解説

細胞変形能評価は ブラックボックス排除との戦い

Fair Evaluation on Cell Deformability is Impossible
without Removing Many Black Boxes

執筆者プロフィール

金子 真
Makoto KANEKO

◎1981年東京大学工学系研究科機械工学専門課程博士課程修了，産業技術総合研究所，九州工業大学，広島大学を経て現在に至る
◎研究・専門テーマは，ハイパーヒューマン工学，ダイナミックアクティブセンシングのバイオ・医療応用
◎正員（フェロー），大阪大学教授 大学院工学研究科機械工学専攻
(〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 2-1 /
E-mail: mk@mech.eng.osaka-u.ac.jp)

1. はじめに

“ブラックボックスは一つにせよ”，これが計測の鉄則である。一つのセンサ出力から二つの未知数を同時に評価することが困難だからである。例えば，糖尿病患者の赤血球は硬くなる一方で，健常者の赤血球であっても採血後時間が経つと硬くなることが知られている。この場合，両者の硬さを正確に評価しようとする，少なくとも採血後の時刻を合わせておく必要がある。ところが，この時刻を厳密に合わせたとしても，赤血球の硬さは浸透圧によっても変化する。赤血球内圧が上昇すると，赤血球は硬くなり，逆に内圧が下がると柔らかくなる。この浸透圧は塩分濃度に左右されるため，生理食塩水内で赤血球の硬さ評価を行う場合には塩分濃度も厳密に合わせておく必要がある。このように細胞には硬さを左右するブラックボックスが数多く内在し，これが単独の評価指標で細胞の変形能を評価することを難しくしている。細胞変形能特性を支配するブラックボックスが数多く存在することを知った上で，このブラックボックスを少しでも減らすにはどうしたらいいのだろうか，この事実を知った上で，筆者らはブラックボックスをできるだけ排除する工夫を計測方法に施すとともに，細胞の大きさや移動速度に影響を受けにくい無次元変形能評価マップを導入している。本稿ではブラックボックスの対処法と無次元変形能マップについて最近の研究成果につ

いて解説してみたい。

2. 赤血球の変形能がなぜ重要なのか

極細毛細血管の直径は2マイクロメートル程度であるのに対し，赤血球の直径は6～8マイクロメートルあるため，赤血球が動脈から静脈に移動する過程で，自分自身の形を30%程度変形させる必要がある。したがって，赤血球が変形能を失うことは，極細毛細血管内での赤血球の通過抵抗が増大することを意味し，結果的に心臓の負担増に繋がる。このように赤血球がその変形能を失った時点で生命を維持し続けること自体困難になる。赤血球変形能を知る意義がここにある。

3. 赤血球変形能の計測方法

赤血球変形能計測に関する研究は大きく直接法と間接法に大別できる。直接法とは力センサ付きプローブを赤血球に直接押し当て，そのときの変形をビジョン等で計測し，力/変形特性から硬さや粘性を評価する方法である。原子間力顕微鏡を用いた硬さ計測はその一例である。一方，間接法とは，力を直接計測するのではなく，赤血球に同一幾何学的拘束条件下で変形を与え，そのときの変形の時間的な変化を計測することで硬さや粘性を評価する方法である。極細流路内通過時間から細胞の粘弾性を評価する方法がこの一例である。例えば，同一直径かつ同一粘度を有する赤血球であれば，通過時間が長い程，硬く，変形能は悪いと言える。間接法では硬さや粘性の絶対値は得ることはできないものの，力センサが不要，高速計測が可能といった利点を有している。ここでは，高速評価という視点で極細流路を用いる間接評価法に焦点をあてる。

極細流路を用いた赤血球変形能評価に関する研究は数多くあり，極細流路内の細胞の伸展能，極細流路内から出た後の細胞の回復能などが取り扱われている。図1は極細流路内を移動する細胞の挙動を示したものである⁽¹⁾。伸展能とは細胞の元々の直径に対して，極細流路内で長さがどれだけ伸びたかを示す評価指標であり，長いほど変形能は高いと言える。また回復能とは極細流路出口からでた細胞

図1 極細流路内での赤血球の振る舞い⁽¹⁾ 図2 通過時間が同一でも現象が異なる例
($K_a > K_b$, $C_a < C_b$)

が規定距離移動した後、どの程度回復するかを示す評価指標であり、極細流路入口の形状に近いほど変形能が高いと言える。

4. 浸透圧が作るブラックボックスの排除

赤血球の変形能を支配する物理パラメータとして力学パラメータと幾何学パラメータがある。力学パラメータには赤血球内液体の粘性と硬さ（バネ）があげられる。硬さはさらに膜の硬さと内部流体圧が作り出す硬さに分けることができる。一般に赤血球は採血後放置しておくとも時間とともに硬くなることが知られている。この硬さの変化に膜と内圧がどういったバランスで関与しているのかほとんどわかっていない。幾何学パラメータとしては大きさ（直径）がある。赤血球は、脱核後の生まれたての赤血球が一番大きく、極細血管通過中に血流を一時的に止めるほどの抵抗要素になることが指摘されている。一方、血液中の塩分濃度をあげると浸透圧の関係で赤血球内部から水分が外部にもれて内圧が下がり、膜表面に金平糖のようなしわが形成される。血液中の塩分濃度を下げると、赤血球内部に水分が吸収され、内圧が上がり、結果的に膜張力も増加する。赤血球の変形能計測は、血液を生理食塩水で薄めて赤血球の分布密度を50倍程度に下げた状態で行われることが多い。その場合、浸透圧を平衡状態に維持するため塩分濃度は生体内に近い0.9%に保たれる。血液を生理食塩水で薄めることは、赤血球の分布密度を下げる以外に、検体によって異なる血液粘度を一様にし、赤血球特性だけを浮き彫りにするという効果も作り出される。つまり生理食塩水で薄めることにより、浸透圧からくるブラックボックスと元々の血液粘度の違いに起因するブラックボックスの両者を排除している訳である。

5. 細胞内粘性が作り出すブラックボックスの排除

図2は極細流路内を硬さと粘性が異なる二種類の赤血

球が同一時間で通過する場合の挙動を示したものである。

図2 (a), (b) では $K_a > K_b$, $C_a < C_b$ の条件が成り立っているものとする。ここで K , C はそれぞれ硬さと粘性係数を表し、添字 a , b は (a), (b) の赤血球を意味している。

図2 (a) の赤血球は粘性が小さいため流入部での変形に要する時間は短いものの、硬いため、定常速度が小さくなる。一方で、図2 (b) の赤血球は粘性が大きいため流入部での変形に要する時間が長くなるものの、柔らかいため、定常速度は大きくなり、結果的に両赤血球の極細流路通過時間は同じになるという特例である。この例からもわかるように粘性の影響が入る場合、総通過時間から赤血球の硬さ評価を行うことはできない。つまり一個の計測値に対してブラックボックスが二つ入っている訳である。ところが粘性は変形速度に関与するパラメータであり、流入部において赤血球が大きく変形するときには関与するが、赤血球の変形が完了し、極細流路内を一定速度で移動しているときには、その影響は消滅する。一方、赤血球の硬さに応じて、極細流路内で変形させられた赤血球が壁面を押し返す力が変化し、それに応じて速度の大きさが変化するため、一定になったときの速度は粘性の大きさによらず、硬さだけで決まる⁽²⁾⁽³⁾。つまり速度が一定になったときに着目すれば“細胞内粘性”の影響が排除できる訳である。

6. 流路系に存在するブラックボックスの排除

極細流路の出入り口の圧力差を一定にしておけば、赤血球が極細流路内に入ったときの抵抗要素としての振る舞いを観察することにより、赤血球の変形能を評価することができるはずである。ところが、極細流路内出入り口の圧力差を一定にし続けること自体、結構難しい。一番の理由は流路系に介在する弾性要素により、数秒から数分オーダーで微妙な容積変化が起こり、結果的に圧力変化が起こってしまう。本来一定圧力差が維持できていれば極細流路入口部の流速は変化しないはずであるが、ビジョンで観察していると分オーダーで流入速度が変動する。このブラックボックスを排除する方法としては圧力センサを組み込んで、出入り口の圧力をモニターし、圧力を絶えず微調整し続けるしかない。

7. 伸展能と回復能の同時計測によるブラックボックスの排除^{(4)~(8)}

極細流路通過中の赤血球をビジョンで観察しているとき、変形による圧力上昇に耐え切れなくなったのか、赤血球が突然破裂した。この映像を見た瞬間、機械工学で勉強した「材料試験」のことを思い出した。赤血球を機械材料と見立てて、破壊するまで力学ストレスを加えてみよう。赤血球変形能の極限の状態が評価できるに違いない。ピエゾアクチュエータ、シリンジ、高速ビジョンを導入し、メカトロニクス技術を駆使して図3のような細胞ストレス試験装置を構築した⁽⁵⁾⁽⁶⁾。この装置を用いて実験してみると、数百回から千回程度繰り返すストレスを赤血球に加えても破裂は観察されることはなかった。よく考えてみると、赤血球は体内を一日に数百回から数千回循環している。数十秒で同じ赤血球が心臓に帰ってくる勘定になる。単純に

図3 細胞ストレス試験装置

計算してみても肺の毛細血管、末端の毛細血管と少なくとも赤血球は一日数百回から数千回のストレス試験にさらされることになる。しかも赤血球が血管内に入ってから寿命が約4箇月であることを考えると、赤血球の寿命スパンでは数万回から数十万回のストレス試験にさらされていることになり、わずかに数千回のストレス試験で破裂していたのでは、生命維持ができなくなってしまう。そこで、極細流路の中にさらに幅3マイクロメートルの狭窄部を設け、一回通過する際のストレスレベルをあげてみた。図4はこの場合のストレス試験のコンセプトを示したものである⁽⁸⁾。基本的には極細流路内での赤血球の伸展能と極細流路から出た後の回復能を同時計測し、さらにストレス試験の回数によって両指標がどのように変化していくのかストレス回数毎に追跡するという方法である。重要な点は、ストレス回数毎に赤血球の伸長特性も回復特性も悪くなり、結果的に両者が一致するストレス回数が必ず存在する点である。その回数をその赤血球の変形能限界と見なすことができる。これまで伸展能と回復能はそれぞれ個別に実験が行われていたが、それらを同時に調べることによって、個体差や実験時間差からくるブラックボックスを排除しようとしている。図5はストレス試験中の赤血球の様子を示したものである。運動方向によって赤血球の形が変化し、魚の尾ひれのような形状が運動方向の後部側に現れる。しかもこの尾ひれ形状が現れるのは変形能が高いときだけで、変形能が低くなると、この尾ひれ形状は消滅する。図6は評価結果の一例で、予想されたように伸展能と回復能が一致するストレス回数が存在していることがわかる。さらにもっと面白いことは、この変形能限界に対応するストレス回数は、一回目のストレス時の伸長特性と回復特性と相関がでる点である。図7は、縦軸に変形能限界、横軸に一回目のストレス試験における伸展能を初期直径 D_0 を用いて無次元化したパラメータ $EI = L(1, 0)/D_0$ で整理している。この図からも両者の間で相関があり、一回目に大きな差がでる赤血球は変形能が高く、ストレス回数も大きくなっていることがわかる。

図4 ストレス試験のコンセプト

図5 ストレス試験中の赤血球の様子

図6 ストレス試験の一例

図7 変形能限界と伸展性の関係

図8 健常者と糖尿病患者の無次元変形能評価の一例

8. 無次元数の導入

極細流路で赤血球の硬さを評価する場合、物理現象は以下のパラメータによって支配されていると考えられる。

$$F(k, D, L, u_{eq}, u_t, w, \mu) \sim \text{無次元}$$

ここで k , D , L , u_{eq} , u_t , w , μ はそれぞれ細胞の硬さ、変形前の細胞直径、極細流路内での細胞の長さ、極細流路内での平衡速度、細胞が流路内にない場合の流体平均速度、極細流路幅、および流体粘性である。 π 定理を用いて次元解析を行うと、以下のように無次元細胞硬さは三つの無次元数の関数と見なすことができる。

$$\left(\frac{k}{u_t \mu}\right) = F\left(\frac{D}{w}, \frac{L}{w}, \frac{u_{eq}}{u_t}\right)$$

図8は無次元変形能評価指標 $\hat{D}I = L/w$ を横軸にとって健常者と糖尿病患者の変形能評価の行い、両者に統計的有意差が現れることを示した例である⁹⁾。無次元数の導入はパラメータ数を減らす有効手段となる。

9. おわりに

生体内では赤血球は多くの赤血球が互いに連なって移動することが知られている。一方、血管には交感神経により内径を能動的に変化させることができる。例えば、大きな赤血球が極細血管内に入ると、交感神経がそれを察知して血管内径を拡張し、抵抗を緩和しようとする。このような血流の調節機能は、結果的に局所的な血圧上昇を防止する役目を担っている。本解説では赤血球の変形能に特化した、血管の変形能評価も重要かつ興味深い研究課題である。赤血球や血管の力学特性に関する研究は、機械工学の基礎知識を有する技術者にとって研究トピックスの宝庫であることを付記しておきたい。

(原稿受付 2014年1月16日)

●文 献

- (1) Hirose, Y., Tadakuma, K., Higashimori, M., Arai, T., Kaneko, M., Iitsuka, R., Yamanishi, Y. and Arai, F., A New Stiffness Evaluation toward High Speed Cell Sorter, *Proc. of the IEEE Int. Conf. on Robotics and Automation*, (2010-5), 4113-4118.
- (2) Tsai, C., Kaneko, M., Sakuma, S. and Arai, F., Distinct Patterns of Cell Motion Inside a Micro-Channel under Different Osmotic Conditions, *35th Annual Int. Conf. of the IEEE Engineering in Medicine & Biology Society (EMBC13)*, (2013-7), 5525-5528.
- (3) Tsai, C., Kaneko, M., Sakuma, S. and Arai, F., Phase Decomposition of a Cell Passing Through a μ -channel - A Method for Improving the Evaluation of Cell Stiffness, *Proc. of the IEEE Int. Conf. on Mechatronics and Automation (ICMA12)*, (2012-8), 138-143.
- (4) Fukui, W., Kaneko, M., Sakuma, S., Kawahara, T. and Arai, F., m-Cell Fatigue Test, *Proc. of the IEEE Int. Conf. on Robotics and Automation*, (2012-5), 4600-4605.
- (5) Kuroda, K., Fukui, W., Kaneko, M., Sakuma, S. and Arai, F., A New Index of Cell Fatigue under Reciprocative Stress Test, *Proc. of the Int. Conf. on Miniaturized System for Chemistry and Life Sciences (micro-TAS)*, (2013-10), 371-373.
- (6) Sakuma, S., Kuroda, K., Arai, F. and Kaneko, M., Cell Vibro-deformability, *Proc. of the Int. Conf. on Miniaturized System for Chemistry and Life Sciences (micro-TAS)*, (2013-10), 976-978.
- (7) Sakuma, S., Kuroda, K., Arai, F. and Kaneko, M., Realization of 240 Nanometer Resolution of Cell Positioning by a Virtual Flow Reduction Mechanism, *Proc. of the IEEE Int. Conf. on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS2014)*, (2014-1), 1031-1034.
- (8) Sakuma, S., Kuroda, K., Tsai, C.H.D., Fukui, W., Arai, F. and Kaneko, M., Red Blood Cell Fatigue Evaluation Based on Close-encountering Point between Extensibility and Recoverability, *Lab on a Chip*, **14**-6 (2014), 1135-1141.
- (9) Tsai, C., Sakuma, S., Arai, F. and Kaneko, M., A New Dimensionless Index for Evaluating Cell Stiffness-based Deformability in Microchannel, *IEEE Trans. on Biomedical Engineering*, (in press).