

新しいヘパリン化処理法を応用した
新生児用ECMOシステムに関する実験的検討

北野良博

新しいヘパリン化処理法を応用した新生児用ECMOシステム
に関する実験的検討

北野良博

目次

	頁
【研究の背景】	...1
【実験材料と方法】	...4
ヘパリン化処理法	...4
ECMOシステムの構成	...4
実験（1）水溶液系での基礎評価	...5
1-A) ヘパリン活性持続性の検討	...5
1-B) ヘパリン化処理が人工肺ガス交換能に及ぼす影響の検討	...5
1-C) ヘパリン化処理が血漿漏出に及ぼす影響の検討	...6
実験（2）動物実験による評価	...6
ECMO施行法	...6
血液学的検査方法	...7
2-A) 低流量域におけるヘパリン減量の安全限界に関する検討	...8
2-B) 低流量域における本システムの抗血栓性の評価	...9
【結果】	...10
実験（1）水溶液系での基礎評価	...10
1-A) ヘパリン活性持続性の検討	...10
1-B) ヘパリン化処理が人工肺ガス交換能に及ぼす影響の検討	...10
1-C) ヘパリン化処理が血漿漏出に及ぼす影響の検討	...10
実験（2）動物実験による評価	...11
2-A) 低流量域におけるヘパリン減量の安全限界に関する検討	...11
2-B) 低流量域における本システムの抗血栓性の評価	...11
【考察】	...14
【結語】	...19
【引用文献】	...20
【図表】	...27
謝辞	...50

【研究の背景】

ECMOは extracorporeal membrane oxygenationの略で、膜型人工肺を用いた長期部分体外循環の総称である。ガス交換を行う人工肺と血液ポンプから構成される点は開心術時の cardiopulmonary bypass (CPB)と同じであるが、CPBが比較的短時間の完全体外循環であるのに対し、ECMOは部分体外循環を前提とした長期間の心肺バイパスである点が異なる。ECMOによる最初の救命例は成人型呼吸窮迫症候群

(ARDS) の成人例である¹⁾が、その後の米国 National Heart, Lung, and Blood Institute を中心とした多施設共同研究の結果、その有効性が従来の人工呼吸管理と変わらないと報告²⁾されてから成人領域では一時注目されなくなった。一方、新生児領域では1975年に Bartlett 等が最初の救命例を発表³⁾して以来着実な成果を上げ、現在では人工呼吸管理で救命できない新生児重症呼吸循環不全(先天性横隔膜ヘルニア、敗血症、胎便吸引症候群、新生児呼吸窮迫症候群、新生児遷延性肺高血圧症など)の究極の治療法として定着している。日本でも1987年に長屋等が最初の救命例を報告⁴⁾して以来、各施設で行われるようになった。最近では機械的人工呼吸による肺損傷に対する反省から、ARDSや重症肺炎の小児・成人例への適応について再検討が進んでいる⁵⁻⁹⁾。

ECMOの最大の合併症は全身投与されるヘパリンなどの抗凝固療法に伴う出血傾向であり、頭蓋内出血・消化管出血・創出血などの出血性合併症の発生率は20-50%にのぼる¹⁰⁻¹⁴⁾。頭蓋内出血は新生児症例において高頻度に発症し、しかも非常に重篤な結果を招く合併症である。その合併率は初期の報告では52%¹¹⁾、現在でも15%と高く¹⁵⁾、未熟児に特に高率にみられるので、未熟児がECMOの適応から除外される根拠の一つとなっている¹⁶⁾。また外傷や手術直後にECMOを運転する場合やECMO中に手術が必要となった場合には、創部からの出血に難渋し、しばしば致命的となる^{9,17)}。

このような問題点を克服するため、回路・人工肺の血液接触面にヘパリンを固定し、全身投与するヘパリン量を減らす試みが古くからある¹⁸⁻²²⁾が、抗血栓性とその安定度に問題があり、一般化されるには至らなかつ

た。1983年にLarmらが発表した共有結合法によるヘパリンコーティング法²³⁾は動物実験でその効果が確認され^{24, 25)}、欧州を中心に臨床応用された。

しかし、現存するヘパリン化処理人工肺は需要の多い開心術時のCPBを念頭に開発されており、低流量で長時間に及ぶ新生児のECMOで使用するにあたっては次のような問題点がある。

1) 人工肺に多孔質中空糸膜を使用しているので血漿漏出が起こりやすく、長期間使用すると人工肺の交換が必要になる^{9, 14, 26-28)}。人工肺の交換は血行動態の急激な変化、血小板の消費、輸血量の増加を伴うので可及的に避けるべきである。Rossaintらの13例の報告では、延べ227日のECMO期間中に113個の人工肺が必要であり、人工肺の平均寿命は62時間であった⁹⁾。血漿漏出のないシリコン膜人工肺へのヘパリン化処理は、現在のところ技術上の問題から実現していない^{29, 30)}。

2) ほとんどの報告が1l/min以上の高流量域での検討で、新生児ECMOで使用するような低流量域(200-500ml/min)での抗血栓性の評価がほとんどされておらず、その結果は必ずしも良好ではない³¹⁻³³⁾。

一方、1990年に国内で開発された人工肺は、中空糸素材として膜の小孔が厚さ約0.5 μ mの緻密層で覆われた2層構造ポリオレフィン膜を採用し、血漿漏出とそれに伴うガス交換能の低下を防ぐことに成功した^{34, 35)}。この人工肺は、ガス交換能に優れ、膜面積の縮小が可能であること、血液と気体の接触がなく溶血が少ないこと等の利点もあり、その後国内で広く使用されるようになった。

ECMOで使用する場合、ヘパリン化処理法も長期間安定な共有結合法によるものが望ましいと考えられる。今回ヘパリンの固定に必要なすべての結合を共有結合にすることによって、より長期間の抗血栓性が期待できる新しいヘパリン化処理法が開発された。

われわれはこのヘパリン化処理法を、前述の耐久性に優れた人工肺と回路に適用することによって理想的なECMOシステムが可能になるのではないかと考え、試作システムを作成した。

本研究では水溶液系と動物実験に分けてこのシステムを評価した。水溶液系ではヘパリン化処理した中空糸と回路の一部をイオン強度の異なる水溶液中で4日間振盪し、ヘパリン活性の持続性について検討した。

また、ヘパリン化処理が人工肺のガス交換能と血漿漏出に及ぼす影響の有無をそれぞれ検討した。動物実験ではビーグル犬を用いて実際にECMOを施行し、低流量域においてヘパリンをどこまで減量することが可能かを検討した。さらに少量のヘパリン併用下において本システムの抗血栓性を検証し、ヘパリン未処理システムと比較した。

本論文は、人工肺のヘパリン化処理が人工肺のガス交換能と血漿漏出に及ぼす影響の有無をそれぞれ検討した。動物実験ではビーグル犬を用いて実際にECMOを施行し、低流量域においてヘパリンをどこまで減量することが可能かを検討した。さらに少量のヘパリン併用下において本システムの抗血栓性を検証し、ヘパリン未処理システムと比較した。

本論文は、人工肺のヘパリン化処理が人工肺のガス交換能と血漿漏出に及ぼす影響の有無をそれぞれ検討した。動物実験ではビーグル犬を用いて実際にECMOを施行し、低流量域においてヘパリンをどこまで減量することが可能かを検討した。さらに少量のヘパリン併用下において本システムの抗血栓性を検証し、ヘパリン未処理システムと比較した。

なお、以上の結果は、以下の論文で発表された。

人工肺システムの開発

本論文は、人工肺のヘパリン化処理が人工肺のガス交換能と血漿漏出に及ぼす影響の有無をそれぞれ検討した。動物実験ではビーグル犬を用いて実際にECMOを施行し、低流量域においてヘパリンをどこまで減量することが可能かを検討した。さらに少量のヘパリン併用下において本システムの抗血栓性を検証し、ヘパリン未処理システムと比較した。

【実験材料と方法】

ヘパリン化処理法

基材へのヘパリン固定法の模式図を図1に示す。基材表面に過マンガン酸カリウムを含む硫酸水溶液により酸化処理を行い、水酸基を導入する。次に酸性条件下で加水分解した3-グリシドキシプロピルトリメトキシシラン (GPS) 水溶液と接触させて水酸基とシリル基を共有結合させる。さらにポリエチレンイミン (PEI) 水溶液と接触させ、塩基性条件下でGPSのエポキシ基とPEIのアミノ基を共有結合させる。最後にアルデヒド基を導入したヘパリン (ヘパリンナトリウム、ミドリ十字) とPEIのアミノ基を結合させ、生成したイミン結合を還元する。ヘパリンのアルデヒド基の導入は、過ヨウ素酸ナトリウムを用いてヘパリンのヘキソース構造部分に行い、透析処理により精製する。

本法はヘパリンの固定に必要なすべての結合を共有結合にすることによってヘパリンの徐放を防止し、かつ高分子スパーサーであるPEIを基材とヘパリンの間に入れてヘパリン分子の自由度を保持するという特徴を有する。

なお、以上の処理はクラレメディカル研究開発室にて行った。

ECMOシステムの構成

検討の対象としたECMOシステム (以下、本システム) の人工肺は緻密膜を有する外部灌流型膜型人工肺 (MENOX-EL-2000、膜面積 0.4m^2 、充填量45ml、クラレ) を、ポンプはローラーポンプ (KM-7800-P、クラレ) を使用した。回路は内径6mmのポリ塩化ビニル製、コネクターはポリカーボネート製 (いずれもクラレ) のものをそれぞれ使用した。脱送血カニューレにはポリウレタン製の thin wall cannula (脱血側 SC-14Fr、送血側 SA-8Fr、クラレ) を使い、人工肺を含むすべての血液接触面に上記方法でヘパリン化処理を行った。人工肺を含む回路の充填量は約70 mlであった。回路の構成を図2に示す。

1. 実験(1) 水溶液系での基礎評価

1-A) ヘパリン活性持続性の検討

ヘパリン化処理を行った人工肺中空糸膜サンプル(ポリオレフィン製、 $n=13$)と回路サンプル(ポリ塩化ビニル製、 $n=5$)をイオン強度の異なる3種の水溶液(生理食塩水、リンゲル液、1M NaCl水溶液)各80ml中に浸漬し、40°Cで4日間振盪した。イオン強度の高い1M NaCl水溶液中では、イオン結合で付着しているヘパリン分子は除去され、共有結合されたヘパリンの活性のみが測定できる。振盪前後のヘパリン活性を比較し、その保持率を求めた。ヘパリン活性は抗Xa活性で測定した(テストチームヘパリンS、第一化学薬品)。

結果は平均±標準誤差で表示した。統計学的検討は、Paired t-testを用いて行い、危険率 <0.05 をもって有意差ありと判定した。

1-B) ヘパリン化処理が人工肺ガス交換能に及ぼす影響の検討

ヘパリン化処理人工肺のガス交換能(酸素運搬能、炭酸ガス除去能)を牛血を用いた閉鎖回路で測定し、ヘパリン未処理肺と比較した。以下の条件に調節したACD添加牛血を人工肺に送り、流量1.5、2.0、2.5 l/minで人工肺の入口側、出口側で血液ガス分析を行った。人工肺に吹送するガスは100% O_2 、 $V/Q=1.0$ とした。人工肺に流入する血液の条件は、人工肺出口とリザーバー間に置いた気泡型人工肺(パイオ10プラス、Bentley社)に吹送する N_2/CO_2 ガス流量を変えて調節した。各条件で4-12セットのサンプリングを行い、人工肺ガス交換能を以下の式で算出した。

人工肺に流入する血液の条件

- (1) 酸素飽和度: $65 \pm 5\%$
- (2) ヘモグロビン濃度: 12 ± 0.5 g/dl
- (3) base excess: 0 ± 2 mEq/l
- (4) PCO_2 : 45 ± 5 mmHg
- (5) 温度: 37 ± 1 °C

- *酸素運搬能 (ml/min) = 流量 (ml/min) × (送血側酸素含量 (Vol%) - 脱血側酸素含量 (Vol%)) × 0.01
- *酸素含量 (Vol%) = $1.39 \times \text{酸素飽和度} (\%) \times 0.01 \times \text{ヘモグロビン量} (\text{g/dl}) + 0.003 \times \text{PaO}_2 (\text{mmHg})$
- *炭酸ガス除去能 (ml/min) = $22.26 \times (\text{脱血側二酸化炭素含量} (\text{mmol/l}) - \text{送血側二酸化炭素含量} (\text{mmol/l})) \times 0.001 \times \text{流量} (\text{ml/min})$

結果は平均±標準誤差で示した。統計学的検討は、Unpaired t-testを用いて行い、危険率<0.05をもって有意差ありと判定した。

1-C) ヘパリン化処理が血漿漏出に及ぼす影響の検討

ACD液と抗生剤（ペントシリン、富山製薬）を添加した牛全血より分離した血漿を用い、流量1000 ml/min、V/Q=1.0の条件で、ヘパリン化処理人工肺を閉鎖回路で1週間連続灌流した。吹送ガスは空気とした。人工肺より出てくるガスを碎水中に誘導し、結露した液体の総蛋白濃度とアルブミン濃度を測定した。総蛋白濃度はヒロガロールレッド法（マイクロTPテストワコー、和光純薬、検出限界30mg/dl）で、アルブミン濃度はゲル濾過クロマトグラフィー法（TSK-GPC G3000SW、東ソー、分析限界5 ppm）でそれぞれ測定した。

実験（2）動物実験による評価

以下の動物実験は国立小児病院小児医療研究センターの動物実験指針に基づいて行った。

ECMO施行法

末梢静脈ラインよりペントバルビタール（ネンプタール、大日本製薬）25mg/kgを静注後気管内挿管を行い、人工呼吸器（Humming V、メトラン）による調節呼吸を行った。換気条件は $F_{I}O_2$ 0.21、最高気道内圧12cmH₂O、最低気道内圧3 cmH₂O、呼吸回数10-20回/分、PaO₂とPaCO₂が生理的範囲内になるように設定した。ただし、人工肺ガス交換能の測定30分前には呼吸回数を5回/分とした。麻酔はペントバルビタールとバンクロニウムプロマイド（ミオブロック、三共）を適宜追加投与して維持した。右大腿動脈に留置した18Gのプラスチック留置針

にて動脈圧を視血的にモニター（血圧用増幅ユニット2238、日本電気三栄）し、動脈圧波形をタコメーター（Model1321、日本電気三栄）にてカウントして心拍数を測定した。左外頸静脈より右房に挿入した10 Frのカテーテルを輸液ルートならびに採血ルートとした。血液検査に影響を及ぼす可能性があるため輸血は行わず、アセテートリンゲル液（Veen-D、日研化学）を5 ml/kg/hrで投与した。実験中は、ヒーターと温水パッドを用いて直腸温を36-38度に調節した。

回路は加温ヘパリン化生食（1 mg/100ml）にて充填し、ヘパリン1 mg/kgを静注後、脱血カニューレを右外頸静脈より右房に、送血カニューレを内頸動脈より大動脈弓にそれぞれ留置し、流量300 ml/minでV-A ECMOを10時間運転した。人工肺には100%酸素ガスを流量1 l/minで吹送した。運転開始後は、ACTを想定した値に維持するように、人工肺手前の三方活栓より100倍稀釈ヘパリン液を持続投与した。ACTの測定にはACTester（Tri-Med、採血量0.6ml）を使用した。

ECMO終了後、回路内を生理食塩水1500 mlを用いて約50cmH₂Oの静水圧で洗浄し、2%グルタルアルデヒド-5%蔗糖リン酸緩衝液により内面を固定、血栓形成の部位とその程度を肉眼および走査型電子顕微鏡にて観察した。肉眼的血栓形成の程度は、以下の3段階に分類した。それぞれの例を図3（a-c）に示す。

- 1 群：臨床のECMO終了時に観察される程度の微小血栓
- 2 群：1 群と3 群の間
- 3 群：人工肺または回路内腔全体に及ぶ大量の血栓

血液学的検査方法

血小板数は、EDTA 2 K入り試験管に採血し、自動測定装置（E-3000、NE-7000、東亜医用電子）にて測定した。ヘパリン、プロトロンビン時間（PT）、活性化部分トロンボプラスチン時間（APTT）、フィブリノーゲン、アンチトロンビンIII（ATIII）、トロンビン-ATIII複合体（TAT）、プラスミン- α 2プラスミンインヒビター複合体（PIC）の採血には3.8%クエン酸ナトリウム0.2 mlの入った真空試験管を使用した。採血後3000 rpmで15分間遠心して血漿を分離し、-80℃にて保存

しておき後日まとめて測定した。ヘパリンの測定には発色合成基質法（テストチームヘパリンS、第一化学薬品）を使用した。PT、APTT、フィブリノーゲンの測定には全自動血液凝固測定装置（CA-5000、東亜医用電子）を使用した。ATIIIは合成基質法（テストチームATIIIオート、第一化学薬品）により測定した。TATの測定にはウサギ抗ヒトロンビン抗体を用いたEIA法（Enzygnost-TAT、ヘキストジャパン）を使用した。PICの測定にはウサギ抗ヒトプラスミノゲン抗体とマウス抗ヒト α 2プラスミンインヒビターモノクローナル抗体を用いたEIA法（PICテスト、帝人）を使用した。血漿遊離ヘモグロビンはヘパリン入り採血管にて血漿を分離し、後日まとめて比色法にて測定した。Fibrinopeptide A (FPA) とFibrinopeptide B β 15-42 (FPB β 15-42) の測定にはヘパリン 50 IU/ml、トラジロール10000 kIU/mlのインヒビターが0.4 ml入った試験管に1.6 ml採血し、3000 rpmで15分間遠心して分離した血漿を、-80℃にて保存しておき後日まとめて測定した。FPAはウサギ抗ヒトFPA抗体を用いたEIA法（アセラクロムFPA、ベーリンガー・マンハイム山之内）で、FPB β 15-42はウサギ抗ヒトFPB β 15-42抗体を用いたRIA法（FPB β 15-42キット、IMCO）でそれぞれ測定した。FDPの測定はアプロチニン250 KIEとトロンビン5 NIHの入った専用試験管に採血し、ラテックス凝集法（コアグリルFDP、日本ロシュ）で測定した。

なお、以上の血液学的検査はBML社（東京）に依頼した。

2-A) 低流量域におけるヘパリン減量の安全限界に関する検討

低流量域でヘパリンの減量がどこまで可能かを探る目的で、7頭のビーグル犬を対象として実験を行った。種々の量のヘパリン投与下に8時間のECMOを施行し、血栓形成の程度を観察、比較した。ACTは1時間毎に測定し、麻酔導入直後（Control）、血管の露出操作終了後ECMO開始直前（pre hep.）、ECMO開始1、2時間後、以後2時間毎に血小板数、FPA、TAT、FDP、FPB β 15-42、PICを測定した。なお、初期の3頭には本システムに比較して充填量の多い大型の回路を使用した。

2-B) 低流量域における本システムの抗血栓性の評価

ビーグル犬5頭を対象に、本システムを使用して流量300 ml/minでECMOを10時間施行した。ECMO中はACTを130秒前後に維持する目的で人工肺手前よりヘパリンを持続投与した。

ACTは1時間毎に測定し、麻酔導入直後 (Control)、血管の露出操作終了後ECMO開始直前 (pre hep.)、ECMO開始1、2時間後、以後2時間毎に血小板数、ヘパリン濃度、プロトロンビン時間 (PT)、活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT)、血漿遊離ヘモグロビン、アンチトロンビンIII (ATIII)、フィブリノーゲン、Fibrinopeptide A (FPA)、トロンビン-ATIII複合体 (TAT)、FDP、Fibrinopeptide B β 15-42 (FPB β 15-42)、プラスミン- α 2プラスミンインヒビター複合体 (PIC) を測定した。

運転開始30分後、5時間後、10時間後に人工呼吸の換気回数を5回にして、人工肺の前後で採血し、人工肺のガス交換能 (酸素運搬能、炭酸ガス除去能) を測定した。計算法は実験 (1-B) の計算式で行った。また、ECMO終了後に右腎と脳を摘出し、血栓の有無を組織学的に検討した。

血液検査の結果は平均±標準誤差で表示した。統計学的検討は、one-way analysis of variance (ANOVA) for repeated measures と Scheffe's testを用いて行い、ヘパリン静注直前 (pre hep.) の値との有意差を危険率 <0.05 をもって判定した。

さらにヘパリン化処理の有用性を判定する目的で、対照として別の2頭にヘパリン未処理の人工肺・回路を使用してほぼ同条件で8-10時間のECMOを施行し、血栓形成の程度を先の5頭と比較した。

【結果】

実験 (1) 水溶液系での基礎評価

1-A) ヘパリン活性持続性の検討

抗Xa活性の初期値は中空糸サンプルが 9.7 ± 0.6 mIU/cm²、回路サンプルが 39 ± 2.7 mIU/cm²で、中空糸表面よりも回路表面で活性が高かった。初期値を100%としたときの各水溶液中でのヘパリン活性保持率を表1に示す。本処理法で固定したヘパリンの抗Xa活性は、血漿よりイオン強度の高い条件下でも中空糸表面で90%以上、回路表面でも75%以上保持されていた。

1-B) ヘパリン化処理が人工肺ガス交換能に及ぼす影響の検討

結果をクラレのカタログ値とともに図4に示す。ヘパリン化処理人工肺の酸素添加能は流量1.5 l/minで 91 ± 0.8 ml/min、流量2.0 l/minで 113 ± 1.1 ml/min、流量2.5 l/minで 135 ± 1.3 ml/minであり、未処理肺では流量1.5 l/minで 84 ± 2.4 ml/min、流量2.0 l/minで 98 ± 2.6 ml/min、流量2.5 l/minで 115 ± 3.2 ml/minであった。流量2.0 l/minと2.5 l/minにおいてヘパリン化処理人工肺の酸素添加能がむしろ有意に良好であった。炭酸ガス除去能はヘパリン化処理人工肺では流量1.5 l/minで 44 ± 3.1 ml/min、流量2.0 l/minで 56 ± 8.4 ml/min、流量2.5 l/minで 58 ± 8.6 ml/minであり、未処理肺では流量1.5 l/minで 49 ± 4.7 ml/min、流量2.0 l/minで 46 ± 7.6 ml/min、流量2.5 l/minで 61 ± 8.1 ml/minであった。両者間に有意差は認めなかった。

1-C) ヘパリン化処理が血漿漏出に及ぼす影響の検討

1週間て人工肺ガス側から得られた液体は約5 mlで、総蛋白、アルブミン濃度はいずれも検出限界以下であった。即ち、本人工肺の血漿漏出を認めないという長所は、ヘパリン化処理後も損なわれなかった。

実験 (2) 動物実験による評価

2-A) 低流量域におけるヘパリン減量の安全限界に関する検討

結果を表2に示す。低流量域では本システムを使用しても完全にヘパリン投与を中止することは血栓形成の危険が大きいことが明らかとなった。即ち、現段階ではヘパリンの少量持続投与が必要で、ACTにして120-130秒が安全下限であると思われた。また、凝固線溶系のマーカーとして測定したFPA、TAT、FDP、FPB β 15-42、PICはいずれも肉眼的血栓形成の程度に応じて上昇しており、イヌにおいてもその有用性が示唆された。

2-B) 低流量域における本システムの抗血栓性の評価

結果を表3と表4に示す。全例10時間の運転が可能で(ただしNo. 7だけは8時間)、人工肺の血漿漏出は認めなかった。手術創からの出血傾向も認めなかった。

1. システム内血栓形成状況

本システムを使用した5頭においても、人工肺入口側のハウジング部の周辺、中空糸固定用の縦糸付近に、回路内で生じた血栓が飛散したと思われるわずかな赤色血栓を認めた(図5-a)。また、段差を伴う回路接合部に小血栓を認めた(図5-b)。しかし全例1群に相当する軽微なもので、人工肺の内部および出口部には血栓の付着は認めなかった。

2. 走査型電子顕微鏡写真所見

ヘパリン処理人工肺内部の中空糸表面には、血球及びフィブリン等の付着は認めなかった(図6-a)が、中空糸固定用の縦糸編み目部分に微小血栓の付着が観察された(図6-b)。

3. ACT、PT、APTT

運転開始後1時間のACTはカニューレ直前に静注したヘパリンの影響で 152 ± 8.8 秒と延長していたが、2時間以降には低下し(図7)、運転開始後1-10時間の平均ACTは 128 ± 2.5 秒であった。PTは

1時間後に有意な上昇をみたが、その後は低下した。APTTはヘパリン静注前が 11.9 ± 0.7 秒であったのに対して、ECMO運転中は15-17秒に延長していたが、統計学的有意差は1、2、8時間でのみ認められた。

4. ヘパリン

ヘパリンの維持投与量は平均 0.31 ± 0.02 mg/kg/hrで、ECMO施行中は0.6 IU/ml以上を維持していた(図8)。

5. 血小板数

血小板数は稀釈による影響を除外する目的でHt値により補正し、麻酔導入直後(Control)の値に対する変化率で表示した(c-Platelet)。血小板数は1時間後にはControlの $52.4 \pm 12.6\%$ に減少したが、その後はむしろ軽度上昇し、10時間後にも $67.9 \pm 10.7\%$ を維持していた(図9)。ECMO開始直前(pre hep.)の値との統計学的有意差は1、2、6、10時間で認められた。

6. 凝固系マーカー

血液凝固系の活性化の指標としてフィブリノーゲン、ATIII、TAT、FPAを測定した。ATIIIは1時間後より有意に低下、その後も漸減傾向を示し、麻酔導入直後(Control)の $112 \pm 5.8\%$ から10時間後には $72.4 \pm 6.9\%$ まで低下した(図10)。TATはECMO開始後上昇し、10時間後には $28.6 \pm 6.1 \mu\text{g/l}$ まで上昇した(図10)。統計学的有意差は4時間以降でみられた。フィブリノーゲンはECMO開始後軽度低下したが、Controlの85%以下になることはなく、統計学的有意差も認めなかった(図11)。FPAは上昇傾向を示し、10時間後には $6.4 \pm 0.7\text{ng/ml}$ まで上昇したが、統計学的有意差は認めなかった(図11)。

7. 線溶系マーカー

線溶系の活性化の指標としてFDP、FPB β 15-42、PICを測定した。FDP、FPB β 15-42はともにECMO開始後軽度上昇したが、いずれも軽微な上昇で統計学的に有意差は認めなかった(図12)。また、PICはまったく上昇しなかった。

8. 血漿遊離ヘモグロビン

溶血の指標として測定した血漿遊離ヘモグロビンはECMO開始後漸減し、麻酔導入直後 (Control) の 33.8 ± 3.9 mg/dlから10時間後には 18.8 ± 2.7 mg/dlまで低下した。統計学的有意差は8時間と10時間で認めた (図13)。

9. 人工肺ガス交換能

ECMO開始後30分、5時間、10時間に人工肺の入口と出口で血液ガスを測定し、人工肺のガス交換能を測定した。酸素添加能は30分後 12.3 ± 0.4 ml/min、5時間後 14.3 ± 1.2 ml/min、10時間後 14.7 ± 1.7 ml/minで、炭酸ガス除去能は30分後 25.8 ± 3.7 ml/min、5時間後 26.4 ± 2.8 ml/min、10時間後 17.9 ± 2.8 ml/minで、ともに経過中有意な変動は認めなかった (図14)。

10. 組織学的検査結果

ECMO終了後右腎と脳を摘出し、組織学的検索を行った。組織内に血栓、塞栓の所見は認めなかった (図15)。

11. ヘパリン未処理システムを使用した場合の血栓形成

ヘパリン未処理システムを使用した2頭においても、先の5頭とほぼ同量のヘパリン投与量でACTを約130秒に維持することができた。流量はNo. 6では300 ml/min、No. 7では500 ml/minで、それぞれ10、8時間のECMO運転が可能であったが、終了後の血栓形成は先の5頭に比較して著明で、2-3群の血栓形成を認めた (図16-17)。走査型電子顕微鏡写真でも、中空糸表面に血小板の付着が観察され、縦糸編み目部分の血栓形成もより顕著であった (図18)。

【考察】

体外循環回路のヘパリン化処理法には様々な方法があるが、イオン結合法と共有結合法の2種類が代表的な方法である。イオン結合法はヘパリンの結合が比較的弱いことから、ヘパリンとそのバインダーが血中に溶出し経時的に抗血栓性が低下することが知られている^{36, 37)}。ECMOの様に長期間の使用が前提となる場合、結合させたヘパリンがより安定である共有結合法の方が望ましい。Larmらの方法は共有結合法の代表的なものとしてされているが、ヘパリンとポリエチレンイミン (PEI) の間は共有結合であるものの、PEIと基材表面との間はイオン結合である²³⁾。今回採用したヘパリン化処理法は、ヘパリンとPEIの間だけではなく、PEIと基材表面との結合もすべて共有結合であるので、理論上ヘパリン分子の固定はより強固になっているものと考えられ、長期の抗血栓性が期待できる。

実験 (1-A) では中空糸と回路の基材に対して共有結合したヘパリンは、生理食塩水やリンゲル液中だけでなく、血液よりイオン強度の高い1M NaCl水溶液中でも長期間ヘパリン活性を保持することが確認された。若干のヘパリン活性の低下は、陰性荷電のヘパリンと陽性荷電のPEIとの間のイオン結合で付着していたヘパリンが剥離したためと考えられる。実験 (1-B) では炭酸ガス除去能については2つの人工肺の間に有意差はなかったが、酸素添加能は高流量でヘパリン化処理人工肺が未処理肺に比べて有意に高いという結果であった。ヘパリン化処理によって酸素添加能が向上する理由はなく、測定値がヘパリン未処理人工肺のカタログ値に比較しても有意に高いことより製品間のばらつきのためであると思われる。いずれにせよ、ヘパリン化処理がガス交換能に与える悪影響は認められなかった。実験 (1-C) では、ガスの出口から7日間かけて採取した液体中に全く蛋白成分を検出なかったことより、血漿漏出がないというこの人工肺の利点はヘパリン化処理により損なわれなかったと判断できる。

今回検討した中空糸表面のヘパリン初期活性は中空糸表面で $9.7 \pm 0.6 \text{ mIU/cm}^2$ 、回路表面で $39.5 \pm 2.7 \text{ mIU/cm}^2$ であった。回路表面に

比較して、中空糸表面でヘパリン活性が弱かったが、これは中空糸に用いられる材質のポリオレフィンより、回路に用いられるポリ塩化ビニルの方が基材に導入される水酸基が多くなるためと考えられ、今後は材質の違いによる初期活性や活性保持率の差を解消するために、材質ごとに処理条件を変更する必要性が示唆された。ヘパリン初期活性をさらに増加させることは、ヘパリンに導入するアルデヒド基、または基材に導入する水酸基を増加させることによって理論的に可能であり、現在前者の方法により中空糸表面のヘパリン初期活性を25 mIU/cm²程度にまで増加させ得る方法が確立されつつあり、引き続き検討を加える予定である。

さて、動物実験で体外循環システムの抗血栓性を評価する際には用いられる流量の影響に注意する必要がある。高流量下では、血小板の脱顆粒を誘発する化学物質が稀釈され、成長途中の微小血栓が洗い流されるので、血栓が形成されにくく³⁸⁻⁴⁰⁾、また流量が1 l/min 以上のように多ければ、ヘパリン未処理の通常回路でもヘパリンを投与することなく運転が可能とする報告もある^{41, 42)}。本実験では血液凝固を生じやすい厳しい条件ではあるが、実際に新生児の臨床で使用される流量域で検討を行った。

実験(2-A)では、375-700ml/minの低流量域では本システムを使用しても、カニューレーション直前のヘパリン静注(1 mg/kg)のみ、または0.1 mg/kg/hの微量ヘパリン持続投与の条件下では、大量の血栓形成と凝固・線溶系の活性化が認められた。現段階ではヘパリンの少量持続投与が必要で、ACTの安全限界は120-130秒であると思われた。血栓の主な形成部位は人工肺入口側、ローラーポンプ内回路、リザーバー、回路段差部分で、これらは血流の鬱滞、乱流が生じやすい部位と一致していた。人工肺入口部の大きな血栓は周辺部から形成されていくことが観察され、血流の不均等分布が血栓形成に関与するものと思われた。各種の凝固線溶系のマーカー(FPA、TAT、FDP、FPB β 15-42、PIC)は抗原抗体反応を利用して測定するので、理想的には抗イヌ抗体を使用すべきであるが、この実験で血栓形成に伴う妥当な上昇が確認されたので、以後の実験でも採用した。

実験(2-A)の結果を一步進めて、実験(2-B)では流量を新生児の臨床で使用する300ml/minに固定し、ACT 130秒を目標にヘパリン投

与量を調節して、本システムの安全性を検討した。その結果、平均ACT 128 ± 2.5 秒、平均ヘパリン持続投与量 0.31 ± 0.02 mg/kg/hr で血栓形成のない安定した運転が可能であった。

ヘパリンの血中濃度は終始 0.6 IU/ml 以上を維持しており、臨床的にヒトでACTを200秒前後にコントロールする際のヘパリン投与量が 0.2-0.6 mg/kg/hr である⁴³⁾ことを考えると、今回必要としたヘパリン量はヒトの場合に比べて高値であった。その理由として、イヌはヒトに比べて血液の凝固系、線溶系の活性が強いという種差の問題⁴⁴⁾と、ヒトでECMOの適応となる症例ではECMO施行前より血小板数の低下、APTTの延長、凝固因子低下等の理由でACTが高くなっている^{45, 46)}ことが関与しているものと思われる。

臨床的にはECMO施行中のヘパリン量のコントロールにAPTTを用いることは少ないが、Uzielらは1.5 IU/ml以下の低ヘパリン濃度域ではAPTTの方がACTよりも血中ヘパリン濃度との相関が良かったと報告しており、ECMO中は正常値の1.7-3.0倍に維持すると述べている⁴⁷⁾。本実験中PTは全く延長せず、APTTの延長もControlの1.3-1.4倍であったので、APTTも比較的低値に維持されていたものと思われる。その結果、術創からの出血傾向も認めなかった。

回路内の血栓形成状況は軽微ではあったが、人工肺入口側のハウジング内と回路の段差部分にわずかな血栓が認められた。人工肺入口部にみられた血栓は、人工肺内部に血栓形成を認めなかったことより、回路でできたものが飛散した可能性が高いと思われる。走査型電子顕微鏡写真では、人工肺内部の中空系表面には血栓は観察されなかったが、中空系固定用の縦系周囲に微小血栓が確認された。

基材に固定されたヘパリンの抗血栓性発現には、流血中のATIIIが不可欠である。凝固系の活性化によって生じたトロンビンは基材表面のヘパリン分子上で流血中のATIIIとTATを形成する。生じたTATはヘパリン分子から遊離するので、基材表面のヘパリンはATIIIの供給がある限り、次々とトロンビン分子を不活化することが可能である^{30, 48)}。しかし、血流が鬱滞する部分では基材表面のヘパリンに十分なATIIIが供給されないため、ヘパリン化処理がいかに安定でも抗血栓性は十分発揮されない^{38, 49)}。実験(2-A)における血栓形成部位、血栓形成状況の観察から

も血流状態の重要性が示唆されており、システム全体としての抗血栓性を向上させるには、血液接触面の性状だけでなく、形状面からの検討も重要であると考えられる。

血小板数は開始前値 (pre hep.) の96.1%から1時間後に52.4%に減少しているが、その後持続的な減少はみられず、10時間後も67.9%を維持していた。この変化はイヌを用いてACTを400秒以上にコントロールした諸家の報告^{33, 50, 51)}や臨床における報告^{47, 52)}と概ね同様の傾向であり、ヘパリン投与量減量による影響ではないと考えられる。

血液凝固系活性化の指標としてフィブリノーゲン、ATIII、TAT、FPAを測定した結果、ATIIIは軽度低下し、TATは軽度上昇したが、フィブリノーゲンとFPAの変動は有意なものではなかった。これは生成されたトロンビンがヘパリンとATIIIで不活化され、それ以降の凝固系カスケードが抑制されていることを示している。臨床例でACTを十分高値に維持している状況でも凝固系の活性化が生じていることが知られており^{47, 53)}、本実験でみられた程度の活性化は許容範囲内と考えられる。

体外循環時の線溶系の亢進については多くの報告^{54, 55)}があるが、ほとんどはCPBに関するものである。CPBと異なり外科的侵襲が少ないECMOの場合、線溶系の活性化は少ないという^{47, 53)}。本実験においても、線溶系の活性化の指標としてFDP、FPB β 15-42、PICを測定した結果、いずれも有意な上昇は認めなかった。予備実験でも線溶系の亢進は常に血栓形成と平行しており、Uzielらの報告を支持する結果となった。

溶血の指標として測定した血漿遊離ヘモグロビンは上昇せず、本システムの溶血に及ぼす影響はないものと考えられた。組織学的検索でも腎と脳に血栓、塞栓の所見を認めず、回路からの血栓の流入はなかったと思われる。また、実験中に血漿漏出は認めず、人工肺のガス交換能も低下しないことが確認された。

本システムの対照として、同一の人工肺・回路を使用したヘパリン未処理システムを使用し、2頭のビーグル犬でほぼ同一の条件下 (1頭では流量が500ml/min) でECMOを施行した。その結果、肉眼的所見でも電子顕微鏡所見でも、本システムを使用した場合に比較して明らかに血栓形成が著明で、ヘパリン化処理の有用性が示唆された。

以上より、今回評価したECMOシステムは300ml/minの低流量下で

もACT130秒と相当低い値での運転が可能で、血小板数、血液凝固・線溶系の活性化の程度、溶血の程度等の評価でも十分満足すべき結果が得られ、臨床応用の可能性が示唆された。本システムは新生児・未熟児への適応を念頭に開発したものではあるが、将来的には心臓術後の心不全、外傷後のARDS、心肺移植待機中または移植後の呼吸循環不全、脳外科・気管外科領域での術中管理等への応用も考えられる。しかし現時点では血流が乱れる部位で、微量とはいえ血栓形成を認めたことから、その抗血栓性は未だ十分とはいえない。今後、1) ヘパリン固定量の増加、2) 乱流・鬱滞の少ない形状の人工肺、及び段差の少ない一体形成型回路の設計を中心に、更なる改良が必要であると思われる。

【結語】

ヘパリン減量下に低流量でも長期間運転できるECMOシステムを目標に、血漿漏出を起こさない人工肺に新規に開発された方法でヘパリン化処理を行い、実験的検討を加えた結果、以下の結論を得た。

1. 新しい方法で共有結合したヘパリンは、高イオン強度の水溶液中でも長期間安定していた。また、このヘパリン化処理工程によりガス交換能の劣化もなく、血漿漏出がないことの利点も損なわれなかった。

2. ビーグル犬を用いた実験で、ACT130秒、流量 300ml/minの条件でV-A ECMOを10時間施行したところ、血栓形成は極めて軽微で、血液学的にも大きな変動を認めなかった。ヘパリン未処理の同一回路・人工肺では中等度ないしは高度の血栓形成を認め、ヘパリンコーティングの有用性が示唆された。しかし、現時点では低流量ECMOでヘパリンを完全に中止することは危険が大きいと考えられた。

3. 本システムを利用することによって、ECMOに伴う出血性合併症を減らし、さらには現在適応となっていない未熟児や、外傷後の症例、移植前後の症例にもECMOの適応が広がるのが期待できる。

4. 今後の課題としてヘパリン固定量を増加させて抗血栓性をさらに増加させること、人工肺や回路を血流の鬱滞・乱流の少ない形状にすることが残された。

【引用文献】

- 1) Hill JD, O'Brien TG, Murray JJ, et al. Prolonged extracorporeal membrane oxygenation for acute post-traumatic respiratory failure (shock-lung syndrome). *N Engl J Med* 1972; 286: 629-634.
- 2) Zapol WM, Snider MT, Hill JD, et al. Extracorporeal membrane oxygenation in severe acute respiratory failure. A randomized prospective study. *JAMA* 1979; 242(20): 2193-2196.
- 3) Bartlett RH, Gazzaniga AB, Jefferies MR, et al. Extracorporeal membrane oxygenation (ECMO) cardiopulmonary support in infancy. *ASAIO Trans* 1976; 22(80): 80-93.
- 4) 長屋昌宏, 津田峰行, 飯尾賢治, 他. 先天性横隔膜ヘルニアにおけるECMOの利用 救命例の報告と文献的考察. *日本小児外科学会雑誌* 1987; 23(3): 600-607.
- 5) Gattinoni L, Pesenti A, Mascheroni D, et al. Low-frequency positive-pressure ventilation with extracorporeal CO₂ removal in severe acute respiratory failure. *JAMA* 1986; 256(7): 881-886.
- 6) Pesenti A, Gattinoni L, Kolobow T, et al. Extracorporeal circulation in adult respiratory failure. *ASAIO Trans* 1988; 34(1): 43-47.
- 7) Custer JR, Bartlett RH. Recent research in extracorporeal life support for respiratory failure. *ASAIO J* 1992; 38(4): 754-771.

- 8) Morton A, Dalton H, Kochanek P, et al. Extracorporeal membrane oxygenation for pediatric respiratory failure: five-year experience at the University of Pittsburgh. *Crit Care Med* 1994; 22(10): 1659-1667.
- 9) Rossaint R, Slama K, Lewandowski K, et al. Extracorporeal lung assist with heparin-coated systems. *Int J Artif Organs* 1992; 15(1): 29-34.
- 10) Bartlett RH, Gazzaniga AB, Toomasian J, et al. Extracorporeal membrane oxygenation (ECMO) in neonatal respiratory failure. 100 cases. *Ann Surg* 1986; 204(3): 236-245.
- 11) Sell LL, Cullen ML, Whittlesey GC, et al. Hemorrhagic complications during extracorporeal membrane oxygenation: prevention and treatment. *J Pediatr Surg* 1986; 21(12): 1087-1091.
- 12) Watson JW, Brown DM, Lally KP, et al. Complications of extracorporeal membrane oxygenation in neonates. *South Med J* 1990; 83(11): 1262-1265.
- 13) Stolar CJ, Snedecor SM, Bartlett RH. Extracorporeal membrane oxygenation and neonatal respiratory failure: experience from the Extracorporeal Life Support Organization. *J Pediatr Surg* 1991; 26(5): 563-571.
- 14) Knoch M, Kollen B, Dietrich G, et al. Progress in veno-venous long-term bypass techniques for the treatment of ARDS. Controlled clinical trial with the heparin-coated bypass circuit. *Int J Artif Organs* 1992; 15(2): 103-108.
- 15) Extracorporeal Life Support Organization. International ECMO registry report. June 1994.

- 16) Cilley RE, Zwischenberger JB, Andrews AF, et al. Intracranial hemorrhage during extracorporeal membrane oxygenation in neonates. *Pediatrics* 1986; 78(4): 699-704.
- 17) 新美教弘, 長屋昌宏, 村橋修, 他. ECMOによる横隔膜ヘルニアの治療. *小児外科* 1995; 27(11): 1348-1352.
- 18) Gott VL, Whiffen JD, Dutton RC. Heparin bonding on colloidal graphite surfaces. *Science* 1963; 142: 1297-1298.
- 19) Lagergren HR, Eriksson JC. Plastics with a stable surface monolayer of cross-linked heparin: Preparation and evaluation. *ASAIO Trans* 1971; 17: 10-12.
- 20) Eberle JW, Manton JR, Meals CR, et al. Cross-linked heparin binding of a membrane oxygenator system. *J Biomed Mater Res* 1973; 7(2): 145-153.
- 21) Hagler HK, Powell WM, Eberle JW, et al. Five-day partial bypass using a membrane oxygenator without systemic heparinization. *ASAIO Trans* 1975; 21: 178-187.
- 22) Fletcher JR, McKee AE, Mills M, et al. Twenty-four hour membrane oxygenation in dogs without anticoagulation. *Surgery* 1976; 80(2): 214-223.
- 23) Larm O, Larsson R, Olsson P. A new non-thrombogenic surface prepared by selective covalent binding of heparin via a modified reducing terminal residue. *Biomater Med Devices Artif Organs* 1983; 11(2-3): 161-173.
- 24) Bindslev L, Gouda I, Inacio J, et al. Extracorporeal elimination of carbon dioxide using a surface-heparinized veno-venous bypass system. *ASAIO Trans* 1986; 32(1): 530-533.

- 25) von Segesser K, Turina M. Long term cardiopulmonary bypass without systemic heparinization. *Int J Artif Organs* 1990; 13(10): 687-691.
- 26) Bindslev L. Adult ECMO performed with surface-heparinized equipment. *ASAIO Trans* 1988; 34(4): 1009-1013.
- 27) 江崎公明. ヘパリン結合人工肺による長期ECLA (extracorporeal lung assist) 時の血小板-血液凝固能の変化. *麻酔* 1990; 39(7): 845-853.
- 28) 大関一, 諸久永, 山本和男, 他. 全回路ヘパリンコーティングしたECMOシステムによる循環、呼吸補助の経験. *人工臓器* 1994; 23(1): 301-304.
- 29) Aranki SF, Adams DH, Rizzo RJ, et al. Femoral veno-arterial extracorporeal life support with minimal or no heparin. *Ann Thorac Surg* 1993; 56(1): 149-155.
- 30) Gravlee GP. Heparin-coated cardiopulmonary bypass circuits. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 1994; 8(2): 213-222.
- 31) van der Hulst VP, Grundeman PF, Moulijn AC, et al. Long-term extracorporeal blood bypass in dogs at low flows without systemic heparinization. Heparin-coated versus uncoated circuits. *ASAIO Trans* 1991; 37(4): 577-583.
- 32) Miyasaka K, Takata M, Muto R, et al. Twenty-four-hour veno-arterial ECMO without systemic heparinization in dogs. *Pediatr Surg Int* (in press).
- 33) 正井崇史, 中野肅, 白倉良太, 他. 全回路ヘパリン (Hep) 化処理ECMOシステムの実験的検討 heparinless ECMOの可能性について. *人工臓器* 1994; 23(1): 313-316.

- 34) 赤須弘幸, 穴沢孝典. 新しい二層構造のポリオレフィン中空糸とそれを用いた人工肺の開発. 生体材料 1990; 8(3): 141-147.
- 35) Katayama M, Miyasaka K, Hirose I, et al. Miniature membrane oxygenator for use in neonatal ECMO. ASAIO Trans 1991; 37(3): M407-408.
- 36) 萩原和彦, 横山研二, 鬼頭均, 他. ヘパリン化抗血栓性人工肺及び回路の開発. 人工臓器 1991; 20(3): 1294-1299.
- 37) Liu LS, Ito Y, Imanishi Y. Synthesis and antithrombogenicity of heparinized polyurethanes with intervening spacer chains of various kinds. Biomaterials 1991; 12(4): 390-396.
- 38) Arnander C, Olsson P, Larm O. Influence of blood flow and the effect of protamine on the thromboresistant properties of a covalently bonded heparin surface. J Biomed Mater Res 1988; 22(10): 859-868.
- 39) Nojiri C, Okano T, Park KD, et al. Suppression mechanisms for thrombus formation on heparin-immobilized segmented polyurethane-ureas. ASAIO Trans 1988; 34(3): 386-398.
- 40) Kundu SK, Salley SO, Whittlesey GC, et al. Extracorporeal membrane oxygenation without anticoagulation: a study using quantitative scanning electron microscopy. J Lab Clin Med 1989; 114(1): 58-62.
- 41) DelRossi AJ, Cernaianu AC, Vertrees RA, et al. Heparinless extracorporeal bypass for treatment of hypothermia. J Trauma 1990; 30(1): 79-82.
- 42) Whittlesey GC, Drucker DE, Salley SO, et al. ECMO without heparin: laboratory and clinical experience. J Pediatr Surg 1991; 26(3): 320-324.

- 43) 宮坂勝之. ECMOガイドブック. 東京: 克誠堂出版, 1990.
- 44) National Heart Lung and Blood Institute Working Group. Guidelines for blood-material interactions. Bethesda, Maryland: U.S. Department of Health & Human Services, 1985.
- 45) Bui KC, LaClair P, Vanderkerhove J, et al. ECMO in premature infants. Review of factors associated with mortality. ASAIO Trans 1991; 37(2): 54-59.
- 46) McManus ML, Kevy SV, Bower LK, et al. Coagulation factor deficiencies during initiation of extracorporeal membrane oxygenation. J Pediatr 1995; 126(6): 900-904.
- 47) Uziel L, Cugno M, Fabrizi I, et al. Physiopathology and management of coagulation during long-term extracorporeal respiratory assistance. Int J Artif Organs 1990; 13(5): 280-287.
- 48) Miura Y, Aoyagi S, Kusada Y, et al. The characteristics of anticoagulation by covalently immobilized heparin. J Biomed Mater Res 1980; 14(5): 619-630.
- 49) Mottaghy K, Oedekoven B, Poppel K, et al. Heparin free long-term extracorporeal circulation using bioactive surfaces. ASAIO Trans 1989; 35(3): 635-637.
- 50) von Segesser LK, Turina M. Cardiopulmonary bypass without systemic heparinization. Performance of heparin-coated oxygenators in comparison with classic membrane and bubble oxygenators. J Thorac Cardiovasc Surg 1989; 98(3): 386-396.

- 51) Matsuwaka R, Matsuda H, Kaneko M, et al. Experimental evaluation of a heparin coated ECMO system simplified with a centrifugal pump. *ASAIO Trans* 1990; 36(3): M473-M475.
- 52) Robinson TM, Kickler TS, Walker LK, et al. Effect of extracorporeal membrane oxygenation on platelets in newborns. *Crit Care Med* 1993; 21(7): 1029-1034.
- 53) Plotz FB, van Oeveren W, Bartlett RH, et al. Blood activation during neonatal extracorporeal life support. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1993; 105(5): 823-832.
- 54) Tanaka K, Morimoto T, Yada I, et al. Physiologic role of enhanced fibrinolytic activity during cardiopulmonary bypass in open heart surgery. *ASAIO Trans* 1987; 33(3): 505-509.
- 55) Woodman RC, Harker LA. Bleeding complications associated with cardiopulmonary bypass. *Blood* 1990; 76(9): 1680-1697.

【図表】

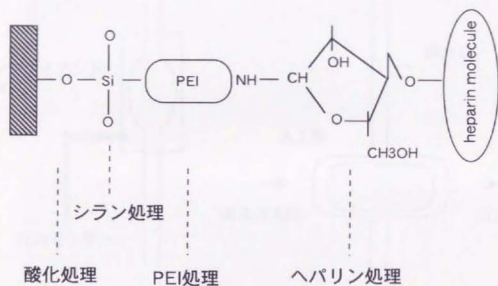


図1：ヘパリン化処理法の模式図

基材表面に酸化処理により水酸基を導入した後、シランカップリング剤とスペーサー分子であるPEIを介してヘパリン分子を結合させる。本法はヘパリンの固定に必要なすべての結合が共有結合であるという特徴を有する。

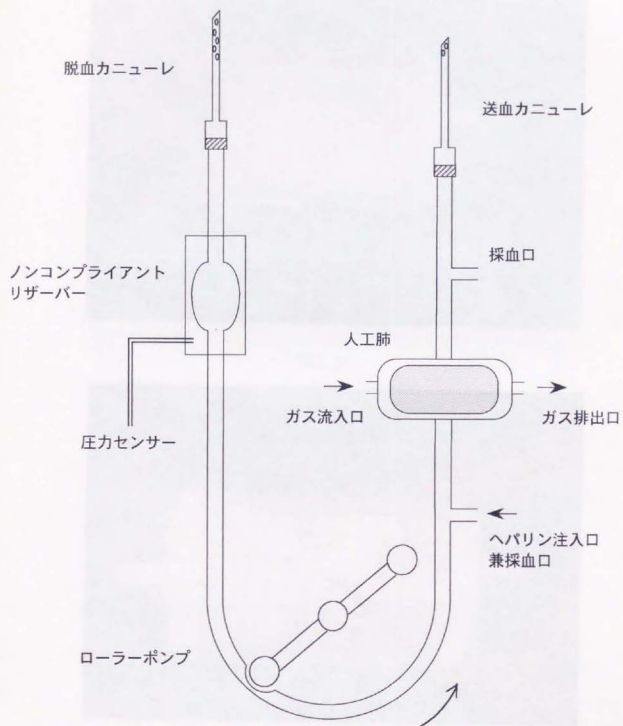


図 2 : 実験 (2) で使用した回路図



図3-a

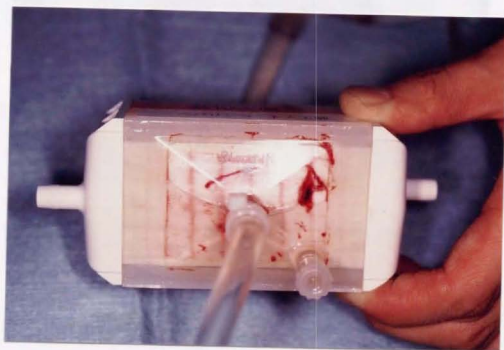


図3-b

図3-a、b：実験（2）で使用した肉眼的血栓形成の程度分類

1群：臨床のECMOで観察される程度の微小血栓（a）

2群：1群と3群の間（b）

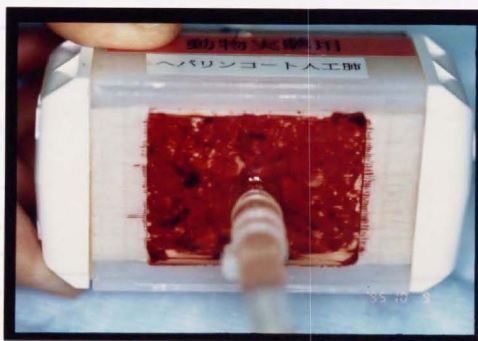


図 3-c

図 3-c: 実験 (2) で使用した肉眼的血栓形成の程度分類

3 群: 人工肺入口部または回路内腔全体に及ぶ大量の血栓

	生理食塩水	リンゲル液	1M NaCl水溶液
中空系膜サンプル（ポリオレフィン製） n=13	99±0.6%	96±1.1%**	93±0.5%**
回路サンプル（ポリ塩化ビニル製） n=5	87±1.8%**	86±1.4%**	76±3.8%**

表1：新しいヘパリン化処理法のヘパリン活性の持続性

初期値を100%とし、イオン強度の異なる3種の水溶液中で4日間振盪した後のヘパリン活性の保持率を示す。** p<0.01（Paired t-test）

酸素添加能 (ml/min)

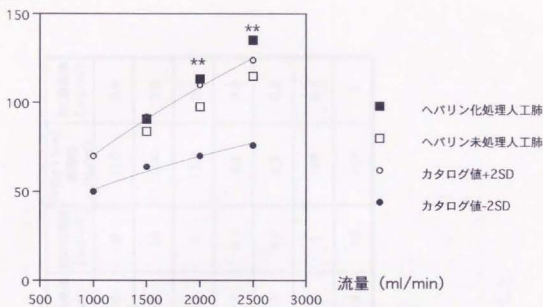


図 4-a

炭酸ガス除去能 (ml/min)

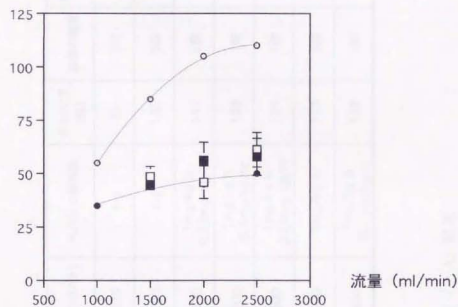


図 4-b

図 4 : ヘパリン処理人工肺と未処理人工肺の酸素添加能 (a) と炭酸ガス除去能 (b)

カタログ値より平均 \pm 2SDを算出し、併記した。

** $p < 0.01$ (Paired t-test)

No.	体重(kg)	流量(ml/分)	ヘパリン投与量	平均ACT (秒)	血栓の程度	FPA最高値 (ng/ml)	TAT最高値 (μ g/l)	FDP最高値 (μ g/ml)	FPB β 15-42 最高値 (ng/ml)	PIC最高値 (μ g/ml)
1	7.5	375	(-)	85	3群	13.3	30.6	9	110	5.4
2	14	700	(-)	102	3群	8.1	49.2	14	106	3.9
3	12	500	1mg/kg iv 0.23mg/kg/hr	141	2群	8.5	52.3	5	13.9	0.9
4	12	500	1mg/kg iv 0.4mg/kg/hr	138	1群	6.4	13.7	0.4	4.3	0.8
5	15	500	1mg/kg iv 0.23mg/kg/hr	124	1群	5.3	16.1	0.7	5.5	0.8
6	10	500	1mg/kg iv	113	3群	10.7	37.2	1	108	8.4
7	15	500	1mg/kg iv 0.1 mg/kg/h	118	3群	6.1	26.9	10	129	5

表 2 : 実験 (2-A) 結果

血栓の程度は1群から3群に分類した (本文中に記載)。

No. 1-3 では本システムより大型の回路 (充填量約130 ml) を使用した。

No.	体重 (kg)	回路	流量 (ml/分)	ヘパリン投与量	平均ACT (秒)	血栓形成
1	9	HCC	300	1mg/kg iv 0.36mg/kg/hr	132	1群
2	12	HCC	300	1mg/kg iv 0.29mg/kg/hr	134	1群
3	8	HCC	300	1mg/kg iv 0.28mg/kg/hr	131	1群
4	9	HCC	300	1mg/kg iv 0.25mg/kg/hr	123	1群
5	11	HCC	300	1mg/kg iv 0.36 mg/kg/hr	122	1群
6	12	NCC	300	1mg/kg iv 0.28 mg/kg/hr	132	3群
7	12	NCC	500	1mg/kg iv 0.31 mg/kg/hr	129	2群

表3：実験（2-B）結果

HCC; heparin-coated circuit（ヘパリン化処理回路）NCC; non-coated circuit（ヘパリン未処理回路）

本システムを使用すると、300ml/minの低流量でもACT120-130秒で血栓形成のない、安全なECMOを施行することができた。本システムにおけるヘパリン化処理の効果を確認するために、No. 6-7の2頭ではヘパリン未処理の人工肺・回路を使用した。

	Controi	pre hep.	1h	2h	3h	4h	5h	6h	7h	8h	9h	10h
ACT (秒)		108±2.6	152±8.8	135±9.5	127±6.0	123±4.3	119±4.9	124±7.4	121±6.3	133±3.1	121±5.4	131±13.6
APTT (秒)	11.8±0.7	11.9±0.7	18.1±1.6**	17.4±1.4**		15.6±0.7		15.5±0.8		16.6±0.5*		16.1±0.2
PT (秒)	6.5±0.3	6.5±0.3	7.3±0.3**	7.0±0.3		6.8±0.2		6.9±0.3		6.9±0.3		6.9±0.3
heparin (IU/ml)	0.1±0.0	0.1±0.0	0.9±0.1**	0.8±0.1**		0.6±0.1**		0.6±0.1**		0.6±0.0**		0.7±0.1**
Platelet(万/mm ³)	34.8±2.1	35.0±1.1	18.3±3.3**	19.5±3.4**		22.5±3.5**		20.8±2.7**		21.4±2.8**		19.0±2.2**
Ht(%)	46.0±2.3	48.5±2.3	48.0±1.7	46.4±1.9		42.9±2.1		39.5±1.5**		39.9±2.0**		37.9±0.7**
c-Platelet(%)	100	96.1±3.3	52.4±12.6**	58.7±14.2**		71.0±12.8		70.7±10.7*		71.9±10.4		67.9±10.7*
AT-III(%)	112±5.8	111±5.6	93.8±6.3**	86.6±4.4**		85.6±6.8**		78.6±6.5**		74.6±5.7**		72.4±6.9**
fibrinogen(mg/dl)	214±32	210±30	186±23	183±29		185±28		183±25		184±26		203±31
FPA(ng/ml)	3.2±0.3	4.2±0.7	2.2±0.3	3.5±1.1		5.5±0.7		5.9±0.8		5.0±0.9		6.4±0.7
TAT(microgram/l)	1.0±0.2	4.0±1.4	2.3±0.8	8.5±5.8		20.5±3.3*		25.4±3.1**		24.6±3.8**		28.6±6.1**
FDP(microgram/ml)	0.6±0.4	0.6±0.4	0.6±0.4	0.6±0.4		0.7±0.3		0.8±0.3		1.1±0.4		1.2±0.5
FPB(ng/ml)	3.8±0.3	4.8±0.7	3.7±0.4	4.4±0.6		5.9±1.1		6.2±0.9		5.2±0.4		6.5±0.4
PIC(microgram/ml)	<0.8	<0.8	<0.8	<0.8		<0.8		<0.8		<0.8		<0.8
free hemo.(mg/dl)	33.8±3.9	32.0±3.4	32.8±2.2	30.6±3.3		28.8±1.9		24.0±3.1		20.8±2.6**		18.8±2.7**

表 4 : 実験 (2-B) 本システムを使用した 5 頭の血液学的検査結果

測定値はすべて 5 頭 (No.1-5) の平均値±標準誤差で表示し、ECMO開始直前の値 (pre hep.) と比較した。* p<0.05 ** p<0.01 (one-way ANOVA)

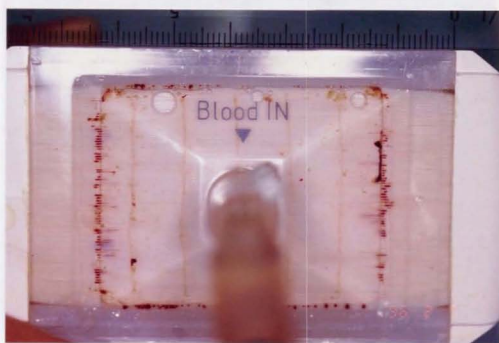


図 5-a

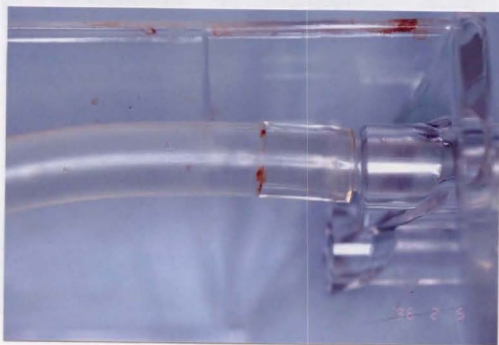


図 5-b

図 5 : 実験終了後のヘパリン処理人工肺入口部 (a) と回路段差部分 (b) の微小血栓

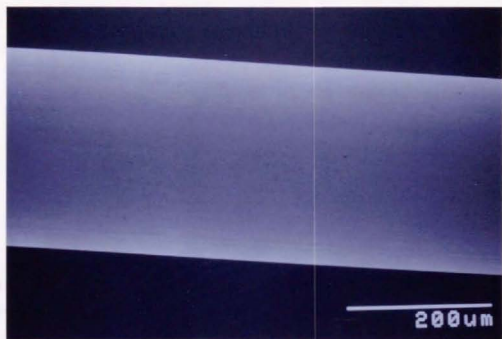


図 6-a

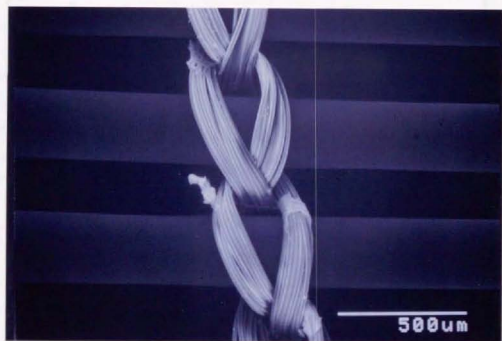


図 6-b

図 6 : ヘパリン処理人工肺の中空系 (a) と、中空系を保持する縦系 (b) の走査型電子顕微鏡写真

中空系表面には血栓は認めないが、縦系表面には微小血栓が観察された。

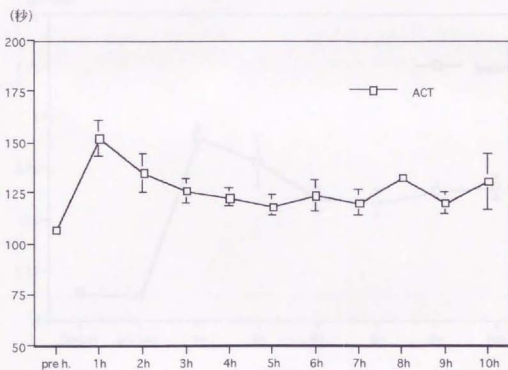


図7：ACTの変動

1時間後の上昇はカニューレ直前に静注したヘパリンの影響である。1-10時間の平均ACTは128秒であった。

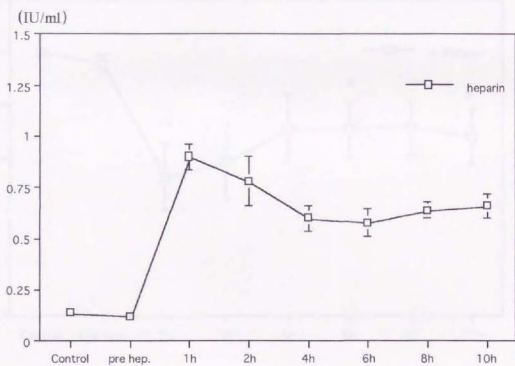


図 8 : 血中ヘパリン濃度の変動

ECMO施行中は0.6 IU/ml以上に保たれていた。

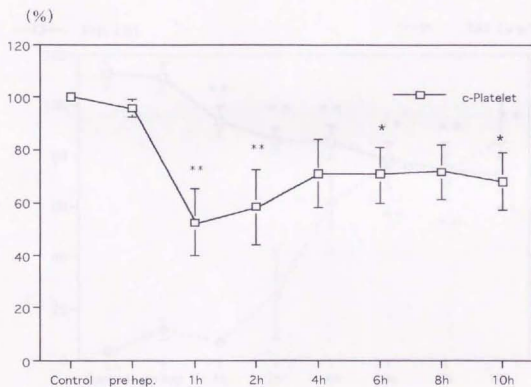


図9：血小板数の変化

稀釈の影響を除外するためにHtで補正し、Controlに対する百分率で表示した。血小板はECMO開始直後に半減したが、以後安定していた。

* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ (one-way ANOVA)

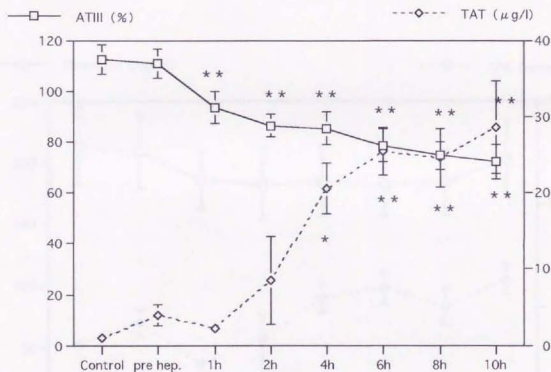


図10 : ATIIIとTATの変化

ATIIIは漸減し、同時にTATは漸増した。* p<0.05 ** p<0.01
 (one-way ANOVA)

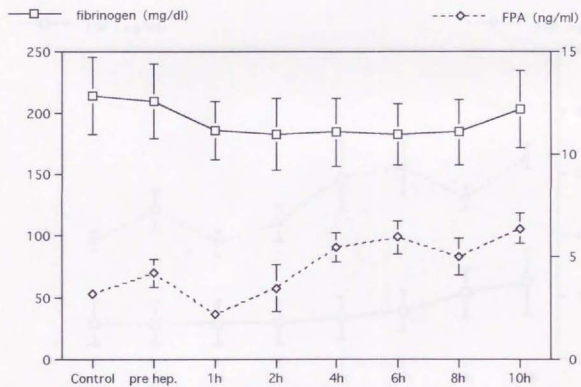


図11：フィブリノーゲンとFPAの変化

どちらも統計学的に有意な変化は認めなかった。(one-way ANOVA)

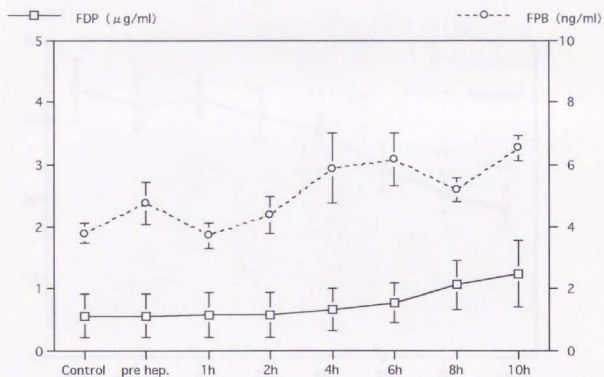


図12 : FDPとFPB β 15-42の変化

ともに統計学的に有意な上昇は認めなかった。(one-way ANOVA)

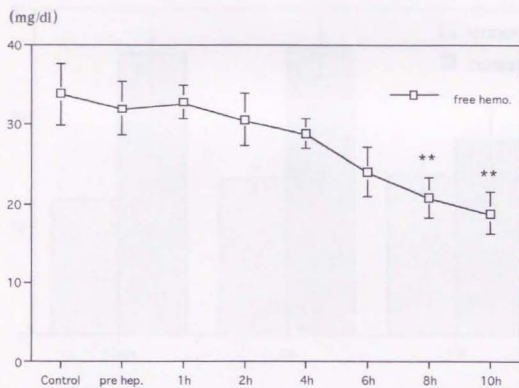


図 13 : 血漿遊離ヘモグロビンの変化

ECMO開始後、むしろ漸減傾向を認めた。** $P < 0.01$ (one-way ANOVA)

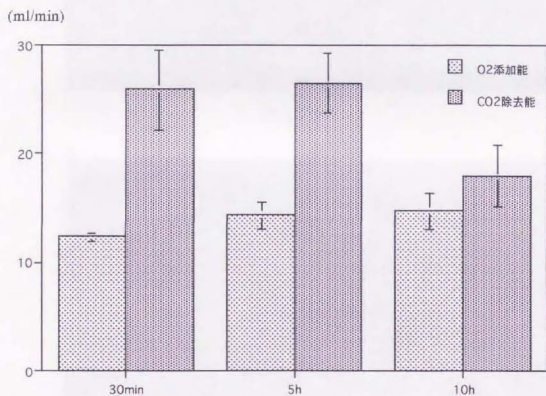


図 14：人工肺ガス交換能の経時的变化

酸素添加能、炭酸ガス除去能はともに良好に保たれていた。

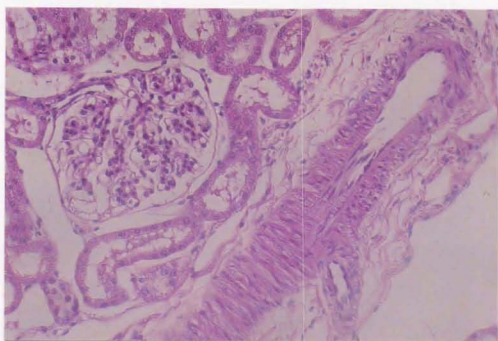


図 15-a

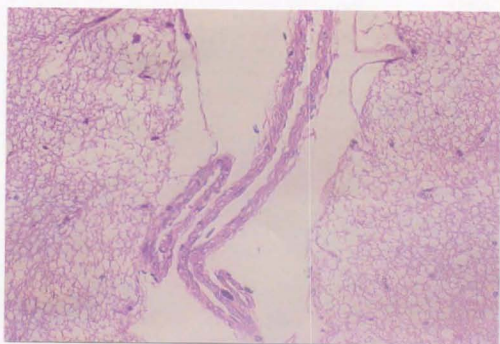


図 15-b

図15：実験終了後に摘出した右腎臓と脳の組織像

腎糸球体と弓状動脈（a：H.E.×100）、および脳表面クモ膜直下の小血管（b：H.E.×100）に血栓、塞栓の所見を認めなかった。

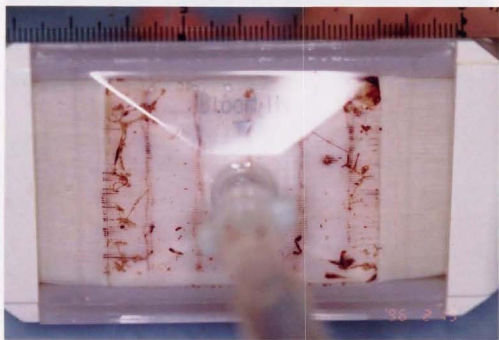


図 16-a

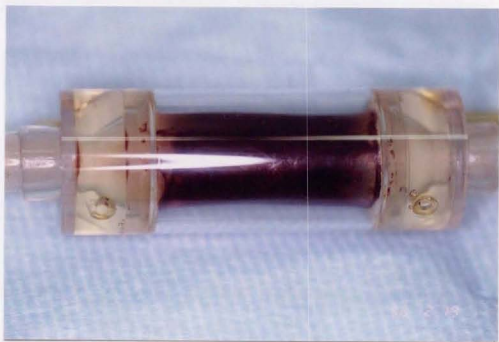


図 16-b

図 16 : ヘパリン未処理を回路を使用した場合に人工肺入口部 (a) とリザーバー部分 (b) に生じた血栓 (表 3 の No. 6)



図 17-a



図 17-b

図 17 : ヘパリン未処理回路を使用した場合に人工肺入口部 (a) と回路内 (b) に生じた血栓 (表 3 の No. 7)

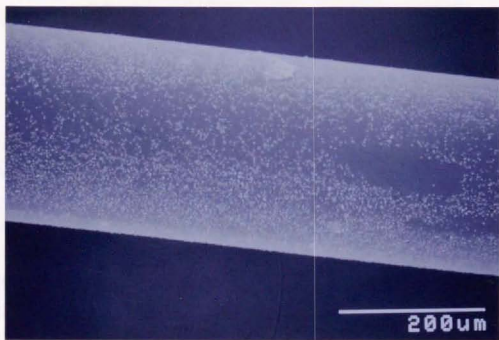


図 18-a

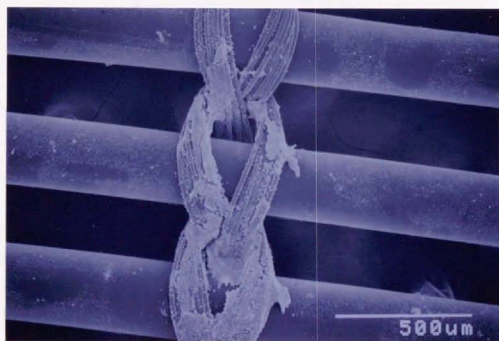


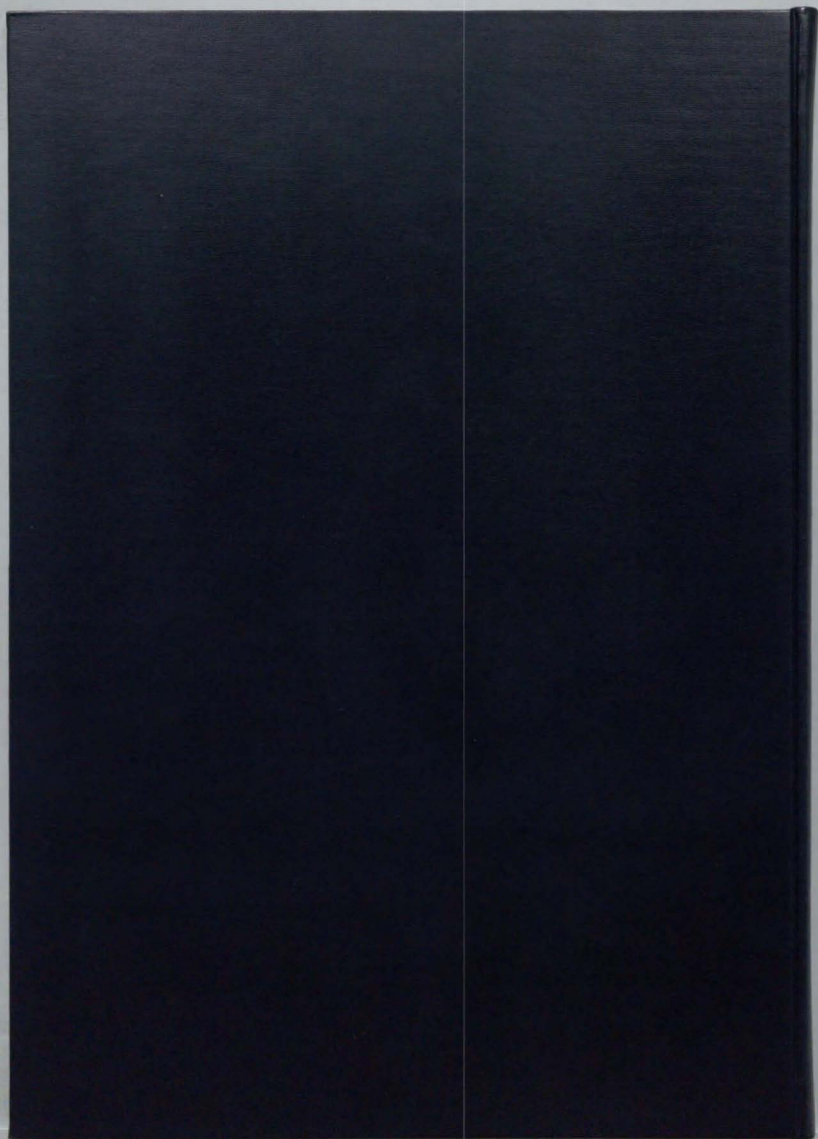
図 18-b

図 18 : ヘパリン未処理人工肺の中空糸 (a) と、縦糸 (b) の走査型電子顕微鏡写真

中空糸表面に多数の血小板の付着が観察される。縦糸表面の血栓形成もヘパリン化処理したものに比べ著明である。

謝辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました本学小児外科学教室土田嘉昭前教授と横森欣司助教授、ならびに国立小児病院小児医療研究センター病態生理研究室宮坂勝之先生に深甚なる謝意を表します。また、本研究に実地に御指導、御助力を戴いた国立小児病院小児医療研究センター病態生理研究室高田正雄先生、ならびに室員各位、回路のヘパリン化処理を実際に施行して戴いた(株)クラレメディカル研究開発室和田徹氏、田中操一氏、三村理七氏、また組織学的検索で御指導戴いた国立小児病院研究検査科宮内潤先生、八反田洋一先生、最後に本学小児外科学教室の各位に心より感謝いたします。



Kodak
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19
inches 1 2 3 4 5 6 7 8 9

Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM Kodak



Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

