

機関番号：34416

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2007 ～ 2010

課題番号：19360090

研究課題名(和文)

血管壁表面の糖鎖層の力学的役割

研究課題名(英文)

Fluid mechanical study on the roles of the endothelial surface glycocalyx

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

研究成果の概要(和文)：血管壁の内腔表面には高分子ネットワークで構成される糖鎖の層が存在することが分かり、その生理的意義に関してさまざまな議論がなされている。本研究では、流体力学的観点から、微小血管の血管壁を介する水や溶質の物質輸送と血球への作用に関して糖鎖層の意義を調べた。物質輸送において糖鎖層が分子フィルターの役割を果たす可能性を示し、電荷の影響の重要性を示すとともに、糖鎖層内の電荷密度の推定を行なった。

研究成果の概要(英文)：The presence of fiber matrix layer of proteoglycans and glycoproteins at the surface of vascular endothelial cells has been reported and physiological roles of the layer have been investigated extensively. In the present study, we studied the transport of solute and solvent across the layer and the effect on blood cells, from fluid mechanical point of view. The present analysis has suggested that the layer plays an important role as a molecular filter and indicated significance effects of electric charge on the transport property.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2008年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2009年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
2010年度	3,200,000	960,000	4,160,000
年度			
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

研究分野：流体物理学

科研費の分科・細目：流体力学

キーワード：微小血管、糖鎖層、血球、物質輸送、数値シミュレーション、電荷

1. 研究開始当初の背景

血管壁の内腔表面に糖鎖の層が存在することが明らかとなり、その生理的意義に関して多方面から研究が始まりつつあった。例えば、微小血管の血管内腔から血管外組織への水の輸送量は、糖鎖層を薬物処理により除去すると約 2.5 倍に増加することや、糖鎖層のもつ表面電荷を中性化すると溶質の透過性が大きく変化することなど、血管壁を介した物質輸送に糖鎖層が大きな影響を与えていることが動物実験により指摘されていた。こ

のような実験的研究の進展の一方、そのメカニズムに関する研究は緒に付いたばかりであった。血管壁は血液流れから受ける力学的刺激に応答して機能を発揮することから、糖鎖層の役割を血液流れと関係付けて考えることが重要であると考えられる。従って、流体力学的観点からの研究が必要となるが、(1) 糖鎖層は複雑な配列をもち、その微細構造が近年まで不明であったこと、(2) 細胞レベル(マイクロ・メーター)から分子レベル(ナノ・メーター)までの幅広い取り扱いが必要で

あること、(3) 細胞や溶質表面が電荷を有しているため、電気的な解析が力学的取り扱いと同時に必要であること、などの理由で正確な解析が困難であり、1次元か2次元の近似的な取り扱いに限られてきた。

このような状況の中、2001年にカエルの腸間膜微小血管の糖鎖層の詳細な構造解析が成功し、その微細構造がナノレベルで報告された。さらに、2004年にラット腸間膜の微小血管壁に対して、内皮細胞幾何形状の信頼できるデータが報告された。本研究では、これらの実験データをもとに糖鎖層の解析モデルを構築し、微小血管壁を介する水および溶質の物質輸送と血球への作用に関して解析を行なうこととした。

流体解析では、内皮細胞のサイズである $10\mu\text{m}$ 程度から溶質サイズの数 nm までナノ・メゾ・マイクロの4桁の幅に亘って精度の高い数値解析法が必要であるが、申請者らが開発したスペクトル有限要素法の手法を改良して適用することとした。また、分子動力学法による解析も平行して行うことで、よりミクロな分子レベルからの現象の解明も目指した。また、表面電荷の影響に関して、静電相互作用を取り入れた定式化を行い、生理的な表面電荷密度やイオン濃度の範囲で解析を行なって、実験結果と比較・検討を行なうこととした。

2. 研究の目的

血管壁表面の糖鎖層の生理的意義を、微小血管壁を介する水や溶質の物質輸送と血球への作用に関して、流体力学的観点から明らかにすることを目的とした。

具体的には、(1)微小血管壁を介する物質輸送、(2)物質輸送に対する電荷の影響、(3)白血球に作用する応力の評価と血小板の挙動の解析を行なうこととした。

3. 研究の方法

まず、上に挙げた(1)と(2)の物質輸送に関する研究の手順は、①糖鎖層のモデル化、②血管壁のモデル化、③物質輸送の定式化、④物質輸送係数の評価、⑤電荷の影響の解析、⑥分子動力学法による浸透圧の評価、に分けられる。(3)の血球への作用に関しては、⑦血球に作用する応力の評価法の確立、⑧血管壁近傍の血漿層を含む解析法の開発、⑨マイクロチャネルを用いた血球運動の解析、に分けられる。それぞれの具体的な方法は次の通りである。

① 糖鎖層のモデル化

Squireらは、カエルの腸間膜微小血管の糖鎖層の詳細な構造解析を行った結果、直径 $10\sim 12\text{ nm}$ のコア蛋白質が数珠のように繋がって内皮細胞表面から $150\sim 400\text{ nm}$ の高さまで表面に対してほぼ垂直に伸びており、それら

は内皮細胞表面上で 20 nm 程度の間隔で配置しているという描像を報告した。本研究では、この報告を基に、糖鎖層の数値モデルとして数珠状のコア蛋白質を円柱形状と近似し、それらが内皮細胞表面で丁度六角形の頂点の位置に規則的に配置していると仮定した。円柱の直径や、円柱間の間隔は計測データから決定した。

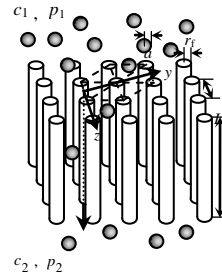


図1 糖鎖層モデル

② 血管壁のモデル化

微小血管の血管内腔から糖鎖層、内皮細胞を介して血管外組織へといった血管壁全体の物質輸送路モデルを構築した。特に、内皮細胞間隙の数値モデルは、ラット腸間膜微小血管の血管壁幾何形状に対する Adamsonらの報告に基づいて、次のように作成した。隣り合う内皮細胞の間には約 20 nm のほぼ一定幅の隙間が2次元状に広がっているが、その中に、細胞膜が密着しているために媒質(水)や溶質が通れない部分が一繋がり存在する (junction strand)。Junction strand にはところどころ数 100 nm の幅で途切れた部分があり、そこを通過して媒質や溶質が運ばれると考えられている。本研究では、内皮細胞を直方体形状と仮定し、隣り合う細胞間の2次元スリット状の隙間を流路として、血管内腔側と血管外組織側間の流れを考える。スリット内には、一定の深さの位置に表面と平行に直線状の junction strand があり、そこに等間隔で孔があるものとした。

③ 物質輸送の定式化

媒質は、血管内腔と血管外組織の間の圧力差(大体 $10\sim 30\text{ cmH}_2\text{O}$)により流れると共に、溶質の濃度差に起因する浸透圧(大体 $20\sim 30\text{ cmH}_2\text{O}$)によっても移動する。このとき、圧力差を Δp 、浸透圧を $\Delta\Pi$ とすれば媒質の流束 J_v は、

$$J_v = L_p(\Delta p - \sigma_v \Delta\Pi) \quad (1)$$

と表すことができる。このとき、 L_p は濾過率、 σ_v は浸透反射率と呼ばれる輸送係数である。

一方、溶質分子は主として移流と濃度差による拡散により運ばれ、両者の比として定義されるペクレ数 Pe を用いると、溶質の流束 J_s は、

$$J_s = P(c_1 - c_2) \frac{Pe}{\exp(Pe) - 1} + J_v(1 - \sigma_f)c_1 \quad (2)$$

と表すことができる。ここで、 c_1, c_2 は上流側と下流側の溶質濃度であり、 P は透過率、 σ_f は濾過反射率と呼ばれる輸送係数である。本研究では、糖鎖層を介する輸送に対して、(1)、(2)式に現れる輸送係数の値を評価する。

④ 物質輸送係数の評価

作成した糖鎖層モデルに対して、(1)、(2)式の濾過率、反射率、透過率を求める。まず、濾過率と浸透反射率として、

$$L_p = \gamma \frac{U_1^*}{\mu \ell} \left(\frac{L}{2} \right)^2, \quad \sigma_v = 1 - \frac{U_2^*}{U_1^*} \exp(-\phi_0^*) \quad (3)$$

の表式が導かれる。ただし、 γ は、糖鎖層の空隙率、 μ は媒質の粘性率、 ℓ は円柱の長さ、 L は隣り合う円柱間の間隔、 ϕ は溶質ポテンシャル(無次元)、 U_1^* と U_2^* はそれぞれ一様圧力勾配と溶質ポテンシャルに起因する流れの流束(無次元)を表す。

また、溶質の輸送に対しては、透過率と濾過反射率が次のように得られる。

$$P = \gamma \frac{D_\infty}{\ell} H, \quad \sigma_f = 1 - W, \quad (4)$$

ただし、

$$H = \int_S \frac{1}{F_t} e^{-\phi^*} dS, \quad W = \int_S \frac{F_0}{F_t} e^{-\phi^*} dS, \quad (5)$$

であり、 F_t は、静止流体中を溶質が並進運動するとき受ける抗力係数を表し、 F_0 は糖鎖層モデル内で静止した溶質に圧力勾配に起因する流れが当たるときの抗力係数を表す。 D_∞ は広い媒質中における溶質の拡散係数である。積分は糖鎖層の断面に対して行なう。

溶質ポテンシャルは、電荷の影響がない場合には、溶質中心が流路壁からその半径以内に入り込めないという幾何学的条件のみを表すが、電荷の影響がある場合には静電的相互作用を含む必要がある。

⑤ 電荷の影響の解析

溶質が表面電荷をもつ場合について、コア蛋白質を表す円柱表面の電荷分布との相互作用が媒質および溶質の輸送に及ぼす影響を調べる。媒質を電解質溶液とし、そのイオンの分布と静電場を Poisson-Boltzmann 方程式を解いて求め、相互作用エネルギーを評価することで、溶質ポテンシャルを求める。その結果を用いて、(3)-(5)式より、濾過率、反射率、透過率の評価を行なう。

⑥ 分子動力学法による浸透圧の評価

溶質分子と媒質分子からなる理想溶液を考え、直方体の容器中央に設けられた半透膜の両側に溶質濃度の異なる溶液を入れたときの分子運動を分子動力学法により解析して、浸透圧の発生を分子レベルで調べる。

⑦ 血球に作用する応力の評価法の確立

細静脈壁に粘着した白血球の観察結果をもとに白血球形状を表す計算メッシュを作成する。白血球モデルの周りの流れ場をスペクトル有限要素法により数値解析する。求めた速度場から、白血球表面に作用する応力分布を解析する。

⑧ 血管壁近傍の血漿層を含む解析法の開発

血管内では、赤血球が血管中心軸方向に集まる傾向をもつため、血管壁近傍に赤血球がほとんど流れない領域ができる。この領域は血漿層と呼ばれる。糖鎖層は血漿層の中に含まれると考えられるので、本研究では、血漿層を含む血管内流れの取り扱い法を開発する。血漿層内は粘性率が低く、その内側の赤血球が流れる層は粘性率が高いと考えられるので、血液を粘性率が流線に沿って一定となる非均質なニュートン流体として取り扱うことで血漿層を表すことにする。

⑨ マイクロチャネルを用いた血球運動の解析

蛍光標識した血小板および直径 3 μm 程度の蛍光粒子を血小板模擬粒子としてマイクロチャネルに流し、その流路壁近傍における挙動についてレーザー共焦点蛍光顕微鏡を用いて詳しく観察する。血小板あるいは血小板模擬粒子の軌跡を顕微鏡下で追跡してマイクロ PTV 法により流速を求めると共に、その変動と赤血球体積分率との関係を調べる。

4. 研究成果

目的で述べた(1)~(3)のそれぞれに対して、研究成果は次の通りである。

(1) 微小血管壁を介する物質輸送

構築した微小血管壁モデルを用いて、血管壁を通過する単位面積当たりの水の流量と、血管壁両側の圧力差の比から濾過率 L_p を求めた。本研究で提案した血管壁モデルを用いて濾過率 L_p を評価したところ、 $L_p = 0.70 \times 10^{-7} \text{ cm s}^{-1} \text{ cmH}_2\text{O}^{-1}$ が得られた。ラット腸間膜の微小血管に対して、 $L_p \sim 1 \times 10^{-7} \text{ cm s}^{-1} \text{ cmH}_2\text{O}^{-1}$ と報告されているので、本解析の結果は動物実験よりわずかに小さいながら、ほぼ一致する値となった。このことから本解析の血管壁モデルが妥当なものになっていると考えられる。また、各部分の流体抵抗への寄与を調べた結果、微小血管壁の流体抵抗はほとんどが内皮細胞間隙に起因し、糖鎖層の寄与は従来の評価に比べてかなり小さいことが示唆された。この結果は、溶質輸送の決定因子が糖鎖層であることと対照的である。

内皮細胞表面に作用する流体のせん断応力を求めると、血管壁の単位表面積当たりの流束が 10^{-8} m/s 程度のとき、内皮細胞間隙で数 Pa のオーダーに達することが分かった。この数値は一般に血液流れが血管壁内腔に及ぼす粘性応力より大きな値である。このこ

とは、内皮細胞間隙における応力が内皮細胞の機能制御に何らかの役割を果たしている可能性を示唆する結果である。

次に、糖鎖層モデルを用いて溶質の輸送を解析し、透過率と濾過反射率の値を、溶質半径の関数として評価した。透過率を拡散係数で除した相対透過率は実験結果と広い範囲で一致する結果となった。また、浸透反射率と濾過反射率は、溶質濃度が低い範囲で一致する値となり、Onsagerの相反定理が成り立つことが示された。

分子動力学法を用いて、溶質分子と媒質分子からなる溶液の分子運動を解析し、浸透圧の発生を分子レベルで調べた。半透膜の両側での圧力の評価を行った結果、溶質濃度が低い範囲ではvan't Hoffの式に従うが、溶質濃度が高くなるにつれ、この式からのずれが顕著になることが示された。

(2) 物質輸送に対する電荷の影響

微小血管壁の両側では一般に溶質の濃度が異なり、これにより生じる浸透圧に起因する流れ、いわゆる浸透流が起こる。まず、血管壁表面の糖鎖層を介する浸透流に着目し、溶質や糖鎖層の帯電および媒質中のイオン濃度が浸透流にどのような影響を与えるかについて、(3)式を用いて浸透反射率 σ_v を評価することにより調べた。その結果、 σ_v の値は、電荷密度が高いほど、また媒質のイオン濃度が低いほど増加することが分かった。血漿アルブミンに対して正味の電荷量(-17)がStokes-Einstein半径3.6 nmの球表面に様に分布しているものと仮定して解析を行なうと、従来の解析では説明できなかったアルブミンの高い反射率を説明する結果が得られた。

また、糖鎖層の電荷密度の直接測定は未だ成功しておらず、従来研究では、研究手法ごとに-1 mEq/lから-30 mEq/lまで幅広い値が提唱されている。本研究では、電荷量が既知の様々な溶質分子に対する実験結果を、本解析結果と比較することにより、糖鎖層の電荷密度として-30 mEq/l程度であることを推定した。

続いて、溶質の拡散と移流に関して電荷の影響を調べるために、まず、単純化したモデルとして、円筒形の細孔を多数含む膜を介した溶質輸送について解析を行って手法を確認した。具体的には、溶質まわりの電解質溶液の領域において求めた電場から電氣的相互作用エネルギーを計算し、(5)式に基づいて H と W を電解質溶液のイオン濃度、電荷量、および溶質サイズの関数として求めた。

図2には、細孔の半径が10 nm、溶質の電荷密度が $-1.7 \times 10^{-2} \text{ C/m}^2$ 、細孔表面の電荷密度が $-4.5 \times 10^{-2} \text{ C/m}^2$ の場合に得られた H の値を、溶質と細孔の半径比の関数として、イオン濃度が0.01 M, 0.04 M, および0.15 Mの場

合に示した。比較のために、電氣的な影響がない場合の値を点線で描いている。電氣的に中性である場合と比較して、溶質と細孔が同符号の表面電荷をもつ場合には、拡散も移流も減少した。これは、静電相互作用による斥力に起因して溶質サイズが大きくなった場合に相当するためと考えられる。また、媒質のイオン濃度が減少する場合も同様の傾向が得られたが、イオン濃度の減少によりDebye長が増加することを考慮すると、この場合も実質的な溶質サイズの増大により説明される。これらはいずれも実験結果と一致する結果である。現在、糖鎖層モデルに対して同様の解析を行っているところである。

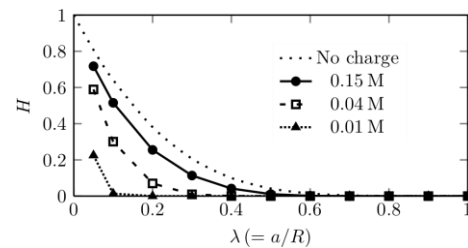


図2 円筒形の細孔を介する溶質の拡散

(3) 白血球に作用する応力の評価と血小板の挙動の解析

細静脈内の観察結果をもとに形状を決めた白血球モデルの周りの流れ場を数値解析により求め、白血球表面に作用するせん断応力分布を評価した。この結果を、動物実験においてマイクロPTV法により求められたせん断応力分布と比較すると、両者は定性的に一致するが、定量的には差異が見られた。

その原因のひとつとして、血漿層の存在がある。そこで、血液を粘性率が流線に沿って一定となる非均質なニュートン流体として取り扱うことで血漿層を表現できるようなモデルを考案した。そのモデルを用いて、白血球周りの速度場を求め、流れが白血球表面に及ぼす応力分布を求めた。血液の粘性率が空間的に変化することで、血液流れ中の白血球に作用する応力が大きく変動することが示された。

幅、高さが25-150 μm の矩形断面をもつマイクロチャンネルに、血小板あるいは血小板模擬粒子である蛍光粒子を混ぜた赤血球サスペンションを流し、レーザー共焦点蛍光顕微鏡を用いて、流路壁近傍の血小板あるいは血小板模擬粒子の運動を観察した。流れに対して垂直方向の粒子の変動は、赤血球が混じっていない(赤血球の体積分率=0)場合には、広い領域での測定により得られるブラウン運動による変動と一致するが、赤血球が混じると変動が大きくなる結果が得られた。すなわち、赤血球が混じっていないときの粒子の

横方向変動は水分子のランダムな衝突に起因するブラウン運動によるものであるが、赤血球が混じると赤血球の存在により粒子の変動が大きく増加することが分かった。また、粒子の速度分布をマイクロ PTV 法により計測した結果、血小板の平均速度分布は赤血球体積分率にほとんど依存しなかったが、変動成分は赤血球体積分率の増加とともに増大した。血小板の運動は赤血球により大きな影響を受けることが分かり、赤血球との相互作用を含めて解析することの重要性が示唆された。

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 18 件)

- ① Sugihara-Seki, M., Akinaga, T., and Itano, T.: Effects of electric charge on osmotic flow across periodically arranged circular cylinders. *Journal of Fluid Mechanics*, 査読有, 664, 2010, 174-192.
- ② Akinaga, T., Sugihara-Seki, M., Itano, T. and Yamamoto, J.: The motion of microbeads in shear flow through a conical tube. *Journal of the Japanese Society for Experimental Mechanics*, 査読有, 10, 2010, 102-106.
- ③ 大谷英之, 関眞佐子: 円管内壁に接着している球形粒子周りの遅い流れ: 二層流モデルによる数値解析. *ながれ*, 査読有, 29, 2010, 363-371.
- ④ Akinaga, T., Sugihara-Seki, M. and Itano, T.: Osmotic flow in porous membranes: Effects of electric charge, *Theoretical and Applied Mechanics Japan*, 査読有, 58, 2009, 261-270.
- ⑤ Sugihara-Seki, M., Akinaga, T. and Itano, T.: Flow across microvessel walls through the endothelial surface glycocalyx and the interendothelial cleft. *Journal of Fluid Mechanics*, 査読有, 601, 2008, 229-252.
- ⑥ Akinaga, T., Sugihara-Seki, M. and Itano, T.: Electrical charge effect on osmotic flow through pores. *J. Phys. Soc. Jpn*, 査読有, 77, 2008, 053401-1 - 4.
- ⑦ Itano, T., Akinaga, T. and Sugihara-Seki, M.: Molecular dynamics study of solvent transport in nanoscale osmosis, *J. Phys. Soc. Jpn*, 査読有, 77, 2008, 064605-1-7.
- ⑧ Sugihara-Seki, M., Akinaga, T., Itano, T. and Matsuzawa, T.: Electrostatic analysis for osmotic flow through rectangular channels. *Theoretical and Applied Mechanics Japan*, 査読有, 56, 2008, 365-372.
- ⑨ Sugihara-Seki, M., Akinaga, T., and Itano, T.: The role of the endothelial surface glycocalyx in solute exchange across capillary walls. *Theoretical and Applied Mechanics Japan*, 査読有, 56, 2008, 373-379.
- ⑩ Itano, T., Akinaga, T. and Sugihara-Seki, M.: A numerical study of molecular motion in the osmotic equilibrium, *Theoretical and Applied Mechanics Japan*, 査読有, 56, 2008, 357-363.
- ⑪ Makino, A., Shin, H.Y., Komai, Y., Fukuda, S., Coughlin, M., Sugihara-Seki, M. and Schmid-Schonbein, G.W.: Mechanotransduction in leukocyte activation. *Biorheology*, 査読有, 44, 2007, 221-249.

[学会発表] (計 53 件)

- ① Sugihara-Seki, M., Akinaga, T. and Itano, T.: Charge effects on the osmotic flow across the endothelial surface glycocalyx. 6th World Congress of Biomechanics, 2010.8.3, Singapore.
- ② O-tani, H. and Sugihara-Seki, M.: Two-phase Newtonian fluid flow around a leukocyte model attached to the wall of a circular cylindrical tube. 5th Pacific Rim Conference on Rheology, 2010.8.3, Sendai.
- ③ Akinaga, T., Sugihara-Seki, M., Itano, T. and Yamamoto, J.: An experimental study of the motion of platelets in shear flow. 4th International Symposium on Advanced Fluid/Solid Science and Technology in Experimental Mechanics, 2009.11.28, Niigata..
- ④ Sugihara-Seki, M., Akinaga, T. and Itano, T.: Fluid mechanical study on the material exchange across microvessel walls. EUROMECH Fluid Mechanics Conference 7, 2008.9.16, Manchester (UK).
- ⑤ Sugihara-Seki, M., Akinaga, T., and Itano, T.: Fluid mechanical analysis on the role of the endothelial surface glycocalyx in transcapillary exchange. International Symposium on Multi-scale Simulations of Biological and Soft Materials. 2008.6.20, Tokyo.

[その他]

ホームページ等

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

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：80550225

(2) 研究分担者

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

(3) 連携研究者

秋永剛 (Akinaga Takeshi)
関西大学・先端科学技術推進機構・非常勤
研究員
研究者番号：50512711