

赤血球輸血による酸素運搬能の変化

——PEPの効果——

松山博之^{*}，浜崎直孝^{**}，吉武潤一^{*}

1. はじめに

生体は、赤血球減少、ヘモグロビン減少による酸素運搬能低下に対して、急性・慢性の適応を示すが、手術時の出血にともなう赤血球減少にたいしては、それが大量になれば、どうしても輸血という方法で対処することが必要となる。一方、輸血に伴う合併症を避けるため輸血量をできるだけ少なくする、あるいは、他人の血液を輸血しない自家血輸血法などが検討、応用されている。しかし、大量輸血あるいは自家血輸血に伴う赤血球の機能変化についてはあまり検討されていない。我々は、自家血輸血症例の赤血球機能として、酸素運搬能の変動を酸素解離曲線より得られたP50および赤血球内2,3-DPG量を指標として、viabilityを赤血球内ATP量を指標として測定したので報告するとともに赤血球酸素運搬能賦活剤としてのフォスフォエノールピルビン酸(PEP)の臨床応用について言及したい。

2. 対象および方法

1) 対象

対象は、特発性脊椎側弯症にてハリントン手術を施行された12才から15才(平均13.8才)、体重27kgから50kg(平均40.4kg)の5症例とした。表1に対象例の背景を示す。なお、5症例のうち4症例は、術前1～2年かけて自家血を2000～3000ml採取し、冷凍赤血球と新鮮凍結血漿として保存していた。術中出血量は平均3300mlであり自家血の準備のなかった1症例以外は、術中銀行血の使用は必要なかった。

	症例 1	症例 2	症例 3	症例 4	症例 5
性	M	M	F	F	F
年齢	16	15	12	13	13
体重(kg)	43	47	35	27	50
自家血の有無	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
出血量(ml)	3200	3500	4500	2800	2500
回収洗浄時間 1回目(h)	3	3	2	2.5	3
2回目	5	5	3	5	7
3回目	6.5	7	6.5	6	
4回目	7	9	7.5	7	

表1 自家血輸血症例の背景

2) 方法

全例thiamylalとpancuroniumを用いて麻酔導入し、GONLAにて麻酔維持し、Sodium nitro prusside, enfluraneを適宜用いて低血圧麻酔とした。輸血管理は、図1に示すように麻酔導入後ヘマトクリットが27～30%になるように術前脱血し血液希釈をおこない、術中出血に対して、はじめは保存していた自家血あるいは銀行血にて対処し、のちには出血した血液を吸引回収したのち赤血球成分を分離洗浄して再輸血するcell savingにて対処した。cell savingはHemonetics社のcell saver®を用いた¹⁾抗凝固剤としてヘパリン添加生理食塩水を用いた。手術直後に術前脱血した血液を自家新鮮血として輸血した。赤血球機能は麻酔導入直後に採血した新鮮血をコントロールとし、手術終了直後、術後1日、2日に採血して測定した。一方、使用した解凍赤血球やcell saving血は輸血直前に採取し、その機能を測定した。P50は、ヘモックスアナライザーを用いpH7.4(ヘモックス

^{*} 九州大学医学部麻酔科

^{**} 福岡大学医学部第二生化学教室

ソリューション), 37度, P_{CO_2} 0 mmHgにて酸素解離曲線を記録して測定した。赤血球中の ATP, 2, 3 DPG は除

蛋白質後その抽出液を用いて, 酵素利用測定法にて行った²⁾。

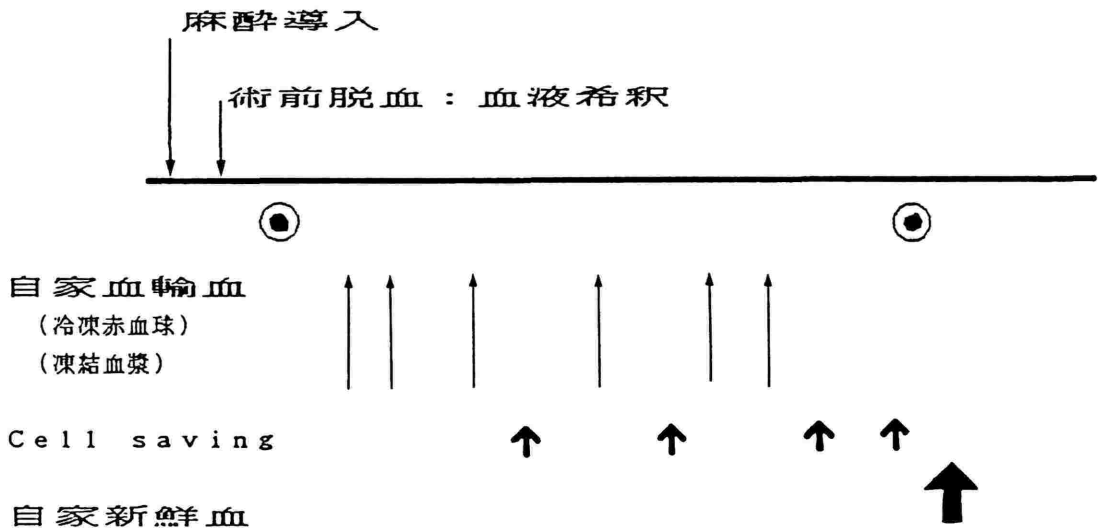


図1 自家血使用症例の術中輸血管理

3) PEP 処理赤血球を用いた症例
cell saving で集めた赤血球をPEP と37℃にて30~120分無菌的にインキュベートし洗浄後生体に戻した。対象症例は, 同じくハリントン手術症例とした。抗凝固剤をヘパリン添加 130mMマンニトール, 50mMPEP, 15mMクエン酸, 6mMリン酸, pH 6.5のソリューション (PEPソリューション) とし, 回収血液をフィルターを通した

のちプールし37度でインキュベーションし, 分離洗浄した。PEP 応用例は現在2症例しかなく, 結果は平均値のみとした。

3. 結果

1) 輸血赤血球の機能

輸血赤血球の機能を図2, 表2に示す。

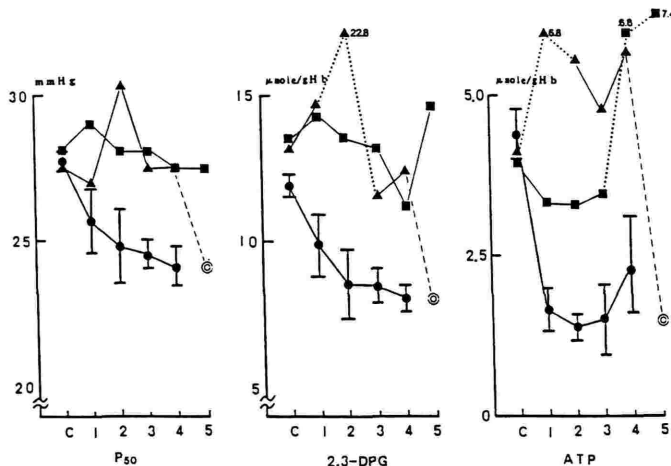


図2 回収赤血球の機能: ●, PEP 非処理回収赤血球, 平均値およびSDを示す。

▲, ■, PEP 処理回収赤血球, 測定値のみを示す。◎, PEP 非処理例。

	fresh RBC (n=10)	frozen RBC (n=18)	saved RBC PEP(-) (n=18)	saved RBC PEP(+) (n=9)
P 50 (mmHg)	27.3 ± 1.1	22.5 ± 1.2	24.9 ± 2.3	28.0 ± 0.9
2,3-DPG ($\mu\text{mol/gHb}$)	12.1 ± 1.1	8.6 ± 0.4	9.1 ± 1.4	14.3 ± 3.2
ATP ($\mu\text{mol/gHb}$)	4.7 ± 0.3	4.3 ± 0.4	1.7 ± 1.1	5.4 ± 1.4

表2 新鮮血、解凍赤血球、回収赤血球、PEP 処理回収赤血球の機能

a) 解凍赤血球

解凍赤血球のP50は $22.5 \pm 1.2\text{mmHg}$ 、2,3-DPG は $8.6 \pm 1.8\mu\text{mol/gHb}$ 、ATP は $4.1 \pm 0.7\mu\text{mol/gHb}$ であり、コントロールの新鮮血に比べてATP は91%、2,3-DPG は71%に低下しており、2,3-DPG 低下を反映してP50が $27.3 \pm 1.1\text{mmHg}$ から $22.5 \pm 1.2\text{mmHg}$ へと小さくなっている。赤血球の酸素解離曲線から算出すると解凍赤血球の酸素運搬能は約60%に低下した。この赤血球機能は1週間保存したCPD 血に相当する。

b) 回収赤血球 (saved RBC)

PEP 非使用の5症例のうち4症例は4回、1症例は2回の計18回のcell saving をおこなった。図2に cell saving ごとの赤血球機能を示す。P50は、術前の $27.9 \pm 0.4\text{mmHg}$ に比べてcell saving 1回目から有意に低下し、その後も徐々に低下した。2,3-DPG 量もP50と同じく術前の $11.9 \pm 0.3\mu\text{mol/gHb}$ がcell saving 1回目には 9.9 ± 1.1 と有意に低下し、その後も徐々に低下した。一方、ATP 量は、術前 $4.4 \pm 0.4\mu\text{mol/gHb}$ であったが、cell saving 1回目には $1.7 \pm 0.4\mu\text{mol/gHb}$ と急激な減少が認められた。表2に18回の回収血の機能を示す。P50は $24.9 \pm 2.3\text{mmHg}$ 、2,3-DPG は $9.1 \pm 1.4\mu\text{mol/gHb}$ であり、赤血球の酸素親和性に対する変化は比較的少ないが、ATP は $1.7 \pm 1.1\mu\text{mol/gHb}$ と極端な低下を示している。このATP 量は5～6週間保存したCPD 血に相当する。

PEP 使用例は2症例しかないが、2症例で計9回のc-

ell savingをおこなった。図2、表2に示すようにPEP を処理した回収赤血球のP50、2,3-DPG、ATP 量はばらつきはあるものの術前値を維持していた。特に、ATPの急激な低下は阻止されている。1症例で最後のcell saving でPEP を用いずヘパリン添加生理食塩水を用いたところPEP 非使用例と同じようにP50、2,3-DPG の低下と、ATP の急激な減少が認められた(図2◎印)。

2) 輸血後の赤血球機能

PEP 非使用例の平均出血量は3300mlであり、使用自家血は平均2000ml、回収血は平均1000ml(ヘマトクリット40～50%)で解凍赤血球と回収赤血球の使用割合は2対1であった。自家血の準備のなかった症例ではACD 保存血2000ml、回収血500mlを使用した。輸血後の赤血球機能を図3に示す。P50、2,3-DPG は術前値 $27.9 \pm 0.4\text{mmHg}$ 、 $11.9 \pm 0.3\mu\text{mol/gHb}$ より術直後 $25.5 \pm 0.6\text{mmHg}$ 、 $9.8 \pm 0.5\mu\text{mol/gHb}$ と有意に低下し、徐々に回復するが完全に回復するまで2日以上かかっている。ATP は、術後2日まで徐々に低下傾向を示すが有意差は認められなかった。

PEP 使用の2症例の出血量はそれぞれ3000mlと2000mlであり、自家血使用量はそれぞれ2000mlと800mlであり、回収血使用量は1000mlと1250mlであった。輸血後のP50、2,3-DPG、ATP の変化を図3に示しているが、三者とも術前値を維持している。症例が少なく有意差検討はできなかったが、ATP はむしろ上昇傾向を示した。

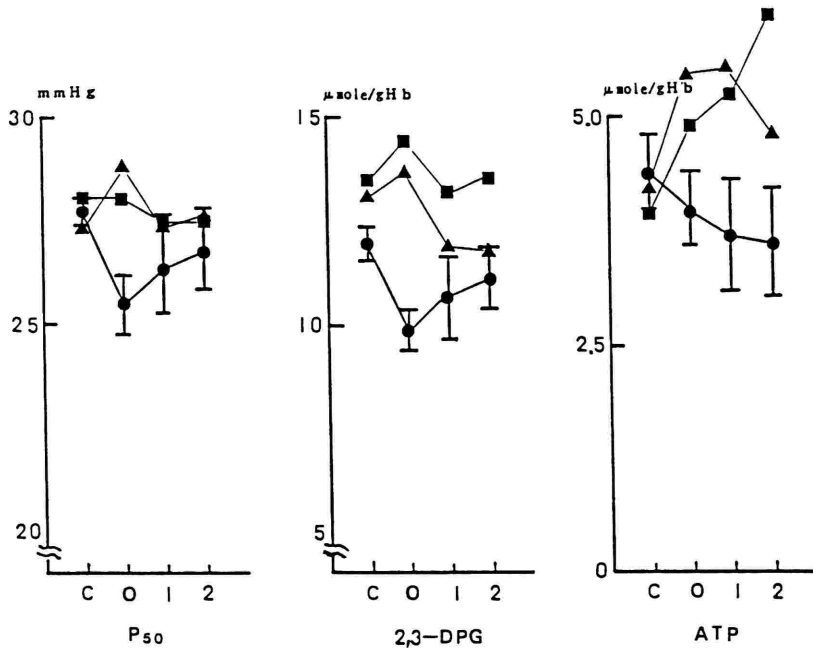


図3 輸血後の赤血球機能変化； ●， PEP 非処理回収赤血球、平均値およびSDを示す。

▲、■， PEP 処理回収赤血球、測定値のみ示す。

4) 輸血後早期貧血をきたした症例

PEP 非使用例で輸血後早期に貧血を来した症例を経験した。

12才，体重35kgの女児で術中4500mlの出血に対し，自家血2600ml，回収血1200mlにて対処した。図4，5に術後の経過を示す。

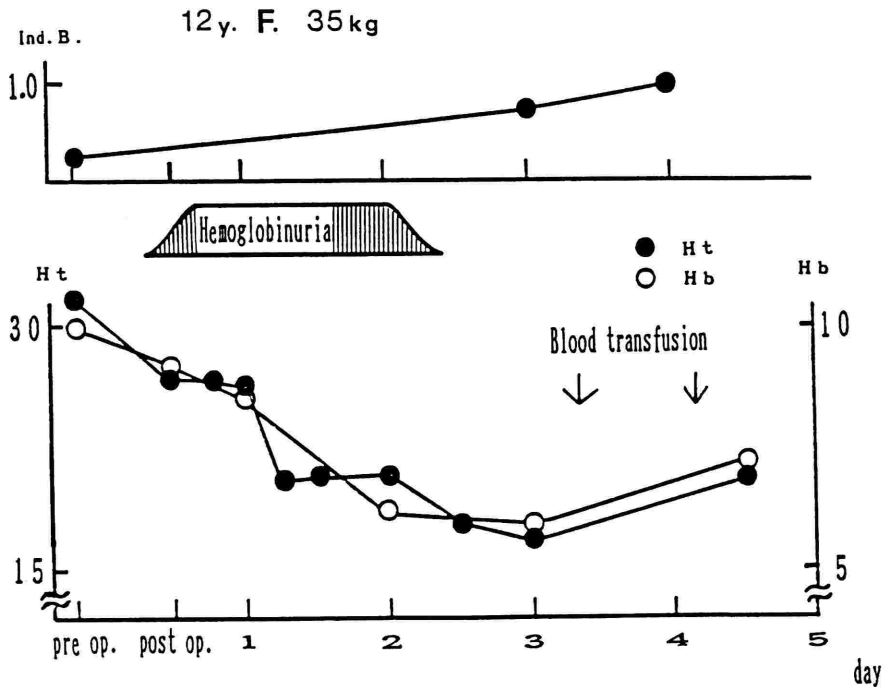


図4 輸血後早期に貧血を来した症例

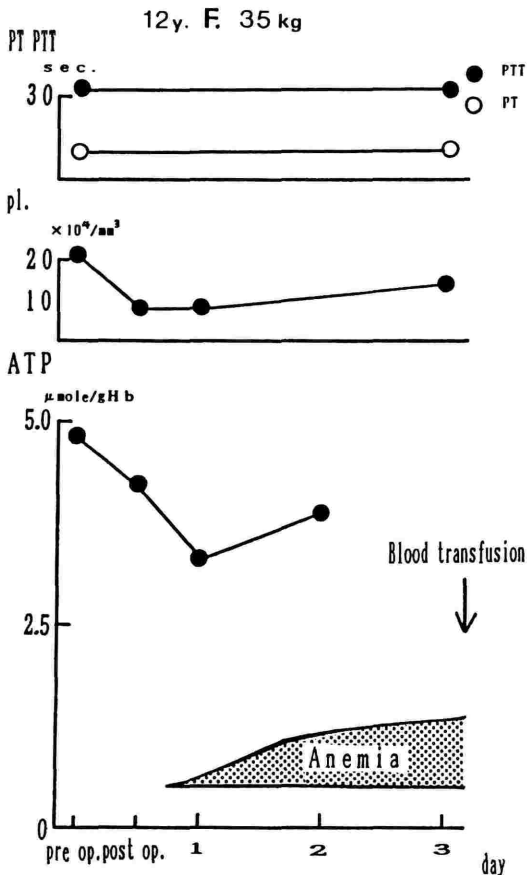


図5 輸血後早期に貧血を来した症例

術前のヘモグロビン値、ヘマトクリット値は、10g/dl, 32%であり、術直後 9.2g/dl, 27%となった。術後5～6時間はこのレベルを維持していたが、ヘモグロビン尿が認められるようになり、急激に貧血が進行し、間接ビリルビンも上昇した。術直後の循環血のATP量は $4.2\mu\text{mol/gHb}$ であり、術後1日目には $3.18\mu\text{mol/gHb}$ と術前値の65%に低下した。この貧血は、創部に挿入していたドレーンからの出血も少なく、PT, PTTの延長もなく、血小板数の低下も見られなかったため、輸血後赤血球のATP量低下に伴う輸血後寿命短縮によるものと推測された。

4. 考察

1) 輸血赤血球、輸血後赤血球の機能

現在、保存血はACD血からCPD血に変っているが、ACD血であろうが、CPD血であろうが保存期間が長くなる

にしたがって、赤血球内のATP, 2, 3-DPGは減少し、機能低下がおこなることが知られている。しかしながら、解凍赤血球や回収赤血球の機能変化についてはほとんど検討されていない。解凍赤血球は、採血直後凍害防止剤のグリセロールを添加し-90度で凍結保存したものである。解凍赤血球は凍結時の代謝が停止しているため、新鮮血とほぼ同じ機能を維持していると考えられていたが、今回測定したところでは、ATPの低下は少ないが、2, 3-DPG P50の低下が見られた。測定した解凍赤血球は、最大2年保存したものであるが保存期間と機能低下との相関は認められなかった。むしろ、極端な2, 3-DPG, P50の低下が見られるものがあり、凍結・保存・解凍段階の状態が解凍後の赤血球機能に影響すると思われる。回収赤血球は時間的には新鮮血であるが、実際には2, 3-DPG, P50低下, ATPの極端な低下が認められた。術野に出血した血液を吸引回収し赤血球成分を分離洗浄するまでの時間は2～3時間であり、この時間赤血球は出血とともに吸引された組織片、骨片および抗凝固剤と接することになる。従って、溶血による赤血球内酵素の放出、出血にともなう凝固機転の活性化、tissue factorの放出、補体の活性化などが起こり回収された赤血球はさまざまな蛋白分解酵素にさらされることになる。これらが赤血球を傷害し機能低下をもたらすものと推測される。

Beutlerらは、2, 3-DPGの低下したACD保存血を貧血患者に輸血し、輸血後の2, 3-DPGの変化を調べ、輸血後4時間で2, 3-DPGの再合成がおこなると報告している²⁾。従って、従来機能の低下した古い血液を輸血をしても赤血球の機能はすぐに回復すると考えられ、輸血赤血球や輸血後赤血球の機能についてはあまり顧みられなかった。一方、Brownらは、約3000mlの出血にACD保存血で対処したところ輸血直後よりP50が27mmHgより22mmHgに低下し、その回復に3日間要することを報告した³⁾。さらに、循環血の50%を脱血し、返血したイヌでは、その後の体内循環血の酸素解離曲線は左方移動し、P50は低下する。2, 3-DPGレベルも約80%に低下し、回復までは3日から7日かかっている⁴⁾。我々の自家血使用症例に用いた解凍赤血球、回収赤血球の機能は低下

しており、輸血後に酸素運搬能の低下が認められ、術後2日ではまず回復していない。また、輸血後のATP変化には有意差は見られなかったものの低下傾向がにつき、輸血後ATPの低下した1症例で輸血後寿命の短縮が推測された。以上のことから、機能低下した赤血球を大量に輸血した場合輸血後に赤血球の酸素運搬能の低下や、輸血後寿命短縮がおこると考えられる。特に酸素運搬能は、他の要因をぬきにして酸素解離曲線より単純に計算すると60~70%に低下したことになり、輸血直後より呼吸、循環に負担がかかったと考えられる。したがって、大量輸血や自家血使用時には使用赤血球の機能を高めておく必要があると思われる。保存赤血球の使用は3週間以内とされているが、これには赤血球機能についての考慮がなされていない。輸血後寿命と、酸素運搬能を定量的に算出したtransfusion index⁵⁾などを利用して、今後、使用赤血球の機能を考えた輸血管理を是非行う必要がある。なお、今回は酸素運搬能、ATP量に注目し、ATPは輸血後寿命を反映する1つの指標として用いたが、今後は実際の輸血後寿命を測定することは必須であり、さらに、微小循環を考えていく上にも輸血後の赤血球変形能などの検討が必要になってゆくものと思われる。

2) 赤血球保存剤としてのPEP

PEPは解糖中間体の一つで、かつ、生体内で最もエネルギーが高いリン酸化合物である。この化合物は赤血球膜を透過する⁶⁾。この透過は、陰イオン透過系の媒介蛋白質である赤血球膜蛋白質Band 3によって媒介される⁶⁾。PEPの赤血球膜透過は、pHや陰イオンの共存の有無により影響され、pH6以下、陰イオン非共存下で最も効率よく透過される⁷⁾。赤血球のエネルギー産生系は解糖系のみである。赤血球の解糖系は、2, 3-DPG合成系の活性が高く、ATP産生を犠牲にして2, 3-DPGを合成し、酸素運搬能を高く維持している。ATPや2, 3-DPGは赤血球膜を透過できないので赤血球内のATP、2, 3-DPGを維持するためにはこの解糖系を利用しなければならない。しかしながら、この系は、ATPを高めるのに有利であれば2, 3-DPGの維持に不利に働き、2, 3-DPGを高めるのに有利であればATPの維持に不利に働くという逆相関の関係にある。一方赤血球内に透過したP-

EPは、ただちにピルビン酸キナーゼによりピルビン酸に代謝され、この過程でADPよりATPが合成される。この反応の結果ADPが枯渇し、PEPはもはやピルビン酸に代謝されず、むしろ大量に合成されたATPとカップルしてフォスフォグリセレートキナーゼにより2, 3-DPGへと代謝される^{8) 7)}。つまり、まずATPが合成され、次に2, 3-DPGが合成される。ATPの増加は、内在しているADPの量に依存し、それ以上には増加しないが、2, 3-DPGは透過したPEPの量により正常値の数倍に上昇させることができる。PEPを用いると2, 3-DPGの増加と同時にATP量を維持できる。現在、PEPを利用した赤血球保存、赤血球の若返りが検討されている^{8) 9) 10)}。Yonenagaらは、犬を用いて循環血液量の50%をPEP処理し、再輸血する自家血輸血実験で輸血後赤血球機能を検討し、ATPに変化は見られなかったが、2, 3-DPG、P50は輸血後3日間は高く維持されたと報告している。同時にPEP処理による輸血後寿命の変化も認められないことを報告している⁴⁾。

3) PEPの臨床応用

PEPの回収赤血球に対する影響は図2に示すごとく、ばらつきはあるものの2, 3-DPG、P50、ATPをほぼ術前値に維持している。我々は、血液吸引量とほぼ等量のPEPソリューションを加えるようにし、吸引回収後フィルターを通し順次インキュベーションした。しかし、吸引時の状態により吸引血液量とPEPソリューション添加量は一定とならず、またインキュベーション時間も一定でなかったためPEPの回収赤血球に対する効果にばらつきが生じたものと思われる。インキュベーション時のpH、PEP濃度はクロズドシステムのため測定できず、分離洗浄後に測定した。インキュベーション終了時のpHは7.0~7.2であり比較的PEPが赤血球膜を透過しにくい条件であったが、PEP使用例で、回収赤血球の機能がほぼ維持されていることから、ATP、2, 3-DPG合成に必要なPEPは赤血球膜を透過していると考えられる。PEP使用の1症例で最後のcell saving時にPEPソリューションよりヘパリン添加生理食塩水に換えたところP50は24.1mmHgに、2, 3-DPGは8.82 μ mol/gHbに、ATPは1.81 μ mol/gHbに低下した。したがって、PEPによ

る赤血球機能賦活効果は明白であった。PEP 使用例の輸血後の赤血球機能は図3に示すように酸素運搬能は輸血直後より正常値を保っている。一方、ATP は輸血後よりやや上昇傾向を示した。今回解凍赤血球にはPEP を使用しておらず、輸血後のPEP 処理赤血球は循環血液量の約20~30%であった。機能低下した解凍赤血球を同時に使用していることを考え合わせると、PEP で処理した機能の良い赤血球が存在したことが、PEP 処理症例で術後の循環血の酸素運搬能などが術前の状態を維持できた理由だと考えられる。PEP の臨床使用例は症例も少なく、検討すべき点も多くあるが、今回の症例ではPEP の使用の有用性を示唆するものと思われる。

5. まとめ

解凍赤血球、回収赤血球の機能は悪く、このような血液を大量に輸血した場合輸血後に循環血の酸素運搬能低下がおこる。回収赤血球をPEP 処理することによりin vitroでの機能維持と輸血後in vivo での赤血球機能維持が可能であった。

6. 文献

- 1) 高折益彦, 福井明, 奥坊康士: 自己輸血麻酔
- 2) Minakamis S. ———J. Bicclu
- 3) Beutler, R. and Wood, L. : The in vivo regeneration of red cell 2,3 diphosphoglyceric acid (DPG) after transfusion of stored blood. J. Lab. & Clin. Med., 74: 300- 304, 1969.
- 4) Bryan-Brown, C. W., Bake, S., Makabali, G., et al. : Consumable oxygen : availability of oxygen in relation to oxyhemoglobin dissociation. Crit. Care Med., 1 : 17-21 , 1973.
- 5) Yonenaga, K., Todoroki, H., Tokunaga K., et al. : Change in adenosine triphosphate, 2,3 diphosphoglycerate and P50 of dog blood following transfusion of autologous red cells pretreated with phosphoenolpyruvate in vitro.

- 6) 浜崎直孝: 保存赤血球の機能についての定量的考察 日本輸血学会雑誌31: 103-109, 1985.
- 7) Hamasaki, N. and Kawano, Y. : Phosphoenolpyruvate transport in the anion transport system of human erythrocyte membranes., TIBS 12: 183- 185, 1987.
- 8) Hamasaki, N., Hirota, C., Ideguchi, H., et al. The Red Cell: Fifth Ann Abor Conference, Alan R. Liss, Inc., New York, 1981, 577-592
- 9) 浜崎直孝: ホスホエノールピルビン酸 (PEP) を用いた赤血球保存について 日本輸血学会雑誌 29: 587- 590, 1983.
- 10) Hamasaki, N., Ideguchi, H., Ikehara, Y. : Regeneration of 2,3-bisphosphate and ATP in stored erythrocyte by phosphoenolpyruvate: A new preservative for blood storage Transfusion 21 : 391- 396, 1981.
- 11) Hamasaki, N. and Chigita, H., C. : Acid-citrate-dextrose-phosphoenol-pyruvate medium as a rejuvenant for blood strage., Transfusion 23: 1-7, 1983.