

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H03931

研究課題名(和文) マイクロプラットフォームを用いた血球・血流・血管の温度特性計測と血栓熱物理の解明

研究課題名(英文) Measurement and analysis of temperature characteristics and thermal physics of blood cell, blood flow and blood vessel using microfluidic platform

研究代表者

巽 和也 (Kazuya, Tatsumi)

京都大学・工学研究科・准教授

研究者番号：90372854

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではマイクロ流路、マイクロキャピラリー、キュベットを用いてヒト血液に関する血栓形成起点と過程、血栓形成時間、反応速度定数を計測し、静脈血栓の形成に対する流れと温度の影響を評価した。流速が小さい静脈流では壁面に付着した血小板からフィブリン網が成長し、そこから血栓が形成することを示した。また流れによるフィブリン網の成長パターンと血小板を起点とした物質拡散の範囲に相関があり、血栓形成因子の濃度分布と流れの影響を明らかにした。さらに血栓形成時間およびフィブリン濃度の時間変化と温度との関係から37～40℃に対して温度が増減すると反応速度定数の低下に伴い血栓形成時間が増加することを示した。

研究成果の概要(英文)：Point of origin and the formation process of the thrombus, thrombus formation time, and the reaction constant of fibrin reaction was measured using microfluidic device, micro-capillary, and cuvette for human blood to evaluate the effects of flow and temperature on venous thrombus formation. We showed that in the case of low flow rate observed in vein, the fibrin fibers grow from the platelets attached to the channel wall from which the thrombus starts to form. The pattern of the fibrin fibers showed a correlation with the mass concentration pattern diffused and convected from the platelet, the results from which we showed that the flow and concentration of the coagulation factors affects the thrombus formation. Further, the relationship between the temperature and the thrombus formation time and the fibrin concentration showed that the thrombus formation time increases as the temperature increase or decrease from the range of 37-40C due to the decrease of the reaction coefficient.

研究分野：伝熱工学

キーワード：血栓 熱物性 マイクロ流体工学 反応定数 静脈血栓 フィブリン トロンピン 凝固時間

### 1. 研究開始当初の背景

静脈血栓塞栓症は深部静脈血栓症や肺塞栓症(エコノミー症候群)のような深刻な症状を誘発する血液・血流に関係する重要な課題である。突然死は約25%と致死率が高く、北米、欧州、日本での死亡率はそれぞれ60,000-100,000件/年、126,145件/年、7,864件/年<sup>6)</sup>と高い。このため血栓・止血に関する研究は古くから精力的に行われており、血栓形成や線溶系の構造とそれを伴う各種要因の究明がなされている。

一般に静脈は動脈よりもせん断速度が低く、血液凝固反応も動脈に比べ緩やかに進行する。そのため血栓は凝固カスケードと呼ばれる様々な凝固因子の連鎖的反応を経て形成され、様々な内因系と外因系、共通系の影響を受ける。内的要因(内因系凝固)は血管内皮細胞の損傷に伴うコラーゲンの露出を指し、外的要因(外因系凝固)は血管壁の損傷に伴う組織因子の放出を指す。また、共通系は内因系、外因系凝固反応に共通して見られる反応経路のことを指し、これらは壁面せん断応力、流れの淀み(停滞)、血液の成分濃度、温度等に関係している。

この中で温度に関していえば、人間の体の中の温度は一定であり、一様であるとされるが、病院や手術の現場ではこの条件はあてはまらない。例えば、低温療法や術中の麻酔、輸血・人工心肺機能等で、体温管理機能が低下し数時間で深部体温が3°C低下し、血流や止血機能に影響する場合がある。さらに温熱療法や熱射病による血流温度の上昇等、温度が血栓形成に影響を及ぼすことが知られているが、その詳細な特性は明らかにされていない。

### 2. 研究の目的

本研究では静脈流の条件で血栓形成の起点と過程を明らかにすると共に流れと温度による影響を明らかにすることを目的とする。

はじめに静脈内の血栓形成の主要素であるフィブリン網の成長に対する活性化血小板及び流れと物質拡散の影響について明らかにするために、マイクロ流路を用いた活性化血小板及びフィブリン網のパターンの可視化計測と血小板を起点とした場合の対流拡散の分布との比較を行った。

つぎにフィブリン塊形成に要する時間(凝固時間)と温度の関係を調べるために、凝固反応における血液試料の透過光強度の変化から凝固時間を測定した。さらにフィブリン形成の反応速度定数を求めるため、透過光強度の時間分布に対する1次反応式の曲線回帰を行い、温度を変化させた場合の測定結果についてアレニウスプロットを適用することで反応定数と温度の関係を求めた。

### 3. 研究の方法

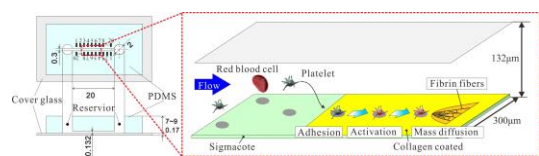
図1(a)にマイクロ流路の模式図を示す。流

路はカバーガラス及びPDMSで構成される直線流路である。血小板の活性化(内因系凝固)を抑制するために、シグマコート(Flow)を流路全体に塗布した後、血管損傷の模擬を目的として一定区間にコラーゲンを塗布した。また静止流体中での測定を行うために直径5mmの穴を設けたPDMSとカバーガラスとで構成されるウェルも用いた。

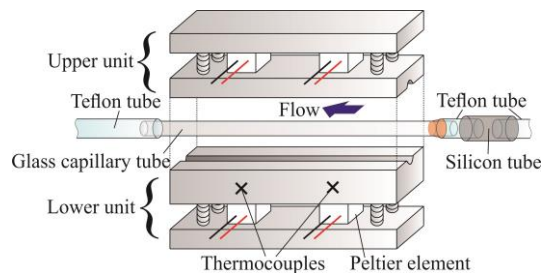
流路へは圧力駆動型の送液装置を用いて圧力一定で流量1.3mL/minで健常者のヒト全血を送液した。この条件は静脈内の壁面せん断応力条件と同じである。流路とウェルの温度は37°Cで一定とした。

フィブリン網及び血小板内Ca<sup>2+</sup>はそれぞれFibrinogen-Alexa Fluor R546(Thermo Fisher Scientific, F13192)とFluo-4 AM(Dojindo, F312)を用いて蛍光標識した。蛍光測定は倒立顕微鏡と高感度カメラを用いて撮影し、ImageJを用いて画像からフィブリン網の角度、面積、血小板の蛍光強度を求めた。測定は流路内のコラーゲン成膜領域の上流端より下流1mmの位置における262×262mm<sup>2</sup>の領域で行った。これに加えて、高速度カメラを用いてマイクロ蛍光粒子(粒径1µm, Thermo Fisher Scientific, CA94303)の水及び血液中での運動を撮影し粒子のスパン方向の拡散範囲とそれに基づく拡散係数を求めた。

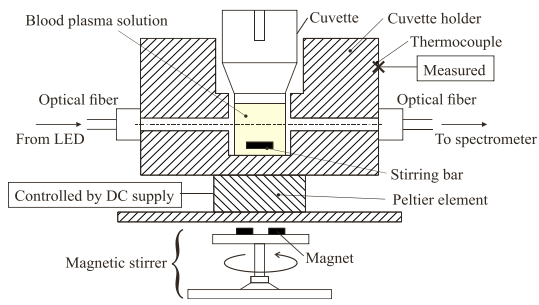
図1(b)と(c)にマイクロキャピラリーとキューベットから構成される実験装置の概略図を示す。キャピラリーの直径は200µmであり、マイクロ流路と同様にポンプを用いて血液を供給する。キューベットでは血漿試料を注入し、光を照射してその透過光強度を分光器により測定することでフィブリン濃度とフィブリン塊の生成を測定した。これら3種類の実験系では流路やキューベットの温度を制御することで温度による影響について検討を行った。



(a) Microchannel and the schematic of fibrin fiber formation at the channel wall



(b) Glass-capillary-tube-type system



(c) Cuvette-type measurement system

Figure 1. Measurement apparatus (a) Microchannel measurement visualizes the fibrin fiber pattern by applying fluorescence labeling, and detects the clot formation by measuring the flow rate. (b) Micro-glass capillary measures the change in flow rate of the blood flow in the capillary driven under constant pressure. (c) Cuvette-type system detects the fibrin clot formation and measures the fibrin concentration by measuring the transmitted light intensity.

#### 4. 研究成果

##### 4.1 活性化血小板とフィブリン網成長

図2にマイクロ流路内におけるフィブリン網形成初期段階の可視化画像を示す。(a)は血液送液開始より10分後、(b)は12分後の画像である。画像中の白点は活性化血小板であり、それを起点にして白い繊維状のフィブリン網が時間の経過と共に流れの方向に沿って成長している様子が分かる。

図3に血小板の活性化の度合とフィブリン網の形成領域の面積の時系列変化を示す。 $t$ は血液送液開始からの経過時間である。血小板は活性化されると細胞内に $\text{Ca}^{2+}$ を取り込むため、血小板内に取り込まれる $\text{Ca}^{2+}$ に応じて変化する蛍光強度 $I$ を活性化度合とした。 $I$ と $A$ はそれぞれ $t=1\text{min}$ の値 $I_1$ と $t=18\text{min}$ の値 $A_{18}$ で規格化した。

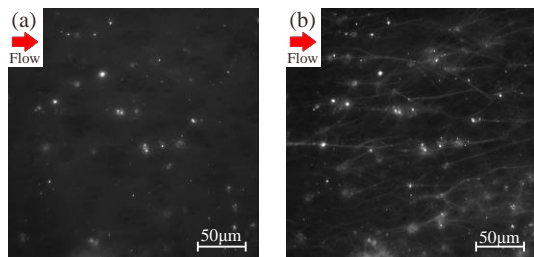


Figure 2. Visualization of the platelet adhered to the bottom wall of the microchannel at different elapse time. ((a)  $t=10\text{min}$ , (b)  $t=12\text{min}$ ).

グラフでは、 $t > 1\text{min}$ で $I/I_1$ は緩やかに増加し、 $t=10\text{min}$ で大きく増加する。 $A$ と $I$ を比較すると、 $I/I_1$ が増加し始める $t=10\text{min}$ で $A/A_{18}$ も増加し、血小板の活性化とフィブリン網成長の時刻が一致する。この時刻では血小板は流路下壁に付着し、活性化することでフィブリン網成長による二次血栓が形成さ

れたと考えられる。

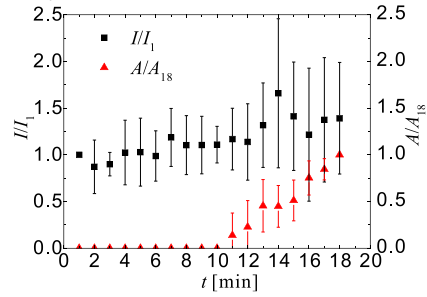


Figure 3. Time distributions of the activation degree of the platelets fluorescent intensity,  $I$ , and the area size of the fibrin network  $A$ .

##### 4.2 フィブリン網形成領域と物質拡散範囲

図4(a)と(b)にそれぞれ、マイクロ流路の流れ中とウェルでの静止流体中で測定したフィブリン網の可視化画像を示す。図4(a)は $t=18\text{min}$ 、(b)は $t=48\text{min}$ において撮影した画像であり、発達したフィブリン網の画像を示す。両者を比較するとウェル内ではフィブリン網が等方的に成長するのに対して、流路内では流れの影響を強く受け、主に主流方向に沿って成長し、異方性を持つことが分かる。そこで、血小板から活性化因子が放出され、その拡散がフィブリン網の成長に影響すると仮定して、流れにおける物質拡散範囲とフィブリン網形成領域の関係を調べた。

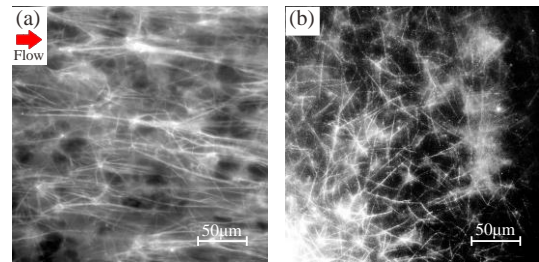


Figure 4. Visualization of the fibrin network in the developed stage which is formed (a) in the microchannel (in flow) and (b) in the well (in stationary fluid).

図5(a)に流路下壁に付着した血小板を起点として下流方向に $10 \leq t \leq 13\text{min}$ の時刻で形成される個々のフィブリン繊維(サンプル数33)について、形成開始位置と成長の様子を全て重ね合わせた分布を示す。図では原点を個々の血小板の位置とし、黒四角は形成開始より5s毎のフィブリン繊維の先端を表す。また、放物線はフィブリン網の見かけの拡散係数 $D_{\text{fibrin}}$ より求めた95%包括線を示す。

この $D_{\text{fibrin}}$ は以下のように求めた。まず、画像より各フィブリン繊維が主流方向と成す角 $\theta$ に関する確率密度分布を求める。この $\theta$ の確率密度の値 $n_\theta$ は各フィブリン繊維を要素に分割し、その各要素について $\theta$ の値を求めることで算出される。続いて、 $\Delta y_{\text{fibrin}} = l \sin \theta$ の関係を用いて $\theta$ を $\Delta y_{\text{fibrin}}$ へ変換し、 $\Delta y_{\text{fibrin}}$ に関する確率密度分布を求める。ここで、 $l$ は $\Delta t$ の間に各フィブリン繊維が成長した距離の平均値である。そして、 $\Delta y_{\text{fibrin}}$ の確率密

度分布を曲線回帰することで標準偏差 $\sigma$ を求め、この値を用いて $D_{\text{fibrin}}$ を求めた。なお、 $n_0$ はフィブリン繊維の長さが長い程大きくなるように重み付けされるため、 $D_{\text{fibrin}}$ は各フィブリン繊維を分割せずに導出した場合の拡散係数 $D_{\text{true}}$ の値より大きくなるが、 $D_{\text{fibrin}}$ を用いて導出したフィブリン網形成領域は $D_{\text{true}}$ を用いた場合の形成領域を含むと考えられるため、フィブリン網形成領域としても問題はないと考えた。

図5(b)の破線は、マイクロ蛍光粒子の流路内のスパン方向運動の測定により求めた水と血液における物質拡散係数を用いて計算したものであり、原点を起点とした流れの中での物質拡散の範囲を表す。また、図5(a)で示したフィブリン網の見かけの形成範囲も合わせて実線で示す。

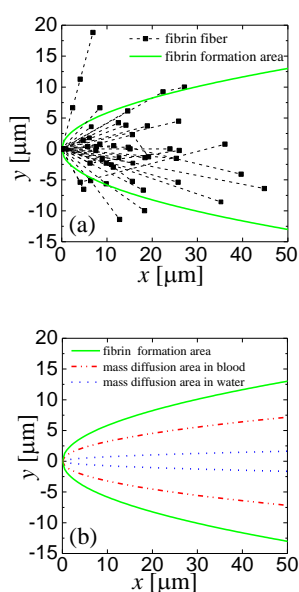


Fig. 5 (a)-top The distributions of fibrin fibers formed from each platelet (the platelet is located at the coordinate origin). (b)-bottom The area of mass diffusion with the released source at the coordinate origin measured by the particle motions in water and blood flows.

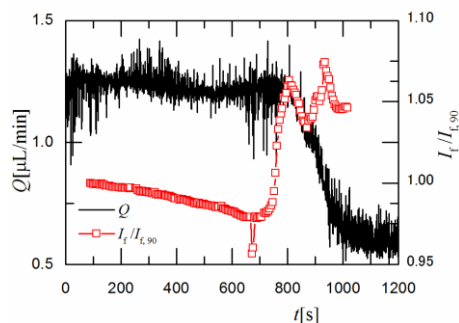
図における分布を比較すると、血中の物質拡散範囲の方が水中よりも大きいことが分かる。これは、血中では血球が存在することにより、流れ場が変化したためである。また、血栓の形成範囲が血流における物質拡散範囲と似た分布を示し、相関を持つ可能性があることが分かる。前者が後者よりも大きい原因は、血流中において下壁に付着した赤血球を含む血球により流れ場や濃度場が変化していることが考えられる。

### 4.3 流路内の血栓形成と温度の関係

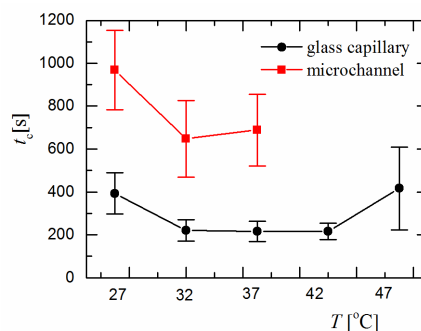
図6(a)の黒線はマイクロ流路に血液を流した場合での流量と時間との関係を示す。また赤の散布図は上記の蛍光標識にて可視化したフィブリン網の蛍光強度分布を示す。約 $t=800\text{s}$ にて流量は減少する。これは血栓が形

成され流動抵抗が増加したためである。これはフィブリン網の蛍光強度が増加したことから裏付けられる。逆に、流量を測定することで血栓の形成時刻が評価できることから、マイクロ流路とキャピラリーにて血液を流したときに流量の変化を測定し、その時刻を血栓形成（凝固）時間 $t_c$ と定義した。

マイクロ流路とキャピラリーの温度を変化させ各温度での $t_c$ を求めた結果を図6(b)に示す。図では流路とキャピラリーの場合とで定性的に同じ温度で $t_c$ は極小となり、血栓形成（凝固）に温度が影響することが分かる。



(a) Time distribution of flow rate and fluorescence intensity



(b) Temperature effects on thrombus formation

Figure 6. Results of microchannel and glass capillary measurements. (a) Relationship between the time distributions for the fluorescence intensity of fibrin fibers and flow rate. (b) Effects of temperature  $T$  on coagulation time  $t_c$ .

4.1 節の可視化で示したように静脈流の条件では血小板の接着と活性化、そしてフィブリン形成が血栓形成の起点となり重要な要素となる。そこでキュベットを用いてフィブリン生成の温度特性を評価した。

キュベット温度を変化させた場合の $t_c$ を測定し、温度との関係性を評価した結果を図7に示す。図に示すように $20^\circ\text{C}$ から温度が増加するに従い $t_c$ は減少し、血栓形成に要する時間が短くなることが分かる。 $t_c$ は約 $37^\circ\text{C}$ で最小値を示し、それよりも高い温度では温度の増加と共に $t_c$ は増大する。

$T > 37\sim 40^\circ\text{C}$ で $t_c$ が増加するのは温度の増加と共にトロンビンの熱変性により酵素反応機能が低下するためであると考えられる。

これに対して  $T < 37^\circ\text{C}$  での温度特性はフィブリン反応の反応速度定数が変化するためと考えられる。

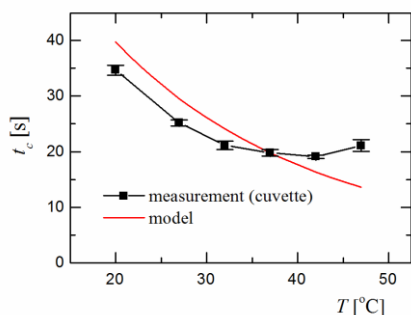
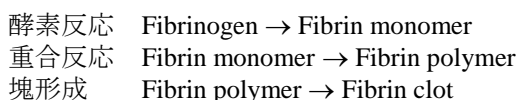


Figure 7. Effects of temperature  $T$  on coagulation time  $t_c$  in the cases of cuvette measurement.

フィブリノゲンからフィブリン塊が形成されるまでの過程は次の3段階の反応から成り立つ。



ここで、試料にトロンビンを添加してからフィブリン塊が形成され始めるまでの反応について速度定数  $k$  の一次反応のみが起きると仮定する。その場合、反応開始から時刻  $t$  におけるフィブリノゲン濃度  $c_{fbg}$  は式(1)で表せる。

$$c_{fbg} = c_{fbg,0} e^{-kt} \quad (1)$$

$c_{fbg,0}$  はフィブリノゲンの初期濃度である。次に、試料を通過する光の強度  $I$  と試料のフィブリノゲン濃度  $c_{fbg}$  の関係を考える。透過光強度と溶質の濃度の関係式として、光を吸収する物質に適用できる Lambert-Beer の式  $\ln(I/I_0) = -\alpha L = -\epsilon c L$  を用いた。ここで  $I_0$  は入射光強度、 $\alpha$  は吸光係数、 $\epsilon$  はモル吸光係数、 $L$  は溶液の厚みである。光を散乱する物質に対しては  $\ln(I/I_0) = -\alpha L = -\tau C$  の関係を用いた。ここで、 $\tau$  は溶液の濁度、 $N$  は溶質の数濃度、 $C$  は散乱断面積である。酵素反応において、酵素分子は触媒として機能した後も繰り返し触媒として働くとする、トロンビンの濃度は凝固反応中で一定である。透過光強度  $I$  とフィブリノゲン濃度  $c_{fbg}$  の関係は係数  $B$ 、 $D$  を用いて式(2)で表される。

$$I = B e^{D c_{fbg}} \quad (2)$$

式(1)と(2)より  $I$  と  $t$  の関係は係数  $E$  と  $k$  を用いて式(3)のようになる。

$$I = B e^{E e^{-kt}} \quad (3)$$

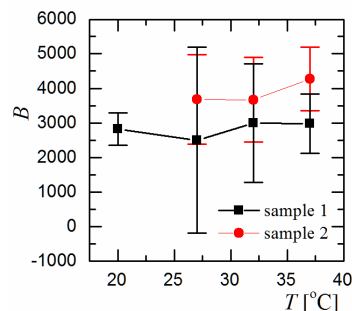
本研究では、実験により得られる透過光強度  $I$  の時間変化の分布に対して式(3)を用いて曲線回帰することで凝固反応の速度定数  $k$  を求める。さらに異なる温度条件で速度定数を求め、アレニウスの式に適用することで速度定数と温度の関係式を導出した。

その結果を図8に示す。図8(a)は定数  $B$

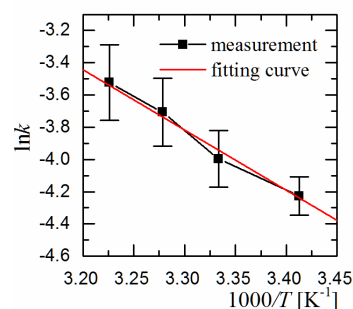
の温度に対する分布を示し、図8(b)は  $k$  と温度との関係を示す。図(b)では速度定数  $k$  は温度と共に増加することが分かる。この  $k$  と  $T$  との関係の曲線回帰した結果は式(4)の通りであり、図に示すように良好に近似できることが分かる。

$$k = 704.1 \exp(-3156/T) \quad (4)$$

最後に得られた反応速度定数  $k$  を用いて凝固時間  $t_c$  と  $T$  との関係を見積もる。この場合、フィブリン濃度が一定の値以上になるとスターラーの回転によりフィブリン塊が形成されると仮定し、さらにその濃度は  $T=37^\circ\text{C}$  の時の  $t_c$  を基に設定した。その結果得られる  $t_c$  と  $T$  の分布を図7に示す。図に示すように  $T < 37\sim 40^\circ\text{C}$  ではモデルにより得られた計算結果は実験と比較してやや大きな値を示すものも、その分布形状は定性的に一致する。このことから式(4)で求めたフィブリン形成の反応速度定数とモデルは妥当であることを示した。



(a)  $T$  effects on coefficient  $B$



(c) Arrhenius plot to  $T$  for  $k$

Figure 8. Measurement results using the cuvette system to obtain the reaction coefficient of the thrombus (fibrin clot) formation and the effects of temperature. (a) shows the temperature effects on coefficient  $B$  of Eq. (3). (b) is the Arrhenius plot to the temperature for reaction coefficient  $k$ .

#### 参考文献

5. 主な発表論文等  
 (研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

① K. Tatsumi, C-H Hsu, A. Suzuki, K. Nakabe, Liquid Temperature Measurement Method in Microchannels by Using Fluorescence Polarization, Heat and Mass Transfer, 2017, s00231-017-2104-6.

② 鈴木淳史, 巽和也, 堀井悟史, 栗山怜子, 中部主敬, 蛍光偏光法を用いたマイクロ流路内流体温度計測, 日本機械学会論文集, B編, 2017, Vol. 83 No. 853, 17-200.

[学会発表] (計 11 件)

1. N. Sugita, H. Hirakata, K. Inoue, K. Tatsumi and T. Murai, Novel Microfluidic Device Development for Venous Thrombus Understanding, International Society on Thrombosis and Haemostasis 2015 Congress, (2015), June 20-25., Toronto.
2. Y. Yamamoto, K. Tatsumi, H. Shirouzu, H. Hirakata, N. Sugita, K. Inoue and K. Nakabe, Measurement of Venous Thrombosis Formation and Mass Transfer Effects in the Initial Stage Using Microchannel Flow, Proc. 20th Int. Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (microTAS-2016), (2016), pp. M099e, October 9-13, Dublin.
3. H. Shirouzu, Y. Yamamoto, S. Noguchi, K. Tatsumi, H. Hirakata, N. Sugita, K. Inoue, R. Kuriyama and K. Nakabe, Measurement of Venous Thrombosis Formation and Mass Transfer Effects in the Initial Stage Using Microchannel Flow, Proc. International Symposium on Micro-Nano Science and Technology 2016, (2016), Dec. 16-18, Tokyo.
4. N. Sugita, H. Hirakata, K. Inoue, K. Koike, K. Tatsumi, S. Ii, H. Niioka, S. Wada, The Blood Components Strongly Affect Thrombus Structure Formed in a Novel Microfluidic Device, International Society on Thrombosis and Haemostasis 2017 Congress, (2017), June 8-13, Berlin.
5. K. Tatsumi, Y. Yamamoto, A. Yanamoto, R. Kuriyama, K. Nakabe, H. Hirakata, N. Sugita, K. Inoue, Thermal Characteristics of Fibrin Clot Formation in Venous Thrombus, 9<sup>th</sup> World Conference on Experimental Heat Transfer, Fluid Mechanics and Thermodynamics, (2017), June 12-15, Iguazu Falls.
6. R. Kuriyama, T. Nakagawa, K. Tatsumi, K. Nakabe, Fluid Viscosity Measurement in Microchannels Using Fluorescence Polarization Imaging, 9<sup>th</sup> JSME-KSME Thermal and Fluids Engineering Conference, (2017), October 31, Okinawa.
7. K. Tatsumi, S. Noguchi, A. Tatsumi, R. Kuriyama, K. Nakabe, Particle and Red Blood Cell Concentration Distributions in Narrow Microchannel Flows with Wall Effects, 6th Micro and Nano Flows Conference (2018), September 9, Atlanta.

8. K. Tatsumi, Y. Yamamoto, A. Yanamoto, H. Hirakata, N. Sugita, K. Inoue, R. Kuriyama, K. Nakabe, Thermal Characteristics Measurement of Fibrin Reaction and Clot Formation in Venous Thrombus Using Microchannel Flow, Proc. 16th International Heat Transfer Conference (IHTC-16). (2018), IHTC16-22842, August 10-15, Beijing.

9. 山本裕亮, 白水仁, 巽和也, 平方秀男, 杉田尚子, 井上京, 中部主敬, 静脈血栓形成と物質拡散の関係解明に向けたマイクロ流路内可視化計測, 流体力学会年会 2016, 2016/9/28.

10. 山本裕亮, 柳本篤則, 栗山怜子, 巽和也, 中部主敬, 静脈血栓機構解明に向けたフィブリン塊形成の温度特性評価-, 第 54 回日本伝熱シンポジウム, 2017/5/25.

11. 野口真之介, 辰巳 朗, 巽和也, 栗山怜子, 中部主敬, マイクロ流路を用いた赤血球の血流内物質拡散に与える影響の評価, 第 30 回バイオエンジニアリング講演会, 2017/12/14.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

巽 和也 (TATSUMI, Kazuya)  
京都大学・大学院工学研究科・准教授  
研究者番号 : 90372854

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

中部 主敬 (NAKABE, Kazuyoshi)  
京都大学・大学院工学研究科・教授  
研究者番号 : 80164268

(4) 研究協力者

平方 秀男 (HIRAKATA, Hideo)  
京都市立病院・研究員  
研究者番号 : 70271509

杉田 尚子 (SUGITA, Naoko)  
京都大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号 : 20750532

栗山 怜子 (KURIYAMA, Reiko)  
京都大学・大学院工学研究科・助教  
研究者番号 : 70781780