

原 著

自己血保存におけるエンドトキシンの影響と 保存前白血球除去の有用性

阿南 昌弘 大久保光夫 柳下 明* 大木 浩子
今井 厚子 渡辺敬依子 久保居由紀子 島田 崇史
森 絵理子 平田 蘭子 前田 平生

埼玉医科大学総合医療センター輸血細胞治療部

*テルモ株式会社

(平成15年10月30日受付)

(平成16年2月18日受理)

EFFECTS OF PRESTORAGE LEUKOCYTE REDUCTION IN ENDOTOXIN-CONTAMINATED AUTOLOGOUS BLOOD

Masahiro Anan, Mitsuo Okubo, Akira Yagishita*, Hiroko Ohki,
Atsuko Imai, Keiko Watanabe, Yukiko Kuboi, Takashi Shimada,
Eriko Mori, Ranko Hirata and Hiroo Maeda

Department of Transfusion Medicine and Cell Therapy, Saitama Medical Center, Saitama Medical School

*Terumo Corporation

To clarify the effectiveness of prestorage leukocyte reduction for whole blood contaminated with endotoxin, we analyzed biochemical mediators, levels of cytokines, and aggregates in blood samples on storage for five weeks.

From 12 healthy donors, 400 mL of blood were collected into CPDA-1 bags as autologous blood samples. A standard E. coli-derived endotoxin (500 pg/mL) was pulsed into all of the bags. Half of each blood sample was filtered to eliminate leukocytes. We assayed pH, Na, K, ATP, free Hb, 2,3-DPG, LDH, bradykinin, C3a, aggregates, RANTES, granulocyte elastase, IFN- γ , IL-1 β , TNF- α , and IL-6 at 3 hours and on days 7, 14, 21, and 35.

There was no adverse effect of leukocyte reduction on erythrocytes. Levels of IL-1 β and IL-6 in the leukocyte-reduced blood were significantly lower than those in blood without reduction. It was confirmed that the number of aggregates was decreased by filtration for leukocyte reduction.

These results suggest that prestorage leukocyte reduction to reduce the risk of endotoxin-related adverse reactions is feasible for storage of autologous blood bags for five weeks, especially for patients with jaundice.

Key words : autologous blood transfusion, endotoxin, prestorage leukocyte reduction, cytokines, adverse reaction

はじめに

自己血輸血は、同種血輸血と比較して輸血後

GVHD、抗体産生、アナフィラキシーなどの免疫学的副作用や、輸血後感染症を回避できるという点

で、安全な輸血方法として積極的な導入が推進されている。また近年では、消化器癌症例における待機的手術の輸血として、自己血輸血を使用する例が増加している。しかしながら、閉塞性黄疸を伴う症例で自己血輸血を行った場合、製剤にエンドトキシンが混入し、輸血後副作用を惹起する恐れがあることが指摘されている¹⁾。一方、同種血液製剤に対し、欧米では製剤の品質向上および輸血後副作用対策として、採血後速やかに白血球除去を行う保存前白血球除去 (prestorage leukocyte reduction; PreSLR) を行っており、有効であるとされている²⁾。今回我々は、エンドトキシンの混入が血液製剤に与える影響、およびその対策としての PreSLR の有用性について検討した。

材料と方法

1. 採血

健康男性ボランティア 12 名から、厚生労働省医薬安全局による自己血輸血のガイドラインに従い、CPDA-1 入り血液バッグ (テルモ) を用い 400 mL 採血した。なお、参加者には本研究への協力を文書にて同意を得、検体は匿名化して取り扱った。

2. エンドトキシン添加濃度の検討

エンドトキシンは大腸菌由来標準品エンドトキシン (和光純薬) を用いた。エンドトキシンは早期にマクロファージに TNF- α を産生させることが知られている。そこで、使用するエンドトキシン濃度を求める予備実験として、健康人 3 例の末梢血単核球細胞に 0, 100, 250, 500, 1,000, 5,000 pg/mL の濃度の大腸菌由来精製エンドトキシンを加えて、24 時間培養し単核球の細胞内 TNF- α を cytofix/cytoperm kit (Pharmingen, San Diego, CA, USA) およびフローサイトメトリー (FACScan, Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) にて検出し、単核球分画における TNF- α 陽性細胞頻度が最も増加した濃度を求め、以下の実験を進めた。

3. 白血球除去

採血したバッグに上記エンドトキシンを加え、3 時間室温にて静置後バッグを 2 等分し、一方はポリウレタン多孔質体濾材の白血球除去フィルター (試作品: テルモ) にて白血球除去を行

(白除群)、他方は白血球除去を行わないコントロール群 (非白除群) とした。なお、エンドトキシンを添加しない自己血に対する保存試験については諸家の報告がある^{2,3,4,5)}。

4. 製剤の保存試験

バッグは 4~6 にて 35 日間保存し、経時的にサンプリングを行った。day0 は 3 時間静置、2 分割、白血球除去を終了した時点とした。白血球数、赤血球数、血小板数は全自動血球計数装置 (Coulter counter MAXM, ベックマン・コールター) で測定した。なお、白血球除去能評価のため、白除直後の白血球数をナジェット法にて測定した。Na, K は自動分析装置 (7170 形, 日立), pH は血液ガス分析装置 (280, バイエルメディカル) を用いた。他に ATP (ATP キット, アスカ純薬), 遊離ヘモグロビン濃度 (ヘモグロビン テストワコー, 和光純薬), 2, 3-DPG (2, 3-DPG, アスカ純薬), LDH (JSCC 標準化対応法, SRL), エンドトキシン (エンドスペー法, SRL) の測定を行った。また、day0 におけるブラジキニン (RIA 法, SRL), C3a (RIA 法, SRL) 濃度を測定し、day35 における凝集塊数 (コールターカウンター Z2, ベックマン・コールター), および無菌試験を行った。無菌試験は、第十四改正日本薬局方の生物学的製剤基準、無菌試験法、1 直接法に準拠して行った。即ち、液状チオグリコール酸培地 (培養温度 30.0~32.0), ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地 (培養温度 21.9~22.0) を用いて 14 日間培養し、発育の有無を観察した。バッグ内血清中のサイトカインは、IL-1 β , TNF- α は ELISA 法 (SRL), IL-6 は CLEIA 法 (SRL), IFN- γ は EIA 法 (SRL) で測定した。その他のケミカルメディエータとして、RANTES (ELISA 法, SRL), 顆粒球エラスターゼ (EIA 法, SRL) の測定を行った。

結 果

1. 白血球除去による赤血球への影響

白血球除去により、白血球の $99.98 \pm 0.02\%$ (mean \pm SD, n = 12), 血小板の 99% が除去されたが、赤血球の損失はほとんど見られなかった。また、Na, K 濃度は白除群、非白除群の間で有意

Table 1. Hematology of endotoxin-contaminated whole blood on storage for five weeks.

Measurement		Storage period (days)				
		0	7	14	21	35
WBC (× 10 ³ / μL)	Control	5.1 ± 1.1	4.8 ± 0.8	4.4 ± 1.0	4.4 ± 0.8	4.4 ± 0.8
	PreSLR	0.1 ± 0.1 *	0.1 ± 0.0 *	0.1 ± 0.1 *	0.1 ± 0.0 *	0.1 ± 0.0 *
Platelet (× 10 ³ / μL)	Control	219.7 ± 41.3	188.9 ± 43.2	181.8 ± 31.1	177.7 ± 26.4	172.8 ± 30.5
	PreSLR	2.3 ± 1.9 *	2.2 ± 0.8 *	2.3 ± 2.0 *	2.5 ± 0.5 *	4.5 ± 2.5 *
RBC (× 10 ⁶ / μL)	Control	4.5 ± 0.4	4.5 ± 0.4	4.2 ± 0.5	4.5 ± 0.3	4.5 ± 0.4
	PreSLR	4.5 ± 0.3	4.4 ± 0.4	4.4 ± 0.4	4.4 ± 0.4	4.4 ± 0.4
Na (mEq/L)	Control	167.9 ± 2.0	163.2 ± 1.7	159.3 ± 1.8	156.4 ± 1.7	149.9 ± 1.8
	PreSLR	168.0 ± 2.0	162.8 ± 1.5	159.3 ± 1.1	157.2 ± 1.5	151.3 ± 1.9
K (mEq/L)	Control	3.5 ± 0.4	11.4 ± 1.2	15.9 ± 1.4	20.6 ± 1.8	27.8 ± 2.3
	PreSLR	3.5 ± 0.4	11.0 ± 1.2	15.3 ± 1.5	19.7 ± 1.9	26.5 ± 2.4

n = 12, * p < 0.05

(mean ± SD)

Table 2. Hematology of endotoxin-contaminated whole blood on storage for five weeks.

Measurement		Storage period (days)				
		0	7	14	21	35
ATP (μmol/mL)	Control	63.6 ± 5.7	68.6 ± 5.2	58.5 ± 7.4	52.0 ± 8.3	37.6 ± 8.4
	PreSLR	64.1 ± 5.3	67.4 ± 5.6	59.7 ± 7.0	55.5 ± 8.3	43.1 ± 8.5
Free Hb (mg/dL)	Control	12.5 ± 9.3	15.2 ± 10.2	14.6 ± 11.9	19.9 ± 13.4	47.2 ± 32.2
	PreSLR	9.0 ± 8.3	11.3 ± 7.2	11.2 ± 9.3	15.7 ± 12.6	33.0 ± 29.3
2,3-DPG (μmol/mL)	Control	1.40 ± 0.20	0.57 ± 0.20	0.12 ± 0.16	0.06 ± 0.03	0.07 ± 0.02
	PreSLR	1.47 ± 0.26	0.78 ± 0.20 *	0.18 ± 0.13	0.11 ± 0.10	0.09 ± 0.03 *
LDH (IU/L/37)	Control	609 ± 134	796 ± 205	898 ± 253	1,292 ± 295	1,726 ± 264
	PreSLR	240 ± 23 *	243 ± 21 *	247 ± 19 *	262 ± 40 *	299 ± 40 *
pH	Control	6.97 ± 0.05	6.76 ± 0.03	6.62 ± 0.02	6.55 ± 0.03	6.46 ± 0.02
	PreSLR	6.98 ± 0.05	6.83 ± 0.03 *	6.69 ± 0.03 *	6.61 ± 0.03 *	6.53 ± 0.03 *

n = 12, * p < 0.05

(mean ± SD)

差は見られなかった (Table 1) .

ATP, 血漿ヘモグロビン濃度は白除群, 非白除群の間で有意差は見られなかった. 2,3-DPG は, day7, day35 で白除群が有意に高値を示し, LDH は保存開始時から白除群の方が有意に低値を示した. pH は day7 以降で有意差が見られ, 白除群においてより良好な状態で保存されることが示された (Table 2) .

day0 における C3a 濃度は白除群の方が有意に高値を示したが, プラジキニン濃度については白除群, 非白除群の間で有意差は見られなかった.

day35 におけるバッグ内凝集塊数は, 20μm 未満, 20μm ~ 60μm とともに白除群の方が有意に少なかった. また無菌試験は白除群, 非白除群ともにすべて陰性であった (Table 3) .

2. 添加エンドトキシン濃度およびその変化

TNF-α 陽性細胞頻度は添加エンドトキシンの濃度が 0, 100, 250, 500, 1,000, 5,000pg/mL の時それぞれ平均 0.05, 0.15, 0.33, 1.07, 0.23, 0.17% であったため, 添加するエンドトキシン濃度を 500pg/mL とした. エンドトキシン濃度は, 保存期間中大きな変化は見られなかったが,

Table 3. Hematology of endotoxin-contaminated whole blood on storage for five weeks.

Measurement		Storage period (days)	
		0	35
C3a (ng/mL)	control	285.3 ± 46.8	N.T
	PreSLR	420.3 ± 65.5 *	N.T
Bradykinin (pg/mL)	control	89.5 ± 29.4	N.T
	PreSLR	108.9 ± 50.6	N.T
Aggregates (~ 20 μ m) (/mL)	control	N.T	43,847 ± 21,445
	PreSLR	N.T	293 ± 197 *
Aggregates (20 ~ 60 μ m) (/mL)	control	N.T	470 ± 274
	PreSLR	N.T	6.7 ± 7.0 *
Sterility test	control	N.T	Negative
	PreSLR	N.T	Negative

C3a, Bradykinin ; n = 6 , Aggregates , Sterility test ; n = 12 , (mean ± SD)

* p < 0.05 , N.T Not tested

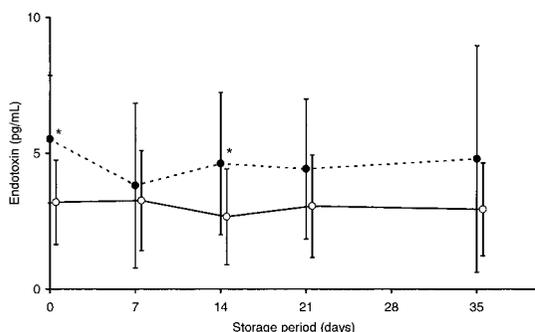


Fig. 1 Endotoxin level on storage of whole blood for five weeks. Open circles, preSLR groups ; Closed circles, control groups. * : P < 0.05

day0, day14 で有意差が見られ, 白除群の方が若干低濃度を示した (Fig. 1) .

3 . サイトカイン濃度の変化 (Fig. 2)

IL-1 β , IL-6 は, 白除群では保存開始時よりほとんど変動せず低値を示したのに対し, 非白除群では IL-1 β , IL-6 とともに経時的に上昇した . TNF- α は day0 では有意差は見られなかったが, day7 には 1/3 の濃度となり, 白除群で有意に低値を示した . IFN- γ は経時的に上昇したが, 白除群と非白除群で有意差は見られなかった .

4 . その他ケミカルメディエータの変化 (Fig. 2)

顆粒球エラスターゼは, day0 では白除群の方が有意に高値であったが, 保存期間中ほとんど変動はなかった . それに対し, 非白除群では保存期間中に漸増し, day35 には白除群とほぼ同じ濃度まで上昇した .

RANTES は白除群ではほとんど検出限界以下の値を示したのに対し, 非白除群では 50ng/mL 以上と高値を示した .

考 察

近年, 自己血輸血は副作用の少ない輸血手段として, 整形外科, 心臓血管外科などを中心に広く行われている . 従来, 高齢者や貧血例が多いなどの問題から, 普及が進まなかった消化器外科領域においても自己血貯血例が増加しており, 今後さらに増加するものと推測される . しかし, 閉塞性黄疸を伴う症例では血中エンドトキシン値が上昇していることが報告されている . 篠塚らは, 膵癌や胆嚢胆管癌などの消化器系担癌症例において, 貯血直前の末梢血中エンドトキシン濃度は, 黄疸併発群の方が非併発群よりも有意に高く, さらに貯血自己血中のエンドトキシン濃度も黄疸群の方が高い傾向を示したが, 返血を行った全症例において, 明らかな合併症は認められなかったと報告

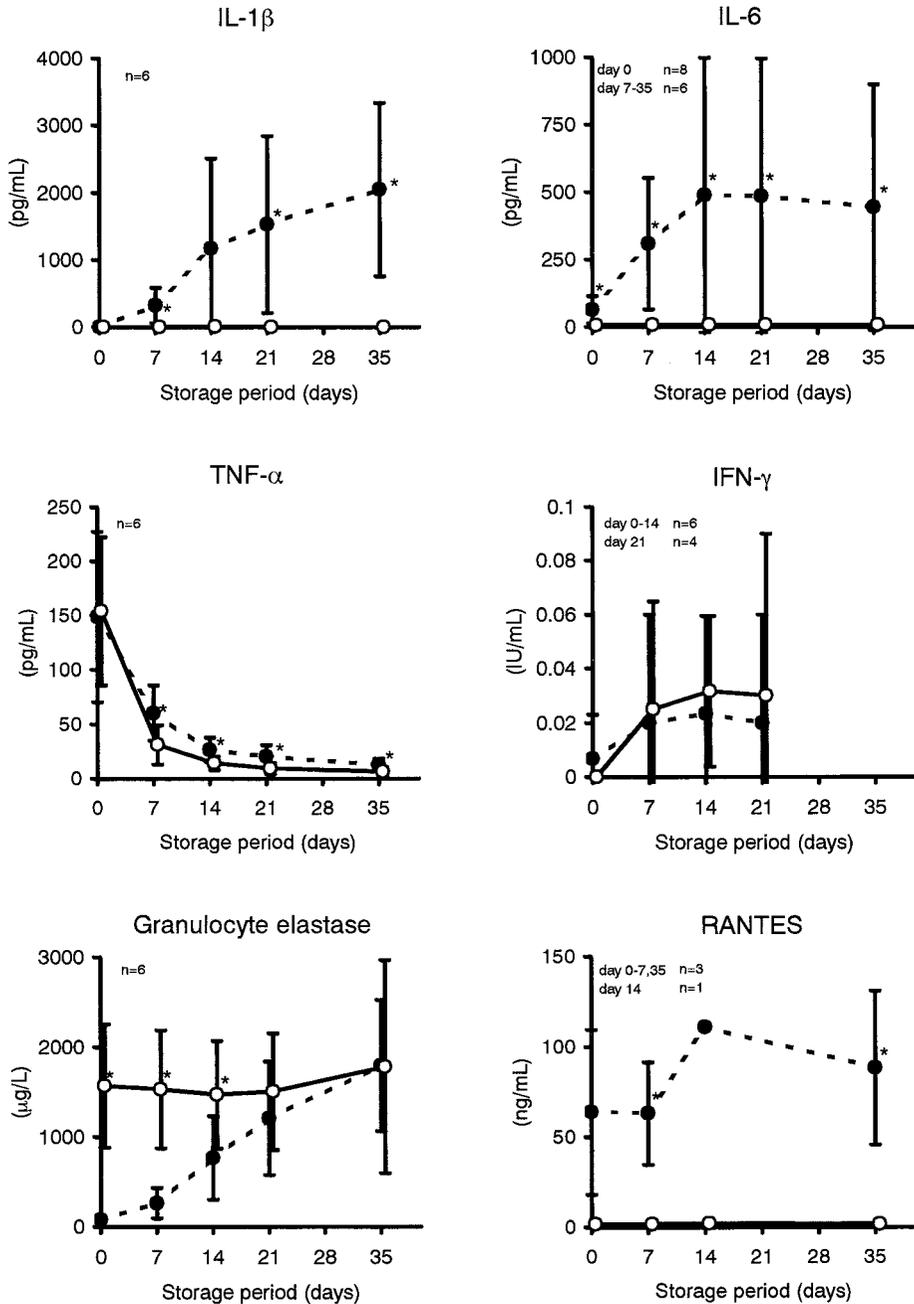


Fig. 2 Cytokine levels in endotoxin-contaminated whole blood on storage for five weeks. Open circles, prsSLR groups ; Closed circles, control groups. * : p < 0.05

しており¹⁾, これは症状が手術侵襲などに覆われている可能性があると考えられる. Van Deventerらは, 6人の健康人ボランティアに2 ng/kg body

weightのエンドトキシンを静脈注射したところ, 血中エンドトキシン濃度は投与5分後で7~13 pg/mLであり, 60分後にはほとんど回収できな

い濃度になったと報告している³⁾。この際、血中サイトカインは TNF- α が 68 ~ 1,374 ng/L、IL-6 が 72 ~ 2,820 U/mL に達し、臨床症状として全員の体温が平均 1.7 上昇し、インフルエンザ様症状を呈したとしている。このことから、短時間でも 7 ~ 13 pg/mL 程度のエンドトキシンが血中に存在すれば臨床的に問題となる可能性が考えられた。本実験において、保存血から回収されたエンドトキシン濃度は、非白除群では day0 で平均 5.5 pg/mL を示し、臨床的に問題となる可能性がある血中濃度であったと思われる。

エンドトキシンは主にグラム陰性菌に由来し、lipopolysaccharide (LPS) と呼ばれる。LPS は、血液中の LPS-binding protein (LBP) と結合し LPS-LBP complex となる。今回の検討ではエンドトキシン添加量は 500 pg/mL であったが、実際に保存血から回収されたエンドトキシンは 5 pg/mL 程度であった。この差異は、エンドトキシン測定法として一般的に行われていたエンドスペーシ法の前処理である過塩素酸処理法では、血漿タンパク質と結合した大量のエンドトキシンを測定できないために認められたものと考えられる。

LPS-LBP complex は、単球やマクロファージの表面上にある CD14 と結合するため⁴⁾、表面抗原と結合した LPS は PreSLR によりある程度は除去できると考えられるが、今回の検討でも白除群において若干のエンドトキシン濃度の低下が認められた。また、LPS-LBP complex は CD14 と結合した後、Toll-like receptor 4 (TLR4) を介して細胞内シグナルを発生し、IL-1 β 、IL-6、TNF- α などのサイトカイン産生を誘導する。これらのサイトカインは、輸血後発熱反応に関与するといわれているが、Weisbach らの報告によれば、CPDA-1 保存血液中の IL-1 β 、IL-6、TNF- α 濃度は、35 日間経過後において、それぞれ 5.4 pg/mL、0.5 pg/mL、0.95 pg/mL と低濃度であったとしている⁵⁾。また、RC-MAP の場合においても同様の傾向が見られ、これら炎症性サイトカインが臨床的に問題になる可能性は低いとされている⁶⁾。しかしながら、エンドトキシン存在下で行った本検討では、非白除群では、保存開始時から IL-1 β 、IL-6、TNF- α

値が非常に高濃度を示した。特に IL-6 は、通常保存期間中濃度が漸減もしくはほとんど変化しない傾向にあるが、高い濃度が維持されていた。これに対し、白除群では採血直後から低濃度を示し、保存期間中の増加も認められなかった。1997 年の自己血輸血に関するアンケート結果によれば、自己血返血時の副作用は 12,613 人 (24,929 単位) 中 109 件に認められ、そのうち発熱性副作用が発生したのは 2 件であったとしている⁷⁾。自己血輸血の副作用は低頻度であるが、エンドトキシンの混入が考えられる場合には、PreSLR により発熱反応が予防できる可能性があると考えられる。また、本検討では PreSLR により血小板の 99% が除去され、RANTES の産生も抑制された。RANTES は主に血小板中に存在し、好塩基球からの脱顆粒を引き起こし、ヒスタミンを遊離させることにより輸血後のアレルギー反応に関与するといわれている⁸⁾。自己血輸血に伴うアレルギー反応は報告が少なく、その意義は不明であるが、同種血輸血においては輸血後のアレルギー反応をおこした血小板製剤中の RANTES 濃度は、コントロール群と比較して有意に高かったとの報告があり、副作用との関連性が示唆されている⁸⁾。顆粒球エラストラーゼは、基質特異性が低いいため、過剰に放出された場合や、 α 1-アンチトリプシンなどのインヒビターが欠乏していると、生体構成成分を分解し組織障害をきたす恐れがある。Willy らの報告によれば、21 日間保存後の CPD 保存血中の顆粒球エラストラーゼ濃度は 1,109 μ g/L と高濃度になったが、白除群ではその産生は抑制され、ほとんど検出されなかったとしている⁹⁾。それに対して本検討では、白除群では保存開始直後から 1,570 μ g/L と高濃度を示した。フィルターを通過する際に顆粒球が破壊され、その結果顆粒球エラストラーゼ濃度が上昇した可能性が考えられたが、臨床的に問題となる顆粒球エラストラーゼの濃度は不明である。

自己血輸血は、輸血後感染症や免疫学的副作用の多くを回避することが可能であるが、長期保存に伴い、混入した白血球や血小板が凝集塊を形成し、輸血時に肺塞栓などの副作用を惹起する可能

性がある。通常、ベッドサイドにて微小凝集塊除去フィルターを用いて予防するが、孔径が20~40 μmであるため、それよりも小さな凝集塊は除去することができない。それに対し、PreSLRを行うことにより、20μm未満の凝集塊の産生が非白除群と比較して有意に抑制されることが示され、副作用の軽減が期待できる。

白血球除去を行うにあたり、フィルターを使用するリスクとして、陰性荷電のフィルターを通過させた場合は製剤中のブラジキニンが増加して血圧低下をきたす場合があり、逆に陽性荷電のフィルターを用いた場合は補体の活性化が起こり、アナフィラキシー様症状をきたす場合があることが知られている^{10,11)}。今回の検討ではブラジキニン濃度には白血球除去による影響は認められなかったが、C3aの上昇がみられた。しかしながら、臨床的に問題となる血液製剤中のC3a濃度は不明であり、輸血後副作用との因果関係もはっきりしていない。

同種血輸血は、感染症スクリーニング検査として核酸増幅検査(NAT)法を導入するなど、その安全性は飛躍的に向上している。また製剤の品質向上、副作用回避の手段として、我が国でも同種血に対するPreSLRが承認され、早期の導入が期待されている。自己血輸血は免疫学的副作用、輸血後感染症が回避できるなどの利点があるが、閉塞性黄疸合併例など、症例によっては製剤にエンドトキシンが混入し、輸血後副作用につながる可能性がある。自己血輸血の安全性向上のため、このような症例に対しては、副作用予防策としてのPreSLRが有用であると考えられた。

文 献

- 1) 篠塚 望, 鈴木義隆, 小山 勇, 安西春幸, 松本隆, 渡辺拓自, 美濃島卓哉, 上笹 直, 俵 英之, 許 俊鋭: 閉塞性黄疸合併担癌症例における自己血貯血中エンドトキシン値測定の意義。自己血輸血, 13(1): 50-54, 2000.
- 2) 比留間潔: 輸血用血液のPrestorage leukocyte depletion。日本輸血学会雑誌, 44(1): 1-11, 1998.
- 3) S.J.H. van Deventer, H.R. Buller, J.W. ten Cate, L. A. Aarden, C.E. Hack, A. Sturk: Experimental endotoxemia in humans: Analysis of cytokine release and coagulation, fibrinolytic, and complement pathways. Blood, 76: 2520-2525, 1990.
- 4) 野口和典: エンドトキシン。肝胆膵, 45(5): 717-722, 2002.
- 5) V. Weisbach, C. Wanke, J. Zingsem, R. Zimmermann, R. Eckstein: Cytokine Generation in whole blood, leukocyte-depleted and temporarily warmed red blood cell concentrates. Vox Sang., 76: 100-106, 1999.
- 6) 秋野光明, 山本定光, 才川 聡, 佐藤雅子, 瀬川紀美子, 小林健次, 池淵研二, 池田久實: 全血処理型白血球除去フィルタークローズドバッグシステム(セパセルインテグラ MAP)を用いた血液製剤の調整と長期保存試験。日本輸血学会雑誌, 46(6): 521-531, 2000.
- 7) 大戸 齊, 富士武史, 脇本信博, 阿南昌弘, 前田平生: 自己血輸血に関するアンケート調査: 自己血採血・貯血・輸血の安全性に関する調査 第1報 自己血採血量と使用量および自己血の採血・保存・返血に伴う副作用・トラブルについて。自己血輸血, 11(2): 175-189, 1998.
- 8) 藤原満博, 若本志乃舞, 池淵研二, 東 寛, 池田久實: 保存による血液製剤中のサイトカインレベルの変化。日本輸血学会雑誌, 47(6): 829-836, 2002.
- 9) C. Willy, W. Reithmeier, W.D. Kuhlmann, H. Gerngross, W.A. Flegel: Leukocyte depletion of red cell components prevents exposure of transfusion recipients to neutrophil elastase. Vox Sang., 78: 19-27, 2000.
- 10) M. Shiba, K. Tadokoro, M. Sawanobori, K. Nakajima, K. Suzuki and T. Juji: Activation of the contact system by filtration of platelet concentrates with a negatively charged white cell-removal filter and measurement of venous blood bradykinin level in patients who received filtered platelets. Transfusion, 37: 457-462, 1997.
- 11) M. Hyllner, J.P. Arnestad, J.P. Bengtson, L. Rydberg, A. Bengtsson: Complement activation during storage of whole blood, red cells, plasma, and buffy coat. Transfusion, 37: 264-268, 1997.