

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：34416

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23360087

研究課題名(和文)血小板凝集ダイナミクスの流体力学的研究

研究課題名(英文)Fluid mechanical study on the platelet aggregation

研究代表者

関 眞佐子 (Sugihara-Seki, Masako)

関西大学・システム理工学部・教授

研究者番号：80150225

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,500,000円、(間接経費) 4,350,000円

研究成果の概要(和文)：血液凝固の初期段階である血小板の凝集現象に対して血液流れが及ぼす影響を明らかにするために、本研究では、流れ中における血小板の微視的挙動に対して共焦点レーザー走査顕微鏡システムを用いた実験と血小板モデルを用いた数値シミュレーションの両面から流体力学的解析を行った。その結果、血小板の凝集過程には周囲の流れ場が大きな影響を与え、赤血球との流体力学的相互作用が重要な因子となっていることが示された。

研究成果の概要(英文)：The present study was aimed to investigate the fluid mechanical effect on the platelet aggregation experimentally and numerically. In the experiment, the observation of fluorescence stained platelets in red cell suspension by a confocal Laser scanning microscope showed that platelets move randomly and their concentration is enhanced near the vessel wall in the presence of red cells. The numerical simulation for binary dispersed suspensions revealed that the suspended particles tend to flow near the channel centerline or near the channel wall, depending on the particle size and physical properties. It was also found that the growth rate of aggregation depends on the surrounding flow and the rotation of the aggregate. Thus, the present study suggests that the fluid mechanical interaction with red cells plays a significant role in the formation and growth of platelet aggregation in blood flow.

研究分野：工学

科研費の分科・細目：流体工学

キーワード：血小板 凝集 流体力学的相互作用

1. 研究開始当初の背景

大きさ約3 μmの血液細胞である血小板は、血液凝固の中心的役割を担っており、生理的、病的に極めて重要である。特に心筋梗塞や脳梗塞など血栓性塞栓による血栓症は重篤な疾病であり、その診断治療のためにはまず初期段階である血小板の凝集現象のメカニズムを明らかにする必要がある。近年の研究により、血小板の凝集現象には血液流れが血小板に及ぼす応力が主要因子となることが実験により示されているが、これまでの研究は生化学的なものに限られ、流体力学的な研究はほとんどなされてこなかった。

2. 研究の目的

本研究では、血液流れ中の血小板の挙動に対して共焦点レーザー走査顕微鏡システムを用いた実験による微視的計測と流れ中の粒子運動に関する数値シミュレーションの両面から流体力学的解析を行うことで、血液流れが血小板凝集に及ぼす影響を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1)微小流路中の血小板挙動の計測

蛍光ラベルした血小板あるいは模擬血小板として同サイズの蛍光粒子を混入させた赤血球サスペンションをマイクロ流路に流し、血流中の粒子の運動を共焦点レーザー走査顕微鏡 - 高速カメラシステムにより蛍光観察した(図1)。流路は、幅100 μm、深さ50 μmの長方形あるいは幅、深さとも50 μmの正方形断面を有するPDMS製人工流路を用いた。流量は、微小血管内流れに対応して、0.1 ~ 1.0 μl/minの範囲で一定値となるようにシリンジポンプで調整した。模擬血液として、ヒト赤血球をリン酸緩衝生理食塩水(pH7.0)へ分散させたものを用い、これにデキストラン40(5w%)と牛血清アルブミン(1w%)を添加した。赤血球の体積分率(ヘマトクリットHct)は0 ~ 44%の範囲で変化させた。ヘマトクリットが高く観察が困難な場合には、必要に応じてゴースト赤血球を用いた。

流量、ヘマトクリットを設定したのち、流路入口から下流方向の数か所において、様々な深さの水平断面を撮影した。画像処理ソフトImageJによる画像解析により、粒子の軌跡を追跡し、分散係数  $D_{yy} = \langle |\Delta y|^2 \rangle / 2\Delta t$  を評価することで、粒子の横(y)方向への移動量を定量化した。ただし、 $\Delta y$  は、時間間隔  $\Delta t$  の間の粒子のy方向への移動量であり、 $\langle \rangle$  は集団平均を表す。次に、画像を流路幅方向(y方向)に2 μm毎に分割し、各区間に含まれる粒子数を積算することで、粒子の流路内分布を求めた。

幅、深さとも50 μmの正方形流路の場合、流量が0.1 ~ 1.0 μl/minの流れは、流路幅と断面平均流速を代表長、代表速度とするレイノルズ数0.015 ~ 0.15に相当する。

(2)数値シミュレーション

赤血球サスペンション流れ中の血小板挙動を数値解析により調べるために、大きさや表面張力が異なる2種類の液滴が混じっている液滴分散系の流れの2次元数値シミュレーションを行った。

ニュートン流体(密度  $\rho$ 、粘度  $\eta$ )に液滴が浮遊する系を考える。流体の速度  $v$  および圧力  $p$  はナビエ・ストークス方程式

$$\rho \left( \frac{\partial v}{\partial t} + v \cdot \nabla v \right) = -\nabla p + \nabla \cdot \left[ \eta (\nabla v + (\nabla v)^T) \right] + f$$

および非圧縮条件

$$\nabla \cdot v = 0$$

で記述される。ここで、 $f$  は表面張力による力で、液滴の表面張力係数  $\sigma$ 、表面の法線ベクトル  $n$  および曲率  $\kappa$  を用いて、

$$f = \sigma \kappa \delta(r)$$

で表す。ここで  $\delta(r)$  はデルタ関数であり、液滴表面上でのみ値を持つ。本研究では、格子ボルツマン法により流体運動を計算し、流体の情報と液滴表面の情報のやりとりは、フロントトラッキング法による重み関数によって計算した。

血小板凝集には、血小板表面に存在する種々の糖タンパクが関与することが知られているが、特に GPI $\alpha$  と血漿中に存在する VWF の結合が重要な役割を果たす。本研究では、凝集体形成におよぼす流れの影響を調べるために、せん断流中でランダム・ウォークする粒子が凝集体を形成する過程を数値シミュレーションにより解析した。既往のDLA (Diffusion-Limited Aggregation)モデルに、せん断流れを負荷し、さらに凝集体が回転する場合において、回転速度および回転方向の影響を詳しく検討した。さらに、GPI $\alpha$  と VWF の結合がせん断速度依存性を有することが実験により明らかにされているので、粒子の結合確率を相対速度に依存して変化させることで、凝集体の成長の度合いを調べた。

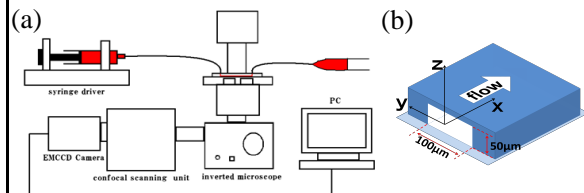


図1 (a) 共焦点レーザー走査顕微鏡 - 高速カメラシステム (b) 微小流路

4. 研究成果

(1)微小流路中の血小板挙動の計測

図2に、Hct=8%、流量0.1 μl/minの場合に、幅100 μm、深さ50 μmの矩形流路における直径1 μmの粒子の分散係数の測定値を示す。静止流体中におけるブラウン運動による同粒子の分散係数(拡散係数)は0.25 μm<sup>2</sup>/s以下で

あるのに対して、 $5\mu\text{m}^2/\text{s}$  以上の値となっている。このことから、赤血球の存在の影響により蛍光粒子の横方向への分散が大きく促進されていることが分かる。流路中央断面 ( $z = 0$ ) では壁面から少し離れた  $|y| \sim 35\mu\text{m}$  で  $D_{yy}$  のピークが見られるのが特徴的である。

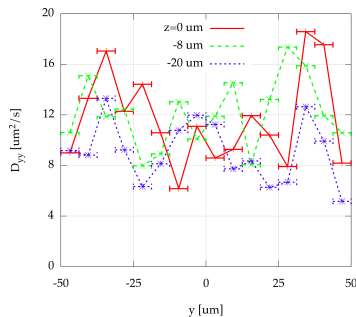


図2 分散係数の分布 ( $z$  軸は深さ方向にとり  $z = 0$  は流路中央の水平断面を表す)

図3には、幅、深さとも  $50\mu\text{m}$  の正方形流路における粒子分布の計測結果の例を示す。粒子径は  $3.1\mu\text{m}$  で、流量は  $1.0\mu\text{l}/\text{min}$ 、ヘマトクリットは 20% と 44% で、流路底面から  $8\mu\text{m}$  の水平断面における結果である。Site A は流路入口、Site B、C はそれぞれ入口から 5、10mm 下流である。流路入口では一様に分布していた粒子は、ヘマトクリットが高い場合、下流に行くにつれに流路壁付近に多く分布するようになる。その程度は粒子径が大きくヘマトクリットが高いほど大きいことが分かった。逆に、ヘマトクリットが小さい場合には ( $\text{Hct} < 10\%$ )、粒子径に関わらず軸集中が見られた。  $\text{Hct} = 0\%$  (粒子のみ) の場合には、粒子は径に関わらず断面内に一様に分布したので、このような非一様な分布は赤血球との相互作用に依るものであることが分かる。血小板は、損傷を受けた血管壁に凝集して修復する役割を担っているため、血小板が流路壁近くを流れることはその機能を果たすのに極めて有効であると考えられる。

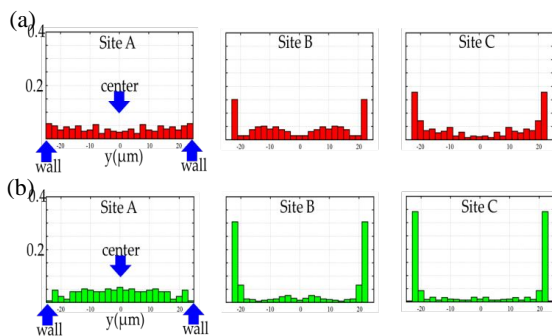


図3 血小板模擬粒子の流路内分布 (a)  $\text{Hct}=20\%$  (b)  $\text{Hct}=44\%$

## (2) 数値シミュレーション

距離  $H$  だけ離れた二平行平板間ポアズイユ流れに、大きい液滴(半径  $a_0$ )と小さい液滴

(半径  $a_1$ )が分散した液滴分散系を考える(図4)。2種類の液滴は、大きさのみ異なり、内部流体の粘度と表面張力係数は等しいものとする。図5は、十分時間がたった後の、大小液滴の流路中心からの平均距離の漸近値を、さまざまなサイズ比  $a_1/a_0$  に対して描いたものである。この図より、 $a_1/a_0=1/\sqrt{2}$  の場合は大きい液滴と小さい液滴の流路中心からの距離はほとんど差がないが、 $a_1/a_0=1/\sqrt{3}$  および  $1/2$  の場合のようにサイズの違いが大きくなると、大きい液滴は流路中心に、小さい液滴は流路壁近くに分布することが分かる。即ち、液滴のサイズの違いにより、液滴の分離が生じることが示された。この結果から、実験で観察された赤血球サスペンション中の血小板分布の偏りは、赤血球と血小板の大きさの違いが大きな要因になっている可能性が示された。

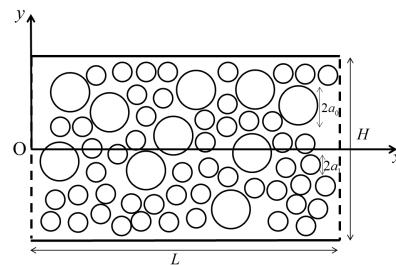


図4 2種類の液滴が分散した系

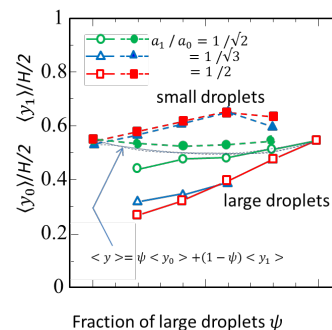


図5 大小液滴の平衡位置 (横軸は全体に占める大きい液滴の割合を表す)

次に、凝集体形成のモデル解析の結果、せん断流れが存在しない場合には凝集体の成長は回転運動によってわずかに促進されるものの、せん断流れが存在する場合には、流れに対する凝集体の回転速度および回転方向によって、形成される凝集体が大きく異なることが示された。即ち、凝集体が回転しない場合には、凝集体はせん断流れに対して負の方向に成長し、凝集体の成長はせん断速度が大きいほど顕著となった。凝集体の回転速度がせん断速度の  $1/2$  の場合には凝集体の成長は抑制され、ほぼ等方的に成長することが明らかとなった。また凝集体がせん断流れの渦度ベクトルと逆向きに回転する場合、凝集体は非等方的に成長することが示された。さらに、粒子の結合確率を相対速度と正の相関をもつように変化させて同様の解析を行っ

たところ、凝集体の成長はせん断速度の増加とともに加速度的に増加した。実験において、VWF の立体構造変化に起因して高せん断負荷による VWF と GPIb $\alpha$  の結合の促進が明らかにされているが、このようなせん断速度に依存した結合確率の増加は顕著に凝集体形成を促すことが示された。

これらの結果から、血小板の凝集過程には周囲の流れ場が大きな影響を与え、赤血球との流体力学的相互作用が重要な因子となっていることが示唆された。現在血小板凝集に関して分子レベルの研究が国内外を問わず活発に行われているところであるが、今後これらの研究が進めば、分子レベルの因子を含めて流体力学的解析を行うことにより血小板凝集のメカニズムが微視的レベルからより詳細に解明されることが期待できる。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 9 件)

Miura, K., Itano, T., Sugihara-Seki, M.: Inertial migration of neutrally buoyant spheres in a pressure-driven flow through square channels. *Journal of Fluid Mechanics*, 査読有, 749, 320-330, 2014.

DOI:10.1017/jfm.2014.232

Makino, M., Sugihara-Seki, M.: Segregation of large and small droplets suspended in Poiseuille flow. *Theoretical and Applied Mechanics Japan*, 査読有, 62, 69-78, 2014.

Makino, M., Sugihara-Seki, M.: Segregation by size difference in binary suspensions of fluid droplets in channel flow. *Biorheology*, 査読有, 50, 149-163, 2013.

DOI 10.3233/BIR-130638

<http://hdl.handle.net/10112/7853>

Itano, T., Akinaga, T., Generalis, S.C., Sugihara-Seki, M.: Transition of planar Couette flow at infinite Reynolds numbers. *Physical Review Letters*, 査読有, 111, 184502, 2013.

DOI: 10.1103/PhysRevLett.111.184502.

Makino, M., Sugihara-Seki, M.: Lateral migration of large and small droplets suspended in channel flow. *Special issue of the ASME Journal of Nanotechnology in Engineering and Medicine, 11th ASME International Conference on Nanochannels, Microchannels and Minichannels*, 査読有, ICNMM-73126, 2013.

DOI: 10.1115/ICNMM-73126.

Sugihara-Seki, M., Akinaga, T., O-tani, H.: Charge effects on the hindered transport of macromolecules across the endothelial surface glycocalyx layer. *Biorheology*, 査読有, 49, 301-316, 2012.

DOI :10.323/BIR-120620

<http://hdl.handle.net/10112/7854>

Akinaga, T., O-tani, H., Sugihara-Seki, M.: Charge effects on hindrance factors for diffusion and convection of solute in pores II. *Fluid Dynamics Research*, 査読有, 44, 065504, 2012.

DOI:10.1088/0169-5983/44/6/065504

<http://hdl.handle.net/10112/7861>

Akinga, T., O-tani, H., Sugihara-Seki, M.: Fluid mechanical and electrostatic study on the osmotic flow through cylindrical pores. *Journal of Biorheology*, 査読有, 26, 3-10, 2012.

DOI:10.1007/s12573-012-0049-4

O-tani, H., Akinaga, T., Sugihara-Seki, M.: Charge effects on hindrance factors for diffusion and convection of solute in pores I. *Fluid Dynamics Research*, 査読有, 43, 065505, 2011.

DOI:10.1088/0169-5983/43/6/065505

<http://hdl.handle.net/10112/7860>

〔学会発表〕(計 42 件)

Nakagawa, N., Miura, K., Otomo, R., Makino, M., Sugihara-Seki, M.: Lateral migration of spherical particles in channel flow. 11th World Congress on Computational Mechanics, July 20 - 25, 2014, Barcelona (Spain).

Makino, M. and Sugihara-Seki, M.: Lateral migration of large and small droplets suspended in channel flow. 11th ASME International Conference on Nanochannels, Microchannels and Minichannels, ICNMM-73126, June 17, 2013, Sapporo (Japan).

Sugihara-Seki, M., Akinaga, T. and O-tani, H.: Hydrodynamic and electrostatic study of charge effects on solute transport across the endothelial glycocalyx layer. 14th International Congress of Biorheology July 7, 2012, Istanbul (Turkey).

Sugihara-Seki, M., Akinaga, T. and O-tani, T.: Charge effect on solute transport across a periodic fiber array. 64th Annual Meeting of the APS Division of Fluid Dynamics, November 22, 2011, Baltimore (USA).

〔図書〕(計 2 件)

Koyama, T., Sugihara-Seki, M., Sasajima, T., Kikuchi, S. (Eds. Swartz, H.M., Harrison, D.K., Bruley, D.F.) Oxygen Transport to Tissue XXXVI. Springer, 372 pages, 2014.

Sugihara-Seki, M. et al. (Eds. Tanishita, K. and Yamamoto, K.) Vascular Engineering, Springer, 425 pages, 2014.

〔その他〕

ホームページ等

関西大学システム理工学部物理・応用物理学  
科流体物理研究室 HP

<http://fluid.phys.kansai-u.ac.jp/>

関西大学学術情報システム

<http://gakujo.kansai-u.ac.cjp/search/index.jsp>

## 6 . 研究組織

(1)研究代表者

関 眞佐子 (SUGIHARA-SEKI, Masako)

関西大学・システム理工学部・教授

研究者番号 : 80150225

(2)連携研究者

板野 智昭 (ITANO, Tomoaki)  
関西大学・システム理工学部・准教授  
研究者番号：30335187

山本 順一郎 (YAMAMOTO, Junichiro)  
神戸学院大学・栄養学部・教授  
研究者番号：60068252

梶島 岳夫 (KAJISIMA, Takeo)  
大阪大学大学院・工学研究科・教授  
研究者番号：30185772

(3)協力研究者

牧野 真人 (MAKINO, Masato)  
山形大学大学院・理工学研究科・助教  
研究者番号：10649172

大友 涼子 (OTOMO, Ryoko)  
関西大学・システム理工学部・助教  
研究者番号：00726862

秋永 剛 (AKINAGA, Takeshi)  
Aston University・Engineering & Applied  
Science・Researcher

大谷 英之 (O-TANI, Hideyuki)  
理化学研究所・計算科学研究機構総合防  
災・減災研究ユニット・特別研究員

三浦 和真 (MIURA, Kazuma)  
関西大学大学院・理工学研究科・大学院生

中川 尚人 (NAKAGAWA, Naoto)  
関西大学大学院・理工学研究科・大学院生