フローサイトメトリーによる白血球除去血液中の白血球数の測定 —FCM濃縮操作法の検討—

青木 功¹⁾ 武田ゆかり¹⁾ 江上 静子¹⁾
里脇賢次郎¹⁾ 古谷 信滋¹⁾ 中原 一彦¹⁾
伊藤 武雄¹⁾ 青山 和美²⁾ 千葉 丈²⁾

¹⁾杏林大学病院中央検査部輸血検査室

²⁾東京理科大学基礎工学部生物工学科

(平成3年6月18日受付)

COUNT OF RESIDUAL LEUKOCYTE NUMBERS IN LEUKOCYTE DEPLETED PRODUCTS —A SAMPLE CONCENTRATION METHOD FOR FLOW CYTOMETRY—

Isao Aoki*, Yukari Takeda*, Shizuko Egami*, Kenjiro Satowaki*, Shinji Furuya*,
Kazuhiko Nakahara*, Takeo Ito*, Kazumi Aoyama** and Joe Chiba**

*Blood Transfusion Service, Central Laboratories, Kyorin University Hospital and

**Department of Biological Science & Technology, Science University of Tokyo

The number of residual leukocytes in blood filtered through a leukocyte removal filter was determined by flow cytometric technique after concentrating specimens (a sample concentration method). In this method, propidium iodide (PI) was used to stain the nuclei of leukocytes remaining in the blood. To determine the number of leukocytes in red cell concentrates (RCC), seven times as much PI solution (3500 μ l) as volume of specimen (500 μ l) was added, and the suspension was centrifuged. After removal of the supernatant, it was resuspended in 400 μ l of PI solution. With platelet concentrates (PC), 1.5 times as much PI solution (3000 μ l) as the volume of specimens (2000 μ l) was added, and the specimen was centrifuged, the supernatant removed, and the sample resuspended in 400 μ l of PI solution. The regression line obtained after concentration was: $y=0.770x-27$ ($r=0.986$, $n=21$) for RCC and $y=0.755x-20$ ($r=0.970$, $n=38$) for PC. The mean leukocyte removal rate revealed $99.97 \pm 0.02\%$ by filtration of 100 ml RCC using a Pall RC100 filter, and $99.90 \pm 0.07\%$ by filtration of 20 units pooled PC using a Pall PL100 filter. The concentration method used in the present study caused no silting in the flow cytometer which can result from insoluble aggregates generated by concentration. It increased the sensitivity for determination of extremely low numbers of leukocytes. This method will also provide an effective means of increasing the sensitivity of other types of flow cytometries.

緒 言

輸血される血液製剤中に含まれる白血球は非溶血性発熱副作用 (nonhemolytic febrile transfusion reactions, NHFTR)¹⁾²⁾, 血小板輸血不応状態³⁾, 移植片対宿主病 (graft-versus-host disease, GVHD)⁴⁾, サイトメガロウイルス^{5)~7)}などのウイルス感染の原因となることが知られている。最近, この混入白血球除去の目的で, 高性能な白血球除

去フィルターが開発され⁸⁾⁹⁾, 白血球除去率が高まってきている。これらのフィルターの正確な白血球除去能を評価することは, 輸血副作用との関係を正確に把握する上で必要不可欠である。現在, コールターカウンターや血球計算版を用いる目視法が用いられているが, これらの方法では, 検出感度に限界がある。最近, フローサイトメトリー (flow cytometry, FCM) を用い, 微量の白血球数

を測定する方法が開発されている。FCMを用いたフィルター処理後の微量白血球数の測定に関しては既に報告があるが¹⁰⁾¹¹⁾、この方法でも、再現性や検出感度において問題がある。そこで著者らは、FCM測定におけるPI(propidium iodide)染色液による検体の希釈に注目し、感度を上昇させる目的で検体を濃縮して測定するFCM濃縮操作法を検討したので報告する。

材料と方法

1. 血液製剤

濃厚赤血球(red cell concentrates, RCC)は、日赤(東京都赤十字血液センター)より供与を受けた20日以内保存の血液を用いた。濃厚血小板(platelet concentrates, PC)は日赤ランダムドナー血小板20単位、3日以内保存を使用した。

2. フィルター処理

白血球除去フィルターとして、RCCについてはポール社製RC100を、PCについては同社PL100を使用した。各フィルターは生理的食塩水による前充填なしに直接血液を充填し、流量2.5ml/分で通過させた。RCCについては、RC100に100mlを通過させた検体を用い、PCについては臨床使用(20単位処理)後のPL100フィルター下流の残液を検体とした。

3. 白血球数測定

フィルター処理前の検体については、コールターカウンター(Coulter Counter S-Plus IV, Coulter Electronics, Hialeah, FL)を使用して、白血球数を測定した。フィルター処理後の検体については、コールターカウンターでの計測、目視法としてチュルク法、さらにFCMによる測定を実施した。目視法は、Bürker-Türk血球計算版を用い、大区画(1mm²)9区画中の白血球数を測定した。

FCMによる測定は、染色液としてPI染色液を使用し、レーザー出力488nm, Differential pressure 0.2, 測定時間60秒で測定した。PI染色液の組成は、PI 50μg/ml (Behring Werke), sodium citrate 1mg/ml (和光純薬), NP-40が30mg/ml (Sigma Chemical Co.)で、蒸留水に溶解し、0.2μmメンブレンフィルター(ポール社)で濾過した

後、使用した。フローサイトメーターとしてはEPICS-CS (Coulter Electronics)を使用した。

4. FCMによる測定法

RCC試料については、PI染色液3,500μlと検体500μlを混合し15分間放置し、続いて5分間遠心分離(3,000rpm)後、上澄を除去し、PI溶液を加えて最終量400μlとし、充分振盪させた後、検体とした。PC試料については、PI染色液3,500μlと2,000μlのPC試料を混合し、15分間放置後、5分間遠心分離(3,000rpm)し、上澄を吸引除去した。これにPI染色液を添加して最終量400μlとし、充分振盪の後、検体とした。

5. 検量線の作成

RCC用検量線：期限切れの濃厚赤血球を、RC100で4回濾過し、白血球除去血を作成し希釈用血液とした。同一血液型新鮮血(検量線作成当日に健常人より採血：抗凝固剤CPD, citrate phosphate dextrose)を上記白血球除去血で段階希釈した。ここで使用する新鮮血中の白血球数はあらかじめコールターカウンターで計測し、希釈血液の測定予測値を計算した。

PC用検量線：1週間保存(期限切れ)濃厚血小板をPL100で4回濾過し、白血球除去血を作製し希釈用血液とした。この白血球除去血を用いて、同一血液型新鮮濃厚血小板を希釈した。ここで使用する新鮮濃厚血小板中の白血球数は、あらかじめコールターカウンターで計測し、希釈血液の測定予測値を計算した。

6. 濃縮操作による白血球凝集の有無

濃縮操作による白血球凝集の有無を確認する目的で、蛍光顕微鏡下のPI染色後の白血球の状態を観察した。

結 果

1. RCC用検量線とPC用検量線

図1, 2にそれぞれRCC用検量線, PC用検量線を示す。RCC用検量線については、フィルター処理前の試料のコールターカウンターから得られる白血球数とFCMから得られる白血球数から、各希釈倍率の予測値を算出しFCM実測値との検量線を得た。PC用検量線についても同様に予測値を算出した。

図1 RCC用検量線

予測値：新鮮血を10倍希釈した血液のFCM測定値から計算される各希釈倍率での白血球数。FCM実測値：EPICS-CSでの各希釈血の実測値。r：相関係数。n：試料数。

図2 PC用検量線

予測値：濃厚血小板（2日以内）を10倍希釈し、FCMで測定し、この値から計算される各希釈倍率での白血球数。FCM実測値：EPICS-CSでの各希釈血の実測値。r：相関係数。n：試料数。

RCC用検量線（図1）：

$$y=0.770x-27 \quad (r=0.986, n=21)$$

PC用検量線（図2）：

$$y=0.755x-20 \quad (r=0.970, n=38)$$

2. フィルター処理後のRCC, PC中の白血球数

表1, 2にそれぞれRCC中とPC中のフィルター処理後の漏出白血球数のコールターカウンター、目視法、FCMによる1 μ l当たりの測定値、白血球除去率(%)を示した。RCCの場合(表1),

コールターカウンターによる測定では、白血球数は6例すべてにおいて0を示した。また目視法では、各々2例ずつで、9区画の白血球数が0個、1個(11個/ μ l)、2個(22個/ μ l)と計測された。

一方、FCMによる計測では、1~108個のカウントを示し、検量線による換算より、0.94~3.60個/ μ lと算出された。FCMの計測より、RC100による除去率は99.92~99.99%(99.97 $\pm$ 0.02%, 平均 $\pm$ 標準偏差)を示した。一方PCの場合は(表

表1 各測定法によるボールRC100処理RCC中の漏出白血球数

フィルター No.	フィルター処理前の 白血球数/l	フィルター処理後の白血球数			
		コールター/ μ l (実測値)	チルク/ μ l (実測値)*	FCM/ μ l (実測値)	除去率(%)
1	4.5×10^3	0 (0)	0 (0)	3.60 (108)	99.92
2	9.7×10^3	0 (0)	22 (2)	1.86 (34)	99.98
3	8.8×10^3	0 (0)	22 (2)	2.49 (20)	99.97
4	7.3×10^3	0 (0)	11 (1)	0.94 (1)	99.99
5	1.12×10^4	0 (0)	0 (0)	1.80 (32)	99.98
6	1.12×10^4	0 (0)	11 (1)	1.34 (17)	99.99

* 9区画中の白血球数

表2 各測定法によるボール PL 100 処理濃厚血小板中の漏出白血球数

フィルター No.	フィルター処理前の 白血球数/ μl	フィルター処理後の白血球			
		コーンター/ μl (実測値)	チルク/ μl (実測値)*	FCM/ μl (実測値)	除去率 (%)
1	1.25×10^3	0 (0)	0 (0)	0.46 (17)	99.96
2	2.0×10^2	0 (0)	0 (0)	0.29 (23)	99.86
3	5.0×10^2	0 (0)	22 (2)	0.39 (45)	99.92
4	2.0×10^2	0 (0)	0 (0)	0.33 (74)	99.84
5	8.0×10^2	0 (0)	11 (1)	0.18 (4)	99.98
6	8.0×10^2	0 (0)	0 (0)	0.32 (45)	99.96
7	1.0×10^2	0 (0)	0 (0)	0.22 (16)	99.78

* 9 区画中の白血球数

2), コーンターカウンターによる測定では, RCC の場合と同様, 白血球数は 7 例すべてにおいて 0 を示した. 目視法では, カウント 0 を 5 例, 1 個 ($11\text{個}/\mu\text{l}$) を 1 例, 2 個 ($22\text{個}/\mu\text{l}$) を 1 例認めた. FCM による計測では, 4~74 個を示し, 検量線より $0.18 \sim 0.46\text{個}/\mu\text{l}$ と計算された. したがって PL100 による除去率は $99.78 \sim 99.98\%$ ($99.90 \pm 0.07\%$) を示した.

3. FCM での実測例

図 3 は, RCC の倍数希釈血 (検量線用) の実測例である. 図 3a のように, 白血球のカウント数が多い場合でも, 比較的尖鋭なピークが得られた. 一方図 3b に示すごとく, カウント数が少ない場合においても, 計測が可能であった. PC の場合も同様で, 白血球数の多い場合 (図 4a), 少ない場合 (図 4b) いずれにおいても, 測定が可能であった.

4. 濃縮法による白血球凝集の確認

濃縮操作による白血球凝集の有無を確認する目的で, 濃縮操作を加えない従来の方法で¹⁰⁾¹¹⁾, RCC 試料 $50\mu\text{l}$ に PI 染色液 $350\mu\text{l}$ を加えた試料の蛍光顕微鏡写真を図 5a に示した. また材料と方法の項 4 で示した濃縮操作を加えた場合の蛍光顕微鏡写真を, 図 5b に示した. このように何れの場合

も, 白血球の凝集は認められなかった. PC の場合も同様で, 濃縮操作を行っても, 白血球の凝集は認められなかった.

考 察

近年の白血球除去フィルターの高性能化に伴い, その評価の目的で, 残存する微量白血球の正確な計測法の確立が必要となってきた. この目的で, サイトスピン法により PC 中の残存白血球数を計測する方法¹²⁾, 白血球の核を PI 染色し, 蛍光顕微鏡で観察する方法¹³⁾, HIV (human immunodeficiency virus) を白血球に感染させ, 濾過後の漏出白血球中の HIV-DNA を PCR (polymerase chain reaction) 法にて高感度に確認する方法¹⁴⁾などが開発されている.

今回著者らは, 高感度白血球検出法として, FCM 法を改良した FCM 濃縮操作法について検討した. FCM を使用する方法は, 既に Bodensteiner¹⁰⁾, 高橋ら¹¹⁾がこの有効性を報告しているが, この方法は PI 染色液を使用し, 末梢血中の白血球の核の DNA を染色する方法であるので, 理論的には 1 個でも白血球が存在し染色されれば測定が可能である. また測定時間を延長することにより試料量を増加させることができるの

a

a

b

b

図3 濃厚赤血球中の白血球数のFCMによる実例。白血球数の多い場合(a)、少ない場合(b)いずれにおいても、尖鋭なピークが得られ、計測可能であった。

図4 濃厚血小板中の残存白血球数のFCMによる実例。濃厚赤血球と同様に、白血球数の多い場合(a)、少ない場合(b)いずれにおいても、尖鋭なピークが得られ、計測可能であった。

で、このことにより感度を上昇させることも可能である。しかし測定操作時の白血球の喪失、とくに試料を入れたチューブやFCMの測定系中での白血球の吸着などがあり、測定白血球数が減少するにつれて、測定誤差の点で大きな問題となる可能性がある。また、染色に使用されるPI染色液による検体の希釈もあり、この測定法にも問題がないわけではない。したがってこの検出法において、高感度かつ正確に白血球数を計測するには、何らかの改善が必要である。そこで今回は、試料を濃縮して測定する方法を試みた。しかし安易に試料

の濃縮を行うと、凝集物が試料に発生し、フローサイトメーターの詰りの原因となり、測定が不能になってしまう。そこで今回は、あらかじめPI染色液を試料に対しある程度大量に加えてから濃縮する方法を考案し、その有効性を検討した。この方法では、今回使用した白血球除去フィルター(ポール社製)からの漏出白血球のFCMでのカウント数は、主に1~100個のオーダーを示し、検体を濃縮しないでPI染色する従来の直接染色法でのカウント数0~10個以下のオーダー(データは示さず)に比較し、より正確であると考えられた。

図5 白血球検体の蛍光顕微鏡写真。直接法(a), 濃縮法(b)いずれにおいても白血球の凝集は認めなかった。

また、濃縮倍率を上げることによって、さらに感度を上昇させることが可能であると考えられた。

今回の測定では、フローサイトメーターとしてEPICS-CSを使用した。EPICS-CSは試料の1回のフローサイトメーター注入量が表示されない。そこでフィルター処理前の試料は、あらかじめコールターカウンターで白血球数を測定し、FCM測定値と比較し、その値を基準としてフィルター処理後試料の漏出白血球数を算出する必要がある。この方法で得られた検量線は、原点近くを通る直線が得られたものの、原点を通る直線は得られなかった。Bodensteiner¹⁰⁾あるいは高橋ら¹¹⁾の実験では、EPICS-CSを用いた我々の実験に比し、より原点近くを通る検量線が得られている。今回、検量線の作成に関しては、試験管やFCM系中で

の吸着を防ぐ目的で、希釈用血液として白血球除去フィルターを4回濾過した濃厚赤血球および濃厚血小板を用いた。また血液の希釈に際しても、微小凝集塊の影響を考慮して、可能な限り新鮮な血液を使用した。しかし原点を通る直線は得られなかった。その原因は明らかではないが、FCM系中での白血球の吸着はその原因の一つであろうと推察される。しかしいずれにせよ、今回検討したFCM濃縮法では、白血球の凝集は認めず、またすべての検体において、漏出白血球数が0を示すことなく1~100個のオーダーで見出された。このことは、今回のFCM濃縮法の有効性を示すと共に、さらに微量の白血球数の計測も可能であることを示しているものと考えられる。

結 語

白血球除去フィルター通過後の血液中に残存する微量白血球数の測定に、従来のFCM測定法を改良したFCM濃縮法を検討した。この方法では白血球の凝集を認めることなく測定が可能で、かつ測定感度を上昇させることができた。今後の白血球除去フィルターの除去率のさらなる向上を考慮し、この種の濃縮法はさらに検討していく必要がある。

謝辞：本研究に御協力頂きました東京都赤十字血液センター、坪倉兎雄製剤課長に深謝致します。

文 献

- 1) Sirchia, G., Wenz, B., Rebulla, P., Parravicini, A., Carnelli, V. and Bertolini, F.: Removal of white cells from red cells by transfusion through a new filter. *Transfusion*, 30: 30-33, 1990.
- 2) Perkins, H.A., Payne, R., Ferguson, J. and Wood, M.: Nonhemolytic febrile transfusion reactions. Quantitative effects of blood components with emphasis on isoantigenic incompatibility of leukocytes. *Vox Sang.*, 11: 578-600, 1966.
- 3) Sniecinski, I., O'Donnell, M.R., Nowicki, B. and Hill, L.R.: Prevention of refractoriness and HLA-alloimmunization using filtered blood products. *Blood*, 71: 1402-1407, 1988.
- 4) 高橋孝喜, 十字猛夫: 輸血とGVHD, 臨床と研究, 66: 455-460, 1989.
- 5) Gilbert, G.L., Hayes, K., Hudson, I.L., James, J. and The Neonatal Cytomegalovirus Infection

- Study Group: Prevention of transfusion-acquired cytomegalovirus infection in infants by blood filtration to remove leucocytes. *Lancet*, 1: 1228-1231, 1989.
- 6) De Graan-Hentzen, Y.C.E., Gratama, J.W., Mudde, G.C., Verdonck, L.F., Houbiers, J.G.A., Brand, A., Sebens, F.W., Van Loon, A.M., The, T.H., Willemze, R. and de Gast, G.C.: Prevention of primary cytomegalovirus infection in patients with hematologic malignancies by intensive white cell depletion of blood products. *Transfusion*, 29: 757-760, 1989.
 - 7) Verdonck, L.F., de Graan-Hentzen, Y.C.E., Dekker, A.W., Mudde, G.C. and de Gast, G.C.: Cytomegalovirus seronegative platelets and leukocyte-poor red blood cells from random donors can prevent primary cytomegalovirus infection after bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplantation*, 2: 73-78, 1987.
 - 8) Kickler, T.S., Bell, W., Ness, P.M. and Pall, D.: Depletion of white cells from platelet concentrates with a new adsorption filter. *Transfusion*, 29: 411-414, 1989.
 - 9) 瀬川紀美子, 長谷川秀弥, 細田真理, 高橋恒夫, 関口定美: 新しい白血球除去フィルターイムガード E の性能. セバセル R-500N との比較. *日輸血会誌*, 36: 497-503, 1990.
 - 10) Bodensteiner, D.C.: A flow cytometric technique to accurately measure post-filtration white blood cell counts. *Transfusion*, 29: 651-653, 1989.
 - 11) 高橋恒夫, 細田真理, 関口定美: フローサイトメトリーによるフィルター処理白血球除去血液製剤中の残存白血球の確認. *日輸血会誌*, 36: 429-437, 1990.
 - 12) 高橋恒夫, 細田真理, 関口定美: サイトスピン法: 白血球除去濃厚血小板中の残存白血球数の新しい確認法. *日輸血会誌*, 35: 497-503, 1989.
 - 13) Kao, K.J. and Scornik, J.C.: Accurate quantitation of the low number of white cells in white cell-depleted blood components. *Transfusion*, 29: 774-777, 1989.
 - 14) Rawal, B.D., Schwadron, R., Busch, M.P., Endow, R. and Vyas, G.N.: Evaluation of leukocyte removal filters modelled by use of HIV-infected cells and DNA amplification. *Blood*, 76: 1-4, 1990.