一様せん断場における血栓形成*

(凹凸円錐型試験機を用いた血栓形成度評価)

橋 本 成 広^{*1}, 笹 田 直^{*2}

Clot Fomation under Uniform Shear Fields (Evaluation of Clot Growth by Concave-Convex Cone System)

Shigehiro HASHIMOTO and Tadashi SASADA

A clot test under a uniform shear field *in vitro* has been designed, which utilizes a concave-convex cone system. A sample of beagle blood was sheared between a stationary convex cone and a rotating concave cone. Evaluation of clot growth was derived from the clotting ratio, which was calculated from the rate of increase of frictional torque between the two cones. The results show that clot grows smaller with increase of shear rate in the range from 100 to 500 s⁻¹.

Key Words: Bio-fluid Mechanics, Shear Flow, Medical Engineering, Blood, Clot

1. 緒 言

血液および血管中には、血栓形成に関与する「血小板凝集」・「血液凝固」・「線維素溶解」などの諸因子が含まれ、平常時には動的平衡を保ちつつ、血液自体の流動性を維持している。血管壁が損傷されたり、血液がある条件を満足する表面と接触したりすると、この動的平衡に変化が生じて、血栓が形成される。この問題は、生体内での生化学的機構⁽¹⁾および血液と人工材料(異物)との接触における化学的相互作用⁽²⁾という観点から精力的に研究が続けられている。

一方、流れが淀んでいるところで血栓が形成され易いことは従来から知られているが、流れと血栓形成との間の定量的な関係は明らかにされていない。この問題は、血液を流す人工流路(人工臓器など)の形状設計において重要である。

本研究では、血液流れと血栓形成との関係を明らかにするために、試料血液全体に、Couette型の一様せん断速度を加えられる装置として凹凸円錐型試験機を開発した。そして、*in vitro*において血液に一定のせん断速度を加えながら、流れを「せん断速度」、血栓量を

「血栓形成度」で量的に表わし、相互の関係を定量的に評価した。

2. 方 法

2・1 凹凸円錐型試験機 凹凸円錐型試験機において血液に加えられる流動は、図1のようになる。すなわち、静止凸円錐に対して凹円錐を「その頂点Pを互いに接触(実際にはわずかに離れている)させながら、凹凸円錐の共通対称軸PZにおいて」一定の角速度で回転させる。すると、例えば、図1でSとQとの間では図1(B)のような流動速度の分布が生じ、そのせん断速度(γ)の値は、PS間の距離(x)によらず一

図1 凹凸円錐型試験機において血液に加えられる流動

* 原稿受付 平成5年5月13日。

^{*1} 正員, 北里大学医学部 (〒228 相模原市北里1-15-1)。

^{*2} 正員, 千葉工業大学工学部 (〒275 習志野市津田沼2-17-1)。

定である。

$$\begin{aligned}\gamma &= u / \delta \\ &= \{ \omega x \sin(\beta/2) \} / (x \theta) \\ &= \{ \omega \sin(\beta/2) \} / \theta \cdots \cdots \cdots (1)\end{aligned}$$

式(1)で、 u は凹円錐面上のSにおける周速度、 δ はS-Q間の距離、 ω は凹円錐の回転角速度(rad s^{-1})、 β は凹円錐の頂角、 θ は凹・凸円錐の隙間角(rad)である(注：式(1)~(8)では θ または ϕ が十分に小さいものとして近似式を用いている)。このせん断速度 γ (s^{-1})の値は、凹円錐の分時回転数 n (min^{-1})と凹・凸円錐間の隙間角 ϕ ($^\circ$)から式(2)を用いて計算される。

$$\gamma = (6n / \phi) \sin(\beta/2) \cdots \cdots \cdots (2)$$

実験で用いた凹・凸円錐は、無色透明なポリメチルメタクリレート樹脂製で、凸円錐の半径2.4 cm、凹円錐の凹部頂角 $\beta = 120.2^\circ$ 、凹・凸円錐の隙間角 $\phi = 3.2^\circ$ である。以下の実験では、 n (30~460 min^{-1})を変えながら、50~750 s^{-1} の一定せん断速度を血液に加えた。

この装置では、回転トルクを歪ゲージによって電気的に検出できる(10 dyn cmのトルクに対して 4×10^{-4} の歪の割合でトルクと歪とが比例関係になっている)。すなわち、凸円錐に伝達されたトルクは、「凸円錐回転軸に取り付けられた突起が、軸受け側に固定された板バネを曲げ変形させる力」に変換される。この凸円錐に伝達されるトルク(T_r)は、式(3)で与えられる。

$$T_r = (2/3) \pi \eta R^3 \gamma / \{ \sin(\beta/2) \} \cdots \cdots \cdots (3)$$

式(3)で、 η は流体全体の見かけの粘性係数、 R は凹・凸円錐間における流体充填部分の半径である。

図2 トルクの時間変化

2・2 血栓形成度 本実験で用いた血液は、生後7年のビーグル犬の血液である。同犬の頸静脈から、麻酔下に、抗凝血剤を使用せずに、各測定ごとに1.5 mlの血液を採取する。この1.5 mlの内の1 mlを、採取後10 s以内に凹円錐に入れ、凸円錐をセットする。直ちに、凹円錐の回転を開始し、周囲温度24℃において、一定せん断速度を加え続けながら、凸円錐に伝達されるトルクの時間変化を測定する。1~8分後に、トルク(T_r)のステップ状の上昇が測定される(図2)。この時点で、凹円錐の回転を停止し、凸円錐を外して、血栓の形成状態を肉眼的に観察する。式(3)に式(2)を代入すると、式(4)が得られる。

$$T_r = 4 \pi \eta R^3 n / \phi \cdots \cdots \cdots (4)$$

血栓形成の程度をトルク(T_r)の上昇率と関連づけ、両者間の関係を単純化するために、以下のi)~iii)を仮定してみる。

i)血栓は図3 Bの斜線部分のように凹円錐・凸円錐間の隙間空間全体に均一に広がった状態で形成されるものと仮定する。このとき、血栓の血液全体に対する体積比率(血栓形成度、 R_c)は式(5)によって計算される。

$$R_c = (\phi_0 - \phi_1) / \phi_0 = 1 - \phi_1 / \phi_0 \cdots \cdots \cdots (5)$$

式(5)において、 ϕ_0 は血栓形成前の凹円錐・凸円錐間の隙間角(図3 A)、 ϕ_1 は血栓形成後の血栓以外の部分(図3 B)の角度である。

ii)血栓部分(図3 B斜線部分)の流動は、血栓を除いた部分(図3 B斜線以外の部分)の流動に比べて無視できると仮定する。このとき、血栓形成後(図3 B)には、凹・凸円錐間の隙間角が ϕ_0 から ϕ_1 に減少したときと同じ流動抵抗になる。

iii)血栓を除いた部分(図3 B斜線以外)の見かけの粘性係数は血栓形成前の血液全体(図3 A)の見かけの粘性係数に等しいと仮定する。このとき、式(4)で η は定数である。

以上の仮定より、血栓形成前のトルク(T_{r0})および血栓形成後のトルク(T_{r1})は、式(4)を用いて式(6)および(7)で与えられ、式(5)~(7)を用いて、血栓形成度(R_c)は式(8)

図3 血栓形成前(A)と血栓形成後(B)の凹凸円錐間の様子

のように表される。

$$Tr_0 = 4 \pi \eta R^3 n / \phi_0 \cdots \cdots (6)$$

$$Tr_1 = 4 \pi \eta R^3 n / \phi_1 \cdots \cdots (7)$$

$$Rc = 1 - Tr_0 / Tr_1 \cdots \cdots (8)$$

図2に例示したように、トルク(Tr)の時間変化のデータから Tr_0 および Tr_1 を読み取って式(8)に代入し、血栓形成度を算出した。この血栓形成度は、トルクの上昇がみられないとき($Tr_0 = Tr_1$)には0となり、トルクが大きく上昇するほど($Tr_0 < Tr_1$)1に近づく。

また、血液採取後、トルク(Tr)のステップ状の上昇が測定されるまでの時間を凝血時間とした。同時に、採取血液の残りの0.5 mlをガラス製試験管に入れ、せん断を加えない下での凝血時間が対照値(10分前後)からずれていないことを確認した。

3. 結 果

図4に、せん断速度と血栓形成度との関係を示す。せん断速度が 100 s^{-1} 以下のときには血栓形成度が0.8程度であるのに対して、 400 s^{-1} を超えときには血栓形成度は0.5以下となっている。特に、 500 s^{-1} を超えときには血栓形成度は0.3程度になっている。

血栓形成度と凹凸円錐上に形成された血栓の状態の肉眼的観察との対応関係については、血栓形成度0.8のときに凹凸円錐面全体膜状血栓、0.4~0.7のときに凹凸円錐面所々の島状血栓、0.3のときに、凹凸円錐面上の少量の点状血栓が形成されていた。

図5に、せん断速度と凝血時間との関係を示す。せん断速度が 200 s^{-1} から 400 s^{-1} に増加すると、凝血時間が1/2倍に短縮している。

4. 考 察

血液に一様せん断速度を加える装置としては、円錐・平板型試験機が広く知られているが、凹凸円錐型の方が有利な点はいくつかある。(a)赤血球が遠心作用によって周辺部へ集まる傾向を和らげる、(b)周辺部の血液にも一様なせん断速度が加えられる、(c)隙間空間からの気泡の追い出しが容易、(d)せん断後の試料血液の採取が容易、(e)外側(凹凸円錐側)を回転させるので2次流れ(テラー渦)の発生が防止される。中でも(b)(c)は、円錐・平板型試験機の欠点として、データの信頼性を問題とする旨の論文⁽³⁾⁽⁴⁾まで発表された。これらのことが、本研究で凹凸円錐型試験機を開発し、採用する動機となった。

本研究では、 $50 \sim 750 \text{ s}^{-1}$ のせん断速度を血液に加えた。このせん断速度の範囲は、Poiseuille流を仮定して血管内径と流量から算出した「ヒトの血管壁におけるせん断速度の範囲 $0 \sim 800 \text{ s}^{-1}$ 」⁽⁹⁾に近い。

過去の研究においては、主として、血栓量を肉眼的に比較する方法が採用されてきた⁽⁶⁾。また、一般に、血栓量を定量的に表わす方法としては、体積や質量を測定する方法が考えられる。しかし、血栓は多量の水分を含んでいるため、体積や質量の測定は容易ではない。その上、血栓は退縮等によって、その体積が時間と共に変化する。これに対して、本研究では「血栓形成度」を用いて、血栓を定量的に評価する方法を考案した。この血栓量評価法の特長は、試料血液全体に一様せん断速度を加えながら、血栓形成の程度を定量的に評価することにある。この「血栓形成度」は、血液全体の流動抵抗の上昇率と対応しているという点で、人工流路の設計の指標として直接的に役立つ。

図4 セン断速度と血栓形成度との関係

図5 セン断速度と凝血時間との関係

血栓形成度が全血液に占める血栓の体積比率に正確に対応づけられるためには、i)~iii)の仮定が成立する必要がある。しかし、i)~iii)の仮定は近似を含んでいるので、実際の現象と厳密に対応しているわけではない。

第一に、血栓の形状は図3(B)のように一様ではない。すなわち、実験での肉眼的観察によれば、血栓が凹凸円錐面全体に形成されたときには、血栓部分の体積比率が大きくなるほど、凹凸円錐間の隙間角度が小さくなって、トルクの上昇率も大きくなっていった。しかし、凹凸円錐面全体ではなく、凹凸円錐面所々に島状の血栓が形成されるときには、血栓部分の体積比率は、空間平均的に凹凸円錐間の隙間角度に対応しているにすぎない。また、形成後の血栓の凹凸円錐回転軸からの位置のふらつきに伴って、トルクの時間変化の波形も、図2のように、上昇・下降を繰り返すことがある。従って、 T_f を細かく読み取ることができない。このことが、図4で血栓形成度の値がばらつく原因のひとつとなる。

第二に、血液は非ニュートン流体であり、せん断速度が 50 s^{-1} 未満になると、せん断速度の減少に伴って見かけの粘性係数が急激に上昇する。従って、せん断速度が 50 s^{-1} 未満の領域で本研究の方法を適用するときには、粘性係数を定数とおくことは適切ではないかもしれない。

血液凝固の試験法としては、凝血時間を比較する方法⁷⁾が一般的である。その試験結果から、せん断によって血栓形成が促進されるという主張がある。このことは、血液がせん断されることにより、凝血塊形成の初期反応が促進され、凝血時間が短縮されることと対応していると考えることができる。本実験でも、せん断速度の増加と共に、凝血時間が短縮するという結果が得られた。しかし、血栓形成度は、せん断速度の増加と共に減少しており、本研究における凹凸円錐試験機を用いた血栓形成度評価法によって、凝血時間と血栓形成度とが明確に区別された。

血栓形成度が、せん断速度の増加と共に減少するメカニズムについては、以下のように考えられる。せん断速度が小さいときには、流れに垂直な方向にフィブ

リン網が広がり、そこに多くの赤血球が引っ掛かって、厚みのある血栓が形成される。これに対して、せん断速度が大きいときには、流れに垂直な方向にフィブリン網が広がらず、引っ掛かる赤血球の数が減って、薄い血栓が形成される。

もっとも、本装置での実験結果を、*in vivo*や*ex vivo*に応用するには、血栓形成に係わる諸因子の状態の違いについて考慮しなければならない。すなわち、血管内では、血管内皮細胞のような血液以外の諸因子も、血栓形成に対して重要な係わりを有している。また、血液は循環しており、血栓が形成される場所以外の血液中に含まれる凝固因子等も、血栓形成部位に到達する場合は考えられる。

5. 結 言

新たに開発した「凹凸円錐型試験機」を用いて、*in vitro*において、試料血液全体にCouette流型の一様なせん断速度を加えた場合に形成される血栓量を「血栓形成度」として定量的に評価した実験から、せん断速度が $100\sim 500\text{ s}^{-1}$ の領域においては、せん断速度の増加に伴って「血栓形成度」が著しく減少することがわかった。

本研究は、文部省科学研究費補助金奨励研究(A)の補助を受けたことを付記する。

文 献

- (1)安部 英・ほか6名, 血液学, (1985), 1427, 丸善.
- (2)Salzman, E. W., *Interaction of the Blood with Natural and Artificial Surfaces*, (1981), 1, Marcel Dekker.
- (3)Monroe, J. M., True, D. E. and Williams, M. C., Surface Roughness and Edge Geometries in Hemolysis with Rotating Disk Flow, *J. Biomed. Mater. Res.*, **15** (1981), 923.
- (4)Lo, R. K., Nichols, A. R. and Williams, M. C., Hemolysis Artifacts Induced in Rotating Shear Devices, *J. Biomed. Mater. Res.*, **8** (1974), 81.
- (5)Whitmore, R. L., *Rheology of the Circulation*, (1968), 93, Pergamon Press.
- (6)Gott, V. L. and Furuse, A., Antithrombogenic Surfaces, Classification and *in vivo* Evaluation, *Fed. Proc.*, **30-5** (1971), 1679.
- (7)Lee, R. I. and White, P. D., A Clinical Study of the Coagulation Time of Blood, *Am. J. Med. Sci.*, **145** (1913), 495.