

## せん断流れ場における血液接触面の表面粗さが溶血量増加に及ぼす定量評価

## —せん断応力発生の関与について—

Quantitative Evaluation of Hemolysis due to Surface Roughness of the Blood-contacting Surface  
under Shear Flow Fields; Effect of the Generation of Shear Stress

○ 丸山 修 (産総研), 工藤大樹 (茨大工), 西田正浩 (産総研), 山根隆志 (神戸大院),  
松田健一 (茨大工), 足立吉数 (茨大農), 増澤 徹 (茨大工)

Osamu MARUYAMA (AIST), Taiki KUDO (Ibaraki Univ.), Masahiro NISHIDA (AIST), Takashi YAMANE (Kobe Univ.),  
Kenichi MATSUDA (Ibaraki Univ.), Yoshikazu ADACHI (Ibaraki Univ.), Toru MASUZAWA (Ibaraki Univ.)

**Abstract:** It is important to clarify the relationship between the hemolysis and degree of surface roughness under blood shear fields. From our previous study, we have obtained that the increasing hemolysis was related to the increasing shear stress using a cone-cylinder-cone type rotational shear stressor based on the surface roughness. However we have not yet measured the increasing shear stress with this stressor due to a problem of its torque sensor sensitivity. In this study, we used a new double-cylinder type rheometer with a highly sensitive torque sensor. Though hemolysis amount increased with the increase of the degree of surface roughness, the torque value due to the shear stress increased little. Then the hemolysis resulting from surface roughness was not only caused by homogeneously increased shear stress but was affected by the fluid environment around the surface roughness.

**Key Words:** Hemolysis, Surface Roughness, Shear Stress, Bovine Blood, Rheometer

## 1. 緒言

体内埋め込み型人工心臓や体外循環ポンプには、遠心血液ポンプが広く使用されている。これらの遠心血液ポンプを開発するにあたって、血球破壊（溶血）特性を調べることは重要である。溶血を引き起こす原因として、高せん断応力、発熱、摺動などが挙げられるが、血液接触面の表面粗さも溶血の要因であることがわかっている。我々は、これまでにコーン・シリンダー・コーン型の回転せん断負荷装置を使用して血液にせん断応力を負荷し、このせん断流れ場において、表面粗さの大きさおよび面積が溶血に及ぼす影響について調べてきた。溶血を引き起こす表面粗さの大きさの閾値や、粗さ面積が溶血に与える影響を解明できれば、遠心血液ポンプを開発する上で、血液接触材料表面加工の有益な目標値を示すことができる。これまでの

研究により、層流のせん断流れ場においては、表面粗さの大きさが、 $Ra0.6\mu m$ 以上で溶血量が急増し、 $Ra0.8\mu m$ の溶血量は、 $Ra0.1\mu m$ における溶血量と比較すると、2倍以上に上昇することがわかっている（図1）<sup>1)</sup>。この溶血量の増加は、流れの可視化解析結果<sup>2)</sup>や溶血試験結果<sup>3)</sup>から、表面粗さに基づく局所的なせん断応力上昇の可能性が示唆された。この実験で使用した回転せん断負荷装置には、回転粘度計と同様のトルクセンサーが装備され、せん断負荷によって生じているせん断応力に加えて、せん断流れ場に粘度変化が生じれば、トルク値上昇が検出できる機能を備えている。しかし、これまで表面粗さ増加に基づいて増加すると考えているせん断応力は、回転せん断負荷装置実機では測定できていない。また、数値流体力学解析においては、この増加するせん断応力は表面粗さ付近に限定されており、さらに $Ra0.1\mu m$ から $0.8\mu m$ に上昇したときの溶血量の2倍以上の増加を引き起こすせん断応力増加は生じていないことがわかっている<sup>2)</sup>。このことから、せん断流れ場において、表面粗さが、どのようなメカニズムで溶血を発生させるのか、また表面粗さに基づくせん断応力増加がどの程度関与するのかを詳細に調べる必要がある。本研究では、せん断流れ場において、表面粗さの大きさ、せん断応力、溶血量の定量的相関を求め、表面粗さが溶血を引き起こすメカニズムの解明を目指している。そのために、微小なせん断応力増加でも検出できるトルクセンサーを設置した新規のせん断負荷装置が必要となる。この新規せん断負荷装置であるレオメーターを使用して、回転数上昇によるせん断速度の増加、せん断負荷時間の延長、ならびに血液接触面の表面粗さの増加に伴う溶血量と、せん断流れ場に生じるせん断応力を定量評価する。これにより、本レオメーターを使用したせん断流れ場における溶血量を定量評価し、せん断応力が溶血現象にどのように関与するのかを明らかにする。

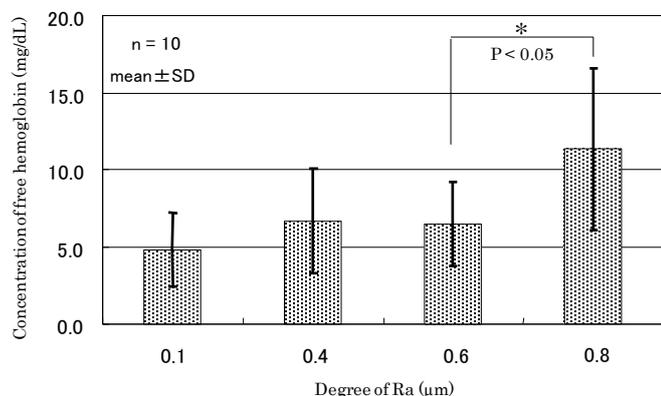


Fig.1 Hemolysis due to inner cylinders with surface roughnesses ranging from  $Ra0.1\mu m$  (without roughened surface) to  $0.8\mu m$  applied to an area of 10% of the cylindrical section, under a laminar shear flow of  $3,750s^{-1}$ . The tests were repeated 10 times ( $n = 10$ )<sup>1)</sup>.

## 2. 目的

高感度のトルクセンサーを備えた新規の二重円筒型レオメーターを使用して、せん断流れ場において、せん断速度増加、せん断負荷時間延長および表面粗さ増加に伴う溶血量ならびにせん断応力を計測することで、表面粗さと溶血量との定量的相関を明らかにする。

## 3. 実験方法

### 3-1 試験血液の調製

茨城大学農学部フィールドサイエンス教育研究センターにおいて、成ウシの頸静脈に穿刺し、リン酸クエン酸デキストロースアデニン (CPDA) 液を含む血液バッグに約 300~400mL の血液を採取した。ただちにクーラーボックスで冷却して実験室へ運搬し、ヘマトクリット値が 30%となるように、採血した血液の自己血漿で希釈して調整した。この作業は、採血を開始してから 1 時間以内に行った。

### 3-2 レオメーターによる溶血試験

レオメーターのせん断負荷部の外観・断面図を図 2 に示した。内筒と外筒の二重円筒になっており、シリンダー下部は円錐型となっている。すなわち、内筒側面では、二重円筒型の構造によって、また内筒下面ではコーン・プレート型の構造によって、内筒・外筒間の隙間に、均一のせん断負荷がかかるように設計されている。なお、内筒はステンレス製、該当はガラス製となっている。内筒を固定し、外筒を回転させることで、せん断流れを安定させる構造となっている。この内筒の円筒側面全周にサンドブラスターを

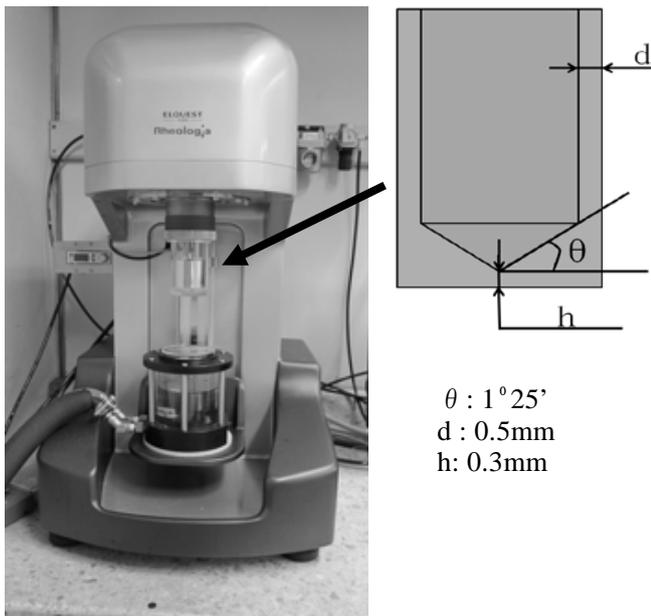


Fig.2 Observation and Cross-section of the shearing portion of a new rheometer

使用して、Ra1.0 $\mu\text{m}$  および 5.0 $\mu\text{m}$  となるように表面粗さを加工した。表面粗さの実測値は、表面粗さ計で測定した。表面粗さをつけた内筒をレオメーターにセットし、内筒と外筒の隙間に試験血液 4.7mL を充填し、せん断速度 0~2,880 $\text{s}^{-1}$ 、0~120 分、37 $^{\circ}\text{C}$ 、窒素雰囲気下の条件でせん断負荷をかけ、実験後の溶血量を次のように測定した。せん断負荷後の血液を回収し、10,000 $\times\text{g}$  で 10 分間遠心分離をかけて血漿を採取した。この血漿 5 $\mu\text{L}$  を、0.5% 3, 3', 5, 5' -テトラメチルベンジジン-90%酢酸水溶液 1.0mL に添加し、次いで 0.3%過酸化水素水 1.0mL を添加して、正確に 10

分後に分光光度計を使用して水対照 600nm で吸光度を測定した。30mg/dL の標準ヘモグロビン水溶液を基準として、吸光度の相対値から、試験血液中のヘモグロビン濃度を算出した。また、内筒軸上には、高感度のトルクセンサーが設置してあり、外筒を回転させて上記せん断速度でせん断負荷をかけた時、生じるせん断流れ場で発生するせん断応力を内筒にかかるトルク値として検出、計測した。

## 4. 実験結果

表面粗さ加工をしていない内筒を用いて、せん断負荷時間を 30 分とし、せん断速度を変化させた時の溶血量、およびトルク値の結果を図 3 に示した。レオメーターに試験血

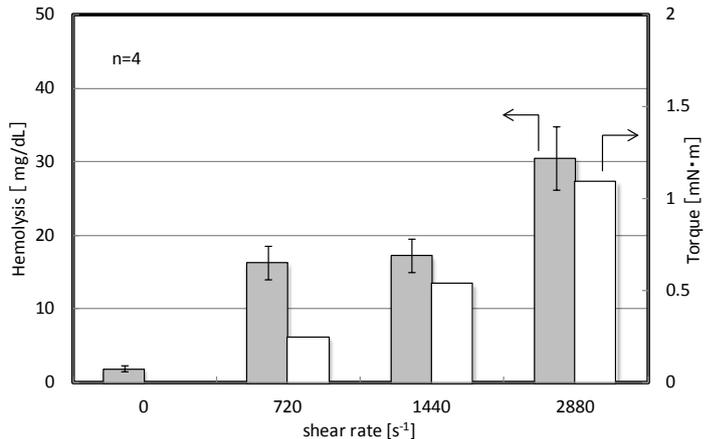


Fig.3 Relationship between shear rate and hemolysis amount by a new rheometer

液を充填し、外筒を回転させない状態、すなわちせん断速度が 0 $\text{s}^{-1}$  においても、4 回の繰り返し実験の平均で 1.9mg/dL の溶血が生じた。同様に、720 $\text{s}^{-1}$  では 16.3mg/dL、1,440 $\text{s}^{-1}$  では 17.2 mg/dL および 2,880 $\text{s}^{-1}$  では 30.5mg/dL の溶血量となり、せん断速度の増加に伴って、溶血量は増加することがわかった。一方、各せん断速度において生じたトルク値は、0 $\text{s}^{-1}$  で 0 $\text{mN}\cdot\text{m}$ 、720 $\text{s}^{-1}$  では 0.25  $\text{mN}\cdot\text{m}$ 、1,440 $\text{s}^{-1}$  では 0.54  $\text{mN}\cdot\text{m}$  および 2,880 $\text{s}^{-1}$  では 1.09  $\text{mN}\cdot\text{m}$  であった。従って、せん断速度の増加にともなって、せん断流れ場に生じるトルク値は上昇した。

せん断速度を 2,880 $\text{s}^{-1}$  とし、せん断負荷時間を変化させた結果を図 4 に示した。せん断無負荷、すなわち 0 分における溶血量は 4.2 mg/dL、15 分では 13.6 mg/dL、30 分では 36.9 mg/dL および 60 分では 54.2mg/dL であった。また、トルク値については、せん断無負荷では 0  $\text{mN}\cdot\text{m}$  であったが、15 分では 1.04  $\text{mN}\cdot\text{m}$ 、30 分では 1.08  $\text{mN}\cdot\text{m}$  および 60 分では 1.16  $\text{mN}\cdot\text{m}$  と、時間経過に伴って緩やかにトルク値は増加した。

内筒表面に加工した表面粗さの外観を図 5 に示した。内筒に加工した表面粗さは、サンドペーパー状の凹凸形状となり (図 6)、表面光沢は Ra の増加に伴い減少した。それぞれの表面の Ra を測定した結果、表面粗さ加工をしていない内筒では Ra0.5 $\mu\text{m}$  であり、目標 Ra1.0 $\mu\text{m}$  および 5.0 $\mu\text{m}$  で加工した表面粗さの実測値は、目標値と同一のそれぞれ Ra1.0 $\mu\text{m}$  および 5.0 $\mu\text{m}$  であった。これらの内筒を使用して、せん断速度 2,880 $\text{s}^{-1}$ 、せん断負荷時間 30 分における溶血量の結果を図 7 に示した。表面粗さをつけていない Ra0.5 $\mu\text{m}$  における溶血量は 27.8 mg/dL、Ra1.0 $\mu\text{m}$  では 39.7 mg/dL および Ra5.0 $\mu\text{m}$  では 40.0mg/dL であった。また、トルク値は Ra0.5 $\mu\text{m}$  で 1.08  $\text{mN}\cdot\text{m}$ 、Ra1.0 $\mu\text{m}$  で 1.11  $\text{mN}\cdot\text{m}$  および Ra5.0 $\mu\text{m}$  で 1.16 $\text{mN}\cdot\text{m}$  であった。

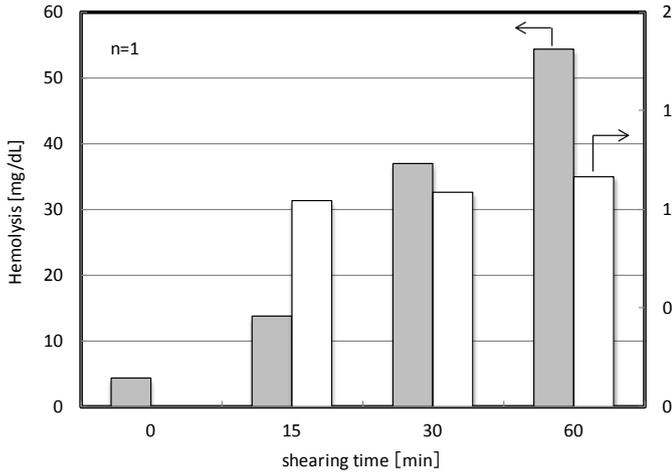


Fig.4 Relationship between exposure time and hemolysis amount by a new rheometer

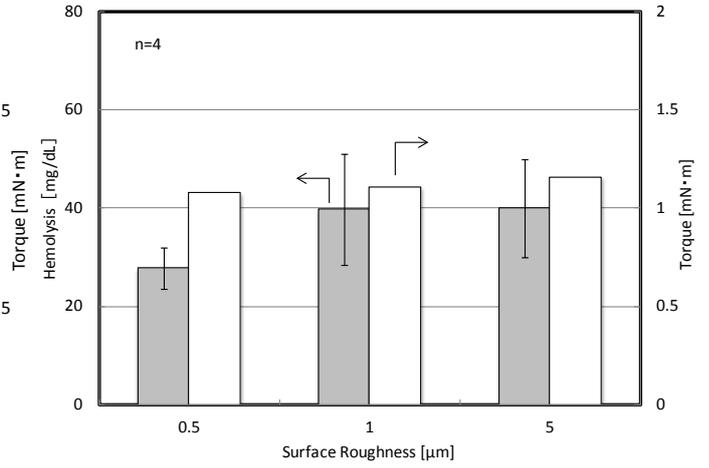


Fig.7 Relationship between surface roughness and hemolysis amount by a new rheometer

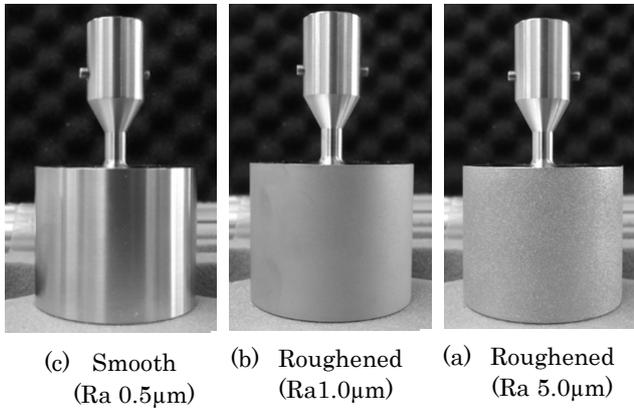


Fig.5 Observation of surface roughness of inner cylinder of new rheometer

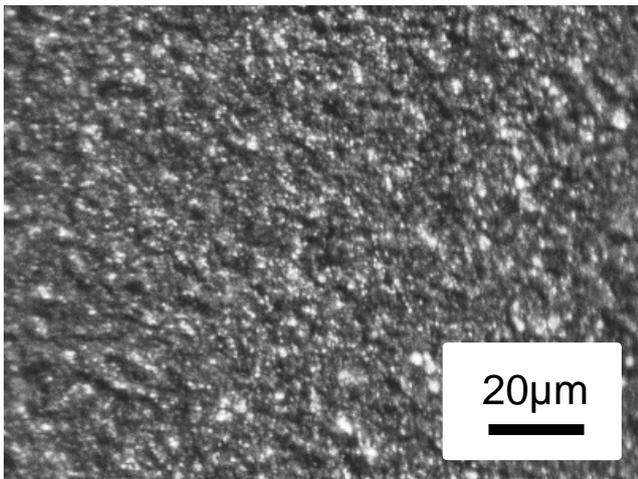


Fig.6 Photograph of the surface roughness created by a by a sand blaster.

5. 考察

図3の結果から、溶血量はせん断速度の増加に伴って溶血量は増加した。せん断速度  $720s^{-1}$  における溶血量は  $16.3mg/dL$ ,  $1,440s^{-1}$  における溶血量は  $17.2mg/dL$  とほぼ同一であったが、トルク値は、せん断速度の増加に伴って上昇しており、従ってせん断流れ場に発生したせん断応力は、せん断速度の増加に伴って上昇し、すなわち、溶血量はせん断応力の増加に伴って上昇することがわかった。そこで、図3をトルク値に対する溶血量を示したグラフに変換し、図8に示した。このグラフの傾きより、本レオメーターで  $4.7mL$  の血液に対して 30 分間せん断負荷をかけたとき、 $1mN \cdot m$  のトルク値に相当するせん断応力が溶血させる量

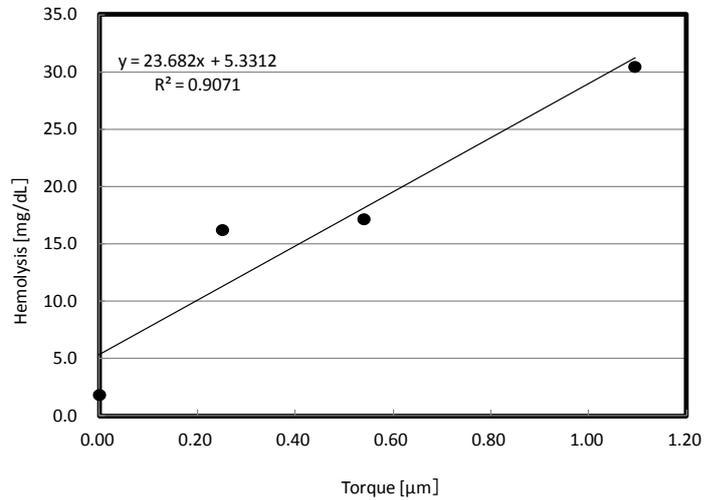


Fig.8 Relationship between torque value and hemolysis amount by a new rheometer

は、 $23.7mg/dL$  であることがわかった。一方、図4の結果からせん断負荷時間の経過に対して、トルク値はせん断負荷時間 15分から60分の45分間で、緩やかに約12%上昇していることから、本レオメーターは連続的なせん断負荷に対して、せん断応力が変動することがわかった。これはせん断負荷部で血液の水分が蒸発して、内筒上部に結露した様子が見られたことから、水分の蒸発によって粘度が増加

し、結果としてせん断応力が増加したと考えている。

図8の表面粗さの増加に対する溶血では、表面粗さを加工していないRa0.5 $\mu\text{m}$ では溶血量が27.8mg/dLであったのに対して、Ra1.0 $\mu\text{m}$ とRa5.0 $\mu\text{m}$ では、それぞれ、それぞれ39.7mg/dLおよび40.0mg/dLであった。従って、Ra1.0 $\mu\text{m}$ とRa5.0 $\mu\text{m}$ との溶血量はほぼ同一であった。溶血量の増加率で換算すると、Ra1.0 $\mu\text{m}$ では42.8%、Ra5.0 $\mu\text{m}$ では43.9%であった。しかし、トルク値ではRa0.5 $\mu\text{m}$ で1.08mN $\cdot\text{m}$ であるのに対して、Ra1.0 $\mu\text{m}$ で1.11mN $\cdot\text{m}$ 、Ra5.0 $\mu\text{m}$ で1.16mN $\cdot\text{m}$ であり、従ってRaの増加に対して、せん断応力の増加率は、Ra1.0 $\mu\text{m}$ では2.8%、Ra5.0 $\mu\text{m}$ では7.4%の増加となった。つまり、本実験において、表面粗さの増加に伴って、せん断流れ場で増加したせん断応力および溶血量との定量的相関は、

- ①Ra0.5 $\mu\text{m}$ →1.0 $\mu\text{m}$ ：せん断応力増加率2.8%、溶血量増加率42.8%
- ②Ra0.5 $\mu\text{m}$ →5.0 $\mu\text{m}$ ：せん断応力増加率7.4%、溶血量増加率43.9%

である。溶血量の増加率に対して、せん断応力増加率が著しく低いことがわかる。これは表面粗さに基づいて溶血量が増加するとき、せん断流れ場において、溶血量増加相当分のせん断応力増加は生じていないことを意味している。例えば、Ra0.5 $\mu\text{m}$ と1.0 $\mu\text{m}$ の溶血量の比較では、Ra1.0 $\mu\text{m}$ における溶血量はRa0.5 $\mu\text{m}$ と比較して、27.8mg/dLから39.7mg/dLの42.8%の増加であり、図8の結果から、この42.8%の溶血量増加をせん断応力の増加のみが引き起こしたと仮定すると、せん断応力の増加量は0.28mN $\cdot\text{m}$ 、すなわち増加率25.9%が必要であるが、実際のトルク値の増加率は2.8%で必要なトルク値の1/9である。しかし、図3の2,880s<sup>-1</sup>においては、トルク値1.09mN $\cdot\text{m}$ 、図4の経過時間30分におけるトルク値1.08mN $\cdot\text{m}$ および図5のRa0.5 $\mu\text{m}$ のトルク値1.08mN $\cdot\text{m}$ は、すべて同一条件のトルク値の計測結果であり、再現性が高いことから、図7のトルク値の微増は、表面粗さに基づくものと考えている。以上のことから、せん断流れ場において、血液接触面の表面粗さが溶血に及ぼす影響は、表面粗さによってせん断応力はわずかに増加するものの、溶血増加のすべての要因ではないと考えている。

本実験では、高感度のトルクセンサーを設置したレオメーターによって、表面粗さに基づく高せん断応力がどの程度発生するのかを明らかにした。その結果、表面粗さが溶血を引き起こすメカニズムは、せん断流れ場のせん断応力が均等に増加するのではなく、また局所的な高せん断応力も溶血に関与することは考えられるが主たる要因と結論づけることも難しい。これまで、表面粗さが引き起こす高せん断応力に焦点を絞ってきたが、今後はヘマトクリット値を変化させ、1個の赤血球に負荷されるせん断応力としてのみではなく、赤血球同士の相互作用も考慮に入れて、粗さ表面から受ける影響について、さらに流体力学的な要因を突き止めて、そのメカニズムを明らかにしていきたい。

## 6. 結論

二重円筒型レオメーターを利用したせん断流れ場における溶血試験において、表面粗さに基づく溶血は、表面粗さが引き起こした高せん断応力によるもののみではなく、表面粗さ近傍の流体力学的環境が大きく原因していると考えられる。

## 参考文献

- 1) Maruyama O, et al, *Artif Organs*, 30; 365-370 (2006)
- 2) 西田ら, 茨城講演会論文集, 269-270 (2009)
- 3) Maruyama O, et al, *J Artif Organs*, 8; 228-236 (2005)