【326】

氏　名（本籍）	服部隆司（静岡県）
学位の種類	博　士（医　学）
学位記番号	博　乙　第　2213　号
学位授与年月日	平成18年4月30日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
審査研究科	人間総合科学研究科
学位論文題目	**Plasma Tissue Factor Plus Activated Peripheral Mononuclear Cells Activate Factors VII and X in Cardiac Surgical Wounds** （心臓外科手術野における可溶性組織因子と活性化単核球の第Ⅶ因子および第Ⅹ因子の活性化）

主　査	筑波大学教授	博士（医学）	田　中　　誠
副　査	筑波大学教授	医学博士	松　村　　明
副　査	筑波大学助教授	医学博士	小　島　　寛
副　査	筑波大学助教授	博士（医学）	和　田　哲　郎

論文の内容の要旨

目的：人工心肺を使用する心臓外科手術では，大量のヘパリンを使用するにも関わらず，人工心肺開始後15～30分で手術野に貯留した血液にトロンビンが生成される。外因系凝固反応では，刺激を受けた単核球がその細胞膜上に組織因子（tissue factor：TF）を発現し，第Ⅶ因子がCa存在下でⅦa－組織因子複合体を形成して活性体となることで反応が進行する。しかし，組織因子が細胞膜上に発現するには，単核球が刺激を受けてから少なくとも2～3時間を要するため，人工心肺開始後15分～30分以内にトロンビンが生成されるという説明には困難がある。過去の報告では，細胞上に発現する組織因子とは別に，可溶性組織因子（soluble plasma TF：spTF）の存在が確認されているが，一般的に可溶性組織因子は凝固活性を示さない。本研究では，心嚢内に貯留した単核球が可溶性組織因子と接合することによって第Ⅶ因子を活性化するという仮説を立て，これを検証した。

方法：心臓外科手術患者13名の血液を使用した。人工心肺開始前（Pre），人工心肺開始後30分の循環血液（Perf）および同時期に心嚢内に貯留した血液（Wnd）を採取，それぞれの血液から単核球，血漿を分離した。可溶性組織因子（pTF）濃度，トロンビン生成の指標としてprothrombin fragment F1.2とTAT（thrombin antithrombin complex）濃度を測定した。pTFはさらにmicroparticle-bound plasma TF（mpTF）とmicroparticle-freeのsupernatant plasma TF（spTF）に分離し，その濃度を測定した。心嚢内単核球が刺激を受けた状態であることの指標としてMCP-1（monocyte chemotactic protein-1）を測定した。単核球と可溶性組織因子が接合することによって，第Ⅶ因子および第Ⅹ因子を活性化することができるかを検証する実験として，単核球（2×10^6/ml）と組織因子（pTF，mpTF，spTF）を，Ca（5mmoles/l）存在下で第Ⅶ因子（10moles/l）と反応させ，Ⅶa因子生成量を測定した。さらに第Ⅹ因子（100nmoles/l）を追加投与して，Ⅹa因子の生成量を測定した。この活性化実験には患者血液と健常成人から採取した単核球を使用した。また単核球を補体C5aで

刺激して，Ⅶa 因子，Ⅹa 因子生成量の変化を観察した。

結果：pTF は Wnd で有意に高値であった（3.64pmoles/l vs. 0.71 and 1.31）。Wnd の pTF 濃度とトロンビン生成の指標である　F1.2，TAT 濃度は正の相関関係（r = 0.944，0.98）を認めた。Wnd の pTF は 81.7％が spTF に，18.3％が mpTF として存在していた。MCP-1 は Wnd で Pre および Perf より有意に高値であった（29.5pmoles/l vs. 2.8 and 3.3）。第Ⅶ因子活性化実験では，Wnd の単核球と Wnd の pTF（3.6pmoles/l）は 10nmole/l の第Ⅶ因子をほぼ全てⅦa（8.9nmole/l）に活性化した。しかし Pre，Perf 中の単核球は第Ⅶ因子すべてをⅦa に活性化することはできなかった（4.0，4.3nmole/l）。Wnd の単核球単独あるいは Wnd の pTF 単独では第Ⅶ因子をⅦa に活性化することは出来なかった（2.0，1.0nmole/l）。健常成人の単核球と Wnd の pTF（3.6pmoles/l）で第Ⅶ因子を活性化すると，Pre および Perf 中の単核球と同程度にⅦa が生成された。この単核球を補体 C5a で刺激すると，Wnd 中の単核球と同じように，ほぼ全てⅦa に活性化した。濃度 1.46pmoles/l の Wnd の pTF は健常成人から採取した単核球との反応では第Ⅶ因子（10nmole/l）をⅦa に活性化した（3.5nmole/l）。この単核球を補体 C5a で刺激すると更にⅦa が生成された（4.5nmole/l）。また Wnd の spTF（1.46 pmoles/l）は mpTF（1.46pmoles/l）より有意に第Ⅶ因子をⅦa に活性化した（3.1 vs 0.48nmole/l）。第Ⅹ因子活性化実験では，健常成人から採取した単核球と Wnd 中の spTF あるいは mpTF を反応させると，Wnd の spTF が mpTF より有意に第Ⅹ因子をⅩa に活性化した。この単核球を補体 C5a で刺激すると更に有意に第Ⅹ因子がⅩa に活性化された。

考察：心嚢内貯留血液中でのトロンビン生成は，可溶性組織因子（pTF）と刺激を受けた単核球が関与していることが示唆された。単核球は TF を発現していないので，pTF と第Ⅶ因子の反応にいわゆる「反応の場」を提供していると考えられる。またこの単核球は agonist の刺激を受けることでより効果的に反応を促進させていた。このような単核球と可溶性組織因子による外因系凝固反応は，全く新しい機序によるものである。手術野に貯留した血液中の pTF 量は第Ⅶ因子活性化に充分な量であった。その存在は microparticle に接合していない microparticle-free の状態で supernatant plasma 中に存在している方が多く，これが第Ⅶ因子及び第Ⅹ因子の活性化に関与していた。人工心肺作動中のトロンビン生成を抑えるには，高濃度の pTF を含んだ心嚢内貯留血液を人工心肺回路内へ返血しないことが効果的である。しかし手術によっては心嚢内に貯留する血液量が多いため，この血液を直接人工心肺回路内に返血せざるを得ないこともある。単核球の活性化を抑制する phosphodiesterase-Ⅲ inhibitor，組織因子阻害物質である tissue factor pathway inhibitor などが効果的であろう。

結論：人工心肺を使用する心臓外科手術において，心嚢内に貯留した単核球は可溶性組織因子と接合することにより第Ⅶ因子を活性化した。更にこの複合体は，第Ⅹ因子を活性化してトロンビン生成に関与していた。単核球と可溶性組織因子の接合による外因系凝固反応は，今までの報告には無い新しい機序である。

審 査 の 結 果 の 要 旨

人工心肺を開始することにより惹起される複雑な凝固反応・炎症反応は，生体に好ましくない様々な合併症を引き起こす危険性がある。本研究では実際の心臓手術患者を用い，人工心肺開始後早期における心嚢内血液中の組織因子や活性化単核球がトロンビン形成に及ぼす重要な役割を明らかにすると同時に，第Ⅶ因子

活性化の新たな機序をも発見した。従って，本研究は人工心肺後の coagulopathy 予防のための新たな研究に展開する可能性を秘め，その結果心臓手術の予後を飛躍的に改善させる可能性を有する貴重な臨床研究であると考えられる。

よって，著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。