

Protamine reversal of heparin affects platelet aggregation and activated clotting time after cardiopulmonary bypass

メタデータ	言語: jpn 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-29 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 望月, 利昭 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1587

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博論第 310号	学位授与年月日	平成11年 9月17日
氏名	望月利昭		
論文題目	Protamine reversal of heparin affects platelet aggregation and activated clotting time after cardiopulmonary bypass (人工心肺離脱後、プロタミンによるヘパリン中和が血小板凝集能およびACTに及ぼす影響)		

博士(医学) 望月利昭

論文題目

Protamine reversal of heparin affects platelet aggregation and activated clotting time after cardiopulmonary bypass

(人工心肺離脱後、プロタミンによるヘパリン中和が血小板凝集能およびACTに及ぼす影響)

論文の内容の要旨

〔はじめに〕

プロタミンは、人工心肺離脱後にヘパリンの抗凝固作用を中和させる目的で投与される。Carrらは、in vitroでプロタミンの過量投与が凝血塊の構造を脆弱化させ、凝固時間を延長させることを示した。Activated clotting time (ACT)は、活性化物質としてceliteもしくはkaolinを用いるベッドサイドで測定可能な全血凝固時間である。人工心肺使用時にヘパリン中和のモニタリングに用いられるが、内因系の凝固能および血小板機能を反映する。ACTを延長させる、もしくは血小板機能を低下させるプロタミン量、プロタミン対ヘパリン比は未だに知られていない。またプロタミン代替のヘパリン中和物質の過剰投与時の影響も検討されていない。よって我々はプロタミン、血小板第4因子(PF4)、ヘキサジメチリンによるヘパリン中和のACTに及ぼす影響を人工心肺後の血液を用いて調べた。また、血小板機能はACTに影響し、人工心肺後の出血も血小板機能に関連するのでin vitroでプロタミンが血小板凝集能に及ぼす影響について調べた。

〔方法〕

1. 予定開心術において、手術終了後人工心肺のリザーバーより3 mlの血液を採取した。ウシ肺由来ヘパリンにより人工心肺中のcelite-based ACTを450秒以上に維持した。ヘパリン血中濃度を測定し、ヘパリン中和物質対ヘパリン比の計算に用いた。この人工心肺血0.4 ml/検体を用い、kaolin-based ACTをbaselineおよび以下のごとくのヘパリン中和物質対ヘパリン比での投与下にて測定した。すなわちプロタミン投与例(31例)では1.3:1、2.6:1、3.9:1、5.2:1、6.5:1、7.8:1、PF4投与例(16例)およびヘキサジメチリン投与例(16例)では1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1とした。各例のACT値のうち最大に中和された値を最大中和値(max)とした。統計はKruskal-Wallis testを用い、Dunn procedureにより各群をmaxと比較した。有意水準は0.05%とした。
2. 予定開心術患者32名より動脈血9 mlを麻酔導入後、(ヘパリン投与前)に採取し、3.8%クエン酸ナトリウム溶液1 mlと混合、遠心分離しplatelet rich plasma (PRP)を得た。PRPにはウシ肺由来ヘパリンを4 units/mlとなるよう加えた。血小板凝集計を用い、baselineの最大凝集値およびPRPにプロタミンをプロタミン対ヘパリン比1.3:1、2.5:1、5.0:1、7.5:1、9.3:1となるように加え、それぞれの最大凝集値を測定した。血小板凝集アゴニストとしてadenosine diphosphate (ADP) 2.4 μ mol/l、コラーゲン2.4 μ g/mlを用いた。統計は一元配置分散分析を行った後、post hoc testとしてBonferroni-Dunn testを用いた。有意水準は0.05%とした。

〔結果〕

1. 人口心肺中のヘパリン濃度は3.3 units/ml (range 2.7-4.1)であった。プロタミン対ヘパリン比1.3:1

でヘパリンの抗凝固作用は最大に中和された。プロタミン対ヘパリン比2.6：1以上でACT値はmaxより有意に上昇した。一方PF4では、PF4対ヘパリン比の最大の場合でもACTを延長しなかった。ヘキサジメチリンではヘキサジメチリン対ヘパリン比の5：1以上でのみACTが延長した。

2. ADPにて誘発された血小板凝集はプロタミン対ヘパリン比1.3：1以上のプロタミン投与でbaselineよりも有意に抑制された。

[考察]

プロタミンの過剰によりACTが延長する安全域が非常に狭いことが示された。プロタミンの過剰投与によってACTが延長する理由については完全には解明されていない。プロタミンの存在下にフィブリノーゲン、フィブリンモノマーが沈降することが知られているが、プロタミンのpositive chargeがフィブリノーゲンのD-domainのnegative chargeと反応するためとされている。その結果、凝固因子の基質自体の量が減少してしまう可能性がある。またトロンビンがフィブリノーゲンの沈降産物に結合することによりトロンビン量が減少する事も示されている。可逆的ではあるが、濃度依存的にプロタミンとトロンビンが相互作用を起こすこともトロンビンの作用を減弱させる要因となる。

プロタミンの過剰投与による血小板機能異常もACTを延長させうる。従来、プロタミン単独では血小板のADPによる凝集能を抑制しない、とされていた。しかし、我々の結果ではヘパリンの存在下でプロタミンはADPによる血小板凝集能を抑制した。ADP由来のカルシウムイオンの内向きの流入がプロタミン-ヘパリン結合体の膜への作用で変化したためと推測した。

[結論]

1. プロタミンはヘパリン中和に際して臨床投与量の二倍の投与によりACTを延長させた。PF4およびヘキサジメチリンと比較してACT延長に関連する安全域は狭い。
2. ヘパリンの存在下でプロタミンは臨床投与量で血小板凝集能を抑制した。
3. プロタミンが過剰投与されていた場合、ACTの延長に対してプロタミンの追加投与を行うと人口心肺後の凝固能異常を増悪させる可能性がある。

論文審査の結果の要旨

プロタミンはサケの精子の核の中で、DNAと結合している多糖類(グリコサミノグリカン)で陽イオンに荷電している。これはヘパリンと結合して、ヘパリンの作用を中和することが知られている。人工心肺など人工的な管の中に血液を通すと、血小板が活性化され、同時に凝固もおき、血液は血管内、人工管腔のなかで固まる。そのためにヘパリンを投与して、凝固を阻止する方法などがとられている。しかし、手術が終了し、人工心肺からの離脱を行うときに、しばしば出血が見られる。これはヘパリンにより凝固が抑制されているためもあるので、普通はプロタミンでヘパリンを中和する。

しかしプロタミンでヘパリンが完全に中和されたかを知るのは困難である。そのために普通はヘパリンとプロタミンの比を1対1.3~1.5に調整して加えている。

申請者はこのような手法に問題があると考え、カオリンACT(activated clotting time)を用いて、ヘパリンとプロタミンの比を種々に変化させ、凝固、血小板凝集などへの作用を調べた。その結果ヘパリンに対して、プロタミンが少なくてもACTは延長し、プロタミンが多くてもACTが延長することが分かった。

その理由としてプロタミンは高濃度でフィブリノーゲンのポリマー化を抑制し、トロンビンの作用を阻害すること、さらにADP、コラーゲンの血小板凝集作用を抑制することが示された。

一方血小板第4因子(PF4)は血小板のなかに含まれ、血小板が活性化されるときに α 顆粒から放出される。PF4はプロタミンと同様にヘパリンの作用を中和する。最近開発されたrPF4や同じように陽イオンの物質からなるヘキサジメチリンもヘパリンの作用を中和する。rPF4などは量を増やしても、凝固阻害、血小板抑制作用は示さなかった。

以上から申請者はプロタミン/ヘパリン比が1.3~1.5ではプロタミンが多すぎて、出血を起こす可能性があること、さらにrPF4、ヘキサジメチリンなどを用いることによりプロタミンの欠点を補うことができることを示した。

以上の発表後申請者には次のような質問が出された。

- 1) celite ACTとkaolin ACTの違いは何か
- 2) 人口心肺開始前後でACTの値は変化しないか
- 3) ヘパリンとプロタミンは一度結合したら離れないか
- 4) フィブリンの形成を示す弾性率はどのように測定されたか
- 5) ADPを加えて血小板を凝集させると何故ACTは延長するか
- 6) 測定に用いたPRPの採取の仕方と、述べられている15万/ μ lは少なくないか
- 7) 血小板凝集の惹起物質の濃度の設定はどのようにして決めたか
- 8) プロタミンの血小板抑制作用の機序は何か。

このような質問に対する申請者の答えはおおむね正しく、委員全員で申請者の論文は学位(医学)に値すると判断した。

論文審査担当者 主査 高田 明 和
副査 数井 暉 久 副査 梅村 和 夫