

体外循環下開心術における凝固線溶系の変動

田 中 國 義* 那 須 通 寛* 矢 田 公*
湯 浅 浩* 草 川 實* 出 口 克 己**

要 旨

体外循環下開心術における凝固線溶系の変動について検討した。対象は成人開心術症例20例である。Antithrombin III (ATIII) は体外循環中、有意の低下を示し、thrombin 生成に対する heparin-ATIII complex の動員と消費が示唆された。また fibrinopeptide A (FPA) は体外循環中、有意の増加を示した。この事は生成 thrombin が heparin-ATIII complex によっても完全に中和されておらず、残存 thrombin によって fibrin 形成がおこっている事を示すものと考えられた。一方 fibrinopeptide B β 15-42 (FPB β 15-42) も体外循環中有意の上昇を示し、線溶活性の発現が確認された。Kaolin 活性化 euglobulin による fibrin 平板溶解面積より求めた内因系線溶活性は、体外循環開始直後に最も消費されていたが、以後急速に前値へ回復した。Cl-inactivator 添加 euglobulin による fibrin 平板溶解面積より求めた外因系線溶活性 (Cl-INA resistant fibrinolytic activity) は体外循環開始60分で前値の24倍にまで増加し、以後急速に低下した。tissue plasminogen activator antigen (t-PA;Ag) も Cl-INA resistant fibrinolytic activity と同様の変動を示した。以上の結果より、体外循環中は heparin の使用にもかかわらず凝固活性は発現しており、微小循環における fibrin 血栓の形成が推察された。一方、体外循環中の線溶活性の発現は、主に血管内皮より放出される t-PA による外因系線溶が主体をなしており、その結果生じる plasmin が血栓を溶解し、

微小循環の維持に役立っているものと考えられた。

はじめに

体外循環中は、血液と異物表面との接触により種々の生体系が賦活される事が知られているが¹⁾²⁾、開心術に用いられる人工心肺も例外ではない。従来、体外循環下開心術においては、heparin が抗凝血薬として用いられてきたが、その作用機序は完全には解明されておらず、未だ不明な部分も多く残されている。一般に、heparin 投与量の目安として activated clotting time (ACT) を300から400秒以上に保つ事がすすめられているが³⁾、これは ACT がこの程度に保たれると、肉眼的には回路表面や術野に凝血塊を認めないという経験に基づくもので⁴⁾、果たして完全に thrombin 活性が抑制され、微小循環においても fibrin 形成が完全に阻止されているか否かは不明である。一方、体外循環中には線溶活性が亢進する事が知られ、術中術後の出血の一因をなすものと考えられてきた。しかし、線溶活性発現に至る機序について明らかにした報告は未だ見当らない。そこで、体外循環下開心術における凝固線溶系の変動を調べ、heparin の抗凝血薬としての効果および線溶活性発現の機序を明らかにする目的で研究を行なった。

研究方法

1) 対象症例および体外循環法

人工弁置換術あるいは AC bypass 術を施行された成人開心術症例20例を対象とした。内訳は男性14名、女性6名、年齢は29~69歳(平均53歳)である。体外循環はローラーポンプと気泡型肺(Harvey-1500)あるいは膜型肺(Maxima)を組み

*三重大学医学部胸部外科

** 同 第二内科

表1 測定項目および方法

A. Coagulation System	
1. Activated clotting time (ACT)	Hemocron®
2. Heparin	Chromogenic substrate assay (S-2222)
3. Antithrombin III	Chromogenic substrate assay (S-2238)
4. Fibrinopeptide A	Enzyme immunoassay (ASSERA CHROM® FPA)
B. Fibrinolytic System	
1. Fibrinopeptide B β 15-42	Radioimmunoassay
2. Tissue Plasminogen activator antigen (t-PA;Ag) ..	ELISA
3. Lysis of Plasminogen Free Fibrin by Kaolin activated Euglobulin	
4. Lysis of Plasminogen Rich Fibrin by Euglobulin with Cl-INA	
(Cl-INA resistant fibrinolytic activity; t-PA activity)	

合わせて行なった。回路は 15% mannitol (5 ml/kg), 6% hydroxy ethyl saccharide (Hespan® 5 ml/kg) に乳酸リンゲル液を加え合計 2200 ml で充填した。中等度低体温 (22.0~29.5°C) を用い、流量は 2.4 l/min/sqm を目標とした。カニューレーション直前に heparin 3 mg/kg を右心房より投与し、体外循環中は ACT を400秒以上に保った。体外循環終了後、投与 heparin 量の1.5倍量の硫酸 protamine を投与し heparin を中和した。

2) 採血および測定方法

採血は、麻酔導入直後より体外循環終了1時間後まで橈骨動脈留置針より経時的に行なった。血液は十分の一容の3.8%クエン酸 Na を加えて試験官に採取した。なお FPA および FPBβ15-42 の測定用検体には抗凝固剤として五分の一容のクエン酸 Na, heparin, trasylol を含んだ溶液を用いた。これらの検体は 4°C, 3,000回転で20分間遠沈の後、上清を分離し、-80°C で凍結し、後日以下の測定を行なった。測定項目および方法を表1に示す。heparin 濃度および ATIII 活性は発色性合成基質 (S-2222, S-2238) を用いて測定した。FPA は酵素免疫法 (ASSERA CHROM® FPA), FPBβ15-42 は radioimmunoassay にて測定した。t-PA;Ag は ELISA 法 (Imubind t-PA kit) を用いて測定した。さらに線溶活性を fibrin 平板法を用いて、内因系および外因系に分けて検索した。内因系線溶活性の指標として、kaolin 活性化 euglobulin を plasminogen-free bovine fibrin plate 上に滴下し、37°C 18時間静置後の溶解面積として測定した。外因系線溶活性の指標として、

plasminogen-rich bovine fibrin plate 上で euglobulin 30 μl に対し、Cl-INA (1200 U/ml, Cordis Laboratories Inc.) 5 μl を添加し、37°C 18時間静置後の溶解面積として測定した (Cl-INA resistant fibrinolytic activity)。

なお体外循環中の各測定値は hematocrit を用いて補正し、希釈の影響を除外した。各値は平均値±標準偏差で示し、統計学的処理は Student's t test により行ない、危険率5%以下を有意差あ

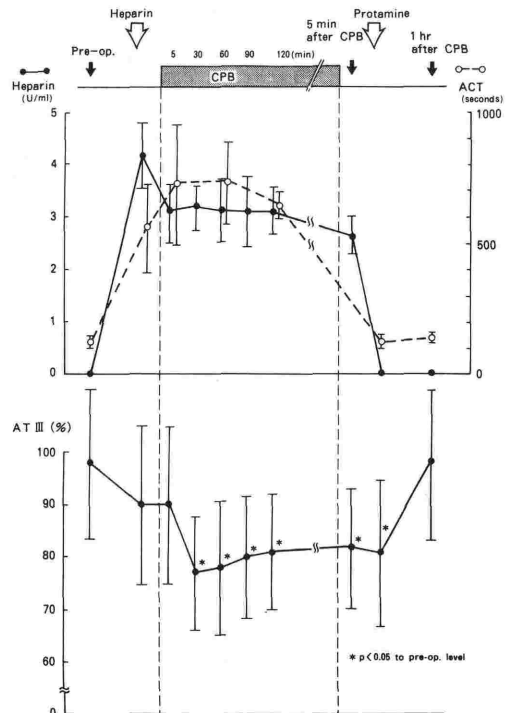


図1 体外循環前・中・後における血中 heparin 濃度, ACT および ATIII 活性の変化

りと判定した。

成績

1) 図1に術中の heparin 濃度, ACT, および ATIII 活性の経時的变化を示す. Heparin 3 mg/kg 投与後, heparin 濃度は 4.2 ± 0.66 U/ml に達し, 体外循環中は 3.1 ± 0.5 U/ml から 3.2 ± 0.4 U/ml に維持された. ACT は前値125±23秒に対し heparin 投与5分後には558±173秒に達し, 体外循環中は635±59秒から732±163秒に維持された. ATIII 活性は heparin 投与直後から低下しはじめ, 体外循環中は前値の80~85%に低下し, 体外循環終了後, 徐々に回復した.

2) 図2に FPA および FPBβ15-42 濃度の経時的变化を示す. FPA は前値 8.8 ± 4.2 ng/ml と正常より高値を示し, これは体外循環中さらに上昇傾向を示し, 体外循環120分で 18.7 ± 14.4 ng/ml に達し, 凝固系の活性化が示唆された. そして protamine による heparin 中和後に 41.0 ± 20.4 ng/ml と最高値に達し, 以後徐々に低下した. 一方, FPBβ15-42 も FPA と同様の傾向を示し, 前値 6.7 ± 0.9 ng/ml に対し, 体外循環中徐々に上昇し, 120分で 37.4 ± 10.0 ng/ml と前値の約5倍に達し, 以後徐々に低下した.

3) 表2左に kaolin 活性化 euglobulin の線溶活性より求めた内因系線溶残存能を plasmin による casein unit (cu/ml) に換算して示す. これは術前 0.20 ± 0.09 (cu/ml) に対し, 体外循環開始直後に 0.08 ± 0.03 (cu/ml) と最も強く活性化

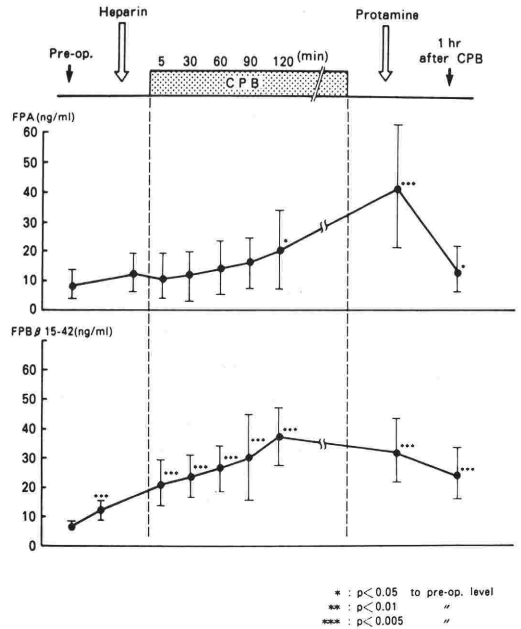


図2 体外循環前・中・後における FPA および FPBβ15-42 の変化

消費され, その後徐々に前値へ回復した. 表2右に Cl-INA resistant fibrinolytic activity より求めた線溶活性の経時的变化を UK 活性 (international unit; iu/ml) を用いて示す. これは前値 0.30 ± 0.14 (iu/ml) に対し, 体外循環開始後急激に上昇し, 体外循環30~60分で 7.21 ± 3.53 (iu/ml) と最高値に達した後減少し, 体外循環終了1時間以内で前値に回復した. 図3は上記の fibrin 平板法より得られた成績を, それぞれ前値

表2 体外循環前・中・後における線溶活性の成績

	Fibrinolytic activity of kaolin-activated euglobulin (cu as plasmin)	Cl-INA resistant fibrinolytic activity of euglobulin (iu as UK)
Pre-op.	0.20 ± 0.09	0.30 ± 0.14
Post-Heparin	0.16 ± 0.07	$0.47 \pm 0.21^*$
During CPB		
5 min	$0.08 \pm 0.03^{**}$	$0.83 \pm 0.45^{**}$
30 min	$0.12 \pm 0.04^*$	$6.79 \pm 5.10^{**}$
60 min	$0.13 \pm 0.06^*$	$7.21 \pm 3.53^{**}$
90 min	0.14 ± 0.05	$2.54 \pm 1.76^{**}$
120 min	0.15 ± 0.06	$2.22 \pm 0.94^{**}$
5 min after CPB	0.15 ± 0.05	$1.22 \pm 0.70^{**}$
Post Protamine	0.15 ± 0.05	$0.49 \pm 0.25^*$
1 hr after CPB	0.18 ± 0.05	0.26 ± 0.20

*p<0.05, **p<0.002 to pre-op. level

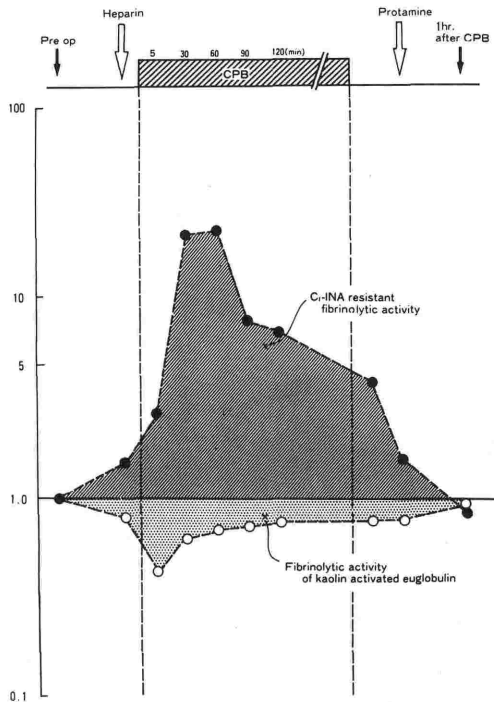


図3 体外循環前・中・後における線溶活性の消長 (内因系, 外因系ともに前値を1とし, その変化を片対数グラフに示す.)

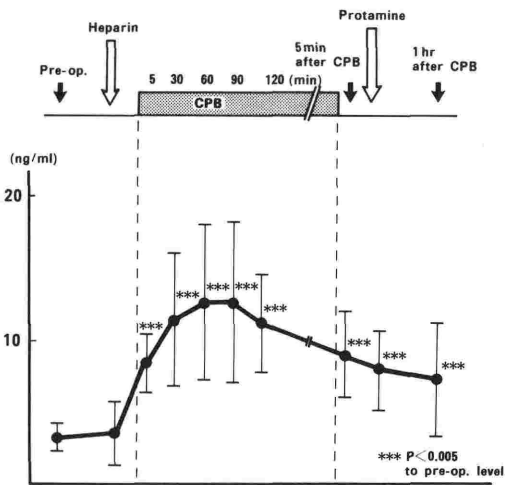


図4 体外循環前・中・後における t-PA:Ag の変化

を1として片対数グラフに表わしたものである。点で示した面積が内因系線溶活性を示し, 斜線で示した面積が外因系線溶活性を示し, 体外循環開始直後の一過性的内因系線溶活性化にひきつづいて, その後は主に外因系線溶が活性化されること

を表わしている。

4) 図4に t-PA:Ag 濃度の経時的变化を示す。これは Cl-INA resistant fibrinolytic activity と同様の傾向を示し, 前値 3.2 ± 1.1 (ng/ml) に対し, 体外循環開始直後から上昇しはじめ, 60分で 12.7 ± 4.4 (ng/ml) と前値の4倍に達し, その後徐々に低下した。

考案

一般に外科的侵襲に伴う “hyperadrenergic state” では血液凝固能は亢進するとされているが⁵⁾, 開心術においては体外循環に伴う種々の特殊な状況がさらに凝固系を著しく活性化すると考えられる。第一に胸骨切開時に凝固系の亢進がおこるといふ報告があるが, これは骨髓液が thromboplastin 様活性を有するためと説明されている⁶⁾。第2には体外循環回路内面と血液との接触による内因系凝固カスケードの進行である⁷⁾。そして, これに関連して第3には体外循環時の血液希釈に伴う ATIII 濃度の低下が挙げられる。これらのなかでも体外循環回路と血液の接触による凝固カスケードの活性化が最大の要因である事は論を待たない。

一般に, 循環血液が異物表面に接触すると第 XII 因子 (FXII), high molecular weight kininogen (HMWK), prekallikrein (PK) といった接触系因子が活性化され, FXIIa は FXI を活性化し, 次々に凝固因子が活性化され, thrombin 生成へ至る内因系凝固カスケードが進行する⁷⁾。一方, FXIIa は循環血液中の plasminogen に作用し, これを plasmin へ転換する事により内因系線溶をも同時に活性化する⁸⁾。

従来, 体外循環下開心術において臨床的に用いられてきた唯一の抗凝血薬は heparin であるが, その作用機序には未だ不明な点も多く残されている。現在市販されている heparin は純粋な化合物ではなく, 牛の肺あるいは豚の腸粘膜からの抽出物で, 分子量6,000から30,000の酸性ムコ多糖類である。heparin の抗凝血薬としての作用は, ATIII の lysine 残基へ結合して ATIII の構造を変化させ, thrombin, FXa, FIXa, FXIa, FXIIa などの serine protease 型凝固因子への即時的な結合を促進する事によるとされている。heparin は体外循環を施行する上で必須の抗凝血薬である

が、その分子量や分子構造の不均一性からも予測されるように、実際に ATIII と結合して活性型 heparin として作用するのは約1/3に過ぎないと言われている⁹⁾。さらに血中 ATIII 濃度が正常の60%以下に低下すると、heparin はその有効性を十分発揮できないとする報告も見られる¹⁰⁾。

現在臨床では、1975年 Bull らにより発表された activated clotting time (ACT) を用いた heparin 投与量のコントロールが一般に行なわれている¹¹⁾。しかし、この方法も、ACT が300秒以上ならば、肉眼的に回路や術野に凝血塊を認めないという経験のみに基づくもので、特に低体温時における ACT の信頼性については問題がある¹²⁾。Davies らは、開心術患者において FPA の上昇を認め、体外循環中は heparin の使用にもかかわらず thrombin 活性は持続していると結論している¹³⁾。Young らは開心術患者で ACT 400 秒以下では fibrin monomer が形成されている事を示し、凝固系の活性化を証明している¹⁴⁾。また Stratta らは heparin は主として凝固カスケードの最終段階に作用し、接触による FXII 活性化の段階には作用しない事を認めている²⁾¹⁵⁾。今回の検索においても、体外循環の進行と共に、ATIII

が低下し、FPA が徐々に上昇した事は、heparin の使用にもかかわらず、凝固系の活性化は完全には阻止されず、thrombin 生成がおこっており、さらに thrombin は heparin-ATIII complex によっても完全に中和されずに、fibrin 形成が微小循環においてはおこっている事を示唆するものと考えられる。

一方、線溶系は体外循環により亢進し、これが、開心術中、術後の出血に関する合併症の一因となると考えられてきた²⁾⁶⁾。しかし、線溶系亢進に至るメカニズムについては明らかにされていない。本研究では、kaolin 活性化 euglobulin による線溶活性残存能は体外循環開始直後に一過性に低下した。この事は内因系線溶の活性化が主にこの時期に限られる事を示している。一方、Cl-INA resistant fibrinolytic activity や t-PA;Ag は体外循環開始後徐々に、そして5分目頃から急速に上昇し、体外循環開始60分後に最高に達した。これは体外循環中の線溶活性の亢進は、主に血管内皮より放出される t-PA によってひきおこされる外因系線溶が主体をなす事を示すものと考えられる¹⁶⁾。一般に t-PA 放出を刺激する因子として血管に対する理学的刺激、神経内分泌性の刺激、

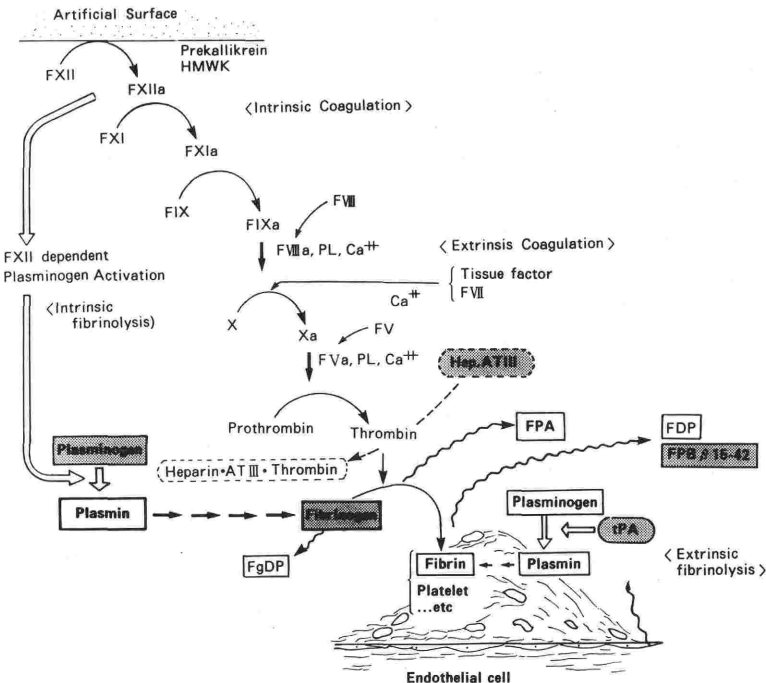


図5 体外循環中の凝固線溶系の活性化機序

catecholamine 等の血管作働性物質, protein C¹⁷⁾, fibrin¹⁸⁾, heparin¹⁹⁾ などが挙げられている。

しかし体外循環中の t-PA 放出の機序に上記のいずれがどのように関与しているかは今後の検討を要する問題である。

まとめ

1. 体外循環中, ATIII 活性が低下し, FPA が徐々に上昇した。また FPB β 15-42 も FPA と類似の変動を示した。この成績は体外循環においては heparin の使用にもかかわらず, 凝固機転が発現しており, 微小循環においては fibrin の形成がおこり, 一方ではこれを溶解すべく, 線溶活性も発現しているものと推察される。

2. この線溶活性化機序に関しては, 体外循環開始直後では blood-material interaction による一過性の内因系接触系因子の活性化にともなう内因系線溶活性がおこり, その後は主に血管内皮より放出される t-PA による外因系線溶が主体となるものと考えられる。

なお本論文の要旨は, 第11回国際血栓止血学会議 (ブラッセル, 1987年7月), および国際心臓血管麻酔学シンポジウム (神戸, 1987年8月) にて発表した。

参考文献

- 1) Andrade, J. D.: Blood-materials interactions—20 years of frustrations (Panel Conference). *Trans Am Soc Artif Intern Organs*. 27:659-662, 1981.
- 2) Stratta, P., Canavese, C., Costa, P., Martini, C., Festa, T., Bulla, A. and Vercellone, A.: Biological stress induced by extracorporeal circulation: Comparison between cardiopulmonary bypass, hemodialysis and plasma exchange. *Trans Am Soc Artif Intern Organs*. 30:502-507, 1984.
- 3) Cohen, J. A.: Activated coagulation time method for control of heparin is reliable during cardiopulmonary bypass. *Anesthesiology*. 60:121-124, 1984.
- 4) Mabry, C. D., Read, R. C., Thompson, B. W., Williams, G. D. and White, H. J.: Identification of heparin resistance during cardiac and vascular surgery. *Arch Surg*. 114:129-134, 1979.
- 5) Hume, D. M.: Endocrine and metabolic receptor to injury. in Schwartz SI et al. (eds), *Principles of Surgery*, p. 29. McGraw-Hill Book Company, New York, 1974.
- 6) Millam, J. D., Austin, S. F., Martin, R. F., Keats, A. S. and Cooley, D. A.: Alteration of coagulation and selected clinical chemistry parameters in patients undergoing open heart surgery without transfusions. *Am J Clin Pathol*. 76:155-162, 1981.
- 7) Griffin, J. H.: Role of surface in surface-dependent activation of Hageman factor (blood coagulation Factor XII). *Proc Natl Acad Sci USA*. 75:1998-2002, 1978.
- 8) Verstraete, M. and Vermeylen, J.: Cellular, chemical and rheological factors in thrombosis and fibrinolysis. In *Thrombosis*. Pergamon press, Oxford, England, p. 40, 1984.
- 9) Glass, D. D.: Management of blood and coagulation. In Kaplan, J. A.: *Cardiac Anesthesia vol. 2 Cardiovascular Pharmacology*. Grune and Stratton, New York, p. 444, 1983.
- 10) 青木延雄, 吉田信彦, 山中恒夫: アンチトロンビン III濃縮分画による DIC の治療. *医学のあゆみ* 109:970-975, 1979.
- 11) Bull, M. H., Huse, E. M. and Bull, B. S.: Evaluation of tests used to monitor heparin therapy during extracorporeal circulation. *Anesthesia* 43:346-353, 1975.
- 12) Culliford, A. T., Gitel, S. N., Starr, N., Thomas, S. T., Baumann, F. G., Wessler, S. and Spencer, F. G.: Lack of correlation between activated clotting time and plasma heparin during cardiopulmonary bypass. *Ann Surg*. 193:105-111, 1981.
- 13) Davies, G. C., Sobel, M. and Salzman, E. W.: Elevated plasma fibrinopeptide A and thromboxane B2 levels during cardiopulmonary bypass. *Circulation* 61:808-814, 1980.
- 14) Young, J. A., Kisker, C. T. and Doty, D. B.: Adequate anticoagulation during cardiopulmonary bypass determined by activated clotting time and the appearance of the fibrin monomer. *Ann Thorac Surg*. 26:231-240, 1978.
- 15) Stratta, P., Canavese, C., Mangiarotti, G., Pacitti, A., Tetta, C., Coppo, R., Ragni, R. and Vercellone, A.: Heparin is unable to prevent activation by three different membranes. *Proc Eur Dial Transplant Assoc* 18:269-274, 1981.
- 16) Lijnen, H. R. and Collen, D.: Interaction of plasminogen activators and inhibitors with plasminogen and fibrin. *Seminars in thrombosis and hemostasis* 8:2-10, 1982.
- 17) Stibbe, J., Kluff, C., Brommer, E. J. P., Gomes, M., Jong, D. S. D. and Natura, J.: Enhanced fibrinolytic activity during cardiopulmonary bypass in open-heart surgery in man is caused by extrinsic (tissue-type) plasminogen activator. *Eur J Clin Invest* 14:375-382, 1984.
- 18) Kaplan, K. L., Mather, T., DeMarco, L. and Solomon, S.: Fibrin stimulation of endothelial cell production of PGI₂ and tissue plasminogen activator. *Thromb Haemost (abstracts)* 58:524, 1987.
- 19) Agnelli, G., Borm, J., Cosmi, I., Levi, I. and Cate, J. W.: Effects of standard heparin and a low molecular weight heparin (KABI2165) on plasma level of t-PA and PA inhibitor. *Thromb Haemost (abstracts)* 58:17, 1987.

Alteration in Coagulation and Fibrinolysis Associated with Cardiopulmonary Bypass in Open Heart Surgery

Kuniyoshi Tanaka, Michihiro Nasu, Isao Yada,
Hiroshi Yuasa, Minoru Kusagawa and Katsumi Deguchi*

Department of Thoracic Surgery and *2nd department of Internal Medicine,
School of Medicine, Mie University, Tsu, Mie, Japan

The effect of heparin as an anticoagulant was examined and the nature of the fibrinolytic activity during CPB was clarified. Twenty patients undergoing valve replacement or aortocoronary bypass surgery were studied. FPA level were elevated gradually as the bypass proceeded, and ATIII decreased during CPB. This indicates that despite the use of heparin the coagulation system is activated, leading to fibrin formation in the microcirculation. On the other hand, FPB β 15-42 also increased to four times of the preoperative level at 2 hours of CPB. The intrinsic fibrinolytic activity determined by the activity of kaolin activated euglobulin was transiently activated only at the

beginning of CPB. The Cl-inactivator resistant fibrinolytic activity and t-PA increased sharply during CPB and reached their maximum levels 1 hr after the start of CPB. This indicates that enhanced fibrinolytic activity during CPB is predominantly of extrinsic origin caused by t-PA released from vascular wall.

It is concluded from the above findings that thrombin activity continues during CPB and that enhanced fibrinolytic activity is essential because t-PA activates plasminogen predominantly where fibrin is formed, resulting in the dissolution of the microthrombi formed during CPB.

Key words; Cardiopulmonary bypass, fibrinopeptide A, Fibrinopeptide B β 15-42, Cl-INA resistant fibrinolytic activity, tissue plasminogen activator