原 著

自動的プレストレージフィルトレーション の可能な成分採取システムの開発

山本定光* 中瀬俊枝* 佐藤典宏*
池淵研二* 関口定美*

Automatic Pre-storage Filtration System for Platelet Apheresis

*Sadamitsu Yamamoto, Toshie Nakase, Norihiro Sato,
Kenzi Ikebuchi and Sadayoshi Sekiguchi
Hokkaido Red Cross Blood Center,
Yamanote 2-2, Nishi-ku, Sapporo, 063, Japan*

Abstract

Leukocyte contaminations in the blood products have been shown to cause post-transfusion adverse effects. To eliminate those effects, leukocyte number in products has been recommended to be less than $1-5 \times 10^6$ per bag, however, apheresis machineries can not guarantee this level at present. Some modifications were introduced to Haemonetics Multi-component system, which made it possible to automatically filter platelet products during collection. The filter was set directly to the circuit line (in-line) or set between the collection bag and final bag (on-line). In-line filtration system decreased the contaminating leukocyte count less than 5×10^6 per bag furthermore, on-line filtration system guaranteed them to be less than 4×10^5 per bag. In addition, several platelet characteristics were similar to those of non-filtered platelets: pH, LDH, Glucose, Lactate, aggregation index, p-selectin and β -TG. Neither bradykinine nor inflammatory cytokines showed the increment during storage. These results indicated that on-line filtration/Multi-component system would be desirable to collect leukodepleted platelet products.

目 的

血小板製剤中に混入する白血球はいくつかの輸血副作用の原因であることはよく知られている。これらの副作用には同種感作、ウイルス感染と、混在する白血球が保存の過程で生成する

サイトカインによると考えられている非溶血性反応がある。

そのため、最近の成分採取装置は血小板採取にあたっては、混入白血球数を少なくして血小板を採取する様に改良がなされてきたが、なお、バッグ当たり 10^7 個以上の混入白血球数の製剤があり、すべてのバッグで混入白血球数の許容限界とされる $1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ 以下に達していない。

* 北海道赤十字血液センター

(原稿受付日：1996年7月4日)

白血球除去フィルターは 10^4 レベルの除去を可能にするまでに開発され、これらのフィルターは主としてベッドサイドで使用されている¹⁾。しかし、白血球除去フィルターをベッドサイドで使用しても、フィルターの効果を常に均一に保証することはできなし、保存中に白血球より生成される炎症性サイトカインの発生を阻止できない。さらに、最近表面が陰性荷電のフィルターでは輸血される血小板製剤中のブラジキニンレベルを上昇させ、受血者に血圧低下をもたらすとの報告もある²⁾。

これらの理由から、血液センターで血液を保存する前、すなわち採血直後に白血球を除くことにより、血小板製剤の高品質と安全性を保証していくことが考えられる。

我々は、ヘモネティクス・マルチコンポーネントシステム (MCS-3P) を使い、回路内に白血球除去フィルターを組み込み自動的に白血球を除去するシステム、すなわち血小板製剤保存前白血球除去 (Prestorage filtration) の実用性と効果について検討した。また、同時にこのプロトコールによって採取された血小板の性状、機能、保存中のサイトカインの生成などの項目について評価した。

方 法

ヘモネティクス・マルチコンポーネントシステム (MCS-3P) を用い、その採取プログラムの一部に変更を加えることで血小板採取からフィルターまでの一連の処理を自動的に行える様にした。

1. システムの概要

a) インラインフィルトレーション

血小板採取回路の血小板採取バッグの直前にフィルターを組み込んだものである (図 1-a)。

血小板は流速 200 ml/分 でフィルターを通じて集められる。

b) オンラインフィルトレーション

血小板は一時バッグに集められ、その後最終サイクル中に自動的に落差によってフィルター処理を行うものである (図 1-b)。

2. 設定、採取条件

この検討には A, B の 2 種類のフィルターを

図 1-a インラインフィルトレーションシステム回路図

図 1-b オンラインフィルトレーションシステム回路図

図 2 血小板製剤中の混入白血球数の分布

用いたが、これらはアメリカ、ヨーロッパ、日本で幅広く使用されている異なった製造社のものを使用した。なお、インラインは A フィルターで、オンラインは A, B の両フィルターを用いた。3 グループに分け実施したが、採取にはマルチコンポーネントシステムを用い、血液流量、遠心回転数、サージ終了点、クリティカルフロー等は同一条件下で 5 サイクルの採取を行った (表 1)。

表 1 採 取 条 件

	In-line	On-line	On-line
フィルター	A	A	B
採血流量 (ml/min)	60	60	60
サイクル数	5	5	5
遠心回転数 (rpm)	4,800	4,800	4,800
サージ終了点 (%)	60	60	60
クリティカルフロー (ml/min)	61	61	61

3. 対 象 群

対象は全例男性で、献血基準に適合するものから採取を行った。その身長、体重、循環血液量、採取前の血算値を表 2 に示すが、3 グループ間に大きな違いは認めていない。

表 2 対 象 群

	In-line (A)	On-line(A)	On-line(B)
例 数	10(男性)	10(男性)	10(男性)
身 長(cm)	167.9±1.2	170.4±5.4	169.6±6.1
体 重(kg)	61.5±4.0	68.2±5.4	70.2±4.6
循環血液量 (mL)	4317±237	4678±410	4770±272
白血球数(/ μ L)	6300±1800	5930±1880	6310±1210
赤血球数 ($\times 10^4$ / μ L)	513±28	491±28	504±20
ヘモグロビン 量(g/dL)	15.4±1.0	15.0±1.0	15.4±0.8
ヘマトクリッ ト値(%)	45.7±2.6	45.2±2.9	45.9±2.2
血小板数 ($\times 10^4$ / μ L)	24.9±3.2	24.7±3.2	26.2±3.2

4. 測 定 方 法

ドナーの血算、製剤の血小板数、MPV 値の測定にはコルターカウンター SPLUS IV を用いた。血小板製剤中の混入白血球数はプロピオデウムアイオダイドで白血球の核を染色し、フローサイトメトリー法（オーソ：サイトロ）にて計測した。血小板の % disk は Moroff らの方法に従い、また % HSR は日立分光光度計 U-2000 を用いて行った。グルコースの測定は (Glu-DH) 法、乳酸の測定は乳酸オキシターゼによる酵素法、LDH は Wroblewski-LaDue 法により測定した。pH 値の測定には Chiba corning 170 Blood gas analyzer を用いた。血小板の凝集能は ADP 10 μ M、コラーゲン 5 μ g/

mL、及び ADP とコラーゲンの共同刺激を NBS HEMA TRACER（日本光電）にて測定した。 β -TG は EIA 法、ブラジキニン濃度は RIA PEG 法にて、P-selectin は血小板表面の CD62 陽性率を免疫学的 CD62 測定試薬を用い、フローサイトメトリー法にて計測した。サイトカイン (IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α) の測定は、R & D 社の ELISA キットを用いて行った。

血小板の採取効率は、ドナーの採取前血小板数と採取後の血小板数の平均に、処理血液量（抗凝固剤を含まない）を掛け求めた処理血液中の総血小板数に対する、実際に採取された血小板数の割合を示した。

結 果

表 3 に採取状況を示す。3 グループとも採取時間はおおむね70分以内で、処理血液量、抗凝固剤使用量も差は認めなかった。A フィルターによるオンライン群のフィルター処理時間は4.7分、B フィルターのオンライン群は8.3分を要した。しかし、自動的フィルター処理は両群とも最終の採取終了前には完全に終わっていた。

表 3 採 取 状 況

	In-line(A)	On-line(A)	On-line(B)
例 数	10(男性)	10(男性)	10(男性)
N-N 時間 (min)	68.4±3.6	69.2±3.4	68.4±3.4
処理血液量* (mL)	2082±132	2112±76	2108±129
ACD 使用量 (mL)	207±14	213±7	211±12
フィルター処 理時間(min)	—	4.7±0.6	8.3±2.1

* 含抗凝固剤

表 4 に 3 つのグループにおける血小板製剤の性状を示す。血小板の回収量は 3 群ともほぼ 3.0×10^{11} 個である。血小板採取効率は 64~70 % であるが、B フィルター群がやや低い傾向にあった。混入白血球数は 10^4 レベルから 5×10^6 以下であった。

図 2 に血小板製剤中の混入白血球数の分布を示す。フィルター処理をしない血小板では、平均 22.3×10^6 白血球混入を認めているが、イン

表 4 採取血小板製剤

	In-line(A)	On-line(A)	On-line(B)
例 数	10	10	10
容量(mL)	251.6±22.9	232.0±30.0	213.7±13.1
血小板数 (10^{11} /bag)	2.94±0.35	3.01±0.57	2.85±0.33
白血球数 (10^6 /bag)	1.43±2.02	0.08±0.11	0.06±0.08
(最小-最大)	(0.06-4.66)	(0.02-0.37)	(0.01-0.20)
採取効率 (%)	69.7±5.4	69.2±6.2	63.9±5.4

図 3 フィルター処理後の血小板回収率の比較

ラインフィルトレーションを行う事で全例 5×10^6 を下回る成績が得られた。また、A、B 両フィルターのオンライン群は恒常的に高度の白

血球除去が得られ、採取された血小板の 100 % に混入白血球数を 4×10^5 以下にすることができた。

フィルターを使用しない時の血小板採取効率を 100 % とした場合の、3 つのグループでの採取血小板数の回収率の成績では (図 3), A フィルターインライン, A フィルターオンライン, B フィルターオンラインがそれぞれ 93.2 %, 92.5 %, 85.4 % となり、いずれも許容される成績であった。

生化学的検査および pH 値の成績を図 4 に示す。グルコースは保存とともに低下傾向を示し、乳酸は増加傾向を、また LDH はやや増加傾向を示すが、いずれもフィルター非使用のものと差はなかった。pH 値は 5 日保存ではほとんど変化は認めていない。

血小板の形態スコアの経時変化の成績では (図 5), 平均血小板容積 (MPV), 血小板ショック回復率 (% HSR) はフィルター非使用群もフィルターを使用した 3 つのテスト群もほとんど変化を認めなかった。ディスクサイトの比率 (% disk) は保存とともに低下するが、コントロール (フィルター非使用) とテストの 3 群に

図 4 Glucose, Lactate, LDH, pH の経時変化

図 5 MPV 値, % disk, % HSR の経時変化

差はなかった。

図 6 に血小板凝集能の検査成績を示す。ADP およびコラーゲン刺激による血小板凝集能検査は、フィルター処理の 3 グループについてのみの検討したが、正常な凝集能を保存していると考えられる。また ADP とコラーゲンの共同刺激による血小板の凝集は、コントロール（フィルター非使用）とテストの 3 群に差はなかった。

図 7 に血小板活性の指標となる β -TG および P-selectin の成績を示す。保存とともにやや

図 6 血小板凝集能の経時変化

上昇傾向は示すものの、その変化は正常範囲内であり、コントロールとテスト群間に違いはなかった。

ブラジキニンレベルは陰性荷電の膜との接触で上昇することがあると言われているが、今回の検討では 3 グループとも上昇は認めていない（図 8）。

保存中におけるサイトカインは多量の白血球の存在のもとで上昇すると言われるが、図 9 に示す通り 3 つのグループの IL-1 β , IL-6, IL-8,

図 7 β -thromboglobulin, P-selectin の経時変化

図 8 ブラジキニンレベルの経時変化

図 9 サイトカインレベルの経時変化

(36) 医器学 Vol. 66, No. 9 (1996)

TNF- α 値は, 5日間保存後でもほとんど検出限界程度であった³⁾.

結 語

今回の検討で, オンラインによる自動的フィルター法はA, Bの2社のフィルターを使用して検討したが, いずれも採取血小板の100%において混入白血球数を 4×10^5 以下にすることができた. これに対してインライン法では白血球混入が高く, しかも偏差の大きいことは血小板採取時の流速が200 ml/分と極めて高く, この流速で血小板がフィルターを通過することが原因になっていると思われる.

しかしそれでもインライン法は100%の血小板が 5×10^6 以下であることが示された. 血小板の回収率は3つのグループとも満足のいくものであった. また, 回収された血小板の性状, 機能はフィルター非使用のものと差違がなく, 保存中のサイトカイン生成も阻止されていた.

この白血球除去システムの更なる長所は, 血小板採取過程の最後まで完全自動で行われ, オペレータの操作が全く不要なことである.

以上のことから, ヘモネティクス・マルチコンポーネントシステム(MCS-3P)による自動的白血球除去プロトコールは有用であり, 単一献血者による恒常的低混入白血球の血小板採取法である. すなわち, この新しいプロトコールは保存前白血球除去血小板の通常の調整法として意義のあるものと考ええる.

文 献

- 1) S. Sekiguchi: Aspects of Leukocyte Depletion of Blood Components: Present Status in Japan, Leukocyte depletion of blood components. Högman CF ed, VU University Press, 1994, pp 19-40.
- 2) T. A. Takahashi, H. Abe, M. Hosoda, S. Sekiguchi: Bradikinin generation during filtration of platelets concentrates with a white cell-reduction filter. Transfusion 1995, 35 (11): 967.
- 3) M. Fujihara, T. A. Takahashi, S. Sekiguchi: Cytokine level detamination in stored apheresis platelet concentrates. Submitted to Transfusion.