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—

Measurement of erythrocyte deformability from uniaxial stretching

-Influence of excessive and cyclic stretching on shape recovery process-

学 ○加藤 陽介 (関大院)
正 田地川 勉 (関大工)

正 郡 慎平 (藍野大)
正 板東 潔 (関大工)

Yosuke KATO, Graduate School of Kansai University, 3-3-35, Yamate-cho, Suita
Shimpei KOHRI, Aino University
Tsutomu TAJIKAWA and Kiyoshi BANDO, Kansai University

Key words : erythrocyte deformability, uniaxial stretching, micropipette, time constant

1. はじめに

赤血球は非常に優れた変形能を有しており、自身よりも細径の毛細血管をわずかな圧力差をもって通過することができる。しかし、生活習慣病やその他の疾患により変形能が低下すると毛細血管を通過することが困難になり、血流を妨げる原因となる。そのため、赤血球の変形能を把握することは重要となるが、現在変形能を定量的に評価するための物理量は定義されていない。そこで我々は静止流体中において、赤血球に単軸引張ひずみを与え、その力から解放されたあと元の形状へと回復していく過程を観察し、その時定数を測定することで赤血球の変形能の評価を試みている。

赤血球は体内で約 120 日生存し、その間に毛細血管を何度も通過していることから誕生から時間が経過し加齢した赤血球は、若い赤血球に比べてより多く繰り返し変形を受けており、疲労などの蓄積により変形能が変化していることが考えられる。そこで赤血球に過度の引張ひずみを繰り返し与え、その繰り返し回数が形状回復時定数にどのように影響するのかを調べた。

2. 実験装置・方法

血液サンプルは、20 代の健康男性から採取した血液を遠心分離にかけ、赤血球のみを取り出す。取り出した赤血球を PBS(リン酸緩衝生理食塩水)で 3 回洗浄し、PBS で希釈することで赤血球サンプルを調製した。なお、赤血球サンプルの変質の影響をできるだけ排除するために、採血後 24 時間以内に実験を行った。

本研究で用いたマイクロマニピュレーターシステムを図 1(a)に示す。コントロールロッドにより 3 次元的に動かすことが可能な各マニピュレーターのアーム部先端に、図 1(b)に示す赤血球を吸引・保持するためのマイクロピペットを取り付けた。実験では、片側のマイクロピペットで赤血球を吸引・保持後、もう片方のマニピュレーターを動かすことで赤血球に単軸引張ひずみを与えた。

Fig. 1 Schematic diagram of Micromanipulator system.

赤血球の復元力がマイクロアスピレートシステムの吸引・保持力を上回り、赤血球がマイクロピペットから解放されて元の両凹円盤形状に回復するまでの様子をカメラで記録した。図 2 に示すように撮影した画像から、その引張軸方向の赤血球の長さ d_x をマイクロピペットから離れた瞬間 ($t=0$ s) から元の形状に回復するまで測定した。赤血球の変形が十分に収束したら、外れた側のマイクロピペットを赤血球に近付けもう一度吸引・保持し、再び引張試験を行い、これを複数回繰り返した。

Fig. 2 The shape recovering process of a tensile-deformed erythrocyte.

3. 赤血球形状回復過程のモデル化

赤血球が単軸引張ひずみを受けて、その力から解放されて元の形状に回復する際、赤血球の長さは図 3 に示すように一次遅れ系の挙動を示すことがわかっている。そこで図 4 に示すような代表的な粘弾性モデルである Kelvin モデルを用いて形状回復過程をモデル化した。式(3)より図 3(b)の傾きの逆数から赤血球の形状回復に関する時定数を算出する。なお、顕微鏡およびカメラの持つ空間分解能よりも高い高ひずみ領域のデータに関して直線近似をする。

Fig. 3 An example of the shape recovering of an erythrocyte.

Fig. 4 Kelvin model as the shape recovering of erythrocyte.

$$F(t) = F_0(1 - I(t)) \quad (1)$$

$$\tau_\sigma = \mu_2 \left(\frac{1}{k_1} + \frac{1}{k_2} \right) \quad (2)$$

$$\varepsilon_x = \frac{F_0}{k_2} \left(1 - \frac{\mu_2}{k_2 \tau_\sigma} \right) \exp \left(\frac{-I}{\tau_\sigma} \right) \quad (3)$$

Table 1 Compositional unit of Kelvin model	
F	External force
I	Unit step function
ε_x	True strain
k_1, k_2	Spring constant
μ_2	Coefficient of viscosity
τ_σ	Relaxation time constant

6. 繰り返し単軸引張試験が形状回復時定数に及ぼす影響

実験では赤血球が単軸引張から解放され元の形状に回復してから十分時間が経過した後、次の単軸引張試験を行った。なお実験は、赤血球の膜が破壊され溶血するまで繰り返した。今回、10 個の赤血球に対して実験を行い、各赤血球に与えたひずみは平均 0.5、その標準偏差 0.16 であった。それぞれの単軸引張試験において形状回復時定数 τ_σ を測定し、引張試験の回数 N との関係求めた結果の例を図 5 に示す。今回測定した 10 個の赤血球のうち 7 個に引張回数が増すにつれて時定数が低下する傾向が見られた。なお図中の r は式(4)で与えられる相関係数を表している。

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n (N_i - \bar{N})(\tau_{\sigma i} - \bar{\tau}_\sigma)}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (N_i - \bar{N})^2} \sqrt{\sum_{i=1}^n (\tau_{\sigma i} - \bar{\tau}_\sigma)^2}} \quad (4)$$

引張回数が多い(a),(b)は、相関係数 r の値が-1 に近いことからわかるように、単軸引張の回数が増すにつれて形状回復時定数が低下する傾向があった。少ない引張回数で溶血した赤血球の中には(c),(d)のように引張回数が増すにつれて時定数が低下するものや、(e)のように時定数が上昇するもの、(f)のように引張回数による時定数の変化はみられないものが見られた。

実験中に、繰り返し引張負荷を与えた赤血球サンプルを観察していると、その前後でその明らかに形状に差異が確認できた。図 6 に繰り返し試験前後の赤血球の様子を示す。試験前の赤血球は中央の凹みをはっきりと観察できるのに対して、繰り返し引張後の赤血球は中央の凹みが不鮮明となっている様子がわかる。実験中、赤血球はリン酸緩衝生理食塩水に浸しているため、浸透圧差によって赤血球が膨張・収縮することは無く、赤血球の体積は一定である。一方、赤血球の膜骨格は外部の力に応じて構造を変化させ、外力が除荷されると元の形状に回復する。しかし膜に対して過度のひずみを与えると構造の一部に不可逆的な変化を生じることがわかっている⁽⁶⁾。今回の実験においては、赤血球に繰り返し過度のひずみを与えたことで膜に裏打ちされているスペクトリンの一部が欠損し、欠損した箇所を補うように赤血球膜が修復したために表面積が減少し球形状に近づいたと考えられる。このように赤血球の表面積/体積比が減少し球形状に近づくと、赤血球自体の剛性が高まるために赤血球の変形能は失われ、その結果、図 5 のように形状回復時定数が低下したと考えられる。

また、初回の引張試験で測定された時定数に、大きな差が見られた。加齢の進行に伴い、赤血球の変形能が低下している可能性がある。変形能が低下した赤血球の形状回復時定数は短縮する傾向にあることから、図 5(e),(f)のように、実験開始時に短時定数であった赤血球は、もともと硬化が進行していたため、多数の繰り返し引張負荷に耐えられず、少ない引張回数で溶血に至ったのではないかと考えられる。そのため今後は、密度差を使って赤血球を加齢度別に分画し、分画したサンプル毎に繰り返し単軸引張試験をすることで、時定数の変化傾向を考察する必要があると考えられる。

Fig. 5 Influence of cyclic stretching on time constant change.

Fig. 6 An example of an erythrocyte's shape change by applying repeated tensile strain.

7. まとめ

赤血球に加えられる繰り返し変形が形状回復時定数に及ぼす影響を調べるために、静止流体中において赤血球に過度の単軸引張ひずみを繰り返し与え、引張から解放された赤血球が元の形状に回復する様子を観察し、その時定数を測定した結果、

- ・赤血球に与える引張負荷の回数が増すにつれて形状回復時定数が低下する傾向が見られた。
- ・繰り返し引張試験後の赤血球は試験前に比べて中央の凹みが不鮮明となり、球形状に近づいた。

参考文献

- (1) 藤井達三; 赤血球膜の脂質と金属イオン分析法 生体膜実験法(上)共立出版株式会社, (1974)
- (2) Fung; Biomechanics -Mechanical Properties of Living Tissues 2nd Ed.,Springer-Verlag. ,(1993)
- (3) Evans; FORCE RELAXATION AND PERMANENT DEFORMATION OF ERYTHROCYTE MEMBRANE, Biophys J, pp.91-98, (1983)
- (4) Tsukada; Direct measurement of erythrocyte deformability in diabetes mellitus with a transparent microchannel capillary model and high-speed video camera system. 61(3), pp.231-239, (2000)
- (5) 菅原; 血液のレオロジーと血流,コロナ社, (2003)
- (6) Ju; Cytoskeletal dynamics of human erythrocyte, PNAS, pp.4937-4942,(2007)
- (7) 高桑;化学と生物; 26(5), pp.287-294