シンポジウム Plasmapheresis その問題点と展望

3. 新鮮凍結血漿中の微小凝集物による肺小動脈塞栓の証明とその防止策について

愛媛大学医学部第三内科 太田康幸 赤松興一

緒 言

劇症肝炎患者に対する血漿交換療法では、血中に増加した毒性物質の排除と、欠乏因子（アルブミン、凝固因子など）の補給を同時に行なう目的で置換液として新鮮凍結血漿（FFP）を用いる。FFPを置換液とした際の合併症としては、これまでに輸血後肝炎、クエン酸中毒、アレルギー反応などが報告されているが、大量輸血に際して、肺の微小塞栓の原因となる血漿中の微小凝集物（MA）は、FFP中には極めて少ないため安全に投与できると考えられてきた¹⁾²⁾。

しかし、実際にFFPを融解してみると、なかには凝集リボ蛋白による脂濁血漿のほか、肉眼でも確認できるフィブリン様凝集物を含むものがある。劇症肝炎に対する血漿交換療法では、1日に約5lに及ぶ大量の血漿を連日3回以上交換することが多いため、FFP中のMAの濃度がたとえ低くても、無視できない量のMAが患者に輸注され、肺の微小循環の障害を介して、肺浮腫や、肺炎合併の危険性が増すことが予測される。

著者らは、FFP中のMAにより、肺の微小塞栓が生じることを動物実験で証明し、臨床例では、FFP中のMAを除去して血漿交換を行なうことにより、肺浮腫ならびに肺炎合併率を低下させ得る成績を得たので、その概要を報告する。

対象ならびに方法

過去6年間に当科へ入院した肝性昏睡Ⅲ～Ⅳ度の劇症肝炎17例、亜急性肝炎4例のうち、血漿交換療法を施行されたのちに死亡し、剖検された14

例（劇症肝炎11例、亜急性肝炎3例）を対象とした。なお、昭和59年度厚生省難治性の肝炎調査研究班、劇症肝炎分科会で集計された劇症肝炎剖検61例を参考資料として用いた。

血漿交換療法は、膜分離法により患者血漿を分離し、1日1回の頻度で施行し、1回あたりFFP約5l(60単位)を置換液として使用した。施行回数は、1例につき2～17回（平均8.1回）に及んだ。置換液として用いたFFPの汙過は、著者らがすでに報告した方法によつた。すなわち、孔径0.2μmのハローファイバー型PVA膜(plasmacure, クラレメデカル社製)あるいはCA膜(plasmaflo, 旭メデカル社製)でFFPを汙過して投与した。

血漿交換終了後、膜に吸着されたMAの測定は、膜の内外を大量の水で洗浄し、洗浄水に蛋白質が検出されなくなつた時点で、1NのNaOHで膜を灌流して、灌流液中の蛋白質をLowry法で測定した。汙過器内に残留した血漿約50mlからのMAの分離は、血漿を10000×g 30分遠心し、上層に浮上した凝集リボ蛋白層と下層に沈殿したフィブリン様物質をそれぞれ別々に生理的食塩水に浮遊させ、同様の遠心操作を4回繰り返して洗浄し、純粋な凝集リボ蛋白(LA)とフィブリン様凝集物(FA)を得た。LAおよびFAの一部はクロラミンT法により¹²⁵Iで標識し、それぞれ50μCi/10mg中性脂肪(¹²⁵I-LA)、50μCi/5mg蛋白質量(¹²⁵I-FA)となるように調整した。

基礎実験として、体重300g前後のSprague-Dawley系雄性ラット11匹を用い、そのうち2匹に

Symposium on plasmapheresis. 3. Microaggregates in the fresh-frozen plasma may cause pulmonary microembolism following exchange plasma transfusion.

Yasuyuki OHTA and Kouichi AKAMATSU, The Third Department of Internal Medicine, Ehime University School of Medicine, Ehime

は ^{125}I -LA $50\mu\text{Ci}$, ^{125}I -FA $50\mu\text{Ci}$ をそれぞれ生理的食塩水1mlに浮遊させたのち、尾静脈より注入し、他の1匹には対照として ^{125}I -Rat albumin $50\mu\text{Ci}$ を静注した。3時間後にガンマカメラを用いて全身シンチグラフィーを行ない、放射活性の体内分布を調べた。また別の2匹に、同様に ^{125}I -LAと ^{125}I -FAを静注し、5分後にドライアイスアセトン中に投入して急速冷凍し、マイクロームで厚さ $30\mu\text{m}$ の全身の凍結切片を作製した。各切片を凍結乾燥したのち、X線フィルムに密着させ、48時間後に現像し、全身のオートラジオグラムを作製した。

MA静注後肺への分布については、組織化学的に検索した。ラット1匹にLA 50mg (中性脂肪)/ kg 体重、5匹にFA 25mg (蛋白質)/ kg 体重をそれぞれ静注し、LAおよびFA静注ラット各1匹は5分後に開胸し、肺を摘出した。FA静注ラットはその後6時間ごとに1匹ずつ屠殺して肺を摘出した。摘出肺は一部をドライアイス・アセトン・イソペンタンで凍結し、他の一部をホルマリン固定後パラフィンで包埋した。

蛍光抗体直接法による肺のフィブリン塞栓の証明には、凍結標本のクリオスタット切片 ($6\mu\text{m}$) を冷アセトンで固定後、FITC標識抗ヒトフィブリノーゲン家兎 γ -グロブリンを重層し、ヒトフィブリリンの検出を行なった。反応の特異性は、充分量のヒトフィブリノーゲンを標識抗体に加えて沈降させ、その上清で染色されないことで確かめた。また、パラフィン切片についても、酵素抗体間接法によるフィブリン塞栓の証明を行なった。なお、凝集リボ蛋白による塞栓の証明には、肺の凍結切片についてSudan III染色を行なった。

成 績

融解直後のFFP中のMAをCoulter counter (Model TA-2) を用いて分析したところ、FFP中のMAは粒子径 $20\mu\text{m}$ 以下のものが多く、粒子容積でみても径 $20\mu\text{m}$ 以下のものが全MAの容積の約90%と大部分を占めていた。FFP 5lを濾過したのち、濾過器内に残留した約50mlのMA含量の多い血漿を $10000\times g$ 30分遠心すると、上層にLA、下層にFAが沈殿した。フィブリン様の外観を呈する

表1. フィルター内凝集物の蛋白および中性脂肪

フィルター	濾過血漿量 (l)	フィルター内の凝集物		フィルターに捕捉された蛋白 (mg)
		沈澱蛋白 (mg)	脂肪腫TG (mg)	
PVA (0.2~0.4 μm)	5.9	255	520	837
PVA (0.2~0.4 μm)	5.1	-	-	920
CA (0.2~0.4 μm)	5.2	-	-	475

FAを、 37°C 24時間孵置しても、再溶解は認められなかった。濾過器に吸着された不溶性蛋白質の量は、表1に示すごとく約 800mg 程度であり、濾過器の回路内に残留したMAの蛋白量と中性脂肪量を合わせると、約 1.5g であった。

FAにウロキナーゼを加え、 37°C で孵置すると、約60分で溶解し、フィブリンの定性反応が強陽性で、FAは主としてFFP中に析出したフィブリンより成ることが推定された。

MA (LAとFA) を含むFFPが大量に静脈内に投与されると、まず心臓を経て、肺に捕捉されることが予測される。そこで、LA, MAをそれぞれ ^{125}I で標識し、 ^{125}I -LA, ^{125}I -FAをそれぞれ $50\mu\text{Ci}$ ずつラット尾静脈より静注して、3時間後に全身シンチグラフィーを行なつて得られたシンチグラムを、ラットアルブミン静注後のシンチグラムと比べると、アルブミンの放射活性は、3時間後にはほぼ全身に分布したが、LAおよびFAの放射活性は、ラットの中心臓器 (心、肺、肝、脾など) に相当する部位に集中していた。以上のように、シンチグラムでは放射活性の集積臓器が明らかに区別できなかった。そこで、 ^{125}I -FA, ^{125}I -LAを静注5分後にラットを屠殺して、全身オートラジオグラフィーを行なった。結果は図1に示すように、LA, FA共にまず肺に捕捉されるが、肺を通過したLAおよびFAは、ついで肝・脾に代表される網内系組織に捕捉されることが確かめられた。

次に、肺に捕捉されたMAが実際に肺の微小塞栓の原因になっているか否かを調べる目的で、LAおよびFAをラットに静注後、直ちに肺を摘出し、組織化学的検索を行なった。図2に示すように、蛍光抗体直接法および酵素抗体間接法により、フィブリン塞栓が実際に生じていることが確

図 1. ^{125}I 標識微小凝集物静注後のオートラジオグラム

認された。また、LA 静注後の肺では、Sudan III 染色により、脂肪塞栓を証明した。なお、FA 静注後 6 時間ごとに屠殺して、ラット肺のフィブリン塞栓の推移を調べたところ、24 時間後にはフィブリン塞栓は全く消失した。以上の成績から、FFP 中にも MA が認められ、その主成分は凝集リボ蛋白とフィブリンと考えられ、大量の FFP が輸注されると、MA による肺の微小塞栓を生ずることが動物実験で証明された。

次に、この FFP 中の MA を汙過により除去して血漿交換を行なうことが、有効か否かを調べる目的で、FFP を汉過しないで血漿交換を行なつた 4 例と、汉過を行なつた 10 例の剖検肺について肺炎合併の有無と肺重量を調べた。汉過を行なわなかつた 4 例では、全例が肺炎を合併し、肺の総重量は $1640 \pm 310\text{g}$ であつた。一方、汉過を行なつた 10 例では、2 例のみが肺炎を合併し、肺重量も $972 \pm 435\text{g}$ で、明らかに肺の病変は軽度であつた（表 2）。この成績は、1984 年度厚生省難治性の肝炎調査研究班の成績からも確かめられた（表 3）。

考 案

Swank (1961)³⁾ が保存血中に白血球および血小

図 2. フィブリン様凝集物静注後屠殺ラット肺の免疫組織学的検討

A: FITC 標識抗ヒトフィブリノーゲン抗体による蛍光抗体直接法

B: 酵素抗体間接法 (PAP 法)

矢印は肺の細動脈におけるフィブリン塞栓を示す。

表 2. 血漿交換療法を施行した死亡例における肺重量 (昭和 55 年 1 月～昭和 59 年 12 月)

症例	年齢	性	診 断	原因	血漿交換 (回)	肺炎	剖 検 時 所 見		計	
							肺重量 (g)	左		右
FFP濾過 (-)										
1	KN	28	男	劇症肝炎急性性型	B	4	+	700	620	1640±310
2	HK	55	女	急性性型	NANB	2	+	1000	1050	
3	ST	39	男	急性性型	〃	15	+	880	650	
4	TM	48	男	急性性肝炎	B	4	+	570	1100	
FFP濾過 (+)										
5	KM	58	男	劇症肝炎急性性型	B	6	-	650	480	P<0.05
6	HO	48	男	〃	〃	3	-	350	400	
7	CM	58	女	〃	NANB	9	-	370	490	
8	KI	42	女	急性性型	〃	17	-	340	285	
9	AO	16	男	〃	〃	15	+	1230	850	972±435
10	FT	68	女	〃	〃	8	-	240	390	
11	EM	52	女	〃	〃	3	+	330	520	
12	NH	41	男	〃	B	6	-	462	660	
13	MT	58	女	急性性肝炎	NANB	3	-	370	660	972±435
14	SK	62	女	〃	〃	2	-	290	350	

板からなる凝集物の存在を初めて記載して以来、保存血中の凝集物に関する報告は多い。大量輸血を行なう場合は、この凝集物が肺の微小塞栓の原

表3. 新鮮凍結血漿のフィルター使用と肺病変

	0.2μフィルター	通常フィルター (孔径20~40μm)	非使用	通常フィルター+非使用
症例数	11	29	32	61
交換回数(M±D)	6.9±5.1	5.0±4.0	6.7±6.1	5.9±5.2
転帰(生/死)	2/9	6/22	9/23	15/45
臨床症状				
肺炎 (+/-)	0/11	9/15*	8/18	17/33*
剖検所見				
肺炎 (+/-)	0/9	5/8	10/4**	15/12*
肺うつ血 (+/-)	8/1	9/3	14/1	23/4
フィブリン血栓 (+/-/?)	0/2/6	0/7	1/6/5	1/13/5

*p<0.1, *p<0.01 vs 0.2μフィルター

〔1984年度厚生省難治性肝炎調査研究会班
劇症肝炎分科会(岡 博会長)全国集計〕

因となり、循環不全を来すことが予想される¹⁾が、その後の研究^{4)~6)}によると、凝集物が現実肺の微小循環を障害することが証明されている。これに対して、FFP中には凝集物が少なく、従って安全に投与できると考えられているのが現状である¹²⁾。しかし、実際にFFPを融解すると、かなりの量のMAが含まれており、肉眼でも凝集物が観察される血漿もある⁷⁾。また、脂濁血漿もしばしば認められ、凍結融解によりリボ蛋白は凝集するため、凝集リボ蛋白は生理的なカイロミクロンよりも大きな粒子になっていると考えられる。

著者らが今回得た成績では、5lのFFP中のMAの総量(蛋白と中性脂肪)は概算で1.5gあり、動物実験の結果から推定して、このMAが肺に捕捉されると、その処理に24時間近くを要するものと推定される。したがって、劇症肝炎に対する血漿交換療法のように、大量のFFPを用いて連日日本療法を施行する場合には、FFP中のMAによる合併症は無視できないと思われる。

血漿交換療法は、一般に比較的安全に施行し得て、致命的合併症は少ないとされている²¹⁾。Huestis⁹⁾によれば、欧米における約14000回の血漿交換施行例についての検討から、本療法による死亡率は、約10000回に3例程度であろうと言われる。しかも、彼が集計した42例の死因をみると、その内30例には置換液としてFFPが使用されて

おり、うち14例は呼吸器病変で死亡している。また、副腎皮質ステロイドなど免疫抑制療法を受けている急性進行性糸球体腎炎患者に、血漿交換療法を行なうと、重症の呼吸器合併症を来すといわれている¹⁰⁾。以上の呼吸器合併症の原因には、FFP中の凝集物が関与している可能性があり、白血球、血小板の破片の混入により産生される抗体による免疫反応も同時に関与している可能性がある。劇症肝炎の場合には、諸種の免疫機能が著明に低下しており、生体防御機構の破綻を来していることは周知のとおりである。しかも副腎皮質ステロイドがしばしば投与されるので、細菌感染に対する危険性が高い。

したがって、生体防御反応の低下した患者に大量のFFPを用いて血漿交換を頻回に行なう場合には、1) FFP中のMAによる肺循環障害の防止、2) 白血球、血小板の混入による抗体産生の防止、3) 大量のFFPを扱うために混入する可能性の大きい細菌を除去する目的で、血漿を濾過して輸注する必要があると考える。

結 論

新鮮凍結血漿のなかには、凝集リボ蛋白およびフィブリンを主成分とする微小凝集物が存在し、大量の血漿交換を行なう場合には、この微小凝集物が肺の微小血栓の原因となることを動物実験で立証した。

新鮮凍結血漿中の微小凝集物を、孔径0.2μmのホローファイバーで除去し、劇症肝炎および亜急性肝炎14例に対して、血漿交換療法を1回5lずつ、平均8.1回施行し、剖検肺について調べた結果、FFPの濾過は、肺炎の合併、肺重量の増加を明らかに抑制した。

文 献

- 1) Gervin AS, et al: The source and removal of microaggregates in aged human blood and human blood components. Surg Gynecol Obst 141: 582, 1975.
- 2) Fray-Wettstein, M and Hoppler R: Mikroaggregat in Lageblut. Schweiz Med Wschr 106: 1436, 1976.
- 3) Swank RL: Alteration of blood on storage. New Engl J Med 265: 728, 1961.

-
- 4) Connel RS and S wank RL: Pulmonary microembolism after blood transfusions; an electron microscopic study. *Ann Surg* 177: 40, 1973.
 - 5) Van Zandwijk N: Pulmonary injury elicited by blood; an experimental study. Thesis, Rodopi, Amsterdam, 1976.
 - 6) McNamard JJ, et al: Effect of debris in stored blood on pulmonary microvasculature. *Ann Thorac Surg* 14: 133, 1972.
 - 7) Akamatsu K, et al: Pulmonary microembolism due to the exchange transfusion of fresh-frozen plasma containing microaggregates. In: Oda, T. (ed.): *Therapeutic Plasmapheresis (III)*, Schattauer, Stuttgart, 1983, p95.
 - 8) Lafferty L and Cotton LT: Hazards of apheresis. *Lancet* II: 1159, 1982.
 - 9) Huestis DW: Mortality in therapeutic haemapheresis. *Lancet* I: 1043, 1983.
 - 10) Wing EJ, et al: Infectious complications with plasmapheresis in rapidly progressive glomerulonephritis. *JAMA* 28: 2423, 1980.
-