

静脈血栓症発現機構に関する実験シミュレーション研究

貝原 真^{*}、岩田 宏紀[§]、姫野 龍太郎[#]

^{*}理化学研究所 生体力学シミュレーション特別研究ユニット
埼玉県和光市広沢 2 - 1

email: kaibara@postman.riken.go.jp

[§]山形大学 医学部

山形県山形市飯田西 2 - 2 - 2

email: iwatah@med.id.yamagata-u.ac.jp

[#]理化学研究所 生体力学シミュレーション特別研究ユニット
埼玉県和光市広沢 2 - 1

email: himeno@postman.riken.go.jp

要旨 血流停滞に近い状態での血液凝固、血栓形成を *in vitro* で調べるために開発したレオロジー計測システムを用いた測定・解析および生化学的分析から、赤血球膜に存在する酵素による凝固第 IX 因子 (factor IX, F-IX と略す) の活性化がトリガーとなって起こる血液凝固反応が存在することを明らかにしてきた。本研究は、この血液凝固反応機構の体系化を目指すとともに、*in vitro* シミュレーション実験により静脈血栓症病態発現との関連を明らかにすることを目的とする。赤血球膜の F-IX 活性化酵素の抽出、精製、同定を行い、酵素の活性化能を調べた。正常者および疾患者の血液凝固のレオロジー的方法による測定から、赤血球によって惹起される凝固反応は全体の 70% 程度であることがわかった。この凝固反応は、流れのズリ速度の増加および mechanical disturbance の負荷によって抑制された。血液の流れが長時間停滞した状態で血管内皮細胞の抗血栓性機能は低下しないことから、赤血球によって惹起される血液凝固は、静脈血栓形成のトリガー機構の一つと考えられる。

1. はじめに

血栓形成には、血流、血液成分、血管壁の性状が関係していることは古くから知られている。静脈血栓は赤色血栓とも呼ばれ、フィブリン網目の中に主に赤血球が取り込まれたクロットであり、血液の流れが停滞するとでき易くなる。赤色血栓は、流れが速いときに血小板が活性化して起こる白色血栓とは本質的に異なる。

血液凝固 (フィブリンクロットの形成) 反応には、外因系と内因系の 2 つがある。外因系凝固反応では、血管壁が損傷したときに出現する組織因子と凝固因子 (F-VII) が反応することにより最終的にトロンビンができる。内因系凝固反応は、血液中の凝固因子 (F-XII あるいは F-XI) が活性化すると起こる反応

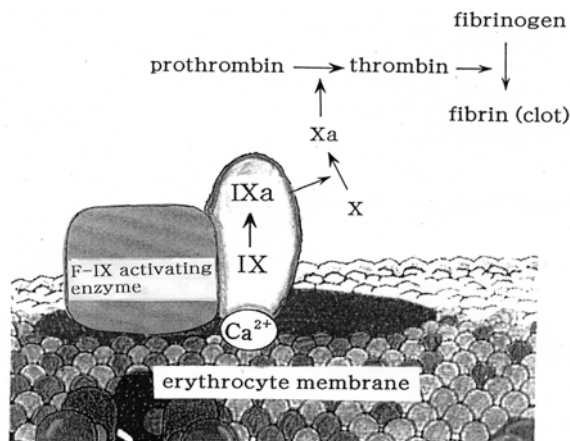


図1 赤血球膜表面の酵素によって惹起される血液凝固反応

で、この反応の生体内での意義については良くわかっていない。さらに、静脈血栓形成には、最初に内皮細胞の損傷が起こる必要があるのか、あるいは内皮細胞の損傷は起こらなくても血流が停滞しただけで起こるのかについても不明である。

正常な赤血球は血液凝固に関与しないと考えられてきた。我々は過去10年以上の研究から、赤血球膜の酵素による凝固因子の活性化がトリガーとなって起こる凝固反応があるとの考えの基に研究を進めてきた(図1)。本研究では、この説を証明するために赤血球膜に存在する酵素の同定を行った。さらに、この反応の静脈血栓症発現との関係を明らかにするための実験的研究を行った。

2. 赤血球膜表面に存在する F-IX 活性化酵素の抽出と同定^{1,2)}

ヒト赤血球から F-IX 活性化酵素を抽出、精製、同定することを試みた。約1,500 mlの正常なヒト血液から白血球と血小板を完全に除去して赤血球のみを分離し、界面活性剤を用いて赤血球膜成分に存在するたんぱく質を抽出した。複数のカラムを用いてのクロマトグラフ法により多数のたんぱく質の中から目的のたんぱく質を得た。このたんぱく質の全アミノ酸配列をアミノ酸分析装置と質量分析装置により同定した結果、アミノ酸配列は白血球エラスターゼとほとんど同じたんぱく質であることがわかった。ただし、C-末端のアミノ酸はエラスターゼよりも一つ多く、一方糖鎖はエラスターゼよりも一つ少ないたんぱく質であり、分子量は25.7 kDa(エラスターゼは29.5 kDa)であった。我々はこの新規たんぱく質をエリスロエラスターゼ-IX(erythroelastase-IX、EE-IX)と命名した。赤血球膜のEE-IXの濃度は、10⁶個の赤血球あたり3.0-3.7 ngであり、白血球のエラスターゼの約1/300と推定された。血液100 mlの赤血球には1.5-1.8 mgのEE-IXが存在することになる。

EE-IX によって F-IX が切断される部位を調べた結果、本来の凝固反応で F-XI によって切断される部位ともまたエラスターゼによって切断される部位とも若干異なることがわかった。エラスターゼによって切断された F-IX は凝固を引き起こす能力が消失することが報告されているが、赤血球膜の EE-IX によって切断された F-IX は、凝固を引き起こす能力を有することがわかった。その凝固能は、通常の凝固反応である F-XI によって活性化される F-IX の凝固能の 1/10 程度と推定された。しかし、下肢深部静脈血栓は数時間から数日の間にゆっくりと生長することが報告されており、EE-IX によって切断された F-IX の凝固能は血栓をトリガーするのに十分であると予想される。

3 . ヒト血液の凝固過程のレオロジー的解析³⁾

本研究で発見した凝固反応が静脈血栓症の発現にどの程度関与しているかを明らかにすることを目的として、正常者および各種疾患の血液の凝固過程を減衰振動型レオメータにより測定・解析した。この装置は、各種チューブ中の血液の流動性 (logarithmic damping factor、LDF と略す) の変化を感度良く測定できる。測定中のズリ速度は 1 sec^{-1} 以下であり、血流がほとんど停滞した状態での血液凝固過程を測定していると考えられる。

本実験では正常者と各種疾患 69 名より抗凝固剤としてクエン酸ナトリウム水溶液を用いて採血した。なお、血液は各研究施設および病院の倫理委員会での承認および提供者の同意を得て提供されたものを使用した。また、本研究の目的から、ヘパリンやワーファリンなどの抗凝固薬およびアスピリン等の抗血小板薬を服用していない疾患の血液を用いた。また、結果の整理に際しては、疾患別分類や正常者と疾患の血液の区別は行わなかった。

1) 凝固パターンの分類

正常者の血液 (全血)、多血小板血漿 (platelet-rich plasma、PRP)、無血小板血漿 (platelet-free plasma、PFP) および PFP 中赤血球サスペンション (RBCs/PFP と呼ぶ) の凝固過程の LDF の変化を測定した例を図 2 に示す。LDF の低下は血液の流動性の低下を意味し、図中の矢印は凝固開始時間を示す。時間ゼロは、血液試料に凝固開始剤である塩化カルシウム水溶液を加えたときである。測定用容器には、血液凝固に対して非活性な表面を有するポリプロピレンチューブを使用した。PRP および RBCs/PFP の凝固は全血に比べて遅延した。PFP の凝固は測定時間内 (2 時間以上) に起こらなかった。

69 名から得た各血液試料の凝固過程の LDF の変化から分類した 4 つの凝固のタイプを図 3 に示す。タイプ I は、PRP および RBCs/PFP の凝固が全血の凝固に比べて遅延したグループであり、全体の 62.3 %であった (正常者 14 名、

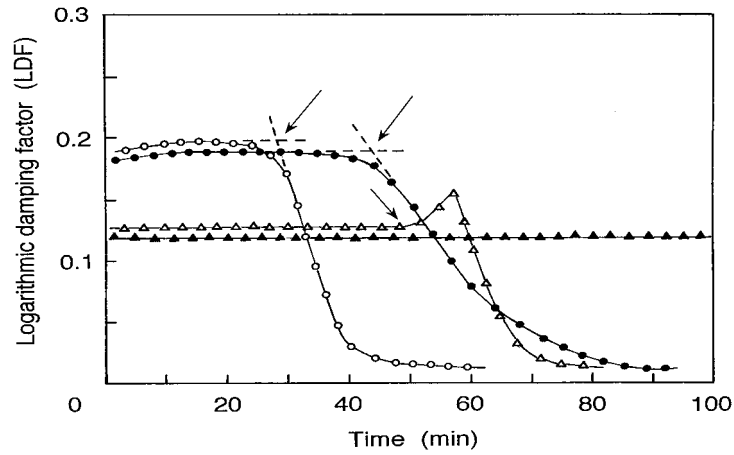


図2 血液凝固過程のLDFの変化(矢印は凝固開始時間)
 ○、全血； ●、RBCs/PFP； △、PRP； ▲、PFP

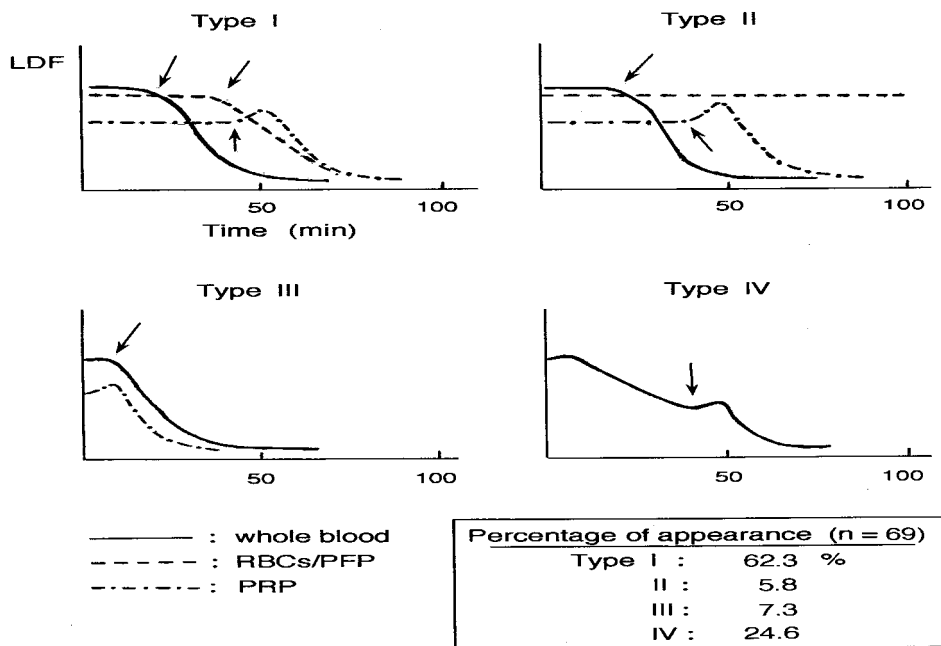


図3 LDFの変化から分類した4つの血液凝固のタイプ

疾患者 29 名)。タイプ II は、PRP の凝固は全血の凝固に比べて遅延したが、RBCs/PFP の凝固が測定時間内 (100 分) に起こらなかったグループであり、全体の 5.8 % であった (正常者 2 名、疾患者 2 名)。タイプ III は、全血および PRP の凝固が 5 ~ 10 分以内に起こったグループであり、全体の 7.3 % であった (疾患者 5 名)。これは何らかの原因で血小板が活性化し、それがトリガーとな

表 1 血液試料の凝固開始時間

sample	Ti (min)		
	Type I	Type II	Type III
whole blood	28.6±10.4 (n = 43)	43.4±13.2 (n = 4)	3 - 7
RBCs/PFP	42.5 ±15.9 (n = 37)	not coagulated	
PRP	47.5±17.8 (n = 19)	50.7±11.6 (n = 4)	3 - 9

って凝固反応が起こったためと考えられる。タイプ IV は、全血の凝固過程で LDF が最初から徐々に低下してしまい、凝固開始時間が決定できなかったグループであり、全体の 24.6 %であった（正常者 2 名、疾患者 15 名）。この LDF の低下は、チューブ中で血沈が起こったためである。各血液試料の凝固開始時間をまとめた結果を表 1 に示す。これらの結果から、赤血球膜の EE-IX による F-IX の活性化がトリガーとなって凝固が起こるのは、全体の 70%以上（タイプ I、II、IV の和）と推定される。

タイプ II の場合の RBCs/PFP で凝固が起こらなかったのは、詳細な解析の結果、EE-IX によって F-IX が活性化した後の反応、すなわち活性化した F-IX による F-IX の活性化とその後のトロンビン生成までの反応（propagation reaction）が赤血球球膜表面で起こらなかったためと考えられる。血小板膜表面では propagation reaction は、個体差がほとんど無く、比較的速く起こる。赤血球膜表面での propagation reaction は、個体差とともに同一個体でもかなり変動するので、赤血球膜表面の構造や性質の微妙な変化が影響している可能性が考えられる。

これらの結果より、本実験系で測定される血液凝固開始時間は、赤血球膜の EE-IX による F-IX の活性化と血小板膜表面での propagation reaction によって支配されていると結論される。

4 . 赤血球の凝固活性と血栓症の危険因子

静脈血栓症発症の危険因子として血流の停滞やヘマトクリットの増加による血液粘度の増加、凝固関連因子の濃度の増加などを伴う過凝固状態（hypercoagulability）あるいは凝固阻止因子の遺伝的欠損などが知られている。しかし、これら危険因子は血液凝固の threshold 値を低下させても直接のトリガーとなり得るとは考えにくい。事実、危険因子が見当たらなくても静脈血栓が起こった例は多数報告されている。本研究では赤血球膜の EE-IX による F-IX の活性化がトリガーとなる血液凝固と危険因子の関係について解析した。

1) 年齢との関係

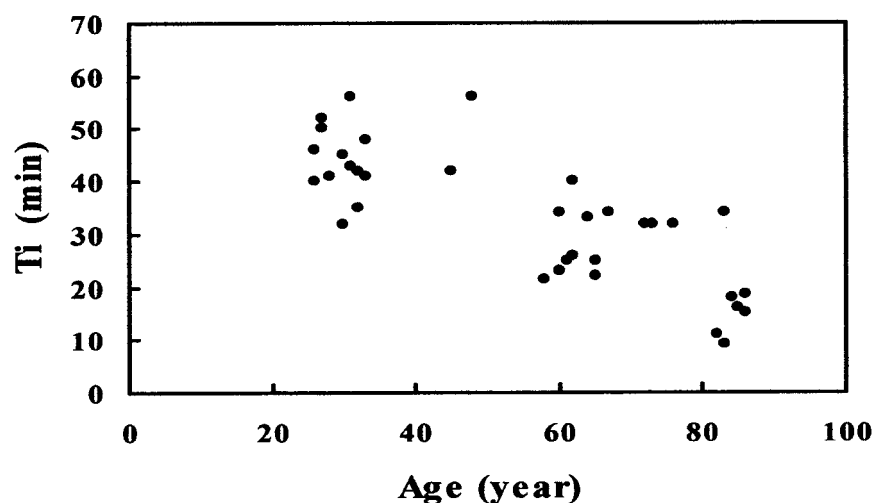


図4 全血の凝固開始時間と年齢との関係

赤血球の EE-IX による F-IX の活性化はヘマトクリットの増加によって促進し、それに伴う血液凝固も早く起こることが確認された。これはヘマトクリットの増加とともに赤血球膜の EE-IX の濃度が増加するためと考えられる。

血栓症は若年者に比べて高年齢者で起こる頻度が高くなることが知られている。28～85歳の幅広い年齢層の血液について、血液凝固開始時間および赤血球膜の EE-IX の濃度について測定した。全血および RBCs/PFP の凝固開始時間 (Ti) は、高年齢になるにつれて短縮する傾向にあった(図4)。また、EE-IX の濃度も年齢の増加とともに増加した。高年齢で血栓が起こり易くなる原因の一つとして、赤血球の凝固活性が亢進する可能性が示唆された。

2) 血液凝固と流れのズリ速度および mechanical disturbance との関係

手術後や長期臥床あるいは飛行中での長時間の座位は、深部静脈血栓症に起因する肺塞栓症の危険因子であることは良く知られている。赤血球による F-IX の活性化がこれらの血栓症のトリガー機構の一つである可能性を考え、赤血球による IX 因子の活性化と血液凝固に及ぼす血液の流動および mechanical disturbance の影響について調べた。

コーン・プレート型回転粘度計を用いて、ズリ速度と EE-IX による F-IX の活性化および血液凝固開始時間の関係を調べた。ステンレス製のコーン・プレートの表面は抗血栓性に優れているセグメント化ポリウレタンでコーティングして使用した。EE-IX による F-IX の活性化は、ズリ速度が 1 sec^{-1} 以下では起こったが、高いズリ速度ではほとんど活性化しなかった。RBCs/PFP の凝固もズリ速度の増加とともに遅延した。赤血球膜表面の EE-IX による F-IX の活性化

が起こるためには、ある時間 EE-IX と F-IX が結合する必要があり、ズリ速度の増加は反応に要する結合時間を短縮させる方向に作用するものと推定される。

深部静脈血栓の発症を予防するための一つの方法として、下肢のマッサージが有効であることが知られている。このことを *in vitro* シミュレーション実験で確認するため、図5に示すような簡単な装置を試作した。抗血栓性に優れているセグメント化ポリウレタンを用いて下端が閉じた透明なチューブ（内径 7 mm、長さ約 10 cm）を作製し、2 ml の血液を入れて凝固が起こるまでの時間を測定した。この場合、偏心カムにより血液の入ったチューブに周期的な刺激を与え、チューブ中の血液に上下の振動的流動を起こさせた。凝固開始時間は、チューブに接触するストレインゲージの出力電圧の変化と目視観察により求め

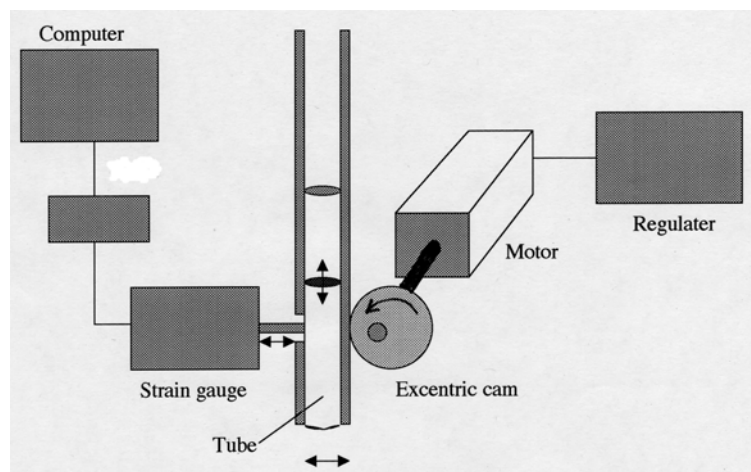


図5 チューブ中の血液に mechanical disturbance を負荷する装置

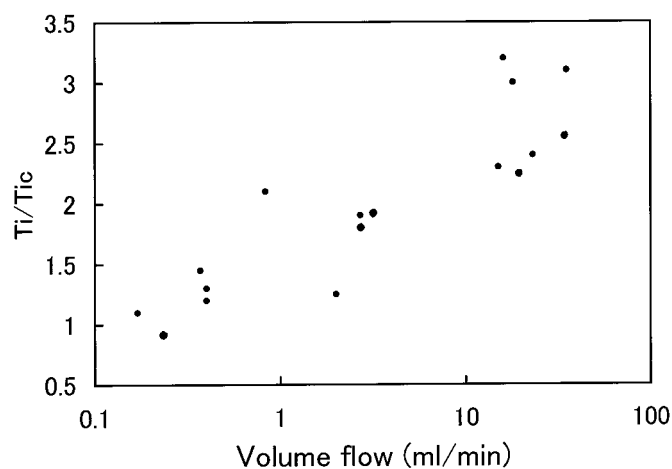


図6 血液凝固開始時間と volume flow の関係

た。図6に全血の凝固開始時間と volume flow との関係を示す。Volume flow は血液の上端の変位量とチューブの面積おとび1分間に試料に与えた周期的な刺激の回数より求めた。また縦軸の凝固開始時間は、コントロールとして減衰振動型レオメータにより測定した凝固開始時間(Tic)との比で表している。Tic は個体差があるが20~30分であった。Volume flow の増加とともに凝固開始時間は著しく延長した(図6)。

5. 血流停滞下での内皮細胞の抗血栓性機能⁴⁾

血流の停滞による血栓症の発現には、血流の停滞下で内皮細胞が損傷して細胞の抗血栓性機能が低下したり、あるいは内皮細胞が血管壁から剥離する必要があるとの報告がある。一方で、血流が停滞しても内皮細胞の損傷や剥離は見られないにもかかわらず血栓形成が起こったという報告もあり、血流の停滞が内皮細胞の抗血栓性機能を低下させるかどうかを実験的に明らかにする必要がある。我々はこれまでに得た研究結果から、内皮細胞の損傷が起こらなくても血流が停滞すると赤血球膜のEE-IXによりF-IXが活性化し血栓形成が起こると考えており、このことをさらに明確にするために *in vitro* シミュレーション実験を行った。

1) 血流停滞下に長時間おかれた内皮細胞への血小板の粘着

長時間血液が内皮細胞に接触した時に細胞表面に血小板が接着・活性化するかどうかを確認するために、内径3cmのガラスシャーレ表面にコラーゲンをコーティングし、さらにその表面に内皮細胞を培養した。内皮細胞表面に血液を長時間接触させた後にその表面を十分に洗浄、多血小板血漿(PRP)を一定時間接触させ、血小板の粘着および活性化の程度を未接着血小板数の計数および接着した血小板の形態から調べた。

内皮細胞を血液と血流停滞下で8時間接触させた後、その内皮細胞の状態を

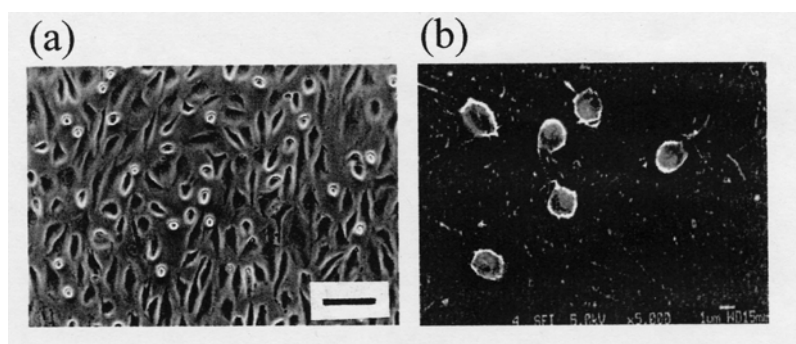


図7 (a) 8時間の間血液と接触していた培養内皮細胞の表面 (bar: 50μm)
(b) 内皮細胞表面に接着した血小板の形態

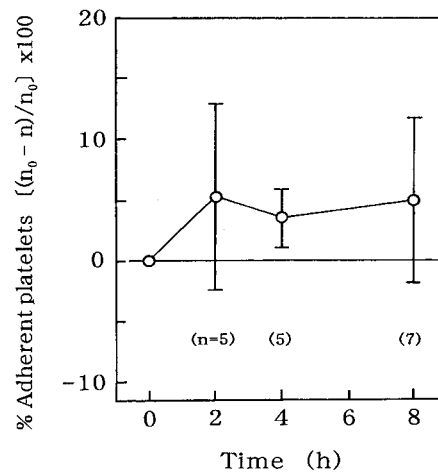


図 8 内皮細胞に粘着した血小板の割合と細胞が血液と接触していた時間
 n_0 、最初の血小板数； n 、未接着血小板数。括弧内の n は実験回数。

位相差顕微鏡で観察した結果を図 7 (a) に示す。この程度の時間では内皮細胞は剥離しないのがわかる。血液を 8 時間内皮細胞に接触・洗浄後、内皮細胞に PRP を接触させ時の血小板の形態を走査型電子顕微鏡で観察した結果を図 7 (b) に示す。少数の血小板が粘着しているが、血小板の活性化は起こっていない。粘着した血小板数と内皮細胞が血液と接触していた時間との関係を図 8 に示す。粘着した血小板数は内皮細胞が血液と接触していた時間にほとんど依存せず 5 % 程度であった。

これらの結果は、コラーゲン表面に増殖した内皮細胞が血液と長時間接触しても内皮細胞は剥離せず、また内皮細胞の抗血栓性機能も失われていないことを示唆する。

2) 血流停滞下に長時間曝された内皮細胞の抗血栓性

下端を閉じたガラスチューブ(長さ 2.5 cm、内径 1.0 cm) 内面にコラーゲンを薄く被覆した。さらにその内面に回転培養法によりウシ大動脈由来の培養内皮細胞を一様に覆ったハイブリッド血管モデル(以後血管モデルと呼ぶ)を構築した。血管モデル内に血液を満たし 37 °C で一定時間静置後、血液を除去して内皮細胞表面を緩衝溶液で十分に洗浄した。内皮細胞の剥離が起こっていないことを顕微鏡により確認し、新鮮な血液(全血)あるいは無血小板血漿(PFP)を血管モデルに入れて凝固過程を減衰振動型レオメータで測定した。血管モデルに PFP を入れて凝固を測定したところ、測定時間内(2 時間以上)に凝固は起こらなかった。一方、内皮細胞表面をエンドトキシンで処理すると、PFP の凝固は起こるようになる。これはエンドトキシン処理により内皮細胞表面に組織因子が露出し、外因系凝固反応が起こったためである。この結果より、本研究で用いた血管モデルの内皮細胞の表面は、内因系および外因系血液凝固反

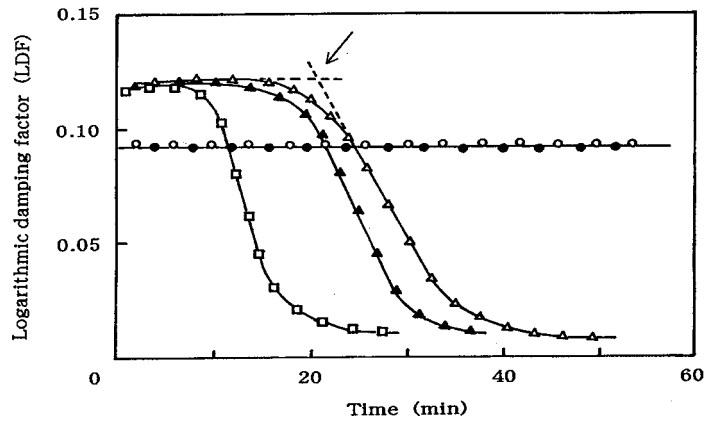


図9 血管モデル中の血液の凝固過程のLDFの変化

血管モデル中の内皮細胞をあらかじめ血液と接触させた時間：
 □、0時間(全血)；△、8時間(全血)；○、0時間(PFP)；◇、8時間(PFP)。コラーゲンと血液が接触した場合を○で示す。
 矢印は凝固開始時間。

表2 内皮細胞およびコラーゲンと接触する血液の凝固開始時間

surface	Ti (min)	
	whole blood	PFP
BAE Cs (control)	21.7±0.3	not coagulated
BAECs (8 h)*	18.8 ±1.1	not coagulated
collagen	10.2 ±1.8	not coagulated

*内皮細胞 (BAECs) を8時間血液と接触させた後、新鮮な血液試料を用いて測定

応に対して非活性な表面を提供していると考えられる。

血管モデル系で、血液の流れが無い状態で内皮細胞を8時間血液と接触させた後に血液を除去、血管モデル内に新鮮な血液(全血あるいはPFP)を入れて凝固過程の対数減衰率(LDF)を測定した結果を図9に示す。比較のために、測定前に血液と接触させなかった場合の全血およびPFPの凝固過程のLDFの変化(コントロール)も図中に示してある。PFPの場合は、LDFの値は2時間以上全く変化せず凝固は起こらなかった。一方、全血は、あらかじめ8時間血液と接触した場合とコントロールとであまり差は無く、20分程度で凝固が起こり始めた。血管モデルの作製に用いたコラーゲンと血液を直接接触させた時の凝固過程のLDFの変化も図9に示す。全血の場合には10分程度で凝固が起こ

り始めたが、PF₃ の場合には凝固は起こらなかった。それぞれの実験を繰り返し行って得られた結果を表 2 に示す。

コラーゲンが血液と接触すると、血小板の活性化によって F-IX が活性化し内因系凝固反応が起こることが知られている。もし、血管モデルで、内皮細胞が血液と長時間接触することにより細胞が脱落しコラーゲンが露出したとすれば、コラーゲンと接触する血液の凝固は図 9 に示すようになり早く起こることになる。実験の結果から、内皮細胞の脱落は起こらず、かつ内皮細胞の抗凝固能も失われていないことが示唆された。

6 . おわりに

赤血球膜に第 IX 因子を活性化する酵素が存在することを明らかにし、赤血球による第 IX 因子の活性化が静脈血栓症発現のトリガー機構の一つの可能性であることを示す多くのデータを蓄積した。今後、この反応機構の静脈血栓症発現における重要性をさらに明らかにするためには、臨床分野でのデータの集積が必要である。計測法の確立および赤血球膜の第 IX 因子活性化酵素阻害剤の開発が進めば、静脈血栓症の予防や治療に役立つものと考えられる。

< 論文 >

- 1) H. Iwata and M. Kaibara : Activation of factor IX by erythrocyte membranes causes intrinsic coagulation. *Blood Coagul. Fibrinol.*, **13**, 489, 2002.
- 2) H. Iwata, M. Kaibara, N. Dohmae, K. Takio, R. Himeno and S. Kawakami : Purification, identification and characterization of elastase on erythrocyte membrane as factor IX-activating enzyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **316**, 65, 2004.
- 3) M. Kaibara, H. Iwata, H. Ujiie, R. Himeno and M. Kaibara : Rheological analyses of coagulation of blood from different individuals with special reference to procoagulant activity of erythrocytes. To be published.
- 4) M. Kaibara, T. Yotoriyama and R. Himeno : Antithrombogenicity of cultured endothelial cells exposed to blood under stagnant flow conditions. *J. Jpn. Soc. Biorheology*, **18**, 53, 2004.