

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：32619

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26750150

研究課題名(和文)ものづくり技術・共焦点顕微鏡・画像解析技術を用いた血小板粘着挙動の機序解明

研究課題名(英文)Elucidation of Platelet Adhesion Behavior using Manufacturing technique, Confocal Microscopy, and Image Analysis

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・准教授

研究者番号：00568644

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：コラーゲン繊維は血管壁損傷部などで出現し、このコラーゲン繊維への血小板の粘着は、初期血栓イベントとして大変重要である。コラーゲン繊維は不規則な向きの曲線形状を有する。このコラーゲン繊維勾配と流れの向きは血小板粘着挙動に何らかの影響を与えている事が予想された。そこで本研究は、血小板粘着挙動とコラーゲン繊維角度との関係性検証のため、本研究は、コラーゲン繊維形態と粘着血小板部位の情報抽出方法、そして、繊維角度と血小板粘着の容易さとの関係性を検証する方法を提案した。

研究成果の概要(英文)：In order to investigate the relationship between the morphology of irregularly curved collagen fibril and easiness for platelet to attach, this study proposed the solution to assess such relationship.

研究分野：バイオレオロジー

キーワード：Morphology of Collagen Image analysis

### 1. 研究開始当初の背景

血栓が生じる仕組みについては、ルドルフウィルヒョウの三大血栓因子として知られる「血液構成要素」と「流れ」、そして「壁面状態」が関与する事、それに加えて、血液構成要素それぞれが凝固プロセスへ複雑に関与する事が知られるが、実質的に良く分かっていない<sup>1</sup>。言い方を替えれば、具体的におのおのの条件で血栓形成を予測することは現在不可能なのである。その一方で、血液ポンプや体外循環装置など今日の医療技術の進歩に伴い、予防医学的観点から血栓形成メカニズム解明のニーズは益々高まりつつある。血栓形成メカニズム解明へ向けた第1歩として、申請者らはこれまでの研究で、ものづくり技術を応用して、再現性よく流路深さを設定できる実験装置を構築し、それを用いた血液流れ実験の成果として、ある流れ条件で血栓発達のしやすさがピークを示す事を明らかにした<sup>2</sup>。加えて、理論的な裏付けにも成功した<sup>3</sup>。

### 2. 研究の目的

本研究では更に詳細な血栓発生メカニズム理解を可能にするため、先端顕微鏡撮影技術ともものづくり技術、更に形態学的な画像解析スキルを応用する事でマイクロスケールで血小板細胞のコラーゲン繊維への粘着挙動の仕組みを解明する事を目的とした。

### 3. 研究の方法

コラーゲンと血小板をそれぞれ標識する手法を検討するために位相差顕微鏡を簡易的に共焦点化する技術を導入した。この技術を利用した2色蛍光標識撮影はうまく機能できなかった。そこでまずは原点としての通常観察法に戻り、コラーゲン繊維と血小板の関係を定量化する画像解析手法を構築した。その後、以下の実験を実施した。

Nycomed 社製のタイプ I コラーゲン線維 (Horm collagen) 溶液 [10mg/dl] を 76mmx52mm のスライドガラス (Matsunami S9213) 中央部

に 10  $\mu$ L 滴下後に 10 分間放置したものを血管損傷部位モデルとして使用した。これを流路幅 24mm 流路深さ 0.2mm の四角形断面のチャンバへその底辺としてマウントし、このチャンバへシリンジポンプ (Model 133 MA1 55-3333, Harvard Apparatus) にて全血を 120 秒間注入する事で 2 次元ポアズイコ流れを作用させ、チャンバ内のスライドガラス上のコラーゲン繊維上の粘着血小板を撮影した。この実験では理論壁面せん断速度を 348 [1/s] と設定した。撮影画像について、MATLAB ソフトウェア (MathWorks, version 9.7, (R2014a)) を用いて、流れとなすコラーゲン繊維の角度と血小板粘着の容易さの関係性を検証した。その手順を以下に示す。1. はじめに撮影画像上のガラス表面のコラーゲン繊維形態を抽出した。その方法は、2 次元画像上における全てのコラーゲン繊維の持つ線分情報を曲線分として近似する事で導出した。2. 導出した線分を血小板スケールで分割する事で、コラーゲン繊維に対する血小板の最多粘着可能数と流れとなすコラーゲン繊維角度の頻度を導出した。3. 血流を与えた後に残った粘着血小板があるコラーゲン線維部分が血流となす角度情報を抽出した。4. 以上の工程から得た、理論上のコラーゲン繊維角度頻度と粘着可能数に対して、粘着血小板数とそこでのコラーゲン繊維角度の頻度を導出し、これらの比率を評価する事で、コラーゲン繊維の流れとの角度と血小板粘着の容易さを比較した。実験は 7 回施行した。

### 4. 研究成果

Fig1 は、ガラス表面にコーティングされたコラーゲン繊維について、画像解析の結果見積もられた血小板スケールのコラーゲン繊維角度頻度・理論最多粘着可能数、結果としての粘着血小板を有したコラーゲン繊維の角度の頻度の比較を Mean  $\pm$  SD で示す。コラーゲン線維角度は、繊維が流れと平行に近い順

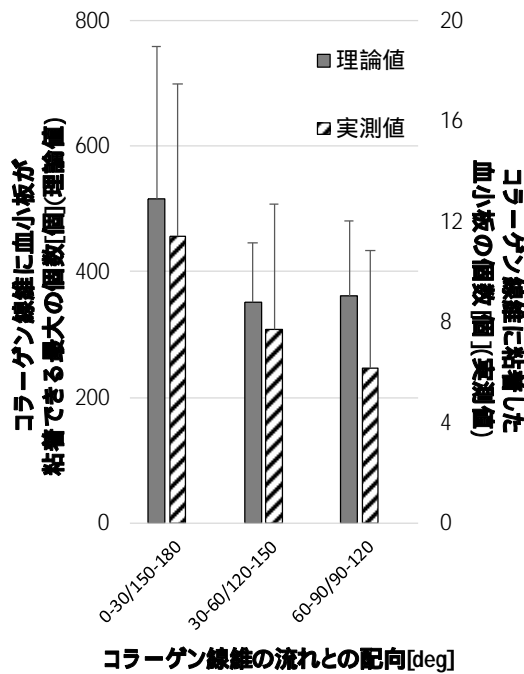


Fig.1:コラーゲン繊維に対する粘着可能な理論最多血小板数(理論値)と血小板粘着部のコラーゲン繊維勾配(実測値)との比較

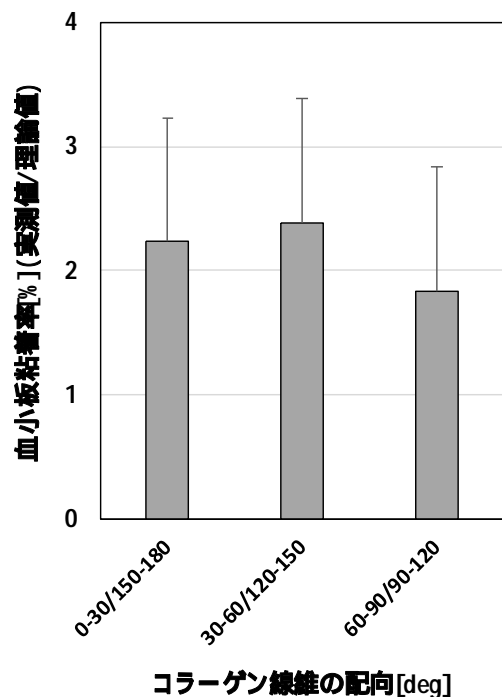


Fig2 : 最多粘着可能血小板数(理論値)に対する実測した血小板数の割合(コラーゲン繊維勾配にてクラス分け)

に 0-30/150-180[deg], 30-60/158-180[deg] 60-90/90-120[deg], というように 3 通りに分けて比較した.

Fig2 に、Fig1 の 2 本の棒グラフ同士を割り算して得た粘着の容易さを示す。この図からは、中間角度において最も粘着の容易さが優れた結果となった。その一方で、SPSS でノンパラメトリック検定の結果は、各角度間で有意差が得られなかった。

血小板粘着挙動とコラーゲン繊維角度との関係性検証のため、本研究は、コラーゲン繊維形態と粘着血小板部位の情報抽出方法、そして、繊維角度と血小板粘着の容易さとの関係性を検証する方法を提案した。現時点では関係性に法則性が統計的に得られなかったが、その判断には更なる検討が必要と考える。本研究は、血小板粘着挙動と流れに対するコラーゲン繊維角度との間の関係検証方法を提案した。

#### 引用文献

- 1) K. Affeld and J. Gadischke, "Shear Rate and Thrombin Transport", in Biofluid Mechanics, No107 edited by D. Liepsch (1994), pp.35-40
- 2) Watanabe N., Affeld K., Schaller J., Schmitzmeier S., Reiningger A.J., Goubergrits L., Kertzsch U., Investigation of the human platelets' adhesion under low shear condition in a rotational flow chamber.. Journal of Biorheology 2011. 25:64-70.
- 3) Affeld K., Goubergrits L., Watanabe N., Kertzsch U., Platelet Deposition to Collagen-Coated Surface at Low Shear Rates -Experimental Results and a Numerical Monte Carlo Model. Journal of Biomechanics 2013. 46(2):430-436.

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

大石麻代, 町村幸夫, 吉田脩右, 渡邊直夫, 血栓形成可視化実験のための最適コラーゲンコーティング条件導出、**LIFE2015** 九州産業大学 2015 年 9 月 9 日 講演要旨集 p66

大石 麻代, 花房 昭彦, 町村 幸夫, 吉田 脩右, 渡邊 直夫, 流れに対するコラーゲン繊維の傾斜角度と血小板の粘着容易さの関係性評価方法の検討, **第 39 回日本バイオレオロジー学会年会**, 東海大学校友会館 2016 年 6 月 19 日発表予定

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 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生命科学

科・准教授

研究者番号：00568644

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：