

[報告]

濃厚血小板の単位に影響を与える血小板濃度測定工程の検証

北海道赤十字血液センター

石原徹也, 秋野光明, 本間稚広, 加藤俊明, 池田久實

Verification of the platelet counting processes to set
the platelet concentrates unit

Hokkaido Red Cross Blood Center

Tetsuya Ishihara, Mitsuaki Akino, Chihiro Homma, Toshiaki Kato and Hisami Ikeda

抄 錄

血小板製剤(PC)の単位を決めるためには、血小板濃度(PLT)を測定する必要がある。PLT測定は、PCバッグから作製した血算検体を用いて行われる。PCバッグから血算検体を作製する手技については製造SOPに明記されているが、作製した血算検体の取り扱いに関する規定はない。血算検体の作製からPLT測定までの取り扱い条件、およびPLT測定に用いる試験管が測定値に与える影響の有無について検討した。

CCSおよびテルシスS由来PCの血算検体(セグメントチューブ)を水平置きにして3時間室温で静置したところ、作製直後に比べて約25%のPLTが低下したが、垂直置きで静置することで許容範囲(初期値の±5%)となった。トリマーアクセル由来PCの血算検体(サンプルポーチ)を水平置きにした場合は3時間後にPLTが作製直後の約10%低下したが、垂直置きでは許容範囲であった。現在、全国の血液センターではPLT測定用として4種類の異なる試験管が用いられているが、何れの試験管も血算検体を分注後6時間はPLTに変化を認めなかった。

血算検体の作製からPLT測定までの時間の規定や取り扱い条件が明らかとなった。PLT測定値に影響を与えない運用方法を各製造施設にて確立することが大切である。

Key words: platelet concentrate, platelet counting, verification

【はじめに】

国内で製造されている濃厚血小板製剤(以下、PC)は、すべて成分採血由来であり、規格が1, 2, 5, 10, 15, 20単位の6種類(PC-HLAは10, 15, 20の3種類)ある¹⁾。PCの規格は総血小板数により決められ、それは容量と血小板濃度(以下、PLT)から算出される。容量は血液の重量と比重

から求め、PLTはPCバッグから作製した測定用検体(以下、血算検体)を用いて自動血球計数装置で測定する^{2), 3), 4)}。

血算検体は、製造部門にてPCバッグから無菌的に作製されるが、成分採血装置の種類(CCS、テルシスS、トリマーアクセル)によって作製方法や血算検体の形状が異なる(図1)。作製した血算

検体は、自動血球計数装置によりPLTが測定される。血算検体の作製方法(図1-②)に関しては現行の製造部門標準作業手順書⁵⁾(以下、製造SOP)に詳細な手順が記載されている。しかし作製後の血算検体をPLT測定用の試験管へ移すまでの手順(図1-④, ⑤)については明確な規定がなく、各製造施設の独自の手順で行われている。また、PLT測定に使用する試験管(図1-⑥)についても、各製造施設で異なっているのが現状である。

現在、当センターでは血算検体の作製からPLT測定まで(図1-②~⑦)を一連の作業として行っている。しかし、製造所の集約により処理本数が増加すると、現行のように血算検体の作製後速やかにPLTを測定することが困難なケースも生じる。そこでわれわれは、当センターにおけるPLT測定の作業工程について検証するため、血算検体の作製後の取り扱い方法を検討すると共に、全国

の各製造施設で用いられているPLT測定用試験管が測定値に与える影響の有無についても検討したので報告する。

【材料と方法】

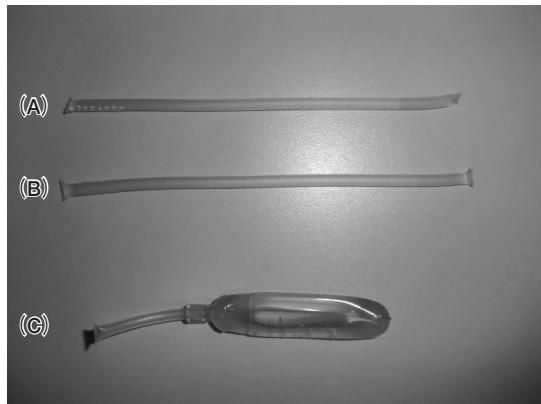
1. PLT測定までの血算検体の取り扱い方法に関する検討

成分採血装置として現在承認されている3種類の機器(CCS: ヘモネティクス社, テルシスS, トリマアクセル: 共にテルモBCT社)で採血された直後のPCを試験に供した。

CCSまたはテルシスS由来PCについては、PCバッグに付属するセグメントチューブで、トリマアクセルはPCバッグに付属するサンプルポーチで血算検体を作製した(図2, CCS由来セグメントチューブ(A), テルシスS由来セグメントチューブ(B), トリマアクセル由来サンプルポーチ



図1 血算検体の作製からPLT測定までの手順



(A) セグメントチューブ：CCS由来PC
 (B) セグメントチューブ：テルシスS由来PC
 (C) サンプルポーチ：トリマアクセル由来PC
 セグメントチューブおよびサンプルポーチの容量：約2mL
 (セグメントチューブの長さは約26cm)

図2 各成分採血装置で採血されたPCから作製した血算検体の形状

(C))。同一PCから7本の血算検体を同時に作製し、PLT測定までの取り扱い方法の検討として、血算検体を水平置き、または垂直置き(図3)で室温静置した場合のPLTについて比較した。1検体あたりの容量は約2mLとした。7本の血算検体のうち、1本は作製直後にPLTを測定し、3本を水平置き、他の3本を垂直置きとした。各々の条件で静置されたAおよびBチューブならびにCポーチのPLTを血算検体の作製から30分、1時間、3時間後に測定した(各n=4)。なお、AおよびBチューブを垂直置きする場合は、チューブの中心で二つ折りにして試験管に立てた状態とし、Cポーチはそのままの状態で立てて静置した。PLT測定には試験管としてPPオートチューブ(アジア器材)を用い、自動転倒混和機能を有する自動血球計数装置(Sysmex XS-1000i)を使用した。本検討においては、血算検体を試験管に移し替えた後、10分以内にPLT測定を終了させた。

2. PLT測定に用いる試験管についての検討

PLT測定に用いる試験管については材質が異なる4種類の試験管を検討した(図4)。各試験管は

管やキャップの材質ならびに形状が異なるが、何れの試験管も容量は同一であり、PLT測定値への影響が懸念される⁶⁾抗凝固剤等の添加剤は含まれていない。

血算検体を試験管へ移し替えた後のPLTの経時変化を測定するため、各試験管を5本準備した。同一PCを各々の試験管に2mLずつ分注し、分注直後、1時間、2時間、3時間、6時間が経過した試験管についてPLTを測定した。PLT測定までは試験管を試験管ラックに立てた状態とした。PLTは2種類の異なる濃度(高濃度PC：160～200×10⁴cells/uL、低濃度PC：60～100×10⁴cells/uL)を用いて試験した(各n=4)。PLTの測定時には自動血球計数装置(Sysmex XS-1000i)のオートサンプラー装置を使用し、試験管を転倒混和した。

3. 統計処理

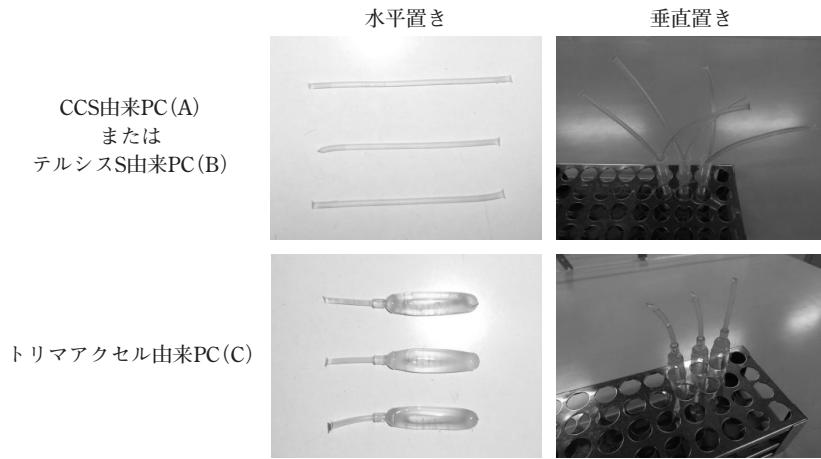
PLT測定までの血算検体の取り扱いに関する検討については、作製直後のPLTを初期値(100%)とし、静置後の値から経時的な変化率を求め、paired t-testにより危険率1%未満を有意とした。PLT測定に用いる試験管に係わる検討も同様に分注直後のPLTを初期値(100%)として、経時的な変化率を求めた。分注直後のPLT、および静置後の変化率についてtwo-factor repeated measure ANOVAにより試験管、濃度の影響を検定し、危険率1%未満を有意とした。各試験管における経時的变化はpaired t-testを用い危険率1%未満を有意とした。また何れの測定値も自動血球計数装置の測定精度を考慮し、初期値±5%の値を許容範囲とした。

【結果】

1. 血算検体の静置条件によるPLTの経時的变化

各成分採血装置で採血されたPCから作製した3種類の血算検体(Aチューブ、Bチューブ、Cポーチ)を、水平置きまたは垂直置きで静置した場合のPLTの経時変化を調べた(図5)。

AおよびBチューブを水平置きで静置した場合、作製してから30分間はPLTに変動がみられず許容範囲内であった。しかし、1時間後には、Aチューブで初期値の6% (p<0.01)、Bチューブでは



水平置き：現行法(作業台に血算検体を静置)
 垂直置き：本報での検討法(試験管に血算検体を立てて静置。
 A・Bチューブは二つ折りにして立てた状態)

図3 血算検体の静置方法

名称	PPチューブ	PSチューブ	バキュティナ	ラルボP
メーカー	アジア器材	アジア器材	日本BD	テルモ
管材質	ポリプロピレン	ポリスチレン	ガラス	ポリエチレン
キャップ材質	ゴム	エラストマー	ゴム	エラストマー
容量(mL)	5	5	5	5
高さ(mm)	74.5	75.0	75.0	78.0
直径(mm)	13.0	13.0	13.0	13.2
外観				

図4 血算用試験管の一覧

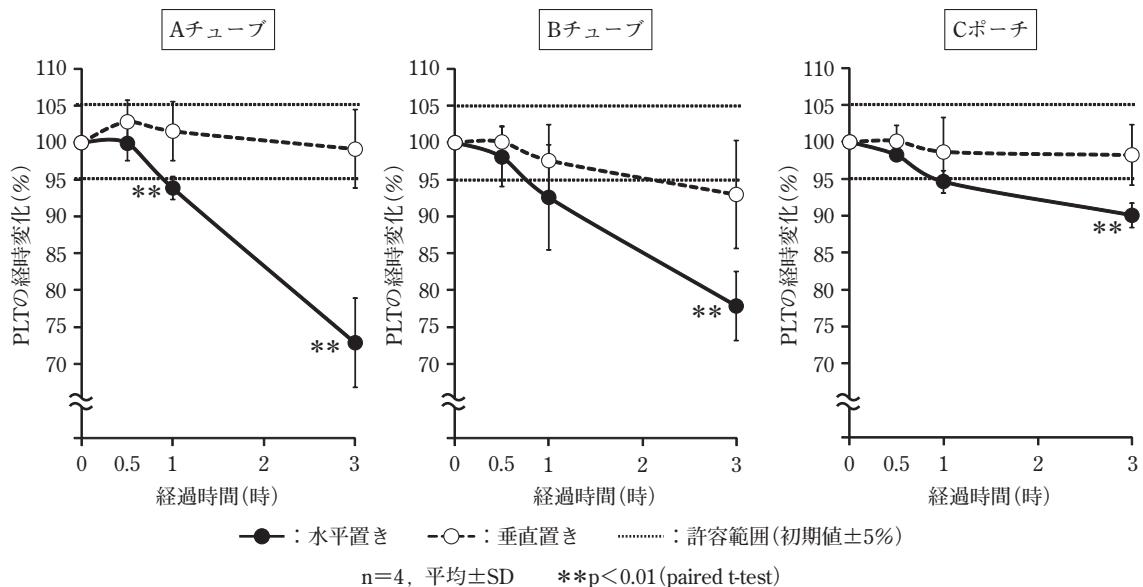


図5 血算検体の種類と静置法の違いによるPLTの経時変化

8 %のPLT低下がみられた。3時間静置後は、Aチューブでは初期値の27% ($p<0.01$)、Bチューブでは22% ($p<0.01$)のPLT低下がみられた。3時間水平置きした後のAおよびBチューブの外観を目視で確認したところ、すべてのチューブの底部に血小板が線状に沈降しているのが確認された。このチューブを血算検体と同量の生理食塩水で3回繰り返し洗浄したところ、血小板の沈降線は消失した。一方、垂直置きで静置した場合では、Aチューブは3時間、Bチューブでは2時間後も許容範囲内であった。また、水平置きでみられた血小板の沈降は、垂直置きで3時間静置したAおよびBチューブのどちらにもみられなかった。

Cポーチを水平置きで静置した場合は、作製してから1時間はPLTに変動がみられず許容範囲内であった。しかし、3時間後では初期値の10%のPLT低下がみられた($p<0.01$)。一方、垂直置きの場合は3時間後もPLTは許容範囲内であった。AおよびBチューブにみられた血小板の沈降について、Cポーチでは水平置き、垂直置きのどちらでも認められなかった。

2. 試験管がPLT測定値に与える影響

血算検体を試験管に移した後のPLTの経時的な変化を材質が異なる4種類の試験管を用いて検討した。今回検討した4種類の試験管における分注直後のPLTは、試験管の材質、濃度のいずれについても有意な差はみられなかった。経時的変化については、PSチューブの高濃度PCを6時間静置した場合のみ、初期値との有意な差がみられた($p<0.01$)ものの許容範囲内であり、その他のすべてにおいて差はみられなかった(図6)。

【考 察】

安全で高品質かつ均一な輸血用血液製剤を製造するには、作業工程を細分化し、各工程を検証することが重要である。PCは総血小板数により単位(規格)が決められる。総血小板数は容量とPLTから算出するため、製造時に正確なPLTを測定する必要がある。

PCバッグから血算検体を得るには、セグメントチューブもしくはサンプルポーチを用いる。現行の製造SOPには均一な血算検体を作製するための手順が記載されているが、その後の血算検体の

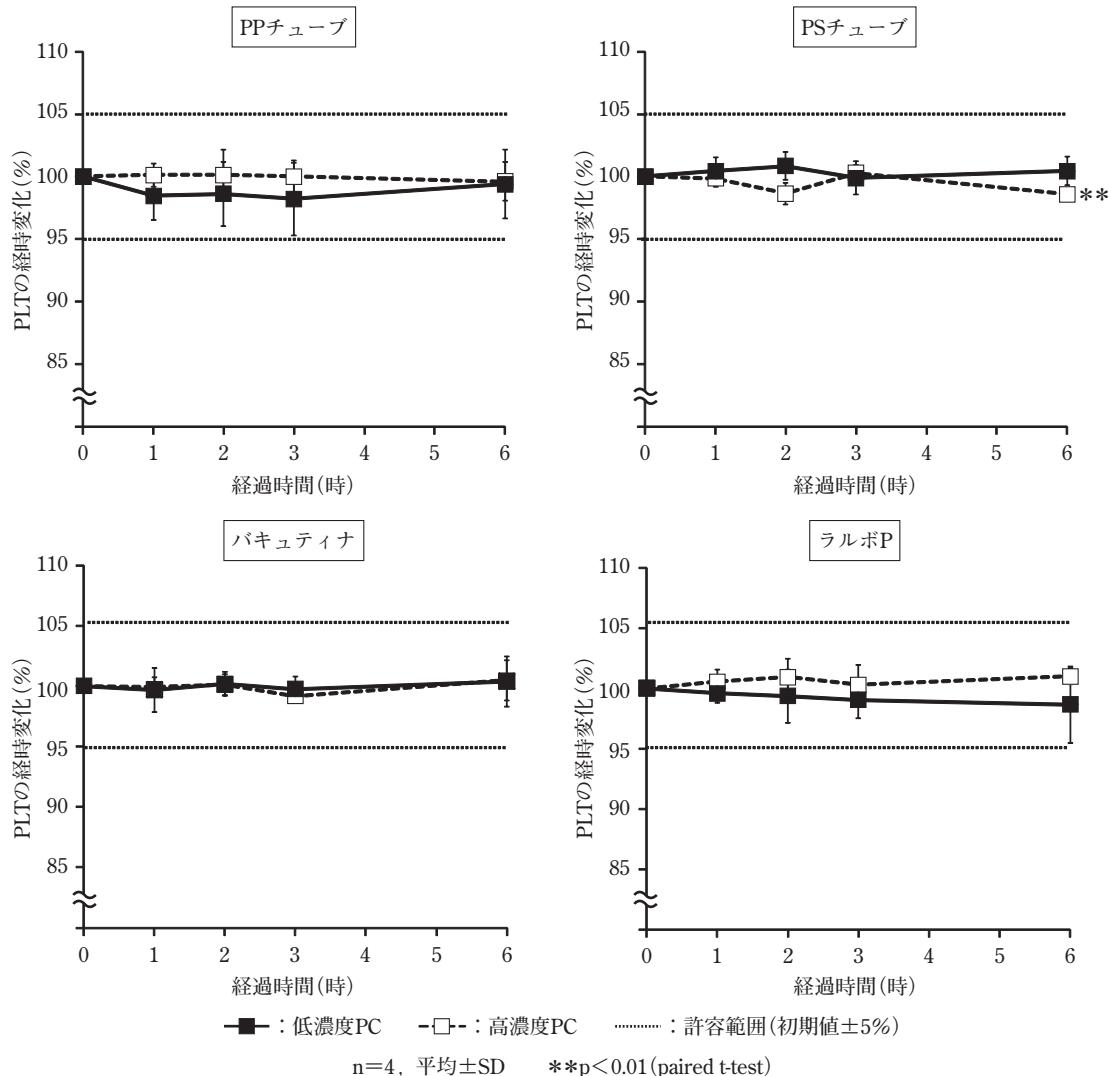


図 6 血算用試験管中のPLT経時変化

取り扱いについては明記されていない。当センターでは、血算検体の作製からPLT測定までを一連の作業として行っており、1検体のみの測定に要する時間は約5分であるが、本数が増加すると30分程度まで延長する場合もある。血算検体を水平置きで静置した場合、AおよびBチューブではPLTの平均値が1時間後に初期値の95%を下回り、その後も時間の経過とともに減少した。しかし、血算検体を垂直置きで静置することにより、

Aチューブでは3時間、Bチューブでは約2時間程度は初期値の95%以上を維持していた(図5)。また、3時間水平置きした後のAおよびBチューブでは、外観上チューブの底部に血小板の沈降線がみられた。垂直置きが水平置きよりもPLTの低下が少なかった原因を調べるために、水平置きで静置し試験管へ移した後の空のチューブを生理食塩液で洗浄した結果、チューブ内の血小板沈降線は消失した。その洗浄液からは、静置時間が長くな

るほど高いPLT、すなわち静置により減少した分に相当するPLTが測定された(データ示さず)。血算検体の静置時間の経過とともに血小板がチューブ内で沈降し、試験管に移した後もチューブ内に血小板が残存したことがPLTの低下を招いたと思われる。チューブを垂直置きで静置した方がPLTの減少が少なかったのは、二つ折りしたチューブの折り返し部分に血小板が沈降するものの、試験管に移す際には沈降した血小板が洗い流されるためと推察される。Cポーチを水平置きで静置した場合は、1時間後は初期値の95%以上を維持したが、3時間後には90%に低下した。一方、垂直置きで静置すると3時間後も初期値の95%以上を維持していた(図5)。水平置きした場合に、CポーチがA、BチューブよりもPLTの低下が穏やかだった要因としては、血算検体を試験管へ移す際の手順の違いが考えられる。当センターでは、Cポーチの血算検体を試験管に移す場合、ポーチの先端を切断してポンピングを数回行い、血算検体を試験管へと移している。このポンピング操作によりポーチ内の血小板が再浮遊し、血小板を残存させることなく試験管へと移行させることができたためと思われる。

今後、製造所の集約により血算検体の本数が増加すると、速やかなPLT測定が困難なケースも想定される。今回の検討結果から、血算検体の静置条件によってはPLTに影響を与えることが確認さ

れた。CCSおよびテルシスS由来PCの血算検体は、セグメントチューブを二つ折りにし立てた状態で2時間以内、またトリマーアクセル由来PCの血算検体はポーチ部を下にして立てた状態で3時間以内にPLTを測定する必要があると考える。

血算検体は試験管に移した後、速やかに測定されるのが望ましいと考えるが、試験管に移された後のPLTの変化について検討した報告はない。そこで、各製造施設で使用されている4種の試験管に同一のPCを分注しPLTを測定したところ、PLTの測定値に差はみられなかった。また血算検体を試験管に移し替えた後のPLTの経時変化を調べたところ、試験に供した4種の試験管はいずれも6時間はPLTが許容範囲内であることを確認した(図6)。時間の経過とともに血小板が試験管の底に沈降するが、自動血球計数装置のオートサンプラーによる転倒混和により、沈降した血小板が再浮遊したことがPLTの維持に関与していると思われる。

PLTに影響を与える可能性が高いと考えられる作業として、血算検体の取り扱い方法やPLT測定に用いる試験管について検証した。本報から、血算検体の取り扱いによっては、PLT測定値への影響があることがわかった。今後の製造所集約に伴う血算検体数の増加を想定し、PCの単位数に影響を与えない作業工程を確立することが大切であると考える。

文 献

- 1) 日本赤十字社血液事業本部医薬情報課:「輸血療法の実施に関する指針」(改定版)および「血液製剤の使用指針」(改定版), 平成17年9月(平成21年2月改訂)
- 2) American Association of Blood Banks: TECHNICAL MANUAL 16th Edition 979, 2008
- 3) American Association of Blood Banks: TECHNICAL MANUAL 16th Edition 203-205, 2008
- 4) 日本赤十字社: 製造SOP 製造管理2(成分採血由来一次製剤)初版, 2011年4月1日施行
- 5) 日本赤十字社: 製造SOP 製造・工程管理(白血球数試験含む)初版, 2011年4月1日施行
- 6) 尾崎由基男: 血小板数の低下する疾患・病態の鑑別, 血栓止血誌, 19(4):447-450, 2008