

令和元年5月30日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04031

研究課題名(和文) 液液接触架橋・溶解過程として捉えられる血液の凝固と線溶

研究課題名(英文) Coagulation and Fibrinolysis as Liquid/Liquid Contact and Crosslinking/Dissolution Process

研究代表者

土橋 敏明 (DOBASHI, TOSHIAKI)

群馬大学・大学院理工学府・教授

研究者番号：30155626

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、血液凝固・線溶能の臨床検査として従来から行われてきた血漿と血液凝固因子または線溶因子との混合による血液凝固時間の測定に代えて、血漿と血液凝固因子または線溶因子との接触によって得られる新たな知見について、物理学の立場から詳細な検討を行った。本方法による様々な実験系において観察される現象は、サイズに依らない普遍的な現象と用いる血液に固有の数個のパラメータにより表すことができ、後者を用いた新たな診断法の可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血液凝固・線溶の理解、それによる診断法・検査法の発展、治療方法の最適化は、現代医学の最重要課題の一つである。そのメカニズムは、生化学的観点からは、非常に多くの多数の分子が関係するネガティブ及びポジティブフィードバックを含む多段階のカスケード反応であると考えられる一方、血液は物理的観点から見ると代表的なソフトマターの一つであり、血液の凝固と線溶はソフトマターのゲル化と溶解として捉えることができる。本研究では、このような観点から、物理的手法を駆使した血液凝固・線溶挙動を解析しうることを示し、また、これまでの方法では得られなかった血液凝固に関する指標が得られる可能性を示唆する結果を得た。

研究成果の概要(英文)：We studied the blood coagulation and fibrinolysis process from the physical point of view using in vitro systems consisting of a contact of plasma and blood coagulation factors or fibrinolysis factors, instead of the conventional mixing of plasma and the factors. We proposed several relevant contact systems and analyzed the coagulation and fibrinolysis behavior of plasma of the systems to find that the coagulation and fibrinolysis behaviors are expressed by a few class of universal scaled equations with several parameters, from which we can extract new information on the blood coagulability of the subjects.

研究分野：バイオレオロジー、高分子物理化学

キーワード：血液凝固 ゲル形成 界面 凝固駆動物質 線溶 MB描像

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

血液の凝固および線溶(凝固物の溶解)は、複雑な正負の増幅反応により起きることが分かっている。臨床における血液凝固の評価として、血漿に凝固駆動物質を混合したときの凝固時間を求める方法が確立しているが、凝固と線溶に関わる因子が非常に多いため、他の検査との組み合わせにより病気の主因を捉えているのが医学生理学の現状である。一方、最近の生化学分野における研究からは、カルシウムイオンは酵素反応に関わるだけでなく、トロンピンやフィブリンに結合しゲル形成とゲル形成阻害( $\text{Ca}^{2+}$ 過剰時)の両方に与与することが明らかとなった。このような新しい知見は、血栓形成の詳細メカニズムの見直しを要請するとともに新たな診断・治療法の可能性を示唆している。しかしながら、生化学では個々の酵素反応が研究の中心である一方、医学生理学の視点からはどうしても個別の現象に注目がいき、さらに、「凝固が起こる」「線溶が起こる」といった静的で定性的な捉え方が主とならざるをえない。内因系凝固の際にミリ秒で起こる酵素反応が数十秒の凝固遅れをもたらす現象や上述のカルシウムイオンの多様な機能と血栓の生成消滅の関係など広い時間スケールに関わる現象は、医学生理学と生化学の狭間にあり物理的アプローチが必要である。すなわち、血栓形成は同一系内で種々の要因が連動してダイナミックに起こっていることがマクロな現象に結びつくものであるため、血栓形成のメカニズムの全体構造を把握した上で、どの程度の時間スケールでどのような時間関数で凝固物が成長するかといったダイナミックスの視点を取り入れた研究方法が必須である。

## 2. 研究の目的

血液凝固・線溶過程をフィブリノゲンなどの高分子溶液と高分子を架橋させる凝固駆動物質溶液との2相接触によって起きるゲル成長・溶解過程と考え、一般の接触系のゲル化に適用できる描像を駆使して、ゲル化ダイナミックスとメカニズムの関係を調べることを目的とした。具体的には、(i)血漿/凝固駆動物質溶液の2相接触モデルの構築、(ii)血液凝固における普遍性と特殊性の切り分け、(iii)血液凝固ゲル/血液界面からのゲル溶解ダイナミックス(線溶過程)の解析、(iv)ゲル溶解過程優勢状態(正常状態)とゲル形成過程優勢状態(病的血栓生成状態)との転移挙動のモデル化を行うことを試みた。

## 3. 研究の方法

血漿/凝固駆動物質溶液接触系として対照系、外因系モデル、内因系モデルを構築し、スケールリング、ゲル化と相分離のカップリング、バッチ系と定常系の違いを明らかにした上で、lag phase については水晶振動子マイクロバランス法を用いて、ゲル成長過程については巨視的観察と Moving boundary picture に基づく理論との比較によって、血液凝固過程のダイナミックスの解析を行った。このことを通して、血漿の凝固について物理的理解を試みた。また同じ手法をゲル溶解過程にも適用した。

## 4. 研究成果

### (1) ゲル化のレオロジーと濁度測定との関連

2相の接触界面から成長する白濁層とゲルの体積がほぼ等しいことからゲル形成ダイナミックスを白濁層の成長のダイナミックスに置換えて解析することが可能であることを確認した。

### (2) スケーリング

セル長の異なる矩形セルを用いてゲル形成過程における溶液の挙動をインターバル撮影することにより、ゲル層の幅の成長を求めた。ゲルの厚みをセル長、時間をセル長の2乗でスケールすることによりサイズによらないゲル形成ダイナミクスが得られることがわかった。このことにより界面移動描像による理論の仮定の妥当性を確認した。さらに、このモデル系を、旅行者血栓症のモデルとなる 血漿/パック赤血球系に応用し、同様な実験を行うことにより凝固初期過程の解析が可能であることを確かめた。

### (3) 水晶振動子マイクロバランス法による精密測定によるプロトフィブリル形成とクロット形成との切り分け

血液凝固の最終段階である「トロンビン作用によるフィブリンクロット形成(ゲル化過程)」を水晶振動子マイクロバランス法を用いて測定することにより、これまでの測定では困難であった分子軸方向に成長するプロトフィブリルの形成からプロトフィブリル同士のラテラル方向への集合への変化を経時的にとらえることができた。このことにより、ゲル形成ダイナミクスの初期過程の解釈が可能になった。

### (4) バッチ系と流動系との比較

静水圧を利用した血液循環モデル系を作製しバッチモデル系における結果と比較し、流動による凝固因子の拡散の影響が明らかになった。

### (5) 血漿/塩化カルシウム水溶液接触系のゲル化ダイナミクス

ウシ、ウマ、ブタ、ヒト血液を用いて、血漿/塩化カルシウム水溶液接触系のゲル化ダイナミクスをクエン酸濃度と塩化カルシウム濃度を変化させて行い、いずれの場合も界面移動描像で表現できることを確認した。また、ヒト血漿を用いたゲル成長のクエン酸濃度依存性と塩化カルシウム濃度依存性から、ゲルの構造に関するパラメータとしてクエン酸とカルシウムイオンの拡散係数、及び、単位体積の血漿がゲル化するのに必要なカルシウムイオン濃度が求められることを示した。また、これらの値は被験者により異なることが分かり、診断の指標となる可能性が示唆された。

### (6) 血漿/パック赤血球接触系のダイナミクス

内因系凝固のモデル系として、ヒト血漿/パック赤血球接触系のダイナミクスを血漿中のカルシウムイオン濃度を変えて測定した。ラグタイムの後、ゲル体積は時間に比例して増加することが分かった。また、比例係数はカルシウムイオン濃度にはほとんど依存しなかった。これらの挙動は、カスケード反応に付随する増幅回路によって界面付近に生成されるフィブリン飽和層における反応律速過程として説明できることが示唆された。

### (7) 血漿/組織因子系のダイナミクス

外因系凝固のモデル系としてヒト血漿/組織因子接触系のダイナミクスを測定した。その結果、凝固の律速過程が時間とともに変化することが示唆された。さらに、界面移動描像のカスケード反応への応用を用いた考察により、エネルギー律速過程から拡散過程への変化であることが示唆された。さらに、それぞれの過程が、血液凝固カスケード内の増幅によって生成される過飽和物凝集体層のエネルギー律速の成長過程と活性化したチモーゲンの拡散過程によるものである可能性が示唆された。

#### (8) 線溶過程の解析

(7)の系に組織由来プラスミノゲンアクチベータ(tPA)が含まれているときの線溶過程を調べた。線溶過程は、ラグタイムの後、凝固物が生成された点から起き、時間に対して 1/2 次で移動することが分かり、また、界面移動描像による表現が可能であることが分かった。この系では、線溶が、凝固物がトリガーとなって拡散過程により起きることが確認された。

#### (9) 線溶過程における流動場の影響

フィブリノゲン水溶液に酵素トロンピンを加えたソフトクロットと抗凝固処理した血漿に塩化カルシウム水溶液を加えたハードクロットを作製し、プラスミンによる線溶過程を QCM を用いて測定した。その結果、ソフトクロットはプラスミンの添加により濃度依存的に溶解する一方、ハードクロットはプラスミンの添加だけでは溶解せず、プラスミン水溶液を還流させた流動場においてのみ溶解がみられた。これらのことは、生体内での凝固線溶過程における流動場の影響の評価が可能であることを示唆した。

(10) 上記(1)-(9)の結果はこれまでに明らかとなっている血液凝固線溶のメカニズムと矛盾なく、また、接触系における測定により、これらの過程における動的因子を特徴づけるパラメータを抽出できることを示唆する。これらのパラメータは生化学的検査では得られない血液の状態を表す物理量であることから、血液の凝固能・線溶能を表す評価因子としてもとらえることができる。また、線溶は凝固をトリガーとして起こり、凝固と線溶はともに界面移動描像として捉えることができることから、凝固・線溶を、独立した事象の足し合わせではなく連立した事象として取り扱える可能性が示された。

### 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 16 件)

T. Dobashi, T. Yamamoto, Analysis of Heterogeneous Gelation Dynamics and Their Application to Blood Coagulation, *Gels*, 4, 59 (2018); <https://doi.org/10.3390/gels4030059>. (査読有)

Y. Toyama, M. Shimizu, M. Ochiai and T. Dobashi, Effects of Urea and NaCl on the Fibrinogen Cryogelation, *J. Biorheol.* 31, 12-15, (2017); <https://doi.org/10.17106/jbr.31.12>. (査読有)

Y. Takagi, S. Tanaka, S. Tomita, S. Akiyama, Y. Maki, T. Yamamoto, M. Uehara, and T. Dobashi, Preparation of Gelatin Scaffold and Fibroblast Cell Culture, *J. Biorheol.* 31, 2-5, (2017). <https://doi.org/10.17106/jbr.31.2>. (査読有)

Y. Toyama, H. Yoshida, T. Yamamoto and T. Dobashi, Erythrocyte aggregation under high pressure studied by laser photometry and mathematical analysis, *Colloids Surf. B* 140, 189-195 (2016); doi: 10.1016/j.colsurfb.2015.12.038. (査読有)

N. Shida, R. Kurasawa, Y. Maki, Y. Toyama, T. Dobashi and T. Yamamoto, Coagulation of plasma induced by a contact with calcium chloride solution, *Soft Matter*, 12, 9471-9476 (2016); DOI: 10.1039/c6sm01926a. (査読有)

〔学会発表〕(計 24 件)

篠田啓貴、倉沢隆太、外山吉治、山本隆夫、土橋敏明、小川哲史、バック赤血球/血漿接触系におけるゲル形成ダイナミクス、第 41 回日本バイオレオロジー学会、2018 年

川端 彬嗣、倉沢隆太、青柳貴彦、篠田啓貴、外山吉治、山本隆夫、土橋敏明、小川哲史、血液凝固モデルとしての血漿/塩化カルシウム水溶液接触系におけるゲル化ダイナミクス、第 41 回日本バイオレオロジー学会、2018 年

為我井大輔、外山吉治、土橋敏明、フィブリンゲル形成過程に与えるトロンピン濃度の影響、第 41 回日本バイオレオロジー学会、2018 年

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 年、

Toshiaki Dobashi, Anisotropic gelation induced by a contact of two phases, FRIMACHAT 2017, 2017

Toshiaki Dobashi, Yasuyuki Maki, Kazuya Furusawa and Takao Yamamoto, Anisotropic Structure Formation Induced by Liquid-Liquid Phase Contact and Diffusion, IUMRS-ICAM, 2017

Toshiaki Dobashi, Sakuya Ishioroshi, Tetsu Kudo, Yasuyuki Maki, and Takao Yamamoto, Anisotropic structure formation triggered by a contact of two phases, APA2017, 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

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

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

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

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

土橋敏明, マイクロカプセルの科学 - 接触・拡散による壁膜ゲル形成、物質放出、吸着のダイナミクス -, 第 18 回 レオロジー・フォーラム, 2016 年

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 年

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, 2016 年

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：山本 隆夫

ローマ字氏名：YAMAMOTO takao

所属研究機関名：群馬大学

部局名：大学院理工学府

職名：教授

研究者番号（8桁）：80200814

研究分担者氏名：外山 吉治

ローマ字氏名：TOYAMA yoshiharu

所属研究機関名：群馬大学

部局名：大学院理工学府

職名：准教授

研究者番号（8桁）：50240693

研究分担者氏名：榎 靖幸

ローマ字氏名：MAKI yasuyuki

所属研究機関名：群馬大学

部局名：大学院理工学府

職名：助教

研究者番号（8桁）：50400776

研究分担者氏名：吉場 一真

ローマ字氏名：YOSHIBA kazuto

所属研究機関名：群馬大学

部局名：大学院理工学府

職名：助教

研究者番号（8桁）：40375564