

## 全血由来 PAS 置換血小板濃厚液の室温保存と冷蔵保存における品質の比較

藤原 満博<sup>1)</sup> 金敷 拓見<sup>1)</sup> 布施 久恵<sup>1)</sup> 有澤 史倫<sup>1)</sup> 若本志乃舞<sup>1)</sup>生田 克哉<sup>2)</sup> 秋野 光明<sup>1)</sup> 紀野 修一<sup>1)</sup>

全血から調製されるプール血小板濃厚液(PC)は、少子高齢化による献血者不足対策の一つとなる可能性がある。本検討では、自動血液分離機能を持つ欧州仕様大容量遠心機 TACSI を用い、400ml 全血から、血漿の一部を血小板保存液 (PAS) に置換したプール PAS-PC の調製を行い、21 日間にわたる室温 (22°C) または冷蔵 (4°C) 保存における品質を比較した。

バフィーコート (BC) 4 バッグのプール (n=4) では 10 単位以上、BC 5 バッグのプール (n=4) では 15 単位以上のプール PAS-PC が得られ、それぞれ本邦の PC の基準を満たした。プール PAS-PC の室温保存では、血小板凝集能、低浸透圧ショック回復率 (%HSR)、血餅形成能が保存 5 日目まで良好に保たれた。冷蔵保存では、%HSR が保存後早期から低下したが、凝集能や血餅形成能は 14 日目まで、室温保存 5 日目と同等に維持された。

以上より、欧州仕様 TACSI を用いることにより、400ml 採血全血から良好な品質をもつプール PAS-PC が得られることが確認された。また、冷蔵により 14 日間までは保存できる可能性が示唆された。

キーワード：プール血小板濃厚液, TACSI, 血小板保存液, T-PAS+, 冷蔵保存

## 緒 言

血小板濃厚液 (platelet concentrate : PC) には、成分採血由来 PC (apheresis PC : APC) と全血から調製されるプール PC (pooled PC) がある。プール PC の調製方法には全血の分画遠心方法の違いにより、buffy coat (BC) 法と platelet rich plasma (PRP) 法があり、前者は欧州にて、後者は米国にて主に実施されている。また、血小板はこれまで血漿に浮遊されてきたが、血小板の長期保存を目指して血漿に替わる血小板保存液 (platelet additive solution : PAS) の開発<sup>1)</sup>が行われ、血漿の一部を PAS に置換したプール PAS-PC や PAS-APC が欧米で広く用いられている。これらの PAS-PC では、血漿成分に由来する非溶血性輸血副反応の低減が報告され、一方で、PAS に置換した血漿は、輸血用製剤または分画製剤の原料に利用されている<sup>1)~3)</sup>。

血小板輸血の多くは、血小板減少症を伴う疾患での出血予防のため行われ、血中での生存期間の長い室温保存が血小板保存の標準となっている。一方、冷蔵保存では、血中での生存期間は短い<sup>4)</sup>が、細菌増殖抑制による細菌感染症リスクの低減<sup>5)</sup>と、室温保存に比べて止血に関する機能の向上あるいは長期維持<sup>6)~13)</sup>という利点がある。そのため、出血治療を対象とした有効期限延

長が期待されており、ノルウェーにおける冷蔵 PAS-PC の pilot trial や米国 Mayo Clinic での冷蔵 PAS-PC 使用において、長期間保存された冷蔵血小板の有用性が報告されている<sup>14)15)</sup>。

欧州では、血小板輸血に占めるプール PC と APC の比率は国ごとに大きく異なるが、欧州全体ではプール PC が半数を占め、その多くがプール PAS-PC である。本邦では PC の全てが APC ではあるが、将来的な少子高齢化における献血者不足および血小板製剤の安定的供給の方策として、プール PAS-PC の調製も一つの選択肢として考えることができる。我々は、自動血液分離機能を持つ大容量遠心機である欧州仕様 TACSI を用い、400ml 採血全血から良好な品質のプール PC を調製できることを既に報告している<sup>16)</sup>。本検討では、本邦における将来的な PAS-PC と冷蔵血小板製剤の調製の可能性を見据え、欧州仕様 TACSI を用いた 400ml 採血全血からのプール PAS-PC の調製を行い、室温および冷蔵長期保存における品質評価を行った。

## 方 法

## 1. プール PAS-PC の調製

プール PAS-PC の調製の概略を Fig. 1 に示した。献

1) 日本赤十字社北海道ブロック血液センター

2) 北海道赤十字血液センター

〔受付日：2023 年 4 月 23 日、受理日：2023 年 7 月 25 日〕

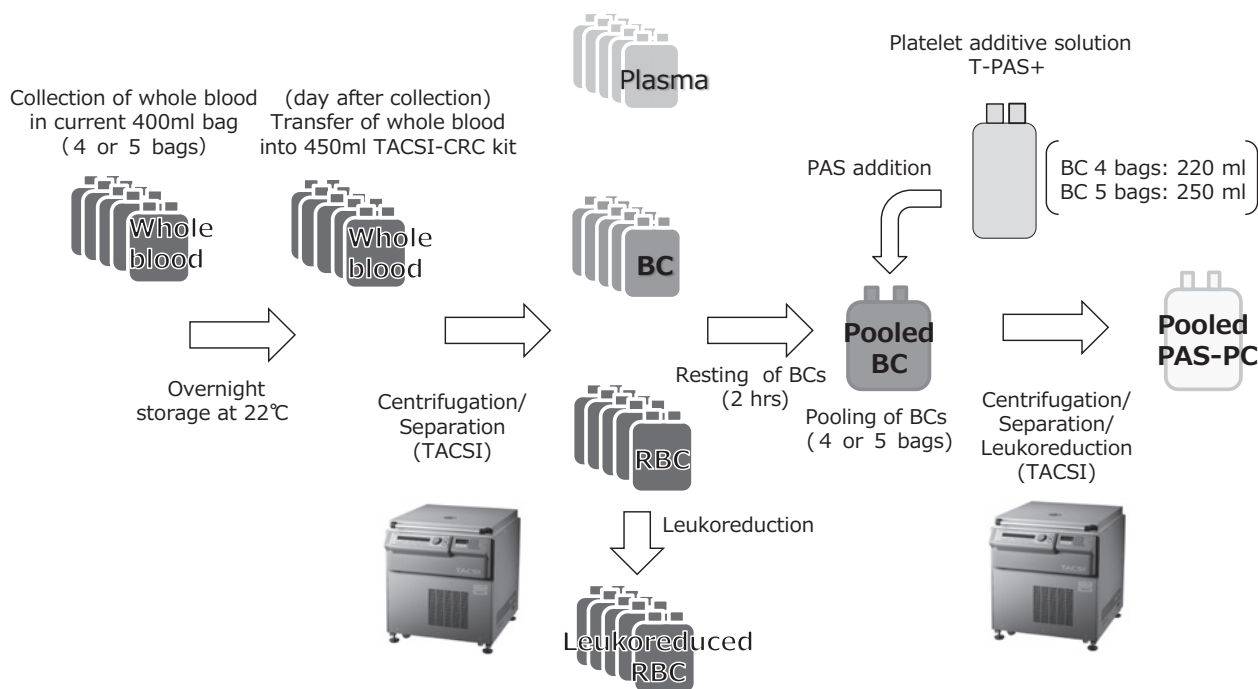


Fig. 1 Outline of pooled PAS-PC preparation in this study.

血同意説明書により、同意の得られた健常人ドナーから採血した全血 400ml (CPD 採血) の 4~5 バッグを 22°C に一晩保管した。なお、BC をプールするため、血液型は同型とした。採血翌日に、予め赤血球添加液 saline-adenine-glucose-mannitol を MAP に置換しておいた、450ml 全血用の TACSI CRC-Kit (Terumo BCT) に無菌的に移し替え、欧州仕様 TACSI (Terumo BCT) により一次遠心 (最大遠心力  $1,677 \times g$ , 22°C) し、赤血球、BC、血漿に分離した。BC は 2 時間、室温にて静置した。TACSI-PL-KIT (Terumo BCT) に BC 4 または 5 バッグと PAS (T-PAS+, Terumo BCT) を無菌接合してプール BC とし、欧州仕様 TACSI により二次遠心 (最大遠心力  $480 \times g$ , 22°C) し、プール PAS-PC を調製した。T-PAS+ の添加量は、血漿置換率 65% (血漿残存率 35%) を目標とし、BC 4 バッグの場合は 220ml, BC 5 バッグの場合は 250ml とした。また、プール PAS-PC の白血球除去 (白除) は、二次遠心工程において、Kit に付属する白除フィルターにより行われた。得られたプール PAS-PC は、X線 15Gy 照射 (MBR-1350A-TW, Hitachi Healthcare Systems, Inc.) した。プール PAS-PC 2 バッグを一旦プールした後、等分割し、調製後 day 21 (全血採血日を day 0 とし、プール PAS-PC 調製当日を day 1 とする) まで、一方は 22°C で振とう保存、他方は 4°C で静置保存した。なお、血小板保存には BC プーリングキットに付属する血小板保存バッグを用いた。

## 2. プール PAS-PC の長期保存試験

サンプリングポイントは、day 1, day 3, day 5, day 10, day 14, day 21 とした。Day 1 検体は、1. でプール PAS-PC 2 バッグを一旦プールしたバッグから採取した。以後、22°C および 4°C 保存のプール PAS-PC バッグより検体を採取した。なお、4°C 保存のプール PAS-PC は、22°C で 10 分間振とうさせた後、検体を採取した<sup>10)</sup>。プール PAS-PC の容量、血小板数、pH、グルコース濃度、低浸透圧ショック回復率 (%hypotonic shock response : %HSR)、血小板凝集能、混入赤血球濃度の測定はいずれも既報に従った<sup>16)17)</sup>。PAS-PC の容量は、血液バッグの総重量を計測して風袋重量を引き、比重 (g/ml) を 1.02 として除して求めた<sup>18)</sup>。%HSR、血小板凝集能、血小板形態、および血餅形成能の測定では、プール PAS-PC の調製時に得られた血漿で、PAS-PC を 30 万/μl に希釈して多血小板血漿 (platelet rich plasma : PRP) を調製し測定試料とした。%HSR は、PRP に半量の蒸留水を添加した時の 610nm における 5 分間の透過率の変化を分光光度計 U-2900 (日立) を用いて測定した。血小板凝集能においては、ADP (エル・エム・エス社)、Collagen (モリヤ産業社製)、Ristocetin (MP Biomedical LLC 社製)、TRAP-6 (Bachem AG 社製) の単独刺激および ADP と Collagen の同時刺激の際の最大凝集率を血小板凝集能とした。血小板形態は、大軒ら<sup>19)</sup> が報告したストップ&フロー法に従って測定した。この方法は、PRP の攪拌時 (800rpm) と静止時 (0rpm) の吸光度比 ( $E_{800}/E_0$ ) から血小板の形態を評価するもの

Table 1 Hematologic parameters in pooled PAS-PCs processed by the BC method using TACSI

Parameters	Number of BC	
	4	5
Volume (ml)	217 ± 12 (205-227)	249 ± 22 (218-267)
PLT yield (×10 <sup>11</sup> /bag)	2.94 ± 0.47 (2.31-3.32)	3.58 ± 0.51 (3.14-4.09)
PLT recovery (%) <sup>a</sup>	65.8 ± 4.6 (60.6-70.1)	71.0 ± 5.1 (64.5-75.6)
Residual WBC (×10 <sup>6</sup> /bag)	0.07 ± 0.11 (0.00-0.23)	0.03 ± 0.05 (0.00-0.10)
Residual RBC (/ $\mu$ l)	1.6 ± 0.6 (1.3-2.5)	21.3 ± 35.9 (1.9-75.0)

Data are shown as mean ± SD with range (n = 4).

$$^a\text{PLT recovery (\%)} = \frac{\text{Total PLTs in PLT bag}}{\text{Total PLTs in primary whole blood bags}} \times 100$$

10 units of PC contains more than 2 × 10<sup>11</sup> PLTs/bag (160-240ml). 15 units of PC contains more than 3 × 10<sup>11</sup> PLTs/bag (200-300ml). 20 units of PC contains more than 4 × 10<sup>11</sup> PLTs/bag (200-300ml). Residual WBCs are required to be ≤ 1 × 10<sup>6</sup> cells in leucocyte-reduced PC. Residual RBCs in PC are required to be ≤ 1 × 10<sup>5</sup> / $\mu$ l. pH of PC is required to be ≥ 6.2.

Abbreviations: PAS, platelet additive solution; PC, platelet concentrate; BC, buffy coat; PLT, platelet; WBC, white blood cell; RBC, red blood cell.

で、血小板がすべて球状化した場合は理論上 1.00 となり、円板状の血小板の割合が高いほど 1.00 よりも低値となる。この測定にはヘマトレーサー (313M, タイヨウ社製) を用いた。プール PAS-PC の残存白血球数は、ビーズ法を使用し、フローサイトメトリー (FACSCalibur, BD) によって測定した。血小板マーカーおよび血小板活性化マーカー試験は、フローサイトメトリー法により測定した。血小板アポトーシスマーカーである血小板外膜へのホスファチジルセリンの表出は、FITC 標識 Annexin V (BD Pharmingen) の結合を指標とし、フローサイトメーター (CytoFlex, Beckman Coulter Inc) にて測定した。プール PAS-PC の血餅形成能は、Clot-Pro (フィンガルリンク) を使用し、外因系の惹起物質である組織因子からなる ExTEST 試薬, cytochalasin D と GPIIb/IIIa インヒビター (tirofiban) 存在下で組織因子による活性化をみる FibTEST 試薬に対する血餅の最大血餅硬度 (MCF) を測定した。また最大血餅弾性 (MCE) は、以下の式を用いて計算した;  $MCE = MCF \times 100 / (100 - MCF)^{20}$ 。

### 3. 統計処理

測定値は平均値 ± 標準偏差で表記した。冷蔵保存 (4°C) と室温保存 (22°C) の各保存日数の比較、22°C の day 5 の測定値と 4°C の各保存日数の比較において、Two-way ANOVA で検定後、Tukey test を用いた。危険率 (P) 5% 未満を有意とした。なお、グルコース濃度において測定機器の検出限界値 (9.01mg/dl) 以下になった場合は、検出限界値を補定し、統計処理を行った。統計処理には Graph Pad Prism 9 (エムデーエフ) を用いた。

### 4. 倫理

本検討は、日本赤十字社 (日赤) 血液事業研究倫理

委員会の承認を受け実施した (承認番号 2018-024-4)。

## 結 果

### 1. プール PAS-PC の性状

調製したプール PAS-PC の性状を Table 1 に示した。BC 4 バッグのプールの場合、プール PAS-PC の総血小板数は、2 バッグが 10 単位、2 バッグが 15 単位で、 $2.94 \pm 0.47 \times 10^{11}$  個/バッグ (10 単位) であった。容量は、 $217 \pm 12$  ml で、各バッグすべて容量基準を満たした。BC 5 バッグのプールの場合、3 バッグが 15 単位、1 バッグが 20 単位で、 $3.58 \pm 0.51 \times 10^{11}$  /バッグ (15 単位) であった。容量は  $249 \pm 22$  ml で、いずれも容量基準を満たした。全血からの血小板回収率は、BC 4 バッグのプールでは  $65.8 \pm 4.6\%$ 、BC 5 バッグのプールでは  $71.0 \pm 5.1\%$  であった。残存白血球数は、それぞれ、 $0.07 \pm 0.11 \times 10^6$  /バッグと  $0.03 \pm 0.05 \times 10^6$  /バッグであり、各バッグすべて本邦の基準 ( $1 \times 10^6$  /バッグ以下) に適合していた。同様に混入赤血球濃度は、それぞれ  $1.6 \pm 0.6$  / $\mu$ l と  $21.3 \pm 35.9$  / $\mu$ l であり、各バッグいずれも基準値 ( $1 \times 10^5$  / $\mu$ l) 以下であった。また、調製直後、すべての検体で良好なスワーリングが観察された。血漿残存率は、プールに用いた BC の容量とヘマトクリット値から算出される血漿容量の総和と添加した PAS の容量から、 $31.9 \pm 1.2\%$  と算出された。

### 2. プール PAS-PC の室温および冷蔵長期保存における品質

1) pH, グルコース濃度, 乳酸濃度 (Table 2)

pH は、22°C と 4°C とともにいずれの保存日数においても本邦の基準である 6.2 以上を満たした。22°C では day 3 で増加し、その後 day 10 まで低下したが、再び増加の傾向がみられた。4°C では day 5 まで変わらず、その後、

Table 2 Metabolic variables of pooled PAS-PCs stored at 22°C or 4°C for 21 days

Parameters		Day 1 (Pool)	Day 3	Day 5	Day 10	Day 14	Day 21
pH (22°C)	22°C	7.28 ± 0.02	7.43 ± 0.03	7.34 ± 0.03	7.08 ± 0.13	7.16 ± 0.18	7.20 ± 0.23
	4°C		7.32 ± 0.03	7.32 ± 0.01	7.19 ± 0.06	7.05 ± 0.06	6.84 ± 0.02*
Glucose (mg/dl)	22°C	149.7 ± 5.7	128.2 ± 10.3	87.1 ± 14.7	10.0 ± 0.5	9.7 ± 0.5	9.3 ± 0.4
	4°C		139.8 ± 9.8	122.5 ± 12.1*	81.3 ± 16.7*	49.5 ± 20.5*	15.8 ± 9.8
Lactate (mg/dl)	22°C	50.7 ± 3.0	77.0 ± 1.0	122.0 ± 5.3	208.8 ± 12.1	207.1 ± 10.5	217.1 ± 14.0
	4°C		70.7 ± 1.4	87.8 ± 1.2*	130.6 ± 8.2*	162.2 ± 11.5*	196.6 ± 7.6*

On Day 1, two pooled PAS-PCs were pooled and split equally for storage at either 22°C or 4°C.

Data are means ± SD (n = 4). \*p < 0.05 at the same time points. Statistical analysis was performed with two-way repeated ANOVA followed by the Tukey post-hoc test.

Abbreviations: PAS, platelet additive solution; PC, platelet concentrate.

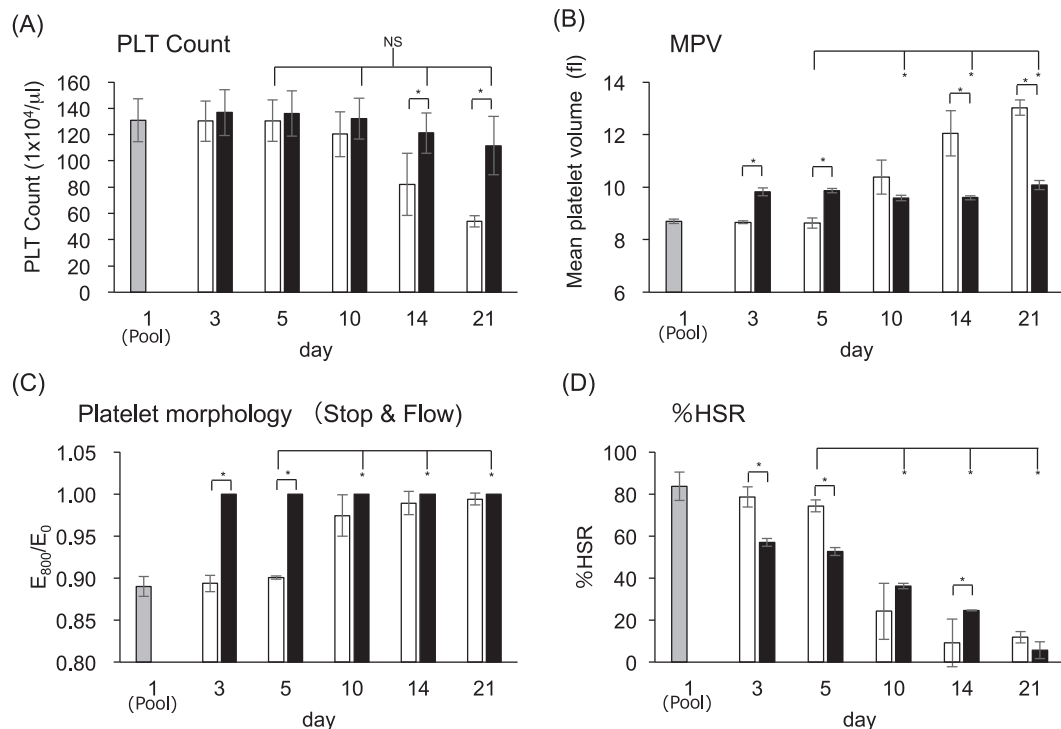


Fig. 2 In vitro assay results of pooled PAS-PCs stored at 22°C (open column) or 4°C (closed column) for 21 days. On day 1, two pooled PAS-PCs were pooled (Pool: grey column) and split equally for storage at either 22°C or 4°C. (A) PLT count, (B) MPV, (C) platelet morphology, and (D) %HSR. Data are shown as mean ± SD (n = 4). \*p < 0.05; NS = not significant.

day 21 まで徐々に低下した。

グルコース濃度は、保存とともに減少し、22°C では day 10 以降 10mg/dl 以下となった。4°C での減少は 22°C に比べ緩やかで、同日数での比較では、day 21 まで有意に高かった。乳酸濃度は保存とともに増加するが、4°C の増加は 22°C に比べ、day 21 まで緩やかであった。

2) 血小板濃度、MPV、血小板形態、%HSR (Fig. 2)

血小板濃度は、22°C では day 10 以降減少し、day 14 で day 1 の 62.8%、day 21 で 41.3% であった。4°C では day 14 で day 1 の 92.6%、day 21 で 85.3% であり、その減少の割合は 22°C に比べると緩やかであった (Fig.

2A)。MPV は、22°C では day 5 まで僅かな増加であったが、day 10 以降、顕著に増加した。4°C では day 3 で 22°C よりも有意に高値になったが、その後はほぼ変わらなかった (Fig. 2B)。E<sub>800</sub>/E<sub>0</sub> 値は、22°C では day 5 まで僅かな増加であったが、day 10 以降、急激に増加した。4°C では day 3 で既に 1.00 となり、球状化を示唆した (Fig. 2C)。%HSR は、22°C では day 5 まで良好に保たれたが、day 10 以降、著しく低下した。4°C では保存初期から低下し、day 5 まで 22°C より有意に低かった (Fig. 2D)。

3) 血小板凝集能 (Fig. 3)

ADP, Collagen, TRAP-6, Ristocetin の単独刺激お

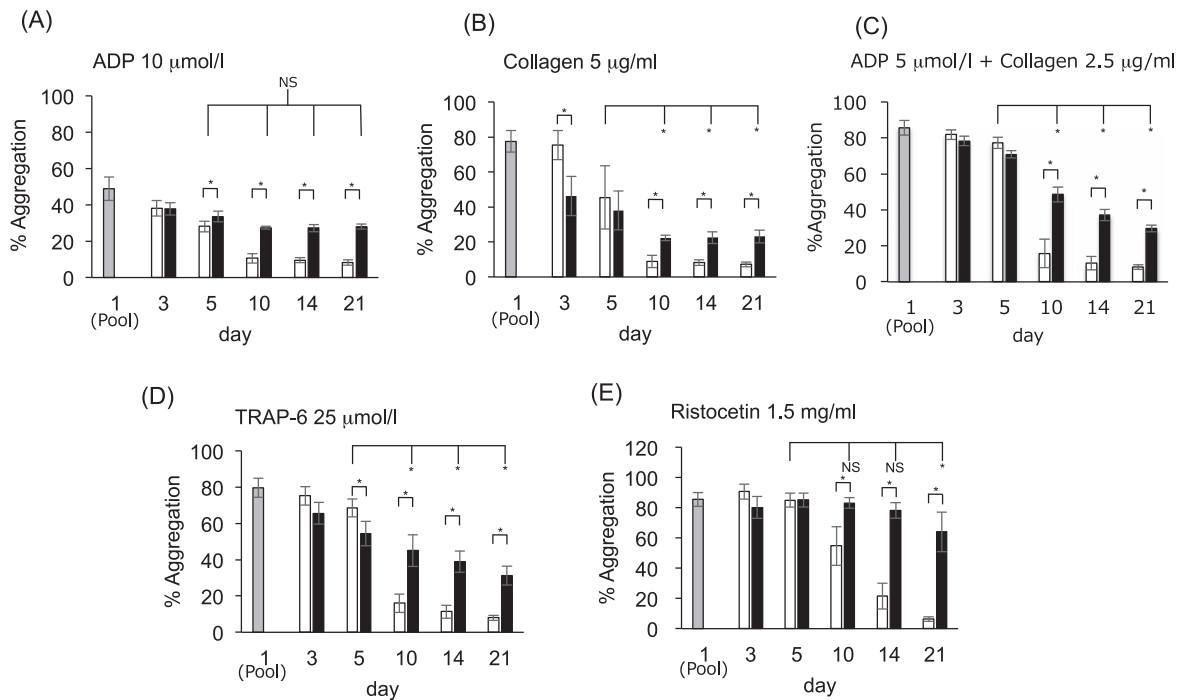


Fig. 3 PLT aggregation responses of pooled PAS-PCs stored at 22°C (open column) or 4°C (closed column) for 21 days. On day 1, two pooled PAS-PCs were pooled (Pool: grey column) and split equally for storage at either 22°C or 4°C. (A) ADP, (B) collagen, (C) ADP plus collagen, (D) TRAP-6, and (E) ristocetin. Data are shown as mean ± SD (n = 4). \*p < 0.05; NS = not significant.

よび ADP と Collagen の同時刺激に対する反応は、22°C では day 5 まで良好に保たれた。Day 10 以降は、各アゴニストに対する反応性が著しく低下した。4°C での ADP 凝集は、day 10 以降も維持され、22°C の day 5 と比較し、day 21 まで有意な差は認められなかった (Fig. 3A)。4°C での Collagen 凝集、TRAP-6 凝集および ADP と Collagen 同時刺激による凝集は、22°C の day 5 と比較し、day 10 以降、有意に低かったが、反応性が維持され、同保存日数での 22°C との比較では、day 21 まで有意差が認められた (Fig. 3B, C, D)。22°C の Ristocetin 凝集は、day 10 以降著しく低下したが、4°C では day 21 まで低下が緩やかであり、22°C の day 5 と比較し、day 14 までは有意な差は認められなかった (Fig. 3E)。

4) 血液粘弾性試験 (Fig. 4)

外因系の惹起物質である ExTEST 試薬に対する血餅の最大血餅強度 (MCF) を解析した。Day 10 以降、保存とともに MCF は減少したが、22°C に比べ 4°C では減少が緩やかであり、22°C の day 5 に比べ day 14 まで有意差は認められなかった (Fig. 4A)。血餅形成刺激時に血小板を不活化させた FibTEST 試薬に対する反応は、保存期間中、有意な変化はいずれの保存温度でもみられなかった (Fig. 4B)。血餅形成における血小板の寄与を示す MCE (ExTEST)-MCE (FibTEST) は、day

10 以降、いずれの温度においても保存とともに減少したが、4°C ではその減少が緩やかであり、22°C の day 5 に比べ day 14 まで有意差は認められなかった (Fig. 4C)。

5) 血小板活性化マーカー (Fig. 5)

CD62P 陽性率は、22°C では day 3 で 24%、day 5 で 44% であったが、day 10 で 81% に増加した。4°C の day 3、day 5 では 22°C よりも高値で有意差が認められた (Fig. 5A)。CD63 陽性率は、22°C では保存とともに増加し、day 21 で 31% となった。4°C では、その増加は緩やかで、day 10 以降は 22°C よりも有意に低値であった (Fig. 5B)。Annexin V の陽性率は、22°C、4°C いずれも day 5 までは低値であり、両者には差は認められなかった。day 10 以降、22°C では陽性率が大きく増加したのに対し、4°C ではその増加が緩やかであった。4°C での、CD63 陽性率と Annexin V 陽性率は、ともに、22°C の day 5 と比べて、day 14 までは有意差は認められなかった (Fig. 5B, C)。CD42b 陽性率は、22°C では day 10 以降減少し、day 14、day 21 で著しく低値となった。一方、4°C では、day 10 以降も高く維持され、22°C の day 5 に比べると、day 21 まで有意差は認められなかった (Fig. 5D)。

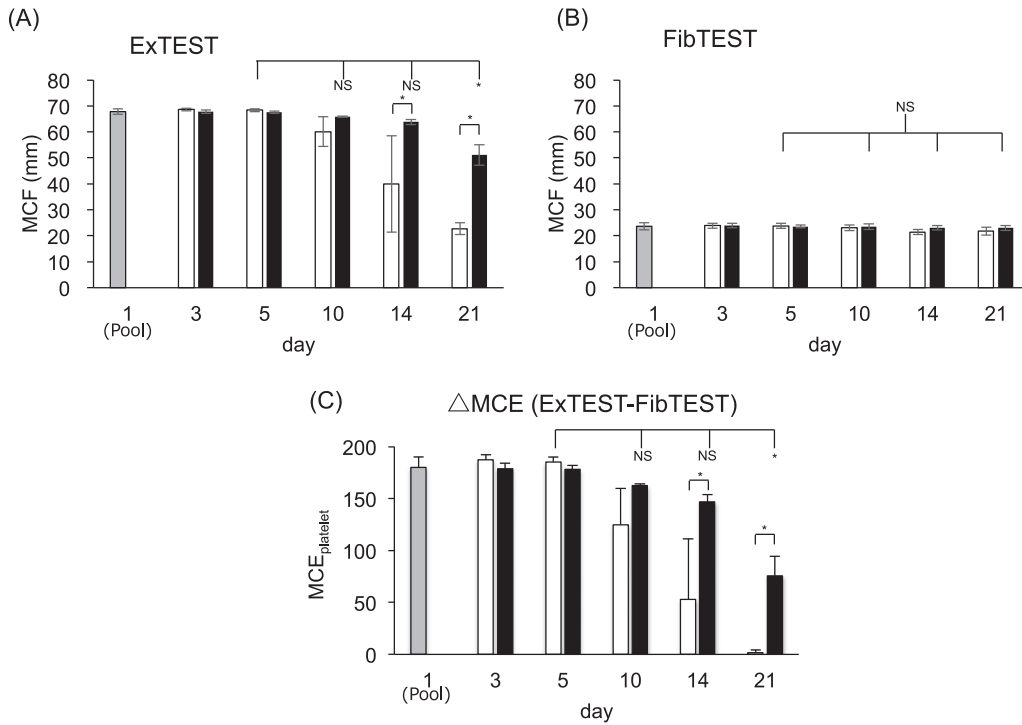


Fig. 4 Viscoelastic function of pooled PAS-PCs stored at 22°C (open column) or 4°C (closed column) for 21 days. On day 1, two pooled PAS-PCs were pooled (Pool: grey column) and split equally for storage at either 22°C or 4°C. (A) Maximum clot firmness (MCF) in response to ExTEST, (B) MCF in response to FibTEST, and (C) difference between ExTEST and FibTEST MCE. Data are shown as mean ± SD (n = 4; except Pool, n = 3). \*p<0.05; NS = not significant.

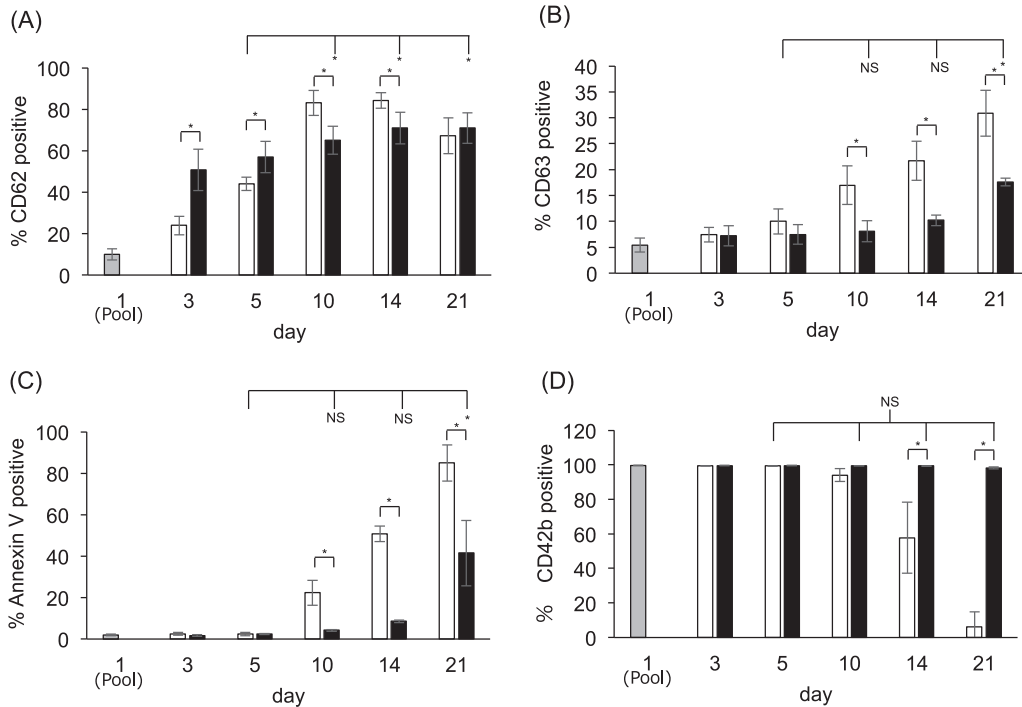


Fig. 5 Flow cytometric analysis of pooled PAS-PCs stored at 22°C (open column) or 4°C (closed column) for 21 days. On day 1, two pooled PAS-PCs were pooled (Pool: grey column) and split equally for storage at either 22°C or 4°C. (A) CD62P, (B) CD63, (C) annexin V, and (D) CD42b. Data are shown as mean ± SD (n = 4). \*p<0.05; NS = not significant.

Table 3 Comparison of the qualities of pooled PAS-PCs and APCs during storage at room temperature

Parameters	Pooled PAS-PCs in this study (n=4)			APCs (n=28) <sup>a</sup>		
	Day 1 <sup>b</sup>	Day 3	Day 5	Day 0 <sup>c</sup>	Day 3	Day 4
PLT ( $\times 10^4/\mu$ )	131 $\pm$ 16	130 $\pm$ 15	131 $\pm$ 16	142 $\pm$ 26	142 $\pm$ 26	141 $\pm$ 27
pH	7.28 $\pm$ 0.02	7.43 $\pm$ 0.03	7.34 $\pm$ 0.03	7.17 $\pm$ 0.06	7.21 $\pm$ 0.30	7.13 $\pm$ 0.39
MPV (fl)	8.7 $\pm$ 0.1	8.7 $\pm$ 0.0	8.6 $\pm$ 0.0	7.7 $\pm$ 0.6	7.6 $\pm$ 0.7	7.6 $\pm$ 0.6
Morphology (E <sub>800</sub> /E <sub>0</sub> )	0.89 $\pm$ 0.01	0.89 $\pm$ 0.01	0.90 $\pm$ 0.00	0.91 $\pm$ 0.02	0.89 $\pm$ 0.03	0.90 $\pm$ 0.03
Aggregation [ADP+Collagen] (%)	86 $\pm$ 4	82 $\pm$ 3	77 $\pm$ 3	89 $\pm$ 5	83 $\pm$ 7	77 $\pm$ 15
%HSR	84 $\pm$ 7	79 $\pm$ 5	74 $\pm$ 3	74 $\pm$ 6	78 $\pm$ 9	75 $\pm$ 18
CD62P (% positive)	10.0 $\pm$ 2.7	23.9 $\pm$ 4.6	44.0 $\pm$ 3.2	6.2 $\pm$ 2.8	19.2 $\pm$ 14.4	25.8 $\pm$ 20.2

Data are shown as mean  $\pm$  SD.

<sup>a</sup>Data from the Japanese Red Cross home page ([https://www.jrc.or.jp/mr/product/list/pdf/result\\_ir\\_pc\\_lr100205.pdf](https://www.jrc.or.jp/mr/product/list/pdf/result_ir_pc_lr100205.pdf))

<sup>b</sup>Day 0 was defined as the day of whole blood collection.

<sup>c</sup>Day 0 was defined as the day of APC collection.

Abbreviations: PAS, platelet additive solution; PC, platelet concentrate; APC, apheresis platelet concentrate; PLT, platelet; MPV, mean platelet volume; %HSR, % hypotonic shock response.

## 考 察

TACSI は、本邦においては全血からの赤血球と血漿の二層分離に用いられているが、元来、欧州においては、専用キットにより赤血球、血漿およびBCの三層分離とプールBCからのプールPCやプールPAS-PCの調製に用いられている<sup>16)21)22)</sup>。今回、この欧州仕様TACSIを用いて、本邦の400ml全血からT-PAS+によるプールPAS-PCを調製し、BC4バッグのプールでは10単位以上を、5バッグのプールでは15単位以上をそれぞれ容量基準内において調製できることを明らかとした(Table 1)。血小板回収率は、BC4バッグのプールでは66%、BC5バッグのプールの場合は71%であった(Table 1)。TACSIを用いて全血からプールPAS-PCを調製したLotensら<sup>21)</sup>の報告においても、血小板回収率は71%であり、我々の結果を支持している。

従来の大容量遠心機と血液分離装置を組み合わせたプールPCの調製では、APCに比べ、混入赤血球濃度が高値であったが、欧州仕様TACSIを用いたプールPCでは、従来の調製方法によるプールPCの混入赤血球濃度681/ $\mu$ l(中央値, n=99)から81/ $\mu$ l(中央値, n=110)に低減したことが報告されている<sup>23)</sup>。今回、プールPAS-PCの混入赤血球濃度は、8バッグ中1バッグが75/ $\mu$ lであった以外は、いずれも10/ $\mu$ l以下であり、現行のAPCの混入赤血球濃度(平均2~4/ $\mu$ l)<sup>24)</sup>と同等レベルであったことから、プールPAS-PCの調製においてTACSIを用いる利点が裏付けられた(Table 1)。

T-PAS+を用いたPAS-APCの検討において、室温保存では7日間、良好な品質が維持されること、また冷蔵保存では若干活性化するものの、14日間程度保存できる可能性が報告されている<sup>13)18)</sup>。T-PAS+を用いたプールPAS-PCの本検討において、室温保存では、血小板数、MPV、血小板形態、Ristocetin凝集、血餅形成におけるMCFおよびMCE、Annexin VおよびCD42b

陽性率は、day5まで維持された。また、%HSRと血小板凝集能(ADP+Collagen同時刺激)はday5まで高値を示し、血小板活性化を示すCD62P陽性率やCD63陽性率はday5までは低値であった。ADP凝集とCollagen凝集は、day1からday5において減少したが、それぞれday1の反応性の50%以上を維持し、自施設での10単位のAPC製剤(n=6)での保存試験においても、同様な減少と反応性の維持が認められた(データ示さず)。室温保存のプールPAS-PCのday5までの性状およびin vitro血小板機能を、日赤が公開している照射血小板製剤(APC)の安定性試験成績の結果<sup>25)</sup>と比較すると、現行のAPCの有効期限であるday3(本検討においては、採血当日をday0とした)では、血小板形態、血小板凝集能(ADPとCollagen同時刺激)、%HSRおよびCD62P陽性率はいずれも同等であった(Table 3)。また、プールPAS-PCのday5における、血小板凝集能と%HSRの減少とCD62P陽性率の増加は、いずれも大きな変化ではなく、APCのday4の結果と同等であった。以上より、今回調製したプールPAS-PCは、現行の有効期限において、APCと同等の品質があり、また、海外の有効期限として広く用いられているday5においても製品として許容できる品質を維持していると考えられた。

一方、day10以降、各種血小板機能の著しい低下と血小板活性化の亢進が認められた。室温保存のday10までのグルコース消費速度は、平均15.5mg/dl/dayと計算されたことから、10mg/dlとなったday10以降は代謝に必要なグルコースは残っておらず、室温保存day10以降での血小板品質の低下は、グルコースの枯渇に依るものと考えられる。

血小板の冷蔵保存では、円板状から球状への血小板の急激な形態変化を引き起こし、MPVの増加、スワーリングの消失、%HSRの低下につながると報告されて

いる<sup>9)(11)(26)~29)</sup>. T-PAS+に置換したプール PAS-PCである本検討においても、同様な変化が確認された (Fig. 2). 一方、血小板の冷蔵保存では、凝集能と止血能が室温保存に比べて亢進あるいは長期間維持されることが報告されている<sup>6)~13)</sup>. PAS-PCの室温保存の有効期限として期待される day 5の値を基準として評価した場合、本検討においては、冷蔵保存血小板の ADP 凝集は day 21まで、Ristocetin 凝集は day 14まで良好に維持された (Fig. 3). また、冷蔵保存血小板の Collagen 凝集, TRAP-6 凝集および ADP と Collagen の同時刺激による凝集は day 10以降、それぞれ、室温保存血小板の 5日目の値よりは低く、有意差が認められたが、day 21においても反応性を維持していた (Fig. 3). さらに血餅形成能に関しては、冷蔵血小板は day 14まで、室温保存血小板の day 5の最大血餅硬度および血餅形成における血小板の寄与の程度とそれぞれ同等であった (Fig. 4).

血小板の活性化マーカーである CD62P 陽性率は、他の報告<sup>6)(7)(28)(29)</sup>と同様に、冷蔵保存後、早い段階で高値となり、血小板の活性化が認められた (Fig. 5). また、冷蔵保存 day 14において、CD62P 陽性率は、室温保存の day 5の値と比較して有意に高値であったが、CD62P 陽性率の高値自体は、貪食細胞による冷蔵血小板の貪食増加の原因とはならないことが示されている<sup>6)</sup>. さらに、冷蔵保存 day 14において CD63 陽性率、Annexin V 結合率、CD42b 陽性率は、室温保存の day 5と有意な差はなかった (Fig. 5). 以上、T-PAS+を用いたプール PAS-PCの冷蔵保存において、血小板が活性化するものの、凝集能および血餅形成能が 14日間良好に維持されることが示された. 血小板の長期保存の最適化のアプローチとして、グルコース消費と乳酸産生の代謝速度を低下させること、保存期間全体を通してグルコースが利用できることがあげられている<sup>30)</sup>. 冷蔵保存 day 10までのグルコース消費速度は、平均 7.6mg/dl/day と計算され、室温保存に比べてグルコース消費速度の低下と day 21でのグルコースの残存が、冷蔵保存における血小板機能の維持に寄与したと考えられる (Table 2).

これまで我々は、欧州仕様 TACSI を用い、本邦の 400 ml 全血から、血漿に浮遊した良好な品質のプール PC を調製できることを示し、プール PC が将来的な少子高齢化における献血者不足対策の一つとなる可能性を報告している<sup>16)</sup>. 今回検討したプール PAS-PC の調製では、プール PC 1 バッグを調製するために要する血漿 (220~250ml) が不要となるため、プール PAS-PC の有用性が示唆された. また、プール PAS-PC の冷蔵保存では in vitro の品質評価から有効期限延長が期待されるが、今後 in vivo での検証が必要である.

## 結 語

欧州仕様 TACSI を用いて、本邦の 400ml 全血から T-PAS+によるプール PAS-PC の調製を検討し、良好な品質のプール PAS-PC が調製できることを明らかとした. また、プール PAS-PC の室温保存では少なくとも 5日間、冷蔵保存では 14日間までは保存できる可能性が示唆された.

著者の COI 開示：本論文発表内容に関連して特に申告なし

謝辞：本検討を実施するにあたり多大なるご協力を頂きました。テルモ BCT 株式会社の船越浩之氏、山崎裕輔氏、丸田千明氏、相澤康孝氏およびテルモ株式会社富士宮工場の今井 正氏に深謝いたします。

## 文 献

- 1) Rinwald J, Zimmermann R, Eckstein R: The new generation of platelet additive solution for storage at 22°C: development and current experience. *Transfus Med Reviews*, 20: 158—164, 2006.
- 2) Tobian AAR, Fuller AK, Uglik K, et al: The impact of platelet additive solution apheresis platelets on allergic transfusion reactions and corrected count increment. *Transfusion*, 54: 1523—1529, 2014.
- 3) Cohn CS, Stubbs J, Schwartz J, et al: A comparison of adverse reaction rates for PAS C versus plasma platelet units. *Transfusion*, 54: 1927—1934, 2014.
- 4) Murphy S, Gardner FH: Effect of storage temperature on maintenance of platelet viability: Deleterious effect of refrigerated storage. *N Engl J Med*, 280: 1094—1098, 1969.
- 5) Currie LM, Harper JR, Allan H, et al: Inhibition of cytokine accumulation and bacterial growth during storage of platelet concentrates at 4°C with retention of in vitro functional activity. *Transfusion*, 37: 18—24, 1997.
- 6) Babic AM, Josefsson EC, Bergmeiser W, et al: In vitro function and phagocytosis of galactosylated platelet concentrates after long-term refrigeration. *Transfusion*, 47: 442—451, 2007.
- 7) Reddoch KM, Pidcoke HF, Montgomery RK, et al: Hemostatic function of apheresis platelets stored at 4°C and 22°C. *Shock*, 41: 54—61, 2014.
- 8) Bynum JA, Meledeo MA, Getz TM, et al: Bioenergetic profiling of platelet mitochondria during storage: 4°C storage extends platelet mitochondrial function and viability. *Transfusion*, 56: S76—S84, 2016.



- 9) Getz TM, Montgomery RK, Bynum JA, et al: Storage of platelets at 4°C in platelet additive solutions prevents aggregate formation and preserves platelet functional responses. *Transfusion*, 56: 1320—1328, 2016.
- 10) Johnson L, Tan S, Wood B, et al: Refrigeration and cryopreservation of platelets differentially affect platelet metabolism and function: a comparison with conventional platelet storage conditions. *Transfusion*, 56: 1807—1818, 2016.
- 11) Skipchenko A, Gelderman MP, Awatefe H, et al: Automated cold temperature cycling improves in vitro platelet properties and in vivo recovery in a mouse model compared to continuous cold storage. *Transfusion*, 56: 24—32, 2016.
- 12) Nadir PM, Pandya SG, Dallo SF, et al: Platelets stored at 4°C contribute to superior clot properties compared to current standard-of-care through fibrin-crosslinking. *Br J Haematol*, 178: 119—129, 2017.
- 13) 小池敏靖, 福田香苗, 平山順一, 他: 血漿を血小板保存液に置換した血小板製剤の冷蔵保存時の品質. *日本輸血細胞治療学会誌*, 64: 726—732, 2018.
- 14) Strandenes G, Sivertsen J, Bjerkvig CK, et al: A pilot trial of platelets stored cold versus at room temperature for complex cardiothoracic surgery. *Anesthesiology*, 133: 1173—1183, 2020.
- 15) Warner MA, Kurian EB, Hammel SA, et al: Transition from room temperature to cold-stored platelets for the preservation of blood inventories during the COVID-19 pandemic. *Transfusion*, 61: 72—77, 2021.
- 16) 藤原満博, 布施久恵, 金敷拓見, 他: 22°C に一晩保管した全血より調製したプール血小板濃厚液の品質. *血液事業*, 45: 11—20, 2022.
- 17) 内藤 祐, 若本志乃舞, 有澤史倫, 他: 成分採血装置「CCS」血小板分割プログラムにより採取された血小板品質. *血液事業*, 42: 633—637, 2019.
- 18) 小野寺秀一, 金子祐次, 小池敏靖, 他: T-PAS+またはビカネイト輸液を血小板保存液 (PAS) として成分採血装置 Trima Accel で採取した PAS 置換血小板の品質の比較. *日本輸血細胞治療学会誌*, 63: 780—787, 2017.
- 19) 大軒子郎, 柴田弘俊: 凝集計を用いたストップ・アンド・フロー法による血小板形態の定量法—濃厚血小板の保存における品質管理への応用. *日本輸血学会雑誌*, 43: 350—355, 1997.
- 20) Solomon C, Ranucci M, Hochleitner G, et al: Assessing the methodology for calculating platelet contribution to clot strength (platelet component) in thromboelastometry and thromboelastography. *Anesth Analg*, 121: 868—878, 2015.
- 21) Lotens A, Najdovski T, Cellier N, et al: New approach to 'top-and-bottom' whole blood separation using the multi-unit TACSI WB system: quality of blood components. *Vox Sang*, 107: 261—268, 2014.
- 22) 徳倉将人, 秋野光明, 川手華与, 他: スイス連邦の血液製剤製造に関する調査—病原体低減化, プール製品, 自己血液点眼液の製造—. *血液事業*, 707—715, 2023.
- 23) Cavagnetto C, Blanco RA, McKenna H, et al: Residual red cells in blood components: a multisite study of fully automated enumeration using a hematology analyzer. *Transfusion*, 61: 568—578, 2021.
- 24) 小池敏靖, 潤崎晶弘, 一杉芽美, 他: 成分採血装置 Trima Accel で採血した分割対象血小板原料血液由来の血小板製剤の品質. *日本輸血細胞治療学会誌*, 64: 490—495, 2018.
- 25) 血小板製剤 (照射) の安定性試験—日本赤十字社. [https://www.jrc.or.jp/mr/product/list/pdf/result\\_ir\\_pc\\_lr100205.pdf](https://www.jrc.or.jp/mr/product/list/pdf/result_ir_pc_lr100205.pdf).
- 26) Sandgren P, Hansson M, Gulliksson H, et al: Storage of buffy-coat-derived platelets in additive solutions at 4°C and 22°C: flow cytometry analysis of platelet glycoprotein expression. *Vox Sang*, 93: 27—36, 2007.
- 27) Hornsey VS, Drummond O, McMillan L, et al: Cold storage of pooled, buffy-coat-derived, leucoreduced platelets in plasma. *Vox Sang*, 95: 26—32, 2008.
- 28) Stiegler G, Fisher G, Ramanathan G, et al: P-selectin mRNA is maintained in platelet concentrates stored at 4°C. *Transfusion*, 49: 921—927, 2009.
- 29) Johnson L, Cameron M, Waters L, et al: The impact of refrigerated storage of UVC pathogen inactivated platelet concentrates on in vitro platelet quality parameters. *Vox Sang*, 114: 47—56, 2019.
- 30) Gulliksson H: Defining the optimal storage conditions for the long-term storage of platelets. *Transfus Med Rev*, 17: 209—215, 2003.

## COMPARISON OF THE QUALITY OF WHOLE BLOOD-DERIVED, PAS-REPLACED PLATELET CONCENTRATES DURING ROOM TEMPERATURE OR REFRIGERATED STORAGE

*Mitsuhiro Fujihara*<sup>1)</sup>, *Takumi Kanashiki*<sup>1)</sup>, *Hisae Fuse*<sup>1)</sup>, *Fuminori Arisawa*<sup>1)</sup>, *Shinobu Wakamoto*<sup>1)</sup>, *Katsuya Ikuta*<sup>2)</sup>, *Mitsuaki Akino*<sup>1)</sup> and *Shuichi Kino*<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Japanese Red Cross Hokkaido Block Blood Center

<sup>2)</sup>Hokkaido Red Cross Blood Center

### **Abstract:**

Pooled platelet concentrate (PC) that is prepared from whole blood may be a solution to the shortage of blood donors caused by the declining birthrate and aging population. Here, we prepared a pooled platelet additive solution (PAS)-PC from 400 ml whole blood by replacing a portion of the plasma with PAS using TACSI, a European-specification large-capacity centrifuge with an automatic blood separation function. We then compared quality during storage at room temperature (22°C) and refrigeration (4°C) over 21 days.

Pooling of four buffy coats (BCs) yielded more than 10 units of pooled PAS-PC (n=4), and pooling of five BCs yielded more than 15 units of pooled PAS-PC (n=4). Each pooled PAS-PC met the quality standard of PC in Japan. On room temperature storage, pooled PAS-PC maintained good platelet aggregation, % hypotonic shock response (%HSR), and clot formation capacity for up to 5 days. On refrigerated storage, %HSR decreased early after storage, but aggregation and clot formation capacity remained similar to those on day 5 of room temperature storage until day 14.

These findings suggest that pooled PAS-PC of good quality can be obtained from 400 ml whole blood using the European specification TACSI. In addition, pooled PAS-PC can be stored for up to 14 days by refrigerated storage.

### **Keywords:**

pooled platelet concentrates, TACSI, platelet additive solution, T-PAS+, refrigerated storage