

遠心顕微鏡による赤血球の摩擦特性の計測

Measurement of Frictional Characteristics of Red Blood Cells with Centrifuge Microscope

○早瀬 敏幸*, 白井 敦*, 杉山 英勝*, 濱谷 剛*

○Toshiyuki Hayase*, Atsushi Shirai*, Hidekatsu Sugiyama*, Tsuyoshi Hamaya*,

*東北大学 流体科学研究所

*Institute of Fluid Science, Tohoku University

キーワード: 微小循環(Microcirculation), 遠心顕微鏡(Centrifuge microscope), 赤血球(Red blood cell), 摩擦特性(Frictional characteristics)

連絡先: 〒980-8577 仙台市青葉区片平 2-1-1 東北大学流体科学研究所 知能流システム研究部門
生体流動研究分野 早瀬敏幸, Tel & Fax: (022)217-5253, E-mail: hayase@ifs.tohoku.ac.jp

1. 緒言

微小循環における血流は、細胞への酸素、栄養物の供給、老廃物の回収など、生理学的に重要な役割を担っており、これまで多くの研究がなされている⁽¹⁾。特に毛細血管内の血流においては、血球、血漿タンパク、血管内皮細胞表面の糖タンパク層などの複雑な相互作用が生じると考えられているが、その実体は未だ明らかにされていない⁽²⁾。最近では、赤血球と血管内皮表面層の干渉を考慮した流動解析等も行われているが、対応する実際の測定例はなく、現象の解明のためには血球と内皮表面層との間の摩擦特性の計測法の確立が必要である。

遠心顕微鏡は、遠心力の作用する回転場での試料の観察を可能とする⁽³⁾。これまで、筋

細胞の収縮力の測定や、細胞の自走力の測定などに用いられているが、従来の遠心顕微鏡は、全て遠心力の作用する水平方向へ移動または変形する細胞の観察を対象としたものであり、垂直抗力が作用する条件下で、平面上を移動する細胞の摩擦力の測定に用いられた例はない。

著者らは、遠心顕微鏡の対物レンズの光軸を鉛直方向から傾けて設置し、さらに試料面と水平面の角度を任意に設定できる「傾斜遠心顕微鏡」を開発し、任意の垂直抗力と接線力が作用する条件下で、ベース面上を移動する細胞の観察を可能とした⁽⁴⁾。生理食塩水で0.4%に希釈したヒト血液を用い、ガラス板上の赤血球の摩擦特性の計測を行ったが、赤血球の速度を求める際に、一定距

離間の移動時間をストップウォッチで計測しているため、赤血球速度の度数分布に基づく誤差が生じている可能性がある。また、血漿濃度が低い条件で測定を行ったため、実際の血液中での摩擦特性とは異なっているものと考えられる。

そこで本報告では、観察された赤血球のビデオ画像から画像処理の手法により赤血球速度を求め、手動計測の精度を検証するとともに、遠心分離した血液の血漿と生理食塩水を混合した媒質に赤血球を微量分散させた試料を用い、媒質中の血漿濃度を100%から広い範囲で変化させた場合の、摩擦特性の計測を行う。

2. 実験装置

測定原理を Fig. 1 に示す。水平面に対して角度 θ だけ傾けた直方体容器内の底面に、赤血球がその上を移動する平板（ベース）をおき、さらに赤血球を分散させた媒質で容器内を満たす[Fig. 1 (a)]。その後、容器を鉛直回転軸のまわりに一定角速度 ω で回転させると、赤血球の密度が媒質のそれより大きい場合には、全ての赤血球は遠心力 F

$[=(\rho_r - \rho_m)V_r r_0 \omega^2]$ 、ここで ρ_r , ρ_m : 赤血球および媒質の密度, V_r : 赤血球の体積, r_0 : 回転半径]の作用で半径方向に移動する(重力の影響は事実上無視できる)。Fig. 1 (b)で、ベース面に到達した赤血球に作用する遠心力は、ベース面に垂直な成分 F_N と平行な成分 F_T とに分解することができる。垂直成分はベース面からの抗力と釣り合い、また平行成分は、赤血球をベース面に沿う方向に加速し、赤血球がベース面から受ける摩擦力 F_T^* と上部の媒質から受ける抵抗 f_D ($=\pi\mu_m d_r U$, μ_m : 媒質の粘度, d_r : 赤血球の直径, U : 赤血球速度)⁽⁴⁾の合力が F_T と釣り合った時点で、赤血球は等速運動となる。 F_N と F_T は、容器の傾斜角 θ と回転速度 ω を調節することにより任意に設定できるので、種々の条件下で赤血球の移動速度を測定すれば、媒質中でベース面上を移動する赤血球の摩擦特性を求めることができる。

実験装置の構成を Fig. 2 に示す。遠心分離機(クボタ 1120, 最高回転数 15000rpm)のローターの対向する位置に、試料容器を取り付けた1組のバケット(ジュラルミン製)を設置する。試料容器はアクリル製で、内

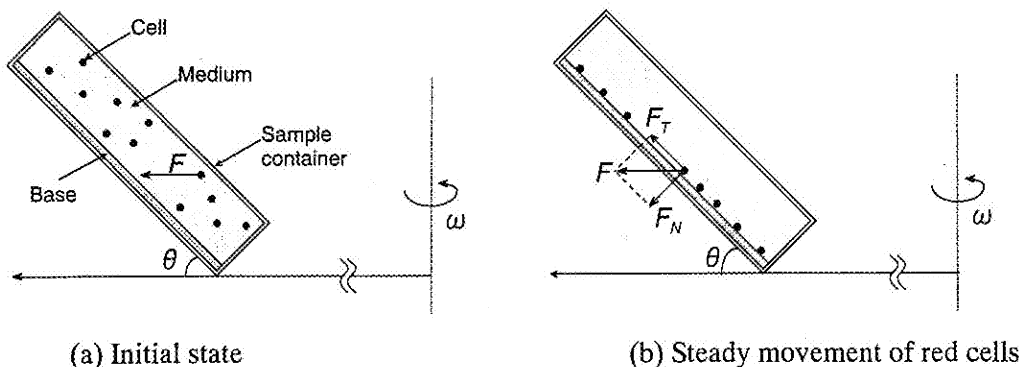
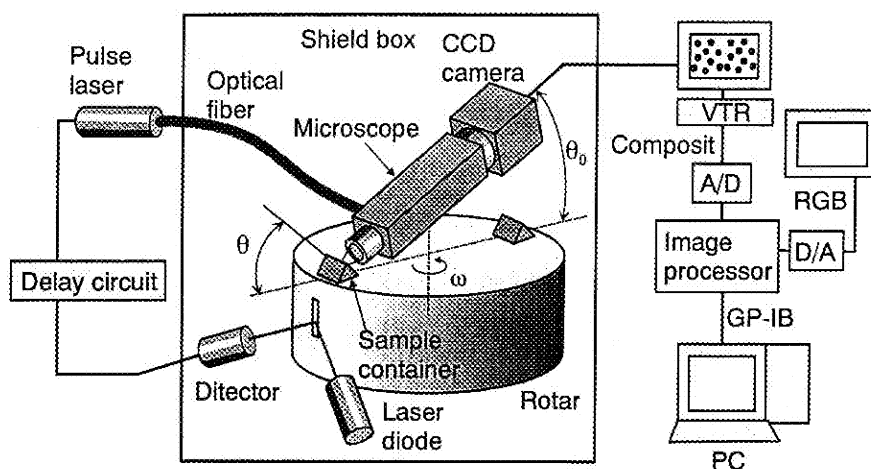


Fig. 1 Principle of frictional force measurement in rotating field



部の寸法は $10\text{mm} \times 8\text{mm} \times 1\text{mm}$ (幅 $\times$ 奥行き $\times$ 高さ) である。試料容器にはロータの回転に同期したパルス幅 50ns の半導体レーザー (日本科学エンジニアリング製 PLD-9010, 波長 900nm , ピークパワー $20\text{W}/10\text{kHz}$) が照射される。同期画像は, 水平面から一定角度 θ_0 傾けて取り付けられた落射顕微鏡 (ニコン CM-10, 対物レンズ CF IC EPI Plan SLWD 20 倍), CCD カメラ (東京電子工業

Table 1 Specification of inclined centrifuge microscope

Angle of microscope light axis	θ_0	30deg
Angle of base plate	θ	45-75deg
Angular frequency	ω	0 - 1257 rad/s
Magnification of microscope		1000
Rotation radius	r_0	5.9×10^{-2} m
Rotation speed	N	0 – 12000 rpm

Fig. 2 の右側が画像処理に関わる部分である。ビデオテープに記録された画像は、1/30s の任意整数倍の時間間隔で最大 6 枚、画像処理装置(ネクサス Qube)に取り込まれる。デジタル化された画像は、512×480 pixel (実寸法 0.48μm/pixel)、256 階調である。原画像に含まれる照明むらなどのノイズは、15×15pixel 領域での平滑化処理で得られたバックグラウンド画像を原画像から減算することにより除去した。さらに 3×3pixel 領域での平滑化処理を行った後、適当な閾値で二値化、平滑化処理後に、赤血球の重心を計算した。時間間隔をおいた 2 枚の二値画像を用いて PTV (Particle Tracing Velocimetry)により画像に含まれる全赤血球の速度ベクトルを測定した。赤血球速度ベクトルのうちロータ回転方向の成分はぶれによる影響を強く受けるので、それに垂直な遠心力方向の成分をとって赤血球の移動速度とした。

実験に先立って、画面上の赤血球に類似のテストパターンを用いて画像処理による速度計測の精度を検定した。これにより、ランダムに配置した 180 個のパターンのうち 118 個の移動距離を 1pixel 以内の精度で計測出来ることを確認した。

本実験で用いた試料の物性値を Table 2 に示す。赤血球に作用する遠心力の評価に大きな影響を及ぼす赤血球と血漿の密度については実際の試料で測定した値を、その他の数値については文献⁽⁵⁾の値を用いた。

試料の作成にあたっては、静脈から採血したヒト血液をクエン酸ナトリウムで抗凝固した後、遠心分離する (1000g, 10 分間)。得られた血漿と生理食塩水を混合した媒質 (血漿の体積割合 $r = 1, 0.5, 0.25, 0.025$ の 4 種類) に、赤血球を体積割合で 0.05% 分散させたものを試料として用いた。赤血球に作用する力の評価に用いる媒質の物性値は、血漿と生理食塩水の値を濃度に応じて比例

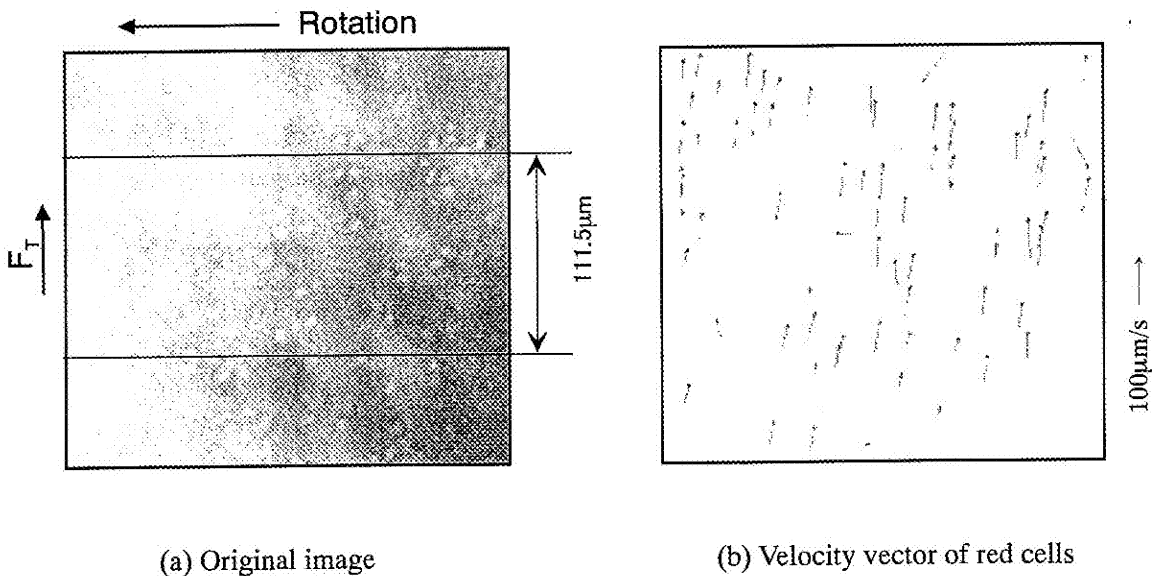


Fig. 3 Red blood cells moving on a glass plate under the effect of centrifugal force
 $(r=0.25, N=3522\text{rpm}, \theta=60.33^\circ, F_N=50.3\text{pN}, F_T=28.6\text{pN})$

配分して用いた。また、赤血球の摩擦特性を求めるベースには、カバーガラス（高橋技研ガラス）をエチルアルコールで脱脂したものを用いた。実験は、一定温度条件下（ $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ ）で行った。

Fig. 3 (a)に、実験により得られた画像の例を示す。ロータの回転数は本実験範囲で中程度の遠心力を与える 3522rpm である。この場合、半導体レーザーの照射時間（50ns）の間の観測部分の回転による移動距離は $1.1\mu\text{m}$ となる。CCD カメラの分解能の関係

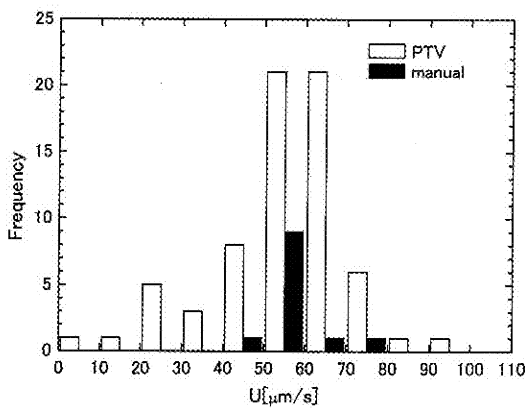


Fig. 4 Comparison of frequency between image processing and manual measurement (same condition as Fig. 3)

Table 3 Statistical values of cell velocity measurement (same condition as Fig. 3)

	Image processing	Manual measurement
Mean velocity [$\mu\text{m/s}$]	55.45	56.16
Standard deviation [$\mu\text{m/s}$]	15.68	6.95
Sample number	68	12

で必ずしも鮮明な画像が得られているとはいえないが、個々の赤血球は認識できることがわかる。実際のビデオ画像では、避けられない同期の誤差の影響により、ロータ回転方向に振幅が $2\mu\text{m}$ 程度の不規則なぶれが生ずるが、 F_T の作用方向への赤血球の移動速度の計測に特に支障はない。また、この画像は試料部のベース面が、落射顕微鏡の光軸とほぼ垂直になるよう試料部傾斜角 θ を 60.33° に設定した場合のもので、後に述べるように画像処理による赤血球速度の計測が可能であるが、ベース面が光軸に対して垂直から外れるに従って、画像のコントラストが低下し、画像処理による計測が困難となる（このような場合でも手動計測は可能であり、現状では手動計測のほうがより広い条件下で摩擦力の測定を行うことができる）。

先に述べた画像処理の方法を用いてノイズ除去等の処理を施した後に、赤血球の速度ベクトルを求めた結果を Fig. 3 (b) に示す。原画像[Fig. 3 (a)]において目視で確認できる約 120 個の赤血球のうち、PTV の手法により 74 個の速度ベクトルが得られており、その内 6 個の不自然な速度ベクトルを除いたものを画像処理計測結果とした。

赤血球速度の度数分布と統計値について画像処理計測と手動計測とを比較したものを Fig. 4 と Table 3 にそれぞれ示す。画像処理では画像上の全ての赤血球について測定を行うため、赤血球速度は広い範囲に分布しているのに対し、手動計測では平均的な速度で移動する赤血球を選んで測定しており、また実験時間の都合上サンプル数も画像処理計測に比べて少ないために、分布は

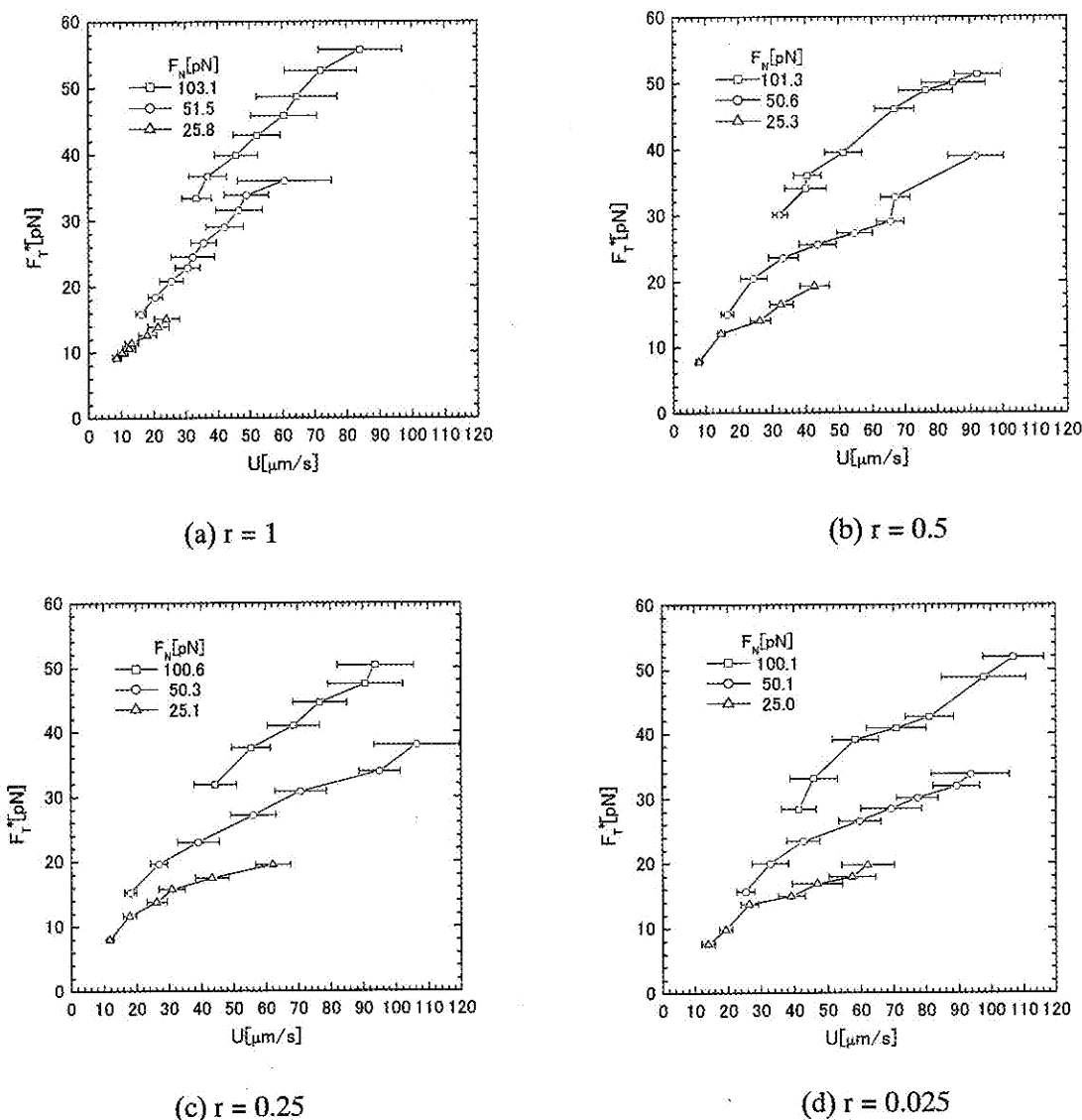


Fig. 5 Frictional characteristics of red blood cells moving on a glass plate in the medium consisting of plasma and saline (r : concentration of plasma)

狭い範囲に限られている。ただし、Table 3に見られるように、赤血球速度の平均値に関しては手動計測の結果は画像処理計測の結果とよく一致しており、妥当な結果を与えていると考えられる。

以下で、種々の条件下で赤血球の摩擦特性を計測した結果を示すが、先に述べたように画像処理計測は試料部傾斜角の設定可

能範囲が手動計測に比べて狭いため、以下の結果では手動計測により赤血球速度を求めている。なお、本実験装置では落射顕微鏡の取り付け角度は固定されているが、これを試料部傾斜角に応じて可変とすれば、上記の問題は解決可能であることを付記する。

3. 実験結果と考察

血漿と生理食塩水を混合した媒質における血漿の割合 r を4種類に変化させて、赤血球とガラス板との摩擦特性を計測した結果を Fig. 5 (a)-(d)に示す。それぞれ3種類の垂直抗力 F_N の値に対する摩擦力を、赤血球速度の関数としてプロットしたものである。各測定点は Fig. 5 (a)については24~48個の、それ以外の図については12個の赤血球に対して平均値と標準偏差を示してある。

媒質が血漿のみの Fig. 5 (a)の場合、3種類の F_N に対する摩擦特性は、ほぼ同じ傾きをもつ直線状となる。摩擦力が速度 0 まで直線状に変化すると仮定すると、摩擦力はクーロン摩擦と粘性摩擦の和として表され、クーロン摩擦の大きさは F_N とともに増加する。また、速度に対して直線的に摩擦力が増加することは、赤血球とガラス板間に一定の厚さの血漿層が存在し、その粘性摩擦力が赤血球に作用していることを示唆している。媒質を血漿と生理食塩水の混合物とし、血漿濃度を徐々に減少させた Fig. 5 (b)-(d)の結果を見ると、特に垂直抗力の小さい場合に、赤血球速度の大きい領域の勾配が小さくなっていることがわかる。一方、速度の小さい範囲では血漿のみの場合とほぼ同じ勾配を保っているが、速度 0 に外挿して得られるクーロン摩擦の値は、血漿濃度 r とともに減少する。

なお、媒質中の血漿濃度が $r=0.025$ よりも低くなると、移動中の赤血球がガラス板に付着するようになり、 $r=0$ (生理食塩水のみ) では全ての赤血球がガラス板上で停止した。

4. 結言

傾斜遠心顕微鏡による赤血球の摩擦特性の計測に関する検討を行って、以下の結論を得た。赤血球の移動速度の測定について、画像処理計測と手動計測を比較した結果、手動計測は平均速度の計測において十分な精度をもつことが明らかとなった。赤血球の摩擦特性については、媒質が血漿のみの場合、摩擦力はクーロン摩擦と線形の粘性摩擦の和で表せる。媒質が血漿と生理食塩水の混合物の場合は、血漿濃度の減少とともに、クーロン摩擦が減少し、さらに線形の粘性摩擦特性からのずれを生じる。

今後は、落射顕微鏡の取り付け角度を可変として、光軸が常に試料ベース面と垂直になる条件で実験を行い、赤血球速度のより低い範囲での測定を可能とするとともに、画像処理による効率的な測定を行いたい。さらに、ガラス板上に血管内皮細胞を培養した条件で赤血球の摩擦特性の計測を行う予定である。

5. 参考文献

- (1) Schmid-Schönbein, G.W., Biomechanics of Microcirculatory Blood Perfusion, *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, Vol. 1, (1999), 103-127.
- (2) Pries, A.R., Secomb, T.W. and Gaehtgens, P., The endothelial surface layer, *European Journal of Physiology*, Vol. 440, (2000), 653-666.
- (3) Inoue, S., Knudson, R. A., Goda, M., Suzuki, K., Nagano, C., Okada, N., Yakahashi, H., Ichie, K., Iida, M., and Yamanaka, K., Centrifuge polarizing microscope. I. Rationale, design and Instrument performance, *Journal of*

Microscopy, Vol. 201, Pt. 3, (2001),
341-356.

- (4) 坂下,他 3 名,赤血球の摩擦特性の計測
(抗力の影響),日本機械学会第 13 回バ
イオエンジニアリング講演会講演論文
集 No.00-35 (2001), 12-13.
- (5) Cooney, D. O., (権藤晋一郎訳), 医工学,
(1984), 30, アイピーシー.