B109 傾斜遠心顕微鏡により計測された種々の基板上を移動する赤血球の摩擦特性の比較

Comparison of frictional characteristics of red blood cells on various substrates measured with inclined centrifuge microscope

○ 神取 孝司, (東北大院), 芳賀沼 智美, (東北大院), 正 井上 浩介, (東北大流体研),
正 早瀬 敏幸, (東北大流体研), 武田 元博, (東北大医学研),

Takashi Kandori, Graduate school of Engineering, Tohoku Univ., 6-6-01 Aramaki, Aoba-ku, Sendai, 980-8579.

Haganuma Tomomi, Graduate school of Engineering, Tohoku Univ., 6-6-01 Aramaki, Aoba-ku, Sendai, 980-8579.

Kousuke Inoue, Institute of Fluid Science, Tohoku Univ., 2-1-1 Katahira, Aoba-ku, Sendai, 980-8577.

Toshiyuki Hayase, Institute of Fluid Science, Tohoku Univ., 2-1-1 Katahira, Aoba-ku, Sendai, 980-8577.

Takeda motohiro, Dept. Bioeng. & Robotics, grad. Sch. Eng., Tohoku Univ., 6-6-01 Aoba-ku, Sendai, 980-8579. Div. Surgical Oncology, Grad. Sch. Medicine, Tohoku Univ., 2-1 Seiryomachi, Aoba-ku, Sendai, 980-8574.

Key word: DLC, MPC ポリマー, 傾斜遠心顕微鏡

1. 緒言

微小循環における血流は、細胞への酸素、栄養物の供給、老廃物の回収など、生理学的に重要な役割を担っており、これまで多くの研究がなされている。特に毛細血管内の血流においては、血球、血漿タンパク、血管内皮細胞表面の糖タンパク層などの複雑な相互作用が生じていると考えられているが、その実体はいまだ明らかにされていない。最近では、赤血球と血管内皮表面層の干渉を考慮した流動数値解析も行われているが、対応する実際の測定例はなく、現象解明のためには、血球と内皮表面層との摩擦特性を計測する必要がある。

本研究では赤血球と内皮細胞の相互作用を明らかにするための基礎的研究として、遠心力を応用して赤血球の摩擦特性を計測する傾斜遠心顕微鏡を開発し、血漿中でガラス板上を移動する赤血球の摩擦特性を測定した。⁽¹⁾

近年、人工臓器や医療機器などの様々なバイオマテリアルをコーティングする材料が注目されており、本研究では特に非晶質炭素膜 (DLC 皮膜)⁽²⁾と MPC ポリマー⁽³⁾というコーティング材に注目した。一般に DLC 皮膜の摩擦係数が小さい点、生体適合性に優れている点などから、将来的に医療機器や人工臓器のコーティング材料としての応用が期待されている。また、MPC ポリマーはタンパク質吸着を始めとする一連の生体異物反応を効果的に抑制する優れたバイオマテリアルであり、バイオ関連産業に貢献すると考えられている。DLC 及び MPC 表面上の赤血球の摩擦特性は興味深い問題である。

本研究では傾斜遠心顕微鏡を用いて、赤血球と DLC 及び MPC ポリマーをコーティングしたガラス板との摩擦特性を測定し、従来の赤血球とガラス板単体との摩擦特性と比較することにより、DLC 皮膜及び MPC ポリマー皮膜が赤血球の運動に与える影響を明らかにし、種々のバイオマテリアルをコーティングする際の一つの基準を与えることを目的とした。

2. 実験装置および実験方法

2-1. 傾斜遠心顕微鏡

実験装置の構成を Fig.1 に示す。遠心分離機のロータに、2つの試料入れを対角線上に設置する。試料入れはアクリル製で、内部の寸法は 10mm×8.5mm×1mm (幅×奥行×高さ)である。一方の試料入れに血液試料を封入する。レーザダイオードとディテクタで生成したロータ回転の同期信号をパルスジェネレータで遅延し、シンセサイザで CCD カメラ (池上通信社製 SKC141, 145 万画素) のフレームレート以下に

なるよう分周したものを、YAG レーザ (KANOMAX, SPIV-30-20-ATT, パルス幅 3ns 最大エネルギー 30 mJ/pulse) のトリガとして与える。試料入れは回転面から角度 θ 傾けて取り付けられており、落射顕微鏡 (ニコン CM-10, 対物レンズ CF Plan EPI SLWD 50 倍及び、オリンパス CplanFI 10 倍) で観察される。ただし落射光は用いず、回転する試料入れが顕微鏡の光軸に正対した瞬間に、光ファイバで導かれたパルスレーザ光を底面から照射することにより、血球の静止画像を得る。画像は CCD カメラを通して PC に保存される。

2-2. 実験試料

i) DLC 成膜基板, MPC 基板及びガラス基板

本研究では赤血球の摩擦特性を計測するのに用いる基板にガラス板 (高橋技研ガラス製, カバーガラス, 厚さ 0.5 mm を 8 mm×8 mm にカットしたもの) 単体と、ガラス板に DLC をコーティングしたもの (以下, DLC 基板), MPC ポリマーをコーティングしたもの (以下, MPC 基板) の三つの基板を用意し、赤血球の摩擦特性を計測する。なお DLC の成膜条件は以下の通りである。

- 電極: 平行平板型,
- 導入ガス: 4 sccm(CH₄)
- 成膜中チャンバ圧力: 2.20E-2 Torr
- バイアス電圧: -700 V
- 成膜時間: 5 分
- 膜厚: 100~200 [nm]

また、ガラス板を MPC ポリマーの液体に浸した後、自然乾燥させ、MPC ポリマーをコーティングした。

Fig. 1 Inclined centrifuge microscope

ii) 血液試料

ヒトの静脈から採取した血液をクエン酸ナトリウム (3.8%) で抗凝固処理した後、遠心分離 (2500rpm, 10 分間) して血漿と赤血球をそれぞれ得る。さらに血漿のみを同条件で再遠心分離する。その後、赤血球を血漿に体積割合で 0.01% の濃度で混入し、これを試料とする。

2-3. 測定原理

傾斜遠心顕微鏡では、媒質中におかれた基板 (以下「ベース」と呼ぶ) に接する赤血球に、遠心力のベースに平行な成分と垂直な成分を与えながら、顕微鏡観察をし、ベース上を移動する赤血球の速度を測定することにより、摩擦特性を計測する。Fig.2 に試料部模式図を示す。血漿に赤血球を分散させた試料を、角度を変えることのできる容器に入れ、回転軸 Z のまわりに回転させる。回転前に浮遊している赤血球には、回転後に遠心力が作用する (Fig. 2(b))。遠心力を付加されてベース面と接する赤血球には、ベース傾斜角 θ に応じて、遠心力のベース面に対して、平行な成分 F_T と垂直な成分 F_N が作用する。

ここで垂直成分はベース面からの抗力とつりあい、平行成分は、赤血球をベースに沿う面に加速させる。赤血球に作用する力について、ベース面から受ける摩擦力 F_T^* と上部の媒質から受ける抗力 f_D の合力が F_T とつりあった時点で赤血球は等速度運動となり、以下の等式が成り立つ。

$$F_T^* + f_D = F_T \quad (1)$$

実際の赤血球に作用する抵抗 f_D を正確に見積もることは困難である。赤血球の直径と移動速度及び血漿の動粘度より求めたレイノルズ数 R_e は、本論文の実験条件では 10^{-3} 以下であることから、ストークス流れを仮定し、さらに便宜的に球の抵抗係数を用いて赤血球に作用する抵抗力をモデル化し、赤血球に作用する摩擦力 F_T^* を算出した。⁽¹⁾

3. 結果と考察

本研究では、赤血球に作用する垂直力を一定 $F_N=47$ [pN] の条件下で、接線力を $F_T=40,35,30,25,20,15,10,5$ [pN] と変化させ、ガラス板、DLC 基板及び MPC 基板でそれぞれ実験を行った。対物レンズの倍率は 10 倍を用いた。速度計測では同一条件で 4 回、各 100 画像撮影し、画像のぶれを補正した後 PT V 演算 (nexus 製 nexus PIV expert2000) を行い、4 回の平均から赤血球の平均移動速度と標準偏差を算出した。

摩擦特性の計測結果を Fig.3 に示す。DLC 基板上及び MPC 基板上を移動する赤血球の移動速度を、それぞれガラス基板上を移動する赤血球の移動速度と比較した。 $F_T=25$ [pN] の条件におけるガラス基板上を移動する赤血球の移動速度と MPC 基板上を移動する赤血球の移動速度には有意差がないが、 $F_T=40,35,30,20,15,10,5$ [pN] の条件下では有意差 (確率水準 5%) があり、ガラス基板上を移動する赤血球と DLC 基板上を移動する赤血球の移動速度は、 $F_T=5$ [pN] の条件下では有意差がないが、 $F_T=40,35,30,25,20,15,10$ [pN] の条件下では有意差があることが確認された。 $F_T=35$ [pN] の条件で DLC 基板上を移動する赤血球の速度が極端に小さい。これは、洗浄が不十分で基板上に吸着した血漿タンパク質が影響したことが原因だと考えられる。基板ごとの赤血球の移動速度の違いには二つの理由が考えられる。一つは摩擦特性が基板によって異なるということ、もう一つは血漿中に存在する障害物 (血漿タンパク質が凝集したものと考えられる) の影響である。DLC 基板を用いて実験を行った際に、赤血球が血漿中の障害物にぶつかりながら移動する様子が、他の二基板で実験を行ったときよりも顕著に見て取れた。実際、いずれの条件下においても DLC 基板上を移動する赤血球の移動速度は他の二基板上を移動する赤血球の移動速度よりも小さいことが見

(a) initial state (b) steady movement of RBCs
Fig. 2 Principle of frictional force measurement

Fig.3 Comparison of friction force characteristics between glass plate, DLC plate and MPC plate

て取れる。DLC 皮膜と血漿が触れると血漿タンパク質が凝集しやすい、もしくは血漿タンパク質が DLC 基板に吸着しやすいということが考えられ、今後検討が必要である。

4. 結言

本研究では傾斜遠心顕微鏡を用いて、赤血球と DLC をコーティングしたガラス基板、及び MPC ポリマーをコーティングしたとの摩擦特性を測定し、従来の赤血球とガラス板単体との摩擦特性と比較することにより、DLC 皮膜及び MPC 皮膜が赤血球の運動に与える影響を明らかにした。

謝辞

東京大学大学院、石原一彦教授には MPC ポリマーをご提供頂きました。東北大学大学院流体科学研究所、竹野貴法様には DLC の成膜にご協力頂きました。ここに、深く感謝の意を表します。

参考文献

1. 早瀬, 白井, 杉山, 濱谷: 傾斜遠心力の作用により血漿中で平板上を移動する赤血球の摩擦特性の計測, 日本機械学会論文集 (B 編) 68 巻 676 号 (2002-12) 3386-3391.
2. M. Mohanty, T.V. Anilkumar, P.V. Mohanan, C.V. Muraleedharan, G.S. Bhuvaneshwar, F. Derangere, Y. Sampeur, R. Suryanarayanan: Long term tissue response to titanium coated with diamond like carbon, Biomolecular Engineering 19 (2002) 125- 128.
3. K. Ishihara, H. Ishihara, T. Mihara, Y. Iwasaki, N. Nakabayashi: Why do phospholipid polymers reduce protein adsorption? J. Biomed. Mater. Res. 39 (1998) 323-330.