

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K05240

研究課題名(和文) 赤血球集合機構の解明：架橋集合と枯渇集合二つの競合するメカニズム

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of erythrocyte aggregation: bridging model and depletion model

研究代表者

外山 吉治 (Toyama, Yoshiharu)

群馬大学・大学院理工学府・准教授

研究者番号：50240693

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：赤血球は血漿中もしくはある種の高分子存在下で面と面を合わせた連鎖と呼ばれる可逆的な集合体を形成する。生体内での赤血球集合の亢進は血流に大きな影響を与える。連鎖の形成については、高分子が赤血球間を架橋する「架橋集合」と高分子が赤血球間から排除される「枯渇集合」の競合する二説があり、未だ解決されていない。本研究は赤血球-フィブリノゲン間の相互作用を水晶振動子マイクロバランスを用いて直接測定し、連鎖形成のメカニズム解明を目指した。赤血球とフィブリノゲン間には相互作用が認められ、架橋集合を示唆する結果が得られた。

研究成果の概要(英文)：When erythrocytes are suspended in a plasma or other macromolecular solutions, they form face-to-face aggregates called rouleaux, which are easily broken up by mechanical shearing. It has been pointed out that enhanced erythrocyte aggregation affects in vivo blood flow. There are two models for erythrocyte aggregation: the bridging model and the depletion model. The bridging model assumes the adsorption of macromolecules onto the erythrocyte membranes. On the other hand, the depletion model assumes the osmotic attractive forces due to macromolecular depletion near the erythrocyte surface. In this study, the interaction between erythrocytes and fibrinogen molecules was measured by quartz crystal microbalance. The results suggested that erythrocyte aggregation was caused by the mechanism of macromolecular bridging.

研究分野：血液レオロジー

キーワード：赤血球 フィブリノゲン 糖鎖 グリコシダーゼ 赤血球集合 水晶振動子マイクロバランス 赤血球沈降速度 トリプシン

1 . 研究開始当初の背景

血液は典型的な非ニュートン流体であり、その原因の一つが“連鎖”と呼ばれる赤血球の集合体形成である。連鎖は静脈などの低ズリ領域で形成されるが、高ズリ領域では再び分散する可逆的な現象である。連鎖形成は健常人でも見られる現象であるが、異常亢進すると血流障害や酸素供給量の不足を招き致命的なものになる。連鎖の形成メカニズムについては、高分子が隣接した赤血球間を架橋する「架橋集合」と、接近した赤血球の間隙から高分子が排除され、生じた浸透圧勾配によって形成される「枯渇集合」の二説がある。これまでにそれぞれの説を間接的に支持するいくつかの実験結果や理論が報告されているが (S. Chien et al., J. Supermol. Struct., 1973, B. Neu et al., Biophys. J., 2002, など) 未だ解決には至っていない。赤血球の集合能は、集合因子の種類 (表 1)、赤血球の由来 (表 2) によって大きく異なる。また、本来集合能がない牛赤血球もトリプシン処理を施すことにより、集合体を形成することが見出されている (M. Kaibara, Biorheology, 1983) が、その原因は明らかにされていない。

表 1

集合因子の種類	特徴	メカニズム
フィブリノゲン	生体内の主な集合因子	不明
デキストラン、ポリリンゴリコール	閾値以上の分子量を持つものが集合能を有する	不明
コンカナバリン A	糖に対する結合部位を有する	架橋集合

表 2

赤血球の由来	特徴
人、豚	ほぼ同程度の集合能を有する
馬	ヒトやブタに比べて強い集合能を有する
牛	集合能がない

2 . 研究の目的

水晶振動子マイクロバランス法を用いて赤血球表面と集合因子となる種々の高分子との相互作用を直接測定し、連鎖形成のメカニズム解明を目指す。

(1) 赤血球と種々の集合因子との相互作用測定

赤血球はフィブリノゲン以外的高分子 (例えば、ポリエチレングリコールやデキストランなど) 存在下でも集合体を形成する。これまでの研究の多くは、赤血球集合の形成メカニズムを高分子の種類によらず、すべて同一のメカニズムで説明しようと試みている。申請者は高分子の種類によってそのメカニズムは異なるものと考えており、相互作用の測定により明らかにする。

(2) 由来の異なる赤血球とフィブリノゲンとの相互作用測定

赤血球の集合能は牛や馬など由来により

大きく異なる。この違いが赤血球表面とフィブリノゲンとの相互作用、あるいは赤血球表面の電気的性質や糖鎖などの立体障害によるものか否かを調べる。例えば、牛赤血球は集合能を持たないが、フィブリノゲンとの相互作用が認められれば、牛赤血球にはこの相互作用に打ち勝つだけの斥力が働いていることになる。

(3) 赤血球表面の物理化学的性質が与える影響

赤血球表面には糖蛋白や糖脂質から伸びる糖鎖が糖衣として赤血球表面を覆っている。また、糖鎖の先端にはシアル酸に由来する負電荷が存在し、赤血球集合に影響を与えている。事実、集合能を持たない牛赤血球をトリプシン処理することにより集合が惹起される。この原因は明らかにされていないが、膜表面に存在する蛋白質や糖鎖の切除などが考えられる。酵素処理により赤血球表面の糖鎖や蛋白質を切断し、表面電荷に与える影響を調べる。

3 . 研究の方法

水晶振動子マイクロバランス (QCM) 法を用いて、赤血球表面と集合因子との相互作用を直接測定する。

(1) 種々の集合因子を用いた実験

フィブリノゲン以外の集合因子であるコンカナバリン A (Con A) およびポリエチレングリコール (PEG) と赤血球との相互作用を測定する。

(2) 由来が異なる赤血球を用いた実験

集合能は赤血球の由来の違いによって大きく異なる。ヒトやブタ赤血球よりも馬赤血球の方が集合能は大きく、牛赤血球は例外で集合能がない。これら由来の異なる赤血球と主要な集合因子であるフィブリノゲンとの相互作用を測定する。

(3) 赤血球表面の物理化学的性質を変えた実験

赤血球表面の蛋白質や糖鎖に由来する電気的性質や立体障害は、赤血球集合に大きな影響を及ぼすことが考えられる。酵素処理による赤血球表面の物理化学的性質の変化が集合能に与える影響を調べる。

4 . 研究成果

(1) 馬赤血球と Con A および PEG との相互作用測定

図 1 に馬赤血球と Con A の QCM 測定の結果を示す。振動子表面に Con A を固定化した後、赤血球を添加すると周波数が著しく減少し、赤血球と Con A との間には強い相互作用があることが分かった。赤血球表面にはたくさんの糖鎖が存在するため、Con A がこれら

の糖と特異的に結合したものと考えられる。この結果は、Con A による赤血球集合が架橋集合であることを支持するものである。図 2 に馬赤血球と PEG の QCM 測定の結果を示す。振動子表面に PEG を固定化した後、赤血球を添加しても有意な周波数の変化は見られなかった。従って、PEG と赤血球との間には相互作用はほとんど存在せず、PEG による赤血球集合は枯渴集合であることが示唆された。

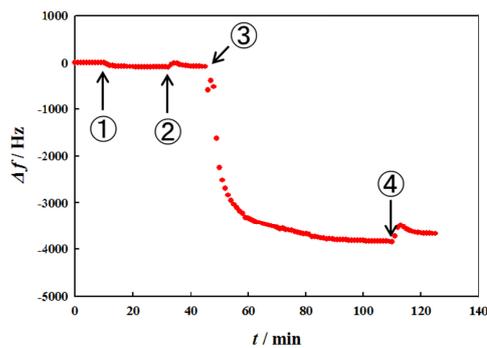


図 1 馬赤血球 - Con A 間の相互作用測定
Con A 固定化, ②媒質にて洗浄, ③赤血球添加, ④媒質にて洗浄

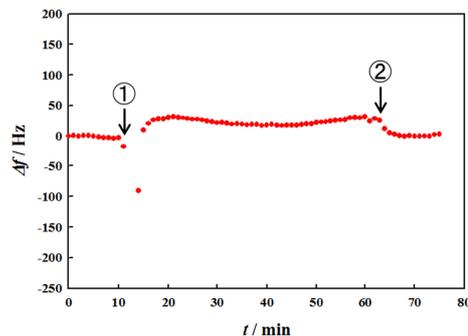


図 2 馬赤血球 - PEG 間の相互作用測定
PEG 固定化振動子に赤血球を添加, ②媒質にて洗浄

(2) 馬および牛赤血球とフィブリノゲンとの相互作用測定

図 3 と図 4 に馬および牛赤血球とフィブリノゲン間の QCM 測定結果を示す。振動子表面にフィブリノゲンを固定化後、赤血球を添加するといずれの赤血球においても周波数の増加を示した。比較的弱い相互作用がある場合には、強い相互作用がある場合とは逆に周波数が増大することが報告されている (A. Pomorska et al. Anal. Chem., 2010)。周波数の増大は、馬赤血球で 117Hz、牛赤血球で 130Hz と強い集合能を有する馬赤血球と集合能のない牛赤血球において有意な差は見られなかった。

(3) 赤血球表面の物理化学的性質の影響
i) 酵素処理が赤血球表面電荷に与える影響:

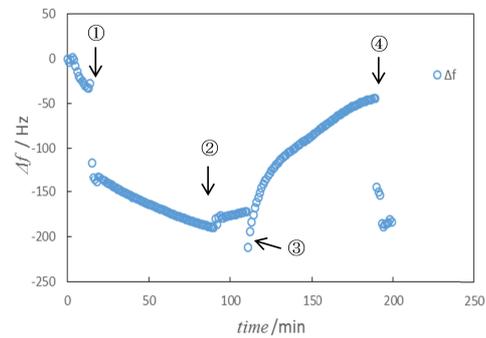


図 3 馬赤血球 - フィブリノゲン相互作用測定
フィブリノゲンの固定化, ②媒質にて洗浄, ③赤血球添加, ④媒質にて洗浄

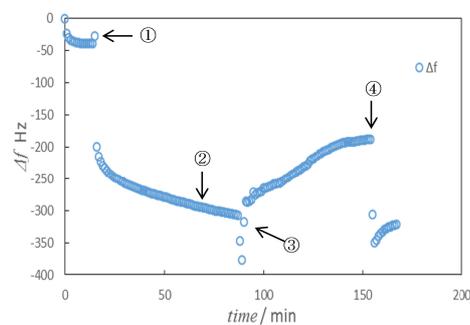


図 4 牛赤血球 - フィブリノゲン間の相互作用測定
フィブリノゲンの固定化, ②媒質にて洗浄, ③赤血球添加, ④媒質にて洗浄

馬および牛赤血球をノイラミニダーゼ、トリプシンおよび -キモトリプシンの各酵素で処理した後、ゼータ電位を ZETA SIZER NANO-ZS (MALVERN) にて測定した。得られた結果を表 3 に示す。

表 3

	未処理	ノイラミダ-ゼ
馬赤血球	-24.2 ± 1.2mV	-19.7 ± 0.7mV
牛赤血球	-22.3 ± 0.8mV	-20.9 ± 0.3mV
	未処理	トリプシン
馬赤血球	-16.3 ± 0.5mV	-20.7 ± 0.7mV
牛赤血球	-22.3 ± 0.8mV	-24.7 ± 1.1mV
	未処理	-キモトリプシン
馬赤血球	-28.5 ± 0.5mV	-34.5 ± 0.9mV
牛赤血球	-17.0 ± 0.8mV	-23.0 ± 0.3mV

馬および牛赤血球ともにノイラミニダーゼ処理した赤血球のゼータ電位は未処理赤血球に比べて負電荷が減少した。一方、トリプシン処理した赤血球のゼータ電位は未処理赤血球に比べて負電荷が増大した。また、トリプシンと切断部位が異なる -キモトリプシンではトリプシンと同様に未処理赤血球と比べて負電荷が増大した。

ii) 酵素処理による赤血球表面からの遊離糖の定量：赤血球表面には多量の糖鎖が存在しており、O-結合型およびN-結合型の糖鎖がある。また、赤血球膜に存在するタンパク質にも糖鎖が結合しており、赤血球が集合体を形成する時の立体障害となる可能性がある。実験は馬および牛赤血球を酵素処理することにより赤血球表面から遊離糖をフェノール硫酸法によって定量し、赤血球表面の糖鎖が赤血球集合能に与える影響について調べた。それぞれの酵素処理により遊離された還元糖濃度を次の表に示す。

	トリプシン処理 還元糖濃度 (μg/ml)	α-トリプシン処理 還元糖濃度 (μg/ml)
馬赤血球	6 ± 1	9 ± 3
牛赤血球	5 ± 1	14 ± 5

	O-グリコシダーゼ処理 還元糖濃度 (μg/ml)	N-グリコシダーゼ処理 還元糖濃度 (μg/ml)
馬赤血球	2 ± 1	0.4 ± 0.2
牛赤血球	1 ± 1	2 ± 1

ノイラミニダーゼ処理した赤血球から遊離したシアル酸量を馬と牛で比較すると、両者で有意な差は見られなかった。これより、赤血球表面に存在する糖鎖末端のシアル酸の量は馬と牛で有意な差異がないことが確認され、シアル酸が牛赤血球の集合体形成を阻害している要因ではないことが分かった。トリプシン処理、α-キモトリプシン処理、O-グリコシダーゼ処理、N-グリコシダーゼ処理した赤血球から遊離した還元糖濃度の値を馬と牛で比較すると、両者で有意な差は見られなかった。このことから、赤血球表面に存在する糖鎖の量は馬と牛で差がないことが分かった。次に、酵素ごとに還元糖濃度の値を比較すると、トリプシンやα-キモトリプシン処理した赤血球の還元糖濃度は、O-グリコシダーゼやN-グリコシダーゼ処理した赤血球の還元糖濃度に比べると極めて少ないことが分かった。赤血球の集合能と比較すると、O-グリコシダーゼやN-グリコシダーゼ処理した馬および牛赤血球では両者ともに集合体を形成しないが、トリプシン処理した馬赤血球は未処理の赤血球と同様に集合体を形成した。一方、牛赤血球は未処理では集合体を形成しないが、トリプシン処理によって集合体を形成した。また、α-キモトリプシン処理では、馬および牛赤血球ともに集合体形成への影響はほとんど見られなかった。従ってプロテアーゼの基質特異性の違いによって影響が異なることが分かった。また、グリコシダーゼ処理により赤血球表面からより多量の糖が切除されたのにも関わらず、赤血球の集合体形成は見られなかった。従って、赤血球表面にグリコカリックスとして存在する糖鎖の立体障害が赤血球集合を阻害するものでないことが分かった。

iii) 酵素処理した赤血球とフィブリノゲン間

の相互作用測定：トリプシン、O-およびN-グリコシダーゼ処理した馬および牛赤血球とフィブリノゲン間の相互作用をQCMを用いて測定した。それぞれの結果を図5 - 図10に示す。①でフィブリノゲン固定化、②でバッファによる洗浄、③で赤血球添加、④でバッファによる洗浄を行った。

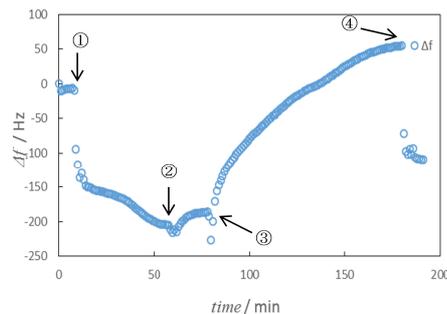


図5 トリプシン処理した馬赤血球 - フィブリノゲン間の相互作用測定

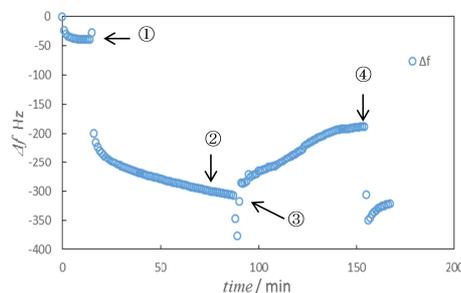


図6 トリプシン処理した牛赤血球 - フィブリノゲン間の相互作用測定

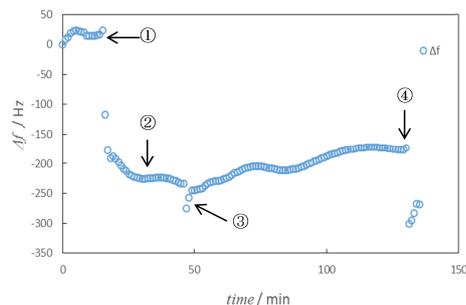


図7 O-グリコシダーゼ処理した馬赤血球 - フィブリノゲン間の相互作用測定

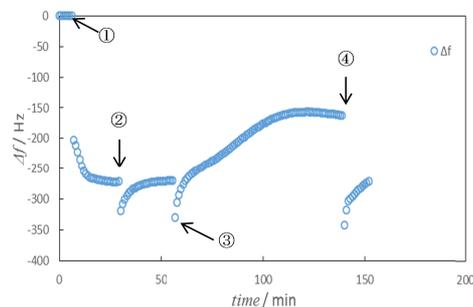


図8 O-グリコシダーゼ処理した牛赤血球 - フィブリノゲン間の相互作用測定

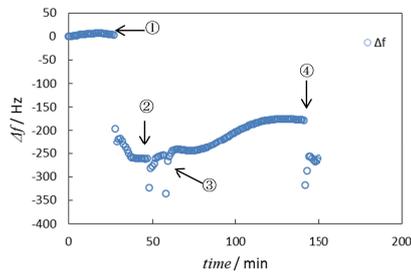


図 9 N-グリコシダーゼ処理した馬赤血球
- フィブリノゲン間の相互作用測定

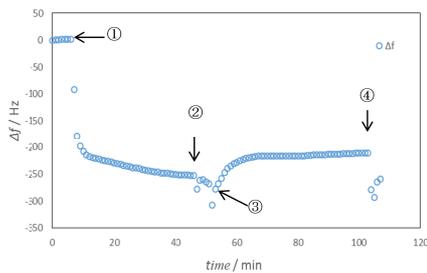


図 10 N-グリコシダーゼ処理した牛赤血球
- フィブリノゲン間の相互作用測定

フィブリノゲンと馬および牛赤血球との QCM 測定では、典型的な相互作用を表すパターンとは異なり、赤血球を添加すると周波数の増加が見られた。これは、赤血球と強く相互作用することで知られているコンカナバリン A を固定した場合は、図 1 のように振動子金表面に赤血球が吸着し、周波数の減少が見られる。これに対して、周波数の増加は固定化したフィブリノゲンと赤血球間の相互作用が比較的弱いことに起因すると考えられる。

通常、強い相互作用が見られる場合、振動子と赤血球が強く結合しているため、水晶振動子の振動運動に対して赤血球が追従し、周波数は減少する。その一例がコンカナバリン A との相互作用である。一方で、フィブリノゲンの場合は、振動子金表面に吸着したフィブリノゲンに添加した赤血球が近づくとき、赤血球とフィブリノゲンとの相互作用によりフィブリノゲンが赤血球に引きつけられる。この時の赤血球とフィブリノゲン間の相互作用は比較的弱く、赤血球は振動子の振動運動に対して追従することができない。そのため、振動子に固定化されたフィブリノゲンが赤血球に引きつけられることで、見かけ上の質量の減少を示す周波数の増加が見られたものと考えられる。従って、周波数の増減に対する閾値は赤血球が振動子の動きに追従できるかどうかであり、明確な周波数変化が確認されれば、周波数の増減に関わらず、その物質間には相互作用が存在しているものと考えられる。本実験の QCM 測定では、赤

血球添加後の周波数変化はいずれの条件においても増加する結果となった。集合体形成の有無が顕著な牛赤血球に着目すると、未処理に比べてトリプシン処理した赤血球の周波数変化が大きいことが分かる。フィブリノゲンとの相互作用で見られる周波数変化の差が赤血球集合の惹起に参与している可能性があると考えられる。また、O および N-グリコシダーゼ処理は馬および牛赤血球とフィブリノゲン間の相互作用を減少させることが新たに示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Y. Toyama, M. Shimizu, M. Ochiai, T. Dobashi, Effects of urea and NaCl on the fibrinogen cryogelation, *J. Biorheol.*, 査読有, 31, 2017, 12-15.

DOI: 10.17106/jbr.31.12

N. Shida, R. Kurasawa, Y. Maki, Y. Toyama, T. Dobashi, T. Yamamoto, Study of plasma coagulation induced by contact with calcium chloride solution, *Soft Matter*, 査読有, 12, 2016, 9471-9476.

DOI: 10.1039/c6sm01926a

Y. Toyama, H. Yoshida, T. Yamamoto, T. Dobashi, Erythrocyte aggregation under high pressure studied by laser photometry and mathematical analysis, *Colloid and Surfaces B: Biointerfaces*, 査読有, 140, 2016, 189-195.

DOI: 10.1016/j.colsurfb.2015.12.038

Y. Maki, K. Toriba, Y. Toyama, T. Dobashi, Correlation between rheological properties and turbidity of mixed gels of gelatin and agar, *J. Biorheol.*, 査読有, 29, 2015, 6-10.

DOI: 10.17106/jbr.29.6

〔学会発表〕(計 14 件)

土屋彩果, 窪田健二, 落合正則, 土橋敏明, 外山吉治, フィブリノゲンクライオゲル: フィブリノゲン分解産物の添加効果, 第 38 回日本バイオレオロジー学会年会, 2015.

志田奈津実, 外山吉治, 榎靖幸, 山本隆夫, 土橋敏明, 血漿と塩化カルシウム水溶液の接触によるゲル形成過程, 第 38 回日本バイオレオロジー学会年会, 2015. 土橋敏明, 志田奈津実, 倉沢隆太, 外山吉治, 榎靖幸, 山本隆夫, 血漿と塩化カルシウム水溶液の接触による白色血栓形成過程の解析, 第 63 回レオロジー討論会, 2015.

岩上祐樹, 須田巧, 榎靖幸, 土橋敏明, 外山吉治, 赤血球の酵素処理が赤血球集合能に与える影響, 第 39 回日本バイオレオロジー学会年会, 2016.

小島瑠美, 土橋敏明, 外山吉治, フィブリン重合過程へのカルシウム添加効果,

第 39 回日本バイオレオロジー学会年会 ,
2016 .

倉沢隆太 , 志田奈津美 , 外山吉治 , 榎靖幸 , 山本隆夫 , 土橋敏明 , 血漿と塩化カルシウム水溶液との接触界面からの凝固のダイナミクス , 第 39 回日本バイオレオロジー学会年会 , 2016 .

土橋敏明 , 倉沢隆太 , 石下咲耶 , 榎靖幸 , 外山吉治 , 山本隆夫 , ソフトマターとしての血液の凝固と線溶 , 第 67 回コロイドおよび界面化学討論会 , 2016 .

土橋敏明 , 倉沢隆太 , 榎靖幸 , 外山吉治 , 山本隆夫 , 液液接触・架橋過程としての血液の凝固 , 第 40 回日本バイオレオロジー学会年会 , 2017 .

倉沢隆太 , 青柳貴彦 , 川端彬嗣 , 篠田啓貴 , 外山吉治 , 榎靖幸 , 山本隆夫 , 土橋敏明 , 小川哲史 , 血漿と血液凝固トリガーとの接触界面からのゲル生成ダイナミクス , 第 65 回レオロジー討論会 , 2017 .

伊藤優吾 , 外山吉治 , 落合正則 , 土橋敏明 , フィブリノゲンクライオゲル形成に与えるカルシウムイオンの影響 , 第 65 回レオロジー討論会 , 2017 .

宮崎拓実 , 外山吉治 , 土橋敏明 , 水晶振動子マイクロバランスを用いた線溶過程の測定 , 第 65 回レオロジー討論会 , 2017 .

青柳貴彦 , 倉沢隆太 , 外山吉治 , 榎靖幸 , 山本隆夫 , 土橋敏明 , 小川哲史 , 血漿と塩化カルシウム水溶液の接触によるゲル化のダイナミクス , 第 65 回レオロジー討論会 , 2017 .

川端彬嗣 , 倉沢隆太 , 榎靖幸 , 外山吉治 , 山本隆夫 , 土橋敏明 , 小川哲史 , 血漿 / 塩化カルシウム水溶液接触界面からのゲル形成におけるサイズ効果 , 第 65 回レオロジー討論会 , 2017 .

篠田啓貴 , 倉沢隆太 , 榎靖幸 , 外山吉治 , 山本隆夫 , 土橋敏明 , 小川哲史 , 赤血球表面からの血漿のゲル化 , 第 65 回レオロジー討論会 , 2017 .

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

外山吉治 (TOYAMA, Yoshiharu)
群馬大学・大学院理工学府・准教授
研究者番号 : 5 0 2 4 0 6 9 3

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし