Non-anticoagulated blood を用いる ずり惹起血栓形成法 haemostatometry について

山本 順一郎*, 高 智美*, 山下 勉*
佐々木 康人*

A Shear-induced Platelet-rich Haemostatic Plug Formation Method,
Haemostatometry, Using Non-anticoagulated Blood

Junichiro YAMAMOTO*, Tomomi TAKA*, Tsutomu YAMASHITA and Yasuto SASAKI*

Key words : shear-induced platelet aggregation, non-anticoagulated blood, haemostasis, thrombosis

はじめに

狭窄した動脈硬化部位等に形成され、血小板からなる動脈血栓は、心筋梗塞や脳卒中等の発症・進展に重要な役割を演じている。血小板は狭窄部位に生じる大きなずり力によって活性化されて血栓を形成する。ずり力と血小板の相互作用については多くの研究が報告されている^{1)~3)}。

易血栓性を測定する種々の方法の中で、ずり惹起血小板凝集法は *in vivo* における動脈血栓形成傾向を反映しているとする報告が蓄積されてきている^{4)~7)}。ずり惹起血小板凝集法においては、多血小板血漿、抗凝固剤添加血液、抗凝固剤非添加血液等が用いられている。しかし動脈血栓は単に血小板だけの反応ではなく、白血球、赤血球、血流との相互作用の結果形成される^{8)~10)}。また生理的濃度のカルシウムイオンやトロンビンの重要性も指摘されている^{11)~14)}。従って、より生理的な易血栓性測定法の開発が望まれる。

ここで紹介する haemostatometry は Gorog と Kovacs によって開発された測定法である⁴⁾¹⁵⁾。この測定法では抗凝固処理しない血液が用いられ、ずり力によって活性化される血小板の反応性と流動下での凝固能が同時に測定される。また測定に使用される血液量が比較的少ないのも特徴である（ヒト : 3 ml, ラット : 1 ml/測定）。

測定法

この測定法の原理および haemostatogram を図 1 に示す。採血後シリンジを A にセットする。2本のポリエチレンチューブのひとつより流動パラフィンがシリンジ内に流入し、その結果他方のチューブから血液が流出する。血液は 37°C の生食中 B を通った後、血液溜 C に流入する。血液は 60 mmHg 下、一定の速度で流される。採血 2 分 30 秒後に、B においてチューブを針で穿刺する。穿刺により出血が起こるが、穴はずり力によって活性化されて形成された血小

* 神戸学院大学栄養学部生理学研究室 [〒 651-2180 神戸市西区伊川谷町有瀬]
Laboratory of Physiology, Faculty of Nutrition, Kobe Gakuin University [Nishi-ku, Kobe 651-2180, Japan]

図 1 haemostatometry の原理 (1) および典型的な haemostatogram (2)

図 2 止血栓 (横断切片) の透過電顕像

板血栓により塞がれる (図 2)。その後血液凝固により血流は停止する。これら一連の現象は C に接続した圧センサーにより、圧変化として測定される。穿刺による最大の圧降下から圧が 30%回復するまでの面積を H1、90%回復まで

の面積を H2 とし血小板反応性の指標とする。また採血から血液凝固による 10 mmHg の圧降下が起こるまでの時間を CT1、10 mmHg になるまでの時間を CT2 とし血液凝固能の指標とする。種々の薬品の血小板反応性と血液凝固能

への影響を検討する場合には、予めシリンジ内に薬品を入れておけばよい。またこの測定法では原理的には血栓溶解能も測定可能である。

終わりに

Kovacs らはこの測定法を用いて、種々の患者の血小板反応性と血液凝固能を測定している⁴⁾。我々もこの測定法と同じ原理をもつ3チャンネルの装置を作成し、興味ある結果を得ている¹⁶⁾。haemostatometry は動脈血栓に関する有益な情報をもたらすものと考えられる。

文 献

- 1) Moake JL, Turner NA, Stathopoulos NA, Nolasco L, Hellums JD: Shear-induced platelet aggregation can be mediated by vWF released from platelets, as well as by exogenous large or unusually large vWF multimers, requires adenosine diphosphate, and is resistant to aspirin. *Blood* **71**: 1366-1374, 1988.
- 2) Ikeda Y, Handa M, Kawano K, Kamata T, Murata M, Araki Y, Anbo H, Kawai Y, Watanabe K, Itagaki I, Sakai K, Ruggeri ZM: The role of von Willebrand factor and fibrinogen in platelet aggregation under varying shear stress. *J Clin Invest* **87**: 1234-1240, 1991.
- 3) Holme PA, Orvim U, Hamers MJAG, Solum NO, Brosstad FR, Barstad RM, Sakariassen KS: Shear-induced platelet activation and platelet microparticle formation at blood flow conditions as in arteries with a severe stenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **17**: 646-653, 1997.
- 4) Ratnatunga CP, Edmondson SF, Rees GM, Kovacs IB: High-dose aspirin inhibits shear-induced platelet reaction involving thrombin generation. *Circulation* **85**: 1077-1082, 1992.
- 5) Cattaneo M, Pareti FI, Zighetti ML, Lecchi A, Lombardi R, Mannucci PM: Platelet aggregation at high shear is impaired in patients with congenital defects of platelet secretion and is corrected by DDAVP: Correlation with the bleeding time. *J Lab Clin Med* **125**: 540-547, 1995.
- 6) Gorog DA, Kovacs IB: Thrombotic status analyser. Measurement of platelet-rich thrombus formation and lysis in native blood. *Thromb Haemost* **73**: 514-520, 1995.
- 7) Tokue J, Hayashi J, Hata Y, Nakahara K, Ikeda Y: Enhanced platelet aggregability under high shear stress after treadmill exercise in patients with effort angina. *Thromb Haemost* **75**: 833-837, 1996.
- 8) Hamburger SA, McEver RP: GMP-140 mediates adhesion of stimulated platelets to neutrophils. *Blood* **75**: 550-554, 1990.
- 9) Santos MT, Valles J, Marcus AJ, Safier LB, Broekman MJ, Islam N, Ullman HL, Eiroa AM, Aznar J: Enhancement of platelet reactivity and modulation of eicosanoid production by intact erythrocytes. A new approach to platelet activation and recruitment. *J Clin Invest* **87**: 571-580, 1991.
- 10) Maugeri N, Evangelista V, Celardo A, Dell'Elba G, Martelli N, Piccardoni P, Gaetano G, Cerletti C: Polymorphonuclear leukocyte-platelet interaction: Role of P-selectin in thromboxane B₂ and leukotriene C₄ cooperative synthesis. *Thromb Haemost* **72**: 450-456, 1994.
- 11) Chow TW, Hellums JD, Moake JL, Kroll MH: Shear stress-induced von Willebrand factor binding to platelet glycoprotein Ib initiates calcium influx associated with aggregation. *Blood* **80**: 113-120, 1992.
- 12) Ikeda Y, Handa M, Kamata T, Kawano K, Kawai Y, Watanabe K, Kawakami K, Sakai K, Fukuyama M, Itagaki I, Yoshioka A, Ruggeri ZM: Transmembrane calcium influx associated with von Willebrand factor binding to GP Ib in the initiation of shear-induced platelet aggregation. *Thromb Haemost* **69**: 496-502, 1993.
- 13) Yamashita T, Yamamoto J, Sasaki Y, Matsuoka A: The antithrombotic effect of low molecular weight synthetic thrombin inhibitors, argatroban and PPACK, on He-Ne laser-induced thrombosis in rat mesenteric microvessels. *Thromb Res* **69**:

- 93-100, 1993.
- 14) Harker LA, Hanson SR, Runge MS: Thrombin hypothesis of thrombus generation and vascular lesion formation. *Am J Cardiol* **75**: 12B-17B, 1995.
- 15) Gorog P, Ahmed A: Haemostatometer: A new *in vitro* technique for assessing haemostatic activity of blood. *Thromb Res* **34**: 341-357, 1984.
- 16) Muraki T, Taka T, Noguchi T, Ishii H, Seki J, Yamamoto J: Effects of cyclosporine and FK506 on *in vitro* high shear-induced platelet reactivity in rat and human non-anticoagulated blood. *Transplantation* **65**: 1132-1134, 1998.
-