

[原著]

小型膜型血漿分離器を用いた洗浄血小板調製法の改良

日本赤十字社関東甲信越ブロック血液センター¹⁾, 東京都赤十字血液センター²⁾
小野寺秀一¹⁾, 金子祐次¹⁾, 栗原勝彦¹⁾, 百瀬俊也¹⁾, 松崎浩史²⁾, 中島一格¹⁾

Improvement of a washed platelet concentrate preparation method using a small membrane plasma separator

*Japanese Red Cross Kanto-Koshinetsu Block Blood Center¹⁾,
Japanese Red Cross Tokyo Metropolitan Blood Center²⁾*

Hidekazu Onodera¹⁾, Yuji Kaneko¹⁾, Katsuhiko Kurihara¹⁾, Shunya Momose¹⁾,
Koji Matsuzaki²⁾ and Kazunori Nakajima¹⁾

抄 録

2015年に、我々が報告した市販の膜型血漿分離器エバキュア®EC-4A20 (川澄化学工業) を用いた洗浄血小板 (WPC) の調製法 (旧法) は、調製工程が煩雑であった⁸⁾。そこで今回、調製工程の簡略化を目的に小型の血漿分離器エバキュア®EC-4A10 (川澄化学工業) を用いたWPCの調製 (新法) が可能か検討した。新法では旧法と比べ、調製工程が7工程から4工程に簡略化され、クランプ操作は31回から11回に減少し、洗浄液の総使用量も2,240mLから1,740mLに減少した。操作時間は約50分と変わらなかった。新法と旧法の血小板回収率と蛋白除去率は、新法、旧法の順に血小板回収率が95.1%、85.3%と新法で有意 ($p = 0.002$) に高かった。蛋白除去率は、総蛋白が86.6%と88.8%、アルブミンが93.5%と94.7%と変わらなかった。

小型の血漿分離器エバキュア®EC-4A10を使用した新法は、大型の血漿分離器EC-4A20を使用した旧法と比べて、蛋白除去性能は同等であるが、より少ない調製工程と操作手順で、高い血小板回収率を得られる優れたWPCの調製法である。

Key words: washed PC, hollow fiber, membrane plasma separator, EC-4A10

【緒 言】

血小板製剤 (以下、PC) による輸血副作用防止には、PCを洗浄して製剤中に含まれる血漿成分を取り除くことが有用とされている^{1)~4)}。通常、PCの洗浄は遠心機を使用した方法^{4)~7)} (以下、遠心法) で行われるため、大容量遠心機を持たない医療機関における洗浄血小板 (以下、WPC) の自家調製は困難である。そこで、我々は市販の膜

型血漿分離器 (以下、分離器) を用いてPC洗浄を行うための基礎的検討を行い、エバキュア®EC-4A20 (川澄化学工業) を用いたWPCの調製法 (以下、旧法) について報告した⁸⁾。

しかしながら、旧法は、洗浄操作の手順 (以下、調製工程) が煩雑であったことから、調製工程の簡略化を目的に小型の分離器エバキュア®EC-4A10を用いたWPC調製法 (以下、新法) を検

討した。

【材料・方法】

I 膜型血漿分離器を用いたWPC調製に使用した資材と洗浄の原理

I-1 検討した膜型血漿分離器

分離器はエバキュア[®]EC-4A20 (以下、大型分離器、膜孔径 $0.030\ \mu\text{m}$ 、膜面積 2.0m^2 、膜素材エチレン-ビニルアルコール重合体、ハウジングサイズ $57\ \phi \times 280\text{mm}$ 、川澄化学工業)または、より小型の分離器エバキュア[®]EC-4A10 (以下、小型分離器、膜面積 1.0m^2 、ハウジングサイズ $45\ \phi \times 280\text{mm}$ 、その他膜孔径等は大型分離器と同じ、川澄化学工業)を使用した。

I-2 使用した資材

原料PCは検査不合格で減損された採血翌日の10単位PCを使用した。洗浄回路は、分離器、原料PCバッグ、洗浄液バッグ、WPC回収用バッグ(KBP-1000FPN、川澄化学工業)、廃液回収用バッグ(セーフミックTPNバッグ $3,000\text{mL}$ 、ジェイ・エム・エス)を連結して作製した(図1)。洗浄液は及川らの方法⁶⁾に従い、ピカネイト[®]輸液(大塚製薬工場)にACD-A液を20:1で混合調製して作製した(以下、BRS-A)。

I-3 PC洗浄の原理

PCの洗浄は、分離器内を洗浄液でプライミングした後、原料PCの全量を中空糸膜の外側に充填して行った。このとき洗浄液を中空糸膜外面から内面の方向に向かって流し廃液バッグに血漿成分を排出した。WPCの回収については、PCの洗浄時とは逆に、洗浄液を中空糸膜内面から外面の方向に向かって流し、WPCを回収用バッグに回収した(図2)。洗浄回路内の流路切替については、クランプの開閉操作によって、流速調整については、落差(原料PCまたは洗浄液バッグから繋がる点滴筒の界面と廃液またはWPC回収用バッグに穿刺するピン針間の落差)を調整して行った。

II 膜型血漿分離器を用いた新法、旧法によるWPC調製工程

II-1 旧法⁸⁾(図3-a)

原料PCを一旦 800mL の洗浄液で全量 $1,000\text{mL}$ に希釈した。大型分離器(EC-4A20)を用いた洗浄回路を作製し、洗浄液のプライミング(300mL)、希釈原料PCの充填、1回目の洗浄(以下、洗浄1: 600mL)、1回目の回収(以下、回収1: 100mL)、2回目の洗浄(以下、洗浄2: 300mL)、2回目の回収(以下、回収2: 140mL)を行った。洗浄液の送液速度は、希釈原料PCの充填時と洗浄時は $60\text{mL}/\text{min}$ 、回収時は $150\text{mL}/\text{min}$ とした。

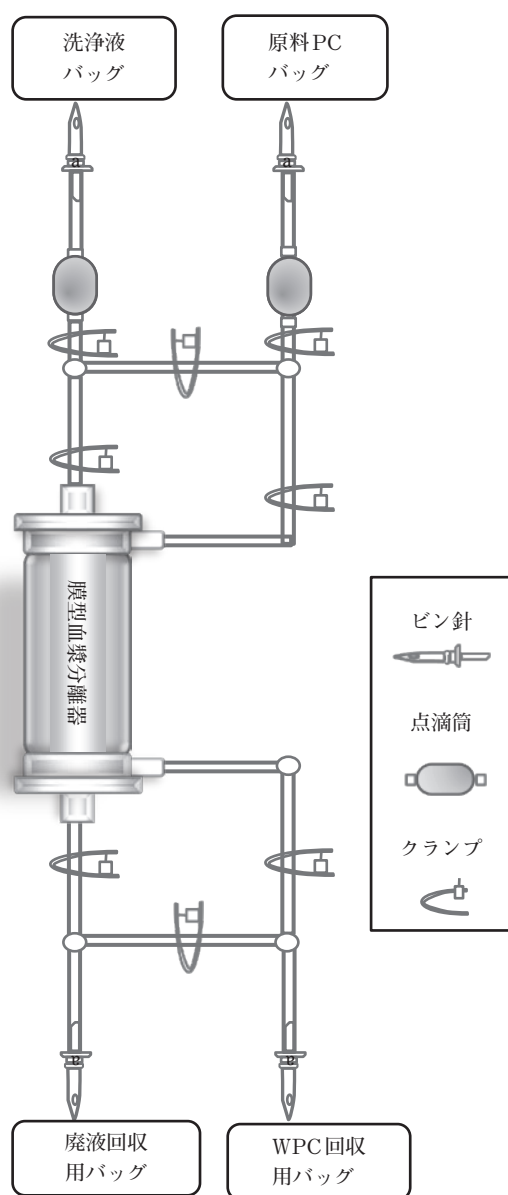
II-2 新法(図3-b)

検討に先立ち、小型分離器の使用で効率的な蛋白除去が可能か検討した。原料PCは希釈することなく、その全量約 200mL をa)小型分離器、またはb)大型分離器に充填した後、それぞれ $40\text{mL}/\text{min}$ 、 $60\text{mL}/\text{min}$ の流速で洗浄液 $2,000\text{mL}$ によるPC洗浄を行い、廃液を 50mL ずつ分取した。原料PCと廃液に含まれる総蛋白(以下、TP)およびアルブミン(以下、Alb)の濃度を試薬A/G B-テストワコー(和光純薬工業)とU-2900形分光光度計(日立ハイテクノロジー)により測定して、蛋白除去がプラトーに達する洗浄液量を確認した($n=1$)。

新法によるWPCの調製工程は、原料PCを希釈することなく使用した。小型分離器(EC-4A10)を用いた洗浄回路を作製し、洗浄液のプライミング(300mL)、原料PCの充填、洗浄1($1,200\text{mL}$)、回収1(240mL)の順に各1回の操作を行った。洗浄工程の洗浄液量は、予備検討の結果に基づき $1,200\text{mL}$ とした。洗浄液の送液速度は、回収時は $150\text{mL}/\text{min}$ 、原料PCの充填時と洗浄時は、過去行った検討で送液速度が過剰であるとき血小板回収率が低下した⁸⁾ことから、分離器の容積あたりの液処理速度が旧法と同程度になるよう $40\text{mL}/\text{min}$ とした。

III 血小板回収率と蛋白除去率の算出と比較(各 $n=6$)

検体採取は①原料PC、②WPCの調製後1hr、の2点とし、分離バッグKBP-50C-2(川澄化学工業)を無菌接合装置TSCD-SC-201A(テルモ)で



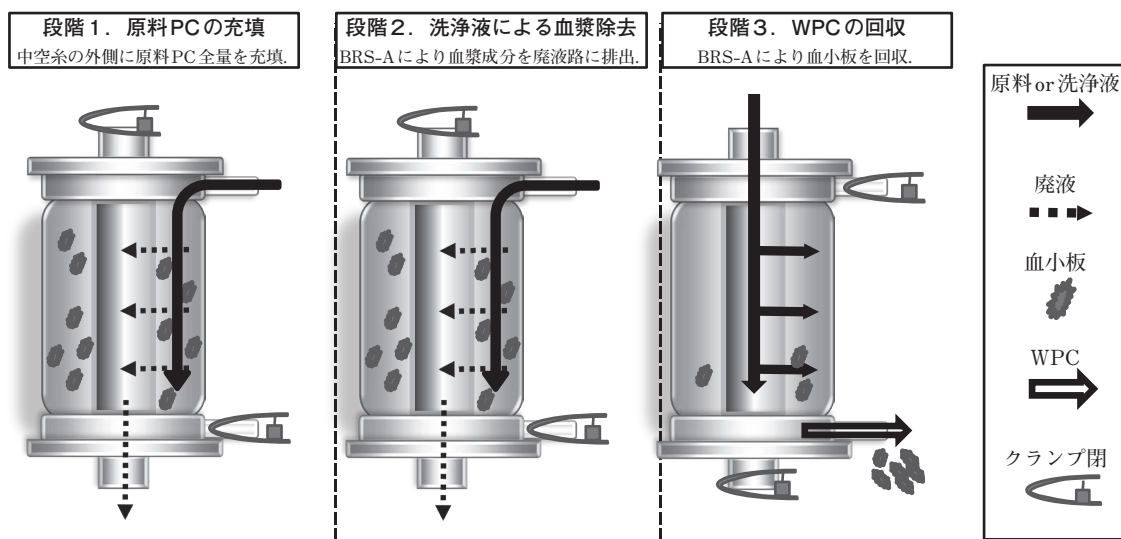
洗浄回路内の流路はクラップの開閉操作により切り替え，流速調整については落差(原料PCまたは洗浄液バッグから繋がる点滴筒の界面と廃液またはWPC回収用バッグに穿刺するピン針間の落差)を調整して行った。

図1 洗浄回路 概形と全景写真

接合して行った。WPCは調製後30分間静置した後，血小板振とう保存装置(プリス社製PRK-Mini型，庫内温度設定22℃)で振とう保存した。

原料PCおよびWPCの容量，血小板濃度，総

蛋白濃度(以下，TP濃度)，アルブミン濃度(以下，Alb濃度)，IgM濃度，IgA濃度，IgG濃度を測定して血小板回収率と蛋白除去率を算出した。容量は，電子天秤LP-4200S(ザルトリウス)で重量を



原料PCを中空糸の外側に充填して洗浄液を注ぎ、血漿成分を除去。

段階1：原料PCを血漿分離器に流入させ、中空糸膜の外側に血小板を捕らえる。血漿成分は膜を通過して廃液路に排出される。

段階2：中空糸膜の外側から内面に向かって洗浄液を流入させ濾過洗浄する。血小板は膜外面に残り、血漿成分は膜孔を通過して廃液路に排出される。

段階3：中空糸膜の内側から外側に向かって洗浄液を流入させ、血漿成分の除かれた血小板(WPC)を回収する。

図2 膜型血漿分離器によるPC洗浄の原理

計測し、比重(g/mL)をそれぞれ原料PC=1.03、WPC=1.01として求めた。血小板濃度は、多項目自動血球分析装置XS-800i(シスメックス)により測定した。TPおよびAlb濃度は、試薬A/G B-テストワコー(和光純薬工業)とU-2900形分光光度計(日立ハイテクノロジー)により測定した。免疫グロブリン濃度(IgM, IgA, IgG)は、業者(三菱化学メディエンス)に委託測定した。

Ⅳ 統計処理

血小板回収率と蛋白除去率の結果はpaired t-testで解析し、 $p < 0.05$ のとき統計的に有意差ありと判断した。

【結 果】

Ⅰ 洗浄操作の簡便性

新法と旧法の操作の概要を表1に示す。調製に必要な工程数は旧法が7工程であったのに対し、

新法は4工程であった。クランプの開閉操作回数は、旧法で31回、新法で11回と減少した。使用した洗浄液の総量は、旧法で2,240mL、新法で1,740mLと新法で少なかった。調製時間はともに約50分と変わらなかった。

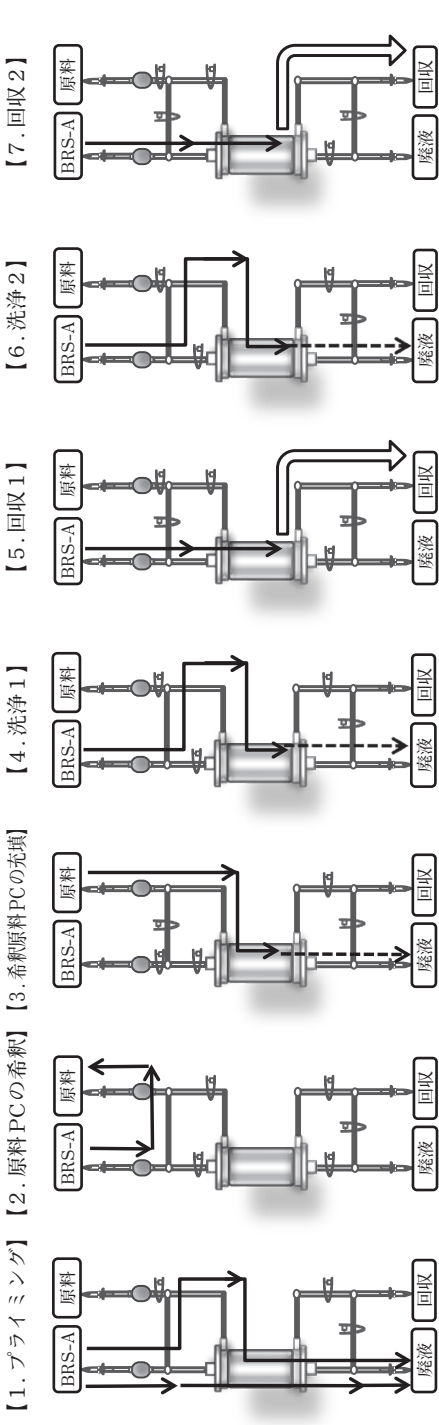
Ⅱ 大型分離器と小型分離器の蛋白除去効率の比較

蛋白除去率と分離器の大きさの関係を図4に示す。小型分離器ではAlbもTPも大型分離器よりも速やかに除去された。廃液中の蛋白が検出できなくなるまでの洗浄液量は、大型分離器で2,000mL以上であったが、小型分離器では1,200mL以下と少量であった。また、いずれの分離器でもAlbはTPよりも速やかに除去された。

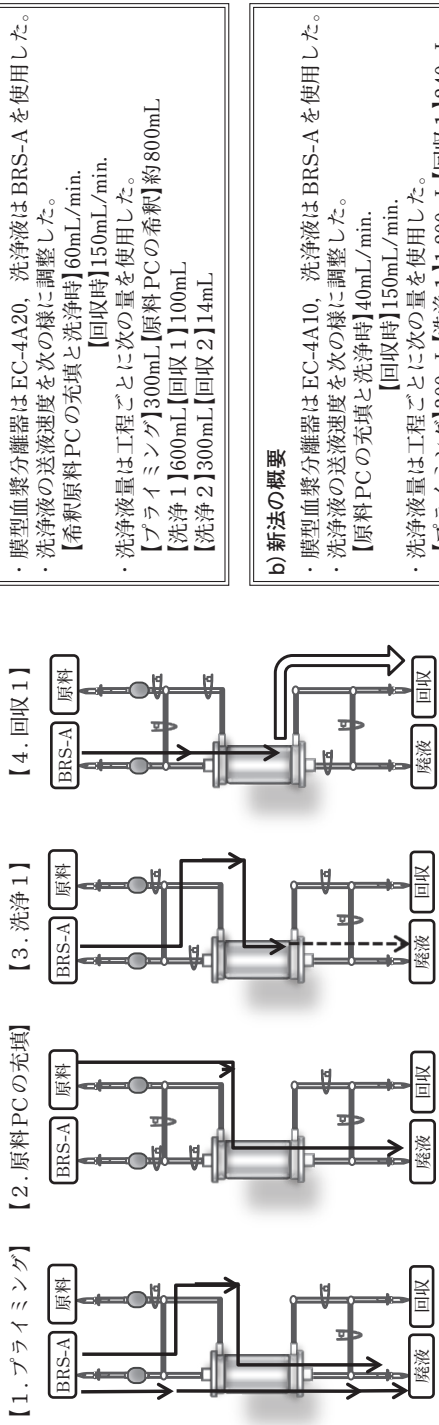
Ⅲ 血小板回収率と蛋白除去率

新法、旧法による血小板回収率と蛋白除去率を表2に示す。血小板回収率は、新法と旧法の順に

a)旧法の調製工程(7工程)



b)新法の調製工程(4工程)



a)旧法の概要

- ・膜型血漿分離器はEC-4A20、洗浄液はBRS-Aを使用した。
- ・洗浄液の送液速度を次の様に調整した。
【希釈原料PCの充填と洗浄時】60mL/min.
【回収時】150mL/min.
- ・洗浄液量は工程ごとに次の量を使用した。
【プライミング】300mL【原料PCの希釈】約800mL
【洗浄1】600mL【回収1】100mL
【洗浄2】300mL【回収2】14mL

b)新法の概要

- ・膜型血漿分離器はEC-4A10、洗浄液はBRS-Aを使用した。
- ・洗浄液の送液速度を次の様に調整した。
【原料PCの充填と洗浄時】40mL/min.
【回収時】150mL/min.
- ・洗浄液量は工程ごとに次の量を使用した。
【プライミング】300mL【洗浄1】1,200mL【回収1】240mL



図3 旧法と新法のWPC調製工程

表 1 旧法と新法の概要比較

WPC調製法	旧法	新法
分離器	EC-4A20	EC-4A10
分離器のハウジングサイズ	57 ϕ \times 280mm	45 ϕ \times 280mm
洗浄時の流速	60mL/min	40mL/min
洗浄時の流速/ハウジング容積	0.08mL/cm ³ \cdot min	0.09mL/cm ³ \cdot min
回収時の流速	150mL/min	150mL/min
工程数	7 工程	4 工程
クランプの開閉操作数	31 回	11 回
使用する洗浄液の総量	2,240mL	1,740mL
各工程の処理時間 と洗浄液量*	プライミング	10 分 (300mL)
	原料の希釈	3 分 (800mL)
	原料の充填	17 分 (1,000mL)
	洗浄 1	10 分 (600mL)
	回収 1	1 分 (100mL)
	洗浄 2	5 分 (300mL)
	回収 2	1 分 (140mL)
調製時間	概ね 50 分	概ね 50 分

*括弧内の数値は各工程で使用した洗浄液量

95.1%と85.3%であり、新法が有意 ($p = 0.002$) に高かった。新法と旧法の蛋白除去率を比較すると、新法、旧法の順にTP除去率は86.6%と88.8%、Alb除去率は93.5%と94.7%、IgM除去率は6.9%と10.6%、IgA除去率は79.3%と74.3%、IgG除去率は92.8%と91.1%であり、両方法で同程度であった。一方で各蛋白の除去率は、分子量によって異なり、測定項目中で分子量が比較的小さいAlbやIgGの除去率は90%以上であったが、IgAではこれよりやや低く、分子量が最大となるIgMの除去率は10%程度に留まった。

【考 察】

原料PCを予め希釈することなく、小型分離器と大型分離器に充填し、洗浄液の流入に伴う蛋白除去がどのように行われたか予備検討で観察したところ、小型分離器では、蛋白除去がプラトーとなるまでに要する洗浄液量が1,200mL以下であり、大型分離器を用いた場合に比べ少量であることから(図4)、より効率の良い血漿除去が行える可能性が示唆された。したがって、大型分離器を用いた旧法の調製工程(図3-a)において行った原料PCの希釈(旧法の工程2)は、小型分離器を使用することによって簡略が可能であると考えられた。また、旧法では分離器内に分散して濃度が

薄くなった血小板を分離器下部に集中させ濃厚とすることを目的に、2回目の洗浄と回収(旧法の工程6と工程7)を行ったが、これらの工程についても、小型分離器の使用と洗浄1の工程における洗浄液量の増加が、ともに血小板の集中に効果的に働くことから(図5)、簡略が可能であると考えられた。WPCの調製を小型分離器で行うことにより、血漿除去と血小板の回収がともに効率的となる利点が得られることから、新法の調製工程は、1) プライミング、2) PCの充填、3) 洗浄1、4) 回収1、の4工程に簡略することが可能であった。

その結果、実質的に血漿成分を除去する工程である洗浄1に用いる洗浄液量は、旧法の600mLに対し、新法で1,200mLと多いものの、調製に用いる洗浄液の総使用量は、旧法の2,240mLに対し、新法で1,740mLとより少量となった。これをピカネイト輸液(1,000mL袋)に換算すると、旧法で3袋の使用が必要であったのに対し、新法では2袋の使用となった。また、クランプの開閉操作回数も31回から11回に減少できた。調製時間はともに約50分であったが、工程が簡略化され、洗浄液の使用が少量で済むことから、新法は旧法より優れていた。

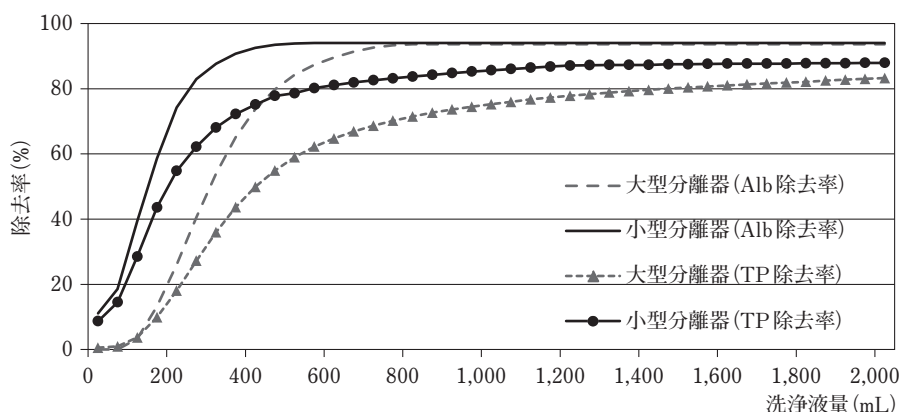
血小板回収率については、新法で95.1%と旧法

と比べ約10%向上した(表2)。この結果は、過去に報告された遠心法によるWPCの調製成績^{4)~7)}と比較しても優れていた。その理由は、分離器内に分散した血小板が分離器の小型化と洗浄工程に使用した洗浄液量の増量により、効率良く分離器下部に集中し、血小板濃度が濃厚となった結果と考えられる(図5)。蛋白除去率については、新法でも旧法と変わらず、これが膜孔径0.030 μm のエバキュア[®]を用いた篩濾過の限界と考えられた。なお、PCの輸血副作用の原因のひとつと考えられているサイトカインやケモカインは、分子量がAlb以下であることから、エバキ

ュア[®]で除去が可能⁹⁾である。

エバキュア[®]で除去が困難な大分子量の蛋白を除去するには、より大きな膜孔径を有する分離器が求められるが、既に国内で医療機器として承認されているプラズマキュアー[®]PE-08(膜孔径0.3 μm , 川澄化学工業)を用いてPC洗浄を行った場合、総蛋白除去率は約98%と良好であるが血小板回収率は30%程度と低く、多数の凝集塊が生じ、また、血小板活性化が伴うことからWPCの調製は困難であった⁸⁾。

一方、PC洗浄を目的に開発された専用の中空糸膜(東レ)を用いて、血漿残存率1.4%のWPC



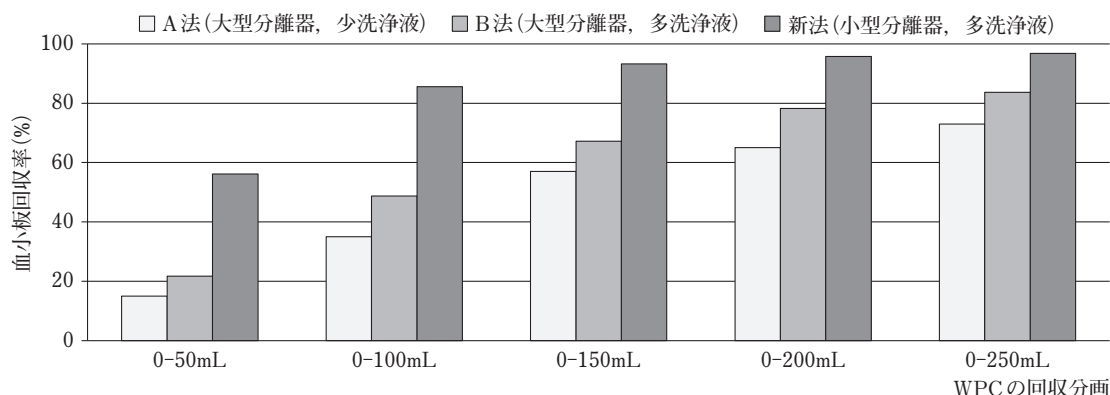
ハウジング容積の異なる分離器(小型分離器: EC-4A10, 大型分離器: EC-4A20)の中空糸外側にそれぞれ原料PCを充填した後、洗浄液(2,000mL)で洗浄を行い、廃液に含まれる蛋白量から蛋白除去率の曲線を求めた(n=1)。蛋白除去の効率は小型分離器でより高く、洗浄液量1,200mLの時点でTP除去はプラトーであった。

図4 分離器のサイズと蛋白除去率の関係

表2 血小板回収率と蛋白除去率(mean \pm SD, n = 6)

W-PC調製法	旧法	新法	p-value*
原料PC PLT数/bag	2.09 \pm 0.08	2.12 \pm 0.21	0.797
WPC PLT数/bag	1.78 \pm 0.06	2.02 \pm 0.24	0.041
血小板回収率(%)	85.3 \pm 4.9	95.1 \pm 3.3	0.002
TP除去率(%)	88.8 \pm 1.7	86.6 \pm 3.1	0.166
Alb除去率(%)	94.7 \pm 0.8	93.5 \pm 1.1	0.063
IgM除去率(%)	10.6 \pm 2.3	6.9 \pm 4.6	0.108
IgA除去率(%)	74.3 \pm 4.0	79.3 \pm 3.9	0.056
IgG除去率(%)	91.1 \pm 2.2	92.8 \pm 1.6	0.170

*: 旧法と新法の結果間をpaired t-testで解析した。



分離器によるPC洗浄(1. プライミング, 2. 原料PCの充填, 3. 洗浄1, 4. 回収1)を分離器サイズと洗浄液量の一部を変更した3つの方法で行い, 回収分画の血小板回収量を調査した(各n=1)。

- ・A法(大型分離器, 少洗浄液): 分離器はEC-4A20(大型), 洗浄液量600mL(少量), 洗浄時の流速60mL/min.
 - ・B法(大型分離器, 多洗浄液): 分離器はEC-4A20(大型), 洗浄液量1,200mL(多量), 洗浄時の流速60mL/min.
 - ・新法(小型分離器, 多洗浄液): 分離器はEC-4A10(小型), 洗浄液量1,200mL(多量), 洗浄時の流速40mL/min.
- 洗浄液量の増量(A→B)や分離器サイズの小型化(B法→新法)により, 血小板回収率は向上した。

図5 血小板回収量の比較

が調製可能であることが田中らによって報告¹⁰⁾されていることから, 専用に開発された中空糸膜カラムを洗浄回路に組み込むことで, 新法の蛋白除去性能の向上が可能であると考えられた。しかしながら, このような分離器は医療機器として承認がなされておらず, 医療機関がWPCを自家調製する方法への応用はできない。また, 「洗浄・置換血小板の適応およびその調製の指針」によれば, やむなく異型PC-HLAを輸血する場合の抗A抗B抗体の除去もWPCの適応¹⁾となる。しかし, 今回検討した分離器を含め, 現在販売されている分離器では, IgM除去率と血小板回収率がともに高いPC洗浄法の確立が困難であるため, 本方法

を適応できないことに留意が必要である。

【結 論】

小型の血漿分離器エバキュア[®]EC-4A10を使用した新法は, 大型の血漿分離器EC-4A20を使用した旧法と比べて, 蛋白除去性能は同等であるが, より少ない調製工程と操作手順で, 高い血小板回収率を得られる優れたWPCの調製法である。

一方で, 新法によるIgM除去率は低値であるため, 異型PC-HLAを輸血する場合の抗A抗B抗体の除去に新法を適用できないことに留意が必要である。

引用文献

- 1) 日本輸血・細胞治療学会ホームページ: 洗浄・置換血小板の適応およびその調製の指針 (Version IV)
http://yuketsu.jstmc.or.jp/wp-content/themes/jstmc/images/medical/file/guidelines/Ref9-1-150127_150604.pdf

- 2) Azuma H, *et al.*: Reduction in adverse reactions to platelets by the removal of plasma supernatant and resuspension in a new additive solution (M-sol). *Transfusion*, 49: 214-218, 2009.
- 3) Ryu Y, *et al.*: Replaced platelet concentrates containing a new additive solution, M-sol: safety and efficacy for pediatric patients. *Transfusion*

- 2013; 53: 2053-2060.
- 4) 東寛ほか. : 洗浄血小板の調製および副作用防止効果について. 病態と抗体 : 診断検査と輸血療法, 39-52, 2008.
 - 5) 小嶋俊介ほか. : 置換液M-solを用いた置換血小板(R-PC)調製のプロセスバリデーションに関する検討. 日本輸血細胞治療学会誌, 57(5) : 379-385, 2011.
 - 6) Oikawa S, *et al.*: Comparative in vitro evaluation of apheresis platelets stored with less 100% plasma versus bicarbonated Ringer's solution with less than 5% plasma. Transfusion, 53: 655-660, 2013.
 - 7) 及川伸治ほか. : 重炭酸リンゲル液により調製した洗浄血小板の性状と臨床効果. 日本輸血細胞治療学会誌, 60(2) : 386, 2014.
 - 8) 小野寺秀一ほか. : 洗浄血小板の調製を膜型血漿分離器で行うための基礎的研究. 血液事業, 38(1) : 38-48, 2015.
 - 9) 名倉豊ほか : 中空糸膜を用いた洗浄血小板作成法の確立をめざした検討. 日本輸血細胞治療学会誌, 61(2) : 287, 2015.
 - 10) S. Tanaka, *et al.*: A hollow-fiber column system to effectively prepare washed platelets. Vox Sanguinis, (3): 239-247, 2015.