

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K12510

研究課題名(和文) 内部構造および力学的性状の異なる血栓はどのように形成されるのか

研究課題名(英文) What is the reason to form the thrombi with different internal structures and mechanical characteristics?

研究代表者

和田 成生 (Wada, Shigeo)

大阪大学・基礎工学研究科・教授

研究者番号：70240546

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：蛍光顕微鏡および電子顕微鏡を用いたマルチスケール観察により、血流場および血液性状の異なる条件で構築された血栓内部のフィブリン線維束の形態構造を評価した。また、フィブリンによる機械特性を反映させた血液凝固過程の巨視的数理モデルおよびプロトフィブリル凝集によるフィブリン線維網形成の微視的数理モデルにより、様々な条件における血栓形成過程を数値的に再現し評価した。これにより、血流場および血液性状が、フィブリン凝集塊の形態構造と密接に関連し、血栓全体の力学性状を決定する一要因と成る可能性があることを示した。

研究成果の概要(英文)：Morphological structures of the bundle of fibrin fibers in thrombi formed under several blood flow and blood characteristic conditions were evaluated by multi-scale observations using fluorescence microscopes and electron microscopes. In addition, thrombus formation processes under several mechanical and physiological conditions were numerically reproduced by a macroscopic mathematical model for blood coagulation processes including a mechanical response of fibrin clots and microscopic model for fibrin-fiber network formation based on protofibril aggregations. These evaluations indicate that the blood flow and blood characteristics are highly related to the morphological structure of fibrin clots and would be one of the factors to determine a mechanical feature of the thrombus.

研究分野：バイオメカニクス

キーワード：血栓 フィブリン 線維網 顕微鏡観察 画像処理 血液凝固モデル ファイバー分散要素 ブラウン動力学

1. 研究開始当初の背景

血栓の主な役割は血管損傷部位において血塊を作り止血する事である。その形成から消失(線溶)の過程に何らかの問題が生じると、血塊が崩壊あるいは剥離し血流に運ばれて末端側の細い血管を閉塞し(血栓塞栓症)、脳梗塞や心筋梗塞の原因となる。医学的に血栓は、白色血栓と赤色血栓およびその中間に属する混合血栓に分類され、これらは文字通り肉眼で見た色調と対応する。この色調の由来は血栓内部に存在する血小板と赤血球および凝固系で析出した線維状フィブリンの多寡によるものである。フィブリンは血液凝固反応の過程で重合を起こし、網目状の形態構造を取ることで血栓を補強する。よって、血栓の力学的正常はフィブリンや血球を含めた内部構造と密接に関連しており、どのような条件下で内部構造の違いが引き起こされるかを明らかにすることができれば、血栓塞栓症などのトリガとなる血塊崩壊の予測から投薬治療予測への展開に繋がっていくと考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、“内部構造および力学的性状の異なる血栓はどうして形成されるのか”という問いに対し、“血流場の違いにより内部構造および力学的性状の異なる血栓が形成される”という仮説を立てアプローチすることで、その根底に潜むメカニズムを解き明かすことを目的とする。

3. 研究の方法

研究目的を達成するため、in vitro 実験・内部構造観察およびマルチスケール力学シミュレーションによるアプローチを試みた。実験観察では、(1) 蛍光顕微鏡および電子顕微鏡により血栓内部の観察を行うとともに、(2) 得られた画像からフィブリン線維を抽出する画像処理法の提案を行い実際の画像で評価を行った。数値シミュレーションでは、(3) フィブリンによる機械特性を反映させた血液凝固過程の巨視的数理モデル、および、(4) プロトフィブリル凝集によるフィブリン線維網形成の微視的数理モデルの構築を行い、現象の解明を試みた。

(1) マイクロ流路内に人血液を流す in vitro 実験において、血液中の血球成分や血流速度など種々の条件で血栓サンプルを作成し、様々なスケールにおける観察アプローチにより血栓内部構造を観察した(図1)。フィブリンノーゲンおよび血小板を蛍光染色し作成された血栓サンプルに対し、蛍光顕微鏡・共焦点顕微鏡および二光子顕微鏡を用いて蛍光画像を取得し、数十マイクロ~数ミリメートルスケールでのフィブリンと血小板の空間分布を調査した。これに加え、得られた血栓試料に対し、固定・洗浄・染色・脱水・置換・樹脂包埋を施し、透過型電子顕微鏡・イオンビーム集束型電子顕微鏡および超高压電子

顕微鏡を用いて、数十ナノ~数マイクロメートルスケールにおける血栓内部構造を観察し、フィブリン線維・赤血球および血小板の空間分布を調査した。

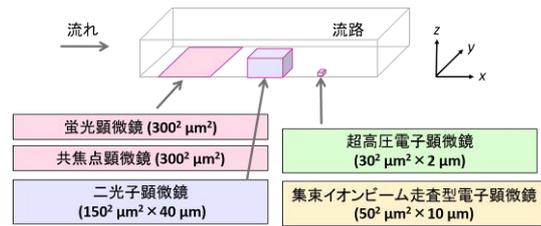


図1 マルチスケール血栓内部観察

(2) フィブリンノーゲンの蛍光スライス画像に対し、離散フーリエ変換を施し輝度全体の配向性を調べることで、フィブリン線維の配向性を評価した。この際、別のモダリティで取得した三次元画像セットに拡張できるように、独自でプログラム開発を行った。これに加え、フィブリン線維束レベルでの評価を行うため、レベルセット関数を用いたセグメンテーション手法を発展させた。本研究では、レベルセット関数の勾配不連続部と距離が線維束の幅と対応することを利用することで、線維束太さを評価した。

(3) 静脈血栓を対象とし、巨視的な場での血栓生成を扱うため血流・生化学反応連成解析手法の構築を行った(図2)。血液を非圧縮粘性流体、血栓を粘弾性体として構成方程式を適用し、オイラー型および混合定式化により直交格子を用いたシミュレーションモデルを構築した。また、ひずみエネルギーによる結合解離状態変化を確率的に扱うアプローチにより血栓破壊の再現を試みた。

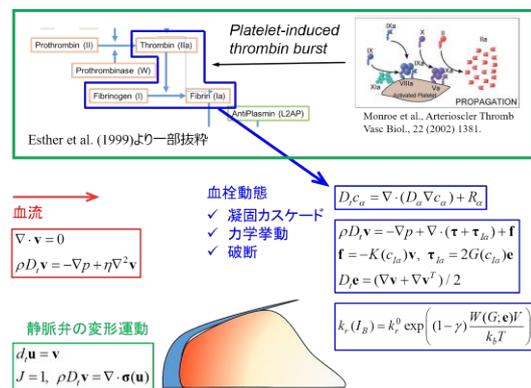


図2 静脈血栓を対象とした、フィブリンによる機械特性を反映させた血液凝固過程の巨視的数理モデル

(4) フィブリン前駆体であるプロトフィブリルの凝集現象を扱うことが可能な物理シミュレーションモデルを構築した。単一のプロトフィブリルの力学挙動を再現するために、

伸縮・曲げおよびねじりに対する離散要素を組み合わせたファイバーモデルを構築し、溶媒分子との相互作用を統計的に扱うランジュバン方程式を運動方程式に採用した。また、ファイバーモデル間に作用するポテンシャルを考慮することで、プロトフィブリル同士の接触および凝集を扱った(図3)。

プロトフィブリルの離散モデル



慣性項を無視したランジュバン方程式(ブラウン動力学)

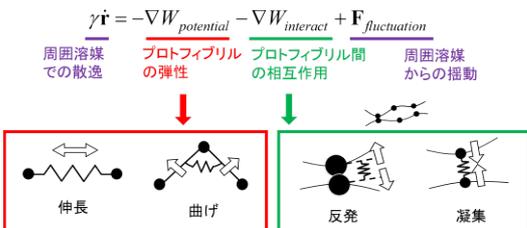


図3 プロトフィブリル凝集によるフィブリン線維網形成の微視的数理モデル

4. 研究成果

(1) 共焦点顕微鏡による観察では、数マイクロ~数十マイクロメートルに渡り、フィブリン線維束が網目構造を有することを確認した(図4)。流れがほぼない低せん断速度(0.35 1/s)において、フィブリン線維束はランダムに配向しているのに対し、静脈の流れに相当するせん断速度(5.56 1/s)においては、フィブリン線維束が流れ方向に配向している様子が確認された。血小板の蛍光画像と比べたところ、両条件において、底面における網目構造の起点に血小板群が存在していることを確認した。これらより、血栓形成時の血流速度がフィブリン線維束の網目構造の配向性に影響を与えることを示し、また底面における網目構造の起点と接着血小板との間に関連があることを示した。

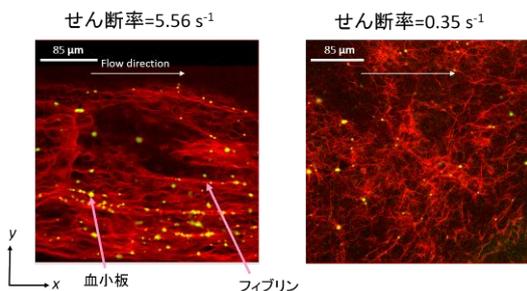


図4 異なるせん断率での流れ場において、共焦点顕微鏡により取得した血小板とフィブリノーゲンの蛍光画像。

二光子顕微鏡による観察では、底面から高さ方向にスライス画像を取得した。予備実験として、フィブリノーゲンの蛍光色素に Alexa

Fluor® 546 を用いて画像を取得したところ、血栓内部に多数の赤血球が存在することが確認できた。しかしながら、フィブリン線維を評価するのが困難であったため、赤血球内のヘモグロビンの蛍光を抑えることを狙い、蛍光色素に Alexa Fluor® 647 を用いて画像を取得した。適当な断面における画像を図5に示す。これによりフィブリンのみの蛍光画像が得られたが、画像全体のノイズが深部に行くにつれて大きくなったため、定量的な評価にはいたらなかった。この原因として、赤血球の色素によってレーザが散乱を起こしてしまったことが考えられ、フィブリン線維を評価するには、血球を脱色するなど前処理が必要であることが分かった。

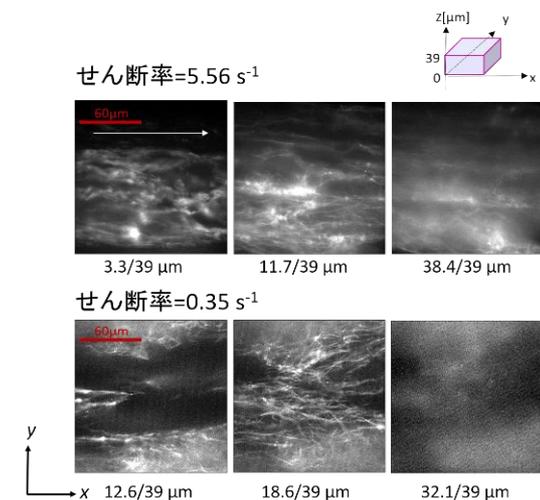


図5 二光子顕微鏡により取得した異なる断面でのフィブリノーゲン蛍光画像。

超高圧電子顕微鏡(大阪大学 超高圧電子顕微鏡センター)による観察より、ナノメートルスケールのフィブリン線維が集まりマイクロスケールのフィブリン線維束を形成していること、フィブリン線維束に赤血球が多く捕獲されていること、フィブリン線維束の一部にマイクロパーティクル(膜小胞体)と思われる粒状物質が捕獲されていることを明らかにした(図6)。

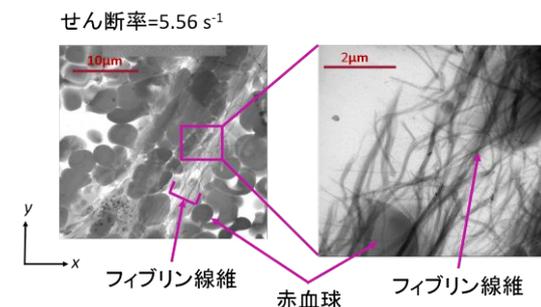


図6 超高圧電子顕微鏡によるフィブリン線維および赤血球の様子。

イオンビーム集束型電子顕微鏡（久留米大学）を用いた観察により，血栓内部の赤血球周囲に存在するフィブリン線維網の三次元構造を予備的に得ることができた．これより，様々な条件における血栓内部のフィブリン線維網および血球らの三次元構造取得の実現可能性を示した．なお，先端バイオイメージング支援プラットフォーム，E04 培養細胞における Volume CLEM 支援による活動支援を受けた．

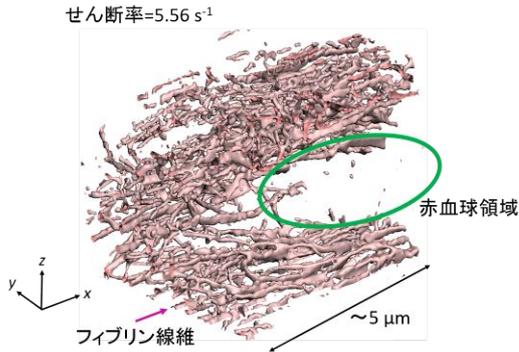


図7 イオンビーム集束型電子顕微鏡画像より再構築したフィブリン線維の三次元形態．

(2) 図8に異なるせん断速度での配向角度()および配向異方差度(AI : Anisotropic index)を示す．これらは，蛍光画像輝度の二次元スペクトルを適当な次数まで和をとり極座標表記したのに対し楕円フィッティングを行うことで評価される値である．図8より，流れがほぼない低せん断速度(0.35 1/s)では配向異方差度が小さくほぼ配向性が認められないのに対し，静脈系を想定したせん断速度(5.56 1/s)では流れ方向に直角するようにスペクトルの値が高い，すなわち流れ方向への高い異方差度(配向性)が確認できた．

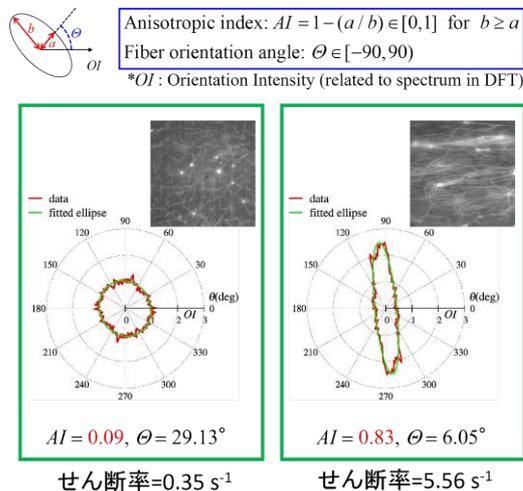


図8 全域における輝度値の離散フーリエ変換を基に評価したフィブリン線維束の配向角度()と配向異方差度(AI)．

図9に異なる血液条件(コントロール，赤血球なし，血小板なし)で得られたフィブリンノーゲン蛍光画像に対して，レベルセット関数を用いたセグメンテーション処理の結果およびそれにより評価された線維束の幅を示す．本手法により，ノイズを含み輝度レベルにばらつきがある画像においても，フィブリン線維束を良く抽出できていることが確認できた．さらに，3~6ピクセルレベルで線維束が捉えられ，その幅が評価可能であることを示した．通常の血液条件であるコントロールに比べ，赤血球なしの条件では線維束は細くなるが，血小板なしの条件では線維束の太さは二つのピークを持ち分布することが示された．

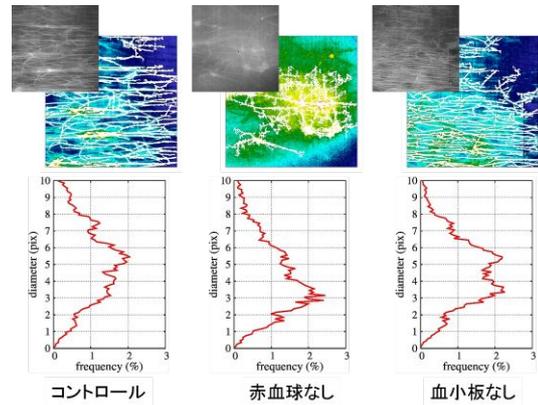


図9 異なる血液条件において得られたフィブリンノーゲン蛍光画像に対する，レベルセット関数を利用したセグメンテーション処理の様子と評価されたフィブリン線維束太さ(diameter, ピクセル単位)のヒストグラム．

(3) 深部静脈血栓を対象とし解析系を構築しシミュレーションを行ったところ，筋収縮ポンプによる流体加速が血栓成長を促進し，さらには形成血栓の形態に依存し血栓内のひずみエネルギーに局在性が出ることを明らかにした(図10)．本解析においては，破断による血栓破壊を再現するにはいたらなかったため今後の検討課題であるが，微視的モデルにより得られた知見を反映することが可能な巨視的モデルの実現可能性を示すことに成功した．

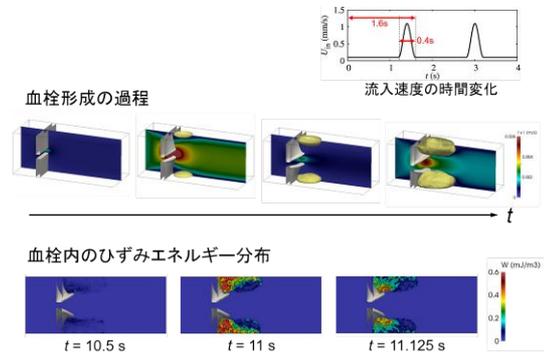


図10 静脈弁後方における血栓形成過程の数値再現結果．

(4) 立方領域内 (3 マイクロ立方メートル) にファイバーモデルをランダムに配置し周期境界条件のもと時間発展シミュレーションを行った。図 11 に本計算結果および同様の条件で得られた走査型電子顕微鏡 (SEM) 画像の結果を示す。ファイバーモデルは揺動的な運動をしながら線維状の凝集形態をとるとともに分岐をとまなう凝集網を形成することを確認した。これらは実際の観察結果と整合しており、提案モデルの妥当性を示すことができた。また、ファイバーモデルの曲げ剛性を変えてシミュレーションを行ったところ、揺動力とのバランスにより運動中のファイバー形態が変化し最終的な凝集網の形態に影響を与えることが分かった。これらより、プロトフィブリルの力学特性変化が最終的なフィブリン凝集形態および凝集塊の力学特性に影響を与えることが示唆された。

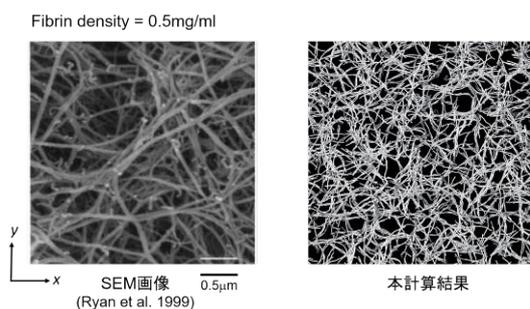


図 11 走査型電子顕微鏡 (SEM) 画像 とプロトフィブリル凝集モデルにより計算されたフィブリン線維網の比較。

次に、十マイクロメートルオーダーの直方空間で底面固定条件を課した解析系において、静止場およびせん断流化でのフィブリン凝集塊の形成過程を数値的に再現した (図 12)。両条件において、解析時間 20 ms での線維の配向性を評価した。静止場では、底面を起点とした高さ方向への高い配向性が見られた一方、せん断下では流れ方向への高い配向性が見られた。さらに、せん断下ではより大きな網目構造となることが明らかとなった。

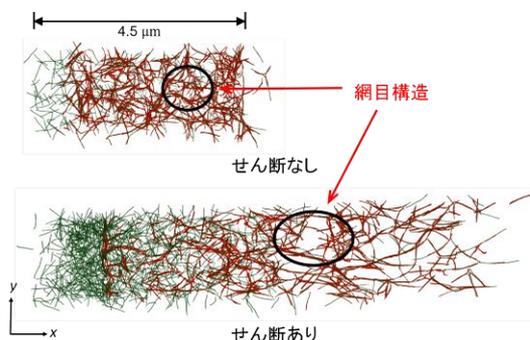


図 12 せん断場の有無によるフィブリン凝集形態および線維束の網目構造の違い。

本解析において、線維伸長に関するポテンシャルエネルギーが高い値を持つものを評価したところ、高い伸縮エネルギーを持つプロトフィブリルは、静止場ではばらばらに存在する一方、せん断流下においてはより近くに集まり結合していることが分かった (図 13)。これらの結果から、せん断流下では、プロトフィブリルが配向性を持つことで部分的に高い伸縮エネルギーを持つ線維束が形成され、剛性の高いフィブリン凝集塊が形成されることが示唆された。これは、血流速度により剛性の異なる血栓が作られる機序の一要因であると考えられる。

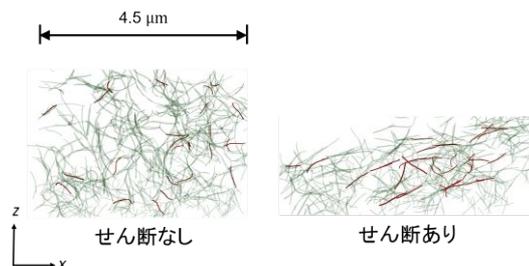


図 13 せん断場の有無が線維伸長の空間分布に与える影響。赤色で示される線維は、任意に定めた閾値より高い伸長を示す。

研究全体のまとめとして、種々の条件において形成された血栓の実験観察およびそれを想定し再現した数値計算により、血流場および血液性状が、フィブリン凝集塊の形態構造と密接に関連し、血栓全体の力学性状を決定する一要因と成る可能性があることを示した。本研究成果をもとに、血球成分の多寡による影響を今後検討することで、血流場と血栓の内部構造および力学性状との関連のより詳細な解明に繋がると期待される。

< 引用文献 >

Yeo et al., Int J Numer Meth Biomed Eng, 30, 2014, 232-248.

Sugiyama et al., J Comput Phys, 230, 2011, 596-627.

Rian et al., Biophys J, 77, 1999, 2813-2826.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

榎崎 凌伍, 伊井 仁志, 武石 直樹, 越山 顕一朗, 重松 大輝, 和田 成生, 離散要素を用いたフィブリン凝集塊形成におけるメゾスコピック数値アプローチ, 計算力学講演会講演論文集, 査読無, 30, 2017, 067 (2 頁)

<https://doi.org/10.1299/jsmecmd.2017.30.067>

榎崎 凌伍, 伊井 仁志, 武石 直樹, 越山 顕一朗, 重松 大輝, 和田 成生, プロトフィブリル凝集モデルを用いたフィブリン凝集塊形成シミュレーション: 凝集塊の形態学的特徴の評価, バイ

オエンジニアリング講演会講演論文集，
査読無，2017，2E07(1頁)。

平方 秀男，杉田 尚子，井上 京，巽 和
也，栗山 怜子，伊井 仁志，新岡 宏彦，
和田 成生，小池 薫，村井 俊哉，静脈
血栓フィブリン構造変化 血小板数，ヘ
マトクリット値の影響，日本バイオロ
ロジー学会誌(電子版)，査読無，31(2)，
2017，88(1頁)
<http://www.biorheology.jp/br.html>

他2件

〔学会発表〕(計8件)

榎崎 凌伍，伊井 仁志，武石 直樹，越
山 顕一郎，重松 大輝，和田 成生，離
散要素を用いたフィブリン凝集塊形成
におけるメソスコピック数値アプロー
チ，日本機械学会第30回計算力学講演
会，2017。

榎崎 凌伍，伊井 仁志，武石 直樹，越
山 顕一郎，重松 大輝，和田 成生，プ
ロトフィブリル凝集モデルを用いたフ
ィブリン凝集塊形成シミュレーショ
ン：凝集塊の形態学的特徴の評価，日本
機械学会第30回バイオエンジニアリ
ング講演会，2017。

Satoshi Ii, Yukiho Ishida, Shigeo Wada,
Multiphysics Coupling Simulation of
Thrombus Growth in Blood Flow through
Venous Valve based on Continuum Scale
Approach, 12th World Congress on
Computational Mechanics (WCCM XII),
2016.

平方 秀男，杉田 尚子，井上 京，巽 和
也，栗山 怜子，伊井 仁志，新岡 宏彦，
和田 成生，小池 薫，村井 俊哉，静脈
血栓フィブリン構造変化 血小板数，ヘ
マトクリット値の影響，第40回日本バ
イオロジー学会年会，2017。

他4件

6. 研究組織

(1) 研究代表者

和田 成生 (WADA, Shigeo)
大阪大学・大学院基礎工学研究科・教授
研究者番号：70240546

(2) 研究分担者

伊井 仁志 (Ii, Satoshi)
大阪大学・大学院基礎工学研究科・助教/特
任准教授
研究者番号：50513016

越山 顕一郎 (KOSHIYAMA, Kenichiro)
大阪大学・大学院基礎工学研究科・助教/講
師
研究者番号：80467513

新岡 宏彦 (NIIOKA, Hirohiko)

大阪大学・大学院基礎工学研究科・助教
研究者番号：70552074

大谷 智仁 (OTANI, Tomohiro)
大阪大学・大学院基礎工学研究科・助教
研究者番号：40778990

武石 直樹 (TAKEISHI, Naoki)
大阪大学・大学院基礎工学研究科・助教
研究者番号：30787669

(3) 連携研究者

平方 秀男 (HIRAKATA, Hideo)
独立行政法人国立病院機構・展開医療研究
部・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