

厚生労働科学研究費補助金

医薬安全総合研究事業

血小板製剤の有効期限延長と安全性確保に関する研究

(H14-医薬-016)

平成14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 大戸 斉

平成15年(2003)年3月

目次

I. 総括研究報告	
血小板製剤の有効期限延長と安全性確保に関する研究	1
大戸 斉	
II. 分担研究報告	
血小板保存に伴う損傷の評価	9
尾崎由基男	
白血球除去フィルターによる細菌の除去	14
浅井隆善	
血液製剤中に混入する細菌の迅速な検出方法について	25
高松純樹	
血小板製剤の需給動向	28
佐竹正博	
ざり応力下血小板血栓形成能測定による保存血小板の機能評価	35
宮田茂樹	
高酸素透過性保存バッグによる血小板機能の長期安定保持	40
大戸 斉	

I. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）
総括研究報告書

血小板製剤の有効期限延長と安全性確保に関する研究

主任研究者 大戸 斉 福島県立医科大学 教授

研究要旨

1. 高齢社会に入った日本では近い将来に輸血血液の需給のバランスが崩れるものと予測されている。中でも血小板輸血は大出血、白血病など重病の患者に使用されるので、入手できない場合は致命的に至る。血小板の有効期限は日本では3日間であるが、世界的には5日間と設定されていて、さらに7日に延長されようとしている。
2. 血小板製剤の期限切れ廃棄率は1.3%~10.6%であったが、血液センター間の頻繁な需給調整によってまかなわれていることが明らかになった。献血血液へのウイルス核酸増幅検査の導入によって、日本の血小板供給体制は辛うじて維持されているのが現状である。
3. 血小板製剤の有効期限延長にあたっては、第一に細菌混入の危険を最小にすることが要求される。白血球除去フィルターを用いることで *Yersinia enterocolitica* の減少が期待できることが示された。また、細菌が混入した場合でも酸素濃度検出パウチを用いると全例検出できることが示された。しかし、スワーリング消失や pH の変化は細菌が増殖しても役立つことが判明した。
4. 次に有効期限延長にあたって、5日（または7日）保存血小板の機能が3日保存血小板と遜色がないことが要求される。体内での血小板機能を試験管内で評価するには必ず応力下で血栓形成能と血小板血管内皮細胞接着分子 PECAM-1 の高応力下での分解が優れたマーカーになりうる可能性が示された。
5. また、酸素透過性を40%向上させた新しい血小板保存バッグを用いると、血小板の嫌気性代謝が抑制されて血漿の pH を安定させ、高単位血小板製剤でも安定して7日間保存可能となることが判明した。

分担研究者

尾崎由基男	山梨大学医学部	教授
浅井 隆善	千葉大学医学部	副部長
高松 純樹	名古屋大学医学部	教授
佐竹 正博	東京都赤十字血液センター	副所長
宮田 茂樹	国立循環器病センター	医長

A. 研究の背景と目的

少子高齢社会となった日本では、献血可能世代の減少、問診の強化などに伴って、献血者の減少が起り、近い将来に輸血用血液の需給バランスが崩れるものと予測されている。必要な患者に輸血が間に合わない事態の発生が危惧されている。血小板輸血は大出血、白血病、造血幹細胞移植など病態が重症である患者に使用されることが多く、血小板が入手できない場合は、致命的な事態も懸念される。

血小板製剤は元来寿命が短いことと室温保存が必須であるため、有効期限は世界的に5日間に設定されている。しかし、日本では細菌混入を危惧し、それによる重篤な副作用を予防するため3日間に限定している。さらに1997年以降、輸血血液にウイルス核酸検査(NAT)を導入し、血液センターから病院に納入される血液の実質有効期間は1日以下に短縮している。中には2~3時間ほどしかないものも少なくない。ある患者に使用しなかった場合、他の患者への転用は大変難しくなり、病院施設内での廃棄血小板も増加している。

この研究は、採血段階での安全対策に加え、さらに安全対策(細菌除去技術の開発・応用)を施したうえで、血小板機能の良好維持をはかり、現在の3日間有効期限血小板と同等、またはそれ以上の安全性で有効な血小板製剤を供給できる条件・採血手技・保存技術を開発・改良するものである。

B. 研究方法

1. 細菌混入の予防と除去対策

1) 血小板製剤の廃棄率の実態調査

日本の血小板輸血製剤の廃棄率を明らかにする目的で全国赤十字血液センター内で期限切れ廃棄血小板製剤率を調査した。また、血液センター間の需給調整率も調査した。

2) 万が一細菌混入が発生しても、その細菌を除去・不活化する技術を確立する。

白血球除去フィルターが排除可能な細菌と不可能な細菌を同定し、その機序を明らかにし、さらに細菌除去フィルター開発まで焦点に置いて実験的研究を行なった。

3) 細菌混入して、増殖した場合にそれを容易に判定できる技術の開発

細菌そのもの、細菌内毒素・外毒素を検出する簡便なモニター、ガス圧の変化などを開発することを目指して、内外の先進的データを収集した。

2. 長期(5日)保存血小板の機能と形態評価

1) 各種血小板活性化マーカーによる血小板保存傷害の経時的評価

血小板活性化分子や血小板から放出されるケミカルメディエーターをマーカーにして、保存による血小板損傷の評価を試みた。

2) 血小板濃度(血小板数と血漿量比)による血小板機能保存に与える影響

一般に血小板濃度が高いほど血小板機能の保持は困難だが、酸素透過性を向上させた血液バッグなどによる血小板機能保持効果を評価した。

3) ずり応力下血小板血栓能測定による保存血小板の機能評価

ずり応力下血小板血栓形成能は生体内の血小板機能を反映していると考えられている。保存血小板の機能をこの点から詳細

に評価した。

3. 血小板の長期保存を可能とする保護液の開発、保存条件の検討

血小板保護液の改良、酸素透過性に優れた血小板保存血液バッグの改良、及び保存条件を上記に挙げた研究の評価を受けながら、血小板機能が最も良好に保存される至適条件を探った。7日間保存も可能となる優れた血小板保存バッグを開発した。

4. 倫理面への配慮

当面3日間の有効期限を過ぎた血小板を患者に輸血することは予定していないので、倫理的な問題は発生しない。しかし、地域の赤十字血液センターから有効期限が過ぎた血小板の譲渡を受けた場合は、善意の献血によるものであることを自覚して、丁寧な研究を実施した。

C. 研究結果

各分担研究者の研究結果は以下のごとくであった。

1) 尾崎由基男 班員

多血小板血漿状態で血小板保存による血小板機能、活性化マーカーを評価した。弱い惹起物質 (ADP) による血小板凝集は2日目より低下し、4日目には殆ど消失した。十分量のコラーゲンによる血小板凝集能は6日目まで保たれていた。血小板活性化マーカーであるP-selectinの発現は2日目より増加し、その後保存期間とともに増加した。血小板血管内皮接着分子PECAM-1の高張り応力下での分解は4日目まで軽度であったが、6日目には有意に増加した。血小板 microparticle 産生も同様なタイムコー

スを示した。血小板の保存により血小板機能は時間依存性に低下し、血小板活性化マーカー、血小板膜の傷害マーカー発現が増加していた。

2) 浅井隆善 班員

白血球除去フィルターは血小板製剤に含まれる白血球と白血球に貪食された細菌も除去可能である。接種した細菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) は時間経過とともに菌数の減少がみられた。*Yersinia enterocolitica* は接種後白血球除去フィルターを使用すると、菌は検出されなくなることを見いだした。細菌が増殖しても血小板製剤中の pH の変化は軽微で、スワーリングの消失も遅れて観察され、両者とも信頼できるマーカーにはなり得ないことを指摘した。

3) 高松純樹 班員

血小板製剤では細菌感染症が最も注意を払わなくてはならない合併症である。全自動血液培養法には最も頻りに検出されるアクネ菌 (*Propionibacterium acnes*) の検出に難があり、遺伝子増幅法では実際の運営上は厳密な無菌管理が要求される欠点を指摘した。

4) 佐竹正博 班員

血小板製剤の需給動向を調査した。期限切れ血小板製剤の割合は 1.2%~10.6%、また他センターからの受け入れは 1.3%~20.2%で血液センター管内で大きなバラツキがあることを指摘した。総じて地域内での激しい需給調整を図って、供給をまかなっていること、病院に届くときには残された有効時間が大変み

じかくなっていることも指摘した。現在の状況は決して望ましいことではなく、血小板の有効期限を延長することで病院施設と血液センターの両者にメリットがあることも付け加えた。

5) 宮田茂樹 班員

生理的流動状況を模倣する評価系（ずり応力下血小板血栓形成能）を用いて、保存期間の異なる血小板の機能を測定した。5日保存血小板は3日保存血小板よりは軽度な機能低下は認められたが、遜色ない血栓形成能を保持していることが明らかになった。

6) 大戸 斉 班員

現市販血小板保存バッグで高単位（20単位）血小板を保存すると、3日目以降、pHの低下、%低浸透圧ショック回復率の低下、血小板凝集能の低下、スワリングパターンの低下、グルコースの低下と乳酸の増加が観察された。しかし、新しく開発された高酸素透過性（40%酸素透過性能の向上）バッグで保存すると、これらの変化は大変マイルドであった。酸素が欠乏すると嫌気性代謝が進み、乳酸が増加して、血漿は酸性に傾き、血小板を傷害することが判明した。10単位以上の血小板製剤は3日を越えて保存するには高酸素透過性バッグが不可欠であると指摘した。

D. 考察

血小板製剤の有効期限は世界的に30年以上前から、製造後5日間と設定されて、さらに5日間に延長しようと言われるようになってきている。日本では1980年ごろから72時間に延長されて以来、固定さ

れている。血小板製剤は室温で保存するため、細菌汚染を避けようという意図があった。これまでは日本の人口に占める若壮年者の割合が比較的高く、献血者の確保はそれほど難しいことではなく、いわば無駄の多い基準を設定することが可能であった。しかし、高齢社会になった日本ではこのような根拠の薄いコストを無視した基準は許されなくなっている。ウイルス核酸検査の影響は直接的には見えなかったが、佐竹班員の調査で期限切れ廃棄血小板製剤は少ない基幹センター管内で1.2%、多い管内センターでは10%を超えていることが明らかになった。また病院内での廃棄血小板は1～5%になっていると推定され、合わせて2%～15%の血小板は使用されていない可能性が示唆された。

しかし、血小板の有効期限延長（日本では5日、世界的には7日）を達成するためには少なくとも2つの案件をクリアしなくてはならないと考えている。一つは細菌汚染の回避であり、もう一つは良質な血小板機能を維持することである。細菌汚染対策には1)採血手技の改善（ドナースクリーニングの向上、採血初めの血液の廃棄、消毒手技の向上など）、2)製造・保存工程の変更改善（保存温度の低温移行、白血球除去技術の応用、病原体の不活化など）、3)病原体の検出（視診、エンドトキシン検出、塗抹染色、リボソームアッセイ、核酸検査、細菌培養、酸素圧測定）、4)ドナー数の削減（輸血適応の厳格化、輸血トリガー値の下方移行、アフエレーシスの採用など）が考えられている。

1) 採血手技の改善

血液の細菌汚染はおおまかには採血直

後では3% (3/100) から主に皮膚常在細菌が検出され、抗体、補体や白血球の殺菌作用で7日後には0.03% (3/1万) の検出率に下り、実際に輸血の際に影響を及ぼすのはグラム陰性菌を中心にしてその1000分の1 (3/1,000万) といわれている。血小板は複数ドナーからプールすると危険だが、日本のようにアフレーションシングルドナー採血では細菌の混入は減少する。事実、日本赤十字社の報告では1万本の血小板製剤を検査して1本からアクネ菌が検出されただけである。

皮膚常在菌を除菌するには穿刺部位をまず70%イソプロピルアルコールで強くこすり、次に2%ヨードチンキを用いるのが最も効果的とされている。日本でもそれまで採用されていた0.5%グルコン酸クロルヘキシジンアルコールが無効である *Bacillus cereus* による血小板細菌汚染 (1996年) を契機に消毒法が変更された。

ドナーの間診強化は *Yersinia enterocolitica* 感染ドナーの検出には全く無力であったと報告されている。しかし、血小板採取の際に菌が検出される最初の10から15mlを廃棄することで、細菌混入が減少するとの研究報告があつて日本でも採用されつつある。

2) 製造・保存工程の変更

細菌増殖を抑えるために、血小板保存条件 (22~24℃) を低温域 (可能ならば4℃) に移行できないかといくつかの試みがなされたが、何れも実用化されていない。血小板を低温で保存すると血小板生存率も悪化し、止血能も低下する。

白血球除去フィルターが副次的に *Yersinia enterocolitica* 細菌除去能を

有することは10年以上前から指摘されていた。浅井班員はさらにその研究を進展させて、トラップされた細菌は白血球除去フィルターから検出されることを見いだした。全血液製剤に白血球除去を導入したフランスでは輸血細菌汚染が3.8%から1.7%に3分の1に減少したことを報告している。現時点では、全血採血後室温に8時間経過した後に、白血球除去フィルターを用いることが推奨されている。

近年、微生物を不活化する技術が急速に進歩してきた。紫外線照射、リボフラビン+可視光線、ソラレン (またはその誘導体) +紫外線、メチレンブルー、フタロシアニンが微生物 (ウイルス、細菌、原生動物) とリンパ球を不活化し、いくつかは治験段階で評価を受け、血小板製剤への応用が間近となっている。すでに、欧州などではこのような処理を受けた新鮮凍結血漿が広く使用されている。しかし、それらが完全に除去されるのか、微量でも残って受血者の遺伝子を傷つけることはないのか、またプールして処理するならばプリオンのような処理抵抗性の蛋白が混入した場合に多数の受血者に被害を拡大するようなことはないのか、危惧は残る。

3) 細菌の輸血前検出

健康なドナーの消毒した皮膚を穿刺して採血するので、細菌混入はあつても微量であるので、検出には鋭敏な感度が要求される。しかも、菌種の多くは常在菌であるので、検査手技上のコンタミネーションと区別が難しい。また、死菌はもはや無害であつて、高松班員が指摘するように核酸増幅検査で菌のDNAやRNAの

痕跡を検出しても臨床的には無意味である。

浅井班員は血漿内酸素分圧を測定するパウチでは細菌接種後 30 時間から 100% の検出率で細菌混入を検出可能であることが示された。しかし、大戸班員の研究では血小板機能が損傷されると酸素消費は減少し、むしろ酸素分圧が上昇する。この状態でも細菌混入を検出できるか来年度の研究に続けたい。また、重篤な輸血細菌感染症の殆どはエンドトキシンを産生するグラム陰性菌によって、発生しているのでエンドトキシンをマーカーに検出を試みるのももう一つの手段とも考えられる。

次に、3 日を越えて保存した血小板が生体内でも遜色なく機能しうるかの評価も試みた。宮田班員はずり応力下血小板血栓形成能を用いると、5 日保存血小板は 3 日保存のものと比較して、軽度な機能低下にとどまっていることを示した。また、尾崎班員は血小板活性化マーカーのうち P-selectin の発現と血小板 microparticle 産生は保存期間に比例して増加すること、血小板血管内皮接着分子 PECAM-1 の高ずり応力下の分解は 4 日を越えると有意に増加することを示した。宮田の成績との乖離は保存条件によるものか、さらに高酸素透過性保存バッグで保存すると、どのような結果が得られるのか、来年度の研究が待たれる。

血小板機能を 5 日から 7 日間良好に保ち得る血小板保存ポリオレフィンバッグが開発された。酸素透過性を 40% 向上させたバッグである。このバッグで高単位血小板を保存すると、pH の低下、% 低浸透圧ショック回復率低下、スワーリング消失が軽度で、7 日間保存血小板は現市販

バッグ 3 日保存に相当するものであった。われわれは血小板有効期間延長にあたって強力な武器を入手したことを意味する。

大戸はこれまでに血漿無しでも血小板機能を良好に保つ Fukushima Cocktail を開発している。Fukushima Cocktail と高酸素透過バッグ PO-80 を組み合わせることで、血小板をさらに長期間安定して保存可能とする展開が期待される。

E. 健康危険情報

特になかった。

F. 研究発表(研究論文)

1. Junki Takamatsu, Hidenori Toyoda, Yoshihide Fukuda. GB Virus C and Mortality from HIV Infection. N Engl J Med 346:377-379,2002
2. Nobuo Aoki, Tamotsu Matsuda, Hidehiko Saito, Kiyoshi Takatsuki, Kenji Okajima, Hoyu Takahashi, Junki Takamatsu, Hidesaku Asakura, Nobuya Ogawa, for the CTC-111 IM clinical research group. A comparative double-blind randomized trial of activated protein C and unfractionated heparin in the treatment of disseminated intravascular coagulation. Int J Hematol 75:540-547,2002
3. Hideki Otagiri, Yoshihide Fukuda, Isao Nakao, Yoshiaki Katano, Hidenori Toyoda, Shoichi Yokozaki, Kazuhiko Hayashi, Tetsuo Hayakawa, Youji Fukuda, Moritoshi Kinoshita and Junki Takamatsu. Evaluation of a new assay for hepatitis C virus genotyping and

- viral load determination in patients with chronic hepatitis C. *J Virol Meth* 103:137-143,2002
4. Satoh, K., Yatomi, Y., Kubota, F., and Ozaki, Y. Small aggregates of platelets can be detected sensitively by a flow cytometer equipped with an imaging device: mechanisms of epinephrine-induced aggregation and antiplatelet effects of beraprost. *Cytometry* 48: 194-201, 2002
 5. Wu, Y., Asazuma, N., Yatomi, Y., Takafuta, T., Berndt, M., and Ozaki, Y. Interaction between von Willebrand factor and glycoprotein Ib activates Src kinase in human platelets: role of phosphoinositide 3-kinase. *Blood* in press, 2003
 6. Naomi Shimizu, Miki Nishimura, Chiaki Nakaseko, Takayoshi Asai, Yasushi Saito. Role of IL-12 in reducing the rate of leukemic relapse after allogeneic stem cell transplantation. *Chiba Medical Journal* 78; 75-82: 2002
 7. Takayoshi Asai. Board certification of medical doctors and medical technologists in Transfusion Medicine in Japan. *Transfusion and Apheresis Science* 26;115-119: 2002
 8. Shinichiro Hashimoto, Michihiro Itoh, Miki Nishimura, Takayoshi Asai. Effect of 8 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ administrations of filgrastim for steady state mobilization of peripheral blood stem cells. *Therapeutic Apheresis* 6 (6); 413-418: 2002
 9. N Shimizu, T Asai, S Hashimoto, M Narita, M Kobayashi, M Ito, M Onoda, A Yokota, R Cho, C Nakaseko, M Nishimura, Y Saito. Mobilization factors of peripheral blood stem cells in healthy donors. *Therapeutic Apheresis* 6; 431-436: 2002
 10. 浅井隆善 血液製剤の種類とその特徴. *産科と婦人科* 69(8); 977-984:2002
 11. 浅井隆善 輸血の確認ポイント. *臨床看護* 8(6); 776-780:2002
 12. Sugimoto S and Miyata S. Functional Property of von Willebrand factor under flowing blood. *Int J Hematol* 2002; 75: 19-24.
 13. Sugimoto M, Matsui H, Mizuno T, Tsuji S, Miyata S, Matsumoto M, Matsuda M, Fujimura Y, and Yoshioka A: Mural thrombus generation in type 2A and 2B von Willebrand disease under flow conditions. *Blood* 2003;105:915-920.
 14. Kuwahara M, Sugimoto M, Tsuji S, Matsui H, Mizuno T, Miyata S, Yoshioka A. Platelet shape changes and adhesion under high shear flow. *Arteriosler Thromb Vasc Biol.* 2002; 22: 329-334.
 15. Matsui H, Sugimoto M, Mizuno T, Tsuji S, Miyata S, Matsuda M, Yoshioka A, and Yoshioka A: Distinct and concerted functions of von Willebrand factor and fibrinogen in mural thrombus growth under high

shear flow. *Blood* 2002;100:3604-3610.

16. Satake M. Residual Risk of Transfusion-Transmitted Diseases in Japan and Pathogen Inactivation. *Vox Sanguinis* 2002; 83 suppl 1: 277-280.

II. 分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）

平成 14 年度研究報告

「血小板製剤の有効期限延長と安全性確保に関する研究」

(H14・医薬・016)

分担研究報告

血小板保存に伴う損傷の評価

分担研究者 尾崎由基男 山梨大学医学部臨床検査医学 教授

研究要旨：

多血小板血漿の保存開始 2 日目より、弱い惹起物による血小板凝集は低下したが、十分量のコラーゲンによる血小板凝集能は 6 日まで保たれていた。P-selection の発現は 2 日目より増加し、その後保存期間とともに増加傾向を示した。高ずり応力による PECAM-1 の分解は、2 日目、4 日目では軽度であったが、6 日目には優位に増加した。血小板 microparticle 産生も同様なタイムコースを示した。このように 血小板保存により血小板機能は時間依存性に低下し、血小板活性化マーカー、血小板膜の integrity の傷害を示すマーカー発現が増加した。

A. 研究目的

血小板は保存によりその機能が低下すると共に、血小板膜上の種々の形質が変化することが知られている。従来より、血小板保存に伴う血小板損傷の指標として、陰性荷電をもつ磷脂質と結合する annexin V の血小板膜への結合、 α 顆粒膜上に存在する p-selectin の血小板膜上への発現などが使われてきた。これらの現象は 血小板保存中に血小板細胞膜の perturbation が起きていることを示

すものであり、さらに血小板に apoptosis に近い変化が起きていることを示唆する。実際、annexin V は他の細胞系に於いて apoptosis の良い指標とされている。apoptosis に伴うもう一つの現象は、細胞膜から小さい塊が放出される microparticle (MP) formation である。血小板保存に於いても、既に MP が多数産生されることが報告されている。

我々は、これらのことより、血小板保存時の血小板機能低下を apoptosis の進

行ととらえ、annexin V、p-selectin、MP formation と共に、apoptosis に関与する分子を同時に評価することにした。従来より血小板膜上には GPIIb/IIIa や GPIb といった血小板凝集に関与する糖タンパクが豊富に存在することが知られている。これらの蛋白に劣らず多くのコピー数が存在する膜蛋白として、PECAM-1 (CD31) が知られていたが、その機能は不明であった。最近になり、この蛋白が他の細胞系に於いて apoptosis を抑制していることが報告されており、この蛋白の非常にユニークな機能が注目を集めている。

この研究は、保存による血小板損傷の評価に以上に挙げた血小板表面形質、血小板機能が適当であるかを探索するものである。

B. 研究方法

健康人より採取した血液より多血小板血漿を得、血小板保存用バッグに入れた後、20℃ 振盪の通常血小板保存条件下に置く。以降 0日、2日、4日、6日、8日後に多血小板血漿を少量抜き取り、ADP 凝集、コラーゲン凝集、cone-plate 法により高ずり応力下での血小板凝集を測定する。フローサイトメーターを用い、血小板膜上の GPII b、p-selectin、PECAM-1 の発現、及び血小板 MP 産生を評価する。同時に、抗 PECAM-1 抗体を用い、PECAM-1 の免疫沈降、Western blot を行い、PECAM-1 の変化を調べる。

C. 研究結果

1) 血小板凝集

多血小板血漿の保存開始2日目より、ADP 惹起による血小板凝集は低下し、4日目には ADP による血小板凝集はほとんど消失した。一方、10 μ g/ml コラーゲンによる血小板凝集は、4日目より軽度の低下傾向を示したが、6日まで十分に保たれていた。高ずり応力により血小板凝集は2日目で40%程度の低下を示したが、以降ほぼ定常状態であり、6日目でも十分な凝集塊の形成を認めた。

2) 表面マーカー及び 血小板 MP 産生
P-selection の発現は2日目より増加し、その後保存期間とともに増加傾向を示した。6日目には約40%の血小板が p-selectin 陽性となった。血小板 MP 産生は保存後4日目には認めなかったが、6日、8日後には軽度認めた。高ずり応力をかけると、MP 産生はより著明であり、6日後には有意に増加した。PECAM-1 の発現を見ると、全体の血小板の発現は変化しないが、MP 上の PECAM-1 が特異的に減少することが認められた。

3) 免疫沈降法による PECAM-1 の変化
高ずり応力をかけることにより PECAM-1 が分解され、元来 130kDa の分子量の PECAM-1 が 100kDa の fragment に分解され、細胞外液中に放出されることを見いだした。PECAM-1 の細胞外ドメインに対する種々の抗体を使った検討により、6個の Ig-like domain の第6番目近傍で切断が起きるらしい。この切断は matrix metalloproteinase (MMP) や caspase の阻害剤では抑制されず、calpain による阻害剤 calpeptin により完全に阻害された。ま

た、高ずり応力を血小板にかけることにより、calpain の活性型が血小板細胞内に現れることも確認した。これらのことより、高ずり応力による血小板活性化において、calpain が活性化され、それにより PECAM-1 が分解されることが推測される。

高ずり応力による PECAM-1 の分解は、2 日目、4 日目では軽度であったが、6 日目には優位に増加した。また、フローサイトメーターを用いた検討により、PECAM-1 の表現が低下した血小板において、MP 産生が高まり、またそれが PECAM-1 の分解と良い相関を示すことが示された。

D. 考察

保存血小板の機能を評価するためには、ADP 刺激血小板凝集能ではその低下が急速すぎ、不相当と思われた。これは、遠心の過程での赤血球より放出された ADP、また保存の期間中に崩壊した血小板から出た ADP が血小板の ADP 受容体の desensitization を起こすためと考えられる。コラーゲンまたは高ずり応力下での血小板凝集能では保存第 6 日目までは十分な血小板凝集能が保持されており、これらの刺激により血小板機能を評価する方が、実用的であろう。

p-selectin の血小板表面の発現がかなり早い時期に起き、また時間とともに相当数の血小板に起きた。これは、血小板活性化というよりは血小板膜の integrity が早期より傷害されることを示すと思われるが、このデータは単なる血小板表面上の p-selectin の陽性化を見

たものであり、血小板表面上の p-selectin を定量的に評価したものではない。陽性率では確かに高値を示すが、コラーゲン凝集の結果などを考慮すると、血小板機能は保存されており、p-selectin の陽性率とは矛盾したデータとなった。現在のような p-selectin の陽性率は、保存血小板の機能評価には不適切と思われる。これからは細胞内の何%の p-selectin が細胞膜上に露出するのか等定量的な評価が必要と考えられる。

今回の研究で、我々は血小板保存に伴い PECAM-1 が分解されること、PECAM-1 が分解された血小板は多くの microparticle を産生するようになること、これらの現象が血小板の機能低下と相関することを見いだした。

従来より血小板膜上には GPIIb/IIIa や GPIb といった血小板凝集に関与する糖タンパクが豊富に存在することが知られている。これらの蛋白に劣らず多くのコピー数が存在する膜蛋白として、PECAM-1 (CD31) が知られていたが、その機能は不明であった。最近になり、この蛋白が他の細胞系に於いて apoptosis を抑制していることが報告されており、この蛋白の非常にユニークな機能が注目を集めている。チロシンリン酸化は細胞活性化機構の中で比較的新しく発見されたものであり、特にコラーゲン凝集、高ずり応力下の血小板凝集にチロシンリン酸化、チロシンキナーゼの関与が大きい。チロシンリン酸化の関与する細胞内信号伝達系路では、Fc 受容体 γ 鎖が特に重要な役割を果たすことが知られている。Fc 受容体に存在する

immuno-receptor tyrosine-related activation motif (ITAM)と呼ばれる構造は細胞活性化に関わる重要な構造であり、類似構造が多くの蛋白に認められている。一方、チロシンリン酸化を受けると、細胞活性化を抑制する構造もあり、immuno-receptor tyrosine-related inhibition motif (ITIM) と呼ばれるが、ヒト血小板でこの構造を持つ蛋白は PECAM-1 のみとされている。他の細胞系においては、PECAM-1 の分解により、その細胞内ドメインが他の信号伝達分子と結合、あるいは解離を起こし、それまでに保持していた apoptosis 抑制作用を失うことがそれらの細胞の apoptosis に繋がること示されている。

我々は、これらのデータより PECAM-1 が生理的条件下では血小板の安定化、apoptosis の抑制に関与しているとの仮説を立てた。今回の研究に於いては、確かに血小板の保存に伴い、PECAM-1 の分解が起き、それが他の細胞系では apoptosis を示すとされる MP 産生と良い相関を示していた。これからの研究では PECAM-1 分解に関与する信号伝達系、PECAM-1 分解の結果惹起される細胞内変化の検討をしたい。

我々は既に、血小板における PECAM-1 の分解が血小板寿命を決定するとの仮定の下に、PECAM-1 の分解に関与する蛋白分解酵素を探求し、これまでにいくつかの候補を同定している。もし、我々の仮説が正しければ、PECAM-1 の分解を抑えるような血小板保存条件にすれば、血小板機能はより長く保たれる可能性がある。この研究に於いてはこれ

らの蛋白分解酵素の阻害剤を用いて、血小板保存下における血小板機能の保持が可能かどうかの研究も行いたい。

ある蛋白の機能を評価する場合に、その蛋白の construct を細胞内に導入、発現させ、細胞の機能変化を評価するのは、有力な手段である。しかし、血小板には核が存在せず、この方法を用いるのは不可能であった。最近になり、HIV の蛋白を使い、ペプチドを血小板に導入する方法が開発され、我々も既にこの方法を習得している。我々は PECAM-1 が分解されると、その細胞内ドメインが他の信号伝達分子と会合し、最終的にカスパーゼ等 apoptosis に関与する酵素の活性化につながるなどの仮説を持っている。以降の研究では、この仮説を評価するために、この新しい方法を用い、PECAM-1 の細胞内ドメインを血小板に導入し、血小板機能に対する影響、特に保存条件下における血小板機能の変化を判定したい。

E. 結論

多血小板血漿の保存開始2日目より、ADP 惹起による血小板凝集は低下したが、十分量のコラーゲンによる血小板凝集能は6日まで保たれていた。P-selection の発現は2日目より増加し、その後保存期間とともに増加傾向を示した。高ずり応力による PECAM-1 の分解は、2日目、4日目では軽度であったが、6日目には優位に増加した。これらのことより、ADP 惹起血小板凝集、p-selectin は保存状態における血小板機能評価には適さないと考えられる。コラーゲン惹起血小板凝集、高ずり応力下の血小板凝集

の方が、機能判定に有用である。高ずり応力下での PECAM-1 の分解、細胞膜上の発現低下、血小板 microparticle 産生は、コラーゲン凝集と同様なタイムコースを示した。このように 血小板保存により血小板機能は時間依存性に低下するが、それに伴い血小板活性化マーカー、血小板膜の integrity の傷害を示すマーカー発現が増加した。これらのうちどれが血小板機能損傷のマーカーとして最適であるかは、これからの検討が必要であろう。

F. 研究成果

1. Satoh, K., Yatomi, Y., Kubota, F., and Ozaki, Y. Small aggregates of platelets can be detected sensitively by a flow cytometer equipped with an imaging device: mechanisms of epinephrine-induced aggregation and antiplatelet effects of beraprost. *Cytometry* 48: 194-201, 2002.
2. Wu, Y., Asazuma, N., Yatomi, Y., Takafuta, T., Berndt, M., and Ozaki, Y. Interaction between von Willebrand factor and glycoprotein Ib activates Src kinase in human platelets: role of phosphoinositide 3-kinase. *Blood* (in press), 2003

厚生労働科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）

平成14年度研究報告書

血小板製剤の有効期限延長と安全性確保に関する研究

(H14-医薬-016)

主任研究者：大戸斉教授 福島県立医科大学輸血医学・移植免疫学

分担研究：白血球除去フィルターによる細菌の除去

分担研究者：浅井隆善 千葉大学医学部附属病院輸血部 副部長

研究要旨

血小板製剤の細菌汚染の対策として、白血球除去フィルターは、白血球と共にそれに貪食された細菌をも除去することができるが、細菌汚染の検査には、血液バッグ内の血液について細菌検査をするとともに、白血球除去フィルターに補足された細菌を培養液で洗い出し、細菌培養することによっても検出できることが確認された。

1. 研究目的

輸血用血液の細菌汚染は、同種血輸血の経験や調査において、少ないながらも一定の頻度で発生していると考えられており、熟練した職員による採血でも0.01-0.04%の感染があると言われている¹⁾。同様に、自己血輸血においても、保存期間が長いことが常であり、同種血と同等、あるいは、むしろ同種血以上に細菌汚染のリスクを伴っていると考えらるべきであろう²⁻⁴⁾。血液製剤の種類別では、特に血小板製剤は、有効期限は短いながらも、保存温度が室温

(20-24℃) で有ることから、混入した細菌の急速な増殖が考えられる。従って、何らかの検出方法が開発、確率されることが望まれている。

この細菌汚染検出のための、保管後色調の変化観察による外観検査は、赤血球製剤においては細菌の増殖が著しくなって溶血を伴わなければ検出は困難であるために、検出感度は低いと言わざるを得ない⁵⁾。そして、採血直後の血液培養は低温で死滅するであろう細菌をも検出する可能性がある。また、血小板製剤では、スワーリン

グの有無によって血小板の形態保持、しいては機能保持を推し量ることができるが、その感度が十分であるか否かは、まだ確認されていない。それでは、細菌の培養検査のために保存後のバッグ中の血液を一部採取するためには、バッグを無菌的保持しながら採血する必要があり、普遍的に行うことに対して工夫の余地が残されている。

一方、輸血用血液の白血球除去は、同種免疫を予防できることに加えて、貯血前に行うことにより、サイトカインによる輸血副作用を予防できる効果が報告されてきている⁶⁾。この白血球除去は、血小板輸血においても、同種免疫の予防とともに、サイトカインの影響を予防し得たり、非特異的免疫抑制反応の予防効果が期待されるとの報告も見られ、今後、全ての血液に白血球除去を行うべしとの意見も見られる⁷⁾。

そして、最近では、白血球除去フィルターを使用し、細菌を貪食した白血球を除去することによって、その後の保管中に汚染細菌が再増殖することを阻止できる効果も報告されてきている¹⁰⁻¹²⁾。

そこで、我々は、この白血球除去による汚染細菌除去と同時に、白血球除去を行った血液における細菌汚染の有無を検査することを目的に、白血球除去フィルター洗浄液を培養した。つまり、白血球除去フィルター洗浄液を培養することが、汚染細菌の検出に有用であるか否かを、実験的に検討した。

さらに、血小板製剤に細菌を接種し、酸素濃度減少を指標として、血小板濃厚液中における菌増殖の有無を検出する方法をも試みたので、その有用性についても報告する。

2. 方法

1) 白血球除去処理後フィルター部分洗浄液の培養による汚染細菌検出

(1) 使用血液

赤十字血液センターに献血された400ml由来赤血球MAPの製造過程に、除去されて不要となった白血球層を実験用血液として用いた。まず、献血された400ml血液は、4,000回転で5分間遠心分離し、上清の血漿を別バッグに移した。次に、赤血球層の上部にある乳白色な層である白血球層を、さらに別の小バッグに移して分離除去した後に使用した。この分離除去された小バッグにおける白血球層の液量は各々約40mlで、白血球数は約25,000/mm³、白血球分画は、顆粒球31%、リンパ球63%、単球6%であった。献血されてから白血球層を分離・除去して細菌接種を実施するまでの時間は約6時間であった。

(2) 細菌接種

血液バッグ内に接種された細菌について、その数の継時的変化を測定するために、*Pseudomonas aeruginosa* (ATCC株) を、226個/ml、または414個/mlを接種した。

また、白血球除去フィルター通過の影響をみる検査には、*Yersinia enterocolitica* (臨床分離株) を接種した。接種細菌数は、諸家の報告を参考にして、15分静置後培養の検査には、1.4個/ml、または13.8個/ml、また、24時間静置後培養の検査には、635個/ml、または、3175個/mlになるように接種した¹⁰⁻¹²⁾。各条件について、それぞれ5バッグの血液を用いて接種した。

(3) 接種後細菌数の継時的変化に関する基礎検討

白血球除去フィルター処理実験を行う前に、白血球除去の時期と、接種細菌の数

との条件を確認するために、血液バッグ内に接種された細菌数の継時的変化を予め測定した。*Pseudomonas aeruginosa*菌の226個/ml、または414個/mlを各4バッグに接種して室温に静置し、接種直後、10分後、30分後における各血液バッグ内の細菌数を、細菌培養法にて測定した。

(4) 白血球除去と検体採取

*Yersinia enterocolitica*菌を接種して、室温に15分、または24時間静置した後、白血球除去フィルターを用いて白血球除去を行った。白血球除去フィルターは、今回用いた白血球層の通過血液量が40mlと少ないことから、血小板用白血球除去フィルターであるセパセルPLX-5AのILS型タイプ(旭メディカル社、東京)を使用した。白血球除去の方法は、血液バッグに接続後にクレンメを解放し、自然落下にてフィルターを通過させて行った。白血球除去後血液の白血球数は血算装置で測定感度以下(100/mm³以下)であった。

この白血球除去を行った際の、白血球除去前血液と、白血球除去後血液と、そして、白血球除去後のフィルター洗浄液とを細菌培養の検体とした。白血球除去フィルター洗浄液の採取は、フィルター下流部から、12mlのミューラーヒュントンプイヨン培養液と、さらに清潔な空気の約18mlとを勢い良く注入し、フィルター上流部から排出された培養液を採集して行った。

(5) 細菌培養検査

細菌培養は、0.5mlの血液検体を5%ヒツジ血液寒天培地に塗布し、24時間後、および、72時間後に細菌コロニー数を測定して、1ml当たりの細菌コロニー数で表した。この通常の細菌培養には、*Pseudomonas aeruginosa*を用いた継時的変化の基

礎検討における細菌検査と、*Yersinia enterocolitica*を接種した血液の白血球除去前血液と除去後血液、及び、白血球除去フィルター洗浄液からなる検体に用いた。また、白血球除去フィルター洗浄液と、白血球除去後の血液については増菌培地(HK半流動生培地)を用いた検査も併用し、その結果は発育の有無(有り:+,無し:-)で表した。

2) 血小板濃厚液における細菌接種と酸素消費を指標とした検出

(1) 酸素消費測定

血小板製剤中における菌増殖を検出する方法として、日本Pall社の血小板製剤用菌検出システム(Pall Bacteria Detection System、以下PBDS)を使用した。本システムは、菌増殖を促進するサンプルパウチと白血球除去用フィルターを内蔵したシステムで、専用の酸素濃度測定機でパウチ内の空気中O₂濃度をモニターした。

(2) 血小板製剤

血小板製剤は、健常ボランティアからHaemonetics Multiを用いて、各10単位を採取した。

(3) 白血球除去

採取した血小板製剤を2分割し、白血球除去フィルター処理の有無により、白血球除去群と、非白血球除去群とした。

(4) 細菌接種

各血小板製剤を常法で24時間保存後に、*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*をそれぞれ接種(100-500CFU/mL)後、PBDSを無菌接続して、血小板製剤3mLをPBDSのサンプルパウチ(以下パウチ)へサンプリングした。

(5) 保管温度