

## 無肝期における凝固線溶系分子マーカーおよび 諸指標の経時的变化に関する実験的検討

京都府立医科大学第2外科

吉村 了勇 濱島 高志 李 哲柱 大坂 芳夫  
平川 一典 閑 啓太郎 安井 仁 天池 寿  
園山 輝久 山岸 久一 岡 隆宏

Veno-venous (V-V) バイパスの凝固能にあたる影響をみるため、ブタ (n=6) を用いて凝固線溶系分子マーカーについて検討した。凝固系分子マーカーである thrombin-antithrombin (TAT) 複合体は無肝期直前に  $10.2 \pm 4.6 \mu\text{g/l}$  (n=6) と低値であったのが無肝期の早期 (30分) に  $58.6 \pm 5.1 \mu\text{g/l}$  ( $p < 0.01$ ) へと著明な増加を示し、その後も時間経過とともに軽度増加した。一方、フィブリンモノマー (FM) テストは無肝期60分から120分を境に (-) から (+) へと変化を示した。一方、線溶系ではDダイマーは無肝期直前に  $65 \pm 5 \text{ng/ml}$  であったのが、無肝期30分、60分、でそれぞれ  $70.0 \pm 10.1 \text{ng/ml}$ ,  $76.0 \pm 8.7 \text{ng/ml}$ , と軽度上昇を示したにとどまった。しかし、120分、150分では  $100 \pm 11.3 \text{ng/ml}$  および  $121 \pm 10.8 \text{ng/ml}$  ( $p < 0.05$ ) と明らかな増加傾向を示した。プラスミン- $\alpha_2$ プラスミンインヒビター (PIC) は有意な変化を示さなかった。無肝期における凝固系分子マーカーの指標として TAT 複合体が、また線溶系分子マーカーではDダイマーがよい指標と考えられ、従来の凝血的諸指標より鋭敏であった。

**Key words:** veno-venous bypass, blood coagulation, fibrinolysis, molecular marker

### はじめに

末期肝障害患者の治療手段として同所性肝移植が臨床応用され優れた成績をおさめている<sup>1)~3)</sup>。手技的には門脈・下大静脈—上大静脈のバイパス (v-v バイパス) を使用することにより、無肝期の良好な血行動態、腎機能の安定などが報告されている<sup>4)</sup>。一方、重症肝障害患者は移植前より凝固能異常を示し、さらに肝移植時無肝期には凝固因子の生産はなく、また FDP などの凝固因子代謝産物の除去もなされないため凝固能は低下する。従来より v-v バイパスを用いた無肝期では血小板数、フィブリノーゲン、ヘパラスチンなどの減少、prothrombin time (PT), activated partial thromboplastin time (APTT) の上昇が報告されてきている<sup>5)6)</sup>。今回 v-v バイパスを使用した無肝期に、最近臨床的意義が注目されてきている凝固線溶系分子マーカーについてその他の諸指標と同時に測定しその意義を検討した。

### 材料と方法

#### 1. 実験モデル

体重20kg前後のブタ (n=6) を使用し ketamine hydrochloride 10.0mg/kg 筋注後、myoblock 4mg を静注し気管内挿管を行いレスピレーターを使用し人工呼吸を行った。右外頸静脈よりカットダウンチューブを挿入し、全経過中乳酸加リンゲル液を  $30 \text{ml/kg/hr}$  の速度で持続点滴を行い、Ht 値がほぼ術前値を維持するよう調節した。経過中適宜ミオブロックの静注を追加し麻酔を維持した。開腹し右大腿静脈より14Fアーガイルチェストチューブを下大静脈へ挿入し、さらに12Fアーガイルチェストチューブを門脈本幹へ挿入し、両チューブを内径8mm Y型ビニールチューブに接続し脱血路とした。左外頸静脈へは12Fアーガイルチェストチューブを上大静脈まで挿入し、送血路とし無ヘパリン下にバイオポンプを使用して門脈血、下大静脈血を上大静脈へ強制灌流した。以上の処置後、肝全摘を行い無肝状態下に150分間体外循環を行った。全身のヘパリン化は行わなかったが、バイパス回路の充填液にはヘパリン500単位を含んだ生食液250mlを用

<1993年3月3日受理> 別刷請求先: 吉村 了勇  
〒602 京都市上京区河原町広小路梶井町 京都府立  
医科大学第2外科

Table 1 Method of tests

Thrombin-antithrombin III complex (TAT)	..... ELISA
Fibrin monomer test (FM)	..... Latex agglutination assay
D dimer	..... EIA
Plasmin- $\alpha_2$ plasmin inhibitor (PIC)	..... EIA
AT-III	..... Chromogenic substrate assay
Hepaprasitin (HP)	..... Normotest for plasma
Fibrinogen (Fng)	..... Thrombin technique
FDP	..... Latex agglutination assay
Tissue plasminogen activator (t-PA)	..... EIA

いた。

## 2. 検査項目および方法

術中の採血は血圧モニター用に留置した左外頸静脈のカテーテルから30分間隔で行い、凝固系分子マーカーとしてトロンビン-アンチトロンビンIII複合体(TAT)、フィブリンモノマーテスト(FMテスト)、線溶系分子マーカーとしてDダイマーおよびプラスミン- $\alpha_2$ プラスミンインヒビター(PIC)を検討した。また従来の凝固系諸指標として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)、アンチトロンビンIII(AT-III)、フィブリノーゲン(Fng)およびヘパプラスチン(HP)を測定した。また線溶系諸指標としてFDPおよび組織プラスミノゲンアクチベーター(t-PA)を検討した。各種検査の方法はTable 1に示した。

## 3. 統計処理

統計学的処理はt検定によって行い、危険率5%以下を有意と判定した。数値は平均 $\pm$ SDで表わした。

## 結 果

### 1. 凝固系分子マーカーの変動

無肝期前には $10.2 \pm 4.6 \mu\text{g/l}$ であったTATは無肝期30分で $58.6 \pm 5.1 \mu\text{g/l}$ と著明な上昇を示した( $p < 0.01$ )。しかし60分で $65.5 \pm 14.5 \mu\text{g/l}$ 、120分で $76.3 \pm 15.4 \mu\text{g/l}$ 、150分で $80.1 \pm 16.0 \mu\text{g/l}$ とその後は軽度な上昇を示した。一方、FMテストは無肝期前、30分では(-)であったのが、60分で5例中3例が(-)であった。無肝期120分で(+)に変化し150分でも(+)を示した(Fig. 1)。

### 2. 凝固系諸指標の動き

#### a) PT, APTT

前値 $12.2 \pm 0.5$ 秒であったPT値は、無肝期30分で $12.8 \pm 0.7$ 秒、60分で $13.1 \pm 0.9$ 秒、120分で $14.0 \pm 0.9$ 秒( $p < 0.05$ )さらに150分で $14.1 \pm 0.5$ 秒( $p < 0.05$ )と時間経過とともに軽度な上昇を示した。また前値

Fig. 1 Serial changes of TAT, FM test

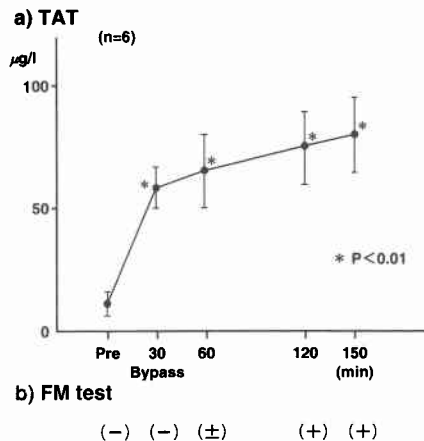
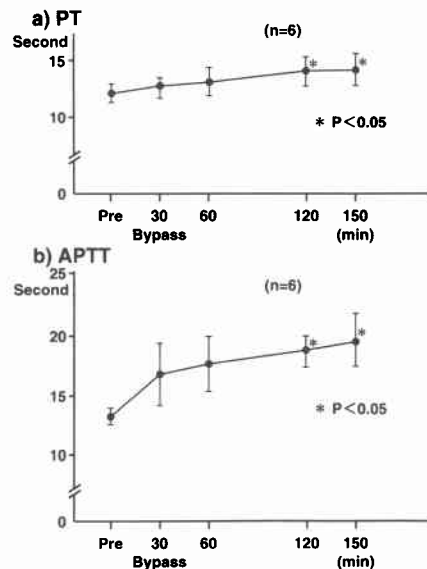


Fig. 2 Serial changes of PT, APTT



13.5±0.5秒であったAPTTは無肝期30分で16.8±2.5秒, 60分で17.6±2.3秒, 120分で18.8±1.7秒(p<0.05), 150分で20.4±4.8秒(p<0.05)とPT同様軽度な上昇を示した(Fig. 2).

b) AT-III, ヘパラスチン(HP), フィブリノーゲン(Fng)

前値88.4±16.3%であったAT-III値は無肝期30分で75.0±7.2%, 60分で62.0±8.4%(p<0.05), 120分で59.0±11.3%(p<0.05), 150分で57.1±13.0%(p<0.05)と60分までは時間に比例して減少したがその後は緩徐に低下した。また前値65.1±7.2%であったヘパラスチンは無肝期30分で53.3±4.9%, 60分で49.5±8.2%, 120分で33.9±6.5(p<0.05)さらに150分で27.0±7.1%(p<0.05)と時間経過に比例して低下した。Fng値は前値99.2±7.6mg/dlであったのがそれぞれ77.1±2.9mg/dl, 66.6±6.1mg/dl(p<0.05), 61.5±9.3mg/dl(p<0.05), 60mg以下(p<0.05)と減少した(Fig. 3).

### 3. 線溶系分子マーカーの変動

無肝期前には44.2±21.0ng/mlであったDダイマーは無肝期30分で47.1±23.1ng/ml, 60分で50.5±25.1ng/ml, とほとんど変動を示さなかったが120分値で70.0±15.1ng/ml, 150分値で98.9±18.7ng/ml(p<

0.05)と無肝期の後期に著しい上昇を示した。一方PICは前値, および無肝期全般を通じて0.3μg/ml以下と変動を示さなかった(Fig. 4).

### 4. 線溶系諸指標の動き

FDPは無肝期前には1.3±0.4μg/ml, 無肝期30分で1.5±0.4μg/ml, 60分で1.6±0.4μg/mlと軽度な上昇であったが120分値で2.6±1.3μg/ml(NS)と上昇した。150分値では1.9±0.6μg/mlと軽度低下した。またt-PAは前値0.7±0.4ng/mlであったのが30分値0.9±0.6ng/ml, 60分値0.9±0.5ng/ml, 120分値1.2±0.6ng/mlおよび150分値1.4±0.6ng/ml(NS)と同時に比例して軽度上昇を示した(Fig. 5).

### 5. その他の指標

血小板数は無肝期前値46.1±17.2×10<sup>4</sup>/mm<sup>3</sup>であったのが30分値37.7±8.5×10<sup>4</sup>/mm<sup>3</sup>, 60分値32.9±8.5×10<sup>4</sup>/mm<sup>3</sup>, 120分値25.7±13.8×10<sup>4</sup>/mm<sup>3</sup>(p<0.05), 150分値19.7±10.1×10<sup>4</sup>/mm<sup>3</sup>(p<0.05)と時間がたつにしたがって低下した(Fig. 3).

### 考 察

肝移植手術では術中術後の大量出血, 肝動脈, 門脈の血栓症など, 出血傾向と凝固亢進状態とが混在した状態にあり複雑な凝血学的動態を示す。肝移植の適応となるのは, 末期肝臓疾患患者であり, 術前から血液

Fig. 3 Serial changes of AT-III, HP, Fng, Platelets (n=6)

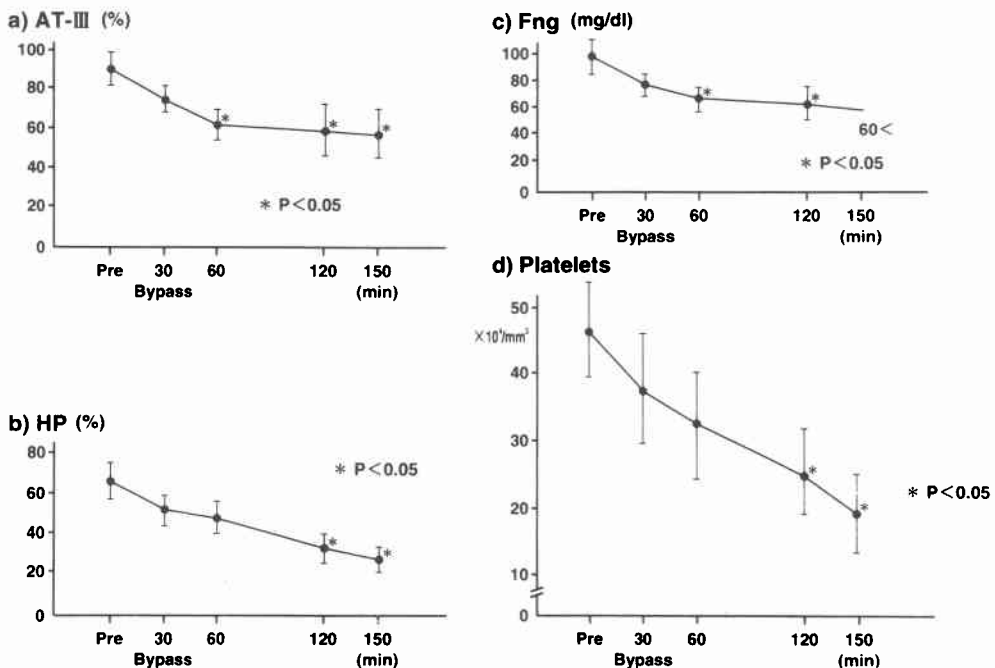


Fig. 4 Serial changes of D dimer (DD), PIC

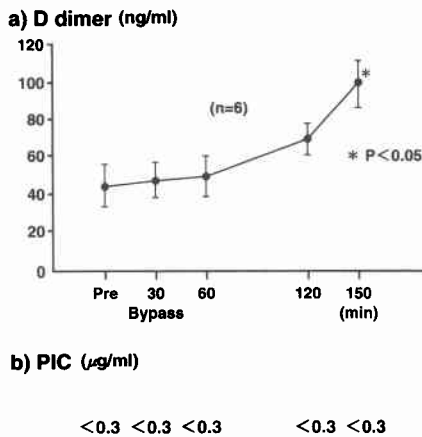
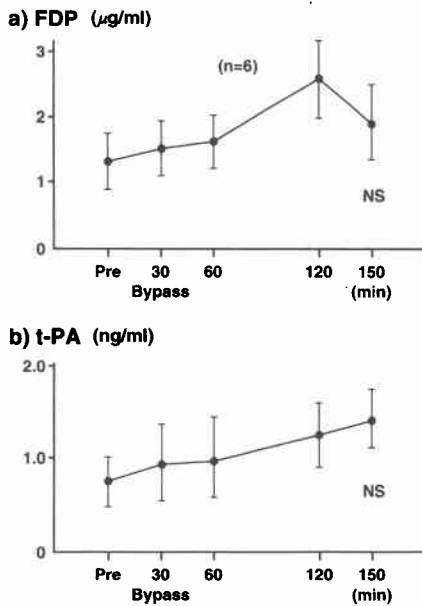


Fig. 5 Serial changes of FDP, t-PA



凝固能の異常を伴っていることが多い<sup>7)~9)</sup>。すなわち、①脾機能亢進による血小板数減少、凝集異常などの血小板機能障害、②第VIII因子以外の血液凝固因子、とくに第V因子あるいはビタミンK依存性凝固因子とされる第II, VII, IX, X因子の減少、③肝臓で生産されるATIIIの低下、網内系機能不全による播種性血管内凝固症候群、④流血中に遊離した組織プラスミノゲンアクチベーター(t-PA)の処理障害、肝由来のt-PAの血中侵入、t-PAに対する阻止因子(PAI)や $\alpha_2$ プラスミンインヒビター( $\alpha_2$ PI)の低下などによる線溶亢進状態などである。

さらに、肝移植手術に特異的な病態として凝固因子産生の中心的役割を持つ肝臓が全摘出され短時間内に血液凝固能の劇的な変化がおこることである。これらのことから、手術手技の問題とともに、術中、とくに無肝期を中心とした血液凝固能の推移の把握とその維持は、肝移植手術の成否を左右する重要な因子の1つである。

従来より大動物(イヌ)を用いた無肝期実験で血小板数、PT、フィブリノーゲン、AT-IIIを経時的に測定し消耗性凝固障害と線溶系の亢進が示されてきた<sup>5)6)</sup>。一方、最近の血栓、止血学の進歩により止血、線溶の機序について分子レベルで理解されるようになり分子マーカーの臨床的意義が注目されつつある<sup>10)</sup>。

血液凝固反応は、酵素前駆体から酵素への一連の転換反応が連鎖的に起こり、最終的にトロンビンがフィブリノーゲンをフィブリンに転化する反応である。従来より凝固亢進状態を把握するための検査として、これら凝固因子およびアンチトロンビンIII(antithrombin III; AT-III)を代表とする凝固阻止因子の消費による低下を証明する方法やフィブリンの分解産物の上昇を証明する方法が用いられてきた。しかし、これら凝固(阻止)因子濃度は生成と破壊(消費)とのバランスに依存するもので、血中濃度の低下が産生低下によるものか消費亢進によるものかはその検査値のみからは不明であり、この点、凝固亢進状態の把握には必ずしも適切ではない。

近年、凝固亢進状態の鋭敏なマーカーとして、トロンビン作用によりフィブリノーゲンから遊離するフィブリノペプチドA、フィブリノペプチドBおよびフィブリンモノマー、また生じたフィブリンのプラスミンによる分解産物(XDP)の測定法が開発され臨床上用いられている<sup>11)~13)</sup>。さらに凝固反応の上の段階の変化をとらえる方法が凝固活性化および血栓準備状態のより鋭敏な指標として開発され、とくにトロンビンそのものの生成のマーカーとしてTATが臨床応用されている<sup>14)15)</sup>。

実際今回の検討でもTATは無肝期早期より急激な上昇を示し消耗性凝固亢進状態を鋭敏に示していた。一方、FMテストは簡便で日常スクリーニング検査には適したものと考えられるが、TATほど鋭敏な変化は示さず無肝期における凝固系分子マーカーとしてはTATが有用と考えられた。線溶系分子マーカーとしてDダイマーとPICを測定したがPICは1次線溶および2次線溶の両者を反映するのに対しDダイ

マーは2次線溶を反映している。実験結果よりDダイマーが無肝期の後期に著明に上昇しているのに対し、PICは経時的な変化を示さなかった。この理由として今回用いた抗体はヒトに対するものであり、ブタのPICとは反応しなかった可能性が考えられる。さらにDダイマーが著しい上昇を示していることから無肝期の後期には2次線溶が亢進している事実が示された。しかし、TATなどの複合体は網内系で処理される。肝は体内における大きな網内系臓器であり、無肝の状態では網内系機能が低下していることになりTATの分解は障害される。そのため今回の研究においても、肝を摘出することにより見かけ上TATが上昇している可能性がある。しかし、無肝期の後期で網内系では分解されないDダイマーが上昇を示していることはすなわち、1次凝固が亢進していたことを示している。無肝期には肝臓に依存していた凝固因子産生能と凝固促進因子除去能が欠如することにより複雑な凝固学的状態に陥る。しかし、各凝固因子あるいは凝固促進因子のIn Vivoでの半減期は少なくとも12時間以上であり<sup>16)</sup>、無肝期150分という今回の実験時間内に、これらの因子の自然減少により凝固、2次線溶が亢進したとは考えられず、他の何らかのメカニズムが働いたと考えられる。従来の凝固学的指標において認められた異常は肝摘出による合成能低下においても、また凝固亢進のいずれにおいても認められる異常である。しかし今回の検討結果より、血液がバイパスという異物と接触し、凝固亢進状態となり凝固因子が消費された結果、合目的に2次線溶が亢進することが分子レベルで示された。今後はアンスロンチューブなどを用いた比較検討が必要であろう。

本論文の要旨は第39回日本消化器外科学会総会(神戸)において発表した。

#### 文 献

- 1) Starzl TE, Iwatsuki S, VanThiel D et al: Evolution of liver transplantation. *Hepatology* 2: 614-636, 1982
- 2) Otte JB, Yandza T, De Ville De Goyet J et al: Pediatric liver transplantation: Report on 52 patients with a 20 year survival of 86%. *J Pediatr Surg* 23: 250-253, 1988
- 3) Broelshe CE, Emond JC, Thistlethwaite JR et al: Liver transplantation with reduced-sized donor organs. *Transplantation* 45: 519-523, 1988
- 4) Show BW, Martin DJ, Marquez JM et al: Venous bypass in clinical liver transplantation. *Ann Surg* 200: 524-534, 1984
- 5) 松波英寿, 鬼束 義, 福富 督ほか: 肝移植無肝期における静脈-静脈 bypassの凝固能に対する影響の実験的研究. *日消外会誌* 20: 1871-1876, 1987
- 6) 瀧島常雅, 横田和彦, 佐藤光史ほか: イヌ同所性同種肝移植実験における術中一特に無肝期一の血液凝固能の推移に関する検討. *北里医* 20: 96-107, 1990
- 7) 朝倉英策, 松田 保: 全身疾患に伴う止血異常の臨床. *Med Pract* 5: 1703-1713, 1988
- 8) Joist JH: Hemostatic abnormalities in liver disease. Edited by Colmean RW, Hirsh J, Marder VJ et al. "Hemostasis and Thrombosis". Lippincott Co., Philadelphia, 1987, p861-872
- 9) Lewis JH, Bontempo FA, Starzl TE: An tithrombin III during liver transplantation. *Transplant Proc* 21: 3543-3544, 1989
- 10) 池田康夫: 分子レベルでみた止血機序. *臨検* 33: 1576-1583, 1989
- 11) Nossel H, Yudelma I, Canfield RE et al: Measurement of fibrinopeptide A in human blood. *J Clin Invest* 54: 43-53, 1974
- 12) 巽 典之, 巽 陽一, 藤井厚男: フィブリノペプチドAの検査法. *臨検* 30: 228-232, 1986
- 13) 田原千枝子, 風間睦美, 安部 英ほか: 凝固亢進状態の指標としてのフィブリン複合体の検半試薬フィブリンモノマーテスト(FNT)の評価. *血と脈管* 15: 71-80, 1984
- 14) Gulba DC, Barthels M, Reil GH et al: Thrombin/antithrombinIII complex level as early predictor of reocclusion after successful thrombolysis. *Lancet* ii: 97, 1988
- 15) 福武勝幸: トロンピン, アンチトロンピンIII複合体(TAT). *臨病理* 37: 261-265, 1988
- 16) Sulzman EW: Hemostatic problems in Surgical patients. Edited by Coleman RW, Hirsh J, Marder VJ et al. "Hemostasis and Thrombosis". Lippincott Co., Philadelphia, 1987, p920-925

**An Experimental Study of the Sequential Determination of Molecular and Conventional Parameters for the Evaluation of the Coagulation and Fibrinolytic Status during the Anhepatic Phase**

Norio Yoshimura, Takashi Hamashima, Chol-Joo Lee, Yoshio Ohsaka, Kazunori Hirakawa,  
Keitaro Kan, Hitoshi Yasui, Hisashi Amaike, Teruhisa Sonoyama,  
Hisakazu Yamagishi and Takahiro Oka  
The Second Department of Surgery, Kyoto Prefectural University of Medicine

Although the development of veno-venous bypass technique during orthotopic liver transplantation (OLT) has decreased the mortality and morbidity of the patients, bleeding or thrombosis due to hemostatic disorders, especially during the anhepatic phase of surgery, are serious problems in OLT patients. In the present study, therefore, we assessed the efficacy of the molecular markers used to evaluate coagulation and fibrinolysis status during the anhepatic phase of surgery using a swine model. Total hepatectomy was performed in the swine (female, BW=20 kg, n=6) and maintained for 150 minutes with veno-venous bypass. Thrombin-antithrombin III complex (TAT) and fibrin monomer test (FM test) were analyzed as molecular markers of the coagulation state, and FDP-D dimer (DD) and plasmin- $\alpha_2$  plasmin inhibitor complex (PIC) were analyzed as molecular markers of the fibrinolytic state. PT, fibrinogen (Fng), AT-III, heparastin (HP), FDP, tissue plasminogen activator (t-PA) and platelet counts were also analyzed as conventional parameters. TAT levels displayed a remarkable elevation in the early anhepatic phase, but FM test showed a slow change from (-) to (+) between 60 and 120 min of the anhepatic phase. On the other hand, DD levels displayed a remarkable elevation in the late anhepatic phase. PIC did not show any significant change. These data suggested that coagulation disturbances due to a consumption of elements developed in the early anhepatic phase and that fibrinolytic disturbances developed in the late period. Since molecular markers are more sensitive than conventional parameters, sequential determination of TAT and DD is recommended to evaluate the hemostatic status in the anhepatic stage of OLT.

**Reprint requests:** Norio Yoshimura The Second Department of Surgery, Kyoto Prefectural University of Medicine  
465 Hirokoji, Kawaramachi, Kamikyo-ku, Kyoto, 602 JAPAN

---