

## 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

### Optimization of collagen coating condition for applying into the visualization of platelet adhesion

○ 大石麻代(芝工大) 町村幸夫(芝工大) 吉田脩右(芝工大) 渡邊宣夫(芝工大)

Asayo OISHI, Yukio MACHIMURA, Shusuke YOSHIDA, Nobuo WATANABE,  
Shibaura Institute of Technology

**Abstract:** It is well known that thrombus triggers such the brain infarct or cardiac infarct, therefore understanding the thrombus formation mechanism is important. However, the relationship between the platelet adhesion behavior to collagen fibers and blood flow is unclear. The purpose is to optimizing the collagen coating condition, which can be applicable as the blood cell injury model for the further platelet adhesion test. Collagen coating was performed with the variation among collagen concentration of coating solution 5, 8, 10mg/dL, and the coating waiting time of 15,30,45,60 min, respectively. The coating was done under the moisturizing condition. As we respected, the collagen coating amount increased with the collagen concentration within the coating solution. However, the coating time didn't show the positive relationship with the coated amount. We concluded the condition with 10% concentration solution and waiting time of 60min would be the best because of least deviation of coating amount.

**Key Words:** Platelet Adhesion, Collagen coating, Blood Flow

#### 1. 背景

血栓は脳梗塞や心筋梗塞の原因となることは良く知られており血栓形成機序解明は重要な課題である。血管内皮細胞が損傷されると、内皮下からコラーゲン線維などが露出し、そこに血小板が粘着することから血栓形成は始まることが分かっている。

先行研究では、血管壁損傷モデルとしてスライドガラス板上にポイントコーティングされたコラーゲン繊維を利用してきた(2-3)。これらの先行研究では粘着血小板のみ考慮し、粘着対象としてのコラーゲン繊維に対する評価がなされていない。したがって、コラーゲン線維への血小板粘着と血液の流れについての関連性はまだ定量的に明らかにされていない<sup>(1)</sup>。そもそもその実験を行う前に血管壁損傷部モデルとしてのコラーゲンコーティング状態がどのように設定すべきか最適条件を導出する必要がある。言い方を替えると、どのような濃度、保湿待機時間がコラーゲンをコーティングする上で妥当なのか、それを知りたい。そこで本研究は、コラーゲン溶液濃度とコーティング待機時間を変えて、面積に占めるコーティングされたコラーゲン量を検証し、コラーゲン溶液濃度とコーティング待機時間のコーティングコラーゲン量に与える関係性を明らかにし、最適なコラーゲンコーティングの条件を選定することを目的とした。

#### 2. 方法

ガラス板へのコラーゲンコーティング量評価実験：

体外診断用医薬品血小板凝集能測定用試薬として知られる馬蹄由来I型コラーゲン試薬(Collagenreagent Horm セット, NYCOMED Austria GmbH 社製)を使用し、コーティングに使用する液体を準備した。その工程を以下に示す。まず、マイクロピペットを用いてコラーゲン試薬を20[μl]だけ試験管に分注する。次に付属の液体(SKF バッファー)を必要な分量だけ取り出して、先ほどの試験管の中に入れた。そして、コラーゲン試薬とSKF バッファーが混ざり合うように、試験管を軽く振り、コラーゲン溶液を調合した。

今回の実験で調合したコラーゲン溶液の濃度と、それに対応するコラーゲン試薬とSKF バッファーの量の関係を以下の表に示す。

**Table1** コラーゲン溶液の濃度とそれに対応するコラーゲン試薬とSKF バッファーの量の関係

コラーゲン溶液濃度	コラーゲン試薬:SKF バッファー
5[mg/dl]	20[μl] : 380[μl]
8[mg/dl]	20[μl] : 230[μl]
10[mg/dl]	20[μl] : 180[μl]

#### 2-1. コーティング手順

- ① コラーゲンをコーティングする。  
血管損傷部位をモデル化するコラーゲンコーティングを同高さ、同位置から行うための滴下補助器具を作成した [Fig.1]。この装置を使って、コラーゲン溶液をガラス板に滴下する。

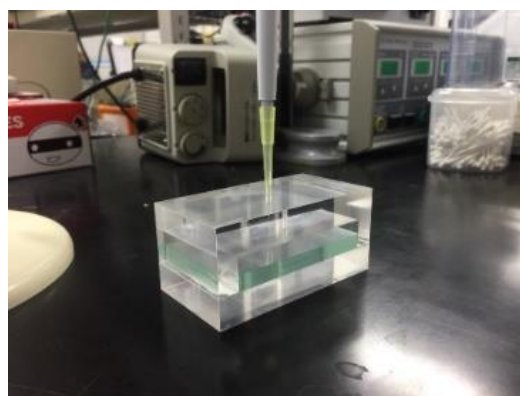


Fig 1 滴下補助器具を用いたコラーゲンコーティングの様子

コラーゲン溶液を調合したら、そこからマイクロピペットを用いてコラーゲン溶液を10[μl]取り出し、コラーゲンコーティング補助器具を用いてガラス板の上に滴下する。滴下したコラーゲン溶液の直径は約5mmであった。

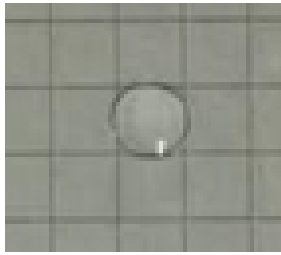


Fig 2 コラーゲンコーティング溶液滴下例 (1マス 5mm)

② 保湿環境下で待機する。

乾燥を防ぐために、コーティングしたガラス板は水を入れたトレーの中に安置した形で、保湿環境下をキープしながら、いくつかの時間長さの間、待機する。

③ 顕微鏡で観察し、画像として撮影する。

待機時間が終わったら、トレーの中からガラス板を取り出して、10mLの水で軽くウォッシュアウトする。これにより、ガラス板上に残ったコラーゲン繊維がコーティングされた量となる。コーティングされたコラーゲン繊維を定量化するために、次に、ガラス板を Fig3 に示したフローチャンバーに取り付けた。なお、このチャンバは、流路の奥行設定を再現性をよくするために真空ポンプで陰圧をかける事で、ガラス板を固定できる工夫がなされている。この装置を倒立顕微鏡のステージ上にセットし、PBS 溶液で流路を満たした後、顕微鏡にて画像を撮影した。この時、撮影倍率は、640倍であった。

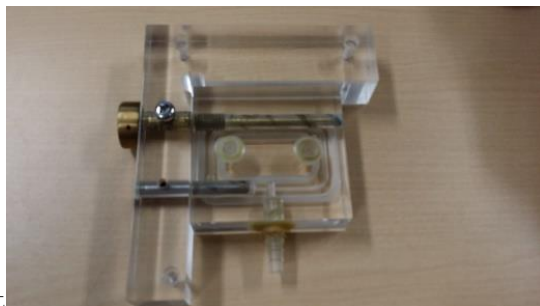


Fig 3 真空性フローチャンバー

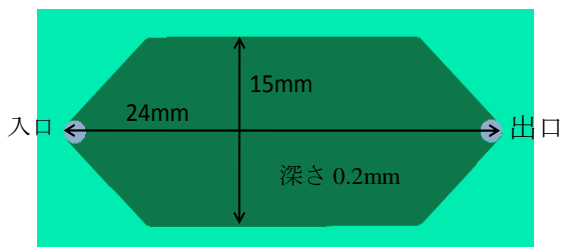


Fig 4 フローチャンバーの流路寸法概略図

2-2. 解析方法

今回のコーティング量評価実験では、コラーゲン量を定量化するために MATLAB を用いて画像解析を行った。コラーゲン量の定量化は、「コラーゲンの面積占有率」を導いた。以下に、画像解析の手順を示す。

- I. 画像を読み込み、2点をプロットしてその間を黒い直線で結ぶプログラムを用いて、画像内のコラーゲン繊維を黒くなぞる。

- LIFE2015 2015年9月7日-9日 福岡 (九州産業大学)
- II. すべてのコラーゲン繊維をなぞり終わったら、なぞった状態の画像を保存して、さらにコラーゲン繊維の総ピクセル数から面積に占めるコラーゲン長さを算出し、その結果をエクセルデータに保存する。
  - III. (II)で保存した画像には、端にコラーゲン繊維の画像ではない白い領域があるため、真ん中のコラーゲン繊維の画像のみを切り出して、別の名前で保存する。
  - IV. (III)で保存した画像を二値化して、さらに白黒を反転させる。これによって黒い背景の中に白いコラーゲン繊維が配向している画像が得られるため、これを保存する。
  - V. (IV)で保存した画像を読み込んで、白ピクセルの総数から面積に占めるコラーゲン粘着量を算出し、その結果をエクセルデータに保存する。これらの画像解析作業を分かりやすく、フローチャートによって模式化した図を Fig5 に示す。

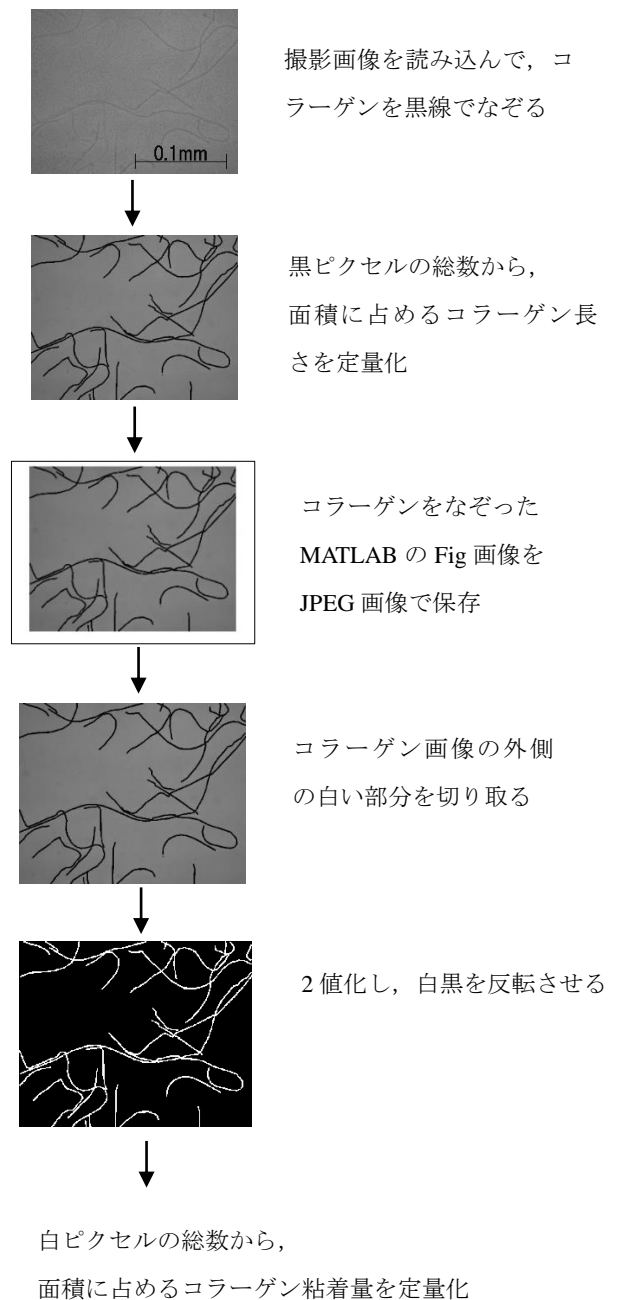


Fig 5 MATLAB による画像解析のフロー

## 参考文献

- (1) Affeld K. and Gadischke J., "Shear Rate and Thrombin Transport", in: Biofluid Mechanics, No107 edited by D. Liepsch (1994), pp.35-40
- (2) Watanabe N., Affeld K., Schaller J., Schmitmeier S., Reininger A.J., Goubergrits L., Kertzsch U., Investigation of the human platelets' adhesion under low shear condition in a rotational flow chamber.. Journal of Biomechanics 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.

## 3. 結果

以下の Fig7 に解析の結果から得られたコラーゲン占有率とその標準偏差を示す。我々が予想していた通り、コラーゲン溶液の濃度が高い方が、スライドガラスにしっかりコラーゲンの粘着量が增大するという結果に比較的なった。その一方で、コーティング待機時間は、コーティング量に正の相関が得られなかった。

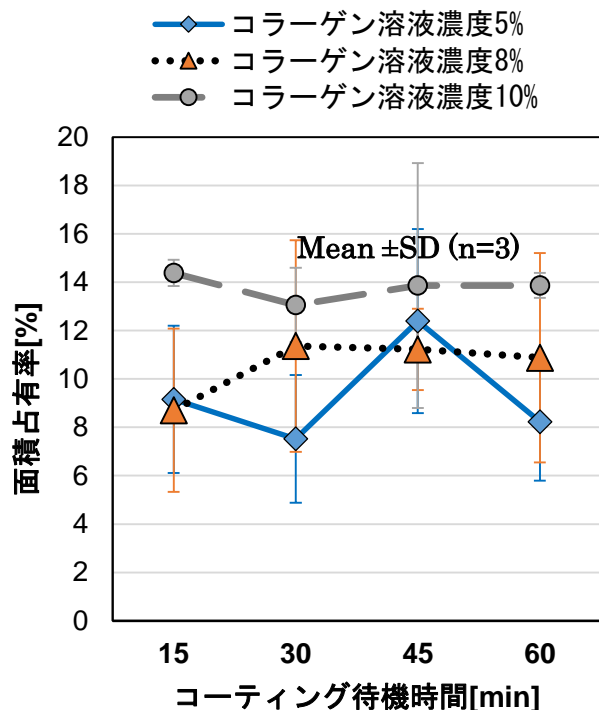


Fig7 濃度別のコラーゲン溶液のコーティングされたコラーゲンの面積占有率

## 4. 考察

解析結果より、よりコラーゲン溶液の濃度が高ければ比較的コーティング量は増大したと言える。その一方で、コーティング待機時間の長さは、コラーゲン占有率に正の相関があるのではという我々の予測は確認できなかった。しかしながら与えられた実験データだけで最適なコラーゲンコーティング条件を考えるとすれば、実験データの標準偏差で見たばらつき量が最も小さかったコラーゲン溶液の濃度が10%、コーティング待機時間が60分の条件であると判断した。

## 5. まとめ

血小板粘着の対象としてのコラーゲン繊維の設定条件について、コラーゲンコーティング法を取り上げてその用いるコラーゲン濃度とコーティング待機時間とが、コーティング量に与える影響をいくつかの条件を用いて検証した。その結果、コラーゲン溶液濃度が10%かつ、コーティング待機時間60分が、最もばらつきが小さくなった。したがって、本実験で行ったコーティング手法の条件の中では、最適であると判断した。

## 謝辞

本研究は科学研究費補助金 (H26年~H27年) により助成頂いた。なお、装置製作過程においては、芝浦工業大学大宮校舎工作室宮城博氏ならびに鳴嶋一男氏よりサポート頂いた。この場をお借りして感謝申し上げます。