人工心臓の模擬血栓試験法に関する研究

泊 陽輔

東京理科大学大学院理工学研究科機械工学専攻修士課程

1. はじめに

人工心臓に用いられる遠心血液ポンプの開発において、動物実験による生物学的な血液適合性評価を行うことは、必要不可欠なプロセスである。これらの動物実験を行うにあたっては、ポンプを取り付ける外科医の他に、手術室や飼育施設などが必要とされる。そのため、このような環境が整っている機関でしか実施することができないのが現状である。当研究室では、ヒツジを使用した1週間の急性動物実験を行っているが、動物実験へ移行する前に、血液ポンプの抗血栓性を事前評価することが求められている。そこで、化学実験室でも実施可能な、試験回路を用いた*in vitro*抗血栓性試験法が注目されている¹⁾³⁾。しかしながら、これらの試験法では、凝固能の制御、動物実験結果との対応、および実験結果の再現性が問題とされてきた。本論文で述べる*in vitro*抗血栓性(模擬血栓)試験法では、これらの問題を解決し、動物実験事前評価法としての有用性の確認を目的とする。

2. 実験方法

予備実験として、凝固能の制御について検討した。凝固能の指標として活性化凝固時間(ACT)を採用した。血液凝固を抑える抗凝固剤、およびその中和剤の組み合わせとして、ヘパリンナトリウム-硫酸プロタミンと、クエン酸ナトリウム-塩化カルシウムを使用した。プラスチック製ビーカー中で、ウシ血液、抗凝固剤およびその中和剤を混合し、全量を10mLとした。抗凝固剤および中和剤の任意の濃度におけるACTを測定して、2種の組み合わせのどちらがACTの制御に適しているかを調べた。次いで、モノピット型遠心血液ポンプ(モデルDD3)と動圧浮上型遠心血液ポンプ(モデルHH2)の2種について、*in vitro*抗血栓性試験を実施した。実験条件は、Mock試験回路を使用し、総血液量500mL、圧力差100mmHg、流量1.5L/min、ACT200s、37℃とした。それぞれのポンプについて5回ずつ繰り返し実験を行い、動物実験による結果と比較した。

3. 実験結果および考察

抗凝固剤および中和剤の任意濃度におけるACTの値について、ヘパリンナトリウム-硫酸プロタミンの組み合わせをFig.1に、クエン酸ナトリウム-塩化カルシウムの組み合わせをFig.2に示した。ヘパリンナトリウムで抗凝固した血液に対して、硫酸プロタミン濃度を増加させるとACTは減少したが、濃度が0.005w/v%以上になるとACTは上昇した(Fig.1(a))。これは、過剰の硫酸プロタミンが、アンチトロンビンⅢ活性を増加させることによるものと考えられる⁴⁾。また、硫酸プロタミンによってACTを200s程度まで低下させた状態から、ヘパリンナトリウム濃度を増加させると、ACTは上昇した(Fig.1(b))。一方、クエン酸ナトリウムで抗凝固

Fig.1 ACT control with the combination of heparin sodium and protamine sulfate

Fig.2 ACT control with the combination of sodium citrate and calcium chloride

した血液に対して、塩化カルシウム濃度を増加させるとACTは減少し(Fig.2(a)), この状態からクエン酸ナトリウム濃度を増加させると、ACTは上昇した(Fig.2(b)). これらの結果から、*in vitro* 抗血栓性試験において、可逆的にACTを制御するのに適した抗凝固剤-中和剤は、クエン酸ナトリウム-塩化カルシウムとした。そこで、遠心血液ポンプの*in vitro*抗血栓性試験では、ACT制御にクエン酸ナトリウム-塩化カルシウムを使用した。DD3およびHH2ポンプの*in vitro*抗血栓性試験結果について、ポンプインベラ背面の写真をFig.3に示した。5回の実験中、DD3では、それぞれ4回において血栓の生成は見られなかった(Fig.3 Exp #1, 2, 4, 5)。HH2については、4回において動圧軸受部に血栓の生成が確認され(Fig.3 Exp #1, 2, 3, 5)、DD3およびHH2ともに、80%の確率で再現性が得られた。1週間の急性動物実験においては、DD3では血栓の生成がピボット中心部に確認されているが (Fig.3 Animal Exp)、動物実験は中断することなく継続できた⁵⁾。しかしながら、HH2では、手術開始後約2時間で、大量の血栓生成により流量低下が生じ、動物実験を中断したことがわかっている(Fig.3 Animal Exp)⁶⁾。これらのことを考慮すると、本試験結果の1つの解釈として、本*in vitro*抗血栓性試験法において、血栓が生成するポンプに関しては、動物実験の途中で血栓生成によって動物実験が中断される可能性があり、ポンプの抗血栓性の改善が求められるポンプと考えている。今後、信頼性を向上させるために、さまざまな遠心血液ポンプについて、動物実験との結果を比較する必要がある。

4. 結論

抗凝固剤にクエン酸ナトリウム、中和剤として塩化カルシウムを使用した模擬血栓試験法に位置づけられる*in vitro*抗血栓性試験法は、人工心臓の動物実験事前評価法として期待できることがわかった。

参考文献

- 1) H. Schima, H. Siegl, S. F. Mohammad, L. Huber, M. R. Müller, U. Losert et al, In Vitro Investigation of Thrombusgenesis in Rotary Blood Pumps, Artf. Organs, 1993; 17(7): 605-608
- 2) P. Swier, W. J. Bos, S. F. Mohammad, D. B. Olsen and W. J. Kolff, An In Vitro Test Model to Study the Performance and Thrombogenicity of Cardiovascular Devices, ASAIO Transactions, 1989; 35: 683-687
- 3) E. Tayama, S. Ohtsubo, T. Nakazawa, Y. Takami, Y. Niimi, K. Makinouchi et al. In vitro Thrombogenic Evaluation of Centrifugal Pumps, Artf. Organs, 1997; 21(5): 418-420
- 4) J. N. Shanberge, M. Murato, T. Quattrociochi-Longe and L. V. Neste, Heparin-Protamine Complexes in the Production of Heparin Rebound and Other Complications of Extracorporeal Bypass Procedures, Am J Clin Pathl, 1987; 87: 210-217
- 5) M. Toyoda, M. Nishida, O. Maruyama, T. Yamane, T. Tsutsui and Y. Sankai, Geometric Optimization for Non-Thrombogenicity of a Centrifugal Blood Pump through Flow Visualization, JSME International Journal Series C, 2002; 45(4): 1013-1019
- 6) O. Maruyama, Y. Tomari, D. Sugiyama, M. Nishida, T. Tsutsui and T. Yamane, Simple In Vitro Testing Method For Antithrombogenic Evaluation of Centrifugal Blood Pumps, ASAIO 52nd Annual Conference, ASAIO Journal, 2006; 52(2): 5A

Fig.3 Comparison of obtained results by *in vitro* tests with *ex vivo* tests