

[原著]

新生児・小児輸血用の分割血小板製剤の品質 —小容量バッグ内のエアーが血小板の品質に及ぼす影響—

日本赤十字社血液事業本部中央血液研究所
金子祐次, 平山順一, 柴 雅之, 宮田茂樹, 佐竹正博

**The quality of split platelet concentrates (PCs) intended for
neonatal or pediatric transfusion:
Influence of air bubbles in the small-volume containers for split
PCs on their quality**

Japanese Red Cross Blood Service Headquarters Central Blood Institute
Yuji Kaneko, Junichi Hirayama, Masayuki Shiba, Shigeki Miyata, Masahiro Satake

抄 錄

現在、血小板製剤(PC)の1,2単位は成分採血由来PCを小容量バッグに分割し製造されている。しかし、5～20単位PCと保存条件(保存バッグの材質、混入エアーの有無)が一部異なっており、今回、その品質について詳細な検討を行った。我々は1,2単位PCの品質が分割後3日まで10単位PCと同等の品質を有しているのか、さらにバッグ内のエアーが品質に影響を及ぼしているのかを検証した。採血翌日に分割した1,2単位PCのpHは分割後3日まで7.3以上を維持し血小板機能等は分割血小板原料血液と概ね同等であったが、1,2単位PC共に一部の製剤で多数の微小凝集塊が観察された。次に混入エアーあり群となし群を1,2単位PCそれぞれ調製し分割後3日までの品質を比較した。混入エアーはpH、血小板機能等に有意な影響を示さなかったが、微小凝集塊の発生数はエアーを除去することで低減した。したがって、分割時、エアーを可能な限り除去することは1,2単位PCの品質向上に有用だと思われる。

Key words: platelet concentrates, small-volume container, air bubbles, platelet aggregates

【はじめに】

現在、日本赤十字社では血小板製剤(Platelet-Concentrate; 以下PCと略す)として1単位、2単位、5単位、10単位、15単位および20単位製剤を製造し供給しており、中でも容量の少ない1単位製剤と2単位製剤は新生児/小児用として供

給されている。

当初1単位PCと2単位PCは全血採血由來の原料血液から調製し製造されていたが、2007年1月の保存前白血球除去の導入によって全血中の血小板が白血球除去フィルターに吸着されることから1単位PCと2単位PCは成分採血由來PC

からの分割製造に変更された。今回、この製造方法および資材で調製された1単位PCと2単位PCの保存中の品質変化について詳細に検討した。

また、PCの分割調製は、血小板原料血液バッグと分割用バッグを無菌的に接続して行う必要がある。この時、分割用バッグ内にもともと含まれているエアーについては血小板の品質低下を招く恐れがあることから製造工程上、必要に応じてエアーを除去する手順となっている。しかしながら、全製造所でのエアー除去工程の判断基準は明確になっておらず、現行の1単位PCと2単位PCのバッグ中にエアーが残存している場合もある。以前に下垣らはPC中に含まれるエアーによる泡の量を一定と仮定すると容量の少ない低単位PCがより血小板とエアー(泡)が接触する機会が多く、血小板活性化および凝集塊生成への影響が大きい可能性があることを指摘している¹⁾。よって、1単位PCと2単位PCにおける残存するエアーの血小板製剤の品質に与える影響について併せて検討することとした。

本研究では、まず分割バッグ内に含まれるエアーを除去しない手順で調製した1単位PCと2単位PCが分割血小板原料血液(10単位PC)と同等の品質を有しているのか確認し、さらに、分割調製後に残存したエアーが、保存中の1単位および2単位PCの品質に影響を及ぼしているのかについて検証した。

【方 法】

1. 分割調製と保存

実験1：コントロール群と1単位PCまたは2単位PCの品質比較

試験用のPCは、ALT値が基準外となった照射10単位PC(成分採血装置トリマーアクセルで採取した分割10単位用血小板原料血液)を採血翌日(Day 0)に2本プールし、約1時間振とう器で振とう保存した。その後、分割前の品質試験用に一部検体を採取し(分割前)、容量および血小板濃度に基づいて1単位PCと2単位PCそれぞれ分割調製した。分割調製は日本赤十字社で規定された手順に従い、テルモ無菌接合装置(TSCD-II, Terumo BCT)を用いてプールPCバッグのチュ

ーブと小容量分割バッグ(BB-T030DJ, テルモ)のチューブを接続して、1単位用に約20mL、2単位用に約40mLを小容量分割バッグに移した(分割直後)。ただし、分割バッグ内にもともと含まれているエアーは除去せずに1単位および2単位PCそれぞれ、3バッグずつ作製した(エアー量：約12mL)。分割した残りの10単位相当量はコントロール群(Terumo BCT社製の血小板採取用バッグで保存)とし、各試験血液とともに血小板振とう機で3日間振とう保存(20～24°C, 60サイクル/分)した(図1)。なお、コントロール群は現行の10単位PCと同条件にするためにエアーは含まれていない。試験は5回実施した。

実験2：1単位PCおよび2単位PC中に含まれるエアーの影響

上述と同様に10単位PCを2本プールし約1時間振とう保存した後、1単位、2単位相当量をそれぞれ、小容量分割バッグに移して、一方はバッグ内にもともと含まれているエアーを残してエアーハブ群(Air+)とし、もう一方はエアーをプールPCバッグ側に戻してエアーレス群(Air-)とした。1単位PC、2単位PCそれぞれ、Air+群とAir-群を3バッグずつ作製し、血小板振とう機で3日間振とう保存(20～24°C, 60サイクル/分)した(図2)。試験は5回実施した。

2. 検体の採取および品質パラメーターの測定

コントロール群からの検体採取(約8mL)は、テルモ無菌接合装置を用いて50mLの分離バッグ(KBP-50C-2, 川澄化学工業)と接続することにより行った。1単位PCと2単位PCは容量が少なく経時的なサンプリングが困難なため、1バッグ全量を品質試験用検体として用いた。容量は電子天秤(LP-4200S, ザルトリウス)を用いて重量を測定し、比重1.03を除して算出した²⁾。pHと血液ガス分圧(pO₂, pCO₂)は、血液ガス分析装置(ラピッドポイント405, シーメンス)を用いて測定した。血小板数、平均血小板容積(MPV)は多項目自動血球分析装置(XS-800i, シスメックス)で測定した。低浸透圧ショック回復、血小板凝集能、血小板形態の測定はPCを自己血漿で

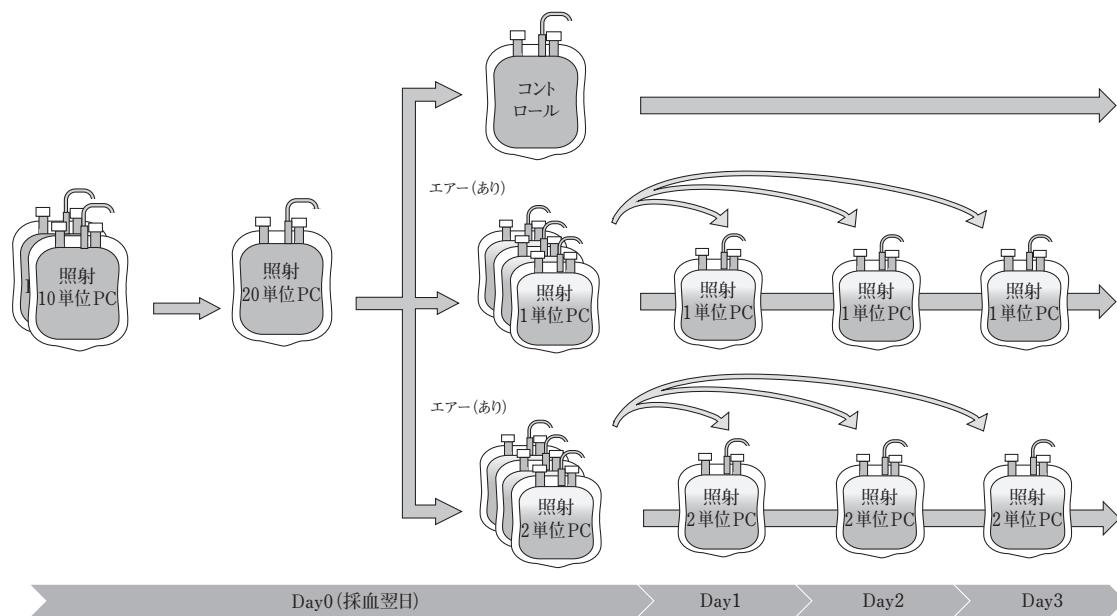


図1 実験1の試験デザイン

照射10単位PCを採血翌日に2本プールした。その後、照射1単位PCと照射2単位PCをそれぞれ3本ずつ作製し(分割バッグ内のエアーは除去しない)分割した残りはコントロール群(10単位PC)とした。各試験血液は3日間振とう保存し、日ごとに品質パラメーターの測定を実施した。

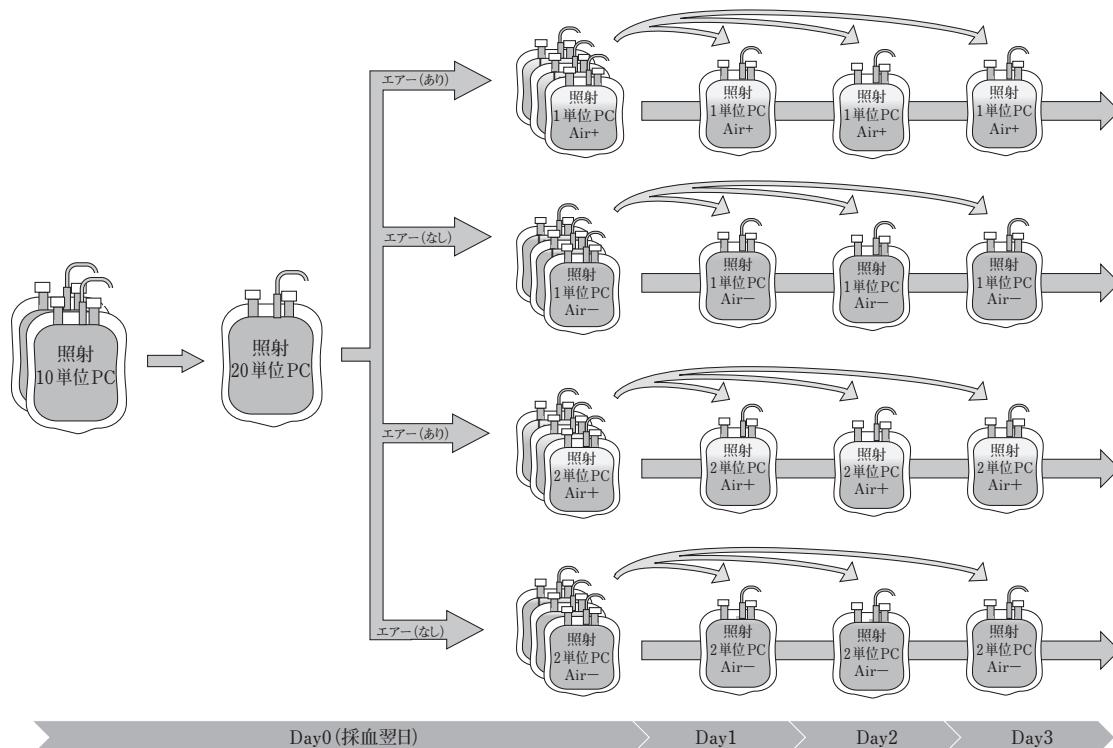


図2 実験2の試験デザイン

照射10単位PCを採血翌日に2本プールし 照射1単位PC, 照射2単位PCそれぞれエー有り群(Air+)とエー無し群(Air-)を3本ずつ作製した。各試験血液は3日間振とう保存し、日ごとに品質パラメーターの測定を実施した。

$30 \times 10^4/\mu\text{L}$ に希釈調製した多血小板血漿 (PRP) を用いて測定した。浸透圧ショック反応 (HSR) は、ダブルビーム分光光度計 (U-2900, 日立ハイテクサイエンス) を用いて常法に従い測定した³⁾。血小板凝集能 (最大凝集率) は、 CaCl_2 (4 mM) の存在下で、最終濃度 $2.5 \mu\text{g/mL}$ コラーゲン (ホルム) と $5 \mu\text{M}$ ADP (エル・エム・エス) に対する凝集反応 (7 分間) を、血小板凝集能測定装置 MCM-313 (タイヨウ) で記録した。血小板形態は、大軒らのストップ・アンド・フロー法に従い血小板凝集能測定装置 MCM-313 で測定し、静止時 (0 rpm) および攪拌時 (800 rpm) の透過率の比 (E_{800}/E_0) を算出した⁴⁾。CD62P 発現率 (%), CD42b 発現量 (MFI), Annexin-V 結合率 (%) の測定は、フローサイトメーター (Cytomics FC 500, ベックマン・コールター) を用いた。CD62P 発現率 (%), CD42b 発現量 (MFI) は、血小板 (5×10^5 個) に CD61-PerCP 抗体と CD62P-PE 抗体、または CD42b-PE (ともに BD) を加え、室温で 20 分間染色した。その後、4 % パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液 (富士フィルム和光純薬) を PBS (-) (富士フィルム和光純薬) で 4 倍希釈した固定液を血小板検体に加え 4°C で 30 分間固定し測定した。Annexin-V 結合率 (%) は、Annexin-V apoptosis detection kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて製造元のプロトコールに従い測定した。上清中のグルコース濃度と乳酸濃度は、それぞれグルコース C II - テストワコー (富士フィルム和光純薬), デタミナー LA キット (日立化成ダイアグノスティックス・システムズ) を使用し測定した。サンプルは遠心分離 (8,000 g, 5 分, 22°C) し、得られた上清を -40°C で保存した。スワーリングはバッグを白色蛍光灯にかざし肉眼で観察し判定した。凝集塊は、各試験血液バッグを 5 分間架台につるした状態で静置し、バッグ底部に沈降してきた凝集塊を肉眼で確認した。凝集塊の判定は 1 個でも観察された場合、陽性と判定した。

3. 統計解析

測定値は平均値土標準偏差 (SD) で表した。統計解析ソフトは、GraphPad Prism 7 ver7.02 (エ

ムデーエフ) を用いた。実験 1 における保存中のコントロール群と 1 単位 PC または 2 単位 PC 間の各品質パラメーターの結果を Two-way repeated-measures ANOVA で検定後 Bonferroni test で多重比較検定し評価した。また、実験 2 における保存中の 1 単位および 2 単位 PC の Air + 群と Air - 群の各品質パラメーターの結果も上記と同様の検定で評価した。実験 1 および実験 2 ともに P 値は <0.05 のときに統計学的に有意であると判断した。

4. 倫理

本検討は日本赤十字社の倫理審査の承認を得て実施した (倫理審査番号 : 2018-001)。

【結 果】

実験 1-1 各 PC の品質変化

実験 1 の品質試験の結果を表 1 に示した。血小板濃度は Day 3 までコントロール群と 1 単位 PC または 2 単位 PC に有意差を認めなかった。

pH は Day 3 まですべての検体で 7.3 以上を維持していた。2 単位 PC はコントロール群と比べて有意に低かったが、日本赤十字社の内部基準 (6.2 以上) を満たした。pO₂ 値は Day 1 では 1 単位 PC がコントロール群と比べて有意に高かった。一方、2 単位 PC は Day 3 までコントロール群と比べて低く、Day 2 および Day 3 において有意差を認めた。pCO₂ 値は Day 3 まで 1 単位 PC とコントロール群は同等レベルであったが、2 単位 PC は Day 3 までコントロール群と比べて有意に高かった。乳酸濃度は 3 群すべて保存とともに上昇したが、Day 3 における 2 単位 PC はコントロール群と比べて有意に低かった。

HSR 値、血小板凝集能値は Day 3 までコントロール群と 1 単位 PC または 2 単位 PC 間に有意差を認めなかった。

MPV, グルコース濃度, CD62P 発現率 (%), CD42b 発現量 (MFI) および Annexin-V 結合率 (%) は、Day 3 までコントロール群と 1 単位 PC または 2 単位 PC に有意差を認めなかった。

表1 コントロール(10単位PC), 1単位PC及び2単位PCの品質①

試験項目	分割前		種別	分割後		
	Day0	Day1		Day2	Day3	
容量 (mL)	421 ± 12	コントロール	190 ± 20	181 ± 20	172 ± 21	
		1単位	21 ± 1	21 ± 1	22 ± 0	
		2単位	41 ± 0	41 ± 0	41 ± 1	
血小板濃度 (×10 ⁴ /mL)	107.4 ± 10.5	コントロール	107.3 ± 9.8	107.4 ± 9.7	108.2 ± 9.3	
		1単位	108.0 ± 8.4	106.8 ± 8.2	106.1 ± 7.8	
		2単位	109.1 ± 9.9	106.2 ± 9.4	106.5 ± 7.7	
pH at 22°C	7.45 ± 0.06	コントロール	7.55 ± 0.03	7.55 ± 0.03	7.52 ± 0.03	
		1単位	7.56 ± 0.02	7.56 ± 0.01	7.51 ± 0.04	
		2単位	7.45 ± 0.03 †	7.42 ± 0.03 †	7.40 ± 0.03 †	
pO ₂ at 22°C (mmHg)	41.1 ± 8.6	コントロール	53.4 ± 2.3	55.3 ± 1.2	60.5 ± 3.8	
		1単位	70.3 ± 3.2 †	62.4 ± 6.4	55.9 ± 12.7	
		2単位	47.1 ± 3.6	41.9 ± 5.9 †	41.4 ± 5.7 †	
pCO ₂ at 22°C (mmHg)	18.0 ± 2.3	コントロール	12.5 ± 0.7	10.9 ± 0.7	10.1 ± 0.7	
		1単位	12.0 ± 0.4	10.5 ± 0.2	10.5 ± 0.4	
		2単位	16.1 ± 0.9 †	15.2 ± 0.9 †	15.0 ± 1.1 †	
グルコース濃度 (mg/dL)	387 ± 25	コントロール	376 ± 26	360 ± 26	347 ± 26	
		1単位	376 ± 26	366 ± 25	355 ± 25	
		2単位	377 ± 25	368 ± 27	359 ± 25	
乳酸濃度 (mg/dL)	31 ± 4	コントロール	41 ± 4	54 ± 4	68 ± 4	
		1単位	42 ± 4	52 ± 4	63 ± 5	
		2単位	39 ± 5	50 ± 5	55 ± 4 †	
MPV (fL)	9.0 ± 0.3	コントロール	9.1 ± 0.2	9.1 ± 0.2	9.1 ± 0.2	
		1単位	9.2 ± 0.2	9.3 ± 0.2	9.4 ± 0.3	
		2単位	9.1 ± 0.2	9.2 ± 0.3	9.2 ± 0.2	
血小板形態 (E ₈₀₀ /E ₀)	0.898 ± 0.020	コントロール	0.895 ± 0.019	0.903 ± 0.022	0.908 ± 0.024	
		1単位	0.898 ± 0.013	0.906 ± 0.016	0.911 ± 0.024	
		2単位	0.892 ± 0.013	0.904 ± 0.019	0.908 ± 0.026	
HSR (%)	76.5 ± 7.8	コントロール	72.4 ± 8.0	71.1 ± 9.7	70.4 ± 10.0	
		1単位	70.9 ± 8.5	66.2 ± 8.7	61.0 ± 9.2	
		2単位	74.0 ± 6.5	70.4 ± 8.2	68.2 ± 10.8	
血小板凝集能 (%)	82.2 ± 9.3	コントロール	78.4 ± 9.5	76.6 ± 10.6	74.4 ± 9.7	
		1単位	77.0 ± 10.2	71.4 ± 11.2	68.2 ± 10.8	
		2単位	78.0 ± 10.7	74.2 ± 9.8	72.6 ± 10.1	
CD62P 発現率 (%)	17.5 ± 5.0	コントロール	21.2 ± 4.8	26.3 ± 5.3	31.2 ± 5.3	
		1単位	22.4 ± 6.3	27.2 ± 7.9	35.0 ± 7.3	
		2単位	19.0 ± 5.9	24.7 ± 7.9	27.9 ± 6.4	
CD42b 発現量 (MFI)	123 ± 11	コントロール	123 ± 11	120 ± 9	116 ± 12	
		1単位	120 ± 9	115 ± 12	113 ± 8	
		2単位	121 ± 11	115 ± 8	115 ± 9	
Annexin-V 結合率 (%)	1.4 ± 0.6	コントロール	2.5 ± 1.0	3.6 ± 1.6	4.3 ± 0.8	
		1単位	2.4 ± 1.3	3.9 ± 1.4	4.7 ± 1.3	
		2単位	1.7 ± 0.5	3.6 ± 1.9	3.6 ± 0.8	

MEAN ± SD (N=5)

† : p<0.05 by Two-way repeated-measures ANOVA with the Bonferroni post hoc test. (コントロール群 vs 1単位 or 2単位)

実験1-2 各PCのスワーリングの有無と凝集塊の発生件数

外観試験の結果を表2に示した。Day 0における分割前のすべての試験血液はスワーリングが良好に観察され、微小凝集塊の発生を認めなかつた。保存中のスワーリングはDay 3まですべての検体で良好に観察された。凝集塊の発生件数はDay 3までに1単位PCは5検体中2検体、2単位PCは5検体中1検体で、その凝集塊は1mm以下の微小凝集塊で多数観察された(図3)。一方、コントロール群は保存中、凝集塊の発生を認めなかつた。

実験2-1 エアーの有無による品質への影響

各PCのエアーの有無による品質試験結果を表3に示した。

pHは1単位PCと2単位PC共にDay 3までAir+群とAir-群の両群間に有意差はなく、7.3以上を維持した。

pO₂値はDay 1では1単位PCおよび2単位PC

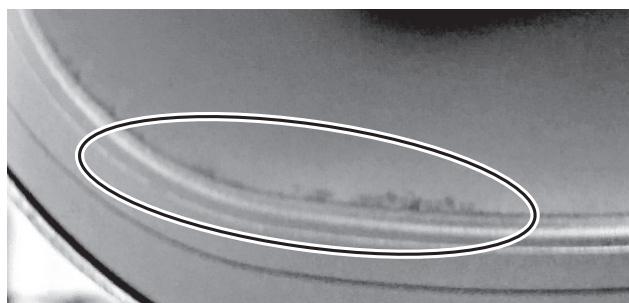


図3 Day2の2単位PCで観察された凝集塊
凝集塊は1mm以下の大きさでバッグ下端に並ぶ程度

表2 コントロール(10単位PC), 1単位PC及び2単位PCの品質②
スワーリングと凝集塊の結果

外観試験項目	種別	Day0 (分割直後)	Day1	Day2	Day3
スワーリング ^a	コントロール	+	+	+	+
	1単位	+	+	+	+
	2単位	+	+	+	+
凝集塊 (陽性数/検体数)	コントロール	0/5	0/5	0/5	0/5
	1単位	0/5	0/5	2/5	2/5
	2単位	0/5	0/5	1/5	1/5

a: スワーリングの有無(−: 無, +: 有)

共にAir+群に比べAir-群が有意に低かったが、Day 2以降は両群間に有意差は見られなかつた。

その他の品質パラメーター(血小板濃度, pCO₂, MPV, HSR, 血小板凝集能, 血小板形態, CD62P 発現率, CD42b 発現量, Annexin-V 結合率)は、Day 3まで1単位PCと2単位PC共にAir+群とAir-群の両群間に有意差を認めなかつた。

実験2-2 エアーの有無によるスワーリングと凝集塊発生への影響

各PCのエアーの有無による外観試験結果を表4に示した。Day 0における分割前のすべての試験血液はスワーリングが良好に観察され、微小凝集塊の発生を認めなかつた。保存中スワーリングは、エアーの有無に関係なくDay 3まですべての検体で良好に観察された。凝集塊の発生件数はDay 3までに1単位PCではAir+群で5検体中3検体、Air-群で5検体中0検体、2単位PCはAir+群で5検体中3検体、Air-群で5検体中1検体観察された。その中でも、図3のような微小凝集塊が多数観察された件数は1単位PCのAir+群で3検体中1検体、2単位PCのAir+群で3検体中2検体であった。

【考察】

本検討では、現行の分割手順で調製した1単位PCと2単位PCの品質を詳細に評価するため、コントロール群(10単位PC)との比較を行うとともに、分割調製時、エアーを除去した1単位PCおよび2単位PCと、エアーを残存させた場合とを比較検討した。実験1では現行の分割手順で調

表3 1単位PCと2単位PCに含まれるエアーの有無が品質に及ぼす影響①

試験項目	単位(Air ±)	Day1	Day2	Day3
容量 (mL)	1(Air +)	22 ± 2	21 ± 2	21 ± 1
	1(Air -)	22 ± 1	23 ± 2	21 ± 1
	2(Air +)	40 ± 1	40 ± 1	41 ± 1
	2(Air -)	40 ± 1	41 ± 1	42 ± 1
血小板濃度 (×10 ⁴ /mL)	1(Air +)	109.8 ± 1.8	109.9 ± 3.5	107.1 ± 4.1
	1(Air -)	111.2 ± 2.4	108.4 ± 4.4	109.2 ± 3.8
	2(Air +)	110.1 ± 3.8	109.5 ± 4.1	106.8 ± 3.6
	2(Air -)	110.2 ± 4.2	109.0 ± 3.6	107.4 ± 5.4
pH at 22°C	1(Air +)	7.59 ± 0.05	7.58 ± 0.07	7.51 ± 0.08
	1(Air -)	7.58 ± 0.07	7.57 ± 0.05	7.53 ± 0.07
	2(Air +)	7.49 ± 0.05	7.45 ± 0.06	7.39 ± 0.06
	2(Air -)	7.48 ± 0.05	7.46 ± 0.06	7.39 ± 0.06
pO ₂ at 22°C (mmHg)	1(Air +)	77.8 ± 6.1	70.3 ± 3.1	69.5 ± 4.7
	1(Air -)	66.1 ± 7.3 †	67.0 ± 1.1	65.7 ± 5.8
	2(Air +)	50.9 ± 4.6	44.7 ± 3.6	41.4 ± 2.0
	2(Air -)	42.8 ± 1.9 †	42.2 ± 2.2	40.8 ± 3.0
pCO ₂ at 22°C (mmHg)	1(Air +)	10.5 ± 0.6	9.7 ± 0.4	9.5 ± 0.9
	1(Air -)	11.3 ± 0.9	9.8 ± 1.0	9.4 ± 1.1
	2(Air +)	14.6 ± 1.2	14.2 ± 0.9	14.5 ± 1.2
	2(Air -)	14.8 ± 0.9	14.2 ± 0.8	14.5 ± 1.2
グルコース濃度 (mg/dL)	1(Air +)	368 ± 55	359 ± 55	349 ± 55
	1(Air -)	369 ± 54	361 ± 54	354 ± 60
	2(Air +)	370 ± 56	362 ± 55	351 ± 50
	2(Air -)	370 ± 55	363 ± 54	352 ± 51
乳酸濃度 (mg/dL)	1(Air +)	41 ± 5	53 ± 6	65 ± 9
	1(Air -)	39 ± 6	51 ± 7	62 ± 6
	2(Air +)	39 ± 5	47 ± 6	59 ± 7
	2(Air -)	38 ± 5	46 ± 6	57 ± 8
MPV (fL)	1(Air +)	8.4 ± 0.3	8.6 ± 0.3	8.8 ± 0.5
	1(Air -)	8.4 ± 0.4	8.5 ± 0.4	8.7 ± 0.3
	2(Air +)	8.4 ± 0.4	8.5 ± 0.3	8.6 ± 0.5
	2(Air -)	8.4 ± 0.3	8.5 ± 0.3	8.6 ± 0.5
血小板形態 (E ₈₀₀ /E ₀)	1(Air +)	0.897 ± 0.024	0.901 ± 0.028	0.897 ± 0.025
	1(Air -)	0.900 ± 0.019	0.901 ± 0.023	0.896 ± 0.023
	2(Air +)	0.894 ± 0.020	0.898 ± 0.024	0.900 ± 0.020
	2(Air -)	0.891 ± 0.016	0.896 ± 0.018	0.892 ± 0.020
HSR (%)	1(Air +)	72.0 ± 7.7	61.6 ± 8.3	54.4 ± 5.3
	1(Air -)	73.0 ± 7.3	62.1 ± 6.8	55.1 ± 5.0
	2(Air +)	77.0 ± 5.8	69.6 ± 6.6	61.7 ± 7.6
	2(Air -)	78.0 ± 5.8	70.2 ± 7.2	62.6 ± 8.2
血小板凝集能 (%)	1(Air +)	76.6 ± 3.8	64.6 ± 6.3	60.4 ± 10.3
	1(Air -)	77.2 ± 4.6	66.0 ± 5.8	63.0 ± 4.9
	2(Air +)	79.0 ± 3.3	70.0 ± 5.2	67.4 ± 7.3
	2(Air -)	77.8 ± 3.9	69.4 ± 7.8	65.6 ± 5.1
CD62P 発現率 (%)	1(Air +)	21.6 ± 4.5	28.6 ± 4.2	39.6 ± 6.1
	1(Air -)	20.9 ± 5.5	27.7 ± 6.0	35.5 ± 5.6
	2(Air +)	18.9 ± 5.9	23.2 ± 3.1	31.5 ± 5.9
	2(Air -)	18.1 ± 4.3	21.0 ± 3.8	29.7 ± 6.3
CD42b 発現量 (MFI)	1(Air +)	107 ± 12	102 ± 10	92 ± 12
	1(Air -)	106 ± 12	103 ± 9	94 ± 12
	2(Air +)	105 ± 11	101 ± 10	90 ± 7
	2(Air -)	102 ± 10	101 ± 10	91 ± 6
Annexin-V 結合率 (%)	1(Air +)	2.3 ± 0.7	3.6 ± 0.6	6.3 ± 2.4
	1(Air -)	2.2 ± 0.8	3.0 ± 1.1	4.4 ± 1.3
	2(Air +)	2.8 ± 0.2	3.2 ± 1.1	5.1 ± 1.1
	2(Air -)	2.5 ± 0.7	3.0 ± 1.1	4.8 ± 1.1

MEAN ± SD (N=5)

† : p<0.05 by Two - way repeated - measures ANOVA

with the Bonferroni post hoc test. (1単位と2単位の Air + vs Air -)

製したエアーありの1単位PCと2単位PCはDay3まで10単位PCと概ね同等の品質を有していることを確認した。さらに、実験2では分割バッグにもともと含まれているエアーは保存中の1単位PCと2単位PCの品質に影響を与えていないが、凝集塊の発生に関与している可能性が示唆された。

実験1においてpHは1単位PCおよび2単位PC共にDay3まで7.3-7.6を維持していた。2単位PCのpHが分割後3日までコントロール群および1単位PCと比べてわずかに低かった理由は2単位PCのpCO₂値がコントロール群および1単位PCと比べてのわずかに高いレベルであったことを反映した結果だと考えられる。そして、これはガス透過性の低いバッグの材質であることと血小板数あたりのバッグ表面積比が小さいことによりCO₂の排出が抑制されたことが要因として考えられる。

また、血小板数あたりのバッグの表面積比は血小板のガス交換だけでなく、保存中の血小板の機能維持にも影響することも示されている^{5), 6)}が、実験1においてDay3までのHSR値および凝集能値の平均値は3群間で有意な差を認めておらず、既報^{5), 6)}を支持する結果ではなかった。しかしながら、保存に伴う1単位PCのHSR値および凝集能値はコントロール群、2単位PCと比べて低い傾向が見られており、この血小板収量(20mL)に対する300mL用のバッグサイズ(表面積)が影響している可能性は否定できず、今後、血小板製剤の長期間保存を考慮する際には、注意深い検討が必要となる可能性がある。

次に実験1で観察された1単位PCと2単位PCの微小凝集塊の発生については、下垣ら¹⁾が示唆しているように容量が少ない低単位PCでは、血小板がエアー(泡)と接触する機会が多く、血小板活性化および凝集塊生成への影響が大きいことを表している可能性が高いと考えられる。

PCの採血時あるいは保管工程で微小凝集塊がまれに発生することは広く知られているが、この現象とその臨床的意義について調査した報告はほとんどない⁷⁾。また一方でPCが細菌汚染されている場合にも、凝集塊が発生することがあり、凝

集塊を有するPCは減損される。本検討では無菌試験を行っていないため、この微小凝集塊が細菌汚染に由来するものではないと断定できないが、微小凝集塊が発生した試験血液のpHは7.3以上で保存中、著しい低下を認めなかつたこと、また、スワーリングが良好に観察でき、色調に変化を認めなかつた。加えて、本検討で微小凝集塊が発生した試験血液が細菌汚染に由来するものであれば分割調製されたすべての群で観察されるはずだが、実験1でのコントロール群では見られず、実験2のAir一群では少ない、または、見られなかつた。そのため、本検討で観察された微小凝集塊が細菌汚染に由来するものとは考えにくい。よって、微小凝集塊を有することにより減損される製剤ができるだけ少なくする方法、すなわち、凝集塊生成を抑制する方法の検討は重要となる。そこで実験2では1単位PCと2単位PC中に含まれるエアーの有無が血小板機能および凝集塊の発生に影響を及ぼしているのかについて検証した。エアーと血小板の*in vitro*の品質の関係についてはバッグ内のエアーを除去することで保存中の1単位PCと2単位PC共にpO₂値がわずかに低値を示したのみで、その他の血小板濃度、pH、形態、代謝能、機能および活性化パラメーターに有意な影響を示さなかつた(表3)。pO₂値のわずかな低値はバッグ中にエアーがないことにより、エアーからPCへの酸素供給が抑制され、Air一群のpO₂値がAir+群と比べて早期に低下しplateauに達したためだと推測される。

今回の結果から分割バッグ中にもともと含まれているエアーは保存中の1単位PCと2単位PCの品質に影響を与えていないこと、また、エアーを除去しても品質が変化しないことを示唆している。これは以前に一杉ら⁸⁾が分割10単位PC中に含まれるエアー(約6mL)は血小板機能には影響を与えたなかったという報告と同様の結果であった。しかし、他方でSandgrenら⁹⁾は血漿を70%PAS液に置換したBuffy-Coat由來の血小板において、調製中に混入したバッグ内のエアーは血小板のさまざまな*in vitro*パラメーター(血小板濃度、MPV、HSR、CD42b発現量)に悪影響を与えること、また下垣ら¹⁾はPC中に含まれるエアー(約

表4 1単位PCと2単位PCに含まれるエアーの有無が品質に及ぼす影響②

スワーリングと凝集塊の結果

外観試験項目	種別	Day0 (分割直後)	Day1	Day2	Day3
スワーリング ^a	1(Air +)	+	+	+	+
	1(Air -)	+	+	+	+
	2(Air +)	+	+	+	+
	2(Air -)	+	+	+	+
凝集塊 (陽性数/検体数)	1(Air +)	0/5	0/5	3/5	3/5
	1(Air -)	0/5	0/5	0/5	0/5
	2(Air +)	0/5	2/5	3/5	3/5
	2(Air -)	0/5	0/5	1/5	1/5

a: スワーリングの有無(−: 無, +: 有)

10-12mL)は、血小板の活性化に伴うCD62P発現率の亢進および生理活性物質(RANTES, β-TG)の放出に関与していることを報告している。

保存中の凝集塊の発生件数については下垣ら¹, Sandgrenら⁹の報告と同様、エアーを除去することで1単位および2単位PC共に低減した(表4)。これは実験1の結果も踏まえるとバッグ中に含まれているエアーが凝集塊の発生に関与している可能性を示唆している。一方、一杉ら⁸の報告においてはエアーの有無による微小凝集塊の発生数に差はなかったとしている。本結果との相違は一杉らが示唆しているようにバッグ中に含まれるエアー量の違いが関係している可能性が考えられる。1単位および2単位PC中に存在するエアーアー量は一杉らが報告したエアーアー量(約6mL)の約2倍量(約12mL)である。そのため、容量が少ない1単位および2単位PCにおいては血小板がエアーアー(泡)と接触する回数が多く、微小凝集塊生成に及ぼす影響が大きいと考えられる。しかしながら、今回、エアーアーを除去しても凝集塊が1例発生したことからエアーアー以外の刺激等が複合的に関与している可能性も想定できる⁷。本結果からエアーアーによる凝集塊の有無と血小板活性化パラメーター(CD62P発現率, CD42b発現量)の変化に直接的な関連性が見られなかつたことからエアーアーによる凝集塊発生の根本的なメカニズムを解明するには、さらなる詳細な検証が必要であると考えられる。

以上のことから本検討の結果をまとめると、現行の手順で分割調製した1単位PCと2単位PC

の品質はコントロール群と比較してわずかな違い(pH, 血液ガス, 乳酸濃度)があったもののDay3まで概ね同等の品質を有しており、良好に維持されていることが確認できた。最近、Bashirら¹⁰は、トリオクチルトリメリテート(TOTM)を可塑剤とした小児血小板保存バッグ(表面積: 225cm²)を用いて保存7日間、小容量PC(45mL)の品質が維持できることを報告している。それゆえ、今後、1単位PC, 2単位PCについて最適なバッグサイズ、材質に変更することで高い血小板機能をより長期に保存できる可能性がある。そして、現行の1単位PCと2単位PC中のエアーアーについてはDay3までpH, 血小板機能、血小板の活性化に影響を与えたかったが、凝集塊の発生に関与している可能性を示唆するものであった。したがって、各血液センターの製造所で1単位PCと2単位PCを分割製造する際、分割バッグ内のエアーアーを可能な限り除去することが品質向上に寄与する可能性が示唆された。

令和元年度実績において全国で1単位PCは111本、2単位PCは307本製造されている。本検討に基づき、残存エアーアー除去工程を各製造所のマニュアルに追記した場合、各製造所に及ぼす負担(教育訓練、作業手順改訂に伴う変更管理、資材コスト、時間外労働)の増加は考慮すべき点ではあるが、品質向上の観点からすれば前向きな検討が望まれる。

また、日本輸血・細胞治療学会の「血液製剤の院内分割マニュアル」ではガス透過性の低い塩化ビニル樹脂製バッグに分割したPCは直ちに輸血

をするよう記載されているが、ガス透過性の低い塩化ビニル樹脂製小容量バッグでも分割後有効期間内まで血小板機能が維持されていたという本結果は院内で分割調製している医療機関の臨床での

利便性の向上に繋がり、今後の新生児/小児患者に対する血小板輸血療法の確立に貢献できるものと思われる。

文 献

- 1) 下垣一成ほか：濃厚血小板製剤中のエアーが品質に及ぼす影響、血液事業,26(3) : 523-527,2003
- 2) Guidelines for the blood transfusion services in the United Kingdom, 8th edition, The Stationery Office, London, 2013. Guidelines for the Blood Transfusion Services Update, 6.3: Component and process monitoring tests <http://www.transfusionguidelines.org/red-book-update/chapter-6-evaluation-and-manufacture-of-blood-components/6-3-component-and-process-monitoring-tests> (2021年5月現在)
- 3) 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 (1) : 31-40,1998
- 4) 大軒子郎ほか：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－、日本輸血細胞治療学会誌,43(3) : 350-355,1997
- 5) 大軒子郎ほか：濃厚血小板保存用ポリ塩化ビニル製バッグの最適表面積比、日本輸血学会誌,36(1) : 37-42,1990
- 6) Skripchenko A, et al. : Maintenance of storage properties of pediatric aliquots of apheresis platelets in fluoroethylene propylene containers. Transfusion, 53 (4) : 872-877, 2013
- 7) Ringwald J, Antoon M, Eckstein R, et al.:Residual aggregates in platelet products: what do we know? Vox Sanguinis, 106 (3): 209-218, 2014
- 8) 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
- 9) Sandgren P, Saeed K : Storage of Buffy-Coat-Derived Platelets in Additive Solution: In Vitro Effects on Platelets of the Air Bubbles and Foam Included in the Final Unit. Blood Transfusion, 9 (2) : 182-188, 2011
- 10) Bashir S, et al. : In vitro quality of apheresis platelets divided into paediatric-sized units and stored in PVC bags plasticised with TOTM, BTHC or DINCH. Transfus Med,28 (5) : 380 - 385, 2018