家兎動脈血栓モデルにおける血栓形成と 血小板凝集塊の動態

小林 正彦* 諸岡 成徳** 石川 正幸*

Arterial thrombosis and platelet aggregates in rabbit carotid artery

Masahiko KOBAYASHI*, Shigenori MOROOKA**
and Masayuki ISHIKAWA*

Key words : arterial thrombosis, platelet aggregates, arterial
stenosis, endothelial injury, blood flow

An experimental arterial thrombus was formed by both of arterial stenosis and de-endothelialization in rabbit carotid artery.

External carotid systolic pressure was decreased about 10~20 % by stenosis at the common carotid artery. Five~thirty minutes after, the systolic, diastolic and pulse-pressure were fluctuated, and then the pulse-pressure was disappeared.

Small numbers of platelet aggregates in external carotid arterial blood were counted in both blood samples collected by a polyethylene ($2.9 \pm 0.48/0.1\text{mm}^3$) or silicone catheter ($2.9 \pm 1.32/0.1\text{mm}^3$) in the sham control.

Platelet aggregates in blood samples through the injured artery, however, markedly recognized at 1 minutes ($20.7 \pm 3.26/0.1\text{mm}^3$) to 20 minutes ($37.5 \pm 3.56/0.1\text{mm}^3$) after.

The platelet aggregates grew up from brittle small size to tightly larger size in the course.

These results suggested that platelet aggregates were originated by endothelial injury at the common carotid artery, and the arterial thrombus which repeats to grow and be washed out into the circulation, might grow to enough size occluding lumen when platelet aggregates attached to the arterial wall can withstand to the blood stream.

はじめに

家兎の総頸動脈内皮細胞を剥離、障害し、そこに狭窄を加えると人の血栓に似た動脈血栓が

発生することを報告した¹⁾。この方法で動脈壁に粘着・凝集した血小板凝集塊から閉塞性血栓に成長する過程を検討する目的で外頸動脈圧の変動と外頸動脈血中血小板凝集塊を観察した。

* 動脈硬化研究所 [〒101 東京都千代田区神田淡路町2-23], Japan Atherosclerosis Research Institute, Tokyo, Japan.

** 東京大学医学部第二内科, The Second Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, University of Tokyo, Tokyo, Japan.

Fig. 1 Method of endothelial denudation and stenosis on rabbit carotid artery.

A balloon catheter was inserted into a common carotid artery via an external carotid artery, and inflated balloon was pulled out gently. The carotid artery was ligated with a steel wire (0.5 mm), then the steel wire was removed.

A catheter for blood collection and blood pressure measurement was inserted into the external carotid artery.

Fig. 2 External barotid arterial pressure treated with de-endothelialization and stenosis at rabbit common carotid artery.

I. 方 法

体重 3~3.5kg の家兎を用い、すでに報告した方法¹⁾と同様に総頸動脈を露出、外頸動脈から総頸動脈内に Fogarty balloon catheter (3F) を挿入、脹らませて引き抜き内皮細胞を剥離し

た。この外頸動脈に polyethylene または silicone catheter を挿入・固定した。次いで内・外頸動脈分枝部より約 10 mm 近位の総頸動脈に約 0.5mm の狭窄を作り血流を再開し、この時を 0 time とした。外頸動脈圧測定は、catheter をトランスジューサーに接続しほぼ脈圧が

Fig. 3 Circulating platelet aggregates (CPA) numbers induced with de-endothelialization and stenosis, and sham control.

消失するまで連続記録した。内皮細胞剥離・狭窄部通過直後の流血中の血小板凝集塊 (CPA) 測定は処置後 1, 5, 10, 20 分に採血し、いずれも採血30秒前に heparine-saline (10 U/ml) でフラッシュし、採血後は saline で catheter 内血液を排除後 heparine-saline を注入し留置した。sham control として、polyethylene または silicone 製の採血用 catheter 挿入処置だけで惹起される血小板凝集と catheter 内の血管外凝集をあわせて検討した(図1)。採血は0.5 ml の EDTA/formalin²³⁾ をあらかじめ取っておいた注射筒に catheter から0.5 ml を採血、1.5 ml の EDTA/formalin 入りスピッツに注入、転倒混和し15~30分間室温放置後150G, 8 分間遠心分離し上澄液を捨て、新たに 1.0 ml の EDTA/formalin を重畳しピペットで白色の CPA 層とその下の赤血球がわずかに浮き立つ程度に浮遊させ、別の容器に分離・攪拌後 Burkcr-Turk 計算盤で約12~15 μ 以上の CPA を 0.1 mm³ 当り、8 個所について数えた。

II. 結 果

総頸動脈狭窄部の血流状態を反映する外頸動脈圧は約70~80%の狭窄度で最高血圧は10~20%減少、最底血圧もわずかに減少した。5~30分後から最高、最底血圧に加えて脈圧が“減少

→回復”という変動を不規則に繰返した後脈圧はほぼ消失した(図2)。これらの変動が見られず脈圧が連続的に減少、消失した例も認められた(図2, 下段)。

一方、外頸動脈血中 CPA は sham control の polyethylene, silicone catheter 採血でおのおの 1 分後 2.9 ± 0.48 , $2.9 \pm 1.32/0.1 \text{ mm}^3$ と両者に CPA が確認され、かつ差がなかったが、20 分後ではおのおの 7.6 ± 1.25 , $4.6 \pm 1.21/0.1 \text{ mm}^3$ と微増し、polyethylene でその傾向がより大であった。一方、内皮細胞剥離・狭窄部通過直後の CPA は 1 分後 $20.7 \pm 3.26/0.1 \text{ mm}^3$, 5 分後 35.6 ± 3.88 と増加し、10 分後 37.2 ± 2.68 , 20 分後 37.5 ± 3.56 と平坦化したが、いずれも sham control に対し有意 ($P < 0.001$) に多かった(図3)。この CPA は 1, 5 分後の初期には小型で血小板相互の粘着は脆い観を呈していたが経時的に大型で密な凝集塊に成った。塗沫 HE 染色標本での CPA は血小板単独なもの、赤血球や有核細胞が混在したもの両者が見られたが、光顕ではフィブリン網の形成は明らかでなかった。また、遠心分離後の上澄液には未凝集血小板、沈渣には赤血球がおのおの単一層に近い状態に分離されていた。しかし、前者にはしばしば内皮細胞様細胞が後者には稀に極めて大型 CPA の混入が認められた。

III. 考 察

実験的動脈血栓モデルの血栓成長の様子を検討したが、総頸動脈狭窄部の血流状態を反映すると考えられる外頸動脈圧は安定した状態を呈した後、最高、最底血圧に加えて脈圧が不規則かつ急激に減少し回復するという変動を繰り返した後脈圧は消失した。また、内皮細胞剥離・狭窄部通過直後の流血中には大小種々な血小板を主体としたCPAが極めて多数認められ、sham controlに比べ有意に多かったことから、これらのCPAは内皮細胞障害血管壁ならびに狭窄部の凝集塊に由来しそれらが流失したものと考えられる⁴⁾。また、CPAは経時的に大型で緻密な塊となり、閉塞性血栓に至る時間に比べ多少先行して認められた。これらの事実から血圧の一連の変化は狭窄部の凝集塊または生長した血栓による血流障害と、その血栓が流失して血流障害が解除された現象を反映しているものと考えられた。しかし、凝集塊または血栓流失を思わせる血圧変化の認められない例もあり、血流状態と狭窄度とがある特定な条件下では血栓が連続的に成長する可能性のあることが示唆された。

また、sham controlにおいて血小板凝集を起し難いsiliconeと、起ししやすいpolyethylene catheterの両者とも直後からCPAが出現し、かつ差がなかったことはcatheter挿入時の血管障害で微弱な血小板凝集が惹起される反面⁵⁾、catheter内等の血管外凝集は有意なものとは考

えられなかった。

以上のことからCPAは内皮細胞障害部の凝集塊が血流で流されたものであり、凝集塊は成長と流失とを繰り返し、凝集塊の粘着力が血流に勝った時点で血管閉塞に至る血栓に成長するものと考えられた。

文 献

- 1) 小林正彦, 諸岡成徳, 石川正幸: 家兎の実験的動脈血栓に関する研究. 血液と脈管, **12**; 95~98, 1981.
- 2) Wu, K. K. and Hoak, J. C.: A new method for the quantitative detection of platelet aggregates in patients with arterial insufficiency. *Lancet*, 924~926, Oct. 19, 1974.
- 3) Maca, R. D., Fry, G. L. and Hoak, J. C.: New method for detection and quantitation of circulating platelet aggregates. *Microvascular Research*, **4**; 453~457, 1972.
- 4) Harker, L. A. and Ross, R.: Vessel injury, thrombosis, and platelet survival. In *Advances in Exp. Med. and Biol.*, Vol. 102 (eds. by Day, H. J., Molony, B. A., Nishizawa, E. E. and Ryebbrandt, R. H.), Plenum Press, New York, 1978, p. 197~212.
- 5) Moore, S.: Thromboatherosclerosis in normolipemic rabbits: A result of continued endothelial damage. *Lab. Invest.*, **29**; 478~487, 1973.