

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09118

研究課題名（和文）体外循環中の凝固線溶系亢進と血小板減少を抑制するための新たなアプローチ

研究課題名（英文）The inhibitory effect of thrombomodulin on thrombocytopenia in a rat cardiopulmonary bypass model

研究代表者

秋山 正年（Akiyama, Masatoshi）

東北大学・医学系研究科・大学院非常勤講師

研究者番号：80526450

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：ラット人工心肺モデルを用いて、人工心肺中におけるトロンボモジュリン(TM)製剤の有効性と安全性を確認する研究を行った。本研究結果では、TM製剤投与による出血事象は確認されず、ヘパリン投与下でもTM製剤を安全に投与可能であることが示唆された。一方でTM製剤投与による血小板減少抑制効果や炎症反応抑制効果は確認できず、その有効性を証明することはできなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果では、人工心肺中におけるTM製剤の有効性を証明することはできなかった。小動物人工心肺モデルでは、循環血漿量と人工心肺回路内容量の比率が大きく異なることやTM製剤の投与量が不足していたと考えられ、今後実験方法を再考し大型動物人工心肺モデルによる実験を行うことでTM製剤の有効性を確認できる可能性はありと考えられた。

研究成果の概要（英文）：The efficacy and safety of thrombomodulin (TM) preparations during artificial heart-lung therapy were confirmed using a rat artificial heart-lung model. The results of this study showed that no bleeding events were observed with TM agents, suggesting that TM agents can be safely administered even under heparin administration. On the other hand, the efficacy of TM administration in suppressing thrombocytopenia and inflammatory reactions could not be confirmed.

研究分野：医学

キーワード：トロンボモジュリン 血小板 人工心肺 心臓外科手術 凝固異常 炎症反応 ヘパリン

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

心臓血管外科手術において、体外循環による心肺補助は必要不可欠であるがそれに伴う問題も少なくはない。体外循環において特に重大な問題となるのは、体外循環中の凝固線溶系の亢進とそれに伴う血栓形成および血小板減少である。さらに人工肺を用いる場合は人工肺への血小板付着と血栓形成も問題となる。体外循環中に血小板減少が起こると、体外循環終了後の出血コントロールに難渋し、出血傾向から更なる凝固能異常状態を惹起し患者の生命予後を危うくすることとなる。そのため心臓血管外科手術、特に長時間の人工心肺を要する場合には血小板輸血が必須となる。実際、当診療科で行われた人工心肺を用いた胸部大動脈手術の血小板数を検討したところ、術前後での血小板の減少は著明であった。このような事実から、心臓外科領域での血小板の需要は大きく、人工心肺中の血小板減少を軽減することができれば、貴重で高価な血小板製剤の消費量を抑えることができ、医療経済にも良い結果をもたらすと考えられる。

人工心肺回路において凝固線溶系の亢進がひきおこされる要因のひとつに、本来血管内皮が持つ抗血栓作用が人工心肺回路に存在しないことが考えられる。血管内皮は抗血栓作用を持つ物質を多数含み、トロンボモジュリン(TM)はその一つである。TMはトロンビンと結合しトロンビン-TM複合体を形成しトロンビンの抗凝固活性を失活させる作用があるが、さらにトロンビン-TM複合体がプロテインCを活性化して強力な抗凝固作用を持つ活性化プロテインCに転換させ、これが活性型第Va因子や、活性型第VIIIa因子を不活化することで抗凝固活性を示し、この機序はヘパリンとは異なる。よって人工心肺中にヘパリンに加えてTMを投与することで、より生理的な血管内皮に近い環境を作り出すことができ、人工心肺回路に伴う一連の凝固線溶系亢進作用を抑制し、血小板減少を抑える可能性がある。またヘパリンとTMの同時投与の出血リスクは明らかではないが、TMはトロンビンの濃度依存性に抗凝固活性を発揮するため出血副作用は少ない可能性がある。さらにTMは抗炎症作用も持つため、血液異物反応に伴う炎症の抑制も期待できる。

これまで開心術のための体外循環成立に必要なヘパリン投与下で、TM製剤を投与した場合の凝固線溶系への影響を詳細に解析した報告はなく、血小板保持効果を証明した研究はこれまでに報告されていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ヘパリン投与下での機械的補助循環維持中に凝固線溶系調節剤としてTM製剤を投与することでより望ましい凝固系抑制と血小板保持効果が得られるという仮説を証明することである。

本研究での、人工心肺中におけるTM製剤の有効性と安全性の証明は日常の開心術において血液凝固と出血合併症を抑制し得るより安全な抗凝固療法的确立と、血小板製剤をはじめとする輸血製剤の使用削減につながる事が期待される。

3. 研究の方法

雄Sprague-Dawley (SD) ラット (11週齢、350~400g) を用いてモデル作成を行い、カニュレーションのみ行い人工心肺装着を行わないSham群(n=5)、人工心肺開始前にヘパリン500IU/kgを投与するControl群(n=8)、ヘパリンに加えTM 12.5U/kgを投与する低用量投与(TM low)群(n=8)、ヘパリンに加えTM 125U/kgを投与する中用量投与(TM medium)群(n=8)、ヘパリンに加えTM 380U/kgを投与する高用量投与(TM high)群(n=8)の5群にわけ、実験を行った(図1)。

全身麻酔下に、尾動脈送血、右心房脱血で人工心肺を確立した。ポンプにはローラーポンプ(Model RP-VT; Furue Science Co, Tokyo, Japan)を、人工肺には実験用人工肺HIPO-003(MERA, Tokyo, Japan)を用い、流量100mL/kg/minで90分間駆動させた。また、左大腿動脈にA-lineを留置し、動脈圧分析並びに血液ガス分析を行った。動脈血血液ガス分析は、人工心肺装着前(T1)、人工心肺開始後15分(T2)、人工心肺開始60分後(T3)、人工心肺停止後30分後(T4)に測定した。

測定終了後に犠牲死させたラットの全身検索を実施して、肺および腎臓を摘出し、病理組織学的に評価した。

4. 研究成果

図1に各群の血小板数の推移を示す。Control、TM low、TM medium、TM highいずれも人工心肺開始後に血小板数の著明な減少を認め、人工心肺により血小板数が減少することをラット人工心肺モデルにおいても確認した。一方で、ControlとTM low、TM medium、TM highの推移は同様の傾向を示しており、血小板減少においても差を認めず、TMの血小板減少抑制効果は確認されなかった。

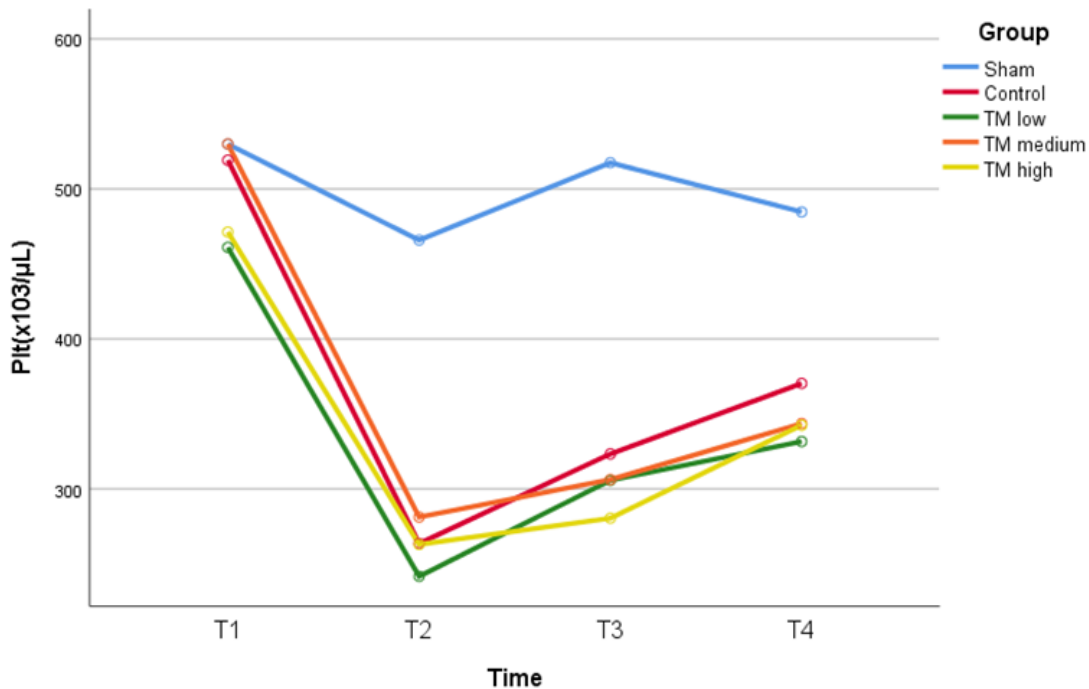


図1. 各群の血小板推移

図2にヘマトクリット値で補正した白血球数の各群の推移を示す。Control、TM low、TM medium、TM highいずれも人工心肺開始後に白血球の著明な増加を認め、人工心肺により炎症反応が亢進されることをラット人工心肺モデルにおいても確認した。一方で、ControlとTM low、TM medium、TM highの推移は同様の傾向を示しており、白血球数の増加においても差を認めず、TMの炎症抑制効果は確認されなかった。

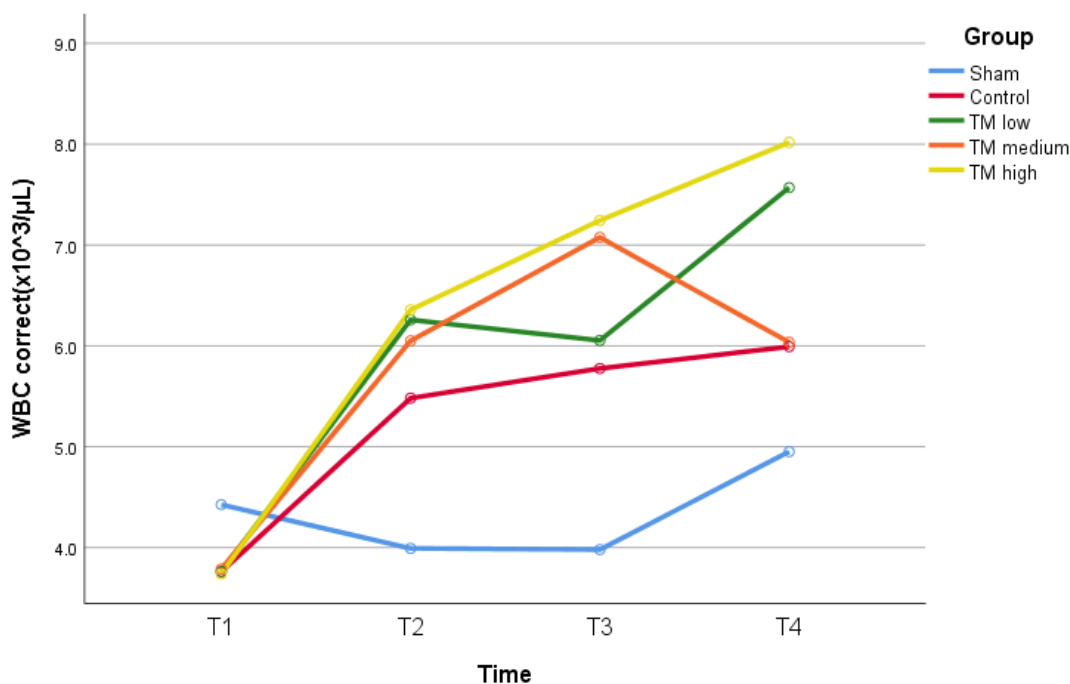


図2. 各群の補正白血球数の推移

摘出した肺、腎臓はHE染色ならびにMT染色を行い、病理組織学的に評価した。

HE染色では、腎臓、肺ともにSham群と比較し、Control群、TM medium群、TM high群いずれでも好中球の浸潤は認めず、人工心肺回路による炎症反応やTMの炎症抑制効果は病理組織学的には確認されなかった。また、MT染色では、腎臓、肺ともにSham群と比較し、Control群、TM medium群、TM high群いずれでも微小血栓の生成や出血は認めず、TMの血栓抑制効果は病理組織学的には確認されなかったが、ヘパリンとTM同時投与による出血リスクの上昇も病理組織学的には確認されなかった。

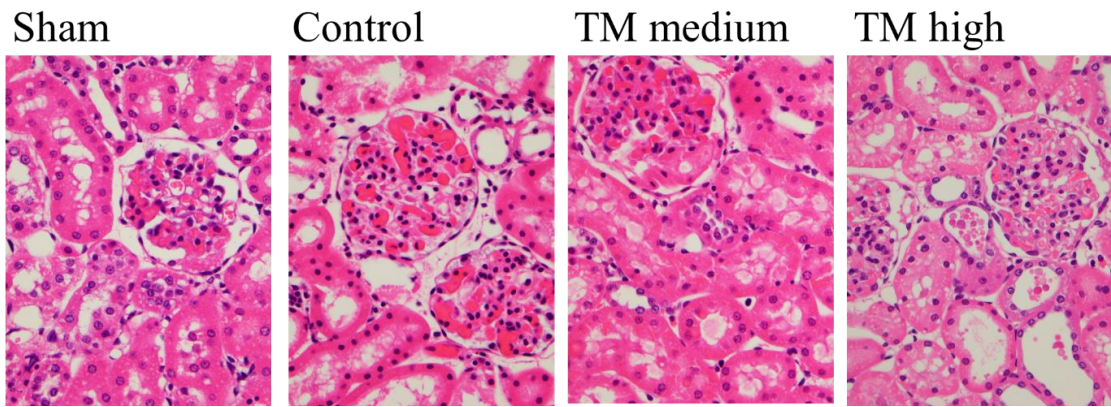


図 3. 腎臓(HE 染色)

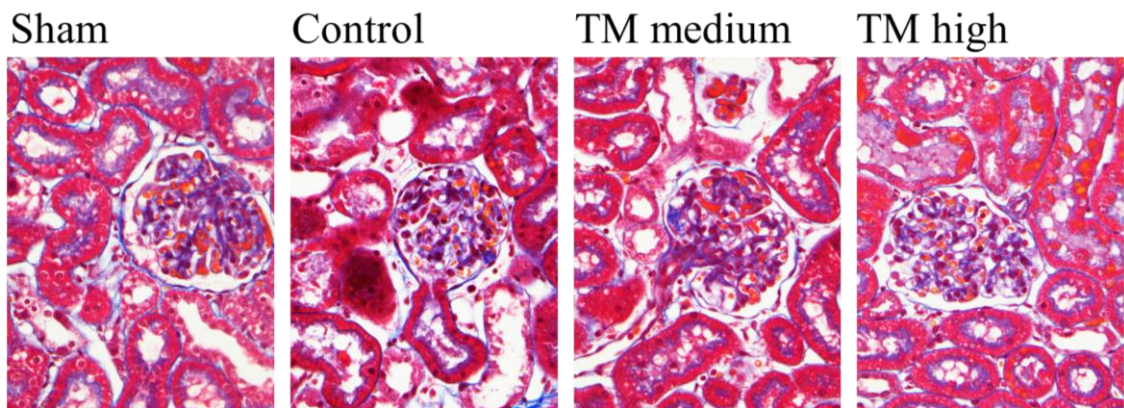


図 4. 腎臓(MT 染色)

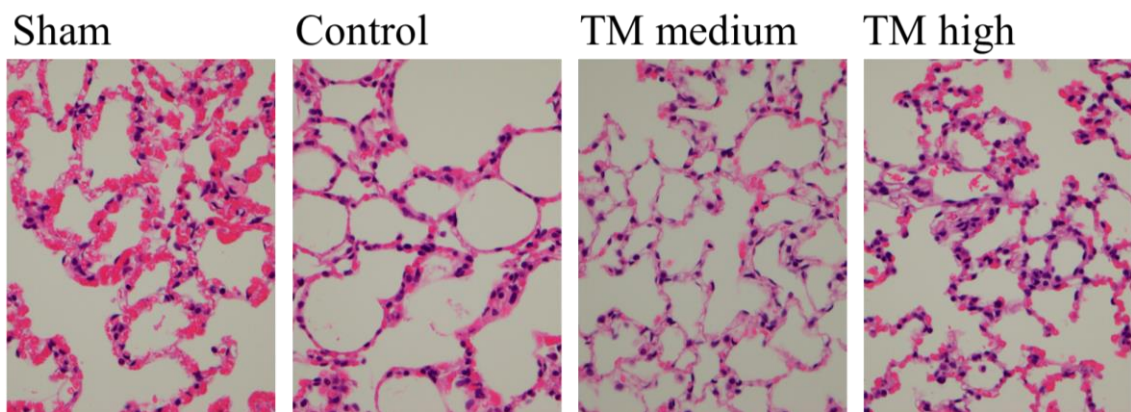


図 5. 肺(HE 染色)

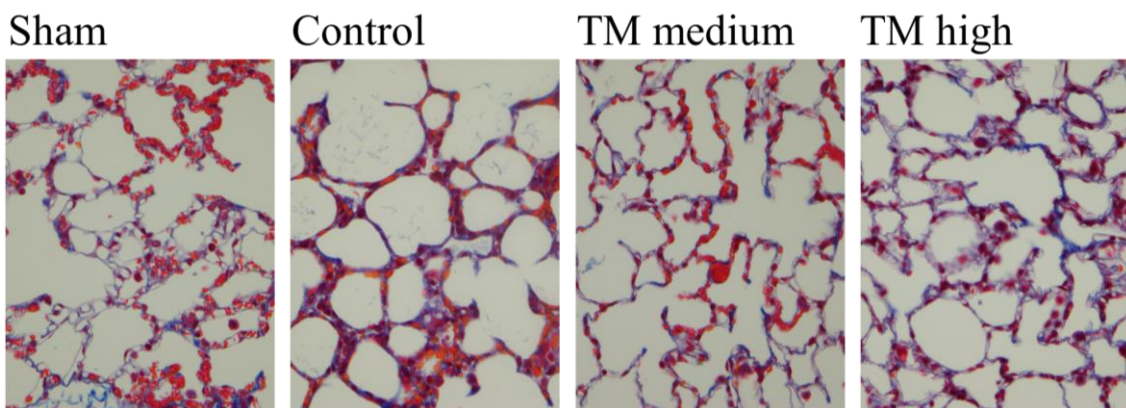


図 6. 腎臓(MT 染色)

以上の結果から、今回の研究では人工心肺中における TM 製剤の有効性を証明することはできなかった。本研究ではラット人工心肺モデルであることから、循環血漿量の変化を最小限に抑えるため血液ガス分析しか行っておらず、血小板減少の原因となる凝固因子や白血球数以外の炎症マーカーの測定を行っていなかった。実験方法

を再考し測定項目を増やすことでTMの効果を示される可能性は十分にあると考えられた。また、今回は播種性血管内凝固の治療量を基に投与量を決定している。しかし、過剰消費されたTMを補うことを目的とした投与量と、基より存在しない人工心肺回路への凝固異常改善を目的とした投与量では、後者のほうがより大量に必要とする可能性がある。さらに小動物の人工心肺モデルでは循環血漿量と回路内容量の比率が実臨床よりも回路内容量が大きくなっていることも一因と考えられた。大型動物人工心肺モデルであればこの問題を解決し、TM製剤の有効性を証明しえると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	坂爪 公 (Sakatsume Ko) (10837032)	東北大学・医学系研究科・大学院非常勤講師 (11301)	
研究分担者	鈴木 智之 (Suzuki Tomoyuki) (10837157)	東北大学・大学病院・助教 (11301)	
研究分担者	齋木 佳克 (Saiki Yoshikatsu) (50372298)	東北大学・医学系研究科・教授 (11301)	
研究分担者	細山 勝寛 (Hosoyama Katsuhiro) (70837046)	東北大学・医学系研究科・大学院非常勤講師 (11301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関