

## 総 説

# 直接血液灌流 (DHP) 方式 LDL 吸着体の開発 —*In Vitro* 実験による吸着性能及び血液適合性の評価—

小林 明・山本 誉・中谷 勝・古吉 重雄・谷 紱孝

鐘淵化学工業株式会社医療器事業部

## *In Vitro* Evaluation of Dextran Sulfate Cellulose Beads for Whole Blood Infusion Low-Density Lipoprotein Hemoperfusion

Akira Kobayashi, Takashi Yamamoto, Masaru Nakatani, Shigeo Furuyoshi and Nobutaka Tani

*Kaneka Corporation*

**Summary** We describe results from a feasibility study of a newly developed low-density lipoprotein (LDL) adsorbent designed for use in whole-blood infusion LDL hemoperfusion. The adsorbent has almost the same chemical structure as the Liposorber adsorbent (dextran sulfate cellulose beads) but has a larger particle size. In whole-blood perfusion tests, the adsorbent adsorbed atherogenic LDL cholesterol directly from whole blood but left concentrations of high-density lipoprotein cholesterol largely unchanged. In whole-blood perfusion tests using fresh human donor blood or bovine blood anticoagulated with acid citrate dextrose solution or sodium citrate, the adsorbent showed minimal side effects in terms of blood cell activation, complement activation, and blood cell loss, suggesting that it has excellent blood compatibility. In addition, the adsorbent showed mechanical stability and absence of hemolysis. In conclusion, the new adsorbent showed the appropriate characteristics for an LDL adsorbent column for use in whole-blood infusion LDL hemoperfusion.

**Key words** : low-density lipoprotein, adsorption, direct hemoperfusion, blood compatibility, dextran sulfate

### 1. はじめに

LDL コレステロールは、動脈硬化の主要な危険因子であり、血中の LDL を除去し、LDL コレステロールの濃度を低下させることにより、動脈硬化の進行の抑制、改善をもたらすことが明らかにされている<sup>1-3)</sup>。

体外循環による LDL の除去方法として、膜による除去<sup>4)</sup>、沈殿による除去<sup>5)</sup>などのシステムが開発され臨床的に普及している。

分離血漿から LDL を選択的に除去するリポソームシステムは 1986 年に上市され<sup>6-8)</sup>、すでに長期の臨床実績がある。本システムの中で、LA-15 システムはその使用中に賦活・吸着のプロセスを繰り返すため、実用上吸着容量に制限が無く、血中 LDL を任意のレベルにまで低下させることができる。

近年、血漿を分離することなく血液を直接灌流する方式である DHP (Direct hemoperfusion) が体外循環量の軽減、操作性の向上、治療時間の短縮などが期

待できる治療方法として開発されている<sup>9-11)</sup>。

今回我々は、DHP の LDL 吸着体として化学的にはリポソーム吸着体と同一構造であるセルロース担体を用い、粒子径を大きくした吸着体を開発して、リポ蛋白吸着性能、非特異吸着性、血球の通過性並びに活性化、また凝固系、補体系への影響を検討したので報告する。

### 2. 材料および方法

#### 2.1 吸着体

吸着体は、粒径約 250  $\mu\text{m}$  の多孔質セルロースにデキストラン硫酸をリポソーム吸着体<sup>6-8)</sup>と同様の方法により共有結合で固定化して調整した。

#### 2.2 バッチ吸着実験 (非特異吸着評価)

吸着体のプライミング溶液として、生理食塩水に 25 mL クエン酸デキストロース (ACD-A) 溶液 25 mL, 8.4% 重炭酸ナトリウム溶液 25 mL とヘパリンナトリウム (最終濃度で 2 IU/mL) とを混合したものを使用した。

ヒト血液は、健常人ボランティアより採血し、ACD-A液 (5% v/v) とヘパリンナトリウム (0.5 IU/mL) にて抗凝固処理したものを使用した。ポリプロピレン製チューブ中で10 mLの血液とあらかじめプライミング溶液で平衡化した吸着体1 mLとを混合し、37°C、2時間振盪 (36回/分) した。

所定時間後上清を採取し、血漿中の蛋白、酵素、甲状腺ホルモン、副腎皮質ホルモン、膵臓ホルモン、免疫グロブリン、補体、電解質、ビタミン、リポ蛋白質の各成分濃度を測定した。コントロールとして吸着体の無い状態で血液を処理した。

吸着体で処理した血漿中の濃度をC{post}、コントロール血漿中の濃度をC{pre}として以下の計算により各成分の変化率を求めた。

$$\text{変化率(\%)} = (C\{\text{post}\}/C\{\text{pre}\}) \times 100.$$

### 2.3 通血実験

Fig. 1に示した実験回路を作製し、アクリル樹脂製カラム (内径10 mm, 長径190 mm) に吸着体13.9 mLを充填し、40 mLのプライミング溶液でプライミングした。

### 2.4 リポ蛋白吸着と通血性評価

ACD-A液 (5% v/v) とヘパリンナトリウム (0.5 IU/mL) にて抗凝固処理したヒト血液60 mLをテフロン製三角フラスコに入れ (以下血液プールと略す)、37°Cに加温し、最初の15分間は0.6 mL/minの流速で、その後15分~120分は1.6 mL/minの流速でカラムに通血した。吸着体を通過した血液は循環させ、カラム出口と血液プールからサンプリングした。

### 2.5 血液適合性評価

ACD-A液 (5% v/v) とヘパリンナトリウム (0.5

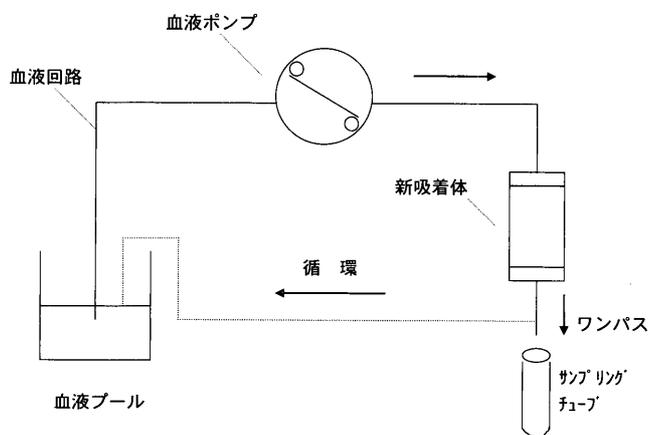


Fig. 1 *In vitro* experimental apparatus for the blood compatibility test is shown.

IU/mL) にて抗凝固処理したヒト血液120 mLをテフロン製三角フラスコに入れ37°Cに加温し、最初の15分間は0.6 mL/minの流速で、その後15分~41分は1.6 mL/minの流速でカラムに通血した。吸着体出口側は、血液プールに戻さず循環させない (以下ワンパスと略す) で41分間通血した。サンプリングはカラム出口と血液プールから実施した。

### 2.6 溶血、カラム差圧

溶血とカラム差圧の評価には、ウシ血液を用いた。ポリカーボネート製カラム (内径71 mm, 径190 mm) に約680 mLの吸着体を充填し、2,000 mLのプライミング溶液でプライミングした。Ca濃度を約0.2 mMに調整したウシ血液5 L (ヘパリン最終濃度で0.5 IU/mL含む) を37°Cに加温し、最初の15分間は30 mL/minの流速で、その後15分~120分は80 mL/minの流速でカラムに通血した。サンプリングはカラム出口と血液プールから実施した。

### 2.7 各成分の測定

血球数はMicrocell Counter CC-180 (シスメックス) にて測定し、各血球の通過率を下式により計算した。

$$\text{血球通過率(\%)} = (\text{カラム出口の血球数}) / (\text{カラム入口の血球数}) \times 100.$$

総コレステロール (TC)、トリグリセリド (TG)、HDL-コレステロール (HDL-C) 濃度はそれぞれ市販のキット [TC: 和光純薬(株) Lタイプワコーコレステロール, TG: 和光純薬(株) Lタイプワコー TG-H, HDL-C: 第一化学薬品(株) コレステスト HDL] を用いて測定した。LDL-コレステロール (LDL-C) 濃度は、Friedewaldの式 ( $LDL-C = TC - TG/5 - HDL-C$ ) により求めた<sup>12)</sup>。血液比重は硫酸銅法により測定した。顆粒球エラストーゼ (PMN-E) はPMN-E EIAキット (SKK社) にて、 $\beta$  トロンボグロブリン ( $\beta$  TG) はAsserachrom  $\beta$  TG ELISAキット (Roche diagnostics) にて、フィブリン/フィブリノーゲン分解産物 (FDP) は、FDP FDP-Eキット (MBL) にて測定した。C<sub>3a</sub>, C<sub>5a</sub> はRIA法 (Human complement C<sub>3a</sub>, C<sub>5a</sub> des Arg [<sup>125</sup>I] assay system, Amersham) によりそれぞれ測定した。活性化部分トロンボプラスチン時間とプロトロンビン時間は、血液凝固時間測定装置 CA-100 (シスメックス) により測定した。溶血の程度は血漿を577 nmで吸光度測定することにより評価した。

### 3. 結 果

#### 3.1 吸着性能

##### 3.1.1 非特異吸着

バッチ吸着実験による血液中の主要な成分の残存率を Fig. 2 に示した。TC 及び  $\beta$  リポ蛋白の 25% 以上が吸着体により除去され、リゾチーム、フィブリノーゲン、C<sub>5</sub>、CH<sub>50</sub>、ビタミン E の濃度は 15% 以上減少した。

##### 3.1.2 リポ蛋白吸着

全血灌流実験における脂質の濃度変化を Fig. 3 に示した。吸着体は TC, TG, LDL を選択的に減少させたが、HDL には影響を及ぼさなかった。

#### 3.2 血液適合性：各血球の通過率

全血灌流実験における各血球の通過率を Fig. 4 に示した。血小板の通過率は、灌流 20 分までは赤血球、白血球よりも低値を示したが、その後はいずれも良好な通過性を示した。通過率は 90% 以上であった。ワンパス通過において、白血球分画（好塩基球、好中球、単球、リンパ球）の比率は、Table 1 に示すようにほとんど変化は見られなかった。

#### 3.3 血球の活性化

白血球及び血小板の活性化の指標として各種放出因子を測定し、結果を Table 2 に示した。白血球活性化の指標としての PMN-E は、ワンパス通過において 285.3  $\mu\text{g/L}$  から 70.3  $\mu\text{g/L}$  へ著しく低下した ( $n=3$  の平均値)。

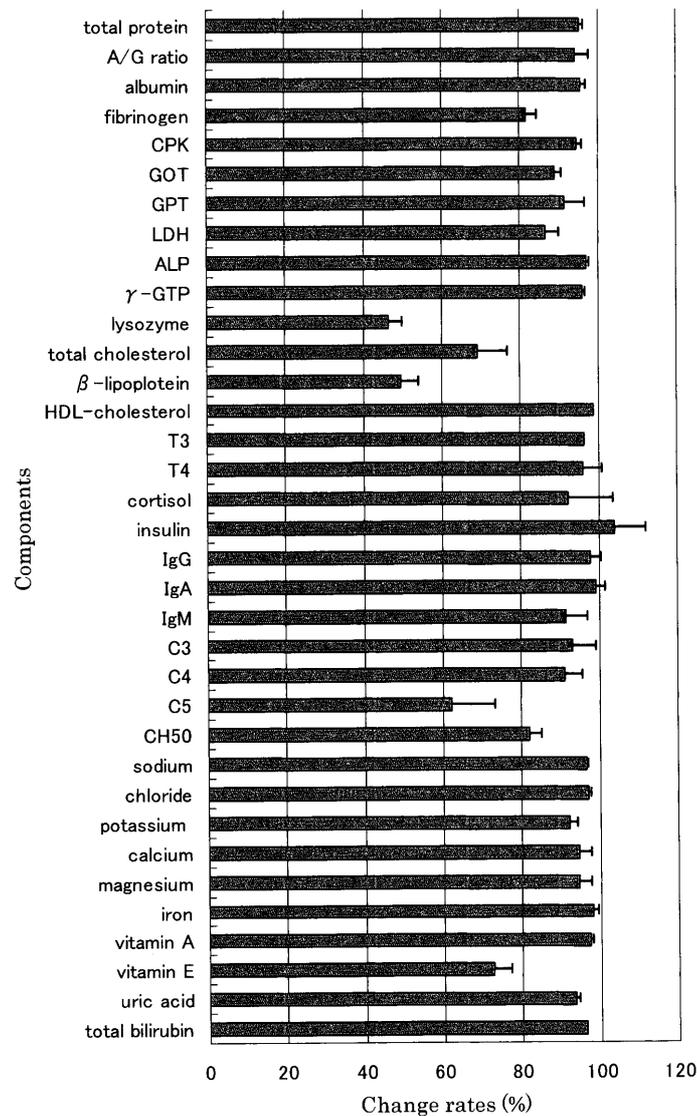


Fig. 2 Shown are change rates (%) of plasma components in batch test (mean  $\pm$  SD,  $n=3$ ).

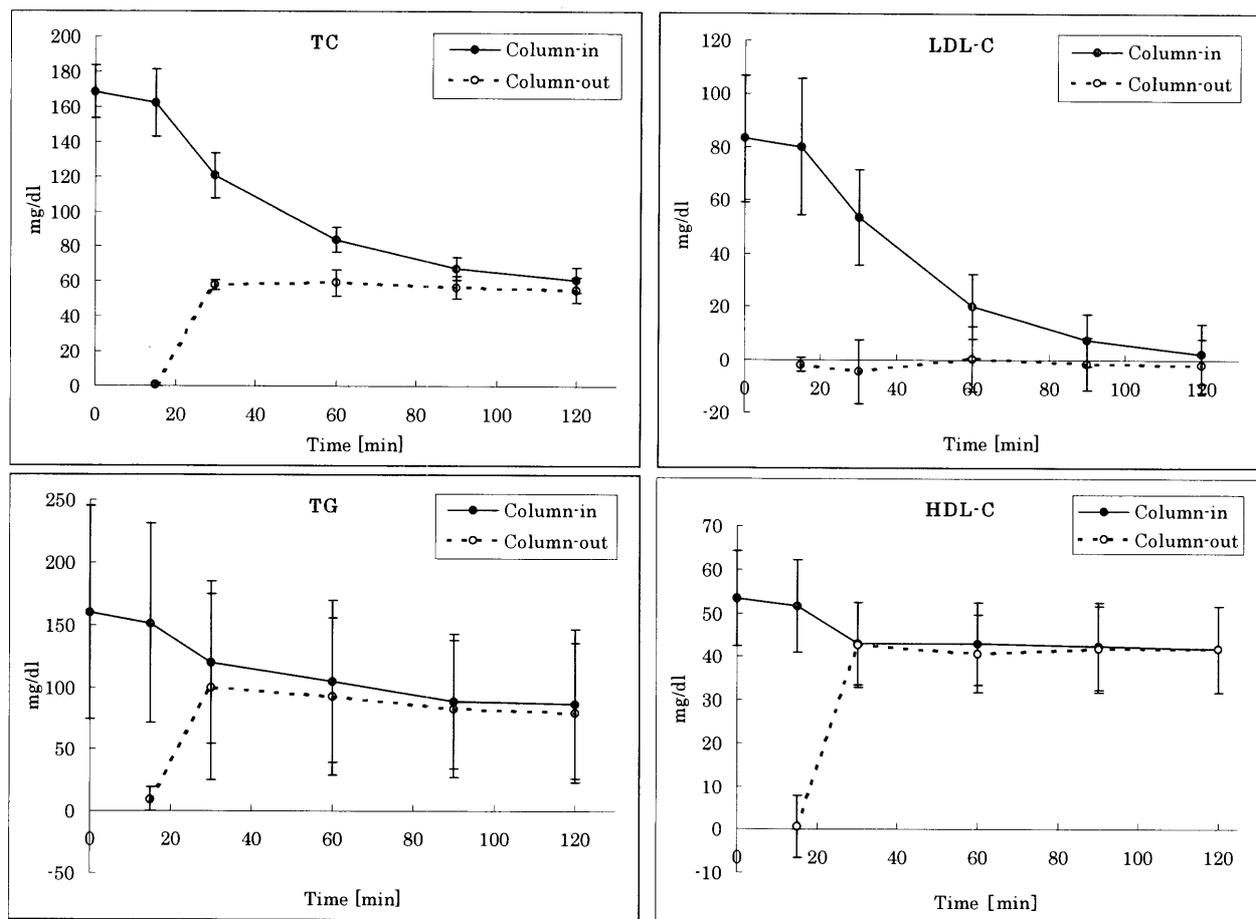


Fig. 3 Shown is the time course of the concentration of lipid parameters during whole-blood perfusion (mean  $\pm$  SD,  $n=3$ ).

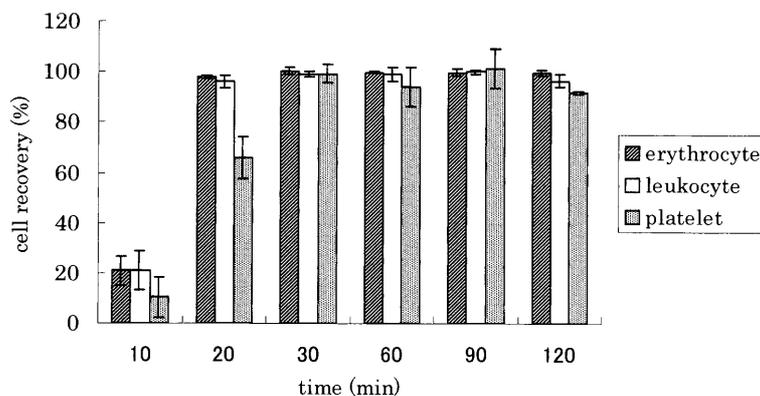


Fig. 4 Shown is the cell recovery of each type of blood cell during Whole-blood perfusion (mean  $\pm$  SD,  $n=3$ ).

Table 1 Effect of single-pass DSC perfusion on absolute changes of differential blood counts.

Treated vol./Column vol.	3.0 (30 min)		4.2 (41 min)	
	Column inlet	Column outlet	Column inlet	Column outlet
Basophile	0.3 $\pm$ 0.6	0.3 $\pm$ 0.6	1.0 $\pm$ 0.0	1.0 $\pm$ 1.0
Eosinophile	1.7 $\pm$ 2.9	1.0 $\pm$ 1.0	0.7 $\pm$ 1.2	2.0 $\pm$ 1.0
Lymphocyte	51.0 $\pm$ 3.6	51.3 $\pm$ 7.1	53.0 $\pm$ 9.2	53.7 $\pm$ 3.8
Monocyte	6.3 $\pm$ 2.1	4.0 $\pm$ 1.7	6.0 $\pm$ 0.0	4.3 $\pm$ 2.3
Neutrophile	40.7 $\pm$ 6.8	43.3 $\pm$ 6.4	39.3 $\pm$ 9.0	39.0 $\pm$ 1.0

mean  $\pm$  SD ( $n=3$ ).

**Table 2** Changes in the concentration of various parameters during a single blood passage through the adsorbent column.

Parameter	Unit	Concentration	
		Column inlet	Column outlet
PMN-E	$\mu\text{g/ml}$	$285.3 \pm 30.9$	$70.3 \pm 34.7$
$\beta$ TG	$\text{ng/mL}$	$619.3 \pm 389.4$	$70.3 \pm 17.6$
C3a	$\text{ng/mL}$	$213.0 \pm 26.1$	$51.7 \pm 17.2$
C5a	$\text{ng/mL}$	<10	<10
FDP	$\mu\text{g/ml}$	<10	<10
Specific gravity	—	$1.056 \pm 0.002$	$1.056 \pm 0.002$

mean  $\pm$  SD ( $n=3$ ).**Table 3** Changes in the blood coagulation time during a single blood passage through the adsorbent column.

		Unit: sec	
		Treated volume/Column volume	
		3.1 (31 min)	4.3 (42 min)
PT	inlet	$14.6 \pm 0.7$	$14.4 \pm 0.8$
	outlet	$26.4 \pm 0.5$	$21.0 \pm 1.5$
APTT	inlet	$48.1 \pm 6.8$	$48.2 \pm 7.5$
	outlet	>600	>600

mean  $\pm$  SD ( $n=3$ ).

血小板活性化の指標である  $\beta$ -TG も  $619.3 \text{ ng/mL}$  から  $70.3 \text{ ng/mL}$  へ著明な低下を示した。

### 3.4 凝固・線溶系

ワンパス通過において、外因系の活性化の指標である PT は 1.5~1.8 倍延長し、内因系の活性化の指標である APTT は著しく延長した (Table 3)。

線溶系の指標とした FDP は、通過前後でともに検出限界 ( $10 \mu\text{g/mL}$ ) 以下であった (Table 2)。

血液比重は、通過前後で変化は認められなかった (Table 2)。

### 3.5 補体系

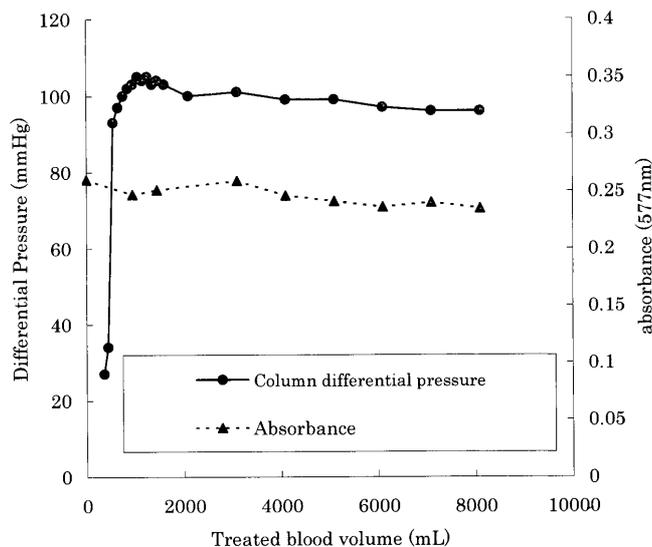
補体系活性化の指標として通過前後における  $C_{3a}$ 、 $C_{5a}$  を測定した。Table 2 に示すように  $C_{3a}$  は、 $213 \text{ ng/mL}$  から  $51.7 \text{ ng/mL}$  に低下した。 $C_{5a}$  は通過前後でともに検出限界 ( $10 \text{ ng/mL}$ ) 以下であった。

### 3.6 溶血・差圧

Fig. 5 に示すように血漿の吸光度は、 $577 \text{ nm}$  で通過の前後で変化が認められなかった。カラム差圧は終始  $100 \text{ mmHg}$  前後で安定していた (Fig. 5)。

## 4. 考 察

DHP 方式の LDL 吸着体として、化学的にリポソーム吸着体と同一で粒径を大きくした吸着体を調整

**Fig. 5** Shown is the plasma absorbance at 577 nm and the change of differential pressure across the adsorbent column.

Column differential pressure = (Column inlet) - (Column outlet).

し、DHP 用吸着体としての可能性を評価した。新吸着体は、TC、TG、LDL に対しては高い吸着率を示し、HDL に対してはほとんど変化させなかった。さらにバッチ実験において、アルブミンや免疫グロブリンなどの主要な血液成分にも影響は認めなかった。

これらの結果から新吸着体はリポソーム吸着体と同等の選択的吸着性能を有することが明らかになった。

非特異吸着の評価では、リゾチーム、フィブリノーゲン、 $C_5$ 、 $CH_{50}$ 、ビタミン E が 15% 以上吸着されることが確認された。これらの成分の中で、ビタミン E は脂溶性のビタミンであり、LDL などのリポ蛋白中に存在するため、脂質の吸着とともに濃度が低下したと考えられた<sup>13)</sup>。

リゾチームは pH 11 の等電点を有する塩基性蛋白であり、ポリアクリロニリル製の膜のような陰性荷電を持つ材料に吸着されることが知られており、本吸着体のリガンドの陰性荷電により吸着したと考えられる<sup>14)</sup>。

フィブリノーゲン、 $C_5$ 、 $CH_{50}$  の低下の機序は不明であるが、これらの成分はリポソームシステムによっても低下し<sup>15-17)</sup>、リポソームの長期臨床使用において副作用発現の報告は無く、実用上の支障とはならないと考えられる。

直接血液灌流用の吸着体カラムの実用化のために吸着体は、高い血液適合性と実用に耐え得る吸着体強度を有していなければならない。

全血灌流実験で通血開始 20 分までは血小板の回収率は赤血球・白血球よりも低値であったが、その後はスムーズに通過し、貯蔵血中の血小板数も 120 分まで変化は見られなかった。これらのことから、通血開始初期の血小板の減少は実用上支障は無いと考えられた。PMN-E,  $\beta$  TG はワンパス通過実験で低下したが、これはリポソーパーでも確認されており<sup>18)</sup>、新吸着体がリポソーパーと同様にこれらの因子を吸着したと考えられる。

白血球や血小板が活性化されるか否かは明らかではないが、PMN-E や  $\beta$  TG は二次的な副反応や活性化反応を惹起することから、これらの放出因子を吸着することは実用上、好ましいことであると思われる<sup>19,20)</sup>。

680 mL の吸着体を含むカラムに流速 80 mL/分 で 5 L のウシ血液を通血した場合、血球の通過率はほぼ 100% であり、またカラム入口と出口の差圧は 120 分まで一定であることが確認された。通血中に目詰りや凝固が生じなかったことから本吸着体は全血灌流に適切であることが判明した。

各血球への影響の評価以外に凝固・線溶系や補体系などの主要な血液成分への適合性も評価した。

凝固系では、APTT, PT の延長が認められた。このことは、ソーパーや LDL 抗体カラムでも報告されており、いくつかの凝固因子の低下と吸着体表面の陰性荷電に接触して内因性の凝固経路が活性化した結果であると考えられる<sup>21,22)</sup>。それゆえ、新吸着体において凝固時間の延長は同様のメカニズムにより生じたものと考えられる。

凝固系の活性化により発生する重要な現象は、強力な血管拡張作用を有するブラジキニンの産生である。ブラジキニンは、DALI システム、リポソーパーシステムにおいても治療中に産生されるが、分解酵素キナーゼ II (=アンジオテンシン変換酵素: ACE) にて血中で速やかに不活性化されるので通常は重大な問題とならない<sup>23,24)</sup>。むしろ、適度なブラジキニンの上昇は、閉塞性動脈硬化症の末梢動脈血液循環を改善させることがリポソーパー治療の結果から明らかにされている。しかしながら、ACE 阻害剤を服用している症例においては、ブラジキニンの不活性化が阻害されることにより、アナフィラキシー様反応を起こすことが報告されている。

新吸着体はリポソーパー吸着体とほぼ同様の化学構造を有しており、ACE 阻害剤によりアナフィラキシー様反応を起こすことが想定され、臨床使用に際して

ACE 阻害剤は禁忌と考えられる。

補体系については、活性化の指標として  $C_{3a}$ ,  $C_{5a}$  の上昇があるが、ワンパス通血実験においては上昇は見られなかった。事実、 $C_{3a}$  は減少し、 $C_{5a}$  は検出限界以下であった。 $C_{3a}$  は陽性に荷電した分子を含んでおり、リポソーパー吸着体のような陰性荷電の材料によって吸着される<sup>25)</sup>。アナフィラトキシン  $C_{3a}$  が吸着されることは吸着体カラムの性質としてはむしろ好ましいと考えられる。

## 5. 結 論

新たに開発した全血灌流用の吸着体は、血液中の主要な成分に影響を与えることなく LDL を選択的に吸着することが確認された。さらに、新吸着体は血球や補体の活性化に影響を及ぼさず、溶血を伴わない良好な血球通過性を示し、十分な吸着体強度を有することから全血灌流用の吸着体として実用可能であると考えられた。

## 6. お わ り に

新吸着体の化学的・生物学的安全性はリポソーパーの長期臨床使用の実績から確立されており、今後 DHP カラムとして動脈硬化性血管病変の治療に応用されることを期待する。

## 文 献

- 1) Cullen P, Funke H, Schulte H, Assmann G: Lipoproteins and cardiovascular risk-from genetics to CHD prevention. *Eur Heart J* **19**: C5-C11, 1998
- 2) Mabuchi H, Koizumi J, Shimizu M, et al: Long-term efficacy of low-density lipoprotein in apheresis on coronary heart disease in familial hypercholesterolemia. *Am J Cardiol* **82**: 1489-1495, 1998
- 3) Tatami R, Inoue N, Itoh H, et al: Regression of coronary atherosclerosis by combined LDL-apheresis and lipid-lowering drug therapy in patients with familial hypercholesterolemia: a multicenter study. *Atherosclerosis* **95**: 1-13, 1992
- 4) Koga N, Nomura G, Yamagata Y, et al: Double filtration plasmapheresis in the treatment of two cases of homozygous familial hypercholesterolemia. *Therapeutic Plasmapheresis (III)*: 113-118, 1983, Schattauer New York
- 5) Eisenhauser T, Armstrong VW, Wieland H, et al: Selective removal of low density lipoproteins (LDL) by precipitation at low pH: First clinical application of the HELP system. *Klin Wochenschr* **65**: 161-168, 1987
- 6) Mabuchi H, Koizumi J, Michishita I, et al: Effects on coronary atherosclerosis of long-term treatment of familial hypercholesterolemia by LDL-apheresis. *Contrib Infus Ther* **23**: 87-96, 1988

- 7) Bambauer R, Olbricht CJ, Schoeppe E: Low-density lipoprotein apheresis for prevention and regression of atherosclerosis: Clinical results. *Therapeutic Apheresis* **1**: 242-248, 1997
- 8) Koga N, Watanabe K, Kurashige Y, et al: Long-term effects of LDL apheresis on carotid arterial atherosclerosis in familial hypercholesterolemic patients. *J Intern Med* **246**: 35-43, 1999
- 9) Bosch T, Schmidt B, Blumenstein M, Gurland HJ: Lipid apheresis by hemoperfusion: *In vitro* efficacy and *ex vivo* biocompatibility of a new low-density lipoprotein adsorber compatible with human whole blood. *Artif Organs* **17**: 640-652, 1993
- 10) Draeger LJ, Julius U, Kraenzle K, et al: DALI-the first human whole-blood low-density lipoprotein and lipoprotein (a) apheresis system in clinical use: procedure and clinical results. *Eur J Clin Invest* **28**: 994-1002, 1998
- 11) Bosch T, Lennertz A, Kordes B, Samtleben W: Low density lipoprotein hemoperfusion by direct adsorption of lipoproteins from whole blood (DALI apheresis): clinical experience from a single center. *Therapeutic Apheresis* **3**: 209-213, 1999
- 12) Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS: Estimation of the concentration of low density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* **18**: 499-502, 1972
- 13) Assogba U, Lepage S, Bruckert E, et al: Blood antioxidants (vitamin E and beta-carotene) in long-term low density lipoprotein apheresis. *Clinica Chimica Acta* **235**: 147-157, 1995
- 14) Barozzi C, Cairo G, Fumero R, et al: Polyacrylonitrile membranes in hemodialysis: blood-surface interactions. *Life Support Syst* **3**: 490-494, 1985
- 15) Yoshidome H, Kuriyama M, Shinmyozu K, Osame M: Effects of LDL-apheresis on serum lipoprotein (a), C 4 b binding protein, protein C, protein S, and complement components. *J Atherosclerosis Thrombosis* **1**: 103-107, 1994
- 16) Tasaki H, Tsuda Y, Yamashita K, et al: Removal of plasma fibrinogen by LDL apheresis. *Jpn J Apheresis* **16**: 263, 1997
- 17) Schulzeek P, Olbricht CJ, Koch KM: Long-term experience with extracorporeal low-density lipoprotein cholesterol removal by dextran sulfate cellulose adsorption. *Clin Invest* **70**: 99-104, 1992
- 18) Soeda K, Odaka M, Tabata Y, et al: Affinity of dextran sulfate-cellulosebead (DSCB) for humoral substances. *Jpn J Artif Organs* **18**: 331-334, 1989
- 19) Suzuki H, Katagiri Y, Tsukita S, et al: Localization of adhesive proteins in two newly subdivided zones in electron-lucent matrix of human platelet  $\alpha$ -granules. *Histochemistry* **94**: 337-344, 1990
- 20) Suzuki H, Kinlough-Rathbone R, Packham M, et al: Immunocytochemical localization of fibrinogen during thrombin-induced aggregation of washed human platelets. *Blood* **71**: 1310-1320, 1988
- 21) Knisel W, Nicuolo AD, Pfohl M, et al: Different effects of two methods of low-density lipoprotein apheresis on the coagulation and fibrinolytic systems. *J Intern Med* **234**: 479-487, 1993
- 22) Kojima S, Harada-shiba M, Toyota Y, et al: Changes in coagulation factors by passage through a dextran cellulose column during low-density lipoprotein apheresis. *Int J Artif Organs* **15**: 185-190, 1992
- 23) Bosch T, Lennertz A, Schmidt B, et al: DALI apheresis in hyperlipidemic patients: biocompatibility, efficacy, and selectivity of direct adsorption of lipoproteins from whole blood. *Artif Organs* **24**: 81-90, 2000
- 24) Keller C, Gruetzmacher P, Bahr F, et al: LDL-apheresis with dextran sulfate and anaphyractoid reactions to ACE inhibitors. *Lancet* **341**: 60-61, 1993
- 25) Bosch TK: Klinische LDL adsorption an dextransulfat. *Mitt Klin Nephrol* **19**: 69-72, 1990