

NAIST-IS-DD0461201

博士論文

白血球除去デバイスの三次元流量解析に関する研究

小野寺 博和

2008年 2月 7日

奈良先端科学技術大学院大学
情報科学研究科 情報生命科学専攻

本論文は奈良先端科学技術大学院大学情報科学研究科に
博士(工学) 授与の要件として提出した博士論文である。

小野寺博和

審査委員：

湊 小太郎教授（主指導教員）

西谷 紘一教授（副指導教員）

飯田 秀博教授（副指導教員）

杉浦 忠男准教授（副指導教員）

白血球除去デバイスの三次元流量解析 に関する研究*

小野寺博和

内容梗概

自己免疫疾患において、白血球は疾患の発症に対して重要な役割をしている。これら患者の末梢血より白血球を除去することは、疾患の改善に有用であると考えられ、遠心分離法を用いたリンパ球除去が検討されていたが、操作が煩雑で白血球の除去効率が十分ではなく改良が切望されていた。

本研究では、第一に、自己免疫疾患の治療を目的とした簡便に治療できる体外循環治療用の白血球除去デバイスの開発について検討した。第二に、白血球除去デバイスの設計に於いて重要なカラム内の三次元流量解析システムを開発した。

白血球除去デバイスの開発は、不織布が白血球の捕捉能に優れていることに着目し、その安全性を高めることで、体外循環で使用できる白血球除去カラムに改良開発した。更に、白血球成分を選択除去できるフィルタを開発し、特異的白血球除去カラムを設計した。白血球除去カラムは、現在保険適用を受け、潰瘍性大腸炎や薬物抵抗性の関節リウマチの治療に用いられている。

一方、デバイス内の血液の流れを計測する技術は、フィルタの最適利用や除去効率を高める設計をする上で必須な技術である。本研究では、カラム内の血液の流れを、1)可視化する技術、2)カラム内の流量を計測するシステムについて検討を実施した。方法は、カラム回転下で、造影剤の濃度をX線造影装置で撮像し、この画像を二次元フィルタードバックプロジェクション法により再構成することで、三次元の連続画像を得、カラム内の流れを可視化した。更に、この連続画像のROIを用い、計算により血流マップを作成することで、カラム内流量を計測するシステムを開発した。また、フィルタの通気抵抗と血液粘度をパラメータにしたモデルによるシミュレーション結果と、本システムで得られた血流マップと

の比較を行い、シミュレーションの限界を明らかにするとともに、カラム改良前後のカラム内流量分布の計測結果から、流れの変化を検出することで本システムの有用性を検証した。本研究により、白血球除去カラムのような流量が遅い白血球除去デバイスに対してカラム内流量分布を測定するシステムを確立し、その有用性を示した。また、より安全性の高い白血球除去デバイスを開発した。

キーワード

白血球除去デバイス、流れ解析、X線断層像

*奈良先端科学技術大学院大学 情報科学研究科 情報生命科学専攻
博士論文, NAIST-IS-DD0461201, 2008年2月7日.

Three Dimensional Flow analysis of a Leukocyte Removal Device*

Hirokazu Onodera

Abstract

In the autoimmune diseases, leukocytes do an important role to the onset of the diseases. Therefore, it is thought that it is useful for the improvement of the disease to remove leukocytes from the autoimmune disease patients. However, lymphocyte removal which used the centrifuge method was complex the operation and has not enough the removal efficiency of leukocytes, so the new technology which improved it was aspired after.

In this research, first, this thesis shows the development of the leukocyte removal device for the extracorporeal circulation therapy that can be easy handling to treat the autoimmune disease. Second, it shows three dimensional flow analysis for designing a leukocyte removal device.

In the development of the leukocyte removal device, we performed improvement to be with the more safety of the filter. And we developed the new device for selective removal of the lymphocyte. Then, leukocyte removal column has excellent therapeutic efficacy in inflammatory bowel disease and rheumatoid arthritis and has been widely applied in Japan.

In addition, it is important to analyzing the blood flow inside of the columns for improvement of the removal efficiency and an ideally use for the therapies.

This study was aimed at the visualization of the blood flow in the column and developing blood flow analysis system. The method: Radiographic contrast agent with bovine blood was continuously injected from the inlet of the column by using X-ray angiographies. During the exposure, the column was rotated 3 times per minute by the specially designed rotating table. From the obtained sequential projection data, multiple three dimensional images were reconstructed by filtered back-projection algorithm. For

quantitative analysis, blood flow in each voxel of the column was computed. The results by the present system were compared with the conventional computer simulation results, and it showed the computer simulation did not agree well with the real blood flow pattern in the column. The present system is able to visualize three dimensional blood flow pattern in the column and is useful to assess performance of the column for leukocytapheresis. Then, this study evaluates the flow analysis system by two types of half size column. And we show the effectiveness of this flow analysis system.

Finally, this thesis shows the development of three dimensional flow analysis for leukocyte removal devices, which use at low blood flow rate, and designing two types of leukocyte removal devices.

Keywords:

Leukocyte removal device, flow analysis, tomographic view

*Doctoral Dissertation, Department of Bioinformatics and Genomics, Graduate School of Information Science, Nara Institute of Science and Technology, NAIST-IS-DD0461201, February 7, 2008.

目次

第1章 序論

1.1 研究の背景	1
1.1.1 体外循環治療の背景と現状	1
1.1.2 白血球除去の背景と現状	4
1.2 白血球除去治療カラム開発上の課題	5
1.3 研究の目的	7
1.4 課題解決への基本戦略	7
1.5 本論文の構成	8

第2章 白血球除去デバイスの開発

2.1 研究の背景 - 体外循環治療による白血球除去療法 -	9
2.2 白血球除去カラムの開発	11
2.2.1 白血球除去カラム改良の背景	11
2.2.2 白血球除去フィルタの開発	11
2.2.2.1 ポリエチレンテレフタレート不織布の表面荷電計測技術の開発	12
2.2.2.2 BKN 活性と陰性荷電量の関係の解析	13
2.2.2.3 BKN 活性と陰性荷電量の関係の解析結果と考察	14
2.2.2.4 白血球除去フィルタの改良開発	15
2.2.2.5 低陰性荷電不織布を用いた白血球除去カラムの性能評価	16
2.2.3 白血球除去フィルタ開発の結論及び考察	17
2.2.4 白血球除去カラムのカラム圧上昇回避検討	18
2.2.4.1 不織布との接触により凝固しやすい血液性情の解析	18
2.2.4.2 血液の凝固に関する因子の試験方法	18
2.2.4.3 凝固しやすい血液因子の試験結果	19
2.2.4.4 凝固しやすい血液因子に関する考察	20
2.2.5 白血球除去カラムの改良	21
2.2.6 白血球除去カラムの臨床での白血球除去効果	23
2.2.7 白血球除去カラムの有用性 - 臨床効果まとめ -	23
2.2.8 白血球除去カラムの開発の結論	24
2.3 特異的細胞除去カラムの開発	26

2.3.1	研究の背景	26
2.3.2	特異的細胞除去カラムの開発	27
2.3.3	吸着担体へのリガンドの固定化技術	28
2.3.4	ポリプロピレン不織布への活性基導入原理	28
2.3.5	抗体固定方法	29
2.3.6	特異的細胞除去カラムの開発	29
2.3.6.1	ミニスケールカラムの調製と血液評価方法	29
2.3.6.2	臨床スケールカラムの調製と血液評価方法	30
2.3.6.3	ヒト新鮮血液での全血直接灌流による ミニスケールカラムの評価結果	32
2.3.6.4	臨床スケールカラムの血液評価結果	33
2.3.7	EAE ラット体外循環用カラムの検討	34
2.3.7.1	ラット体外循環用カラムの調製と試験方法	34
2.3.7.2	ラット末梢血での in vitro 評価結果	34
2.3.7.3	ラットでの体外循環試験と有用性検討結果	35
2.3.8	特異的細胞除去カラム開発の結論	36
2.4	結論	37

第3章 白血球除去デバイスの三次元流量解析技術の開発

3.1	はじめに	39
3.2	白血球除去カラムの流量解析	41
3.2.1	白血球除去カラムの流れ解析システムの概要	41
3.2.2	特異的細胞選択除去カラムの二次元解析	42
3.2.2.1	材料と装置の構成	43
3.2.2.2	実験方法	44
3.2.2.3	画像解析方法	45
3.2.2.4	二次元画像解析結果 -特異的細胞選択除去カラム評価-	45
3.2.3	特異的選択除去カラムの二次元流量解析に関する結論及び考察	47
3.3	白血球除去カラムの三次元流量解析	48
3.3.1	白血球除去カラムの三次元流量解析の目的	48
3.3.2	材料と装置の構成	49

3.3.3 実験	50
3.3.4 画像解析	50
3.3.5 計算機シミュレーション	51
3.3.5.1 シミュレーションモデル	52
3.3.5.2 パラメータの設定	53
3.3.6 白血球除去カラムの三次元流量の解析結果	53
3.3.6.1 画像解析結果	53
3.3.6.1.1 X線画像の再構成による可視化	53
3.3.6.1.2 カラム圧上昇時のカラム内の可視化	53
3.3.6.1.3 カラム内流量分布解析結果	55
3.3.6.2 白血球除去による経時的変化の解析結果	58
3.3.6.3 計算機シミュレーションの結果	59
3.3.7 白血球除去カラムの血液流れ性に関する結論	60
3.4 考察	62
3.5 結論	64

第4章 白血球除去カラムの三次元流量解析システムの応用

4.1 背景と目的	66
4.1.1 血液実験方法	66
4.1.2 画像解析方法	67
4.2 カラム内流量解析結果	68
4.3 血液置換性結果	70
4.4 結果と考察	70

第5章 結論

参考文献	74
------	----

謝辞	76
----	----

付録

A. 回転台図面 77

研究業績 78

目次

1	History of Blood Purification Therapy	1
2	The Size of Blood Components for Blood purification devices	2
3	Leukocyte removal by non-woven fabrics	4
4	Blood circuit for Leukocytapheresis	10
5	Cascade of BKN Activation	12
6	Relationship between surface negative charge and BKN value	14
7	Relationship between surface negative charge and moisture content in PET	15
8	WBC removal rates with Leukocyte removal column	16
9	External view and filter part of Leukocyte removal column	22
10	WBC removal rate with Leukocyte removal column (in vitro)	22
11	Removal rate of WBC and platelets with leukocyte removal column (in vivo)	23
12	Efficacy of Leukocytapheresis for the treatment of UC patients	24
13	Roles for CD4+T Cells in immunological response system	26
14	Concept of CD4+T Cells removal column	27
15	Method for Immobilization of adsorbent	28
16	<i>in vitro</i> evaluation method for mini-scale column	30
17	Two-color Flowcytometry Analysis for CD4 Cells removal column	31
18	Selectivity evaluation tests for full scale column	31
19	Result of Mini scale tests for CD4+TCells removal columns	32
20	Full-scale removal tests with CD4+cells removal column	33
21	Rat CD4+Cells Removal Test. (<i>in vitro</i>)	34
22	Extracorporeal treatment for EAE rat	35
23	Effect of cytapheresis with CD4 removal column on adaptive transfer EAE	36
24	Structure of leukocyte removal column	39
25	Flow analysis system for Leukocytapheresis columns	42

26	Structure of CD4+Cells removal column	43
27	Flow Circuit of blood for CD4+Cells removal column	44
28	Maximum concentration time of CD4+removal column	46
29	Flow rate in column map of CD4+ removal column	47
30	Rotating table and a column setting	49
31	Flow circuit of blood	51
32	Simulation model for the column	52
33	Reconstruction pictures of blood flow	54
34	X-ray images between before and after increasing column pressure	54
35	Difference image of the pressure increasing column	55
36	Flow rate of a column	56
37	Profile of Average flow rate distributions	57
38	Temporal flow rate change of a column	58
39	Correlation coefficient of a column	59
40	Simulation of flow rate	60
41	Velocity of floe rate by simulation results	61
42	Blood flow image in the column	62
43	Relationship between Flow rate and Simulation	63
44	Flow circuit of blood for half size column	67
45	Flow analysis for two types of column	68
46	Flow distribution of two types of column	69
47	Replacement rate of columns from blood to saline solution	70

表目次

1	Adsorptive materials for medical use in practical use	3
2	Coagulation factors and cells for analysis of clotting	19

第1章 序論

1.1 研究の背景

1.1.1 体外循環による血液浄化療法の背景と現状

体外循環による血液浄化療法は、血液中の疾患関連物質を除去することで患者の症状を改善する療法である。従来から行われている一般的な治療は、体に薬剤を投与し、患者の症状を改善するものである。従って、薬剤による治療は、体に物質を投与する治療であり、これにより高い治療効果と共に副作用が生じる可能性がある。一方、血液浄化療法は、体から物質を除去する療法であるため、体に残る薬剤はなく、副作用の少ない治療であることが大きなメリットである。

血液浄化療法の進歩についてFig.1に示す。この療法の起源は、ヨーロッパで紀元前より行われてきた瀉血(Blood Letting)である。この療法は、血液を体外に取り出し、除去することにより、病因物質の一部を血液とともに除去し、病態の改善を図る療法である。瀉血療法は、肝炎の治療で現在でも用いられている。また、血液浄化にデバイスが使用されるようになったのは、血液透析が行われてからである。血液透析は、腎不全に伴う水分、尿素やクレアチニンといった低分子物質の除去及び電解質のバランスを調整するために用いられる療法であ

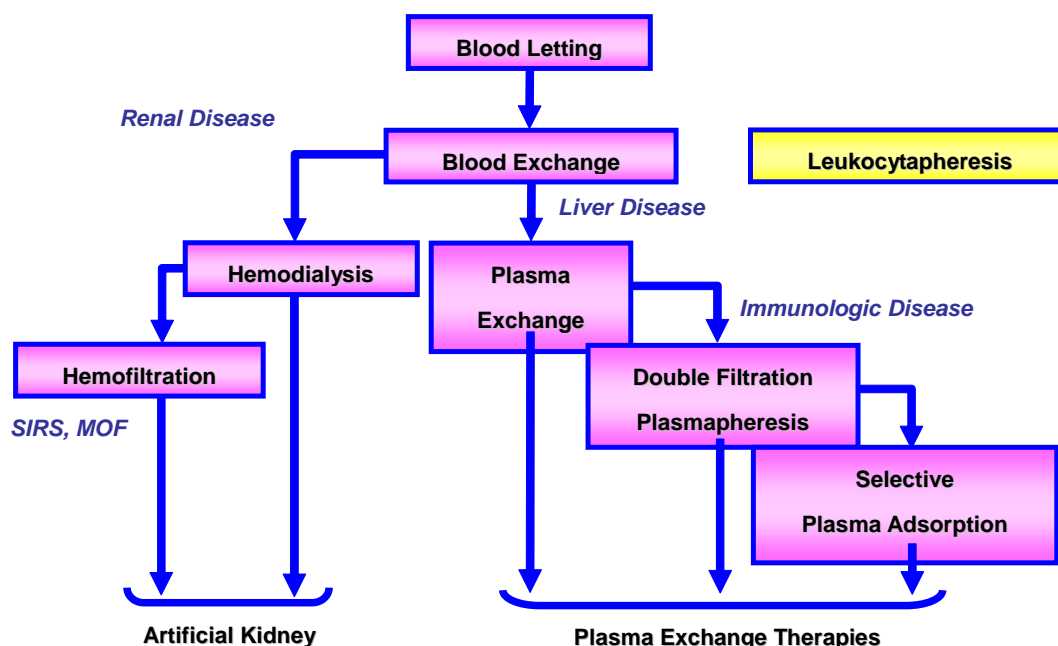


Fig.1 History of Blood Purification Therapy

る。一方、難病の治療という面では、血液中の分子量の高い物質を除去することが必要とされ、血漿成分を除去し病態の改善を図る血漿浄化療法が開発された。

血漿浄化療法は、20世紀始めに血漿交換療法 (Plasma Exchange : PE) が自己免疫疾患等の治療を目的として行われた[1]。1960年には、遠心分離器を用いて患者血漿を分離し、代わりに正常な血漿を輸液する方法で治療が行われた[2]。その後、中空糸膜を用いた血漿分離膜が開発され、日本に於いてもこの治療方法が広く臨床応用されるようになった[3]。特に、体外循環用の膜型血漿分離器が従来の遠心分離法に比べ、より高速で効率的に血漿を分離できることが報告されてから、膜法による血漿分離が日本において一般的に用いられるようになった[4]。従って、血漿交換療法は膜分離により細胞成分より直径の小さい物質が全て除去できることより (Fig.2)、原因不明の疾患にも用いることができ、これが大きなメリットである。更に、膠原病、神経疾患等の自己抗体に起因する疾患の治療方法として臨床が試みられ、現在では治療ガイドラインに組み込まれるまでになっている。特に、ステロイド等の薬物が効きにくい、或いは他に有効な治療方法のない多くの自己免疫疾患の治療で使用され、高い治療効果が報告されている[5]。補充する血漿の感染リスク回避の面より、血漿浄化療法は更に進展し、血漿成分を選択的に除去する技術が開発された。その一つとして、血漿タンパク領域及び中高分子量の溶質を除去できる血漿成分分離器が開発され

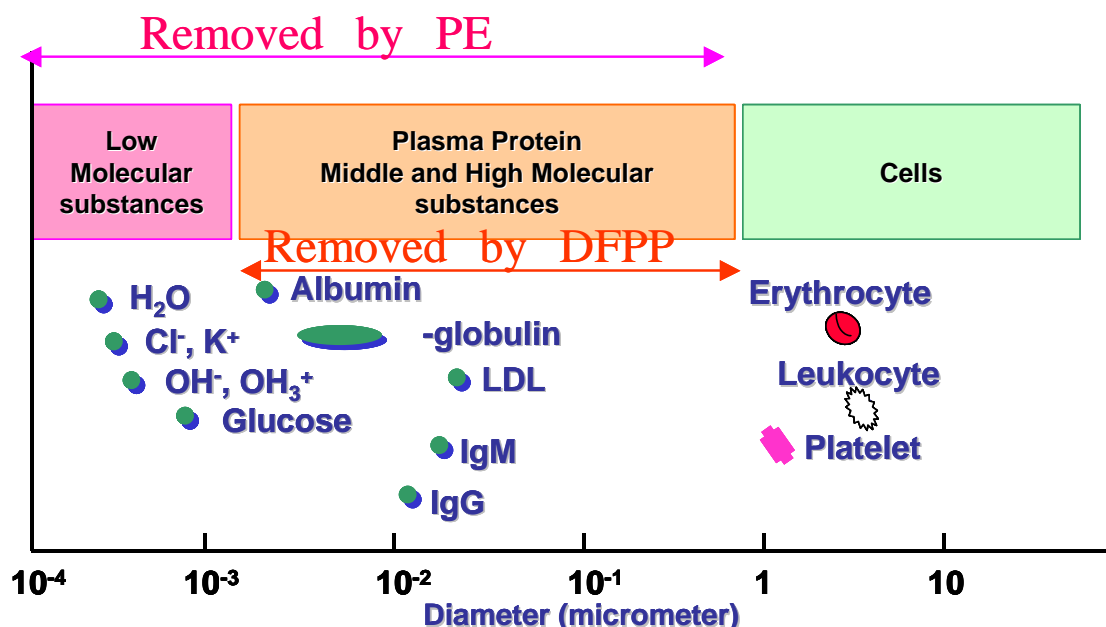


Fig.2 The Size of Blood Components for Blood purification devices.

た。これにより、二重濾過血漿交換療法 (Double Filtration Plasmapheresis: DFPP) が行われるようになった。DFPPでは、低分子量の血漿成分やアルブミン等の有用な蛋白質はほとんど除去されず、中高分子量の溶質が除去されるのが特徴である。従って、この治療方法は主に自己免疫疾患に関連する自己抗体や家族性高脂血漿患者からのLDLの除去等に用いられている。

次に、血漿成分をより選択的に吸着する血漿成分の吸着材が開発されたことで、新鮮凍結血漿やアルブミン製剤等の補液をほとんど必要しない血漿成分吸着療法 (Plasma Adsorption: PA) も用いられるようになった。この療法に用いられる主な血漿成分吸着材についてTab.1に示す。現在、様々な材質及びリガンドが開発され、臨床で用いられている。例えば、農薬等の毒素を吸着除去する目的で活性炭、ビリルビン及び胆汁酸を吸着除去する目的で陰イオン交換樹脂、LDLコレステロールを吸着除去する目的でポリアニオン系リガンドを固定したLDL吸着剤、自己免疫性の抗体を吸着除去する目的でトリプトファン或いはフェニルアラニン等のアミノ酸、プロテインAを固定した免疫吸着剤が実用化されている。

Tab.1 Adsorbents for medical use in practical use.

Adsorbent , Ligands		Adsorptive materials
Biological adsorbent	Antigen	anti blood-type ab. anti-AChR ab.
	Antibody	IgG, LDL
	Protein A	Immune complex
	Peptide	anti-AChR ab.
Non-Biological adsorbent	Polymyxin B	Endotoxin
	Polyanion	LDL, anti-DNA ab.
	Amino Acids	Rheumatoid factor, anti-DNA ab. Immune complex
	Alkyl group	₂ -MG
	Ion exchange resins	Bilirubin, bile acid
	Charcoal	Drug(e.g. paraquat)

1.1.2 白血球除去の背景と現状

血液浄化療法はこれまで主に血漿成分の除去が中心であった。一方、医学の進歩に伴い、免疫に直接関与する白血球の機能が明らかになってくるにつれて、治療の目的で白血球を除去するニーズが高まってきた。

白血球除去の技術は、はじめに輸血分野において、頭痛、吐き気、悪寒、非溶血性発熱反応、アロ抗原感作、輸血後対宿主移植片拒否反応(GVHD)、ウイルス感染等の重篤な副作用を予防する目的で開発され、実用化された[6]。この技術のポイントは、極細繊維からなる不織布が白血球除去を除去できることが明らかになったことであった。特に、繊維直径が3 μm 以下で効率的に白血球を除去できることより、その分野では急速に開発が行われた(Fig.3)[7]。輸血用の白血球除去器は、処理する血液量が200mLから500mL程度であるため、比較的濾材の充填量が少なくても高い白血球除去が可能であるため、平板型ハウジングに不織布フィルタが積層状態で充填されたものが現在でも広く用いられている。

一方、白血球は、免疫を掌る重要な細胞である。白血球による免疫機構は、マクロファージによる抗原提示から始まり、リンパ球中のT細胞の分化及び活性化が起こり、このT細胞からのシグナル伝達により、B細胞を活性化する。これによって、B細胞から、抗体が産生され抗原への攻撃を行い、初期の生体防御が行われる。この免疫応答は、主に抗体等の血漿成分が免疫に寄与するため、液性免疫といわれている。一方、T細胞の活性化から、キラー細胞あるいはT細胞が抗原に対して直接攻撃し、生体防御する細胞性免疫も行われる。このように白血球は、免疫機能の中で生体の防御上で重要な役割を果たしている。

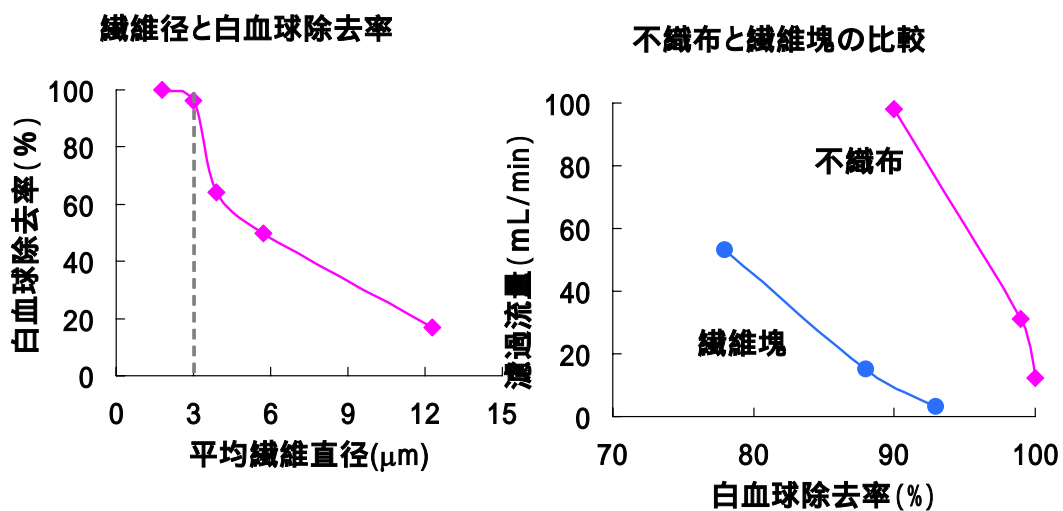


Fig.3 Leukocyte removal by non-woven fabrics

一方、この免疫応答が何らかの原因で自己に向けられた場合、自己免疫疾患となって病気が発症すると考えられている。例えば、多発性硬化症のような自己免疫性神経疾患は、組織(中枢、末梢)や筋肉を標的とした自己抗体、或いは自己反応性T細胞によって、神経組織が傷害を受けることによって発症するとされている。このような自己免疫性神経疾患では、自己抗原と反応するCD4膜抗原陽性Tリンパ球(ヘルパーT細胞)が、神経組織内に侵入し、髄鞘を破壊するため、発症すると考えられている。一方、これら自己免疫疾患では細胞性免疫能の異常として、サプレッサー機能の低下、CD4+/CD8+比の上昇、活性化T細胞の増加及びNatural Killer細胞の減少が認められる。

以上の観点より、自己免疫性疾患に対しては、以下のような免疫調節が有効な治療手段と考えられる。

- (1) 体外循環による*ex vivo*での免疫調節
 - (2) 薬剤を用いた*in vivo*での免疫調節
 - (3) 局所病変部での*in situ*での免疫調節
- 等による治療の可能性が考えられる。

従来までの治療は、薬剤の研究開発の進展により、(2)が主に用いられてきていた。現在、体外循環技術の確立に伴い、白血球除去を目的とした体外循環による免疫調節は安全な治療手段として認知されるようになってきた。

そこで、病因と無関係な赤血球等の有用な細胞にダメージを与えず、末梢血中に存在する成熟した白血球を除去できる体外循環技術を開発することは、免疫調節治療の実用化の上で大きな意義がある。このような背景のもと、白血球或いはこの中のCD4膜抗原陽性Tリンパ球を体外循環で除去することがひとつの治療手段と考えられ、体外循環治療用の白血球除去デバイスの開発が検討された[7]。

1.2 白血球除去デバイス開発上の課題

白血球除去療法は、多くの自己免疫疾患の治療に応用されることが期待されていたため、当初より体内の血液を全て処理することが目標であった。そこで、目標とする血液処理量は3L程度とされ、また患者からの脱血の簡便性の点より、30～50mL/minの比較的遅い流速で血液を処理することが要求されていた。従来の平板型の白血球除去器ではフィルタの充填量不足のため白血球除去能力が不足となるため、不織布を円筒状に巻いて充填した円筒型の白血球除去カラムが開発され、臨床応用が行われた。この中で、この白血球除去カラムを用いた治療時に、ごく一部の患者において、1) 血圧低下や顔面紅潮等の治療初期

に起こるアナフィラキシ様症状の発生する事象、2) 治療中にカラム圧上昇が起こる[17]等の事象が起こり、治療を中断した臨床例が報告されていた。1)の治療初期に起こるアナフィラキシ様症状とは、顔面高潮、血圧低下等の症状が見られるもので、治療開始後5分から20分間に起こることが報告されていた。このような症状は、原因が不明であり、事前にこの症状の発生を診断することが困難であるため、その症状の軽減を目指した改良が優先課題であった。

更に、2)の治療中のカラム圧上昇の原因は、白血球除去によるフィルタの物理的目詰まり及び異物との接触による血小板等の活性化や凝固系の亢進から起こる血漿成分の凝固による目詰まり推測された。このようなカラム圧上昇が起こった場合、血液流速を減速するなど的手段が必要となり、治療時間を大幅に延長せざるを得ない場合もあった。場合によっては治療の中断の必要性もあったことから、更なる改善が必要とされていた。そこで、事前にカラム圧上昇を起こす患者を判別することによって、治療の安全性を更に向上できるのではないかと考えた。そこで、本研究では、上記2つの事象に対して、カラムの改良と血液の判別方法について研究し、より安全な治療を達成できるようにすることを目的に行った。

また、白血球除去デバイスの開発においては、1) 高い白血球除去能を維持すること、2) 2~3Lの血液を目詰まりなく安定して処理すること、の二つが求められていた。そこで、これら要件を満たすため、必要量のフィルタを充填できる円筒型容器(容積:約180mL)が用いられている。一方、白血球除去療法では、前述の如く、患者からの脱血を上腕或いは下肢の静脈より行うため、カラムに入る血液の流速が約30~50mL/minに限定される。従って、カラム内部では血液の流速は非常に遅くなり、圧力によるフローだけでなく拡散の影響が大きくなると外観からの観察により考えられていたが、カラム内流れの解析の方法がなく、これまで十分な実証がなされていなかった。特に、白血球除去カラムは円筒形状であり、フィルタが不透明であるため、カラム内部の流れを直接観察することは困難であった。

Heese [8]らは、均一方向に流れる透析器あるいは心臓外科用フィルタの医療機器の三次元的な流速を、核磁気共鳴映像法(Magnetic Resonance Imaging, 以下MRI)を用いて測定する技術を開発した。彼らの用いた機器では、血液流速が200~400mL/minと速く、カラム内の流れが層流に近いものであったため、流れの定量化が可能であった。しかし、白血球除去カラムのような、流速が遅い系では十分な検討がなされていない。また、超音波ドップラー装置[9]を用いた場合でも、乱流が多い透析器ヘッダ内の中空系界面部の特定小領域での流速の定量的測定は困難であった。つまり、これまで血液容量が大きいカラムに、遅い流速で血液が流入するような場合、カラム内の流れを定量化する有効な技術がなかった。

そこで、デバイスの最適化を行うため、計算機シミュレーションが従来用いられてきたが、その結果について検証する十分な方法がないため、最適設計への障害となっていた。また、治療中に起こるカラム圧上昇や、カラム内の変化を可視化する十分な技術もなかったため、カラム改良に向け、試行錯誤が続いていたのが現状であった。そこで、このような医療用デバイスのカラム内の流れを可視化でき、経時的に且つ定量的に評価するシステムの開発が切望されていた。

1.3 研究の目的

1.2節で述べた課題を踏まえ、本研究は、通常観察・計測困難な白血球除去デバイスの血流の可視化及びカラム内流量分布を定量化することを目的とした。この技術の開発は、効率的且つ機能的な白血球除去カラム開発と、同様のデバイスのカラム内流量を計測するシステムの確立へとつながると考えられる。

そこで、本研究では以下の目的を設定する。

白血球除去デバイスのカラム内流量解析システムを提案し、実験的にシステムを検証する

ここで、研究対象として白血球除去カラムを選定したのは、白血球の吸着によりカラム内が経時的に変化していくことが推測され、経時的な流れを把握することが重要であると考えられたからである。また、このようなシステムは、類似の医療用デバイスを開発する上でも有用に活用できると考えられるためである。

更に、本研究の解析技術を用いることで、デバイス内の見えない流れを可視化でき、更なる改良が可能となる。更に、デバイス内に充填されるフィルタの効率的な活用が可能となるため、小型化を目指した改良への可能性もある。最終的には、自己免疫疾患の治療への更なる貢献と治療される患者の治療中の負担を軽減する一助とすることを考慮して研究を行う。また、本研究を行うことで、より安全性と取り扱い性を向上した体外循環用の白血球除去デバイスを開発でき、より多くの疾患への適用が可能となると考えられ、幅広い自己免疫疾患の治療に貢献することを目的とする。

1.4 課題解決への基本戦略

本研究では以下のような戦略により課題解決を図る。

- 1) 汎用的なX線造影装置及び造影剤を用いて、連続的な画像を得ることで、デバイス内の血液の流れを可視化する。

- 2) 得られた画像を解析することで、デバイス内での血液流量の解析手法を検討する。
- 3) 水平方向にカラムを回転できる回転装置を開発し、撮像した二次元のCT画像を再構成することにより、三次元画像化を行う。
- 4) 連続的な三次元画像よりデバイス内の三次元での血液流量を解析する。
- 5) 得られた解析結果と従来から実施されていたシミュレーションの両者を比較し、この結果について考察する。
- 6) 解析結果を考察し、現状のデバイスでの血液流れ性について明らかにする。この結果より、デバイスの改良を実施し、本解析手法の検証及び課題について考察する。

1.5 本論文の構成

本論文は以下の5章より構成される。

第1章:序論 本研究の位置付け、目的、基本戦略について明確にする。

第2章:白血球除去デバイスの開発 これまで開発を進めてきた白血球除去カラムの課題の解決及び新たなカラムの開発について述べる。第1に全ての白血球を除去する白血球除去カラム、第2にT細胞中のCD4 + T細胞の特異的細胞除去カラムの開発についてその特徴と臨床的意義について明確にする。

第3章:白血球除去デバイスの三次元流量解析技術の開発 白血球除去カラム内の流れを外部から非破壊で解析するシステムの開発について述べる。白血球除去カラムを開発する上で、重要なカラム内の解析システムについて、システム構成、画像解析手法について明確に示す。更に、本システムを用いた解析により、可視化の効果及び白血球除去カラムでの流れ性について明確に示す。加えて、従来用いられているコンピュータシミュレーションの流速分布と本システムでの流量分布を比較し、コンピュータシミュレーションの課題について考察する。

第4章:白血球除去カラムの三次元流量解析システムの応用 白血球除去デバイスの流量解析システムで得られたカラム内流量の特徴を考慮した改良カラムを作成し、改良前後のカラム流量解析を行い、改良による効果を検証する。また、改良効果の識別により、流量解析システムの検出力を確認し、本研究の有用性を明確にする。

第5章:結論 本論文を結び、本研究を通して得られた知見を総括し、今後の展開及び可能性を述べる。

第2章 白血球除去デバイスの開発

2.1 研究の背景 - 体外循環治療による白血球除去療法 -

体外循環用の白血球除去デバイス(以下白血球除去デバイスと略す)は、第1章で述べたように輸血用の白血球除去器の技術を応用して開発された。輸血用の白血球除去器が200~500ml程度の濃厚赤血球製剤や血小板製剤を流し、白血球を除去するのに対して、白血球除去デバイスは、

- 1) 2~3Lの多量の血液を処理する、
- 2) 30~50mL/minの流速で血液をポンプで送液して処理する、
- 3) 血液が体外にでることによる低血圧等のリスクを考慮すると、体外循環に用いるカラムに入る血液量(以下プライミングポリウムと略す)は、成人で300mL以下に限定される、等の制約条件がある。

従って、白血球除去デバイスでは、必要最小限のフィルタを低容量の容器に充填した仕様で、大量の血液を処理する必要がある。更に、赤血球等の細胞への物理的な刺激を抑制するため、単位面積当たりの圧力損失を低く抑えることも重要である。これを達成する手段として、フィルタとして不織布を用い、これをスパイラル状に巻き、円筒容器に充填した白血球除去カラムが開発された[9]。

白血球除去に用いる不織布は、第1章で論じたように、繊維径が白血球除去性能に大きな影響を与えるため、3 μ m以下ものが良好に用いられる。一方繊維径があまり小さくなると赤血球等の細胞の通過が困難となるため最適な範囲として1.2 μ m以上のものがメインフィルタとして用いられる。このような極細繊維による白血球除去のメカニズムは、極細繊維への白血球の吸着、及び血球のサイズ差による濾過の二つが考えられている。白血球の中で存在比率が高い顆粒球は、異物への粘着性が高く、繊維表面に直接吸着する。また、回路との接触や、ポンプ等の物理的刺激により活性化した血小板が白血球除去デバイスの血液入口付近の繊維表面に吸着することにより、血小板を介し顆粒球が吸着すると考えられている[8,9]。また、単球は繊維を異物として認識し、貪食することにより除去されると考えられている。一方、リンパ球は粘着性が低いため、網目によるサイズセパレーションで主に濾過され、除去されていると考えられている[8,9,10]。これに加えて、リンパ球の一部の接着因子が血小板を介して吸着することより[8,9]、活性化したリンパ球が血小板を介して吸着することも除去に寄与していると考えられる。以上の原理で、白血球除去カラムは、2Lの血液処理時においても、カラムの入口と出口の白血球数から求められる白血球除去率で80%以上の除去率

を達成できる。

一方、赤血球の通過性については、不織布の空隙率、繊維径等の形状、サイズに基づく濾過等の物理的特性と、繊維表面の濡れ特性を示す表面張力、繊維表面の静電的性質を示す荷電密度等の化学的特性が重要な要素である。この中で、赤血球自身の変形能力が不織布通過に重要な働きをし、フィルタを通過していると考えられる。白血球除去フィルタは、以上のようなメカニズムにより、赤血球を通過し、粘着性の低いリンパ球を含めた白血球を選択的に除去する。

白血球除去療法は、主に患者の上腕静脈等の血管から脱血された血液に抗凝固剤を混合し、チューブポンプにより血液流速が30～50mL/minで白血球除去カラムに血液を送液し、白血球が除去された血液を患者に返血する療法である(Fig.4)。

白血球除去カラムによる白血球除去療法は、多くの疾患に対して臨床研究が実施され、その治療効果の検討が行われた。結果、全身性エリテマトーデス[11]、慢性または悪性関節リウマチ[12]、多発性硬化症[13,14]、潰瘍性大腸炎[15]、クローン病[16]等の自己免疫疾患、或いは炎症性腸疾患などで高い治療効果が報告されている。

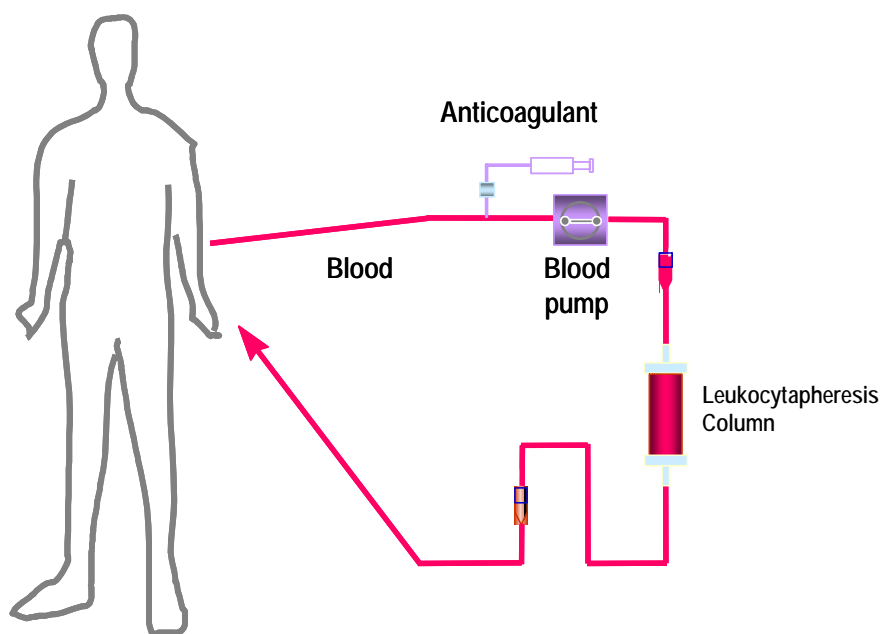


Fig.4 Blood circuit for Leukocytapheresis.

2.2 白血球除去デバイスの開発

2.2.1 白血球除去デバイス改良の背景

前述のように白血球除去カラムを用いた白血球除去療法は、種々の疾患に対して高い治療効果が確認される反面、治療時に、1) 治療初期に起こるアナフィラキシ様症状の発生、2) 治療中カラム圧上昇[17]の発生が、ごく一部の患者で報告されており、治療上の課題であった。

治療開始時に起こるアナフィラキシ様症状は、治療開始後5分から20分経過の間に発症し、顔面高潮、血圧低下等の症状がみられることが知られている。この症状の発症は、ごく一部の患者にのみ起こることが知られていたが、事前にこれを判別することが困難であるため、その症状の軽減を目指した製品改良が、カラムの更なる安全性の向上の面で望まれていた。

また、このカラムに於いては、患者の血液性状によって、凝固系の亢進或いは血小板等の活性化により、フィルタの目詰まりによるカラム圧上昇が発生することも課題であった。カラム圧上昇が起こった場合、治療を継続するため血液流速の低下が必要となり、治療時間が大幅に延長する。更に、場合によっては、治療の中断を余儀なくされることから、更なる改善が必要とされていた。これまでカラム内での滞留等による凝固系活性化に関する十分な知見がなかったため、カラムの改良手段がなかった。このような背景のもと、カラム圧上昇に対し、血液特性を測定することで、治療に適さない患者を判別し、治療の安全性の更なる向上が期待されていた。そこで、治療前にリスクのある患者を判別する方法の開発は非常に重要な課題であった。

以上より、本研究では、アナフィラキシ様症状の軽減を目指したフィルタの改良及び血液性状による判別とフィルタ改善によるカラム圧上昇の回避の2点を課題とし、製品改良と血液の判別方法について検討し、より安全な治療を達成できるようにすることを目的に行った。

更に、以上のような課題を根本的に解決し、且つ目的とする病因細胞を選択的に除去する特異的細胞除去用フィルタの開発、及びこれを充填した特異的細胞除去カラムの開発も併せて実施し、今後の可能性を検討した。

2.2.2 白血球除去フィルタの開発

白血球除去療法では前述の如く、アナフィラキシ様症状の低減が治療上の大きな課題であった。この課題を解決する目的で、症状の発症する患者の治療中の血液成分分析を行い、症状発生と同時に血中の血液キニン(Bradykinin, 以下BKNと略す)の濃度が高値となるこ

とがわかった。BKNの産生は、ガラスなどのような表面に多量の陰性荷電を有する材料表面への血液接触により、血液凝固第XII因子の活性化により産生する活性化血液凝固第XII因子によってプレカリクレインからカリクレインが生成され、更にカリクレインによって高分子量キノーゲンが限定分解されることにより産生される事が知られている(Fig.5)。BKNは、血圧低下、顔面紅潮、結膜充血、平滑筋収縮等のアナフィラキシ様反応の原因物質、即ちアナフィラトキシンの一つであることも知られている。一方、BKN産生と材料表面の陰性荷電量と間に定量的な知見は十分に得られていない。そこで本研究では、ポリエチレンテレフタレート不織布の表面の陰性荷電量を測定し、BKNの生成との関係を明らかにすることを目的に検討を行った。更に本研究の結果を元に、低BKN活性のフィルタの開発を行った。

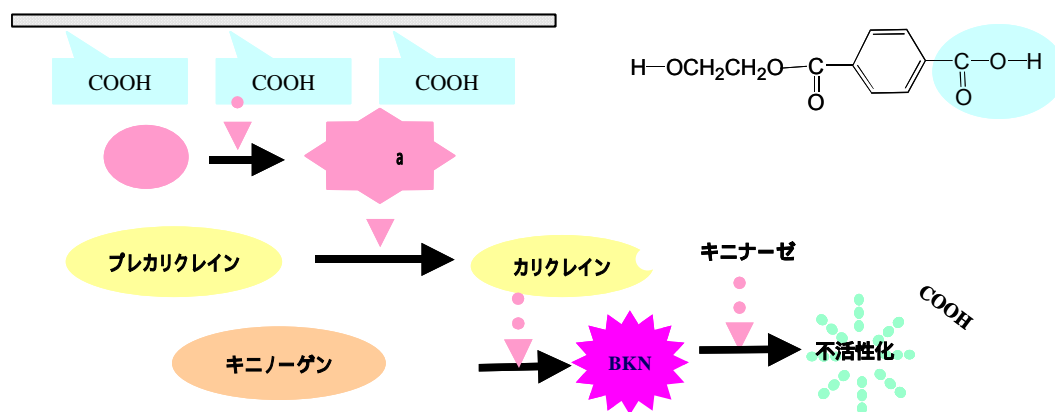


Fig.5 Cascade of BKN Activation

2.2.2.1 ポリエチレンテレフタレート不織布の表面荷電量計測技術の開発

ポリエチレンテレフタレート不織布の表面には、極微量のカルボキシル基が材料の重合末端基として存在している。但し、そのカルボキシル基量が微量であるため、通常の酸塩基滴定で定量することは、その精度の面で十分ではなかった。また、各種高感度の表面分析手法での表面荷電量の測定では、局所でのカルボキシル基の定量は可能であるが、不織布全体の平均値としての陰性荷電量を測定することは困難であった。更に、表面が平滑でなく、更に均一でないため、局所のカルボキシル基量の測定では十分ではなかった。

そこで、本研究では、ヨウ素とヨウ化物イオンから三ヨウ化物錯イオンを生成させる反応に着目し、この反応触媒として不織布表面のカルボキシル基を用いることで、表面の微量のカルボキシル基量を定量する技術を開発した。この技術は、生成する三ヨウ化物錯イオンがア

ルコール等の有機溶媒中で特定波長の光を吸収することより、吸光度を測定することで定量化することができる。既知の触媒量有する材料を同時に評価することで検量線により、微量の表面陰性荷電量を高感度に定量できる。[18]。ヨウ素とヨウ化物イオンの反応式を式(1)に示す。



以下、本研究の表面陰性荷電量の定量法について詳細に説明する。表面の陰性荷電量を測定する材料を触媒とし、メタノール溶媒中でヨウ素及びヨウ化カリウムと同時に浸漬し、24時間後生成する三ヨウ化物錯イオンを定量する。定量に用いる359nmの吸収は、三ヨウ化錯イオンのアルコール性溶媒中での特徴的な吸収のひとつである。この反応において、液体が接触することができる材料表面にある微量の表面陰性荷電が触媒として作用し、三ヨウ化物錯イオンが生成することより、触媒としての増幅効果により材料表面に存在する微量の陰性荷電量の定量が可能となる。同時に、表面にカルボキシル基等の陰性荷電が既知量固定された材料を用い、検量線を作成し、検量線より材料の表面の陰性荷電量を求めた。三ヨウ化物錯イオンによる359nmの吸収は、表面陰性荷電量にとの間に正の相関を示すことを見出し、不織布表面の陰性荷電量の測定に用いた。

2.2.2.2 BKN活性と陰性荷電量の関係の解析

本研究では、白血球除去時にBKN濃度の上昇を抑制した白血球除去フィルタを開発することが課題であることより、陰性荷電量とBKN活性との関係を明らかにする技術は必須である。そこで、この関係を明らかにする目的で、陰性荷電量の異なる白血球除去フィルタを用い、血液と接触させることで産生されるBKN濃度を測定する試験(以後、インビトロ血液試験と呼ぶ)を確立した。インビトロ血液試験の方法を以下に示す[18]。

表面荷電量が既知の白血球除去フィルタを表面積が一定となるように切断し、ポリカーボネート製の10mL三角フラスコに入れた。これにACD-A液を11.1%となるように添加し、37℃に加温した血液(ヘマトクリット値40~60%)5mL加え、37℃で5分間接触する。接触開始5分後に、カリクレインの分解阻害剤及びキニナーゼ阻害剤としてトラジオール、大豆トリプシンインヒビタ、硫酸プロタミン、エチレンジアミン四酢酸-2-ナトリウム塩を添加しBKNの分解を抑制し、4℃で冷却遠心し、血漿成分のみを取り出し冷凍後、ラジオイムノアッセイ法(PEG沈澱法)によりBKN濃度を求めた。同時に、陰性コントロールとして白血球除去フィル

タを加えていない10mLポリカーボネート製三角フラスコ、陽性コントロールとして10mLガラス製三角フラスコを用いて、インビトロ血液試験を行い、血液間差を確認した。

2.2.2.3 BKN活性と陰性荷電量の関係の解析結果と考察

白血球除去フィルタの表面陰性荷電量とBKN濃度の関係を示す (Fig.6)。図の横軸は白血球除去フィルタの表面陰性荷電量、縦軸はBKN値とした。

結果、白血球除去フィルタの表面陰性荷電量とBKN値の間に正の相関($r^2=0.98$)が認められた。これより、白血球除去フィルタの表面陰性荷電量を低くすることで、BKNの産生を抑制できる可能性が示唆され、治療中のBKN濃度の上昇を抑制できると推測された。

一方、臨床評価結果より、BKNの血漿濃度が4000pg/mLを越えると特に重篤なアナフィラキシ様症状が起こりやすい傾向があることが報告されていた。そこで、Fig.6 の結果より、白血球除去フィルタの表面陰性荷電量を30 μ eq/g以下にコントロールした場合、BKN由来のアナフィラキシ様症状を抑制できると考えた。そこで、表面陰性荷電量の低い白血球除去フィルタの開発を行った。

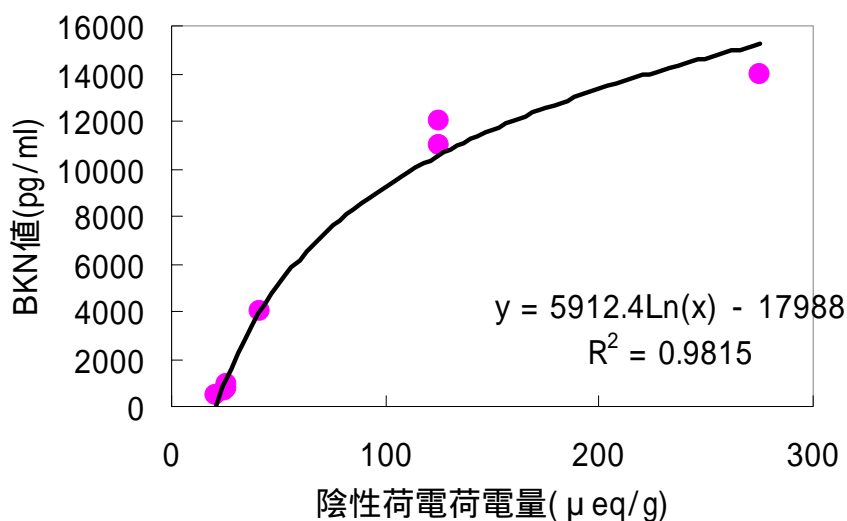


Fig.6 Relationship between Surface negative charge and BKN value.

2.2.2.4白血球除去フィルタの改良開発

表面の陰性荷電量を30 $\mu\text{eq/g}$ 以下にコントロールする目的で以下の手段を考案し、白血球除去フィルタの改良を実施した。

- 1)原料チップの含水率を下げ、且つ熔融紡糸時の温度調節により、不織布の製造過程での加水分解を防止し、陰性荷電量の少ない白血球除去フィルタを得る。
- 2)非陰性の化合物を陰性基にエステル化或いはアミド化等の反応で化学修飾することで陰性荷電量の少ない白血球除去フィルタを得る。
- 3)非陰性の化合物をコーティング等の物理的方法によって陰性基を被覆し血液と接触を抑制した白血球除去フィルタを得る。

以上のいずれの方法でも実施できる可能性は認められたが、制御の簡便性及びスケールアップの容易性の面より、上記1)を選択し、実用化した。

ポリエチレンテレフタレートは、エチレングリコールとテレフタル酸を縮重合することにより合成されるポリマーであり、重合末端はポリマー鎖当たりそれぞれ1当量のカルボキシル基と水酸基を有する。そこで、材料重量あたりのカルボキシル基を低く抑えるためには、重合度が高い状態、すなわち加水分解により分子量を低下させずに紡糸することが有効であると推測された。そこで、不織布紡糸時に、真空乾燥機及びホッパードライヤーを用い、メルトブロー前の原料チップの水分率を低下させて不織布を作成した。紡糸時の水分率と紡糸後不織布の表面陰性荷電量の関係を図7に示す。この結果より、紡糸時のチップの水分率と紡糸

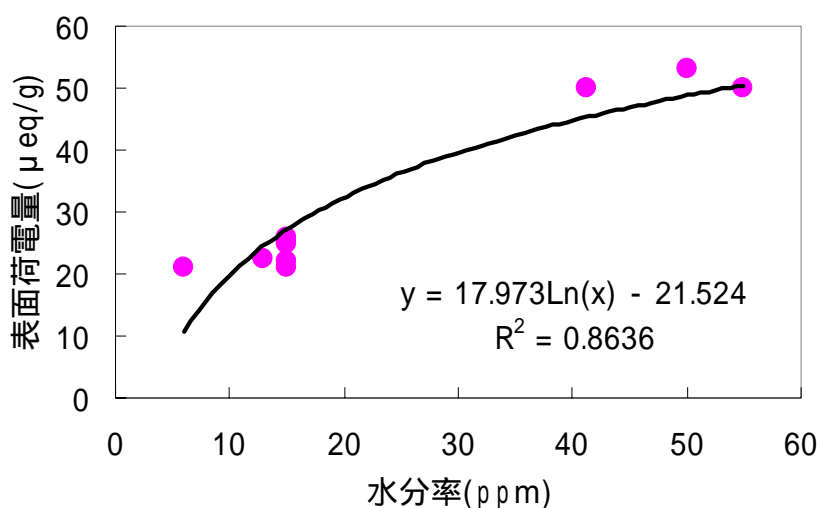


Fig.7 Relationship between surface negative charge and moisture content in PET.

後の白血球除去フィルタの表面荷電量の中に正の相関($r^2=0.86$)があることを確認した[18]。紡糸前の水分率を低くコントロールすることで、ポリマーの加水分解が抑制でき、表面の陰性化電量を低値に抑えた白血球除去フィルタを得ることができた。

2.2.2.5 低表面陰性荷電不織布を用いた白血球除去カラムの性能評価

以上の検討により、紡糸時の水分率をコントロールして作成した低表面陰性荷電量の白血球除去フィルタ22.5gをスパイラル状巻き充填した白血球除去カラムを作成した。新鮮牛血液を用い、インビトロで白血球除去試験を実施した(Fig.8)。図8では、横軸に血液処理量、縦軸に白血球除去率、顆粒球除去率、リンパ球除去率夫々示した。結果、牛血液4L処理時まで95%以上の高い除去率であることを確認した[19]。白血球除去率、顆粒球除去率、リンパ球除去率は、それぞれの血液処理時の出口側白血球数： W_{out} 、入口側白血球数： W_{in} 、出口側顆粒球割合： RG_{out} 、入口側顆粒球割合： RG_{in} 、出口側リンパ球割合： RL_{out} 、入口側リンパ球割合： RL_{in} とした時、以下の式により求めた。

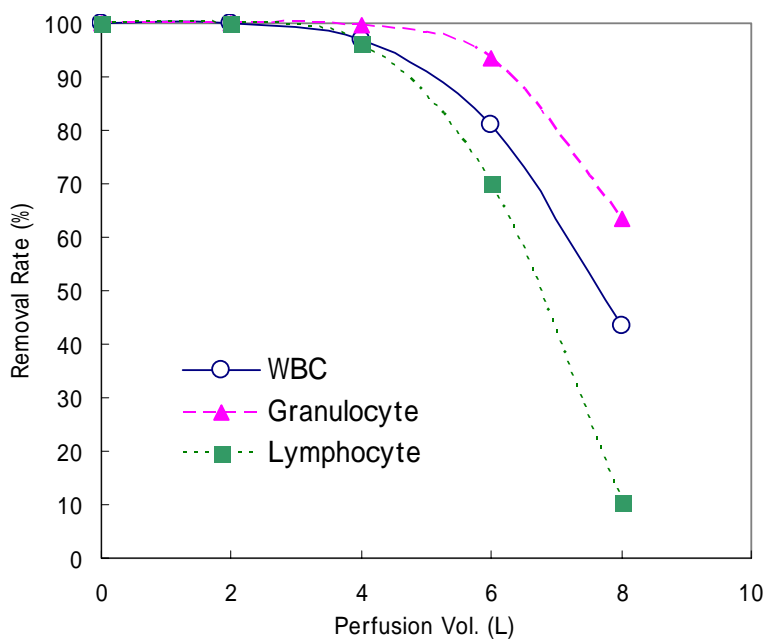


Fig.8 WBC removal rate by leukocyte removal column
 $n=3$ (average) , Blood: Bovine blood (ACD-A), 37°C , $Q_b=50\text{ml/min}$

$$\text{白血球除去率(\%)} = 100 - W_{\text{out}} / W_{\text{in}} \times 100 \quad \text{式(2)}$$

$$\text{顆粒球除去率(\%)} = 100 - (W_{\text{out}} \times \text{RG}_{\text{out}}) / (W_{\text{in}} \times \text{RG}_{\text{in}}) \times 100 \quad \text{式(3)}$$

$$\text{リンパ球除去率(\%)} = 100 - (W_{\text{out}} \times \text{RL}_{\text{out}}) / (W_{\text{in}} \times \text{RL}_{\text{in}}) \times 100 \quad \text{式(4)}$$

2.2.3 白血球除去フィルタ開発の結論及び考察

本研究では、表面のカルボキシル基を触媒として用いた白血球除去フィルタの表面陰性荷電量の定量技術を検討し、液体が接触できる表面に存在する微量の陰性荷電量の定量技術を確立した。本定量技術を用いることで、紡糸時のポリエチレンテレフタレートチップ水分率と不織布表面の陰性荷電量の間には正の相関があることがわかり、チップ水分率を低下させることで陰性荷電量が低い白血球除去フィルタを開発することができた。更に、このチップ水分率をコントロールした白血球除去フィルタを用いて、白血球除去フィルタ表面の陰性荷電量とBKN濃度の間には正の相関があることを明らかにした。以上より、チップ水分率を低くコントロールし、陰性荷電量を低下させることで、白血球除去フィルタと血液が接触することにより産生されるBKN濃度を低くコントロールできることを確認した。

この技術により、臨床でのBKN濃度上昇のリスクを低減でき、治療初期のBKNに起因して起こるアナフィラキシ様症状を抑制できる可能性があると考えられた。一方、臨床での調査より、血清中のBKN濃度が4000pg/mL以上のとき、アナフィラキシ様症状が起こりやすいことがわかっていたため、本検討結果より、白血球除去フィルタの表面陰性荷電を30 μ eq/g以下にすることで、臨床でのアナフィラキシ症状の抑制に有効であると推測された。

一方、表面の陰性荷電量を低下させたことによる白血球除去性能への影響について、牛血液を用いたインピロでの試験を実施した確認を行った。結果、4Lの牛血液を処理後においても、平均95%以上の白血球除去率が達成でき、臨床上十分利用可能であることを確認した。

以上より、本研究で改良開発した白血球除去フィルタを充填した白血球除去カラムは、臨床応用上、アナフィラキシ様症状の発症を減少させ、有用に用いられると考えられた。

2.2.4 白血球除去カラムのカラム圧上昇回避検討

一方、第二の課題であった白血球除去カラムの治療中カラム圧上昇のメカニズムについて、本研究では以下の点に着目し、検討を行った。

- 1)カラム内圧上昇に患者間差があることに着目し、凝固しやすい血液性状について解析
- 2)凝固しやすい血液性状から推測される凝固要因の推定
- 3)凝固を低減するカラム設計

を実施した。

2.2.4.1 白血球除去フィルタとの接触により凝固しやすい血液性状の解析

まず、第一に、白血球除去療法の治療中に発生するカラム圧上昇への解決策について検討を実施した。そこで、カラム内での血液成分の凝固に着目し、白血球除去フィルタと血液の接触により起こるカラム圧上昇と血液性状の関係について以下手段で解析を実施した。ここで得られた知見は、施行前にカラム圧上昇因のある患者を事前に予知することに応用できるものと考えられた[19]。

2.2.4.2 血液の凝固に関する因子の試験方法

試験に使用した血液は、健常人ドナー12名より採血した新鮮血液(白血球数:4370~8200 / μ L、血小板数:100,000~300,000 / μ L)を用いた。試験用の血液は一部をサンプリングし、血漿成分の凝固関連因子及び血球成分について測定を実施した。血漿成分の測定は、すべてSRL社への依頼試験で実施した。また、血球成分については、多項目自動血球分析装置(SF-3000型、Sysmex社)を用いて測定を行った。測定した血漿成分及び血球成分を表2に一覧で示す。

カラム圧上昇を評価するため、白血球除去フィルタとして平均繊維直径2.7 μ mのポリエステル不織布(目付90g/m²、厚さ0.42mm)を6.8mmの円形に切断し、10枚を、上下をポアサイズ90 μ mのポリエチレンフィルタで挟み、カラムに充填した試験用白血球除去カラムを作成し用いた。カラム圧上昇の試験は、抗凝固剤としてメシル酸ナファモスタットを添加した試験用血液(メシル酸ナファモスタット濃度:0.012mg/mL)を37℃に加熱し、血液ポンプで0.25mL/minの一定流速で試験用白血球除去カラム内に6.2mL流し、白血球除去試験を実施した。このとき、試験用白血球除去カラムの入口側圧力を測定し、この圧力が13.3kPa以上に上昇する血液と上昇しない血液を分別し、先に測定した血漿成分及び血球成分と圧力上昇との間で、重回帰分析を行った。

Tab.2 Coagulation factors and cells for analysis of clotting

血漿成分	血球成分
凝固系因子 外因系 プロトロンビン時間、第VII因子、第X因子、 第II因子、第V因子、フィブリノーゲン 内因系 活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)、 プレカレクレイン、キニノーゲン、第XII因子、 第XI因子、第IX因子、第VIII因子、 第X因子、第V因子、第II因子、 フィブリノーゲン、C1インアクチベータ活性 凝固抑制因子 アンチトロンピンIII、トロンボモジュリン プロテインC、プロテインC活性 プロテインS、プロテインS活性 線溶系因子 プラスミノーゲン、アンチプラスミン その他凝固関連因子 フィブリノーゲン分解産物濃度(FDP)、Dダイマー、 可溶性フィブリンモノマー複合体、ビタミンK分画、 プロスタグランジンE2、プレカリクレイン、 プロトロンビンフラグメントF1+2、 エラスターゼ1、コリンエステラーゼ 凝固検査 ヘパプラスチンテスト、トロンボテスト(TT)、 カルシウム再加時間、トロンピン・ATIII複合体 (TAT) 血小板因子関連 ベータトロンボグロブリン(β-TG) 血小板第四因子(PF-4) von Willebrand因子活性、トロンボキサンB2	赤血球系 赤血球数、ヘモグロビン値、 ヘマトクリット値、 平均赤血球容積、 平均赤血球血色素量、 平均赤血球血色素濃度、 赤血球分布幅 白血球系 白血球数 顆粒球数、顆粒球比率 好酸球数、好酸球比率 好塩基球数、好塩基球比率 好中球数(NETU数)、 好中球比率 リンパ球数、リンパ球比率 単球数(MONO数)、 単球比率 血小板系 血小板数(PLT数) 血小板分布幅、 平均血小板容積、 大型血小板比率

2.2.4.3 凝固しやすい血液因子の試験結果

カラム圧上昇の有無と測定した血液性状について、重相関分析を行った結果、血漿成分として、第II因子、プロテインC活性、プロテインS活性、β-TG、PF-4、FDP、及びVon Willebrand因子活性とカラム圧上昇の間に有意に相関があることがわかった。また、血球成分として、PLT数、NEUT数、MONO数がカラム圧上昇との間に相関があることがわかった。

回帰式を以下に示す。

$$\begin{aligned}
 \text{血漿成分回帰式} = & 1.971994 - 0.025498 \times \text{-TG} + 0.094531 \times \text{PF-4} \\
 & + 0.018474 \times \text{第 因子} - 0.002085 \times \text{Von Willebrand因子活性} \\
 & + 0.032470 \times \text{FDP} + 0.00669 \times \text{プロテインC} - 0.040936 \times \text{プロテインS} \\
 & (1: \text{圧上昇血}, 0: \text{非圧上昇血}) \qquad \qquad \qquad \text{式(5)}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{血球成分回帰式} = & - 1.172874 + 0.032019 \times \text{PLT数} + 0.040021 \times \text{NEUT数} \\
 & - 0.228441 \times \text{MONO数} \\
 & (1: \text{圧上昇血}, 0: \text{非圧上昇血}) \qquad \qquad \qquad \text{式(6)}
 \end{aligned}$$

以上統計解析の結果より、血漿成分として、第 因子、プロテインC活性、PF-4及びFDPが高く、 -TG、Von Willebrand因子活性及びプロテインS活性が低いほどカラム圧力が上昇しやすい可能性が示唆された。一方、血球成分については、血小板数と好中球数が多く、単球数が少ないほど、カラム圧力が上昇しやすい可能性が示唆された。

2.2.4.4 凝固しやすい血液因子に関する考察

以上の結果より、血球成分のカラム圧上昇の原因として、主に顆粒球、単球及び血小板数が関与している可能性が示唆された。この原因として、顆粒球数は白血球の中でも最も多い分画であり、また、細胞直径が10～18 μmと最も大きいため、フィルタの目詰まりによる圧上昇に寄与していると考えられる。従って、血液処理量に相関して処理される顆粒球数が多くなることで、フィルタの物理的な閉塞が起これ、カラム圧力の上昇に影響していると考えられる。単球については、顆粒球同様に粘着性が高く、細胞直径が大きい細胞であるが、少ない場合に圧上昇が起これやすいことより、分画比率が小さいことより、顆粒球比率が高くなると相対的に単球比率が低下することによると推測される。一方、血小板数は非常に多いものの、直径約1 μmと小さいことより血小板の吸着がカラム圧上昇に直接寄与しているとは考えにくい。従って、血小板数は、物理的な閉塞によるカラム圧上昇ではなく、血小板が吸着後に起こる活性化に起因した血液凝固の影響ではないかと推察された。

一方、血漿成分のFDP、PF-4濃度がカラム圧上昇に影響することより血小板の活性化によるフィブリン生成によって起こる凝固がカラム圧上昇に寄与していると考えられる。 -TG、PF-4は、何れも血小板より放出される因子で血液の凝固に関与する因子である。 -TGは血小板の顆粒中に含まれ、顆粒中の活性化成分を安定化させるため凝固抑制に影響することより、 -TG濃度が低い場合、凝固抑制不十分となり、カラム圧上昇につながると考えら

れる。一方、PF-4は、抗ヘパリン作用を有するため凝固を促進する因子としてカラム圧上昇に影響すると思われる。また、第Ⅲ因子は、活性化することで可溶性フィブリンに作用し、フィブリンが安定化フィブリンへと転換することより、血液の体外処理時に凝固を検出する上で非常に重要な因子である。一般に第Ⅲ因子活性の値が高いほど凝固を促進するため、カラム圧上昇に寄与していると考えられる。プロテインCは、プロテインSを補酵素タンパクとし、活性化することで、活性化第Ⅴ因子及び活性化第Ⅴ因子を失活させ、凝固反応を阻止する働きをするため、凝固を抑制する因子として重要な役割を果たしており、これら濃度がカラム圧上昇に影響していると考えられる。Von Willebrand因子活性は、血小板の凝集に関与する因子であり、Von Willebrand因子活性が血液の凝固に関与するため重要であると考えられる。いずれに於いても、血小板を含むカスケードからフィブリンクロットに至る過程で凝固促進及び凝固抑制に重要な因子であると考えられ、これら血漿成分が白血球除去カラムのカラム圧上昇に影響していると考えられる。

以上の結果より、治療前に患者の血液を事前に評価することでカラム圧上昇の可能性を事前に推定できる可能性があると考えられる。また、カラムを改良する上で、白血球除去カラムに入る前に生成するフィブリンを白血球除去フィルタに吸着させない様にカラム設計をコントロールすることでカラム圧上昇のリスクを低減できると考えられた。

2.2.5 白血球除去カラムの改良

本研究結果により、顆粒球の吸着によるメインフィルタの目詰まりを軽減し、白血球除去フィルタ以前に生じる血漿成分の凝固によるフィブリン塊の濾過を目的で、目の粗いプレフィルタをメインフィルタの上流に配した白血球除去カラムを開発した[20]。プレフィルタの平均繊維径を10～40 μmにすることで、顆粒球の一部がプレフィルタに吸着し、メインフィルタの顆粒球吸着による負担を軽減できる。更に、プレフィルタは、カラム上流側の血液回路で活性化したフィブリン塊等の凝固による物質を除去できるため、メインフィルタのみの場合に比べ、メインフィルタへのこれらの吸着を抑制できると考えられる。これより、メインフィルタ量を実質減らしても、十分な白血球の除去が可能であり、且つ目詰まりによる圧上昇のリスクを低減できると考えられる。改良したカラムの断面図とフィルタ部の模式図を示す(Fig.9)。

今回改良開発した白血球除去カラムの牛血液を用いた白血球除去性能を示す(Fig.10)。図10は横軸が血液処理量、縦軸に白血球除去率を示した。プレフィルタの追加によりメインフィルタ量が約半量に減少したにもかかわらず、血液2Lを処理した時点での白血球除去率が約90%であったことより、プレフィルタによる白血球除去も寄与していると考えられた。また、

本改良カラムは、比較的処理血液量の少ない場合でも治療効果が認められている潰瘍性大腸炎の治療用に適用できると考え、臨床での治療効果を確認した。

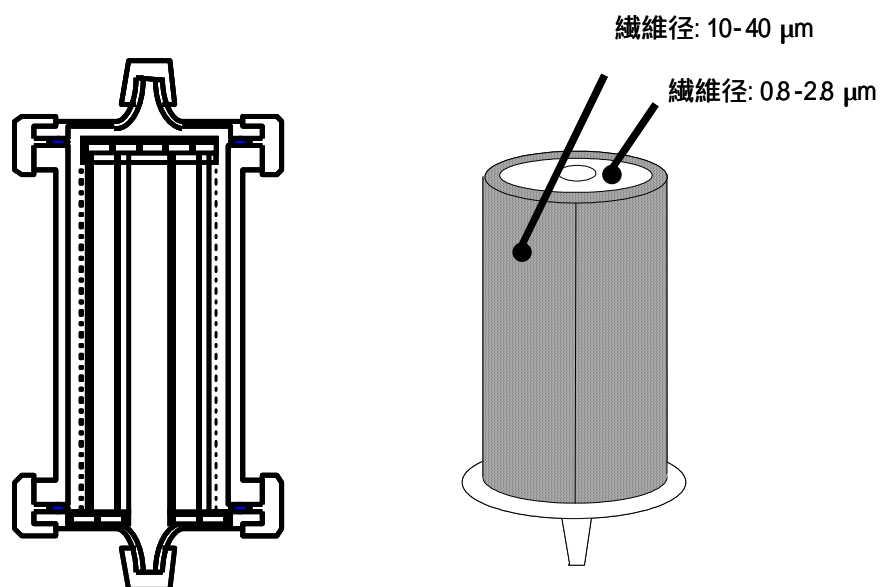


Fig.9 External view and filter part of Leukocyte removal column.

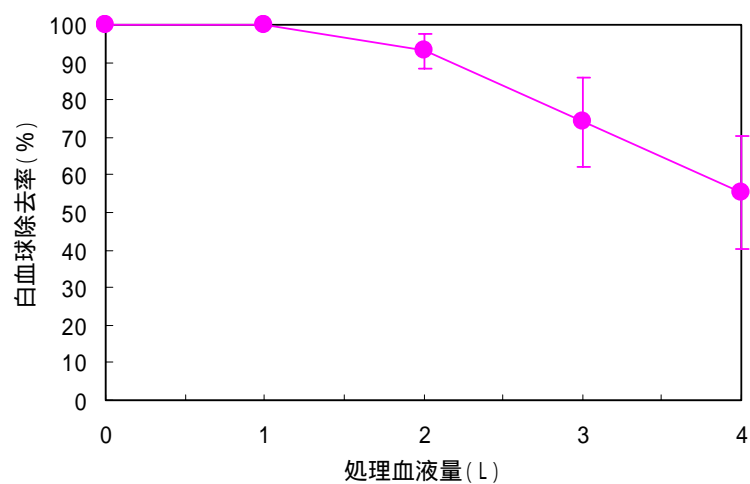


Fig.10 WBC removal rate with Leukocyte removal column (*in vitro*).
Blood: bovine (ACD-A), $Q_b=50\text{ml}/\text{min}$, $n=10$: average, bar: \pm STD

2.2.6 白血球除去カラムの臨床での白血球除去効果

潰瘍性大腸炎の臨床試験での白血球除去率を示す(Fig.11)[21]。図11の横軸は血液処理量、縦軸は白血球、血小板、或いはリンパ球、単球および顆粒球の除去率を示している。白血球除去率は、3L処理時に於いても約90%であり、臨床試験で十分な白血球除去を確認した。また、顆粒球及び単球は3L処理時に於いてもほぼ100%の除去が可能であった。リンパ球は、プレフィルタを増加した分、メインフィルタを減らしたことに起因する除去性能の低下が認められたが、4Lまでの平均除去率が約40%であった。一方、血小板は血液処理量が増加するにつれて血小板除去率が減少し、平均の除去率は約60%であった。臨床試験後のフィルタを走査型電子顕微鏡で観察すると、プレフィルタ部にも顆粒球の吸着が認められ、メインフィルタ部の負担軽減が確認された。

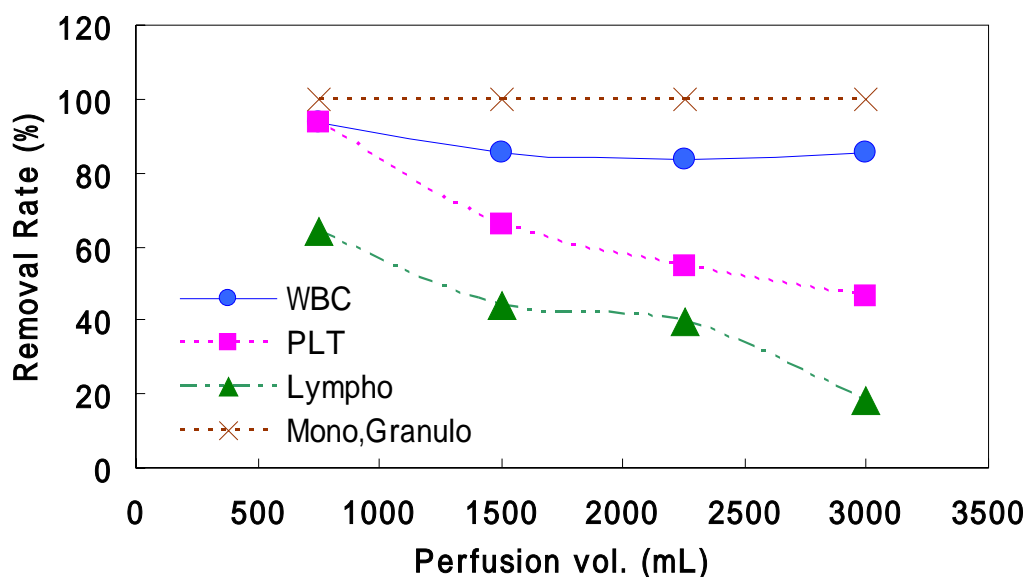


Fig.11 Removal rate of WBC and platelets with leukocyte removal column (*in vivo*).
Qb = 50mL/min, Anticoagulant: Nafamostat mesilate, Patients: Ulcerative Colitis, n=14(average)

2.2.7 白血球除去カラムの有用性 - 臨床効果まとめ -

本研究の白血球除去カラムを用い、澤田らは、潰瘍性大腸炎に対してステロイド治療群をコントロールにした臨床試験を実施した[22]。結果、判定基準で有効以上の有効率はコントロール群が38%であったのに対し、白血球除去群では74%と有意に高い(P<0.01)治療

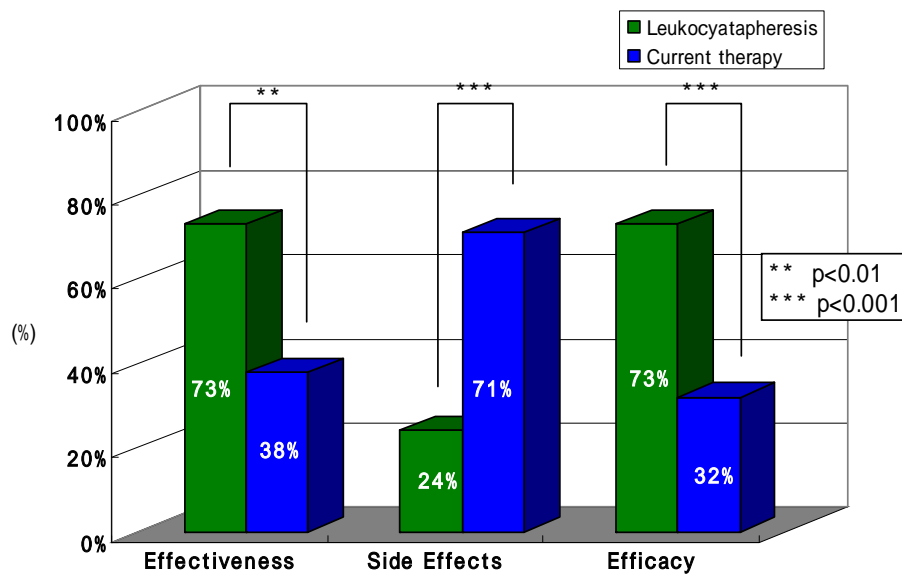


Fig.12 Efficacy of Leukocytapheresis for the treatment of UC patients.

効果であった。一方、副作用発生率については、ステロイド群71%に対し、白血球除去群は24%と有意に低い($P<0.001$)結果であった(Fig.12)。また、有効率と副作用より求めた医師による4段階の有用性判定は、有用以上を示した判定が有意に白血球除去群で高い結果であった。更に、抗凝固剤にメシル酸ナファモスタットを併用することでBKNによる血圧低下もなく安全に治療可能であった。また、臨床でのカラム圧上昇による治療の中断は改良前の白血球除去カラムに比べて約1/10の発生頻度になり、2L処理時点で、ほとんどカラム圧上昇なく安全に施行できた。

本研究で改良開発した白血球除去カラムは、潰瘍性大腸炎及び薬物抵抗性の関節リウマチで製造承認及び健康保険適用になり、通常の治療の一つとして、日本国内にて使用されている。

2.2.8 白血球除去カラムの開発の結論

本研究により、白血球除去治療の課題であった以下の2点を解決した。

- 1) 表面陰性荷電量を30 μ eq/g以下にコントロールした白血球除去フィルタを開発した。本開発の白血球除去フィルタを用いた白血球除去カラムは、抗凝固剤メシル酸ナファモスタットを併用することで、BKNの産生によるアナフィラキシ様症状の発症なく、臨

床において治療できることを確認した。本研究により、白血球除去カラムの安全性を更に高めたことより、臨床での応用が可能となり、有用性を確認することができた。

- 2) 凝固しやすい血液性情の解析を行い、血球成分及び血漿中の凝固因子の一部がカラム圧上昇に影響を及ぼす可能性を確認した。解析結果より、治療中にカラム圧力が上昇するリスクのある患者を事前に予知する回帰式を提案できた。更に、血液性状から推定されたカラム側の対策として、プレフィルタをメインフィルタ上流側に配置したカラムを設計した。これにより、顆粒球或いはフィブリノーゲンによる凝固物質をメインフィルタに到達する前に、除去することができ、メインフィルタの負担を軽減し、カラム圧上昇頻度を抑制することができた。

本研究で検討した白血球除去カラムの改良品は、潰瘍性大腸炎或いは薬物抵抗性の関節リウマチへの臨床試験が行われ、臨床にて有効性と安全性が確認され、日本国内で健康保険適用となった。現在まで、4,000例以上の治療に用いられている。抗凝固剤にメシル酸ナファモスタットを併用した治療においては、BKN濃度上昇による副作用は報告されておらず、本研究の白血球除去フィルタの開発が大きく貢献していると考えられる。

現在、白血球除去カラムの更なる改良課題として、次のようなものがあげられる。

- 1) カラム内のフィルタの効率的利用によるカラム容量の小型化
- 2) 体外循環時の体外血液量過多による、患者負担を軽減するためのプライミンポリウムの最小化
- 3) 白血球の選択的な除去による治療効果の向上

が求められている。

1)及び2)は、現状の白血球除去カラムのカラム容量が180mLと比較的大きいため、低体重の患者に適用する場合には特に更なる改良が必要であると考えられる。一方、治療後のカラムの白血球吸着分布解析より、メインフィルタ最外層及びカラム下部への吸着が多く、吸着部位に偏りが見られることが分かった。そこで、充填したメインフィルタをより効率的に利用することで、白血球除去フィルタ量を最適化でき、カラム容量を小型化することができると考えられる。3)については、カラムの最小化にもつながる技術であるが、フィルタ自体の大幅な開発も必要であることより、次節で説明する。

2.3 特異的細胞除去カラムの開発

2.3.1 研究の背景

白血球除去療法は、白血球を除去することで高い治療効果が得られている。一方、治療上有用な白血球も同時に除去されていることより、更に高い治療効果を目指す上で、より選択性の高いカラムを開発することが期待されている。また、選択性を向上させることで白血球除去フィルタ量を最小化でき、プライミングポリウムを減少させることも同時に可能となる。

一方、自己免疫性神経疾患では、細胞性免疫機能の異常が考えられ、この免疫機構のバランスを正常に戻すことで治療効果が期待でき、より選択的な細胞除去が期待されている。そこで、自己免疫性神経疾患を対象にした特異的細胞除去カラムの開発を実施した。以下この検討について詳細に述べる。

自己免疫性神経疾患では、自己抗原と反応するCD4膜抗原陽性Tリンパ球(ヘルパーT細胞、以下CD4+T細胞と略す)が、神経組織内に侵入し、髄鞘を破壊した結果、発症することが明らかとなっている(Fig.13)。一方、これら自己免疫疾患では細胞性免疫能の異常として、サプレッサー機能の低下、CD4+/CD8+比の上昇、活性化T細胞の増加及びNatural Killer細胞の減少が認められる。そこで、CD4+Tリンパ球細胞を選択的に除去することで、疾患の改善が期待される[23]。たとえば、多発性硬化症等の疾患では、T細胞中のTh1細胞とTh2細胞のバランスが崩れていることが知られている。このような疾患に対して、細胞の選択

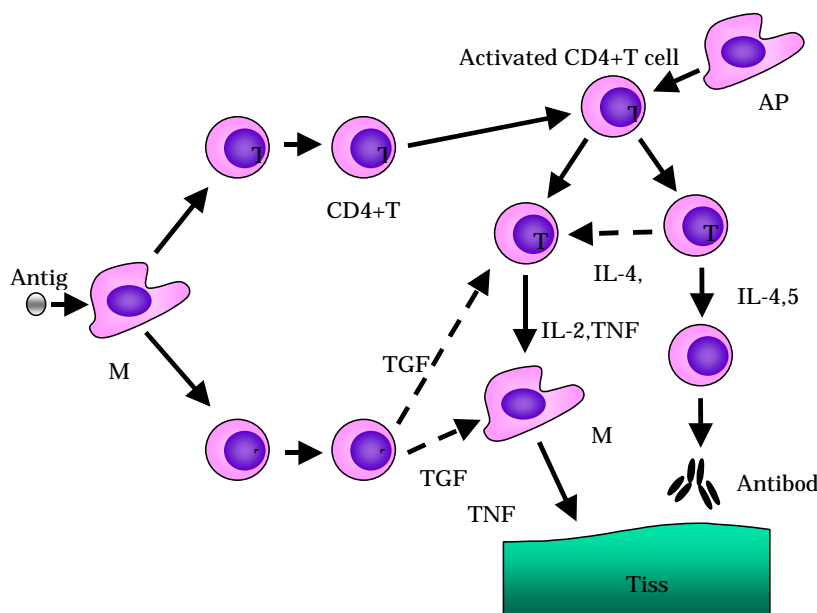


Fig.13 Roles for CD4+T Cells in immunological response system.

除去が有用であると考えられている[24,25,26]。従って、これら自己免疫性神経疾患に対して、体外循環による *ex vivo*での免疫調節が有効な治療手段と考えられる。そこで、本研究では、血液中から体外循環により、CD4 + T細胞を選択的に除去する特異的細胞除去カラムの開発を目的とする。

2.3.2 特異的細胞除去カラムの開発

特異的細胞除去カラムのコンセプトを以下に示す。細胞の選択的除去を行う場合、細胞自体に特別な粘着性があるか、細胞に独特な排他的構造を有していることが重要である。CD4 + T細胞の場合、特別な粘着性に関する知見はなく、その他細胞と区別することは困難である。従って、細胞に独特な構造、即ち表面抗原をターゲットとすることが最適であるとの観点より、設計を行った。

特異的細胞除去器を開発する上で、重要な課題は以下である。

- 1)吸着担体へのリガンドの固定化技術
- 2)特異的細胞除去カラムの滅菌技術の開発

以下、順次検討する。

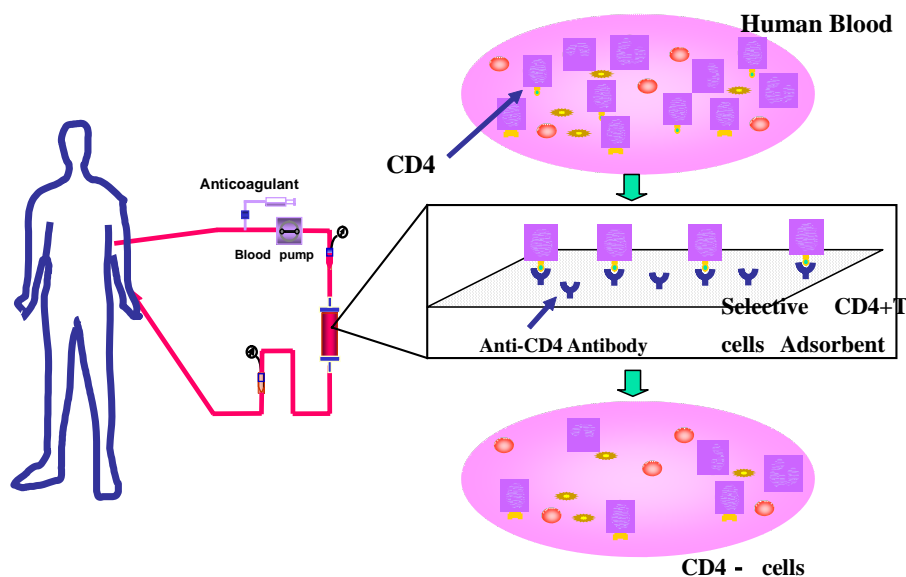


Fig. 14 Concept of CD4+T Cells removal column

2.3.3 吸着担体へのリガンドの固定化技術

特異的な細胞の吸着を行う上で、担体表面にリガンドである抗CD4+抗原モノクローナル抗体を共有結合で固定する技術は、安全な体外循環用の治療器を開発する上で非常に重要な技術である。本研究では、まずモノクローナル抗体の固定を行うために必要な活性基をポリプロピレン不織布に共有結合で導入する技術について検討した。

ポリプロピレンを担体に選定したポイントを以下に示す。

- 1) 表面に陰性荷電のない化学構造の担体 (BKNの産生がない)
- 2) リガンドを多く保持できる点より、単位体積当たり広い表面積を有する構造の担体
- 3) 白血球の非特異的吸着を抑制するため、3 μm以上の繊維直径の担体

上記3点を満たす担体として、ポリプロピレンの繊維径3.5 μmの不織布を担体を選択した。このポリプロピレン不織布への抗体固定化技術について次に示す。

2.3.4 ポリプロピレン不織布への活性基導入原理

抗体固定に用いる活性基として、末端にヨウ素を有する2-ヒドロキシメチルヨードアセトアミド(以下HMIAAと略す)を選択した。HMIAAの末端ヨウ素は、リン酸バッファー存在下で抗体のスルフィド基の水素とヨウ化水素として脱離し、抗体と共有結合することができる。従って、担体表面にHMIAAを水酸基末端で脱水反応によって共有結合することで、前述の条件で抗体を固定することができる。活性基の導入及び抗体固定のスキームをFig.15に示す。

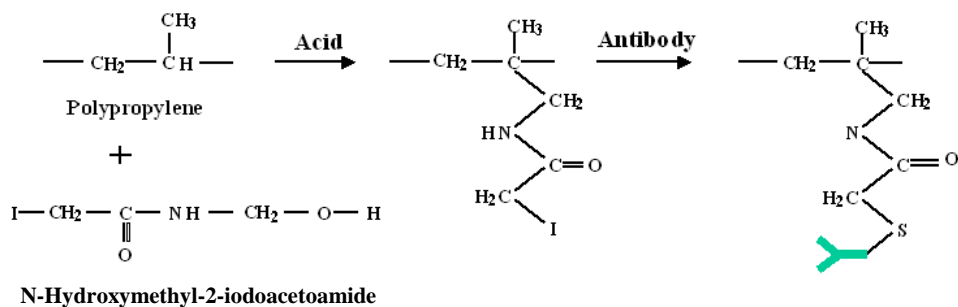


Fig.15 Method for Immobilization of adsorbent

ポリプロピレン不織布へのHMIAAの導入は、ニトロベンゼンを溶媒として用いHMIAAを溶解し、これに硫酸を脱水用の触媒として加えた。この反応液にポリプロピレン不織布を24時間室温で浸し、脱水反応を行った。反応後の不織布はメタノールで有機溶剤をニトロベンゼン臭がなくなるまで洗浄し、表面に吸着したHMIAAを洗浄するため水で洗浄し、凍結乾燥

機で乾燥することで、HMIAA導入活性化不織布を得た。

2.3.5 抗体固定方法

リガンドは、CD4 + T細胞へのアフィニティの高さの点より、抗ヒトCD4IgG1抗体 (mouse IgG, clone: NU-T, ニチレイ社製) を選択した。HMIAA導入活性化不織布への抗体の固定方法を次に示す。

クリーンベンチ内で、抗ヒトCD4IgG1モノクローナル抗体をPBS(-)溶液 (pH6.8) にて希釈し、乾熱滅菌したステンレス製のバットに入れ、マグネチックスターラーで攪拌しながらHMIAA導入活性化不織布を室温で24時間浸し、抗体固定化反応を行った。その後、PBS(-)溶液で非特異的に吸着している抗体を洗浄した。更に、ヨウ素末端が残存している非固定化活性基をTween20 (東京化成製) PBS(-)溶液に浸漬し、モノクローナル抗体固定除去材を作成した。

2.3.6 特異的細胞除去カラムの開発

特異的細胞除去カラムを設計するため、以下のステップで開発を行った[6]。

- 1) ミニスケールカラムを開発し、*in vitro* でCD4+T細胞を特異的除去の可能性を確認
- 2) 臨床スケール(2Lの血液処理用)のカラムを開発し、スケールアップの可能性を確認
- 3) モデル動物での体外循環により、治療効果を検証

以下に、ミニスケール及び臨床スケールの特異的細胞除去カラムの開発について説明する。

2.3.6.1 ミニスケールカラムの調製と血液評価方法

モノクローナル抗体固定除去材を、直径6.8mmに切断し、内径6.8mmのカラム (容量1mL) に4枚積層充填した。充填液には抗体の滅菌保護材として、1%キトサンPBS(-)水溶液をカラム内に充填し、ミニスケールカラムを作成した。このミニスケールカラムをコバルト60 線照射装置にて、照射線量25kGyで照射し 線滅菌を行った。このミニスケールカラムを用いて血液試験を実施した。血液試験は、まず、ミニスケールカラムに流速1mL/minで生理食塩液5mLを流しプライミングを行った。次に、プライミング液を空気で押し出した。カラムに血液の充填されたシリンジを接続し、シリンジポンプを用いてACD-A加血液5mLを、流速1mL/minで流した。(Fig.16)。

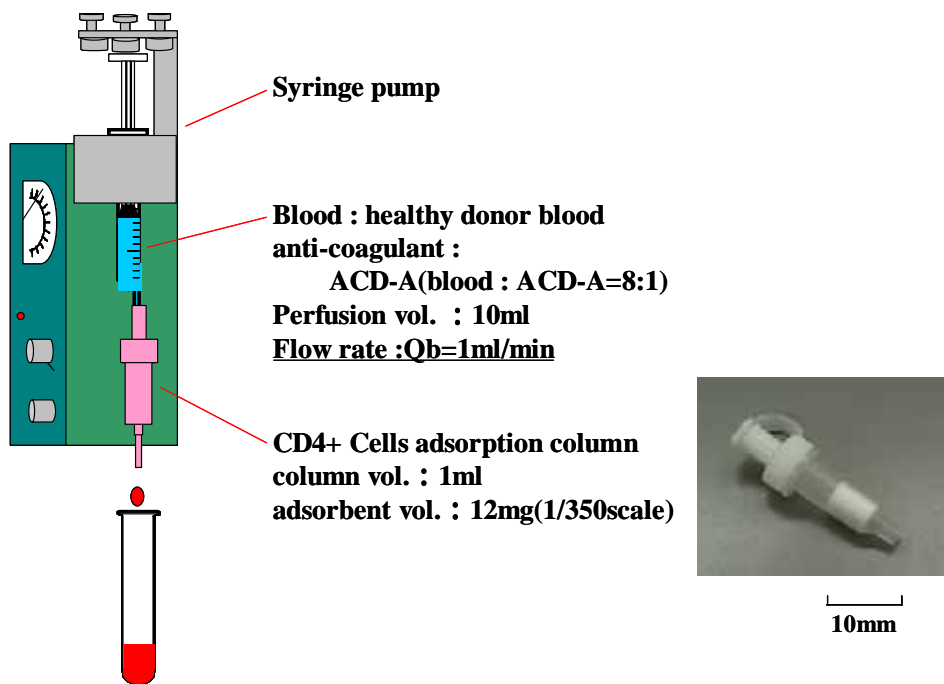


Fig.16 *in vitro* evaluation method for mini-scale column.

カラム処理前後の血液をサンプリングし、白血球数はチュルク液染色により顕鏡によりカウントし、白血球の回収率を求めた。赤血球及び血小板数は多項目自動血球分析装置 (SF-3000型、Sysmex社) を用い測定し、カラム処理前後の夫々の数値より、赤血球及び血小板の回収率を求めた。更に、蛍光標識抗体を用いたフローサイトメーター (ベックマン・コールター社製) を用いたフローサイトメリー分析により、リンパ球分画についてCD4及びCD8の2カラーで分析し、CD4(+)細胞除去率(%)及びCD4(-)細胞回収率(%)を求めた (Fig.17)。

2.3.6.2 臨床スケールカラムの調製と血液評価方法

モノクローナル抗体固定除去材を、96.5mm角に切断し、容量60mLのカラムに充填し、臨床スケールカラムを作成した。この臨床スケールカラムに、1%キトサンPBS(-)水溶液を充填し、コバルト60 線照射装置にて、照射線量25k Gyを照射し、線滅菌を行った。

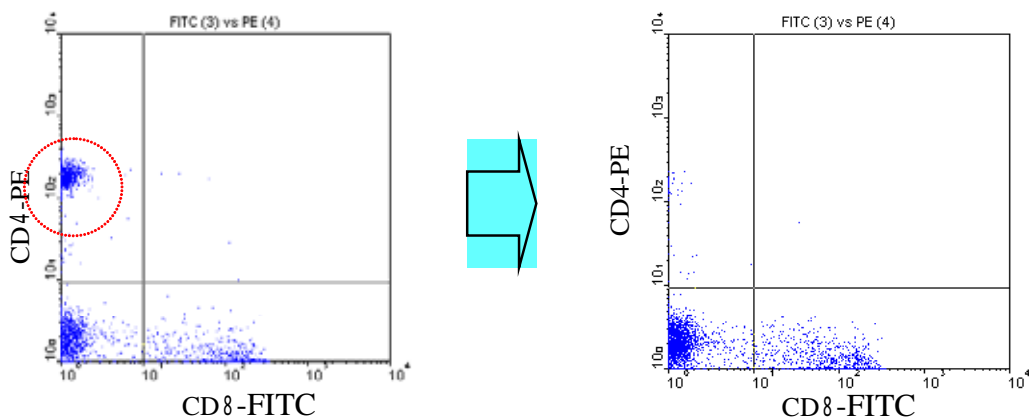


Fig.17 Two-color Flowcytometry Analysis for CD4 Cells removal column. Before column (left), After column (right)

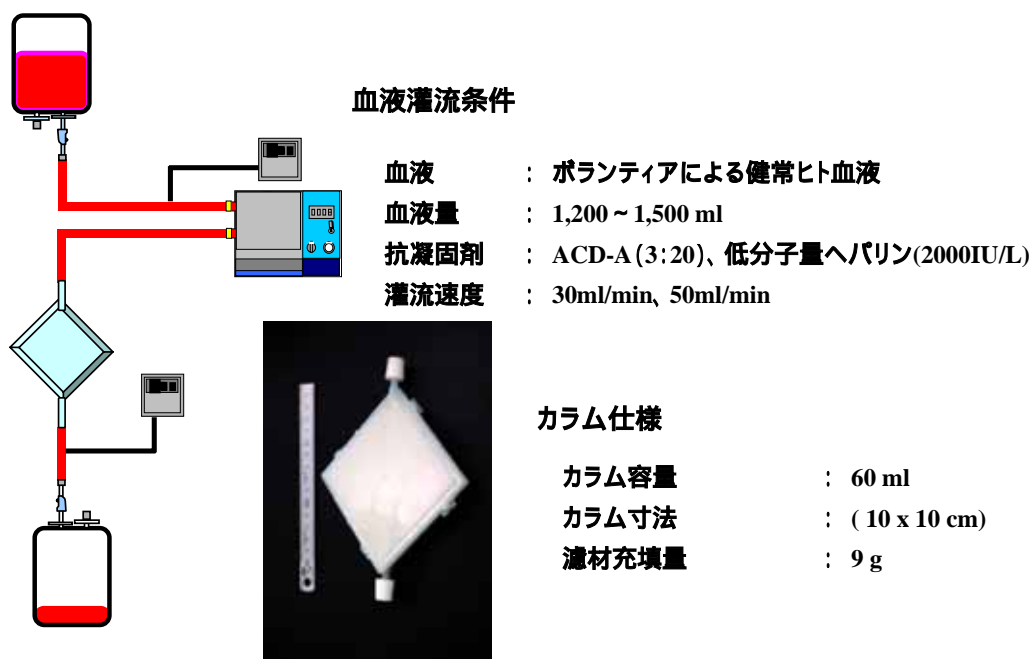


Fig.18 Selectivity evaluation tests for full-scale column.

臨床スケールカラムを用い、血液試験を次に示した方法で実施した。健康人ボランティアから採血した血液1200mL ~ 1500mLに抗凝固剤としてACD-A (血液:ACD-A=20:3) 或いは低分子量ヘパリン(2000IU/L)を添加し抗凝固した。この血液をポンプにて流速50ml/minで送液し、臨床スケールカラムにて選択除去試験を実施した(Fig.18)。血液は、カラム出口

にてサンプリングし、ミニスケールの試験と同様にフローサイトメトリー法でCD4及びCD8細胞の細胞マーカーを測定し、カラム前と比較し、それぞれCD4 + CD8-細胞の除去率、CD4-CD8+細胞の回収率を求めた。

2.3.6.3 ヒト新鮮血液での全血直接灌流によるミニスケールカラムの評価結果

*in vitro*でヒト新鮮血液を直接灌流し、ミニスケールカラムによるCD4+T細胞除去の血液試験を実施した。フローサイトメーターによるリンパ球サブセット測定より求めたCD4 + T細胞除去率は、 $90.3\% \pm 4.2\%$ (mean \pm s.d., n=54)であったのに対し、CD4-T細胞の回収率は、 $84.8\% \pm 10.2\%$ (mean \pm s.d., n=54)であり(Fig.19,left)、特異的なCD4 + T細胞除去が可能であった。

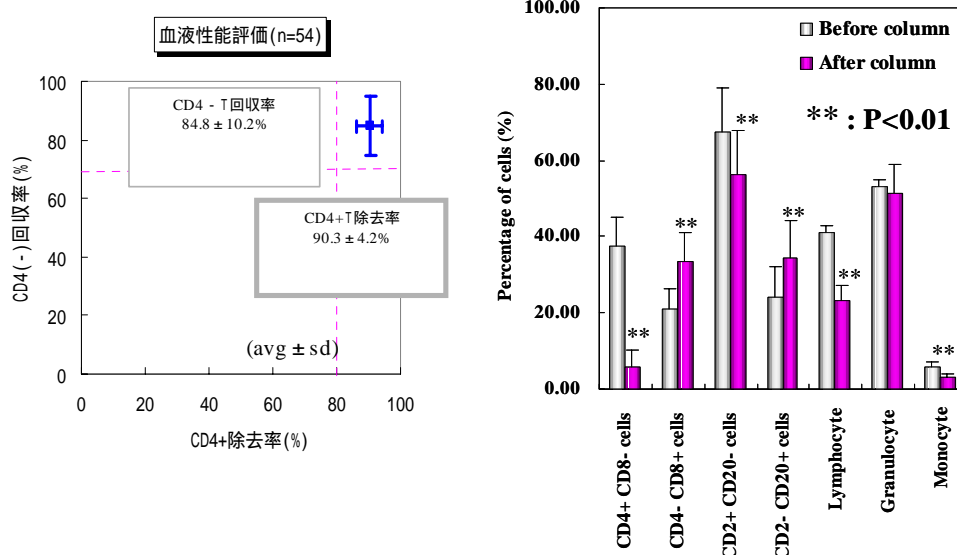


Fig.19 Result of Mini scale tests for CD4+TCells removal columns.
CD4+/CD4-TCells removal rate (left), Change of Cells population (right)

また、Fig.19の右図は、夫々の細胞について、カラム通過前後の細胞分率を示した。T細胞(CD2 + CD20-)は、CD4+T細胞の除去に伴う有意な減少が認められた。これに対して、B細胞(CD2-CD20+)では細胞の割合の減少が認められなかった。この結果より、比較的粘着性の高いB細胞においても、非特異的な吸着は殆ど見られないことがわかった。一方、リンパ球及び単球は、CD4+細胞の除去に伴う有意な減少がカラム通過後で認められた。更に、

最も粘着性の高い顆粒球においても、カラム通過後で殆ど減少は認められなかった。以上より、ミニスケールカラムを用いた血液灌流試験で、その他の白血球の除去はほとんど無く、CD4+T細胞の選択的な除去が可能であった。

更に本結果より、血液間差があっても、CD4+T細胞を平均80%以上の効率で除去できることが分かった。全白血球の除去数は、CD4 + T細胞の除去数、単球及び顆粒球の除去数とほぼ一致することが確認できた。従って、本研究の除去材を用いることにより、体外循環でCD4 + T細胞を選択的に除去できる可能性が示唆された。

2.3.6.4 臨床スケールカラムの血液評価結果

ACD-A、或いはヘパリンを抗凝固剤として用いたヒト新鮮血液を直接灌流し、臨床スケールカラムを用いて血液試験を実施した。結果、フローサイトメーターによるリンパ球サブセット測定より求めたCD4+CD8-細胞除去率は、ACD-Aを抗凝固剤として用いた場合、1200mL或いは1500mLまで、ほぼ100%除去することが可能であった。一方、CD4-CD8+細胞回収率は、初期で非特異的な吸着は認められたが、処理血液量が増すにつれ非特異的な吸着が減少し、平均で約80%の回収率であった。以上より、臨床スケールにカラムサイズを拡大しても選択的にCD4+T細胞が除去できることがわかった。また、抗凝固剤違いに関しては、低分子量ヘパリンで非特異的な吸着が若干多く認められた(Fig.20)。本検討の結果より、臨床

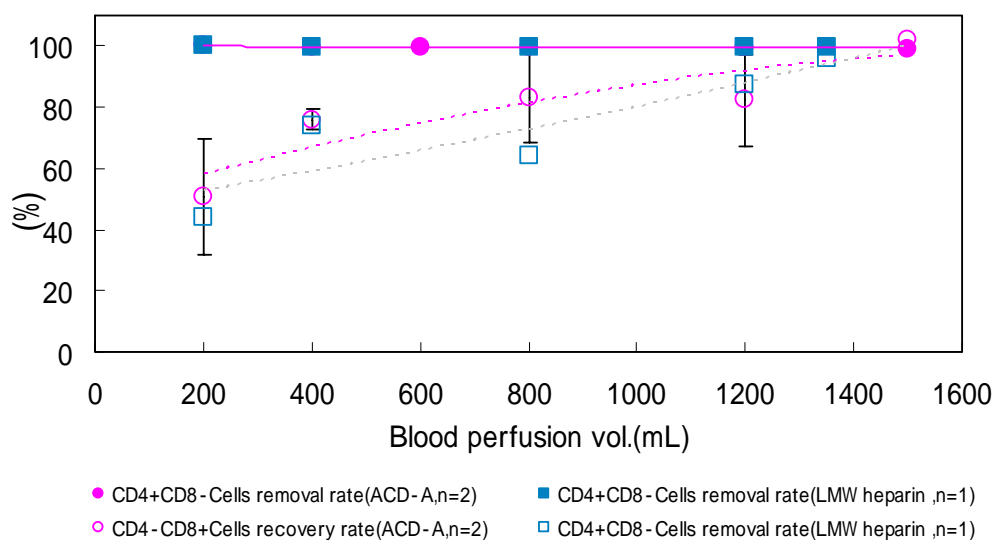


Fig.20 Full-scale removal tests with CD4+cells removal column.

スケールカラムの臨床応用への可能性を確認した。

2.3.7 EAEラット体外循環用カラムの検討

2.3.7.1 ラット体外循環用カラムの調製と試験方法

抗ヒトCD4モノクローナル抗体に代えて、抗ラットCD4抗体を固定したラット用の除去材を作成した。この除去材10枚をミニスケールカラムに充填し、EAEラット体外循環用カラムを設計した。この設計に際し、ラット体重を200gと仮定し、このときの血液量が約15mL程度であることより、除去材の量を決定した。

2.3.7.2 ラット末梢血での*in vitro*評価結果

上記仕様のカラムを用い、ラット新鮮血液より*in vitro*でCD4 + 細胞が除去可能か検討した。結果、約10mL処理時でも、約80%のCD4 + 細胞除去が可能であった。また、目標の15m処理後に於いても約60%除去でき、平均で約80%の除去率を達成できた。カラム処理前後のフローサイトメーターによるリンパ球サブセットをFig.21に示す。CD4 + 細胞分画がカラム前の約50%より、処理後に1%に減少しており、CD4 + 細胞の選択的な除去を確認した。これより、ラット血液においても、抗体を変える事でヒトの血液と同様に選択的な除去ができることを確認した。

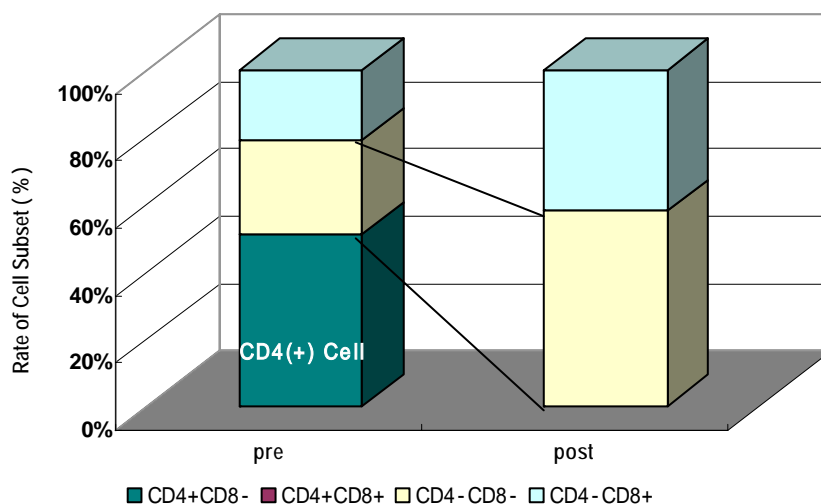


Fig.21 Rat CD4+Cells Removal Test. (*in vitro*).

Blood: rat whole blood (ACD-A), 5ml, Flow rate: 1ml/min

2.3.7.3 ラットでの体外循環試験と有用性検討結果

中根らは、実験的自己免疫性脳脊髄炎 (experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)多発性硬化症の動物モデルラット(以下EAE ラットと略す)に対して、本研究のラット体外循環用カラムで、体外循環によるCD4+細胞除去による治療を実施した[27](Fig.22)。コントロール群には、抗体の代わりに牛血清アルブミン(以下、BSAと略

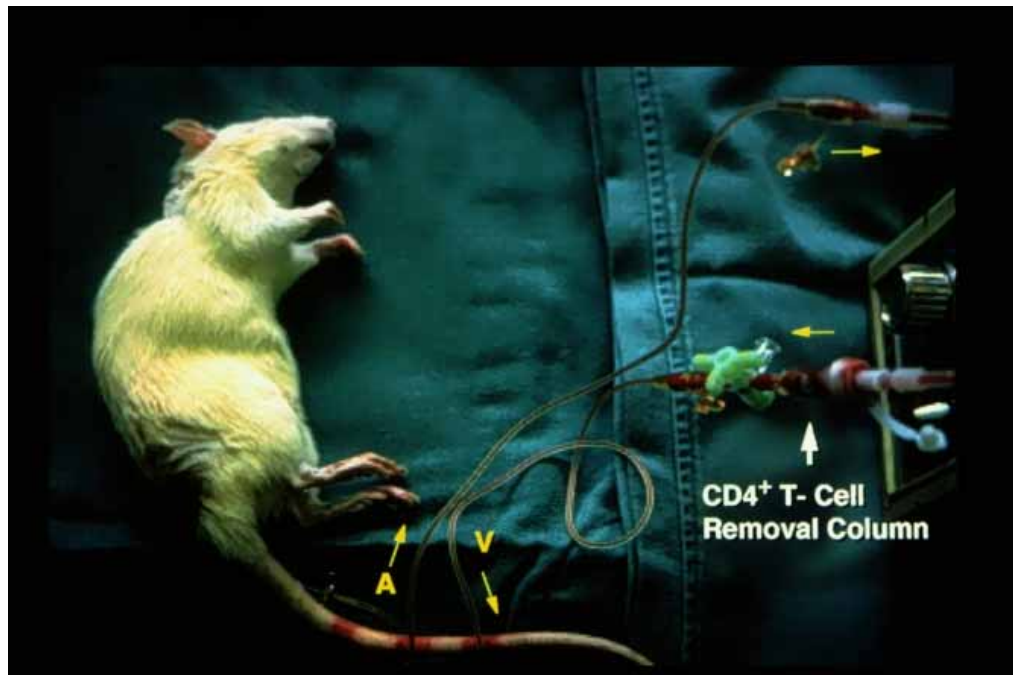


Fig.22 Extracorporeal treatment for EAE rat.

Blood flow rate:1mL/min, Treated blood vol.:15mL (LMW-heparin)

す)を固定したカラムを用いて、同様の体外循環による治療を実施し比較を実施した。各群4頭について治療を実施し、体外循環の条件は、流速1mL/min、抗凝固剤に低分子量ヘパリンをワンショットで尾静脈より投与後、トータル15mLの血液を処理した。治療後から22日後まで、観察を行いIMSの臨床スコアで評価を行った。

結果を図に示す (Fig.23)。 図では横軸に治療後日数、縦軸にMSの臨床スコアを示している。結果、治療後5,7,8日目にCD4(+)除去群でBSA固定のコントロール群に対し、有意に重症度の低下が認められた。

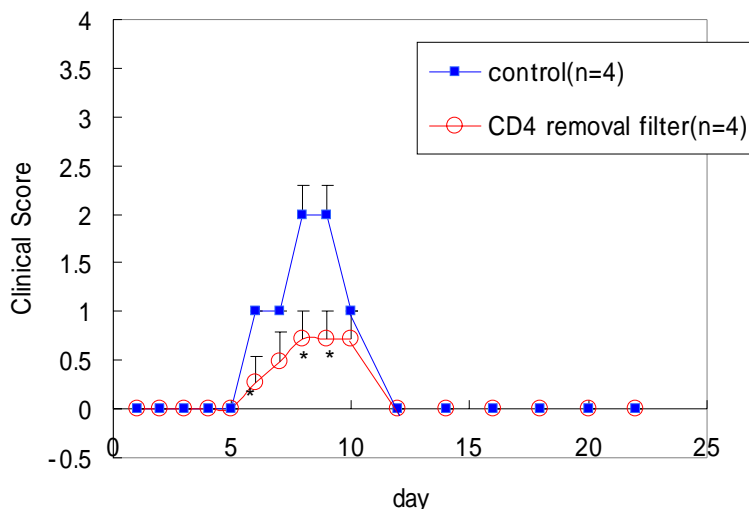


Fig.23 Effect of cytopheresis with CD4 removal column on adaptive transfer EAE. Cytopheresis on the day of transfer of Line 1 marginally suppresses clinical signs of EAE. Mean \pm Std of four rats per group are plotted.

2.3.8 特異的細胞除去カラム開発の結論

CD4選択除去治療器を開発し、ヒト及び疾患モデルラットでのカラム性能の評価を実施した。いずれの系に於いても選択的にCD4細胞を除去できることを実証した。これより、リガンドに抗体を用いた細胞選択除去の可能性が確認された。本研究のカラムは、従来課題であった細胞の選択的な除去による治療効果の向上への足がかりを築くことができると考えられる。

本研究では、ヒト新鮮血液での全血直接灌流による再現性検討により、血液間差があっても、CD4+T細胞のみを平均80%以上の効率で除去できること、同時にCD8+T細胞の非特異的な吸着はほとんどなく、非特異的に吸着する細胞は、単球或いは顆粒球であることが分かった。全白血球の除去率から、CD4+T細胞の除去率を考慮すると、残りの除去白血球数は単球或いは顆粒球の除去数とほぼ一致することがわかった。本カラムを用いることで、体外循環でCD4+T細胞を選択的に除去できると考えられる。一方、ラット用の体外循環用カラムを用いて、MS疾患モデルでの治療効果について検討し、選択的な除去を行わない群に比べ、優位に治療群で重症度の改善が認められたことは、選択的除去の有用性を確認でき、臨床応用での治療効果の可能性を明らかにすることができた。本カラムのように生体由来材料をリガンドに用いることは、安全性の面で実用化に向けてクリアすべき課題は多いと考えられる。また、今回開発したカラムにおいては、カラム内を均一に流れ、リガンドと血液

を同頻度で接触させることで、カラム内のリガンドを有効に使用できると考えられる。そこで、今後はこのようなカラムにおいても流れ性を評価する必要があると考えられる。

2.4 結論

本章においては、白血球除去カラムの改良開発及び特異的細胞除去カラムの開発について検討し、二種類の白血球除去デバイスを提案した。

1) 白血球除去カラムの改良開発では、当初課題となっていた以下の2点をについて検討した。

表面の陰性荷電量を30 μ eq/g以下にコントロールし、抗凝固剤メシル酸ナファモスタット下で、BKNの産生によるアナフィラキシ様症状の発生を抑制でき、安全に施行できることを確認した。これにより、白血球除去カラムの安全性を高めることができ、臨床にてその有用性が確認することができた。

凝固しやすい血液性状の解析により、血球成分及び血漿中の凝固因子の一部がカラム圧上昇に影響を与えることを明らかにした。この対策として、プレフィルタをカラム上流側に配置し、顆粒球或いはフィブリノーゲンによる凝固物質を事前に除去することができ、結果としてメインフィルタの負担を軽減し、カラム圧上昇頻度を抑制することができた。

以上の白血球除去カラムの改良品は、潰瘍性大腸炎或いは薬物抵抗性の関節リウマチへの臨床試験が行われ、臨床にて有効性と安全性が確認され日本国内で健康保険適用となりこれまで4,000例以上の治療に用いられている。この治療においては、BKN濃度上昇による副作用は報告されておらず、本研究の白血球除去フィルタの開発が大きく貢献していると考えられる。

2) 白血球除去カラムの根本的課題解決の1つであり、特に自己免疫性の神経疾患をターゲットに特異的細胞除去カラムの開発を行い、臨床応用可能なレベルのカラム及び動物モデルでの治療効果の確認を実施した。

臨床応用可能な1.5Lの全血液を処理できる特異的細胞除去カラムを、モノクローナル抗体をポリプロピレン不織布表面に固定した濾材を用いることで開発し、健常人の血液を用いた血液で、選択的にCD4(+)細胞が除去できることを確認した。

更に多発性硬化症の動物モデルを用い、本研究の特異的細胞除去カラムでの体外循環での治療効果を検討し、コントロール群に比べ有意な重症度スコアの改善を確認した。

本技術は、今後実用化に向け更なる安全性の確立が必要と考えられるが、今後の自己免疫性の神経疾患の治療への可能性が示唆された。

現在、これら白血球除去デバイスの更なる改良課題として、カラム内のフィルタの効率的利用によるカラム容量の小型化があげられる。しかしながら、これまでカラム内の血液の流れについて、評価技術がなく、カラム内で如何に血液が流れているかについて十分な知見がないのが現状である。本研究では、次章において、白血球デバイス内の流れを非破壊で評価する技術及びシステムについて検討を実施した。

第3章 白血球除去デバイスの三次元流量解析技術の開発

3.1 はじめに

白血球除去デバイスは、第2章で論じた通り、その機能と目的に応じて、多様な容器形状が用いられ、且つ様々なフィルタの充填方法を用いて開発されている。これら白血球除去デバイスにおいては、デバイスの白血球除去性能を高め、小型化する目的で充填されるフィルタの効率的な利用を目指した開発が行われている。即ち、デバイス内の血液の流れを均一にし、フィルタを効率的に利用するための技術が検討されている。このような観点から、これまで、白血球除去デバイス内の血液の流れを解析する技術の検討が行われてきた。例えば、特異的細胞除去カラムのような平板型のカラムの場合、カラム背面から血液の滲出状態を見ることにより、血液の流れを解析できる。このカラムでは、フィルタの厚みが薄く、且つ出口側までの流路が短いことより、厚み方向の流れをあまり考慮する必要が無いため、このような手法が有効に用いられている。よってこのような平板状カラムでは外観より血液の流れを定性的に推定しやすいため、これまでも比較的容易にカラム内の容器形状や充填方法の改良が行われてきた。



Fig. 24 Structure of leukocyte removal column.

Blood goes into the column from inlet, and goes out for outlet.

一方、カラム内の流れ評価については、Heese ら[8]が、均一方向に流れる透析器あるいは心臓外科用フィルタの三次元的な流速を、核磁気共鳴映像法(Magnetic Resonance Imaging, 以下MRI)を用いて測定する技術を開発し、報告している。彼らの用いたカラムでは、血液流速が200～400mL/minと速く、カラム内の流れが層流に近いため、定量化が可能であった。しかし、白血球除去カラムのように、流速が遅く、拡散等の影響も受けやすいカラムでは十分な検討がなされていない。また、同様に超音波ドップラー装置[9]を用いた場合でも、透析器の中空系フィルタ内部は、層流であるため検出できるが、透析器ヘッダの中空系界面部の特定小領域では、乱流が多く流速の定量的測定は難しい状況であった。

これに対し、白血球除去カラムのように円筒形状をしているデバイスでは、流れを外観からの観察で推定することが困難であった。従って、これら白血球除去デバイスにおいては、カラム内の流れを定量化することが難しく、従来、計算機シミュレーション等の方法を用いて推定するのが一般的であった。特に第2章で開発した円筒型の白血球除去カラム(Fig.24)においては、カラム外周部に目の粗いプレフィルタと、内周部に目の細かいメインフィルタを2層に有するため、フィルタの充填状態複雑となっており、流れを解析することが特に困難であった。また、この白血球除去カラム内容量は180mLと大きく、患者から脱血できる血流が30～50mL/minと遅いため、カラム内で不均一な流れが生じる可能性があるとして推定されていた。ところが、流れを評価できる技術がなかったため、白血球除去カラムの設計を改良した後に、その妥当性を検証することが困難であった。

以上のように、これまで血液容量が大きいカラムに、遅い流速で血液が流入し、且つ拡散等の影響を受けやすいデバイス内の流れを定量化する有効な技術がなかった。

以上のような背景のもと、本章においては、以下を目的に検討を行った。即ち、

白血球除去デバイスの流れを三次元で可視化及び定量化する三次元流量解析システムの開発を目的に検討を行った。

本研究は、非破壊で外観からは観察できないカラム内の流れを可視化し、更に得られた画像からカラム内の流量を三次元でマップ化する技術を開発することを目的に実施した。

本研究の戦略を以下に述べる。

- 1)比較定的に流れが把握できる特異的細胞除去カラムを用いて、造影剤の流れを透過画像で撮像し、得られた画像の画像解析を行い、実像との比較によりカラムの最適な解析手法を検討する。
- 2)従来の流れを評価できなかった円筒型の白血球除去カラムについて、画像をフィルタ

ードバックプロジェクションにて再構成し、三次元での流れを連続的に可視化する技術を開発する。

- 3)得られた連続的な三次元の画像から1)で最適化した流量解析を行い、カラム内の流量を三次元でマップ化する技術を確立し、カラムの三次元流量解析システムを完成する。
- 4)充填されているメインフィルタ及びプレフィルタの通気抵抗を流れ抵抗と設定し、血液を一定粘度の流体と置き、血液粘度と同一の流体を流し、各点での速度と方向を求める計算機シミュレーションを実施し、本方法で得られた微小領域での速度のマップと比較し、シミュレーションの可能性と、今後の課題について検討する。

以上の検討から得られた知見を元に、白血球除去カラムの流量分布を明らかにし、白血球除去カラムの流れの推定を行った。

3.2 白血球除去デバイスの三次元流量解析

3.2.1 白血球除去カラムの三次元流量解析システムの概要

白血球除去カラムの三次元流量解析システムは、立体のカラム内の流れを経時的に非破壊で可視化でき、且つ高分解能で非常に遅い変化を解析することを目標とした。そこで、本システムの計測装置としては、カラム内を透過で直接観察でき、高分解能で、撮像時間が非常に短時間であるという観点より、X線造影装置を選択して用いた。

血液の流れを経時的に検出するため造影剤を用いた。用いた造影剤はフィルタ材料に吸着が少なく、且つフィルタにより捕捉除去されず、X線吸収率の大きいヨウ素を含む非イオン性の造影剤を用いた。これに加えて、得られた画像の造影剤の変化を画像処理により流量として定量化するソフトウェアを開発し、これらを組み合わせて、白血球除去カラムの三次元流量解析システムを構成した。

以下に、本システムの概要を示す。(Fig.25)

白血球除去デバイスの三次元流量解析システムは、主な構成要素として、カラムに血液及び造影剤を送液する送液系、カラムを静止あるいは回転状態で保持する回転装置とカラム内の造影剤濃度を経時的に撮像するX線造影装置とから形成される計測系、得られた画像を解析するために用いるソフトウェアとコンピュータから構成される画像解析系からなる。

送液系は、主に血液回路を扱って送液を行う血液ポンプ及び血液回路より構成される。これに加えて、カラム内の圧力変化をモニタする圧力計、血液及び造影剤液を貯留する血液バッグにより構成される。これらは、20 から25 に制御された室温でのコントロール下で用いた。血液は、使用前に室温で一定時間放置し、定温状態になった採血後2日以内の牛

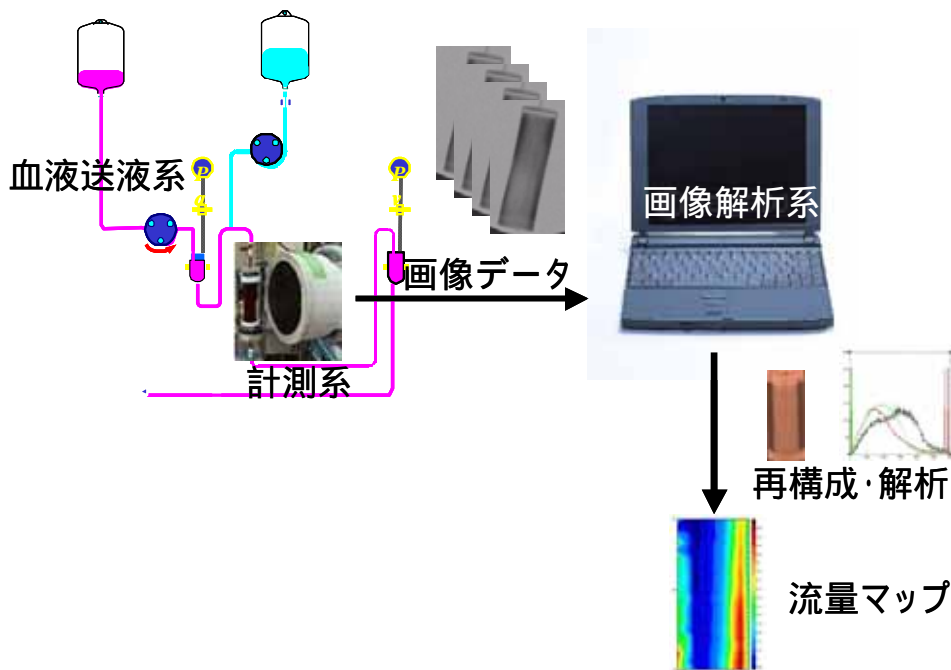


Fig.25 Flow analysis system for Leukocytapheresis columns.

血液 (ACD-Aにより抗凝固) を用いた。

計測系は、X線造影装置として、デジタルモービルCアームシリーズ9800 型式 S-SP (GE-OECメディカルシステムズ社製) を用いた。これに加えて、カラムを水平に固定、或いは円筒状の白血球除去カラムを円周方向に一定速度で回転させる回転装置を新たに設計し用いた。撮像された画像は、X線造影装置よりデジタルビデオ形式、或いはDICOM形式で出力し解析に用いた。

解析系は、OSとしてLinuxを用い、CPUがPentium4を有するコンピュータを用い、解析ソフトウェアはPython (Pyblid) を用いてプログラミングを行い、解析に用いた。

3.2.2 特異的細胞選択除去カラムの二次元解析

本研究のシステムを用いた予備的な検討として、積層型のカラムを、二次元での流量解析を行い、解析手法の検討を実施した。ここで用いた特異的細胞除去カラムの構造は、薄型カラムであり、外観より血液の流れを把握することができる。従って、フィルタ面の流れ状態を出口側面での血液の滲出状態を直接観察でき、流量解析結果と比較することが可能である。そこで、本システムを検証する上で非常に好ましい例と考えられた。以下に詳細に示す。

3.2.2.1 材料と装置の構成

白血球除去カラムは、第2章にて開発した臨床スケールの特異的細胞除去カラムを用いた。本カラムのフィルタ構成は、カラム上流側に平均繊維直径が $10\ \mu\text{m} \sim 40\ \mu\text{m}$ の不織布からなるプレフィルタ、下流側に平均繊維直径が $3.0 \sim 5.0\ \mu\text{m}$ の不織布からなるメインフィルタを積層状に充填した構造 (Fig. 26) をしており、メインフィルタ部に抗CD4+細胞モノクローナル抗体が固定されている。血液はカラム上方ノズルからカラム内に流入し、カラム下方ノズルより流出する構造である。充填されているフィルタの材質は、プレフィルタがポリエチレンテレフタレート、メインフィルタがポリプロピレンである。カラム内の液量のボリュームは、約50 mLであり、血液は通常 $30 \sim 50\ \text{mL/min}$ でポンプにより流される。

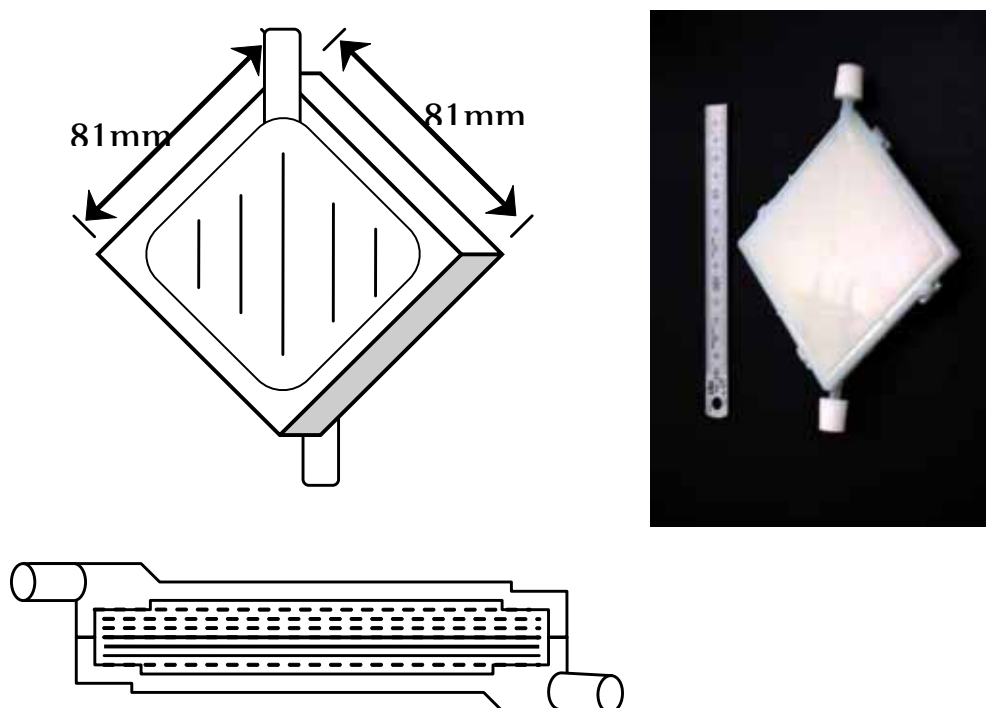


Fig. 26 Structure of CD4+Cells removal column

血液実験には、採血後2日以内の牛血液を用いた。抗凝固剤としてAcid Citrate Dextrose-A(以下ACD-A)液を血液に対して体積比8:1で加え、これを試験用血液(以下血液と略す)とした。

X線造影装置として、デジタルモービルCアームシリーズ9800 型式S-SP(GE-OECメディカルシステムズ社製)を用いた。造影剤はオムニパーク140(第一製薬社製)を用い、血液と体積比1:1で混合し、造影剤液として用いた。

3.2.2.2 実験方法

血液の送液は血液浄化用装置Plasauto-LC(旭化成メディカル社製)を用い、Fig.27に示したフロー図に従い血液を流した。特異的細胞除去カラムは、生理食塩液500 mLを流速100 mL/minで流し、充填液より生理食塩液に置換した後、生理食塩液を50 mL/minで5分間流し平衡状態とした。カラムを固定した状態で、送液を生理食塩液から造影剤液に切り替え、流速50mL/minで流し実験を開始した。造影剤液を50mL送液した時点で、血液に切り替え実験終了まで一定速度を維持し送液した。撮像は、造影剤液がカラムに入る直前より開始し、造影剤がほとんど流出した時点の約7分間で終了した。撮像時のX線造影装置パラメータは、50 kVp、0.61 mAとし、撮像間隔は4 コマ/s で撮像した。この実験は同条件で3回実施した。

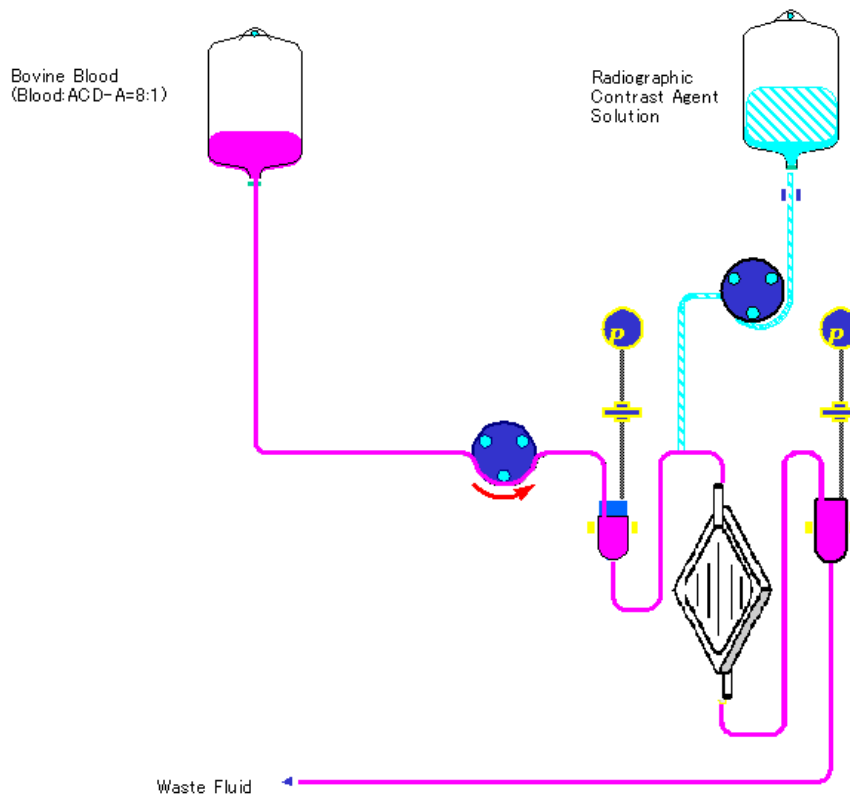


Fig.27 Flow Circuit of blood for CD4+Cells removal column. Flow rate of bovine blood: 50mL/min. Contrast Agent solution, bovine blood added Omipak140(50%,v/v), flow rate:50 mL / min, flow volume :50mL.

3.2.2.3 画像解析方法

撮像された連続的な画像から、各ピクセルでの造影剤濃度 (X線強度が最小となる) が最大になるまでの時間 (最大濃度到達時間: T_{max}) を画像解析により求めた。この値の逆数を各ピクセルで最大濃度到達速度 V_{xy} とした (式(7))。

$$\text{最大濃度到達速度 } V_{xy} \text{ (/sec)} = 1/T_{max} \text{ at } (x,y) \quad \text{式(7)}$$

更に、同画像より、濃度積算強度を、 $T=40(\text{sec})$ から $T=300(\text{sec})$ までの各ピクセルでの ROI における値 r の積算値として求めた。濃度積算強度と最大濃度到達速度より、式(8)により、各ピクセルでのカラム内流量 F_{xy} を求めた。ここで求めた流量を二次元カラム内流量と以後定義した。

$$\text{二次元カラム内流量 } F_{XY} \text{ (/sec)} = 1/T_{max} \sum_{n=40}^{300} r_n \quad \text{at } (x,y) \quad \text{式(8)}$$

3.2.2.4 二次元画像解析結果 -特異的細胞選択除去カラム評価 -

式(7)により求めた最大濃度到達速度をマップ化した結果を Fig. 28 に示す。Fig. 28 では、最大濃度到達速度を等高線状に示している。流れ解析の結果、中央上部に最大濃度到達速度が遅い領域が見られた。この領域を除く中央分のフィルタ部ではほとんど同じ最大濃度到達速度であった。これに対し、フィルタ外周部付近で、急激に最大濃度到達速度が大きい結果となった。外周部の最大濃度到達速度はフィルタ中央部の2倍以上の速度であった。

一方、外観より観察できるカラム出口側面での血液の滲出状況は、フィルタ中央部で速度に差が認められることがカラムの外観からの観察で既に明らかになっている。特に、フィルタ中央部分はその部位により滲出速度に差が認められ、カラムの上部及び下部で若干滲出が遅い傾向が認められていた。

以上より、最大濃度到達速度により求めた流量マップでは、流れの傾向を示していると考えられたが、フィルタ内部の詳細な流れを反映できていない可能性があった。そこで、実際のカラムの流れを更に詳細に評価するため、二次元カラム内流量による画像解析を実施した。

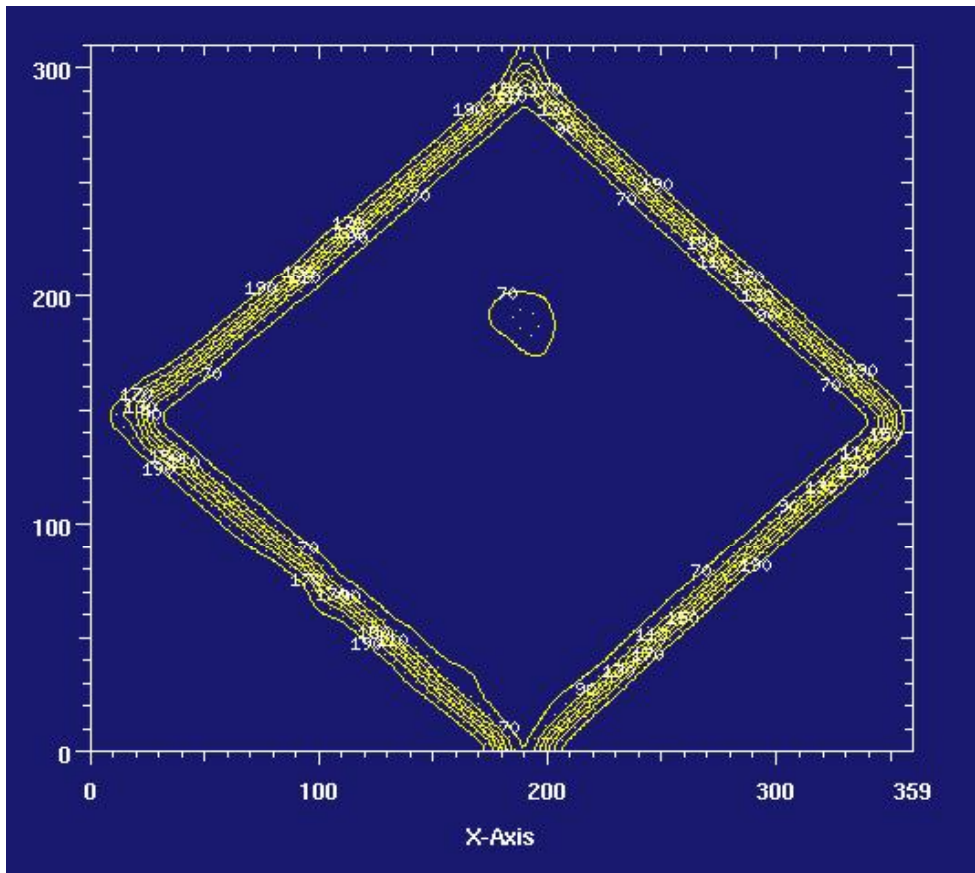


Fig.28 Maximum concentration time of CD4+removal column.

式(8)により求めたカラム内流量をマップ化した結果をFig.29に示す。 Fig.29では、二次元カラム内流量を等高線状に示している。二次元カラム内流量解析より、フィルタ中央部に比べ、外周部で二次元カラム内流量が大きい結果となり、最大濃度到達速度と同様の傾向が認められた。一方、フィルタ中央部分では二次元カラム内流量が遅く、中央分内にも二次元カラム内流量に差が認められることが確認された。本結果より、カラムの上下部分でフィルタ内部においても若干カラム内流量が低い部分が認められ、この傾向は外観から観察される血液滲出とほぼ同様の傾向が見られ、二次元カラム内流量マップが実際の血液の流れをより詳細に評価できることがわかった。

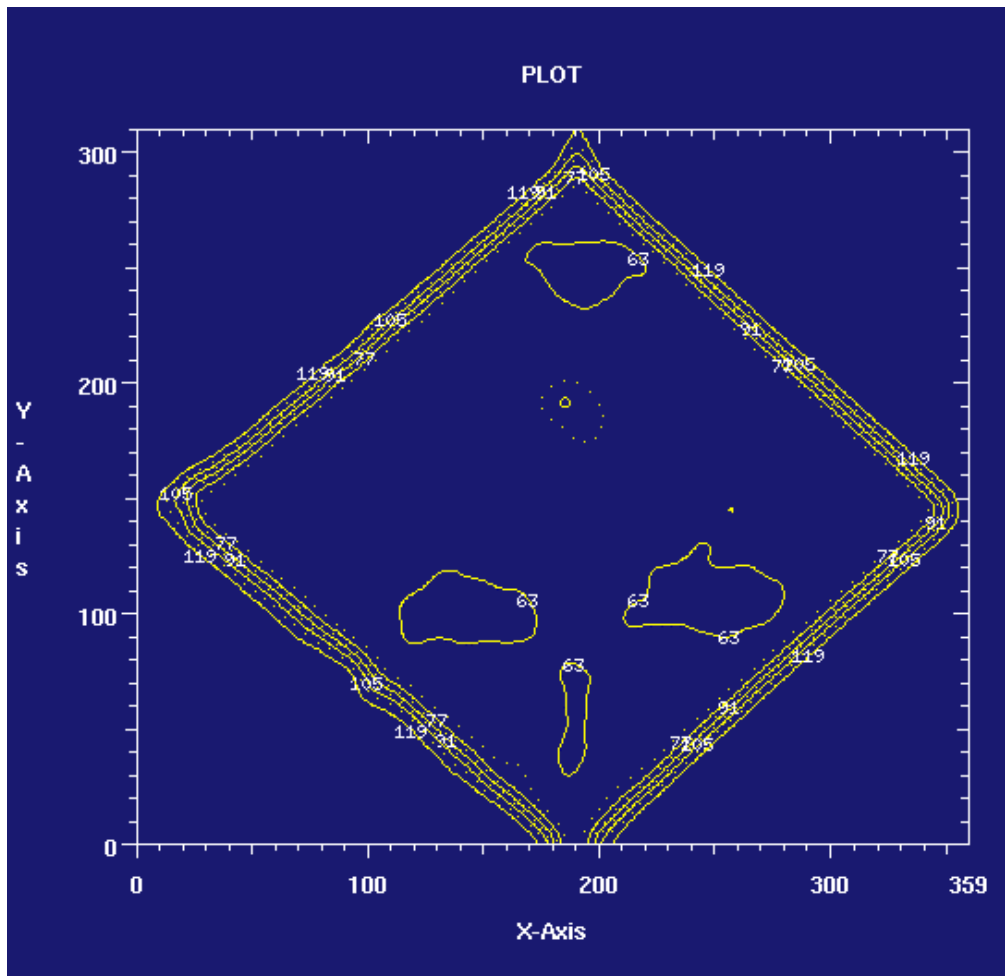


Fig. 29 Flow rate in column map of CD4+ removal column.

Flow speed: $\times 10^{-4}$ (/sec) Max: 119×10^{-4} (/sec), Min: 63×10^{-4} (/sec)

3.2.3 特異的細胞除去カラムの二次元流量解析に関する結論及び考察

平板型の特異的細胞除去カラムを用い、連続的に透過画像を撮像し、二次元での最大濃度到達速度解析及び二次元カラム内流量解析を実施し、カラム内の流れ分布を2種類の方法で、二次元でマップ化することができた。これら2種類の解析法を比較すると、カラム内流量解析がより高分解能に詳細な部分まで解析できることが外観からの観察結果と比較することで明確になった。

また、これら解析法毎に特異的細胞除去カラムの流れ特徴を示すと、最大濃度到達時間法は、カラム外周部で流量が大きく、フィルタ中央部で流量が小さい傾向を示し、カラム内の流れの分布を大まかに捉えることは可能であった。また、カラム内に空間があるフィルタ外周

部で最大濃度到達時間が最大化することより、より抵抗の少ない部分への血液の流れを顕著に反映していると考えられた。但し、フィルタ内部の詳細な速度の分布については、中心部の一部で若干遅い部位を検出できるのみで、中心部のその他領域ではほぼ均一の速度となり、造影剤濃度が最大となる時間をパラメータとするのみでは、検出感度が低い可能性があると考えられた。特に、本法はフィルタ内の微妙な速度の違いより、抵抗の少ない流れやすい部位の検出に適していると考えられる。

これに対し、実際に流れた血液量をパラメータとして加えた二次元カラム内流量解析では、従来行われてきた目視によるカラム背面での血液の滲出を観察した場合の流れと近い流量分布であり、外観からの観察による結果を再現できていると考えられる。これは、実際に流れている血液総量を考慮することで流量の少ないフィルタ部分においても、流量の違いをより高分解能で検出できるためであると考えられた。この結果から、特異的細胞除去カラムでは周辺部から最も距離があり、且つカラム下部で最も流れが遅い傾向を示していることを定量的に実証できた。

二次元流量解析は、カラムを固定し撮像した透過画像を直接解析に用いることができるため非常に簡便であり、カラムの厚みが薄型で、厚み方向への流れをあまり考慮する必要がないカラムの流量を二次元で計測するのに適していると考えられる。

本流量解析の結果より、特異的細胞除去カラムは、フィルタ内について、ほぼ均一に血液が流れており、フィルタ外周部への負担が大きい可能性が示唆された。このような形状のカラムにおいては、外周部の負担を如何に減らし、或いは外周部での漏れを如何に制御するかが、カラムを開発する上での重要な課題と考えられた。

一方、二次元流量解析は積層型の薄型のカラムには有効である反面、厚み方向に変化があり、且つ複雑な形状である円筒型の白血球除去カラムに於いては、カラム内流量を計測することとは困難であると考えられた。そこで、本法の二次元カラム流量解析技術を更に改良する必要があると考えられた。次に、白血球除去カラムの三次元カラム内流量解析技術について述べる。

3.3 白血球除去カラムの三次元流量解析

3.3.1. 白血球除去カラム三次元流量解析の目的

3.2章で論じた平板型カラムとは異なり、白血球除去カラムのような円筒状のカラムについて、二次元的な解析では不十分と考えられた。そこで、円筒状カラム内での血液の流れの可視化と定量化を目的に、高分解能で短時間に連続的な撮像が可能なX線造影装置を用い

て、白血球除去カラム内の流量をマッピングする技術について検討した。

本研究では、従来困難であったカラム内流量の三次元分布に対し、X線造影装置を用いて直接可視化できるシステム及びカラム内流量を解析し、マップ化するシステムを開発することを目的に検討した。更に、本システムの結果と従来の計算機シミュレーションによる結果とを比較して、シミュレーションの限界を明らかにし、本システムの有用性を検討した。

3.3.2 材料と装置の構成

評価に用いたカラムは、第2章で改良開発した白血球除去カラム(吸着型血液浄化器“セルソーバE”(旭化成メディカル社製))を用いた(Fig.24)。

血液実験には、採血後2日以内の牛血液と、抗凝固剤としてACD-A液を血液に対して体積比8:1で加えたものを、これを試験用血液(以下血液と略す)とした。

X線造影装置として、デジタルモービルCアームシリーズ9800 型式S-SP(GE-OECメディカルシステムズ社製)を用いた。造影剤はオムニパーク140(第一製薬社製)を用い、血液と体積比1:1で混合し、造影剤液として用いた。

撮像中にカラムを反時計周りに連続的に回転させる回転装置を設計し開発した(Fig. 30)。カラムは、水準器にて水平となるように専用架台に固定され、これに接続したステップモ



Fig. 30 Rotating table and a column setting. Rotation speed: 3 rot. / min

ータにより一定速度で回転した。本回転装置はカラムと血液回路の接続部に、メカニカルシールを配し、回路のねじれを回避できる設計とした。

3.3.3 実験

血液の送液系は、体外循環用装置Plasauto-LC(旭化成メディカル社製)と装置専用回路を改良して用いた。血液及び造影剤液は、Fig.31に示したフロー図に従い流した。

白血球除去カラムは、生理食塩液500mLを、流速100mL/minで流し、充填液より生理食塩液に置換した後、生理食塩液を50mL/minで7分間流し平衡状態とした。白血球除去カラムは回転装置を用い、カラム円筒の中心を軸として、20秒間に1回転させた。送液を生理食塩液から造影剤液に切り替え、流速50mL/minで流し実験を開始した。造影剤液を50mL送液した時点で血液に切り替え実験終了まで一定速度を維持し送液した。撮像は、造影剤液がカラムに入る直前より開始し、造影剤がほとんど流出した時点の約10分間で終了した。この実験は同条件で3回実施した。更に、経時的な流量の変化を確認する場合、試験後の同じ白血球除去カラムに、8分間送液を続け、再度平衡状態とした後、上記同様の試験を繰り返した。撮像時のX線造影装置パラメータは、50kVp、0.61mAとし、撮像間隔は4コマ/sで撮像した。

また、第2章で検討したカラム内圧力上昇時の流れを観察する目的で、実験前の血液に塩化カルシウムをACD-Aと等量以上添加し、抗凝固剤を失活させ、凝固を促進した血液を37℃に加温した後、カラムを固定した状態で同様の条件で送液を開始し、撮像した。

3.3.4 画像解析

撮像された投影画像は、DICOM形式でコンピュータに取り込み、カラム1回転毎に連続した4.5°毎の80コマずつにまとめ、これらの投影画像を二次元フィルタードバックプロジェクション法[29]で再構成[30]することで三次元像を得た。この三次元画像をまとめることで20秒毎の連続した画像とした。この際に、カラムが1回転する間は、造影剤分布は変化しないと仮定した。これらの一連の画像より、ボクセル毎の微小領域における造影剤濃度の変化を観察し、カラム内流量を以下に述べる方法で定量した。

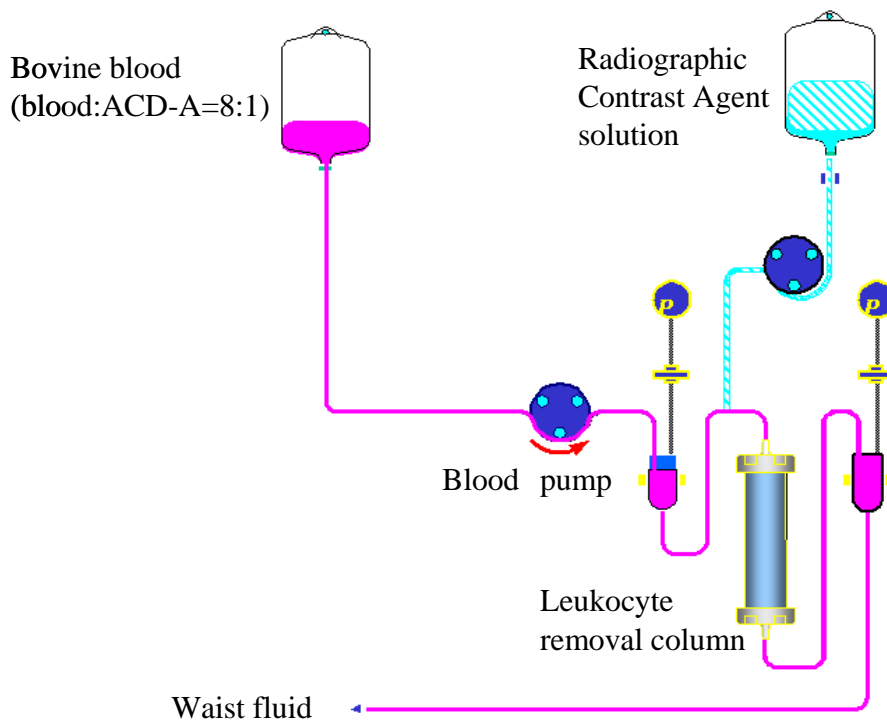


Fig. 31 Flow circuit of blood.

撮像された画像から、各ボクセルで造影剤濃度（X線強度が最小となる）が最大になるまでの時間（カラム流量最大濃度到達時間： T_{max} ）を求めた。続いて、濃度積算値 S_{xyz} を、 $t=0(\text{sec})$ から $t=400(\text{sec})$ までの各ボクセルにおけるCT値 r_t の積算値とし、以下の式より求めた。

$$S_{xyz} = \sum_{t=0}^{400} r_t \quad \text{at } (x,y,z) \quad \text{式(9)}$$

T_{max} と S_{xyz} を用いて、式(10)により各ボクセル (x,y,z) におけるカラム内流量 F_{xyz} を求め、三次元カラム内流量として定義した。

$$F_{xyz} (/sec) = \frac{S_{xyz}}{T_{max}} \quad \text{at } (x,y,z) \quad \text{式(10)}$$

3.3.5 計算機シミュレーション

上記カラム形状を模擬し、カラム内流れのシミュレーションを行った。シミュレーションは汎用熱流体解析プログラムSTAR-CD (CD-adapco社製,USA)を用いて解析を行った。

3.3.5.1 計算機シミュレーションモデル

計算機シミュレーション(以下シミュレーションと略す)に利用したモデルのジオメトリを Fig.32に示す。このモデルは内部に異なる抵抗値を有する二つの円筒型メッシュ領域を有する円筒容器からなる様に設計した。実験で用いたカラム同様、円筒容器の内径は40mm、Z軸長を150mmとした。それぞれの円筒型メッシュの外径は38mmおよび28mmであり、ふたつの円筒型メッシュは直接接触した。内側の円筒型メッシュの内部に直径18mmの、外側の円筒型メッシュの外部には1mm厚の自由に流れる領域を想定した。溶液の入口を上部の中心とし、出口を下部の中心に設定した。

数値計算では、Fig. 32に示すように、円筒状の格子モデルを円周方向に一部切り出し用いた。メッシュ数を等間隔で5675点に設定し、支配方程式であるNavier-Stokes 方程式を有限体積法により離散化し、ソフトウェアの設定としてSIMPLE 法を用いてシミュレーションを行った。このときの乱流モデルには、高レイノルズ数型のモデルを使用し、モデルの境界条件は、容器壁面には速度をゼロとするno-slipを、またr,z面には両面の境界上で計算されるすべてのスカラ量が等しいものと設定した周期境界条件を設定した。

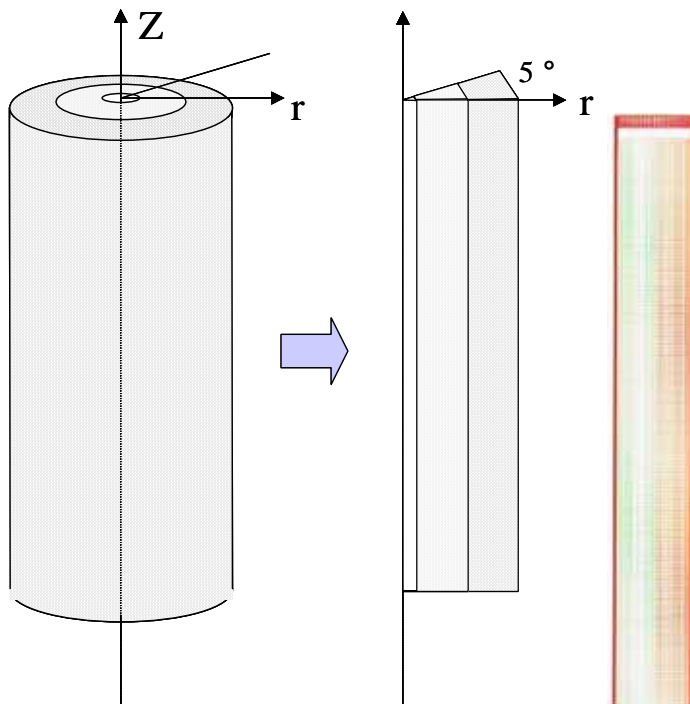


Fig. 32 Simulation model for the column.

Cylindrical lattice model (left), Simulation lattice model (right)

3.3.5.2 パラメータの設定

シミュレーションのパラメータとして、血液条件及びフィルタの通気抵抗をそれぞれ設定した。血液条件として、カラム入口の流入速度および流出速度を50 mL/s とし、血液の粘度を10 cp、密度を1030 kg/m³ と設定した。フィルタの通気抵抗は、通気抵抗測定器(大栄科学精器製作所製)により求めた実測値を用い、メインフィルタの通気抵抗係数1.5kPa・S/mを内側の円筒メッシュ部の抵抗値とし、またプレフィルタの通気抵抗0.35kPa・S/mを外側の円筒メッシュ部の抵抗値として用いた。

3.3.6 白血球除去カラムの三次元流量の解析結果

3.3.6.1 画像解析結果

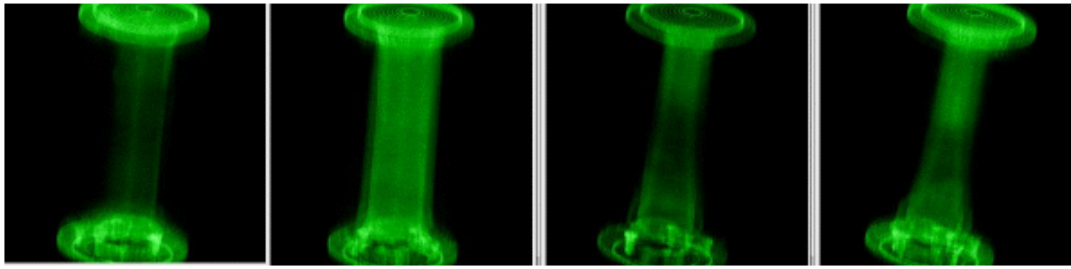
3.3.6.1.1 X線画像の再構成による可視化

三次元再構成結果をFig.33に示す。Fig.33(a)は、1,3.5,6.5,8分時の再構成画像をMIP表示したものである。また、Fig.33(b)は、再構成画像の断面のスライス像を、右上(t=0min)より左下(t=11min)に向けて連続的に示した。血液の白血球除去カラム内での流れを20秒毎の連続的な画像として一度に可視化することが可能となった。

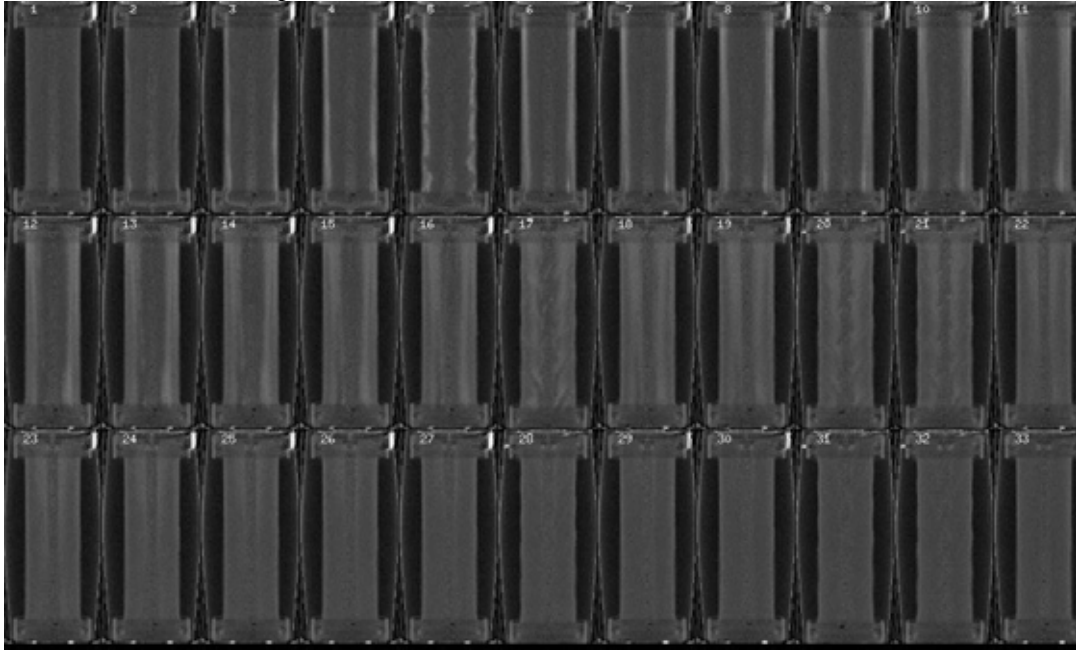
本画像で、血液処理開始時では、造影剤の濃度変化より、カラムのハウジングとフィルタの隙間部分に造影剤が入り、次いで、プレフィルタ部分に造影剤が浸透していく様子が観察された。また、造影剤がプレフィルタ内を、カラム下部に向かって移動し、カラム下部でメインフィルタを最も多く通過する可能性を確認した。

3.3.6.1.2 カラム圧上昇時のカラム内の可視化

カラム内にカルシウムを添加し37℃の加温することで血小板系の凝固を促進した血液を、白血球除去カラムに灌流した。この実験の結果、血液送液開始後37分後にカラムの入口圧と出口圧の差圧が13.3kPa(100mmHg)を越える圧力となった。この際、本システムで撮像を行い、圧上昇直前の画像と比較した(Fig.34)。図34では、撮像開始後60、120、180、240、300、360秒時の画像をそれぞれ示した。各画像の左側が圧上昇前、右側が圧上昇後を示している。造影剤濃度が高い部分を黒色で示した。この画像より、圧上昇直前の画像と比べて、圧力上昇後では、カラム上部及び下部での造影剤の残留が多く見られ、同量の血液を送液した後も残留していることが分かった。即ちこれら部分では血液の流量がほとんどなく、目詰まりが発生していると考えられた。この結果、中心部分の一部のみで流路が確保されるのみとなり、カラム内の圧力が上昇したものと考えられた。



(a):3D reconstruction pictures t=1, 3.5, 6.5, 8 min



(b):Tomographical profile reconstruction pictures from t=0 to t=11

Fig. 33 Reconstruction pictures of blood flow

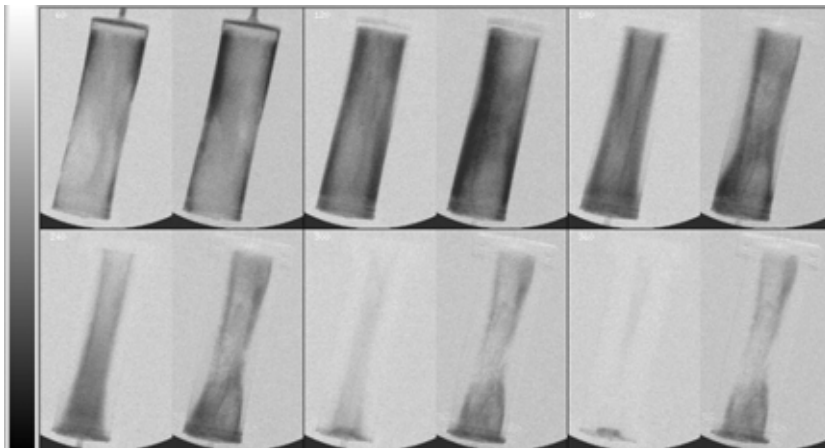


Fig.34 X-ray images between before and after increasing column pressure.
T=60, 120, 180, 240, 300, 360 (sec), Before image(right), After image(left).

更に、フィルタの閉塞部分を明らかにするため、圧上昇後画像から直前の圧上昇前画像を減ずることでカラム圧上昇前後の画像の差分画像を計算により求めた。差分画像の経時変化をFig.35に示す。差分画像より、圧上昇時には、カラム上部及び下部で造影剤濃度が高いことが分かった。特にカラム上部ではメインフィルタ外周部分で、カラム下部では、プレフィルタからメインフィルタにかけて造影剤濃度が高く、血液がほとんど流れていないと推測された。一方、カラム中部の中心部付近での流路が減少してくる現象が、圧上昇として検出されると考えられた。

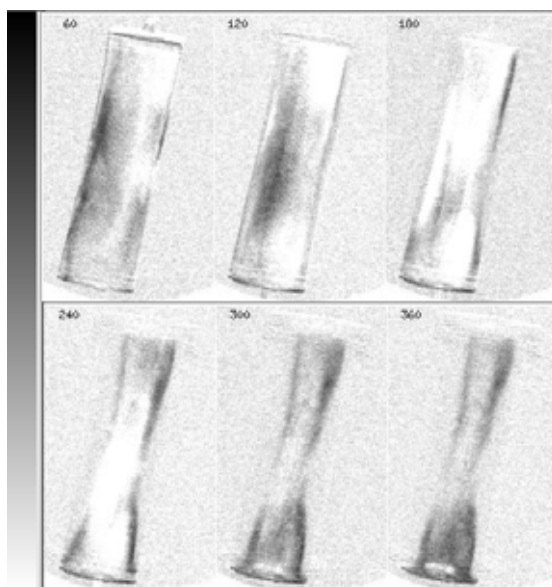


Fig.35 Difference image of the pressure increasing column.
T=60, 120, 180,340,300,360(sec), =after-before.

3.3.6.1.3 三次元カラム内流量分布解析結果

式(10)より求めたカラム内流量分布の一例をFig.36 に示す。図は、白血球除去カラムの中心部より外周部へのカラム内流量をピクセル毎にグラディエーションにより示した。本試験でのカラム内の最大流量は100 (/sec)で濃色にて示し、最低カラム内流量を15.9 (/sec)とし淡色にて表示した。本三次元カラム内流量マップから、外側のプレフィルタ部分が濃色でカラム内流量が大きく、内側のメインフィルタ部ではカラム内流量が小さくなっている可能性が示唆された。メインフィルタのカラム内流量 24 ± 3.4 (/sec) (平均値 \pm STD) はプレフィルタのカラム内流量 90 ± 8.4 (/sec) (平均値 \pm STD) に比べ約3.7倍であることがわかった。プレフィルタ上半分及び下半分のカラム内流量はそれぞれ 71.6 ± 2.0 (/sec) (平均値 \pm STD)、 85.3 ± 2.0 (/sec) (平均値 \pm STD) であった。メインフィルタ部に於いても上半分及び下半

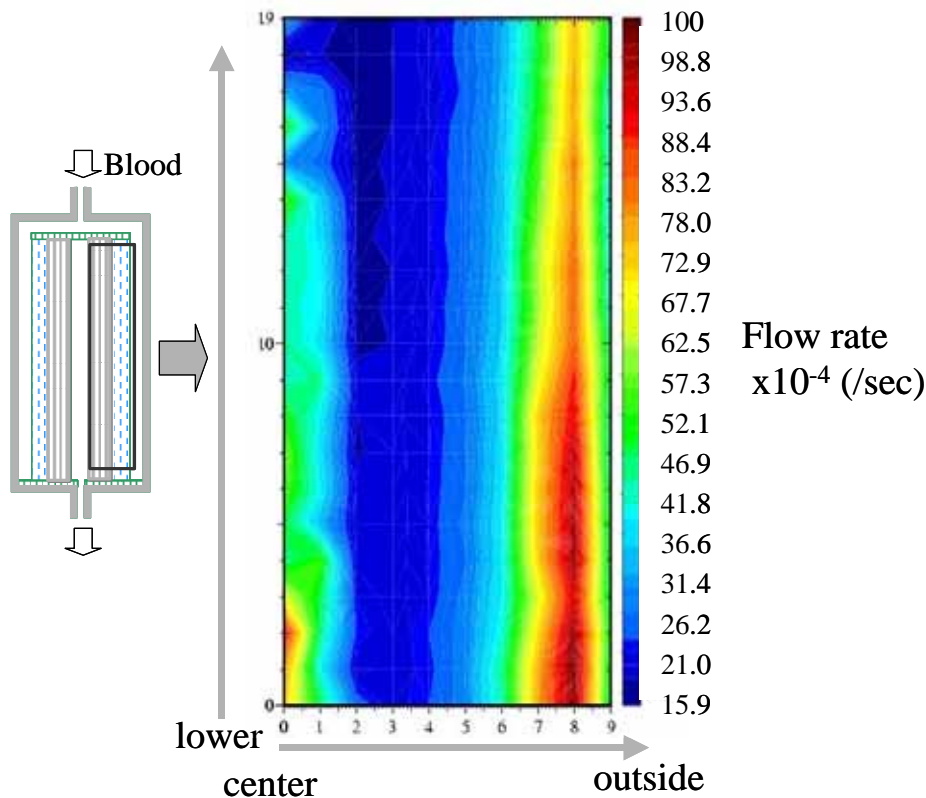


Fig.36 Flow rate of a column. This shows the flow rate of enclosure part.

The flow rate is shown by the gradient. (right figure)

分でそれぞれ 21.7 ± 3.1 (/sec) (平均値 \pm STD)、 26.5 ± 1.9 (/sec) (平均値 \pm STD) であり、両フィルタともに、下半分部のカラム内流量が高いことがわかった。

Fig.37はカラム各部分でのカラム内流量の平均値をプロットした。各部を同心円状に等間隔で10等分し、且つ垂直方向に20等分し、各エリアの平均値を求めた。3回の試験を行い、平均値を図に示した。カラム上部のカラム内流量をFig.37(a)に示す。これより、カラム上部では、外層部で最大 70×10^{-4} (/sec)、内周部で最小約 20×10^{-4} (/sec) と大きなカラム内流量の差が認められた。メインフィルタとの境界付近でカラム内流量が最も小さくなっていることが分かった。カラム中部及びカラム下部のカラム内流量をFig.37(b)及び(c)に示した。これら結果も、カラム上部とほぼ同様の傾向が確認された。更に、カラム垂直方向のカラム内流量平均を、Fig.37(d)に示した。結果、カラム最外層で最も大きいカラム内流量であることが分かった。更にカラム最外層の垂直方向で平均カラム内流量をみると、カラム下部が上部に比べて

段階的にカラム内流量が大きくなっており、この傾向は特にカラム外周部で顕著に認められた。

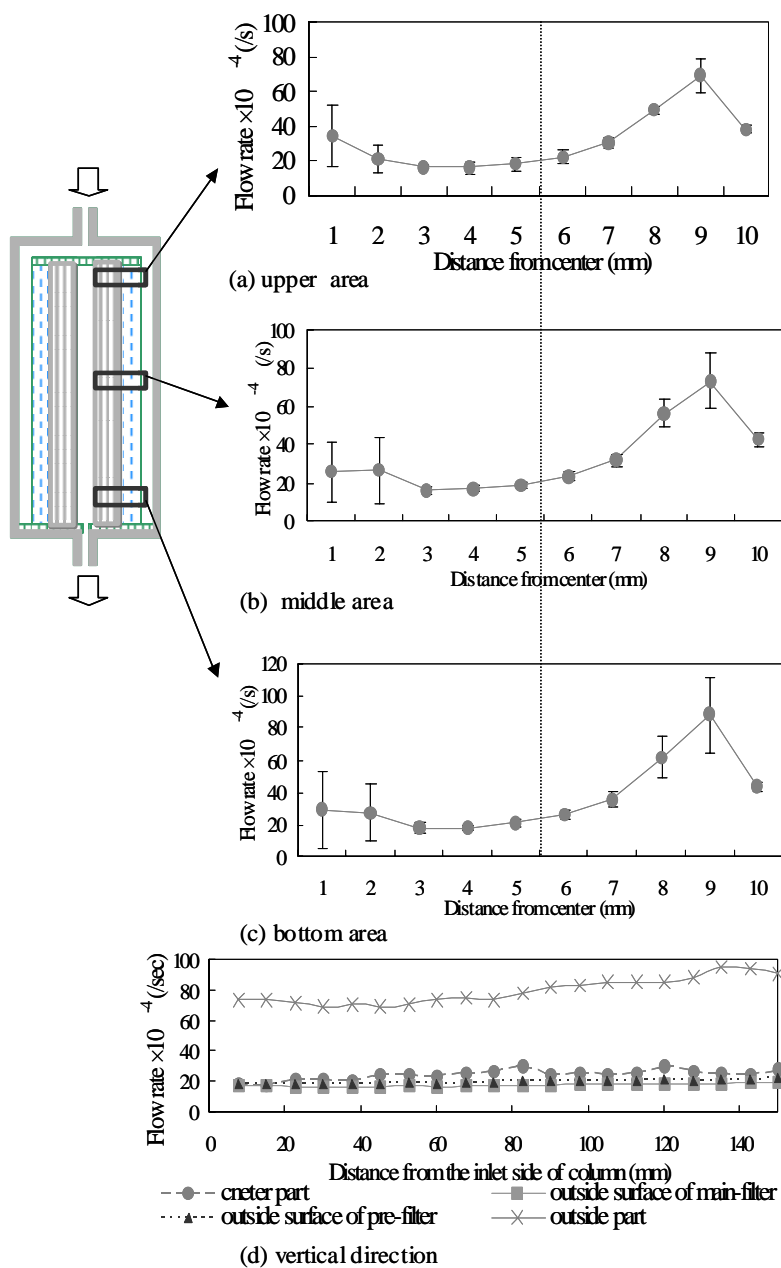


Fig.37 Profile of Average flow rate distributions. (n=3, average \pm STD)
: Interface between pre-filter and main-filter

3.3.6.2 白血球除去による経時的变化の解析結果

白血球除去カラムでは、血液処理が進むにつれ、白血球の除去により、カラム圧上昇の可能性のあることを2章にて述べた。また、送液中の凝固系の活性化によりフィブリン等の血漿成分を吸着することでカラム圧上昇の可能性のあることを示した。従って、血液を処理することで、これら血液成分が吸着することによって、フィルタ内の一部で閉塞が起こり、カラム内の流れが変化することが推測される。そこで本仮説を実証するために、始めに10分間血液を送液し撮像後、カラム内に更に8分間送液を続けた後、再度10分間(送液開始28分後)の撮像を行い、カラム内流量解析を行い、送液開始10分時と28分時のカラム内流量の比較を実施した。結果をFig.38に示す。左側に示した10分時ではカラム入口及びカラム外周部でのカラム内流量が高いに対し、28分時のカラム内流量では、カラム内の分布が均一化されている傾向が認められた。この二つ時間でのカラム内流量について、各点での相関解析を実施したところ、相関係数 $r^2=0.611$ と弱い相関が認められ、流量分布については同傾向であることがわかった。一方、Fig.39に示したように、相関直線より大きく外れた点が認められ、カラ

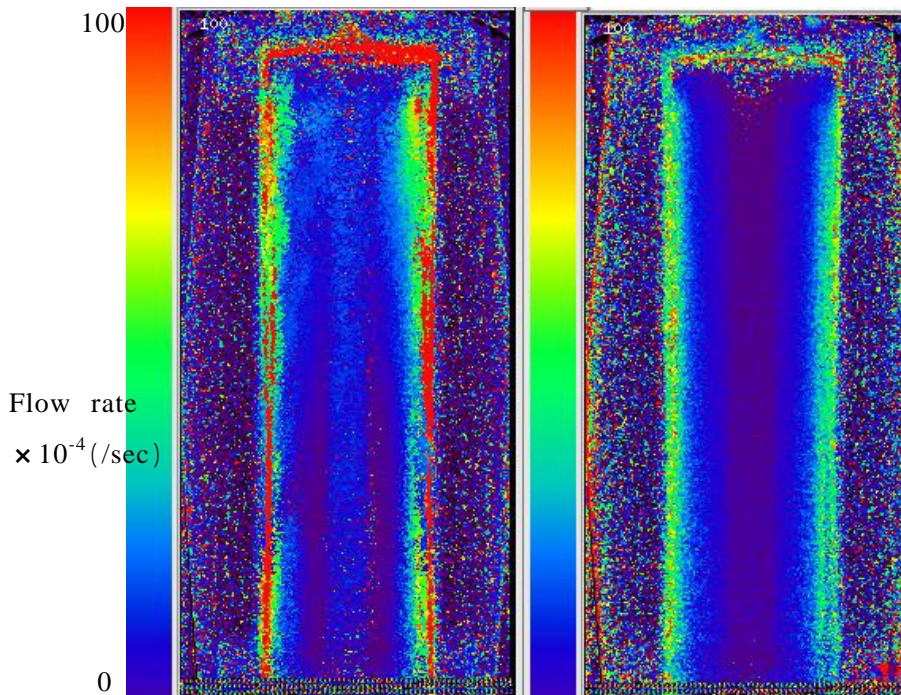


Fig.38 Temporal flow rate change of a column.

10min(left), 28min(right), Max flow rate= 100×10^{-4} (/sec), Min flow rate= 0 (/sec)

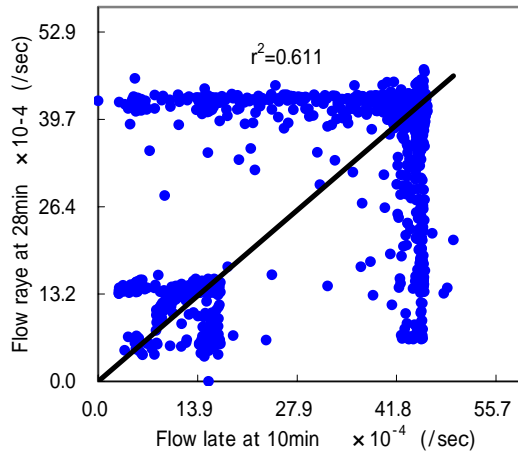


Fig. 39 Correlation coefficient of a column.

ム内の部位で流量が大きく変化していると考えられた。特にプレフィルタ部分のカラム内流量が高いことより、カラム内でプレフィルタ部分を下部に向かって流れ、結果としてカラム上部の中心付近の流量が低くなっていると考えられる。このことより、約1400mLの血液を送液することで大きくカラム内流量が変化することがわかった。従って、血液処理初期にはカラム入口側でメインフィルタへのカラム内流量が大きく、メインフィルタへ負担が大きくなっている。次第にフィブリン等の血漿成分が吸着することより、カラム上部でのメインフィルタでの抵抗が大きくなることで、流れに変化が起こり、より抵抗の少ないカラム中部あるいは下部のメインフィルタに血流がシフトしていくと推測された。

3.3.6.3 計算機シミュレーションの結果

計算機シミュレーション結果をFig. 40に示す。解析は、左側カラム略図の囲み部分で、中央がシミュレーション全体図、右図は中央図の上下部分を拡大した図を示した。何れも図中の左側が円筒の中心部で、右側がプレフィルタ部分を示している。図40は、白血球除去カラムのシミュレーション結果を、流れの方向を矢印で、速度を色で表示した。カラム内の最大速度は 0.78×10^{-3} (m/sec)、最低カラム内流量は 0.36×10^{-5} (m/sec)であった。流速のスカラ量は右に示した色で示した。本流速マップから、カラム入口外側のプレフィルタ部分が非常に速くプレフィルタ内を下方に向かって流れている傾向が見られる。またメインフィルタとプレフィルタの界面で流速に大きな差が見られた。更にすべての血液は中心部のノズルからカラ

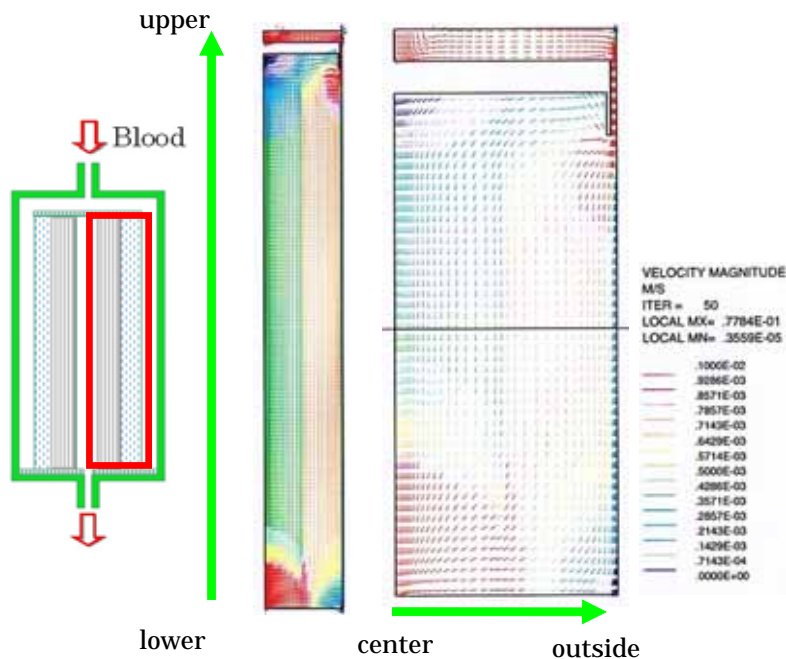


Fig.40 Simulation of flow rate. This shows the flow rate of enclosure part. Whole analysis data of column (center figure) Magnification of upper side and down side flow rate (left figure)

ム外に流出するため、メインフィルタ中心下部で流速が速くなる結果であった。

また、実測で得られたカラム内流量と比較するため、Fig.35で求めたエリアと同位置でのスカラムを速度としてプロットした (Fig.41)。カラム上部の流れは、Fig.41(a)より、外層部で速度が大きく、実測の結果と類似した結果であった。一方、Fig.41(b)に示した中央部では、メインフィルタ部とプレフィルタ部の界面で大きな速度差が認められ、更に、Fig.41(c)のカラム下部では、メインフィルタ部で流速が速く、プレフィルタ部に向かうに従い、遅くなる傾向を示し、本システムで得られた結果と異なった。

3.3.7 白血球除去カラムの血液流れ性に関する結論

本研究により、最大濃度到達時間から求めたカラム内流量による三次元流量解析を用いることで、カラム内流量分布を三次元にマップ化でき、微小領域での流量を定量化できた。今回求めたフィルタ内部での血液の流速と、計算機シミュレーションより得られた血液入出口の流速分布より、本白血球除去カラムの流れはFig.42のように推測できた。即ち、カラム

入口から入った血液は、抵抗の少ないプレフィルタ上部からプレフィルタ内部に入り、プレフィルタ部をメインフィルタ部の約2倍の速度で垂直方向に流れ、カラム下部にて中心方向に入ると推測された。

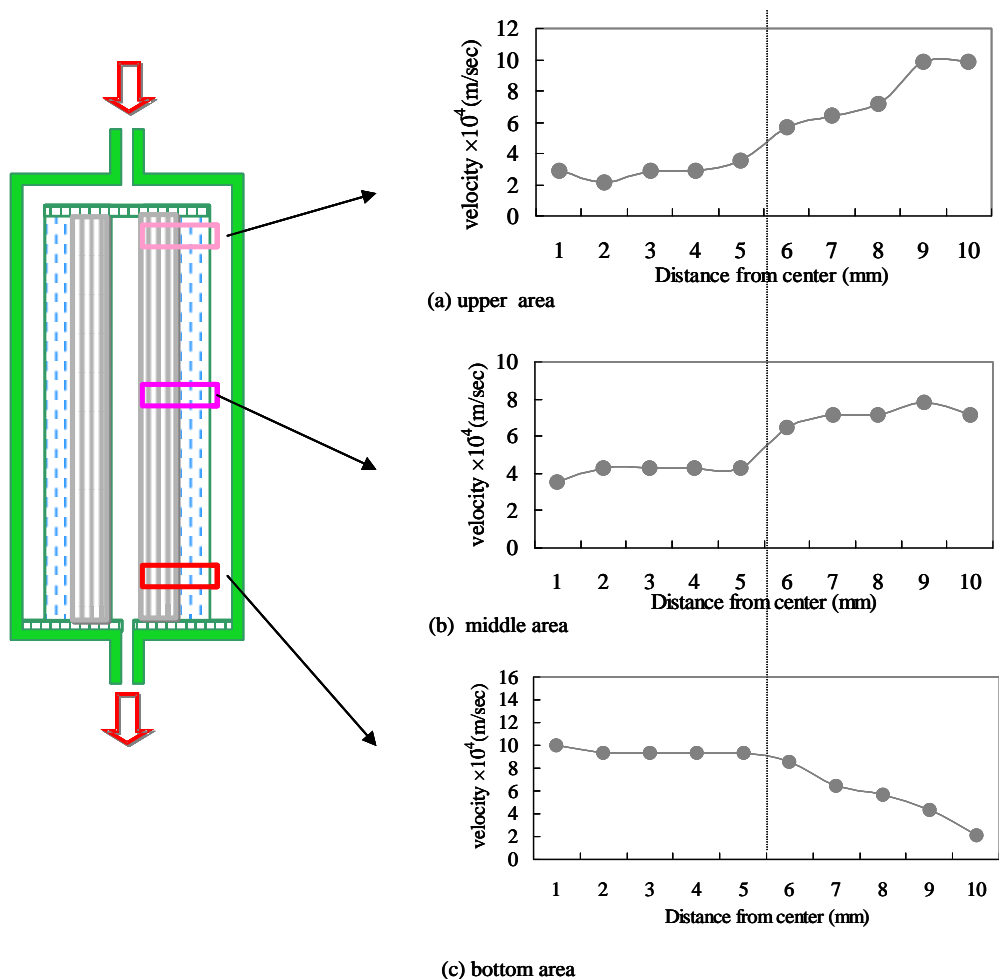


Fig.41 Simulation of flow rate.
: Interface between pre-filter and main-filter

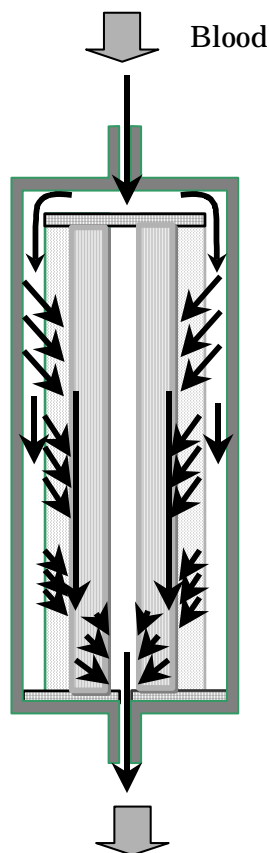


Fig. 42 Blood flow image in the column.

3.4 考察

本研究の三次元流量解析を用いることで、フィルタ抵抗の異なる材料を充填した白血球除去カラムの流れを三次元的に可視化し、カラム内の微小領域でのカラム内流量を定量することが可能になった。また、本システムは、白血球除去カラムのように白血球が吸着或いは濾過により、流れが血液処理によって経時的に変化するような場合においてもカラム内流量をマップ化できる可能であることより、カラムの目詰まり含めた経時的な変化を評価する重要な手段となると考えられる。

本研究で用いたカラム内流量は、本来であれば、速度のスカラ量に近い値となるが、実際は、造影剤量を定量できないため、定数/時間のパラメータとなり速度とはいえない、さらに、仮に、造影剤の濃度に換算できた場合でも、単位時間あたりの造影剤量の変化量となる等の観点より、速度と定義することが妥当ではないと考えられる。また、解析結果及び実際の外観からの観察より、カラム内が層流状態でないため、流速では微細な流れを十分に評価できないと考えられ、各ピクセルを流れる造影剤総量をパラメータに加え

て評価とするのが、よりカラム内の流れを反映していると考えられるため、新たにカラム内流量と定義し
いた。

また、計算機シミュレーションの課題を明確にするため、本法で得られたカラム内流量マップとシミュ
レーションで求めたスカラ量を比較した。シミュレーション結果を縦軸に、カラム内流量を横軸に相関分析し
た結果をFig.43に示した。この結果より、カラム上部では、カラム流量とシミュレーションの間に弱い正の相
関が認められシミュレーションが流れの傾向を現していることがわかった。一方、カラム中部では同様に弱
い相関は認められる反面、近似直線が零点を通らずに傾斜も小さいことより流れを十分反映できていない
と考えられた。更に、カラム下部では相関は全く認められず、実際の系に即していないことが統計的にも明
らかとなった。この原因として、シミュレーションは、血液のインプットとアウトプットの速度が一致するという
条件があるために、カラム下部中央部付近での流速が高くなる点が考えられる。更に、カラム内では、体積
当たりのカラム内流量が低いと、流線ベクトルにあらわせない別の方向の流れ(拡散による流れ)の影響
を受けると考えられ、この拡散がシミュレーションでは考慮されていないことが原因と推察される。シミュレ
ーションを行う場合、拡散を加味した計算が必要と考えられ、今後シミュレーションを行う場合の課題と考え
られる。

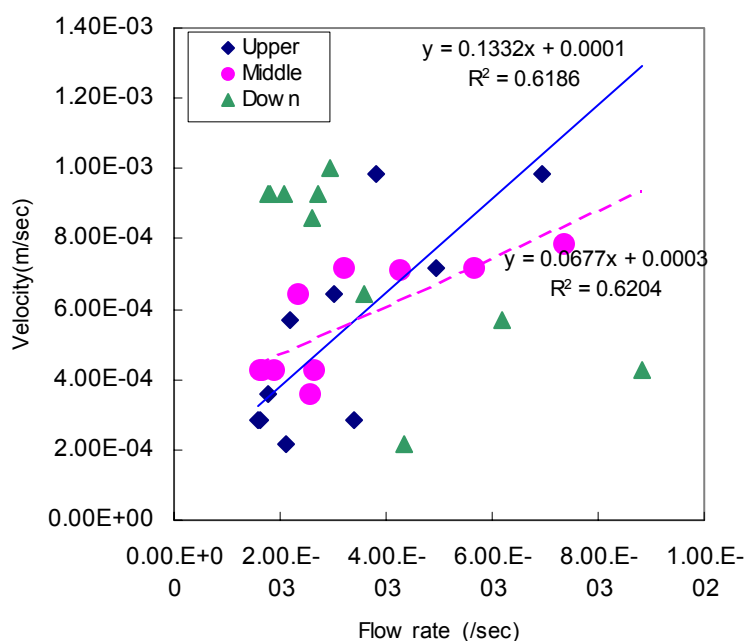


Fig.43 Relationship between Flow rate and Simulation.

また、経時的なカラム内の変化を確認したところ、1400mLの血液処理前後での流量マップで変化が認められたことより、経時的な流れの変化についても本解析も用いて評価できる可能性が示唆された。更にこの流れの変化は、白血球及びフィブリン等の血漿成分の吸着によって生じる流れの変化と考えられる。これより、白血球除去カラムを開発する場合に、経時的な流れの変化も加味した設計が必要であると考えられる。特に、カラム内流量が多い部位が変化していくため、この変化が少ないカラムを設計することが重要であると考えられる。特に、カラム上下での変化が大きいことより短いカラムへの改良が好ましいと考えられる。また、シミュレーションを更に向上させるためには、経時的なフィルタの目詰まりによる抵抗の変化をパラメータとして加える必要があると考えられる。

一方、本解析システムの課題と限界点として、20秒間の画像が1枚の三次元画像となるため、カラム内でのカラム内流量変化が激しい場合に解析できないという問題がある。但し、本研究で観察しているような比較的大きな容量のカラムに遅い速度で血液が流入するような場合、観察している現象が10分程度の現象であるので、この問題は、カラム内流量分布の評価という目的から考えるとそれほど大きくないであろう。T_{max}の計算の際には、時間軸がカラムすべての位置において同じであると仮定している。しかし、実際は、局所での遅れがあり、この仮定は厳密には成り立たない。ただし、本カラムの場合、実際の造影剤は20秒以内にカラムの最外側に充填されるため、この仮定を設けても大きな誤差を生じないと考えられる。今後、他のカラムへの応用を考慮する場合には、この仮定によって生じる誤差を検討すべきであろう。本来、X線造影装置からのX線はコーン状に分布するため、Feldkamp法に代表される三次元画像再構成をすべきであるが、本システムでは、カラムをできるだけ、CCD面に近づけて、X線が並行ビームであるとして、計算速度が速い二次元の画像再構成法を用いた。実際に、本システムで得られた画像は、視覚的に画像歪みは見られなかった。ただし、拡大撮像をする場合は、画像歪みが顕著になるであろう。今後の研究課題として、三次元再構成法を取り入れたい。

本法の活用により、これまで検討が困難であったカラム内の流れの均一化、及び効率的なフィルタの使用の評価手法として活用可能と考えられる。また、カラム内の局所的なカラム内流量を定量化できることより、外側を覆うカラム容器の設計に於いても有効に活用できると考えられる。

3.5 結論

X線造影装置を用いて、画像を再構成することによって得られた画像より、カラムの局所のカラム内流量分布をマップ化する新しい三次元流量解析システムを確立した。即ち本システムは、カラムを回転させながら撮像する装置、及び撮像した画像より各ボクセルにおける最大濃度到達時間と濃度積算値の2つのパラメータから得られるカラム内流量解析から構成される。カラム内流量解析については、二次元での積層型カラムを用いた簡易解析で予備検討し、三次元での解析へと発展させ確立することができた。この解析

手法は、従来用いられてきた最大濃度到達時間法を改良し、濃度積算値を最大濃度到達時間で除して得られる流量が最適な解析手法であることを確認し、この流量を新たにカラム内流量と定義して本システムを完成させることができた。

本システムにより、これまで困難であった円筒型カラムでの経時的なカラム内流量を可視化することができ、更には定量化することが可能となった。本解析システムは、特に血液流速の遅い体外循環用の治療器のカラム内流量分布を求めるにも応用可能な技術と考えられる。また、カラム内の径時的な変化まで本技術を用いて解析できる可能性を確認した。これより、従来確認が困難であった血液凝固、吸着或いは濾過によるカラム内圧力上昇時の閉塞部位を特定することにも応用可能であった。

一方、従来用いられてきた計算機シミュレーションとの比較を行い、カラム内流量と速度分布に大きな差が認められることがわかった。これより、従来の簡易なシミュレーション単独では、流れを十分に把握できていないことが明らかとなった。シミュレーションを改良する上でカラム内の拡散の影響及び除去によるフィルタ抵抗の変化をパラメータとして組み込んでいく必要があると考えられた。

本システムを利用することで、カラム内の流れを可視化及び定量化できるため、これまで検討が困難であったカラム内の流れの均一化及び効率的なフィルタの使用の評価手法として活用できると考えられる。また、カラム内の局所的な流れを定量化できることより、外側を覆うカラムの設計に於いても有効に活用できると考えられる。

次章において本解析システムを用いた白血球カラムの改良への応用を行い、本解析システムの有用性を検証する。

第4章 白血球除去カラムの三次元流量解析システムの応用

4.1 背景と目的

白血球除去カラムにおいて流れにカラム内で流量分布に差が見られ、メインフィルタ内での流れが均一ではないことが、第3章の結果より明らかとなった。そこで、白血球除去カラムの改良の可能性について検討した。カラム改良の方法として、カラム内での血液処理によるカラム上限での変化を減らす点、且つカラム内で乱流の起こりやすい流れ抵抗が少ない部分、即ちフィルタが充填されていないスペースの最小化する点の2点に着目し、カラムを試作し三次元流量解析システムを用いて流れの変化が確認できるかについて検討を行った。更に、本解析システムで得られた結果を検証することを目的に、実際の血液での置換性と比較して本システムの有用性を検証する。

上記目的を検討するため、第3章で流量を測定した白血球除去カラムのカラム長1/2のカラム2種類を作成し用いた。

- 1)白血球除去カラムの長さのみを1/2としたカラム(以下コントロールカラムと略す)
- 2)白血球除去カラムの長さを1/2とし、且つカラム容器内側とフィルタ間のスペースをほぼ1/2に狭めたカラム(以下改良カラムと略す)

上記の2種類の白血球除去カラムについて、白血球除去カラムの三次元でのカラム内流量解析を実施し、それぞれのカラム内流量変化を比較した。更に使用後のカラムで、血液から生理食塩液に流体を変え、一定量流した後に残留する赤血球量から求めた置換量と比較して、本システムの検証を実施した。

4.1.1 血液実験方法

血液は体外循環用装置Plasauto - LC (旭化成メディカル社製)を用い、Fig.44に示すフロー図で血液及び造影剤液を流した。白血球除去カラムは、流速50mL/minで、生理食塩液500 mLで生理食塩液に置換した後、生理食塩液を25 mL/minで7分間流し平衡状態とした。

カラムの入口と出口はメカニカルシール部で固定し、円柱の中心を軸として、モータにより一定速度で、20秒間に1回転させた。送液を生理食塩液から造影剤液に切り替え、流速25mL/minで流し実験を開始した。造影剤液を50mL送液した時点で、血液に切り替えた実験終了まで一定速度を維持し送液した。撮像は、カラム回転開始後に、造影剤液がカラムに入る直前より撮像を開始し、X線モニターにより造影剤がほとんど置換された時点の約16分間で終了した。撮像時の装置パラメータは、50kVp、0.61mAであった。また、撮像間隔は4コマ/s で撮像した。血液試験は、同条件で3回実施し、それぞれに於いて同様の条件で撮像を行い解析に用いた。

更に測定後のカラムに流速25mL/minで200mLの生理食塩水を流し、血液から生理食塩水への置換を行った。このとき、はじめにカラム内に残留していた赤血球由来のヘモグロビン量を測定することで、2つのカラムカラム内に充填されている赤血球由来のヘモグロビン量と、200mLの生理食塩水で処理後の血液置換性を評価した。

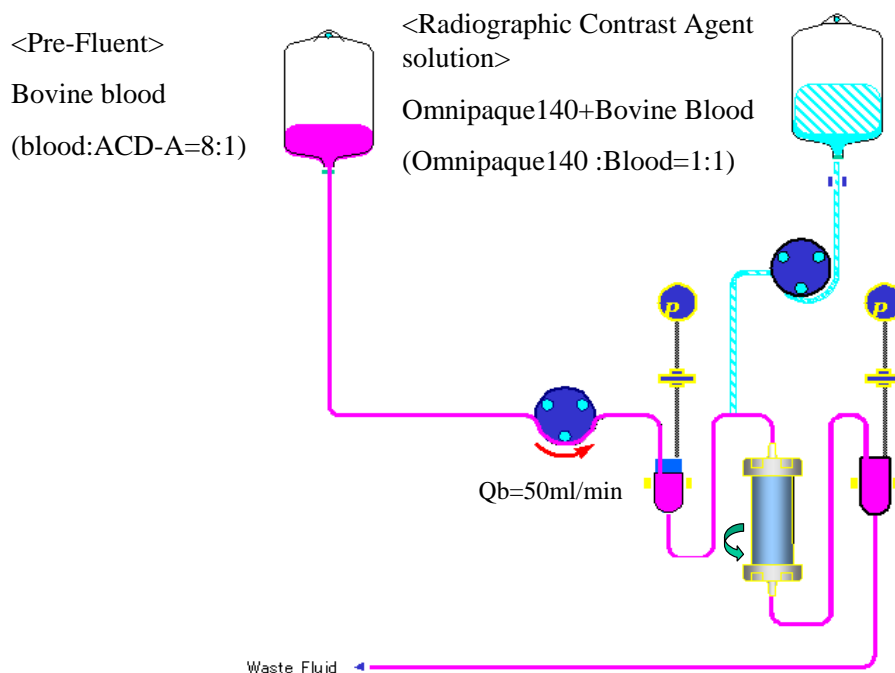


Fig.44 Flow circuit of blood for half size column.

4.1.2 画像解析方法

本研究のカラム内流量解析手法に従い、同条件でそれぞれのカラムでの三次元流量解析を実施した。撮像された画像から、各ボクセルで造影剤濃度(X線強度が最小となる)が最大になるまでの時間(カラム流量最大濃度到達時間: T_{max})を求めた。続いて、濃度積算値 S_{xyz} を、 $t=0(sec)$ から $t=600(sec)$ までの各ボクセルにおけるCT値 r_t の積算値とし、以下の式より求めた。

$$S_{xyz} = \sum_{t=0}^{600} r_t \quad \text{at } (x,y,z) \quad \text{式(11)}$$

T_{max} と S を用いて、次式により各ボクセル (x,y,z) における F_{xyz} をカラム内流量と定義し求め、三次元的のカラム内流量マップとして可視化を行った。

$$F_{xyz}(/sec) = \frac{S_{xyz}}{T_{max}} \text{ at } (x,y,z) \quad \text{式(12)}$$

4.2 カラム内流量解析結果

最大濃度到達時間 T_{max} 及び濃度積算値 S_{xyz} より求めたカラム内流量マップをFig.45 に示す。図は、白血球除去カラムの中心部より外周部への半分のカラム内の速度をピクセル毎にグラディエーションにより示した。本試験でのカラム内の最大速度は100/secで赤色にて示し、最低速度を0とし青色にて表示し、カラーバーにて速度分布をFig.45に示した。カラム形状を1/2とすることで、第3章で得られた白血球除去カラムの流量マップとの間に流量分布が異なることがわかった。これは、カラムの長さが短くなることで、血液流

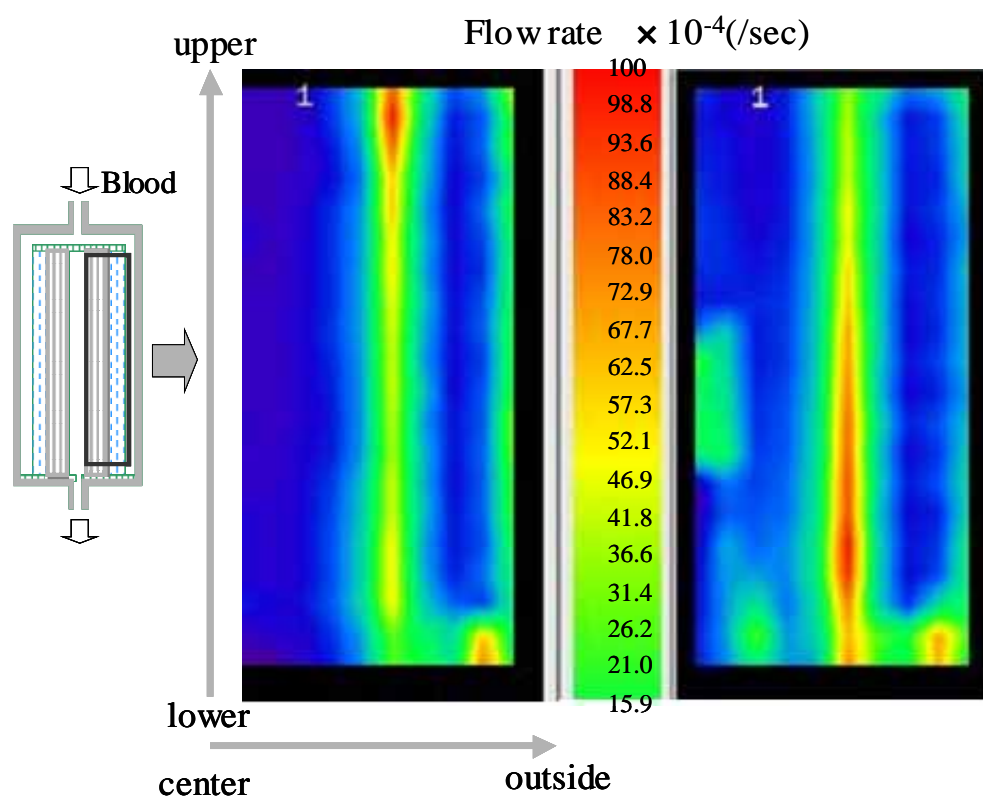


Fig.45 Flow analysis for two types of column. Control column (left), Modified column (right)

量が大きく変化することを示している。更にプレフィルタ部とメインフィルタ部の界面で流速が高い傾向を示した。更に、コントロールカラムと改良カラムを比較すると、カラムとフィルタ間の空間を狭めることで、カラム内の拡散が減少し、フィルタ部での速度が均一となる傾向が認められた。

カラム内の各点での平均流量(平均値±標準偏差)を棒グラフにて図に示した(Fig.46)。本解析より、カラム内平均流量は、コントロールカラムで 2.3 ± 1.2 (/sec)、改良カラムでは、 3.1 ± 1.2 (/sec)であった。隙間容積に変化によると考えられる平均流量の上昇が認められた。特に、カラム上部では、コントロールカラムでは 3.2 (/sec)、改良カラムでは 4.2 (/sec)で流量に明らかな差が認められた。一方、カラム内の最大流量と最小流量について比較すると、コントロールカラムでは、最大流量が 5.3 (/sec)、最小流量が 1.3 (/sec)であるのに対して、改良カラムでは最大流量が 5.1 (/sec)、最小流量が 1.5 (/sec)と流速のバラツキが小さくなっていることがわかった。また、改良カラムでの各点での流量が均一化されており、特にメインフィルタでの

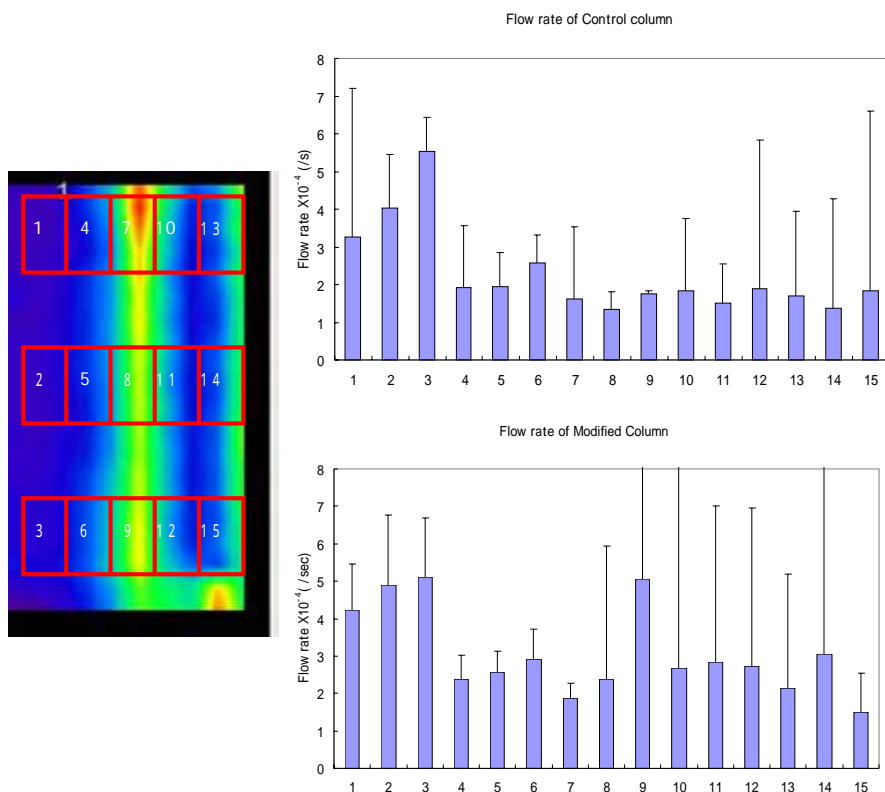


Fig.46 Flow distribution of two types of column.

Measurement position of each flow map (left fig), Control column (upper right), Modified column(lower right).

流量が相対的に高くなり、均一化されていることがわかった。

4.3 血液置換性結果

流量測定後のカラムで、生理食塩水への置換試験を行った結果をFig.47に示す。コントロールカラム及び改良カラムで生理食塩液への置換性をみると、改良カラムで有意に生理食塩液への置換がよい結果であった。置換性が高いということは、カラム内での赤血球の在留が少ないことを示しており、より効率的に生理食塩液に置き換わったと考えられる。また、カラム内流量分布がより均一であるほうが、血液置換性の向上が認められる結果となった。

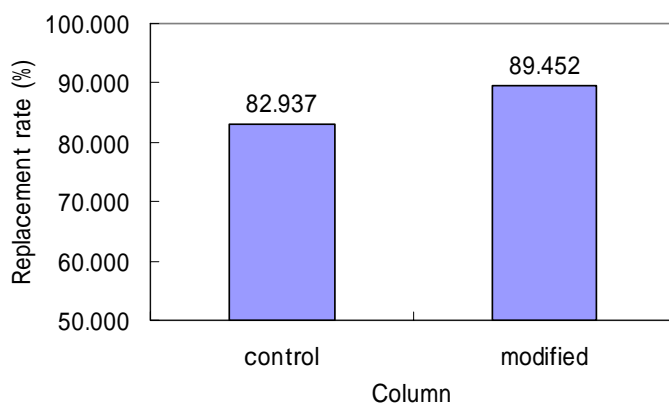


Fig.47 Replacement rate of columns from blood to saline solution.

4.4 結果と考察

本研究の三次元カラム内流量解析法を用いることで、カラム長が1/2のカラムにおいても、三次元で流量の解析が実施可能であった。これより、本三次元流量解析システムを用いて類似のカラムのカラム内三次元流量マップを作成できる可能性を確認できた。またその他の条件を、相対的に同一とすることで、カラム長の変化がカラム内の流量分布に、大きな影響を与えることが明らかになった。更に、カラムの容器内面とフィルタの間の空間を狭めた微小な変化でも、三次元カラム内流量分布への変化を検出できることが明らかとなり、本解析システムの有用性が確認できた。また、この流量変化は、カラム内の抵抗が非常に少ないフリーな空間がカラム内での血液の拡散に大きな影響を与える可能性があることを示唆しており、重要な知

見と考えられる。従って、第3章で考察した拡散と流れのバランスを如何にコントロールするかがカラム開発上の大きな課題と考えられた。今回2つのカラム内流量を定量化することで、改良前後でのプレフィルタでの流量の均一化が、カラム内の血液の流れを均一化する上で重要な要因である可能性が示唆された。また、本結果は、血液から生理食塩水への置換率と同様の改良傾向が認められたことより、本解析システムを用いてカラム内流量分布を計測することで、その他機能を改善する上での重要な情報が得られる可能性があると考えられた。

今後は、本研究の三次元のカラム内流量解析を用いることで、カラム各部での流れを最適化することも可能と考えられ、カラム開発上の有用な知見が得られると考えられた。

第5章 結論

本研究では、白血球除去カラムの改良、カラム内の流れの可視化及び三次元流量解析について研究を行い、以下の点を明らかにした。

- 1) 従来開発された白血球除去カラムの課題について検討し、安全性を更に高めるため、有害事象の原因となるフィルタ表面の荷電量と、その起因物質されるBKN濃度との関係を明らかにした。即ち本検討により、フィルタ表面の陰性荷電量とBKN産生の間に正の相関関係なあることを見出し、BKN産生を抑制するための手段として表面の陰性荷電量を低下させることを提案した。
- 2) 上記結果に基づき、不織布紡糸時の水分量を減少させることで、ポリエチレンテレフタレートの加水分解を防止し、これによって陰性荷電量を低い値にコントロールする技術を開発し、その効果をBKN産生の低減により実証した。また、この場合の陰性荷電量は30eq/g以下である場合、BKNの産生が4000pg/mL以下にコントロールできることを見出し実用化した。
- 3) また、従来の白血球除去カラムのもう一つの課題であった、カラム内での血液凝固によるカラム内圧力上昇について、血液性状について着目し、不織布と接触によりカラム圧上昇しやすい血液の性状を明らかにした。本研究の結果、カラム上昇に影響する因子として、血球成分として、主に顆粒球、単球、及び血小板数が影響していると推測された。これら血球成分は吸着によるフィルタの目詰まりによってカラム内圧力の上昇に影響すると考えられた。また、血漿成分では、 α -トロンボグロブリン、血小板第4因子、血液凝固第13因子活性、プロテインC、プロテインS、Von Willebrand因子活性が重要な影響を与えることを明らかにした。血漿成分については、いずれの成分も血小板を含むカスケードからフィブリンクロットに至るまで、凝固促進上、重要な因子であると考えられ、これらの血漿成分は白血球除去カラム内の圧上昇に影響していると考えられた。従って、白血球除去カラムに入る前に生成するフィブリンを不織布表面に吸着させない様にカラム設計をコントロールすることが重要であると考えられた。
- 4) 上記知見を元に、プレフィルタを導入することで上記課題を解決した白血球除去カラムを改良開発し、実用化することができた。現在、潰瘍性大腸炎や薬物抵抗性のリウマチの治療に用いられ、有用に用いられている。
- 5) 白血球除去カラムの選択性を高めた特定細胞に対する抗体を、フィルタ表面に固定した特異的細胞除去カラムを開発し、その可能性を実スケールのカラムで確認した。
- 6) 白血球除去デバイスの開発においては、プレフィルタ等のフィルタの複数成分化や使用するカラム構造によって最適なカラム設計を行う必要がある。ところが、これまでカラム設計を行う上で必要なカラム内の流量分布を計測する手段が十分ではなく、十分な改良が困難であった。

以上の背景のもと、白血球除去デバイスの三次元流量解析技術と、これを実現するシステムの開発を以下の戦略にて行い、実用化を含め完成させた。

- a) 特異的細胞除去カラムを対象に、カラムをCCD面に固定させ撮像し、得られた画像から二次元でカラム内の流量解析技術について検討を実施した。
- b) 流量解析手法として、各ピクセルでの最大濃度到達時間法及び最大濃度到達時間と濃度積算量から求めたカラム内流量解析カラム内流量法について比較した。その結果、カラム内流量解析手法が実際のカラムの流れを反映していることにより、本方法が白血球除去カラムの流れ解析手法として有効であること確認し、カラム内流量と新たに定義した。
- c) 二次元では解析が不十分である円筒型白血球除去カラムの三次元流量解析について検討し、カラムを回転しながら撮像し、得られた画像をフィルタードバックプロジェクション法で再構成することで、三次元の画像を得ることに成功した。この画像により白血球除去カラムのカラム内での血液の流れを初めて可視化することができた。また、各ボクセルでのカラム内流量解析を行い、白血球除去カラム内のカラム内流量をマップ化することができた。この結果から、白血球除去カラムではポンプによる流れとカラム内で発生する拡散が全体の流れを左右する大きな因子であることが推測された。
- d) 更に、カラム長が1/2のカラムを試作し、本研究の三次元流量解析システムの検証を実施した。これより、カラム長が異なることによっても流量分布に大きな差がみられることが明らかになり、カラム長の短いカラムでより均一な流れを実現できる可能性を確認した。更にカラム内のフィルタが充填されていない空間を減らすような微小なカラム内構造の変化によっても、カラム内流量に変化があることが明らかになった。同時に本解析システムの三次元流量解析の有用性を検証できた。
- e) また2種類のカラム間で、カラムの血液から生理食塩水による置換性とカラム内流量を比較することで、カラム内流量を均一化する方向でカラム内の置換性を向上できる可能性を確認した。

以上に示したように、本研究では、新たに、カラム内の流れを解析するカラム内流量解析手法と、白血球除去デバイスの三次元流量解析システムを提案した。更に、これを活用することで、計算機シミュレーションの改良への重要な知見が得られると考えられる。また、本システムを活用することで、白血球除去デバイスの改良に向け更に有用な知見が得られると考えられる。

参考文献

- [1] Abel J, Rowntree LG, Turner BB. Plasma removal with return of corpuscles(plasmapheresis). J Pharmacol Exp. Ther 5:pp.625-41, 1914
- [2]Schwab PJ, Fahey JL. Treatment of Waldenstrom's macroglobulinemia by plasmapheresis. N Engl J Med. 263:pp.574-9,1960
- [3] Sakaki S, Marumoto A, Nishimura N et.al., Plasmapheresis Using Two Hollow Fiber Filters of Cellulose-diacetate Membrane of Different Pore Siza, Therapeutic Plasmapheresis; (I) pp.177-182,1981
- [4] Shumak KH, Rock GA. Therapeutic plasma exchange. N Engl J Med. 310:pp.762-71,1884
- [5] Shimizu M, et al, Japanese J of Apheresis Vol. 16 (3): pp.523 - 533, 1997
- [6] Masse M, et al, Transfusion. Nov-Dec;31(9):pp.792-7, 1991
- [7] 梅香家鎮, 西村隆雄, 黒田徹ほか: Filtration Lymphocyatapheresis の開発と臨床応用. 人工臓器 17,(2);pp413, 1988
- [8] Frank Heese and Laurance Hall: [Quantification of fluid flow through a clinical blood filter and kidney dialyzer using magnetic resonance imaging](#), Sensors Journal, IEEE, 5(2): pp.273-276, 2005
- [9] 西田 正浩, 本間 一弘, 沼野 智一: ダイアライザ内の流速測定 : 一粒子画像流速測定法を用いたヘッダ内の測定— . 生体医工学. 43 No. 1: pp.50-57, 2005
- [10] Sunny D; Leukodepletion Blood Filters. Transfusion Medicine Review, 12(2), (April), pp.65-77,1993
- [11] Sunny D; Mechanism of Leukocyte Removal by Filtration. Lane T A, Myllyla G(eds):Leukocyte-Depleted Blood Products.Curr Stud Hematol Blood Tranf. Basel Karer, No.60, pp.123-133, 1994
- [12] I. Steneker et.al.; Electromicroscopic examination of white blood cell reduction by four white cell-reduction filters, Transfusion, 32(8), pp.450-457, 1992
- [13] Tuda H et al, Lymphocyatapheresis and lymphocytoplasmapheresis in the treatment of systemic lupus erythematosus., Jpn J Artif Organs pp.151637-1640, 1986
- [14] Matsuda et al, Lymphocytoplasmapheresis using leukocyte removal column (Cellsorba) for treatment of rheumatoid arthritis In. Therapeuticplasmapheresis Vol. VII, pp.73-78, 1987
- [15] Hauser SL et al, Lymphocyatapheresis in chronic progressive multiple sclerosis: Immnologic and clinical effects, Neurology 34:pp.922-926, 1984

- [16] Maida E et al, Long-term lymphocytapheresis therapy in multiple sclerosis: Preliminary observations. *Eur Neurol* 25, pp.225-232, 1986
- [17] Sawada k et al, Leukocytapheresis with leukocyte removal filter as new therapy for ulcerative colitis. *Ther Apheresis* 1:pp.207-211, 1997
- [18] Sawada k et al, Leukocytapheresis therapy with leukocyte removal filter for inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol* 30(Suppl 8):pp.124-127, 1995
- [19] 澤田 康史, 白血球除去療法とその適応, *Modern Physician* Vol.23 No.10:pp.1515-1521, 2003
- [20] 小野寺博和他 特許3162165表面陰性荷電量測定法
- [21] 小野寺博和et.al., 第13回日本はアフェレシス学会学術大会プログラム 1993年6月4日・5日
- [22] 小野寺博和 特許公開2005 - 249738 血液の体外処理時に凝固しやすい血液の判別方法
- [23] 小野寺博和他 特許公開2003 - 320026 円筒状白血球除去器及び白血球除去システム
- [24] Sawada K et al, Multicenter Randomized Contolled Trial for Teratment of Ulcerative Colitis with a Leukocytapheresis Column.: *Curr Pharm Des* 9,pp.307-321, 2003
- [25] 澁谷 統壽ら 免疫性神経疾患に対するアフェレシス療法の開発と評価: 選択的CD4 + T細胞除去カラムの開発, *人工臓器*, 25,(1); pp165-168, 1996
- [26] McFarlin DE et al., Multiple sclerosis. *N Engl J Med*: 307: pp.1183-88, 1982
- [27] Hafler DA et al., T-cells in multiple sclerosis and inflammatory central nervous system diseases. *Immunol Rev*: 100: pp.307-333, 1987
- [28] Noseworthy JH et al., Multiple sclerosis. *N Engl J Med*: 243: pp.938-50, 1984
- [29] Nakane et, al , Multiple Sclerosis, 9: pp.575-584, 2003
- [30] G.N.Ramachandran and A.V. Lakshminarayanan, "Three dimensional reconstructions from radiographs and electron micrographs: Application of convolution instead of fourier transforms," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 68, pp. 2236 - 2240, 1971
- [31] A.C. Kak and M. Slaney, *Principles of Computerized Tomographic Imaging*. IEEE, Inc., New York: IEEE Press, 1988

謝辞

本研究を遂行するにあたり、研究に対する技術手法や工学的視点に基づいたテーマ検討から論文のまとめ方まで、あらゆる面において有効且つ有益なご指導、ご指示を賜りました、指導教官である国立循環器病センター研究所 / 放射線医学部 飯田秀博先生 に深く感謝いたします。多くの研究機会を持たせていただくとともに、発表の機会を持たせていただき、多方面における分野への見識を広げることができ、多くの貴重な経験をさせていただき、心よりお礼申し上げます。

本論文をまとめるにあたり、投稿の機会のみならず学会発表のチャンスを持たせていただき、且つご多忙にもかかわらず親切かつ丁寧なご教示、ご指導をいただきました、奈良先端科学技術大学院大学/情報化学研究科/情報生命科学専攻/生命機能計測学講座 湊小太郎教授 に心よりお礼申し上げます。

実務面において、常に熱心なご指導、ご助言をいただくとともに、多岐にわたるプログラミングのご指導をいただいた 国立循環器病センター研究所/放射線医学部 渡部浩司先生に深く感謝いたします。

本論文をまとめるにあたり、多岐にわたりご指導いただきました奈良先端科学技術大学院大学/情報化学研究科/情報システム学専攻/システム制御・管理講座 西谷 紘一教授、及び情報生命科学専攻/生命機能計測学講座 杉浦 忠男准教授 に深く感謝いたします。

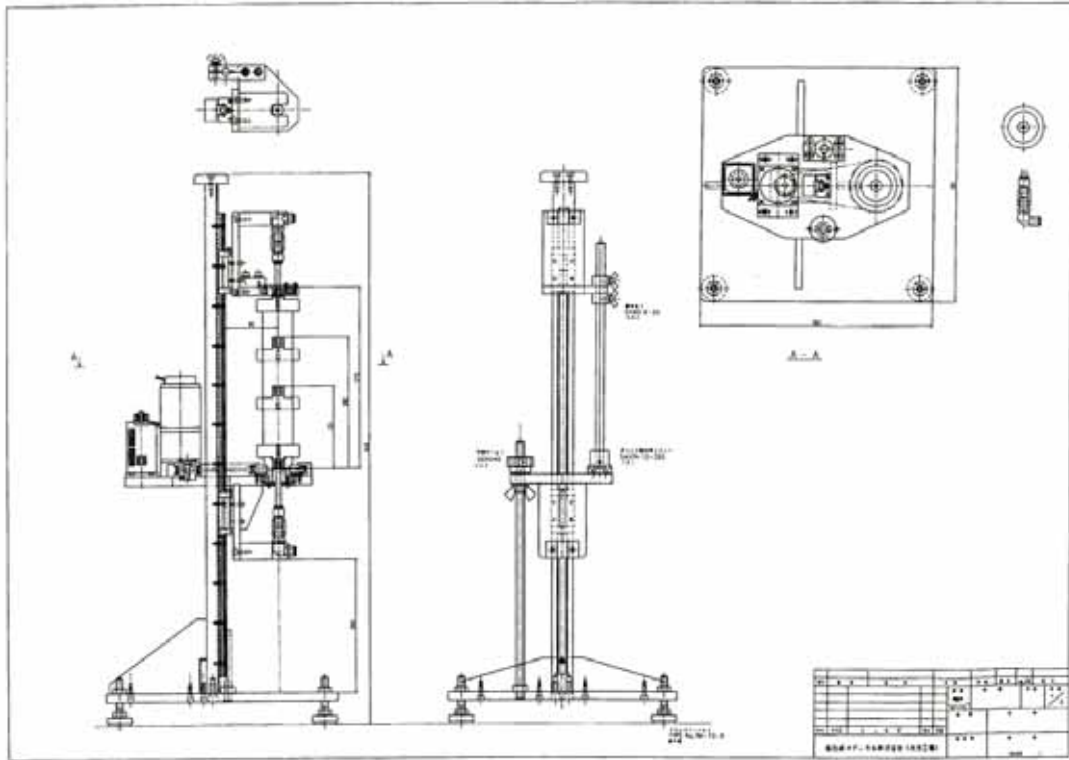
本研究にあたり、医学的な面より多くのご指導をいただきました澁谷統壽先生 及び 長崎神経医療センター 松尾秀徳先生 に心より感謝いたします。

更に、本研究フィールドとなった、国立循環器病センター研究所 / 放射線医学部、奈良先端科学技術大学院大学/情報化学研究科 / 情報生命科学専攻/生命機能計測学講座、及び旭化成クラレメディカル株式会社の皆様に心よりお礼いたします。

最後に、著者のわがままを温かく見守るとともに、常に励ましてくれた妻にこころから感謝いたします。

付録

A. 回転台図面



研究業績

【学術論文】

【査読論文】

小野寺博和、渡部浩司、湊小太郎、飯田秀博; 白血球除去カラムの流れ解析システム、MEDICAL IMAGING TECHNOLOGY、 Vol. 25、 No.4、 pp.277-283、 2007.

H.Matsuo, H.Goto, C.Kambara, T.Fukudome, T.Mizota, H.Onodera, M.Yoshida, N.Shibuya; Selective adsorption of human CD4 T cells, Therapeutic Apheresis and Dialysis.Vol.8, No.3, pp.194-196, 2004.

H.Onodera, K.Ninomiya, M.Yoshida, H.Matsuo, N.Shibuya; Development of a device for selective removal of CD4+ T cells, Therapeutic Apheresis and Dialysis. Vol.7, No.3, pp.329-333, 2003.

Matsuo H, Goto H, Kambara C, Fukudome T, Mizota T, Onodera H, Yoshida M, Shibuya N., Selective adsorption of human CD4 T cells., Ther Apher Dial., Jun;8(3):pp.194-196, 2004.

Nakane S, Matsuo H, Goto H, Yoshinaga-Matsumoto M, Ohtsuru I, Ichinose K, Onodera H, Yoshida M, Shibuya N. Cytapheresis with a filter for selective removal of CD4+ T cells in experimental autoimmune encephalomyelitis., Mult Scler. Dec;9(6):pp.579-84, 2003.

Onodera H, Ninomiya K, Yoshida M, Matsuo H, Shibuya N. Development of a device for selective removal of CD4+ T cells. Ther Apher Dial. Jun;7(3):pp.329-33, 2003.

Matsuo H, Ichinose K, Ohtsuru I, Fujishita S, Onodera H, Suematsu J, Yoshida M, Yamawaki N, Shibuya N. Treatment of experimental allergic encephalomyelitis by selective removal of CD4+ T cells., Ther Apher. May;1(2):pp.165-8,1997

【査読なし論文】

Onodera H, Abe Y, Yoshida M, Yamawaki N, Yamashita Y, Matsuo H, Ichinose K, Otsuru I, Shibuya N. A new device for selective removal of CD4+ T cells. 1998.Ther Apher. 2000 Apr;4(2):161-6.

【総説】(査読有り)

松尾秀徳、後藤公文、近藤誉之、吉田一、小野寺博和、安武幹智、澁谷統壽; 神経疾患に対する白血球系細胞除去療法: 選択的に病因となるリンパ球を除去する試み, 日本アフエレンス学会誌, Vol.24, No.2, pp.157-166, 2005

【国際会議発表】(査読有り)

H Onodera, H Watabe, K Minato, H Iida ; Flow analysis for Leukocyte removal column, :Proceeding of the World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering August 30, pp.2469-2471, 2006

【国内研究発表】

小野寺博和、渡部浩司、湊小太郎、飯田秀博: 白血球除去フィルタの流れ解析システムの開発、生体医工学シンポジウム2006, pp.179, Sep. 2006

【国内エッセイ】

小野寺博和: バイオマテリアルのrisk and benefit, バイオマテリアル - 生体材料 -, 23-2, pp.240-241, 2005

【国内出願特許】

1. 特開2005-323652 細胞吸着材の照射滅菌方法および照射滅菌された細胞吸着材
2. 特開2005-319064 体外循環用白血球除去フィルターから血液を回収する方法
3. 特開2005-249738 血液の体外処理時に凝固しやすい血液の判別方法
4. 特開2005-143973 白血球除去装置、白血球除去用流路系および白血球除去方法
5. 特開2004-166749 白血球除去フィルターに残留する白血球が除去された血液を回収する方法、回収装置および回収システム
6. 特開2004-166748 白血球除去フィルターから白血球が除去された血液を回収する方法
7. 特開2004-166747 白血球除去フィルターユニット内の残留血液回収方法及び残留血液回収装置
8. 特開2004-105529 細胞吸着材および細胞吸着器の滅菌方法ならびに細胞吸着器
9. 特開2003-320026 円筒状白血球除去器及び白血球除去システム
10. 特開2003-190276 ウイルス及び白血球選択除去方法、除去材および除去装置
11. 特開2003-058758 医療用品販売システム、サーバ、端末装置、プログラムおよび販売方法
12. 特開2002-360676 湿熱滅菌処理のための医療用具用栓体およびこれを用いる医療用具
13. 特開2002-153539 医療用具用ルーア-栓体及びこれを用いる医療用具

14. 特開2000-245833 白血球選択除去材
15. 特開2000-212235 親水性共重合体
16. 特開2000-185094 白血球選択除去フィルタ 装置
17. 特開2000-014773 血液中のリンパ球除去方法及びリンパ球除去装置
18. 特開平11-158076 特異的細胞除去材料
19. 特開平10-286307 B細胞親和性リガンド、B細胞分離材及びB細胞分離方法
20. 特開平10-033668 白血球選択除去フィルター及び白血球選択除去フィルター装置
21. 特開平09-075450 細胞選択フィルターおよび細胞分離方法
22. 特開平09-075076 単球及びノ又は単球由来のマクロファージ選択除去フィルター装置
23. 特開平08-201384 細胞選択フィルター
24. 特開平08-196627 細胞選択フィルター用固定基
25. 特開平07-024066 白血球選択捕捉器及び白血球捕捉装置
26. 特開平06-296864 ブラジキニンの吸着体
27. 特開平06-007431 血液成分分離用膜
28. 特開平06-007430 血液処理用の吸着材
29. 特開平06-007429 血液濾過材
30. 特開平05-264457 表面陰性荷電量測定法
31. 再表03/106518 生体適合性ポリマーおよびそれを用いた白血球選択除去フィルター材
32. 再表99/010025 白血球除去材及び親水化ポリオレフィンの製造方法
33. 再表97/027878 滅菌保護剤及び滅菌方法

【国内登録特許】

1. 特許3812909 単球及びノ又は単球由来のマクロファージ選択除去フィルター装置
2. 特許3533541 細胞選択フィルター
3. 特許3386195 白血球選択捕捉器及び白血球捕捉装置
4. 特許3330420 ブラジキニンの吸着体
5. 特許3176754 血液成分分離用膜
6. 特許3176753 血液処理用の吸着材
7. 特許3176752 血液濾過材
8. 特許3162165 表面陰性荷電量測定法

以上