

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 7 月 9 日現在

機関番号：82626

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2019

課題番号：16K12923

研究課題名（和文）メカニカルストレスによる血液凝固反応抑制メカニズムの粘弾性学的定量評価

研究課題名（英文）Quantitatively viscoelastic evaluation of the inhibition mechanism of blood coagulation reaction by mechanical stress.

研究代表者

丸山 修（Maruyama, Osamu）

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究部門付

研究者番号：30358064

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：血液にメカニカルストレス（せん断応力）を負荷し、粘弾性学的な評価を行うことによって、血液凝固反応が抑制されることを明らかにできた。血液凝固に関しては、血漿タンパク中の血液凝固第V因子が、血液凝固反応に大きく関与することが証明された。また、出血に関しては、同じく血漿タンパクであるフォンビル・ブランド因子の崩壊量が、同環境のメカニカルストレスを負荷しても異なり、出血しやすい血液と出血しにくい血液に分類されることが本実験で明らかとなった。本実験から、メカニカルストレスに対して血液凝固第V因子とフォンビル・ブランド因子が血液凝固反応抑制に深く関与するメカニズムが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

循環器系人工臓器を使用した治療を行うときの重篤な合併症が「血栓」と「出血」である。研究者たちは経験的に、「血液に流動を与えないと凝固する」ということを認識しているが、どの程度の流動（メカニカルストレス）をどの程度の時間与えると、血栓形成がどの程度抑制されるかの詳細は明らかではなかった。出血は、凝固とは反対の意味にとらえられるが、血液凝固反応抑制が極端に進行した例である。本研究を実施したことにより、メカニカルストレスに関与するこれらのタンパク量を検査することにより、血栓や出血を抑えることが可能となる。本研究で得られた成果は、循環器系人工臓器の機種選択や運転至適条件に大きく貢献できる。

研究成果の概要（英文）：It made clear that blood coagulation reaction rate was inhibited by the quantitatively mechanical stress loading (shear stress) to the human blood followed by the rheological evaluation, utilizing the custom-made shear stressor developed in our laboratory. The mechanism is as follows; regarding the blood coagulation, it was verified the blood coagulation factor V presented in a human plasma was related to the blood coagulation reaction. On the other hand, regarding the bleeding, the residual amount of von Willebrand factor after sheared was different even under the equal shear condition, that means human patients' blood with circulatory medical device such as artificial heart, was classified into blood that easily bleeds and blood that does not easily bleed. These results are very effective to the cardiovascular surgeons who select and/or drive the suitable medical device.

研究分野：生体工学

キーワード：メカニカルストレス せん断応力 人工臓器 血液 血栓 血液凝固第V因子 出血 フォンビル・ブランド因子

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

我が国において心疾患は死因の第二位に位置しており、中でも重篤な心疾患である虚血性心疾患の国民医療費は 7,421 億円に及んでおり、さらに症状が進行すると、心移植を前提とした治療が必要となる<sup>1)</sup>。開心手術や心肺停止時の救命用に使用する数時間使用の体外循環ポンプ、ならびに心移植へのつなぎとなる人工心臓は、このような重症心疾患患者救命のために必要不可欠な医療機器である。人工心臓のような血液循環に使用する医療機器として血液ポンプが利用されており、近年では血栓抑制に優れたモデルが数多く発表されている<sup>2)</sup>。しかしながら、実際の治療においては、依然として血液ポンプ内に生じる血栓の問題は解決しておらず、医療従事者は機械的な血液ポンプ駆動条件の調整と生物学的な薬剤投与量の組み合わせに苦心している。これは血液凝固反応におけるメカノバイオロジー的視点の基礎研究が不十分であることが背景にある。

1) 虚血性心疾患の年間医療費は 7,421 億円 平成 24 年度国民医療費の概況 Available from <http://mhlab.jp/malab-calendar/2014/11/011872.php> [Accessed on Oct. 2015]

2) James KK, David CN, Francis DP, et al. Sixth INTERMACS annual report: A 10,000-patient database. J Heart Lung Transplant 2014; 33: 555-564

### 2. 研究の目的

我々は、メカニカルストレス、すなわちせん断応力をかけた時の血液凝固時間および血栓形成量を定量的に評価することに成功した。心疾患患者救命のための血液ポンプが使用されている臨床現場では、血流量調整のためポンプ回転数を低下させることがあるが、回転数の低下に基づいて血流が停滞し、血液凝固による血栓が生じるリスクが高くなることが経験的にわかっている。しかし、具体的にどの程度のせん断応力になった時に血栓形成が生じるかについてはほとんどわかっていない。そこで、本研究ではレオメータをして、種の異なる複数の血液にせん断応力を負荷し、せん断応力による血液凝固反応抑制メカニズムを明らかにすることで、血栓形成リスクを粘弾性学的に評価する。

### 3. 研究の方法

本研究で実施する *in vitro* 血液凝固実験は、完全に生体内の挙動を反映することはできないが、実験系はシンプルであるため、循環器系医療機器デバイスについて、特にせん断応力の影響を定量的に評価できることが明らかである<sup>3)</sup>。また、ウシ血液では、せん断応力は主に内因系凝固経路の化学反応を抑制することがわかっている<sup>4)</sup>。内因系凝固経路には、血液凝固第 XII 因子 (XII と表記) 血液凝固第 XI 因子 (XI) 血液凝固第 Ⅸ 因子 (Ⅸ) および血液凝固第 Ⅷ 因子 (Ⅷ) の全部で 4 つの因子がある。しかしながら、それぞれどの因子がせん断応力に対して応答性を有して血液凝固を抑制しているのかについては、わかっていない。一方、本実験系において、せん断応力に対して活性化する血小板系の影響に関しても十分にはわかっていない。さらに、ウシ血液での血液凝固因子の分析は、ヒト血漿用試薬を用いて相対的に増減を確認しただけであり、定量評価には至っていない。そこで本実験では、ヒト血液を試験血液として固定し、レオメータを使用して、内因系および外因系凝固因子活性、血小板第 4 因子濃度およびフォンビル・ブランド因子マルチマー解析により、凝固系及び血小板系のせん断応力に対する挙動を計測し、どの因子がせん断応力に対して必須であるかを明らかにする。図 1 および図 2 に本実験で使用するレオメータの概略を示した。本実験の計画時は、図 1 のみのレオメータであったが、より大きいせん断応力を負荷するために、図 2 の新規レオメータも導入した。

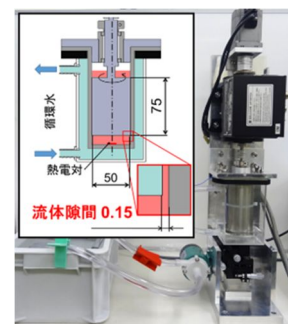
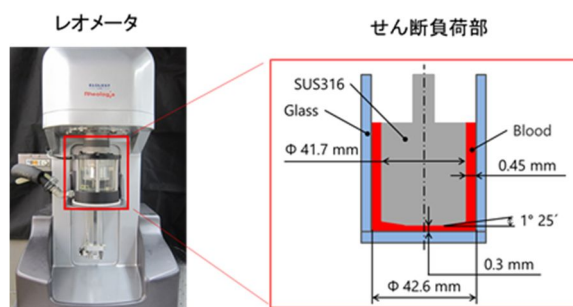


図 1 低メカニカルストレス用レオメータ

図 2 高メカニカルストレス用レオメータ

図 1 および図 2 のレオメータは、双方ともせん断負荷部は、内筒と外筒から構成されているが、図 2 の低メカニカルストレス用は、流体安定性のため外筒が回転する仕組みとなっており、図 3 の高メカニカルストレス用は、高速回転のため内筒回転型である。せん断応力として、低メカニカルストレス用は最大で 8.6Pa まで、高メカニカルストレス用は 120Pa まで負荷できる仕様となっている。ヒト血であるため、ヒト血漿試薬による分析を正確に実施できる。

ウシおよびブタ血液について、ヒト血と同じ実験を実施した。血液ポンプの開発途中における動物実験では、その動物に固有の血栓形成挙動を解明することが、実験中の抗血栓性対策において重要である。これらの動物は、血液ポンプの開発において、動物実験でよく使用される種であ

る。血液凝固因子活性および血小板系機能計測における分析については、ヒト血液試薬を使用して補正を行い計測した。

3) Maruyama O et al, Simple in vitro testing method for antithrombogenic evaluation of centrifugal blood pumps, *ASAIO J* 2009; **55**:314-322

4) Maruyama O et al, In vitro thrombogenesis resulting from decreased shear rate and blood coagulability, *International Journal of Artificial Organs*, **39**(4), 194-199, 2016

#### 4. 研究成果

##### (1) ヒト血液のメカニカルストレスによる血液凝固反応抑制

試験検体としてクエン酸ナトリウム抗凝固ヒト血液、およびヒト血液を遠心分離して採取したヒト血漿を使用した。これらのヒト試料を使用した実験は、産業技術総合研究所生命倫理委員会の承認を得て行った。せん断応力を血液および血漿に負荷する方法として、せん断負荷装置である外筒回転式二重円筒型レオメータを使用した。試験血液 5.00 mL をせん断負荷部に入れ、せん断応力の指標として、せん断速度  $2,880 \text{ s}^{-1}$  (8.6Pa) で3時間、37℃でせん断負荷を加えた。その結果、せん断速度負荷後のヒト血液の APTT はせん断速度負荷前と比較して有意差は見られず(図 3)、PT は 14.8% 有意に延長した(図 4)。また、血液凝固第 V 因子の反応を特異的に反映する PT が 21.3% 有意に延長した(図 5)。一方、せん断速度負荷後のヒト血漿の APTT はせん断速度負荷前と比較して 118.8% 延長し(図 6)、PT は 74.9% 延長した(図 7)。これに伴い内因系に關与する血液凝固因子のうち、第 X 因子の反応を反映する APTT は 2.9% 延長、第 V 因子では 13.5% 延長、第 X 因子では 3.7% 延長、第 V 因子では 48.7% 延長、および第 II 因子では 3.0% 延長した(図 8)。外因系に關与する凝固因子のうち、第 V 因子の反応を反映する PT は 52.4% 延長し、第 II 因子では 1.7% 短縮した(図 9)。また、せん断負荷前の反応時間から、外因系に關与する血液凝固因子は第 X と V、II 因子の順に外因系全体の反応に影響することが分かった。これらの結果から、特に血球を含まない血漿の結果から、ヒト血液にせん断速度を負荷すると、主に血漿中の血液凝固第 V 因子の反応が抑制されることで、血液凝固因子全体の反応が抑制されることが分かった。また、このせん断負荷条件は、フォンビル・ブランド因子マルチマーが分解されるせん断応力であることを確認した。

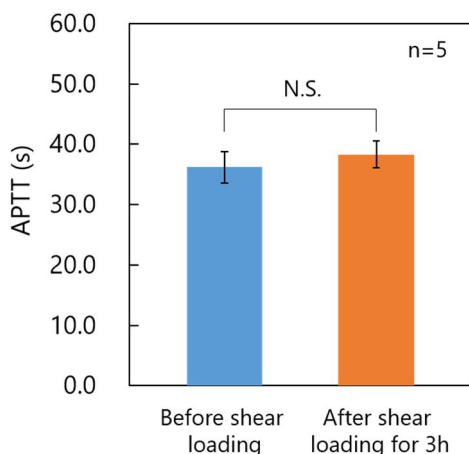


図 3 ヒト血液(全血)のメカニカルストレス負荷後の APTT

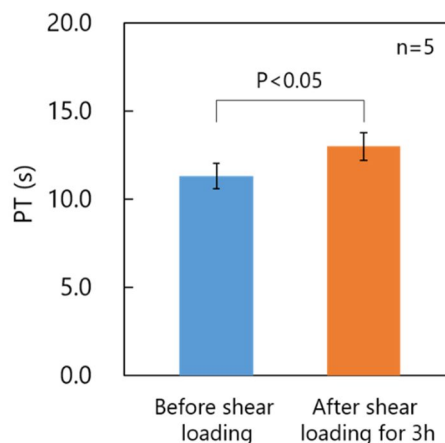


図 4 ヒト血液(全血)のメカニカルストレス負荷後の PT

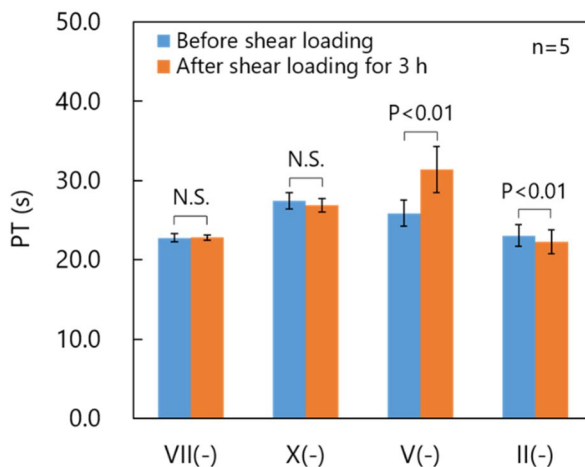


図 5 ヒト血液(全血)の各血液凝固因子活性を反映する PT

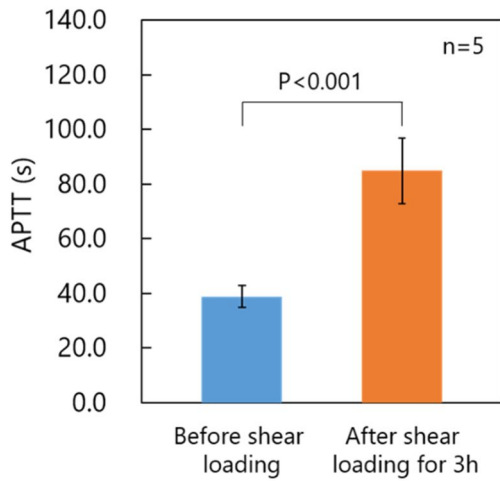


図 6 ヒト血漿のメカニカルストレス負荷後の APTT

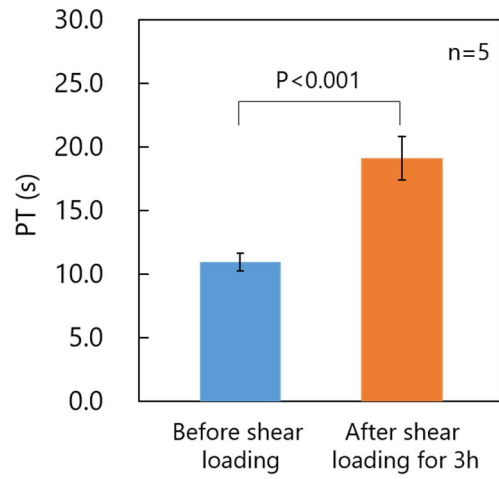


図 7 ヒト血漿のメカニカルストレス負荷後の PT

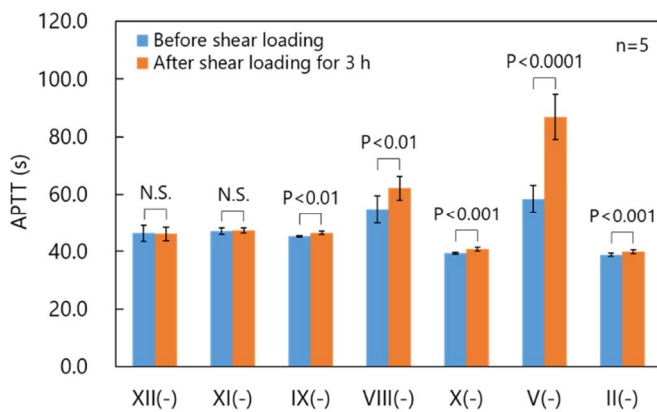


図 8 ヒト血液(全血)の各血液凝固因子活性を反映する PT

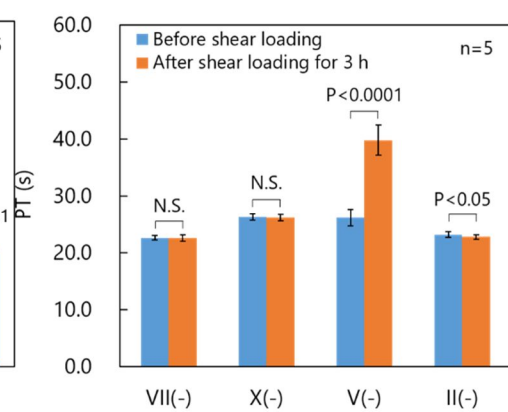


図 9 ヒト血液(全血)の各血液凝固因子活性を反映する PT

### (2) ウシおよびブタ血液のメカニカルストレスによる血液凝固反応抑制

ウシおよびブタ血液のメカニカルストレス、すなわちせん断速度の大きさに基づく血栓形成時間( $t_c$ )および血栓形成量( $C_R$ )をヒト血液と比較して図 10 に示した。数値は、各試験血液の活性化凝固時間(ACT)を示している。ウシ血液では、せん断速度の増加に伴って、ACT190s と 242s では増加しなかったが、261s と 296s では増加した。ACT242s と 261s に注目すると、わずか 19s の ACT 増加が、血液凝固時間を著しく延長させた。一方で、ACT が異なる試料で  $t_c$  が異なっていたにもかかわらず、 $C_R$  は同じ抑制傾向を示し、最終的にできる血栓量はほとんど同じであり、また ACT261s と 296s では、最高せん断速度の  $2,880s^{-1}$  で  $C_R$  はゼロになり、せん断応力だけで完全に血栓を抑制できることが示された。

ブタ血液では、ACT84s から 366s までの全試料において、せん断速度の増加に伴って、 $t_c$  は増加せず初期値と同じか、あるいは若干減少しており、血栓形成を促進する結果も見られた。しかしながら、 $C_R$  はすべて同様の減少を示しており、ウシ血液と同様に、血栓形成度は高せん断速度域で抑制されることがわかった。また、注目すべきは、ブタ血は ACT を 366s まで増加させても高せん断速度域において  $C_R$  はゼロにならず、ウシ血液とは異なり、せん断速度だけで血栓を抑制させることはできなかった。

ヒト血液では、せん断速度の増加に伴って、すべて  $t_c$  の増加が見られた。また、ACT285s 以上、低せん断速度域で活性化する傾向を示した。また、ウシ血、ブタ血と同様に、 $C_R$  はせん断速度の増加に伴って、ACT の値に関係なく減少した。しかしながら、ブタ血とは異なって  $2,880s^{-1}$  においては、すべての血液試料で  $C_R$  はゼロになり、完全に血栓は抑制されることがわかった。

### (3) ヒト血液のメカニカルストレスによる出血現象

一方、メカニカルストレスに対する「出血」に関する血液凝固因子について、試験検体としてクエン酸ナトリウムを主成分とする抗凝固剤で抗凝固したヒト血液(日赤提供の献血液、全血)およびヒト血液を遠心分離したヒト血漿を使用した。これらのヒト血液試料を使用した実験は、産業技術総合研究所生命倫理委員会の承認を得て行った。せん断応力を血液および血漿に負荷する方法として、図 2 に示す高メカニカルストレス用内筒回転式二重円筒型レオメータを使用した。試験血液 3.6 mL をせん断負荷部に注入し、せん断速度  $10,000s^{-1} \sim 60,000s^{-1}$  で



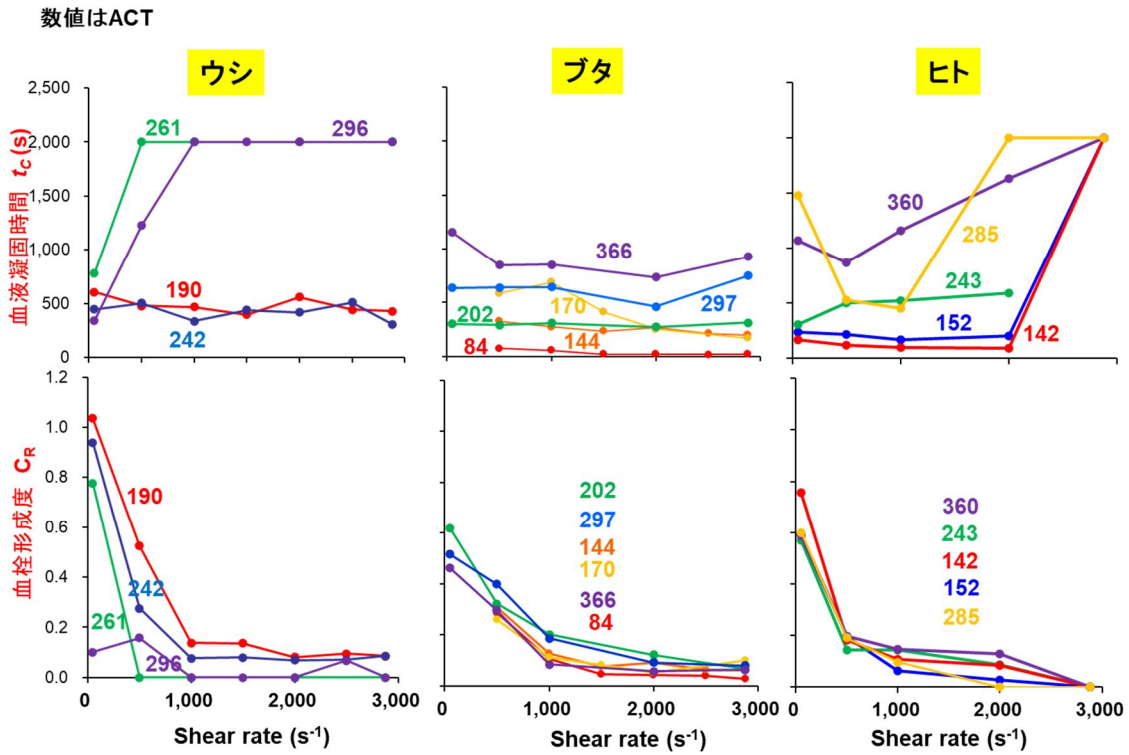


図 10 ウシ、ブタおよびヒト血液のメカニカルストレスの大きさに基づく血栓形成時間  $t_c$  と血栓形成量  $C_R$

30 秒間、37 でせん断負荷を加えた。その結果、全血でも血漿でも、せん断速度の増加に伴って、出血に係る血液凝固因子であるフォンビル・ブランド因子(vWF)高分子マルチマーが分解されることが定量的に見いだされた。粘度で補正したせん断応力に基づく vWF 高分子マルチマーの分解量、すなわち保存率は、全血と血漿ではほぼ同量であることがわかった (図 11(a), (b))。また、血液型に依存する傾向は見られなかったが、健常者であっても、vWF 保存率は大きく異なることがわかった。これらのことから、臨床検査の観点では、全血でなく血漿状態でもせん断応力に対する vWF 保存率を計測することができ、人工心臓や体外循環ポンプのようなせん断応力を発生する循環器系デバイスの装着に先立ち、患者の保存血漿を用いて、デバイスに対する出血耐性を事前評価することが可能であると期待できた。

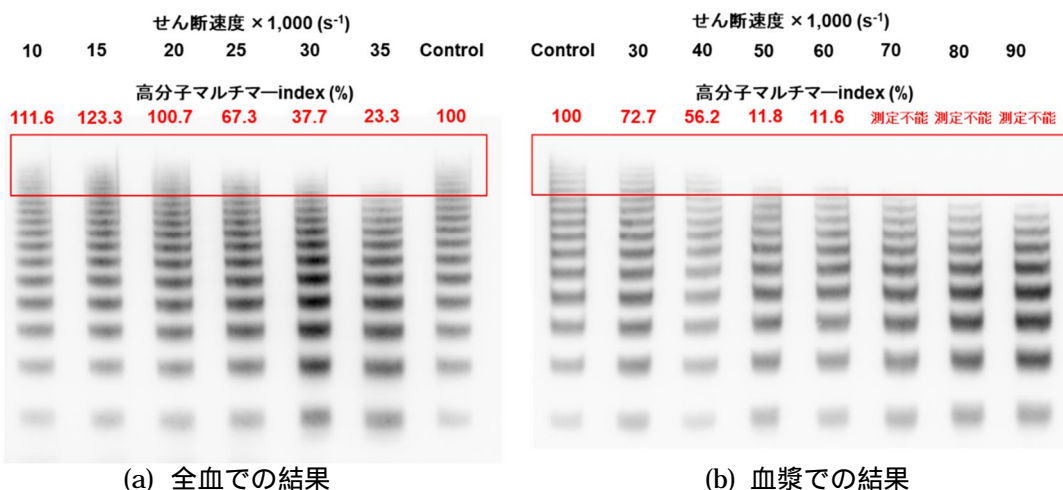


図 11 フォンビル・ブランド因子のメカニカルストレス後の高分子マルチマー残存量

(4) 計画していた動物実験での立証について

最終年度である平成 30 年度に、これまでに得られた in vitro による実験結果を動物実験に応用し、比較実験を実施する予定であった。しかしながら、2018 年 5 月に、所属機関内の異動により、研究部署から離れて事務職を主務とする業務を命ぜられた。元の研究部署に兼務がかかっていたものの、研究業務へのエフォートは激減し、計画通りに研究を進めることができなかった。動物実験への応用は、新たに実験計画を立てて再開したい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 川上滉貴、村重智崇、迫田大輔、小阪亮、西田正浩、川口靖夫、丸山修	4. 巻 38
2. 論文標題 Reaction mechanism of blood coagulation factors in shear flow field	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC), 2016 IEEE 38th Annual International Conference of the IEEE	6. 最初と最後の頁 4309-4312
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1109/EMBC.2016.7591680	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 丸山 修	4. 巻 45
2. 論文標題 せん断応力が血液凝固に与える影響	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 人工臓器	6. 最初と最後の頁 232-236
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 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計19件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 丸山 修、川上滉貴、村重智崇、迫田大輔、小阪 亮、西田正浩、山根隆志、
2. 発表標題 非生理的高ずり応力は血液凝固第V因子に作用し血栓形成を抑制する。
3. 学会等名 第39回日本血栓止血学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 丸山 修、中島翔太、川上滉貴、村重智崇、迫田大輔、小阪 亮、西田正浩、増澤 徹、山根隆志
2. 発表標題 二重円筒型レオメータを使用したせん断流れ場における血栓/溶血定量評価
3. 学会等名 日本機械学会2017年度茨城講演会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 丸山 修、川上滉貴、村重智崇、迫田大輔、小阪 亮、西田正浩、山根隆志
2. 発表標題 ウシ、ブタおよびヒト血液のせん断応力に基づく血液凝固特性の比較
3. 学会等名 第55回日本人工臓器学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 丸山 修、川上滉貴、村重智崇、迫田大輔、小阪 亮、西田正浩、山根隆志
2. 発表標題 せん断応力が血栓形成反応抑制に及ぼす血液凝固反応の定量評価
3. 学会等名 LIFE2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 丸山 修、川上滉貴、村重智崇、迫田大輔、小阪 亮、西田正浩、
2. 発表標題 Shear-Responsive Blood Coagulation Factors Related to Inhibition of Thrombosis,
3. 学会等名 2017 International Conference of Mechanical Circulatory Support, (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 丸山 修、川上滉貴、村重智崇、迫田大輔、小阪 亮、西田正浩、
2. 発表標題 高せん断応力が血液凝固反応抑制に及ぼすメカニズム
3. 学会等名 日本機械学会 第30回バイオエンジニアリング講演会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 丸山 修
2. 発表標題 循環器系人工臓器内で生じる血栓/止血現象の定量評価
3. 学会等名 つくば医工連携フォーラム2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 丸山 修、川上滉貴、迫田大輔、小阪 亮、西田正浩、山根隆志
2. 発表標題 せん断応力による血液凝固反応抑制の定量評価と反応メカニズム
3. 学会等名 第55回日本生体医工学会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 丸山 修、川上滉貴、迫田大輔、小阪 亮、西田正浩、山根隆志
2. 発表標題 非生理的ずり速度における血栓形成抑制メカニズム
3. 学会等名 第38回血栓止血学会学術集会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 丸山 修、川上滉貴、迫田大輔、小阪 亮、西田正浩、山根隆志
2. 発表標題 せん断応力が血液凝固因子の反応速度に及ぼす影響
3. 学会等名 第39回日本バイオレオロジー学会年会
4. 発表年 2016年



1. 発表者名 川上滉貴、迫田大輔、小阪亮、西田正浩、川口靖夫、丸山 修
2. 発表標題 血流によるせん断負荷が血液凝固因子の反応に及ぼす影響
3. 学会等名 日本機械学会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 川上滉貴、迫田大輔、小阪亮、西田正浩、川口靖夫、丸山 修
2. 発表標題 血流せん断応力に影響を受ける血液凝固因子の評価
3. 学会等名 LIFE2016
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 丸山 修、川上滉貴、村重智崇、迫田大輔、小阪 亮、西田正浩、山根隆志
2. 発表標題 In Vitro Quantitative Thrombosis of Bovine, Porcine, and Human Blood under Shear Flow
3. 学会等名 24th Congress of International Society for Rotary Blood Pumps (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 川上滉貴、迫田大輔、小阪亮、西田正浩、川口靖夫、丸山 修
2. 発表標題 Quantitative evaluation of the effect of shear loading on human blood coagulation factors
3. 学会等名 24th Congress of International Society for Rotary Blood Pumps
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 丸山 修、川上滉貴、村重智崇、迫田大輔、小阪 亮、西田正浩、山根隆志
2. 発表標題 動物種の異なる血液のせん断応力に対する血液凝固特性の比較
3. 学会等名 第54回日本人工臓器学会大会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 川上滉貴、迫田大輔、小阪亮、西田正浩、川口靖夫、丸山 修
2. 発表標題 せん断応力に特異的に影響を受けるヒト血液凝固第V因子活性の定量評価
3. 学会等名 第54回日本人工臓器学会大会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 川上滉貴、迫田大輔、小阪亮、西田正浩、川口靖夫、丸山 修
2. 発表標題 せん断速度負荷時の血液凝固反応における血液凝固因子活性の評価
3. 学会等名 つくば医工連携フォーラム2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 川上滉貴、迫田大輔、小阪亮、西田正浩、川口靖夫、丸山 修
2. 発表標題 せん断流れ場における血液凝固因子の反応
3. 学会等名 第16回 産総研・産技連LS-BT合同研究発表会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 川上滉貴、村重智崇、迫田大輔、小阪亮、西田正浩、川口靖夫、丸山 修
2. 発表標題 レオメータを使用したせん断速度に基づく血液凝固反応のメカニズム
3. 学会等名 ライフサポート学会 第26回フロンティア講演会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 せん断応力負荷時のフォンウィルブランド因子高分子マルチマーの保持率のインビトロ測定法	発明者 坂爪 公、齋木佳克、堀内久徳、丸山修、迫田大輔、土方	権利者 産業技術総合研究所ほか
産業財産権の種類、番号 特許、特願2017-186730	取得年 2019年	国内・外国の別 国内

〔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