

市販の膜型血漿分離器 EC-4A10[®]により調製した洗浄血小板の品質小野寺秀一¹⁾ 金子 祐次¹⁾ 瀧崎 晶弘²⁾ 一杉 芽美²⁾ 栗原 勝彦¹⁾百瀬 俊也¹⁾ 松崎 浩史³⁾ 中島 一格¹⁾

血小板製剤(PC)による輸血副作用防止にはPCの洗浄が有用だが、通常、これには大型遠心機を用いたPC洗浄(遠心法)が行われる。一方、血液透析や血漿交換など医療機関における血液浄化療法では、中空糸膜を用いた血球と血漿の分離が一般的である。

そこで我々は市販の膜型血漿分離器(分離器)EC-4A10の中空糸外側にPCを充填し、洗浄液BRS-Aにより血漿成分を除去する洗浄血小板調製法(膜法)を開発した。本研究では膜法と遠心法で調製した洗浄血小板の品質を比較した。

血小板回収率は、膜法95.8%と遠心法90.4%で膜法が有意に高かった。血漿蛋白除去率は、膜法、遠心法の順にアルブミンは93.2%, 97.2%, IgGは92.1%, 96.2%, IgAは78.0%, 96.2%, IgMは7.3%, 96.5%, 総蛋白は85.8%, 95.7%と概ね遠心法が有意に高かった。一方、遠心法では調製に伴ってCD62P陽性率の上昇とHSR低下がみられたが、膜法でこれらはなく、調製後48hまで良好な品質を維持した。

膜法は血小板回収率の高さと血小板活性化の少なさにおいて、遠心法はIgMなどの分子量が大きな物質の蛋白除去能において優れていた。また、膜法はどこの施設でも行える利便性もあり、洗浄血小板の調製法として意義のある方法と思われた。

キーワード：洗浄血小板、中空糸膜、膜型血漿分離器、EC-4A10

緒 言

血小板製剤(以下、PC)による輸血副作用防止には、PCを洗浄して製剤中に含まれる血漿成分を取り除くことが有用とされている^{1)~4)}。しかしながら、通常、PCの洗浄は遠心機を使用した方法^{4)~7)}(以下、遠心法)で行われるため、大容量遠心機を持たない医療機関における洗浄血小板(以下、WPC)の自家調製は困難である。一方、血液透析や血漿交換など医療機関における血液浄化療法には、中空糸型血液浄化器を用いることが一般的である。

もしも、中空糸型血液浄化器によってPC洗浄を行えば、広くWPCの自家調製が可能となることから、我々は市販の膜型血漿分離器(以下、分離器)を用いたPC洗浄法の検討⁸⁾⁹⁾を行い、エバキュア[®]EC-4A10(川澄化学工業)を用いて1)プライミング、2)PC充填、3)洗浄、4)回収の4工程でWPCを調製する方法(以下、膜法)を開発した⁹⁾。

本研究では、膜法で調製したWPCについて、経時的

に品質検査を実施し、遠心法で調製したWPCの成績と比較検討した。

材料・方法

1. 膜法によるWPCの調製。

1-1. 洗浄液の調製。

洗浄液は及川らの方法⁶⁾に従い、ピカネイト[®]輸液(大塚製薬工場)にACD-A液を20:1で混合調製して作製した(以下、BRS-A)。

1-2. 洗浄回路の作成。

洗浄回路は、分離器EC-4A10(膜孔径0.030 μ m, 膜面積1.0m², 膜素材 エチレン-ビニルアルコール重合体, ハウジングサイズ57 ϕ ×280mm, 川澄化学工業), 原料PCバッグ, 洗浄液(BRS-A)バッグ, WPC回収用バッグ(KBP-1000FPN, 川澄化学工業), 廃液回収用バッグ(セーフミックTPNバッグ3,000ml, ジェイ・エム・エス)を血液回路で連結して作製した(図1)。

1-3. 膜法によるWPCの調製手順(図2)。

1) 日本赤十字社関東甲信越ブロック血液センター

2) 日本赤十字社血液事業本部中央血液研究所

3) 東京都赤十字血液センター

〔受付日：2016年3月31日、受理日：2016年6月9日〕

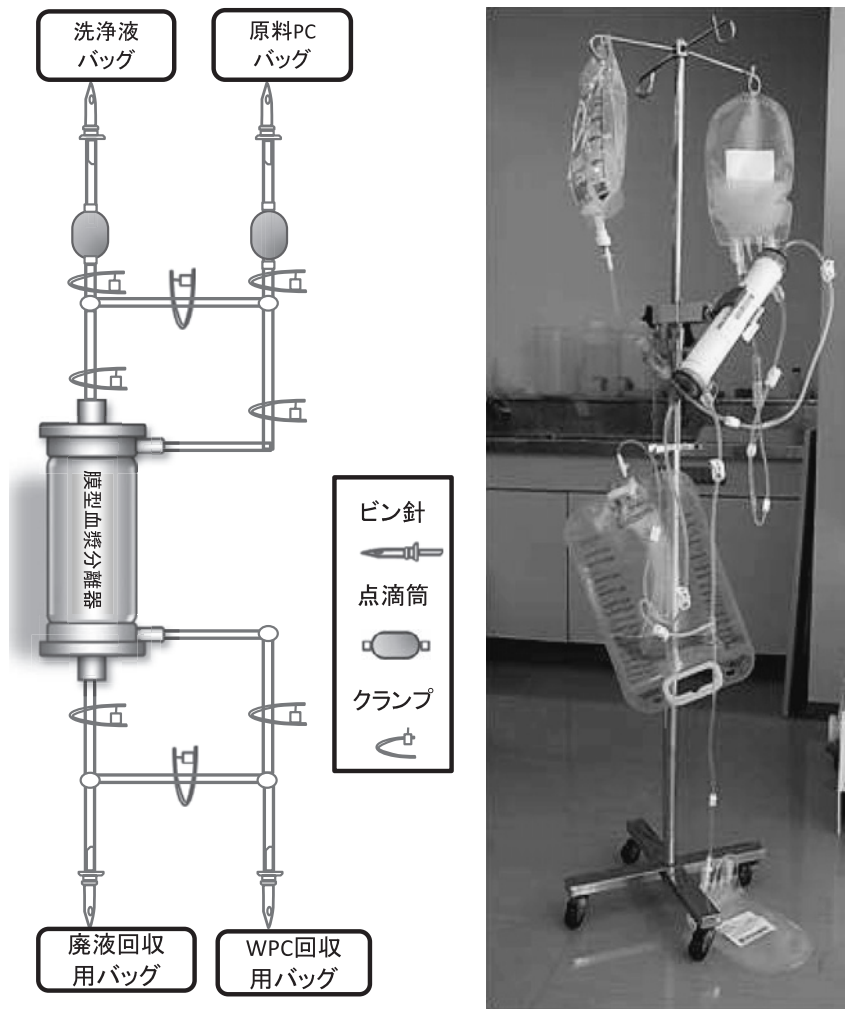


図1 洗浄回路，概形図と全景写真

洗浄回路内の流路はクラップの開閉操作により切り替え，流速調整は原料PCまたは洗浄液バッグから繋がる点滴筒の界面と廃液またはWPC回収用バッグに穿刺するピン針間の落差を調整して行った。

調製に用いたPCは，採血翌日のPC-LR10(以下，原料PC)である(n=6)．調製は次の4段階の操作を順に行った．1)プライミング：洗浄液を300ml使用して分離器内の注射用水を洗浄液に置換した(流速150ml/min)．2)原料PCの充填：原料PCの全量を分離器の中空糸外側に充填した(流速40ml/min)．3)洗浄：洗浄液を1,200ml使用して分離器内に充填した原料PCを洗浄した(流速40ml/min)．4)回収：洗浄液を240ml使用して回収バッグにWPCを回収した(流速150ml/min)．ここで，洗浄液または原料PCは，洗浄回路のクラップの開閉操作により1)プライミングから3)洗浄までは，中空糸膜の外側から内面の方向に向かって分離器内に流入させ，廃液回収用バッグに注射用水または血漿成分を排出した．これとは逆に，4)回収の操作では，洗浄液を中空糸膜内面から外面の方向に向かって分離器内に流入させ，WPC回収用バッグにWPCを回収した．回路内の流速調整は，原料PCまたは洗浄

液バッグから繋がる点滴筒の界面と廃液またはWPC回収用バッグに穿刺するピン針間の落差を調整して行った．

2. 遠心法によるWPCの調製.

原料PCを日本輸血・細胞治療学会の洗浄・置換血小板の適応およびその調製の指針¹⁾に添って洗浄しWPCを調製した(n=6)．調製手順は及川らの方法⁶⁾に従って，原料PCバッグにBRS-Aを250ml添加し混和後，大容量遠心機(日立工機社製，日立大容量冷却遠心機himac CR7型)で遠心(2,560g，22℃，10min)した．つづいて分離スタンドを用いて原料PCバッグをプレスし，上清を可能な限り廃液バッグ(血液分離用バッグKBP-600C，川澄化学工業)に排出した．原料PCバッグにBRS-Aを240ml添加して30分間静置後，血小板振とう保存装置(プリス社製PRK-Mini型，庫内温度設定22℃)で30分間振とうして再懸濁した．

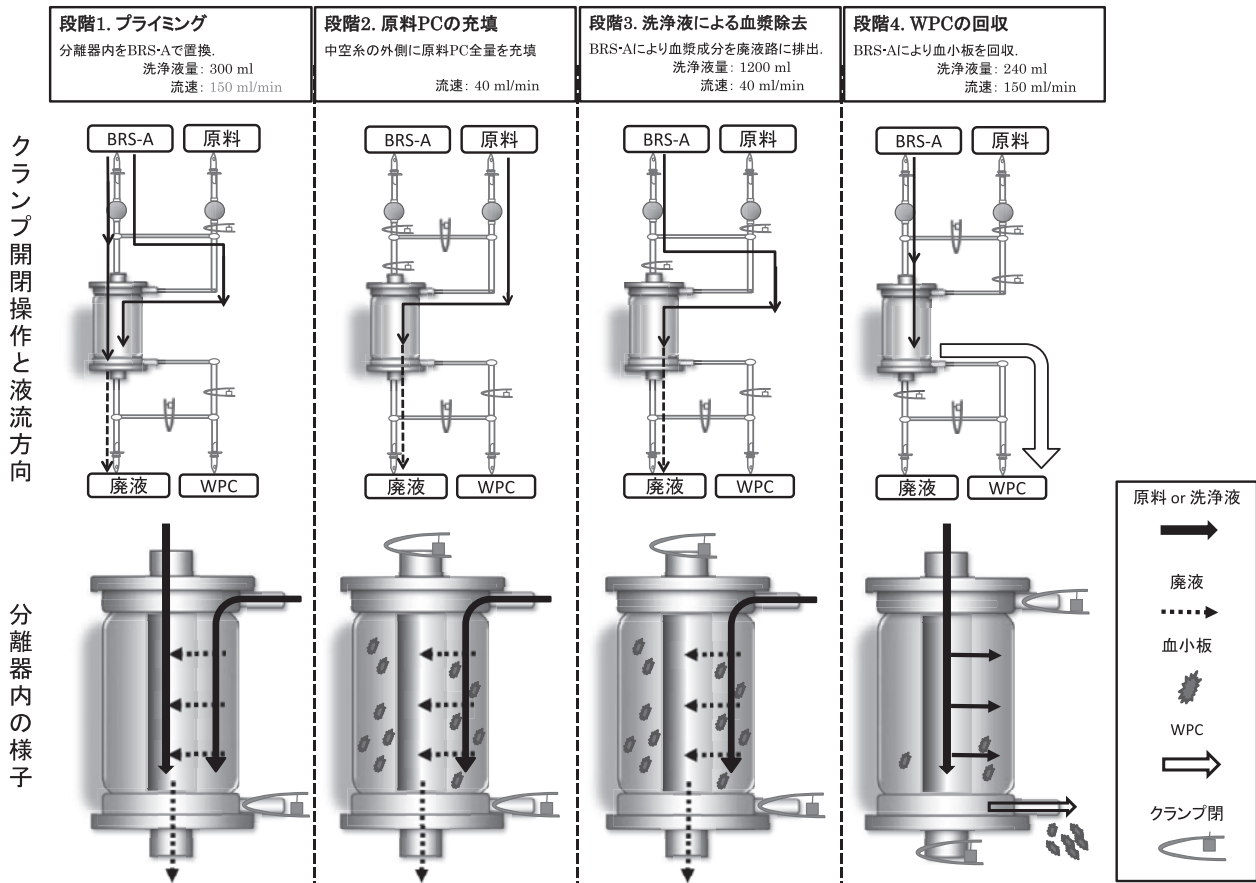


図2 膜法によるWPCの調製手順: 原料PCを膜型血漿分離器の中空糸の外側に充填して洗浄液を注ぎ、血漿成分を除去した。段階1: 分離器内を洗浄液300 mlでプライミングする。洗浄回路と分離器内の空気と注射用水は廃液路に排出される。段階2: 原料PCの全量を分離器に流入させ、中空糸膜の外側に血小板を捕らえる。血漿成分は膜を通過して廃液路に排出される。段階3: 中空糸膜の外側から内面に向かって洗浄液1,200 mlを流入させ濾過洗浄する。血小板は膜外側に残り、血漿成分は膜孔を通過して廃液路に排出される。段階4: 中空糸膜の内側から外側に向かって洗浄液240 mlを流入させ、血漿成分の除かれた血小板(WPC)を回収する。

3. 血小板回収率と蛋白除去率, サイトカインおよびケモカイン除去率の算出

原料PCおよびWPCの容量, 血小板濃度, 総蛋白濃度(以下, TP濃度), アルブミン濃度(以下, Alb濃度), IgM濃度, IgA濃度, IgG濃度を測定して血小板回収率と蛋白除去率を算出した。容量は, 電子天秤LP-4200S(ザルトリウス)で重量を計測し, 比重(g/ml)をそれぞれ原料PC=1.03, WPC=1.01として求めた。血小板濃度は, 多項目自動血球分析装置XS-800i(シスメックス)により測定した。TPおよびAlb濃度は, 試薬A/GB-テストワコー(和光純薬工業)とU-2900形分光光度計(日立ハイテクノロジー)により測定した。免疫グロブリン濃度(IgM, IgA, IgG)は, 三菱化学メディエンスに委託測定した。サイトカインおよびケモカイン除去率は, Luminex[®] 200(メルクミリポア)によるLuminex[®] 200 xPONET[®] 3.1システムを用いて原料PCとWPC上清中の濃度を測定して算出した。

4. 品質試験

WPC(膜法をTest, 遠心法をControlとした)の品質試験を調製後48 hrまで経時的に行った(各n=6)。WPCは調製後30分間静置したのち, 血小板振とう保存装置(庫内温度設定22℃)で振とう保存した。検体採取時期は, ①原料PC, ②WPCの調製後1 hr, ③同24 hr, ④同48 hrの4点とし, それぞれpre, 1H, 24H, 48Hの結果とした。検体採取は, 血液分離バッグKBP-50C-2(川澄化学工業)を無菌接合装置TSCD-SC-201A(テルモ)で接続して行った。血小板濃度と平均血小板容積(以下, MPV)は, 多項目自動血球分析装置XS-800iにより測定した。血液ガス分析とグルコース濃度(以下, Glu濃度)の測定は, 血液ガス分析装置Rapid Point 405(シーメンスヘルスケア)で行った。乳酸濃度(以下, Lac濃度)の測定は, 試薬デタミナーLA(協和メディックス)とU-2900形分光光度計により測定した。CD62P-selectin陽性率(以下, CD62P陽性率)の測定は, CD41-PC5抗体とCD62P-PE抗体(とも

表1 血小板回収率と蛋白除去率 (mean ± SD, n=6)

WPCの調製方法	膜法	遠心法	p-value*
原料PC血小板総数/bag (×10 ¹¹ 個)	2.16 ± 0.14	2.03 ± 0.11	0.121
WPC血小板総数/bag (×10 ¹¹ 個)	2.07 ± 0.14	1.83 ± 0.13	0.014
血小板回収率 (%)	95.8 ± 1.9	90.4 ± 3.6	0.008
TP除去率 (%)	85.8 ± 3.3	95.7 ± 1.5	<0.001
Alb除去率 (%)	93.2 ± 1.2	97.2 ± 0.8	<0.001
IgM除去率 (%)	7.3 ± 4.6	96.5 ± 1.7	<0.001
IgA除去率 (%)	78.0 ± 4.7	96.2 ± 2.3	<0.001
IgG除去率 (%)	92.1 ± 1.7	96.2 ± 1.3	0.001

* : 膜法と遠心法の群間を paired t-test で解析した。

表2 サイトカイン, ケモカイン濃度と除去率

検査項目	濃度*						除去率**		
	洗浄前 (n=6)			洗浄後 (n=6)			膜法	遠心法	p-value
	膜法	遠心法	p-value	膜法	遠心法	p-value			
IFNg	15.9 ± 4.9	14.8 ± 10.6	0.818	2.5 ± 2.2	3.7 ± 3.4	0.487	80.9 ± 14.1	66.7 ± 31.4	0.335
IL-1a	17.9 ± 25.5	15.3 ± 8.7	0.821	1.6 ± 0.0	3.6 ± 5.0	0.341	65.9 ± 34.0	89.0 ± 44	0.225
IL-1b	4.5 ± 2.7	2.7 ± 2.3	0.225	0.6 ± 0.7	0.3 ± 0.1	0.247	79.3 ± 22.4	75.3 ± 24.3	0.773
IL-6	1.2 ± 1.4	1.4 ± 1.7	0.786	<0.1 (全て検出限界以下)	—	—	>89.6 ± 7.8	>74.7 ± 34.9	—
IL-8	9.6 ± 21.9	2.3 ± 2.9	0.438	<0.2 (全て検出限界以下)	—	—	>86.4 ± 12.9	>87.3 ± 8.6	—
IL-10	6.0 ± 3.9	4.0 ± 2.8	0.329	0.4 ± 0.0	0.4 ± 0.0	0.341	88.2 ± 6.8	83.1 ± 10.5	0.342
TNFa	7.0 ± 1.4	4.9 ± 2.5	0.103	2.6 ± 3.7	1.2 ± 1.1	0.385	78.3 ± 28.2	67.2 ± 29.5	0.542
VEGF	271.5 ± 92.6	251.8 ± 121.3	0.759	111.9 ± 72.1	94.6 ± 59.5	0.660	62.7 ± 10.6	57.3 ± 20.9	0.619
PDGF-AA	1.5 ± 0.3	1.3 ± 0.5	0.535	0.8 ± 0.3	0.6 ± 0.3	0.437	33.7 ± 22.9	49.1 ± 25.9	0.322
PDGF-AB/BB	7.6 ± 3.2	7.4 ± 6.7	0.955	3.3 ± 2.5	1.2 ± 0.6	0.068	61.0 ± 12.6	77.1 ± 12.0	0.059
RANTES	69.6 ± 19.9	64.4 ± 45.8	0.802	23.6 ± 6.7	20.8 ± 11.1	0.606	56.8 ± 10.6	53.6 ± 26.8	0.785

・膜法と遠心法の群間を paired-t-test で解析し p-value を算出した。

* : 濃度の単位は, FDGF-AA, PDGF-AB/BB, RANTES では ng/ml, それ以外の検査項目では pg/ml で示した。

** : IL-6 と IL-8 の除去率は, 洗浄後検体の検査結果が全て検出限界以下の値であったため, 信頼性区間における最小値から仮に求めた。

にベックマン・コールター)で染色した細胞を1%-パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液(和光純薬工業)で固定し, 全自動細胞解析装置 Cytomics FC 500(ベックマン・コールター)によるフローサイトメトリーで測定した。浸透圧ショック回復率(以下, HSR)は, 常法¹⁰⁾により U-2900 形分光光度計を用いて測定した。血小板凝集能は, PRP(血小板濃度を30万/μlに調整)をADP(10μM) + Collagen(1μg/ml)により同時刺激し, 血小板凝集能測定装置 PRP313M (IMI)を用いて測定した。スワリングと凝集塊の有無は, 血液バッグを白色蛍光灯にかざし肉眼観察した。

5. 統計処理

血小板回収率と蛋白除去率, サイトカインとケモカイン濃度および除去率の結果は, 群間を paired t-test で解析した。品質試験の結果は, Test と Control の群間を paired t-test で解析し, 調製法の違いによる影響を評価した。また, 群内を 1way-ANOVA で検定後, Dunnett-test で解析し, 調製による影響を pre vs. 1H により, 振とう保存による影響を 1H vs. 24H または 48 H により評価した。それぞれ p<0.05 のとき統計的に有

意とした。

結 果

1. 血小板回収率と蛋白除去率。

膜法と遠心法による血小板回収率と蛋白除去率を表1に示す。血小板回収率は, 膜法が95.8%, 遠心法が90.4%であり, 膜法で有意 (p<0.05) に高かった。以下, 結果を膜法, 遠心法の順に記すと, 蛋白除去率はTPが85.8%と95.7%, Albが93.2%と97.2%, IgMが7.3%と96.5%, IgAが78.0%と96.2%, IgGが92.1%と96.2%であり, すべて遠心法で有意に高かった。遠心法の蛋白除去率は物質によらずほぼ一律であったが, 膜法の蛋白除去率は物質によって異なり, 比較的分子量の小さい物質であるAlbやIgGの除去率は90%以上であったが, IgAでこれよりやや低く, 測定項目中で最大の分子量を持つIgMの除去率は10%以下に留まった。

2. サイトカインおよびケモカイン濃度と除去率。

原料PCとWPC上清中の濃度と, 洗浄による除去率を表2に示す。WPCのサイトカインおよびケモカイン濃度はいずれも原料PCより低値となった。膜法と遠心

表3 膜法 (Test) と遠心法 (Control) で調製した WPC の品質試験結果 (mean ± SD, n = 6)

試験項目	WPC の調製方法	原料 PC		WPC	
		pre	1H	24H	48H
容量 (ml)	Test	190.0 ± 5.3	232.9 ± 5.8 [†]	N.D.	N.D.
	Control	192.6 ± 7.6	229.3 ± 8.7 [†]	N.D.	N.D.
	p	0.511	0.427	—	—
血小板濃度 (×10 ⁴ /μl)	Test	113.6 ± 8.4	88.9 ± 7.4 [†]	87.4 ± 7.2	88.0 ± 7.8
	Control	105.5 ± 7.1	80.1 ± 6.3 [†]	80.1 ± 7.1	80.2 ± 7.1
	p	0.096	0.053	0.128	0.124
血小板総数 (×10 ¹¹ /bag)	Test	2.16 ± 0.14	2.07 ± 0.14* [†]	N.D.	N.D.
	Control	2.03 ± 0.11	1.83 ± 0.13* [†]	N.D.	N.D.
	p	0.121	0.014	—	—
MPV (fl)	Test	9.2 ± 0.7	9.0 ± 0.7	9.4 ± 0.9	9.3 ± 0.8
	Control	9.1 ± 0.5	9.2 ± 0.8	9.2 ± 0.8	9.0 ± 0.6
	p	0.839	0.681	0.683	0.557
pH (at 22°C)	Test	7.38 ± 0.08	7.09 ± 0.08 [†]	7.55 ± 0.03 [‡]	7.59 ± 0.09 [‡]
	Control	7.38 ± 0.12	7.06 ± 0.15 [†]	7.62 ± 0.07 [‡]	7.66 ± 0.08 [‡]
	p	0.974	0.640	0.053	0.251
pO ₂ (at 22°C)	Test	53.0 ± 4.3	74.6 ± 4.4 [†]	70.0 ± 8.6	72.3 ± 7.7*
	Control	58.4 ± 6.9	79.7 ± 3.5 [†]	77.7 ± 4.3	82.7 ± 2.2* [‡]
	p	0.146	0.064	0.103	0.017
pCO ₂ (at 22°C)	Test	22.5 ± 3.0	55.1 ± 11.6 [†]	18.2 ± 0.9 [‡]	14.7 ± 1.7 [‡]
	Control	21.3 ± 4.5	52.7 ± 10.0 [†]	16.4 ± 1.9 [‡]	13.3 ± 2.0 [‡]
	p	0.626	0.734	0.062	0.230
Glu (mmol/l)	Test	23.0 ± 2.1	6.0 ± 0.2* [†]	5.1 ± 0.3 [‡]	3.7 ± 0.7 [‡]
	Control	22.5 ± 1.9	6.5 ± 0.1* [†]	5.7 ± 0.5 [‡]	4.3 ± 0.7 [‡]
	p	0.692	0.001	0.051	0.172
Lac (mmol/l)	Test	2.4 ± 0.8	0.4 ± 0.1 [†]	2.1 ± 0.5 [‡]	4.2 ± 1.1 [‡]
	Control	2.4 ± 0.9	0.4 ± 0.1 [†]	2.0 ± 0.5 [‡]	4.0 ± 1.0 [‡]
	p	0.986	0.521	0.648	0.812
凝集能 (ADP + Collagen 刺激)	Test	80.9 ± 4.0	86.6 ± 6.5	86.6 ± 7.0	82.6 ± 5.4
	Control	81.9 ± 17.8	75.7 ± 35.4	81.4 ± 11.8	83.7 ± 7.3
	p	0.899	0.475	0.389	0.788
HSR (%)	Test	72.4 ± 9.3	76.0 ± 16.1	78.5 ± 11.2	80.9 ± 8.9
	Control	81.2 ± 8.7	71.1 ± 8.7 [†]	83.4 ± 7.7 [‡]	86.4 ± 10.8 [‡]
	p	0.142	0.561	0.428	0.373
CD62P-selectin positive (%)	Test	9.6 ± 2.6	12.5 ± 5.5*	12.3 ± 2.8*	11.2 ± 2.8*
	Control	7.1 ± 1.5	19.1 ± 2.5* [†]	15.8 ± 3.8*	16.2 ± 2.8*
	p	0.083	0.036	0.015	0.016
凝集塊 (+ or -)	Test	—	—	—	—
	Control	—	+ (2/6 例)	—	—
スワリングスコア (0-3)	Test	3	3	3	3
	Control	3	3	3	3

[†] : pre vs. 1H に有意差有り (by Dunnett-test, 5% 基準値以上)

[‡] : 1H vs. 24H, 48H に有意差有り (by Dunnett-test, 5% 基準値以上)

* : Test vs. Control に有意差有り (by paired t-test, p<0.05)

法によるサイトカインおよびケモカインの除去率は、方法間で差を認めなかったが、両方法ともに物質によって異なった。

3. WPC の品質試験.

膜法または遠心法により調製した WPC の品質試験結果 (膜法 = Test, 遠心法 = Control) を表 3 に示す。

【調製による影響 (pre vs. 1H)】

Test, Control とともに、調製により容量, pO₂, pCO₂

は上昇し、血小板濃度、血小板総数、pH、Glu 濃度、Lac 濃度は低下した。MPV と血小板凝集能は調製前後で変化しなかった。ここで、1H における血小板総数 (×10¹¹/bag) は、Test が 2.07 で Control の 1.83 より高く、Glu 濃度 (mmol/l) は、Test が 6.0 で Control の 6.5 より低かった。Control の HSR は 81.2% (pre) から 71.1% (1H) と調製後に低下し、CD62P 陽性率は 7.1% (pre) から 19.1% (1H) と調製後に上昇した。これに

対し、Test の HSR は 72.4% (pre) から 76.0% (1H), CD62P 陽性率は 9.6% (pre) から 12.5% (1H) と、ともに調製前後で変わらなかった。1H における CD62P 陽性率を比較すると、Control に対し Test が低値となった。スワリングは pre と 1H の全検体で良好で、両群ともに調製前後で変化しなかった。調製による凝集塊発生は、Test でみられなかったが、Control の 6 例中 2 例で観察された。

【保存による影響 (1H vs. 24H および 48H)】

Test, Control とともに、保存により pH, Lac 濃度は上昇し、pCO₂ と Glu 濃度は低下した。血小板濃度、MPV, 凝集能、CD62P 陽性率は、両群ともに 48H まで変化せず 1H と同等の値を維持した。ここで、各保存期間における CD62P 陽性率を比較すると、いずれも Control に対し Test が低値となった。

pO₂ については、Test では 48H まで 1H と同等の値を維持したが、Control では保存により上昇し、48H における pO₂ 分圧は、Test と比べ高値となった。

また、HSR については、Test では 48H まで変化せず 1H と同等の値を維持したが、Control では保存による値の上昇がみられ、調製に伴って一旦低下した HSR が、調製後 24 時間までの保存中に回復した。

全検体でスワリングスコアは良好であり、保存に伴う変化は確認されなかった。凝集塊は 24H と 48H の検査ではすべて陰性で、Control の 1H で確認された凝集塊は、調製後 24 時間までの保存中に消失した。

考 察

血小板回収率は膜法で 95.8%、遠心法で 90.4% と膜法で良好で、TP 除去率は膜法で 85.8%、遠心法で 95.7% と遠心法で良好であった。これは、WPC の調製について過去に報告された遠心法の成績^{4)~7)}と比較しても同様である。膜法の TP 除去率がやや低率であるのは、エバキュア[®]の中空糸膜孔以上に分子量が大きい物質(例えば IgM) の除去が困難なためである。

一方、分子量がより小さな物質 (Alb や IgG) に着目すると、その除去率は 90% 以上と高く、遠心法と比べて大差ない(表 1)。このことは、膜法が HLA 抗体などの同種免疫抗体等に関しても十分な除去性能¹²⁾を有することを示唆した。サイトカインとケモカインの除去率は、膜法と遠心法で同程度であったものの、物質間で一律でなかった(表 2)、これは血小板細胞中からの再放出が関与した結果と考えられる。

アレルギー性副作用の機序として考えられている仮説のひとつに、炎症性サイトカインやケモカインが保存中に血液製剤に貯留し、血液とともに輸血されて発症するという説がある¹¹⁾。これに関与する生理活性物質としては、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)、可溶性 CD40L、

ヒスタミン、腫瘍増殖因子 β (TGF- β)、RANTES など が挙げられる^{12)~16)}が、これらの物質は膜法による洗浄により低減される¹⁷⁾ことから、この機序を介するアレルギー性副作用は、膜法によっても防止が可能と思われる。

一方、PC 輸血後のアレルギー性副作用の原因が血漿蛋白に起因するのであれば、膜法による PC 洗浄では一部の副作用が除かれなくなる。しかしながら、どのような蛋白質が輸血副作用に関係するか、その原因となる物質はほとんど特定されていない¹¹⁾¹⁸⁾ことから、膜法による洗浄で一部の物質が除かれませんが、副作用抑止効果にどのような影響を及ぼすか明らかでない。

膜法の臨床応用には、除去されない分子量の大きい血漿蛋白が輸血副作用を認めた症例において影響を与えず、遠心法による洗浄血小板と同様の輸血副作用防止効果があるかについて、臨床研究等による検証が必要と思われる。また、分離器 EC-4A10 を PC 洗浄の用途に使用することが、現在のところ医療機器として保険適用外の使用にあたることから、膜法の実施で生じる医療コスト(分離器と洗浄液の合算費用約 2 万円)は保険償還されないことに留意が必要である。

エバキュア[®]で除去が困難な分子量の大きい血漿蛋白を除去するには、より大きな膜孔径を有する分離器が求められるが、既に国内で医療機器として承認されているプラズマキュア[®] PE-08 (膜孔径 0.3 μ m, 川澄化学工業)を用いて PC 洗浄を行った場合、TP 除去率は約 98% と良好であるが血小板回収率は 30% 程度と低く、多数の凝集塊が生じ、また、血小板活性化が伴うことから WPC の調製は困難であった⁸⁾。一方、PC 洗浄を目的に開発された専用の中空糸膜(東レ)を用いて、血漿残存率 1.4% の WPC が調製可能であることが田中らによって報告されている¹⁹⁾。同カラムを今回用いた洗浄回路に組み込めば、蛋白除去性能の向上が期待される。しかしながら、このような分離器は医療機器として承認がなされておらず、医療機関が WPC を自家調製する方法への応用はできない。今回検討した分離器を含め、現在販売されている分離器は、異型 PC-HLA を輸血する場合の抗 A 抗 B 抗体の除去¹⁾目的には使用できないことに留意しておく必要がある。

次に、WPC の品質試験結果(表 3)において、血小板の代謝に関連する項目(pH, pO₂, pCO₂, Glu, Lac)に着目すると、血小板総数の違いにより生じたと思われる僅かな差が Glu 濃度(1H)と pO₂(48H)でみられ、膜法でやや低値を示したが、その他は両群ともほぼ同等な値を推移し、保存による pH 低下や血小板の膨化はみられなかった。これは、膜法による WPC 中の血小板の好氣的代謝が遠心法と同様に行われ、振とう保存に

より調製後 48 hr まで品質が保持可能なことを示唆した。つぎに、HSR や血小板活性化マーカーとされる CD62P 陽性率²⁰⁾などに着目すると、遠心法では調製直後に一時的な HSR 値の低下と CD62P 陽性率の上昇がみられ、さらに凝集塊が発生した。これらのことは過去にも報告されているが^{21)~23)}、遠心操作により血小板の活性化が起きたと考えられる。

一方、膜法ではこれらの指標に関し活性化を示す傾向はみられず、保存中も品質は良好に維持された。血小板は Shear Stress により活性化を受けることが知られているが²⁴⁾²⁵⁾、膜法では、洗浄時の流速が 40ml/min と十分に低速であり、血小板が強く膜表面に押し付けられないことから、これが起きず、調製工程で活性化が生じにくいと考えられる。また、膜法で調製した WPC は、血小板凝集能も遠心法と同等で調製後 48 hr でも十分に機能し、スワリングの減弱や凝集塊の発生もなかった。

これらのことから、膜法による WPC の in vitro における血小板機能は、遠心法による WPC と比べ、保存期間中に同等以上といえ、なおかつ、調製直後に血小板活性化がみられない点でより優れていたといえる。このことが輸血効果を改善させるか否かは不明であるが、市販の医療機器によって、血小板回収率と血小板機能の高い WPC を調製できる膜法は意義のある方法であると思われた。また、膜法に使用する資材は市販製品が主で、調製者に求められる操作も洗浄回路の作成とクランプの開閉操作のみと簡便⁹⁾であることから、大容量遠心機を備えた医療機関に限らず、どの医療機関においても WPC の調製が可能であることも膜法の利点である。

本研究で報告した膜法は、手作業で WPC を調製する方法であるが、調製に関するクランプの開閉操作を自動で行える安価な装置が開発されれば、更に利便性の高い方法となろう。

結 論

膜法で調製した WPC は、血小板回収率と血小板活性化の少なさにおいて、遠心法で調製した WPC より優れ、血小板機能は調製後 48hr まで良好に維持された。一方で、遠心法は IgM など大分子量域の蛋白除去性能に優れていた。市販の膜型血漿分離器 EC-4A10 を用いた今回の方法は、大型遠心機を持たない施設でも行える WPC の調製法として意義のある方法と思われる。

著者の COI 開示：本論文発表内容に関連して特に申告なし。

文 献

- 1) 日本輸血・細胞治療学会ホームページ：洗浄・置換血小板の適応およびその調製の指針 (Version IV) http://yuketsu.jstmct.or.jp/wp-content/themes/jstmct/images/medical/file/guidelines/Ref9-1-150127_150604.pdf (2016年3月現在)。
- 2) Azuma H, Hirayama J, Akino M, et al: Reduction in adverse reactions to platelets by the removal of plasma supernatant and resuspension in a new additive solution (M-sol). *Transfusion*, 49: 214—218, 2009.
- 3) Ryu Y, Shigetaka S, Shunsuke K, et al: Replaced platelet concentrates containing a new additive solution, M-sol: safety and efficacy for pediatric patients. *Transfusion*, 53: 2053—2060, 2013.
- 4) 東 寛, 池田久實：洗浄血小板の調製および副作用防止効果について、病態と抗体：診断検査と輸血療法, 2008, 39—52.
- 5) 小嶋俊介, 柳沢 龍, 石川伸介, 他：置換液 M-sol を用いた置換血小板 (R-PC) 調製のプロセスバリデーションに関する検討. *日本輸血細胞治療学会誌*, 57(5) : 379—385, 2011.
- 6) Oikawa S, Sasaki D, Kikuchi M, et al: Comparative in vitro evaluation of apheresis platelets stored with less 100% plasma versus bicarbonated Ringer's solution with less than 5% plasma. *Transfusion*, 53: 655—660, 2013.
- 7) 及川伸治, 三浦正光, 田口 剛, 他：重炭酸リンゲル液により調製した洗浄血小板の性状と臨床効果. *日本輸血細胞治療学会誌*, 60 (2) : 386, 2014.
- 8) 小野寺秀一, 榎本圭介, 金子祐次, 他：洗浄血小板製剤の調製を膜型血漿分離器で行うための基礎的研究. *血液事業*, 38 (1) : 39—48, 2015.
- 9) 小野寺秀一, 金子祐次, 栗原勝彦, 他：小型膜型血漿分離器を用いた洗浄血小板調製法の改良. *血液事業*, in press.
- 10) Holme S, Moroff G, Murphy S: A multi-laboratory evaluation of in vitro platelet assays: the tests for extent of shape change and response to hypotonic shock. *Transfusion*, 38: 31—40, 1998.
- 11) Hirayama F: Approach of using established and new laboratory tests to more comprehensively investigate noninfectious and nonhemolytic transfusion reactions - along with the experience in Japan. *Vox Sanguinis*, 105: 183—195, 2013.
- 12) Wadhwa M, Seghatchian MJ, Lubenko A, et al: Cytokine levels in platelet concentrates quantitation by bioassays and immunoassays. *Br J Haematol*, 93: 225—234, 1996.

- 13) Edvardsen L, Taaning E, Mynster T, et al: Bioactive substances in buffy coat derived platelet pools stored in platelet additive solutions. *Br J Haematol*, 103: 445—448, 1998.
- 14) Phipps RP, Kaufman J, Blumberg N: Platelet derived CD 154 (CD40 ligand) and febrile responses to transfusion. *Lancet*, 357: 2023—2024, 2001.
- 15) Wakamoto S, Fujihara M, Kuzuma K, et al: Biologic activity of RANTES in apheresis PLT concentrates and its involvement in nonhemolytic transfusion reactions. *Transfusion*, 43: 1038—1046, 2003.
- 16) Garraud O, Hamzeh-Cognasse H, Cognasse F: Platelets and cytokines: How and why? *Transfus Clin Biol*, 19: 104—108, 2012.
- 17) 名倉 豊, 津野寛和, 中村 悠, 他: 中空糸膜を用いた洗浄血小板作成法の確立をめざした検討. *日本輸血細胞治療学会誌*, 61 (2): 287, 2015.
- 18) 平山文也: アレルギー性輸血副作用の最近の知見: 頻度, 発生機序, 検査, 予防, 治療. *日本輸血細胞治療学会誌*, 59 (4): 601—612, 2013.
- 19) Tanaka S, Hayashi T, Sugaya S, et al: A hollow-fiber column system to effectively prepare washed platelets. *Vox Sanguinis*, 109 (3): 239—247, 2015.
- 20) Stenberg PE, McEver RP, Shuman M, et al: A platelet alpha-granule membrane protein (GMP-140) is expressed on the plasma membrane after activation. *J Cell Biol*, 101: 880—886, 1985.
- 21) Schoenfeld H, Muhm M, Doepfner U, et al: Platelet activity in washed platelet concentrates. *Anesth Analg*, 99: 17—20, 2004.
- 22) Kelley WE, Edelman BB, Drachenberg CB, et al: Washing platelets in neutral, calcium-free, Ringer's acetate. *Transfusion*, 49: 1917—1923, 2009.
- 23) Oikawa S, Sasaki D, Kikuchi M, et al: Feasibility of a closed-system cell processor (ACP215) for automated preparation of washed platelet concentrates. *Vox Sanguinis*, 102: 110—115, 2012.
- 24) Ikeda Y, Handa M, Kawano K, et al: The role of von Willebrand factor and fibrinogen in platelet aggregation under varying shear stress. *J Clin Invest*, 87: 1234—1240, 1991.
- 25) Bergmeier W, Chauhan AK, Wagner DD: Glycoprotein Ibalph and von Willebrand factor in primary platelet adhesion and thrombus formation: lessons from mutant mice. *Thromb Haemost*, 99: 264—270, 2008.

QUALITY OF WASHED PLATELET CONCENTRATE PREPARED WITH A MEMBRANE PLASMA SEPARATOR EC-4A10[®]

Hidekazu Onodera¹⁾, Yuji Kaneko¹⁾, Akihiro Fuchizaki²⁾, Megumi Ichisugi²⁾, Katsuhiko Kurihara¹⁾, Syunya Momose¹⁾, Koji Matsuzaki³⁾ and Kazunori Nakajima¹⁾

¹⁾Japanese Red Cross Kanto-Koshinetsu Block Blood Center

²⁾Japanese Red Cross Central Blood Institute

³⁾Tokyo Metropolitan Red Cross Blood Center

Abstract:

To prevent adverse events following platelet transfusion, it is usually recommended that platelet concentrate products (PCs) be washed with a cooling centrifuge. However, the majority of hospitals do not have access to suitable equipment. On the other hand, almost all hospitals have hollow fiber membrane equipment on hand for hemodialysis and plasma exchange. Given this situation, we decided to develop a new method for preparing washed platelet concentrate (WPC) using a membrane plasma separator. We compared the quality with WPC prepared by the centrifuge method (CM) and our newly developed membrane method (MM). The new MM consists of 4 processes : 1) a separator (EC-4A10, Kawasumi Laboratories, INC.) is first rinsed. 2) Platelets are primed outside of the hollow fibers. 3) The platelets are then washed with 1,200 ml of BRS-A (Bicarbonate Ringer's solution with ACD-A) and 4) recovered with 240 ml of BRS-A. The platelet recovery rates were 95.8% in MM and 90.4% in CM ($p < 0.05$). The removal rates of plasma proteins were significantly superior in CM compared to those in MM. Specifically, albumin, IgG, IgA, IgM and total protein removal rates in CM were 97.2%, 96.2%, 96.2%, 97.2%, 95.7%, while those in MM were 93.2%, 92.1%, 78.0%, 7.3%, 85.8% ($p < 0.05$). On the other hand, the CD62P-selectin levels were significantly lower in MM than in CM when measured at 1, 12, 24 hours after the respective procedures. In conclusion, MM was superior in having a higher platelet recovery rate and less platelet activation than CM. However, plasma proteins were more poorly removed in MM. We assume that this result was due to the relation between protein molecular weight and membrane pore size. However, currently it is not clearly known how important of a role these proteins take in adverse transfusion reactions, and further examination is needed.

Keywords:

washed platelet concentration, hollow fiber, membrane plasma separator, EC-4A10