

## 研究 単軸引張によるヒト赤血球の変形能の測定 : 見かけのヤング率と形状回復時定数の測定

著者	郡 慎平, 加藤 陽介, 田地川 勉, 山本 恭史, 板東 潔
雑誌名	生体医工学
巻	53
号	1
ページ	1-7
発行年	2015
その他のタイトル	Measurement of Erythrocyte Deformability by Uniaxial Stretching : Measurement of Apparent Young's Modulus and Time Constant of Shape Recovering
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10112/8962">http://hdl.handle.net/10112/8962</a>

# 単軸引張によるヒト赤血球の変形能の測定 —見かけのヤング率と形状回復時定数の測定—

郡 慎平\*・加藤 陽介\*\*・田地川 勉\*\*\*・山本 恭史\*\*\*・板東 潔\*\*\*

## Measurement of Erythrocyte Deformability by Uniaxial Stretching

### — Measurement of Apparent Young's Modulus and Time Constant of Shape Recovering —

Shimpei KOHRI,\* Yousuke KATO,\*\* Tsutomu TAJIKAWA,\*\*\* Yasufumi YAMAMOTO,\*\*\* Kiyoshi BANDO\*\*\*

**Abstract** An erythrocyte can be deformed very easily by even very small amounts of stress, enabling it to flow smoothly through approximately 3  $\mu\text{m}$  diameter microvessels despite its larger size of 8  $\mu\text{m}$  in diameter and 2  $\mu\text{m}$  in thickness. Reduction of erythrocyte deformability leads to poor circulation particularly in microvessels, which may result in hypertension and various circulatory diseases. To clarify blood microcirculatory properties, it is very important to understand the deformability of erythrocytes. However, a standard method for quantitative evaluation of erythrocyte deformability has not yet been established. In this study, an apparent Young's modulus and a time constant for the recovery of erythrocyte shape following uniaxial stretching are proposed as deformability indices. When an erythrocyte was pulled horizontally on opposite ends using two micropipettes, tensile stress and strain were measured, and an apparent Young's modulus was calculated based on Hooke's law. On returning to its initial shape after the erythrocyte was released from stretching, the elapsed time and strain were measured, and a time constant for shape recovery was calculated based on the Kelvin model. The average apparent Young's modulus was 16.0 Pa, and the average time constant was 113.4 ms, with a slight tendency toward an inverse relation between the two physical quantities.

**Keywords :** erythrocyte, deformability, uniaxial stretching, apparent Young's modulus, time constant.

## 1. はじめに

血液は体中に張り巡らされた血管内を循環し、毛細血管内で各種臓器細胞への酸素・栄養物の供給を行い、同時に二酸化炭素・老廃物の回収を行う。この中でも特に酸素供給は生物が生命活動を行う上でもっとも重要である。この酸素運搬を行うのが赤血球である。赤血球は両凹円盤形状

をしており、直径 8  $\mu\text{m}$ 、最大厚さ 2  $\mu\text{m}$  である。酸素供給は毛細血管で主に行われるが、この血管は赤血球よりも細い直径約 6  $\mu\text{m}$  (最小で 3  $\mu\text{m}$ ) であり、赤血球は管内を柔軟に変形しながら流れて酸素供給を実現する。ところが病気の発症や外部からの力学的なストレスの作用により赤血球が変質して変形能力が低下した場合、赤血球は毛細血管内をスムーズに通過できない、または完全に閉塞させる。この状態が続くと、生理反応として血液を流すために血圧が上昇するため高血圧症に陥り、さらに状態を悪くすると動脈硬化や動脈瘤などの循環器病発症へとつながる [1, 2]。このようなことから赤血球の変形能の定量化は循環器病の診断、早期発見などの観点で極めて重要であると言える。また、変形能の測定が可能になれば医療機器、たとえば人工心肺装置 [3] などの生命維持装置や、人工心臓などの人工臓器の研究開発において、患者の身体的負担をより軽減させ QOL 向上につながると考えられる。

赤血球の変形能評価を実施した研究として、ピペット吸引法を用いた研究 [4]、光ピンセット法を用いた研究 [5-7]

生体医工学シンポジウム 2014 発表 (2014 年 9 月, 東京)  
2014 年 8 月 1 日受付, 2014 年 10 月 15 日改訂, 2014 年 12 月 8 日再改訂

Received August 1, 2014; revised October 15, 2014, December 8, 2014.

\* 藍野大学医療保健学部臨床工学科  
Department of Medical Engineering, Aino University

\*\* 関西大学大学院理工学研究科  
Graduate School of Science and Engineering, Kansai University

\*\*\* 関西大学システム理工学部機械工学科  
Department of Mechanical Engineering, Faculty of Engineering Science, Kansai University

や原子間力顕微鏡を用いた研究[8, 9]があるが、それぞれ異なる物理量で評価がなされており、たとえば、ピペット吸引法や光ピンセットを用いた結果では膜せん断弾性率で数  $\mu\text{N/m}$  程度の値となり、形状回復特性を示す時定数が百数十 ms[10]、一方原子間力顕微鏡を用いた結果では、ヤング率が 0.1 MPa 程度でありバネ定数にすると数 mN/m から十数 mN/m と報告されている。赤血球は約 120 日の間に血管内を弾性変形と形状回復をつねに続けて流れていることから、赤血球寿命なども考慮すると赤血球に対して粘弾性特性を捉えるためには、個々の赤血球に対して弾性特性と形状回復特性を示す物理量を一度に測定すべきであるが、そのような研究はあまりなされていない。

本研究では、工学の分野において代表的な Hooke の法則と Kelvin モデルを基に赤血球の変形および形状回復をできる限り単純モデル化し、個々の赤血球に対して変形特性の定量化を行うことを目的とした。顕微鏡観察下で二本のマイクロピペットを操作して赤血球に引張変形を与えた場合の引張応力とひずみの関係に対して Hooke の法則を基にして見かけのヤング率を算出し、引張から解放された赤血球が変形状態から元に戻るまでの形状回復過程に対して Kelvin モデル[11]を基にしてその時定数を測定した。これにより個々の赤血球に対して見かけのヤング率と形状回復時定数の両方を同時に測定し、それぞれの結果を基に、赤血球の変形能の定量化ならびに各量の関係性について調べた。本実験は、顕微鏡観察後にピペットを赤血球に近づけて引張り実験を行うため、測定対象となる赤血球の選別がし易く、実験が極めて簡便に行うことができる利点がある。また、ピペット内径と赤血球の吸引応力の調整によって大変形を対象とした実験も可能となる。

## 2. 実験方法

本研究における赤血球サンプルは関西大学保健管理センターにて健康成人から採血された。研究進行はヘルシンキ宣言に則り、血液提供者に対しては事前にインフォームドコンセントを行った。また個人情報保護のために、実験並びに解析そして発表などの情報公開時に本人特定ができないようにしている。なお、血液提供者が情報の開示および破棄を希望した場合は、それに従うものとした。また、長期に赤血球保存を行うと保存液による性状変化が考えられるため、実験は採血当日中に実施した。本研究で使用したすべての血液サンプルは、健康な 20 代男性から抗凝固剤として EDTA-2Na が入れられた全血血球数検査用真空採血管を使用した。

採血直後に血液を遠心分離し、血漿およびパフィーコート（白血球および血小板）を除去した後、PBS（リン酸緩衝生理食塩水：Phosphate Buffered Salts）で 3 回洗浄した。実験に用いる血液サンプルはヘマトクリット 0.1% 程度を目安に PBS で赤血球を十分希釈したものを用いた。

なお、採血直後から上記の実験処理にかかる時間はおよそ 1~2 時間程度である。図 1 は血液サンプル中の赤血球の一つである。実験では真円を描く赤血球のみを抽出することはできなかったため、図 1 のようにほぼ円形を示している赤血球は実験対象に用いた。

図 2 にマイクロマニピュレータシステムの概略図を示す。マイクロマニピュレータシステムは中央に位置する倒立型顕微鏡（Olympus 社製 IX-70）とその両肩に設置されたマイクロマニピュレータ（Eppendorf 社製 トランスファーマン NK2）で構成されている。マイクロマニピュレータのアームはコントロールロッドにより三次元操作が可能である。アーム両端にマイクロピペットを装着し、ピストン型マイクロアスピレータ（Eppendorf 社製 CellTram<sup>®</sup> vario）でマイクロピペット内を減圧し先端で赤血球を吸引保持する仕組みとなっている。実験に用いるマイクロピペットはガラス細管（Drummond 社製 内径 0.7 mm, 外径 1.2 mm）をプラー（株式会社 島津製作所 MPT-1）で熱を与えながら引き延ばして切断することで先端の尖ったガラス細管を作製し、このガラス細管を顕微鏡観察下でガラスカッターにより先端一部分のみをせん断破壊することで作製した。実験に用いたマイクロピペット先端は、外径は約  $2\mu\text{m}$ 、内径は約  $1\mu\text{m}$  である。赤血球の変形の様子は CMOS カメラ（The Imaging Source 社製 DMK 22BUC03, maximum frame rate 76 fps）を用いて撮影し、パソコンで記録した。またピペット内圧の測定は Argon Medical Devices 社製のひずみゲージ式圧力トランスデューサ（DX-360X (S580)）を用いた。圧力計はマイクロアスピレータ手前に設置した。観察には 100 倍油浸対物レンズ（Olympus 社製 UPlanApo）を用いた。なお、本研究における空間分解能は 204 nm（波長 550 nm 基準）

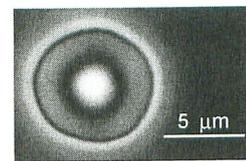


図 1 実験に用いた赤血球サンプル。

Fig. 1 A sample erythrocyte used in the experiment.

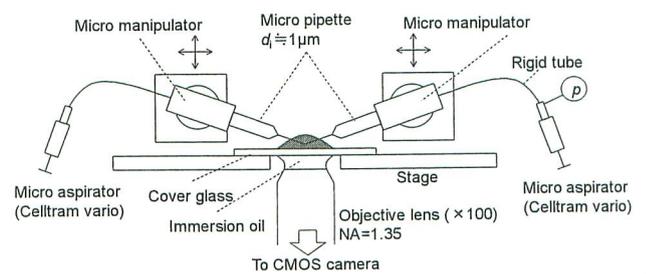


図 2 実験装置概略図。

Fig. 2 Schematic diagram of the experimental apparatus.

である。

顕微鏡ステージに設置したカバーガラス (BSA コーティング済) 上に赤血球サンプルを滴下し、マイクロマニピュレータに取り付けたマイクロピペットを赤血球縁の相対する2端に近づけ、ピストン型マイクロアスピレータでピペット内圧を低下させ赤血球を吸引・保持した。その状態でピストンを固定させておき、撮像および圧力測定開始後にマイクロマニピュレータで片方のピペット先端を水平に移動させ赤血球に単軸引張を与えた。このときマイクロピペット内部は PBS で満たした。本研究において引張り速度は約  $2 \mu\text{m/s}$  とした。赤血球の初期直径が  $8 \mu\text{m}$  の場合、ひずみ速度は  $\ln(10/8) = 0.22/\text{s}$  である。これより単位ひずみを与えるのに必要な時間はその逆数から約 4.5 秒である。これは後述する赤血球の形状回復時定数 (百数十 ms) よりも十分に大きいため、本実験においては赤血球の引張変形速度が応力とひずみの測定結果に及ぼす影響は無視できると考えられる。

赤血球がマイクロピペットにより単軸引張を加えられ始めてから、完全に解放されるまでの間の吸引圧の値とこの時の赤血球変形動画を同期させて記録し応力とひずみの関係を求めて、フックの法則より赤血球の見かけのヤング率  $E_a$  を算出した。このとき、マイクロピペット内圧を赤血球に与える引張応力とみなした。

単軸引張においてマイクロピペット吸引圧を赤血球の復元力が越えたとき、赤血球はピペット先端から解放される。解放後、赤血球は徐々に元の形状へと回復していく。そのときの各時刻における赤血球長さを測定し、形状回復過程における赤血球ひずみと時間の関係を調べ、赤血球の形状回復時定数を測定した。

見かけのヤング率測定実験において計測した項目の定義を図 3 に示す。赤血球長さの測定は赤血球に外接する四角形を描き、引張軸方向の長さを  $d_x$  とした。このとき引張り始めを時間  $t = 0 \text{ s}$  とした。

赤血球は一定の吸引圧で保持された状態からマイクロピペットにより引張られる。マイクロピペット内圧は赤血球が受ける引張り力と反対方向の力 (復元力) が作用するため低下する。ピペットから赤血球が離れた瞬間 (図中  $t = t_r$ ) までの内圧  $p_1$  ( $p_2$ ) を圧力トランスデューサで測定した。

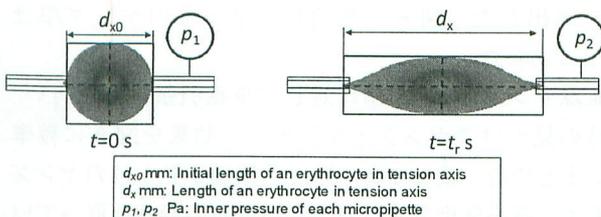


図 3 測定項目。

Fig. 3 Physical parameters measured.

単軸引張を加えられた赤血球のひずみは真ひずみとして式 (1) から求めた。式中において、 $d_x$  は各時刻における引張軸方向の赤血球の長さを、 $d_{x0}$  は引張りを加える直前の赤血球長さを表す。

$$\varepsilon_x = \ln \left( \frac{d_x}{d_{x0}} \right) \quad (1)$$

ここで、赤血球の引張応力  $\sigma$  は吸引・保持してからのマイクロピペット内圧の差圧に等しいため、本実験において式 (2) で表される。

$$\sigma = \Delta p = p_1 - p_2 \quad (2)$$

これら  $\sigma$  と  $\varepsilon_x$  に対して Hooke の法則を適用することで、式 (3) から赤血球の見かけのヤング率  $E_a$  を算出した。

$$E_a = \frac{\sigma}{\varepsilon_x} \quad (3)$$

形状回復時定数測定においては、赤血球がマイクロピペットから離れた直後の時間を  $t = 0 \text{ s}$  とした。このとき 16.67 ms 間隔で赤血球長さ  $d_x$  を測定し、赤血球の形状が回復するまで測定を続けた。実験では、回復後の  $d_x$  の収束値を  $d_{x0}$  とおいた。なお、測定時に赤血球が真円にならない場合でも  $d_x$  がある値に収束していれば、その値を  $d_{x0}$  とし、赤血球の形状回復が完了したとみなした。実験に用いた 100 倍対物レンズ (空間分解能  $0.204 \mu\text{m}$ ) の場合、赤血球の直径が  $8 \mu\text{m}$  とすると、 $\ln(8.204/8) \approx 0.03$  となり測定限界のひずみは 0.03 となるため、 $\varepsilon \leq 0.03$  の低ひずみ領域は計測限界に達していることになる。そのため、本実験においては低ひずみ領域のデータは削除し、データ処理を行った。

図 4 に赤血球の変形の様子を顕微鏡観察した結果を示す。図 4(a), (b), (c) が赤血球を引張っているときであり、図 4(d), (e), (f) が引張から解放したときの画像である。画像から 2 本のピペットにより赤血球が引張変形し、解放後元の形状に戻る事がわかる。

### 3. 赤血球形状回復に関する理論モデル

単軸引張から解放された赤血球の形状回復モデルとして

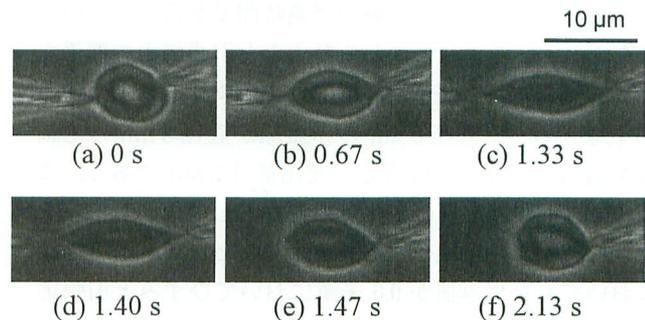


図 4 赤血球の引張りおよび形状回復過程の顕微鏡画像。

Fig. 4 Microscopic images of erythrocyte stretching and shape recovery.

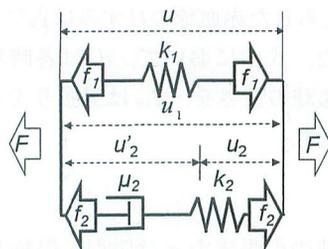


図 5 Kelvin モデル.

Fig. 5 The Kelvin model.

Kelvin モデル (図 5) を用いた[11].

Kelvin モデルにおける力の釣り合いに関する基礎式を式(4)に示す. このとき,  $\tau_\epsilon$ ,  $\tau_\sigma$ ,  $E_R$  は式(5)で表される. 実験では, 赤血球は瞬間的に引張力から解放されるとみなせるため, Kelvin モデルにおける外力  $F$  はステップ関数  $I(t)$  で式(6)のように表した.

$$F + \tau_\epsilon \dot{F} = k_1(u + \tau_\sigma \dot{u}) \quad (4)$$

$$\tau_\epsilon = \frac{\mu_2}{k_2}, \tau_\sigma = \mu_2 \left( \frac{1}{k_1} + \frac{1}{k_2} \right), E_R = k_1 \quad (5)$$

$$F = F_0(1 - I(t)) \quad (6)$$

Kelvin モデルの基礎式から式(7), (8)が求まる. この式(7)よりひずみの時間変化は一次遅れとなることわかる.

$$\epsilon_x = \frac{x}{d_{x0}} = \alpha \exp\left(-\frac{t}{\tau_\sigma}\right) \quad (7)$$

$$\alpha = \frac{F_0}{d_{x0} E_R} \left(1 - \frac{\tau_\epsilon}{\tau_\sigma}\right) \quad (8)$$

#### 4. 実験結果と考察

##### 4.1 単軸引張による赤血球の見かけのヤング率の測定

同期測定されたひずみと応力の測定結果の一例を図 6, 7 に示す. 図 6 は赤血球に与えられたひずみの時間変化を表す. 縦軸がひずみを, 横軸が経過時間である. 本実験では引張り速度を一定値としているが, 本研究において赤血球ひずみは真ひずみを取るため縦軸は対数関数的な増加を示す筈である. しかしながら, ひずみが 0.6 を超えるとひずみ値が傾きを変えて再増加する傾向が見られた. また図 7 は赤血球に与えられた引張応力 (吸引圧) の時間変化を表し, 縦軸が引張応力, 横軸が経過時間である. 二つのグラフをもとに, 赤血球に加わるひずみと引張応力の関係をまとめた結果の一例を図 8 に示す. 生体内での赤血球の変形を考えると, 直径  $8 \mu\text{m}$  の赤血球が直径  $3 \mu\text{m}$  の毛細血管を通過するとした場合その変化量は  $5 \mu\text{m}$  である. この変化量を引張り変形の変化量の目安として用いると, そのときの真ひずみは式(1)から  $\epsilon_x \approx 0.5$  となる. 本実験結果においてもひずみ値が 0.6 未満においてひずみと引張応力の間に直線関係が見られ, それ以上になると比例とは異なる関係性が見られた. 図 6, 7, 8 の結果は一つの赤血球サンプルに対するものであるがその他の結果を見ても似

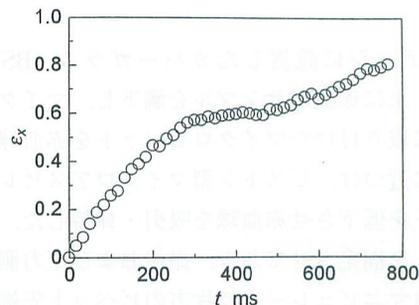


図 6 単軸引張におけるひずみの時間変化.

Fig. 6 Changes in erythrocyte strain during uniaxial stretching.

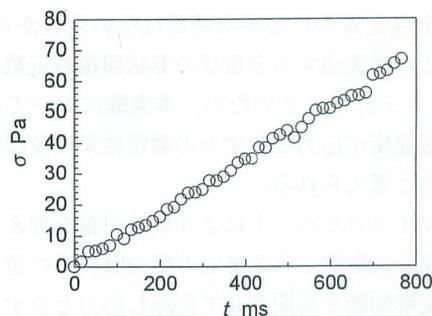


図 7 引張実験における応力の時間変化.

Fig. 7 Erythrocyte tensile stress during uniaxial stretching.

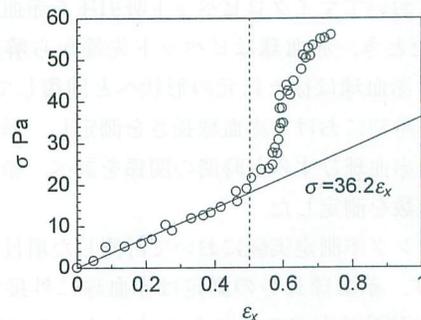


図 8 単軸引張における赤血球応力ひずみ線図.

Fig. 8 Erythrocyte stress-strain curve during uniaxial stretching.

た傾向が表れていた. これら二つの観点から, 実験のデータ整理は  $\epsilon_x < 0.5$  で行った.

図 8 において,  $\epsilon_x < 0.5$  の範囲で Hooke の法則 (式(3)) を適用し, グラフの傾きから赤血球の見かけのヤング率を算出した. 図 8 の場合は, 見かけのヤング率は  $36.2 \text{ Pa}$  であった.

赤血球サンプル数 41 個に対して単軸引張試験を行い, 赤血球の見かけのヤング率を算出した結果を図 9 に確率密度でまとめた. 縦軸が確率密度, 横軸が見かけのヤング率を表す. 確率密度分布は対数正規分布の形状を取っていたことから, 平均値は幾何平均から求めた. 測定結果から, 赤血球の見かけのヤング率  $E_a$  は最大で  $118.0 \text{ Pa}$ , 最

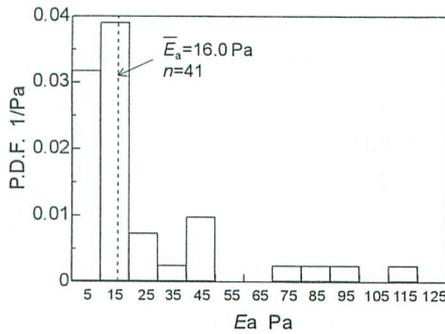


図9 見かけのヤング率の確率密度分布.

Fig. 9 Probability density distribution of apparent Young's modulus.

小で 4.0 Pa, 幾何平均は 16.0 Pa であることがわかった. 最大値と最小値で大きく差が見られたが, 顕微鏡観察結果から赤血球形状などに差異は見られなかった. 本実験では赤血球の年齢による分画を行っていないため, 赤血球年齢により見かけのヤング率の値に差が見られたと考えられる.

見かけのヤング率を基に, ピペット内径を  $1\mu\text{m}$ , 赤血球の直径を  $8\mu\text{m}$  として, 見かけのバネ定数  $k_a$  を概算した結果  $k_a = 1.6\mu\text{N/m}$  という結果が得られた. 一方, 光ピンセットやピペット吸引法を用いた研究[4-7]より得られた膜せん断弾性係数は数  $\mu\text{N/m}$  (しばしば参考にされる数値として  $6\mu\text{N/m}$ ) であることが報告されており, これらとオーダーが一致していることがわかった. 本研究では膜せん断弾性係数という量で弾性特性を評価せずに, Hooke の法則を基に極めて単純なモデルで算出した見かけのヤング率という量で弾性特性の評価を行ったが, 各量のオーダーが一致していたことから本手法でも赤血球の弾性評価が可能であると考えられる.

Ujihara らにより線維芽細胞のヤング率として  $0.63 \pm 0.38\text{ kPa}$  が報告されており[12], その他にも Nagayama らによりマウスの平滑筋細胞の剛性率として  $11.0 \pm 1.9\text{ kPa}$  が報告されている. Nagayama らの結果に関しては本研究における見かけのヤング率に相当するものと考えられる[13]. これらの結果を考慮すると, 赤血球の見かけのヤング率は幾何平均で 16.0 Pa であることから, 赤血球は極めて柔軟性に優れておりわずかな応力によって大変形が可能であることがわかる. これにより, 自身よりも小さな毛細血管をスムーズに通過することが可能となっていると考えられる. なお, 赤血球のヤング率としてよく用いられる原子間力顕微鏡で測定された  $E = 0.1\text{ MPa}$ [8, 9] は本実験結果と大きく値が異なるが, これはそれぞれの測定法において測定されている対象が異なっていることが原因と考えられる. 原子間力顕微鏡を用いた測定では細胞膜構成する膜骨格のヤング率を測定していることが考えられ, 一方本研究のように赤血球を一つの物体と見なしてその全体を変

形させて測定した場合は, 測定対象は膜骨格[14]で構成される構造体としてみなされるため, その構造が変形要素に深く関与することが考えられる. 以上のことから, それぞれのヤング率が異なる値を示したと考えられる.

#### 4.2 単軸引張から解放された赤血球の形状回復時定数の測定

図 10(a), (b) に赤血球が引張りから解放された後の引張軸方向のひずみの時間変化を示す. 図 10(b) はひずみに関して片対数表記した結果である. 図 10(b) 中の破線は顕微鏡観察システムの測定限界を示しており, この線より低い値を除いて直線近似を行った. 図 10(a) から引張軸方向の赤血球の形状回復過程が一次遅れ系の挙動を示していることがわかった. この結果を基に本研究における赤血球形状回復モデルに対して Kelvin モデルの適用を決めた.

測定限界よりも高いひずみ領域のデータに対して最小二乗法を用いて近似直線を描き, Kelvin モデルから得た式(7)より, この近似直線の傾きの逆数から, 赤血球の形状回復に関する時定数を算出した. なお, 本実験における赤血球変形は, 図 9(a) のように赤血球が単軸引張りひずみを与えられた際にほぼ左右対称に変形する「全体変形型」と, 膜の一部が大きくひずんでしまい引張から解放したときにその部位が瞬間的に形状回復する「部分変形型」の二種類の変形様式が確認されたが[15], 本研究においては全体変形型のみを対象として実験結果を整理した.

引張軸方向における時定数の確率密度関数を図 11 に示す. 本実験ではサンプル数は  $n = 82$  である. 図 11 の縦軸は確率密度関数, 横軸は時定数を表している. 時定数に関しても対数正規分布とみなし, 幾何平均値を算出した結果, 形状回復時定数は 113.4 ms であった. このとき最大値は 339.0 ms, 最小値は 31.9 ms であった. これは Hochumuth ら[10]の結果と近い値であった. これらの結果から赤血球は引張りなどの変形から解放されると速やかにもとの形状に回復することがわかった. なお, 形状回復時定数が大きい赤血球サンプルと低い値を示した赤血球サンプルの形状に差異は見られず, 時定数の違いは見かけのヤング率と同様に個体差が原因であると考えられる.

#### 4.3 赤血球の見かけのヤング率と形状回復時定数の関係

同一赤血球に対して形状回復時定数と見かけのヤング率を算出した結果を図 12 に示す. 式(5)で与えられる形状回復時定数  $\tau_0$  は粘性特性と弾性特性からなる. 赤血球の見かけのヤング率  $E_a$  を Kelvin モデルにおけるバネ定数  $k_1, k_2$  のいずれかと考えた場合, 時定数  $\tau_0$  と見かけのヤング率  $E_a$  は反比例の関係にあると言える. そのため見かけのヤング率の上昇に反比例して形状回復時定数が減少することが Kelvin モデルから予想される. そこで, 測定データ  $\tau_0$  と  $E_a$  に対し反比例関係を基に最小二乗近似から近似曲線を求めた結果を図中に実線で示す. 近似曲線は式

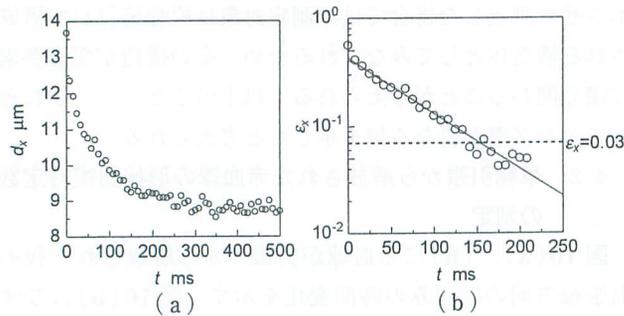


図10 形状回復過程における赤血球長さや時間および、ひずみと時間の関係。(a)  $d_x$  vs  $t$ , (b)  $\epsilon_x$  vs  $t$  (片対数表示).

Fig. 10 Relationship between time and length and between time and strain during erythrocyte shape recovery. (a)  $d_x$  vs  $t$ , (b)  $\epsilon_x$  vs  $t$  (single logarithmic plot).

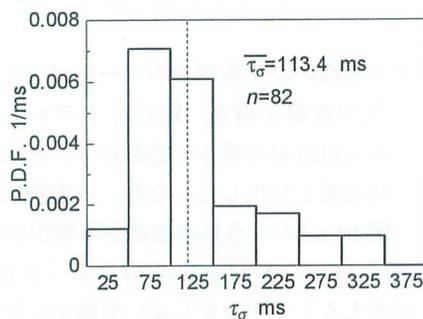


図11 形状回復過程における時定数の確率密度分布.

Fig. 11 Probability density distribution of the time constant on erythrocyte shape recovery.

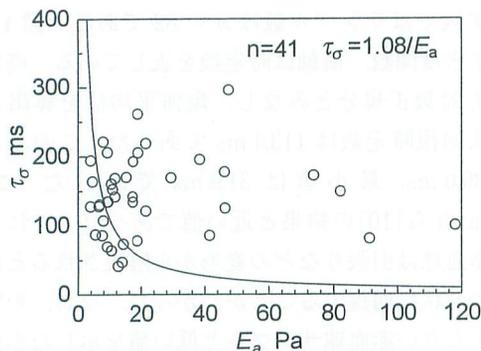


図12 単軸引張における赤血球の見かけのヤング率と形状回復時定数の関係.

Fig. 12 Relationship between the apparent Young's modulus of erythrocyte uniaxial stretching and the time constant on shape recovery.

(9)で表された。このとき相関係数は0.54であった。

$$\tau_{\sigma} = \frac{1.08}{E_a} \quad (9)$$

本結果において、データのばらつきにより、形状回復時定数と見かけのヤング率の間で明確な反比例関係を得ることはできなかった。実験では、赤血球の年齢による分画は行っておらず、個々の赤血球の条件を完全に統一すること

ができていない。このため見かけのヤング率が同じであった場合でも、個々の赤血球の持つ粘性特性が異なることで測定する赤血球によってばらつきが発生することが考えられ、それが形状回復時定数に影響を及ぼし、図12におけるばらつきの要因になったと考えられる。本報ではサンプル数が41であったことから、サンプル数を増加させることでより明確に両者の関係性が確認できると考えられる。

## 5. おわりに

赤血球の粘弾性特性に着目し、力学的観点から赤血球の変形能の測定を試みた。Hookeの法則とKelvinモデルを基に、顕微鏡観察下で赤血球に単軸引張を与えて、見かけのヤング率と形状回復過程における時定数を算出し、さらに両者の関係について調べた。その結果、以下のことがわかった。

- (1) 単軸引張における赤血球の引張応力とひずみとの関係からHookeの法則を基に見かけのヤング率を算出した結果、最大で118.0 Pa、最小で4.0 Pa、幾何平均で16.0 Paであり、赤血球は小さい応力で大変形することがわかった。
- (2) 単軸引張から解放された赤血球の形状回復過程からその時定数を求めた結果、最大で339.0 ms、最小で31.9 ms、幾何平均で113.4 msであり、赤血球は変形から解放されると速やかに形状回復することがわかった。
- (3) 単軸引張における赤血球の見かけのヤング率と形状回復時定数の関係についてKelvinモデルを基に反比例関係として考察した結果、サンプル数の少なさおよび実験条件を十分に統一できなかったことから、結果のばらつきが大きくなってしまい、両者の間で明確な反比例関係を得ることはできなかった。

**利益相反** 日本生体医工学会の投稿規定の基準による利益相反はない。

**謝辞** 本研究を推進するにあたり、実験協力をして頂いた新池谷崇氏(当時大学院生)、永井勇大氏(大学院生)に謝意を表す。また、本研究の一部は、平成25~26年度 関西大学若手研究者育成経費、および関西大学 先端科学技術推進機構 平成24~26年度「流体・弾性膜連成現象研究グループ」の研究費、日本学術振興会 科学研究費補助金(24700466, 26350521)によって行われた。ここに付記し、謝意を表す。

## 文 献

1. Ethier CR, Simmons CA: Introductory Biomechanics — from cells to organisms —, Cambridge Univ. Press, Cambridge, pp. 119-129, 2007.
2. 岡小天: バイオレオロジー, 裳華房, 東京, pp. 31-48, 1971.
3. 小野哲章, 峰島三千男, 堀川宗之, 渡辺敏: 臨床工学技士標準テキスト 第2版, 金原出版, 東京, pp. 283-292, 2012.
4. Markle DR, Evans EA, Hochmuth RM: Force relaxation and permanent deformation of erythrocyte membrane. *Biophys J.* **42**, pp. 91-98, 1983.
5. Suresh S, Spatz J, Mills JP, Micoulet A, Dao M, Lim CT, Beil M, Seufferlein T: Connections between single-cell biomechanics and human disease states: gastrointestinal cancer and malaria. *Acta Biomater.* **1** (1), pp. 15-30, 2005.
6. Hénon S, Lenormand G, Richert A, Gallet F: A new determination of the shear modulus of the human erythrocyte membrane using optical tweezers. *Biophys J.* **76** (2), pp. 1145-1151, 1999.
7. Mills JP, Qie L, Dao M, Lim CT, Suresh S: Nonlinear elastic and viscoelastic deformation of the human red blood cell with optical tweezers. *Mech Chem Biosyst.* **1** (3), pp. 169-180, 2004.
8. 南谷晴之, 川村友美, 塚田孝祐, 飯島淳彦, 関塚永一, 大塩力: 原子間力顕微鏡による赤血球弾性の計測. *電気学会論文誌.* **122** (9), pp. 1664-1671, 2002.
9. Dulińska I, Targosza M, Strojny W, Lekkab M, Czuba P, Balwiercz W, Szymońska M: Stiffness of normal and pathological erythrocytes studied by means of atomic force microscopy. *J Biochem Biophys Methods.* **66** (1-3), pp. 1-11, 2006.
10. Hochmuth RM, Worthy PR, Evans EA: Red cell extensional recovery and the determination of membrane viscosity. *Biophys J.* **26** (1), pp. 101-114, 1979.
11. Fung YC: *Biomechanics Mechanical — Properties of Living —*. Springer-Verlag, pp. 41-48, 1993.
12. Ujihara Y, Nakamura M, Miyazaki H, Wada S: Contribution of actin filaments to the global compressive properties of fibroblasts. *J Mech Behav Biomed Mater.* **14**, pp. 192-198, 2012.
13. Nagayama K, Nagano Y, Sato M, Matsumoto T: Effect of actin filament distribution on tensile properties of smooth muscle cells obtained from rat thoracic aortas. *J Biomech.* **39** (2), pp. 293-301, 2006.
14. 高桑雄一: 赤血球膜骨格の構造と機能. *化学と生物.* **26** (5), pp. 287-294, 1988.
15. 郡慎平, 新池谷崇, 田地川勉, 大場謙吉: マイクロピペットを用いた単軸引張から解放されるヒト赤血球の形状回復時定数の測定—変形様式が時定数に及ぼす影響—, 第16回関西大学先端科学技術シンポジウム講演集, pp. 56-57, 2012.

## 郡 慎平 (コオリ シンペイ)

2008年関西大学大学院工学研究科博士課程後期課程修了。2008年関西大学先端科学技術推進機構ポスドクトラルフェロー。2010年藍野大学医療保健学部臨床工学科講師。現在に至る。専門分野：流体工学，医用生体工学。

所属学会：日本生体医工学会，日本機械学会。



## 加藤 陽介 (カトウ ヨウスケ)

2014年関西大学大学院理工学研究科博士課程前期課程修了。2014年(株)日立メデココ入社。現在に至る。専門分野：流体工学，医用生体工学。

所属学会：日本機械学会。



## 田地川 勉 (タヂカワ ツトム)

2002年関西大学大学院工学研究科博士課程後期課程修了。2002年関西大学工学部助手。2006年関西大学工学部専任講師。2014年関西大学システム理工学部准教授。現在に至る。専門分野：流体工学，医用生体工学・生体材料学，生物・生体工学。

所属学会：日本生体医工学会，日本機械学会，日本人工臓器学会，日本バイオレオロジー学会，日本検査血液学会，可視化情報学会，日本流体力学学会。



## 山本 恭史 (ヤマモト ヤスフミ)

1999年大阪大学大学院工学研究科博士課程後期課程修了。1999年立命館大学総合理工学研究機構ポスドクトラルフェロー。2000年関西大学工学部管理工学科助手。2009年関西大学システム理工学部機械工学科准教授。現在に至る。専門分野：数値流体工学，混相流。

所属学会：日本機械学会，日本混相流学会，可視化情報学会。



## 板東 潔 (バンドウ キヨシ)

1977年大阪大学工学部機械工学科卒業。1982年大阪大学大学院工学研究科機械工学専攻博士課程後期課程修了(工学博士)。1982年大阪大学工学部機械工学科助手。1991年同助教授。1995年関西大学工学部機械工学科助教授。1999年関西大学工学部(現在はシステム理工学部)機械工学科教授。現在に至る。専門分野：流体工学，バイオメカニクス。

所属学会：日本生体医工学会，日本機械学会，日本流体力学学会など。

