HamaMed-Repository
浜松医科大学学術機関リポジトリ
浜松医科大学
Hamamatsu University School of Medicine

Heparin modulates activated protein C-dependent anticoagulant function in thrombin -induced thromboem bolism in mice

メタデータ	言語: Japanese 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: 余, 明宇 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1159

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	医博第　３０６号	学位授与年月日	平成１２年　３月２７日
氏　　名	会　　明　字		
論文題目	Heparin modulates activated protein C – dependent anticoagulant function in thrombin – induced thromboembolism in mice (トロンビン誘発マウス血栓症における活性化プロテインＣの抗凝固作用に及ぼすヘパリンの影響)		

博士(医学)　余　明宇

論文題目

Heparin modulates activated protein C－dependent anticoagulant function in thrombin－induced thromboembolism in mice

(トロンビン誘発マウス血栓症における活性化プロテインCの抗凝固作用に及ぼすヘパリンの影響)

論文の内容の要旨

〔はじめに〕

プロテインCはビタミンK依存性凝固因子で主に肝臓で合成され、血管内皮細胞上のトロンボモジュリン(TM)に結合したトロンビンにより活性化プロテインC(APC)に変換される。APCは凝固Va因子およびⅤⅢa因子を選択的に分解することにより血液凝固反応を強く阻害する。またAPCは内皮細胞や血小板から分泌されたPAI－1を中和して線溶促進作用を有する。動物を用いた慢性DICモデルにおいて、APCは強い抗凝固作用を持ち、出血等の副作用も少ないことから近い将来新しい抗血栓薬として臨床に応用される可能性がある。そこで私達は急性DICモデルにおけるAPCの有効性、またAPCとヘパリン同時投与時の効果について検討した。

〔材料ならびに方法〕

(1)ICRマウス(7－8週、体重20－25g)の尾静脈よりトロンビン(250、1,000U／kg)を投与し、急性DICモデルを作成した。トロンビン投与3分後マウスをエーテルで屠殺し、左下肺組織を10%中性ホルマリンで24時間固定した後、5μmのparaffin切片を作成した。肺血管内の血栓はphosphotungstic acid－hematoxylin法で染色した後、400倍の視野で10視野中全血管に対する血栓形成率を算出した。

(2)APC(0.5、1.0、2.0、4.0mg／kg)とヘパリン(10U、50U、100U／kg)、またAPC＋ヘパリンをそれぞれトロンビン投与3分前に尾静脈から注射し、(1)で述べた方法で血栓形成率を計算した。

(3)ヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVEC)を培養し、間接酵素抗体法と蛍光染色でprotein C inhibitor(PCI)を染色した。

(4)Flow cytometry およびconfocal laser scan microscopy法でHUVEC細胞に局在しているPCIに対するヘパリンの影響を検討した。

〔結果〕

(1)トロンビン(250、1,000U／kg)を投与した後の血栓形成率はそれぞれ36.6±9.5%、83.2±7.8%と濃度依存性に増加した。

(2)トロンビン1,000U／kgに対しては、APC(0.5－4.0mg／kg)を3分前に投与しても抗凝固作用は認められなかった。ヘパリン(50、100U／kg)投与群では、いずれも血栓形成を抑制した(血栓形成率は32.3±6.3%、10.7±5.4%)。

(3)トロンビン250U／kgに対して、APC(1.0mg／kg)、ヘパリン(10U／kg)投与群ではすべて血栓形成抑制作用を示し、血栓形成率はそれぞれ21.5±5.6%、17.5±4.2%であった。しかし、両者同時投与群では、血栓形成抑制効果は有意に低下し(血栓形成率：28.6±7.8%)、同時投与群と単独投与群の間に有意差が認められた($p<0.05$)。

(4)免疫および蛍光染色法によりPCI抗原はHUVEC細胞に局在していることが確認された。

(5)Flow cytometry とconfocal laser scan microscopy により、ヘパリン(10U／ml以上、37℃、5分)はHUVEC細胞表面に存在しているPCIを濃度依存性に遊離させた。

〔考察〕

急性DICモデルでは、ヘパリンがAPCより強い抗凝固作用を有することが示された。APCと低濃度のヘパリン同時投与の場合には、APCの抗凝固作用がヘパリンにより抑制された。ヘパリンを血管内皮細胞に投与すると細胞表面のPCIが遊離し、APCと結合するためAPCの抗凝固作用が抑制されることが考えられ、臨床応用時には注意を要する。

〔結論〕

(1)急性DICモデルでは、ヘパリンがAPCより強い抗凝固作用を示した。

(2)APCと低濃度のヘパリン同時投与の場合では、APCの抗凝固作用がヘパリンにより抑制された。

(3)ヘパリンは血管内皮細胞表面のPCIを遊離させ、APCの抗凝固作用を減弱させた。

論文審査の結果の要旨

活性化プロテインC(APC)は強い抗凝固作用を持ち、出血等の副作用が少ないと報告されており臨床での効果が期待されている。そこで申請者は急性DICモデルにおけるAPCの有効性、またAPCとヘパリンの同時投与による効果について検討した。

〔材料ならびに方法〕

(1)ICRマウス(7－8週、体重20－25g)の尾静脈よりトロンビン(250、1,000 U／kg)を投与し、急性DICモデルを作成した。トロンビン投与3分後マウスを屠殺し、左下肺組織を取り出し、固定後パラフィン切片を作成した。光学顕微鏡により血栓形成を観察した。血栓形成率は血管に占める血栓の割合として算出した。

(2)APCとヘパリンの効果を検討するためにAPC(0.5、1.0、2.0、4.0 mg／kg)、ヘパリン(10、50、100 U／kg)、APC＋ヘパリンをそれぞれトロンビン投与3分前に尾静脈から注射し、血栓形成への影響を検討した。

(3)ヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVEC)を培養し、間接酵素抗体法と蛍光染色でprotein C inhibitor(PCI)を染色した。

(4)Flow cytometry およびconfocal laser scan microscopy法でHUVEC細胞に局在しているPCIに対するヘパリンの影響を検討した。

〔結果〕

(1)トロンビン(250、1,000 U／kg)を投与した後の血栓形成率はそれぞれ36.6±9.5%、83.2±7.8%と濃度依存性に増加した。

(2)トロンビン1,000 U／kgに対しては、APC投与群では血栓形成に影響は認められなかったが、ヘパリン投与群では、血栓形成は抑制された。

(3)トロンビン250U／kgに対して、APC(1.0mg／kg)単独およびヘパリン(10U／kg)単独投与で血栓形成は抑制された。しかし、2剤併用投与群では、血栓形成抑制効果は有意に低下した。
(4)免疫および蛍光染色法によりPCI抗原はHUVEC細胞に局在していることが確認された。
(5)Flow cytometry とconfocal laser scan microscopyによる検討で、ヘパリンはHUVEC細胞表面に存在しているPCIを濃度依存性に遊離させた。

以上の結果から申請者は以下の結論に至った。
(1)急性DICモデルにおいて、APCは抗凝固作用を示した。
(2)ヘパリンは血管内皮細胞表面のPCIを遊離させ、APCの抗凝固作用を減弱させる可能性がある。
申請者が動物DICモデルにおけるAPCの抗凝固作用を明確に示したことと、APCとヘパリンとの併用が抗凝固作用を減弱させるため臨床応用時には注意して使用すべきだと提唱したことを審査委員は高く評価した。

〔本論文の評価〕
本論文内容の説明の後、論文内容と関連の深い以下の点について申請者との間に質疑応答がなされた。

1) APCによるFVa、FVⅢa不活性化のメカニズム
2) 今回の実験に用いたトロンビンによるDICモデルについて
3) 観察期間を3分と設定した根拠
4) ヘパリンとAPCの投与量の設定根拠
5) Heparintinaseの作用について
6) PCIの発現メカニズムと血中での推移
7) Phosphotungstic acid－hematoxylin stain 法について
8) ヘパリンとAPCとの併用がヘパリン単独より効果が減弱した理由
9) 統計学的解析法について
10) APC活性の測定について
11) ヘパリンとAPCの出血傾向の差について
12) PCIの分布する臓器について
13) 血液学的パラメータの測定について

以上の質問に対する申請者の解答は概ね適切であり、問題点も十分理解しており、本論文は博士(医学)の学位授与にふさわしい内容を備えていると審査員全員一致で判定した。

論文審査担当者　主査　梅村和夫
副査　菅野剛史　副査　浦野哲盟