

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2023

課題番号：18K12056

研究課題名(和文) 血液凝固因子の移流拡散と静脈血栓形成～成長・構造の関係に関する研究

研究課題名(英文) advection diffusion of clotting factors and venous thrombi formation and structure

研究代表者

平方 秀男 (Hirakata, Hideo)

京都大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：70271509

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：静脈血栓塞栓症(VTE)による突然死予防を目的として、自作のマイクロ流路システムで血流中のトロンピンを可視化し様々な条件が血栓形成～成長・構造などに与える影響を解明することとした。

マイクロ流路内で血流中のトロンピンを蛍光顕微鏡により可視化するのに適した方法を見出した。活性化した血小板膜表面上でトロンピンバーストが起こることは知られていたが、定説のように一部の血小板だけで起こるのではなく、反応初期にはほとんどの血小板で起こっていることを突き止めた。また、トロンピン濃度変化をリアルタイムで可視化する方法論も確立した。また、形成中の血栓の内部でトロンピン濃度は極めて高濃度となることも見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

静脈血栓塞栓症(VTE)は発症予測が困難で発症すると高率で突然死する。現在のVTE発症予測は臨床的な危険因子を列挙するにとどまり有効性に疑問が残る。発症するか否かは新鮮な静脈血栓の力学的性状が重要であるが、不明な点も多い。血栓形成・構造などはフィブリン網が主な決定因子であるが、フィブリン網の形成にはトロンピンの生成や拡散・濃度分布や流れ方が重要と考えられる。

我々の血流中での血栓形成・構造やトロンピンなどの観察結果はフィブリン網やその力学的性状解明の基礎となる。学術的には医工連携を進める意義がある。VTEが予測できれば多くの人を救命できるという社会的に重要な意義がある。

研究成果の概要(英文)：We aimed prevention of sudden death due to Venous Thromboembolism (VTE). Using handmade microfluidics system, we planned to clarify how thrombin generated by activated platelets affect thrombi formation, structure and mechanical properties in blood flow. We found suitable method to visualize thrombin in blood flow using fluorescence microscope. It was well known fact that thrombin burst was occurred on the surface of activated platelet. Established theory suggested that only few platelets caused thrombin burst but we found almost all platelets could do so at least early stage of thrombi formation. We established the method to visualize real time thrombin concentration change in blood flow by fluorescence microscope. We also found that thrombin concentration in formed thrombi was extremely high.

研究分野：生体医工学関連

キーワード：静脈血栓塞栓症 トロンピン 移流拡散

1. 研究開始当初の背景

(1)我々は静脈血栓塞栓症(VTE、エコノミークラス症候群)¹に注目している。発症の予測は臨床的には極めて困難²であるにもかかわらず、発症すると死亡率が極めて高く主要な死因の一つである¹。抗血栓薬の予防投与が極めて有効であることは知られているが、出血リスクを伴うためVTE発症が正確に予測される症例にのみ投与されるべきである。したがってきわめて正確なVTE発症予測が望まれている。

VTE発症予測方法が数多く提唱されているが多くの患者さんに見られる特異性の低い臨床的な危険因子を列挙するにとどまり発症予測という点における有効性には極めて疑問が残る³。実際に多くのガイドラインや予測方法が提唱されているにもかかわらずVTE発症の頻度は必ずしも低下していない事実からもこのことは裏付けられる。

(2)VTEは主に下肢静脈に形成された新鮮な血栓が崩壊して血流により肺血管に運ばれて詰まる(塞栓)ことで発症する⁴。つまり下肢静脈に形成された血栓の力学的性状が発症を決定すると考えられる⁵。VTE発症の予測が極めて困難である理由は、どのような条件下に形成される新鮮な静脈血栓がVTEを起こしやすい力学的性状をもつかが明らかでないからである。

静脈血栓には血小板は関与しないとの議論も多かったが、実際には血小板が静脈血栓でも核となっているという病理学的な解析も見られるようになった。

血栓は活性化血小板上でトロンビンが爆発的に産生・拡散しフィブリンを生成することで形成されるが⁵、実際の拡散・濃度分布などは必ずしも明らかではない。またトロンビンバーストの基礎となる血小板の活性化(細胞内カルシウムの増加や細胞膜表面へのホスホファチジルセリンの発現)などの詳細も不明な点が多い。さらにトロンビンの拡散・濃度分布を知ることは、血栓の力学的性状を決定する血栓の形成・成長や構造を理解し、将来的に発症を予測・予防するカギと考えられた。

2. 研究の目的

(1)上記のようにVTE発症の予測を視野に入れるために様々な条件(温度、血小板数、流速、ヘマトクリットなど)が血栓形成過程や血栓構造・血栓の力学的性状に与える影響を解明することが大切となる。

しかし、これまでの多くの先行研究は血液が静止した状態で形成された血栓を固定して解析していたが、血流の重要性が指摘されている⁶。我々は独自のマイクロ流路システムを自作して血流中で様々な条件設定(温度、血小板数、流速、ヘマトクリットなど)の下で「リアルタイムに血小板からフィブリンが発生・成長する様子⁷」や「せん断速度やヘマトクリットと共にフィブリン繊維の配向性が増加すること^{8,9}」を明らかにしてきた。本研究では我々独自のマイクロ流路システム手法を応用して血液流れの中でリアルタイムに「血小板の活性化(細胞内カルシウム濃度変化や細胞膜表面へのホスホファチジルセリンの発現)」、「トロンビンの拡散・分布」と「血栓形成・成長・構造」を同時にリアルタイムに捉えることによりこれまでの静止系での血栓構造の観察とは全く異なる視点で、様々な条件と静脈血栓形成過程における血小板の変化や血小板の活性化に起因するトロンビンバーストの可視化や血栓構造との関係を解明することが大切である。このような血小板活性化からトロンビンバーストが起こり血流内でトロンビンがどのように拡散しどのような濃度分布を示すのか、またこのようなトロンビンの濃度分布がいかに関与し血栓構造に影響するのかを見極めるのが目的である。このような見地から血栓構造に影響する主要なファクターを見出すことでVTE発症の予測や予防のための第一歩とすることが目的となる。

(2)我々は独自に「血栓成長の移流拡散反応をモデル化」したが¹⁰、上記実験結果と比較することで移流拡散反応モデルを精密化し様々な条件が血栓形成過程・構造に与える影響を理解する(医学と工学の融合)ことも目的である。したがって様々な条件下でできる血栓構造を数理モデル化することで力学的性状を推測してVTEを予測するという数理的な医学を創設するための基礎となることを目指すこととした。

3. 研究の方法

すでにマイクロ流路・圧力制御ポンプ・蛍光顕微鏡を用いた様々な静脈を模した条件設定下での血栓の観察には成功している⁷⁻⁹。基本的には現システムを応用・改良する。現在自作のマイクロ流路・自作の圧力制御ポンプ・蛍光顕微鏡・高速度カメラ・流量計・顕微鏡温度管理用ヒーター・制御用パソコンなどをシステム化して血液温度やヘマトクリット、血小板数、せん断速度などを自由に条件設定して、血小板、フィブリン繊維、赤血球などを可視化している。そこで以下の方法で本研究を進めることとした。

(1) 要素技術の確立

トロンビン濃度を蛍光で可視化する方法の選択

主要な凝固因子であるトロンピンを蛍光として測定する方法は数多く報告されているが、それぞれ蛍光波長や反応速度、蛍光強度、退色のしにくさなどが異なる。また血漿中タンパク質の自家蛍光によるノイズも予想される。そこでまずウエル内に血漿を満たした中で我々が持つ蛍光顕微鏡によりトロンピンを観察するのに適した方法を数種選定する。

マイクロ流路内でトロンピンを可視化する（赤血球なしで）

流路内の液量はウエルに比べて少量であるため蛍光信号が弱い。そこで、マイクロ流路システムにおける計測技術に実績のある異（Medical Engineering & Physics, 2015）が高感度カメラをシステムに組み込こと及び露光時間など撮影条件の調整や励起条件の最適化やマイクロ流路形状の設計を変更することで解決する。

赤血球を含む血液でも可視化する

上記で培った要素技術を利用して血中でトロンピンを観察するが赤血球が光信号に干渉する。微量の血液中でもトロンピンを捉えた報告¹²も参考にして、異（分担）が撮影条件を最適化・励起光の調整や対物レンズの仕様の変更・撮影機器の制御ソフトの開発をすることで対応する。それでも困難な場合は赤血球の透明化¹¹や疑似赤血球の使用も視野に入れる。

(2)様々な条件が「トロンピンの拡散・濃度分布」「血栓～成長・構造」に及ぼす影響の解明

上記要素技術を用いて各種条件設定下で活性化した血小板の細胞内カルシウム変化や細胞膜へのホスホファチジルセリン発現を可視化する。

さらに活性化した血小板近傍の「トロンピンの拡散・濃度分布」と「血栓形成～成長・構造」を同時にリアルタイムで観察する。

血栓症が多いとされる“うつ病患者”を杉田がリクルートし臨床経過を観察すると共に患者血液の場合では拡散・分布や血栓形成が健常人と異なるか否かも明らかにする。

4. 研究成果

(1) トロンピン可視化

蛍光顕微鏡によりトロンピンを可視化するための試薬としては紫外線で励起した時に蛍光を発する蛍光試薬が適している。しかし試薬濃度が高すぎると生成したトロンピンがこの試薬に取りられてしまいトロンピン機能に支障が出る可能性があるため試薬濃度は下げたい。ただそのために紫外線強度を上げると血液が焼けついてしまい正常な血栓とは異なってしまう。最適な撮影条件を見出して、血液にダメージを与えることなくトロンピンを蛍光顕微鏡下で可視化することに成功した。

(2) 血小板膜表面でのトロンピンバーストの可視化

上記の技術を応用して活性化した血小板膜表面で爆発的なトロンピン生成（トロンピンバースト）が起こりこのトロンピンが血液流れの下流に尾を引くように流れていく様子をリアルタイムに蛍光顕微鏡下で観察することに成功した。これまでは、一部の血小板のみからトロンピンバーストが起こるように言われていたが、血栓生成のごく初期にはほとんどの血小板でこのトロンピンバーストが起こることも見出した。

(3) トロンピンバースト発生のカギとなるホスホファチジルセリン発現の可視化

アネキシンVというホスホファチジルセリンに結合する試薬を蛍光化したものを用いてトロンピンバースト発生のための基本条件となるホスホファチジルセリンが血小板膜表面に発現してくるタイミングも観察することに成功した（右図）。タイミング的にもこのホスホファチジルセリン発現とトロンピンバーストは合致していた。



(4) 血小板細胞内カルシウムの可視化によりカルシウム濃度の振動を見出した

血小板表面でのホスホファチジルセリン発現のためには、血小板細胞内カルシウム濃度の上昇が必要である。細胞内カルシウム指示薬である fluo-4 を用いて血小板内カルシウム濃度を観察した。従来は血小板が刺激されると細胞内カルシウム濃度が一気に上昇してから徐々に下降するように思われていたが、個々の血小板を個別に観察すると細胞内カルシウム濃度は増減を繰り返すことが分かった。しかも複数の血小板を同一視野でとらえていると血小板ごとにはばらばらに増減していて全く同期性もないことが分かった。

(5) 血栓内ではトロンピンが極めて高濃度になっていること

血栓がおおむね完成するころには血栓の内部では著しくトロンピン濃度が高まっていることも見出した。これは血栓の構造や力学的性状に大きく寄与しているものと思われた。

その他目的としながらも完了しえなかったこともあるのは事実であるが、これはコロナのまん延以降に京大病院から他学部施設への出入りを何年にもわたり禁止されたことで工学部の実験

室で共同研究していた我々としては大変な痛手を受けたことも大きな原因である。

引用文献

1. Nature 2008 451: 914-8
2. Acta Cardiol Sin 2016 32:1-22
3. Phlebology. 2017 32:443-447
4. N Engl J Med 2008 358:1037-52
5. Matrix Biol 2017 60-61: 110-123
6. J Thromb Haemost 2010 8:2826-8
7. 国際血栓止血学会 2015 P0505-TUE
8. 国際血栓止血学会 2016 6-BR
9. 国際血栓止血学会 2017 PB 1415
10. 日本機械学会 関西支部第 90 期定時総会 2015 P016
11. Cell 2014 159: 911-924

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 K. Tatsumi
2. 発表標題 Thermal Characteristics Measurement of Fibrin Reaction and Clot Formation in Venous Thrombus Using Microchannel Flow
3. 学会等名 16th International Heat Transfer Conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔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
研究分担者	杉田 尚子 (Sugita Naoko) (20750532)	京都大学・医学研究科・助教 (14301)	
研究分担者	伊井 仁志 (Ii Hitoshi) (50513016)	東京都立大学・システムデザイン研究科・准教授 (22604)	
研究分担者	巽 和也 (Tatsumi Kazuya) (90372854)	京都大学・工学研究科・准教授 (14301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------