

原 著

## 白血球除去フィルター濾過後の全血に残存する白血球分画の解析

比留間 潔<sup>1)</sup> 奥山 美樹<sup>1)</sup> 矢澤 昌子<sup>1)</sup> 佐久間香枝<sup>1)</sup>  
金子 幸子<sup>1)</sup> 中原美千代<sup>1)</sup> 國友由紀子<sup>1)</sup> 藤本 昌子<sup>1)</sup>  
山本 恵美<sup>1)</sup> 小澤 直宏<sup>1)</sup> 堀内 賢一<sup>2)</sup> 石井 一成<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>東京都立駒込病院輸血科

<sup>2)</sup>日本ポール株式会社応用技術研究所

(平成13年10月18日受付)

(平成14年6月24日受理)

### ANALYSIS OF RESIDUAL LEUKOCYTE SUBSETS IN FILTERED WHOLE BLOOD PRODUCTS

Kiyoshi Hiruma<sup>1)</sup>, Yoshiki Okuyama<sup>1)</sup>, Masako Yazawa<sup>1)</sup>, Kae Sakuma<sup>1)</sup>, Sachiko Kaneko<sup>1)</sup>,  
Michiyo Nakahara<sup>1)</sup>, Yukiko Kunitomo<sup>1)</sup>, Shoko Fujimoto<sup>1)</sup>, Emi Yamamoto<sup>1)</sup>,  
Naohiro Ozawa<sup>1)</sup>, Ken-ichi Horiuchi<sup>2)</sup> and Kazunari Ishii<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>Transfusion Service, Tokyo Metropolitan Komagome Hospital

<sup>2)</sup>Biomedical Scientific and Laboratory Services Division, Nihon Pall Limited.

We assessed the performance of a leukocyte reduction filter, WBF2, which has been developed for preparation of blood products with pre-storage leukocyte reduction, and analyzed residual leukocyte subsets in the filtered whole blood.

Whole blood was collected from six healthy volunteer donors and filtered 4 hours after collection. Leukocyte subsets of unfiltered and filtered whole blood were analyzed by flow cytometry, and absolute cell numbers of each leukocyte subset were determined.

Total leukocyte counts per bag were  $1.75 \pm 0.34 \times 10^9$  for the unfiltered blood and  $2.23 \pm 1.37 \times 10^8$  for the filtered blood. Average  $\log_{10}$  leukocyte reduction rate was 4.83. In the filtered whole blood, the number of granulocytes, CD4+ T lymphocytes, CD8+ T lymphocytes and NK cells was  $8.67 \pm 7.66 \times 10^3$ ,  $11.6 \pm 36.5 \times 10^3$ ,  $4.05 \pm 0.80 \times 10^3$  and  $1.66 \pm 1.35 \times 10^3$ , respectively. No monocytes or B lymphocytes were detected in the whole blood after filtration.

These results show that leukocyte reduction rate using the WBF2 filter varies according to leukocyte subset; in particular, monocytes and B lymphocytes are reduced more effectively by this filter.

**Key words** : Leukocyte reduction filter, Leukocyte subsets, Residual leukocytes, Prestorage leukocyte reduction

### はじめに

輸血用血液中の白血球に起因する副作用は周知され<sup>1,2)</sup>, これらの副作用は白血球の種類に関連する。例えば, 輸血関連移植片対宿主病( transfusion-associated graft versus host disease : TaGVHD )

はTリンパ球がその発症に関与する<sup>3)</sup>。human immunodeficiency virus ( HIV )<sup>4)</sup>および human T-cell lymphotropic virus( HTLV )はTリンパ球<sup>5)</sup>, Epstein-Barr virus ( EBV )は主にBリンパ球<sup>6)</sup>, cytomegalovirus( CMV )は主にBリンパ球, 単球,

顆粒球に感染し<sup>7,8)</sup>, 感染性輸血副作用の原因になる。また, プリオンの伝播は B リンパ球などと関連していることが指摘されている<sup>9)</sup>。

近年, このような白血球による輸血副作用の予防に白血球除去血液が広く使用されている。白血球除去のためフィルターが開発され, 99.99% 以上の白血球を除去することができるようになった<sup>10)</sup>。我が国では主に輸血時に臨床現場で使用されているが, 欧州諸国では輸血用血液から採血後速やかに白血球を除去する prestorage leukocyte reduction (保存前白血球除去) が導入されている<sup>11)</sup>。このように, 今後, 白血球を減少させた血液がさらに広く臨床応用されると思われるが, 濾過後の微量の残存白血球の性状に関しては不明な点が多い。

そこで, 我々は保存前白血球除去用に開発された全血用白血球除去フィルターを用い, フィルターの性能を評価するとともに残存白血球の分画およびその数量を解析した。

## 材料と方法

### 1. 白血球除去血液

文書による同意の得られた 6 名の成人健常者から 4 連採血バッグ, 保存前白血球除去システム・カーミリュートラップ MAP (川澄化学工業) を用い採血した。この 4 連採血バッグには全血用白血球除去フィルター WBF2 (日本ポール) が組み込まれた閉鎖回路系である (Fig. 1)。各健常者より全血を 400ml 採血して ACD-A 液 56ml とよく混合し検査用に 18ml 採取した後, 室温にて約 4 時間静置保存した。落差 150cm で濾過した後, パイプラインより空気を採血バッグに戻し, フィルター内の血液を回収した。

### 2. 白血球数測定

濾過前後の全血中の白血球数はニワトリ赤血球 (cRBC) を内部算定基準として用いたフローサイトメトリー (FCM) 法<sup>12,13)</sup> で測定した。血液 400  $\mu$ l と LEUKOSOL (Pall, USA) 575  $\mu$ l を混合し 5 分間室温で暗所に静置した。この操作によって白血球の核酸が propidium iodide で蛍光標識される。4,000/ $\mu$ l の cRBC (Bio Sure, USA) を 25  $\mu$ l 添加し FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose,

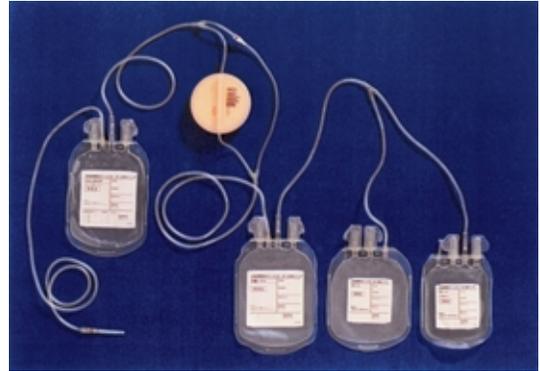


Fig. 1 Kami Leukotrap MAP, a whole blood in-line filter system.

The blood container system incorporating an in-line filter (WBF2) consisted of a collection container with a 56-ml ACD, a MAP additive solution pack, and a container for a plasma product.

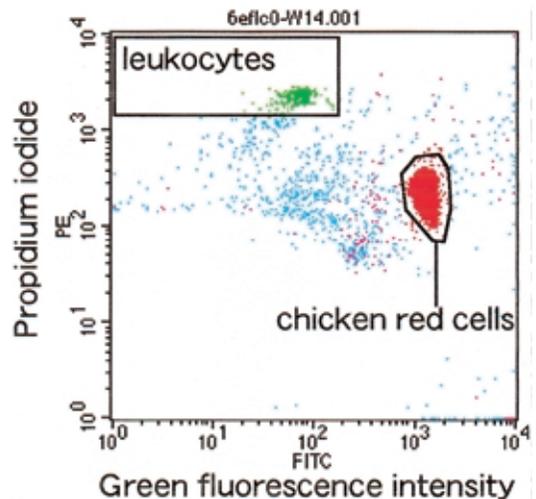


Fig. 2 Flow cytometry dot plots of blood sample for counting residual leukocytes.

400 ml of blood sample was stained with propidium iodide and mixed with 100,000 chicken red cells, then analyzed by flow cytometry.

CA)にて測定した。陰性対照として BPF4 白血球除去フィルターで 2 回濾過した血液を同様に LEUKOSOL と cRBC を添加し用いた。なお, 2 回濾過した血液には, 本方法で白血球が全く検出されないことをあらかじめ確認している。Fig. 2

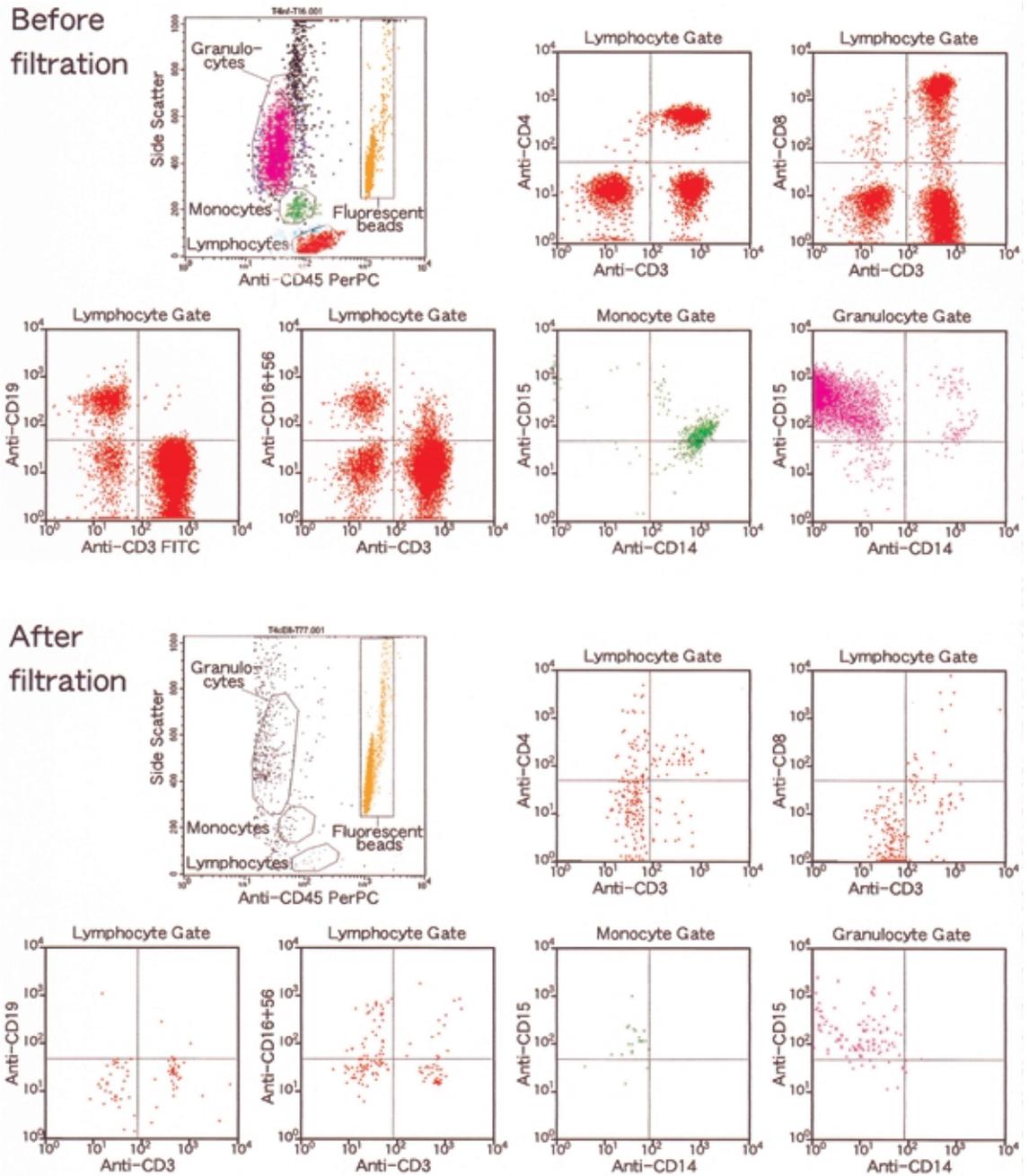


Fig. 3 Flow cytometry dot plots of blood sample for determining the absolute cell number of each leukocyte subset.

Each leukocyte subset was gated by fluorescence intensity associated with CD45 expression and side scatter light intensity, and analyzed to detect subset specific antigens. The absolute number of each subset was determined by event number of the cell population and of fluorescence beads.

に FCM の解析図および白血球と cRBC のゲート法を示した。白血球数および cRBC の計測数から以下のように白血球濃度が算定される。

$$\text{白血球濃度 } (\mu\text{l}) = (\text{白血球計測数} - \text{陰性対照白血球計測数}) \times 250 (\mu\text{l} / \text{cRBC 計測数})$$

### 3. 白血球濃縮

濾過後の血液中の白血球は微量なので、白血球分画解析のために濾過後全血 108ml を用いて Sowemimo-Coker らの方法に従い濃縮した<sup>14)</sup>。6本の 50ml 遠心管それぞれに比重 1.113g/ml の Polymorphrep(第一化学薬品)を 22.5ml 入れて、濾過後全血 18ml づつを緩速に重層した。400G, 22分遠心した後、各遠心管の中間の白血球層を分離した。この白血球層を集めてヒトアルブミン 1% 添加 PBS で 2 回洗浄し、最終容量を 400 $\mu$ l (270 倍) に濃縮した。濾過前の全血に関しては、全血 18ml を用い Polymorphrep 22.5ml で同様に白血球層を 45 倍に濃縮し分離した。

なお、濃縮前後の白血球数を FCM 法で算出し回収率を算出し、濃縮後の検体での白血球分画解析の妥当性も検討した。

### 4. 白血球分画の解析

分離した白血球は蛍光標識抗体で反応させた後、FACSCalibur で解析した。FITC 標識抗 CD3 抗体, PE 標識抗 CD8 抗体, PerPC 標識抗 CD45 抗体, APC 標識抗 CD4 抗体の混合抗体試薬, FITC 標識抗 CD3 抗体, PE 標識抗 CD16 抗体, PE 標識抗 CD56 抗体, PerPC 標識抗 CD45 抗体, APC 標識抗 CD19 抗体の混合抗体試薬, FITC 標識抗 CD14 抗体, PE 標識抗 CD45 抗体, PerPC 標識抗 CD15 抗体の混合抗体試薬(Becton Dickinson)をそれぞれ用いた。対照に FITC 標識コントロール抗体, PE 標識コントロール抗体, PerPC 標識抗 CD45 抗体, APC 標識コントロール抗体(Becton Dickinson)の混合抗体試薬を用いた。

それぞれの混合抗体試薬各 20 $\mu$ l を既知数(約 50,000 個)の蛍光ビーズ入り TrueCOUNT チューブ(Becton Dickinson)に添加し血液検体 50 $\mu$ l を加えた。15 分間室温で反応させた後、溶血試薬(Becton Dickinson)で溶血し PBS で洗浄後、再浮

遊した。FACSCalibur を用い、濾過前全血では蛍光ビーズを 10,000 個、濾過後では 25,000 個計測するまで解析した。本方法での検出最低限度は 0.05/ $\mu$ l であり、0.05 ~ 1,000/ $\mu$ l の範囲での直線性( $r^2 > 0.95$ ) が認められている。

濾過前後の各白血球分画の解析を Fig. 3 に示した。まず CD45 蛍光強度と側方散乱光(SSC)強度でリンパ球分画, 単球分画, 顆粒球分画をゲートし、それぞれに適合した抗原を解析した。リンパ球分画では CD3 陽性 CD4 陽性細胞を CD4 陽性 T リンパ球, CD3 陽性 CD8 陽性細胞を CD8 陽性 T リンパ球, CD3 陰性 CD19 陽性細胞を B リンパ球, CD3 陰性 CD16 + 56 陽性細胞を NK 細胞とした。単球分画で CD14 陽性細胞を単球とし、顆粒球分画では CD14 陰性 CD15 陽性細胞を顆粒球とした。各白血球分画の細胞濃度は以下のように計算される。

$$\text{白血球分画細胞濃度 } (\mu\text{l}) = [(\text{白血球分画計測数} - \text{陰性対照計測数}) \times \text{試験管ビーズ総数}] / [\text{ビーズ計測数} \times 50\mu\text{l}]$$

$$\text{また、濾過前および濾過後の白血球数から、白血球除去率は以下のように } \log_{10} \text{ 除去率で示した。}$$

$$\log_{10} \text{ 除去率} = -\log_{10} [\text{濾過後白血球数} / \text{濾過前白血球数}]$$

## 結 果

### 1. 白血球除去フィルターの性能

1 フィルター当たりの実際の濾過量は 434.5  $\pm$  9.0ml, 濾過時間は 7.2  $\pm$  1.7 分, 流速は 63.1  $\pm$  14.9 ml/分であった。濾過前, 濾過後の全血の白血球濃度はそれぞれ, 3924.5  $\pm$  374.4/ $\mu$ l, 0.06  $\pm$  0.02/ $\mu$ l 以下であった。バッグ当たりの白血球数は濾過前, 濾過後の全血でそれぞれ, 1.75  $\pm$  0.34  $\times 10^9$ , 2.23  $\pm$  1.37  $\times 10^4$  個で,  $\log_{10}$  除去率は平均 4.83 であった。

### 2. 濃縮後の白血球の回収率

白血球除去血液を濃縮し、濃縮前後の白血球数を FCM 法で算定したところ回収率は 89.4  $\pm$  3.1% (最大 106.2%, 最小 84.9%) が得られた。

### 3. 濾過後全血中の白血球分画

CD15 陽性細胞を顆粒球, CD14 陽性細胞を単球, CD3 陽性細胞を T リンパ球, CD19 陽性細胞を B リンパ球, CD16, CD56 陽性細胞を NK 細胞

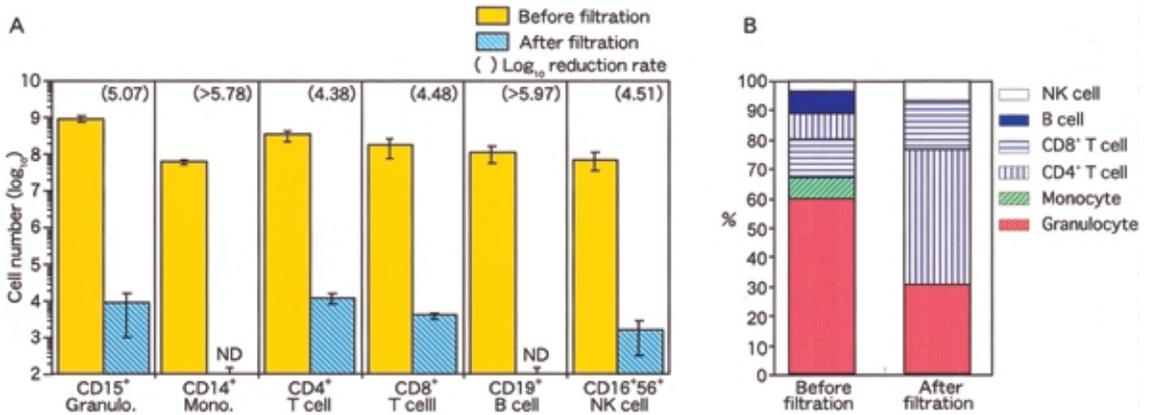


Fig. 4 Changes in absolute cell number of each leukocyte subset of whole blood products after filtration.

The cell numbers of each subset of blood samples before and after filtration and Log<sub>10</sub> reduction rate are shown in Figure 4A. Percentage of leukocyte subsets in whole blood products are shown in Figure 4B. Each bar represents the mean of six samples.

とし、濾過前後の血液中の白血球分画を解析し Fig. 4A にまとめた。濾過後は単球、B リンパ球が最もよく除去され、検出限度以下であり、log<sub>10</sub> 除去率はそれぞれ 5.78 以上、5.97 以上であった。T リンパ球は相対的に除去率が低いが、CD4、CD8 陽性 T リンパ球の濾過後残存数はそれぞれ  $11.6 \pm 36.5 \times 10^3$ 、 $4.05 \pm 0.80 \times 10^3$  であった。

これらの白血球分画の濾過前後の比率の変化を Fig. 4B に示した。濾過前では顆粒球が最も多く  $60.2 \pm 16.4\%$  であったが、濾過後では  $30.0 \pm 12.6\%$  と比率が低下していた。一方、CD4 および CD8 陽性 T リンパ球の濾過後の比率は、それぞれ  $46.5 \pm 12.0\%$ 、 $16.9 \pm 5.0\%$  と T リンパ球が平均  $63.4\%$  を占めた。単球と B リンパ球は濾過後 0% であった。

### 考 察

保存前白血球除去は我が国でも 1999 年 6 月に厚生省中央薬事審議会で導入が決定されており、今後さらに世界的に一般化される状況である。本研究では保存前白血球除去血液の調製用に関与された白血球除去フィルター組み込み閉鎖回路式採血バッグシステムを用いて、その性能と濾過後に残存する白血球の種類を検討した。

白血球除去率は log<sub>10</sub> 除去率で平均 4.83 であり、濾過後の残存白血球数は約  $10^4$  と優れた除去率が得られた。採血 4 時間後に濾過を行ない、血液が室温以上の比較的温度的の高い状況にもかかわらずフィルターの性能は満足すべきと言ってよいだろう。Europe Council の白血球除去剤の白血球数基準値、 $1 \times 10^6$  以下<sup>15)</sup>を十分満たす成績であった。

濾過後の白血球は微量なので濃縮して解析したが、本濃縮法による濃縮前後の白血球分画の比率がほぼ同様とされている<sup>14)</sup>。我々も実際に平均 89.4% の白血球の回収率が得られているので、濃縮による白血球分画の解析は十分評価が可能と思われた。

濾過後では特に単球と B リンパ球がよく除去されることが判明した。一般にフィルターによる白血球除去の機序は白血球とフィルターの孔径との大きさの差による「ふるい」効果と、細胞接着などによる「停留効果」が考えられている<sup>16)17)</sup>。白血球は種類によって大きさや接着能力が異なるので、フィルターの白血球除去効果は白血球分画によって異なる可能性がある。単球と B リンパ球が除去され易い理由も「ふるい」効果の差や接着能力の差による「停留効果」の差に起因する可能

性があるが、いずれにしても詳細な機序の解明にはさらなる検討を要する。

単球には抗原提示機能があり、Bリンパ球と単球はHLAクラスI抗原のみならずクラスII抗原を発現しているため、これらが除去され易いことは同種免疫反応の予防に、より好ましい結果と思われた。また、単球は顆粒球とともにCMVの感染細胞として重要な役割を果たしているため、CMV感染の伝播の予防の観点からも有意義であろう。

Tリンパ球の除去率は最も低く、その結果濾過後の白血球に占める割合は相対的に増加することが判明した。したがって、白血球除去フィルターを用いてもTaGVHDなどのTリンパ球に起因する輸血副作用は依然として注意を要する。ただし、その絶対数は $10^3$  -  $10^4$ と極めて少ない数量である。我々は、新鮮凍結血漿（FFP）にも生きたTリンパ球が $10^3$  -  $10^4$ は存在することを示したが<sup>18)</sup>、これまでFFPでTaGVHDが発症したという明らかな報告はない。したがって、白血球除去フィルターによってTaGVHDの発生を皆無にすることはできないにしても、その発生頻度を極めて低くする可能性がある。

同種白血球は免疫性輸血副作用のみならず感染性副作用の原因となり、その副作用は白血球分画の種類に密接に関連している。白血球除去血液が一般化しても、白血球除去フィルターでは白血球が皆無にはなるわけではない。したがって、どのような白血球分画が残存しているかを解析し、輸血副作用の予防効果との関連性を考察することは意義あることと思われた。

## 文 献

- 1) Bordin, J.O., Heddle, N.M., Blajchman, M.A. : Biologic effects of leukocytes present in transfused cellular blood products. *Blood*, 84 : 1703 - 1721, 1994.
- 2) Heddle, N.M., Klama, L.N., Griffith, L., et al. : A prospective study to identify the risk factors associated with acute reactions to platelet and red cell transfusions. *Transfusion*, 33 : 794 - 797, 1993.
- 3) Sazama, K., Holland, P. : Transfusion-induced graft-versus-host disease. (Garratty G, ed. *Immunobiology of transfusion medicine*). Marcel Dekker, New York, 1994, 631 - 656.
- 4) Levine, A., Liebman, H. : The acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). (Beutler E, Lichtman M, Coller B, Kipps T, eds. *Williams' hematology*) McGraw-Hill, New York, 1995, 975 - 997.
- 5) Hjelle B. : Transfusion-transmitted HTLV-I and HTLV-II (Rossi EC, Simon TL, Moss GL, Gould SA, eds. *Principles of transfusion medicine*. 2nd ed.) Williams and Wilkins, Baltimore, MD, USA, 1996, 709 - 716.
- 6) Gunter, K., Luban, N. : Transfusion-transmitted cytomegalovirus and Epstein-Barr virus diseases (Rossi EC, Simon TL, Moss GL, Gould SA, eds. *Principles of transfusion medicine*. 2nd ed.) Williams and Wilkins, Baltimore, MD, USA, 1996, 717 - 732.
- 7) Pollock, J.L., Presti, R.M., Paetzold, S., Virgin, H. W. : Latent murine cytomegalovirus infection in macrophages. *Virology*, 227 : 168 - 179, 1997.
- 8) Kondo, K., Xu, J., Mocarski, E.S. : Human cytomegalovirus latent gene expression in granulocyte-macrophage progenitors in culture and in seropositive individuals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93 : 11137 - 11142, 1996.
- 9) Klein, M.A., Frigg, R., Flechsig, E., et al. : A crucial role for B cells in neuroinvasive scrapie. *Nature*, 390 : 687 - 690, 1997.
- 10) 山村 一, 宮原正行, 佐藤博正 : ポリエステル系白血球除去フィルターの濾過能に及ぼす操作法と原料血保存の影響. *日本輸血学会雑誌*, 40 : 655 - 660, 1994.
- 11) 比留間潔 : 輸血用血液のPrestorage leukocyte depletion. *日本輸血学会雑誌*, 44 : 1 - 11, 1998.
- 12) Vachula, M., Simpson, S.J., Martinson, J.A., et al. : A flow cytometric method for counting very low levels of white cells in blood and blood components. *Transfusion*, 33 : 262 - 267, 1993.
- 13) Sheckler, V.L., Loken, M.R. : Routine quantitation of white cells as low as 0.001 per microL in platelet components. *Transfusion*, 33 : 256 - 261, 1993.
- 14) Sowemimo-Coker, S.O., Kim, A., Tribble, E., Brandwein, H., Wenz, B. : Leukocyte subsets in apheresis and filtered platelet concentrates. *Transfusion*, 38 : 650 - 657, 1998.
- 15) Council of Europe : Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components, 5th ed. Council of Europe Publishing, Germany, 1999, 95 - 98.
- 16) Dzik, S. : Leukodepletion blood filters : filter design and mechanisms of leukocyte removal. (*Transfus Med Rev*) 1993, VII, 65 - 77.

- 17) Bruil, A., Beugeling, T., Feijen, J., et al. : The mechanisms of leukocyte removal by filtration. ( *Transfus. Med. Rev.* ) 1995, IX, 145-166.
- 18) Hiruma, K., Okuyama, Y. : Effect of leucocyte re-

duction on the potential alloimmunogenicity of leukocytes in fresh-frozen plasma products. *Vox. Sang.*, 80, 51-56, 2001.

---