

論 文 内 容 の 要 旨

**Establishment and evaluation of a rat model of extracorporeal
membrane oxygenation (ECMO) thrombosis
using a 3D-printed mock-oxygenator**

3D プリンター作成模擬人工肺を用いたラット体外式膜型人工肺
血栓モデルの確立と評価

日本医科大学大学院医学研究科 疼痛制御麻酔科学分野

大学院生 梅 井 菜 央

Journal of Translational Medicine 2021; 19: 179 掲載

緒言

従来、体外式膜型人工肺 (Extracorporeal membrane oxygenation: ECMO) の抗凝固療法に関する研究では、市販の人工肺やカニューレを使用できるという点で大型動物が使われてきた。しかし、大型動物実験は多大な人手・資源・費用を要するため、小型の動物実験モデルの開発が必要とされている。本研究では、ラットの ECMO 血栓モデルを開発し、ECMO の抗凝固療法に関する研究に使用できることを検証した。

方法

ECMO 回路を、内径 1/16 inch のチューブ・蠕動ポンプ・模擬人工肺で作成した。模擬人工肺を、Solidworks (Dassault Systemes SolidWorks Corp., Waltham, MA) で設計し、DLP™ 3D printer (Ember Autodesk, San Rafael, CA) で製造した。設計は、幅 7.3 mm、高さ 3 mm、長さ 20 mm の形状とし、内部には直径 380 μm の rods を 345 本等間隔に配置し、市販の人工肺中空糸束の形状・血流形態・表面積血液量比を同等にした。回路全長は 60 cm、模擬人工肺血液充填量は 0.3 mL、総血液充填量は 2.5 mL であった。

雄の Sprague-Dawley ラットを使用し、鎮静鎮痛管理後、気管切開を行い人工呼吸器に装着した。脱血不良を防ぐために、左内頸動脈に 24-gauge の脱血管 (Insyte™, BD, Franklin Lakes, NJ)、右外頸静脈に 20-gauge の送血管 (Insyte™, BD) を挿入した。ラットを低用量ヘパリン (LD: low-dose) 群と高用量ヘパリン (HD: high-dose) 群に割り付け、血液流量 1.9 mL/min で ECMO を開始し、両群間での生理機能、血栓形成を評価した。LD 群ではヘパリン

15 IU/kg/h を 8 時間持続投与した。HD 群ではヘパリン 50 IU/kg/h を 1 時間、25 IU/kg/h を 7 時間持続投与した。ECMO 施行中は、ノルエピネフリンを用い平均動脈圧を 60 mmHg 以上に維持した。実験の終了は 8 時間、あるいは、模擬人工肺の前後圧較差を血液流量で除した血流抵抗値が開始時の 3 倍以上に達した時とした。実験終了後に模擬人工肺重量を測定し、前との差を血栓量とした。

測定値は平均値 ± 標準誤差で表示した。統計解析は STATA (Stata Corp LP, College Station, TX) を使用し、Student's t 検定、線形混合モデルで行い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

結果

両群ともに有害事象なく ECMO を装着した。両群ともに ECMO 施行中の平均動脈圧は 80 mmHg 前後で推移した。血液ガス分析では、LD 群の PaCO_2 と HCO_3^- 、両群の乳酸値が 8 時間の経過で有意な上昇を示した。ヘマトクリット値 (Hct) およびヘモグロビン値 (Hb) は両群ともに 8 時間の経過で有意に減少したが、実験終了時の Hct、Hb は 30–35%、10–12 g/dL であった。

実験開始 1、4、8 時間後に測定した activated clotting time (ACT) は、HD 群で 152–220 秒、LD 群で 120–200 秒であった ($p < 0.05$)。HD 群の出血時間は LD 群より長い傾向にあったが有意差はなかった。血小板数は両群ともに 8 時間の経過で有意に減少したが ($p < 0.05$)、両群間に有意差はなかった。LD 群の人工肺血流抵抗値は、HD 群より一貫し高値を示したが両群間に有意差はなかった。血栓量は、LD 群が 0.02 ± 0.006 g と HD 群の 0.003 ± 0.001 g に比べ有意に重かった ($p < 0.05$)。

考察

従来のラット体外循環モデルは、リザーバーや胸骨正中切開を必要とし、人工肺表面積が広く、血液充填量も多く、ECMOの抗凝固療法に関する研究には適さない。

一方、本モデルはポンプで血液流量を制御した動脈脱血静脈送血の方法により、従来のモデルで問題となる脱血不良を回避し、リザーバーや胸骨切開を必要としない。また、表面積 0.0015 m^2 の模擬人工肺を用いた回路の充填量は 2.5 mL で世界最小モデルである。循環動態は8時間安定し、HbとHctの低下は20-30%程度にとどまり、輸血の必要性はなく、凝固への影響も少ない。

さらに、本モデルは、ヘパリン投与量の増量により血栓量は減少し、出血時間が延長した。また、人工肺血流抵抗値は、模擬人工肺内に巨大な血栓が形成された場合に上昇した。血小板数は両群ともに経時的に減少したが、ヘパリンの投与量の違いによる差はなかった。これらの結果から、本モデルは血栓形成の検証に有効であり、ECMOの抗凝固療法に関する研究に使用できる。

本研究でラットのECMOモデルでのヘパリン投与方法を示したことも重要である。HD群のACT値は臨床での凝固制御範囲と同等であり、HD群でのヘパリン投与量が、今後の研究で対照群として使用できる。

本研究の限界として、人工肺の作成に市販の中空糸膜を使用していないことや、ラットの血小板数がヒトの6倍と高値であること等が挙げられる。今後、血小板活性、人工肺の電子顕微鏡所見等を本モデルで検討していく必要がある。

結語

3D プリンターで作成された模擬人工肺を使用したラット ECMO 血栓モデルは、抗凝固療法の違いに応じ有意に異なる血栓形成を示した。本モデルは、COVID-19 特異的な凝固障害や新しい抗凝固療法の研究に使用可能である。