

高せん断流れにおける赤血球変形流動プロセスの可視化のための装置開発

Development of experimental setup to visualize the red blood cell's

deformation and rheological behavior in high shear flow

○嶋田貴洋 (芝工大院) 原遼平 (芝工大院) 渡邊宣夫 (芝工大)

Takahiro SHIMADA, Shibaura Institute of Technology

Ryohei HARA, Shibaura Institute of Technology

Nobuo WATANABE, Shibaura Institute of Technology

Abstract: It is known that high shear stress within the blood pump would destroy red blood cells(1)-(4), however, no accomplishment to monitor such a phenomenon has been ever accomplished. The purpose of this study is to develop the experimental setup, which can be applied into study to visualize the red blood cell's destruction. We developed the shear chamber which adopted the counter rotating mechanism, which allow us to monitor a single red blood cell locating within the middle position at the gap clearance. The preliminary study showed the time limitation to monitor red cell, and maximal monitoring time resulted for eight seconds. The reason of this limitation was supposed to be generated by looseness of assembling of the device. And then, the further modification of the experimental setup was performed. After that, we further evaluated the feasibility of the setup with the measurement of the axis stability using the dial gauge. As the result, better stability was shown. The additional visualization study showed the successful possibility to monitor the red cells for longer time over 30 seconds.

Key Words: Shear stress related hemolysis, Counter rotation mechanism, Blood cell visualization

1. 研究背景

血液ポンプを使用するとその発生する高いせん断によって溶血が生じることは知られている。またせん断応力と溶血の関係については、一様せん断応力 τ [Pa]とさらされる時間 t [sec]で、溶血率 $\Delta Hb/Hb$ [%]が(1)式にて表わされる事(6)がすでに報告されている。

$$\Delta Hb/Hb[\%]=3.62 \times 10^{-5} \times t^{0.785} [s] \times \tau^{2.416} [Pa] \dots (1)$$

この式は溶血時に増大する血漿中ヘモグロビン濃度と吸光度との相関性を利用した光学的手法で導出されたものである(6)。実際のところ個々の赤血球がせん断に起因した溶血に至るまで可視化された事例は無い。そこでせん断流れ場での血球の直接観察が可能となれば血球破壊のプロセスが理解できるのではないかと考えた。これが可能となれば、場合によっては従来の式で表わされる情報が覆される可能性も十分ありうると考えた。例えば、高せん断でもさらされる時間が一瞬であれば赤血球にとって安全であるかもしれない。そこで本研究室では高せん断流れにおける赤血球損傷プロセスの可視化を最終目的とし、まずは、せん断負荷環境下において、赤血球の変形流動を安定してモニタリングできるようにする実験装置を開発することを目的とした。

2. 装置の設計および製作

2-1 設計コンセプト

開発する赤血球せん断負荷装置は、赤血球を機械的仕組みの工夫により対物レンズから見て終始常にモニター内に撮影可能なように、回転方向が互いに逆で、同じ速度で回転する平行平板の真逆運動 (Fig1 参照) を取り入れた。実際の機構には、Fig.2 に示すような、カップとコーン形状を用いた。カップとコーンの間の隙間中心は互いの流れを打ち消し、そこにあるものは見た目上動かない。つまりその流れ場の中心位置を観察することで、そこに存在する赤血球は、せん断応力を与えられたとしても、継続的に観察が理論上可能である。カップコーンの構造によりせん断応力 τ [Pa]が下記の式によって求められる。ただし、 r :回転半径位置、角速度 ω [rad/s]、円錐部の傾き θ [rad]である。カップとコーンの回転角速度が

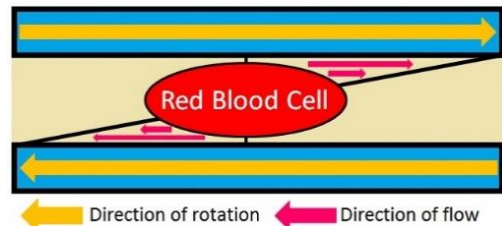


Fig.1 Mechanism plan to observe a single red blood cell under high shear
それぞれ $+\omega/2$ [rad/s], $-\omega/2$ [rad/s] とすると、隙間で発生するせん断応力 τ [Pa] は以下の式で表す事ができる。

$$\tau = \mu r \omega / r \tan \theta \approx \mu \omega / \theta$$

よって、どの半径位置においても一様せん断となる。概念図を Fig.2 に示す。実際には、既に述べた通り、カップとコーンの回転方向が逆であるが、相対的に見れば、静止カップに対して、コーンが 2ω [rad/s] で回転しているとみなす事ができるため、せん断速度は $2\omega/\theta$ で表される。また、図のようにコーン円錐先端部を 0.01mm カットする事により、コーンとカップ間の干渉を避けて熱発生を防ぐことを狙った。

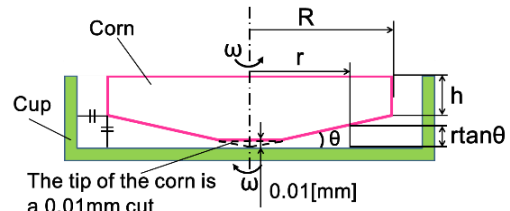


Fig.2 Schematic diagram of shear chamber

2-2 製作

設計したせん断流れ発生装置断面図を Fig. 3, 製作した装置を Fig. 4 に示す。モータの回転を歯車を用いて、等速かつ逆回転の動きに変換する機構を採用した。コーン部分をアクリルで製作することによって、顕微鏡からの光源を取り込むことが可能である。試作の後、試作品の妥当性評価のため、実際に血液細胞を用いた流れの可視化実験を行った。

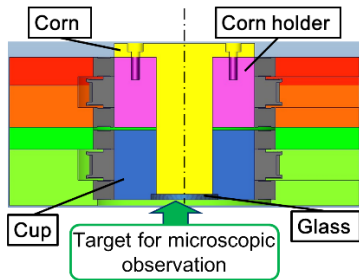


Fig.3 Cross-sectional view of the shear generator

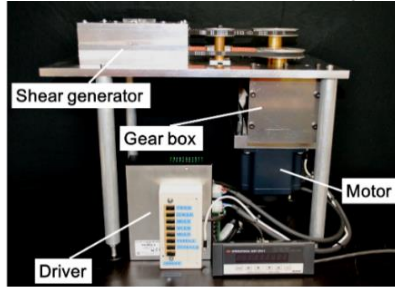


Fig.4 Assembled experimental setup

3. 製作装置の妥当性評価

3-1 赤血球を用いた流れの可視化実験

製作した装置を倒立型顕微鏡(OLYMPUS 製 IX71)にマウント(Fig.5)し、赤血球を含む溶液に対して、装置を動作させてせん断を発生させた状態で赤血球を撮影する実験を行った。血液は、抗凝固剤としてクエン酸ナトリウムが10%添加された豚血液を使用し、PBS溶液を用いて200倍に希釈したものをを用いる。また、増粘剤としてデキストラン(Low Fraction, Acros Organics 製)を30%添加した。この血液をカップコーン部分の間に流し込み、カップコーン部分を逆回転させることで、せん断速度を発生させ、せん断応力を与えられた血液を観察した。実験システムを Fig.6 に示す。

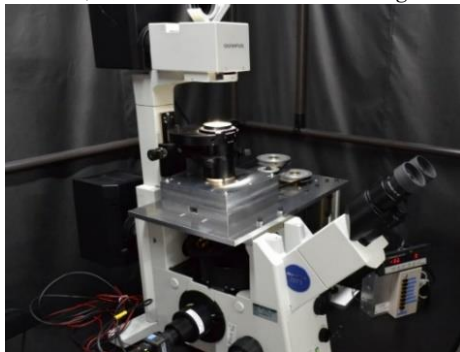


Fig.5 Setup mounted on the microscope
Top view

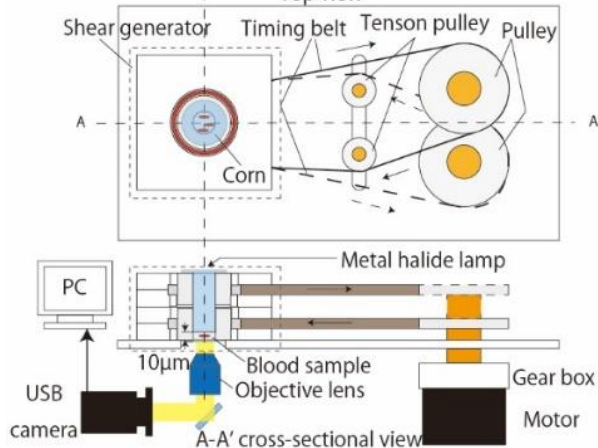


Fig.6 Experimental system schematic

3-2 赤血球の流動変形可視化実験結果

顕微鏡の対物レンズは40倍を使用した。Fig.7に示す通り、単一赤血球をせん断応力下にかけることに成功した。しかし、血球観察できる時間は8[s]と短く、その後、流れが乱れる様が観察された。

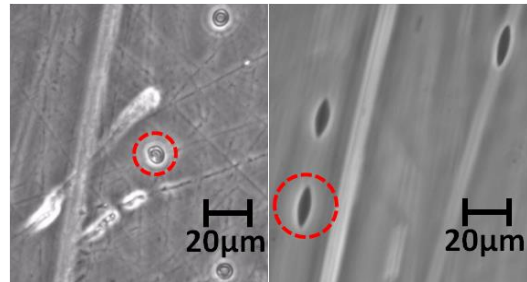


Fig.7 Red blood cell's during shear load experiment
(The left: In no load, The right: Shear stress 24Pa)

3-3 可視化実験結果に対する考察

流れが乱れる原因として軸ぶれや遠心力などによる影響が強く出た事が原因ではないかと考えられた。そこで軸ぶれ検証実験を行ったので4章にその詳細を示す。

4. フライス盤を使用した軸ぶれ検証実験

4-1 せん断発生装置の軸ぶれ検証方法

Fig.8に示すようにフライス盤にダイヤルゲージを装着し、コーンのガイドとなっている部分を測定した。つまり、Fig.3の装置断面図のコーンを取り除いた後に残ったコーンホルダ部分の筒状部に対して、ダイヤルゲージにて計測する事で、軸ぶれを測定した。ダイヤルゲージが振れない部分を探し出し、その部分のX,Yの値を中心軸であると定めた。測定位置はコーン挿入口を0点とし、高さを0[mm]とし、深さ20[mm], 30[mm]の位置を行った。これは、せん断発生位置により近い位置の測定が必要となった為、この位置の値を測定した。

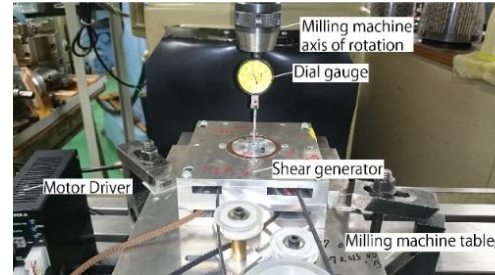


Fig.8 Experimental view to check the corn holder axis

4-2 せん断発生装置の軸ぶれ検証結果

計測ごとにベアリング等が持つクリアランスで、毎回測定誤差が現れた。そのため、この実験装置が持つ精度は静止時 $X \pm 0.01[mm]$, $Y \pm 0.015[mm]$ であることがわかった。その結果を Table.1 に示す。

Table.1 Middle arbor measurement result

Measurement depth Z[mm]	Average	
	X[mm]	Y[mm]
0mm	0	0
20mm	0.018	0.018
30mm	0.015	0.032

4-3 せん断発生装置の軸ぶれ検証結果に関する考察

測定に毎回変化が現れた原因として、ベアリングをはめているクリアランスが原因と考えた。現在使用しているクリア

ランスは 0.02[mm]であるため、ほぼ同様の結果が実験より得られた。よってこのクリアランスを軽減することにより動作が安定するのではないかと考え、厚さ 0.01[mm]のシックネステープをベアリング自体に巻きつけ、ぶれの軽減を図った。その後どれほどぶれを軽減できたのか顕微鏡を用いた可視化実験を行ったので、5章にその詳細を示す。

5. 軸ぶれ評価のための顕微鏡を用いた可視化実験

5-1 可視化実験方法

3章と同様に製作した装置を倒立型顕微鏡(OLMPUS 製 IX71)にマウントし、30%のデキストランで増粘した PBS 溶液を使用し、豚血液を 200 倍希釈した。回転数は 5, 25[rpm]を用い、それぞれ約 24, 120[Pa]のせん断応力を得た。カメラは USB カメラ (Imaging Development Systems 製 UI-1640SE: 18fps)を使用し、対物レンズは 40 倍を用いた。

また本研究室はハイスピードカメラ(NAC 製 GX-1: 3000fps)を所有しており、それを用いた実験も行った。血液は 10%のポリビニルピロリドン(SIGMA 製)で増粘した PBS 溶液を使用し、200 倍希釈した豚血液を用いた。回転数は 300[rpm]を用い、約 270[Pa]のせん断応力を得た。

5-2 可視化実験結果

24[Pa]のせん断応力に対し、30[s]という前回よりも長時間の定常観察が可能となりより安定した流れを実現する事ができた。しかし、絵流れが起きてしまう事が鮮明に観察出来ない事や、回転数を上げると、安定して観察できない事が挙げられた。これは使用している USB カメラ (Imaging Development Systems 製 UI-1640SE)が実験に使用している回転数に対応しきれていないものと考えられる。そこで本研究室にあるハイスピードカメラ(NAC 製 GX-1)を使用し、実験を試みた。しかし、せん断応力を与えても赤血球が変形しない現象が発生した。そこで代替品としてポリビニルピロリドンを使用した。回転数は 300rpm, フレームレートは 3000f で撮影を行い成功した(Fig.9)。撮影時間は約 1.16[s]であり、赤血球に掛かったせん断応力は約 270[Pa]であった。またせん断を与えてから約 0.67[s]あたりから約 1.16[s]まで、赤血球の変形に周期的に変化が現れた。

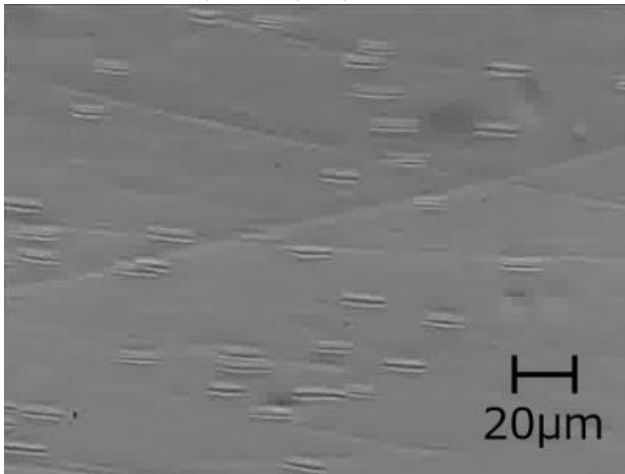


Fig.9 Red blood cell's during a shear load experiment by using high speed camera (3000fps) (Shear stress: about 270[Pa])

5-3 可視化実験に関する考察

デキストランを使用し、変形が見られなかった原因として、デキストランに含まれている糖質により赤血球膜の酸化が起こり、変形能の低下につながったのではないかと考えられる。

また約 0.67[s]あたりから、赤血球の変形挙動に周期的な変化が現れた原因として、せん断を与え、変形し続けた結果、赤血球内の ATP が消費され変形能力が低下したためだと考えられる。その為、より長い時間撮影することが出来れば赤血球の破壊現象を観察できるのではないかと予想する。

6. 考察

本研究を通じて行った実験結果をまとめると以下の通りである。せん断流れ発生装置の持つ軸ぶれをベアリングのクリアランスにシックネステープをはさむ事によって、軽減を図った。その結果、今まで 8[s]の血球観察しか行えていなかったが 30[s]まで行えるようになった。しかし、絵流れが起きてしまう、回転数を上げると安定して観察する事が出来なくなってしまうことが挙げられた。その為ハイスピードカメラによる撮影を試みた。しかし、増粘剤として使用したデキストランの影響により赤血球の変形を観察することが出来なかった。そこで代替品としてポリビニルピロリドンを使用した。その結果安定した赤血球変形を観察することが出来、現在 300rpm, 約 270[Pa]までの観察に成功した。撮影した動画の解析を行った結果、約 0.67[s]あたりから、赤血球の変形挙動に変化が現れた。この実験結果を踏まえ考察を行った。

今まで 8 秒間の観察しか行えなかったが、ベアリングのはめあいを 0.01[mm]のシックネステープを使用し、変更することにより、30 秒間の安定観察に成功した。これはベアリングのはめあいが動画のぶれに影響しているためだと考えられる。しかし、絵流れが起きてしまう、回転数を上げると安定して観察する事が出来なくなってしまうことが挙げられた。これは撮影に使用している USB カメラのフレームレートの問題ではないかと考えられる。またデキストランでの赤血球変形が見られなかった原因として、デキストランに含まれている糖質により赤血球膜の酸化が起こり、変形能の低下に影響を及ぼしたためだと考えられる。代替品としてポリビニルピロリドンを使用した。使用した結果、赤血球変形を観察することが出来た。観察した結果、約 1.16[s]の観察に成功した。観察を行うと約 0.67[s]あたりに赤血球の変形挙動に変化が現れた、したがって赤血球は溶血に至らずとも損傷している可能性が考えられた。

7. まとめ

逆運動平行平板の仕組みを利用し、せん断下で赤血球を撮影する実験装置を製作し、その動作検証を行った結果、軸ずれによる流れの不安定挙動が明らかとなった。組み立て要素間のギャップを低減する工夫により、軸ずれ量の低減が出来た。その結果、今まで 8[s]の血球観察しか行えていなかったが 30[s]まで行えるようになった。しかし、絵流れが起きてしまう、回転数を上げると安定して観察する事が出来なくなってしまうことが挙げられた。これは USB カメラのフレームレートの影響ではと考えられる。その為高フレームレートでの撮影が可能であるハイスピードカメラによる観察を行った。その結果、回転数 300rpm までの観察に成功し、赤血球変形挙動の変化を観察することが出来た。

参考文献

- [1] Carl A.et al. *Artif Organs* 35(1),2011,p9-21.
- [2] Takatani S.et al. *ASAIO Journal* 51(5), 2005, p557-562
- [3] Chris H.H. *Artif Organs* 39(2),2014,p1-9
- [4] 佐々木栄作ら. *人工臓器* 25 (4),1996,p806-810
- [5] Giersiepen M.et al. *Artif Organs* 13(5), 1990, p302
- [6] Reinhard Paul.et al. *Artif Organs* 27(6), 2003, p517-519