透析回路内に形成された淡黄色顆粒物の検討

青木 弘之¹ 藤岡 紀昭¹ 阿部 正典¹ 松岡 由美子¹
大森 容子¹ 葉山 修陽² 佐藤 茂³ 大藺 英一⁴
恵章会御徒町腎クリニック¹ さいたまつの森クリニック²
日本医科大学形態解析共同研究施設³ 日本医科大学微生物免疫⁴

キーワード：維持血液透析，血小板血栓，低温刺激，ヘパリン，回路内加温

〈要旨〉

血液透析施行時，透析開始直後から血液回路内に淡黄色顆粒物が付着し回路内凝固などのトラブルの原因となることがある。冬季に多く，プライミング時に血液回路を 37℃まで加温すると回避される場合がある。今回この顆粒物の本態を検討し成因を推定した。電子顕微鏡所見から，顆粒物は活性化血小板による血小板血栓であった。5名の症例に性差，透析歴や原疾患の共通性はなく，回路内凝固以外共通症状もなかった。低温刺激に関連するクリオグロブリン血症や寒冷凝集素症も認められず，ヘパリン起因性血小板減少症関連の抗体もすべて陰性であった。顆粒物が形成されない透析患者と比較して血液検査上の差はなく血小板数も正常範囲にあったが，ヘパリン化による平均血小板容積（MPV）の低下率が大きかった（ $p=0.016$ ）。未分画ヘパリンの増量は顆粒物形成に影響しなかったが，プライミング時の回路内加温および低分子ヘパリンやナファモostatへの抗凝固薬の変更で抑制され回路内凝固の回避に成功した。この病態は低体温下手術時の全身ヘパリン化で認められる血小板減少症に類似し，淡黄色顆粒物の成因として回路内の低温刺激と高分子分画のヘパリンが複合的に関与していると考えられた。

Pale yellow granules forming in hemodialysis circuit

Hiroyuki Aoki¹, Noriaki Fujioka¹, Masanori Abe¹, Yumiko Matsuoka¹, Yoko Omori¹, Naoaki Hayama², Shigeru Sato³ and Eiichi Osono⁴

Okachimachi Kidney Clinic¹; Saitama Tsuki no mori Clinic²; Joint Research Facility for Morphological Analysis, Nippon Medical School³; Department of Microbiology and Immunology, Nippon Medical School⁴

Key words : maintenance hemodialysis, platelet thrombus, cold stimulus, heparin, heating in the circuit

〈Abstract〉

Pale yellow granules start to adhere in the dialysis circuit immediately after hemodialysis initiation, and coagulate the circuit in some cases. This frequently occurs in winter, and is avoided by warming the dialysis circuit to 37℃ at the time of priming. We investigated the granules and cause of their formation. On electron microscopy, the granules were platelet thrombi formed by activated platelets. There were no common findings in the past medical history of dialysis or primary disease and no common symptom other than coagulation of the circuit among 5 cases. No cryoglobulinemia nor cold agglutinin disease related to cold stimulation was noted, and all antibodies related to heparin-induced thrombocytopenia were negative. Compared to non-granule-forming dialysis patients, no difference was noted on blood testing, and the platelet count was within the normal range, but the rate of heparin-induced reduction of the mean platelet volume (MPV) was greater ($p=0.016$). An increase in the non-fractionated heparin dose did not influence granule formation, but warming of the dialysis circuit at the time of priming and switch of the anticoagulant to low-molecular-weight heparin or nafamostat inhibited granule formation and avoided coagulation of the circuit. This pathology is similar to thrombocytopenia in patients under systemic heparinization in hypothermic surgery, suggesting that cold stimulation in the dialysis circuit and the macromolecular heparin fraction are involved in pale yellow granule formation.

緒 言

血液透析施行時に発生するトラブルのひとつに回路内凝固がある。一般に抗凝固薬量の不足や脱血不良による血液凝集が原因で生じるが¹⁾、透析開始時より淡黄色の顆粒物(図1)が形成され血液回路やエアトラップチャンバ内に付着して静脈圧上昇や回路内凝固をひき起こすことがある。このパターンの回路内凝固を起こす病態としてクリオグロブリン血症が知られており、血液回路を37℃以上に加温(図2a)すると γ グロ

ブリン(IgGまたはIgM)の凝集、さらには回路内凝固自体を回避できたとの報告²⁾がある。そこで当院でも血液回路の加温を試みたところ、同様に顆粒物形成が抑制されトラブルが回避された。しかしわれわれの症例ではクリオグロブリンが陰性であった。

I. 目 的

血液回路内の淡黄色顆粒物の本態を解析しその成因を推定する。

II. 症例と方法

1. 症例の背景と臨床像

当院で維持透析をうけている患者85名(男性66名、女性19名)中、動・静脈エアトラップチャンバ内に淡黄色の顆粒物形成を視認した患者5名(男性4名、女性1名)に回路凝固への対応を含め文章にて研究協力に同意を得た。5例とも週3回の血液透析を受けており、統計学的解析は平均値 $\pm$ 標準偏差で表した。

診療録と透析チャートから各症例の症候および顆粒物の形成状況を検討した。血液検査は2日空きの透析前に行った。定期的に施行している血球計算検査・生化学検査以外に、顆粒物形成に関与する病態としてクリオグロブリン血症^{2,3)}と寒冷凝集素症^{4,5)}、ヘパリン起因性血小板減少症(Heparin-induced thrombocytopenia)

図1 形成された顆粒物の形状
動脈チャンバ内のコーン型メッシュにトラップされた淡黄色～白色の顆粒物。

図2 回路内加温
血液回路の脱血・返血用穿刺針接続部の間に、バイパス用回路(図2b)を装着しループを形成する。37.5℃の透析液をダイヤライザーに流し、ポンプを80 mL/minに設定して回路内の生理食塩水を循環させ、透析開始時まで回路を加温する。バイパス用回路の着脱時に清潔操作を要するが、手技は簡便で熟練に時間を要さない。

表 1 患者背景と主要検査結果

症例	性別	年齢 (歳)	透析歴 (年)	原疾患	感染症	血小板数 ($10^4/\mu\text{L}$)	抗体価検査		
							クリオグロブリン 定性	寒冷凝集素価	抗 PF4・ヘパリン 複合体抗体
A	M	58	7.5	DM	なし	27.8	陰性	8 倍	陰性
B	M	59	15.6	腎硬化症	HCV	19.8	陰性	8 倍	陰性
C	M	62	4.25	尿路結核	なし	28.4	陰性	16 倍	陰性
D	M	63	7	DM	なし	21.8	陰性	8 倍	陰性
E	F	44	4.92	CGN	なし	22	陰性	16 倍	陰性

表 2 顆粒物形成の対処とその成否

症例	顆粒物 形成度 (HD 終了時)	回路 凝固歴 (HD 中)	対処				
			回路内 加温	コーン型 チャンバ	ヘパリン の増量	低分子 ヘパリン	メシル酸 ナファモスタット
A	(3+)	あり	(3+)→(2+)	効果なし	効果なし	(3+)→(+)	(3+)→(+)
B	(3+)	あり	(3+)→(2+)	効果なし	効果なし	(3+)→(+)	(3+)→(+)
C	(2+)	あり	(2+)→(+)	効果なし	効果なし	(2+)→(-)	(2+)→(+)
D	(+)	なし	(+)→(-)	ND	効果なし	(+)→(-)	ND
E	(+)	なし	ND	ND	ND	(+)→(-)	ND

nia : HIT)⁶⁾を疑いそれぞれの抗体価を測定した。クリオグロブリン定性検査・寒冷凝集素価の血清は検査まで常温で保存し、抗 PF4・ヘパリン複合体抗体は 3.2%クエン酸 Na 入り採血管で採血し血漿を冷蔵保存した。

2. 顆粒物形成を抑制するための対処

プライミング方法・血液回路・抗凝固薬の変更を行った。これらの対処により顆粒物形成がどう変化したか観察した。

回路内加温 (図 2) は、透析開始時の血液回路自体の温度を体温に近づける目的で行った。予めプライミングを済ませた血液回路の脱血・返血用穿刺針接続部の間をバイパス用回路 (図 2b) で繋ぎループ状にした。37.5℃に設定した透析液をダイアライザーに流して血液回路内の生理食塩水を加温し、透析開始時まで 80 mL/min 程度で循環させた。また血液回路による血球成分への物理的刺激を軽減する目的で、一部の症例にエアトラップチャンバの異物除去メッシュがコーン型 (図 1) のものを用いた。

透析中の過凝固状態への対応として、未分画ヘパリンを 10~20%増量、抗凝固薬を等用量の低分子ヘパリンやメシル酸ナファモスタット (30 mg/時)へ変更した。

3. 顆粒物の形態的検討

血液回路内の淡黄色顆粒物を透析終了後直ちに採取し、2.5%グルタルアルデヒド固定および四酸化オスミウムで固定し、エポキシ樹脂にて包埋した。この試料を光学顕微鏡用には準超薄切片としてトリジンブルー染色した。また、電子顕微鏡用には超薄切片

としてウランと鉛で電子染色し透過型電子顕微鏡にて観察した。

4. ヘパリン化による血小板数・血小板容積の検討

症例の EDTA 化血とヘパリン化血を血液透析前に採取し、血小板数・血小板凝集の有無・平均血小板容積 (mean platelet volume : MPV) を検討した。さらに症例と性別・年齢・透析歴・原疾患が同等な透析患者で顆粒物の形成が認められていない患者に協力を依頼し、同意の得られた 5 例を対照として同様の検査を行い比較した。検体は室温で保存し検査機関に移送し、データは平均値±標準偏差で表した。症例と対照との差は分散の等しくない 2 群間の *t* 検定 (ウエルチの *t* 検定) を Stat view 最終版を用いて求め、 $p < 0.05$ を統計学的に有意とした。

III. 結 果

1. 症例の背景と臨床像

症例の背景を示す (表 1)。年齢は 57.2 ± 4.5 歳、透析歴は 7.9 ± 7.6 年、原疾患は糖尿病性腎症 2 名、腎硬化症 1 名、尿路結核 1 名、慢性糸球体腎炎 1 名であった。透析条件としてダイアライザーは 3 名がポリスルフォン膜、2 名が再生セルロース膜を用い、抗凝固薬は未分画ヘパリンを初回投与 800~1,000 単位、一回総投与量 3,000~5,000 単位を使用していた。症例は当院全患者の 5.9%にあたり比率は男性 6.1%、女性 5.3%と男女差はみられなかった。全例維持期の患者で、全身性の血小板血栓症や血小板減少症に伴う易出

血性や粘膜出血、紫斑、深部静脈血栓症等の症状を示すものはなかった。症例に高度の貧血や多血症はみられず、白血球数やその分画も正常であった。血小板数にも $19.8 \sim 28.4 \times 10^4 / \mu\text{L}$ と異常はなく進行性の減少を示すものもなかった。また、肝機能・脂質代謝異常もみられなかった。1名 (case B) クリオグロブリン血症に関与するとされる HCV 抗体の陽性者がいた。しかしクリオグロブリン定性検査はすべて陰性であり、代表的症状の紫斑、レイノー現象、関節痛もみられなかった。寒冷凝集素価は陽性所見 256 倍以上に対し 5 名とも 8~16 倍と陰性であった。また、HIT (II 型) で形成される抗 PF4・ヘパリン複合体抗体も陰性であった。

2. 顆粒物形成を抑制するための対処と経過

プライミング方法・血液回路・抗凝固薬の変更に伴う顆粒物の形成状態の変化を表 2 に示す。全例で透析終了時の生理食塩水による血液回収後にチャンバ内に顆粒物が確認された。顆粒物は主に動・静脈チャンバのメッシュ部に多く視認されるが、メッシュ部以外でも血液回路内全体にみられ肉眼的に白色から淡黄色、大きさは芥子粒~米粒大で不整型であった (図 1)。透析開始直後から観察されることがあるもの (2 名 case A, B) や、開始後 1~2 時間で静脈圧上昇をきたすもの (4 名 case A, B, C, D)、透析終了間際に顆粒物によりエアトラップチャンバが完全に凝固したことがあるもの (3 名 case A, B, C) がいた。

顆粒物の形成量が多く回路凝固歴のある 3 名を含む 4 名に対して回路内加温 (図 2) を行った。透析開始時に血液回路自体を加温しておく、4 名とも顆粒物の形成が抑えられ回路内凝固の頻度が低下した。一方、チャンバ内メッシュをコーン型に変更しても顆粒物形成を抑制するには至らなかった。

Case E を除く 4 名にヘパリンの増量を試みると、ダイアライザーや血液回路内壁の赤血球による残血 (赤色血栓) は軽減されたが顆粒物は増量前と比べ変化がなかった。しかし、未分画ヘパリンと等用量の低分子ヘパリンを用いて透析を施行すると、5 名すべてで顆粒物形成が抑制された。また、顆粒物形成の多い 3 名にメシル酸ナファモスタット (30 mg/時、総量 100~120 mg) を使用したところ 3 名とも顆粒物形成が抑制された (表 4)。これらの症例に対し、現在冬期は低分子ヘパリンと回路内加温で対処しているが、夏期は顆粒物形成の落ち着いている症例もあり case B, D は回路内加温のみ case E は通常の条件で透析を行っている。

3. 顆粒物の形態的検討

3 名 (case A, B, C) の顆粒物を検討した。トルイジンブルー染色の光学顕微鏡下の観察では一部に好中球や赤血球の混入を伴う無構造物 (図 3a, case A) であり、透過型電子顕微鏡低倍率では顆粒物は径 3~4 μm の粒子の集合体で、混入した好中球や赤血球と比較し小型であった。高倍率でこの粒子は円盤形で核はなく二つの構造の違う小胞を含んでいる血小板であった。また、中には細胞質突起を出しているものや小胞を放出している血小板の活性化像が観察された (図 3b, case A)。顆粒物内には白血球が多く混入していたが、好中球のみが選択的に取り込まれ単球やリンパ球は認められなかった。Case B, C においても同様の結果が得られたが時間的に古い印象があり崩壊した血小板像が認められた。また 3 名とも血小板血栓周囲には凝固系の活性化によるフィブリンの析出がみられた (図 3c, case B) が、好中球には細胞質突起を出すなどの活性化像を認めなかった。

4. 血小板関連検査

ヘパリン化による血小板数・血小板凝集の有無・MPV の変化を、症例と他の透析患者 (対照) とで比較した (図 4)。両群とも EDTA 化血と比較してヘパリン化血では血小板数の減少 (症例: $23.5 \pm 2.8 \rightarrow 14.3 \pm 4.4 \times 10^4 / \mu\text{L}$, 対照: $22.0 \pm 3.8 \rightarrow 13.5 \pm 3.5 \times 10^4 / \mu\text{L}$) と MPV の低下 (症例: $12.1 \pm 1.2 \rightarrow 10.6 \pm 1.3 \text{ fl}$, 対照: $11.0 \pm 0.9 \rightarrow 10.5 \pm 0.8 \text{ fl}$) が認められ、血小板の凝集像も認められた。しかし症例では、MPV が基準値 (9.7~12.6 fl) から逸脱する割合が高く、さらにヘパリン化による MPV の低下率は症例で $-12.0 \pm 4.4\%$ と対照群の $-4.5 \pm 1.3\%$ より有意 ($p=0.016$) に大きかった。

IV. 考 察

顆粒物が形成される成因について、透析開始時の回路内加温により顆粒物形成が抑制されたことから血液回路内の低温刺激が関与していること、また低分子ヘパリンやメシル酸ナファモスタットへの変更で顆粒物が減少したことにより未分画ヘパリンが大きく関与していることが推定された。輸注用の血小板製剤の検討^{7,8)}で、冷蔵保存によって血小板数の減少と血小板の細胞質突起形成などの活性化が顕著になることが知られている。しかしこれらは低温刺激単独で生じたものであり、症例の透析中の条件と完全には合致しない。またヘパリン関連の過凝固状態であることから HIT を疑ったが、抗 PF4・ヘパリン複合体抗体は陰性であ

図 3 顆粒の形態像

- a. 光学顕微鏡写真：トルイジンブルー染色において無構造物の集合体と好中球（➡）を認める（case A）。
- b, c. 透過型電子顕微鏡写真：血小板は細胞質突起を出しており，小胞の放出による空胞化などの活性化像（b➡，case A）やフィブリンの析出（c➡，case B）を認める。

りⅡ型 HIT⁶⁾は否定的であった。さらに症例は維持期の透析患者でヘパリンを使用して数年～十数年を経過していること，ヘパリン使用中に血小板の進行性の減少を示していないこと，HIT に対して唯一有効とされる抗トロンビン薬ではなく低分子ヘパリンやナファモスタットが有効であったこと，回路内加温により回避しうることから，Ⅰ型 HIT⁶⁾とも異なる病態であると考えられた。ヘパリンにはアンチトロンビンⅢ（ATⅢ）を介した凝固因子抑制のほかに，特に高分子分画のものに血小板凝集作用が認められる⁹⁾。この作用が低温刺激で増強されて血栓を形成することが，低体温下手術時の血小板減少症の成因として報告されている^{10～12)}。一方低分子ヘパリンは低温刺激による影響を受けにくいとされ血小板凝集作用も少ない^{9,11)}。今回の症例においても低温刺激を回避する回路内加温，低

温刺激の影響を受けにくい低分子ヘパリンやナファモスタットが有効であるにもかかわらず未分画ヘパリンの増量には効果がなかったことから，未分画ヘパリンに含まれる高分子ヘパリンと低温刺激が複合的に顆粒物形成を惹起したと考えられた。

電顕像より，顆粒物の本態は血小板の活性化に伴う血小板血栓と判定した。血小板血栓の形成機序は血小板の活性化に起因し，活性化因子と接触することで凝集・粘着し血栓形成へと至る。この活性化は血小板自身の形態を変化させ細胞質突起を出し（図 3b），細胞内にある α 顆粒，濃染顆粒の二つの小胞に含まれる血小板活性化因子（プロトロンビン・ADP・TXA2 など）を放出して周囲の血小板を活性化させる⁷⁾。特にプロトロンビンが活性化したトロンビンでこの作用が強く¹³⁾，さらに大量のトロンビンが生成されてフィブリ

図 4 EDTA 化血とヘパリン化血での血小板数と血小板平均容積の差

症例・対照ともヘパリン採血で血小板数が減少し MPV が低下した。しかし症例ではヘパリン化による MPV の低下する割合が対照と比較して有意に大きかった ($p=0.016$)。

ノーゲンをフィブリンに転換し、フィブリン同士が架橋することによって白色血栓となる。症例の血小板血栓内には好中球のみが取り込まれ単核球はみられなかった (図 3a) ことから、血栓形成に好中球も寄与した可能性を考える必要がある。好中球は異物と接して遊走能や貪食能を示し活性酵素を放出し、さらにミエロペルオキシダーゼが血小板を活性化する¹⁴⁾。しかし症例の白血球数や分画には異常がみられず、電顕上でも明らかな好中球の活性化像は認められなかった (図 3b)。一方、血小板も物理的刺激に曝露されると von Willebrand 因子依存性に活性化し、好中球と接着する P-selectin を発現する¹⁵⁾。異物 (血液回路) に接触して血小板が刺激され単に好中球が血栓内に巻き込まれたものかもしれないが、症例に易出血性はなく透析時にのみに症候を示していることから、ヘパリンと低温刺激に加え異物に対する生体反応の関与は否定できない。

この現象のモデル実験として、EDTA 化血とヘパリン化血を室温で保存し移送した際の血小板の数と容積をみた (図 4)。対照と比較して症例では、血小板消費の亢進による血液中血小板の幼弱偏性もしくはヘパリン化による血小板の活性亢進による矮小化¹⁶⁾に起因すると考えられる MPV の逸脱を認め、さらにヘパリン化により MPV が高度に低下 (対照の $-4.5 \pm 1.3\%$ に対して $-12.0 \pm 4.4\%$) した。血小板自体のヘパリンに対する反応の強弱が症候 = 顆粒物形成として現れるか否かの差になると考えられ、EDTA 化血とヘパリン化血を 2 本同時に採取し MPV を測定することで今回提唱した血液回路内の低温誘発性ヘパリン惹起血

小板血栓症の存在を推定しうると思われた。今回の検討では、概ね 10% 以上 MPV の低下を認めた場合には回路内に顆粒物が発症するリスクが高いと考えられるが、閾値の設定にはさらに症例数を増やして検討する必要がある。また MPV の逸脱以外これらの症例と他の患者との間に原疾患、透析条件、他覚所見、血液検査所見上の差異は認められず、今後も継続観察し病因の解析を行っていきたい。

結 語

低温誘発性ヘパリン惹起血小板血栓症と考えられる症例を報告した。症例は EDTA 化血に比べヘパリン化血による MPV の低下度が大きく、プライミング時の回路の加温もしくは未分画ヘパリンから抗凝固薬の低分子ヘパリン・ナファモスタットへの変更で改善が認められた。低温にさらされることにより未分画ヘパリンに含まれる高分子分画のヘパリンが血小板の凝集を促進することが機序として考えられ、選択的トロンビン阻害剤であるアルガトロバンへの変更や抗血小板薬の使用によっても回避しうると考えられた。

謝辞：投稿にあたり、貴重なご意見を賜った、日本医科大学解析人体病理学 清水章先生、日本医科大学循環器科 岡松健太郎先生、東京警察病院リウマチ科 中島敦先生に深謝いたします。

文献

- 1) 木全直樹, 三和奈穂子, 大坪 茂, 堀田 茂, 岩崎富

- 人, 陣内彦博, 菊地 勘, 岡野一祥, 峰島三千男, 秋葉 隆: 血液浄化療法にみられる透析回路凝固の臨床的成因と血栓の病理学的検討. 人工臓器 37: S132, 2008
- 2) 市河三欧, 一之瀬方由利: 慢性維持透析中クリオグロブリン血症を発症し回路内凝固をきたした一例. 東京透析懇談会誌 35: 47-50, 2007
- 3) 大竹喜雄, 林 春幸, 横関一雄, 鹿島 孝, 入江康文, 佐久間光史, 横須賀収, 奥田邦雄: 維持透析患者におけるクリオグロブリン血症とC型肝炎ウイルス感染との関係について. 透析会誌 31: 119-124, 1998
- 4) 倉田義之, 林 悟, 城崎 潔, 小西一郎, 柏木浩和, 富山佳昭: 血小板寒冷凝集素により偽性血小板減少症を呈した4例. 臨床血液 47: 781-786, 2006
- 5) 康 秀男, 阪本親彦, 久村岳央: 寒冷凝集反応異常高値を呈したマイコプラズマ肺炎の一例. OSAKA HEMATOLOGY REPORT 2: 9-12, 2004
- 6) 宮田茂樹, 山本晴子, 河野浩之, 豊田一則, 峰松一夫: ヘパリン起因性血小板減少症. 脳神経外科ジャーナル 17: 909-916, 2008
- 7) 小池 正, 服部 晃: 血小板の基礎と臨床 I. 基礎形態面. 日輸血会誌 28: 35-39, 1982
- 8) Murphy S, Gardner FH: Effect of storage temperature on maintenance of platelet viability-deleterious effect of refrigerated storage. N Engl J Med 280: 1094-1098, 1969
- 9) 上野良樹, 奥 和代: ヘパリンによる血小板凝集作用機序の検討: 低分子ヘパリンおよびヘパリン類似物質との比較. 日血栓止血会誌 17: 175-182, 2006
- 10) 志田 寛, 森本雅己, 井之川孝一, 津金次郎, 池田裕, 杠 英樹, 黒田孝井: 単純低体温下開心術における血小板の変動, 体外循環下開心術との比較. 日小外会誌 14: 869-873, 1978
- 11) 重田 治, 平松祐司, 軸屋知昭, 榊原 謙: 超低体温循環停止手術における血小板機能低下. 日心血管外科会誌 33: 147-151, 2004
- 12) 宮下寛子, 浅田玲子, 和中敬子, 奥宮明子: 寒冷下における血小板凝集能に対するヘパリンおよびアルガトロパンの影響. 神戸大医学保健紀要 20: 47-52, 2004
- 13) 村崎かがり: 抗血小板療法と動脈硬化. 循環 plus 10: 2-6, 2010
- 14) Witko-Sarsat V, Gausson V, Nguyen AT, Touam M, Drueke T, Santangelo F, Descamps-Lastscha B: AOPP-induced activation of human neutrophil and monocyte oxidative metabolism. Kidney Int 64: 82-91, 2003
- 15) 杉本充彦, 水野智寛: 高ずり速度下における血小板-von Willebrand 因子相互作用. モレキュラ-メディシン 41: 1501-1509, 2004
- 16) 渡辺清明: 網血小板の自動算定とその臨床的意義. 医科器械学 69: 35-40, 1999