Japanese Society for Apheresis

日本アフェレシス学会雑誌 35(1):36-41, 2016

原著論文

新しい洗浄型CART（Washed-CART）の考案：基礎的検討

江口　圭[*1]・山本健一郎[*2]・峰松佑輔[*4]・金子岩和[*1]
秋葉　隆[*3]・峰島三千男[*2]

[*1]東京女子医科大学臨床工学部, [*2]同臨床工学科, [*3]同血液浄化療法科
[*4]国立病院機構大阪医療センター臨床工学室

New Approach to Cell-free and Concentrated Ascites Reinfusion Therapy (CART): A Preliminary Study of Washed-CART

Kei Eguchi[*1], Ken-ichiro Yamamoto[*1], Yusuke Minematsu[*3], Iwakazu Kaneko[*1], Takashi Akiba[*2] and Michio Mineshima[*1]

[*1] *Department of Clinical Engineering and* [*2] *Department of Blood Purification, Tokyo Women's Medical University,* [*3] *Division of Clinical Engineering, National Hospital Organization Osaka National Hospital*

Summary These days, cell-free and concentrated ascites reinfusion therapy (CART) is aggressively performed for intractable ascites of hepatocirrhosis, cancer in Japan. However, adverse reactions such as fever have often occurred. In order to improve conventional CART, we developed a new CART system named "Washed-CART". In this system, we tried not only to remove cytokines from concentrated ascites but also to control their concentration with a washing process with saline. The reduction ratio of cytokine-like solutes with a molecular weight of 20-30 kDa increased by 20% or more through the washing process, while the albumin level remained almost the same. Pressure at the inlet of the filter strongly correlated with the albumin level of the concentrate, indicating the albumin level can be controlled by the pressure value. If a cryopreserve ascites system is developed in the future, the Washed-CART will prove effective for the system.

Key words : cell-free and concentrated ascites reinfusion therapy (CART), adverse reaction, washing process with saline, concentration control of the ascites

要　旨　腹水濾過濃縮再静注法（CART）は，肝硬変や癌患者における難治性腹水症例を対象に積極的に施行されつつある．しかし，未だ機序が不明瞭な発熱が副作用として高頻度に報告されており，薬剤による対症療法が併用されている．そこで今回，発熱への関与が疑われるサイトカイン分画を除去し，一定濃度に調整した腹水製剤の精製を目的に，生理食塩液にて洗浄・再濃縮する洗浄型CART（Washed-CART）を考案し，その有用性を *in vitro* にて検証した．その結果，通常の濾過濃縮操作に洗浄操作を加えることで，分子量2万～3万に存在するサイトカインと同分画の除去率を20%程度向上できた．一方，アルブミン分画の除去率はほぼ不変であった．また，濃縮器入口圧と濃縮液中の蛋白濃度との間には，良好な相関関係が認められ，圧力値を指標にした濃度制御の可能性が示唆された．今後，腹水製剤の冷凍保存が一般的になれば，Washed-CARTの重要性はさらに高まるであろう．

1. 緒　　言

腹水濾過濃縮再静注法[1]（CART: cell-free and concentrated ascites reinfusion therapy）は，難治性腹水症例の緩和ケア療法の一環として，以前より行われてきた．ここ数年のCARTの動向は，肝硬変などに併発する肝性腹水[2]のみならず，癌患者おける癌性腹水[3,4]にも積極的に適応されるようになった．

現在，CARTと腹腔内化学療法の併用療法[5]や，回収した癌細胞を利用したオーダーメイド癌治療[6]など，種々の新しい試みが展開している．

さらに血液センターや輸血部を有する施設において，腹水を血漿製剤と同様に取り扱い，患者認証システムを導入して，腹水製剤を分割・保存する取り組みも始

2015年7月1日受付，2015年10月27日受理.

NII-Electronic Library Service

Japanese Society for Apheresis

まっている[7].

しかし，未だ機序が不明瞭な発熱[8]が副作用として高頻度に報告されており，薬剤による対症療法が併用されている．現在までのところ，腹水中にサイトカインの1つであるinterleukin-6（IL-6）[9,10]が高濃度に存在し，再静注時の発熱に何らかの影響を及ぼしている可能性が指摘されている．

そこで今回，発熱への関与が疑われるサイトカイン分画を除去し，一定濃度に調整した腹水製剤の精製を目的に，洗浄赤血球液（washed red cells）と同様，生理食塩液にて洗浄・再濃縮する洗浄型CART（Washed-CART）を考案し，その有用性を*in vitro*にて検証した．

2. 方　　法

東京女子医科大学倫理委員会の承認のもと，ヒト血漿を模擬の腹水に見立てて，以下に示す*in vitro*実験1，2を単回実験にて行った．

ヒト血漿は，腎不全患者を対象とした血漿交換療法の廃液として得たものを，凍結保存後に解凍し，川澄化学工業社製輸血フィルタ（微小凝集塊除去用）SQ40sによる濾過処理後に使用した．なお，炎症性サイトカインと同分画の他溶質を測定するため，サイトカインと同等の分子量蛋白を含む透析液濃縮廃液を混合した．

検査項目とその分子量を表1に示す．ここで透析液濃縮廃液は，高性能な蛋白漏出型透析器（V型）を用いた血液透析時における4hぶんの貯留廃液を，蛋白透過性の低い透析器（FB210EG，I型，ニプロ社製）を用いて，容量が約120Lから0.5Lになるまで濾過濃縮したものである．

腹水濃縮器には，実験1，2とも旭化成メディカル社製AHF-UPを，実験ごとにシングルユースで使用した．

模擬腹水の蛋白濃度は，過去の報告[11]より癌性腹水の平均蛋白濃度Alb≒2.0 g/dL，TP≒4.0 g/dLを参考に希釈調整した．最終的な実験溶液は，検査値でAlb＝2.2 g/dL，TP＝3.6 g/dLとなった．

表1　検査項目と分子量

検査項目	分子量	分子量が近似するサイトカイン	分子量
urea	60 Da		
β2-microglobulin（β2-MG）	11.8 kDa		
myoglobin（Mb）	17.5 kDa	interleukin-1β（IL-1β）	17.5 kDa
prolactin（PRL）	23 kDa	interleukin-6（IL-6）	20～30 kDa
α1-microglobulin（α1-MG）	33 kDa	tumor necrosis factor-α（TNF-α）	17～51 kDa
albumin（Alb）	66 kDa		
immunoglobulin G（IgG）	155 kDa		
total protein（TP）	—		

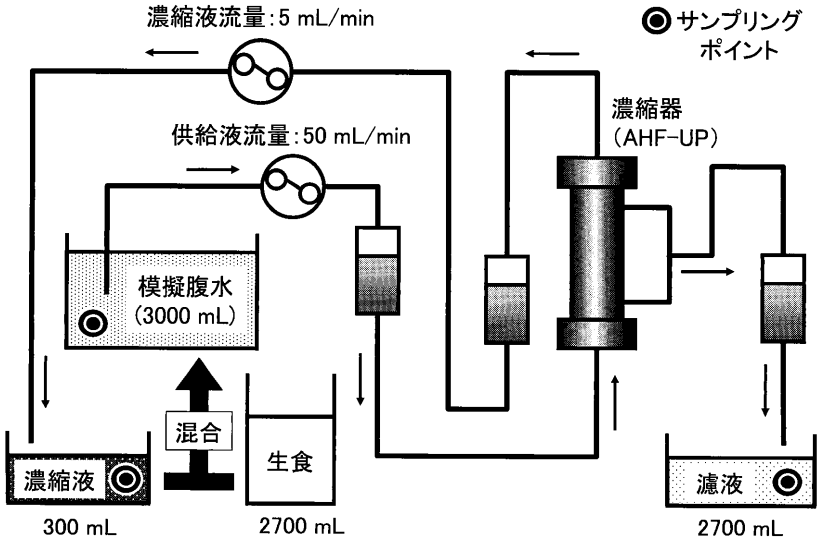

図1　実験1の回路図

工程①：模擬腹水3,000 mLを10倍に濃縮する（濃縮液300 mL）．工程②：濃縮液300 mLに生理食塩液2,700 mLを混合後，再度10倍濃縮する．工程③：工程②の繰り返し．

NII-Electronic Library Service

Japanese Society for Apheresis

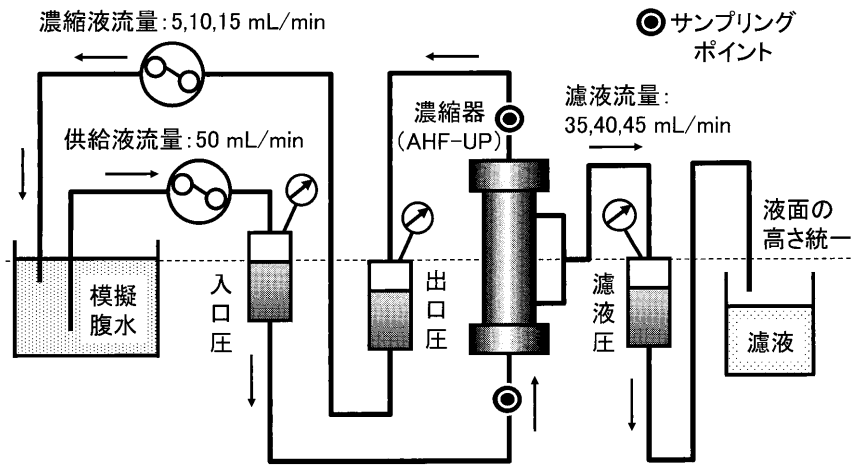

図2　実験2の回路図

抗凝固薬は，臨床中に患者へ投与されたものが一部血漿中に含まれるが，実験に際して別途追加混注はしなかった．

2.1　腹水製剤の洗浄（実験1）

実験回路図を図1に示す．模擬腹水（3,000 mL）に対して，供給液流量50 mL/min，濃縮液流量5 mL/minの操作条件にて，単純濾過濃縮操作（工程①）を行い，10倍濃縮した（濃縮液300 mL）．この濃縮液に対し生理食塩液（2,700 mL）を混合・希釈して，容量（3,000 mL）に戻した後，再度10倍濃縮する洗浄操作を2度繰り返した（工程②③）．本工程（①②③）は，同一濃縮器で連続して行った．

この洗浄操作に伴うサイトカイン分画の除去，アルブミン分画の損失などを，各溶質の除去率および溶質濃度の推移により評価した．

2.2　腹水製剤の濃度制御（実験2）

実験回路図を図2に示す．同一組成の模擬腹水(3,000 mL）を3セット準備し，供給液流量50 mL/min（一定），濃縮液流量5，10，15 mL/minの3条件にて，連続した濾過濃縮操作を行った．濃縮器は条件ごとに新しいフィルタを使用した．

ここで濾液流量および濾過分率（FF:filtration fraction）は，以下に示す式(1)(2)によって定義されるため，FFは図2に示すように0.7，0.8，0.9の3条件である．

濾液流量＝供給液流量－濃縮液流量　　式(1)

FF＝濾液流量/供給液流量　　式(2)

この連続した濾過濃縮操作中の10，20，30，35，40，45，50，55，60，65，70 min時に，図2に示すように液面の高さ位置を統一して，入口圧，出口圧，濾液圧を計測した．

また，同時刻に蛋白濃度（Alb，TP）を測定すべく，濃縮器入口側/出口側からサンプリングした．なお，入口圧が500 mmHgに到達した時点で実験終了とした．

ここで測定された各圧力値から，以下に示す式(3)より膜間圧力差（TMP:transmembrane pressure）を算出し，TMPと蛋白濃度との関係をFF別に調べた．

TMP＝(入口圧＋出口圧)/2－濾液圧　　式(3)

3. 結　　果

3.1　腹水製剤の洗浄効果

まず初めに，処理前の模擬腹水中の溶質量に占める，各工程（①②③）別の濾液中に含まれる溶質量の割合から，除去率を求め図3に示す．

ureaなどの小分子な溶質は，濃縮器の細孔を容易に通過できるため，濾過されやすく除去率は極めて高値となった．一方，Albなどの大分子な溶質は，濃縮器の細孔を通過しにくいため，あまり除去されずに除去率は極めて低値となった．

各工程別に比較すると，小分子溶質は工程①単独でも，高い除去率に到達する傾向にあった．一方，β2-MGからα1-MGまでの分画では，工程①に続く工程②③の洗浄操作に伴い，除去率の増加が認められた．

次に，各工程の進展（①→②→③）に伴う濃度推移

NII-Electronic Library Service

Japanese Society for Apheresis

$$除去率(\%) = \frac{各工程別の濾液中の溶質量}{処理前の模擬腹水中の溶質量} \times 100$$

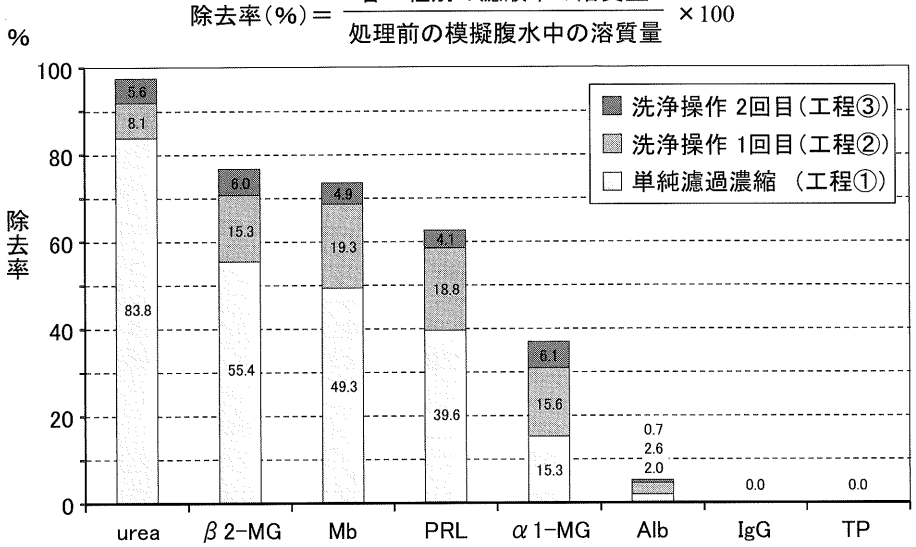

図3　腹水製剤の洗浄効果（除去率）

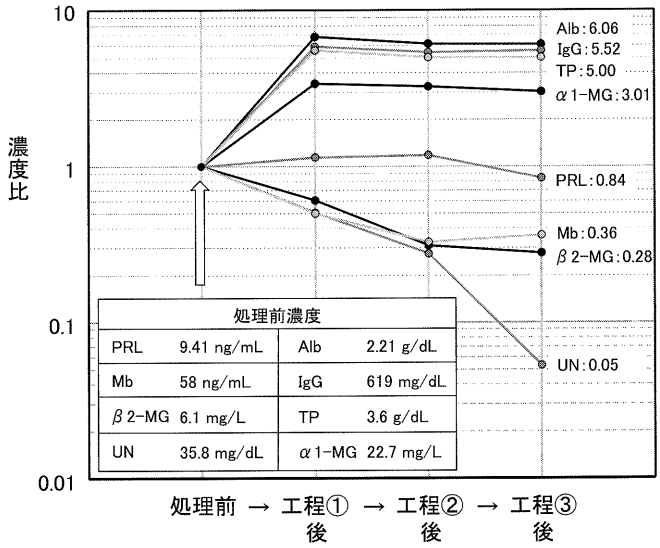

図4　腹水製剤の洗浄効果（濃度比）

を，処理前の模擬腹水中溶質濃度を基準に，濃度比として求め図4に示した．

ureaからMbまでの分画では，濃縮現象は起きにくく，回路内にもともと充填されていた生理食塩液による希釈により，工程①後でも濃度比の低下が認められた．その後は工程②③の洗浄操作に伴い，濃度比はさらに低下する傾向が認められた．

一方，α1-MGからIgGまでの分画およびTPでは，工程①に伴う顕著な濃度比の上昇（濃縮現象）を呈し，その後に工程②③の洗浄操作を加えても，ほぼ同値を維持した．

その中間の分画に位置するPRLは，初期の僅かな上昇後（濃度比1.14），最終的には洗浄操作により軽度の低下（濃度比0.84）に転じた．

3.2　腹水製剤の蛋白濃度と圧力値

FF別に見た濃縮器入口側/出口側の蛋白濃度（Alb, TP）とTMPの関係を図5に示す．図5上段にTP濃度，下段にAlb濃度のグラフを示す．

まず初めに，図5の左図に示すように，入口側蛋白濃度が高いほど，濾過の推進力としてより大きなTMPを必要とし，さらにFF＝0.9と濾過分率が高いほど，この傾向は顕著であった．

次に，図5の中央図に示すように，横軸を出口側蛋白濃度にすると，FFによる差異はなくなり，各プロットは一本の曲線上に分布した．この曲線をもとに，例えばTMP＝400 mmHgの濾過条件下では，フィルタ出口においてTP≒20 g/dL，Alb≒15 g/dLの濃縮液が得られていると推測できる．

一般に，CART施行時には濃縮器を囲む3点圧（入口圧，出口圧，濾液圧）を監視することはない．ここで圧力損失が軽微で，濾液側は大気解放であることから，入口圧≒出口圧，濾液圧≒0 mmHg（ゲージ圧）と仮定すると，式(3)よりTMP≒入口圧となる．そのため図5の右図に示すように，縦軸を単純に入口圧としても，グラフ傾向は図5の中央図とほとんど変わらず，特に1点圧（入口圧）監視でも遜色のない良好な相関関係が示された．

4. 考　　察

近年CARTがより積極的に行われるようになり，治療件数の増加のみならず，婦人科領域[12]などへの適

NII-Electronic Library Service

Japanese Society for Apheresis

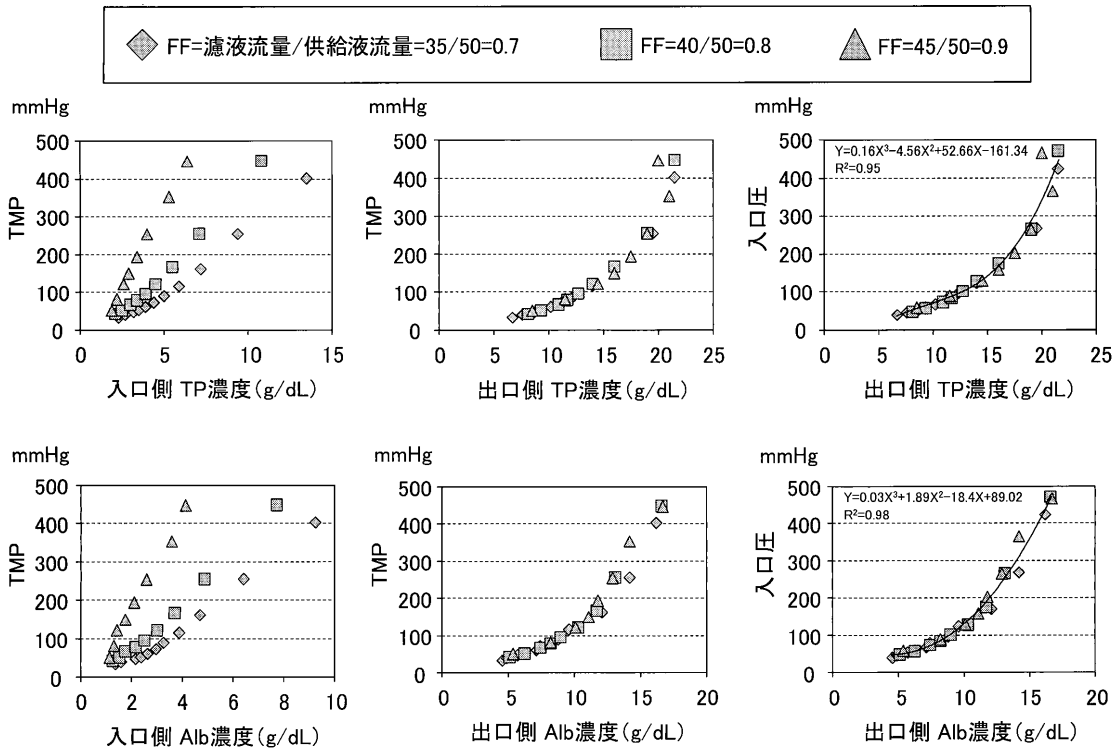

図5　蛋白濃度と圧力値の関係

応拡大，診療報酬の改定など，CART を取り巻く環境は日々変化している．

例えば，CART の最大の副作用とされた再静注時の発熱は，処理速度の調整[8]（緩徐な濾過速度）による免疫細胞への機械的ストレスの軽減や，副腎皮質ホルモンの前投与と解熱剤の使用[13,14]により，軽症な範囲に抑えられるようになった．

一方，CART の技術的な部分においても，内圧濾過法/外圧濾過法，シングルパス方式/再循環方式[15]など種々の回路構成が提案され，吸引器を用いて在宅での CART を可能にした KM-CART[16]など，技術的変革がもたらされている．

そこで今回，発熱への関与が疑われるサイトカイン分画を除去し，一定濃度に調整した腹水製剤の精製を目的に，Washed-CART の考案を試みた．

まず初めに，図3に示す実験1の結果から，単純濾過濃縮操作に洗浄操作を加えることで，分子量2万～3万に存在するサイトカインと同分画の除去率を増加させることができた．一方，アルブミン分画の除去率はほぼ不変であり，本法は原腹水中のサイトカイン分画を除去する有効な手段の1つと考えられた．

しかし，1本の濃縮器で濾過濃縮操作を繰り返すことは，膜のファウリングを助長する可能性がある．事実，工程②による Alb 除去率 2.6% に比べ，工程③の Alb 除去率は 0.7% に低下している．よって urea などの小分子な溶質を除き，ファウリングによるサイトカイン分画の除去効率の低下が懸念される．ゆえに，洗浄操作は単純濾過濃縮操作後に1回とするのが妥当であるかもしれない．

次に，図5に示す実験2の結果から，濃縮器出口側の蛋白濃度は，入口圧と良好な相関関係にあり，圧力値を指標にした流量制御を行えば，最終腹水製剤の蛋白濃度を制御することが可能であると思われた．

例えば，Washed-CART の洗浄工程中に，入口圧＝400 mmHg を維持するようにプログラムし，供給液流量（一定），濃縮液流量（可変）を自動制御すれば，TP≒20 g/dL，Alb≒15 g/dL の腹水製剤を調整することが期待できる．

さらに蛋白濃度のバラツキの減少は，同一な再静注速度下での蛋白補充量の統一にも寄与するものと思われる．

最近の CART は外来診療として行われることも多く，腹水採取→腹水濾過濃縮処理→再静注の各工程に，それぞれ数時間を要し，1日がかりとなることも少なくない．このような現状において，Washed-CART はサイトカイン分画の除去量増大というメリットの反面，腹水処理時間のさらなる延長という問題を抱えている．

NII-Electronic Library Service

Japanese Society for Apheresis

未だ，発熱の原因物質は特定されておらず，特にサイトカイン分画の除去率向上が，臨床上どのような効果をもたらすかは不明であるが，将来，岡本ら[7]が提唱する「腹水を血漿製剤と同様に取り扱い，分割・(冷凍) 保存して，次回の腹水穿刺時に投与する」という新しい運用法が一般的になれば，時間的制約はなくなり，より質の高い腹水製剤を精製できるWashed-CARTの重要性はさらに高まるであろう．

現在，Washed-CARTを施行する場合，現状ではマニュアル操作となり，手技の煩雑さ，圧力制御/流量制御の難しさ，生理食塩液分のコストなど，他にも改善すべき問題点は残されている．より多くの難治性腹水症例に対して，広範囲に技術提供するためには，Washed-CARTモードを備えた専用装置による自動化が必須である．

5. 結　　論

CARTの一変法としてWashed-CARTを考案し，その性能を調査すべく *in vitro* 実験による基礎検討を行った結果，通常の濾過濃縮操作に洗浄操作を加えることで，サイトカイン分画を除去することができた．また，濃縮器入口圧と濃縮液中の蛋白濃度との間には，良好な相関関係が認められ，圧力値を指標にした濃度制御が可能と思われた．ゆえにWashed-CARTは，より質の高い腹水製剤を精製するのに有効と思われた．

本研究に使用した製品情報や，測定方法についてのアドバイスなど，川澄化学工業株式会社の遊馬貴義氏および細井信幸氏より，ご協力をいただきました．心より感謝いたします．

著者の利益相反（conflict of interest：COI）開示：本論文発表内容に関して特に申告なし．

文　　献

1) 丸山和紀，草生真規雄，山路　健：腹水濾過濃縮再静注法（CART）．日アフェレシス会誌 2014；**33**：148-55
2) 高松正剛，﨑久保悦男，大畑　博，他：肝硬変における腹水濾過濃縮再静注法（Cell-free and Concentrated Ascites Reinfusion Therapy, CART）．日アフェレシス会誌 2014；**33**：156-61
3) Ito T, Hanafusa N, Fukui M, et al：Single center experience of cell-free and concentrated ascites reinfusion therapy in malignancy related ascites. Ther Apher Dial 2014；**18**：87-92
4) Ito T, Hanafusa N, Iwase S, et al：Effects of cell-free and concentrated ascites reinfusion therapy (CART) on symptom relief of malignancy-related ascites. Int J Clin Oncol 2015；**20**：623-8
5) 石神浩徳，北山丈二，山口博紀，渡邉聡明：癌性腹膜炎を伴う胃癌に対する集学的治療：CARTと腹腔内化学療法を併用した積極的治療戦略．日アフェレシス会誌 2014；**33**：162-6
6) 松﨑圭祐：外圧・定圧濾過により拡がるCARTの可能性：症状緩和からオーダーメイド癌治療へ．日アフェレシス会誌 2014；**33**：194-201
7) 岡本好雄，槍澤大樹，小林博人，他：自己血漿製剤という観点から見たCART．日アフェレシス会誌 2014；**33**：178-84
8) 高松正剛，宮﨑浩彰，片山和宏，他：難治性腹水症に対する腹水濾過濃縮再静注法（CART）の現況：特に副作用としての発熱に影響する臨床的因子の解析．肝胆膵 2003；**46**：663-9
9) 近藤守寛，石田　猛，仲川孝彦，坂口徹太郎：腹水濃縮再静注法の発熱の防止．洛和会病院医学雑誌 2000；**11**：30-6
10) 中嶋章貴，柴原伸久，岡　博史，他：腹水濾過濃縮再静注法における腹水中IL-6濃度と発熱との関係．透析会誌 2001；**34**：335-8
11) 横田治重，吉川裕之：厚生労働科学研究費補助金（がん臨床研究事業）進行卵巣がんにおける化学療法先行治療の確立に関する研究：進行・再発卵巣がん治療における腹水濾過濃縮再静注法の有用性に関する研究．平成21年度総括研究報告書 2010, pp. 42-3
12) 寺尾泰久：腹水濾過濃縮再静注法の婦人科適応疾患と婦人科癌患者における有効性と安全性について．日アフェレシス会誌 2014；**33**：167-71
13) 中村裕紀，北村健太郎，中村啓章，他：腹水濾過濃縮再静注法施行時の体温変化に関する検討．日アフェレシス会誌 2014；**33**：208-14
14) 伊藤哲也：CARTの効果と副作用．日アフェレシス会誌 2014；**33**：172-7
15) 渡邊恭通：CARTの回路の特徴とプライミングにおける注意点．日アフェレシス会誌 2014；**33**：185-93
16) Japanese CART Study Group, Matsusaki K, Ohta K, et al：Novel cell-free and concentrated ascites reinfusion therapy (KM-CART) for refractory ascites associated with cancerous peritonitis：its effect and future perspectives. Int J Clin Oncol 2011；**16**：395-400

連絡先：〒162-8666 東京都新宿区河田町8-1　東京女子医科大学臨床工学部　江口　圭　E-mail：eguchi.kei@twmu.ac.jp

NII-Electronic Library Service