ラット軽度低体温 (33°C) でのソノクロット™ を用いた凝固機能評価

岩本慎一郎 高須 朗 阪本 敏久

背 景：我々はラット及びブタ出血性ショックモデルで軽度低体温 (34～36°C) が生存時間を延長させることを報告してきた¹⁻³⁾。一方、低体温は凝固・止血機能に重大な影響を及ぼすとされ、外傷患者の治療では積極的保温が推奨されている。しかし、低体温と凝固機能の関係について検討した *in vivo* での研究はほとんどなく、また軽度低体温が凝固機能に及ぼす影響は依然不明である。

目 的：ラット (*in vivo*) で軽度低体温が凝固機能に及ぼす影響について個体温度と測定系温度を一致させて検討する。

方 法：過去の我々の研究¹⁻³⁾では 34～36°C を軽度低体温として研究しているが、尾本らの報告⁴⁾で、ヒト全血を用いたソノクロットの検討において 33°C で測定した場合に凝固機能障害を観測したとされていることから、本研究では低体温群を 33°C に設定した。

ハロタン麻酔下、ラット 8 匹 (体重 350～380g) の直腸温度を 38°C に保ち、大腿動脈にカニューレションした。38°C で 20 分間安定させた後、33°C (低体温) → 38°C (正常体温) → 33°C と 45 分間ずつ繰り返して各直腸温度を維持した。加温は保温マットとランプ、冷却はアルコール噴霧と扇風機を用い、それぞれ 15 分間で目標体温に変化させた後、温度変化によるラットの生命徴候の変化を安定させるために 30 分間目標体温で維持させた (Fig. 1)。

各体温変更直前に採血を行い、ソノクロット™ (米

国サイエンコ社) を用いた血液凝固・血小板機能分析を行った。ソノクロット™ では、ガラス粒 (凝固活性物質) 入りキュベットに全血 360μl を注入し、フィブリン形成を促進させることで、管状プローブの振動 (200Hz) が制限され、血液粘弾性変化が clot signal として経時的に記録される。測定時間に 1 時間を要し、測定温度の設定が必要である。本実験では体温と測定温度を同じにする必要があるので、2 台のソノクロット™ を用いた。

ソノクロット™ の測定項目は① activated coagulation time (Son ACT: 正常値 119-175 秒; フィブリン形成までの時間)、② clot rate (正常値 7-23 clot signal/min; フィブリン形成速度)、③ time to peak (正常値 17 分以内; 血餅の退縮が始まり、キュベットの底からはがれ始めるまでの時間) の 3 項目である。併せて、凝固・線溶亢進時の産生物質であるトロンビン・アンチトロンビン III 複合体 (TAT) とプラスミン・α2-プラスミンインヒビター複合体 (PIC) の量を測定した。採血による循環血液量減少の影響を最小限とするため、TAT・PIC の測定は最初の 1 クールのみとし、1 回採血量を 1 クール目は 1.7ml、2 クール目は 0.5ml とした。

統計学的処理は repeated-measure ANOVA または paired t-test を用いて行い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

結 果：凝固機能 (Son ACT, clot rate, time to peak) と TAT・PIC は温度変化で差がなかった (Table 1)。

考 察：低体温と凝固機能の関係について *in vitro* の研究は散見されるが^{4,6)}、*in vivo* の研究はほとんどない。さらに、測定系温度を個体温度に一致させないと、実際に生体で起こっている凝固機能を正しく評価できない⁷⁾。Staab⁸⁾ らは本実験と同様に深部体温

Effect of hypothermia on Sonoclot analysis in rats

Shinichiro Iwamoto, Akira Takasu, Toshihisa Sakamoto

防衛医科大学校病院救急部 (Department of Traumatology and Critical Care Medicine, National Defense Medical College)

キーワード: 血液凝固 (blood coagulation), 血小板機能 (platelet function), *in vivo*

著者連絡先: 〒359-853 埼玉県所沢市並木 3-2 / 原稿受理日: 2008 年 3 月 28 日 (08-028)

Fig. 1. Experimental design.

Table 1. Mean values ($\pm$ SD) of Sonoclot and fibrinolysis measurements at normothermia and hypothermia.

Rectal temperature ($^{\circ}$ C)	38 $\rightarrow$	33 $\rightarrow$	38 $\rightarrow$	33	p
Son ACT (sec)	99.1 $\pm$ 39.3	122.6 $\pm$ 70.9	94.6 $\pm$ 43.4	115.5 $\pm$ 35.9	0.56
Clot rate (Clot signal/min)	21.0 $\pm$ 11.0	18.6 $\pm$ 11.4	24.6 $\pm$ 16.1	23.0 $\pm$ 21.8	0.86
Time to peak (min)	13.4 $\pm$ 4.3	13.8 $\pm$ 6.1	11.8 $\pm$ 5.3	14.5 $\pm$ 9.4	0.83
TAT (ng/ml)	5.4 $\pm$ 2.1	5.4 $\pm$ 2.5	NA	NA	0.56
PIC (μ g/ml)	<0.3	<0.3	NA	NA	-

(mean $\pm$ SD) NA: not availableACT: activated coagulation time, TAT: thrombin-antithrombin III complex, PIC: plasmin- α 2-plasmin inhibitor complex

を変動させたミニブタでの検討で、軽度低体温 (34°C) は活性化部分トロンボプラスチン時間、プロトロンビン時間を延長させたが、ソノクロットTM による凝固機能測定値に明らかな変化を起さなかったことを報告している。一方、Shimokawa⁹⁾ はウサギ全身麻酔モデルでトロンボエラストグラフィ (TEG) 及びソノクロットTM による凝固機能を測定し、低体温 (34°C) は血液凝固を遷延させたが、一度形成された血餅の強度は常温時と差がなかったことを報告している。ただし、この実験では乳酸リンゲル液を持続投与しているため、血液希釈の影響を否定できない。ヒト (*in vivo*) においては、低体温手術例で行った TEG やソノクロットTM を用いた検討の報告がみられるが¹⁰⁻¹²⁾、血液希釈の可能性を排除した報告はなく、軽度低体温と凝固機能の関係については明らかでない。

ラット (*in vivo*) で行った本実験では輸液を行って

いないので希釈の影響を除外できる。ACT が低体温時に延長する傾向を認めたが、統計学的有意差はなく、その他、clot rate, time to peak, TAT, PIC でも温度間で有意差を認めなかった。軽度低体温では凝固・線溶系へ明らかな影響を及ぼさないことが示唆された。今後、凝固系を活性化させた出血性ショックや臓器損傷などの状態で検討する必要があると考える。

我々の過去の研究¹⁻³⁾ では基本的にハロタン麻酔を用いており、本研究においては同条件での検討を行うためにハロタン麻酔を採用した。実験操作においては、凝固機能へ影響を及ぼす可能性がある侵襲としては麻酔とカニキュレーションがあげられる。ハロタン麻酔が ADP 惹起による血小板凝集を可逆的に抑制するというを示している研究があり¹³⁻¹⁵⁾、本研究においても麻酔の影響を受けている可能性がある。しかし、本研究では全血での検討を行っており、ま

たソノクロット™はフィブリン形成から線溶に至るまでの全凝固プロセスを観察する検査であるので、結果に及ぼす影響は最小限であると考えた。

カニューレが凝固系へ及ぼす影響について考察した文献を見出すことはできなかった。しかし、カニューレの長さは一定で、血管への侵襲も最低限かつ一定と考えられるため、実験結果への影響はないと考えた。

結 語：ラット (*in vivo*) において 33°C の軽度低体温では明らかな凝固異常を検知できない。

文 献

- 1) Takasu A, Stezoski SW, Stezoski J, et al: Mild or moderate hypothermia, but not increased oxygen breathing, increases long-term survival after uncontrolled hemorrhagic shock in rats. *Crit Care Med* 2000; 28: 2465-74.
- 2) Takasu A, Norio H, Sakamoto T, et al: Mild hypothermia prolongs the survival time during uncontrolled hemorrhagic shock in rats. *Resuscitation* 2002; 54: 303-9.
- 3) Takasu A, Norio H, Gotoh Y, et al: Effect of induced-hypothermia on short-term survival after volume-controlled hemorrhage in pigs. *Resuscitation* 2003; 56: 319-28.
- 4) 尾本健一郎, 新井正徳, 松田潔, 他: ソノクロットによる凝固能評価に温度変化が及ぼす影響. *日救急医学会誌* 2002; 13: 668-73.
- 5) Reed RL 2nd, Bracey AW Jr, Hudson JD, et al: Hypothermia and blood coagulation: dissociation between enzyme activity and clotting factor levels. *Circ Shock* 1990; 32: 141-52.
- 6) Rohrer MJ, Natale AM: Effect of hypothermia on the coagulation cascade. *Crit Care Med* 1992; 20: 1402-5.
- 7) Reed RL 2nd, Johnson TD, Hudson JD, et al: The disparity between hypothermic coagulopathy and clotting studies. *J Trauma* 1992; 33: 465-70.
- 8) Staab DB, Sorensen VJ, Fath JJ, et al: Coagulation defects resulting from ambient temperature-induced hypothermia. *J Trauma* 1994; 36: 634-8.
- 9) Shimokawa M, Kitaguchi K, Kawaguchi M, et al: The influence of induced hypothermia for hemostatic function on temperature-adjusted measurements in rabbits. *Anesth Analg* 2003; 96: 1209-13.
- 10) Boldt J, Knothe C, Welters I, et al: Normothermic versus hypothermic cardiopulmonary bypass: do changes in coagulation differ? *Ann Thorac Surg* 1996; 62: 130-5.
- 11) Miyashita T, Kuro M: Evaluation of platelet function by Sonoclot analysis compared with other hemostatic variables in cardiac surgery. *Anesth Analg* 1998; 87: 1228-33.
- 12) Tuman KJ, Spiess BD, McCarthy RJ, et al: Comparison of viscoelastic measures of coagulation after cardiopulmonary bypass. *Anesth Analg* 1989; 69: 69-75.
- 13) Bjoraker DG: Failure of clinical concentrations of halothane to block adenosine diphosphate-induced platelet aggregation in vitro. *Br J Anaesth* 1979; 51: 187-91.
- 14) Dalsgaard-Nielsen J, Gormsen J: Effects of halothane on platelet function. *Thromb Haemost* 1980; 44: 143-5.
- 15) Walter F, Vulliamoz Y, Verosky Y, et al: Effects of halothane on the cyclic 3',5'-adenosine monophosphate enzyme system in human platelets. *Anesth Analg* 1980; 59: 856-61.