技 術

ポリエステル系白血球除去フィルターの濾過能に 及ぼす操作法と原料血保存の影響

山村 一 宮原 正行 佐藤 博正

岡山県赤十字血液センター

(平成6年3月26日受付)

THE EFFECTS OF FILTRATION PROCEDURES AND BLOOD STORAGE PERIOD ON THE EFFICIENCIES OF POLYESTER FILTERS FOR PREPARING LEUKOCYTE REDUCED RED CELLS

Hajime Yamamura, Masayuki Miyahara and Hiromasa Satoh
Okayama Red Cross Blood Center

To find the optimal protocol for preparing leukocyte-reduced red cells (LRRC) with polyester filters, such as Sepacell R-500N and Pall BPF4, we studied the effects of filtration procedures and blood storage period on their efficiencies. Pre-filtration dilution had no effect on leukocyte removal, but caused about 5% increase in red cell recovery and almost 50% reduction in filtration time when Pall BPF4 was used. On the other hand, post-filtration rinse resulted in a decrease in leukocyte removal by about 10 times and an increase in red cell recovery by about 5%. These procedures had the almost same effects on the filtration efficiencies of Sepacell R-500N. There were no significant differences in leukocyte removal and red cell recovery between two groups of starting red cells stored for 2~10 days or 42 days in a mannitol-adenine-saline (MAP) solution. However, 21 day-old cells in CPD showed higher hemolysis after filtration than 2 to 14 day-old red cells in CPD. These data indicate that pre-dilution is required but post-rinse should be avoided for achieving the maximum efficiencies of the polyester filters. The storage limit of red cells as a starting material for LRRC can be extended up to 14 days in CPD or 42 days in MAP. Thus, the use of the optimal protocol for Pall BPF4 led to 4 log of leukocyte reduction, 92% of red cell recovery and 11 min of filtration time.

はじめに

近年、輸血に伴う副作用の主な原因が血液製剤中に混入した白血球に因ることがわかり、その副作用を軽減するため白血球をできる限り除去することが望まれている^{1)~3)}。その目的には、白血球除去フィルターが効率的な方法であり、近年、コットンウールからポリエステル不織布へ充填素材を改良した第3世代の Sepacell R-500N や、さらに高度な白血球除去率を達成した第4世代の Pall BPF4等が開発されてきた^{4)~7)}。

これらの進展に伴い、ポリエステル系フィル

ターの臨床応用は数多く研究されてきたが^{8)~11)}、その調製法に関してはあまり関心が払われてこなかった¹²⁾¹³⁾。例えば、Sepacell R-500N では、日本赤十字血液センター業務標準に記載されているように前世代のコットンウール糸フィルターで採用された濾過前後の希釈及びリンス等の操作を行う方法がそのまま踏襲されているが¹⁴⁾、一方の Pall BPF4ではメーカーの推奨法によればこれら全ての操作が省かれ極端に簡素化されている。すなわち、同じポリエステル系フィルターにおいてもその操作法に統一性がみられない。

また、充填素材の改良に伴い、American association of blood banks (AABB) では原料用の赤血球製剤の使用期限がその有効期限まで延長されたのに対し¹⁵⁾¹⁶⁾、日赤業務標準では10日間のままである¹⁴⁾。ポリエステル系フィルターは白血球除去率の向上だけでなく濾過時間の短縮及び赤血球回収率の増加等も図られていることも考慮すれば⁴⁾¹⁷⁾、このフィルターにおける至適な濾過操作法及び原料血の使用期限については明らかにする必要があると思われる。

そこで、我々は、Sepacell R-500N 及び Pall BPF4を用い、白血球除去率、赤血球回収率、及び濾過時間等のフィルター性能に及ぼす濾過前後の操作法と原料血の保存日数の影響について検討を行った。

方 法

血液製剤の調製と保存

CPD 液あるいは ACD 液で採血された400ml 血液を、日赤血液センターの業務標準に従い¹⁴⁾、それぞれ濃厚赤血球製剤 (RC-CPD) 及び MAP 赤血球製剤 (RC-MAP) を調製した。これらの製剤を濾過前まで 5℃で保存し、濾過操作は室温で行った。

RC-CPD の場合は、2～10日間、14日間、及び 21日間保存されたものを濾過前希釈操作を行い、それぞれ Pall BPF4で濾過した。また、RC-MAP の場合は、2～10日間及び42日間保存されたものをそれぞれ直接 Pall BPF4で濾過した。

充填素材の洗浄、濾過前の原料血の希釈、及び濾過後のリンス操作

これらの操作の影響は、Imugard フィルターで以前検討対象になった保存 2～10日間の RC-CPD¹²⁾¹³⁾を用いて検討した。Pall BPF4における

フィルター充填素材の洗浄は、ドレインチューブを無菌的接続装置 (SCD, DuPont 製, No. 312) により接続して行った。充填素材の洗浄、濾過前の原料血の希釈、及び濾過後のリンスは、100ml の生理食塩水を用いて行った。

血球数と溶血の測定

濾過前後の赤血球数及び濾過前の白血球数は自動血球計数装置 (Sysmex E-5000) で計数した。濾過後の白血球数は、チュルク液で検体を10倍希釈後 Nageotte chamber を用い、検鏡 (×200) にて計数した¹⁸⁾。溶血の測定は tetramethylbenzidine 法¹⁹⁾で行い、濾過前の値に対する濾過後の増加量で示した。

結 果

フィルターの性能に及ぼす濾過操作の影響

濾過前希釈操作及び濾過後リンス操作が及ぼす Pall BPF4のフィルター性能への影響について検討し、その結果を Table 1 に示す。濾過前希釈操作は、白血球除去率には影響しなかったが、赤血球回収率を約 5%増加させ、濾過時間をほぼ半分に短縮した。この場合の残存総白血球数は、AABB (5 × 10⁶個以下)¹⁶⁾及び Council of Europe (1 × 10⁶個以下)²⁰⁾の基準を満足する 2 × 10⁵個以下であった。また、濾過前希釈操作を行った場合には濾過時間が30分を越える検体は観察されなかったが、希釈操作を省いた場合には濾過時間が30分以上を示す検体が27例中 3例 (40, 48, 55分) 観察された。一方、濾過後のリンス操作は、赤血球回収率をやや増加させたが、白血球除去率を約 1log 低下させることがわかった。

Sepacell R-500N についても同様に濾過前後の各操作の影響を検討したところ、Pall BPF4の場合とほぼ同様な傾向を示した (Table 2)。ただし、

Table 1 The effects of pre-dilution and post-rinse of Pall BPF4 on its filtration efficiencies

Filtration procedure	WBC-removal (%)	Residual WBC (×10 ⁵ /bag)	RBC-recovery (%)	Filtration time (min)	n
No-dilution, no-rinse	>99.993±0.003	<0.38±0.17	88.3±2.5	20.5±11.5	19
Pre-dilution	>99.995±0.002	<0.38±0.14	91.8±0.9	11.4±3.5	13
Post-rinse	99.962±0.030	5.2±2.7	90.6±4.7	20.4±9.2	8
Dilution +rinse	99.960±0.017	3.6±1.4	96.4±1.3	13.0±3.3	8

Table 2 The effects of pre-dilution and post-rinse of Sepacell R-500N on its filtration efficiencies

Filtration procedure	WBC-removal (%)	Residual WBC ($\times 10^5$ /bag)	RBC-recovery (%)	Filtration time (min)	n
No-dilution, no-rinse	99.958 $\pm$ 0.023	3.9 $\pm$ 2.3	80.5 $\pm$ 1.2	—	5
Pre-dilution	99.980 $\pm$ 0.090	5.8 $\pm$ 5.1	85.0 $\pm$ 0.9	7.5 $\pm$ 1.5	10
Dilution+rinse	99.82 $\pm$ 0.41	51 $\pm$ 23	95.2 $\pm$ 2.8	7.9 $\pm$ 1.5	12

同一条件で比較すると、Sepacell R-500N の白血球除去率は Pall BPF4より約1 log 低く、赤血球回収率も約7%低値を示した。

次に、濾過前における充填素材の洗浄操作が Pall BPF4のフィルター性能に及ぼす影響について調べたところ、この操作を省いても濾過に伴う溶血の増加は殆んどなく、また、この操作を実施してもフィルター性能に悪影響を及ぼさなかった（濾過前後の希釈及びリンス操作を省き本操作のみ実施の場合：濾過時間、20.3 $\pm$ 6.5min：白血球除去率、99.991 $\pm$ 0.003% (n=5)）。

原料血の保存日数が及ぼす Pall BPF4のフィ

Table 3 The effect of storage period of RC-MAP on the filtration efficiency of Pall BPF4*

Test item	Storage period (days)	
	2~10	42
WBC-removal (%)	>99.997 $\pm$ 0.001	>99.997 $\pm$ 0.001
Residual WBC ($\times 10^4$ /bag)	<2.72 $\pm$ 0.18	<2.49 $\pm$ 0.18
RBC-recovery (%)	90.6 $\pm$ 0.9	90.2 $\pm$ 1.4
Filtration time (min)	14.7 $\pm$ 1.7	21.2 $\pm$ 5.3
Increased hemolysis (mg/dl) ¹⁾	2.6 $\pm$ 0.9	3.2 $\pm$ 1.2
n	5	5

* Neither pre-filtration dilution nor post-filtration rinse was carried out.

¹⁾ Increased hemolysis meant the amount of plasma hemoglobin increased by filtration.

Each mark of < or > meant less than or more than, respectively.

Table 4 The effect of storage period of RC-CPD on the filtration efficiency of Pall BPF4*

Test item	Storage period (days)		
	2~10	14	21
WBC-removal (%)	>99.995 $\pm$ 0.002	>99.994 $\pm$ 0.002	>99.996 $\pm$ 0.003
Residual WBC ($\times 10^4$ /bag)	<3.8 $\pm$ 1.4	<3.5 $\pm$ 1.6	<2.9 $\pm$ 1.2
RBC-recovery (%)	91.9 $\pm$ 0.9	92.3 $\pm$ 1.0	92.5 $\pm$ 0.9
Filtration time (min)	11.7 $\pm$ 3.8	13.3 $\pm$ 3.5	17.5 $\pm$ 2.7
Increased hemolysis (mg/dl) ¹⁾	3.1 $\pm$ 1.7	3.9 $\pm$ 2.3	12.8 $\pm$ 3.2
n	9	5	8

* Pre-filtration dilution was carried out.

¹⁾ Increased hemolysis meant the amount of plasma hemoglobin increased by filtration.

Each mark of < or > meant less than or more than, respectively.

ルター性能への影響

Pall BPF4のフィルター性能に及ぼす原料血である RC-MAP の保存日数の影響を調べた結果、濾過時間以外は2~10日保存群と42日保存群の間に差は認められなかった (Table 3)。一方、RC-CPD においては、保存21日群で濾過に伴う溶血の増加度が保存2~10日群よりも高値を示し (Table 4)、結果的に、製造した白血球除去赤血球製剤の溶血度は50mg/dl を上回る場合があり

39 $\pm$ 12mg/dl となった。

考 察

白血球除去赤血球の調製法は、フィルター本来の性能を発揮し常に高い品質の製剤をもたらせるものでなければならない。しかし、今回の検討から、フィルターの濾過効率は操作法等によって大きな影響を受け、現行の日赤業務標準法やメーカーの標準法が必ずしも至適条件とは言えない面があることがわかった。

現行の日赤業務標準におけるポリエステル系フィルターを用いた調製法は、前世代のコットンウール系フィルターであるテルモ Imugard フィルターの方法を基本的に踏襲しており、そこに記載されている濾過後のリンス操作は赤血球回収率を若干増加させるものの¹⁴⁾、このフィルター本来の白血球除去率を約1 log 低下させることが明らかになった。したがって、本フィルターにおける白血球の除去機構の吸着現象²¹⁾は可逆的であることが示唆され、また、フィルター内容積が縮小し濾過後の残存血液量が少ないことも考慮すれば²²⁾、濾過後のリンス操作は現行の業務標準より削除すべきであると考えられる。

一方、原料血の濾過前の希釈操作は、白血球除去率を低下させることなく赤血球回収率を向上させ、濾過時間を短縮できる利点があることがわかった。また、ポリエステル系フィルターで採用されている白血球除去率を高めるための充填繊維径を細くする手法は、濾過時間を延長させる欠点に伴うことが知られている²³⁾。したがって、希釈操作は、Pall BPF4のメーカー推奨法から省かれているが、今後も作業効率の面から実施した方がよいと思われる。これに伴い、Pall BPF4には生理食塩水用のドレインチューブの設置が望まれる。

AABBの基準によれば、フィルターの赤血球回収率は80%以上必要であると規定されている¹⁶⁾。Pall BPF4では、濾過前後の希釈及びリンス操作を省いても $88.5 \pm 2.4\%$ の赤血球回収率を示し、この基準を満足することがわかった。一方、Sepacell R-500Nでは、希釈及びリンス操作を省けば赤血球回収率は $80.5 \pm 1.2\%$ となり、この基準を辛うじて満足するレベルであることがわかった。したがって、赤血球回収率の面からは、濾過前の希釈操作はPall BPF4ではメーカー推奨法のように省くことが可能であると思われるが、Sepacell R-500Nでは省略はしない方がよいと考えられる。ところで、SAGM等のprotein-poor mediumを保存液とした赤血球製剤を使用する際は、例えば第4世代のポリエステル系フィルターのCF-1(ニッショー製)では、白血球除去率がRC-CPD製剤の場合よりも低下することが指摘されている

ため⁷⁾、本系フィルターでは濾過前の希釈操作は避ける方がよいと思われる。

濾過前におけるフィルター充填材の洗浄操作は、濾過に伴う溶血を防止し残存するエチレンオキサイドガス等を除去するため、第3世代のフィルターまで勧められてきた¹⁴⁾。すなわち、第1世代のフィルターはG. Barbadenseの植物種より得られるエジプト綿を乾燥状態でカラムに充填していたため、急速な浸透圧変化を抑制するためには本操作が必要であった²⁴⁾。しかし、ポリエステル繊維は本来疎水性であるので、エジプト綿の様な浸透圧変化を起こさない。我々のデータからも、ポリエステル系フィルターの洗浄操作を省いても濾過後の溶血は増加せず、白血球除去率も低下しないことが示された。したがって、この操作は第3世代も含めたポリエステル系フィルターには必須ではないと考えられる。しかし、最近、白血球除去フィルターに伴うショック症状等の副作用が報告されており²⁵⁾、その原因やフィルターとの因果関係はまだ不明であるが、本操作を省いている血小板用白血球除去フィルターの使用時に多発しているため、安全性を重視するためには実施することが望ましいだろう。

本製剤用の原料血の使用期限は、Sepacell R-500N等の第3世代フィルターを使用する場合は日赤業務標準¹⁴⁾とAABB¹⁶⁾間で大きな差がある。将来白血球除去フィルターの主流は第4世代フィルターになると予想されるため、Pall BPF4を用いて原料血の保存日数が及ぼすフィルター性能への影響について検討した。その結果、RC-MAPにおいては6週間保存したものでも白血球除去率の低下及び溶血の上昇等はみられなかった。また、RC-CPDの場合、21日間の保存では濾過に伴う溶血が増加し、日赤業務標準の遊離ヘモグロビン濃度 50mg/dl 以下の基準¹⁴⁾を満足できなかったが、14日間保存では白血球除去率及び溶血等は現行の10日以内と同等であることがわかった。さらに、ポリエステル系フィルターでは、コットンウール系フィルターのように10日間以上の保存によって濾過時間が大幅に延長(30~90分間)²⁶⁾することなかった。したがって、Pall BPF4における原料

血の使用期限は、現行の10日間から、RC-CPDでは保存14日間まで、RC-MAPでは有効期限の42日間まで延長できると思われる。

以上のことより、Pall BPF4及びSepacell R-500N等のポリエステル系フィルターにおける白血球除去赤血球製剤の至適調製法は、原料血の濾過前希釈操作を実施し、日赤業務標準に記載されているリンス操作は省くべきであると考えられる。また、原料血の使用期限は、現行の保存10日間からRC-CPDで保存14日間まで、RC-MAPで有効期限の42日まで延長できると思われる。さらに、ポリエステル系フィルターの濾過能は調製法に影響されることが示されたため、本フィルターで製造される白血球除去赤血球製剤は調製法が管理し易い血液センター及び病院輸血部等で製造するのが望ましいと思われる。

まとめ

ポリエステル系フィルターにおける白血球除去赤血球の至適調製法を明らかにするために、フィルターの性能に及ぼす濾過操作及び原料血保存の影響について検討し、以下の知見を得た。

1) 濾過前における原料血希釈操作は、白血球除去率に悪影響を及ぼさず、赤血球回収率を高めて濾過時間を短縮させるので、今後も実施する方がよいと思われる。

2) 日赤業務標準に記載されている濾過後リンス操作は、ポリエステル系フィルター本来の白血球除去率を約1 log低下させるので、省くべきであると考えられる。

3) 本製剤の原料血の使用期限は、現行の保存10日間からRC-CPDで14日間、RC-MAPで有効期限の42日間までそれぞれ延長できることが示された。

これらの条件において、第4世代Pall BPF4を使用すれば、4 log以上の白血球除去率及び約90%の赤血球回収率が達成でき、濾過時間も約10分と比較的短時間でできることがわかった。

文 献

- 1) 池田康夫, 半田 誠: 血液製剤からの白血球除去. *Immunohaematology*, 11: 145—52, 1989.
- 2) 関口定美, 高橋恒夫: 新しい白血球除去用輸血

フィルター. 外科診療, 33: 387—395, 1991.

- 3) Meryman, H.T.: Cleaning up red cells and platelets: Alloimmunization, immunosuppression and disease transmission. In *Controversies of Leukocyte-poor Blood and Components* (Ed. McCarthy, L.J. and Baldwin, M.L.), American Association of Blood Banks, Arlington, Virginia, 1—26, 1989.
- 4) 長谷川秀弥, 関口定美: 白血球除去フィルター-Sepacell R-500の白血球除去能・赤血球通過能の分析. *血液事業*, 13(1): 17—23, 1990.
- 5) 瀬川紀美子, 長谷川秀弥, 細田真理, 高橋恒夫, 関口定美: 新しい白血球除去フィルター—イムガードEの性能—セパセルR-500Nとの比較—. *日本輸血学会雑誌*, 36(4): 497—503, 1990.
- 6) 高橋恒夫, 細田真理, 関口定美: フィルターによる濃厚赤血球製剤からの白血球除去—Pall RC 100, Pall RC 50及びPall BPF4の評価—. *医科器械学*, 62(2): 68—77, 1992.
- 7) Rebulli P., Porretti L., Bertolini F., Marangoni E., Prati D., Smacchia C., Pappalettera M., Parravicini A., and Sirchia C.: White cell-reduced red cells prepared by filtration: a critical evaluation of current filters and for counting residual white cells. *Transfusion*, 33: 128—133, 1993.
- 8) Perkins HA, Payne R, Ferguson J, et al: Nonhemolytic febrile transfusion reactions. Quantitative effects of blood components with emphasis on isoantigenic incompatibility in leukocytes. *Vox Sang.*, 11: 578—600, 1966.
- 9) Bowden R.A., Slichter S.J., Sayers M.H., Mori M, Cays M.J., and Meyers J.D.: Use of leukocyte-depleted platelets and cytomegalovirus-seronegative red blood cells for prevention of primary cytomegalovirus infection after marrow transplant. *Blood*, 78: 246—250, 1991.
- 10) Meryman H.T.: Transfusion-induced alloimmunization and immunosuppression and the effects of leukocyte depletion. *Transfusion Medicine Reviews*, 3: 180—193, 1989.
- 11) Wenz, B., Burns E.R., and Freundlich L.F.: Prevention of growth of *Yersinia enterocolitica* in blood by polyester fiber filtration. *Transfusion*, 32: 663—666, 1992.
- 12) 武部道和, 河島道雄, 名雲英人, 坪倉兌雄, 松永信夫: 400ml 採血由来白血球除去赤血球の調製—イムガードフィルターによる検討—. *血液事業*, 8(4): 185—189, 1985.
- 13) Mijovic V., Brozovic B., Hughes A.S.B., and Davies T.D.: Leukocyte-depleted blood: A

- comparison of filtration techniques. *Transfusion*, 23: 30—32, 1983.
- 14) 日本赤十字社血液事業部：赤十字血液センター業務標準・技術部門，1992.
 - 15) American Association of Blood Banks: Technical Manual. 9th Ed., 1985.
 - 16) American Association of Blood Banks: Standards for blood banks and Transfusion services. 14th Ed., 1991.
 - 17) Wilms E.: Leukocyte depleted blood: A study of the modified Sepacell R-500 filter for leukocyte depletion of one or two units of blood. *Red Cross Bloodbank Groningen-Drenthe, Groningen*, 1985.
 - 18) Masse M., Naegelen C., Pellegrini N., Segier J. M., Marpaux N, and Beaujean F.: Validation of a simple method to count very low white cell concentrations in filtered red cells or platelets. *Transfusion*, 32: 565—571, 1992.
 - 19) Levinson S.S. and Goldman J.: Measuring hemoglobin in plasma by reaction with tetramethylbenzidine. *Clin. Chem.*, 28: 471, 1982.
 - 20) Council of Europe meeting on automation and quality assurance in blood transfusion. *Transfusion International*, 51 (Aug.): 6, 1990.
 - 21) Callaerts A.J., Gielis M.L., Sprengers E.D., and Muylle L.: The mechanism of white cell reduction by synthetic fiber cell filters. *Transfusion*, 33: 134—138, 1993.
 - 22) 武部道和, 坪倉兌雄: 400ml 採血由来白血球除去赤血球の調製に用いるフィルターの検討. *日本輸血学会雑誌*, 34: 540—545, 1988.
 - 23) 高橋恒夫, 岡真一郎, 西村隆雄, 細田真理, 茂木祐子, 大地宏子, 那須百代, 千葉清司, 山脇直邦, 関口定美: 白血球除去フィルター-R-S350 の評価とそのクローズドシステム化. *日本輸血学会雑誌*, 38(3): 401—407, 1992.
 - 24) 武部道和, 羽富智志, 坪倉兌雄, 天木一太: 新しく開発されたフィルターによる白血球除去赤血球の調製. *血液事業*, 12: 357—362, 1989.
 - 25) Adverse reactions to platelet transfusions reported. *Blood Bank Week* (published by the american association of blood banks), 10(9): 1—2, 1993.
 - 26) Meryman H.T. and Hornblower M.: The preparation of red cells depleted of leukocytes; Review and evaluation. *Transfusion*, 26: 101—106, 1986.
-