

重炭酸リンゲル液による血小板製剤の2回洗浄は血小板製剤の品質を維持しつつ 血漿タンパクレベルを大幅に低減する

及川 伸治 峯岸 正好 遠藤希美加 川島 航 小砂子 智
室川 宏之 鈴木 光 清水 博

キーワード：Immunoglobulin A, ハプトグロビン, 洗浄血小板, 2回洗浄

本論文内容は、Elsevier社の許可のもと *Transfusion and Apheresis Science* 誌 (2016; 55: 344—346) 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, Hiroyuki Murokawa, Ko Suzuki, Hiroshi Shimizu: Washing platelets twice with a bicarbonated Ringer's solution significantly reduces plasma protein levels while maintaining platelet quality.)

Transfusion and Apheresis Science 誌への掲載からすでに4年経過しているが、日本赤十字社による洗浄血小板の製造販売開始後も、洗浄血小板の院内調製が実施されている。そこで調製手技に関する本論文の情報が学会員にとって有用であると考え、本論文記事を作成した。

血小板輸血に伴う副反応防止のために前投薬を行った場合でも、重度のアレルギー反応等の副作用が発生することがある。Tobianらは、アフエシス血小板を洗浄することによりアレルギー反応を大幅に減らすことが可能であること、また製剤中の血漿成分がアレルギー反応の重要なトリガーであることを示している¹⁾。

日本では、血液センターは、血小板の洗浄を必要とする医療機関に技術協力を行っているが(本誌が出版される2020年時点では、洗浄血小板の技術協力は行っていない)、血小板添加液(PAS: platelet additive solution)の臨床使用は承認されていない(2016年3月に日本赤十字社は洗浄血小板の製造販売承認を取得している)。最近、我々は、輸液療法に臨床使用されている重炭酸リンゲル液(BRS: bicarbonated Ringer's solution)(ピカネイト輸液、大塚製薬工場)とacid-citrate-dextrose formula A(ACD-A)を用いて調製可能な新しいPASであるBRS-Aを開発した。この新規PASは、血漿残存5%未満で7日間保存中、血小板のin vitroでの品質を維持することが示されており²⁾、日本輸血・細胞治療学会のガイドラインに掲載されている³⁾。

IgA欠損患者の場合、血小板製剤中IgAレベルを可能な限り低減し重度のアレルギー反応のリスクを減らすために複数回の洗浄が必要になることがある⁴⁾⁵⁾。血小板製剤の洗浄手順は施設により異なるが、その目的はIgAレベルを0.05mg/dl未満に低下させることであ

る⁶⁾。アジアの集団では、ハプトグロビン欠損症の発生率はIgA欠損症よりも高いため、ハプトグロビン濃度が検出限界(3mg/dl未満)より低いハプトグロビン欠損症の日本人患者の輸血には、より注意する必要がある⁷⁾⁸⁾。田中らは、ハプトグロビン欠損患者用に調製された血小板の品質は、M-solでの2回洗浄またはA-solに続いてM-solで2回洗浄した後も維持されると報告している⁹⁾。しかし、BRS-Aで2回洗浄した血小板の品質については報告がない。本研究の目的は、血小板をBRS-Aで2回洗浄することの実行可能性を評価することである。

本研究では、100%血漿浮遊の血小板は、3種類の成分採血装置(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、日本赤十字社の採血基準にしたがい採血した。血小板は、血小板振とう機(60サイクル/分, 20~24℃)で保管し、採血後2日以内に洗浄することとした。ABO型が一致した2本の血小板を混合し、コントロール群とテスト群に均等に分割した。BRS-Aは既報にしたがい調製した²⁾。血小板洗浄は次のように行った。300ml BRS-Aと25ml ACD-Aをコントロール群とテスト群に添加し、その混合物を遠心した(1,500g, 20分, 22℃)。分離スタンドを使用して上清を除去し、最終容量が200mlに達するまでBRS-Aを添加した。血小板ペレットは、30分間静置後、血小板振とう機で少なくとも30分以上振とうす

Table 1 (a) Characteristics of platelets washed once (control) and twice (test) with BRS-A. (b) *In vitro* properties of control (washed once) and test (washed twice) platelets in BRS-A.

(a)	Control	Test	(b) Days after washing				p value ^c
			Day 1	Day 2	Day 3	Day 7	
Total plasma protein (mg/bag)							
Pre-wash	14,821 ± 1,107	14,782 ± 1,071					
Post-wash	241 ± 50	21 ± 4 ^b					
IgA (mg/bag)							
Pre-wash	236.54 ± 45.76	235.79 ± 49.50					
Post-wash	2.66 ± 0.65	0.06 ± 0.03 ^b					
Haptoglobin (mg/bag)							
Pre-wash	109.35 ± 36.64	109.11 ± 40.22					
Post-wash	1.79 ± 0.83	0.04 ± 0.03 ^a					
pH at 37°C							
Pre-wash	7.15 ± 0.05						
Post-wash	6.73 ± 0.02	6.76 ± 0.04					
Mean platelet volume (fl)							
Pre-wash	7.8 ± 0.6						
Post-wash	7.7 ± 0.6	7.8 ± 0.6					
Hypotonic shock response (%)							
Pre-wash	79.2 ± 7.5						
Post-wash	59.9 ± 6.0	53.4 ± 6.6					
CD62P expression (%)							
Pre-wash	8.4 ± 1.9						
Post-wash	17.0 ± 3.2	25.6 ± 5.2 ^a					
pH at 37°C							
Control			7.24 ± 0.05	7.20 ± 0.06	7.13 ± 0.05	7.49 ± 0.02	1.0000
Test			7.18 ± 0.08	7.17 ± 0.06	7.13 ± 0.04	7.58 ± 0.05	
pO ₂ (mmHg)							
Control			144 ± 8	146 ± 10	145 ± 7	154 ± 6	0.6906
Test			146 ± 9	146 ± 8	146 ± 8	157 ± 8	
pCO ₂ (mmHg)							
Control			37 ± 4	34 ± 5	32 ± 3	12 ± 1	0.8514
Test			41 ± 6	33 ± 4	29 ± 2	10 ± 1	
HCO ₃ ⁻ (mmol/l)							
Control			15.2 ± 0.4	12.7 ± 0.8	10.3 ± 0.5	8.8 ± 0.7	0.2339
Test			14.3 ± 0.9	11.8 ± 0.7	9.2 ± 0.7	9.8 ± 0.9	
Glucose (mmol/l)							
Control			4.81 ± 0.19	3.10 ± 0.29	1.64 ± 0.18	<0.02	<0.001
Test			3.90 ± 0.29 ^d	2.20 ± 0.38 ^d	0.75 ± 0.44 ^d	<0.03	
Lactate (mmol/l)							
Control			3.02 ± 0.32	5.81 ± 0.52	8.21 ± 0.54	10.09 ± 0.38	0.1375
Test			3.73 ± 0.67	6.63 ± 0.73	9.14 ± 0.84	9.42 ± 0.64	
Hypotonic shock response (%)							
Control			65.2 ± 4.5	68.6 ± 5.9	71.3 ± 4.5	60.5 ± 3.2	0.2898
Test			63.5 ± 5.0	66.4 ± 9.6	66.2 ± 4.4	57.1 ± 2.6	
Mean platelet volume (fl)							
Control			7.8 ± 0.5	7.8 ± 0.6	7.7 ± 0.6	8.5 ± 0.5	0.7480
Test			8.0 ± 0.5	7.8 ± 0.6	7.7 ± 0.5	8.6 ± 0.4	
CD62P (%)							
Control			14.2 ± 3.8	14.8 ± 3.3	13.3 ± 3.9	22.4 ± 5.7	0.8976
Test			17.1 ± 4.6	14.9 ± 2.9	13.1 ± 2.3	20.6 ± 4.8	
Platelet-derived microparticles (U/10 ⁸ platelets)							
Control			6.85 ± 1.85	7.30 ± 2.89	4.88 ± 0.81	11.28 ± 2.31	0.1647
Test			6.97 ± 1.81	6.99 ± 1.79	6.59 ± 1.84	14.07 ± 4.37	
sCD40L (ng/ml)							
Control			2.60 ± 1.23	4.33 ± 2.30	5.41 ± 2.57	4.14 ± 1.81	0.6482
Test			3.17 ± 1.65	4.17 ± 2.26	4.40 ± 2.42	2.60 ± 1.19	

Data represent mean ± SD (n = 6).

^a significantly different from control at p < 0.01.^b significantly different from control at p < 0.001.^c Obtained using a two-way analysis of variance with repeated measures indicating an overall difference between groups and days.^d p < 0.01 on the same day, determined with post hoc Bonferroni correction for multiple comparisons.

BSR-A, bicarbonated Ringer's solution supplemented with acid-citrate-dextrose formula A; Control, platelets washed once; Test, platelets washed twice.

ることにより再浮遊した(60 サイクル/分, 20~24°C). テスト群については, 再度, 300ml BRS-A 及び 25ml の ACD-A を添加し, その混合物を遠心した(1,500g, 20分, 22°C). 分離スタンドを使用して上清を除去し, 最終容量が 200ml に達するまで BRS-A を添加した. 両群の洗浄血小板はポリオレフィンバッグ (KBP-1000 FPN, 川澄化学工業) に充填し保管した. サンプル(約 2ml) は, 洗浄前後, 保管 1, 2, 3, 及び 7 日目に無菌的に分取した. 洗浄血小板の血漿タンパクレベル測定と in vitro 試験は既報にしたがい実施した²⁾. サンプルを遠心 (10,000×g, 5分, 22°C) して得られた上清中の血小板由来マイクロパーティクル, soluble CD 40 ligand (sCD40L), IgA, 及びハプトグロビンを, それぞれ PDMP ELISA キット(タンパク精製工業), Human sCD40L Instant ELISA キット (eBioscience), Human IgA ELISA Ready SET Go!® キット (eBioscience), 及び Human Haptoglobin Quantikine ELISA キット (R&D Systems) を用いて測定した. 保存中のコントロール群とテスト群の in vitro 品質の違いは, 事後検定を Bonferroni test とした two-way analysis of variance with repeated measures で評価した. 洗浄当日のコントロール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. $p < 0.05$ の場合に統計学的有意であると判断した.

洗浄当日, コントロール群及びテスト群の血小板数 ($\times 10^{11}$ /bag) は, それぞれ 2.11 ± 0.16 及び 2.05 ± 0.18 , 血小板回収率は $91.4 \pm 1.3\%$ 及び $89.0 \pm 1.4\%$, 容量 (ml) は 206.4 ± 1.5 及び 205.8 ± 1.1 ($n=6$) であった. 血漿タンパク, IgA, 及びハプトグロビンレベルの有意な減少がテスト群で認められた (Table 1). したがって本研究では, BRS-A で 2 回洗浄することで, 1 回洗浄より血漿タンパク, IgA, 及びハプトグロビンのレベルを大幅に低減できることが分かった. 特に IgA レベルは 0.06 ± 0.03 mg/bag (< 0.05 mg/dl) に減少した. したがって, IgA 欠損患者に投与する際は 2 回洗浄がより有効であると考えられる⁶⁾. 保管中, テスト群とコントロール群の両方でスワーリングは良好に維持され, 大きな違いはなかった. グルコースが 7 日目に枯渇したため, 1~3 日目までのグルコース消費割合と乳酸生成割合を求めた. コントロール群とテスト群のグルコース消費割合は, それぞれ, 1.48 ± 0.12 mmol/ 10^{12} PLT/day, 1.64 ± 0.15 mmol/ 10^{12} PLT/day であった ($p < 0.01$). コントロール群とテスト群の乳酸産生割合は, それぞれ, 2.48 ± 0.19 mmol/ 10^{12} PLT/day, 2.90 ± 0.27 mmol/ 10^{12} PLT/day であった ($p < 0.01$). これらの結果は, 2 回洗浄の物理的ストレスが 1 回洗浄よりも大きいために, グルコース消費が増加して血小板形態を回復させたことを示している. 乳酸産生の増加は, pH レベルに影響しなかつ

た (Table 1). 洗浄後の測定値はテスト群の活性化マーカー CD62P がコントロール群よりも高いことを示しているが, その後保存を継続することにより, 両群でその差はみられなくなった (Table 1).

したがって, 2 回洗浄による血小板の活性化は一時的であり, 血小板品質の大きな低下につながることはないと考えられる. 本研究の結果は, IgA やハプトグロビン等の血漿タンパクをより低減するために 2 回洗浄しても, 血小板の in vitro 品質が損なわれないことを示している.

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, 室川宏之, 鈴木光, 清水博 (日本赤十字社職員)

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) 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.
- 3) Japan Society of Transfusion Medicine and Cell Therapy: Indication guidance for washed and replaced platelets and their preparation, Version V presented, April 27, 2016. <http://yuketsujstmct.or.jp/wp-content/uploads/2016/05/IndicationVersion-V-003.pdf> (2016/6/10 accessed).
- 4) 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.
- 5) Sloand EM, Fox SM, Banks SM, et al: Preparation of IgA-deficient platelets. *Transfusion*, 30: 322—326, 1990.
- 6) Sandler SG: How I manage patients suspected of having had an IgA anaphylactic transfusion reaction. *Transfusion*, 46: 10—13, 2006.
- 7) Koda Y, Watanabe Y, Soejima M, et al: Simple PCR detection of haptoglobin gene deletion in anaphylactoidemic patients with anti-haptoglobin antibody that causes anaphylactic transfusion reactions. *Blood*, 95: 1138—1143, 2000.
- 8) Shimada E, Tadokoro K, Watanabe Y, et al: Anaphylactic transfusion reactions in haptoglobin-deficient patients with IgE and IgG haptoglobin antibodies. *Transfusion*, 42: 766—773, 2002.

- 9) 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.

WASHING PLATELETS TWICE WITH A BICARBONATED RINGER'S SOLUTION SIGNIFICANTLY REDUCES PLASMA PROTEIN LEVELS WHILE MAINTAINING PLATELET QUALITY

Shinji Oikawa, Masayoshi Minegishi, Kimika Endo, Wataru Kawashima, Satoshi Kosunago,

Hiroyuki Murokawa, Ko Suzuki and Hiroshi Shimizu

Japanese Red Cross Tohoku Block Blood Center

Keywords:

Immunoglobulin A, Haptoglobin, washed platelets , twice washing

©2020 The Japan Society of Transfusion Medicine and Cell Therapy

Journal Web Site: <http://yuketsu.jstmct.or.jp/>