

特別講演

座 長 松 尾 理

新しい血栓形成準備状態測定法による予知とその栄養学的予防

山本順一郎

神戸学院大学栄養学部生理学研究室

キーワード：血小板反応性、血栓溶解、食物、Gorog Thrombosis Test

生活習慣病の予防対策確立は多くの国において緊急かつ重要な社会的課題となっている。生活習慣病発症の主たる危険因子は、不適当な栄養摂取、運動不足、過剰なストレスなどである。生活習慣病には血栓形成が密接に関係しており、血栓形成の予防は生活習慣病の予防でもある。本論文の目的は、新しい血栓形成準備状態測定法の紹介とその方法を用いた抗血栓性食物探索の試みについて述べることである。

A. 血栓形成準備状態（易血栓性）の測定

病的な血栓形成を予防するには、まず個々人の血栓形成準備状態を測定しなければならない。この目的のため、種々の血栓関連因子を測定する多くの *in vitro* の方法が開発され、広く用いられている。しかし、これらの方法はまだ開発途上にあり、血栓形成準備状態を十分に把握するには到っていない。そこで著者らは血栓性マーカー測定とは別の包括的な測定法を検討してきた。包括的測定法を確立するため、主として動物実験により *in vitro* における血栓形成準備状態を反映する *in vitro* の測定法を検討することにした。我々は原則として血液試料に何も加えないで、血栓形成準備状態が測定できる方法を模索することにした。文献検索の結果、KovacsとGorogが確立した測定法が我々の目的に合致していた。この測定法では抗凝固剤を加えない全血が用いられ、ズリ応力によって血小板が活性化され、血小板反応性、凝固能、血栓溶解能が測定される。この測定法の有効性を検討するため、実験動物の血管に血栓を形成する *in vitro*法とKovacsおよびGorogの開発した *in vitro*法（Haemostatometry、Thrombotic Status Analyser法、Gorog Thrombosis Test）で得られた結果を比較検討することにした⁽¹⁻⁴⁾。この比較においては、*in vitro*法で得られる結果を基準と考えた。

1. ヘリウム-ネオン（He-Ne）レーザー惹起血栓形成法（*in vivo*法）

本測定法の実験系を図1に示す。He-Neレーザーヘッドから発したレーザーを、ファイバーを介して顕微鏡々筒内に導入する。He-Neレーザーは顕微鏡々筒内のダイクロイックミラーで反射され対物レンズへ向かい、載物台に用意された実験動物の血管を照射する。照射径は対物レンズとレーザーヘッドに取り付けられたコリメーターで任意の大きさに変えられ、血管をピンポイントで照射する。血栓形成過程はCCDカメラによりモニター上に映し出され、同時にビデオに録画される。血栓画像は必要に応じて、画像解析ソフトにより処理される。血栓は以下の手順で形成される。ネンブタール麻酔下で、血管を露出した実験動物を顕微鏡載物台に乗せる。血管内に一定量のエバンスブルーを注入した後、He-Neレーザー照射により血栓を形成する。

ラット腸間膜細動脈に形成された血栓を図2に示す。図2左は照射前、右は照射後の透過電顕

図 1

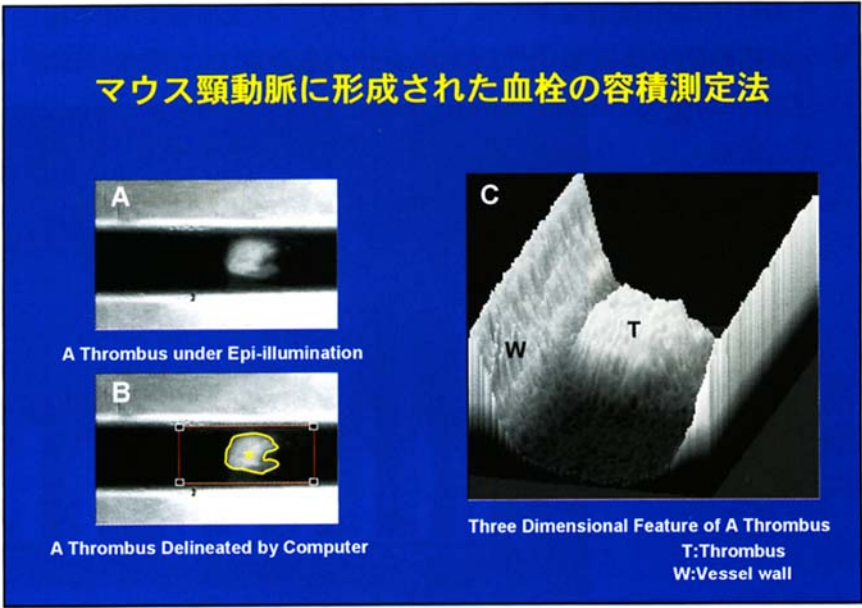


図 2



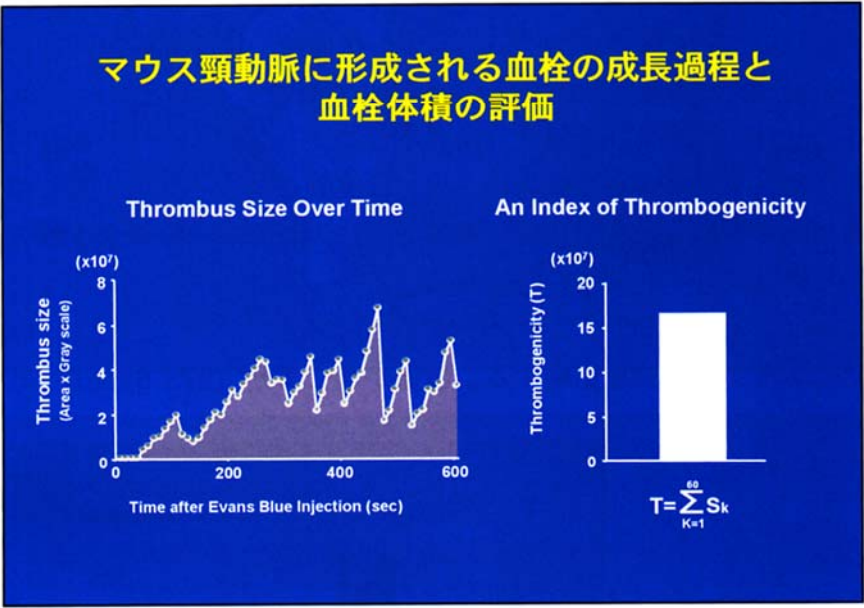
像である。血栓は血小板からなり、透過電顕の拡大をあげてもフィブリンは観察されない。また、血管内皮は照射後でも剥離されてなく、血小板血栓は血管内皮の上に形成されている。細静脈の場合でも同様である。マウス頸動脈に形成された血栓も血小板血栓であり、血管内皮は剥離していない。腸間膜微小血管など透過光下で観察できる血栓形成の場合と異なり、頸動脈の場合では、血栓サイズが画像解析ソフトを用いて定量化される（図3）。すなわち、血栓ができている頸動脈に一定の輝度値を与えて血栓の輪郭を決め、次いでこの面積に血栓の輝度値を乗じて血栓サイズを求める。血栓形成準備状態の判定法は血管と目的によって変えられる。腸間膜微小血管などのように血栓形成過程が透過光下で観察される場合には、血管を断続的に照射し（例えば5秒間照射、15秒間休止を繰り返す）、完全閉塞に要する照射回数で判定する。頸動脈のように透過光下で観察できない場合には、He-Neレーザーを連続で照射し、血栓形成過程を録画後、例えば10秒毎に1枚の画像を10分間にわたってPCに取り込み、画像解析により

図 3



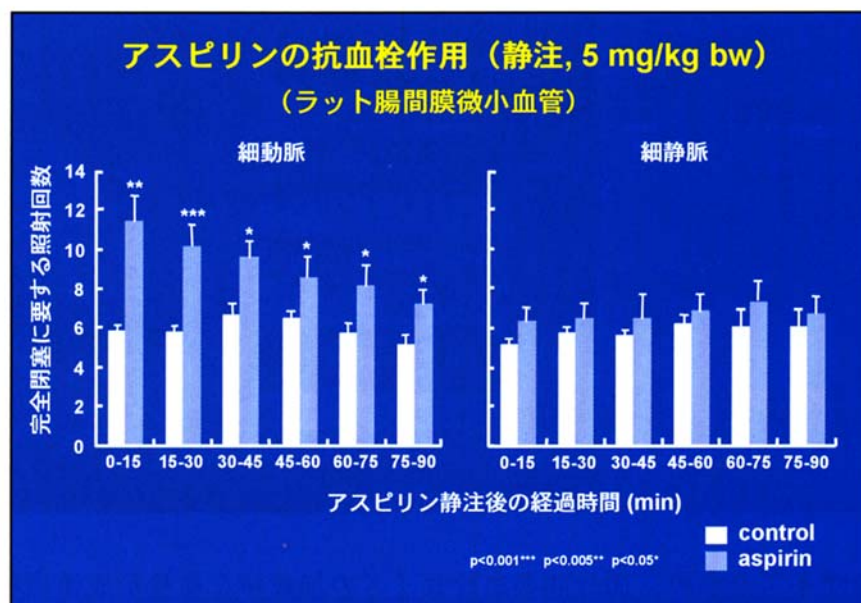
各血栓サイズを求め、10分間の血栓サイズの加算値を血栓形成準備状態の指標とする（図4）。マウス頸動脈では、血栓形成は完全閉塞までには到らず、血栓は飛翔血栓となって下流に流されるが、再び成長するというサイクルを繰り返す⁽⁵⁾。

図 4



ラット腸間膜微小血管を用いて、アスピリンの抗血栓作用を測定した結果を図5に示す。アスピリンは細動脈では抗血栓作用を示すが、細静脈では認められない⁽⁶⁾。

図 5

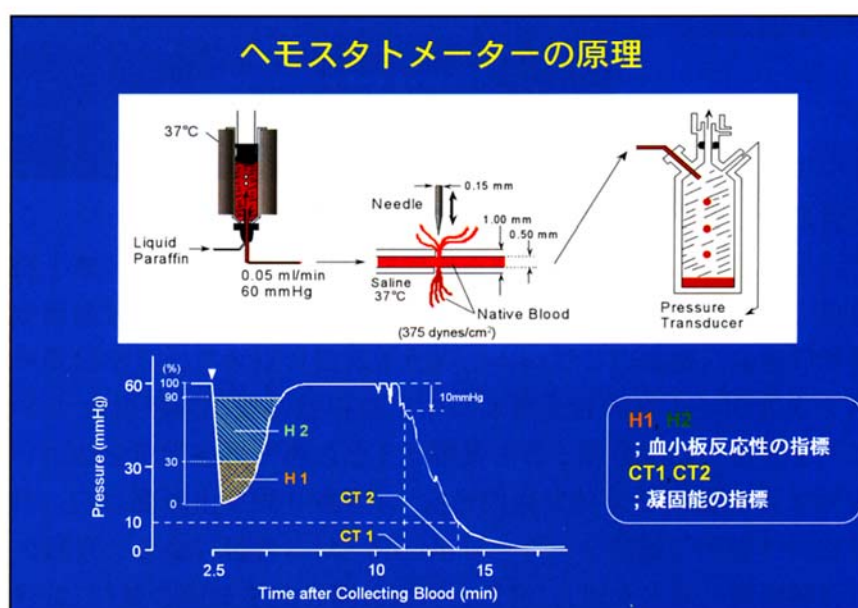


2. ズリ惹起血小板反応性測定法（*in vitro*法）

2-1. Haemostatometry

Haemostatometryの原理を図6に示す。採血後、抗凝固剤無添加の血液を含む注射筒を注射筒ホルダーに入れる（薬剤の効果を*in vitro*で測定する場合には、注射筒内に予め薬剤を入れておく）。注射筒の出口に直径1.0 mmのポリエチレンチューブを取り付ける。ひとつのチューブは流動パラフィンの入ったビンに、他方は流動パラフィンの入った廃液溜に接続する。一方より流動パラフィンを一定の速度で注射筒内に入れる。その結果、他方のチューブから血液が流れ出て廃液溜に入る。血液が廃液溜に入ると、流動パラフィンが上のチューブから流れ出るが、ここにおける抵抗のため、系内の圧は60 mmHgに保たれている。採血150秒後、直径0.15 mmの針でチューブの中央を穿刺する。出血が起こるが（375 dyne/cm²）、やがて穴に血栓が形成

図 6



され止血し、血液は廃液溜へと流れ続ける。その後チューブ内の血液が凝固し、その後凝固塊の溶解が起こる。これらの変化を圧変化として測定する。穿刺・出血により圧が下がるが、止血栓形成により圧が回復する。次いで凝固により圧が下がるが、血栓溶解がおこれば圧が上昇する。穿刺による圧の最大低下値から圧が30%回復したときの面積をH1、90%回復したときの面積をH2とし、血小板反応性の指標とする。採血から凝固により圧が10 mmHg低下するまでの時間をCT1、圧が10 mmHgに低下するまでの時間をCT2とし凝固能の指標とする。図7にチューブ壁の穿刺孔にできた止血栓の走査電顕像を示す。止血栓が血小板からなることが示されている。アスピリンおよび安定化PGI₂は*in vitro*において、H1とH2を増大させるが、CT1とCT2には影響を与えない(図8、9)。これらの形態的および薬理的结果から、止血栓は血小板血栓であることが示される。汎用されている他の測定法では、クエン酸ソーダおよびヘパリンで抗凝固された血液が用いられるが、Haemostatometryの場合にはこれらの血液では止血栓は形成されない⁽⁷⁾。

図7



図8

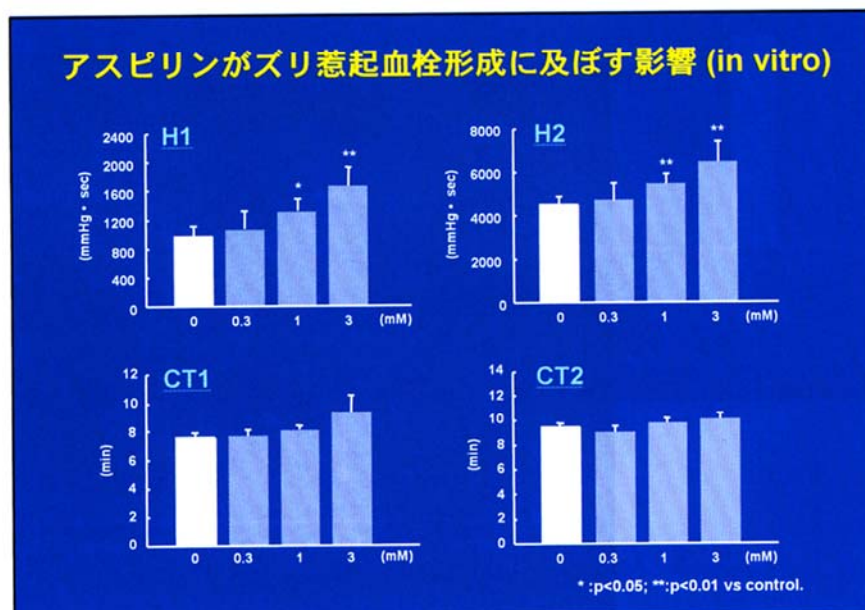
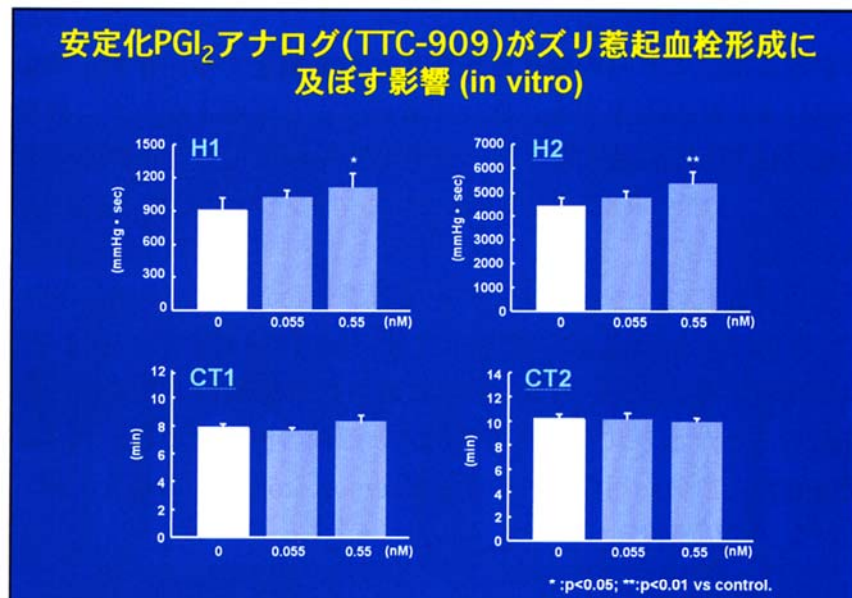


図 9



健常者に20分間の運動負荷を与え、負荷前後に採血し、血漿カテコールアミン濃度および血小板反応性をHaemostatometerで測定した。結果を図10、11に示す。運動により血小板反応性は亢進した。また、安静時に採血した血液に運動後に測定された濃度のカテコールアミンを添加し、血小板反応性に及ぼす影響を検討したところ、ノルエピネフリンは血小板反応性を亢進させたが、エピネフリンではその効果は認められなかった。この結果はHaemostatometryが感度の高い、生理的方法であることを示している⁽⁸⁾。

2.2. Thrombotic Status Analyser (TSA)

Haemostatometerでは針による穿刺でチューブ壁に穴を作成したが、TSAでは内径0.13 mmのチューブが予め組み込まれている。一定の陰圧下で、血液を一定の速度でチューブ内を流す(401 dyne/cm²)。止血栓形成による閉塞に到るまでの時間(OT)を血小板反応性、血栓溶解による血流停止から血流再開までの時間を血栓溶解能の指標とする。TSAを用いて、糖尿病、脳出血、ラクナ梗塞、出血と梗塞を伴わない脳卒中患者の血栓形成準備状態を測定し、汎用されている全血を用いたコラーゲン凝集、ADP凝集、血漿フィブリンノーゲン、FPA、D-dimer測

図10

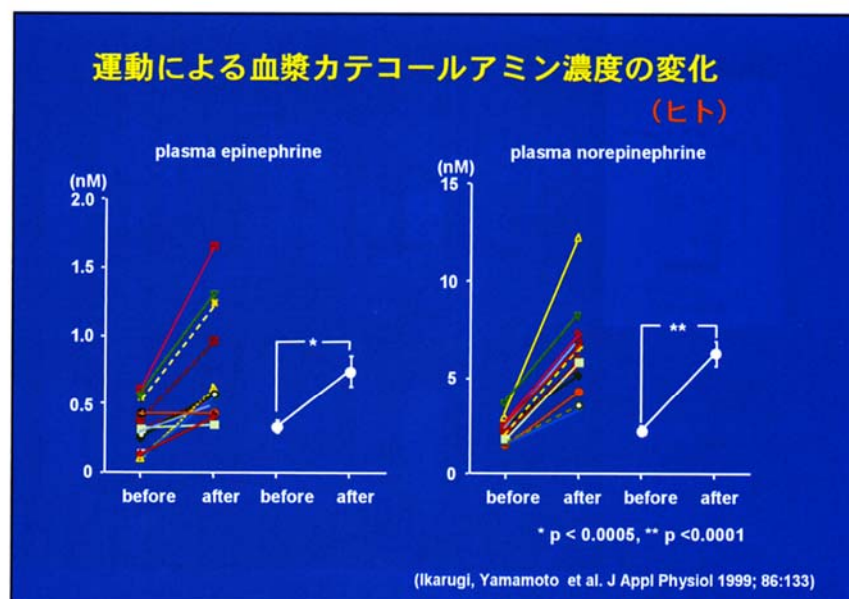
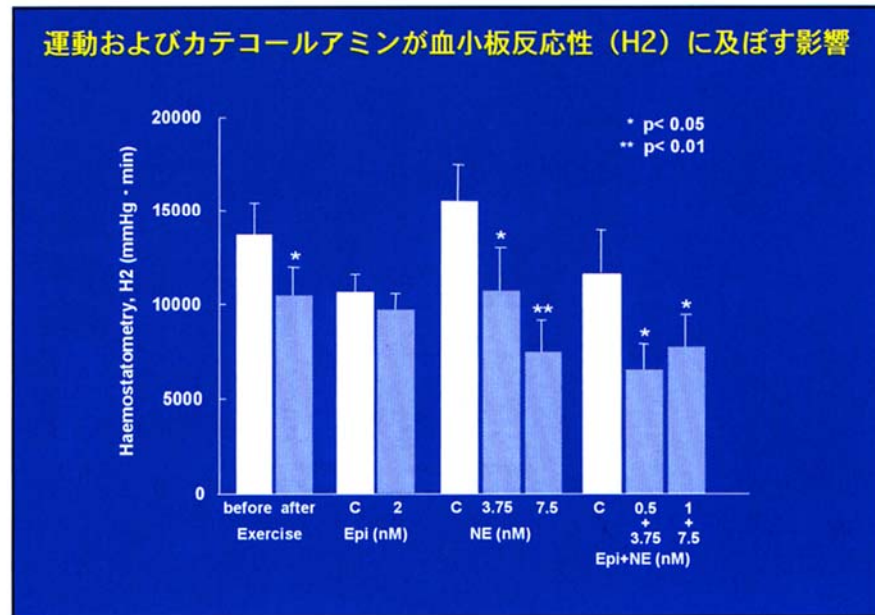


図11



定値と比較した。TSAの結果と他の測定法による結果は一致しなかった⁽⁹⁾。

2-3. ズリ惹起血小板反応性測定法 (*in vitro*) とHe-Neレーザー惹起血栓形成法 (*in vivo*) との相関

自然発症II型糖尿病ラットのGKラットとOLETFの血小板反応性をHaemostatologyとHe-Neレーザー惹起血栓形成法で比較した。結果を図12、13に示す。GKラットの場合、両測定法とも血小板反応性の亢進を示した。一方、OLETFの場合、両測定とも血小板反応性の抑制を示した⁽¹⁰⁾。これらの結果から両測定法の結果が一致することが示された。

図12

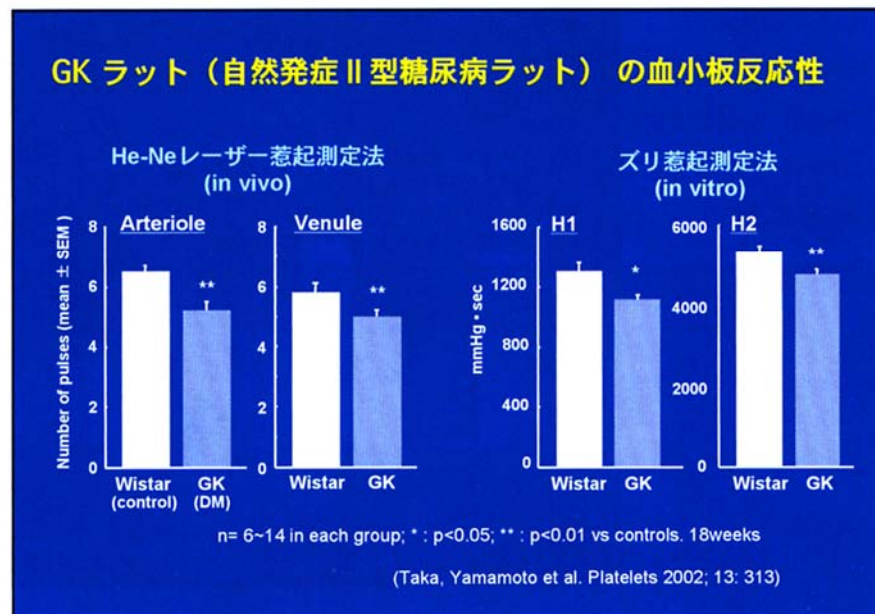
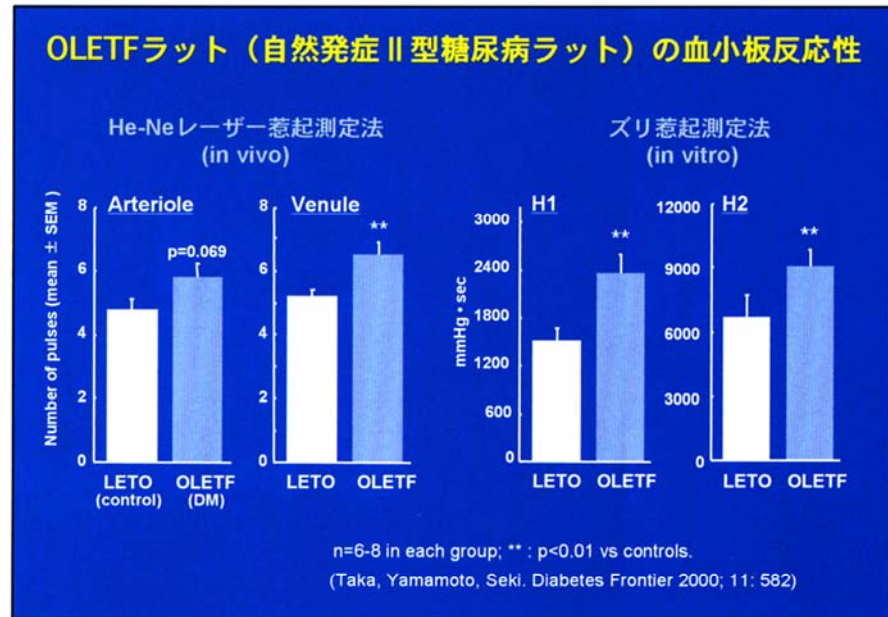


図13



しかし、脳卒中易発症高血圧ラットSHRSPの場合、Haemostatometryでは血小板反応性の抑制が認められたのに対し、He-Neレーザー惹起血栓形成法では血小板反応性の亢進が見られた（図14）。この原因を明らかにするため、臨床検査において用いられている反応性充血法をラットに適用することにした。血流を5分間遮断した後、遮断を解放して血流を元に復し、遮断前後の大腿動脈の血管径を比較した（図15）。SHRSPでは血流遮断解放後に血管弛緩が起こらず、血管内皮機能が損傷されていることが示された⁽¹¹⁾。内皮機能損傷が大きい場合には、両測定法に乖離が起こることが示され、ズリ惹起血小板反応性測定法の限界も示された。

図14

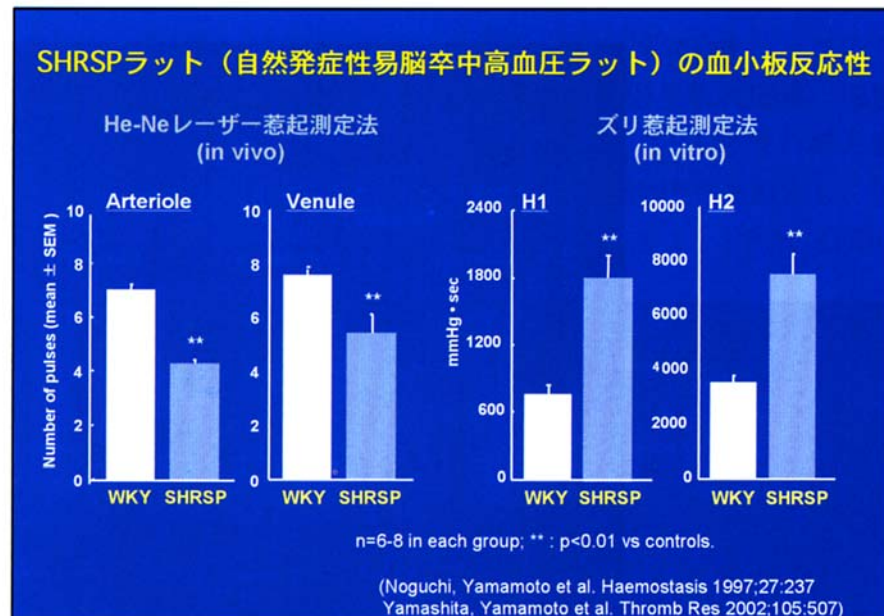
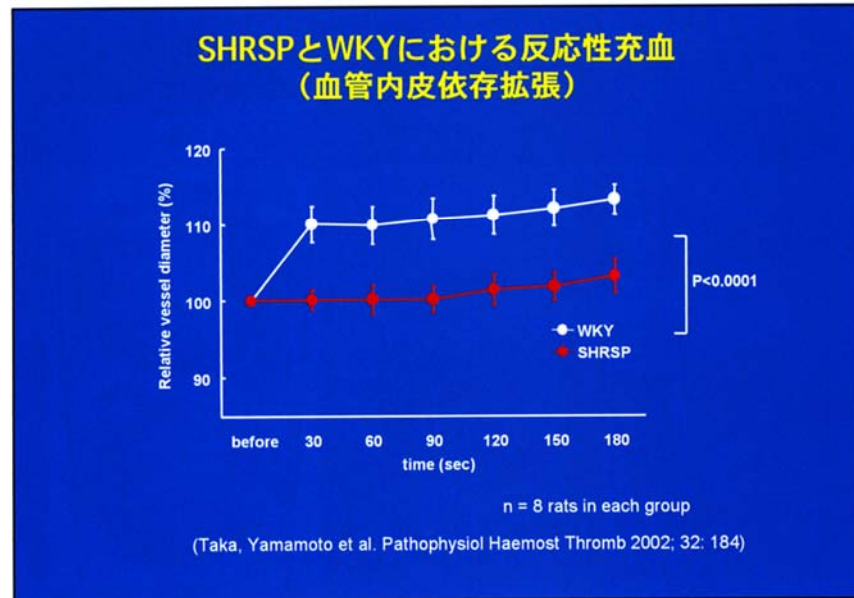


図15



以上の結果から、ズリ惹起血小板反応性測定法 (*in vitro*) とHe-Neレーザー惹起血栓形成法 (*in vitro*) とのよい相関が示され、ズリ惹起血小板反応性測定法は優れた*in vitro*測定法であることが示されたが、また限界も示された。

2-4. Gorog Thrombosis Test (GTT)

測定原理は上記のHaemostatometerとTSAと同じであるが、血液を重力下で流すため、それらのような特別の装置を必要とせず、また細かい間隙への血液の流入が滑らかであり、簡便で再現性が高く、ベッドサイドにおける測定に使用可能な小型 (16×20×16 cm) のGTTが開発された (www.gorogthrombosistest.com)。この測定に使用されるディスプレイザブルチューブの下端には、図16に示すように向かい合う2組の平面が作成されており、中に大小2個のスチールボールが入っている。そのため平面部分とボールの間に間隙ができる。一定量の血液がディスプレイザブルチューブに入れられると、血液は上下2ヶ所の間隙を通過した後液滴となって落下する。落下する液滴の間隔が読み取られ記録される。図17に示すように、上のボールのところの間隙を血液が通過するとき生じるズリ応力により血小板が活性化される (加える血液量が4.0

図16

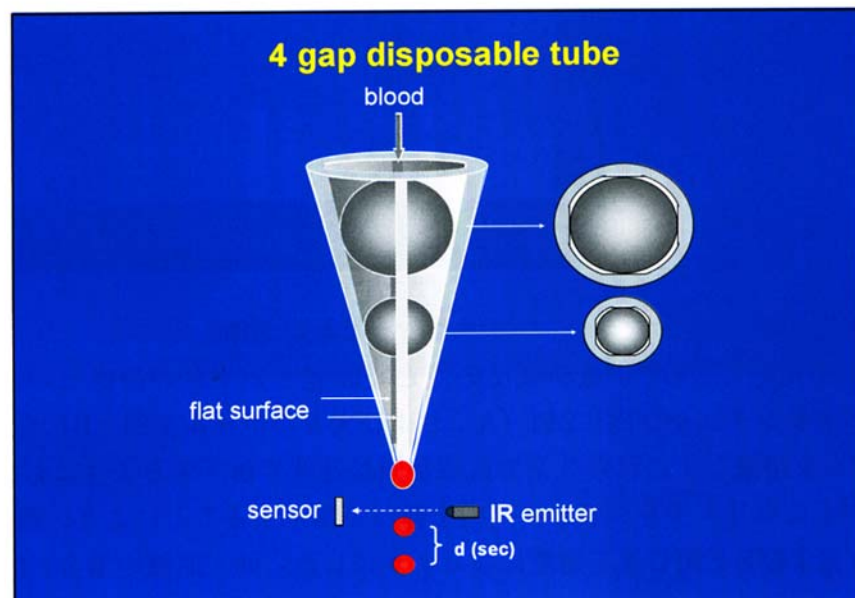
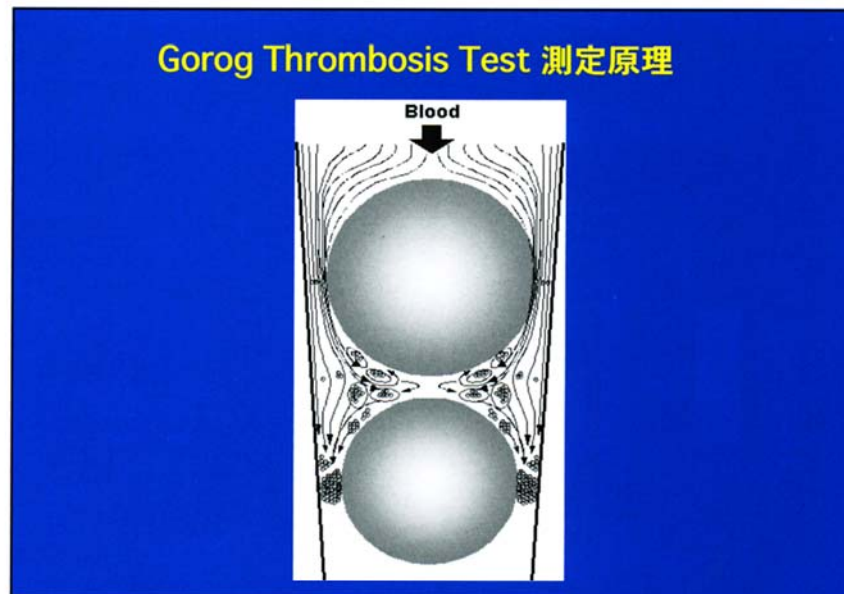
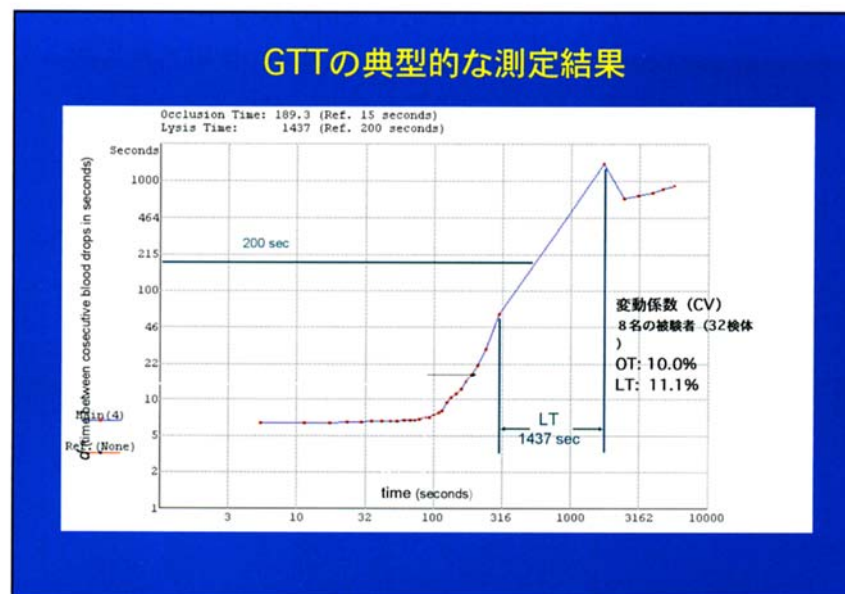


図17



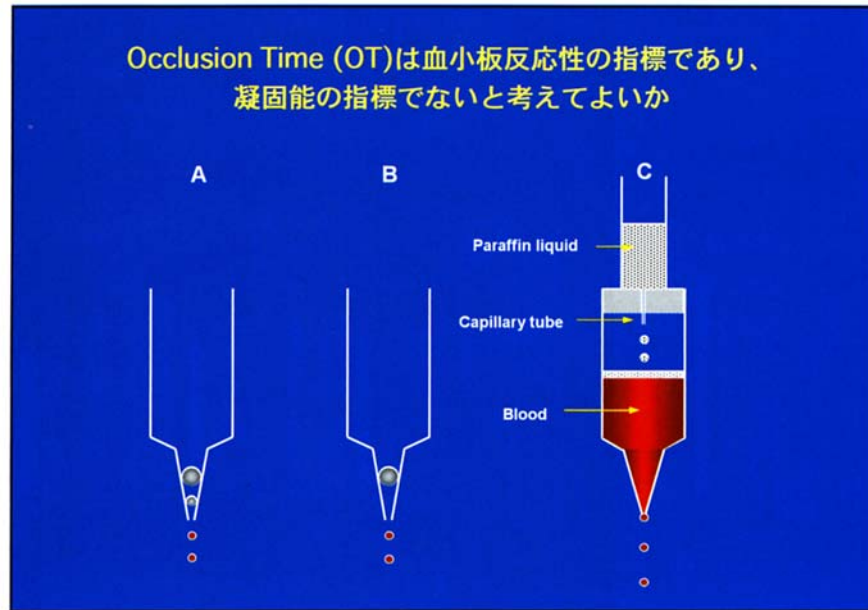
mlの場合175dyne/cm²、2.8 mlの場合、147 dyne/cm²)。活性化された血小板は大小2個のボール間で凝集塊を形成し、下のボールのところの間隙を塞ぎ、血液落下速度を遅くする。得られる落下間隔-時間経過結果を図18に示す。血液滴の最初の落下から落下間隔が15秒に達するまでの時間を血小板反応性の指標とする (Occlusion Time, OT)。また、落下間隔が200秒を越えた後、次の落下までの時間を測定し、直前の落下までの時間との差を血栓溶解能の指標とする (Lysis Time, LT)。

図18



本測定法においても、試料の血液には抗凝固剤が加えられていないので、図19に示すような実験系を用いて、OTが血小板反応性と凝固能のいずれの指標なのかを検討した。すなわち、ポリエチレンチューブ内に2個 (A) および大きなボール1個 (B) を入れた系とボールなしの系 (C) を用意し、これら3系で血液が同じ速度で落下するようにした。(C) では流動パラフィンが上のポリエチレンチューブ内を通過して落下することにより、落下速度にブレーキがかかり、AおよびBと同じ落下速度になるようにした。同一血液の場合、(A)、(B)、(C)のOTはそれ

図19



ぞれ186.7、620.1、988.9秒であり、(A)におけるOTは凝固能ではなく血小板反応性の指標であることが示唆された。次いで、血小板膜GPIIbに対するモノクローナル抗体と阻害剤オーリントリカルボキシリクアシッド(ATA)を加えた血液をGTTで測定した。これらの阻害剤の濃度に依存したOTの延長が認められた(図20)。血小板膜GPIIb/IIIaに対するモノクローナル抗体および阻害剤を加えた血液の場合も、これらの濃度に依存したOTの延長が認められた(図21)。次いでvWFおよびフィブリンノーゲンに対するポリクローナル抗体を加えた血液を測定した。前者では抗体濃度に依存したOTの延長が認められたが、後者では抗体の影響は認められなかった(図22)⁽⁴⁾。この結果はcone-plateを用いた池田らの報告と一致した⁽¹²⁾。

図20

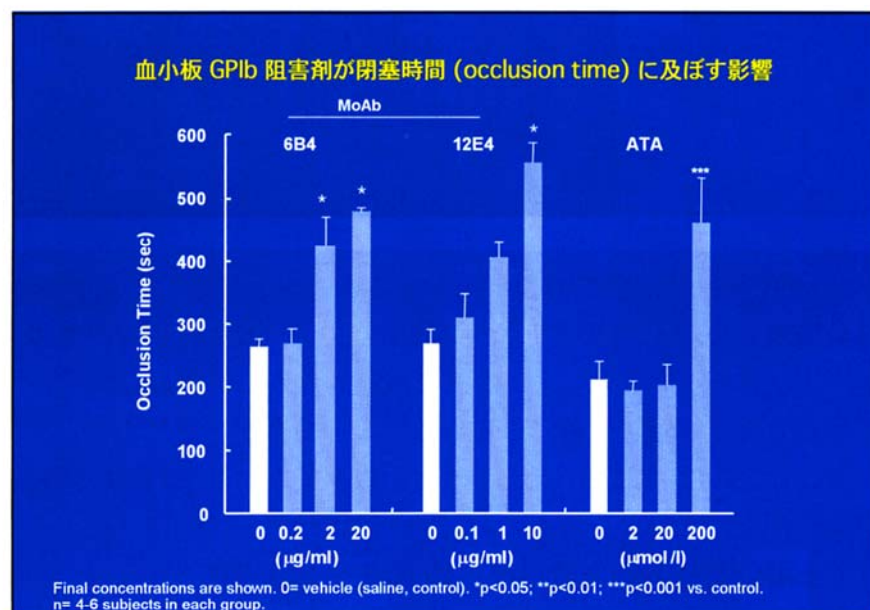


図21

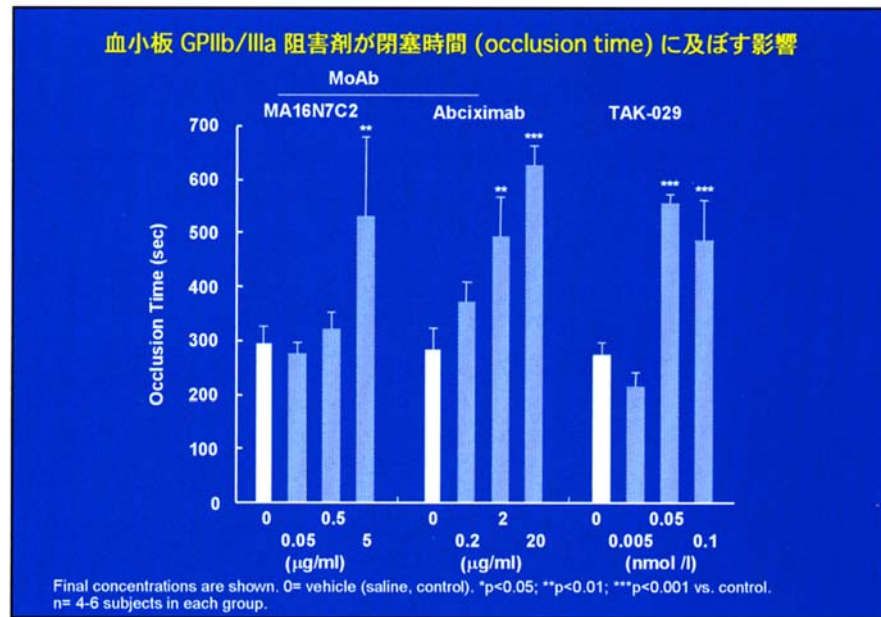
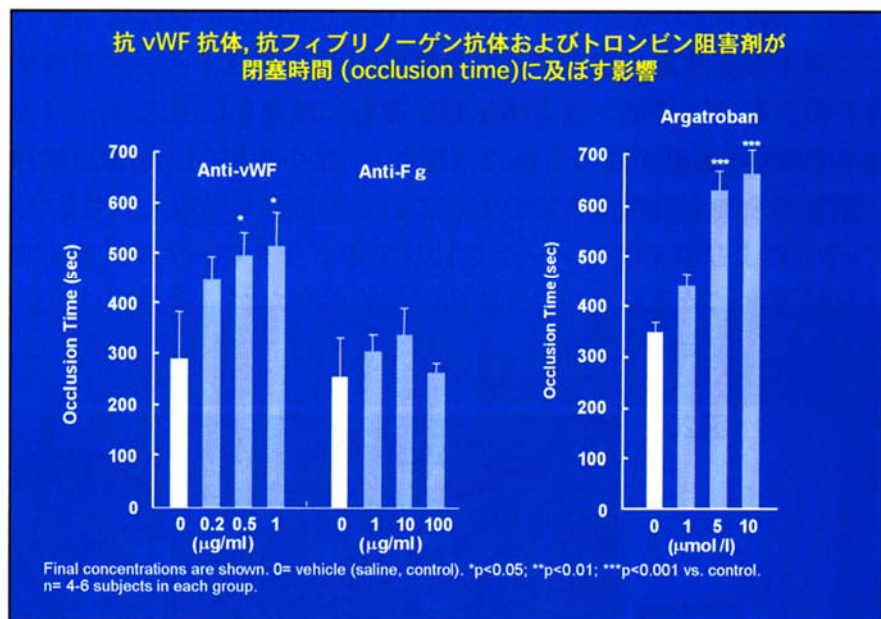


図22



次いで、LTが血栓溶解能の指標足りうるか否かを検討した。tPAおよびSK添加によりLTはそれらの濃度に依存して短縮した（図23）。しかし、OTには有意な影響は認められなかった。また、サイトカラシンBを加えた血液で測定したが、影響は認められず、LTの短縮は血栓溶解によるものであり、血餅退縮によるものでないことが示された⁽⁴⁾。

以上のことからGTTにおけるOTは血小板反応性、LTは血栓溶解能の指標として使用可能なことが示された。

3. GTTを用いたヒトの血栓形成準備状態

3-1. 血小板反応性および自発的血栓溶解能に及ぼす加齢の影響

結果を図24、25に示す。加齢に伴い血栓溶解能は低下したが、血小板反応性には有意な変化は認められなかった。また加齢による血栓溶解能の低下は男性では明らかなのに対して、女性では傾向は認められるものの有意ではなかった^(13,14)。

図23

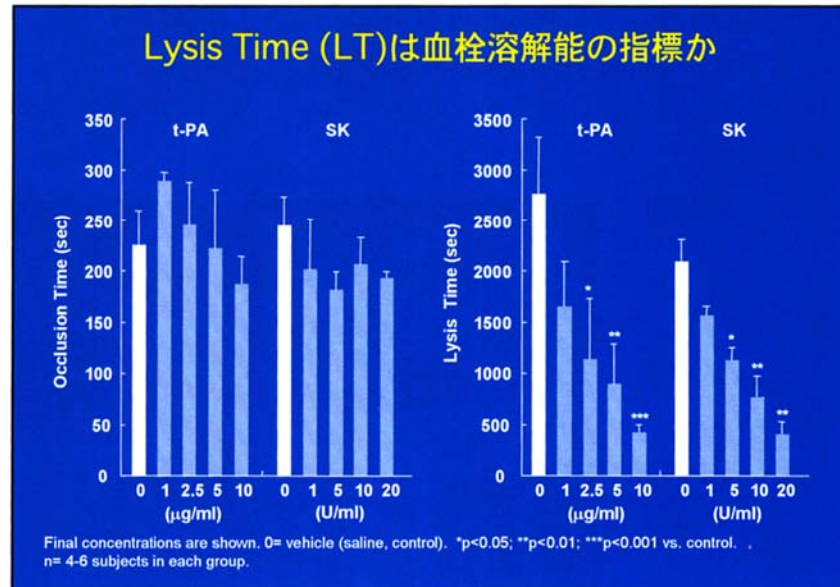


図24

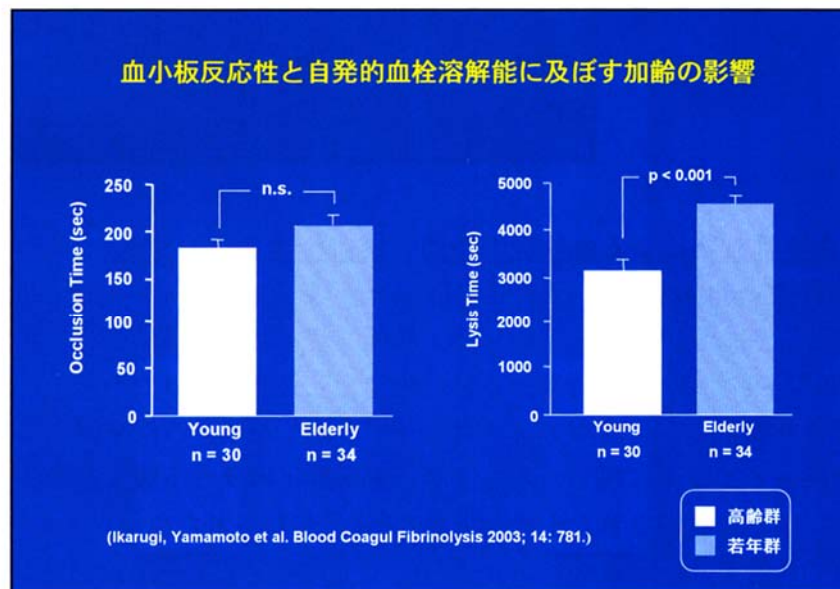
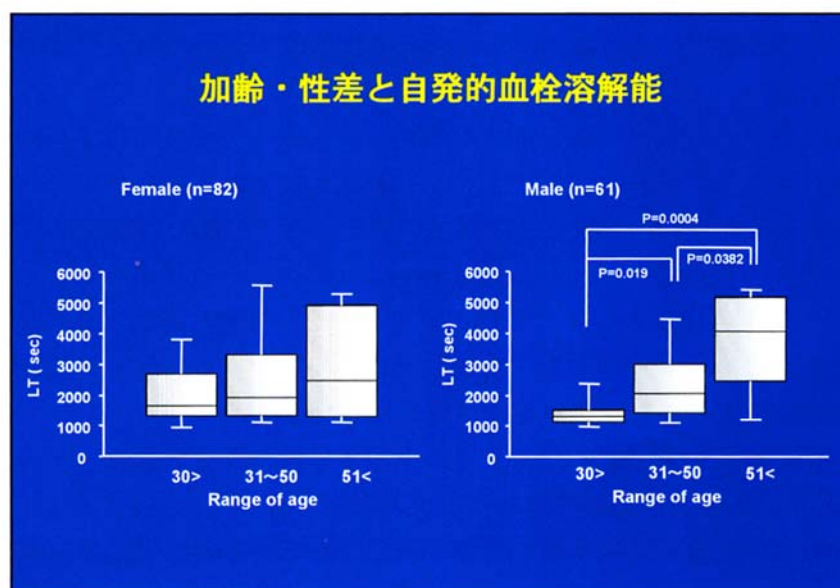


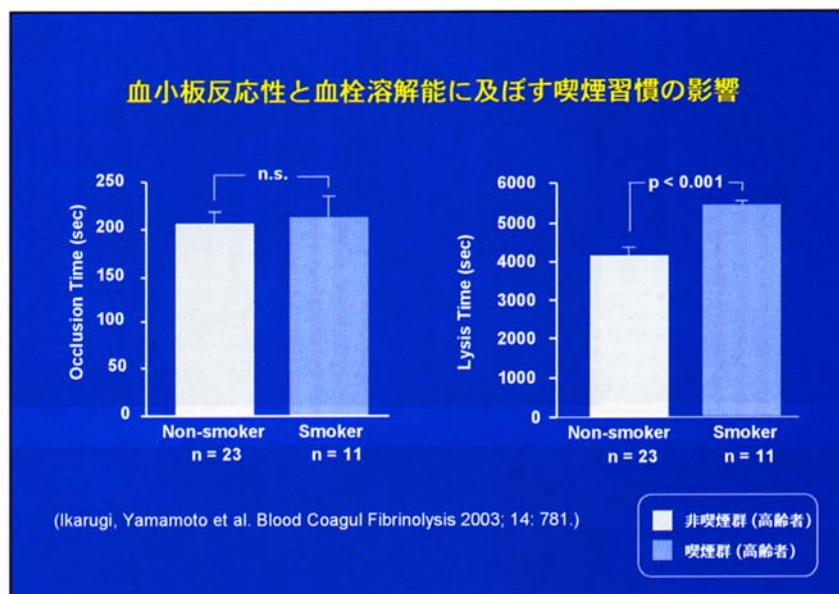
図25



3-2. 血小板反応性および自発的血栓溶解能に及ぼす喫煙習慣の影響

図26に示すように、血小板反応性への影響は認められなかったが、血栓溶解能は喫煙により有意に低下した。また、この低下は年齢と関係し、若年の喫煙者では低下傾向は認められるが、有意ではなかった⁽¹³⁾。

図26



B. 抗血栓性食物による血栓症の予防 (抗血栓性食物の探索)

上記のHaemostatometer/GTT (*in vitro*) およびHe-Neレーザー惹起血栓形成法 (*in vivo*) を用いて、抗血栓性食物を探索した。品種に着目し、1種につき、同じ圃場で同じ年に栽培された約15品種を用いた。野菜あるいは果物を乳鉢あるいはプラスチックのすりおろし器を用いて搾汁液を調製し、ミリポアフィルターでろ過した後、ろ液を測定まで-80℃で保存した。測定時に解凍して室温に戻し、ネンブタール麻酔下のラット腹大動脈より抗凝固剤を加えないで採血し、37℃に保温された生理食塩水で2倍に希釈された血液に加えた(ろ液：希釈血液=1：9)。この血液をHaemostatometerまたはGTTで測定し、抗血栓性野菜・果物をスクリーニングした。次いで、*in vitro*で抗血小板活性および血栓溶解能が認められたろ液をマウスに経口投与し、マウス頸動脈にHe-Neレーザー惹起血栓形成法 (*in vivo*) により血栓を形成し、抗血栓作用を測定した。

搾汁液から得られたろ液を生食で希釈し、抗血小板活性を示す有効最大希釈度により、イチゴ品種をクラス分けした(図27)。最も強い抗血小板活性を示した品種のろ液をマウスに経口で投与し、抗血栓作用を投与2時間後に測定した(図28)。対照群には蒸留水を投与したが、*in vitro*で抗血小板活性を示した品種は*in vivo*において血栓形成を阻害し、抗血栓作用を示した⁽¹⁵⁾。更にKYst-4を人ボランティアに経口投与し、2時間後に採血してGTTで測定した。*in vitro*で抗血小板作用を示さなかった“女峰”はGTT測定(*ex vivo*)で抗血小板活性を示さなかったが、“濃姫(KYst-4)”は抗血小板活性を示した(図29)⁽¹⁶⁾。

ニンジン15品種を測定したが、その中の3品種の成績を示す(図30-32)⁽¹⁷⁾。加熱調理を考慮し、100℃、10分間の加熱処理したろ液の測定も行った。結果の値はGTT測定(*in vitro*)における対照値(生食)に対する相対値で表している。品種SAKATA-0418では、加熱前に血小板

図27

イチゴ搾汁液の強度判定結果 (H2: 血小板反応性, in vitro)
— ヘモスタトメトリー —

(ラット)

阻害/促進	イチゴ品種
+4	KYST-4, KYSt-11, KYSt-17
+3	
+2	KYST-1, KYSt-5, KYSt-7, KYSt-8, KYSt-9
+1	KYST-12, KYSt-13
0	KYST-3, KYSt-6, KYSt-10, KYSt-14 KYSt-15, KYSt-16
+/-	KYST-2

+:阻害; -:促進; +/-:不明

図28

3品種のイチゴが
血栓形成に及ぼす影響
(経口投与, in vivo)
(マウス)

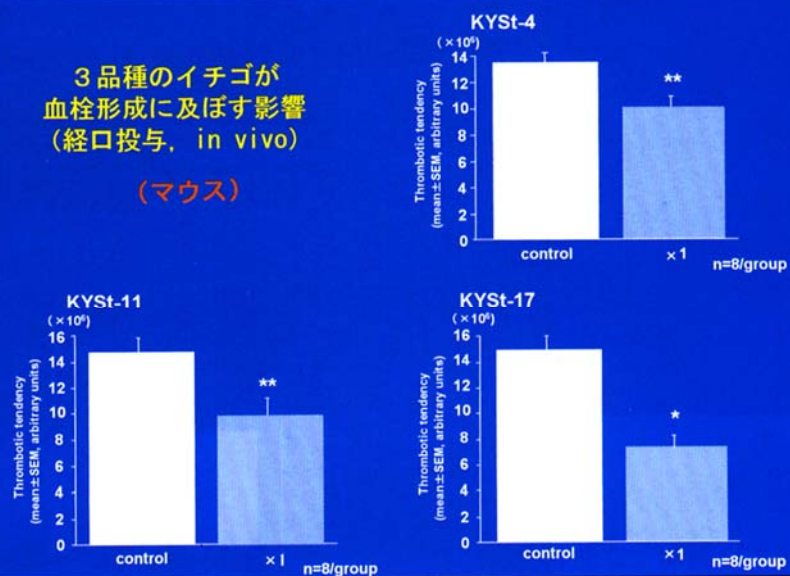
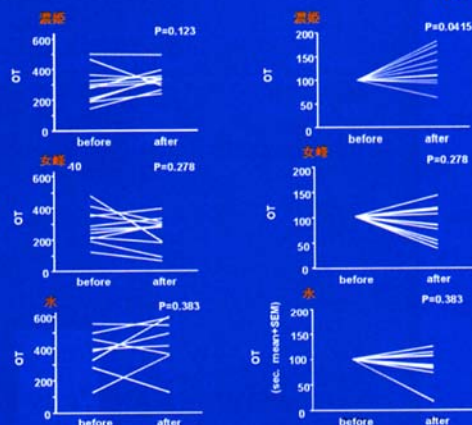


図29

経口摂取後の血小板反応性 (GTT, ex vivo)

(ヒト, ex vivo)



(Naemura, Yamamoto et al. Pathophysiol Haemost Thromb 2006; 35: 398)

図30

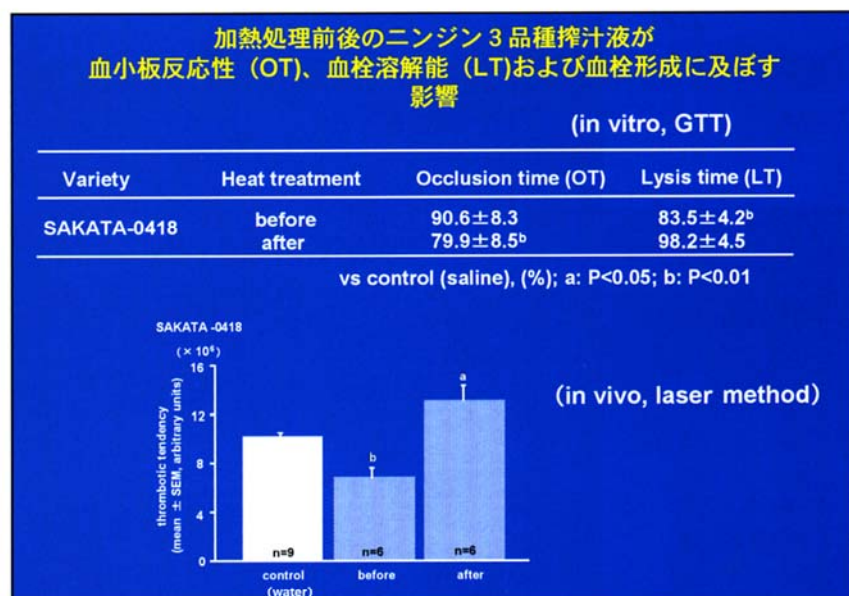


図31

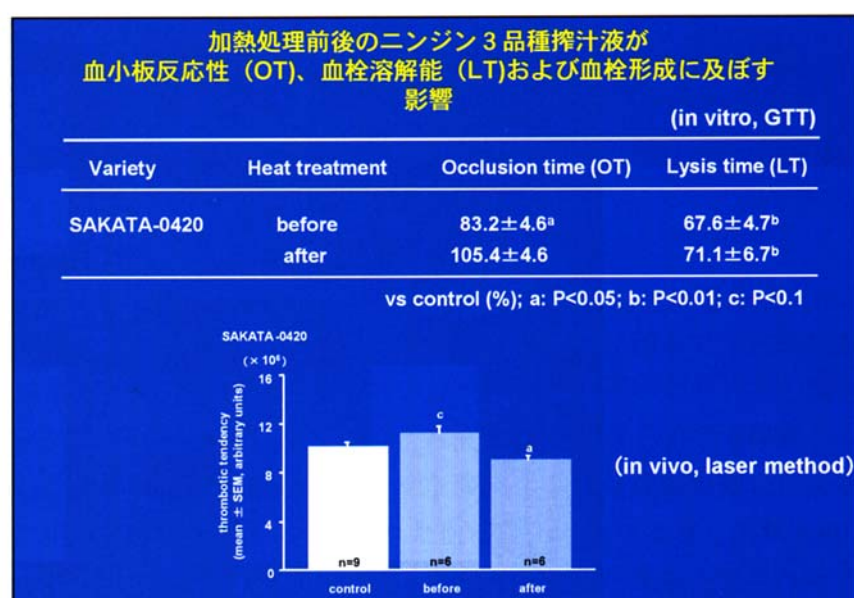
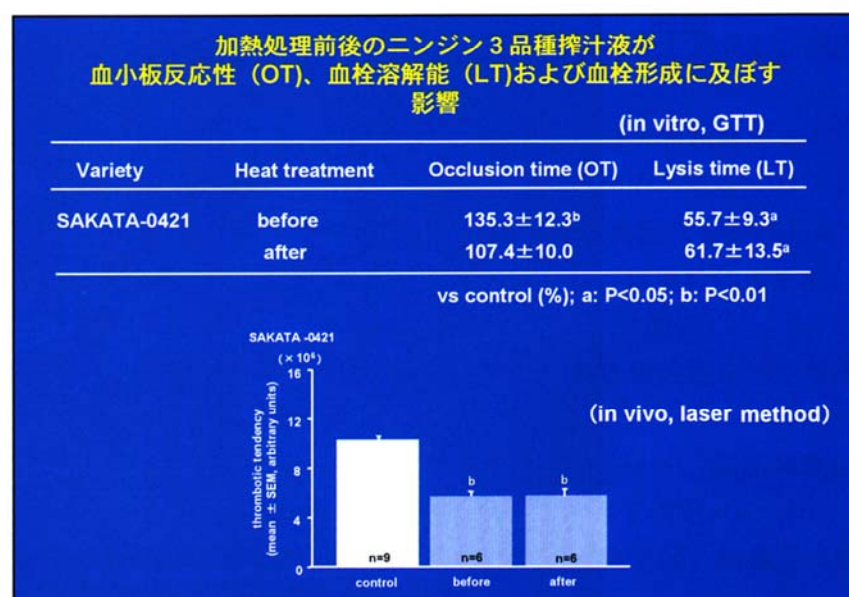


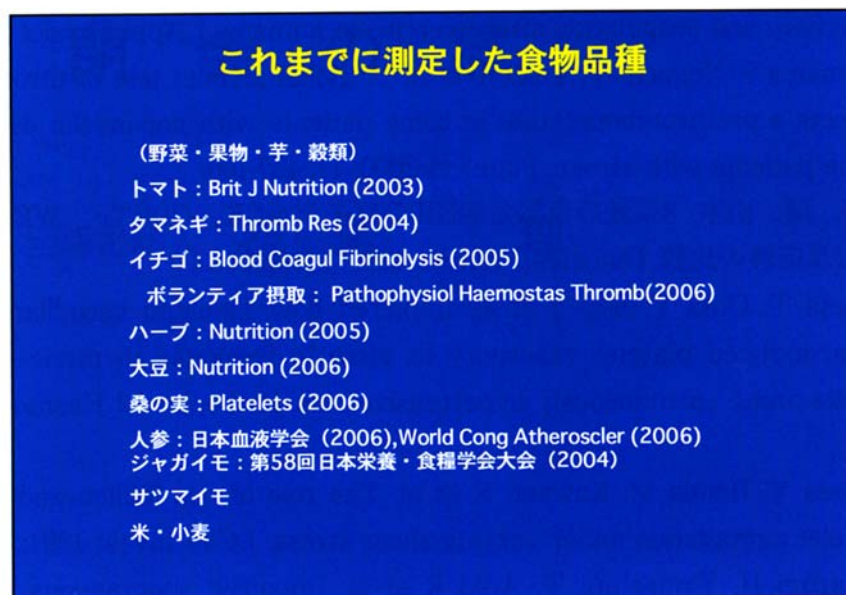
図32



反応性には有意な影響が認められなかったが、血栓溶解能を有意に亢進した。この試料をマウスに経口投与し *in vivo* で抗血栓作用を測定すると、血栓形成が有意に抑制された。しかし、加熱後では、*in vitro* において血小板反応性を有意に亢進し、一方、血栓溶解能は消失した。この試料の経口投与では、有意に血栓形成が亢進した (*in vivo*)。SAKATA-0421は加熱に関係なく、抗血栓作用を示した。

以上の結果から、同一種においても品種によって血栓形成に与える影響が異なることが明らかにされた。また、血栓形成に及ぼす影響は血小板反応性と自発的血栓溶解の両者に及ぼす影響によって決められることが示された。これまでに図33に示す食物の抗血栓作用を検討している。

図33



C. 終わりに

Gorog Thrombosis Testは血小板反応性と血栓溶解能の両者が測定可能な、簡便なベッドサイドで測定できる血栓形成準備状態測定法である。また、内在性血栓溶解能も血栓形成準備状態に重要な働きを果たしていることが示唆された。更に、血栓性疾患の予防に、個人の血栓形成準備状態に応じたオーダーメイドの栄養学確立の可能性が考えられた。

引用論文

1. Kovacs IB, Hutton RA, Kernoff PB. Hemostatic evaluation in bleeding disorders from native blood. Clinical experience with the hemostatometer. Am J Clin Pathol. 1989;91: 271-279.
2. Ratnatunga CP, Edmondson SF, Rees GM and Kovacs IB. High-dose aspirin inhibits shear-induced platelet reaction involving thrombin generation. Circulation 1992; 85:1077-1082.
3. Gorog DA, Kovacs IB. Thrombotic status analyser. Measurement of platelet-rich thrombus formation and lysis in native blood. Thromb Haemost. 1995; 73:514-520.
4. Yamamoto J, Yamashita T, Ikarugi H et al. Gorog Thrombosis Test: A global *in vitro* test of platelet function and thrombolysis. Blood Coagul Fibrinolysis 2003; 14: 31-39.

5. Ijiri Y , Miura M, Hashimoto M et al. A new model to evaluate the diet-induced prothrombotic state, using He-Ne laser-induced thrombogenesis in the carotid artery of apolipoprotein E-deficient and low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2002; 13: 497-504.
6. Nagamatsu Y, Yamamoto J, Fukuda A et al. Quantification of leucocyte elastase and cathepsin G in plasma by a simple method: Effect of elastase in plasma levels of D-dimer and thrombomodulin. *Clin Lab Haematol* 1996; 18: 29-34.
7. Yamamoto J, Taka T, Nakajima S et al. A shear-induced in vitro platelet function test can assess clinically relevant anti-thrombotic effects. *Platelets* 1999; 10: 178-184.
8. Ikarugi H, Taka T, Nakajima S et al. Norepinephrine, but not epinephrine, enhances platelet reactivity and coagulation after exercise in humans. *J Appl Physiol* 1999; 86: 133-138.
9. Nakajima S, Noguchi T, Taka T et al. A global platelet test of thrombosis and thrombolysis detects a prothrombotic state in some patients with non-insulin dependent diabetes and in some patients with stroke. *Platelets* 2000; 11: 459-466.
10. 高, 関, 山本. 3系統の自然発症NIDDMモデルGK, OLETF, WBN/Kobラットにおける血小板反応性の比較. *Diabetes Frontier* 1999; 10: 582-583.
11. Taka T, Ohta Y, Seki J et al. Impaired flow-mediated vasodilation in vivo and reduced shear-induced platelet reactivity in vitro in response to nitric oxide in prothrombotic, stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2002; 32: 184-189.
12. Ikeda Y, Handa M, Kawano K et al. The role of von Willebrand factor and fibrinogen in platelet aggregation under varying shear stress. *J Clin Invest* 1991; 87: 1234-1240.
13. Ikarugi H, Yamashita T, Aoki R et al. Impaired spontaneous thrombolytic activity in elderly and in habitual smokers, as measured by a new global thrombosis test. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2003; 14: 781-784.
14. Yamashita T, Sato A, Ikarugi H et al. Significantly reduced spontaneous thrombolytic activity in older men: a possible explanation for the gender differences in risk of acute coronary syndromes. *Thromb Res* 2005; 116: 127-131.
15. Naemura A, Mitani T, Ijiri Y et al. Anti-thrombotic effect of strawberries. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2005; 16: 501-509.
16. Naemura A, Ohira H, Ikeda M et al. A strawberry variety with experimental antithrombotic effect inhibits thrombotic status in humans. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2006; 35: 398-404.
17. Yamamoto J, Naemura A, Ijiri Y et al. Testing various vegetables for anti-thrombotic effect: II. Carrots. XIV International Symposium on Atherosclerosis (June 2006, Rome, Italy)