

図4 微小血管における血小板密度分布。左段：細動脈。右段：細静脈。

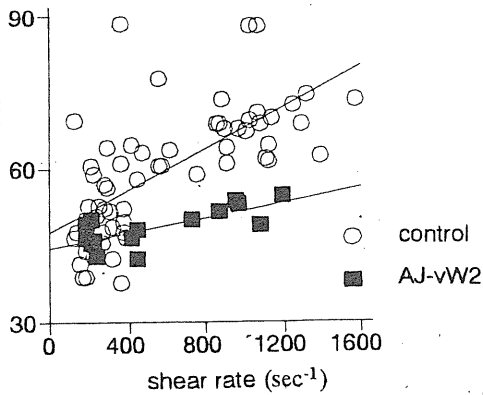


図5 微小血管における shear rate と傍内皮領域の血小板密度の相関関係と anti-vWF MoAb AJvW2 の効果。

存在下で GP1b 依存性の凝集反応を示すことが *in vitro* で報告されているが、その生理的意義は十分には明らかにされていない。今回明らかにされた成績は、shear rate の高い細動脈において、血小板が GP1b-dependent に microaggregate を形成し、軸流から傍内皮辺縁流への分布シフトが起きたことを示唆している。すなわち本成績は人工血小板を細動脈周辺のような高い shear のもとで、血管壁と相互作用させるためには GP1b と vWF の結合が不可欠であることを意味している。したがって本年度の研究により血小板のミメテイクスを設計しこれを shear stress の作用する血管内で生理的に血管壁と相互作用させるためには、表面に GP1b をコーティングした微小粒子を作成することが必要であることが明らかにされ、人工血小板開発のための設計原理のひとつが提示されたことになる。現在、

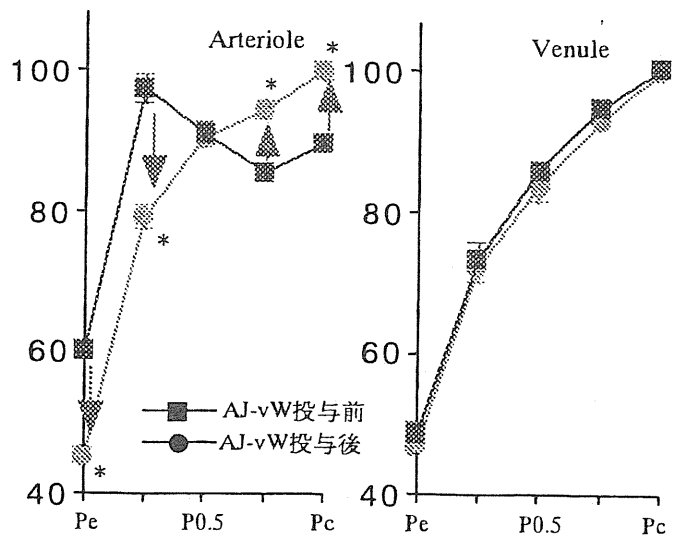


図6 anti-vWF MoAb AJvW2 投与による血小板密度分布の変動。左段：細動脈。右段：細静脈。

GP1bの機能ドメインを外側に表出したリポソーム粒子(分担研究者、村田満、西谷孝子博士より供与)を蛍光標識して、その挙動を同じ微小循環システムを用いて検討を進めている。

E. 結論

新規生体蛍光顕微鏡システムにより血小板の体内挙動が細動脈、細静脈で大きく異なることが示され、その違いはGP1b-vWFを介した血小板反応により起こることが示唆された。また血小板はコントロールの状況下でもミリ秒単位で内皮細胞とのtransient adhesionを起こしていることが示された。人工血小板を投与する対象として臨床上最も重要となる血小板減少症におけるspontaneous bleedingのメカニズムは依然として不明である。このことは血液中の1-2万/microliterの血小板がなんらかの機序で微小血管のpermeabilityを抑制的に調節している可能性を示唆している。今後傍内皮細胞域の血小板の存在意義と止血機序の関係をさらに検討すると同時に、正常血管、障害血管におけるGP1b-coated liposomeの微小循環挙動を解析する予定である。

F. 研究発表

- 1: 論文発表 未
 - 2: 学会発表
- 第25回日本医学会総会シンポジウム
「微小循環における血球接着分子と炎症反応」
1999、4月(予定)

謝辞

研究に御協力いただいたJT医薬探索研の玉谷卓也博士、早稲田大学理工学部土田英俊教授に深謝致します。また動物実験の遂行に直接寄与した片山富博先生にも深謝致します。

分担研究報告書

人工血小板の最適設計に関する計算流体力学的研究

分担研究者 山口隆美 名古屋工業大学生産システム工学専攻教授

研究要旨 本年度においては、昨年度までに開発した微小領域の流れ-構造相関計算力学問題を取り扱うことができる計算力学シミュレーションシステムを用い、自然および人工の血小板が血管壁に粘着集積して血栓を形成する場合に、血栓の形状およびサイズによって、いかなる血行力学的な力が血流から働くかを検討し、人工血小板の設計における集積効果を見積もるための基礎的な資料を得た。

A.研究目的

がん治療研究の普及・高度化にともなって、血小板輸血の需要は急速に増加しており、人工血小板の開発は、わが国がん治療医療において緊急の課題である。血小板は、血流中において血管壁の損傷箇所、出血部位に選択的に到達して止血の効果をあげることが必要とされている。そこで、開発される人工血小板も血流中においてこのような機能を発揮しなければならないが、そのための最適な形状など設計のためのパラメータは不明である。本研究は、スーパーコンピュータを用いた計算流体力学的手法により、人工血小板として使用する微小粒子と血流の相互作用を解析し、その形状、寸法などについての最適設計を行うための方法を開発し、これを実際の人工血小板の開発に応用することを目的として実施する。

B.研究方法

人工血小板の開発には、血小板機能を代替するものとして使用することが検討されている、リポゾーム粒子、アルブミン重合体、赤血球などの微小粒子のサスペンション（懸濁液）における振舞を知る必要がある。このためには、おおむね次に掲げる4種類の力学的相互作用とその結果を検討する必要がある。

- 1.分散媒-血漿、分散質-粒子の力学的相互作用による微小粒子の分散と分布
- 2.血小板による止血作用は、血管壁において実現されるものであるから、血管壁の物理的、化学的性質を考慮にいたした、微小粒子まわりの流れと粒子の相互作用の解析
- 3.臨床応用においては、赤血球の濃厚なサスペンションである血液中で使用するの
で、他の粒子との衝突などの相互作用を含めた解析
- 4.形成される血栓が安定に止血効果を発揮するための力学的条件の解析

本研究に予定されている当初3年間の、前半においては、解析手法の確立、計算力学の方法論の検討、さらに、同時に進行する人工血小板のモデル化などを行い、後半においては、これらの開発された解析手段を用いて、設計された人工血小板の力学的特性を、各種の生理的・病理的条件の下で計算し、その得失をあきらかにし、あわせて、これらの経験をもとに最適な設計原理を追求する計画とした。

計算流体力学的手法としては、血漿中における人工血小板粒子の流れとの力学的相互作用を検討する目的であるので、非圧縮性 Newton 粘性流体に対する Navier-Stokes 方程式を有限体積近似で、時間進行法でとくいわゆる SIMPLE 法を使用する。本方法は、すでに、応用理工学領域においてほとんど確立された方法であるので新たに計算コードなどを開発する必要がな

いという利点がある。

人工血小板粒子のモデリングには、任意形状の物体境界を計算領域に写像できる境界適合座標系を用いる。人工血小板が血管壁に近接する場合には、血小板と血管壁とくに内皮細胞との相互作用を考慮に入れる必要があるため、内皮細胞のモデルとしては、我々が開発している動脈内皮細胞のモデルを使用することとする。さらに、壁在の血栓のモデルとして上述内皮細胞モデルを発展させたパラメトリックな3次元形状をもつ血管壁変形のモデルを開発する。

C. 研究結果

平成9年度においては、上記の全体計画のもと、とくに、微小粒子と血漿の流れの相互作用に関する計算流体力学解析のための基礎的手法の確立を図った。

平成10年度においては、以上の結果を踏まえ、自然および人工の血小板が血管壁損傷部位に集積し止血血栓を生成する機構における、血流の力学的影響を開発した計算力学の手法で検討した。この結果、生成される血栓の絶対的なサイズではなく、流れの方向から工学でいうところのアスペクト比が、血流と血栓相互作用において重要であることがわかった。このアスペクト比の値と、流れのパラメタの間には、ある種の共鳴関係があり、最大の血行力学的影響が血流から及ぼされる血栓の形状は、かならずしもサイズが大きいものではないことがわかった。

D. 考察

すでに、昨年度の報告書において指摘したように、人工血小板がその機能を果たすためには、生理学および流体力学には次のような条件が必要であると考えられる；
(1) 人工血小板粒子が流血中において破壊されずに所定の生存期間中機能を発揮できる状態にあること。
(2) 出血あるいは血管壁の損傷部位に集中して活性化状態に移行すること。

(3) 必要とされる部位において、他の凝固因子と協同して、必要な寸法の血栓を形成し、止血を行うこと。

(4) 非損傷部位などの血流中においては、安定で不必要な活性化を起こさないこと。

(5) 設計寿命が尽きた場合、生体に害をなすことなく吸収あるいは排泄されること。
もとより、これらの条件の大部分は、生体組織としての血小板において、いかなる機構を通じて実現されているのか不明な点も多く、このような機構の解明と人工血小板の設計は平行して実施されねばならない。本研究においては、設計された人工血小板粒子が血流中においてどのような力学的挙動を示すかを解析することを通じて逆に、生体由来の血小板の挙動の機構に対する理解もすすめようとするものであり、従来このような研究は実施されることがない。従って、これまで知られていることから結果を積み上げる研究が必要であり、この意味で、昨年度は、内皮細胞のモデリング、微小粒子のモデリングなどを行い、本年度は、生成される血小板血栓に対する血行力学的影響を見積もることができた。

E. 結論

昨年度までに開発した微小領域の流れ一構造相関計算力学問題を取り扱うことができる計算力学シミュレーションシステムを用い、自然および人工の血小板が血管壁に粘着集積して血栓を形成する場合に、血栓の形状およびサイズによって、いかなる血行力学的な力が血流から働くかを検討し、人工血小板の設計における集積効果を見積もるための基礎的な資料を得た。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 山口隆美, 小林 拓史, 山本 康人, 血流と血管壁の力学的相互作用の計算バイオメカニクス, 計算工学, 3(1)8-15, 1998
2. 山口隆美, 血流のシミュレーションと動脈硬化, 血管と内皮, 8(3)11-18, 1998
3. T.Takamasa, T.Yamaguchi, Y.

Yamamoto, K. Sugimoto and K. Yamashita, Oblique alignment of stress fibers in cells reduces the mechanical stress in cyclically deforming fields, European Journal of Cell Biology, 77: 91-99, 1998

2.学会発表

- 1.山口隆美, 山本康人流れ負荷に対する培養内皮細胞の動的変形過程のシミュレーション (内皮細胞の創発的形態形成の計算実験), 第10回バイオエンジニアリング講演会, 1998年1月25日
2. 山口隆美, 小林拓史粥状動脈硬化症病変部が血流から受ける力学的影響の数値解析-, 第10回バイオエンジニアリング講演会, 1998年1月25日
3. 山口隆美血流と血管壁の計算バイオメカニクス, 第8回ヒューマンライフ支援バイオメカニクス研究会, 1998年3月17日
4. 山口隆美粥状動脈硬化症病変の分布が動脈の分岐によって異なるのは何故か--剥離渦と分岐のサイズの関係, 日本機械学会第75期通常総会講演会, 1998年3月31日
5. 山口隆美, 山本康人, 劉 浩, 吉田 洋二粥状動脈硬化症病変の局在と動脈分岐の形-計算流体力学的検討, 第37回日本エム・イー学会大会, 1998年5月15日
6. 山口隆美, 小林拓史, 劉 浩, 急性冠症候群(ACS)をもたらす粥状硬化プラーク破裂の力学的機構, 第37回日本エム・イー学会大会, 1998年5月15日
7. 山口隆美, 山本康人, 粥状動脈硬化症病変の分布と動脈の分岐形状に関する計算流体力学的検討, 第3回日本計算工学会, 1998年5月27日
8. T. Yamaguchi and H. Liu, Three-dimensional hydrodynamics of tadpole swimming, 3rd World Congress of Biomechanics, 1998年8月5日
9. T. Yamaguchi, T. Kobayashi and H. Liu, Fluid-Wall Interactions In The Collapse and Ablation of Atheromatous Plaque in Coronary Arteries, 3rd World Congress of Biomech., 1998年8月4日
10. T. Yamaguchi, T. Takemasa, Y.

Yamamoto, K. Sugimoto and K. Yamashita, Stress Fibers Align Themselves Obliquely in Order to Reduce the Mechanical Stress in Cyclic Deforming Fields, 3rd World Congress of Biomechanics, 1998年8月8日

11. T. Yamaguchi and H. Liu, Computational Fluid Mechanical Study of the Alignment and the Dealignment of Endothelial Cells Under the Fluid Flow, Japan-USA-Singapore-China Conference on Biomech., 1998年8月
12. 山口隆美, 内皮細胞のずり応力検知機構には飽和と不応期があるのではないか, 第1回日本血管細胞生物学会, 1998年9月12日
13. 山口隆美, 武政 徹, 杉本 啓治, 山下和雄, 律動的伸縮刺激に対してストレスファイバーは斜めに配向する, 第1回日本血管細胞生物学会, 1998年9月12日
14. 劉 浩, 山口隆美, 狭窄部後の血流動態の計算流体力学的解析, 日本機械学会第76期全国大会, 1998年10月2日
15. 山口隆美, 劉 浩, 血流と血管壁の相互作用のもとでの血管形態形成, 日本機械学会第76期全国大会, 1998年10月3日
16. 山口隆美血液流れと構造の相互作用の計算生体力学と人工臓器, 第36回人工臓器学会大会, 1998年10月23日
17. 山口隆美, 粥状動脈硬化症の発症・進展機構における流れ・構造相関と物質輸送問題, 1998年度熱工学講演会, 日本機械学会熱工学部門, 1998年11月14日
18. T. Yamaguchi, H. Liu, Interactions between oscillatory flow and spasmic coronary artery -a FVM study with prescribed moving wall-, 1998 ASME International MEchanical Engineering Congress and Exposition, 1998年11月
19. T. Yamaguchi, H. Liu, Computational visualization of external and internal biological flows with fluid-wall interactions, 1998 ASME International MEchanical Engineering Congress and Exposition, 1998年11月

細胞近傍の微小流動及び微粒子運動の計測と解析

分担研究者 谷下 一夫 慶応義塾大学理工学部教授

研究要旨 人工血小板の機能を評価するため、微粒子の運動と流れを解析する流体力学的手法を開発した。モデル内皮細胞近傍の粒子の運動と速度を微粒子追跡法（PTV）を用いて定量化し、速度分布や細胞表面の壁面剪断応力分布を求めることに成功した。流れに適応していない内皮細胞では細胞の頂点で剪断応力が最大となり、比較的高い剪断応力の分布が広い範囲に及んでいるが、流れ方向に伸長配向している内皮細胞では剪断応力の大きさが軽減されている。この方法を用いて血管壁近傍の人工血小板の運動を計測、解析し、機能評価を今後行って行く。

A. 研究目的

血小板は血管壁の損傷部位に凝集して止血効果を生む出すが、その機能を人工血小板に持たせるには、人工血小板の血液中の振る舞いを明らかにする必要がある。血小板は血流中で活性化して凝集し、血管壁に付着するため、血管壁近傍における人工血小板の運動の解析及びその運動制御が最も重要なポイントとなる。ところが従来の流体力学では壁近傍の流れや粒子の運動を把握することが困難であるため、壁近傍の流れの測定方法を開発する必要があり、昨年より動脈壁表面の内皮細胞近傍の微視的流れの測定技術を開発してきた。昨年度は主に細胞形態を三角関数状の形態で模擬し、その近傍の流れを測定することにより、方法の信頼性や不確かさを明確にした。昨年度に引き続き、今年度では実際の内皮細胞近傍の流れの測定方法を開発し、速度分布や細胞表面の壁面剪断応力分布を求めることとした。人工血小板としてはリポソームを利用する方法が有望視されているが、リポソームの大きさは約200nmで極めて小さく、リポソーム粒子の運動の測定も簡単ではない。今年度では、暗視野顕微鏡を用いて200nmのリポソーム粒子の平行平板間の平

面ポアゼイユ流れにおける速度と濃度分布を予備的に測定した。

B. 研究方法

(1) 細胞の形態変化の観察および形態測定

1. 細胞培養

ウシ大動脈由来の内皮細胞（継代数5~9）を培養フラスコに継代培養し、コンフルエントになった内皮細胞を平行平板流路の壁面に培養した。培養中は別の蓋を取り付けてある。細胞を光学顕微鏡で観察するために、このチャンバーの中央部にはカバーガラスが貼り付けてあり、カバーガラス上で細胞がコンフルエントになった時点で、流路の上のチャンバーに付け替えた。

2. 細胞への流れ負荷

内皮細胞を培養した平行平板流路は、平板間距離0.2mm、幅20mm、長さ50mmで、十分助走区間をとることにより、流路の中央部での流れは2次元ポアズイユ流とみなせる。流路は共焦点レーザー走査型顕微鏡(MRC-600 Bio-Rad社)のステージの上に設置し、下から観察する。ローラーポンプで回路内に培養液(Dulbecco's Modified Eagle Medium, GIBCO)を循環させ、内皮細胞に定常流を負荷した。流量は、壁せん断応力が1.5Pa

となるように、ローラーポンプの回転数をあわせ
た。回路内には、ローラーポンプの拍動を除去す
るための Damping Chamber, 平行平板流路内への
空気の混入を防ぐための Bubble Trap を設置して
ある。実験中, Reservoir と Damping Chamber は
37°Cの保温槽に浸し, 顕微鏡のステージ上はヒー
ターで 37°Cに保った。また CO₂ 5%, Air 95%の
混合湿潤ガスを Reservoir に通気することで, 培養
液の pH を 7.4 に保つようにした。初めはこの方法
で実験を行っていたが, 実験終了後の pH を測って
みたところ約 8.3~8.5 に上がっていたので, 濃度
が 15 mM/l になるように HEPES (分子量 238.31)
を培養液に入れて pH を保つようにした。

3. 細胞の形態変化の観察

共焦点レーザー顕微鏡により, 流れを負荷した
内皮細胞を 20 倍の対物レンズで観察した。まず初
めの観察方法として, 最長で 72 時間まで, CCD
カメラを用いてビデオ撮影を行った。撮影のため,
照明はつけたままにした。

次に, 照明をあてることによる内皮細胞へのダ
メージを減らすために, ビデオ撮影をやめ, 6~8
時間ごとに位相差像をとり, これも最長 72 時間ま
で観察した。

4. 細胞断層像の測定

チャンバーを顕微鏡のステージ上に設置してか
ら, 流れを負荷する前にコントロールの状態にお
ける内皮細胞の断層像測定を行った。測定時には
蛍光色素 Fluorescein Isothiocyanate-Dextran
(FITC-Dextran, 平均分子量 2,000,000,
SIGMA) を培養液に溶解させたもの (濃度 1 g/l)
を流路内だけに注入し, 細胞膜外を染色した。測
定は 60 倍の対物レンズで Z 方向に 0.3 μm 間隔で
記録した。測定終了後すぐに培養液で流路内を洗
浄し, 流れをかけ始めた。その後, 位相差像によ
り変化の様子を観察した。

5. カバーガラス上に培養した内皮細胞への流れ 負荷実験

カバーガラス上の内皮細胞がコンフルエン
トになった時点で流路にカバーガラスをはめ
込んで, 流れをかけ始めた。この流路では実
験中に内皮細胞の様子を観察できないので,

顕微鏡のステージの上には置かずに, 保温槽
の中に入れた。48 時間の流れ負荷後, カバー
ガラスを取り外し FITC-Dextran で内皮細胞を
膜外染色し, 断層像を測定した。

(2) 細胞拡大モデルの作製

1. 断層像からの立体構築

共焦点レーザー走査型顕微鏡により得られた細胞
断層像を平滑化, 二値化することにより, 輪郭抽
出を行い, 細胞形態の等高線図をつくった。等高
線処理は共焦点レーザー走査型顕微鏡の 1 フレ
ームの大きさ (240 μm×160 μm) で行った。等高線
の高さ情報をもとに 2.5 μm 間隔の格子点上の補間
高度を求めるため, 格子点から最短距離の細胞の
頂上とその格子点を通る直線と, 等高線の交点を
求めて線形補間した。さらに, 格子点上の高度を
もとに三角パッチ (0.0625 mm×0.0625 mm の
メッシュにおける格子点上の各点を結んだもの)
を施し, 立体構築した。

2. 光造形法によるモデル作製

培養内皮細胞の形状測定によって得られたデー
タから, 光造形法を用いて細胞拡大モデルを作製
した。

光造形による成型とは, 光硬化性樹脂を紫外
(UV) レーザー光で露光, 硬化させ, 硬化層を積
層して 3 次元成型物を作製することである。レー
ザー光はソフトウェアの指示にしたがって X-Y 方
向に自由自在に走査し, 硬化する部分だけを露光
する。レーザー光の走査は, 成型物の設計データ
(3 次元 CAD データ) をもとにして行う。

光硬化性樹脂をレーザービームで走査して一定
以上の露光を与えると, 液体樹脂は硬化する。こ
の装置では, 成型パラメータの中に指定した硬化
深度が得られるようにレーザーの走査速度は自動
的に調整される。

成型物 (パーツ) は, まず底となる第 1 層を成
型することから始まり, エレベータに取り付けら
れているプラットフォームを一度, 樹脂液中に浸
す。次に, ほんの少しだけ液面から表面がでる高
さに設定する。こうしてプラットフォームの上面
をおった光硬化性樹脂の薄い層の上からレーザ
ー光を照射すると, 樹脂はプラットフォームのす
ぐ上で硬化するので, 第 1 層目はしっかりとプラ

ットフォームに接着する。

第1層目が露光・硬化できたら、プラットフォームを下げ、第1層目全体を液体樹脂の中に沈め、層表面全体に液体樹脂がかぶるようにする（リコート）。その後、硬化樹脂をプラットフォームごと持ち上げ、液体樹脂が1層分に相当する厚さ（一般に0.10~0.25 mm）になるようにし（エレベーション）、余分な樹脂はリコタブレードではき取る（スウィープ）。この上に、第2層目成型のためのレーザー光を走査して樹脂を硬化する。この操作を繰り返し行い、薄い層を重ねていくことによって立体成型物を作る。

レーザー硬化した成型物は、装置から取り出し洗浄する。この時レーザー光だけで硬化した成型物は、まだ完全に硬化していない（グリーン状態）ため、比較的波長スペクトルが広い紫外光で完全に硬化させる（ポストキュア）。

硬化のとき、層の厚みやレーザー光の走査速度・強度などは、樹脂によって異なるが、これらの数値の選び方によって成型物の精度や強度、成型時間が大きく異なるため、あらかじめ最適化しておく必要がある。

光造形では紫外線を発振する He-Cd レーザー（発振波長 325 nm）、または Ar イオン・レーザー（発振波長 351 nm と 364 nm）を使う。これらのレーザービームは、互いに垂直に設置された走査ミラーを介して3次元 CAD のデータにしたがってコンピュータ制御で走査する。レーザービームの直径は液面上で 0.2~0.3 mm である。この装置には硬化ライン幅補正機能があるので、ビーム幅の大きさによる成型物の寸法誤差はほとんど出現しない。He-Cd レーザーと Ar イオン・レーザーの発振モードは異なっているが、硬化ラインの形状にはあまり影響しない。レーザーの走査速度は最適な露光量が得られるように自動的に決まる。露光による硬化深度は成型法と層の厚さにもよるが、一般に 0.10~0.50 mm である。

また、走査位置を正確に保つために液槽の端にプロファイラを設置し、毎層レーザー走査を行うごとに確認・補正している。さらにミラーの走査角と液面での位置関係は、3D Systems 社の開発した特殊キャリブレーション・プレートとソフトで各装置ごとに精度確認しているので、走査位置は CAD データに忠実にできる。

立体構築により得られた形状データを光造形用データ、STL (Stereo Lithography) 形式に変換し、光造形装置 (SLA250, 3D Systems 社) を用いて培養内皮細胞の 100 倍拡大モデルを作製した。光硬化性樹脂はエポキシ樹脂 (XB5170, 日本チバガイギー社) を使用した。光硬化性樹脂は透明度が低く、そのままでは流路内の可視化ができないため、シリコンで型をとってから透明度の高いエポキシ樹脂に転写した。転写後、表面を研磨剤 (アクリルサンダー社) で磨いた。

(3) 細胞モデル近傍の流速測定

1. 拡大平行平板流路

拡大平行平板流路を用いて流速測定を行った。平板間距離は 20 mm で、内皮細胞拡大モデルの拡大倍率に合わせた。流路幅は 200 mm、長さは 300 mm である。流路の中央部に蓋をつくり、モデルの取り替えが可能になっている。リザーバー部分の自由水面での静水圧により一様流をつくり、流路の入口部での乱れの影響を減らすことができる。また、閉鎖系ではないので余分な加圧が避けられる。

2. 流れの可視化

流れを可視化するために、トレーサ懸濁法を用いた。トレーサ粒子として、比重 1.62 g/cm³、粒径 10 μm のシリカビーズ (SiO₂, MFS-100 リキッドガス社) を用いた。作動流体は、光学的ひずみをなくすために、モデルの素材であるエポキシ樹脂 (屈折率 1.50) と屈折率をできるだけ合わせたヨウ化ナトリウム (NaI) 飽和水溶液 (濃度 66 %, 屈折率 1.49, 動粘性係数 1.64 × 10⁻⁶ cm²/s (20°C), 比重 1.83 g/cm³) を用いた。また、トレーサ粒子との比重も合わせて、流体に対しての粒子の追従性を向上させた。

流路は、蓋の部分にモデルを取り付け、顕微鏡 (TMD-300, Nikon 社) のステージの上に置き、ローラーポンプで作動流体を流した。細胞に流れを負荷する実験とレイノルズ数が合うようにバルブで流量を調節した (Re = 13.7, 流量 0.27 l/min)。光源はファイバー照明装置を用い、顕微鏡の対物

レンズに直接光が入らないようにした。粒子の動きは、10 倍の倍率で観察し、顕微鏡に接続した CCD カメラにより VTR に記録した。

3. 拡大平行平板流路内の一様流の流速測定

流路内の流れが一様であることを確認するために、流路にモデルを取り付けずに、LDV（レーザドップラー流速計）を用いて流路中央部の、流速測定を行った。流量は 0.27 l/min, 作動流体を水、トレーサ粒子をナイロンパウダー（粒径約 5 μm）とした。また、同じ状態で、PTV を用いて流路中心部における流速を測定した。

(4) PTV システム

粒子直接追跡法；Particle Tracking Velocimetry (PTV)，とは、可視化された流れの画像をコンピュータ処理して定量的データを得る方法の 1 つである。内皮細胞拡大モデル近傍の流速測定において汎用ソフト、Current PTV を用いる。以下にそのシステムについて述べる。

1. 粒子抽出手順

トレーサ粒子で可視化された流れは、連続光で照明されて、シャッタ機能を持つ CCD カメラによってフレーム間隔 1/30[s] で VTR に記録される。このビデオ信号は高速 A-D 変換器でデジタル信号（白黒デジタル画像）に変換されイメージメモリに格納される。これにより、4 時刻の連続する瞬時画像データが得られる。次に画像中のトレーサ粒子を選別するため適当な輝度の閾値を決め二値化、ノイズ除去を行い、粒子の重心位置 $P(X_g, Y_g)$ を決めるラベリング処理を行う。各粒子の構成画素を (X_i, Y_i) 、各粒子の面積を A 、各粒子の構成画素数を n 、1 画素の面積を a とすると、 $P(X_g, Y_g)$ は次式により算出される。

$$X_g = \sum_{i=1}^n X_i \cdot a / A, \quad Y_g = \sum_{i=1}^n Y_i \cdot a / A \quad (1)$$

2. 粒子追跡手順（4 時刻粒子追跡法）⁽¹²⁾

次に $t_0 \sim t_3$ までの 4 時刻の同一トレーサ粒子の対応付けを Fig. 2.3 のような方法で行う。まず時刻 t_0 の画像中の粒子重心位置 $P_{0,1}$ を選び、これを中心とする半径 R_1 （流れ場全体で予想される $\Delta t_1 = t_1 - t_0$ 間の最大移動距離程度の値）の円 S_1 を

時刻 t_1 の画像中に設定する。 S_1 内に存在するすべての粒子は $P_{0,1}$ の移動先候補で、その内 1 つを $P_{1,1}$ とする。 $P_{0,1}$ と $P_{1,1}$ より推定される次の探査領域、半径 R_2 の円 S_2 を時刻 t_2 の画像中に設定し、次の移動先 $P_{2,1}$ を選ぶ。ここで半径 R_2 は $P_{1,1}$ の速度ベクトルがある程度推定されているので、処理速度を上げるため、 R_1 より小さくする。同様に時刻 t_3 の画像中から $P_{3,1}$ を選ぶが、粒子の $t_0 \sim t_2$ 間の移動履歴を考慮するため、 θ_a と θ_a' が等しくなるようにする。このような操作をすべての経路について行う。この中から 1 つの経路を選ぶには、以下の様な条件を用いる。まず、 l_1, l_2, l_3 は R_1 を超えないとし、4 時刻間の移動距離の分散を σ_1 、移動角度の分散を σ_2 とすると、

$$\begin{aligned} \sigma_1 &= \left[(l_1 - \bar{l})^2 + (l_2 - \bar{l})^2 + (l_3 - \bar{l})^2 \right] / 3 \\ \sigma_2 &= \left[(\theta_a - \bar{\theta})^2 + (\theta_b - \bar{\theta})^2 \right] / 2 \end{aligned} \quad (2)$$

ここで \bar{l} は粒子の平均移動 $(l_1 + l_2 + l_3) / 3$ 、 $\bar{\theta}$ は $(\theta_a + \theta_b) / 2$ で、

$$\sigma = \sigma_1 + \bar{l}_2 \sigma_2 \quad (3)$$

を最小とする組み合わせの粒子経路を同一トレーサ粒子の奇跡とする。

3. 格子点への補間

次に検出された速度ベクトルを格子点上に補間する手順について述べる。まず最上部、最左部での格子点での速度ベクトルを、格子点に最も近いトレーサ追跡結果で近似する。格子点 A における速度ベクトルを求める場合、点 A を中心とした円領域を設定し、この円領域内に存在し、かつ右下方向 (AB-AF 空間) の領域に存在するトレーサ追跡結果を捜す。このベクトルと点 C, D におけるベクトルの始点で形成される三角形空間で面積座標計算を行い点 A における速度ベクトルを計算する。ただし設定する領域内にトレーサ粒子が存在しない場合には、点 C, D での速度ベクトルから平均化演算で計算する。以下に計算式を示す。 S を三角形の面積、 $u(u, v)$ を速度ベクトルとする。

$$\begin{aligned} &\text{トレーサ粒子があるとき} \\ (u, v) &= \left(\sum S_i \cdot u_i \right) / \left(\sum S_i \right) \end{aligned}$$

(4)

トレーサ粒子がないとき

$$(u, v) = \{(u_2, v_2) + (u_3, v_3)\} / 2$$

(5)

4. PTV の適用範囲および設定条件

まず、PTV において適用可能な流速の範囲について述べる。粒子が時間間隔 Δt の間に移動する距離を $\Delta L_i = V \Delta t / p_i$ [画素] と表す。ただし p_i [m/画素] は 1 画素の長さで、デジタル画像の空間分解能に相当する。また粒子径を d_p とすれば画像上の大きさは $d_i = d_p / p_i$ となる。ここでデジタル画像上での移動距離 ΔL_i は画像の画素数により制限を受け、一辺画素数の 5~10% すなわち 20~50 [画素] 程度である必要がある。また d_i は粒子重心位置の計測のために 3 [画素] 程度以上になるように倍率を設定する必要がある。よって直径 $d_p = 0.01$ [mm] のトレーサ粒子を用いた場合の p_i の上限が決まり、さらに CCD カメラでは $\Delta t = 1/30$ [s] なので、流速 V が 2~5 [mm/s] 以下という適用範囲の目安が得られる。

次に、画面上で抽出できる粒子の空間密度について述べる。同一粒子の対応づけを正しく行うためには、粒子の移動距離が平均粒子間距離に比べ十分小さい必要がある。PTV では移動距離 ΔL_i と平均粒子間距離 l_i の比 $\Delta L_i / l_i$ が 1/4 程度になるよう粒子の空間密度を設定すればよい。例えば $V = 1$ [mm/s], $d_p = 0.01$ [mm], $d_i = 5$ [画素] とすると $l_i = 70$ [画素] 程度であり、1 画面に 50~100 個程度の粒子密度である。

また画像処理上での設定の目安は、主流平均速度を \bar{U} とすると、

$$R_1 = 1.5 \times \left| \bar{U} \right| \cdot \Delta t$$

$$R_2 = R_3 = 0.4 \times \left| \bar{U} \right| \cdot \Delta t$$

(6)

である。

これらの条件を踏まえて、最適な設定を行った。測定領域は細胞拡大モデルは、中心部の細胞 1 つを囲む領域とした。また、流れ方向に x 軸、高さ方向に z 軸をとり位置決めをした。

最終的な流速情報は、1 mm × 1 mm の領域を 1

フレームとし、これを 16 × 16 のメッシュに切ったときの各格子点での補間ベクトルとなる。この補間に十分な追跡有効ベクトル (1 フレームあたり 200 個程度) を求めるために、トレーサ粒子の濃度、粒子抽出の際の二値化の輝度の閾値を調節した。

5. 流速ベクトルの 3 次元化

PTV システムにより求められた 2 次元断面の流速ベクトルから高さ方向の速度成分を求める手順について述べる。ある格子点 (i, j) を囲む微小区間を考え、 x, y, z 方向の速度成分をそれぞれ u, v, w とすにると、連続の式

$$\frac{\partial u}{\partial x} + \frac{\partial v}{\partial y} + \frac{\partial w}{\partial z} = 0$$

(7)

と $z = 0$ で $w = 0$ となることから、 z 方向の速度成分がわかる。次に実際のプログラム中でのアルゴリズムを示す。まず Fig. 3.9 の格子点を囲む微小区間をとる。 $z = 0.0$ mm に接する微小区間では、 $z = 0.1$ mm における x, y 平面の速度データを用いて以下の計算を行う。 $z = 0$ のとき $fb_0 = 0$ 、 a は微小区間の側面の面積として

$$fe_0 = \{1/4u(i, j) + 1/4u(i+1, j)\} / 2 \cdot a$$

(8)

$$fw_0 = -\{1/4u(i, j) + 1/4u(i-1, j)\} / 2 \cdot a$$

(9)

$$fn_0 = \{1/4v(i, j) + 1/4v(i, j-1)\} / 2 \cdot a$$

(10)

$$fs_0 = -\{1/4v(i, j) + 1/4v(i, j+1)\} / 2 \cdot a$$

(11)

$$ft_0 = -\{fe_0 + fw_0 + fn_0 + fs_0 + fb_0(i, j)\}$$

(12)

となり、 $-ft_0$ を次の断面における fb に代入する。これにより $z = 0.1$ mm における fb の値が求められる。これ以降は各断面における、 x, y 平面の速度データを用いて ft を計算する。

$$fe = \{u(i, j) + u(i+1, j)\} / 2 \cdot a$$

(13)

$$fw = -\{u(i, j) + u(i-1, j)\} / 2 \cdot a$$

(14)

$$fn = \{v(i, j) + v(i, j-1)\} / 2 \cdot a$$

(15)

$$fs = -\{v(i, j) + v(i, j+1)\} / 2 \cdot a$$

(16)

$$f_t = -\{f_e + f_w + f_n + f_s + f_b(i, j)\}$$

(17)

よって各格子点における速度の z 成分は

$$w(i, j) = \{f_t(i, j) / a - f_b(i, j) / a\} / 2$$

(18)

となり、PTV システムによって求められた 2 次元の速度ベクトルを 3 次元化することができる。

6. せん断応力分布

3 次元化した流速ベクトルから細胞拡大モデル表面にかかるせん断応力分布図を求めた。求め方は、まず三角パッチの 1 つの頂点からその頂点を含む面の法線方向 0.1 mm のところに点 P をとる。点 P を囲む 8 個の格子点における 3 次元補間流速ベクトルから点 P の流速ベクトルを求めた。さらに点 P の流速ベクトルから三角パッチの面に平行な成分を求め、作動流体の粘性係数を乗じてその面における壁せん断応力とした。

C. 研究結果および考察

(1) 細胞形状測定の精度評価

内皮細胞の断層像からの、3 次元形状測定の精度評価を直径 10 μm のガラスビーズ(MICROPEARL SP-210, 積水ファインケミカル) を用いて行った。

ガラスビーズの精度については、メーカーのデータによると、(標準偏差/平均粒子径) で表される変動係数が 4~5% で、標準偏差が 0.4~0.5 ということになる。測定値における標準偏差もだいたい同じくらいの値になった。参考として直径 10 μm の円の断面の半径を示したが、この程度の大きさのものを正確に測定する方法がないため、断層像からの測定結果と直接比べることはできない。

本測定における高さ方向の分解能は 0.3 μm であり、直径 10 μm のガラスビーズに対して、誤差は 3% より小さくはならない。また、さらに精度を上げるにはレンズの倍率を上げなくてはならないが、視野が狭くなってしまふ。しかし、モデル形状を測定し、モデル作製時の誤差が 5% 程度であったことを考えると、断層像からの立体構築における誤差の影響はなく、この方法が有効であるといえる。

2. カバーガラス上の内皮細胞の観測

この実験で使用した内皮細胞はカバーガラスに培養してコンフルエントになった時点で、方向はそろっていないが伸びていた。このような現象は培養中たまに見られ、継代数の若い細胞に多い傾向がある。また、流れ負荷後カバーガラスをはずす時にカバーガラスがずれている可能性があるので流れ方向は正確ではない。よって、流れの影響で細胞が伸び、配向したものとしてこの結果を扱うことはできないが、コントロールの状態とは明らかに異なる細胞形態とし、拡大モデルを作製す

3. 細胞拡大モデル近傍の流速測定

内皮細胞モデルを用いて、中心部の細胞 1 つを囲む領域で流速測定を行った。測定したモデルの高さはコントロール時で 0.72 mm、流れ負荷後のモデルで 0.48 mm であり、それぞれ 3 mm \times 4 mm の 12 フレームの領域で 5 断面、2 mm \times 6 mm の 12 フレームの領域で 6 断面の測定を行った。流速ベクトルは細胞基底面付近や細胞の壁付近で小さくなっているが、断面が高くなるにつれて次第に大きくなっていく。また細胞の形態によっても細胞近傍の流れ場が変化しており、細胞が形態変化をおこすことで、細胞自身が受けるせん断応力も変化していると考えられる。

5. せん断応力分布と細胞形態

測定した流速ベクトルを 3 次元化し、三角パッチの壁面に平行な速度勾配を求め、モデルがない場合の速度勾配を 1 として無次元化した壁せん断応力分布を求めた。

実際の細胞全体の平均の高さはコントロール時で 7.4 μm (標準偏差 1.53)、流れ負荷後で 5.1 μm (標準偏差 1.17) であり、流れを負荷した細胞は高さが低くなり、高さのばらつきも減った。これは Barbee ら⁽¹⁵⁾の報告と一致した。

流速を測定した細胞モデルにおいて、流れに平行な断面では、流れ負荷後の細胞モデルのほうが勾配が緩やかであるのに対し、垂直な断面では勾配が急になっていることがわかる。せん断応力分布を見ると、コントロール時のモデルにかかるせん断応力は強い部分の広がりが大きいのに対して、流れ負荷後のモデルでは強くせん断応力がかかる部分が減った。よって形態が変化することで、流

れから受ける刺激を減少させていることがわかった。

内皮細胞は伸張から配向までに24~48時間かかり、非常にゆっくりと変化するため、さらに途中過程における形態とせん断応力の関係も必要となる。本研究における測定方法では、細胞が配向しなかったり、細胞形態を測定する際にレーザーをあてた部分で細胞が多く剥がれてしまうという問題があるが、流れ負荷中の変化の様子を観察することができるので、応力分布を経時的に求めることが可能である。また、細胞1つ1つによっても形や大きさが異なるので、流れから受ける影響にも違いがあるはずである。よって、個々の細胞について、細胞にかかるせん断応力を調べることで、隣接する細胞間での情報伝達の解明にもつながる。

E. 結論

動脈内表面の内皮細胞近傍の流れをPTV法によって詳しく実験的に解析することが出来た。PTVでは基本的に粒子の運動を追跡して速度分布を決める方法であるため、そのプロセスを利用することによって粒子の運動そのものを解析することが出来る。従って、本年度の研究によって、内皮細胞近傍の流れの計測が可能になったということは、細胞近傍の粒子の運動を明らかにできたことと同値である。本年度の研究により粒子追跡の精度と信頼性が明らかになった。

F. 研究発表

- (1) 工藤奨、池澤憲治、松村伸治、池田満里子、岡浩太郎、谷下一夫、培養内皮細胞の高分子取り込みに及ぼす壁せん断応力の影響、日本機械学会論文集、B64巻、618号、(1998) pp.367-374
- (2) 工藤奨、池澤憲治、松村伸治、池田満里子、岡浩太郎、谷下一夫、培養内皮細胞の壁せん断応力による高分子物質取り込み変化と細胞内顆粒との関係、日本機械学会論文集、B64巻、623号、(1998)pp.2123-2131

- (3) Tanaka, G., Ueda, Y. and Tanishita, K., Augmentation of axial dispersion by intermittent oscillatory flow, Trans. ASME, J. of Biomechanical Eng., Vol. 120, (1998) pp. 405-415.

- (4) 島本敦介、氏平政伸、鈴木雅之、岡浩太郎、谷下一夫、凍結保存状態の評価を目的とした凍結赤血球懸濁液における有効熱物性値の測定、日本機械学会論文集、B64巻、625号、(1998) pp.3068-3076.

- (5) Tanaka, G., Ogata, T., Oka, K. and Tanishita, K., Spatial variation of secondary flow during oscillatory flow in model human central airways, Trans. ASME, J. of Biomechanical Eng., (to appear)

- (6) Fujioka, H., Oka, K. and Tanishita, K., Oscillatory flow and gas transport through a symmetrical bifurcation, Trans. ASME, J. of Biomechanical Eng., (to appear)

- (7) 福島修一郎、出口隆明、貝原真、岡浩太郎、谷下一夫、内皮細胞近傍の流れの計測、日本バイオレオロジー学会誌、12巻、4号、(1998), pp.226-233.

- (8) 谷下一夫、氏平政伸、生体組織保存に向けての工学的アプローチ、低温生物工学会誌、44巻、1号、(1998), pp.13-18.

- (9) Tanaka, G., Ogata, T., Oka, K., and Tanishita, K., Secondary flow augmentation in intermittent oscillatory flow in model human central airway, Advances in Bioengineering, BED-Vol.39, (1998), pp.91-92.

- (10) Ikezawa, K., Ueno, K., Ikeda, M., Oka, K., and Tanishita, K., Intracellular transport route of albumin in cultured aortic endothelial cells, Advances in Bioengineering, BED-Vol.39, (1998), pp.107-108.

- (11) Fukushima, S., Deguchi, T., Nishida, M., Kaibara, M., Oka, K., and Tanishita, K.,

Determination of microscopic wall shear stress distribution on endothelial cell model, *Advances in Bioengineering, BED-Vol.39*, (1998), pp.109-110.

(12) Fukawa, T., Takematsu, K., Oka, K., Miyahara, N., Koike, S., Ando, K., Kobayashi, H., and Tanishita, K., Reoxygenation in tumor tissues after x-ray or carbon-12 irradiation, *Advances in Bioengineering, BED-Vol.39*, (1998), pp.371-372.

(13) Kitamura, Y., Uzawa, T., Oka, K., Komai, Y., Ogawa, H., Kobayashi, H., Takizawa, N., and Tanishita, K., Microcoaxial electrode for local Nitric Oxide measurement in biological systems, *Advances in Bioengineering, BED-Vol.39*, (1998), pp.387-388.

厚生科学研究費補助金（厚生省高度先端医療研究事業：人工血液開発研究分野） 分担研究報告書

人工血小板の開発に関する研究班（血小板の凍結乾燥）

担当者 高橋恒夫 東京大学医科学研究所細胞プロセッシング研究部門

（研究要旨）血小板製剤の輸注における最大の問題点は低い保存安定性と感染症リスクの存在にある。ヒト血小板をパラホルムアルデヒドにより固定処理したのち凍結乾燥する方法は血小板機能の一部を維持したまま保存安定性を飛躍的に高めると同時に病原体を不活化する可能性が期待される画期的な手法である。我々はこの固定凍結乾燥血小板について一連の物理化学的解析を行い、その結果血小板の固定処理により血小板機能の多くが失われており、実用化には幾つかの解決すべき問題が残されていることが判明した。

A. 研究目的

長期保存可能な血小板代替物の開発を目的としてヒト血小板の凍結乾燥処理に関する検討を行った。血小板機能の一部を維持した状態で凍結乾燥する技術としては血小板をパラホルムアルデヒド固定処理したのち凍結乾燥する方法が知られている。最近 Read らによってこの血小板が動物モデルにおいて出血時間を短縮する機能を持つことが報告され、*in vitro*でも機能し得ることが示されている。我々はより優れた血小板保存法開発の最初のステップとして凍結乾燥血小板の構造と機能について一連の物理化学的解析を行ったので報告する。

B. 研究方法

原料にはバッフィコート由来ヒト血小板を用い、検討方法として、凍結および凍結乾燥血小板についてFACSによる膜糖蛋白質解析、示差走査熱量計（DSC）による溶液相変化測定、血小板凝集能測定、浸透圧抵抗性の測定、電顕による細胞構造の観察等を行った。また細胞保護作用の期待される種々の物質を添加した条件におけるこれらの物理化学的特性の変化についても測定を行った。

C. 研究結果

原料となるヒト血小板の浸透圧抵抗性は900mOsmと他の細胞に比べ低い値を示した。凍結過程の解析の結果、DSC測定により -20°C で塩析が観測され、 -120°C でガラス転移発生が検出された。DMSO添加による塩析抑制が認められ、5%濃度で最も効果的であった。膜糖蛋白質解析の結果、凍結処理によりGPIbの大幅な消失が認められた。凍結乾燥過程の解析では血小板活性化の指標であるPセレクチンの発現増加がみられた。また血小板自体の回収率も低く細胞構造での大規模な損傷が考えられる。1.8%パラホルムアルデヒド中で固定処理を行うことにより凍結乾燥過程でのGPIbの消失は完全に抑制され、Pセレクチンも検出されなくなった。電顕による観察で細胞構造の維持が証明された。しかし固定化血小板はリストセチン凝集能は示したものの、コラーゲン凝集は見られず、またトロンビン刺激による活性化も示さなかった。

D. 考察

血小板の凍結乾燥過程においてパラホルムアルデヒド固定処理は細胞構造を維持する上で非常に効果的であるが、一方で血小板活性化やコラーゲン凝集など重要な血小板機能が失われるため臨床への応用には解決すべき課題

も多い。血小板を凍結乾燥保存する上で最初に解決すべき問題には、凍結過程における細胞損傷の抑制と主要な細胞機能の維持が挙げられる。実現可能な解決法としては室温乾燥法と血小板のガラス化が考えられる。前者は最近開発されつつある技術であり蛋白構造や酵素活性の維持への有用性が示されている。後者にはHES、トレハロース等の添加物が知られており、我々の検討でもHESがガラス転移温度を上昇させる結果が得られている。また特許調査の結果ではあるが、欧米ではトレハロースを細胞内に導入することにより多くの細胞機能を維持したまま凍結乾燥保存することに成功している。今後我々はこれまでに得られた知見を活かしこれらの方法論を発展させることにより、より優れた血小板代替物の開発を目指す。

E. 結論

ヒト血小板をパラホルムアルデヒドにより固定処理したのち凍結乾燥する方法は血小板の保存安定性を飛躍的に高め、同時に各種病原体に対する不活化作用も期待される画期的な手法である。しかし血小板機能の多くが失われること、ヒトに輸注後の生体内における動態が未解明であることなど解決すべき問題点も多い。近年、脂質膜や細胞に対し優れた保存効果を持つ物質や保存法が開発されつつあり、これらの技術を応用することにより、より実用的な血小板保存技術の確立が期待される。

F. 研究発表

高橋恒夫、酒居一雄、仲井邦彦、藤川清三、田所憲治、十字猛夫、村田満、池田康夫：パラホルムアルデヒド固定による血小板保存の検討。低温生物工学会誌、vol.44(2), 83-86,1999

細胞培養系を用いた血小板代替物に関する研究

分担研究者 池淵研二 北海道赤十字血液センター 副所長

研究要旨

培養中巨核球系細胞をより効率良く増幅するために、予め造血幹細胞、未熟造血前駆細胞を増幅し、その後巨核球系細胞の分化増殖を支持する従来の培養系に移し、さらに巨核球系細胞の増幅を図るという2段階の増幅が可能であるかを検討した。ヒト造血幹細胞、未熟造血前駆細胞として臍帯血CD34+CD38-細胞を用い、Thrombopoietin (TPO), flt3 リガンド (FL) の存在下にストローマ細胞単層培養層上で共培養すると CD34+CD38- という未熟な形質をとどめた細胞が4週間で約1,000に増加した。同様にCFU-c (colony forming unit in culture) も著明に増幅され、第1段階である造血幹細胞、未熟造血前駆細胞の増幅は達せられた。しかし、このように増幅された前駆細胞をTPOをはじめとした各種サイトカインで更に培養したが、巨核球系細胞の増殖分化は得られなかった。今後、第1、第2段階のギャップを埋める検討が必要である。

リストセチン凝集能を指標にして、血小板の固定保存条件を検討した。2-4%のparaホルムアルデヒドを用い1時間固定することにより、血小板を40°C, PBS 浮遊液の状態でも12ヶ月間保存可能であった。今後は、実験動物への輸注実験を行い、生体内でどの程度の止血効果が得られるかを検討して行きたい。

A. 研究目的

血小板は多機能な細胞であり、その粘着能、凝集能、放出反応など全てを保持した代替物を人工的に作成することは困難である。そこで、血小板の直接の前駆細胞である巨核球系の細胞を *ex vivo* で大量に培養し血小板の代替物として使用できないかという考えが生まれてくる。TPOが発見されて以来、TPOに各種サイトカインを組み合わせることによって、巨核球の前駆細胞あるいはそれよりやや未熟な前駆細胞を増殖分化させ、*ex vivo* で巨核球系の細胞を著明に増幅させることが可能となってきた。しかし、成人で日々およそ 10^{11} 個も産生される血小板を補うのに十分な数の巨核球系細胞を得ることは容易ではない。そこで我々は自己再生能を持つ造血幹細胞あるいはそれに近い未熟な造血前駆細胞の数をまず増幅し、その後従来の巨核球系細胞の増幅方法を組み合わせるという2段階の増幅過程をとることによって、従来よりも効率的に巨核球を増幅できる培養法の樹立を試みた。

また、血小板の長期保存を目的とし、para

ホルムアルデヒドを用いた血小板固定の可能性も併せて検討した。

B. 研究方法

1. ヒト臍帯血CD34+CD38-細胞は、臍帯血をHES法を用い赤血球を除き、フラスコにて約1時間培養することにより付着性細胞を除いた後に、CD34+細胞分離キットにてCD34+細胞を得、さらにセルテックを用いて精製した。精製したCD34+CD38-細胞はマウスストローマ細胞株、MS-5細胞の単層培養層上に、TPO (50mg/ml) とFL (100mg/ml) の存在下に共培養した。培養後経時的に細胞を回収し、フローサイトメーターを用いCD34+CD38-細胞の数とCFU-c (colony forming unit in culture) を測定した。また、回収された細胞から再度CD34+CD38-細胞を純化し共培養を継続させた。巨核球系細胞の培養はTPOをはじめとした種々のサイトカインの存在下に無血清培地 X-VIVO を用いて行った。培養開始後経時的に細胞を回収し、細胞表面マーカーをフローサイトメーターを用いて解析し、CD41+細胞を巨核球系細胞とした。

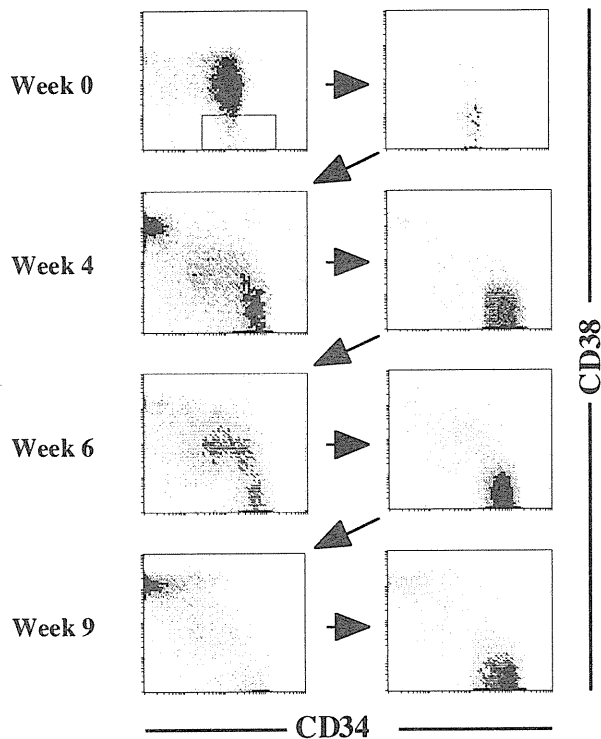


図1 Flow cytometric analysis of cultured cells

2. 全血由来濃厚血小板液を用い、パラホルムアルデヒド (PFA) で血小板を固定した。固定後 PBS あるいは 1% アルブミン加 PBS で 4°C 保存し、経時的に血小板機能をリストセチン凝集能で評価した。

C. 結果

1. 巨核球系細胞の増幅

1-1. ヒト臍帯血 CD34+CD38- 細胞の増幅

まず CD34+CD38- 細胞を TPO と FL のみを加えた液体培養、あるいは MS-5 との共培養にサイトカインとして TPO 単独あるいは FL と組み合わせて添加した 3 条件で培養を行った。培養 4 週目に非付着性細胞を回収し解析したところ、MS-5 非存在下で TPO と FL のみを加えた液体培養では、細胞の増殖も低く、また CD34+ 細胞の維持も確認できなかった。一方、TPO 存在下で MS-5 と共培養した系では FL の有無に関わらず、CD34+CD38- 細胞の維持、増殖が観察された。TPO と FL を共に添加した方が、総細胞数が 2.6-4 倍多く、以下の検討には TPO と FL を添加した MS-5 共培養系を用いた。

次に、CD34+CD38- 細胞が自己複製しているか否かを検討するために、培養開始後 4 週目に非付着性細胞からセルソーターを用いて CD34+CD38- 細胞を純化し直し、再度 TPO と FL の存在下で MS-5 と共培養した

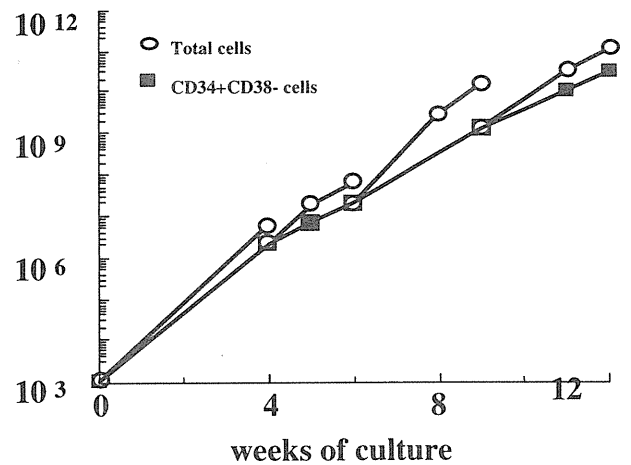


図2 Expansion of CD34+CD38- cells

ところ、再び CD34+CD38- 細胞の増殖が認められた (図 1)。再純化を繰り返した際の総細胞、CD34+CD38- 細胞、CFU-c の延べ数を算出すると、図 2、3 に示すように CD34+CD38- 細胞、CFU-c 共にほぼ指数関数的に増殖している事が明らかとなった。CD34+ 細胞を用いて培養を開始しても同様な著明な CD34+CD38- 細胞、CFU-c の増殖が認められた。

1-2. TPO, FL 添加 MS-5 共培養系で増殖した細胞の巨核球系細胞への分化

臍帯血 CD34+ 細胞を TPO, FL 添加 MS-5 共培養系で 5 週間培養した後に得られた細胞 (CD34+: 49%, CD34+CD38-: 29%, CD41+: 0.1%) を TPO, FL, stem cell factor (SCF), IL-3, granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF), stromal cell derived factor-1 (SDF-1) を種々の組み合わせで添加培養し、果たして CD41+ の巨核球系の細胞が増殖分化してくるかを検討したが、総細胞数の増加は認められた

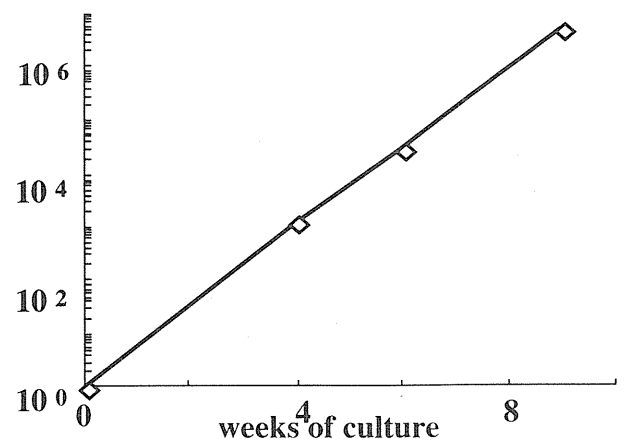


図3 Expansion of CFU-C

ものの培養後7-19日に渡りCD41+の巨核球系の細胞の増殖は認められなかった。

2-1. 固定血小板の検討

固定時間を1時間とした場合、PFA濃度0.25, 0.5, 1.0%では固定直後でリストセチン凝集能は80%以上であるものの7日後にはいずれも20%以下に低下した(表1)。これに対し、2.0, 4.0%では固定直後、7日後のいずれにおいても凝集能は60%以上に保たれた。しかし、固定時間が30分の場合には、いずれの濃度のPFAを用いても固定直後の凝集能は良く保たれるものの、7日後には20%以下に低下した(表1)。固定後の血小板の洗浄は2回以上施行することで凝集能は60%以上に保たれた(図4)。このように2-4% PFAで1時間、その後2回以上洗浄する事でリストセチン凝集能が60%以上保たれた固定血小板を得る事ができた。このような条件で作成した固定血小板をPBSにて浮遊液として保存したところ4°Cで12ヶ月間リストセチン凝集能が良好に維持された(図5)。

D. 考察, 結論

巨核球系細胞を血小板代替物として考える場合、大量の数の巨核球系細胞が必要である。そこで自己再生能を持つ造血幹細胞あるいはそれに近い未熟な造血前駆細胞の数をまず増幅し、その後に従来の巨核球系細胞の増幅方法を組み合わせるという2段階の増幅過程をとることによって従来より効率的な巨核球系細胞の増幅を試みた。

TPOとFL存在下でマウスストローマ細胞株と共培養すると、第1段階の未熟造血前駆細胞の著明な増幅は可能であった。予備実験では、マウスストローマ細胞株だけではなく、ヒト骨髓由来初代ストローマ細胞を用いても同様の現象が認められている。現在、造血幹細胞レベルでの増幅があるの

表1. 固定時間及びPFA濃度の違いによるリストセチン凝集能の変化

PFA (%)	30 min		1 hr	
	Day 0	Day 7	Day 0	Day 7
0.25	78	5	96	15
0.5	69	5	101	19
1.0	83	10	87	21
2.0	70	18	68	62
4.0	64	16	59	58

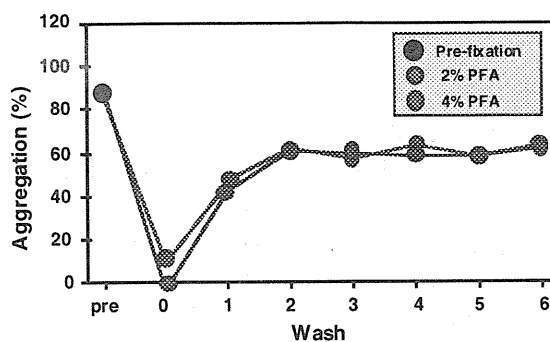


図4. 洗浄によるリストセチン凝集能の変化

血小板を2, 4%PFAで固定後にPBSで6回洗浄し、その凝集能を測定した。

か否かをNOD/scidマウスを用いて検討している。しかし、第2段階である増幅した未熟造血前駆細胞からの巨核球系細胞の増殖分化は、今回試した条件では得られなかった。今後この第1段階と第2段階のギャップを埋める検討が必要である。サイトカインのみの刺激では不十分であり、ストローマ細胞との接触を介するシグナル等が必要なのかもしれない。

血小板の固定保存に関しては、in vitroでのリストセチン凝集能を指標にする限り、PFA 2-4%, 1時間固定で良好な結果が得られた。今後は、実験動物への輸注実験を行い、生体中でどの程度の止血効果が得られるかを検討して行きたい。

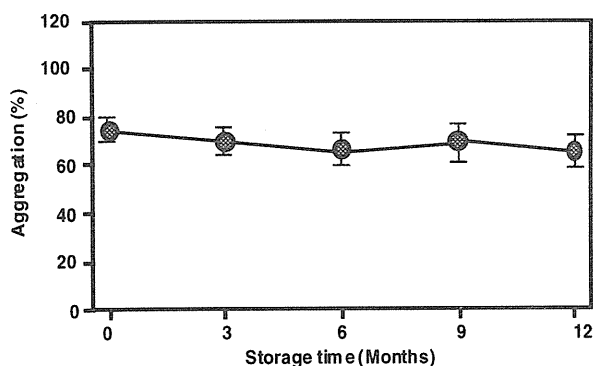


図5. 固定後の保存におけるリストセチン凝集能の変化

固定血小板を浮遊液として3, 6, 9, 12ヶ月間保存後のリストセチン凝集能を測定した。

E. 謝辞

この研究は、関口定美(北海道赤十字血液センター 所長), 平山文也(同研究課長), 東 寛(同研究課長), 山口美樹(同研究員)の協力を得て行われた。記して謝意を表す。

F. 研究発表

a. 論文発表

1. K Ikebuchi, M Yamaguchi, K Niwa, H Abe, M Fujihara, S Sekiguchi: Platelet-like particle production from cultured human megakaryocytic cell line. *Art Cells Blood Subs and Immob Biotech* 26: 549-558, 1998.
2. 平山文也, 山口美樹, 大河原順一, 中條聖子, 金井誠, 池淵研二, 関口定美: 巨核球の *ex vivo* 大量培養—血小板代替物としての可能性. セルテラピー 関口定美編エッセイブック 富士書院. 札幌, 1999

b. 学会発表

1. 平山文也, 山口美樹, 大河原順一, 池淵研二, 関口定美: 巨核球の *ex vivo* 大量培養—血小板代替物としての可能性. 第10回北海道輸血シンポジウム
2. 平山文也, 山口美樹, 大河原順一, 池淵研二, 関口定美: 体外造血系の可能性—血小板代替物を目指した巨核球の大量培養の試み. 第5回日本血液代替物学会
3. F.Hirayama, M Yamaguchi, J Ohkawara, M Kanai, S Nakajo, K Ikebuchi, S Sekiguchi: *Ex vivo* expanded megakaryocytes; a possible candidate for platelet substitutes. *International Symposium on hematologic Disorder*
4. 山口美樹, 池淵研二, 平山文也, 東寛, 関口定美; 血小板代替物としての固定血小板の可能性 (パラホルムアルデヒドを用いた固定方法及び保存法の検討). 第5回日本血液代替物学会

