

令和 2 年 5 月 10 日現在

機関番号：32619

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K01370

研究課題名(和文)せん断刺激に起因した赤血球と血小板の機能低下・損傷現象に関する総合的基礎研究

研究課題名(英文)Multidisciplinary basic studies on the shear stress related functional deterioration and damage phenomenon of erythrocytes and platelets

研究代表者

渡邊 宣夫 (Watanabe, Nobuo)

芝浦工業大学・システム理工学部・准教授

研究者番号：00568644

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)：心臓が悪い患者に対して利用される血液ポンプ、重度のぜんそく患者を助ける人工心肺装置などを用いると血液に含まれる赤血球や血小板、さらにはタンパク質まで、機能低下を引き起こしてしまいます。私たちは、赤血球が流れの激しさに応じて一酸化窒素を発生する事や、機能低下が引き起こる時の赤血球の形の変化、血小板のくっつく程度を確かめる方法を使って、流れの激しさに応じてたんぱく質の能力が低下する事、さらには血液ポンプなどの激しい流れで赤血球の膜が酸化してしまうリスクがある可能性など、明らかにする事ができました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来血液ポンプや体外循環装置を例とした血液循環補助機械の利用による血球破壊(溶血)現象は光技術を利用した間接的な形で、研究されていた。また、流れの中でどのように赤血球が溶血に至るかまでは、従来の技術では、なかなか調べる事が出来ていなかった。このような背景を受け、我々は、流れの中で直接血液細胞を観察する事ができる技術を構築した。そしてそれを用いて、豪州研究者らと協力し、赤血球が溶血に至る前の段階で、いびつな形状が出現する事、せん断刺激の度合いによりNO産生量が変化する事や膜酸化が生じる事、血小板の凝集しやすさも影響を受ける事などを明らかにする事ができた。

研究成果の概要(英文)：In the blood circulation through mechanical circulatory support devices such as blood pump or cardiopulmonary bypass, both blood cells and plasma protein will have risk to get damaged because of very strong flow generated by such devices. Therefore, it is very important to study how much blood cells or blood protein can endure in strong flow in the mechanical circulatory support device. We made special table top type flow device, which can mimic strong flow in mechanical circulatory support devices, and applied the device to study mechanical fragility of blood.

Our study successfully made it cleared through international research collaboration that NO production of red blood cells, and their becoming strange shape as they get damaged, and decrease of plasma protein function, furthermore, red cell's getting oxidized, respectively, according to strong flow by mechanical circulatory devices.

研究分野：バイオレオロジー

キーワード：血液流動可視化 せん断流れ 血小板凝集 赤血球変形能 NO産生 血液損傷 血漿タンパク 血液ポンプ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ドナー不足の問題もあり、重症心不全患者が機械式血液循環サポート装置を利用する事は必要不可欠である。その一方で、その装置の高せん断状態が出血性疾患の発症や、血小板を刺激する事による血栓形成、また赤血球損傷の結果としての変形能低下や循環不全の発症リスクを伴う。このため血液細胞のせん断応答性を理解する事はとても重要である。しかしながら、流動中の血液細胞に対する観察は技術的に難しくこれまで不明であった。そこで申請者はせん断流れの中でも安定して血液細胞を可視化できる実験システム(図1参照)を構築した。

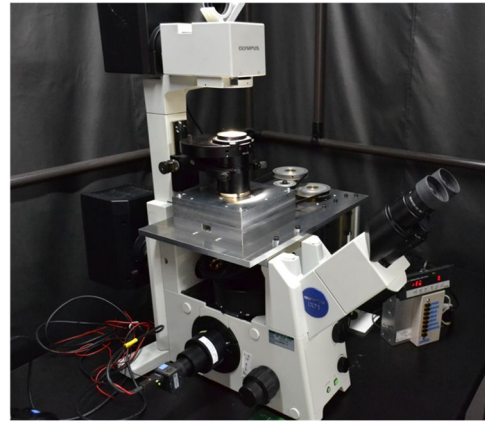


図1:逆回転式せん断流れ発生装置を用いたせん断流れ環境撮影実験システム

2. 研究の目的

本研究は、申請者が開発した流れの中で血液細胞を可視化できる装置を応用し、さまざまにせん断刺激を受けた血小板細胞の膜表面に生じるタンパク構造の変化や、膜電位や一酸化窒素産生応答で評価した赤血球機能変化、加えて、断片化を伴う赤血球損傷現象について、定量的に解明する。

3. 研究の方法

<研究1> 構築したせん断負荷装置を用いて、高せん断流れ環境下におけるヒト赤血球の流動変形挙動を可視化する事で、溶血に至る前の段階の赤血球損傷現象を明らかにする(2017年度)。
<研究2> 本研究室で構築したせん断流れ環境下において血液細胞を撮影できる実験機構をオーストラリアの共同研究チーム一員のグリフィス大学医学部マイケル・シモンズ博士の研究室に設置し、申請者研究室の修士2年箱崎が主体となり、現地のメンバと連携し、せん断流れ環境における赤血球の損傷現象の定量化を試みる(2017年度 - 2018年度)。
<研究3> 同じくグリフィス大学シモンズ博士らとの共同研究として、我々のせん断装置を用いて、現地の生化学手法を取り入れて、せん断刺激に対する赤血球のNO産生現象を実験的に調査する(2017年度 - 2018年度)。
<研究4> 申請者研究室修士学生井上が主体となり、ブリスベン Prince Charles 病院研究所救命救急研究グループ(代表: John Fraser 教授)と協力し、せん断流れにおける血小板凝集挙動可視化法を用いた血漿タンパク vWF の凝集能の流れ依存性を検証する(2018年度 - 2019年度)。
<研究5> 申請者研究室修士学生五十嵐が主体となり、ブリスベン Prince Charles 病院研究所救命救急研究グループ(代表: John Fraser 教授)と協力し、せん断に起因した血小板活性化・赤血球変形能低下・および溶血といった3項目同時計測実験を実施する事で、せん断負荷に起因して生じる血液損傷現象を総合的に検証する(2018年度 - 2019年度)。

4. 研究成果

<研究1成果> 申請者は、血液ポンプ内を想定した288Paの高せん断応力環境下の赤血球挙動を撮影する事に成功した。その結果、赤血球はせん断負荷直後においては図2aに示すように、いずれも同じレベルの楕円形状を示した一方、さらにせん断に晒される時間が延長すると、図2bのように、非対称ないびつな形状や断片化といった異常形状が出現する事を明らかにした。また、顕微鏡下の異常形状赤血球が変形の長軸に沿ってその太い部分が場所移動を周期的に繰り返すような挙動も確認できた事から、異常形状の赤血球における形状変化、および膜の変形能異常が生じているプロセスを解釈するモデルを提案し、学術誌 The International Journal of Artificial Organs に学術論文投稿した(学術論文1)。
<研究2成果> 本研究室修士2年箱崎が計画通り、グリフィス大学シモンズ博士研究室に我々が開発した装置を持って1年間留学し、ヒト赤血球の損傷現象を、10Paから60Paまでのせん断応力下で5分間の赤血球モニタリングを実施した結果、30Pa以上のせん断負荷に対して赤血球が異常形状の出現が見られた事、加えて入力せん断の大きさおよびそのさらされる時間の長さに起因して、異常形状の出現率が增大する傾向がある事を見出した。この結果は、2018年ヨーロッパ人工臓器学会において成果報告を行った(現在論文投稿中)。

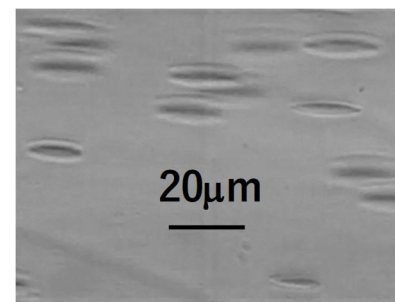


図2a: 健常赤血球

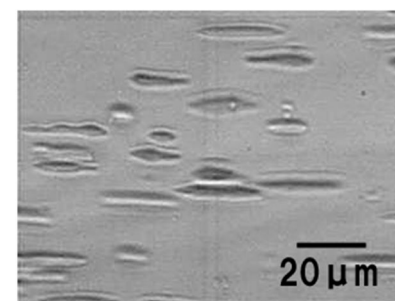


図2b: 異常形状赤血球

<研究3成果> 研究2と同様に、箱崎と、Griffith 大学医学部 Michael Simmonds 博士研究室の博士学生 Jarod Horobin 氏と共に研究協力し、ヒト赤血球に対して、1-100Pa のせん断応力を、0 から 30 分間負荷する実験を行い、せん断負荷後に蛍光撮影法による赤血球からの一酸化窒素(NO) 産生量の評価を試みた結果、晒されるせん断応力と晒される時間に応じて発生する NO 量が単調増加傾向を示す事が明らかとなった。この結果は、学術論文として Journal of Clinical Hemorheology and Microcirculation に採択された(学術論文2)

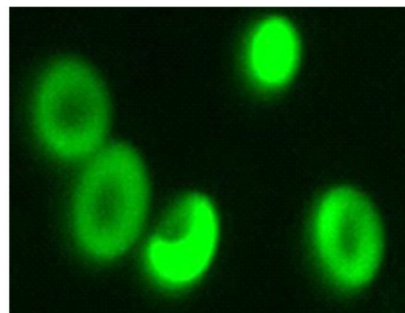


図3:せん断負荷を受け NO 産生する赤血球

<研究4成果> 申請者研究室修士学生井上が主体となり、プリズベン Prince Charles 病院研究所救命救急研究グループの血液研究チームリーダーの Chris Chan 博士と実験

協力し、1 から 10000[1/s]のせん断速度の環境下に 15 分晒した環境で、せん断流れにおける血小板凝集挙動可視化法を用いた血漿タンパク vWF の凝集能の流れ依存性を検証した。その結果、血小板凝集塊の大きさで判断する血小板凝集能は、3000[1/s]のせん断速度環境において最も優位な傾向を示す結果となり、凝集能の流れ依存性においてピークがある事が示された。この成果については、2019 年 10 月に開催された日本人工臓器学会にてポスター発表した結果、優秀賞を頂いた(現在、学術誌 Artificial Organs に論文投稿中)。上記の成果に加えて、異常形状を損傷と解釈する事で、画像解析手法による損傷赤血球同定法を考案する事に成功した。この成果は、2019 年 8 月にタイ・バンコックにて開催された国際精密技術学会(LE2019)において口頭発表を既に行っており、成果内容はさらに近々論文投稿予定である。

<研究5成果> 申請者研究室修士学生五十嵐が主体となり、申請者研究室で開発した 5 cc程の血液を用いてせん断実験を可能にした装置を、Griffith 大学医学部 Michael Simmonds 博士および同大学工学部 Geoff Tansley 教授との共同研究施設に持参して 1 年留学し、せん断負荷に起因した血小板活性・赤血球変形能・溶血それぞれの現象の同時検証実験を実施した。その結果、血小板活性、赤血球変形能低下、溶血の順に発生する事を見出した。また 3 項目間の相関性も定量的に示す事ができ、これらの結果について、2019 年 10 月の国際人工臓器学会(IFA02019)においてポスター発表を実施した。本成果については、現在雑誌 Artificial Organs に論文投稿中である。

以上に述べたように本研究成果をまとめて表現すると、一様せん断環境における血液損傷現象について、赤血球直接可視化、および血小板凝集挙動、血小板活性、溶血それぞれに着目し、定量評価する事が出来たと言える。しかしながら、臨床で用いられている機械式血液循環装置においては、より短時間で且つ高せん断が発生する環境であり、せん断応力も変化する事が想定される。従って、これらの研究成果を更に発展させ、変化するせん断流れ環境で研究を実施する事で、一様せん断流れだけでなく、機械式血液循環サポート装置内部流れを想定した変動せん断流れ環境下におけるせん断刺激負荷に対する血液損傷現象を解明する事ができるはずである。本研究プロジェクトを通じて協力頂いた、豪州研究所の先生方とは引き続き上記内容で連携協力していくことを同意頂いている。加えて、血栓および血小板の流体力学的な刺激に対する挙動研究で先駆的な立場の独国ベルリン Charite 病院研究所 Biofluid Mechanics 研究室 Ulrich Kerscher 博士研究室と共に、我々が本研究で培った技術を応用し血小板挙動の更なる解明に向け 2020 年度以降に共同研究を実施する予定である。また、申請者と同所属の生化学分野研究者の福井浩二教授と研究協力する事でせん断流れから受ける刺激と細胞老化現象との関係性を検証する事ができる可能性も見えてきた。本研究成果からつながるこれらの更なる研究テーマは、引き続き、2020 年度からの基盤研究 C 事業を通じて実施予定である。

5. まとめ 本研究においては、申請者が開発したせん断流れ発生装置を用いて、豪州研究機関との共同研究を行った成果として、赤血球のせん断刺激に対応した NO 産生現象を解明できた事、過度のせん断負荷刺激による引き起こされる赤血球損傷現象の可視化を可能にした事、血小板凝集能がせん断依存性を示す事、さらには、せん断刺激により赤血球膜酸化が進む事実、をそれぞれ明らかにできた。

学術論文 1 : N. Watanabe, T Shimada, M Hakozaiki, R Hara, Visualization of erythrocyte deformation induced by supraphysiological shear stress Int J Artif Organs. 2018, Vol. 41(12) 838-844

学術論文 2 : Jarod T. Horobin, Nobuo Watanabe, Masaya Hakozaiki, Surendran Sabapathy, Michael J. Simmonds. Shear-stress mediated nitric oxide production within red blood cells: a dose-response. Journal of Clinical Hemorheology and Microcirculation vol. 71, no. 2, pp. 203-214, 2019

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Horobin Jarod T., Watanabe Nobuo, Hakozaki Masaya, Sabapathy Surendran, Simmonds Michael J.	4. 巻 71
2. 論文標題 Shear-stress mediated nitric oxide production within red blood cells: A dose-response	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clinical Hemorheology and Microcirculation	6. 最初と最後の頁 203 ~ 214
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3233/CH-189412	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Watanabe Nobuo, Shimada Takahiro, Hakozaki Masaya, Hara Ryohei	4. 巻 41
2. 論文標題 Visualization of erythrocyte deformation induced by supraphysiological shear stress	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The International Journal of Artificial Organs	6. 最初と最後の頁 838 ~ 844
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/0391398818793387	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 H. Nakamura, M. Shibata, N. Watanabe	4. 巻 1072
2. 論文標題 Intravital Observation of Microvascular Remodeling During Chronic Exposure to Hypoxia in Mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Adv Exp Med Biol 2018	6. 最初と最後の頁 245 ~ 249
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計16件（うち招待講演 3件/うち国際学会 10件）

1. 発表者名 Chris Hoi Hong Chan, Masataka Inoue, Katrina K Ki, Tomotaka Murashige, John F Fraser, Nobuo Watanabe, Geoff Tansley
2. 発表標題 The effect of shear stress and exposure time on the formation size of platelet aggregation
3. 学会等名 The American Society for Artificial Internal Organs (ASAIO) San Francisco. (国際学会)
4. 発表年 2019年

1 . 発表者名 Nobuo Watanabe and Reina Ioka
2 . 発表標題 Abrupt change of shear stress as additional hemolysis factor
3 . 学会等名 ESA0 Congress Sept 3-7 2019 Hannover, Germany. (招待講演) (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 M. Hakozaiki, M. J. Simmonds, J. T. Horobin, A. P. McNamee, T. Shimada, R. Hara, N. Watanabe
2 . 発表標題 Visualisation of the erythrocyte damage process induced by sublethal shear stress
3 . 学会等名 ESA0 2018 Madrid Spain. (国際学会)
4 . 発表年 2018年

1 . 発表者名 N. Watanabe, T. Shimada, N. Ikeda, M. Hakozaiki, K. Igarashi
2 . 発表標題 Discussion about high shear stress induced erythrocyte 's damage and lysis - Interpretation of hemolysis in cardiovascular devices based on our visualized erythrocytes ' behaviors
3 . 学会等名 Joint Meeting of The European Society for Clinical Hemorheology and Microcirculation The International Society for Clinical Hemorheology The International Society of Biorheology 2-6 July 2018 (招待講演) (国際学会)
4 . 発表年 2018年

1 . 発表者名 N. Watanabe, T Shimada, M Hakozaiki, R Hara
2 . 発表標題 Visualized erythrocyte 's shear induced damage process under high shear flow
3 . 学会等名 44th ESA0 and 7th IFAO Congress (国際学会)
4 . 発表年 2017年

1. 発表者名 池田 直生 , 井上 雅喬 , 箱崎 雅也 , 五十嵐 公輔 , 渡邊 宣夫
2. 発表標題 観察点移動機構を有する 血液細胞流動撮影装置の構築とその妥当性検証
3. 学会等名 第41 回日本バイオレオロジー学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nobuo Watanabe
2. 発表標題 Mechanical characteristics of Blood cells
3. 学会等名 International Conference on Mechanical, Electrical and Medical Intelligent System 2019 (ICMEMIS 2019) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kosuke Igarashi, Tomotaka Murashige, Katrina Ki, Michael J. Simmonds, Geoff Tansley, John F. Fraser, Nobuo Watanabe, Chris H. H. Chan
2. 発表標題 he threshold shear stress for mechanical damage as evaluated by hemolysis, red blood cell deformability and platelet activation using a novel shearing device
3. 学会等名 The 8th Meeting of the International Federation for Artificial Organs (IFA0 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masataka Inoue, Katrina K. Ki, Tomotaka Murashige, Michael J. Simmonds, Nobuo Watanabe, Geoff D. Tansley, John F. Fraser, Chris Hoi Houg Chan
2. 発表標題 the effect of shear rate and exposure time on the formation size of human platelet aggregations
3. 学会等名 ISMCS201, Bologna, Italy (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuki Udono Yugo Kato, Koji Fukui, Nobuo Watanabe
2. 発表標題 Study to evaluate erythrocyte's membrane oxidation during shear stress loading by centrifugal blood pump
3. 学会等名 ISMCS201, Bologna, Italy (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masataka Inoue, Masaya Hakozaiki, Jarod T. Horobin, Antony P. McNamee, Geoff D. Tansley, John F. Fraser, Michael J. Simmonds, Shuto Yoshida, Masahiro Shibata, Nobuo Watanabe
2. 発表標題 Image analysis to detect erythrocyte damage induced by high shear stress
3. 学会等名 Life Engineering Symposium 2019 (LE2019) 34th Biological and Physiological Engineering (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井上 雅喬, 渡邊宣夫
2. 発表標題 せん断流れに起因した血液損傷の解明 画像解析を用いた赤血球損傷および血小板凝集評価
3. 学会等名 ライフサポート学会 フロンティア講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 井上雅喬, 箱崎雅也, Jarod T. Horobin, Antony P. McNamee, Geoff D. Tansley, John F. Fraser, Michael J. Simmonds, 渡邊宣夫
2. 発表標題 画像解析による高せん断応力下の損傷赤血球検知法の提案
3. 学会等名 第57回日本人工臓器学会大会 (JSAO 2019)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井上雅喬, Ki Katrina, 村重 智崇, Simmonds Michael, 渡邊宣夫, Tansley Geoff, Fraser John, Chan Chris
2. 発表標題 せん断速度が血小板凝集サイズに与える影響
3. 学会等名 LIFE2019日本機械学会福祉工学シンポジウム2019第35回ライフサポート学会大会第19回日本生活支援工学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 池田直生、井上雅喬、浅井森介、吉田脩人、渡邊宣夫
2. 発表標題 観察点移動機構を有するせん断流れ発生撮影装置を用いたラット新鮮血中の赤血球観察
3. 学会等名 第42回日本バイオレオロジー学会年会第27回福岡県臨床工学会合同大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鶴殿裕輝、福井浩二、渡邊宣夫
2. 発表標題 密度別に区分した赤血球に対する膜酸化量の測定評価
3. 学会等名 第42回日本バイオレオロジー学会年会第27回福岡県臨床工学会合同大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 21. Michael J. Simmonds, Nobuo Watanabe, Deepika Nandakumar, Jarod Horobin	4. 発行年 2017年
2. 出版社 Elsevier	5. 総ページ数 597-626
3. 書名 Chapter19. of Mechanical Circulatory and Respiratory Support 1st Edition	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	シモンズ マイケル (Simmonds Michael)		豪州研究所で実施した実験で利用した顕微鏡撮影設備をご提供頂いた。2017年度 2018年度の期間、申請者研究室修士学生箱崎の現地での研究活動を医学生理学専門の立場から研究協力して頂いた。
研究協力者	ホロビン ジャーロッド (Horobin Jarod)		生化学的手法を用いた赤血球のNO産生能評価法を構築し、申請者修士学生箱崎君と協力し、せん断刺激に対応したNO産生能を定量評価する研究にて主体的に加わり、ご協力頂いた。
研究協力者	チャン クリス (Chan Chris)		申請者研究室修士学生井上君および五十嵐君に対し、彼らの留学期間主体的に研究指導を頂いた。血小板研究およびフローサイトメトリーを利用した実験において研究協力頂いた。
研究協力者	マクナメ アントニー (McNamee Antony)		申請者研究室修士学生箱崎の行ったせん断刺激環境下の赤血球観察実験において、実験協力および解析作業において研究協力頂いた。
研究協力者	フレーザー ジョン (Fraser John)		プリンスチャールズ病院研究所救命救急研究部門リーダー。箱崎君の留学に関してオーストラリア側の統括役をして頂いた。
研究協力者	タンズレー ジェフ (Tansley Geoff)		井上君および五十嵐君の留学にあたり、オーストラリア側の統括役をして頂いた。また、顕微鏡にマウントした申請者のせん断装置の不具合を工学的に解決するのに現地ワークショップと共に協力頂いた。
研究協力者	福井 浩二 (Fukui Koji) (80399807)	芝浦工業大学・システム理工学部生命科学科・教授 (32619)	赤血球加齢現象と酸化現象加えて、我々の研究における細胞の機能変化に関する研究ディスカッションでご協力頂いた。