

原 著

## スワーリング検査不合格な濃厚血小板の発生頻度とその性状

秋野 光明 藤原 満博 佐藤 典宏 本間 稚広  
若本志乃舞 山本 定光 池田 久實  
北海道赤十字血液センター

(平成15年1月20日受付)

(平成15年4月9日受理)

### FREQUENCY AND CHARACTERISTICS OF SWIRLING NEGATIVE PLATELET CONCENTRATES

Mitsuaki Akino, Mitsuhiro Fujihara, Norihiro Sato, Chihiro Homma,  
Shinobu Wakamoto, Sadamitsu Yamamoto and Hisami Ikeda  
Hokkaido Red Cross Blood Center

We have introduced the swirling test as a routine quality control of individual platelet concentrates (PC) in use since 1995. Of PC (127,623 bags) examined in the last six years, 82 (0.064%) failed the swirling test. The swirling-negative PC bags tended to be obtained when 1) a certain apheresis machine was used for PC collection, 2) the PC donor was female and 3) the PC was obtained from a donor whose PC was swirling-negative at a previous donation. Of 141 PC donation from 12 such donors, 36 PC bags (25.5%) showed negative swirling.

While swirling-negative PCs showing normal pH originally maintained their normal range for five days, the extent of their platelet shape change and morphology scores were significantly lower than those of normal PCs. There were no significant differences in aggregation activity or in the expression of activation markers (P-selectin and beta-TG).

The cause of this type of negative swirling is unknown at present. The fact that PCs repeatedly showed negative swirling from the same donors suggest that a factor(s) of the donors may be associated with the loss of swirling.

**Key words** : Swirling, Platelet concentrates

#### はじめに

濃厚血小板 (platelet concentrates, PC) にはスワーリングと呼ばれる特有の現象が観察される<sup>1)~4)</sup>。スワーリングとは、PC の入ったバッグを光にかざして、ゆっくりと攪拌すると渦巻き状のパターンが見られる現象をいう。これは、無刺激の血小板の形態は円盤状であり、攪拌時、円盤状血小板が光を一様に屈折する光散乱現象 (スワーリング) をおこすためであると言われている。しかし、血小板の形態が変化すると一様な屈折が生

じないためスワーリングが低下し消失する。このことは、PC の光散乱現象の有無が血小板の形態と密接に関係し、血小板の状態を反映していることを示している。また、PC 中に含まれる円盤状血小板の割合は生体内の寿命と相関すると言われている<sup>5)</sup>。従って PC のスワーリング検査は、PC 中の血小板の形態を外観の観察によって確認することができるため、サンプル採取することなく、PC の品質を簡便かつ短時間に把握できる有用な方法である。

ISBT ( International Society of Blood Transfusion ) の , BEST ( Biomedical Excellence for Safer Transfusion ) Working group は , スワーリング検査が PC の品質保証の方法として有効か否か評価し<sup>4)</sup> , さらにルーチンでスワーリング検査を実施して検査不合格の発生状況等を調べたところ , PC の品質管理手段として有用であるとしている<sup>5)</sup> . 北海道赤十字血液センター ( 以下 , 当センター ) では , その検討結果を基に , 平成 7 年 4 月よりスワーリング検査を導入し , 製剤部門から供給部門への出荷時及び供給部門から医療機関へ供給する前に同検査を実施することとした . 本稿では , 平成 7 年 4 月から平成 13 年 3 月までの 6 年間において , 製剤部門から供給部門への出荷時の検査でスワーリング不合格となった PC の発生状況と不合格 PC の性状について検討した結果を報告する .

## 方 法

### (1) PC 調製法

成分採取装置を用いて , 5 ~ 20 単位の PC を採取した . 採取後 PC は成分採血キットに付属のポリオレフィン製 PC 保存用バッグ , 或いは 600ml , 1,000ml のポリオレフィン製バッグ ( KBP-600CP または KBP-1000CP , カワスマ化学工業 , 東京 ) で水平振盪保存した .

### (2) スワーリング検査方法

日常業務におけるスワーリング検査では , スワーリング陰性の PC を確実に除外することが目的であることから , 判定は 2 名で行い , 合格と不合格の 2 段階で評価した . PC バッグを判定者 2 名が別々に白色光源下 ( 50 ~ 100W ) にかざしながら軽く揺らし , 30 ~ 70cm の離れた距離からバッグ内にみられるスワーリングパターンを観察した . 2 名の判定が不一致のときは , 他の観察者が再検査を行い , その結果を採用した . なお , スワーリング検査は採血翌日に行った .

### (3) スワーリング検査不合格 PC の血小板機能検査

スワーリング検査で不合格と判定された PC については , 可能な限り判定直後に pH を測定し 7.0 以上を示した PC について , 血小板機能の測定を行い , 合格 PC と比較した .

血小板数は自動血球計数装置 ( Sysmex K-2000 または K-4500 , シスメックス , 神戸 ) で測定した . pH は pH メーター ( pH meter model COM-8 , 電気化学計器 , 東京 ) を使用し 22 °C で測定した . 血小板の形態 ( Morphology score ) は , 2.5% グルタルアルデヒド / PBS 溶液 ( 片山化学 , 大阪 ) で血小板を固定し , 位相差顕微鏡 ( OLYMPUS BX50 , オリンパス光学 , 東京 ) を用いて観察し , 血小板の形態を Kunicki ら<sup>7)</sup> の方法に準じて 4 段階に分類して円盤状血小板が全体に占める割合 ( % discs ) を算出した . 血小板機能の測定は , 自己血漿で血小板数を  $30 \times 10^4 / \mu\text{l}$  に調製した platelet rich plasma ( 調製 PRP ) を用いて行った . 凝集能は  $\text{CaCl}_2$  存在下  $5 \mu\text{g} / \text{ml}$  コラーゲン ( Horm 社 ) あるいは  $10 \mu\text{M}$  ADP ( adenosine diphosphate : Boehringer 社 ) を加えたときの最大凝集率 ( % ) をヘマトレイサー 801 ( 二光バイオサイエンス社 , 東京 ) を使用して求めた . 低浸透圧ショック回復率 ( % HSR ) は調製 PRP に 1/3 容量の蒸留水を加え , 分光光度計 ( Hitachi U-2000 , 日立 , 東京 ) で 610 nm の透過度の変化を測定し , 添加直後の最大値と 5 分間後の回復率の比を求め百分率 ( % ) で示した . 変形能 ( Extent of platelet shape change ) は Chrono-Log 凝集メーター ( AHS ジャパン社 , 東京 ) を使用し ,  $500 \mu\text{l}$  の調製 PRP に最終濃度 5mM の EDTA ( ethylene diaminetetra acetic acid ) を加え , さらに ADP を最終濃度  $10 \mu\text{M}$  加えたときの透過度の変化率で表した .  $\beta$ -トロンボグロブリン (  $\beta$ -TG :  $\beta$ -thromboglobulin ) は , 専用測定試薬アセラクロム  $\beta$ -TG ( ロッシュ・ダイアグノスティック社 , 東京 ) を用い EIA 法で測定した . 血小板膜糖蛋白である P-セレクチン ( CD62P ) はモノクローナル抗体 ( 宝酒造 , 京都 ) を用い , フローサイトメーター , オーソ・サイトロン ( オーソ・ダイアグノスティック・システムズ , 東京 ) で血小板表面の P-セレクチン陽性率を求めた<sup>8)</sup> . 無菌試験には好気性菌 , 嫌気性菌を同時に培養可能な培養システム ( オクソイド「シグナル」 ) を使用した .

### (4) 統計処理

製剤名別 , 年齢別でみたスワーリング検査不合格 PC 数の有意差検定には , 独立性の検定を行い ,

Table 1 Frequency of swirling-negative PC classified by PC product

( Test period : 1995. 4 ~ 2001. 3 )

PC product	Number of PC ( bags )	Swirling-negative PC	
		Number ( bags )	Percentage ( % )
PC- 5	4,692	1	0.021
-10	36,485	13	0.036
-15	46,349	28	0.060
-20	40,097	40	0.100
Total	127,623	82	0.064

\* p = 0.003 ( Bonferroni test )

Table 2 Frequency of swirling-negative PC classified by apheresis equipment

( Test period : 1995. 4 ~ 2001. 3 )

Apheresis equipment	Number of PC ( bags )	Swirling-negative PC	
		Number ( bags )	Percentage ( % )
A	30	0	0.000
B	4,393	1	0.023
C	9,493	3	0.032
D	39,871	21	0.053
E	37,075	37	0.100
F	25,870	14	0.054
G	10,866	6	0.055

p &lt; 0.05 ( Mann-Whitney U test )

独立性のある場合には、Bonferroni 検定により群間を比較し、危険率 1% 未満を有意とした。装置別の比較には Mann-Whitney 検定を行い、危険率 5% 未満を有意とした。性別の比較は、フィッシャーの直接確率検定を用い危険率 1% 未満を有意とした。検査不合格 PC の血小板機能検査成績の比較は、unpaired t-test を用い危険率 5% 未満を有意とした。

## 結 果

### (1) スワーリング検査不合格 PC の発生状況

平成 7 年 4 月から 13 年 3 月までの 6 年間、スワーリング検査で不合格となった PC は 127,623 バッグ中 82 バッグ、発生率は 0.064% であった ( Table 1 )。製剤別では 20 単位 PC が 82 バッグ中 40 バッグを占め、10 単位 PC に比べて統計上、有意性をもって多く発生していた ( p = 0.003 )。

採血装置別のスワーリング検査不合格 PC の発生率では、装置 E で多く発生する傾向がみられた ( Table 2 )。そこで、同機種で採血された 20 単位

PC について採取条件 ( 処理血液量、採取時間、ACD の使用量など ) を比較したが、合格と不合格の両者に違いはみられなかった ( Table 3 )。

スワーリング検査が不合格であった PC のドナーについて、性別、年齢別に比較した結果を Table 4 に示したが、男性に比べ女性に多く発生していた ( p < 0.001 )。年齢による発生率の差は見られなかった。

スワーリング検査不合格となった PC のドナーについて、献血回数との関係を調べた。調査期間中、PC 献血を行ったドナーは、26,577 名おり、そのうち 58 名がスワーリング検査不合格 PC のドナーであった ( 発生率 0.218% )。献血回数の増加による明らかな影響は確認されなかったものの、検査不合格ドナーの発生頻度は増加する傾向にあった ( Table 5 )。

次にスワーリング検査不合格 PC のドナーが、再度献血を行った場合に、その PC が不合格となるか否かについて調べた。スワーリング検査不合

Table 3 Conditions of collection of swirling-negative PC by Apheresis equipment E

	Swirling test	
	Negative	Positive
Number	20	100
Platelet count ( × 10 <sup>11</sup> /bag )	4.7 ± 0.4	4.1 ± 0.8
Volume ( mL )	242.6 ± 22.7	259.2 ± 21.3
Treated blood volume ( mL )	3,459 ± 425	3,678 ± 563
N-N time ( min )	79 ± 11	80 ± 10
ACD consumed ( mL )	367.3 ± 50.0	377.0 ± 51.4
Centrifuge speed ( rpm )	1,400 ~ 1,600	1,400 ~ 1,600
Critical flow ( mL/min )	35 ~ 50	35 ~ 60

( mean ± SD )

Table 4 Frequency of swirling-negative PC classified by donor gender and age

( Test period : 1995. 4 ~ 2001. 3 )

	Number of PC ( bags )	Swirling-negative PC	
		Number ( bags )	Percentage ( % )
Sex			
Males	82,553	38	0.046
Females	45,070	44	0.098
Age			
< 20	8,287	3	0.036
20 ~ 29	49,083	32	0.065
30 ~ 39	30,963	14	0.045
40 ~ 49	28,707	23	0.080
50 <	10,583	10	0.095

\* 1 : p < 0.001 ( Fisher's exact probability test )

\* 2 : p = 0.248 ( χ<sup>2</sup>-test for independence )

格PCのドナー58名中、PC献血が1回のみであったドナー(8名)を除いた50名について検討したところ、複数回スワーリング検査不合格PCが発生しているドナーは、12名(発生率24%)であった。これら12名のドナーの内訳をTable 6に示す。献血回数は、5~25回で、不合格回数は2~5回、不合格の回数が3回以上のドナーが大半(12人中9人)で、不合格率が40%を超えるドナーが5名存在した。12名の合計の献血回数は141回で、そのうちの36回(25.5%)が不合格であった。

(2) 不合格PCの血小板機能

スワーリング検査が不合格でpHの測定が可能

であったPC(45例)のうち、pHが7.0以上を示したPC(33例)の一部について血小板機能を調べた(Table 7)。スワーリング検査が合格であったPCと比べて、ADP或いはコラーゲン刺激に対する凝集能および%HSRに差はみられなかった。変形能及び形態スコアは、不合格PCの方が有意に低値であった(P<0.05)。P-セレクチン陽性率、β-TGは合格PCに比べてやや高値を示したが有意な差はみられなかった。また、無菌試験の実施が可能であったPC(25例)について細菌汚染の有無を確認したところ結果はすべて陰性であった。

考 察

スワーリング検査は以前から血小板の外観試験

Table 5 Frequency of swirling-negative PC classified by frequency of donation

( Test period : 1995. 4 ~ 2001. 3 )

Donation		Swirling-negative PC	
( frequency )	( number )	Number ( bags )	Percentage ( % )
1	10,607	8	0.075
2	4,111	5	0.122
3 ~ 5	5,571	18	0.323
6 ~ 9	2,783	16	0.575
10 <	3,505	11	0.314
Total	26,577	58	0.218

Table 6 Background of donors whose PC failed the swirling test repeatedly

ID No.	Sex	Age	No. of donations	Swirling-negative PC	
				Number ( bags )	Percentage ( % )
2	F	48	7	3	42.9
5	M	42	7	3	42.9
6	M	31	5	2	40.0
9	F	23	11	3	27.3
12	M	47	8	3	37.5
13	M	52	9	4	44.4
19	F	22	5	3	60.0
25	F	21	13	2	15.4
34	F	42	19	3	15.8
40	F	25	25	5	20.0
58	F	29	10	3	30.0
73	M	20	22	2	9.1

Table 7 Properties of platelets in swirling-negative PC showing normal pH range

	Swirling test	
	Negative ( n = 8 )	Positive ( n = 6 )
pH	7.1 ± 0.1	7.2 ± 0.1
Aggregation ( % )		
Collagen 5 µg/mL	85.3 ± 12.4	73.2 ± 11.0
ADP 10 µM	52.7 ± 12.0	41.3 ± 6.4
%HSR	80.5 ± 7.7	79.6 ± 3.5
ESC † ** ( % increase O.D. )	7.7 ± 1.8	13.2 ± 3.1
Morphology score	12.8 ± 19.2	69.8 ± 9.2
P-selectin positive ** ( % )	1.1 ± 0.1	0.6 ± 0.1
β-TG ( ng/mL )	3,273 ± 1,459	1,960 ± 423

† Extent of platelet shape change ( mean ± SD , p<0.05 Student's t-test )

\*\* n = 4

の一つとして利用されている<sup>9)-11)</sup>。当センターでは、平成7年4月からスワーリング検査をルーチンに導入した。これまでの6年間の結果、不合格

PCの発生頻度は0.064%であった ( Table 1 )。BESTの検討では、13施設で5,366バッグを3日間保存したPCについて調査を行い、0.0~3.8%

(平均 0.67%) が不合格であったと報告されている<sup>6)</sup>。そのなかで、成分採血由来 PC (305 バッグ) については、3 施設で実施され、そのうち 2 施設では不合格 PC が 0 であったが、77 バッグ中 3 バッグ (3.8%) が不合格の施設もみられた。スワーリング検査の判定は目視によるため、経験の浅い施設では判定者のトレーニングが大切であり、熟練度の違いが施設間でのばらつきに影響していると思われる。これまで、スワーリング検査の機械化への検討が行われてきた<sup>1, 8) 12)</sup>が、未だ確立された装置の開発には至っていない。

PC の採取時にスワーリングが消失する原因としては、採取装置又は採取条件あるいはドナーに由来する要因等が推定される。今回行った検討から、不合格 PC の発生は、ある特定の装置や高単位 PC に多く見られた。この理由を検討するため、合格と不合格 PC の採取条件および血小板数を比較したが、両者に違いはなく、不合格 PC 発生のみらかな要因は見出せなかった。ドナーの性別および年齢別の発生頻度では、男性に比べて女性に多く発生していたが、その原因は明らかではない。一方、スワーリング検査が不合格となった PC のドナーが、再度献血を行ったときに、その PC が不合格になるか否かを調査したところ、一度不合格となったドナーの 24% が、その後も何度か不合格となっていた。バッグ数にすると不合格 PC 全体の約半数が、2 回以上不合格となった PC のドナー由来であった。このことから、スワーリングの消失とドナー側の要因との関連が示唆された。スワーリングが弱い PC の内因性セロトニン含量が低いという報告もあり<sup>13)</sup>、ドナーに起因する要素と不合格 PC の発生の関連については、今後さらに検討を重ねていく必要があると考える。

従来、PC は細菌汚染<sup>14)</sup>あるいは低温又は低 pH の保存下でスワーリングが消失すると言われてきた<sup>2)</sup>。今回の場合、無菌試験を全例に実施したわけではないが、可能であった PC は全て細菌検査陰性であり、細菌汚染が原因とは考えにくい。BEST の検討結果<sup>6)</sup>によると、保存 3 および 5 日目の判定においてスワーリング不合格 PC の大半が pH6.4 以下または pH7.5 以上であった。これまで pH の

低下に伴ったスワーリング不合格 PC の検討では、%discs 以外の項目においても血小板の品質低下を裏付ける異常値を示し、in vivo での生存率は低いとされている<sup>7)</sup>。さらに、このようなスワーリング不合格 PC の輸血後の補正血小板増加数 (CCI: corrected count increment) が著しく低いこと、また非溶血性輸血副作用の発生頻度が有意に高いことが Bertolini ら<sup>15)</sup>によって報告されている。今回我々は、低 pH-PC 例の血小板機能については、詳細な検討を行わなかったが、清水ら<sup>2)</sup>の報告にもあるような同様の機能異常がみられたものと推定される。

一方、BEST の検討では、pH が維持されているにもかかわらずスワーリングが消失した例も報告されているが、そのような PC の性状は明らかではない。そこで、採血後 1 日目に pH が 7.0 以上でスワーリング不合格となった PC の血小板機能を測定した。これらの PC は正常 PC に比べて変形能が低く、morphology score の変化すなわち %discs が低値であることが確認された。しかし、その他の機能は正常 PC に比較して有意な変化は認められなかった。%discs の減少が活性化血小板の増加あるいは凝集能の変化としてとらえられなかったのは、機能検査の条件(惹起物質の濃度)や活性化マーカーの感度による可能性も考えられる。今回の検討に用いた正常 pH 範囲にあるスワーリング不合格 PC は、その後 4 日間保存しても pH の低下は認められなかった。このような PC が生体内での生存率の低下に結びつくか否かは明らかではないが、PRP-PC の自己血輸血の際に、正常 pH 範囲にありながらスワーリング不合格となった PC は生体内での生存率が低いという報告がある<sup>16)</sup>。このようなことから、正常 pH 範囲にありスワーリング不合格の PC が、臨床的に使用可能か否かについては、今後さらに検討が必要と考える。

謝辞：今回の研究を行うにあたり、統計学解析をご指導いただきました金子雅一博士に感謝いたします。

## 文 献

- 1) Frantantoni, J.C., Poindexteret, B.J., Bonner, R. F.: Quantitative assessment of platelet morphol-

- ogy by scattering : A potential method for the evaluation of platelets for transfusion. *J. Lab. Clin. Med.*, 103 : 621-631, 1984.
- 2) 清水哲夫, 打桐千鶴子, 佐野 薫, NG JUNG YI, 中村定生, 石川裕子, 阿部裕司, 船戸悦二, 水野伸一, 中島 武, 神谷 忠, 大久保幸雄: 簡便におこなえる血小板製剤の外観試験法 swirling pattern test . *日本輸血学会雑誌*, 41(3) : 207-212, 1995.
  - 3) George, V., Hoime, S., Moroff, G. : Evaluation of two instruments for noninvasive platelet concentrate quality assessment. *Transfusion*, 29 : 273-275, 1989.
  - 4) Bertolini, F., Murphy, S. : A multicenter evaluation of reproducibility of swirling in platelet concentrates. *Transfusion*, 34 : 796-801, 1994.
  - 5) Holme, S., Vaidja, K., Murphy, S. : Platelet storage at 22 °C : effect of type of agitation on morphology, viability, and function in vitro. *Blood* 52 : 425-435, 1978.
  - 6) Bertolini, F., Murphy, S. : A multicenter inspection of the swirling phenomenon in platelet concentrates prepared in routine practice. *Transfusion*, 36 : 128-132, 1996.
  - 7) Kunicki, T.J., Tuccelli, M., Becker, G.A., Aster, R. H. : A study of variables affecting the quality of platelets stored at " room temperature " *Transfusion*, 15 : 414-421, 1975.
  - 8) Fijnheer, R., Modderman, P.W., Veldman, H., Ouweland, W.H., Nieuwenhuis, H.K., Roos, D., Korte, D. : Detection of platelet activation with monoclonal antibodies and flow cytometry. *Transfusion*, 30 : 20-25, 1990.
  - 9) Pietersz, R., Reesink, H., Dekker, W.J.A. : Preparation of leukocyte-poor platelet concentrates from buffycoats. II. Lack of effect on storage of platelet concentrates. *Vox Sang*, 53 : 208-213, 1987.
  - 10) Fijnheer, R., Pietersz, R.N.I., D. de Korte, Roos, D. : Monitoring of platelet morphology during storage of platelet concentrates. *Transfusion*, 29 : 36-40, 1989.
  - 11) 飯田俊二, 川村 薫, 岡田基文, 平井建策: Swirling Pattern による濃厚血小板の品質管理 . *日赤薬剤師会会誌*, 58 : 98-100, 1990.
  - 12) 秋野光明, 新保雅之, 関口定美, 久保田文雄, 中本博幸, 岡田徳弘: 自動スワーリング判定装置の評価 フローイメージサイトメータの応用 . *医科器械学*, 68 : 607-612, 1998.
  - 13) Hervig, T., Bakken, A.M., Farstad, M. : The swirling phenomenon in stored platelets is influenced by their endogenous serotonin. *Transfusion Medicine*, 9 : 139-145, 1999.
  - 14) 三谷孝子, 橋本浩司, 千葉眞彰, 池淵研二, 関口定美: 濃厚血小板製剤の細菌汚染 血小板献血由来血小板製剤で経験した一症例 . *日本輸血学会雑誌*, 42(6) : 294-298, 1996.
  - 15) Bertolini, F., Agazzi, A., Peccatori, F., Martinelli G. Sandri, T.M. : The absence of swirling in platelet concentrates is highly predictive of poor post-transfusion platelet count increments and increased risk of a transfusion reaction. *Transfusion*, 40 : 121-122, 2000.
  - 16) Ross, D., Holme, S., Hartman, P., Reece, K., Cubilla, L., Heaton, A. : A quick visual method for quality control of platelet concentrates( abstract ). *Transfusion*, 26 : 550, 1986.
-