

血小板洗浄工程が血小板品質と保存液中の可溶性 CD40 リガンド及び 血小板由来マイクロパーティクルレベルに及ぼす影響について

及川 伸治¹⁾²⁾ 峯岸 正好³⁾ 遠藤希美加¹⁾⁴⁾ 川島 航¹⁾⁵⁾ 小砂子 智¹⁾
大山 正則¹⁾ 鈴木 光⁴⁾ 清水 博¹⁾

重炭酸リンゲル液に ACD-A 液を添加することにより調製できる血小板保存液 BRS-A (bicarbonated Ringer's solution supplemented with ACD-A) と、血小板洗浄のための自動血球洗浄装置が新たに開発されている。本研究では、洗浄と保存に BRS-A を用いて、自動血球洗浄装置(自動法)または用手法で調製した洗浄血小板の品質を評価した。

ABO 型が一致したアフレスス血小板を 2 本プールした後、等量に分割し、コントロール群(非洗浄または用手法による洗浄)及びテスト群(自動法による洗浄)のための試験血小板とした。自動法で洗浄した血小板の 7 日間保存中の品質を、非洗浄血小板 (Study 1) または用手法で洗浄した血小板 (Study 2) と比較した。

(Study 1) コントロール群とテスト群の 7 日間保存中における低浸透圧ショック回復率、凝集能、ミトコンドリア膜電位、ATP、及び CD42b 平均蛍光強度は同程度であった。テスト群の 3 日目及び 7 日目の CD62P 発現率は、コントロール群よりも低かった。テスト群の 1 日目及び 2 日目の血小板由来マイクロパーティクル (PDMP) レベルは、コントロール群よりも高かった。対照的に、テスト群の可溶性 CD40 リガンド (sCD40L) 及び regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES) レベルは、コントロール群よりも低かった。(Study 2) 血小板数以外の品質試験項目で統計学的有意差は認められなかった。テスト群の PDMP レベルはコントロール群よりも高かった。

BRS-A を用いて自動法で洗浄したアフレスス血小板の品質は保存中も維持されること、また血小板洗浄工程の違いは PDMP レベルに影響を与えるが、sCD40L と RANTES レベルには影響を与えないことが示された。

キーワード：血小板保存液、洗浄血小板、重炭酸リンゲル液、可溶性 CD40 リガンド (sCD40L)、
血小板由来マイクロパーティクル (PDMP)

本論文内容は、Wiley 社の許可のもと Transfusion 誌 (2019, 59 (3) p1080-1089) に最初に掲載された論文に基づき作成したものである。(Shinji Oikawa, Masayoshi Minegishi, Kimika Endo, Wataru Kawashima, Satoshi Kosunago, Masanori Oyama, Ko Suzuki, Hiroshi Shimizu : Impact of the platelet washing process on in vitro platelet properties, and the levels of soluble CD40 ligand and platelet-derived microparticles in the storage media)

背景

血小板輸血に伴う有害反応を最小限にするため、血小板製剤中の血漿を濃縮または洗浄することにより減少させているが、洗浄がより効果的な手法である¹⁾。さらに、血小板や赤血球の洗浄製剤は、急性骨髄性白血病及び急性前骨髄球性白血病の患者の転機を改善することが報告されている^{2)~4)}。しかし、洗浄操作は時間の

かかる手技であり血小板品質を低下させるおそれがある。T-sol, InterSol, Composol, 及び SSP+ などの血小板保存液は、その組成に pH の安定化に寄与する重炭酸や血小板のエネルギー源となるグルコースを含まないという欠点があるが、血漿の代替物として使用されている。これらで血漿を置換するときは、血小板品質を維持するために重炭酸とグルコースを含む血漿をあ

1) 日本赤十字社東北ブロック血液センター

2) 宮城県赤十字血液センター

3) 福島県赤十字血液センター

4) 日本赤十字社血液事業本部中央血液研究所

5) 日本赤十字社血液事業本部

〔受付日：2019 年 8 月 21 日、受理日：2019 年 10 月 7 日〕

る一定の割合で残存させる必要がある⁵⁾。T-sol, InterSol, 及び Composol を使用する場合は, 30~40% の血漿を残存させる必要がある。一方, InterSol の改良版である SSP+ はカリウムとマグネシウムを含んでおり, 20% 血漿残存下で 7 日間血小板品質を維持することが可能である⁶⁾⁷⁾。これまでに, 重炭酸とグルコースを含む血小板保存液はいくつか開発されている。Radwanski らは, 5% 血漿/95% PAS-5 にアフェレシス血小板を浮遊させると 7 日間血小板品質を保持できると報告している⁸⁾。Gravemann らは, バフィーコート由来血小板は 10% 血漿残存下で InterSol-G に浮遊させるとその品質を良好に維持できることを示している⁹⁾。日本では Hirayama らが, 重炭酸, グルコール, 及びマグネシウムを含む M-sol を開発しており, それは 5% 未満血漿残存下で 14 日間血小板機能を維持できることを示している¹⁰⁾。

Azuma らは, 5% 未満の血漿濃度で M-sol に浮遊した血小板は問題なく輸血することが可能であり, 100% 血漿に浮遊した血小板によって引き起こされる有害反応を減らすことができることを示した¹¹⁾。しかし, M-sol の調製は煩雑なため, 調製のための訓練が必要となる。そこで, 我々は重炭酸リンゲル液 (BRS: bicarbonated Ringer's solution) に ACD-A 液を添加して調製する新しい血小板保存液 BRS-A (BRS supplemented with ACD-A) を開発した。BRS-A は 5% 未満の血漿濃度で少なくとも 7 日間血小板品質を維持することができる¹²⁾。BRS-A は M-sol と異なり, 2 種類の輸液を混合するだけで調製することが可能であり, 認可された血小板保存液がない日本では特に有用である。さらに BRS-A は, 現在使用されている SSP+, Composol, 及び PAS-5 といった血小板保存液と異なり, その組成に酢酸塩を含まない。Saunders らは, 酢酸塩を含む血小板保存液は血小板の活性化に関連していること, 酢酸塩がアセチル CoA へ変換されるときに ATP を必要とするため逆に, ATP レベルを低下させてしまうことを示している¹³⁾。さらに研究が必要であるが, BRS-A はより効果的に血小板品質を維持できる可能性がある。

血小板保存液の進歩とは対照的に, 洗浄操作は自動化装置 (COBE 2991, テルモ BCT) を使用する一部の例外を除けば, 複雑な手作業が必要となる^{14)~17)}。最近, Tanaka らは中空糸カラムシステムを用いることにより, 高い血小板回収率 (約 97%) と低い血漿タンパク残存率 (1.4%) を達成できることを示している¹⁸⁾。我々は過去の研究で, 洗浄工程の大部分は, 血小板洗浄用にプログラムされた自動血球洗浄装置 (ACP215, ヘモネティクス) により自動化できることを報告したが, 遠心ボウル内壁に付着する血小板を回収するための手作業が必要であった¹⁸⁾。その後, この洗浄プログラムを改良し

完全自動化を達成している。洗浄を開始すると, BRS と ACD-A 液が 20:1 の比率で自動的に混合され BRS-A が調製される。最終的に遠心ボウル内にはほとんど血小板を残さずに, 製品バッグに洗浄血小板を得ることができる。日本赤十字社は 2016 年 3 月に洗浄血小板の製造販売承認を取得し, 2016 年 9 月から供給を開始している²¹⁾。

可溶性 CD40 リガンド (sCD40L) や血小板由来マイクロパーティクル (PDMP) など, 保存液に蓄積する免疫調節因子は, 血小板輸血に伴う有害反応を引き起こすおそれがある^{22)~24)}。Iwama らは, M-sol と BRS-A で洗浄した血小板の *in vitro* での品質を比較し, 大きな違いはないと結論付けている²⁵⁾。しかし, 血小板品質及び免疫調節因子の蓄積レベルに対して洗浄方法の違い (自動法と用手法) が影響するかどうかは不明である。本研究では, BRS-A を用いて自動法又は用手法で洗浄した血小板の *in vitro* 品質を評価した。さらに我々は, 保存液中の sCD40L, PDMP, 及び regulated upon activation of normal T-cell expressed and secreted (RANTES) の蓄積レベルを評価した。

材料及び方法

研究デザイン

5% 未満残存血漿下 BRS-A に保存した血小板について, 2 つの *in vitro* での評価を実施した。Study 1 と Study 2 は日本赤十字社東北ブロック血液センターで実施した。試験用のアフェレシス血小板は, 日本赤十字社のドナー選択ガイドラインに従って採血した。Study 1 では, 2 つの ABO 血液型が一致した血小板をプールした後分割することにより, 2 つの試験用血小板を得た。そのうちの 1 つは非洗浄のコントロール群とし, もう一方は BRS-A を保存液として自動血球洗浄装置 (ACP215) を用いて自動的に洗浄した。Study 2 では, Study 1 と同様に 2 つの ABO 血液型が一致した血小板をプールした後分割することにより, 2 つの試験用血小板を得た。1 つは BRS-A を保存液として用手法で洗浄し, もう一方は BRS-A を保存液として ACP215 を用いて自動的に洗浄した (Study 1 及び 2 で, それぞれ 8 例実施)。

重炭酸リンゲル液 (BRS)

ピカネイト[®]輸液 (5.84g NaCl, 0.30g KCl, 0.22g CaCl₂ · 2H₂O, 0.120g MgCl₂ · 6H₂O, 2.35g NaHCO₃, 及び 0.20g Na₃-citrate · 2H₂O in 1L; 大塚製薬工場) を保存液 BRS-A の調製に使用した。

アフェレシス血小板

試験用血小板は, 3 つのアフェレシス採血装置 (トリマ, テルシス S; テルモ BCT, CCS; ヘモネティクス) のいずれかを用いて採血した。ALT が高値のために輸血用血液としては適さない血小板を試験用血液として

用いた。血小板含有量は、血小板数に血小板容量（重量/比重 1.03）又は洗浄血小板容量（重量/比重 1.01）を乗じることによって計算した。血小板は血小板振とう機（20~24°C, 60 サイクル/分）で保存し、採血後 2 日以内に試験用血液として用いた。

Study 1 : 100% 血漿中に保存した血小板(コントロール群)と ACP215 を使用して BRS-A で洗浄した血小板 (テスト群) の比較

血小板の洗浄 (自動法)

ACP215 血小板洗浄ディスプレイキット (238J, ヘモネティクス) を ACP215 にセットし、2 本の 1L BRS 及び ACD-A 液をプラスチック製スパイク針でディスプレイキットに接続した。洗浄中に BRS と ACD-A 液は 20 : 1 の比率で混合され、洗浄ラインに組み込まれた 0.22 μ m のフィルターで濾過することにより無菌性を維持した。洗浄対象血小板は、秤量した後、無菌接合装置 (TSCD モデル 212, テルモ) を使用して指定のラインに接続した。次に全てのクランプを解放し、開始ボタンを押して自動洗浄を開始した。洗浄サイクルには、血小板への ACD-A 液添加、BRS-A による血漿の置換、分離ボウルからの血小板の回収、及び洗浄した血小板のポリオレフィンバッグ (KBP-1000FPN, 川澄化学工業) への充填が含まれており、途中で中断することなく完了した (約 26 分)。BRS-A で洗浄した血小板は、血小板振とう機 (20~24°C, 60 サイクル/分) で 7 日間保存した。

In vitro 試験

サンプル (約 3ml) を、血小板洗浄の前後 (0 日目) 及び保存して 1, 2, 3, 7 日後に、80ml の分離バッグ (BB-T008FJ, テルモ) を使用して無菌的に採取した。洗浄前後の血漿タンパクレベルは、ピシンコニン酸タンパク質測定キット (Pierce BCA プロテインアッセイキット, サーマフィッシャーサイエンティフィック) を用いて測定した。37°C での pH, 酸素及び二酸化炭素分圧 (pO₂ 及び pCO₂) は自動血液ガス分析装置 (ABL5, ラジオメーター) で測定した。重炭酸塩濃度は、pH 及び pCO₂ の値から自動的に計算された。

自動血液分析装置 (XS-1000i, シスメックス) を用いて血小板数及び平均血小板容積 (MPV : mean platelet volume) を測定した。グルコース測定キット (グルコース CII テストワコー, 和光純薬工業) 及び L-乳酸キット (ロシュ・ダイアグノスティックス) を用いて、グルコース濃度及び乳酸濃度を測定した。これらの測定のために、血小板サンプルを遠心分離し (10,000g, 5 分), 得られた上清を -40°C で保存した。凝集能及び低浸透圧ショック回復率 (HSR : hypotonic shock response) を測定するため、サンプルの血小板濃度を AB

型血漿で 3 \times 10¹¹/l に調整した。ブランクとサンプルの BRS-A に対する血漿の比率は同等とした。最終濃度 10 μ g/ml のコラーゲン (コラーゲンリエージェント Horm, Nycomed Pharma GmbH) に対する凝集反応を血小板凝集計 (MCM Hema Tracer, MC Medical) で記録した。HSR は、分光光度計 (Multiskan GO, サーマフィッシャーサイエンティフィック) を使用して測定した²⁶⁾。CD62P (P-セレクチン) 及び CD42b (glycoprotein Ib α) の発現レベルは既報に従いフローサイトメトリーにより検出した¹²⁾。血小板の GPIIb/IIIa 複合体上の立体配座エピトープの自発的発現を検出するために、マウスモノクローナル抗ヒト PAC-1 抗体を使用した²⁷⁾。サンプルを遠心分離 (10,000g, 22°C, 5 分) することにより得られた上清の PDMPs を、抗 GPIX 及び抗 GPIb モノクローナル抗体を用いた酵素結合免疫吸着測定 (ELISA) キット (PDMP ELISA キット, 蛋白精製工業) で検出した²⁸⁾。

サンプルの遠心 (10,000g, 5 分, 20°C) 上清中の RANTES, sCD40L, IgA, 及びハプトグロビンは、ELISA キット (Human RANTES Instant ELISA kit, Human sCD40L Instant ELISA kit, Human IgA ELISA Ready Set Go! Kit, eBioscience ; Human Haptoglobin Quantikine ELISA Kit, R&D Systems) を使用して測定した。

スワーリングは目視で検査し、0 (スワーリングなし), +, ++, または +++ (スワーリング最大) として評価した²⁹⁾。血小板外膜へのホスファチジルセリン露出は、製造元のプロトコールに従って、Annexin V-fluorescein isothiocyanate (FITC Annexin V, BD Bioscience Pharmingen) の結合をフローサイトメトリーによって測定した。ミトコンドリア膜電位 (MMP : mitochondrial membrane potential) の検出には、測定キット (MitoProbe JC-1 Assay Kit, サーマフィッシャーサイエンティフィック) を使用した。血小板サンプルはリン酸緩衝生理食塩水を加えて 500 倍に希釈した。JC-1 の原液を最終濃度 0.8 μ mol/l となるように希釈して血小板サンプルに添加し、37°C で 30 分間インキュベートした。インキュベーション後、サンプルをフローサイトメーター (FACSCalibur, Becton Dickinson) で分析した。緑色蛍光 (FL1) 及び赤色蛍光 (FL2) の平均蛍光強度 (MFI : mean fluorescence intensity) は、デブリンを除外した前方及び側方散乱ゲーティングにより定義した血小板集団を用いて決定した。MFI の比 (FL2/FL1) を計算し MMP の指標とした。ATP 濃度は、ルシフェール 250 (キッコマンバイオケミファ) とルミノメーター (Lumitester C-110, キッコマンバイオケミファ) を用いて、製造元のプロトコールに従い測定した。

Table 1 Characteristics of PLTs in 100% plasma and pre- and post-washed with ACP215 system (Study 1)*

	100% Plasma PLTs (Control)	PLTs washed with ACP215 system (Test)	P value
PLT yield ($\times 10^{11}$ /bag)			
Prewash	2.20 \pm 0.26	2.36 \pm 0.25	<0.001
Postwash		2.16 \pm 0.22	
Platelet recovery (%)		91.5 \pm 1.9	
Volume (ml)			
Prewash	211 \pm 9	225 \pm 8	<0.001
Postwash		217 \pm 1	
Plasma protein (mg/bag)			
Prewash		13,448 \pm 1,373	
Postwash		163 \pm 35	
Plasma protein removal rate (%)		98.8 \pm 0.2	
IgA (mg/bag)			
Prewash		302.6 \pm 54.6	
Postwash		3.4 \pm 0.7	
IgA removal rate (%)		98.9 \pm 0.2	
Haptoglobin (mg/bag)			
Prewash		115.8 \pm 35.6	
Postwash		1.3 \pm 0.5	
Haptoglobin removal rate (%)		98.9 \pm 0.3	
CD62P expression (%)			
Prewash		14.3 \pm 3.6	
Postwash		15.8 \pm 2.9	
HSR (%)			
Prewash		78.6 \pm 4.7	
Postwash		61.7 \pm 6.5	

The statistical differences between control and test groups were determined using a two-tailed Student's t-test.

* The data represent means \pm standard deviation; n = 8.

HSR = hypotonic shock response, PLTs = platelets.

Study 2 : 用手法 (コントロール群) 及び ACP215 システム (テスト群) を用いて BRS-A で洗浄した血小板の比較

血小板の洗浄 (用手法)

血小板洗浄の直前に、既報に従い BRS-A を調製した¹²⁾。血小板洗浄のために、250ml BRS-A と 25ml ACD-A を血小板に加え、その混合物を遠心 (1,500g, 20 分, 22°C) した。分離スタンド (川澄化学工業) を用いて上清を除去し、BRS-A を添加して洗浄血小板の最終容量を約 215ml に調整した。ポリオレフィンバッグ (KBP-1000FPN, 川澄化学工業) 中の血小板ベレットを 30 分間静置した後、少なくとも 30 分間振とう (20~24°C, 60 サイクル/分) して再浮遊した。

血小板の洗浄 (自動法)

ACP215 システムによる自動洗浄は、Study 1 と同様に行った。

In vitro 品質試験

サンプリングと in vitro 品質試験は Study1 と同様に行った。

統計処理

結果は平均値 \pm 標準偏差 (SD : standard deviation) で示した。統計分析はエクセル 2013 (マイクロソフト) のアドインソフトである STATCELA (オーエムエス出

版) を用いて行った。コントロール群とテスト群の統計学的有意差を確認するために two-tailed paired Student's t-test で検定した (Table 1, 2)。コントロール群とテスト群の 7 日間保存中の血小板品質は、事後検定を Bonferroni test とした two-way analysis of variance with repeated measures で評価した (Table 3~6)。P < 0.05 のときに統計学的に有意であると判断した。

結 果

Study 1 100% 血漿中または ACP215 を用いて保存液 BRS-A で洗浄し保存した血小板の比較

ACP215 を用いて保存液 BRS-A で洗浄する前後の血小板及び 100% 血漿中の血小板の特長を Table 1 に示す。血小板数、HSR、MPV、凝集能、MMP、ATP、及び CD42b MFI の平均値は、7 日間の保存期間中、コントロール群とテスト群で同程度であった。1, 2, 及び 7 日目のテスト群の pH レベルはコントロール群よりも有意に高かった (Table 3)。洗浄の結果、テスト群のグルコース及び乳酸レベルはコントロール群よりも有意に低かった。1 日目及び 7 日目のテスト群の乳酸レベルは、コントロール群よりも有意に低かった (Table 3)。1, 2, 及び 7 日目のテスト群の重炭酸濃度は、コントロール群よりも有意に高かった (Table 3)。7 日目までにグ

Table 2 Characteristics of PLTs pre- and post-washed with a manual method and ACP215 system (Study 2)*

	PLTs washed with a manual method (Control)	PLTs washed with ACP215 system (Test)	P value
PLT count ($\times 10^{11}$ /bag)			
Prewash	2.18 \pm 0.12	2.19 \pm 0.11	0.3365
Postwash	2.05 \pm 0.09	1.97 \pm 0.09	<0.05
Platelet recovery (%)	94.11 \pm 3.76	89.98 \pm 2.29	<0.05
Volume (ml)			
Prewash	216.9 \pm 7.2	217.9 \pm 8.6	0.3328
Postwash	216.9 \pm 2.0	215.8 \pm 1.5	0.2958
Plasma protein (mg/bag)			
Prewash	14,440 \pm 475	14,578 \pm 605	0.2022
Postwash	240 \pm 51	142 \pm 24	<0.001
Plasma protein removal rate (%)	98.3 \pm 0.3	99.0 \pm 0.2	<0.001
IgA (mg/bag)			
Prewash	273 \pm 151	276 \pm 157	0.3478
Postwash	5 \pm 1	3 \pm 1	<0.001
IgA removal rate (%)	98.1 \pm 0.5	98.7 \pm 0.3	<0.001
Haptoglobin (mg/bag)			
Prewash	115 \pm 30	116 \pm 30	0.3253
Postwash	1.85 \pm 0.87	1.14 \pm 0.42	<0.05
Haptoglobin removal rate (%)	98.4 \pm 0.4	99.0 \pm 0.1	<0.01
CD62P expression (%)			
Prewash	12.8 \pm 4.1		
Postwash	27.4 \pm 9.3	18.6 \pm 6.4	<0.01
HSR (%)			
Prewash	74.4 \pm 3.3		
Postwash	61.2 \pm 5.4	62.0 \pm 5.8	0.7700

The statistical differences between control and test groups were determined using a two-tailed Student's t-test.

* The data represent means \pm standard deviation; n=8.

HSR = hypotonic shock response, PLTs = platelets.

ルコース消費及び乳酸産生がほぼ停止したため、グルコース消費及び乳酸産生速度は1日目から3日目までの間で計算した。テスト群のグルコース消費速度(1.49 \pm 0.22mmol/10¹²PLT)は、コントロール群(0.63 \pm 0.11 mmol/10¹²PLT)よりも有意に高かった(P<0.001)。テスト群の乳酸産生速度(2.84 \pm 0.43mmol/10¹²PLT)は、テスト群(1.22 \pm 0.17mmol/10¹²PLT)よりも有意に高かった(P<0.001)。洗浄直後のテスト群では一時的なスワーリングの低下が観察されたが、スワーリング最大値は全ての試験血小板で良好に維持されていた(data not shown)。テスト群のCD62P発現レベルは、コントロール群と同等かそれよりも低かった(Table 3)。1日目及び2日目のテスト群のPDMPレベルは、コントロール群のPDMPレベルよりも有意に高かった。2日目及び3日目のテスト群のRANTESレベルは、コントロール群よりも有意に低かった。2, 3, 及び7日目のテスト群におけるsCD40Lレベルは、コントロール群よりも有意に低かった(Table 4)。

研究2：手法とACP215システムを用いてBRS-Aで洗浄した血小板の比較

コントロール群における血小板回収率はテスト群よりも高かった(Table 2)。テスト群における残存血漿タンパク質レベルは、コントロール群よりも低かった。

このことは、テスト群における血漿タンパク、IgA、及びハプトグロビンの高い除去率を反映していた。テスト群における洗浄後CD62P発現レベルは、コントロール群より低かった。コントロール群及びテスト群におけるCD62P発現レベルは、洗浄前と比較して、それぞれ2.1倍及び1.5倍高かった(Table 5)。血小板数を除く全ての試験項目で有意差は認められなかった(Table 5)。7日目までにグルコース消費及び乳酸産生がほぼ停止したため、グルコース消費及び乳酸産生速度は1日目から3日目までの間で計算した。テスト群(1.46 \pm 0.25 mmol/10¹²PLT)のグルコース消費速度は、コントロール群(1.44 \pm 0.25mmol/10¹²PLT)と同等であった。テスト群(2.72 \pm 0.54mmol/10¹²PLT)の乳酸産生速度は、コントロール群(2.58 \pm 0.61mmol/10¹²PLT)より高かった(P<0.05)。洗浄直後の一時的な低下を除いて、最大スワーリングは両群において良好に維持されていた(data not shown)。テスト群のPDMPレベルはコントロール群よりも高かったが、RANTES及びsCD40Lレベルに有意差はなかった。

考 察

本研究では、BRS-Aを保存液としたACP215による血小板洗浄の実用性を評価するため、ACP215で洗浄し

Table 3 In vitro properties of PLTs in 100% plasma (control) and washed with ACP215 system (test) (Study 1)*

	Days after washing				P value
	Day 1	Day 2	Day 3	Day 7	
pH at 37°C					
Control	7.16 ± 0.03	7.14 ± 0.03	7.10 ± 0.04	6.85 ± 0.06	<0.001
Test	7.26 ± 0.07 †	7.24 ± 0.07 †	7.18 ± 0.07	7.50 ± 0.05 ‡	
pO ₂ (mmHg)					
Control	129.0 ± 11.6	133.1 ± 8.3	132.4 ± 11.8	139.3 ± 6.4	<0.001
Test	150.1 ± 6.9 ‡	153.9 ± 4.6 ‡	151.8 ± 8.1 ‡	152.6 ± 6.8	
pCO ₂ (mmHg)					
Control	32.4 ± 2.6	31.0 ± 2.6	30.6 ± 2.4	29.0 ± 2.6	<0.05
Test	35.9 ± 6.7	31.3 ± 3.9	29.3 ± 3.2	12.5 ± 1.4 ‡	
Glucose (mmol/l)					
Control	20.5 ± 1.6	19.7 ± 1.7	19.0 ± 1.7	15.4 ± 1.9	<0.001
Test	4.4 ± 0.2 ‡	2.7 ± 0.4 ‡	1.3 ± 0.5 ‡	0.0 ± 0.0 ‡	
Lactate (mmol/l)					
Control	5.4 ± 0.9	6.6 ± 0.9	7.9 ± 1.0	14.7 ± 1.7	<0.001
Test	3.1 ± 0.4 ‡	6.0 ± 0.7	8.5 ± 0.9	9.9 ± 0.6 ‡	
Bicarbonate (mmol/l)					
Control	11.3 ± 1.0	10.1 ± 1.0	9.0 ± 0.8	4.9 ± 1.0	<0.001
Test	15.4 ± 0.7 ‡	13.0 ± 1.1 ‡	10.5 ± 1.2	9.4 ± 0.9 ‡	
PLT count (× 10 ⁴ /μ)					
Control	104.9 ± 8.7	104.6 ± 9.0	103.9 ± 8.7	100.2 ± 10.0	NS
Test	98.6 ± 10.5	98.6 ± 9.9	97.1 ± 9.7	77.7 ± 11.4	
HSR (%)					
Control	73.3 ± 6.1	69.9 ± 5.6	69.4 ± 5.6	62.4 ± 6.7	NS
Test	66.6 ± 3.3	70.3 ± 5.6	71.6 ± 3.5	65.6 ± 5.8	
MPV (fl)					
Control	9.2 ± 0.7	9.2 ± 0.7	9.2 ± 0.6	9.5 ± 0.7	NS
Test	9.2 ± 0.7	9.3 ± 0.8	9.3 ± 0.8	10.3 ± 0.7	
Aggregation response (%)					
Collagen (10μg/ml)					
Control	66.1 ± 20.8	63.6 ± 19.8	59.3 ± 20.8	49.0 ± 14.4	NS
Test	67.3 ± 21.7	66.3 ± 16.9	65.5 ± 17.3	43.1 ± 16.9	
MMP (FL2/FL1)					
Control	5.2 ± 2.7	5.3 ± 2.4	5.1 ± 2.2	2.4 ± 0.8	<0.001
Test	3.7 ± 3.4	2.9 ± 1.6	1.9 ± 1.1	0.7 ± 0.3	
ATP (μmol/10 ¹¹ PLTs)					
Control	4.7 ± 1.4	4.7 ± 1.3	4.5 ± 0.9	4.1 ± 1.3	NS
Test	3.4 ± 0.9	3.6 ± 0.8	3.5 ± 0.7	3.2 ± 1.5	
CD62P (%)					
Control	16.6 ± 3.7	21.3 ± 5.2	27.9 ± 6.2	61.7 ± 6.3	<0.001
Test	19.5 ± 3.5	19.1 ± 2.1	19.2 ± 2.7 †	30.5 ± 3.3 ‡	
CD42b (MFI)					
Control	100.6 ± 18.6	108.2 ± 20.7	109.4 ± 21.1	130.2 ± 20.5	NS
Test	90.7 ± 22.8	97.8 ± 14.5	106.9 ± 11.3	112.1 ± 16.8 ‡	
Annexin V (%)					
Control	4.7 ± 1.3	6.9 ± 1.7	9.3 ± 3.0	22.9 ± 8.5	NS
Test	6.2 ± 1.6	5.8 ± 1.5	6.1 ± 2.3	24.6 ± 4.4	
PAC-1 (MFI)					
Control	5.5 ± 4.0	5.4 ± 4.0	4.9 ± 2.9	5.1 ± 3.3	NS
Test	6.4 ± 4.5	6.1 ± 4.2	5.7 ± 3.4	7.1 ± 5.1	

Obtained using a two-way analysis of variance with repeated measures indicating an overall difference between groups and days.

* Data represent mean ± standard deviation; n = 8.

† p < 0.05 and

‡ p < 0.01 on the same day, determined with post hoc Bonferroni correction for multiple comparisons.

HSR = hypotonic shock response; MFI = mean fluorescence intensity; MMP = mitochondrial membrane potential; MPV = mean platelet volume; NS = nonsignificant; PLTs = platelets.

た血小板を、100% 血漿に保存した血小板 (未洗浄) または用手法で洗浄した血小板の in vitro での品質と比較

した。Study 1 では、ACP215 で洗浄した血小板の品質は、少なくとも 3 日目までは 100% 血漿に保存した血

Table 4 Comparison of the accumulation levels of PDMP, RANTES, and sCD40L (Study 1)*

	Days after washing				P value
	Day 1	Day 2	Day 3	Day 7	
PDMP (U/10 ⁸ PLTs)					
Control	4.7±2.5	5.8±2.0	7.6±2.3	24.3±5.2	<0.001
Test	15.3±6.0‡	15.4±4.4‡	13.5±3.1	20.9±3.7	
RANTES (ng/ml)					
Control	70.7±22.3	91.3±13.5	112.8±28.3	144.1±28.0	<0.001
Test	41.4±5.0	47.9±5.5†	61.0±16.2‡	115.0±37.3	
sCD40L (ng/ml)					
Control	6.8±2.4	8.9±3.4	9.8±3.5	12.8±4.0	<0.001
Test	2.4±1.1	2.8±1.6‡	3.0±1.6‡	2.4±1.7†	

Obtained using a two-way analysis of variance with repeated measures indicating an overall difference between groups and days.

* Data represent mean ± standard deviation; n = 8.

† P < 0.05 and

‡ P < 0.01 on the same day, determined with post hoc Bonferroni correction for multiple comparisons.

NS = nonsignificant; PLTs = platelets; PDMPs = platelet-derived microparticles; RANTES = regulated upon activation of normal T-cell expressed and secreted; sCD40L = soluble CD40 ligand.

血小板よりも全体的に優れていた。Study 2 では、テスト群 (ACP215 洗浄) の残存タンパクレベルはコントロール群 (用手法) より低くなり、7 日間の保存期間中、品質に差は認められなかった。BRS-A を保存液とした自動法での洗浄は、血小板製剤中の血漿タンパクレベルをより低減できる可能性がある。

Study 2 では、用手法と ACP215 で洗浄した血小板回収率は、それぞれ 94.1 ± 3.8%、90.0 ± 2.3% であり、これは我々の過去の研究¹²⁾¹⁸⁾¹⁹⁾及び中空糸フィルター²⁰⁾以外の COBE2991 による自動洗浄を検討した以前の報告^{14)~17)}で得られたものに匹敵する。血小板回収率の低下は、洗浄工程中における血小板凝集の発生に起因することが報告されている³⁰⁾。ACP215 での洗浄では、血小板凝集は数分以内に完全に消失するが¹⁹⁾、これは保存液 BRS-A 中の抗凝固剤の量と ACP215 洗浄システムの物理的ストレスの程度が血小板洗浄に適しているためと考えられる。

用手法及び ACP215 で洗浄した血小板中の血漿タンパク、IgA、及びハプトグロビンレベルは同等であり、血小板輸血での血漿に起因する有害反応に対する抑制効果を示した研究で報告されている値よりも低かった^{11)14)~17)}。従って、ACP215 での洗浄により得られる血漿タンパクレベルであれば、血小板輸血関連の有害反応を抑制できる可能性がある。ハプトグロビンまたは IgA 欠損患者では、血小板製剤中のハプトグロビンまたは IgA レベルを可能な限り減らすために、血小板を複数回洗浄する必要がある³¹⁾³²⁾。ACP215 での洗浄で得られる残存血漿タンパクレベルは、ハプトグロビンまたは IgA 欠損患者の血小板輸血に伴う有害反応を予防できる可能性がある。

一般に、用手法でも自動法でも血小板活性化は誘導

される。Schoenfeld らは血小板を生理食塩液を用いて用手法で洗浄すると、血小板表面 CD62P 発現率が 3 倍になることを示している³³⁾。血球処理装置 COBE 2991 での洗浄において、Veeraputhiran et al³⁰⁾は、生理食塩液及び neutral calcium - free Ringer's acetate で洗浄した血小板の CD62P 発現率が洗浄前と比較して 1.4 倍上昇したことを示した。ACP215 での洗浄に関する我々の過去の研究では、M-sol で洗浄した血小板の CD62P 発現率は洗浄前より 1.6 倍高く、2.2 倍の増加を示した用手法よりも低かったことを報告している¹⁸⁾。本研究では ACP215 で 1.5 倍の増加、用手法では 2.1 倍の増加が認められた。これは、ACP215 での BRS-A を用いた洗浄の shear stress は用手法よりも少ないことを示している。従って、ACP215 での洗浄により誘導された血小板活性化の程度は許容できる範囲であると考えられる。保管中の血小板数の減少は、微小凝集、血小板劣化、または integrity の喪失に起因している可能性がある。しかし、保存中の両群の活性化マーカー CD62P 発現率は同等であったため正確な原因は不明である。

洗浄血小板の pH レベルは 7 を超えたままであったが、100% 血漿に保存した血小板の保存 7 日後における pH 低下は、重炭酸塩の枯渇による乳酸からの H⁺ 過剰蓄積によるものと考えられる。緩衝剤としてリン酸ナトリウムの代わりに重炭酸塩を使用すると、より安定した pH が得られる³⁴⁾。BRS-A 中の重炭酸塩は、7 日間保存中の pH 安定化に寄与している可能性が高い。Study 1 と Study 2 では、洗浄血小板のグルコースは 7 日目に枯渇しており、それを反映して 7 日目以降は乳酸産生が抑制されている。保存 1 日目から 3 日目までのテスト群における pH 上昇は、二酸化炭素の放出によるものである。保存 7 日目に pH がさらに上昇しているのは、

Table 5 In vitro properties of PLTs washed with a manual method (control) and ACP215 system (test) (Study 2)*

	Days after washing				P value
	Day 1	Day 2	Day 3	Day 7	
pH at 37°C					
Control	7.28 ± 0.05	7.30 ± 0.06	7.25 ± 0.09	7.46 ± 0.04	NS
Test	7.30 ± 0.04	7.30 ± 0.04	7.23 ± 0.08	7.51 ± 0.05	
pO ₂ (mmHg)					
Control	151.0 ± 5.5	159.8 ± 6.0	160.8 ± 13.9	157.0 ± 4.4	NS
Test	156.1 ± 7.2	161.3 ± 6.2	157.9 ± 5.0	160.9 ± 5.6	
pCO ₂ (mmHg)					
Control	33.8 ± 3.7	27.6 ± 2.7	26.0 ± 2.1	11.5 ± 1.0	NS
Test	33.4 ± 3.2	28.6 ± 1.4	28.1 ± 1.7	11.1 ± 1.2	
Glucose (mmol/l)					
Control	5.12 ± 0.34	3.50 ± 0.53	2.15 ± 0.83	0.00 ± 0.01	NS
Test	4.85 ± 0.33	3.27 ± 0.36	1.90 ± 0.58	0.01 ± 0.01	
Lactate (mmol/l)					
Control	2.69 ± 0.62	5.68 ± 1.06	8.33 ± 1.79	13.43 ± 1.21	NS
Test	2.70 ± 0.68	5.69 ± 0.99	8.41 ± 1.57	13.93 ± 1.57	
Bicarbonate (mmol/l)					
Control	15.5 ± 0.7	13.1 ± 0.8	11.1 ± 1.7	8.4 ± 0.5	NS
Test	16.0 ± 0.9	13.4 ± 1.0	11.4 ± 2.0	9.0 ± 1.2	
PLT count (× 10 ⁴ /μl)					
Control	96.0 ± 3.2	95.6 ± 3.5	94.8 ± 3.8	80.9 ± 6.4	< 0.001
Test	90.0 ± 3.7	90.6 ± 4.0	89.8 ± 3.3	74.0 ± 5.5	
HSR (%)					
Control	71.3 ± 7.6	70.6 ± 5.3	74.7 ± 6.7	59.4 ± 6.3	NS
Test	75.1 ± 6.5	72.8 ± 4.5	75.8 ± 5.3	61.2 ± 7.7	
MPV (fl)					
Control	8.9 ± 0.3	8.9 ± 0.2	8.7 ± 0.4	9.5 ± 0.4	NS
Test	8.9 ± 0.3	9.0 ± 0.2	8.9 ± 0.4	9.9 ± 0.4	
Aggregation response (%)					
Collagen (10μg/ml)					
Control	52.6 ± 5.1	46.0 ± 10.3	47.5 ± 8.4	28.6 ± 9.2	NS
Test	46.9 ± 7.6	47.5 ± 6.8	46.3 ± 4.3	24.9 ± 7.6	
MMP (FL2/FL1)					
Control	3.3 ± 1.4	2.3 ± 0.7	1.7 ± 1.4	0.6 ± 0.2	NS
Test	2.2 ± 0.6	2.4 ± 1.2	1.0 ± 0.3	0.5 ± 0.1	
ATP (μmol/10 ¹¹ PLTs)					
Control	3.6 ± 0.8	3.6 ± 1.2	3.7 ± 1.3	3.0 ± 0.8	NS
Test	3.7 ± 1.0	3.6 ± 0.9	3.7 ± 1.2	2.9 ± 0.8	
CD62P (%)					
Control	19.5 ± 6.6	17.5 ± 5.8	17.2 ± 5.9	28.1 ± 5.5	NS
Test	20.3 ± 6.2	17.9 ± 6.3	17.9 ± 6.3	27.6 ± 8.0	
CD42b (MFI)					
Control	85.7 ± 19.3	95.8 ± 13.5	103.5 ± 16.0	114.2 ± 34.7	NS
Test	82.9 ± 10.6	88.7 ± 12.5	96.8 ± 11.8	96.5 ± 32.4	
Annexin V (%)					
Control	5.2 ± 1.5	8.0 ± 4.5	7.8 ± 3.3	18.2 ± 6.2	NS
Test	7.7 ± 2.4	9.5 ± 4.4	8.5 ± 5.0	24.0 ± 4.4	
PAC-1 (MFI)					
Control	8.7 ± 3.7	7.6 ± 2.7	7.4 ± 2.8	8.2 ± 2.9	NS
Test	8.9 ± 3.6	7.7 ± 2.9	7.9 ± 3.5	8.8 ± 3.1	

Obtained using a two-way analysis of variance with repeated measures indicating an overall difference between groups and days.

* Data represent mean ± standard deviation; n = 8.

ATP = adenosine triphosphate; HSR = hypotonic shock response; MFI, mean fluorescence intensity; MMP = mitochondrial membrane potential; MPV = mean platelet volume; NS = nonsignificant; PLT = platelet.

乳酸産生の停止に伴い H⁺産生も停止し、その結果重炭酸イオン濃度が上昇したためと考えられる。

JC-1 を添加した血小板の FL2/FL1 比は、MMP を反

映する信頼性が高く鋭敏な指標である³⁵⁾。血小板保存障害が起こると、MMP 喪失とホスファチジルセリン露出が認められることが報告されている³⁶⁾。Study 1 では、

Table 6 Comparison of the accumulation levels of PDMP, RANTES, and sCD40L (Study 2)*

	Days after washing				P value
	Day 1	Day 2	Day 3	Day 7	
PDMP (U/10 ⁸ PLTs)					
Control	6.1 ± 1.6	8.2 ± 3.2	6.4 ± 1.5	11.3 ± 3.3	<0.001
Test	16.6 ± 3.4 ‡	16.5 ± 2.6 ‡	14.9 ± 2.7 ‡	24.1 ± 6.1 ‡	
RANTES (ng/ml)					
Control	35.4 ± 7.2	44.4 ± 9.2	53.6 ± 12.1	96.9 ± 21.0	NS
Test	35.8 ± 9.1	47.4 ± 7.7	58.5 ± 13.8	100.5 ± 14.0	
sCD40L (ng/ml)					
Control	1.6 ± 1.0	2.4 ± 1.3	3.1 ± 1.3	3.3 ± 1.4	NS
Test	1.9 ± 0.9	2.7 ± 1.1	3.1 ± 1.3	2.2 ± 1.2	

Obtained using a two-way analysis of variance with repeated measures indicating an overall difference between groups and days.

* Data represent mean ± standard deviation; n = 8.

‡ P < 0.01 on the same day, determined with post hoc Bonferroni correction for multiple comparisons.

NS = nonsignificant; PLTs = platelets; PDMPs = platelet-derived microparticles; RANTES = regulated upon activation of normal T-cell expressed and secreted; sCD40L = soluble CD40 ligand.

テスト群の MMP (FL2/FL1) レベルは保存中のコントロール群より低かったが、テスト群のアネキシン V 結合率 (%) (ホスファチジルセリン露出) は 3 日目のコントロール群より低かった。これらの結果は、MMP の維持が必ずしもアネキシン V 結合率 (%) の低下に関与していないことを表している。この理由は、ミトコンドリア外側の細胞質における解糖が活発であり、少なくとも 3 日間は血小板品質を維持できる ATP レベルを保っているためと考えられる。

PDMP は保存中の血小板製剤中に認められる³⁷⁾。物理的に高い shear stress はプロテインキナーゼ C の活性化を誘導して PDMP 産生を促進する³⁸⁾。Xie らは、PDMP が CD40L によるシグナル伝達の担体になることにより、多形核白血球を介したヒト肺微小血管内皮細胞損傷を促進し、輸血関連急性肺損傷 (TRALI: transfusion-related acute lung injury) の発症に影響を与えるおそれがあることを示した³⁹⁾。本研究では、ACP215 システム (自動法) で洗浄された血小板の PDMP は、100% 血漿や的手法よりも高くなっている。これは ACP215 処理の物理的ストレスが血小板膜の安定性に影響していることを表している。しかし、洗浄血小板では、時間依存的な PDMP の増加は保存 3 日間までは観察されなかった。そのため、血小板膜に対する洗浄中の物理的負荷の影響は一過性であると考えられる。本研究では、PDMP を GPIb 及び GPIX に対する 2 つのモノクローナル抗体を用いた二重染色に基づく ELISA で測定した。フローサイトメトリーと対照的に、ELISA はより簡便で再現性のある結果をもたらす²⁸⁾。しかし、GPIb は保存中に裂けて脱落することが知られており、それは PDMP 総数を過小評価につながるおそれがある。従って、洗浄 (手法又は ACP215 を使用) 又は未洗浄の shear stress の違いが ELISA による PDMP 測定精度の低下に

つながるおそれがある。PDMP の別な測定方法を確立し、血小板製剤の PDMP とアレルギー性反応との関係を明らかにするためには、さらに研究が必要である。

39kDa の膜貫通型糖タンパク CD40L は血小板に発現しており、切断によってリリースされ、血小板製剤中に蓄積する⁴⁰⁾。CD40 によって活性化されるシグナル伝達経路は炎症と血栓症を調節する⁴¹⁾。また血小板保存中に蓄積する sCD40L は、粘着性多形核白血球を活性化し、血管内皮損傷により TRALI に関与するおそれがある⁴²⁾。さらに、血小板の sCD40L は、発熱、急性輸血反応、及び TRALI を誘発するおそれがある⁴³⁾⁴⁴⁾。ACP215 システムで洗浄した血小板中の sCD40L レベルは、7 日間保存中用手法と同等であり、100% 血漿中の血小板よりも低かった。これは血漿中の sCD40L の効率的な除去によるものであると考えられる。これは、BRS-A による血小板の保存は、血小板機能維持と血漿中の sCD40L によるアレルギー反応抑制の両方に寄与することを示している。

我々の研究における限界の 1 つ目は in vivo データの欠如である。最近、小林らは、手法で血小板を BRS-A 洗浄することで、原発性血液疾患及び悪性疾患の小児に対して輸血効果を失うことなくアレルギー性輸血反応を予防できることを示唆している⁴⁵⁾。Fujiwara らは、日本赤十字社が供給する洗浄血小板は輸血反応の既往のある患者にとって有効かつ安全であることを証明した²¹⁾。ACP215 を用いて BRS-A で洗浄した血小板の臨床的有効性を明らかにするためには、さらなる前向き研究が必要である。限界の 2 つ目は、Study 1 と Study 2 における凝集反応のベースラインが異なることである。これは、アフエレシス装置の違い、血小板の個体差、及びコラーゲン試薬のロット間の違いが凝集反応に影響を及ぼしていると考えられる。

結論として、クローズドシステム自動血球洗浄装置 ACP215 は、血小板を問題なく洗浄することができ、洗浄済の血小板を BRS-A に浮遊して保管することでその品質を維持することができる。さらに、人的エラーの回避や洗浄血小板の調製に要する時間の短縮に貢献できる可能性がある。臨床的影響度は不明だが、この BRS-A を用いた自動法による洗浄は、RANTES と sCD40L のレベルに影響を及ぼさず、その後保存 3 日目までは、PDMP, RANTES, 及び sCD40L の経時的な蓄積はほとんど認められなかった。Johnson⁴⁶⁾らは、血小板アポトーシス（アネキシン V の結合）は、保存が長期に渡る場合に引き起こされることを示しているが、これは保存液中のグルコースの枯渇に関連しているおそれがある。この報告のように、本研究においてもグルコースの枯渇に伴い、保存 7 日目にアネキシン V の結合が大幅に増加し、凝集反応及び HSR が低下することを示した。BRS-A で洗浄血小板を保存する場合、有効期間である製造後 48 時間の間は高い品質を保っていると考えられる。

著者の COI 開示：及川伸治、峯岸正好、遠藤希美加、川島航、小砂子智、大山正則、鈴木光、清水博；日本赤十字社職員

謝辞：松本幸子、佐藤秀一（以上、ヘモネティクス合同会社）、及び Dominique Uhlmann (Haemonetics Corp.) の技術的な助言に感謝します。

文 献

- 1) Tobian AA, Savage WJ, Tisch DJ, et al: Prevention of allergic transfusion reactions to platelets and red blood cells through plasma reduction. *Transfusion*, 51: 1676—1683, 2011.
- 2) Blumberg N, Heal JM, Rowe JM: A randomized trial of washed red blood cell and platelet transfusions in adult acute leukemia. *BMC Blood Disord*, 4: 6, 2004.
- 3) Greener D, Henrichs KF, Liesveld JL, et al: Improved outcomes in acute myeloid leukemia patients treated with washed transfusions. *Am J Hematol*, 92: E8—E9, 2017.
- 4) Sahai T, Henrichs K, Refaai M, et al: ABO identical and washed blood transfusions as candidate strategies to reduce early mortality in acute promyelocytic leukemia. *Leuk Res*, 62: 1—3, 2017.
- 5) Gulliksson H: Platelet storage media. *Vox Sang*, 107: 205—212, 2014.
- 6) Gulliksson H, AuBuchon JP, Cardigan R, et al: Storage of platelets in additive solutions: a multicentre study of the in vitro effects of potassium and magnesium. *Vox Sang*, 85: 199—205, 2003.
- 7) Gulliksson H, AuBuchon JP, Vesterinen M, et al: Storage of platelets in additive solutions: a pilot in vitro study of the effects of potassium and magnesium. *Vox Sang*, 82: 131—136, 2002.
- 8) Radwanski K, Wagner SJ, Skripchenko A, et al: In vitro variables of apheresis platelets are stably maintained for 7 days with 5% residual plasma in a glucose and bicarbonate salt solution, PAS-5. *Transfusion*, 52: 188—194, 2012.
- 9) Gravemann U, Volgmann T, Min K, et al: In vitro variables of buffy coat-derived platelet concentrates with residual plasma of down to 10% are stably maintained in new-generation platelet additive solutions. *Transfusion*, 55: 1700—1709, 2015.
- 10) Hirayama J, Azuma H, Fujihara M, et al: Storage of platelets in a novel additive solution (M-sol), which is prepared by mixing solutions approved for clinical use that are not especially for platelet storage. *Transfusion*, 47: 960—965, 2007.
- 11) 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.
- 12) Oikawa S, Sasaki D, Kikuchi M, et al: Comparative in vitro evaluation of apheresis platelets stored with 100% plasma versus bicarbonated Ringer's solution with less than 5% plasma. *Transfusion*, 53: 655—660, 2013.
- 13) Saunders C, Rowe G, Wilkins K, et al: Impact of glucose and acetate on the characteristics of the platelet storage lesion in platelets suspended in additive solutions with minimal plasma. *Vox Sang*, 105: 1—10, 2013.
- 14) Kalmin ND, Brown DJ: Platelet washing with a blood cell processor. *Transfusion*, 22: 125—127, 1982.
- 15) Buck SA, Kickler TS, McGuire M, et al: The utility of platelet washing using an automated procedure for severe platelet allergic reactions. *Transfusion*, 27: 391—393, 1987.
- 16) Vesilind GW, Simpson MB, Shifman MA, et al: Evaluation of a centrifugal blood cell processor for washing platelet concentrates. *Transfusion*, 28: 46—51, 1988.
- 17) Pineda AA, Zylstra VW, Clare DE, et al: Viability and functional integrity of washed platelets. *Transfusion*, 29: 524—527, 1989.
- 18) Oikawa S, Sasaki D, Kikuchi M, et al: Feasibility of a closed-system cell processor (ACP215) for automated preparation of washed platelet concentrates. *Vox Sang*, 102: 110—115, 2012.

- 19) Oikawa S, Minegishi M, Endo K, et al: Washing of platelets can be fully automated using a closed-system cell processor and BRS-A platelet additive solution. *Vox Sang*, 111: 437—440, 2016.
- 20) Tanaka S, Hayashi T, Sugaya S, et al: A hollow-fibre column system to effectively prepare washed platelets. *Vox Sang*, 109: 239—247, 2015.
- 21) Fujiwara SI, Fujishima N, Kanamori H, et al: Released washed platelet concentrates are effective and safe in patients with a history of transfusion reactions. *Transfus Apher Sci*, 57: 746—751, 2018.
- 22) Cognasse F, Sut C, Fromont E, et al: Platelet soluble CD 40-Ligand level is associated with transfusion adverse reactions in a mixed threshold and hit model. *Blood*, 130: 1380—1383, 2017.
- 23) Hamzeh-Cognasse H, Damien P, Nguyen KA, et al: Immune-reactive soluble OX40 ligand, soluble CD40 ligand, and interleukin-27 are simultaneously over-secreted in platelet components associated with acute transfusion reactions. *Transfusion*, 54: 613—625, 2014.
- 24) Provost P: The clinical significance of platelet microparticle-associated microRNAs. *Clin Chem Lab Med*, 55: 657—666, 2017.
- 25) Iwama A, Hirayama J, Nogawa M, et al: Comparison between in vitro properties of washed platelet concentrates suspended in M-sol and those in BRS-A, both of which were prepared with an automated cell processor. *Transfus Apher Sci*, 56: 241—244, 2017.
- 26) 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. *Biomedical Excellence for Safer Transfusion Working Party of the International Society of Blood Transfusion. Transfusion*, 38: 31—40, 1998.
- 27) Terada C, Mori J, Okazaki H, et al: Effects of riboflavin and ultraviolet light treatment on platelet thrombus formation on collagen via integrin α IIb β 3 activation. *Transfusion*, 54: 1808—1816, 2014.
- 28) Osumi K, Ozeki Y, Saito S, et al: Development and assessment of enzyme immunoassay for platelet-derived microparticles. *Thromb Haemost*, 85: 326—330, 2001.
- 29) Bertolini F, Murphy S: A multicenter evaluation of reproducibility of swirling in platelet concentrates. *Biomedical Excellence for Safer Transfusion (BEST) Working Party of the International Society of Blood. Transfusion*, 34: 796—801, 1994.
- 30) Veeraputhiran M, Ware J, Dent J, et al: A comparison of washed and volume-reduced platelets with respect to platelet activation, aggregation, and plasma protein removal. *Transfusion*, 51: 1030—1036, 2011.
- 31) Sandler SG: How I manage patients suspected of having had an IgA anaphylactic transfusion reaction. *Transfusion*, 46: 10—13, 2006.
- 32) Tanaka Y, Ohishi K, Yonekawa T, et al: Effect of washing solution on platelet counts following transfusion with twice-washed platelets: a single-patient experience. *Transfus Med*, 20: 358—360, 2010.
- 33) Schoenfeld H, Muhm M, Doepfmer U, et al: Platelet activity in washed platelet concentrates. *Anesth Analg*, 99: 17—20, 2004.
- 34) Radwanski K, Min K: The role of bicarbonate in platelet additive solution for apheresis platelet concentrates stored with low residual plasma. *Transfusion*, 53: 591—599, 2013.
- 35) Verhoeven AJ, Verhaar R, Gouwerok E, et al: The mitochondrial membrane potential in human platelets: a sensitive parameter for platelet quality. *Transfusion*, 45: 82—89, 2005.
- 36) Albanyan AM, Marrison P, Murphy MF, et al: Markers of platelet activation and apoptosis during storage of apheresis- and buffy coat-derived platelet concentrates for 7 days. *Transfusion*, 49: 108—117, 2009.
- 37) Rank A, Nieuwland R, Liebhardt S, et al: Apheresis platelet concentrates contain platelet-derived and endothelial cell-derived microparticles. *Vox Sang*, 100: 179—186, 2011.
- 38) Miyazaki Y, Nomura S, Miyake T, et al: High shear stress can initiate both platelet aggregation and shedding of procoagulant containing microparticles. *Blood*, 88: 3456—3464, 1996.
- 39) Xie RF, Hu P, Wang ZC, et al: Platelet-derived microparticles induce polymorphonuclear leukocyte-mediated damage of human pulmonary microvascular endothelial cells. *Transfusion*, 55: 1051—1057, 2015.
- 40) Henn V, Steinbach S, Büchner K, et al: The inflammatory action of CD40 ligand (CD154) expressed on activated human platelets is temporally limited by coexpressed CD40. *Blood*, 98: 1047—1054, 2001.
- 41) Henn V, Slupsky JR, Gräfe M, et al: CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature*, 391: 591—594, 1998.

- 42) Khan SY, Kelher MR, Heal JM, et al: Soluble CD40 ligand accumulates in stored blood components, primes neutrophils through CD40, and is a potential cofactor in the development of transfusion-related acute lung injury. *Blood*, 108: 2455—2462, 2006.
- 43) Phipps RP, Kaufman J, Blumberg N: Platelet derived CD 154 (CD40 ligand) and febrile responses to transfusion. *Lancet*, 357: 2023—2024, 2001.
- 44) Hamzeh-Cognasse H, Damien P, Nguyen KA, et al: Immune-reactive soluble OX40 ligand, soluble CD40 ligand, and interleukin-27 are simultaneously over-secreted in platelet components associated with acute transfusion reactions. *Transfusion*, 54: 613—625, 2014.
- 45) Kobayashi J, Yanagisawa R, Ono T, et al: Administration of platelet concentrates suspended in bicarbonated Ringer's solution in children who had platelet transfusion reactions. *Vox Sang*, 113: 128—135, 2017.
- 46) Johnson L, Schubert P, Tan S, et al: Extended storage and glucose exhaustion are associated with apoptotic changes in platelets stored in additive solution. *Transfusion*, 56: 360—368, 2016.

IMPACT OF THE PLATELET WASHING PROCESS ON IN VITRO PLATELET PROPERTIES, AND THE LEVELS OF SOLUBLE CD40 LIGAND AND PLATELET-DERIVED MICROPARTICLES IN THE STORAGE MEDIA

*Shinji Oikawa*¹⁾²⁾, *Masayoshi Minegishi*³⁾, *Kimika Endo*¹⁾⁴⁾, *Wataru Kawashima*¹⁾⁵⁾, *Satoshi Kosunago*¹⁾, *Masanori Oyama*¹⁾, *Ko Suzuki*⁴⁾ and *Hiroshi Shimizu*¹⁾

¹⁾Japanese Red Cross Tohoku Block Blood Center

²⁾Japanese Red Cross Miyagi Blood Center

³⁾Japanese Red Cross Fukushima Blood Center

⁴⁾Central Blood Institute, Blood Service Headquarters, Japanese Red Cross Society

⁵⁾Blood Service Headquarters, Japanese Red Cross Society

Keywords:

platelet additive solution, washed platelet, bicarbonated Ringer's solution, soluble CD40 ligand (sCD40L), platelet-derived microparticle (PDMP)