

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09441

研究課題名(和文) 一酸化窒素(NO)による人工肺膜表面の生体適合性の改善

研究課題名(英文) Improvement of biocompatibility of oxygenator membrane surface by nitric oxide (NO)

研究代表者

小林 こず恵 (Kobayashi, Kozue)

北里大学・医療衛生学部・講師

研究者番号：60448975

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ECMOにおいて、人工肺内血栓の形成は重大な合併症である。血管内では、内皮細胞上で生成される一酸化窒素(NO)が、血小板の凝集・活性化および白血球の接着・活性化の両方を抑制する。人工肺吹送ガスにNOガスを添加することにより、人工肺の生体適合性を向上させることができると考え、ラットECMOモデルを用いて、NOガス添加による血液凝固抑制効果および抗炎症作用の有無を検討した。正常ラットVV-ECMO実験ではNO200 ppmを人工肺に添加することにより、血液凝固を抑制できた。敗血症ラットVV-ECMO実験ではNO40 ppmを人工肺に添加することにより、血液凝固と炎症作用の抑制の可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

人工肺の吹送ガスに一酸化窒素(NO)ガスを混合し、人工肺表面を溶存ガス放出表面とすることで、NO放出という血管内皮細胞の動的な機能を模倣する。この新しい概念の抗血栓性材料の使用は、NOの白血球・血小板内での働きや作用機序、また、それらの相互作用に及ぼす影響などについても同時に明らかになる可能性が高く、学術的意義も大きい。また結果よりNOガスによりECMOの主要な合併症を低減できる技術が開発できる可能性が高く、結果として、ECMO管理の能力は確実に向上し、医療関係者、患者のすべての人に恩恵を与えることが期待できる。肺障害に対する治療における今後の研究動向に重要な影響を与える技術開発と考える。

研究成果の概要(英文)：Clot formation in the membrane oxygenator is a serious complication in long-term extracorporeal membrane oxygenation (ECMO). In the blood vessels, nitric oxide (NO) generated by nitric oxide synthase on the endothelial cells suppresses both aggregation/activation of platelets and adhesion/activation of leukocytes. Therefore, biocompatibility of the membrane oxygenator may be improved by the addition of NO gas to the sweep gas. The objective of the present study was to determine, using a rat ECMO model, whether the addition of NO gas to the blood can suppress blood coagulation and inflammation. In the normal rat VV-ECMO experiment, blood coagulation was suppressed by adding 200-ppm NO to the membrane oxygenator. In the septic rat VV-ECMO experiment, the addition of 40-ppm NO to membrane oxygenator suggested the possibility of suppressing blood coagulation and inflammatory effects.

研究分野：人工臓器

キーワード：体外式呼吸補助(VV-ECMO) 一酸化窒素(NO) 抗血栓性 抗炎症性

1. 研究開始当初の背景

現在、体外式呼吸補助 (**ECMO**) において、回路内血栓は頻発する合併症で、特に人工肺で血栓が形成しやすい。体外循環回路や人工肺の生体適合性は向上しているが、未だにヘパリンなどの抗凝固剤を必要とし、長期に使用する場合に、特に出血のリスクがある。一方で、生体内では血管内皮細胞の一酸化窒素 (**NO**) 合成酵素によって一酸化窒素が常に放出されており、血管平滑筋弛緩作用、血小板と白血球の粘着、凝集抑制作用、細胞接着因子の発現抑制作用などの多彩な作用を発揮すること、生体内での半減期が **3-6 秒** 程度と短いことが知られている。そこで、**NO** を人工肺の吹送ガスに添加することでヘパリンの使用量を減らし出血のリスクを減らすことができるのではないかと考えた。またさらに、**ECMO** を **ARDS**、**COVID-19** 感染症、敗血症など重篤な患者に使用する場合もあり、そういった患者において、**NO** の抗凝固抑制作用、抗炎症作用がどのように作用するかは検討する必要がある。

2. 研究の目的

本研究では、人工肺の吹送ガスに一酸化窒素ガスを混合し、人工肺表面を溶存ガス放出表面とすることで、人工肺表面の生体適合性を改善することを目的とした。

本研究では、まず、ラットを用いた **VV-ECMO** を模擬した実験系を確立し、その後、ラットを用いた **in vivo** 実験により、以下の点を明らかにした。

(1) **NO** 放出表面における白血球、血小板の活性化抑制効果を検討し、有効な濃度を明らかにした。

(2) ガス放出表面と接触した白血球や血小板が生体に戻ったときの、**NO** の作用について特に **NO** ガスが血液凝固、抗炎症反応に及ぼす影響を明らかにした。

3. 研究の方法

本研究は北里大学医療衛生学部動物実験委員会の承認を得て実施した(承認番号 衛・研 **19-03**)。

(1) **NO** 放出表面における白血球、血小板の活性化抑制効果を検討し、有効な濃度の検討。

構築したラット **ECMO** モデルを用いて、ヘパリンを循環開始時に **0.7 単位/g** 投与して **4 時間** 循環を行った。ガス交換にはラット用外部灌流型ポリメチルペンテン膜型人工肺(ニプロ社製を用いた。実験は **Control** 群と **NO** 群 (**100 ppm, 200 ppm, 400 ppm**) の **4 群** で行い、ガス交換器を介して血液に添加した。循環実験中、動脈圧と脱血圧、人工肺入口圧、送血圧、活性化全血凝固時間 (**ACT**)、メトヘモグロビン (**Met-Hb**)、血中 **NO** 濃度 (**NO₂/NO₃**) と血小板数を測定した。また、循環終了後、人工肺の残血ヘモグロビン (**Hb**) 量、残血乳酸脱水素酵素 (**LDH**) 活性値を測定した。

(2) ガス放出表面と接触した白血球や血小板が生体に戻ったときの、**NO** の作用について及ぼす影響の検討。

盲腸結紮・穿刺法 (**CLP** 法) により作成した敗血症モデルラットを用い、方法(1)と同様に体外循環を行った。実験は **Control** 群と **NO** 群 (**40 ppm, 100 ppm, 200 ppm**) 行い、方法(1)の評価項目に抗炎症効果(血液 **IL-6** 濃度、肝臓 **MPO** 活性値)の評価を追加しておこなった。

4. 研究成果

(1) ラットを用いた **VV-ECMO** を模擬した実験系の確立

本研究で構築したラット **ECMO** モデルは、右心房脱血、大腿静脈送血で行い、血液流量 **1~8 mL/min** で **4 時間** 循環可能で、人工肺へのガス吹送も様々な混合ガスの種類、流量を調節可能な実験系を作成することができた。

(2) **NO** 放出表面における白血球、血小板の活性化抑制効果を検討し有効な濃度の検討。

Control 群、**NO** (**100 ppm, 200 ppm**) 群ともに

安定して **4 時間** 循環を行うことができた。また、

循環実験中、回路内凝固などで実験が中断

するようなイベントは起こらなかった。循環開

始から **4 時間** 後の全 **NO** 群の **Control** 群、**NO**

(**100 ppm, 200 ppm**) 群ともに安定して **4 時間**

循環を行うことができた。また、循環実験中、

回路内凝固などで実験が中断するようなイベ

ントは起こらなかった。循環開始から **4 時間** 後の

全 **NO** 群の **NO₂/NO₃** は、**Control** 群と比べ有

意に高値を示した。また、**Met-Hb** は、**NO₂₀₀**

ppm 群では **NO₁₀₀ ppm** 群、**Control** 群と比べ有

意に高値を示した(図 1)。人工肺内の残血評価では

残血 **Hb** 量が **NO₂₀₀ ppm** 群では **Control** 群と比べ

有意に低値を示した(図 2)。正常ラットを用いた

VV-ECMO モデルを用いた実験では **NO₂₀₀ ppm**

人工肺の吹送ガスに添加することにより、血液凝固

を抑制できた。また、**NO₄₀₀ ppm** で有害域を超え

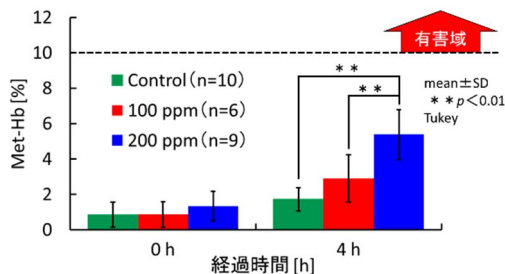


図 1. Met-Hb

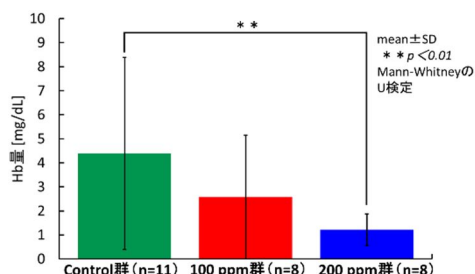


図 2. Hb 量

ることから、**NO** 添加の安全性に関する参考値を得ることができた。よって、本実験での循環実験系において、人工肺を介して、血液に添加する **NO** 濃度は **200ppm** が限界であることが示された。

(3) ガス放出表面と接触した白血球や血小板が生体に戻ったときの、**NO** の作用について及ぼす影響の検討。

敗血症モデルラットを用いた **ECMO** 体外循環実験では、**CLP** 法施術後 **8** 時間後から **12** 時間後の間に **4** 時間の体外循環実験を行った。敗血症モデルラットは、**CLP** 法施術後 **16** 時間後から生存率が下がるモデルである。この条件下では、**NO 200 ppm** を人工肺の吹送ガスに添加することにより、人工肺残血 **Hb** 量は、**NO 200ppm** 群が **Control** 群に比べ有意に高値を示した。また、循環実験中の白血球数は、**NO200 ppm** 群が **Control** 群に比べ有意に高値を示した。また、肝臓の **MPO** 活性値は、**NO200 ppm** 群が **Control** 群、**NO100 ppm** 群に比べ有意に高値を示した。敗血症モデルラットでは、正常ラットで見られた **NO** による人工肺内の血液凝固を抑制が起こらなかったと考えられる。特に高濃度の **NO** ガスを付加したとき、白血球の活性化が抑制されず、逆に **NO** を用いることで炎症反応が亢進した可能性があると考えられた。**NO** をラット敗血症モデルに **ECMO** を用いる際に、吹送ガスに高濃度の **NO** を用いると、病態に悪影響を与える可能性があり、注意が必要と考えられた。次に、**NO 40ppm** を人工肺の吹送ガスに添加すると、**NO200ppm** で見られた凝固の亢進が見られなかった。このことから、**NO** 濃度を变化させた検討を行うことで、人工肺内の血液凝固を抑制できる可能性がある。**IL-6** 濃度は、**NO** 群で低値を示す傾向がみられ、**NO** 体外循環において抗炎症効果が期待できる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 小林こず恵
2. 発表標題 Suppression of blood coagulation by nitric oxide gas added to the sweep gas during veno-venous extracorporeal membrane oxygenation
3. 学会等名 European Society for Artificial Organs (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔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	塚尾 浩 (Tsukao Hiroshi) (10584972)	北里大学・医療衛生学部・講師 (32607)	
研究分担者	小久保 謙一 (Kokubo Kenichi) (20287965)	北里大学・医療衛生学部・准教授 (32607)	

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
---------	---------