

原 著

[原著]

単位割れ濃厚血小板の血小板数に対する振とう処理効果の解析

宮城県赤十字血液センター

及川伸治, 田口 剛, 佐々木大, 平野健司, 菊地正輝, 澤村佳宏, 伊藤 孝

Analysis of the effect of agitation process on the platelet counting in platelet concentrates not reached to the target yield

Japanese Red Cross Miyagi Blood Center

Shinji Oikawa, Takeshi Taguchi, Dai Sasaki, Kenji Hirano, Masaki Kikuchi,
Yoshihiro Sawamura and Takashi Itoh

抄 録

血小板数の低値による「単位割れ」は、血小板活性化による一時的な凝集に起因すると仮定し、振とう処理により血小板数が上昇するかを検討した。また、血小板数と関連パラメータ変動値に対し相関分析と重回帰分析を行い、CD62P、PAC-1陽性率とPLT Clumpsとの関係を調べた。さらに、振とう処理後の血小板数増加を予測するため線形判別分析を行った。

振とう処理後の24.6%において単位が上昇し、重回帰分析によりP-LCRとPLT Clumpsは血小板数変動との関連が示唆された。CD62P、PAC-1陽性率はPLT Clumps 50以上の群で有意に高く、PLT Clumpsは血小板活性化を反映していることが示唆された。さらに、正判別率約80%の予測式が得られたことから、血小板数が上昇する可能性の高いPCの選択的な振とう処理が可能となり、効率的に単位割れPCの製造を抑制することができる。

Key words: platelet concentrate, multiple regression analysis, discriminant analysis, CD62P/PAC-1

はじめに

日本赤十字社では輸血用濃厚血小板製剤(以下PCと略す)を、1単位、2単位、5単位、10単位、15単位および20単位製剤として製造し供給している。10単位製剤の供給量が最も多く、全体の約80%を占めている。血小板はすべて単一献血者からアフエーシス採血されているが、これは受血者に対する献血者数を減らすことにより、同種免疫とウィルス伝播のリスクを回避するためである。現在は、混入白血球数が低減化されたCCS(ヘモ

ネティクス)、テルシスS(テルモ)およびトリマアクセル(カリディアンBCT)が使用されている。

血小板製剤の単位は、製造時に測定される容量と血小板数(以下PLTと略す)に基づき決定されるが、しばしば総PLTが低値となり、採血予定単位数に到達しないことがある(単位割れ)。この単位割れ本数が多いほど採血指図本数と実製造本数との乖離が大きくなる。

アフエーシス採血は前述した利点がある一方、その採血中のずり応力により血小板が活性化

され、その品質に影響を及ぼすことが報告されている¹⁾。本研究では、PLTの低値による「単位割れ」は、血小板の活性化による一時的な凝集に起因すると仮定し、振とう処理により凝集を消失させることでPLTが上昇するかを検討した。一方、血小板の活性化や凝集塊の検出に自動血液分析装置が活用されている^{2)~5)}。そこでPLT測定工程で使用しているXS-1000i(シスメックス)の血小板関連パラメータであるMPV(平均血小板容積)、P-LCR(大型血小板比率)、PDW(血小板分布幅)およびPLT Clumps(血小板凝集)と、フローサイトメトリーで検出した血小板表面抗原の発現率との関連性を調べた。また、血小板関連パラメータが、PLT増加の予測因子になり得るかを、重回帰分析(変数選択法)および線形判別分析により検証した。

方 法

1. PLT測定と単位の決定

採血部門から引き渡されたPC原料は、標準作業手順書に従い処理した。色調、凝集の有無などを確認後、原料バッグ内に残存しているエアは原料バッグに接続されている小容量バッグに移すことにより除去した。PLT測定用検体は原料から3mL程度試験管に採取し、PLTを多項目自動血球分析装置SF-3000またはXS-1000i(シスメックス)を用いて測定した(2009年はSF-3000、2010年4月以降はXS-1000iを使用した)。血小板容量は、電子秤(GX-2000R, エー・アンド・デイ)で全体重量を秤量し、その重量から風袋を減じた値を比重(1.03)で除することにより求めた。PC単位は、血小板濃度に容量を乗じて得られた総PLTに基づき決定した(表1)。以上のPC単位決定に係る計

算は、血小板単位測定システム(CJPテクノロジー)を用いて行った。

2. 採血予定単位数に満たなかったPCの振とう処理とPLT再測定

採血予定単位数が10単位であるPCのうち、総PLTが10単位規格未満となったPCを血小板振とう機(大同工業)に格納し、一晚振とう保管した(22℃, 60サイクル/分)。翌日の午前中に、分離バッグ(BB-T008FJ, テルモ)を無菌的に接続してPLT測定用検体を採取した。PLT再測定と全体重量の再秤量を行った後、単位を決定した。振とう処理前後のPLT変動と単位上昇件数は血小板単位測定システムに保存されているデータを用いて集計した。

3. 振とう処理前後のPLTおよび血小板関連パラメータ変動値に対する相関分析と重回帰分析

分析対象は2010年4月～7月の振とう処理実施PCとした。振とう処理前後のPLT変動と血小板関連パラメータ変動との相関性を調べるために、PLT変動値に対する関連パラメータの変動値の散布図を作成して相関係数(r)を求めた。さらにPLT変動に影響が大きい関連パラメータを抽出するため、目的変数をPLT変動値、説明変数を関連パラメータ(PDW, MPV, P-LCR, PLT Clumps)変動値として、重回帰分析(変数選択法)を行った。

4. フローサイトメトリーによるCD62P, PAC-1陽性率の測定

採血当日にサンプリングしたPLT測定用検体

表1 血小板製剤の総血小板数と容量(製造管理基準書 社内統一版 改訂No.12より抜粋)

分量(単位数)	総血小板数	容量
分量1(1単位)	0.2×10 ¹¹ 以上0.4×10 ¹¹ 未満	15～25mL
分量2(2単位)	0.4×10 ¹¹ 以上1.0×10 ¹¹ 未満	30～50mL
分量5(5単位)	1.0×10 ¹¹ 以上2.0×10 ¹¹ 未満	80～120mL
分量10(10単位)	2.0×10 ¹¹ 以上3.0×10 ¹¹ 未満	160～240mL
分量15(15単位)	3.0×10 ¹¹ 以上4.0×10 ¹¹ 未満	200～300mL
分量20(20単位)	4.0×10 ¹¹ 以上5.0×10 ¹¹ 未満	200～300mL

を、PLT Clumpsが0の群(Clumps 0群)と50以上の群(Clumps 50以上群)に分けた。検体はリン酸緩衝生理食塩液(以下PBSと略す)で20倍に希釈した後、FITC 標識 PAC-1、PE 標識 CD62P および PerCP 標識 CD61抗体と共に、15分間、室温、暗所で反応させた。陰性コントロールとして、PE 標識抗マウスIgG1抗体とPAC-1の結合を阻害するRGDSを使用した。抗体はすべてBD Bioscience Pharmingenから入手した。反応後、1%パラホルムアルデヒドPBS溶液 1000 μ Lを添加して固定した。測定は抗CD61抗体陽性細胞をゲーティングし、その10,000個中におけるCP62PまたはPAC-1陽性PLTをカウントした。解析時に、PE およびFITC logスケール上で、陰性コントロールの0.5%が陽性となる位置を陽性細胞決定のための境界とした。フローサイトメーターはBD社製FACSCalibur を使用し、解析は付属のCell Questを用いて行った。

5. 線形判別分析による振とう処理後のPLT増加予測

採血当日のPLTと関連パラメータから、単位割れPCの振とう処理によるPLT増加を予測するために、線形判別分析を行った。分析対象は2010年4月～7月の振とう処理実施PCとした。振とう処理後にPLTが $10 \times 10^4 / \mu$ L以上増加した群を「増加群」($n=22$)、 $10 \times 10^4 / \mu$ L未満の群を「非増加群」($n=171$)とした。

6. 統計処理

統計処理方法と処理対象データは各実験方法の項に記述した。t検定、相関分析および重回帰分析を行う場合はStatcel2(4stepsエクセル統計 第2版付属ソフト、オーエムエス出版)を、線形判別分析を行う場合はMulcel(エクセル統計 実用多変量解析編付属ソフト、オーエムエス出版)を使用した。危険率が5%未満である場合、統計学的に有意であると判断した。

結 果

1. 単位割れ発生件数と振とう処理実施結果

単位割れは、調製本数26,440件中412件(1.6%)

であった。振とう処理による単位上昇件数は、振とう処理実施本数252件中62件(24.6%)であった。単位上昇群のPLT変動(増加)割合が最も大きかった(図1)。再測定後に単位が上昇したPCは、血小板凝集が解消されたことによりPLTが増加したためと推測されるため、通常手順に従い製品化した。

2. 振とう処理前後のPLTおよび関連パラメータ変動値に対する相関分析と重回帰分析

振とう処理前後におけるPLTと各パラメータの変動には、負の相関が認められた(図2)。また重回帰分析を行ったところ、P-LCRとPLT Clumpsを選択した場合の自由度修正決定係数が最も高い値であった(図3)。

3. CD62P、PAC-1陽性率と血小板関連パラメータ

Clumps 50以上群のCD62P、PAC-1、CD62P/PAC-1(ダブルポジティブ)陽性率、PDW、MPVおよびP-LCRはClumps 0群よりも有意に高い値を示した(図4)。

4. 線形判別分析

線形判別関数は、説明変量を PLT(X_1)、PDW(X_2)、MPV(X_3)、P-LCR(X_4)、PLT Clumps (X_5)とした場合、 $Z=0.043X_1+0.062X_2+0.140X_3-0.041X_4-0.064X_5+31.4637$ ($Z \geq 0$ ならば 非増加群に判別、 $Z < 0$ ならば 増加群に判別)となる。正判別率は約80%を示した。また、PLT Clumpsの係数のP値は $P < 0.001$ となり最も低く、PLT増加とより関連があることが示唆された(表2)。

考 察

採血当日に単位割れとなったPCを一晩振とう処理しPLT再測定を実施した。その結果、PLTの上昇に伴い単位が上昇した割合は24.6%であり、単位割れ抑制効果があることが明らかとなった。また、振とう処理前後のPLTと関連パラメータの変動値に対する相関分析と重回帰分析の結果から、P-LCRとPLT Clumpsの変動はPLTの変動とよ

件数		
調製件数		26,440
単位割れ		412 (発生率 1.6%)
振とう処理実施		252
血小板数	増加	173
	減少	79
単位数	上昇	62 (上昇率 24.6%)
	変化なし	190

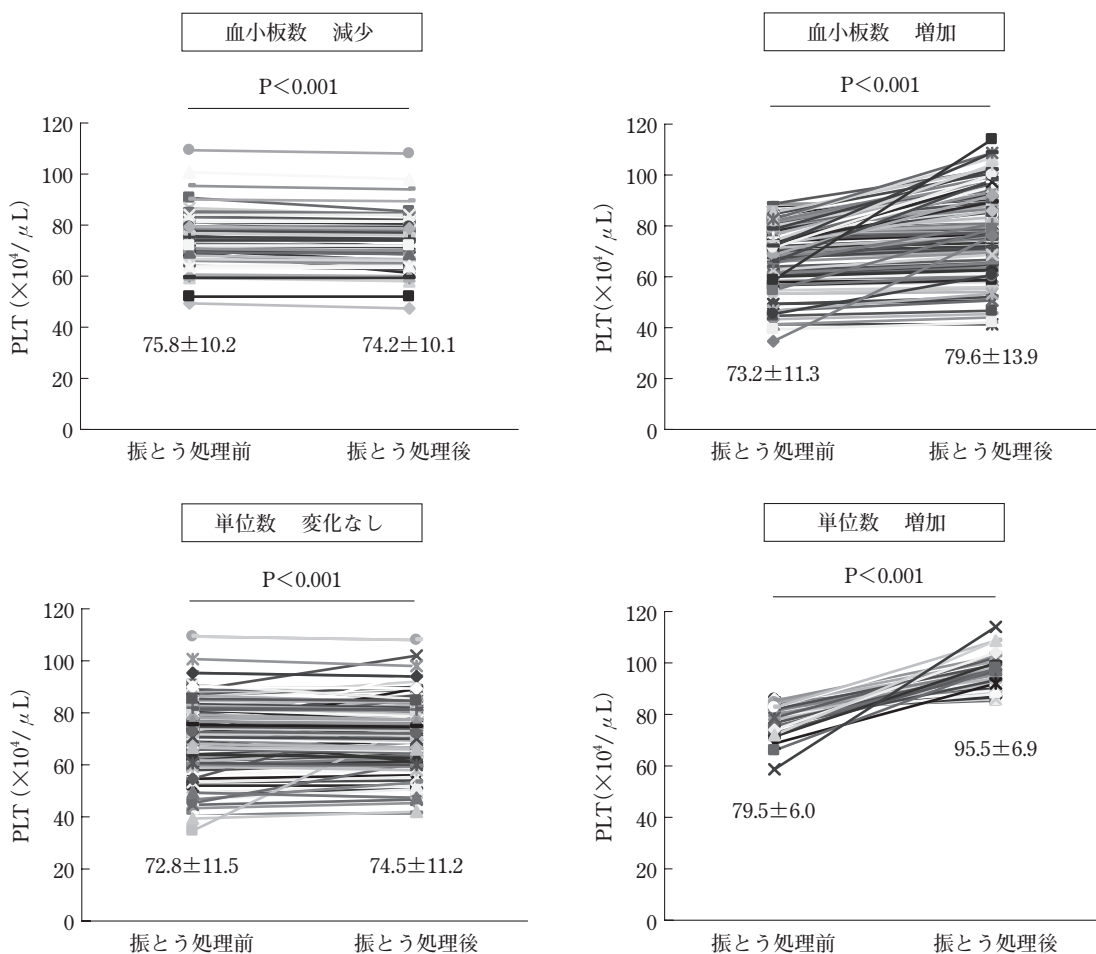


図1 単位割れPC振とう処理実施状況と血小板数変化

2009年血小板データから調製件数、単位割れ発生件数および振とう処理実施件数を求めた。また振とう処理前後で、血小板数(PLT)が増加した群、減少した群、単位数が増加した群、および変化しなかった群のPLTを比較した(平均値±標準偏差)。t検定を行い、危険率5%未満を統計学的に有意であると判断した。

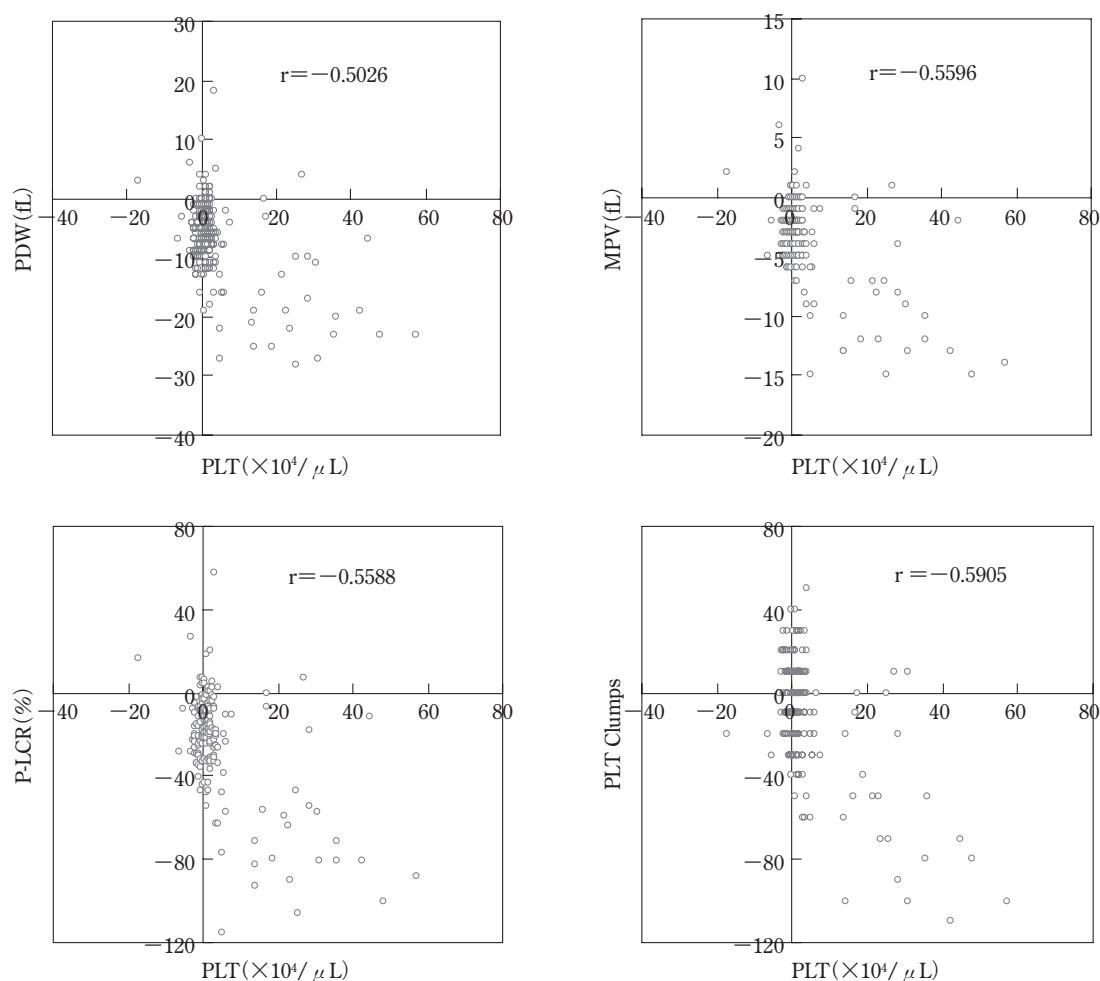


図2 血小板関連パラメータ変動の相関分析

振とう処理前後の血小板数(PLT)変動値と血小板分布幅(PDW), 平均血小板容積(MPV), 大型血小板比率(P-LCR), および血小板凝集(PLT Clumps)変動値をそれぞれプロットし, 相関係数(r)を求めた。

り深い関連があることが示唆された。さらに, フローサイトメトリーによりCD62PとPAC-1陽性率を測定したところ, PLT Clumps 50以上の群で有意に高い値となった。したがって, PLT Clumpsは血小板活性化による凝集の程度やPLTサイズを部分的に反映していると考えられる。また線形判別分析の結果, 正判別率が約80%を示したことから, PLTと関連パラメータの変動値の関連性を裏付けると共に, 振とう処理後のPLT再測定時にPLTが上昇するPCを高い確率で予測することが

可能であることが明らかとなった。

今回の検討で, 採血予定単位数が10単位のPCが, 5単位に単位割れしているPCを振とう処理したところ, PLTが増加したケースが見受けられた。採血当日(採血後数時間)では血小板は活性化状態にあることが報告されていることから¹⁾, 原料PC中で血小板凝集が部分的に発生しているケースがあると考えられる。したがって, 一定時間振とう処理することにより可逆的な凝集が消失し, PLTが増加したと推測される。

データ数	193
重相関係数 R	0.6593
決定係数 R^2	0.4346
自由度修正済決定係数 adjusted R^2	0.4287

Factor	回帰係数	P値
P-LCR	-0.1382	<0.001
PLT Clumps	-0.1469	<0.001
定数項	-0.5824	0.438

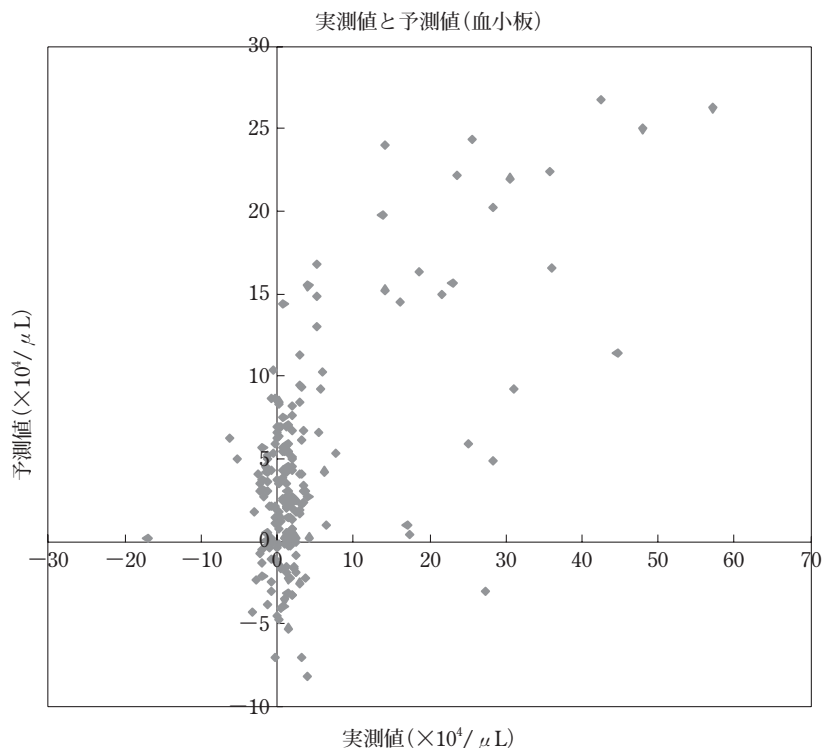


図3 重回帰分析(変数選択法)結果

目的変数を血小板数(PLT)変動値, 説明変数を血小板分布幅(PDW), 平均血小板容積(MPV), 大型血小板比率(P-LCR)および血小板凝集(PLT Clumps)変動値として, 重回帰分析(変数選択法)を行った。

振とう処理後にPLTが増加する現象を統計学的に検証するため, 振とう処理前後のPLTおよび関連パラメータ変動値の散布図を作成し, 相関係数を求めた。その結果, PLTの変動に対しPDW, MPV, P-LCR, PLT Clumpsに負の相関が認められた。これは凝集した血小板が分布やサイズを示すパラメータに影響を与えていることを示唆している。さらに, PLTの変動を目的変数, 他のパラ

メータの変動を説明変数として重回帰分析(変数選択法)を行った。これは複数の説明変数の中から目的変数に大きく影響を与えている変数だけを用いて回帰式を求める手法であり⁶⁾, 輸血の分野では医療機関における血液製剤の使用量の予測モデルの構築に利用されている⁷⁾。その結果, P-LCRとPLT Clumpsの変動がPLTの変動とより関係性が高く, 振とう処理後のPLTに影響を与えて

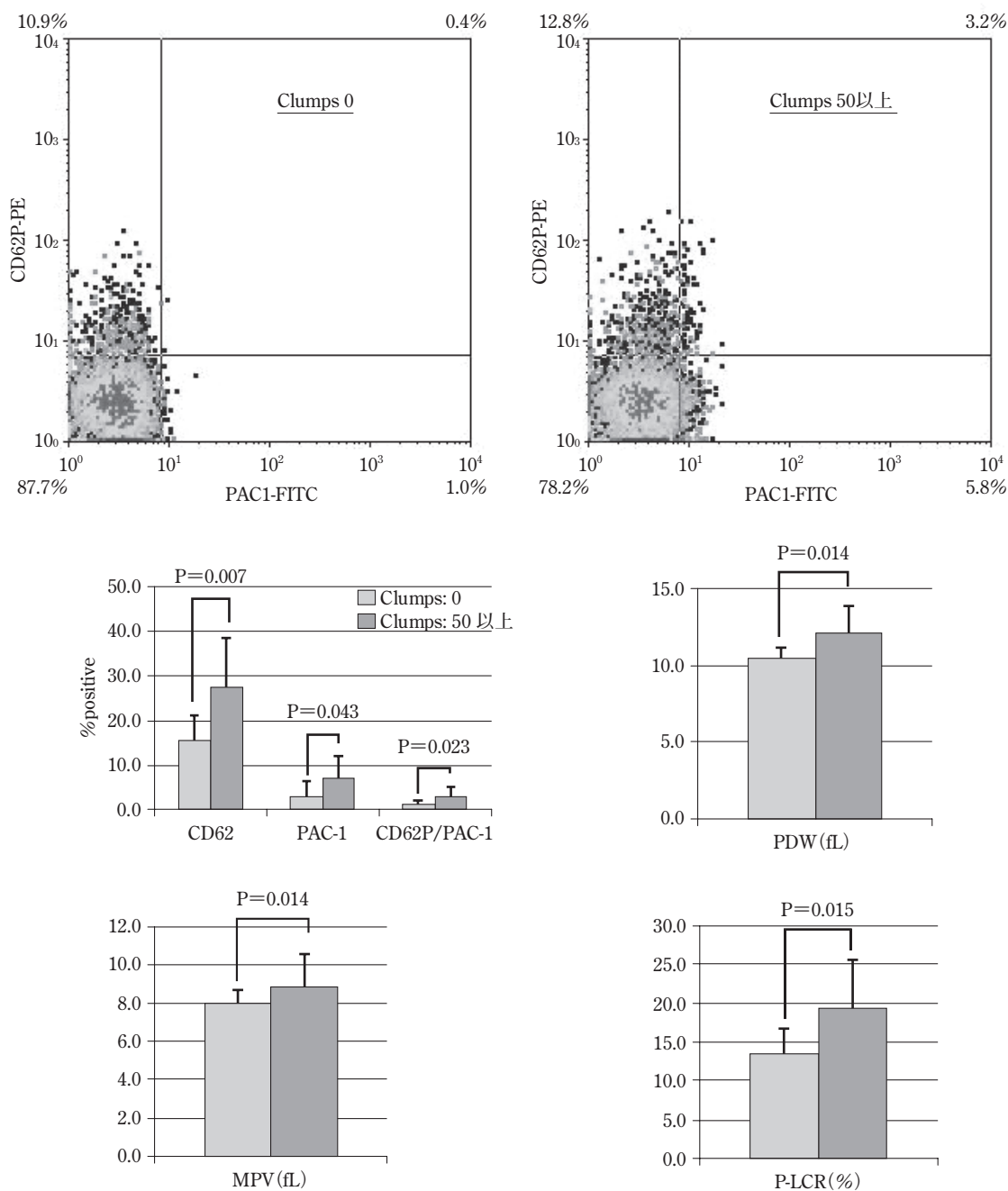


図4 CD62P/PAC-1陽性率と血小板関連パラメータ

Clumps 0群(n=10)とClumps 50以上群(n=13)の代表的な散布図を示した。また、両群のCD62P、PAC-1陽性率と関連パラメータを比較した(平均値±標準偏差)。t検定を行い、危険率5%未満を統計学的に有意であると判断した。

表 2 判別分析結果

分散共分散行列の等分散性の検定(ボックスM検定)				
χ^2 値	自由度	P値	$\chi^2(0.05)$	$\chi^2(0.01)$
24.414	15	0.058	24.996	30.578

マハラビノスの平方距離D ²	2.8456
誤判別率	19.949%
正判別率	80.051%

線形判別関数の係数の検定	
係数	P値
PLT(X ₁)	0.129
PDW(X ₂)	0.521
MPV(X ₃)	0.623
P-LCR(X ₄)	0.406
PLT Clumps(X ₅)	<0.001

いることが明らかとなった。PLT Clumpsは、白血球分類で使用している溶血剤では血小板凝集塊を解離・収縮することができないことを利用して、DIFFチャンネルで検出されるフラグである。正常な血小板は溶血剤で収縮し、ゴースト領域にプロットされる。しかし血小板凝集塊は溶血処理後に正常な血小板より大型の粒子として残存し、前方散乱光の強い領域(ゴースト領域の右側)にプロットされ、これにより、PLT Clumps が決定される。したがって、振とう処理前後のPLT増加には、血小板凝集と、それに伴い見かけ上増加したP-LCRが深く関係していることが統計学的に証明された。

PLT Clumpsの計算値100は、全血検体で血小板数等に影響を及ぼすレベルの凝集があることを警告するためにメーカーが設定した境界値である。しかし、白血球除去されたPC検体では、白血球や血小板—白血球凝集⁸⁾によるDIFFチャンネルへの影響はほとんどない。したがって、大部分が血小板で占められるPC検体では、50でも一部の血小板は活性化し凝集していると仮定し、PLT Clumps 50 以上と0の群に分け、CD62PとPAC-1陽性率を比較した。CD62Pは、血小板の α 顆粒膜に存在する膜糖蛋白であり、刺激を受けると顆粒の放出と共に細胞表面に移動する⁹⁾。CD62Pは膜結合型と可溶型に分類されており、膜結合型はフローサイトメトリーにより検出することができ

る。一方、PAC-1は活性化し構造変化を起こしたGPⅡb/Ⅲa上のフィブリノゲン結合部位を認識するモノクローナル抗体であり、非活性化型のGPⅡb/Ⅲaにはほとんど結合せず、フィブリノゲンを介した血小板凝集を反映すると考えられている¹⁰⁾。今回の検討では、Clumps 50以上の群でCD62P, PAC-1, CD62P/PAC-1(ダブルポジティブ)の発現率が有意に高くなり、血小板活性化マーカーの発現率を反映した。またMPV, P-LCR, PDWにも差が認められたことから、血小板の活性化はXS-1000iで測定される関連パラメータの値に影響を与えることが判明した。

さらに、振とう処理によるPLT増加を予測するため線形判別分析を行い、予測式(判別関数)が成立するかを検討した。判別分析とは、いくつかの群ごとに得られている過去のデータに基づき、新たなサンプルが得られたとき、このサンプルがどの群に属するかを判別(判定、予測)する多変量解析の一手法である⁶⁾。外科手術実施前の難易度判定や¹¹⁾、食品分野での原産地判別¹²⁾などさまざまな分野で活用されている。今回の検討では、正判別率が約80%となるPLT増加の予測式を求めることができた。この結果は単位割れPCのうち、振とう処理によりPLTが増加するPCを高確率で選別できることを示すと共に、血小板関連パラメータがPLT増加予測に役立つことも裏付けている。

今回行った重回帰分析および線形判別分析で

は、説明変数としてXS-1000iから得られるデータのみを選択した。しかし、薬剤の血中濃度を予測する手法である治療薬物モニタリング(TDM)では、予測精度向上のために、関連する患者母集団パラメータを適切に選択する必要があることが論じられている¹³⁾。したがって、今回求めた予測式の精度を向上させるためには、PLT測定データを継続的に集積しつつ、性別や年齢を含めたドナー情報を要因として扱うことを検討する必要がある。

最近、血小板は血液センターの保存条件下で分裂し、平均21.1%増加することが報告されている¹⁴⁾。今後は分裂による血小板数の変動も考慮し、最適な血小板数測定時期を検討する必要がある。

本研究では、単位割れしたPCは振とう処理により単位が上昇するケースがあることを明らかにし、フローサイトメトリーによる血小板活性化マーカーの発現率と、多項目自動血球分析装置Xs-1000iでのPLTおよびその関連パラメータに相関性があることを示した。また、PLT測定工程で得られたデータを多変量解析することにより、PLT増加に関与するパラメータを抽出し、正判別率約80%の予測式を構築することができた。予測式を用いることで、PLTが上昇する可能性の高いPCを選択的に振とう処理することが可能となり、効率的に単位割れPCの製造を抑制することができる。

文 献

- 1) Hagberg IA, *et al.*: Apheresis-induced platelet activation: comparison of three types of cell separators. *Transfusion*, 40: 182-92, 2000.
- 2) 林務ほか：動脈硬化性疾患危険因子としての活性化血小板の検討—Abbot社製CELL-DYN SAPPHEREの使用経験。日本職業・災害医学会会誌, 57: 308-14, 2009.
- 3) Shimizu M, *et al.*: Simple rapid, and automated method for detection of hyperaggregability of platelets using a hematology analyzer. *Am J Hematol*, 72: 282-3, 2003.
- 4) 清水美衣ほか：Hematology Analyzer を用いた血小板自然および惹起凝集塊検出法—基礎および臨床的検討—。日本血栓止血学会誌, 17: 165-74, 2006.
- 5) Beard MJ, *et al.*: Comparison of platelet activation in platelet concentrates measured by flow cytometry or ADVIA 2120. *Vox sang*, 2011. in press.
- 6) 柳井久江：エクセル統計 実用多変量解析編 Practical Multivariate Analysis Greate Utilities on Excel. オーエムエス出版, 埼玉県, 2005.
- 7) 関本美穂ほか：重回帰分析を用いた病院ごとの血液製剤使用量の予測モデルとその評価。日本輸血・細胞治療学会誌, 56: 347-53, 2010.
- 8) Michelson AD, *et al.*: Circulating Monocyte-Platelet Aggregates Are a More Sensitive Marker of In Vivo Platelet Activation Than Platelet Surface P-Selectin: Studies in Baboons, Human Coronary Intervention, and Human Acute Myocardial Infarction. *Circulation*, 104: 1533-7, 2001.
- 9) Johnston GI, *et al.*: Structural and biosynthetic studies of the granule membrane protein, GMP-140, from human platelets and endothelial cells. *J Biol Chem.*, 264: 1816-23, 1989.
- 10) Shattil SJ, *et al.*: Changes in the platelet membrane glycoprotein IIb・IIIa complex during platelet activation. *J Biol Chem*, 260: 11107-14, 1985.
- 11) 広松孝ほか：腹腔鏡下胆嚢摘出術における術前難易度判定。日消外会誌, 40: 1449-55, 2007.
- 12) 小阪英樹ほか：無機元素組成による黒大豆「丹波黒」の産地判別。日本食品科学工学会誌, 53: 344-53, 2006.
- 13) 湯川榮二：ポピュレーションファーマコキネティクスとポピュレーションファーマコダイナミクスとは？。月刊薬事 医薬品適正使用のための臨床薬物動態(3月臨時増刊号), 42: 724-30, 2000.
- 14) Schwertz H, *et al.*: Anucleate platelets generate progeny. *Blood*, 115: 3801-9, 2010.