

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

2 0 1 3

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

森住 誠

筑波大学

博士（医学）学位论文

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

2 0 1 3

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

森住 誠

目 次

第 1 章 本研究の背景

| | |
|--|----|
| 1. 人工心肺を用いた心臓外科手術の歴史と現状 | 4 |
| 2. 人工心肺の morbidity | 8 |
| 3. 血液麻酔 (Blood Anesthesia) の概念 | 13 |
| 4. 血液麻酔 (Blood Anesthesia) 研究の歴史 | 16 |
| 5. 組織因子を起点とする外因系凝固反応への着目 | 20 |
| 6. 外因系凝固反応の抑制を目指して | 23 |

第 2 章 組織因子は模擬体外循環中の好中球変形能劣化を助長する

| | |
|-------------|----|
| 1. 背景 | 25 |
| 2. 仮説 | 25 |
| 3. 方法 | 26 |
| 4. 結果 | 34 |
| 5. 考察 | 38 |

第3章 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

| | |
|----------------------------------|----|
| 1. 背景 | 45 |
| 2. 仮説 | 47 |
| 3. 方法 | 47 |
| 4. 結果 | 52 |
| 5. 考察 | 58 |
| | |
| 第4章 本研究の Limitation | 70 |
| | |
| 第5章 総括 | 72 |
| | |
| 第6章 今後の展望 | 73 |
| | |
| 第7章 謝辞 | 76 |
| | |
| 第8章 参考文献 | 77 |

略語集

| | |
|------------------|---------------------------------------|
| TNF | tumor necrosis factor |
| AT | antithrombin |
| ACT | activated clotting time |
| TAT | thrombin antithrombin complex |
| GP | glycoprotein |
| PDE | phosphodiesterase (好中球ホスホジエステラーゼ) |
| TF | tissue factor |
| TFPI | tissue factor pathway inhibitor |
| rTF | recombinant tissue factor |
| SC | standing control |
| ANOVA | analysis of variance |
| ELISA | enzyme-linked immunosorbent assay |
| TAT | thrombin – antithrombin complex |
| F ₁₊₂ | prothrombin fragment F ₁₊₂ |
| POD | peroxidase (ペルオキシダーゼ) |
| TM | thrombomodulin (トロンボモジュリン) |

第1章 本研究の背景

1. 人工心肺を用いた心臓外科手術の歴史と現状

心臓や大血管の修復操作を行う外科手術（開心術）においては、心臓が担う体循環と肺循環、および肺が担うガス交換の機能を一時的に停止して心内腔の無血視野を確保しなければならない。そのためには心臓のポンプ機能を代行して全身の血液灌流を行い、肺の呼吸機能を代行して血液のガス交換を行うことのできる生体機能代行装置（人工心肺装置）が必要である。人工心肺はそうした目的に沿って開発された開心術にとって必須の補助装置であり、半世紀にわたる様々な技術改良によってその安全性は高められてきたものの、依然大小様々な弊害を患者にもたらし、その危険性を無視できるレベルには未だない。1986年から行われてきた日本胸部外科学会の全国学術調査によれば、近年の心臓大血管手術の死亡率は徐々に減少しつつあるものの、全心臓大血管手術の2010年における病院死亡率は依然2.7%にも上り、さらなる改善が望まれている[1, 2]。

1953年5月6日、世界初の人工心肺装置を用いた心臓手術が、アメリカ合衆国フィラデルフィアのJohn Gibbonという外科医によって行われた。患者は18歳の女性で、心房中隔欠損の閉鎖手術であった[3]。この時の人工心肺装置には、シンプルなローラー型血液ポンプと、血液の薄い膜を酸素と接触させてガス交換を行うスクリーン型人工肺とが使用された。第一例は成功したものの、その後が続いて行われた5例の開心術の結果は惨憺たるもので、5人の患者を立て続けに失った失意のGibbonは

結局人工心肺の研究を断念した。しかしながら、幸いGibbonの志を継ぐ研究者が現れ、1955年にはMayo ClinicのKirklinらによってGibbonの人工心肺装置を改良したMayo-Gibbon型人工心肺装置が開発された。Kirklinらはこの人工心肺装置を用いて8例の開心術を行い、うち4例で長期生存を得ることができた。同時期のヨーロッパにおいては、回転する円板の表面に血液の薄い膜を作って血液に対して酸素付加と二酸化炭素除去を行うしくみの人工肺技術がCrafoordらによって開発された。1956年にKayとCrossは、Crafoordらの技術を改良した回転式円板フィルム型人工肺（Kay-Cross人工肺）の作製に成功した。しかしながら、これら黎明期の人工肺はディスポーザブルではなく、構造も複雑で、メンテナンスや充填液のプライミングに多大な労力、多量の血液や高いコストを必要とした。

同じ頃、Minnesota大学のLilleheiらは、ディスポーザブルの気泡型人工肺の開発に成功し、7例の心室中隔欠損症の手術に応用して5例の長期生存を得た。Lilleheiらの気泡型人工肺は、血液に酸素の小泡を注入する部分、血液と酸素の小泡を混合する管、除泡槽、そして貯血槽から構成されたもので、簡易性に優れ低コストであった。但し、気泡型人工肺では血液と酸素が直接接触するため、血球や血漿蛋白の物理的破壊や空気塞栓症などの合併症が懸念された。その後、1969年にはシリコン膜を用いた積層型人工肺が、1971年にはシリコン膜を用いたコイル型膜型人工肺が開発された。1980年代になるとポリプロピレンの多孔質膜がガス交換能に優れていることが報告され、新たに開発された中空糸型人工肺によって人工肺内への充填液

プライミング量が画期的に削減された。

日本国内に目をやると、1956年3月に曲直部らが気泡型人工心肺を組み込んだ人工心肺を用いてファロー四徴症の根治術に成功した[4]。その数日後には、榊原らが類似のシステムを用いて僧帽弁閉鎖不全症に対する手術に成功し[5]、わが国の心臓外科黎明期を支える貴重な業績となった。

現在の人工心肺システムは、基本的には静脈脱血ライン、心腔内血吸引ライン、貯血槽、人工肺、動脈フィルター、動脈送血ラインから構成され、送血にはローラーポンプや遠心ポンプが使用される。回路には、ポリ塩化ビニール、ポリカーボネートやポリプロピレンなどの表面が極めて平滑な素材が使用されている。ローラーポンプは、半円型のポンプヘッドにセットされた弾性チューブを回転するローラーでしごいてチューブ内の血液を圧出するものであり、Gibbonの人工心肺にも用いられた。一方、1980年代後半には、遠心ポンプが人工心肺に使用されるようになった。遠心ポンプは、内部の回転子を高速回転させることによって、ポンプ内に満たされた血液を高速で回転させ遠心力によって血液を駆出するものである。遠心ポンプは機械的溶血を生じにくいなどの利点を有することから、特に長時間にわたる補助循環においては応用される頻度が増している[6]。しかしながら、たとえ遠心ポンプを用いたとしても人工心肺装置による機械的な血液へのダメージは避けられず、血液はポンプや吸引ラインにより非生理的な陽圧や陰圧を受けたり、回路・人工肺などの異物表面や貯血槽内の気泡と接触したりして損傷

や刺激を受ける。ひいては赤血球破壊（溶血）、白血球破壊、血小板凝集、凝固線溶系の亢進等が惹起され、これらが体外循環を用いた心臓手術特有の合併症の要因となる。

近年、人工心肺回路や人工肺などの血液接触面に生体適合性の高い素材のコーティングを施して、体外循環の合併症軽減を図る取り組みがなされている[7]。ヘパリンコーティング処理をした場合、従来の回路と比較して異物反応が少なく、凝固線溶系の活性化抑制に有効であるとの報告も見られる[8]。さらに、ヘパリンよりも品質管理が容易である高分子材料を用いたポリマーコーティング回路素材も臨床応用され始めている。生体膜表面と同様の水和構造を血液接触面に形成することにより、血漿タンパク質の吸着・変性を抑制して生体適合性を向上させようとする技術である[9]。しかしながら、こうした高いレベルの回路コーティング技術をもってしても、人工心肺によって生じる血液成分の破壊や活性化は未だそのごく一部しか制御されていないのが現実である。

このように、過去 60 年間にわたり人工心肺システムには多くの改良や工夫が加えられてきたが、未だに人工心肺による体外循環は生体に多大な侵襲を与える両刃の剣であり、心臓大血管手術の比較的高い死亡率の要因となっている。体外循環技術をさらに向上させてその安全性を高めるための追究は、今後もたゆまず続けられなければならない。

2. 人工心肺の morbidity

人工心肺回路には平滑な内面構造を有するポリ塩化ビニール、ポリカーボネートやポリプロピレンなどの人工素材が使用されているが、残念ながらその生体適合性は血管内皮のそれには遠く及ばない。血液が回路内を通過すると、グロブリンなどの血漿タンパクが強い静電気力によって構造変化をきたす。変性した血漿タンパクは凝集し、補体カスケードの強い賦活物質となって炎症を惹起し、凝固線溶系亢進のトリガーともなる。血球の異物との接触、血液ポンプによる機械的侵襲、手術侵襲、麻酔侵襲、冷却、希釈などの物理的刺激によっても、赤血球、白血球や血小板の破壊および活性化、補体やサイトカインの活性化などの血液学的変化が惹起される[10, 11]。

赤血球は人工心肺回路内での気泡との接触、ローラーポンプ、遠心ポンプや吸引装置による物理的刺激により溶血し、血漿中の遊離ヘモグロビン濃度が上昇する。この遊離ヘモグロビンは腎糸球体を容易に通過し尿細管細胞に取り込まれてヘムとグロビンに分解される。このうちヘムは尿細管上皮細胞に対して毒性を示すため、尿細管の機能障害（腎障害）を引き起こす[12, 13]。好中球も破壊されるが、炎症機転の亢進により骨髓からの好中球誘導がなされて、見かけ上の好中球減少は明らかではないことも多い。リンパ球は体外循環開始直後から減少し、これにより術後に細胞性免疫能が低下し易感染性が高まる可能性も指摘されている。また、血小板は体外循環開始と同時に人工心肺回路表面に粘着して活性化され、さらに血小板の活

性化に伴って脱顆粒現象が生じ、血小板凝集が進行する。体外循環終了後には、血小板数は通常術前値の40～50%まで減少し、術後の止血凝固障害の要因となる。

凝固系においては、プレカリクレイン、高分子キニノーゲンや第 XII 因子が人工心肺回路表面と接触することで活性化され、接触-内因系凝固反応が開始される。第 XIIa 因子は第 XI 因子を活性化して第 XIa 因子に変換し、次に第 XIa 因子が第 IX 因子を活性化して第 IXa 因子に、第 VIII 因子の存在下で第 IXa 因子が第 X 因子を第 Xa 因子に変換する。第 Xa 因子は第 V 因子の存在下でプロトロンビンをトロンビンに変換し、トロンビンは可溶性フィブノゲンを不溶性のフィブリンに転換する（図 1）。線溶系においては、プラスミノーゲンがトロンビンの作用によって強力な線溶作用を有するプラスミンに変わり、線溶活性が高まる。プラスミンは主にフィブリノゲンを分解し、フィブリン分解産物を生成する。このように、体外循環による接触-内因系凝固反応の亢進により各種凝固因子が消費され、一方でトロンビン産生により線溶系の活性化が進行することが知られており、こうした機序が術後の凝固障害や非外科的出血の要因となりうる[14]。

炎症においては、人工心肺回路内面と血液との接触により好中球、補体およびサイトカインなどの血液成分が活性化され、いわゆる全身性炎症機転が惹起される。特に好中球の活性化機構は炎症機転の中で重要な位置を占める。活性化好中球は微小循環へ集積し、急性肺障害をきたす一因となる。また、活性化好中球は多くの炎症性メディエータを遊離する。中でも好中球エラスターゼは最も組織傷

害性の高いプロテアーゼの一つとして知られ、体外循環に伴う炎症活性化機構の中心的な役割を担うと考えられている。

人工心肺はその他にもさまざまな影響を生体に与える。人工心肺回路内を満たすために通常ブドウ糖液、電解質液、生理食塩水、アルブミンなどが用いられる。新生児、乳児、貧血の著明な成人では、この回路充填のために血液が使われることもある。人工心肺による体外循環開始と同時に、人工心肺回路内の充填液と患者の循環血液とが混合されて血液が希釈され、血漿膠質浸透圧の低下や血管外への水分および電解質のシフトが生じる。外科的侵襲による血管透過性亢進も加わり、血管内の水分は細胞間質へ貯留して肺を含めた全身臓器の浮腫が引き起こされる。この血管透過性の亢進には、人工心肺開始直後からの C3a や C5a などの補体系の活性化、血液の異物との接触によるカリクレイン系の賦活化に伴うブラディキニンの遊離、および活性化された単球から放出される tumor necrosis factor (TNF) なども関与していると考えられている。人工心肺による臓器灌流が適正に維持されている状態であっても、血液希釈によって血液の酸素運搬能が低下し、末梢循環不全による代謝性アシドーシスに傾くことがある。また、人為的な非拍動性の体外循環はホメオスタシスを無視あるいはこれと拮抗するために循環血液量や血圧の変動を来しやすく、非生理的な血圧（灌流圧）によって諸臓器の機能障害が生じることも懸念される。さらには、低血圧や非拍動性の血流、微小血栓や血小板凝集塊、あるいは外科的操作に伴う動脈硬化性血管壁からの微小塞栓塊

の遊離や空気混入などに起因する脳梗塞を含めた塞栓症の発生も、頻度はさほど多くはないが人工心肺に関連する重大な有害事象の一つである。

以上のような人工心肺に起因する多くの有害事象に、血液中の蛋白や血球成分の活性化は強く関与している。有害事象の発生頻度や程度を抑制して心臓手術の morbidity を改善するためには、人工心肺と血液との接触を発端とする血液成分への悪影響（Blood-Artificial Surface Interaction）を制御して凝固線溶機転や全身性炎症機転の亢進を抑制することが、極めて重要な課題であると考えられる。

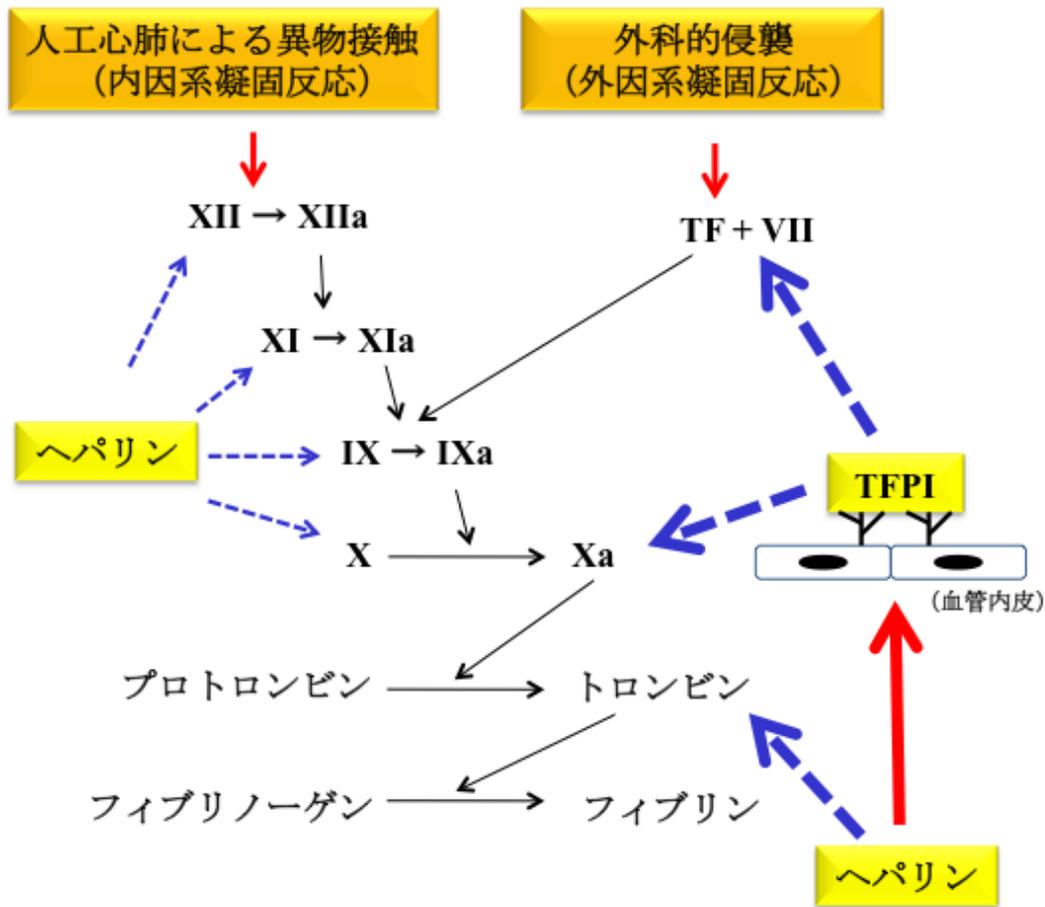


図1. 凝固カスケード

- : 亢進
- > : 抑制

図 1. 凝固カスケード

心臓手術時には、人工心肺回路（血液の異物との接触）により内因系凝固反応が亢進するだけでなく、外科的侵襲により tissue factor (TF) を起点とする外因系凝固反応も亢進する。ヘパリンは血管内皮にも作用して tissue factor pathway inhibitor (TFPI) を血中に放出し、内因系のみならず外因系凝固反応をも抑制する。

3. 血液麻酔 (Blood Anesthesia) の概念

正常な血管内皮細胞には血栓の形成を阻止して血液の流動性を維持するための多くの凝固制御機構が存在する。中でも重要なのがセリンプロテアーゼインヒビターによる制御で、アンチトロンビン (AT ; antithrombin) が主にこの機構に関与する。AT はトロンビンの制御因子として中心的な役割を果たし、その抗トロンビン活性はヘパリンによって著しく増強される。他の制御機構としては、第 Va 因子や第 VIIIa 因子などを失活させるプロテアーゼによる制御系があり、その代表的なプロテアーゼとしてはプロテイン C がある。活性化プロテイン C は第 Va 因子、第 VIIIa 因子、およびトロンビンを分解して凝固反応を抑制する。ところが、当然ながら人工心肺回路表面には血管内皮細胞が存在せず、上に述べた血管内皮細胞による凝固制御機構が機能することはない。そのため血液が非生理的回路内を流動して異物面と接触することにより接触-内因系凝固反応が惹起される。最近まで、この接触-内因系凝固反応が心臓手術後の凝固障害を引き起こす主因と理解され[10]、これをよりの確に制御するための新たな抗凝固手段が模索されてきた。

日常臨床においては体外循環開始直前に大量のヘパリンが静脈内投与され、凝固線溶系の抑制がなされる。その際、接触-内因系凝固活性抑制の程度をベッドサイドで即時評価する検査手段として活性化全血凝固時間 (ACT ; activated clotting time) が用いられる。ACT は、活性化剤 (セライト、カリオン、ガラス粒、シリカなど) と全血液とを混合して凝固系を活性化させておこなう検査法である。活

活性化剤と全血液が接触すると第 XII 因子が活性化される。これに続き第 XI 因子、第 IX 因子、第 X 因子、プロトロンビンが活性化され、最終的に血栓が形成されるまでの時間を以って抗凝固効果の指標とする（基準値：90～120 秒）。体外循環中の回路内での血栓形成防止のためには、ACT が 400 秒以上になるようにヘパリンが使用されることが推奨されている。

ヘパリンはブタ腸管粘膜やウシ肺から抽出される酸性ムコ多糖類であり、血中の AT と結合して強力な抗トロンビン作用を発揮し、トロンビンによるフィブリノーゲンの活性化を抑制する。同時に内因系凝固カスケードの第 XII 因子、第 XI 因子、第 X 因子、第 IX 因子の各凝固因子をも抑制する。ヘパリンにより接触-内因系凝固因子の活性化は抑制され、人工心肺回路内の血栓形成は見かけ上阻止されることがほとんどである。しかしながらヘパリンは決して理想的な抗凝固薬ではなく、ヘパリン大量使用下でも体外循環中にはトロンビン・アンチトロンビン複合体（TAT ; thrombin antithrombin complex）、フィブリノペプチド A、フィブリンモノマーなどの各種トロンビン生成マーカーの産生亢進が観察される[15-17]。ヘパリンの使用だけでは人工心肺回路内でのトロンビン産生を完全に制御することは困難であり、実際には心臓手術開始前と比較して体外循環中には約 5～10 倍のトロンビン産生が認められる[18, 19]。

Blood Anesthesia とは、ヘパリンに代わる何らかのプロテアーゼインヒビター等を駆使して、血液が人工心肺回路表面と接触することに端を発する血液成分への

悪影響（Blood-Artificial Surface Interaction）を薬理的に制御し、より侵襲の少ない安全な体外循環を確立しようとする概念である。体外循環を含めた外科的侵襲による炎症および凝固反応の活性化を一時的かつ完全に抑制しながら、体外循環終了時には速やかにこの抑制作用を中和して生体防御反応である炎症および凝固反応を正常復帰させることが究極の目標である。

4. 血液麻酔 (Blood Anesthesia) 研究の歴史

Blood Anesthesiaの実現のための第一歩として当研究グループが関与した初期研究においては、まず血小板の活性化抑制が試みられた。体外循環中には血小板の凝集と人工心肺回路表面への粘着が生じることにより、術中および術後に血小板数が著明に低下する。体外循環中に限った血小板機能の可逆的な活性化抑制が可能となれば、血小板の消費が抑えられ、正常な機能を有する血小板により術後の止血機能が維持されると想定された。そこで、血小板膜に存在しフィブリンノーゲンとの架橋形成を担う glycoprotein (GP) IIb/IIIa レセプターの競合拮抗薬である tirofiban や阻害薬である eptifibatid を用いて、血小板凝集の最終段階であるフィブリンノーゲンとの結合を抑制することが試みられた。ヒヒ体外循環モデルを用いた実験の結果、両薬剤により体外循環中の血小板凝集および活性化が抑制され、体外循環後の血小板数と機能とが良好に維持されることが確認された[20-22]。GP IIb/IIIa レセプター阻害薬はその後冠動脈疾患に対する抗血小板療法のための薬剤として脚光を浴びたが、半減期が数十分以上と長く中和する手段もないため、体外循環用の抗血小板薬としては臨床応用されていない。

体外循環においては、好中球、補体およびサイトカインなどの炎症に関与する血液成分も活性化され、いわゆる全身性炎症機転が惹起される。特に好中球の活性化機構は炎症機転の中で重要な位置を占める。中でも好中球エラスターゼは最も組織傷害性の高いプロテアーゼの一つとして知られ、体外循環に伴う炎症活性化機構の

中心的な役割を担うと考えられている。当研究グループにおいては好中球の活性化抑制にも焦点が当てられ、独自の模擬体外循環システムを用いた好中球ホスホジエステラーゼ (PDE ; phosphodiesterase) type IV阻害薬の性能検証実験が行われた。模擬体外循環システムは小児サイズの人工心肺の*in vitro*シミュレーションであり、小型膜型人工肺、ローラーポンプ、およびソフトリザーバーが1/4インチシリコンチューブで連結された簡易的な体外循環モデルである[23]。選択的なPDE IV阻害薬であるrolipramは、多形核白血球中のcyclic adenosine monophosphateの分解を特異的に阻害することによって細胞内のcyclic adenosine monophosphate濃度を上昇させ、細胞内Caの流入を制御して好中球の接着分子発現や細胞骨格変化を抑制する[24]。模擬体外循環において、PDE4阻害薬rolipramは多形核白血球の活性化を有効に抑制することが示された[25]。これに続く一連の研究では、選択的好中球エラスターゼ阻害薬であるONO-6818およびONO-5046-Na (シベレスタット) の好中球活性化抑制効果が模擬体外循環実験によって検証された。ONO-6818とONO-5046-Naとはともに好中球エラスターゼの活性を競合阻害する作用があり、これらの薬剤添加により炎症物質であるインターロイキン8の体外循環中の産生が抑制された。それにより、再びインターロイキン8から好中球活性化へと渡るサイクルが断たれたと考えられ、結果的に好中球エラスターゼの血中への遊離が減じたことが証明された[26, 27]。同時期には、メシル酸ナファモスタットが模擬体外循環中に好中球の脱顆粒と血小板の凝集抑制を果たすことも証明された[28]。メシル酸ナファモスタットは合成広域

プロテアーゼインヒビターであり、トロンビン、第XII因子、カリクレイン、プラスミン、補体、血小板凝集などを広く阻害すると言われている[29]。中でもカリクレインは好中球を活性化させる主要な伝達物質であり[30]、カリクレインを抑制することが模擬体外循環中の好中球活性化抑制に効果的であったと推察された。

このように好中球や血小板の制御方法に一定の方法論を提示することができたが、同時期に行われた臨床研究では、体外循環開始前に広域プロテアーゼインヒビターであるメシル酸ナファモスタットを静脈内投与したにも関わらず、期待されたようなトロンビン生成抑制作用や抗炎症作用は確認できなかった[31]。*In vivo*では、骨髄からの新たな血球供給、外科的侵襲による炎症反応物質の産生および血管内皮細胞の影響などの複雑な修飾を受ける。そのため、内因系凝固反応への広範囲な作用を有するものの個々のプロテアーゼに対する抑制効果が低いメシル酸ナファモスタット単独では、トロンビン生成抑制効果が不十分であったものと推察された。同様にして行われた抗線溶剤アプロチニンを用いた臨床研究では、アプロチニンによる体外循環中のトロンビン産生抑制効果と抗炎症効果とが認められた[31]。膵臓で生産するKunitz型のトリプシンインヒビターであるアプロチニンは、カリクレイン、プラスミン、血小板活性化などを阻害する作用を有し[32]、他施設からの研究においても、人工心肺開始前からアプロチニンを投与することによって凝固活性が抑制され、術後出血が減少し得ることが報告されている[33]。しかしながら、心臓外科手術におけるアプロチニン使用により塞栓症に伴う腎不全や脳梗塞などの合

併症の確率が高まるという報告[34]がなされて以降、アプロチニンは心臓外科手術には使用されなくなった。

上記のように様々なプロテアーゼインヒビターがヘパリンに代わる新たな抗凝固薬としての可能性を試験されてきたが、残念ながらヘパリンを凌駕する薬剤は未だ見つかっていない。理想的な血液麻酔への道はまだまだ遠いと言わざるを得ない。

5. 組織因子を起点とする外因系凝固反応への着目

1993年に Boisclair らは、体外循環中の大量のヘパリン投与にも関わらず、トロンビン産生が依然亢進している事実を示した。同研究によれば、トロンビン産生亢進は第 IX 因子活性と正の相関を示したが、第 XII 因子活性とは相関を示さなかった。この研究において、体外循環中のトロンビン産生亢進の主因は接触-内因系凝固反応以外に存在する可能性が初めて示唆された[18, 35]。また Burman らは、心房中隔欠損症を有する先天性第 XII 因子欠損症患者の心内修復術において、接触-内因系凝固反応が活性化されないはずであるにもかかわらずトロンビン産生が亢進していた事実を報告した[36]。Tabuchi らは、心臓手術中の心嚢内に貯留した血液中でトロンビン産生や線維素溶解活性が亢進していることを証明し、心嚢内の貯留血液を人工心肺回路内へ回収することが全身の凝固反応促進につながるのではないかと提唱した[37]。一方で Kappelmeyer らは、模擬体外循環システムによって刺激を受けた単球がその細胞膜上に組織因子 (TF ; tissue factor) を発現させることを確認したが、この単球による TF 発現には mRNA を介する蛋白合成を必要とし、発現までに体外循環開始から 2~4 時間以上を要する点が体外循環開始早期の凝固反応亢進を説明する上での矛盾であった[38]。これより後に Hattori らは、心臓手術において体外循環開始後早期から心嚢内に貯留した血液内に可溶性 TF が多く発現していることを証明した。この時心嚢内に貯留していた単球は未だ TF を発現しておらず、単球は可溶性 TF と第 VII 因子との反応するためのプラッ

トフォームとして働くものと考えられた[39]。他の研究においても、心嚢内に貯留した可溶性 TF は赤血球、単球、好中球や血小板の存在下でのみ第 VII 因子と反応し、中でも単球が最も重要な役割を担うことが示されている。このように、心臓外科手術における凝固線溶系亢進の要因は、接触-内因系凝固反応よりもむしろ TF を発端とする外因系凝固反応にあるとの考え方が最近の趨勢である[40-42]。

TF は低分子量の膜糖蛋白であり、生体内では多くの細胞膜上に分布する。特に肺、脳、胎盤に多く存在するが、血管内皮細胞や血球には普段発現していない。切開、凝固、剥離などの外科的組織損傷により TF は産生・遊離され、これにより外因系凝固反応が惹起される。TF はカルシウムの存在下で第 VII 因子に結合して TF-第 VIIa 因子複合体となり、この複合体が第 IX 因子および第 X 因子を活性化してトロンビン生成を誘導し、不溶性のフィブリン血栓が形成されるに至る(図 1) [43]。

心臓手術においては、切開、凝固および剥離操作などの外科的侵襲により生体組織から TF が遊離され循環血液中や心嚢内貯留血液内に増加する[44]。したがって TF が多く含まれる心嚢内貯留血液を吸引回収して人工心肺回路に取り込むことは、トロンビン産生を助長することにつながると考えられる。実際 Somer らは、心嚢内に貯留した血液を全て除去することによってトロンビン産生が有意に抑制されたことを報告している[15]。しかしながら、心嚢内に貯留してくる血液をすべて廃棄することによって TF 由来のトロンビン産生を防ぐという手段は、出血

量が必ずしも少なくない心臓手術においては現実的ではない。また、心臓手術においては体外循環開始以前から比較的侵襲度の高い手術操作が行われていることから、我々は独自の発想として、手術開始早々からの外科侵襲によって血中に放出される TF に対して、体外循環開始以前にあらかじめその作用を阻害する態勢を血中に備えておくことはできないものかと考えた。そこで着目したのが、組織因子を直接阻害する唯一の生理的物質、tissue factor pathway inhibitor (TFPI) である。

6. 外因系凝固反応の抑制を目指して

TFPI は、外因系凝固反応のトリガーである TF を直接抑制する唯一の生理的物質として知られている。ヒト TFPI のアミノ酸配列は 1988 年に Broze らにより決定された。このインヒビターはもともと lipoprotein-associated coagulation inhibitor あるいは extrinsic pathway inhibitor と呼ばれてきた。TFPI は主に肝臓で合成され、通常そのほとんどが血管内皮細胞表面に存在する。TFPI が血管内皮細胞から血漿中に遊離されると、その 85~90% はリポ蛋白質と結合し、10~15% 程度が遊離型として存在するとされる[45]。TFPI は強力なセリンプロテアーゼインヒビターであり、TF-第 VIIa 因子複合体による第 X 因子の活性化を直接阻害して強力な外因系凝固抑制作用を発揮する[46]。また、TFPI は好中球細胞内へのカルシウム流入を阻害し、好中球接着分子 CD11b / CD18 の発現や放出反応を抑制する。さらには内皮細胞や単球にも作用し、TNF- α 、IL-6 や microparticle の放出を抑制することが知られており、凝固系のみならず体外循環に関連する炎症機転の制御にも関与する可能性が示されている。血管壁にヘパリンが作用すると内皮細胞から血漿中に TFPI が遊離され、血中 TFPI 濃度は 2 倍~10 倍に上昇することが知られている[45, 47, 48]。しかしながら、体外循環における TFPI の血液学的な存在意義に関しては、実際の人工心肺使用症例での TFPI 血中濃度を測定した研究が散見される程度である[49-51]。通常ヘパリンは体外循環開始直前になって初めて投与されるため、執刀時から体外循環開始までの数十分間には、外科侵襲による TF 放出は始まっ

ていても未だ血漿中の TFPI 濃度は上昇していない。すなわち、心臓手術全般を通して見れば、TF を起点とする外因系凝固反応によるトロンビン産生は、ヘパリン大量投与とこれによる TFPI 放出によっても効率よく、あるいはタイミングよく抑制されているとは言い難い。

以上のような観点から、我々は体外循環における凝固線溶および炎症を制御する最も効果的な方略として外因系凝固反応の抑制に着目し、特に TF 発現以前の早期に TFPI を血中誘導することの効果に期待を抱いた。次章以降に示すように、体外循環における TF の役割について独自の視点で検証した上で、TF を起点とする外因系凝固反応の新たな制御法開発に向けて研究を進めることとした。

第2章 組織因子は模擬体外循環中の好中球変形能劣化を助長する

1. 背景

前章で述べたように、近年、TFを起点とする外因系凝固活性化が体外循環中の凝固線溶異常や炎症機転発現の重要なトリガーとして注目されている[18, 52]。TFは第VII因子と複合体を形成することにより外因系凝固反応を開始するのみでなく、血管内皮細胞のprotease activated receptor-2を活性化し、血管内皮透過性亢進や白血球接着分子の発現を惹起するとされており、凝固反応と炎症反応の間には繊細なクロストークが存在している。しかしながら、体外循環におけるTFの血液学的作用の詳細は未だ明らかにされていない[50]。本研究では、複雑な生体環境を排した模擬体外循環システムを用いて、体外循環中の血液諸因子に及ぼすTFの影響を検討した。全血microchannel transit timeとその主な規定因子である好中球および血小板機能の変化を解析するとともに、炎症機転の中心的役割を担う好中球機能へのTFの影響を明らかにすることを目的とし、次のような仮説を立てた。

2. 仮説

模擬体外循環において、血管内皮細胞のprotease activated receptor-2を介さずにTFは炎症機転の主座のひとつである好中球機能を活性化させる。

3. 方法

3.1. 模擬体外循環システム

本実験は、膜型人工肺（model 60EC, surface area 0.6m^2 , MERA, Tokyo, Japan）とローラーポンプ（model MS-033, MERA）とリザーバーバッグ（250mL, MERA）を 1/4 インチのシリコンチューブで連結した模擬体外循環システム（図 2）を用いて行なった。模擬体外循環システムは前章「血液麻酔の歴史」で述べたとおり、小児用の人工心肺を模した、動物等の生体を用いない簡易的な体外循環モデルである[23]。同システムは、臨床に近い環境下で血液ポンプによる機械的侵襲や人工心肺回路内面と血液との接触などによる血液学的変化を容易に評価できる装置である。ヘパリン（3.75 U/mL）およびブドウ糖（2.25 mg/mL）を添加した健常人ドナー新鮮血 250mL を 37°C 、流量 $400\text{mL}/\text{min}$ で 120 分間システムの中を循環させた。人工肺は、酸素と二酸化炭素の混合気（95:5） $1.0\text{L}/\text{min}$ で換気した。人工肺、リザーバーおよび回路はドナー毎に新しいものを使用した。

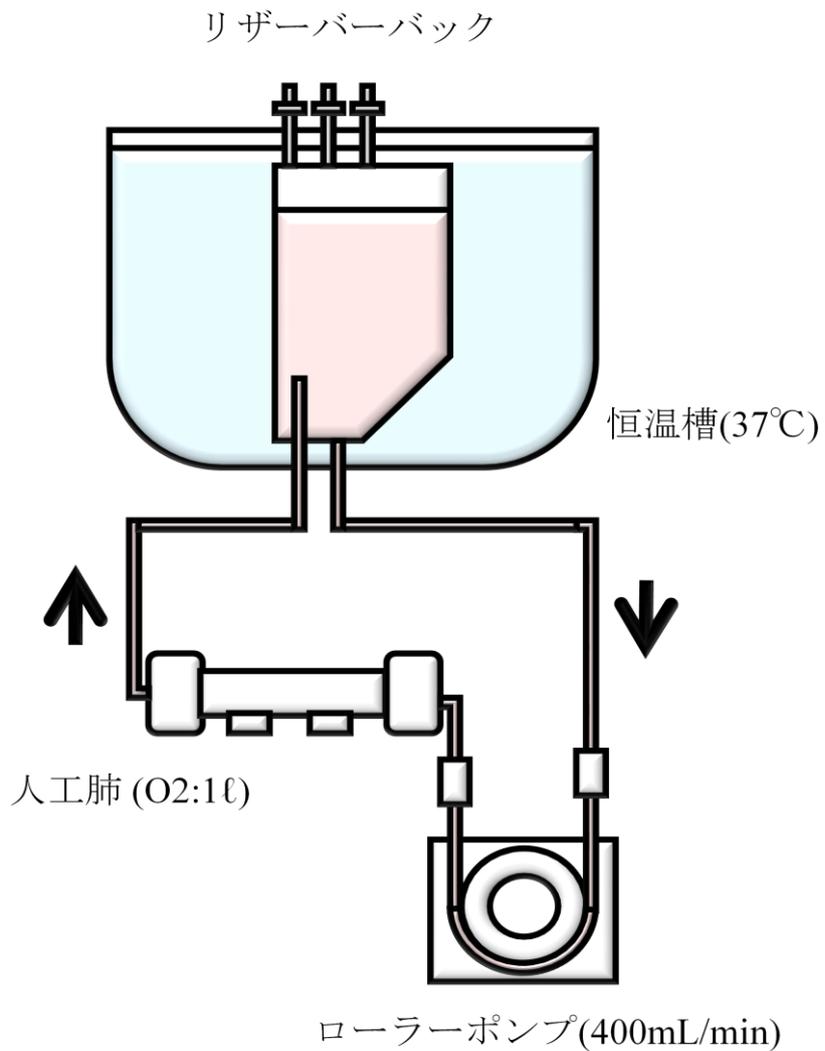


図 2. 模擬体外循環システム

本システムは小児サイズの人工心肺の *in vitro* シミュレーションであり、小型膜型人工肺 (model 60EC, surface area 0.6m², MERA, Tokyo, Japan)、ローラーポンプ (model MS-033, MERA)、およびリザーバーバック (250mL, MERA) が 1/4 インチシリコンチューブで連結された簡易的な体外循環モデルである。

3.2. プロトコール

模擬体外循環開始前のリザーバーバッグ（ヘパリンを含む）にあらかじめリコンビナント組織因子（rTF; recombinant full-length human tissue factor, Biogenesis, Poole, UK）を添加した群を Tissue Factor 群（最終血中濃度 1000 pg/mL, n=6）とし、組織因子を添加しない Control 群（コントロール, n=6）と比較した。Tissue Factor 群の TF 血中濃度は、過去に報告されている健常人データをもとに 5~10 倍のマージンをとるよう設定した。血液検体は、薬剤添加前（Donor ; 模擬体外循環システム内へ入れる前の健常人ドナーから採取した血液）と、模擬体外循環開始（両薬剤接触）から 0、30、60、120 分後に採取した。薬剤添加後体外循環を行わず、37°Cで 120 分間震盪したのみの検体を standing control（SC）とした。測定項目および測定方法を以下に列挙する。

血球数測定

血球数は、血球算定機（T-660, Coulter Electronics, Hialeah, USA）を用いて測定し、白血球分画は Wright 染色スメアで観察の上算出した。

Transit time 測定

好中球変形能の指標として、microchannel array flow analyzer（MC-FAN, Hitachi Haramachi Electronics, Hitachi, Japan）を用いて Transit time を計測した。Transit time

とは、全血が毛細血管構造を模したシリコン製 microchannel array (幅 6 μ m, 深さ 4.5 μ m, 長さ 10 μ m, チャンネル本数 2600 本, Bloody-3S, Hitachi Haramachi Electronics, 図 3) を通過する時間を意味し、血液の流動性を評価する検査である。

3.8% acid-citrate-dextrose で抗凝固処理した全血を phosphate-buffered saline 緩衝液で 2 倍に希釈したのち、落差 10cmH₂O で microchannel に流し、検体 100 μ L の通過時間をもって transit time とした[23]。

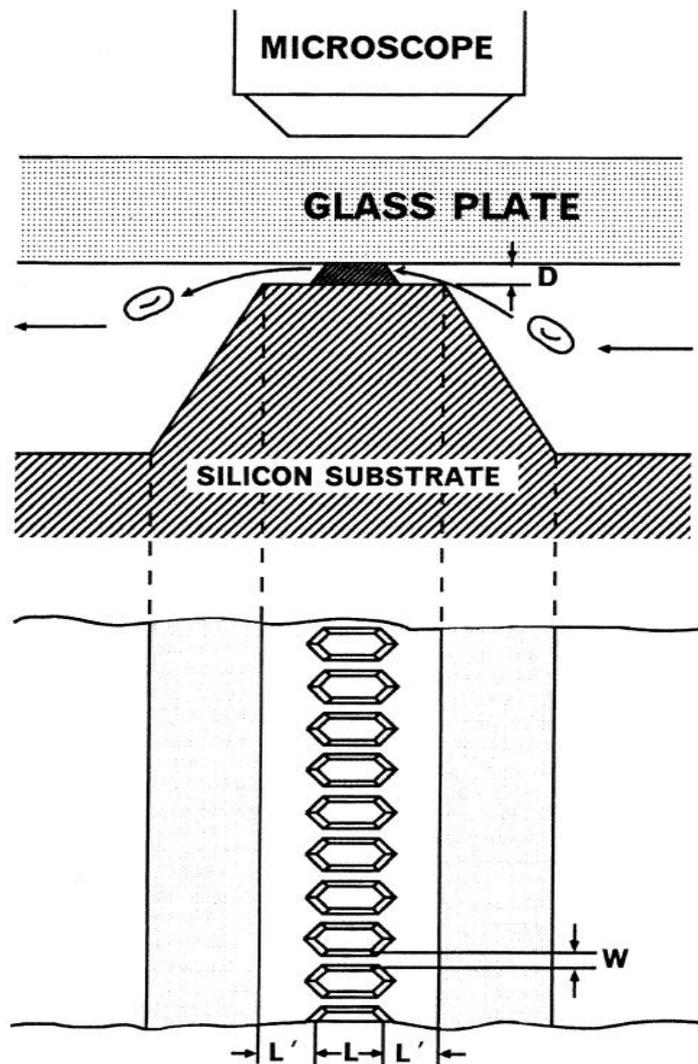


図 3. microchannel array の略図

毛細血管構造を模したシリコン製 microchannel array (Bloody-3S ; Hitachi Haramachi Electronics, Hitachi, Japan) は幅 ($W = \text{width}$) $6.0\mu\text{m}$, 深さ ($D = \text{depth}$) $4.5\mu\text{m}$, 長さ ($L = \text{length}$) $10\mu\text{m}$, チャンネル本数 2600 本から構成される。(参考文献[23]より引用)

好中球細胞骨格 (F-actin) と好中球接着分子 (CD11b, L-selectin) 測定

細胞骨格とは、細胞の形態を維持し、細胞自体の運動に必要な物理的力を発生させる細胞内の繊維状構造物である。その好中球細胞骨格の指標である F-actin と、好中球接着分子である CD11b と L-selectin とを flow cytometry (FACS Calibur, Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) で測定した[53]。好中球は前方散乱光と側方散乱光により選別され、各種測定項目は好中球 5000 個の平均蛍光強度として測定された。解析ソフトは BD CellQuest Pro (Becton Dickinson) を使用した。

F-actin 検出の前処理のために、IntraPrep (Immunotech Coulter, Marseilles, France) を用いて 50 μ l の血液サンプルをホルムアルデヒドで固定し膜透過処理した。続いて BODIPY FL phalloidin (Molecular Probes, Eugene, OR) を用いて、37°C の暗室で 30 分間好中球内の F-actin を標識し、最後に phosphate-buffered saline 溶液で 2 回洗浄した。CD11b および L-selectin 検出のために、100 μ l の血液サンプルを 1 mg/mL の phycoerythrin - conjugated mouse monoclonal antihuman CD11b 抗体 (DAKO Laboratories, Copenhagen, Denmark) と 2 mg/mL の fluorescein isothiocyanate - conjugated antihuman CD62L 抗体 (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA) とを用いて 4°C で 30 分間前処理した。

血小板凝集能検査

血液サンプルを 150 ×g で 10 分間遠心分離して多血小板血漿 (platelet-rich plasma) を採取し、15000 ×g で遠心分離して乏血小板血漿 (platelet-poor plasma) を採取した。多血小板血漿中の血小板数を血小板数算定機 (model Z1 Coulter counter, Coulter Electronics) で測定した。多血小板血漿を乏血小板血漿で希釈して血小板数 150000/μl に調整した上で、血小板凝集惹起物質である Adenosine diphosphate に対する血小板凝集能を血小板凝集計 (model PAC-4S, NBS HEMA TRACER, Tokyo, Japan) で測定した。

血小板 α 顆粒 (GMP-140) と血小板由来 microparticle 測定

血小板 α 顆粒の放出 (GMP-140) と血小板由来の microparticle 産生の程度を flow cytometry で測定した[54]。多血小板血漿 (platelet-rich plasma) を用いて、血小板表面抗原を phycoerythrin-labeled monoclonal antibody (CD62-PE, Becton Dickinson)、CD42b 抗体 (DACO A/S, Glostrup, Denmark)、そして CD41b 抗体 (TP80, Nichirei, Tokyo, Japan) で認識させた。使用した CD62-PE は血小板 α 顆粒分泌後に血小板表面上に出現する膜糖蛋白 (GMP-140) を認識する。CD42b 抗体及び CD41b 抗体はそれぞれ血小板表面上の GPIb、GPIIb/IIIa に対する抗体であり、血小板由来の microparticle を標識する。CD42b 抗体及び CD41b 抗体で標識された血小板由来 microparticle と正常血小板とは、flow cytometry 上のサイズによって識別された。

3.3. 統計学的解析

全ての測定結果は Donor 値に対する割合（% of Donor）に換算し、平均±標準誤差で示した。統計処理は、各値の Donor 値に対する比較判定を One-way analysis of variance (ANOVA)を用いて行った。経時変化の群間比較には Repeated measure ANOVA を用い、有意差を認めた場合には Scheffe 法による各時点での比較判定を加えた。

本研究プロトコールは、筑波大学医学医療系・医の倫理審査委員会の承認に基づいて実施された。

4. 結果

体外循環中の ACT は両群ともヘパリンを使用して常に 500 秒以上に維持され、ヘマトクリット値は両群とも一定の値で経過した。その他の全ての血液学的測定結果を表 1 に示す。好中球数は両群とも有意な経時的変化を認めなかった。血小板数は体外循環開始後から漸減し、120 分までに初期値 (Donor 値) の約 20% に減少したが、全経過を通して 2 群間に有意差は認めなかった。

Transit time は rTF を添加した Tissue Factor 群において 120 分までに有意に延長したが、Control 群では有意な変化がなく、2 群間に有意差を認めた (図 4, $p = 0.022$)。F-actin の発現は Tissue Factor 群において 30 分後から有意に増加したが、Control 群では有意な変化がなく、2 群間に有意差を認めた (図 5, $p = 0.030$)。

好中球接着分子は CD11b、L-selectin とも、有意に経時的増加を示したが、2 群間には有意差を認めなかった。血小板凝集能は初期亢進の後に漸減し、120 分までに Donor 値の約 25 % まで減弱したが、2 群間に有意差を認めなかった。血小板 GMP-140 および microparticle は 2 群ともに有意な経時的増加を示したが、2 群間に有意差を認めなかった。

表 1. 模擬体外循環中の血液学的検査所見^a

| 項目 | 群 | Donor | 0 min | 30 min | 60 min | 120 min | SC | P Value |
|----------------------|---------------|-------|--------------------------|---------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-------------------------|---------|
| Neutrophil count | Control | 100 | | 102.3 ± 5.1 | 105.1 ± 2.7 | 95.5 ± 3.6 | 99.6 ± 3.4 | 0.71 |
| (% of Donor) | Tissue Factor | 100 | | 106.4 ± 2.5 | 103.9 ± 2.6 | 99.6 ± 2.9 | 98.2 ± 3.6 | |
| Platelet count | Control | 100 | | 29.1 ± 2.8 ^e | 27.9 ± 3.2 ^e | 21.8 ± 2.8 ^e | 90.3 ± 1.2 ^d | 0.67 |
| (% of Donor) | Tissue Factor | 100 | | 28.8 ± 1.8 ^e | 24.3 ± 2.0 ^e | 18.8 ± 2.0 ^e | 88.2 ± 0.9 ^e | |
| Transit time | Control | 100 | | 121.4 ± 4.8 | 153.7 ± 9.6 | 184.8 ± 22.5 ^c | 128.1 ± 14.6 | 0.022 |
| (% of Donor) | Tissue Factor | 100 | | 156.1 ± 15.6 | 200.7 ± 30.0 | 330.4 ± 57.7 ^{c,e} | 156.9 ± 14.0 | |
| F-actin | Control | 100 | 124.5 ± 13.7 | 128.9 ± 23.7 | 106.8 ± 25.7 ^b | 75.6 ± 12.6 | 73.6 ± 8.2 | 0.030 |
| (% of Donor) | Tissue Factor | 100 | 144.4 ± 12.5 | 182.3 ± 11.9 ^d | 196.2 ± 19.6 ^{b,e} | 122.0 ± 18.8 | 98.9 ± 18.3 | |
| CD11b | Control | 100 | 99.8 ± 5.2 | 452.2 ± 41.9 ^e | 515.0 ± 41.1 ^e | 538.6 ± 35.9 ^e | 228.1 ± 51.3 | 0.61 |
| (% of Donor) | Tissue Factor | 100 | 105.4 ± 9.1 | 461.2 ± 52.0 ^e | 502.0 ± 54.0 ^e | 556.6 ± 56.5 ^e | 146.3 ± 23.9 | |
| L-selectin | Control | 100 | 104.9 ± 2.5 | 52.1 ± 6.9 ^e | 29.6 ± 7.3 ^e | 16.3 ± 4.9 ^e | 71.2 ± 10.9 | 0.87 |
| (% of Donor) | Tissue Factor | 100 | 105.5 ± 2.3 | 54.5 ± 6.5 ^e | 31.2 ± 6.1 ^e | 17.8 ± 5.0 ^e | 81.8 ± 8.1 | |
| Platelet aggregation | Control | 100 | 131.5 ± 8.3 | 78.2 ± 3.1 | 54.4 ± 6.8 ^e | 25.1 ± 3.0 ^e | 102.5 ± 10.9 | 0.94 |
| (% of Donor) | Tissue Factor | 100 | 134.2 ± 5.5 ^d | 81.2 ± 6.0 | 55.2 ± 8.2 ^e | 25.4 ± 3.6 ^e | 94.5 ± 10.4 | |
| GMP-140 | Control | 100 | 258.0 ± 59.0 | 331.0 ± 75.1 | 429.7 ± 95.4 ^d | 479.8 ± 125.0 ^d | 173.0 ± 24.6 | 0.86 |
| (% of Donor) | Tissue Factor | 100 | 235.4 ± 58.3 | 391.7 ± 126.4 | 322.3 ± 66.4 | 454.3 ± 68.4 ^d | 187.7 ± 20.7 | |
| Microparticles | Control | 100 | 82.3 ± 6.9 | 116.0 ± 22.6 | 141.1 ± 27.9 | 181.0 ± 34.8 ^d | 71.6 ± 7.5 | 0.39 |
| (% of Donor) | Tissue Factor | 100 | 103.8 ± 7.2 | 117.3 ± 8.5 | 161.6 ± 20.4 ^d | 238.4 ± 25.7 ^e | 85.0 ± 2.9 | |

^a 血液、血漿、および transit time などの測定値は平均値±標準誤差

^b $p < 0.05$, ^c $p < 0.01$: Tissue Factor 群と control 群とで有意差あり

^d $p < 0.05$, ^e $p < 0.01$: Donor と比較して有意差あり

SC = standing control

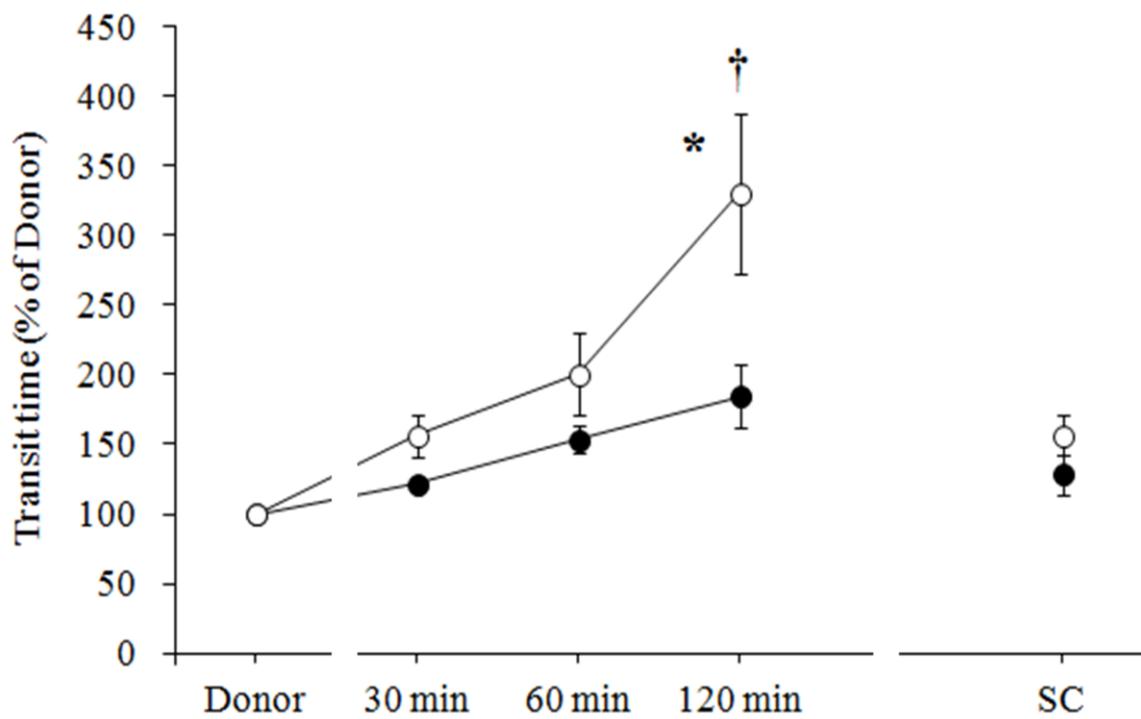


図 4. 模擬体外循環中の transit time の変化

結果は Donor 値に対する割合 (% of Donor) に換算し、平均±標準誤差で示した。

● = Control 群 (n = 6) , ○ = Tissue Factor 群 (n = 6) , SC = standing control.

† : Tissue Factor 群と control 群とで有意差あり ($p < 0.01$)

* : Donor と比較して有意差あり ($p < 0.05$)

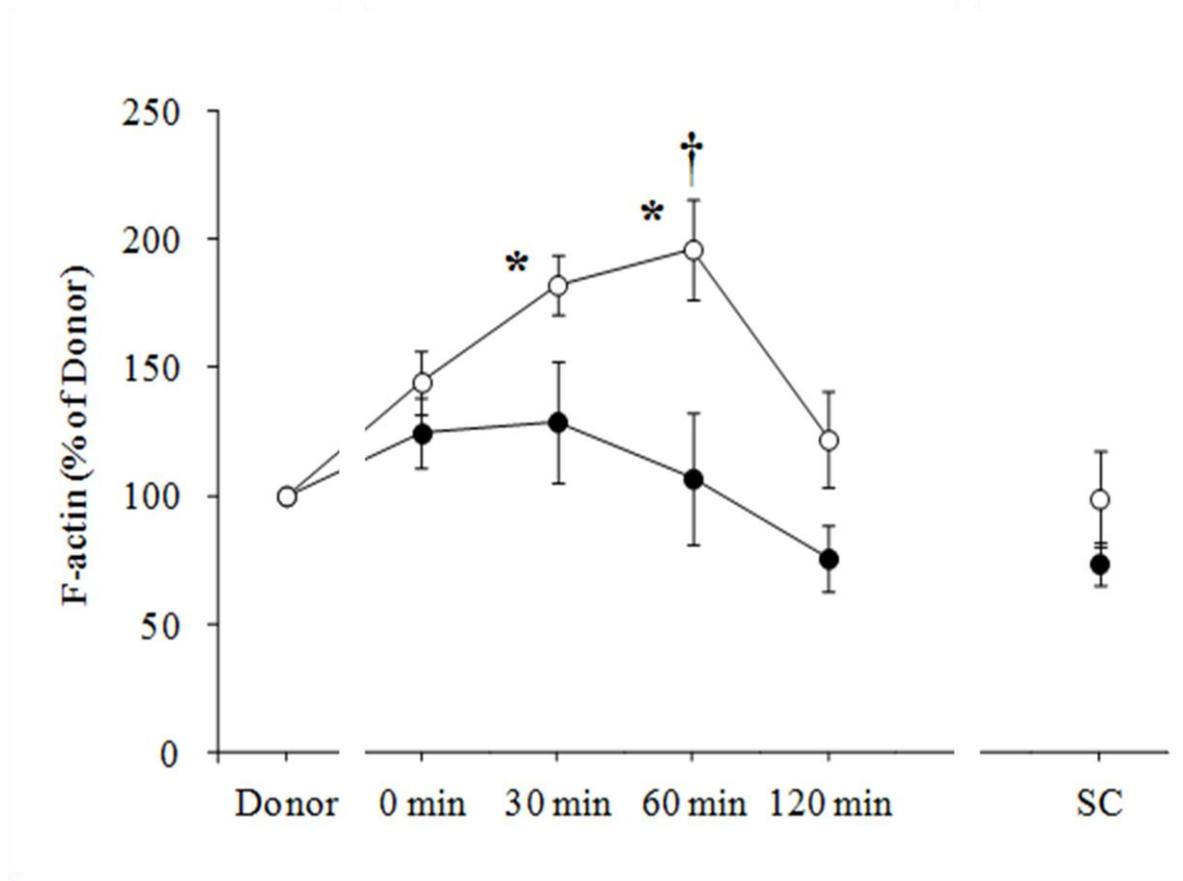


図 5. 模擬体外循環中の F-actin 変化

結果は Donor 値に対する割合 (% of Donor) に換算し、平均±標準誤差で示した。

● = Control 群 (n = 6) , ○ = Tissue Factor 群 (n = 6) , SC = standing control.

† : Tissue Factor 群と control 群とで有意差あり ($p < 0.05$)

* : Donor と比較して有意差あり ($p < 0.01$)

5. 考察

TF を起点とする外因系凝固活性化は、体外循環中の凝固線溶異常や炎症機転発現の重要なトリガーであると考えられている[18, 52]。既に述べたように、体外循環を使用する心臓手術においては、体外循環開始後早期から心嚢内に貯留した血液内での可溶性 TF の発現が観察されている。この可溶性 TF が体外循環における凝固線溶系亢進の重要な因子として注目されているものの、そのメカニズムは未だ不明瞭である[50]。

平常時には TF は血管壁の平滑筋細胞や線維芽細胞で産生され、全身臓器の細胞膜中に細胞結合型 TF として存在するが、血管内皮細胞や血球には発現していない[55]。血中には発現細胞から脱落した遊離型 TF が低濃度で存在し、健常成人の血中濃度は 100~200 pg/mL と報告されている[50, 56-58]。遊離型 TF は、白血球や血管内皮細胞のアポトーシスに伴って生成される microparticle に結合した膜結合性タイプと単独の可溶性タイプに大別され、強い procoagulant 活性を示すのは前者である[57]。人工心肺中の血中 TF に関する報告データは、その多くが TF 陽性細胞の割合や TF 活性の値であり、TF の血中濃度に関する報告はごく僅かである[50, 59]。TF の血中濃度測定法には、Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) を用いた血中 TF 測定法、Polymerase chain reaction を用いた TF messenger RNA 測定法、フローサイトメトリーを用いた細胞表面 TF 測定法など

がある。ELISA や Polymerase chain reaction を用いた測定法は操作手順が煩雑で測定に時間を要するため、安定した血中濃度の測定結果を得にくい。我々も当初市販の ELISA 測定キットを用いて模擬体外循環中の TF 血中濃度推移の検証を試みたが、残念ながら安定したデータは得られなかった。そこで本研究では、TF 血中濃度の経時的推移を実証することは断念し、報告されている健常人データ[50, 56-58]を基に、その 5~10 倍に相当する 1000 pg/mL を Tissue Factor 群の初期血中 TF 濃度として設定した。十分なマージンをとることによって体外循環中の TF 血中濃度の減衰に配慮した。

前章で述べたように、体外循環を用いた心臓手術では全身性炎症機転の亢進が必発である。活性化好中球は、血小板凝集塊とともに諸臓器の毛細血管床に堆積して細胞傷害を先導し[23, 60, 61]、特に肺への影響は顕著である[62]。好中球が毛細血管のような微小流路を通過する際には、好中球自体の変形や好中球表面上に存在する接着分子（L-selectin, CD11b）を介したrollingからはじまる接着現象が起きる。好中球変形能はアクチン線維の増減による細胞骨格の変化によって決定され、F-actinはその変化の指標となる。L-selectinは血管内皮細胞表面上のE-selectinとの、インテグリンであるCD11bは血管内皮細胞上のintercellular adhesion molecule-1との接着に関与する(図6)。当グループの先行研究において、模擬体外循環中に活性化好中球が細胞骨格変化を伴う変形能の劣化を来とし、

血小板凝集塊とともに微小血管床へ集積することを報告している（図7） [23]。本研究ではその結果に基づき、外因系凝固反応に関連する好中球活性化の指標として、transit timeおよびこれに影響するであろう好中球細胞骨格（F-actin）、好中球接着分子（L-selectin, CD11b）、さらには血小板機能を測定し評価した。

本研究においては、模擬体外循環への rTF の添加によって好中球 F-actin の発現が増加し、transit time の延長と関連付けられた。好中球の細胞骨格はマイクロフィラメントから構築される。マイクロフィラメントはアクチンフィラメントを主構造とし、単量体である G-actin および G-actin が数珠状に重合した F-actin の二つの形態を有する。F-actin は G-actin の可逆的な重合反応により生成され、好中球の変形能を調節している（図 8）。すなわち、F-actin の増加は細胞骨格の硬化をもたらし、好中球の変形能を劣化させる[63]。本研究における 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。この事実からは、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窺われる。

当グループの過去の研究において、F-actin 値は体外循環開始後 30～60 分でピークを迎えたが、transit time のピークはこれより遅れて 120 分以降に存在した [26-28, 64]。F-actin と transit time の時間変化は完全には合致せず、本研究におい

ても同様の現象が認められた。他にも、走化性物質である formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine を用いた好中球活性化によって F-actin と transit time との経時的変化を観察した実験において、同様のタイムラグが報告されている[63]。詳細なメカニズムは明らかではないが、好中球細胞骨格の構造変化が好中球変形能という機能変化に反映されるまでに若干の時間を要するものと思われる。

本研究において、模擬体外循環は好中球と血小板を活性化し、rTF の添加は好中球 F-actin の発現をさらに高め、好中球変形能の劣化については transit time の延長をもたらした。「模擬体外循環において、血管内皮細胞の protease activated receptor-2 を介さずに TF は炎症機転の主座のひとつである好中球機能を活性化させる。」という我々の仮説は一部肯定され、TF は好中球変形能の劣化を助長し、体外循環における炎症機転亢進に関与している可能性が示された。

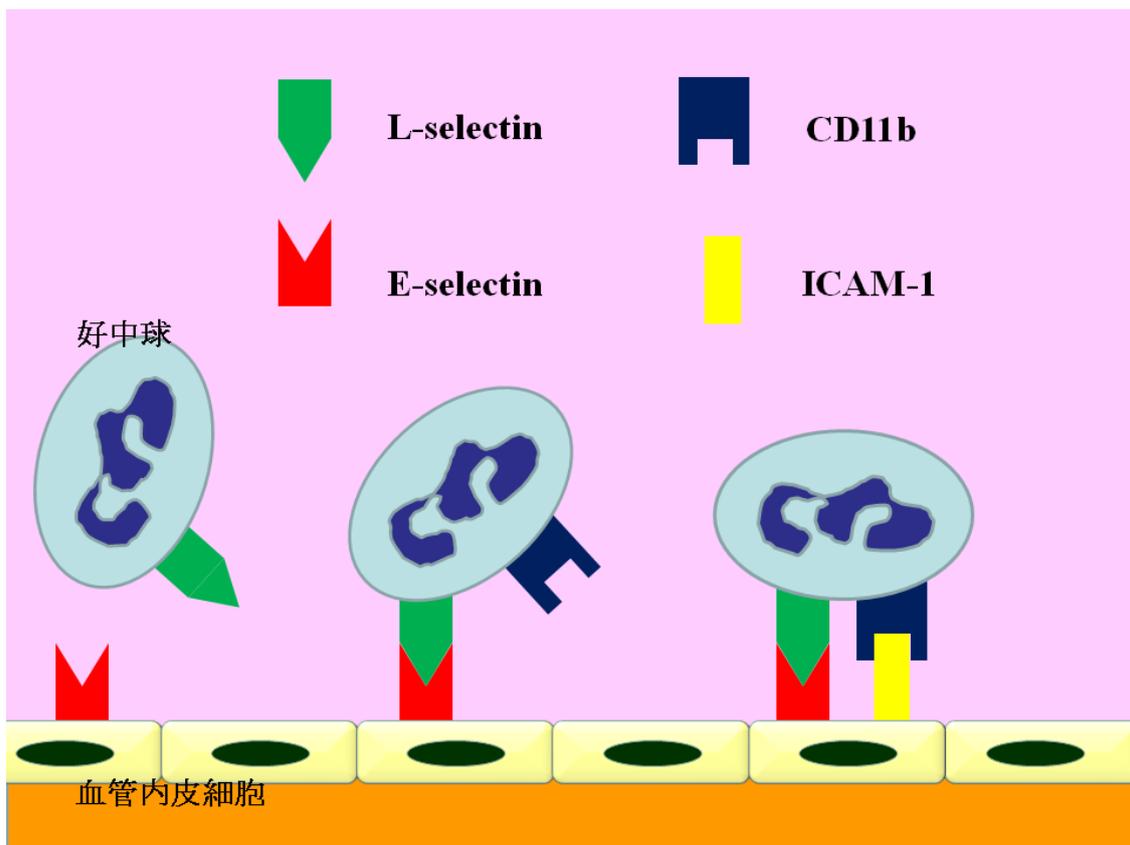


図 6. 好中球の血管内皮細胞との接着メカニズム

好中球表面上の L-selectin が血管内皮細胞表面上の E-selectin と、同様に CD11b が intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) と反応することにより、ローリングから始まる接着現象が起きる。

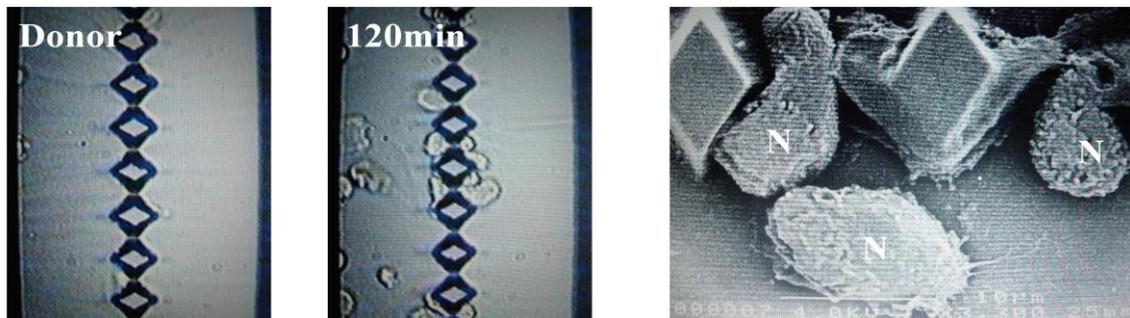


図 7. 模擬体外循環における活性化好中球の microchannel 通過特性を示す画像

活性化好中球が細胞骨格変化を伴う変形能の劣化を来たし、模擬体外循環終了時（120min）には microchannel を閉塞している。最右の電顕写真は 120min の microchannel を拡大したもので、活性化好中球（N）が microchannel に捕捉されている様子が観察できる。（参考文献[23]より引用）

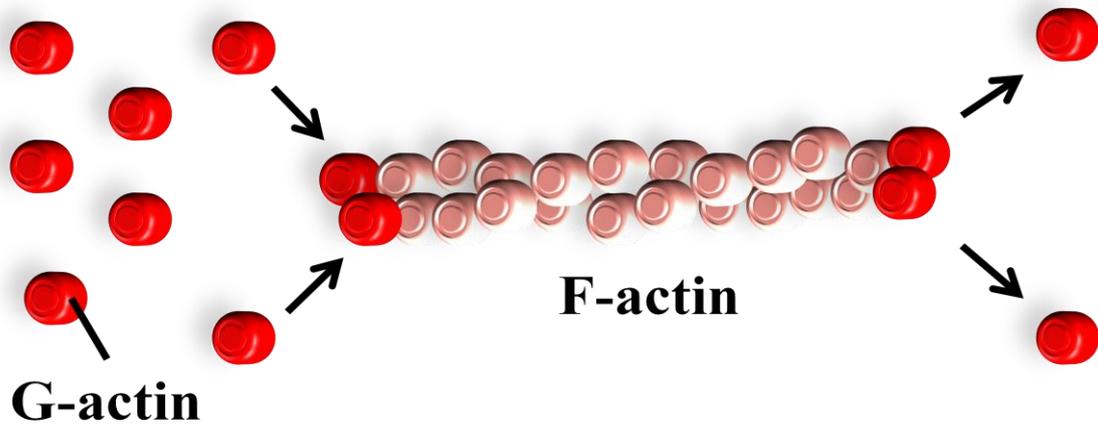


図 8. F-actin 生成

好中球の形態的变化を調節している F-actin は、単量体である G-actin が数珠状に重合したものから構成される。この重合反応は可逆的である。

第3章 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

1. 背景

第2章では炎症機転の中心的役割を担う好中球機能に対するTFの影響に焦点をあて、TFが好中球変形能の劣化を助長し、体外循環における炎症機転の亢進に関与している可能性を示した。すなわち、外因系凝固反応と炎症反応との間の繊細なクロストークについて、我々独自の手法によってそのメカニズムの一端を解明することができた。TFが体外循環に関わる二つの重要な反応系である外因系凝固と炎症の両者を活性化するならば、これを制御する効果的な手段の開発は体外循環を用いる心臓外科診療にとって大きな福音となるはずである。

第1章の終わりに記したように、我々は体外循環における凝固線溶および炎症を制御する効果的な方略としてTFPIによる外因系凝固反応の抑制に着目し、特にTF発現以前の早期にTFPIを血中動員することの効果を想定し本章に示す研究を開始した。

繰り返し述べてきたように、心臓外科手術においては、体外循環開始直前に大量のヘパリンを静脈内投与するにもかかわらずトロンビン産生は亢進している。心嚢内に貯留した血液内には可溶性TFが多く発現している事実があり、これが第VII因子と反応して外因系凝固反応を開始させる結果、トロンビン産生が

高まるものと考えられている[37, 39, 44]。この可溶性 TF を直接阻害し得る生理的物質として現時点で知られているのは、TFPI のみである。

TFPI は 40 キロダルトンのセリンプロテアーゼインヒビターで、TF-第 VIIa 因子複合体による第 X 因子の活性化を直接阻害して強力な外因系凝固抑制作用を発揮する[46]。TFPI は主に肝臓で合成され、通常そのほとんどが血管内皮細胞表面に存在するが、血管壁にヘパリンが作用すると内皮細胞から血漿中に TFPI が遊離され、血中 TFPI 濃度は 2 倍～10 倍に上昇することが知られている[45, 47, 48]。心臓手術においては、手術開始早期から切開、凝固および剥離操作などの外科的侵襲により TF が生体組織から遊離され循環血液中や心嚢内貯留血液内に増加する[44]。TF によって惹起される外因系凝固反応を効率的かつ遅滞なく抑制するためには、体外循環開始直前のヘパリン投与を待たず、TF の血中濃度が上昇し始める手術開始時に照準を合わせて血中に TFPI を誘導するべきではないかと考えた。

本研究においては、前章と同様の模擬体外循環システムを用い、rTF 添加による外因系凝固反応惹起以前に血中 TFPI 濃度を高めておくことの意義を検討した。健常人ドナーにあらかじめヘパリンを静脈内投与して TFPI を誘導させたのちに血液を採取することにより、リザーバー内で TFPI 濃度の高いドナー血と TF とを接触させ、TFPI によるトロンビン産生抑制効果を評価することを目的とした。

TFPI 誘導の程度およびトロンビン産生能の評価として、血中 TFPI、thrombin-antithrombin complex (TAT)、および prothrombin fragment F₁₊₂ (F₁₊₂) 濃度を測定した。

2. 仮説

模擬体外循環において、健常人ドナーに対する早期ヘパリン添加による内因性 TFPI 誘導は TF を起点とする外因系凝固反応の進行を妨げ、トロンビン産生を抑制する。

3. 方法

3.1. 模擬体外循環システム

使用した模擬体外循環システムは前章の実験に用いたものと同一で、小児用の人工心肺を模したものである。膜型人工肺 (model 60EC, surface area 0.6m², MERA)、ローラーポンプ (model MS-033, MERA)、およびソフトリザーバーバック (250mL, MERA) をシリコンチューブ (1/4 インチ) で連結した (図 2)。リザーバーバック内にはあらかじめヘパリン (3.75U/mL) およびブドウ糖 (2.25mg/mL) を添加しておいた。インフォームドコンセントを得た健常人ドナー 29 名からそれぞれ全血 250 mL を採取し、リザーバーバックに充填した。37 °C

に設定した恒温槽内でリザーバーバックを振盪しながら、流量400 mL/minで120分間の体外循環を行った。人工肺は、酸素と二酸化炭素の混合気(95:5) 1.0L/minで換気した。人工肺、リザーバーおよび回路はドナー毎に新しいものを使用した。

3.2. プロトコール

生体組織を有しない模擬体外循環システムにおいて外因系凝固反応を惹起させるために、体外循環開始前のリザーバーバッグ(ヘパリンを含む)にあらかじめrTF(Tissue Factor 9010-6006, Biogenesis)を添加した群をrTF群(最終血中濃度1000 pg/mL)とし、添加しないものをControl群とした。rTF群の初期TF血中濃度は、第2章と同様過去に報告されている健常人データをもとに5~10倍のマージンをとるよう設定した。また、血液採取前の健常人ドナーにあらかじめヘパリンを静脈内投与することにより、ドナー血液中のTFPI濃度を高めた群をTFPI boost群とし、TFPI濃度の高いドナー血液にrTFを添加した群をrTF+TFPI boost群とした。これら4群の詳細は以下のとおりである。

- ① **Control 群**: 健常人ドナーから採取した血液を使用した群(ヘパリン 3.75U/mL, n = 7)
- ② **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ツ

ク内に rTF を添加して外因系凝固反応を惹起した群 (初期 rTF 濃度 1000 pg/mL, n = 7)

③ **TFPI boost 群** : 採血 5 分前にあらかじめドナーにヘパリン (50 U/kg) を静注し、ドナー血中に 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 (n = 8)

④ **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 (初期 rTF 濃度 1000 pg/mL, n = 7)

血液検体は、薬剤添加前 (Donor ; 模擬体外循環システム内へ入れる前の健康人ドナーから直接採取した血液) と、体外循環開始 (両薬剤接触) から 0、30、60、120 分後に採取した。薬剤添加後体外循環を行わず、37°C で 120 分間震盪したのみの検体を standing control (SC) とした。

採取した血液サンプルはクエン酸ナトリウムと 9:1 の割合で混合したのち、遠心分離器を用いて血漿分離した (4°C, 3000 回転/分, 15 分)。遠心分離した血漿はアッセイを行うまでは -80°C で凍結保存した。各血液検体について pH、Ht、血小板数、ACT を計測した。これら以外の測定項目は、ELISA 法を用いて以下のように測定した。

Total TFPI 測定

IMUBIND Total TFPI ELISA Kit (American Diagnostica Inc., Stamford, USA) を用いて測定した。抗ヒト TFPI ウサギポリクローナル抗体固相プレートに血漿サンプルを加え、低温 (2~8°C) で 12 時間インキュベーションした。洗浄後、ペルオキシダーゼ (POD ; peroxidase) 標識抗ヒト TFPI ビチオン化モノクローナル抗体を加え、さらに室温で 1 時間インキュベーションした。洗浄後、発色液 (TMB, 過酸化水素) を加え、室温で 20 分間インキュベーションしたのち酵素活性を 450nm で吸光度測定した。濃度既知の検量線から TFPI 濃度を求めた。

TAT 測定

TAT ELISA Kit (TFB Inc., Tokyo, Japan) を用いて測定した。抗ヒトトロンビンウサギポリクローナル抗体固相プレートに血漿サンプル (50 μ L) を加え、室温で 2 時間インキュベーションした。洗浄後、POD 標識抗ヒト ATIII ウサギポリクローナル抗体を加え、さらに室温で 1 時間インキュベーションした。洗浄後、発色液 (TMB, 過酸化水素) を加え、室温で 30 分間インキュベーションしたのち酵素活性を 450nm で吸光度測定した。濃度既知の検量線から TAT 濃度を求めた。

F₁₊₂測定

Prothrombin fragment F₁₊₂ Kit (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Erlangen, Germany) を用いて測定した。TAT 測定と同様、抗ヒト F₁₊₂ マウスモノクローナル抗体固相プレートに血漿サンプル (50 μ L) を加え、37 $^{\circ}$ C で 30 分インキュベーションした。洗浄後 POD 標識抗ヒトプロトロンビンマウス抗体を加え、さらに 37 $^{\circ}$ C で 15 分インキュベーションした。洗浄後、クロモゲン溶液を加え、遮光して室温で 15 分間インキュベーションしたのち酵素活性を 450nm で吸光度測定した。濃度既知の検量線から F₁₊₂ 濃度を求めた。

3.3. 統計学的解析

測定結果は平均値 \pm 標準誤差で示した。統計処理は各群の Donor 値に対する比較判定を One-way ANOVA を用いて行った。経時変化の群間比較には repeated measure ANOVA を用い、有意差を認めた場合には Scheffe 法による比較判定を加えた。

本研究プロトコールは、筑波大学医学医療系・医の倫理審査委員会の承認に基づいて実施された。

4. 結果

体外循環中の ACT は全群ともヘパリンを使用して常に 500 秒以上に維持され、ヘマトクリット値は両群とも一定の値で経過した。pH は経過中 7.3 から 7.5 の範囲内であった。血小板数も 4 群間に有意差は認めなかった。これらの結果は第 2 章と同様であり割愛した。血中 TFPI 濃度の推移、血中 TAT および F₁₊₂ レベルの変化を表 2、図 9 - 11 に示す。

4.1. Total TFPI 濃度変化

ドナーにあらかじめヘパリンを静脈内注射することによりドナー血中の TFPI 誘導を試みた 2 つの群 (rTF+TFPI boost 群, TFPI boost 群) においては、他の 2 つの TFPI 非誘導群 (Control 群, rTF 群) と比較して約 8 倍の Total TFPI 濃度の上昇を認めた (図 9, $p < 0.0001$)。Total TFPI 濃度は TFPI boost 群のみ経時的に有位に減少したが、2 つの TFPI 誘導群は体外循環中に Total TFPI 濃度 400ng/mL 以上を維持し、他 2 つの TFPI 非誘導群での Total TFPI 濃度 60ng/mL 前後と比較して有意に高値を呈した。

4.2. TAT 濃度変化

血漿 TAT 濃度は、すべての群において模擬体外循環開始後 120 分までに有意

に増加した (図 10, $p < 0.05$)。rTF 群での TAT 値は Control 群に比べ高かったが、2 群間の差は有意ではなかった ($p = 0.09$)。rTF 群での TAT 濃度は 120 分までに 19.7 ± 2.21 ng/mL に達した。一方で rTF+TFPI boost 群では、rTF の添加にもかかわらず TAT の増加は rTF 群と比較して、120 分までに 9.90 ± 0.76 ng/mL と有意に増加したが軽度であった (rTF 群 vs. rTF+TFPI boost 群 : $p = 0.0158$)。また、TFPI boost 群の TAT 濃度は 120 分までに 7.50 ± 0.94 ng/mL となり、Control 群の TAT 濃度 10.48 ± 1.03 ng/mL と比べて低値であったが、2 群間の差は有意ではなかった ($p = 0.2831$)。

4.3. F_{1+2} 濃度変化

Control 群と rTF 群の両者において、 F_{1+2} 濃度は模擬体外循環開始後 120 分までに有意に増加したが、Control 群よりも rTF 群の増加が有意に著しかった ($p = 0.0002$) (図 11)。rTF 群での F_{1+2} は 120 分までに 1.19 ± 0.21 nmol/L となり、これに対して rTF+TFPI boost 群では rTF の添加にもかかわらず F_{1+2} の産生は抑制され、120 分値は 0.36 ± 0.04 nmol/L であった (rTF 群 vs. rTF+TFPI boost 群 : $p < 0.0001$)。また、rTF+TFPI boost 群の F_{1+2} 濃度は、Control 群よりも有意に低いレベルにとどまった (Control 群 vs. rTF + TFPI boost 群 : $p = 0.0178$)。TFPI boost 群の F_{1+2} 濃度も Control 群より有意に低値を示した ($p < 0.0001$)。

表 2. 模擬体外循環中の血液学的検査所見^a

| 項目 | 群 | Donor | 0 Minutes | 30 Minutes | 60 Minutes | 120 Minutes | SC | p Value (ANOVA) | |
|------------------------------|----------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|-----------------------------|-----------------------------|---------------------------|-----------------|---------|
| | | | | | | | | vs. control | vs. rTF |
| TFPI (ng/mL) | Control | 63.7±3.7 | 64.3±4.0 | 66.9±7.0 | 60.9±6.1 | 53.1±4.7 | 57.0±6.2 | | |
| | TFPI boost | 504.7±25.3 ^{b,c} | 482.4±26.4 ^{b,c} | 476.4±22.0 ^{b,c} | 433.6±26.1 ^{b,c,d} | 415.9±20.1 ^{b,c,d} | 459.8±21.7 ^{b,c} | <0.0001 | <0.0001 |
| | rTF | 55.4±3.8 | 59.1±2.2 | 57.8±3.2 | 53.4±3.9 | 54.3±3.9 | 64.8±3.4 | 0.9988 | |
| | rTF+TFPI boost | 511.3±7.5 ^{b,c} | 523.6±7.5 ^{b,c} | 504.7±12.9 ^{b,c} | 499.7±10.9 ^{b,c} | 494.6±5.6 ^{b,c} | 524.9±5.5 ^{b,c} | <0.0001 | <0.0001 |
| TAT (ng/mL) | Control | 1.10±0.06 | 4.16±1.38 | 4.62±0.35 | 10.24±1.83 ^d | 10.48±1.03 ^d | 2.90±0.44 | | |
| | TFPI boost | 1.05±0.05 | 1.20±0.05 ^c | 2.90±0.44 ^c | 3.90±0.50 ^{c,d} | 7.50±0.94 ^{c,d} | 3.60±0.94 ^c | 0.2831 | 0.0018 |
| | rTF | 1.90±0.68 | 7.60±1.45 | 10.70±1.88 ^d | 14.00±2.50 ^d | 19.70±2.21 ^d | 7.60±1.54 ^d | 0.09 | |
| | rTF+TFPI boost | 1.20±0.03 | 1.50±0.45 | 2.63±0.15 ^c | 4.33±0.29 ^d | 9.90±0.76 ^{c,d} | 2.30±0.31 ^c | 0.615 | 0.0158 |
| F ₁₊₂ (nmol/L) | Control | 0.35±0.02 | 0.38±0.01 | 0.44±0.02 ^c | 0.69±0.10 ^d | 0.69±0.13 ^{c,d} | 0.42±0.04 | | |
| | TFPI boost | 0.11±0.01 ^{b,c} | 0.10±0.01 ^{b,c} | 0.11±0.01 ^{b,c} | 0.14±0.02 ^{b,c,d} | 0.15±0.02 ^{b,c,d} | 0.13±0.02 ^c | <0.0001 | <0.0001 |
| | rTF | 0.38±0.03 | 0.51±0.01 | 0.83±0.14 ^b | 0.90±0.06 | 1.19±0.21 ^{b,d} | 0.89±0.34 | 0.0002 | |
| | rTF+TFPI boost | 0.28±0.05 | 0.25±0.02 ^c | 0.26±0.02 ^c | 0.36±0.10 ^{b,c} | 0.35±0.04 ^c | 0.28±0.02 ^c | 0.0178 | <0.0001 |

a: 血液または血漿の測定値は平均値±標準誤差

b: control 群と比較して有意差あり ($p < 0.05$)

c: rTF 群と比較して有意差あり ($p < 0.05$)

d: Donor と比較して有意差あり ($p < 0.05$)

ANOVA = analysis of variance, SC = standing control, rTF = recombinant tissue factor, TFPI = tissue factor pathway inhibitor

TAT = thrombin-antithrombin complex, F₁₊₂ = prothrombin fragment F₁₊₂

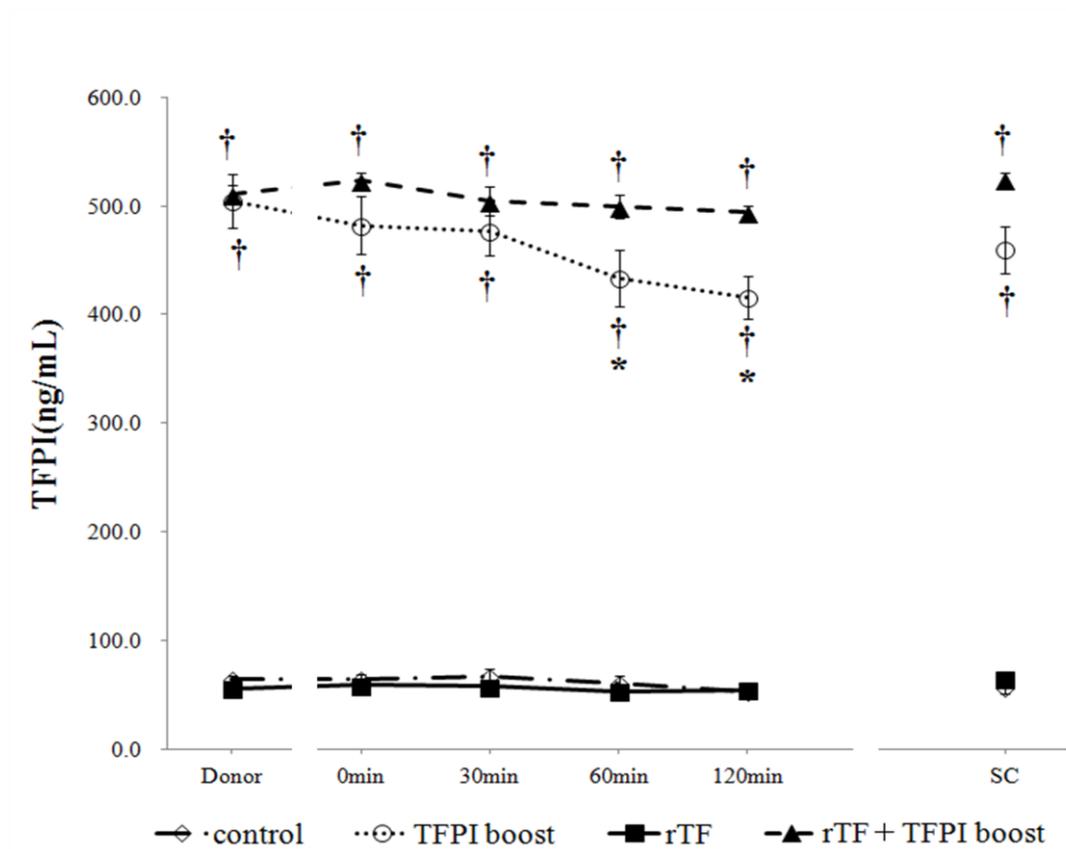


図 9. 血漿 TFPI 濃度変化

測定値は平均±標準誤差で示した。

◇ = Control 群 (n = 7) , ○ = TFPI boost 群 (n = 8)

■ = rTF 群 (n = 7) , ▲ = rTF + TFPI boost 群 (n = 7)

SC = standing control, rTF = recombinant tissue factor

TFPI = tissue factor pathway inhibitor

* : Donor 値と比較して有意差あり ($p < 0.05$)

† : Control 群と比較して有意差あり ($p < 0.05$)

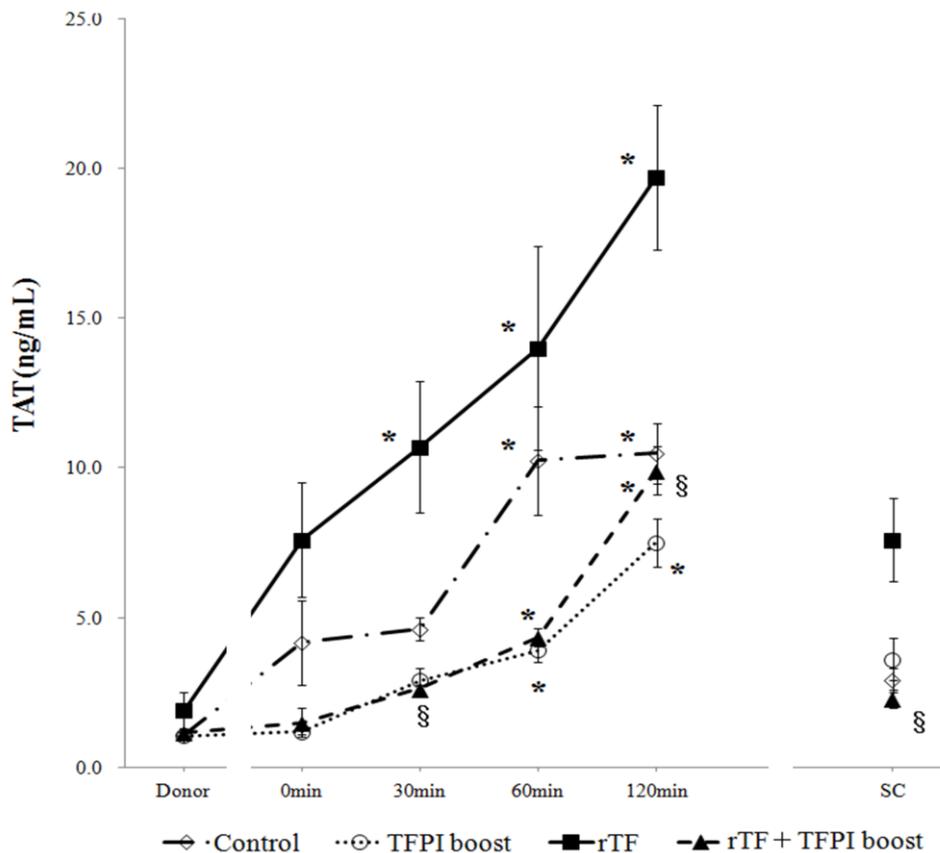


図 10. 血漿 TAT 濃度変化

測定値は平均±標準誤差で示した。

◇ = Control 群 (n = 7) , ○ = TFPI boost 群 (n = 8)

■ = rTF 群 (n = 7) , ▲ = rTF + TFPI boost 群 (n = 7)

SC = standing control, rTF = recombinant tissue factor

TFPI = tissue factor pathway inhibitor, TAT = thrombin antithrombin complex

* : Donor 値と比較しての有意差あり ($p < 0.05$)

§ : rTF 群と rTF + TFPI boost 群間での有意差あり ($p < 0.05$)

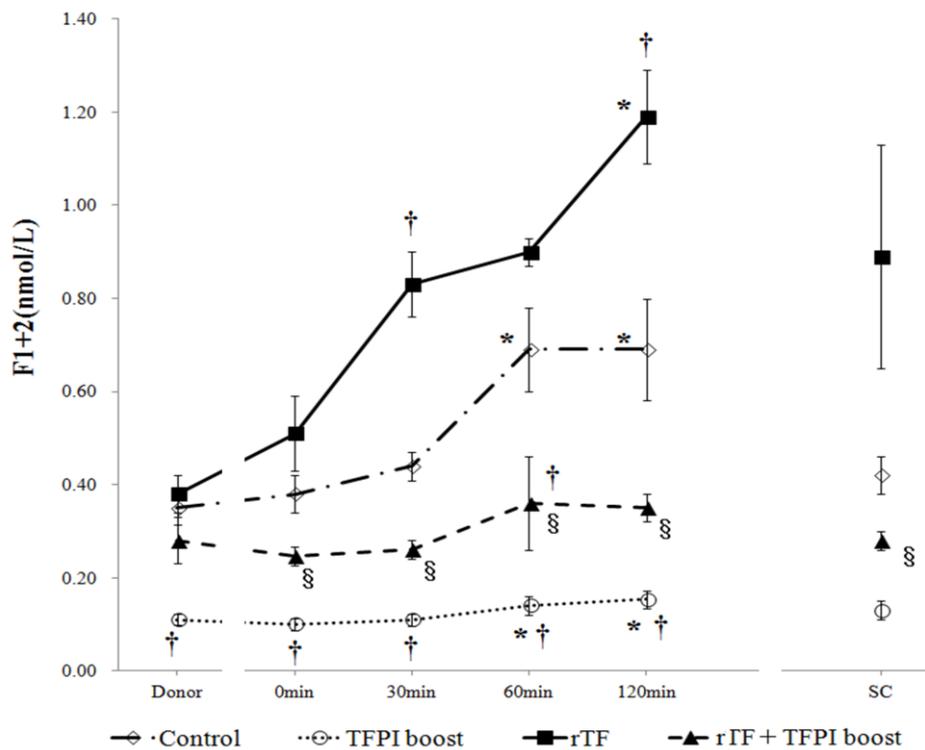


図 11. 血漿 F₁₊₂ 濃度変化

測定値は平均±標準誤差で示した。

◇ = Control 群 (n = 7) , ○ = TFPI boost 群 (n = 8)

■ = rTF 群 (n = 7) , ▲ = rTF + TFPI boost 群 (n = 7)

SC = standing control, rTF = recombinant tissue factor

TFPI = tissue factor pathway inhibitor, F₁₊₂ = prothrombin fragment F₁₊₂

* : Donor 値と比較しての有意差あり ($p < 0.05$)

† : Control 群と比較しての有意差あり ($p < 0.05$)

§ : rTF 群と rTF + TFPI boost 群間での有意差あり ($p < 0.05$)

5. 考察

5.1. 模擬体外循環において rTF が果たした役割

体外循環下の手術においては、大量のヘパリン投与にもかかわらずトロンビン産生は亢進している。心嚢内に貯留した血液内には可溶性 TF が多く発現している事実が報告されており、この可溶性 TF が単球存在下に第 VII 因子と反応して外因系凝固を惹起させることが、体外循環におけるトロンビン産生亢進の主因であると考えられている[19, 37, 39, 44]。しかしながら、可溶性 TF による外因系凝固活性化のメカニズム及びその時間経過は未だ十分に解明されているとは言い難い。

生体内に存在する膜結合型の TF は、219 残基のアミノ酸からなる細胞外ドメイン、23 残基のアミノ酸からなる膜貫通ドメイン、21 残基のアミノ酸からなる細胞内ドメインから構成される、いわゆる full-length TF である。これら 3 つのドメインのうち、主に凝固作用を司るのは細胞外ドメインである。可溶性 TF は 206 残基のアミノ酸からなるが、細胞内ドメインや膜貫通ドメインを持たず、細胞外ドメイン単独の構成である[65]。炎症局所ではインターロイキン-1 や TNF などの刺激によって、単球や内皮細胞上に TF のメッセンジャー RNA およびその抗原が誘導される。単球や内皮細胞などの細胞表面上に発現した膜結合型 TF は、直ちに第 VII 因子との複合体を形成し、外因系凝固反応を惹起する。また、

血管内皮細胞が損傷を受け、中膜や外膜に存在する膜結合型 TF が血液に暴露されると、同様の機序で外因系凝固反応が開始される。これに対して、膜貫通ドメインを持たない可溶性 TF がいかにしてトロンビン産生を惹起させ得るのか、そのメカニズムは未だ明らかにはなっていない。

Philippou らは心嚢内に貯留した血液を分析し、体外循環開始から 15 分以内に可溶性 TF の増加とトロンビン産生の亢進が生じていることを示した[19]。従来、TF - 第 VIIa 因子複合体の形成には TF を細胞表面に発現した単球の存在が重要であると考えられていたが、単球が独自に TF のメッセンジャーRNA を発現するまでには 60 分を、さらに TF をその細胞膜表面上に発現させるまでには 6 ~ 12 時間程度を要することも事実として知られている[66]。したがって、単球を起点として体外循環開始後早期の心嚢内貯留血液中での可溶性 TF とトロンビン産生の増加とを説明することには無理がある。これに対して Szotowski らは、炎症性サイトカインである TNF による刺激から 10 分程度で内皮細胞膜上に可溶性 TF 抗原が発現することを示しており[66]、体外循環開始後早期の心嚢内貯留血液中に多量の可溶性 TF が含まれるメカニズムの一端を説明する論拠となる重要な事実である。加えて Szotowski らは、リン脂質を添加することによって可溶性 TF の凝固活性が高まることも証明している。その後 Hattori らは、心嚢内貯留血液中の可溶性 TF と単球とが第 VII 因子や第 X 因子を活性化させ、外因系凝固反応

を促進させることを示した[39]。通常、TF が第 VII 因子と複合体を形成するためには膜貫通ドメインの存在が重要であると考えられているが、膜貫通ドメインを有しないにもかかわらず可溶性 TF が第 VII 因子と効率的に反応する機序として、Hattori らは活性化された単球、活性化血小板、あるいは内皮細胞から放出された microparticle が陰性に荷電したリン脂質のプラットフォームを可溶性 TF に提供する可能性を示唆した。リン脂質膜の組成が酸性リン脂質であるフォスファチジルセリン主体となることにより、膜貫通ドメインなしでも TF と VII 因子との結合に協同性がもたらされ、その結合力にも影響が及ぶものと考えた。

本研究においては、体外循環を用いた心臓手術時の血中 TF 発現をシミュレーションするために、full-length rTF をリザーバーに添加した。最近のいくつかの研究において、rTF は生体内 TF の代わりとして用いられている。特に膜貫通ドメインを有する full-length rTF は、生体内 TF と類似した凝固特性を有することが知られている[67-70]。しかしながら、rTF の外因系凝固活性化作用を保証するデータは十分ではなく、われわれは、rTF の血中濃度を極端に高く設定することによって、外因系凝固反応の活性化をより確実なものにしたいと考えた。

Philippou らは、体外循環開始から 15 分後には心嚢内の血中 TF 濃度が約 5 倍になったことを示している[19]。また、健常成人血液中には TF 発現細胞から脱落した可溶性 TF が存在し、その濃度は 100~200 pg/mL であると報告されている

[50, 56, 58]。これらのデータをもとに、われわれは模擬体外循環システム内に添加する rTF 濃度を健常人データの 5~10 倍に相当する 1000 pg/mL と設定した。この rTF はリザーバー添加時には単球、血小板、あるいは microparticle などとは結合していない。しかしながら、われわれの以前の研究において、模擬体外循環開始から 30 分以内に血小板、好中球および単球が活性化されることを確認しており [23, 25, 28]、特に血小板については、模擬体外循環開始直後から回路や人工肺内面に付着・凝集して活性化が始まる。このような活性化された好中球、単球や血小板、あるいはこれらの活性化細胞から放出された microparticle などが陰性荷電リン脂質のプラットフォームとして機能し、rTF が体外循環開始後早期から外因系凝固反応を促進させることに寄与したのではないかと考えている。

5.2. 早期 TFPI 誘導の効果

本研究の結果は、ヘパリンによって血中に誘導された TFPI が模擬体外循環中の rTF によるトロンビン産生を抑制するというわれわれの仮説を支持した。通常、血漿中では、TFPI はその 85~90% がリポ蛋白質に結合し、10~15% 程度が遊離型 TFPI として存在している [45]。リポ蛋白質結合型 TFPI は、C 末端側部分が欠損した truncated form で弱い抗血栓活性しか持たず、主に遊離型 TFPI が血液凝固反応を阻害すると考えられている [71]。遊離型 TFPI が第 Xa 因子と結合し

て TFPI-第 Xa 因子複合体を形成し、TFPI-第 Xa 因子複合体が TF-第 VIIa 因子複合体と結合することにより外因系凝固の開始反応を抑制する。過去の研究において、ヘパリンの静脈内投与から数分以内に内皮細胞から遊離型 TFPI が血液中に放出され、血中濃度が 2~10 倍程度に増加することが報告されている (図 13) [47, 51, 72, 73]。また Sun らは、体外循環中 (ヘパリン投与中) には TFPI の血中濃度が有意に高く維持され、血漿中のリポ蛋白質結合型 TFPI と遊離型 TFPI とを合計した total TFPI 濃度は、遊離型 TFPI 濃度 (free TFPI 濃度) と相関することを示した (図 14) [51]。ヘパリンを静脈内投与することによりまず血中の遊離型 TFPI が増加し、その後遊離型 TFPI の一部がリポ蛋白質と結合すると考えられているが、その詳細な機構や配分は明らかではない。本研究においては、free TFPI と total TFPI の濃度とが正の相関関係にあることを前提にして、free TFPI 血中濃度の推移と産生された TFPI 総量の両者を評価する意味で total TFPI 血中濃度を測定した。実際、ヘパリンを静脈内投与してから 5 分後に採取した血液中には正常の約 8 倍の濃度となる total TFPI が検出され、120 分間の模擬体外循環中 total TFPI 濃度を高く維持することができた。

ヘパリンによって誘導された TFPI は、rTF による TAT および F₁₊₂ の増加を完全に打ち消した。通常、体外循環を使用する心臓手術においては、送血および脱血のための動静脈カニューレーションをする直前までヘパリンは静脈内投与さ

れない。しかしながら、皮膚切開や胸骨切開から始まる外科的操作によって TF は既に血管中膜や外膜から血中に遊離し、炎症性サイトカインによって血管内皮細胞から血中へと誘導されている[66]。したがって、TF によるトロンビン産生を根本的に抑制するためには、TF が血中に発現すると同時かそれ以前の手術開始早期から高いレベルの TFPI を血中に誘導しておく必要がある。そのためには体外循環開始時点をターゲットとするのではなく、手術開始早々に一定量のヘパリンを投与することによって TFPI 誘導を図るべきではないかとわれわれは考え、本研究の結果はこうしたコンセプトの利を裏付けるものとなった。本研究が立案されたのと同じ頃、Hobbs らは、破裂性腹部大動脈瘤においては非破裂性の場合と比較して周術期の組織因子血中濃度が有意に高いという興味ある事実を報告している[74]。同報告によれば、破裂性腹部大動脈瘤手術開始早期には血中 TF 濃度の極端な上昇が生じながら血中 TFPI は増加しておらず、著しい凝固線溶亢進状態に陥っている。そこで Hobbs らは、破裂性動脈瘤などにおいては、抗 TF 抗体やリコンビナント TFPI の早期投入により TF をできるだけ早い段階で直接抑制することで、凝固線溶系の破綻を効果的に防止し得るのではないかと提唱している。この提唱はまさに本研究とコンセプトを共にするものである。特に、大動脈解離、複雑心奇形あるいは再開胸手術などの侵襲性の高い心臓手術においては、ヘパリンを手術早期に投与して血中 TFPI 濃度を十分に高めてお

けば、TFによる有害作用を未然に防いで最終的に予後の改善につながる可能性がある。懸念されることは、手術開始早期のヘパリン静脈内投与によって、切開、剥離やカニューレーション準備の際に出血量が増加し得るという点である。そうした出血という観点からは、ヘパリンよりもリコンビナント TFPIの方が有利であるかもしれない。しかしながら、ヘパリンを早期静脈内投与して TFPI を誘導する手法はシンプルかつ経済的である。血管内皮から TFPI を誘導するために必要なヘパリン量 (50U/kg) は、体外循環時に使用するヘパリン量と比較して 6 分の 1 程度と比較的少量であったが、慎重な外科的手技が必要であると考えられる。

本研究においては、外因系凝固反応によるトロンビン産生をシミュレーションするために、模擬体外循環システム内に rTF を添加した。その結果、rTF 由来のトロンビン産生 (外因系凝固反応による) が内因系凝固反応によるトロンビン産生に上乗せされる現象を明確にとらえることができた。ヘパリン静脈内投与により誘導した血中高濃度 TFPI は、TF を起点とする外因系凝固反応の活性化によるトロンビン産生をほぼ完全に相殺し、内因系凝固反応単独の場合のレベルに押し戻した。さらに驚くことに、TF を添加せず TFPI を誘導したのみの群 (TFPI boost 群; 接触-内因系凝固によるトロンビン産生が主体) においては、 F_{1+2} 濃度で見ると control 群よりも有意にトロンビン産生が抑制された。これ

は以下に記述するように、TFPI が内因系凝固反応の抑制にも効果を発揮したからではないかと解釈される。TFPI は血管内皮細胞で合成されるプロテアーゼインヒビターであり、分子内には3つの Kunitz 型阻害領域を有する(図 15)[75, 76]。第1 Kunitz 型ドメインは TF-第 VIIa 因子複合体を、第2 Kunitz 型ドメインは第 Xa 因子をそれぞれ阻害し、第3 Kunitz 型ドメインの機能は不明瞭ながらヘパリンやリン脂質との結合において何らかの役割を果たすと考えられている[76]。こうした TFPI の特性から推察して、TF の関与を除外した TFPI 誘導群(TFPI boost 群)においても、TFPI の第2 Kunitz 型ドメインが直接的に第 Xa 因子の阻害作用を発揮して内因系凝固反応を抑制した可能性が考えられる。TFPI が TF による外因系凝固反応のみならず、体外循環回路と血液との接触面において惹起される内因系凝固反応をも抑制するならば、早期ヘパリン投与による TFPI 誘導は、体外循環に関連する凝固線溶障害を包括的に制御する画期的な方略であるのかもしれない。

5.3. 模擬体外循環システムが果たした役割

体外循環を用いる心臓外科手術において、TF がトロンビン産生にどの程度関わるかはこれまであまり知られておらず、それを明確に検証し得る実験系もなかった。本研究においては、基本的に生体由来の TF が増加し得ない(単球由来

は別として) 模擬体外循環システムを用い、これに rTF を添加するか否かによって、内因系凝固反応によるトロンビン産生と TF 由来の (外因系凝固反応による) トロンビン産生とを区分して評価することに成功した。さらにヘパリン予備投与により血中 TFPI 濃度を高めたドナー血液を用いて模擬体外循環システムのプライミングを行うことにより、高濃度の TFPI と rTF が血中で遭遇するタイミングを正確にコントロールし得た。

上記の点においては、模擬体外循環システムには TF や TFPI の供給源としての血管内皮細胞が存在しないことが有利に働いたと言える。

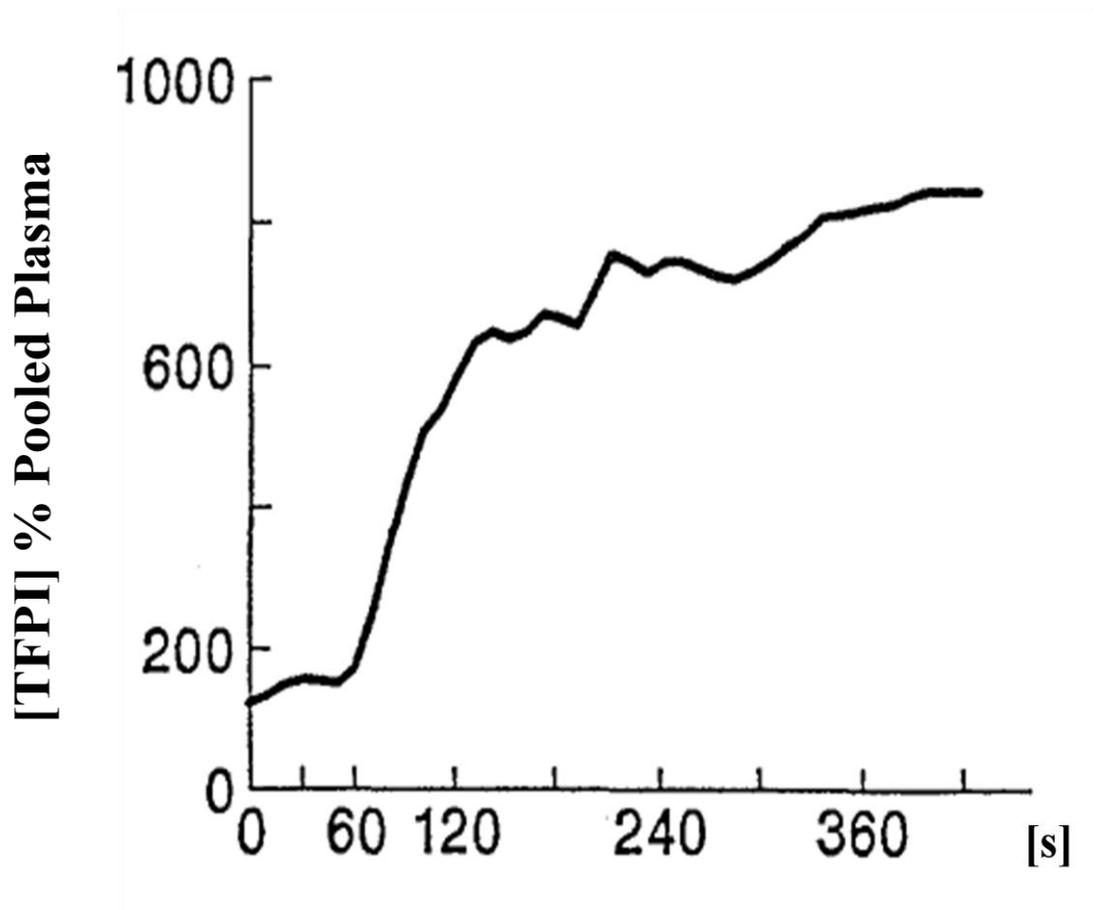


図 13. ヘパリン静脈内投与後の血漿中 TFPI 濃度変化

ヘパリンの静脈内投与により数分以内に内皮細胞から遊離型 TFPI が放出され、その血中濃度は投与前の 2~10 倍程度に増加した。

TFPI = tissue factor pathway inhibitor (参考文献[73]から引用)

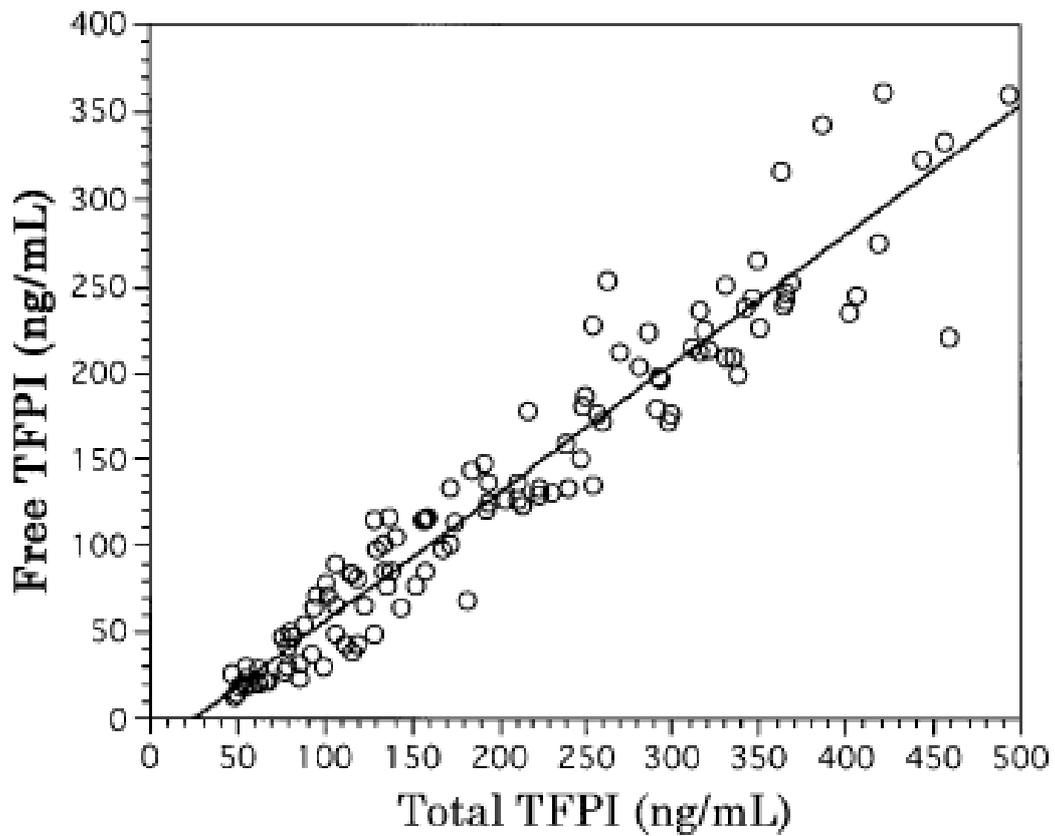


図 14. 体外循環中の free TFPI と total TFPI との相関関係

体外循環を用いた心臓外科手術中の total TFPI 濃度は free TFPI 濃度に比例する ($r = 0.96$)。TFPI = tissue factor pathway inhibitor (参考文献[51]から引用)

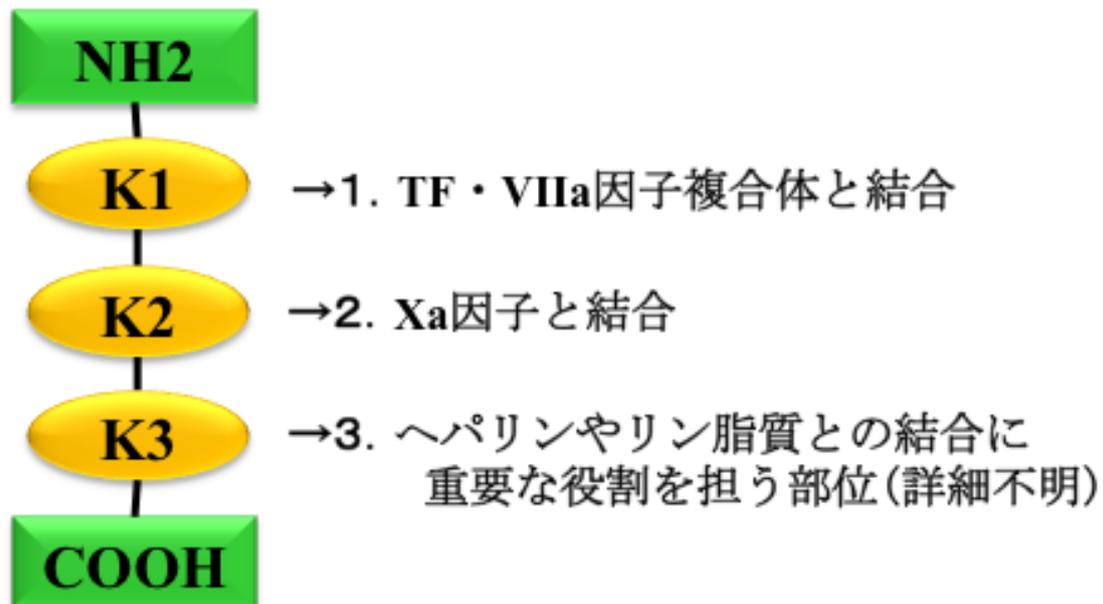


図 15. TFPI の構造と機能

TFPI は分子内に 3 つの Kunitz 型阻害領域を有する。第 1 Kunitz 型ドメイン(K1) は TF-第 VIIa 因子複合体を、第 2 Kunitz 型ドメイン (K2) は第 Xa 因子を阻害する。第 3 Kunitz 型ドメイン (K3) の機能は明らかではないが、ヘパリンやリン脂質との結合において何らかの役割を果たすと考えられている。

TF = tissue factor, TFPI = tissue factor pathway inhibitor

第4章 本研究の Limitation

模擬体外循環システムはその単純さ故に、血液希釈、低体温あるいは虚血再灌流傷害などの影響を受けない。生体の炎症反応、凝固反応あるいは免疫応答などは、体外循環のみではなく、麻酔、手術操作や低体温などの侵襲によっても少なからず惹起されるが、こうした影響も模擬体外循環は排除している。また、血管内皮細胞は好中球の接着、血小板凝集や凝固線溶など様々な現象に関わっているが、模擬体外循環システムには血管内皮細胞は存在しない。さらに、生体内では常に骨髄から新たな血球導入がなされているが、模擬体外循環システムではこうした血球の補充も起こり得ない。

われわれが使用した rTF は可溶性 TF と類似した機能を有するものの、両者の凝固メカニズムの違いは不明瞭である。また、可溶性 TF の代用としての rTF の適切な投与量も定かではない。本研究で設定した血中 TF 濃度は高すぎて非生理的と言えるかもしれないが、本研究の目的は必ずしも臨床と同一の環境を設定することにはなく、体外循環における好中球、血小板および凝固反応に対する TF の影響を現象として明確に浮き彫りにすることにあった。

本研究はあくまでもシミュレーションあるいは特定の抗凝固プロトコールのスクリーニングであり、生体の複雑な制御反応を除外している以上、研究結果を直接臨床に結びつけることも、*in vivo* 実験の代用とすることもできない。し

かしながら、少なくとも本研究においては、複雑な生体制御反応を除外した模擬体外循環システムであるからこそ、TFPI と rTF との相互作用やトロンビン産生に与える内因系凝固と外因系凝固それぞれの影響を明確に捉えることができた。血管内皮細胞が存在しないことも模擬体外循環システムの欠点ではあるが、先に述べたように TF や TFPI の供給源を排除したシミュレーションを構築するにはむしろ好都合であった。

第5章 総括

模擬体外循環は好中球と血小板とを活性化し、rTF の添加は好中球 F-actin の発現をさらに高め、transit time の延長をもたらした。TF は好中球変形能の劣化を助長し、体外循環における炎症機転亢進に関与している可能性が示された。

ヘパリンの静脈内投与によって血中に誘導された TFPI は、模擬体外循環システムにおいて、rTF を起点とする外因系凝固反応によるトロンビン産生を効果的に抑制した。TF 発現以前の早期ヘパリン投与による血中 TFPI 誘導は、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可能性が示され、体外循環に関連する凝固線溶障害を包括的に制御する革新的な方略となり得るのではなかろうか。

今後、*in vivo* 体外循環モデルでの本方略の検証が必要である。

第6章 今後の展望

内因性 TFPI 誘導による TF 阻害（外因系凝固反応抑制）は、体外循環に関連する凝固・線溶・炎症を制御する有望な手段と結論付けられたが、今後、これに加えて接触-内因系凝固反応をもより効果的に制御する手段の確立を目指したい。その点では、体外循環へのトロンボモジュリン（TM ; thrombomodulin）や AT の添加によってトロンビンの産生および凝固活性の阻害を図ることは魅力的な方略であり、TFPI による TF 阻害と併せて包括的な抗凝固手段の確立につながる可能性を秘めている。

本研究を発展させるための方略としての、TM および AT を用いた抗凝固コンセプトを以下に示す。

1. 体外循環中の TM 添加によるトロンビン産生・活性阻害

TM は主に血管内皮細胞上に存在する抗凝固蛋白である。TM はトロンビンと結合することによりプロテインCの活性化を促進する。活性化プロテインCは、第 Va 因子および第 VIIIa 因子を不活化することによりトロンビン産生を抑制する。一方で、TM に結合したトロンビンはフィブリノーゲンと結合できなくなり、フィブリン形成、血小板活性化、第 V 因子、第 VIII 因子および第 XIII 因子活性化などの働きを失う。また、TM はヘパリン様の作用をも有し、AT によるトロ

ンビン抑制を促進する。さらに TM のレクチン様ドメインは、炎症性メディエーターである high-mobility group-B1 DNA-binding protein の捕捉を介して好中球活性化抑制作用、抗炎症作用を発揮することも最近明らかにされた[77]。

TM は血液中にも可溶性 TM として存在し、トロンビン結合能とプロテイン C 活性化能を有している。リコンビナント可溶性 TM は膜貫通型糖タンパクである TM の細胞外の可溶性部分の構造と機能を完全に模しており、血中半減期が長く、体外循環中の持続投与を必要としない。このリコンビナント可溶性 TM による体外循環中の多角的な抗内因系凝固、抗血小板および抗炎症効果への期待は大である。

2. 体外循環中の AT 添加によるトロンビン産生・活性阻害

AT は肝や血管内皮で産生される生理的プロテアーゼ阻害剤で、ヘパリンによって増幅される抗トロンビン作用の他に、第 IXa 因子、第 Xa 因子、第 XIa 因子および第 XIIa 因子への阻害作用を有している。AT は suicide substrate と呼ばれ、トロンビン産生が著しく亢進する体外循環中には急速に消費され、体外循環終了時には術前と比較して thrombin-antithrombin 相互バランスが崩れて過凝固状態を招く[78]。最近 AT についてもその抗炎症作用が認識されつつあり、第 X 因子やトロンビンの阻害を通じた間接的抗炎症作用に加え、内皮細胞の

syndecan-4 受容体を介した prostacyclin 放出による好中球活性化抑制作用を有することが示されている[79]。

体外循環中に急速に消費される AT を補充することにより体外循環終了時の過凝固状態を防ぎ、同時に高い抗内因系凝固効果や抗炎症反応を得ることができるとすれば、これもまた包括的な抗凝固手段確立のための一翼となり得る、魅力的な抗凝固戦略である。

第7章 謝 辞

本研究を行うにあたり、終始ご指導とご鞭撻を賜りました人間総合科学研究科疾患制御医学専攻 榊原 謙 教授に深く感謝致します。

本研究において、直接の御指導をいただきました人間総合科学研究科疾患制御医学専攻 平松 祐司 教授に深く感謝致します。

本研究への御支援をいただきました筑波技術大学保健科学部 松下 昌之助 教授、ならびに筑波大学医学系技術室研究室支援部門 佐藤 晶子 技師に深く感謝致します。

第 8 章 参考文献

1. Sakata R, Kuwano H, Yokomise H. Hospital volume and outcomes of cardiothoracic surgery in Japan: 2005-2009 national survey. *Gen Thorac Cardiovasc Surg* 2012;60:625-638.
2. Kuwano H, Amano J, Yokomise H. Thoracic and cardiovascular surgery in Japan during 2010 : Annual report by The Japanese Association for Thoracic Surgery. *Gen Thorac Cardiovasc Surg* 2012;60:680-708.
3. Gibbon JH Jr. Application of a mechanical heart and lung apparatus to cardiac surgery. *MinnesotaMed* 1954;37:171.
4. 曲直部寿夫, 藤本 淳, 星田嘉朗. 人工心肺による直視下心臓内手術 (本邦に於ける最初の成功例) . *臨床外科* 1956;11:443-449.
5. 榊原 仟. 心臓手術の手技の改良に関する研究. 第 56 回日本外科学会総会演説. *日外会誌* 1956;57:832-835.
6. Oku T, Harasaki H, Smith W, et al. Hemolysis. A comparative study of four nonpulsatile pumps. *ASAIO Trans* 1988;34:500-504.
7. Shann KG, Likosky DS, Murkin JM, et al. An evidence-based review of the practice of cardiopulmonary bypass in adults: A focus on neurologic injury, glycemic control, hemodilution, and the inflammatory response. *J Thorac Cardiovasc Surg*

2006;132:283-290.

8. Mahmood S, Bilal H, Zaman M, et al. Is a fully heparin-bonded cardiopulmonary bypass circuit superior to a standard cardiopulmonary bypass circuit? *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2012;14:406-414.
9. Bashein G, Townes BD, Nessly ML, et al. A randomized study of carbon dioxide management during hypothermic cardiopulmonary bypass. *Anesthesiology* 1990;72:7-15.
10. Griffin JH, Cochrane CG. Recent advances in the understanding of contact activation reactions. *Semin Thromb Hemost* 1979;5:254-273.
11. Courtney JM, Matata BM, Yin HQ, et al. The influence of biomaterials on inflammatory responses to cardiopulmonary bypass. *Perfusion* 1996;11:220-228.
12. Davis CL, Kausz AT, Zager RA, et al. Acute renal failure after cardiopulmonary bypass is related to decreased serum ferritin levels. *J Am Soc Nephrol* 1999;10:2396-2402.
13. Haase M, Bellomo R, Haase-Fielitz A. Novel biomarkers, oxidative stress, and the role of labile iron toxicity in cardiopulmonary bypass-associated acute kidney injury. *J Am Coll Cardiol* 2010;55:2024-2033.
14. Levy JH, Tanaka KA. Inflammatory response to cardiopulmonary bypass. *Ann*

- Thorac Surg 2003;75:715-720.
15. De Somer F, Van Belleghem Y, Caes F, et al. Tissue factor as the main activator of the coagulation system during cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2002;123:951-958.
 16. 阿部稔雄. 人工心肺 – 理論と実際 第二版. 名古屋大学出版会 1992, p.86.
 17. Davies GC, Sobel M, Salzman EW. Elevated fibrinopeptide A and thromboxane A2 levels during cardiopulmonary bypass. *Circulation* 1980;61:808-814.
 18. Boisclair MD, Lane DA, Philippou H, et al. Mechanisms of thrombin generation during surgery and cardiopulmonary bypass. *Blood* 1993;82:3350-3357.
 19. Philippou H, Adami A, Davidson SJ, et al. Tissue factor is rapidly elevated in plasma collected from the pericardial cavity during cardiopulmonary bypass. *Thromb Haemost* 2000;84:124-128.
 20. Hiramatsu Y, Gikakis N, Anderson HL 3rd, et al. Tirofiban provides "platelet anesthesia" during cardiopulmonary bypass in baboons. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1997;113:182-193.
 21. Rao AK, Sun L, Hiramatsu Y, et al. Glycoprotein IIb/IIIa receptor antagonist tirofiban inhibits thrombin generation during cardiopulmonary bypass in baboons. *Thromb Haemost* 1999;82:140-144.

22. Suzuki Y, Hillyer P, Miyamoto S, et al. Integrilin prevents prolonged bleeding times after cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 1998;66:373-381.
23. Yoshimura Y, Hiramatsu Y, Sato Y, et al. Activated neutrophils and platelet microaggregates impede blood filterability through microchannels during simulated extracorporeal circulation. *Ann Thorac Surg* 2003;75:1254-1260.
24. Torphy TJ. Phosphodiesterase isozymes: molecular targets for novel antiasthma agents. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:351-370.
25. Sato Y, Hiramatsu Y, Homma S, et al. Phosphodiesterase type 4 inhibition of activated polymorphonuclear leukocytes in a simulated extracorporeal circulation model. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003;125:172-177.
26. Yoshimura Y, Hiramatsu Y, Sato Y, et al. ONO-6818, a novel, potent neutrophil elastase inhibitor, reduces inflammatory mediators during simulated extracorporeal circulation. *Ann Thorac Surg* 2003;76:1234-1239.
27. Matsuzaki K, Hiramatsu Y, Homma S, et al. Sivelestat reduces inflammatory mediators and preserves neutrophil deformability during simulated extracorporeal circulation. *Ann Thorac Surg* 2005;80:611-617.
28. Hiramatsu Y, Homma S, Sato Y, et al. Nafamostat preserves neutrophil deformability and reduces microaggregate formation during simulated

- extracorporeal circulation. *Ann Thorac Surg* 2005;79:1326-1332.
29. Usui A, Hiroura M, Kawamura M, et al. Nafamostat mesilate reduces blood-foreign surface reactions similar to biocompatible materials. *Ann Thorac Surg* 1996;62:1404-1411.
30. Wachtfogel YT, Kucich U, James HL, et al. Human plasma kallikrein releases neutrophil elastase during blood coagulation. *J Clin Invest* 1983;72:1672-1677.
31. Kaminishi Y, Hiramatsu Y, Watanabe Y, et al. Effects of nafamostat mesilate and minimal-dose aprotinin on blood-foreign surface interactions in cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 2004;77:644-650.
32. Fritz H, Wunderer G. Biochemistry and applications of aprotinin, the kallikrein inhibitor from bovine organs. *Arzneimittelforschung* 1983;33:479-494.
33. Bidstrup BP, Royston D, Sapsford RN, et al. Reduction in blood loss and blood use after cardiopulmonary bypass with high dose aprotinin (Trasylol). *J Thorac Cardiovasc Surg* 1989;97:364-372.
34. Mangano DT, Tudor IC, Dietzel C. The risk associated with aprotinin in cardiac surgery. *N Engl J Med* 2006;354:353-365.
35. Boisclair MD, Philippou H, Lane DA. Thrombogenic mechanisms in the human: fresh insights obtained by immunodiagnostic studies of coagulation markers. *Blood*

- Coagul Fibrinolysis 1993;4:1007-1021.
36. Burman JF, Chung HI, Lane DA, et al. Role of factor XII in thrombin generation and fibrinolysis during cardiopulmonary bypass. *Lancet* 1994;344:1192-1193.
37. Tabuchi N, Haan J, Boonstra PW, et al. Activation of fibrinolysis in the pericardial cavity during cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1993;106:828-833.
38. Kappelmeyer J, Bernabei A, Edmunds LH Jr, et al. Tissue factor is expressed on monocytes during simulated extracorporeal circulation. *Circ Res* 1993;72:1075-1081.
39. Hattori T, Khan MM, Colman RW, et al. Plasma tissue factor plus activated peripheral mononuclear cells activate factors VII and X in cardiac surgical wounds. *J Am Coll Cardiol* 2005;46:707-713.
40. Chung J, Suzuki H, Tabuchi N, et al. Identification of tissue factor and platelet-derived particles on leukocytes during cardiopulmonary bypass by flow cytometry and immunoelectron microscopy. *Thromb Haemost* 2007;98:368-374.
41. Shibamiya A, Tabuchi N, Chung J, et al. Formation of tissue factor-bearing leukocytes during and after cardiopulmonary bypass. *Thromb Haemost* 2004;92:124-131.

42. Khan MM, Hattori T, Niewiarowski S, et al. Truncated and microparticle-free soluble tissue factor bound to peripheral monocytes preferentially activate factor VII. *Thromb Haemost* 2006;95:462-468.
43. Ruf W, Edgington TS. Structural biology of tissue factor, the initiator of thrombogenesis in vivo. *FASEB J* 1994;8:385-390.
44. Chung JH, Gikakis N, Rao AK, et al. Pericardial blood activates the extrinsic coagulation pathway during clinical cardiopulmonary bypass. *Circulation* 1996;93:2014-2018.
45. Lindahl AK, Sandset PM, Abildgaard U. The present status of tissue factor pathway inhibitor. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1992;3:439-449.
46. LaRosa SP, Opal SM. Tissue factor pathway inhibitor and antithrombin trial results. *Crit Care Clin* 2005;21:433-448.
47. Sandset PM, Abildgaard U, Larsen ML. Heparin induces release of extrinsic coagulation pathway inhibitor(EPI). *Thromb Res* 1988;50:803-813.
48. Donahue BS, Gailani D, Mast AE. Disposition of tissue factor pathway inhibitor during cardiopulmonary bypass. *J Thromb Haemost* 2006;4:1011-1016.
49. Fischer T, Kuppe H, Koster A. Impact of heparin management on release of tissue factor pathway inhibitor during cardiopulmonary bypass. *Anesthesiology*

- 2004 ;100:1040.
50. Kojima T, Gando S, Kemmotsu O, et al. Another point of view on the mechanism of thrombin generation during cardiopulmonary bypass: role of tissue factor pathway inhibitor. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2001;15:60-64.
51. Sun LB, Utoh J, Kunitomo R, et al. Altered plasma antigen levels of tissue factor pathway inhibitor during open-heart surgery. *Surg Today* 2000;30:122-126.
52. Shibamiya A, Tabuchi N, Chung J, et al. Formation of tissue factor-bearing leukocytes during and after cardiopulmonary bypass. *Thromb Haemost* 2004;92:124-131.
53. Sato Y, Hogg JC, English D, et al. Endothelin-1 changes polymorphonuclear leukocytes' deformability and CD11b expression and promotes their retention in the lung. *Am J Respir Cell Mol Bio* 2000;23:404-410.
54. Shigeta O, Kojima H, Jikuya T, et al: Aprotinin inhibits plasmin-induced platelet activation during cardiopulmonary bypass. *Circulation* 1997;96:569-574.
55. Camerer E, Kolsto AB, Prydz H. Cell biology of tissue factor, the principal initiator of blood coagulation. *Thromb Res* 1996;81:1-41.
56. Koyama T, Nishida K, Ohdama S, et al. Determination of plasma tissue factor antigen and its clinical significance. *Br J Haematol* 1994;87:343-347.

57. 中村 伸. 組織因子(CD142). 血栓と循環 2004;12:521-524.
58. Misumi K, Ogawa H, Yasue H, et al. Comparison of plasma tissue factor levels in unstable and stable angina pectoris. Am J Cardiol 1998;81:22-26.
59. Sturk-Maquelin KN, Nieuwland R, Romijn FP, et al. Pro- and non-coagulant forms of non-cell-bound tissue factor in vivo. J Thromb Haemost 2003;1:1920-1926.
60. Edmunds LH Jr. Inflammatory response to cardiopulmonary bypass. Ann. Thorac Surg 1988;66:S12-16.
61. Worthen GS. Mechanics of stimulated neutrophils: Cell stiffening induces retention in capillaries. Science 1989;245:183-186.
62. Kotani N. Cardiopulmonary bypass produces greater pulmonary than systemic proinflammatory cytokines. Anesth Analg 2000;90:1039-1045.
63. Frank RS. Time-dependent alterations in the deformability of human neutrophils in response to chemotactic activation. Blood 1990;76:2606-2612.
64. 松崎寛二, 平松祐司, 吉村幸浩, 他. 好中球エラスターゼ阻害剤 Elaspol による *in vitro* 体外循環中の炎症機転制御および全血 microchannel 通過性改善効果. 日本ヘモレオロジー学会誌 2004;7:13-18.
65. Ott I. Soluble tissue factor emerges from inflammation. Circ Res 2005;96:1217-1218.

66. Szotowski B, Antoniak S, Poller W, et al. Procoagulant soluble tissue factor is released from endothelial cells in response to inflammatory cytokines. *Circ Res* 2005;96:1233-1239.
67. Callas DD, Bacher P, Fareed J. Studies on the thrombogenic effects of recombinant tissue factor: in vivo versus ex vivo findings. *Semin Thromb Hemost* 1995;21:166-176.
68. Butenas S. Comparison of natural and recombinant tissue factor proteins: new insights. *Biol Chem* 2013;394:819-829.
69. Bogdanov VY, Balasubramanian V, Hathcock J, et al. Alternatively spliced human tissue factor: a circulating, soluble, thrombogenic protein. *Nat Med* 2003;9:458-462.
70. Ruf W, Rehemtulla A, Morrissey JH, et al. Phospholipid-independent and -dependent interactions required for tissue factor receptor and cofactor function. *J Biol Chem*. 1991;266:2158-2166.
71. Lindahl AK, Sandset PM, Abildgaard U. The present status of tissue factor pathway inhibitor. *Blood Coagulation and Fibrinolysis*. 1992;3:439-449.
72. Hansen JB, Svensson B, Olsen R, et al. Heparin induces synthesis and secretion of tissue factor pathway inhibitor from endothelial cells on vitro. *Thromb Haemost* 2000;83:937-943.

73. Novotny WF, Palmier M, Wun TC, et al. Purification and properties of heparin-releasable lipoprotein-associated coagulation inhibitor. *Blood* 1991;78:394-400.
74. Hobbs SD, Haggart P, Fegan C, et al. The role of tissue factor in patients undergoing open repair of ruptured and nonruptured abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg* 2007;46:682-686.
75. Wun TC, Kretzmer KK, Girard TJ, et al. Cloning and characterization of a cDNA coding for the lipoprotein-associated coagulation inhibitor shows that it consists of three tandem Kunitz-type inhibitory domains. *J Biol Chem* 1988;263:6001-6004.
76. Girard TJ, Warren LA, Novotny WF, et al. Functional significance of the Kunitz-type inhibitory domains of lipoprotein-associated coagulation inhibitor. *Nature* 1989;338:518-520.
77. Abeyama K, Stern DM, Ito Y, et al. The N-terminal domain of thrombomodulin sequesters high-mobility group-B1 protein, a novel antiinflammatory mechanism. *J Clin Invest* 2005;115:1267-1274.
78. Ranucci M. Antithrombin III. Key factor in extracorporeal circulation. *Minerva Anesthesiol* 2002;68:454-457.

79. Roemisch J, Gray E, Hoffmann JN, et al. Antithrombin: a new look at the actions of a serine protease inhibitor. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2002;13:657-670.