



Antigenicity and Irritancy Tests of Leukocyte-Reduction Filters using Animal Models

Kokubunji, Akira

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2006-03-25

(Date of Publication)

2012-08-10

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲3668

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1003668>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【 1 2 9 】

氏 名・(本 籍)	国分寺 晃 (兵庫県)
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学 位 記 番 号	博い第1751号
学位授与の 要 件	学位規則第 5 条第 1 項該当
学位授与の 日 付	平成18年3月25日

【 学位論文題目 】

Antigenicity and Irritancy Tests of Leukocyte-Reduction
Filters using Animal Models
(動物モデルによる白血球除去フィルターの抗原性
と刺激性試験)

審 査 委 員

主 査	教 授	熊 谷	俊 一
	教 授	千 原	和 夫
	教 授	上 野	易 弘

血液製剤に含まれる白血球が原因で起こる輸血副作用には、同種抗原感作、非溶血性発熱反応(non-hemolytic febrile transfusion reaction, NHFTR)、輸血後移植片対宿主病(post-transfusion graft-versus-host disease, PT-GVHD)、CMVやHTLV-Iなどの輸血後ウイルス感染がある。中でも非溶血性輸血副作用が輸血による副作用全体の8割を占め、医療機関は血液センターと協力してその原因解明に当たっている。しかし、原因を特定できない副作用例も多い。

赤血球あるいは血小板製剤等の輸血が将来にわたって必要な患者へは、輸血する際、血液製剤に含まれる白血球自体が同種免疫原となり、抗HLA抗体の産生や血小板輸血無効状態(platelet transfusion refractoriness, PTR)のような重大な輸血副作用を生じる可能性があることから、その予防策として白血球除去フィルター(以下フィルター)を用いた白血球除去製剤が使用されている。しかし、フィルターの使用時においても輸血副作用が発生しており、我々も特定のフィルター使用時に、重篤なアレルギー症状が生じた症例を経験している。その症例ではフィルターを他社の製品へ切り替えて輸血した時には副作用は発生しなかった。また、その製品から抽出した物質によるプリックテストを実施したところ、陽性反応が認められた。このように、輸血に伴う副作用の原因の一つとしてフィルター成分の患者体内への混入と、それに対するアレルギー反応を生じる可能性が示唆される。そこで今回、フィルター抽出物を用いてフィルター成分に抗原性、あるいは刺激性があるか否かを検討した。

皮膚感作性試験として、最も広く行われている方法にMagnusson and Kligmanによって開発されたモルモットによるMaximization testがある。この試験方法は、動物を用いた遅延型アレルギー反応を調べるものとして、国際標準化機構による「医療材料の生物学的評価」(10993-10)に掲載されており、今回は、annex B of ISO 10993-10の基準に従い検討した。また、マウスを用いてフィルター抽出物の皮膚刺激性試験と、皮膚感作性試験を併せて行った。

モルモットを用いた白血球除去フィルターの抽出物によるMaximization testでは、まず3社のフィルター(A、B、C社)からアセトン抽出物を作成し、10%の濃度で感作と惹起を行った。その結果、1社(B社)のフィルター抽出物でモルモットに感作が成立することを確認した。さらにそのB社の抽出物において、10%、1%、0.1%、0.01%の濃度で同様に感作性を検討したところ、1%の濃度において感作性が認められ、0.1%、0.01%の濃度においては感作性が認められなかった。

次に、マウスを用いた皮膚刺激性及び皮膚感作性試験のために、5%エタノールによりフィルターから抽出物を作成したが、C社の抽出量が極めて少なかった事から、2社(A、B社)からの抽出物に対してマウスを用いた皮膚刺激性試験及び皮膚感作性試験を行った。皮膚刺激性試験としては、5%、あるいは0.5%の濃度の抽出物をマウス耳介に皮内注射し、1時間後・24時間後・48時間後・7日後の耳介腫脹を観察した。その結果、B社の5%の濃度の抽出物では、有意の耳介腫脹が認められた。皮膚感作性試験としては、5%の濃度の抽出物をマウス背部に3日間連続で皮下注射することで感作し、0.5%の濃度の抽出物をマウス耳介に皮内注射することで反応惹起を行い、耳介腫脹の

経時変化を観察した。その結果、B社の抽出物において、惹起後1時間目(即時型)および24時間目(遅延型)から成る2相性の耳介腫脹が認められた。

今回の研究では、モルモットを用いた皮膚感作性試験における陽性率や平均評価点から、遅延型の反応が認められたことから、B社のフィルター抽出物の中に生体に対する感作能を有する抗原性物質が含まれることが示された。また、マウスを用いた皮膚刺激性試験の結果から、B社のフィルター抽出物は高濃度では皮膚に対して刺激性的炎症反応を惹起しうることが明らかとなった。さらに、皮膚感作性試験の結果では、即時型と遅延型の反応が認められたことから、B社のフィルター抽出物に含まれる抗原性物質は遅延型反応のみならず即時型反応を惹起しうることとも判明した。

したがって、今回の研究の結果はヒトにおいてフィルター使用時に生じた輸血副作用が、フィルター抽出物に含まれる何らかの物質が抗原となってアレルギー反応を生じたために引き起こされた可能性を示唆している。ただ、その抗原性物質の特定には至っていないが、3社のフィルターの特徴から考慮すると、容器材質と滅菌方法の違いよりもフィルター材質のポリウレタンとポリエステル不織布の違いや、各社の製造工程において使用される各種処理剤の違いによる要因が考えられる。また、フィルターの使用回数やフィルター成分の患者体内への混入量の違い、および患者自身の体質(遺伝的背景)により、副作用の症状が異なっていると推測する。実際に、マウス接触過敏反応においても、遅延型反応を惹起するハプテンを繰り返し塗布することで即時型反応が誘発されることが示されており、抗原性物質の暴露頻度が多い場合にはアナフィラキシーショックが生じる可能性もありうる。いくつかのサイトカインやBKの産生が輸血副作用に関連しているとの報告はあるが、フィルター抽出成分による感作性、および刺激性を示した報告は今回が初めてである。

結論として、今回の研究により、白血球除去フィルターには、皮膚刺激性や感作性を惹起しうる物質が含まれている事が明らかになった。この研究で用いた抗原性と刺激性試験は、フィルターによる輸血副作用を予防するのに有用である。

論文審査の結果の要旨

受付番号	甲 第 1752 号	氏 名	国分寺 晃
論文題目	<p>Antigenicity and Irritancy Tests of Leukocyte-Reduction Filters using Animal Models 動物モデルによる白血球除去フィルターの抗原性と刺激性試験</p>		
審査委員	主 査	熊谷 俊一	
	副 査	上野 易弘	
	副 査	千原 和夫	
審査終了日	平成 18 年 3 月 13 日		

(要旨は1, 000字～2, 000字程度)

輸血による副作用の報告件数は年々増加しており、医療機関は血液センター等と協力してその原因解明に当たっているが、原因を特定できない副作用例も多く存在している。輸血する際、血液製剤に含まれる白血球自体が同種免疫原となり、抗HLA抗体の産生や血小板輸血無効状態のような重大な輸血副作用を生じる可能性があることから、その予防策として白血球除去フィルター（以下フィルター）を用いた白血球除去製剤が使用されている。しかし、フィルターの使用時においても輸血副作用が発生しており、その原因の一つとしてフィルター成分の患者体内への混入と、それに対するアレルギー反応を生じている可能性があることから、今回、フィルター抽出物を用いてフィルター成分に抗原性、あるいは刺激性があるか否かを検討した。

皮膚感作性試験として、最も広く行われている方法にモルモットを用いたMaximization testがあり、国際標準化機構（ISO）による「医療材料の生物学的評価」（10993-10）の annex B の基準に従い検討した。また、マウスを用いた皮膚刺激性試験と、皮膚感作性試験を併せて行った。

モルモットを用いたMaximization testでは、まず3社のフィルター（A、B、C社）からアセトン抽出物を作成し、10%の濃度で感作と惹起を行ったが、その結果は、1社（B社）のフィルター抽出物でモルモットに感作が成立することが確認された。さらにそのB社の抽出物において、10%、1%、0.1%、0.01%の濃度で同様に感作性を検討したところ、1%の濃度において感作性が認められ、0.1%、0.01%の濃度においては感作性が認められなかった。

次に、マウスを用いた皮膚刺激性及び皮膚感作性試験のために、5%エタノールによりフィルターから抽出物を作成したが、C社の抽出量が極めて少なかったことから、2社（A、B社）からの抽出物を用いて各試験を行った。皮膚刺激性試験としては、5%、あるいは0.5%の濃度の抽出物をマウス耳介に皮内注射し、1時間後・24時間後・48時間後・7日後の耳介腫脹を観察した。その結果、B社の5%の濃度の抽出物では、有意の耳介腫脹が認められた。皮膚感作性試験としては、5%の濃度の抽出物をマウス背部に3日間連続で皮下注射することで感作し、0.5%の濃度の抽出物をマウス耳介に皮内注射することで反応惹起を行い、耳介腫脹の経時変化を観察した。その結果、B社の抽出物において、惹起後1時間目（即時型）および24時間目（遅延型）から成る2相性の耳介腫脹が認められた。

今回の研究では、モルモットを用いた皮膚感作性試験における陽性率や平均評価点から、B社のフィルター抽出物の中に生体に対する感作能を有する抗原性物質が含まれることが示された。また、マウスを用いた皮膚刺激性試験の結果から、B社のフィルター抽出物は高濃度では皮膚に対して刺激性の炎症反応を惹起しうることが明らかとなった。さらに、皮膚感作性試験の結果では、B社のフィルター抽出物に含まれる抗原性物質は遅延型反応のみならず即時型反応を惹起しうることが判明した。

抗原性物質の特定には至っていないが、3社のフィルターの特徴から考慮すると、フィルター材質のポリウレタンとポリエステル不織布の違い、各社の製造工程において使用される各種処理剤の違い、フィルターの使用回数やフィルター成分の患者体内への混入量の違い、および患者自身の体質（遺伝

的背景)の違いにより、副作用の症状が異なっていると推測される。これまで、いくつかのサイトカインやBK(ブラジニキン)の産生が輸血副作用に関連しているとの報告はあるが、フィルター抽出成分による感作性、および刺激性を示した報告は今回が初めてであり、この研究で用いた試験は、輸血副作用の原因解明に意義あるものと考えられた。

本研究は、輸血副作用における白血球除去フィルターの関連を研究したものであるが、従来ほとんど行われていなかった白血球除去フィルターに皮膚刺激性や感作性を惹起する物質が含まれている事を明らかにし、重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士(医学)の学位を得る資格があると認める。