◆原 著◆

組織プラスミノゲンアクチベータによる血栓溶解過程 に及ぼすアルガトロバン及び未分画ヘパリンの影響

山田 恵三 辻 肇 高田 治
米田 充 増田 治史 中川 克
山田 結佳 玉垣 俊幸 山上 正仁
澤田 昌平 中川 雅夫

Effects of Argatroban and Unfractionated Heparin on t-PA Induced Thrombolysis

Keizo YAMADA, Hajime TSUJI, Osamu TAKADA,
Mitsuru YONEDA, Haruchika MASUDA, Katsumi NAKAGAWA,
Yuka YAMADA, Toshiyuki TAMAGAGI, Masahito YAMAGAMI,
Shohei SAWADA and Masao NAKAGAWA

Key words: thrombolysis, thrombosis model, argatroban, heparin, t-PA,

The effects of argatroban (a selective thrombin inhibitor) and unfractionated heparin (UFH) on t-PA induced thrombolysis were compared in an experimental thrombosis using the microvasculature of hamster cheek pouch. The thrombus was produced by irradiation of ultraviolet light (intensity ; 20 mW/mm², wave length ; 400-500 nm) in combination with the intravascular administration of fluorescein sodium (50 mg/kg), until the development of thrombus stenosed 99% of the luminal area of the venule (50-70 μ m). Thrombolytic process mediated by t-PA was observed on a color television through a high gain video camera and recorded on videotape. The effects of these anticoagulants administered with t-PA were evaluated by the percent stenosis of lumen and the percent area of thrombus, which were calculated by the computed video analyzer. Prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (aPTT) were measured on plasma samples obtained one hour after the injection of anticoagulants. Bleeding time was measured on the shaved left medial hind leg with blade before sampling the blood. Argatroban (0.1-0.3 mg/kg · hr) significantly enhanced thrombolysis by t-PA (72×10^4 IU/kg · hr) in one and two hours after infusion of t-PA. Argatroban (0.1-0.3 mg/kg · hr) prolonged PT, aPTT and bleeding time dose dependently and significantly at the dose of 0.3 mg/kg · hr. Argatroban (0.3 mg/kg · hr) enhanced thrombolysis by t-PA (72×10^4 IU/kg · hr), but UFH (12.5 anti-X U/kg · hr) delayed it. Argatroban (0.3 mg/kg · hr) did not significantly prolonged PT and

aPTT as compared with UFH (12.5 anti-X U/kg · hr). From these results, argatroban was suggested to be a useful additional anticoagulant in thrombolytic therapy using t-PA.

緒 言

血栓溶解療法においては、血栓溶解に伴い血栓表面に出現するトロンビンの作用を阻害することにより新たな血栓形成が抑制され、速やかな血管の再疎通が期待できると考えられる。従来、組織プラスミノゲンアクチベータ (t-PA) による血栓溶解療法において未分画ヘパリン (UFH) を始めとする種々の抗凝固薬が併用されているが、これらの血栓溶解過程に及ぼす影響についての知見は乏しいのが現状である。今回、筆者らはハムスターの頬袋の微小血管を用いて作製した血栓を対象として、アルガトロバンおよび UFH の t-PA による血栓溶解過程に及ぼす影響を検討したので報告する。

対象および方法

1) 微小血管内血栓モデル:

雄性ハムスター (体重: 120-150 g) を用い、ペントバルビタール (100 mg/kg; i. p.) 麻酔下に気管内挿管後、右鎖骨下動脈および右大腿静脈にカニューレーションを行い、Shanberge ら¹⁾の方法に従いハムスターの右頬袋を観察台上に展開、上層を切開し結合織を除去して下層の微小血管床を露出した。ハムスターの頬袋は 37°C の Bicarbonate buffer にて 1 ml/min の速度で灌流し、血管床は蛍光倒立顕微鏡 (オリンパス社製) に接続した高感度テレビカメラ (Flovel 社) を通してモニター上にて観察した。微小血管内血栓は、fluorescein sodium (50 mg/kg) を右鎖骨下動脈より注入、5 分後に水

Fig. 1 Thrombus was formed in the venule (diameter: 70 μ m) of hamster cheek pouch using filtered light from mercury lamp, 5 minutes after injection of fluorescein sodium. Each panels represents the time course of thrombus formation just after (upper left), 2 minutes (upper right), and 4 minutes (lower left) after the starting of irradiation. Lower right panel shows the accomplished thrombus just after the discontinuation of filtered light.

Fig. 2 The infusion of t-PA (72×10^4 IU/kg · hr) was started 15 minutes after the discontinuation of irradiation and continued for 4 hours. Thrombolytic process mediated by t-PA (72×10^4 IU/kg · hr) before (upper left), 1 hour (upper right), 2 hours (lower left), and 4 hours (lower right) after the infusion.

銀ランプを光源とし、FITC フィルターを通した励起光 (強度 20 mW/mm^2 , 波長 $400 \sim 500 \text{ nm}$) の励起光を対象血管 (細静脈, 直径; $50 \sim 70 \mu\text{m}$) の半側に照射して作製した. 励起光照射面積は $2,000 \sim 2,500 \mu\text{m}^2$ に調節し血栓による血管閉塞率が 99% になった時点で照射を終了し, 偏在性血栓を作製した (図 1). 励起光照射終了 15 分後, t-PA (TD-2061; 東洋紡績社) を右鎖骨下動脈より, 72×10^4 IU/kg · hr の濃度で 4 時間持続注入した. 血栓溶解過程 (図 2) はテレビカメラに接続した VTR により記録, 画像解析装置 (XL 500; Avionics 社) を用いて, 再生画像を解析した. すなわち, t-PA 注入直前の血管径を D_0 , 血栓面積を A_0 とし, これに対する 1 時間毎の血栓の高さ $H_{1 \sim 4}$ 並びに血栓面積 $A_{1 \sim 4}$ より, % 血管閉塞率, % 血栓面積を算出し, 血栓溶解過程の指標とした (図 3).

2) t-PA による血栓溶解過程に及ぼす各種抗凝固剤の影響:

生食をコントロールとし, 選択的抗トロンビン剤アルガトロバン (MD 805, 三菱化成工業: $0.05, 0.1, 0.2, 0.3 \text{ mg/kg} \cdot \text{hr}$) および UFH

Fig. 3 The assessment of the thrombolytic process. Percent area of thrombus was calculated as the ratio between the area of thrombus at every one hours after t-PA infusion ($A_{1 \sim 4}$) and the original area (A_0). Percent stenosis of the lumen by thrombus was calculated as the ratio between the height of thrombus at every one hours ($H_{1 \sim 4}$) and the original vessel diameter (D_0).

(Kabi: $12.5 \text{ anti-XaU/kg} \cdot \text{hr}$) を右大腿静脈より t-PA とともに併用投与し血栓溶解過程に及ぼす影響を比較検討した.

3) 凝血的検討:

生食をコントロールとし右鎖骨下動脈より投与するとともにアルガトロバン ($0.1, 0.2, 0.3$

Fig. 4 Effect of argatroban on t-PA induced thrombolysis. Argatroban (0.1-0.3 mg/kg·hr) in combination with t-PA significantly accelerated the decrease of percent stenosis (A) and percent area of thrombus (B) dose dependently as compared with control. Values were expressed as mean ± SE.

mg/kg·hr) および UFH (12.5 anti-X_aU/kg·hr) を右大腿静脈より 1 時間持続投与しクエン酸加血漿を得、プロトロンビン時間 (PT) および活性化部分トロボプラスチン時間 (aPTT) を測定した。アルガトロバンにおいては出血時間も採血前に測定した。PT および aPTT はそれぞれリオプラスチン 1 号 (持田製薬), プラテリン・プラス・アクチペータ (オルガノテクニカ社) を用いて測定した。出血時間は右足伸側を剪刀にて約 1 mm 切傷し、止血に要する時間を測定した。

統計学的検討:

一元配置分散分析 (ANOVA) 法により行っ

た。測定値は平均値 ± 標準誤差として表した。

結 果

1) t-PA による血栓溶解過程に及ぼすアルガトロバンの影響

A. % 血管閉塞率 (図 4 A):

コントロール群における微小血管内血栓は、血管閉塞率において 4 時間後、71.5 ± 1.0% まで減じ、自然溶解を認めた。

一方、t-PA 単独投与群では 2 時間以降においてコントロール群に比し有意の血栓溶解を認めた。しかし、t-PA 単独投与による血栓溶解における形態的变化は極めて複雑であり血栓の溶解

とともに血栓表面で新たな血栓形成が1時間後まで進行し途絶と再疎通を繰り返した。以後、血管閉塞率が減少するに従い、再途絶は認められなくなり2時間後よりコントロール群に比し有意な血栓溶解が認められた。アルガトロバン ($0.05 \sim 0.3 \text{ mg/kg} \cdot \text{hr}$) は投与量依存性に t-PA による血栓溶解を促進した。アルガトロバン ($0.1 \sim 0.3 \text{ mg/kg} \cdot \text{hr}$) の併用群においては t-PA 単独投与群に比し、1~2時間後に有意の血栓溶解の促進を認めたが、 $0.05 \text{ mg/kg} \cdot \text{hr}$ の併用では有意差は認めなかった。また、アルガトロバン $0.1 \text{ mg/kg} \cdot \text{hr}$ 以上の併用各群間には有意差を認めなかった。アルガトロバン併用時の血栓形態の経時変化においては t-PA 単独投与群において観察された血栓表面上での新たな血栓形成が本剤の併用により抑制され、これは $0.1 \sim 0.3 \text{ mg/kg} \cdot \text{hr}$ の併用群に顕著に認められた。

B. % 血栓面積 (図 4 B) :

コントロール群において4時間後の血栓面積は $71.3 \pm 1.7\%$ であり自然溶解を認めた。t-PA 単独投与群では2時間以降においてコントロール群に比し有意の血栓面積の減少を認めた。アルガトロバン併用時の血栓面積の経時的減少は血管閉塞率と近似した変化を示した。

2) 凝血学的検討 :

A. アルガトロバンの PT, aPTT および出血時間に及ぼす影響

① PT (図 5 A) :

アルガトロバンはコントロール群 ($10.8 \pm 0.5 \text{ sec}$) に比し $0.1 \text{ mg/kg} \cdot \text{hr}$ ($10.3 \pm 0.6 \text{ sec}$) および $0.2 \text{ mg/kg} \cdot \text{hr}$ ($11.2 \pm 0.4 \text{ sec}$) の投与では有意差は認めなかったが、 $0.3 \text{ mg/kg} \cdot \text{hr}$ ($12.8 \pm 1.0 \text{ sec}$) の投与にてコントロール群に比し有意な延長を認めた。

② aPTT (図 5 B) :

PT と同様にアルガトロバンはコントロール群 ($28.8 \pm 0.4 \text{ sec}$) に比し $0.1 \text{ mg/kg} \cdot \text{hr}$ ($30.7 \pm 0.8 \text{ sec}$) および $0.2 \text{ mg/kg} \cdot \text{hr}$ ($31.6 \pm 0.4 \text{ sec}$) の投与では有意差は認めなかったが、 $0.3 \text{ mg/kg} \cdot \text{hr}$ ($34.6 \pm 2.1 \text{ sec}$) の投与にてコントロール群に比し有意な延長を認めた。

③ 出血時間 (図 6) :

Fig. 5 Effect of argatroban on PT and aPTT. Argatroban prolonged PT (A) and PTT (B) dose dependently and significantly at the dose of $0.3 \text{ mg/kg} \cdot \text{hr}$. Values were expressed as mean ± SE.

アルガトロバンはコントロール群 ($204 \pm 6 \text{ sec}$) に比し $0.1 \text{ mg/kg} \cdot \text{hr}$ ($228 \pm 12 \text{ sec}$) および $0.2 \text{ mg/kg} \cdot \text{hr}$ ($228 \pm 12 \text{ sec}$) の投与では有意差は認めなかったが、 $0.3 \text{ mg/kg} \cdot \text{hr}$ ($265 \pm 9 \text{ sec}$) の投与にてコントロール群に比し有意な延長を認めた。t-PA との併用時も同様の傾向を示すが、アルガトロバン単独投与群に比し、有意な延長は認めなかった。

B. アルガトロバンと UFH の PT, aPTT に及ぼす影響についての比較検討

① PT (図 7 A) :

PT はコントロール群 ($10.8 \pm 0.5 \text{ sec}$) に比し、アルガトロバン $0.3 \text{ mg/kg} \cdot \text{hr}$ (12.8 ± 1.0

Fig. 6 Effect of argatroban on bleeding time. Argatroban (0.1-0.3 mg/kg · hr) prolonged bleeding time dose dependently and significantly at the dose of 0.3 mg/kg · hr. Argatroban with t-PA prolonged bleeding time as much as argatroban alone. Values were expressed as mean ± SE.

sec) の投与では有意な延長を認めた。UFH 群 (12.4 ± 0.4 sec) ではコントロール群に比し延長傾向を認めるも有意差は認めなかった。

② aPTT (図 7 B) :

aPTT はコントロール群 (28.8 ± 0.4 sec) に比し, アルガトロバン 0.3 mg/kg · hr (34.6 ± 2.1 sec) の投与では有意な延長を認めた。UFH 群 (33.3 ± 1.1 sec) ではコントロール群に比し延長傾向を認めるも有意差は認めなかった。

3) アルガトロバンおよび UFH の t-PA による血栓溶解過程に及ぼす影響についての比較検討

A. % 血管閉塞率 (図 8 A) :

t-PA 単独投与群に比し, 投与開始後 1~2 時間においてアルガトロバン (0.3 mg/kg · hr) で % 血管閉塞率の有意の減少を認め, UFH 群では 2 時間以降において遅延する傾向を認めた。また UFH 群における血栓溶解過程では, アルガトロバン (0.3 mg/kg · hr) で抑制された

血栓表面上で新たな血栓形成が増加する傾向にあった。

B. % 血栓面積 (図 8 B) :

% 血栓面積は % 血管閉塞率の経時的変化と同様の傾向を認め, t-PA 単独投与群に比し投与開始後 1~2 時間においてアルガトロバン (0.3 mg/kg · hr) で有意の減少を示したが, UFH 群では 2 時間後以降遅延する傾向を認めた。

考 案

近年, 本邦においても急性心筋梗塞に対する血栓溶解剤として t-PA が臨床応用されているが, 併用される抗凝固薬についての検討成績は乏しい²⁾³⁾。今回著者らは hamster の cheek pouch を用い, 蛍光色素-光反応により微小血管内に固着性壁血栓を作製し, t-PA による血栓溶解過程に及ぼすアルガトロバンと UFH の影響について比較検討した。本法では, 高田及び

Fig. 7 Effects of argatroban and UFH on PT and aPTT. Argatroban significantly prolonged PT (A) and aPTT (B) as compared with control, but UFH did not. Values were expressed as mean $\pm$ SE.

米田ら⁴⁾⁵⁾が報告しているように一定の条件下で一定面積の血小板血栓が再現性よく形成され、血栓溶解効果を比較するのに適しているものと考えられる。

抗凝固薬が血栓溶解を促進する機序としては、血栓溶解に伴い血栓表面上に出現するトロンビンによる新しい血栓形成を阻害することが考えられている。従来、線溶療法における抗凝固剤としてヘパリンが広く用いられているが本実験においてヘパリンは t-PA による血栓溶解を遅延させた。これはヘパリンがトロンビンに対して液相では効果的な阻害剤であるがフィブリンに結合したトロンビンに対しては阻害作用が弱いという既報の実験結果と一致するものであった⁶⁾⁷⁾⁸⁾。Weitz ら⁷⁾によると、遊離トロンビンを抑制するには 0.1 U/ml の濃度のヘパリンで十分であるがフィブリン塊に結合したトロンビンを抑制するには 2 U/ml の濃度のヘパリン

が必要と報告される。ヘパリンの常用量である 0.2~0.4 U/ml の濃度では遊離トロンビンは完全に抑制され得るがフィブリン塊に結合したトロンビンの 20~40% しか抑制されないとされる。5,000 U のヘパリンをヒトに bolus で投与すると 1 U/ml の濃度となるが、この濃度ではフィブリン塊に結合したトロンビンの 60% しか抑制し得ないとしている。ヘパリンが血栓溶解を促進するという実験成績も散見されるが、これらの実験に用いられたヘパリンの投与量はいずれも高濃度であり、PT, aPTT を著しく延長させている。Schneider ら⁹⁾によると aPTT を 5.3 倍に延長させる投与量ではヘパリンは r-scu-PA (recombinant single chain urokinase-type plasminogen activator) による血栓溶解を促進したが、2.5 倍に延長させる投与量では血栓溶解を促進しなかったとしている。今回筆者らの用いたヘパリンの投与量は比較的低濃度であり、t-PA による血栓溶解を促進させなかったと考えられる。ヘパリンの t-PA による血栓溶解を遅延させる機序としては、血栓の溶解によって血栓表面に露出したトロンビンに対してヘパリン-AT III 複合体の分子量が大きく作用しなかったこと⁶⁾やヘパリンがプラスミノゲンの血栓への結合を妨げること⁸⁾が考えられるが、他に AT III のヘパリンによる消費⁹⁾、トロンビンのヘパリン結合部位のフィブリン結合による隠蔽⁷⁾、活性化血小板より放出された血小板第 4 因子、トロンボスポンジンによるヘパリンの作用の中和⁹⁾、フィブリンモノマーによるヘパリンの作用の阻害¹⁰⁾などが挙げられる。一方、アルガトロバンはヘパリンに比し PT 及び aPTT において有意な延長を認めない濃度において、t-PA による血栓溶解を有意に促進させた。この機序としてアルガトロバンは分子量が小さく、血栓溶解過程において出現するフィブリン上のトロンビンに対して効果的に阻害作用を発揮し、血栓表面での新たな血栓形成を抑制させ、血栓溶解が効率的に進行するためと考えられた⁶⁾¹²⁾¹³⁾¹⁴⁾。実際、t-PA 単独投与時に血栓溶解過程を観察すると血栓溶解の進行と平行して血栓が形成され、血流は途絶と再疎通を繰り返すが、アルガトロバンを併用した

Fig. 8 Effects of argatroban and UFH on t-PA induced thrombolysis. Argatroban accelerated the decrease of percent stenosis (A) and that of area of the thrombus (B), but UFH delayed them. Values were expressed as mean ± SE.

場合には、投与量依存性にこの現象が著明に減少するのが観察された。またアルガトロバンはトロンビンによる XIII 因子の活性化を抑制するため、フィブリン中の α_2 -プラスミン・インヒビターとフィブリンとの結合が抑制されることが報告され、血栓表面に生成された新たな血栓が溶解作用を受けやすいとも考えられる¹⁴⁾¹⁵⁾。以上のことより、アルガトロバンは固相上での血栓形成を抑制させた結果、速やかな血管の再疎通が得られ、t-PA による血栓溶解を促進させたものと推測される。

凝血学的検討において、アルガトロバンによる PT, aPTT 及び出血時間の有意の延長は 0.1 あるいは 0.2 mg/kg·hr 投与下において認められないが、0.3 mg/kg·hr 投与下ではコントロール群に比し有意に延長した。血栓溶解促

進効果については 0.1 mg/kg·hr 投与群、0.2 mg/kg·hr 投与群及び 0.3 mg/kg·hr 投与群のいずれにおいても t-PA 単独投与群に比し有意な血栓溶解の促進が認められたが、これらの 3 群間に有意差はなかった。したがって、投与量の増加による出血の危険を避ける上からはアルガトロバン 0.1~0.2 mg/kg·hr 投与が本血栓モデルにおいては適当と考えられた。

結 語

トロンビンの特異的阻害薬であるアルガトロバンは従来のヘパリンに比し、t-PA による血栓溶解を促進させ、血栓溶解療法における併用抗凝固薬として有用と推察された。

なお、本論文の要旨は第 15 回日本血栓止血学会にて発表した。

文 献

- 1) Shanberge J.N., Tuji H. and Longe T.Q. : Production of thrombi on intact endothelium by use of antiheparin agents in vivo. *J. Lab. Clin. Med.* **116** : 831~839, 1990.
- 2) Gold H.K., Yasuda T., Jang I.K., Guerrero J.L., Fallon J.T., Leinbach R.C., and Collen D. : Animal model for arterial thrombolysis and prevention of reocclusion. *Circulation* **83** (Suppl. IV) : 26~40, 1991.
- 3) Jang I.K., Gold H.K., Ziskind A.A., Fallon J.T., Holt R.E., Leinbach R.C., May J.W. and Collen D. : Differential sensitivity of erythrocyte-rich and platelet-rich arterial thrombi to lysis with recombinant tissue-type plasminogen activator. *Circulation* **79** : 920~928, 1989.
- 4) 高田 治, 辻 肇, 米田 充, 渡辺雅彦, 亀田 充, 山本克巳, 加藤一晴, 小林恭一郎, 澤田昌平, 中川雅夫 : 微小血管内血栓モデルによる低分子ヘパリンの抗血栓作用の検討. *腎臓* **14** : 30~34, 1991.
- 5) 米田 充, 辻 肇, 高田 治, 中川 克, 山田恵三, 山田結佳, 増田治史, 中川雅夫 : t-PA による血栓溶解過程におけるヘパリン併用の効果に関する検討. *腎臓* **15** : 15~18, 1992.
- 6) Mirshai M., Soria J., Soria C., Faivre R., Lu H., Courtney M., Roitsh C., Tripier D., and Caen J. P. : Evaluation of the inhibition by heparin and hirudin of coagulation activation during t-PA induced thrombolysis. *Blood* **74** : 1025~1030, 1989.
- 7) Weitz J.I., Hudoba M., Massel D., Marganore J. and Hirsh J. : Clot bound thrombin is protected from inhibition by heparin-Antithrombin III but is susceptible to inactivation by Antithrombin III-independent inhibitors. *J. Clin. Invest.* **86** : 385~391, 1990.
- 8) Görög P., Ridler C.D. and Kovacs I.B. : Heparin inhibits spontaneous thrombolysis and thrombolytic effect of both streptokinase and tissue-type plasminogen activator. An in vitro study of the dislodgement of platelet-rich thrombi formed from native blood. *J. Int. Med.* **227** : 125~132, 1990.
- 9) Schneider J. : Heparin and the thrombin inhibitor argatroban enhance fibrinolysis by infused or bolus-injected saruplase (r-scu-PA) in rabbit femoral artery thrombosis. *Thromb. Res.* **64** : 677~689, 1991.
- 10) Hogg P.J., and Jackson C.M. : Fibrin monomer protects thrombin from inactivation by heparin-antithrombin : implication for heparin efficacy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86** : 3619~3626, 1989.
- 11) Tsuji H., Yoneda M., Takada O., Nakagawa K., Masuda H., Yamada K., Yamada Y., Yamagami M., Sawada S. and Nakagawa M., The effect of anticoagulants on thrombolysis in an experimental model using hamster microvasculature. *JAMA SEA* **8** (Suppl.) : 55~58, 1992.
- 12) Jang I.K., Gold H.K., Leinbach R.C., Fallon J.T., and Collen D. : In vivo thrombin inhibition enhances and sustains arterial recanalization with recombinant tissue-type plasminogen activator. *Circulation Res.* **67** : 1552~1561, 1990.
- 13) Fitzgerald D.J., and Fitzgerald G.A. : Role of thrombin and thromboxane A₂ in reocclusion following coronary thrombolysis with tissue-type plasminogen activator. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86** : 7585~7589, 1989.
- 14) Tamao Y., Yamamoto T., Kikumoto R., Hara H., Itoh J., Hirata T., Mineo K. and Okamoto S. : Effect of a selective thrombin inhibitor MCI-9038 on fibrinolysis in vitro and in vivo. *Thromb. Haemostas.* **56** : 28~34, 1986.
- 15) Sakata Y., Aoki N. : Crosslinking of α_2 -plasmin inhibitor to fibrin by fibrin-stabilizing factor. *J. Clin. Invest.* **65** : 290~297, 1980.