

原 著

## 新しい洗浄血小板の調製方法：成分採血装置 (CS 3000 plus) を用いた洗浄血小板の調製

佐々木 大<sup>1)</sup> 小砂子 智<sup>1)</sup> 小宮山祥光<sup>1)</sup> 鈴木 光<sup>1)</sup>  
中野 月子<sup>1)</sup> 清水 哲夫<sup>2)</sup> 神谷 忠<sup>2)</sup> 平沼 隆明<sup>3)</sup>  
高良 真一<sup>3)</sup> 西岡 克郎<sup>1)</sup> 伊田八洲雄<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>宮城県赤十字血液センター

<sup>2)</sup>愛知県赤十字血液センター

<sup>3)</sup>テルモ株式会社

(平成 11 年 1 月 28 日受付)

(平成 11 年 3 月 24 日受理)

### COMPARISON OF TWO PREPARATION METHODS IN PRODUCTION OF WASHED PLATELET CONCENTRATES

Dai Sasaki<sup>1)</sup>, Satoshi Kosunago<sup>1)</sup>, Yoshimitsu Komiyama<sup>1)</sup>, Ko Suzuki<sup>1)</sup>, Tsukiko Nakano<sup>1)</sup>,  
Tetsuo Shimizu<sup>2)</sup>, Tadashi Kamiya<sup>2)</sup>, Taka-aki Hiranuma<sup>3)</sup>, Shin-ichi Kora<sup>3)</sup>,  
Katsurou Nishioka<sup>1)</sup> and Yasuo Ida<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Miyagi Red Cross Blood Center

<sup>2)</sup>Aichi Red Cross Blood Center

<sup>3)</sup>Terumo Corporation R & D Center

In Japan, most platelet concentrates (PC) are presently collected by plateletpheresis machines and suspended in autologous plasma. Transfusion of PC occasionally induces non-hemolytic side reactions in thrombocytopenic patients by unknown factors in plasma. To prevent these side effects, removal of autologous plasma from PC has been used with a synthetic medium used for resuspension of platelets. In this study, we compared two methods for washing platelet concentrates (WPC), one by centrifugation to a platelet pellet (P-WPC) and the other using a plateletpheresis machine (CS 3000 plus) to non-pelleted platelets (CS-WPC). Both these methods allowed removal of nearly all plasma in PC. Platelet recovery with CS-WPC (98.56%) was greater than that with P-WPC (91.07%). LDH release into the supernatant was lower with CS-WPC than with P-WPC. Platelet discoid ratio and ADP/collagen aggregation in CS-WPC were also greater than those with P-WPC. However, other indicators such as pH, pCO<sub>2</sub>, pO<sub>2</sub>, MPV, %HSR, P-selectin release and lactate concentration in the supernatant were not significantly different between the two methods. These results suggest that this new washing method with the CS 3000 plus plateletpheresis machine is useful for the preparation of WPC with an acceptable quality of platelets.

**Key words** : washed platelet concentrates, preparation method of washed platelet concentrates, LDH release, plateletpheresis machine, non-hemolytic side effect of transfusion

## はじめに

濃厚血小板(PC)製剤の輸血時に発熱やアナフィラキシー様ショック等が、非溶血性副作用として報告されている<sup>1)2)</sup>。しかしながら、これらの副作用の原因は、現在のところ明確に特定されていない。最近、保存血漿中に存在する発熱性またはアレルギー性のタンパク質(サイトカイン等)による可能性が報告された<sup>3)~5)</sup>。吉田ら<sup>6)</sup>は、PC中の血漿を人工的に調製された液により洗浄することが、これらの副作用の発生を抑制することを証明した。また、現在欧州においてPAS<sup>2)</sup>という血小板保存液は、臨床使用されている。

洗浄血小板は、通常のPCの血漿部分を人工液に置換することから、置換された量の血漿が分画製剤原料として転用可能であると考えられる。現在のように分画製剤の国内自給率が低く、献血者の減少が進んでいる状況において、このようなPC由来の分画原料血漿の増加は、大きなメリットがあると推察される。

これまでにPCの調製方法の違いによる血小板の機能変化について、いくつかの報告がある<sup>8)9)</sup>。これらの報告によれば、PCを多血小板血漿(PRP)を分離し、遠心によりpellet化し調製する方法と、バフィーコート(BC)を分離した後にpellet化せずに調製する方法を比較したところ、pellet化する方法は、BCにより調製する方法に比べ、血小板の活性化を生じていることが明らかとなっている。

洗浄血小板においても調製方法の違いにより血小板の活性化が生じる可能性が考えられたことから、今回我々は、新規に成分採血装置を用いた洗浄方法を開発し、その方法により調製された洗浄血小板と、従来の遠心機を用いた血小板をpellet化する洗浄方法により調製された洗浄血小板について、血小板機能等(血小板回収率、血漿除去率、総血小板数、白血球混入数、pH、pCO<sub>2</sub>、pO<sub>2</sub>、形態観察、上清 lactate 量、上清 lactate dehydrogenase (LDH)活性、上清 P-selectin 量、%HSR、血小板凝集能)を比較検討した。

## 材料および方法

### 1. 血小板洗浄・保存液

洗浄ならびに保存に用いた液は、現在臨床使用

が可能であるブドウ糖加アセテートリンゲル液(VeenD液:250 ml, 日研化学社製), 注射用水(250 ml, 大塚製薬社製), 7%炭酸水素ナトリウム液(メイロン:20 ml, 大塚製薬社製), ACD-A液(75 ml, 川澄化学工業社製)を混合し調製した<sup>10)</sup>。

### 2. 血小板の採血

PCは、成分採血装置CS 3000 plus (Baxter社製)を用いてボランティアドナーより約10~15単位相当を目標に採血した。

### 3. 洗浄血小板(WPC)の調製

CS 3000 plusを用いた洗浄方法(CS法)は、採取工程終了後、以下の方法により行った。すなわちCS 3000 plusを初期化し、生理食塩液ラインに洗浄液(250 ml)、返血ラインに廃液用空バッグをSterile Connecting Device (SCD: Haemonetics社製)にて接続した。採取量を250 mlに設定し、1400 rpm, 40 ml/minの条件でcollectionバッグ内にクリーム状に採血された血小板を洗浄した。洗浄終了後、collectionバッグを回路から切り離し、SCDにて洗浄液を静かに約200 ml加えた。洗浄液中に血小板を浮遊させ、SCDにて血小板保存用バッグ(PL-732: Baxter社製)に移し、CS 3000 plusにより調製された洗浄血小板(CS-WPC)とした。

血小板をpellet化する方法(pellet法)は、採取工程終了後、以下のように行った。まず通常のPCと同様にcollectionバッグ内へ血漿を加え、血漿中に再浮遊させた。その後、PL-732バッグへ血小板を移した。このPCにSCDにて、ダブルバッグ(KBP-106 DCP: PC保存用バッグ1000 ml, 血漿用バッグ600 ml: 川澄工業社製)を接続し、PC保存用バッグに血小板を移した後、3500 rpm, 6 min遠心した。遠心後、分離台を用いて血漿を除去し、SCDにて洗浄液のバッグを接続し、洗浄液250 mlを静かに注入した。pellet化した血小板を、90 rpm, 30 min振盪し、再浮遊した。さらに、同様に遠心し、上清を除去し、容量が約230 mlとなるように洗浄液を加え、90 rpm, 30 min振盪し、再浮遊した。その後、PL-732バッグへ移し、pellet化した洗浄血小板(P-WPC)とした。

各方法ともに、6例調製し、20~24℃で5日間振

盪(50 rpm)保存した。

#### 4. WPC の性状

洗浄効果の評価は、WPCの上清タンパク質濃度と血漿タンパク質濃度をA/G B-テストワコー(和光純薬工業社製)により測定し、以下の式を用いて血漿タンパク質除去率を求めた。

血漿タンパク質除去率(%) = (1-WPCの上清タンパク質濃度/血漿タンパク質濃度) × 100

また血小板の回収率は、除去した液中の血小板数および総血小板数から算出した。

残存白血球数は、ヨウ化プロピジウム染色によるNageotte chamber法により蛍光顕微鏡下で計測した。血小板濃度は、自動血球計数装置E-5000(Sysmex社製)を用いて測定した。

#### 5. 洗浄血小板保存状態の測定

WPCの保存状態は、洗浄後0, 1, 3, 5日目にサンプルを本体より5~6 ml採取し、以下の項目を測定した。pH, pCO<sub>2</sub>, pO<sub>2</sub>は、血液ガス分析装置ABL-30(ラジオメーター社製)により測定した。形態観察は、サンプル100 μlに400 μlの1%グルタルアルデヒド/PBS(-)溶液を加え、室温、30 min静置後、血小板約150個を顕微鏡下にて観察し、その内のdiscoid型血小板の割合を算定した。上清lactate量、上清LDH活性測定のサンプルは、3000 rpm, 10 min遠心し、上清を-20℃で保存した。血小板中から放出された上清lactate量は、ラクテートテスト「BMY」(ペーリンガー・マンハイム社製)、上清LDH活性は、ラクテートデヒドロゲナーゼCII-テストワコー(和光純薬工業社製)を用いて測定した。上清P-selectin量は、ダイアチューブH(ペーリンガー・マンハイム社製)を用いてサンプルを調製し、GMP-140(P-selectin) EIA kit (Precoated) (Takara medicals社製)を用いて測定した。平均血小板容積(mean platelet volume: MPV)は、E-5000を用いて測定した。

#### 6. 洗浄血小板機能の測定

5.において採取したサンプル1.8 mlを3000 rpm, 10 min遠心し、上清を除去し、AB型血漿を用いて3 × 10<sup>5</sup>/μlに調製し、以下の測定に用いるPRPとした。%HSRは、常法に従いPRPサンプル

Table 1 Effect of different washing procedures on the percentage of platelet recovery and plasma removal rate in WPCs

	PLT recovery (%)	Plasma removal (%)
P-WPC	91.07 ± 3.29	97.73 ± 0.35
CS-WPC	98.56 ± 0.52 *	97.32 ± 0.23 **

The plasma removal ratio was determined as follows: (1-protein concentration of supernatant/protein concentration of plasma) × 100. Data are the mean of 6 preparations ± SD. \*: p < 0.01, \*\*: p < 0.05.

Table 2 Composition of WPCs prepared by centrifugation and the CS 3,000plus plateletpheresis machine

	WBC (1 × 10 <sup>6</sup> /bag)	Total PLT (1 × 10 <sup>11</sup> /bag)
P-WPC	9.46 ± 11.94	2.43 ± 0.43
CS-WPC	4.48 ± 5.24	2.50 ± 0.32

Platelet concentration was measured by E-5000. White blood cells were counted using a Nageotte chamber with the propidium iodide stain. Data are the mean of 6 preparations ± SD.

1.6 mlに0.8 mlのPBS(-)を加えた時の610 nmの吸光度の変化と0.8 mlの精製水を加えたときの吸光度の変化の差から算出した。血小板凝集能は、最終濃度がADP 5 μM, collagen 5 μg/mlとなるように加えたときの最大凝集率を自動血小板凝集能測定装置(HEMA TRACER 601: NBS社製)により測定した。

#### 7. 統計処理

有意差検定は、Studentのt-testにより行い、P値を求めた。P<0.05の場合を統計的有意とした。

### 結 果

#### 1. WPC の性状

PCの洗浄による血漿タンパク質除去率は、両方法ともに平均97%以上であった(Table 1)。しかしながら、血小板回収率は、CS法が98.56%であったのに対し、pellet法では91.07%と有意に低かった(P<0.05)。調製後の血小板数ならびに混入白血球数は、両方法に用いたサンプルの間に有意な差はなかった(Table 2)。

#### 2. WPC の保存状態

洗浄液のpHは、6.7であった。pHは、両WPC

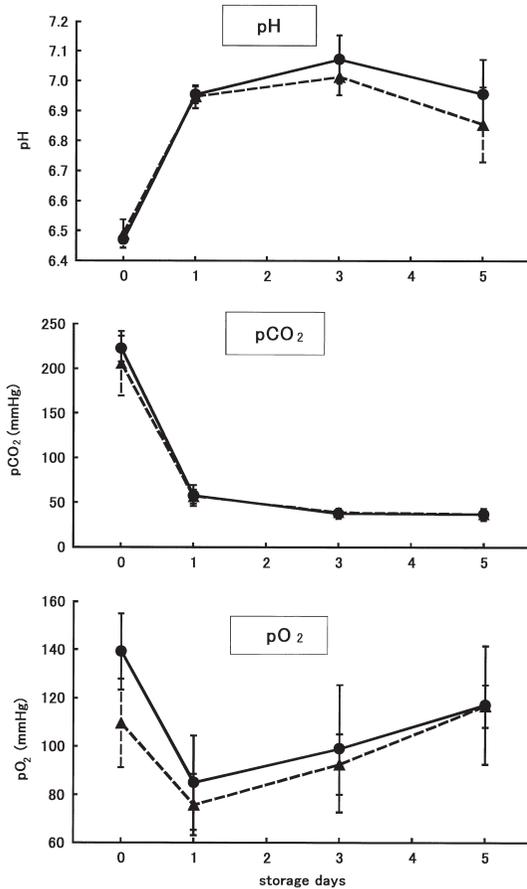


Fig. 1 Comparison of pH, pCO<sub>2</sub> and pO<sub>2</sub> values by P-WPC and CS-WPC on 5 days' storage.

pH, pCO<sub>2</sub> and pO<sub>2</sub> were measured on days 0, 1, 3 and 5. Data are the mean of 6 preparations ± SD.

● : P-WPC, ▲ : CS-WPC.

の間に有意な差はなく、調製直後約 6.5 であったのが、1 日目に 6.9 以上となり、3 日目まで上昇した。その後、5 日目において pH は低下したが、6.8 以上を維持していた。pCO<sub>2</sub> も同様に両 WPC の間に違いはみられず、0 日目から 1 日目まで急激に低下し、1 日目以降は 5 日目まで緩やかに低下した。pO<sub>2</sub> は、1 日目までに急激な低下を示し、1 日目以降は 5 日目まで上昇したが、両 WPC に有意な差はなかった (Fig. 1)。P-selectin 放出量と上清 lactate 量は、0 日目から 5 日目まで直線的な上昇傾向を示したが、両 WPC の間に有意な差はなかった (Fig. 2)。

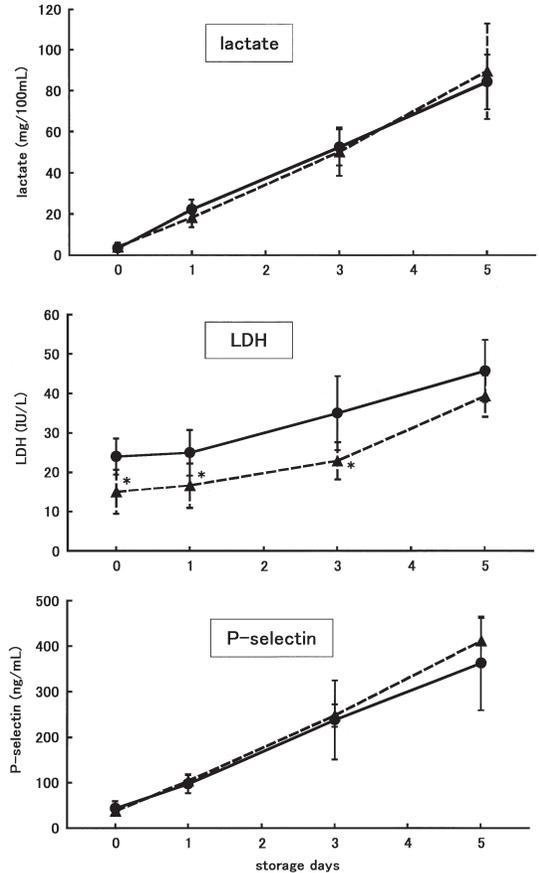


Fig. 2 Comparison of lactate concentration, lactate dehydrogenase activity and P-selectin concentration by P-WPC and CS-WPC in supernatant on 5 days' storage.

Lactate concentration, lactate dehydrogenase activity and P-selectin concentration were measured on days 0, 1, 3 and 5. Data are the mean of 6 preparations ± SD. ● : P-WPC, ▲ : CS-WPC. \* : P < 0.05.

一方、上清 LDH 活性は、徐々に上昇する傾向を示したが (Fig. 2)、0, 1, 3 日目において CS-WPC が P-WPC に対し、有意に活性が低く抑えられていた (P < 0.05)。

また、形態観察においても (Fig. 3)、0 日目において discoid 型の血小板の割合が平均 25% 以上と、P-WPC に対し CS-WPC は有意に高い割合を示した (P < 0.05)。しかし、MPV は 5 日間保存の間、両 WPC に有意差は認められなかった。

### 3. WPC の血小板機能

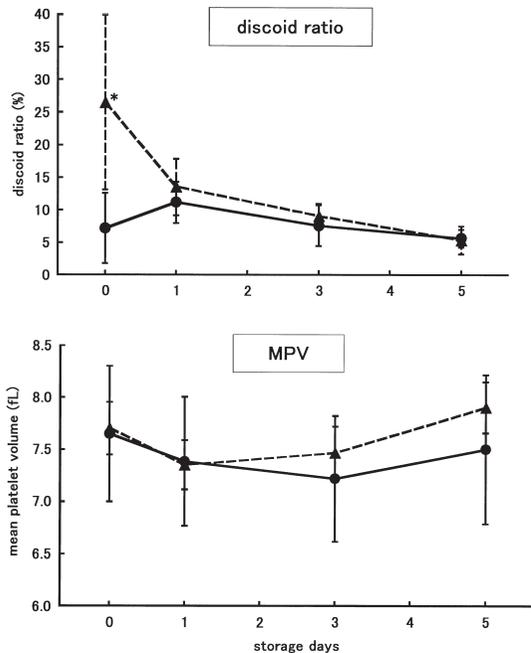


Fig. 3 Comparison of platelet morphology and mean platelet volume by P-WPC and CS-WPC on 5 days' storage.

Platelet morphology and mean platelet volume were measured on days 0, 1, 3 and 5. Platelet morphology was determined with the discoid ratio of about 150 platelets. Data are the mean of 6 preparations  $\pm$  SD. ● : P-WPC, ▲ : CS-WPC. \* :  $P < 0.05$ .

%HSR は、5日保存の間に、CS-WPC と P-WPC の間に有意な差は認められなかった (Fig. 4)。一方、1日目において P-WPC の血小板凝集能が  $60.33 \pm 10.03\%$  であったのに対し (Fig. 4), CS-WPC は  $77.17 \pm 3.13\%$  と有意に高い凝集能を示した ( $P < 0.01$ )。また、5日目においても同様に P-WPC の血小板凝集能が  $19.67 \pm 7.20\%$  であったのに対し、CS-WPC は  $31.67 \pm 5.68\%$  と有意に高い凝集能を示した ( $P < 0.05$ )。

### 考 察

今回我々は、PC による輸血副作用の回避を目的とした洗浄血小板製剤の調製方法について検討した。その結果、従来用いられてきた遠心機を使用し血小板を pellet 化する方法により調製された P-WPC は、血小板を pellet 化せずクリーム状のまま洗浄する方法により調製された CS-WPC に比

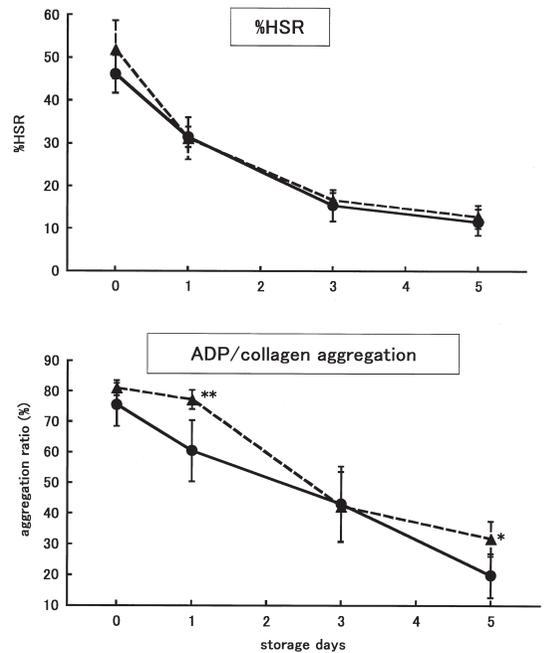


Fig. 4 Comparison of hypotonic shock response and ADP/collagen aggregation by P-WPC and CS-WPC on 5 days' storage.

%HSR and  $5 \mu\text{M}$  ADP/ $5 \mu\text{g/ml}$  collagen aggregation were measured on days 0, 1, 3 and 5. Data are the mean of 6 preparations  $\pm$  SD. ● : P-WPC, ▲ : CS-WPC. \* :  $P < 0.05$ , \*\* :  $P < 0.01$ .

べ、上清 LDH 活性が有意に高値を示した。このことから、遠心し pellet 化した後に再浮遊するという操作は、血小板の活性化を生じ易く、クリーム状態での血小板の洗浄操作は、血小板の活性化を生じにくい可能性を示唆している。血漿浮遊の PC においても、一旦 pellet 化する方法と、BC 由来の non-pellet 法の間と同様の傾向、すなわち pellet 化することにより血小板が活性化すると報告されている<sup>8)9)</sup>。さらに、P-WPC の discoid 型血小板の割合が 0 日目にすでに低かったことから、洗浄操作直後に P-WPC では、血小板の活性化を生じていた可能性がある。また、血小板凝集能において 1 日目に CS-WPC が 0 日目と変化なかったの compared、P-WPC で有意に低下していたことから、CS-WPC の方が血小板の活性維持にも有効であることが示唆された。

P-WPC と CS-WPC は、両者とも 97% 以上の高

い血漿除去率を示したが、血小板回収率では、CS-WPCが高い回収率を示した。これは、一旦成分採血装置内に採取された血小板が回路外へ排出されることが少ないことを示唆している。先に報告された<sup>11)</sup>血球洗浄装置による洗浄方法は、血漿除去率と血小板回収率がP-WPCと同等であり、CS-WPCほどの回収率はみられなかった。また、別の報告<sup>12)</sup>においても血球洗浄装置を用いた場合の血小板回収率は、CS-WPCより低かった。

これら以外の測定項目では、P-WPCとCS-WPCの間で違いが認められなかった。しかし、これらの洗浄操作に要する時間は、CS法の場合、血小板を採血後約20分ほどで終了したのに対し、pellet法では2時間以上を要した。これらの結果は、CS法がpellet法に比べWPCの調製が短時間であり、血小板機能も同等かより良い状態で保存できる有効な方法であることを示している。

今回実験に用いた洗浄液は、清水が考案し井上ら<sup>10)</sup>により報告された、現在臨床使用が可能である市販の補液の混合液をもとに改変し使用した。しかしながら、この洗浄液は、現在血漿保存で承認されている72時間まで保存すると血小板機能が明らかに低下することから、実際に临床上WPCとして使用する場合、どちらの方法を使用するとしても、調製後24時間以内の使用が望まれる。また、今回使用した血小板洗浄液を血小板の保存用に開発された液（Seto液<sup>6)13)14)</sup>などに代えることにより、血小板に対する影響は両方法の間で小さくなる可能性も考えられる。その際には、PC本来の有効期限（72時間以内）までは当然ながら、5日目までの使用も両方法ともに可能であると思われる。

今回われわれは、血漿除去率が95%以上となるような調製方法について検討したが、現在のところ血漿除去率が何%以上であれば非溶血性副作用の回避に十分であるか明確になっていない。しかしながら、血漿除去率が約60~70%であるバフィーコート法により調製したプールPCにおいて有意な副作用の発生の減少が認められている<sup>15)</sup>。今回われわれが報告した新たな洗浄方法は、PC製剤の輸血により多数報告されている副

作用を回避するのに十分な血漿除去率を示すと思われることから、WPCが製造承認された場合の調製方法の一つとして、有用であると思われる。

謝辞：今回の研究を行うにあたり、ご協力いただきました宮城県赤十字血液センター 柴田正道 製剤一係長はじめ製剤課員諸氏、ならびに採血にご協力いただきました採血課員諸氏に感謝いたします。また、CS 3000 plusの操作法をご指導いただきましたBaxter社 金川和也氏に感謝いたします。

## 文 献

- 1) 田所憲治：副作用報告に見る輸血副作用の現況と血液センターの対策，第6回赤十字血液シンポジウム—変貌する輸血医療—，日本赤十字社中央血液センター医薬情報部，東京，1998，30—34。
- 2) 田所憲治：同種血輸血に伴う合併症—全国の輸血副作用調査より—，第6回赤十字血液シンポジウム—変貌する輸血医療—，日本赤十字社中央血液センター医薬情報部，東京，1998，49—55。
- 3) Muylle, L., Joos, M., Wouters, E., De Bock, R., Peetermans, M. E. : Increased tumor necrosis factor $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), interleukin 1, and interleukin 6 (IL-6) levels in the plasma of stored platelet concentrates : relationship between TNF $\alpha$  and IL-6 levels and febrile transfusion reactions. *Transfusion*, 33 : 195—199, 1993.
- 4) 柴 雅之，田所憲治，徳永勝士，十字猛夫：血小板濃厚液保存中のサイトカイン産生，ヒスタミン遊離，および補体の活性化。日本輸血学会誌，40 (5) : 716—720, 1994。
- 5) Stack, G., Snyder, E. L. : Cytokine generation in stored platelet concentrates. *Transfusion*, 34 : 20—25, 1994.
- 6) 吉田久博，万木喜美子，伊藤和彦：血小板保存液“セト液”の臨床使用。日本輸血学会誌，40 (4) : 589—592, 1994。
- 7) Gulliksson, H., Sallander, S., Pedajas, I., Christenson, M., Wiechel, B. : Storage of platelets in additive solutions : a new method for storage using sodium chloride solution. *Transfusion*, 32 : 435—440, 1992.
- 8) Sloand, E. M., Yu, M., Klein, H. G. : Comparison of random-donor platelet concentrates prepared from whole blood units and platelets prepared from single-donor apheresis collections. *Transfusion*, 36 : 955—959, 1996.
- 9) Fijnheer, R., Pietersz, R.N.L., deKorte, D., Gouwerok, C. W. N., Dekker, W. J. A., Reesink, H. W., Roos, D. : Platelet activation during preparation of platelet concentrates : a comparison of the

- platelet-rich plasma and the buffy coat methods. *Transfusion*, 30 : 634—638, 1990.
- 10) 井上雅雄, 松田裕一, 小川 徹, 茶谷 真, 田賀 糸一, 上田明子, 外山陽之助, 中尾 功, 清水哲夫 : 洗浄血小板の輸血使用経験について. *血液事業*, 16 (3) : 312—314, 1993.
  - 11) Vesilind, G. W., Simpson, M. B., Shifman, M. A., Colman, R. E., Kao, K. J. : Evaluation of a centrifugal blood cell processor for washing platelet concentrates. *Transfusion*, 28 : 46—51, 1988.
  - 12) Kalmin, N. D., Brown, D. J. : Platelet washing with a blood cell processor. *Transfusion*, 28 : 46—51, 1988.
  - 13) Shimizu, T., Shibata, K., Kora, S. : Plasma-depleted platelet concentrates prepared with a new washing solution. *Vox Sang*, 64 : 19—23, 1993.
  - 14) Shimizu, T., Murphy, S. : Role of acetate and phosphate in the successful storage of platelet concentrates prepared with an acetate-containing additive solution. *Transfusion*, 33 : 304—310, 1993.
  - 15) Oksanen, K., Ebeling, F., Kekomäki, R., Elonen, E., Sahlstedt, L., Volin, L., Myllylä, G. : Adverse reactions to platelet transfusion are reduced by use of platelet concentrates derived from buffy coat. *Vox Sang*, 67 : 356—361, 1994.
-