体外循環中における術野吸引血の特異的サイトカイン活性化とその処理方法についての検討

村木亮介¹⁾・永田和之¹⁾・中島康佑¹⁾
大下智也¹⁾・有道真久¹⁾・坂口太一²⁾

要 旨

体外循環中の術野吸引血における特異的なサイトカイン活性化を IL-6 の測定によって証明するとともに、その処理方法の一つとして自己血回収装置による血液洗浄効果について検証した。方法は Sorin 社リザーバー HVR-DUAL^{TM} を使用し、吸引血を分離。同時間軸にて採血を行い、CBC、血生化学、Free-Hb、IL-6 について評価を行った。結果、灌流血・吸引血・洗浄血群間で IL-6 (68 ± 56 , 467 ± 460 , 51 ± 60 pg/mL ; $P < 0.01$)、Free-Hb (0.06 ± 0.04 , 0.21 ± 0.12 , 0.03 ± 0.02 g/dL ; $P < 0.01$) と吸引血において有意に上昇を認めたとともに、洗浄処理による除去を確認した。また IL-6 上昇に関係する因子として検討した結果、白血球等には関係性は見られなかったが血小板数や Free-Hb には有意な相関を認めた ($P < 0.05$)。なお洗浄処理によって吸引血中血小板の $68 \pm 16\%$ の除去を示した。

これらより、吸引血のサイトカイン活性化は灌流血に比べ特異的に強く、吸引血を分離して処理することは有効であると考えられた。また処理方法については検討中ではあるが自己血回収装置によって活性化血小板の除去と IL-6 の除去が確認できたため、有効な方法の一つではないかと考える。

索引用語：サイトカイン活性化、吸引血分離、生体適合性、自己血回収装置、血小板

Study for the specific complement activation processing method of suction blood during extracorporeal circulation

Ryosuke Muraki¹⁾, Kazuyuki Nagata¹⁾, Kosuke Nakajima¹⁾, Tomoya Oshita¹⁾, Masahisa Arimichi¹⁾, Taichi Sakaguchi²⁾

Abstract

Objective : In a cardiopulmonary bypass (CPB) procedure, a systemic inflammatory response is activated by contact of blood with an extracorporeal circuit during re-transfusion of pericardial suction blood (PSB). The aim of this study was to clarify activation of specific cytokines and the efficacy of PSB washing to attenuate inflammatory reactions during CPB.

Methods : Blood samples were collected from 20 patients undergoing elective open-heart surgery using CPB at the time of aortic de-clamping. PSB was washed using an autologous blood recovery device (HVR-DUAL, Sorin Inc), then CBC, serum chemistry, Free-Hb, and IL-6 values were measured in circulating blood (V-group), PSB (K-group), and washed blood (S-group).

Results : The value for serum IL-6 was 7.78 times higher in the K-group than the V-group (467 ± 460 vs. 68 ± 56 pg/mL, $P < 0.01$), while that was significantly decreased by the washing procedure (K-group vs. S-group : 467 ± 460 vs. 51 ± 60 pg/mL ; $P < 0.01$). In addition, the serum free Hb value was 3.69 times higher in the K-group than the V-group (0.21 ± 0.12 vs. 0.06 ± 0.04 g/dL ; $P < 0.01$) and was also significantly reduced by washing (K-group vs. S-group : 0.21 ± 0.12 vs. 0.03 ± 0.02 g/dL ; $P < 0.01$). Platelet count and Free-Hb were significant factors for increased serum IL-6 in PSB, and PSB washing resulted in a $68 \pm 16\%$ reduction in platelet count.

Conclusion : Serum IL-6 was markedly increased in PSB during CPB. PSB washing may be useful to attenuate cytokine activation caused by CPB.

Key words : suction blood separation, autologous-blood recovery device, cytokine

1) 心臓病センター榊原病院 臨床工学科 村木亮介 (Ryosuke Muraki)

〒700-0804 岡山県岡山市北区中井町2-5-1

Department of Clinical Engineering, The Sakakibara Heart Institute of Okayama

2-5-1, Nakai-cho, Kita-ku, Okayama, 700-0804, Japan

2) 同 心臓血管外科

I. 緒 言

体外循環による影響として、サイトカインの活性化に伴う全身性炎症反応は広くいわれている。全身性炎症反応による悪影響は多々あるが、主なものとして血管内皮の透過性亢進による水分の間質への移動や血管拡張に伴う血圧低下である。報告では 200mL 程度の吸引血により動脈圧は 40% も低下するといわれており、サイトカイン活性による血行動態への影響は少なくない。その原因として人工肺や体外循環回路などの異物との接触や術野吸引血によるものなど様々である。昨今コーティング技術の向上により異物との接触による炎症反応は軽減できていると考えられるが、術野吸引血に対する対策法については未だ結論を得ていない。また、オフポンプ冠動脈バイパス手術 (off pump coronary artery bypass grafting ; OPCABG) 時の心腔内吸引血のサイトカイン活性について報告はなされているものの、体外循環症例における術野吸引血のサイトカイン活性化について灌流血と比較したものはなく、その程度は明らかではない部分が多い。そこで今回我々は心内ベントを除いた術野吸引血を分離することにより、吸引血におけるその特異的なサイトカイン活性化を、炎症性サイトカインであるインターロイキン 6 (IL-6) の測定によって証明するとともに、その影響因子について検証を行った。また、吸引血の処理方法についてであるが、Allen らは OPCABG において自己血回収装置の使用が全身性炎症反応の軽減に影響すると報告しており、その洗浄による効果を報告している¹⁾。そこで、本研究では体外循環中の吸引血の処理方法の一つとして自己血回収装置による洗浄効果についても検証を行ったので報告する。

II. 研究方法

1. 対 象

対象は 2014 年 10 月から 2015 年 3 月までに胸骨正中切開を行った体外循環のうち、低体温症例、透析患者

表 1 対象患者

年 齢 (歳)	76.7 ± 7.7
性 別 (男 : 女)	14 : 6
体外循環時間 (min)	173.2 ± 33.1
遮断時間 (min)	123.7 ± 24.0
採血時体外循環時間 (min)	132.1 ± 23.7

を除外した 20 症例とした (表 1)。

2. 方 法

吸引血の分離は Sorin 社製リザーバー HVR-DUAL™ を使用した。検査のタイミングは、肺や心筋の虚血再灌流によるサイトカインへの影響を考慮して大動脈遮断解除直前とし、分離した吸引血液を 200mL 程度サンプルした。その分離した吸引血を自己血回収装置 (Sorin 社製 Xtra 55mL bowl™) によって、メーカー推奨である洗浄流量 100mL/min、洗浄量 300mL の条件下で処理を行い、洗浄血とした。このときの灌流血 (V 群)、吸引血 (K 群)、洗浄血 (S 群) の採血を同時間軸で行い、比較検討を行った。同時に自己血回収装置による洗浄効果について、処理に伴う除去性能を評価した。評価項目は全血球計算 (CBC)、血清値、IL-6、遊離ヘモグロビン (Free-Hb) とした。また、CABG を付随して行った場合のサイトカインへの影響を検証するために CABG の有無によって 10 症例ずつの 2 群に分け、比較を行った。

なお検定は、3 群間は Fried-man 検定、2 群間は Mann-Whitney U-test、を用いて行い $P < 0.05$ にて有意とした。相関については Spearman 順位相関によって評価し $P < 0.05$ にて有意とした。

III. 研究結果

1. 灌流血、吸引血、洗浄血の 3 群比較 (図 1)

1) サイトカイン活性化

IL-6 値は吸引血において 467 ± 460 pg/mL と高値を示し、灌流血群の 68 ± 56 pg/mL に対し有意に高く、そ

図 1 吸引血における IL-6 と Free-Hb の上昇

表2 灌流血、吸引血、洗浄血の血球算定

	V 群	K 群	S 群
WBC ($\times 10^2/\mu\text{L}$)	84.2 $\pm$ 28.5	57.1 $\pm$ 22.0	85.8 $\pm$ 41.9
RBC ($\times 10^4/\mu\text{L}$)	282 $\pm$ 40	228 $\pm$ 54	426 $\pm$ 130
Hb (g/dL)	8.8 $\pm$ 1.1	7.1 $\pm$ 2.2	13.4 $\pm$ 4.1
Hct (%)	26.4 $\pm$ 3.1	21.5 $\pm$ 4.8	38.1 $\pm$ 10.9
PLT ($\times 10^4/\mu\text{L}$)	11.4 $\pm$ 4.6	8.26 $\pm$ 3.9	6.1 $\pm$ 3.8
Neutrophil (%)	88.4 $\pm$ 5.7	82.5 $\pm$ 8.47	85.1 $\pm$ 8.1
Lymphocyte (%)	9.7 $\pm$ 5.1	14.8 $\pm$ 7.5	12 $\pm$ 6.8
Monocyte (%)	1.2 $\pm$ 0.9	1.5 $\pm$ 1.2	1.1 $\pm$ 0.7
Eosinophil (%)	0.6 $\pm$ 0.6	1.2 $\pm$ 0.8	1.4 $\pm$ 1.4
Basophil (%)	0.1 $\pm$ 0.1	0.1 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.2
TP (g/dL)	4.0 $\pm$ 1.0	3.6 $\pm$ 1.1	0.4 $\pm$ 0.2
ALB (g/dL)	2.4 $\pm$ 0.4	1.9 $\pm$ 0.4	0.2 $\pm$ 0.2

の上昇率 (K/V) は 7.78 倍であった ($P<0.01$)。また、自己血回収装置による洗浄処理によって $51\pm 60\text{pg/mL}$ へと有意に低下した ($P<0.01$)。

2) Free-Hb

Free-Hb も IL-6 同様に吸引血において $0.21\pm 0.12\text{g/dL}$ と高値を示し、灌流血群の $0.06\pm 0.04\text{g/dL}$ に対して有意に高く、上昇率 (K/V) は 3.69 倍であった ($P<0.01$)。また、洗浄群において $0.03\pm 0.02\text{g/dL}$ とその除去を示し、吸引血群と比して有意に低下した ($P<0.01$)。

3) 血球数 (表 2)

吸引血において、WBC は $57.1\pm 22.0\times 10^2/\mu\text{L}$ となり他群 (V 群: $84.2\pm 28.5\times 10^2/\mu\text{L}$, S 群: $85.8\pm 41.9\times 10^2/\mu\text{L}$) に対し有意に低値を示した ($P<0.01$)。しかし白血球分画における好中球には差を示さなかった。

なお、他項目において灌流血と吸引血に有意な変化はなかった。

2. 自己血回収装置による洗浄効果

1) IL-6、Free-Hb の除去性能

自己血回収装置による洗浄によって、IL-6 の $99\pm 0.01\%$ 、Free-Hb の $82\pm 12\%$ 以上の除去を示し、良好な除去性能を示した (図 2)。

2) 血球、血小板等に対する影響

今研究においてサンプリングされた吸引血の容量は平均 $151\pm 37.7\text{mL}$ (Hct: 21.4%) であるが、洗浄処理に伴う血液濃縮によって、洗浄処理血容量は $66.2\pm 3.7\text{mL}$ (Hct: 38.3%) となり、その濃縮率は $47\pm 13\%$ であった。その処理過程に伴う血球の除去率は、CBC による単位あたりの血球数と容量の積によってサンプルの総数を算出し評価した結果、除去率はそれぞれ RBC: $16\pm 16\%$ 、WBC: $34\pm 17\%$ 、K: $92\pm 6.3\%$ 、Glu: $77\pm 11\%$ 、PLT: $68\pm 16\%$ 、TP: $79\pm 43\%$ 、ALB: $92\pm 7.3\%$ であった (図 2)。

3) 吸引血のサイトカイン活性化に対する影響因子

IL-6 の上昇する因子について検討を行った結果、血小板数との有意な相関を認めた ($r_s=0.568$; $P<0.05$)。また、Free-Hb とも強い相関を認めた ($r_s=0.685$; $P<0.01$)。しかし、白血球数 ($r_s=0.153$; n.s)、採血までの体外循環時間 ($r_s=0.276$; n.s) などとは相関は得られなかった (図 3)。

また、CABG を付随して行っているかの有無による 10 症例ずつの 2 群間比較を行った。結果 IL-6 の上昇率について、CABG を行っていない症例が 6.0 倍であったのに対し、行っている症例の方が 9.6 倍と高い傾

図2 自己血回収装置による血液への影響

向にあることがわかった ($P=0.056$)。その関連因子として開胸から採血までの時間と IL-6 に相関を認めた (rs

$=0.542$; $P<0.05$) (図 4)。

図 3 IL-6 上昇に関する影響因子

図 4 CABG の有無による IL-6 上昇への影響

Ⅳ. 考 察

まず、吸引血の特異的な血液性状についてであるが、灌流血に比べ吸引血にのみ IL-6 の特異的な上昇を認めたことから、吸引血のリザーバーへの返血が体外循環における全身性炎症反応の助長に大きく関わっていることが示唆された。また Free-Hb も上昇していたため、吸引動作による血球破壊も多く起こっていることが確認された。Free-Hb は 100mg/dL 以上になると腎障害の原因になりうるといわれている。結果では吸引血の Free-Hb はこの基準値の 2 倍程度まで上昇しており、その返血は体外循環に起因する臓器障害の原因の一つにもなっていることが推測され、除去が必要である。これらの結果から Albes らも提唱しているように、吸引血を分離して選択的に処理をすることは有効であると考え²⁾。また IL-6 上昇の原因について、通常では補体活性化経路のうち classical-pathway 並びに alternative-pathway によるものが一般的であり、マクロファージ等の白血球に起因されることが予想される。しかし本研究では白血球との相関はなく、血小板との相関が認められた。血小板とサイトカイン活性との関係について、Horstman, Ahn らは血小板由来マイクロパーティクル (platelet-derived microparticle ; PDMP) によるサイトカイン活性化について報告しており、また宮崎らは高シェアストレス下での血小板の活性化および PDMP の放出を報告している^{3, 4)}。これらの報告より、IL-6 上昇に起因する因子として、術野吸引動作に伴う血小板の活性化、並びに PDMP の放出に関連した補体活性化経路の影響を受けた可能性が示唆された⁵⁻⁷⁾。

また、今回我々は吸引血の処理方法に関して、Allen らの報告をもとに自己血回収装置による洗浄効果について検証を行った結果、IL-6 や Free-Hb などの有害物質の良好な除去を確認できたことから、処理方法の一つとして有効であると考えられた。同時に有効であると考えられた点について IL-6 との相関によって活性化が予想された血小板の除去がある。これについて De Somer らは、活性化された血小板の返血によってより凝固システムを活性化させ出血に繋がると報告している⁸⁾。この洗浄方法によって、吸引血中血小板の 68% を除去できていることはかえってサイトカイン活性だけでなく、凝固系に対しても生体適合性向上に寄与している可能性もある。ただし、本研究において処理は 1 回のみであり、かつ非処理群との比較を行っていないことから、あくまで仮定の範疇である。

最後に本処理方法による血球等に対しての影響を考えてみる。今結果からは IL-6 や Free-Hb に対してその選択的な除去性能を示したものの、RBC に対してもわずかながら減少を示した。その要因として考えられるものの一つとして、洗浄処理作業に伴う溶血が挙げら

れる。菊池らは自己血回収装置の洗浄効果について、同様に洗浄処理による溶血の可能性を示唆しており⁹⁾、赤血球保護の観点からいうと課題も残るが、処理後の Free-Hb 値より、その程度はわずかであると考ええる。また、凝固因子への影響も考慮しなければいけない。阿久津らは洗浄処理によって凝固因子は低下することを示したものの、2,000mL までの処理量までは FFP を使用せずに手術が可能であったと報告している¹⁰⁾。これらの報告からは本洗浄方法について、血球等への影響はあるものの、ある程度持続的には使用可能であると考えられる。しかし本洗浄方法は遠心分離によるものであり、分子量に依存してその効果の程度は変化するため、分子量の大きい TP や ALB も大部分が除去されてしまうことも考慮しなければいけない。その点では持続的な処理方法としては課題点も多いのが現状である。

Ⅴ. 結 語

体外循環の吸引血ではサイトカインが活性化され、その特異的な上昇率から体外循環中の生体適合性には吸引血が大きく関与していることが示された。また、そのメカニズムとして血小板の関与が示唆された。自己血回収装置による洗浄は有効であり、血球、蛋白成分の保存等の観点から、処理するタイミング・方法などの更なる検討が今後必要である。

本稿のすべての著者には規定された COI はない。

●参考文献

- 1) Allen SJ, McBride WT, Armstrong MA, et al. : Cell salvage alters the systemic inflammatory response after off-pump coronary artery bypass grafting surgery. *Ann Thorac Surg*, 83 (2) : 578-585, 2007.
- 2) Albes JM, Stöhr IM, Wahlers T, et al. : Physiological coagulation can be maintained in extracorporeal circulation by means of shed blood separation and coating. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 126 (5) : 1504-1512, 2003.
- 3) Horstman LL, Ahn YS : Platelet micro particles : a wide-angle perspective. *Crit Rev Oncol Hematol*, 30 (2) : 111-142, 1999.
- 4) Miyazaki Y, Nomura S, Fukuhara S, et al. : High shear stress can initiate both platelet aggregation and shedding of procoagulant containing micro particles. *Blood*, 88 (9) : 3456-3464, 1996.
- 5) Lovern F, Verma S : Evolving role of microparticles in the pathophysiology of endothelial dysfunction. *Clin Chem*, 59 (8) : 1166-1174, 2013.
- 6) 藤見 聡, 小倉裕司, 杉本 壽, ほか : マイクロパーティクル産生からみた sepsis の病態解明. *Inflammation and Regeneration*, 24 (1) : 18-26, 2004.
- 7) 乾 清重, 鷺尾正彦 : 体外循環侵襲への血小板活性化因子の関与について. *日本胸部外科学会雑誌*, 41 (2) : 238-246, 1993.

- 8) De Somer F, Van Belleghem Y, Van Nooten G, et al. : Tissue factor as the main activator of the coagulation system during cardiopulmonary bypass. J Thorac Cardiovasc Surg. 123 (5) : 951-958, 2002.
- 9) 菊地 充, 村田厚夫, 島崎修次, ほか : 自己血輸血時の血中サイトカインの変動について. 日救急医学会誌, 11 (8) : 386-392, 2000.
- 10) 阿久津博美 : 回収式自己血輸血の臨床的検討. 東医大誌, 50 (2) : 276-282, 1992.