

令和 5 年 5 月 22 日現在

機関番号：32619

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K12609

研究課題名(和文) 一様・変動流れ発生装置を用いた血液細胞のせん断刺激に対する応答性解明

研究課題名(英文) Elucidation of blood cell's response to constant and fluctuating shear stresses

研究代表者

渡邊 宣夫 (Watanabe, Nobuo)

芝浦工業大学・システム理工学部・教授

研究者番号：00568644

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：高せん断に起因した血液損傷理解の為、豪州と独国と国際共同研究を実施した。60 Paのせん断応力にさらされると100秒以上で損傷赤血球数が増加、これを画像解析にて形状非対称性検出することで同定できる事(Sci Rep)、血液がせん断にさらされると血漿タンパクvWF細分化、血小板活性、溶血の順に複合的に生じる事(J.Biomech.)、さらには、溶血と血小板凝集現象との間の関連性が示唆される事(J.Biorheol)など明らかにした。加えて、変動せん断流れ環境を再現するため、正弦曲線的なせん断応力を発生する流れ装置を構築し、赤血球の独特な変形応答を可視化できた(AIP Advances)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は一様・変動せん断応力下における赤血球単体の変形能およびせん断脆弱性について例示する事ができた。さらに、多数の健康者赤血球の流動変形応答性を検証する事、またそれと対比する事で赤血球変形能低下を伴う病的疾患の診断方法開発へ応用できる可能性が期待される。また、細胞加齢にともなう細胞変形応答性の詳細把握は、赤血球の生理学を前進させる知見につながる可能性がある。さらに、せん断応力の長時間の負荷に対する脆弱性評価も今後可能になり、血液ポンプなどの機械式血液循環装置の血液適合性や、患者血液毎にその赤血球の変形能やせん断脆弱性を考慮したデバイス選定や治療方針をたてる事が可能になる事が期待される。

研究成果の概要(英文)：In order to understand blood damage induced by high shear stress, applicants applied his original shear device into international collaborative projects. Morphological abnormalities increased under the condition with high shear stress of 60Pa over 100 seconds exposure time. And image analysis method to detect damaged erythrocyte was successfully proposed (Sci Rep). Blood shear experiments showed correlation among multiple damage parameters, such as von Willebrand factor, platelet activation, and hemolysis (J.Biomech.), and also slight correlation between hemolysis and platelet aggregation(J.Biorheol). Additionally, sinusoidal shear stress generator was successfully developed, and it revealed cyclic deformation change under sinusoidal shear stress (AIP Advances).

研究分野：バイオレオロジー

キーワード：赤血球変形能 せん断脆弱性 血小板活性 血液損傷 せん断応力 流れの可視化 一様せん断流れ 変動せん断流れ

### 1. 研究開始当初の背景

重症心不全患者に対する血液ポンプを用いた延命療法成績は、益々向上しつつある。しかしながら、血液ポンプの利用は、出血性疾患や、血栓形成誘発、また赤血球変形能低下による循環不全発症のリスクがある。これらの原因はポンプが発生する高せん断状態に起因すると解釈されているが、その機序はいまだ明らかでない。そこで、この解明のため申請者は単純せん断流れの中で血液細胞を可視化できる実験システムを構築した。これを用いてこれまでに、赤血球がせん断刺激の度合いに対応し NO 産生を増大する事、加えて過度にせん断刺激を受ければ損傷し、その過程において異常形状が出現する事を明らかにする事ができた。加えて、最近の予備実験を通じて、赤血球損傷時に膜酸化が発生している可能性、および血小板凝集能がせん断条件に応じてピークを示す可能性を示唆するデータを得た。

### 2. 研究の目的

本研究は申請者らの上記の研究成果をさらに発展させ、一様せん断条件だけでなく、心血管デバイス内部を想定した変動せん断条件において如何にして血液細胞が出血性疾患や血栓および循環不全の発症につながる反応を引き起こすか解明する。

### 3. 研究の方法

方法1 (豪州医学部研究機関との共同研究): 申請者が構築した円錐平板間の逆回転型せん断流れ装置を豪州共同研究機関 (Griffith 大学医学部 Michael Simmonds 博士研究室および Prince Charles 病院 John Fraser 教授研究室と共に共同研究を実施し、60 Pa までのせん断下におけるヒト赤血球の損傷現象可視化実験を実施した。さらに、容積型せん断負荷装置を用いて、ヒト新鮮血液に対し一様せん断負荷実験を実施し、血小板活性、血漿タンパク vWF 細分化現象、溶血量といった複数項目について総合的に評価する実験を豪州 Prince Charles 病院 Chris Chan 博士らと共に実施した。この研究の一環で申請者研究室修士学生2名が1年間研究留学した。

方法2: 申請者研究室において、上記のせん断装置を用いて、せん断による溶血現象と血栓誘発につながる血小板凝集現象の関連性を検証した。

方法3 (福井浩二教授との共同研究): 申請者研究室にて血液に対するせん断負荷実験を実施した後に、フローサイトメトリー法を用いて加齢度別の赤血球の膜酸化度を計測する試みに取り組んだ。

方法4: 変動せん断応力発生装置を新たに試作し、その装置を用いて正弦曲線的なせん断応力変化環境下において赤血球の流動変形応答を可視化する事を試みた。

方法5: 独国 Charite 研究所 Ulich Kertzsch 博士研究室と共同で血液細胞の変形能の管内流れ挙動との関係性を検証する共同研究を実施した。

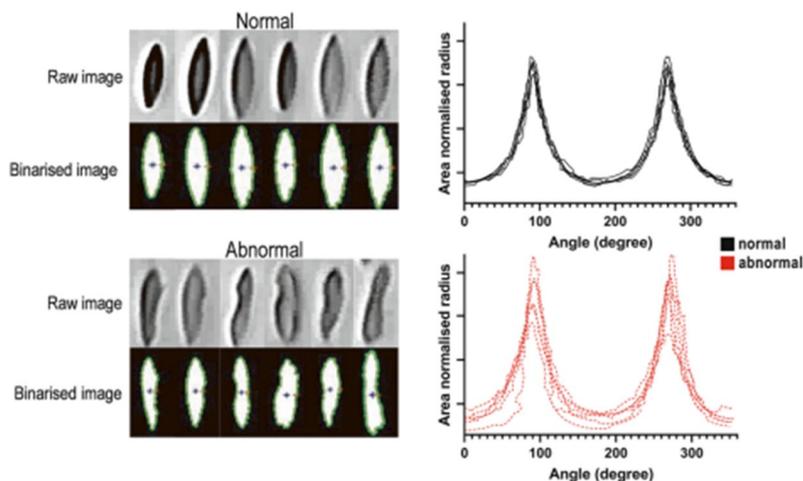


図1: 健全赤血球 (左上) と損傷赤血球 (左下)、およびそれらの輪郭情報 (右ト、右下)

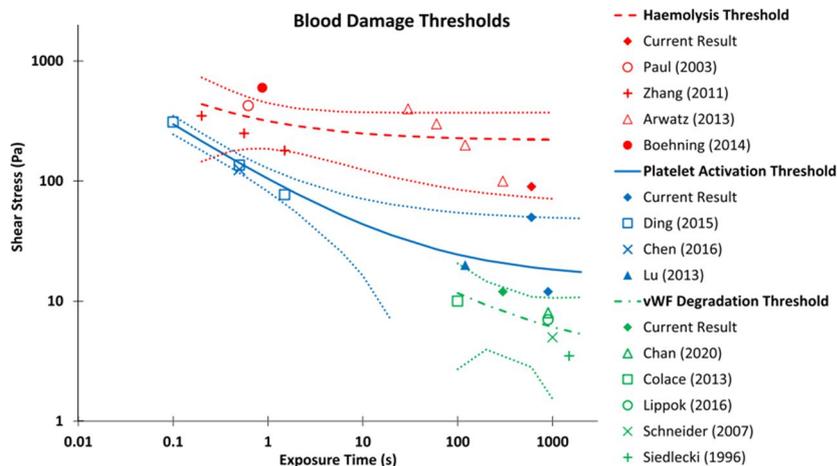


図2: せん断による血液損傷 (vWF 細分化, 血小板活性, 溶血)

#### 4. 研究成果

結豪州研究者らと協力し一様せん断装置を用いた共同研究を実施し、60Paまでの高せん断に起因した赤血球の流動観察実験を行った結果、いびつ形状をなす赤血球が現れ、輪郭情報を用いた非対称性を利用した損傷赤血球の同定が可能である事を明らかにした(学術誌 Scientific Reports 論文採択済(成果論文1))。さらに、容積型のせん断負荷装置を用いて行った共同研究の結果、一様せん断負荷に対する血液損傷指標としての血小板活性、溶血、血漿タンパクvWFの細分化現象の同時評価実験を行った結果、10Paの

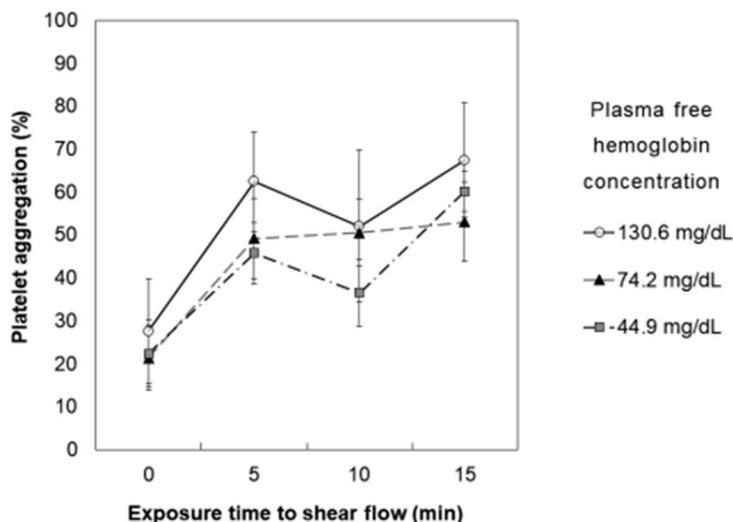


図3:溶血量と血小板凝集

せん断応力を超えてくると血小板活性が進む事、12Paのせん断応力下においては血漿タンパクvWFの損傷がある事など明らかにした(図2, Journal of Biomechanicsに論文採択済(成果論文2))。加えて、せん断装置を利用し溶血現象と血栓誘発につながる血小板凝集現象の関連性を検証した結果、溶血量に応じた凝集塊サイズの増大を認める結果を得た(図3, Journal of Biorheologyに論文採択済(成果論文3))。これらの成果を2022年4月人工心臓と補助循環懇話会にて報告した。加えて、フローサイトメトリー法を用いて加齢度別の赤血球の膜酸化度を計測する試みに取り組んだ結果、高密度(老齢)赤血球が優位に酸化度を増大するデータを得た(2022年日本酸化ストレス学会にて報告済、論文投稿準備中)。上記の一様せん断負荷装置に加えて、変動せん断応力発生装置を新たに試作し、その装置を用いて正弦曲線的なせん断応力変化環境下における独特な形状変化応答を可視化する事に成功した(図4、研究成果論文4)。この研究成果を2022年ヨーロッパ人工臓器学会にて報告し、さらに学術論文にまとめ



図4:正弦曲線的なせん断応力変化に対する赤血球変形応答

AIP Advances誌に採択頂いた(成果論文4)。独国Charite病院のKertzsch博士研究室と共同研究を行った赤血球変形能と管内流れ挙動との関係性については現時点では結論を下すことはできず、さらなる検証を要する状況である。血液凝固能指標である活性化凝固時間(ACT値)を測定する種類の異なる2台の装置を用いて、血液の活性化凝固時間(ACT値)の測定実験を実施した結果、装置間で正の相関性を得た(図なし)。この結果をJBR誌に報告した(業績論文5)。以上の研究成果から、本研究プロジェクトは概ね順調に進展したと判断する。

#### 研究成果学術論文

1. MacNamee A., Simmonds M., Inoue M., Horobin J., Hakozaiki M., Fraser J., Watanabe N., Erythrocyte morphological symmetry analysis to detect sublethal trauma in shear flow. *Sci Rep* 11, 23566 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-02936-2>
2. C.H.H. Chan, M.J. Simmonds, K.H. Fraser, K. Igarashi, K.K. Ki, T. Murashige, M.T. Joseph, J.F. Fraser, G.D. Tansley, **N. Watanabe**, Discrete responses of erythrocytes, platelets, and von Willebrand factor to shear, *Journal of Biomechanics* 130 (2021) 110898, <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2021.110898>
3. **Nobuo Watanabe**, Naoki Kawada, Effect of hemolysis on platelet aggregation as evaluated by microscopic observation under physiological shear flow, *J Biorheol* 2021. 35 (2); 62-67, <https://doi.org/10.17106/jbr.35.62>
4. Kriengsak Masnok, Masataka Inoue, and **Nobuo Watanabe**, Direct observation of deformation of individual red blood cells in oscillatory fluid flow produced using a generator of precise sinusoidal shear flow. *AIP Advances* 12, 095020 (2022); <https://doi.org/10.1063/5.0113873>
5. **N. Watanabe**, M. Inoue, M. Honda, K. Masnok, T. Negishi, In vitro comparative study of activated clotting time in fresh human whole blood with various levels of coagulability using two devices, *J Biorheol* 2022. 36(2); 39-44, <https://doi.org/10.17106/jbr.36.39>

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 N. Watanabe, M. Inoue, M. Honda, K. Masnok, T. Negishi,	4. 巻 2
2. 論文標題 In vitro comparative study of activated clotting time in fresh human whole blood with various levels of coagulability using two devices	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biorheology	6. 最初と最後の頁 未定
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 有
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 -
1. 著者名 Chan Chris H.H., Simmonds Michael J., Fraser Katharine H., Igarashi Kosuke, Ki Katrina K., Murashige Tomotaka, Joseph Mary T., Fraser John F., Tansley Geoff D., Watanabe Nobuo	4. 巻 130
2. 論文標題 Discrete responses of erythrocytes, platelets, and von Willebrand factor to shear	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biomechanics	6. 最初と最後の頁 110898 ~ 110898
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbiomech.2021.110898	査読の有無 有
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 該当する
1. 著者名 McNamee Antony P., Simmonds Michael J., Inoue Masataka, Horobin Jarod T., Hakozaiki Masaya, Fraser John F., Watanabe Nobuo	4. 巻 11
2. 論文標題 Erythrocyte morphological symmetry analysis to detect sublethal trauma in shear flow	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 23566
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-02936-2	査読の有無 有
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 該当する
1. 著者名 Watanabe Nobuo, Kawada Naoki	4. 巻 35
2. 論文標題 Preliminary study of the effect of hemolysis on platelet aggregation through microscopic observation under physiological shear flow	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biorheology	6. 最初と最後の頁 62 ~ 67
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.17106/jbr.35.62	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Chan Chris Hoi Houg、Inoue Masataka、Ki Katrina K.、Murashige Tomotaka、Fraser John F.、 Simmonds Michael J.、Tansley Geoff D.、Watanabe Nobuo	4. 巻 44
2. 論文標題 Shear dependent platelet aggregation size	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Artificial Organs	6. 最初と最後の頁 1286 ~ 1295
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/aor.13783	査読の有無 有
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 該当する

[学会発表] 計8件(うち招待講演 1件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Reina Kato, Yugo Kato, Koji Fukui, Nobuo Watanabe
2. 発表標題 Examination of new method to express in detailed expression of plasma vWF for elucidation of their shear stress induced diminishment
3. 学会等名 47th Annual European Society for Artificial Organs(ESA0) Congress, Brunel University, London, Uxbridge, during 7-11 September, 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nobuo Watanabe, Antony P. McNamee, Jarod T. Horibin, John F Fraser, Masataka Inoue, Masaya Hakozaki, Fukuta Matsuzawa, Michael J. Simmonds,
2. 発表標題 Asymmetrical erythrocyte morphology to detect sublethal damage
3. 学会等名 2nd Joint Meeting of ESCHM-ISCH-ISB Japan (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井上雅喬, 渡邊宣夫
2. 発表標題 一樣単純せん断流れ発生装置を用いた血液細胞の観察結果から予想される機械式補助循環装置利用環境において生じうる血液損傷現象に対 する考察
3. 学会等名 第50回 人工心臓と補助循環懇話会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三浦千代子, 渡邊宣夫
2. 発表標題 共焦点蛍光顕微鏡を用いた血小板活性状態の観察 GPIIb/IIIaに着目した血小板活性評価指標の検討
3. 学会等名 第31回ライフサポート学会フロンティア講演会,
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川田尚輝, 柴田政廣, 渡邊宣夫
2. 発表標題 せん断流れ下における血小板凝集の顕微鏡観察
3. 学会等名 第44回日本バイオレオロジー学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加藤玲奈, 加藤優吾, 福井浩二, 渡邊宣夫
2. 発表標題 止血タンパク研究のための血漿アルブミン除去法の検討
3. 学会等名 第44回日本バイオレオロジー学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 久保田玲, 福井浩二, 渡邊宣夫
2. 発表標題 赤血球の加齢と膜酸化現象の関連性検証
3. 学会等名 第75回日本酸化ストレス学会学術集会、
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 金子侑香里, Kriengsak Masnok, 渡邊宣夫
2. 発表標題 正弦曲線的せん断流れ発生装置を用いた 赤血球変形能評価システムの構築
3. 学会等名 第46回日本バイオレオロジー学会年会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>SIT Lab Vol.26血液循環を工学的に再現。赤血球の健康状態を可視化する  <a href="https://www.youtube.com/watch?v=1QT91E2MowI">https://www.youtube.com/watch?v=1QT91E2MowI</a>  Engineered blood circulation.  <a href="https://www.youtube.com/watch?v=La3jraC2nS4">https://www.youtube.com/watch?v=La3jraC2nS4</a></p>
--

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
研究分担者	福井 浩二  (Fukui Koji)  (80399807)	芝浦工業大学・システム理工学部・教授    (32619)	せん断に血液損傷研究において、生化学的実験を担当する。

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------