原 著

濃厚血小板の性状と白血球除去フィルターの 血小板回収率との関係

浅井 隆善 伊藤 道博 比留間 潔 中島 耀子

千葉大学医学部附属病院輸血部

(平成7年6月14日受付)

(平成7年10月20日受理)

RELATIONSHIP BETWEEN QUALITY OF PLATELET CONCENTRATE AND PLATELET RECOVERY RATE OF LEUKOCYTE REMOVAL FILTER

Takayoshi Asai, Michihiro Ito, Kiyoshi Hiruma and Yoko Nakajima
Division of Blood Transfusion, Chiba University Hospital

We studied the effect of the quality of platelet concentrate (PC) on the recovery rate of leukocyte removal filters in platelet transfusion.

Apheresis PCs taken in our hospital were stored in two types of storage bags (polyvinylchloride bag and polyolefin bag) for 48 to 96 h. PC quality was analysed using GMP140-positive rate and pH level as parameters. Under the storage conditions employed, PCs showed a wide distribution of parameters, with pH ranging from 5.82 to 7.39 and GMP140-positive rate from 6.8% to 96.3%. The PCs were filtered with a leukocyte removal filter and then platelet recovery rate was measured.

A significant correlation was found between PC quality (pH level and GMP140-positive rate) and platelet recovery rate, with values of $Y=9.107X + 18.618$, $r=0.345$ ($p<0.05$) and $Y=-0.199X + 89.487$, $r=0.498$ ($p<0.01$). A significant correlation was also found between the indicators of PC quality (pH level and GMP140-positive rate), with $r=0.662$ and $p<0.0001$.

These findings indicate that a deterioration in PC quality strongly affects the platelet recovery rate of the leukocyte-removal filter.

Key words: platelet concentrate, leukocyte removal filter, GMP140, pH, platelet recovery rate

緒 言

血小板製剤 (PC) 中に含まれる白血球を除去することは、発熱、血小板輸注不応症、ウイルス感染などの輸血に伴う副作用を防止する上で、有効な手段と考えられている^{1)~6)}。

PC 用白血球除去フィルターはその有効な手段の一つであり、特に実用的であることから、広く使用されている⁷⁾。しかし、フィルター使用後の血小板回収率のばらつき⁸⁾、また PC 保存日数の違いにより血小板回収率に差が見られるとの報告⁹⁾¹⁰⁾もある。さらに稀ではあるがフィルターの目詰ま

りを経験することがある¹¹⁾。この原因が何に起因するか調査することは、白血球除去フィルターを使用する血小板輸血に重要である。

今回、我々は、PC 用白血球除去フィルターを用い、種々の保存条件の後種々の異なった性状を呈した PC をろ過し、その血小板回収率を測定して、血小板回収率のばらつきに関しての若干の知見を得たので報告する。

材料と方法

1. PC の採取

PC 用白血球除去フィルターを用いて血小板回

収率の測定をした PC は、院内にて健常献血者から供血された38個の PC を対象とした。採血は成分採血機 Haemonetics 社 V50または Fenwal 社 CS3000を用いて採取したものを使用した。保存バッグはポリオレフィン製 (PO) 及びポリ塩化ビニル製 (PVC) の2種類のいずれかを使用した。

2. PC の保存

上記の PC は、採取した血小板を150ml、及び600ml PVC 保存用バッグまたは1,000ml PO バッグ中に保存した。容量は50~280ml、血小板数は $67\sim134\times10^4/\mu\text{l}$ 、各バッグの血小板総数は $8.69\times10^9\sim2.86\times10^{11}$ 個であった。その後、室温にて採血後48時間から最高96時間まで回転式振盪機上で振盪保存した。

3. 白血球除去フィルターによる処理

各種条件下で保存された PC を血小板用白血球除去フィルター PL50 (ポール・バイオメディカル・プロダクツ・カンパニー, USA) を用いて白血球除去を行った。フィルターの使用は、自然落差で流量調節クランプの調節により5~10ml/min の点滴速度でろ過を行った。これらは、輸血前にろ過した PC と、期限切れになったが血小板回収率のみを測定して輸血には使用しなかった PC とをも併せて今回の解析対象とした。

4. 血小板回収率の測定

ろ過前後の PC 中の血小板数を自動血球計数装置 K1000 (東亜医用電子, 神戸) を用いて測定した。ろ過前の血小板数に対するろ過後の血小板数の百分率 (%) を血小板回収率として表した。

5. PC の性状評価

白血球除去フィルターを用いてフィルターの血小板回収率を測定した PC について以下の性状を調べた。

(1) pH

フィルターろ過直前の PC につき pH を測定した。方法は、採血用アダプターを用いて注射用シリンジに検体を採取し、血液ガス分析装置 AB-L505 (Radiometer 社, デンマーク) で測定した。

(2) GMP140陽性血小板の測定

前項と同一の PC について、同時に血小板表面の GMP140陽性率を測定した。方法は、先ず1ml

の1%パラホルムアルデヒド等張リン酸緩衝液 (PBS, pH 7.4) に PC 50 μl を添加し4℃で2時間以上静置して血小板を固定した。固定した血小板を PBS (pH 7.4) で2回洗浄し、最終容量1mlになるよう PBS に再浮遊した。血小板の再浮遊液50 μl に20 μl の FITC 標識抗 GMP140 (CD62) 抗体 (Beckton Dickinson 社, USA) を添加し蛍光標識した。蛍光標識したサンプルをフローサイトメーターFACScan (Beckton Dickinson 社, USA) でレーザー波長488nm を用い分析を行い、血小板膜表面に GMP140を発現した血小板の百分率 (全血小板に対する) を求めた。尚、総血小板数として 5×10^3 個分析を行った。

6. 目詰まりを起こした白血球除去フィルター の電子顕微鏡検査

目詰まりを起こした白血球除去フィルターについて、生理食塩水で洗浄後、1%パラホルムアルデヒド等張リン酸緩衝液 (PBS, pH 7.4) に浸し4℃で2時間以上静置して固定した。その後、繊維層の表面を白金、パラジウムで蒸着した後、走査型電子顕微鏡 (ABT-150S, TOPCON 社, 東京) で観察した。

7. 統計処理

統計処理は各パラメーター間の回帰分析により相関係数を求め、相関係数の有意差の検定は student の t-test を用いた。

結 果

1. 白血球除去フィルターろ過前後の血小板回収率

白血球除去フィルターを使用してろ過を行った38件の内2件は途中で目詰まりを起こし、最終的に血小板回収率を測定できなかった。この2件を除く36件を血小板回収率の測定対象とした。

血小板回収率は35%から102%までの間で見られ ($80.2\%\pm13.9$ (mean $\pm$ SD)), 一部の PC には血小板回収率の明らかな低下を示すものが認められた (Table 1)。

2. 白血球除去フィルター使用前の PC の性状

血小板回収率を測定した36件の PC について測定した PC の性状のパラメーターは以下の結果であった (Table 1)。

Table 1 Platelet recovery rate and the quality of PC used for leukocyte removal filtration

Parameter	Result	
Platelet number	67-134×10 ⁴ /μl	(97.2±23.1)*
PC volume	50-280ml	(151±61)*
pH	5.82-7.39	(6.67±0.56)*
GMP140	5.7-96.3%	(45.7±34.6)*
Platelet recovery rate	35-102%	(80.2±13.9)*

n=36, * = mean ± SD

(1) pH

PC の pH は 5.82 から 7.39 の間に分布 (6.67 ± 0.56) し、pH 6 以下の明らかな低下を示したのも認められた。なお、目詰まりを起こした PC の 2 件は、それぞれ 6.12, 5.77 であった。

(2) GMP140 陽性血小板

PC 中血小板の GMP140 陽性血小板の百分率は 5.7% から 96.3% (45.7 ± 34.6) と幅広い分布を示し、大部分の血小板で GMP140 が陽性となっている PC も認められた。目詰まりを起こした 2 件の GMP140 は、それぞれ 78.2%, 79.8% であった。

(3) PC の pH と血小板 GMP140 陽性率との関係

測定した PC の pH と血小板 GMP140 陽性率との関係を Fig. 1 に示した。両者の間に有意な相関 ($r=0.662$, $p<0.0001$) が認められた (Fig. 1)。

3. 血小板回収率と PC の pH との関係

血小板回収率を測定した各 PC についての pH と白血球除去フィルター前後の血小板回収率との関連を検討した。

血小板回収率と pH の間には有意な正の相関 ($r=0.373$, $p<0.05$) が認められた (Fig. 2)。このうち pH 6.3 以上を示した PC のみの検討では有意な相関はなく ($r=0.126$)、pH6 以下の PC では血小板回収率の低下が強い傾向があった。

4. 血小板回収率と血小板 GMP140 陽性率との

Fig. 1 Relationship between the GMP140-positive rate of platelets and pH in stored PCs.
X : pH of stored PCs. Y : Percentage of GMP140-positive platelets in stored PCs.
r : Correlation coefficient.

Fig. 2 Relationship of the pH in PCs to the platelet recovery rate after filtration through a leukocyte removal filter.
X: pH of stored PCs. Y: Platelet recovery rate after filtration through a leukocyte removal filter. r: Correlation coefficient.

関係

血小板回収率を測定した各 PC について、血小板回収率と GMP140陽性率との関連を検討した。

血小板回収率と血小板の GMP140陽性率とは負の相関($r=0.498$, $p<0.01$)が認められ、GMP140陽性率が90%以上の PC では血小板回収率の低下

Fig. 3 Relationship of the GMP140-positive platelet rate in PCs to the platelet recovery rate after filtration through a leukocyte removal filter.
X: Percentage of GMP140-positive platelets in stored PCs. Y: Platelet recovery rate after filtration through a leukocyte removal filter. r: Correlation coefficient.

Fig. 4 Relationship of the platelet recovery rate to the period of PC storage. X: Period of PC storage (hours). Y: Platelet recovery rate after filtration through a leukocyte removal filter. r: Correlation coefficient.

が顕著であった (Fig. 3).

5. 血小板回収率と保存時間との関連

血小板回収率を測定した各 PC について、PC の保存時間との関連を検討した。

PC の保存時間と血小板回収率の関係では回収率の低下傾向は観察されたが、統計的に有意な差は認められなかった ($r = -0.289$, $p = 0.102$) (Fig. 4). なお、目詰まりを起こした 2 件はいずれも 72 時間の保存期間であった。

6. 目詰まりを起こした白血球除去フィルターの電子顕微鏡検査

目詰まりを起こした 2 件のフィルターの繊維層の走査型電子顕微鏡写真を Fig. 5 に示した。写真はフィルターの繊維層のろ過前側の最上層を示しているが、両件のフィルターともに著しい凝集物の捕集が観察された。写真には示されていないが、

Fig. 5 Surface of the filter membrane of cases complicated with clogging during filtration of PCs through a leukocyte removal filter (magnification $\times 1,000$).

upper: Case 1 (pH 5.77, GMP140-positive 79.8%). lower: Case 2 (pH 6.12, GMP140-positive 78.2%)

ろ過後側の繊維層にはこのような凝集物は観察されなかった。

考 察

PC 中に混入する白血球を除去することは、発熱¹⁾²⁾、血小板輸注不応症³⁾⁴⁾、サイトメガロウイルス感染⁵⁾⁶⁾などの輸血後副作用防止に有効であり、PC 用白血球除去フィルターはその有効な手段の一つである。しかし PC 用白血球除去フィルター使用後の血小板回収率のばらつき^{8)~10)}、そして稀ではあるがフィルターの目詰まりを経験することがある¹¹⁾。このことは、白血球除去フィルターを臨床使用の際の懸念となる。この原因に関しては、フィルター自身に由来する場合と血小板製剤に由来する場合の2つのケースが考えられる。

今回、我々は同一ロットのフィルターを使用し、使用条件を一定にすることによりフィルター側の条件を一定にし、血小板製剤側の条件の変動が、ろ過後の血小板回収率にどのように影響するかを検討した。方法として種々の性状の PC を使用し、PC 用白血球除去フィルターでろ過し血小板回収率を測定した。

血小板の性状に影響する因子として、保存時間、保存温度、血小板数、血漿量、保存バッグの材質、遠心分離条件、抗凝固剤濃度などが知られている¹²⁾。本研究では、保存時間、血小板数、保存バッグの材質の異なった PC を用いたが、これらの PC は、結果として種々の性状を呈していた。

PC の性状を示す指標として pH と GMP140 を測定した。pH は PC の性状の一般的な指標として広く使用されており、pH 6.2 以下で血小板機能低下、形態変化を起こすとの報告もある¹³⁾。一方、GMP140 は、血小板の活性化後血小板膜上に発現する α 顆粒膜蛋白で、血小板の活性化の指標として有用であることが報告されている^{14)~16)}。これらの指標についてはさらに、血小板製剤を臨床使用した際の pH と輸血後の血小板回収率の関係¹⁷⁾、GMP140 陽性率の上昇と輸血後の血小板回収率との関係¹⁸⁾についての研究もなされている。

我々は、pH と GMP140 で示される性状が異なる PC を用い、PC 用白血球除去フィルターに同一条件で通過させ、pH、GMP140 陽性率と血小板

回収率との相関を調べた。まず、pH と血小板回収率との関係を見ると、これらの間には有意な正の相関が認められ、さらに、GMP140 陽性率と血小板回収率には有意な負の相関が認められた。また、今回用いた PC の性状の指標間 (pH、GMP140) にも有意な負の相関が認められた。このことは、血小板の性状の変化が PC 用白血球除去フィルター使用後の血小板回収率に大きく影響することを示唆するものと思われる。つまり、pH 低下に見られる PC の保存条件の悪化と、それに伴う GMP140 の出現に示される血小板の活性化及び機能の低下が、白血球除去フィルター使用に伴う血小板回収率の低下と有意に関係していると言える。さらに、保存期間の影響について比較してみると、保存日数の長い PC 程血小板回収率は低下傾向にあった。これは高橋ら¹⁰⁾の報告を裏付ける結果であるが、今回の結果では統計学的な有意差が得られなかった。従って、保存時間の直接的な影響よりも、その結果として生じた PC の性状の変化、言い換えれば性状の悪化が血小板回収率を低下させたと考えられる。

では何故性状の低下した PC 中の血小板がフィルターに捕捉されてしまうのであろうか。GMP140 の発現した血小板は、白血球と粘性性があることが示されている¹⁹⁾。Pedigo らは PC 用白血球除去フィルターでの CD62 (GMP140) 陽性率の高い PC の血小板回収率低下について、捕捉された白血球への GMP140 陽性血小板の粘着の可能性を挙げている²⁰⁾。しかし、これらの性状が悪化した PC のフィルターによる血小板捕集の機構についての説明は未だ議論の余地のあるところと考えられる²¹⁾。

今回の試験中、2 例では PC 用白血球除去フィルターの目詰まりを生じ、最後までろ過を完了できなかった。その時の pH は各 5.77、6.12、GMP140 陽性率は各 79.8%、78.2% であり、目詰まりを起こした PC の性状悪化が著しいことが推察されるが、この程度の pH、GMP140 陽性率を示す PC でろ過を完了できた例もあり、フィルター目詰まりと PC の性状の指標との関連は、さらにいくつかの因子が関わっていると思われる。例数も

少ないことからさらに検討が必要であろう。

結 語

種々の性状のPCを用いて、同一条件下でPC用白血球除去フィルターを使用し、血小板回収率を測定し、次の結果を得た。

1. PCのpHとフィルターろ過後の血小板回収率には有意な相関が認められた。

2. PCのGMP140陽性率と血小板回収率には有意な相関が認められた。

1.2. よりPCの性状がPC用白血球除去フィルターの血小板回収率に大きく影響していることが示唆された。

文 献

- 1) Sirchia, G., Parravicini, A. and Rebulla, P.: Leukocyte depleted blood components. *Prog. Trans. Med.*, 3: 87-109, 1988.
- 2) Sirchia, G., Wentz, B., Rebulla, P., Parravicini, A., Carnelli, V. and Beltolini, F.: Removal of white cells from red cells by tranfusion through a new filter. *Transfusion*, 30: 30-33, 1990.
- 3) Meryman, H.: Transfusion induced alloimmunization and immunosuppression and the effects of leukocyte depletion. *Transf. Med. Reviews*, III: 180-193, 1989.
- 4) Kickler, T.: The challenge of platelet alloimmunization: Management and prevention. *Transf. Med. Reviews*, IV: 8-18, 1990.
- 5) Hillyer, C., Snyderman, D. and Berkman, E.: The risk of cytomegalovirus in solid organ and bone marrow transplant recipient: Transfusion of blood products. *Transfusion*, 30: 659-666, 1990.
- 6) Bowden, R. and Meyers, J.: Prophylaxis of cytomegalovirus infection. *Sem. Hematol.*, 27: 17-21, 1990.
- 7) Snyder, E.: Clinical use of white cell poor blood components. *Transfusion*, 29: 568-571, 1989.
- 8) 佐々木津, 金森平和, 田村智彦, 岡本理英, 田辺寿一, 菅村リカ, 藤田浩之, 府川仁哉, 松崎道男, 毛利 博, 大久保隆男, 山下勝巳, 横田敏和, 伊藤 仁: 白血球除去フィルターの血小板への影響とその輸血副作用防止効果. *日輸血会誌*, 38: 3-7, 1992.
- 9) 高橋恒夫, 細川真理, 関口定美: フィルターによる濃厚血小板製剤からの白血球除去-Pall

PL100及びPall PL50の評価-I. *医科器械学*, 60: 351-357, 1990.

- 10) 高橋恒夫, 細川真理, 福田達也, 西村隆雄, 山脇直邦, 関口定美: 血小板製剤用白血球除去フィルター Sepacell PLS10A, PLS5A及びPLS5Nの開発と性能表化. *日輸血会誌*, 40: 46-53, 1994.
- 11) 浅井隆善, 伊藤道博, 橋本真一郎, 竹下明宏, 比留間潔, 吉田 尚: 血小板製剤の保存条件と白血球除去フィルター濾過能の影響. *臨床血液*, 34: 1297, 1993.
- 12) Moroff, G. and Holme, S.: Concept about current conditions for the preparation and storage of platelets. *Trans. Med. Reviews*, 5: 48-59, 1991.
- 13) 清水哲夫, 神谷 忠: 血小板保存法. 山中 學, 山崎博男 編, 血小板, 医学書院, 東京, 1991, p. 257-260.
- 14) Shattil, S., Cunningham, M. and Hoxie, J.: Detection of activated platelets in whole blood using activated dependent monoclonal antibodies and flow cytometry. *Blood*, 70: 307-315, 1987.
- 15) Abram, C., Ellison, N., Budzynski, A. and Shattil, S.: Direct detection of activated platelets and platelet derived microparticles in humans. *Blood*, 75: 128-138, 1990.
- 16) Wun, T., Paglieroni, T., Sazama, K., and Holland, P.: Detection of plasmapheresis induced platelet activation using monoclonal antibodies. *Transfusion*, 32: 534-540, 1992.
- 17) Murphy, S.: Platelet storage for transfusion. *Sem. Hematol.*, 22: 165-177, 1985.
- 18) Rinder, H.M., Murphy, M., Stocks, K.A., Mitchell, J.G., Ault, K.A. and Hillman, R.S.: Progressive platelet activation with storage: Evidence for shortened survival of activated platelets after transfusion. *Transfusion*, 31: 409-414, 1991.
- 19) Larsen, E., Celi A, Gilbert, G., et al: PAD-GEM protein: A receptor that mediates the interaction of activated platelets with neutrophils and monocytes. *Cell*, 59: 305-312, 1989.
- 20) Pedigo, M., Wun, T. and Paglieroni, T.: Removal by white cell reduction filters of activated platelets expressing CD62. *Transfusion*, 33: 930-935, 1993.
- 21) Rao, G.H.R., Escolar, G. and White, J.G.: Biochemistry, physiology, and function of platelets stored as concentrates. *Transfusion*, 33: 766-778, 1993.