

赤血球の粘弾性を計測するための周期的せん断応力負荷機構の開発

Development of the cyclic shear stressor for the estimation of erythrocyte's mechanical properties

○ 安田利貴 (東京高専) 坂井優斗 (長岡技大) 橋本成広 (工学大)

Toshitaka YASUDA, Tokyo National college of Thecnology  
 Hiroto SAKAI, Nagaoka University of Tehcnology  
 Shigehiro Hashimoto, Kogakuin University

**Abstract:** The purpose of this study is to improve a variable cyclic shear-flow generator (VCSFG) for the investigation of erythrocyte deformability. First prototype of the VCSFG generates the shear rate using by the two parallel plates sandwich two silicone rollers, and when the top plate moves right, the silicone rollers rotate clockwise and the bottom plate moves left. However, there were slip between the rollers and plates so that shear rate decreased. The gap distance between top and bottom plate was low reproducibility. In order to resolve the reproducibility of the gap distance and the slip problems, we replace the two parallel plates sandwich two silicone rollers to a liner guide consisted of two stages (processed light hand screw and left hand screw) and a ball screwed shaft. We found that the liner guide system was able to supply high reproducibility of the gap distance and the movable frequency of top and bottom plate-displacements.

**Key Words:** Erythrocyte Deformability, Variable Cyclic Shear-Flow Generator.

1. 緒言

赤血球の力学特性評価は、循環器系人工臓器の溶血性能や血液病などの評価法の1つとして期待されている[1,2]. 赤血球の力学特性は、赤血球に加わる外力に対する変形量から推定される. 赤血球に加える外力は、マイクロ・フローセルや回転粘度計を用いた流れ場で発生するせん断応力がある[3-5]. 我々は、赤血球粘弾性特性を計測するために、平行平板型粘度計を応用した周期的せん断応力負荷機構の開発を試みている[6,7]. 我々が開発している周期的せん断応力負荷機構は、上下の平板を同時に同じ変位量で逆方向に動く機構を備えている(以下、逆相せん断応力負荷機構とする)[8,9]. これまで開発してきた逆相せん断応力負荷機構の特徴は、2枚の平板をローラで挟み込み、上側平板を周期的に動かすことで、下側平板が上側平板と逆相に動き、間隙内に速度ゼロとなるせん断速度が発生させることである(Fig.1). せん断速度 $\gamma$ は、上下平板の速度をそれぞれ $v_t(t)$ 、 $v_b(t)$ 、上下平板の間隙を $h$ とすると、

$$\gamma = \frac{v_t(t) - v_b(t)}{h} \quad (1)$$

と定義される.

これまで試作した逆相せん断応力負荷機構は、観察視野内での赤血球の繰返し変形を撮影することが可能であった. しかし、上下平板とローラ間に滑りが発生してしまい、速度ゼロの位置が移動してしまうため、せん断速度が小さくなってしまったことがわかった. そこで本研究では、逆相せん断応力負荷機構の再設計・試作評価を行い、発生するせん断速度の特性について検討することを目的とした.

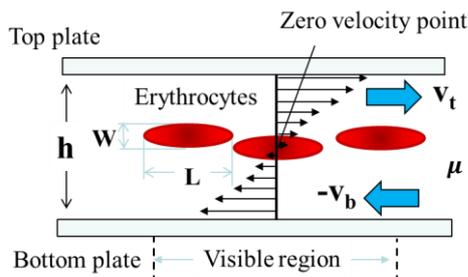


Fig.1 Schematic diagram showing the shear flow filed in the variable cyclic shear-flow generator (VCSFG).

2. 逆相せん断応力負荷機構型レオメータ

2-1 逆相せん断応力負荷機構

Fig.2 に試作した逆相せん断応力負荷機構の概略図を示す. 試作した機構は上下平板変位の伝達は、ローラの代わりに、1本の回転軸に右ねじと左ねじで加工された2つのステージが搭載されたリニアガイドアクチュエータ(以下、リニアガイド)を用いる. このリニアガイド(KR26, THK, Tokyo, Japan)は、回転軸が回ると2つのステージが同時に逆相かつ同じ速度で動く. 赤血球に負荷するせん断速度は、それぞれのステージに、ガラス平板を取り付けることで発生させる. 従来の逆相せん断応力負荷機構は、上側ガラス平板を逆相せん断応力負荷機構から取り外してから、赤血球試料をセットしていた. そのため組み立てによる間隙距離にばらつきが伴う. そこで、本実験では上側ガラス平板の上下の動きをカムおよび回転機構で支えることで、上側ガラス平板を外すことなく赤血球試料の入れ替を実現できるようにした. また、上側ガラス平板が、下側ガラス平板に対して平行な状態で接するため、間隙の平行度および距離が従来の機構に比べ再現性の向上が期待される.

2-2 平板変位の正弦波制御

逆相せん断応力負荷機構は、リニアガイドの回転軸にステッピングモータを接続して、回転運動を直線運動に変換している. そのため、市販のモータドライバでは、平板の変位を正弦波的に制御することが困難である. そこで、ステッピングモータを駆動させるパルス信号の時間間隔(以下、パルス間隔)  $\Delta t$ を調整することで、平板変位を正弦波

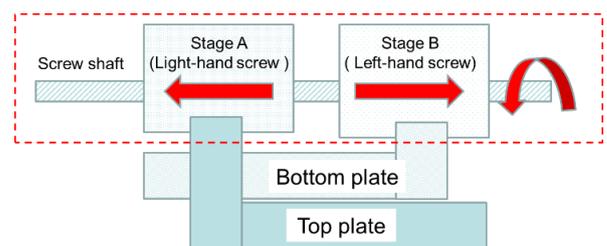


Fig.2 Schematic diagram showing the VCSFG consisted of liner guide.

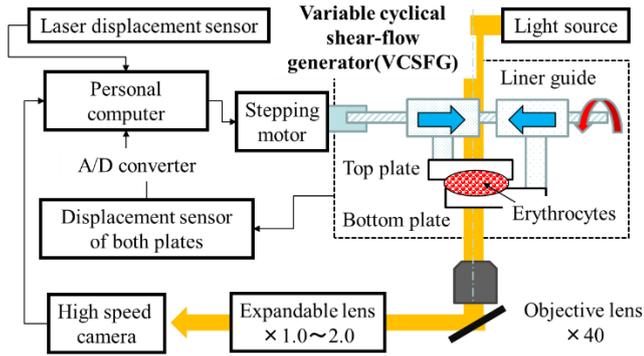


Fig.3 Schematic diagram showing the VCSFG with attached rheoscope system.

的に制御する。パルス間隔  $\Delta t$  は、周波数およびせん断速度（平板振幅  $A$ ）を考慮して、1 周期分の信号をステップ  $n$  から  $n+1$  ステップで分割することで決定する。

$$\Delta t = \frac{T}{2n} \left( \arcsin\left(\frac{n+1}{A}\right) - \arcsin\left(\frac{n}{A}\right) \right) \quad (2)$$

なお、本アルゴリズムを用いたパルス信号の生成は、RX マイコン(R5F56218BDFP, Renesas Electronics, Tokyo, Japan) で行った。

2. 実験方法

Fig.3 は逆相せん断応力負荷機構を搭載したレオメータを用いた実験装置を示す。試作した逆相せん断応力負荷機構の上下ガラス平板間の変位と間隙の評価方法を以下に記す。変位は、上下ガラス平板のステージに取り付けられた LED とリニアガイドを固定面に取り付けたラインセンサ（1次元 PSD）から計測される平板変位を測定した（サンプリング周波数 1 kHz）。上下ガラス平板間の間隙は、上ガラス平板を固定する平板の高さにおいて、赤血球試料の有無における変位をレーザ変位計（LK-G30,KEYENC, Tokyo, Japan）で計測して、その差を間隙距離とした。

平板を動かす条件は、周波数が 0.5~3.5Hz (+1.0 Hz 間隔) で、各周波数は 3 周期とする。この時、最大せん断速度が  $750s^{-1}$  となるように、式 (2) 用いてパルス間隔  $\Delta t$  を制御した。実験では赤血球試料の摩擦の影響を考慮して、デキストラン水溶液 (31wt.%) に Ht. が 5% になるように洗浄したブタ赤血球を希釈した溶液を用いた。本実験で使用するブタ赤血球は、食肉センターから購入をしているため、倫理上の問題はない。

4. 実験結果

平行平板の間隙は  $13.9 \pm 6.2 \mu m$  ( $n=9$ ) となり、従来 ( $101 \pm 34.7 \mu m$ ) の約 1/10 まで狭くすることができた。

Fig.4 は、0.5~3.5Hz の周波数をそれぞれ 3 回繰り返した時の実測した上下ガラス平板変位と変位の理論波形を示す。ただし、測定した波形は 30 点の移動平均で平滑化した。

Fig.5 は、Fig.4 の測定結果から求めたせん断速度の波形と、せん断速度  $750s^{-1}$  を発生させるための理論波形を示す。

Table1 は、変位とせん断速度の周波数の実測値とその誤差を示す。変位の周波数の誤差は+1%の範囲だが、変位から求めたせん断速度の周波数誤差は、+5~+23.7%の範囲となった。Table2 は、各周波数に対する最大変位とせん断速度の誤差を示す。最も誤差が大きかったのは、3.5Hz の条件で変位は -15.26%、せん断速度は -8.76% となった。

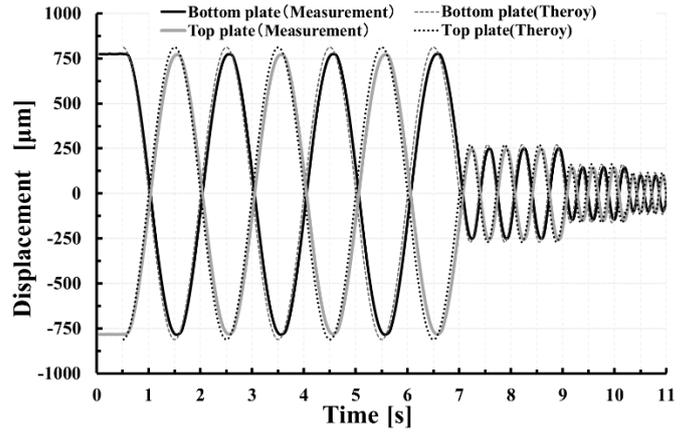


Fig.4 Relationship between top and bottom plate displacements and shear rate.

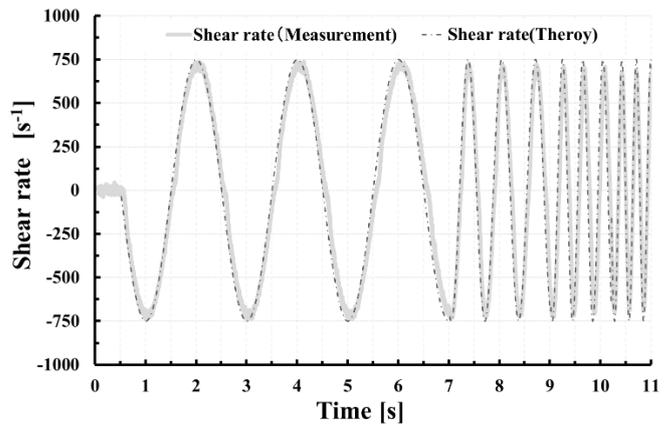


Fig.5 Time change of measurement and theoretical shear rates.

Table 1 Relationship between the measured displacement and shear rate with each frequency ( $n=3$ ).

Frequency [Hz]	Measured frequency [Hz] (Error[%])	
	Displacement	Shear rate
0.5	0.5 (0.83)	0.53 (5.24)
1.5	1.49 (0.57)	1.66 (10.76)
2.5	2.48 (0.67)	3.07 (23.72)
3.5	3.472(0.8)	3.78 (8.08)

Table 2 Maximum value of measured shear rate with each frequency ( $n=3$ ).

Frequency [Hz]	Displacement [ $\mu m$ ] (Error [%]) Bottom / Top	Shear rate [ $s^{-1}$ ] (Error [%])
0.5	780 (-3.90) 776 (-4.47)	738 (-1.66)
1.5	250 (-7.54) 251 (-7.49)	724 (-3.53)
2.5	145 (-10.86) 146(-10.39)	710 (-5.29)
3.5	98 (-15.26) 99 (-14.32)	684 (-8.76)

5. 考察

本実験では、試作した逆相せん断応力負荷機構のガラス平板の変位から計算されるせん断速度の特性について評価を行った。平板変位の周波数誤差は 1% 程度であり、適切

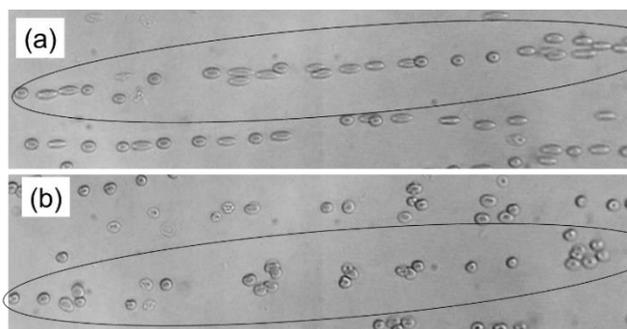


Fig.6 Morphological changes in erythrocytes. (a) 3.5Hz of shearing. (b) After shearing.

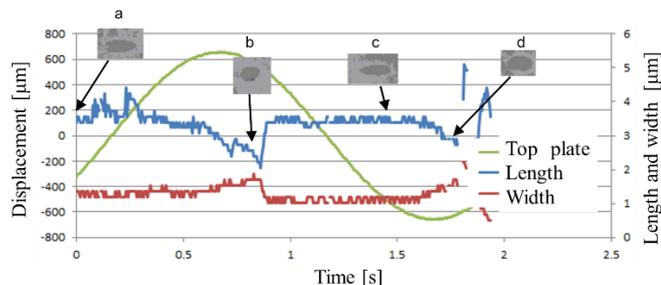


Fig.7 Time change of morphological changes in an erythrocyte.

な制御が行うことができた。また、上下ガラス平板の振幅もほぼ同等であった。しかし、周波数が大きくなるにつれ変位の最大振幅の誤差は大きくなり、3.5Hzの条件では-14%の減少となった。一方、せん断速度は、周波数および最大値共に±8%程度の誤差に収まった。これらの結果から、リニアガイドを用いた逆相せん断応力負荷機構およびパルス間隔  $\Delta t$  による制御信号発生器を用いることで、2つの平板を同変位かつ逆相で正弦波的に制御できることがわかった。また、変位振幅の誤差原因は、ラインセンサの高周波成分のノイズが原因と考えられる。今後は、ラインセンサに高周波成分のフィルタ回路を組み込み、せん断速度の推定誤差の低減を行うことが必要であると考えられた。

Fig.6 は、相せん断応力負荷機構のガラス平板の変位と変位を測定していた時に、撮影された赤血球の一例を示す。図内の楕円領域は、観察視野内にとどまった赤血球である。Fig.6a は連続的にせん断速度を加えたときの最後の周波数3.5Hz、Fig.6b は負荷を取り除き形状変化が無くなった時の赤血球試料様子をそれぞれ示す。今回の撮影条件である平板間の間隙  $20\mu\text{m}$  以下、Ht.が5%程度などの条件が揃うと、赤血球が等間隔で並び変形する様子が観察された。現段階では定性的評価になるが、せん断速度の向きが変化するとき、Fig.7の点b,dでは、赤血球が折れ曲がる、もしくはパラシュート型に変形する赤血球が観察できた。そのため、赤血球の力学的挙動を示す赤血球モデルを検討することで、観察された赤血球の形状変化から、赤血球粘弾特性が推定可能であることが考えられた。

これまで試作してきたせん断応力負荷機構の赤血球試料を設置する間隙は、上板の自重と試料の表面張力に依存していた。そのため間隙は、 $100\mu\text{m}$  を超えていたが、今回、カム機構を用いることで間隙  $20\mu\text{m}$  以下に設定できるようになった。そのため、赤血球試料の溶媒の粘度を下げて、加えるせん断応力の大きさは従来と同様にすることができる。

## 謝辞

本研究の一部は公益財団法人精密計測振興財団の研究助成(平成24年度)の下で実施された。当財団に深く感謝の意を表します。

## 参考文献

- (1) Vasků J, Urbánek P., Etiopathogenesis of hemolytic reactions in total artificial heart recipients. *Artif Organs* 1997;21(12):1268-76.
- (2) Dobbe JG, Streekstra GJ, Hardeman MR, Ince C, Grimbergen CA, Measurement of the distribution of red blood cell deformability using an automated rheoscope. *Cytometry* 2002;50(6):313-25.
- (3) Fischer TM, On the energy dissipation in a tank-treading human red blood cell. *Biophys J* 1980;32(2):863-8.
- (4) Watanabe N, Kataoka H, Yasuda T, Takatani S, Dynamic deformation and recovery response of red blood cells to a cyclically reversing shear flow: Effects of frequency of cyclically reversing shear flow and shear stress level. *Biophysical J* 2006; 91(5):1984-98.
- (5) Hashimoto S, Oku H, Omori M, Matsumoto Y, Sakaue K, Ikegami K, Otani H, Imamura H, Measurement of erythrocytes deformability with counter-rotating parallel disk system, Proc. 4th World Congress of Biomechanics, CD-ROM, 2002.
- (6) 血球細胞の力学的特性測定装置, 特許第5137129号, 登録日: 2012年11月22日, 発明者: 安田利貴: 出願人, 山口大学.
- (7) 血液細胞の力学的特性計測システム, 特許第4843794号, 登録日: 2011年10月21日, 発明者: 安田利貴: 出願人, 山口大学.
- (8) Yasuda T, Gates J, Yokoyama N, Takatani S, Development of a cyclically shear flow generator based on the reversing rheoscope method, The 50th of Annual conference of Japanese Society for Medical and Biological Engineering 2011; 51:221.
- (9) 細胞用力学負荷装置, 特許第5400815号, 登録日: 2013年11月1日, 発明者: 安田利貴: 出願人, 高専機構.