

[報告]

血小板原料の凝集塊発生要因と血小板活性化の関連性について

日本赤十字社東北ブロック血液センター¹⁾, 日本赤十字社血液事業本部中央血液研究所²⁾
小田島千尋¹⁾, 及川伸治¹⁾, 峯岸正好¹⁾, 川島 航¹⁾, 小砂子智¹⁾, 室川宏之¹⁾, 鈴木 光²⁾, 清水 博¹⁾

Analysis of the relationship between clump formation
and platelet activation

*Japanese Red Cross Tohoku Block Blood Center¹⁾,
Central Blood Institute, Blood Service Headquarters, Japanese Red Cross Society²⁾*
Chihiro Odajima¹⁾, Shinji Oikawa¹⁾, Masayoshi Minegishi¹⁾, Wataru Kawashima¹⁾,
Satoshi Kosunago¹⁾, Hiroyuki Murokawa¹⁾, Ko Suzuki²⁾ and Hiroshi Shimizu¹⁾

抄 録

採血機種別による血小板製剤 (PC) 原料の凝集塊発生率および凝集塊発生と血小板活性化との関連性について検討した。東北ブロック製造施設までの搬送時間が平均で7時間を超える秋田県赤十字血液センター中通出張所 (中通) と青森県赤十字血液センター弘前出張所 (弘前) で採血されたPC原料を対象とした。成分採血装置CCS, テルシスSおよびトリマアクセルの凝集塊発生率は中通でそれぞれ36.5%, 17.7%および1.2%, 弘前でそれぞれ50.8%, 24.5%および3.4%であり, トリマが有意に低かった。また血小板凝集塊発生と血小板活性化との関連性については, すべての採血機種で凝集塊の有無とCD62P陽性率に関連性はなかったが, 凝集塊が確認された場合, CD42b平均蛍光強度は有意に低下していた。効率的で安定的な血小板製剤供給のために, 遠隔地の採血施設では, 凝集塊発生頻度が搬送時間の影響を受け難い採血装置の導入が有効である可能性がある。血小板凝集塊と活性化の関連性についてはさらに検討が必要と思われた。

Key words: platelet, platelet activation, clump formation

【はじめに】

受入時に凝集塊が確認された血小板製剤 (PC) 原料は, 血小板数測定工程に移行する前に, 振とう処理により凝集塊を消失させる必要がある。そのため, 凝集塊の発生はPC出荷時期の遅延の原因となる。したがって, 凝集塊形成要因を特定し, その対策を立てることはPCの安定供給において重要である。これまでの検討で, 凝集塊の発生には搬送距離 (搬送時間) が関与すること, また成分

採血装置トリマアクセル (テルモBCT株式会社, 東京) (以下, トリマと略す) で採血した血小板は, 搬送距離 (搬送時間) にかかわらず, 凝集塊発生率が他機種に比し有意に低値であることを報告している¹⁾。この検討結果に基づき, 東北ブロック血液センター (製造施設) より遠隔地の2つの採血施設にトリマが導入された。本研究では, 当該施設で採血された血小板の採血機種別の凝集塊発生率を検証し, あわせて血小板活性化と凝集塊形成

との関連性について検討した。

【対象と方法】

1 採血機種別の凝集塊発生率の検討

対象としたPC原料は、秋田県赤十字血液センター中通出張所(以下、中通出張所と略す)と青森県赤十字血液センター弘前出張所(以下、弘前出張所と略す)において、CCS(ヘモネティクスジャパン合同会社、東京)、テルシスS(テルモBCT株式会社、東京)、およびトリマにより採血された。同原料は採血施設から製造施設である東北ブロック血液センター(宮城県仙台市)に搬送され、受入直後に白色蛍光灯下、肉眼で凝集塊の有無を確認した。微小な凝集塊が1つでも確認された場合に「凝集塊あり」、確認されなかった場合に「凝集塊なし」と判定した。採血機種別の凝集塊発生率は、平成25年10月から平成26年1月までの採血当日製造本数と受入時に記録した凝集塊発生本数から凝集塊発生率を算出した。

2 凝集塊形成と血小板活性化との関連性の検討

受入時に凝集塊が確認されたPC原料は、血小板数測定工程に移行する前に振とう処理を行った。PC原料を、凝集塊が確認されなかった群(凝集塊-/-)、受入れ時に凝集塊が確認され翌日までに消失した群(凝集塊+/-)、および受入れ時に確認された凝集塊が翌日になっても消失しなかった群(凝集塊+/+)の3つに分類した。採血翌日にPC検体をサンプリングし、既報にしたがい固定と染色を行った²⁾。CD62P陽性細胞の測定と解析にはフローサイトメーターFACSCalibur(BD Biosciences, San Diego, CA, USA)およびCell Quest(BD Biosciences, San Jose, CA, USA)を用い¹⁾、標識抗体はPhycoerythrin(PE)標識抗CD62P単クローン抗体(BD Biosciences Pharmingen, San Jose, CA, USA)とPeridinin chlorophyll protein(PerCP)標識抗CD61単クローン抗体(BD Biosciences Pharmingen)を使用した。CD62P陽性率は、CD61抗体陽性細胞をゲーティングし、その中のCD62P陽性細胞を測定することにより算出した。CD42b陽性細胞の測定は、Fluorescein isothiocyanate(FITC)標識抗

CD42b単クローン抗体(BD Biosciences Pharmingen)を使用し、同様にCD61抗体陽性細胞をゲーティングすることにより行った。CD42bの発現については平均蛍光強度(Mean fluorescence intensity, MFI)を比較した。

3 統計処理

統計解析ソフトは統計解析Statcel2(2nd edition, OMS; Saitama, Japan)を使用した。凝集塊発生頻度はカイ二乗検定および残差分析で比較した。CD62PおよびCD42b陽性率、CD42b MFI値はTurkey-Krammer検定で比較した。いずれも危険率5%未満の場合に統計学的に有意であると判定した。

【結 果】

1 採血機種別の凝集塊発生率

製造施設と中通出張所および弘前出張所との搬送距離、平均搬送時間はそれぞれ239km、7.5時間および398km、7.4時間であった。採血当日製造分の凝集塊の有無は、中通出張所で凝集塊あり167件(CCS 131件、テルシスS 35件およびトリマ1件)、凝集塊なし473件(CCS 228件、テルシスS 163件およびトリマ82件)、弘前出張所で凝集塊あり236件(CCS 186件、テルシスS 48件およびトリマ2件)、凝集塊なし385件(CCS 180件、テルシスS 148件およびトリマ57件)であった(表1)。凝集塊発生率は中通出張所で26.1%(CCS 36.5%、テルシスS 17.7%およびトリマ1.2%)、弘前出張所で38.0%(CCS 50.8%、テルシスS 24.5%およびトリマ3.4%)であった(表1)。カイ二乗検定の結果、トリマ採血PCにおける凝集塊発生率は他機種に比し有意に低かった(表1)。

2 凝集塊形成と血小板活性化との関連性

凝集塊-/-、凝集塊+/-および凝集塊+/+の原料PCにおけるCD62P陽性率はそれぞれ $15.4 \pm 9.2\%$ ($n=180$)、 $16.7 \pm 9.8\%$ ($n=114$)および $14.9 \pm 9.8\%$ ($n=60$)であり、有意差は認められなかった(データ示さず)。同様にCD42bの発現について検討した結果、各陽性率は99.7

±0.2% (n=67), 99.5±0.3% (n=57) および 99.1±1.2% (n=35) であり, また各凝集塊群の CD42b MFI 値は 165.7±57.3, 139.4±41.1 および 109.6±31.3 であった (表2)。凝集塊(+/-)群の CD42b MFI 値は, 凝集塊(-/-)群および凝集塊(+/-)群の MFI 値に比し, また凝集塊(+/-)群のそれは凝集塊(-/-)群に比し有意に低下していた (表2)。同様の結果は採血機種別の原料 PC においても認められた (表3)。

【考 察】

これまでの検討で, 凝集塊の発生には「搬送距離 (搬送時間)」と「採血機種の違い」が関与すること, また成分採血装置トリマで採血した PC 原料は他の採血機種に比べて, 搬送距離 (搬送時間) の影響を受けることなく血小板の凝集塊発生率が低

いことを報告している¹⁾。この検討結果に基づき, 東北ブロックの製造施設までの搬送時間が平均で 7 時間を超える中通出張所 (7.5 時間) と弘前出張所 (7.4 時間) において採血された血小板を対象として, 再度検討したところ, 成分採血装置 CCS およびテルシス S で採血された血小板よりもトリマで採血された血小板の凝集塊発生率が有意に低いことを再確認することができた。製造施設から遠方の採血施設においては, 凝集塊発生頻度の低い成分採血機種を導入することにより, 血小板製剤業務の効率性を高め, その結果は同製剤の安定供給に有利に働くのではないかと考えられた。

血小板の膜表面上に存在する CD42b は, von Willebrand factor (vWF) と結合する接着受容体であり, 休止中の血小板に発現しているが, 活性化すると抗体との反応性は変化する³⁾。また CD62P

表 1 採血機種別の凝集塊発生頻度

中通出張所 (対象件数 640 件, 採血期間; 平成 25 年 10 月～平成 26 年 1 月)

| 採血機種 | CCS | テルシス S | トリマ | 合計 |
|------------|--------|--------|-----|------|
| 対象件数 | 359 | 198 | 83 | 640 |
| 凝集塊 | | | | |
| 有 | 131 | 35 | 1 | 167 |
| 無 | 228 | 163 | 82 | 473 |
| 凝集塊発生率 (%) | 36.5 | 17.7 | 1.2 | 26.1 |
| カイ二乗検定 | < 0.05 | | | |

弘前出張所 (対象件数 621 件, 採血期間; 平成 25 年 10 月～平成 26 年 1 月)

| 採血機種 | CCS | テルシス S | トリマ | 合計 |
|------------|--------|--------|-----|------|
| 対象件数 | 366 | 196 | 59 | 621 |
| 凝集塊 | | | | |
| 有 | 186 | 48 | 2 | 236 |
| 無 | 180 | 148 | 57 | 385 |
| 凝集塊発生率 (%) | 50.8 | 24.4 | 3.4 | 38.0 |
| カイ二乗検定 | < 0.05 | | | |

表 2 原料 PC における CD42b の発現

| | 凝集塊 | | | P § |
|---------------|------------|------------|------------|----------|
| | (-/-) | (+/-) | (+/+) | |
| 対象件数 | 67 | 57 | 35 | — |
| CD42b 陽性率 (%) | 99.7±0.2 | 99.5±0.3 | 99.1±1.2 | — |
| CD42b MFI 値 | 165.7±57.3 | 139.4±41.1 | 109.6±31.3 | < 0.05 † |

§ Turkey-Krammer 検定

† 凝集塊(-/-)vs(+/-), (-/-)vs(+/+), (+/-)vs(+/+)

表3 採血機種別原料PCにおけるCD42b MFI値の比較

| 採血機種 | | 凝集塊 | | | P § |
|-------|------|--------------|--------------|--------------|---------|
| | | (-/-) | (+/-) | (+/+) | |
| CCS | 対象件数 | 19 | 29 | 21 | |
| | MFI値 | 226.5 ± 15.6 | 140.9 ± 40.9 | 121.4 ± 24.1 | <0.05 † |
| テルシスS | 対象件数 | 19 | 19 | 8 | |
| | MFI値 | 181.4 ± 39.7 | 146.4 ± 41.9 | 93.7 ± 25.7 | <0.05 † |
| トリマ | 対象件数 | 29 | 9 | 6 | |
| | MFI値 | 115.5 ± 35.5 | 119.6 ± 38.3 | 89.3 ± 43.9 | |

§ Turkey-Krammer 検定

† CCS : 凝集塊(-/-)vs(+/-), (-/-)vs(+/+)

テルシスS : 凝集塊(-/-)vs(+/-), (-/-)vs(+/+), (+/-)vs(+/+)

(P-selectin) は血小板が活性化すると、細胞内顆粒から膜表面上に移動してくる⁴⁾。脱顆粒した血小板は、in vitroではP-セレクトインと単球および好中球上P-selectin glycoprotein ligand-1を介して凝集することが報告されている⁵⁾。Leytinらは期限切れや冷蔵保存の血小板をウサギに輸血した動物モデルにおいて、CD62PおよびCD42bは両方ともに輸血後の血小板クリアランスに関与していることを示している⁶⁾。本研究においては、凝集塊(-/-)、凝集塊(+/-)および凝集塊(+/-)の3群に分類した原料PC上のCD42bおよびCD62Pの発現を比較した結果、凝集塊の有無によるCD62Pの陽性率に有意差は認められなかった。この結果はFeysらの報告⁷⁾と一致している。対照的に、Nakajoらは凝集塊の存在と血小板活性化マーカーの上昇に関連性があることを報告している⁸⁾。Nakajoらの研究では、白血球除去を行っていない血小板製剤を用いており、一部の血小板は単球や好中球と結合して凝集塊を形成し、あるいはより強い活性化刺激を受けていた可能性がある⁹⁾。またその当時の血液バッグの材質がPolyolefin (PO) 80ではなくPO65であり、ガス透過性の差に起因した可能性が考えられる^{10)~12)}。一方、CD42bの発現については、いずれの群においても99%以上の陽性率を示しているものの、凝集塊(-/-)→(+/-)→(+/-)の順に有意にCD42b MFI値は低下した。この結果は抗CD42b抗体の結合性が上記の順に低下していたことを示しており、血小板の活性化が進行していた可能性を示唆している。Feysらは、凝

集塊が存在する血小板は凝集塊が存在しない血小板に比べてvWF結合性が高いが、GPIb α (CD42b) に差はないことを報告している¹³⁾。CD42b発現率と凝集塊発生の関連性をさらに明らかにするためにはvWFを測定する必要がある、今後の課題であるといえる。凝集塊の存在によりCD42bMFI値が低下する現象は凝集塊発生率が低いトリマ採血PCにおいても観察された。トリマが他の採血機種と異なる点は、回路の中に白血球除去フィルターが用いられていないこと、回路の構造上血小板はチャネルの壁に接触しないこと、また採取バッグの材質がpolyvinyl chlorideであり、可塑剤としてn-butyl tri-n-hexyl citrateが配合されているなどである。したがって、いずれの採血機種においても活性化シグナルは入るものの、トリマ採血PCにおいては活性化シグナルの強弱やその機序が他機種とは異なっているものと考えられる^{14), 15)}。採血機種とシグナル伝達メカニズムとの関連性については、今後の検討課題である。

結 語

トリマで採血されたPCにおける凝集塊発生頻度は他機種よりも有意に低かった。また同PCの凝集塊発生頻度は搬送距離(時間)に依存しないことが再確認された。したがって、製造施設より遠方に新たに成分採血装置を導入する場合は、搬送時間が長くても凝集塊発生の少ない機器を選択し、採血機種の特性を理解して機器を配備することが血小板製剤調製業務の効率性、同製剤の安定

供給上有利であると思われた。また、凝集塊発生と血小板活性化マーカー CD62P の発現に関連性は認められなかったが、CD42b の MFI 値は有意

に低下した。血小板活性化が PC の品質に及ぼす影響については引き続き検討すべき課題であると思われた。

文 献

- 1) 及川伸治, 川島航, 星尚宏, 他 : 多重ロジスティック回帰分析による血小板製剤原料の凝集塊発生要因の検討. 血液事業, 36 : 450, 2013.
- 2) Oikawa S, Sasaki D, Kikuchi M, *et al.*: Comparative in vitro evaluation of apheresis platelets stored with 100% plasma versus bicarbonated Ringer's solution with less than 5% plasma. Transfusion, 53: 655-660, 2013.
- 3) Hourdillé P, Heilmann E, Combrié R, *et al.*: Thrombin induces a rapid redistribution of glycoprotein Ib-IX complexes within the membrane systems of activated human platelets. Blood, 76: 1503-1513, 1990.
- 4) Stenberg PE, McEver RP, Shuman M A, *et al.*: A platelet alpha-granule membrane protein (GMP-140) is expressed on the plasma membrane after activation. J Cell Biol, 101: 880-886, 1985.
- 5) Michelson AD, Barnard MR, Krueger LA, *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: 1533-1537, 2001.
- 6) Leytin V, Allen DJ, Gwozdz A, *et al.*: Role of platelet surface glycoprotein Ib α and P-selectin in the clearance of transfused platelet concentrates. Transfusion, 44: 1487-1495, 2004.
- 7) Feys HB, Coene J, Devloo R, *et al.*: Persistent aggregates in apheresis platelet concentrates. Vox Sang, 108: 368-377, 2015.
- 8) Nakajo S, Hirayama F, Niwa K, *et al.*: Clump formation in apheresis platelet concentrates. Transfusion, 39: 913-915, 1999.
- 9) Macey M, Azam U, McCarthy D, *et al.*: Evaluation of the Anticoagulants EDTA and Citrate, Theophylline, Adenosine, and Dipyridamole (CTAD) for Assessing Platelet Activation on the ADVIA 120 Hematology System. Clin Chem, 48: 891-899, 2002.
- 10) 川島航, 及川伸治, 佐々木大, 他 : 成分採血由来濃厚血小板を静置保存した時の影響について. 血液事業, 26 : 368, 2003.
- 11) 江月将史, 伊藤貴俊, 白濱憲昭, 他 : 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. 日本輸血学会雑誌, 51 : 578-584, 2005.
- 12) Ezuki S, Kanno T, Ohto H, *et al.*: Survival and recovery of apheresis platelets stored in a polyolefin container with high oxygen permeability. Vox Sang, 94: 292-298, 2008.
- 13) Feys HB, Van Aelst B, Devloo R, *et al.*: The contribution of von Willwbrand factor-GPIb α interactions to persistent aggregate formation in apheresis platelet concentrates. Vox Sang, 110: 344-351, 2016.
- 14) Ringwald J, Antoon M, Eckstein R, *et al.*: Residual aggregates in platelet products: what do we know? Vox Sang, 106: 209-218, 2014.
- 15) Macher S, Sipurzynski-Budrass S, Roskopf K, *et al.*: Function and activation state of platelets in vitro depend on apheresis modality. Vox Sang, 99: 332-340, 2010.