様式Ｆ－１９

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 3 日現在

機関番号：17104
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2011 ～2012
課題番号：23650268
研究課題名（和文）
血液流れのせん断応力による血小板活性化のリアルタイム計測と血栓形成のモデル構築
研究課題名（英文）
Measurement of platelet activation process on shear blood flows and modeling of thrombus formation process
研究代表者
玉川 雅章（TAMAGAWA MASAAKI）
九州工業大学・大学院生命体工学研究科・教授
研究者番号：80227264

研究成果の概要（和文）：
本研究では，血栓現象を血小板の活性化，活性化された血小板の輸送，血小板の付着と高分子化の３ステップと考え，このうち，特に，血小板の活性化におけるせん断速度依存性を実験によって得ることを目的としている．本研究課題においては，（１）血小板に作用するせん断応力（一定せん断応力）による血小板変形挙動と活性化機能変化について，100-200(1/s)までの平均せん断速度を与えた結果，血栓形成が壁面より認められた．また，その成長速度についても，せん断速度が高いほど血栓形成速度（血栓成長の無次元時間変化）が上昇するという傾向にあった．（２）一方，機能変化の発光ならびに蛍光観察については，せん断速度が高い流れ場でのイクオリン発光強度がかなり低く，せん断速度を変化させたときの結果が，S/N 比で有意差が得られないほど微弱であった．

研究成果の概要（英文）：
In this investigation, thrombus formation process is modeled as three step process, which are activation of platelet, transport of activated platelet and adhesion of platlet to the wall and polymerization. Especially, the dependency of shear rate on the platelet activation was focused in this project. From this project, it is concluded that (1) By working averaged shear rate from 100 to 200 (1/s), thrombus can be found at the wall, and the higher the shear rate becomes, the more thrombus formation rate increases, (2) By observation of luminescence with aequorin for detecting platelet-activation, the amplitude of luminescence is too low level comparing with background (S/N ratio) even if changing optical setting up.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：総合領域
科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学/生体材料学
キーワード：バイオメカニクス，医用流体機械

１．研究開始当初の背景

近年，血液ポンプなどの医用流体機器の開発が進むにつれ，製品の安全基準を作成するため機器内での血液の溶血・血栓の問題がより大きく取り上げられるようになってきた．例えば，ＦＤＡ（アメリカ食品医薬品局）では，2008 年より医用機器の安全基準策定のため，ＣＦＤによる溶血・血栓，薬物動態の

予測などのデータの信頼性検討の段階に移行してきている．このような医用機器開発の問題のうち，特に血栓については，流れ場での生化学反応および凝固を伴った流れのため現象が複雑であり，未だ予測できるレベルに達していないのが現状である．したがって，この血栓現象を予測できるツールの開発が行われれば，上記のＣＦＤによる安全基準の策定および医用開発規格の標準化も容易になるため，その必要性はきわめて高い．

一方，血液ポンプなどの人工的な流路内での血栓現象においては，人体内の血管内での血栓形成とは異なり，流路内でのせん断応力が血栓形成に関与するとされ研究されてきているが，未だ現象は十分に解明されていないのが現状である．

特に，血栓形成については，これまでの先行研究によって医療流体機器などの人工壁面に付着する血液の成分として血小板（2-3 μm）があり，この血小板にせん断応力が作用したときの物理的刺激による活性化機構によって，人工流路内での血栓現象が決定されると考えられているが，未だに未解明な部分が多く，先の設計に生かせる血栓予測や低減手法の開発が必要となっている．

２．研究の目的

本研究では，血栓現象を（１）血小板の活性化，（２）活性化された血小板の輸送，（３）血小板の付着と高分子化の３ステップと考え，このうち，特に（１）の血小板の活性化におけるせん断速度依存性を実験によって得ることを目的とする．具体的には，１個または複数個の血小板に対して２次元クエット流れを作用させることで，マイクロスケールでの変形挙動への影響を調べ，その一方で流れ場での血小板の活性化（壁面付着性の上昇）過程を蛍光計測により明らかにすることを目的とする．

３．研究の方法

(1)血小板に作用するせん断応力（一定せん断応力）による血小板変形挙動と活性化機能変化については，回転粘度計を改良した微小隙間の２次元クエット流れ生成装置を開発し，この狭い隙間の流れにおいて，100-200(1/s)までの平均せん断速度を与え，これまでの血栓形成実験と同様に，赤血球を除いた血液の流れを可視化した

(2) 前年度開発した装置に，波長を変化できるチューナブルレーザ，フォトダイオードを設置し，血小板自身を緑色蛍光で標識させるメパクリンで染色して装置内流路に入れる．装置にせん断応力が生成され，血小板が活性化すると流路内に分散させたカルシウム感受性発光タンパク（エクオリン）を用いてその発光強度を調べることで，活性化の度合いを調べた．

４．研究成果

本研究では，血栓現象を（１）血小板の活性化，（２）活性化された血小板の輸送，（３）血小板の付着と高分子化の３ステップと考え，このうち，特に（１）の血小板の活性化におけるせん断速度依存性を実験によって得ることを目的としており，本課題遂行により以下のことが明らかとなった．

(1) 血小板に作用するせん断応力（一定せん断応力）による血小板変形挙動と活性化機能変化については，回転粘度計を改良した微小隙間の２次元クエット流れ生成装置を開発し，この狭い隙間の流れにおいて，100-200(1/s)までの平均せん断速度を与え，これまでの血栓形成実験と同様に，赤血球を除いた血液の流れを可視化した結果，このせん断速度においても，相対的にアクリル樹脂よりも吸着度が高いアルミ金属表面ではあるものの，血栓形成が壁面より認められた．また，その速度についても，壁面の材料依存性（吸着度依存）はあるものの，定性的には，これまでのはく離せん断流れと同様の傾向，すなわち，せん断速度が高いほど血栓形成速度（血栓成長の無次元時間変化）が上昇するという結果が得られた．

(2)機能変化の発光ならびに蛍光観察については，せん断速度が高い流れ場での活性化指標となるイクオリン発光強度がかなり低く，各種実験手法や装置の改良は試みたものの，せん断速度を変化させたときの結果が，S/N 比で有意差が得られないほど微弱であった．したがって，一定せん断速度のクエット流れにおいての血小板の活性化そのものの瞬間的な発光・蛍光観察に対しては，今のところバックグラウンド画像に対して，場所や瞬間的な観察像を得ることができていないが，引き続き，光学的経路とカメラの改良を行うことによって，反応係数を求めるためのイクオリン発光と蛍光指標を捕らえる実験を継続中である

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計２件）

① <u>Masaaki Tamagawa</u>, Effects of High Shear Rate on Thrombus Formation Rate on Pipe Orifice Flows using Laser Sheet

Method and the Prediction of Thrombus Formation Rate by CFD, Proceedings of the IMECE2012 (ASME 2012 International Mechanical Engineering Congress & Exposition),868061 (3pages), 2012 （査読有）

② Masaaki Tamagawa, Ryoji Moriya, Ryosuke Motooka, Effects of shear rate on thrombus formation rate on pipe orifice flows, Proceedings of the 8th KSME-JSME Thermal and Fluids Engineering Conference, 40081(2pages), 2012 （査読有）

〔学会発表〕（計 2 件）

① Masaaki Tamagawa, Ryosuke Motooka, Effects of Shear Rate on Thrombus Formation Rate on Pipe Orifice Flows using Laser Sheet Visualization Method, ASAIO 58th annual conference, San Francisco, CA, USA, 2012 (2012.6.14)

② Masaaki Tamagawa and Kouske MatsumuraDriving Force of a Neutrophile in Liquid By Concentration Gradient For Developing DDS Particles and Capsules with Propulsion, World Congress 2012 Medical Physics and BiomedicalEngineering, Beijing, China, 2012 (2012.5.3)

６．研究組織

(1)研究代表者

玉川雅章（TAMAGAWA MASAAKI）

九州工業大学・大学院生命体工学研究科・教授

研究者番号：80227264