

## せん断速度が血液凝固能に与える影響

## Effect of Blood Coagulability due to Shear Rate

○ 丸山 修 (産総研), 小阪 亮 (産総研), 西田正浩 (産総研), 山根隆志 (産総研)

巽 英介 (国循), 妙中義之 (国循)

Osamu MARUYAMA (AIST), Ryo KOSAKA (AIST), Masahiro NISHIDA (AIST), Takashi YAMANE (AIST),  
Eisuke TATSUMI (NCVC), Yoshiyuki TAENAKA (NCVC)**Abstract:**

In vitro antithrombogenic testing is a useful pre-evaluation for an ex vivo test of a continuous flow pump. In our previous study, we quantitatively obtained that the increasing shear rate reduced both thrombus formation time and the amount of thrombus. However, we have not yet make clear the blood coagulation factors which related to reducing the thrombus formation based on the increasing shear rate. In this paper, we aimed to evaluate the effect of blood coagulability due to shear rate. Prothrombin time (PT) and activated partially thromboplastin time (APTT) of whole blood and plasma with different activated clotting time, were measured at different shear rate between 50 and 2,880s<sup>-1</sup>. As a result, APTT of each test blood sample were prolonged up to 1,000s<sup>-1</sup>. Therefore, blood coagulability due to shear rate related to intrinsic clotting system, irrespective of ACT value and /or the presence of red blood cell.

**Key Words:** In vitro thrombosis, shear rate, ACT, PT, APTT

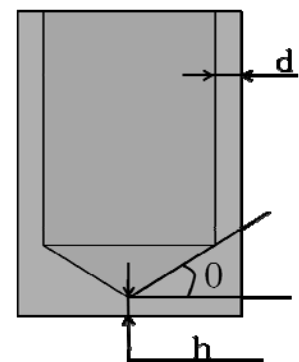
**1. 背景**

人工心臓や体外循環ポンプなどに使用される血液ポンプを開発するにあたり、抗血栓性を付与することは、血栓形成による臓器障害を防ぐためにも非常に重要である。血栓形成は、ポンプ内の血流による影響が注目されるが、ポンプ材料や患者の血液の性状にも大きく起因し、これはウィルヒョーの三原則として提唱されている。我々は、図1に示すような、底部がコーンプレート型でシリンダー部が二重円筒型のレオメータ（株式会社エルクエスト製レオロジーA300）を利用して、試験血液の活性化凝固時間（ACT）とせん断速度に対する血栓形成速度と血栓形成量について調べてきた。本レオメータは、せん断負荷部が、ステンレス製の内筒およびガラス製の外筒からなる二重円筒式で、外筒が回転するしくみとなっている。本レオメータを使用した我々のこれまでの実験結果から、ACTの増加とせん断速度の増加によって、血栓形成時間が延長し、また形成する血栓の量も少なく抑えられることを定量的に得ることに成功した。せん断速度の増加によって、マクロな視点で血栓形成が抑えられることは明らかにできたが、せん断速度に対して、複雑な血液凝固反応がどのように抑制されるのかについては明らかでない。そこで、本研究では、凝固系、血小板系、細胞系および線溶系の中で、まず凝固系の血液凝固反応に注目した。ACTを調整した血液に一定のせん断速度を負荷し、せん断負荷後の血液について、プロトロンビン時間（PT）および活性化部分トロンボプラスチン時間（APTT）を計測することで、せん断負荷が外因系血液凝固および内因系血液凝固にどのように関与しているのかを明らかにできる。

**2. 目的**

せん断負荷によって血栓形成が抑制される時、血液凝固反応の外因系凝固および内因系凝固に対してどのように関与しているのかを調べ、血液凝固能に与える影響を明らか

かにすることを目的とした。



$\theta : 1^{\circ}25'$   
 $d : 0.5\text{mm}$   
 $h : 0.3\text{mm}$

Fig.1 Observation and cross-section of the shearing portion of a double-cylinder type rheometer

**3. 実験方法**

使用したレオメータは、内筒底面のコーン角度と、内筒と外筒の隙間を調整することで一定のせん断速度が負荷できるように設計されている。クエン酸ナトリウムで抗凝固されたウシ保存血液（屠殺採血から24時間経過）に2%塩化カルシウムを添加し、ACTを400sに設定したウシ血液全血を内筒と外筒の隙間に4.2mL充填し、ただちに0~2,880s<sup>-1</sup>のせん断速度を1,000秒（16分36秒）間負荷した。また、2%塩化カルシウム無添加の全血（ACT>1,000s, 以下ACT1,000と表記）と2%塩化カルシウム無添加の血漿（ACT1,000s）についても同様のせん断負荷を行った。せん断負荷後の血液を遠心分離して血漿を採取し、血液凝固測定装置を使用してPTおよびAPTTを計測した。

#### 4. 結果および考察

せん断速度0~2,880s<sup>-1</sup>におけるACT400sの全血, ACT1,000sの全血およびACT1,000の血漿について, それぞれのPTおよびAPTTの結果を図2~図4に示した.

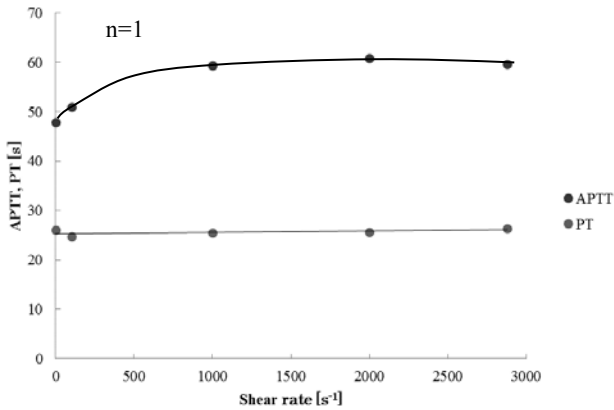


Fig.2 PT and APTT with increasing shear rate for whole blood (ACT400 s, 1,000 s)

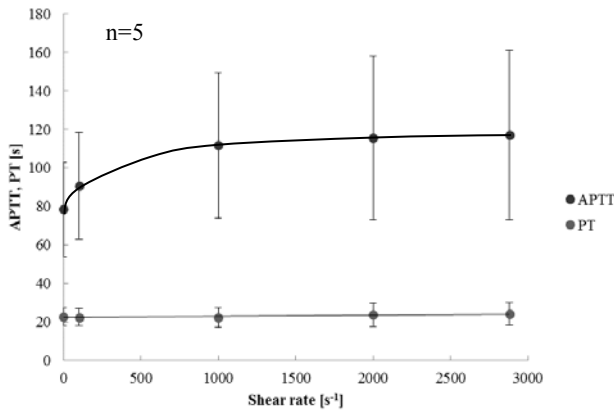


Fig.3 PT and APTT with increasing shear rate for whole blood (ACT1,000 s, 1,000 s)

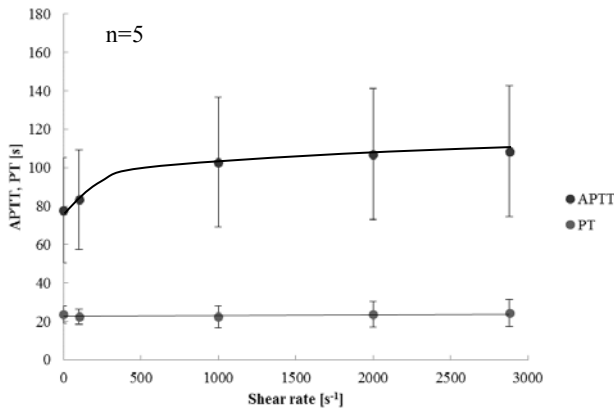


Fig.4 PT and APTT with increasing shear rate for plasma (ACT1,000 s, 1,000 s)

図2の結果から, ACT400sの血液では, せん断速度1,000s<sup>-1</sup>まで, PTは変化せず, APTTのみが延長することがわかった. この傾向は, 図3のACT1,000sの全血での結果, およびACT1,000sの血漿での結果でも同じであった. せん断速度1,000s<sup>-1</sup>までのせん断負荷は, APTTが延長したことから, 内因系凝固に関与することがわかった. ACTが400sでも1,000秒でもAPTTに変化がなかったが, 図3では図2と比較して, APTTはACT1,000sの血液で高値を示した. このことから, ACTの調整によって, 血液凝固時間を延長させても, せん断速度に対するAPTTの応答性は同一であることがわかった. また, 図4の結果から, 赤血球を除去した血漿に対して, 図2および図3と同一のせん断速度を負荷していることから, 血漿にかかるせん断応力は小さいことが考えられるが, APTT応答性に関しては, 全血と同様であった. したがって, 赤血球の存在は, せん断速度に対する相対的なAPTT値の変化には大きな影響を及ぼさないことがわかった.

以上の結果および考察は, in vitroにおけるせん断速度が血液に与える影響として, 図5のようにまとめることができる.

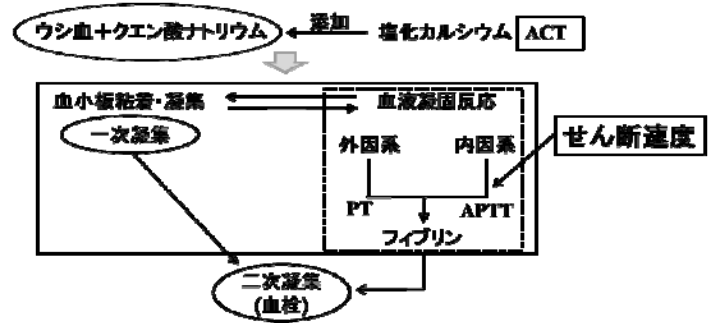


Fig.5 Blood coagulation system with shear rate. APTT was prolonged up to 1,000s<sup>-1</sup> of shear rate, irrespective of the ACT value and/or the presence of red blood cells.

せん断速度は内因系凝固に関与し, 1,000s<sup>-1</sup>までのせん断速度の負荷によって, APTTが延長し, 血液凝固能を抑制することができる. この実験結果は, 血液接触面の材料が, ステンレス製の内筒とガラス製の外筒であり, 材料が変わることにより, この傾向が変わることも考えられる. また, 本実験では, 血小板系の影響を加味していないので, 今後これらの問題に取り組む必要がある.

#### 5. 結論

In vitro血栓形成において, せん断速度の負荷が内因系凝固に関する血液凝固能を抑制していることが明らかとなった.

#### 謝辞

本研究は, NEDO再委託「小柄患者用補助人工心臓の有効性および安全性の評価」により行われたものであり, 謝意を表する.