

レオメータを使用した *in vitro* 抗血栓性試験における血液凝固能の最適化Optimization of Blood Coagulability for the *In Vitro* Antithrombogenic Testing using a 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, Graduation 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、動物実験を効率的に進めるため、設計し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のかをスクリーニング評価できるように、一般的な化学実験室でも実施可能な *in vitro* 抗血栓性試験法を開発してきた<sup>(1)</sup>。しかし、*in vitro* 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、せん断速度に対する試験血液の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求することを目的とした。

## 2. 実験方法

実験に使用した血液は、クエン酸ナトリウムを添加して抗凝固した保存ウシ血液(フナコシ(株)、最終濃度: 0.45 w/v%)である。実験時には、この血液と任意量の塩化カルシウム(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混和することで血液凝固能を設定した。なお血液凝固能は、血液凝固計(I.T.C., ヘモクロンレスポンス)を使用し、活性化凝固時間(ACT)により数値として設定した。

使用した実験装置は、図1左の写真に示す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。せん断負荷部は、内筒(SUS316)と外筒(硬質ガラス)の二重円筒で構成されている。内外筒の幾何形状は図1右の断面図に示す通りであり、内筒の中心部が円筒型、下部

が円錐型となっているため、設計上は試験血液に均一のせん断速度を負荷できる。また、内筒上部に位置するトルクメータにより、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から、内筒にかかるトルクを経時的に測定できる構造になっている。

実験では、内筒と外筒の隙間に ACT を設定した試験血液を注入し、ただちに一定のせん断速度を負荷した。なお、せん断負荷時には循環恒温槽により、せん断負荷部は  $37^\circ\text{C}$  に保たれる。

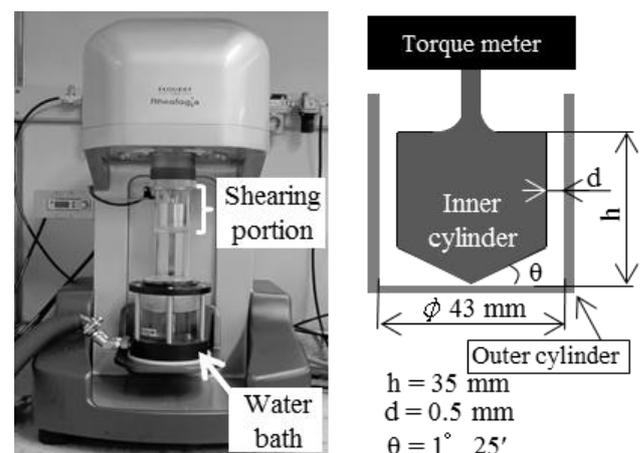


Fig.1 Photograph of a rheometer and shearing portion

## 2-1 せん断流れ場での血栓形成の観察

## 2-1-1 血栓形成過程の観察

ACT200 s に設定した試験血液に  $100 \text{ s}^{-1}$  のせん断速度を負荷した時、血栓形成によって変化するトルクを(1)トルク

が増加するまで. (2)トルクが増加しているとき. (3)トルクがピーク値をとるとき. (4)トルクが減少しているとき. の4つの領域に分け, それぞれの領域における血栓形成過程を次の二つの方法により観察した.

観察①: レオメータのせん断負荷部に近赤外線を照射し, 850 nm までの波長光を吸収カットする IR フィルターを取り付けたカムコーダ(ソニー(株), HDR-SR8)を使用して撮影した. なお, 撮影はカムコーダの赤外線カットフィルターを使用しないモードで行い, 輝度の変化から血栓を観察した.

観察②: せん断負荷部を分解し, 内外筒に形成した血栓をそれぞれ観察した.

2-1-2 血栓形成後の観察

ACT を 200, 250, 300, 400, および 1,000 s に設定した試験血液にそれぞれ 50, 100, 500, 1,000, 1300, 2,000, 2,200, および 2,880 s<sup>-1</sup> のせん断速度を 2,000 s 間負荷した後, せん断負荷部を分解して内外筒に形成した血栓をそれぞれ観察した.

2-2 せん断流れ場での血栓形成の定量

ACT を 200, 250, 300, 400, および 1,000 s に設定した試験血液にレオメータを使用して, それぞれ 50, 100, 500, 1,000, 1300, 2,000, 2,200, および 2,880 s<sup>-1</sup> のせん断速度を 2,000 s 間負荷した. またせん断速度の負荷と同時に, トルク値を計測した.

得られたトルクの経時変化から, 血栓形成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るまでの時間(血液凝固時間), および血栓の形成量である, 血栓形成前のトルクに対する血栓形成後のトルク増加比(血栓形成度)を算出した.

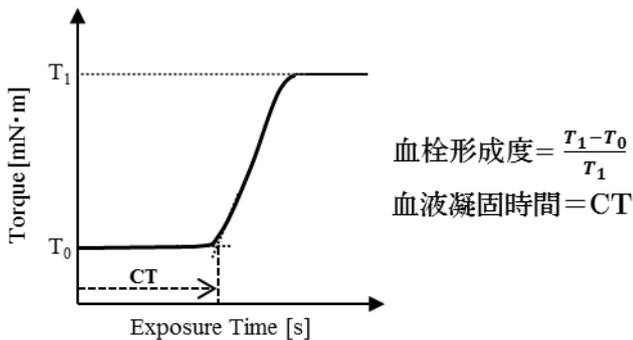


Fig.2 Torque versus exposure time trace

2-3 せん断速度を負荷した試験血液の血液凝固能検査

ACT を 1,000 s に設定した試験血液, および試験血漿にレオメータを使用して, 0, 100, 1,000, 2,000, および 2,880 s<sup>-1</sup> のせん断速度を 1,000 s 間負荷した. そして, せん断速度を負荷し終わった試験血液の活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT), およびプロトロンビン時間(PT)を次の手法により測定した.

APTT, および PT の測定に使用した実験装置は, 生物活性法により血液凝固能の分析を行う, 自動血液凝固測定装置(Sysmex Corporation, CA-50)である. 本装置は, 光散乱測定方式に基づき, 試薬を添加した血漿に光を照射して凝固曲線を作り, パーセント検出法で凝固時間を算出する. APTT, および PT の測定に使用した試薬はそれぞれ, 同社のデータファイ・APTT および, トロンボレル S である.

3. 実験結果

3-1 せん断流れ場での血栓形成の観察

3-1-1 血栓形成過程の観察

ACT200 s に設定した試験血液に 100 s<sup>-1</sup> のせん断速度を負荷した結果, せん断速度負荷時間が 100, 220, 290, および 1,000 s 経過したときが 2-1-1 で記した 4 つの領域にそれぞれ相当することがわかった. その結果を図 3 に示す.

次に表 1 の結果について説明する. なお, 観察①列はカムコーダで撮影した結果, 観察②列はせん断負荷部を分解したときの内外筒の様子を示している.

(1)100 s のとき, 観察①において輝度の変化は確認されなかった. また, 観察②においても血栓は確認されなかった.

(2)220 s のとき, 観察①において輝度が高い部分が現れ, 外筒とともに回転した. また, 観察②において内筒には血栓を確認できなかったが外筒に薄い血栓の付着を確認した.

(3)290 s のとき, 観察①において輝度が非常に高い点が見られ, その点の下流側に輝度が高い線が形成された. なお, これらの輝度が高い部分は, 外筒とともに回転した. そして, 290 s に到達する直前, 外筒の回転によらず静止する高輝度部分が現れた. また, 観察②において観察①で静止した高輝度部と一致する内筒箇所にも血栓の付着を確認した. そして, 分解時に外筒から剥がれ落ちてしまったが, 外筒に付着した血栓を確認した.

(4)1,000 s のとき, 観察①において輝度が高い部分はすべて静止した. また, 観察②では内筒に厚い血栓の形成を確認したが, 外筒に血栓は付着しなかった.

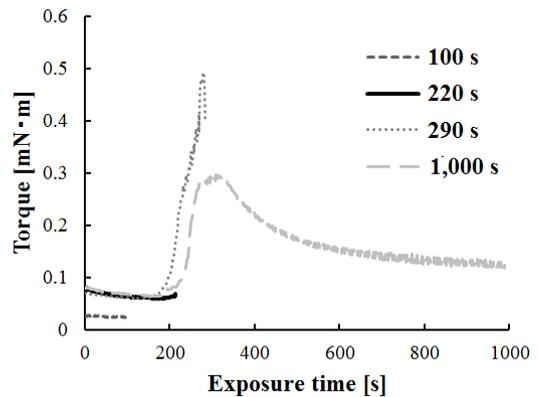


Fig.3 Torque versus exposure time trace

Table1 Clot formation of each condition

Exposure time [s]	Observation	
	①	②
100 s		
220 s		
290 s		
1,000 s		

3-1-2 血栓形成後の観察

各 ACT に設定した試験血液に、2,000 s 間一定せん断速度を負荷した後、内筒に形成した血栓の写真を表 2 に示す。なお、血栓は内筒のみに付着し、外筒には付着、および剝離しなかった。

はじめに血栓形成の有無に関して、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 s、および 300 s の条件では、それぞれ 2,200 s<sup>-1</sup>、100 s<sup>-1</sup> を超過すると血栓は形成しなかった。そして、ACT400 s、および 1,000 s の条件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。

次に、血栓量に関して、血栓が形成した ACT200 s、250 s、および 300 s の条件では、せん断速度が大きくなると血栓量が減少することがわかった。さらに形成した血栓の表面積は、せん断速度ごとに同程度であることがわかった。

Table2 Clot formation of each condition

		ACT [s]				
		200	250	300	400	1,000
Shear Rate [s <sup>-1</sup> ]	50					
	100					
	500					
	1,000					
	1,300					
	2,000					
	2,200					
	2,880					

3-2 せん断流れ場での血栓形成の定量

血液凝固時間、および血栓形成度の結果をそれぞれ図 4、および図 5 に示す。

はじめに図 4 の血液凝固時間に関して、ACT200 s の条件では血液凝固時間はせん断速度に依存的ではなく、50 s<sup>-1</sup> ~ 2,880 s<sup>-1</sup> の間でいずれも約 200 s であった。一方 ACT250 s の条件では、50 s<sup>-1</sup> ~ 2,000 s<sup>-1</sup> の間ではせん断速度に依存的ではなく、いずれも約 500 s であったが、2,200 s<sup>-1</sup> で急激に血液凝固時間が増加し、2,880 s<sup>-1</sup> においては 2,000 s 以内に血栓が形成しなかった。また、ACT300 s の条件では、

100 s<sup>-1</sup> で血液凝固時間が急激に増加し、500 s<sup>-1</sup> 以上のせん断速度においては、2,000 s 以内に血栓が形成しなかった。

次に図 5 の血栓形成度の結果について述べる。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、血栓形成度が 0 以外の値、すなわち血栓が形成した場合、せん断速度ごとに近い値をとることがわかった。しかし、100 s<sup>-1</sup> では、ACT200 s と 250 s、および 300 s とでは 0.2 程度の差がみられた。

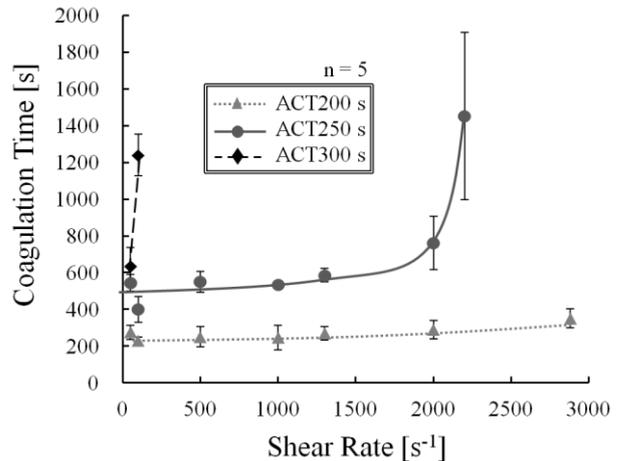


Fig.4 Plot of the coagulation time versus shear

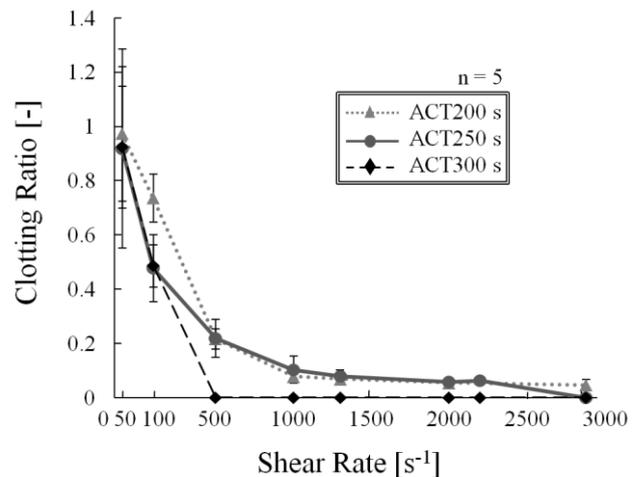


Fig.5 Plot of the clotting ratio versus shear rate

3-3 せん断速度を負荷した試験血液の血液凝固能検査

せん断速度を負荷した試験血液の APTT、および PT の測定結果を図 6 に、試験血漿の APTT、および PT の測定結果を図 7 に示す。

はじめに試験血液の APTT に関して、0 s<sup>-1</sup> ~ 1,000 s<sup>-1</sup> までは、せん断速度に対して急激に増加するが、1,000 s<sup>-1</sup> ~ 2,880 s<sup>-1</sup> の間では、104.0 s から 113.6 s までゆるやかに増加することがわかった。PT に関しては、0 s<sup>-1</sup> ~ 2,880 s<sup>-1</sup> の間でせん断速度に依存することなく 17 ~ 18.1 s 程度ではぼ一定であった。

次に試験血漿の APTT に関して、0 s<sup>-1</sup> ~ 1,000 s<sup>-1</sup> まではせん断速度に対して急激に増加するが、1,000 s<sup>-1</sup> ~ 2,880 s<sup>-1</sup> の間では、96.5 s から 105.7 s までゆるやかに増加することがわかった。PT に関しては、0 s<sup>-1</sup> ~ 2,880 s<sup>-1</sup> の間でせん断速

度に依存することなく 18.3~20 s 程度でほぼ一定であった。

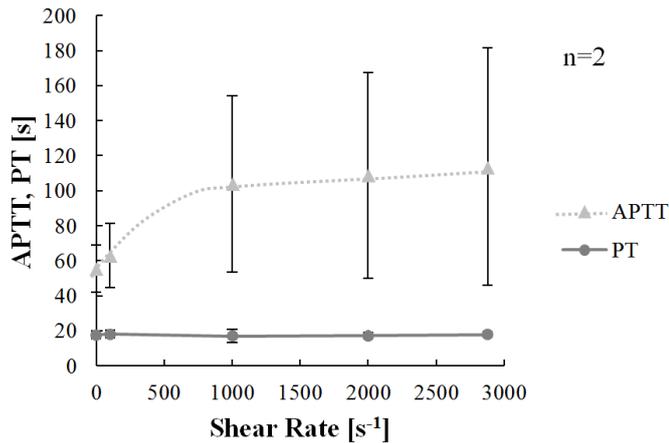


Fig.6 Plot of APTT and PT versus shear rate when the whole blood was exposed by shear rate

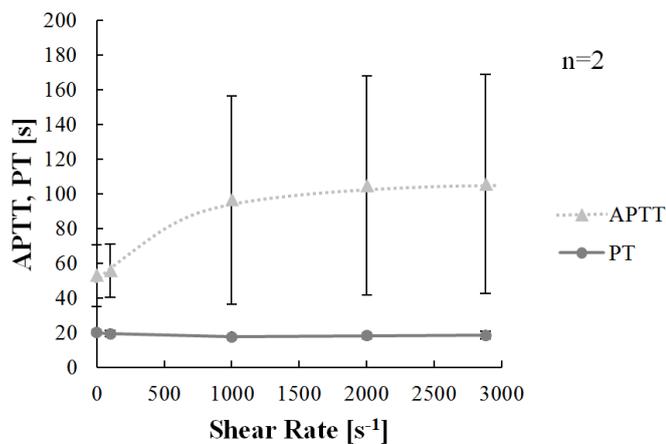


Fig.7 Plot of APTT and PT versus shear rate when the blood plasma was exposed by shear rate

## 4. 考察

### 4-1 セン断流れ場での血栓形成の観察

表1の観察①, および②の結果から, 輝度が高い部分, すなわち形成した血栓は, 外筒に付着して外筒とともに回転するが, その後, 内筒に付着することで静止することがわかった. このことから, セン断負荷部内での血栓形成過程は外筒からはじまり, 内筒に向かって成長し, 血栓が内筒に付着すると外筒から剥がれ, 内筒のみに付着すると考えられる. このように, 血栓が外筒から形成する理由は, 材質が陰性荷電表面を有するガラスであり, ガラス近傍の血液凝固第Ⅻ因子が活性化されることによるものと考えている. そして, 外筒から内筒に向かって形成した陽性荷電を有するフィブリン血栓上で血小板が活性化しながら内筒方向への進展を助け, それに伴うせん断速度の増加によりさらに活性化するものと考えている. なお, トルクの経時変化のグラフがピーク値をとる理由は, 形成した血栓が外筒から内筒に移動することによるものと考えている.

今後, 材質の影響等を検討しようと考えている.

### 4-2 セン断流れ場での血栓形成の定量

図4より血液凝固時間は, ACT250 s の条件で 2,200 s<sup>-1</sup>, ACT300 s で 100 s<sup>-1</sup> のとき急激に増加した. すなわち, ACT250 s, および 300 s の試験血液において, 血液凝固能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 を適切に設定することで, 血栓形成を抑制するせん断速度の閾値

を任意に決定できると考えられる.

図5より血栓形成度は, 100 s<sup>-1</sup> の条件で, ACT200 s と 250 s, および 300 s との差が 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2に示す血栓の様子からも確認された. 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る.

ここで, 100 s<sup>-1</sup> を省く 50 s<sup>-1</sup>~2,200 s<sup>-1</sup> のせん断速度範囲における血液凝固時間は ACT200 s と ACT250 s の条件で明瞭な違いがあった. しかし, 同条件における血栓形成度は, せん断速度に依存してその値が変化するものの, ACT200 s と ACT250 s 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わかる. つまり, *in vitro* 抗血栓性試験で形成する血栓は, ACT を変化させることで, 血栓形成時間は延長できても, 完全に血栓形成を抑制することはできないと考えられる. よって, *in vitro* 抗血栓性試験における ACT の至適条件は, 血栓形成度が重要であると考えることができ, せん断速度 50~2,880 s<sup>-1</sup> の範囲で血栓形成の有無を確認する場合は, ACT250~300 s の範囲が至適条件であると考えられる.

### 4-3 セン断速度を负荷した試験血液の血液凝固能検査

図6, および7の結果から, セン断速度を増加させたとき PT には変化がないが, APTT が 0s<sup>-1</sup> から 1,000 s<sup>-1</sup> までに約 100 % 増加することがわかった. この結果から 1,000 s<sup>-1</sup> 以下では, セン断速度の値が大きいほど, 内因系凝固反応を抑制することが明らかとなった. この理由について, 全血での実験に関しては, 负荷するせん断速度の増加が赤血球膜上のエリスロエラスターゼ-IXによる血液凝固第IX因子の活性を低下させているためだと考えている<sup>(2)</sup>. しかし, 血漿においても全血同様に内因系凝固反応が抑制されるとともに, 図4の ACT250 s の結果では約 2,200 s<sup>-1</sup> においても血液凝固能が抑制されたことから, この他にもせん断速度により抑制される血液凝固機序が存在すると考えている.

## 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, セン断速度が血栓形成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, セン断速度が 50~2,880 s<sup>-1</sup> 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至適であると示唆された.

また, セン断速度により血栓形成が抑制された一つの理由として, セン断速度が内因系凝固反応を抑制したことが明らかとなった. ただし, セン断速度がその他にどのような血液凝固機序を抑制するかについて, 詳細な研究の必要性が示唆された.

### 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, 謝意を表する.

### 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) Makoto Kaibara, Rheological study of blood with special reference to the reiggering mechanism of venous thrombus formation, J Biorheol, vol23, pp2-10