

赤血球濃厚液-LR「日赤」の保存中に形成される凝集塊について

田村 暁 秋野 光明 勝又 雅子 本間 稚広 加藤 俊明

池田 久實

日本赤十字社が2007年まで製造・供給していた赤血球濃厚液(RC-MAP)には保存に伴う大小の凝集塊の形成が報告されていた。大凝集塊は輸血セットへの目詰まりを引き起こし、微小凝集塊は肺塞栓を誘発する可能性が示唆されている。保存前白血球除去が導入され、血液保存液としてはACD-A液ではなく、CPD液を用いた赤血球濃厚液-LR「日赤」(RCC-LR)の供給が開始されたが大凝集塊や微小凝集塊の形成に関する報告はみられない。そこで我々はCPD液を含むRCC-LRの保存中に形成される大凝集塊および微小凝集塊量を測定した。さらに微小凝集塊除去フィルターの使用に際しての判断基準は明確になっていないので微小凝集塊除去フィルター処理前後における微小凝集塊量を計測した。大凝集塊は現在供給されているRCC-LRでは全く形成されず、微小凝集塊の形成量も従来に比べ有意に減少した事を確認した。また、RCC-LRを微小凝集塊除去フィルターでろ過しても、処理前後の微小凝集塊量に変化はみられなかった。RCC-LRは大量輸血や小児輸血においては、わずかに混入する微小凝集塊が臨床的な有害事象を引き起こす可能性は否定できないが、成人の慢性貧血などで輸血する際は微小凝集塊除去フィルターを使用せずとも、微小凝集塊に起因する副作用は生じないと考える。

キーワード：保存前白血球除去、CPD液、大凝集塊、微小凝集塊、微小凝集塊除去フィルター

はじめに

保存前白血球除去(Prestorage Leukocyte Reduction: PreLR)の導入前に供給されていた赤血球濃厚液M・A・P(Red Cells MAP; RC-MAP)には大小様々な凝集塊が形成することが報告されている^{1)~4)}。大凝集塊は目視で確認可能な大きさの凝集塊であり、白血球や血小板の崩壊物およびフィブリン様繊維物質から構成される。大凝集塊の形成機序には顆粒球の崩壊と凝固系の亢進が関与していると考えられている²⁾。大凝集塊が輸血と共に体内へ流入し、輸血患者へ悪影響を及ぼしたとする報告はないが、RC-MAPに形成した大凝集塊が輸血セット内に詰まり、輸血に支障をきたした事例はよく知られている⁵⁾。一方、微小凝集塊は活性化した血小板と白血球が結合し、さらにその結合体にフィブリンなどが付着することで形成され、目視で識別不可能な小さな凝集塊である³⁾。微小凝集塊は輸血されることで、発熱、肺浮腫や肺機能不全等の非溶血性副作用、および血小板減少を引き起こす原因と考えられている²⁾³⁾。微小凝集塊の除去には輸血セットの一種である微小凝集塊除去フィルターが効果的とされており⁶⁾⁷⁾、その使用により輸血副作用の発生率が減少したとの報告もある⁸⁾。2007年にPreLRが導入され、人全血液-LR

「日赤」(Whole Blood-Leukocytes Reduced; WB-LR)や赤血球濃厚液-LR「日赤」(Red Cells Concentrate-Leukocyte Reduced; RCC-LR)などの白血球が低減化された赤血球製剤の供給が開始された。PreLR導入前の赤血球製剤には血液保存液にAcid Citrate Dextrose-A (ACD-A)液が用いられていたが、PreLR導入後はCitrate Phosphate Dextrose (CPD)液が使用されている。CPD液を含むWB-LRやRCC-LRにおいては、保存中に大小の凝集塊がどの程度形成されるのか不明である。そこで我々はWB-LRやRCC-LR中に含まれる大凝集塊や微小凝集塊の形成量を調べ、さらに保存したRCC-LRを市販の微小凝集塊除去フィルターで処理し、どの程度の凝集塊が除去可能かについて調査したので報告する。

対象および方法

1. 血液製剤の調製

文書にて同意の得られた健常人ドナーより、400ml採血用CPD液入バッグ(BB-WQM407J:テルモ社製、またはABQ-400CM7NF:川澄化学社製)を用いて血液を採取し、採血当日に以下の4群の血液を調製した。

①採血用バッグに付属する白血球除去(白除)フィル

Table 1 Net weight (g) of the trapped aggregates in the mesh of transfusion sets after the flow of RC-MAP and RCC-LR stored for 3 or 6 weeks at 4 °C.

Storage period	RC-MAP	RCC-LR
3 weeks	0.4±0.5g (n=29)	0.0±0.0g (n=29)
6 weeks	0.8±0.2g (n=10)	0.0±0.0g (n=10)

(mean ± SD)

ターを用いてろ過後に遠心分離を行い、赤血球層に MAP 液を添加した RCC-LR 群. ②フィルターによる白除処理を行わずに遠心後、自動分離装置によるパフィーコート除去と赤血球層への MAP 液の添加を行った RC-MAP 群. ③白除フィルターによるろ過後、遠心分離を行わずに全血状態で保存した WB-LR 群. ④採血後、そのままの状態に保存した WB 群.

これら 4 種類の血液を調製直後から 6 週目まで 2~6°C に保存し、試験に供した.

従来の RC-MAP は ACD-A 液を含んでいたが、今回の検討に用いた血液製剤は全て CPD 液入り採血バッグに採取された血液から調製した.

2. 赤血球濃厚液中の大凝集塊の測定

大凝集塊は RCC-LR と RC-MAP を 3 週または 6 週間保存後に、千葉らの方法¹⁾に従って採取した. 即ち血液を輸血セット (カワスミ輸血セット A-52R: 川澄化学社製) に通し、血液を全て排出した製品バッグに生理食塩液を 50ml 程度入れてバッグ内壁の付着物をリンス (3 回繰り返し), ろ過網にバッグ内の内容を全て通過させた. 続けてろ過網にトラップされた捕捉物を生理食塩液で洗浄し、水分を軽く除去した後ろ過網を取り出して重量を計測し大凝集塊の形成重量とした.

3. 保存血液中の微小凝集塊の測定

微小凝集塊は、RCC-LR と RC-MAP については調製直後から 6 週目まで 1 週毎にサンプリングして測定した. WB-LR と WB については調製直後と保存 1, 3, 6 週目において測定を実施した. 微小凝集塊の測定には Coulter Counter Z2 (Beckman Coulter 社製) を用い¹⁾⁹⁾¹⁰⁾, 1ml 中の血液に含まれる 40~120µm 径の粒子数を計測した. アパーチャー (計測の際、血球等の粒子が通過する細孔) には 200µm 径孔を用い、血液は ISOTON II 希釈液 (Beckman Coulter 社製) によりなるべく濃度が高く、かつ粒子の同時通過による測定誤差が生じないように、25 倍に希釈して測定した.

4. 微小凝集塊除去フィルターの性能確認

微小凝集塊除去フィルターの性能を確認するため、2~6°C で 3 週間保存した WB および RCC-LR を微小凝集塊除去フィルター (SQ40s: ポール社製) に通し、各々の処理前後の微小凝集塊量を計測した.

5. 統計処理

統計処理には Microsoft Excel[®] 2003 上で統計演算プログラム ystat2006 を用い、微小凝集塊除去フィルター処理前後の比較には paired Student's t-test を、その他の 2 群間の比較には unpaired Student's t-test を用いた. 4 種の血液製剤の保存期間中の微小凝集塊量に関する検定には non-repeated measured ANOVA と Dunnett-test を用いた. いずれも危険率 5% 未満を有意差ありと判定した.

結 果

1. 赤血球濃厚液中の大凝集塊

RC-MAP および RCC-LR 保存中の大凝集塊の重量測定結果を Table 1 に示す. RC-MAP の大凝集塊が保存 3 週目から 6 週目で 2 倍に増加したのに対し、RCC-LR では全例で大凝集塊の形成を認めなかった.

6 週保存後の RC-MAP および RCC-LR を輸血セットに通過させ、生理食塩液で洗浄したろ過網内の様子を示した (Fig. 1). 6 週間保存した RC-MAP では目視で確認可能な塊が存在していた (Fig. 1A) のに対し、RCC-LR (Fig. 1B) には確認されなかった.

2. 保存血液中の微小凝集塊

RCC-LR と RC-MAP の微小凝集塊の形成量をグラフに示す (Fig. 2). 調製直後はいずれも 100counts/ml 以下の凝集塊量であった. RCC-LR は調製直後から保存 5 週目までの微小凝集塊の形成量に変化はなく、保存 6 週目のみ値が増加したが平均値は 100counts/ml 以下であった. RC-MAP は調製直後から保存 4 週目まで値が増加し平均値が最大で約 300counts/ml を示したが、それ以降は保存と共に値が減少した. RCC-LR と RC-MAP の比較では、2 週目以降は RCC-LR が RC-MAP よりも有意に低値を示した.

WB-LR と WB の微小凝集塊の形成量を示す (Fig. 3). 調製直後はいずれも 100counts/ml 以下の凝集塊量であり、WB の微小凝集塊量は保存 1 週目から著しく増加し、6 週目には平均 2,000counts/ml 以上にまで上昇した. それに対し WB-LR は RCC-LR と同様の傾向を示し、1 週目以降は WB に比べ有意に低値を示した.

3. 微小凝集塊除去フィルターの効果

微小凝集塊除去フィルター処理前後における WB

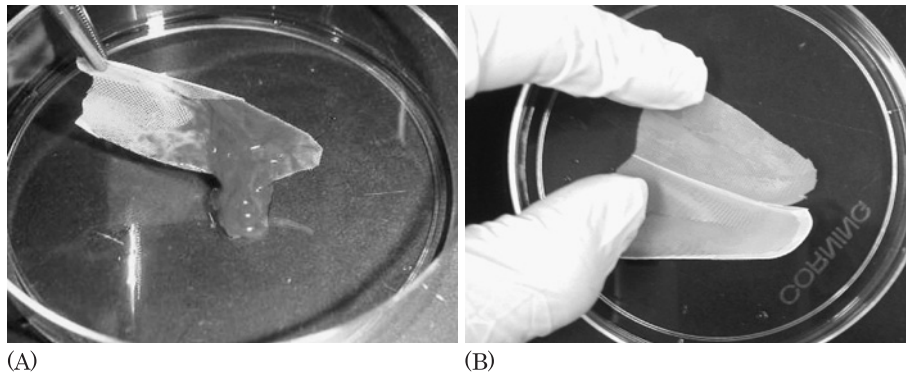


Fig. 1 Appearance of the filter mesh of the transfusion set after the flow of RC-MAP (A) and RCC-LR (B) stored for 6 weeks.

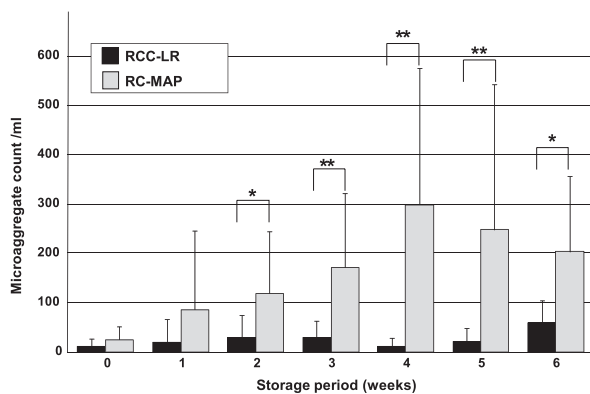


Fig. 2 Microaggregates (40 to 120 μ m) in RCC-LR (n=20) and RC-MAP (n=10) for 6 weeks' storage at 4°C. (*p < 0.05 and **p < 0.01 for comparison with each week, mean + SD)

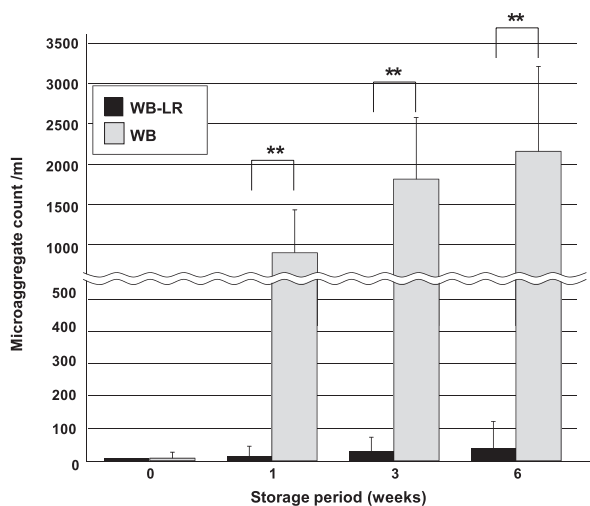


Fig. 3 Microaggregates (40 to 120 μ m) in WB-LR (n=18) and WB (n=10) after 6 weeks' storage at 4°C. (**p < 0.01 for comparison with each week, mean + SD)

及び RCC-LR の微小凝集塊量を示した (Fig. 4).

微小凝集塊除去フィルターにより WB 中の微小凝集塊の 9 割以上が除去され、処理後の平均値は 100counts/

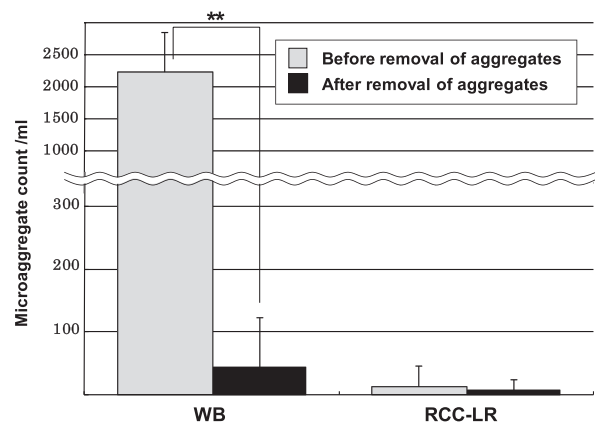


Fig. 4 Microaggregates (40 to 120 μ m) in WB (n=10) and RCC-LR (n=10) before and after filtration after 3 weeks' storage at 4°C. Microaggregate screen filter (SQ40s, Pall) was used for filtration. (**p < 0.01, mean + SD)

ml であり、処理前と比較すると有意に値が低下していた。RCC-LR は処理前後で値に差はみられなかった。

考 察

液状保存された血液製剤は保存中に大小の凝集塊が形成されることが古くから知られている。大凝集塊については様々な報告があり、構成成分や形成機序に関しては保存血中の白血球の崩壊により放出された DNA とフィブリノゲンやフィブリンなどの接着性タンパクが凝集塊を形成し、さらに血球成分を巻き込んで大凝集塊へと肥大化するとされている^{1)~3)}。高橋ら²⁾は RC-MAP 中の凝集塊を低減するため、MAP 液中のクエン酸濃度を通常の約 2 倍に増量し大凝集塊の発生を調べたが、抑制することはできなかったと報告している。また、榊井ら¹⁾は採血後 6 週間保存の RC-MAP の 95% 以上に大凝集塊が発生し、その発生防止には白除フィルターが有効であったとし、比留間¹²⁾は白血球が残存したまま輸血用血液製剤を保存すると凝集塊の発生を含む種々の保存傷害を引き起こすと報告している。従来

の RC-MAP にはバッグあたり $10^8 \sim 10^9$ 個の白血球が残存していたため長期保存によって大凝集塊が形成されやすかったと考えられるが、現行の RCC-LR の残存白血球数は 1×10^6 /bag 以下であり、大凝集塊が低減化される可能性が高い。赤血球製剤の保存は ACD-A 液よりも CPD 液を用いる方が利点が多いとされている¹³⁾。奥山ら¹⁴⁾や秋野ら¹⁵⁾は PreLR により、長期保存しても赤血球製剤中には大凝集塊が形成しない事を報告しているが、それらの検討では採血用の血液保存液に ACD-A 液が用いられている。今回我々は、現在国内で使用されている CPD 液を含む RCC-LR を 6 週間保存しても大凝集塊が全く形成されないことを確認した (Fig. 1)。従来の RC-MAP の輸血では大凝集塊による輸血セットの目詰まりを防止するために、血液バッグを攪拌し内容物を混和して、3~5 分間静置した後に輸血することが推奨されていたが、現行の RCC-LR ではそのような操作は不要であると考えられる。実際、国内で RCC-LR の供給が開始された 2007 年以降、大凝集塊が要因となって生じる輸血セットの目詰まりの事例は報告されていない¹⁶⁾。

微小凝集塊は活性化した血小板と白血球が結合し、さらにフィブリンなどが付着することで形成される 20~50 μm 程度の極めて小さな凝集塊であり、保存と共に 100 μm 以上へ増大するとされている¹⁾。我々は RCC-LR の微小凝集塊について調べたところ、RC-MAP に比べて RCC-LR ではその形成量が有意に少ない事を確認した (Fig. 2)。また、RC-MAP の微小凝集塊は保存 4 週目が最も多かったが、この結果は高橋らの報告²⁾と一致する。この理由としては、保存初期に形成された微小凝集塊が保存と共に集合し、その大きさを増して 4 週目以降には測定範囲の上限 (120 μm) よりも大きくなったためと考えられている。白除していない WB では微小凝集塊が保存 1 週目から急激に増加したが、WB-LR 中に含まれる微小凝集塊は、保存中に増加を認めず RCC-LR と同様な値 (保存期間中の平均値 100counts/ml 以下) を示した (Fig. 3)。欧州の輸血用血液製剤に関するガイドライン¹⁷⁾には PreLR によって微小凝集塊が減少すると記載されており、本報でも同様の結果が確認された。

輸血する血液中の微小凝集塊を除去するために、ろ過網付きの輸血セットや微小凝集塊除去フィルターが使用される場合がある¹⁰⁾。輸血セットに組み込まれているろ過網の孔径 (170 μm) に比べ、微小凝集塊除去フィルターの孔径は 20~40 μm と小さく、この微細な孔により輸血セットのろ過網にトラップできなかった凝集塊を取り除く事が可能であるとされている。しかし、これらのフィルターはろ過時に陰圧がかかることで溶血が起こり¹⁸⁾、除去処理に際しては多少なりとも血液の口

スが生じるため、可能であればその使用は避けるべきである。今回の検討で用いた SQ40s の孔径は 40 μm であり、Fig. 4 に示したように WB では 40 μm 以上の微小凝集塊の大部分が除去されていた。本報での結果は中村らの報告¹⁰⁾と同様であり、WB についてはその有効性が確認された。しかしながら RCC-LR については SQ40s の処理前後で微小凝集塊の値に変化は認められなかった。データは示さないが我々は別の微小凝集塊除去フィルター (アグリガード: テルモ社製) についても同様の結果を得ている。我々は微小凝集塊の測定に電気抵抗式のパーティクルカウンターを用いたが、この測定法は 100counts/ml 以下の測定値の精度が高いとは言い難い。そのため、さらに微量な凝集塊を計測するにはより高感度な装置を用いる必要があると思われる。

厚生労働省からの通知¹⁹⁾によると、「輸血にあたって、保存前白血球除去製剤を使用した場合には輸血用血液フィルター (微小凝集塊除去用) は別に算定できないものであること」と記載されている。その一方で、PreLR 赤血球製剤の添付文書には「微小凝集塊による副作用防止のためには、必要に応じて微小凝集塊除去用フィルターを使用すること」と記載されている。カナダにおける輸血の臨床ガイドライン²⁰⁾によれば、かつては白除を行っていない赤血球製剤には微小凝集塊除去フィルターを用いることとしていたが、患者の費用負担の増加や赤血球製剤の迅速な輸血を妨げるとの理由から PreLR 製剤における微小凝集塊除去フィルターの使用は不要としている。また米国血液銀行協会 (AABB) のテクニカルマニュアル²¹⁾では、微小凝集塊除去フィルターは主に術中あるいは術後の出血による自己血を回収する際に用いるとし、通常の輸血においては使用しない旨が記載されている。このように国外においては PreLR 製剤の輸血には微小凝集塊除去フィルターを用いないとしている国が多い。我々が国内の PreLR 製剤について検討したところ、現在供給されている RCC-LR の微小凝集塊量は従来の RC-MAP に比べ有意に少なく、また微小凝集塊除去フィルターを使用した場合と使用しなかった場合では凝集量に差が認められなかった。

最近、Keating ら²²⁾は輸血される血液製剤中の血小板および白血球が受血者側で血小板と白血球から成る凝集塊の形成を誘発する可能性があり、心血管疾患を持つ患者における輸血副作用の発生との関連性を示唆している。大量輸血や小児輸血においては微小凝集塊が臨床的な有害事象を引き起こす可能性は否定できない。そのため、臨床的な関連性を明らかにするにはさらなる検討を要するが、日本赤十字社が製造・供給する PreLR 赤血球製剤を成人の慢性貧血などに輸血する際は、微小凝集塊除去フィルターを使用せずとも大凝集

塊および微小凝集塊が輸血に支障をきたす事はないと考える。

結 語

従来供給されていた RC-MAP には大凝集塊や微小凝集塊の形成が認められていた。しかし、2007 年の保存前白血球除去導入後の CPD 液を含む RCC-LR や WB-LR について大凝集塊は形成されず、また微小凝集塊の形成量も有意に減少する事を確認した。そのため、凝集塊が要因で発生していた輸血時の有害事象は著しく減少すると考えられるが、大量輸血あるいは小児輸血などにおいて発生する輸血副作用と微小凝集塊との関連性を明らかにするには輸血後の臨床データを蓄積していく必要があると考える。

文 献

- 1) 千葉清司, 漆原範子, 秋野光明, 他: 赤血球 M・A・P における大凝集塊形成の機構と形成防止法. 日本輸血学会誌, 40: 625—634, 1994.
- 2) 高橋雅彦, 柴 雅之, 江畑 実, 他: RC-M・A・P の凝集塊について. 日本輸血学会誌, 40: 24—31, 1994.
- 3) 矢野眞紀, 岡田基文, 豊田 庸, 他: RC-MAP の微小凝集塊について—構成成分の検討—. 日本輸血学会誌, 42: 83—89, 1996.
- 4) 池田忠明, 立石真理, 平井見奈子, 他: 赤血球 MAP 「日赤」に生成する巨大凝集塊 (MA) について. 日本輸血学会誌, 40: 14—23, 1994.
- 5) 川村 薫, 矢野眞紀, 榊井里美, 他: RC-M・A・P 中に発生する凝集塊 (マクロアグリゲート) の簡易判別法および構成成分分析法. Technical Information, 124: 1—10, 1995.
- 6) Swank LR, Seaman FVG: Microfiltration and microemboli: a history. Transfusion, 40: 114—119, 2000.
- 7) 遠山 博: 輸血における微小凝集塊 (microaggregate) 濾過フィルターの進歩と意義. 医学のあゆみ, 122: 1—7, 1982.
- 8) 寺内純一, 一瀬京子, 吉田静香, 他: ポール輸血フィルター SQ40s の使用経験. 日本輸血学会誌, 32: 238, 1986.
- 9) 秋野光明, 佐藤雅子, 栗倉裕美, 他: 自己血における保存前白血球除去の有用性. 自己血輸血, 14: 132—136, 2001.
- 10) 中村宣雄, 高階雅紀: 貯血された患者自己血中に発生する凝集塊と, SQ40s スクリーンフィルターによる除去効果の検討. 自己血輸血, 15: 175—182, 2002.
- 11) 榊井里美, 永沢雅秀, 川村 薫, 他: 赤血球 M・A・P 「日赤」保存中に発生する MACROAGGREGATES. 血液事業, 18: 49—56, 1995.
- 12) 比留間潔: 輸血用血液の Prestorage leukocyte depletion. 日本輸血学会誌, 44: 1—11, 1998.
- 13) Orlina AR, Josephson AM: Comparative Viability of Blood Stored in ACD and CPD. Transfusion, 9: 62—69, 1969.
- 14) 奥山美樹, 比留間潔: 自己血輸血における通常 RC-MAP と白除 RC-MAP の比較検討—凝集塊, サイトカイン濃度の比較—. 自己血輸血, 14: 125—131, 2001.
- 15) 秋野光明, 山本定光, 才川 聡, 他: 全血処理型白血球除去フィルタークローズドバッグシステム (セパセルインテグラ MAP) を用いた血液製剤の調製と長期保存試験. 日本輸血学会誌, 46: 521—531, 2000.
- 16) 日野郁生, 高橋雅彦, 高橋好春, 他: 保存前白血球除去導入前後での医療機関からの苦情報告について. 血液事業, 31: 212, 2008.
- 17) Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components, 14th ed, Council of Europe, Strasbourg Cedex, 2008, 137—140.
- 18) Roback DJ, Combs RM, Grossman JB, et al: AABB Technical Manual, 16th ed, American Association of Blood Banks, Bethesda Maryland, 2008, 653.
- 19) 厚生労働省保険局医療課長: 使用薬剤の薬価 (薬価基準) 等の一部改正について. 保医発第 1208001 号, 2006 年 12 月 8 日.
- 20) Stevenson H: Clinical Guide to Transfusion, 4th ed, Canadian Blood Services, Canada, 2006, 74—114.
- 21) Roback DJ, Combs RM, Grossman JB, et al: AABB Technical Manual, 16th ed, American Association of Blood Banks, Bethesda Maryland, 2008, 619.
- 22) Keating KF, Fung KM, Schneider JD: Induction of platelet white blood cell (WBC) aggregate formation by platelets and WBCs in red blood cell units. Transfusion, 48: 1099—1105, 2008.

AGGREGATE FORMATION DURING STORAGE OF RED CELLS CONCENTRATE-LEUKOCYTE REDUCED, “NISSEKI”

Satoru Tamura, Mitsuaki Akino, Masako Katsumata, Chihiro Homma, Toshiaki Kato and Hisami Ikeda
Hokkaido Red Cross Blood Center

Abstract:

A number of studies have shown the formation of various sizes of aggregates during storage of red cells concentrate (RC-MAP) supplied by the Japanese Red Cross until 2007. Among aggregates, macroaggregates are known to cause the clogging of transfusion filters at the bed side, and microaggregates are suggested to induce transfusion-related pulmonary embolism. Since the introduction of a prestorage leukocyte reduction system containing a CPD solution instead of an ACD-A solution as anticoagulant, and the supply of Red Cells Concentrate-Leukocyte Reduced (RCC-LR) in the blood program in Japan, the formation of macroaggregates and microaggregates has not been reported. We evaluated the formation of macroaggregates and microaggregates during storage of RCC-LR containing CPD solution. In addition, since the criteria for the use of a microaggregate screen filter have not been determined, we measured the number of microaggregates in RCC-LR before and after use of a microaggregate screen filter. Our results showed that no macroaggregates were formed in the storage of RCC-LR, and that the number of microaggregates in RCC-LR was significantly lower than that in RC-MAP. No significant change in the number of microaggregates was observed between pre- and post-filtered RCC-LR using a microaggregate screen filter. From our results, it is expected that transfusion of RCC-LR without using a microaggregate screen filter in adult patients with chronic anemia and related conditions may not cause adverse effects due to microaggregates, although the possibility cannot be ruled out that a small amount of microaggregates in RCC-LR still may be harmful in patients during massive transfusion or pediatric transfusion.

Keywords:

prestorage leukocyte reduction, citrate phosphate dextrose solution, macroaggregates, microaggregates, microaggregate screen filter