◆原 著◆

体外循環下開心術における活性化血小板の 変動とその意義

—抗 GMP-140抗体 2 T 60 を用いた flow cytometry による解析—

近 藤 智 昭^{*1}, 田 中 國 義^{*1}, 矢 田 公^{*1},
湯 淺 浩^{*1}, 草 川 實^{*1}, 赤 松 紀 子^{*2},
田 上 憲 次 郎^{*2}

Activation of the Circulating Platelets During Cardiopulmonary Bypass

—Flow Cytometric Analysis Using an Anti-GMP-140
Monoclonal Antibody (2 T 60) —

Chiaki KONDO^{*1}, Kuniyoshi TANAKA^{*1}, Isao YADA^{*1}, Hiroshi YUASA^{*1},
Minoru KUSAGAWA^{*1}, Noriko AKAMATSU^{*2}, Kenjiro TANOUE^{*2}

Key words: cardiopulmonary bypass (CPB), open heart surgery, platelet activation,
GMP-140, flow cytometry

Appearance of the activated platelets and their behaviors during cardiopulmonary bypass (CPB) surgery were studied in 21 adult patients undergoing coronary artery bypass grafting or valve replacement. Sampled blood was immediately fixed with 1% paraformaldehyde. The isolated and washed platelets were incubated with 5 μ g/ml of 2 T 60 (anti-GMP-140 monoclonal antibody) and then with FITC-conjugated anti-mouse IgG for flow-cytometric analysis.

Mean fluorescence intensity of the 2 T 60-stained platelets was 19.5 ± 5.9 at pre-CPB and increased significantly ($p < 0.01$) during CPB and reached the maximal level (26.2 ± 9.2) at 120 min of CPB. After the end of CPB, it decreased and on the first postoperative day it returned to the pre-CPB value. Immunofluorescence histograms of 2 T 60-stained platelets showed a main population composed of the inactivated GMP-140-negative platelets (channel number less than 20) with a small population of the activated GMP-140-positive platelets on the right slope shoulder of the main (channel number greater than 20) before CPB. After the beginning of CPB, the activated platelets rapidly increased and formed another distinguishable population of activated platelets. In 8 of 21 patients, the peak

^{*1} 三重大学医学部胸部外科 [〒 514 三重県津市江戸橋 2-174]: Department of Thoracic & Cardiovascular Surgery, Mie University School of Medicine. 2-174 Edobashi, Tsu, Mie, 514, Japan.

^{*2} 東京都臨床医学総合研究所循環器病研究部 [〒 113 東京都文京区本駒込 3-18-22]: Department of Cardiovascular Research, The Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science. 3-18-22 Honkomagome, Bunkyo-ku, Tokyo, 113, Japan. 受付: 1992. 10. 26, 受理: 1993. 2. 10.

height of the population of the activated GMP-140-positive platelets was higher than or equal to that of the inactivated GMP-140-negative platelets. However, the peaks of the activated platelets did not shift to the right side, i.e., the channel number of the peak remained at the same immunofluorescent intensity, suggesting that there is a certain limit in the activation of the circulating platelets during CPB and the platelets activated beyond the limit may be removed from the circulation.

In conclusion, platelets are activated during CPB and the platelets activated beyond a certain limit are removed from the circulation, resulting in thrombocytopenia after CPB.

はじめに

体外循環下開心術においては人工心肺 (cardiopulmonary bypass, (CPB)) 回路内面と血液との接触や凝固線溶機能亢進などに伴い、血小板の活性化,あるいは機能異常が引き起こされ,術後の止血異常の原因となると考えられている¹⁾。しかし,その詳細な機序については今なお不明な点が少ない。

血小板 α 顆粒膜に存在する糖蛋白 GMP-140 は,血小板活性化反応の一つとしての放出反応に伴って表面膜上に移動する糖蛋白であり,この GMP-140 に対して作成されたモノクローナル抗体 2 T 60^{2)~4)} は,ヒトまたは家兎の活性化血小板に特異的に結合することができる。

本研究は血小板活性化反応の一つとして分泌(放出)反応を経過した血小板を,モノクローナル抗 GMP-140 抗体 (2 T 60) 結合可能なものとして検出することにより,体外循環下開心術における血小板活性化の動態を明らかにすることを目的として行った。

I. 対象と方法

1. 対象

当科にて施行した体外循環下開心術症例 21 例(冠動脈バイパス術 15 例,弁置換術 6 例)を対象とした。内訳は男性 14 例,女性 7 例,年齢は 24 から 77 歳(平均 55.8 歳)であった。

2. 体外循環方法

体外循環は全膜型肺(MERA 社製,メラエクセランバインディング HPO-25 H または Medtronic 社製, MAXIMA-1380)とローラーポンプを組み合わせて施行した。膜型肺の材質

はポリプロピレンで,回路チューブは塩化ビニル製を用いた。回路充填には 20% D-mannitol 5 ml/kg, 6% hydroxyethylstarch (Hespan[®]) 5 ml/kg に乳酸リンゲルを加えて全量を 1,800 ml とし,充填液 500 ml に対し,抗凝血薬としてヘパリン 10 mg を加えた。カニューレーション前にヘパリン 3 mg/kg を右心耳から全身投与し,体外循環中は ACT を 400 秒以上に保った。体外循環終了後,投与ヘパリンの 1.5 倍量の硫酸プロタミンにてヘパリンを中和した。体外循環灌流量は 2.4 l/min/m² を目標とし, 25~28°C の中等度低体温下に開心術を行った。平均体外循環時間は 154±38 分であった。

3. 採血および測定

採血は術前,体外循環開始後 5 分, 60 分, 120 分, 体外循環終了後 1 時間, 3 時間, 術後 1 日目(体外循環終了後 16~20 時間)の時点で,橈骨動脈留置カテーテルまたは体外循環回路送血側から行った。血小板数の測定は自動血球測定器(東亜医用電子, E 4000, 神戸)にて行い,ヘマトクリット値で補正した。活性化血小板の検出は次のように施行した。ACD 液 1 量を含むプラスチック注射筒に 6 量の血液を採取, ゆっくりと 3 回転倒混和し, 直ちに等量の 2% paraformaldehyde (TAAB Laboratories. Reading, Berks.) と混合し, 室温にて 15 分間固定した。120 g 室温で 15 分間遠心し platelet-rich plasma (PRP) を集め, さらに PRP を 1200 g 室温で 15 分間遠心し pellet とした。これを phosphate-buffered saline (PBS, pH 6.5) に浮遊させた後, 1,000 g で 10 分間室温にて 2 回洗浄, PBS (pH 7.4) に再浮遊させ解析まで 4°C で保存した。血小板 1×10^8 /ml に対し, 2 T 60 抗

体を最終濃度 $5 \mu\text{g/ml}$ になるように加え、氷冷中にて1時間孵置、洗浄後、FITC 標識ヤギ抗マウス Ig (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA) と反応させた後に、flow cytometry (FACSscan, Becton Dickinson Immunocytometry Systems, Mountain View, CA, 以下 FC) にて解析した。2 T 60 抗体との反応、FC による解析は血小板の固定、洗浄後、48 時間以内に行った。予備実験にて同一検体を種々の保存時間で解析したところ、5 日以内であれば測定結果に差を認めないことを確認している。2 T 60 抗体のヒト血小板への結合が、活性化に依存していることを明らかにするために、洗浄ヒト血小板を種々の濃度のトロンビンで10分間刺激し、固定、洗浄後、2 T 60 抗体と反応させた時の FC におけるヒストグラムを **Fig. 1** に示す。ヒストグラム上で2 T 60 結合の peak が右方へ移動することにより、血小板表面の GMP-140 の発現が、トロンビンの濃度依存性に増加することが証明された。

陰性対照としては、2 T 60 のかわりに正常マウス IgG を用いた。

各測定値は $\text{mean} \pm \text{SD}$ で表し、統計学的処理は Wilcoxon test または Student's t test にて行い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

II. 結 果

1. 血小板数

ヘマトクリットで補正した血小板数は、体外循環開始前を100% とすると、5 分後にはすでに有意に ($p < 0.01$) 減少し、120 分後 $74.3 \pm 14.6\%$ 、体外循環終了1時間後 $60.6 \pm 21.2\%$ とさらに減少し、術後1日目に最低値 $49.1 \pm 18.0\%$ に達した。その後は増加し、術後7日目には $136.7 \pm 52.1\%$ まで反跳した (**Fig. 2**)。

2. 活性化血小板

① Mean Channel による検討：流血中の血小板への2 T 60 の結合度、すなわち GMP-140 の血小板表面への発現を FC の蛍光強度における Mean Channel で表現すると、術前は 19.5 ± 5.9 で、体外循環開始5, 60, 120 分後にはそれぞれ 21.1 ± 6.0 , 24.2 ± 8.9 , 26.2 ± 9.2 (いずれ

Fig. 1 Flow cytometric analysis of thrombin-activated platelets. Platelets activated with thrombin showed dose-dependent increases in the expression of GMP-140 (2 T 60 antigen).

も $p < 0.01$) と漸増し、体外循環終了後は低下傾向を示すものの、体外循環開始5分から終了1時間後まで有意 ($p < 0.01$) の高値を示した。しかし、体外時間後3時間には 20.4 ± 6.0 まで低下し、術後1日目には 19.3 ± 5.3 と前値に復した (**Fig. 3**)。

②陽性率による検討：各 sampling point において、2 T 60 のかわりに IgG を結合させた血小板を陰性対照とし、FC のヒストグラムで蛍光強度が弱いほうからの度数が90% となる部位に cut off line を設定し、それより蛍光強度の強い部分を陽性として、全体に対するパーセントで表現した。術前には $29.7 \pm 8.4\%$ で、体外循環開始5, 60, 120 分後にはそれぞれ $35.2 \pm 10.2\%$, $41.0 \pm 11.2\%$, $41.5 \pm 10.1\%$ (いずれも $p < 0.001$) と漸増し、体外循環終了後は低下傾向を示し、術後1日目には $30.5 \pm 8.3\%$ とほぼ前値に復した。mean channel による検討と同様に体外循環開始5分から終了1時間後まで、2 T 60 結合陽性血小板の有意 ($p < 0.001$) な増加を認めた。

③ヒストグラムのパターンによる検討：**Fig.**

Fig. 2 Changes in platelet counts during open heart surgery.

Fig. 3 Changes in mean fluorescence intensity of the 2 T 60-stained platelets on flow cytometry. The mean fluorescence intensity of the 2 T 60-stained platelets increased significantly during CPB and reached the maximal level at 120 minutes of CPB. After the end of CPB, it decreased and on the first postoperative day it returned to the pre-CPB value.

4は FC における血小板のヒストグラムを示したものである。2 T 60 結合陰性の血小板の峰の中心は Channel Number (以下 CN) の 6~10 に存在する。一方、2 T 60 結合陽性の血小板の峰は CN 30~50 に形成された。Fig. 4 A は陽性血小板の峰の形成が陰性血小板の峰よりも低値にとどまった症例 (38 歳, 男, 冠動脈バイパス術), B は陽性血小板の峰が陰性血小板の峰と同じ高さになった症例 (65 歳, 男, 冠動脈バイパス術), C は陽性血小板の峰が陰性血小板の

峰より高くなった症例 (41 歳, 女, 僧帽弁置換術) のヒストグラムを表す。今回検討した 21 例を上記の 3 パターンに分類すると, A: 13 例, B: 3 例, C: 5 例であった。程度の差はあるものの, いずれも陽性血小板の峰は体外循環中しだいに高くなり, パターン A を呈した症例の中にも明確な 2 峰性を呈する症例もあり, これらを含めると全症例の半数以上で陽性血小板の明確な峰が検出された。しかし陽性血小板の峰の位置を詳細に検討すると, この峰の位置 (CN) は

Fig. 4 Immunofluorescence histograms of 2T60-stained platelets during open heart surgery.

Immunofluorescence histograms of 2T60-stained platelets showed a main population composed of the inactivated GMP-140-negative platelets (channel number less than 20) with a small population of the activated GMP-140-positive platelets on the right slope shoulder of the main (channel number greater than 20) before CPB. After the beginning of CPB, the activated platelets rapidly increased and formed another distinguishable population of the activated platelets.

A: Thirty-eight years old male, undergoing coronary artery bypass grafting (CABG). The peak height of the population of the activated platelets was lower than that of the inactivated platelets.

B: Sixty-five years old male, undergoing CABG. The peak height of the population of the activated platelets was equal to that of the inactivated platelets.

C: Forty-one years old female, undergoing mitral valve replacement. The peak height of the population of the activated platelets was higher than that of the inactivated platelets.

Even in the case B or C, the peaks of the activated platelets did not shift to the right side, i.e., the channel number of the peak remained at the same immunofluorescence intensity.

症例間により若干の差がみられたが、同一症例においては CPB の経過において、峰の高低にかかわらずほぼ一定の位置にとどまっていた。さらに、パターン C の様に体外循環開始 120 分後に陽性血小板の峰が陰性血小板の峰よりも高くなるような場合でも、陽性血小板の峰の CN がさらに右方へ移動することはなかった。

III. 考 察

体外循環は開心術の補助手段として必須のものであるが、体外循環中は血液と回路内面との接触をはじめとする種々の機序により、凝固線溶系、血小板、補体系、顆粒球などの活性化が引き起こされ、これらがさまざまな合併症の発生に大きく関与すると考えられる^{5)~7)}。とりわけ血小板に招来される変化は、術後の止血異常の原因となると考えられている⁸⁾。一方、近年、血小板活性化の機構の研究が進み、血小板表面受容体として、血小板膜糖蛋白の構造、機能が明らかにされてきた⁹⁾。

体外循環に伴う血小板の活性化は、従来、血小板 α 顆粒内容物である β -thromboglobulin (β TG) や platelet factor 4 (PF 4) の血漿中濃度の増加で示されることが多いが¹⁰⁾¹¹⁾、果してそれらの増加が活性化に伴う放出反応のみを示すものかどうかは問題のあるところであり、体外循環のように機械的刺激のかかる状況下においては、物理的破壊に伴う血漿中への遊離という可能性も否定できない。今回我々は、個々の血小板におけるその活性化状態を α 顆粒膜糖蛋白の GMP-140 の血小板表面への発現の程度でとらえた。その結果、体外循環の経過に伴い、流血中に 2 T 60 抗体を結合し得る血小板、すなわち GMP-140 を表面に発現する血小板が増加することを明らかにした。このことは体外循環に伴って血小板が何らかの機序により分泌反応、いわゆる活性化を経過したことを明確に示している。Rinder ら¹²⁾¹³⁾ も、体外循環における血小板の活性化を同様に GMP-140 の血小板表面への発現という面から検討し、活性化血小板の増加を報告しているが、彼らは実際の FC のヒストグラムのパターンについては詳細に検討していない。

そこで、われわれは FC のヒストグラムのパターンによる血小板活性化の状態を検討した。まず、体外循環中の血小板のヒストグラムで、活性化され GMP-140 を発現した血小板と、そうでないものの二つの population が見られた。この二つの population の形成の正確な機序については、なお検討の余地があるが、一つの理由として、血小板の中で活性化され易い血小板とそうでないものとが存在し、その反応性の違いから FC のヒストグラムが二峰性を呈した可能性も考えられた。Rinder ら¹²⁾ は抗 GMP-140 抗体を反応させた血小板の contour graph を示しているが、one population であった。われわれとの相違の原因は不明であるが、体外循環装置や手技を含めた手術全体の違いや、体外循環時間の違いが考えられた。また、用いた抗 GMP-140 モノクローナル抗体も異なり、われわれが用いた抗体 (2 T 60) の方が血小板表面に発現された GMP-140 をより感度良く検出し得たとの可能性も推察された。

次に、体外循環開始 1 または 2 時間後には、2 T 60 陽性の血小板の峰が、2 T 60 陰性の血小板の峰と同程度 (21 例中 3 例) か、あるいはそれよりも高くなるもの (21 例中 5 例) も見られ、体外循環中には広範に、かつ強度に血小板への刺激が生じていることが示唆された。しかしながら、2 T 60 陽性の血小板が最大量に達した時点 (体外循環開始 1 または 2 時間) においても、陽性血小板の峰の CN は症例によりほぼ一定であり、CN の増大 (峰の右方移動) が生じなかったことは注目された。このことは体外循環の経過とともに血小板表面に GMP-140 の発現している血小板数は増大するが、流血中では個々の血小板における GMP-140 の発現量には一定の限界があると解釈される。

一方、実験的に in vitro でトロンビン濃度を変えて血小板を刺激した場合には、濃度依存性に 2 T 60 陽性の血小板が増加するとともに、FC のヒストグラム上で陽性血小板の峰の CN が増大する。すなわち峰の位置が右方へ移動し、無刺激血小板とはそのすそ野と僅かにしか重ならない程に右方へ移動する (Fig. 1)。すなわち、体外循環施行中の流血中に存在する血小板

の GMP-140 の発現は、最大限まで達していないと考えられる。体外循環中の *in vivo* で GMP-140 の発現量に限界がみられた原因として、①体外循環による刺激が *in vitro* でおこなったトロンビン刺激 (0.05 U/ml) に比して軽度であるか、あるいは②限界を越えて活性化された血小板は、生体内では循環し得なくなるか、という二つの可能性が考えられる。

次に、体外循環終了後、2 T 60 陽性の血小板の峰は速やかに低下するが、この活性化血小板の全てが流血中から除去されるのではないと考えられる。それは、Fig. 2 の血小板数の変動をみると、体外循環開始後 1 時間は急速に減少するが、体外循環を続けてもそれ以後の 1 時間はあまり減少していない。さらに、体外循環開始 2 時間時のヒストグラムで 2 T 60 陽性血小板が陰性血小板よりも多いか同じ程度の症例 8 例 (Fig. 4 B, C に相当する) において、体外循環終了 1 時間後の血小板数は体外循環開始 2 時間の血小板数の約 75% にとどまっていたが、もし全活性化血小板が流血中から除去されるなら 50% 程度まで低下するはずである。これらのことより、GMP-140 を表面に発現するに至った血小板の一部は、体外循環終了後には何らかの機序で修復を受けて流血中に存在し続けている可能性が示唆された。この機序についての解明は、今後、検討が必要と考えられる。

最近、GMP-140 に対する ligand が、さまざまな細胞表面に存在することが明らかにされてきており^{14)~16)}、また、体外循環中に単球と血小板の接着が増加するという報告もみられる¹⁷⁾。このことは、生体内においては、ある限界を越えて活性化され、GMP-140 をより多く膜表面に持つに至った血小板は、これら GMP-140 の ligand を持つ流血中の好中球、単球などと接着し、一層、網内系で貪食され易くなる可能性も推測される。これは、一定限界以上活性化を受けた血小板が、流血中から除去される過程と体外循環に伴っておこる血小板数の低下のメカニズムに対し、ひとつの説明を与えるものかも知れないと考えられた。

結 語

体外循環施行時の流血中の活性化血小板の検出を、抗 GMP-140 抗体 2 T 60 を用いて行った。

①体外循環に伴って GMP-140 が血小板表面に増加したことから、体外循環により血小板の放出反応を含む活性化が生じていることが確認された。

②流血中の血小板の GMP-140 の発現量には限界が見られた。

文 献

- 1) Tanaka K., Takao M., Yada I., Yuasa H., Kusagawa M. and Deguchi K.: Alterations in coagulation and fibrinolysis associated with cardiopulmonary bypass during open heart surgery. *J. Cardiothorac. Anesth.*, **3**: 181~188, 1989.
- 2) 田上憲次郎, 赤松紀子, 鈴木英紀, 片桐康博, 山崎博男, 藤本 司, 福田祐幹, 小野沢康輔: 活性化血小板の検出—抗 GMP-140 抗体を中心に—. *日本臨床*, **50**: 330~335, 1992.
- 3) Akamatsu N., Yamaguchi A., Katagiri Y., Suzuki H., Tanoue K. and Yamazaki H.: A novel monoclonal antibody specific to activated platelets. *Thromb. Haemostas.*, **62**: 250, 1989.
- 4) Tanoue K., Akamatsu N., Katagiri Y., Fujimoto T., Kurokawa T., Iwasa S., Koike M., Kawasaki H., Suzuki H. and Yamazaki H.: Detection of in-vivo activated platelets in experimental cerebral thrombosis in rabbits, studies by a new monoclonal antibody '2 T 60' specific for the activated platelets of both humans and rabbits. *Platelets*, **4**: 31~39, 1993.
- 5) Tanaka K., Tani K., Morimoto T., Yada I., Yuasa H. and Kusagawa M.: Hemostatic analysis for patients undergoing open heart surgery by molecular marker assays—with special reference to thrombin-antithrombin III complex and α 2 plasmin inhibitor-plasmin complex. *Artif. Organs Today*, **2**: 127~135, 1992.
- 6) Andrade JD., Coleman DL., Didisheim P., Hanson SR., Mason R. and Merrill E.: Blood material interaction—20 years of frustration (Panel Con-

- ference). *Trans. Am. Soc. Artif. Int. Organs*, **27**: 659~662, 1981.
- 7) 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. Int. Organs*, **30**: 502~507, 1984.
- 8) Woodman RC. and Harker LA.: Bleeding complication associated with cardiopulmonary bypass. *Blood*, **76**: 1680~1697, 1990.
- 9) 山崎博男: 血栓準備状態としての血小板活性化と膜糖蛋白. *最新医学*, **45**: 1306~1312, 1990.
- 10) Harker LA., Malpass TW., Branson HE., Hessel EA. and Slichter SJ.: Mechanism of abnormal bleeding in patients undergoing cardiopulmonary bypass: Acquired transient platelet dysfunction associated with selective α -granule release. *Blood*, **56**: 824~834, 1980.
- 11) Mezzano D., Aranda E., Urzua J., Lema G., Habash J., Irrarrazabal MJ. and Pereira J.: Changes in platelet β -thromboglobulin, fibrinogen, albumin, 5-hydroxytryptamine, ATP, and ADP during and after surgery with extracorporeal circulation in man. *Am. J. Hematol.*, **22**: 133~142, 1986.
- 12) Rinder CS., Bohnert J., Rinder HM., Mitchell J., Ault K. and Hillman R.: Platelet activation and aggregation during cardiopulmonary bypass. *Anesthesiology*, **75**: 388~393, 1991.
- 13) Rinder CS., Mathew JP., Rinder HM., Bonan J., Ault KA. and Smith BR.: Modulation of platelet surface adhesion receptors during cardiopulmonary bypass. *Anesthesiology*, **75**: 563~570, 1991.
- 14) De Bruijne-Admiraal LG., Modderman PW. Von dem Borne AEGKr. and Sonnenberg A.: P-selectin mediates Ca^{2+} -dependent adhesion of activated platelets to many different types of leukocytes: Detection by flow cytometry. *Blood*, **80**: 134~142, 1992.
- 15) McEver RP.: Leukocyte interactions mediated by selectins. *Thromb. Haemostas.*, **66**: 80~87, 1991.
- 16) Springer TA. and Lasky LA.: Sticky sugars for selectins. *Nature*, **349**: 196~197, 1991.
- 17) Rinder CS., Bonan JL., Rinder HM., Mathew J., Hines R. and Smith BR.: Cardiopulmonary bypass induces leukocyte-platelet adhesion. *Blood*, **79**: 1201~1205, 1992.
-