
スポーツ活動が小児の血小板・血管内皮機能
と動脈硬化の進展に及ぼす効果に関する研究

15500431

平成 15 年度～平成 17 年度科学研究費補助金
(基盤研究 (C)) 研究成果報告書

平成 18 年 3 月

研究代表者 堀米 仁志

筑波大学大学院人間総合科学研究科講師

寄贈
堀米仁志氏

<はしがき>

加齢に伴う動脈硬化性病変の進行は虚血性心疾患のリスクとなる。小児における生活習慣病の増加は小児期からの動脈硬化性病変を引き起こし、その進展には血管内皮機能異常、血小板機能異常、凝固線溶系の異常が強く影響している。成人肥満者においては食事や運動療法による体重減少が凝固線溶機能や血管内皮機能を改善し、虚血性心疾患のリスクを減少させると報告されている。また、成人を対象とした運動介入試験では、過度の運動は過凝固状態を引き起し心血管イベントのリスクとなるが、有酸素運動は血小板凝集抑制作用を呈し、凝固線溶系では線溶活性が優位となるため予防的効果が期待される事が報告されている。小児期には成長に伴い活動性や必要とされる栄養が変化するため、年齢軸を含めた運動食事療法が血管内皮機能や血小板機能、凝固線溶系因子に及ぼす影響についての検討が必要となる。小児生活習慣病に関する遺伝因子、環境因子、生理学的因子の解明や、小児の健全な成長に必要な運動食事療法の確立は、その後の成人期の生活習慣病の予防に重要な影響を与えると考えられる。本研究では、小児期に特徴的な慢性的に低酸素状態にあるチアノーゼ性先天性心疾患(CCHD)を含め、小児、成人を対象に血管内皮機能の指標となる凝固線溶蛋白や血小板機能の評価と食事運動介入に伴うこれらの因子の変化の検討を目的とした。本研究の結果、赤血球増多を伴う CCHD における血小板活性の指標となる血小板由来マイクロパーティクルの産生亢進が明らかとなった。また、CCHD においても健常小児と同じように線溶系蛋白に午前中高値となる日内変動を認めたが、CCHD では健常小児と比較し tissue-type plasminogen activator (t-PA) 抗原が午前、午後ともに高値を呈し、CCHD における血小板活性や凝固線溶系の異常が示された。成人肥満者を対象とした食事制限介入と食事制限と有酸素運動介入による減量が血小板活性や線溶系蛋白に及ぼす効果に関する研究では、線溶系蛋白だけでなく血小板活性も肥満の程度や脂肪組織に影響され異常を呈する事が明らかとなった。

研究組織

- 研究代表者 : 堀米仁志 (筑波大学大学院人間総合科学研究科講師)
研究分担者 : 平松祐司 (筑波大学大学院人間総合科学研究科助教授)
研究分担者 : 田中喜代次 (筑波大学大学院人間総合科学研究科教授)

交付決定額（配分額）

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 15 年度	2,200,000	0	2,200,000
平成 16 年度	900,000	0	900,000
平成 17 年度	600,000	0	600,000
総 計	3,700,000	0	3,700,000

研究発表

（1）学科誌等

1. Horigome H, et al. Increased plasma level of endothelin-1 following percutaneous balloon dilatation of aortic coarctation in children. *Eur J Pediatr.*162(7-8);543-544,2003.Shiono J. et al.
2. Detection of repolarization abnormalities in patients with cardiomyopathy using current vector mapping technique on magnetocardiogram. *Int J Cardiovasc Imaging.* 19(2);163-70,2003.
3. Shiono J. et al. Electrocardiographic changes in patients with cardiac rhabdomyomas associated with tuberous sclerosis. *Cardiol Young.* 13(3);258-63,2003.
4. Yoshinaga M. et al. Who is at risk for cardiac events in young patients with long QT syndrome? *Circ J.* 67(12);1007-10012,2003.
5. Horigome H, et al. Ventricular fibrillation during anesthesia in association with J waves in the left precordial leads in a child with coarctation of the aorta. *J Electrocardiol.* 36(4);339-343,2003.
6. Tokunaga C, et al. Palliative open heart surgery in an infant with factor VII deficiency. *Annals Thoracic Surgery.* 76(6);2093-2094,2003.
7. Horigome H, et al. Soluble P-selectin and thrombomodulin-protein C-Protein S pathway in cyanotic congenital heart disease with secondary erythrocytosis. *Thromb Res.* 112(4);223-227,2003.
8. Yanagi S, et al. Heart rate variability and ambulatory blood pressure monitoring in young patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Circ J.* 68(8);757-762,2004.
9. Horigome H, et al. Fatal eosinophilic heart disease in a child with neurofibromatosis-1 complicated by acute lymphoblastic leukemia. *Heart Vessels.*

20(3);120-122,2005.

10. Abe K, et al. Successful management of supraventricular tachycardia in a fetus using fetal magnetocardiography. *Fetal Diagn Ther.* 20(5);459-62,2005.
11. Horigome H, et al. Standardization of the PQRST waveform and analysis of arrhythmias in the fetus using vector magnetocardiography. *Pediatr Res.* 59(1);121-125,2006.
12. Horigome H, et al. Magnetic resonance imaging of the brain and hematologic profile in adult cyanotic congenital heart disease without stroke. *Heart* 92(2);263-265,2006.
13. Ikeda A, et al. A pitfall in ligation of intrahepatic shunting after fontan type operation. *Asian Cardiovasc Thorac Ann.* 14(1);e6-8,2006.
14. Murakami T, et al. Impact of weight reduction on production of platelet-derived microparticles and fibrinolytic parameters in obesity. *Thromb Res.*2006.In press
15. Sato M, et al. Replacement of the common atrioventricular valve with floating annuloplasty in a patient with univentricular physiology. *Jpn Thorac Cardiovasc Surg.* 54(2);85-87.2006.

(2) 口頭発表

1. 堀米 仁志、成人チアノーゼ型先天性心疾患における血液凝固系と頭部 MRI 所見、第 39 回日本小児循環器学会、2003 年 7 月 18 日
2. 村上 卓、チアノーゼ性先天性心疾患における凝固線溶系蛋白の検討 (PAI-1 の日内変動を含めて)、第 40 回日本小児循環器学会、2004 年 7 月 2 日
3. 片山 靖富、MC-FAN を用いたチアノーゼ性先天性心疾患における血液流動性の検討、第 7 回成人先天性心疾患研究会、2005 年 1 月 8 日
4. 堀米 仁志、アイゼンメンジャー症候群・チアノーゼ性先天性心疾患における線溶系指標の変動、第 41 回日本小児循環器学会、2005 年 7 月 7 日
5. 村上 卓、チアノーゼ性先天性心疾患および Fontan 循環患者における血小板活性化指標としての platelet derived microparticles の検討、第 41 回日本小児循環器学会、2005 年 7 月 7 日

(3) 出版物

研究成果による工業所有権の出願・取得状況

「研究成果」

チアノーゼ性先天性心疾患における線溶系指標の変動

【研究目的】近年、治療法の進歩に伴い、ほとんどの先天性心臓病のみならず、様々の小児期心臓病が救命可能となった。しかし、チアノーゼ性先天性心疾患 (cyanotic congenital heart disease: CCHD) など一部の心疾患では未だに生命予後に影響する重度の低酸素血症、肺高血圧、赤血球増加を呈し、不幸な転帰をとる事がある。組織学的には乱流に伴う動脈血栓や血流うっ滞に伴う静脈血栓形成、動脈硬化、内中膜や平滑筋の増殖等の血管リモデリング、線維化や心筋肥大等の心筋障害が認められる。これらの病態には、血管内皮細胞障害、低酸素刺激、赤血球増加や高血圧、血流異常に伴うずり応力、cytokine や増殖因子、血小板活性や凝固線溶系蛋白等が複雑に関係していると考えられる。また、CCHD では生命予後に影響する重度の出血傾向や血栓形成傾向を呈する事がある。体循環における血栓形成では脳梗塞や腎梗塞、肺循環では肺梗塞や肺静脈閉塞を発症し、出血傾向は頭蓋内出血や肺出血等の合併症を引き起こし、また、周術期の管理にも影響を与える。血栓形成傾向と出血傾向は凝固系と線溶系の活性と阻害のバランスに大きく影響される。CCHD における血栓傾向や出血傾向の原因としては、低酸素による肝臓でのビタミン K 依存性凝固因子産生低下や、多血に伴う微小血栓産生による凝固因子や血小板の消費が報告されているが不明な点が未だに多く、術後を含めた CCHD における血栓塞栓予防目的の抗凝固療法についての確固としたガイドラインはない。

Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) は早朝から午前中が午後に比べて高値となる日内変動を呈する。PAI-1 gene の promoter である 4G/5G の polymorphism (4G allele) は PAI-1 の早朝の増加を増強すると報告されている。Polymorphism は動脈血栓や深部静脈血栓症のリスクにはならないとの報告がある一方で、PAI-1 活性上昇が若年の心筋梗塞の再発予知に有用であるとの報告や、vasospastic angina や variant angina の患者で早朝の PAI-1 が高値であるとの報告があり、日内変動による早朝の PAI-1 上昇が早朝の虚血性心疾患イベント発生に関連するとの見方もある。

肺高血圧や慢性的な低酸素状態にある CCHD では凝固線溶系や血小板機能の異常が存在し、CCHD における血栓形成傾向や出血傾向に影響を与えていることが推測されるが、日内変動を含めた凝固線溶系蛋白の変動に関する報告は非常に少なく不明な点が多い。従って、本研究では、臨床研究として CCHD と健常人における PAI-1 活性、tissue-type plasminogen activator (t-PA) 抗原の血漿レベルと赤血球増加の程度や低酸素レベル等との関係について検討した。また、PAI-1 の日内変動をコントロール群と比較した。

【研究計画・方法】

<対 象>

対象は 2003 年 8 月～2004 年 12 月に筑波大学付属病院小児循環器外来を受診、あるいは同病院に入院した症例を小児心疾患患者の対象とした。CCHD 患者 27 例（年齢：中央値 8.3 歳（1.3～31.2 歳））を CCHD 群とした。非チアノーゼ性心疾患患者 25 例（年齢：中央値 9.8 歳（1.6～19.7 歳））をコントロール群とした。抗凝固療法、抗血小板療法に関しては、アスピリンがチアノーゼ群 8 例、コントロール群 1 例で使用されていたが、今回の検討では継続下に採血した。

<方 法>

血液採取は2本シリンジ法を用いて施行した。採血量は3.8%クエン酸0.25mlに対して $2.25 \times (100 - \text{正常のヘマトクリット (Hct)}) / (100 - \text{対象のHct})$ とした。9時および16時の安静時に血液検体を肘静脈より採取し、直ちに4℃冷却遠心後-80℃の冷凍庫に保存し、後日PAI-1活性、t-PA抗原、白血球数、赤血球数(RBC)、Hct、ヘモグロビン(Hb)、血小板数、フィブリノーゲン、アンチトロンビン III、fibrin degradation product (FDP)、トロンビン・アンチトロンビン III複合体、総コレステロール、トリグリセリド、high-density lipoprotein(HDL)コレステロール、low-density lipoprotein(LDL)コレステロールを測定した。

<検討項目>

数値は正規分布が仮定できる項目は平均±標準偏差で示し、正規分布から逸脱するものは中央値(25%タイル値-75%タイル値)で示した。統計学的手法は、CCHD 群とコントロール群の比較は、正規分布と等分散が仮定できる項目は対応のない t 検定を用い、それ以外には Welch's t-test や Mann-Whitney test を用いた。日内変動の検討には、正規性の仮定できる項目には対応のある t 検定を用い、それ以外には Wilcoxon's signed-rank test を用いた。CCHD 群の各因子の相関の検討には、正規分布に従うものにはピアソンの積率相関係数を用い、正規分布が仮定できない項目にはスピアマンの順位相関係数を用いた。p<0.05 を統計学的に有意とし、統計学的計算には p<0.05 を統計学的に有意とし、統計学的計算には SPSS ソフトウェア (SPSS, Chicago, version 11.0J)を用いた。

【結果】 PAI-1 活性は CCHD 群(9時 0.26 (0.19-0.52) ng/ml、16時 0.13 (0.12-0.22) ng/ml (p=0.008))、コントロール群(9時 0.21 (0.12-0.36) ng/ml、16時 0.09±0.02 ng/ml (p=0.007))と、いずれも 9 時が有意に高値を示した。t-PA 抗原も CCHD 群 (9時 4.25 (2.86-5.53) ng/ml、16時 3.30 (2.43-4.80) ng/ml (p=0.015))、control 群

(9 時 2.62 ± 0.2 ng/ml、16 時 1.62 ± 0.2 ng/ml ($p=0.005$)) と、9 時が有意に高値であった。9 時の PAI-1 は CCHD 群、コントロール群で差を認めず ($p=0.172$)、16 時の PAI-1 と、t-PA 抗原は 9 時 16 時ともに CCHD 群が高値を呈した。(PAI-1 活性 16 時: $p=0.017$, t-PA 抗原 9 時: $p<0.001$, 16 時 $p<0.001$) 16 時の PAI-1 活性は血小板数と正の相関 ($r=.366$, $p=0.039$) を認め、9 時の t-PA 抗原は RBC 数、Hb、Hct (RBC: $r=.462$, $p=.001$, Hb: $r=.592$, $p<0.001$, Hct: $r=.631$, $p<0.001$) と、16 時の t-PA 抗原は Hb、Hct (Hb: $r=.509$, $p=0.003$, Hct: $r=.499$, $p=.004$) と正の相関を呈した。

【今後期待される研究成果】

現在の CCHD の血栓形成傾向に対する治療は抗凝固薬の使用や外科治療による低酸素の軽減であるが、CCHD における凝固線溶系の解明は、血管内皮細胞障害や血管リモデリングの側面からの治療や、出血傾向や血栓形成傾向を呈する児の管理に貢献すると考えられる。今後は、長期にわたり慢性的な低酸素にさらされた CCHD の実験モデルとして、長期的な低酸素負荷マウスを用い、肺動静脈や心筋等における PAI-1 や t-PA の mRNA 発現量を評価するような研究が望まれる。