

原 著

血小板の洗浄・保存液の比較検討

佐々木 大¹⁾ 小砂子 智¹⁾ 小宮山祥光¹⁾ 鈴木 光¹⁾
浦野 慎一¹⁾ 中野 月子¹⁾ 清水 哲夫²⁾ 神谷 忠²⁾
平沼 隆明³⁾ 西岡 克郎¹⁾ 伊田八洲雄¹⁾

¹⁾宮城県赤十字血液センター

²⁾愛知県赤十字血液センター

³⁾テルモ株式会社

(平成12年10月27日受付)

(平成13年7月19日受理)

COMPARISON OF PLATELET QUALITY IN WASHED PLATELET CONCENTRATES PREPARED WITH DIFFERENT SYNTHETIC STORAGE SOLUTIONS

Dai Sasaki¹⁾, Satoshi Kosunago¹⁾, Yoshimitsu Komiyama¹⁾, Ko Suzuki¹⁾, Shin-ichi Urano¹⁾,
Tsukiko Nakano¹⁾, Tetsuo Shimizu²⁾, Tadashi Kamiya²⁾, Taka-aki Hiranuma³⁾,
Katsurou Nishioka¹⁾ and Yasuo Ida¹⁾

¹⁾Miyagi Red Cross Blood Center

²⁾Aichi Red Cross Blood Center

³⁾Terumo Corporation R & D Center

Washed platelet concentrates (WPC) have been used for patients with severe non-hemolytic febrile transfusion reaction (NHFT) following ordinary PC transfusion. We studied three synthetic platelet storage solutions, namely Solution 1 containing saline including 0.1% citrate, Solution 2 based on acetate Ringer's solution with glucose and citrate, and Solution 3 being Seto solution designed for longer storage of PC. The pH of PC washed with Solution 1 rapidly decreased from 6.37 to 5.82 after 1 day storage, but remained at 6.8 throughout storage for 5 days with Solutions 2 and 3. On day 5, P-selectin concentrations in the supernatant of PC washed with Solution 3 were still lower than those washed with Solution 1 or Solution 2 and stored for 1 day or 3 days, respectively. The percent hypotonic shock response (%HSR) of Solution 1 was completely lost after 1 day storage, and Solution 2 reached about 20% after 3 day storage. %HSR and discoid shape were maintained at a high level, for 5 days by using Solution 3. These results suggest that Solution 3 is the most desirable solution for platelets. Owing to the rapid deterioration of platelet quality, we recommended that transfusion of WPC prepared with Solution 1 or Solution 2 be done within 6 hr or 1 day, respectively.

Key words : platelet storage solution, washed platelet concentrates, Seto solution, non-hemolytic febrile transfusion reactions

血小板製剤 (PC) 輸血による非溶血性副作用 (NHFT, non-hemolytic transfusion reactions) の報告が近年増加の傾向を示している¹⁾。NHFTは、しばしばアナフィラキシー様ショックを呈し、

血圧低下、呼吸困難等の重篤な症状を認めることが知られている²⁾。しかしながら、この副作用の原因は、いくつかの症例において血漿タンパク質に対する抗体が患者より検出³⁾されたり、発熱性サイ

トカインの産生⁴⁾⁻⁶⁾による可能性が考えられたりしているが、ほとんどの症例は原因不明のままである。われわれを含むいくつかのグループは副作用原因物質が、血漿中に存在しているという考えに基づいて、血漿を人工的に調製された液に置換した洗浄血小板(WPC, washed platelet concentrates)を検討してきた⁷⁾⁻¹¹⁾。WPCの輸血によって、NHFT Rは抑制され、輸血された血小板も十分機能することが報告されている¹²⁾⁻¹⁵⁾。WPCの洗浄・保存に用いられる液は、数種類開発されたが、国内では承認されておらず、簡便には臨床使用ができない¹¹⁾。そのため、市販の輸液剤混合により、WPCの調製を行っているのが現状である。これら洗浄保存液間の血小板保存効果の違いについては、明確にされていない。今回、われわれは血小板の洗浄保存液として、調製が簡単な、クエン酸含有生理食塩液(保存液1)、調製が若干複雑であるが、入手が容易なブドウ糖加アセートリンゲル液を主剤とした液(保存液2)、ならびにわれわれが開発した血小板保存液のSeto液¹¹⁾(保存液3)を用いて、血小板機能の保存能について比較検討した。

材料および方法

1. 材料

保存液1, 保存液2, 保存液3の組成は、Table 1に示した。保存液1は、500ml 生理食塩液(川澄化学工業社製)に10% 輸血用クエン酸ナトリウム注射液(輸血用チト랄ル, 山之内製薬社製: 5ml)を加え無菌的に調製した。保存液2は、ブドウ糖加アセートリンゲル液(ヴィーンD液, 日研化学社製: 250ml), 注射用水(大塚製薬社製: 250ml), 7% 炭酸水素ナトリウム注射液(メイロン, 大塚製薬社製: 20ml), ACD-A液(川澄化学工業社製: 75ml)を混合し無菌的に調製した。保存液3のSeto液は、テルモ株式会社より供与された。保存液1は、調製直後、36時間後および1日目にPCよりサンプルを5~7ml採取し測定に用いた。保存液2および3は、調製直後、調製後1, 3, 5日目にPCよりサンプルを5~7ml採取し測定に用いた。

2. 血小板の洗浄方法

Table 1 Composition of three platelet storage solutions*

Solution	1	2	3
NaCl	152.5	43.1	110.0
KCl		1.7	4.0
MgCl ₂			3.0
Na ₃ citrate	3.8	10.7	5.0
CH ₃ COONa		18.8	15.0
NaH ₂ PO ₄			7.5
Glucose		132.0	14.0
NaHCO ₃		28.0	10.0
CaCl ₂		0.8	
Citrate		5.2	

* : Concentrations are given as mM.

PCは、常法に従い成分採血装置(CS3000plus: Baxter社製)を用いて10単位以上を目標として採取した。採取した後、成分採血装置CS3000plusを用いた方法⁶⁾により洗浄した。採血ラインに保存液を接続し、通常の採血操作と同様にcollectionバッグ内に保存液を流し、バッグ内の血漿を保存液に置換した。返血ラインには、廃棄用バッグを接続し、collectionバッグ内の血漿を回収した。洗浄終了後、collectionバッグを回路から切り離し、無菌接合装置(Sterile Connecting Device: SCD)にて接合した保存液を静かに約200ml加えた。保存液中に浮遊させた血小板を、SCDにて接合した血小板保存用バッグ(PL-732: Baxter社製)へ移し、WPCとした。

血小板回収率は、CS3000plusに接続した廃液用バッグ中の血小板数と保存用バッグに回収された血小板数から算出した。

洗浄による血漿の除去率は、WPC上清中のタンパク質濃度と血漿タンパク質濃度をビウレット法(A/G Bテストワコー: 和光純薬社製)により測定し、以下の式により算出した。

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

保存液1により調製したWPCは、22℃で1日間振盪(50rpm)保存した。保存液2と3により調製したWPCは、22℃で5日間振盪(50rpm)保存した。

3. 血小板の保存状態の測定

pH 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 μ l に 400 μ l の 1% グルタルアルデヒド/PBS(-)溶液を加え、室温、30min 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 lactate dehydrogenase(LDH)活性測定のサンプルは、3,000rpm, 6min 遠心し、上清を - 20 $^{\circ}$ C で保存した。血小板から放出された 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 χ Takara medicals 製)を用いて測定した。

4. 血小板の機能測定

低浸透圧ショック回復率 (percent hypotonic shock response: %HSR) は、常法に従い PRP サンプル 1.6ml に 0.8ml の PBS(-)を加えた時の 610nm における吸光度変化と 0.8ml の精製水を加えたときの吸光度変化の差から算出した。血小板凝集能は、PRP サンプル(200 μ l)に対し、100 μ M ADP を 11 μ l (最終濃度 5 μ M) と 100 μ g/ml collagen を 11 μ l (最終濃度 5 μ g/ml) 同時に加えたときの最大凝集率により評価した。

5. 統計処理

洗浄直後と 1 日目の保存液 1, 2, 3 の有意差検定は、Kuraskal-Wallis 検定により行った。3 日目と 5 日目の保存液 2, 3 の有意差検定は、t 検定により行った。p < 0.05 の場合を統計的有意とした。

結 果

1. 洗浄効果

洗浄後の血小板の回収率は、保存液 1 で 99.0 \pm 0.5%, 保存液 2 で 98.6 \pm 0.5%, 保存液 3 で 96.5 \pm 3.3% であった。これらの回収率の間に有意な差はみられなかった。

上清中のタンパク除去率は、保存液 1 で 98.25 \pm 1.25%, 保存液 2 で 97.32 \pm 0.23%, 保存液 3 で 98.69 \pm 0.95% であり、有意差はなかった。

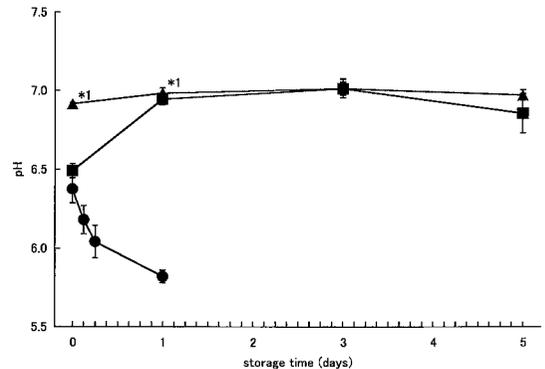


Fig. 1 Comparison of pH values on storage for 5 days in platelet concentrates washed with different solutions.

Data are mean \pm SD. \blacktriangle : Solution 1 (n = 6), \blacksquare : Solution 2 (n = 6), \bullet : Solution 3 (n = 5). *1: p < 0.01, Solution 1 vs. Solution 3.

2. 血小板保存状態

保存液 1 により調製した WPC は、直後からバッグ内 pH が 6.37 と低く (p < 0.01, vs 保存液 3), 1 日目には 5.82 まで低下した (p < 0.01, vs 保存液 3)。しかしながら、保存液 2 および 3 は、保存 5 日目においても 6.8 以上の高い pH を維持していた (Fig. 1)。

円盤型 (discoid form) の血小板の割合を測定したところ、保存液 1 は、調製直後から、円盤型血小板の割合は保存液 2, 3 に比べ有意に低く、1 日目には 1% 以下にまで低下した (Fig. 2)。保存液 2 は、洗浄直後 26.05 \pm 13.37% であったが、保存に従い徐々に低下し、5 日目では 5.35 \pm 2.16% まで低下した。保存液 3 は、5 日目まで 25% 以上の高い値を維持した (p < 0.01, vs 保存液 2)。

上清 lactate 量は、これらの保存液の間において差は認められなかった。

保存液 1 の上清 LDH 活性は、洗浄直後から、保存液 2, 3 に比べて低く、1 日目においても、ほとんど変化がなかった。保存液 2 の上清 LDH 活性は、5 日目まで段階的に上昇した。これに対し、保存液 3 は 5 日間の保存においてもほとんど変化せず、5 日目において保存液 2 に比べ有意に低い活性を維持した (Fig. 3, p < 0.001)。

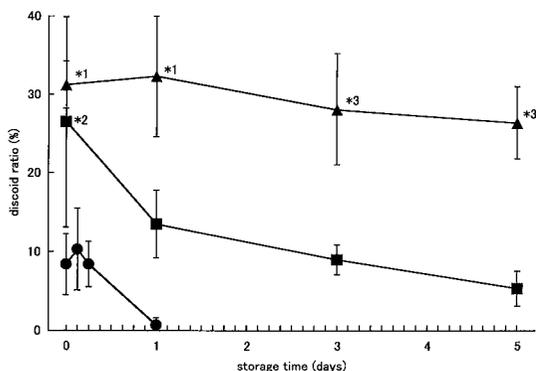


Fig. 2 Comparison of platelet morphologies during storage for 5 days in platelet concentrates washed with different solutions.

Platelet morphology was determined from the discoid ratio of about 150 platelets.

Data are mean \pm SD. : Solution 1 (n = 6) : Solution 2 (n = 6), : Solution 3 (n = 6). *1 : p < 0.01, Solution 1 vs. Solution 3. *2 : p < 0.05, Solution 1 vs. Solution 2. *3 : p < 0.01, Solution 2 vs. Solution 3.

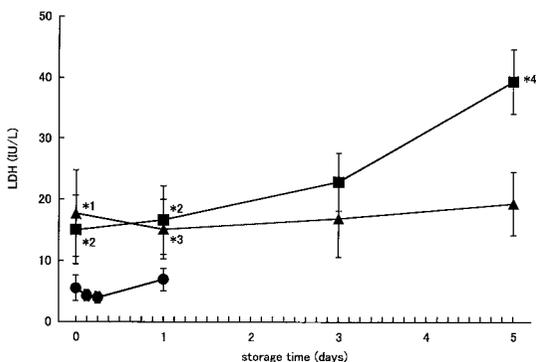


Fig. 3 Comparison of lactate dehydrogenase levels during 5 days storage in the supernatant of platelet concentrates washed with different solutions.

Data are mean \pm SD. : Solution 1 (n = 6), : Solution 2 (n = 6), : Solution 3 (n = 7). *1 : p < 0.01, Solution 1 vs. Solution 3. *2 : p < 0.05, Solution 1 vs. Solution 2. *3 : p < 0.05, Solution 1 vs. Solution 3. *4 : p < 0.001, Solution 3 vs. Solution 2.

洗浄直後の上清 P-selectin 量は、保存液 1 が最も多く、保存液 3 が最も少ない値を示した (Fig. 4). 保存液 1 と保存液 2 は、1 日目において既に洗浄直後の約 3 倍量を示したが、保存液 3 の 1 日目

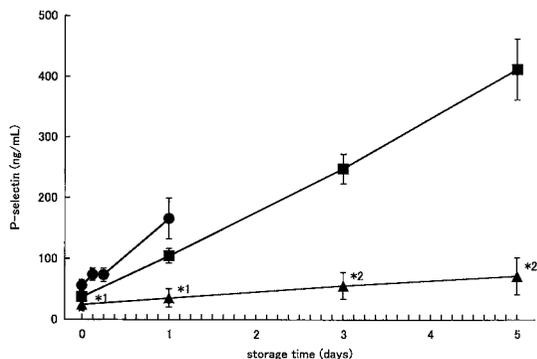


Fig. 4 Comparison of P-selectin concentration during 5 days storage in the supernatant of platelet concentrates washed with different solutions.

Data are mean \pm SD. : Solution 1 (n = 6), : Solution 2 (n = 6), : Solution 3 (n = 7). *1 : p < 0.01, Solution 1 vs. Solution 3. *2 : p < 0.001, Solution 2 vs. Solution 3.

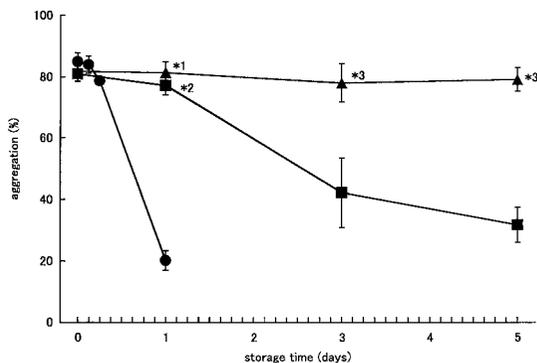


Fig. 5 Comparison of ADP/collagen-induced aggregation during 5 days storage in platelet concentrates washed with different solutions.

Aggregation was induced by 5 μ M ADP plus 5 μ g/ml collagen. Data are mean \pm SD. : Solution 1 (n = 6) : Solution 2 (n = 6) : Solution 3 (n = 5). *1 : p < 0.01, Solution 1 vs. Solution 3. *2 : p < 0.05, Solution 1 vs. Solution 2. *3 : p < 0.001, Solution 2 vs. Solution 3.

は洗浄直後の 1.5 倍以下であった。また、保存液 2 の 5 日目が、洗浄直後の 10 倍以上を示したのに対し、保存液 3 は洗浄直後の 3 倍にとどまり、保存液 2 の 1 日目の値と比較しても低かった。

3. 血小板機能

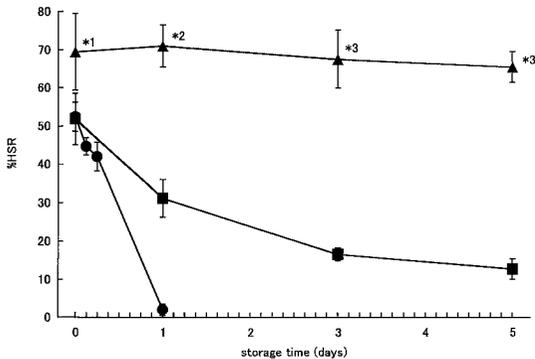


Fig. 6 Comparison of hypotonic shock responses on 5 days storage of platelet concentrates washed with different solutions.

Data are mean \pm SD. \circ : Solution 1 (n=6), \bullet : Solution 2 (n=6), \blacksquare : Solution 3 (n=5). *1: $p < 0.05$, Solution 1 vs. Solution 3. *2: $p < 0.01$, Solution 1 vs. Solution 3. *3: $p < 0.001$, Solution 2 vs. Solution 3.

ADP と collagen の刺激による最大凝集率は、洗浄直後はいずれの保存液を用いても 80% 以上の値を示した (Fig. 5). 保存液 1 では 6 時間後まで 75% 以上の凝集率を維持したが、1 日目で 20% まで低下した。保存液 2 では 1 日目までそれぞれ 75% 以上の凝集率を維持したが、5 日目では約 30% まで低下した。保存液 3 では 5 日目まで 75% 以上を維持し、洗浄直後からほとんど凝集率の低下を認めなかった。

%HSR は、洗浄直後はいずれの保存液においても 50% 以上の活性を示した (Fig. 6)。しかし、保存液 1 は、6 時間後までは 40% 以上の活性を維持していたが、1 日目にはほとんど反応しなくなった。保存液 2 は、1 日目までは 30% 以上の活性を維持していたが、3 日目以降は、20% 以下に低下した。これに対し保存液 3 は、5 日目まで 65% 以上の活性を示し、洗浄直後からほとんど活性の低下を認めなかった。

考 察

日本国内において赤血球に対する人工保存液は承認され使用されているが、血小板に対する人工血小板保存液は承認されておらず、WPC 製剤は製造されていない。しかしながら、幾つかの血液センターは、医療機関の協力依頼のもと、技術協

力という形で WPC を調製している¹⁶⁾。当センター管内においても、2 例の重篤な副作用 (血圧低下、意識消失) が発生し、医療機関の協力依頼により WPC を提供したところ、NHFTTR の回避が可能であった。

WPC を調製する液は、比較検討が少ないために、どのような液を使用すべきか判断に迷うところである。そこでこの点を明らかにするために、WPC の調製に用いられている 3 種 (臨床使用可能 2 種、開発中 1 種) の液剤について、血小板機能の違いを比較検討した。

保存液 1 は、組成も簡単であるため調製に時間もかからず、簡便に使用可能な保存液であると考えられた。しかしながら、pH が保存 1 日目において 6.0 以下と低く、in vitro での血小板機能も大きく低下していた。このことから、保存液 1 は、数時間しか血小板の活性化を防ぎ、機能を維持できないことが明らかとなった。しかしながら、文献的に保存液 1 と類似した組成の液により洗浄した PC が、一定の止血効果を認めていることから、医療機関内において洗浄後、直ちに投与する場合は使用可能と思われる^{12) 14) 17)}。

一方、保存液 2 は洗浄直後ならびに洗浄 1 日目においても大きな機能の低下を示さず、5 日間保存中の pH も 6.8 を維持していた。これは、血小板の代謝の維持に必須な成分が保存液 2 の中に含まれているためであると考えられた^{11) 18) 21)}。しかし、この保存液 2 を用いた場合でも、保存に従い徐々に機能が低下したことから、3 日以降の使用は不可能である。現時点における WPC の保存液としては、保存液 2 が推奨される。洗浄後 1 日以内のみ使用に耐えうると考えられた。

保存液 3 は血小板保存用に開発されたもので、血漿保存と同等な血小板機能を維持する能力を持っている^{11) 20)}。今回われわれが検討した 3 液の中でも、他の 2 液に比べ保存液 3 は格段に優れた血小板機能の維持能を示した。保存液 3 は、欧州において臨床使用されている PAS (platelet additive solution) と呼ばれる保存液と比較して遜色ないものであった¹⁰⁾。保存液 3 を使用した場合、国内での PC の有効期限である 72 時間は明らかに

使用可能である。さらに理論上は、これまでの報告^{11, 19)}や今回の結果から、保存液3を用いることで5日間の保存も可能と考えられた。

PC製剤による種々のNHFTRの原因が明らかとなっていない現状においてWPCは、NHFTR回避のひとつの対応と考えられる²²⁾。現時点において臨床使用可能な保存液としては、保存液2が適当であった。しかしながら、WPCを血液センターから供給する製剤とする場合には、保存液3のような有効期限を十分保障できる血小板保存液の使用が不可欠であると考えられる。Seto液を用いたWPC製剤の臨床使用が可能となることで、多くのNHFTRの発生を抑制できると思われる。

引用文献

- 1) 池田和代, 磯波秀紀, 仁井原裕美, 嶋田英子, 光永滋樹, 高橋雅彦, 田所憲治, 十字猛夫, 医薬情報担当者, 検査担当者: 全国から寄せられた非溶血性副作用報告 肺水腫を伴う呼吸困難症例について. 血液事業, 23(4): 647-654, 2001.
- 2) 藤井伸治, 嶋田英子, 池田和真, 足羽敦子, 竹中克斗, 品川克至, 石丸文彦, 平松靖史, 角南一貴, 石川雅一, 平田康司, 光永滋樹, 田所憲治, 新谷憲治, 原田実根: 血小板輸血時にアナフィラキシー症状が出現し, 抗IgA2m(1)抗体と抗C9抗体が陽性であった1例. 日本輸血学会誌, 46(3): 324-329, 2000.
- 3) 林 悟, 清川知子, 青地 寛, 永峰啓丞, 押田真知子, 富山佳昭, 倉田義之: 非溶血性輸血副作用と抗血漿タンパク抗体: 特に蕁麻疹・痒みと抗C2, 抗C4抗体の関係について. 日本輸血学会誌, 44(4): 489-495, 1998.
- 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) Muylle, L., Joos, M., Wouters, E., De Bock, R., Peetermans, M.E.: Increased tumor necrosis factor α (TNF α), interleukin 1, and interleukin 6 (IL-6) levels in the plasma of stored platelet concentrates: relationship between TNF α and IL-6 levels and febrile transfusion reactions. *Transfusion*, 33: 195-199, 1993.
- 7) Eriksson, L., Högman, C.F.: Platelet concentrates in an additive solution prepared from pooled buffy coats. 1. In vitro studies. *Vox Sang*, 59: 140-145, 1990.
- 8) Rock, G., White, J., Labow, R.: Storage of platelets in balanced salt solutions: a simple platelet storage medium. *Transfusion*, 31: 21-25, 1991.
- 9) Adams, G.A., Swenson, S.D., Rock, G.: 5-day storage of human platelet concentrates in 30 ml of plasma or artificial medium. *Vox Sang*, 52: 305-312, 1987.
- 10) 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.
- 11) Shimizu, T., Shibata, K., Kora, S.: Plasma-depleted platelet concentrates prepared with a new washing solution. *Vox Sang*, 64: 19-23, 1993.
- 12) Pineda, A.A., Zylstra, V.W., Clare, D.E., Dewanjee, M.K., Forstrom, L.A.: Viability and functional integrity of washed platelets. *Transfusion*, 29: 524-527, 1989.
- 13) Silvergleid, A.J., Hafleigh, E.B., Harabin, M.A., Wolf, R.M., Grumet, F.C.: Clinical value of washed-platelet concentrates in patients with non-hemolytic transfusion reactions. *Transfusion*, 17: 33-37, 1977.
- 14) 栗原勝彦, 柴 雅之, 村岡正人, 長橋久方, 嶋田英子, 竹ノ内康司, 坪倉兌雄, 佐竹正博, 中島一格, 田所憲治, 十字猛夫, 多田和子, 澤登雅一, 鈴木憲史, 非溶血性副作用回避のための洗浄血小板輸血. 日本輸血学会雑誌, 44(2): 182, 1998.
- 15) 麻田真由美, 三鬼あかね, 川本佳代, 大塚志保, 峯 佳子, 藤田往子, 金光 靖, 椿 和央, 金丸昭久: 血小板製剤の血漿除去による副作用防止効果. 日本輸血学会雑誌, 44(2): 182, 1998.
- 16) 佐々木大, 小砂子智, 小宮山祥光, 鈴木 光, 中野月子, 清水哲夫, 神谷 忠, 平沼隆明, 高良真一, 西岡克郎, 伊田八洲雄: 新しい洗浄血小板の調製方法: 成分採血装置 (CS3000plus) を用いた洗浄血小板の調製. 日本輸血学会雑誌, 45(4): 449-455, 1999.
- 17) 田中マサヨ, 百木圭子, 江川佐登子, 奥田浩人, 光富吉朗, 千代田晨, 松尾辰樹, 洗浄血小板の機能と輸血効果. 血液事業, 23(1): 41-51, 2000.
- 18) 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.
- 19) 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.
- 20) Shimizu, T., Murphy, S.: 血小板保存剤の最近の進歩, 医学の歩み, 161: 407-409, 1992.
- 21) 清水哲夫: 血小板保存法. 最新医学, 48(7): 997-1005, 1993.
- 22) 吉田久博, 万木紀美子, 伊藤和彦: 血小板保存液“セト液”の臨床使用. 日本輸血学会雑誌, 44(4): 589-592, 1994.