

原 著

白血球除去フィルター及び放射線照射が 血小板機能に及ぼす影響について

名倉 豊 津野 寛和 柴田 洋一 高橋 孝喜

東京大学医学部附属病院輸血部

(平成 15 年 4 月 8 日受付)

(平成 15 年 8 月 1 日受理)

LEUKOCYTE-REDUCTION FILTERS AND RADIATION DO NOT CAUSE SIGNIFICANT CHANGES IN PLATELET FUNCTION

Yutaka Nagura, Hirokazu Tsuno, Yoichi Shibata and Koki Takahashi

Department of Transfusion Medicine, Graduate School of Medical Sciences, The University of Tokyo

In the present study, we investigated the effects of radiation and leukocyte-reduction filters on platelet function. Platelet aggregation in response to collagen and ADP were measured prior to and after irradiation and filtration, as were the platelet recovery rate and complement factor C3. Four types of leukocyte-reduction filter were used, namely positively-, negatively-, and non-charged filters (all of polyester composition) as well as a polyurethane filter. Radiation itself did not significantly affect either the platelet recovery rate, platelet function, or C3 value. On the other hand, filtration through polyester leukocyte-reduction filters resulted in a significant reduction in the platelet recovery rate, an effect not observed with the polyurethane filter. However, none of the filters caused significant changes in platelet function or in C3 value. We concluded that radiation and filtration do not cause significant changes in platelet function, but polyurethane filters are superior to polyester filters in relation to platelet recovery.

Key words : Leukocyte-reduction filter, radiation, Platelet aggregation, Platelet recovery rate

緒 言

血小板を輸血の際に、当院では、輸血後移植片対宿主病 (post transfusion graft versus host disease: PT-GVHD) の予防に、日本輸血学会の放射線照射ガイドラインにそって、15Gy の放射線照射を行っている¹⁾。また、白血球抗体などの同種免疫感作、非溶血性副作用や輸血によるウイルス感染症 (HTLV-I, CMV) の予防のために²⁾⁻⁴⁾全血小板輸血患者を対象に白血球除去フィルターを使用している。現在、輸血用血液中の白血球を高率に除去する方法として陽性荷電面 (以下、陽性フィルター)、陰性荷電面 (以下、陰性フィルター) 及び、

中性荷電面 (以下、中性フィルター) をもつポリエステル不織布を用いた白血球除去フィルターやポリウレタン系多孔質体 (以下、ポリウレタンフィルター) を用いた白血球除去フィルターが開発されている。どの白血球除去フィルターもフィルター通過後の白血球除去率は、98~99% 以上と報告されており⁵⁾、その性能は極めて高い。しかし、中心線量 15Gy の放射線照射で PT-GVHD を発症した報告⁶⁾や、AABB (American association of blood banks) では血液バックの中心に最低 25Gy、外側部分に 15Gy 以上の照射線量を推奨している⁷⁾。また、白血球除去フィルターの使用に伴い血

Table 1 Total platelet recovery rate of each filter (polyurethane, positively-charged, non-charged, negatively-charged filter) according to the grade of radiation. Radiation dose : 0Gy, 15Gy, 30Gy, and 45Gy. Platelet-rich plasma (PRP) was divided into four 4 fractions, and consecutively passed through the filters. After filtration, the 4 fractions were pooled, and the recovery rate calculated in relation to pre-filtration values. The values represent the mean+/- SD of 5 different samples

n = 5	Polyurethane filter (%)	Positively-charged filter (%)	Non-charged filter (%)	Negatively-charged filter (%)
0 Gy	97 ± 2	88 ± 6 *	87 ± 4 *	85 ± 5 *
15 Gy	92 ± 12	84 ± 11 *	88 ± 13 *	84 ± 2 *
30 Gy	95 ± 3	87 ± 3 *	84 ± 9 *	82 ± 4 *
45 Gy	96 ± 3	76 ± 21 *	81 ± 12 *	81 ± 5 *

* Compared to the prefiltration control value at P < 0.05

血小板数及び血小板凝集能の低下が報告されている⁸⁾。このことから、現在の放射線照射線量及び白血球除去フィルターの使用について、検討を加える必要があると考えた。今回、我々は4種類の白血球除去フィルター及び15Gyから45Gyの放射線照射線量の、血小板機能に及ぼす影響について検討を行った。

方 法

1) 対象および多血小板血漿 (Platelet-rich-plasma, 以下, PRP) の調整

健康人から, CPD 加血液バック (SC-407J8, テルモ株式会社) を用いて 400ml 採血を行った後, 2,600rpm (2,000g) で 3 分間, 室温で遠心を行い, PRP を得た。

2) PRP の放射線照射

50ml ずつ 4 つの試験管に分注し, 放射性同位元素¹³⁷Cs を用いた (中心線量 20Gy, 最低線量 15 Gy) の放射線照射装置 (IBL 437C, CIS Bio International, France) により, 試験管をキャニスターの中央部におき, それぞれ最低線量で 15Gy, 30 Gy, 45Gy となるように放射線照射を行った。対照は未照射のものとした。

3) PRP の白血球除去

白血球除去フィルターを一般に用いられている大きさの 1/6 スケールに調整し⁹⁾, 未照射および放射線照射後の PRP のろ過を行った。

各白血球除去フィルターとも, 約 1ml/60sec の速度でろ過し, 10ml ろ過後の試料を F1 とし, ろ過後 20ml, 30ml, 40ml, をそれぞれ F2, F3, F4

とした。

すべての PRP をろ過後, さらに全体の血小板回収率及び血小板凝集能を評価するために, F1 から F4 までの試料から 1ml ずつ採取し, プール血漿とした。

4) 測定方法

①血小板数

自動血球測定装置 SE-9000 (シスメックス株式会社) を用いてそれぞれの放射線照射量を照射または未照射の後, フィルターろ過する前後の血小板数を計測し, 血小板回収率をもとめた。

②血小板凝集能の測定

粒子計測法を原理とした血小板凝集能測定装置 PA-20 (興和株式会社) を用いた¹⁰⁾。この装置は, 半導体レーザーを血小板に照射することにより発生する散乱光を測定することにより, 血小板凝集塊を大・中・小凝集塊と 3 段階で判別することができ, さらに透過率も同時に測定することができる。測定時間 10 分間の血小板凝集塊の生成をグラフにして, その曲線下面積 (AUC, area under the curve) を数値化して評価を行う。今回, 5 μ M の ADP と 2 μ g/ml のコラーゲンの血小板惹起物質を使用して, 血小板凝集塊の大きさごとに測定したその合計値を, 評価の対象とした。

③補体値の変動の測定

補体活性化については, 放射線照射量を照射または未照射の後, フィルターろ過する前後の試料を用いて補体蛋白 C3 を, 免疫比濁法を原理とした N-アッセイ TIA C3-SH (日東紡績株式会社) に

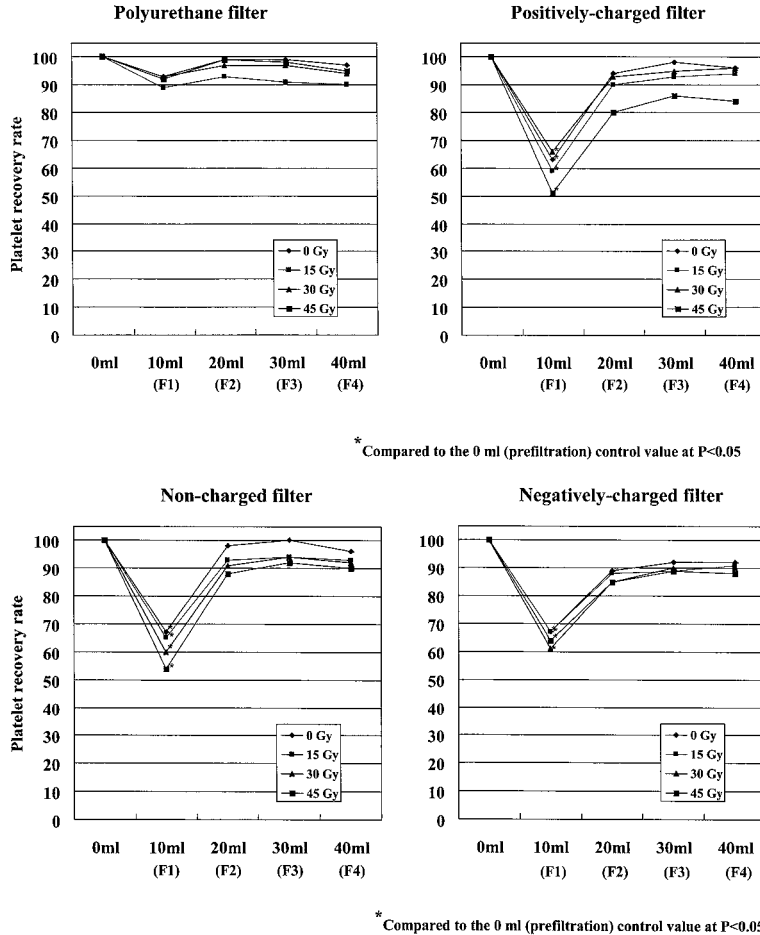


Fig. 1-a, b Platelet-rich plasma (PRP) was divided into 4 fractions of 10 ml each, and passed consecutively through the polyurethane, as well as positively-, negatively- and non-charged (neutral) filters. The recovery rate of each of the 4 fractions was calculated separately. The recovery rate of the first PRP fraction was lowest among all the filters tested, but the polyurethane filter had the smallest effect. In addition, the recovery rate tended to decrease with increasing radiation dose, but differences were not statistically significant for any of the filters.

て測定した。

5) 統計解析

有意差検定は、フィルター処理前後の測定値を、paired t-test を用いて比較した。

危険率 (P) 5% 未満を有意とした。

結 果

1) 血小板回収率の変化

①白血球除去フィルターの影響

未放射線照射時における、白血球除去フィル

ターろ過前後の血小板回収率は、ポリウレタンフィルターろ過後の血小板回収率は、 $97 \pm 2\%$ であった。しかし、陽性フィルター、中性フィルター及び陰性フィルターろ過後の血小板回収率は、それぞれ $88 \pm 6\%$ 、 $87 \pm 4\%$ 、 $85 \pm 5\%$ 、であり、ろ過前後で有意な差を認めた ($P < 0.05$) (Table 1)。

さらに、白血球除去フィルターろ過中の血小板回収率の変化を、Fig. 1a, 1b に示した。ポリウレタン多孔質フィルターは、F1 から F4 まで 90%

Table 2 Platelet aggregation in response to collagen and ADP after radiation and filtration. The data are expressed as the ratio of the area under the curve (AUC) of irradiated and filtered platelets in relation to non-irradiated and non-filtered platelets. AUC was the value obtained in the platelet aggregometer (PA-20) after stimulation of platelets with collagen or ADP. The values represent the mean+/- SD of 5 different samples

		Polyurethane filter (%)	Positively-charged filter (%)	Non-charged filter (%)	Negatively-charged filter (%)
Collagen	0 Gy	123.3 ± 40.7	88.8 ± 27.5	104.3 ± 7.0	100.0 ± 23.7
	15 Gy	94.8 ± 14.8	92.0 ± 19.4	106.4 ± 37.5	103.6 ± 18.2
	30 Gy	103.3 ± 12.5	99.0 ± 9.5	92.4 ± 19.0	105.2 ± 26.2
	45 Gy	108.8 ± 16.7	86.9 ± 14.9	89.6 ± 36.3	80.9 ± 9.7
ADP	0 Gy	113.6 ± 32.7	104.7 ± 26.0	131.7 ± 27.3	88.1 ± 12.4
	15 Gy	88.4 ± 38.6	101.7 ± 10.3	105.7 ± 13.8	95.2 ± 21.3
	30 Gy	84.2 ± 21.5	95.2 ± 7.1	113.9 ± 19.3	100.3 ± 13.8
	45 Gy	109.7 ± 13.3	94.2 ± 22.4	99.8 ± 27.6	95.3 ± 17.1

Table 3 Complement factor C3 values obtained from plasmas after irradiation and filtration. The values represent the mean+/- SD of 5 different samples, and are expressed as mg/dl. Neither irradiation nor any of the filters tested caused significant changes in plasma C3 values

	Polyurethane filter		Positive-charge filter		Non-charged filter		Negative-charge filter	
	Before	After	Before	After	Before	After	Before	After
0 Gy	71.0 ± 6.1	71.0 ± 6.6	76.7 ± 18.6	77.0 ± 18.5	76.6 ± 8.7	76.4 ± 9.2	84.0 ± 10.2	83.4 ± 10.6
15 Gy	70.7 ± 6.0	71.0 ± 6.4	77.0 ± 18.5	77.0 ± 18.5	75.8 ± 9.4	76.4 ± 9.2	83.6 ± 10.4	83.4 ± 11.3
30 Gy	71.5 ± 6.2	70.8 ± 6.0	76.3 ± 19.0	76.7 ± 19.0	76.6 ± 8.7	76.0 ± 8.7	83.4 ± 10.0	83.4 ± 10.4
45 Gy	71.0 ± 6.1	71.3 ± 6.2	78.0 ± 20.1	77.0 ± 19.0	76.4 ± 8.0	76.0 ± 8.7	83.2 ± 9.6	83.0 ± 10.8

以上の血小板回収率を得た。陽性フィルター、中性フィルター及び陰性フィルターでは、未放射線照射でフィルターろ過開始後、F1の陽性フィルター、中性フィルター、陰性フィルターの血小板回収率が63%、67%、67%と急激な減少が見られ、ろ過前と有意な差を認めた(P<0.05)。しかし、F2では94%、98%、89%、F3では98%、100%、92%、F4では96%、96%、92%と血小板回収率は回復した。

②放射線照射の影響

プール血漿での、放射線照射による血小板回収率の影響は、放射線線量が増加するにつれ、低下した。しかし、有意な差は認められなかった。

2) 血小板凝集能の変化

各白血球除去フィルター処理後及び、各線量での放射線照射処理後の血小板凝集の値がそれぞれの処理前の値と比べたときの比較値をTable 2に示した。

陽性フィルターで、ろ過処理前後でのコラーゲンの血小板凝集率の低下が認められたが、有意な差は認められなかった。その他の白血球除去フィルターの処理では、フィルターろ過前と有意な差は認められなかった。また、放射線照射線量が増加しても、有意な差は認められなかった。

3) 補体値(C3値)の変化

白血球除去フィルター使用前後及び放射線照射前後の補体値(C3値)に、有意な差は認められなかった(Table 3)

考 察

現在、血小板輸血において、重篤で致死的な輸血後副作用であるPT-GVHDや白血球が原因で発生する非溶血性副作用、輸血後感染症やHLA抗体による血小板輸血不応状態などを防止するために、血小板製剤に放射線照射や白血球除去フィルターを用い、より安全な輸血が行えるよう、予防策がとられている。

今回、我々が検討した4種類のフィルターは、血小板輸血の際、多く用いられているものであり、どのフィルターも98~99%の白血球を除去することができる⁵⁾。輸血の安全性を向上させるために血小板製剤に、放射線照射及び白血球除去フィルターの処置を行うことが一般化してきている。そのことから、それら処置により血小板の機能がどのくらい保たれるか評価する必要がある。今回の検討で、1/6スケールの白血球除去フィルターを使用したのは、血小板製剤の入手が困難であったため、実際の血小板製剤量の1/6の過量で検討できるようにフィルターを調整した。血小板凝集能に関しては、どの白血球除去フィルター及び放射線照射を行っても処置前とほとんど変化は見られず、良好な結果が得られた。採血直後の血小板製剤であれば、これら処置後の血小板製剤でも高い血小板機能を有した血小板を輸血することが可能であると考えられる。しかし、現在日本赤十字社から供給されている血小板製剤は、新しい感染症検査である核酸増幅検査(NAT)の導入により、保存後3日目の血小板製剤が供給されてくることは、少なくない。また、保存した血小板製剤がこれら処置により、血小板機能低下の原因の一つになっているという報告もあることから⁸⁾、今後保存血小板の機能を評価する必要がある。血小板回収率に関しては、陽性フィルター、陰性フィルター及び中性フィルターで、全体の血小板回収率が90%以下であったが、ポリウレタンフィルターでは、血小板回収率が90%以上保たれた。これは、ポリウレタンフィルターでは、どのフラクションでもほとんど変化がなかったことから、全体の血小板回収率がほとんど低下することなく血小板数が維持されたと考えられる。しかし、前者3つのフィルターは共通して、フィルターを過開始直後1/4で、血小板回収率が急激に低下し、その後、回復していったことから、フィルターを過開始直後の血小板数の低下が全体の血小板回収率を低下させる大きな原因である。このことから、ポリエステル不織布を材料とした白血球除去フィルターは、ポリウレタンフィルターに比べ、血小板吸着性が高いと考えられた。補体活性化につい

ては、各フィルターとも、ほとんど変化がなかったことから、これら処置による安全性は保たれていると考えられる。

現在、当院では赤血球製剤及び血小板製剤に全例、15Gyの放射線照射を行っている。今回の検討で、放射線照射後の血小板回収率及び血小板凝集能、補体活性値とも最大45Gyまで、放射線照射の影響がなかったこと、15Gyの放射線照射でPT-GVHDの発症の報告があったこと⁶⁾、さらに30Gyでの放射線照射した血小板輸血でも、副作用が増えることなく血小板輸血が実施された報告があることから¹⁾、さらにPT-GVHDを防止するために、放射線の線量を増加させる必要性について検討すべきであると考えられた。また、白血球除去フィルターの中で、ポリウレタン性のフィルターは、効率よく血小板を回収することができ、血小板凝集能にも、ほとんど影響を及ぼさないため、血小板製剤を効率よく輸血することができると考えられた。

文 献

- 1) 日本輸血学会：輸血によるGVHD予防のための血液に対する放射線照射ガイドライン IV, 3, 1999.
- 2) Dumont, L.J., Luka, J., VandenBroeke, T., Whitley, P., Ambruso, D.R., Elfath, M.D. : The effect of leukocyte-reduction method on the amount of human cytomegalovirus in blood products : a comparison of apheresis and filtration methods, *Blood*, 97 : 3640-3647, 2001.
- 3) Mazon, M.C. : Leukocyte depletion and infection by cytomegalovirus. *Transfusion Clinique et Biologique*, 7 Suppl 1 : 31s-35s, 2000.
- 4) Pietersz, R.N., van der Meer, P.F., Seghatchian, M. J. : Update on leukocyte depletion of blood component by filtration. *Transfusion Science*, 19 : 321-328, 1998.
- 5) Reverberi, R., Menini, C. : Clinical efficacy of five filter specific for leukocyte removal. *Vox Sang*, 58 : 188-191, 1990.
- 6) Lowenthal, R.M., Challis, D.R., Griffiths, A.E., Chappell, R.A., Goulder, P.J.R. : Transfusion associated graft-versus-host disease : report of an occurrence following the administration of irradiated blood. *Transfusion*, 33 : 524-529, 1993.
- 7) Technical Manual of the American association of Blood Banks, 13th Edition : AABB, Arlington,

- 176 177, 1999.
- 8) 比嘉幸枝, 田中明美, 野原正信, 田中真典, 高島聡子, 丸高ゆう子, 中田浩一, 坂本久治, 菊池亮: 血小板製剤用白血球除去フィルターの血小板機能に及ぼす影響. 日本輸血学会雑誌, 47: 270, 2001.
- 9) 小本美奈, 高野波留美, 風間あきみ: ミニカラムを用いた白血球除去フィルターの製剤処理能力の検討. 日本輸血学会雑誌, 45: 241, 1999.
- 10) Tomida, Y., Iino, S., Nishikawa, M., Hidaka, H.: A new system to detect native microaggregates of platelets in vivo, with a novel platelet aggregometer employing laser light scattering. *Thromb. Res.*, 92: 221-228, 1998.
- 11) 下島ひろみ, 伊藤武善, 沢田海彦, 堀江孝至: 30 Gy 放射線照射と白血球除去フィルターの併用処置が血小板及び血小板輸血に与える影響. 日本輸血学会雑誌, 47: 646-653, 2001.
-