

レオメータを用いたせん断流れ場における血液凝固反応の定量評価

Quantitative Evaluation for Blood Coagulation Time and Clotting Ratio under Shear flow Field

Using a Double-Cylinder Type Rheometer

○ 可児裕基(東理大院) 小阪亮(産総研) 西田正浩(産総研) 丸山修(産総研)

山根隆志(産総研) 川口靖夫(東理大) 巽英介(国循) 妙中義之(国循)

Yuki KANI, Graduated School of Science and Technology, Tokyo University of Science
 Ryo KOSAKA, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology
 Masahiro NISHIDA, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology
 Osamu MARUYAMA, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology
 Takashi YAMANE, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology
 Yasuo KAWAGUCHI, Tokyo University of Science
 Eisuke Tatsumi, National Cerebral and Cardiovascular Center
 Yoshiyuki Taenaka, National Cerebral and Cardiovascular Center

Abstract: We have developed a simple *in vitro* antithrombogenic testing method using a mock circulation system as used in the hemolysis test to evaluate the antithrombogenicity of centrifugal blood pumps. With regard to this method, the fundamental issue was the absence of the basic knowledge of activating clotting time (ACT) response to shear rate. In this study, to evaluate the correlation among the shear rate, ACT and blood coagulation time was examined quantitatively with whole blood using a double-cylinder type rheometer. Evaluation of blood coagulation time was derived from the time until initial increasing torque and of clotting ratio was done from the ratio of torque difference between before and after clotting at the gap between the rotating outer cylinder and the stationary inner cylinder. The results suggest that it is suitable to adjust the ACT from 250 to 300 s, at a shear rate below $2,880 \text{ s}^{-1}$ because of coagulation behavior for shear stress.

Key Words: Centrifugal Blood Pump, Blood Coagulation, *in vitro* Anti-thrombus Testing, Shear Rate, Rheometer

1. はじめに

人工心臓に用いられる遠心血液ポンプの開発において、動物実験は必要不可欠な抗血栓性評価法である。しかし、動物実験の実施にあたっては、外科医の他、手術室や飼育施設といった大型の特殊施設が必要となり、血液ポンプの抗血栓性評価には大きな制約条件があった。そこで我々は、開発された遠心血液ポンプが動物実験に耐えうる抗血栓性を有するかをスクリーニング評価するため、一般的な化学実験室でも実施できる *in vitro* 抗血栓性試験法を開発してきた⁽¹⁾。しかし、*in vitro* における抗血栓性試験法によって生じる血栓が、試験血液の血液凝固能やポンプ内で生じるせん断速度に対してどのように凝固するかは明らかでなかった。

そこで本研究では、二重円筒型レオメータを使用して、*in vitro* 抗血栓性試験法と同様の血液凝固能を設定した試験血液に関して、せん断速度に対する血液凝固時間や血栓形成量を定量し、*in vitro* 抗血栓性試験法の至適条件を探索する事を目的とした。

2. 実験方法

2-1 試験血液の調製

フナコシ(株)より購入した、クエン酸ナトリウム添加保存ウシ血液(最終濃度: 0.45 w/v%)に塩化カルシウム(大塚製薬(株), 大塚塩カル注 2%)をポリエチレン製のビーカー内で任意量添加、混和することで活性化凝固時間(ACT)を設定した。なお、このときの ACT は、血液凝固計(I.T.C., ヘモクロンレスポンス)を使用し、200~1,000 s の範囲で設定した。

2-2 せん断流れ場での血液凝固反応の定量

使用した実験装置は、外観、および測定部の形状を図1に示した、外筒回転式二重円筒型レオメータ((株)エルクエスト, RheologiaA300)である。測定部は、内筒(SUS316)と外筒(硬質ガラス)の二重円筒で構成されている。内筒形状は、中央部は円筒型、下部が円錐型となっており、試験血液に均一せん断速度を負荷する事ができる。そして、内筒と外筒のすきまに各 ACT の試験血液を入れ、せん断速度を $50 \sim 2,880 \text{ s}^{-1}$ の範囲で $37 \text{ }^\circ\text{C}$, 2,000 s 間負荷した。またせん断負荷時、外筒の回転に伴い発生した粘性摩擦力による内筒の変位を、内筒上部に位置するトルクメータで測定し、トルク値を計測した。

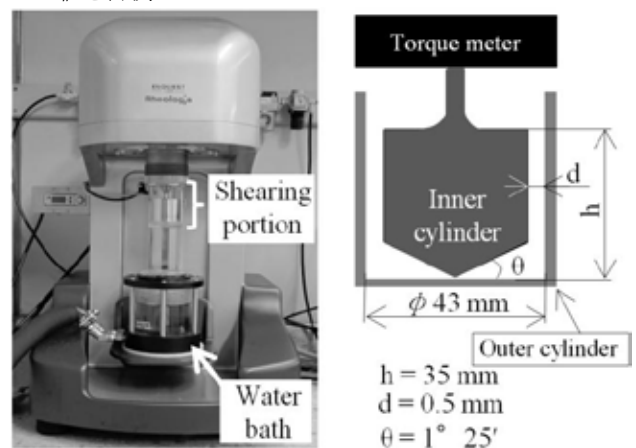


Fig.1 Photograph of a rheometer and measurement site

得られたトルクの経時変化から、血液凝固反応を定量するために定義した指標について説明する。内筒-外筒間で血栓が形成すると、図2に示すようなトルクの経時変化が観察される。このグラフから血栓が形成しはじめた時間を血液凝固時間、および血栓形成前のトルクに対する血栓形成後のトルク上昇比を血栓形成度とした。そして、各試験血液について血液凝固時間、血栓形成度を算出した。

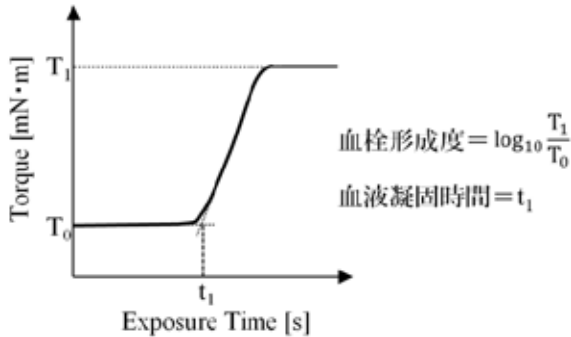


Fig.2 Torque value with exposure time

2-3 トロンボエラストメトリーによる血液凝固能測定

本研究においては、ACTを変化させたときの凝固能の変化を内因系、および外因系凝固機序に基づき測定した。使用した実験装置は、図3に示す包括的止血能測定システム(Tem Innovations GmbH, ROTEM[®]delta)である。本装置は、1948年にHartertによって考案されたトロンボエラストグラム(TEG)に基づいたものである⁽²⁾。測定原理は、全血をキュベット内で活性化し、回転するピンに浸す。光学センサー用、クロット形成による血液粘度の変化により発生した、ピンに負荷される機械的インピーダンスを5,400 s間測定する。測定結果は、図4のような波形として得られる。

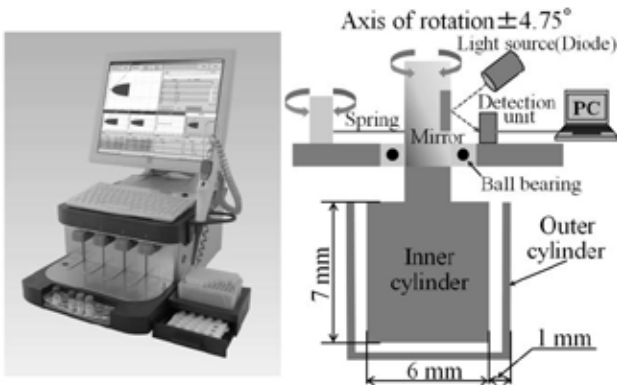


Fig.3 Photograph of a ROTEM[®] and its measurement site

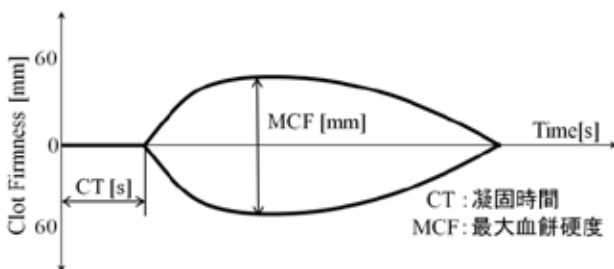


Fig.4 Clot firmness with exposure time

本研究では、この波形から凝固時間(CT)、および最大血餅硬度(MCF)を読み取った⁽³⁾。測定した項目は、内因系凝固能(INTEM)、および外因系凝固能(EXTEM)である。試験血液の活性化のために使用した試薬はそれぞれ、接触相(内因系)の活性剤(Tem Innovations GmbH, in-TEM)、および組織因子(外因系)の活性剤(Tem Innovations GmbH, r ex-TEM)である。

試験血液のACTを200, 225, 250, 300 sに設定した後、せん断負荷することなくただちにINTEM、およびEXTEMの測定をおこなった。

3. 実験結果

3-1 測定部に形成した血栓

各せん断速度、およびACT条件で実験終了後、内筒に形成した血栓の写真を表1に示した。ACT200 sの条件では、いずれのせん断速度においても血栓が形成した。一方、ACT250, 300 sの条件では、それぞれせん断速度が2,200 s⁻¹, 100 s⁻¹を超過すると血栓が形成しなくなった。そして、ACT400 s以上では、いずれのせん断速度においても血栓は形成しなかった。なお血栓形成は、内筒以外には確認できなかった。

3-2 血液凝固時間、および血栓形成度

血栓が形成することにより、トルクの変化が確認された条件の血液凝固時間、および血栓形成度の結果をそれぞれ、図5、および図6に示した。

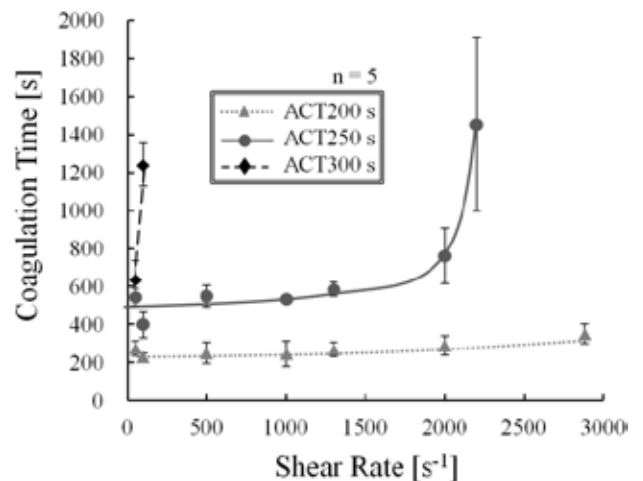


Fig.5 Change of the coagulation time against shear rate

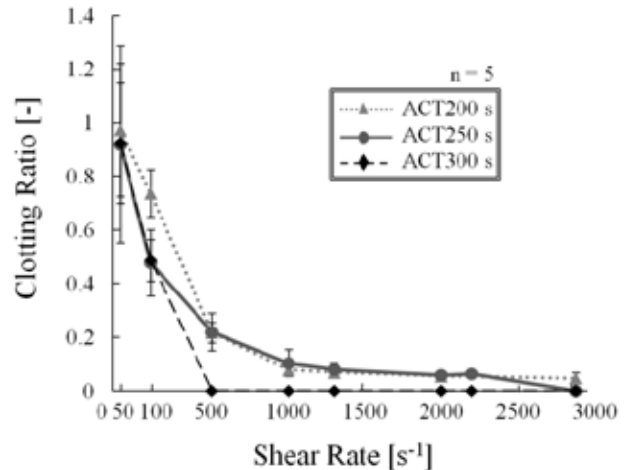
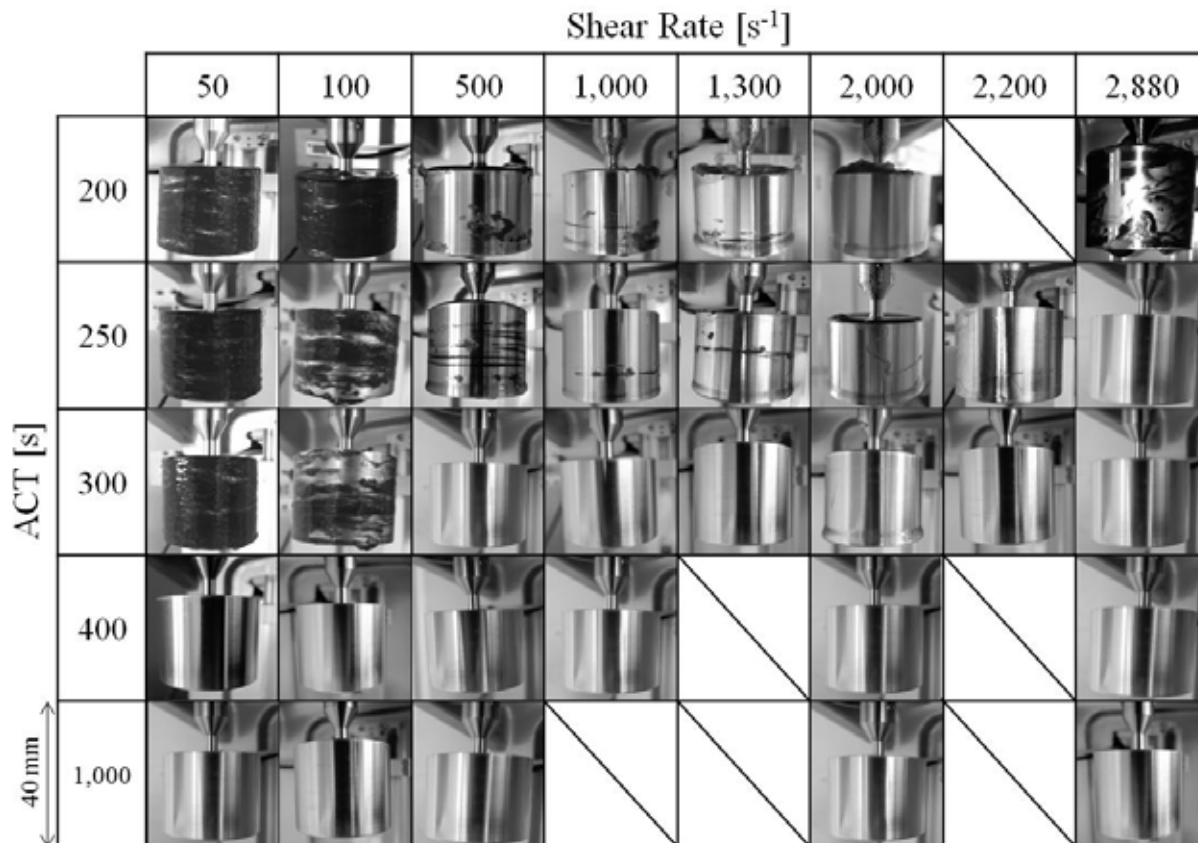


Fig.6 Change of the clotting ratio against shear rate

Table1 Clot formation of each condition



はじめに、血液凝固時間に関して、ACT200 s の条件では、血液凝固時間 t_f は、せん断速度依存적でなかった。一方、ACT250 s、および 300 s の条件では、それぞれ、2,200、100 s^{-1} 近傍において急激に血液凝固時間が増加することがわかった。

次に、血栓形成度に関して、いずれの ACT 条件においても、せん断速度を増加させると、血栓形成度が減少することがわかった。さらに、その減少傾向は、500~2,200 s^{-1} の範囲で ACT200、250 s の条件が似通っていることがわかった。しかし、100 s^{-1} では、ACT200 s と ACT250、および 300 s とでは 0.2 程度の差がみられた。

3-3 トロンボエラストメトリーによる血液凝固能測定

INTEM、および EXTEM の測定結果をそれぞれ図 7、および図 8 に示した。なお、5,400 s 以内に血栓が形成しなかった場合、MCF を 0 mm とした。

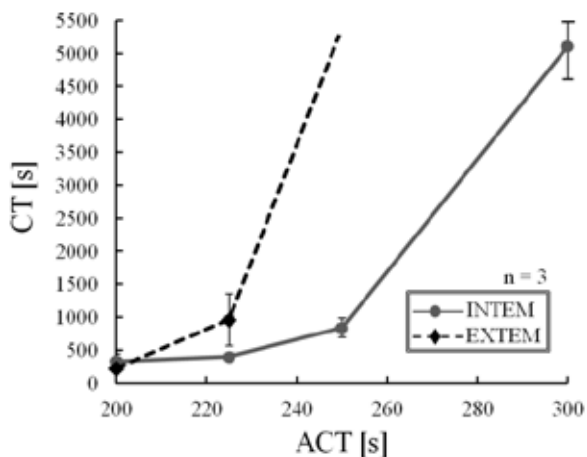


Fig.7 Change of the CT against ACT

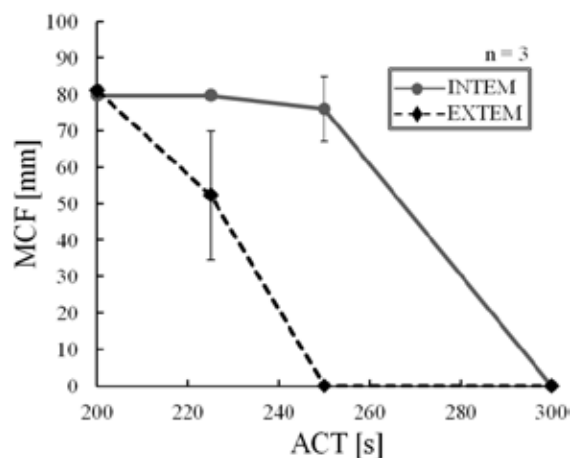


Fig.8 Change of the MCF against ACT

はじめに、CT に関して、ACT200 s の条件では、INTEM と EXTEM に約 100 s という相対的に小さな差しか見られなかった。しかし、ACT を増加させると、INTEM、EXTEM 共に CT が増加したものの、EXTEM の増加率は INTEM よりも大きくなり、ACT250 s では、EXTEM で血栓は形成しなかった。そして、ACT300 s の条件では、いずれの測定項目においても血栓は形成しなかった。

次に、MCF に関して、ACT200 s の条件では、INTEM と EXTEM に約 1 mm という相対的に小さな差しか見られなかった。しかし、ACT を増加させると、INTEM、EXTEM 共に MCF が減少したものの、EXTEM の減少率は INTEM よりも大きくなり、ACT250 s での EXTEM は 0 mm となった。そして、ACT300 s の条件では、いずれの測定項目においても MCF は 0 mm となった。

4. 考察

4-1 *in vitro* 抗血栓性試験における ACT の至適条件

図 5 より血液凝固時間は、ACT250 s の条件で 2,200 s⁻¹ 近傍で、ACT300 s で 100 s⁻¹ 近傍で増加した。すなわち、ACT250 s、および 300 s の試験血液において、血液凝固反応を抑制したせん断速度が明らかとなった。これらの結果から、*in vitro* 抗血栓性試験において、設定する ACT を変化させることで、血栓形成を抑制するせん断速度の閾値を任意に決定出来ると考えた。

図 6 より血栓形成度は、100 s⁻¹ の条件で、ACT200 s と 250 s、および 300 s との血栓形成度差が 0.2 で得られた。さらに、この違いは実験終了後の内筒に形成した表 1 に示す血栓の様子からも観察された。これらの結果から、本研究で定義した血栓形成度により、任意に設定した ACT、およびせん断速度下で形成する、血栓量を評価できたと考えた。

ここで、せん断速度が、500~2,200 s⁻¹ の範囲では、血液凝固時間は ACT250 s の条件で急激に増加するなど、ACT200 s の条件との違いが明瞭であった。しかし、同じせん断速度範囲の血栓形成度は、ACT200 s と 250s の条件で、せん断速度の変化に伴いそれぞれの値は変化するものの、両者の値にほとんど差は認められなかった。これらの結果から、ACT は血栓が形成しはじめるまでの時間には影響を与えるが、血栓の形成量には影響を及ぼさないことが考えられる。つまり、*in vitro* 抗血栓性試験で形成する血栓量は、ACT を変化させても、変化しないと考えられる。

よって、*in vitro* 抗血栓性試験における ACT の至適条件は、血液凝固時間の結果のみで判断しても差し支えないと考えることができ、せん断速度 50~2,880 s⁻¹ の範囲で血栓形成の有無を確認する場合には、ACT250~300 s の範囲が ACT の至適条件であると考えられる。

4-2 せん断速度増加に伴う血液凝固時間の増加

図 5 より、ACT250 s の条件における血液凝固時間は、2,200 s⁻¹ 近傍で急激に増加した。また、ROTEM による CT の結果では図 7 より、ACT250 s の条件で、INTEM では 850 s であったが EXTEM では 5400 s を超過し、測定不可能であった。ここから、ACT250 s における血液凝固反応は、主に内因系凝固反応に基づくものであることが考えられ、せん断速度が内因系凝固反応を抑制したことが示唆された。また、この現象について貝原らの研究においても、血液に負荷するせん断速度を増加させると、赤血球が血液凝固第 IX 因子の活性を低下させ、内因系凝固反応を抑制することが報告されている。

よって本実験で観察された、せん断速度増加に伴う血液凝固時間の急激な増加は、力学的なせん断速度が内因系凝固反応を抑制したことに起因するものであると考えられる。

4-3 血栓形成度と MCF にていての考察

図 6 より、ACT200 s と ACT250 s の血栓形成度が非常に酷似していたが、その理由を ROTEM による MCF 測定結果より考察する。図 8 に示す MCF の結果では、ACT200 s では INTEM、および EXTEM 共に、同量の血栓形成を認め、ACT250 s では、INTEM において血栓が形成され、その血栓量は ACT200 s とほぼ同量であった。すなわち、血栓が形成される過程において、内因系、および外因系のいずれの経路であっても、最終的に形成される血栓量は ACT にほぼ依存しないことが示唆された。

しかしながら、血栓形成度がせん断速度増加に伴い、なぜ減少するかについてのメカニズムは、さらなる研究を要するであろう。

5. 結論

抗凝固剤としてクエン酸ナトリウム、その中和剤として塩化カルシウムを用いて ACT を設定したウシ血液について、せん断速度が血液凝固反応に与える影響を定量的に得た。この結果から、*in vitro* 抗血栓性試験において、せん断速度 50~2,880 s⁻¹ の範囲で血栓形成の有無を確認するには、ACT を 250~300 s の間で設定することが示唆された。

また、本研究での ACT 制御は、外因系凝固経路の活性を主に変化させることによりおこなっていたことが示唆された。

謝辞

本研究は、新エネルギー・産業技術総合開発機構(NEDO) 次世代心機能代替治療技術の研究開発により行われたものであり、謝意を表す。また、ROTEM[®]を提供していただいた、フィンガルリンク株式会社の御担当者各位に感謝を表す。

参考文献

- (1) Osamu MARUYAMA, Yousuke TOMARI, Simple *in vitro* testing for antithrombogenic evaluation of centrifugal blood pumps., ASAIO J., vol. 55, no. 4, pp. 314-322, 2009.
- (2) Hartert H, Blutgerinnungstudien mit der Thrombelastographie, einem neuen Untersuchungsverfahren., Klin Wochenschrift, vol 26, pp. 557-583, 1948
- (3) Satoru OGAWA, Jun KAWASAKI, トロンボエラストメトリーを用いた周術期止血管理, 血栓止血誌, vol. 21, no. 6, pp.553-561, 2010
- (4) Makoto Kaibara, Rheological study of blood with special reference to the reiggering mechanism of venous thrombus formation, J Biorheol, vol23, pp2-10