

(原著論文)

フィブリンのネットワーク形成に及ぼすカドミウムや熱の影響

酒見博之^{1,2)}、石井理恵^{1,3)}、西村尚子^{1,4)}、山口暁子^{1,5)}、高橋敬^{1,6)}

¹⁾ 大分県立看護科学大学 人間科学 生体科学研究室, ²⁾ 山口厚生年金病院, ³⁾ 九州厚生年金病院、

⁴⁾ 神戸市立中央市民病院、⁵⁾ 湯布院厚生年金病院、⁶⁾ Northwestern University

(投稿:2008年6月9日、採択:2008年8月8日)

要旨

イタイ・イタイ病の原因の1つはカドミウムであり、病態として高体温が続くと身体機能に変調を来す。本研究は重金属や熱によるフィブリンの重合に及ぼす影響を初めて定量的に検討した。ロジスティック成長式の数値解、写真画像のフラクタル分析と蛍光分析結果は、1) ロジスティック曲線の接線はフィブリンの重合速度、プラトー値(定常状態)は重合度(フィブリン線維密度)を示唆した。2) フィブリンは2分岐成長するフラクタルであり、その次元(D)を分析する直線の傾きは重合速度に、縦軸切片は重合度(画像密度)に対応した。カドミウムや熱処理によってフィブリンは非線維性の不規則な凝集塊を呈した。混合フィブリン塊(FITC-標識とRITC-標識熱変性)の2蛍光色分析から、3) 正常フィブリンと変性フィブリンは不均一なフィブリン塊を形成し、また変性フィブリンは正常フィブリンによって部分的に代償されることが示唆された。

キーワード

フィブリンネットワーク、重金属と熱による変性、フラクタル構造、蛍光分析

序文

血液凝固は各種プロテアーゼのカスケード反応であり、フィブリン線維による血栓形成が最終段階である。すなわちトロンビンがフィブリノーゲンをフィブリンに変換し反応が終了する。フィブリン塊(ネットワーク¹⁾)は自己組織化的^{注1) 2, 3)}な分子重合によって形成される(図1 A)。また吸光度(350 nm)で重合過程を追跡^{4~6)}するが、トロンビン、pH、2価イオンなどの溶媒環境に影響される⁷⁾。観察には電子顕微鏡⁸⁾や共焦点レーザー走査顕微鏡が用いられ構造と機能の研究を可能にした^{7, 9, 10)}。

イタイ・イタイ病^{11~13)}はカドミウムによる骨軟化症、骨粗鬆症、腎機能障害などを特徴とし、また高体温が続くと生体機能が障害される。これらの血液凝固に及ぼす生理学的な研究は行われていない。

本研究はカドミウムや高温に暴露されたフィブリン塊形成に及ぼす影響を定量的に検討することを目的にした。1) 吸光度の変化はロジスティック^{注2)}成長¹⁴⁾の2階差分方程式で表された。2) ボックスカウント法^{注3) 15, 16)}でフラクタル次元(D)を求め、確率モデル画像^{注4)}(コンピュータグラフィックス¹⁷⁾)とフィブリンのフラクタル性^{注5) 15, 16)}を比較した。直線の傾き(=D)は反応速度(dy/dt)を、y軸切片は線維の密度(複雑性^{注6)})を示した。カドミウムや熱に暴露したフィブリンは不規則な

注1) self-organization; ランダムに分散した粒子の集団から時間経過とともに粒子間の相互作用により自発的に「形」が形成されるシステムを言う。

注2) ロジスティックス(logistics)は「兵站」、「物流」の意。物の流入、流出の非平衡定常状態を微分方程式で記述するが、離散量を扱う差分方程式(difference equation)はコンピュータで数値計算するのに適している。

注3) 画像を分割した画分数の対数と各画分内の濃度の対数を両対数プロットすると直線が得られる(材料と方法)。

注4) Mathematica, Wolfram Research Co. LTD (USA), Ver.2.2

注5) マンデルブロー¹⁸⁾が命名した。半端な次数(次元)を意味する。いわゆる2次元画像の次元は2ではなく、1と2の間の小数点が続く半端な数値になる。

注6) complexity¹⁹⁾。入り組んだ海岸線¹⁸⁾ほど、ギザギザの程度(入り組み方)が大きくなり複雑性をます。フィブリンの場合は高い濃度(密度)に対応する。

著者連絡先: 高橋敬

〒870-1177

大分市 富士見が丘 西3-19-6

e-mail: hashikei@hi.enjoy.ne.jp

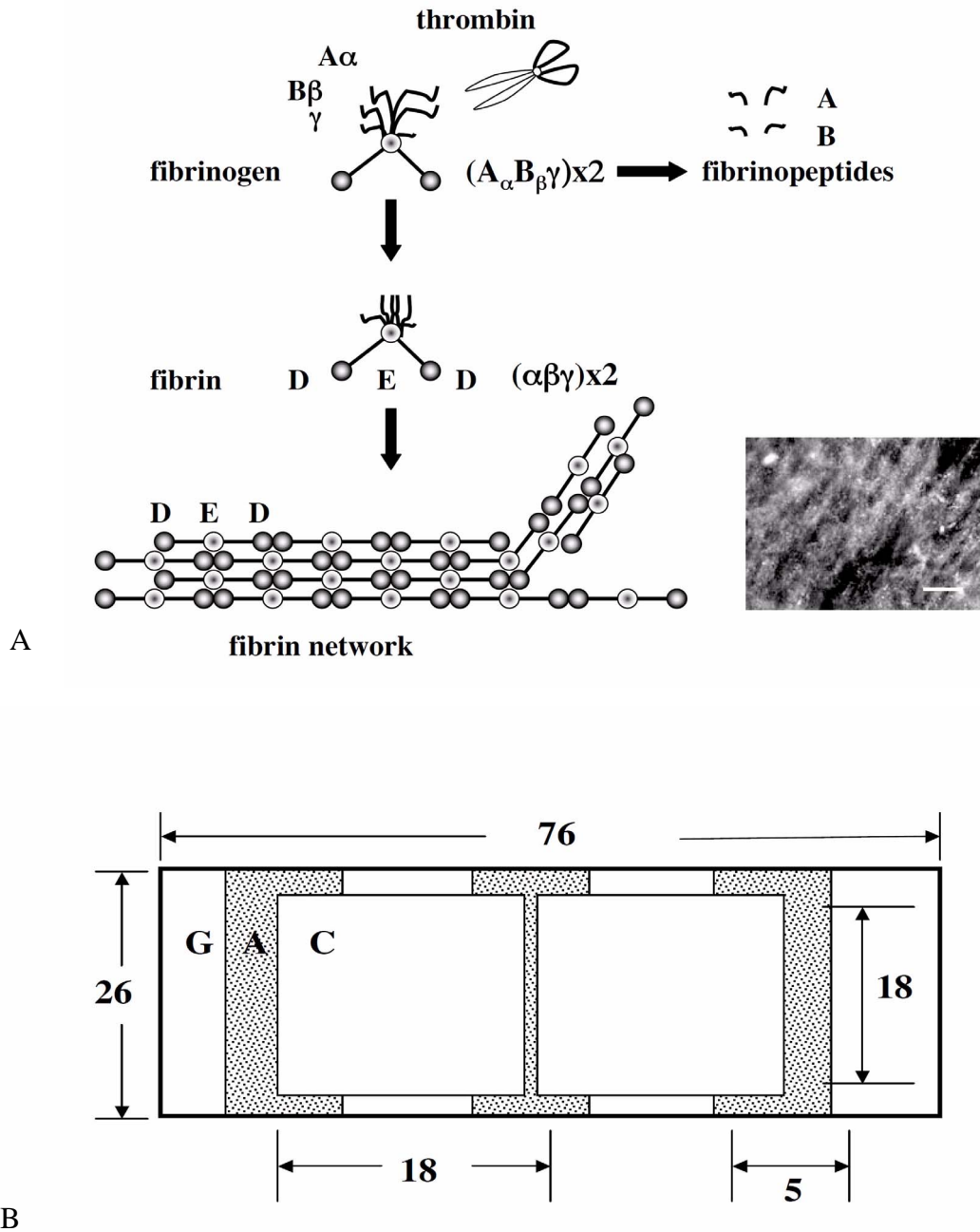


図1

A、フィブリン・ネットワークの形成

フィブリノーゲン（3本鎖の2量体、 $[A_\alpha B_\beta \gamma]_2$ ）の A_α 、 B_β 鎖はトロンビンによりN-末端側の十数個のアミノ酸残基AとB（フィブリノペプチド）が次々に取り除かれ α 、 β 、 γ 鎖の2量体 $[\alpha\beta\gamma]_2$ に変換される。Dは各鎖のC-末端、Eは各鎖のN-末端ドメイン。フィブリンモノマー（D-E-D）は直鎖方向（end-to-end）と側鎖方向（side-by-side）に重合し、不溶性のネットワークを形成する。挿入図は暗視野装置で可視化したフィブリン（白い部分がフィブリン線維）。バーは10 μm 。

B、マイクロチェンバー

顕微鏡で観察するために作成したマイクロチェンバー。Gはガラススライド、Aは片面に接着テープが付いたアルミ薄（厚さ0.26 mm）、Cはカバースリップ。ガラススライドとカバースリップの空所は約60 μl になるように設計されている。AとCはマニキュアで接着した。数字の単位はmm。

非線維的なフィブリン塊を形成した。3) 混合フィブリン塊 (FITC と RITC) の2蛍光量を分析した結果、変性フィブリンの重合は正常フィブリンより部分的に代償される。すなわち正常フィブリンは非線維的な凝集塊を捕い、その構造の不均一性は変性フィブリンの増加により増大することが見いだされた。

材料と方法

1 分光光度計によるフィブリン重合反応の分析

牛血清フィブリノーゲン (Calbiochem, USA, 24 mg/ml)、標準緩衝液 (50 mM Tris-HCl/pH 7.5, 0.1 M NaCl, 2 mM CaCl₂) にトロンビン (Calbiochem, 0.2 ユニット) を添加し吸光度 (350 nm) を分光光度計⁴⁾で測定した (1~25 分)。その他の2価の陽イオンはマグネシウム、亜鉛、カドミウムを用いた。

2 フィブリンの SDS 電気泳動

フィブリン塊から酢酸でモノマーを抽出した⁴⁾。透析後、10%SDS (sodium dodecylsulfate) ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (Laemmli²⁰⁾) を行った。ゲルはクマシー・ブリリアント・ブルー (R250) で染色し、酢酸 (10%) -メタノール (30%) 液で脱色した。蛍光標識フィブリンは、ゲルをトランス・イルミネータ (UVP, USA) で発光さ

せ、デジタルカメラ (Nikon Photonics, Tokyo) で撮影した。

3 フィブリノーゲンの蛍光標識

フィブリノーゲンは FITC (fluoresceine isothiocyanate) (Sigma, USA) / セライトまたは RITC (rhodamine isothiocyanate) / セライト (1 mg/ml) で蛍光標識した⁹⁾。遠心 (11,200 xg, 1 分) し、上澄みを PD-10 カラム (Sephadex G25, Pharmacia, Sweden) でクロマトグラフィーを行った。標準緩衝液で溶出した画分 (ボイド、3~5 ml) を回収し、スピカラム (MiniCent M-30, Tosoh, Tokyo) で濃縮した。

4 フィブリン塊の可視化と蛍光画像の分析

熱変性と正常フィブリノーゲンを混合 (モル比 1:1, 1:2, 1:5) し、トロンビンを添加してマイクロチェンバー (図 1 B) 内でフィブリンを重合した⁹⁾。蛍光顕微鏡 (Eclipse, Nikon Photonics, Tokyo) の励起波長はバンドパスフィルター (FITC; 465~495 nm, RITC; 510~560 nm) を用いた。暗視野照明は暗視野コンデンサー (Dark field condenser, Dry 0.95~0.80, Nikon Photonics) を用いデジタルカメラで撮影した。2 蛍光画像はイメージ・プロ・プラス (Image-Pro Plus, Ver.3.0.1, Media Cybernetics, USA) を用いて 2 画像を重ね合わせ、またラインスキャンし蛍光強度 (FITC と RITC) を求めた。強度はそれぞれの最大値を 100 として相対値で示した。

5 幾何学的分析

パーコレーション¹⁷⁾ (確率 P = 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, サイズ L = 10, 20, 30, 40, 50, 70, 100)、シルピンスキーのガスケット、乱数によるランダムストリートなどはマセマティカ (Mathematica, Ver.2.2) で作成した²¹⁾。イメージ J (ImageJ, NIH, USA) で 2 値画像を作成し、式

$$\log N(\lambda) = -D \log(1/\lambda) + \log K$$

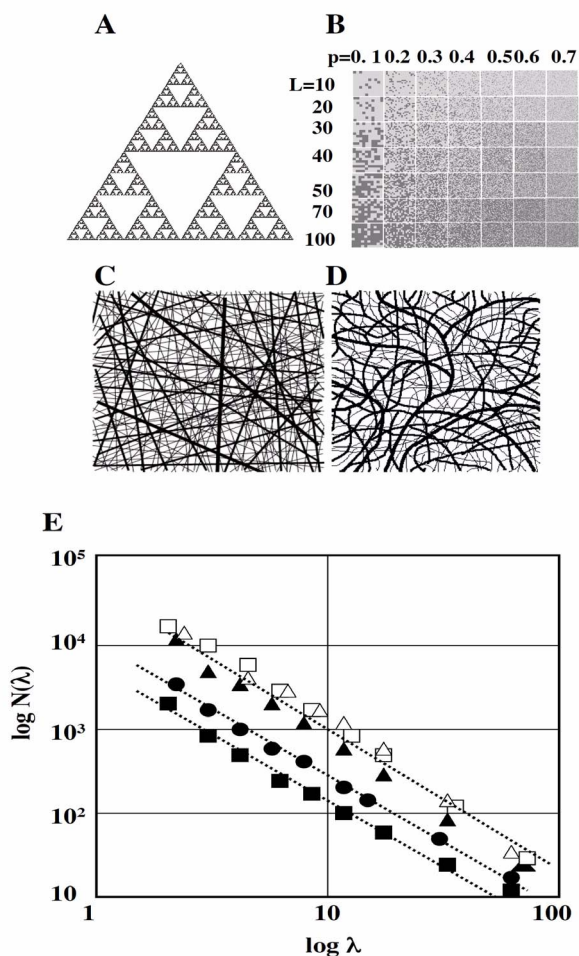


図2 フラクタル画像とフラクタル次数 (次元) の決定

A; シルピンスキーのガスケット、B; Mathematicaで作成したパーコレーション画像。pは確率 (0.1~0.7)、Lは画像サイズ (プール格子の縦と横、mxm、10~100)。確率とサイズを組み合わせた49の画像を示した。C; ランダムストリート、D; フィブリンの仮想的なスケッチ。E、フラクタル次数 (次元) の決定。図 2 A~Dを2値化し、イメージJによりフラクタル次数 (D) を決定した。縦軸; カウント数の対数、横軸; ボックスサイズの対数。■; p=0.1, 画像L=10、▲; p=0.7, L=100、●; ガスケット、□; ランダムストリート、△; 手書きフィブリン。

からフラクタル次数を求めた (ボックスカウント法^{15, 16)})。ただし、 K は定数、 D はフラクタル次数、1 辺 S の画像を λ 分割したときに $(S/\lambda)^2$ 画分内にヒットする画像数を $N(\lambda)$ 、 $\log K$ を縦軸の切片とする。

結果

1. フラクタル次数

ガスケット (図 2 A) は 1/2 分割ごとに 3 つの画像が生成する。次元の定義から $2^D=3$ となる。よって $D=1.5849$ 。イメージ J で実測すると $D=1.5106$ であったので本方法による差異は 0.074 だった。次に確率 (p) とサイズ (L) が $(p, L) = (0.1, 10)$ と $(p, L) = (0.7, 100)$ のパーコレーション・クラスター (図 2 B)、ランダムストリート (図 2 C) とフィブリン線維 (手書き、図 2 D) をイメージ J で測定した (図 2 E)。パーコレーション (0.1, 10) の D (傾き = 1.4586) と y 軸切片が最小であった。その他の

直線はほぼ平行であった。よって、次数が小さい画像の複雑性は少なく、低い密度 (y 軸切片値) をもつことが示唆された。

2. 分光光度計によるフィブリン重合反応とロジステイック成長式

図 3 A はフィブリノーゲン濃度依存の吸光度の変化を示す。初期濃度が高いと密度の高い線維形成が起こる。差分ロジステイック式をエクセルで数値計算した (図 3 B)。パラメータ a を 0.1、0.2、0.4、0.6 とし、 b を 0.0025 にすれば図 3 A の結果に類似した。すなわち $a/b=240$ のとき吸光度は 0.15 に近似する。したがって a/b は吸光度を一定にする値 (プラトー) であり、フィブリノーゲンの (初期) 濃度に依存することが示唆された。図 3 B の曲線① (フィブリノーゲン濃度 1.4 mg/ml) は、フィブリンの重合 (成長率) を 60% ($a=0.6$) にすれば、成長率が遅延

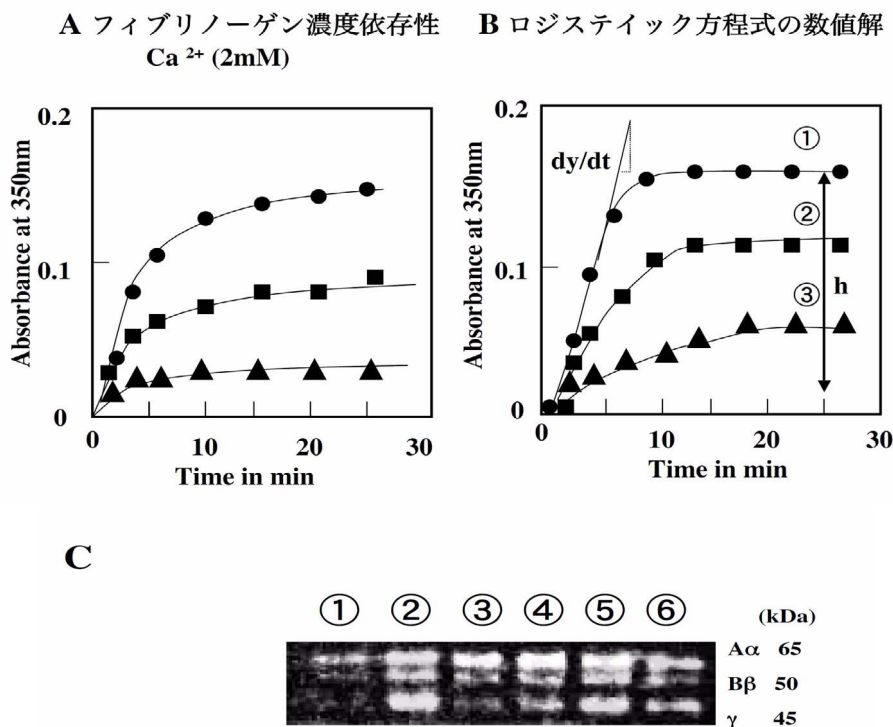


図 3

フィブリノーゲン濃度依存の重合とそのシミュレーション (ロジステイック差分方程式の数値解)

A、トロンビン (0.1 ユニット) とカルシウムの濃度 (2 mM) を一定にし、フィブリノーゲンの濃度を変え (25°C) た。● ; 1.4 mg/ml、■ ; 0.7 mg/ml、▲ ; 0.3 mg/ml。縦軸 ; 吸光度、横軸 ; 分。B、ロジステイック方程式の数値解。遅延時間を考慮した離散ロジステイック差分方程式を $N_{m+1}-N_m=N_m(a-bN_m)$ と現す。ただし a と b は定数で、時間 $m=0$ のときの濃度を N_0 とし、時間 m のときの濃度を N_m とする ($m=0, 1, 2, 3 \dots$)。初期値 $N_0=10$ とし、 $a=0.1, 0.2, 0.4, 0.6$ に対して b を 0.0025 とし、時系列を 1~30 (分) にした。曲線① ; $a/b=240$ 、② ; $a/b=160$ 、③ ; $a/b=80$ はそれぞれプラトー値 (環境収容力、ゼロポピュレーション成長¹⁴⁾)。接線 (dy/dt) が反応速度、プラトー値 (①、②、③の最大高 h) がフィブリノーゲン濃度に比例する。C ; フィブリンの SDS ポリアクリルアミド電気泳動。正常フィブリン (FITC 標識) と変性フィブリン (RITC 標識) を還元剤で処理した。レーン① RITC (正常)、② FITC (正常)、③ RITC (カドミウム添加)、④ RITC (65°C 処理)、⑤ RITC (カドミウム添加) : FITC (正常) = 1:1 モル比で混合、⑥ RITC (65°C) : FITC (正常) = 1:1 モル比で混合。 α 鎖は 65 kDa、 β 鎖は 50 kDa、 γ 鎖は 45 kDa。⑤、⑥ は分子量に違いがあればそれぞれ緑と赤に分離するがそれぞれ等量なので黄色のバンドとして観察された。

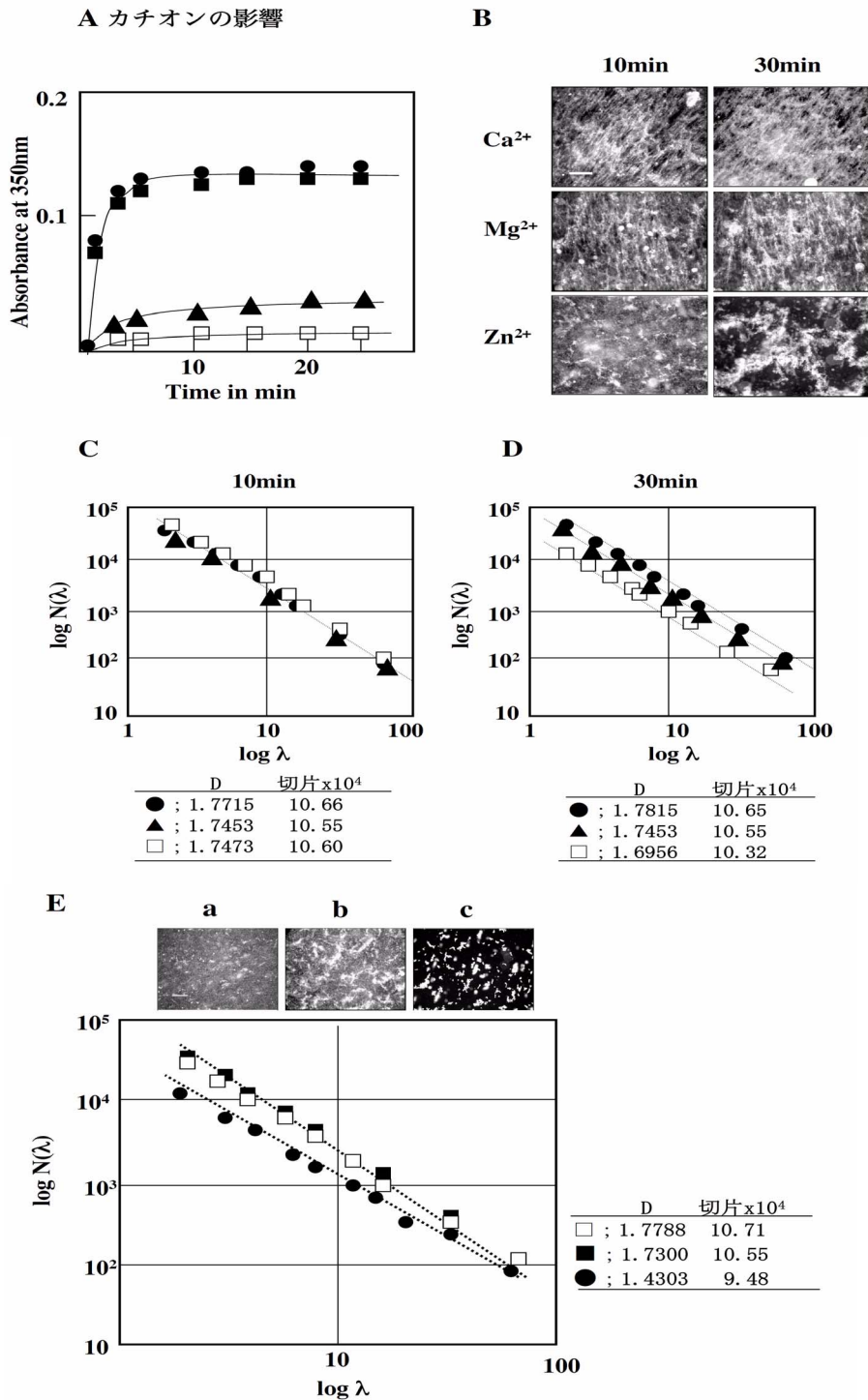


図4 カチオンの影響

A、カチオンを一定濃度(2 mM)にし、25°Cで重合させた。●、Cd²⁺；■、Zn²⁺；▲、Mg²⁺；□、Ca²⁺。縦軸：吸光度、横軸：分。

B、暗視野顕微鏡画像。Ca²⁺、Mg²⁺、Zn²⁺をそれぞれ2 mM 添加し重合を開始し、暗視野顕微鏡で観察した。バーは10 μm。

C、Ca²⁺、Mg²⁺、Zn²⁺をそれぞれ2 mM 添加し、10分の顕微鏡画像(図4B参照)。

D、Ca²⁺、Mg²⁺、Zn²⁺をそれぞれ2 mM添加し30分の顕微鏡画像(図4B参照)。フラクタル解析はイメージJを用いた。●、Ca²⁺；▲、Mg²⁺、□、Zn²⁺。縦軸：カウント数の対数、横軸：ボックスサイズの対数。テーブルは各種のD値と切片値。

E、カドミウムの影響。各種濃度のカドミウムでフィブリンを重合させイメージJを用いてフラクタル解析した。画像はそれぞれ30分後の暗視野画像。(a) 0.4 mM、(b) 2 mM、(c) 20 mM Cd²⁺、Cd²⁺濃度：0.4 mM (■)、2 mM (□)、20 mM (●)。縦軸：カウント数の対数、横軸：ボックスサイズの対数。バーは10 μm。テーブルは各種のD値と切片値。

(律速) 因子 ($b=0.0025$ 、25%) に比例して減少するので、時間の経過につれゼロになり、プラトーとなる。

3. 変性フィブリンの分子量

フィブリンの分子量が熱や重金属の影響により変化するかを検討した。フィブリンモノマーは2量体 [$\alpha\beta\gamma$] $\times 2$ なので還元剤と SDS 処理で α (65 kDa ; キロダルトン)、 β (50 kDa)、 γ (45 kDa) の3つのポリペプチドに分離する。蛍光標識-フィブリンノーゲン (FITC は未変性、RITC は変性) からフィブリン塊を作成しフィブリンモノマーを抽出した。2種類を等量ずつ混合した場合、分子量に変化があれば2蛍光色は分離する。変化がなければ正常と同じ位置で黄色のバンドになる。重金属(カドミウム)や熱処理(65°C、1分、図5 C 参照)は分子量への影響はなかった(図3 C、レーン③、④、⑤、⑥)。

4. 重金属の影響とフラクタル性

重金属の影響を吸光度の変化とフィブリン塊画像のフラクタル次数で比較した。コントロール(2 mM Ca^{2+})に比べてマグネシウムは反応速度(dy/dt)とプラトー値が大きく、カドミウムと亜鉛はさらに大きな反応速度とプラトー値を与えた(図4 A)。図4 B は各種イオンの10分、30分後の暗視野画像である。カルシウムに比べてマグネシウムや亜鉛は不規則な非線維状の凝集塊を形成した。亜鉛はさらに太い非線維状の不規則な凝集塊(30分)を形成した。マグネシウムと亜鉛による吸光度の増加はこのような凝集塊の析出を示唆した。次に、図4 C (10分)と図4 D (30分)にフラクタル解析を示した。トロンビン添加後10分では勾配も切片もほぼ同じであったが、30分では y 軸切片の大きさに差が見いだされた。すなわち異常凝集塊の析出が画像密度を低くすることを示唆した。次にカドミウムの影響を分析した(図4 E)。他の金属イオンに比較して勾配も切片も小さな値であり、カドミウム濃度に依存し非線維的な大小の凝集塊が観察された(暗視野画像; 図4 E、挿図 a、b、c)。

5. 熱変性フィブリン塊の異常構造

熱変性(45°C、1分)は未変性(25°C)と同じように重合(反応速度とプラトー値)した(図5 A)。一方、45°C(5分)と65°C(1分)のプラトー値は他に比べて低値でありいずれも反応開始後3分間の遅延が観察された。熱変性(65°C、1分)(図5 C)によって不規則な大小の非線維性異常凝集塊が多数形成した(図5 D)。この凝集塊に正常フィブリンが混在すると、どの程度修復されるのかを検討するために蛍光標識フィブリンノーゲン(FITC-、RITC- 標識)を混合し、トロンビンを添加した。重ね合わせた画像(FITCとRITC画像)を観察すると、緑色のフィブリン線維に黄色い蛍光をもつフィブリン塊が混在した。すなわち、正常フィブリンは異常フィブリンの重合をある程度代償することを示唆した(図5 D、a/b)。変性フィブリン量が増加すると、赤色の異常フィブリン塊

(RITC)が増加した(図5 D、e/f)。黄色は正常と変性フィブリンが等量存在することを意味し、赤い蛍光の増加は異常フィブリンが正常な構造から分離することを意味する。

構造の不均一性を確かめるために2蛍光画像の一部(図5 D、c/d、丸印内の線分)を選び、蛍光量をラインスキャン(10 μm)した。正常と異常フィブリンが等量ずつ含まれれば黄色い領域として観察され、RITCが多い部分は異常フィブリンが多く含まれる領域を意味する(図5 E)。さらに2蛍光量の分散を検討した(図5 F)。画像全体の相関係数は0.833であったが、a群、b群はそれぞれ0.971、0.944であり、c群は0.690であった。すなわち混合フィブリン塊は正常と異常フィブリン塊が均一な部分や不均一な部分として分散していた。正常フィブリンが多いほど異常フィブリンに組み込まれ、異常フィブリンが多いほど正常フィブリンから分離することが見いだされた。

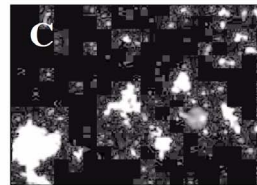
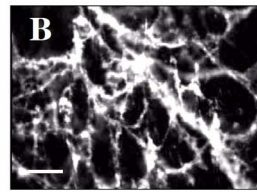
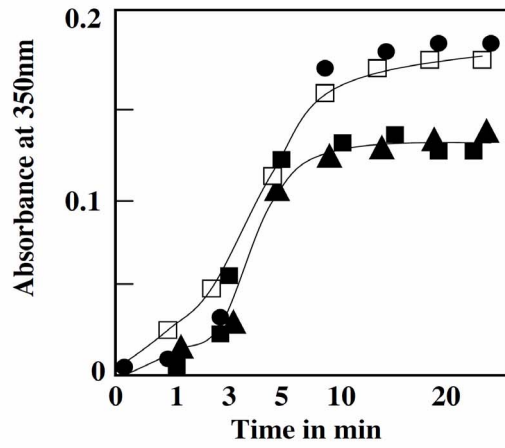
考 察

カドミウム汚染はイタイ・イタイ病を引き起こす原因の一つである¹¹⁻¹³)。また高体温により身体機能はさまざまな変調を来す。本研究の目的は重金属や熱に暴露されたフィブリンの重合反応を定量的に検討することである。吸光度(350 nm)の変化を遅延ロジスティック成長式¹⁴)でシミュレーションし、フィブリン塊の構造をフラクタル解析と、2蛍光分析を試みた結果、重合は成長期($dy/dt > 0$)と定常状態(プラトー、 $dy/dt = 0$)からなり、それぞれフラクタル次数 D と、 y 軸切片(フィブリン線維の密度)で特徴づけられることが示唆された。またフィブリンの変性は非線維的な異常凝集塊を形成し、正常フィブリンにより部分的に補われる。しかしながら、その構造の不均一性は変性フィブリンの増加により増大することが示唆された。

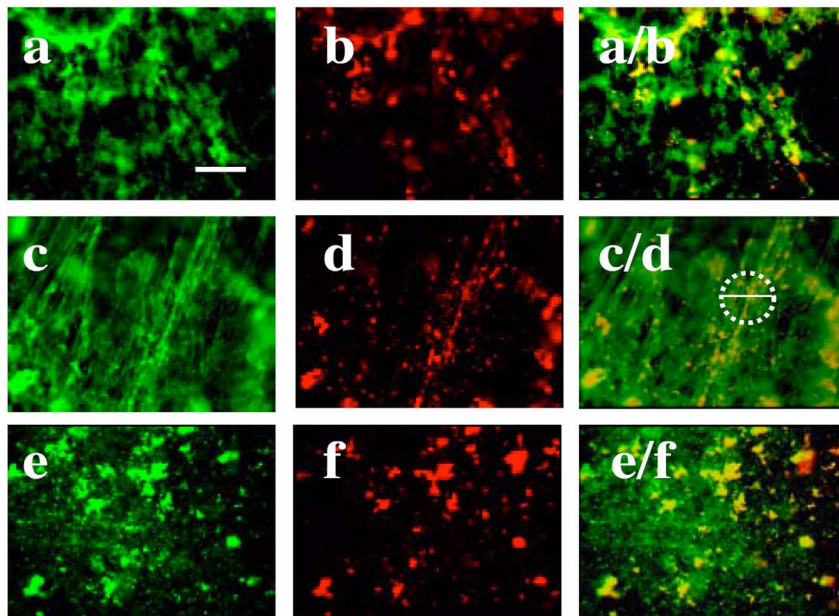
図1 A に示したようにフィブリンモノマーは自己組織化^{2, 3})を行う。モノマーの重合メカニズムに関する研究は多数あるが²²⁻²⁶)、コンピュータで数値解析した例²⁶)は少なく、一般に各種の微分方程式の解を求めるのは困難である。本研究は遅延時間を考慮した差分ロジスティック方程式をエクセルで数値解析し、フィブリン重合のモデリングとした(図3 B)。すなわちパラメータ a/b ^{注7)}を適切に選べば重合過程をよく表現でき、律速因子は環境要因(トロンビンやフィブリンモノマーの量など)により決定されることが示唆された。

血管分岐^{27, 28})、気管支分岐²⁹)、バクテリア³⁰)やカビ³¹)のコロニーなどはフラクタルである^{15, 16})。カビはシルピンスキーのガスケットをモデルとして解析されている。パーコレーション・クラスターモデル^{17, 32}) (図2 A)において、 $p=0.7$ 、 $L=100$ とすればランダムストリート(図2 C)や手書きのフィブリンネットワーク(図2 D)によく似たシミュレーション画像が得られた。フィブリン線維の形成は気管支や血管分岐と同様に2分岐^{9, 22})するのでフラクタルである。したがって、フィブリン塊

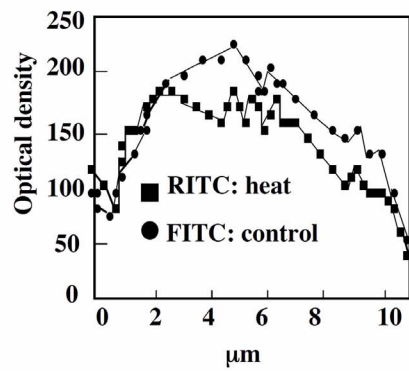
A 温度の影響



D



E



F

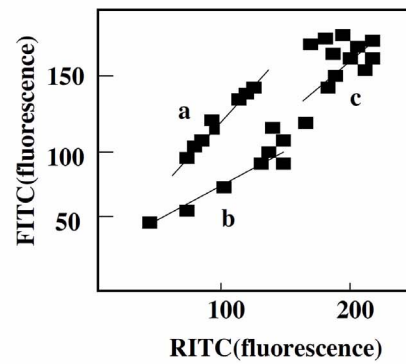


図5 熱処理の影響と熱変性フィブリンの修復

A、熱処理したフィブリノーゲンにトロンビンを添加し重合を開始した。●; 45°C、3分、□; 36°C (コントロール)、■; 65°C、1分、▲; 45°C、5分。縦軸; 吸光度、横軸; 分。

B、フィブリンネットワークの蛍光顕微鏡画像 (FITC)。バーは10 μm 。

C、熱処理 (65°C, 1分) したフィブリノーゲンにトロンビンを添加した。大小の不規則な凝集塊が多数形成された。

D、正常フィブリノーゲン (FITC) と熱変性フィブリノーゲン (RITC) (65°C, 1分、図5A参照) の混合フィブリン塊の蛍光画像。a、正常と変性フィブリノーゲンをモル比で1:1に混合したFITC画像。b、RITC画像。a/b、FITC画像 (a) とRITC画像 (b) をマージングした。c、正常と変性フィブリノーゲンをモル比で1:2に混合したFITC画像。d、RITC画像。(c/d)、FITC画像とRITC画像をマージングした。丸印は蛍光強度を分析したAOI (area of interest)。バーは10 μm 。e、正常と変性フィブリノーゲンをモル比で1:5に混合した。f、RITC画像。(e/f)、FITC画像とRITC画像をマージングした画像。バーは10 μm 。

E、ラインスキャンと2蛍光量の分布

図5D (FITC:RITC=1:2、65°C、1分処理) の丸印部分 (c/d) の線 (バーは10 μm) に沿ってスキャンした。■; RITC熱処理、●; FITCコントロール。横軸、スキャン距離 (10 μm)、縦軸、蛍光強度 (任意)。

F、2蛍光量の分散。FITC 蛍光強度を縦軸に、RITC 蛍光強度を横軸にプロットした。相関係数が1であれば、その部分のFITCとRITCは等量に混合している (変性と正常部分が均等に混じり合っている)。縦軸; FITC 蛍光強度 (任意)、横軸; RITC 蛍光強度 (任意)。

形成の動態は遅延ロジスティックス差分方程式、そのモデリングはパーコレーション・クラスターで近似できる。

フィブリン重合は分子の確率的な衝突と、直鎖方向 (end-to-end) や側鎖方向 (side-by-side) に重合するので線維の成長 (長さとかさ) が起こる。フィブリンが変性 (カドミウム、熱) すると結合部位が質的变化²²⁾し異常なフィブリン塊が生成する。正常フィブリンによりある程度代償され (図5D)、ネットワークは不均一なものになる (図5E、図5F)。以上のことから、フィブリンは熱や金属イオンで容易に変性し、異常フィブリン塊を形成する。血液凝固機能に変調が考えられるが、血栓の生理的性質 (濁度、透過性)^{注8) 7, 33)} や、異常フィブリン塊が血管内に生成したときの病態 (血液疾患) は今後の興味ある課題である。

文 献

- 1) Budzynski AZ, Olexa SA, Pndya BV (1983) Fibrin polymerization sites in fibrinogen and fibrin fragments. *Annal NY Acad Sci* 83: 301-314
- 2) Field RJ (1985) Chemical organization in time and space. *Amer Scientist* 73: 142-150
- 3) Madore BF, Freedman WL (1997) Self-organizing structures. *Amer Scientist* 75: 252-259
- 4) Gralnack HR, Giverber HM, Shainoff JR, Finlayson JS (1971) Fibrinogen Bethesda: a congenital dysfibrinogenemia with delayed fibrinopeptide release. *J Clin Invest* 50: 1819-1830
- 5) Terukina S, Yamazumi K, Okamoto K, Yamashita H, Ito Y, Mtsuda M (1989) Fibrinogen Kyoto III: A congenital dysfibrinogen with a γ aspartic acid-330 to tyrosine substitution manifesting impaired fibrin monomer polymerization. *Blood* 74: 2681-2687
- 6) Yoshida N, Ota K, Moroi M, Matsuda M (1988) An apparently higher molecular weight γ -chain variant in a new congenital abnormal fibrinogen Tochigi characterized by the replacement of gamma argine-275 by cysteine. *Blood* 71: 480-487
- 7) Blömbäck B, Carlson K, Hessel B, Liljeborg A, Procyk R, Åslund (1989) Native fibrin gel networks observed by 3D microscopy, permeation and turbidity. *Biochim Biophys Acta* 997: 96-110
- 8) Müller MF, Ris H, Ferry JD (1984) Electron microscopy of fine fibrin clots and fine and coarse fibrin films. *J Mol Biol* 174: 369-384
- 9) Koh CS, Takahashi K, Sakurai S, Kwaan H (1997) Abnormal formation of fibrin network from X-ray irradiated fibrinogen: Two-color fluorescence analysis of the dynamic process and the incorporation of fibrinolytic components into fibrin by confocal laser-scanning microscopy. *Bioimages* 5: 49-58
- 10) Ishizuka Y, Takahashi K, Arai M (2003) Image analysis of composite fibrin networks of normal fibrin from X-ray irradiated fibrinogen and their decomposition by fibrinolytic enzymes (2003) *Bioimages* 11: 87-95
- 11) Kazantzis G (2004) Cadmium, osteoporosis and calcium metabolism. *BioMetals* 17: 493-498
- 12) Satarug S, Moore MR (2004) Adverse health effects of chronic exposure to low-level cadmium in foodstuffs and cigarette smoke. *Environ Health Perspect* 112: 1099-1103
- 13) Inaba T, Kobayashi E, Suwazono Y, Uetani M, Oishi M,

注7) a の値の設定の仕方により、系は振動したり、発散したりすることが知られている。0<a<1/4ならば、平衡な定常状態になり、1/4<a<1ならば収束振動し、a>1ならば発散振動する¹⁴⁾。

注8) 濁度 (turbidity) はフィブリンの濃度 (重合度) を意味し、高い程密度の大きいフィブリン塊ができる。透過性 (permeability) は溶液がフィブリン塊を浸透する速さを意味する。どちらもフィブリン線維の生理学的な特徴を現す。

- Nagasawa H, Nogawa K (2005) Estimation of cumulative cadmium intake causing Itai-itai disease. *Toxicol Lett* 15: 192-201
- 14) ハーパーマン R 生態系の微分方程式 固体群成長の数学モデル、p41-65 稲垣宣生 訳、1992、現代数学社、京都
- 15) Morse DR, Lawton JH, Dodson MM, Williamson MH (1985) Fractal dimension of vegetation and the distribution of arthropod body lengths *Nature* 314: 731-733
- 16) タマス・ウ` イチェック フラクタル成長現象、p13-17 宮島佐介 訳、1990、朝倉書店、東京
- 17) Gaylord RJ, Wellin PR (1995) Percolation clustering. In *Computer simulations with Mathematica. Explorations in complex physical and biological systems.* Chapter 5, p57-74, TELOS, Santa Clara, CA, USA
- 18) Mandelbrot B (1967) How long is the coast of Britain? Statistical self-similarity and fractal dimension. *Science* 156: 636-638
- 19) Adami C (2002) What is complexity. *BioEssays* 24: 1085-1094
- 20) Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685
- 21) 中村健蔵 *Mathematica で絵を描こう* p104~131、1998、東京電機大学出版局、東京
- 22) Mosesson BW, DiOrio JP, Siebenlist KR, Wall JS, Hainfeld JF (1993) Evidence for a second type of fibrin branch point in fibrin polymer networks, the trimolecular junction. *Blood* 82: 1517-1521
- 23) Wiesel JW (1986) Fibrin assembly Lateral aggregation and the role of the two pairs of fibrinopeptides. *Biophys J* 50: 1079-1093
- 24) Makowski L, Magdoff-Fairchild B (1986) Polymorphism of sickle cell hemoglobin aggregates: Structural basis of limited radial growth. *Science* 234: 1228-1231
- 25) Weisel JW, Nagaswami C, Makowski (1987) Twisting of fibrin fibers limits their radial growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 8991-8995
- 26) Wiesel JW, Nagaswami C (1992) Computer modeling of fibrin polymerization kinetics correlated with electron microscope and turbidity observations: clot structure and assembly are kinetically controlled. *Biophys J* 63: 111-128
- 27) Daxer A (1993) Characterisation of the neovascularization process in diabetic retinopathy by means of fractal geometry: diagnostic implications. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 232: 681-686
- 28) Daxer A, Ettl A (1995) Corneal vascularization and its relation to the physical properties of the tissue: a fractal analysis. *Curr Eye Res* 14: 263-268
- 29) Mauroy B, Filoche M, Weibel ER, Sapoval B (2004) An optimal bronchial tree may be dangerous. *Nature* 427: 633-636
- 30) Obert M, Pfeifer P, Sernetz M (1990) Microbial growth patterns described by fractal geometry. *J Bacteriol* 172: 1180-1185
- 31) Jones CL, Lonergan GT, Mainwaring DE (1995) Sierpinski fractal analysis and percolation threshold implications in fungal colonies. *Bioimages* 3: 71-78
- 32) Witten TA, Sander LM (1983) Diffusion-limited aggregation. *Phys Rev B* 27: 5686-5697
- 33) Shah GA, Ferguson IA, Khall TZ, Dhall DP (1982) Polydispersion in the diameter of fibers in fibrin networks: consequence on the measurement of mass-length ratio by permeability and turbidity. *Biopolymers* 21: 1037-1047

Fractal geometric analyses of the networks from normal and abnormal fibrins exposed to cadmium or heat

Hiroyuki Sakemi^{1, 2)}, Rie Ishii^{1, 3)}, Akiko Yamaguchi^{1, 4)}, Naoko Nishimura^{1, 5)}, and Kei Takahashi^{1, 6)}

¹⁾Laboratory for Molecular and Cellular Biology, Oita University of Nursing and Health Sciences, ²⁾ Yamaguchi Kosei-nenkin Hospital, ³⁾ Kyushu Kosei-nenkin Hospital, ⁴⁾ Yufuin Kosei-nenkin Hospital, ⁵⁾The Central Citizens Hospital of the City of Kobe and ⁶⁾Northwestern University Feinberg School of Medicine, Hematology/Oncology

Keywords:

fibrin-networks, heavy metals and heat treatment, fractal analysis

Abstract

Serine-proteases in blood allow the consequent chemical reactions, coagulation. The final step is the generation of thrombin, which quickly converts fibrinogen to fibrin. The resulted monomers are able to form fibrils, visible networks by self-assembly. The velocity depends on the milieu, divalent cations, pH, ionic strength and temperature. Cadmium causes “itai-itai” disease and high body temperature might allow a poor organization of fibrils. Thus, we ask how the denaturation affects fibrin monomers causing morphological and functional disorders. To elucidate quantitative studies, 1) we measured the polymerization of fibrins by the optical absorbance at 350 nm. It is a logistic curve given by a difference equation consisting of a lag phase, growth phase and plateau. Thus, the slope of the curve is a reaction velocity (dy/dt), and the plateau is the density of the networks. 2) To understand this process, a computer simulation followed stochastic models such as percolation clustering, Sierpinski's gasket, and random street. The images thus obtained and those of normal and abnormal networks were assessed by fractal analyses using ImageJ. Our results suggest that fractal geometry accounted for structural characteristics of fibrils indicating faster the reaction velocity, higher the D value. The y-intercepts were the density of networks. Both cadmium and heat exposure caused non-fibrous abnormal clusters of fibrins. 3) Then, we carried out computer-assisted image analyses of composite fibrils made by heat denatured (RITC) and normal fibrinogens (FITC). The results suggest that fibrin networks are heterogeneous composing of denatured-, normal-fibrils and mixed ones, suggesting that abnormality could be compensated in part by normal fibrins.