

EDTA 依存性偽性血小板減少症における 血小板数推移パターンおよび抗凝固剤としての 硫酸マグネシウムの有用性

土屋 直道, 松尾 収二

公益財団法人 天理よろづ相談所病院 臨床検査部：奈良県天理市三島町 200 番地 (〒 632-8552)

はじめに

EDTA 依存性偽性血小板減少症 (EDTA Dependent Pseudothrombocytopenia: 以下, EDP) は, 血算 (CBC) 用採血管で使用される抗凝固剤 EDTA 塩の存在下で血小板凝集が起こるために生じる, 試験管内の現象である^{1,2)}. この現象は, GP IIb/IIIa などの血小板膜上の膜蛋白質に配位している Ca^{2+} イオンが EDTA 塩のキレート作用により奪われることで構造が変化し露出した潜在性抗原に, 当該患者の血液中に存在する免疫グロブリンが反応するため生じると考えられている^{3,4)}. EDP の発生頻度は 0.09 ~ 0.11%⁵⁾ といわれており, 悪性腫瘍, 肝疾患, 自己免疫疾患, 抗菌薬投与患者など免疫刺激状態にある基礎疾患との関連が指摘されている^{6,7)} が, 健常人にも認められる. EDP が見逃されると, 血小板抗体や骨髓穿刺など過剰な検査が追加されたり, 血小板輸血など不要な治療が行われたりするなど, 重大な医療過誤に繋がりがかねない⁸⁾.

EDP に対する血小板数測定対策としては, ①ボルテックスミキサーで 2~3 分攪拌して物理的に血小板の凝集をほぐす方法, ②過剰量の EDTA 塩を添加する方法, ③カナマイシンを添加 (10mg/mL) する方法⁷⁾, ④プレイン採血管にて採血後, 直ちに血球分析装置で測定する方法, ⑤ FC 管⁴⁾, ヘパリン, 凝固検査用 (クエン酸ナトリウム), 血糖検査用 (フッ化ナトリウム) など EDTA 以外の市販の採血

管を用いる方法, ⑥硫酸マグネシウム ($\text{MgSO}_4 \cdot 7$ 水和物, 以下 MgSO_4) を用いる方法^{9, 10)} などがあるが, これらの方法について詳述した文献は少ない. そこで本論文では, 当院で行った MgSO_4 を用いた方法についての検討を紹介する.

当院における EDP の確認手順と対応方法の検討

図 1 に当院における EDP 捕捉の流れを示した. 血小板数のオーダーにおいて, 初診の場合は塗抹標本作製して鏡検するようにしている. 血小板異常 (Abnormal, Suspect メッセージおよびデルタエラーなど (図 1)) によりフラグ判定されると, 塗抹標本作製して鏡検を行う. 血小板凝集を認めない場合は, 真の血小板減少と判断される. フィブリン析出を伴う血小板凝集は, 採血手技による偽性血小板減少, フィブリン析出を伴わない血小板凝集の場合に, EDP の可能性を考慮する. 連続して血小板凝集を認める場合は EDP の可能性がさらに高まる.

本検討では EDP を疑う患者に対し, 以下の手順で EDP か否か確認した. EDTA-2K と MgSO_4 20mg 添加の 2 種類の採血管を用い 2mL ずつ採血し, それぞれを採血直後, 30, 60, 90 および 120 分後に測定する. 血小板数の経時変化を基に報告書 (図 2) を作成し, EDTA 採血で血小板数の減少を認めた場合に EDP と判断した.

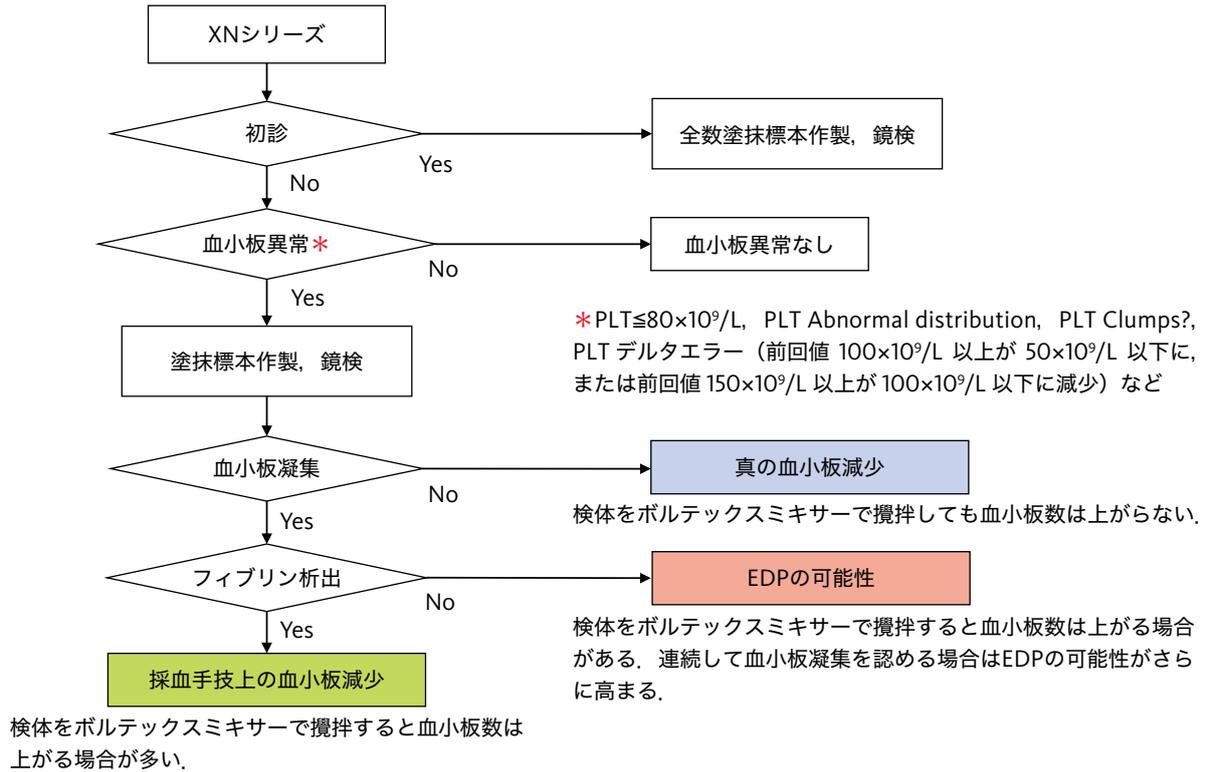


図1. 当院における EDP 捕捉の流れ

EDTA依存性偽性血小板減少症確認検査報告書

ID-No. 0001234567 検査日 20XX年XX月XX日
 氏名 ○○ ○○
 年齢 性別 □□歳 男性
 依頼元 血液内科 検査 土屋
 医師 △△ △△ 関 松尾

当該患者は、CBC採血時に抗凝固剤としてEDTAを用いると血小板が凝集するため、時間の経過とともに低値に測定されます(下図参照)。これは血小板膜上のカルシウムイオンがEDTA塩による強力なキレート作用により修飾を受け、血小板膜蛋白GP IIb/IIIaのエピトープが変化した結果、潜在性抗原が露出し血液中に存在する免疫グロブリンが反応するためと考えられています。肝疾患、自己免疫疾患など免疫刺激状態にある基礎疾患との関連が指摘されておりますが、健康人にも認められる場合があります。システムに患者登録しますので、次回から MgSO₄ 採血管にて採血をお願いします。なお、この採血管は外来棟総合検査室にあります。

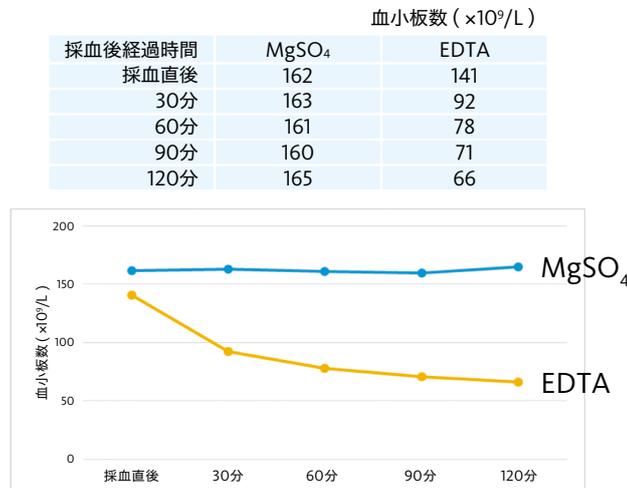


図2. 当院における EDP 患者の確認方法および報告例

対象および方法

1. MgSO₄ 最適添加量の検索

1) 抗凝固作用と自動血球分析装置での測定値への影響度検討

測定装置は多項目自動血球分析装置 XE-2100 (以下, XE; シスメックス) および多項目自動血球分析装置 XN シリーズ (システム: XN-3000) (以下, XN; シスメックス) を用いた。MgSO₄ 採血管として, MgSO₄ を 10, 15, 20, 25, 30 および 40mg をプレイン採血管に添加した。比較対象として EDTA-2K 採血管を準備した。健常者 8 名それぞれから注射器にて 15mL 採血し, それぞれの試験管に血液 2mL ずつ分注後, 十分に混和した。採血直後, 30, 60, 90 および 120 分後に XE にて測定した。

2) 血球形態への影響度検討

各濃度の採血管の血液について塗抹標本 (ライトギムザ染色) を作製し, 血球形態を観察した。

3) スキャッタグラムへの影響度検討

EDTA-2K, MgSO₄ 20mg および MgSO₄ 40mg の XE の Diff スキャッタグラムを比較した。

2. 当院における EDP 症例の血小板数推移パターン

当院で経験した EDP 144 症例について EDTA-2K および MgSO₄ 採血の血小板数 (PLT-I) の推移パターンを分類した。なお, 当院では 2014 年に自動血球分析装置を XE から XN に変更したため,

EDP 144 症例のうち, 81 症例が XE, 63 症例が XN によるものである。

3. MgSO₄ によるヘマトクリット (HCT) 偽低値の回避策

MgSO₄ 採血では EDTA-2K と比較して HCT が偽低値になり, その結果 MCV が偽低値, MCHC が偽高値に測定される問題がある。症例によっては MCHC が 37g/dL を超えてしまうことがある。当院の経験では毛細管 HCT を実施しても改善されない場合が多い。そこで健常人から EDTA-2K および MgSO₄ 20mg 添加の 2 種類の採血管を用いて 2mL ずつ採血し, XN にて計数後, MgSO₄ 採血管の残余血液約 1mL を空の EDTA-2K 採血管に移して計数した。即ち, EDTA-2K, MgSO₄ 20mg, および MgSO₄ 20mg + EDTA-2K 血液の XN の WDF スキャッタグラム, 白血球 5 分画比率および計数値を比較した。

結 果

1. MgSO₄ 最適添加量の検索

1) 抗凝固作用と測定値

①抗凝固作用

MgSO₄ 10mg で 8 例中 7 例, 15mg で 8 例中 1 例に血液凝固を認めたため測定できなかった。20mg 以上では凝集することなく測定できた。ただし, 40mg 添加の 1 例で 120 分後の測定で血小板数の減少を認めた (表 1)。

表 1. MgSO₄ 添加量と抗凝固作用

	MgSO ₄ 添加量	10mg	15mg	20mg	25mg	30mg	40mg
サンプル番号	No.1	凝固	○	○	○	○	○
	No.2	○	○	○	○	○	○
	No.3	凝固	○	○	○	○	○
	No.4	凝固	○	○	○	○	○
	No.5	凝固	○	○	○	○	血小板減少
	No.6	凝固	○	○	○	○	○
	No.7	凝固	凝固	○	○	○	○
	No.8	凝固	○	○	○	○	○

○: 問題なし

② CBC5項目と白血球5分画

血液凝固を認めなかった $MgSO_4$ 20, 25, 30 および 40mg の 8 例について、採血直後の CBC5 項目および白血球 5 分画の平均値を比較したところ、いずれについても明らかな差は認めなかった (表 2)。

③ MCV の経時変化

同対象 8 症例の各濃度の採血管について採血直後、30, 60, 90 および 120 分後の MCV の経時変化を平均で比較したところ、EDTA-2K に比べ MCV が採血直後でおよそ 1fL 低く、時間の経過とともにその差は広がり、2 時間後では 3~4 fL 低くなった。また、 $MgSO_4$ 濃度が高い程、その差は大きくなった (図 3)。

表 2. $MgSO_4$ 添加量と測定値の比較
(8 例について平均値を記載)

CBC5 項目	EDTA-2K	$MgSO_4$ 20mg	$MgSO_4$ 25mg	$MgSO_4$ 30mg	$MgSO_4$ 40mg
WBC ($\times 10^9/L$)	6.00	6.00	6.15	5.99	6.01
RBC ($\times 10^{12}/L$)	4.82	4.78	4.79	4.79	4.78
HGB (g/dL)	14.37	14.26	14.19	14.2	14.11
MCV (fL)	87.3	86.2	86.3	86.3	86.2
PLT ($\times 10^9/L$)	242.1	224.6	227	228.1	220.6

白血球 5 分画 (%)	EDTA-2K	$MgSO_4$ 20mg	$MgSO_4$ 25mg	$MgSO_4$ 30mg	$MgSO_4$ 40mg
Neutro	59.5	58.6	58.7	59.2	60.4
Lympho	33.1	34	33.5	33.2	32.8
Mono	5.1	5.2	5.5	5.4	4.7
Eosino	1.9	1.7	1.8	1.7	1.6
Baso	0.4	0.5	0.6	0.5	0.4

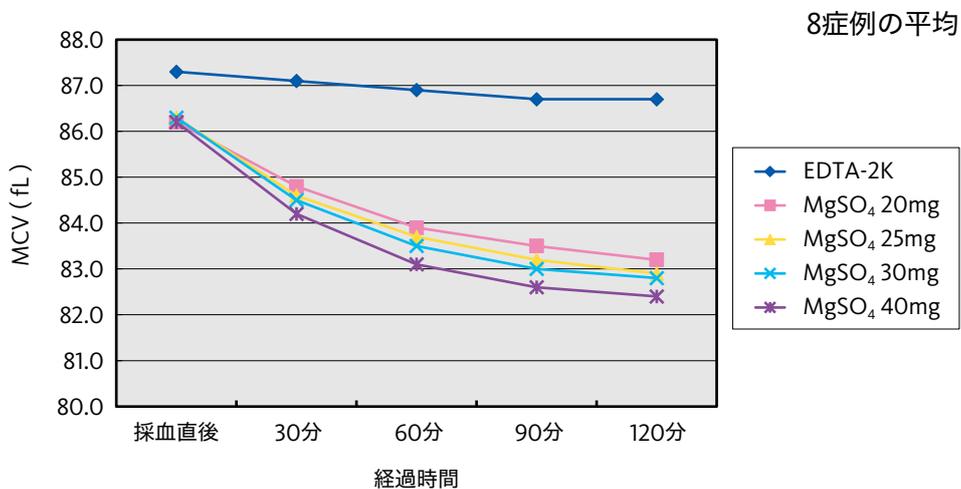


図 3. $MgSO_4$ 添加量と MCV の経時変化

2) 血球形態

MgSO₄ 20mg では、EDTA-2K とほぼ遜色なく血球形態が保たれた。一方で MgSO₄ 濃度が上がる 40mg 以上では、リンパ球が萎縮したり、好中球が崩壊傾向のものが増えた。赤血球についても立体感が失われたり、標的様に変化する傾向がみられた (図4)。

3) スキャッタグラム

EDTA-2K 採血に比べ、MgSO₄ 採血では XE

の DIFF スキャッタグラム上、縦軸側 (蛍光強度) の広がり方が小さくなり、その影響は MgSO₄ 濃度が高くなるほど強くなった。リンパ球領域の下部は有核赤血球の出現を示唆する領域であるため、MgSO₄ 濃度が高くなると XE において NRBC? フラグが表示されやすくなった (図5)。以上のことを総合的に判断すると、MgSO₄ 添加量は 20 mg が最良と考えられた (表3)。

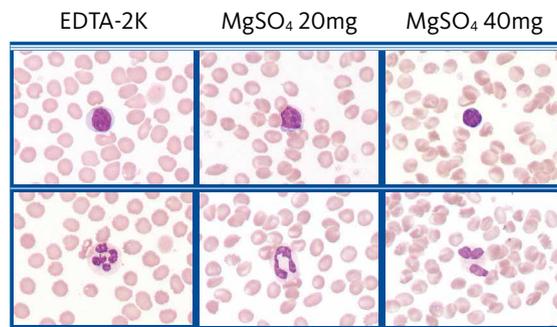


図4. MgSO₄ 添加量と血球形態

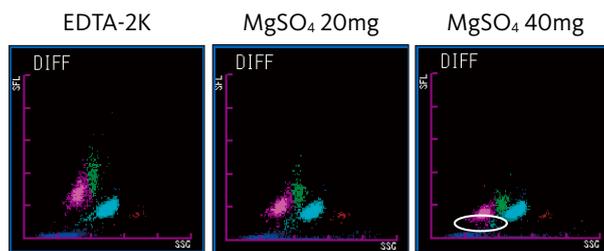


図5. MgSO₄ 添加量と DIFF スキャッタグラムへの影響

表3. MgSO₄ 添加量の総合評価

MgSO ₄ 添加量	10mg	15mg	20mg	25mg	30mg	40mg
血液凝固 (/8件)	7	1	0	0	0	0
NRBC フラグ表示の有無	0/1件	0/7件	0/8件	2/8件	8/8件	8/8件
血球形態	ND	ND	○	○	△	△~×

○: 良好 △: やや不良 ×: 不良

2. 当院における EDP 症例の血小板数推移パターン

過去に当院で EDP の確認を行った 144 症例の血小板数 (PLT-I) の推移パターンをタイプ分けしてみると、EDTA-2K 採血管で徐々に低下するタイプ (94 例)、採血直後から低値のタイプ (40 例)、直後が低く徐々に増加するタイプ (7 例) があつた。141 例については $MgSO_4$ 20mg 採血管で血小板凝集を抑制できたが、1 例については血小板数が元々低値であつたため血小板凝集抑制効果については判断できなかった。2 例については $MgSO_4$ 20mg 採血管を用いても採血直後から明らかに血小板数が偽低値になり、血小板凝集を抑制できないものが存在した (図 6)。

この 2 例は非常に稀な血小板寒冷凝集症例^{11~13)}であり、約 41°C で反応させて血小板解析が行われる、XN の蛍光色素法 (PLT-F) は目視法の結果を踏まえて寒冷による血小板凝集の影響を回避できる手段と考えられる¹⁴⁾。

3. $MgSO_4$ による HCT 偽低値の回避策

図 7 に EDTA-2K, $MgSO_4$ 20mg および $MgSO_4$ 20mg + EDTA-2K 採血管の XN の WDF スキャッタグラムと白血球 5 分画比率の一例を示した。 $MgSO_4$ 20mg および $MgSO_4$ 20mg + EDTA-2K 採血管は、EDTA-2K と比較して縦軸側 (蛍光強度) の広がり

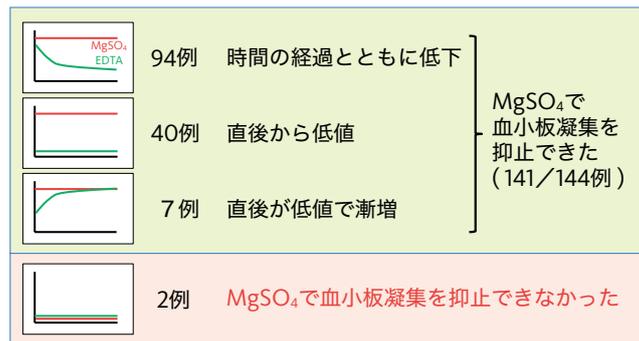


図 6. EDP における血小板数の推移パターン

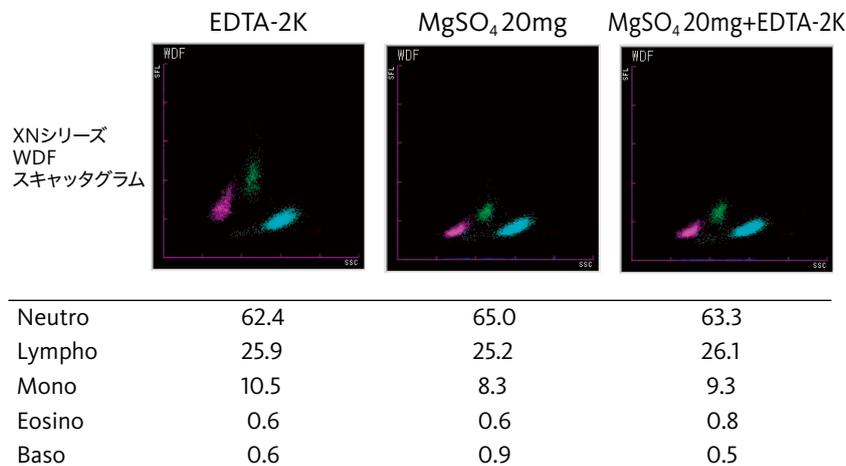


図 7. 各採血管の WDF スキャッタグラムと白血球 5 分画比率の比較

方が小さくなったが、白血球5分画比率においては
大差を認めなかった。表4に各採血管のCBC8項目
の比較一覧を示した。MgSO₄ 20mg 採血管において
HCT, MCVの低下とMCHCの上昇がみられた
が、MgSO₄ 20mg + EDTA-2K 採血管ではEDTA-
2K 採血に近似した測定値に戻った。

考 察

MgSO₄の利点としては、少なくとも2時間以上血
小板凝集を抑制する効果があることとJIS 試薬特級
で薬価が500gあたり1,000円程度と安価であること
が挙げられる。ただし、MgSO₄の結晶は粒が大き
いので、秤量時に乳鉢などを用いて粉末状にすり潰
しておく、精密に秤量でき全血に溶解しやすくな
る。問題点としてはEDP患者の初回時に対応できな
いことが挙げられる。EDP患者のEDTA-2K 採血
管にMgSO₄を添加することで血小板凝集の解離が
みられる場合がある¹⁰⁾が、必ずしも有効ではない。
また、ボルテックスミキサーでEDTA-2K 採血管を
攪拌し、物理的に血小板凝集を解離させて血小板数
を上げる方法もあるが、過剰な攪拌は白血球や赤血
球の物理的破壊に由来する断片を血小板として偽高
値に測定する可能性がある¹⁵⁾。当院ではEDP患者登
録後は、検査の煩雑さを考慮してCBC 検査用とし

て本研究結果より今後MgSO₄ 20mg 採血管のみを用
いて血小板凝集を回避できる可能性が示唆された。
このことは、XEおよびXNの血小板数値が、目視
法など計数結果にて検証した結果と時系列的計数結
果に大きな変化がみられなければ、そのまま報告で
きる結果と推測できる。一方で、MgSO₄ 採血では
HCTが低値に測定されるため、赤血球恒数、特に
MCHCが37g/dLを超えるような場合は、MgSO₄
20mg 採血管の残余血液約1mLを空のEDTA-2K
採血管に添加することでEDTA-2K 採血に近似した
計数値が得られると考えられる。なお、EDPの状態
は長期に渡るものから、ある種の投薬が原因と考え
られる一過性のものがある^{6,7)}ため、煩雑な作業にな
るが、EDTA-2KとMgSO₄の2種類を採血し、両
者の血小板数を比較してEDPが回復していないか確
認しておく必要がある。臨床側への報告は、血小板
数のみMgSO₄ 採血管の値を採用し、血小板数以外
の項目についてはEDTA-2K 採血管の値を用いる方
法が理想的と考えられる。

ただし、現時点ではシスメックスがXEおよび
XNにおけるMgSO₄の有用性・安全性を検証/保
証しているわけではなく、実臨床でMgSO₄ 採血管
を使うにあたってはさらなる検討が必要である。

表4. 各採血管のCBC8項目の比較

	EDTA-2K	MgSO ₄ 20mg	MgSO ₄ 残余血液 1mL を 空の EDTA-2K 採血管に添加
WBC (×10 ⁹ /L)	7.77	7.70	7.65
RBC (×10 ¹² /L)	4.61	4.61	4.58
HGB (g/dL)	14.8	14.8	14.7
HCT (%)	41.2	40.1	40.8
MCV (fL)	89.4	87.0	89.1
MCH (pg)	32.1	32.1	32.1
MCHC (g/dL)	35.9	36.9	36.0
PLT (×10 ⁹ /L)	355	349	338

MgSO₄ 採血ではEDTA-2K 採血と比べてHCTが低値に測定されたが、MgSO₄ 残余血液1mLを空のEDTA-2K 採血管に添加して測定すると、EDTA-2K 採血と近似した測定値になった。

結語

EDP 患者に対する血算用採血管として、 $MgSO_4$ の最適添加量を検索した。全血 2mL に対し $MgSO_4$ を 20 ~ 40mg 添加した採血管を用いると、血小板凝集抑制効果が保たれ、EDTA-2K と比較して赤血球恒数を除き、血球計数値や白血球 5 分画に大差を認めなかった。ただし、 $MgSO_4$ の添加量が増えるほど血球形態への影響やダメージを受けやすく、MCV も低値になる傾向が強まった。

全血 2mL あたり $MgSO_4$ 20mg 添加の採血管は、EDTA-2K 採血管と比較して MCV が 1 ~ 4fL 程度低値になるが、血球形態への影響が少なく、当院で経験した EDP 患者 144 症例中 141 例に対して血小板凝集を回避できた。

なお、本検討の要旨については、日本臨床検査自動化学会第 41 回 (2009 年) および 47 回 (2015 年) 大会において発表した。

多項目自動血球分析装置 XE-2100 : 医療機器製造販売
届出番号 28B2X10007000104

多項目自動血球分析装置 XN シリーズ : 医療機器製造販売
届出番号 28B1X1001400030

参考文献

- 1) Gowland E, et al : Agglutination of platelets by a serum factor in the presence of EDTA. J Clin. Path. 1969 ; **22** : 460-464
- 2) Shreiner DP, et al : Pseudothrombocytopenia : Manifestation of a new type of platelet agglutinin. Blood. 1973 ; **42** : 541-549,
- 3) 巽 典之 : 臨床検査用ユニバーサル・アンチコアグラント . 血栓止血誌 . 2002 ; **13** (2) : 158-168
- 4) 萩原幸恵, 他 : EDTA 依存性偽性血小板減少症における希釈管と FC 管の有用性について—1 検診センターの使用経験—. 医学検査 . 1999 ; **48** (5) : 843-847
- 5) Bizzaro N : EDTA-dependent pseudothrombocytopenia : a clinical and epidemiological study of 112 cases, with 10-year follow up. Am J Hematol. 1995 ; **50** : 103-109
- 6) 西郷勝康, 他 : EDTA 依存性偽性血小板減少症の臨床と検査 . 臨床病理 **53** : 646-653, 2005
- 7) 櫻井 進, 他 : 抗生物質添加による血小板凝集塊の乖離効果 . 臨床病理 . 1992 ; **40** : 1275-1280
- 8) Chun-HuiFang, et al : Case report EDTA-dependent pseudothrombocytopenia. Formosan Journal of Surgery. 2015 ; **48** (3) : 107-109
- 9) 仲本恭子, 他 : EDTA 偽性血小板減少症の血小板数の測定について, $MgSO_4$ の抗凝固剤としての応用 . 臨床病理 . 1986 ; **34** : 167-173
- 10) 小木曾美紀, 他 : EDTA 依存性偽性血小板減少症に対する $MgSO_4$ 添加による血小板凝集抑制の検討 . 医学検査 . 2007 ; **56** (6) : 926-930
- 11) 林 悟, 他 : 血小板寒冷凝集素により偽性血小板減少症を呈した 1 例 . 臨床病理 . 2005 ; **53** (8) : 703-707
- 12) 倉田義之, 他 : 血小板寒冷凝集素により偽性血小板減少症を呈した 4 症例 . 臨床血液 . 2006 ; **47** : 781-786
- 13) 中澤澄子, 他 : 血小板寒冷凝集素による偽性血小板減少症の 1 症例 . 医学検査 . 2013 ; **62** (1) : 52-55
- 14) 土屋直道, 他 : 血小板寒冷凝集素による偽性血小板減少に対する XN-3000 の PLT-O と PLT-F の有用性 . 日本臨床検査自動化学会誌 . 2015 ; **40** (4) : 441-441
- 15) 三島清司, 他 : Vortex 攪拌が血球計数に及ぼす影響 . 日本検査血液学会雑誌 . 2018 ; **19** (2) : 138-144