

学 位 論 文 の 要 旨

学位の種類	博 士	氏 名	伊 勢 隼 人
-------	-----	-----	---------

学 位 論 文 題 目

Hypothermic circulatory arrest does not induce coagulopathy in vitro
(in vitroモデルにおいて低体温循環停止法は凝固異常を惹起しない)

共 著 者 名

小山恭平, 國岡信吾, 白坂知識, 神田浩嗣, Payam Akhyari, 紙谷寛之

Journal of Artificial Organs, 2022年掲載予定

研 究 目 的

低体温循環停止法は、大動脈外科手術時において臓器保護を行いながら無血野での遠位側吻合を可能とする効果的な手法である。1975年にGriepが低体温循環停止法の利点を報告して以来、脳灌流を併用した改良法により術後合併症は減少し、臨床成績は飛躍的に向上してきた。しかし、現在においてもなお低体温循環停止法時に起こる血液の凝固異常は致命的合併症である。低体温循環停止法において、これまで低体温は凝固異常の原因の一つと考えられてきた。そのため、低体温循環停止法時の設定温度を高くすることで、凝固異常の危険性を減少させようとする報告が近年増加している。しかし、設定温度を高くすることは手術時の臓器保護効果を不確実なものとする。また、これまでの研究では、低体温循環停止法時に低体温が凝固異常を惹起するという明確なエビデンスは示されていない。本研究は、臨床的要因を排除したin vitroモデルを構築し、低温暴露が血液凝固異常を引き起こすかどうかを明らかにすることを目的として行った。

材 料 ・ 方 法

健康人ボランティアの血液を利用して、①血液低温保存実験と、②模擬循環回路実験、を行い、低温暴露が血液凝固能に与える影響について解析を行った。(承認番号18210及び19001)

① 血液低温保存実験

健康人ボランティア5人の血液を約20ml採血し、それぞれ常温群と低温群に分け、常温群は37℃で3時間、低温群は20℃で2時間保管した後に、1時間37℃で復温を行った。血液検査は両群において、採血時及び3時間の保存後に行った。凝固能の測定には全血を利用する血液凝固検査であるトロンボエラストグラフィ（TEG）を用いた。

分析項目はR（血餅形成開始までの時間）、K（血餅が十分な強度に達するまでの時間）、MA（血餅最大強度）をCK（内因系凝固能の評価試薬）及びCRT（内因系及び外因系評価試薬）で行った。また、ActF（フィブリンによる血餅形成評価試薬）、ADP（血餅形成における血小板評価試薬）を用いてMAに対するフィブリンと血小板の寄与度を評価した。常温群と低温群におけるTEG測定項目の血液保管前後の変化量について、t検定を用いて比較検討した。

② 模擬循環回路実験

次に、心臓外科手術における低体温循環停止をシミュレーションするため模擬循環回路を作成した。健常人ボランティア10人から血液を200ml採血し、ローラーポンプ及び小児用リザーバー・人工肺から成る模擬循環回路に充填した。常温群では37℃、1L/minの流量で4時間の模擬循環を行った。低温群では37℃、1L/minで15分間模擬循環を行った後、15分間かけて20℃まで冷却した。20℃に到達の後、0.1L/minの低流量で3時間模擬循環を行い、低体温循環停止を模した。その後1L/minの流量で15分間かけて37℃まで復温し、さらに15分間37℃、1L/minで模擬循環を行った。合計循環時間は両群で4時間とした。血液検査は両群において模擬循環開始15分後（T1）及び模擬循環終了時（T2）に行った。凝固能の測定には一般血液検査及び、全血を用いた血液凝固検査であるトロンボエラストメトリー（ROTEM）を用いた。解析項目は一般血液検査においてはヘモグロビン、ヘマトクリット、血小板数、フィブリノーゲン、アンチトロンビンⅢ、プロトロンビン時間、活性化部分トロンボプラスチン時間を測定した。ROTEMではCT（血餅形成開始までの時間）、CFT（血餅形成時間）、MCF（最大血餅強度）についてEXTEM（外因系評価試薬）、INTEM（内因系評価試薬）、FIBTEM（フィブリノーゲン評価試薬）を用いて測定した。また、測定したMCFからEXTEM、INTEM、FIBTEMにおいてMCE（最大血餅弾性）を算出し比較した。また、EXTEM MCEとFIBTEM MCEの算出値から、血餅強度における血小板の寄与度を示すPlatelet MCEを算出し比較した。統計解析は対応のあるt検定を用いて各群の模擬循環前後（T2 vs T1）を比較、t検定を用いて常温群と低温群における測定値の変化量を比較検定した。

成 績

① 血液低温保存実験

TEGの測定結果ではCK、CRTにおいてR及びKに常温群と低温群で有意差は無かった。また、血餅形成に対するフィブリノーゲンの寄与度を示すCFF-MA、Act-MA、血小板の寄与度を示すADP-MAについても有意差は無かった。この結果から血液を低温に暴露しても、復温後の血液凝固に影響を与えないことが示唆された。

② 模擬循環回路実験

模擬循環が血液凝固に与える影響を明らかにするため、各群において模擬循環前後の比較を行った。一般血液検査から、模擬循環後に両群で血小板数が有意に減少し（常温群； $p=0.048$ ，低温群； $p=0.013$ ）、低温群においては活性化部分トロンボプラスチン時間（ $p=0.047$ ）が延長、アンチトロンビンⅢ（ $p<0.01$ ）が減少することが示された。フィブリノーゲンは常温群で模擬循環後において有意に減少（ $p=0.016$ ）した。ROTEMでは模擬循環後に

EXTEM CFTが常温群で延長し ($p=0.016$)、EXTEM CFTは両群において有意に延長した (常温群; $p=0.029$, 低温群; $p<0.01$)。INTEM MCFは両群において模擬循環後に有意な減少を示し (常温群; $p<0.01$, 低温群; $p=0.02$)、EXTEM MCFは低温群で減少した ($p<0.01$)。模擬循環後にINTEM MCE (常温群; $p<0.01$, 低温群; $p<0.01$) 及びEXTEM MCE (常温群; $p=0.037$, 低温群; $p=0.016$) は有意に減少した。しかし、FIBTEMによるCT、MCF、MCEは両群において模擬循環前後で有意差は無かった。Platelet MCEは模擬循環後に低温群で有意に減少し ($p=0.036$)、常温群でも減少傾向であった。これらの結果から、模擬循環は両群において血餅形成速度と血餅強度を減少させることが示唆された。

次に、模擬循環中の低温が血液凝固に与える影響について検討するため、一般血液検査及びROTEMの全項目について模擬循環前後の変化量を常温群と低温群で比較検討した。一般血液検査及びROTEMの全測定項目において、両群間で有意差は無かった。これらの結果から、模擬循環中の低温は内因系、外因系、フィブリンノーゲン、血小板の全てに影響しないことが示唆された。

考 案

低体温循環停止法における低体温は、これまで凝固異常の原因の一つと考えられてきた。臨床研究においては凝固異常の危険性を減らすために設定温度を高くする試みがなされているが、出血量や輸血量が減少したという報告がある一方で、出血量及び輸血量ともに温度設定を高くしても変化は無かったとの報告もあり、有効性のコンセンサスが得られていない。一方で、温度設定を高くすることは脳・脊髄・腹部臓器の障害が生じる危険性を高めることが報告されている。in vitroの先行研究において低温は凝固異常を惹起すると報告されてきたが、その殆どは低温時の血液を解析したものであった。しかし、実際の低体温循環停止法において、体温は人工心肺終了時に十分に復温されることから、復温によって血液凝固異常が回復するのであれば低温による凝固異常が生じていても問題とはならない。本研究では低温に暴露した血液を復温し各種測定を行った。血液低温保存実験及び模擬循環回路実験から、復温後の血液において、低温暴露により凝固異常が生じていないことを明らかにした。この結果から、低体温循環停止法時の設定温度を高くすることは、臓器保護の観点からは必ずしも有用ではない可能性があると考えられる。一方、模擬循環回路は温度に関係なく血餅強度の低下を引き起こした。模擬循環回路によってフィブリンノーゲンは変化しなかった一方で、血小板数及びPlatelet MCEは減少したことから、血餅強度に対する血小板の寄与度がフィブリンノーゲンより高いことが示唆された。

結 論

In vitroモデルにおいて、低温暴露は不可逆的な血液凝固異常を惹起しないことが示された。低体温に対する生体側の反応が凝固異常に与える影響を明らかにするために、更なるin vivo研究が必要である。

引 用 文 献

(重要な引用文献 3 編以内を掲載すること。)

1. Griep RB, Stinson EB, Hollingsworth JF, Buehler D. Prosthetic replacement of the aortic arch. J Thorac Cardiovasc Surg 1975;70:1051-63.
2. Kamiya H, Hagl C, Kropivnitskaya I, et al. The safety of moderate hypothermic lower body circulatory arrest with selective cerebral perfusion: a propensity score analysis. J Thorac Cardiovasc Surg 2007;133:501-9.
3. Kaufmann TA, Wong KC, Schmitz-Rode T, Steinseifer U. Mimicking of cerebral autoregulation by flow-dependent cerebrovascular resistance: a feasibility study. Artif Organs 2012;36:E97-101.

学位論文の審査結果の要旨

報 告 番 号	第 号		
学 位 の 種 類	博士(医学)	氏 名	伊勢 隼人
審査委員長 水上 裕輔  審 査 委 員 清水 恵子  審 査 委 員 木下 学 			
学 位 論 文 題 目 Hypothermic circulatory arrest does not induce coagulopathy in vitro (in vitro モデルにおいて低体温旬間停止法は凝固異常を惹起しない) 掲載雑誌: J Artif Organs. 2022 Mar 18. Online ahead of print. doi: 10.1007/s10047-022-01324-5. (本論文が評価される点及び審査結果を600字から800字以内で簡潔に記載すること。) 低体温循環停止法は、大動脈外科手術時の無血野での遠位側吻合と同時に臓器保護を可能とするが、この手技に伴う血液凝固異常は致命的合併症となる。本研究は、健常人ボランティアの血液を用い、(1) 血液低温保存実験及び(2) 模擬循環回路実験により低温暴露後の複温(低温群)が血液凝固能に及ぼす影響について常温群と比較した。凝固能の評価には、全血を用いたトロンボエラストグラフィーによる測定が行われ、論文提出者自身の先行研究(Gen Thorac Cardiovasc Surg 2020)により検証された各種パラメータが使用された。実験(1)より複温後の血液凝固能に異常が見られないこと、実験(2)により模擬回路による血液凝固能の低下は低温暴露によって悪化しないことが確認された。また後者では、温度に関係なく血餅形成速度と血餅強度の低下がみられ、この現象における血小板に寄与度が、フィブリノーゲンよりも高いことを示す結果が得られた。本研究では臨床的要因を排除したEx vivo実験系が採用されたが、論文発表会では患者検体の使用を含む病態をより正確に反映した評価系の必要性が指摘された。なお、論文提出者らは低体温に対する生体側の応答が凝固異常に及ぼす影響を調べるため、ブタを用いた実験によるサイトカイン測定等の検討を進めていることを諮問の際に確認した。これまで、低体温は臓器保護に重要である一方で血液凝固異常の一因と考えられてきたが、低体温循環停止法では人工心肺終了後に複温されることから、複温により低温暴露時の血液凝固異常が回復することを示した本研究の意義は高い。論文内容と関連領域について各審査委員による諮問に対して論文提出者から適切な解答が得られ、この領域において十分な知識を有することが示された。以上から、本審査委員会は本論文が博士(医学)の学位に値するものであると判定した。			