

# The Relationship Between Hemostatic Parameters and Residual Blood Volume in Dialyzer during Hemodialysis

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/8300">http://hdl.handle.net/2297/8300</a>

## 慢性透析患者におけるダイアライザー内残血量と凝固・線溶能の関連

金沢大学医学部内科学第三講座 (主任: 松田 保教授)

山 崎 雅 英

(平成4年1月10日受付)

慢性糸球体腎炎に対し血液透析を施行している49症例について静脈血の凝固学的パラメータとダイアライザー内残血量の関係を検討した。凝固・線溶動態は、粒子計数免疫測定法 (particle counting immunoassay, PCIA) によりフィブリン分解産物 (cross-linked fibrin degradation products, XDP) を、また酵素免疫測定法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) によりトロンビン・アンチトロンビンⅢ複合体 (thrombin-antithrombin Ⅲ complex, TAT), プラスミン・ $\alpha_2$  プラスミンインヒビター複合体 (plasmin- $\alpha_2$  plasmin inhibitor complex, PIC), プロテインC (protein C, PC), プロテインS (protein S, PS), 活性型プラスミノゲンアクチベーターインヒビター (active form plasminogen activator inhibitor type 1, 活性型 PAI), プラスミノゲンアクチベーター (tissue-type plasminogen activator, t-PA)・PAI 複合体 (plasminogen activator/plasminogen activator inhibitor type 1 complex, tPA/PAI) を測定した。血管内皮細胞上に存在し、内皮細胞の障害により流血中に遊離するトロンボモジュリン (thrombomodulin, TM) と、炎症時に生体に対し様々な障害を与えることで知られている顆粒球エラスターゼ (polymorphonuclear elastase, PMN-E) についても ELISA により測定した。血中の TAT, XDP, TM は透析前より有意に上昇していた。TAT, PIC, t-PA/PAI, TM, および PMN-E は1回の透析により有意に上昇し、活性型 PAI は有意に低下した。透析前の TM は短期透析症例と比較して長期透析症例において有意に高値を示した。透析による TM の変動は PMN-E の変動と正の、白血球数の変動と負の相関を示した。残血量の多い症例では、残血量の少ない症例と比較して透析前より活性型 PAI は高値を示し、また透析による TAT および TM の上昇度も高度であった。ダイアライザー内残血量の多い症例では、凝固機序の活性化と線溶機序の抑制が生じているものと考えられた。これらの所見より、透析を施行されている症例では、血液とダイアライザー等の異物面との接触により凝固機序の活性化が惹起され、また血管内皮細胞の障害が生じているものと考えられた。血管内皮細胞の障害の原因としては、透析によるトロンビンの生成と顆粒球からのエラスターゼの放出が考えられた。

**Key words** hemodialysis, thrombin-antithrombin Ⅲ complex, active form plasminogen activator inhibitor type 1, thrombomodulin, residual blood volume in dialyzer

長期に血液透析 (hemodialysis, HD) を要する腎不全患者においては、原疾患そのものによる種々の血液学的変化、すなわち貧血<sup>1)</sup>や血小板減少<sup>2)</sup>等の細胞学的異常をはじめ、血漿蛋白、特に $\alpha_2$ グロブリンや補体、その他の免疫担体<sup>3)</sup>、あるいは凝固・線溶因子の異常<sup>4)</sup>を生じ得る。さらにこれらの症例では、長期透析を施行することによりこのような血液所見に修飾が加えられ<sup>5)</sup>、透析そのものの有効性、あるいは患者の一般状態などに影響を与えることがある。すなわち透析時には体外循環回路と血流との接触からダイアライザー等の回路内に凝固した残血が生じ透析効率の低下を来す症例がある<sup>6)</sup>。この原因としては、体外循環回路と血流の接触により内因系凝固機序の活性化<sup>7)</sup>や血小板の活性化<sup>8)</sup>が惹起されることが考えられる。一方、透析回路の構造上、血流の停滞しやすいダイアライザー内部や動脈側、静脈側のドリップチャンパー部等では回路内の均一な速い流れから乱流を伴う遅い流れとなり、残血を生じやす

いものと考えられる<sup>9)</sup>。この残血を予防するため、ダイアライザー等における抗凝固素材の開発<sup>10)</sup>、回路の抗血栓性構造の設計<sup>11)</sup>、新しい抗血栓療法<sup>12)</sup>や抗血小板療法<sup>13)</sup>の併用<sup>14)</sup>等が試みられている。しかし、回路内残血量の問題は解決されたわけではなく、症例により残血量の多少がみられ、その原因や病態は必ずしも明らかにはされていない。

また、透析症例では透析時に心筋梗塞や脳梗塞等の血栓症の合併をみることが少なくない<sup>15)</sup>。この原因としても、従来血液透析時の内因系凝固機序の活性化、血小板の活性化等が指摘されてきた<sup>16)</sup>が、血管内皮細胞の障害の有無について論じた報告はみられない。

一方、1971年 Engvall ら<sup>17)</sup>による酵素免疫測定法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) の考案により、凝固・線溶分子マーカーの開発には近年めざましいものがあり、血管内における凝固・線溶病態を詳細かつ鋭敏に評価することが可能

Abbreviations: active PAI, active form plasminogen activator inhibitor type 1;  $\alpha_1$  PI,  $\alpha_1$  proteinase inhibitor;  $\alpha_2$  PI,  $\alpha_2$  plasmin inhibitor; APC, activated protein C; APTT, activated partial thromboplastin time; AT Ⅲ, antithrombin Ⅲ; BUN, blood urea nitrogen; CAPD, continuous ambulatory peritoneal dialysis; C4bp, C4 binding protein; CGN, chronic glomerulonephritis; Cr, creatinine; ELISA, enzyme-linked

になりつつある。

本論文では血液透析前後の凝固・線溶動態を各種分子マーカーを指標として評価し、あわせてダイアライザー内残血量の多少との関連を検討した。また血管内皮細胞障害の指標と考えられている血中トロンボモジュリン (thrombomodulin, TM) の血液透析による変動についても検討を加えた。

## 対象および方法

### 1. 対象

1989年11月より1991年4月までの間に石川県立中央病院腎臓内科で慢性糸球体腎炎 (chronic glomerulonephritis, CGN) による慢性腎不全のため血液透析を行っている患者49例を対象とし、透析前後に採血をおこなった。症例の内訳は、男性28例、女性21例で年齢は32~75歳 (平均55.8±10.5歳) であり、透析歴は4カ月~16年 (平均6.0±4.6年) であった。その他、対照として健康成人10名に加え、CGNによる慢性腎不全に対し持続的腹膜透析 (continuous ambulatory peritoneal dialysis, CAPD) を行っている6症例、透析未導入3症例についても検討を加えた。

### II. 透析方法

透析は全例週3回、午前9時に開始し、1回につき4時間透析を行った。透析装置はTR-200, TR-700 (東レ, 東京) を、透析膜はエチレンビニルアルコール重合膜 (ethylen vinylalcohol, EVA 膜) を用い、透析液はキンダリー液 AF-1 号液 (扶桑, 大阪) を使用した。抗凝薬はスタンダードヘパリン (ノボヘパリン) (ノボ・ノルディスクA/S, ゲントフト, デンマーク) を用い、透析開始時に1000単位側注し、以後透析時間1時間につき1000単位ずつ持続注入されるよう設定した。

### III. 採血方法

採血は透析開始直前および終了時に患者前腕のシャント側より行った。末梢血球数はエチレンジアミンテトラ酢酸2ナトリウム塩 (ethylene-diaminetetraacetic acid di-sodium, EDTA-Na<sub>2</sub>) 入り真空採血管に採血し測定した。血清総蛋白 (total protein, TP), 尿素窒素 (blood urea nitrogen, BUN), クレアチニン (creatinine, Cr) は乾燥真空採血管に採血後、3000rpm, 10分間室温にて速やかに遠心分離して得られた血清を用いて測定した。

凝固線溶パラメータは3.8%クエン酸ナトリウム 0.5ml 入り真空採血管に4.5ml 採血し、速やかに4℃, 3000rpm, 10分間遠心分離して得られた血漿を使用した。各パラメータのうち、プロトロンビン時間 (prothrombin time, PT), 活性化部分トロンボプラスチン時間 (activated partial thromboplastin time, APTT), フィブリノゲン濃度 (fibrinogen, Fbg), アンチトロンビンⅢ活性 (antithrombin Ⅲ, ATⅢ) は採血後ただちに測定した。その他のパラメータの測定は、得られた血漿を-80℃にて凍結保存し、測定時に融解して使用した。

### IV. 測定方法

#### 1. 末梢血球数

白血球数 (white blood cells, WBC), ヘモグロビン濃度 (hemoglobin, Hb), 血小板数 (platelets, Plts) は自動血球計数

装置 CC-150 (東亜医用電子, 東京) を用いて測定した。

#### 2. 血液生化学

TP, BUN, Cr は自動化学分析装置を用いて測定した。

#### 3. 凝固・線溶パラメータ

1) プロトロンビン時間 (prothrombin time, PT), 活性化部分トロンボプラスチン時間 (activated partial thromboplastin time, APTT)

PT はシンプラスチン (Organon Teknika, ターンハウト, ベルギー) を試薬とする Quick 一段法<sup>19)</sup> にて測定した。また APTT はプラテリン・プラス・アクチベータ (Organon Teknika) を試薬とし、0.025M 塩化カルシウムを添加して測定した<sup>20)</sup>。PT, APTT とも自動測定装置 Amelung-Coagulometer, KC 4A (Amelung, リーメ, ドイツ) を用いた。

#### 2) フィブリノゲン (fibrinogen, Fbg)

Fbg はトロンビン時間法<sup>21)</sup> による測定キットであるデータファイ・フィブリノゲン (バクスター, マイアミ, アメリカ) を用いて測定した。トロンビン時間は自動測定装置 KC 4A (Amelung) を用いた。

3) フィブリン分解産物 (cross-linked fibrin degradation products, XDP)

XDP は、フィブリンがプラスミンにより分解されることにより生じるフィブリン分解産物であり、XDP の上昇は凝固が生じたことを反映している。XDP は粒子計数免疫測定法 (particle counting immunoassay, PCIA) により測定した<sup>22)</sup>。すなわち、マウス抗ヒト XDP モノクローナル抗体により被覆したラテックス粒子と検体血漿中の XDP との間で抗原抗体反応を生じさせ、ラテックス粒子の凝集を起こさせ、この凝集したラテックスと非凝集ラテックスとの総体積比の変化を測定することにより検体中の XDP 濃度を定量するものである。測定には FDP 測定用試薬 (第一化学, 東京) を用い、PCIA メーター (第一化学) を使用して測定した。

#### 4) アンチトロンビンⅢ (antithrombin Ⅲ, ATⅢ)

血漿中に存在するトロンビン, 活性化第X因子, 活性化第IX因子のインヒビターである ATⅢ は、テストスチーム AT-Ⅲ オート (第一化学) を用いて、発色合成基質法により測定した<sup>23)</sup>。

#### 5) その他のパラメータ

以下の凝固線溶分子マーカーはサンドイッチ ELISA にて測定した。すなわち、測定する抗原を認識するポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を一次抗体として固相 (96穴マイクロウエルまたはビーズ) に固定した後、検体を37℃, 2時間インキュベーションすることにより血漿中の抗原を結合させた。非結合物質を緩衝液にて3回洗浄し除去後、この抗原の他の部位を認識するポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体に酵素標識したものを二次抗体として抗原と37℃, 1時間インキュベーションさせて、検体中の抗原をはさんだサンドイッチ複合体を形成させた。緩衝液にて3回洗浄し抗原と結合していない二次抗体を除去した。次いで発色剤を添加、37℃, 30分反応させた後反応停止液を添加、吸光度を測定した。抗原量は固層に結合した酵素量に比例するため、この固層の酵素活性を

immunosorbent assay; Fbg, fibrinogen; Hb, hemoglobin; HD, hemodialysis; PAI-1, plasminogen activator inhibitor type 1; PC, protein C; PCIA, particle counting immunoassay; PIC, plasmin- $\alpha_2$  plasmin inhibitor complex; Plts, platelets; PMN-E, polymorphonuclear elastase; POD, peroxidase; PS, protein S; PT,

発色系で測定することにより検体中の抗原量を測定した。

i. トロンビン・ATⅢ 複合体 (thrombin-ATⅢ complex, TAT)

血液中に生成されたトロンビンは速やかに ATⅢ と複合体を作り失活する。従って、血漿中の TAT は血中で生じたトロンビンの量を反映し、凝固亢進状態の鋭敏なマーカーとなる<sup>24)</sup>。

TAT はウサギ抗ヒトトロンビンポリクローナル抗体を一次抗体とし、ペルオキシダーゼ (peroxidase, POD) 標識ウサギ抗ヒト ATⅢ ポリクローナル抗体を二次抗体とする TAT 測定キット TDC-86 (帝人, 東京) を使用して測定した。

ii. プラスミン・ $\alpha_2$  プラスミンインヒビター 複合体 (plasmin- $\alpha_2$  plasmin inhibitor complex, PIC)

血栓を生じると組織プラスミノゲンアクチベータ (tissue-type plasminogen activator, t-PA) によりプラスミノゲンがプラスミンに転化し血栓溶解が起こる。この際生じたプラスミンは $\alpha_2$  プラスミンインヒビター ( $\alpha_2$  plasmin inhibitor,  $\alpha_2$ PI) と結合して複合体 (PIC) を形成し中和される。このため PIC の上昇は、生じたプラスミンの増加を意味し、線溶亢進状態を反映すると考えられる<sup>25)</sup>。

PIC はウサギ抗ヒトプラスミノゲン抗体を一次抗体、西洋ワサビ POD 標識マウス抗ヒト $\alpha_2$ PI モノクローナル抗体を二次抗体とする $\alpha_2$ PI コンプレックス「テイジン」EIA-B (帝人) を使用して測定した。

iii. プロテインC (protein C, PC)

血管の内皮細胞上にあるトロンボモジュリンと複合体を形成したトロンビンにより血漿中の PC は限定分解され、活性化プロテインC (activated protein C, APC) となる。APC は細胞膜リン脂質に結合した活性化第Ⅷ因子、活性化第Ⅴ因子を失活させ凝固の進展を抑制する。また APC はプラスミノゲンアクチベータインヒビター 1 (plasminogen activator inhibitor type 1, PAI-1) を中和して相対的に t-PA の活性を発現させる。すなわち APC は抗凝固、線溶促進作用を示す<sup>26)</sup>。

PC は活性化に際し遊離されるペプチドを認識するモノクローナル抗体を一次抗体とし、 $\gamma$ -カルボキシグルタミン酸 ( $\gamma$ -carboxyglutamic acid, Gla) の構造変化を認識するモノクローナル抗体を二次抗体とすることにより、活性化される PC のすべてを測定する PC キット TD82 (帝人) を使用して測定した。

iv. プロテインS (protein S, PS)

PS は PC の補因子であり、APC の活性化第Ⅷ、Ⅴ因子に対する作用を促進する作用がある。血中では PS の約40%が補体 C4b 結合蛋白 (C4 binding protein, C4bp) と結合し、C4bp-PS 複合体として存在する。PC の補因子としての作用を有するのは C4bp と結合していない free-PS である<sup>27)</sup>。

PS はウサギ抗ヒト PS ポリクローナル抗体を一次抗体とし、PS の C4bp 結合部位を認識するモノクローナル抗体を二次抗体とすることにより free-PS のみを測定する PS キット TD84 (帝人) を使用して測定した。

v. 活性型プラスミノゲンアクチベータインヒビター (active form plasminogen activator inhibitor type 1, active

PAI), プラスミノゲンアクチベータ (t-PA)・PAI 複合体 (plasminogen activator/plasminogen activator inhibitor type 1 complex, t-PA/PAI)

t-PA は血管内皮細胞で形成される分子量72000のセリン蛋白分解酵素であり、プラスミノゲンをプラスミンに活性化作用を有する<sup>28)</sup>。PAI-1 はこの t-PA の阻止因子であり、主に血管内皮細胞で生成される分子量約50000の蛋白である<sup>29)</sup>。PAI-1 は t-PA を中和する能力のない不活型として産生され、何らかの機序で活性型に変換されると言われている<sup>29)</sup>。通常は t-PA に比べて活性型 PAI が過剰に存在し、産生された t-PA はその90%程度が活性型 PAI と複合体を形成する<sup>29)</sup>。従って、t-PA/PAI を測定することは血管内皮細胞の t-PA 産生能を反映するものと考えられる<sup>29)</sup>。

t-PA/PAI は抗ヒト PAI モノクローナル抗体を一次抗体、抗ヒト t-PA ポリクローナル抗体を二次抗体として測定した。

検体に一定量の t-PA を添加すると、検体中の活性型 PAI は、t-PA と反応して t-PA/PAI を生成する。この原理を応用し、t-PA 添加検体と無添加検体とを同時に測定し、その測定結果の差より活性型 PAI を算出した。t-PA/PAI および活性型 PAI は TD88 (帝人) を使用して測定した。

vi. トロンボモジュリン (thrombomodulin, TM)

TM は分子量約105000の血管内皮特異性膜蛋白であり、脳を除く全身の血管内皮細胞膜上に存在し、トロンビンと高い親和性を示す。TM と結合したトロンビンはフィブリン形成能、第Ⅷ、Ⅴ因子活性化能、血小板活性化能等の凝固促進作用を失い、逆に PC を活性化することにより抗凝固作用を呈する。TM は血中、尿中にも活性のない形で存在するが、血管内皮細胞が損傷を受けると血中への出現量が増加する。従って、血中 TM 濃度の免疫学的測定は、正確にはその分解産物を測定していることになり、血管内皮細胞の障害の程度を反映する可能性がある<sup>29)~32)</sup>。

TM は抗ヒト TM ポリクローナル抗体を一次抗体とし、TM のトロンビン結合部位近傍を認識するモノクローナル抗体を二次抗体とするキット TD90 (帝人) を使用して測定した。

vii. 顆粒球エラスターゼ (polymorphonuclear elastase, PMN-E)

PMN-E は分子量約37000のセリン蛋白分解酵素であり<sup>33)</sup>、多核顆粒球のアズール顆粒に含まれ、炎症その他の刺激を受けると細胞外へ放出される<sup>34)35)</sup>。凝固線溶に関する PMN-E の作用は、凝固亢進・抑制、線溶亢進・抑制のいずれの方向へも働き得る<sup>36)</sup>。同時に PMN-E は血管内皮細胞のプロテオグリカン (ヘパリンやヘパラン硫酸) や TM による血栓防御機構を破壊する可能性が報告されている<sup>36)</sup>。血中では PMN-E は $\alpha_1$  proteinase inhibitor ( $\alpha_1$ PI) に結合し不活性化された複合体として存在する<sup>37)</sup>。

PMN-E はヒツジ抗ヒト PMN-E ポリクローナル抗体を一次抗体とし、抗ヒト $\alpha_1$ PI ポリクローナル抗体を二次抗体とするキット (PMN Elastase, MERCK Immunoassay, ダームスタット, ドイツ) を用いて測定した。

V. ダイアライザー内残血量の分類

prothrombin time; TAT, thrombin-antithrombin Ⅲ complex; TM, thrombomodulin; TP, total protein; t-PA, tissue-type plasminogen activator; t-PA/PAI, plasminogen activator/plasminogen activator inhibitor type 1 complex; WBC, white blood cells; XDP, cross-linked fibrin degradation products

ダイアライザー内残血量は、透析終了時のダイアライザーについて動脈面、静脈面、前面、後面の4方向より写真撮影し、残血による着色がダイアライザー表面積の1/2を越えるもの(I群16例)、1/2以下のもの(II群22例)、着色をほとんど認めないもの(III群11例)に分類した。

#### VI. 測定結果の補正

透析により一般には血液濃縮が生じる。このため透析後の測定結果は血清総蛋白量で補正した数値で表現した。すなわち、

$$\text{「透析後の補正值」} = \text{「透析後の実測値」} \times \frac{\text{「透析前の TP 値」}}{\text{「透析後の TP 値」}}$$

である。

#### VII. 統計学的処理

測定結果は全て平均値±標準偏差で表示した。統計学的検定は Wilcoxon 検定を用い、p値0.05未満を有意とした。

### 成 績

血液細胞数、残腎機能(BUN, Cr)、ダイアライザー内残血量については、透析歴、年齢、性差による有意差はみられなかった。

凝血学的パラメータについては、後述する様に、透析歴の長い症例においてTMが高値をとる以外には透析歴、年齢、性差による有意差はみられなかった。

透析前後の血液細胞数、各種凝血学的パラメータの変動を表1に示す。健常者に比較して血液透析患者では、透析前よりFbg, XDP, TAT, TMは有意に上昇しており、active PAIは有意に低下していた。透析前後で比較すると、PT, APTTは有意に延長した。白血球数は有意に減少したが、血小板数は透析前後で有意な変動はみられなかった。Fbg, XDP, ATIII, PC, PSは透析前後で有意な変動を認めなかったが、TAT,

PIC, t-PA/PAI, TM, PMN-Eは透析後に有意に上昇、活性型PAIは有意に低下した。

ダイアライザー内残血量と各種凝固線溶パラメータの変動を表2に示す。PSには一定の傾向がみられず、白血球数、血小板数、XDP, PC, PIC, PMN-Eは各群間で透析前後の変動に有意差は認めなかった。TATは残血量の少なかった群に比較し、残血量の多かったI群で透析前後の上昇が有意に高度であった。また、t-PA/PAIはI群ではII, III群と比較して透析前より低値を、活性型PAIは透析前より高値をとる傾向を認めた。TMはTATと同様に、透析前および後とも残血量の多いI群で最も高く、残血量の少ないIII群で最も低く、両群間には有意差がみられた。1回の透析によるTMの増加は、III群と比較してI群において有意に高度であった。

透析前および後における各パラメータ間の相関を表3に示す。透析前のTATと透析後のTAT、および透析前のXDPと透析後のXDPはそれぞれ強い正の相関を示した。透析前の活性型PAIは、透析後のTAT、透析後の活性型PAIとの間に強い正の相関を示した。また透析前の活性型PAIは透析後のPICと負の相関を示した。

透析による各パラメータの変動に関する相関を表4に示す。TATは活性型PAIとの間に負の相関を、TMおよびPMN-Eとの間に正の相関を認めた。WBCはPltsとの間に正の相関を、PMN-Eとの間に負の相関を認めた。また、TMはPMN-Eとの間に正の相関を認めた。

血中TMは、その大部分が腎より排泄されるため、その血中濃度は腎機能により大きく影響される。そこで、腎機能および透析歴とTMの関係について検討した結果を図1に示す。

血清Cr値14mg/dl以上の群と14mg/dl未満の群に分けて検討したところ、Cr高値群ではTMは47.6±13.2ng/ml、低値群では34.8±12.6ng/mlとCr高値群で有意に高値を示し

Table 1. The changes in hemostatic parameters during hemodialysis

Parameters	Normal values	Before HD	After HD	p values
WBC	(6.5±1.0×10 <sup>3</sup> /μl)	5.6±1.8	4.9±1.7	p<0.01
Plts	(22.0±8.0×10 <sup>4</sup> /μl)	21.4±8.0	21.3±7.1	NS
PT	(15.5±0.5 sec.)	14.9±0.5	16.2±1.1	p<0.01
APTT	(43.5±4.3 sec.)	44.1±6.8	104.2±30.7	p<0.01
Fbg	(240±60 mg/dl)	312.5±72.7	331.2±82.5	NS
XDP	(<0.3 μg/ml)	1.1±1.7	1.1±1.7	NS
AT-III	(100±30%)	90.5±14.3	94.4±18.4	NS
TAT	(<3.0 ng/ml)	3.2±2.9	7.8±8.0	p<0.01
PIC	(<0.8 μg/ml)	0.7±0.5	0.9±0.6	p<0.05
PC	(3.3±0.5 μg/ml)	5.2±1.8	5.1±1.5	NS
PS	(11.0±1.9 μg/ml)	12.1±3.8	12.7±4.1	NS
t-PA/PAI	(10.8±5.3 ng/ml)	9.3±12.2	12.0±11.2	p<0.01
active PAI	(11.1±7.9 ng/ml)	8.5±10.7	5.5±9.1	p<0.05
TM	(8.2±2.5 ng/ml)	38.4±13.8	46.8±14.6	p<0.05
PMN-E	(152.2±65.1 μg/l)	145.1±37.7	763.7±434.4	p<0.01

HD, hemodialysis; WBC, white blood cells; Plts, Platelets; PT, Prothrombin time; APTT, activated partial thromboplastin time; Fbg, fibrinogen; XDP, cross-linked fibrin degradation products; ATIII, antithrombin III; TAT, thrombin-ATIII complex; PIC, plasmin-α<sub>2</sub> plasmin inhibitor complex; PC, protein C; PS, Protein S; t-PA/PAI, plasminogen activator/plasminogen activator inhibitor type 1 complex; active PAI, active form plasminogen activator inhibitor type 1; TM, thrombomodulin; PMN-E, polymorphonuclear elastase; All values are expressed as the mean±standard deviation (SD) (n=49). P values represent the significant differences on comparison between "before HD" and "after HD." Plasma levels of Fbg, XDP, TAT and TM before HD significantly elevated than those of control (p<0.05). Plasma levels of active PAI before HD significantly decreased than those of control (p<0.05).

た。

また透析歴6年以上の長期透析群ではTMは $48.6 \pm 13.8$  ng/mlであり、透析歴6年未満の群の $35.2 \pm 11.8$  ng/mlと比較して有意に高値であった。

透析歴6年未満の症例では血清Crの高値例においてTMが高値であったが、6年以上の長期透析症例では血清Cr値とは無関係にTMは全体的に高値であった。

透析前のTM, BUN, Crを表5に示す。HD群, CAPD群, 無治療群, 対照群間の年齢に有意差はみられなかった。また, BUN, CrはCAPD群, 無治療群と比較してHD群では高

値傾向であったが、各群間に有意差はみられなかった。TMは、HD群で最も高く、次いでCAPD群, 無治療群の順であり、HD群は無治療群と比較して危険率5%以下で有意に高値であった。

## 考 察

慢性血液透析患者では一般に凝固亢進状態にあるとする報告が多くみられ<sup>1)2)3)4)5)</sup>、その機序として、ダイアライザー等の体外循環回路と血液との接触による第Ⅻ因子の活性化に始まる内因性凝固機序の活性化が想定されている<sup>1)2)</sup>。本検討でも、血液透

Table 2. Hemostatic parameters during hemodialysis and residual blood volume in the dialyzer

Parameters		I (n=16)	II (n=22)	III (n=11)
WBC ( $\times 10^3/\mu$ l)	HD-b	$5.6 \pm 1.7$	$5.1 \pm 1.5$	$6.4 \pm 1.8$
	HD-a	$5.1 \pm 2.0$	$4.4 \pm 1.1$	$5.5 \pm 2.1$
	HD-c	$-0.5 \pm 0.9$	$-0.7 \pm 1.2$	$-1.0 \pm 1.8$
Plts ( $\times 10^4/\mu$ l)	HD-b	$22.2 \pm 7.6$	$19.6 \pm 6.5$	$24.1 \pm 10.7$
	HD-a	$22.9 \pm 7.3$	$19.6 \pm 6.1$	$22.4 \pm 8.6$
	HD-c	$0.7 \pm 5.3$	$-0.2 \pm 2.8$	$-1.7 \pm 3.0$
XDP ( $\mu$ g/ml)	HD-b	$0.8 \pm 0.7$	$1.1 \pm 2.0$	$1.6 \pm 2.0$
	HD-a	$0.7 \pm 0.6$	$1.1 \pm 2.0$	$1.6 \pm 2.0$
	HD-c	$-0.2 \pm 0.8$	$0.2 \pm 0.6$	$0.0 \pm 0.5$
TAT (ng/ml)	HD-b	$3.7 \pm 4.6$	$3.0 \pm 1.5$	$3.1 \pm 2.2$
	HD-a	$10.6 \pm 12.4$	$7.1 \pm 4.2$	$5.2 \pm 3.3$
PIC ( $\mu$ g/ml)	HD-b	$6.9 \pm 10.2$	$4.1 \pm 4.8$	$2.2 \pm 3.6$
	HD-a	$0.6 \pm 0.4$	$0.7 \pm 0.6$	$0.6 \pm 0.4$
	HD-c	$0.9 \pm 0.9$	$0.9 \pm 0.4$	$0.9 \pm 0.4$
PC ( $\mu$ g/ml)	HD-b	$0.3 \pm 0.8$	$0.2 \pm 0.8$	$0.4 \pm 0.5$
	HD-a	$5.2 \pm 1.3$	$4.9 \pm 1.9$	$5.9 \pm 2.1$
	HD-c	$5.3 \pm 1.9$	$5.0 \pm 1.2$	$5.1 \pm 1.3$
PS ( $\mu$ g/ml)	HD-b	$0.1 \pm 1.8$	$0.1 \pm 2.0$	$-0.7 \pm 2.2$
	HD-a	$11.8 \pm 3.7$	$12.6 \pm 4.2$	$11.8 \pm 3.1$
	HD-c	$13.2 \pm 4.1$	$11.3 \pm 2.9$	$14.6 \pm 5.0$
t-PA/PAI (ng/ml)	HD-b	$1.4 \pm 4.5$	$-1.3 \pm 3.4$	$2.8 \pm 4.0$
	HD-a	$6.6 \pm 3.0$	$8.0 \pm 4.1$	$16.8 \pm 24.3$
	HD-c	$11.4 \pm 7.1$	$11.3 \pm 2.7$	$17.1 \pm 18.7$
active PAI (ng/ml)	HD-b	$3.8 \pm 9.5$	$3.4 \pm 6.1$	$0.2 \pm 22.6$
	HD-a	$11.5 \pm 14.0$	$9.3 \pm 12.6$	$5.9 \pm 5.8$
	HD-c	$6.9 \pm 5.5$	$6.5 \pm 7.6$	$4.5 \pm 2.9$
TM (ng/ml)	HD-b	$-4.6 \pm 12.3$	$-2.6 \pm 6.0$	$-1.3 \pm 4.5$
	HD-a	$41.0 \pm 12.4$	$40.9 \pm 15.9$	$37.5 \pm 11.4$
	HD-c	$49.1 \pm 21.6$	$45.6 \pm 20.1$	$38.7 \pm 13.5$
PMN-E ( $\mu$ g/l)	HD-b	$8.2 \pm 5.3$	$4.8 \pm 8.6$	$1.3 \pm 2.4$
	HD-a	$160.6 \pm 45.8$	$136.4 \pm 19.8$	$139.7 \pm 47.7$
	HD-c	$738.4 \pm 356.1$	$715.7 \pm 502.4$	$867.8 \pm 442.4$
	HD-c	$577.9 \pm 359.2$	$574.6 \pm 498.9$	$783.5 \pm 393.7$

HD-b, the value of parameters before HD; HD-a, the value of parameters after HD; HD-c, the changes in the values of parameters during HD: I, the patients in which coagula covered more than 50% of the surface of the dialyzer during HD (n=16); II, the patients in which coagula covered less than 50% of the surface of the dialyzer during HD (n=22); III, the patients in which there was little or no coagula covered during HD (n=11); All values are expressed as the mean  $\pm$  SD. Marks (\*) and (\*\*) indicate statistical significance at 5 and 1 percent levels, respectively.

析患者では透析前より血管内凝固活性化の鋭敏な指標と考えられている TAT, フィブリンの分解産物である XDP の上昇がみられ、凝固亢進状態の存在が示唆された。

透析前後の凝血的検査所見の変動のうち、PT, APTT の延長はヘパリンの効果と考えられた。透析後の TAT の有意な上昇は、透析中の回路内凝固活性化の存在を示唆しているが、同時に、血管内でのプラスミン産生を反映する PIC にも有意な上昇がみられ、透析中には凝固と線溶の両者の活性化が同時に進行しているものと考えられた。

血管内皮細胞から産生された t-PA はそのほとんどが速やかに PAI-I と結合して血中に存在するため、1 回の透析により

t-PA/PAI が有意に上昇したことは、透析中の血管内皮細胞からの t-PA の放出亢進を反映しているものと考えられ、同時に TAT も有意に上昇することより、透析中に形成されるトロンビンがその動態に関与しているものと想定された。ただし、t-PA との結合能を有する活性型 PAI は透析により有意に減少しており、この点 t-PA と反応して消費された結果と考えられる。この様に透析中の凝固・線溶両系の活性化は明らかであるが、XDP の上昇は伴わず、Fbg のフィブリンへの転化は著明ではなく、生じたトロンビンの大部分がフィブリンを形成することなく中和され、播種性血管内凝固症候群 (disseminated intravascular coagulation, DIC) とは異なった動態を呈してい

Table 3. The correlation coefficient among hemostatic parameters

	active PAI		t-PA/PAI		PS		PC		PIC		TAT		AT-III		XDP		Fbg		APTT		PT		Plts		WBC					
	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a				
WBC	b																0.60*	0.52*	0.63*	0.60*							0.54*	0.43*	0.74*	
	a																0.39	0.45*	0.51*							0.34	0.40			
Plts	b																0.41*	0.36	0.57*	0.37								0.88*		
	a																0.32	0.44*	0.37											
PT	b											-0.31								0.54*										
	a																													
APTT	b								0.34												0.49*									
	a							-0.05*	0.33			-0.34	-0.34								0.53*									
Fbg	b							0.35		0.40							0.54*	0.54*		-0.30										
	a															0.30	0.46*	0.43*												
XDP	b								-0.30											0.94*										
	a								-0.31																					
AT-III	b													0.63*																
	a																													
TAT	b												0.51*																	
	a	0.44*																												
PIC	b																													
	a	-0.30								0.39																				
PC	b																													
	a																													
PS	b																													
	a																													
t-PA/PAI	b																													
	a																													
active PAI	b																													
	a	0.64*																												

b, the value of parameters before HD; a, the value of parameters after HD: Mark (\*) indicates statistical significance at 1 percent level. No mark superscript of the coefficient means that the correlation is significant ( $p < 0.05$ ). No description of the correlation coefficient means no statistically significant correlation.

Table 4. The correlation coefficient among the changes in hemostatic parameters during hemodialysis

	PMN-E	TM	active PAI	t-PA/PAI	PS	PC	PIC	TAT	XDP	Fbg	Plts
WBC	-0.33	-0.31									0.43*
Plts										0.44*	
Fbg										-0.32	
XDP											
TAT	0.30	0.37	-0.37								
PIC	0.31			0.30							
PC					0.30						
PS											
t-PA/PAI											
active PAI											
TM	0.31										

Mark (\*) indicates statistical significance at 1 percent level. No mark superscript of the coefficient means that the correlation is significant ( $p < 0.05$ ). No description of the correlation coefficient means no statistically significant correlation.

るものと考えられた。

t-PA/PAIと同様に1回の透析によりTMが有意に上昇したことは興味深い。TMは血管内皮細胞上に存在し抗凝固的に作用しているが<sup>41,42</sup>、血管内皮細胞が損傷を受けると血中への出現量が増加するため、TMは血管内皮障害の指標として有用であろうと考えられている<sup>43</sup>。血中のTMはその性状より透析膜にはほとんど吸着されないといわれており<sup>32</sup>、透析前後のTMの差は透析により血管内皮細胞から遊離したTMをほぼ反映しているものと思われる<sup>42</sup>。

1回の透析により血管内皮細胞からTMが遊離された原因としては、透析により血管内皮細胞が障害されたことが考えられる。血管内皮細胞の障害の機序としては、透析による補体の活性化<sup>44</sup>、組織の一過性の低酸素血症<sup>45-46</sup>、活性化白血球からのプロテアーゼの放出<sup>47</sup>、血小板の活性化<sup>48</sup>等が予測される。透析によるTMの変動はWBCの変動と負の、PMN-Eの変動との間に正の相関を示した。透析中のPMN-Eの上昇は、ダイアライザー透析膜に補体が接触することにより第2経路(alternative pathway)が活性化されて肺内血管床に顆粒球がト

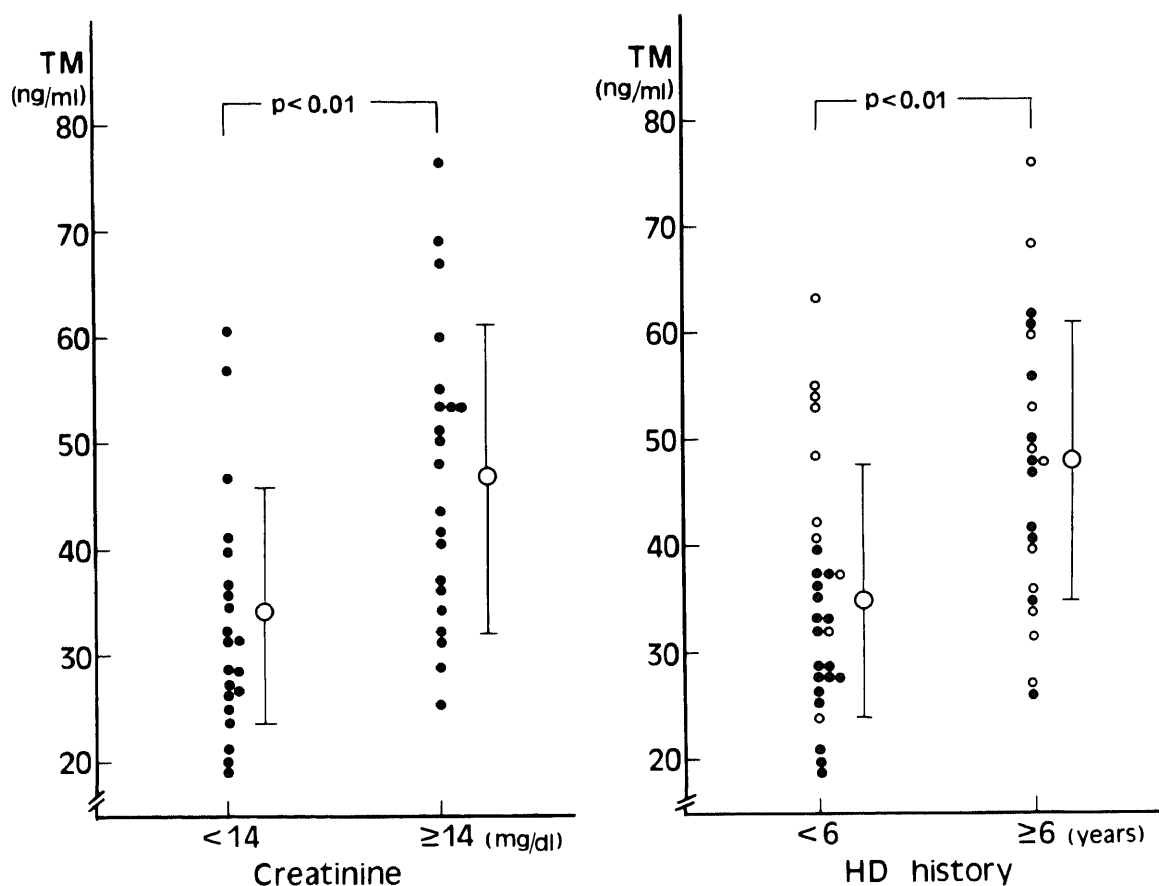


Fig. 1. Plasma levels of thrombomodulin (TM) before hemodialysis (HD), related to serum concentrations of creatinine (Cr) and the history of HD. The left figure refers to the relationship between plasma levels of TM and serum concentrations of Cr. The right figure refers to the relationship between plasma levels of TM and the history of HD. ○, serum Cr  $\geq 14$  mg/dl; ●, serum Cr  $< 14$  mg/dl in the right side: Mark (●) expresses as the mean  $\pm$  SD.

Table 5. Plasma levels of thrombomodulin in the patients with renal insufficiency and in the control subjects

	Age	TM (ng/ml)	BUN (mg/dl)	Cr (mg/dl)
HD (n=49)	55.8 $\pm$ 10.8	38.4 $\pm$ 13.8	100.8 $\pm$ 63.6	14.2 $\pm$ 2.8
CAPD (n=6)	55.5 $\pm$ 9.6	34.5 $\pm$ 8.6	62.9 $\pm$ 5.8	13.0 $\pm$ 3.2
No dialysis (n=3)	41.3 $\pm$ 12.5	30.5 $\pm$ 10.5	54.8 $\pm$ 6.5	12.0 $\pm$ 3.2
control (n=10)	52.5 $\pm$ 8.6	8.2 $\pm$ 2.5	9.2 $\pm$ 4.2	0.8 $\pm$ 0.1

TM, plasma levels of thrombomodulin; BUN, serum concentrations of nitrogen urea; Cr, serum concentration of creatinine; HD, the patients with hemodialysis; CAPD, the patients with continuous ambulatory peritoneal dialysis; No dialysis, the patients without HD or CAPD: All values are expressed as the mean  $\pm$  SD. Mark (\*) indicates statistical significance at 5 percent.



ラップされ、蓄積された顆粒球から elastase が放出されるという機序が推測されている<sup>49)</sup>。従って透析による TM の上昇は、肺血管床にトラップされた顆粒球から PMN-E 等のプロテアーゼが放出され、血管内皮細胞の障害を起こしたことによる可能性が考えられる。同時に TM の変動と TAT の変動が正の相関を示したことから、透析によるトロンビンの生成が血管内皮細胞に障害を与えたことも考えられた。この様に透析時には様々な要因が複雑に絡み合って血管内皮細胞に影響を与えているものと思われる。

今回の検討では、血小板の活性化に関する指標は検討していないが、透析による TM の変動と血小板数の変動の間には有意な相関はみられなかった。いずれにしても 1 回の透析による t-PA/PAI および TM の有意な上昇は透析により血管内皮細胞上に何らかの障害機転が生じていることを考えさせた。

次に透析の反復が血管内皮細胞に与える影響を評価するため、慢性腎不全症例に対する治療法の相違、および透析歴と TM の関連を検討した。表 5 に示す通り、HD 群、CAPD 群、無透析群でいずれも TM は高値をとった。この点については、血管内皮細胞から遊離された TM はその大部分が腎臓から排泄されることから、血中の TM の腎からのクリアランスの低下による影響も少なくないと考えられる。しかし、各群間で BUN, Cr に有意差がみられなかったにも関わらず、TM は無透析群と比較して HD 群で有意に高値であったことより、透析による血中 TM の増加の関与も考えられた。

また、図 1 に示す通り、短期透析症例では血清 Cr の高値症例において TM は高値であったが、長期透析症例では血清 Cr とは無関係に TM は全体的に高値であった。この点、短期透析症例では、血中 TM の上昇は腎からのクリアランスの低下が主因であるものの、長期透析症例では、他の因子すなわち透析の反復が血中 TM の上昇の主因となっているものと思われる。透析の反復による血管内皮細胞障害の進展が想定された。

ダイアライザー内残血量と凝固・線溶パラメータとの関連についてみると、3 群において残血量の多い群ほど透析後の TAT の上昇が有意に高度であり、残血量の多い群ではより強い凝固活性化が存在するものと考えられた。一方、残血量の多い 1 群では、透析前より t-PA/PAI が低値を、活性型 PAI が高値をとる傾向があり、残血量の多い症例では透析前より線溶系が抑制されている可能性が示唆された。また、残血量の多い症例では透析による血中への TM の遊離も高度であった。以上の結果より、残血量の多い症例では透析により、より多くのトロンビンが生成され、血管内皮細胞の障害に影響を与えている可能性が考えられ、透析による TM と TAT の変動が正の相関を認めたこともこの可能性を支持するものと思われる。

凝固・線溶パラメータの相関のうち、透析前の活性型 PAI が、透析後の TAT とは正の相関を示し、透析後の PIC とは負の相関を示した点は特に興味深い。TAT の高い例ではトロンビンの形成が多かったためダイアライザー内により多量の凝血を生じ、また活性型 PAI の増加している例では、その溶解が障害されるため残血量が増加するのであろう。すなわち、透析前の活性型 PAI の量により、ダイアライザー内残血量の程度を予知しうる可能性がある。現在、残血量の多い症例に対して、臨床の場では、ヘパリンの増量やアスピリンの併用により対処している例が多いが<sup>49)</sup>、必ずしも残血の問題を完全に解決しているとはいえない。活性型 PAI の高い症例で、血液透析中の

TAT の上昇が高度であり、残血量も多いとすると、活性型 PAI を抑制するような薬物により、血液透析中の残血の問題を解決しうる可能性がある。理論上は、活性化プロテイン C にこのような作用が期待されたが、実際に DIC 症例に対し投与した結果からは PAI 抑制作用はみられていない<sup>49)</sup>。この点については、今後さらに検討の望まれる問題である。

今回得られたデータのみから、透析前に活性型 PAI の高い例において、透析後の TAT, TM の上昇の度合いが大きい理由を説明することは困難である。透析前の活性型 PAI を上昇させている機転が、すでに潜在的に存在する血管内皮障害と関連し、このことが透析による TAT, TM の上昇と関連しているのかも知れない。もし TM の上昇に PMN-E が関与しているとするならば、これを選択的に阻害すると考えられるエラスターゼ・インヒビターをヘパリンと併用することも有用かもしれない。

## 結 論

慢性糸球体腎炎による慢性腎不全のため血液透析を施行している 49 例を対象に各種凝固学的パラメータを測定し、透析の血管内皮細胞に対する影響、およびダイアライザー内残血量と凝固線溶動態の関連を検討し、以下の結論を得た。

1. 血液透析症例では透析前より、TAT, XDP が上昇していることより、凝固亢進状態にあると考えられる。

2. 1 回の血液透析により TAT, PIC, t-PA/PAI が上昇し、活性型 PAI が低下することから凝固および線溶の活性化が惹起されることが考えられる。

3. TM は 1 回の透析後にも有意に上昇し、長期透析症例において有意に高値であったことより、腎からのクリアランスの低下のみならず、透析の反復により血管内皮細胞の障害の進行が生じているものと考えられる。

4. 血管内皮細胞障害の原因として、透析による内因性凝固機序の活性化によって生じたトロンビンや、顆粒球からのエラスターゼの放出が関与している可能性が考えられる。

5. ダイアライザー内残血量の多い症例では、透析前より活性型 PAI が高値をとる傾向があることから、線溶の抑制状態にあるものと考えられる。同時に、ダイアライザー内残血量の多い症例では、透析による TAT および TM の上昇の程度が大きいことより、凝固機序の活性化の程度が強くなり、また血管内皮細胞の障害も生じやすいものと考えられる。

本研究の結果より、血液透析症例において凝固・線溶分子マーカーを測定することは、生体内の凝固学的変動を鋭敏に反映すると同時に、臨床問題となるダイアライザー内残血量をも反映し、さらに予知しうる可能性があるものと考えられる。

## 謝 辞

稿を終えるに臨み、終始、御懇篤なる指導と御校閲を賜りました恩師松田 保教授に深甚なる謝意を表します。また直接の御指導を頂きました朝倉英策先生をはじめ、終始研究に御協力頂きました第三内科凝固研究室の諸兄ならびに教室員の皆様方に深謝致します。さらに血液透析に関しまして御教示を頂き、加えて貴重な患者血漿を御提供頂きました石川県立中央病院腎臓内科佐藤 隆部長、津川喜憲先生、松村正巳先生に篤く感謝の意を表します。

尚本論文の一部は第 52 回日本血液学会 (平成 2 年、東京) および第 53 回日本血液学会 (平成 3 年、京都) において発表した。

## 文 献

- 1) 秋沢忠男, 穴戸寛治, 高橋 健, 越川昭三: 腎性貧血の成因と治療. 臨床成人病, 15, 1851-1857 (1985).
- 2) 平嶋邦猛: エリスロポイエチンの臨床応用. 実験医学, 7, 1852-1858 (1989).
- 3) Remuzzi, G., Cavenaghi, A. E., Mecca, G. & Donati, M. B.: Prostacyclin-like activity and bleeding in renal failure. Lancet, 2, 1195-1197 (1977).
- 4) Castaldi, P. A., Rozenberg, M. C. & Steward, J. H.: The bleeding disorder in uremia. Lancet, 2, 66-69 (1966).
- 5) Inamoto, H., Ino, Y., Sata, K., Ozaki, R., Akizawa, K. & Osawa, A.: High risk ratio on mortality and characteristics of malignancies in dialysis patients. Clin. Exp. Dial. Apheresis, 7, 219-224 (1983).
- 6) 安部 英, 中村一路: 血液学的異常. 日本臨床, 38, 2359-2369 (1980).
- 7) Egeberg, O.: Blood coagulation in renal failure. Scand. J. Clin. Lab. Invest., 14, 163-169 (1962).
- 8) 松井則明: 血液透析. 日本臨床, 44, 1211-1217 (1986).
- 9) Vicente, V., Alegre, A., Alberca, I., Borrasca, L. A., Gomez, R. J. & Macias, F. J.: Changes of contact phase proteins during haemodialysis. Haematologia, 21, 159-162 (1988).
- 10) Rylance, P. B., Gordge, M. P., Ireland, H., Lane, D. A. & Weston, M. J.: Haemodialysis with prostacyclin (epoprostenol) alone. Proc. Eur. Dial. Transplant. Assoc., 21, 281-286 (1984).
- 11) Turney, J. H., Williams, L. C., Fewell, M. R., Prasons, V. & Weston, M. J.: Platelet protection and heparin sparing with prostacyclin during regular dialysis therapy. Lancet, 2, 219-222 (1980).
- 12) Fourt, L., Schwartz, A. M., Quasius, A. & Bowman, R. L.: Heparin-bearing surfaces and liquid surfaces in relation to blood coagulation. Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs, 12, 155-165 (1966).
- 13) Kusserow, B. K., Larrow, R. & Nichols, J.: The urokinase-heparin bonded synthetic surface. An approach to the creation of a prosthetic surface possessing composite antithrombogenic and thrombolytic properties. Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs, 17, 1-5 (1971).
- 14) Grode, G. A., Pitman, J., Crowley, J. P., Leininger, R. I. & Falb, R. D.: Surface-immobilized prostaglandin as a platelet protective agent. Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs, 20, 38-41 (1974).
- 15) 森河 浄, 田村克彦, 児島弘臣, 高橋淳子, 衣笠えり子, 関口 孝, 中山文義, 高橋 健, 秋沢忠男, 佐藤昌志, 北岡建樹, 出浦照国, 越川昭二, 藤井節郎: 蛋白分解酵素阻害薬 FUT-175 の血液透析への応用. 人工臓器, 12, 75-78 (1983).
- 16) Maurin, N. & Ballmann, M.: Prevention of coagulation during hemodialysis by a combination of the stable prostacyclin analogue CG 403 and low-dose heparin. Clin. Nephrol., 30, 35-41 (1988).
- 17) Dibble, J. B., Kalra, P. A., Orchard, M. A., Turney, J. H. & Davies, J. A.: Prostacyclin and iloprost do not affect action of standard dose heparin on haemostatic function during haemodialysis. Thromb. Res., 49, 385-392 (1988).
- 18) Engvall, E. & Perlman, P.: Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Immunochemistry, 8, 871-874 (1971).
- 19) Clauss, A.: Gerinnungsphysiologische Schnellmethode zur Bestimmung des Fibrinogens. Acta Haematol., 17, 237-246 (1957).
- 20) 藤巻道男: 抗凝固療法モニタリング. 臨床病理, 70 (臨時増刊), 273-281 (1987).
- 21) 橋本仙一郎: トロンビン時間法によるフィブリノーゲンの定量. 臨床病理, 21, 615-620 (1973).
- 22) Sakai, Y., Maeda, M., Takei, F., Matsumoto, T., Nishijima, Y. & Nakamura, K.: Determination of FDP in human plasma by a novel latex immunoassay. Thromb. Res., 50, 469-479 (1988).
- 23) Abildgaard, U., Lie, M. & Odegard, O. R.: Antithrombin (heparin cofactor) assay with "new" chromogenic substrates (S-2238 and Chromozym TH). Thromb. Res., 11, 549-553 (1977).
- 24) Pelzer, H., Schwarz, A. & Heimburger, N.: Determination of human thrombin-antithrombin III complex in plasma with an enzyme-linked immunosorbent assay. Thromb. Haemostasis, 59, 101-106 (1988).
- 25) Mimuro, J., Koike, Y., Sumi, Y. & Aoki, N.: Monoclonal antibodies to discrete regions in alpha-2-plasmin inhibitor. Blood, 69, 446-453 (1987).
- 26) Wakabayashi, H., Sakata, Y. & Aoki, N.: Conformation-specific monoclonal antibodies to the calcium-induced structure of protein C. J. Biol. Chem., 261, 11097-11105 (1986).
- 27) Takahashi, H., Tatewaki, T., Wada, K. & Shibata, A.: Plasma protein S in disseminated intravascular coagulation, liver disease, collagen disease, diabetes mellitus, and under oral anticoagulant therapy. Clin. Chim. Acta, 182, 195-208 (1989).
- 28) Sakata, Y., Murakami, T., Noro, A., Mori, K. & Matsuda, M.: The specific activity of plasminogen activator inhibitor-1 in disseminated intravascular coagulation with acute promyelocytic leukemia. Blood, 77, 1949-1957 (1991).
- 29) Ishii, H., Nakano, M., Tsubouchi, P. J. & Kazama, M.: Establishment of enzyme immunoassay of human thrombomodulin in plasma and urine using monoclonal antibodies. Thromb. Haemostasis, 63, 157-162 (1989).
- 30) Takano, S., Kimura, S., Ohdad, S. & Aoki, N.: Plasma thrombomodulin in health and disease. Blood, 76, 2024-2029 (1990).
- 31) Asakura, H., Jokaji, H., Saito, M., Uotani, C., Kumabashiri, I., Morishita, E., Yamazaki, M. & Matsuda, T.: Plasma levels of soluble thrombomodulin increase in cases of disseminated intravascular coagulation with organ failure. Am. J. Hematol. 38, 281-287 (1991).

- 32) 石井秀美, 風間睦美: トロンボモジュリン. 血液と脈管, 20, 469-505 (1989).
- 33) Baugh, R. J.: Human leukocyte granule elastase. Rapid isolation and characterization. *Biochemistry*, 42, 836-841 (1976).
- 34) Ohlsson, K.: The extracellular release of granulocyte collagenase and elastase during phagocytosis and inflammatory process. *Scand. J. Haematol.*, 19, 145-161 (1977).
- 35) Belch, J. J. F.: The role of white blood cell in arterial disease. *Blood Coagulat. Fibrinol.*, 1, 183-191 (1990).
- 36) 松田 保: t-PA. 第1版, 36-46 頁, ライフサイエンス社, 東京, 1991.
- 37) Cohen, A. B.: Mechanism of action of  $\alpha$ -1-antitrypsin. *J. Biol. Chem.*, 248, 7055-7059 (1973).
- 38) Sorenson, P. J., Knudsen, F., Nielsen, A. H. & Dyerberg, J.: Protein C assays in uremia. *Thromb. Res.*, 54, 301-310 (1989).
- 39) Alegre, A., Vicente, R. & Gonzalez, I. A.: Effect of hemodialysis on protein C levels. *Nephron*, 46, 386-387 (1987).
- 40) Esmon, N. L.: Thrombomodulin. *Semin. Thromb. Hemostasis*, 13, 456-463 (1987).
- 41) Ishii, H. & Majerus, P. W.: Thrombomodulin is present in human plasma and urine. *J. Clin. Invest.*, 76, 2178-2181 (1985).
- 42) Kazama, M.: Soluble thrombomodulin; a specific parameter of endothelial injury. *Jpn. J. Clin. Hematol.*, 32, 103-107 (1991).
- 43) 櫻林郁之介, 伊藤弘美, 石井周一, 本間寿美子, 河合忠: 血漿中における顆粒球エラスターゼに関する研究. *臨床病理*, 33, 1113-1118 (1985).
- 44) Aurigemma, N. M., Feldman, N. T., Gottlieb, M., Ingram, R. H., Lazarus, J. M. & Lowrie, E. G.: Arterial oxygenation during hemodialysis. *N. Engl. J. Med.*, 297, 871-873 (1977).
- 45) Ogawa, S., Shreenwas, R., Brett, J., Clauss, M., Furie, M. & Stern, D. M.: The effect of hypoxia on capillary endothelial cell function; modulation of barrier and coagulant function. *Br. J. Haematol.*, 75, 517-524 (1990).
- 46) 青木宏明: 血液透析に伴う低酸素血症の成因について—顆粒球エラスターゼの肺への影響—. *埼玉医科大学雑誌*, 14, 211-222 (1987).
- 47) 山木万里郎, 草野英二, 進藤靖夫, 細井春久, 永島弘文, 武藤重明, 鈴木宗弥, 浅野 泰, 櫻林郁之介: 血液透析による血中顆粒球エラスターゼ値の変動. *透析会誌*, 22, 1195-1200 (1989).
- 48) Zussman, R. M., Reuben, R. H. & Cato, A. E.: Hemodialysis using prostacyclin instead of heparin as the sole anti-thrombotic agent. *N. Engl. J. Med.*, 304, 934-939 (1981).
- 49) Oakajima, K., Koga, S., Inoue, M., Nakagaki, T., Funatsu, A., Okabe, H., Takatsuki, K. & Aoki, A.: Effect of protein C and activated protein C on coagulation and fibrinolysis in normal human subjects. *Thromb. Haemostasis*, 63, 48-53 (1990).

**The Relationship Between Hemostatic Parameters and Residual Blood Volume in Dialyzer during Hemodialysis**  
Masahide Yamazaki, Department of Internal Medicine (III), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-J.  
Juzen Med Soc., **101**, 100-110 (1992)

**Key words** hemodialysis, thrombin-antithrombin III complex, active form plasminogen activator inhibitor type 1, thrombomodulin, residual blood volume in dialyzer

#### Abstract

The purpose of this study was to evaluate the relationship between hemostatic parameters and the residual blood volume in the dialyzer during hemodialysis in a group of 49 patients with end-stage chronic glomerulonephritis (CGN) maintained in hemodialysis (HD). The coagulation analysis was performed by determination of some molecular markers such as cross-linked fibrin degradation products (XDP) measured by particle counting immunoassay (PCIA), thrombin-antithrombin III complex (TAT), plasmin- $\alpha_2$  plasmin inhibitor complex (PIC), protein C (PC), protein S (PS), active form plasminogen activator inhibitor type 1 (active PAI) and plasminogen activator/plasminogen activator inhibitor type 1 complex (t-PA/PAI) in plasma using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Plasma levels of thrombomodulin (TM), known to be present on vascular endothelial cells and to be released into circulating blood with damage to endothelial cells, and polymorphonuclear elastase (PMN-E), known to relate with inflammation and cause several kinds of biological injury, were also measured using ELISA. Plasma levels of TAT, XDP and TM before hemodialysis were significantly higher than those of normal control. After a single hemodialysis, plasma levels of TAT, PIC, t-PA/PAI, TM and PMN-E increased and plasma levels of active PAI decreased significantly. Plasma levels of TM before the hemodialysis were significantly higher in the cases of long-term hemodialysis than in those of short-term hemodialysis. There was a statistical correlation between an increase in TM and one in PMN-E following the hemodialysis. There was a statistically significant correlation between increment of TM and decline of white blood cell counts following the hemodialysis. Plasma levels of active PAI before the hemodialysis were higher in the patients with increased volume of residual blood in the dialyzer. In these patients, a significant increase in plasma levels of TAT and TM during a single hemodialysis was observed. It is highly possible that enhanced activation of the blood clotting system and impaired fibrinolysis caused an increase in the residual blood in the dialyzer in these patients. From these results, it was suggested that the coagulation system of patients treated by hemodialysis was activated by contact between blood and the foreign surface in the dialyzer and that the endothelial cells of these patients were damaged. The damage to the endothelial cells may be induced by the production of thrombin and the release of elastase from the polymorphonuclear cells during hemodialysis.