

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 11 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462373

研究課題名(和文) 血液凝固と炎症反応のクロストークの研究：微小循環と赤血球の流動挙動を指標として

研究課題名(英文) Crosstalk between inflammation and coagulation: erythrocyte rheology during cardiac surgery with cardiopulmonary bypass

研究代表者

市川 順子 (Ichikawa, Junko)

東京女子医科大学・医学部・講師

研究者番号：60318144

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)：体外循環使用の心臓手術に焦点をあて、赤血球の流動挙動、血液凝固機能、それに派生する抗線溶薬やフィブリノゲン濃度測定法の問題につき研究を行った。体外循環開始後、赤血球の有棘状の変化があったが、変形能は保持され、体外循環終了時には形態の一部が回復した。変形能は濃厚赤血球製剤投与により低下し、赤血球が小型化、比重が増加した。人工心肺中の高濃度ヘパリン下においても、凝固機能は活性化し、F1+2、TATなどは有意に増加し、高濃度ヘパリンによるPT延長はPT法によるフィブリノゲン濃度に影響を与えた。ROTEM使用により、血液凝固機能を評価でき、血液製剤使用の時期、量の適正化を図れた。

研究成果の概要(英文)：The present study showed that echinocytosis is induced without significant loss of deformability at the start of cardiopulmonary bypass (CPB). Loss of deformability did not occur in parallel with the morphological changes after initiation of CPB, but it was associated with administration of homologous blood at the end of CPB and the stored red blood cells themselves, accompanied by significantly smaller MCV and larger MCHC. After initiation of CPB and despite adequate anticoagulation with heparin, the F1+2 and TAT complex significantly increased compared with baseline. Thrombin formation at CPB initiation and the prolonged clotting lag time depending on the heparin concentration may lead to an underestimation of the fibrinogen level by the PT-derived method. Timely availability of ROTEM-based coagulation management during cardiac surgery has the potential to reduce overall blood product use and blood loss and the duration of hospitalization compared with empirical treatment.

研究分野：麻酔学

キーワード：赤血球流動挙動 血液凝固機能 体外循環 心臓手術

1. 研究開始当初の背景

人工心肺下の心臓手術では低体温、血液希釈や人工心肺回路と血液の接触などを伴い、血液粘度の増加、末梢動脈の血管径減少、毛細血管領域の赤血球流速の停止をもたらす。こうした赤血球流動挙動の変化は、個々の赤血球の変形能や膜の安定性にも影響し、血液粘度のさらなる増加、酸素運搬能、放出能の低下を招き、微小循環障害が助長し、凝固機能に対する影響も予測する。そこで、人工心肺下の心臓手術中において、赤血球形態、変形能、膜の安定性などの流動挙動および血液凝固機能を測定し、両者の関連性、微小循環に及ぼす影響を明らかにする。さらに、インターロイキンなどの各種メディエータおよび接着因子発現など白血球動態を測定し、血液凝固と炎症のクロストークについてメカニズムを解明し、ショック治療の特異的な治療法開発を行う。

2. 研究の目的

本研究では、体外循環使用の心臓手術に焦点をあて、赤血球の流動挙動、血液凝固機能、それに派生する抗線溶薬やフィブリノゲン濃度測定法の問題につき研究を行った。心臓手術中の赤血球変形能や形態の変化、およびその関連性を調べ、赤血球流動挙動の変化およびその原因につき究明する。また、血餅の形成・退縮過程を経時的に評価し、血小板やフィブリン、線溶機能を測定できるトロンボエラストメトリー (ROTEM) を用いて、人工心肺使用の心臓手術における凝固機能を評価し、ROTEM の結果に基づいた新鮮凍結血漿 (FFP) の使用が経験学的な投与方法と比較して、どの程度の出血量と血液製剤使用の削減につながるかを検討した。凝固機能評価のひとつであるフィブリノゲン濃度がプロトロンビン時間 (PT) による測定法では、人工心肺中の高濃度ヘパリンに影響を受け、正確性が劣ることが予測されたため、ヘパリン濃度がフィブリノゲン濃度に及ぼす影響につき検討した。さらに、心臓手術中に用いるトラネキサム酸 (TA) の抗線溶効果をプロテイン C 活性化を促進することで、血管内の凝固や炎症に対して抑制的に機能するトロンボモジュリン (TM) と比較検討した。

3. 研究の方法

(1). 心臓手術中の赤血球変形能や形態の変化、およびその関連性
人工心肺装置を使用して心臓手術を予定した患者を対象に、動脈カテーテルより 1 回 5cc の採血を、全身麻酔開始前 (基準)、体外循環開始後、体外循環終了後、手術終了直前の計 4 回を行い、投与した濃厚赤血球製剤そのものも検体とした。Ektacytometer を用いて、回転によるずり応力によって赤血球を楕円形に変形させ、レーザー光線の回折像を用いて解析した赤血球変形能、パーコールの密度勾配遠心による赤血球分画、赤血球恒数など

の測定およびメイ・グリュンワルド染色後、光学顕微鏡 1000 倍にて観察し、Ferrel と Huestisl による形態指数を求めた。

(2). トロンボエラストメトリーに基づく新鮮凍結血漿の投与は、人工心肺を用いた心臓手術における周術期の出血と血液製剤使用量を減少させる。

ROTEM を導入する前に人工心肺を用いた心臓手術を行った症例 81 人 (基準群) と ROTEM の結果に基づいて、FFP を投与した症例 82 人のデータを分析し、比較検討した。赤血球濃厚液は人工心肺中にヘマトクリット値が 20% 以下になった場合、もしくは人工心肺後に 30% 以下になった場合に投与した。濃厚血小板は、術前に血小板減少やヘパリン拮抗後に、臨床的に止血困難になった患者に投与した。FFP 投与は、ROTEM 導入前は経験学的に判断し、ROTEM 導入後はアルゴリズムに基づいて投与した。

(3). 人工心肺下の心臓手術中のヘパリン濃度が PT 法によるフィブリノゲン値に及ぼす影響

対象は体外循環下の心臓手術が予定された患者 78 名で、動脈カテーテルより 1 回 5 cc の採血を手術室入室後 (基準値)、人工心肺開始後に行い、フィブリノゲン濃度 (PT 法)、血漿ヘパリン濃度、AT 活性、プロトロンビンフラグメント 1+2 (F1+2)、トロンピンアンチトロンピン複合体 (TAT) などを測定した。

(4). トロンボモジュリン (TM) の組織プラスミノゲン活性化因子による線溶亢進に対する調節作用

薬物未投与の対照群と組織プラスミノゲンアクチベータ (tPA) を最終濃度 2nM になるように投与し、線溶亢進した検体を作成した。対照群は生理食塩水を tPA と同量用いた。さらに、線溶亢進した検体に TM を最終濃度 0.3、1、3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ および TA を最終濃度 0.033、0.165、0.33 mg/ml になるようにそれぞれ加えた。各薬剤の線溶に対する作用をトロンボエラストメトリー (ROTEM) を用いて比較検討した。

4. 研究成果

(1). 体外循環開始により赤血球の形態が一部、円盤形から有棘状に変化し、形態指数 (0.4 ± 0.15) も基準値 (0.23 ± 0.1) と比較すると有意に上昇したが、変形能や赤血球恒数、パーコール上の密度勾配は基準値と比較して有意な差は生じなかった。手術終了前には形態指数は 0.34 ± 0.11 と回復したが、手術終了時の変形能 ($0.49, 0.33$) は基準値 ($0.75, 0.13$) と比較して有意に低下し、MCV、MCHC は有意に変化し、パーコール上の高密度の分画が増えた。投与した赤血球製剤の平均貯蔵期間は 7.8 ± 1.9 日 (中央値 8 日、四

分位範囲 2.8 日)であった。投与した濃厚赤血球血液製剤の変形能は、基準値および体外循環終了後、手術終了前と比較して有意に低く、赤血球の形態も晩期の有棘状の割合が増えた。赤血球変形能の低下は、体外循環導入ではなく、濃厚赤血球製剤投与に関連し、赤血球の小型化、比重の増加という生化学的変化も生じた。体外循環開始後の有棘状の変化は、血液希釈、低体温、人工心肺回路との接触など急激な環境の変化によるものと考えられた。形態学的変化には段階があり、初期の変化は変形能には影響しないが、濃厚赤血球製剤などの多数の小突起をもつ晩期の有棘球状の割合が増えると変形能が低下した。体外循環終了時の形態学的変化は、初期の有棘状変化であるため、体外循環終了時には回復した。

(2). 患者背景と術前の血液検査の結果は、ROTEM の導入の前後で、Hb 値を除いて統計学的に有意な差はなかった。ROTEM 導入後、周術期の赤血球製剤使用量は減少し、術中・術後の FFP 必要量は減少した。ROTEM に基づいた FFP 投与により、FIBTEM の MCF は 10.0 から 11.0mm に有意に増加し、EXTEM の MCF は 55.5mm に維持された。また、フィブリノゲン濃度は、FFP 投与により、平均 232.2 から、286.1mg/dl と有意に増加した。ROTEM 導入後、術後 24 時間での出血は有意に減少し、在院日数は有意に短縮した。両群間で、術後の合併症や再開胸止血術の割合に有意な差はなかった。ROTEM 使用は、術中のみであったが、術後の出血および血液製剤使用量・使用率が有意に低下した。経験学的な止血管理は、血液製剤使用の時期、量の適正化が図れず、外科的止血が必要か否かの判断も難しく、出血に伴う希釈性凝固障害も引き起こし、結果として過剰な出血を起こし、血液製剤需要が高まるという悪循環になる。ROTEM 検査は血漿分離も必要なく、全血検体で、高用量ヘパリンの抗凝固中においても測定可能である。人工心肺使用の心臓手術において、人工心肺中の ROTEM を用いた FFP 投与は、経験学的投与と比較して、周術期の出血量、血液製剤使用量が減少し、さらに入院期間も短縮した。

(3). 人工心肺導入後のフィブリノゲン濃度は全患者の 17.6% が基準値の 337.1 ± 120.1 mg/dl から 40mg/dl 未満へと低下 ($44.0 \pm 24.1\%$ 低下) し、同時期のヘパリン濃度は 3.58 ± 0.52 U/ml であった。ヘパリン濃度が 3, 4 U/ml におけるフィブリノゲン濃度はヘパリン濃度 1, 2 U/ml と比較して有意に低かった (4 vs 1 U/mL, $P=0.016$; 4 vs 2 U/mL, $P=0.01$; 3 vs 2 U/mL, $P=0.031$)。人工心肺導入後のヘパリン濃度は PT 値と相関し ($r=0.49$, $P=0.0001$)、PT 値とフィブリノゲン値には負の相関を認めた ($r=-0.36$, $P=0.001$)。これは、PT 値がプロトロンビン時

間法によるフィブリノゲン濃度に影響を与え、PT 値が延長するとフィブリノゲン濃度が低く評価されることを示唆した。ACT 値が 450 秒以上に達するヘパリン量を投与しても、F1+2 や TAT 複合体は基準値と比較すると有意に増加し、トロンビン濃度の上昇が推測され、こうした高トロンビン濃度下では細いフィブリン線維が集合し濃密なフィブリン網を形成、検体が不透明になりやすく吸光度に影響を及ぼすと考えた。

(4). 2nM の tPA 添加により、すべての検体で線溶亢進が生じ、tPA 添加後の LI45 は、TA0.033mg/mL (95.5%、4.75、 $P=0.028$)、0.165mg/mL (94.0%、4.75、 $P=0.028$)、0.33mg/mL (94.5%、5.5、 $P=0.028$)、LI60 は TA0.033mg/mL (93.0%、6.0、 $P=0.026$)、0.165mg/mL (92.0%、4.0、 $P=0.027$)、0.33mg/mL (92.5%、5.0、 $P=0.026$) であり、tPA 単独混和群と比較して有意な差を生じた。tPA 付加による LI45 は、TM 0.3 μ g/mL (93.0%、56.5、 $P=0.028$)、1 μ g/mL (93.0%、74、 $P=0.028$)、3 μ g/mL (92.0%、61、 $P=0.042$) であり、tPA 単独混和群と比較して有意に変化した。本研究では、全血を用いた ROTEM による EXTEM の測定の結果、2nM の tPA による線溶亢進を TA は濃度差にかかわらず完全に抑制し、TM 添加は、血餅溶解時間を有意に延長し tPA による線溶亢進を抑制したが、どの濃度においても線溶抑制作用は弱かった。本研究で用いた TM 濃度は、推奨使用濃度およびその前後の濃度になっており、invitro の研究上、TM を臨床推奨使用量で用いる限り、線溶は亢進せず、安全に使用できることを示唆した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 12 件)

1. Ichikawa J, Marubuchi T, Nishiyama K, Kodaka M, Görlinger K, Ozaki M, and Komori M. Introduction of thromboelastometry-guidance for the administration of fresh frozen plasma is associated with decreased allogeneic blood transfusions and postoperative blood loss in cardiopulmonary-bypass surgery. Blood Transfus. 2016 in press. 査読有
2. Ichikawa J, Mori T, Kodaka M, Nishiyama K, Ozaki M, Komori M. Changes in heparin dose-response slope during cardiac surgery possibly result in inaccuracy in predicting heparin bolus dose requirement to achieve target ACT. Perfusion. 2016 in press. 査読有
3. Ichikawa J, Kodaka M, Nishiyama K, Komori M. Influence of Heparin on the Fibrinogen Level Measured by the

Prothrombin Time-Derived Method During Cardiac Surgery With Cardiopulmonary Bypass. J Cardiothorac Vasc Anesth. 2016 S1053-0770(16)30751-0. doi: 10.1053/j.jvca.2016.12.025 査読有

4. Samejima Y, Kodaka M, Ichikawa J, Mori T, Ando K, Nishiyama K, Komori M. Management of a patient with antiphospholipid syndrome undergoing aortic valve replacement using the Hepcon Hemostasis Management System Plus and rotational thromboelastometry A A Case Rep. 2017 Mar 1;8:100-104. doi: 10.1213/XAA.0000000000000439 査読有

5. Ichikawa J, Hagihira S, Mori T, Kodaka M, Nishiyama K, Ozaki M, Komori M. In vitro and in vivo effects of hemodilution on kaolin-based activated clotting time predicted heparin requirement using a heparin dose-response technique. J Anesth. 2016 30:923-928 DOI:10.1007/s00540-016-2227-9 査読有

6. 市川順子, 西山圭子, 小高光晴, 小森万希子. 過去3年間における麻酔関連のインシデント・アクシデントのSHELL分析に基づく解析. 日臨麻会誌 37 :1-5, 2017 査読有

7. 市川順子, 鮫島由梨子, 市村健人, 小高光晴, 西山圭子, 小森万希子. トロンボモジュリンの組織プラスミノゲン活性化因子による線溶亢進に対する調節作用. 日本血栓止血学会誌 27:70-75, 2016 査読有

8. 岡村圭子, 市川順子, 小高光晴, 金子吾朗, 大野まり子, 小森万希子. 開心術の止血に大容量の新鮮凍結血漿を要し、術後肺障害をきたした1症例. 日臨麻会誌 36; 297-304, 2016. 査読有

9. 市川順子, 小高光晴, 北原智子, 佐藤敦彦, 西山圭子, 中野清治, 小森万希子. 開心術における周術期の出血量、血液製剤使用に対してトラネキサム酸およびトロンボエラストメトリー(ROTEM)使用の有用性. 麻酔 64:131-138, 2015 査読有

10. Ichikawa J, Kodaka M, Nishiyama K, Hirasaki Y, Ozaki M, Komori M. Reappearance of circulating heparin in whole blood heparin concentration-based management does not correlate with postoperative bleeding after cardiac surgery. J Cardiothorac Vasc Anesth. 28: 1015-9, 2014. doi: 10.1053/j.jvca.2013.10.010. 査読有

11. Ichikawa J, Kodaka M, Ando K. Intracardiac mass of the LAA during CPB for MVR. J Anesth. 28:645, 2014 doi: 10.1007/s00540-013-1760-z. 査読有

12. Ichikawa J, Kodaka M, Kaneko G. Use of ROTEM and MEA in a cardiac surgical patient with ITP. J Anesth. 28:310, 2014 doi: 10.1007/s00540-013-1690-9. 査読有

〔学会発表〕(計16件)

1. 市川順子, 西山圭子, 小高光晴, 小森万希子. 当院の過去3年間の麻酔関連アクシデント2が関与したヒューマンエラーの要因分析. 日本臨床麻酔学会第36回学術集会(2016年, 11月3日, ホテル日航高知旭口イタルザクラウンパレス新阪急高知, 高知県高知市)
2. Junko Ichikawa, Ichiro Koshino, Kazuyoshi Ando, Mitsuharu Kodaka, Makiko Komori. Transfusion of stored allogeneic blood is associated with dose-dependent adverse effects on RBC deformability. American Society of anesthesiologists Annual meeting (Chicago, Illinois, October 23rd 2016)
3. Junko Ichikawa, Testu Mori, Mitsuharu Kodaka, Keiko Nishiyama, Makoto Ozaki Makiko Komori. Anticoagulation based on heparin dose-response technique did not predict accurately heparin bolus dose requirement to achieve target ACT during cardiac surgery. American Society of anesthesiologists Annual meeting (Chicago, Illinois, October 24th 2016)
4. 市川順子, 森哲, 小高光晴, 金子吾郎, 小森万希子. ヘブコンHMSの使用は人工心肺下の心臓手術において、ヘパリン必要量を的確に予想できるか? 心臓血管麻酔学会第21回学術集会(2016年9月16日, 横浜ベイホテル東急, 神奈川県横浜市)
5. 市川順子, 越野一郎, 伊藤実紀子, 小高光晴, 小森万希子. 心臓手術中に濃厚赤血球製剤の投与により、赤血球が小型化、密度上昇、変形能が低下する. 日本麻酔科学会第63回学術集会(2016年5月26日, 福岡国際会議場, 福岡県福岡市)
6. Junko Ichikawa, Keiko Okamura, Goro Kaneko, Keiko Nishiyama, Makiko Komori. Activated clotting time can be used to monitor residual heparin after discontinuing intravenous heparin for antithrombotic prophylaxis. Euroanaesthesia (London, UK, May 29th, 2016)
7. 市川順子, 小高光晴, 金子吾朗, 大野まり子, 小森万希子. 当院における過去3年間の麻酔関連のインシデント・アクシデント報告. 臨床麻酔学会第35回学術集会(2015年10月21日, パシフィコ横浜, 神奈川県横浜市)
8. 市川順子, 小高光晴, 森哲, 西山圭子, 小森万希子. 長時間の人工心肺および再手術により血液凝固機能異常、循環不全、乳酸アシドーシスに陥った症例. 心臓血管麻酔学会第20回学術集会(2015年10月9日, アクロス福岡, 福岡県福岡市)
9. Junko Ichikawa, Ichiro Koshino, Kazuyoshi Ando, Mitsuharu Kodaka, Makiko Komori. Transfusion of stored allogeneic

blood decreased deformability, increased density and miniaturized erythrocytes during cardiac surgery. American Society of anesthesiologists Annual meeting (San Diego, CA, October 25th 2015)

10. 市川順子, 鮫島由梨子, 市村健人, 大野まり子, 塚本加奈子, 小森万希子. トロンボモジュリンの組織プラスミノゲン活性化因子による線溶亢進に対する調節作用. 日本麻酔科学会第 62 回学術集会 (2015 年 5 月 28 日, 神戸ポートピアホテル, 兵庫県神戸市)

11. 市川順子, 岡村圭子, 金子吾郎, 北原智子, 西山圭子, 小森万希子. 術前のヘパリンによる抗凝固療法中止後の活性化凝固時間 (ACT) による残存ヘパリンの検出. 日本麻酔科学会第 62 回学術集会 (2015 年 5 月 28 日, 神戸ポートピアホテル, 兵庫県神戸市)

12. Junko Ichikawa, Mitsuharu Kodaka, Tomoko Kitahara, Keiko Nishiyama, Makiko Komori. Thromboelastometry-guided administration of fresh frozen plasma during cardiopulmonary surgery is associated with fewer perioperative allogenic blood transfusions and less postoperative blood loss. Euroanaesthesia (Berlin, Germany, May 1st2015)

13. Junko Ichikawa, Mitsuharu Kodaka, Yuriko Samejima, Goro Kaneko, Makiko Komori. A successful case of conventional treatment for systolic anterior motion without left ventricular outflow tract obstruction following mitral valve plasty. International Anesthesia Research Society (Honolulu, Hawaii, March 21st2015).

14. Junko Ichikawa, Mitsuharu Kodaka, Goro Kaneko, Mariko Oono, Keiko Nishiyama, Makiko Komori. Use of thromboelastometry during cardiac surgery with cardiopulmonary bypass reduces perioperative blood loss and transfusion requirements. American Society of anesthesiologists Annual meeting (New Orleans, Louisiana, October 11th2014)

15. 市川順子, 小高光晴, 金子吾郎, 西山圭子, 小森万希子. 人工腱索の長さの決定に経食道心エコーが有効であった症例. 第 19 回日本心臓血管麻酔学会 (2014 年 9 月 21 日, ホテル阪急エキスポパーク, 大阪府吹田市)

16. 市川順子, 小高光晴, 西山圭子, 黒川桂子, 小森万希子. 心臓手術中の希釈によるアンチトロンビン減少が、Hepcon-HMS 上のヘパリン必要量に及ぼす影響. 日本麻酔科学会第 61 回学術集会 (2014 年 5 月 15 日, パシフィコ横浜, 神奈川県横浜市)

〔図書〕(計 1 件)

1. 市川順子: 香取信之編書, 薬剤性凝固障害; 抗凝固薬 (ワルファリン、ヘパリン類、

抗トロンピン薬、抗 Xa 薬) および血小板薬. 検査値から考える周術期血液凝固異常. (査読有) 克誠堂出版 2016 in press

6. 研究組織

(1) 研究代表者

市川 順子 (ICHIKAWA, Junko)

東京女子医科大学・医学部・講師

研究者番号: 60318144

(2) 研究分担者

小森 万希子 (KOMORI, Makiko)

東京女子医科大学・医学部・教授

研究者番号: 60178332

小高 光晴 (KODAKA, Mitsuharu)

東京女子医科大学・医学部・臨床教授

研究者番号: 90280635

西山 圭子 (NISHIYAMA, Keiko)

東京女子医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 00155532