

## バイオメカニクス (溶血・赤血球損傷)

弘前大学大学院理工学研究科

矢野 哲也

Tetsuya YANO



### 1. はじめに

溶血は、赤血球膜の損傷に伴い血球内部の流体が外部に漏出する現象である。現在臨床で使用されている補助人工心臓 (VAD) の多くは、高速で回転する羽根車 (インペラ) で血液を送り出す方式の連続流ポンプである。このタイプのポンプでは、インペラ周辺において特にせん断速度 (速度の空間勾配) が大きくなり、この領域を通過する赤血球には非生理的な高いせん断応力が負荷され、膜の損傷や破断が生じ、赤血球内部のヘモグロビン溶液が漏出する。このように連続流ポンプを用いて血液循環を補助する際には、ポンプの構造と駆出原理から、程度の差はあれ、溶血は不可避である。一方で、血球崩壊を伴わない損傷 (sublethal blood trauma; 以下、血球損傷と呼ぶ) に関する研究が進んでおり、せん断負荷による赤血球の変形能 (deformability) の変化が明らかにされてきた。また、顕微鏡技術の向上に伴い、細胞骨格の形態や力学特性に関する新しい知見も得られてきている。本稿ではこれらの研究についてまとめる。

### 2. VADの数値流体解析と溶血量予測

溶血試験は血液ポンプの血液適合性を評価する上で重要な試験であるが、動物血を使用する限り、結果のばらつきは避けられない。これに対し、数値流体解析 (CFD 解析) によってポンプ内の流れ場を解き、得られたせん断応力分布に基づき溶血量を推定する方法は、再現性の高い方法と言える。これらの推定法のほとんどは、溶血量とせん断

力の大きさ、曝露時間を関係づける実験式<sup>1)</sup>をもとにしている。米国食品医薬品局 (FDA) が提示した血液ポンプのベンチマークモデルについて、実機を用いた流動場計測および溶血試験の結果と、多施設の研究者による CFD 解析の結果およびそれに基づく溶血量予測の結果との比較が行われ、正確な溶血量予測まで至ったグループは少数であったと報告されている<sup>2)</sup>。現状では、CFD 解析の計算精度や溶血量推定モデルの不完全さが原因であると考えられる。ただし、溶血量の絶対値の正確な予測までは至らずとも、相対的な比較に限れば正しく予測ができている結果は多く、機器の改良設計など用途を限定すれば十分実用的なものではあると考えられる。Liらは、5種類の VAD (Impella<sup>®</sup> 5.0, HVAD<sup>™</sup>, HeartMate<sup>™</sup> II ほか) の CFD 解析を行い、VAD 内の溶血発生および血栓形成のホットスポットを特定し、血液損傷のメカニズムの理解を深めることで、臨床において VAD の選択、設計最適化の指針が得られるとしている<sup>3)</sup>。Tsukiyaらは様々なポンプ運転条件での VAD 内部の流れ場を詳細に解析し、軸受部の二次流路内の流れを明らかにしている<sup>4)</sup>。近年、赤血球の力学モデルを構築し、流れ場中での赤血球の変形をシミュレートし、膜面の局所のひずみに基づき溶血量を推定する方法が提案されている<sup>5),6)</sup>。前述の実験式に頼らない基礎原理に基づく方法を採用することで、CFD 解析ベースの溶血量予測は新しい段階へ進むことになると思われる。

### 3. せん断負荷による赤血球損傷

非生理的な高いせん断応力の負荷は、赤血球の力学特性を変化させ、変形能に影響を与えることが知られている<sup>7)</sup>。赤血球の変形能の評価には多くの場合、エクササイトメトリが用いられる。これは、せん断流れ場中を流れる赤血球群にレーザー光を照射して得られる楕円形の回折像の長径

#### ■ 著者連絡先

弘前大学大学院理工学研究科

(〒036-8561 青森県弘前市文京町3)

E-mail. yano@hirosaki-u.ac.jp

( $l$ ), 短径 ( $s$ ) から計算される伸長率 (elongation index) を用いて評価する方法である。

$$EI = \frac{l-s}{l+s}$$

Simmondsらは、せん断応力に対する赤血球の感受性を特徴付ける指標として mechanical damage sensitivity ( $MS$ ) を導入し、5~100 Paのせん断応力を300秒間印加した赤血球の $MS$ の変化を調べ、低せん断負荷赤血球の $MS$ は低下(変形能が改善)し、高せん断負荷赤血球の $MS$ は上昇(変形能が低下)すること、また、間欠的なせん断負荷による赤血球の変形能の変化は連続的負荷による変化よりも小さいことを示した<sup>8)</sup>。Horobinらは、5~100 Paのせん断応力を1~16秒間印加した赤血球について、低せん断応力(5 Pa, 25 Pa)の負荷では曝露時間によらず $MS$ が低下し、高せん断応力負荷では曝露時間が長い条件(100 Paで4秒以上、75 Paで16秒)で $MS$ が上昇することを示した<sup>9)</sup>。このことは、生理的な範囲内かそれを少し上回る程度のせん断応力を負荷された赤血球は、変形能が改善し、せん断応力に対する抵抗性が増すこと、過大なせん断応力を負荷された赤血球は、せん断応力に対する抵抗性が減弱することを意味する。

McNameeらは、60 Paのせん断応力を連続的に負荷されている赤血球を顕微鏡下で撮影し、個々の赤血球の画像を解析し、曝露時間の増加とともに伸長率 $EI$ は変化しないが、非対称な形態の赤血球の割合が増加することを報告している<sup>10)</sup>。一様せん断流中で赤血球がいびつな形状になることは、赤血球膜の弾性率が膜面上で不均一になっていることが原因であると考えられる。

VADによる循環中の赤血球脆弱性の変化については、MaddenらがVAD装着患者の赤血球の浸透圧脆弱性を調べた結果、有意な変化はなかったと報告している<sup>11)</sup>。また、KuckらはVADを用いた*ex vivo*実験において赤血球の浸透圧脆弱性を調べ、成人左心補助のポンプ運転条件では脆弱性の変化はなく、成人右心補助の条件で脆弱性がわずかに低下すると報告している<sup>12)</sup>。せん断負荷による血液損傷について現在までに得られている知見については、McNameeらによってまとめられている<sup>13)</sup>。

VAD使用による血液の損傷は赤血球のほかに、フォン・ヴィレブランド因子(vWF)の低分子量化として表れることが明らかにされており<sup>14)</sup>、臨床上有意義な指標と認識されている。Shiraishiらはせん断負荷によるvWF低分子量化のメカニズム解明のために、血液に対して繰り返しせん断応力を負荷することが可能な装置を開発している<sup>15)</sup>。

#### 4. 酸化剤添加による赤血球の膜骨格構造と力学特性の変化

赤血球の変形能をはじめとする力学特性を支配しているのは膜骨格と考えられている。Sinhaらは酸化剤添加が赤血球膜の構造および力学特性に与える影響について調べ、ジアミド、プリマキンビスホスフェート水溶液中に曝露された赤血球を原子間力顕微鏡(AFM)で観察、測定し、酸化剤を添加しない赤血球と比較して膜骨格のスペクトリン長が短く、膜の剛性率(shear modulus)が増加することを明らかにした<sup>16)</sup>。Renouxらは、浸透圧勾配エクタサイトメトリ(osmotic gradient ektacytometry)<sup>17)</sup>を用いて赤血球の $EI$ を測定した結果、ジアミド添加赤血球は高浸透圧側で $EI$ が顕著に低下することを報告した<sup>18)</sup>。この $EI$ の変化傾向は、楕円赤血球症(elliptocytosis)や熱変形赤血球症(pyropoikilocytosis)の場合と類似するものであり<sup>19)</sup>、これらは表面積・体積比(surface area-to-volume ratio)の低下、膜剛性率の増大を示唆するものである。ジアミド添加による平均赤血球容積(MCV)の変化はないことが確認されており<sup>18)</sup>、表面積・体積比の低下は表面積の減少によることがわかる。SinhaらとRenouxらの両研究の結果から、赤血球膜の力学特性と微細構造の変化を赤血球変形能の変化に基づき推定可能であることがわかる。

#### 5. 超解像顕微鏡を用いた赤血球膜骨格の測定

近年、超解像顕微鏡法を用いた赤血球膜の観察が行われ、新しい知見が次々と得られている。Panらは、STORM(stochastic optical reconstruction microscopy, 確率的光学再構築顕微鏡)<sup>20)</sup>を用いて自然な状態の赤血球の細胞骨格構造を明らかにし、スペクトリンネットワークのジャンクション間距離の分布を示し、その平均が弛緩したスペクトリン4量体の長さとはほぼ一致する80 nmであることを明らかにした<sup>21)</sup>。Houらは、膨張顕微鏡法とSMLM(single-molecule localization microscopy)<sup>22)</sup>を組み合わせる赤血球膜構造を解析し、両凹円盤形状の赤血球の窪み部分のスペクトリン細胞骨格が緑のそれよりも密度が低く、ジャンクション間距離が長いことを明らかにした<sup>23)</sup>。Yeらは、点滅機能と持続的な単一分子発光機能を備えた蛍光プローブを開発するとともに、赤血球の非侵襲的捕捉と長期イメージングのためのマイクロ流体プラットフォームを構築し、それらを組み合わせ、ヒト赤血球膜上で分子スケールでの超解像再構築と単一分子追跡をハイスループットで実現した<sup>24)</sup>。このように、超解像顕微鏡法により、最小限の前処理で自然な状態に近い赤血球の膜構造が明らかにされ

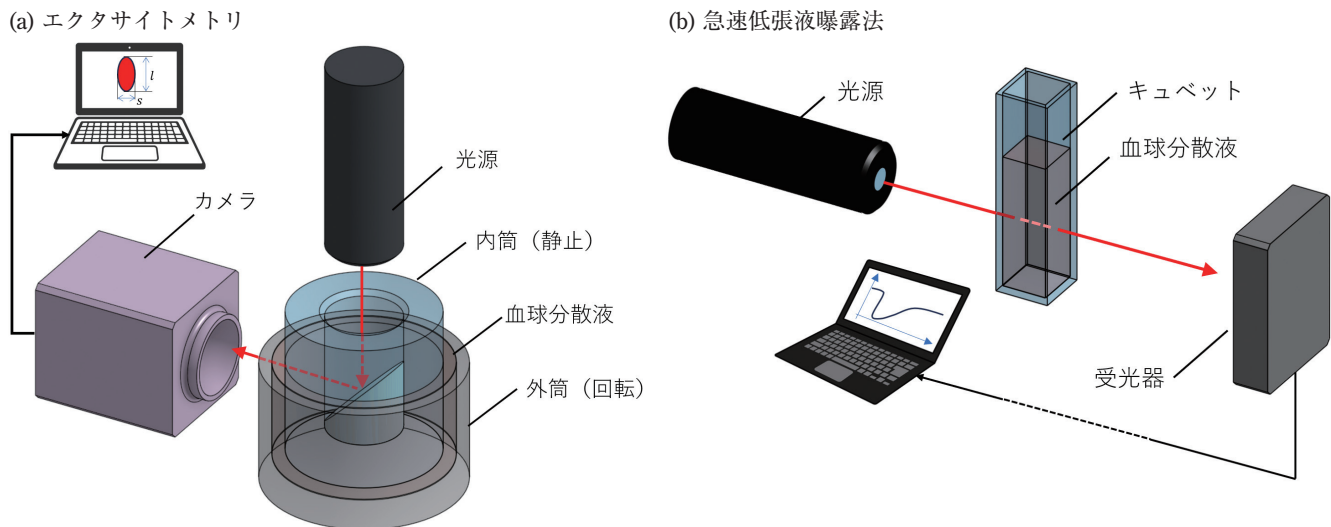


図1 赤血球損傷評価のためのエクタサイトメトリと急速低張液曝露法の基本的な装置構成

てきた。将来の展望として、膜構造に基づく病態診断の可能性についても言及されている<sup>24)</sup>。

## 6. 赤血球損傷評価法の比較

ここまでに、赤血球の変形能の測定方法、赤血球の膜構造の観察・測定方法についてまとめた。いずれも赤血球の膜性状を調べる有用な方法である。特に前者の方法は後者の方法よりも圧倒的にハイスループットであるため、迅速診断用途に向いており、VAD使用中の赤血球損傷評価にも適していると考えられる。赤血球変形能測定の方法として本稿では2つを紹介した。1つは、エクタサイトメトリにより回折像から $EI$ を測定する方法(ここでは「間接法」と呼ぶ)、もう1つは、せん断流中の赤血球を直接観察することにより $EI$ を測定する方法(ここでは「直接法」と呼ぶ)である。直接法では多数個の赤血球の $EI$ を測定することで、 $EI$ の分布を取得できることが最大のメリットである。その半面、十分な $EI$ 測定精度を得るために高倍率で赤血球を撮影すると、必然的に視野内の赤血球の数は限られるため、十分な数の赤血球の $EI$ を測定するために複数回の撮影とその都度の画像処理が必要になり、迅速性の点では間接法が勝るであろう。この不利を補う方法として、マイクロ流路内を流動する赤血球を撮影することでハイスループット化する方法が提案されている<sup>25)</sup>。また、 $EI$ の分布を得られないという間接法の欠点を補うために、回折像の楕円形状からのひずみに着目し、血球の変形能の不均一性を推定することが試みられている<sup>26)</sup>(ここでは「改良版エクタサイトメトリ」と呼ぶ)。この回折像のひずみは、膜剛性の高い一部の赤血球が流れに配向しないことによると考察され

ている。

我々のグループは、光学的手法による赤血球損傷度評価法の開発を進めている<sup>27),28)</sup>。これは、等張の赤血球分散液に蒸留水を追加することで赤血球を低張環境に急速曝露、膨潤、崩壊させ、そのときの赤血球分散液の光学特性の変化に基づき赤血球損傷を評価する方法である(ここでは「急速低張液曝露法」と呼ぶ)、この方法は個々の赤血球ではなく、試料液に含まれる赤血球群に着目しているため、前述の間接法に分類される。赤血球の膨潤による前方散乱の増加と崩壊による散乱体の減少に伴い、赤血球分散液の透過光強度が増加する。この方法を用いて、ジアミド、プリマキンを添加して膜の剛性率を高めた赤血球について評価したところ、酸化剤の濃度増加に伴い、透過光強度の増加速度が速くなった。このように、透過光強度の変化速度に基づき赤血球の損傷度を評価することができる。エクタサイトメトリと急速低張液曝露法の基本的な装置構成を図1に示す。急速低張液曝露法は、同じ間接法に分類されるエクタサイトメトリと比較して、迅速性に関しては同等以上、また、接液部に可動部品を有さないことから、取り扱いの簡便性に関しては優位性を持つと考えている。また、透過光強度の時間変化の履歴から赤血球の損傷度分布を取得することで、直接法に準ずる機能性を付与することが可能と考えている。

## 7. おわりに

本稿では、VADの血液適合性評価法である溶血試験を代替あるいは補助するものとして、CFD解析による溶血量予測法、赤血球損傷評価法およびそれに関連する研究をまと



めた。赤血球の力学モデルを用いた溶血量予測の発展には、モデルの精度の向上が不可欠であり、そのためには、超解像顕微鏡によって明らかにされた膜骨格の構造や力学特性に関する知見が大いに役立つであろう。また、10 Paオーダーのせん断応力の負荷による赤血球の膜性状の変化に関する知見が次々と集積しつつあり、これらを溶血モデルに組み込むことで、溶血量予測のさらなる改善につながると期待される。

本稿の著者には規定されたCOIはない。

## 文 献

- 1) Giersiepen M, Wurzinger LJ, Opitz R, et al: Estimation of shear stress-related blood damage in heart valve prostheses-*in vitro* comparison of 25 aortic valves. *Int J Artif Organs* **13**: 300-6, 1990
- 2) Ponnaluri SV, Hariharan P, Herbertson LH, et al: Results of the Interlaboratory Computational Fluid Dynamics Study of the FDA Benchmark Blood Pump. *Ann Biomed Eng* **51**: 253-69, 2023
- 3) Li Y, Wang H, Xi Y, et al: Multi-indicator analysis of mechanical blood damage with five clinical ventricular assist devices. *Comput Biol Med* **151**: 106271, 2022
- 4) Tsukiya T, Nishinaka T: Numerical simulation of the leakage flow of the hydrodynamically levitated centrifugal blood pump for extracorporeal mechanical circulatory support systems. *J Artif Organs* **26**: 176-83, 2023
- 5) Nakamura M, Bessho S, Wada S: Analysis of red blood cell deformation under fast shear flow for better estimation of hemolysis. *Int J Numer Method Biomed Eng* **30**: 42-54, 2014
- 6) Faghih MM, Sharp MK: Modeling and prediction of flow-induced hemolysis: a review. *Biomech Model Mechanobiol* **18**: 845-81, 2019
- 7) Avci M, O'Rear EA, Foster KM, et al: Sublethal damage to erythrocytes during blood flow. *Fluids* **7**: 66, 2022
- 8) Simmonds MJ, Atac N, Baskurt OK, et al: Erythrocyte deformability responses to intermittent and continuous subhemolytic shear stress. *Biorheology* **51**: 171-85, 2014
- 9) Horobin JT, Sabapathy S, Simmonds MJ: Red blood cell tolerance to shear stress above and below the subhemolytic threshold. *Biomech Model Mechanobiol* **19**: 851-60, 2020
- 10) McNamee AP, Simmonds MJ, Inoue M, et al: Erythrocyte morphological symmetry analysis to detect sublethal trauma in shear flow. *Sci Rep* **11**: 23566, 2021
- 11) Madden JL, Drakos SG, Stehlik J, et al: Baseline red blood cell osmotic fragility does not predict the degree of post-LVAD hemolysis. *ASAIO J* **60**: 524-8, 2014
- 12) Kuck L, Simmonds MJ, Chan CHH, et al: Ex vivo assessment of erythrocyte tolerance to the HeartWare ventricular assist device operated in three discrete configurations. *Artif Organs* **45**: E146-57, 2021
- 13) McNamee AP, Simmonds MJ: Red Blood Cell Sublethal Damage: Hemocompatibility Is not the Absence of Hemolysis. *Transfus Med Rev* **37**: 150723, 2023
- 14) Bartoli CR, Dassanayaka S, Brittan KR, et al: Insights into the mechanism(s) of von Willebrand factor degradation during mechanical circulatory support. *J Thorac Cardiovasc Surg* **147**: 634-43, 2014
- 15) Shiraishi Y, Tachizaki Y, Inoue Y, et al: Hemolysis and von Willebrand factor degradation in mechanical shuttle shear flow tester. *J Artif Organs* **24**: 111-9, 2021
- 16) Sinha A, Chu TT, Dao M, et al: Single-cell evaluation of red blood cell bio-mechanical and nano-structural alterations upon chemically induced oxidative stress. *Sci Rep* **5**: 9768, 2015
- 17) Da Costa L, Suner L, Galimand J, et al; Society of Hematology and Pediatric Immunology (SHIP) group; French Society of Hematology (SFH): Diagnostic tool for red blood cell membrane disorders: Assessment of a new generation ektacytometer. *Blood Cells Mol Dis* **56**: 9-22, 2016
- 18) Renoux C, Faivre M, Bessaa A, et al: Impact of surface-area-to-volume ratio, internal viscosity and membrane viscoelasticity on red blood cell deformability measured in isotonic condition. *Sci Rep* **9**: 6771, 2019
- 19) Llaudet-Planas E, Vives-Corrans JL, Rizzuto V, et al: Osmotic gradient ektacytometry: A valuable screening test for hereditary spherocytosis and other red blood cell membrane disorders. *Int J Lab Hematol* **40**: 94-102, 2018
- 20) Rust MJ, Bates M, Zhuang X: Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nat Methods* **3**: 793-5, 2006
- 21) Pan L, Yan R, Li W, et al: Super-Resolution Microscopy Reveals the Native Ultrastructure of the Erythrocyte Cytoskeleton. *Cell Rep* **22**: 1151-8, 2018
- 22) Lelek M, Gyparaki MT, Beliu G, et al: Single-molecule localization microscopy. *Nat Rev Methods Primers* **1**: 39, 2021
- 23) Hou M, Xing F, Yang J, et al: Molecular Resolution Mapping of Erythrocyte Cytoskeleton by Ultrastructure Expansion Single-Molecule Localization Microscopy. *Small Methods* **7**: e2201243, 2023
- 24) Ye Z, Yang W, Zheng Y, et al: Integrating a Far-Red Fluorescent Probe with a Microfluidic Platform for Super-Resolution Imaging of Live Erythrocyte Membrane Dynamics. *Angew Chem Int Ed Engl* **61**: e202211540, 2022
- 25) Saadat A, Huyke DA, Oyarzun DI, et al: Correction: A system for the high-throughput measurement of the shear modulus distribution of human red blood cells. *Lab Chip* **20**: 4638-9, 2020
- 26) Parrow NL, Violet PC, Tu H, et al: Measuring Deformability and Red Cell Heterogeneity in Blood by Ektacytometry. *J Vis Exp* **12**: 56910, 2018
- 27) 矢野哲也, 佐藤隆介, 三田村好矩, 他: 浸透圧溶血過程における赤血球径変化の光学計測と血球損傷度評価への応用. *バイオエンジニアリング講演会講演論文集2016* **28**: 1A24-1-4, 2016
- 28) 矢野哲也, 八尾谷亮太: 酸化ストレスによる赤血球脆弱性の変化. *日本実験力学2019年度年次講演会講演論文集* 2pp, 2019