フィルター処理白血球除去血液製剤中に含まれる漏出白血球の種類

茂木 祐子 細田 真理 高橋 恒夫 関口 定美

北海道赤十字血液センター

(平成3年7月29日受付)

FLOW CYTOMETRIC ANALYSIS OF RESIDUAL LEUKOCYTES IN FILTERED BLOOD COMPONENTS

Yuko Mogi, Mari Hosoda, Tsuneo A. Takahashi and Sadayoshi Sekiguchi
Hokkaido Red Cross Blood Center

Knowing the population of residual leukocytes in filtered blood products is as important as knowing the number of leukocytes to elucidate the mechanisms of the side effects caused by transfused leukocytes and to find ways to prevent them completely. We concentrated residual leukocytes in the filtered red cell concentrates (RCC) and platelet concentrates (PC) by centrifugation with Ficoll-Paque and Percoll respectively, and analyzed the differential population of leukocytes, as well as subpopulations and subsets of lymphocytes using a flowcytometer. Among leukocytes collected from the filtered PC, monocytes were found to be most effectively removed by all the filters tested in this study; the Pa11 PL100, Sepacell PL5N, Imugard PL and Imugard IG-400Y. When using filters made for the RCC, Imugard IG-400Y, Pa11 RC100, Sepacell R-500N, Imugard RC, monocytes are also most effectively removed. Granulocytes tended to come out of filters made of non-woven polyester fibers (Sepacell R-500N and Pa11 RC100) if the RCC was fresh and filtered above 4°C. B cells were removed more effectively than T cells by filters made for RCC. On the other hand the specificity to the B cells of filters made for PC was much less than that observed using the filters made for RCC. CD8⁺ cells were more specifically removed by the filters made for PC. Among the RCC filters, the Imugard RC filter made of microporous polyvinyl alcohol could remove CD8⁺ cells most effectively. The filters made for RCC removed NK cells more effectively than T cells, but the filters made for PC did not show specificity to NK cells.

This study should help to clarify the mechanisms of alloimmunization and viral infection transmitted by specific leukocytes and also to elucidate the mechanism of leukocyte-depletion by filters, which are not perfectly understood at present.

緒 言

全血 (WB: whole blood), 濃厚赤血球 (RCC: red cell concentrate), 濃厚血小板 (PC: platelet concentrate) といった製剤中には1単位あたり $10^7 \sim 10^9$ 個レベルの白血球が含まれている¹⁾. この白血球が原因となる輸血副作用としては, 非溶血性発熱反応, 同種免疫抗体の発現とそれに伴う血小板輸血不応状態, 輸血後ウイルス感染 (HTLV-I, CMV, HIV 等), 輸血後 GVHD (graft-versus-host disease) 等がある¹⁾²⁾. これらの副作用の中で, 非溶血性発熱反応については白血球を 10^8 個程

度まで除去した製剤を用いれば防ぐことが出来るが^{3)~5)}, 同種免疫の予防には 5×10^6 個あるいは 1×10^6 個以下に白血球数を減らす必要があると考えられている^{2),6)~8)}. CMV 感染は血液製剤当りの白血球数を 10^7 個以下にすれば防止でき⁹⁾, HTLV-I 感染は 10^8 個以上のリンパ球の存在が感染に必要と言われている¹⁰⁾. 一方輸血後 GVHD はより少ないリンパ球でも起こる可能性がある¹¹⁾¹²⁾. さらにこれらの副作用はそれぞれ特異的な白血球によって引き起こされることも明らかになりつつある¹³⁾¹⁴⁾. この輸血副作用の原因となる白血球を除

去するためのフィルターの開発は近年めざましいものがあり、材質の異なる様々な白血球除去フィルターが使用可能となってきた^{15)~19)}。同時に従来その正確な測定が困難とされた、フィルター処理によっても漏出してくるごくわずかな数の白血球を測定する方法も考案されてきている^{20)~25)}。しかしフィルター処理前後の血液製剤中の白血球数を知るのみでなくその種類、リンパ球のサブポピュレーションおよびサブセットを知ることは、輸血副作用の予防やその発症の機序を解明していく上で極めて重要である。

今回我々は、400ml 献血由来の WB・RCC・PC およびアフエーシス PC、さらに種々のフィルターで処理した RCC および PC に含まれる白血球の数と種類(顆粒球、リンパ球、単球)、リンパ球のサブポピュレーションおよびサブセットを、フローサイトメトリー (FCM: flow cytometry) によって測定したので報告する。

材料と方法

1. 血液製剤の調製

56ml の抗凝固液 CPD (citrate phosphate dextrose) を含むトリプルバッグに健常人から採血した400ml の WB を、1,100×g で5分間20℃で遠心し、RCC と多血小板血漿 (PRP: platelet rich plasma) に分離した。PRP はさらに3,200×g で十分間遠心して血小板ベレットと乏血小板血漿 (PPP: platelet poor plasma) に分離し、ベレットに40ml の PPP を戻して PC とした。WB と RCC は採血当日に、PC は分離後室温で1時間静置した後、水平振盪保存 (60rpm, 20~22℃) して翌日測定を行った。フィルター処理は RCC は採血当日もしくは4℃で1日保存したもの、また PC は200ml 全血由来 PC を1単位 (平均 $2.4 \pm 0.7 \times 10^{10}$ 個の血小板を含む) として採血後1日保存した後20単位プールしたものをを用いた。

アフエーシス PC は、Fenwal CS-3000 (Baxter, Deerfield, IL, USA) を用いて、採血時間約90分、全血と ACD (acid citrate dextrose) 液の比率を11:1 として PC 約10~15単位分を採取した。

2. フィルター処理

RCC のフィルター処理は、ポリエステル不織布からなるボール RC100 (Pall RC100: Pall Co., Glen Cove, NY, USA) およびセパセル R-500N (Sepacell R-500N: 旭メディカル, 東京)、ポリビニルアルコール系多孔質体からなるイムガード RC (Imugard RC: テルモ, 東京)、エジプト綿からなるイムガード IG-400Y (Imugard IG-400Y: テルモ) で400ml 献血由来 RCC 1単位をフィルター処理した。イムガード IG-400Y では生理食塩液 (大塚製薬, 東京) でプライミング・リンスを行ったが、ボール RC100、セパセル R-500N およびイムガード RC では行わなかった。セパセル R-500N とイムガード RC では当日血と1日保存血、その他のフィルターでは1日保存血を、いずれも流量調節のクランプ全開で処理した。ボール RC100 では、フィルター中の空気が抜けるまで圧入した。

PC のフィルター処理は、ポリエステル不織布からなるボール PL100 (Pall PL100) では20単位の PC、表面処理を施したポリエテル不織布からなるセパセル PL-5N (Sepacell PL-5N) とポリウレタン多孔質体からなるイムガード PL (Imugard PL) では10単位の PC をいずれも生理食塩液によるプライミングなしで行った。セパセル PL-5N ではフィルター処理後、約50ml の生理食塩液でリンスした。イムガード IG-400Y は RCC の場合と同様にプライミングとリンスを行い PC 20単位を処理した。RCC と同様にボール PL100 は圧入をして、いずれのフィルターも流量調節のクランプ全開で処理した。

3. フィルター処理血液製剤中の白血球の分離・濃縮

フィルター処理した血液製剤は白血球濃度が低くリンパ球サブポピュレーションの測定は困難であるため、FCM で測定可能な程度まで白血球を分離・濃縮した。フィルター処理 RCC は処理 RCC を2~3単位まとめ、等量の Ca^{2+} ・ Mg^{2+} 不含 Hanks 液 (HBSS: Hanks' balanced salt solution) で希釈し、その30ml を20ml の Ficoll-Paque (比重1.0777, Pharmacia, Piscataway, NJ, USA) に重層し、380×g で30分間遠心して単

核球層を得た。この単核球層をすべてプールし、HBSSで洗浄し、さらにアルブミン添加HBSS(2%w/v)で2回洗浄後、上清を約2mlまで除去してリンパ球サブポピュレーション測定用サンプルとした。

またフィルター処理PCでは20単位分を20mlの33%Percoll(比重1.04, Pharmacia, Uppsala, Sweden)に20mlずつ重層して127×gで15分間遠心し、約200 μ lまで上清を除去した。これを1本にまとめて、1/10量のACDを加えたリン酸緩衝生理食塩液(PBS: NaCl 8.0mg/ml, KCl 0.2mg/ml, KH₂PO₄ 0.2mg/ml, Na₂HPO₄·7H₂O 2.16mg/ml, NaN₃ 1.0mg/ml, pH 7.4)で3回洗浄し、RCCと同様に約2mlまで上清を除去して、サンプルとした。

4. 白血球の組成とリンパ球サブポピュレーションおよびサブセットの測定

試料100 μ lに対して2mlの溶血液(NH₄Cl 8.26mg/ml, KHCO₃ 1mg/ml, EDTA-4Na 37 μ g/ml, pH7.3: オーツ・ダイアグノスティック・システムズ社, 東京)を加え、攪拌後室温に15分間静置した後、白血球組成分析用サンプルとしてレーザーフローサイトメーター(ORTHO CYTORON: オーツ社)で測定した。測定は励起波長488nm, レーザー出力15mW, サンプル流入速度1 μ l/秒, シース液の流入速度を6ml/分, 測定時間は60秒とした。前方散乱光および90°散乱光から顆粒球, 単球, リンパ球の細胞比率を求めた。

上と同様に溶血した製剤から、リンパ球サブセット測定用サンプルを調製した。4℃で300×g, 10分間遠心した後上清を除去し、細胞を4mlのPBSで2回洗浄した。上清を除去した後、PBSを加えて元の血液量100 μ lに合わせ、FITC(fluorescein isothiocyanate)標識抗体, PE(phycoerythrin)標識抗体各10 μ l, もしくは陰性コントロール(FITC標識マウス免疫グロブリン)10 μ lを加えて二重染色し水中で30分間静置した。4mlのPBSで洗浄, 上清を除去し細胞を1mlのPBSに再浮遊した。この細胞浮遊液をCYTORONで測定時間120秒で測定し、リンパ球領域に標示された細胞の緑色蛍光(FITC)と赤色蛍光(PE)の陽性率を

求めた。

5. モノクローナル抗体

各モノクローナル抗体はオーソミューンOKシリーズ(オーソ社)を用いた。OKT3(CD3)はヒト末梢血Tリンパ球と反応し、OKT4(CD4), OKT8(CD8)は各々、主にヒト末梢血のヘルパー/インデューサーTリンパ球, サプレッサー/細胞障害性Tリンパ球と反応する。OKB20(CD20)はヒトBリンパ球を, OKNK(CD16)はLGL(large granular lymphocyte)を含むNK/K細胞や顆粒球を識別する。本研究ではOKT8(FITC)とOKT4(PE), OKB20(FITC)とOKT3(PE), OKNK(FITC)とOKT3(PE)を組み合わせで行った。

6. 白血球数の測定

試料100 μ lを750 μ lのプロピディウムイオダイド(PI: propidium iodide)溶液(PI 50 μ g/ml, ribonuclease A 1mg/ml, sodium citrate monobasic 1mg/ml, Triton X-100 1 μ l/ml, 各々PBS中の最終濃度)に加えて、室温で10分間反応させ、前方散乱光と赤色蛍光強度のサイトグラムを得、白血球数を計測した²¹⁾。

7. 統計処理

フィルター処理前後のリンパ球サブポピュレーション, サブセットの差の検定は、対応のある場合のt検定を用い、p<0.05を有意な差とした。

結 果

1. 血液製剤中の白血球組成およびリンパ球サブポピュレーションとサブセット

400ml 献血由来のWB・RCC・PC, およびアフエーシスPC中の白血球組成を調べた(表1)。WBとRCCはリンパ球(WB 45.9±2.6%, RCC 43.1±2.7%)と顆粒球(50.4±2.4%, 53.5±

表1 血液製剤中の白血球組成

	リンパ球 (%)	単 球 (%)	顆粒球 (%)
WB*	45.9±2.6	3.7±0.5	50.4±2.4
RCC*	43.1±2.7	3.4±0.6	53.5±2.3
PC**	89.0±1.6	5.2±0.5	5.8±1.5
アフエーシスPC**	96.4±0.8	2.3±0.2	1.3±0.7

平均±1SE *: n=5, **: n=7

2.3%)によって白血球全体の95%以上が占められるが、PCでは全血由来・アフエーシス共にリンパ球がそれぞれ $89.0 \pm 1.6\%$ 、 $96.4 \pm 0.8\%$ とその大部分を占め、顆粒球の混入は $5.8 \pm 1.5\%$ 、 $1.3 \pm 0.7\%$ とわずかであった。

またリンパ球のサブポピュレーションは、B細

表2 血液製剤中のリンパ球サブポピュレーションおよびサブセット

	WB*	RCC*	PC*	アフエーシス PC**
T細胞 (%)	62.2 ± 2.6	62.3 ± 2.4	65.4 ± 1.3	70.3 ± 1.6
B細胞 (%)	9.4 ± 1.2	9.7 ± 1.2	14.7 ± 1.4	16.6 ± 1.2
T/B	7.3 ± 0.6	7.1 ± 0.7	4.9 ± 0.6	4.5 ± 0.4
T細胞 (%)	61.9 ± 2.3	61.5 ± 1.6	64.2 ± 1.4	68.0 ± 1.5
NK細胞 (%)	18.5 ± 2.1	20.1 ± 1.8	17.9 ± 1.7	11.1 ± 1.6
T/NK	3.9 ± 0.6	3.4 ± 0.4	4.1 ± 0.6	7.6 ± 0.9
CD4+ (%)	39.2 ± 2.4	37.5 ± 2.3	41.9 ± 2.0	43.2 ± 1.8
CD8+ (%)	26.6 ± 1.1	26.5 ± 0.8	24.1 ± 1.4	26.3 ± 1.6
4+/8+	1.5 ± 0.2	1.4 ± 0.1	1.8 ± 0.2	1.8 ± 0.2

平均 $\pm$ 1 SE * : n=5, ** : n=7

図1 フィルター処理濃厚赤血球の白血球除去率(上)と1バッグ当りの残存白血球数(下)。白血球除去率は平均 $\pm$ 1SE。(0) : 当日血, (1) : 1日保存血, n数はa) : 3, b) : 4, c) : 5, d) : 7, e) : 6. IG-Y : イムガード IG-400Y, Pall RC : ボール RC100, Sep500 : セバセル R-500N, IG-RC : イムガード RC

胞はWBで全リンパ球の $9.4 \pm 1.2\%$, RCCで $9.7 \pm 1.2\%$ であったのに対し, 全血から調製したPCおよびアフエーシスPCではやや多い傾向を示し各々 $14.7 \pm 1.4\%$, $16.6 \pm 1.2\%$ であった(表2). NK細胞はアフエーシスPCでは全リンパ球の $11.1 \pm 1.6\%$ で, その他の製剤($17.9 \sim 20.1\%$)よりもやや少ない傾向がみられた。またリンパ球サブセット比では $CD4^+/CD8^+$ が $1.4 \sim 1.8$ で, いずれの製剤についてもほぼ同じ値が得られた。

2. フィルター処理による白血球除去率と残存白血球数

当日あるいは1日保存RCCを各種フィルターで処理した際の白血球除去率および漏出総白血球数を図1に示した。全般に単球の除去率が最も高く, 次いで顆粒球, リンパ球の順であった。セバセル R-500Nによる当日血処理では白血球の除去率は 93.2% と低く, この原因は顆粒球の漏出によるものであった。しかし1日保存血では除去率は他フィルターと同等以上の成績を示した。イムガード RCは当日血および保存血双方に高い白血

図2 フィルター処理濃厚血小板の白血球除去率(上)と20単位当りの残存白血球数(下)。n=4, 白血球除去率は平均 $\pm$ 1SE, IG-Y : イムガード IG-400Y, Pall PL : ボール PL100, Sep5 : セバセル PL-5N, IG-PL : イムガード PL

球除去率を示し、保存条件の違いによる大きな差は認められなかった。セバセル R-500N 当日血処理での漏出白血球総数は、 $1.5 \pm 0.4 \times 10^8$ 個、イムガード IG-400Y で $5.8 \pm 2.9 \times 10^7$ 個、その他はいずれも 4×10^6 個以下であった。

PC 用フィルター 4 種の白血球除去率および漏出総白血球数を図 2 に示した。いずれのフィルターでも RCC 用フィルターと同様に単球が最も良く除去された。一方顆粒球の除去率は単球に比較して低かった。イムガード PL は白血球除去率 99.91% ($3.07 \log_{10}$) と最も良い成績を示し、20 単位 PC 中の漏出白血球数は他のフィルターでは $7 \sim 8 \times 10^5$ 個であったのに対して $2.5 \pm 0.8 \times 10^5$ 個であった。

3. フィルター処理血液製剤中のリンパ球サブポピュレーションおよびサブセット

Ficoll-Paque 処理して得られた単核球層における白血球の回収率はフィルター処理 RCC の全白血球の $11.4 \pm 1.5\%$ ($n=35$) であったが、これは白血球のうち顆粒球がこの処理によって除かれたためである。また Percoll 処理によるフィルター処理 PC 全白血球からの回収率は $55.6 \pm$

7.5% ($n=23$) であった。しかし濃縮を必要としない細胞濃度による予備検討により、これら比重分離法処理の前後におけるリンパ球の種類とサブセットの違いは測定結果に対して影響を与えないことを確認した。

(1) T リンパ球と B リンパ球

RCC フィルター処理においてはポール RC100 を除くすべてのフィルターで、T リンパ球/B リンパ球比は処理後に有意に高い値を示した (図 3)。イムガード RC では特に当日血 (処理前 T/B 比 6.50 ± 1.05 , 処理後 255.56 ± 72.38) において、また保存血 (同 7.13 ± 0.26 , 33.16 ± 10.67) でも顕著な差がみられ、B リンパ球が T リンパ球に比べてフィルターにより除去されやすいことがわかった。

PC フィルター処理では、イムガード IG-400Y で処理後に T/B 比は有意に高い値が得られた。またセバセル PL-5N とポール PL100 でも処理後の方が高くなる傾向が認められたが、イムガード PL ではその差はほとんど認められなかった。

(2) NK 細胞

NK 細胞は、セバセル R-500N とイムガード

図3 フィルター処理 RCC および PC 中の T/B 細胞比。平均+1SE。RCC：当日血 (0), 1 日保存血 (1)。n 数は、a) : 3, b) : 4, c) : 5, d) : 7, e) : 6。IG-Y：イムガード IG-400Y, Pall RC：ポール RC100, Sep500：セバセル R-500N, IG-RC：イムガード RC, Pall PL：ポール PL100, Sep5：セバセル PL-5N, IG-PL：イムガード PL

図4 フィルター処理 RCC および PC 中の T/NK 細胞比, 平均+1SE. RCC: 当日血 (0), 1 日保存血 (1). n 数は a): 3, b): 4, c): 5, d): 7, e): 6. IG-Y: イムガード IG-400Y, Pall RC: ボール RC100, Sep500: セパセル R-500N, IG-RC: イムガード RC, Pall PL: ボール PL100, Sep5: セパセル PL-5N, IG-PL: イムガード PL

RC で処理した場合 T 細胞よりも有意に除去されやすい傾向が認められた (図 4). 処理後の T 細胞/NK 細胞比は, セパセル R-500N では当日血 (9.35 ± 2.54) よりも保存血 (21.81 ± 6.60) の方が大きかったが, イムガード RC では逆に保存血 (13.10 ± 3.45) よりも当日血 (47.65 ± 16.16) の方が大きな値が得られた. ボール RC100 でも T/NK 比は処理後に高くなる傾向はあったが, 有意差は得られなかった.

PC 用フィルターではいずれのフィルターでも T/NK 比に処理前後で有意差は認められなかったが, セパセル PL-5N で処理後 (6.86 ± 1.55) の方が処理前 (5.06 ± 0.35) に比べてやや高い値を示す傾向が得られた.

(3) CD4⁺と CD8⁺T リンパ球

RCC においてはセパセル R-500N で当日血処理, イムガード RC では当日血および保存血処理の双方で, CD4⁺/CD8⁺比にフィルター処理前の RCC 中のリンパ球に比べて有意に高い値が得られ, この条件下で CD8⁺細胞が CD4⁺細胞よりフィルターに捕捉されやすいことがわかった (図 5). 中でもイムガード RC による当日血処理では

5.55 ± 1.41 と, 処理前 (1.44 ± 0.15) の約 4 倍の CD4⁺/CD8⁺値が得られた.

一方 PC ではいずれのフィルターを用いた場合にも処理前に対して処理後の CD4⁺/CD8⁺値は有意に高く, イムガード PL で 5.25 ± 0.75 , その他のフィルターでも平均 $3.05 \sim 3.46$ で, 処理前の 2 倍以上であった.

考 察

全血由来 PC, アフェレーシス PC においては, 混在白血球のほとんどがリンパ球によって占められており, 顆粒球はわずかしこ混入していない (表 1). これは全血由来 PC, アフェレーシス由来 PC のどちらにおいても遠心という物理的条件により調製されているため, 比重の大きい顆粒球は PC 中に混在しにくいと考えられる.

健常人末梢血中のリンパ球は, T 細胞が 54~88%, B 細胞 7~27%, NK 細胞 7~37%, CD4⁺ 31~60%, CD8⁺ 21~36%と報告されている²⁶⁾. 今回我々が測定した WB, RCC, PC の血液製剤中のリンパ球サブポピュレーションを比較すると, 全血由来, アフェレーシス由来 PC 中に B 細胞がやや多く, アフェレーシス PC 中に NK 細

図5 フィルター処理 RCC および PC 中の $CD4^+/CD8^+$ T リンパ球比. 平均 $\pm$ 1SE.
 RCC: 当日血(0), 1日保存血(1). n数はa): 3, b): 4, c): 5, d): 7, e): 6.
 IG-Y: イムガード IG-400Y, Pall RC: ポール RC100, Sep500: セバセル R-500N,
 IG-RC: イムガード RC, Pall PL: ポール PL100, Sep5: セバセル PL-5N, IG-PL: イムガード PL

胞がやや少ない傾向が得られた(表2). この傾向が各リンパ球の比重や大きさの違いによるものなのかどうか, またアフレーション機器の違いによっても生じるかどうか等²⁷⁾を, 今後さらに例数を増やして確認していく必要があると思われる. RCC および PC からのフィルターによる白血球除去を進めていく場合は, このような血液製剤間の混在白血球の種類の違いを認識することが必要である.

セバセル R-500N による RCC 当日血処理では顆粒球が多く漏出し, その結果全体の白血球除去率が低下している(図1). この当日血処理における顆粒球漏れの現象¹⁶⁾²⁸⁾は, 同種の素材(ポリエステル不織布)からなるポール RC50 フィルター(Pall Co.)でも同様な結果が得られている(北海道血液センター: 未発表データ). ポリビニール多孔質体からなるイムガード RC フィルターではこのような現象がみられないことは, 不織布と多孔質というフィルター材質の違いを反映していると思われる. しかし当日血 RCC でも 4℃で 2~3 時間冷却した後に室温にてセバセル R-500N フィルター処理した場合には顆粒球の漏出はかなり減

少し¹⁶⁾, また不織布の充填密度を高めた実験用フィルター R-S350 (旭メディカル) では当日血で室温処理でも顆粒球漏れがほとんど起こらない²⁹⁾. このことから顆粒球の漏れは, 顆粒球自身の能動的なフィルターの通り抜けに起因するのかもしれない.

1日保存した PC をイムガード IG-400Y およびセバセル PL-5N でフィルター処理した場合には, 漏出白血球の中でリンパ球の占める割合が RCC に比較して大きい(図2), これはフィルター処理前の PC 中に含まれる白血球はリンパ球がほとんどを占めること(表1)を反映しているためと考えられる.

従来第二世代の白血球除去フィルターとしてエジプト綿からなるイムガード IG-400Y が RCC および PC からの白血球除去に多く使用されてきたが, 白血球除去率は同種免疫を防ぐ上で必ずしも十分ではなく, その内容量から赤血球の損失も大きく血小板の吸着も免れない. 第三世代の白血球除去フィルターであるセバセル R-500N やポール RC は, 微細ポリエステル繊維を不織布化することにより白血球の除去率を高め, またフィルター

の内容量の減少に寄与している。不織布による白血球除去は第一に白血球の繊維への受動的吸着、次に密な繊維空間による捕獲(ふるい分け)、第三に白血球の能動的粘着が考えられる³⁰⁾。一方ポリビニルアルコール系多孔質体からなるイムガード RC の場合は、ふるい分けが吸着に加えて大きな要素となると考えられる。Steneker と Biewenga³¹⁾は不織布からなる 3 種のフィルターを使用し、フィルター内の各層に残存する白血球の種類を同定し、白血球除去の機構を考察している。それによると顆粒球、単球は主に吸着によって除去されるが、リンパ球についてはふるい効果により除去される場合(ボール RC100)と吸着によっても除去される場合(セパセル R-500)があると報告されている。RCC、PC 用フィルター処理ではほとんどの場合、単球の除去率が最も高かったが(イムガード RC 当日血処理を除く)、これは単球が他の細胞に比べてサイズが大きいという要素に加えて、単球の特徴である強い付着性を反映していると考えられる。フィルター処理により単球と B 細胞が除去されやすいことは Vakkila と Myllyla の報告³²⁾と一致する。単球の除去率が高く、B 細胞が T 細胞より(図 3)、CD8⁺細胞が CD4⁺細胞より除去されやすい(図 5)という結果からは、細胞の大きさに依存したふるい分け効果に加えて細胞吸着が白血球除去機構においてフィルターの材質を問わず大きな要素となっているといえよう。

フィルター処理によるリンパ球のサブセットの特異的な除去についてはリンパ球アフェレーシスによって得られた多リンパ球血漿をセパセル R-500 とイムガード IG-500 (エジプト綿)で処理した吉田らの報告がある³³⁾。そこではリンパ球含有率が極めて高いため除去率は本研究よりは低く同一のレベルでの比較は難しいが、単球が除去されやすいこと、両フィルターで B 細胞、CD8⁺細胞が除去されやすい等、除去の特異性は本研究と一致した結果がみられる。

ボール RC100 とセパセル R-500N はいずれもポリエステル不織布からなるが、除去される細胞の特異性は B 細胞除去能に特に差がみられ(図

3)両フィルターで若干異なっている。ボール RC フィルターがポリエステル繊維の表面を放射線グラフトでコートしてあるのに対し、セパセル R-500N ではそのような処理がなされていないが、この結果は不織布繊維の表面荷電と細胞付着の関係等を調べていく上での手がかりになるかもしれない。

不織布からなる PC 用フィルターでは血小板の吸着を防ぐため不織布表面がポリマーでコーティング処理(セパセル PL)あるいは放射線グラフト重合により繊維表面を水酸基化して(ボール PL)いるため、特定の細胞が除去される傾向は RCC 用フィルターに比べて少ないと予想された。たしかにセパセル PL においては B 細胞への特異性は減少しており(図 3)、特に NK 細胞の除去率はセパセル、ボールの両 PC 用フィルターで RCC 用フィルターに比べて減少していた(図 4)。しかし CD8⁺が CD4⁺よりも除去される傾向(図 5)は PC 用フィルターの方がより顕著であった。現在のところ CD4⁺細胞と CD8⁺細胞に大きさ、付着性に違いがあるという確証は得られておらず、この結果を説明するには細胞側とフィルター材質の両方からさらに詳細な研究を進める必要がある。

多孔質体フィルターであるイムガード RC とイムガード PL は材質、多孔質の形状が異なるため、白血球除去の機構をこの両者の結果から類推するのは難しいが、CD8⁺の特異性は両者ともあるものの(図 5)、B 細胞および NK 細胞への特異性がポリビニルアルコール系多孔質体からなるイムガード RC で不織布フィルターに比べても極めて大きいのは(図 3, 4)、細胞の大きさより吸着性の違いがこの結果を導いている可能性が大きいと考えられる。

以上のようにフィルター処理によっても漏出してくる白血球の種類はフィルターの種類によって、また処理する RCC の保存日数によっても違いがあるが、同一条件下では同じ傾向がみられる。現在まで報告されているフィルターを用いた同種免疫予防の in vivo 実験を残存白血球の種類を考慮して見直すことは、意義のあることと考える。白血球の中で MHC クラス II 抗原を発現してい

る単球が極めて除去されやすく、またB細胞が比較的除去されやすいということは、クラスII抗原陽性の細胞が主たる免疫原といわれている同種免疫の予防の上では大きな意味のあることと思われる。末梢血中の樹状細胞(dendritic cell)は抗原提示細胞として重要であるが、末梢血中の数がきわめて少ないことと特定のマーカーがないため³⁴⁾今回検討できなかったが、フィルター処理によりこのdendritic cellが除かれやすいという報告も見られる³⁵⁾。またCD8⁺細胞がよりよく除去されることは、GVHDの発症に何らかの影響を与える可能性が考えられる。また特異的な白血球に宿すウイルスによる輸血感染の防止にも効果があるかも知れない。

漏出してきたリンパ球はフィルターを通過している間に傷害を受け、培養を続けることができない結果が得られている¹³⁾。またHTLV陽性血をフィルター処理した場合の漏出白血球はHTLV-I感染能を失う結果が得られている³⁶⁾。今後はフィルター処理によっても漏出してきたそれぞれのリンパ球の性状がどう変化しているかをさらに詳細に検討していくことが必要であると考え。

結 語

(1) フローサイトメトリーによる血液製剤中の白血球の組成を明らかにした。WBとRCCの白血球組成はほぼ一致するが、PCは全血由来、アフレーシスともにリンパ球がその大半を占めていた。またリンパ球サブセットはWB、RCC、PC間で大差は認められなかった。

(2) 白血球除去フィルター処理ではRCC、PCともに単球が最も高率に除去された。

(3) RCC用フィルター中、セパセルR-500NおよびイムガードRCではB、NK細胞およびCD8⁺がより除去された。PC用フィルターでは、イムガードIG-400YではB細胞が除去されやすい傾向がみられたが、他のフィルターでは特異性は認められなかった。またいずれのフィルターでもCD8⁺がCD4⁺に比べて良く除去された。

血液製剤中の、またフィルター処理により白血球除去した製剤中の混入白血球を同定することは、輸血副作用の予防、発症のメカニズムの解明、

またより効果的な白血球除去フィルターの開発に役立つと考えられる。

文 献

- 1) 関口定美：臓器移植と術前・術後の輸血。今日の移植, 2: 357—365, 1989.
- 2) Meryman, H.T.: Cleaning up red cells and platelet: Alloimmunization, immunosuppression and disease transmission. In McCarthy, L. J., Baldwin, M.L. (Eds.): Controversies of Leukocyte-Poor Blood and Components, p. 1—26, American Association of Blood Banks, Arlington, 1989.
- 3) Sirchia, G., Rebulla, P., Parravicini, A., Carnelli, V., Gianotti, G.A. and Bertolini, F.: Leukocyte depletion of red cell units at the bedside by transfusion through a new filter. Transfusion, 27: 402—405, 1987.
- 4) Sirchia, G., Wenz, B., Rebulla, P., Parravicini, A., Carnelli, V. and Bertolini, F.: Removal of white cells from red cell by transfusion through a new filter. Transfusion, 30: 30—33, 1990.
- 5) Reverberi, R. and Menini, C.: Clinical efficacy of five filters specific for leukocyte removal. Vox Sang., 58: 188—191, 1990.
- 6) Fisher, M., Chapman, J.R., Ting, A. and Morris, P.J.: Alloimmunization to HLA antigens following transfusion with leukocyte-poor and purified platelet suspensions. Vox Sang., 49: 331—335, 1985.
- 7) Myllylä, G.: Leuco-Depletion: The Finish Experience, Presented at the Meeting of British Blood Transfusion Society on the Aspects of Blood Filtration, Birmingham, U.K., 1990.
- 8) Saarinen, U.M., Kekomäki, R., Siimes, M.A. and Myllylä, G.: Effective prophylaxis against platelet refractoriness in multitransfused patients by use of leukocyte-free blood components. Blood, 75: 512—517, 1990.
- 9) de Graan-Henzen, 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.
- 10) Okochi, K. and Sato, H.: Transmission of adult T-cell leukemia virus (HTLV-I) through blood transfusion and its prevention. AIDS Research, 2: 157—161, 1986.
- 11) Douglas, S.D. and Fudenberg, H.H.: Graft

- versus host reaction in Wiskott-Aldrich syndrome: Antemortem diagnosis of human GVH in an immunologic deficiency disease. *Vox Sang.*, 16: 172-178, 1969.
- 12) 高橋孝喜, 十字猛夫: 輸血による GVHD. 外科診療, 33: 369-376, 1991.
 - 13) Sekiguchi, S. and Takahashi, T.A.: Leucocyte-depleted blood products and their clinical usefulness, In Brozović, B. (Ed.): *The Role of Leukocyte Depletion in Blood Transfusion Practice*, p. 26-34, Blackwell Scientific Publication, Oxford, 1989.
 - 14) 池田康夫, 半田 誠: 血液製剤からの白血球除去. *Immunohaematology*, 11: 145-152, 1989.
 - 15) 武部道和, 羽富智司, 坪倉兌雄: イムガード E を用いた白血球除去濃厚赤血球の調製. 日輸血会誌, 35: 622-626, 1989.
 - 16) 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. セパセル R-500N との比較. 日輸血会誌, 36: 497-503, 1990.
 - 17) 宮本正樹, 石川善英, 小川篤子, 西村隆雄, 黒田徹: 血小板輸血用白血球除去フィルターの開発. 日輸血会誌, 35: 370-374, 1989.
 - 18) 高橋恒夫, 細田真理, 茂木祐子, 黒木 仁, 黒田慎一郎, 佐渡峯生, 関口定美: イムガード PL (ポリウレタン多孔質体フィルター) による濃厚血小板製剤中の白血球除去. 日輸血会誌, 37: 24-31, 1991.
 - 19) 高橋恒夫, 細田真理, 関口定美: フィルターによる濃厚血小板製剤からの白血球除去-Pall PL100 及び Pall PL50 の評価-1. 医科器械学, 60: 351-357, 1990.
 - 20) 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.
 - 21) 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数の確認. 日輸血会誌, 36: 429-437, 1990.
 - 22) Bodensteiner, D.C.: A flow cytometric technique to accurately measure postfiltration white blood cell counts. *Transfusion*, 29: 651-653, 1989.
 - 23) Dzik, W.H., Ragosta, A. and Cusack, W.F.: Flow-cytometric method for counting very low numbers of leukocytes in platelet products. *Vox Sang.*, 59: 153-159, 1990.
 - 24) Wenz, B., Burns, E.R., Lee, V. and Miller W.K.: A rare-event analysis model for quantifying white cells in white cell-depleted blood. *Transfusion*, 31: 156-159, 1991.
 - 25) Sadoff, B.J., Dooley, D.C., Kapoor, V., Law, P., Friedman, L.I. and Stromberg, R.R.: Methods for measuring a 6 log₁₀ white cell depletion in red cells. *Transfusion*, 31: 150-155, 1991.
 - 26) 中原一彦: 臨床検査ガイド. 文光堂, 東京, 1990, p. 747-754.
 - 27) 篠沢 隆, 渋谷 温, 小田部裕恵, 市川洋一: IBM2997 を用いた血小板および顆粒球採取時の供血者ならびに採取バッグ中のリンパ球サブセット. 日輸血会誌, 33: 503-506, 1987.
 - 28) 宮本正樹, 柴 雅之, 村 徹, 笹川 滋: セパセル-R500 による濃厚赤血球からの白血球除去一分離能に及ぼす保存日数の影響-1. 日輸血会誌, 36: 567-573, 1990.
 - 29) 高橋恒夫, 細田真理, 岡慎一郎, 西村隆雄, 茂木祐子, 那須百代, 千葉清司, 山脇直邦, 関口定美: 高性能白血球除去フィルター R-S350 の開発とそのクローズドシステム化. 日輸血会誌, 37: 232, 1991.
 - 30) 高橋恒夫, 細田真理, 茂木祐子, 関口定美: フィルターによる白血球除去血液製剤の調製. 血液事業 Blood Programme, 14: 311-316, 1991.
 - 31) Steneker, I. and Biewenga, J.: Histologic and immunohistochemical studies on the preparation of white cell-poor red cell concentrates: the filtration process using three different polyester filters. *Transfusion*, 31: 40-46, 1991.
 - 32) Vakkila, J. and Myllylä, G.: Amount and type of leukocytes in 'leukocyte-free' red cell and platelet concentrates. *Vox Sang.*, 53: 76-82, 1987.
 - 33) 吉田久博, 伊藤和彦, 内野治人: 治療的 filtration lymphocytapheresis のための基礎的検討. 日輸血会誌, 32: 389-393, 1986.
 - 34) Freudenthal, P.S. and Steinman, R.M.: The distinct surface of human blood dendritic cells, as observed after an improved isolation method. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 87: 7698-7702, 1990.
 - 35) Freedman, J., Blanchette, V., Hornstein, A., Farkas, S., Milner, R., Adams, M., Lim, F.C., Garvey, B. and Hannach, B.: White cell depletion of red cell and pooled random-donor platelet concentrates by filtration and residual lymphocyte subset analysis. *Transfusion*, 31: 433-440, 1991.
 - 36) 小林正友, 矢野美佐子, 高橋恒夫, 権 吉源, 池田久實, 関口定美: Sepacell フィルターを用いた HTLV-I 感染白血球除去の検討-PCR 及び syncytium induction assay による評価-1. 日輸血会誌, 37: 272, 1991.