

Loading Effect for a Red Blood Cell

正 ○伊藤 弘明 (大阪大) 学 村上 遼 (大阪大)
正 Chia-Hung Dylan Tsai (大阪大) 洞出光洋 (大阪大) 正 金子 真 (大阪大)

Hiroaki ITO, Osaka University, ito@hh.mech.eng.osaka-u.ac.jp Ryo Murakami, Osaka University
Chia-Hung Dylan Tsai, Osaka University Mitsuhiro HORADE, Osaka University
Makoto KANEKO, Osaka University

We propose a new method for quantifying red blood cell (RBC) deformability based on the combination of a microfluidic constriction channel and a “robotic pump”, which enable real-time high speed, precise manipulation of a RBC inside the channel. By the manipulation of a RBC around the narrow path, we applied deformation for a specified time. After the launch from the narrow path, the cell shape recovers depending on the loading time and amount of adenosine triphosphate (ATP). The analysis of the recovery shows that these dependences appears in the timescale of 100 s, which could be involved in that of shape adaptation to the applied deformation stress. Finally, the quantitative comparison between the recovery time after the continuous and repetitive loadings is discussed.

Key Words: Microfluidics, Robotic pump, Manipulation, Red blood cell, Deformability

1. 緒言

赤血球細胞が血流の剪断や毛細血管内壁の幾何学的拘束にさらされたときの变形しやすさ、すなわち「変形能」は、スムーズな血液循環を実現する上で必要不可欠な力学的性質である。この変形能を定量化することを目的に、これまでにマイクロピペットや光トラップ等の個別の赤血球を詳細に評価する手法や、マイクロ流体デバイスを用いて大量の赤血球を高速に連続計測する手法が報告されてきた[1]。本研究では、マイクロ流路の高速な連続計測に「負荷時間」の概念を取り入れることで、従来の評価値であった狭窄部における細胞の通過速度や形状伸長率よりも詳細な力学的情報の抽出を試みた。特に、図1のように負荷「時間」を制御することで、弾性だけでなく、これまでのマイクロ流路内計測で無視されてきた粘性情報の抽出を試みたことが新規な点である。

2. 実験

2.1 実験システム

本研究では、マイクロ流路内に設計した狭窄部（幅 3 μm 、高さ 3.5 μm ）に赤血球（直径 8 μm 、厚み 2 μm ）を閉じ込める時間を制御することで、赤血球に変形負荷をかける時間 T を制御する。図2は実験装置の概要図である。ここでは、狭窄部周辺を観察するハイスピードカメラと流路に接続したシリンドリクを駆動するピエゾアクチュエータをコンピュータにより 1000 Hz で連動させるフィードバック制御システムを用いており、流路内の赤血球を実時間で高速にマニピュレーションすることができる。本研究ではこれを用いてステップ状のマニピュレーションを行うことで、負荷時間 T の精確な制御を実現した。負荷時間 T を 0 s ~ 300 s の範囲で制御した後、狭窄部外に射出し形状回復を評価することで、赤血球の粘弾性を評価した。また、赤血球のエネルギー源である ATP が 40% に枯渇した状態の赤血球との比較も行った。

2.2 赤血球細胞の粘弾性評価

狭窄部外における形状回復は、4 つの粘弾性要素から成る Standard linear elastic (SLE) モデルを用いて評価した。図3にモデルの詳細と射出後の挙動例を示す。このモデルにおける射出後の細胞高さ $H(t)$ は以下の指数関数で表現される[2]：

$$H(t) = H(0) - [A_1 + A_2 \exp\{-(t-T)/\tau\}] \quad (1)$$

$$\tau = c_2(k_1+k_2)/k_1k_2 \quad (2)$$

ここで、 A_1 と A_2 は (k_1, k_2, c_1, c_2, T) で構成される正の定数、回復時定数 τ は負荷時間 T に依らない物性定数となる。

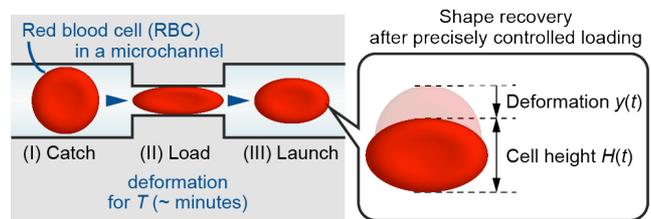


Fig.1 Control of a “loading time” T inside a narrow path.

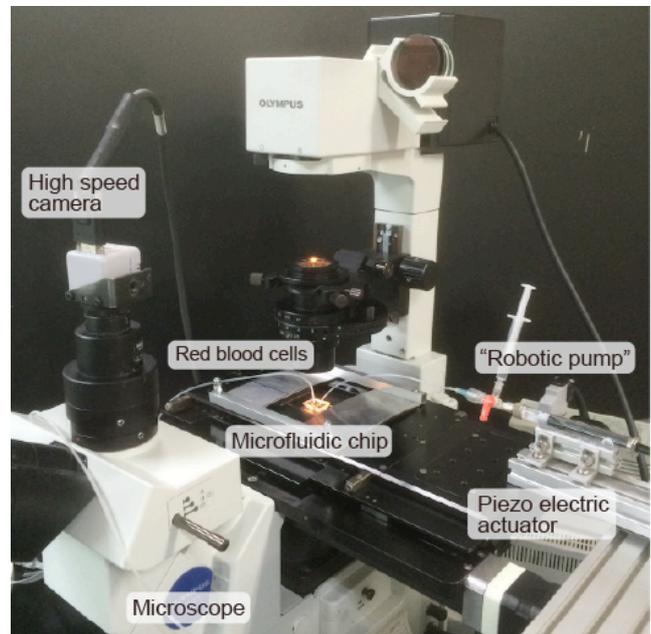


Fig.2 Experimental setup.

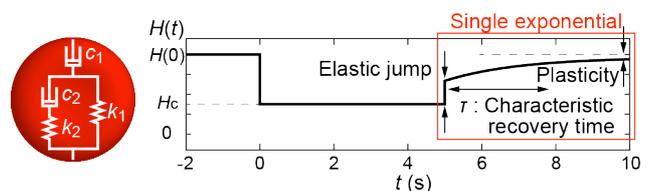


Fig.3 Viscoelastic model.

3. 結果

図 4(a)に $T = 180$ s での細胞高さの典型的な回復挙動と $t = 150$ ms でのスナップショット、図 4(b)に $T = 0$ s から 300 s までの負荷時間に対する内部ダンパの粘性 c_2 および回復時定数 τ のプロットを示す。ただし、本研究では 4 つの変数に対しフィッティングから 3 つのパラメータが得られるため、最終的に得られた情報は c_2 そのものではなく、他のパラメータとの比 c_2/k_1 である (ここでは k_1 との比をとった)。黒色で示すデータは通常の健康な赤血球群、赤色で示すデータは ATP が 40%に枯渇した赤血球群であり、○は平均値、影は標準偏差、実線は SLE モデルによるフィッティング結果を示している。これらより、(1) 回復にかかる時間 τ は内部粘性 C_2 が支配的な影響を示すこと、(2) $T > 180$ s の負荷時間に対して回復が極端に遅くなること、(3) $T = 180$ s において健康条件と ATP 枯渇条件の差が顕著に現れることがわかる。特筆すべき点として、モデルでは物性定数として導入した c_2 や τ が、各負荷時間の実験データに適用すると顕著な負荷時間依存性を示し、赤血球細胞の場合は時変パラメータであることがわかった。

4. 考察

4.1 過去の研究との関連：疲労試験

これまでに、赤血球を何度も狭窄部に通過させ、断続的な変形負荷を与えて赤血球が変形能を失うまでの通過回数を変形能の指標として評価する、疲労試験が提案されていた[3]。この疲労試験では、狭窄部外へ射出されてから 25 ms 後の形状を評価することで、変形能 (形状回復能) を有しているか失っているかを判断していた。したがって、疲労は永久変形ではなく過渡的な粘弾性変形の指標であり、外部ダンパ c_1 ではなく内部ダンパ c_2 が関わる現象であると考えられる。実際に、疲労試験での 1 回の変形時間が 100 ms オーダー、変形能を失う変形回数が 1000 オーダーであることを考慮すると、変形時間の総和は 100 s オーダーであり、本研究で激変が現れた負荷時間 T と同オーダーになる。また、変形時間の総和が同じであればその後の回復挙動は変形の時空間パターンに依存しないことも示唆されていることから[4]、合計 100 s オーダーの変形不可が赤血球の力学応答に対し大きな意味を持っている可能性が高い。

4.2 時変パラメータの起源

今回、赤血球の粘弾性パラメータは定数ではなく負荷時間 T に応じて変化することがわかった。特に内部ダンパの粘性 c_2 および回復時定数 τ が $T = 180$ s を境に激変し、細胞内部の ATP 量にも依存した振る舞いを見せることから、この時間スケールで細胞がエネルギーを消費しながら自身の粘弾性や変形能を変化させている可能性が高い。赤血球において変形能に最も寄与し、ATP 依存性を示す内部構造は、細胞骨格と呼ばれる繊維状タンパク質の三角格子状ネットワークである。このネットワークは細胞膜直下に裏打ちされており、機械的強度を与えるだけでなく、ATP を消費してネットワークのノードが細胞膜から一瞬脱着を起こすことが知られていた[5]。周りの負荷環境が変化中、このノードの脱着の繰り返しで赤血球は最安定な骨格構造へ組み替えていくと考えられるが、今回 ATP 依存性とともにも得られた 100 s オーダーの時定数はこの組み換えりの時定数であることが示唆される。

5. 結言

マイクロ流路内で赤血球への変形負荷時間を精確に制御することで、100 s オーダーの負荷時間が赤血球の変形能を激変

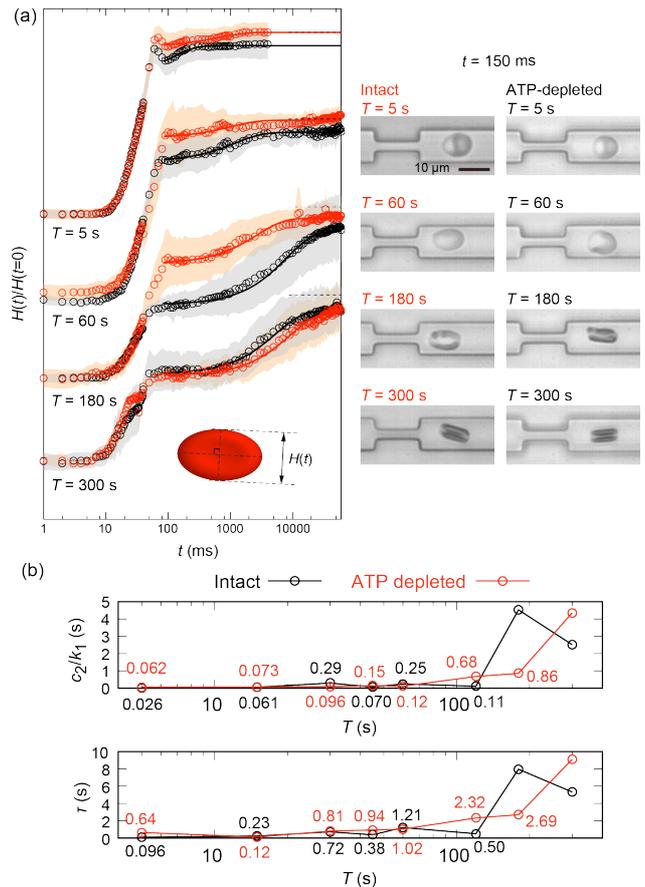


Fig. 4 Results of the loading-time and ATP dependent recovery.

させること、この時定数には細胞のエネルギー源である ATP 濃度依存性があること、を示すことができた。従来の研究との定量的な比較と、時変パラメータの起源の考察も行った。今後は、力学的診断法として疾患状態の赤血球の評価にも応用する他、負荷時間依存性を説明するモデルを構築したい。

本研究は、科研費研究活動スタート支援 (JP16H06933) および基盤 S (JP15H05761)、文部科学省ナノテクノロジープラットフォーム事業 (大阪大学ナノテクノロジー設備供用拠点) (F-16-OS-0006, S-16-OS-0005) の支援を受け、大阪大学大学院医学系研究科坂田泰史教授の協力の下で行われた。

参考文献

- [1] Wan, J., Forsyth, A. M., and Stone, H. A., "Red blood cell dynamics: from cell deformation to ATP release," *Integr. Biol.*, vol.3, pp.972-981, 2011.
- [2] Ito, H., Murakami, R., Sakuma, S., Tsai, C.-H. D., Gutsmann, T., Brandenburg, K., Pöschl, J. M. B., Arai, F., Kaneko, M. and Tanaka, M., "Mechanical diagnosis of human erythrocytes by ultra-high speed manipulation unraveled critical time window for global cytoskeletal remodeling," *Sci. Rep.*, vol.7, 43134:1-14, 2017.
- [3] Sakuma, S., Kuroda, K., Tsai, C.-H. D., Fukui, W., Arai, F. and Kaneko, M., "Red blood cell fatigue evaluation based on the close-encountering point between extensibility and recoverability," *Lab Chip*, vol. 14, pp. 1135-1141, 2014.
- [4] Ito, H., Murakami, R., Tsai, C.-H. D., Horade, M., Tanaka, M. and Kaneko, M., "Red blood cell deformability upon continuous and repetitive loadings," The 30th International Conference on IEEE Micro Electro Mechanical System (MEMS2017, Las Vegas, USA), Jan. 2017.
- [5] Gov, N. S. and Safran, S. A., "Red Blood Cell Membrane Fluctuations and Shape Controlled by ATP-Induced Cytoskeletal Defects," *Biophys. J.*, vol. 88, pp.1859-1874, 2005.