

Heparin Surface：その抗血栓機構と膜型人工肺への応用

Heparin Surface : Its Thromboresistance and Application for Membrane Oxygenator

児玉謙次^{*1}, 谷山卓郎^{*2}, 高橋成輔^{*3}, 吉武潤一^{*4}, Per Olsson^{*5}

まとめ

Heparin Surface は、従来の医用素材の表面に、ヘパリン分子を共有結合させた新しいBiomaterial で、強い抗血栓性を有している。その抗血栓機構は、Heparin SurfaceがThrombinを取り込んで、AntithrombinⅢ存在下に、取り込んだThrombin活性を阻害するという結果から、血管内皮に類似していると考えられる。Heparin Surfaceを、膜型人工肺に応用し、犬でヘパリン非投与で、24～30時間の体外循環を試行したところ、凝固系や血小板に著変なく、対外循環を維持でき、膜型人工肺のガス交換能も良好であった。

今後、さらにHeparin Surface の抗血栓機構が解明され、その安全性が確認されて、臨床応用が可能となれば、呼吸不全に対する膜型人工肺による呼吸補助の適応も、大いに拡大されるであろう。

1. はじめに

血液は、異物表面に接触すると凝固する性質を持っているため、機能上血液と接触することが避けられない人工臓器や医用装置の開発にあたっては、抗血栓性素材の開発も重要な研究課題となってきたが、未だ理想的な素材は生み出されていない。

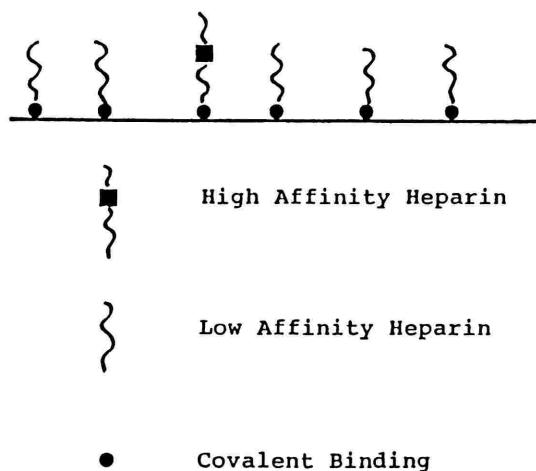
最近開発されたHeparin Surface¹⁾ は、血管内皮と同様の強い抗血栓性を有し、膜型人工肺にも応用できることが実証され、新しいBiomaterial として注目されている。

本稿では、Heparin Surface について、現在までに解

明された抗血栓機構について述べ、膜型人工肺に応用した実験結果について概説する。

(1) Heparin Surface とは？

図1に、Heparin Surface の模式図を示す。図の様に、Heparin Surface は、Surface にHeparin 分子が共有結合しているものを称するが、その結合様式が、end-point attachment であることが特徴である¹⁾。Heparin 分子は、AntithrombinⅢ (以下AT) に対するAffinityによって、High Affinity Heparin とLow Affinity Heparinに分けられるが、これらのHeparin 分子は、亜硝酸によって分解されているので、平均分子量が、約8000になってしまっており、Heparin Surface 上のHigh Affinity HeparinとLow Affinity Heparin の割合は、計算上、約1対5と考えられている。



*1 九州大学医学部附属病院麻酔科

*4 九州大学医学部麻酔学講座

*2 同 中心治療部

*5 Karolinska研究所実験外科

*3 同 手術部

図1 Heparin Surface の模式図

AntithrombinⅢ結合部位を持つHigh Affinity HeparinとAntithrombinⅢ結合部位を持たないLow Affinity Heparin が約1対5の割合でSurface に共有結合しており、結合様式はend-point attachmentであることが特徴である。

(2) Heparin Surface の抗血栓機構

Heparin Surface の抗血栓性は、Thrombinとの相互作用を調べた結果から、血管内皮との類似性が強く示唆されており、この点が、従来の医用材料の抗血栓性と根本的に異なっている^{2) 3)}。すなわち、表1に示す様に、ヒト血漿、AT (Tyrode溶液またはヒト血清アルブミン溶液) やヒト血清アルブミン単独で前処理したHeparin Surfaceと無処理のHeparin Surface を、ウシThrombin溶

液と、室温で15分間反応させると、合成基質 (S-2238) を分解する活性は、溶液中からほとんど消失し、その活性の約50%が、Heparin Surface 上に回復している。この結果は、Heparin Surface の前処理法には関係ないことから、Heparin Surface に取り込まれたThrombinのうち、約半分は、Heparin 単独で失活され、前処理によってHeparin Surface によって吸着されたATの役割りは、重要でないと考えられている。次に、Thrombinを取り込み、一部Thrombin活性を残したHeparin Surface に、Fibrinogen 除去ヒト血漿やATを反応させると、表2に示す様に、室温で約30秒以内に、Heparin Surface 上のThrombin活性は、ほとんど失われてしまう。ATの稀釀液をHSAとTyrodeにした場合の阻害活性の差については、Ca⁺⁺の関与が推定されているが定かではない。

Pretreatment	Initial amount of thrombin in solution (NIH units)	Loss of thrombin from solution totally (NIH units)	Surface recovered thrombin activity per cm ² (est. units/cm ²)
None	10.0	8.90	0.356
PFP	10.0	9.20	0.368
AT/Tyrode	10.0	9.38	0.375
AT/HSA	9.86	9.13	0.365
HSA	9.88	9.02	0.361

表1 ウシスロンビン (10単位) をHeparin Surface と反応させた場合の、スロンビン溶液からのスロンビン活性の消失とHeparin Surface 上に現れたスロンビン活性。

PFP : Platelet Free Plasma

AT/Tyrode : AntithrombinⅢ dissolved in Tyrode's solution

AT/HSA : AntithrombinⅢ dissolved in 4%HSA

HSA : Human Serum Albumin

文献2) より変更引用

以上の結果から、図2に示す様に、Heparin Surface は、Thrombinを取り込み、取り込んだThrombinのうち一部は、Heparin 単独で阻害し、また一部は、ATの存在

下に阻害するという血管内皮に類似した抗血栓機構を有すると考えられている。

Surface confined thrombin activity: [Est. units/cm² x 10⁻³]

Pretreatment	Before exposure	After exposure to		AT/HSA
		HDHP	AT/Tyrode	
None	200	4±2	n.s	4±1 p<0.05 17±11
PFP	190	7±2	n.s	5±1 p<0.001 38±19
AT/Tyrode	194	5±2	n.s	8±1 p<0.05 20±10
AT/HSA	187	4±1	n.s	7±4 n.s 13±8
HSA	192	5±2	n.s	7±2 p<0.001 38±20

表2 Heparin Surface 上のThrombin活性の阻害

HDHP : Heat Defibrinogenated Human Plasma

PFP : Platelet Free Plasma

AT/Tyrode : AntithrombinIII dissolved in Tyrode's solution

AT/HSA : AntithrombinIII dissolved in 4%HSA

HSA : Human Serum Albumin

文献2) より変更引用

- ▲ AT
- △ AT activated
- IIa
- IIa inhibited
- AT binding site

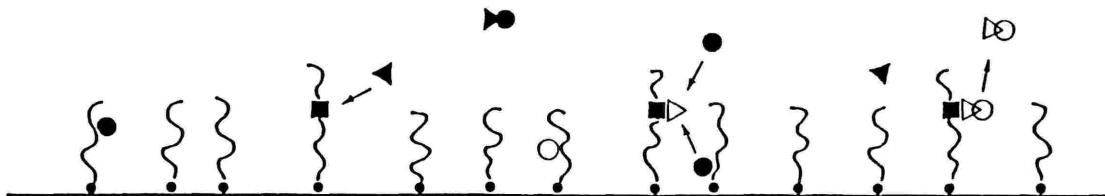


図2 Heparin Surface によるThrombin (II a) の取り込みと阻害

Heparin Surface に取り込まれたThrombinの一部はHeparin 単独で阻害される。また, High Affinity Heparin に吸着したAntithrombinIII (A T) は活性化され, 失活していない Thrombin を阻害し, Thrombin・AntithrombinIII複合体が血中へ遊離していく。この様な取り込みと阻害をくり返すことによって, Heparin Surface は抗血栓性を維持している。

また, 活性型第X因子 (Factor Xa) とHeparin Surfaceの相互作用については, Thrombinとは若干異なる機構があり, A Tを吸着した場合のみ, Heparin Surfaceは, Factor Xaを取り込んで阻害すると考えられている⁴⁾。

(3) Heparin Surface の膜型人工肺への応用

上述の様な強い抗血栓性を有するHeparin Surface を膜型人工肺に応用し, 人工肺とそれに接続する回路内で血液と接触する表面を全てHeparin Surface にした膜型人工肺と対外循環回路を用いて, 犬で24時間の部分体外循環による呼吸補助 (Extracorporeal CO_2 Removal) を, ヘパリン非投与で行った⁵⁾。図3に, その実験の模式図を示す。体外循環は, 下大静脈より脱血し, 上大静脈に送血するVeno-Venous Bypassで行い, 膜型人工肺の血流量は2~3 L/min に維持した。従来, 膜型人工肺を用いた長期の体外循環では, ヘパリンを全身投与するため, 出血が制御できなくなることや, 膜型人工肺からの血漿漏出が起こることが問題となってきたが, この実験では, 体外循環施行中, 凝固時間, Fibrinopeptide A (FPA) の生成量, 血小板数に著変なく, 膜型人工肺の CO_2 排出能も良好に維持され, 呼吸回数毎分1回の人工呼吸併用で, 動脈血 pH, PaO_2 , PaCO_2 は正常範囲に

保たれ, 膜型人工肺からの血漿漏出も認められなかった。図4に, 体外循環中の凝固時間の変化を示すが, 体外循環開始21時間以降も正常範囲に保たれている。体外循環開始後2時間の凝固時間の延長は, 共有結合によってSurfaceに完全に固定されていないHeparin 分子のSurfaceから血中への一時的漏出によるものと思われ, この時期に 0.1U/ml 以下のヘパリン活性が検出されたが, それ以降は, 血中のヘパリン活性は検出されなかった。図5は, FPAの変化を示す。体外循環中, 経過と共に血中FPAが増加しているが, Control に示した様に, 体外循環を行わず麻酔のみの場合にも, 若干増加傾向を示したことから, FPAの増加が, 体外循環によるThrombin 生成を意味するか否かは不明であるが, 終盤の増加は, 膜型人工肺内の流出路の一部に, 小さな血栓が形成されていたことから, Thrombin の生成を反映している可能性がある。図6に, 血小板数の変化を示す。体外循環回路の充填液により血液が稀釈されるためヘモトクリット値で補正した値を示すが, 終盤の血小板減少の原因是, Roller Pump による血小板の破壊などが考えられる。図7に, 膜型人工肺からの CO_2 排出量の変化を示すが, 体外循環中平均 120ml/min の CO_2 排出が認められ, 炭酸ガス排出能も良好に維持されていた。

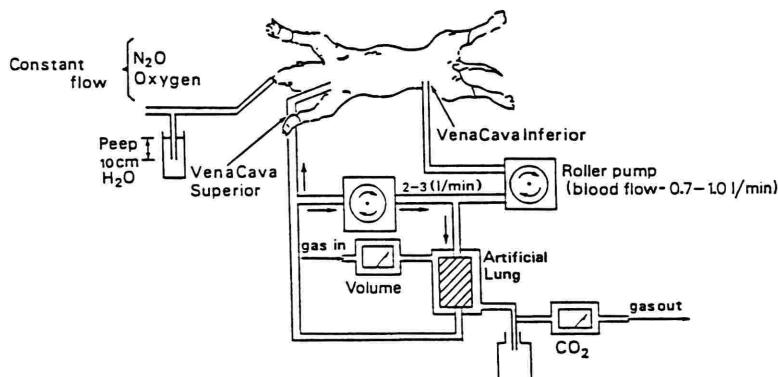


図3 実験の模式図

気管内チューブを通して、気管分岐部に先端が達するカテーテルを留置し、そのカテーテルから酸素 (0.5 L/min) と笑気 (0.5 L/min) を投与した。呼気終末に10cm H₂O の陽圧 (peep) をかけ、毎分1回の人口呼吸 (1回換気量500ml) を行った。模型人口肺に充分な血流を得るため、血液を再循環させた。模型人口肺は、Capiox II 43, 4.6m² (Terumo) または、BOS-CM 40, 4.0m² (American Bentley) を使用した。

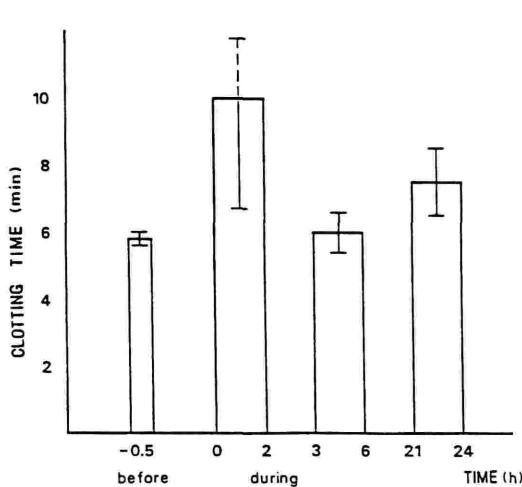


図4 体外循環中の凝固時間の変化

文献5) より変更引用

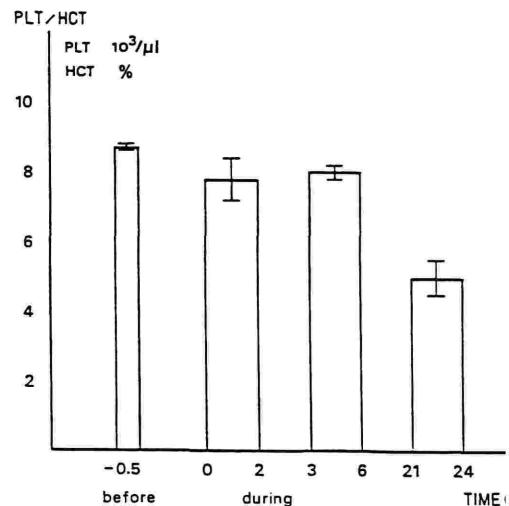


図6 体外循環中の血小板数の変化

(ただし、ヘマトクリット値による補正值を示す。)

文献5) より変更引用

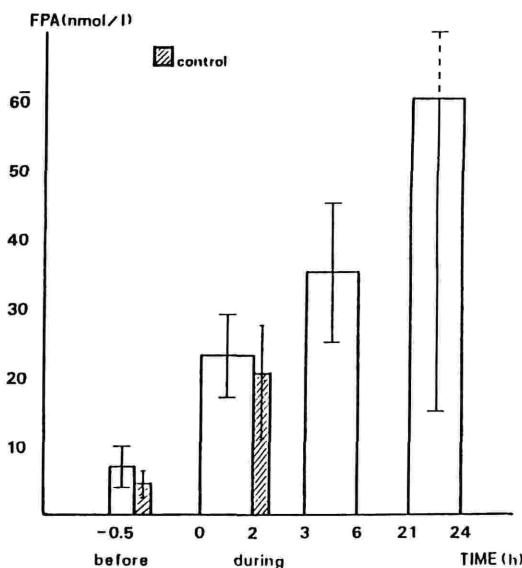
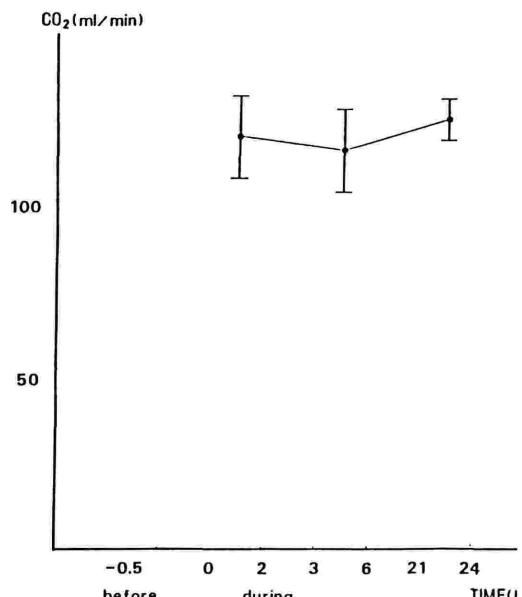


図5 体外循環中のFibrinopeptide Aの変化

文献5) より変更引用

図7 体外循環中の模型人口肺からのCO₂ 排出量の変化

文献5) より変更引用

2. おわりに

新しいBiomaterialとしてのHeparin Surfaceについて、現在までに解明された抗血栓機構と膜型人工肺に応用した実験結果について述べたが、抗血栓機構については、今後ThrombinやFactor Xa以外の凝固因子あるいは線溶系因子や補体系因子などとの相互作用も次第に明らかにされていくであろう。さらにHeparin Surfaceの臨床応用が可能となれば、長期体外循環が安全に行われる様になり、呼吸不全に対する膜型人工肺による呼吸補助の適応も広がっていくことが期待される。

3. 参考文献

- 1) Larm O., Larsson R., Olsson P. : A new non-thrombogenic surface prepared by selective covalent binding of heparin via a modified reducing terminal residue. *Biomat. M-ed. Dev. Art. Org.* 11: 161-173, 1983.
- 2) Pasche B., Kodama K., Larm O., Olsson P., Swedenborg J. : Thrombin inactivation on surfaces with covalently bonded heparin. *Thromb Res* 44: 739-748, 1986.
- 3) Arnander C., Dryiski M., Larsson R., Olsson P., Swedenborg J. : Thrombin uptake and inhibition on the endothelium and surfaces with a stable heparin coating. *J. Biomed. Mat. Res* 20: 235-246, 1986.
- 4) Kodama K., Pasche B., Olsson P., Adolfsson L., Larm O., Riesenfeld J. : Antithrombin III binding to surface immobilized heparin and its relation to F Xa inhibition. *Thromb. Haemostas.* 印刷中
- 5) Bindslev L., Gouda J., Inacio J., Kodama K., Lagergren H., Larm O., Nilsson E., Olsson P. : Extracorporeal elimination of carbon dioxide using a surface-heparinized veno-venous bypass system. *T-rans ASAIO 32/1* : 530-533, 1986.