

全血と血漿の凝固時間に対する採血後の保存時間の影響

木下 明美, 堀江 登
(武庫川女子大学生活環境学部食物栄養学科)

Effect of storage time after drawing blood on coagulation time of whole blood and plasma

Akemi Kinoshita and Noboru Horie

Department of Food Science and Nutrition,
School of Human Environmental Sciences,
Mukogawa Women's University, Nishinomiya, Hyogo 663-8558, Japan

Obtaining a sufficient volume of blood for research purposes from small animals, such as mice, is difficult, especially because usually only the plasma is used for various tests. The ideal solution would be to use the whole blood for measurements such as that of coagulation time. Being able to use the whole blood sample would double the amount available for tests and also should provide an environment closer to that in the living organism. However, the questions arise of whether differences exist between the coagulation time of whole blood and plasma and what the effects of storage time are.

We examined these issues and found that both the whole blood and plasma could be used for measurement of thrombin time, activated partial thromboplastin time and prothrombin time.

緒言

マウスやラット等の小動物を用いる研究では、採取できる血液量は少ない。しかし、小動物について多種項目の検査や経時的变化を追求する実験には多くの血液を要する。一般的に凝固能の検査には血漿を用いるが、全血を用いれば血漿と比較して約半分の血液量で測定が可能である。また、全血を用いる方が生体内の環境をより反映していると推察する。さらに、ベッドサイドでは、検体の調製時間の短縮と操作の簡素化を考えると全血を用いた測定が必要となる。しかし、全血と血漿の測定値に何らかの相違が生じることが考えられる。

本研究は全血および血漿の双方の凝固時間の比較をすると共にこれらに対する保存時間の影響も併せて検討された。

実験材料

1. 血液検体

血液凝固能の測定に使用した血液は、エーテル麻酔下で安楽死した Wistar 系雌性ラットの腹部後大静脈から採取し、これに抗凝固剤として 1/10 容の 3.8% クエン酸ナトリウム溶液を添加した後、7 時間後の測定までは氷中に、24 時間後の測定までは 4℃ で保存した。このクエン酸ナトリウム添加血液の一部を直ちに遠心分離(1000×g, 20 分間)して血漿を得た後、7 時間後の測定までは氷中に、24 時間後の測定までは 4℃ で保存した。

2. 試薬

トロンビン時間の測定にはトロンビン(持田製薬、東京)およびオーレンペロナール緩衝液を使用した。活性化部分トロンボプラスチン時間の測定には市販のアクチン(Dade 社, Los Angeles)を用いた。プロトロンビン時間の測定には市販のトロンボプラス

チンC(Dade社, Los Angeles)を使用した。

方法

トロンビン時間¹⁾は全血あるいは血漿 0.02ml にオーレンペロナール緩衝液 0.18ml を加えて 37°C で 1 分間加温後, 生理食塩水に溶解して調製した 100 単位/ml トロンビン溶液 0.10ml を加えてから凝固するまでの時間を測定した。活性化部分トロンボプラスチン時間²⁾は, アクチン 0.10ml を 37°C で 1 分間加温後, 全血あるいは血漿 0.10ml を加えてさらに 2 分間加温し, 0.02M 塩化カルシウム溶液 0.10ml を加えてから凝固するまでの時間を測定した。プロトロンビン時間³⁾は全血あるいは血漿 0.10ml を 37°C で 2 分間加温後, 蒸留水で溶解したトロンボプラスチン C 0.20ml を加えてから凝固するまでの時間を測定した。採血後の検体の保存時間による変化を確認するために全血および血漿のトロンビン時間, 活性化部分トロンボプラスチン時間, およびプロトロンビン時間について採血直後, 採血 7 時間後および 24 時間後に凝固能を測定した。すべての凝固時間の測定に磁力センサー検出方式の血液凝固自動測定装置(AMELUNG 社, KC1A)を用いた。

結果

1. トロンビン時間法

全血では採血後の保存時間が経過するに連れて, 凝固時間が延長する傾向にあったが, 大きな変化は認められなかった(図 1)。同様に血漿でも著しい延長は認められなかった。

2. 活性化部分トロンボプラスチン時間法

血漿では採血から 7 時間後, 24 時間後へと保存時間が経過するに連れて, 凝固時間が著しく延長した(図 2)。また, 全血ではさらに著しい延長が認められた。

3. プロトロンビン時間法

全血では採血後からの時間経過に伴う凝固時間の延長はほとんど認められなかった(図 3)。また, 血漿でも凝固時間の延長はほとんどなかった。

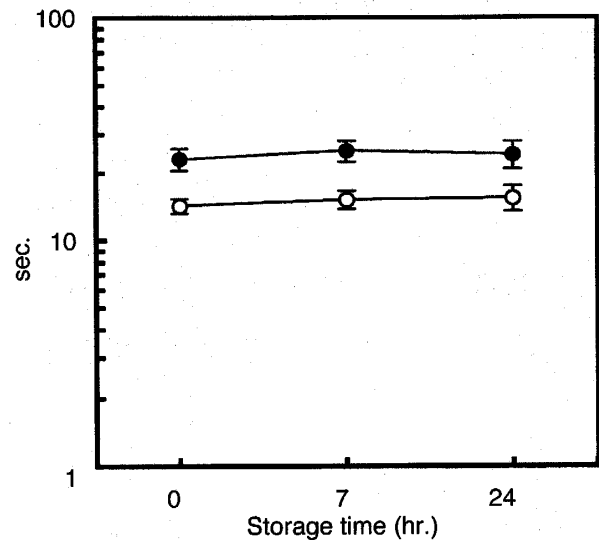


Fig. 1. Variations of thrombin time of whole blood and plasma at 0, 7, and 24 hours after drawing blood. Results are expressed as mean \pm SD of five rats. ●: whole blood, ○: plasma

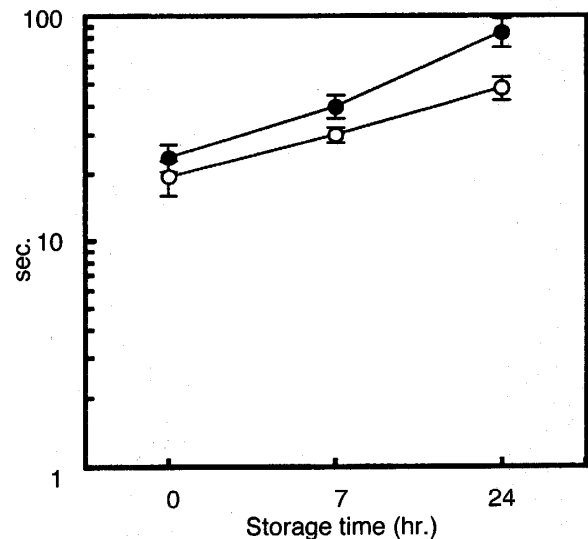


Fig. 2. Variation of activated partial thromboplastin time of whole blood and plasma at 0, 7, and 24 hours after drawing blood. Results are expressed as mean \pm SD of five rats. ●: whole blood, ○: plasma

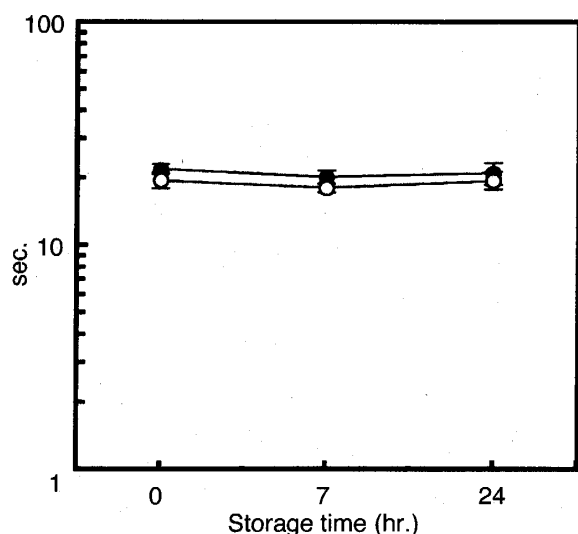


Fig. 3. Variation of prothrombin time of whole blood and plasma at 0, 7, and 24 hours after drawing blood. Results are expressed as mean \pm SD of five rats. ●: whole blood, ○: plasma

考 察

血液凝固系の検査は、総合的検査、血液凝固因子定量および凝固抑制物質と循環抗凝血素の検査に大きく分類される⁴⁾。総合的検査として、内因系凝固因子の活性を測る全血凝固時間法、血漿カルシウム再加凝固時間法および活性化部分トロンボプラスチン時間法、外因系凝固因子の活性を測るプロトロンビン時間法、トロンボテスト、トロンボプラスチン生成試験およびトロンボエラストグラフィーが用いられている。次に血液凝固因子定量として、フィブリノゲンを定量するトロンビン時間法、チロンン法、硫酸アンモニウム比濁法および免疫学的方法、また、血液凝固第Ⅱ、Ⅴ、Ⅶ、Ⅷ、Ⅸ、Ⅹ、Ⅺ、Ⅻ、Ⅼ因子、プレカリクレインおよび高分子キニノゲンの測定が行われている。そして、凝固抑制物質と循環抗凝血素の検査として、アンチトロンビンⅢ、循環抗凝血素のスクリーニング試験、循環抗凝血素抑制力価の測定が行われている。これらの検査法の中から、総合的な凝固能を知るために最低限必要とされ、しかも操作が簡便で少量の検体で測定が可能な血液凝固自動測定装置を用いた測定が可能であることを考慮して測定方法を選択した。本実験

では血液凝固の最終段階に関わるトロンビン時間の測定を、次に総合的な内因系因子の測定法の中から活性化部分トロンボプラスチン時間法を、総合的な外因系因子の測定法の中からプロトロンビン時間法を選んで用いた。

研究に小動物を用いる場合、採取できる血液検体は少量である。そこで血液凝固系の検査だけでなく、一検体から可能なかぎり多くの情報を得るためには、精度を保持しながら少量で測定することが必要である。また、検査室では多数の検体を迅速に処理しなければならないことから操作を簡便にすることや患者への負担を軽減するために採血量を最小限にすることが重要である。さらに、全血の方が血漿よりも生体内の環境を反映している。これらのことから血漿を用いるよりも全血で測定する方が貴重な血液検体を有効利用できるものと確信する。

本実験の結果から、血液凝固に関する諸因子は血漿に含有するため凝固時間は血漿よりも全血の方が長い、凝固時間に対する採血後の保存時間の影響は、トロンビン時間法およびプロトロンビン時間法についてはほとんど認められなかった。しかし、活性化部分トロンボプラスチン時間は保存時間が長くなるに連れて延長し、ヒトの血液の凝固時間に対する保存時間の影響について述べた報告^{5,6)}では、活性化部分トロンボプラスチン時間は採血後2時間以上を経過すると血液のpHがアルカリ側に変化して凝固因子が不安定になるために凝固時間が急激に延長すると記されている。おそらくラットの血液についても同じ変化が起きていたものと推察する。また、凝固系が亢進したカラゲニン誘発炎症ラット⁷⁻⁸⁾の血液を用いて凝固時間を測定したが、いずれの測定方法でも正常ラットの血液の場合と同様の結果が得られた。さらに、ヘマトクリット値は全血の凝固時間に影響を及ぼすと推察されるため、ヘマトクリット値が正常範囲を外れている場合、凝固因子に基づく値の変動のみを把握するためには何らかの補正をしなければならない。そこでデータは示さないが、ヘマトクリット値の凝固時間への影響を検討するために全血に血漿を添加してヘマトクリット値を40%、35%および30%に調整したものについて凝固時間を測定した。その結果、トロンビン時間についてはヘマトクリット値による補正で血漿の凝固時間を推定することが可能であったが、活性化部分トロンボプラスチン時間およびプロトロンビン時間については総合活性を測る方法であるために簡単

な計算では推定できなかった。

以上の結果より、正常値を対照にすれば、全血が凝固能の判定に十分使用可能であること、さらに全血および血漿共に採血時から半日後あるいは翌日に凝固時間を測定してもデータとして有効な値が得られると推察した。

結 語

トロンビン時間およびプロトロンビン時間について、採血後から保存時間が7時間および24時間の全血および血漿は安定した値を示した。しかし、活性化部分トロンボプラスチン時間については保存時間の経過に伴って凝固時間が延長した。

以上の結果より、いずれの検体も保存条件を一定にすることによって、全血が血漿と同様に血液の凝固時間を判定するための検体として有効であることが示唆された。

文 献

- 1) Quick, A.J., in "Hemorrhagic disease", pp.436-439, Lea and Febiger, Philadelphia (1957)
- 2) Hattersley, P.G. and Hayse, D., *Am. J. Clin. Pathol.*, **66**, 295-310(1976)
- 3) Quick, A.J., Stanly, B.M. and Baneroff F.W., *Am. J. Med. Sci.*, **190**, 501-511 (1935)
- 4) 金井 泉, 臨床検査法提要, 金原出版, 東京 第29版, pp.321-396(1983)
- 5) 小林香織, 湯本ちづ子, 中山佳典, 半戸茂友, 仙名清次郎, 村山範行, *医学検査*, **44**(7), 1137-1141(1995)
- 6) Zucker, S., Cathey, M.H., West, B., *Am. J. Clin. Pathol.*, **53**, 924-927(1970)
- 7) Tsurufuji, S., Sato, H., Min, K.R. and Ohuchi, K., *J. Pharm. Dyn.*, **1**, 8-14(1978)
- 8) Horie, N., Kinoshita, A., Iemoto, A., Okamoto, U. and Okada, Y., *Bull. Mukogawa Women's Univ. Nat. Sci.*, **41**, 27-34(1993)