原 著

温熱による血液凝固・線溶系に及ぼす影響

— in vitro における検討 —

伊藤要子¹⁾ 相原真理子¹⁾ 堀 浩¹⁾

神取祥和¹⁾ 宮田伸樹¹⁾ 小栗 隆²⁾

1) 愛知医科大学放射線医学教室

2) 同 第二内科学教室

Effects of Hyperthermia on Blood Coagulation and Fibrinolytic System

— in vitro experiments —

Youko Hishikawa-Itoh¹⁾, Mariko Aihara¹⁾

Hiroshi Hori¹⁾, Yoshikazu Kandori¹⁾

Nobuki Miyata¹⁾ and Takashi Oguri²⁾

1) Department of Radiology, Aichi Medical University

2) The Second Department of Internal Medicine, Aichi Medical University

Summary

Human blood was incubated in the water bath at various temperature (0~50°C) for various time (5~90min), to experiment the effects of temperature on APTT, PT, fibrinogen, activities of clotting and fibrinolytic factors, platelete aggregation and its morphology. The results were as follows.

1. APTT and PT prolonged significantly at the border temperature, 43 °C
2. Fibrinogen was clottable at 0~45 °C, and unclottable at 50 °C. But the changes of fibrin clot strand was observed under scanning at 43 °C. Prothrombin activity decreased at 50 °C, and factor X at 45 °C.
3. Plasminogen activity increased at 43 and 45 °C, but decreased at 50 °C. Prekallikrein showed almost no change throughout 0~50 °C.
4. Platelets lost their aggregative function at 43 °C using collagen, at 40 °C using ADP. Simultaneously morphological change was observed at 43 °C under scanning electron microscope.

From these results, we concluded that 43 °C might be critical very important temperature in blood coagulation and fibrinolytic system as well as cell-survival in hyperthermia.

Key Words:

血液加温	Blood heating
血液凝固・線溶	Blood coagulation and fibrinolysis
血小板凝集	Platelet aggregation
フィブリン網	Fibrin strand

はじめに

血液の機能は、その血中成分の多様性により多岐にわたっている。即ち、その有形成分である赤血球の機能は酸素運搬であり、白血球は生体防御・免疫、血小板は止血にと各々独立した機能を有している。更に、液体成分の血漿においては、pH や膠質浸透圧の維持、各種酵素・ホルモン活性の発現など多種多様の機能を保持している。

Hyperthermia において、血液は加温された組織局所又は全身の熱を運搬・分散することにより体温調節の役割を果たしている。これを血液の側より考慮すると血液の構成成分の各々が加温され何らかの変化を受けているものと推察される。

今回は、特に血液の重要な生体防御反応の一つである止血・凝固機序に及ぼす温熱の影響を *in vitro* の実験を中心に検討することを目的とした。即ち、血中有形成分である血小板、液体成分中の凝固・線溶因子が加温によりどのような変化を受けるのか、更にハイパーサーミアにおける臨界温度 43 °C が血液凝固・線溶系に如何なる意義をもたらすか検討するため基礎実験を実施した。

実験材料及び実験方法

1. 血液の採取

1 / 10 容量の 3.8 % クエン酸 Na を加えてヒト血液を肘静脈から採血した。採取した血液はガラス面での XII 因子の活性化を防止するため、ポリチューブ又はシリコナイズした器具を使用した。

2. 全血の加温

採取した血液をポリチューブに 2 ml ずつ入れ、0 °C (水中)、24 °C (室温)、及び 37, 40, 43, 45, 50 °C の各々の温水浴中に放置した。処置時間は、15, 30, 45, 60, 90 分とし 50 °C 加温については、5, 10, 15, 30, 45 分とした。

全血血小板凝集、血小板及び Fibrin の形態観察には加温した全血をそのまま検体とした。その他の APTT, PT, 凝固・線溶因子測定に関しては、加温した全血を 3500 rpm 15 分遠心分離し、上清の血漿を検体とした。

3. APTT 及び PT 測定

APTT は 0.1 ml のアクチン (国際試薬) に血漿 0.1 ml を加え 37 °C で 2 分加温後、加温した 0.02M CaCl₂ 0.1 ml を加え、凝固時間を Fibrosystem (BBL Co.) にて測定した。

PT は加温した血漿 0.1 ml に加温したトロンボプラスチン C (国際試薬) 0.2 ml を加え Fibrosystem にて同様に測定した。

4. Fibrinogen (FI) 測定

FI 量は、血漿に Thrombin と CaCl₂ を加えて形成された Clott を Tyrosine 法¹⁾にて定量した。

5. 凝固・線溶因子活性測定²⁾³⁾

各因子は各々の活性化剤で活性化後、蛍光基質⁴⁾⁵⁾ (MCA 基質、ペプチド研) にて活性を測定した。

Prothrombin (FII) は、血漿を 50 mM Tris-HCl pH8.2 + 0.175M NaCl + polybren 1mg/ℓ にて 500 倍希釈し、Echis carinatus venom (Sigma Co.) で Thrombin (FIIa) に活性化後⁶⁾、0.1 mM Boc-Val-Pro-Arg-MCA を基質として活性測定した。

Factor X (FX) は、血漿を 50 mM Tris-HCl pH8.2 + 0.2M NaCl + polybren 1.5 mg/ℓ にて 20 倍希釈し、Russell's viper venom (BMY K. K.) で Factor Xa (FXa) に活性化後、0.05 mM Boc-Ile-Glu-Gly-Arg-MCA 基質にて活性測定を行った。

Plasminogen (PG) は、酸処理により Inhibitor を除去した 10 倍希釈血漿を Urokinase で Plasmin (PM) に活性化後、0.1 mM Boc-Glu-Lys-Lys-MCA 基質にて活性測定を行った。

Prekallikrein (PK) は、血漿を 0.05M Tris-HCl pH8.0 buffer にて 20 倍希釈し、Prekallikrein activator (第一化学) で kallikrein に活性化後、0.05mM Z-Phe-Arg-MCA 基質にて活性測定を行った。

6. 血小板凝集能測定

加温処理した全血を生理食塩水で 2 倍に希釈し、その 1 ml を 37 °C で 3 分加温後、凝集惹起

物質として ADP(Sigma Co.) 又は Collagen (Horm Co.) を最終濃度 $10.0 \mu\text{M}$ 又は $2.0 \mu\text{g/ml}$ となるよう添加し, Whole Blood Aggregometer C-530(Chrono-Log.Co.) にて凝集能を測定した。なお, 凝集能は電気抵抗で現す電気インピーダンス法⁷⁾にて惹起物質添加5分の抵抗値で表示した。

7. 血小板の走査電子顕微鏡による形態観察⁸⁾

加温処理した全血 0.3 ml を 4°C の 1% glutaraldehyde 10 ml で約 30 分前固定後, 800 rpm にて 10 分遠心した上清の固定血小板浮遊液を採取した。poly L-lysine 処理 (0.1% , 室温で数分) したガラス小片を底の平な遠心管に置き, 固定血小板浮遊液を入れ, 2500 rpm にて 10 分遠心した。血小板の付着したガラス小片を取り出し, 2% glutaraldehyde 液中で約 30 分固定した後, 0.5% 四酸化オスミウムで約 30 分, 後

固定し水洗した。alcohol 系列で脱水後, t -butylalcohol に置換, 乾燥, 蒸着した後, 走査電子顕微鏡 (日本電子 JSM-6000) にて形態を観察した。

8. 凝固ゲルの走査電子顕微鏡による形態観察⁹⁾

ポリ試験管に, 加温処理した全血 0.05 ml と 0.025M CaCl_2 0.05 ml を加え 37°C で 60 分放置して生じた凝固ゲルを 0.015M phosphate buffer($\text{pH}7.4$) で洗浄後, 2.5% glutaraldehyde で 1~2 時間固定した。その後, alcohol 系で脱水, t -butyl alcohol で置換, 乾燥, 蒸着し走査電子顕微鏡にて fibrin strand(FS) を観察した。

実験結果

1. APTT 及び PT

APTT および PT 共に点線で示した $0 - 37^\circ\text{C}$ では著明な変化を認めなかった。 40°C で

Fig. 1 Changes of APTT and PT in human blood by heating at various temperature.

は、60, 90 分と長時間加温のみににおいて、APTT で 5 % の、PT で 1 % の危険率で有意な延長を認めた。43 °C では APTT では 30 分から、PT では 15 分から有意 ($p < 0.01$) な凝固時間の延長を認め、45 °C では更に延長し、50 °C では加温 5 分から急激な延長を示し 30 分では凝固せず測定不能であった (Fig. 1)。

2. 凝固因子活性

FII 及び FX の蛍光基質法による結果を Fig. 2 に示した。FII では、43, 45 °C 加温で活性低下傾向にはあるものの有意な低下ではなかった。しかし、50 °C では加温時間とともに直線的に低下した。

Fig. 2 Changes of clotting activities (prothrombin and factor X) in human blood by heating at various temperature.

FX については、FII より温度感受性で、0 ~ 40 °C では著明な変化はなく、43 °C では有意差は認めないものの活性低下傾向を示し、45 °C 以上では加温時間と共に有意な低下を示した (Fig. 2)。

FI は、SD が若干大きいものの、0 ~ 45 °C では殆ど変化がなかった。50 °C では 10 分加温で既に clot 形成は傷害され FI の急激な減少を認

めた。更に加温時間と共に clot は細片化され 45 分加温では clot は形成されなかった。

0 ~ 45 °C では殆ど変化のなかった FI であるが、43 °C における clot の走査電顕像では、対照に比し FS はもろく、付着物が多く、集束部は塊状を呈していた。50 °C では、急速に clot 形成は傷害され海綿状構造を示した (Fig. 3)。

Fibrin Strands

Fig. 3 Changes of fibrinogen and fibrin clot strands in human blood by heating at various temperature.

2. 線溶因子活性

PG, PK の加温による蛍光基質活性の変化を Fig.4 に示した. PG 活性は 0 ~ 40 °C では殆ど変化を認めなかったが, 45 °C では 5 % の有意性をもって, また 43 °C では有意差は無いが, 凝固因子とは逆に对照の 24 °C に対し活性増加を認め

た. 50 °C では活性は有意に低下するものの凝固因子に比しその低下は軽度であった.

PK 活性は, 破線群の 0 ~ 40 °C 及び実線群の 43, 45 °C 加温においても殆ど変化なく, 50 °C の高温処理においても著明な活性低下を認めなかった.

Fig. 4 Changes of fibrinolytic activities (plasminogen and prekallikrein) in human blood by heating at various temperature.

3. 血小板凝集及び形態

collagen 又は ADP を添加したときの加温による凝集能の変化を Fig.5 に示した. collagen 凝集では APTT, PT と同様, 0 ~ 40 °C で殆ど著明な変化が認められなかった. しかし, 120 分と長時間の加温においては, 5 % の有意差で凝集能は低下した. 43 °C 加温からは明らかに有意な凝集抑制がみられ, 45, 50 °C では更に強く抑制され, 凝集不能となった. 0 ~ 40 °C の破線群と 43 ~ 50 °C の実線群が, 明らかに区別された.

ADP 凝集では 0 ~ 37 °C で全く変化せず, 40 °C では加温と共にゆっくりとした凝集の抑制

が認められ, 43 ~ 50 °C では急激な凝集抑制が認められた.

更に, この時の血小板の形態を各温度について検討した. 採血後速やかに固定した Control の血小板は, ほぼ Native な血小板像を示す. 0, 37 °C の 60 分処理では, 多数の偽足が認められ活性化を受けている. しかし, 43 °C では小さい突起が多数突出した球状になり, 50 °C でこの傾向は更に強くなった. 60 °C 10 分処理では, 血小板は丸くふくらみ表面は滑らかとなった. この様に血小板の形態と凝集能は, 43 °C を境に大きく変化した (Fig. 6).

Fig. 5 Changes of platelet aggregation (collagen and ADP aggregation) in human blood by heating at various temperature.

Fig. 6 Changes of platelets morphology in human blood by heating at various temperature.

考 察

ハイパーサーミアによる全身の加温, 特に加温血液を全身に循環させる全身ハイパーサーミアそして腫瘍局所が加温される局所ハイパーサーミアの場合, 加温された血液が凝固し易いか否かは大きな問題であるにもかかわらず, 加温温度と凝固・線溶活性との関連を検討した報告は非常に少ない¹⁰⁾. また, ハイパーサーミアを受ける担癌生体自体としては, 血中凝固・線溶活性は癌の進行に伴い凝固亢進・線溶低下傾向¹¹⁾¹²⁾¹³⁾が増すことにより, 更に加温が付加された場合の影響は重要な課題である.

そこで, まず基礎実験として *in vitro* における加温によるヒト血液の凝固・線溶に及ぼす影響を検討した.

APTT, PT 共に良く類似した温度・凝固時間曲線を示したが, PT の方が若干温度感受性が高かった. これは, PT が主として外因系凝固の影響を示すことより, 組織因子¹⁴⁾, 組織トロンボプラスチンなどの因子が血中凝固因子に比し比較的温度に感受性を示すことを示唆する. FI は, 0 ~ 45 °Cまで殆ど変化なく Fibrin clot を形成したものの, 生じた Fibrin clot 走査電頭で観察すると, やはり 43 °C近傍から FS が弱化したことにより, 外見上 clot 形成には影響を与えないものの, FI 自体も 43 °Cから何等かの変化を受けているものと推察された. FX は, ほぼ APTT, PT と同様のパターンを示し, 43 °Cで活性低下傾向をそして 45 °Cから有意に低下した. FII は 50 °Cで活性低下を認め FX より温度感受性は低かった.

PG では 43, 45 °C加温では活性増加を認めた. この原因については, 血中で inhibitor(IH) と complex を形成¹⁵⁾¹⁶⁾して活性のなかった PM が加温処理により, IH との complex が解離又は IH の失活により活性を示したものと考えられる. PK については, 43, 45 °C加温はもとより 50 °Cの高温処理でも殆ど著明な変化を認めず, 温度に抵抗性であると思われた.

血小板の加温による凝集抑制の限界温度は,

collagen 凝集と ADP 凝集で各々約 43, 40 °Cと異なっていた. これは, 凝集惹起剤の作用機序¹⁷⁾の差によるものと思われる. collagen を用いた場合は, 凝集と放出反応が同時に起きるのに対し, ADP の場合は放出反応は凝集に依存し, 凝集と放出の間に time lag が認められる.

血小板形態に関しては, 43 °Cを境に細長い偽足を伴わない球状化を認めた. 血小板は, 本来微小管の特異な輪状配列のため円盤形という特有な形態をとる. しかし, 播種性血管内凝固症候群 (DIC), 特発性血小板減少性紫斑病, 妊娠後期の妊婦などでは, 血管内で血小板が何等かの刺激を受け, 球状化と共に偽足の頻度が増加する¹⁸⁾. しかし, 球状化の強い DIC では球状化しながら偽足のない spineless sphere が増加するとの報告¹⁹⁾がある. 我々の *in vivo* での家兎加温実験結果から, 軽度 DIC 様変化を認めたことより, 血小板の加温による球状化の形態変化も DIC と類似の機序によるものではないかと思われた.

本実験結果を凝固系, 線溶系で比較すると, 凝固系に関したパラメータの多くは, 約 43 °C加温で活性低下又は変化を示したのに対し, 線溶系に関したパラメータでは, 比較的温度抵抗性で温度の影響を受けにくいように思われた. しかし, 凝固・線溶系共にその活性値は各々の IH にも大きく影響されることから, IH の検討も必要であると思われた.

多くの細胞において, 異なる温度の温熱処理による細胞生存率を求めると, 約 43 °Cの温度で劇的に傾斜が変化する温度・細胞生存率曲線が得られる²⁰⁾. 本実験においても, 特に APTT, PT, FX, 血小板凝集の温熱処理による結果は, 細胞のそれと酷似しており, 約 43 °Cを境にそれ以上, 以下で全く異なっていた. これらの結果は, 血液凝固・線溶の多くのパラメーターに対して, 細胞に対する温熱処理による細胞死と同様の機序²¹⁾が適用できることを示唆するものと考えられる. 即ち, 約 43 °C以上, 以下で凝固・線溶のパラメーターの活性低下・失活に対するメカニズムが異なるためと思われる. 凝固・線溶因子に関しては, 酵

素活性基への影響から酵素自体の蛋白変性, 血小板に関しては, 細胞膜上 receptor と細胞膜の変化とのメカニズムが転換したものである。

以上の如く, 43 °Cはハイパーサーミアにおける細胞の生存限界温度であると共に血液凝固・線溶系(特に凝固系)における多くのパラメータに対する限界温度でもあり, 重要な意義をもつ温度であることを解明した。

まとめ

ヒト血液を 0 ~ 50 °Cの各温度で 0 ~ 90 分間処理し, 凝固系パラメータとして APTT, PT 及び FI, FII, FX 活性そして血小板凝集を, 線溶系のパラメータとして PG, PK 活性を測定すると共に血小板, Fibrin clot の形態変化を走査電顕にて観察したところ下記の如き結果を得た。

1) APTT, PT 共に約 43 °C加温を境に凝固時間の延長が認められたが, 若干 PT の方が温度感受性であった。

2) FI は, 50 °C加温で減少を認めたが, Fibrin clot の走査電顕像では 43 °Cから変化を認めた。FII は 50 °Cで, FX は 45 °Cから活性低下を示した。

3) PG は 45 °Cで活性増加傾向を, 50 °Cで低下を認め, PK は 0 ~ 50 °C加温で著明な変化を示さなかった。

4) 血小板凝集は, collagen 凝集で 43 °Cを, ADP 凝集で 40 °Cを境に凝集能は低下した。血小板形態は, 43 °C加温から球状化した。

以上の結果より特に, APTT, PT, FX, 血小板凝集・形態はほぼ 43 °Cを境に著明に変化したことより, Hyperthermia における細胞の生存限界温度・43 °Cと同様, 凝固・線溶系においても 43 °C (40~43 °C) は重要な意義をもつ限界温度であることを実証した。

謝 辞

本実験に御協力頂いた愛知医科大学・法医学教室 水谷洋子助手に深く感謝致します。

文 献

- 1) 松岡松三: Tyrosine 法による血漿フィブリノゲンの定量法。臨検 2: 61, 1958.
- 2) 伊藤要子, 水谷洋子, 山田 学, 宮田伸樹, 山田高路, 小栗 隆: 急性アルコール投与におけるハムスターの凝固・線溶。日本血栓止血学会誌 1: 134-140, 1990.
- 3) 伊藤要子, 宮田伸樹, 小栗 隆: 肝照射家兎の凝固・線溶。日本血栓止血学会誌 2: 293-301, 1991.
- 4) Morita, T., Kato, H., Iwanaga, S., Takada, K., Kimura, T. and Sakakibara, S.: New fluorogenic substrate for α -thrombin, factor Xa, kallikreins and urokinase. J. Biochem. 82:1495-1498, 1977.
- 5) Kato, H., Adachi, N., Ohno, Y., Iwanaga, S., Takada, K. and Sakakibara, S.: New fluorogenic peptide substrates for plasmin. J. Biochem. 88: 183-190, 1980.
- 6) 浅井紀一: 合成基質による測定法。1. プロトロンビン。青木延雄, 柴田 昭: 血液学研究検法。pp532-537, 中外医学社, 東京 1980.
- 7) Cardial, D.C. and Flower, R.J.: The electronic aggregometer: A novel device for assessing platelet behavior in blood. J. Pharmacological Method. 3: 135-158, 1980.
- 8) 服部 晃, 飯泉俊雄: 電子顕微鏡による巨核球と血小板の形態。実践止血凝固学-血小板・血液凝固・線溶検査法-。pp25-37 藤巻道男編, 医歯薬出版, 東京, 1980.
- 9) 横瀬琢男: 血液凝固ゲルの力学的ならびに形態学的研究。-糖尿病性細小血管症の成因に関する血液レオロジー的研究-。慈恵医大誌 97: 932-946, 1982.
- 10) Klaubert, W., Lange, E.L. and Wilmanns, W.: Coagulation and fibrinogenolysis during whole-body hyperthermia. Cancer Res. 107: 205-208, 1988.

- 11) 伊藤要子, 相原真理子, 宮田伸樹, 水谷洋子, 小栗 隆: 担癌マウスの血液凝固・線溶活性と組織内酸素分圧. 日本血栓止血学会誌 1: 453, 1990.
- 12) Rickles, F. and Edwards, R.L.: Activation of blood coagulation in cancer; Trousseau's syndrom revisited. Blood 62: 14-31, 1983.
- 13) Francis, J.L.: Haemostasis and cancer. Med Lab. Sci. 46: 331-346, 1989.
- 14) Strother, S.V., Bull, J.M.C. and Branham, S.A.: Activation of coagulation during therapeutic whole body hyperthermia. Thromb. Res. 43: 353-360, 1986.
- 15) Aoki, N., Moroi, M. and Matsuda, M.: The behavior of α_2 -plasmin inhibitor in fibrinolytic states. J. Clin. Invest. 60: 361, 1977.
- 16) Aoki, N., Moroi, M. and Tachiya, K.: Effects of α_2 -plasmin inhibitor on fibrin clotlysis. Its comparison with α -macroglobulin. Thromb. Haemostas., 39: 22, 1978.
- 17) 久米章司, 東原政明, 橋本佳明, 高畑 京: 血小板の放出反応と凝集反応との関連 pp81-87, 1984.
- 18) 服部 晃: 血小板の形態と機能. 医学のあゆみ 114: 55-561, 1980.
- 19) 服部 晃, 小島知子, 高橋 薫, 真田雅好, 飯泉俊雄, 長山礼三, 高橋芳右, 小林 勲, 小池 正, 柴田 昭: DIC にみられた球状血小板症. 医学のあゆみ 115: 384-386, 1980.
- 20) Dewey, W.C., Hopwood, L.E., Sapareto, S. A. and Gerweck, L.E.: Cellular responses to combinations of hyperthermia and radiation. Radiology 123: 463-474, 1977.
- 21) Conner, W.G., Gener, E.W., Miller, R.C. and Boone, L.M.: Prospects of hyperthermia in human cancer therapy. Radiology 123: 497-503, 1977.