

せん断負荷装置によるせん断速度が血液凝固因子の反応に 及ぼす影響

Effect on reaction of blood coagulation factors due to shear rate using a rotational shear stressor

○ 川上滉貴(東理大院) 迫田大輔(産総研) 小阪亮(産総研)
西田正浩(産総研) 川口靖夫(東理大) 丸山修(産総研)

Koki KAWAKAMI, Graduated School of Science and Technology, Tokyo University of Science (TUS)
Daisuke SAKOTA, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)
Ryo KOSAKA, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)
Masahiro NISHIDA, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)
Yasuo KAWAGUCHI, Tokyo University of Science (TUS)
Osamu MARUYAMA, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)

Abstract: Thrombus formation is a major problem in using blood pumps. It has been reported that shear rate is closely related to thrombus formation in blood pumps. However, the inhibition mechanism of blood coagulation by shear rate is not yet fully understood. The purpose of this study is to evaluate the effect of shear rate on reaction time of blood coagulation factors. The test blood sheared in a range of 0-2,880 s^{-1} for 1,000 s using a rotational shear stressor. After sheared to bovine blood, prothrombin time (PT), activated partial thromboplastin time (APTT), and the thrombin time (TT) were measured using an automated coagulation analyzer. As a result, PT was decreased and APTT was increased with increased shear rate from 0 to 2,880 s^{-1} . On the other hand, TT remained constant with increased shear rate from 0 to 2,880 s^{-1} .

Key Words: Blood coagulation factor, Blood pump, Rotational shear stressor, Shear rate

1. 緒言

重症心不全患者に対する外科的治療として、血液ポンプを用いて機械的に心機能を補助する補助循環が行われている。しかし、血液ポンプ内部の淀み域で血栓が形成することがあり、血液ポンプ内での血栓形成は未だ解決すべき課題となっている⁽¹⁾。

生体内における血栓形成の反応系は、血小板凝集系および血液凝固系に大別される。血小板凝集系では、血管内皮の損傷により血小板が集合し、凝集することで血小板血栓を形成する。血小板凝集は反応が速く、血栓形成の初期段階で重要な役割を担っている。さらに、血小板は活性化すると長い義足を出して凝集し、表面にリン脂質である血小板第3因子を発現して血液凝固系の反応を助ける。一方、血液凝固系では、血小板凝集系で形成した血小板血栓を強化し、より強固な血栓を形成する。この凝固反応は、血液凝固因子のカスケード反応であり、凝固因子の活性化が連鎖的に起こる。反応の開始点によって外因系凝固反応と内因系凝固反応の2つの反応に分けられる。外因系凝固反応は、組織の陰性荷電面上で血管損傷が生じると、血管内皮下にある組織因子(血液凝固第III因子)が出現し、この組織因子を基点に血液凝固が開始する。内因系凝固反応は、組織の陰性荷電面上で血管壁が傷ついて露出したコラーゲンに接触し、血液凝固が開始する凝固反応である。

生体外における血栓形成は、血液が異物表面と接触することで血液凝固反応が開始し、異物表面に血小板が凝集することで血栓形成を生じる⁽²⁾。つまり、血液ポンプを用いる際には、生体内と同様の反応により血栓形成を生じる可能性がある。一方、血液ポンプ内部では、インペラとケーシングの間でせん断速度が生じており、このせん断速度が血液ポンプ内での血栓形成に密接に関与していることが報告されている⁽³⁾。このように、血液ポンプ内部ではポン

プ材料との接触による血液凝固促進と、せん断速度による血液凝固抑制が同時に生じている。しかし、せん断速度による血液凝固機序は明らかになっていない。そこで本研究では、せん断速度に対する血液凝固因子の反応時間を測定し、せん断速度が血液凝固因子の反応時間に及ぼす影響を定量的に評価することを目的とした。

2. 実験方法

2-1. 試験血液の調整

本実験では、血液ポンプ開発の際の血液適合性試験に用いられることのあるウシ新鮮血およびウシ保存血を試験血液とした。ウシ新鮮血は、穿刺採血後直ちに3.8 w/v%クエン酸ナトリウム水溶液(血沈用チトラート「コクサイ」、シスメックス株式会社、兵庫)で抗凝固し、最終濃度を0.38 w/v%とした。ウシ保存血は、フナコシ株式会社より購入したクエン酸ナトリウム抗凝固ウシ保存血(最終濃度:0.50 w/v%)を使用した。

2-2. 試験血液へのせん断負荷

本実験では、せん断負荷装置として外筒回転式二重円筒型レオメータの改造品(Rheologia A300, 株式会社エルクエスト, 千葉)を用いた。装置の外観およびせん断負荷部を図1に示す。せん断負荷部の材質は、内筒がステンレス鋼(SUS316)、外筒が硬質ガラスの二重円筒で構成されている。外筒は、モータ駆動によって最大600 rpmで回転する。設計上、内外筒の側面隙間は0.45 mm、下面隙間は0.3 mmである。内筒底面は、1°25'のテーパがかかっており、内筒と外筒との下部隙間が0.3 mmとなるように円錐がカットされた形状となっている。また、せん断負荷時には、恒温槽が上方方向に移動することで、せん断負荷部が37°C一定に保たれる構造になっている。

試験血液 5 mL をマイクロペットで外筒内に入れ、外筒を本体に装着し、恒温槽によって 37°C に加温した。せん断負荷部の温度が 37°C になったことを確認し、外筒を回転させて血液にせん断速度を与えた。せん断速度は、0, 500, 1,000, 1,500, 2,000, 2,500, 2,880 s⁻¹ で変化させ、各せん断速度におけるせん断負荷時間 1,000 s とした。せん断負荷後、外筒より血液を採血し、直ちに 6,149×g で 10 分間遠心分離をして血漿を取り出した。

2-3. 血液凝固因子の反応時間の測定

本実験では、図 2 に示す自動血液凝固測定装置(CA-50, シスメックス株式会社, 兵庫)を用いて、取り出した血漿のプロトロンビン時間(PT), 活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT), およびトロンビン時間(TT)を 37°C で測定した。本装置の測定原理を図 3 に示す。本装置による測定には、光学的検出法が採用されており、血液が凝固する過程の濁度変化を散乱光の変化として検出した。凝固時間の検出には、パーセント検出方式を用いており、凝固開始時の散乱光レベルを 0%, 凝固終了時の散乱光レベルを 100% とし、散乱光レベルが 50% に達した時間を凝固時間と定義した。本方式は、わずかな散乱光の変化があれば凝固時間の検出ができる。よって、散乱光の変化が小さな検体(低フィブリノゲン検体), および変化速度の小さな検体(凝固時間が延長した検体)においても、凝固時間を検出することが可能である。パーセント検出方式による凝固時間 t (s) は、図 3 に示す凝固曲線の勾配直線と散乱光レベルが 0% との交点を凝固開始時間 t_s (s) とし、勾配直線と散乱光レベルが 100% との交点を凝固終了時間 t_f (s) とすると、次式(1)より算出される。

$$t = \frac{t_s + t_f}{2} \tag{1}$$

本実験では、PT, APTT, および TT を測定した。PT は、外因系凝固因子の反応を反映する。PT 測定試薬には、ヒト組織抽出トロンボプラスチン(組織因子およびリン脂質)が含まれており、この組織トロンボプラスチンが第 VII 因子を活性化することで反応が開始し、フィブリンができるまでの時間を測定した。APTT は、内因系凝固因子の反応を反映する。APTT 測定試薬には、活性化剤およびウサギ脳由来セファリン(カルシウムおよびリン脂質)が含まれており、活性化剤が第 XI, XII 因子を活性化することで反応が開始し、セファリンの存在下でフィブリンができるまでの時間を測定した。TT は、フィブリノゲンからフィブリンへの転換反応を反映する。TT 測定試薬には、ウシトロンビンが含まれており、トロンビンがフィブリノゲンを活性化し、フィブリンができるまでの時間を測定した。

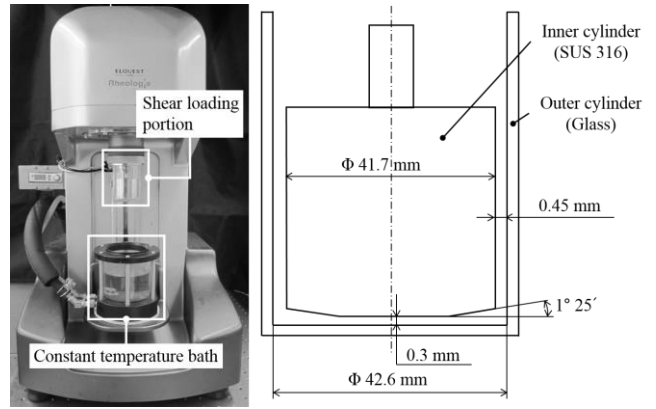


Fig.1 Photograph of Rheologia A300 left and shear loading portion right.

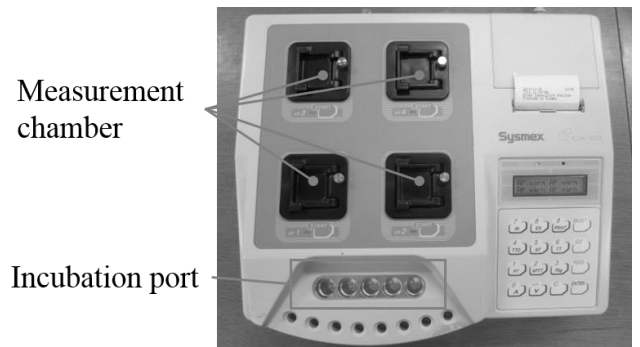


Fig.2 Photograph of the automated blood coagulation analyzer (CA-50).

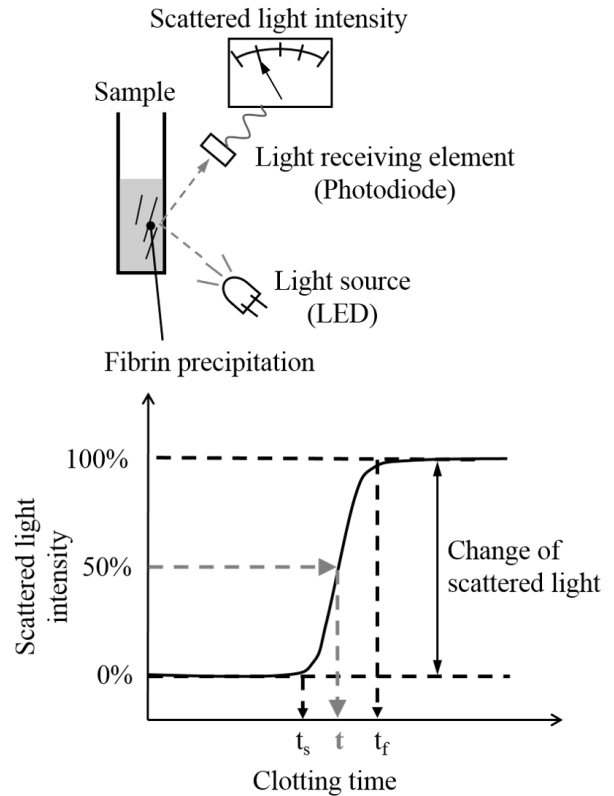


Fig.3 Measurement principle of the automated blood coagulation analyzer (CA-50).

3. 実験結果

せん断速度 $0-2,880 \text{ s}^{-1}$ をそれぞれ $1,000 \text{ s}$ 間負荷した後の PT, APTT, および TT の測定結果を図 4 に示す. 図 4 より, せん断速度が 0 から $2,880 \text{ s}^{-1}$ に増加するに伴い, ウシ新鮮血の PT は, 22.6 s から 20.9 s に 7% 短縮し, ウシ保存血の PT は, 31.1 s から 26.1 s に 16% 短縮した. せん断速度が 0 から $2,880 \text{ s}^{-1}$ に増加するに伴い, ウシ新鮮血の APTT は, 59.5 s から 67.9 s に 14% 延長し, ウシ保存血の APTT は, 140.1 s から 168.1 s に 20% 延長した. せん断速度が 0 から $2,880 \text{ s}^{-1}$ に増加するに伴い, ウシ新鮮血の TT は, 11.8 s から 12.4 s は 5% 延長し, ウシ保存血の TT は 13.1 s から 13.5 s に 3% 延長した.

また, 本結果よりウシ新鮮血の PT, APTT, および TT は, ウシ保存血の PT, APTT, および TT に比べて短いことがわかった.

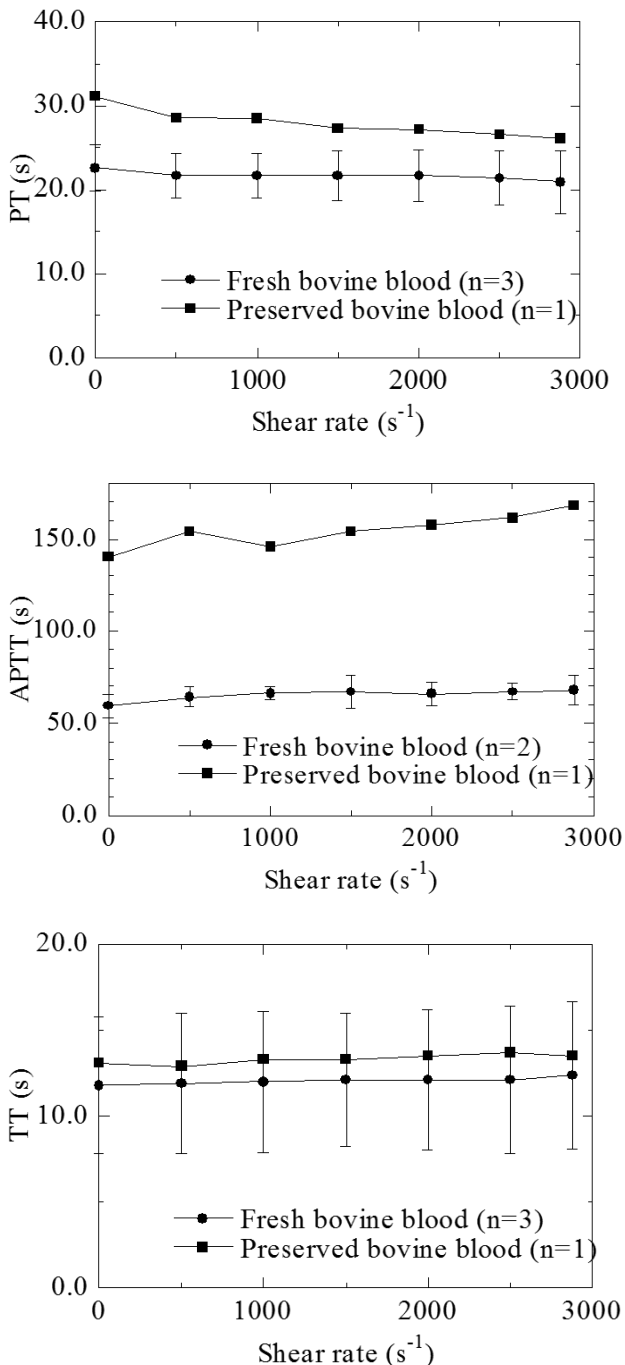


Fig.4 Result of PT, APTT, and TT after sheared for 1,000 s.

4. 考察

本研究において, せん断速度の増加に伴い, PT は短縮した. 従って, せん断速度の増加に伴い外因系凝固因子の反応が促進されたと考えられる. Gemmell らは, 直管のフローチャンバーを使用して, 組織因子を付加した血液にせん断速度を与え, せん断速度の増加に伴い, 第 X 因子の反応速度が速くなることを報告している⁽⁴⁾. このことから, せん断速度の増加に伴う外因系凝固因子の反応の促進は, 第 X 因子の活性化が促進することによって生じると考えられた. また, せん断速度の増加に伴い, ウシ新鮮血の PT に比べてウシ保存血の PT の方が短縮したのは, ウシ保存血の血小板活性による影響が考えられる. ウシ保存血は, 屠殺採血されているため血管壁および組織に接触し, 輸送のため 1 日冷蔵保存される. 血小板は低温で保存されることで活性化が抑制され, せん断速度が与えられることで活性化し元の新鮮血の PT に戻ろうとしたためにウシ保存血の PT 方が短縮したと考えている. 本実験では, 血小板活性についての測定はできていないため, これらについては今後明らかにする予定である.

せん断速度の増加に伴って APTT が延長したのは, 内因系凝固因子である血液凝固第 XII, XI, IX, および VIII 因子が破壊または変性し, 反応が抑制されたためだと考えられる. ヒト血およびブタ血においては, 赤血球膜上に第 IX 因子活性化酵素が存在し, その第 IX 因子活性化酵素は, せん断速度の増加に伴い, 第 IX 因子が抑制され, 凝固反応が遅延することが報告されている⁽⁵⁾. しかし, 本研究で使用したウシ血においては, 赤血球膜上の第 IX 因子活性化酵素が存在しないことが報告されている⁽⁶⁾. 従って, せん断速度の増加に伴う, ウシ血の内因系凝固因子の反応の抑制は, 赤血球膜上の第 IX 因子活性化酵素による反応を抑制することではなく, 血漿中の内因系凝固因子に直接作用し, それらを破壊または変性することによって生じると考えている. また, せん断速度の増加に伴い, ウシ新鮮血の APTT に比べてウシ保存血の APTT が延長した. これは, ウシ新鮮血の方がウシ保存血に比べて血小板活性が大きいため, せん断速度の増加による影響を受けにくいことによるものと考えている.

せん断速度の増加に伴って, TT はウシ新鮮血で 5% , ウシ保存血で 3% の変化となったが, ほぼ一定であると考えられた. Charm らは, レオメータを使用してヒト血漿のフィブリノゲンにせん断速度を与え, せん断速度の増加に伴ってフィブリノゲンの凝固能が小さくなること, およびせん断速度によるフィブリノゲンの減少が半減期によるフィブリノゲンの減少よりも優位であることを報告している⁽⁷⁾. すなわち, 本結果は, Charm らの結果を追従するものではなかった. しかし, Charm らは, せん断速度を 90 分間与えてフィブリノゲンの凝固能が小さくなること, およびフィブリノゲンが減少することを確認しているが, 本実験におけるせん断負荷時間は $1,000 \text{ s}$ であり, Charm らの実験に比べて短い. 以上のことから, せん断負荷時間を長くすることで, フィブリノゲンの凝固能が小さくなること, およびフィブリノゲンの減少を確認することができると考えられる. また, フィブリノゲンからフィブリンへの転換反応は, フィブリノゲンのみに依存し, 他の凝固因子に関係しない反応である. そのため, 本実験ではせん断負荷時間が短く確認できなかったが, せん断速度の増加に伴うフィブリノゲンからフィブリンへの転換反応は, フィブリノゲンが物理的に壊れることによって延長すると考えられる.

5. 結論

本研究では、せん断速度が外因系凝固因子の反応、内因系凝固因子の反応、およびフィブリノゲンからフィブリンへの転換反応に及ぼす影響について定量的に明らかにすることを目的として、せん断負荷後のPT、APTT、およびTTを測定した。本実験より、0-2,880 s⁻¹の範囲でせん断速度が増加するに伴って、外因系凝固因子の反応時間は短縮し、内因系凝固因子の反応時間は延長し、またフィブリノゲンからフィブリンへの変換時間はせん断負荷時間が1,000 sでは変化しないことがわかった。

謝辞

ウシ新鮮血の採血に当たっては、茨城大学農学部附属フィールドサイエンス教育研究センターの足立吉数教授のご協力により実験に供することができた。ここに謝意を表します。

参考文献

- (1) N. A. Mokadam, S Andrus, A Ungerleider, Thrombus formation in a HeartMate II, Eur J Cardiothorac Surg, vol.39, no.3, 2011.
- (2) 森有一, 丹沢宏, 血栓をつくらない材料, 高分子, vol.22, no.11, pp.613-617, 1973.
- (3) M Toyoda, M Nishida, O Maruyama, et al., Geometric Optimization for Non-Thrombogenicity of a Centrifugal Blood Pump through Flow Visualization, JSME International Journal, vol.45, no.4, 2002.
- (4) C. H. Gemmell, Y Nemerson, V Turitto, The Effect of Shear Rate on the Enzymatic Activity of the Tissue-Factor VIIa Complex, Microvascular Research, vol.40, no.3, 1990.
- (5) 貝原真, 血栓形成と血液の流動 -静脈血栓を中心に-, 日本バイオレオロジー学会誌, vol.18, no.3, 2004.
- (6) M Kaibara, T Shinozaki, R Kita, et al., Analysis of coagulation of blood in different animal species with special reference to procoagulant activity of red blood cell, J. Jpn. Soc. Biorheology, vol.20, no.1, 2006.
- (7) S. E. Charm, B. L. Wong, Shear Degradation of Fibrinogen in the Circulation, Science, vol.170, no.3956, 1970.