

[原著]

全血採血由来製剤における白血球数試験不適検体中の白血球サブセット

日本赤十字社血液事業本部中央血液研究所
齊藤彰一，柴田昭子，佐竹正博，田所憲治

Residual leukocyte subset in leukoreduced whole blood which was unacceptable to a standard of leukocyte depletion

Central Blood Institute, Blood Service Headquarters, Japanese Red Cross Society
Shoichi Saito, Shoko Shibata, Masahiro Satake and Kenji Tadokoro

抄 録

400mL採血全血製剤の白血球数試験において，当日ろ過に比べ翌日ろ過で不適が多かった。また，LeucoCOUNT法による全血の白血球数の測定において，低蛍光強度の白血球(Rain)が観察され，翌日ろ過で増えていた。採血後冷蔵保存した全血を室温に置くことで，全血中の顆粒球が死滅，破碎しDNAを含む細胞断片となり，Rainとして検出された。Rainは，白血球除去フィルターで補足され難く，ろ過後の全血中で増加していた。また，正常な白血球(顆粒球，単球，リンパ球)も室温放置により，白血球除去フィルターを通過し易くなっていた。全血製剤においては，白血球が死滅もしくは傷害を受ける前に白血球除去することが望まれる。冷蔵保存した血液を冷えた状態でろ過することで，白血球数試験結果が改善されと考えられた。

Key words: whole blood, universal leukoreduction,
low propidium iodide intensity, subsets of residual leukocytes

はじめに

2007年1月より，全血製剤の白血球除去が始まり，その品質管理として白血球除去全血製剤中の残存白血球数の測定を開始した(白血球数試験)。全血製剤においては，採血バッグに組み込まれた白血球除去フィルターを用いて白血球除去が行われ，これまでA社およびB社製採血バッグに組み込まれたアサヒ化成メディカル社製白血球除去フィルターを用いて，ほぼすべての白血球除去が実施された。白血球除去は採血当日に行う場合(以下，当日ろ過)と，採血後全血製剤を1℃～

10℃に保存し翌日に行う場合(以下，翌日ろ過)がある。白血球数試験の基準は，製剤中(バッグ当たり)の総白血球数が 1×10^6 個以下を適とし，その適合率が95%以上としている。

表1に2011年度から2013年度の400mL採血全血製剤の白血球数試験結果をまとめた。B社，A社とも当日ろ過，翌日ろ過どちらにおいても適合率は99%以上と基準を大きく上回ったが，当日ろ過に比べて翌日ろ過で，バッグ当たりの白血球数が 1×10^6 個を超え不適となる製剤が多く見られた。ろ過日別に集計すると，当日ろ過と比較

表 1 400mL 採血全血製剤の白血球数試験結果

		当りろ過		翌りろ過	
		A 社	B 社	A 社	B 社
2011 年度	試験数	16,206	9,727	3,931	3,608
	不適数	1	0	7	5
	適合率	99.99%	100.00%	99.82%	99.86%
2012 年度	試験数	14,830	10,830	4,434	3,321
	不適数	1	1	14	10
	適合率	99.99%	99.99%	99.68%	99.70%
2013 年度 (～2014 年 1 月)	試験数	11,902	8,036	3,230	2,925
	不適数	6	1	15	5
	適合率	99.95%	99.99%	99.54%	99.83%
		当りろ過		翌りろ過	
ろ過日別集計	試験数	71,531	21,449		
	不適数	10	56		
	(／年)	(3.6)	(20.4)		
	適合率	99.99%	99.74%		

し翌りろ過は試験数が 1／3 なのに対し、不適数が 5 倍となり、実質不適の出現頻度が 15 倍になっていた。翌りろ過では年間 20 本程度の不適が出ており、白血球数試験が 100 本に 1 本の抜取試験であることから、年間およそ 2,000 本の不適製剤が発生していると推定された。ここでは、翌りろ過で不適が増加する原因について検討したので報告する。

材料および方法

1. 白血球数試験：各製造施設にて、白血球除去製剤から血液を一部採取し、その血液 1.8mL をバキュティナ真空採血管〔日本 BD(株)〕に分注し、そこに白血球固定液、PALLFIX〔日本 PALL(株)〕¹⁾ 200 μ L を加え、ミキサーでよく攪拌し白血球数試験用検体(以下、検体)とした。検体は、測定まで 2℃～8℃で保管し、中央血液研究所にて集約して白血球数を測定した。
2. 白血球数測定 (LeucoCOUNT 法)：白血球数の測定には LeucoCOUNT kit〔日本 BD(株)〕を用いた²⁾。LeucoCOUNT kit は、内部標準ビーズ(以下、TruCOUNT beads) 約 50,000 個(ロットにより異なる)を充填したチューブ(以下、TruCOUNT tubes)と核染色試薬である Propidium Iodide(以下、PI)を含む試薬(以下、

LeucoCOUNT reagent) から成る。TruCOUNT tubes に 検 体 100 μ L を 加 え た 後、LeucoCOUNT reagent を 400 μ L 加えフローサイトメーター用検体とした。フローサイトメーター用検体をフローサイトメーターに取込み、PI で染色されたイベント(白血球)と TruCOUNT beads を、FL1 (530nm) と FL2 (585nm) のドットプロットで分離し、それぞれをゲートで囲み、その数を測定した。TruCOUNT tubes 中の TruCOUNT beads の 1／5 (約 10,000 個)を取り込んだ時点で測定終了とし、以下の式より白血球数を求めた。

$$\frac{\text{測定白血球数}}{\text{測定 TruCOUNT beads 数}} \times \frac{\text{全 TruCOUNT beads 数}}{\text{検体量 (100 } \mu\text{L)}} \\ = \text{白血球数 (／} \mu\text{L)}$$

3. 低蛍光強度白血球(以下、Rain)数の測定：FL1 と FL2 のドットプロットで分離された白血球について、Rain のみを囲うゲートを設定し、Rain の数を測定した。
4. 白血球サブセットの測定：LeucoCOUNT 法で白血球を測定する際に、検体と一緒に APC もしくは PC7 標識抗白血球サブセット抗体を加え、FL1 と FL2 のドットプロットで分離した白血球について、side scatter と FL4 (675nm) もしくは FL5 (755nm) を用いて陽性細胞を分離

しその数を測定した。

5. 白血球viabilityの測定：白血球viabilityの測定には、BD Cell Viability Kit〔日本BD(株)〕を用いた。TruCOUNT tubesに全血100 μ Lを加えた後、赤血球溶血剤Pharm Lyse〔日本BD(株)〕400 μ Lを加え赤血球を溶血させた。そこにThiazole Orange 1 μ LとPI 0.5 μ Lを加え攪拌し、FL1とFL3(620nm)のドットプロットを用いて、FL1でThiazole Orangeに染まった全細胞をFL3でPIに染まった死細胞を検出し、その数を測定した。
6. 白血球除去率の算出：白血球除去前の全血から一部を採取し白血球数(／ μ L)を測定し、白血球数に血液容量を乗じバッグ当たりの白血球数(A)を求めた。その後、白血球除去を行い白血球除去全血についても同様にバッグ当たりの白血球数(B)を求めた。(A)を(B)で除し白血球除去率とした(対数表示)。

結 果

2012年度400mL採血全血製剤の白血球数試験において、 6×10^5 ／バッグ以上となった製剤の度数分布を図1に示す(判定基準は 1×10^6 個／バッグ以下が適であるが、係数1は小数第一位を四捨五入した値をとり、1.5未満は1となり適に、1.5以上は2となり不適となる)。A社、B社どちらも当日ろ過と比較し翌日ろ過で、不適製剤が

増加しているだけでなく、不適近傍の白血球を多く含む製剤が増えていた。

LeucoCOUNT法では、白血球はFL1とFL2のドットプロットで一まとまりのイベント(以下、イベント群)として検出された。血漿製剤、血小板製剤中の白血球は、PIの蛍光を検出するFL2の蛍光強度が一定のイベント群として検出されたが、全血製剤ではしばしばそのイベント群の下に、ブロードに広がるFL2の蛍光強度が低いイベント群が検出された。これらは、PIによる染色が弱い低蛍光強度の白血球と考えた。低蛍光強度の白血球については、他施設でも観察されており^{3), 4)}、Janatpour等は、FL2の蛍光強度が高く、一定のイベント群をCloud、その下のFL2の蛍光強度が低く、ブロードに広がるイベント群をRainと呼んでいる⁵⁾。ここでもこの命名に従い以下CloudとRainと呼ぶこととする(図2)。白血球数測定においては、CloudもRainも白血球として測定した。

CloudとRainの比率は、個々の製剤で異なり、白血球がすべてCloudで構成されている製剤から、すべてRainで構成されている製剤までさまざまであった。2012年度の白血球数試験において、白血球数が 6×10^5 ／バッグ以上となった製剤について、全白血球中でRainの占める比率を求め、0～25%、25～50%、50～75%、75～100%の4つのクラスに分類した。A社の当日ろ

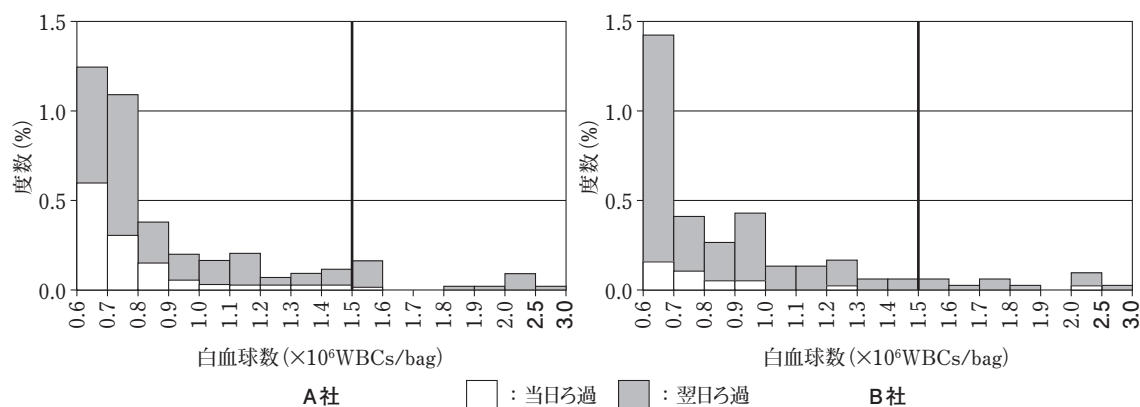


図1 2012年度400mL採血全血製剤中の白血球数の度数分布

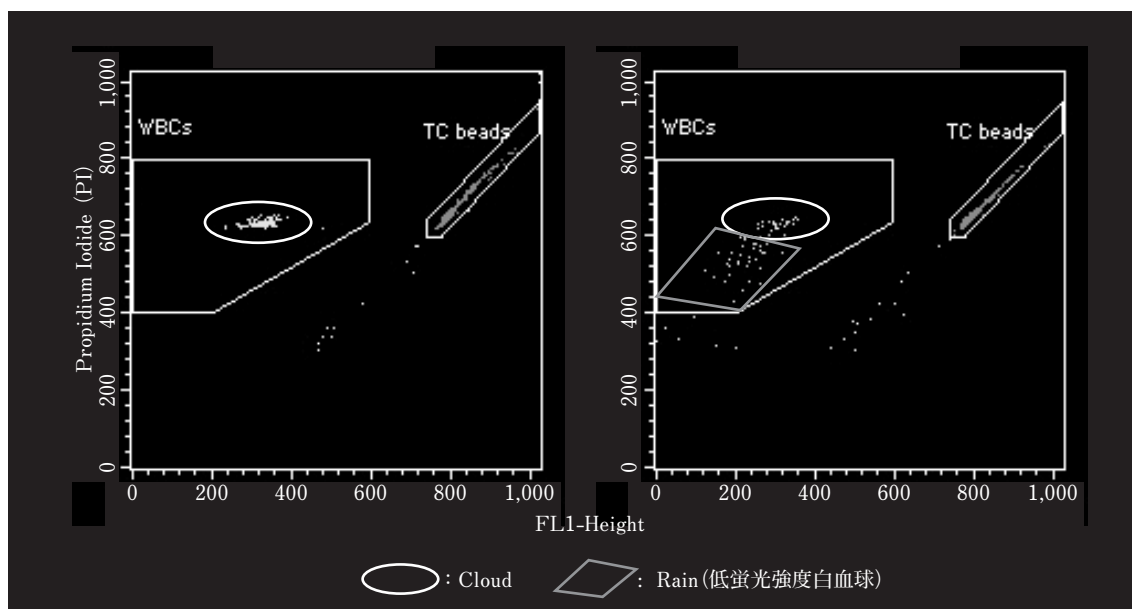


図2 LeucoCOUNT法による全血製剤中の白血球(CloudとRain)の検出

過と翌日ろ過, B社の当日ろ過と翌日ろ過, それぞれのグループごとに, 各クラスに含まれる製剤数が, 全体の中でどれくらいの比率を占めるかを集計した(図3)。Rainの比率が75~100%であった製剤の全体の中での比率は, A社, 当日で2.8%であったが, 翌日で14.0%となり, B社, 当日で10.7%であったのが, 翌日で30.9%となり, 翌日ろ過でRainの比率が高い製剤が増えていた。また, A社に比べB社でRainの比率が高い製剤が多かった。

白血球がCloudのみで構成されていた3検体およびRainのみで構成されていた3検体について, 白血球サブセットを調べた。Cloudのみの検体では, side scatterでリンパ球, 単球, 顆粒球が分離でき, その比率は末梢血とほぼ同じであった。Rainのみの検体では, side scatterでリンパ球, 単球, 顆粒球は分離できず, 顆粒球からリンパ球の位置にブロードなイベント群が検出された。次に, 抗白血球サブセット抗体による染色を行った。Cloudのみの検体では, side scatterで分離した顆粒球分画が抗CD16抗体に, リンパ球分画の一部が抗CD3抗体に染まったが, Rainのみの検体では,

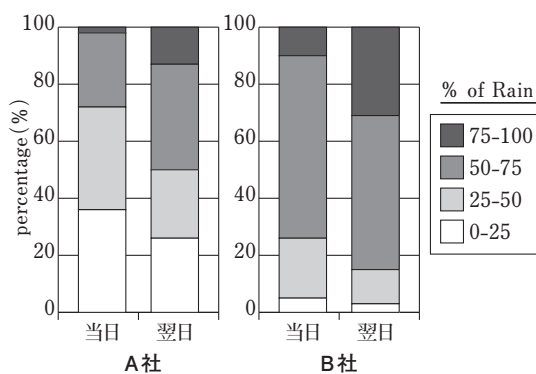


図3 製剤中のRainの比率(% of Rain)によるクラス分類と各クラスの全体の中での比率

すべての細胞が抗CD16抗体にやや弱く染まり, 抗CD3抗体に染まる細胞は見られなかった(図4)。

容量不足で減損処分となり1℃~10℃で保存した400mL全血を, 採血翌日もしくは翌々日に血液バッグのまま21℃~23℃の室内に静置し, 静置後0時間から7時間の間に血液5mLを分取

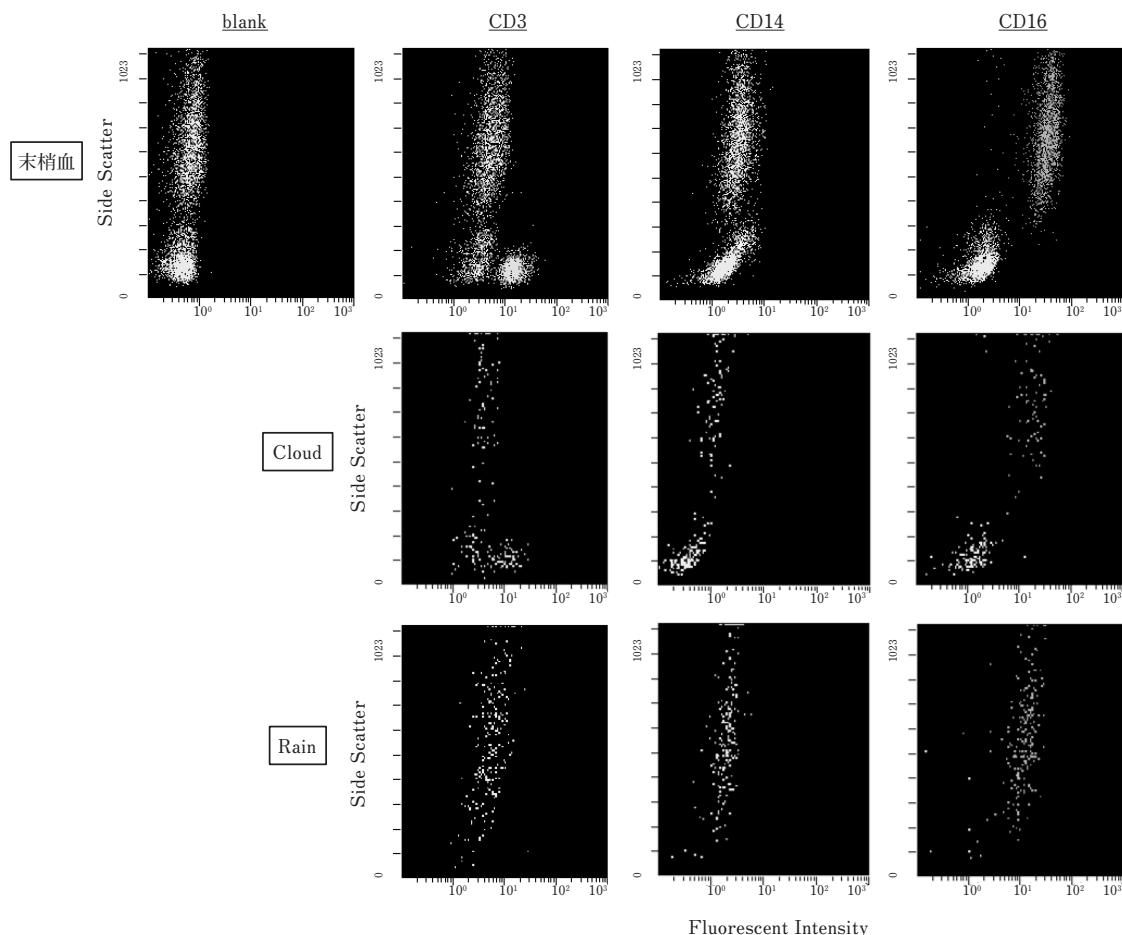


図4 CloudおよびRainの白血球サブセット

し、白血球数およびRain数を測定した。室温放置0時間の全血中にはRainはほとんど見られなかった(1%以下)が、室温放置により徐々に白血球中のRainの比率が増加し、4時間～6時間で6%～12%に達し安定した(図5)。

以下の実験には採血翌々日の全血を用いた。全血6本について、室温放置0時間と6時間の白血球数を比較した。室温放置0時間の白血球数を100.0%とすると、その内のCloudとRainの比率は、それぞれ99.6%と0.4%であった。一方、6時間後では白血球数が103.7%に増加し、CloudとRainの比率は、97.2%と6.5%になった。室温放置により、Cloudが2.4%減少したのに対しRain

が6.1%増加したことより、1つのCloudからおよそ2.5個のRainが生じた($6.1 \div 2.4 \div 2.5$)と考えられた(表2)。

室温放置とviabilityの関係を調べた。室温放置により、死細胞は2.1%から9.9%に増加した。死細胞のほとんどは、forward scatterとside scatterのドットプロットで正常な白血球の左側に現れた。forward scatterの左側に現れたことから正常な白血球より小さいことが、side scatterが弱陽性から陰性であることから、細胞内顆粒をある程度持つことが示唆された。また、顆粒球マーカーである抗CD16抗体で弱陽性に染まった。これらの特徴は、白血球数試験検体で見られた

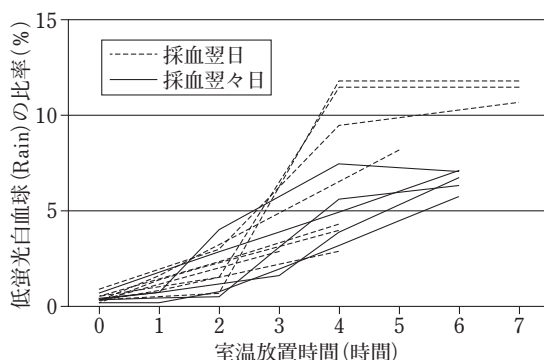


図5 採血翌日もしくは翌々日全血の室温放置時間と低蛍光白血球(Rain)の増加

表2 室温放置による白血球数の増加(%)

	Total	Cloud	Rain
0時間	100.0	99.6 ± 0.2	0.4 ± 0.2
6時間	103.7 ± 0.4	97.2 ± 0.7	6.5 ± 0.5
増減	+ 3.7	- 2.4	+ 6.1

(n = 6)

Rainと一致した(図6)。

ABO式が同型の全血をプールし、およそ400mLずつA社、B社の採血バッグ各2個に分注した。A社、B社の一方のバッグは分注後すぐに白血球除去した。もう一方は、室温に6時間放置後白血球除去した。ろ過前後のCloudとRainの数を求め、それぞれの白血球除去率を調べた。0時間でのCloudの除去率はA社で4.8ログ、B社で5.6ログであったのに対し、6時間では、それぞれ4.5ログ、4.9ログに低下した。一方、0時間でのRainの除去率は、A社で3.6ログ、B社で3.9ログであったのに対し、6時間ではそれぞれ3.6ログ、3.7ログとほとんど変わらなかった(表3)。

考 察

採血後冷蔵保存した全血を室温に置くことで、ろ過後の全血中の白血球数が増加した。これは、白血球の大部分を占めるCloudの白血球除去率が低下したことと、白血球除去率が低いRainが、ろ過前の全血中に増加したことに起因した。

Cloudは、フルサイズのDNAを持つ白血球であり、Rainは死んだ顆粒球に由来するDNAを含む細胞断片であった。Rainについてはこれまで、白血球に由来するDNA断片であると考えられていたが^{3)~5)}、今回、直接Rainの細胞表面抗原を調べた結果、ほぼすべてのRainが抗CD16抗体に染まることから細胞膜を持ち、顆粒球に由来することがわかった。RZ2000は、白血球の特異的吸着力を利用して白血球除去するフィルターであり、Rainを含む死細胞や、室温放置により傷害を受けた一部のCloudにおいては吸着能が低下し、フィルターを通過し易くなったと考えられた。また、Rainについては、サイズが小さくなることでフィルター(不織布)との接触頻度が低下し、除去率が低下した可能性もある⁶⁾。

製造現場において、翌日ろ過を行う際には、一度にすべての血液のろ過が難しいことから、ろ過されるまで一時的に室温に置かれる。その間に白血球が死滅もしくは傷害を受け、ろ過後の全血中に漏れ込んだと考えられた。Rainは、白血球の破碎の指標となると報告されており⁷⁾、当日ろ過でもRainが観察されたことから、程度は低いものの白血球の破碎は当日も起こっていると思われる⁸⁾。

白血球は、同種抗原として抗白血球抗体を産生させ血小板不応答等を引き起こし⁹⁾、また、サイトメガロウイルス(以下、CMV)、HTLV I/II等の感染の原因となる。全血中に増加したCloudとRainが、副作用にどれ程影響するかは不明であるが、各種ウイルスは白血球除去により低減化されるものの、残存することが報告されており^{10), 11)}、Wagner等は、白血球除去製剤のCMVに対するリスクがCMV陰性血より高いのは、白血球の破碎と関係している可能性があると述べている¹²⁾。しかしながら、今回調べた範囲では、CMVのhost細胞である単球、マクロファージの細胞表面マーカーはRainでは見られず、RainとCMV感染のリスクについては、今後さらに検討される必要がある。

全血製剤においては、白血球が死滅もしくは傷害を受ける前に白血球除去することが望ましい。翌日ろ過において、冷蔵庫から取り出して直ぐに、

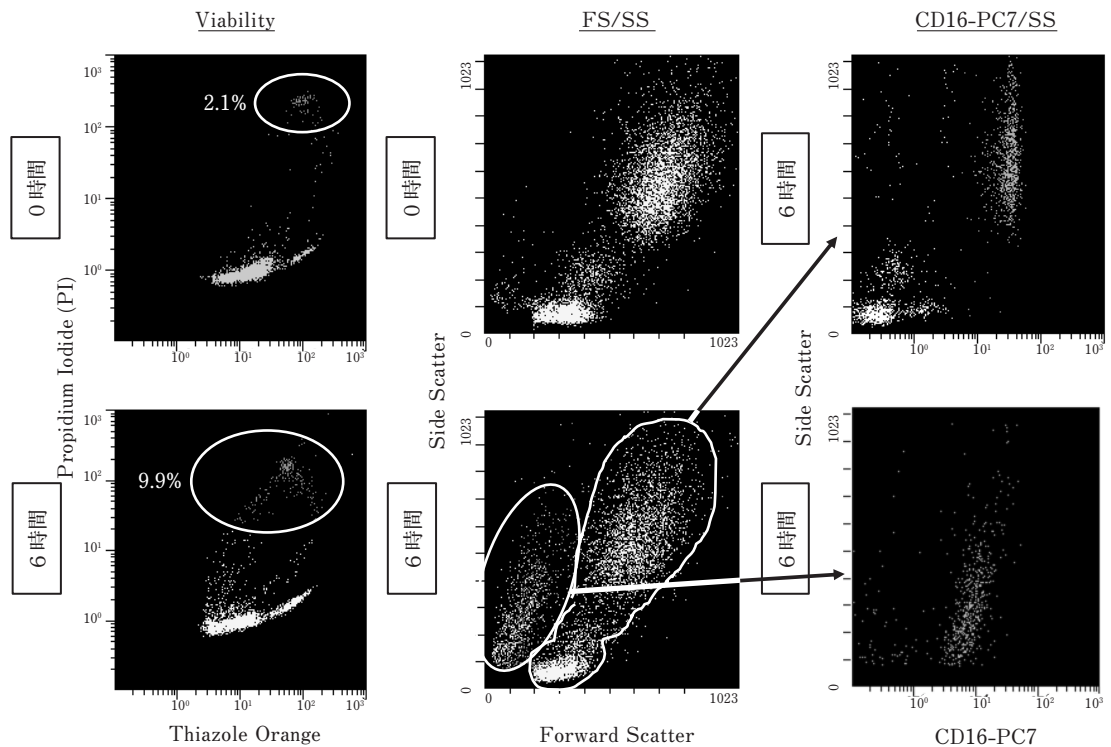


図6 室温放置による Viability の低下と白血球サブセット

表3 室温放置時間と白血球除去率

		白血球数 (/bag)			白血球除去率 (対数)	
		ろ過前	ろ過後			
			A 社	B 社	A 社	B 社
Cloud	0 時間	2.0E + 09	3.0E + 04	5.0E + 03	4.8	5.6
	6 時間	1.9E + 09	6.7E + 04	2.4E + 04	4.5	4.9
Rain	0 時間	1.5E + 07	3.8E + 03	1.9E + 03	3.6	3.9
	(% of Rain)	(0.7%)	(11%)	(27%)		
	6 時間	1.3E + 08	3.3E + 04	2.6E + 04	3.6	3.7
	(% of Rain)	(6.4%)	(33%)	(53%)		

冷えた状態でろ過することで、白血球除去成績の改善が期待できるが、ろ過時間が延長するデメリットもある。また、米国においては、ろ過までに時間を要する遠隔地での採血について、採血後急速に血液の温度を冷やす試みが始められている¹³⁾。

白血球数試験では、Cloud も Rain も 1 つの白血球として測定した。しかしながら、Rain として検出されたのは DNA の断片であり、Rain を含む検体の白血球数は、フルサイズの DNA に換算した白血球数よりも多くなっている⁵⁾。ルーチンにおいて Cloud と Rain を分けて測定することは難

しく、白血球数については高めとなるものの、実際より低い結果を出さないように試験をデザインした。

RZ2000は、A社、B社の採血バッグに組み込まれ、両者製品は非常に高い適合率を示した。し

かしながら、残存白血球中のRainの比率が異なったことから、それぞれのメーカーの製造工程(高圧蒸気滅菌など)の差がRZ2000のろ過機構に影響している可能性が示唆された。

文 献

- 1) Palmer D.S., *et al.*: Flow cytometric determination of residual white blood cell levels in preserver samples from leukoreduced blood products. *Transfusion*, 48: 118-128, 2008
- 2) Barclay G.R., *et al.*: Quality assurance by a commercial flow cytometry method of leucodepletion of whole blood donations: initial application of universal testing and proposals for a batch-release sampling plan. *Transfusion Medicine*, 10: 37-48, 2000
- 3) Meer P.F. and Wildt-Eggen J.: The effect of whole-blood storage time on the number of white cells and platelets in whole blood and in white cell-reduced red cell. *Transfusion*, 46: 589-594, 2006
- 4) Bashir S. and Cardigan R.: The origin and identification of unknown events associated with low-level leucocyte counting by flow cytometry. *Vox Sang*, 85: 190-198, 2003
- 5) Janatpour K., *et al.*: Interpretation of Atypical Patterns Encountered when using a flow cytometry-based method to detect residual leukocytes in leukoreduced red blood cell components. *Cytometry*, 50: 254-260, 2002
- 6) Tazzari P.L., *et al.*: Flow cytometry characterization of white cell-reduced blood: apoptosis markers and morphology of postfiltration elements. *Vox Sang*, 85: 109-113, 2003
- 7) Wagner T., *et al.*: Low propidium iodide intensity in flow cytometric white blood cell counting as a marker of cell destruction. *Transfusion*, 45: 228-233, 2005.
- 8) Shinar E., *et al.*: WBC filtration of whole blood after prolonged storage at ambient temperature by use of an in-line filter collection system. *Transfusion*, 42: 734-737, 2002.
- 9) Dzik S., *et al.*: HLA antigens on leukocyte fragments and plasma proteins: prestorage leukoreduction by filtration. *Vox Sang*, 66: 104-111, 1994
- 10) Hewitt P.E., *et al.*: Human T-lymphotropic virus lookback in NHS blood and transplant (England) reveals the efficacy of leukoreduction. *Transfusion*, 2012
- 11) Wu Y., *et al.*: Direct assessment of cytomegalovirus transfusion-transmitted risks after universal leukoreduction. *Transfusion*, 50: 776-786, 2010.
- 12) Qu L., *et al.*: Efficacy of Epstein-Barr virus removal by leukoreduction of red blood cells. *Transfusion*, 45: 591-595, 2005
- 13) Hinojosa R. and Bryant B. J.: WBC reduction filtration efficacy performed at varying time interval post-collection. *Transfusion*, 51: 2758-2760, 2011.