
輸血後 G V H D の予防法としての
血液製剤 X 線照射法の基礎的検討

(02670529)

平成2年度科学研究費補助金 [一般研究 (C)] 研究報告書

平成4年3月

研究代表者 紀野修一
(旭川医科大学医学部)

輸血後移植片対宿主病（graft versus host disease, GVHD と略す）は、輸血血液中に存在する活性を持ったリンパ球が graft として生体内で生着し、hostである患者の組織や血球を異物と認識して種々の異様な反応を起こす病態である。GVHDは抗癌剤療法や放射線療法などによって、免疫力の低下した患者や、心臓手術患者に多く発症し、報告例も増加し注目を集めるようになった。一度発症すると現在のところ有効な治療法がない致死的な輸血合併症であり、予防が唯一、GVHDを防ぐ手段である。根本的な予防法は血液製剤中にリンパ球の混入をなくすることであるが、これは血液製剤分離操作上不可能である。また、輸血する時や血液製剤を調整する際に白血球除去フィルターが開発使用されているが残存リンパ球が多く、GVHDの予防として不十分である。

リンパ球は他の血液細胞に比べ放射線感受性が高く、低線量にてDNAが切断され細胞周期が停止し分裂能を持たず増殖しないとされている。この血液細胞間の放射線感受性の差を利用して血液製剤にX線やγ線などの放射線を照射し、リンパ球のみを不活化させGVHDを予防する試みが行なわれている。血液製剤にX線やγ線を照射する特別な装置が開発されているが、医療用機器として認可されておらず、また高価なこともあって一般には普及していない。そこで本研究では、一般放射線治療に

多用されている線状加速器（リニアック）を使用し血液製剤、特に日常臨床で最も使用頻度の多い濃厚赤血球（Concentrated Red Blood Cell, CRC）について、X線照射し、リンパ球の不活化を得るための条件を設定し、その照射条件が赤血球や血小板などの本来の輸血目的のための血液細胞に与える影響と安全性につき検討することを目的とした。

研 究 組 織

研究代表者：紀野修一（旭川医科大学医学部 助手）

浅川全一（旭川医科大学医学部 講師）

（平成2年4月～平成3年9月まで）

研究分担者：山本 哲（旭川医科大学医学部 講師）

研究協力者：坂田博美（旭川医科大学医学部 助手）

研 究 経 費

平成2年度 1, 000千円

平成3年度 1, 100千円

研 究 発 表

未 定

目 的

I . リンパ球不活化のための X 線至適照射線量の検討。

I - A . X 線照射法 .

I - B . 各種 mitogen に対するリンパ球増殖能を指標とした
至適 X 線線量の検討 .

II . X 線照射による血液細胞の影響についての検討 .

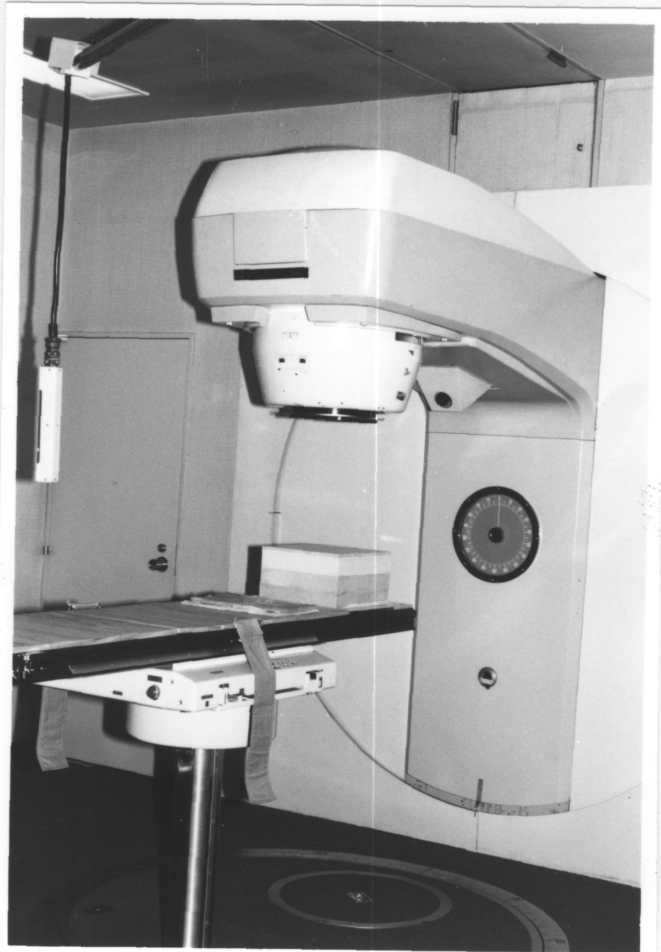
II - A . 赤血球に対する影響 .

II - B . 血小板に対する影響 .

I . リンパ球不活化のための X 線至適照射線量の検討。

I - A . X 線照射療法

当院で放射線治療用に用いられている三菱社製線状加速器（リニアック）モデル ML15 II-B を使用した（図 1）。この装置はコンスタントに X 線エネルギー 10MeV を発生することができ、1 分間約 500 レントゲンを照射することができる。表面下最大吸収線量は、深さ 2.5cm で血液パックなどの軟物体照射では散乱線についての考慮は不要である。図 2 の如く血液パックをオリーブ油を浸みこませたガーゼで被い血液パックを最大吸収線量の得られる厚さに静置（Build-up）し、また照射線量分布の表面分布の均一化を計った。一門照射で、線源表面間距離（Source-Surface Distance, SSD）は 100cm とした。照射時間は 15Gy で約 3 分、50Gy で約 10 分である。



☒ 1

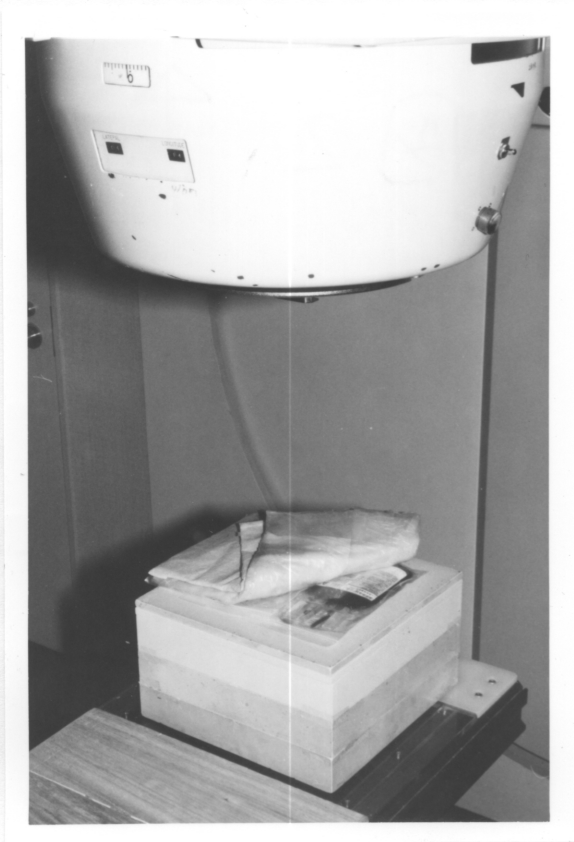


図 2

I - B . 各種 mitogen に対するリンパ球増殖能を指標とした
至適 X 線線量の検討 .

1 . 実験方法

(1) リンパ球の分離

X 線照射前および 15Gy、50Gy照射後の各段階において、血液バックより 20ml の血液を抜き取り、Ficoll-Paque による比重遠沈法によりリンパ球を分離し、MEPSにて 2 回洗浄後、10% ヒト AB 血清加 RPMI-1640 (ペニシリン 200U/ml、ストレプトマイシン 200 μ g/ml 含有) にて 5×10^5 個/ml 及び 1×10^6 個/ml の

2種類のリンパ球浮遊液を調整した。また、以下に示すリンパ球混合培養で用いる刺激細胞として、他のdonorの血液から同様の方法によりリンパ球を分離し、リンパ球浮遊液を調整した後、抗原性を残存させ、かつリンパ球活性を不活化するため、50GyのX線を照射した。

(2) リンパ球活性の測定

リンパ球の分裂、増殖能の指標として、同種抗原に対する反応性(リンパ球混合培養、以下MLC)およびmitogenに対する反応性を測定した。mitogenとしてはPhytohemagglutinin(以下PHA)およびConcanavalin-A(以下Con-A)を用いた。

mitogen反応では、各照射段階の採取血液より調整したリンパ球浮遊液(5×10^5 個/ml)をマイクロプレートの各wellに200 μ lずつ分注した後、mitogenとしてPHAを終濃度10 μ g/mlに、Con-Aを終濃度50 μ g/mlになるように添加した後、炭酸ガス培養器内で2日間培養した。その後、 ^3H -thymidine(1 μ Ci/well)を添加し、更に24時間培養した後、オートセルハーベスターにてリンパ球をガラスフィルター上に回収し、液体シンチレーションカウンターにて放射活性を測定した。

MLCでは、まず96穴マイクロプレートの各wellに反応細胞として各照射段階の採血血液より調整した 1×10^6 個/mlのリンパ球浮遊液を100 μ lずつ分注し、次に50GyのX線照射により予め不活化した刺激細胞 1×10^6 個/mlを各wellに100 μ lずつ添加した後、プレートミキサーにて十分に混和した。なお、

コントロールとして刺激細胞の代わりに50GyのX線照射により不活化した自己リンパ球浮遊液 (1×10^6 個/ml) を各wellに100 μ l ずつ添加し、十分に混和した。その後、炭酸ガス培養器 (5% CO₂ 存在下、37°C) 内に5日間培養した後、³H-thymidine (1 μ Ci/well) を添加し、更に24時間培養した後、オートセルハーベスターにてリンパ球をガラスフィルター上に回収し、液体シンチレーションカウンターにて放射活性を測定した。

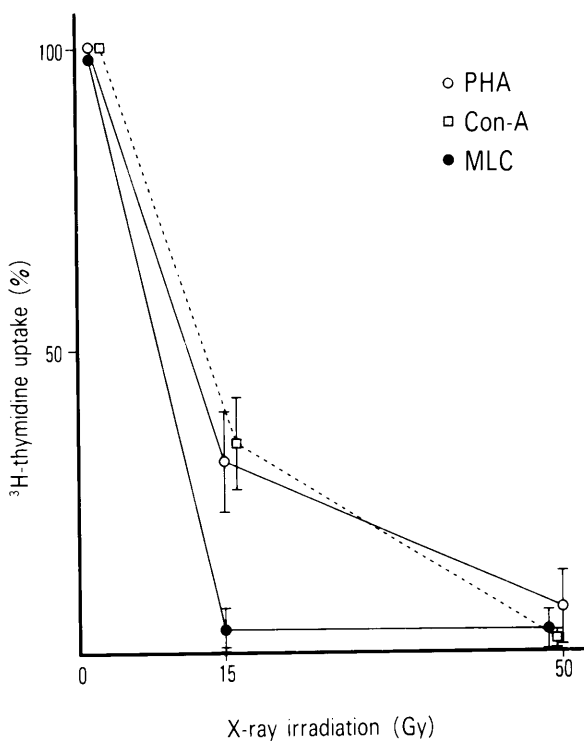
mitogen 反応およびMLCの両方ともに、triplicateで行ない、X線未照射の試料での放射活性を100%とし、各照射段階での資料の放射活性より相対値(%)を算出し、これを残存リンパ球活性(%)とした。

2. 実験成績

PHA および Con-A による mitogen 刺激によるリンパ球の分裂増殖能 (³H-thymidine uptake) は、15Gy照射により約70%抑制され、50Gy照射では約95%抑制された。また、同種抗原に対する反応性をみるリンパ球混合培養試験 (MLC) では15Gy照射によりリンパ球の³H-thymidine取り込みは、ほぼ完全に抑制された (図3)。

3. 小括

PHA、Con-Aなどのmitogen 刺激に対するX線照射リンパ球の分裂増殖能 (^3H -thymidine uptake) の変化は、ほぼ同一の傾向を示し、50Gyにてほぼ完全に抑制された。GVHDは患者体内での自己リンパ球を同様抗原とした輸血リンパ球の増殖反応とも捉えることができるので、リンパ球混合培養試験が、その病態を最もよく反映していると考えられる。従って、本実験の結果からは15Gy照射でGVHDの予防が十分になされるものと考えられる。



Effect of irradiation on lymphocytes proliferation.

図 3

II. X線照射による血液細胞の影響についての検討.

II - A. 赤血球に対する影響.

1. 実験方法

X線照射前、照射15Gy、50Gyの各段階で血液バッグより血液を採取し、以下の方法にてX線照射による影響の有無を検討した。

(1) 赤血球数、ヘモグロビン量、ヘマトクリット値、平均赤血球容積(MCV)、血清ナトリウム、カリウム値
これらは自動分析機器(Beckman社)にて測定した。

(2) 赤血球ATP、2,3-DPG量
過塩素酸にて除蛋白後の遠沈上清を検体とし、各々測定キット(BMR)にて測定した。

(3) 赤血球浸透圧溶血試験
蒸留水(0mOsm)と生理食塩水(308mOsm)を適量ずつ混和し、0mOsm、100mOsm、200mOsm溶液を作製し、血液と等量混和後3000rpm 5分間遠沈し、上清中のヘモグロビン量を測定し、上清に移行したヘモグロビン量の割合を%溶血とした。

(4) 走査電顕による赤血球形態

X線照射前、および50Gy照射後の赤血球を2.5%グルタールアルデヒドにて前固定、2%オスミウムにて後固定後、常法にて脱水、臨界点乾燥および金蒸着を行ない走査電顕にて赤血球

の形態観察を行なった。

2. 実験成績

(1) 赤血球数 (図4)、ヘモグロビン量 (図5)
ヘマトクリット値 (図6)、平均赤血球容積 (図7)
血清ナトリウム値 (図8)、血清カリウム値 (図9)

X線照射前後で変化は、ほとんどみられなかった。血清カリウム値は50Gy照射血液でわずかながら上昇していたが有意差はなかった。

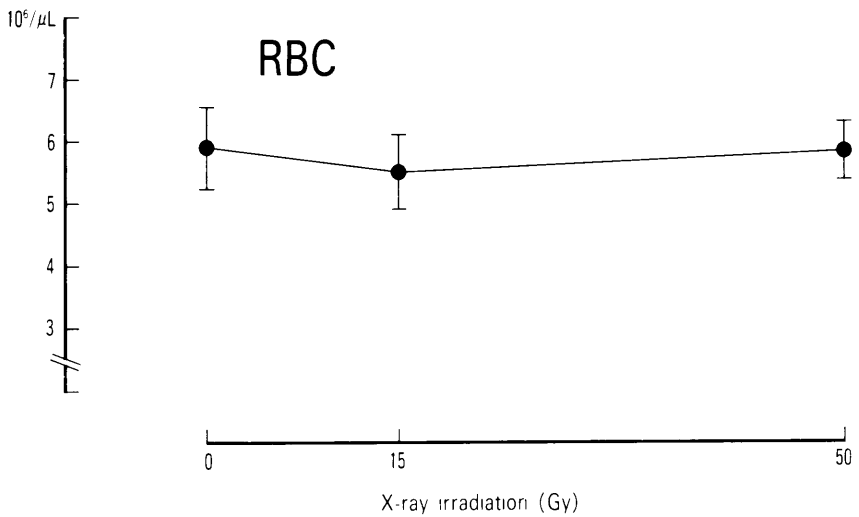
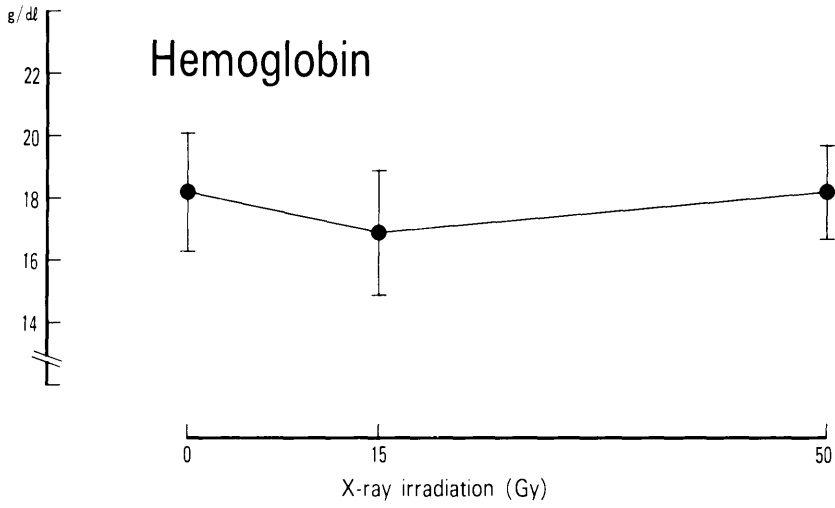
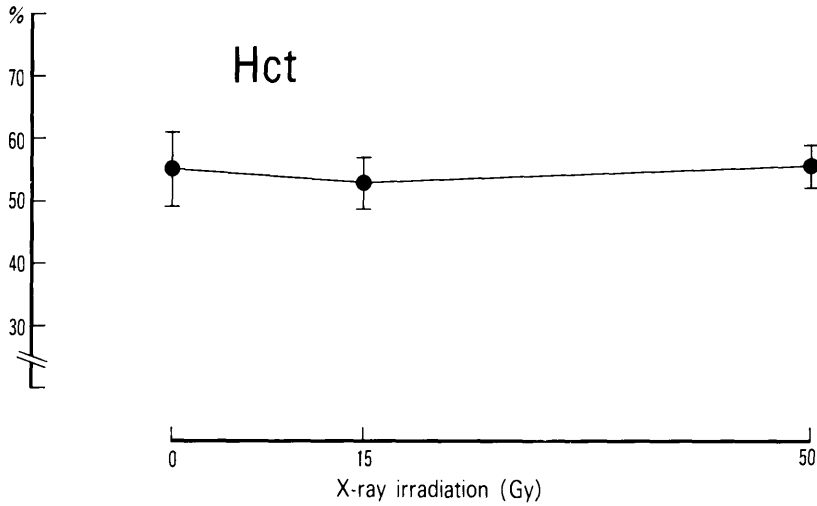


図4 Effect of X-ray irradiation on RBC count(mean \pm S.D.).



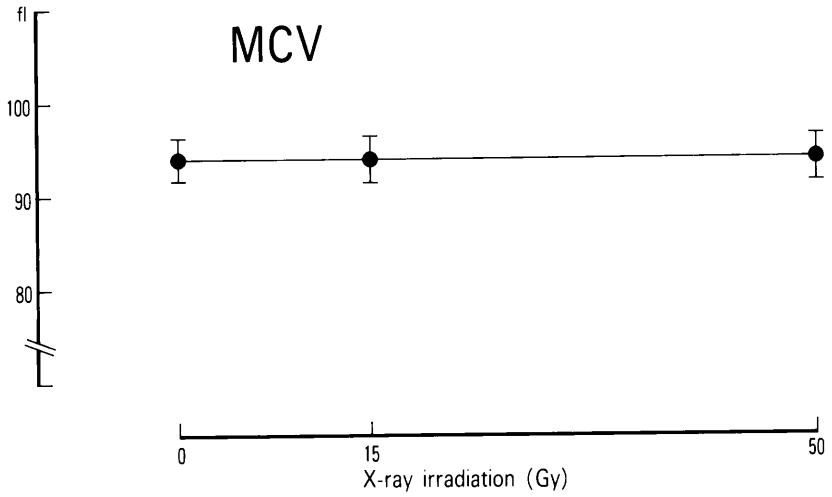
☒ 5

Effect of X-ray irradiation on hemoglobin concentration (mean \pm S.D.).

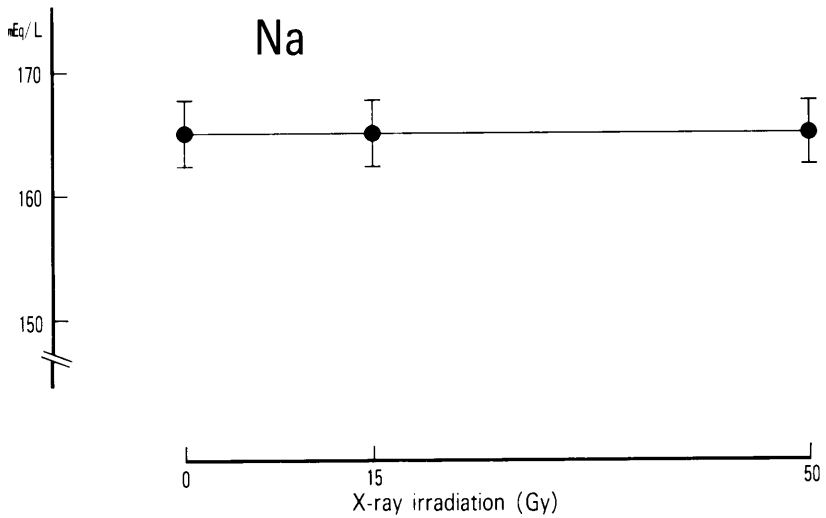


☒ 6

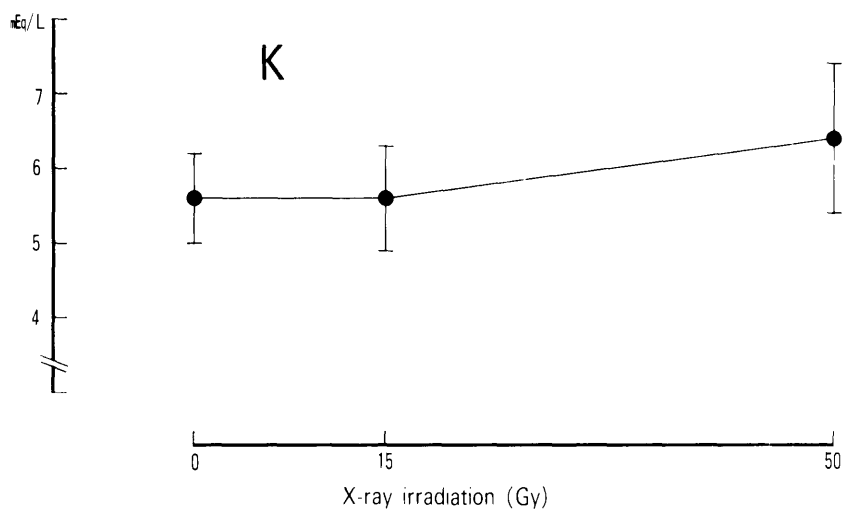
Effect of X-ray irradiation on hematocrit (mean \pm S.D.).



☒ 7 Effect of X-ray irradiation on Mean Capsular Volume(MCV) (mean \pm S.D.).



☒ 8 Effect of X-ray irradiation on sodium concentration in plasma (mean \pm S.D.).



Effect of X-ray irradiation on potassium concentration in plasma(mean \pm S.D.).

図 9

(2) 赤血球 ATP 、 2,3-DPG 量 (表 1)

照射前後で有意の変化はみられなかった。

赤血球 ATP, 2,3-DPG の変化

照射線量	0 Gy	15 Gy	50 Gy
A T P ($\mu\text{mol/gHb}$)	4.5 \pm 0.1	4.1 \pm 0.7	4.2 \pm 0.4
2,3-DPG ($\mu\text{mol/gHb}$)	11.6 \pm 3.3	11.2 \pm 2.1	9.9 \pm 1.8

表 1

(3) 赤血球浸透圧溶血試験 (表2)

照射前後の各血液は、蒸留水中では80%前後の溶血、100mOsm液中では25%前後の溶血が起った。また、200mOsm液ではみられなかった。

赤血球浸透圧溶血試験(%溶血)

照射線量 \ Osm	0	100	200
0 Gy 照射血液	82.9±7.8	24.5±8.9	0
15 Gy 照射血液	79.9±8.2	27.1±6.4	0
50 Gy 照射血液	83.9±8.9	28.6±5.0	0

表 2

(4) 走査電顕による赤血球形態

X線照射前 (図10) および50Gy照射後 (図11) の赤血球形態を比較検討したが、両者とも中心陥凹の正常形態を呈し、異形赤血球はみられなかった。

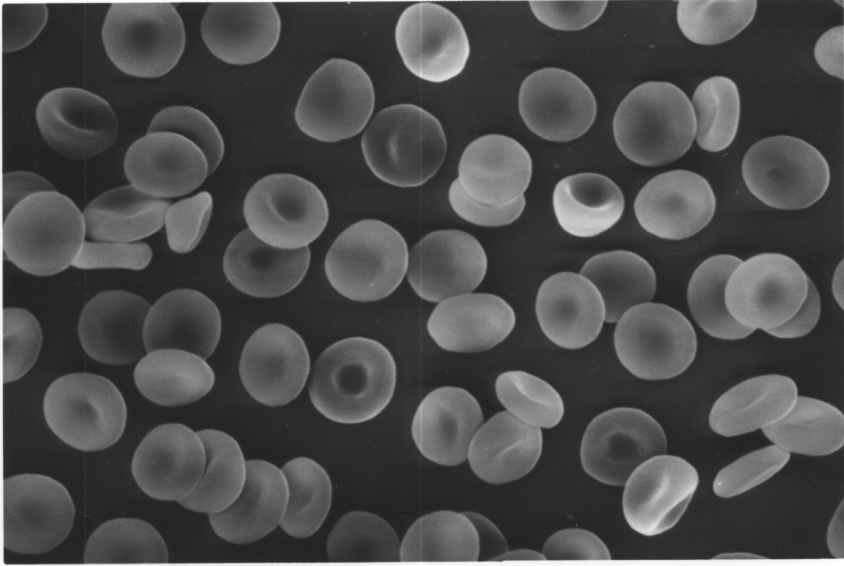


图 10

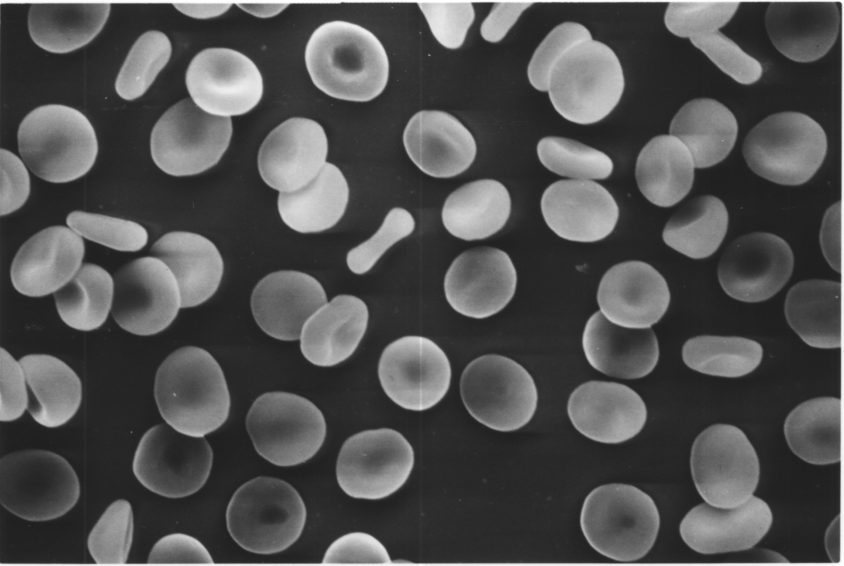


图 11

3. 小括

50Gy照射にても赤血球数、ヘモグロビン量などの数値に変化がなかった。また、平均赤血球容積や溶血試験、血清ナトリウム、カリウム値、走査電顕による形態像などから赤血球膜機能も、良く保持されているものと考えられX線照射による異常は指摘できなかった。しかし、本実験に使用した濃厚赤血球は採血後1日目の比較的新鮮なものであった。赤血球が古くなっていくに従い、X線照射による影響が顕著にあらわれてくる可能性は否定できないので厳密には濃厚赤血球製剤の使用期限が採血後21日であるので、この時期の血液で検討を加えておく必要があると思われた。

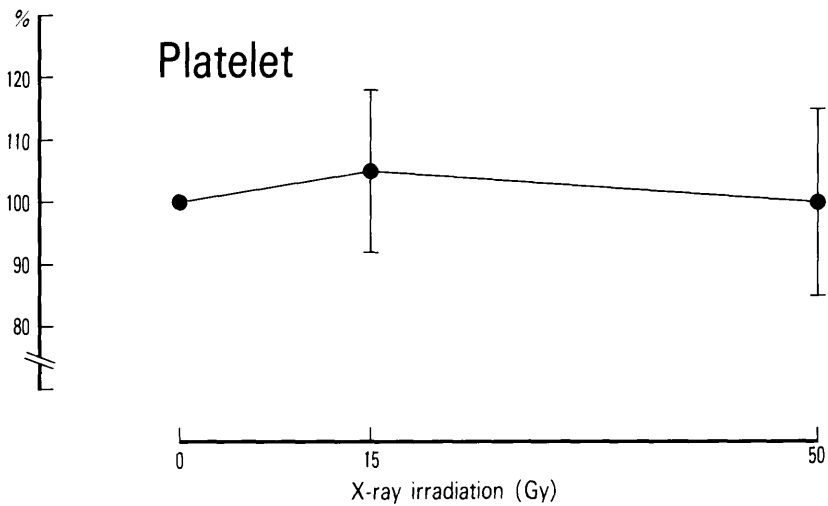
II - B. 血小板に対する影響.

1. 実験方法および結果

赤血球に対する影響の検討と同様にX線照射前、15Gyおよび50Gy照射血液を対象として検討した。

(1) 血小板数

濃厚赤血球製剤中の血小板数を算定した。結果は図12に示す如くX線照射の影響はなかった。



Effect of X-ray irradiation on platelet count (percentage change).

図 12

(2) 血小板凝集能

濃厚赤血球製剤より多血小板血漿と乏血小板血漿を調整し、ADP ($1.0 \mu\text{mol}$, $3.0 \mu\text{mol}$) Collagen ($0.5 \mu\text{g/g1}$, $2.0 \mu\text{g/d1}$)にて血小板凝集を刺激し、血小板凝集計(二光バイオサイエンス社)にて凝集能におよぼすX線照射の影響を検討したが、3群とも有意な凝集がみられず、X線照射の影響は解析できなかった。

Ⅲ．総括

輸血後GVHDの報告は1965年Hathawayが免疫不全の小児に発症した症例を報告したのが初めてといわれている。従来より輸血後GVHDは免疫機能の低下した免疫不全や免疫抑制状態の患者に発症すると考えられてきた。しかし、免疫機能の正常な患者でも報告され、日本胸部外科学会と日本輸血学会の合同調査では約660例の開心術に1例の割合で発症していた。その原因として心臓手術では新鮮血や血小板輸血が好んで行なわれていたこと、人工心肺装置による自己リンパ球の障害、日本人は、よく似たHLAを有することなどが考えられている。

輸血後GVHDの予防策としては、①全血の1週間保存でリンパ球機能は30分の1に低下するといわれているので、新鮮血輸血あるいは生血輸血を極力避ける。②自己血輸血の推奨。③白血球の除去に務める。白血球除去フィルターにて白血球の98%は除去可能と報告されているが、残存リンパ球は 10^5 オーダーであり、GVHDの根本的な防止には不十分と考えられる。④放射線照射でリンパ球の分裂増殖能を選択的に抑制する。などが考えられている。

放射線照射が現在のところ確実な方法と考えられ専用の血液製剤放射線照射機器が開発され基礎的検討も行なわれつつあるが、医療機器として認可されていないこと、高価なことなどの理由で一般には普及していない。そこで本研究では、日常の放

射線治療に多用されている線状加速器（リニアック）を利用して血液製剤の X 線照射を行ない種々検討を加えた。リニアックは高い X 線エネルギーを発生可能で血液バックに均一に照射でき、3 分間程で 15Gy 照射が可能である。

GVHD の病態と近似していると考えられる混合リンパ球培養試験では、15Gy 照射でリンパ球の分裂増殖能は、ほぼ完全に抑制された。また 50Gy までの照射でも赤血球の形態と機能には、ほとんど影響がないことも判明した。血小板については本研究では結論は引き出せなかった。濃厚赤血球からの血小板分離に難点があった可能性があると考えている。濃厚血小板製剤（platelet concentrate, PC）を試料として同様な実験を行なう必要があると思われる。また、今回実験に供した濃厚赤血球は、採血後 1 日目のもので比較的新鮮なものであったが、時間の経過と共に放射線による影響も変化する可能性は否定できないので、この点でも検討を加える必要があると思われた。