

血流せん断応力に影響を受ける血液凝固因子の評価

Evaluation of shear stress-responsible blood coagulation factors

○ 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
 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
 Osamu MARUYAMA, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)

Abstract: Thrombus formation is a major problem using blood pumps. It has been reported that shear stress is closely related to thrombus formation in blood pumps. However, the mechanism of blood coagulation by shear stress is not yet fully understood. The purpose of this study is to evaluate the effect of shear loading on reaction of blood coagulation factors quantitatively. Human blood was used as test blood because blood coagulation factors were evaluated using clinical reagents. The test blood was sheared at $2,880\text{ s}^{-1}$ for 3 h using a rotational rheometer. After sheared, activated partial thromboplastin time (APTT), prothrombin time (PT), and reaction time of blood coagulation factors were measured using an automated coagulation analyzer. As a result, the APTT and PT were prolonged after shear loading. Accordingly, the reaction time of human blood coagulation factor V was prolonged.

Key Words: Blood pump, Blood coagulation factors, Rotational rheometer, 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の低せん断速度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。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二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。血液ポンプの内部では，インペラの回転速度によって血流によるせん断応力が生じており，このせん断応力の指標である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⁾。また，せん断流れ場における血栓形成はせん断応力および血液凝固能に寄与しており，せん断応力によって血栓形成が抑制されることが報告されている⁽⁴⁾。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，血流せん断応力による血液凝固抑制が同時に生じていることが分

かっている。しかし，血液ポンプによる血流せん断応力に基づく血液凝固抑制機序は十分に明らかになっていない。そこで本研究では，血流せん断応力が血液凝固反応のうち血液凝固因子の反応(図1)に及ぼす影響を定量的に評価し，血流せん断応力による血栓形成抑制に関与する血液凝固因子を明らかにすることを目的とした。

2. 実験方法

2-1. 試験血液

本実験では，試験血液として上腕静脈より穿刺採血したクエン酸ナトリウム抗凝固ヒト新鮮血(最終濃度：0.32 w/v%)を使用した。本実験は，国立研究開発法人産業技術総合研究所ヒト由来試料実験倫理委員会の承認を得て行った。

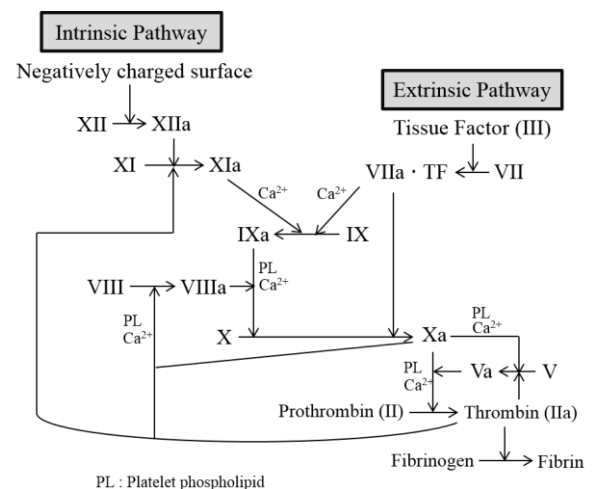


Fig. 1 Coagulation cascade and fibrin formation by intrinsic and extrinsic pathways⁽⁵⁾.

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2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、一様なせん断応力がかかる形状となっている。また、せん断負荷時には、恒温槽が上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 5.0 mL をマイクロピ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負荷を加えた。せん断速度は、2,880 s⁻¹ とし、せん断負荷時間を 3 時間とした。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、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、取り出した血漿の活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT), プロトロンビン時間(PT), および各血液凝固因子の反応時間を 37°C で測定した。APTT は、内因系凝固因子の反応を反映し、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、活性化剤が第 XII, XI 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。PT は、外因系凝固因子の反応を反映し、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、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。各血液凝固因子の反応時間は、各血液凝固因子の欠乏血漿を使用して測定した。内因系の血液凝固因子が欠乏または活性化した血漿においては APTT の延長または短縮が見られ、外因系の血液凝固因子が欠乏または活性化した血漿においては PT の延長または短縮が見られる。測定対象となる各血液凝固因子の欠乏血漿と試験血漿を混合し、APTT および PT を測定した。得られた結果から、ヒト標準血漿を使用して作成した検量線を使用し、解析することにより活性を求めた。特定の血液凝固因子が欠損している血漿は、当該の因子欠乏血漿を用いた場合、血液凝固因子の補充が行われないため、APTT および PT の延長が見られる。

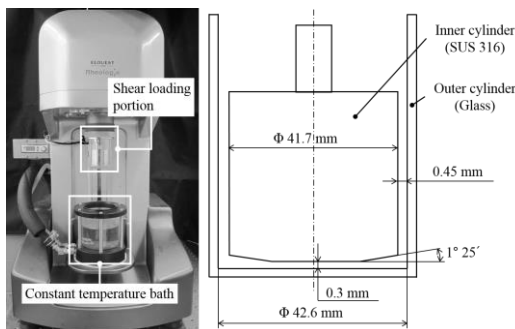


Fig. 2 Photograph of Rheologia A300 left and shear loading portion right.

3. 実験結果

APTT および内因系に關与する血液凝固因子の反応時間の測定結果を図3に、PT および外因系に關与する血液凝固因子の反応時間の測定結果を図4に、これらの結果から算出した各血液凝固因子の反応活性を図5に示す。

内因系に關与する各血液凝固因子の測定結果において、第 X 因子および第 II 因子の欠乏血漿を混合した血漿の APTT は、試験血漿の APTT とほぼ同じ値となった。一方、第 XII, XII, IX, VIII, および V 因子の欠乏血漿を混合した血漿の APTT は、試験血漿の APTT と比較して延長した。また、第 V, VIII, XI, IX, XII 因子の順に APTT が延長したことから、内因系に關与する血液凝固因子は第 V, VIII, XI, IX, XII 因子の順に APTT に影響することが分かった。せん断負荷を加えた試験血液から得た試験血漿の APTT は、せん断負荷を加えていないものと比較して 7% 延長した(図3)。また、血液凝固因子のうち血液凝固第 V 因子の反応を反映する APTT が 14% 延長したことから、APTT に対する血液凝固第 V 因子の反応活性は 40% 低下した(図5)。

外因系に關与する各血液凝固因子の測定結果において、第 VII, X, V, II 因子の欠乏血漿を混合した血漿の PT は、試験血漿の PT と比較して延長した。また、第 X, V, VII, II 因子の順に PT が延長し、外因系に關与する血液凝固因子は第 X, V, VII, II 因子の順に PT に影響することが分かった。せん断負荷を加えた試験血液から得た試験血漿の PT は、せん断負荷を加えていないものと比較して 10% 延長した(図4)。また、血液凝固因子のうち血液凝固第 V 因子の反応を反映する PT が 18% 延長したことから、PT に対する血液凝固第 V 因子の反応活性は 43% 低下した(図5)。

4. 考察

内因系に關与する血液凝固因子の測定結果について、血液凝固第 X 因子および第 II 因子の欠乏血漿を混合した血漿の APTT は、試験血漿の APTT とほぼ同じ値となった。従って、第 X 因子および第 II 因子を大きく欠乏させてもわずかな量があれば APTT には影響を及ぼさないと考えている。また、内因系に關与する血液凝固因子は、第 V, VIII, XI, IX, XII 因子の順に APTT に影響することが分かった。従って、内因系に關与する血液凝固因子の APTT への影響は血液凝固因子の反応カスケードの順とは異なり、それぞれの血液凝固因子が独立に APTT に影響すると考えている。外因系に關与する血液凝固因子の測定結果について、第 X, V, VII, II 因子の順に PT が延長し、外因系に關与する血液凝固因子は第 X, V, VII, II 因子の順に PT に影響することが分かった。従って、外因系に關与する血液凝固因子の PT への影響も血液凝固因子の反応カスケードの順とは異なり、それぞれの血液凝固因子が独立に PT に影響すると考えている。

せん断負荷を加えたヒト血の血液凝固第 V 因子の反応時間は延長し、反応活性は低下した。これは、せん断負荷によって第 V 因子のタンパク構造が変化したことが原因だと考えている。簡略化した第 V 因子の構造を図5(A)に示す。通常、第 V 因子は、トロンビンによって活性化され、図5(B)に示すような活性化第 V 因子となる。このように活性化第 V 因子の構造に変化することにより、活性化第 X 因子および第 II 因子と反応し、血液凝固反応を進行させる。しかし、せん断負荷を受けた第 V 因子は、活性化第 V 因子とは異なる構造に変化したと考えられる。従って、せん断負荷を加えた第 V 因子は、活性化第 X 因子および第 II 因子と十分に反応することができず、内因系および外因系全体の凝固反応が抑制されたと考えている。

本研究より，せん断負荷によりヒト血液凝固第V因子の反応が特異的に抑制されることが分かった．従って，血液ポンプ内の血流に基づく血栓形成のマーカーとして第V因子を使用し，血液検査で血液ポンプの抗血栓性を評価できる可能性があると考えている．しかし，開発された血液ポンプの抗血栓性評価としてはブタ等を使用した動物実験が行われており，動物血においても本研究と同様の結果が得られるか検証する必要がある．本研究では，臨床用試薬を使用してヒト血液凝固因子の反応時間を測定したが，動物血の測定の際には臨床用試薬を使用した反応時間の測定は正しく行えない可能性がある．今後，動物由来の試薬を作成し，本実験と同様の測定を行い評価することで，動物実験における血液ポンプ内での血栓形成の評価に応用できると考えている．

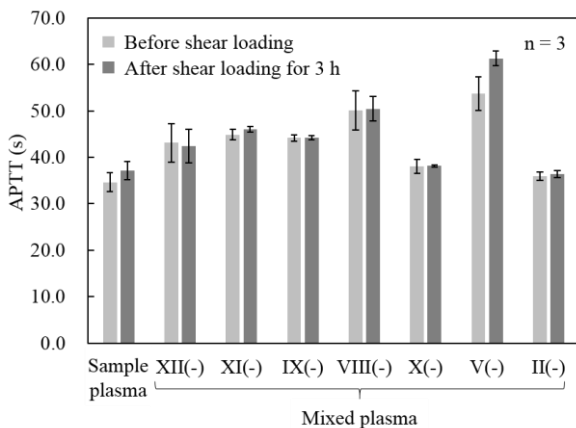


Fig. 3 APTT of human blood after shear loading.

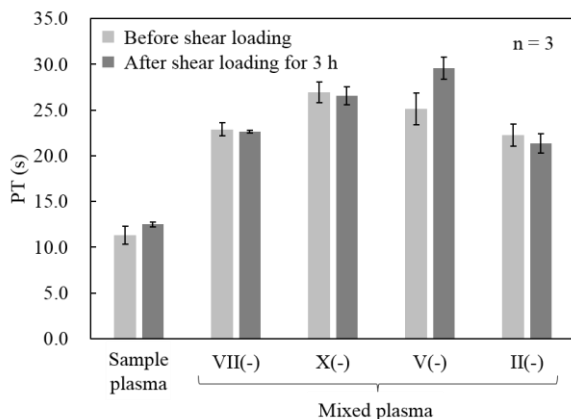


Fig. 4 PT of human blood after shear loading.

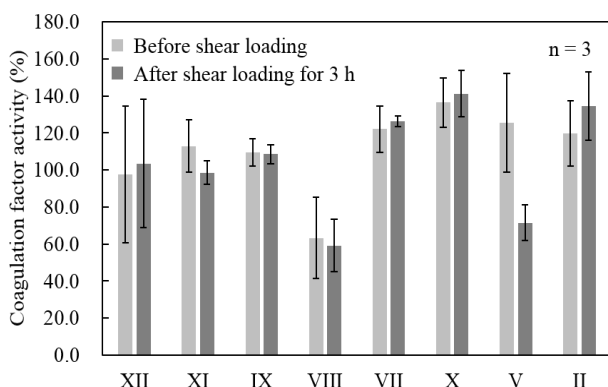


Fig. 5 Blood coagulation factor activities after shear loading.

(A) Blood coagulation factor V



(B) Activated blood coagulation factor V



Fig. 6 Simplified structure of blood coagulation factor V and activated blood coagulation factor V⁽⁶⁾.

5. 結論

せん断負荷を受けたヒト血のAPTTおよびPTは延長した。それに伴い，血液凝固因子のうち血液凝固第V因子の反応時間が延長し，反応活性が低下した．従って，ヒト血では，せん断負荷によって血液凝固第V因子の反応活性が特異的に低下することで，内因系および外因系全体の凝固反応が抑制されることが分かった．今後，ヒト以外の他の動物種についても血液凝固第V因子のせん断負荷に対する影響を評価するとともに，せん断負荷によって血液凝固第V因子が具体的にどのようなメカニズムで血液凝固反応を抑制するかを定量評価する．

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) O Maruyama, R Kosaka, M Nishida, et al., In vitro thrombogenesis resulting from decreased shear rate and blood coagulability, Int J Artif Organs, Vol.39, No.4, pp.194-199, 2016.
- (5) E. W. Davie, K Fujikawa, and W Kisiel, The Coagulation Cascade: Initiation, Maintenance, and Regulation, Biochemistry, Vol. 30, No. 43, pp. 10363-10370, 1991.
- (6) T. J. Cramer and A. J. Gale., The anticoagulant function of coagulation factor V, Thromb Haemost, Vol.107, No.1, pp. 15-21, 2012.