顆粒球保存条件の検討

〔II〕 buffy coat 保存に及ぼす抗凝固剤 (CPD vs. ACD) と

温度 (22°C vs. 4°C) の影響

宮 本 正 樹 笹 川 滋

日本赤十字社中央血液センター

(昭和59年8月3日受付)

STUDIES ON GRANULOCYTE PRESERVATION

II. Effects of Anticoagulants (CPD vs. ACD) and Temperature (22°C vs. 4°C) on Granulocyte Concentrates

Masaki Miyamoto and Shigeru Sasakawa

The Japanese Red Cross Central Blood Center

To establish the optimum storage conditions of granulocyte concentrates, the effects of anticoagulants (CPD and ACD) and temperature (22°C and 4°C) on granulocyte functions were examined. Granulocyte concentrates were obtained as buffy coats from fresh blood by centrifugation. The degree of granulocytes damage was studied from cell counts, mean cell volume, morphology, chemotaxis, adhesion, spreading ability, phagocytosis, and bactericidal activity during the storage of granulocytes to 48 hours.

Cell counts and various cell functions were better maintained in CPD than in ACD, and at 22°C than at 4°C during storage. We evaluated synthetically granulocytes compatibility for storage from various cell functions. Granulocytes compatibility (%) was expressed in terms of (% cell counts × % chemotaxis × % phagocytosis × % bactericidal activity)^{1/4}. All these values were expressed as a percentage to fresh cells. The combination of CPD and 22°C was the most suitable for granulocyte storage. In this condition, stored granulocytes showed on the average 90% and 80% in granulocytes compatibility after 24 hours and 48 hours, respectively. On the other hand, in granulocytes stored at 4°C granulocytes compatibility significantly reduced during 48 hours to below 50% in CPD, and impaired much further in ACD.

はじめに

成分輸血の残された課題として、顆粒球製剤がある。顆粒球輸血は、白血病、再生不良性貧血、化学療法や放射線療法等により著しい顆粒球減少状態を伴った重症感染症の治療や予防に、その需要は高まっている^{1)~3)}。しかし、顆粒球は寿命が短い上に、分離や保存の際に機能低下が激しく、これが赤血球や血小板に比べ顆粒球の輸血が立ち遅れた原因となっている。しかも、顆粒球の機能測定は十分に行なわれていない⁴⁾⁵⁾、不明な点が多い、このような状況に対処するために、我々は従来顆粒球の分離システムの開発⁶⁾や保存条件の確立を

検討してきた。顆粒球の液状保存では、保存温度⁷⁾、保存液の種類⁸⁾、pH⁷⁾、振盪の有無⁹⁾、保存容器⁹⁾¹⁰⁾が細胞機能に及ぼす影響を既に報告した。前報⁷⁾は、ACD採血後、分離調製した顆粒球濃厚液 (buffy coat) において、保存温度による顆粒球機能の変化を調べ、室温保存が有効であることを示した。さらに、現行のCPD採血は、ACD採血よりpHが若干高く、顆粒球機能向上が期待された。そこで本報は、CPD採血したbuffy coat保存に及ぼす温度 (室温 vs. 低温) の影響を調べ、ACD保存との比較検討を行なった。

方 法

1. buffy coat の調製

CPD 液 (28ml) または ACD 液 (30ml) 入り採血バッグ (クォード・ラップル, テルモ社製) に健康人から採血し, 4,000rpm×3min 4℃で遠心 (インターナショナル DPR-6000) した。多血小板血漿を分離後, 赤血球沈層の上部約20ml を buffy coat として実験に用いた。

2. buffy coat の保存

保存は, 温度を室温 (22±0.5℃) と低温 (4±0.5℃) に保ち, 水平振盪⁹⁾ (80rpm, Rotary Shaker R-III, 大洋科学工業) を行なった。

3. 顆粒球の数, 形態, 機能変化

保存24, 48時間後, 浮遊顆粒球数の pH (堀場 pH メータ) を測定し, 機能測定のために, dextran-ficoll 法¹¹⁾で顆粒球を分離した。4℃保存の buffy coat は室温に30分間放置し, 室温に戻してから数, pH の測定や分離を行なった。測定は, 下記の項目を前報⁶⁾の方法に従い行なった。

① 浮遊細胞数: Coulter Counter[®]により計数した。

② 細胞体積保持率 (MCV): Coulter Channelyzer[®]による粒度分布測定から算出した。

③ 浮遊細胞の形態: 走査型電子顕微鏡 (JSM-T20, JEOL) により観察した。

④ 遊走能: zymosan 処理血清を用いた Boyden chamber 法¹²⁾に従った。

⑤ 粘着能: 未コートおよびヒト免疫グロブリン (IgG) コート・ガラス表面に対する粘着細胞数をみた。

⑥ spreading ability: 上記ガラス表面に対する粘着形態を走査型電子顕微鏡により観察した。

⑦ 貪食能: ポリスチレン・ラテックス粒子貪食後, ジオキサン抽出法に従った。

⑧ 殺菌能: zymosan 貪食に伴う化学発光放出 (chemiluminescence release) を定量した。

各測定値は, 同一検体の保存前の顆粒球機能を100%として, その比率で表わした。

成 績

1. buffy coat

調製直後の buffy coat は Table 1 に示すように体積, 総白血球数, 総顆粒球数, 総赤血球数, 総血小板数において, ACD 採血と CPD 採血の違いは認められなかった。

2. 保存中の pH 変化

buffy coat の pH (Fig. 1) は, 調製直後 CPD で 7.28 ± 0.02 , ACD で 7.06 ± 0.03 と, CPD が約 0.2 高かった (有意差検定 $p < 0.01$)。4℃保存は,

Fig. 1 Effects of anticoagulants and temperature on buffy coat pH. Circles and squares indicate CPD and ACD, respectively.

Open and closed symbols indicate 22°C and 4°C storage, respectively.

Data are expressed as means±S.D. (N=12).

Table 1 Properties of bufft coats.

anticoagulants	volume ml	white cells ×10 ⁸	granulocytes ×10 ⁸	red cells ×10 ¹¹	platelets ×10 ⁹
ACD	22.4±2.1	8.3±2.5	5.3±1.5	1.0±0.1	7.5±0.6
CPD	21.8±2.0	8.2±2.4	5.3±1.6	1.0±0.1	7.4±0.7

Data are expressed as means±S.D. (N=12).

Fig. 2 Changes of cell counts (A) and mean cell volume (B) of granulocytes (PMNs) stored in various conditions.

The notations are the same as in Fig. 1.

Data are expressed as means $\pm$ S.D. (N=12).

48時間まではほとんどpHの変化が認められなかった。一方、室温保存は、24時間からpHの低下が起こり、48時間ではCPD 7.1, ACD 6.9と、低温保存より0.1~0.2低くかった ($p < 0.01$)。

3. 顆粒球数の変化

顆粒球数の減少 (Fig. 2A) は、4°C, 22°C共にACDに比べてCPDで少なく、その減少率は48時間で約10%であった ($p < 0.01$)。ACD保存は、24時間で約30%の細胞数の減少を示し、48時間では特に室温保存での低下が著しく ($p < 0.01$)、50%以下に激減した。

4. MCVの変化

顆粒球のMCV (Fig. 2B) は、いずれの保存条件においても増加した ($p < 0.01$)。その増加率は、24時間、48時間共にACD系約14%, CPD系約7%とACD系で高い傾向を示した。MCVの変化は、低温と室温で有意の差が認められなかった。

5. 顆粒球の形態変化

浮遊顆粒球を直ちに固定後、細胞形態を顕微鏡により観察した。新鮮顆粒球は、roundな状態で細胞表面には数多くの微絨毛が存在した。保存により微絨毛は減少すると同時に、細胞表面は波打つようになり、膜の一方から不規則なシート状の突起

が出現した。これら一連の変化は、室温保存で大きく、ACDとCPDでの差は認められなかった。

6. 遊走能の変化

遊走能 (Fig. 3A) は、室温CPD保存が良好であり、24時間で90%前後の機能を有した。低温やACD保存は、急激な機能低下を惹き起こし、24時間で50%以下になった ($p < 0.01$)。ACD保存は、48時間で10%以下にまで低下し、特に低温では機能は消失した。

7. 粘着能の変化

Fig. 3Bは、未コート・ガラス表面に対する顆粒球粘着能変化を示す。保存に伴い粘着能は、24、48時間共に亢進した ($p < 0.01$)。その増加率は室温保存で高い傾向を示し、24時間で30~40%、48時間で約50%の上昇がみられた。CPD保存では、粘着能に温度による差は認められなかったが、ACD保存では、室温が低温より粘着能は高かった ($p < 0.01$)。顆粒球は、IgGをプレコートしたガラス表面に対しても Fig. 3Bと同様な粘着能変化を示した。さらに、上記両表面に粘着した細胞の形態を観察すると、室温保存した細胞は、新鮮な細胞形態とほとんど変わらなかったが、低温保存では、spreadingを起こしている細胞は少なかった。

Fig. 3 Changes of chemotaxis (A), adhesion (B), phagocytosis (C), and chemiluminescence release (D) of granulocytes stored in various conditions. The notations are the same as in Fig. 1. Data are expressed as means±S.D. (N=12).

た。

8. 貪食能の変化

貪食能(Fig. 3C)は、ACD 保存では 4℃, 22℃ 共に48時間までほとんど低下しなかったが、CPD 保存では低下を認めた (p<0.01)。CPD, 48時間において、貪食能に及ぼす保存温度の影響がみら

れ、22℃に比べて 4℃では約50%に低下した(p<0.01)。

9. 殺菌能

殺菌能 (Fig. 3D) は、室温に比べて低温で低下が著しく、24時間で20~50%、48時間で約80%の機能が失われた。CPD 室温保存は、殺菌能を良好

に維持し、48時間においても85%以上の機能を有した。

10. 保存に伴う顆粒球機能保持率の変化

以上の結果から、buffy coat 保存における抗凝固剤、保存温度、保存時間と顆粒球機能保持との関係を示したのが Table. 2 である。ここで機能保持とは、顆粒球のもつ種々の機能を総合的に評価した値であり、顆粒球数、遊走能、貪食能、殺菌能の各値 (%) の相乗平均から算出、即ち新鮮細胞を100%として%顆粒球機能保持率 (% PMNs compatibility) = (% cell count × % chemotaxis × % phagocytosis × % chemiluminescence release)¹⁴で表した⁷⁾。その結果、buffy coat 保存に伴う顆粒球機能保持は、ACD より CPD で、また低温より室温で良好であった。特に、CPD 室温の保存条件が機能保持に有効であり、24時間、48時間で、それぞれ約90%、約80%の機能を有していた。低温保存は、機能損失が大きく、48時間で50%を下回り、特に ACD 保存においては0%であった。

考 察

顆粒球の保存には、抗凝固剤と温度が重要であった。まず、機能保持に及ぼす抗凝固剤の影響として、保存 pH の違いが挙げられる。buffy coat 調製直後の pH (Fig. 1)は、CPD 系7.28±0.02に対して、ACD 系は7.06±0.03と低く、室温48時間保存で、6.9を下回った。一方、CPD 室温保存は、48時間においても7.0以上を保った。我々は、既に顆粒球保存における pH の効果を調べ、機能保持には保存 pH を7.2前後に維持することが重要であり、pH 7.4以上でも7.0以下でも機能保持は悪く(p<0.05)、特に pH 7.0以下になると著しい機能低下を惹き起こすことを報告⁷⁾している。さらに、pH 7.2に保ちながら種々の抗凝固剤が顆粒球機能に及ぼす影響を調べた結果、ACD と CPD では各種機能変化に差は認められなかった¹³⁾。これらのことから、pH は、buffy coat 保存においても重要な因子であり、CPD 液が ACD 液よりも優れていることが明らかになった。そして、今後は、保存中の pH が7.2に維持できるように、混在する他の血球 (Table 1) の除去、緩衝効果の強い抗凝

固剤の改良、pH 低下の原因となる CO₂ のガス交換性を高めたバッグの開発等をすすめる必要がある。

低温保存は、室温保存と比べて pH の低下が少なく、48時間まではほとんど変わらなかった (Fig. 1)が、機能保持は著しく悪かった (Table 2)。特に、遊走能 (Fig. 3A)、貪食能 (Fig. 3C)、殺菌能 (Fig. 3D) で低下が激しいことから、細胞機能調節に必要なマイクロ・チューブールが低温処理により破壊¹⁴⁾¹⁵⁾されたことが原因と考えられる。また、低温で保存した顆粒球は、Ficoll-gradient (1.077±0.001g/cm³) 分離の際、低密度の単核細胞群へ移り、回収率が50%以下になることが多い。分離は、buffy coat を室温に戻してから行っており、この現象は、低温保存により顆粒球の細胞密度が低下したことを示唆した。保存温度は、MCV 変化 (Fig. 2B) にさほど影響を及ぼさなかった。また、浮遊細胞の形態変化は、低温より室温で大きかった。低温処理による細胞密度の低下は、これらの観測では把握できない細胞膜障害が起きているものと推察された。最近、低温保存した顆粒球は血管内回収率が室温保存より低いことが報告¹⁶⁾されており、上述の細胞密度の低下に示されるような細胞膜性状の変化が原因とも考えられる。

Table 2に示した顆粒球機能保持率は、顆粒球の有する種々の機能を総合的に評価した指標である。顆粒球は、生体に侵入した異物に近づき (遊

Table 2 Effects of anticoagulants and temperature on granulocytes compatibility.

storage time (hr)	PMNs compatibility(%)			
	ACD		CPD	
	4℃	22℃	4℃	22℃
24	67±5*	72±5*	67±8*	89±4**◇
48	0*	56±6**	42±6*◇	82±3**◇

Data are expressed as means±S.D. (N=12)

*Significantly (p<0.01) different from fresh cells.

+Significantly (p<0.01) different from the cells stored at 4℃.

◇Significantly (p<0.01) different from the cells stored in ACD at the same temperature.

走), 貪食, 殺菌し, 生体を外敵から防御する重要な役割を果たしている。この一連の反応に, 1つの機能障害があっても, 顆粒球は十分に活動できない。機能保持率は, 各機能測定値を掛け合わせて算出することより, 1項目でも機能が消失した場合, その細胞の総合評価は0となる。ACD, 4℃, 48時間保存では遊走能が0%である (Fig. 3A) ことより, 遊走後, 貪食・殺菌するという一連の顆粒球機能は期待できないとの結果を得た。保存に伴う MCV の増加 (Fig. 2B), 粘着能の亢進 (Fig. 3B) は, 他の機能との関連が明らかではないが, 細胞膜障害の指標とも考えられ⁷⁾, 今後詳細な検討が必要である。

結 論

顆粒球濃厚液 (buffy coat) 保存における抗凝固剤 (CPD vs. ACD) と温度 (22℃ vs. 4℃) が顆粒球機能に及ぼす影響を検討した。保存24, 48時間後, buffy coat の pH, 顆粒球数, 平均細胞体積, 浮遊細胞の形態, 遊走能, 粘着能, spreading ability, 貪食能, 殺菌能を調べ総合的に評価した。

その結果, buffy coat 保存に伴う顆粒球の数と細胞機能は, ACD より CPD で, 低温より室温で高く保たれた。そして, 顆粒球機能を総合的に評価した値 (顆粒球機能保持率%) は, CPD と室温の組み合わせが最適であり, 24, 48時間保存でそれぞれ約90%, 約80%を示したが, 低温保存では, 48時間において, CPD で50%を下回り, ACD では0%と, 機能低下が著しかった。

本論文の一部は, 第32回日本輸血学会総会 (仙台, 1984年) において発表した。本研究に際し, 種々の御配慮を頂いた中央血液センター徳永栄一所長に感謝する。

文 献

- 1) 品田章二, 小島健一: 白血球輸血の諸問題—臨床から—。免疫と血液, 2: 8—18, 1980。

- 2) 下山正徳: 成分輸血顆粒球。内科, 48: 581—588, 1981。
- 3) 三上雅嗣, 他: 白血球輸血の現状と問題点。臨床病理, 30: 1081—1088, 1982。
- 4) McCullough, J.: Liquid preservation of granulocytes. Transfusion, 20: 129—137, 1980。
- 5) Bank, H.: Granulocyte preservation circa 1980. Cryobiology, 17: 187—197, 1980。
- 6) 宮本正樹, 笹川 滋: 細胞分離用繊維の医療への応用。繊維と工業, 39: 411—420, 1983。
- 7) 宮本正樹, 笹川 滋: 顆粒球保存条件の検討 [I] buffy coat 保存における温度と pH が顆粒球機能に及ぼす影響。日本輸血学会雑誌, 29: 612—617, 1984。
- 8) 宮本正樹, 笹川 滋: 顆粒球保存条件の検討。日本輸血学会雑誌, 30: 31—33, 1984。
- 9) 宮本正樹, 笹川 滋: 顆粒球保存条件の検討。[III] buffy coat 保存に及ぼす振盪の影響。第32回日本輸血学会総会 (仙台, 1984年), 演題番号59。
- 10) 宮本正樹, 笹川 滋: 高分子材料と顆粒球との相互作用の解析。[II] 親水性材料。第13回医用高分子シンポジウム予稿集, 53—54, 1984。
- 11) Böyum, A.: A one-stage procedure for isolation of granulocytes and lymphocytes from blood. Scand. J. Clin. Lab. Invest., Suppl. 97: 51—76, 1968。
- 12) Territo, M.C.: Chemotaxis. Leukocyte Function (ed. by Cline, M.J.), Churchill Livingstone, N.Y., 1981, pp. 39—52。
- 13) 宮本正樹, 笹川 滋: 顆粒球保存条件の検討。第31回日本輸血学会総会 (奈良, 1983年), 演題番号133。
- 14) Palm, S.L., et al.: Effects of temperature and duration of storage on granulocyte adhesion, and ultrastructure. Lab. Invest., 45: 82—88, 1981。
- 15) Snyder, J.A. and McIntosh, J.R.: Biochemistry and physiology of microtubules. Annu. Rev. Biochem., 45: 699—720, 1976。
- 16) McCullough, J., et al.: Effects of storage of granulocytes on their fate in vivo. Transfusion, 23: 20—24, 1983。