

ポアデバイスによる赤血球変形能評価法の開発

Development of the Evaluation Method for Red Blood Cell Deformability by Using Pore Devices

産総研¹, ○横田 一道¹, 橋本 宗明¹, 梶本 和昭¹

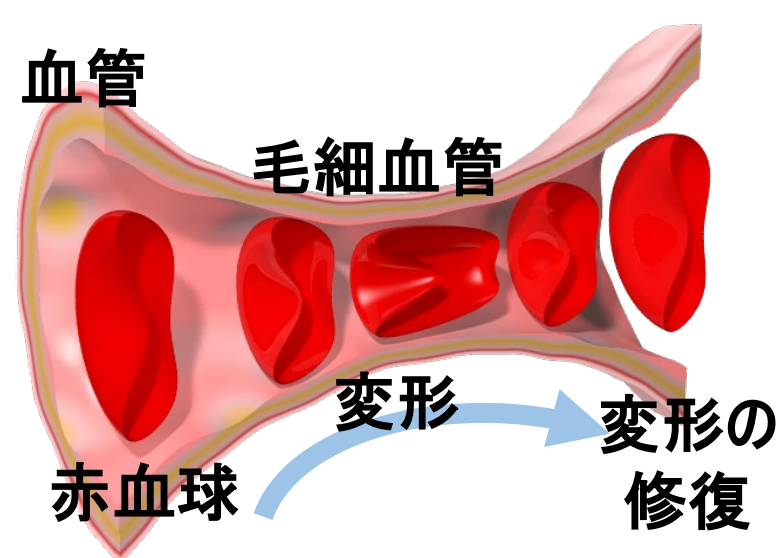
AIST¹, ○Kazumichi Yokota¹, Muneaki Hashimoto¹, Kazuaki Kajimoto¹

E-mail: kazumichi-yokota@aist.go.jp

背景

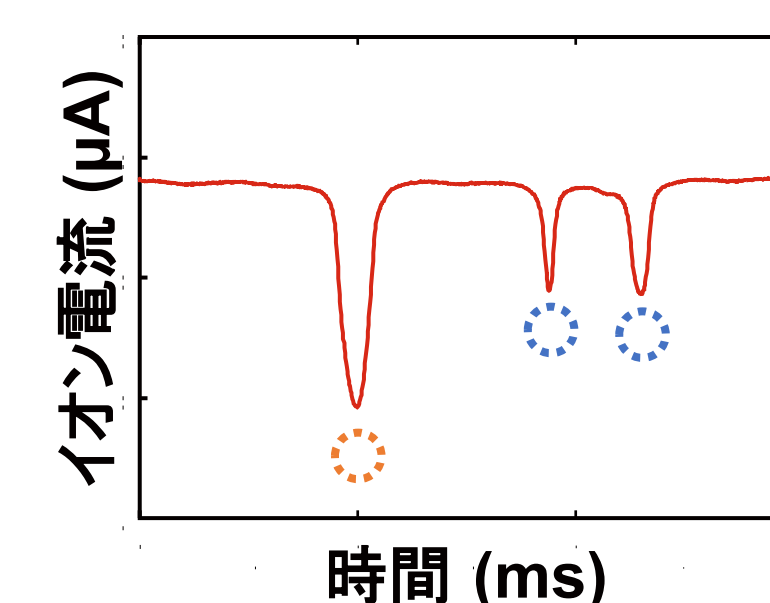
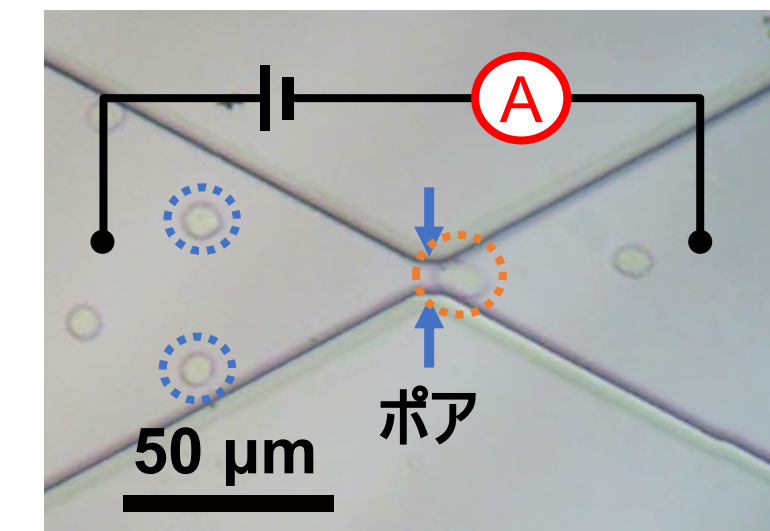
赤血球(Red Blood Cell, RBC)は柔軟性に富み、それ自身の直径(約7 μm)より細い毛細血管(2–5 μm)を変形と形状の修復を繰り返しながら通過し、全身に酸素に運ぶ。

赤血球変形能の低下は赤血球の老化、糖尿病等の疾患や感染症とも関連し、バイオマーカーとなり得る⁽¹⁾。一方で、一細胞レベルで高スループットに赤血球変形能を評価できる手法がなく、疾患と関連する変形能が低下した赤血球の割合が少ない場合、その正確な評価が難しい。

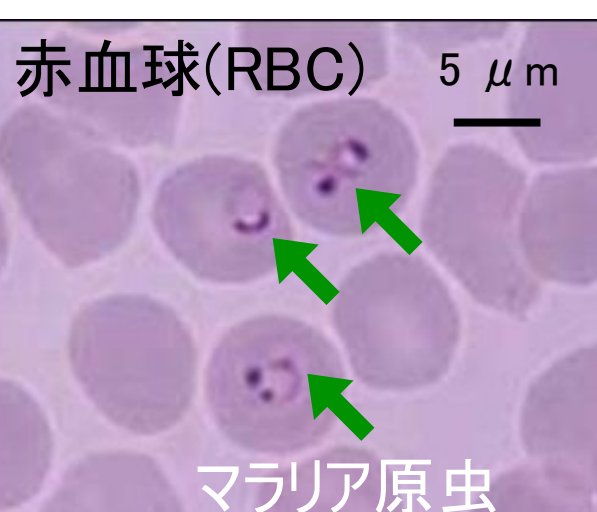


ポアデバイスとは

- 微細加工技術によって形成した細孔(ポア)に電解質溶液を充填し、電圧を印可することでポアを介したイオン電流を測定
- 標的細胞がポアを通過するとイオン電流が阻害され、パルス状の波形が計測される
- パルス波形の評価により、非標識・リアルタイムで標的細胞の定量検出や評価が可能^{(2), (3)}

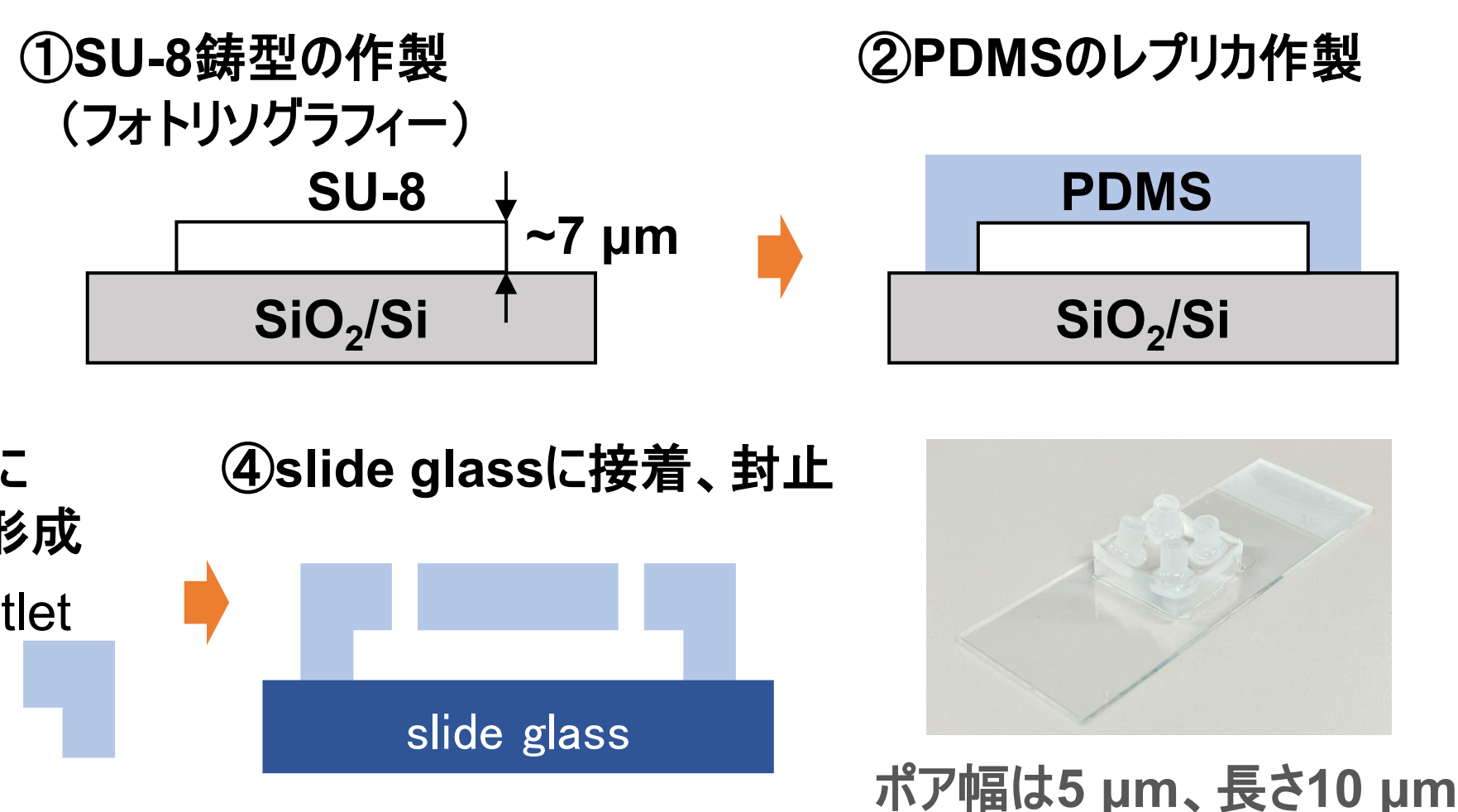


目的



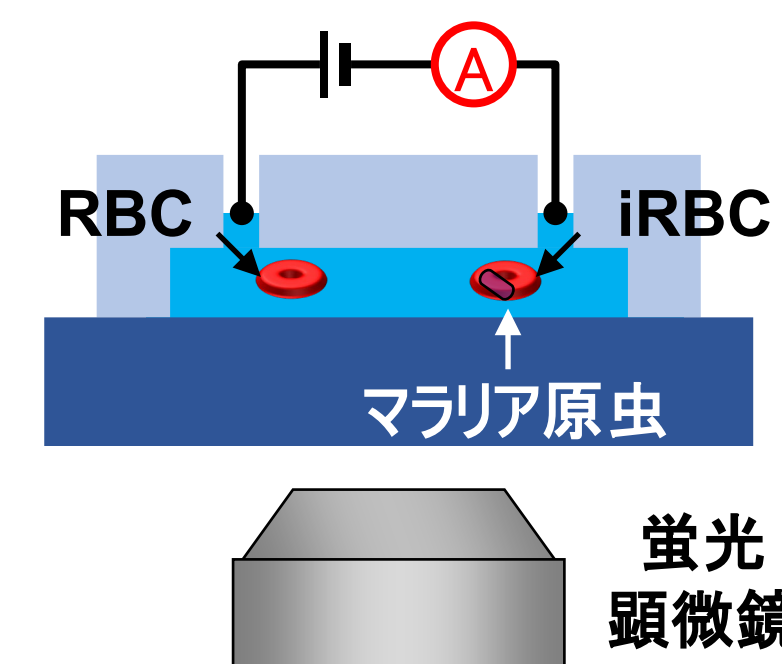
マラリア原虫に感染した赤血球(infected RBC, iRBC)は変形能が低下することに注目し、ポアを通過するRBCおよびiRBCの変形能の違いが、ポアデバイスによって計測されるパルス波形から評価可能かを検証する。

デバイス作製



実験 計測および有限要素法シミュレーション

- RBCおよびiRBC(感染率29.1%)を含む1×PBS懸濁液(5×10⁶ /mL) + アクリジンオレンジ(蛍光核染色)
- 10 μL 懸濁液をポアデバイス中に導入
- 倒立蛍光顕微鏡下、印可電圧1.0 Vでイオン電流計測
- 有限要素法による流体構造連成シミュレーション(ポアを通過する弾性膜の球体) → 計測結果とシミュレーション結果のパルス波形を比較し妥当性を検証



非圧縮のNavier-Stokes方程式(流体)

$$\rho \left(\frac{\partial u}{\partial t} + (u \cdot \nabla)u \right) = -\nabla[pI + \mu(\nabla u + (\nabla u)^T)] + f$$

u : 流速, t : 時間, p : 圧力, ρ : 密度, μ : 粘度, f : 体積力

運動方程式、応力歪み関係式(弾性体)

$$\rho \frac{\partial v}{\partial t} = \nabla \cdot \sigma + f \quad \sigma = E \cdot \varepsilon$$

v : 速度, σ : 応力, E : ヤング率, ε : 歪み

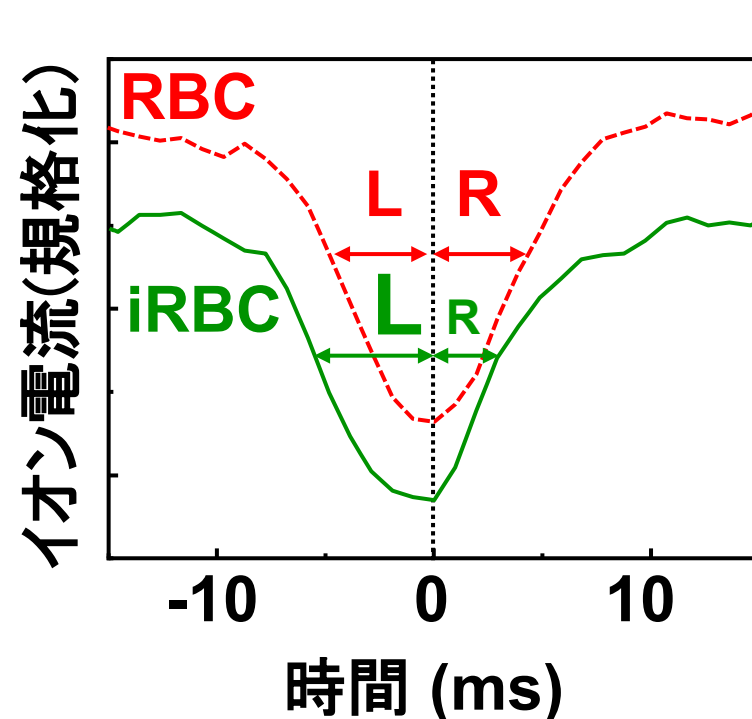
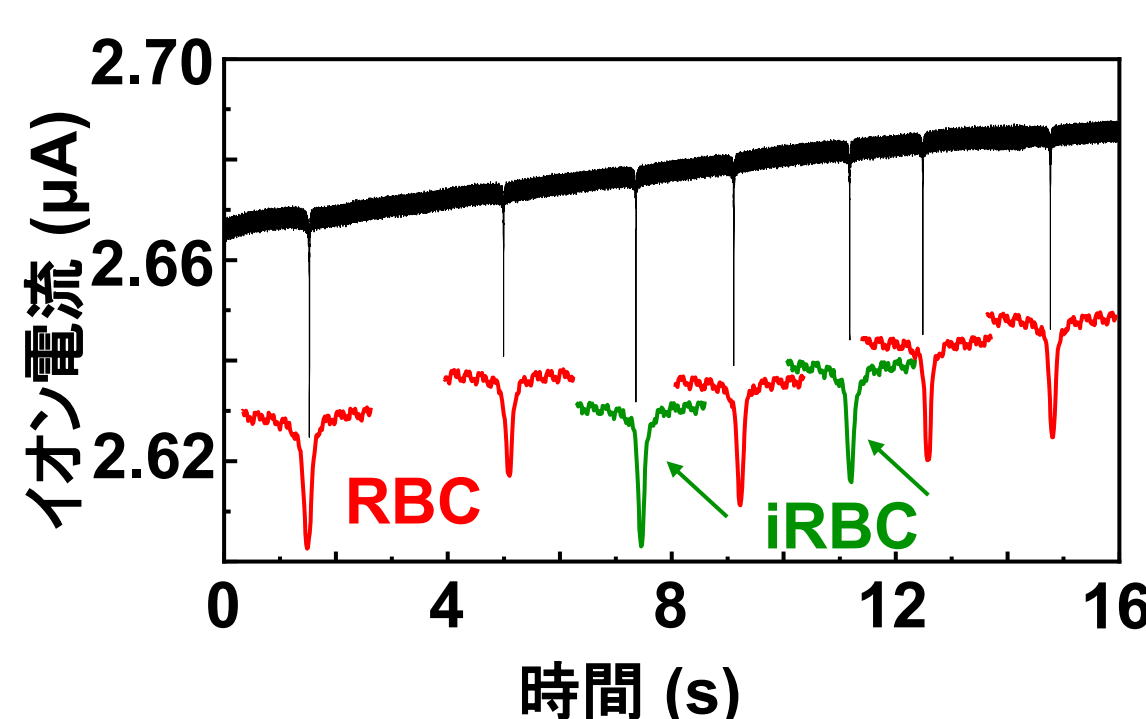
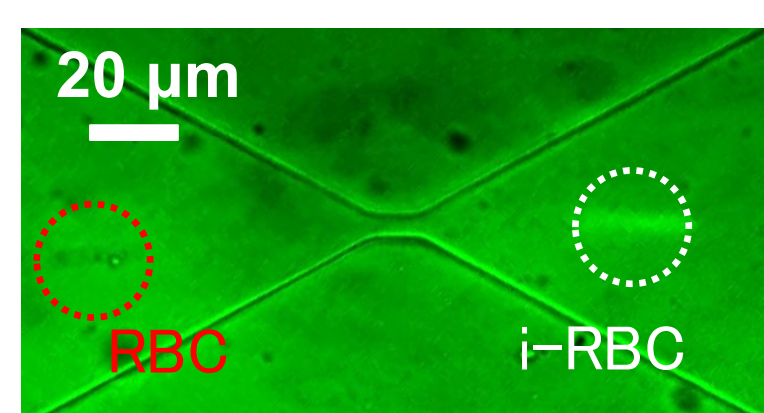
面積当たりの流体抗力と抗力

$$\Gamma = -pI + \mu(\nabla u + (\nabla u)^T)$$

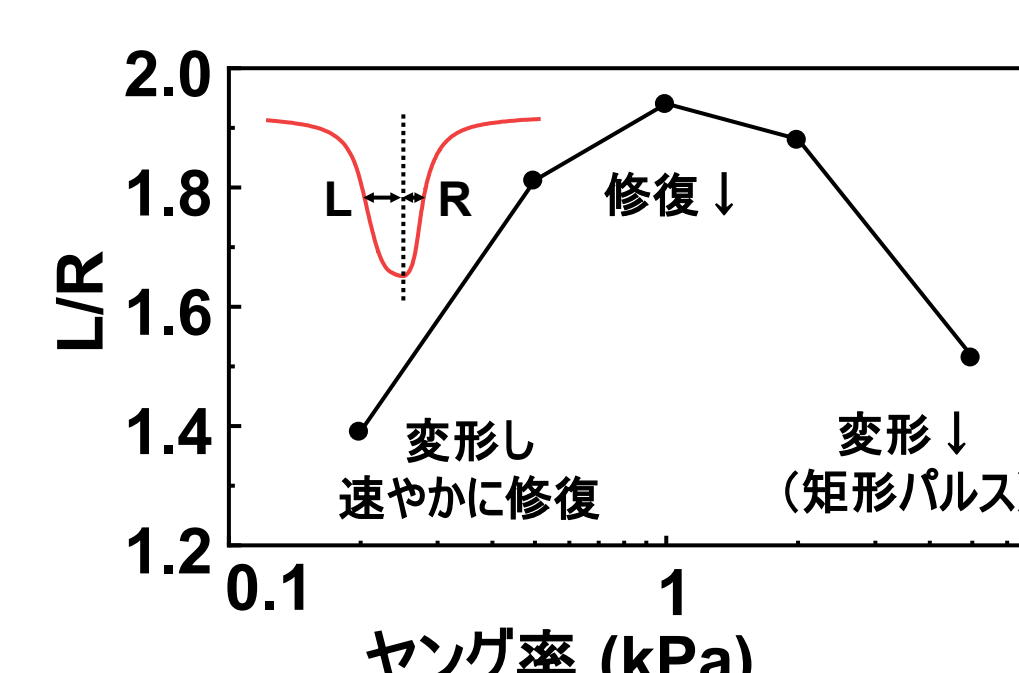
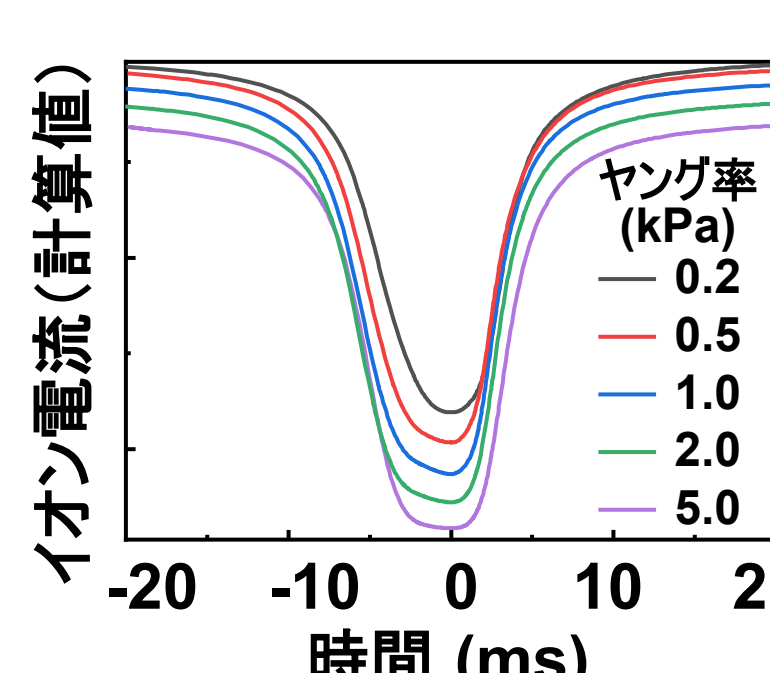
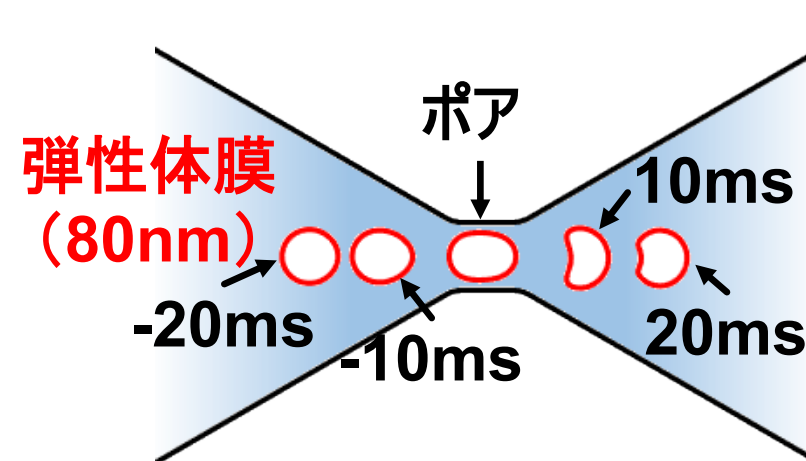
$$\Gamma \cdot n = \sigma \cdot n$$

結果と考察

計測結果



有限要素法シミュレーション



- アクリジンオレンジによる核染色により、核を持たないRBCは暗点として、マラリア原虫由来の核を有するiRBCは輝点として観測
- RBCおよびiRBCの典型的なパルス波形では、RBC由来の波形が左右対称、iRBC由来の波形が左右非対称(左右半値幅の比L/Rが増加)となった
- 有限要素法によるシミュレーションで、細胞膜をモデル化した弾性膜のヤング率変化に伴う、パルス波形非対称性の系統的な変化が再現
- iRBCで計測されたL/R値の増加が赤血球変形能の低下に対応することが明らかとなった

まとめ

- ポアデバイスを用いてRBCとiRBCを計測し、iRBCでの変形能低下が、ポア通過時に計測されるパルス波形非対称性として評価可能であることを見出した⁽⁴⁾
- 本技術は、赤血球や細胞の変形能と関連する様々な疾患や現象(脳梗塞や心筋梗塞などの循環器疾患、がんの転移や細胞の分化など)の評価への展開が期待でき、現在、糖尿病網膜症のリスク評価デバイスへの応用を目指している(R6. A-STEPステージ I に採択)

参考文献

- K. Matthews, *et al.* Technologies for measuring red blood cell deformability, Lab Chip, 22, 1254 (2022).
- K. Yokota, *et al.* Effect of Electrolyte Concentration on Cell Sensing by Measuring Ionic Current Waveform through Micropores, Biosensors, 11, 78 (2021).
- K. Yokota, *et al.* Application of Micropore Device for Accurate, Easy, and Rapid Discrimination of Saccharomyces pastorianus from Dekkera spp., Biosensors, 11, 272 (2021).
- 横田一道、橋本宗明、梶本和昭、浮遊細胞の変形能評価方法(特願2023-099478, PCT/JP2024/021668)