原 著

血小板濃縮液の製造及び保存に及ぼす振盪方法の影響：

Rotary 型水平振盪の効果

岡田 英俊 宇多 正行 石居 昭夫 西崎太計志

岡山県赤十字血液センター

(昭和60年12月2日受付)

EFFECT OF MODE OF AGITATION ON PREPARATION AND STORAGE OF PLATELET CONCENTRATES:

Effectiveness of Rotary Flat-Bed Agitation

Hidetoshi Okada, Masayuki Uda, Akio Ishii and Takeshi Nishizaki

Japanese Red Cross Okayama Blood Center

To find a suitable mode of agitation for the preparation and storage of platelet concentrates (PC), we evaluated the effects of a newly designed rotary motion flat-bed agitator on the resuspension of platelets and maintenance of platelet integrity during storage, in comparison with two conventional types of agitators, the reciprocal flat-bed and elliptical agitators. PC were stored at 20—24°C for 72 hours under agitation, and changes in pH, collagen aggregation, hypotonic shock response, morphology score and lactate dehydrogenase (LDH) discharge were measured. The percentage of PC resuspended after 16 hours of elliptical, rotary and reciprocal agitation was 85%, 82% and 77%, respectively. The pH of PC was maintained at 7.1 to 7.5 for 72 hours with any mode of agitation, but the pH varied more widely in the reciprocal group than in the other two groups. The two types of flat-bed agitation showed better preservation of platelets than elliptical agitation as evaluated by collagen aggregation. The morphology scores of PC stored on the rotary agitator were highest among the three groups after 72 hours of storage. The greatest LDH discharge was observed in PC stored on the elliptical agitator. These data indicate that the rotary mode is more efficient than the reciprocal mode and causes less damage to platelets due to mechanical stress than the elliptical mode. We consider the rotary mode of flat-bed agitation to be preferable for preparing and storing PC.

はじめに

血小板濃縮液 (PC) の現在の製造法及び保存法においては、振盪操作が重要な役割をはたしている。たとえば、製造過程の重遠心操作において血小板はバッグの底に button 状に沈降するので、これを再浮遊させるため何らかの振盪操作が必要である¹⁾。また、PC の保存過程において血小板機能を良好に保持するには、保存中 pH の低下を抑制することが重要であり、そのためにも振盪が有効であることが知られている²⁾³⁾。

しかし、現在用いられている振盪モードには、reciprocal 型水平振盪、elliptical 型転倒振盪、

face to face 型転倒振盪など種々のモードがあり、その優劣については明確な結論が得られていない^{4)~9)}。一般に、転倒型回転運動の elliptical モードや face to face モードは、血小板の再浮遊率が高く⁹⁾、保存中の pH 低下も十分抑制するが、血小板に与える shear stress が強く、血小板に損傷を与え易いことが指摘されている⁶⁾⁷⁾。一方、reciprocal 型の水平振盪では、血小板に与える損傷は少ないが、血小板 button の再浮遊率が低く⁹⁾、時には pH も十分維持されない場合があることが報告されている⁷⁾。したがって、この相反する二つの要因を満たす振盪モードを見い出すこと

は、PC を効率的に製造し、しかも血小板を良好な状態で保存するための重要な因子であると考えられる。

我々は、穏やかな水平振盪の一種であり、しかも攪拌効率が高いと考えられる旋回運動の rotary 型水平振盪モードを血小板の振盪法に応用し、この効果について従来の代表的振盪モードである reciprocal 型水平振盪、及び elliptical 型転倒振盪と比較した。各振盪モードの評価の指標として、PC の製造時における血小板 button の再浮遊率、及び PC の保存中の pH, morphology score, collagen 凝集能, hypotonic shock response (HSR), lactate dehydrogenase (LDH) 漏出率を測定した。

方 法

1. PC の調製法、再浮遊法及び保存方法

健康な供血者より、polyvinylchloride (PVC) 製トリプルバッグ(テルモ社, BB-TC 207J)を用い、28ml の citrate-phosphate-dextrose (CPD) 液を含んだ親バッグ中に約200ml 採血し、通常の二段階遠心法により PC を製造した⁹⁾。遠心後生じた button 状の血小板を $22 \pm 2^\circ\text{C}$ の恒温室に1時間静置し、続いて振盪保存した。PC の再浮遊率は、16時間振盪保存した後、バッグを軽く振り、直径1mm 以内の微小な血小板 clump が1バッグ中1個以内の場合を再浮遊状態と判定し、その百分率によって示した。

PC の振盪には、rotary 型水平振盪機[久保田商事 G10-21 (NBS Gyrotory Shaker を血小板用に改良), 50rpm], reciprocal 型水平振盪機(大洋科学工業, Recipro Shaker R-1改良型⁹⁾, 50cycles/min), 及び elliptical 型転倒振盪機(Fenwal 社, Elliptical Platelet Rotator PR-1, 6rpm) の三種

の振盪機を用いた。保存温度は、静置保存も含み、すべて $22 \pm 2^\circ\text{C}$ にコントロールした。

2. 血小板の in vitro 検査

pH は pH メーター (Horiba, F-AD 型) を用い、また血小板数は自動血小板計数器(東亜医用電子, PL-100)を用いてそれぞれ測定した。Collagen 凝集能は、アグリゴメーター (二光バイオサイエンス, Model PAT-4A) を用いて測定し、collagen の終濃度 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ における最大凝集率で示した。HSR は Kim¹⁰⁾等の方法に従い、PRP を150 mOsm の低張にさらし、5分後の吸光度(610nm)の回復率を測定した。LDH 活性は、簡易型臨床化学分析装置(中外製薬, RaBA-super)を用いて測定し、血小板の LDH 漏出率は、1% Triton X-100 により溶解した血小板内総 LDH 活性量に対する血漿 LDH の比率で示した。Morphology score は、位相差顕微鏡(Nikon, DIAPHOT-TMD, 1000倍)を用い、Kunicki¹¹⁾等の方法に従って測定した。なお、collagen 凝集能、HSR の測定用サンプルには、血小板数を $3 \times 10^5/\text{mm}^3$ に調整した PRP (自己血漿で希釈)を用いた。

測定値はすべて mean $\pm$ SD で表示し、統計学的有意差検定は、Student の t 検定で行ない、 $p < 0.05$ の場合を有意とした。

表1 血小板 button の再浮遊率に及ぼす振盪方法の影響

振盪モード	回転数	再浮遊率*	n
Rotary 型水平振盪	50rpm	82%	469
Reciprocal 型水平振盪	50cpm	77%	283
Elliptical 型転倒振盪	6rpm	85%	80

*遠心後生じた血小板 button を1時間静置し、その後16時間振盪した時の血小板の再浮遊率を示す

表2 PC を 22°C で静置または振盪保存した時の pH の変化 (Mean $\pm$ SD, n=10)

Mode of Agitation	Storage Time			
	3hr	24hr	48hr	72hr
Rotary 型水平振盪	7.26 ± 0.03	7.40 ± 0.04	7.40 ± 0.07	7.33 ± 0.07
Reciprocal 型水平振盪	7.23 ± 0.03	7.32 ± 0.09	7.33 ± 0.11	7.30 ± 0.16
Elliptical 型転倒振盪	7.26 ± 0.03	7.38 ± 0.04	7.45 ± 0.05	7.41 ± 0.06
静置保存	7.24 ± 0.08	7.21 ± 0.19	7.11 ± 0.30	6.97 ± 0.44

結 果

表1に、三種の振盪方法による血小板の再浮遊率を示す。16時間振盪後の再浮遊率は、三種のモードで若干の差がみられ、elliptical モードが最も高く、ついでrotary モード、reciprocal モードの順であった。

表2に、PCを22℃で72時間保存した時のpHの経時変化を示す。PCのpHは調製3時間後で7.2~7.4の範囲にあり、72時間後はいずれの振盪方法によっても7.0以上に維持された。24時間後のpHは、rotary モードがreciprocal モードより有意に高値を示したが($p<0.05$)、それ以降の保存中では有意差がなかった。Elliptical モードは、48時間保存以後二つの水平振盪群より有意に高いpHを示した($p<0.05$)。また、rotary 及び elliptical モードでは、PCの個体差によるpHのバラツキは小さいが、reciprocal モードではpHのバラツキが保存時間の経過とともに大きくなる傾向を示

した。静置保存では、さらに大きなpHのバラツキが観察された。

図2 PCの22℃保存における血小板のHSRに及ぼす振盪方法の影響 (Mean±SD).

—○—: rotary 型水平振盪 (n=10), —●—: reciprocal 型水平振盪 (n=5), —△—: elliptical 型転倒振盪 (n=5).

図1 PCの22℃保存における血小板のcollagen凝集能に及ぼす振盪方法の影響 (Mean±SD).

—○—: rotary 型水平振盪 (n=10), —●—: reciprocal 型水平振盪 (n=14), —△—: elliptical 型転倒振盪 (n=10).

図3 PCの22℃に保存における血小板のLDH漏出率に及ぼす振盪方法の影響 (Mean±SD).

—○—: rotary 型水平振盪 (n=10), —●—: reciprocal 型水平振盪 (n=8), —△—: elliptical 型転倒振盪 (n=10).

表3 PCを22℃で静置または振盪保存した時の血小板のmorphology scoreの変化 (Mean±SD, n=10)

Mode of Agitation	Storage Time			
	3hr	24hr	48hr	72hr
Rotary 型水平振盪	347±15	355±17	345±15	340±24
Reciprocal 型水平振盪	352±14	334±9	336±18	311±44
Elliptical 型転倒振盪	348±25	331±30	310±49	274±70
静置保存	337±30	342±22	301±64	216±72

図1, 2及び3に, 三種の振盪モードを用いてPCを72時間保存した時のcollagen凝集能, HSR及びLDH漏出率をそれぞれ示す。Collagen凝集能は, 保存24時間以後からrotaryモードが他のモードより有意に高値を示し($p<0.05$), 48時間後ではreciprocalとellipticalの差も有意であった($p<0.05$)。HSRは, 72時間保存中三種の振盪モードの間に有意差がなかった。LDH漏出率は, 24時間以後ellipticalモードが他の二つの水平振盪モード群より有意に高値を示した($p<0.05$)。

表3に, PCを振盪保存及び静置保存した時のmorphology scoreの経時変化を示す。PCの調製直後のmorphology scoreは, 340~350であり, 保存72時間後ではrotaryモードがellipticalモードより有意に高値を示した($p<0.05$)。統計学的有意差はなかったが, rotaryモードの平均値はreciprocalモードより若干高い傾向を示した。また, 静置保存では, 72時間後にscoreが急激に低下した。

考 察

血小板の保存において, 最も大きな影響を及ぼす因子はpHであり, この値は振盪の如何によって大きく変化する。特に室温保存では, 酸素の供給や炭酸ガスの放出が不十分であるとpHの低下傾向が著しく³⁾¹²⁾¹³⁾, pHが6.0以下になるとviabilityが著明に劣化することが知られている²⁾³⁾。一方, pHが7.2以上に上昇すると血小板にとって有害であることも指摘されている³⁾⁵⁾。しかし, この原因はpHの上昇に起因するのではなく, むしろ強い振盪そのものが血小板に劣化を与えるという説もある¹⁴⁾。いずれにしても, 今回の実験では, 三種の振盪モードの間に大きな差はなく, いずれも7.0以上に保つことができたので, pHの維持という観点では大きな優劣はないと考えられる。

最近, 米国においてreciprocal型水平振盪は振盪力が弱く, pHが若干低下することが問題にされているが⁷⁾, 我々の実験ではこの様な現象は認められなかった。この理由は, 恐らく本邦のPCの単位容量当たりのバッグ表面積が米国の場合に比べて約2倍の広さがあり(テルモ社テルフレック

ス: $10.0\text{cm}^2/\text{ml}$, Fenwal社PL-732: $5.4\text{cm}^2/\text{ml}$), ガス交換効率が相対的に高いためであろう。

しかし, reciprocalモードは, rotaryモードに比べてpHのパラツキが大きいことが観察されたので(表2), 攪拌の均一性に若干問題があると思われる。たとえば, 保存72時間後のPCのpHの統計学的変動係数(C.V.)を調べると, ellipticalとrotaryがそれぞれ0.81, 0.95とほぼ同等の低値を示したが, reciprocalは2.19, 静置では6.31と, 血小板が滞留しやすくなるほど高値を示す傾向が認められた。すなわち, reciprocal型水平振盪では, 攪拌がバッグ内全体で均一に行なわれない場合があり, 血小板がバッグの底やエッジの部分に滞留する現象が観察された。一方, rotary型水平振盪モードでは, 旋回運動によってバッグの内容物がよりスムーズに攪拌できるので, この様な滞留はほとんど認められなかった。このrotaryモードの特徴は, 血小板の再浮遊率にも好結果を与えた。すなわち, PC製造時における血小板buttonの再浮遊率に対するrotary振盪の効果は, ellipticalモードには若干劣るが, reciprocalモードより約5%高値を示した(表1)。

血小板の重要な機能の一つであるcollagen凝集能では, rotary振盪において最も良好に維持され, 一方elliptical振盪において著明な劣化がみられた。この原因として, 血小板がelliptical振盪の強いshear stressによって, 凝集惹起剤のreceptorを有する血小板膜が損傷を受けた可能性が推定される。実際に, 血小板の損傷度の指標となるLDH漏出率¹⁵⁾¹⁶⁾は, 従来の報告⁶⁾⁷⁾と同様に, elliptical振盪が二つの水平振盪グループより高値であり, このことから両者のshear stressの大きさの違いが示された。凝集能におけるrotaryモードとreciprocalモードの差の原因は明確ではないが, 攪拌の均一性と関係あることが示唆される。

血小板の形態変化の定量的指標であるmorphology score¹¹⁾は, ellipticalモードより二つの水平振盪モードにおいて良好に維持される傾向を示した。振盪保存時のmorphologyの劣化は, 一般に強いshear stress^{4)~6)14)}によって起こると言

われており、我々のデータもこれを支持した。また、形態は、PCを静置保存した場合のように、pHが低下する時にも劣化することが報告されている²⁾³⁾¹¹⁾。しかし、我々の実験では、静置保存72時間後においてもpHは6.97と比較的高値に維持されているにもかかわらず、morphology scoreが低下する現象が認められた。この原因として、最近、松田等¹⁷⁾によって指摘されている様に、静置保存では血小板が一定の場所に滞留するため、血小板の周囲で局所的なpHの低下が生じ、血小板が劣化する可能性が示唆される。したがって、たとえばみかけ上のpHの低下が起こらなくても、血小板を滞留させることは好ましくないと考えられる。

以上のように、振盪は血小板に非常に微妙な影響を与え、強過ぎても弱過ぎても問題がある。今回の実験においても、ellipticalモードでは、血小板の再浮遊率が高く、pHの低下もよく抑制されるが、その強いshear stressにより血小板の損傷が大きくなる欠点が認められた。一方、reciprocal型水平振盪では、血小板の損傷は少ないが、保存中のpHのバラツキが大きく、血小板の再浮遊率も低いことがわかった。

最近、Snyder等⁶⁾⁷⁾は、転倒振盪の一種であるface to faceモードの回転数を従来の6rpmから2rpmに変更することにより、血小板の損傷が若干改善されることを報告した。しかし、この振盪モードでは、バッグの収納場所によって回転半径が異なることや、バッグの出し入れが面倒であり、また大量のバッグを収納するラックが作りにくいなど、実用的な面で欠点がある。また、reciprocalモードの往復運動の振幅を従来の1-inchから1.5-inchに変更することにより、reciprocalの欠点の一つである再浮遊率が改善されることも示された¹⁸⁾。しかし、pHのバラツキには改善がみられないことから、reciprocalモードの攪拌効果に関する本質的な欠点が改良されたとは必ずしも言えないと思われる。

我々が用いたrotary型水平振盪では、これらの問題のほとんどを改善することができた。すなわち、PCのpHは72時間保存中十分良好に維持され、その個体差によるバラツキも非常に少なく、

しかも、再浮遊率もreciprocalモードより高値を示した。さらに、血小板の損傷度はellipticalより少なく、凝集能や血小板形態も最も良好に保持された。従って、rotary型水平振盪モードはPCの製造及び保存用として優れた振盪方法であると考えられる。

今回使用したrotary型水平振盪機は、別名gyrotory型とも呼ばれ、回転プレートをバランス機構（カウンターウェイト）のついた3本の偏心軸で支えることにより、非常に均一な振盪パターンと安定した旋回運動を可能にしたことに特徴がある。PC用の本機は、10段のラックを有し、一段に24単位、全部で240単位のPCバッグを同時に振盪できるので、PCの効率的振盪法として実用的価値も大きいと考えられる。

まとめ

血小板濃縮液の製造及び保存時において、血小板の再浮遊率及び血小板の保存状態に及ぼすrotary型水平振盪の効果について、従来のreciprocal型水平振盪及びelliptical型転倒振盪と比較し、次の結果を得た。

(1) 血小板の再浮遊率は、elliptical振盪85%、rotary振盪82%、reciprocal振盪77%であった。

(2) PCの保存中のpHは、いずれの振盪モードにおいても7.1~7.5に維持され、三者の間に大差はなかったが、reciprocal振盪では個体差によるバラツキが大きかった。

(3) Collagen凝集能では、rotaryモードにおいて最も良好に維持され、elliptical振盪では顕著な劣化が観察された。

(4) Morphology scoreでは、二つの水平振盪がelliptical振盪より高値を示し、一方LDH漏出率では前二者が後者より低値を示した。

以上のデータから、rotaryモードは、reciprocalモードより攪拌効率が高く、しかもellipticalモードより血小板に損傷を与えにくいことが示されたので、PCの製造及び保存用として優れた振盪方法であると考えられる。

文 献

- 1) Widmann, F.K., Editor-in-chief: AABB Technical Manual: Preparation of blood

- components, 8th ed., AABB, Washington, D.C., 1981, 47—49.
- 2) Murphy, S., Sayer, S.N. and Gardner, F.H.: Storage of platelet concentrates at 22°C. *Blood*, 35: 549—557, 1970.
 - 3) Murphy, S. and Gardner, F.H.: Platelet storage at 22°C: Role of gas transport across plastic containers in maintenance of viability. *Blood*, 46: 209—218, 1975.
 - 4) Holme, S., Vaidja, K. and Murphy, S.: Platelet storage at 22°C: Effect of type of agitation on morphology, viability and function in vitro. *Blood*, 52: 425—435, 1978.
 - 5) Murphy, S., Kahn, R.A., Holme, S., Phillips, G. L., Sherwood, W., Davisson, W. and Buchholz, D.H.: Improved storage of platelets for transfusion in a new container. *Blood*, 60: 194—200, 1982.
 - 6) Snyder, E.L., Koerner, T.A.W., Kakaiya, R., Morre, P. and Kiraly, T.: Effect of mode of agitation on storage of platelet concentrates in PL-732 containers for 5 days. *Vox Sang.*, 44: 300—304, 1983.
 - 7) Snyder, E.L., Bookbinder, M., Kakaiya, R., Ferri, P. and Kiraly T.: 5-Day storage of platelet concentrates in CLX containers: Effect of type of agitation. *Vox Sang.*, 45: 432—437, 1983.
 - 8) Rock, G., Sherring, V.A. and Tittley, P.: Five-day storage of platelet concentrates. *Transfusion*, 24: 147—152, 1984.
 - 9) 宇多正行, 岡田英俊, 内藤俊二, 石居昭夫, 西崎太計志: CPD 液を用いた濃縮血小板の調製法と保存法についての検討. *血液事業*, 6: 139—147, 1983.
 - 10) Kim, B.K. and Baldini, M.G.: The platelet response to hypotonic shock. Its value as an indicator of platelet viability after storage. *Transfusion*, 14: 130—138, 1974.
 - 11) Kunicki, T.J., Tuccelli, M., Becker, G.A. and Aster, R.H.: A study of variables affecting the quality of platelets stored at "Room Temperature". *Transfusion*, 15: 414—421, 1975.
 - 12) Wallvik, J. and Åkerblom, O.: Platelet concentrates stored at 22°C need oxygen: The significance of plastics in platelet preservation. *Vox Sang.*, 45: 303—311, 1983.
 - 13) 清水哲夫, 福田常男: 濃縮血小板血漿の血液ガス分析. *日輸血会誌*, 30: 226—230, 1984.
 - 14) Bannai, M., Mazda, T. and Sasakawa, S.: The effects of pH and agitation on platelet preservation. *Transfusion*, 25: 57—59, 1985.
 - 15) Snyder, E.L., Hezzy, A., Katz, A.J. and Bock, J.: Occurrence of the release reaction during preparation and storage of platelet concentrates. *Vox Sang.*, 41: 172—177, 1981.
 - 16) 宇多正行, 岡田英俊, 石居昭夫, 西崎太計志: Non-button PC 法: 穏やかな条件を用いた血小板濃縮液の製造法. *日輸血会誌*, 31: 385—390, 1985.
 - 17) 松田利夫, 坂内 誠, 笹川 滋: 濃縮血小板血漿の保存について: 保存液及び攪拌の影響. *日輸血会誌*, 29: 331—339, 1983.
 - 18) Snyder, E.L., Ferri, P., Brown, R., Gallup, P. and Roberts, S.: Evaluation of flatbed reciprocal motion agitators for resuspension of stored platelet concentrates. *Vox Sang.*, 48: 269—275, 1985.
-