

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790996
 研究課題名（和文） 免疫機能低下を指標とした人工心肺操作の最適化に関する研究
 研究課題名（英文） Study of optimization of extracorporeal circulation in open heart surgery on diminished immune function
 研究代表者
 新保 年弘（SHINBO TOSHIHIRO）
 北里大学・医療衛生学部・助教
 研究者番号：10406910

研究成果の概要（和文）：本研究では、免疫系における心臓手術での体外循環の影響を明らかにするために、リンパ球機能に着目し、リンパ球の幼若化能について検討した。Phytohemagglutinin(PHA)刺激において、人工肺あり群と人工肺なし群では人工肺あり群に有意にリンパ球幼若化能低下が見られた。血液回路閉鎖群と血液回路開放群では差は見られなかった。また、人工肺へのガス吹送あり群とガス吹送なし群とでも差は見られなかった。

研究成果の概要（英文）：In the present study, to elucidate the effects of extracorporeal circulation in open heart surgery on the immune system, I focused on the function of lymphocytes and examined the changes in the ability of lymphocyte blastoid transformation. After the treatment with Phytohemagglutinin(PHA), ability of blastoid transformation in contact with the extracorporeal circulation circuit with membrane oxygenator was lower than the ability in contact with extracorporeal circulation circuit without membrane oxygenator. There was no significant difference of the ability between the closed extracorporeal circulation circuit and the opened extracorporeal circulation circuit. And there was no significant difference of the ability between the extracorporeal circulation circuit without oxygenator gas and the extracorporeal circulation circuit with oxygenator gas too.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2008年度 | 1,600,000 | 480,000 | 2,080,000 |
| 2009年度 | 1,600,000 | 480,000 | 2,080,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,200,000 | 960,000 | 4,160,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：人工心肺、体外循環、リンパ球

1. 研究開始当初の背景

体外循環を用いた開心術後では、患者の免疫力低下や感染症などが発症しやすく、特に体外循環時間が長くなると、その傾向は強く、患者の生命にも係わってくる。そのため、開心術後の評価では、手術方法のほかに、患者の侵襲が最も大きい体外循環の評価（体外循環時間、人工心肺充填量、無輸血体外循環など）も考慮に含まれている。しかし、これらの評価には人工心肺操作による評価は少ない。手術後にその手術がうまく行ったかどうかを人工心肺操作による免疫機能といった観点から評価することができれば、患者の術後の管理に役立てることができ、また、人工心肺操作技術の向上、手術手技の改善などにもつながる。

そのためには、人工心肺材料に接触したときの免疫機能に關与するリンパ球について調べる必要がある。しかし実際の開心術では、体外循環以外にも執刀行為（術部や送・脱血のカニューレション）や麻酔器による陽圧換気、大量の薬剤投与などの侵襲によっても免疫機能の低下することが知られており、体外循環だけでの評価は困難なものに近い。

2. 研究の目的

リンパ球の影響について体外循環だけに注目しても、リザーバ、人工肺、人工心肺回路など人工肺材料による影響や、人工肺へのガス吹送制御、ポンプ流量制御など人工心肺装置操作による影響など様々な要素が含まれている。本研究では、生体による影響を受けない Ex vivo での実験を行い、体外循環のみでの環境の中から、人工心肺材料や人工心

肺操作条件の違いなどにおけるリンパ球の幼若化能について検討した。

3. 研究の方法

(1) 実験条件

実験回路として、均質膜と多孔質膜を組み合わせた複合膜型の人工肺、ソフトリザーバ、血液回路チューブを用い、人工心肺装置にはトノクラ医科工業社製のコンポⅡを使用した。対象血液はブタ血液を使用し、ヘパリンと抗生剤を加え、生理食塩水でヘマトクリット (Ht) 30%に希釈、調製した。人工心肺回路血液充填量を 1500 ml とし、血液温度 34°C、循環時間 3 時間、血液流量 3 l/min で循環させ、以下の条件で比較した。

(2) 人工心肺材料の違いによる条件

(人工肺による影響)

Ht 30%に調整したブタ一匹の血液を、循環させないで 34°Cにて保存した“34°C群”、リザーバと血液回路のみで循環させた“人工肺なし群”、血液回路に人工肺を組み込み循環させた“人工肺あり群”に分類し、上記 3 (1)の条件下でリンパ球の評価を行った。また、体外循環中の空気接触を避けるため人工心肺回路は閉鎖回路で行った (図 1)。

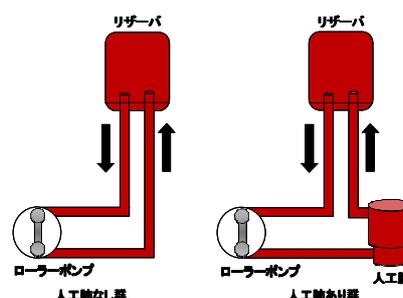


図1 人工肺有無による実験回路

(3) 血液回路の開放回路と閉鎖回路の違いによる条件

(リザーバ内での空気接触による影響)

Ht 30%に調整した血液を、循環させないで 34°Cにて保存した“34°C群”、リザーバと血液回路の構成で、空気の接触ないようにした“血液回路閉鎖群”、リザーバを開けて空気接触をさせた“血液回路開放群”に分類し、3 (1) の条件下でリンパ球の評価を行った (図 2)。

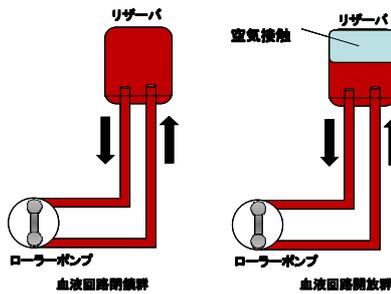


図2 リザーバ内空気接触の有無による実験回路

(4) 人工心肺操作の違いによる条件

(人工肺ガス吹送の有無による影響)

Ht 30%に調整した血液を、循環させないで 34°Cにて保存した“34°C群”、血液回路と人工肺とで閉鎖回路にし、人工肺に空気を吹送させない“人工肺吹送なし群”、人工肺に空気を吹送させた“人工肺吹送あり群”に分類し、3 (1) の条件下でリンパ球の評価を行った。人工肺吹送なし群では人工肺ガス層側に窒素を充填し、その後、ガス入口、出口を封鎖し空気接触がないようにした。また、人工肺吹送あり群では空気を 2 l/min の流量で人工肺に吹送した (図 3)。

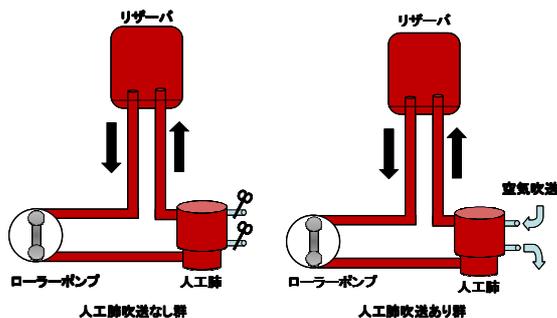


図3 人工肺ガス吹送の有無による実験回路

(5) リンパ球の幼若化能試験

各群より得られた血液からリンパ球を分離し細胞数を調整後、リンパ球の mitogen である Concanavalin A (Con A) を添加したものと、Phytohemagglutinin (PHA) を添加したものと無刺激のものを 48 時間培養した。細胞増殖感受性試薬である WST-8 キット (キシダ化学株式会社) を用いてそれぞれの吸光度を測定し、培養前の吸光度と比較することで、幼若化能を評価した。

4. 研究成果

(1) 結果

①人工心肺材料の違いによる結果 (人工肺による影響)

グラフの縦軸は吸光度を表しており、この値が高いほど細胞数が多いことを示している。これらのグラフから、リンパ球幼若化能は無刺激に対して ConA 刺激、PHA 刺激は各群において増加した。また両刺激とも吸光度の値が 34°C群に比べ、人工肺なし群、人工肺あり群の両群で低下し、人工肺なし群より人工肺あり群の方がさらに値は低下した。PHA 刺激においては、この変化を対応のある t 検定にて統計処理を行った。その結果、人工肺なし群と人工肺あり群の間に有意差が見られた (図 4)。

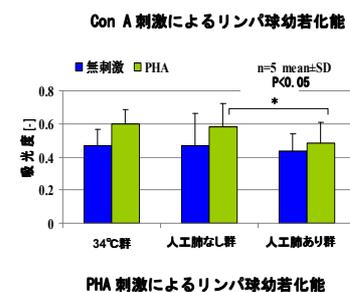
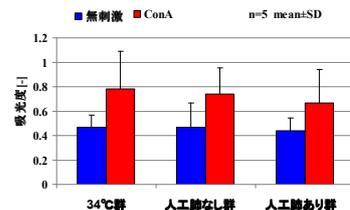


図4 人工肺有無によるリンパ球幼若化能

②血液回路の開放回路と閉鎖回路の違いによる結果（リザーバ内での空気接触による影響）

リンパ球幼若化能は無刺激に対して Con A 刺激、PHA 刺激は各群において増加した。しかし、どの刺激においても各群の間に差は見られなかった（図 5）。

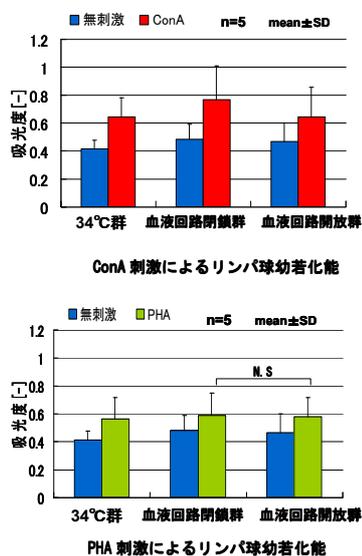


図 5 空気接触有無によるリンパ球幼若化能

③人工心肺操作の違いによる結果（人工肺ガス吹送の有無による影響）

Con A 刺激、PHA 刺激のいずれも吹送なし群と吹送あり群の間に差は見られなかった。また PHA 刺激では、34°C 群に対する吹送なし群、34°C 群に対する吹送あり群に有意差が見られた（図 6）。

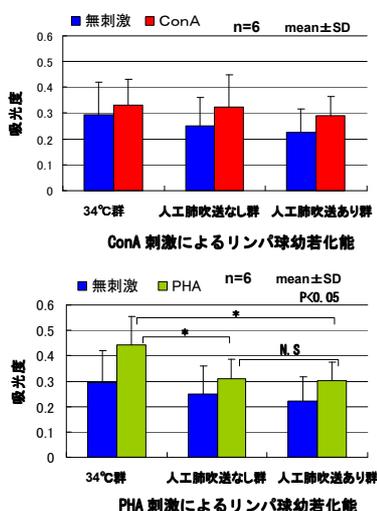


図 6 吹送ガス有無によるリンパ球幼若化能

(2) 考察

①人工心肺材料の違いによる考察（人工肺による影響）

4-(1)-①において、リンパ球の幼若化能は 34°C 群、人工肺なし群、人工肺あり群の順に低下した。この 3 群は、保温のみの 34°C 群をコントロールとし、人工肺なし群と比較することで血液回路への接触とローラポンプの物理的刺激的の有無による影響が検討できる。また人工肺あり群と比較することで血液回路、ポンプに加え、人工肺への接触による影響が検討できる。これらのことから、リンパ球は循環による血液回路やローラポンプの物理的刺激と、人工肺への接触の影響を受けたと考えられる。

PHA 刺激では、人工肺あり群と人工肺なし群の間で有意にリンパ球幼若化能が低下した。このことからリンパ球は血液回路やローラポンプの物理的刺激以上に、人工肺への接触の影響を受けたと考えられ、特に PHA に反応する CD4 陽性細胞、すなわちヘルパー T 細胞の機能が大きく関与すると考えられる。

人工肺は膜面積が広く、ガス交換を良くするために中空糸間の血流を層流ではなく乱流にする設計がなされている。この血液との接触面積の大きさと構造が、リンパ球幼若化能に影響を与えた可能性があると考えられる。

②血液回路の開放回路と閉鎖回路の違いによる考察（リザーバ内での空気接触による影響）

4-(1)-②において、リンパ球幼若化能は無刺激に対して Con A 刺激、PHA 刺激ともに各群において増加した。しかし、どの刺激においても各群の間に差は見られなかった。

このことから、リザーバ内での血液と空気との接触によるリンパ球への影響は少ない

と考えられる。これは、実験で用いたリザーバ内の空気と血液の接触面積がわずかであったため、また空気と血液が穏やかに接触していただけであったため、リンパ球へ与える影響は少なかったと考える。

③人工心肺操作の違いによる結果（人工肺ガス吹送の有無による影響）

4-(1)-③において、Con A 刺激、PHA 刺激とも、吹送なし群と吹送あり群の間でリンパ球の幼若化能に差は見られなかった。このことから、人工肺でのガスの吹送がリンパ球に及ぼす影響は少ないと考えられる。本実験で用いた人工肺は、複合膜を使用しており、血液が直接ガスと接触していないため、血液に対して影響を与えなかったと考える。

しかし、PHA 刺激において、34℃群に比べて、吹送なし群と吹送あり群のリンパ球幼若化能は有意に低下した。これらのことから、血液が人工肺材料と接触することによってリンパ球の機能に影響を与えるがあるが、人工肺のガス吹送による血液との空気接触はリンパ球機能に与える影響は少ないと考えられる。

今回の研究から人工心肺材料では人工肺にリンパ球に大きな影響を与えられ、人工心肺操作においては人工肺ガス吹送、リザーバ内の空気接触にはさほど影響を与えないと考える。しかし、この他にもその他の人工心肺材料、吸引やベント、血液温変化高濃度酸素付加、ポンプ回転数などの人工心肺操作条件などが考えられ、さらに検討する必要があると考えられる。

⑤ 今後の展望

今回の研究では Ex vivo で行い、ブタ血液のリンパ球の機能についてリンパ球幼若化能から検討した。今後はリンパ球幼若化能以

外でのリンパ球検査についてさらに多くの検討が必要であると考えられる。また、研究背景でも述べたが、今回行った実験以外にも体外循環による影響要素があると考えられ、体外循環の条件のひとつひとつを検討する必要があると考えられる。そして体外循環では何の人工心肺材料が影響を与えるのか、また人工心肺操作ではどのような操作が影響を与えるのかを総合的に評価することで、現在まで経験的に頼っていた人工心肺操作方法を規準化することができると考えている。さらには患者の術後管理に有用で、術後評価につながる臨床上大きな意義を持つと考えている。また、学術的には、手術方法もしくはその手術それ自体を評価する新しい指標の提示にもつながると考えている。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計0件）
なし
〔学会発表〕（計0件）
なし
〔図書〕（計0件）
なし
〔産業財産権〕
○出願状況（計0件）
なし
○取得状況（計0件）
なし
〔その他〕
ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新保年弘 (SHINBO TOSHIHIRO)
北里大学・医療衛生学部・助教
研究者番号：10406910

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし