体外循環管理時のアルカレミア環境下での 「いが状赤血球」形成に関する研究

曾山奉教^{1,2,4)}・吉田秀人³⁾・瀧本順三郎²⁾・高橋幸博⁴⁾

要 旨

アルカレミア環境下で血液が過度に希釈される状況では、体外循環開始後早期および modified ultrafiltration (MUF) 施行後の再循環回路内に血液凝集塊の形成をもたらす。我々はトリス塩酸緩衝液を用いて調整した4種類のpH条件(pH7.5、pH8.0、pH8.5、pH9.0)で、倒立型ルーチン顕微鏡を使用し赤血球形態を観察した。更に、pH7.5とpH9.0の条件でトリス塩酸緩衝液下にアルブミンとデンプンをそれぞれ0.5%と5.0%の濃度に溶解し、コロイドの赤血球形態保護作用を観察した。結果、pH9.0 トリス塩酸緩衝液で13.9%あった「いが状赤血球」の出現頻度は、同緩衝液に0.5%、5.0%の割合でアルブミンを溶解することで、それぞれ3.5% ($p<0.01$)、1.2% ($p<0.01$)、同じくデンプンの溶解で7.6% ($p<0.05$)、2.1% ($p<0.01$)まで特異的に減少した。

人工心肺回路充填液へのアルブミン製剤や人工膠質液の投与は「いが状赤血球」起因の血液凝集塊形成を抑制するものと考ええる。

索引用語: アルカレミア環境、いが状赤血球、血液凝集塊、コロイド、Donnan 平衡比

Study of echinocytes appearing under alkalemia during cardiopulmonary bypass control

Tomonori Soyama^{1,2,4)}, Hideto Yoshida³⁾, Junzaburo Takimoto²⁾, Yukihiro Takahashi⁴⁾

Abstract: The dilution of excessive amounts of blood under alkalemic conditions causes blood to accumulate in the early stages following a cardiopulmonary bypass (CPB) or in recirculation circuits after modified ultrafiltration (MUF). We investigated changes in the shape (echinocytes) of red blood cells (RBC) in alkaline tris hydroxymethyl aminomethane (THMA) buffer at pH 7.5, 8.0, 8.5, and 9.0 using inverted microscopy. We then examined the ability of THMA buffer containing 0.5% or 5.0% (final concentrations) colloidal albumin and starch at pH 7.5 and 9.0 to protect against changes in the shape of RBC. The rates at which echinocytes appeared were significantly reduced from 13.9% in THMA buffer at pH 9.0 to 3.5% and 1.2% in THMA buffer containing 0.5% and 5.0% albumin, respectively ($p<0.01$ for both), and to 7.6% and 2.1% in that containing 0.5% and 5.0% starch ($p<0.05$ and $p<0.01$), respectively. These findings suggest that adding albumin and artificial colloid to CPB filling liquid might protect against blood accumulation caused by echinocytes.

Key words: alkalemia, echinocyte, blood accumulation, colloid, Donnan equilibrium ration

I. 緒 言

体外循環管理時に出現する血液凝集塊によって回路閉塞から回路交換を必要とした報告が散見される¹⁻⁸⁾。し

かし、未だ血液凝集塊の原因は解明に至っていない⁹⁻¹⁴⁾。

我々は2012年と2013年に当学会で、体外循環管理時に出現する血液凝集塊が回路内のアルカリ化と NaHCO_3 の相乗効果で出現する「いが状赤血球」に起因し¹³⁾、血小板凝集・血栓形成が血液凝集塊形成に関与しないことを報告した¹⁴⁾。

今回、体外循環開始後早期およびMUF施行後の再循環回路内など、アルカレミア環境下で血液が過度に希釈される状況下に血液凝集塊が形成されることに着目し¹⁻⁸⁾、in vitroで様々なアルカレミア環境下での赤血球形態の観察を試みた。その際、アルブミン(Alb)やデンプンなどのコロイドを付加することで、赤血球形態が保護されることを明らかにした。

1) 天理医学技術学校 臨床工学専攻科

曾山奉教 (Tomonori Soyama)

〒632-0018 奈良県天理市別所町 80-1

Department of Clinical Engineering, Tenri School of Medical Technology

80-1, Bessho-cho, Tenri, Nara, 632-0018, Japan

2) 同 臨床検査学科

3) 天理よろづ相談所病院 臨床検査部 CE 部門

4) 奈良県立医科大学大学院 医学研究科 発生・発達医学専攻

[原稿受領日: 2014 年 2 月 25 日 採択日: 2014 年 5 月 8 日]

なお、本研究の著者および共著者に産学連携利益相反（COI）の関与はない。

II. 研究方法

1. 対象

健常人 10 名（男性 5 名、女性 5 名、平均年齢 20.7 歳）にインフォームドコンセントを得た後、テルモ社製 65 単位ヘパリンナトリウム入り 5 mL 真空採血管を用いて採血した。採血はヘルシンキ宣言を遵守のうえ実施した。

2. アルカリ調整液の作製と浸透圧調整

アルカレミア環境を再現するため、0.15mol/L トリス緩衝液（pH10.3）に 1N HCl を滴下し、pH7.5、pH8.0、pH8.5、pH9.0 の 4 種類のトリス塩酸緩衝液（pH 調整許容範囲： ± 0.1 、pH 調整時温度：20～25℃）を作製した。

浸透圧調整は、あらかじめ作製しておいた pH7.5 から pH9.0 の 4 種類のトリス塩酸緩衝液に浸透圧調節のため計算上求めた量の NaCl（分子量 58.5）を付加し、浸透圧を 280 ± 5 mOsm/L の範囲に調節した。

なお、pH 測定は HORIBA 社製卓上型 pH・水質分析計 LAQUA F-72 を使い、浸透圧測定は ARKRAY 社製浸透圧測定装置オズモスタット OM-6040 を使用した。

3. コロイドによる赤血球形態保護作用の検討

pH7.5 と pH9.0 の 2 種類のトリス塩酸緩衝液に Alb とデンプンをそれぞれ 0.5% と 5.0% の濃度で溶解した 8 種類のコロイド溶液を作製した。その後、浸透圧調節のため計算上求めた量の NaCl を付加し、浸透圧を 280 ± 5 mOsm/L の範囲に調節した。

4. 赤血球形態観察

OLYMPUS 社製倒立型ルーチン顕微鏡 CKX41SF で行った。被検調整溶液をサンプラテック社製細胞培養用プレートに 2 mL 採取し、全血 10 μ L を滴下直後に用手法で水平方向に振盪混和した後（希釈倍率 200 倍）、直ちに標本中央部より周囲 10 視野を鏡検倍率 400 倍で撮影した（滴下直後）。引き続き水平振盪器で 30 分間の振盪を行い、滴下直後と同様の手順で撮影した（反応直後）。滴下直後、反応直後に撮影した全画像から、目視で「正常赤血球数」と「いが状赤血球数」を計測し、「全赤血球数（「正常赤血球数」＋「いが状赤血球数」）」に対する「いが状赤血球数」の割合を「いが状赤血球出現頻度」（出現頻度）として算出した。各被検調整溶液における出現頻度は、採血 10 サンプルで平均した出現頻度平均値として評価した。

5. 統計学的処理

pH7.5 から pH9.0 の各トリス塩酸緩衝液での出現頻度は、pH7.5 から pH9.0 の各系列での多重比較検定に Scheffe 法を用いた。また、コロイド溶液の出現頻度も、pH9.0 トリス塩酸緩衝液での出現頻度と対比するため、Alb 付加群とデンプン付加群に分けたうえで、Scheffe

図 1 倒立型ルーチン顕微鏡による赤血球形態観察（ $\times 400$ ）
A：全血滴下直後の赤血球形態の 1 例（pH9.0 トリス塩酸緩衝液）
B：「いが状赤血球」の 1 例（pH9.0 トリス塩酸緩衝液）
C：5.0% Alb 溶液の赤血球形態の 1 例（pH9.0 コロイド溶液）
D：5.0% デンプン溶液の赤血球形態の 1 例（pH9.0 コロイド溶液）

表 1 アルカレミア環境における出現頻度平均値

	pH7.5	pH8.0	pH8.5	pH9.0
反応直後 (%)	0.36 **	0.34 **	2.1 **	13.9

** pH9.0 トリス塩酸緩衝液の出現頻度に対する危険率が 0.01 未満（ $p < 0.01$ ）

図 2 アルカレミア環境が赤血球形態に与える影響

法を用いて解析した。

III. 研究結果

1. アルカレミア環境が赤血球形態に与える影響

滴下直後の各トリス塩酸緩衝液における出現頻度平均値は、すべて 1.0% 未満であった（図 1A）。

反応直後の各トリス塩酸緩衝液の出現頻度平均値は、pH7.5 トリス塩酸緩衝液が 0.36%、pH8.0 トリス塩酸緩衝液が 0.34%、pH8.5 トリス塩酸緩衝液が 2.1%、pH9.0 トリス塩酸緩衝液が 13.9% であり、pH8.5 以上で出現頻度平均値が増加傾向を示した（表 1・図 2）。また、pH9.0

表2 コロイド付加による出現頻度平均値

反応直後 (%)	pH9.0				
	付加なし	Alb 付加群		デンプン付加群	
		0.5% Alb	5.0% Alb	0.5%デンプン	5.0%デンプン
	13.9	3.5 **	1.2 **	7.6 *	2.1 **

*付加なし (pH9.0 トリス塩酸緩衝液) の出現頻度に対する危険率が 0.05 未満 ($p < 0.05$)**付加なし (pH9.0 トリス塩酸緩衝液) の出現頻度に対する危険率が 0.01 未満 ($p < 0.01$)

図3 Alb 付加群の赤血球形態保護作用

図4 デンプン付加群の赤血球形態保護作用

トリス塩酸緩衝液では3例で28.4%、29.3%、30.3%の出現頻度であった(図1B・図2)。

Scheffe 法による比較では、pH7.5、pH8.0、pH8.5の各トリス塩酸緩衝液に対するpH9.0トリス塩酸緩衝液の出現頻度が有意に高値であった($p < 0.01$) (表1・図2)。

2. コロイドによる赤血球形態保護作用

滴下直後の全コロイド溶液および反応直後の各pH7.5コロイド溶液における出現頻度平均値は、すべて1.0%未満であった。

反応直後の各pH9.0コロイド溶液における出現頻度平均値は、Alb付加群の0.5% Alb溶液が3.5%、5.0% Alb溶液が1.2% (表2・図1C)、デンプン付加群の0.5%デンプン溶液が7.6%、5.0%デンプン溶液が2.1%であり(表2・図1D)、各群ともにコロイド濃度の上昇に伴い出現頻度平均値が低下傾向を示した(表2・図3・図4)。反応直後のpH9.0トリス塩酸緩衝液との比較では、各コロイド群とも有意に低値であり($p < 0.05$) (表2)、特にpH9.0トリス塩酸緩衝液で28%以上の出現頻度を示した3例は、5.0% Alb溶液とした場合にはいずれも3.0%以下(図3)、5.0%デンプン溶液とした場合にはいずれも9.0%以下(図4)まで低下した。

IV. 考 察

体外循環管理時に出現する血液凝集塊は数多く報告されているが、その主要因は「血小板凝集・血栓形成説」と「いが状赤血球凝集塊説」のいずれかに起因するものと考えられている¹⁻¹⁴⁾。この点について我々は2012年と2013年に当学会において、体外循環管理時のアルカレミア環境下で出現する血液凝集塊がpHのアルカリ化と NaHCO_3 の相乗効果で出現する「いが状赤血球」に起因し¹³⁾、血小板凝集・血栓形成は関与しないとの実験結果を報告した¹⁴⁾。

今回我々は、血液凝集塊が体外循環開始後早期およびMUF施行後の再循環回路内に形成されていることに着目し¹⁻¹⁴⁾、その原因はアルカレミア環境下で血液が過度に希釈されることに起因するものと考えた¹⁰⁻¹⁴⁾。つまり、「いが状赤血球」は赤血球周囲のコロイド濃度が低下したアルカレミア環境下で出現するものと考え、様々なアルカレミア環境下でコロイド濃度を変化させ赤血球形態の観察を行った。

最初にアルカレミア環境が赤血球形態に与える影響を見るために、4段階の異なるpHのトリス塩酸緩衝液に全血10 μL を滴下し、その赤血球形態を観察した。

V. 結 論

アルカレミア環境下で血液が過度に希釈されると赤血球膜内外の Donnan 平衡比の低下に伴い「いが状赤血球」が出現することが推定された。また、コロイドの付加により同環境下の Donnan 平衡比を上昇させ、赤血球形態を保護すると考えられた。

●参考文献

- 1) Fisher AR, Baker M, Whitehorne M, et al.: Normal and abnormal trans-oxygenator pressure gradients during cardiopulmonary bypass. *Perfusion*, 18 (1): 25-30, 2003.
- 2) 井上 将, 丸屋 拓, 桑名克之: 体外循環開始直後に人工肺入口側圧が上昇する現象について. *体外循環技術*, 36(1): 18-20, 2009.
- 3) 吉田 均, 竹内 斉, 浅井 徹, ほか: 回路の工夫により人工肺トラブルでの交換を迅速に行えた症例と交換用回路の作製. *体外循環技術*, 37 (4): 429-432, 2010.
- 4) 栗原大典, 向井憲子, 上田 彰, ほか: 体外循環の安全性向上に対する検討—人工肺交換を経験して得たこと—. *体外循環技術*, 37 (4): 444-447, 2010.
- 5) 東田直樹, 西垣孝行, 亀井政孝, ほか: 静脈リザーバ内に大量の血栓を認めた1例. *体外循環技術*, 38 (2): 187-190, 2011.
- 6) 久保田好光, 小田貴仁, 稲垣亜由梨, ほか: 人工肺交換事例における採取血からの一考察. *体外循環技術*, 38 (4): 524-526, 2011.
- 7) 古垣達也, 平松祐司, 榊原 謙, ほか: 人工肺流入部圧力上昇のため人工心臓運転中に人工肺または全回路交換を余儀なくされた3症例の検討. *体外循環技術*, 39 (1): 65-69, 2012.
- 8) 鈴木克尚, 神谷典男, 北本憲永, ほか: MUF 施行によるトラブル—体外循環下における赤血球の凝集—. *体外循環技術*, 28 (4): 22-25, 2001.
- 9) 田村 明, 佐藤隆司, 森 渥視, ほか: 開心術中の人工心肺血より分離した血漿の示す赤血球変形誘起効果. *Jpn J Thorac Cardiovasc Surg*, 38 (7): 1152-1157, 1990.
- 10) 副島健市, 中江世明, 佐々木彰, ほか: 人工心肺の血液充填と PH—alkalosis と赤血球凝集—. *人工臓器*, 17 (3): 1417-1421, 1988.
- 11) 村上厚文, 森保幸治, 伊井義博, ほか: 膜型人工肺の臨床的, 実験的検討—赤血球の変形と膜吸着について—. *人工臓器*, 19 (1): 506-509, 1990.
- 12) 小林靖雄, 吉田秀人, 橋本武昌, ほか: 自己血充填時の静脈リザーバ内のホールドアップ現象の原因について. *体外循環技術*, 31 (2): 200-202, 2004.
- 13) 曾山奉教, 吉田秀人, 筏 義人: アルカレミア環境下の赤血球凝集に関する研究. *体外循環技術*, 39 (2): 138-143, 2012.
- 14) 曾山奉教, 吉田秀人, 高橋幸博, ほか: 体外循環時のアルカレミア環境下での血液凝集塊形成に血小板凝集, 血栓形成が関与するのか?. *体外循環技術*, 40 (1): 1-6, 2013.
- 15) 高桑雄一, 萬野純恵: 赤血球膜の構造と機能 赤血球膜の細胞骨格構造. *日本臨牀*, 54 (9): 2341-2347, 1996.
- 16) 濱崎直孝: 細胞 pH 調節系輸送蛋白研究の進歩 陰イオン交換輸送蛋白質 (バンド 3 蛋白質). *日本臨牀*, 50 (9): 2069-

その結果、pH8.5 以上で「いが状赤血球」の出現頻度平均値は増加傾向を示し、pH7.5 から pH8.5 の各トリス塩酸緩衝液に対する pH9.0 トリス塩酸緩衝液の出現頻度平均値が有意に高値であった。

高桑らの報告では¹⁵⁾、赤血球膜を裏打ちする細胞骨格はスペクトリン、アクチンなどの構成蛋白間の結合により網目状の平面的な広がりを保ち、赤血球膜貫通蛋白である Band3 蛋白 (Band3) との連結により脂質二重層を細胞質側から裏打ちするとされている。この Band3 の高次構造 (内向き構造、外向き構造) は赤血球膜内外の Cl^- 濃度、 HCO_3^- 濃度、 OH^- 濃度、 H^+ 濃度の Donnan 平衡比 ($[\text{Cl}^-]_i / [\text{Cl}^-]_o = [\text{HCO}_3^-]_i / [\text{HCO}_3^-]_o = [\text{OH}^-]_i / [\text{OH}^-]_o = [\text{H}^+]_o / [\text{H}^+]_i$) に依存することから、赤血球膜外の pH 上昇に伴う Donnan 平衡比の低下は Band3 の内向き構造を増加させ、これに伴い膜骨格が収縮し「いが状赤血球」を誘発するとされている¹⁶⁻¹⁹⁾。

以上のことから、本研究における pH8.5 以上のトリス塩酸緩衝液で出現頻度平均値が増加傾向を示したのは、pH のアルカリ化に伴う Donnan 平衡比の低下に起因するものと想定された。また、pH9.0 トリス塩酸緩衝液では出現頻度 28% 以上を 10 例中 3 例で確認したが、体外循環管理時の血液凝集塊が不規則に出現するのと同様に、Donnan 平衡比の低下には大きな個人差があるのではないかと想定された。なお、既報告の「アルカレミア環境下の赤血球凝集に関する研究」¹³⁾ では、血液凝集塊は pH のアルカリ化と NaHCO_3 の相乗効果で出現する「いが状赤血球」に起因するとの実験結果を報告したが、それらは今回の文献的考察から鑑みると、pH 上昇に伴う H^+ 濃度の低下および NaHCO_3 のイオン化に伴う HCO_3^- 濃度の上昇が Donnan 平衡比を低下させ、これに伴い出現した「いが状赤血球」に起因したものと考えられる。

更に多数の「いが状赤血球」を認めた pH9.0 トリス塩酸緩衝液にコロイド (Alb, デンプン) を付加し、コロイド濃度の上昇に伴う出現頻度の抑制を確認した。水溶液中で陰性帯電コロイドとして存在する Alb (等電点 pH4.9) は、それ自体の濃度低下および pH のアルカリ化に伴い低下する Donnan 平衡比を上昇させ、Band3 の高次構造変化を保護し「いが状赤血球」の出現を抑制するとの報告がある^{18, 19)}。また、デンプンも Alb と同様に水溶液中で陰性帯電コロイドとして存在しており²⁰⁾、本研究よりいずれのコロイドにも少量で赤血球膜内外の Donnan 平衡比を上昇させ「いが状赤血球」の出現を抑制する効果があるものと考えられる。よって体外循環中のアルカレミア環境下において、コロイドは赤血球形態保護作用を有し、血液凝集塊の形成を抑制するものと思われる。

2076, 1992.

- 17) Wong P : Mechanism of control of erythrocyte shape : a possible relationship to band 3. J Theor Biol, 171 (2) : 197-205, 1994.
- 18) Wong P : A basis of echinocytosis and stomatocytosis in the disc-sphere transformations of the erythrocyte. J Theor Biol, 196 (3) : 343-361, 1999.
- 19) Wong P : A hypothesis of the disc-sphere transformation of the erythrocytes between glass surfaces and of related observations. J Theor Biol, 233 (1) : 127-135, 2005.
- 20) 戸嶋直樹 : 理解しやすい化学 I B・II. 改訂版, 東京, 文英堂. 2001. p128.