

# 血栓形成傾向の検出を目指す新たな検査法 T-TAS に関する検討

## —いわゆる血液ドロドロ・サラサラ検査について—

森木 隆典\* 広瀬 寛\* 田中由紀子\*  
齋藤 圭美\* 神吉 正子\* 村田 満\*\*  
河邊 博史\*

脳卒中や心筋梗塞に代表される虚血性疾患は日本人における死亡率の約30%を占めており、動脈硬化を背景とした血栓形成が主たる病態であることが分かっている。メタボリックシンドロームの診断基準である内臓脂肪型肥満、脂質異常症、高血圧、耐糖能異常に加えて喫煙、ストレスなどの生活習慣は、動脈硬化を促進し血栓形成傾向を高める要因と考えられている。生活習慣の改善や投薬によりこれらを是正することは動脈硬化に伴う虚血性疾患の発症を抑制すると考えられるが、血液の血栓形成傾向そのものを評価する検査として確立された方法は乏しいのが現状である。

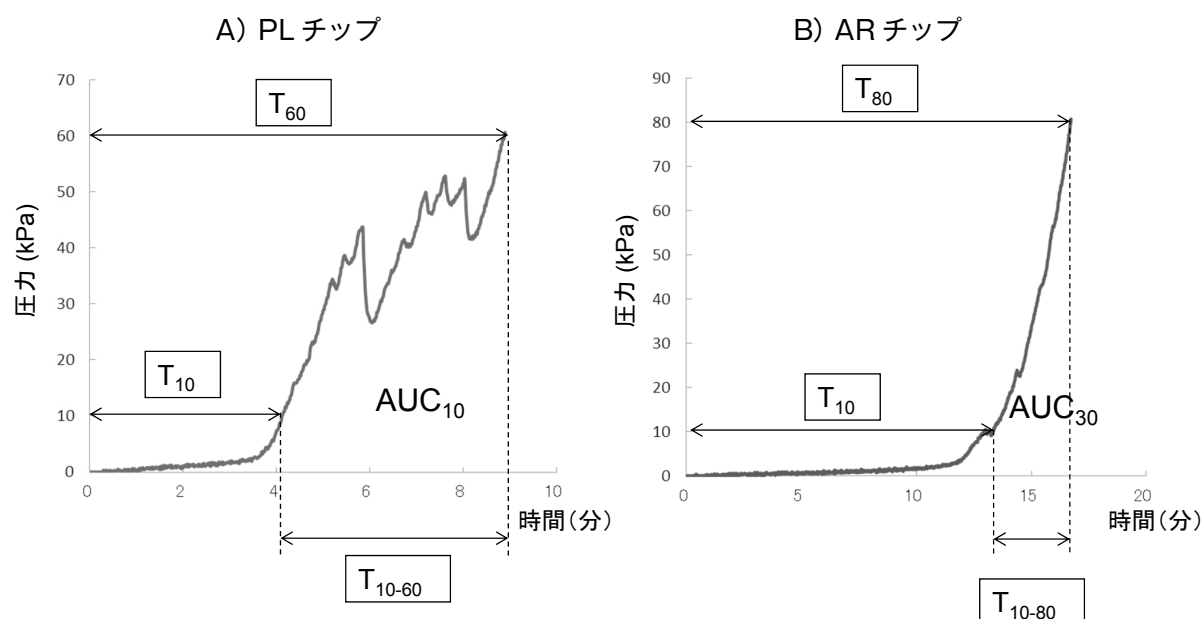
血管内における血栓形成には、血液成分・血流・血管壁の状態が関与しているため<sup>1)</sup>、それらの複合的な関与を単一の検査で評価することは困難な点が多い。これまでも透過光を用いた血小板凝集能などを用いた検討が行われてきたが、血栓形成傾向の評価として臨床的に意義のある結果は十分に得られてはいない<sup>2, 3)</sup>。近年、我が国でマイクロチップ型フ

ローチャンバーを用いた血栓形成能解析装置 (Total Thrombus-formation Analysis System :T-TAS, 藤森工業) が開発され、血栓形成能を評価する検査法として注目されている<sup>4, 5)</sup>。本装置は、コラーゲンを固相化したマイクロチップ内の流路にポンプを用いて全血を流し込み、血栓が形成され流路が閉塞するまでのマイクロチップ内の圧力上昇をグラフとして連続的に記録することが可能である。この得られた圧力波形から、閉塞開始時間・閉塞終了時間・血栓形成時間・圧力曲線下面積 (area under the flow pressure curve: AUC) などの血栓形成傾向と関連するパラメータを算出することができる (図1)。

今回、健常人31人から採取した血液サンプルを使用し、T-TASを用いた血栓形成能に関する測定を行ったところ、本装置が個人の血栓形成能を感度良く検出する可能性が見いだされたので報告する。

\* 慶應義塾大学保健管理センター

\*\* 慶應義塾大学臨床検査医学



A) PL チップ.  $T_{10}$ : 基線から10kPaに到達するまでの時間 (閉塞開始時間).  $T_{60}$ : 60kPaに到達するまでの時間 (閉塞終了時間).  $T_{10-60}$ :  $T_{60}$ と $T_{10}$ の差 (血栓形成時間).  $AUC_{10}$ : 10分間の圧力曲線下面積. B) AR チップ.  $T_{10}$ : 基線から10kPaに到達するまでの時間 (閉塞開始時間).  $T_{80}$ : 80kPaに到達するまでの時間 (閉塞終了時間).  $T_{10-80}$ :  $T_{80}$ と $T_{10}$ の差 (血栓形成時間).  $AUC_{30}$ : 30分間の圧力曲線下面積.

図 1 T-TAS における圧力曲線と測定値

## 対象と方法

文書にて同意を得られた本学教職員31名 (男性11名, 女性20名) を対象とした。年齢は25歳から62歳 (平均39歳) であり, 全員が現病歴を有さない健康な被験者であった。また, 血小板機能や凝固線溶系に影響のある内服薬やサプリメントを服用している者はいなかった。31名中26名は本学における教職員健康診断を受診しており, その背景因子は表1に掲げる通りであった。採血は21G翼状針を用いて肘静脈より行い, 全ての測定は4時間以内に施行された。本研究は, 慶應義塾大学倫理委員会の承認を得て行われた。

T-TASによる血栓形成能測定には, 2種類のマイクロチップ (PLチップ, ARチップ) を使用した。PLチップはコラーゲンを固相化した流路を有しており, 抗凝固剤ヒルジンは添加された全血を高ずり応力下 (1000~2000/sec)

で流して測定することにより, 主として血小板が関与する血栓形成能 (血小板血栓または白色血栓形成能) を評価することができる。ARチップはコラーゲンに加えて組織因子を固相化した流路を有しており, 凝固線溶系因子を含めた全血の血栓形成能を評価することができる。

表 1 対象者の背景因子

|                                      |                 |
|--------------------------------------|-----------------|
| 男性/女性 (人)                            | 11/20           |
| 平均年齢 (範囲) (歳)                        | 39 ± 11 (25-62) |
| body mass index (kg/m <sup>2</sup> ) | 21 ± 2.7        |
| 収縮期血圧 (mmHg)                         | 117 ± 17        |
| 拡張期血圧 (mmHg)                         | 69 ± 11         |
| 空腹時血糖 (mg/dl)                        | 96 ± 9          |
| トリグリセリド (mg/dl)                      | 79 ± 40         |
| HDLコレステロール (mg/dl)                   | 67 ± 18         |
| LDLコレステロール (mg/dl)                   | 110 ± 31        |

平均 ± SD  
(検査値は31人中26人のもの)

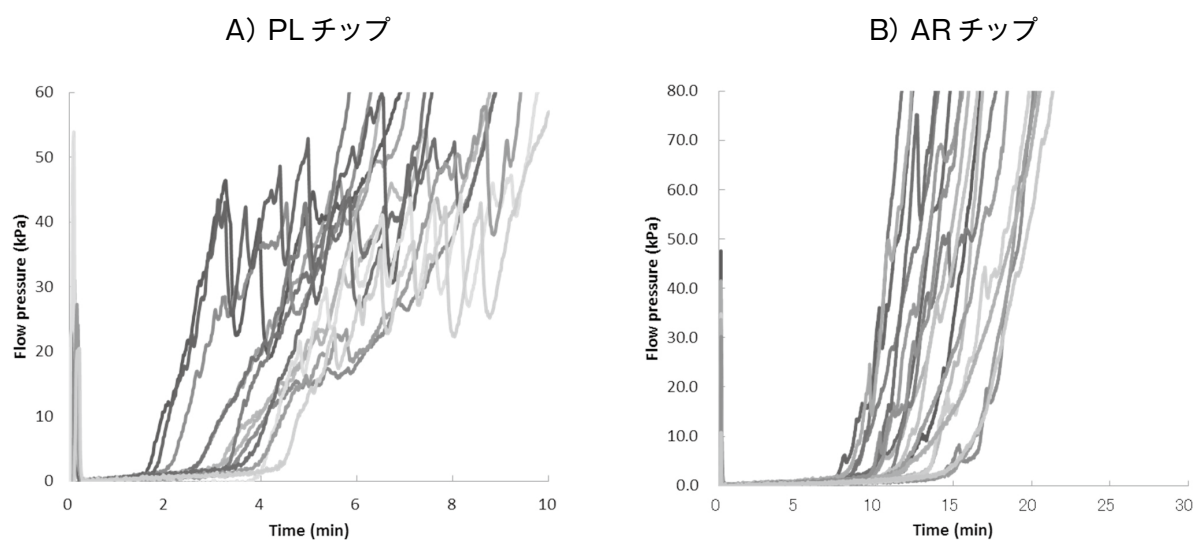
## 成 績

1. T-TAS によって得られる圧力波形の個人差  
PLチップおよびARチップのそれぞれについて、被験者の圧力波形を記した結果を図2に示す。閉塞開始時間および終了時間には、健康人において個人差が認められ、圧力波形は各個人の血栓形成能を反映したものであることが示唆される。

## 2. T-TAS 測定値の解析

### 1) PLチップによる測定

血小板血栓形成能を検出するPLチップにおける閉塞開始時間 ( $T_{10}$ )、閉塞終了時間 ( $T_{60}$ )、血栓形成時間 ( $T_{10-60}$ :  $T_{10}$ と  $T_{60}$ の差)、 $AUC_{10}$ の分布図を示す(図3A)。また、各測定値の平均値  $\pm$  SD、範囲を表2に示す。各測定値は、1000/sec、1500/sec、2000/secの3種類の流速(ずり応力)で測定された(図3A各項目の左・中・右)。流速が増加するに従い  $T_{10}$ 、



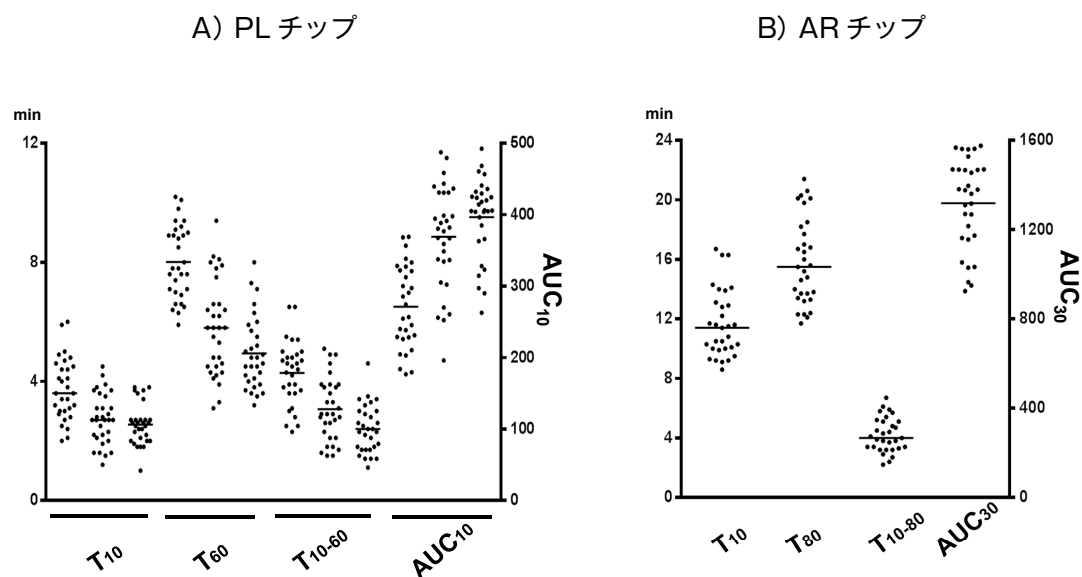
A) PLチップ (13人). B) ARチップ (19人).

図2 T-TAS 圧力曲線にみられる血栓形成傾向の個人差

表2 T-TAS 測定値

|             | 1000/sec                          | 1500/sec                          | 2000/sec                          |             | 300/sec                              |
|-------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-------------|--------------------------------------|
| $T_{10}$    | 3:44 $\pm$ 1:02<br>(1:57-6:01)    | 2:43 $\pm$ 0:51<br>(1:10-4:30)    | 2:32 $\pm$ 0:41<br>(1:00-3:50)    | $T_{10}$    | 11:39 $\pm$ 2:15<br>(8:39-16:44)     |
| $T_{60}$    | 8:00 $\pm$ 1:14<br>(5:51-10:10)   | 5:47 $\pm$ 1:36<br>(3:03-9:26)    | 4:55 $\pm$ 1:12<br>(3:13-7:57)    | $T_{80}$    | 15:48 $\pm$ 2:56<br>(11:42-21:21)    |
| $T_{10-60}$ | 4:16 $\pm$ 1:04<br>(2:16-6:30)    | 3:03 $\pm$ 1:03<br>(1:26-5:07)    | 2:23 $\pm$ 0:48<br>(1:05-4:35)    | $T_{10-80}$ | 4:08 $\pm$ 1:11<br>(2:12-6:42)       |
| $AUC_{10}$  | 271.1 $\pm$ 58.2<br>(176.6-369.1) | 369.1 $\pm$ 71.8<br>(196.0-487.4) | 396.6 $\pm$ 55.8<br>(262.7-492.5) | $AUC_{30}$  | 1318.5 $\pm$ 203.2<br>(924.9-1576.1) |

平均  $\pm$  SD (範囲) (分:秒 or 分  $\cdot$  kPa)



A) PL チップ. 各測定値の左, 中, 右はずり応力 (流速) 1000, 1500, 2000  $s^{-1}$ .  
 B) AR チップ. ずり応力 (流速) は 300  $s^{-1}$ .  
 T<sub>10</sub>: 閉塞開始時間, T<sub>60</sub>, T<sub>80</sub>: 閉塞終了時間, T<sub>10-60</sub>, T<sub>10-80</sub>: 血栓形成時間, AUC<sub>10</sub>, AUC<sub>30</sub>: 圧力曲線下面積.

図 3 健常人 31 人における T-TAS 測定値の分

T<sub>60</sub>とも短縮することより, 血流速度が速くなるほど血小板血栓形成が始まるスピードが速くなり, より早く流路が閉塞することが分かる。さらに, T<sub>10</sub>, T<sub>60</sub>の差である T<sub>10-60</sub>も短縮することより, 血小板血栓形成のスピード自体も流速が増加するに伴い上昇することが分かる。また, 表 2 における各測定値の標準偏差を見ると, T<sub>10</sub>においては, 流速の増加に伴う減少が著明であるのに対し, T<sub>60</sub>においては流速に依存していないと考えられる。このことより, 主として血小板が関与する血栓形成傾向の個人差を評価するのは, 低流速における T<sub>10</sub>が適している可能性が示唆される。

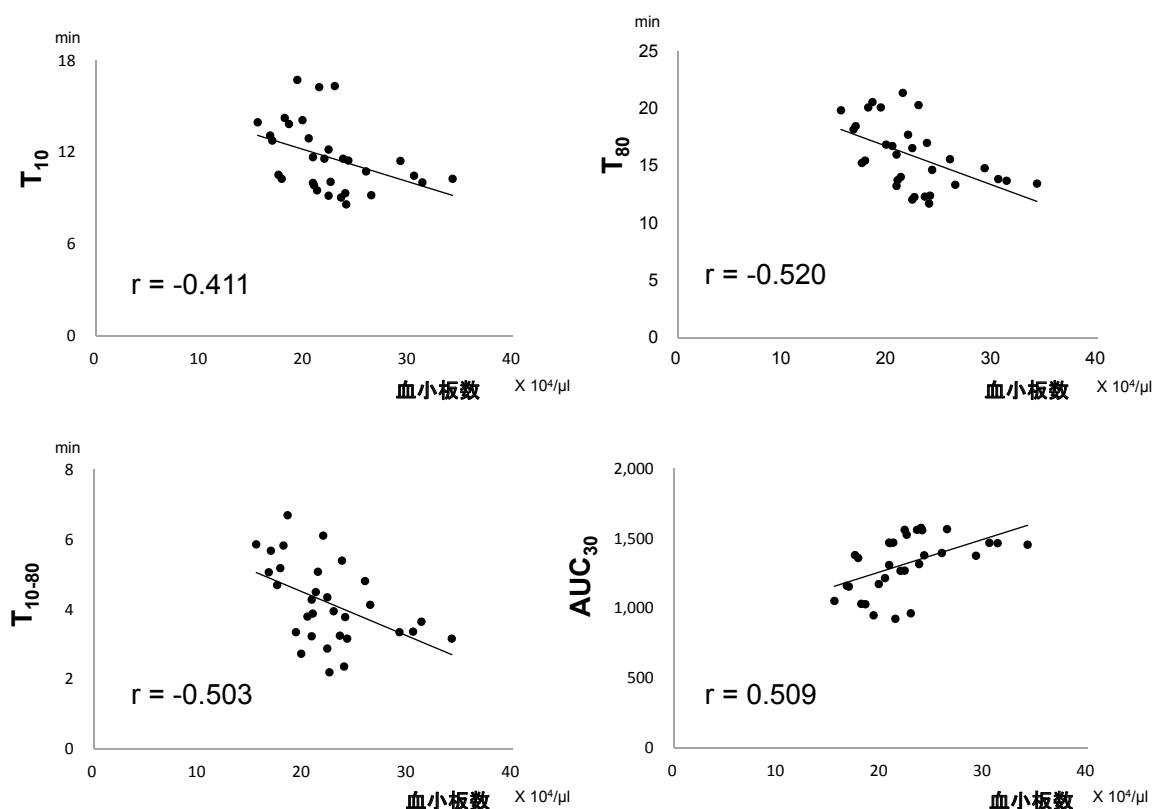
## 2) AR チップによる測定

凝固線溶系因子も含めた全血の血栓形成能を検出する AR チップにおける閉塞開始時間 (T<sub>10</sub>), 閉塞終了時間 (T<sub>80</sub>), 血栓形成時間 (T<sub>10-80</sub>: T<sub>10</sub>と T<sub>80</sub>の差), AUC<sub>30</sub>の分布図を示す (図 3 B)。さらに, 各測定値の平均値  $\pm$  SD, 範囲

を表 2 に示す。流速 (ずり応力) は 300/sec のみで施行された。T<sub>10</sub>, T<sub>80</sub>の両方において同程度の各個人間のばらつきが認められたが, その差である T<sub>10-80</sub>のばらつきは小さくなっていた。このことより, AR チップにおける健常人の個人差を評価するパラメータとして T<sub>10</sub>, T<sub>80</sub>のいずれも使用できると考えられるとともに, 血栓形成時間には個人差が少なく, ほぼ一定である可能性が示唆された。

## 3. T-TAS 測定値と関連する血液成分

血液中の血球成分である白血球・赤血球・血小板や, 血漿成分の中で血栓形成能と関連する可能性が予想される凝固系や線溶系因子を測定し, T-TAS 測定値との関連を解析した。凝固系や線溶系因子との間には, 測定した項目の範囲では, 明らかな関連は見いだされなかったが, 血小板数との間に明らかな関連が認められた。特に AR チップにおける測定値とは全てに



$T_{10}$  (上段左),  $T_{80}$  (上段右),  $T_{10-80}$  (下段左),  $AUC_{30}$  (下段右).

図4 血小板数とT-TAS (ARチップ) 測定値の相関

において有意な相関があり（図4），PLチップにおいても大部分の測定値において有意な相関が認められた。即ち，血小板数が高くなるほど，閉塞開始時間・閉塞終了時間・血栓形成時間が減少し，血栓形成傾向が強くなることが示唆された。

なお，T-TAS 測定値と年齢，性差との関係について解析したが，関連は認められなかった。また，健康診断のデータが存在する26名について，BMI，血圧， $HbA_{1c}$ ，血中脂質等との関連について検討したところ，一部の項目で相関を示す可能性が示唆されたが，PLチップでの複数の流速およびARチップにおいて共通して関連を示す項目は見出されず，今後さらに被験者数を重ねて検討する必要があると思われる。

## 考 察

血栓形成過程には，血液成分のみならず血流や血管壁の状態が深く関与しており，血栓形成能を解析するためには，これらを複合的に評価する必要がある。今日に至るまで，血液成分に由来する出血傾向や血栓傾向を評価するための様々な血液検査が考案されており，血液凝固線溶関連因子活性や血小板数の測定，透過光を用いた血小板凝集能検査，Platelet Function Analyzer 100，VerifyNow assayなどが挙げられるが，臨床的な有用性に関しての定まった評価は乏しいのが現状である。近年，我が国で開発されたマイクロチップ型フローチャンバーによる血栓形成能解析装置は，全血の流動状態下における血栓形成能を測定することが可能であ

り、新たな検査法として注目されている。使用するのは数 ml 程度の全血であり、臨床的にも十分実用性があると考えられる。

本研究では、T-TAS が健常人における血栓形成能の個人差を検出できるか否かを検討した。主として血小板が関与する血栓形成能を評価する PL チップと、さらに凝固線溶系因子も加えた条件下で血栓形成能を評価する AR チップの 2 種類を用い、31 人の健常人血液サンプルの評価を行ったところ、十分に各個人間の血栓形成能の差異を検出することが可能であると考えられた。

PL チップにおける測定値は全項目において流速依存性を示していることより、本測定によって、ずり応力依存性の血小板血栓形成能が評価できると考えられた。これは、動脈血栓によって引き起こされる虚血性心疾患や脳梗塞などに関連するリスクが検出できる可能性を示唆している<sup>6)</sup>。また、血栓形成が開始される時間（閉塞開始時間）は、低流速において個人差が大きいことより、本測定値が血小板血栓形成能の個人差を反映するのに適したパラメータであることが示唆された。

AR チップはフィブリン形成も含めた総合的な血小板血栓形成能を検出すると考えられるが、測定値は PL チップ同様に個人差を良く反映していた。圧力波形を見ると分かるように、閉塞開始時間 ( $T_{10}$ ) に個人差が良く反映され、血栓形成時間 ( $T_{10-80}$ ) には個人差が少ない傾向が認められた (図 2 B)。閉塞開始時間は、血小板のコラーゲンへの接着に引き続く活性化の過程と関連すると考えられ、動脈における血小板血栓形成傾向を反映している可能性がある<sup>7)</sup>。血液成分の中で、血小板数が全ての AR チップにおける測定値と相関を示したのは本測定が血小板血栓形成能を反映していることと関連していると考えられる。臨床的には、血

小板数が高いほど虚血性疾患の発症率が高くなるかどうかについては議論が分かれており、最近では否定的な見解が多い<sup>8-10)</sup>。また、今回検討した血漿成分中の凝固系や線溶系因子には、PL チップを含めた T-TAS 測定値との相関が認められなかった。この理由としては、血栓形成時間が主として血小板活性化に伴って急速に進行するフィブリン形成と関連することより、健常人においては、この過程に個人差が少ない可能性がある。しかしながら、糖尿病等においては、凝固系や線溶系因子の活性に異常が認められることが報告されており<sup>11)</sup>、今後は患者血液サンプルを用いた検討が必要であると考えられる。

## 総 括

1. 我が国で新規に開発された血栓形成能解析装置 (Total Thrombus-formation Analysis System :T-TAS) を用いて、健常人 31 人の血栓形成能を測定した。
2. T-TAS 測定により、健常人における血栓形成能の個人差を感度良く検出することが可能であった。
3. T-TAS 測定値は、主として血小板が関与する動脈における血栓傾向を反映する可能性が示唆された。

## 文 献

1. Wolberg AS, et al: Procoagulant activity in hemostasis and thrombosis: Virchow's triad revisited. *Anesth Analg* 114:275-285, 2012
2. Michelson AD: Methods for the measurement of platelet function. *Am J Cardiol* 103 (Suppl 3):20A-26A, 2009
3. Favaloro EJ, Lippi G: Coagulation update: what's new in hemostasis testing? *Thromb Res* 127 (Suppl 2):S13-16, 2011
4. Hosokawa K, et al: A novel automated microchip flow-chamber system to quantitatively evaluate thrombus formation and antithrombotic agents under blood flow conditions. *J Thromb Haemost* 9:2029-2037, 2011
5. Hosokawa K, et al: A microchip flow-chamber system for quantitative assessment of the platelet thrombus formation process. *Microvasc Res* 83:154-161, 2012
6. Jackson SP: Arterial thrombosis--insidious, unpredictable and deadly. *Nat Med* 17:1423-1436, 2011
7. Nieswandt B, et al: Platelet adhesion and activation mechanisms in arterial thrombosis and ischaemic stroke. *J Thromb Haemost* 9 (Suppl 1): 92-104, 2011
8. Thaulow E, et al: Blood platelet count and function are related to total and cardiovascular death in apparently healthy men. *Circulation* 84:613-617, 1991.
9. Meade TW, et al: Platelet counts and aggregation measures in the incidence of ischaemic heart disease (IHD). *Thromb Haemost* 78:926-929, 1997
10. Spencer CG, et al: Haemorheological, platelet and endothelial indices in relation to global measures of cardiovascular risk in hypertensive patients: a substudy of the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial. *J Intern Med* 261:82-90, 2007
11. Grant PJ: Diabetes mellitus as a prothrombotic condition. *J Intern Med* 262:152-172, 2007