

原 著

## 体外循環に伴う血清遊離ヘモグロビン値の変動と腎尿細管障害について

—ELISA 法による遊離ヘモグロビン測定を用いて—

田 中 國 義\* 佐 藤 友 昭\* 水 元 亨\*  
和 田 潔 人\* 片 山 芳 彦\* 矢 田 公\*  
湯 淺 浩\* 草 川 實\*

## 要 旨

体外循環下手術を施行した成人症例14例について、ELISA 法を用いた遊離ヘモグロビン測定をおこない、体外循環による溶血と腎尿細管障害との関係について検討した。尿細管障害の指標として尿中 N-acetyl-D-glucosaminidase (NAG) および  $\alpha_1$ -microglobulin ( $\alpha_1$ M) の測定値を尿中 creatinine 値で除して index として表した。いずれの症例も体外循環中遊離ヘモグロビン値の上昇に比例して NAG-index および  $\alpha_1$ M-index の上昇を認め、溶血と尿細管障害の関係が推察された。

## はじめに

体外循環にともなう溶血性腎障害の発生は、開心術における大きな合併症の一つであり、血清遊離ヘモグロビン値と尿細管障害との関係について数多くの報告がなされてきた<sup>1), 2), 3), 4)</sup>。一方、血清遊離ヘモグロビンの測定は、従来、直接これを測定する方法がなく、ヘモグロビン 1 mg につきハプトグロビン 1.42 mg が結合するとの仮定のもとに総ヘモグロビン濃度および総ハプトグロビン濃度から計算式により求める分別法が一般的に行われてきた<sup>5), 6)</sup>。今回、(株)ミドリ十字が ELISA 法を用いた遊離ヘモグロビン測定キットを開発したので、これを用いて体外循環下手術における遊離ヘモグロビン値の推移と腎障害の関連について

検討した。

## 対象と方法

体外循環下に AC bypass 術、人工弁置換術、あるいは胸部大動脈瘤人工血管置換術を施行した14例を対象とした。全員、成人で男性9名、女性5名、年齢は44-67歳(平均55歳)であった。また術前の腎機能検査は全員正常で、BUN  $17 \pm 3$  mg/dl, creatinine  $1.0 \pm 0.2$  mg/dl であった。体外循環はローラーポンプと気泡型肺 (Harvey 1700) あるいは膜型肺 (Maxima) を組み合わせて行った。回路は 15% mannitol (5 ml/kg), 6% hydroxyethyl saccharide (Hespander 5 ml/kg) に乳酸リンゲル液を加え合計 2000-2200 ml で充填した。中等度低体温を用い、流量は  $2.4$  l/min.m<sup>2</sup> を目標とした。

## 採血および測定方法

採血は橈骨動脈留置針から、麻酔導入時、体外循環中30分毎、手術終了時、術後1日目、2日目、3日目の各時点において行った。尿検体は各採血時点間における蓄尿を用いた。

測定項目および測定方法を表1に示す。遊離ヘモグロビンの測定はミドリ十字社製の ELISA キットを用いた。本キットはハプトグロビンがヘモグロビンと特異的に結合するという特性を利用したもので、マイクロプレートにヒトハプトグロビンを結合させた固相化ハプトグロビンと、抗ヒトヘモグロビン抗体に酵素を標識した酵素標識抗ヒ

\*三重大学医学部胸部外科学教室

表1 測定項目及び測定方法

総ハプトグロビン	免疫比濁法
総ヘモグロビン	テトラメチルベンジジン法
遊離ハプトグロビン	総ハプトグロビン-総ヘモグロビン×1.42
遊離ヘモグロビン	ELISA 法
N-acetyl-D-glucosaminidase (NAG)	合成基質法
α <sub>1</sub> -microglobulin (α <sub>1</sub> M)	放射免疫測定法
NAG-index	尿中 NAG / 尿中 creatinine 値
α <sub>1</sub> M-index	尿中 α <sub>1</sub> M / 尿中 creatinine 値

トヘモグロビン抗体によるサンドイッチ ELISA を用いている。なお健康人100検体について本試薬で測定した結果は 0.0±0.0 mg/dl (M±SD) であった。

また腎尿細管障害の指標として、尿中の N-acetyl-D-glucosaminidase (NAG) および α<sub>1</sub>-microglobulin (α<sub>1</sub>M) を測定し、それぞれ尿中 creatinine 値で補正して NAG-index あるいは α<sub>1</sub>M-index として表した。

なお各測定値は平均±標準偏差で示し、統計学的処理は Student's t test により行い、危険率5%以下を有意差ありと判定した。

結 果

1) 図1に血清総ハプトグロビンおよび総ヘモグ

ロビン濃度の術中から術後3日にかけての経時的变化を示す。体外循環中、総ハプトグロビン濃度は有意の変化を示さないのに対し、総ヘモグロビン濃度は徐々に増加し、体外循環180分で 120±73 mg/dl に達した。

2) 図2に血清遊離ハプトグロビンおよび遊離ヘモグロビン濃度の経時的变化を示す。全例、体外循環開始後30-90分で遊離ハプトグロビンは消失し、体外循環終了後徐々に回復した。一方、いずれの症例も遊離ハプトグロビンが血漿から消失すると同時に遊離ヘモグロビンが検出されるようになった。一旦遊離ヘモグロビンが出現した後は急激に増加し、平均値で見ると、3時間で 93 mg/dl に達した。体外循環終了後は

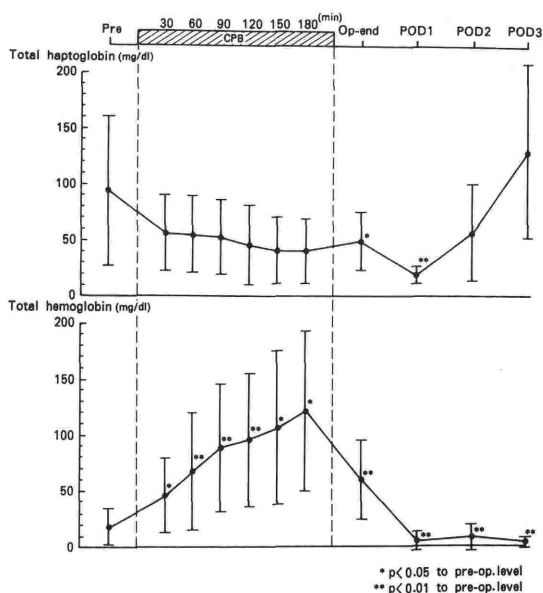


図1 総ハプトグロビンおよび総ヘモグロビンの変動

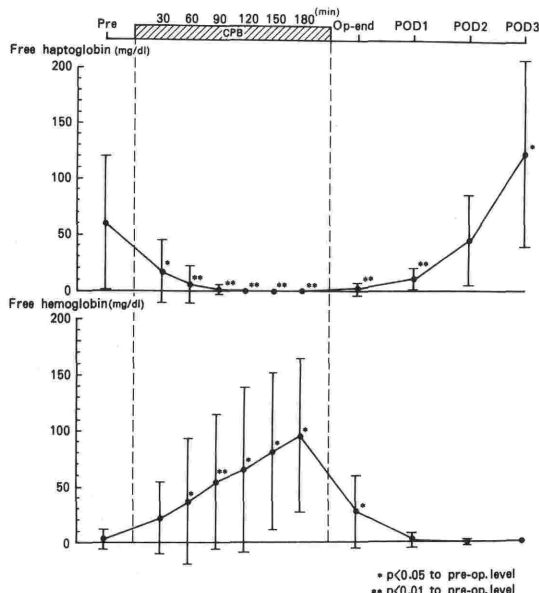


図2 遊離ハプトグロビンおよび遊離ヘモグロビンの変動

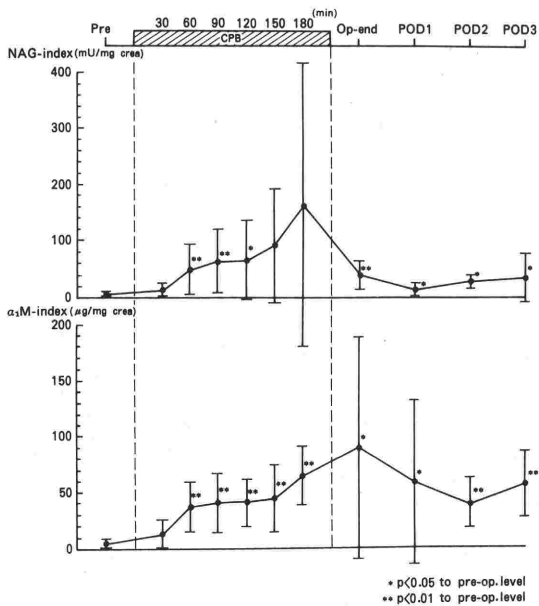


図3 尿 NAG-index および尿  $\alpha_1$ M-index の変動

急速に低下するが術後1日目にもなお14例中5例で 1.8-10.1 mg/dl の遊離ヘモグロビンが検出された。

- 3) 図3に尿 NAG-index および  $\alpha_1$ M-index の経時的变化を示す。NAG-index は、麻酔開始時から体外循環開始時までが  $8 \pm 4$  mU/mg crea に対し、体外循環中徐々に増加し、体外循環開始150-180分時には  $168 \pm 253$  mU/mg crea に達した。尿  $\alpha_1$ M-index は、体外循環開始前が  $4 \pm 4$   $\mu$ g/mg crea に対し、体外循環中漸増し、体外循環150-180分時には  $66 \pm 29$   $\mu$ g/mg crea に達した。両 index 共に、体外循環終了後低下するが、術後3日たってもなお前値に比べ高値が持続した。

## 考 察

人工肺や体外循環回路装置の進歩により、体外循環に起因する合併症を改善する工夫が積み重ねられてきたが、体外循環中の溶血に起因する腎機能障害は、いままお大きな問題として残されている。体外循環中の溶血による腎機能障害発生の機序として、1) 尿細管に排泄された遊離ヘモグロビンが分解されて生じた細胞毒 heme による急性尿細管壊死<sup>3)</sup>、2) 遊離ヘモグロビンが尿細管内で cast を形成する結果おこる尿細管内圧の上昇<sup>4)</sup>、3)

遊離ヘモグロビンによる血液凝固能亢進作用の結果引き起こされる DIC 類似現象<sup>7)</sup>などが想定されているが、いずれにしても過剰の遊離ヘモグロビンが腎尿細管障害を引き起こすことは異論のないところであろう。本研究においては、尿細管障害の指標として、近位尿細管 lysosome に多く存在し尿細管障害により尿中に逸脱すると考えられる尿中 NAG<sup>8),9)</sup>と急性尿細管障害において早期に尿中に排泄される尿中  $\alpha_1$ M<sup>10)</sup>を測定し、さらに尿量による影響をなくするため尿 NAG-index, 尿  $\alpha_1$ M-index を求めて検討した。その結果は、いずれも体外循環の経過とともに増加することが確認された。体外循環中は溶血の他に、腎血流低下、低体温、アシドーシスなども腎機能にたいし悪影響を及ぼすとされ<sup>11)</sup>、尿 NAG-index,  $\alpha_1$ M-index を上昇させる原因になり得ると考えられる。今回は溶血による影響を中心に検討したが、尿 NAG-index,  $\alpha_1$ M-index ともに遊離ヘモグロビンの上昇と対応した変化を示しており、遊離ヘモグロビンによる尿細管障害を反映しているものと推察される。

DeWall ら<sup>12)</sup>によると人工心肺使用時には血清遊離ヘモグロビンは 1.64 mg/dl/min のスピードで出現し、直線的に増加するといひ、我々の成績でも同様の結果であった。しかし個々の症例毎にみると、早いものでは体外循環開始前にすでに血清遊離ヘモグロビンの出現をみたのに対し、体外循環開始後90分まで血清遊離ヘモグロビンの出現しない症例もあった。このように血清遊離ヘモグロビンの出現時期が症例により一様でないことの原因として次のような原因が考えられる。一つは術前の血清ハプトグロビン値に極めて大きな個体差があるために、遊離ヘモグロビンに対する結合能が症例によって異なることがあげられる。血清ハプトグロビンの正常値は  $128 \pm 25$  mg/dl<sup>13)</sup>あるいは  $169.5 \pm 57.6$  mg/dl<sup>14)</sup>などの数値が報告されてはいるが、実際には 30-300 mg/dl と個体間にはかなりの開きがあり、心疾患とくに弁膜症では低値をとるとの報告もみられる<sup>5)</sup>。われわれの症例でも 15.9-120.8 mg/dl とその術前総ハプトグロビン値には大きなばらつきが見られた。もう一つは、体外循環中の溶血には人工肺など体外循環回路内面と血液との接触による血液破壊に加え、心嚢内血液の吸引による血液破壊が大きな原因と

なるため、疾患や術式による吸引出血量の差が、血清遊離ヘモグロビンの出現時期に大きく影響するためと考えられる。

最後に、本研究では遊離ヘモグロビンの測定に Enzyme linked immunosorbent assay を用いたが、従来の分別法と比較して、1) 直接、遊離ヘモグロビンを測定できる点、2) 測定法も容易で測定結果が2時間程度で得られる点など、体外循環のみならず様々な病態における溶血の診断に有用であると考えられる。

### ま と め

- 1) 体外循環中、総ハプトグロビン値は有意の变化を示さないのに対し、総ヘモグロビン値は経時的に増加した。
- 2) 体外循環中、遊離ハプトグロビンの消費に伴い遊離ヘモグロビンが出現した。
- 3) 体外循環中、尿 NAG-index および  $\alpha_1$  M-index の経時の上昇を認め、腎尿細管障害の発現を示唆した。
- 4) ELISA 法による血清遊離ヘモグロビンの測定は臨床上有用であった。

### 文 献

- 1) 栗岡孝明, 中村一俊, 橋本 宇, 小西邦彦, 宗行万之助: 大量輸血後血清遊離ヘモグロビン増加による腎機能障害とハプトグロビン製剤の効果. 臨床麻酔 13: 165-169, 1989.
- 2) 田中良哉, 三砂将裕, 織田 進, 斎藤和義, 千葉省三, 江藤澄哉: Evans 症候群の溶血発作による溶血性腎障害の回避にハプトグロビンが有効であった一例. 臨床と研究 65: 2351-2355, 1988.

- 3) Lalich, J. J.: The role of brown pigment in experimental hemoglobinuric nephrosis. Arch. Path. 60:387-392, 1955.
- 4) Meroney, W. H., Rubini, M. E.: Kidney function during acute tubular necrosis: clinical studies and a theory. Metabolism 8:1-15, 1959.
- 5) 金森由朗, 田辺 一, 下野高嗣, 谷 一浩, 矢田公, 湯浅 浩, 草川 實: 体外循環に従う溶血に対するハプトグロビン投与の効果. 臨床胸部外科 9: 463-467, 1989.
- 6) 長柄英男, 和田寿朗, 跡部正明, 平塚博男: 体外循環におけるハプトグロビン投与 Hp-Hb 複合, 遊離 Hp, 遊離 Hb の分別定量. 日胸外会誌 27: 172-177, 1979.
- 7) Jaenike, J. R., Schneeberger, E. E.: The renal lesion associated with hemoglobinemia II. Its structural characteristics in the rat. J. Exp. Med. 123:537-545, 1966.
- 8) 浅見 直: 尿中  $\beta$ -D-N-acetylglucosaminidase の諸性質と小児腎疾患における臨床的意義. 日腎誌 22: 117-136, 1980.
- 9) 長浜大輔, 田畑一弥, 安間文彦: 開心術後の腎尿細管障害における尿中 NAG 活性の変動. 臨床病理 56: 168-180, 1983.
- 10) 河内 忠:  $\alpha_1$ -マイクログロブリンの基礎と臨床. 生物物理化学 29: 225-230, 1985.
- 11) Yeb, T. J., Brachney, E. L., Hall, D. P., and Ellison, G. R.: Renal complications of open-heart surgery: predisposing factors, prevention, and management. J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 47: 79-97, 1964.
- 12) De Wall, R. A., Long, D. M., Gemmill, S. J., Lillehei, C. W.: Certain blood changes in patients undergoing extracorporeal circulation. J. Thoracic Surg. 37:325-333, 1959.
- 13) Lathem, W., Worley, W. E.: The distribution of extracorporeal hemoglobin in circulating plasma. J. Clin. Invest. 38:474-483, 1959.
- 14) 大城 孟: 無 haptoglobin 血症の臨床的意義. 最新医学 27: 1144-1155, 1972.

## Renal Tubular Damage Caused by Hemolysis during Extracorporeal Circulation—Free Hemoglobin Titration using Enzyme Linked Immunosorbent Assay

Kuniyoshi Tanaka, Tomoaki Sato, Toru Mizumoto  
Kiyoto Wada, Yoshihiko Katayama, Isao Yada  
Hiroshi Yuasa, and Minoru Kusagawa

Department of Thoracic Surgery, Mie University  
School of Medicine, Tsu, Mie, Japan

A study was undertaken to evaluate hemolysis which may cause subsequent renal damage in 14 patients undergoing cardiopulmonary bypass (CPB) surgery. Serum free hemoglobin concentration was measured using newly developed enzyme linked immunosorbent assay. Both N-acetyl-D-glucosaminidase (NAG) and  $\alpha_1$ -microglobulin ( $\alpha_1$ -M) values expressed in per urine creatinine levels (NAG-index and  $\alpha_1$ -M index) were used as indicators for renal tubular injury. Total hemoglobin level increased progressively and reached  $120 \pm 73$  mg/dl at 180 minutes under CPB. As a result, free haptoglobin disappeared

within 30~90 minutes under CPB, and free hemoglobin level increased progressively, reaching  $93 \pm 73$  mg/dl at 180 minutes under CPB. The NAG-index and  $\alpha_1$ -M index also increased progressively, reaching  $168 \pm 253$  mU/mg crea and  $66 \pm 29$   $\mu$ g/mg crea at 3 hours under CPB, respectively. These findings indicated that once the plasma hemoglobin level exceeded the binding capacity for haptoglobin, the free hemoglobin level would increase progressively, resulting in renal tubular injury as indicated by these corresponding increases in the NAG-index and  $\alpha_1$ -M index.

**Key Words:** Renal tubular injury, free hemoglobin, cardiopulmonary bypass, N-Acetyl-D-glucosaminidase,  $\alpha_1$ -microglobulin