

ペリスタ型血液ポンプが赤血球に及ぼす影響 ～ずり応力効果の分光学的評価†

柴田理沙*, 加藤正太**, 中舘和彦***, 野村保友*

Impacts on erythrocytes by peristaltic extracorporeal circulation: Spectroscopic evaluation of shear stress†

Risa Shibata*, Shota Kato**, Kazuhiko Nakadate***, and Yasutomo Nomura*

The treatment for severely ill patient with COVID-19 is a burden to hospital management. When a centrifugal blood pump is replaced with a peristaltic pump in an extracorporeal membrane oxygenation (ECMO) used for respiration failure, the cost would be effectively decreased because the peristaltic pump can be used for long periods without the need to replace expensive parts. Blood in the peristaltic pump flows with moving the roller which compresses fluid within the tube. Under inappropriate occlusion, red blood cells undergo the morphological change and finally hemolysis. To avoid such unfavorable processes, the appropriate occlusion must be kept during the treatment. In this review, we examined the literatures on mechanisms of the changes in morphology dependent on the occlusion and pursued the clue of early change of the morphology.

Key words : ECMO, COVID-19, ペリスタポンプ, ずり応力, ずり速度, 有棘赤血球

1 はじめに

2020 年は新型コロナウイルスの流行が社会に大きな影響を与えた。特に 4 月 7 日には東京、大阪、福岡などに対して史上初の緊急事態宣言がなされて、16 日にはそれが全国に拡大された。ヒト同士の接触の機会が激減し緊張感が高まった。その頃、この感染症の治療では重症化した患者に対して限られた台数の体外式膜型人工肺 Extracorporeal membrane oxygenation (ECMO) が効果的に使われた。5 月 25 日までに緊急事態宣言は全国で解除された。その間が第一波と認識され、夏の第二波、秋からの第三波と続いた。

12 月に入って欧米でワクチン接種が開始されたが、その効果の持続性など楽観視できない点も多く、長期にわたってこのウイルスと共存することを考える必要がありそうである。そのためにはこれまで以上に機器や操作者の充実が避けられない。しかしながらコロナ患者を受け入れた病院ほど経営的に甚大な悪影響が出てしまい、実際にはその充実はあまり進んでいない。政府により病院への財政支援が進められているが、一方で重症コロナ患者に対する医療コストを抑制する方策を医療機器の側面からも検討する必要があると考えた。

2 課題

呼吸をサポートする ECMO (veno-venous ECMO, V-V ECMO) は患者から静脈血を取りだし人工肺で酸素化し二酸化炭素を除去した血液を静脈へ戻す。循環をサポートする ECMO (veno-arterial ECMO, V-A ECMO) とは異なる部分が多く、重症コロナ患者では V-V ECMO に特徴的な長期管理が数か月に及ぶ場合もあり、血栓を回避するための交換が必要になる。V-V ECMO を交換する際、チューブやガス交換膜などの消耗品に比べて血液ポンプは高価である。

体外循環ポンプは多くの場合、遠心ポンプあるいはペリスタポンプが使われる。遠心ポンプは 5 L/min 程度で安定した送血機能が重要な特徴の一つであるが、血液と直接接するため高価な遠心ポンプ自身を交換しなければならない (Fig.1(A))。一方、ペリスタポンプではポンプ部分が血液に直接触れないためチューブのみの交換が可能であることが大きな長所である (Fig.1(B))。これまで体外循環開始時に最適な圧閉度を設定してきたが、次以降のセクションで説明するように長期管理では送液チューブの圧閉度を最適化しなければ赤血球の劣化や溶血は避けられない。

† 原稿受理 令和 3 年 2 月 26 日 Received February 26, 2021

* システム生体工学科 (Department of Systems Life Engineering)

** 群馬パース大学保健科学部臨床工学科 (School of Clinical Engineering, Faculty of Health Science, Gunma Paz University)

*** 明治薬科大学薬学教育研究センター (Educational and Research Center for Pharmacy, Meiji Pharmaceutical University)

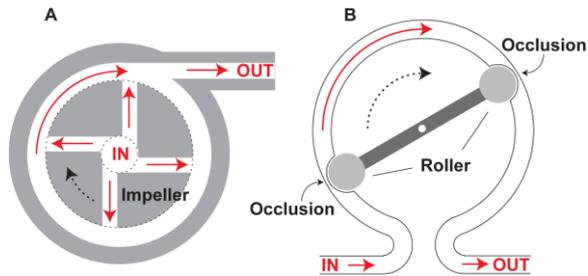


Fig.1 Typical blood pumps in ECMO. (A) Centrifugal pump. Blood flows due to the rotating impeller. (B) Peristaltic pump in which rollers compress blood in the tube under the appropriate occlusion.

3 圧閉度とずり応力

圧閉度 (occlusion) とは送液チューブがローラーによって押しつぶされる隙間の度合いであり、強すぎると赤血球が力学的に押しつぶされ破壊される。一方、緩すぎると逆流が生じて溶血が増加し、流量誤差の原因にもなる。通常、圧閉度は完全な圧閉からわずかに逆流が発生する程度が適正圧閉度とされ、施術ごとに使用前に日本工業規格 (JIS T1603) に従って、輸液滴下法などで調整する。重症コロナ患者が長期使用する場合はこの圧閉度を常に最適化することが望まれる。

血液レオロジーにおいては体外循環に関しても血圧によるすべての方向に働く力と、血流によるチューブ内面に対して接線方向に作用するずり応力 (shear stress) を考える。Fig.2(A)に示すように長さ L の送液チューブの太さ方向に y 軸をとり、チューブ半径を a とする。チューブは動かずにその中の血液だけが流れるので、チューブの壁に近いほど遅く流れる。チューブ断面の中心に対して同心円状に流速の異なる層が混ざることなく流れるとここでは考える (層流)。次に Fig.2(B) のように太さ方向に y 軸をとり、血液の流れの向きに流速 v をとる。中心から距離 r の点の $v(r)$ を考えると $v(a) = 0$ で $v(0)$ が最大値になる。チューブの中心近くを速く流れる層の血液を、壁に近くて流速の遅い層の血液が引き戻す力が生じる。

血液は上流に加わる圧力 $P(0)$ が下流に加わる圧力 $P(L)$ より高いときに左から右へ流れる。血液に加わる力 F_1 は圧力差 $\Delta P = P(0) - P(L)$ に比例する。その圧力は単位面積に働く力だから右向きの力 F_1 は、

$$F_1 = \pi y^2 \Delta P. \quad (1)$$

血液に加わる逆向きの力 F_2 は壁に近い血液が中心に近い血液を引き戻す力として働く。Fig.1(A)では右から左へ引っ張る力は、チューブの中で同心円状に同じ大きさで働いているはずである。 F_2 は流速の異なる血液の層がこすれて発生する力だから、①血管の中の血液の円柱の側面全体がその外側の壁よりの血液によって引き戻されるので、その表面積が大きいほど引き戻す力 F_2 も大きくなる。その表面積は半径 y の円周と血管の長さ L から計算できる。②流速の異なる血液の層がずれて発生する力

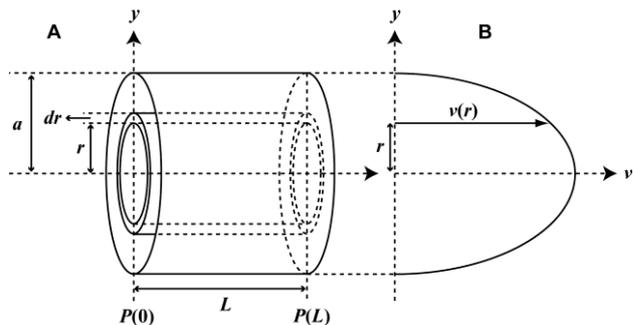


Fig.2 Rheological model for bloodstream. (A) Geometry of the model where blood flows in the direction of an arrow. (B) Velocity distribution in the transverse plane.

だから、流速の差が大きいほどより強い力が発生する。つまり流速 v の y 軸方向の速度勾配に比例する。これをずり速度 (shear rate) という。③血液の粘性係数 η が高いほど引き戻す力も大きくなる。したがって F_2 はこれら三つの積として記述できる。

$$F_2 = 2\pi y L \eta \frac{dv}{dy}. \quad (2)$$

血液の流れを等速直線運動として運動方程式を考えると、(1)(2)式の右辺の和は0になる。整理して得られた微分方程式について r での流速を $v(r)$ として積分区間に注意して書くと、

$$\int_r^a y dy = -\frac{2L\eta}{\Delta P} \int_{v(r)}^0 dv. \quad (3)$$

積分を実行すると

$$v(r) = \frac{\Delta P}{4L\eta} (a^2 - r^2). \quad (4)$$

Fig.2(B)の図が(4)式の二次関数として得られた。

この流速から血流量を求めてみる。血流量は単位時間当たりに流れる血液の体積である。Fig.2(A)に示すように、幅 dr の非常に幅の狭いドーナツ型の断面に流れ込む血液の体積を考えると、ドーナツ型の断面積 $2\pi r dr$ と時間 t の間に進む距離 $v(r)t$ との積になる。 dr が微小なのでその間に流れ込む僅かな血流量を dQ とすると、時間 t の間には tdQ 流れ込むことになるので

$$tdQ = 2\pi r dr \cdot v(r)t. \quad (5)$$

t を消去して、チューブ全体の区間で積分すると

$$\begin{aligned} Q &= \int_0^a 2\pi r dr \cdot \frac{\Delta P}{4L\eta} (a^2 - r^2) \\ &= \frac{\pi a^4}{8L\eta} \Delta P \end{aligned} \quad (6)$$

これがポアズイユの法則である。血流量 Q は血圧 ΔP に比例するので、電流と電圧の間に成り立つオームの法則に似ている。生体内では正常な赤血球はずり応力が大きい時に赤血球が変形して粘性が低下する。赤血球が硬

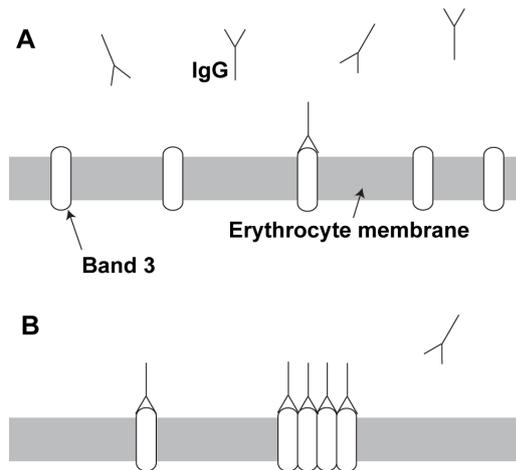


Fig. 3 Band 3 clustering model in erythrocyte membrane and antibodies. (A) normal conditions. (B) senescence.

く変形できないときには粘性が増す。この粘性の増加に続いてポアズイユの法則にしたがい、血圧が上昇したり血流量が低下することになる。ずり応力による赤血球の変化がひとたび溶血を引き起こすと赤血球としての機能は期待できなくなる。したがって溶血が起こる前の前兆を把握できれば不適切な圧閉度を調節することによって赤血球機能低下の進行を抑制できるかもしれない。ペリスタ血液ポンプの圧閉度最適化を進めるにあたり、ずり応力が赤血球に及ぼす影響の研究について文献調査した。

4 ずり応力の影響

1962年には動物実験の体外循環によって赤血球の寿命が短くなり、貧血により重篤なダメージを与えることが明らかになった¹⁾。人工心臓弁を利用するとずり応力によって赤血球の寿命が2割短くなった²⁾。同様に心臓ポンプの中で高いずり応力に暴露されても赤血球の寿命は短くなった³⁾。これらからずり応力を負荷されると、赤血球が硬くなり変形能が低下して、寿命の早い段階で脾臓に捉えられてより多くの赤血球が失われたのではないかと解釈された。1977年のVelkerらのインビトロ実験で初めてずり応力暴露後の赤血球が硬くなることが実証された⁴⁾。同じ頃Nanjappaらは犬の血液に体外で9 Paの加圧した後で体内に戻すとその寿命が22-60%短縮することを見出した⁵⁾。これらの知見は人工心臓弁や心臓ポンプを使った臨床データとよく合うものであった⁶⁾。ずり応力負荷後の赤血球変化と赤血球の老化の機序に関しては異なるかもしれないが、その後の赤血球除去は似た仕組みであると考えられるようになった。

5 ずり応力による赤血球変化と老化

1995年にKamenevaらは老化赤血球とずり応力を負荷した赤血球について、溶血のしやすさ、変形能の低下、凝集のしやすさなどの類似性からずり応力による赤血球

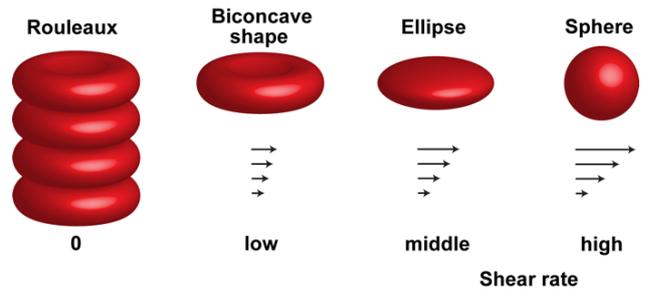


Fig. 4 Morphological changes in erythrocytes exposed to shear stress

老化加速説を提案した⁷⁾。赤血球の老化には二つのモデルが提案されている。2008年Follerらはリン脂質スクランブルによるホスファチジルセリンの細胞外表面への露出と細胞形態変化を特徴とするアポトーシス仮説Eryptosisを提案した⁸⁾。老化赤血球の溶血抑制に役立つと考えられているがこのモデルは薬剤応答にもとづいており、ずり応力についてはあまり検討されていない。

2012年RubinらによってBand 3クラスタリング仮説が提案された。これは老化により硬くなった赤血球が脾臓の中をゆっくり移動し、IgGのようなオプソニンがマクロファージによる認識をしやすくし、食作用が促進されると考えた⁹⁾。老化した赤血球では赤血球膜の内面にメトヘモグロビンが結合することで細胞膜を貫通したタンパクBand 3(陰イオン交換体)の凝集を促進する。さらにその後起こるBand 3クラスターへのIgGの結合が脾臓での老化赤血球除去を促進する(Fig.3)。

Band 3タンパクがもつ老化抗原についてIgGの抗原決定基を含むことを2005年にKayが発表した¹⁰⁾。この老化抗原は若い赤血球のBand 3にもあるので、老化の過程の重要なステップはIgGの老化抗原への結合効率の増加だろうと考えられている¹¹⁾。そのステップは凝集、酵素による修飾、あるいは分子の再配列によって起きるのかもしれない。若い赤血球は血流の間に何度も生じる変形で抗原決定基がだんだん露出するようになっていくということは十分に考えられる。ずり応力の結果として生じた膜タンパクの構造変化が老化抗原を露出させるかもしれない。さらにずり応力が負荷されることによって細胞膜流動性が促進されて、Band 3クラスタリングや立体構造の変化を促す可能性もある。

6 ずり応力による赤血球形態変化

赤血球の形態について、ずり応力はずり速度(shear rate)と粘性に比例するので、shear rateに対する赤血球形態変化をFriebelらは赤血球の吸収・散乱スペクトルの実測データとモンテカルロシミュレーションによって整理した¹²⁾。Fig.4に示すように0-200 s⁻¹では連鎖rouleauxなどの凝集が観察され、その形成には血漿タンパクを必要とした。200-600 s⁻¹では完全に解離し層流に沿って転がりながら流れたtumbling motion。1000 s⁻¹以上ではずり応力により細胞膜が進展し回転楕円体状に

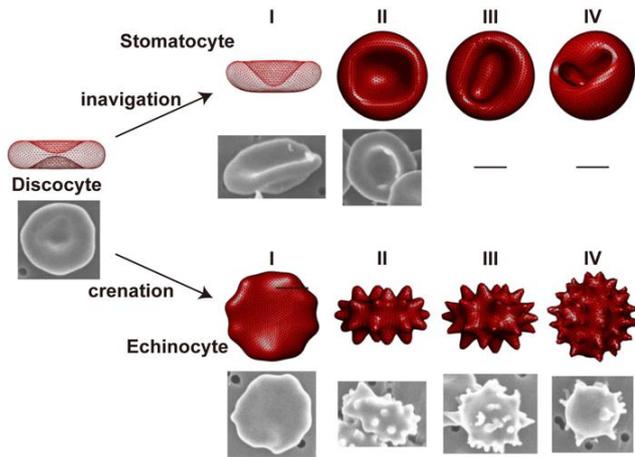


Fig. 5 Stomatocyte-discocyte-echinocyte shape transformation and classification. Red illustrations denote predicted shapes¹³⁾ and monochrome pictures denote our experimental observations by SEM imaging.

なった。赤血球の外側の粘性が高い場合には赤血球膜だけが回転する現象 tank-treading motion が観察されることがあった。さらにずり応力が高くなると赤血球は球形になり、最終的には破裂して溶血した。

7 赤血球の有棘化

ペリスタポンプ使用時に見られる赤血球の異常な形態として赤血球の有棘化があるが、ずり応力暴露による赤血球の有棘化の報告は少ない。ずり応力に限らず様々な因子が赤血球形態に影響を与える。赤血球の可逆的な形態変化については stomatocyte-discocyte-echinocyte shape transformation (SDE transformation, 口状-円盤状-いが状赤血球変形) 仮説が提案され、詳細な数値解析が行われた¹³⁾。様々な薬剤に暴露されると正常な円盤状赤血球 (discocyte) が外方突出 (crenation) に進むといが状赤血球 (echinocyte) になり、内方陥没 (inavigation) に進むと口状赤血球 (stomatocyte) になる。薬剤の影響がさらに強まるとどちらも非可逆的な球状赤血球 spherocyte になり、最終的に溶血に至る。

SDE transformation についてはその程度によって分類されている。Stomatocyte I は両凹面ではなく片側に浅い円形の陥入があるカップ型、Stomatocyte II は深い陥入があるカップ型で陥入は少なくともまだほぼ円形を保つ。Stomatocyte III は深い陥入があり、その陥入は円形ではない。Stomatocyte IV はくぼみ内部に小さな突起を持つ球形である。Echinocyte I は円盤状の円周にいくつか波打つような構造を持つ。Echinocyte II は平坦な楕円体の表面全体に先端が丸まった突起がばらばらに分布している。Echinocyte III は少し膨らんだ卵型に 30-50 個の鋭いとげが表面全体に分布する。Echinocyte IV は鋭いとげが球形の赤血球にある。我々も血液保存時の赤血球に様々な形態を観察した (Fig.5)。

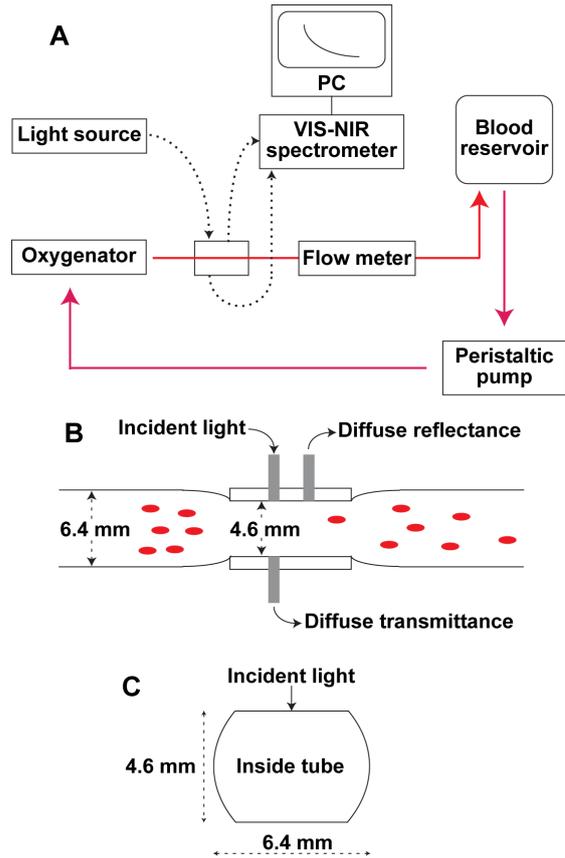


Fig. 6 Optical evaluation system of erythrocyte morphology dependent on shear rate. (A) Block diagram of the whole system. (B) Structure in the optical probe site. (C) Transverse section shape of the probe, by which shear rate can be calculated.

1999 年に Wong は Band 3 タンパクの陰イオン交換機能低下が有棘化を促すと指摘した¹⁴⁾。ずり応力が Band 3 タンパクの凝集によって赤血球の形態変化を誘導することから、Band 3 タンパクの凝集が陰イオン交換機能低下をもたらすならば赤血球が有棘化する可能性がある。ずり応力暴露による赤血球形態変化の中の一つの状態としていが状赤血球を位置づけられるかもしれない。有棘化は正常赤血球形態へ戻る可逆的過程であると報告されていることから、ペリスタポンプによる圧閉度の最適化の指標として赤血球形態、特に有棘化を指標として使えるかもしれない。

8 赤血球形態評価システム

圧閉度調節の手がかりになる形態変化は両凹面円盤状の正常赤血球から両凸面になる細胞レベルの形態変化と赤血球表面の有棘化という大きさが一桁小さな形態変化であろう。その大きさを考えると散乱光強度が波長の 4 乗に反比例する単純なミー散乱というよりは複雑なレイリー散乱に形態変化のわずかなシグナルが含まれる可能性がある。ここでは Friebel らの方法¹²⁾を参考にして、赤血球形態評価システムを検討した。

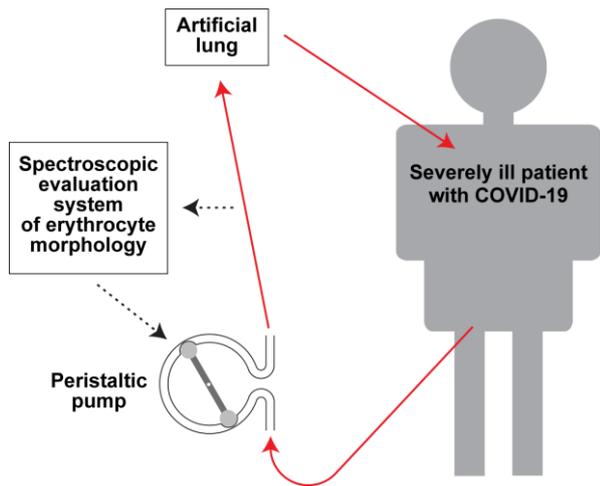


Fig. 7 ECMO system improved for severely ill patient with COVID-19. Instead of centrifugal pump, the system with peristaltic pump under appropriate occlusion would be helpful to effective manage of hospital.

Fig.6 に示す赤血球変形に対する依存性を拡散透過光強度スペクトルと拡散反射光強度スペクトルにもとづいて検討したい。Fig.6(A)に示すように、ここではペリスタポンプで血流を発生させて、赤血球の環境を ECMO に近づけるために人工肺（ガス交換膜）を通して血液を酸素化できるようにした。Fig.6(B)に示すように光学プローブ部位でタンダステン・ハロゲン光源から可視・近赤外光をプローブ内の血液に照射し拡散透過光及び拡散反射光スペクトルを分光器で測定し、大きさの異なる形態変化に由来する散乱光シグナルを分析することとした。その際、Fig.6(C)に示すように形態変化をもたらすためのずり応力を負荷した。

ずり応力はずり速度に比例するためをずり速度 γ にもとづいて解析する。 γs^{-1} は以下の(7)式に従って計算する¹²⁾。

$$\gamma = \frac{3Q}{e^2 l} \quad (7)$$

ここで Q mL/s は血流量、 e mm は流路断面厚さ、 l mm は流路断面幅である。ポンプ流量は 0~5 L/min の範囲で変動させることにした。十分なずり速度を得るために一般的な 1/4 インチ (6.35 mm) のタイゴンチューブを想定した。矩形流路厚さで $e = 4.6$ mm, 矩形流路幅で $l = 6.4$ mm である。(7)式よりこの実験では 0~1800 s^{-1} のずり速度に設定する。赤血球凝集は血液ポンプを停止すると急速に進行するはずなので、赤血球の凝集状態をコントロールするためにまず流量 5 L/min で十分に環流した後にポンプを停止させ、流量が 0 L/min になったのを確認してただちにポンプを駆動する。ずり速度 1800 s^{-1} に達するまで徐々に回転数を増加させ赤血球形態に依存する特徴的な散乱変化を調査する。

9 まとめ

本研究で押さえるべきポイントは以下の3点であろう。①ずり応力暴露による有棘化が eryptosis の過程なのか、核のない赤血球では通常のアポトーシスの定義にそぐわない部分があり、慎重な見極めが必要である。②有棘化を招くずり応力の大きさの程度、③有棘化した赤血球から正常な円盤状赤血球に戻すためにずり応力をどの程度の時間、どの程度低下させると有効なのか。④周期的に赤血球を加圧するペリスタポンプにおいて最適な圧閉度のフィードバック手法を確立することである。以上のことが明らかになると、Fig.7 に示すように赤血球形態評価器を導入することによってペリスタポンプ圧閉度の最適化を図ることが可能になり、コロナ重症患者の医療コスト抑制に貢献できることが期待される。

謝辞

中谷医工計測技術振興財団の緊急支援「令和2年新型コロナウイルス感染症対策助成プログラム」にて採択された研究課題「コロナ重症者へのペリスタ式 ECMO 治療の効率化～有棘赤血球による圧閉度の最適化」の一環として本研究は実行された。

参考文献

- 1) D. E. Brinsfield *et al.*, Hematological changes in long-term perfusion. *J Appl Physiol* 17, 531–534 (1962).
- 2) Y. Shapira *et al.*, Hemolysis associated with prosthetic heart valves a review. *Cardiol Rev* 17, 121–124 (2009).
- 3) Z. Taimeh *et al.*, Erythrocyte aging as a mechanism of anemia and a biomarker of device thrombosis in continuous-flow left ventricular assist devices. *J Heart Lung Transpl* 36, 625–632 (2017).
- 4) J. A. Velker *et al.*, Alteration of erythrocyte deformability due to shear stress as assessed by nuclepore filters. *T Am Soc Art Int Org* 23, 732–735 (1977).
- 5) B. N. Nanjappa *et al.*, Trauma of the erythrocyte membrane associated with low shear stress. *Biophys J* 13, 1212–1222 (1973).
- 6) B. L. Mitlyng *et al.*, Use of breath carbon monoxide to measure the influence of prosthetic heart valves on erythrocyte survival. *Am J Cardiol* 97, 1374–1376 (2006).
- 7) M. V. Kameneva *et al.*, Mechanisms of red blood cell trauma in assisted circulation. Rheologic similarities of red blood cell transformations due to natural aging and mechanical stress. *Asaio J* 41, M457–460 (1995).
- 8) M. Foller *et al.*, Erythrocyte Programmed Cell Death. *IUBMB Life* 60, 661–8 (2008).

- 9) O. Rubin *et al.*, Red blood cell microparticles: clinical relevance. *Transfus Med Hemother* 39, 342–347 (2012).
- 10) M. Kay, Immunoregulation of cellular life span. *Ann N Y Acad Sci* 1057, 85–111, (2005).
- 11) J. P. Buerck *et al.*, A flow induced autoimmune response and accelerated senescence of red blood cells in cardiovascular devices. *Sci Rep* 9 19443 (2019)
- 12) M. Friebel *et al.*, Influence of shear rate on the optical properties of human blood in the spectral range 250 to 1100 nm. *J Biomed Opt.* 12 054005 (2007)
- 13) N. M. Geekiyanage *et al.*, A coarse-grained red blood cell membrane model to study stomatocyte - discocyte-echinocyte morphologies. *PLoS One* 14 e0215447 (2019)
- 14) P. Wong, A basis of echinocytosis and stomatocytosis in the disc-sphere transformations of the erythrocyte. *J Theor Biol* 196, 343-361 (1999)