

総説

新しい発想に基づく二重濾過血漿交換法の提案

花房規男^{*1}・吉元裕介^{*2}・玉地正樹^{*2}・安井正英^{*3}^{*1} 東京大学医学部附属病院腎疾患総合医療学講座, ^{*2} 川澄化学工業株式会社, ^{*3} 元川澄化学工業株式会社

A Prototype of a Novel Double Filtration Plasmapheresis System for More Selective Solute Removal

Norio Hanafusa^{*1}, Yusuke Yoshimoto^{*2}, Masaki Tamachi^{*2} and Masahide Yasui^{*3}^{*1} Division of Total Renal Care Medicine, The University of Tokyo Hospital, ^{*2} Kawasumi Laboratories, Inc., ^{*3} Formerly Kawasumi Laboratories, Inc.

Summary Double filtration plasmapheresis (DFPP) is one of the modalities of plasmapheresis. DFPP is widely utilized to remove immunoglobulins or low density lipoproteins. Differences in molecular weights of solute to be removed and albumin to be retained make DFPP a more selective procedure than simple plasma exchange. Some modified versions of DFPP have been developed to optimize the relation between the pore size of the second filter and the size of the solute, so that such procedure should maximize the selectivity of removal. However depletion of some coagulation factors cannot be assured, which sometimes causes clinical sequelae.

We proposed a novel DFPP system that uses a plasma fractionator for plasma separation instead of an ordinary plasma separator. This system is anticipated not to deplete coagulation factors but to remove IgG, because the filter does not virtually pass coagulation factors. Some modification is warranted from the results of an *in vitro* study, but we believe the system promising for more selective solute removal, which is the goal of the apheresis therapy.

Key words: double filtration plasmapheresis, coagulation factor retention, selective removal, plasma separator

1. 二重濾過血漿分離交換法

二重濾過血漿分離交換法 (Double Filtration Plasmapheresis: DFPP) は、血漿交換療法のモデルの一つである。治療のクリアランスを考えた際、血漿交換療法では分離した血漿量が一治療のクリアランスに相当するため、クリアランスを増すためには、より多くの血漿を分離・廃棄する必要がある。単純血漿交換療法では、膠質浸透圧を担う物質であるアルブミンが廃棄される分画に入るため、補充液として、アルブミンを含む溶液 (アルブミン溶液あるいは、新鮮凍結血漿) を、廃棄した血漿と同じ量だけ使用する必要がある。このため、単純血漿交換では、大量の血液由来製剤が必要であるという問題点がある¹⁾。

このような、補充液の量を少なくできるよう開発されたのが、DFPPである。DFPPは1980年に、阿岸らにより報告²⁾された。その後、様々な疾患に対して応用されており、わが国の血漿交換療法の主要なモダ

リティとなっている。血漿交換療法の保険適応としても、劇症肝炎、薬物中毒以外のすべての疾患において、適応が認められている。

2. 膜分離とDFPP

膜分離に使用される分離膜には、小孔が存在する。DFPPでは、図1に示すように、血漿分離膜を通過し、血漿成分分離器を通過しない物質が除去される²⁾。図2には、血漿分離膜、血漿成分分離器に関して、模式的に分子量と、阻止率との関連を示した。図に示すように、DFPPにおいては、血漿分離膜と血漿成分分離器との阻止率のグラフの間に存在する部分が除去対象となる。血漿成分分離器の小孔径が分子量に関する分離性能を決定している^{3,4)}。わが国で市販されている血漿成分分離器は川澄化学工業の EvafluxTM 2A, 3A, 4A, 5A, 旭化成メディカルの CascadefloTM EC20W, 30W, 40W, 50W であり、それぞれ小孔径はこの順に大きくなる (図3)。

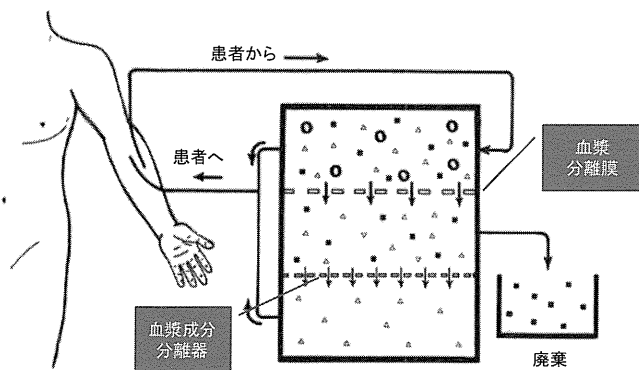


図1 二重濾過血漿交換の物質除去の模式図

血漿分離膜で濾過され、血漿成分分離器で濾過されない部分が廃棄される。文献1より許可を得て改変引用。

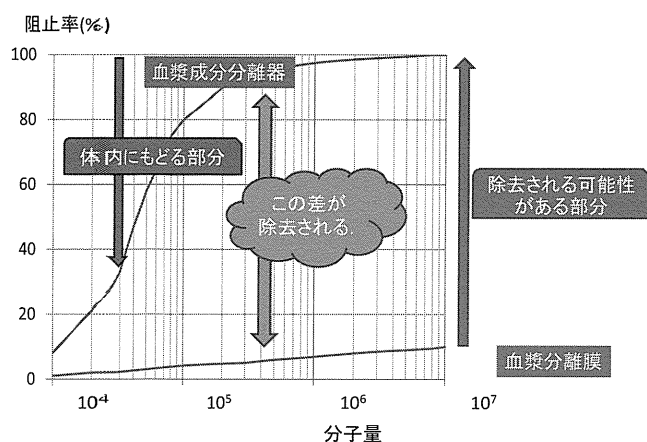


図2 DFPPにおける分子量と物質除去との関連

各分離膜（血漿分離膜と血漿成分分離器）における、分子量と阻止率との関連を模式図で示した。血漿分離膜と血漿成分分離器とのグラフの間の部分が除去される部分に相当する。

しかし、問題点として小孔径がそもそも均一ではないが、さらに、小孔に蛋白が付着する、いわゆる「ファウリング現象」や、蛋白の濃度分極層の形成により本来の小孔とは異なった特性を持つ可能性がある。この関係は図4に示したが、本来、小孔径が均一であり、ファウリングが生じないような理想的な膜であれば、分画性能はグラフが立ったシャープが性能になりうるが(A)、実際には分子量と阻止率の間にはグラフで示すような broad な関連がある。

特に、後者に関しては、江口は³⁾、ファウリング・濃度分極層の結果生じる二次膜の膜間圧力差 (TMP) が高値になる状態では、見かけ上の小孔径が小さくなっており、阻止率の上昇からアルブミン喪失が増加することを示している。

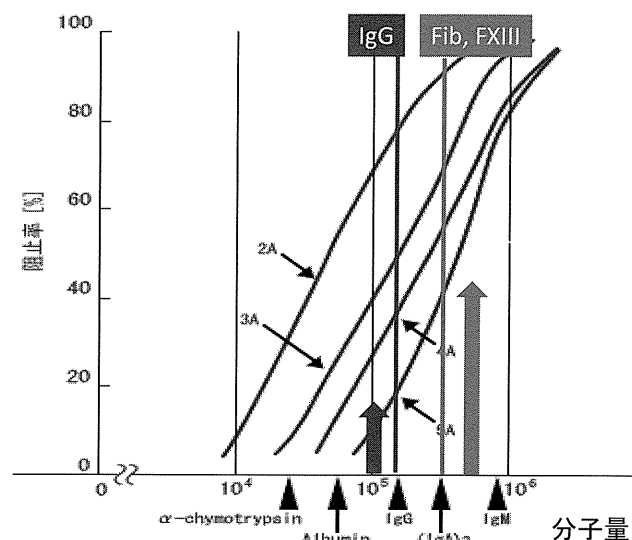


図3 Evaflux™ の阻止率

Evaflux™ 5A を血漿分離器として使用することで、Fib, F13 を保持しながら、IgG を除去できる可能性が想定された。

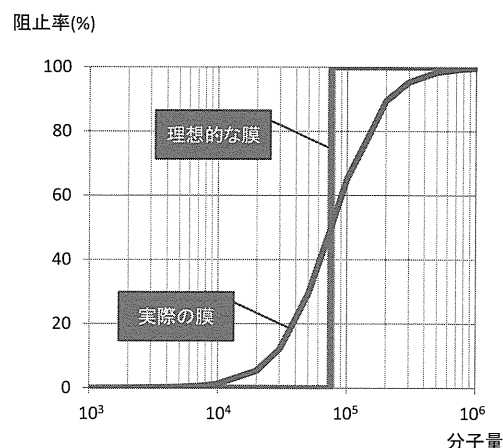


図4 理想的な膜分離と実際の膜分離

分子量と阻止率との関連を、理想的な分離膜と、実際の分離膜で示した。あるカットオフ分子量以上では完全に阻止され、それ以下では完全に濾過される膜が理想的な分離膜であるが、実際には分子量と阻止率との関連は幅を持った関連になる。

3. 従来行われてきた DFPP の変法

このような背景を基にして、選択性を向上させるため、除去対象物質の分子量などを考慮して、小孔径の異なる二次膜の使用、アルブミンとの分子量（分子径）の差を大きくする操作、血漿自体の流動性を変化させる操作が行われてきた。

二次膜の選択については、IgG を除去対象物質にする場合には、小孔径の最も小さな EC-20W、あるいは 2A を使用するが、LDL, HCV などより大きな物質を除去する場合には、EC-50W, 5A を使用すること

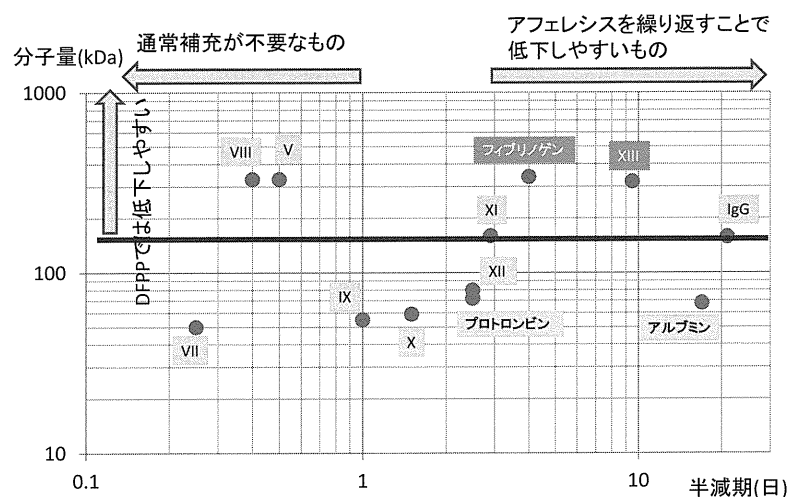


図5 凝固因子の半減期と分子量

分子量が大きいものは1回のDFPP治療で低下しやすく、半減期が長い物質は治療を繰り返すことで低下しやすい。文献1より改変引用。

で、アルブミンの阻止率が低く抑えられ、アルブミン喪失を抑えられることが示されている。

分子径の差を大きくする操作については、たとえば、クリオフィルトレーションの例が挙げられる。クリオフィルトレーションではクライオゲルを形成させることで、見かけ上の分子サイズを大きくし、アルブミンとの分子サイズの差を大きくすることによって、結果的により大きな小孔径を持った血漿成分分離器において分離を可能とするものである⁵⁻⁷⁾。

血漿自体の流動性を向上させる操作については、血漿を加温するDFサーモ法が行われている。血漿を加温することにより、血漿の物性を変化させ、分画性能を向上させるものである^{8,9)}。

いずれも、除去対象物質と、二次膜の「見かけ上の」小孔径との関連を変化させることにより、分画性能を向上させようとする試みである。

4. DFPPの問題点

DFPPでは、二次膜のカットオフ分子量より大きな物質が除去対象となる。このため、対象物質より大きな物質は除去される可能性がある。DFPPは、自己免疫性疾患など抗体除去の目的で施行されることも多く、除去対象物質はIgGであることが多い。IgGの分子量は約160 kDaであるため、これよりも分子量が大きな物質では効率よく除去される可能性がある。

一方、物質の濃度の低下は産生速度にも依存する。産生速度が速い物質は、治療を繰り返しても、次回治療前までに体内総量が回復しており、血漿中濃度も低

下しない。一方、産生速度が遅い物質については、治療を繰り返すことにより、体内総量の回復が遅れ、血漿中濃度が低下する。産生速度については、臨床経過など様々な要因を受けること、また産生速度自体が測定できないことも多いが、定常状態においては、産生速度が遅い物質は、半減期が長い物質である。このため、一般的には半減期が長い物質ほど回復が遅くなる傾向にある。

以上のことから、比較的大きな物質で、産生速度が遅いものは、DFPPにより効率よく除去される可能性がある。図5には、凝固因子の分子量と半減期との関連を示した¹⁾。図5に示すように、IgGがDFPPにより除去対象となるのは、半減期が長いためであり、アルブミンの補充が必要となるのも、同じ理由である。一方、フィブリノゲン、F13の半減期もそれぞれ比較的長く、通常の頻度のDFPPにおいて、血漿中濃度が低下することが知られている¹⁰⁾。その結果、F13では重篤な転帰をとる可能性も報告されている¹¹⁾。

5. Evacure™

血液を膜濾過する際に頻用されているのは、血球成分のみを保持して、マイクロパーティクル¹²⁾レベルの大きな物質までを濾過可能な血漿分離膜¹³⁾と、アルブミンをほとんど濾過せず、晶質液として濾過する血液濾過器である。つまり、通常の血漿分離膜では血漿蛋白を一様に分離し、血漿濾過器では、血漿蛋白はほとんど分離されない。

一方、Evacure™は、DFPPの二次膜を血漿分離膜

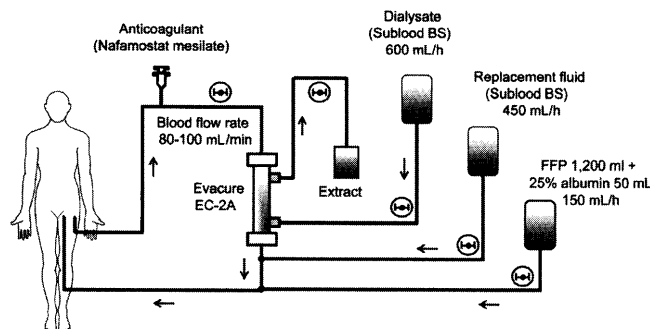


図6 PDFの回路図

Evacure™ 2A で血漿交換を行いながら、補液を補充する治療である。凝固因子の除去が少ないことも特徴の一つである。文献15より許可を得て改変引用。

として使用したものである。このため、Evacure™ では分子量による血漿蛋白の分画が可能である。従来、Evacure™ を用いて検討がよく行われているのは、Plasma Diafiltration (PDF) である。PDF は、最も小さなカットオフ分子量を持つ 2A を使用して血漿交換を行いながら、中空糸の外側に補液を流すという手法である^{14,15)} (図6)。サイトカインあるいはアルブミン近傍の物質の除去に応用されている。PDF は除去対象物質の領域の観点から、腎代替療法と、血漿交換との間を埋める治療法として注目されている。PDF では、血漿分離膜として 2A を使用するため、分子量が大きな凝固因子の篩係数は小さく、除去されにくいという特性がある。しかし、2A では IgG の篩係数も小さく、自己抗体の除去目的での PE には利用しづらい。

6. DFPP の問題点を Evacure™ で解消可能か？

以上のことから、我々は、DFPP における欠点（頻回の治療を行うことにより、比較的半減期の長い凝固因子が減少してしまうこと）を補いつつ、IgG を除去するため、一次膜に Evaflux™ 5A を使用することを考案した。

Evaflux™ 5A, Cascadeflo™ EC-50W は、DFPP の二次膜としては、最も見かけ上の小孔径が大きな膜であり、従来 LDL アフェレシス^{16,17)}、VRAD¹⁸⁾ など分子量が大きな物質を除去する際の二次膜として利用されてきた。一方、我々は、VRAD における検討で、F13 の篩係数は比較的小さく (0.355 ± 0.052)、治療を反復することにより、フィブリノゲン、F13 が低下することを示した¹⁹⁾。さらに同じ検討で、IgG の篩係数は比較的高く (0.866 ± 0.036)、5A 膜は F13、フィブ

リノゲンと、IgG とを分離することが可能であることが示唆された。

DFPP の利点は、二次膜でアルブミンを分離して血中に戻すことにより、必要とされるアルブミン量を少なくすることが可能であるということである。二次膜には、通常の 2A 膜を使用することにより、IgG とアルブミンとを分画し、アルブミンを一部回収することにより、通常の DFPP と同様に必要とされるアルブミン量を減量できる可能性がある。

以上から、一次膜に 5A、二次膜に 2A を用いた 5A-2A DFPP を考案した²⁰⁾。

7. In vitro での検討

上記のような仮説を検証するために我々は、牛血を用いて実際の Evaflux™ 5A, 2A の篩係数を検討し、IgG とフィブリノゲン、F13 が分離可能か、安定した治療を行うことが可能かについて検討を行った。

7.1 方法

牛血を用いた single pool, 再循環法で行った。設定した条件は以下のとおりである。牛血はヘマトクリット 40% に調整し、5 L のプールを作成した。血漿処理量は 5 L とした。これは牛血プール中の血漿量の 1.67 倍に相当した。血流量は 100 mL/分、分離比率は 25% に設定した。二次膜のドレイン比率は 20% とし、除去分を 10% ウシアルブミン溶液により補充した。

図7には、回路図を示すが、各分離膜の前後でアルブミン、IgG、F13、フィブリノゲン、総コレステロールを測定した。測定は 1 L 毎に行い、圧力とともに記録した。

7.2 結果²⁰⁾

血漿分離膜として使用した 5A の特性：Alb の篩係数は 80% で血漿処理量 5 L まではほぼ一定であった。一方、IgG の篩係数は 0.5 であり、フィブリノゲンの篩係数は 0.2 程度であった。F13 の篩係数を測定したところ、0.4 前後で、後半に上昇する傾向にあった。

血漿成分分離器として使用した 2A の特性：フィブリノゲンは、二次膜側入り口濃度が低く、出口では測定感度未満であり、篩係数は算出できなかった。一方、Alb、F13 についてはいずれも篩係数が 0.75 程度、IgG は 0.6 であった。この値は経時的にも変化はみられなかった。

7.3 In vitro での検討の考察

5A-2A において、一次膜の 5A は従来血漿成分分離器として利用される場合と比較的類似した性質を示し

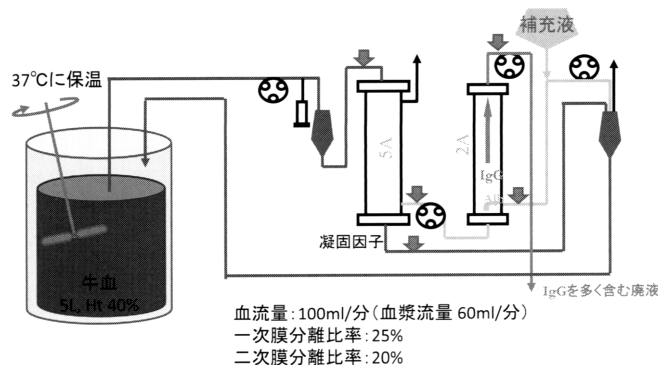


図7 5A-2A DFPPの*in vitro*回路図

牛血を用いて、血漿分離膜に Evaflux™ 5A、血漿成分分離器に Evaflux™ 2A を使用した。Partial discard 法で、アルブミン溶液を補充した。

ていた。5Aにより、IgGを除去し、フィブリノゲンを保持できる可能性が示された。しかし、二次膜である2Aの篩係数はアルブミンとIgGにおいては大きな差が認められず、通常のDFPPの時に認められる篩係数とは異なることが明らかになった。5Aによって血漿が分画され、総蛋白濃度が低下することで、血漿自体の性質が変化してしまう可能性が考えられた。通常のDFPPと同一条件では、IgGとアルブミンとが分離できない可能性が考えられた。このことから、今後5A-2A DFPPでアルブミンの回収を増加させるためには、より最適な二次膜における分離の条件を検討する必要があるものと考えられた。解決すべき課題は存在するものの、5A-2A DFPPは凝固因子への影響を最小限に保ちながら、IgGを除去できる可能性を秘めていることが示唆された。

8. 臨床応用

以上のような*in vitro* studyを第33回日本アフェレシス学会学術集会(2012年11月)で発表していた²⁰⁾のだが、その直後に中国のGongらから同様のコンセプトのDFPPを臨床応用したという報告が行われた²¹⁾。

5Aと同一であるEC50Wを一次膜として利用し、2Aと同一であるEC20Wを二次膜として利用したDFPPの報告である。このEC50W/EC20W DFPPと、通常の血漿分離膜MPS07(Bellco s.p.a, Mirandola, Italy)を用いて、二次膜をEC20WあるいはEC50Wを用いたものとを比較している。なお、MPS07は小孔径0.5 μmであり、わが国で通常用いられている血漿分離膜とほぼ同等の性能を持つと考えられる。

この報告では、DFサーモ⁹⁾と同様、二次膜側を再

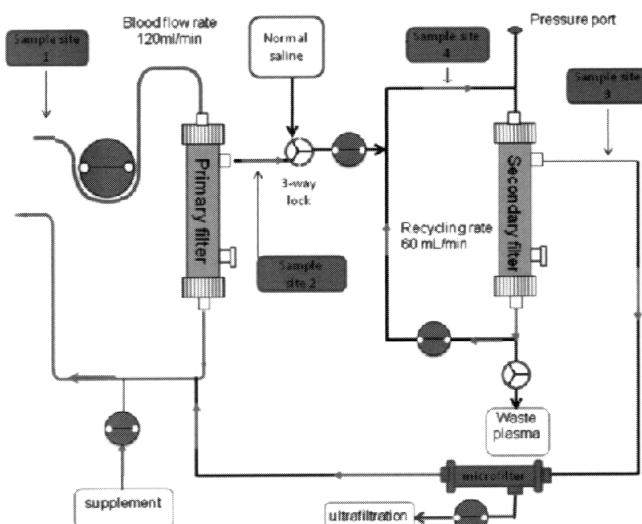


図8 GongらのEC50W/20W DFPPの回路図

EC50Wを血漿分離膜、EC20Wを血漿成分分離器として使用したDFPP。再循環法を用いている。文献21より許可を得て引用。

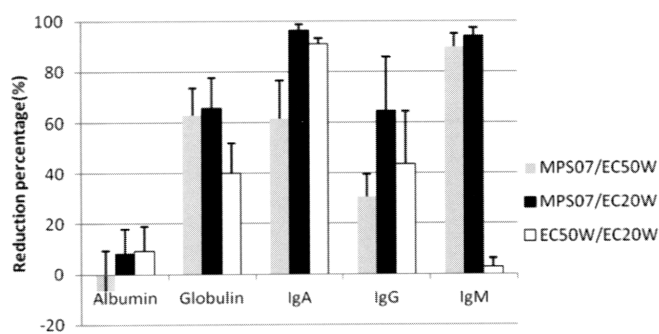


図9 EC50W/20Wの有効性

IgGの低下は通常のDFPPと大きな差はみられなかったが、IgMはEC50W/20Wでは保持されることが示された。文献21より許可を得て引用。

循環、中空糸内の線速度を向上させることにより、分離特性を改善させるとともに、排液はstop flowにしており、一定の圧を基準として二次膜側回路内の血漿成分を廃棄するという方法をとっている(図8)。この点で、我々の5A-2A DFPPや通常施行されているpartial discard法^{22,23)}によるDFPPとは若干異なる。

上記のような3種類のDFPPをMPO-ANCA陽性のRPGN患者19人に対して施行し、ANCA, IgG, IgMの値を検討している。2 plasma volumeを処理し、30~40 gのアルブミンの補充が必要であったとしている。その結果、図9に示すように、EC50W/20WではMPS07/EC20Wに比較して、IgGの低下に関しては非常に大きな差はみられなかったものの(EC50W/20W $43.5 \pm 13.8\%$, $64.7 \pm 21.0\%$), MPS07/EC20Wで大きく($94.2 \pm 3.1\%$)低下したIgMはEC50W/20Wでは

ほとんど低下が認められなかった ($2.8 \pm 12.9\%$) としている。

この報告では、凝固因子の低下について言及されていない。しかし、IgG とほぼ同一の分子量を持つ IgA (Mw 160 kDa) は EC50W/20W でも IgM と同等の reduction ratio ($90.9 \pm 4.4\%$) を認めている。このことから、320 kDa の分子量を持つフィブリノゲン、F13 については、IgG/IgM ほどの分画性能は持ち合わせなかったのかもしれない。

いずれにしても、一次膜と二次膜の小孔径の間に分子サイズが存在する場合、DFPP で除去される (図 2)。このため、従来の二次膜のみの選択だけではなく、血漿分離膜においても、その種類を選択することは、より厳密な選択除去に寄与できる可能性がある。

9. 将来への展望

アフエレシス治療の最終的な目標は、病因物質のみをいかに選択的に除去するかということにある。この点において、現時点においても DFPP はすぐれた技術である。しかし、実際の治療においては、ある種の凝固因子など、本来除去対象ではないものについても、除去されてしまうという問題がある。

現状の DFPP では、分子の大きさのみを元にした分画が行われているが、二次膜の特性を変化させることにより、別の次元の分画性能を発揮できるような膜の開発も期待される。

一方、5A-2A DFPP の二次膜側で認められたように、血漿自体の物性の変化は、分離性能に影響する可能性がある。DFPP の二次膜では、膜の小孔径だけではなく、血漿蛋白により形成される膜近傍の濃度分極層を含めた「見かけ上の」小孔径が実際の治療には影響する。従来の DF サーモ、クリオフィルトレーションも、血漿の物性を変化させる介入であり、DF サーモや Gong ら²¹⁾の DFPP で行われている再循環法は、中空糸内の線速度の変化を介して、濃度分極層に介入することにより見かけ上の小孔径に介入する方法であった。こうした、血漿自体の物性への介入も分画性能を向上させるための介入ポイントとなることが期待される。

わが国の膜分離の技術を巧みに利用した DFPP は、現状でも優れた技術であることは疑いがない。しかし、いくつかの介入可能なポイントがあり、これらを改善することで、アフエレシスのゴールであるより選択的な物質除去につながる可能性がある。

著者の利益相反 (conflict of interest: COI) 開示: 吉元裕介, 報酬 (川澄化学工業(株)); 玉地正樹, 報酬 (川澄化学工業(株)); 安井正英, 報酬 (川澄化学工業(株)); 花房規男, 寄付 (テルモ(株)), それ以外に申告すべき利益相反状態はない。

文 献

- 1) Hanafusa N: Theoretical basis of pathogenic substance removal during plasmapheresis. *Ther Apher Dial* 2011; **15**: 421-30
- 2) Agishi T, Kaneko I, Hasuo Y, et al: Double filtration plasmapheresis. *Trans Am Soc Artif Intern Organs* 1980; **26**: 406-11
- 3) 江口 圭: 【実践 アフエレシス技術マニュアル 2011】二重濾過血漿分離交換法 (DFPP). *日アフエレシス会誌* 2011; **30**: 213-9
- 4) Sueoka A: Therapeutic apheresis application using membrane plasma fractionation technology: present scope and limitations. *Ther Apher* 2000; **4**: 211-2
- 5) Katsume C, Abe Y, Horiuchi T, et al: Cryogel studies for the optimization of cryofiltration (CF) therapy. *Trans Am Soc Artif Intern Organs* 1983; **29**: 463-7
- 6) Smith JW, Kayashima K, Katsume C, et al: Cryopheresis: Immunochemical modulation and clinical response in autoimmune disease. *Trans Am Soc Artif Intern Organs* 1982; **28**: 391-5
- 7) 米川元樹: 【アフエレシスマニュアル】技術編 膜分離法総論 (治療の基礎) 冷却濾過法. *Clinical Engineering* 2010; 別冊: 85-9
- 8) Nosé Y, Usami M, Malchesky PS, et al: Clinical thermofiltration: Initial application. *Artif Organs* 1985; **9**: 425-7
- 9) Nakashima M, Yasui M, Ihara A: Fibrinogen salvage during DF Thermo using Evaflux-5A plasma fractionators. *Ther Apher Dial* 2012; **16**: 472-7
- 10) Hanafusa N, Kondo Y, Suzuki M, et al: Double filtration plasmapheresis can decrease factor XIII Activity. *Ther Apher Dial* 2007; **11**: 165-70
- 11) Seishima M, Shibuya Y, Kato G, Aoki T: Decreased factor XIII activity in a patient with subcutaneous bleeding after double filtration plasmapheresis. *Ther Apher Dial* 2009; **13**: 229-31
- 12) Hanafusa N, Satonaka H, Doi K, et al: Platelet-derived microparticles are removed by a membrane plasma separator. *ASAIO J* 2010; **56**: 323-5
- 13) Hirata N, Shizume Y, Shirokaze J, et al: Plasma separator Plasmaflo OP. *Ther Apher Dial* 2003; **7**: 64-8
- 14) Nakae H, Igarashi T, Tajimi K, et al: A case report of hepatorenal syndrome treated with plasma diafiltration (selective plasma filtration with dialysis). *Ther Apher Dial* 2007; **11**: 391-5
- 15) Nakae H, Eguchi Y, Yoshioka T, et al: Plasma diafiltration therapy in patients with postoperative liver failure. *Ther Apher Dial* 2011; **15**: 406-10
- 16) Suzuki M, Yamane S, Matsugane T, et al: Evaluation of double filtration plasmapheresis, thermofiltration, and low-density lipoprotein adsorptive methods by crossover test in the treatment of familial hypercholesterolemia patients. *Artif Organs* 1996; **20**: 296-302
- 17) 末弘 健, 末岡明伯, 堀口純子, 他: 新たに開発した高性能 EVAL2 次膜 (Evaflux 5A) による高脂血症に対する臨床評価. *人工臓器* 1993; **22**: 243-7

- 18) Fujiwara K, Kaneko S, Kakumu S, et al: Double filtration plasmapheresis and interferon combination therapy for chronic hepatitis C patients with genotype 1 and high viral load. *Hepatol Res* 2007; **37**: 701-10
- 19) Hanafusa N, Satonaka H, Doi K, et al: Virus removal and eradication by modified double filtration plasmapheresis decreases factor XIII levels. *Ther Apher Dial* 2010; **14**: 287-91
- 20) 花房規男, 野入英世, 南学正臣: 新たな二重濾過血漿分離交換法の試み (第1報). *日アフエレシス会誌* 2012; **31** (Suppl): 125
- 21) Gong D, Ji D, Xu B, Liu Z: More selective removal of myeloperoxidase-anti-neutrophil cytoplasmic antibody from the circulation of patients with vasculitides using a novel double-filtration plasmapheresis therapy. *Ther Apher Dial* 2013; **17**: 93-8
- 22) 峰島三千男, 阿岸鉄三, 金子岩和, 他: 血漿分画分離器に対する各種ふるい係数の妥当性. *人工臓器* 1986; **15**: 1575-8
- 23) 末岡明伯, 宮原忠司, 高島征助, 他: EVAL 血漿処理膜の基礎的検討. *人工臓器* 1984; **13**: 931-4