

平成 21 年 6 月 3 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007-2008

課題番号：19591788

研究課題名（和文） 周術期における血栓形成機構解明に関する研究

研究課題名（英文） The study of the underlying mechanism of thromboembolism formation during perioperative period

研究代表者

平方 秀男（HIRAKATA HIDEO）

滋賀医科大学・医学部・講師

研究者番号：70271509

研究成果の概要：

本研究において、われわれは、主に次の三つの研究成果を得た。まず、第一に人工心肺を使用した心臓血管手術において、血小板機能が低下しているが、自己血輸血で、機能が回復することを見出した。つぎに、この血小板機能低下には血小板のアポトーシスが関与していることも併せて見出した。また、近年全身麻酔管理下でうつ病に対して電気けいれん療法が行われることが多いが、このような患者では、血栓塞栓準備状態になっていることを確認した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・麻酔・蘇生学

キーワード：周術期管理学、血栓塞栓症、血小板、心臓血管外科手術、人工心肺、アポトーシス、うつ病

1. 研究開始当初の背景

数年来、本邦においてもきわめて重篤な病態を惹起する周術期における深部静脈血栓症や肺血栓塞栓症が問題化している。さまざまな予防法・ガイドラインの勧告などがなされているが、主に血栓症の発生頻度の全く違う諸外国における内科的研究結果に依拠しているもので周術期に受けるストレスや人種差を反映していない。本邦における周術期に即したガイドラインの作成が強く望まれる。そのために、血栓産生の初期段階として働く

血小板機能の術中変化を検討する。具体的には①血小板凝集能は凝集計を用いて、②血小板膜表面抗原で接着分子である P-セレクチン、CD41 および活性化 CD41-61 をフローサイトメトリーにて、③細胞内伝達物質であるイノシトール 3 リン酸とトロンボキサン産生は RI を用いて、④細胞内カルシウム濃度と細胞骨格系の変化を蛍光法でとらえ手術中における血小板機能の質的変化の本体に迫る。日本人且つ周術期という意味において本邦で初の試みとなる。本研究者は各種麻酔

薬の血小板に対する亢進・抑制作用と機序を基礎 1-7・臨床 8, 9 の両面から報告している。さらに 2004 年から 2006 年までの UCSD 留学中にフローサイトメトリーの取り扱い、蛍光抗体細胞染色法や分子生物学的手法にも習熟した。したがって本研究を開始する準備はできている。

2. 研究の目的

周術期における血栓形成機構を検討することにより、周術期血栓塞栓予防ガイドラインの策定に実情に合った科学的根拠を与える。手術というストレスや周術期使用薬物・抗血小板薬の制限などの条件下での血栓形成機構を本邦で解明し、科学的で日本に沿った周術期の血栓塞栓予防法ガイドラインを策定する必要があり、ひいて周術期死亡を減少させることは意義深い。

①周術期血栓塞栓問題は周術期という特殊性を考慮すべきことを提案し、②本邦の周術期使用薬物や手術ストレス下という新観点から迫る新着想を示す。③以上により漫然と諸外国の内科延長上として捉えられていた常識を覆し、凝固・線溶分野にも新観点を与える。④本研究を科学的な全国レベルの臨床的研究につなげたい。⑤本研究成果は早急に解決すべき術中脳梗塞の予防、術中止血困難症例、心疾患患者の非開心術の取り扱いなどにも応用可能であり、多方面への波及効果が期待できる。

(1) 心臓血管手術と血小板

人工心肺使用により血小板は活性化及び消費され、術後血小板数の減少および機能低下が報告されている。われわれは、まず第一歩として、希釈式自己血輸血が体内の血小板機能に及ぼす影響について調べた。

(2) 手術侵襲と血小板アポトーシス

上記 (1) の血小板と人工心肺の結果から、この血小板機能変化とアポトーシスが関連しているのではないかと考えた。有核細胞のアポトーシス(細胞死)の過程は広く知られているが、無核細胞の血小板におけるアポトーシス(細胞死)に関しては、不明な点も多い。特に我々は可逆的な血小板アポトーシスの進行過程に注目している。人工心肺時間が短時間で血小板における障害が軽度な場合、アポトーシス(細胞死)の過程が初期である為、アポトーシス(細胞死)の進行が可逆的なプロセスで抑制され、一旦低下した血小板凝集能が回復すると考えられる。似たような現象は

血液細胞においても過去に報告されている。

(3) うつ病患者での変化

近年、うつ病に対して ECT を施行される患者の増加に伴い、麻酔科領域でも、このような患者の取り扱いが急増している。

精神病患者に関する、麻酔科医の一般的な知識は十分とは言い難い。

気分障害患者に関して、精神科領域では、心血管イベントや脳こうそくなどの合併症が多いことは、精神科領域では、多数報告されている。

これに対する統一の見解として、このような背景を持つ患者では、何らかの機序で血栓塞栓症が起こりやすい病態生理学的変化が起こっていると考えるのは、論理的である。

麻酔科医が手術の一環として、今後多く取り扱う可能性の高い、気分障害患者の、血栓塞栓症発症準備状態に関する知識を得ることは、今後の診療方針を考える上でも、重要と考える。

3. 研究の方法

(1) 心臓血管手術と血小板

対象：人工心肺使用下に心臓弁膜修復術を施行する 20 症例。

方法：麻酔導入後、希釈式自己血貯血 400ml を行い常温にて保存、自己血返血群、非返血群にわけ、人工心肺前、人工心肺中、人工心肺離脱後自己血返血前(プロタミン拮抗後、活性凝固時間回復)、自己血返血 5 分後(拮抗 30 分後)、自己血返血 2 時間後、6 時間後と動脈血採血を行った。アグリゴメーターを用いて全血凝集能を、フローサイトメトリー法により血小板 α 顆粒膜上に存在する糖蛋白で血小板活性化に伴い膜表面に分布する P-セレクチン(CD62)、血小板上の α IIb β 3 が血小板活性化に伴い構造変化をおこした時に発現する PAC-1 の測定もあわせておこなった。また、血小板濃染顆粒から放出される ATP をルミノメーターを用いて測定した。

(2) 手術侵襲と血小板アポトーシス

(1) の血小板と人工心肺の結果から、この血小板機能変化とアポトーシスが関連しているのではないかと考えた。この作業仮説を検証するため、(1) と同様の条件下で、血小板 p38MAPK, ERK1/2 のリン酸化、ミトコンドリア膜電位、caspase-3 の発現を測定することにより、手術侵襲と血小板アポトーシスに関連があるかないかを検討した。

(3) うつ病患者での変化

気分障害患者に関して、精神科領域では、心血管イベントや脳こうそくなどの合併症が多いので、このような背景を持つ患者では、

何らかの機序で血栓塞栓症が起りやすい病態生理学的変化が起こっているとの作業仮説を検討する。

気分障害患者における、血栓塞栓症発症の分子メカニズムが、興味を中心となるが、そこに至る前に、凝固機能亢進などが実際に起こっているかどうかの確認が第一番目に重要である。

そこで、対象は治療前の入院患者 23 名とした。対象患者を、一般的な重症度判定の基準 (HAM-D) により、スコア 21 以上の重症群とスコア 21 未満の軽症群に分類した。入院当初の患者採血時に、ラテックス凝集法により D-ダイマーの計測を行った。

4. 研究成果

(1) 心臓血管手術と血小板

結果：両群とも人工心肺離脱後自己血返血前、血小板機能は低下したが、自己血返血直後から自己血返血群において凝集能の回復を認めた。しかし、非返血群は返血群に比べ血小板機能の回復を認めなかった。

考察：希釈式自己血返血には若干の血小板が含まれており、術中自己血返血により一旦機能低下に陥った体内血小板機能の再回復が期待できる。そのメカニズムを調べる事により「止血機能回復」「輸血感染回避」という点について、人工心肺使用下の心臓手術麻酔の分野にて大きなメリットをもたらすと期待している。

(2) 手術侵襲と血小板アポトーシス

最近の実験結果において、人工心肺離脱後の血小板凝集能の低下と、血小板内 p38MAPK, ERK1/2 のリン酸化の程度、アポトーシス(細胞死)進行の指標となるミトコンゴリア膜電位の低下及び血小板内 Caspase-3 の発現に相関関係が有ることを見出した。また、人工心肺離脱直後に一旦低下した血小板凝集能が経時的に回復した患者においては、一旦上昇した血小板内の p38MAPK, ERK1/2 のリン酸化が低下する現象も発見した。人工心肺下心臓手術において、人工心肺離脱後、血小板凝集能低下にともない、経時的に血小板ない ERK1/2 のリン酸化と Caspase-3 の発現が増加している。また、Akt のリン酸化が減少している。これらより、血小板のアポトーシス(細胞死)の進行が、血小板機能低下の最大の要因であり、血小板障害が軽微で有る場合、アポトーシス(細胞死)の進行が可逆的であると我々は考えた。よって血小板のアポトーシス(細胞死)をコントロールする事により、人工心肺下心臓手術による血小板凝集能低下の予防治療の可能性を考えている。

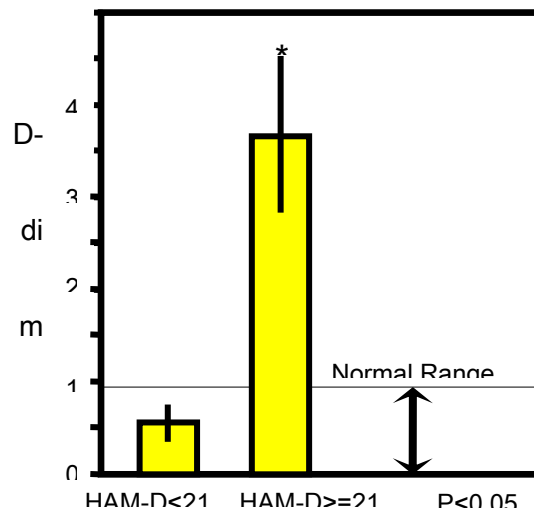
(3) うつ病患者での変化

HAM-D21 点を基準にすることで、対象患者 23 名を分類した結果、15 名が重症群、残り 8 名が軽症群と分類された。

D ダイマーレベルは、重症群で高値を示し、両群間に有意差を認めた。

これにより、気分障害患者に関して、心血管イベントや脳こうそくなどの合併症が多いことは、やはり予想通り、このような患者群では、何らかの機序で血栓塞栓症が起りやすい病態生理学的変化が起こっていると考えられた。

また気分障害患者では、血小板機能に変化があるとの報告も散見されるため、目下、その機序の少なくとも一部には血小板が関与しているのではないかと作業仮説のもとに、さらに研究を進めている。



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)

[学会発表] (計 4 件)

平方 秀男

①

麻酔による血小板機能変化
日本麻酔科学会 第 55 回大会
シンポジウム 7
2008. 6. 14
横浜

②

影山 京子
人工心肺使用後の希釈式自己血輸血における血小板機能回復のメカニズムについて
日本麻酔科学会 第 55 回大会
2008. 6. 14
横浜

③

平方 秀男

麻酔による血小板機能変化
日本血栓止血学会
2008. 11. 22
大阪

④

影山 京子
人工心肺使用後の希釈式自己血輸血における血小板機能回復のメカニズムについて
日本血栓止血学会
2008. 11. 22
大阪

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平方 秀男 (HIRAKATA HIDEO)
滋賀医科大学・医学部・講師
研究者番号：70271509

(2) 研究分担者

溝部 俊樹 (MIZOBE TOSHIKI)
京都府立医科大学・医学研究科・講師
研究者番号：50239266

(3) 連携研究者