

Hydroxyethyl starch製剤による 血液凝固障害の*in vivo*の検討

東口 隆, 時永泰行, 君塚基修, 数馬 聡, 濱田耕介, 山蔭道明

札幌医科大学医学部麻酔科学講座

キーワード: hydroxyethyl starch, *in vivo*, 血液希釈, 血液凝固障害

連絡先: 東口 隆

〒060-8543 札幌市中央区南1条西16丁目291

Tel: 011-688-9663

E-mail: rygz.32417.ad@gmail.com

要 旨

【背景】 先行研究ではhydroxyethyl starch (HES) 製剤を用いた血液希釈は凝固因子を低下させることで血液凝固を障害することが示唆されている。しかしそれらのほとんどが*in vitro*か、希釈度が厳密に統一されていない臨床研究であるため、生体内代謝と希釈効果そのものの影響は同時には考慮されていない。

【方法】 生理食塩水, HES130kD (ボルベン[®]), HES200kD (ペントスパン[®]) を用いて、ヘマトクリット値を指標とした均等な血液希釈を各群16匹ずつのラットに対して行った。ヘマトクリット値26-30%における血液凝固障害の程度をSonoclot[™]を用いて比較した。さらに血漿中の第X因子, GP IIb/IIIa, トロンビン-アンチトロンビン複合体 (TAT) の定量をELISAでおこなった。統計はKruskal-Wallis検定を用いP<0.05を有意とした。

【結果】 Sonoclot[™]のclot rateは生理食塩水と比べ分子量の大きなHES製剤ほど低下した。Platelet functionは生理食塩水と比べHES製剤でむしろ高値となりボルベン[®]とペントスパン[®]で差はなかった。第X因子はペントスパン[®]で有意に低下したが, GP IIb/IIIa, TATに差はなかった。

【結論】 HES製剤は第X因子を減少させて凝固を抑制したが、微小血栓の形成を示唆する所見はえられなかった。血小板機能は生理食塩水に比べむしろ高値となったが、可溶性GP IIb/IIIaの量では説明できなかった。

【背景】

多くの先行研究においてhydroxyethyl starch (HES) 製剤の使用が凝固因子を低下させ^{1,2)}, もしくはROTEM[®]などpoint-of careの凝固機能測定結果を悪化させ³⁾, 血液凝固機能を障害することが示唆されている。しかしこれらの研究はほとんどすべてが希釈度が完全にそろえられた*in vitro*研究か、手術などで使用された臨床研究である。*In vitro*研究はaアミラーゼによる溶質の

生体内代謝が考慮されておらず、臨床研究は厳密に希釈度を統一することが困難であるため、希釈効果そのものの影響が考慮されていない。『生体内代謝』と『希釈度の統一』のふたつの条件は同時には満たされてこなかった。HES製剤による血液凝固機能障害を正しく評価するためには*in vivo*で、かつ希釈の程度を統一しておこなうべきである。また繰り返し報告される凝固因子の減少に関してもその原因までは検討されていない。

[目的]

われわれはHES製剤が生体内で微小血栓を形成することで凝固因子を低下させ、希釈効果をうわまわる血液凝固機能抑制作用をもつとの仮説をたてた。In vivoにおける等希釈時の血液凝固機能をSonoclot™を用いて検討し、さらに血漿中の凝固因子、血小板膜タンパクおよび凝固関連因子の定量をおこなった。

テーテルおよび静脈カテーテルより適宜0.5mlから1mlの追加輸液をおこなった。これらの採血と輸液投与により循環を維持したまま血液希釈をおこなった。血液希釈はヘマトクリット値を指標とし⁴⁾、25%以下になるまで継続した。ヘマトクリット値26-30%におけるSonoclot™の計測値を比較した。平均血圧20%以上の低下時、アシデミア時にえられたSonoclot™値は除外した。

[方法]

血液希釈

札幌医科大学医学部動物実験倫理委員会の承認のもと（承認番号：16-095）、雄性Wistarラット（300 ± 50 g）48匹を、生理食塩水群16匹、HES130kD生食液ベース（ボルベン®）群16匹、HES200kD生食液ベース（ペンタスパン®）群16匹に分けた（Table 1）。セボフルラン麻酔下に気管切開、人工呼吸をおこない、大腿動脈および尾静脈にカテーテルを留置した（Figure 1）。血圧の持続モニタリングを開始し、動脈カテーテルおよび静脈カテーテルより1ml/時の速度で割り当てられた輸液製剤を投与した。約30分ごとに血液ガス分析用0.2ml、Sonoclot™用0.8ml、合計1mlの採血をおこないヘマトクリット値とSonoclot™値を記録した。モニタリング開始時の平均血圧の20%以上の低下を避けるため動脈カ

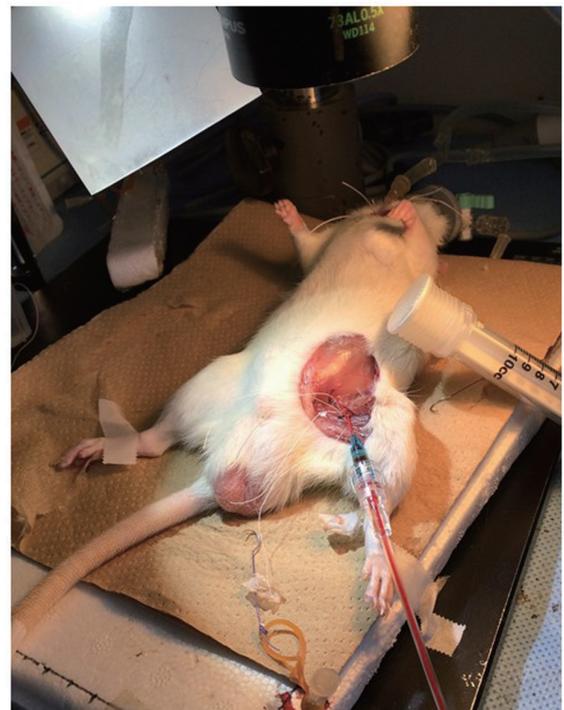
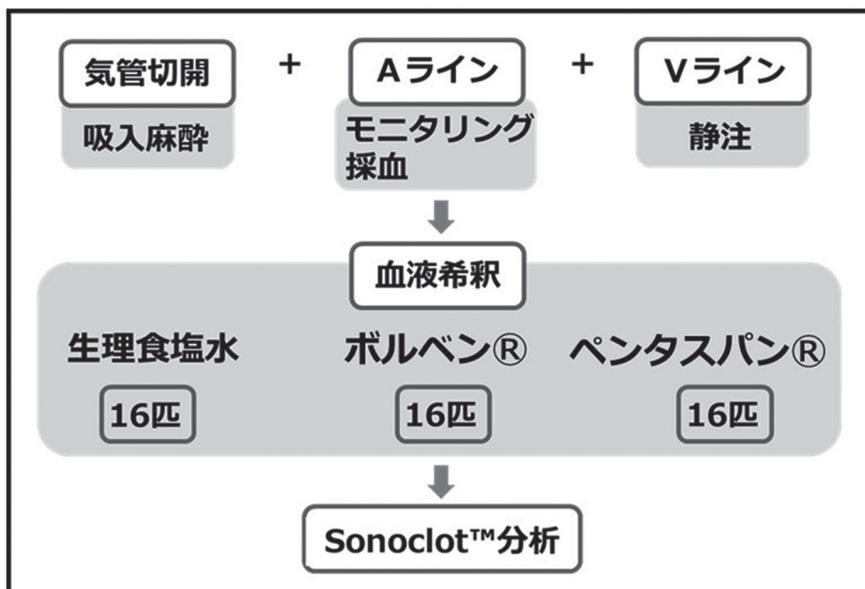


Figure 1. 血液希釈中のラット。

Table 1. 実験フローチャート。



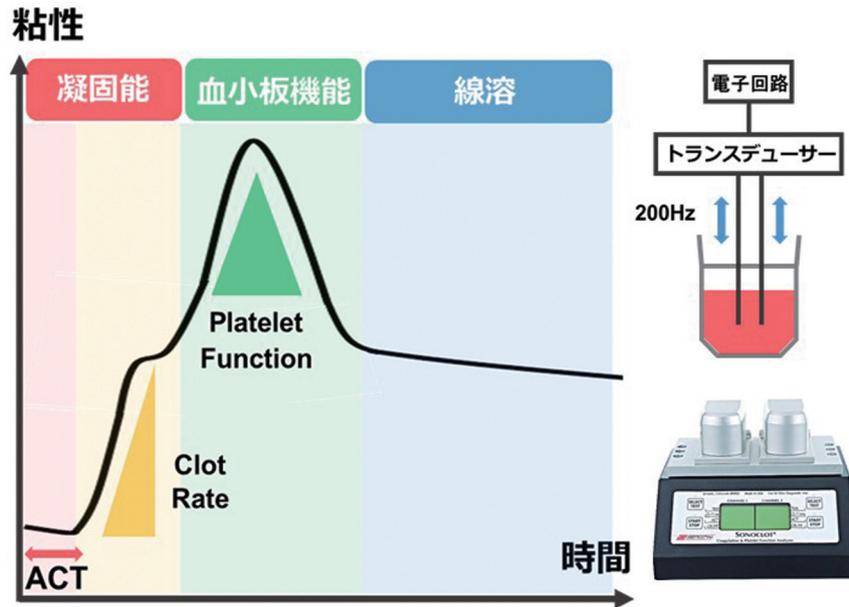


Figure 2. Sonoclot™ の実際.

Sonoclot™

Sonoclot™ (Scienco社；米国)は全血の血液粘性度測定を利用したpoint-of-careの血液凝固・血小板機能測定機器である。経時的に変化する粘性度から特有のsignature curveをえがき (Figure 2.), activated clotting time (ACT), clot rate (CR), platelet function (PF) の3項目を数値化する。ACTはフィブリンゲル形成開始までの時間, CRはフィブリンゲル形成度, PFは血餅退縮能を反映する。HES製剤を使用した*in vitro*での血液希釈実験では, ROTEM™ (テムインターナショナル社；ドイツ)と同程度の血液凝固抑制作用の検出力をもつとの報告がある⁵⁾。

凝固因子 (第X因子), 血小板膜タンパク (GP II b/ III a), 凝固関連因子 (トロンビン-アンチトロンビン) のELISAによる定量

Sonoclot™のACTおよびCR, すなわちフィブリンゲル形成の程度に最も強く影響を与える血漿中の第X因子 (CSB-E08441r; Cusabio Biotech, Wuhan, China)と, PFすなわち血餅退縮能に最も強く影響を与えるGP IIb/ IIIa (CSB-E08776r; Cusabio Biotech, Wuhan, China)の定量をELISAでおこなった。GP IIb/ IIIaは活性化血小

板細胞膜上に多数存在し, フィブリンゲンやvon Willebrand因子との接着を介して血小板どうしの結合を促進する。さらに凝固因子低下の原因として微小血栓形成の有無を確認するためトロンビン-アンチトロンビン複合体 (TAT) (LS-F22358; Life Span Bio Sciences, Seattle, WA, USA)の定量をELISAでおこなった。

統計

統計解析には, GraphPad Prism (Version 7.00., GraphPad Software, San Diego, CA; 米国)を用いた。Kruskal-Wallis検定を用い, $P < 0.05$ を有意とした。

[結果]

ACTは差がなかった (Figure 3A.). CRは生理食塩水と比べ分子量の大きなHES製剤ほど低下した (Figure 3B.). PFは生理食塩水と比べHES製剤でむしろ高値となりボルベン®とペンタスパン®で差はなかった (Figure 3C.). 第X因子はペンタスパン®で有意に低下した (Figure 4A.)が, 可溶性GP IIb/ IIIa (Figure 4B.), TATに差はなかった (Figure 4C.).

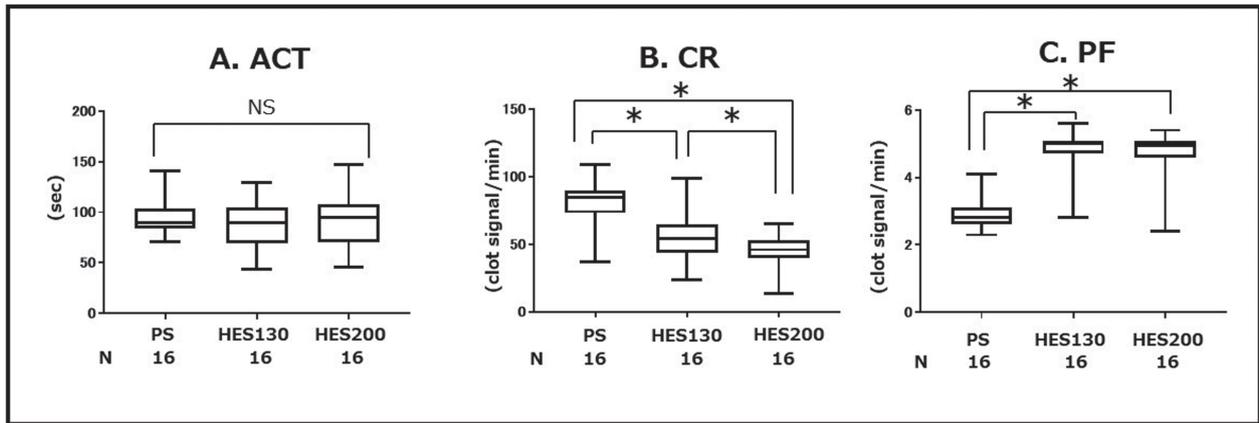


Figure 3. ヘマトクリット値 26-30% 時の Sonoclot™ を用いた凝固・血小板機能評価.

ACT: activated clotting time, CR: clot rate, PF: platelet function, 生食: 生理食塩水, NS: 非有意, *P < 0.05

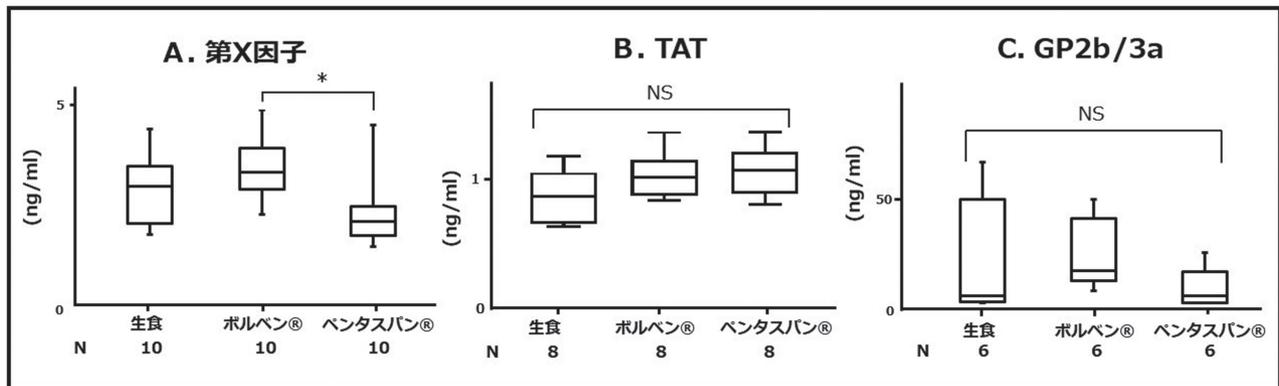


Figure 4. ELISA による定量.

TAT: トロンビン-アンチトロンビン複合体, 生食: 生理食塩水, NS: 非有意, *P < 0.05

[考 察]

HES製剤の使用による血液凝固障害は前述のごとく繰り返し報告されている。古くは中-高分子量かつ高置換度の、代謝の遅いHES製剤が使用され、第Ⅷ因子と von Willebrand 因子の低下が指摘されていた⁶⁾。これらのHES製剤は現在では使われなくなったが、現在主流となっているボルベン[®]を膀胱全摘術に使用した研究でもフィブリノゲン、プロトロンビン、第Ⅹ因子、第ⅩⅢ因子の活性が低下したことが報告されている⁷⁾。また、*in vivo*もしくは*in vitro*でHES 130/0.4 (溶媒不明)による血液希釈効果をROTEM™, Sonoclot™, TEGで評価した研究を対象としたシステマティックレビューでは中分子量/低置換度のHES製剤といえど、血液凝固障害をひきおこすと結論づけられている⁸⁾。本研究においても

『*in vivo*』かつ『等希釈』という新たな条件下で、HES製剤の、生理食塩水による希釈効果をうわまわる凝固抑制作用と、特定の凝固因子を減少させることが示された。部分的過凝固による凝固因子の消費を証明することはできなかった。一方で血小板機能はHES製剤でむしろ高値となった。本研究と類似する結果は、ボルベン[®]と、ペントスパン[®]と同等のHES製剤を用いて*in vitro*の血液希釈をおこなった際、ROTEM™測定による凝固機能は両者とも生理食塩水よりも抑制されたが、白血球と血小板の接着分子であるCD62 (P-セレクチン)の発現が両者で増加し、免疫学的血小板機能はむしろ活性化された研究にもみられる⁹⁾。ボルベン[®]以外のHES製剤がアデノシン二リン酸とトロンビン受容体活性化ペプチドによる血小板細胞膜上のGPⅡb/Ⅲa活性を抑制したの

に対し、生理食塩水とボルベン[®]のみが抑制しなかった研究も存在する¹⁰⁾。しかし凝固機能の低下と血小板機能の上昇が同時に起きる機序とその臨床的意義は不明である。これらを合理的に説明するにはさらなる研究が必要である。

【結 語】

HES製剤は第X因子を減少させて凝固を抑制したが、微小血栓の形成を示唆する所見はえられなかった。血小板機能は生理食塩水に比べむしろ強化されるが、可溶性GP IIb/IIIaの量では説明できなかった。

【参考文献】

1. Jin S, Yu G, Hou R, et al: Effect of Hemodilution In Vitro with Hydroxyethyl Starch on Hemostasis. *Med Sci Monit.* 2017 May 8 ; 23 : 2189-2197.
2. Kind SL, Spahn-Nett GH, Emmert MY, et al: Is dilutional coagulopathy induced by different colloids reversible by replacement of fibrinogen and factor XIII concentrates? *Anesth Analg.* 2013 Nov ; 117 (5) : 1063-71.
3. Schlimp CJ, Cadamuro J, Solomon C, et al: The effect of fibrinogen concentrate and factor XIII on thromboelastometry in 33% diluted blood with albumin, gelatine, hydroxyethyl starch or saline in vitro. *Blood Transfus.* 2013 Oct ; 11 (4) : 510-7.
4. Amoroso M, Özkan Ö, Özkan Ö, et al: The Effect of Normovolemic and Hypervolemic Hemodilution on a Microsurgical Model: Experimental Study in Rats. *Plast Reconstr Surg.* 2015 Sep ; 136 (3) : 512-9.
5. Casutt M, Kristoffy A, Schuepfer G, et al: Effects on coagulation of balanced (130/0.42) and non-balanced (130/0.4) hydroxyethyl starch or gelatin compared with balanced Ringer's solution: an in vitro study using two different viscoelastic coagulation tests ROTEMTM and SONOCLOT™. *Br J Anaesth.* 2010 Sep ; 105 (3) : 273-81.
6. Kozek-Langenecker SA: Effects of hydroxyethyl starch solutions on hemostasis. *Anesthesiology.* 2005 Sep ; 103 (3) : 654-60.
7. Fenger-Eriksen C, Tønnesen E, Ingerslev J, et al: Mechanisms of hydroxyethyl starch-induced dilutional coagulopathy. *J Thromb Haemost.* 2009 Jul ; 7 (7) : 1099-105.
8. Hartog CS, Reuter D, Loesche W, et al: Influence of hydroxyethyl starch (HES) 130/0.4 on hemostasis as measured by viscoelastic device analysis: a systematic review. *Intensive Care Med.* 2011 Nov ; 37 (11) : 1725-37.
9. Sossdorf M, Marx S, Schaarschmidt B, et al: HES 130/0.4 impairs haemostasis and stimulates pro-inflammatory blood platelet function. *Crit Care.* 2009 ; 13 (6) : R208. doi: 10.1186/cc8223. Epub 2009 Dec 22. (cited 2018-06-14).
10. Franz A, Bräunlich P, Gamsjäger T, et al: The effects of hydroxyethyl starches of varying molecular weights on platelet function. *Anesth Analg.* 2001 Jun ; 92 (6) : 1402-7.