

## [原著]

## 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 血小板製剤の品質

日本赤十字社北海道ブロック血液センター<sup>1)</sup>, 北海道赤十字血液センター<sup>2)</sup>, 日本赤十字社血液事業本部<sup>3)</sup>

内藤 祐<sup>1)</sup>, 若本志乃舞<sup>1)</sup>, 有澤史倫<sup>1)</sup>, 林 宜亨<sup>1)</sup>, 布施久恵<sup>1)</sup>,  
藤原満博<sup>1)</sup>, 算用子裕美<sup>2)</sup>, 増川みゆき<sup>2)</sup>, 荒木あゆみ<sup>3)</sup>, 名村喜一郎<sup>1)</sup>,  
本間稚広<sup>1)</sup>, 山本 哲<sup>2)</sup>, 池田久實<sup>2)</sup>, 紀野修一<sup>1)</sup>, 牟禮一秀<sup>1)</sup>

### The quality of platelet concentrates derived from double dose plateletpheresis by CCS device

*Japanese Red Cross Hokkaido Block Blood Center<sup>1)</sup>, Hokkaido Red Cross Blood Center<sup>2)</sup>,  
Japanese Red Cross Blood Service Headquarters<sup>3)</sup>*

Yu Naito<sup>1)</sup>, Shinobu Wakamoto<sup>1)</sup>, Fuminori Arisawa<sup>1)</sup>, Yoshiaki Hayashi<sup>1)</sup>, Hisae Fuse<sup>1)</sup>,  
Mitsuhiko Fujihara<sup>1)</sup>, Hiromi Sanyoshi<sup>2)</sup>, Miyuki Masukawa<sup>2)</sup>, Ayumi Araki<sup>3)</sup>,  
Kiichiro Namura<sup>1)</sup>, Chihiro Homma<sup>1)</sup>, Tetsu Yamamoto<sup>2)</sup>, Hisami Ikeda<sup>2)</sup>,  
Shuichi Kino<sup>1)</sup> and Kazuhide Mure<sup>1)</sup>

### 抄 錄

ヘモネティクス社製成分採血装置「コンポーネント コレクション システム (CCS)」の血小板分割プログラムで血小板を採取し, 分割製造した血小板製剤(PC)の品質について検討した。

CCSで採取した分割血小板は, 容量が $440.3 \pm 5.5\text{mL}$  ( $n = 5$ ), 総血小板数が $4.6 \pm 0.2 \times 10^{11}$  個 ( $n = 5$ ) であり, 10単位PC2バッグに分割可能であった。性状および外観は保存5日まで異常をみとめなかった。分割PCの赤血球数および総白血球数はPCの基準を満たした。血小板数および平均血小板容積は, 保存5日まで変化をみとめなかった。pHは保存期間中6.2以上を維持した。低浸透圧ショック回復率, 血小板凝集能および血小板形態は, 保存5日まで維持された。CD62P陽性率は保存4日で $30.8 \pm 10.5\%$ であった。

CCSの血小板分割プログラムで採血し, 分割製造された10単位PCの品質は, 有効期間である保存4日まで維持された。

Key words: double dose plateletpheresis, platelet concentrate division, CCS

### 【はじめに】

1単位および2単位血小板製剤(PC)は, かつて全献血由来の血液から製造されていた。2007年1月, 全血液の保存前白血球除去導入に

よって, 全血液中の血小板は白血球除去フィルターに捕捉されることから, 1単位および2単位PCは, 成分献血由来血小板から分割することによって製造することとなった。

2014年9月から、日本赤十字社では、1名のドナーから高単位の血小板を採取し、10単位PCを2バッグ等に分割する製造を開始した。これは、PCの安定供給のみならず、製造および検査に係る費用削減等が期待される。

海外において、1名のドナーから2倍量(総血小板数 $6.0 \times 10^{11}$ 個/バッグ)あるいは3倍量(総血小板数 $9.0 \times 10^{11}$ 個/バッグ)の血小板が採取できる成分採血装置は複数ある<sup>1)~4)</sup>。一方、本邦において、分割可能な高単位血小板原料血液が採取できる成分採血装置は、テルモBCT社製の「Trima Accel(Ver. 7.0)」のみである。

今般、ヘモネティクス社製成分採血装置「コンポーネントコレクションシステム( CCS)」において、分割可能な高単位血小板原料血液を採取するためのソフトウェアが完成した。CCSは、ソフトウェアのバージョンアップを行うのみで使用でき、ディスピーザブルキットは同一である。CCSにおいて、分割対象血小板原料血液が採取でき、PC品質が良好であれば、成分採血装置の選択肢が広がる。

今回、本ソフトウェアで採取した原料血液からPCを分割製造し、PCの品質について検討した。

## 【材料および方法】

### 1. 試験血液

試験の血小板原料血液は、同意が得られた6名のボランティアドナーから成分採血装置「CCS」(ソフトウェアCCSD-PPPLDPLP-B.7-JP, Haemonetics Japan GK)にて採取した。採取目標は、総血小板数を $4.0 \sim 4.5 \times 10^{11}$ 個、容量を450mLとした。PCは、血小板原料血液を採血翌日に無菌接合装置(TSCD-II, Terumo Corporation)を用いてポリオレフィン(PO)バッグ(KBP1000FPN, Kawasumi Laboratories, Inc.)を接続し等分割した。このとき、POバッグおよび接続チューブに含まれるエアーは、両バッグに均等に分けた。分割製造されたPC2バッグは、X線照射装置(MBR-1530A-TW, Hitachi Healthcare Systems, Inc.)によって15GyのX線を照射した。PCは20~24°Cで振盪保存(60rpm/min)し、採血バッグから保存1日(採血当日)、2

日、3日、4日および5日に検体を約15mLずつ採取した。

### 2. PCの保存安定性

PCの性状および外観は、生物学的製剤基準<sup>5)</sup>に従い、目視で確認した。判定基準は、それぞれ、性状が黄色ないし黄褐色の液剤であること、外観が溶血による著しい着色、その他の異常をみとめないこととした。容量は、電子天秤(BP3100S, Sartorius Japan K. K.)を用いて重量を測定し、比重(1.03)で除して算出した。白血球数は、LeucoCOUNTキット(BD Biosciences)を用いて、フローサイトメーター(FACSCalibur, BD Biosciences)で測定した。赤血球数は、改良ノイバウエル計算盤(Sunlead Glass corporation)を用い、正立型顕微鏡(Y2F-21, Nikon corporation)下で計数した。血小板数および平均血小板容積は、多項目自動血球分析装置(XS-1000i, Sysmex corporation)によって測定した。pH、二酸化炭素分圧(pCO<sub>2</sub>)および酸素分圧(pO<sub>2</sub>)は、全自动血液ガス・電解質分析装置(cobas b 221, Roche Diagnostics K. K.)によって測定した。低浸透圧ショック回復率、血小板凝集能および血小板形態の測定には、PCを自己血漿で希釈した血小板(血小板濃度 $30 \times 10^4/\mu\text{L}$ )を用いた。低浸透圧ショック回復率は、Holme S<sup>6)</sup>らの方法に従って測定し、算出した。血小板凝集能は、CaCl<sub>2</sub>(終濃度4mM)存在下、ADP(終濃度5μM)およびCollagen(終濃度2.5μg/mL)を同時添加し、血小板凝集能測定装置(PRP313M, TAIYO Instruments, Inc)によって、7分間の透過率の変化を測定し、最大凝集率を求めた。血小板形態は、血小板凝集能測定装置(PRP313M, TAIYO Instruments, Inc)を用いてStop&Flow法<sup>7)</sup>で測定した。CD62Pの発現は、血小板をPE標識抗CD62P抗体およびPerCP標識抗CD61抗体(いずれもBD Biosciences)によって室温暗所で20分間染色した。1%パラホルムアルデヒドで固定後、フローサイトメーター(Cytomics FC500, Beckman Coulter, Inc)によって測定した。陰性コントロールはPE標識抗マウスIgG1抗体(BD Biosciences)を使用した。Scatter gram上で血小

板高密度領域にゲートを設定し、抗CD61抗体陽性細胞中のCD62P陽性細胞率を求めた。PC上清のナトリウム濃度およびカリウム濃度は、全自动血液ガス・電解質分析装置(cobas b 221, Roche Diagnostics K. K.)によって測定した。PC上清は、試験血液の一部を遠心(1,710g, 15分, 22°C)し、上清採取後、再度、同条件で遠心し、採取した。

### 3. 統 計

感染症検査結果が不適(HBc抗体陽性)であった1例は、統計処理から除き、5例について統計処理を行った。測定値は、平均±標準偏差で表記した。保存1日と保存2, 3, 4および5日の比較は、Repeated Measures ANOVAで検定後、Dunnett's testを用い、危険率(P)5%未満を有意とした。統計処理にはGraphPad Prism (Version 6.0, GraphPad Software, Inc., USA)を用いた。

## 【結 果】

### 1. PCの規格

採取した血小板原料血液および分割後のPCが、それぞれ基準に適合するか検討した(表1)。

血小板原料血液およびPCの性状および外観は、すべての検体が基準に適合した。採血1日の容量(440.3±5.5mL)および総血小板数(4.6±0.2×10<sup>11</sup>個)は、10単位PC2バッグへの分割が可能な数値であった。血小板原料血液の総白血球数は、0±0×10<sup>6</sup>個であり、すべてのPCが基準(1×10<sup>6</sup>個/バッグ以下)に適合した。同様に、赤血球数は、6±2/μLであり、すべて基準値(100,000/μL)以下であった。

### 2. PCの保存安定性

分割後のPCについて、保存安定性を検討するため、各品質評価項目を測定した(表2)。

分割後(保存3日)の容量は203.4±3.1mL、総血小板数は2.1±0.1×10<sup>11</sup>個であり、10単位PCの規格に適合した。保存1日の血小板数(98.5±4.6×10<sup>4</sup>個/μL)および平均血小板容積(9.0±0.5fL)は、いずれも保存5日まで変化はなかった。pHは、保存3日以降、保存1日(7.21±0.03)に比べて有意に高値であったが、内部基準(6.2以上)を満たした。pCO<sub>2</sub>は、保存により低下し、保存3日以降、保存1日(76.4±4.4mmHg)に比べて有意に低値となった。pO<sub>2</sub>は、保存により上昇し、保存3日以降、保存1日(30.8±10.3mmHg)に比べて有意に高値となった。上清中のナトリウム濃度およびカリウム濃度は、それぞれ保存1日と5日の間に変化をみとめなかった。低浸透圧ショック回復率は、保存1日(83.0±9.6%)と保存3, 4, 5日との間に有意な差をみとめなかった。血小板凝集能は、保存1日で84.9±3.2%であり、保存5日まで約80%以上を維持した。血小板形態は、保存1日(0.88±0.01)から保存5日(0.88±0.02)まで変化をみとめなかった。CD62P陽性率は、保存に伴い上昇し、保存5日で40.4±8.2%であった。

## 【考 察】

CCS分割プログラムによって20単位相当の血小板を採取し、2分割したPCの品質を評価するため、PCの性状、外観および血小板機能を調べた。

採取された血小板原料血液の容量は440.3±5.5mL、血小板総数は4.6±0.2×10<sup>11</sup>個であり、

表1 Characteristics of platelet concentrates before being devided

Parameter	
Volume (mL)	440.3±5.5
Total PLT (10 <sup>11</sup> /bag)	4.6±0.2
RBC (/μL)	6±2
WBC (10 <sup>6</sup> /bag)	0±0

Data are represented as mean ± standard deviation, n=5.

表2 In vitro properties of platelet concentrates during 5 days storage

Parameter	Storage periods (days)				
	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3	4	5
Volume (mL)	440.3 ± 5.5	403.2 ± 13.9	203.4 ± 3.1	187.6 ± 3.7	171.8 ± 3.7
PLT (10 <sup>4</sup> / $\mu$ L)	98.5 ± 4.6	98.6 ± 5.2	97.5 ± 4.6	97.5 ± 4.9	97.2 ± 4.9
Total PLT (10 <sup>11</sup> /bag)	4.6 ± 0.2	4.2 ± 0.3	2.1 ± 0.1	1.9 ± 0.1	1.8 ± 0.1
MPV (fL)	9.0 ± 0.5	9.0 ± 0.6	8.8 ± 0.5	8.8 ± 0.5	8.8 ± 0.5
pH (at 22°C)	7.21 ± 0.03	7.20 ± 0.06	7.39 ± 0.05*	7.44 ± 0.05*	7.46 ± 0.05*
pCO <sub>2</sub> (mmHg, at 22°C)	76.4 ± 4.4	70.0 ± 7.9	38.3 ± 2.6*	30.1 ± 0.9*	26.8 ± 0.6*
pO <sub>2</sub> (mmHg, at 22°C)	30.8 ± 10.3	29.2 ± 12.8	104.4 ± 10.3*	111.5 ± 7.1*	119.3 ± 8.1*
Supernatant sodium (mmol/L)	142.6 ± 1.2	no data	no data	no data	142.3 ± 0.1
Supernatant potassium (mmol/L)	2.9 ± 0.1	no data	no data	no data	3.0 ± 0.1
HSR (%)	83.0 ± 9.6	92.3 ± 7.5*	91.3 ± 7.9	90.1 ± 6.7	90.4 ± 10.1
Aggregation (%)	84.9 ± 3.2	82.4 ± 3.8	83.0 ± 1.2	83.0 ± 2.1	79.3 ± 1.5*
Platelet morphology	0.88 ± 0.01	0.88 ± 0.01	0.88 ± 0.01	0.87 ± 0.02	0.88 ± 0.02
CD62P (%)	18.8 ± 6.0	23.4 ± 11.5	25.3 ± 9.5	30.8 ± 10.5*	40.4 ± 8.2*

Data are represented as mean ± standard deviation, n=5.

<sup>a</sup> Parameter levels at day 1 and 2 are obtained from the result of platelet concentrate before being divided.

\* For comparison of parameter levels at days 1 versus 2, 3, 4 and 5, the significant differences were analysed by one-way repeated-measured ANOVA followed by the Dunnett's test. Significance was set at p<0.05.

10単位PC2バッグ分の血小板原料血液が採取できた。血小板原料血液採取時、製剤中に混入した白血球数は基準 ( $1 \times 10^6$ 個/バッグ以下) を満たし、赤血球数は低値であった。

PC品質の重要な指標となるpHは、保存3日以後、保存1日に比べて有意に高値となった。小池ら<sup>8)</sup>は、Trima Accelによる分割PCにおいて、保存中のpH上昇は、pCO<sub>2</sub>が低下したことによるとしている。CCSに付属するPOバッグにおいても、保存に伴いpCO<sub>2</sub>が低下した。POバッグは、ガス透過性が高く<sup>9)</sup>、乳酸と重炭酸の平衡反応により生じたCO<sub>2</sub>はバッグ外に放出される。よって、保存中のpH上昇は、Trima Accelの血小板採取キットに付属するポリ塩化ビニル製バッグ同様、CO<sub>2</sub>濃度の低下が要因と考えられた。また、pHは保存5日まで、内部基準である6.2以上を維持しており、血球計数、血小板の機能や活性化に関するパラメーターは大きく変化していないことから、保存中のpHの上昇はPCの品質に影響しないと考えられた。

輸血後のviabilityと相関する<sup>10)</sup>とされる低浸透圧ショック回復率は、保存1日と保存3日以後との間に有意差をみとめなかった。血小板の止血能

評価である血小板凝集能は、有効期間(保存4日)内の変化をみとめず、保存5日まで約80%を維持した。輸血後の回収率と相関する<sup>11)</sup>とされる血小板形態は、保存5日まで変化がなかった。また、CCSによる分割PCの低浸透圧ショック回復率、血小板凝集能および血小板形態は、各保存期間において、Trima Accelによる分割PC<sup>8)</sup>と比較し同等あるいはそれ以上であった。血小板活性化マーカーであるCD62P陽性率は、保存4日で30.8 ± 10.5%であり、Trima Accelによる分割PCの保存4日値(28.9 ± 9.2%)<sup>8)</sup>と同等であった。よって、CCSによる分割PCの血小板機能は保存4日まで良好に維持され、また、血小板の活性化は、現在、輸血に使用されているPCと同程度と考えられた。

CCS分割プログラムによって採血された血小板原料血液の分割調製は、血小板採取バッグと分割用のPOバッグを無菌的に接続して行う。この時、POバッグと付属の接続チューブに由来するエアー(約12mL)がPCに混入し、品質低下を起こす可能性がある。一杉ら<sup>12)</sup>は、血小板分割時、エアーを均等(約6mL)にすれば、分割PCの品質は保存5日まで影響ないと報告している。本検

討の分割方法は、一杉らの報告と同一であるため、分割調製時に残存するエアーを均等にすることで、エアーによるPCの品質への影響はないと考える。

以上のことから、CCS分割プログラムによって採取し、分割製造された10単位PCの品質は、有効期間である保存4日まで良好に維持されたと考えられた。

## 文 献

- 1) Moog R: Feasibility and Safety of Triple Dose Platelet Collection by Apheresis. *J Clin Apher* 24: 238-240, 2009.
- 2) Keklik M, *et al.*: Comparison of double dose plateletpheresis on the Fenwal Amicus, Fresenius COM.TEC and Trima Accel cell separators. *Transfus Apher Sci* 51(2): 193-196, 2014.
- 3) Zhou Q, *et al.*: Improvement of plateletpheresis via technical modification on the MCS+. *Transfus Med* 25(3): 184-188, 2015.
- 4) Keklik M, *et al.*: Effectiveness of the Trima Accel cell separator in the double dose plateletpheresis. *Transfusion Apher Sci* 55(2): 240-242, 2016.
- 5) 生物学的製剤基準：厚生労働省告示第409号, 2018.
- 6) Holme S, *et al.*: 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.
- 7) 大軒子朗, ほか: 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.
- 8) 小池敏靖, ほか: 成分採血装置Trima Accelで採取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(3): 490-495, 2018.
- 9) 江月将史, ほか: 高酸素透過性バッグによる高単位血小板の室温長期(9日間)保存. *日本輸血細胞治療学会誌*, 51(6): 578-584, 2005.
- 10) Kim BK, *et al.*: The platelet response to Hypotonic Shock. Its value as an indicator of platelet viability after storage. *Transfusion* 14: 130-138, 1974.
- 11) Holme S, *et al.*: The expression of p-selectin during collection, processing, and storage of platelet concentrates: relationship to loss of in vivo viability. *Transfusion* 37: 12-17, 1997.
- 12) 一杉芽美, ほか: 血小板製剤の分割調製時に含まれるエアーが品質に及ぼす影響. *血液事業*, 40(3): 645-651, 2017.