04212 赤血球の形状がおよぼす光散乱現象の検討

Investigation of relationship between erythrocyte configuration and scattering density

○ 非 安田 利貴 (東京医科歯科大) 非 渡邊 宣夫 (東京医科歯科大)
 正 高谷 節雄 (東京医科歯科大) 正 舟久保 昭夫 (東京電機大学)
 正 福井 康裕 (東京電機大学)

Toshitaka YASUDA, Tokyo Medical and Dental University, Kanda surugadai 2-3-10, Chiyoda-ku, Tokyo

Nobuo WATANABE, Setsuo TAKATANI, Tokyo Medical and Dental University

Akio FUNAKUBO, Yasuhiro FUKUI, Tokyo Denki University

One of the causes of micro thrombosis is thought to be erythrocyte deformability. In particularly, the erythrocytes might become irreversible configuration (lower deformability) prior to lysis because erythrocytes in cardiopulmonary devices were subjected to unphysiological level of mechanical stress. Therefore, it is important for development of cardiopulmonary devices to investigate the relationship between erythrocyte configuration and deformability. The purpose of this study is to investigate the relationship between erythrocyte deformability and light scattering density. At first, we investigated the relationship between erythrocyte configuration and light scattering density. An estimation of experimental apparatus was applied to numerical analysis of differential cross-section (Mie single phase function theory) and to measure light scattering intensity of sphere particles. The differential cross-section of blood sample is similar to the scattering cross-section of sphere. However, the differential cross-section of blood sample did not find the dimple. In conclusion, we could measure erythrocyte of phase function by using our experimental apparatus.

Key Words : erythrocytes, deformability

1. 緒言

循環器系人工臓器内(以下、人工臓器)を通過した赤血球は、非生理的な大きさの力学的負荷を受けるため、溶血には至らないものの膜構造が変化し、不可逆的な形状変化が起こる^{1,2)}。この様な赤血球の出現は、血栓や貧血を誘発する原因の1つである。そのため、人工臓器の安全性を高めるには、in-vivo において赤血球の変形能などを観察する必要がある。

従来、in-vitro における赤血球変形能の評価は、逆回転レオメータ、エクサイトメータ(回折光評価)などで行われている。これらの評価結果を基に、赤血球の力学的特性や酸素運搬について詳細な検討が行われている³⁾。しかしながら、これらの評価方法は、in-vitro 評価方法であるため、in-vivo へ応用することは困難である。そこで我々は、in-vivo 下における赤血球の変形能を計測するための装置の開発を目指している。本報告では、赤血球の形状変化ならびに濃度がおよぼす散乱光特性について報告を行うことにした。

2. 粒子の光散乱特性

粒子がおよぼす光の散乱は、粒子の形状、粒子と周囲の相対屈折率、光の波長などに依存する。単一粒子光散乱条件下では、入射光 I_0 と散乱光 $I(\theta, \varphi)$ の関係は、以下の式で表される。

$$I(\theta, \varphi) = \frac{NV}{k^2 r^2} F(\theta, \varphi) I_0 \quad \cdots \cdots (1)$$

ただし、 $F(\theta, \varphi)$: 微分散乱断面積、 N : 粒子の個数、 k : 波数 $(\frac{2\pi}{\lambda})$ 、 r : 計測距離(センサと散乱物との距離)とする。

(1)式において、 $F(\theta, \varphi)$ は微分散乱断面積と呼ばれ、散乱の対象となる粒子の形状によって決定される。

3. 実験方法

3.1 散乱光計測装置

Fig.1 に今回試作した散乱光計測装置の概要を示す。本計測装置は、フォトカウンティングヘッド(浜松フォトニクス, H8259-02)、波長 628.3nm の He-Ne レーザ(メスグリオ社, 05LHR991)、 θ ステ

ジ(シグマ光機, SGAM-H120YAW)、偏光フィルタ、ND フィルタ、絞りレンズなど構成されている。散乱光強度は、散乱角 $(0.5^\circ/\text{step})$ ごとに 1 秒間でカウントされるフォトン数とした。計測範囲は $\pm 141^\circ$ 、 θ ステージならびにフォトカウンティングヘッドの制御は、パーソナルコンピュータにて Visual Basic を使用して行った。本実験では、計測範囲を $\pm 120\text{deg}$ とした。計測対象のサスペンション溶液は、ステージ上の Pyrex ガラス管内 ($\phi 10\text{mm}$) に入れた。フォトンカウンティングヘッドとガラス管の距離は、17.5cm とした。

Fig.1 Schematic diagram of experimental apparatus

3.2 散乱光計測装置の感度特性評価

計測装置の感度係数 b' は(1)式から、 $b' = \frac{N}{k^2 r^2} I_0$ と表すことが

出来る。

本実験では、まず、単一粒子の散乱理論である Mie 散乱により、 $\phi 10 \mu\text{m}$ (屈折率 1.5) の球形粒子について $F(\theta, \varphi)$ の数値計算を行った。ただし、粒子は、水の中に分散されている条件とした(水の屈折率: 1.33)。次に、散乱光計測装置を用いて、ポリスチレン粒子 ($\phi 9.02 \pm 0.667 \mu\text{m}$; 屈折率 1.5 (楕円ポリサイエンス)) を静止条件下において粒子濃度の違いによる $I(\theta, \varphi)$ の計測を行った。

ただし、 $\varphi=0$ 一定、粒子濃度積割合は、0.002~0.067%vol とした。そして、これらの結果から、各散乱角における感度係数 b' を

求め、計測装置の総合感度特性 (Coefficient of total sensitivity) について検討を行う。

3.3 赤血球の微分散乱断面積の計測

赤血球の微分散乱断面積は、3.2 で検討される総合感度係数 b' と本実験で計測される赤血球の散乱光強度を用いて求めた。実験では、形状の変化を浸透圧で調整した。高浸透圧溶液は、等張溶液である PBS 溶液 (約 300mOsm/l) に NaCl 1.0% (約 340mOsm/l) を混ぜ約 640mOsm/l とした。Hct. は、0.012, 0.036% とした。高浸透圧溶液下では、0.012, 0.036% (0.012h%, 0.036h%) とした。微分散乱断面積は、計測された $I(\theta, \varphi)$ と (1) 式の関係から求めた。ただし、 $\varphi=0$ 一定、総合感度係数 b' は、3.2 の実験結果を用いた。

4. 結果

4.1 散乱光計測装置の感度特性評価実験結果

Fig.2 は、粒子濃度の変化による $I(\theta)$ の計測結果の一部を示した。0.00624%vol では、計測された散乱光にディンプルが確認された。一方、0.06656%vol では、散乱角ごとのディンプルは確認されなかった。両方の実験条件において、垂直偏光 (Vertical) に比べ、水平偏光 (Horizontal) が散乱角 80deg 以上で高い光子数が確認された。

Fig.2 Results of scattering intensity

Fig.3 には、Fig.2 の結果と Mie 散乱理論より求められた微分散乱断面積から、 b' を求めた結果を示す。散乱角 25~45deg までは、垂直方向、水平方向の両者において、ほぼ同様な感度特性が得られた。一方、散乱角 45~90deg 近辺において、垂直方向の感度係数は、水平方向に比べて、約 2 倍の大きさを示した。

Fig.3 Coefficient of total sensitivity

そこで、Fig.3 の実験結果から、本実験装置の総合感度係数 b' は、散乱角ごと (5~110deg) の感度係数の総和の平均値とした ($b'=0.303$)。

4.2 赤血球の微分散乱断面積の計測結果

Fig.4 に総合感度係数と散乱光強度の計測結果から算出される散乱角ごとの微分散乱断面積を示した。等張溶液下における赤血球の微分散乱断面積は、本実験条件において、全ての Hct. および散乱角における微分散乱断面積は、球 $\phi 4.7 \mu\text{m}$ (牛赤血球と同等な体積球) の微分散乱断面積と同様な傾向を示した。一方、高浸透圧溶液において、Hct. 0.012, 0.036% (0.012h%, 0.036h%) では、散乱角 5~60deg 付近において Hct. に関係なく微分散乱断面積がほぼ同様な結果を示した。一方、0~5deg および 60deg 以降では、濃度による明らかな違いが観察された。

Fig.4 Differential cross section

5. 考察

単球形粒子の散乱光強度の数値解析 (Mie 散乱理論) と球形粒子の散乱光強度の実測により、散乱光計測装置の感度特性について検討を行った。本実験では、総合感度係数 b' は、散乱角ごとの感度係数の総和の平均値として表した。この b' を用いて、実測された赤血球の微分散乱断面積と Mie 散乱理論による微分散乱断面積について比較すると、ディンプルは見受けられないものの大まかな微分散乱断面積の一致が確認された (Fig.4)。ディンプルは、実際の赤血球が楕円形状であることに起因すると考えられる⁵⁾。

一方、赤血球の形状がおよぼす微分散乱断面積の計測結果では、各浸透圧条件において、濃度に関係なく同様な微分散乱断面積が確認された。今後、楕円形状、有棘形状などの赤血球形状に関する散乱光とそれらの微分散乱断面積の関係について詳細な検討を行っていく予定である。

文献

- 1) Y.Ohta, et al : Atomic force microscopic observation of mechanically traumatized erythrocytes, Artif.Organs26(1):10/17,2002
- 2) 安田利貴ほか: 光散乱による溶血に至る前の赤血球の状態計測に関する検討, ライフサポート 15(2):47/54,2003
- 3) M.Bessis at el : A diffractometric method for the measurement of cellular deformability, Blood Cells1:307/313,1975
- 4) N.Takahashi et al : Deformation response of red blood cells in oscillatory shear flow, American Physiological Society, H1701/1078,1990
- 5) JM.Steinke at el: Comparison of Mie theory and the light scattering of red blood cells, Applied Optics 27(19):4027/4033,1988