

vWF、フィブリンノーゲン等の2個以上のリガンドが結合する。③GPIIb/IIIaに2個以上のリガンドが結合することによりGPIIb/IIIaが重合し、構造変化を起こすことによりoutside-inシグナルが発生し、細胞内に伝達される。GPIIb/IIIa細胞内ドメイン、シグナル分子ならびにアクチン系細胞骨格蛋白群の反応を通じて、蛋白チロシンリン酸化反応を主体として、アクチンの重合ならびに細胞骨格の再構成がおこなわれ、血小板の形態変化(伸展)を通じて、粘着を強固にし、顆粒放出を誘導し、その結果血小板凝集を促進する³⁾。④血管障害部位に伸展粘着し、相互反応により血小板の粘着層が形成される。粘着層血小板の血管内腔側に露出したGPIIbならびに活性化されたGPIIb/IIIaとの反応を介して血漿中vWFならびに放出反応による血小板vWFが血小板表面に固相化されることにより新たな血栓形成表面を形成し、新たに血小板がリクルートされrollingを引き起こす。これらの過程が繰り返され、血小板が積み重なり血小板血栓が構築されていく。この血小板血栓により血流が乱され、遮られることにより、フィブリンノーゲンが活性化したGPIIb/IIIaに結合、重合することが可能となり、血小板血栓の安定化をもたらす⁴⁾。⑤最後に、血小板血管内腔側のGPIIb/IIIa活性化の程度が弱くなりリガンド結合が可逆的になることもしくは活性化GPIIb/IIIaの数自体の減少により新たな血小板が捕獲されなくなり血栓成長が終了する。

2) 保存期間が血小板機能に与える影響
まず、血小板除去再構成血(最終血小板

数20,000/ μ l)と正常コントロールとしてのPRP加再構成血(最終血小板数160,000/ μ l)との比較検討を行った。2,000/sの比較的高ずり速度下で、測定開始後10分後に形成された血小板血栓像を図1に示す。また、形成された血小板血栓をZ方向にスキャンすることで血小板血栓の3次元イメージを再構築した後の血小板血栓の高さを測定した。血小板除去再構成血では、血小板血栓の表面占有率は17%、高さは3.6 μ mであり、血小板がまばらに粘着するのみで三次元的な血栓成長は認められなかった(図1上)。これに比し、PRP加再構成血の形成した血小板血栓の表面占有率は75%、高さは15.0 μ mであり、血小板再添加による血栓形成の回復が認められた(図1下)。

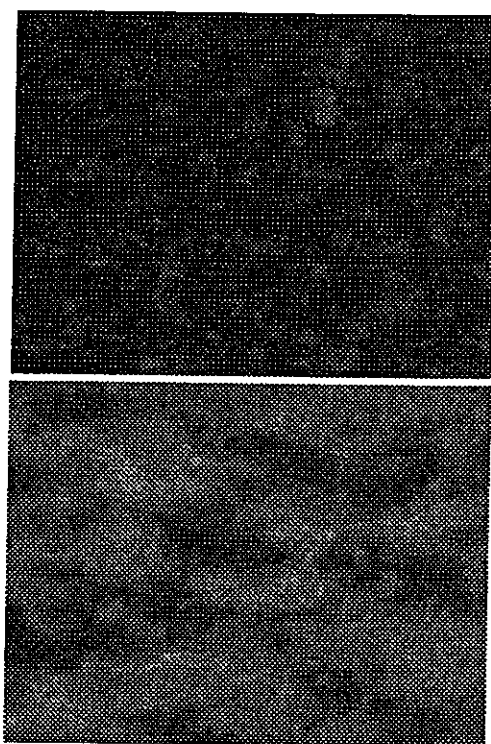


図1 再構成血のずり応力下血小板血栓
(上) 血小板除去再構成血
(下) PRP 加再構成血

次に、保存3日ならびに5日後の濃厚血小板を血小板終濃度 160,000/ μ l で添加した再構成血の血小板血栓形成過程を観察した。上記実験と同様に 2,000/s の比較的高ずり速度下で、測定開始後 10 分後に形成された血小板血栓像で検討した (図 2)。3 日間保存血小板加再構成血では、血小板血栓の表面占有率は 61%、高さは 9.0 μ m であり、正常コントロールである PRP 加再構成血と比較し血小板機能低下が認められた (図 2 上)。5 日間保存血小板加再構成血は、血小板血栓の表面占有率は 57%、高さは 7.8 μ m であり、3 日間保存

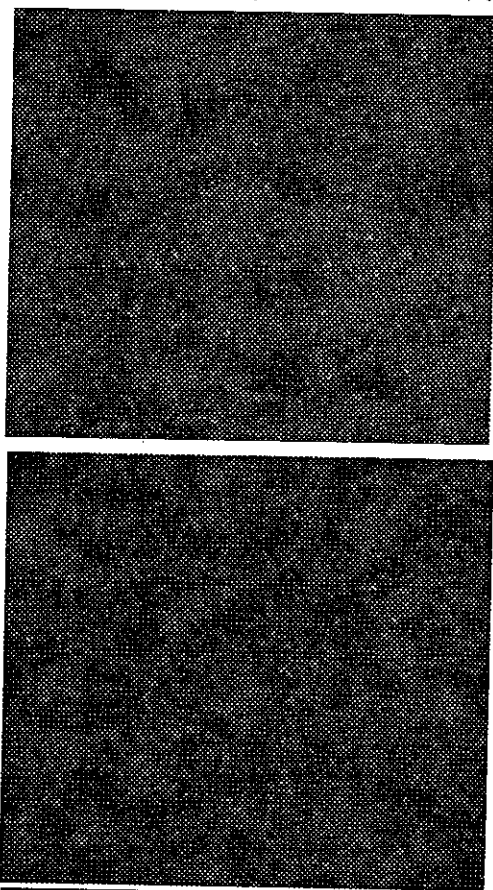


図 2 保存期間の血小板機能に与える影響

(上) 3 日間保存血小板
(下) 5 日間保存血小板

血小板と比較し若干の機能低下が認められた (図 2 下) が、3 日間ならびに 5 日間保存血小板はいずれもずり応力下での血栓形成のための機能を保持していた。

D. 考案

血小板機能は従来、主に血小板凝集計を用い静止状況下にて検討されてきたが、現在、血小板機能を検討する際の測定環境の重要性が指摘されている。血小板は生体内では、血管内皮近傍を流れ、血流の特性による速度勾配によって生じるずり応力に絶えず晒されながら循環している。血管内皮細胞は nitric oxide, prostaglandin I₂ 等を産生し、血小板粘着が起こらないように血管のダイナミクスを支えている。しかし、一旦血管内皮に、外傷等で損傷が起こると、血管内皮下組織と反応する形で血小板粘着が起こり、それに引き続いて血小板凝集、血栓形成が引き起こされる。この際、ずり応力依存性に血小板粘着凝集が引き起こされる。したがって、生体内での血小板機能を評価する際には、血流存在下 (ずり応力下) における血小板の機能を常に考慮する必要がある。今回我々は平行板型フローチャンバーを用いることで、ずり応力下血小板血栓が様々な血小板膜レセプターと粘着蛋白の相互作用により形成されるというメカニズムを明らかにした¹⁴⁾。このメカニズムを考慮することで、血小板機能の詳細を整理状況下に近い形で検討することが可能となる。

本研究の目的である血小板製剤の有効期限を現在の 3 日間 (72 時間) から 5 日間へ延長することによる血小板機能に与

える影響を、出来る限り生理的状況下に近い形での基礎検討を行うために、全血を用い流動状況下で検討する方法を確立した。すなわち、平行板型フローチャンバーを用い、正常健康人の全血より作成した血小板除去再構成血に保存期間の異なる血小板製剤を添加した検体のコラーゲン固相表面上でのずり応力下血小板血栓形成能を測定する系である。その結果、血小板除去再構成血と比較して3日ならびに5日保存血小板添加検体は、明らかにずり応力下血小板血栓形成能の回復を示し、3日ならびに5日間保存血小板のいずれもずり応力下での血栓形成のための機能を保持していることが明らかとなった。しかしながら、採血直後の血小板を用いた正常コントロールと比して、保存血小板の機能低下が認められた。また、3日間保存と5日間保存と比較して保存期間延長による若干の機能の低下が観察された。

今回の結果は、測定系確立のための基礎検討であり、今後検討数を積み重ね、この差が有意かどうかについて、慎重に評価する必要がある。また、この測定系を用いて、保存時の血小板濃度（血小板数と血漿量比）が血小板機能に与える影響、異なった血小板保護液ならびに血液バッグが血小板機能に与える影響等について来年度以降詳細に検討し、最終的には血小板機能が最も良好に保存される至適条件を決定したい。

E. 結論

- ずり応力下血小板血栓形成のメカニズムを明らかにした。

- 保存期間の異なる血小板の機能の差異について検討するための生理的流動状況下を模倣する評価系を確立した。
- 3日間ならびに5日間保存血小板のいずれもずり応力下での血栓形成のための機能を保持していた。

研究成果

1. Sugimoto S and Miyata S. Functional Property of von Willebrand factor under flowing blood. *Int J Hematol* 2002; 75: 19-24.
2. 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.
3. 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.
4. 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.

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

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

分担研究者 大戸 斉 福島県立医科大学医学部附属病院 教授

研究要旨

近い将来には輸血用血液製剤は不足状態におちると予測されている。そこで、血小板製剤の有効期限は世界中で日本でだけ3日間に設定されている。この研究は血小板機能が損傷されること無く5日保存可能な血小板バッグの開発を目的とした。高酸素透過性バッグ PO-80 は高単位（20 単位）を3日以上保存しても pH、スワーリングパターン、%HSR、血小板凝集能ともに良好に保持できた。グルコースの低下と乳酸の増加も緩やかで、嫌気性代謝は抑制されていた。しかし、現市販バッグは3日以上保存すると嫌気性代謝が進み、血小板機能は著しく影響された。通常単位（10 単位）では両バッグ間に有意な差を認めなかった。以上より、高酸素透過性バッグは10 単位以上の血小板製剤を機能良好に保存するのに優れていることが判明した。

A. 研究目的

わが国の急速な高齢人口の増加と青若年人口の減少に伴って、近い将来にも輸血血液需給のバランスが崩れ、不足する事態が懸念されている。特に血小板製剤は、重篤な患者に使用されることが多く、供給が間に合わない場合は生命にかかわってくる。さらに血小板製剤の日本における有効期限は3日間に限定され、ウイル

ス核酸検査の1999年からの導入もあって、血小板製剤のわが国における供給体制は大変厳しくなっており、その脆弱性が指摘されている。

血小板は低温保存が不可能なので室温で保存せざるを得ない。そのため代謝スピードを抑制するのが難しく、ともすれば嫌気性に傾きやすく、損傷を受けやすい。約10年程前からそれまで使用されて

いた塩化ビニール製品よりも酸素透過性に富むポリオレフィン製のバッグが血小板保存には広く使用されている。

本研究はさらに酸素透過性を亢進させた高酸素透過性血液バッグ (PO-80) を用いることにより、血小板製剤を長期に良好に保存しうるかを現在市販バッグの中でも最も血小板保存に適しているといわれる血小板保存バッグと比較しつつ、検証した。血小板製剤の有効期限を5日または7日に延長可能であれば、期限切れのために廃棄されている2~10%の血小板が有効に利用可能となるからである。

B. 研究方法

- 1) 血小板の採取は自動成分採血装置 (アミカス, Baxter 社) を用いて、同意の得られた18名の健常人よりアフレーシスにより20 (または10) 単位を採取した。同じ血液型製剤3人分を一旦プールし、同一ロットを形成して血小板製剤を再度3つに等分割して血小板機能と生化学検査にて評価した。
- 2) 血小板保存には酸素高透過性バッグ (PO-80, 川澄化学工業, 内容量800ml) と対照として現市販バッグ (C3553, 川澄化学工業, 内容量1000ml) を用いた。酸素透過性はPO-80が市販品より40%優る (表1)。20~24°Cにて水平振盪保存した。
- 3) 血小板の機能は以下の項目を評価した。すなわち、血小板のスワーリングパターン、血小板数、平均血小板容積 (MPV), pH, 血液ガス (pO_2 , pCO_2), 低浸透圧ショック回復率 (%HSR), 血小板凝集能, グルコー

ス濃度, 乳酸濃度, 細菌培養試験である。

C. 研究結果

1) 高単位 (20 単位) 保存条件における機能推移

①高酸素透過性バッグ PO-80 で20単位を保存すると、pHは3日間6.9~7.2の間で保持され、スワーリングパターンは良く保たれ、%HSRや血小板凝集能も良好に保存された。またグルコースと乳酸量の増減は緩やかで、代謝が抑制される傾向にあった。従って、酸素透過性の高いバッグは20単位の保存に優れていることが示された。

②市販バッグ C3553 で20単位を保存すると、3日目でMPVの増加(4/9例)、pHの急速な低下(2/9例で6.3以下)、スワーリング消失や%HSR及び血小板凝集能の著しい低下がみられた。グルコースと乳酸量の増減は著しく、代謝がより早く進む傾向にあり、現市販バッグは酸素透過が十分でなく、嫌気的条件下におこり易いことが推測された。

2) 通常単位 (10 単位) 保存条件における血小板機能推移

①血小板10単位を7日間保存すると、高酸素透過性バッグPO-80と現市販バッグC3553の何れも、pHは7.4以上に上昇せず、凝集能や%HSRも良く保持された。また、その他の評価項目も両バッグで差は無く、PO-80の10単位製剤の保存性はC3553と同等で、7日間保存可能であった。

以上より、血小板有効期限5日間に延長

するにあたって、10 単位以下の通常単位血小板保存には現市販バッグでもかまわないが、高単位保存には適さないことが判明した。酸素透過性バッグ PO-80 は 10 から 20 単位の製剤を 3 日以上 7 日間まで血小板機能を良好に保存するバッグとして、有用である可能性が示された。

D. 考察

輸血用血小板製剤の有効期限は世界的に 5 日間に設定されている。しかし、先進国どの国でも血小板の安定的供給を図ることが求められている。高い期限切れ廃棄率と需要に応えられないアンバランスは有効期限を 7 日間に延長する策が求められている。

一時期米国は 7 日間としていたが細菌感染の多発のために 5 日間に戻した。また、機能面からも 3 日以上保存すると劣化する血小板も観察されている。後者の問題は血小板は低温で保存すると不可逆的变化がおこるので、常温で保存しなければならないことに起因する。そのためバッグの酸素透過性が劣ると、血小板の嫌氣的糖代謝が進行し、結果として血漿が酸性側に傾き、血小板機能を大きく損傷してしまう。すべての血小板製剤を良好な機能を維持しつつ、採血後 5 日あるいは 7 日に延長するためには現市販品より、さらに高酸素透過性バッグの開発が必要である。

今回、新たに開発された血小板保存用 PO-80 バッグは市販品よりも酸素透過性が 40% 向上し、酸素とバッグ内に産生された二酸化炭素を効率よく交換し、保存血漿中の pH を好ましい範囲に長期間保つことが可能となった。

成分採血装置を用いて、福島県立医科大学病院輸血・移植免疫部で血小板を採血し、経時的に血小板機能と保存血漿中の生化学的マーカーを追跡した。その結果、高単位保存条件で現市販バッグと高酸素透過バッグで優位な差が認められた。高単位血小板製剤は高酸素透過バッグで保存するのが望ましく、特に 3 日以上保存するには現市販バッグでは不適であることが判明した。

現市販バッグで保存すると、pH は保存 3 日目から 6.6 まで低下し、7 日で 6.3 まで低下した。低浸透圧ショックからの回復率も 7 日には day 0 と比較して 40% も低下した。高酸素透過バッグで保存すると 7 日経過してもそのような影響は軽微であった。この差はバッグ内のグルコース濃度が現市販バッグでは著しく低下し、乳酸濃度は著しく上昇したのに対し、高酸素透過バッグで上記濃度の変化がより小さいことで説明が可能である。すなわち、高酸素透過性バッグでは血漿内に酸素が充分供給されるため、血小板のエネルギーに好気性代謝経路が使われ、嫌気性代謝エネルギーを使用しなくとも生存できるからである。

保存 7 日で現市販バッグの酸素分圧が上昇し、二酸化炭素分圧が低下しているのが観察された。これは、血小板が死滅して、代謝が停止したため、酸素を消費しなくなり、二酸化炭素の産生もなくなったためと推測される。

E. 結論

1. 現市販バッグを用いても通常単位(10 単位)血小板を 5 日間の保存は可能である。

2. しかし、高単位(20 単位)血小板には現市販バッグでは3日を越えた保存には不十分で、高酸素透過性バッグが必要である。
3. 高酸素透過性バッグを用いることにより嫌気性代謝が抑制され、血漿内pHの変化を最小に保つことが可能である。

F. 研究成果

1. 論文
準備している。
2. 学会発表
準備している。

表1 高酸素透過性POバッグ評価試験

- 目的:高単位(20単位)血小板製剤の長期保存を可能とする、高性能(酸素透過性)バッグの開発
- 試験概要:高酸素透過性のバッグ及び現行製品バッグで20単位の血小板を7日間保存し、血小板の保存性や機能を比較した

		酸素透過性 (mL/m ² ·day·atm)	容量 (mL)
サンプル	PO-80	2660±200	800
コントロール	K社市販品	1900±200	1000

表2 高単位(20単位)保存における血小板保存バッグの評価1

		0day	3day	7day
PLT ($\times 10^4$ cell/ μ L)	市販品	16.8 \pm 1.4	17.5 \pm 1.6	17.7 \pm 2.2
	PO-80	16.8 \pm 1.4	17.4 \pm 1.2	17.8 \pm 1.5
MPV (fL)	市販品	7.4 \pm 0.2	7.3 \pm 0.9	8.3 \pm 1.4
	PO-80	7.4 \pm 0.2	6.9 \pm 0.5	7.1 \pm 0.2
pH	市販品	7.054 \pm 0.03	6.646 \pm 0.43	6.277 \pm 0.51
	PO-80	7.054 \pm 0.03	7.066 \pm 0.11	6.673 \pm 0.24
pO ₂ (mmHg)	市販品	84.0 \pm 17.7	60.4 \pm 18.1	105.3 \pm 53.5
	PO-80	84.0 \pm 17.7	73.2 \pm 12.9	63.3 \pm 19.1
pCO ₂ (mmHg)	市販品	63.1 \pm 4.7	57.1 \pm 10.4	22.6 \pm 20.5
	PO-80	63.1 \pm 4.7	41.2 \pm 5.3	35.0 \pm 4.6

*n=6, Average \pm SD

表3 高単位(20単位)保存における血小板保存バッグの評価2

		0day	3day	7day
%HSR (%)	市販品	76.5 \pm 4.4	72.4 \pm 5.3	44.6 \pm 33.6
	PO-80	76.5 \pm 4.4	77.2 \pm 2.0	71.3 \pm 8.5
Aggregation (%)	市販品	89.2 \pm 8.1	79.7 \pm 5.9	34.3 \pm 29.3
	PO-80	89.2 \pm 8.1	81.0 \pm 6.0	56.7 \pm 11.3
Glucose (m g/dL)	市販品	323 \pm 23	184 \pm 83	74 \pm 78
	PO-80	323 \pm 23	253 \pm 34	123 \pm 35
Lactate (mg/dL)	市販品	33 \pm 7	159 \pm 78	261 \pm 94
	PO-80	33 \pm 7	91 \pm 23	195 \pm 45

*n=6, Average \pm SD

図1 バッグ別pO2/pCO2濃度の経日推移

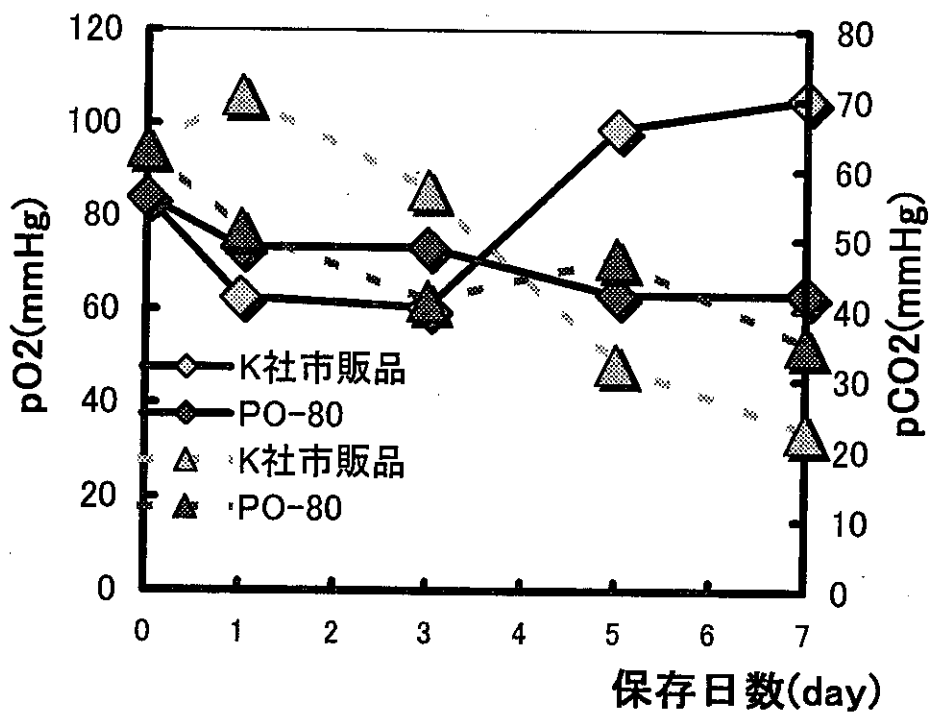
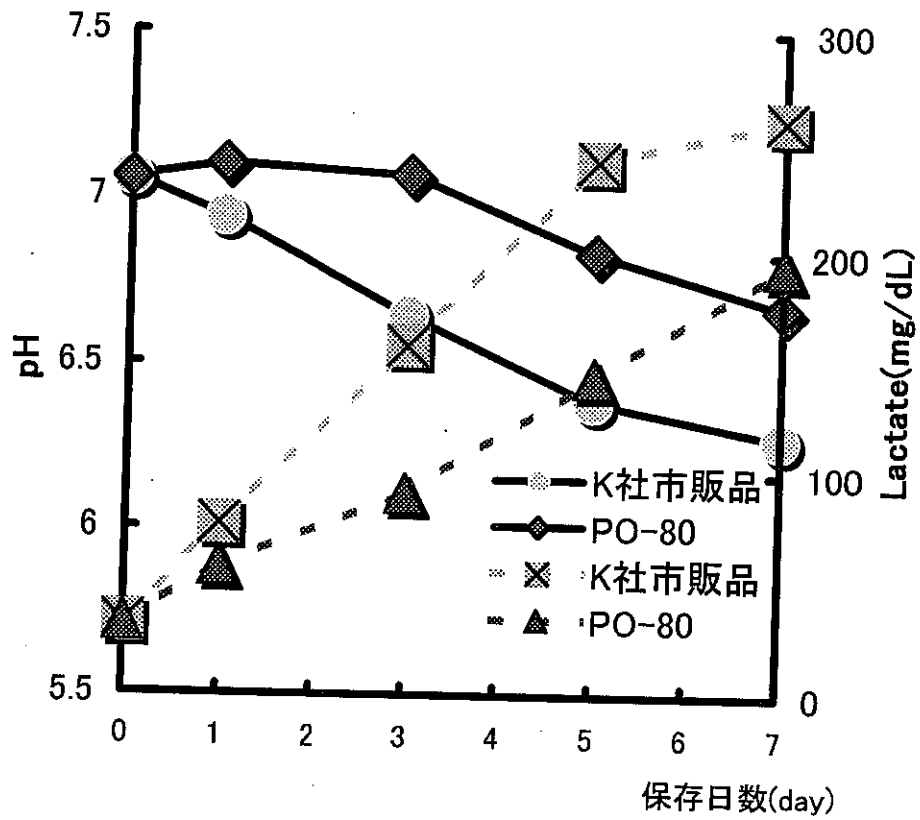


図2 バッグ別血漿内pHの変化と乳酸量の経日増加推移



表示 ◆:pH ▲:乳酸量