、倒立顕微鏡から得られる画像をモニタに映し出すことにより、サンプルの状態を把握しつつ実験を行うことができる。実験ではモニタを見ながら測定対象となる赤血球を選び、カンチレバーの位置合わせを行った。対象サンプルは、いずれの実験でもヘパリン採血したラット及びヒトの全血をリン酸緩衝液 (PBS) で希釈し、個々の赤血球が観察できる濃度に調製したものを用いた。なお、ヒトからの採血にあたってはインフォームドコンセントを受けた。

〈3・1〉 硬化赤血球の弾性特性 赤血球の弾性定数は、プローブの押し込み量とそのときの赤血球に加わる力によって変化する。個々の赤血球弾性を一律に評価するには、最大押し込み力 $F_{\max}$ を一定にして弾性定数を求める必要がある。また、弾性評価に適切な $F_{\max}$ を決めることも重要である。本システムでは、サンプルにプローブをどこまで押し込むか、そのときのカンチレバーのたわみ量 S から $F_{\max}$ を検知するが、この S の値を事前に設定し、レーザー測距で制御する。そこで、 $F_{\max}$ を 0.1~2.0 nN の範囲で変化させて、正常赤血球とこれをグルタールアルデヒド (GA) 処理した硬化赤血球の違いが精度よく検出できる $F_{\max}$ を検討した結果、適切な $F_{\max}$ は 1.5 nN 前後であることを確認した。

サンプルは、Wistar 系雄性ラット 6 匹の赤血球であり、GA の濃度 (重量 %) を PBS で調製し、0.05 %, 0.5 %, 5 % 溶液に正常赤血球を浸漬し、赤血球膜に硬化処理したものを用いた。対象赤血球は、PBS を充たした poly-L-lysine で処理したディッシュ底面に静置させ、カンチレバーを接触移動させてフォースカーブを計測した。プローブ押し込みは、すべて両面くぼみ円盤形 (binconcave disc shape) をしている赤血球の周辺凸部へ行った。

図4にフォースカーブの一例を示す。使用したカンチレバーのバネ定数は $k_1 = 0.02 \text{ [N/m]}$ である。図中横軸は、左よりカンチレバーが赤血球に近づき、数値0の位置でプ

図4 フォースカーブの計測結果
Fig. 4. Experimental results of the force curves for healthy and GA-treated erythrocytes.

(a) バネ定数による評価
(*... $P < 0.05$, **... $P < 0.001$. vs. Normal)

(b) ヤング率による評価
(*... $P < 0.05$, **... $P < 0.001$. vs. Normal)

図5 正常赤血球と硬化赤血球の弾性定数

Fig. 5. Elastic properties of healthy and GA-treated erythrocytes; (a) the spring constants and (b) the Young's moduli.

ローブが接触し、これより右に移動するにしたがい赤血球を押し込んでいることを表す。図から明らかなようにGAの濃度が上昇するにつれ、フォースカーブの傾きが大きくなり、サンプルが硬くなっていることを示している。

これらのフォースカーブを個々の赤血球に対して計測し、Hooke's Law を用いてバネ定数、Hertz Model を用いてヤ

図6 健常及び糖尿病赤血球のフォースカーブ
Fig. 6. Experimental results of the force curves for healthy and diabetic erythrocytes. In the figure, a force curve of dish vessel is represented.

(a) バネ定数による評価 (*... $P < 0.001$)

(b) ヤング率による評価 (*... $P < 0.001$)

図7 健常者と糖尿病患者の赤血球の弾性定数

Fig. 7. Elastic properties of healthy and diabetic erythrocytes; (a) the spring constants and (b) the Young's moduli.

ング率を算出した。図5は、 $F_{\max} = 1.5 \text{ nN}$ に設定したときの赤血球のバネ定数を示したものである。各々の群について30～35個の赤血球のバネ定数の平均値と分散で表し、 t -検定による正常赤血球に対する有意差を示した。図からわかるように正常赤血球とGA濃度0.5%、5%の硬化赤血球の弾性に有意な差がみられたが、0.05%の硬化赤血球の弾性には有意な差がみられなかった。この結果は、Hooke's Lawによるフォースカーブの線形近似が赤血球の荷重対変位量の非線形性と合致せず、また、このモデルがカンチレバーのプロープと赤血球の接触面積を考慮していないため、荷重対変位量の関係を厳密に評価できず、誤差が大きくなることを示している。

一方、ヤング率で赤血球弾性を評価した結果では、正常赤血球と、硬化赤血球の弾性に有意な差がみられた。特に、バネ定数で評価した場合には有意差がみられなかったGA濃度0.05%の場合についても、有意差がみられた。

〈3・2〉 糖尿病赤血球の弾性特性 つぎに、健常者8名と糖尿病患者13名を対象に各人の赤血球7～10個に対し弾性計測を行い、比較検討した。サンプルはヒトからヘパリン採血後、リン酸緩衝液(PBS)で希釈し、AFM下で個々の赤血球が観察できる濃度に調整したものを用いた。ヒトの赤血球はラットのものより一回り大きく、カンチレバーのプロープを押し込みやすいが、 $F_{\max} = 1.5 \text{ nN}$ に設定して赤血球の弾性定数を求めた。図6は、健常赤血球と糖尿病赤血球のフォースカーブの計測結果の一例である。健常者赤血球のフォースカーブは、ラットの正常赤血球と同様に傾きの緩やかな特性を示した。一方、糖尿病赤血球のフォースカーブは、健常のものより傾きが若干急しゅんになり、赤血球膜の糖化により硬くなっているものと推定される。図中にはディッシュ底面をカンチレバーで押し込んだときのフォースカーブを併記したが、柔軟な赤血球とは異なり剛体への押し込み変位はみられず、カンチレバーのたわみ量が線形に変化していることがわかる。

図7は、対象となった健常群と糖尿病群について赤血球の弾性定数の平均値と分散を求めたものである。バネ定数、ヤング率ともに健常群と糖尿病群の赤血球弾性に有意な差がみられ、糖尿病患者の赤血球弾性が上昇、すなわち硬くなっていることが示された。これは、高血糖下で赤血球の細胞膜の脂質・蛋白が糖化して硬くなり、毛細血管内を流動する際に赤血球の変形能が著しく低下するという現象⁽⁴⁾⁽⁵⁾に合致する。したがって、糖尿病では細動脈や毛細血管などで実質的に高ずり応力の発生に起因して血管内皮の傷害が起り、血栓や梗塞の発生頻度の増大など最小血管症(Microangiopathy)へ発展する可能性が大きくなると考えられる。

4. 考 察

〈4・1〉 生体サンプルの弾性特性について AFMによる生物試料の形状観測ならびに弾性計測には幾つかの先行研究がある。N.J. Taoらは、牛の含水脛骨のフォースカーブを計測し、ヤング率が0.1～10[GPa]であることを示した。硬

いサンプルであるが、計測部位の違いによってその弾性特性は一様でなく、また、プローブの形状によっても異なるフォースカーブが得られることを明らかにしている⁽⁶⁾。一方、同様なフォースカーブ計測によりA.L. Weisenhornらは、ヒトの肺癌細胞を対象にヤング率が0.013～0.15[MPa]となることを⁽⁷⁾、M. Radmacherらは、ヒトの血小板で0.001～0.05[MPa]となることを⁽⁸⁾、E. Braetらは、肝臓内覆細胞の生細胞で2[kPa]前後、グルタールアルデヒド固定細胞で0.1[MPa]以上になることを⁽⁹⁾、R.W. Starkらは、ヒトの染色体を用いて生理的条件を保ったPBS溶液下で0.5～0.7[MPa]、TE溶液下で0.16～0.3[MPa]になることを示した⁽¹⁰⁾。これに対してM. Arnoldiらは、グラム陰性バクテリアを対象にバネ定数を求めているが、0.042[N/m]であることを示した⁽¹¹⁾。以上のデータと比較して、筆者らの赤血球のバネ定数及びヤング率に関するデータは、軟らかい生物試料の弾性特性として妥当な数値であるといえる。

〈4・2〉 赤血球に加わる力について いずれのデータにも共通して言えることは、カンチレバー先端のプロープを細胞表面のどの部位に押し込みフォースカーブを得るかにによって弾性特性が異なることである。すなわち、ミクロ構造の影響が特性上に反映する。本計測では、両面くぼみ円盤形(binconcave disc shape)をしている赤血球の周辺凸部へプロープを押し込むことによってデータを取得しているが、中央凹部へプロープを押し込むとカンチレバーの一部が辺縁の凸部に接触してフォースカーブの計測がなされないことが多い。周辺凸部を計測部位とすると、その影響は全くない。これはカンチレバーの形状とプローブの長さ、すなわち構造上の問題によるものであり、本システムを使用する限り避けられない。本研究では赤血球の周辺凸部のみを計測対象としたが、赤血球の弾性特性は周辺凸部と中央凹部では構造上および内部実質の違いから異なる値が得られるものと予想されるので、今後、カンチレバーとプローブ構造の異なるものを使って細胞中央から周辺にわたる弾性特性の計測を行う必要がある。さらに弾性特性は細胞膜の脂質や蛋白質の骨格構造の部位依存性があるものと考えられる。スペクトリンなど裏打ち蛋白構造などで細胞膜に一様性がないことは既に知られており、スペクトリン網目構造部位とそうでない部位ではヤング率が異なるものと考えられる。本計測では、構造体のいかなる部位を計測しているかは特定できないため、計測結果のバラツキに反映しているものと言える。今後、フォースカーブの計測部位がどこであるかは色素や蛍光染色などによって特定し、ミクロ構造とヤング率の関係を明らかにする必要がある。

また、サンプルを押し込む力の大小によってサンプルの変位とカンチレバーのたわみ量が非線形に変化するため、そのフォースカーブから得られる弾性特性が一定値として求まらない。 $F_{\max}$ が小さい場合、プローブのサンプルへの押し込み量は少なく、プローブとサンプルの接触面積も少ない。したがって、サンプルからプローブへの反力は少なく、カンチレバーのたわみ量も少なく、フォースカーブ

の傾きは極めて小さい。例えば $F_{\max} = 0.1 \text{ nN}$ はカンチレバーのたわみ量 $= 5 \text{ nm}$ に相当する。一般に、赤血球とカンチレバーが接触していない状態でも、カンチレバーには $2 \sim 3 \text{ nm}$ 程度のふれ（オフセット）が生じており、カンチレバーのたわみ量が小さいほどオフセットの影響を強く受ける。そのため、フォースカーブから得られる弾性特性は低い値を示すとともに、オフセットの影響により正確な計測が困難になる場合が多い。

一方、 $F_{\max}$ が大きい場合、プローブのサンプルへの押し込み量は多くなり、プローブとサンプルの接触面積も広がり、反力は大きくなる。そのため、フォースカーブの傾きは極めて大きくなり、弾性特性は高い値を見積もることになる。また、 $F_{\max}$ が大きいとサンプルの変形が大きくなり、接触領域に対しサンプルが半無限体とみなせるといふ Hertz Model の理論を適用することができなくなる。本研究の実験結果から判断すると、赤血球に対する最大押し込み力は、 $F_{\max} = 2.0 \text{ nN}$ が計測できる上限値と考えてよい。

表 1 は、ラット正常赤血球及びグルタルアルデヒド硬化処理赤血球のバネ定数とヤング率の押し込み力依存性を示したものであり、 $F_{\max}$ の値によってサンプルの弾性特性に違いがでてくる。本研究では、これらのデータを基にして $F_{\max} = 1.5 \text{ nN}$ を最適値とした。

なお、使用したカンチレバーのプローブ形状はピラミッド形をしており、円錐形状より接触面積が広く、サンプルに

加わる力 F は大きくなるため、円錐形状を仮定した Hertz Model を得られたフォースカーブに適用すると、ヤング率が高く見積もられると考えられる。プローブ形状の差異による弾性特性の算出に関して、理論的ならびに実験的に詳細な検討が必要であるが、今後の課題である。

〈4・3〉 カンチレバーのバネ定数について カンチレバーのバネ定数を大きい（硬い）ものにするか、小さい（柔らかい）ものにするかによってもフォースカーブの形状が変わり、得られる生体サンプルの弾性特性が異なってくる。使用したカンチレバーの形状、バネ定数およびプローブ先端角 α は、同じロット（1 ロットに 2 本）のものであればほぼ同一であるが、異なるロットのものはこれらの数値も若干異なっている。本計測では 1 つのカンチレバーで 80 個の赤血球の弾性特性を計測しているが、全サンプルには異なるカンチレバーを多数本使用しているので、そのままの条件で計測すると異なる弾性特性を算出し、計測結果にばらつきが生じてしまう。したがって、使用条件として、まず各カンチレバーで計測前にディッシュを使ってフォースカーブを計測し、オフセットとセンシティビティの校正を行い、すべて同一条件になるように初期設定してから本実験に入るようにした。これらは AFM でフォースカーブを計測する際に必須のことであり、メーカーからの使用規定に遵守した。なお、カンチレバーのバネ定数と先端角はメーカーの仕様にとり、一定値と仮定して弾性特性の算出に使ったが、数%のばらつきがあるものと考えている。

式 (1)～(4) からわかるように、カンチレバーの移動量 ($Z - S$) に対するカンチレバーのたわみ量 S の傾きは、カンチレバーのバネ定数 k_1 に大きく依存し、サンプルの弾性特性の計測感度に深く関わる。特に生細胞は非常に軟らかい物質であり、サンプルのバネ定数やヤング率が小さいほど、カンチレバーのバネ定数は小さいことが望ましく、高感度で高精度の計測が可能となる。本研究で用いたカンチレバーのバネ定数は 0.02 N/m であるが、予備実験でバネ定数 0.08 N/m のものを用いてフォースカーブの計測精度の比較を行った結果、バネ定数 0.08 N/m のカンチレバーを用いた方では、赤血球の弾性定数が大きく見積もられる。これは、弾性計測の際に、たわみ量 S を一定に保つように AFM の設定を行うため、バネ定数 0.08 N/m のカンチレバーを用いた方では、赤血球に加わる力が大きくなり過ぎて、上述の $F_{\max}$ が大きい場合と同様に弾性定数が大きく見積もられるためである。また、 0.08 N/m のカンチレバーでは、 $F_{\max}$ が大きいために赤血球の弾性変形限界を超え、赤血球にくぼみが残る例が多い。その状態は、フォースカーブ計測後に本体に付設した高倍率の光学顕微鏡で明らかに観察された。したがって、カンチレバーが硬い場合には、プローブの押し込み量とたわみ量が小さい範囲で計測しなければならず、その結果、計測感度が更に低下することになる。

一方、カンチレバーのバネ定数が小さくなり過ぎると、感度が高いために共振現象が生じたり、オフセットの影響

表 1 赤血球弾性特性の印加力依存性

Table 1. Elastic properties of healthy and GA-treated erythrocytes dependent on the applied force of AFM cantilever; (a) the spring constants and (b) the Young's moduli.

(a) バネ定数で評価した赤血球弾性
(平均値 $\pm$ SD, unit : mN/m)

Force [nN]	Normal	GA 0.05 %	GA 0.5 %	GA 5 %
0.5	3.82 ± 2.20	4.17 ± 1.47	7.28 ± 1.78	14.01 ± 6.92
1.0	6.62 ± 3.95	7.11 ± 3.09	11.67 ± 2.28	20.46 ± 9.33
1.5	8.65 ± 5.18	9.99 ± 4.58	15.18 ± 3.98	24.28 ± 10.49
2.0	10.31 ± 8.86	13.86 ± 5.21	19.45 ± 4.45	27.83 ± 10.13

(b) ヤング率で評価した赤血球弾性
(平均値 $\pm$ SD, unit : MPa)

Force [nN]	Normal 1	GA 0.05 %	GA 0.5 %	GA 5 %
0.5	0.071 ± 0.084	0.100 ± 0.097	0.216 ± 0.093	0.799 ± 0.745
1.0	0.113 ± 0.126	0.169 ± 0.169	0.261 ± 0.118	0.625 ± 0.520
1.5	0.123 ± 0.126	0.218 ± 0.207	0.280 ± 0.155	0.496 ± 0.298
2.0	0.137 ± 0.161	0.283 ± 0.177	0.284 ± 0.134	0.249 ± 0.109

がより大きくなるなど、実験時の取り扱いが困難を極める。つまり、軟らかいサンプルを評価する場合には、カンチレバーのバネ定数は小さいものが適しているものの、小さい程良いとは言えない。

以上のように、カンチレバーのバネ定数は、フォースカーブ計測に大きな影響を与えるパラメータであり、対象によってカンチレバーの選択に注意する必要がある。非常に軟らかい生体サンプルである赤血球の弾性計測にバネ定数 0.02 N/m のカンチレバーを用いたことは妥当であったと考える。

〈4・4〉 老化赤血球と糖尿病赤血球の弾性特性 ヒト赤血球の寿命は、およそ 120 日、ラットでは 45～68 日である。採血した赤血球には若いもの、老いたものそれぞれが混在しており、その弾性特性は、サンプルが老若いずれかによって左右される。したがって、赤血球のバネ定数及びヤング率に偏差がみられるのはサンプルの日齢にも依存していることになる。両面くぼみ円盤形 (binconcave disc shape) をしている赤血球が老化すると、表面積が減少して小球化し、細胞容積の減少、細胞内 Ca イオンの増加、 Na イオンの増加、 K イオンの減少、これにともなう脱水で細胞内水分の減少、内部粘度の上昇、等が起こり、赤血球自体は変形しにくくなる。また、細胞膜の脂質・蛋白質・糖質の量が減少し、膜の弾力性がなくなり、脆弱化すると考えられる。細胞内のヘモグロビン量はほとんど変化しないが、細胞内水分量の減少でヘモグロビン濃度は上昇し、ヘモグロビンの酸素親和性が高まるため、組織への酸素供給を低下させることになる⁽¹⁴⁾。

成人病における赤血球の機能変化は、老化赤血球と同様な状態を呈すると考えられる。血球内の Ca イオンの蓄積とこれに起因する膜蛋白質間相互作用の変化は、本態性高血圧症、糖尿病、慢性腎不全における細胞変形能の低下の一因となっている。糖尿病では、とくに赤血球膜骨格蛋白質の糖化、膜裏打ち蛋白のスペクトリンの酸化的傷害やリン酸化、スペクトリンの膜内密度の変化（減少により球状化）、膜脂質組成や赤血球内 ATP-量の変化、が膜の可塑性を低下させ、赤血球変形能を低下させ、組織への酸素供給を低下させているものと考えられる。赤血球膜内コレステロールが増加した場合にも、膜の流動性が低下し、変形能が低下する。更に、糖尿病では赤血球の凝集促進がみられ、糖化が血小板、白血球、血管の構成成分にも起こるので、血液細胞と血管壁との相互作用が著しく変化し、循環系全体としての病態を形成することになる⁽¹⁴⁾。

本研究では、糖尿病赤血球のバネ定数とヤング率がともに健常例に比べて有意に増加し、細胞自身が硬くなっていることを示したが、上述のように、糖化にともなう細胞膜の変性、膜骨格の変化、細胞内のイオン濃度や内部粘度の変化などが起因して弾性定数の上昇をもたらしているものと考えられる。従来、マイクロピペット法で赤血球表面を吸引し、その吸引変形量と吸引圧の関係から正常赤血球膜の弾性定数を求めた例があるが、ずり弾性率が $6.6 \times 10^{-6} \text{ N/m}$

であり⁽¹⁵⁾、本研究の計測データとは異なる。AFM によるミクロな弾性計測では極微細なカンチレバーのプロープを押し込み、その押し込み歪との関係から弾性定数を求めたもので、上記のずり弾性率とは全く異なるものと考えるべきである。

以上、本研究で赤血球のミクロな弾性定数が AFM のフォースカーブ計測によって初めて示されたとともに糖尿病赤血球の弾性が健常例に比べて硬く、赤血球の変形能低下に寄与することが示されたことは意義あるものと考えられる。なお、赤血球の弾性特性を AFM で計測する際の誤差は、カンチレバーとプロープの形状、カンチレバーのバネ定数、カンチレバーの押し込み・引き上げ速度、カンチレバー押し込み・引き上げ時のプロープとサンプル間の引力や粘着力・接合力に基づくオフセット、フォースカーブの原点の識別、などに依存し、10～10 数%の誤差は避けられない。これらの誤差要因の克服は、今後の検討にまたなければならぬ。また、生物サンプルを対象とする場合、特性値はサンプルの計測部位や個体差に依存するため、対象群間の差異を比較するには統計的処理による有意差検定による評価が必要である。

5. おわりに

本研究では、AFM のコンタクトモード動作により赤血球細胞のフォースカーブを計測し、Hooke's Law 及び Hertz Model を適用して赤血球のミクロな弾性特性を求めた。ヒト及びラットの健常赤血球では、赤血球に加える力が 1.5 nN でバネ定数 $7 \sim 9 \text{ mN/m}$ 、ヤング率 $0.1 \sim 0.15 \text{ MPa}$ であったが、糖尿病赤血球のバネ定数とヤング率はともに健常例に比べて有意に増加し、細胞自身が硬くなっていることが明らかになった。これは赤血球の変形能が低下することを意味し、種々の末梢血管病変の誘発にも密接に関連することから極めて重要なことである。AFM による生体サンプルの計測自体がまだ新しいものであるため、有効な評価方法は確立されておらず、経験を積み重ねる必要があるが、以上に述べてきた問題点の改善、加えてプロープであるカンチレバーの材質、形状、大きさや、バネ定数などを改良することにより、様々な生体サンプルの形状観測や弾性計測が可能になると考えられる。

なお、本研究は一部、文部省科学研究費基盤研究 B(2)、No.11558112 及び中谷電子計測技術振興財団研究助成金 No.15-1 の研究助成を受けてなされたものである。ここに記して謝す。

(平成 14 年 1 月 29 日受付、同 14 年 4 月 8 日再受付)

文 献

- (1) 武見太郎、沖中重雄、山村雄一：「微小循環」、山中書店、85-86 (1979)。
- (2) 岡小天：「バイオレオロジー」、裳華房、83-88 (1984)。
- (3) N. Maeda and T. Shiga: "Velocity of oxygen transfer and erythrocyte rheology", News Physiol. Sci., 9, 22-27 (1994)。

- (4) K. Tsukada, E. Sekizuka, C. Oshio, and H. Minamitani: "Direct measurement of erythrocyte deformability in diabetes mellitus with transparent microchannel capillary model and high-speed video camera system", *Microvasc. Res.*, 61, 3, 231-239 (2001).
- (5) H. Minamitani, K. Tsukada, T. Kawamura, E. Sekizuka, and C. Oshio: "Analysis of elasticity and deformability of erythrocytes using microchannel flow system and atomic force microscope", *Proc. 1st Ann. Int. IEEE-EMBS Special Conf. Microtech. Med. Biol.*, 68-71 (2000).
- (6) N.J. Tao, S.M. Lindsay, and S. Leeds: "Measuring the microelastic properties of biological material", *Biophys. J.*, 63, 4, 1165-1169 (1992).
- (7) A.L. Weisenhorn, M. Khorsandi, S. Kasas, V. Gotzos, and H.J. Butt: "Deformation and height anomaly of soft surfaces studied with an AFM", *Nanotechnology*, 5, 106-113 (1993).
- (8) M. Radmacher, M. Fritz, C.M. Kacher, J.P. Cleveland, and P.K. Hansma: "Measuring the viscoelastic properties of human platelets with the atomic force microscope", *Biophys. J.*, 70, 556-567 (1996).
- (9) E. Braet, C. Rotsch, E. Wisse, and M. Radmacher: "Comparison of fixed and living liver endothelial cells by atomic force microscopy", *Appl. Phys., A*, 66, S575-S578 (1998).
- (10) R.W. Stark, S. Thalhammer, J. Wienberg, and W.M. Heckl: "The AFM as a tool for chromosomal dissection - the influence of physical parameters", *Appl. Phys., A*, 66, S579-S584 (1998).
- (11) M. Arnoldi, C.M. Kacher, E. Bauerlein, M. Radmacher, and M. Fritz: "Elastic properties of the cell wall of *Magnetospirillum gryphiswaldense* investigated by atomic force microscopy", *Appl. Phys., A*, 66, S613-S617 (1998).
- (12) R.W. Stark, S. Thalhammer, J. Wienberg, and W.M. Heckl: "The AFM as a tool for chromosomal dissection-in the influence of physical parameters", *Appl. Phys. A*, 66, 579-584, (1998).
- (13) S.P. Timoshenko, and J.N. Goodier: "Theory of Elasticity", 「弾性論」, 金多潔監訳, コロナ社, 413-423 (1973).
- (14) 三輪史朗監修, 藤井寿一, 高桑雄一編: 「赤血球」, 医学書院, 62-68 (1998).
- (15) 貝原 眞, 坂西明郎: 「バイオレオロジー」, 米田出版, 131 (1999).

南 谷 晴 之 (正員) 昭和 41 年慶大・工・電気卒。同 46 年同大大学院博士課程了。同 45 年慶大・工・電気助手。同大専任講師, 助教授を経て, 現在, 同大・理工・物理情報工学科教授。同 49~51 年西独アーヘン工科大学ヘルムホルツ研究所客員研究員。生体計測, 生体信号処理, 生体画像計測等の研究に従事。工学博士。電気学会, 日本エム・イー学会, 電子情報通信学会, 計測自動制御学会, 日本微小循環学会, 等各会員。

川 村 友 美 (非会員) 平成 11 年 3 月慶大・理工・電気卒。同 13 年 3 月同大大学院理工学研究科生体医工学専攻修士課程了。微小循環動態の解析, マイクロマシーニング技術の生体計測への応用に関する研究に従事。

塚 田 孝 祐 (非会員) 平成 7 年 3 月慶大・理工・電気卒。同 9 年 3 月同大大学院理工学研究科生体医工学専攻修士課程了。現在, 同大・大学院理工学研究科生体医工学専攻博士課程在学中。光・画像工学, マイクロマシーニング技術の生体計測への応用に関する研究に従事。日本学術振興会特別研究員 (DC)。

飯 島 淳 彦 (非会員) 平成 11 年 3 月慶大・理工・電気卒。同 13 年 3 月同大大学院理工学研究科生体医工学専攻修士課程了。現在, 同基礎理工学専攻博士課程在学中。生体計測, 生体信号処理, 生体画像計測等の研究に従事。

関 塚 永 一 (非会員) 昭和 55 年慶大・医卒。同 60 年南アラバマ大・医生理・研究員, 同 62 年ルイジアナ州立大・医生理・研究員, 同年国立埼玉病院消化器内科医長, 現在, 同臨床研究部長。消化器病・肝臓病・糖尿病学および微小循環学の研究に従事。医学博士。日本内科学会, 消化器病学会, 糖尿病学会, 日本微小循環学会, 等の各会員。

大 塩 力 (非会員) 昭和 45 年慶大・医卒。同 52 年慶大病院消化器内科医長。同 53~55 年トロント大・医病理・研究員。同 57 年国立埼玉病院消化器内科医長・臨床検査科長。現在, 亮友会大塩医院長。消化器病・肝臓病・糖尿病学および微小循環学の研究に従事。医学博士。日本内科学会, 消化器病学会, 糖尿病学会, 日本微小循環学会, 等の各会員。