

令和元年6月26日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K10547

研究課題名(和文)人工心肺における白血球・血小板機能障害誘発機構の基礎的解明

研究課題名(英文) Research of a leukocyte and platelet dysfunction causing by cardiopulmonary bypass

研究代表者

板橋 俊雄 (Itabashi, Toshio)

東京医科大学・医学部・助教

研究者番号：00439738

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：心臓血管手術では、人工心肺や低体温などの影響で血小板や白血球機能障害がおこる。本研究では、血小板ミトコンドリアの呼吸機能を時間経過に従い測定し比較検討した。結果として、人工心肺中は人工心肺前後に比べて血小板ミトコンドリア呼吸鎖のComplex I、Complex II、Complex IIIの機能低下が認められた。また、人工心肺が長時間になるほど血小板ミトコンドリア呼吸鎖複合体の全体に機能低下が認められるが、術後に血小板ミトコンドリア呼吸鎖複合体の機能は回復することが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心臓血管外科手術において、人工心肺による血小板機能障害による出血助長の可能性が想定されているが、その機序は明らかでない。本研究では、人工心肺中の血小板ミトコンドリア呼吸能を測定した。結果として、ミトコンドリア呼吸鎖複合体の機能低下が確認され、ATP産生低下を引き起こし止血能低下に関与する可能性が示唆された。ミトコンドリア呼吸鎖複合体は、各complexは運動して機能するため、どのcomplexが大きく影響しているかは今後も引き続き研究が必要であるが、障害部位が特定され、機能を補う薬剤が発見されれば、人工心肺後の出血を抑えられる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：A platelet and leukocyte dysfunction occur in a cardiopulmonary bypass and hypothermia by a cardiovascular surgery. In this study, we measure a mitochondrial respiratory function of a platelet.

As a result, a decline of a function in a Complex I, Complex II, and Complex III which were platelet mitochondria breathing chain was found in the cardiopulmonary bypass.

We confirmed that the function of the platelet mitochondria breathing chain complex was decline with a cardiopulmonary bypass time was long but got back after an operation.

研究分野：麻酔科学

キーワード：血小板 ミトコンドリア 人工心肺 呼吸能

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

#### 1. 研究開始当初の背景

心臓血管手術では人工心肺(Cardiopulmonary bypass; CPB), 低体温などの影響で血小板の機能障害が起こり止血凝固系に異常が生じると考えられるが, その障害機構については明らかになっていない。

#### 2. 研究の目的

本研究では人工心肺を用いる心臓血管手術が白血球, 血小板ミトコンドリア呼吸能に及ぼす影響および Ca 取り込み能に及ぼす影響を中心に検討することにした。

#### 3. 研究の方法

##### < 研究対象者の選択 >

東京医科大学倫理委員会の承認を得て行った(承認番号 3552)。

研究材料として対象とする患者の動脈血を用いた。人工心肺を用いる心臓血管手術では必ず観血的動脈圧測定をするため, 患者に負担のない方法を採用した。

手術内容や手術時間によるばらつきを少なくするため, 以下の条件で対象患者を選択した。

適応基準 1) 本人から同意書が取得できた患者 2) 20 歳以上の待機的手術患者 3) 感染症を有さない 4) 手術時間が比較的短いと予想されるもの 5) 心臓血管手術が初回である 6) ASA-PS 分類 ~ 7) 血液疾患を有さない

除外基準 1) 妊娠中の患者や悪性疾患のある患者 2) 重篤な電解質異常のある患者 3) 重篤な内分泌疾患, 肝障害, 腎機能障害のある患者 4) 周術期に血小板輸血をされた患者 5) その他本研究に不適当と判断した患者

##### < 血小板ミトコンドリア機能の測定のタイミングの検討 >

白血球に比べ血小板の方が短時間で単離しやすいため, 血小板を用いてミトコンドリア呼吸能の測定を行った。高感度のオキシグラフであるオロボロス™ (Oroboros Oxygraph-2k, Innsbruck, Austria) は数種類の試薬を用いることでミトコンドリア呼吸鎖の複合体( ~ )のうち, どの部位がどの程度の障害を受けているかを評価することが可能である。

はじめに人工心肺を用いる心臓血管手術のどのタイミングで血液を採取し, ミトコンドリア呼吸能を調べるのが適当か検討した。

当初の予定では術前, 人工心肺開始 1, 2 時間後, 手術終了時, 術後第一病日を予定していた。しかし人工心肺開始 1 時間後と 2 時間後では大きく差がでない可能性があること, 手術終了時では手術の内容により時間が大きく異なることが考えられた。そこで手術や人工心肺時間によるばらつきを少なくするため, 麻酔導入時(t1), 人工心肺開始 2 時間後(t2), 人工心肺開始 4 時間後(t3), 術後第一病日(t4)の 4 ポイントで測定を行った。

##### < 統計解析 >

GraphPad Prism6(GraphPad Software Inc, San Diego, CA)を使用し, Tukey's multiple comparison test の後, Two-way ANOVA で行った。p 値 0.05 未満を有意差ありとした。

#### 4. 研究成果

条件にあてはまる 31 名から同意書を取得し, 血小板輸血がされたもの, 何らかの事情で 4 回の採血が行えなかったもの等を除いた 17 例で解析を行った。平均年齢は 66.5 歳, 男女比は 10:7, 主な手術は弁置換術であった。平均手術時間は 405 分, 人工心肺時間は 224 分, 出血量は 1192ml であった。術前の平均血小板数は  $215 \times 10^3/\mu\text{l}$ , 術後の平均血小板数は  $115 \times 10^3/\mu\text{l}$  であった。薬剤投与前の basal の時点で, t1 と t3(p<0.05)および t3 と t4(p<0.05)に有意差が見られた。ミトコンドリアの呼吸基質であるマレイン酸とピルビン酸の投与では全てのタイミングで有意差は見られなかった。complex の基質である ADP の投与で, t1 と t3(p<0.01)および t3 と t4(p<0.05)に有意差が見られた。complex を促進する Glutamate の投与で, t1 と t3(p<0.05)に有意差が見られた。complex を促進する Succinate の投与で, t1 と t3(p<0.05)および t3 と t4(p<0.05)に有意差が見られた。complex を抑制する Oligomycin の投与では全てのタイミングで有意差は見られなかった。脱共益剤で, プロトンを強制的にミトコンドリア内に透過させて酸素消費を増加させる FCCP titration では t1 と t3(p<0.01)および t3 と t4(p<0.05)に有意差が見られた。complex を抑制する Rotenone の投与では全てのタイミングで有意差は見られなかった。

人工心肺中は人工心肺前後に比べて血小板ミトコンドリア呼吸鎖の Complex , Complex , Complex の機能低下がみられた。薬剤投与前の basal の時点で, 麻酔導入時(t1)と人工心肺開始 4 時間後(t3)に有意差があるが, 人工心肺開始 2 時間後(t2)には有意差が見られないことから, 人工心肺が長時間になるほど血小板ミトコンドリア呼吸鎖複合体の全体に機能低下が認められることが分かった。さらに人工心肺開始 4 時間後(t3)と術後第一病日(t4)に有意差があるが, 麻酔導入時(t1)と術後第一病日(t4)には有意差が見られないことから, 術後に血小板数が低下しても血小板ミトコンドリア呼吸鎖複合体の機能は回復することが分かった。

また, complex と を促進する薬剤および強制的に酸素消費を増加させる FCCP の投与で人工心肺中は人工心肺前後に比べて機能が低下することが分かったが, complex や を抑制する

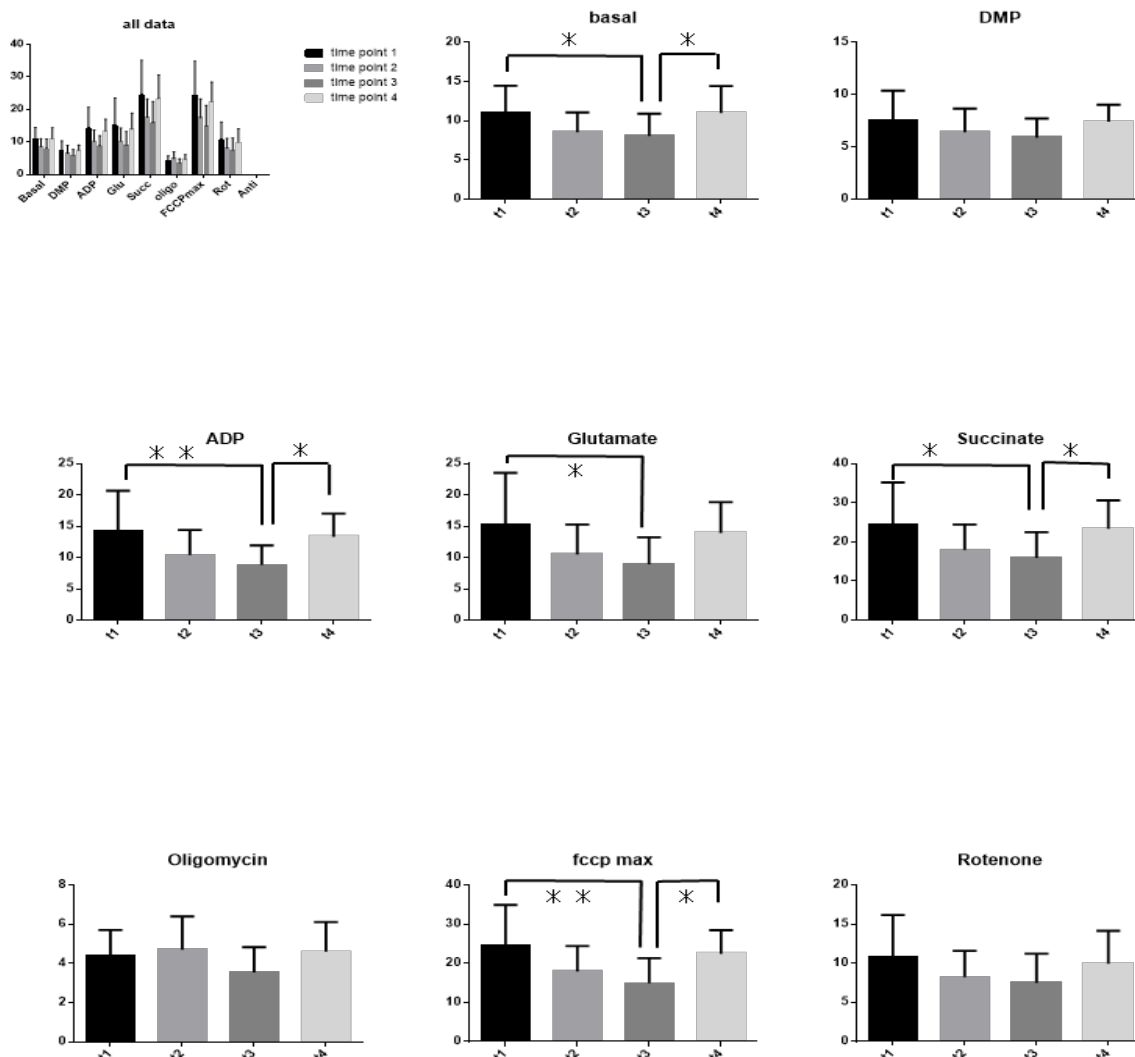
薬剤の投与では有意差が認められなかった。basal の結果で血小板ミトコンドリア呼吸鎖複合体の全体に機能低下が認められることから、各 complex の促進剤の投与に関しても同様にミトコンドリア機能が低下した可能性が考えられる。抑制剤の投与で有意差が認められなかったことから、他の complex が人工心肺中のミトコンドリア機能低下に大きく関わっている可能性もあるが、更に研究が必要と考えられる。

人工心肺中の血小板機能不全は、人工物への暴露、低体温、ポンプによる剪断応力などが原因の一部と考えられている<sup>(1)</sup>が、本研究結果からミトコンドリア呼吸鎖の機能低下も起こることが分かった。各 complex は連動して機能しているので、どの complex が特に影響を受けているかは引き続き研究が必要である。

本研究では手術室での人工心肺を用いた心臓血管手術を対象としたが、Left ventricular assist devices (LVADs)などの体外ポンプでミトコンドリア機能不全が起こることが分かっている<sup>(2)</sup>。今回の結果と比較すると、術後第一病日 (t4) にミトコンドリア呼吸能が回復しているのはCPBの時間が比較的短時間であることが影響している可能性も考えられる。

人工心肺中に血小板ミトコンドリア呼吸能が低下することで、ATP 産生低下を引き起こし止血能低下に関与する可能性が示唆された。

1. Zharikov S1, Shiva S. Platelet mitochondrial function: from regulation of thrombosis to biomarker of disease. *Biochem Soc Trans.* 2013
2. Mazzeffi M, et al., Effect of cardiopulmonary bypass on platelet mitochondrial respiration and correlation with aggregation and bleeding: a pilot study. *Perfusion.* 2016



## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

1 . 魚島直美、板橋俊雄、沖田綾乃、安藤千尋、柿沼孝泰、内野博之  
人工心肺下成人心臓手術が血小板ミトコンドリア呼吸能に与える影響の検討  
日本心臓血管麻酔学会第 22 回学術大会  
2017 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：内野 博之

ローマ字氏名：Uchino Hiroyuki

所属研究機関名：東京医科大学

部局名：医学部

職名：主任教授

研究者番号(8桁)：60266476

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：Eskil Elmer

ローマ字氏名：Eskil Elmer

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、研究者個人に帰属されます。