

出血性ショック蘇生に対する治療的低体温：
必要な蘇生輸液量、輸液量と凝固障害、低体温・
アシドーシス・凝固機能障害を伴う重症出血性
ショックに注目した実験的研究

にし こういちろう
西 紘一郎

(救急医学専攻)

防 衛 医 科 大 学 校

平成 25 年度

目次

	頁
略語一覧	1
第1章 緒言	2
第2章 実験1. 出血性ショックに対する治療的低体温が蘇生輸液量 に及ぼす影響	5
第1節 背景と目的	5
第2節 方法	6
1. 対象と外科的処置	6
2. 3-phased Hemorrhagic Shock モデル	7
3. 群分け	7
4. 測定	8
5. 統計	9
第3節 結果	9
1. 直腸温	9
2. 循環動態と呼吸数	9
3. 必要輸液量	10
4. 動脈血液ガスと Ht	10
5. ビタミン E と %CoQ9	11
6. 生存率	11
第4節 考察	11
第5節 小括	13
第3章 実験2. 出血性ショックに対する大量輸液時の血液希釈性 凝固障害	14
第1節 背景と目的	14
第2節 方法	14
1. 対象と外科的処置	14
2. 3-phased Uncontrolled Hemorrhagic Shock モデル	15
3. 群分け	16
4. 測定	16
5. 統計	17
第3節 結果	17
1. 循環動態	17

2. 動脈血液ガスと血液算定	1 8
3. 凝固機能	1 9
4. HST 60 分における Clot rate と Ht 値の相関	1 9
5. 尻尾断端からの出血量	1 9
6. 生存率	2 0
第4節 考察	2 0
第5節 小括	2 2
第4章 実験3. 低体温、アシドーシス、凝固機能障害を伴う重症出血性ショックでの治療的低体温の有効性	2 3
第1節 背景と目的	2 3
第2節 方法	2 4
1. 対象と外科的処置	2 4
2. 低体温と希釈による“死の三徴”の作成	2 4
3. 群分け	2 5
4. 持続出血性ショック	2 5
5. 測定	2 5
6. 統計	2 7
第3節 結果	2 7
1. 直腸温	2 7
2. 循環動態	2 7
3. 動脈血液ガスと血液算定	2 8
4. 凝固機能	2 8
5. 尻尾断端からの出血量	2 9
6. ビタミン E と %CoQ9	2 9
7. 生存率	2 9
第4節 考察	3 0
第5節 小括	3 2
第5章 総括	3 3
第6章 結論	3 5
謝辞	3 6
図・表	3 7

図説	6 4
参考文献	7 3

略語一覧

ACT : activated coagulation time 活性化凝固時間

BE : base excess 過剰塩基

CoQ9 : coenzyme Q9 コエンザイム Q9

ET : experiment time 実験時間

HST : hemorrhagic shock time 出血性ショック時間

Ht : hematocrit ヘマトクリット

MAP : mean arterial pressure 平均動脈圧

第1章 諸言

重症出血性ショックに対する治療的低体温は、これまでの大小の動物を用いた実験では生存時間が延長し⁽¹⁻⁹⁾有効性が示されているが、臨床応用は未だ行われていない。これは出血性ショックに対する基礎的研究が十分ではなく、治療的低体温を臨床に用いるまでのエビデンスが示されていないことや低体温が生体にとって有害であるという認識が根強いことによると考える。外傷に伴う出血性ショックに対する蘇生では輸液療法が中心となるが、1) 治療的低体温が蘇生時の必要輸液量に及ぼす影響、2) 出血性ショックに対する輸液による希釈性凝固障害の存在、3) 重症出血性ショックでは低体温、アシドーシス、凝固障害を伴うが、低体温を治療的に用いることの有効性、についてはそれぞれ明らかにされていない。

出血性ショックでは組織血液灌流量が著明に低下し組織の酸素化が阻害される。出血性ショックに対する根本的治療は出血源の止血・修復であることは言うまでもないが、その蘇生法の中心的治療は大量輸液で循環不全を改善させ組織酸素供給量を増加させることである。これは、虚血・再灌流モデルの一型とみなされ、蘇生のために輸液すること、すなわち、虚血となった組織に再灌流することで大量の活性酸素が発生し組織障害が生じるといわれている⁽¹⁰⁻¹²⁾。治療的低体温は虚血後の再灌流障害を抑制することが示されており^(13, 14)、出血性ショックに対して大量輸液した際に出現する再灌流障害も抑制できると考えられ、実際にその効果について検討した研究は存在するが^(1, 2, 15)、治療的低体温が出血性ショック時の蘇生に必要な輸液量に及ぼす影響についての研究はほとんど行われていない。実験1では、外傷を想定した重症の出血性ショ

ックで、治療的低体温が蘇生に必要な輸液量とその際の酸化ストレスに及ぼす影響をまず検討する。

出血性ショックに対する蘇生輸液療法の目的は、血管内容量を増加させて循環動態を改善させることである。しかし、そこで行われる大量輸液は血液を希釈し、止血カスケードの酵素活性や血小板機能を阻害し⁽¹⁶⁾、血液希釈性の凝固障害を引き起こすといわれている⁽¹⁷⁾。しかしながら、その血液希釈と凝固障害の関係を明確に示した研究はなく、希釈性凝固障害の発生に関してin vivoで確認した報告はない。実験2では、外傷を想定した重症出血性ショックで、大量輸液に伴って希釈性凝固障害が発生するか否かを明らかにする。

死の三徴は、重症外傷の出血性ショックの蘇生中にしばしば認められ、①低体温、②アシドーシス、③凝固機能障害の三徴を指し、お互いが影響して悪循環となり、一度発生すると治療に難渋し、致死率も急激に跳ね上がる⁽¹⁸⁻²¹⁾。これら三徴のうち、特に低体温は血小板機能や凝固カスケードの酵素活性を低下させて凝固障害を招き出血のコントロールを困難にしている⁽²²⁾。それゆえ、復温および体温維持の重要性が強調されている^(23, 24)。しかし、出血性ショックの本質は組織での酸素供給量の不足であるから、治療的低体温で代謝を抑制して酸素代謝の需要・供給バランスを改善させることは合理的であり、いくつかの実験的研究では出血性ショックに対する治療的低体温の転帰改善効果が示されている⁽¹⁻⁹⁾。これら実験的研究での治療的低体温の有効性と死の三徴でみられる低体温の不利益は全く矛盾することから、低体温、アシドーシス、凝固機能障害を伴うような重症出血性ショックにおいて、治療として低体温を継続することが、日常診療で行われているように復温する場合と比較

検証が必要と思われる。実験 3 では、低体温、アシドーシス、凝固機能障害を伴った重症出血性ショックでの治療的低体温の有効性、特に凝固系に及ぼす影響とその有効性について究明を行う。

以上、本研究ではこれら出血性ショックの蘇生に関する治療的低体温と必要輸液量、輸液量と凝固障害、および低体温、アシドーシス、凝固機能障害を伴った重症出血性ショックに注目して、1) 治療的低体温が出血性ショックに対する蘇生時の必要輸液量に及ぼす影響、2) 蘇生輸液による希釈性凝固障害は存在するのか、3) 低体温、アシドーシス、凝固機能障害を伴った重症出血性ショックに対する治療的低体温の有効性について究明を行う。

第2章 実験1. 出血性ショックに対する治療的低体温が蘇生輸液量に及ぼす影響

第1節 背景と目的

出血性ショック時の輸液による蘇生は虚血・再灌流モデルの一型と考えられ、蘇生中に活性化酸素が発生する⁽¹⁰⁻¹²⁾。Childsらは出血性ショック蘇生で治療的低体温が活性酸素の発生を抑制し、毛細血管の透過性亢進をも抑制したことを報告している⁽¹⁵⁾。血管透過性亢進が抑制されると血管外への輸液の漏出が抑制され、低体温は輸液量に影響を及ぼすことが考えられるが、これまでに、治療的低体温の輸液量に及ぼす効果について注目した研究はない。そこで、実際の出血性ショック蘇生で行われる蘇生法を再現して実験的研究を行った。大量出血に伴う出血性ショックでは、成人ではおよそ1～2Lの初期輸液を行い、続いて輸血も行うが、輸液と輸血の割合は3:1で行われることが多い。本研究では体重70 kgヒトの初期輸液量1 Lに準じ、体重400 gのラットの蘇生輸液を6 mLとし、輸血量は2 mLとした。

ビタミンEはトコフェノールとトコトリエノールを含む、脂溶性ビタミンで活性酸素を減少させる働きがある⁽²⁵⁾。また、ユビキノール（還元型Coenzyme Q9; CoQ9）に対するユビキノン（酸化型CoQ9）の比率（%CoQ9）は酸化ストレスの良い指標として用いられている⁽²⁶⁾。本実験においては活性酸素の抑制能力としてのビタミンEと活性酸素の産生指標としての%CoQ9を測定し酸化ストレスについて評価することとした。

本研究ではラットを用いた出血性ショック蘇生で治療的低体温が①蘇生に必要な輸液量と蘇生中の活性酸素発生を抑制し、②生存率を改善させるか否かを

明らかにすることを目的とした。なお、本実験は本学動物実験取扱い倫理委員会の許可のもとに行った。

第2節 方法

1. 対象と外科的処置

雄性 Sprague-Dawley ラット 16 匹（体重 350 ～ 400 g）を用いて実験を行った。ラットを麻酔箱（笑気 50%、酸素 50%、ハロセン 4%）に入れ、麻酔導入後、体重測定を行い、仰臥位で固定した。コーンマスクを用いて（気管挿管を行わず）自発呼吸を維持させながら、吸入麻酔（笑気 50%、酸素 50%、ハロセン 1%）を持続した。直腸に体温計（TR-71S; T&D 社製）を挿入し、保温パッドとランプ照射を用いて直腸温を $38 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ に維持した。左大腿を切開し、ポリエチレン製カテーテル（INTRAMEDIC, PE50; Becton Dickinson 社製）を大腿動脈内に 2 cm 挿入した。同様のカテーテル（INTRAMEDIC, PE60; Becton Dickinson 社製）を大腿静脈内に 6 cm 挿入し、先端を下大静脈に留置した。カテーテルはそれぞれ圧変換器（P231D; Gould 社製）に接続し、生体監視記録装置（RM-6000; 日本光電社製）を用いて心電図、心拍数、動脈圧、静脈圧、呼吸数を持続的にモニターした。これらの処置は 45 分以内に終了した。処置終了後、10 分間状態を安定させたのち、平均動脈圧 (Mean Arterial Pressure; MAP)、心拍数、呼吸数、直腸温のベースライン測定を行った。ベースライン測定後、ハロセン濃度を 0.5% とした。ベースライン測定 5 分後に出血性ショック導入のため脱血を開始するが、その脱血開始時間を出血性ショック時間 (Hemorrhagic Shock Time; HST) 0 分 (HST 0 分) とした。

2. 3-phased Hemorrhagic Shock モデル (図 1 - 1)

Phase I : 出血性ショック期 (HST 0 ~ 75 分)

ベースライン測定の後 5 分後に下大静脈カテーテルから脱血を開始し、15 分かけて 2.5 mL/100 g の脱血を行った。脱血した血液は血液 1 mL あたりへパリン 5 単位を混和して室温で保存した。脱血終了後の HST 15 分以降の 60 分間、5 分毎に 0.5 ~ 1.0 mL の脱血と返血を繰り返しながら、MAP を 25 ~ 35 mmHg に調整して出血性ショックを導入した。この間、体温は $38 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ を維持した。

Phase II : 蘇生期 (HST 75 ~ 150 分)

下大静脈カテーテルから 1.5 mL/100 g の乳酸加リンゲル液を 10 分間で輸液し、続いて脱血保存した血液から 0.5 mL/100 g を 5 分間で輸血した。その後 60 分間、HST 150 分まで MAP 75 mmHg を目標に維持するよう、5 分毎に測定した MAP が 75 mmHg よりも低下した場合には乳酸加リンゲル液を輸液し、MAP が一定となるよう微調整した。Phase II 終了後の HST 150 分にカテーテルを抜去し、創を縫合して 100%酸素を吸入させ麻酔から覚醒させた。

Phase III : 観察期 (HST 150 分 ~ 72 時間)

ラットを摂食・摂水自由なケージに移動させ、8 時間ごとに生存状態を観察した。72 時間以上生存したラットはハロセンの過量投与により安楽死させた。

3. 群分け

16 匹のラットを出血性ショック終了直前 (HST 75 分) で無作為に 2 群に分

けた。Group 1 (n=8) を常温群、そして Group 2 (n=8) を低体温群とし、蘇生期の Phase II の間 (HST 75 ~ 150 分)、それぞれ直腸温を $38 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ と $34 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ になるよう調節した。すなわち、加温は保温パッドとランプ照射、冷却はアルコールと扇風機を用いて行った。Phase II 終了後、低体温群 (Group 2) のラットはランプ照射を行い復温した。

4. 測定

HST - 5 分 (ベースライン)、HST 75 分 (出血性ショック終了後) 及び HST 150 分 (蘇生終了後) に動脈血 1 mL を採取し、動脈血液ガス分析とラジカルスカベンジャーとしてビタミン E と %CoQ9 を測定した。各血液採取時に同量の乳酸加リンゲル液を輸液して、循環動態の変動を極力抑えた。

(1) 動脈血液ガス分析とヘマトクリット (Hematocrit; Ht)

動脈血液ガス分析装置 (ABL 330; Radiometer 社製) を用い、 PaCO_2 、 PaO_2 、pH、Base excess (BE)、Ht 値を温度補正せず測定した。

(2) ビタミン E と %CoQ9

ビタミン E、ユビキノン (CoQH) およびユビキノール (CoQOH) を液体ガスクロマトグラフィーで測定した。前処理カラム (Supelguard LC-ABZ, $5\ \mu\text{m}$, $33\ \text{mm} \times 4.6\ \text{mm}$; Supelco 社製)、分析カラム (Supelcosil LC-8, $5\ \mu\text{m}$, $250\ \text{mm} \times 4.6\ \text{mm}$; Supelco 社製)、還元カラム (Type RC-10-1; Irica 社製) を使用し、UV 吸収検知器 (210 nm) (JUSCO UV970; 日本分光製)、電気化学検出器 (NANOSPACE SI-2; 資生堂製) を用いて検出しピーク値を測定した。%CoQ9 はユビキノン (CoQH) のユビキノール (CoQOH) に対する比率で計算した。

5. 統計

測定値は平均値±標準偏差で表示し、群間の比較は Student's t-test を用いて行った。生存時間は Kaplan-Meier 法と Gehan-Wilcoxon 法を用いて群間を比較した。 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

第3節 結果

1. 直腸温 (図 1 - 2)

直腸温をプロトコルに基づき管理した。常温群 (Group 1) の平均体温は phase I で $37.7 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ 、phase II では $37.8 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ と実験期間を通じて直腸温を $38 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ に維持し、低体温群 (Group 2) の平均体温は phase I で $37.5 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ であり、冷却開始から 10 分後の HST 85 分に $34.3 \pm 0.6^{\circ}\text{C}$ となり、その後は phase II 終了まで $34 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ の低体温を維持した。

2. 循環動態と呼吸数

(1) 平均動脈圧 (MAP) (図 1 - 3)

最初の脱血終了時 (HST 15 分)、すべてのラットで MAP は $25 \pm 5 \text{ mmHg}$ ($17 \sim 33 \text{ mmHg}$) に低下し、その後はプロトコル通り phase I 終了まで $25 \sim 35 \text{ mmHg}$ を維持した。両群とも MAP の低下による返血は必要とせず、常温群 (Group 1) では $0.8 \pm 0.3 \text{ mL}/100 \text{ g}$ 、低体温群 (Group 2) では $0.9 \pm 0.5 \text{ mL}/100 \text{ g}$ の脱血を行った。phase II において、低体温群 (Group 2) では初期輸液の乳酸加リンゲル液を投与した直後に MAP が 75 mmHg 以上に上昇したのに対し、常温群 (Group 1) では輸血後にはじめて血圧上昇がみられた。輸血終了後も低体温群 (Group 2) では 75 mmHg で維持できたのに対し、常温群 (Group

1) では輸液なしに MAP を維持できなかった。HST 80 ～ 150 分で低体温群 (Group 2) の MAP は常温群 (Group 1) より有意に高値であった。 $(p<0.01)$

(2) 心拍数 (図 1-4)

両群ともいずれのラットの心拍数も、ベースラインの 349 ± 8 回/分から HST 15 分に 259 ± 40 回/分まで低下したが、その後は徐々に上昇し、HST 70 分で 371 ± 49 回/分となった。実験中、両群間に心拍数の有意差はなかった。

(3) 呼吸数 (図 1-5)

ベースラインでは 129 ± 12 回/分であったが、実験中は緩やかに低下し、HST 150 分 (phase II 終了時) に常温群 (Group 1) で 103 ± 11 回/分、低体温群 (Group 2) で 88 ± 8 回/分となった。HST 120 ～ 150 分で低体温群 (Group 2) の呼吸数は常温群 (Group 1) より有意に低下した ($p<0.05$)。

3. 必要輸液量 (図 1-6)

HST 90 分まではプロトコル通りに輸液と輸血を行った。HST95 分以降で MAP を 75 mmHg 以上に維持するために必要となった 5 分毎の追加輸液量は、常温群 (Group 1) が低体温群 (Group 2) より多かった ($p<0.01$)。追加した総輸液量は常温群 (Group 1) で 6.6 ± 1.4 mL/100 g ($4.2 \sim 8.7$ mL/100 g) を要したのに対し低体温群 (Group 2) では 0.4 ± 0.7 mL/100 g ($0 \sim 1.7$ mL/100 g) に留まっていた ($p<0.01$)。

4. 動脈血液ガスと Ht (表 1-1)

動脈血液ガス分析ではベースライン及び HST 75 分で両群間に有意差を認めなかった。両群とも BE は HST 75 分で最低値となり、蘇生後 (HST 150 分) に回復した。phase II 終了時 (HST 150 分) で、常温群 (Group 1) の Ht は輸

液のため $17 \pm 2\%$ (14 ~ 19%) に低下したのに対し、低体温群 (Group 2) では維持され $26 \pm 2\%$ (23 ~ 29%) であった ($p < 0.05$)。

5. ビタミン E と %CoQ9 (図 1 - 7)

本実験を通じて %CoQ9 は両群間で有意差を認めなかった。すべてのラットでビタミン E はベースラインの $16.5 \pm 2.4 \mu\text{mol/L}$ (20.7 ~ 12.0 $\mu\text{mol/L}$) から HST 75 分の $10.8 \pm 1.8 \mu\text{mol/L}$ (13.8 ~ 7.5 $\mu\text{mol/L}$) に減少したが ($p < 0.05$)、両群間に有意差を認めなかった。HST 150 分 (phase II 終了時) にビタミン E は低体温群 (Group 2) で $15.9 \pm 3.1 \mu\text{mol/L}$ へ上昇したが、常温群 (Group 1) では $10.2 \pm 0.8 \mu\text{mol/L}$ と低値のままであり、低体温群 (Group 2) で有意に上昇していた ($p < 0.05$)。

6. 生存率

72 時間後の生存率は、常温群 (Group 1) が 6/8 (75%) で低体温群 (Group 2) が 8/8 (100%) であった。両群間に生存率の有意差を認めなかった ($p = 0.6$)。

第 4 節 考察

出血性ショックに対する治療的低体温が予後を改善するという有効性を示した研究は過去に行われているが、輸液蘇生量に注目した研究はない⁽¹⁻⁹⁾。また、臨床の外傷診療で出血性ショックを認めた場合、初期輸液として乳酸加リンゲル液 1 ~ 2 L を投与して、その後、輸液量 : 輸血量 = 3 : 1 で輸血を行うことが実際に多くなされている。本研究では、実際の臨床に合わせて、外傷治療で目標とされる 70 ~ 80 mmHg を蘇生の目標血圧として設定し、これを維持するよう蘇生輸液・輸血プロトコルを作成した。このように、実際の蘇生輸液療法を

想定して、出血性ショック蘇生で治療的低体温が蘇生輸液量を著明に抑制しうることを明らかにしたことは、意義が大きいと思われる。

出血性ショックモデルを用いた過去の研究では、治療的低体温が血圧を上昇させることが示されている^(2, 16-18)。本研究でも低体温群でMAPが持続的に高値であったのに対し、常温群では大量の乳酸加リンゲル液投与にも関わらず低値であった。Childsらは出血性ショック蘇生で、治療的低体温が毛細血管からのアルブミン漏出を減少させたことを示しており⁽¹⁵⁾、治療的低体温導入により血管透過性と血管外水分漏出が抑制することで血管内水分も保留され血圧が上昇したのではないかと考えられた。

出血性ショックから蘇生させる際に活性酸素の産生が増加することが知られている⁽¹⁰⁻¹²⁾。治療的低体温は再灌流障害を減少させることで、脳、心臓、筋および小腸間膜での活性酸素の産生を減少させることが虚血・再灌流モデルで示されており^(15, 27-29)、その機序として、酸素所要量の減少⁽³⁰⁾、ロイコトリエン産生減少⁽³¹⁾、IL-1の低下⁽³²⁾などが挙げられている。出血性ショックでの輸液蘇生も虚血・再灌流モデルの一型と思われ、Childsらは腸間膜の蛍光ジヒドロローダミンを測定することにより、出血性ショック蘇生でも治療的低体温が活性酸素を減少させることを報告しており、さらに、その活性酸素抑制こそが前述した毛細血管透過性減少の要因であることも報告している⁽¹⁵⁾。本研究でも低体温群（Group 2）でビタミンE値がベースライン値近くまで回復しており、再上昇したビタミンEがラジカルスカベンジャーとして活性酸素の消去に働いた可能性が推察され、Childsらの報告に矛盾しないと考える。

過去の動物実験では、出血性ショックという全身虚血に対して治療的低体温

を導入することで生存率が明らかに改善した⁽¹⁻⁹⁾。本研究では出血性ショック期ではなく、その後の蘇生期に治療的低体温を導入したが、長期生存率は常温群と低体温群で有意差を認めなかった。常温群（Group 1）では2例が死亡した一方、低体温群（Group 2）では全例生存していることから、検討するnを増加させれば過去の実験と同様な結果が得られると期待される。

本研究により、出血性ショックにおける治療的低体温は蘇生輸液量を抑制できることが明らかにされた。輸液制限すべき頭部外傷や心不全を合併した出血性ショック患者での応用も期待でき、その臨床的意義は大きいと思われた。

第5節 小括

ラットの出血性ショックモデルで、治療的低体温が血中ビタミン E を上昇させるとともに血圧を維持するための蘇生輸液量を減少させることが明らかとなり、本研究結果は出血性ショックの治療において意義があるものと思われた。

第3章 実験2. 出血性ショックに対する大量輸液時の血液希釈性凝固障害

第1節 背景と目的

出血性ショックに対する蘇生輸液療法は、血液を希釈し止血カスケードの酵素活性や血小板機能を阻害することで、血液希釈性の凝固障害を引き起こすといわれている^(16, 17)。しかし、血液希釈と凝固障害の相関関係を明確に示したin vivo研究はなく、希釈性凝固障害という病態については依然として不明な点が多い。ヒトでの外傷性出血性ショックに対する標準的な初期輸液量が2 Lであることから、体重400 gのラットに換算して11 mLを標準輸液群として、その半分の5.5 mLを制限輸液群、3倍量の33 mLを大量輸液群として、それぞれ輸液療法を行うようにプロトコルを作成した。本研究では重症出血性ショック中の蘇生で行われる大量輸液に伴う血液希釈による凝固障害に対する影響、すなわち、①大量輸液は標準輸液、あるいは制限輸液と比較して凝固障害が強く起こるか否か、そして、②輸液量と凝固障害の相関関係を明らかにすることを目的とした。なお本実験は本学動物実験取扱い倫理委員会の許可のもとに行った。

第2節 方法

1. 対象と外科的処置

雄性 Sprague-Dawley ラット（体重 360 ～ 450 g）18 匹を用いて実験を行った。

実験1と同様に自発呼吸を維持したまま、麻酔箱とコーンマスクで麻酔を導入（笑気 50%、酸素 50%、ハロセン 4%）・維持（笑気 50%、酸素 50%、ハロセン 1%）し、大腿動脈内にポリエチレン製カテーテル（INTRAMEDIC, PE50;

Becton Dickinson 社製) を 2 cm 挿入し、大腿静脈内に同様のカテーテル (INTRAMEDIC, PE60; Becton Dickinson 社製) を 6 cm 挿入し、先端を下大静脈に留置した。カテーテルはそれぞれ圧変換器 (P231D; Gould 社製) に接続し、生体監視記録装置 (RM-6000; 日本光電社製) を用いて心電図、心拍数、動脈圧、静脈圧、呼吸数を持続的にモニターした。これらの処置は 45 分以内に終了した。処置終了後、10 分間安定させたのち、平均動脈圧 (MAP)、心拍数、呼吸数、直腸温のベースライン測定を行った。直腸温は本実験を通じて $38 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ となるよう調節した。ベースライン測定 5 分後に出血性ショック導入のため脱血を開始するが、その脱血開始時間を出血性ショック時間 0 分 (HST 0 分) とした。

2. 3-phased Uncontrolled Hemorrhagic Shock モデル (図 2-1)

Phase I : 出血性ショック期 (HST 0 ~ 60 分)

ベースライン測定の 5 分後に下大静脈カテーテルから 15 分かけて 2.5 mL/100 g の脱血を行った。脱血した血液は血液 1 mL あたりへパリン 5 単位を混和して室温保存した。脱血終了直後 (HST 15 分) に尻尾を尾部付け根から全長の 25% 部位で切断 (尻尾全長の 75% を切断) し、切断端からの出血を持続させて出血量を測定した。尻尾切断後、制限輸液群 (Group 1)、標準輸液群 (Group 2)、大量輸液群 (Group 3) の 3 群に分けて、それぞれプロトコル通り乳酸加リンゲル液の輸液を 45 分間行った。HST 0 分からハロセン濃度は 0.5% で維持した。

Phase II : 蘇生期 (HST 60 ~ 100 分)

Phase II 開始時、各群とも切断した尻尾断端を縫合止血した。各群ともハ

ロセン濃度を 1.0%とし、下大静脈カテーテルから Phase I で保存した血液から 0.75 mL/100 g を 10 分間で輸血し、続いて 0.25 mL/min で乳酸加リンゲル液を 30 分間持続投与した。Phase II 終了後にカテーテルを抜去し、創を縫合して 100%酸素を吸入させ麻酔から覚醒させた。

Phase III：観察期（HST 100 分 ～ 72 時間）

ラットを摂食・摂水が自由にできるケージに移動させ、8 時間ごとに観察した。72 時間以上生存したラットはハロセンの過量投与により安楽死させた。

3. 群分け

Phase I の脱血終了時（HST 15 分）に制限輸液群（Group 1；0.1 mL/min、n=6）、標準輸液群（Group 2；0.25 mL/min、n=6）、大量輸液群（Group 3；0.75 mL/min、n=6）の 3 群を無作為に分けた。各輸液速度で乳酸加リンゲル液輸液を HST 60 分まで 45 分間、微量輸液注入ポンプ（Model CVF-3200；日本光電社製）を用いて行った。

4. 測定

HST - 5 分（ベースライン）、HST 60 分（出血性ショック終了後）及び HST 100 分（蘇生終了後）に動脈血 1 mL を採取し、動脈血液ガス分析と血算、凝固機能の測定を行った。それぞれのサンプリングでは血液採取と同時に乳酸加リンゲル液を採血と同量輸液して、循環動態の変動を極力抑えた。

（1）血液ガス分析

200 μ L の血液サンプルで動脈血液ガス分析装置（ABL 330；Radiometer 社製）を用い、PaCO₂、PaO₂、pH を測定した。

(2) 血液算定

100 μ L の血液サンプルで自動血球計数装置 (pocH-100iV; Sysmex 社製) を用い Ht 値と血小板数を測定した。

(3) 凝固機能 (図 2-2)

370 μ L の血液サンプルを凝固血小板機能測定装置 (Sonoclot analyzer; Scienco 社製) を用いて分析した。測定項目は①activated coagulation time (ACT; フィブリン形成までの時間)、②clot rate (フィブリン形成速度; 低下が凝固機能悪化を示す)、③time to peak (血小板機能; 延長が凝固機能悪化を示す) の 3 項目である。

5. 統計

測定値は平均値 $\pm$ 標準偏差で表示し、群間の比較は ANOVA 検定と Tukey-Kramer 法で比較した。生存時間は Kaplan-Meier 法と Gehan-Wilcoxon 法を用いて群間を比較した。 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

第3節 結果

1. 循環動態

(1) 平均動脈圧 (MAP) (図 2-3)

最初の脱血終了時 (HST 15 分)、すべてのラットで MAP は 22 ± 3 mmHg ($19 \sim 31$ mmHg) に低下した。輸液開始後 (HST 20 分) では、大量輸液群 (Group 3) が 42 ± 9 mmHg まで上昇し、制限輸液群 (Group 1; 30 ± 6 mmHg) や標準輸液群 (Group 2; 31 ± 3 mmHg) と比較して有意差に高かった (ともに $p < 0.05$)。その後 HST 40 $\sim$ 50 分では、標準輸液群 (Group 2)

と大量輸液群 (Group 3) が制限輸液群 (Group 1) と比較して有意に高い MAP を示した (ともに $p < 0.05$)。蘇生期 (phase II) において、輸血直後、すべてのラットで MAP は $57 \pm 16 \text{ mmHg}$ ($32 \sim 90 \text{ mmHg}$) まで上昇した。その後、制限輸液群 (Group 1) 及び標準輸液群 (Group 2) では phase II 終了まで、 60 mmHg 前後の MAP で維持できたが、大量輸液群 (Group 3) では HST 70 分に $34 \pm 4 \text{ mmHg}$ まで低下し、その後徐々に上昇して HST 100 分に 60 mmHg 付近に到達した。

(2) 心拍数 (図 2-4)

すべてのラットで心拍数はベースラインの 351 ± 53 回/分から、HST 15 分には 254 ± 56 回/分に低下し、その後徐々に上昇して HST 60 分には 414 ± 49 回/分となった。蘇生期 (phase II) ではすべての群で 400 回/分程度であった。各群間に有意な差を認めなかった。

2. 動脈血液ガスと血液算定 (表 2-1)

ベースラインではすべての項目で群間に有意差を認めなかった。出血性ショック終了時 (HST 60 分) に動脈血 pH はすべての群でベースラインより低下したが、制限輸液群 (Group 1) が 6.93 ± 0.21 と最も低値で、標準輸液群 (Group 2 ; 7.26 ± 0.15) 及び大量輸液群 (Group 3 ; 7.23 ± 0.18) と比較しても有意に低かった ($p < 0.05$)。大量輸液群 (Group 3) の Ht 値は $12 \pm 3\%$ で、制限輸液群 (Group 1) の約 3 分の 1、標準輸液群 (Group 2) の約半分の値であり、有意に低値であった (ともに $p < 0.05$)。血小板数もまた、大量輸液群 (Group 3) で $25 \pm 8 \times 10^4/\mu\text{L}$ と制限輸液群 (Group 1) の約半分と有意に低値であった ($p < 0.05$)。

3. 凝固機能 (表 2-2)

ベースラインでは凝固機能に群間での有意差はなかった。Phase I の輸液終了時 (HST 60 分) で、制限輸液群 (Group 1) では ACT が 95 ± 11 秒、time to peak が 7 ± 2 分、clot rate が 40 ± 10 clot signal/分とベースラインからほとんど変化がなかったのに対し、標準輸液群 (Group 2) は各々 183 ± 96 秒、 15 ± 15 分、 16 ± 9 clot signal/分で、大量輸液群 (Group 3) は各々 174 ± 100 秒、 22 ± 16 分、 14 ± 10 clot signal/分とベースライン値より悪化した。制限輸液群 (Group 1) に対して標準輸液群 (Group 2) と大量輸液群 (Group 3) では ACT と time to peak に有意な差を認めなかったが、clot rate のみ有意差を認めた ($p < 0.01$)。標準輸液群 (Group 2) と大量輸液群 (Group 3) の間には有意差を認めなかった。HST 100 分ではすべての群で凝固パラメーターは増悪傾向を示した。凝固障害を認める代表的な Sonoclot analyzer のグラフを図 2-5 に示す。

4. HST 60 分における clot rate と Ht 値の相関 (図 2-6)

すべてのラットで出血性ショック終了時 (HST 60 分) において、clot rate と Ht 値の相関関係を調べたところ、正の相関を認めた ($r = +0.67$, $p < 0.01$)。一方、HST 100 分では clot rate と Ht 値に相関関係を認めなかった。

5. 尻尾断端からの出血量 (図 2-7)

出血量は制限輸液群 (Group 1) で 1.1 ± 0.3 mL/100 g、標準輸液群 (Group 2) で 1.2 ± 0.6 mL/100 g、大量輸液群 (Group 3) で 3.6 ± 1.1 mL/100 g であり、大量輸液群 (Group 3) で有意に出血量が多かった ($p < 0.01$, Group 3 vs. Groups 1 and 2)。

6. 生存率 (図 2-8)

制限輸液群 (Group 1) のすべてのラットが HST 120 分までに死亡し、その生存率は標準輸液群 (Group 2) 及び大量輸液群 (Group 3) よりも有意に低下していた ($p < 0.05$) (Group 2 と Group 3 に有意差なし)。

第 4 節 考察

外傷性重症出血性ショックの蘇生では大量輸液に伴い血液希釈性凝固障害が発生することは古くから指摘されている^(16, 17)。しかし、*in vitro*での研究はあるものの⁽³³⁾、輸液と凝固障害の関係を相関係数などで直接的に示す*in vivo*での研究はない。外傷性重症出血性ショックでみられる凝固障害は、アシドーシス、低体温、炎症など、血液希釈以外の問題も原因となり、単純に輸液性希釈に焦点を絞った研究は困難である。本研究では、臨床で行われている外傷患者への推奨初期輸液量の 2 L を基に蘇生輸液量を決定し、また、血液希釈による実際の出血量への影響を評価するためラット尾部を切断して出血を持続させた状態の出血性ショックモデルを用いて実験を行った。制限輸液、標準輸液、大量輸液の 3 つの異なる輸液プロトコルを作成して比較検討したところ、標準輸液と大量輸液で血液希釈性凝固障害が認められたが、循環動態、アシドーシス、そして生存率が改善した。

さらに、血液希釈指標の Ht 値と凝固障害指標の clot rate に正の相関関係があることを明確にした。clot rate はフィブリノーゲンがフィブリン形成する速度を反映した指標であり⁽³⁴⁾、フィブリノーゲンが希釈されるために血液希釈と clot rate が相関したものと考ええる。蘇生期 (Phase II) 終了直後 (ET 100 分) では

これらに相関関係を認めなかったが、制限輸液群 (Group 1) はPhase IIでHt値の変化はほとんど無いにも関わらず半分のラットが死亡していた。これは出血性ショックの虚血による組織侵襲が標準輸液群 (Group 2) や大量輸液群 (Group 3) よりも大きいことが要因ではないかと推測される。また、ほとんどの症例が死亡していることから出血性ショックモデルとしては極めて重篤であり、生存率を評価するには不十分であったことも考えられる。

本研究ではACT、time to peakと血液希釈の指標であるHt値との相関関係は示せなかった。ACTは全血の凝固開始時間を反映しており、血小板数や凝固因子といった複数の要因で変化するため、血液希釈の指標とは単純に相関を示すことができなかったと考えられる。また、time to peakは血小板機能を反映しており、血小板数とHt値が相関しないことからtime to peakとHt値も相関しなかったと考える。また、ショック終了後のACTやtime to peakの値にばらつきが大きく、凝固機能を比較する指標としては不適當である可能性もある。さらに、各群は6例ずつでの検討でありnが不足していることも要因であると考えられる。

大量輸液は血圧を上昇させたが、一方、標準的輸液群に比べ3倍以上の出血量をもたらした。これとは対照的に制限輸液群では低血圧を持続させて出血量を減少させたが、アシドーシスが遷延し死亡率が100%であった。標準輸液量は他の輸液量に比べて、組織灌流を維持しつつ、出血を助長しない適度な輸液量であったと思われた。

本研究により、重症出血性ショックに対する大量輸液は循環動態と生存率を改善させるが、出血性ショックが制御されていない場合は、出血量が増加する

ことが示された。さらに、輸液に伴う血液希釈と一部の凝固パラメーターには正の相関関係が存在することを示した。これは、輸液療法での利点と欠点、すなわち、組織灌流圧上昇と希釈性凝固障害という相反する問題点を明確にしたもので、その臨床的意義は大きいと思われる。

第5節 小括

本研究では、重症出血性ショックの蘇生で行われる大量輸液が凝固パラメーターを悪化させることを明らかにした。大量輸液は血液希釈性凝固障害の原因となることが充分示唆されるが、同時に循環動態を改善させ生存率も改善させることも明らかとなった。さらに、希釈パラメーターである Ht 値と凝固パラメーターである clot rate に相関関係を有することをはじめて明らかにした。これらの知見は今後の出血性ショックに対する蘇生輸液法の研究開発に意義があると思われた。

第4章 実験3. 低体温、アシドーシス、凝固機能障害を伴う重症出血性 ショックでの治療的低体温の有効性

第1節 背景と目的

重症外傷でしばしば認められる死の三徴は①低体温、②アシドーシス、③凝固機能障害の三徴を指し、お互いが“vicious circle”を形成して、発症すると治療は極めて困難となる⁽¹⁸⁻²¹⁾。特に低体温は凝固障害を増悪させるため、出血性ショックでは致命的となる⁽²²⁾。しかし、出血性ショックでは組織灌流低下で酸素供給不足になっていることから、治療的低体温で酸素代謝の需要・供給バランスを改善させることは合理的と思われ、いくつかの動物実験では治療的低体温が出血性ショックの予後を改善するという有効性が示されている⁽¹⁻⁹⁾。しかし、これら動物実験では常温状態から治療的低体温を導入しているのに対し、現実の外傷患者では治療開始時より既に低体温状態にあることが多い。また、重症外傷に伴う低体温に対しては復温および体温維持の重要性が強調されている^(23, 24)。よって、より重篤な出血性ショックモデル、特に死の三徴に近い、低体温、アシドーシス、凝固機能障害がすでに存在した状態で、治療的低体温が復温する場合と比べて悪影響を及ぼすか否かの実験的検証が必要と思われる。実験1では低体温を34℃に設定したが、より重篤な状態を再現するため32℃の低体温で実験を行うこととした。それに伴い急激な体温上昇による復温性傷害(rewarming injury)を最小限に防ぐため、復温後の体温はこれまでの実験よりも1℃低い37℃を目標として行うこととした。また、虚血による活性酸素産生を評価するため、指標となるラジカルスカベンジャーの測定も行うこととした。本研究では、低体温、アシドーシス、凝固機能障害を伴った重

症出血性ショックでの治療的低体温の有効性、特に凝固系に及ぼす影響とその有効性を明らかにすることを目的とした。なお本実験は本学動物実験取扱い倫理委員会の許可のもとに行った。

第2節 方法

1. 対象と外科的処置

雄性 Sprague-Dawley ラット 16 匹（体重 360 ～ 425 g）を用いて実験を行った。

実験 1、実験 2 と同様に自発呼吸を維持したまま、麻酔箱とコーンマスクで麻酔を導入（笑気 50%、酸素 50%、ハロセン 4%）・維持（笑気 50%、酸素 50%、ハロセン 1%）し、大腿動脈内にポリエチレン製カテーテル（INTRAMEDIC, PE50; Becton Dickinson 社製）を 2 cm 挿入し、大腿静脈内に同様のカテーテル（INTRAMEDIC, PE60; Becton Dickinson 社製）を 6 cm 挿入し、先端を下大静脈に留置した。カテーテルはそれぞれ圧変換器（P231D; Gould 社製）に接続し、生体監視記録装置（RM-6000; 日本光電社製）を用いて心電図、心拍数、動脈圧、静脈圧、呼吸数を持続的にモニターした。導入中の直腸温は $36.0 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ に維持した。これらの処置は 45 分以内に終了した。処置終了後、10 分間安定させたのち、平均動脈圧（MAP）、心拍数、呼吸数、直腸温のベースライン測定を行った。ベースライン測定時間を実験時間（Experiment Time ; ET）0 分とした。ハロセン濃度は 0.5% とし、実験中はこの濃度を維持した。

2. 低体温と希釈によるアシドーシス、凝固機能障害の作成（図 3-1）

ベースライン測定の 5 分後に体表へのアルコール噴霧と扇風機により、ET 15 分までに目標直腸温度の 32°C まで低下させ、以後は冷却と保温パッドとランプを用いた加温で体温を維持した。血液希釈性アシドーシスを作成するため、大腿動脈から 10 分毎に 5 mL ずつ（1 回の脱血は 5 分間かける）ET 40 分まで 4 回、合計 20 mL の脱血を行い、並行して下大静脈内へ生理食塩液を ET 50 分まで 1.11 mL/min の速度で 45 分間、微量輸液注入ポンプ (Model CVP-3200; 日本光電製) を使用し、合計 50 mL を持続注入した。

3. 群分け

ET 50 分（脱血・輸液終了時）に復温群 (Group 1 ; 37°C n=8) と低体温群 (Group 2 ; 32°C, n=8) の 2 つのグループに無作為に分けた。復温群 (Group 1) では保温パッドとランプを用いて体表から復温を行った。低体温群 (Group 2) では加温は保温パッドとランプ照射、冷却はアルコールと扇風機を用いて直腸温を $32.0 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ に維持した。

4. 持続出血性ショック

ET 60 分（脱血・輸液終了 10 分後）に尻尾を尾部付け根から全長の 25% 部位で切断（尻尾全長の 75% を切断）し、切断端からの出血を持続させ、出血量を測定した。蘇生輸液を行わずに死亡あるいは ET 140 分まで経過観察した。ET 140 分まで生存したラットはハロセンの過量投与により安楽死させた。

5. 測定

ET 0 分（ベースライン）、ET 50 分（脱血・輸液終了時）、ET 140 分（実験終了時）に動脈血 1.5 mL を採取し動脈血液ガス分析と血液算定 (200 μL) と凝固機能 (370 μL)、ラジカルスカベンジャー (300 μL) の測定を行った。ET 95

分には採血に伴う循環動態への影響を最小限とするため、凝固機能とラジカルスカベンジャーのみ測定（採血量 0.7 mL）した。それぞれのサンプリングでは血液採取と同時に生理食塩液を採血と同量輸液して、循環動態の変動を極力抑えた。

（１）血液ガス分析と血液算定

動脈血液ガス分析装置（ABL 330; Radiometer 社製）を用い、PaCO₂、PaO₂、pH、BE、自動血球計数装置（pocH-100iV; Sysmex 社製）を用い Ht 値と血小板数を測定した。

（２）凝固機能

実験 2 と同様、370 μ L の血液サンプルを凝固血小板機能測定装置（Sonoclot analyzer; Scienco 社製）を用いて分析した。温度補正は、ベースラインは 37°C、ET 50 分は 32°C で設定し、群分け以降は 37°C (Group 1) と 32°C (Group 2) に各々設定した。測定項目は①Activated coagulation time (ACT ; フィブリン形成までの時間)、②clot rate（フィブリン形成速度；低下が凝固機能悪化を示す）、③time to peak（血小板機能；延長が凝固機能悪化を示す）の 3 項目である。

（３）ビタミン E と %CoQ9

実験 1 と同様にビタミン E、ユビキノン (CoQH) およびユビキノール (CoQOH) を液体ガスクロマトグラフィーで測定した。前処理カラム (Supelguard LC-ABZ, 5 μ m, 33 mm $\times$ 4.6 mm; Supelco 社製)、分析カラム (Supelcosil LC-8, 5 μ m, 250 mm $\times$ 4.6 mm; Supelco 社製)、還元カラム (Type RC-10-1; Irica 社製) を使用し、UV 吸収検知器 (210 nm) (JUSCO UV970; 日本分光製)、電気化学検出器 (NANOSPACE SI-2; 資生堂製) を用いて検出しピーク値を測定した。%

CoQ9 はユビキノン (CoQH) のユビキノール (CoQOH) に対する比率で計算した。

6. 統計

測定値は平均値±標準偏差で表示し、群間の比較は Student's t-test を用いて比較した。生存時間は Kaplan-Meier 法と Gehan-Wilcoxon 法を用いて群間を比較した。 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

第3節 結果

1. 直腸温 (図 3-2)

プロトコル通り ET 50 分まで 32°C で維持した。群分け以降、復温群 (Group 1) では ET 85 分に 37.1 ± 1.1°C まで復温した。一方、低体温群 (Group 2) は 32°C 付近を継続して維持した。

2. 循環動態

(1) 平均動脈圧 (MAP) (図 3-3)

MAP は 10 分毎の脱血で増減を繰り返しつつ低下し、ET 50 分 (脱血・輸液終了時) には 73 ± 11 mmHg (58 ~ 92 mmHg) となった。尻尾切断後の ET 65 分には復温群 (Group 1) で 30 ± 4 mmHg、低体温群 (Group 2) で 28 ± 2 mmHg まで低下したが両群間に有意差を認めなかった。その後、低体温群 (Group 2) では徐々に上昇し ET 120 分では 35 ± 4 mmHg となったが、復温群 (Group 1) では 30 ± 4 mmHg と低体温群 (Group 2) と比較し有意に低かった ($p < 0.05$)。ET 110 分までは両群に有意差を認めなかった。

(2) 心拍数 (図 3-4)

全ラットの心拍数は ET 50 分（脱血・輸液終了時）で 360 ± 22 回／分であったが、群分け後に ET 65 分では復温群（Group 1）で 262 ± 22 回／分、低体温群（Group 2）で 217 ± 39 回／分とそれぞれ明らかに低下した（ $p < 0.05$ ）。その後、ET 140 分（実験終了時）では復温群（Group 1）で 478 ± 42 回／分まで上昇したが、低体温群（Group 2）で 297 ± 29 回／分とわずかに上昇するのみであった（ $p < 0.05$ ）。ET 65 ～ 140 分では復温群（Group 1）の心拍数は低体温群（Group 2）より有意に高かった（ $p < 0.05$ ）。

3. 動脈血液ガスと血液算定（表 3－1）

すべてのラットで動脈血 pH はベースラインの 7.38 ± 0.03 から ET 50 分（脱血・輸液終了時）に血液希釈性アシドーシスを形成して 7.22 ± 0.22 まで低下した（ $p < 0.01$ ）。Ht 値は ET 50 分に $15 \pm 1\%$ まで低下した。血小板数は ET 50 分にベースラインの約半分の $31 \pm 5 \times 10^4 / \mu\text{L}$ まで低下した。ベースラインと ET 50 分ではすべての項目で 2 群間に有意差を認めなかった。群分け以降の ET 140 分（実験終了時）で、復温群（Group 1）で pH は 7.18 ± 0.17 までさらに低下したが、低体温群（Group 2）では 7.27 ± 0.03 へと ET 50 分よりも緩やかに上昇した（ $p < 0.05$ ）。BE は ET 140 分で復温群（Group 1）が低体温群（Group 2）よりも有意に低かった（ $p < 0.01$ ）。血小板数は ET 140 分で上昇傾向にあったが、両群間に有意差を認めなかった。

4. 凝固機能（図 3－5）

全ての凝固機能の指標がベースラインから ET 50 分（脱血・輸液終了時）にかけて増悪したが（ $p < 0.01$ ）、2 群間に差を認めなかった。ET 95 分では、復温群（Group 1）で time to peak のみ 12 ± 1 分と改善傾向を示したものの

($p=0.6$)、ACT は 228 ± 64 秒 ($p=0.03$)、clot rate は 11 ± 5 clot signal/分 ($p=0.3$) と増悪傾向を示した。低体温群 (Group 2) では ACT は 355 ± 131 秒 ($p<0.01$)、clot rate は 7 ± 4 clot signal/分 ($p<0.01$) と増悪し、time to peak は 23 ± 9 分 ($p=0.2$) と増悪傾向を認めた。ACT と time to peak で 2 群間に有意差を認めた ($p<0.05$)。ET 140 分 (実験終了時) では両群ともに改善傾向を認めたものの、time to peak と clot rate は復温群 (Group 1) が低体温群 (Group 2) に比べて改善を認めた ($p<0.05$)。

5. 尻尾断端からの出血量

出血量は復温群 (Group 1) で 0.6 ± 0.4 mL/100 g、低体温群 (Group 2) で 0.4 ± 0.2 mL/100 g と有意差はなかった。

6. ビタミン E と %CoQ9 (図 3-6)

ラジカルスカベンジャーであるビタミン E は脱血・輸液終了以降の ET 50、ET 95、ET 140 分でベースラインと比較して両群が有意に低下した ($p<0.01$) が、両群間に有意差はなかった。酸化ストレス指標である %CoQ9 は ET 95 分で、両群ともおよそ 30%程度まで上昇したが (有意差なし)、ET 140 分 (実験終了時) では両群とも低下傾向に転じ、復温群 (Group 1) では $21 \pm 2\%$ の低下に留まったのに対し、低体温群 (Group 2) は $7 \pm 1\%$ と復温群 (Group 1) に比し著明な低値を呈した ($p<0.01$)。

7. 生存率 (図 3-7)

低体温群 (Group 2) のすべてのラットが ET 140 分の実験終了まで生存したが、復温群 (Group 1) では 3 例が死亡した。生存率は復温群 (Group 1) で 5/8 (63%)、低体温群 (Group 2) で 8/8 (100%) であった。生存率は両

群間に有意差を認めなかった ($p=0.06$)。

第4節 考察

出血性ショックにおける低体温の有用性については、動物実験⁽¹⁻⁹⁾と臨床研究^(3,5-37)とで矛盾した結果が示されている。これは動物実験^(3, 4, 8, 9)の常温状態からの治療的低体温を導入するプロトコルに対して、臨床では低体温、凝固障害、アシドーシスを含む死の三徴が進行して、特に低体温が既に完成していることに原因があるのではないかと考え、本研究では従来の出血性ショックモデルにない死の三徴状態に近い、低体温、アシドーシス、凝固機能障害を伴った重症出血性ショックモデルで治療的低体温の有効性について検討を行った。

これまでの動物実験⁽¹⁻⁹⁾では脱血あるいは臓器からの出血により出血性ショックを導入するのみであり、アシドーシスや凝固障害をも再現したモデルは存在していない。本研究では脱血と輸液による希釈、低体温の導入によりET 50分の脱血と輸液が終了した時点で低体温、アシドーシス、凝固障害を示した。これは重症出血性ショックモデルとしてより臨床に近いモデルといえる。しかしながら、本研究では輸液による希釈や体表冷却によりアシドーシスや凝固障害を再現している。アシドーシスや凝固障害は出血性ショックの後に起こる合併症であり、今後はより死の三徴に近いモデルを追及して治療的低体温の有効性を検討する必要がある。

低体温、アシドーシス、凝固機能障害を伴った持続性出血性ショックで、低体温の維持は積極的な復温よりも転帰を悪化させないことを示した。生存率の

有意差を示すことはできなかったが、低体温群（Group 2）が全例生存したのに対し、復温群（Group 1）は 8 例中 3 例死亡しており、n の不足が要因となったとも考えられる。

本研究で低体温群の心拍数は抑制され、血圧は上昇した。これらの出血性ショック中の循環動態に対する治療的低体温の効果は過去の研究でも示されている^(2-4, 7)。MeyerとHortonはイヌでの出血性ショックモデルで、治療的低体温は、左心室拡張終末期圧を変化させずに脈拍を低下させるにも関わらず、左心機能を向上させ心拍出量を増加させることを示している^(39, 40)。本研究での治療的低体温による徐脈は心筋酸素需要量を減少させ、血圧上昇は組織灌流を増加させ代謝性アシドーシスを抑制したと考えられる。活性酸素の産生は出血性ショック後の蘇生期に増加する^(10, 12)が、治療的低体温はその活性酸素の産生を減少させ、再灌流障害を抑制することが知られている^(15, 27, 29)。実験 1 では出血性ショック蘇生で治療的低体温がラジカルスカベンジャーであるビタミンEを増加させ、活性酸素を抑制している可能性があることを示したが、本実験ではビタミンEの上昇は認めなかった。ビタミンEは脂肪組織を中心として多くの臓器に蓄積されているが⁽⁴¹⁾、本実験では蘇生を行った実験 1 とは異なり出血性ショックが持続した状態であったことから、持続する細胞障害により血中へのビタミンE放出が障害されたことが要因ではないかと考える。しかし、本実験においては復温群（Group 1）と比較して低体温群（Group 2）の%CoQ9が低下しており、治療的低体温が酸化ストレスを減少させる傾向を示した。輸液蘇生で再灌流させなくても治療的低体温は低体温自体が酸化ストレスを抑制する、あるいはビタミンE以外のラジカルスカベンジャーを活性化させることで

持続出血性ショックの酸化ストレスを減少させるのかもしれない。

低体温群では凝固パラメーターが悪化したが、尻尾切断端からの出血量が両群間で差がなかったことから、本モデルでは実際の出血傾向がみられなかったと思われる。Wuらはブタの肝臓および脾臓損傷による出血性ショックモデルにおいて、治療的低体温は肉眼的な臓器出血傾向に影響しないとしている⁽⁴²⁾。あるいは、低体温の血管収縮作用で尻尾切断端からの出血量を抑制した可能性も考えられる。

本研究において、低体温、アシドーシス、凝固機能障害を伴う未治療の出血性ショックで低体温を維持することは、復温させる場合と比較して凝固機能パラメーターを悪化させるものの、生存率を悪化させないことが明らかになった。これらの知見は出血性ショック蘇生で従来からの強調された積極的復温という標準的治療法を覆すものであり、その臨床的意義は大きいと思われる。

第5節 小括

本研究では、より重症な出血性ショックモデルで低体温の有用性について凝固機能障害への影響も加えて検討した。低体温、アシドーシス、凝固機能障害を伴う重症出血性ショックモデルを作成し、この動物モデルで復温に比べて治療的低体温は凝固機能パラメーターを悪化させるが、実際の出血量に影響なく、生存率、生存時間とも悪化させないことを明らかにした。低体温による心拍数抑制に伴う心保護や酸化ストレス抑制も示唆された。これらの知見は、重症出血性ショックに対する診療の「復温・体温保持」という従来 of 定説とは異なる新しい結果であり、その臨床的意義は大きいものと思われた。

第5章 総括

本研究では出血性ショックの蘇生に関係する治療的低体温と輸液量、輸液量と凝固障害および低体温、アシドーシス、凝固機能障害を伴った重症出血性ショックに注目して、1) 治療的低体温が蘇生時の必要輸液量に及ぼす影響、2) 希釈性凝固障害は存在するのか、3) 低体温、アシドーシス、凝固機能障害を伴った重症出血性ショックに対する治療的低体温の有効性についての3つの実験的研究を行った。第2章では重症出血性ショックに対する治療的低体温は蘇生に必要な輸液量を減少させることができることを示した。また、治療的低体温により蘇生後にラジカルスカベンジャーである血中ビタミンEを上昇させ、活性酸素の産生を抑制する可能性についても示した。第3章では出血性ショックの蘇生で行う大量輸液は希釈性凝固障害という外傷では重篤な合併症を進行させることを示した。これらの結果から重症出血性ショックで治療的低体温を導入することにより蘇生輸液量を減少させ、大量輸液による合併症である希釈性凝固障害を防ぐことができると考えられた。第4章では低体温自体も凝固障害の要因となるが、治療的低体温は出血量を増加させないことを示し、治療的低体温による酸化ストレスの抑制効果がある可能性を示した。また、低体温、アシドーシス、凝固機能障害を伴うような重症の出血性ショックにおいても治療的低体温は生存率を悪化させないことを示した。低体温には凝固機能障害の他にも電解質異常⁽⁴³⁾や耐糖能異常⁽⁴⁴⁾といった合併症もあるため、外傷に対する治療的低体温の導入には更なる研究が必要である。しかしながら、本研究によって、外傷に伴う重症出血性ショックの蘇生では、低体温が治療前に存在しているか否かにかかわらず、早期から治療的低体温を導入することにより蘇生に

必要な輸液量を最小限に制限することができ、活性酸素産生を減少させて細胞障害を抑制できることが示唆された。また、低体温による凝固障害にも関わらず出血量を抑制するという治療的低体温の新たな有益性を見出すことができた。さらに、従来の積極的復温に比べても治療的低体温が出血量や生存率に悪影響を及ぼさないことを明らかにした。これは今後の治療的低体温の臨床応用につながる大きな一歩であり、その臨床的意義は大きいと思われる。

第6章 結論

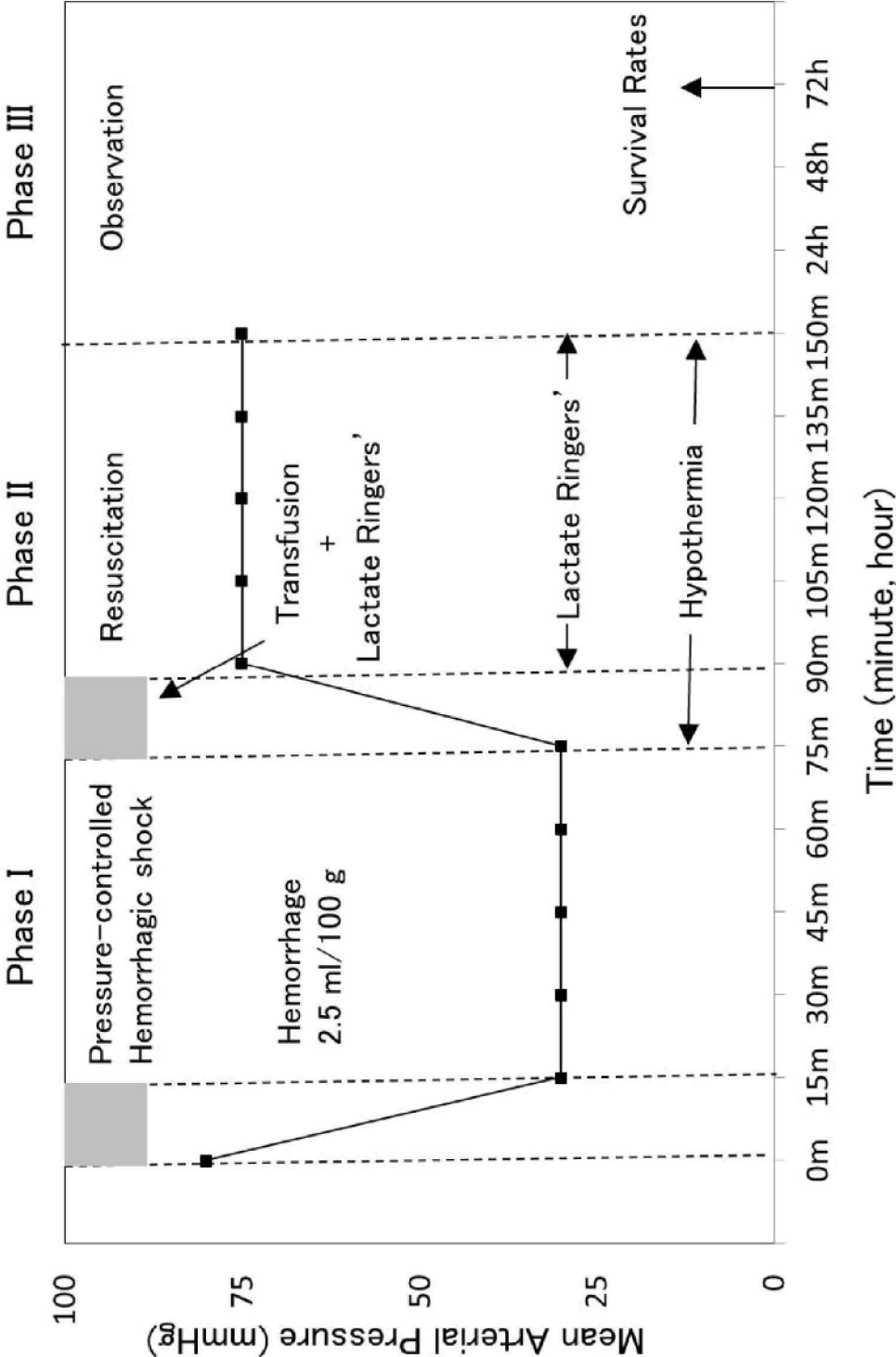
1. 出血性ショックにおける治療的低体温が蘇生に必要な輸液量を減少させ、血中ビタミンEを上昇させることを明らかにした。
2. 大量輸液は循環動態を改善させ生存率も増加させるが、血液希釈性凝固障害を進行させて出血量を増加させる要因になることを明らかにした。出血性ショックでの大量輸液療法の相反する問題点、すなわち、利点（循環動態改善）と欠点（希釈性凝固障害）を明確にした。
3. 低体温、アシドーシス、凝固機能障害を伴う重症出血性ショックでは、治療的低体温により凝固機能は悪化させるが、出血量は増加させず、生存率も改善しうるということが明らかとなった。
4. 外傷に伴う重症出血性ショックの蘇生では低体温の有無にかかわらず、早期から治療的低体温を導入すれば蘇生に必要な輸液量を減少させて出血量を抑制でき、復温と比較しても悪影響を及ぼさないという治療的低体温の新たな有益性を見出すことができた。

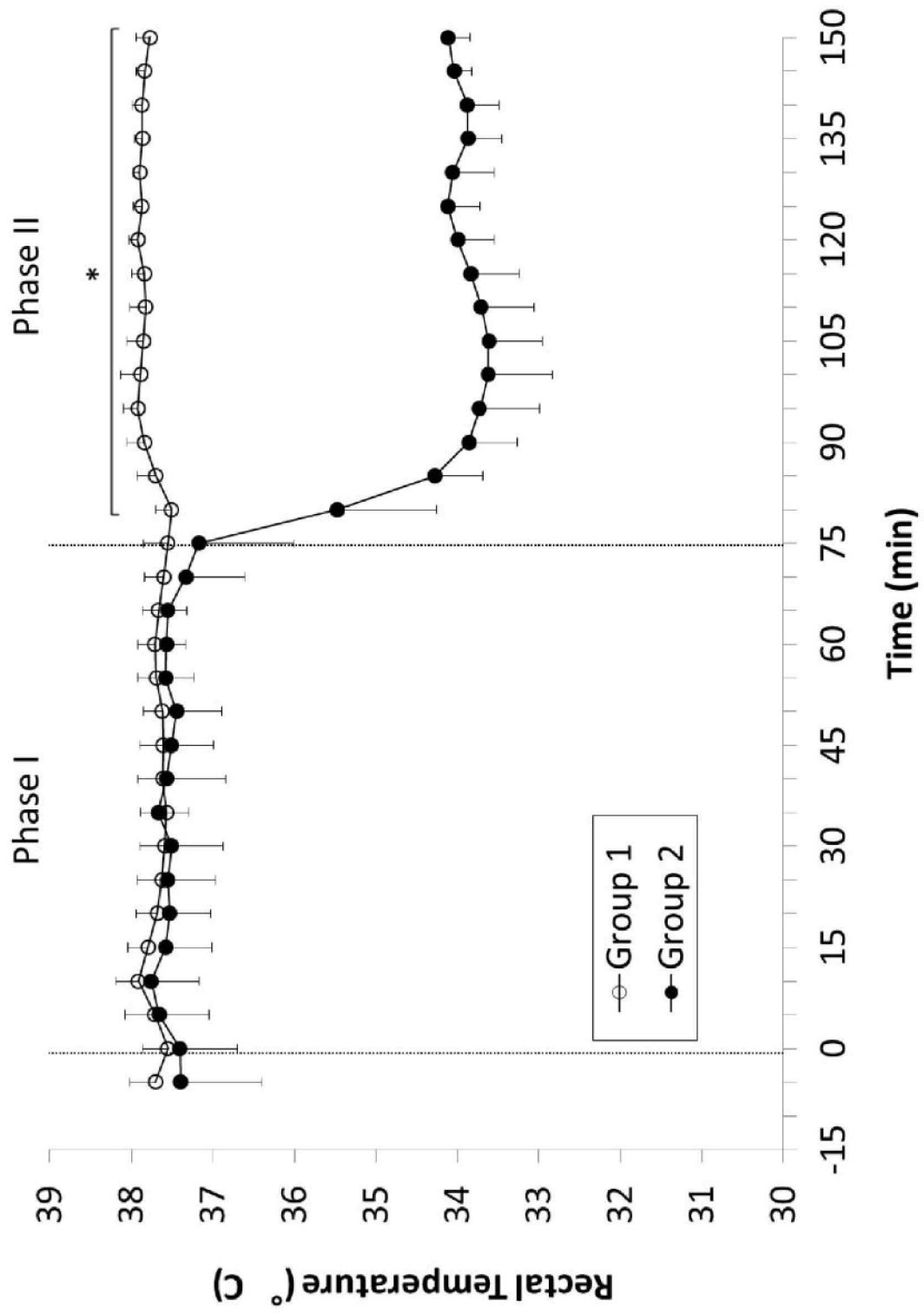
謝 辞

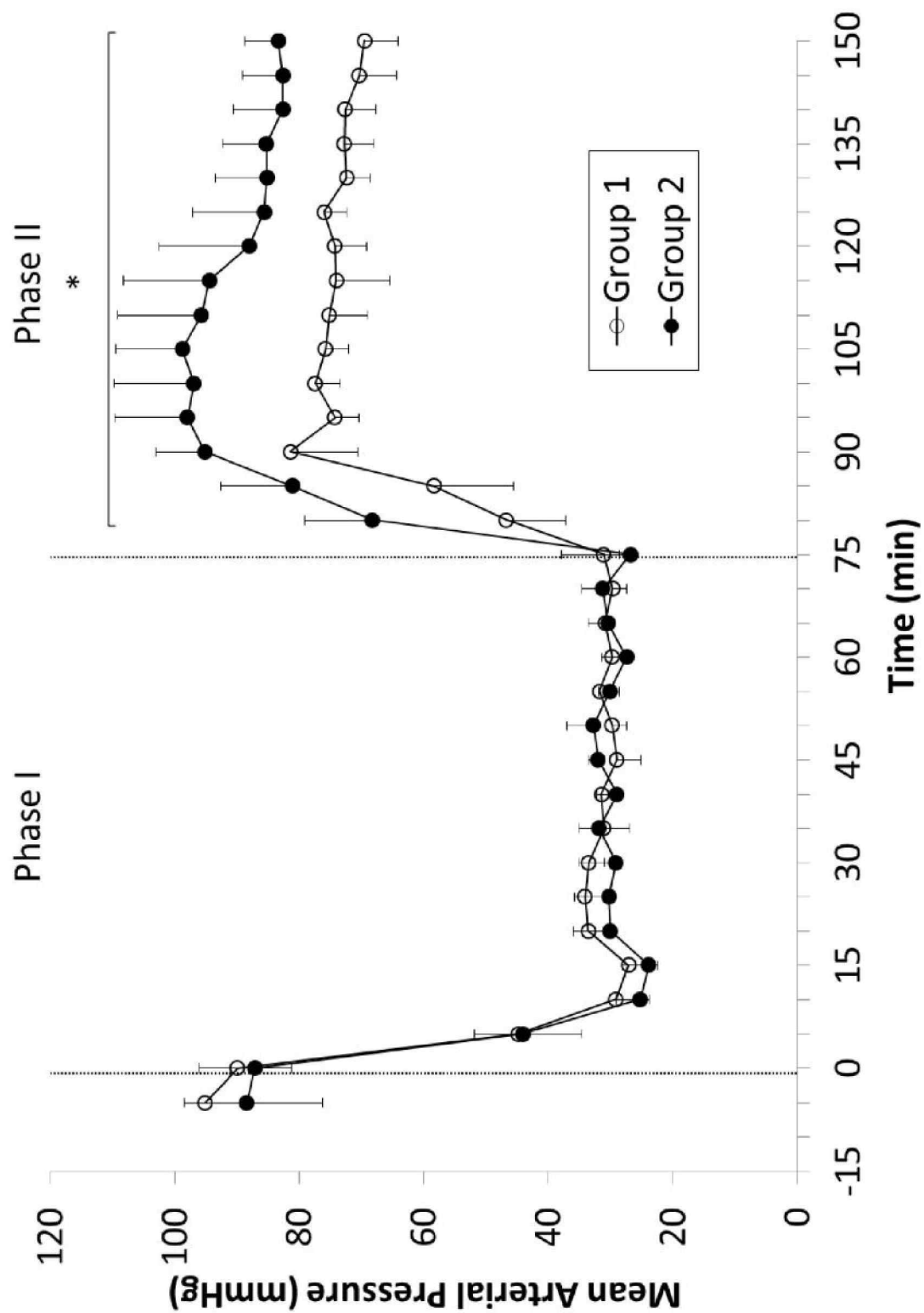
本稿を終えるに当たり、御指導、御高閲を賜りました、防衛医科大学校第二外科学教授 前原正明博士、同救急部教授 阪本敏久博士、同免疫微生物学准教授 木下学博士に衷心より感謝申し上げます。

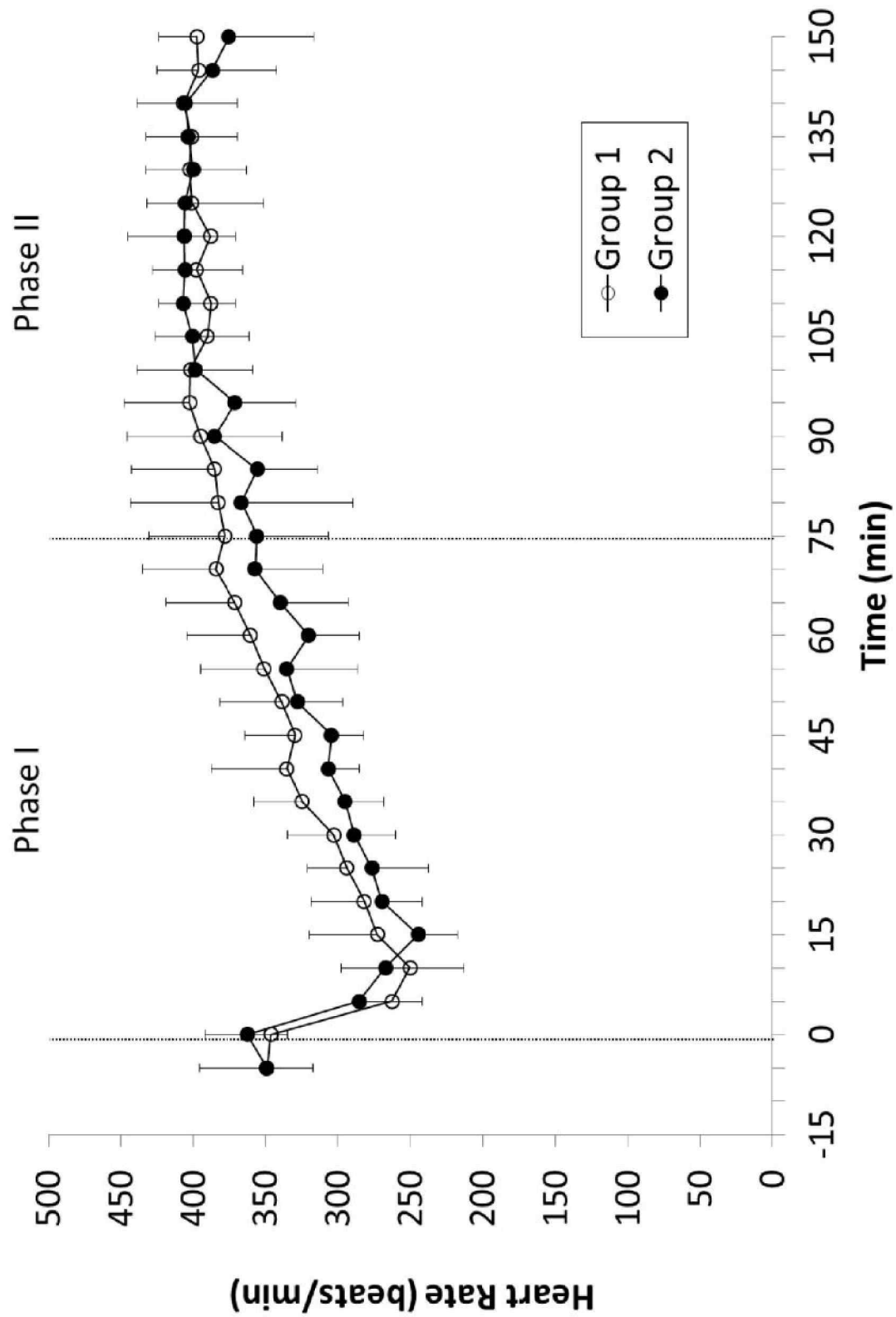
大阪医科大学生体管理再建医学講座救急医学教室教授 高須朗博士にはあらゆるところで本研究に関する御助言、御指導を頂き、感謝の念が耐えません。厚く御礼申し上げます。

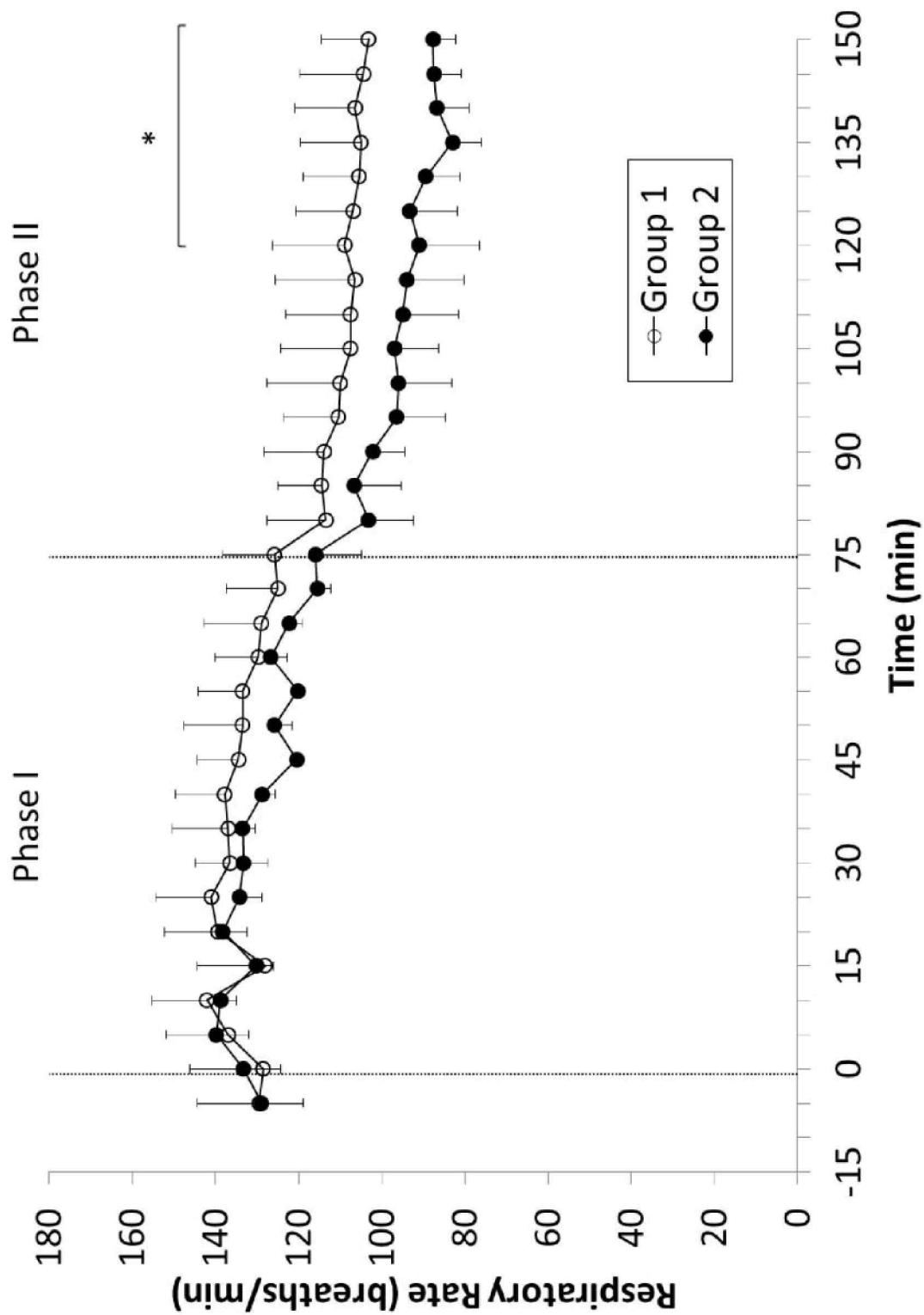
東京工科大学応用微生物学部教授 山本順寛博士、同抗加齢医科学研究室のスタッフ、学生の方々には多くの御助言、抗酸化物質の測定について甚大なご協力を賜り、深く感謝の意を表します。

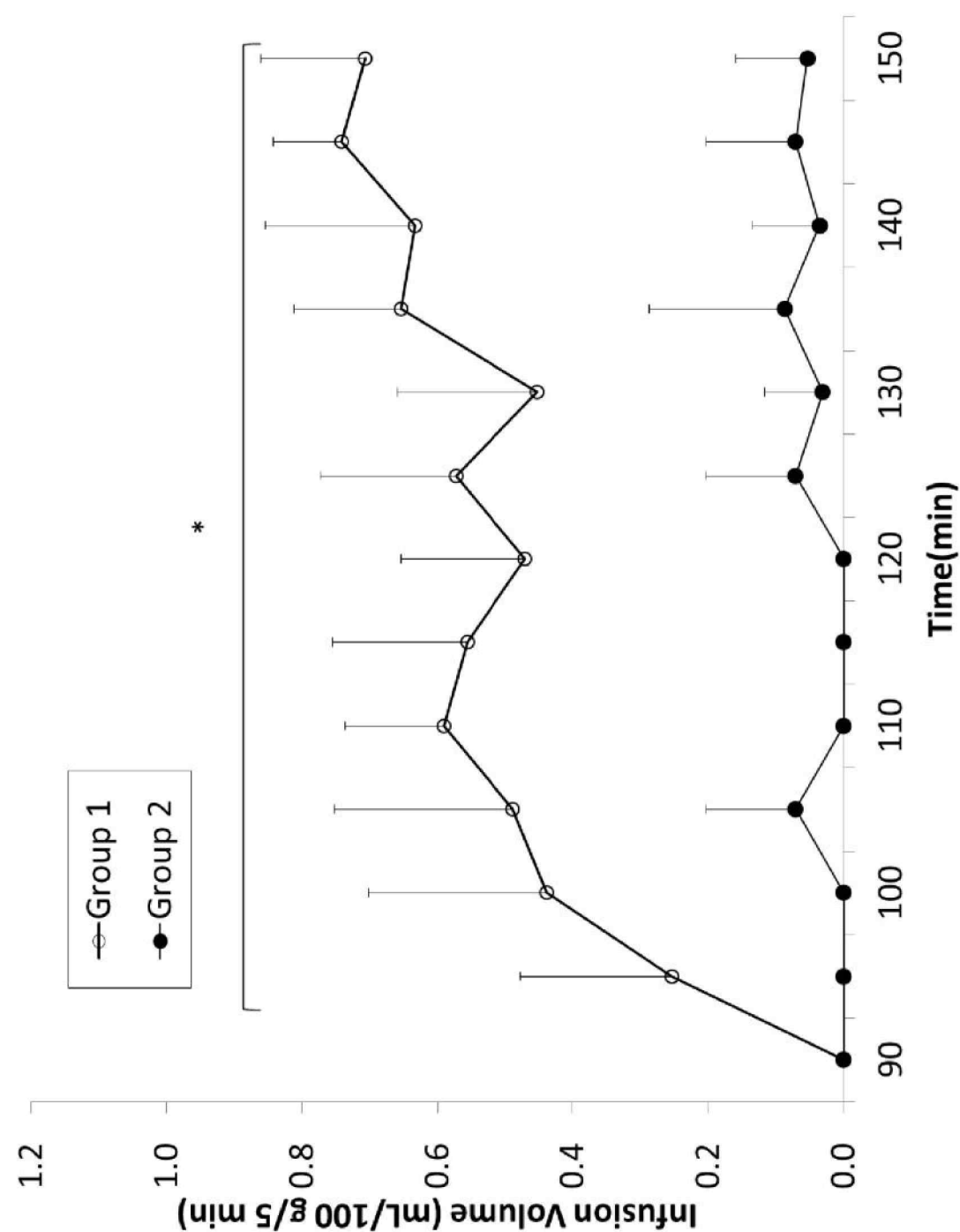












☒ 1 – 7

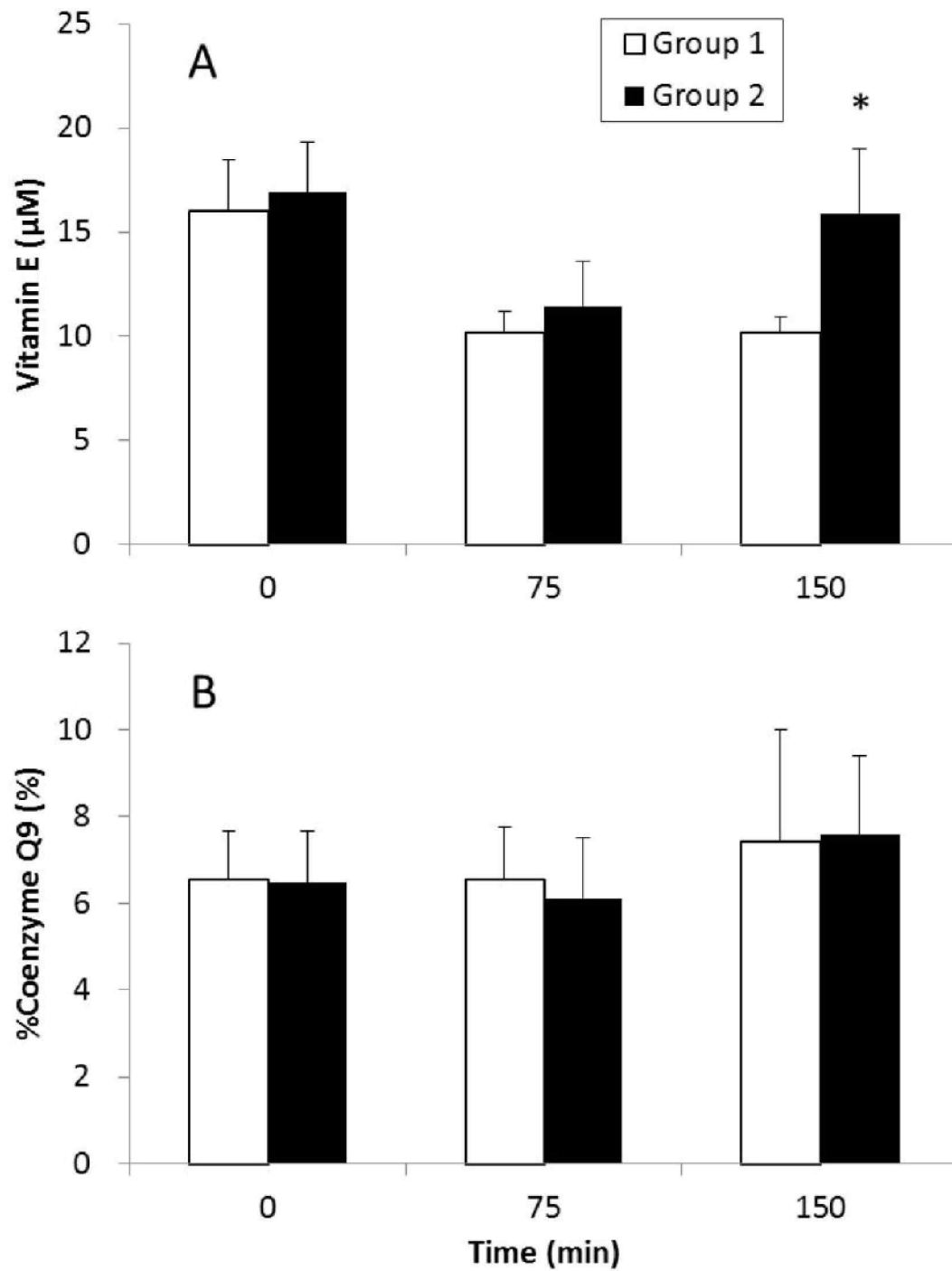
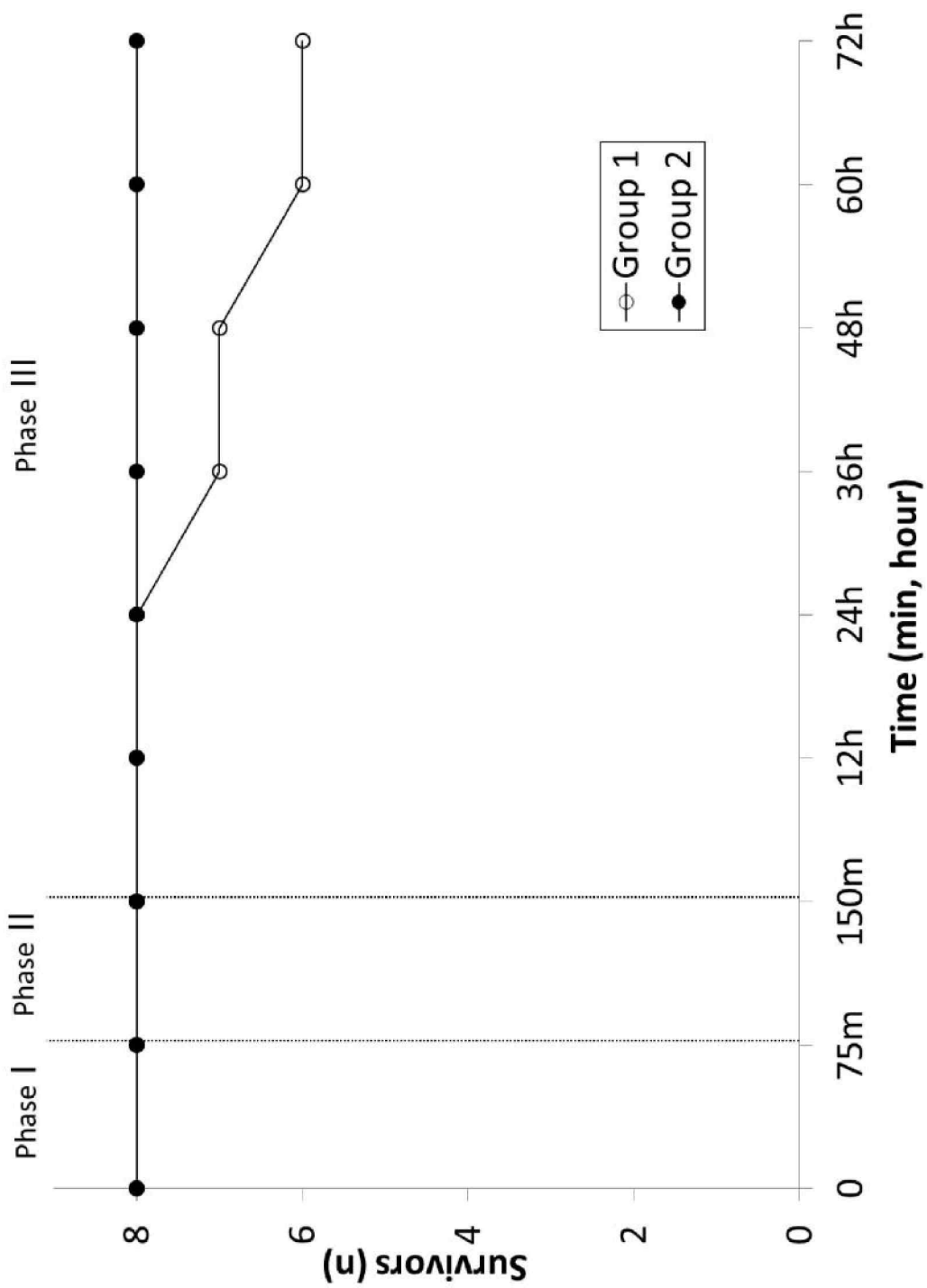


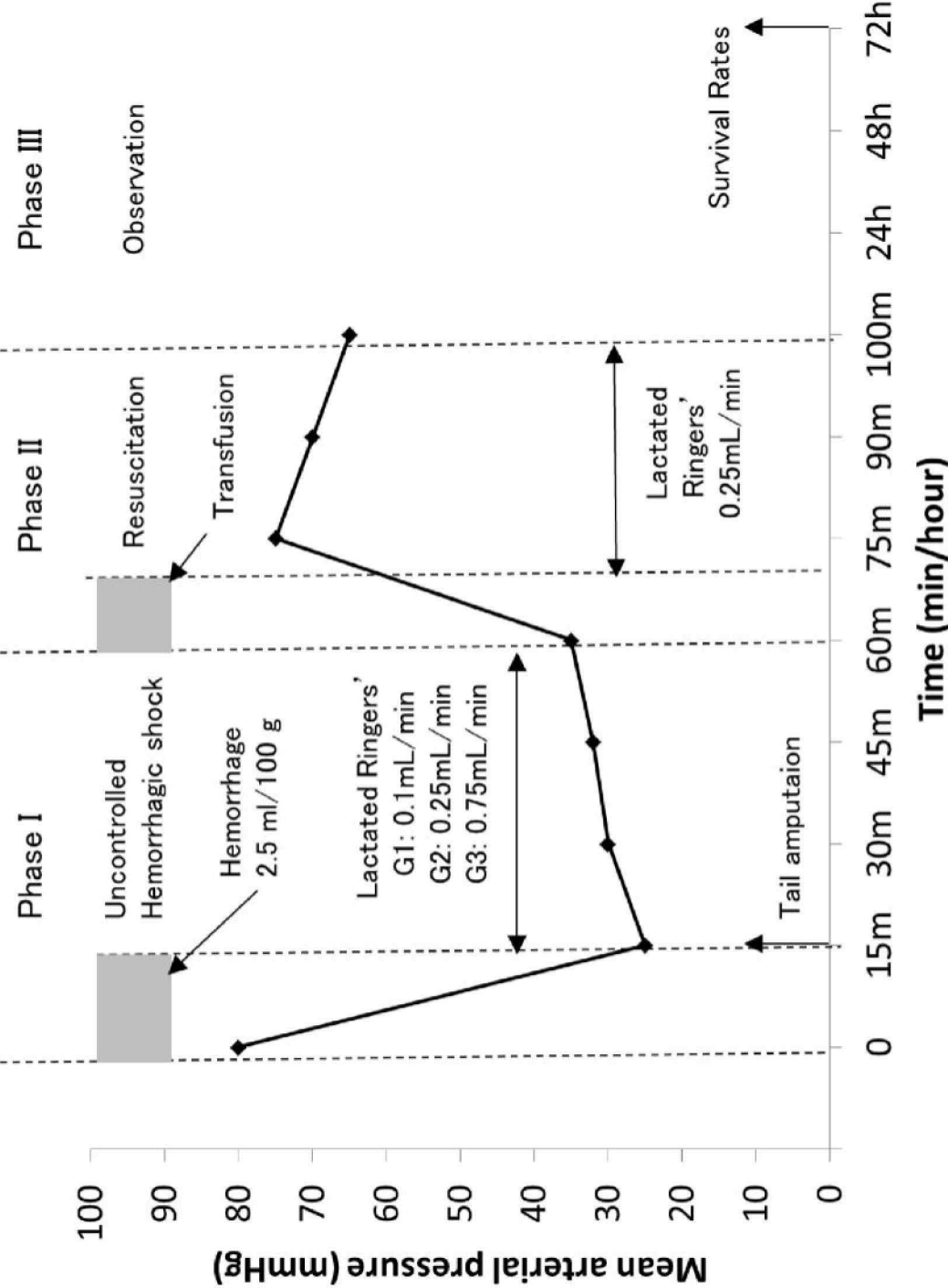
表 1 – 1

	Baseline		75 min (End of Phase I)		150 min (End of Phase II)	
	Group 1	Group 2	Group 1	Group 2	Group 1	Group 2
PaO2 (mmHg)	299 ± 34	253 ± 54	314 ± 44	290 ± 25	299 ± 19	299 ± 41
PaCO2 (mmHg)	43 ± 3.7	46 ± 2.6	26 ± 3.0	31 ± 5.7	43 ± 4.0	52 ± 10.2
Arterial pH	7.41 ± 0.03	7.40 ± 0.02	7.34 ± 0.04	7.35 ± 0.11	7.36 ± 0.02	7.29 ± 0.09
Base excess (nmol/L)	2.1 ± 1.6	3.4 ± 1.5	-11.2 ± 2.2	-8.2 ± 4.8	-1.2 ± 1.8	-2.3 ± 3.4
Hematocrit (%)	35 ± 2.2	37 ± 2.6	21 ± 2.0	23 ± 2.3	17 ± 1.8	26 ± 2.2*

HS, hemorrhagic shock; Art., Arterial.

Group 1, normothermia (n=8); group 2, hypothermia (n=8) .





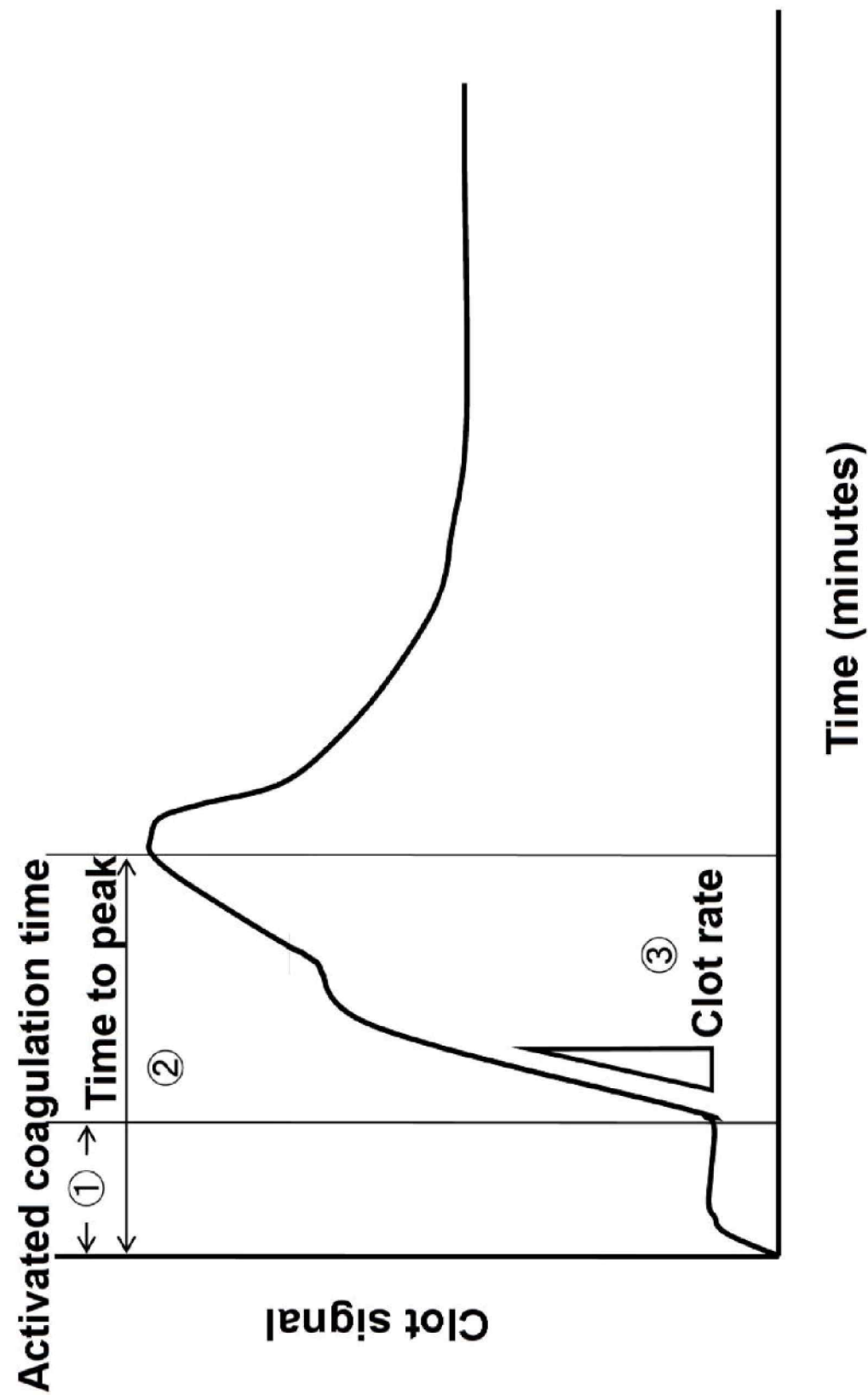


图 2-3

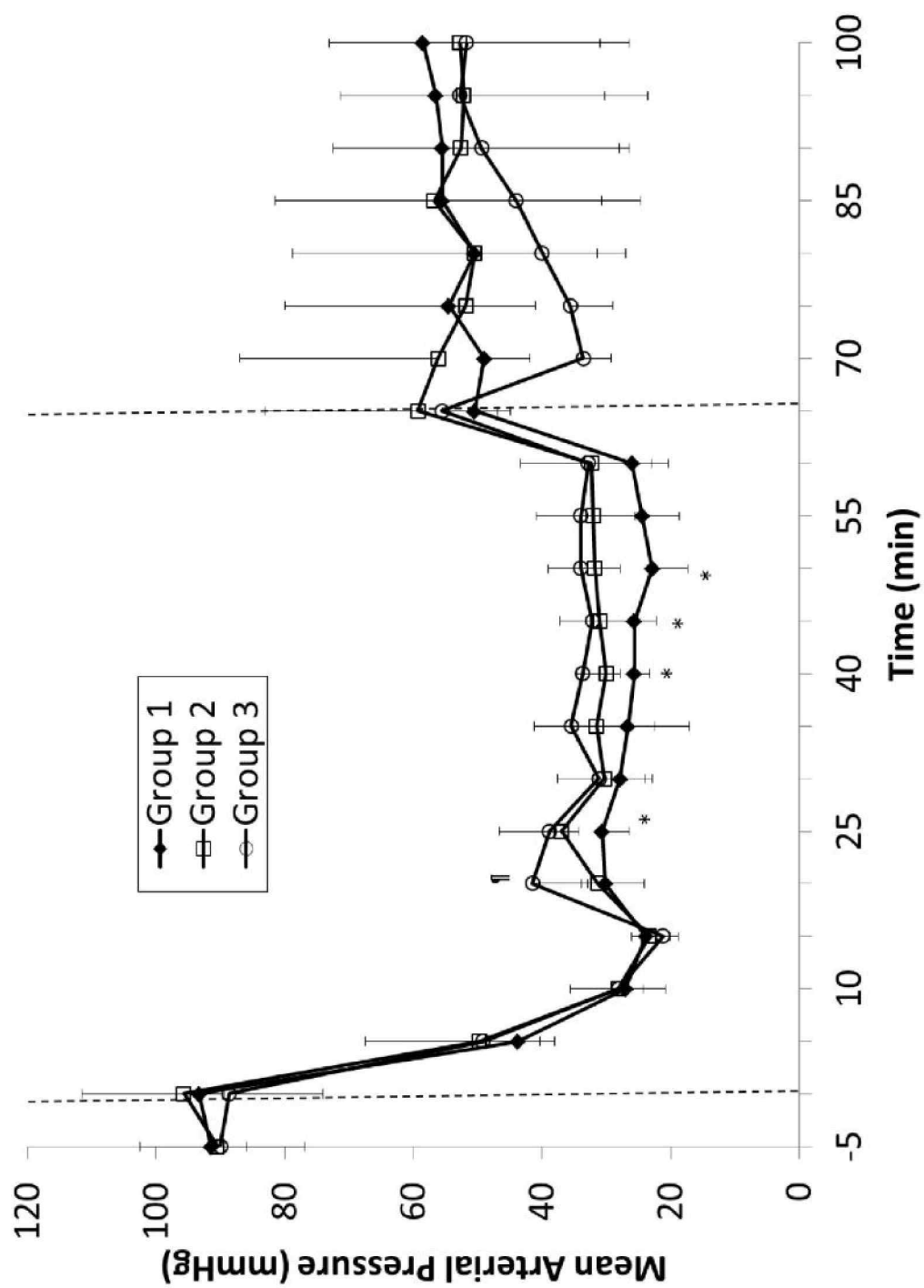


图 2-4

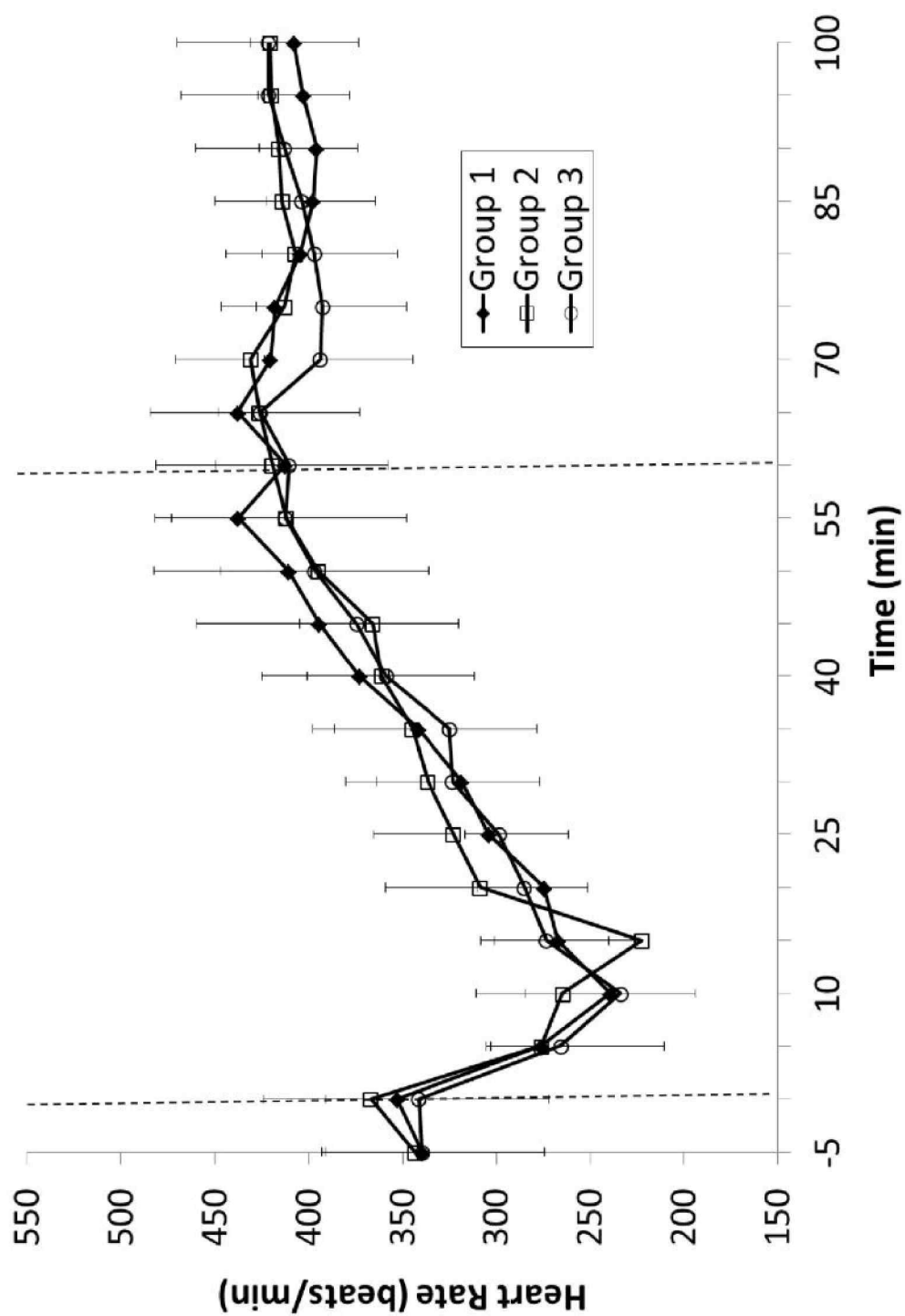


表 2 - 1

	Baseline			HST 60 min (end of phase I)			HST 100 min (during phase II)		
	Group1 (n=6)	Group2 (n=6)	Group3 (n=6)	Group1 (n=6)	Group2 (n=6)	Group3 (n=5)	Group1 (n=2)	Group2 (n=5)	Group3 (n=5)
pH	7.39 ± 0.01	7.41 ± 0.03	7.39 ± 0.01	6.93 ± 0.21	7.26 ± 0.15	7.23 ± 0.18	7.11 ± 0.28	7.27 ± 0.13	7.26 ± 0.19
PaO ₂ (mmHg) ^a	222 ± 21	254 ± 28	231 ± 19	214 ± 47	274 ± 20	266 ± 21	234 ± 6	270 ± 14	265 ± 7
PaCO ₂ (mmHg)	45 ± 6	44 ± 4	46 ± 4	42 ± 12	31 ± 7	37 ± 11	50 ± 9	40 ± 9	41 ± 5
Hematocrit (%) ^b	38 ± 7	41 ± 2	41 ± 2	29 ± 2	23 ± 3	12 ± 3	30 ± 0	27 ± 2	20 ± 2
Platelet (×10 ⁴ /μL) ^b	69 ± 22	65 ± 14	63 ± 10	53 ± 5	43 ± 6	25 ± 8	50 ± 5	45 ± 6	38 ± 8

^a P<0.05, group 1 vs. groups 2 and 3 at HST 60 min.

^b P<0.05, comparison of three groups with each other at HST 60

表 2 – 2

	Baseline			HST 60 min (end of phase I)			HST 100 min (during phase II)		
	Group1 (n=6)	Group2 (n=6)	Group3 (n=6)	Group1 (n=6)	Group2 (n=6)	Group3 (n=6)	Group1 (n=2)	Group2 (n=5)	Group3 (n=5)
ACT (sec)	84 ± 26	84 ± 2	74 ± 24	95 ± 11	183 ± 96	174 ± 100	262 ± 129	214 ± 119	248 ± 104
Clot rate (clotting/min) ^a	40 ± 12	42 ± 7	39 ± 17	40 ± 10	16 ± 9	14 ± 10	27 ± 0	14 ± 11	13 ± 8
Time to peak (min)	8 ± 2	7 ± 2	9 ± 2	7 ± 2	15 ± 15	22 ± 16	18 ± 17	18 ± 16	19 ± 17

ACT, activated coagulation time.

^a P<0.05, group 1 vs. groups 2 and 3 at HST 60 min.

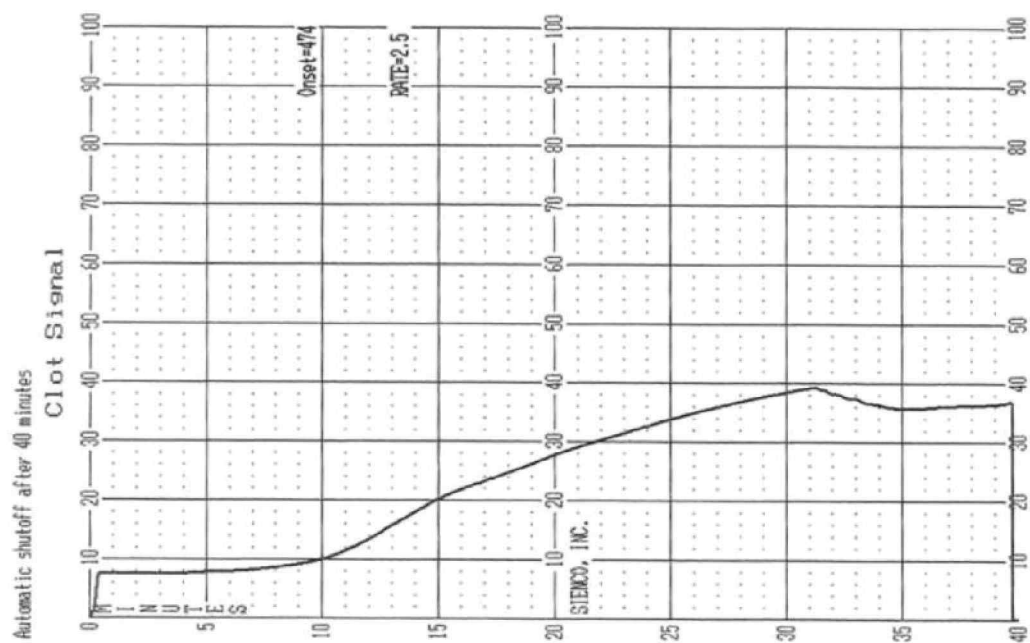


图 2-6

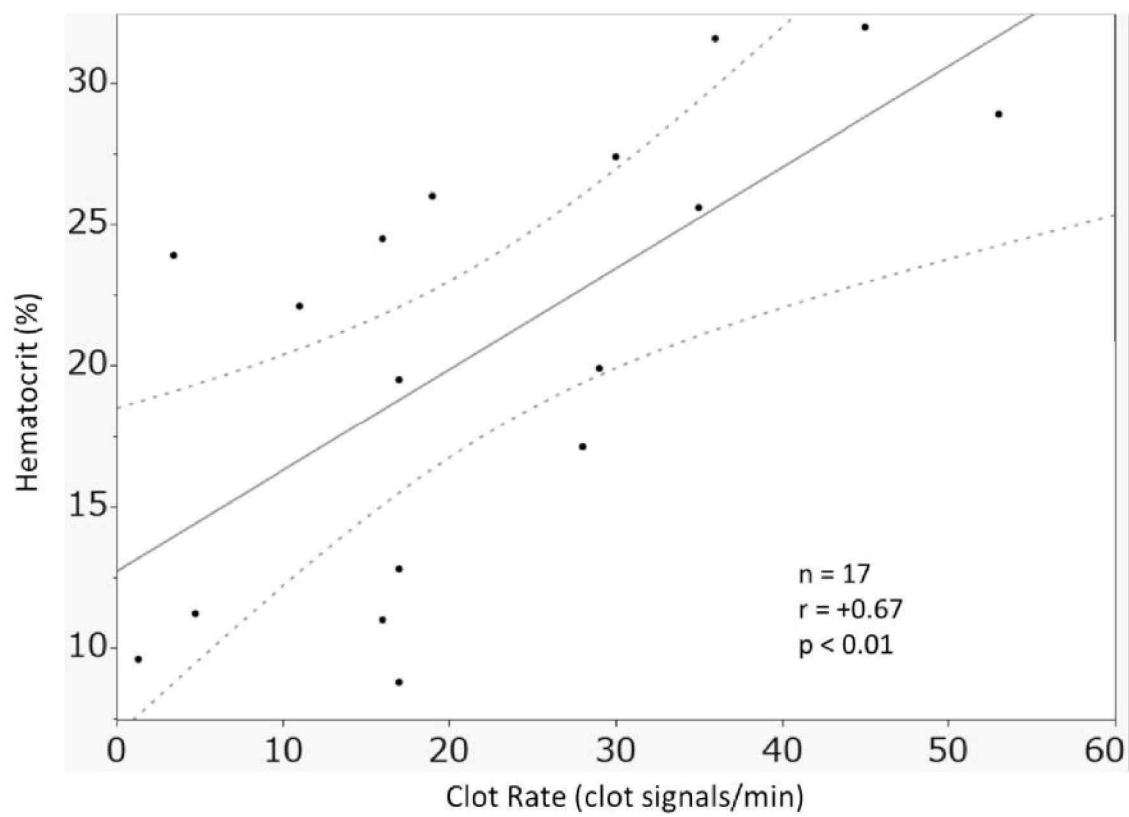
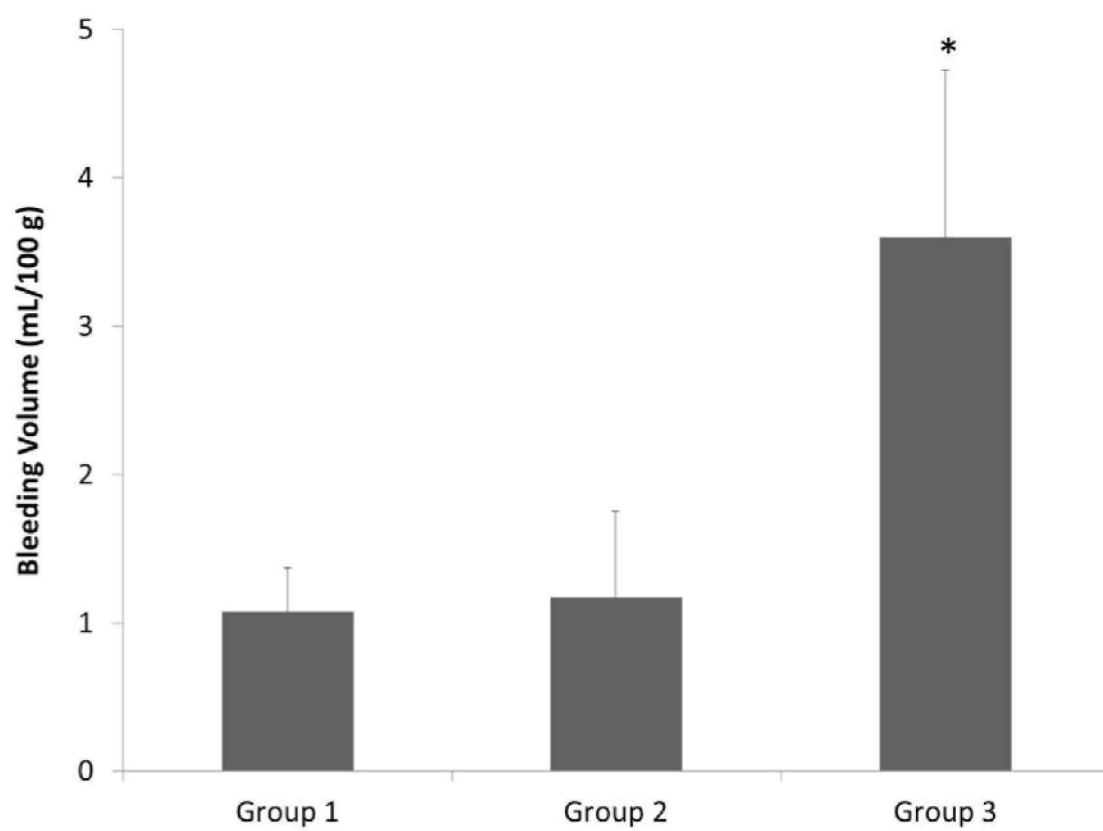
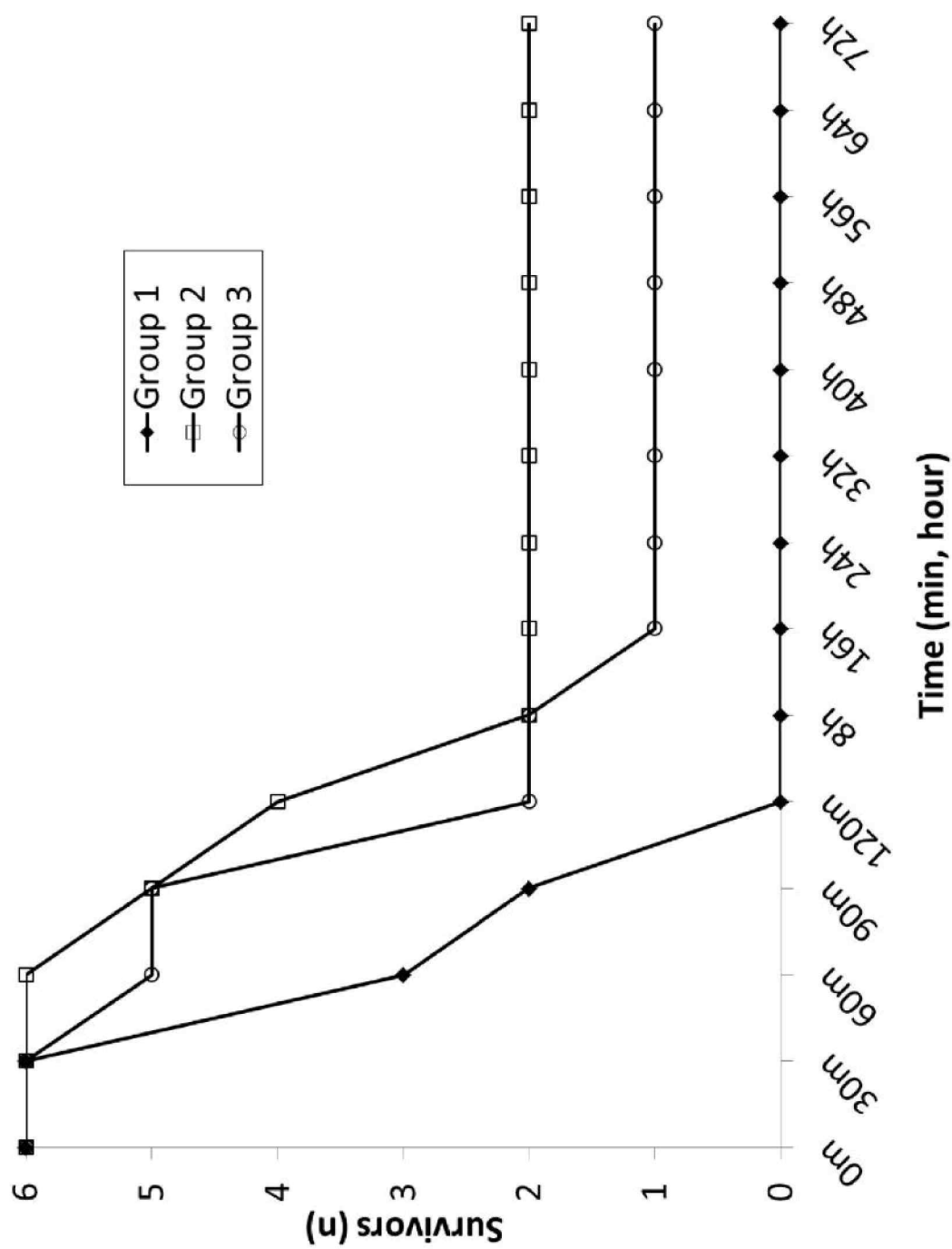


图 2-7





intermittent blood withdrawal
(20mL total)

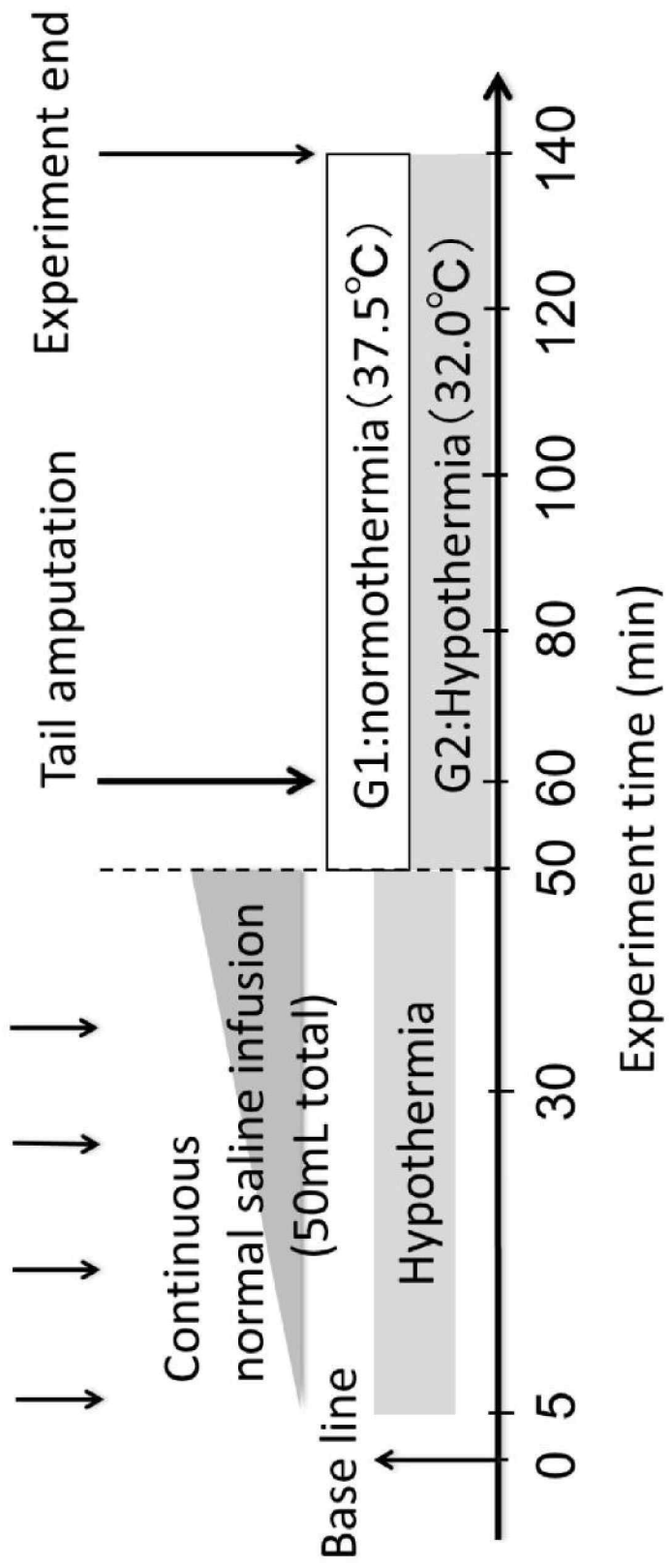
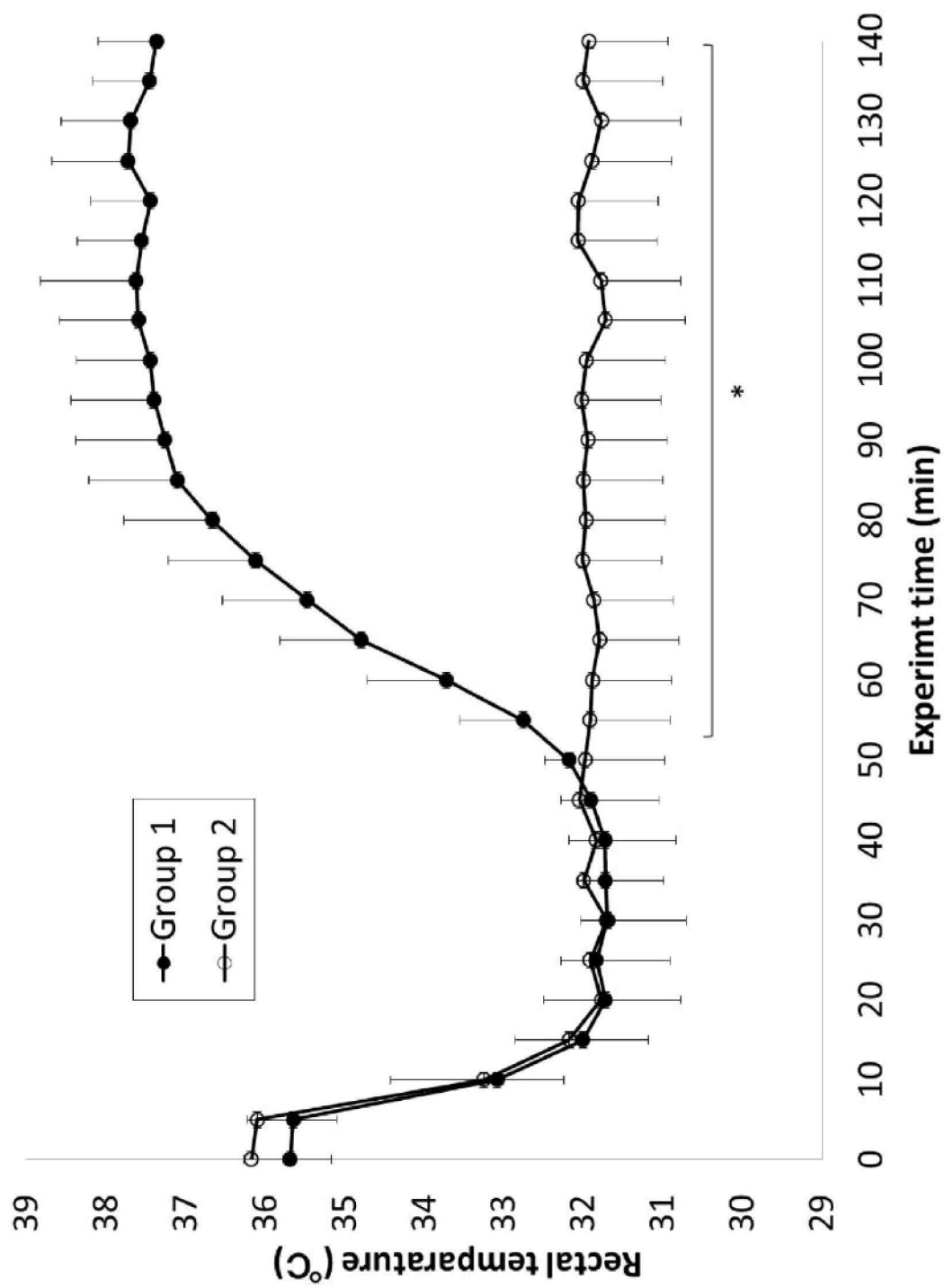


Figure 3-2



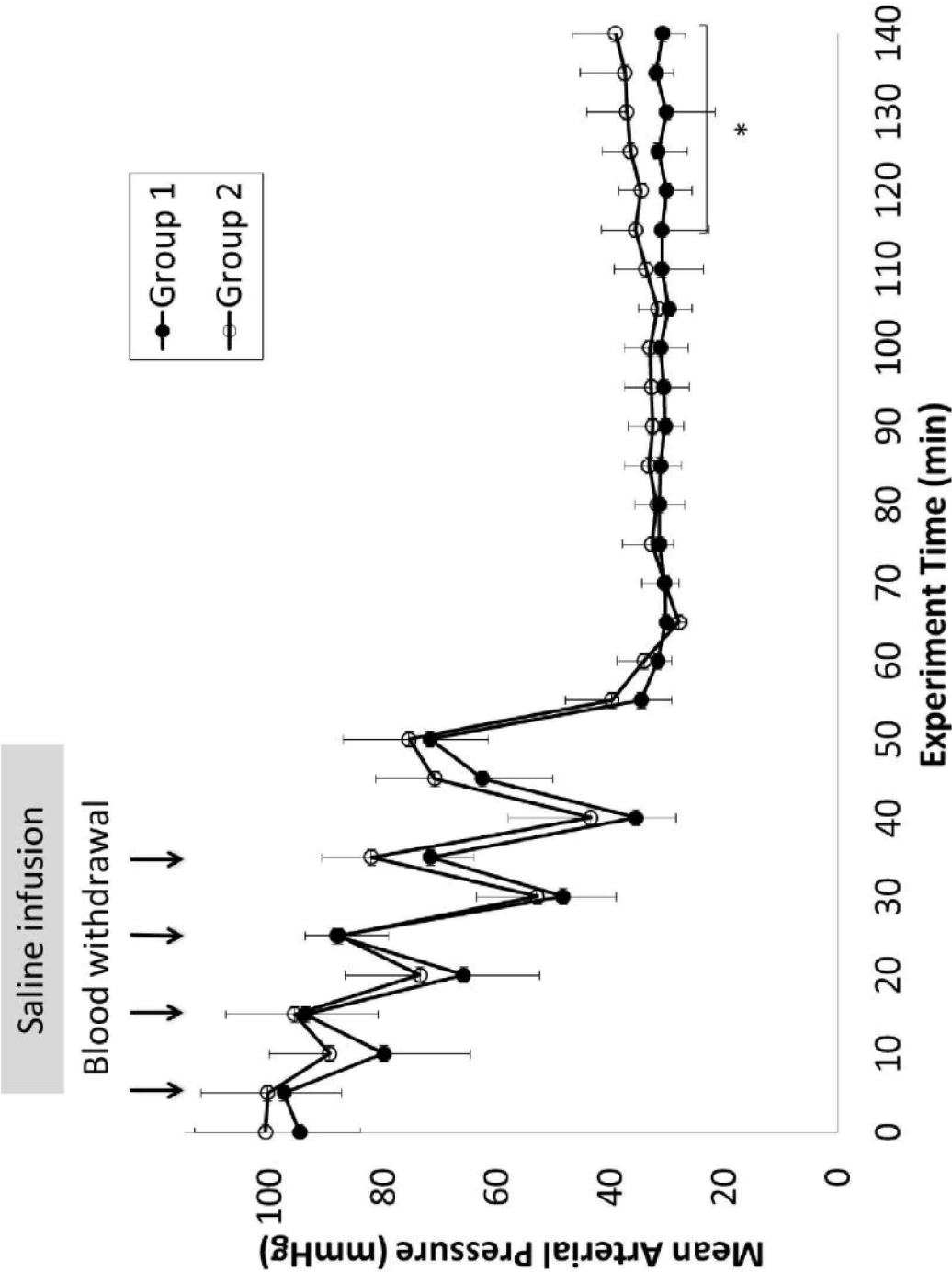


图 3-4

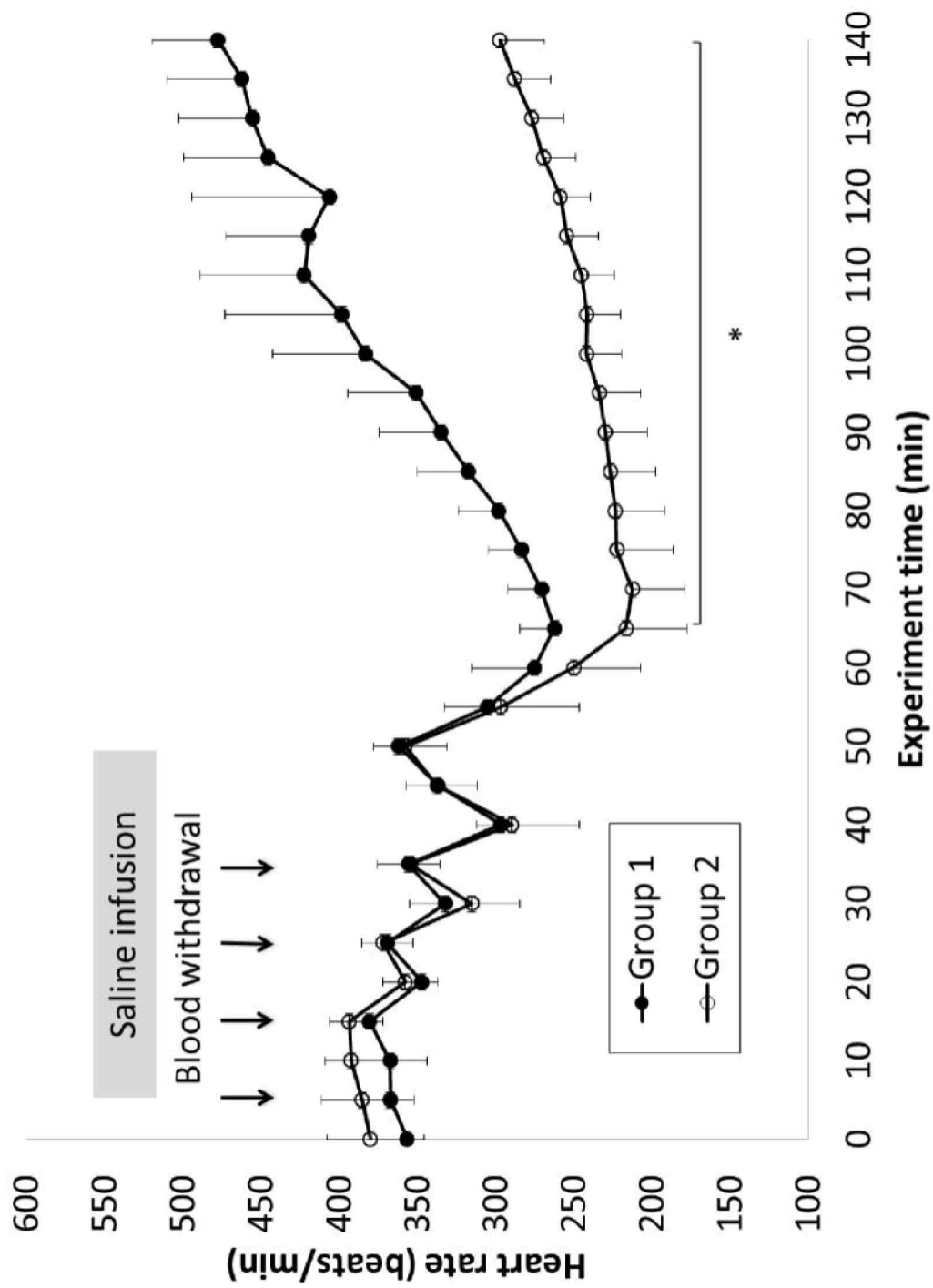
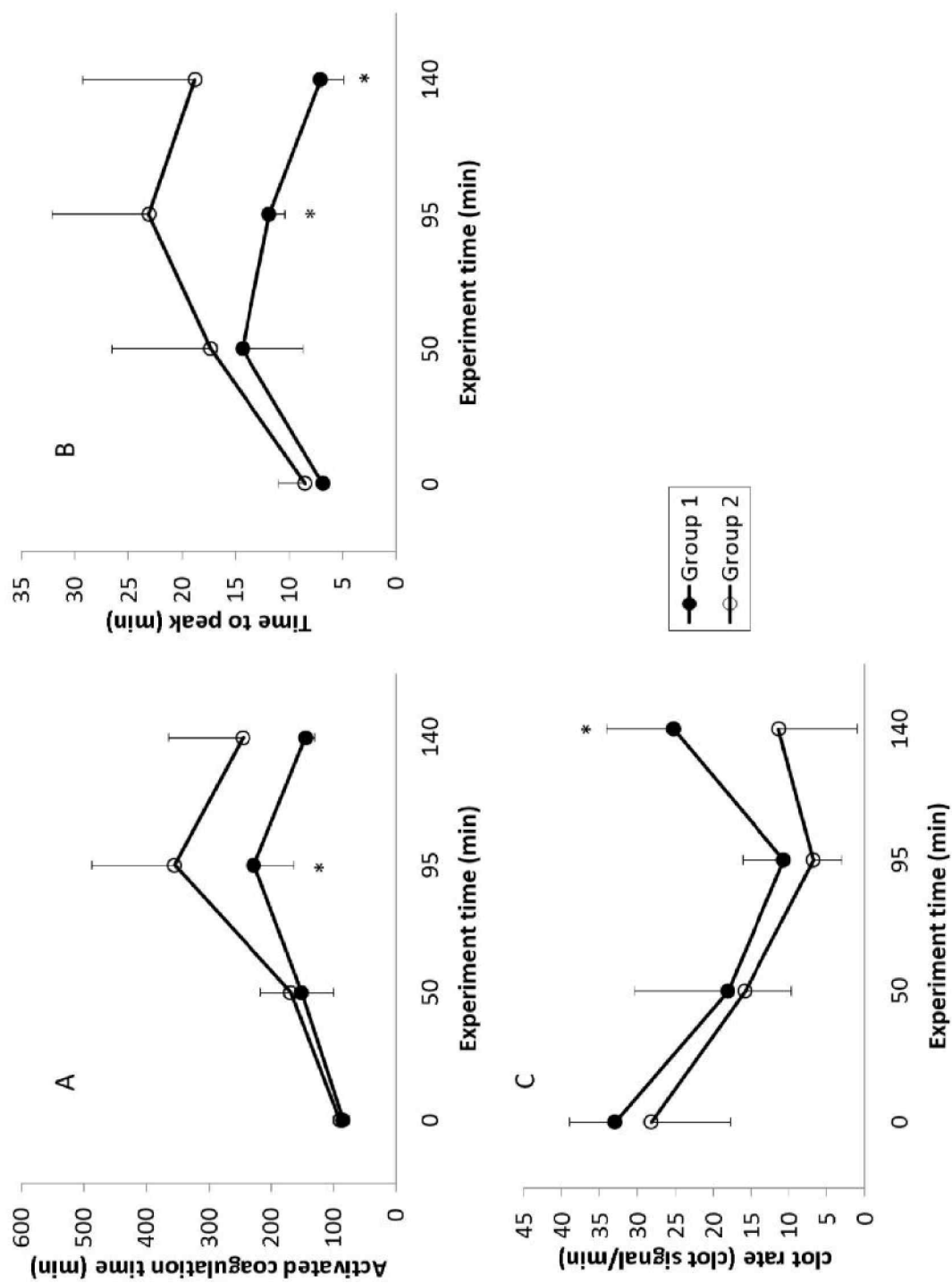


表 3 – 1

	Baseline		ET 50 min		ET 140 min	
	Group 1 (n=8)	Group 2 (n=8)	Group 1 (n=8)	Group 2 (n=8)	Group 1 (n=5)	Group 2 (n=8)
pH	7.38 ± 0.01	7.38 ± 0.01	7.22 ± 0.02	7.21 ± 0.02	7.18 ± 0.17	7.27 ± 0.03
PaO2 (mmHg)	49 ± 6	51 ± 3	50 ± 4	53 ± 3	27 ± 5	36 ± 5*
PaO2 (mmHg)	246 ± 36	223 ± 48	315 ± 25	278 ± 48	290 ± 17	287 ± 39
BE (mmol/L)	3 ± 1	4 ± 1	-7 ± 1	-6 ± 1	-16 ± 5	-10 ± 2*
Hematocrit (%)	41 ± 2	42 ± 2	14 ± 1	15 ± 2	18 ± 2	16 ± 1
Platelet (x10 ⁴ /μL)	74 ± 13	74 ± 2	31 ± 2	32 ± 5	42 ± 9	39 ± 4

BE: Base Excess

*P<0.05, vs. Group 1.



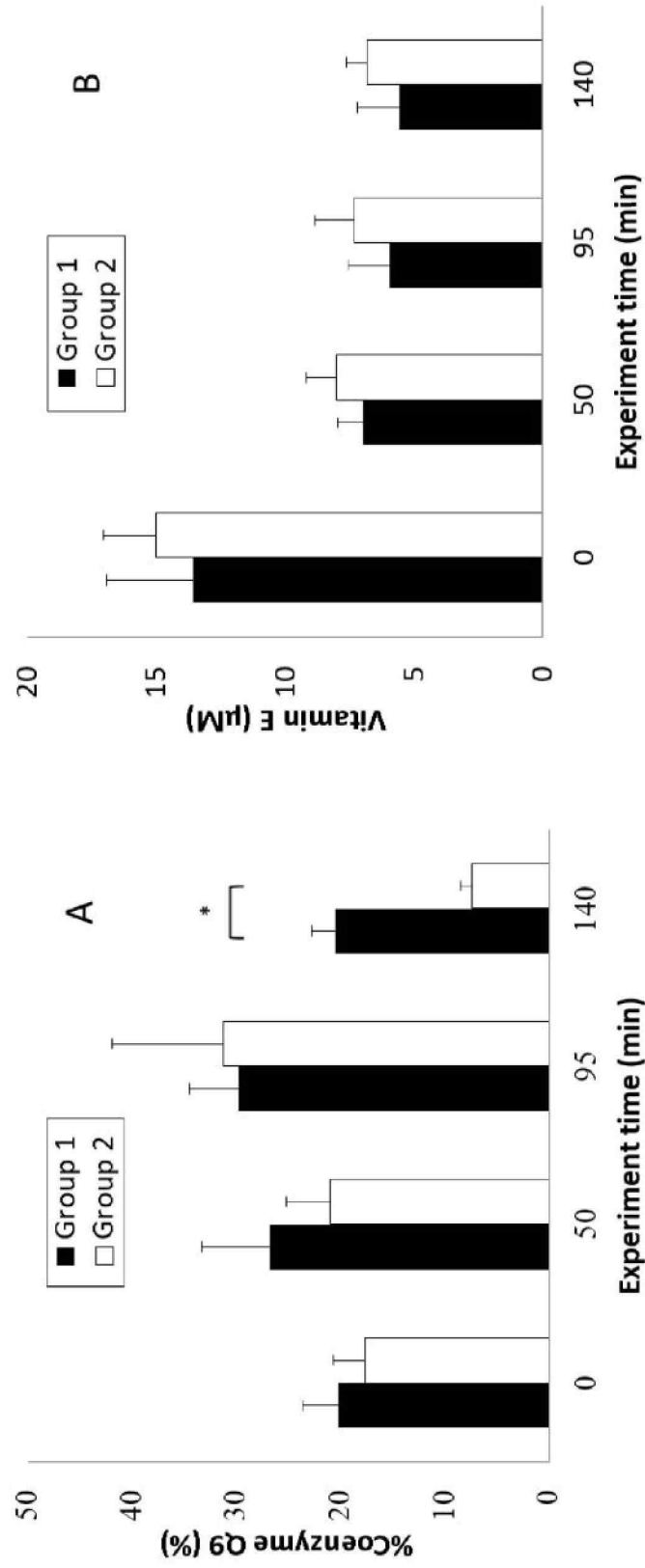
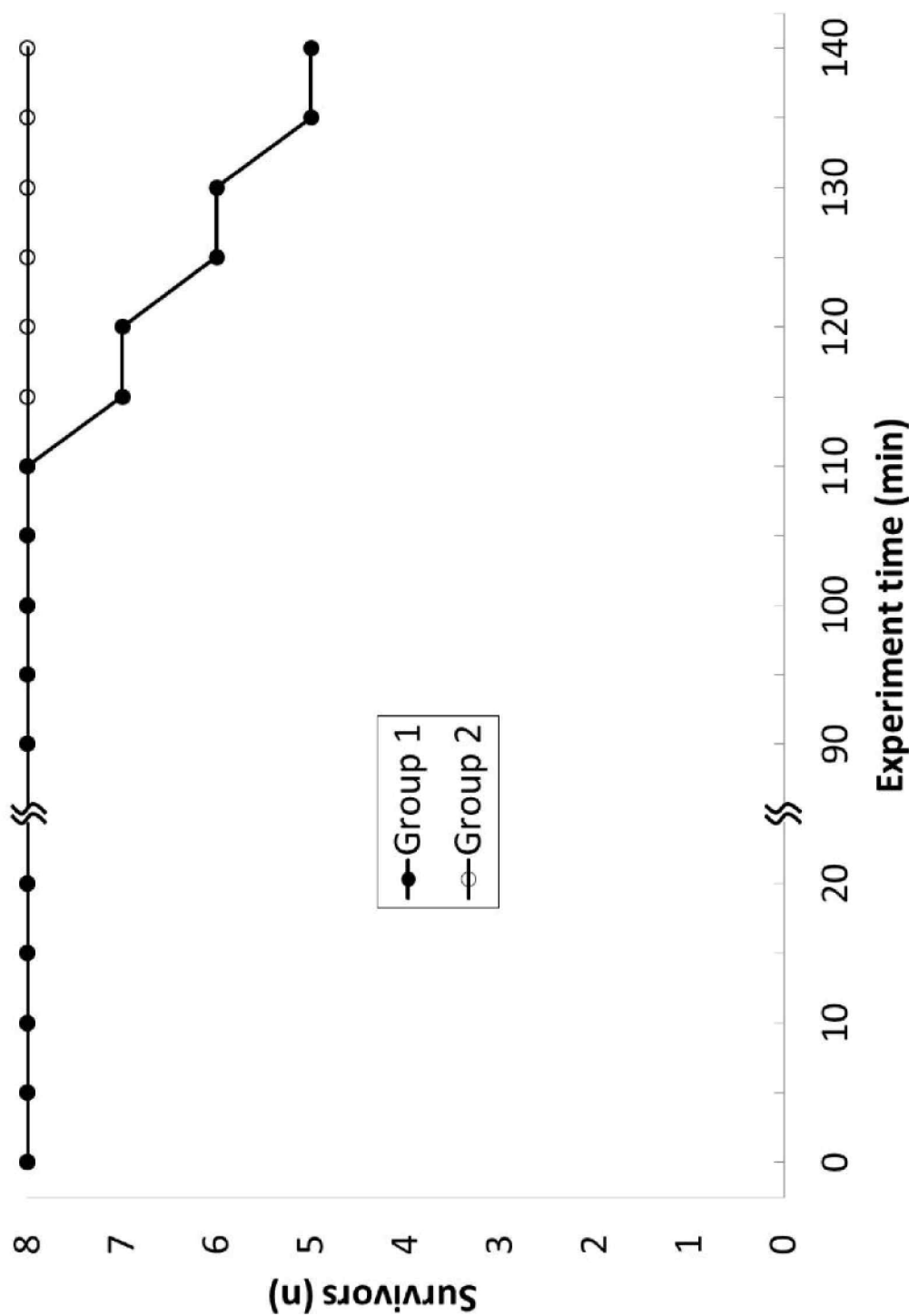


Figure 3-7



図説

図 1－1 デザイン（実験 1）

Pressure-controlled hemorrhagic shock model: Phase I (HST 0 ～ 75 分) ;

出血性ショック期、Phase II (HST 75 ～ 150 分) ; 蘇生期、Phase III (HST 150 分 ～ 72 時間) ; 観察期

目標とする平均動脈圧を示した。

低体温群では HST 75 分から 150 分までの間、直腸温を 34℃で維持した。

HST: Hemorrhagic shock time

図 1－2 直腸温の変化（実験 1）

○ : Group 1（常温群）

● : Group 2（低体温群）

Mean±SD

* $p < 0.01$ vs. Group 2

Phase II の間、プロトコル通り直腸温を維持した。常温群 : 38℃、低体温群 34℃

図 1－3 平均動脈圧の変化（実験 1）

○ : Group 1（常温群）

● : Group 2（低体温群）

Mean±SD

* $p < 0.01$ vs. Group 1

Phase II において Group 2（低体温群）が有意に上昇した。

図 1－4 心拍数の変化（実験 1）

○：Group 1（常温群）

●：Group 2（低体温群）

Mean±SD

両群間に有意差を認めなかった。

図 1－5 呼吸数の変化（実験 1）

○：Group 1（常温群）

●：Group 2（低体温群）

Mean±SD

* $p < 0.05$ vs. Group 2

HST 120 ～ 150 分において Group 2（低体温群）が有意に低下した。

図 1－6 蘇生期（Phase II）における 5 分毎の追加輸液量（実験 1）

○：Group 1（常温群）

●：Group 2（低体温群）

Mean±SD

* $p < 0.01$ vs. Group 2

追加輸液量は HST95 分以降で有意差を認め、Group 1（常温群）において血圧維持に必要な輸液量は有意に多かった。

図 1－7 ビタミン E (A) および%CoQ9 (B) の変化 (実験 1)

□ : Group 1 (常温群)

■ : Group 2 (低体温群)

Mean±SD

* $p < 0.05$ vs. Group 1

%CoQ9 は有意差を認めなかったものの、ビタミン E は Group 2 (低体温群) で Phase II 終了時にベースラインレベルまで上昇した。

表 1－1 動脈血液ガス分析とヘマトクリット (実験 1)

HS : Hemorrhagic shock

Art. : Arterial

Group 1 (常温群、n=8)、Group 2 (低体温群、n=8)

* $p < 0.05$ vs. Group 1

図 1－8 生存数 (実験 1)

○ : Group 1 (常温群)

● : Group 2 (低体温群)

Group 2 (低体温群) は 7 2 時間後まですべてのラットが生存したが、Group 1 (常温群) では 2 例が死亡した。両群間に有意差は認めなかった ($p=0.6$)。

図 2-1 デザイン (実験 2)

Uncontrolled hemorrhagic shock model: Phase I (HST 0 ~ 60 分) ; 出血性ショック期、Phase II (HST 60 ~ 100 分) ; 蘇生期、Phase III (HST 100 分 ~ 72 時間) ; 観察期

HST 0~15 分の脱血後に尻尾を切断した。Phase I の間、乳酸加リンゲル液を Group 1 は 0.1 mL/min、Group 2 は 0.25 mL/min、Group 3 は 0.75 mL/min で輸液した。

図 2-2 Sonoclot analysis の典型的グラフ

① activated coagulation time (ACT ; フィブリン形成までの時間)、②time to peak (血小板機能を反映)、③clot rate (フィブリン形成速度)

図 2-3 平均動脈圧の変化 (実験 2)

● : Group 1 (制限輸液群)

□ : Group 2 (標準輸液群)

○ : Group 3 (大量輸液群)

Mean±SD

* $p < 0.05$ vs. Groups 2 and 3

¶ $p < 0.05$ vs. Groups 1 and 2

脱血終了後にすべてのラットで低下し、輸血後に上昇した。Group 3 (大量輸液群) では輸血終了後に低下したが、その後徐々に上昇した。

図 2－4 心拍数の変化（実験 2）

● : Group 1（制限輸液群）

□ : Group 2（標準輸液群）

○ : Group 3（大量輸液群）

Mean±SD

脱血終了時に低下したが、その後徐々に上昇した。3 群間に有意差を認めなかった。

表 2－1 動脈血液ガス分析とヘマトクリットおよび血小板数（実験 2）

Mean±SD

^a $p < 0.05$ Group 1 vs. Groups 2 and 3 at HST 60 min

^b $p < 0.05$ comparison of three groups with each other at HST 60 min

HST 60 分において pH は Group 1（制限輸液群）で有意に低かった。ヘマトクリット値と血小板数は Group 3（大量輸液群）で有意に低かった。

図 2－5 Sonoclot analysis で凝固機能障害グラフの代表例（実験 2）

ACT の延長、clot rate の低下、time to peak の延長を認め、ピーク値も低下している。

表 2－2 凝固機能（実験 2）

Mean±SD

ACT : activated coagulation time

^a $p < 0.05$ Group 1 vs. Groups 2 and 3 at HST 60 min

HST 60 分において clot rate が Group 2（標準輸液群）と Group 3（大量輸液群）で Group 1（制限輸液群）と比べ有意に低下した、

図 2－6 HST 60 分における clot rate とヘマトクリット値の相関（実験 2）

clot rate とヘマトクリット値に正の相関を認めた。 $r = +0.67$ 、 $p < 0.01$

図 2－7 尻尾断端からの出血量（実験 2）

Mean $\pm$ SD

* $p < 0.01$ Group 3 vs. Group 1 and 2

Group 3（大量輸液群）で有意に出血量が多かった。

図 2－8 生存数（実験 2）

● : Group 1（制限輸液群）

□ : Group 2（標準輸液群）

○ : Group 3（大量輸液群）

Group 1（制限輸液群）で有意に生存率が低下した（ $p < 0.05$ ）。

図 3－1 デザイン（実験 3）

低体温と希釈による“死の三徴”の作成。体表冷却による低体温と、脱血と輸液により血液希釈を行った。ET 50 分に復温群（Group 1；37.0℃）と低体温群（Group 2；32.0℃）に分け、ET 60 分に尻尾の切断を行い、ET 140 分まで経過観察した。

ET: experiment time

図 3－2 直腸温の変化（実験 3）

●：Group 1（復温群）

○：Group 2（低体温群）

Mean±SD

* $p < 0.01$ vs. Group 1

ET 55 ～ 140 分で Group 1（復温群）が有意に高かった。

図 3－3 平均動脈圧の変化（実験 3）

●：Group 1（復温群）

○：Group 2（低体温群）

Mean±SD

* $p < 0.05$ vs. Group 2

ET 120 ～ 140 分において Group 1（復温群）が有意に高かった。

図 3－4 心拍数の変化（実験 3）

● : Group 1（復温群）

○ : Group 2（低体温群）

Mean±SD

* $p < 0.05$ vs. Group 1

ET 65 ～ 140 分で Group 1（復温群）が有意に高かった。

表 3－1 動脈血液ガス分析と血液算定（実験 3）

Mean±SD

BE: Base Excess

* $p < 0.05$ vs. Group 1

動脈血 pH は両群とも ET 50 分で低下したが、ET 140 分では Group 2（低体温群）のみやや上昇した。

図 3－5 凝固機能（実験 3）

A : activated coagulation time (ACT) B : clot rate C : time to peak

● : Group 1（復温群）

○ : Group 2（低体温群）

Mean±SD

* $p < 0.05$ vs. Group 1

全ての凝固機能が ET 50 分に増悪したが、その後は Group 1（復温群）で改善傾向を認めた。

図 3－6 %CoQ9 (A) およびビタミン E (B) の変化 (実験 3)

■ : Group 1 (復温群)

□ : Group 2 (低体温群)

Mean±SD

* $p < 0.05$

ビタミン E は両群とも ET 50 分で低下したが、その後は両群間に有意差を認めなかった。%CoQ9 は ET 140 分で Group 2 (低体温群) が有意に低下した。

%CoQ9 : %Coenzyme Q9

図 3－7 生存数 (実験 3)

● : Group 1 (復温群)

○ : Group 2 (低体温群)

Group 2 (低体温群) のすべてのラットが ET 140 分の実験終了まで生存したが、

Group 1 (復温群) では 3 例が死亡した。両群間に有意差を認めなかった ($p=0.06$)。

参考文献

- 1 . Wu X, Stezoski J, Safar P, Nozari A, Tisherman SA. After spontaneous hypothermia during hemorrhagic shock, continuing mild hypothermia (34°C) improves early but not late survival in rats. *J Trauma* 2003;55:308-316.
- 2 . Takasu A, Yanagawa Y, Sakamoto T, Okada Y. Therapeutic hypothermia limited to the resuscitation period does not prolong survival after severe hemorrhagic shock in rats. *Resuscitation* 2005;67:119-126.
- 3 . Takasu A, Sakamoto T, Okada Y. Effect of induction rate for mild hypothermia on survival time during uncontrolled hemorrhagic shock in rats. *J Trauma* 2006;61:1330-1335.
- 4 . Takasu A, Norio H, Sakamoto T, Okada Y. Mild hypothermia prolongs the survival time during uncontrolled hemorrhagic shock in rats. *Resuscitation* 2002;54:303-309.
- 5 . Takasu A, Carrillo P, Stezoski SW, Safar P, Tisherman SA. Mild or moderate hypothermia but not increased oxygen breathing prolongs survival during lethal uncontrolled hemorrhagic shock in rats, with monitoring of visceral dysoxia. *Crit Care Med*. 1999;27:1557-1564.
- 6 . Wu X, Stezoski J, Safer P, Behringer W, Kentner R, Kochanek PM, et al. Systemic hypothermia, but not regional gut hypothermia, improves survival from prolonged hemorrhagic shock in rats. *J Trauma* 2002;53:654-662.
- 7 . Iwamoto S, Takasu A, Sakamoto T. Therapeutic mild hypothermia: Effect on coagulopathy and survival in a rat hemorrhagic shock model. *J Trauma* 2010;68:669-675.

- 8 . Hachimi-Idrissi S, Yang X, Nguyen DN, Huyghens L. Combination of therapeutic mild hypothermia and delayed fluid resuscitation improved survival after uncontrolled haemorrhagic shock in mechanically ventilated rats. *Resuscitation*. 2004;62:303-310.
- 9 . Takasu A, Stezoski SW, Stezoski J, Safar P, Tisherman SA. Mild or moderate hypothermia, but not increased oxygen breathing, increases long-term survival after uncontrolled hemorrhagic shock in rats. *Crit Care Med*. 2000;28:2465-2474.
- 10 . Douzinas EE, Livaditi O, Andrianakis I, Prigouris P, Paneris P, Villiotou V, et al. The effect of hypoxemic resuscitation from hemorrhagic shock on blood pressure restoration and oxidative and inflammatory responses. *Intensive Care Med* 2009;34:1133-1141.
- 11 . Kapoor R, Prasad K. Role of oxyradicals in cardiovascular depression and cellular injury in hemorrhagic shock and reinfusion: Effect of SOD and catalase. *Circ Shock* 1994;43:79-94.
- 12 . Kapoor R, Kalra J, Prasad K. Cardiac depression and cellular injury in hemorrhagic shock and reinfusion: role of free radicals. *Mol Cell Biochem* 1997;176:291-301.
- 13 . D'Cruz BJ, Fertig KC, Filiano AJ, Hicks SD, DeFranco DB, Callaway CW. Hypothermic reperfusion after cardiac arrest augments brain-derived neurotrophic factor activation. *J Cereb Blood Flow Metab* 2002;22:843-851.
- 14 . Kalia N, Pockley AG, Wood RF, Brown NJ. Effects of hypothermia and rewarming on the mucosal villus microcirculation and survival after rat intestinal ischemia-reperfusion injury. *Ann Surg* 2002;236:67-74.

- 1 5 . Childs EW, Udobi KF, Hunter FA. Hypothermia reduces microvascular permeability and reactive oxygen species expression after hemorrhagic shock. *J Trauma* 2005;58:271-277.
- 1 6 . Advanced Trauma Life Support for Doctors. Chicago, IL: American College of Surgeons; 8th ed. 2008.
- 1 7 . Stern SA. Low-volume fluid resuscitation for presumed hemorrhagic shock: helpful or harmful? *Curr Opin Crit Care*. 2001;7:422-430.
- 1 8 . Rotondo MF, Zonies DH. The damage control sequence and underlying logic. *Surg Clin North Am*. 1997;77:761-777.
- 1 9 . Mitra B, Tullio F, Cameron PA, Fitzgerald M. Trauma patients with the 'triad of death'. *Emerg Med J*. 2012;29:622-625.
- 2 0 . Moore EE, Thomas G. Orr Memorial Lecture. Staged laparotomy for the hypothermia, acidosis, and coagulopathy syndrome. *Am J Surg*. 1996;172:405-410.
- 2 1 . Sharp KW, Locicero RJ. Abdominal packing for surgically uncontrollable hemorrhage. *Ann Surg*. 1992;215:467-474.
- 2 2 . McLarty CD. Hypothermia in the trauma patient: how vital is this sign? *Adv Emerg Nurs J*. 2012;34:75-81.
- 2 3 . Beilman GJ, Blondet JJ, Nelson TR, Nathens AB, Moore FA, Rhee P, et al. Early hypothermia in severely injured trauma patients is a significant risk factor for multiple organ dysfunction syndrome but not mortality. *Ann Surg*. 2009;249:845-850.
- 2 4 . Hess JR, Brohi K, Dutton RP, Hauser CJ, Holcomb JB, Kluger Y, et al. The coagulopathy of trauma: a review of mechanisms. *J Trauma*. 2008;65:748-754.

- 2 5 . Herrera E, Barbas C. Vitamin E: action, metabolism and perspectives. *J Physiol Biochem*. 2001;57:43-56.
- 2 6 . Yamshita S, Yamamoto Y. Simultaneous detection of ubiquinol and ubiquinone in human plasma as a marker of oxidative stress. *Anal Biochem* 1997;250:66-73.
- 2 7 . Zhao W, Richardson JS, Mombourquette MJ, Weil JA, Ijaz S, Shuaib A. Neuroprotective effects of hypothermia and U-78517F in cerebral ischemia are due to reducing oxygen-based free radicals: An electron paramagnetic resonance study with gerbils. *J Neurosci Res* 1996;45:282-288.
- 2 8 . Prasad MR, Liu X, Rousou JA, Engelman RM, Jones R, George A, et al. Reduced free radical generation during reperfusion of hypothermically arrested hearts. *Mol Cell Biochem* 1992;111:97-102.
- 2 9 . Yoshioka T, Shires GT, Fantini GA. Hypothermia relieves oxidative stress in reperfused skeletal muscle following partial ischemia. *J Surg Res* 1992;53:408-416.
- 3 0 . Hegnauer AH, D'amato HE. Oxygen consumption and cardiac output in the hypothermic dog. *Am J Physiol*. 1954;178:138-142.
- 3 1 . Dempsey RJ, Combs DJ, Maley ME, Cowen DE, Roy MW, Donaldson DL. Moderate hypothermia reduces postischemic edema development and leukotriene production. *Neurosurgery*. 1987;21:177-181.
- 3 2 . Goss JR, Styren SD, Miller PD, Kochanek PM, Palmer AM, Marion DW, DeKosky ST. Hypothermia attenuates the normal increase in interleukin 1 beta RNA and nerve growth factor following traumatic brain injury in the rat. *J Neurotrauma*. 1995;12:159-67.

- 3 3 . Brazil EV, Coats TJ. Sonoclot coagulation analysis of in-vitro haemodilution with resuscitation solutions. J R Soc Med. 2000;93:507-510.
- 3 4 . Hett DA, Walker D, Pilkington SN, Smith DC. Sonoclot analysis. Br J Anaesth. 1995;75:771-776.
- 3 5 . Luna GK, Maier RV, Pavlin EG, Anardi D, Copass MK, Oreskovich MR. Incidence and effect of hypothermia in seriously injured patients. J Trauma. 1987;27:1014-1018.
- 3 6 . Jurkovich GJ, Greiser WB, Luterman A, Curreri PW. Hypothermia in trauma victims: an ominous predictor of survival. J Trauma. 1987;27:1019-1024.
- 3 7 . Martin RS, Kilgo PD, Miller PR, Hoth JJ, Meredith JW, Chang MC. Injury-associated hypothermia: an analysis of the 2004 National Trauma Data Bank. Shock. 2005;24:114-118.
- 3 8 . Steinemann S, Shackford SR, Davis JW. Implications of admission hypothermia in trauma patients. J Trauma. 1990;30:200-202.
- 3 9 . Meyer DM, Horton JW. Effect of moderate hypothermia in the treatment of canine hemorrhagic shock. Ann Surg. 1988;207:462-469.
- 4 0 . Meyer DM, Horton JW. Effect of different degrees of hypothermia on myocardium in treatment of hemorrhagic shock. J Surg Res. 1990;48:61-67.
- 4 1 . 池田彩子, 野村早. ビタミンEの貯蔵組織としての脂肪組織の役割. ビタミン. 2012;86:174-176.

- 4 2 . Wu X, Kochanek PM, Cochran K, Nozari A, Henchir J, Stezoski SW, et al. Mild hypothermia improves survival after prolonged, traumatic hemorrhagic shock in pigs. *J Trauma*. 2005;59:291-299.
- 4 3 . Polderman KH, Peerdeman SM, Girbes AR Hypophosphatemia and hypomagnesemia induced by cooling in patients with severe head injury. *J Neurosurg*. 2001;94:697-705.
- 4 4 . Polderman KH, Herold I. Therapeutic hypothermia and controlled normothermia in the intensive care unit: practical considerations, side effects, and cooling methods. *Crit Care Med*. 2009;37:1101-20.