

輸血後GVHD予防を目的とした紫外線血液照射システムの基礎研究

佐藤英哉・市川晃・島田哲雄・松本義伸
西村義孝・福本一朗

輸血後GVHD予防を目的とした紫外線血液照射システムの基礎研究

佐藤英哉*・市川晃*・島田哲雄*・松本義伸**・西村義孝***・福本一朗*

A Basic Study of Ultraviolet Irradiation on Blood for Preventing of PT-GVHD

Hideya SATO*, Akira ICHIKAWA*, Tetsuo SHIMADA*, Yoshinobu MATSUMOTO**,
Yoshitaka NISHIMURA***, Ichiro FUKUMOTO*

Post Transfusion-Graft-versus-host-disease (PT-GVHD) is one of the most severe side effects of blood transfusion. There is no effective treatment for PT-GVHD, the mortality rate is about 100%. Therefore prevention of PT-GVHD is very important. X-ray irradiation (15~50Gy) to blood products is recommended as a standard method for the prevention of PT-GVHD. But a X-ray irradiation unit is so expensive and so heavy that small medical institutions can hardly afford one.

UV irradiation to lymphocytes has also inactivation effect. UV irradiation to blood products is expected to solve these problems of the X-ray irradiation. But the method has some problems such as its low power and low transmittancy. We researched the inactivation effect of high power UV irradiation on lymphocytes using Super-High-Pressure-Mercury-Lamp as a high power source of UV ray.

Key words : PT-GVHD, ELISA, UV lamp, Mercury-Lamp, PHA

1. はじめに

輸血後GVHD (Post Transfusion-Graft-Versus-Host Disease:PT-GVHD) は輸血製剤中の活性を持ったリンパ球が宿主(患者)の体中で宿主の組織や血球を攻撃することによって起きる極めて重篤な輸血副作用の一種である。現在未だ有効な治療法はなく、一度発症すると死亡率はほぼ100%であることから、予防が極めて重要とされている。PT-GVHDは以下のような条件が満たされている場合に発症する¹⁾。

移入される細胞の中に反応性のリンパ球が存在している。

移入細胞と宿主との間に遺伝的に決められている移植抗原に差がある。

宿主は移入細胞を拒絶(排除)しない。

PT-GVHDの発症を防ぐには、移入血液細胞中の反応性リンパ球の十分な不活化もしくは除去が必要とされている。現在PT-GVHD予防のための最も有効な手法として血液製剤に対する放射線照射(15~50Gy)が行われている。しかし放射線照射装置は高価であり、保守にかかるコストも大きいことから、結果としてコストパフォーマンスは良いとは言えない。また、重量が約

1tであることから、専用の設置スペースを確保することが必要である。これらのことから、大規模な医療施設以外では設置が困難な状況となっている。日本赤十字社による照射血の供給も行われているが、未だ輸血に使用される血液の全てに対し照射が行われているわけではない。またこの他、放射線照射の大きな問題点として放射線照射後の血液製剤中では上清中のK⁺イオン濃度が大きく上昇する。これは高カリウム血症を引き起こす要因となってしまいうため、照射後血液の有効期間は極めて短縮されてしまうこととなる。

一方、紫外線にはリンパ球を不活化する効果が古くから知られており²⁾、これまでにPT-GVHDの予防を目的として、血液製剤中のリンパ球を紫外線照射により不活化する試みが行われている³⁾。紫外線は放射線と比較して照射装置が安価であること、取り扱いが簡単であること、照射装置の小型化が可能であること、これまでの報告では照射後のK⁺イオン濃度の上昇が見られないこと等から、放射線照射に伴う問題点を根本的に解決することが可能であると考えられており、血液製剤に対する紫外線照射装置の開発が大いに期待されている。しかしながらこれまでの報告において使用された紫外線ランプは紫外線強度が低く、血液中でもしくは血漿中のリンパ球を十分に不活化するには長時間の照射が必要であること、また血液、特に赤血球に対する紫外線の透過率が低いことから、その実用化は難しいとされてきた。

原稿受付：平成13年5月21日

*長岡技術科学大学生物系

**長岡技術科学大学RIセンター

***長岡西病院放射線科

そこで本研究では、血液製剤に対する紫外線照射装置の実用化を目的とした基礎研究として以下の実験を行った。まず血液製剤に対する照射に適した紫外線の波長域を検討するため、紫外線透過に関して主に障害となっていると予想されている血液バッグと赤血球成分について紫外線吸光度の波長依存性をUV分光光度計により測定した。次に、紫外線によるリンパ球不活化効果を高めるため、光増感剤である8-Methoxy-psoralen (8-MOP)の存在下で紫外線照射を行う手法についてその効果を検討した。血液から分離した末梢血単核球(Peripheral Blood mononuclear cells: PBMCs)にin vitroで様々な濃度の8-MOPを添加した細胞浮遊液に対して紫外線照射を行い、照射後のリンパ球増殖能力を測定してリンパ球不活化効果を検討した。また、従来頻繁に使用されてきた紫外線ランプと比較して格段に高強度の紫外線を発することが可能である超高圧水銀ランプを光源として用い、照射によるリンパ球の不活化効果について従来の紫外線ランプとの比較を行った。リンパ球の増殖能力は紫外線照射後にリンパ球増殖刺激因子であるPhytohemagglutinin (PHA)とともに培養し、細胞増殖測定法であるELISA法により測定した。最後に、高強度の紫外線照射を血液に対し照射した場合の血液上清K⁺イオン濃度の変化に与える影響について検討を行った。

2. 方法

2.1 分光分析

血液バッグと赤血球成分について紫外線の吸光度測定を行った。血液バッグは通常広く使用されているPolyvinyl chloride (PVC) バッグ 膜厚500 μ mのものを使用した。

赤血球成分は、血液製剤を製造する際に血液より遠心分離されたバフィーコート(BC)層を新潟県赤十字血液センターより提供していただき、これを遠心分離して赤血球層を採取した。使用したBCは実験日より3日以内に採血された血液から分離したものである。

分光光度計はUV・vis分光光度計としてU-2000型ダブルビーム分光光度計(日立製作所)を使用した。測定波長域は200~400nmとして測定を行った。血液バッグは10×30mmの大きさにカットし、入射光に対して垂直となるように立てて固定し、測定した。赤血球成分はリン酸緩衝溶液(PBS(-))で0.1vol%に希釈し、石英セル中にて測定した。

2.2 PBMCs

赤血球成分を採集した場合と同じく、血液製剤を製造する際に血液より遠心分離されたバフィーコート(BC)層からFicoll-Paque遠心分離法によりPBMCsを取り出した。まずBCをPBS(-)により3倍に希釈し、遠心チューブ内のFicoll-Paque遠心分離液(Pharmacia Biotech)10mlの上に重層した。その後1500rpm 30min遠心してPBMC層を採集した。これをPBS(-)に懸濁し、1000rpm 10分間遠心分離を行った。この洗浄処理をさらに2回行った。最後に細胞を、10%FCS(Gibco BRL)、100 μ g/mlのstreptomycin(Gibco BRL)、100units/mlのpenicillin(Gibco BRL)を含むRPMI-1640培地(コスモバイオ)中に懸濁し、濃度 1.0×10^6 /mlに調整して、これを細胞懸濁液とした。

2.3 ランプと紫外線照射条件

一般に波長400nm~10 μ mまでの電磁波が紫外線と呼ばれ、その中の近紫外線と呼ばれる波長域がさらにUV-A(400~320nm)、UV-B(320~280nm)、UV-C(280~200nm)の3つに分けられている。これまで報告された研究の多くはUV-Bを用いて行われている。これはUV-Cでは生物学的活性が高いためリンパ球不活化効果は高いと考えられるが、血液バッグに対する紫外線透過率が極端に低いことが問題となってしまう。またUV-Aでは、UV-C、UV-Bに比べて血液製剤に対する透過率が高いとされているが、生物学的活性が低く、十分にリンパ球を不活化できないことが予想されており、UV-C及びUV-Aはともに実用には適さないと考えられているためである。

本研究においても従来の研究に多く用いられているランプと同様の強度をもつ紫外線ランプCBT-15A、B(15W、コスモバイオ)を低強度紫外線の光源として使用した。A、Bそれぞれの中心波長は365、312nmである。このランプを3本平行に配置(ランプ間距離10mm)して氷上にて片面照射を行った。紫外線強度はUVX Radiometer(UVP)を用いて測定し、細胞懸濁液水面上でA、Bそれぞれ6、8 mW/cm²であった。CBT-15Aは8-MOP添加によるリンパ球不活化効果の検討の際に光源として使用し、低強度紫外線と高強度紫外線のリンパ球不活化効果の検討には低強度紫外線の光源としてCBT-15Bを使用した。高強度紫外線は超高圧水銀ランプ250W(ウシオ電機)を光源として使用した。超高圧水銀ランプは200nmから600nmまでの広範囲のスペクトル(Fig.1)を持つため、紫外透過・可視吸収フィルター(ケンコー光学)を用いて300nmから400nmの

波長域のみを使用した。照射は専用の照射装置である高照射型 高輝度光源装置 Optical ModuleX (ウシオ電機) を使用した。照射光は水平方向に発せられるため、鏡で反射させ、氷上に置いたシャーレに対し鉛直下向きに照射した。強度は照射装置の特性データとフィルター特性データより算出し、シャーレ上部表面で約400mW/cm²とした。

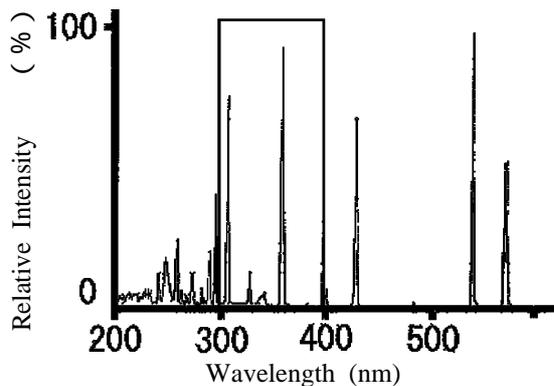


Fig. 1 Spectrum distribution of high pressure mercury lamp

2.4 8-MOP

8-MOPは光増感物質であり、波長360nm付近の光を吸収することにより細胞増殖抑制効果を有することが知られている。経口投与もしくはペーストに溶解させ患部に塗布し、アトピー性皮膚炎や乾癬等の治療に利用されている。これまでの研究から生体内において数時間で分解されることが確認されている。8-MOPを培地中に最終濃度0.1~50 μg/mlとなるように添加し、紫外線照射を行った。その後3日間培養し、ELISA法によりリンパ球増殖能力の測定を行った。尚、培養に関して培地中に8-MOPが存在していることは特にリンパ球の増殖に対し影響を与えないことは実験前に確認されている。

2.5 ELISA法

ELISA法は細胞増殖を測定する方法であり、本測定ではCell Proliferation ELISAキット(Boehringer Mannheim)を使用した。細胞懸濁液をプラスチックシャーレ(36mm)に3mlづつ分注し、上記条件にてそれぞれ紫外線照射を行った。その後増殖刺激因子であるPHAを最終濃度5 μg/mlとなるように添加し、37℃、5%CO₂の条件下で3日間培養した。PHAはTリンパ球にのみ増殖刺激を与える物質である。培養終了8時間前に細胞懸濁液を100 μl取って96穴マイクロプレートに移し、標識物質である5'-Bromo-3'-deoxy-uridineを添加して

細胞内DNAに取り込ませた。培養終了後に遠心した後上清を捨て、60℃で60分間乾燥してマイクロプレート底面に細胞を固定した。次にperoxidaseを結合した抗-BrdU-モノクローナル抗体を添加し、90分間反応させてから上清を捨てた後、専用の洗浄液にて3度洗浄を行った。最後に基質となるTetraMethylBenzidineを添加して発色させ、これを専用の吸光度計であるマイクロプレートリーダー(東ソー)で波長492nmにて吸光度を測定した。測定で細胞増殖が活発であれば吸光度は上昇し、紫外線の照射によりリンパ球の不活化が行われていれば吸光度は低下することとなる。実験は異なる3検体について行った。

2.6 血液上清中K⁺イオン濃度の測定

血液をガラスセル中に入れ、超高圧水銀ランプを光源とする高強度紫外線をガラスセルに対し垂直に照射した。ガラスセルに使用したガラスの紫外線透過率は0.85(365nm)であり、ガラスセル表面での紫外線強度を測定しセル内面での紫外線強度を算出したところ2010mW/cm²であった。血液は有効期限切れの日赤MAPを使用し、0、5、10minの照射を行った。照射の間、温度上昇による溶血を防ぐため、セル表面を4℃の流水により冷却した。照射8時間後に遠心し、血液上清を取り出して自動血液分析装置 SYNCHRON EL-ISE (Beckman) によりK⁺イオン濃度を測定した。

3. 結果と考察

血液バッグと赤血球成分の吸光分析結果をFig. 2-a、bにそれぞれ示した。血液バッグでは300nm以下の波長域ではほとんど透過していないが、300nm以上の波長域では吸光度は低く、比較的透過しており、この波長域における紫外線照射では大きく問題にはならないと考えられる。赤血球成分の結果でも同様に300nm以下の波長域ではほとんど透過していない。300nm以上の波長域では400nm付近に大きなピークが見られたが、300nm以下の波長域に比べ透過しやすいことが分かった。また特に300nm付近と360nm付近では比較的透過しやすくなっていると考えられる。しかしながら、赤血球の濃度は通常の血液の0.1%としてあることから、やはり紫外線の赤血球に対する透過性は非常に悪く、測定時の路光長が10mmであることを考えると、その0.1%である100 μm程度に血液の厚みを設定しなければ充分な不活化は難しいと考えられる。但し、超高圧水銀ランプのような非常に高強度の光源を使用すれば、

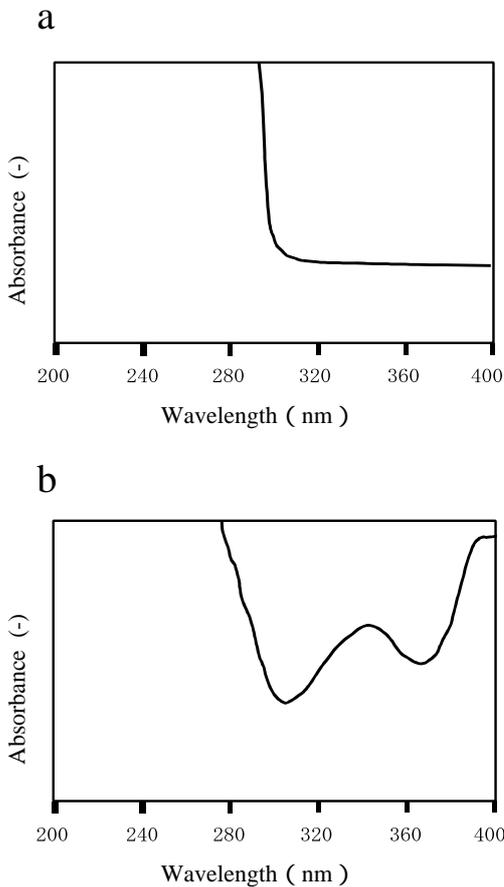


Fig. 2 Absorption features.
(a) Blood bag , (b)Red cells

透過率が低くても血液の膜厚が数mm程度であればリンパ球の不活化が可能であると考えている。

次に、8-MOP存在下でPBMCsに対し紫外線照射を行った際のリンパ球不活化効果について測定結果をFig. 3-a、bに示す。a、bはそれぞれ照射時間10、1minの場合を示している。照射時間10minの場合、8-MOP濃度1.0 $\mu\text{g/ml}$ 以上でリンパ球はほぼ完全に不活化されていると思われる。また、照射時間1minにおいても、10 $\mu\text{g/ml}$ 以上ではほぼ完全に不活化されたようである。この結果から、8-MOPの添加により紫外線照射によるリンパ球不活化効果は向上しており、8-MOPの濃度の上昇とともに効果は高まる傾向にあることが分かった。

次に、従来多く用いられてきた低強度の紫外線を照射した場合及び超高压水銀ランプを光源とした高強度紫外線を照射した場合の、それぞれのリンパ球増殖能力をELISA法により測定した結果をFig. 4に示す。低強度紫外線を照射した場合では400sec程度の照射により著しい増殖能力の低下がみられたのに対し、高強度紫外線を照射した場合は、6~10sec程の照射で増殖能

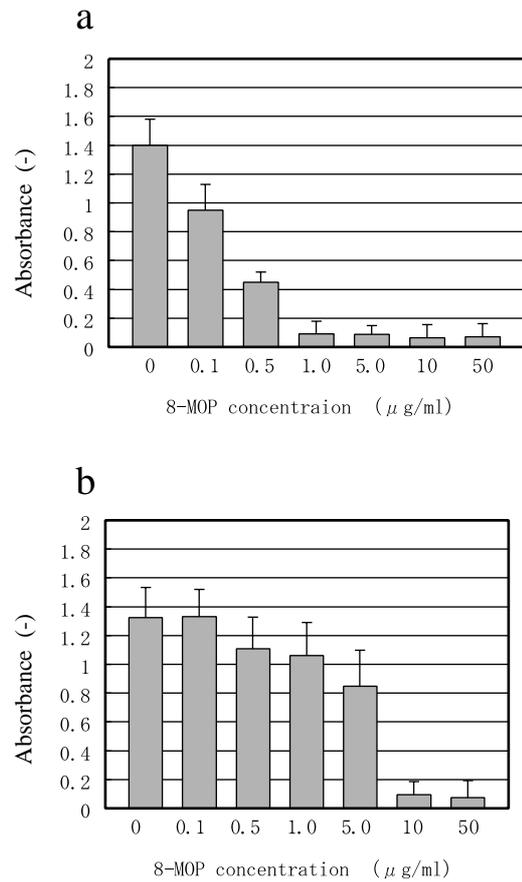


Fig. 3 Inactivation effects of 8-MOP with UV-irradiation.
Irradiation time is 10min(a) and 1min(b).

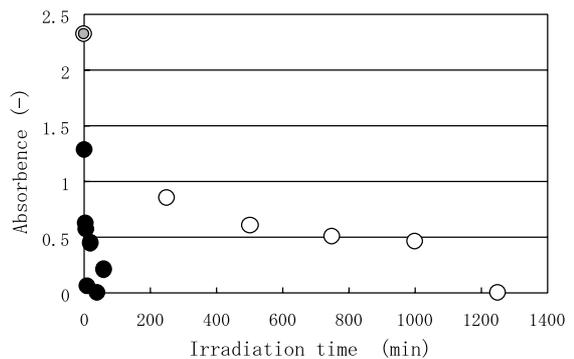


Fig. 4 Effects of UV-irradiation on lymphocytes inactivation. Each irradiation was obtained by UV lamp (15W) (○) and high pressure mercury lamp (250W) (●)

力の著しい低下がみられた。

この結果から、超高压水銀ランプを高強度紫外線の光源として使用することで、従来の低強度紫外線ランプと比較して血液製剤中のリンパ球の不活化が極めて短時間で行える可能性が示された。また、8-MOPを使

用した場合と比較しても短時間でリンパ球不活化が可能であると考えられた。これらのことから、実用化に際しては超高圧水銀ランプの使用がより適していることが示された。

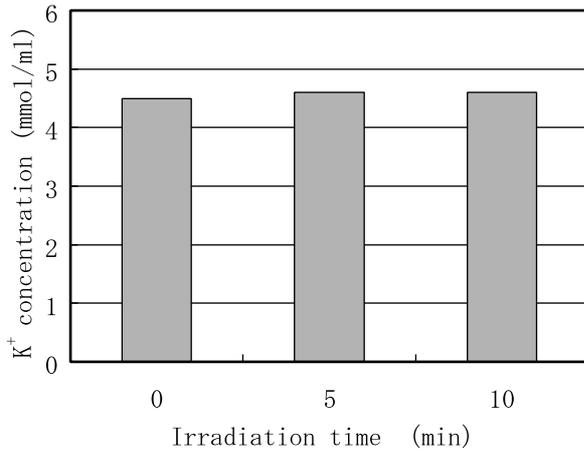


Fig. 5 K⁺ concentration in the plasma after UV-irradiation.

Fig. 5 に高強度紫外線照射後の血液上清中K⁺イオン濃度を示す。照射時間0、5、10minでK⁺イオン濃度の違いはほとんど見られなかった。紫外線照射は血液中にフリーラジカルを発生させると考えられており、従来の紫外線よりもはるかに高強度の紫外線を照射した場合、フリーラジカルが細胞膜に孔をあけ、細胞中のK⁺イオンが血漿中に流出する可能性が考えられた。しかし、この結果からは細胞中K⁺イオンの血漿中への流出はほとんど発生していないことが示唆された。洗浄赤血球製剤に対し放射線を照射した場合は、放射線照射直後からK⁺イオン濃度が急激に上昇し、照射24時間後ではK⁺イオン濃度の上昇率は非照射の場合と比較して最低でも2倍以上となると考えられている。このことから、高強度紫外線を用いてリンパ球の不活化を行った場合には、従来の放射線照射を行った場合と比較して照射後血液製剤の使用可能期間の大幅な延長が可能であり、輸血される患者に対する安全性も高めることができると考えられる。ただし、血液製剤中のK⁺イオン濃度は一般に時間とともに上昇する傾向があるため、照射1週間後やさらにそれ以上の期間において紫外線照射がK⁺イオン濃度に影響を及ぼしていないことを確認する必要がある。

以上の結果からPT-GVHD予防を目的とした血液に対する紫外線照射装置は、高強度紫外線を用いることによりその実用化が大いに期待できる。しかしながら実用化のためにはさらにいくつかの問題点が残されてい

る。それらのうち最も大きな問題は血液に対する紫外線の透過性である。これまでの研究から赤血球を含む血液製剤では紫外線透過率は著しく低いことが分かっており、血液バッグに密封された血液に対して紫外線を照射した場合、高強度紫外線を用いても血液製剤中のリンパ球を十分に不活化することは極めて困難であることが予想される⁹⁾。この問題を解決するためには血液層の厚みを薄くすることが必要である。このようにして照射を行う場合には血液バッグではなく血液がチューブ内を流れている際の照射が適切であると思われる。考えうる照射のタイミングとしては採血時、血液製剤の作製するために成分の分離を行う時及び輸血時である。今後は作業効率や作業時間等を含むそれぞれの場合の利点を考えながら、照射に最適なタイミングを検討して選択していく必要があると考えられる。今後それぞれの場合での照射を想定し、照射によるリンパ球の十分な不活化に必要な紫外線強度や血液の厚み等の各種条件についてさらに検討していく予定である。

紫外線照射装置の実用化に関して必要な検討課題として、照射による赤血球、白血球、血小板などリンパ球以外の血液細胞への影響の調査が挙げられる。これまでも紫外線照射が血液成分に与える影響が報告されているが、⁵⁾これらは全て従来の低強度紫外線ランプが用いられたものであり、高強度の紫外線による影響についてはこれまで全く調査されていない。その他には放射線照射の場合と同様に、発癌性についても検討されるべきであると考えられる。

4. おわりに

血液製剤中のリンパ球を紫外線照射により不活化する試みはこれまで数多く報告され、その起序についても数多く報告されているが、血液製剤に対する紫外線照射装置は未だ実用化されていない。現在、輸血後GVHDの予防のため、ほとんど全ての輸血血液に放射線照射を行うことが推奨されており、放射線照射は広く行われている。しかし、設備上の問題で未だ未照射血を使用する施設が、全体に占める割合は小さいながらも存在している。また、放射線照射の他に白血球除去フィルターを使用して白血球を血液中から除去する手法が提案、実用化されている。しかし、過去に白血球除去フィルターを使用したGVHDを発症した例があり^{6),7)}、その後も改良が進められているが、未だ十分とは言えない。さらに白血球除去フィルターは紫外線照

射よりも高コストであることが予想されている。この他に利点として、放射線照射ではGVHDを予防するのみであるが、紫外線照射ではGVHDの予防のみならず同種抗原感作予防にも役立つことが知られており、紫外線照射装置の実用化はこの面からからも大いに期待されている。

また近年、保存前白血球除去の必要性についての議論が高まっている。これは保存前に血液製剤中の白血球除去を行うことにより、輸血によるウイルス感染の防御、保存期間中に白血球により産生されるサイトカインの一部に起因すると考えられる発熱などの副作用の減少、その他細菌の除去による輸血後の感染の予防と血液製剤の保存期間延長の効果を得ようとするものであり、これらの効果によるコストダウンが最も大きな目標である。この保存前白血球除去が実際に導入された場合、現在行われている放射線照射では照射後の保存期間が短くなってしまふことやコストの面から考えて紫外線照射による利点が今後より注目されるものと考えられる。また紫外線と光増感物質との併用による血液中のウイルスに対する不活化効果なども報告されており⁸⁾、臨床応用された場合の今後の可能性はさらに大きいと考えられる。

5. 謝 辞

本研究を行うに際し、試料を提供していただいた新潟県赤十字血液センター前所長小島健一先生、現所長田村眞先生、製剤課の皆様、並びに関係者の皆様に深く感謝いたします。

また、紫外線照射装置についてご尽力いただきましたウシオ電機株式会社の関係者の皆様に深く感謝いたします。

参考文献

- 1) 十字猛夫, 伊藤和雄: 輸血後GVHD, 金芳堂, 1994.
- 2) K.Lindahl-Kiessling, J.Safwenberg: Inability of UV-irradiated lymphocytes to stimulate allo- beneic cells in mixed lymphocyte culture, Int Arch Allergy 41, 670-678, 1971.
- 3) G.Andreu, F.Heshmati, C.Boccaccio, The role of UV irradiation in the prevention of HLA allo- immunization and in therapeutic apheresis. 日輸血会誌, 28, pp.763-781, 1992.
- 4) 佐藤英哉, 市川晃, 児玉直樹, 松本義伸, 西村義孝, 福本一郎: 輸血後GVHD予防を目的とした紫外線照射システムの基礎研究, 信学技報MBE2000-62, Vol.100, No.330, pp67-72, 2000.9.29
- 5) R.A.Kahn, B.F.Duffy, G.G.Rodey: Ultraviolet irradiation of platelet concentrate ablogates lymphocyte activation without affecting platelet function in vitro, Transfusion, 25, pp.547-550, 1985.
- 6) M.Akahoshi, M.Takahashi, M.Masuda: A case of transfusion-associated graft-versus-host disease not prevented by white cell-reduction filters.

Transfusion, 32, pp.169-172, 1992.

- 7) 林 英明, 田村栄稔, 武田 清: 白血球除去フィルターの使用にもかかわらず輸血後GVHDを発症した1例, 日本臨床麻酔学会誌, 12(6), 298, 1992.
- 8) 矢野美佐子, 権吉 源, 仲井邦彦, 高橋恒夫, 関口定美: 光化学処理によるHTLV-1感染の防止, 日輸血会誌, 39, 438, 1993.