

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2021

課題番号：17K11073

研究課題名（和文）誘電率測定に基づく血液凝固機能評価法の臨床応用：心臓手術における検討

研究課題名（英文）Clinical evaluation of blood coagulation based on dielectric permittivity measurement: a study in cardiac surgery.

研究代表者

山本 雄大（Yamamoto, Yudai）

東京医科歯科大学・東京医科歯科大学病院・助教

研究者番号：50710026

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,700,000円

研究成果の概要（和文）：誘電コアグロメーターは誘電率の変化を測定する血液凝固測定機器であり、赤血球連銭形成測定は血漿フィブリノーゲン濃度の予測において従来から使用されてきたrotational thromboelastometryと同等な性能であることが心臓血管外科手術を対象とした本研究で示された。組織因子刺激試薬による誘電コアグロメーター測定はトロンビン生成能を測定できる可能性が示された。また、組織因子経路インヒビターとトロンビン生成能の低下との関与が示された。人工心肺後のplasminogen activator inhibitor-1は人工心肺時間と関連する傾向が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、心臓血管外科手術において誘電コアグロメーターはフィブリノーゲン濃度の予測やトロンビン生成能の変化の測定が可能であることが示唆され、血液凝固障害の診断への臨床応用が期待される。また、血液の組織因子への反応性が組織因子経路インヒビター(tissue factor pathway inhibitor: TFPI)により抑制されているような状態が考えられ、TFPIの中和など、新たな治療的な介入の提案につなげていくことができると考えられる。また、直接経口抗凝固薬の薬効作用など、トロンビン生成能に影響を与える薬剤の薬効評価への応用などが期待される。

研究成果の概要（英文）：The dielectric coagulometer is a blood coagulation assay device that measures changes in dielectric permittivity. In this study of cardiovascular surgery, it was shown that erythrocyte rouleau formation measured by dielectric coagulometry predict plasma fibrinogen concentration as well as rotational thromboelastometry. Dielectric coagulometry with tissue factor stimulating reagents has the potential to measure thrombin generation. In addition, the relationship between tissue factor pathway inhibitor and decreased thrombin generation was demonstrated. Plasminogen activator inhibitor-1 after cardiopulmonary bypass tended to be associated with duration of cardiopulmonary bypass time.

研究分野：麻酔科学

キーワード：血液凝固 誘電率 トロンビン フィブリノーゲン 連銭形成

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

心臓血管外科手術など人工心肺を用いる手術症例では、血液凝固・止血管理をいかに適切に行うかが臨床成績を向上させる上で重要な課題である。手術に関連した出血の主原因は手術侵襲に伴う凝固因子の不足、血小板機能異常や血小板不足、線溶亢進に加えて低体温などが影響し、さらに、状態は刻々と変化する。このような状況で適切な処置を行うためには患者の包括的な血液凝固能を検査する必要があるが、血液が凝固するプロセスでの粘性・弾性を評価する Thromboelastometry などが導入されているが、測定操作の煩雑さ等が問題となっている。よって、手術室内で比較的簡便な操作で再現性の高い包括的血液凝固検査法の確立が求められている。

2. 研究の目的

誘電コアグロメーターは、血栓・血餅の内部構造を反映する物理的な指標に着目した新しい包括的血液凝固検査法である[1]。誘電率は、全血検体を双極で挟み、交流電流を流したときに発生する誘電分極の強弱の測定により得られる物理的なパラメーターであり、血球成分の性状やフィブリンネットワーク形成を反映して変化する。誘電コアグロメーターは、クエン酸添加全血を入れた採血管をセットするだけで全自動で分析を行うことができる。

Thromboelastometry と比較して、検査施行者の手技に依存せず、しかも環境振動の影響を受けにくい性質を有するため、簡便な操作で再現性の良いデータ取得が可能となり、全血としての血栓形成能、フィブリンポリマーの形成と線溶系活性の評価において、患者管理に役立つ情報を提供する装置として期待される。これまでに肺塞栓血栓形成に関する臨床的な検討[2]や、脳塞栓症発症リスクに関する検討[3]が行われてきた。

我々の研究グループでは、心臓外科手術の症例における血液凝固能の解析を誘電コアグロメーターを用いて行ってきたが、外因系・内因系の加速試験において、誘電コアグロメーターにおける外因系加速試験と非加速試験の比較により、加速試薬である組織因子に対する反応性を定量評価することができ、誘電率の変化が血漿フィブリノーゲン濃度や、トロンビン生成能を予測できる可能性が示唆された。そこで、誘電コアグロメーターを用いて、人工心肺を使用する手術における約 100 症例を対象として血液の凝固能の変化について分析し、全血検体の誘電率解析が、患者の血液凝固能を反映するものとなっているかどうかを検討することを計画した。

本研究では、心臓手術の術中に患者から採血した血液検体で、誘電コアグロメーターを用いて包括的血液凝固検査を行い、Thromboelastometry (ROTEM) による測定と比較しながら、臨床的に有用な検査となりうるかどうかを検証する。また、誘電コアグロメーターによって測定される血液の組織因子への反応性が、組織因子経路インヒビター(Tissue Factor pathway inhibitor; TFPI)の血中濃度または活性との相関関係(逆相関)についても検討し、本装置を用いた検査法が、臨床上実用的なものであるかを検討することを目的としている。

3. 研究の方法

本臨床研究では、心臓手術の術中に採血した検体で、誘電コアグロメーターを用いて全血凝固検査を行い、Thromboelastometry(ROTEM)による測定と比較し検討する。また、組織因子に対する血液凝固反応についても、誘電コアグロメーターでの評価を行い、血漿中の TFPI 濃度および活性と相関があるかどうかを検討する。誘電コアグロメーターで得られるデータでその変化をとらえられるかについて検討する。

本研究の対象は、人工心肺を用いる予定心臓血管外科手術を受ける成人(20 歳以上)患者 100 名であり、維持透析を受けている患者、心臓大血管手術として初回手術ではない患者、および、本人からインフォームドコンセントが取得できない患者は除外する。

採血量は手術中の下記(a)～(c)のタイミングで採血し、誘電コアグロメーターによる測定 ROTEM による測定(Thromboelastometry) トロンビン生成試験である calibrated automated thrombogram(CAT)、凝固検査を行う。

(a) 麻酔導入後手術開始前

(b) 人工心肺終了後・プロタミンによるヘパリン中和の終了時。

(c) 閉胸後手術終了時

4. 研究成果

(1). 誘電率に基づく血液凝固測定値

誘電コアグロメーターによる 1MHz の交流電流を流した際に測定される誘電率の変化は赤血球の連鎖形成による誘電率の上昇と、その後の血餅形成による誘電率の上昇、血餅の安定化による

誘電率の低下が測定される。この変化から、以下の測定値を定義する。

DBCМ CT

DBCМ CT は 1MHz の交流電流を流した際に測定される誘電率の誘電率の最高値となるまでにかかった時間(図 1)であり血液凝固反応の早さを反映する。

F- Index

赤血球の連鎖形成速度を反映する値であり、測定初期の赤血球連鎖形成時の誘電率の変化の傾きを元に算出される。

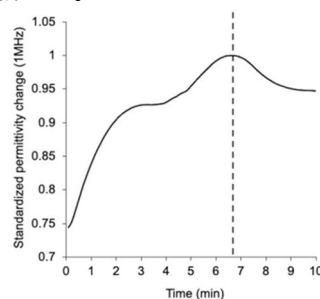


図 1.1MHz における測定波形と DBCM CT(破線)

(2) DBCM CT と トロンビン生成能、TFPI が トロンビン生成能に与える影響

DBCМ CT と CAT による トロンビン生成能の指標である endogenous thrombin potential (ETP) について検討した。DBCМ CT が測定出来た 283 検体について DBCM CT と CAT ETP の評価を行った。DBCМ CT と CAT ETP は $R_s = -0.62$ と逆相関を認め、DBCМ CT の延長は トロンビン生成能の低下を示す可能性が示唆された(図 2)。組織因子経路インヒビター (Tissue Factor pathway inhibitor; TFPI) の血中濃度と DBCM CT は $R_s = 0.56$ と相関を認め、DBCМ CT の延長には TFPI が関与することが示された(図 3)。TFPI は人工心肺後、および手術終了時において上昇を認めた(図 4)。また、抗 TFPI 抗体の添加の有無による トロンビン生成能について(図 5A)と血漿 TFPI 濃度 35ng/mL をカットオフとした トロンビン生成能について(図 5B)を示した。CAT ETP は抗 TFPI 抗体の添加により上昇することが示され、トロンビン生成能の抑制には TFPI が関与することが示された(図 5A, B)。また、血漿 TFPI 濃度が 35ng/mL 以上の検体ではそれ以下の検体より CAT ETP が低く トロンビン生成能が抑制されていることが示され、血漿 TFPI 濃度が高いほど トロンビン生成能が抑制されることが示された(図 5B)。

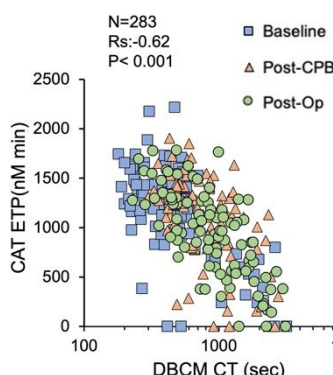


図 2. DBCM CT と CAT ETP の関係

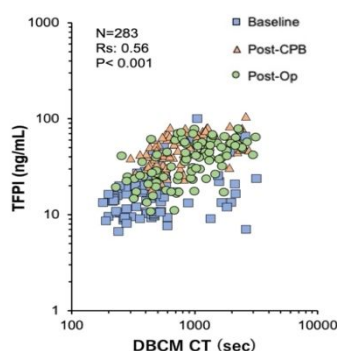


図 3. DBCM CT と TFPI の関係

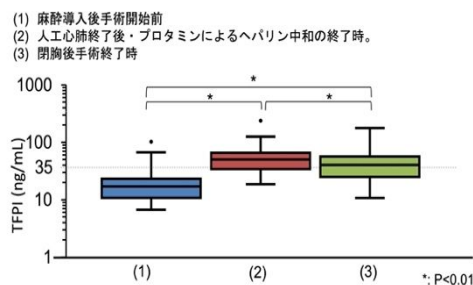


図 4. 術中の TFPI の推移

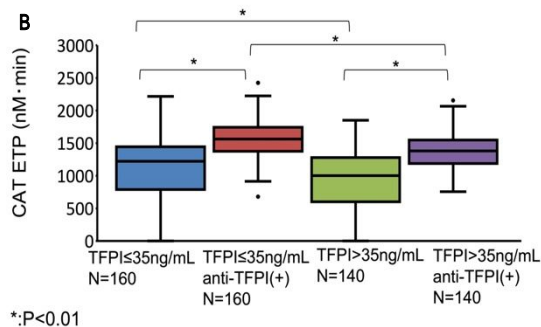
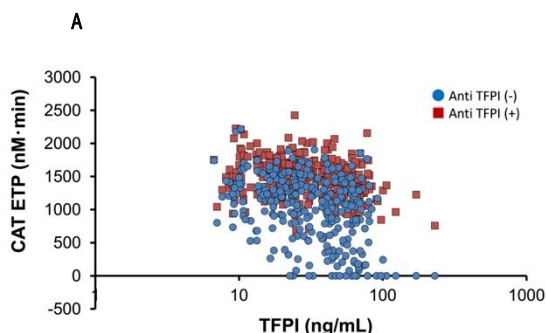


図 5. 抗 TFPI 抗体添加による ETP の変化

(3) 血漿フィブリノーゲン濃度と F-Index の評価

100名から得られた300検体を解析の対象とした。F-indexと血漿フィブリノーゲン濃度は $R_s=0.79$ ($p < 0.001$) と有意な相関を示し(図6A)、F-indexで血漿FIB濃度 > 200 mg/dLを判定すると仮定した場合のROC曲線の曲線化面積は0.91(図6B)であり、血漿フィブリノーゲン濃度が臨床的に十分なレベルにあるかどうかを判定する際に有用な指標となる可能性が示された。

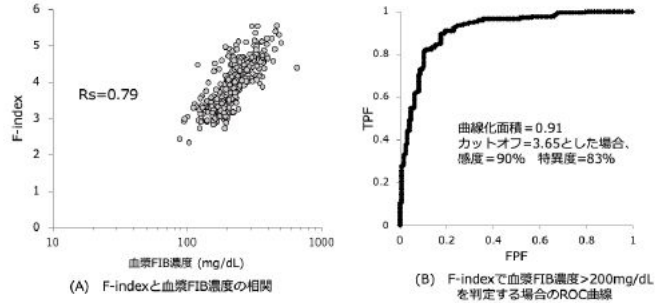


図6.F-indexと血漿フィブリノーゲン濃度の関係

(4) Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1)の術中変化についての検討

術中の PAI-1(1)

12ng/mL [IQR: 0, 18],
 (2) 24ng/mL [15, 35],
 (3) 67ng/mL [29, 146] と手術終了時に大幅な上昇を認めた(図7A)。また、全患者を人工心肺時間の中央値(242分)で2分割すると、人工心肺時間が長かった症例(> 242 分)において、短かった症例と比較して、人工心肺終了時

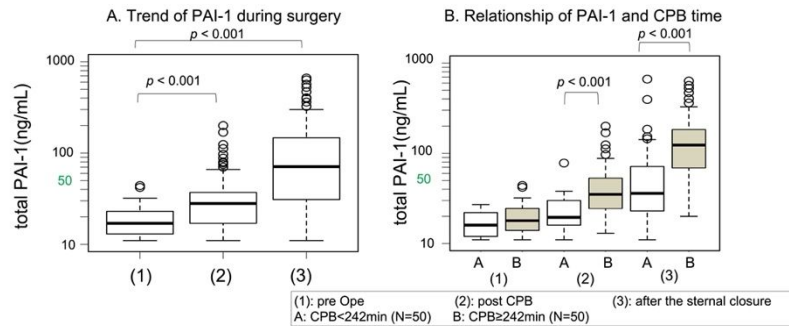


図7.術中の PAI-1 の変化と人工心肺時間との関係

(19ng/mL [11, 25.8] vs 34ng/mL [19, 48], $P < 0.001$), 手術終了時(34.5ng/mL [19, 60] vs 123ng/mL [70, 182], $P < 0.001$)、PAI-1濃度が有意に高かった(図7B)。また、手術終了時の PAI-1濃度と人工心肺終了から手術終了までの時間の関係について図8に示した。人工心肺時間終了後120分を経過すると、PAI-1が50ng/mL以上に増加する症例が増える傾向にあった。

心臓血管外科手術において人工心肺終了後、手術終了時に PAI-1が上昇することが示された。特に人工心肺時間が長時間に及ぶ手術では PAI-1が著明に増加する。PAI-1は人工心肺終了後2時間以降に上昇する傾向が示された。今後、PAI-1の上昇の有無による線溶系への影響や抗線溶薬の効果について検証が必要であると考えられる。

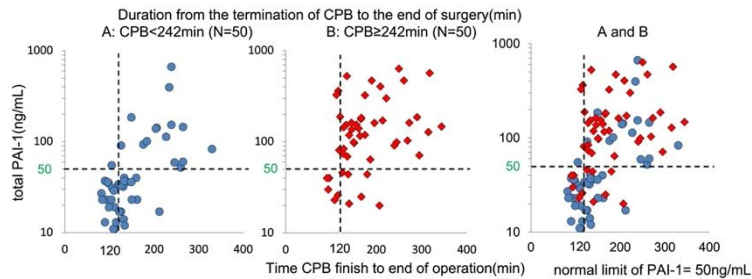


図8.手術終了時の PAI-1 濃度と人工心肺終了から手術終了までの時間の関係

< 参考文献 >

- [1] Hayashi Y et al. Anal Chem 82: 9769-74, 2010
- [2] Chiba S et al. Journal of Scientific Research & Reports 4: 180-188, 2015
- [3] Hasegawa Y et al. PLoS One. 2016 Jun 8;11:e0156557

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yudai Yamamoto, Tokujiro Uchida	4. 巻 197
2. 論文標題 Dielectric blood coagulometry as a means of evaluating the change in thrombin generation induced by direct oral anticoagulants	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Thrombosis Research	6. 最初と最後の頁 141 - 143
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.thromres.2020.11.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Tokujiro Uchida, Yudai Yamamoto
2. 発表標題 Estimation of plasma fibrinogen level and platelet count using dielectric blood coagulometer in patients undergoing cardiovascular surgery: single center prospective observational study
3. 学会等名 EUROANAESTHESIA (The European Anaesthesiology Congress) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tokujiro Uchida, Yudai Yamamoto
2. 発表標題 Evaluation of dielectric blood coagulometer as a point of care test for measurement of anticoagulation potential caused by direct oral anticoagulants
3. 学会等名 EUROANAESTHESIA (The European Anaesthesiology Congress) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yudai Yamamoto, , Aya Takemoto, Tokujiro Uchida
2. 発表標題 Elevation in the level of plasminogen activator inhibitor-1 in the post cardiopulmonary bypass period in cardiovascular surgery
3. 学会等名 Anesthesiology 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yudai Yamamoto, Tokujiro Uchida
2. 発表標題 Reduction in Thrombin Generation by Tissue Factor Pathway Inhibitor After Cardiopulmonary Bypass
3. 学会等名 ANESTHESIOLOGY 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yudai Yamamoto, Tokujiro Uchida
2. 発表標題 Dielectric Coagulometry: A New Method to Estimate Thrombin Generation in Cardiac Surgery
3. 学会等名 ANESTHESIOLOGY 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山本雄大, 内田篤治郎, 木戸浩司, 横田浩史
2. 発表標題 心臓血管外科手術におけるThrombelastography (TEG6s), Rotational thromboelastometry (ROTEM), 血液凝固検査の比較:前向き観察研究
3. 学会等名 日本麻酔科学会 第64回学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山本雄大, 内田篤治郎
2. 発表標題 赤血球連鎖形成過程における誘電率解析による血漿フィブリノーゲン濃度測定法:単施設観察研究
3. 学会等名 日本麻酔科学会 第67回学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山本雄大, 内田篤治郎
2. 発表標題 誘電コアグロメーターにおける内因系凝固測定カートリッジを用いたヘパリン濃度予測に関する 検討:人工心肺を用いた心臓手術を対象とした単施設観察研究
3. 学会等名 日本麻酔科学会 第67回学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	内田 篤治郎 (Uchida Tokujiro) (40262183)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授 (12602)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------