◆技術講座◆

血栓形成と血流の変化の測定

佐藤正明*, 大島宣雄*

Thrombus Formation and Blood Flow Dynamics in Microvessels

Masaaki SATO and Norio OSHIMA

Key words: light/dye reaction, microcirculation, platelet thrombus, blood flow dynamics, wall shear rate, active oxygen

はじめに

傷害を受けた血管内皮細胞に血小板が粘着し、血栓として成長していく過程は、多くの因子が相互に作用し合って複雑な経過を構成している。本講座では、これらの因子の中で特に血流の動態に焦点を当て、血小板の血栓形成の開始から成長に至る過程と血流動態との関係について、著者らの研究をもとに概説する。血栓の形成に血流因子が重要な役割を演じていることは、古く Virchow の時代から指摘されているところである¹⁾。しかしながら、流れの影響一つとってみても、速い流れによって血小板自身は活性化し粘着は促進する方向に向かうのに対し、一方では粘着を阻害あるいは形成された血栓を剝離して血栓の成長を抑制し、相反する二つの作用をみせる。このために、血流の及ぼす影響は一見複雑な様相を呈することになる。

ここでは、対象を微小循環系の血管に絞り、著者らの開発した血小板血栓形成モデル²⁾³⁾を中心に話を進め、血栓形成に対する血流のもつ意義の一端を明らかにする。

血栓形成モデル

著者らは、光と蛍光色素の反応によって微小血管内に血小板血栓を作製する方法を新たに見

いだし²⁾³⁾、血栓形成モデルとして確立した。以下にその方法を要約する。

使用するシステムは、**Fig. 1** に模式的に示す蛍光生体顕微鏡を基本とした装置である。これまでは主に腸間膜の微小血管床を対象としているが、微小血管が観察可能な部位であればいずれの血管にも応用可能である。

まず、蛍光色素を励起するための光を落射光学系を通して、目的とする微小血管に照射する。光の波長は使用する色素によって異なり、著者らが通常使用しているフルオレセインナトリウム (F/Na: sodium fluorescein) の場合は、蛍光顕微鏡に備え付けられた FITC あるいは B 励起による波長 400~500 nm の青色の光である。続いて、外頸静脈へのカニューレを通して、一定濃度の蛍光色素を注入する。こうすると、光の照射領域に蛍光色素が到達し、お互いの反応によって内皮細胞が傷害を受け、血小板の内皮細胞への粘着、凝集過程を顕微鏡下に観察することができる。光の照射領域を直径 130 μm に絞り、腸間膜の内径 62 μm の細静脈内に形成させた血栓の様子を **Fig. 2** に示す。この血栓の成長の過程すなわち血栓の形成開始および成長の速度は、照射した光の強度並びに蛍光色素の濃度に依存しており、光の強度が強く蛍光色素の濃度が高いほど血栓はできやすく

* 筑波大学基礎医学系医工学〔つくば市天王台 1-1-1〕: Tsukuba University, 1-1-1 Ten-nodai, Tsukuba Ibaraki 305, Japan

Fig. 1 Schematic diagram of experimental apparatus. Screen of 10-channel dual-sensor is set above intravital microscope.

Fig. 2 Photomicrograph of microthrombus induced in a venule of 62 μm in diameter.

なる²⁾。

現時点では、本血栓モデルの形成機序の詳細は不明であるが、著者らは以下のように考えている。一般的には、光と色素の反応によって活性酸素（特に一重項酸素）が発生することはよく知られており、この活性酸素が内皮細胞の膜に微小な傷害を引き起こすことが想定される。しかしながら、著者らの実験では活性酸素の一種であるスーパーオキシドの除去剤の SOD

(superoxide dismutase) の投与により、血栓の形成と成長が有意に抑制されることがわかっている⁴⁾。また、Rosenblum ら⁵⁾ は、DMSO (dimethyl sulfoxide) によって、この血小板の凝集が有意に抑制されるとして、活性酸素のうちのヒドロキシルラジカルの重要性を指摘している。このように、蛍光色素と光の反応によって形成される血小板血栓には何らかの形で活性酸素が関与しているものと考えられる。

微小循環系における血流速度の測定

微小循環系における血流速度の測定に当たっては、太い血管系で一般に使用されている装置と違って、特別な装置が用いられる。著者らの使用している方法は、Fig. 1 にその装置の模式図を示すデュアル・センサ法 (dual-sensor method) である。装置の詳細を示したのが、Fig. 3 である⁶⁾。原理的には、赤血球をマーカーとして、2つのサンプリング点間を経過するのに要する時間を統計的に計測する方法に基づいている。実際の計測においては、顕微鏡によって観察した像を Fig. 3 に示すスクリーン上に

Fig. 3 Schematic diagram of a projection screen of the dual-sensor equipment.

Fig. 4 Effect of wall shear rate on thrombus initiation time, t_i , in venules and arterioles. r , Correlation coefficient; n , number of data points (on rats).

投影し、測定の対象となる微小血管内の赤血球による光学的な明暗の変化を、スクリーン上にセットした2つの光センサによってとらえる。続いて、この2点間の信号の遅れ時間を相互相関計⁷⁾によって計測し、血流速度に換算することになる。Fig. 3に示す装置は、これを血管の半径方向に沿って、同時に10点の計測が可能のように、著者らの研究室で開発したものである。

血栓形成に及ぼす血流動態の影響

血小板血栓が形成される初期の過程では、血小板と内皮細胞の局所における相互作用が重要になってくる。この点から、血管内皮近傍の血液の流れの状態を示すパラメータとして、次式によって表される壁ずり速度 (wall shear

rate, $\dot{\gamma}$) を用いて、血栓形成開始の状態を整理した。

$$\dot{\gamma} = 4\bar{v}/r$$

ここで、 $\bar{v}$ は血液の平均流速、 r は血管の半径である。すなわち、このパラメータは血液が内皮を擦る程度を表すものであって、流体力学的には壁近傍の血液の流れの速度勾配を意味している。血栓のできやすさを表すパラメータとしては、正確かつ容易に測定可能であることから、一定濃度の蛍光色素を投与し、一定の光強度の励起光を照射した際に、目的とする微小血管の内皮に血小板が粘着し始める時間 (t_i) を採った。ラット腸間膜の細動脈および細静脈に対して計測を行った結果を Fig. 4に示す⁸⁾。細静脈では全体的に血栓形成時間が早く、しかも壁ずり速度が速い程血栓形成が早く生ずると

Fig. 5 Blood flow velocity profiles and thrombus initiation sites at an arteriolar bifurcation. Dots represent velocity measured by dual-sensor method. Parabolic solid lines are velocity profiles corrected by method of Baker and Wayland⁹⁾ on assumption of an ideal Poiseuille flow in a straight tube. These parabolic solid lines give reference information on distortion of measured velocity profiles. Short arrows in microvessels indicate blood flow direction. Length of long arrow expresses magnitude of velocity written below; distance from chain line to dots and parabolic solid lines shows magnitude of velocity in microvessels. Broken circular line is area irradiated by excitation light. Numbers beside chain lines are internal diameters of microvessels.

いう結果となった。これに対して、血液の流れる速度が速い細動脈においては、壁ずり速度が速い場合には血栓の形成は極端に遅くなることが明らかである。図中に示す直線の相関係数 (r) の値は統計学的に有意である。この結果から、著者らのモデルのように内皮細胞が軽度の傷害を受けていた場合、壁ずり速度が大体 $700 \sim 1,000 \text{ sec}^{-1}$ の領域を境にして血小板と内皮細胞の相互作用の様子が異なるようである。すなわち、傷害を受けた内皮細胞に血小板が粘着する過程が確率的に起るとする。この場合、血液の流れる速度が遅いと単位時間当りに血漿に浮かんで運ばれてくる血小板の数も少なく、したがって内皮細胞に粘着する血小板の数も少なくなると、血栓形成開始時間が遅くなることになる。これに対して、細動脈のように血

Fig. 6 Blood flow velocity profiles and thrombus initiation sites at a venular confluence. Explanations in the panel are the same as those in Fig. 5.

液の流れる速度が速くなった状態では、上述の過程のように多くの血小板が流れてきて内皮細胞に粘着する数が増える確率は大きくなるが、たとえ血小板が内皮細胞に粘着しても、高い壁ずり速度によって剥がされる力も強くなり、粘着力が弱い場合には血栓の形成に至らないということになる。このようにして、血液の流れの立場からみれば血栓形成にとって最適 (悪?) の状態がありそうである。

血液の流れの状態が複雑な細動脈の分岐部および細静脈の合流部において、同様の実験を行った結果を **Figs. 5, 6** に示す⁸⁾。この実験では、まず最初に、分岐部および合流部の近傍における血流速度の分布を Fig. 3 に示した測定装置を用いて計測した。その結果は図中にドットとして示されている。続いて、図の破線で示す円の領域に励起光を照射し、分岐部および合流部にある内皮細胞に一樣に傷害を加え、血小板血栓のでき始める部位を観察した。Fig. 5 に示す細動脈の分岐部の例では、血栓は分岐部の血管の内側に形成されている。これは、図中のドットマークで示す血流速度分布から明らかのように、いずれも速度勾配の小さいいわゆる低壁ずり速度側に対応している。一方、Fig. 6 に示す細静脈の合流部の例では、血栓は合流直後の外側に形成している。血栓形成部における速度分布をみると、速度勾配の大きい高ずり速度側に血栓ができ始めていることがわかる。こ

Fig. 7 Time course for changes in the center line blood flow velocity and relative thrombus height in arteriole with a diameter of $42 \mu\text{m}$.

の分岐部および合流部の例では流れが複雑なため、計算によって正確に壁ずり速度を求めることは難しく、相対的に壁ずり速度が高いあるいは低いという表現をした。これらの結果を Fig. 4 の結果と合わせて考えると、相対的には細静脈においては壁ずり速度の高い側に血小板の血栓はできやすいということがいえそうである。筆者らの実験においても、もちろん例外が観察された場合もあった⁹⁾。ただし、この場合には細動脈での血流速度がかなり遅く、細静脈での血流速度が速い例であった。

これまででは、血栓の形成開始の状態に焦点を当ててみてきたが、この血栓モデルでは血栓の成長に対する血流動態の影響も観察できる⁸⁾。すなわち、Fig. 2 に示すように血栓がある程度成長した段階で励起光の照射を中断すると血栓の成長を止めることができる。この状態で血栓によって囲まれた最狭部の血流速度を計測し、その後再び励起光を照射して血栓の体積の増加速度あるいは血栓の半径方向への成長速度との関係を調べるわけである。その結果、血栓近傍での壁ずり速度が $1,500 \sim 2,000 \text{ sec}^{-1}$ 辺りで血栓がもっとも成長しやすく⁸⁾、前述の血小板の内皮細胞への粘着過程に対する壁ずり速度の効果が、この場合にも当てはまりそうであ

る。ただし、血小板どうしの凝集力に依存して、血栓が成長しやすい壁ずり速度は異なることが予想される。

血栓の成長に伴う血流動態の変化

著者らの血栓モデルでは、時間とともに血栓の成長していく過程をテレビ画面を通して観察することができる。その間、血栓の成長に伴って血栓部位における血流動態も変化していると思われる。そこで、血栓の成長の様子を観察しながら、Fig. 2 における血栓部の最狭部の流速をデュアル・センサ法を用いて計測した。得られた結果の1例を Fig. 7 に示す¹⁰⁾。内径 $42 \mu\text{m}$ の細動脈内の中心部流速 (v_c) が、血栓の成長に伴って時間とともに変化していく様子をドットマークで表している。一方、血栓の成長の様子は、血管内径に対する血栓の相対的な高さとして実線によって示されている。細動脈の場合には、蛍光色素投与から血栓形成開始までの時間が長く、血流速度はある程度の変動はあるもののほぼ一定した状態を保っている。しかしながら、血栓形成開始によって血流速度は上昇し始め、血栓の成長による血液流路の狭小に伴って血流速度は急激に増加している様子がよくわかる。血栓がある程度の高さに達すると血

栓の成長と流れによる血栓の剥離がバランスする領域があり, この辺りで測定された血流速度は飛翔する微小血栓の影響もあって大きく変動している。このような変動はもちろん細静脈においても観察されるが, Fig. 7 に示す細動脈ではより激しいようである。ところが, 血栓の相対的高さが約 65% の辺りまで達すると血流速度は急激に低下して直ちに血流停止に至ってしまう。この間に血小板は赤血球を伴って血栓を急激に成長させる。

血栓の相対的な高さを血管の断面積に対する狭窄率として計算し直し, 血流速度が急激に低下する時の値を求めた¹⁰⁾。すると, 内径 30~80 μm の細静脈および内径 45 μm 程度の細動脈のいずれの血管においても断面狭窄率は 70~90% の範囲に入り平均値はほぼ 85% の値であった。

血栓の成長に伴い, 狭窄部における中心流速が増加してくる点については前述したとおりである。そこで, 流路の断面積と中心流速から血流量を計算し, 血栓の成長との関係を検討した。その結果, 血栓が成長していく過程においても血流量は一定に保たれるように変化しており, この状態は Fig. 7 で示した血流速度の急激な低下が始まるまで続いていることが明らかとなった¹⁰⁾。

おわりに

微小循環系における血小板血栓モデルに基づいて, 血管内の血流動態が血栓の形成, 成長にどのように影響しているかについて概要を述べた。さらに, 血栓の成長過程における血流動態の変化についても, 血流量を一定に保つように末梢レベルで調節が行われていることを示唆する結果を示した。このような結果は, あくまでも著者らの血栓モデルを用いた場合の結果である。しかしながら, 血小板の内皮細胞への粘着から始まる一連の血栓形成過程は, 必ずしも内皮細胞の剥離といった激しい現象を伴わなくても起り得る現象であり, 本モデルはその意味においては生体内で起り得る現象を再現している

と考えられる。本稿が, 血栓の形成および成長の機序を考えるうえで, 読者にとって何らかの参考になれば幸いである。

参考文献

- 1) 田中健蔵: 血栓症の病理 (村上元孝監修: 血栓症—基礎と臨床—), 日本メディカルセンター, 東京, 1982, pp. 11~28.
- 2) Sato, M. and Ohshima, N.: Platelet thrombus induced *in vivo* by filtered light and fluorescent dye in mesenteric microvessels of the rat. *Thromb. Res.*, **35**: 319~334, 1984.
- 3) 佐藤正明, 大島宣雄: 微小血管内血小板血栓形成の新しい実験モデルとその応用に関する 2, 3 の基礎的検討. **15**: 36~44, 1984.
- 4) Sato, M., Natori, T. and Ohshima, N.: Effects of scavengers of active oxygens on the platelet thrombus formation in microvessels induced by photochemical reaction. *Microcirc. Ann.* 1987, pp. 135~136.
- 5) Rosenblum, W.I.: Biology of disease: Aspects of endothelial malfunction and function in cerebral microvessels. *Lab. Invest.*, **55**: 252~268, 1986.
- 6) Sato, M. and Ohshima, N.: Velocity profiles of blood flow in microvessels measured by ten channels' dual-sensor method. *Biorheology*, **25**: 279~288, 1988.
- 7) 佐藤正明, 大島宣雄: 1 ビット相関計を用いた TV 画像処理による微小血管内血流速度の計測. *医用電子と生体工学*, **19**: 45~48, 1981.
- 8) Sato, M. and Ohshima, N.: Effect of wall shear rate on thrombogenesis in microvessels of the rat mesentery. *Circ. Res.*, **66**: 941~949, 1990.
- 9) Baker, M. and Wayland, H.: On-line volume flow rate and velocity profile measurement for blood in microvessels. *Microvasc. Res.*, **7**: 131~143, 1974.
- 10) Sato, M. and Ohshima, N.: Hemodynamics at stenoses formed by growing platelet thrombi in mesenteric microvasculature of rat. *Microvasc. Res.*, **31**: 66~76, 1986.