透析患者における血小板由来マイクロパーティクルの解析

岩田 晶子 安藤 稔 土谷 健 二瓶 宏

東京女子医科大学第4内科

key words : マイクロパーティクル, 血栓症, フローサイトメトリー, Annexin V, P-selectin

〈要旨〉

慢性腎不全患者には、出血傾向を呈する一方で、血栓症に罹患する頻度も高率であるという、一見矛盾する2つの病態が同居している。しかしその原因については十分に検討されていない。これまでに、慢性腎不全患者の血小板では、その表面の糖タンパク (GP IIb・IIIa) 発現の低下があること、それと von Willebrand 因子との interaction の障害から血小板の血管内皮への粘着低下が生じることなどが指摘され、その出血傾向の機序はある程度解明されつつある。しかし、慢性腎不全の血栓形成性に対する血小板の関与については、報告が少ない。

我々は、病的血栓症の発症機序に血小板由来マイクロパーティクル (PMP) が少なからず関係していることを知り、慢性腎不全患者が血栓を形成し易いことには、この PMP の異常が関与しているのではないかと仮説を立てた。そこで血液透析 (HD) 患者 22 例、腹膜透析 (CAPD) 患者 15 例の血中 PMP 数とその質の変化をフローサイトメトリーを用いて、定量的に測定した。また、HD 療法と内シャントの PMP 産生への影響についても検討を加えた。その結果、透析患者の血中 PMP 数は、透析方法のいかんにかかわらず、健常コントロールより増加しており、特に、Annexin V (凝固因子活性化能の指標)、P-selectin (接着能の指標) を発現した PMP が有意に血中に増加していることが判明した。また、こうした PMP 数は HD と CAPD 間では差がなかった。4 時間の HD 治療の間に PMP 数の有意な増加はみられず、シャント血 (内シャント近傍中枢側の脱血用静脈から採取した血液) と、非シャント血 (非シャント肢の肘静脈から採取した血液) の PMP 数の間にも有意差はなかった。

以上より、透析患者血中では PMP 数が増加しており、このため血小板の正常止血機能が低下しているとされる透析患者においても、血栓性疾患の罹患率が高いのであろう。また、PMP 数の増加には内シャントや HD 治療過程の血小板刺激は関与していないと推察された。

Analysis of platelet-derived microparticle in dialysis patients

Akiko Iwata, Minoru Ando, Ken Tsuchiya, Hiroshi Nihei

Department of Medicine IV, Tokyo Women's Medical University

Uremic patients have two opposite features in hemostatic status, that is, bleeding and thrombophilic tendency. Platelet functions for normal hemostasis are impaired, possibly contributing to the bleeding tendency in uremic patients. In contrast, platelet hyperaggregability and hypercoagulability that are commonly observed in uremic patients may be associated with their high incidence of thrombotic diseases. Recent studies suggested that platelet microparticles (PMPs) which are small vesicles with procoagulant activity released from the activated platelets might be relevant to thrombogenesis. This research investigated this hemostatic paradox in uremia by analyzing the characteristics of PMPs in circulation.

The subjects were patients under hemodialysis (HD) or continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD), and healthy controls. The PMPs analysis was performed using a flow cytometer. The procoagulant and adhesive activities of PMPs were specially determined by their expressions of Annexin V and P-selectin, respectively. The influence of HD procedure and arterio-venous (A-V) fistula on PMP formation were also assessed. The counts of total PMPs and PMPs with procoagulant and adhesive activities were statistically greater in both uremic groups, but those PMP counts did not differ between the uremic groups. The HD procedure and A-V fistula did

not affect the PMP formation. In conclusion, the elevated PMP counts may be responsible for the thrombotic tendency in uremia despite impaired platelet function.

結 言

腎不全患者は出血傾向と易血栓症という一見矛盾する出血凝固病態の異常を呈する。このことは、臨床統計上で脳出血、消化管出血とともに脳血栓、心筋梗塞などが透析患者の重要な死亡原因であることから納得される¹⁾。

一般に、出血凝固過程、血栓症発症のメカニズムで主役的役割を果たしているのは血小板である。事実、これまでに腎不全（透析）患者では各種刺激下において、正常な止血血栓形成に不可欠な血小板表面の糖蛋白の発現が低下していることが示されている²⁾。また一方で血小板凝集能の亢進を呈すること³⁾も示されているなど、まだ血小板の性質変化、機能の異常については十分に解明されていない段階である。そこで我々は、腎不全患者における相反するかのような出血凝固系の異常が生じる機序の一端を説明するため、血栓止血学の分野で近年注目を集め、徐々にその役割が解明されつつある血小板由来マイクロパーティクル（PMP）の関与に着目した。

PMP は、血小板が活性化される際に放出される血小板細胞膜の一部であり、その表面には活性化血小板同様リン脂質や各種の接着分子が存在し、凝固因子活性化（procoagulant activity）作用を有すること⁴⁾、血流にのって遠隔的に白血球や内皮細胞に接着して自己の持つ脂質化学伝達物質（PAF、アラキドン酸など）をそれらの細胞に提供（chemical mediator delivery system）している可能性⁵⁾などが指摘されている。また、PMP は、いわゆる“ずり応力”による物理的刺激により血小板からよく放出されることが証明されており、病的血栓症発症のメカニズムとの深い関係が推察されている⁶⁾。臨床的には、脳血管障害、急性心筋梗塞、不安定狭心症、糖尿病などでその血中レベルが高いことが示されている⁷⁻¹⁰⁾。我々は、動脈硬化、高血圧、カルシウム代謝などの異常を伴い、種々の尿毒素の共存する末期腎不全（透析）患者においては、たとえ血小板の正常止血機能は低下しているとしても、PMP の量的・質的異常が存在することにより病的血栓症のリスクが高まるのではないかと仮説を立てた。そこで、本研究では安定した非糖尿病性血液透析（HD）患者、持続携帯式腹膜透析（CAPD）患者を対象に、これらの患者血中の PMP の量的・質的違いの有無を健常コン

表 1 透析患者の臨床像

	HD 患者 (n=22)	CAPD 患者 (n=15)
年齢（歳）	48±12	48±7.6
透析年数（年）	11±6.6	5.4±3.9*
rHuEPO 療法	全例施行	全例施行
抗血小板療法	全例未施行	全例未施行
ヘマトクリット（%）	31.2±4.1	28.8±3.6
血小板数（×10 ⁹ /L）	164±54.3	193±33.5*
血清アルブミン値（g/dl）	3.4±0.82	3.1±1.4
血清尿素窒素値（mg/dl）	74.1±10.4	59.9±8.7*
血清クレアチニン値（mg/dl）	11.1±3.7	9.9±3.8

数値は平均値±標準偏差で表示。

* p<0.05 vs HD 患者

トロールと比較検討した。PMP の測定はフローサイトメトリ法により定量的に行った¹¹⁾。また、特に臨床的に重要と思われる PMP の持つ凝固因子活性化能（procoagulant activity）と接着活性の程度については、それぞれ Annexin V および P-selectin（CD62P）の発現量で評価した¹²⁾。

I. 対象および方法

1. 対 象

慢性腎不全状態と PMP との関係性を明らかにするため、本研究では糖尿病を有さず抗血小板療法を施行されていない外来通院中の安定した HD 患者 22 名（ポリスルホン膜使用 14 名、PMMA 膜使用 4 名、セルロース・トリアセート膜使用 4 名）、CAPD 患者 15 名（全例バクスター社システム II 使用）、健常成人 17 名の血中 PMP 数を調べた。遺伝子組換え型エリスロポエチン（rHuEPO）療法は全症例に施行されていた。対象患者の臨床的特徴を表 1 にまとめたが、健常コントロール（42±8.3 歳）と HD、CAPD 患者とは年齢一致していた。本研究施行前に全対象から informed consent を得た。

2. 方 法

血液サンプリングは HD 患者では各週の初回透析開始時に内シャント（動静脈吻合）血管の返血用静脈から採取し、CAPD 患者では外来受診日に肘部静脈から採取した。全血 2 ml を 200 μ l の EDTA-ACD 液を含む真空採血管に採取し、通常通り、多血小板血漿（PRP）を調整（180 g で 20 分間、室温遠心）した。15 μ l の PRP を 0.1% EDTA 生理的食塩液で 50 μ l に希

図1 a: GPIb 抗体陽性細胞を FSC-SSC 画面に展開したフローサイトメトリ図. 下方の細胞集団 (R1) が PMP, その上の細胞集団 (R2) は血小板である. b: 上記 PMP 細胞群の P-selectin の陽性率を示すヒストグラム. 図中のバー (M1) の部分が陽性部分である (M1 より左方のヒストグラムはバックグラウンドレベルである).

釈した後, FITC-GPIb および PE-Annexin V または PE-P-selectin (CD62P) 抗体 (各 2 μ l) と暗所で室温下に 30 分間インキュベートした後, フローサイトメーター (FACS Calibur, Becton Dickinson 社) にかけて, 解析ソフト CellQuest (Becton Dickinson) により解析した. まず血小板および PMP を認識する特異抗体である FITC-GPIb でラベルされた細胞を Side light scatter (SSC)-Fluorescence-1 (FL 1) 画面上でゲートし, その細胞集団を Forward light scatter (FSC)-SSC 画面に展開することで, PMP の細胞集団と血小板の細胞集団を細胞サイズにより区別した (図 1 a). 次に, この PMP の細胞集団の総数とその Annexin V または CD62P 陽性率をヒストグラム (図 1 b) から求めた. Annexin V および P-selectin 陽性 PMP の絶対数は, 総 PMP 数にそれらの陽性率 (%) を掛け 100 で除した値として求めた. 測定値の定量化のため, フローサイトメーター測定時にあらかじめサンプル内に 30000 個のラテックスビーズ (SPHERO Fluorescent Particles, 0.7~0.9 μ m) を混和しておき, 各サンプル解析時間をフローサイトメーターが, ラテックスビーズを 300 個吸引する時間に一定化した¹¹⁾. 抗 FITC-GPIb 抗体¹³⁾は野村昌作博士 (関西医科大学) のご好意により供与されたものを用い, PE-Annexin V は Pharmingen 社から, PE-CD62P は Beckton Dickinson 社から購入した.

II. 結 果

1. 透析患者の血中 PMP 数

HD 患者, CAPD 患者, 健常コントロールの血中総 PMP, Annexin V 陽性 PMP, P-selectin 陽性 PMP 数を図 2 に示した. 血中総 PMP 数, Annexin V 陽性

PMP および P-selectin 陽性 PMP 数は, HD, CAPD いずれの透析患者においてもコントロールと比べ有意に高値を呈した. 特に, Annexin V 陽性 PMP は, HD 群で高値であり, P-selectin 陽性 PMP 数は CAPD 群で高値であった. しかし, HD と CAPD 間ではいずれの PMP 数とも有意差はなかった. HD, CAPD, コントロールいずれの群においても総 PMP, Annexin V 陽性 PMP, P-selectin 陽性 PMP 数の間には, それぞれ相互に強い有意相関関係があった. HD の結果を図 3 に示した. 血小板数は, いずれの対象群においても総 PMP, Annexin PMP, P-selectin PMP 数と有意な相関関係を持たなかった.

2. HD 療法中の血小板数と総 PMP 数の変化

HD 療法が血中 PMP 数の増加に影響を及ぼすかを知らるために, HD 中の血小板数と総 PMP 数を HD 開始直前, 開始後 5 分, 30 分, 1 時間, 2 時間, 4 時間の 6 ポイントで測定し, 結果を表 2 に示した. 検討した 3 症例のうち 2 症例はポリスルホン膜のダイアライザー (フレゼニウス川澄株式会社), 1 症例は PMMA 膜のダイアライザー (東レ株式会社) が用いられており, 抗凝固剤としてヘパリンが時間あたり 600~800 単位で持続注入されていた. 血液サンプリングはすべてシャント血管の脱血側を用いた. 4 時間の HD 療法中には, 血小板数も総 PMP 数も有意な増減を示さなかった.

3. HD 患者におけるシャント血と非シャント血での総 PMP 数の比較

4 例の HD 患者で内シャント脱血用血管 (吻合部近傍部) からサンプリングした血液と非シャント肘静脈よりサンプリングした血液の総 PMP 数を測定し, 内シャントの PMP 産生に及ぼす影響を検討した. シャント血液の総 PMP 数は, 4544 ± 1290 , 非シャント

図2 a : HD, CAPD, 健常コントロールの総 PMP 数の比較.
 b : HD, CAPD, 健常コントロールの Annexin-V 陽性 PMP 数の比較.
 c : HD, CAPD, 健常コントロールの P-selectin 陽性 PMP 数の比較.
 * $p < 0.05$ vs コントロール
 ** $p < 0.01$ vs コントロール

表2 血液透析中の血小板数と PMP 数の変化

	透析前	透析後 5 分	透析後 30 分	透析後 1 時間	透析後 2 時間	透析後 4 時間
血小板数 $\times 10^9/L$ (n=3)	228 $\pm$ 41.4	249 $\pm$ 61.2	217 $\pm$ 44.7	219 $\pm$ 41.7	253 $\pm$ 50.6	240 $\pm$ 42.9
PMP 数 (n=3)	6186 $\pm$ 524.7	5399 $\pm$ 809.0	6860 $\pm$ 1091	6112 $\pm$ 580.7	7815 $\pm$ 774.8	6692 $\pm$ 517.3

数値は平均値 $\pm$ 標準誤差で表示.

血液の総 PMP 数は 4228.5 ± 839.1 であり, 両者間には, 有意な差はなかった.

III. 考 案

本研究結果から, 非糖尿病性の透析患者では, HD, CAPD の modality (透析方法) にかかわらず, 血中には Annexin V および P-selectin 陽性の PMP がコントロールに比して有意に増加していることが判明した. 換言すれば, 透析患者の血液は, PMP という凝固因子活性化能や接着活性の高い血栓形成誘導性に富む微粒子を多く含んでいるということである. また, 治療過程で血小板を刺激する可能性を持つ HD 療法や内シャントの存在は, こうした PMP 産生には関与が

薄いことも明らかになった.

PMP の持つ臨床的意義については, 集積されたデータが不十分であり, 未だ確定的なものはない. しかし, これまでに, 血中 PMP 数が糖尿病患者, 急性心筋梗塞患者, 不安定狭心症患者, 脳血管障害の患者などで上昇していることが示され, PMP がこうした血栓性疾患の発症機序に少なからず関与している可能性, または血栓症のリスクファクターの一つであるとする見解が有力である⁷⁻¹⁰⁾. Nomura ら¹⁴⁾は, 論文の一部として腎不全患者において血中 PMP 数 (本論文の総 PMP 数に当るもの) が増加していることを報告しているが, 対象とした腎不全患者の詳細, 例えば, 糖尿病患者含有率や抗血小板薬使用の有無, 維持透析患者をどの程度含んでいたのか, またその modality

図3 血液透析患者における、PMP, Annexin V 陽性 PMP, P-selectin 陽性 PMP の相関関係。PMP と Annexin V 陽性 PMP: $r=0.884$, $p<0.001$, PMP と P-selectin 陽性 PMP: $r=0.862$, $p<0.001$

(■) は Annexin V (+) PMP を表す。
(○) は P-selectin (+) PMP を表す。

などが不明である。彼らも別の論文で明らかにしているように、糖尿病自体の病態¹⁵⁾や抗血小板薬(特にシロスタゾールなど)の使用は血中 PMP 数に影響する¹⁶⁾ことから、本論文のデータは、対象の設定が明確であり、より信頼性に優る慢性腎不全患者における PMP の情報を提供できたと考える。

次に、なぜ透析患者では PMP 数が増加しているかの疑問に若干の検討を加えた。近年の *in vitro* 実験から“ずり応力”が PMP 産生の強い刺激になりうるということが知られている⁹⁾。そこで、とりあえず検証すべき点として次の2つを取りあげた。

(1) HD 療法中に血小板に加わると思われる物理的刺激が人工心肺施行時¹⁷⁾と同様に血中 PMP 数の増加に寄与しているか、(2) 内シャントを通過する際の刺激が同様に HD 患者の慢性的 PMP 産生刺激になっているか¹⁸⁾である。(1)を検証するために、HD 中の脱血側(ダイアライザー前)から血液をサンプリングし、開始直後を含めて HD 終了まで経時的に PMP 数をカウントしたところ、少なくとも HD 直後(4時間)の時点までは、患者体内の PMP 数の有意な上昇はなく、HD 療法そのものが患者流血中の PMP 数に影響を与えていた可能性は低い。今回はダイアライザー前後での PMP 数の変化については検討していないが、少なくとも図2に示した HD 患者の定常的な血中 PMP

数の増加に HD 療法が関係していた可能性は低い。この点で、人工心肺と HD 療法では PMP 産生にかかわる血小板刺激の質およびその程度は異なるものと思われる。また、HD と CAPD 患者間で総 PMP 数、Annexin V、P-selectin 陽性 PMP 数のいずれにも差がないことから長期的にも HD 療法そのものが PMP 産生に影響している可能性は否定的である。さらに、HD 療法中、特に開始 30 分頃に血小板数が有意に減少するとの報告¹⁹⁾もあるが、これは多分に使用された透析膜の材質の性状に関わるもののようである。本実験中血小板数にその傾向は認められておらず、使用されたダイアライザー膜(ポリスルホン膜と PMMA 膜)の性状が少なからず関係していたことは否定できない。血小板数同様に使用透析膜と HD 中 PMP 数の変動についても症例数を増やして詳しく検討を加える必要があると考えられる。(2)に関しては、シャント血液、非シャント血液の含有する総 PMP 数に変化のないこと、HD 患者と CAPD 患者(全例とも動静脈吻合を有していない)間で PMP 数に差がないことから内シャントが透析患者の PMP 産生に影響している可能性も低いと思われる。

以上、今回の検討から、透析患者(慢性腎不全患者)における PMP 数の増加に、尿毒症の複雑な病態そのものが関係している可能性が高いと考えられるが、今回の対象患者は全例 rHuEPO 補充療法を受けており、血小板産生と活性を刺激することが知られる rHuEPO²⁰⁾が透析患者の PMP 増加に関与した可能性は否定できない。この件は、今後に残された重要な検討課題の一つであろう。現時点では、*in vivo* での PMP 産生刺激因子の検討は血液病学、血栓止血学の分野でも十分には行われておらずこれ以上の推論は差し控え、今後の PMP 研究の発展に期待したい。

結 語

透析患者では、軽度の血小板減少を呈する²¹⁾ことに加え、止血に必要な血小板機能は低下しており出血傾向を呈し易い^{22,23)}。一方で、PMP という血栓形成性粒子が透析患者の流血中に増加しており、これが透析患者に高頻度にみられる動脈血栓症の発症に少なからず関係している可能性がある。こうして、透析患者は出血と血栓傾向という一見矛盾する病態を併せ持つことになる可能性が推測される。

謝辞：フローサイトメトリー検査での技術的ご協力を頂いた大塚製薬第一創薬研究所、小関 靖氏に深謝致し

ます。

文献

- 1) 日本透析医学会統計調査委員会：わが国の慢性透析療法の現況（1998年12月31日現在）. p 105, 日本透析医学会, 1999
- 2) Gawaz M, Dobos G, Spath M, Schollmeyer P, Gurland HJ, Mujais SK : Impaired function of platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa in end-stage renal diseases. *J Am Soc Nephrol* 5 : 36-46, 1994
- 3) Viener AM, Aviram M, Better OS, Brook JR : Enhanced in vitro Platelet aggregation in hemodialysis patients. *Nephron* 43 : 139-143, 1986
- 4) Sims PJ, Faioni EM, Wiedmer T, Shattil SJ : Complement proteins C5b-9 cause release of membrane vesicles from the platelet surface that are enriched in the membrane receptor for coagulation factor Va and express prothrombinase activity. *J Biol Chem* 263 : 18205-18212, 1988
- 5) Iwamoto S, Kawasaki T, Kambayashi J, Ariyoshi H, Monden M : Platelet microparticles : a carrier of platelet-activating factor? *Biophys Res Commun* 218 : 940-944, 1996
- 6) Miyazaki Y, Nomura S, Miyake T, Kagawa H, Kitada C, Taniguchi H, Komiyama Y, Fujimura Y, Ikeda Y, Fukuhara S : High shear stress can initiate both platelet aggregation and shedding of procoagulant containing microparticles. *Blood* 88 : 3456-3464, 1996
- 7) Geiser T, Sturzenegger M, Genewein U, Haerberli A, Beer JH : Mechanisms of cerebrovascular events as assessed by procoagulant activity, cerebral microemboli, and platelet microparticles in patients with prosthetic heart valves. *Stroke* 29 : 1770-1777, 1998
- 8) Gawaz M, Neumann JF, Ott I, Schiessler A, Schomig A : Platelet function in acute myocardial infarction treated with direct angioplasty. *Circulation* 93 : 229-237, 1996
- 9) Singh N, Gemell CH, Daly PA, Yeo EL : Elevated platelet-derived microparticle levels during unstable angina. *Can J Cardiol* 11 : 1015-1021, 1995
- 10) Nomura S, Suzuki M, Katsura K, Xie GL, Miyazaki Y, Miyake T, Kido H, Kagawa H, Fukuhara S : Platelet-derived microparticles may influence the development of atherosclerosis in diabetes mellitus. *Atherosclerosis* 116 : 235-240, 1995
- 11) Combes V, Dignat-George F, Mutin M, Sampol J : A new flow cytometry method of platelet-derived microparticle quantitation in plasma. *Thrombosis and Haemostasis* 7 : 212-224, 1997
- 12) Dachary-Prigent J, Freyssinet J-M, Pasquet J-M, Carron J-C, Nurden AT : Annexin V as a probe of aminophospholipid exposure and platelet membrane vesiculation : A flow cytometry study showing a role for free sulfhydryl groups. *Blood* 81 : 2554-2565, 1993
- 13) Yanabu M, Ozaki Y, Nomura S, Miyake T, Miyazaki Y, Kagawa H, Yamanaka Y, Asazuma N, Satoh K, Kume S, Komiyama Y, Fukuhara S : Tyrosine phosphorylation and p72^{syk} activation by an anti-glycoprotein Ib monoclonal antibody. *Blood* 89 : 1590-1598, 1997
- 14) Nomura S, Shouzu A, Nishikawa M, Kokawa T, Yasunaga K : Significance of platelet-derived microparticles in uremia. *Nephron* 63 : 485, 1993
- 15) Nomura S, Komiyama Y, Miyake T, Miyazaki Y, Kido H, Suzuki M, Kagawa H, Yanabu M, Takahashi H, Fukuhara S : Amyloid β -protein precursor-rich platelet microparticles in thrombotic disease. *Thrombosis and Haemostasis* 72 : 519-522, 1994
- 16) Nomura S, Shouzu A, Omoto S, Hayakawa T, Kagawa H, Nishikawa M, Inada M, Fujimura Y, Ikeda Y, Fukuhara S : Effect of cilostazol on soluble adhesion molecules and platelet-derived microparticles in patients with diabetes. *Thromb Haemost* 88 : 388-392, 1998
- 17) Miyamoto S, Marcinkiewicz C, Henry Edmunds L Jr, Niewiarowski S : Measurement of platelet microparticles during cardiopulmonary bypass by means of captured ELISA for GPIIb/IIIa. *Thromb Haemost* 80 : 225-230, 1998
- 18) Ben Driss A, Benessiano J, Poitevin P, Levy BI, Michel JB : Arterial expansive remodeling induced by high flow rates. *Am J Physiol* 272 : H 851-H 858, 1997
- 19) 新井浩之, 松崎竜児, 矢吹亜希子, 難波香織, 三浦 明, 杉浦清史, 小篠 榮, 鈴木利明 : HPM 型ビタミン E 固定化再生セルロース膜 (CLEE15N) の生体適合性および性能評価. 腎と透析 40 別冊ハイパフォーマンスメンブレン '96 : 118-122, 1996
- 20) Stohlawetz PJ, Dzirlo L, Hergovich N, Lackner E, Mensik C, Eichler HG, Kabrna E, Geissler K, Jilma B : Effects of erythropoietin on platelet reactivity and thrombopoiesis in humans. *Blood* 95 : 2983-2989, 2000
- 21) 岩本祐介, 安藤 稔, 土谷 健, 二瓶 宏 : 透析患者の血小板減少症の解析. 日腎会誌 41 : 712-718, 1999
- 22) Remuzzi G : Bleeding in renal failure. *Lancet* 1 : 1205-1208, 1988
- 23) Escolar G, Cases A, Bastida E, Garrido M, Lopez J, Revert L, Castillo R, Ordinas A : Uremic platelets have a functional defect affecting the interaction of von Willebrand factor with glycoprotein IIb-IIIa. *Blood* 76 : 1336-1340, 1990