凝集塊のある濃厚血小板の機能について

坂 内 誠 松 田 利 夫

東京都赤十字血液センター

(昭和62年6月9日受付)

THE FUNCTION OF PLATELET CONCENTRATES CONTAINING AGGREGATES

Makoto Bannai and Toshio Mazda

Japanese Red Cross Tokyo Metropolitan Blood Center

Platelet size distribution and aggregation response were studied in platelet concentrates (PCs) containing platelet aggregates. Both normal and abnormal platelet size distribution were observed. As the number of clumps in PC increased, abnormal size distribution patterns also increased. As size distribution became abnormal, aggregability to thrombin decreased. Passage of PC through microaggregate filters did not affect platelet functions.

These in vitro results indicate that some PCs, containing platelet aggregates can be used for transfusions while others can not. The selection of the proper PC can be judged by the number of clumps, and more exactly, by platelet size distribution. PCs of normal size distribution can be used for transfusion provided adequate blood filters are employed.

序 言

濃厚血小板 (PC) の調製にあたり、血小板が再浮遊せず血小板の凝集塊がみられることがある¹⁾。この再浮遊をしない PC の発生は pH が高い場合に起きることから、抗凝固剤の ACD 液を過剰に加えることにより、pH を下げて PC を調製することが試みられ、その結果、凝集塊の生成がおさえられ輸血後の Yield が良くなるという報告がある²⁾³⁾。しかし、pH の低下はクリオプレシベータの調製などに悪影響を与えること⁴⁾⁵⁾、さらに PC の長期保存にも問題があること⁶⁾などから実施させず、遠心後に静置し⁷⁾、時間を置くことにより、血小板周囲の pH を低下させ⁸⁾凝集塊の発生をできるだけ防止するようにしている。

日本では1983年に抗凝固剤が ACD 液から CPD 液に変わり PC 中の凝集塊の発生率が若干上昇した¹⁾。このような凝集塊のある PC は輸血しても患者の血小板数が上昇しないと言われている⁴⁾ので、血液センターでは、このような PC は供給していない。一方、1985年には PC の有効時間が48時間にまで延長されたが、それにもかかわらず医療

機関が集中している東京都内では、需要に応じきれないことがある⁹⁾。そこで今回はこのような凝集塊のみられる PC でも、どうしても血小板輸血を必要とする場合、輸血用として使用できるのかどうかを検討するため、凝集塊の量と血小板の粒度分布 (血小板体積分布) との関係、さらにそれらと血小板機能について比較検討した。そして、輸血に際し、凝集塊を取除くため Microaggregate Filter を用いた場合、その血小板機能への影響を検討した。

その結果、凝集塊のある PC にも使用できると思われるものと、そうでないものがあること、そして、それを粒度分布を測定することにより簡単に見分けられることがわかった。さらに、Microaggregate Filter を用いれば血小板の品質に影響を与えずに凝集塊を除去できることがわかったので報告する。

方 法

1. PC の調製

献血者より、220ml の血液を CPD 液28ml 入りトリプルバック (Teruflex, テルモ製) に採血し、

IEC DPR-6000遠心機を用い、4時間以内にPCを調製した¹⁰⁾。全血より多血小板血漿 (PRP) を $1,100 \times g$ (2,000rpm), 22°C , 6分間の遠心で調製し、さらに、 $3,350 \times g$ (3,500rpm), 7分の遠心で血小板を沈澱させた。上清血漿を約20ml 残して取り除き、 22°C で1.5~2時間静置後、 22°C で垂直回転 (PA-18, Helmer 製, 6rpm) で保存した。15時間後、PCを肉眼により凝集塊の有無を判定し、さらに、血小板の粒度分布、および血小板凝集能の測定を行った。

2. 凝集塊の判定および Microfiltration

PC中の凝集塊は肉眼的に3群に分類した。直径1mm以上の凝集塊の数が1~2個のものを+, 3~9個のものを++, 10個以上のものを+++とした。

血小板への Microaggregate Filter の影響を見るには、調製・静置後、水平回転 (MR-5, カヤガキ製, 50rpm) の攪拌で15時間保存したPCを用いて Microaggregate Filter (MF10, カワスミ製) に通し、透過前後の血小板数、粒度分布、平均血小板体積 (MPV)、凝集能の測定を行った。

3. 粒度分布の測定

粒度分布と血小板数及びMPVはPCを希釈液 (セルエント, 東亜医用電子製) により10,000倍に希釈し、すみやかに血球計数器 (CC-108, 東亜医用電子製) と接続した粒度分布記録装置 (PDA-400, 東亜医用電子製) で測定した。体積調製は $4.3 \mu\text{m}^3$ のラテックス粒子を用いた。最小閾値は $2.5 \mu\text{m}^3$ に設定した。

4. 凝集能の測定

Adenosin diphosphate (ADP, シグマ製, Grade I), コラーゲン (Horm 製) に対する最大凝集能、およびトロンビン (シグマ製, 850-1) に対する試薬添加5分後の最大凝集能を、あるいはこれらを複合して添加したときの最大凝集能を凝集計 (Hema Tracer 1, Model PAT-4A, 二光バイオサイエンス製) を用い比濁法¹¹⁾により測定した。なお、トロンビンあるいはそれと他の凝集惹起物質を同時に使用する場合は、測定は Legrand らの方法¹²⁾で1回洗浄した血小板を用いた。また、洗浄血小板を用いて ADP (単独) に対する凝集能を測定

する場合には、ADPの他に 0.2mg/ml フィブリノゲン (Grade L, Kabi 製) を添加した。

結 果

通常、PC中の血小板の粒度分布は $5 \sim 6 \mu\text{m}^3$ にピークを持つ曲線 (Fig. 1, Type 1) を描くが、中には小粒子の割合が異常に増えた粒度分布 (Type 3) を示すものと、その中間型 (Type 2) を示すものの3群に分類できた。

凝集塊のみられないPC(−)ではほとんどが正常な粒度分布 (Type 1) を示したが、凝集塊のあるPCの粒度分布は様々で、肉眼判定による凝集塊の多いPCほど、粒度分布では小粒子の割合が増加したものが多かった (Table 1)。肉眼判定++のPCでは70%がType 3に分類され、Type 1はほとんどなかった。逆に、肉眼判定+のPCではType 3は6%にすぎなかった。また、+および++のPCの特徴としてType 2の粒度分布を示すものが多くあり、+の60%、++の50%がType 2であった。粒度分布のタイプと凝集能との関係をFig. 2に示した。トロンビン (1IU/ml) に対する凝

Fig. 1 Platelet size distribution curves of PCs containing clumps.

—: Type 1, - - -: Type 2, ···: Type 3. Minimum threshold level was set at $2.5 \mu\text{m}^3$.

Table 1 Relation between number of clumps and size distribution type

Clumps	Size distribution type			
	1	2	3	Total
−	18	2	0	20
+	11	20	2	33
++	9	18	9	36
+++	1	8	22	31

20 PCs with no clumps(−) and 100 PCs with clumps were classified.

Fig. 2 Relation between type of size distribution and aggregability.

○, ●: Aggregability to 1U/ml thrombin, △, ▲: Aggregability to 50μM ADP, ○, △: PCs which do not contain clumps, ●, ▲: PCs which contain clumps. Numbers shown above symbols are mean values ± SD.

集能は粒度分布が異常になるにつれ低下した。特に Type 3では低下が大きく、 $26 \pm 8\%$ と低値を示した。しかし、凝集塊のあるPCでも Type 1では $56 \pm 5\%$ と凝集塊のないPCの $60 \pm 8\%$ と比べ差は認められなかった。また、Type 2では $49 \pm 5\%$ と若干の低下はあるものの、大きな低下は認められなかった。

次に、凝集塊の除去を目的として Microaggregate Filter に凝集のあるPCを通したところ粒度分布や血小板数に影響せずに凝集塊を取り除くことができた (data not shown)。さらに、Table 2に示したごとく、調製後、穏やかな水平回転攪拌により保存したPCを、Microaggregate Filter に通したが、透過前後の $5\mu\text{M}$ 及び $50\mu\text{M}$ ADP, 0.05 U/ml 及び 1 U/ml トロンビンに対する凝集能、血小板数、MPV、さらに粒度分布 (data not shown)

Table 2 Effects of microaggregate filtration on platelet functions

	Before	After
5 μM ADP aggregation (%)	13 ± 5	14 ± 6
50 μM ADP aggregation (%)	41 ± 11	41 ± 11
0.05 U/ml Thrombin aggregation (%)	42 ± 11	44 ± 12
1 U/ml Thrombin aggregation (%)	65 ± 3	66 ± 3
MPV (μm ³)	8.4 ± 0.6	8.4 ± 0.6
Platelet concentration (×10 ⁴ /μl)	142 ± 17	144 ± 18

4–6 PCs were pooled and filtrated. (Mean ± SD, n=6)

Fig. 3 Aggregability changes with storage

A: single agonist, ●: 1U/ml thrombin, ○: 0.05 U/ml thrombin, △: 50μM ADP, □: 20μg/ml collagen. B: multiple agonists, ○: 50μM ADP + 0.05U/ml thrombin, △: 50μM ADP + 20μg/ml collagen, □: 20μg/ml collagen + 0.05U/ml thrombin.

にも変化はみられなかった。

なお、以上のように粒度分布が正常な Type 1の血小板は、その機能を良く保持していた事から、このような血小板を穏やかな水平回転攪拌で5日目まで保存し、各種凝集惹起剤に対する凝集能を洗浄血小板を用いて測定した。 $50\mu\text{M}$ ADP, $20\mu\text{g/ml}$ コラーゲン及び 0.05 U/ml トロンビンに対する凝集能は保存とともに減少し、5日後には $50\mu\text{M}$ ADP に対する凝集能は $4 \pm 2\%$, $20\mu\text{g/ml}$ コラーゲンに対する凝集能は $22 \pm 13\%$, 0.05 U/ml トロンビンに対する凝集能は $13 \pm 16\%$ と低値を示し

た。しかしながら、1U/ml トロンビンに対する凝集能は5日後でも $57 \pm 11\%$ と高値を示した (Fig. 3-A)。さらに、単独ではほとんど凝集を引き起こさなかった凝集惹起剤を組合せて2種類を同時に添加すると、50 μ M ADP と20 μ g/ml コラーゲンでは $63 \pm 5\%$ 、20 μ g/ml コラーゲンと0.05U/ml トロンビンでは $65 \pm 7\%$ 、50 μ M ADP と0.05U/ml トロンビンは $37 \pm 22\%$ と5日保存したものでも高い凝集能を有する結果が得られた (Fig. 3-B)。

考 察

日本では採血量は200ml の場合が多く、さらに、採血バッグの透過性がすぐれている¹³⁾¹⁴⁾など種々の条件が諸外国とは異なっている。そのためか、PC 中の血小板数も少なく、また pH も諸外国より高い¹⁰⁾。それゆえ、製造条件が難しい。例えば、高い pH は大量にルーチンとして PC を調製する場合には、凝集塊が発生しやすくなる要因の1つと考えられている¹⁵⁾。保存においても、高い pH という条件下では、穏やかに攪拌保存を行えば、血小板の機能になんら影響を及ぼさないが、激しい攪拌を行うと血小板が破壊される¹⁶⁾。赤十字血液センターでは凝集塊発生の原因とその発生の防止法を模索しているが未だ完全な方法はない¹¹⁾¹⁵⁾。一方、このような凝集塊のある PC が使用できるか否かに関する研究も未だない。

そこで我々はこのような凝集塊のある PC や血小板が破壊されたような PC を使用できるのか否か、また、それを簡単に知る方法があるのかを検討した。その結果、血小板の大きさや形態の変化を表すものと考えられている血小板の粒度分布が血小板機能とも密接に関係していることが明らかとなり、簡便な品質管理手段となり得ることを認めた。凝集塊の見られた PC では粒度分布の正常なものと異常なものとがあり、それが凝集塊の数と相関していた。凝集には血小板の破壊を伴うものとそこまで至っていないものの2種類が存在すると考えられる。そして正常な粒度分布を示すものは血小板破壊が少ないと考えられた。

今回はさらに粒度分布と凝集能の関係を見てみたが、高濃度 (1U/ml) トロンビンに対する凝集も粒度分布 Type 3 では約 26% と他の Type

(Type 1; 56%, Type 2; 49%) よりかなり低値を示した。このことから、粒度分布異常を示した血小板の機能低下はかなり激しいものと思われる。ADP 凝集能は垂直回転 6rpm の保存条件では粒度分布のタイプによる差が見られなかったが、これは ADP 凝集能は激しい攪拌により明らかな絶対値の低下が起こり、粒度分布の正常な血小板でも保存による低下が激しいためと考えられる。穏やかな攪拌 (水平回転 50rpm) を行えば、より高い凝集能を維持していた (Table 2, Fig. 3)。

粒度分布が Type 1 の血小板が正常な血小板と言えるかどうか。また、それと血小板の凝集能の関係をさらに詳しく知るため、PC で5日間室温保存し、その粒度分布が Type 1 の血小板の凝集能を調べてみた。高濃度トロンビンや凝集惹起剤の複合による刺激に対しそれらの血小板は高い凝集能を示した。この結果は生体内での血小板凝集が種々の因子の相互作用により起こることを考え合せると、粒度分布が Type 1 の正常な血小板なら、5日保存した血小板でも生体内で有効に機能する可能性を示唆するものと考えられる。諸外国の有効期間と比して日本の PC の有効期間はあまりにも短く、有効期間をさらに延長することも望まれる。

Holme らは激しい攪拌で保存した PC の血小板粒度分布では dispersion が増加し、それが輸血後の血小板回収率の低下とよく相関することを報告している¹⁷⁾。さらに形態と viability がよく相関することもしられている¹⁸⁾¹⁹⁾。従って小粒子の出現した Type 3 の粒度分布を示した PC は輸血に使用しても効果を示さないと考えられる。

しかし、正常な粒度分布、Type 1 の PC は凝集塊があっても Microaggregate Filter を用い凝集塊を除去すれば輸血に使用できる可能性が示唆された。Microaggregate Filter は穏やかな攪拌により保存状態を良くして保存した反応性に富むと考えられる血小板を通して機能などには全く影響を及ぼしていない結果は、このフィルターの有用性を示唆しているものと思われる。今後、in vivo での血小板の有効性についても検討して行かなければならないであろう。

結 語

凝集塊のある PC 中の血小板は著しく破壊され機能を傷害されているものと、そうでないものがある。それは粒度分布を測定すれば正確にみわけることができるがその凝集塊の数によってもおおまかに分けることが出来ることがわかった。血小板の粒度分布は血小板機能を良く反映しており、また操作法自体も簡便であることから、PC の品質管理に使用すれば非常に有用であることがわかった。

さらに、粒度分布が正常な血小板は凝集塊があっても Microaggregate Filter を通せば血小板の機能を損うことなく輸血できることがわかった。

文 献

- 1) 武部道和, 西田一雄, 外山陽之助, 清水 勝: 血液パックの変更に伴う濃縮血小板血漿製剤 (PC) の凝集塊発生に関する検討. 日輸血会誌, 32: 533—538, 1986.
- 2) Aster, R.H. and Jandl, J.H.: Platelet sequestration in man. I. Methods. J. Clin. Invest., 43: 843—855, 1964.
- 3) Aster, R.H.: Effect of acidification in enhancing viability of platelet concentrates. Current Status. Vox Sang., 17: 23—27, 1969.
- 4) Pert, J.H., Zucker, M.B., Lundberg, A., Yankee, R. and Hendersen, E.: Recent advances in preparation of platelet concentrates from ACD and CPD blood. Vox Sang., 13: 119—126, 1967.
- 5) Pool, J.G.: The effect of several variables on cryoprecipitated factor VIII (AHG) concentrates. Transfusion, 7: 165—167, 1967.
- 6) Slichter, S.J. and Harker, L.A.: Preparation and storage of platelet concentrates II. Storage variables influencing platelet viability and function. Br. J. Haem., 34: 403—419, 1976.
- 7) Mourad, N.: A simple method for obtaining platelet concentrates free of aggregates. Transfusion, 8: 48, 1968.
- 8) 松田利夫, 坂内 誠, 召田明子, 宇田川武男, 清水 勝, 笹川 滋: 血小板保存条件の検討 II. 血小板周囲の pH の影響. 日輸血会誌, 29: 704—706, 1983.
- 9) 坂野立子, 田口淳一, 足達光男, 伊藤 等, 岩田卓也, 佐藤三吉, 松永信夫: 有効時間延長による濃縮血小板血漿供給状況の変化. 血液事業, 9: 224—225, 1986.
- 10) 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.
- 11) Born, G.V.R.: Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. Nature, 194: 927—929, 1962.
- 12) Legrand, C., Dubernard, V. and Caen, J.: Platelet aggregation: Its relation with ADP-induced fibrinogen binding to platelets and ADP-related membrane enzyme activities. Eur. J. Biochem., 142: 465—471, 1984.
- 13) Sasakawa, S. and Tokunaga, E.: Physical and chemical changes of ACD-preserved blood: A comparison of blood in glass bottles and plastic bags. Vox Sang., 31: 199—210, 1976.
- 14) 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.
- 15) 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血漿の調整法と保存法についての検討. 血液事業, 6: 139—147, 1983.
- 16) Bannai, M., Mazda, T. and Sasakawa, S.: The effects of pH and agitation on platelet preservation. Transfusion, 25: 57—59, 1985.
- 17) 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.
- 18) 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.
- 19) 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.