技 術

白血球除去赤血球の製造のための小型フィルターを 組み込んだ5連バックシステム

宮原 正行 大熊 重則 西崎太計志

岡山県赤十字血液センター

(平成元年 7 月20日受付)

QUINTUPLE-BAG SYSTEM WITH A SMALL FILTER FOR PREPARING LEUKOCYTE-DEPLETED RED BLOOD CELLS

Masayuki Miyahara, Shigenori Ohkuma and Takeshi Nishizaki
Okayama Red Cross Blood Center

A quintuple-bag system with a small filter was devised to prepare leukocyte-depleted red blood cells in a closed system. This system is a combination of buffy coat removal by centrifugation and filtration through cotton filter. Approximately 65% of leukocytes were removed in the first step, centrifugation process, and approximately 98% of leukocytes were removed in the following filtration process. Removal of leukocytes increased up to 99% when the filtration was carried out at 4—6°C. Thus, the number of leukocytes remaining in the red cell concentrates derived from 400 ml of blood was estimated to be approximately $1.4 \times 10^7/\text{unit}$. Therefore, if the red cells prepared by this method are used, the risk of HLA immunization can probably be prevented.

はじめに

近年の成分輸血の発達は、輸血療法に著しい進歩をもたらしたが、反面血液の使用量を飛躍的に増大させ、それに伴う輸血副作用が新たな問題として提起されてきた。特に、血液製剤中に含まれている白血球が輸血副作用の原因となることが多く、発熱、悪寒など^{1)~3)}のような以前から指摘されていた副作用だけでなく、最近では抗白血球(HLA)抗体の産生や⁴⁾⁵⁾graft versus host (GVH)反応^{6)~8)}などによる副作用が大きな問題となってきた。そのため、今後の輸血においては、白血球をできるだけ除去した血液製剤を用いることが望ましいと思われる。

従来から、乏白血球製剤として洗浄赤血球や白血球除去赤血球が日本赤十字社血液センターから供給されているが、いずれも open system で製造されるので有効期限が製造後24時間と短く、限られた患者だけに少量製造されているに過ぎない。

また、その白血球除去率がHLA抗体産生やGVH反応の防止のためには必ずしも十分でないことなど、改良すべき点も多い。

このような観点から、我々は以前に4連バックを用いた non-button PC 法を考案し、濃厚赤血球や濃厚血小板から closed system で白血球が除去できることの他、機能の良好な血小板が得られること、血漿の収量が現行法より20~30%高くなること、赤血球の保存期限が約2週間延長できることなど、多くの利点が得られることを示した⁹⁾¹⁰⁾。現在、この方法の実用化を目指し、機械を用いて自動化することが検討されている¹¹⁾¹⁷⁾。しかし、この方法だけでは、濃厚赤血球における白血球除去率が約65%であり、最近問題になっている HLA 抗体や GVH 反応の防止の目的には不十分であると思われる。そこで、当研究では、濃厚赤血球の白血球除去率をさらに向上させるため、このシステムに小型の白血球除去フィルターを組み込んだ

5連バックシステムを考案した。

当システムを考案する際、上記で指摘した問題点を解決するため、特に次の3点について考慮した。(1)白血球除去率の目標は、少なくとも現行の白血球除去赤血球の白血球除去率(90~95%)以上とする。(2)白血球を効率的に除去するため、原理の異なった除去方法である遠心法とフィルター法を組み合わせる。(3)白血球除去赤血球の有効期限を現行法より大幅に長くするため、closed systemで製造できるようにする。以上の観点から、今回考案した5連バックシステムの有効性について検討した。

方 法

当研究で考案した5連バックシステムを図1に示す。このシステムでは、親バッグと第4子バッグ(SAGP-maltose液)⁹⁾の間に小型の白血球除去フィルター(テルモ社特注品、カラムの直径2cm, 長さ10cm, エジプト綿重量5~7g)が組み込まれている。

このシステムを用いた血液成分製剤の製造法は以下の通りである。最初に、400mlの血液を親バッグ(CPD液)に採血し、これを3,500×gで5~6分間遠心する。上層の血漿を第1子バッグに移行させ、buffy coat層が親バッグの排出口から

約3.5cmのところ(白線の目印)に達した時止める。次に、親バッグ中の残存血漿と血小板を含むbuffy-coat層を合わせて約70mlを第2子バッグ(ミニバッグ)に移す。a点及びb点をシールした後切り離し、第1子バッグを-20℃以下で凍結して新鮮凍結血漿とする。第2子バッグと第3子バッグを連結したまま1,800×gで5~6分間遠心し、上層の血漿(血小板が浮遊)約40mlを第3子バッグへ移し、濃厚血小板(PC)を得る。次に、第4子バッグのSAGP-maltose液をフィルターを通してプライミングし、同時にその液で赤血球を浮遊させる。赤血球を均一に再浮遊させた後、親バッグ(上)と第4子バッグ(下)の落差が約60cmになるように吊るし、赤血球浮遊液をフィルターで濾過して白血球除去赤血球を得る。低温で濾過する時は、4~6℃の冷蔵庫で同様な操作を行った。

濃厚赤血球中の残存白血球数は、Vakkila等の方法にしたがって計数した¹²⁾。すなわち、10~15mlの赤血球に対し10倍量の0.83%NH₄Cl, 0.01M KHCO₃ (pH 7.4)を加え、赤血球を溶血させる。次に、PBS, RPMI-1640 (5%FCS)でそれぞれ洗浄後、後者の液に再浮遊させ、チュルク染色液で染色し、視算法(検鏡)により白血球を計

図1 小型白血球除去フィルター (IG-S) を組み込んだ5連バッグシステム

数した。残存白血球の分類はペルオキシダーゼ染色(PO-K 染色キット, 武藤化学)を用いて行った。なお、赤血球の計数には、Sysmex E-5000を用いた。

結 果

フィルターを含まない5連バッグシステムによって製造した濃厚赤血球の白血球除去率を表1に示す。このデータから、遠心法(non-button PC法)によって、リンパ球は約90%除去できたが、なお顆粒球が約50%残存することが示された。

各種の小型フィルターを組み込んだ5連バッグシステムによって製造した濃厚赤血球の白血球除

去率を表2に示す。この実験では、原料血液の個体差による実験誤差を少なくするため、non-button PC法で製造した濃厚赤血球の数単位をあらかじめプールし、これを室温で各種のフィルターに通した。Polyester (PET)系フィルターは白血球アフェレーシスのロイカラム(テルモ社)と同じ材料が使用されているので、白血球に対して強い吸着力を持つと予想されたが、実際はイムガード(IG)フィルターより白血球除去効果が低かった。種々の綿重量のIGフィルターを比較すると、綿重量の増加に応じて濾過時間が長くなったが、白血球除去率は上昇する傾向を示した。白血球除去率の当初の目標は90~95%以上としたので、綿重量は少なくとも6g以上必要であると考えられる。

次に、イムガードフィルターの綿重量6gと7gのものについて、さらに濾過温度等の条件を変え、白血球除去効率の改善を試みた。その結果、濾過温度を室温から4~6℃に変更すると、白血球の除去率がさらに上昇し、残存する白血球数は同条件の室温における濾過法に比べて1/2~1/3に低下

表1 Non-button PC法(遠心工程)で製造した400ml由来濃厚赤血球の白血球除去率

	白血球残存量 ($\times 10^8$ /unit)	白血球除去率 (%)
総白血球	8.46 $\pm$ 2.94	66.5 $\pm$ 3.2
リンパ球	0.61 $\pm$ 0.32	92.8 $\pm$ 3.2
顆粒球	7.24 $\pm$ 2.82	53.3 $\pm$ 16.3

n=18

表2 小型白血球除去フィルター付き5連バッグシステムで製造した濃厚赤血球の性状*

フィルター	フィルター 綿重量 (g)	濾過 落差 (cm)	濾過 時間 (min)	白血球除去率		
				遠心工程 (%)	濾過工程 (%)	全工程 (%)
IG-S5	5	60	34	67.1	78.0	93.5
IG-S6	6	60	70	67.1	86.9	95.6
IG-S7	7	60	127	67.1	91.3	97.3
PET-S5	5	60	22	67.1	39.2	79.4
PET-S5	5	40	32	67.1	46.5	81.9

*この実験では、フィルターの性能を正確に比較するため、Non-button PC法(遠心工程)で製造した5単位の400ml由来の濃厚赤血球をプールした後5バッグに再分注し、それぞれを各フィルターで濾過した。

IG=Imugard filter(エジプト綿), PET=Polyester 綿フィルター

表3 白血球除去率に及ぼす小型イムガードフィルターの綿重量と濾過温度の影響

フィルター	フィルター 重量	濾過 温度	残存白血球数 ($\times 10^7$)	白血球除去率 (%)	残存白血球の PO陽性率* (%)	残存リンパ球数 ($\times 10^7$)	濾過時間 (min)	n
IG-S6	6g	RT	9.54 $\pm$ 4.68	95.5 $\pm$ 2.4	83.0 $\pm$ 7.8	1.57 $\pm$ 1.11	70	5
IG-S6	6g	5℃	5.05 $\pm$ 3.06	97.0 $\pm$ 2.3	65.5 $\pm$ 9.9	1.67 $\pm$ 1.06	180	5
IG-S7	7g	RT	3.96 $\pm$ 1.48	97.8 $\pm$ 1.5	70.4 $\pm$ 10.6	1.21 $\pm$ 0.81	120	5
IG-S7	7g	5℃	1.41 $\pm$ 0.57	99.1 $\pm$ 0.7	32.6 $\pm$ 15.1	1.03 $\pm$ 0.56	280	5

*PO=ペルオキシダーゼ RT=room temperature(室温)

表4 小型IG フィルター付き5連バッグシステムと現行のIG フィルター法の比較

方 法	濾過温度	残存白血球数 ($\times 10^7$)	白血球除去率 (%)	保存期限 (日)	n
IG-400Y ¹⁾	RT	17.50 $\pm$ 16.40	93.8 $\pm$ 5.7	1	5
NBPC+IG400Y ²⁾	RT	1.56 $\pm$ 0.91	99.1 $\pm$ 0.2	1	5
NBPC+IG-S7 ³⁾	5 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C	1.41 $\pm$ 0.57	99.1 $\pm$ 0.7	21~35	5

1) 通常の濃厚赤血球を400ml/血液用 Imugard filter(IG400Y)で濾過(日赤業務標準法)

2) Non-button PC法(NBPC)で製造した濃厚赤血球を400ml/用 Imugard filter(IG400Y)で濾過

3) 小型フィルター(IG-S7)付き5連バッグシステムを用いた non-button PC法(NBPC)

RT=room temperature(室温)

した(表3)。特に、IG-S7(綿重量7g)を用いた場合、残存白血球数が平均 1.41×10^7 個(白血球除去率:約99%)となり、当初の目標を大きく上回った。また、除去される白血球の種類を調べると、ペルオキシターゼ陽性のものの減少率が大きいことから、低温で濾過することによって顆粒球が一層除去され易くなる傾向が認められた。ただし、低温にすると濾過時間が著しく長くなった。

上記のIG-S7(closed system, 5 $^{\circ}$ C濾過)と、テルモ社のイムガードフィルターIG-400Yを用いた現行の白血球除去赤血球製造法(open system, 室温濾過)、および non-button PC法で製造した濃厚赤血球を原料としてIG-400Yを用いた方法(open system, 室温濾過)の比較を表4に示す。IG-S7を用いた5 $^{\circ}$ C濾過法は、現行の白血球除去赤血球より白血球除去率が高く、non-button PC法とIG-400Yの室温濾過法と組み合わせた場合とほぼ同等の値を示した。

考 察

血液製剤から白血球をどの程度除去すればよいかと言う問題には種々の議論がある。たとえば、発熱や悪寒などの副作用を防止するためには約 1×10^9 個以下にすればよいと言われているが¹³⁾¹⁴⁾、抗体価によって異なる可能性がある。また、HLA抗体の産生度は、1回に輸注される白血球量だけでなく、輸血の頻度や間隔、また受血者の免疫応答性などによっても大きく異なる¹⁵⁾。そのため、除去すべき白血球の個数を正確に表すこ

とは容易ではないが、これまでの研究例から総合的に判断すると、 1×10^7 個以下にすれば発熱、悪寒などの副作用だけでなく、HLA抗体産生の防止にも大きな効果を示すものと推定される⁵⁾¹⁶⁾。今回我々が考案した方法では、400ml/由来の濃厚赤血球から白血球を約99%除去(残存白血球数:約 1.4×10^7 個)できることが示されたので、HLA抗体産生の防止のためにも有効であると考えられる。これらの関係をまとめると、図2のようになる。

白血球の除去効果を評価する際に注意すべきもう一つの事項は、白血球数の表示方法と計数方法である。たとえば、除去率95%と言え、ほとんどの白血球が除去されたような印象を受けるが、個数で表せばなお $2 \sim 5 \times 10^8$ 個(400ml/由来濃厚赤血球)も残存していることを意味する。また、白血球数が 1×10^7 個以下になると、通常の自動血球計数器による測定法では誤差が大きい。このような低濃度の白血球を計数する場合は、前処理として検体を濃縮し、その後顕微鏡で計数する方法¹²⁾が良いと思われる。

本法の特徴の一つは、遠心法とフィルター法を組み合わせたことである。遠心法では通常リンパ球は効率的に除去されるが、顆粒球は赤血球との比重差が小さいため、十分分離することが困難である。したがって、遠心操作の繰り返し法は、2回目以降の白血球の除去効率が悪く、しかも赤血球の損失が大きくなる。一方、フィルター法は、

図2 各種の赤血球製剤(400ml 由来)の白血球残存量と輸血副作用発生日の関係
1)~3) 日赤業務標準法, 4) NBPC=non-button PC法, 5) Non-button PC法で製造したものを400ml 用イムガードフィルターで濾過, 6) 小型イムガードフィルター(7g)を組み込んだ5連バッグシステム

白血球を選択的に除去する能力がある。ただし、多量の白血球を含んだ血液を一度に通すと吸着力や濾過速度が著しく低下する傾向がある。したがって、遠心法を先に実施することによってフィルターへの負担を軽減することができる。その結果、通常の1/4~1/5程度の小型フィルターで大きな効果が得られ、しかもフィルターをバッグシステムに組み込むことも可能となる。また、フィルター法では顆粒球が優先的に除去され易い傾向があるので、リンパ球が優先的に除去される遠心法との組み合わせは、白血球除去法として非常に合理的な方法であると考えられる。

さらに、小型フィルターで白血球除去率を一層向上させるため、低温(4~6℃)における濾過操作を試みたところ、同じ綿重量のフィルターを用いても白血球除去率が著しく上昇した。反面、低温操作では濾過時間が非常に長くなった。しかし、当システムはclosed systemで操作できるので、たとえば冷蔵庫などでバッグを一晩吊るしておいて濾過するという方法も可能であり、操作の煩雑さを避けることができるであろう。また、closed systemの利点から有効期限が長くなるので、一定量をまとめて製造することもでき、むしろ

ろ作業効率が向上する可能性があると思われる。

現行の白血球除去製剤として使用されている洗浄赤血球や白血球除去赤血球の問題点の一つは、open systemで製造されていることである。そのため、有効期限が非常に短く(製造後24時間)、製造の作業効率が悪いだけでなく、使用する際にも不便である。それに対し、本法ではclosed systemで製造できるので、短い有効期限による様々な制約から解放されるであろう。

本法を実用化する上で今後検討を要することは、製造工程が若干複雑になり、製造経費が高くなることである。操作性の改良のためには、分離工程を自動化することが有効かも知れない。最近、このような自動分離装置の開発も試みられている¹¹⁾¹⁷⁾。経費に関しては、バッグ、フィルター、保存液などの追加によって確かに上昇するが、血漿の採取量が増加すること、赤血球の有効期限が延びること、輸血副作用が減少することなどを考慮すれば、全体的経済効果はむしろ向上する可能性があると思われる。また、最近セパセルフィルター(旭メディカル)¹⁸⁾やイムガードE(テルモ)¹⁹⁾など、白血球除去効果の一層優れた新しいフィルターも開発されてきているので、今回示した小型

フィルターシステムとして応用すれば、さらに白血球除去効果の高い方法を開発できる可能性もある。

以上のことから、小型白血球除去フィルターを組み込んだ5連バッグシステムは、non-button PC法の利点に加えて、白血球を約99%除去した濃厚赤血球（白血球残存量約 1×10^7 個）が得られるので、輸血副作用の少ない血液製剤を製造する方法として有用であると考えられる。今後、この方法の実用化についてさらに検討していきたい。

ま と め

現行の白血球除去赤血球よりさらに白血球除去率の高い濃厚赤血球をclosed systemで製造できるようにするため、小型フィルターを組み込んだ5連バッグシステムを考案した。本法では、遠心操作で約65%の白血球が除去され、次に小型のImugard Filter（カラム： 2×10 cm, 綿重量：7g）による濾過操作で約98%の白血球が除去された。さらに、濾過操作を4℃で行うと、白血球除去率は99%まで上昇した。この値を400ml由来の濃厚赤血球中の白血球残存量で示すと約 1.4×10^7 個となり、発熱等の副作用だけでなくHLA抗体産生の防止にも有効と思われる。本法は、遠心法と濾過法を組み合わせたことによりリンパ球と顆粒球がともに効率的に除去でき、しかもclosed systemのため有効期限も長くなり、白血球除去赤血球の製造法として有用であると考えられる。

文 献

- 1) Dauset, J.: Leuko-agglutinins. IV. Leuko-agglutinins and blood transfusion. *Vox Sang.*, 4: 190—198, 1954.
- 2) Brittingham, T.E.: Immunologic studies on leukocytes. *Vox Sang.*, 2: 242—248, 1957.
- 3) Brittingham, T.E. and Chaplin, H.J. Jr.: Febrile transfusion reactions caused by sensitivity to donor leukocytes and platelets. *J.A.M.A.*, 165: 819—825, 1957.
- 4) Goldstein, I.M., Free, H.J., Terasaki, P.I., et al.: Leukocyte transfusions—Role of leukocyte alloantibodies in determining transfusion response. *Transfusion*, 11: 19—24, 1971.
- 5) Fisher, M., Chapman, J.R., Ting, A., et al.: Alloimmunisation to HLA antigens following transfusion with leukocyte-poor and purified platelets suspensions. *Vox Sang.*, 49: 331—335, 1985.
- 6) Hathaway, W.E., et al.: Aplastic anemia, histiocytosis and erythrodermia in immunologically deficient children. *N. Eng. J. Med.*, 273: 953—958, 1965.
- 7) 下山正徳：輸血によるGraft-versus-host Disease (GVHD). *日輸血会誌*, 33: 568—575, 1987.
- 8) 榊原高之, 井野隆史：いわゆる術後紅皮症について. *日輸血会誌*, 33: 576—580, 1987.
- 9) Uda, M., Ohkuma, S., Ishii, A., et al.: Preparation of blood components with saline-adenine-glucose-phosphate-maltose quadruple-pack system. *Transfusion*, 25: 325—329, 1985.
- 10) 宇多正行, 岡田英俊, 石居昭夫, 他：Non-button PC法：穏やかな条件を用いた血小板の製造法. *日輸血会誌*, 31: 385—399, 1985.
- 11) 宇多正行, 大熊重則：血液自動分離装置を用いたnon-button PC法. 第20回日赤薬剤会血液センター研究会, 1989年4月, 名古屋.
- 12) Vakkila, J. and Myllyla, G.: Amount and type of leukocytes in leukocyte-free red cell and platelet concentrates. *Vox Sang.*, 53: 76—82, 1987.
- 13) Brittingham, T.E. and Chaplin, H.Jr.: The antigenicity of normal and leukemic human leukocytes. *Blood*, 17: 139—165, 1961.
- 14) Perkins, H.A., Pane, R., Ferguson, J., et al.: Non hemolytic febrile transfusion reactions. *Vox Sang.*, 11: 578—600, 1966.
- 15) 村上省三, 佐藤公彦, 折居 喬：輸血による抗白血球抗体の発生. *Immunohaematology* (免疫と血液), 2: 1—7, 1980.
- 16) Sirchia, G., Parravicini, A., Rubulla, P., et al.: Effectiveness of red blood cells filtered through cotton wool to prevent antileukocyte antibody production in multitransfused patients. *Vox Sang.*, 42: 190—197, 1982.
- 17) 大谷 学, 鷺谷由紀子, 大山政則, 山本聖子, 白木 洋, 清川博之, 前田義章：自動分離器による白血球血液成分の調製. *日輸血会誌*, 35: 366—369, 1989.
- 18) 長谷川秀弥, 関口定美：可及的な白血球除去を試みた赤血球製剤調製方法の検討. 第36回日本輸血学会総会講演抄録集（新潟）, p. 262, 1988.
- 19) 武部道和, 津山典久, 坪倉只雄, 他：IG-E フィルターを用いたno primingによる白血球除去の検討. 第37回日本輸血学会総会講演要旨集（神戸）, p. 293, 1989.