

## 保存中に血小板より遊離する輸血副作用関連物質の吸着ビーズによる除去に関する検討

田中 成憲 林 智也 谷 慶彦 平山 文也

【背景】最近の研究によると、保存中に血小板から遊離する生理活性物質が輸血副作用に関与していると報告されている。洗浄血小板や人工保存液置換血小板（約30%の血漿を含む）は輸血副作用を減少させると報告されているが、洗浄血小板は調製操作が煩雑であり、人工保存液置換血小板では完全に輸血副作用を防ぐことはできない。

【目的】今回、4種類のセルロース・ビーズを用いて、保存中に血小板から遊離・蓄積する生理活性物質である soluble CD40 ligand (sCD40L), regulated upon activation, normal T-cell expressed, and secreted (RANTES) 及び transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) の吸着除去について検討した。

【方法】濃厚血小板製剤(PC)を10日間保存し、保存期間中の上記生理活性物質の蓄積濃度をELISA法により測定した。次に、10日間保存したPC由来の血漿及び5日間保存したPCを用いて、4種類の吸着ビーズでの吸着処理(3時間)後の上記生理活性物質の濃度をELISA法にて測定した。更に、2日間または5日間保存したPCを用いて、吸着処理後のPCの品質について評価した。

【結果】上記3種類の生理活性物質の血漿中の濃度は、保存とともに増加した。4種類のセルロース・ビーズの中で、A：硫酸エステルを有するビーズ、及びB：リン酸エステルを有するビーズはsCD40L及びRANTESを効率的に除去し、TGF- $\beta$ 1を部分的に除去した。

このA、Bのビーズで処理することによる血小板活性化はほとんど認められなかったが、血小板濃度は処理後に一部低値を示した。

【結論】今回の検討により、セルロースビーズA及びBは、保存中に蓄積した3種類の生理活性物質を効率的に除去できることが示された。今後は、この方法が輸血副作用の防止に有効であるかどうかを確認するために、更なるin vitro 及び in vivo の実験が必要である。

キーワード：輸血副作用、生理活性物質、吸着ビーズ

本論文内容は、John Wiley and Sons社の許可のもとTransfusion誌(第50巻、第5号、1096—1105、2010年)に掲載された論文に基づき作成したものである。(Shigenori Tanaka, Tomoya Hayashi, Yoshihiko Tani, Fumiya Hirayama : Removal by adsorbent beads of biological response modifiers released from platelets, accumulated during storage, and potentially associated with platelet transfusion reactions. Transfusion, 50 (5) : 1096—1105, 2010)

第58回日本輸血・細胞治療学会総会推薦論文

### 緒 言

濃厚血小板製剤(PC)の輸血は、血小板減少症例や血小板機能低下症例における出血の予防や治療に不可欠である。しかし、血小板輸血は、輸血関連急性肺障害(transfusion-related acute lung injury, TRALI)<sup>1)</sup>、発熱<sup>2)</sup>、アレルギー反応<sup>3)</sup>などの非溶血性輸血副作用発症と関連することが報告されている。現在までに、PC中に存在するヒト白血球抗原(HLA)やヒト顆粒球抗原に対する抗体が非溶血性輸血副作用の発症に関与し

ていることが報告されている<sup>4)5)</sup>。更に、IgAやハプトグロビンなどの血漿蛋白に対する抗体がこれらの血漿蛋白欠損者において生成され、その抗体が輸血された血液中の血漿蛋白と反応し、輸血副作用が引き起こされることが報告されている<sup>6)7)</sup>。また、サイトカイン<sup>8)</sup>、ケモカイン<sup>9)</sup>や糖蛋白<sup>10)</sup>などの生理活性物質が、輸血副作用に関与する可能性が示唆されている。血小板による輸血副作用の原因となる様々な分子や輸血副作用の発生メカニズムについては、完全には解明されてい

い。日本では、2004年から白血球除去された成分PCが輸血に用いられてきた。この白血球除去された成分PCの使用により、非溶血性輸血副作用の中でアレルギー反応よりもむしろ発熱反応は減少したが、なお完全には解消されていない<sup>31)</sup>。

soluble CD40 ligand (sCD40L), regulated upon activation, normal T-cell expressed, and secreted (RANTES, CCL5)及びTransforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1)は保存中に血小板から遊離し、種々の輸血副作用と関連することが報告されている<sup>2)10)12)~18)</sup>。

CD40Lは、細胞表面に発現している39-kDaの膜貫通糖蛋白であり、膜から切り出されると18-kDaの可溶性物質(sCD40L)として遊離する<sup>19)</sup>。CD40Lの受容体であるCD40は、血管内皮細胞、モノサイト、マクロファージ、平滑筋や血小板などに発現しており、CD40-CD40L間の相互作用が、炎症や血栓に関連している<sup>20)</sup>。また、血小板由来のsCD40Lはヒトでの発熱反応のメディエーターであるプロスタグランジンE<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)の生成を起こすサイクロオキシゲナーゼ-2の発現を誘発する<sup>21)</sup>。

RANTESは血小板の $\alpha$ 顆粒に蓄えられている8-kDaのケモカイン・ファミリーの一つであり、刺激により外部に放出され、好酸球や好塩基球の走化性促進やヒスタミン放出を誘導し、好塩基球の活性化を刺激する<sup>22)</sup>。

TGF- $\beta$ 1は25-kDaの分泌蛋白であり、アポトーシスなどに関与することが知られている<sup>23)</sup>。更に、TGF- $\beta$ 1はマクロファージ及び単球の走化性誘引物質として働く。TGF- $\beta$ 1は血小板に豊富に含まれ、保存中に遊離、蓄積される。PCの輸血は患者での血漿TGF- $\beta$ 1レベルを有意に上昇させることが報告されている<sup>24)</sup>。

洗浄血小板や人工保存液置換血小板(約70%の血漿を除去)における血漿除去は、非溶血性輸血副作用の発生頻度を低下させる<sup>25)26)</sup>。しかしながら、洗浄操作は煩雑で相当の時間を要し、また置換血小板は非溶血性輸血副作用の発生頻度を低下させるが、完全には解消できない。それ故、保存血小板から遊離する生理活性物質を選択的に除去する吸着システムの開発が、非溶血性輸血副作用の発生頻度を減少させるために役立つ可能性がある。今回、白血球除去処理済みの成分PCの保存中に蓄積されるsCD40L、RANTES及びTGF- $\beta$ 1の定量を行い、更にこれらの生理活性物質を吸着除去するための吸着ビーズの有効性について検討した。

## 材料・方法

### 1. 成分PCの調製

白血球除去PCの採血は、所定の手順に従い、成分採血装置にて行なわれた。今回の実験には、ALT(alanine aminotransferase)値が規定値以上を示し、輸血用として用いられない10、15及び20単位のPCを用いた。こ

れらのPCを、20~24°Cで、60rpmにて振盪しながら10日間保存した。なお、採血当日をday 1とした。

### 2. サンプル採取及び保存したPC中の生理活性物質の定量

保存2、4、6、8及び10日目にサンプリングされたPC中の各生理活性物質の定量を行った。サンプル(PC)は1,000g、15分間遠心分離し、得られた上清を更に10,000g、10分間遠心分離し、その上清(血漿)を-80°Cにて凍結保存した。生理活性物質の測定は、ELISA kitを用いて、添付マニュアルに従い実施した(sCD40L及びRANTES: R & D Systems, TGF- $\beta$ 1: BioSource Europe SA)。

### 3. バッチ法での吸着除去処理

今回、我々は吸着担体として以下の4種類のセルロース・ビーズを用いた: (A) 硫酸エステルを有するビーズ(Cellufine Sulfate, チッソ株式会社), (B) リン酸エステルを有するビーズ(Cellufine Phosphate), (C) イミノ酢酸を有するビーズ(Cellufine Chelate), (D) フェニルほう酸を有するビーズ(Cellufine PB)。吸着除去処理の試料として10日目のPC(day 10-PC)由来の血漿及び5日目のPC(day 5-PC)を用いた。

方法としては、各セルロース・ビーズ3ml(25%スラリー)を試験管にとり、modified Tyrode's bufferを加え、1,000gで3分間の遠心を4回繰り返し、洗浄した。最後に、2,000gで5分間遠心し、バッファーを限界まで除去した。洗浄済みの各ビーズに、2.5mlの血漿(day 10-PC由来)またはday 5-PCを添加した。これらをローテータで60rpmにて3時間、20~24°Cにて振盪した。その後、血漿添加群では2,000gで5分間遠心後に上清(血漿)を採取し、PC添加群では1,000g、15分の遠心に続いて、更に10,000g、10分遠心後に上清(血漿)を採取し、-80°Cに保存した。セルロース・ビーズの添加なしで、血漿またはPCを添加し、同様に3時間処理後、得られた試料をコントロールとして用いた。試料中の各生理活性物質濃度をELISA法にて測定した。

### 4. 血小板数及び血小板活性化

3mlの各セルロース・ビーズ(25%スラリー)を洗浄後、2.5mlのday 2-またはday 5-PCを添加後、バッチ法での吸着除去処理と同様に、3時間、振盪した。その後、10分間サンプルを静置することによりビーズを自然沈降させて、上清の血小板画分をとり、血小板濃度及び血小板活性化マーカー(CD62P, CD63)の測定を行った。血小板濃度は血球計数装置(K-4500, Sysmex)にて測定し、血小板活性化マーカーのCD62P陽性及びCD63陽性血小板比率(%)は、PE標識抗CD62P抗体及びPE標識抗CD63抗体(Becton Dickinson Immunocytometry Systems)を用いるフローサイトメトリーに

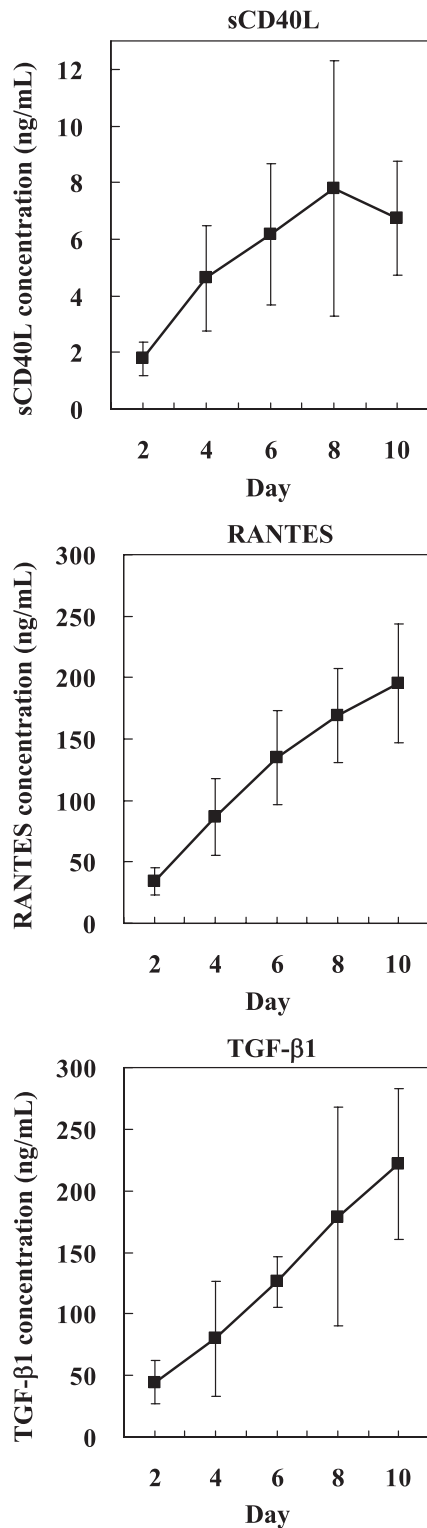


Fig. 1 Accumulation of BRMs in the plasma of PCs stored up to day 10.

The concentrations of three BRMs (sCD40L, RANTES, and TGF-β1) in the plasma of stored PCs were determined by commercial ELISA kits using aliquots of PCs collected at days 2, 4, 6, 8, and 10. For all three BRMs, statistical differences between day 2 and days 4, 6, 8, 10 were observed with the paired t-test ( $p < 0.05$ ),  $n = 6$

て測定した. フローサイトメトリーでは, 前方散乱光 (FSC) 及び側方散乱光 (SSC) にてゲーティングした後, 更に血小板と特異的に反応する PerCP 標識抗 CD61 モノクローナル抗体 (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) にてゲーティングした領域を血小板領域とした.

#### 5. 乳酸脱水素酵素 (LDH) の測定

細胞破壊のマーカーである乳酸脱水素酵素 (LDH) を測定した. day 2-PC 及び day 5-PC について吸着除去処理後 (コントロールを含む) に得られた血漿中の LDH 活性を LDH assay kit (Kainos Laboratories, Inc.) にて測定した.

#### 6. 血小板凝集能

血小板凝集能は, アゴニストとして終濃度  $40 \mu\text{mol/l}$  adenosine 5'-diphosphate (ADP, Sigma),  $10 \mu\text{g/ml}$  コラーゲン (Horm) または  $10 \mu\text{mol/l}$  ADP +  $5 \mu\text{g/ml}$  コラーゲンを各々添加し, 血小板凝集計 (PA-200, 興和) にて最大凝集率を測定した.

#### 7. 低浸透圧ショック回復率 (Hypotonic shock response, HSR)

HSR の測定は, ホルムらの標準法<sup>27)</sup>により, 分光光度計 (BioSpec-1600, 島津製作所) にて測定した.

#### 8. 血小板形態

血小板形態の測定は, 改造型血小板凝集計 (Hema Tracer 801, NBS) により測定した. ストップ・アンド・フロー法<sup>28)</sup>により, 静止時 (0rpm) 及び攪拌時 (800 rpm) の透過率から E800/E0 を計算し, 求めた.

#### 9. 統計処理

結果は, 平均値  $\pm 1\text{SD}$  で表した. 統計処理は paired t-test で行い,  $p$  値が 0.05 以下であるケースを, 有意差有りとした.

### 結 果

#### 1. 保存中の PC に蓄積された生理活性物質の濃度

Fig. 1 に示すとおり, RANTES 及び TGF-β1 は 2 日目から 10 日目まで, 保存とともに著しく増加し, 両者とも 10 日目には 2 日目の値の約 5~6 倍程度に増加した. sCD40L は, 2 日目から 8 日目まで著しく増加し, 8 日目には 2 日目の約 4 倍の高値を示したが, その後 10 日目までは若干低下傾向を示した.

#### 2. セルロース・ビーズによる生理活性物質の吸着除去

(1) day 10-PC 由来の血漿を試料とした場合

各ビーズでの吸着処理後の sCD40L 相対残存レベル (%) (ビーズ不含条件下で処理を行ったコントロール群を 100% とした値) は, ビーズ A :  $13.4 \pm 1.8$ , ビーズ B :  $33.7 \pm 9.9$ , ビーズ C :  $83.3 \pm 9.4$ , ビーズ D :  $11.4 \pm 3.5$  であり, C 以外の 3 種のセルロース・ビーズは効率

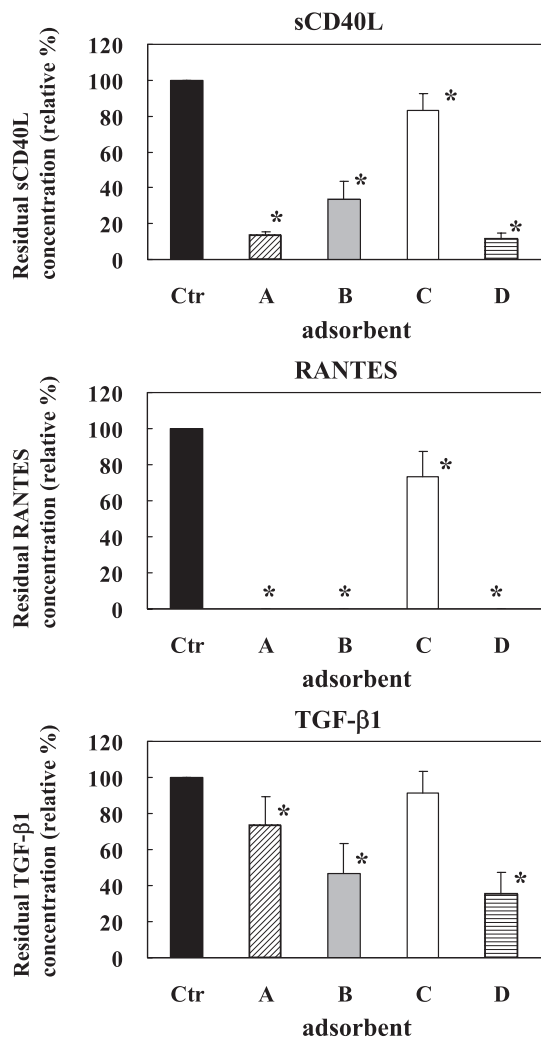


Fig. 2 Adsorption of BRMs in the plasma of PCs stored up to day 10 by four types of cellulose beads.

The residual concentrations of three BRMs (sCD40L, RANTES, and TGF-β1) in plasma derived from day 10-PCs, treated or untreated with one of four adsorbents for 3 hours. Ctrl: Control (No adsorbent), A: cellulose beads possessing sulfate ester groups, B: cellulose beads possessing phosphate ester groups, C: cellulose beads possessing iminodiacetic acid groups, D: cellulose beads possessing phenyl borate groups.

Asterisk (\*) shows the data of a sample that is significantly different from that of control (Ctrl) treated without an adsorbent for 3 hours ( $p < 0.05$ ).  $n = 5$

良く sCD40L を吸着することが判明した (Fig. 2).

同様に、処理後の RANTES 相対残存レベル (%) は、ビーズ A :  $0.1 \pm 0.2$ , ビーズ B :  $0.0 \pm 0.0$ , ビーズ C :  $73.5 \pm 14.0$ , ビーズ D :  $0.1 \pm 0.2$  であり、C 以外の 3 種のセルロース・ビーズは効率良く RANTES を吸着することが判明した (Fig. 2).

また、処理後の TGF-β1 相対残存レベル (%) は、ビーズ A :  $73.6 \pm 15.6$ , ビーズ B :  $46.4 \pm 17.1$ , ビーズ C :  $91.6 \pm 11.5$ , ビーズ D :  $35.1 \pm 12.1$  であり、C 以外の 3 種のセ

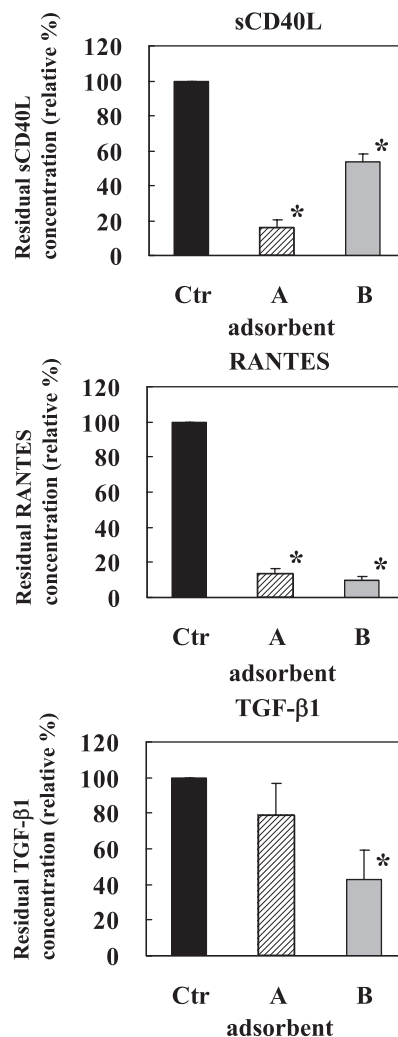


Fig. 3 Adsorption of the BRMs in day 5-PCs by cellulose bead (A) or (B).

The residual concentrations of three BRMs (sCD40L, RANTES, and TGF-β1) in day 5-PCs, treated or untreated with cellulose bead (A) or (B) for 3 hours. Ctrl: Control (No adsorbent), A: cellulose beads possessing sulfate ester groups, B: cellulose beads possessing phosphate ester groups.

Asterisk (\*) shows the data of a sample that is significantly different from that of control (Ctrl) treated without an adsorbent for 3 hours ( $p < 0.05$ ).  $n = 5$

ルロース・ビーズは部分的に TGF-β1 を吸着することが判明した (Fig. 2).

(2) day 5-PC を試料とした場合

ビーズ D については、後述するように血小板活性化及び血漿 LDH 活性の亢進が認められたため、PC を試料とする吸着除去実験においてはビーズ A 及び B を用いて実施した。

その結果、両ビーズでの吸着処理後の相対残存レベル (%) は、sCD40L に対してはビーズ A :  $15.9 \pm 4.3$ , ビーズ B :  $53.6 \pm 4.7$ , RANTES に対しては、ビーズ A :  $13.2 \pm 3.0$ , ビーズ B :  $9.7 \pm 2.6$ , TGF-β1 に対しては、ビー

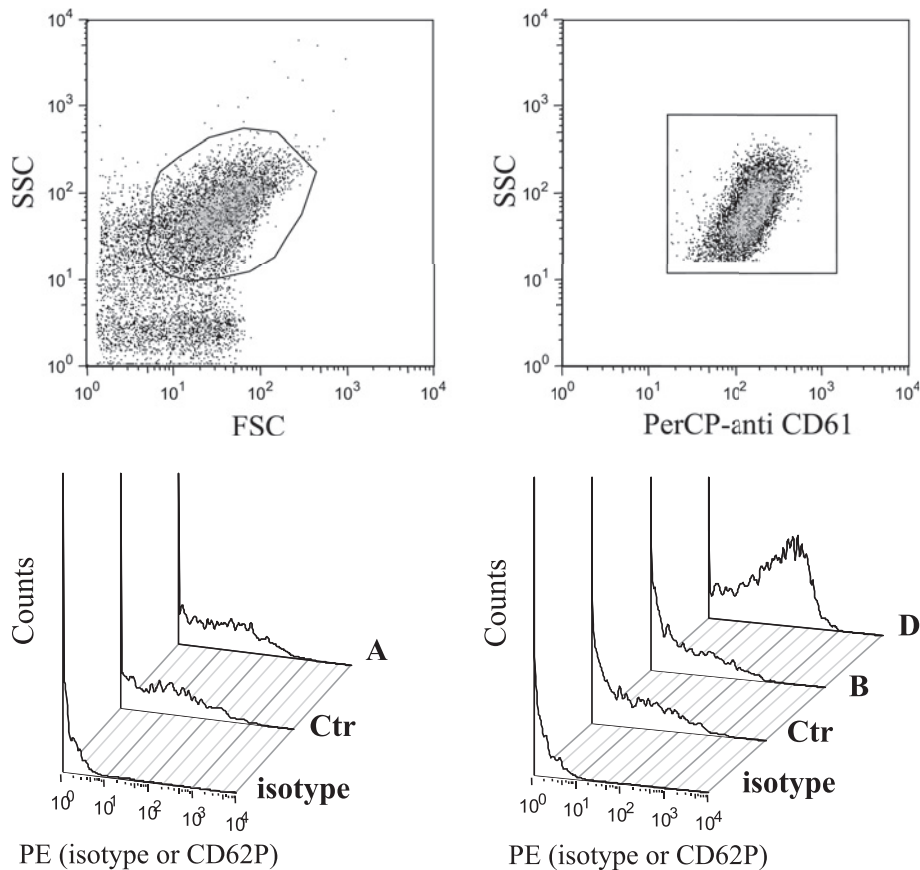


Fig. 4 A representative profile of platelet activation by flow cytometry. Platelets were gated with FSC and SSC, and further gated with PerCP-anti-CD61 antibody, which specifically reacted with platelets. A representative histogram of CD62P expression of day 2-PCs is shown. Isotype: isotype control, Ctr: Control (No adsorbent), A: cellulose beads possessing sulfate ester groups, B: cellulose beads possessing phosphate ester groups, D: cellulose beads possessing phenyl borate groups.

ズ A :  $78.6 \pm 18.5$ , ビーズ B :  $42.9 \pm 16.4$ , であった (Fig. 3).

(1) 及び (2) の結果より, 血漿と PC の両者において同様の吸着除去効果が認められた。

### 3. バッチ法による吸着処理後の血小板濃度及び血小板活性化

day 2-PC をセルロース・ビーズ A, B または D で吸着処理を行った後の血小板濃度の相対値 (ビーズ不含条件下で処理を行ったコントロール群を 100% とした値) は, 各々平均 70, 87 及び 60% であった (Table 1 には実測値の平均値  $\pm$  1SD を示す)。また, 同様に day 5-PC を A または B で吸着処理を行った後の血小板濃度の相対値は, 各々平均 79 及び 86% であった。このように吸着処理により, 血小板濃度の部分的低下が認められた。

血小板活性化については, CD62P 及び CD63 陽性血小板比率をフローサイトメトリーにより測定した。Fig. 4 に, 前方散乱光 (FSC) 及び側方散乱光 (SSC) による血小板領域のゲーティング, 更に血小板特異的な

PerCP 標識抗 CD61 によるゲーティングを示す。CD62P 陽性血小板比率の測定例を Fig. 4 に示すが, ビーズ D 処理血小板のみ高値パターンを示した。各ビーズで day 2-PC を処理した際の CD62P 陽性血小板比率 (%) は, コントロール vs. ビーズ A =  $10.29 \pm 5.16$  vs.  $13.64 \pm 6.39$ , コントロール vs. ビーズ B =  $10.48 \pm 2.91$  vs.  $8.99 \pm 2.42$ , コントロール vs. ビーズ D =  $10.48 \pm 2.91$  vs.  $41.78 \pm 11.02$ , であった (Table 1)。同様に, 各ビーズで day 2-PC を処理した際の CD63 陽性血小板比率 (%) は, コントロール vs. ビーズ A =  $12.61 \pm 6.15$  vs.  $13.02 \pm 5.13$ , コントロール vs. ビーズ B =  $17.54 \pm 7.27$  vs.  $19.14 \pm 8.27$ , コントロール vs. ビーズ D =  $17.54 \pm 7.27$  vs.  $43.34 \pm 8.29$ , であった (Table 1)。このようにビーズ D で処理した血小板では, CD62P 及び CD63 陽性血小板比率 (%) は両者ともコントロール群よりも有意に高値を示したが, ビーズ A 及び B 処理血小板では, コントロール群に比し顕著な差異は認められなかった。

day 5-PC では, CD62P 陽性血小板比率 (%) は, コントロール vs. ビーズ A vs. ビーズ B =  $12.99 \pm 3.22$  vs.

Table 1 Characteristics of PCs treated or untreated with one of three cellulose beads (A, B, and D) possessing different groups

<Day 2-PCs>		
Cellulose beads (A)		
	Control	Cellulose beads (A)
CD62P-positive %	10.29 ± 5.16	13.64 ± 6.39
CD63-positive %	12.61 ± 6.15	13.02 ± 5.13
platelet count (× 10 <sup>6</sup> /μl)	1.262 ± 0.338	0.882 ± 0.336*
plasma LDH activity (W unit) #	351 ± 50	354 ± 44
Cellulose beads (B)		
	Control	Cellulose beads (B)
CD62P-positive %	10.48 ± 2.91	8.99 ± 2.42
CD63-positive %	17.54 ± 7.27	19.14 ± 8.27*
platelet count (× 10 <sup>6</sup> /μl)	1.176 ± 0.258	1.028 ± 0.212*
plasma LDH activity (W unit) #	288 ± 28	296 ± 24
Cellulose beads (D)		
	Control	Cellulose beads (D)
CD62P-positive %	10.48 ± 2.91	41.78 ± 11.02*
CD63-positive %	17.54 ± 7.27	43.34 ± 8.29*
platelet count (× 10 <sup>6</sup> /μl)	1.176 ± 0.258	0.706 ± 0.131*
plasma LDH activity (W unit) #	288 ± 28	783 ± 287*
<Day 5-PCs>		
Cellulose beads (A)		
	Control	Cellulose beads (A)
CD62P-positive %	12.99 ± 3.22	17.11 ± 3.82*
CD63-positive %	16.20 ± 2.47	15.68 ± 2.60
platelet count (× 10 <sup>6</sup> /μl)	1.491 ± 0.402	1.183 ± 0.329*
plasma LDH activity (W unit) #	298 ± 21	317 ± 34
Cellulose beads (B)		
	Control	Cellulose beads (B)
CD62P-positive %	12.99 ± 3.22	12.10 ± 3.07*
CD63-positive %	16.20 ± 2.47	14.56 ± 2.76*
platelet count (× 10 <sup>6</sup> /μl)	1.491 ± 0.402	1.276 ± 0.341*
plasma LDH activity (W unit) #	298 ± 21	271 ± 21*

Values shown as mean ± 1SD, n=5

\*significantly different from Control at P<0.05, #Wróblewski unit

17.11 ± 3.82 vs. 12.10 ± 3.07, であった (Table 1). 同様に, 各ビーズで day 5-PC を処理した際の CD63 陽性血小板比率 (%) は, コントロール vs. ビーズ A vs. ビーズ B = 16.20 ± 2.47 vs. 15.68 ± 2.60 vs. 14.56 ± 2.76, であった (Table 1). 以上より, セルロース・ビーズ A 及び B 処理血小板では, 顕著な血小板活性化は認められなかったが, セルロース・ビーズ D では著しい血小板活性化が認められた.

#### 4. バッチ法による吸着処理後の血漿 LDH 活性

各ビーズで day 2-PC を処理した際の血漿 LDH 活性 (Wróblewski unit, W unit) は, コントロール vs. ビーズ A = 351 ± 50 vs. 354 ± 44, コントロール vs. ビーズ B = 288 ± 28 vs. 296 ± 24, と有意差は認められなかったが,

セルロース・ビーズ D 処理血小板ではコントロール vs. ビーズ D = 288 ± 28 vs. 783 ± 287, と有意に高い値を示した (Table 1). 各ビーズで day 5-PC を処理した際の血漿 LDH 活性 (W unit) は, コントロール vs. ビーズ A vs. ビーズ B = 298 ± 21 vs. 317 ± 34 vs. 271 ± 21, であり, 顕著な差異は認められなかった.

#### 5. バッチ法による吸着処理後の血小板凝集能

各ビーズで day 5-PC を処理した後の血小板凝集能は, 40μmol/l ADP ではコントロール vs. ビーズ A vs. ビーズ B = 48 ± 13 vs. 33 ± 12 vs. 42 ± 14, 10μg/ml collagen ではコントロール vs. ビーズ A = 73 ± 23 vs. 65 ± 22, であり, 各ビーズ処理血小板でわずかに低値となったが, その他の結果においては特に顕著な差異は認められなかった (Table 2).

#### 6. バッチ法による吸着処理後の HSR

各ビーズで day 5-PC を処理した後の HSR は, コントロール vs. ビーズ A vs. ビーズ B = 77.0 ± 9.0 vs. 75.7 ± 8.6 vs. 75.8 ± 8.6, であり, 有意差は認められなかった (Table 2).

#### 7. バッチ法による吸着処理後の血小板形態

各ビーズで day 5-PC を処理した後の血小板形態をストップ・アンド・フロー法にて測定したところ, E800/E0 はコントロール vs. ビーズ A vs. ビーズ B = 0.850 ± 0.013 vs. 0.854 ± 0.006 vs. 0.856 ± 0.007, であり, 有意差は認められなかった (Table 2).

## 考 察

血小板の保存中に sCD40L, RANTES 及び TGF-β1 が遊離・蓄積することは既に報告されている. 例えば, 白血球除去 PC 中の RANTES 及び TGF-β1 濃度は, 6 日間の保存中に増加することが報告されている<sup>20)</sup>. しかし, これらの報告以降, 白血球除去フィルター, 成分採血装置, ガス透過性血液バッグが改良・導入され, そのため保存中の生理活性物質の遊離・蓄積量に変化している可能性がある. そこで今回, 現行の手順にて成分採血装置で採血され, ガス高透過性バッグで保存された白血球除去 PC について, 10 日間保存中の RANTES 及び TGF-β1 濃度の測定を行った.

sCD40L については, 既に Khan らは米国の基準及び材料にて採血及び保存された成分 PC を用いて, 7 日目までの保存中の蓄積量に関して報告している<sup>14)</sup>. しかし, 日本の基準及び材料にて採血及び保存された成分 PC を用いて, 10 日目までの保存中の sCD40L 蓄積量に関する報告はない. そこで今回われわれは現行の基準及び材料にて採血及び保存された成分 PC を用いて, 検討を加えた.

血液中の生理活性物質の吸着除去については, 既に陰性荷電フィルターが RANTES や IL-8, C3a, C5a

Table 2 Characteristics of PCs treated or untreated with cellulose beads (A) and (B)

	Control	Cellulose beads (A)	Cellulose beads (B)
platelet aggregability (maximum %)			
40 $\mu$ M ADP	48 $\pm$ 13	33 $\pm$ 12*	42 $\pm$ 14*
10 $\mu$ g/ml collagen	73 $\pm$ 23	65 $\pm$ 22*	73 $\pm$ 21
10 $\mu$ M ADP + 5 $\mu$ g/ml collagen	82 $\pm$ 9	80 $\pm$ 7	82 $\pm$ 5
%HSR	77.0 $\pm$ 9.0	75.7 $\pm$ 8.6	75.8 $\pm$ 8.6
platelet morphology (E800/E0)	0.850 $\pm$ 0.013	0.854 $\pm$ 0.006	0.856 $\pm$ 0.007

Values shown as mean  $\pm$  1SD, n = 5

\*significantly different from Control at P < 0.05

を吸着することが報告されている<sup>29)30)</sup>. これらの報告及び今回の結果から、陰性荷電を有する担体は、RANTESを吸着することが示唆された. しかし、sCD40Lの吸着除去については、過去に報告はない. 今回の検討結果より、セルロース・ビーズ A 及び B は、各々 87 及び 66% (試料: 血漿), 84 及び 46% (試料: PC) の sCD40L を除去できることが判明した (Fig. 2 及び Fig. 3). 更に、TGF- $\beta$ 1 については有効な吸着担体の報告はないが、今回の検討でセルロース・ビーズ A 及び B は、各々 26 及び 54% (試料: 血漿), 21 及び 57% (試料: PC) の TGF- $\beta$ 1 を除去できることが判明した (Fig. 2 及び Fig. 3).

セルロース・ビーズ D は血小板活性化を引き起こし、同時に細胞破壊のマーカーである血漿 LDH 活性を亢進することが判明したが、セルロース・ビーズ A 及び B にはそのような問題点は認められなかった. しかし、セルロース・ビーズ A 及び B は、血小板濃度を各々 30 及び 13% (試料: day 2-PC), 21 及び 14% (試料: day 5-PC) だけ減少させたことから、吸着処理により一部の血小板がビーズにトラップされることが示唆された. この血小板濃度減少のメカニズムは明らかではないが、ビーズでの吸着処理群とコントロール群で血漿 LDH 活性はほぼ同じであるため、血小板破壊は生じていないことは明らかである.

更に、セルロース・ビーズ A 及び B による吸着処理は、HSR 及び血小板形態にも有意な影響を及ぼさなかった. HSR 及び血小板形態は輸血後の血小板機能や血小板寿命を反映することが報告されていることから判断すると、セルロース・ビーズ A 及び B による吸着処理は、輸血後の in vivo での有効性に悪影響を及ぼさないことが示唆される.

以上より、このような生理活性物質の吸着除去にはセルロース・ビーズ A 及び B が適していることが示唆された.

sCD40L, RANTES 及び TGF- $\beta$ 1 は保存中に血小板から遊離・蓄積し、非溶血性輸血副作用に関連していることが報告されている. しかし、非溶血性輸血副作用発症におけるこれらの生理活性物質の役割については

不明な点が多い. 輸血された血小板自体または輸血された PC 中の生理活性物質が非溶血性輸血副作用発症の原因であるかどうか決定することは、しばしば困難である. それ故、本研究で提案した吸着除去処理により非溶血性輸血副作用の発症頻度を低減させることを証明する必要がある. この問題を解明するためには、今後次の in vitro 及び in vivo での検討を行うべきである. 1) 非溶血性輸血副作用を起した PC の血漿中に、これらの生理活性物質が高濃度に含まれるかどうかを調べる, 2) 好塩基球活性化とそれに続くヒスタミン放出がアレルギー性輸血副作用に関与するので、この吸着除去処理が in vitro での好塩基球の活性化や脱顆粒を低減化するかどうかを調べる, 3) sCD40L はヒトにおける主な発熱性メディエーターである PGE<sub>2</sub> の生成を誘発するので、吸着処理前後での保存 PC 中の PGE<sub>2</sub> のレベルを測定する, 4) 非溶血性輸血副作用を防止するための吸着処理の臨床的有効性を証明するために、動物モデルを用いる in vivo study を行う.

本研究では、吸着担体としてセルロース・ビーズ A 及び B を用いることにより、血小板活性化を起すことなく、3種類の生理活性物質 (sCD40L, RANTES 及び TGF- $\beta$ 1) を除去することができた. しかし、吸着処理により血小板濃度の部分的低下が認められたが、今後ビーズと血小板との直接的な接触を避けることにより血小板のトラップを防止するために、ビーズのパッケージング方法を検討する必要がある.

謝辞: 数種類の吸着ビーズを御提供頂き、同時に有益な技術的アドバイスを頂きました戸所 正美 様(チッソ株式会社 横浜研究所) に深謝致します.

## 文 献

- 1) Chapman CE, Stainsby D, Jones H, et al: Serious Hazards of Transfusion Steering Group: Ten years of hemovigilance reports of transfusion-related acute lung injury in the United Kingdom and the impact of preferential use of male donor plasma. *Transfusion*, 49: 440—452, 2009.

- 2) Klüter H, Bubel S, Kirchner H, et al: Febrile and allergic transfusion reactions after the transfusion of white cell-poor platelet preparations. *Transfusion*, 39: 1179—1184, 1999.
- 3) Pruss A, Kalus U, Radtke H, et al: Universal leukodepletion of blood components results in a significant reduction of febrile non-hemolytic but not allergic transfusion reactions. *Transfus Apher Sci*, 30: 41—46, 2004.
- 4) Reil A, Keller-Stanislawski B, Günay S, et al: Specificities of leucocyte alloantibodies in transfusion-related acute lung injury and results of leucocyte antibody screening of blood donors. *Vox Sang*, 95: 313—317, 2008.
- 5) Davoren A, Curtis BR, Shulman IA, et al: TRALI due to granulocyte-agglutinating human neutrophil antigen-3a (5b) alloantibodies in donor plasma: a report of 2 fatalities. *Transfusion*, 43: 641—645, 2003.
- 6) Nishiki S, Hino M, Kumura T, et al: Effectiveness of washed platelet concentrate and red cell transfusions for a patient with anaphthoglobinemia with antihaptoglobin antibody. *Transfus Med*, 12: 71—73, 2002.
- 7) Heal JM, Cowles J, Masel D, et al: Antibodies to plasma proteins: an association with platelet transfusion refractoriness. *Br J Haematol*, 80: 83—90, 1992.
- 8) Vetlesen A, Mirlashari MR, Ezligini F, et al: Evaluation of platelet activation and cytokine release during storage of platelet concentrates processed from buffy coats either manually or by the automated OrbiSac system. *Transfusion*, 47: 126—132, 2007.
- 9) Davenport RD: An introduction to chemokines and their roles in transfusion medicine. *Vox Sang*, 96: 183—198, 2009.
- 10) Khan SY, Kelher MR, Heal JM, et al: Soluble CD40 ligand accumulates in stored blood components, primes neutrophils through CD40, and is a potential cofactor in the development of transfusion-related acute lung injury. *Blood*, 108: 2455—2462, 2006.
- 11) Paglino JC, Pomper GJ, Fisch GS, et al: Reduction of febrile but not allergic reactions to RBCs and platelets after conversion to universal prestorage leukoreduction. *Transfusion*, 44: 16—24, 2004.
- 12) Cognasse F, Boussoulade F, Chavarin P, et al: Release of potential immunomodulatory factors during platelet storage. *Transfusion*, 46: 1184—1189, 2006.
- 13) Cognasse F, Osselaer JC, Payrat JM, et al: Release of immune modulation factors from platelet concentrates during storage after photochemical pathogen inactivation treatment. *Transfusion*, 48: 809—813, 2008.
- 14) Apelseh TO, Hervig TA, Wentzel-Larsen T, et al: Cytokine accumulation in photochemically treated and gamma-irradiated platelet concentrates during storage. *Transfusion*, 46: 800—810, 2006.
- 15) Kameyoshi Y, Dörschner A, Mallet AI, et al: Cytokine RANTES released by thrombin-stimulated platelets is a potent attractant for human eosinophils. *J Exp Med*, 176: 587—592, 1992.
- 16) Wahl SM, Wen J, Moutsopoulos N: TGF-beta: a mobile purveyor of immune privilege. *Immunol Rev*, 213: 213—227, 2006.
- 17) Alam R, Stafford S, Forsythe P, et al: RANTES is a chemotactic and activating factor for human eosinophils. *J Immunol*, 150: 3442—3448, 1993.
- 18) Chakrabarti S, Varghese S, Vitseva O, et al: CD40 ligand influences platelet release of reactive oxygen intermediates. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 25: 2428—2434, 2005.
- 19) Jin Y, Nonoyama S, Morio T, et al: Characterization of soluble CD40 ligand released from human activated platelets. *J Med Dent Sci*, 48: 23—27, 2001.
- 20) Henn V, Slupsky JR, Gräfe M, et al: CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature*, 391: 591—594, 1998.
- 21) Zhang Y, Cao HJ, Graf B, et al: CD40 engagement up-regulates cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 production in human lung fibroblasts. *J Immunol*, 160: 1053—1057, 1998.
- 22) Kuna P, Reddigari SR, Schall TJ, et al: RANTES, a monocyte and T lymphocyte chemotactic cytokine releases histamine from human basophils. *J Immunol*, 149: 636—642, 1992.
- 23) Assoian RK, Komoriya A, Meyers CA, et al: Transforming growth factor-beta in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization. *J Biol Chem*, 258: 7155—7160, 1983.
- 24) Kunz D, Luley C, Heim MU, et al: Transforming growth factor beta is increased in plasma of patients with hematologic malignancies after transfusion of platelet concentrates. *Transfusion*, 38: 156—159, 1998.
- 25) Azuma H, Hirayama J, Akino M, 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.
- 26) Rebibo D, Simonet M, Hauser L: Introduction of platelet additive solution in platelet concentrates: towards a decrease of blood transfusion reactions. *Transfus Clin Biol*, 15: 289—293, 2008.



- 27) Holme S, Moroff G, Murphy S: A multi-laboratory evaluation of in vitro platelet assays: the tests for extent of shape change and response to hypotonic shock. *Transfusion*, 38: 31—40, 1998.
- 28) Patscheke H, Dubler D, Deranleau D, et al: Optical shape change analysis in stirred and unstirred human platelet suspension. A comparison of aggregometric and stopped-flow turbidimetric measurements. *Thromb Res*, 33: 341—353, 1984.
- 29) Fujihara M, Ikebuchi K, Wakamoto S, et al: Effects of filtration and gamma radiation on the accumulation of RANTES and transforming growth factor-beta 1 in apheresis platelet concentrates during storage. *Transfusion*, 39: 498—505, 1999.
- 30) Geiger TL, Perrotta PL, Davenport R, et al: Removal of anaphylatoxins C3a and C5a and chemokines interleukin 8 and RANTES by polyester white cell-reduction and plasma filters. *Transfusion*, 37: 1156—1162, 1997.

## **REMOVAL BY ABSORBENT BEADS OF BIOLOGICAL RESPONSE MODIFIERS THAT ARE RELEASED FROM PLATELETS, ACCUMULATED DURING STORAGE, AND POTENTIALLY ASSOCIATED WITH PLATELET TRANSFUSION REACTIONS**

*Shigenori Tanaka, Tomoya Hayashi, Yoshihiko Tani and Fumiya Hirayama*

Japanese Red Cross Osaka Blood Center

### **Keywords:**

transfusion reactions, biological response modifiers, adsorbent beads