

微弱光観測にもとづく血液ポンプ内血栓の検出

Detection of the Platelet Activation in Blood Pumps by Observing Faint Light Emission from the Reaction of ATP and Luciferin

○瀧浦 晃基*, 望月 修一**

○Koki TAKIURA*, Shuichi MOCHIZUKI**

*山形大学, **大阪工業大学

*Yamagata University, **Osaka Institute of Technology

キーワード：血小板 (platelet), 血栓(thrombus), ルシフェリン (luciferin),
血液ポンプ(blood pump)

連絡先：〒992-8510 山形県米沢市城南 4-3-16 山形大学大学院 理工学研究科
瀧浦 晃基, Tel&Fax: 0238-26-3192, E-mail: takiura@yz.yamagata-u.ac.jp

1. はじめに

心臓手術時の体外循環や人工心臓などで使用される血液ポンプには, 流体機械としての効率の高さとともに, 高い血液との適合性(抗血栓性と低溶血性)が求められる。血液ポンプ内部における血栓形成は依然として大きな問題である。血栓形成は, 血液とポンプ材料との接触によって引き起こされるほか, 高剪断やよどみなどの流れ場の状態によっても引き起こされる。流れによって形成される血栓を解決するためには, 流れ場と血栓形成の関係を解析する必要があるが, 血液ポンプ内の血栓形成を実時間で経時的に観測することは困難である。

血栓形成の初期段階である血小板凝集の過程においては, まず一次凝集した血小板が活性化され, 濃染顆粒に含まれる物質が放出される。次に, 濃染顆粒から放出されたアデノシン二リン酸(ADP)がさらなる血小板の凝集を促進する。この過程を繰り返すことによって血栓が形成されていく。濃染顆粒内の物質が放出されるとき, ADP と同時にアデノシン三リン酸(ATP)も放出される。この ATP は, ホタルの発光物質であるルシフェリン・ルシフェラーゼを

用いて, 発光測定によって安全かつ容易に, しかも高感度に検出することができる。つまり, ルシフェリンの発光測定を利用した ATP の検出によって, 血小板凝集を観測できることになる。

本研究では, ルシフェリンを用いた ATP の検出手法を応用し, 活性化された血小板の濃染顆粒から放出される ATP を検知することにより, 血栓形成の初期段階である血小板凝集を, 血液ポンプ内において高感度に検出しようとするものである。

2. 予備実験

まず予備実験として, 試験管内に血栓を形成させ, それをルシフェリンを用いた ATP の検出方法で検出できるかどうか調べた。45 度に傾き一定回転で回転している試験管内にヘパリン加血を充填し, それにルシフェリン・ルシフェラーゼ試薬(キッコマン, ルシフェール 250)を加えた(Fig.1)。血液の凝固能を復活させるために硫酸プロタミンを注入すると, 試験管の材料であるガラスとの異物反応によって, 血液の凝固が始まる。血液中から放たれる発光の強度を光電子増倍管(浜松ホトニクス,

H7360) を用いて, 光子計数法で観測した。

予備実験の結果を (Fig.2) に示す。凝固能復活後から徐々に ATP とルシフェリンの反応による発光強度が増大し, 硫酸プロタミン注入から約 5 分後にそのピークが観測された。この結果は, 明視野で実施した比較実験における, 凝固能復活から血栓形成までに要する時間とよく一致し, ルシフェリンを用いる本手法によって血小板凝集が検出できたものと考えられた。

3. 血液ポンプを用いた実験

模擬循環回路に遠心型血液ポンプ (日機装, HPM-15) を設置し, 回路をヘパリン加血液で充填, ルシフェリンを投与, さらに硫酸プロタミンで凝固能を復活させる実験を行った (Fig.3)。この場合も基礎実験と同様に, 血小板凝集によると考えられる発光の観測に成功した (Fig.4)。また, 実験後にポンプ内に形成された血栓を観察したところ, 臨床において経験される血栓と, 生成位置がよく一致していた (Fig.5)。

4. まとめ

本研究で得られた実験結果において, 発光時間や実験後の血栓生成位置を検討すると, ルシフェリンを用いた ATP の検出手法を応用することで, 血液ポンプ内の血栓形成の実時間観測が可能であることが確認できた。今後は, 実験条件の最適化を行い, 血栓形成量の定量的測定を目指す。また, 高感度 CCD カメラを用いることにより, 血栓形成の位置情報を実時間で得ることのできる実験系を構築していく。

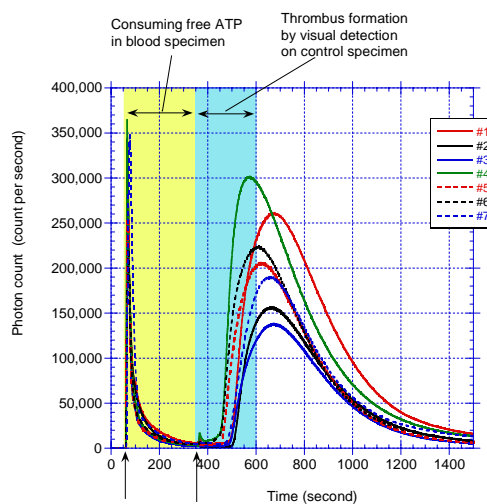


Fig.2 Light emission from the activated platelet in the test tube

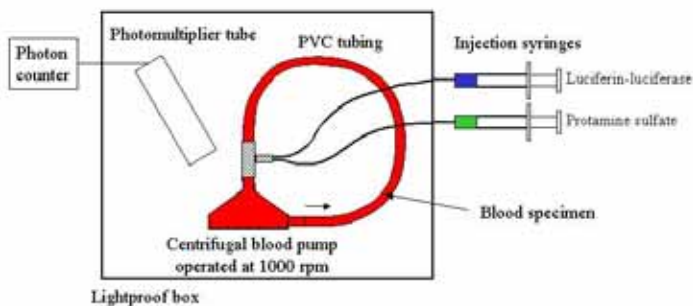


Fig.3 Experimental apparatus with a centrifugal blood pump

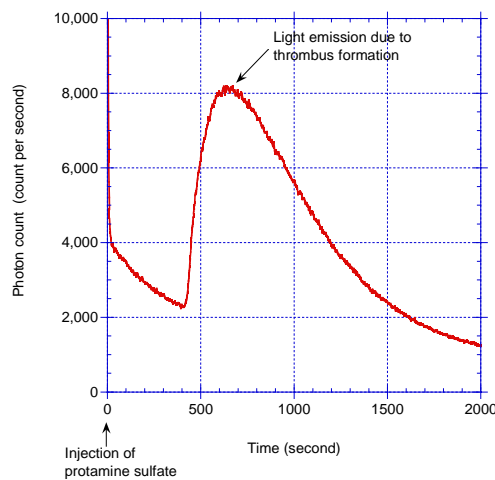


Fig.4 Light emission from the activated platelet in the blood pump

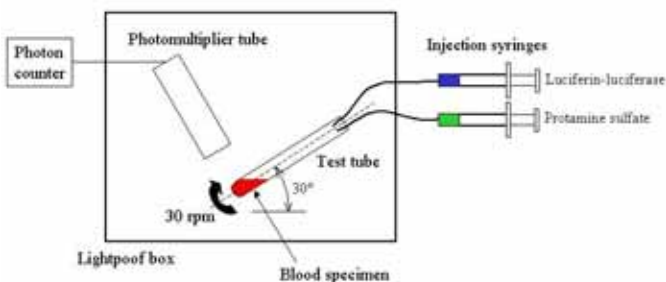


Fig.1 Experimental apparatus with a rotating test tube



Fig.5 Thrombus formed in the blood pump