

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：32678

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K12633

研究課題名（和文）低ずり応力下で無損傷の内皮細胞に粘着する血小板数の測定

研究課題名（英文）Measurement of platelets adhering to intact endothelial cells under low shear flow conditions

研究代表者

島野 健仁郎（Shimano, Kenjiro）

東京都市大学・理工学部・教授

研究者番号：90287475

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）：アデノシン二リン酸（adenosine diphosphate, ADP）またはトロンビンを添加したブタ全血の灌流を内皮細胞を底面に播種したマイクロ流路内で実施し、内皮細胞に粘着する血小板数をカウントした。その結果、ADPを用いた場合、粘着血小板数はADP濃度上昇とともに増加し、ずり速度上昇とともに減少することが定量的に確かめられた。一方、トロンビンをを用いた場合、トロンビン濃度とずり速度の変化に対して明確な傾向は観察されず、粘着血小板数もADPの場合と比べて1桁小さい値となった。これの原因としてトロンボモジュリンがトロンビンの作用を阻害した可能性が考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血栓形成量の予測は、血栓症の診断や脳動脈瘤コイル塞栓術の予後評価のために重要であるが、内皮細胞が無損傷の場合に血流停滞下で起こる血栓形成は正確な予測ができないのが実情である。これはこの種の血栓形成に関する知見が限定的であることが原因である。特に無損傷の内皮細胞に血小板がどれほど粘着するかについての定量的知見はほとんど存在していなかったため、本研究を実施した。本研究の成果により、血小板粘着量を考慮に入れた血栓形成のモデリングが可能になった。

研究成果の概要（英文）：Porcine whole blood with adenosine diphosphate (ADP) or thrombin was perfused in a micro flow passage with endothelial cells disseminated over its bottom surface so that the number of platelets adhering to the endothelial cells could be counted. Perfusion under each condition lasted 30 minutes. When ADP was used, it was quantitatively confirmed that the number of adherent platelets increased with the ADP concentration and decreased with the shear rate. On the other hand, when thrombin was used, no clear tendency was observed in response to change in the thrombin concentration or shear rate. The numbers of adherent platelets with thrombin were approximately 10 times smaller in magnitude than those with ADP. This sharp contrast between ADP and thrombin was possibly caused by thrombomodulin which inhibits the functions of thrombin.

研究分野：生体医工学

キーワード：血小板 内皮細胞 粘着 血栓形成 ずり速度

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 血流停滞による血栓形成は、肺塞栓症や心原性脳梗塞などの原因となる一方、脳動脈瘤のコイル塞栓術により積極的に治療に利用されており、臨床的に極めて重要な意味を持っている。血流停滞に起因する血栓形成を定量的かつ正確に予測することの必要性は言を待たないが、この種の血栓形成について定量的知見が十分に得られていないのが実情である。

(2) 血小板粘着量は血液凝固の最終生成物たるフィブリン形成量に直接影響する重要なファクターであり、血栓形成の予測には不可欠なものである。しかしながら、無損傷の内皮細胞に血小板がどれほど粘着するかについての定量的知見はほとんど存在していない。

2. 研究の目的

本研究では無損傷の内皮細胞への血小板粘着について定量的データを包括的に得て、新たな血栓形成モデルの構築に資することを目的とした。すなわち、粘着血小板数が血小板を活性化するアゴニストの濃度と血流のずり速度にどのように依存して変化するかを明らかにする。

3. 研究の方法

ブタ内皮細胞を播種したマイクロ流路(全長 48.2 mm × 全幅 5.0 mm × 全高 0.8mm) にブタ全血をおおよそ $0 \sim 17 \text{ s}^{-1}$ の範囲の低ずり速度で灌流する実験を行い、内皮細胞への血小板粘着量を求めた。ずり速度を 0 s^{-1} とするときは流路内の血液を 30 分間静止させた。血小板活性化物質にはアデノシン二リン酸 (adenosine diphosphate, ADP) とトロンピンを用いた。ADP 濃度は 0, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 1.5 μM 、トロンピン濃度は 0, 0.1, 1, 5 unit/mL とそれぞれ設定した。各条件で 30 分灌流を行った後、メタノール固定を施し、走査型電子顕微鏡 (scanning electron microscopy, SEM) により撮影を行い、目視により画像上の粘着血小板をカウントした。SEM により取得された画像は条件毎に 100 枚であり、各画像におけるカウントの平均値を $900 \mu\text{m}^2$ (SEM 画像 1 枚がカバーする面積に相当) 当たりの粘着血小板数とした。

4. 研究成果

(1) 図 1 に一例として ADP 濃度 $1 \mu\text{M}$ 、ずり速度 16.8 s^{-1} の条件で得られた粘着血小板の SEM 画像を示す。一部の血小板がつぶれており、これはメタノールによる固定を施した際に生じたものと考えられるが、それ以外の血小板は球形に近い形状をしている。元来円盤状である血小板が球状に形態変化していることから、これらの血小板は活性化して粘着しているものと判断できる。なお、アゴニストをまったく用いない場合であっても血小板は球形への形態変化を起こして粘着していることが確認されている。この原因として当初は灌流装置の主流部に用いている遠心ポンプの影響を考えたが、ブタから採取した直後の全血を直接マイクロ流路に導入した場合にも同様の血小板粘着が観察されたことから、遠心ポンプではなく採血時にシリンジ内で生じるせん断の影響により血小板が活性化して粘着したものと推察された。

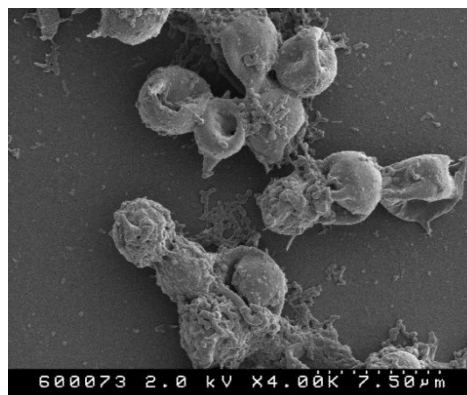


図 1 粘着血小板の SEM 画像 (ADP 濃度 $1 \mu\text{M}$ 、ずり速度 16.8 s^{-1})

(2) 血小板を活性化させるために ADP を用いた場合、同一 ADP 濃度でずり速度を上昇させると粘着血小板数は減少した。たとえば、ADP 濃度 $1 \mu\text{M}$ 、ずり速度 0 s^{-1} のときの粘着血小板数は $900 \mu\text{m}^2$ 当たり 32.8 個であったが、同一 ADP 濃度でずり速度が 0.84 s^{-1} 、 16.8 s^{-1} に上昇すると粘着血小板数はそれぞれ 26.7 個、8.3 個となった。この定性的傾向は、他の ADP 濃度でも同様であり、ずり速度の上昇に伴って粘着血小板数は減少した。これは、血小板側受容体 リガンド 内皮細胞側受容体の粘着力とずり速度により発生するせん断応力とのバランスにより粘着血小板数が決まることを示唆している。

得られたデータを精査した結果、ずり速度の対数 (対数ずり速度) に対する粘着血小板数の減少率は ADP 濃度の一次関数で増加関数となることが分かった。ただし、ある程度濃度が上昇すると減少率は一定値となり、その限界の ADP 濃度が $1.2 \mu\text{M}$ 付近に存在することも判明した。

(3) 血小板を活性化させるために ADP を用いた場合、ずり速度 0.75 s^{-1} 近傍で ADP 濃度を変化させると、粘着血小板数は ADP 濃度に比例することが分かった。ただし、ADP 濃度 $1.2 \mu\text{M}$ 付近を超えると、それ以上の粘着数増加は起こらないことも判明した。

(4) 前々項と前項の知見から、 $900\ \mu\text{m}^2$ 当たりの血小板粘着数をずり速度と ADP 濃度の関数として表わすモデルを導出した。このモデルにより、血小板が無損傷内皮細胞に粘着することのできる限界のずり速度が $35\ \text{s}^{-1}$ 付近に存在することが示唆された。

(5) 血小板を活性化させるためにトロンピンを用いた場合、トロンピン濃度とずり速度に関係なく粘着血小板数は $900\ \mu\text{m}^2$ あたり 5 個を超えることはなかった。これは、ADP を用いた場合に 20 個を超えていたケースがあることと比べて対照的である。たとえば、ずり速度 $0\ \text{s}^{-1}$ のとき、トロンピン濃度 $0.1\ \text{unit/mL}$ における粘着血小板数は $900\ \mu\text{m}^2$ 当たり 2.0 個、 $1\ \text{unit/mL}$ で 4.5 個、 $5\ \text{unit/mL}$ で 2.8 個であった。トロンピン濃度 $5\ \text{unit/mL}$ は生体内では通常あり得ない高濃度であるにも関わらず、コントロール(アゴニストなし)の場合と比べて粘着数の大幅な増加は観察されなかった。また、トロンピン濃度の上昇に対して、粘着血小板数が増加するか、減少するかは一定していなかった。ずり速度 $0\ \text{s}^{-1}$ でトロンピン濃度が異なるデータを t-test により検定したところ粘着血小板数に有意差 ($p < 0.01$) は認められなかった。

(6) 血小板を活性化させるためにトロンピンを用いた場合、同一トロンピン濃度でずり速度を増加させたときの粘着挙動には一定した傾向が見られなかった。たとえば、トロンピン濃度 $1\ \text{unit/mL}$ でずり速度を $0\ \text{s}^{-1}$ から $1.53\ \text{s}^{-1}$ に増加させたとき、 $900\ \mu\text{m}^2$ 当たりの粘着血小板数は 4.5 個から 1.1 個に減少した。一方で、トロンピン濃度 $5\ \text{unit/mL}$ でずり速度を $0\ \text{s}^{-1}$ から $1.56\ \text{s}^{-1}$ に増加させたとき、 $900\ \mu\text{m}^2$ 当たりの粘着血小板数は 2.8 個から 3.9 個に増加した。同一トロンピン濃度でずり速度が異なるデータを t-test により検定したところ、 $0.1\ \text{unit/mL}$ と $5\ \text{unit/mL}$ では粘着血小板数に有意差 ($p < 0.01$) は認められなかった。

(7) 前々項と前項の知見から、トロンピンをアゴニストとして用いても極わずかな血小板しか粘着せず、その個数はアゴニストを用いない場合と同等であることが分かった。すなわち、トロンピンは血小板を活性化させて粘着させる作用が極めて低いことが示唆された。トロンピンは血小板を活性化することが知られているが、本研究で対象とした粘着現象の起こる場所は無傷の内皮細胞の極近傍であることから、内皮細胞の表面に発現するタンパク質であるトロンボモジユリンが関与して血小板活性化の度合いを弱めた可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 荒川未悠, 城出宗太, 薄田隼人, 小林千尋, 島野健仁郎, 永野秀明, 白鳥英
2. 発表標題 活性化物質の違いが血小板の内皮細胞粘着量に与える影響
3. 学会等名 日本機械学会 第34回バイオエンジニアリング講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Miyu Arakawa, Tatsuya Tsuchida, Haruho Mukoda, Kenjiro Shimano, Chihiro Kobayashi, Suguru Shiratori, Hideaki Nagano
2. 発表標題 Adhesion of platelets activated by thrombin to intact endothelial cells
3. 学会等名 The 3rd World Congress of ESCHM-ISCH-ISB (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 島野健仁郎, 小林千尋, 永野秀明, 白鳥英
2. 発表標題 無損傷内皮細胞への血小板粘着量測定
3. 学会等名 日本機械学会 第36回バイオエンジニアリング講演会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
研究分担者	小林 千尋 (Kobayashi Chihiro) (00570699)	東京都市大学・理工学部・講師 (32678)	

6. 研究組織（つづき）

	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	氏家 弘 (Ujiie Hiroshi) (00138869)	東京都市大学・理工学部・教授 (32678)	

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