Haemonetics-PEX による成分採血 III

多リンパ球血漿分画のリンパ球サブセットの変動

吉田 久博 伊藤 和彦 内野 治人

京都大学医学部附属病院 輸血部

(昭和60年7月8日受付)

APHERESIS USING HAEMONETICS-PEX BLOOD PROCESSOR III. Variation of Lymphocyte Subsets in Fractions of Lymphocyte-Rich Plasma

Hisahiro Yoshida, Kazuhiko Ito and Haruto Uchino

Blood Transfusion Service, Kyoto University Hospital, Kyoto 606, Japan

Lymphocyte-rich plasma obtained with a centrifugal cell separator was fractionated in 5-6 ml and lymphocyte subsets were measured in each fraction. During the process of lymphocyte fractionation, the percentages of OKT3 (+)- and OKT4 (+)-lymphocytes were gradually increased but those of OKT8 (+)- and OKB7 (+)-lymphocytes were gradually decreased. The ratios of OKT3/OKB7 and OKT4/OKT8 were remarkably and progressively increased. Extent of those variation was influenced by the hematocrit of donor blood. Variation of the specific gravity of lymphocyte subsets seems to lead to their relative separation in lymphocytapheresis.

緒 言

薬剤療法に対して抵抗性を示す難治性慢性関節リウマチの治療に lymphocytapheresis 療法が施行され、臨床諸症状の著明な改善の得られることが報告されている^{1)~5)}。Lymphocytapheresis 療法による効果発現機構については未だ解明されていないが、治療効果と末梢リンパ球サブセット (OKT4/OKT8) 比の低下との間に良好な相関性の認められることから^{5)~9)}、lymphocytapheresis による治療効果は、処置中の各リンパ球サブセットの除去率の相異に基づくもの、あるいは処置後各サブセットの turn over の相異に基づくものと推察されている。今回 lymphocytapheresis 療法の効果発現機構を解明する一環として、慢性関節リウマチ患者の lymphocytapheresis により得られる多リンパ球血漿を分画してリンパ球サブセットの解析を行ない、各サブセットの分画採取の可能性について明確にすると共に、これに影響を及ぼす要因について検討した。

方 法

Lymphocytapheresis は間歇流式連続血液成分分離装置を用いて、抗凝固剤に ACD-A 液を、内部容量125ml の pheresis bowl を使用して脱血速度 55ml/min、多リンパ球血漿採取速度25ml/min で行ない、65ml/min で返血した。処理時間は約3時間で、約300ml の多リンパ球血漿を採取した。なお処置中の hypovolemia を防止するために約300 ml の補液を行なった後、cytapheresis を開始した。また ACD-A 液によるクエン酸中毒を防止するためにグルコン酸カルシウムを適宜投与した。

リンパ球の分画採取は分離装置のカラーディスクリミネーターが作動して3ウェイクランプが切り換わった後、流出する多リンパ球血漿(約35ml)を手動操作により約5~6ml ずつ無菌的に採取した。

リンパ球サブセットの解析は、リンパ球をオーソミューン及び FITC-抗マウス IgG 抗体を用いて間接法により染色した後、細胞自動解析装置オーソ・スペクトラムIII (オーソ社)を用いて各

リンパ球サブセットの陽性率を測定して行なった。

症 例

リンパ球採取を3名の女性慢性関節リウマチ患者に施行した。各患者のリンパ球分画採取施行直前の血液検査結果を表1に示す。

結 果

1. リンパ球サブセットの解析

Lymphocytapheresisにより流出する多リンパ球血漿を分画採取したとき、各画分のリンパ球サブセットが異なるか否か検討した。表2及び図1aに第1症例より分画採取した時の各画分中血球数、リンパ球サブセット陽性率ならびに処置前末梢リンパ球サブセットに対する各画分の比を示した。リンパ球サブセットの分布様式は、OKT3及びOKT4陽性率が分画採取開始後徐々に上昇し、第4画分で最高となり、第一画分の1.22倍および

1.40倍となった。これに対してOKT8, OKB7陽性率は採取開始後漸減傾向を示し、各々最終画分では第一画分の70%, 27%に減少した。この結果(OKT4/OKT8)比及び(OKT3/OKB7)比は採取開始後著明に上昇し、最終画分では各々約2倍、約3.5倍となった。これらの結果は各画分でリンパ球サブセットの構成が著しく異なることを示している。

次に同一患者に再度リンパ球の分画採取を行ないサブセット分布様式の再現性について検討した。結果を図1bに示す。各画分中のリンパ球サブセット陽性率は図1aと若干異なる値を示したが、各サブセットとも同様の増減パターンを示した。この事は、リンパ球サブセットを分離し得たのは偶発的なことによるのではなく、比重の相異により各サブセットがbowl内で分離されるためと推察される。

2. リンパ球サブセット分画採取に及ぼすヘマトクリット値の影響

リンパ球サブセットを分画採取する際、患者のヘマトクリット値がサブセットの分離効率に影響を及ぼすか否か検討した。すなわちヘマトクリット値の異なる3名の患者に同一採取条件でリンパ球を分画採取し、リンパ球サブセットの分布パターンについて比較検討した(図1)。第2症例(図1c)は第1症例同様分画採取開始後OKT3, OKT4陽性率が漸増し、OKB7陽性率が漸減した。しかしその増減の程度は第1症例に較べて低値を示した。第3症例(図1d)では各画分間にサブ

表1 採取前血液検査

症 例	1		2	3
Pheresis No.	I	II	III	IV
RBC (10 ⁴ /μl)	302	288	361	397
Hct (%)	22.6	21.5	26.6	35.8
Hg (g/dl)	7.3	6.8	8.5	11.7
PLT (10 ⁴ /μl)	27.7	28.5	48.3	33.3
WBC (10 ³ /μl)	3.8	4.0	6.0	7.9
顆 粒 球 (%)	73	81	73	60
単 球 (%)	8	5	2	2
リンパ球 (%)	17.5	13	25	36

表2 多リンパ球血漿分画採取によるリンパ球サブセットの変動

	処置前	Fraction No.					
		1	2	3	4	5	6
RBC (10 ⁴ /μl)	302	10	31	40	93	128	158
PLT (10 ⁴ /μl)	27.7	397	904	400	223.5	92.6	63.4
WBC (10 ² /μl)	38	21	44	77	173	124	83
Lymph (%)	18	97	95	89	84	83	78
OKT3 (%)	57.4	48.9	48.6	55.8	59.7	53.5	56.2
OKT4 (%)	50.8	36.2	39.6	47.1	50.6	45.2	50.3
OKT8 (%)	7.3	9.6	9.1	6.8	7.3	6.2	6.7
OKB7 (%)	27.8	37.9	34.0	16.9	14.9	10.0	10.3
OKT4/OKT8	6.9	3.8	4.4	6.9	6.9	7.3	7.5
OKT3/OKB7	2.1	1.3	1.4	3.3	4.0	5.4	5.5

図1 分画採取した多リンパ球血漿のリンパ球サブセット及び血球成分

セットの著明な変化は認められなかった。リンパ球サブセットの分離効率とヘマトクリット値との関係をより明確にするために両者の関係を図示し

たのが図2である。なおリンパ球サブセット間に僅かな比重差がある場合、リンパ球ピークの両端でサブセット組成が著しく異なり得ることからサ

図2 リンパ球サブセットの分離効率に及ぼす Hct 値の影響

表3 Lymphocytophoresisによる末梢リンパ球サブセットの変化

採取画分	採取 リンパ球数		OKT3	OKT4	OKT8	OKB7	OKT4 OKT8	OKT3 OKB7
LP1 (第1～第5画分)	(2.39±0.09) ×10 ⁹	処置前(%)	59.7±1.2	46.7±4.5	12.8±3.2	29.3±2.7	4.73±1.15	2.14±0.29
		処置後(%)	57.9±1.6	46.0±3.5	14.8±4.6	29.4±3.1	4.61±1.30	2.08±0.28
		採取Bag(%)	61.5±1.1	48.8±3.4	15.3±4.3	26.3±2.1	4.43±1.18	2.42±0.27
		処置後 処置前	0.97±0.02	1.00±0.06	1.09±0.11	0.98±0.04	1.02±0.12	0.98±0.03
		採取Bag 処置前	1.03±0.02	1.07±0.08	1.15±0.07	0.91±0.04	0.94±0.08	1.14±0.06
LP2 (第3～第7画分)	(3.08±0.28) ×10 ⁹	処置前(%)	58.9±3.1	40.0±3.3	17.1±4.3	20.9±2.8	3.15±0.90	2.98±0.32
		処置後(%)	58.3±3.3	37.4±3.7	17.7±4.5	22.9±3.0	2.90±0.86	2.71±0.30
		採取Bag(%)	60.0±2.3	44.9±1.9	16.6±4.8	19.8±2.4	3.83±1.20	3.21±0.33
		処置後 処置前	0.99±0.01	0.93±0.04	1.04±0.04	1.09±0.04	0.89±0.02*	0.91±0.03*
		採取Bag 処置前	1.02±0.02	1.15±0.09	0.94±0.06	0.95±0.03	1.15±0.05*	1.09±0.03*

Mean±S.E.M.

* P<0.05

ブセット分離効率を第一画分に対する最終画分の比で示した。図より明らかな様に両者の間に良好な相関性を認めた。この事は、リンパ球サブセットの分画採取にヘマトクリット値が重要な影響を及ぼしていることを示している。

3. Lymphocytophoresis 前後の末梢リンパ球サブセットの変化

Lymphocytophoresis 施行時流出する多リンパ球血漿中のサブセット構成が各画分で著しく異なることから、多リンパ球血漿の採取画分を第一～第五画分(LP1)あるいは第三～第七画分(LP2)として症例1及び2についてcross-overにlymphocytophoresis 療法を施行したときの末梢血中及び総採取画分中のリンパ球サブセットの変化について比較検討した(表3)。LP1採取画分のサブセット陽性率は処置前値に較べてOKT3, OKT4, OKT8で僅かな上昇傾向を、OKB7で僅かな低下傾向を示した。また(OKT4/OKT8)比及び(OKT3/OKB7)比も各々上昇傾向、低下傾向を示したがいずれも有意差は認められず、処置後末梢リンパ球サブセットの変化も観察されなかった。これに対してLP2採取した場合、採取画分中

リンパ球サブセットのOKT3, OKT4陽性率が僅かに上昇し、OKT8, OKB7陽性率が僅かに低下した。また(OKT4/OKT8)比及び(OKT3/OKB7)比が有意(p<0.05)に上昇した。一方処置後末梢リンパ球サブセットは、OKT8, OKB7陽性率が僅かに上昇し、OKT4陽性率が僅かに低下した。(OKT4/OKT8)比、(OKT3/OKB7)比は有意(p<0.05)に低下した(表3)。これらの結果はlymphocytophoresis 施行時、採取時期を選択することにより僅かではあるが末梢リンパ球サブセットを任意に変更し得ることを示している。また15～20回lymphocytophoresis 療法を施行した時、著明なリンパ球サブセットの変動が認められるのは1回当りの僅かな変動の積み重ねによるものと推察される。

考 察

間歇流式連続血液成分分離装置を用いてリンパ球採取した時、多リンパ球血漿の採取画分によってリンパ球サブセットが異なること、各サブセットの分離効率が被採血者のヘマトクリット値によって影響を受けることを明らかにした。

現在慢性関節リウマチをはじめ各種難治性自己

免疫疾患の治療に lymphocytapheresis 療法が施行されている。各施設により処置回数・処置期間・採取条件等一様でなく、その治療成績も異なっている。著者らは、慢性関節リウマチ患者に15~20回 lymphocytapheresis を施行した時、末梢リンパ球サブセットの (OKT4/OKT8) 比が顕著に低下すること、またこれに伴ない臨床症状が著明に改善することを報告している⁵⁾。今回得た結果とこれらの結果を対比して考察したとき、lymphocytapheresis により慢性関節リウマチ患者の末梢リンパ球サブセットが変化したのは、OKT4陽性リンパ球をより選択的に除去したことが一因であると推察される。しかしリンパ球除去後の各サブセットの turn over の相異に起因する可能性もあり、いずれが主要因であるか今後更に検討する必要がある。

被採血者のヘマトクリット値によってリンパ球サブセットの分離効率が左右されることを示した。著者らは、内部容量の異なる pheresis bowl を用いて単一供血者に同じ処理条件で成分採血を行なった時、pheresis bowl 容量と総採取リンパ球数との間に良好な相関性を認めている¹⁰⁾。従ってヘマトクリット値の相異によりリンパ球サブセットの分離効率が左右されるのは pheresis bowl 内での血球成分の遠心時間の差に基づくものと考えられる。すなわち脱血速度を $V\text{ml}/\text{min}$ とすると1分間当りに pheresis bowl 内に流入する血球量は $V \times \left(\frac{\text{Hct}}{100} \right) \text{ml}$ である。1cycle 当りの血球成分みかけ遠心処理時間 T_{min} は pheresis bowl (内部容量 $P\text{vml}$) 内が血球成分で満たされるのに要する時間であることから次式が成立する。

$$T = \frac{Pv}{V \times \left(\frac{\text{Hct}}{100} \right)}$$

この式は遠心時間が (1/ヘマトクリット値) に比例することを示している。従って先にリンパ球サブセットの分離効率と (1/ヘマトクリット値) との間に相関性が認められたのは遠心時間の相異に基づくものと推察される。

Lymphocytapheresis によりリンパ球サブセットを分画採取し得ることを明らかにしたが今回対

象としたのは慢性関節リウマチ疾患患者であり、この結果が即他の自己免疫疾患患者あるいは健康人にあてはまるか否か明確ではない。今後他の自己免疫疾患患者についてもリンパ球サブセットの分画採取について精細に検討し、より効果的な lymphocytapheresis 療法を確立する必要がある。

要 約

間歇流式連続血液成分分離装置によるリンパ球除去療法の治療効果を高めるために、リンパ球サブセット分画採取の可能性と、これに影響を及ぼす要因について検討した。血液成分分離装置を用いて採取した多リンパ球血漿を5~6ml 毎に分画し、各分画中リンパ球サブセットを測定した。リンパ球採取開始後リンパ球 OKT3および OKT4陽性率は漸増し、OKT8および OKB7陽性率は漸減した。(OKT3/OKB7)比および(OKT4/OKT8)比は著明に増加した。これらの変動の程度はヘマトクリット値により影響をうけた。リンパ球サブセットの比重差により各サブセットが遠心分離されたと推測される。

文 献

- 1) Boku, E., Yoshida, Y., Yoshida, H., Sawada, J., Uchino, H., Senaha, Y., Kamio, T., Okumura, H. and Yamamuro, S.: Treatment of refractory rheumatoid arthritis with lymphocytapheresis. Therapeutic Plasmapheresis, II: 275-280, 1982.
- 2) 吉田久博, 吉田弥太郎, 沢田 仁, 朴 英薫, 内野治人, 鏑田武志, 河合忠一, 瀬名波良永, 上尾豊二, 奥村秀雄, 山室隆夫, 津田英夫, 吉岡三恵子, 三河春樹: 膠原病に対する Lymphocytapheresis 療法. 日輸血会誌, 29: 114-120, 1983.
- 3) 上尾豊二, 奥村秀雄, 山室隆夫, 瀬名波良永, 村瀬徹哉, 田中大也, 吉田久博, 吉田弥太郎: リンパ球排除法による慢性関節リウマチの治療. 日関外誌, 2: 147-154, 1983.
- 4) 吉岡三恵子, 津田英夫, 吉田弥太郎, 吉田久博: Lymphoplasmapheresis による難治性小児多発性筋炎の治療. 臨床神経学, 24: 214-217, 1984.
- 5) 吉田久博, 伊藤和彦, 内野治人, 上尾豊二, 奥村秀雄, 山室隆夫: 慢性関節リウマチに対する lymphocytapheresis 療法の治療効果について. 日輸血会誌, 印刷中.
- 6) Bach, M.A. and Bach, J.F.: Imbalance in T-cell subsets in human disease. Int. J. Immunopharmacol., 3: 269-273, 1981.

- 7) Veys, E.M., Hermann, P., Goldstein, G., Kung, P., Schindler, J. and Van Wauwe, J.: Determination of T lymphocyte subpopulations by monoclonal antibodies in rheumatoid arthritis. Influence of immunomodulating agents. *Int. J. Immunopharmacol.*, 3 : 313—319, 1981.
 - 8) Berrih, S., Gaud, C., Bach, M.A., LeBrigand, H., Binet, J.P. and Bach, J.F.: Evaluation of T cell subsets in myasthenia gravis using anti-T cell monoclonal antibodies. *Clin. Exp. Immunol.*, 45 : 1—8, 1981.
 - 9) Chalenoud, L., Bach, M.A., Jungers, P. and Bach, J.F.: Deficiency of suppressor/cytotoxic T cells in idiopathic membrane glomerulonephritis. *Immunol. Lett.*, 2 : 167—168, 1981.
 - 10) 吉田久博, 伊藤和彦, 吉田弥太郎: Haemonetics-PEX による成分採血 II : 新しく試作された内部容量170ml pheresis bowl による成分採血の検討. *日輸血会誌*, 29 : 618—622, 1983.
-