

氏名（本籍）	森住 誠（愛知県）		
学位の種類	博士（医学）		
学位記番号	博甲第 6740 号		
学位授与年月	平成 25 年 1 2 月 3 1 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	内因性 tissue factor pathway inhibitor 誘導による 体外循環中の外因系凝固開始反応の制御		
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	久賀 圭祐
副査	筑波大学准教授	博士（医学）	長谷川 雄一
副査	筑波大学講師	博士（医学）	酒井 光昭

論文の内容の要旨

（目的）

人工心肺装置を用いた体外循環は開心術を行うにあたって不可欠の手段である。しかし、体外循環は様々な血液成分の活性化を惹起し、凝固線溶系や炎症機転の亢進を介して心臓外科手術特有の術後合併症を生む。従来、血液と人工心肺回路との接触に端を発する内因系凝固反応が凝固線溶・炎症機転亢進の要因とみなされてきたが、近年、組織因子（tissue factor = TF）を起点とする外因系凝固反応を惹起する重要なトリガーとしての役割があると理解されつつある。

TF は第 VII 因子と複合体を形成したり、血管内皮細胞の protease activated receptor-2 を活性化して白血球接着分子の発現を惹起することも知られており、凝固反応と炎症反応の間には複雑なクロストークが存在する。TF は開心術において手術開始早期から心嚢内貯留血液内に増加していることが確認されているが、体外循環における TF の血液学的作用の詳細は未だ十分理解されていない。TF を直接阻害し得る唯一の生理的タンパクが Tissue factor pathway inhibitor (TFPI) である。TFPI はほとんどが血管内皮細胞表面に存在するが、ヘパリンが作用すると内皮細胞から血漿中に遊離されることが知られている。

本研究では、体外循環における外因系凝固反応及び炎症機転のトリガーとしての TF の機能と、TF を制御するであろう TFPI の機能の解明に迫ることを目的とし二つの実験を行った。まず TF が体外循環中の炎症機転亢進に関与するという仮説のもとに、TF の添加が模擬体外循環中の全血 microchannel transit time と好中球及び血小板に及ぼす変化を分析した。続いて、TF と血液との接触以前に内因性 TFPI を血液内へ誘導することが TF 由来のトロンビン産生を抑制するという仮説

のもとに、トロンビン産生量を測定して TFPI の制御効果を分析した。

(対象と方法)

膜型人工肺、ローラーポンプ、およびリザーバーバックをシリコンチューブで連結した *in vitro* 模擬体外循環システムを用いた。リザーバー内にはヘパリン(3.75U/ml)を添加した。健常人ドナーから新鮮血 250ml を採取し、37°C、流量 400ml/min で 120 分間循環させた。血液検体は、リザーバーバック充填前、体外循環開始から 0、30、60、120 分の時点で採取した。実験-1：以下の 2 群において、全血 microchannel transit time、好中球細胞骨格成分 F-actin、好中球接着分子、血小板凝集能、血小板 α 顆粒と microparticle を測定した (**Control 群**：健常人ドナーから採取した血液を使用した群。**Tissue Factor 群**：Control 群と同様の血液を使用し、体外循環開始前にリザーバーバック内に recombinant TF (rTF) を添加して外因系凝固反応を惹起した群 (最終 rTF 濃度 1000 pg/ml))。実験-2：ヘパリン静脈内投与による循環血液中への TFPI 誘導効果を検証した。模擬体外循環を用いて、トロンビン産生に対する TFPI の抑制効果を評価した。以下の 4 群での TFPI 及びトロンビン産生 (thrombin-antithrombin complex = TAT、prothrombin fragment F_{1+2} = F_{1+2}) を測定した (**Control 群**：ヘパリンを静注していない健常人ドナーから採取した血液を使用した群。**rTF 群**：Control 群と同様の血液を使用し、体外循環開始前にリザーバーバック内に rTF を添加して外因系凝固反応を惹起した群 (最終 rTF 濃度 1000 pg/ml)。**TFPI boost 群**：採血 5 分前に予め健常人ドナーにヘパリン(50U/kg)を静注し、ドナー血中に内皮細胞から TFPI を誘導した後に血液を採取してリザーバーに充填した群。**rTF+TFPI boost 群**：TFPI boost 群と同様の血液を使用し、体外循環開始前にリザーバーバック内に rTF を添加して外因系凝固反応を惹起した群 (最終 rTF 濃度 1000 pg/ml))。

(結果)

実験-1：Transit time は Tissue Factor 群において 120 分までに有意に延長し、2 群間に有意差を認めた。F-actin の発現は Tissue Factor 群において 30 分後から増加し、2 群間に有意差を認めた。実験-2：TFPI を誘導した TFPI boost 群、rTF+TFPI boost 群では、TFPI 非誘導群と比較して約 8 倍の TFPI 血中濃度上昇を認めた。すべての群において TAT および F_{1+2} は模擬体外循環開始後有意に増加し、体外循環によるトロンビン産生の亢進が示された。rTF を添加した rTF 群では F_{1+2} の増加が有意に助長された。TFPI を誘導した TFPI boost 群、rTF+TFPI boost 群ではそれぞれ TFPI を誘導しなかった Control 群、rTF 群と比較して、体外循環開始後 120 分において有意に F_{1+2} が低値を示した。特に rTF+TFPI boost 群では、rTF の添加にもかかわらずトロンビン産生の程度が Control 群と同程度の低いレベルにとどまった (Control 群 vs. TFPI boost 群 : $P = 0.0007$, rTF 群 vs. rTF+TFPI boost 群 : $P < 0.0001$)。TAT も同様の傾向を示したが、rTF 群と rTF+TFPI boost 群との間にのみ有意差を認めた。

(考察)

transit time の延長は F-actin の増加のみと関連し、好中球接着分子や血小板機能の変化とは連動しなかった。TF による好中球変形能の劣化が transit time 延長の主因であり、体外循環における炎症機転発現・亢進に TF が関与する際の重要な機序である可能性が示唆された。体外循環開始により接触-内因系凝固反応を介してトロンビン産生は亢進したが、TF の添加はトロンビン産生をさらに助長させた。ヘパリンの静脈内注射により、血管内皮から約 8 倍の血中濃度をもたらす TFPI を誘導できた。TF と血液との接触以前に高濃度内因性 TFPI を血液内へ誘導することにより、TF を発端とする外因系凝固反応の活性化に伴うトロンビン産生を効果的に抑制した。また、TF を添加しない接触-内因系凝固反応の活性化を主体とする体外循環モデルにおいても、TFPI はトロンビン産

生を有意に抑制した。TF の関与を除外した体外循環においても、TFPI は直接的あるいは間接的な第 Xa 因子およびトロンビンの阻害作用を発揮してトロンビン産生を抑制したものと考えられた。

審査の結果の要旨

(批評)

本研究の内容は、TF 発現以前の早期へパリン投与による血中 TFPI 誘導が、TF による外因系凝固反応はもとより、接触- 内因系凝固反応をも抑制する事実を示しており、体外循環に関連する凝固線溶異常を包括的に制御する革新的な方略となり得る可能性を示している。その結果、循環器外科領域における術後合併症の飛躍的減少につながる発展性を有する貴重な研究といえる。

平成 25 年 11 月 7 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。