

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K12639

研究課題名（和文）人工心臓内で生じる非生理学的なせん断応力が出血と血栓形成に与える影響のメカニズム

研究課題名（英文）Mechanism of effects of non-physiological high shear stress in artificial heart on bleeding and thrombus formation

研究代表者

丸山 修（MRUYAMA, Osamu）

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・総括研究主幹

研究者番号：30358064

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本実験計画で予定していた最高せん断応力120Paを、安定して血液試料に負荷することに成功した。また、本研究課題の一つであった血液試料に対する空気の巻き込みを防ぐことに成功した。さらに、ヒト血、ウシ血およびブタ血について、血小板系、線溶系および凝固系に関連する全29のマーカー評価を網羅的に行い、ウシ血液においては、凝固系のマーカーであるフィブリン・フィブリノゲン分解生成物、Dダイマー、フィブリンモノマーと、線溶系のマーカーであるプラスミノゲン活性（PLG）以外の全マーカーが、ブタ血においてはPLG以外の全マーカーがヒト血と同様に評価できることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究による成果として、血液にせん断応力を負荷する新たなせん断負荷装置を開発することに成功した。これは、血液にせん断応力を負荷する際に、空気の血液への巻き込みを防止するものである。空気の巻き込みが、血液凝固反応に大きな影響を及ぼすことが判明したため、本実験計画で予定していた最高せん断応力120Paを、空気を巻き込むことなく安定して血液に負荷する必要があった。また、ウシ、ブタ、ヒトと、種差の異なる血液試料において、血液凝固因子が正確に計測できるかを比較し、その正確性を確認することができた。これらは、人工心臓装着患者の出血および血栓合併症を防ぐために、重要な解析手法である。

研究成果の概要（英文）：We succeeded in developing a new shear stressor, in stably loading the maximum shear stress of 120 Pa, which was planned in this experimental plan, to the blood sample. In addition, we also succeeded in preventing entrainment of air into the blood sample in the shear portion. Furthermore, in human blood, bovine blood, and porcine blood, a total of 29 markers related to the platelet system, fibrinolytic system, and coagulation system were comprehensively evaluated. All markers other than D-dimer, fibrin monomer, and plasminogen activity (PLG) in bovine blood, and those other than PLG in porcine blood, can be evaluated in the same way as in human blood.

研究分野：人工臓器学

キーワード：人工心臓 血液 せん断応力 血栓 出血 溶血 血液凝固反応

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

人工心臓は、わが国では重症心疾患患者救命のため、心臓移植までのつなぎとして認可された医療機器である。国内では5種類の人工心臓が使用されている。うち、4種類は遠心式(羽根車によって遠心力を利用するポンプであり、軸流式よりも回転数は低いサイズが大きい)、1種類は軸流式(羽根車によって揚力を利用するポンプであり、遠心式よりも回転数は高いサイズが小さい)である。人工心臓の未だ解決しない問題として、周術期における血栓形成と出血現象がある。人工心臓の内部では、遠心式であっても軸流式であっても、血液を循環し駆出させるための部品であるインペラが高速回転する。高速回転するインペラと静止しているポンプ本体との隙間には、図1で示されるような速度勾配(せん断速度(s^{-1}))が生じる。

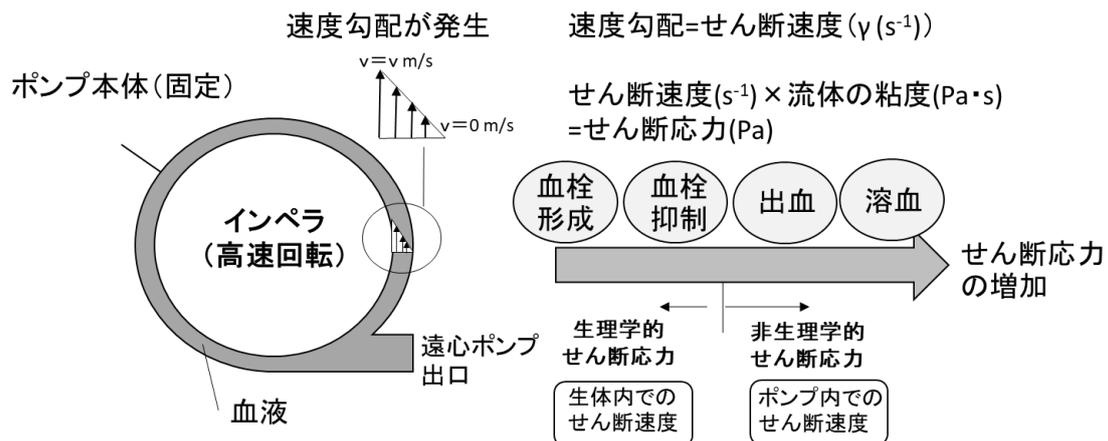


図1 人工心臓内で生じるせん断応力と、せん断応力増加に対応する血栓、出血

せん断応力に基づく血栓形成や出血現象は、人工心臓を手術で取り付ける臨床医が、手術・治療における段階で経験している事象であり、血栓や出血を予測することはできない。そのために、臨床では血栓形成を防ぐため、過度の抗凝固療法を施して出血合併症となったり、逆に出血を懸念して抗凝固剤の投与量が不足し、結果として血栓梗塞症を引き起こしたりと、対症療法による処置となることがしばしば引き起こる。これは、人工心臓内で生じる非生理学的高せん断応力に対して、血液凝固反応の挙動が明らかになっていないからに他ならない。したがって、研究課題の核心をなす学術的「問い」は、「血液にどの程度のせん断応力を負荷すると血栓形成や出血を引き起こしてしまうのか、また、どのせん断応力応答因子の濃度・活性を検査すれば、血栓形成や出血を予測、防止することができるのか」を立証することである。

2. 研究の目的

上記の学術的な問いを受けると、本研究の目的は明確であり、せん断応力応答因子の同定と血液凝固反応に及ぼす定量評価である。

具体的には、図2に示すとおりであり、



図2 本研究で明らかにする項目のカスケード

これらの相関関係を定量的に明らかにする。臨床現場では、図2の①の処置、すなわち人工心臓の装着に対し、②、③がわからないまま、④の血栓・出血の対応に苦慮していることになる。応募者らは、これまでにせん断応力に基づく血液凝固反応の一部の現象について、平成28年度～30年度で採択された科研費挑戦的萌芽研究「メカニカルストレスによる血液凝固反応抑制メカニズムの粘弾性学的定量評価」で明らかにすることに成功した。この研究では、回転型せん断負荷装置を使用して、均一なせん断応力を一定時間、*in vitro* で血液に負荷することで、血栓形成量を調べたものである。その成果として、せん断応力に応答する血漿タンパク質は、血液凝固第V因子(FV)であり、せん断応力を負荷することでこの因子の活性が低下し、血液凝固反応が延長、すなわち血栓形成を抑制することを突き止めた。しかも、この血液凝固因子は、せん断応力に対して止血機構を制御する血小板の影響を全く受けることなく、メカノケミカルに、せん断応力増加に対して活性低下を示すことがわかった。しかしながら、せん断応力の変化に対する活性値の変化についてはさらなる研究が必要である。

一方、せん断応力がさらに増加すると、血栓形成抑制が過剰になり、止血メカニズムが崩壊し、出血現象が顕著になる。出血現象には、血液凝固第V因子と同様に、せん断応力に対してADAMTS13の介在を通して、メカノケミカルに分解するフォンビルブランド因子(vWF)が関与し、また溶血には、赤血球が大きな変形を伴い溶血を引き起こすことが応募者らの研究グループで明らかとなっている。vWFもせん断応力応答因子と言える。

本研究計画の独自性は、せん断応力が均一にはならない血液ポンプ実機や他の回転装置で試験するのではなく、本実験遂行のために、均一なせん断応力を負荷するせん断負荷装置を設計・製作し、血液凝固反応の進行度を血栓形成量として数値化する点((3)で詳細を述べる)が学術的独自性であると考えている。また、せん断応力負荷と血栓形成量は、単に両者がダイレクトに相関するのではなく、必ずせん断応力応答性因子が介在すると仮定し、その因子の同定および挙動を科学的に解明することが、オリジナルティの高い本研究の創造性である。

3. 研究の方法

(1) せん断負荷装置の製作

図2のカスケードの相関関係を明らかにするためには、血液試料に与える外因として、正確なせん断応力のみとすることが重要であるが、既存のせん断負荷装置では、高速回転になると、一部血液試料に空気を巻き込む事象が生じることが判明した。そこで、東京工業大学と共同で、血液試料が充填されるせん断負荷部が、これまでの開放型ではなく、密閉型のせん断負荷装置を製作した。

(2) 種差の異なる血液の血液凝固因子の計測

また、ヒト血、ウシ血およびブタ血について、血液凝固因子の中のせん断応力応答因子を同定するのに先立ち、以下の血小板系、線溶系および凝固系に関連する20項目全29のマーカー評価(分析試薬が異なる)を、全自動血液凝固測定装置(シスメックス、CN-3000)により網羅的に行った。

4. 研究成果

(1) せん断負荷装置の製作

血液にせん断応力を負荷する新たなせん断負荷装置を開発することに成功した。この装置は、磁気軸受式で非接触回転可能であり、空気を巻き込むことなく、また血液に損傷を与えることなく、本研究課題に必要な最高せん断応力120Paを安定して血液に負荷できることを確認した。

(2) 種差の異なる血液の血液凝固因子の計測

評価した分析項目 29 の測定値を、表 1～表 3 に示す。

表 1 ウシ血の血液凝固因子測定結果

ウシ	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	判定
PT(レボヘムPT)	11.3sec 87.5%	13.2sec 64.2%	10.9sec 94.1%	15.0sec 55.7%	13.6sec 67.7%	13.1sec 73.0%	14.3sec 61.2%	○
PT(トロンボレルS)	20.6sec	28.8sec	21.4sec	68.9sec	32.3sec	32.1sec	46.3sec	△
PT(デイドイノピン)	31.5sec	42.9sec	25.6sec	凝固ー	45.9sec	47.8sec	87.3sec	△
APTT (レボヘムAPTT)	48.6sec	61.2sec	50.3sec	163.4sec	75.7sec	84.0sec	76.9sec	△
APTT (アクテン)	78.7sec	138.5sec	115.9sec	凝固ー	158.6sec	168.1sec	163.3sec	△
APTT (アクチンFSL)	28.8sec	34.0sec	32.8sec	61.8sec	39.9sec	38.8sec	47.3sec	○
Fbg(トロンボチェックFib)	211.4mg/dL	260.2mg/dL	224.8mg/dL	233.2mg/dL	196.5mg/dL	271.7mg/dL	298.2mg/dL	○
AT	119.90%	105.20%	117.50%	129.50%	126.60%	136.50%	125.40%	○
α2-AP	>150%	>150%	>150%	>150%	>150%	>150%	>150%	△
PLG	<5%	<5%	<5%	<5%	<5%	<5%	<5%	×
PC	33.10%	26.40%	34.60%	45.00%	34.60%	39.80%	39.10%	△
第Ⅷ因子合成基質	>144%	>144%	>144.0%	>144.0%	>144.0%	>144.0%	>144.0%	△
第Ⅸ因子合成基質	79.70%	64.90%	76.90%	68.20%	77.50%	80.00%	64.90%	○
第ⅩⅢ因子合成基質	113.20%	>150%	125.40%	112.80%	148.40%	>150.0%	149.00%	○
vWF(L低濃度検体) 抗原量	>21.2%	>21.2%	>21.2%	>21.2%	>21.2%	>21.2%	>21.2%	○
vWF(M標準濃度検体) 抗原量	54.60%	52.50%	44.50%	49.10%	60.40%	63.80%	64.50%	○
vWF RcoF活性	>192%	>192%	>192%	>192.0%	>192.0%	>192.0%	>192.0%	△
FDP	<2.5 μg/ml	×						
Dダイマー	<0.5 μg/ml	×						
FM	<3.0 μg/ml	×						
第Ⅱ因子(PT)	59%	44.10%	49.10%	51.00%	64.20%	69.10%	57.90%	△
第Ⅴ因子(PT)	>150.0%	>150.0%	(13.5sec)	>150.0%	>150.0%	>150.0%	>150.0%	△
第Ⅶ因子(PT)	<6.3%	6.30%	6.50%	<6.3%	<6.3%	<6.3%	<6.3%	△
第Ⅷ因子(APTT)	>144%	>144%	>144%	>144.0%	>144.0%	>144.0%	>144.0%	△
第Ⅸ因子(APTT)	117.00%	84.10%	69.60%	75.60%	97.80%	113.20%	78.60%	○
第Ⅹ因子(PT)	101.80%	70%	143%	>150.0%	>150.0%	>150.0%	>150.0%	○
第Ⅺ因子(APTT)	27%	19.20%	13.20%	8.40%	14.30%	17.90%	10.20%	△
第Ⅻ因子(APTT)	105.60%	107.60%	>129.0%	107.60%	>129.0%	>129.0%	100.00%	○
2%ADP 最大凝集率		0.20%	2.00%	<0.0%	0.70%	0.10%	1.00%	×?
10%ADP 最大凝集率		0.80%	1.40%	<0.0%	1.50%	2.90%	2.50%	×?
2%コラーゲン 最大凝集率		1.70%	0.50%	0.90%	1.70%	0.80%	2.70%	×?
5%コラーゲン 最大凝集率			0.10%	1.40%	2.20%	1.00%	3.60%	×?
リストセチン 最大凝集率			0.30%	1.10%	0.30%	1.40%	4.00%	×?
エピネフリン 最大凝集率			1.10%	1.80%	0.50%	1.90%	3.40%	×?
アラキドン酸 最大凝集率			2.00%	1.80%	1.70%	1.90%	4.80%	×?

表 2 ブタ血の血液凝固因子測定結果

ブタ	#1	#2	#3	#4	#5	判定
PT(レボヘムPT)	9.4sec	9.3sec	9.2sec	9.3sec	9.8sec	△
PT(トロンボレルS)	12.7sec	12.2sec	11.8sec	10.5sec	10.7sec	○
PT(デイドイノピン)	13.3sec	11.1sec	11.1sec	11.0sec	11.4sec	○
APTT (レボヘムAPTT)	20.9sec	12.3sec	12.0sec	12.1sec	11.5sec	△
APTT (アクテン)	21.6sec	9.0sec	9.0sec	10.5sec	10.5sec	△
APTT (アクチンFSL)	22.2sec	14.0sec	14.0sec	13.6sec	13.3sec	△
Fbg(トロンボチェックFib)	378.9mg/dL	277.8mg/dL	281.0mg/dL	190.5mg/dL	220.8mg/dL	○
AT	80.70%	103.60%	100.10%	102.00%	94.50%	○
α2-AP	>150%	>150%	>150%	141.40%	>150%	△
PLG	<5%	<5%	<5%	<5%	<5%	×
PC	18.10%	16.60%	26.40%	27.90%	15.20%	△
第Ⅷ因子合成基質	>144.0%	>144.0%	>144.0%	>144.0%	>144.0%	△
第Ⅸ因子合成基質	>180.0%	>180.0%	>180.0%	>180.0%	>180.0%	△
第ⅩⅢ因子合成基質	71.30%	104.70%	108.40%	90.20%	127.40%	○
vWF(L低濃度検体) 抗原量	>21.2%	>21.2%	>21.2%	>21.2%	>21.2%	○
vWF(M標準濃度検体) 抗原量	113.70%	90.30%	89.50%	117.10%	85.60%	○
vWF RcoF活性	49.30%	<48.00%	<48.00%	58.28%	<48.0%	△
FDP	<2.5 μg/ml	20.8 μg/ml	<2.5 μg/ml	34.0 μg/ml	<2.5 μg/ml	△
Dダイマー	0.5 μg/ml	<0.5 μg/ml	<0.5 μg/ml	<0.5 μg/ml	<0.5 μg/ml	○
FM	10.7 μg/ml	3.2 μg/ml	8.4 μg/ml	>150.0 μg/ml	10.7 μg/ml	△
第Ⅱ因子(PT)	85.60%	116.50%	116.50%	100.90%	94.80%	○
第Ⅴ因子(PT)	(14.5sec)	>150.0%	>150.0%	>150.0%	>150.0%	△
第Ⅶ因子(PT)	27.00%	55.80%	50.70%	62.30%	41.70%	△
第Ⅷ因子(APTT)	>144%	>144.0%	>144.0%	>144.0%	>144.0%	△
第Ⅸ因子(APTT)	>168.0%	>168.0%	>168.0%	>168.0%	>168.0%	△
第Ⅹ因子(PT)	140%	>150.0%	>150.0%	>150.0%	>150.0%	△
第Ⅺ因子(APTT)	60.70%	>135.0%	130.90%	>135.0%	>135.0%	○
第Ⅻ因子(APTT)	>129.0%	>129.0%	>129.0%	>129.0%	>129.0%	△
2%ADP 最大凝集率	<0.0%	<0.0%	2.70%	<0.0%	<0.0%	×?
10%ADP 最大凝集率	0.50%	0.60%	33.30%	2.50%	2.00%	×?
2%コラーゲン 最大凝集率	1.40%	1.60%	4.10%	0.50%	0.70%	×?
5%コラーゲン 最大凝集率	0.50%	1.30%	52.10%	4.10%	5.00%	×?
リストセチン 最大凝集率	1.00%	1.20%	0.60%	0.50%	0.00%	×?
エピネフリン 最大凝集率	1.00%	1.20%	1.00%	0.30%	0.00%	×?
アラキドン酸 最大凝集率	3.00%	2.50%	2.60%	1.90%	1.80%	×?

表3 ヒト血の血液凝固因子測定結果

ヒト	#1	#2	#3	#4	#5	#6	判定
PT(レボヘムPT)	11.3sec	10.7sec	10.1sec	11.3sec	10.7sec	10.7sec	○
PT(トロンボレルS)	13.0sec	12.1sec	11.9sec	13.0sec	12.4sec	12.8sec	○
PT(デイドイノビン)	12.0sec	11.9sec	13.0sec	17.0sec	14.1sec	11.9sec	○
APTT (レボヘムAPTT)	35.8sec	38.1sec	36.1sec	40.2sec	33.9sec	34.4sec	△
APTT (アクテン)	37.3sec	40.9sec	39.5sec	46.6sec	37.8sec	39.6sec	△
APTT (アクテンFSL)	32.2sec	36.5sec	33.0sec	34.7sec	35.4sec	35.0sec	△
Fbg(トロンボチェックFib)	294.6mg/dL	265.8mg/dL	277.8mg/dL	209.6mg/dL	274.7mg/dL	237.7mg/dL	○
AT	92.90%	101.20%	93.80%	102.50%	108.90%	109.30%	○
α2-AP	102.10%	116.10%	106.20%	110.50%	106.80%	114.20%	○
PLG	96.00%	100.00%	95.80%	93.50%	116.10%	100.00%	○
PC	77.90%	86.90%	101.10%	47.30%	115.30%	119.70%	○
第VIII因子合成基質	43.30%	24.40%	42.50%	37.40%	34.30%	43.80%	△
第IX因子合成基質	69.50%	85.50%	95.10%	58.10%	56.90%	50.40%	○
第X III因子合成基質	>150.0%	>150.0%	>150.0%	>150.0%	98.30%	116.60%	△
vWF(L低濃度検体) 抗原量	>21.2%	>21.2%	>21.2%	-	>21.2%	>21.2%	○
vWF(M標準濃度検体) 抗原量	94.00%	58.20%	83.10%	128.70%	81.00%	106.20%	○
vWF RcoF活性	54.03%	<48.00%	51.29%	105.37%	56.08%	84.58%	△
FDP	<2.5 μg/ml	8.1 μg/ml	<2.5 μg/ml	<2.5 μg/ml	<2.5 μg/ml	<2.5 μg/ml	○
Dダイマー	1.0 μg/ml	2.0 μg/ml	1.9 μg/ml	1.8 μg/ml	<0.5 μg/ml	<0.5 μg/ml	△
FM	<3.0 μg/ml	8.0 μg/ml	<3.0 μg/ml	<3.0 μg/ml	<3.0 μg/ml	<3.0 μg/ml	○
第II因子(PT)	92.00%	96.30%	100.90%	94.80%	123.70%	107.70%	○
第V因子(PT)	125.20%	135.40%	146.80%	83.20%	126.80%	106.40%	○
第VII因子(PT)	77.50%	83.00%	101.10%	124.60%	90.20%	102.40%	○
第VIII因子(APTT)	50.40%	28.10%	44.70%	47.20%	41.70%	53.90%	△
第IX因子(APTT)	77.60%	77.60%	90.80%	98.80%	91.10%	82.50%	○
第X因子(PT)	108%	92.90%	146%	>150%	131%	123%	○
第XI因子(APTT)	95.40%	71.30%	101.20%	84.90%	91.40%	78.90%	○
第XII因子(APTT)	64.70%	51.20%	54.10%	47.20%	76.60%	50.90%	△?
2%ADP 最大凝集率	19.10%	5.70%	9.40%	9.20%	4.00%	28.80%	△?
10%ADP 最大凝集率	50.50%	28.00%	44.70%	35.20%	37.80%	51.40%	△?
2%コラーゲン 最大凝集率	17.70%	34.50%	56.00%	31.30%	56.60%	57.90%	△?
5%コラーゲン 最大凝集率	42.90%	51.50%	61.80%	50.90%	67.40%	61.50%	△?
リストセチン 最大凝集率	65.90%	44.30%	64.80%	66.40%	71.00%	58.30%	△?
エピネフリン 最大凝集率	22.80%	17.10%	18.80%	21.60%	9.20%	39.50%	△?
アラキドン酸 最大凝集率	55.60%	48.70%	64.80%	67.20%	73.60%	59.00%	△?

ウシ血液では、全7ロットの試験血液について、血液凝固因子活性の測定を行った。PTやAPTTでは、分析試薬が異なる測定項目において差が見られた。ヒト血液の数値と一概に比較することは難しいが、血液凝固能評価として可能であると判断している。一方、線溶系のPLG、FDP、Dダイマーについては分析できず、血液凝固因子活性を測定することは不可であることがわかった。血小板凝集能については、入手した血液試料がクエン酸ナトリウムで抗凝固された保存血液であったため、現時点では、測定可能かの判断は難しい。ブタ血液では、全5ロットの試験血液について、血液凝固因子活性の測定を行った。PTやAPTTでは、ウシ血液とは異なり、#1のロットを除いて再現性は得られている。線溶系のPLGは測定できなかったが、FDPとDダイマーは測定の可能性が見いだされた。血小板凝集能についてはブタ血と同様に、今後判断が必要になる。ヒト血については、分析試薬が臨床用となっているため、すべての分析項目が測定可能であるが、それでも分析試薬が異なれば、数値も異なることが明らかであった。

人工心臓の血液適合性を評価するために、ウシやブタを使用した動物実験を実施することは重要である。しかし、人工心臓内で生じるせん断応力が引き起こす血栓形成や出血合併症を定量的に理解するためには、ヒト血液での分析と同等の血液凝固挙動を調べることは必須である。本研究成果によって、すべてではないものの、血液凝固活性を計測可能であることが明らかとなり、せん断応力応答因子の同定は十分可能であることが見いだされた。

令和2年度および令和3年度は、新型コロナウイルスの影響によって、また最終年度の令和4年度において、本提案者自身が大きな病気に罹患してしまい、入院・手術を経て、現在も治療中である。そのため、学会発表および論文発表がかなわなかった点は大変残念であった。しかし、本研究の学術的問いを突き止めるためのせん断負荷装置を完成させることができ、またヒト血、ウシ血およびブタ血において、血栓形成および出血に関するマーカーの計測可否を明らかにすることができた。今後の追加実験により、本研究目的を達成できるものと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 丸山 修、迫田大輔、小阪 亮、西田正浩、山根隆志
2. 発表標題 血液ポンプの溶血評価の重要性について
3. 学会等名 第59回日本人工臓器学会大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------