

ろうが、最悪の事故を防ぐという意味で重要な検査のひとつである。

その標準的な外観の変化を記したテキストが整備されれば、輸血現場においてチェックの際の指標として役立つであろう。

B. 研究の方法

今回の検討では、血小板製剤 (PC) や赤血球製剤に細菌をスパイクし、経時的に細菌数を同定しつつ、その外観の変化を記録した。

B. 研究結果と考察

以下に代表的な細菌について得られた結果を一般的に知られた事実をあわせて記述する。

1) *Staphylococcus aureus*

一般に増殖はきわめて速い。PC 中で 48 時間後には 10^8 CFU/mL にまで増殖する。24 時間後に黄白色または白色のフィブリン塊ができることがある。この場合 PC 全体が透明度を増すことがある。その後これが融解し、まったく肉眼では判別できなくなることがある。しかし菌数は増えつづける。

これらの変化は菌が放出する次のような毒素・酵素に由来する。

- ①コアグラーゼ：トロンビン様物質を作る。これが PC 中に凝固物質を析出させる一因となる。
- ②スタフィロキナーゼ：プラスミノーゲンを活性化する。このため PC 中に一度できたフィブリンを溶解する。
- ③その他溶血毒

- ④ロイコシジン；白血球を破壊する
- ⑤エンテロトキシン；食中毒の原因となる。

2) *Staphylococcus epidermidis*

Staphylococcus aureus よりも増殖速度は遅く、72~96 時間で 10^8 CFU/mL に達する。コアグラーゼ陰性なので血漿の凝固は認められない。

10^8 CFU/mL に増えていてもスワーリングが残ることが多い。したがって外観からは汚染がわかりづらい。輸血による敗血症の原因菌としての報告が少なくない。

3) *Streptococcus pneumoniae*

72 時間後に 10^8 CFU/mL にまで増殖するが、このとき全体が緑色がかかった色調を呈することがある。これはビリベルジンの産生によるものと思われる。

スワーリングは消失する。細菌増殖の静止期を過ぎると、細菌は自己融解を起こし菌数はかえって低下する。ただしこのときもスワーリングは当然消失したままである。

4) *Bacillus cereus*

PC において血漿が乳び様に濁る。これは細菌の持つフォスホリパーゼ C の働きによると思われる。このため、乳びとの区別が重要であるが、困難である。

ガスを産生しない。

増殖は速く 24~48 時間でプラトーに達する。このためスワーリングも早期に消失する。凝集物ができることがある。

5) *Serratia liquefacience*

増殖は速く、24 時間で 10^7 CFU/mL に達する。

スワーリングは 48 時間ごろから消失し、この頃凝集物も認められるようになる。凝集物は次第に大きさを増し、ヒモ状～綿状の大きな凝集塊となる。

なお、この細菌を赤血球製剤に接種した場合には、4℃での保存においても増殖を示し、7 日目ごろから暗赤色～黒色に色調が変化する。この変化は数時間の経過で速やかに起こる。14 日目ごろからはバッグ外にも悪臭を放つようになる。

6) *Serratia marcescens*

この細菌も低温増殖性の細菌として有名であるが、さらに色素産生菌である。

PC に接種して 8 日目には、バッグに鮮やかな赤色の色素が沈着するのが観察される。

赤血球製剤に接種した場合は、*S liquefaciens* と同様に 1 週間後ごろより暗赤色の色調に変化する。

7) *Pseudomonas aeruginosa*

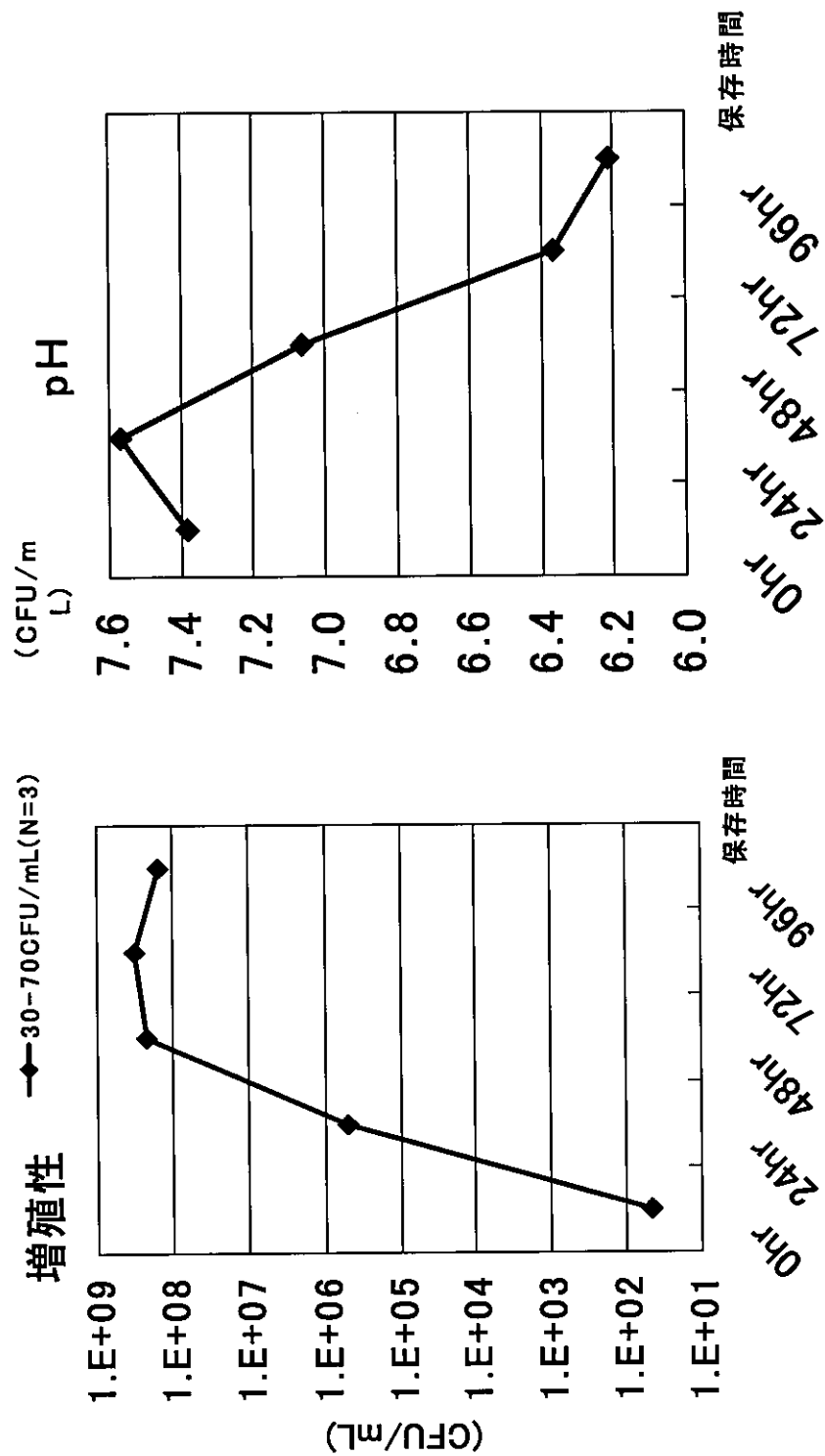
理由は不明であるが、この細菌は PC 中で増殖しない。PC 中の最終濃度を 700CFU/mL となるように接種しても 24 時間後には生細菌を認めることができない。実際 PC 輸血による敗血症報告 71 例のうち、*P aeruginosa* が原因菌と推定された例は 1 例のみである。ただし菌株による違いがある可能性は残る。

まとめ

血小板製剤(PC)の細菌汚染による外観の変化

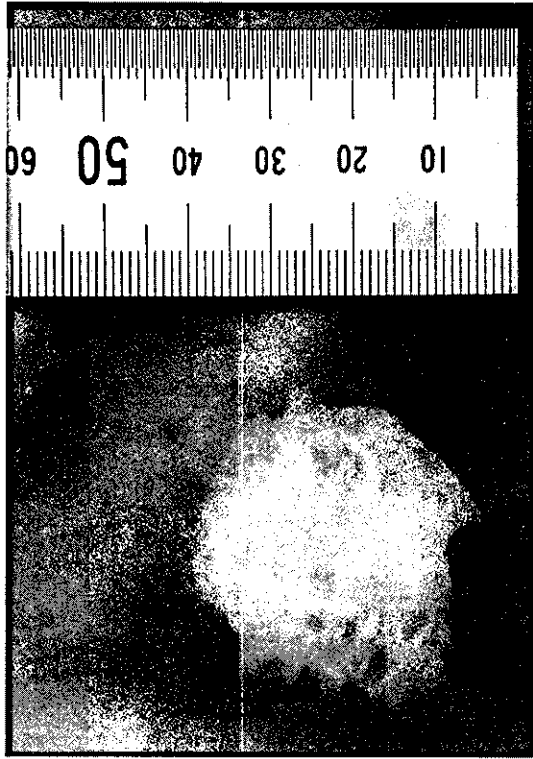
菌種 接種菌数(PC 中 最終濃度)		0	24	48	72	96 時間
<i>S aureus</i> 10 cfu/mL	スワーリング	+	+	±	±	-
	凝固・凝集	-	-	+	+	+
<i>S epidermidis</i> 10 cfu/mL	スワーリング	+	+	+	±	-
	凝固・凝集	-	-	-	+	+
<i>B cereus</i> 10 cfu/mL	スワーリング	+	-	-	-	-
	凝固・凝集	-	+	+	+	+
<i>S pneumoniae</i> 5 cfu/mL	スワーリング	+	+	+	-	-
	凝固・凝集	-	-	-	+	+
<i>P aeruginosa</i> 100 cfu/mL	スワーリング	+	+	+	+	+
	凝固・凝集	-	-	-	-	-

PC製剤中の*Staphylococcus aureus*の増殖性とPH変化



Staphylococcus aureus

凝固物の消失



⇐ 血漿凝固酵素を産生

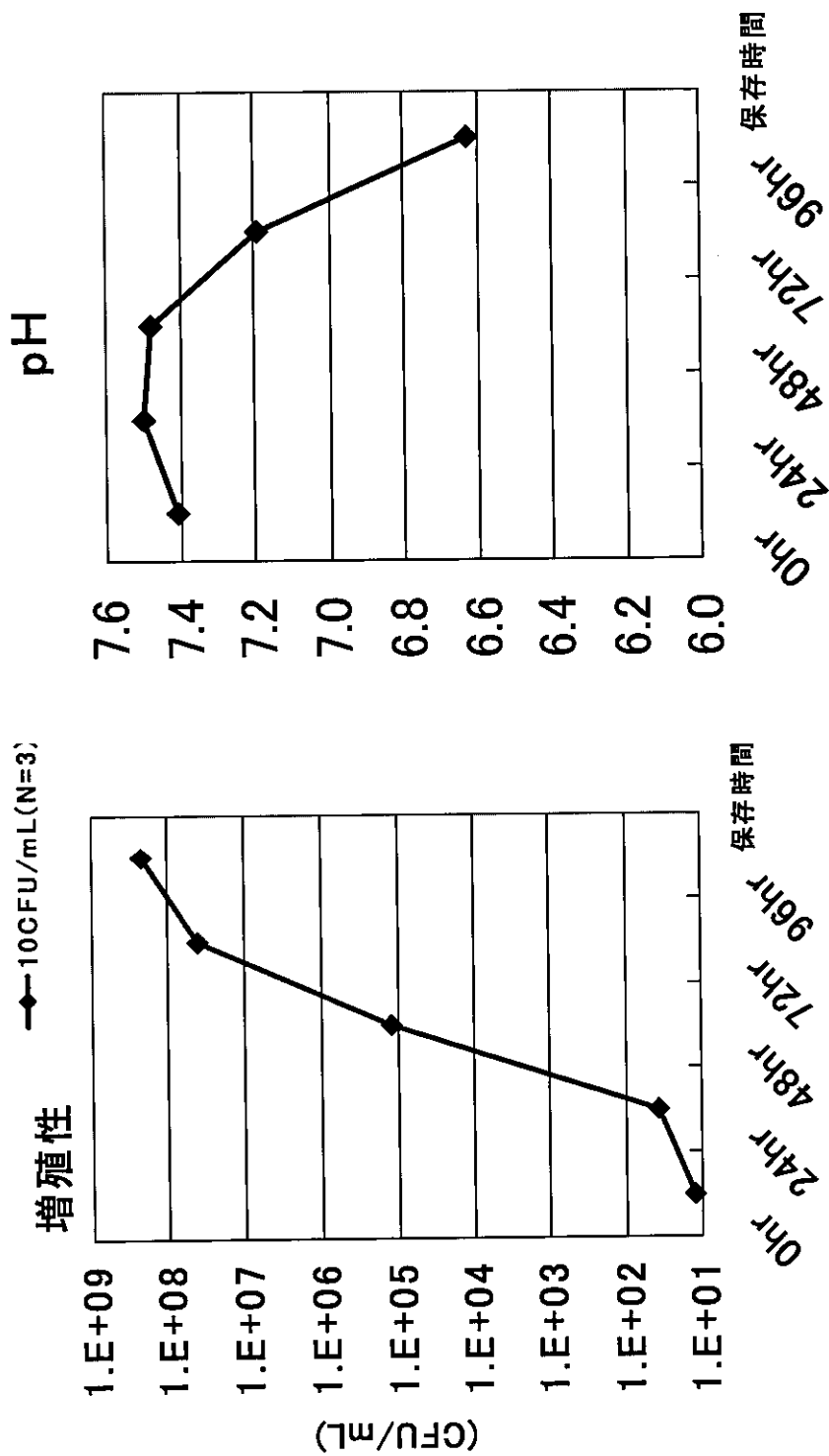
24時間後 1.5×10^6 CFU/ml

融解 ⇓

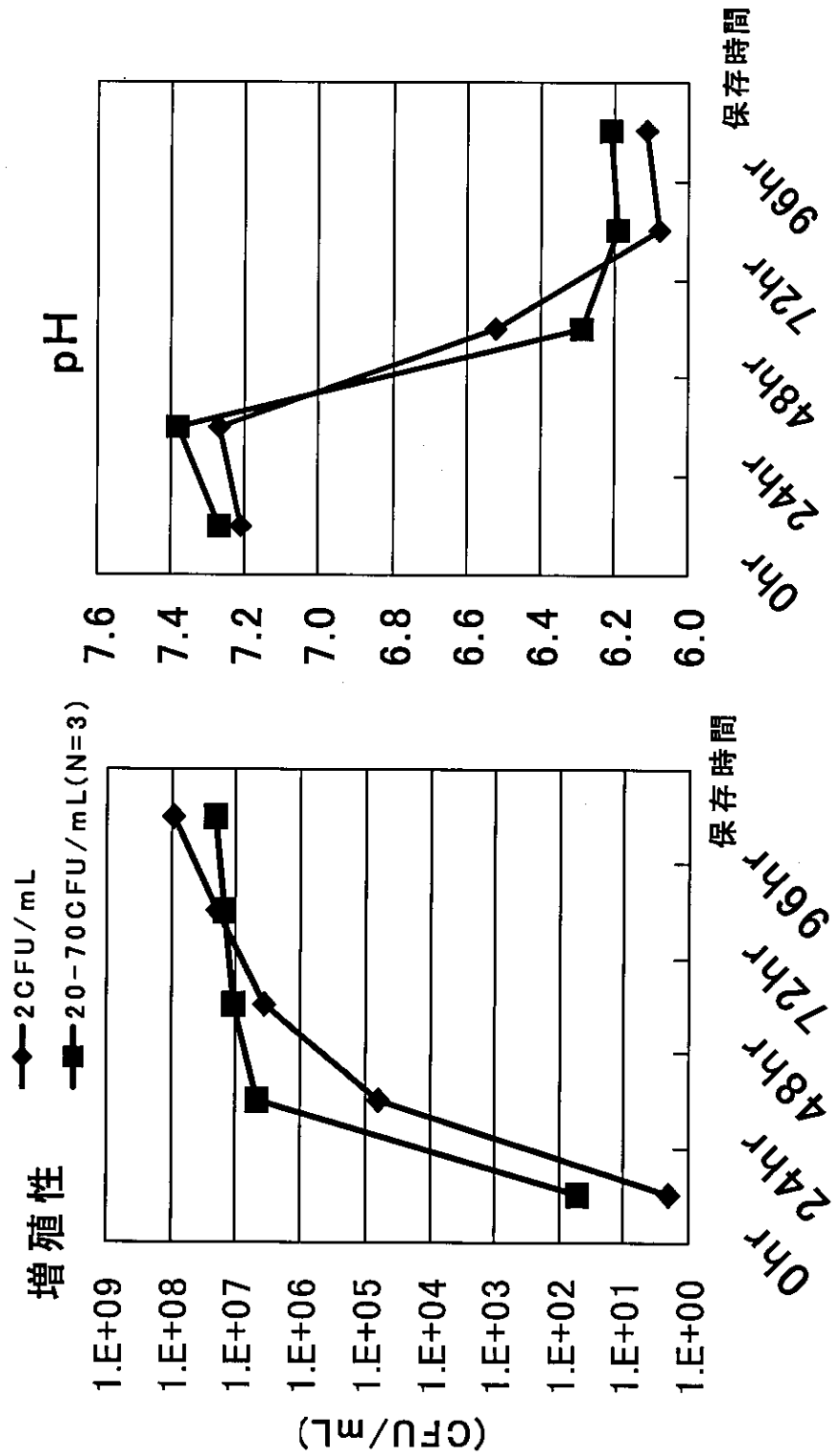
⇐ 繊維素融解酵素を産生

48時間後 5.0×10^8 CFU/ml

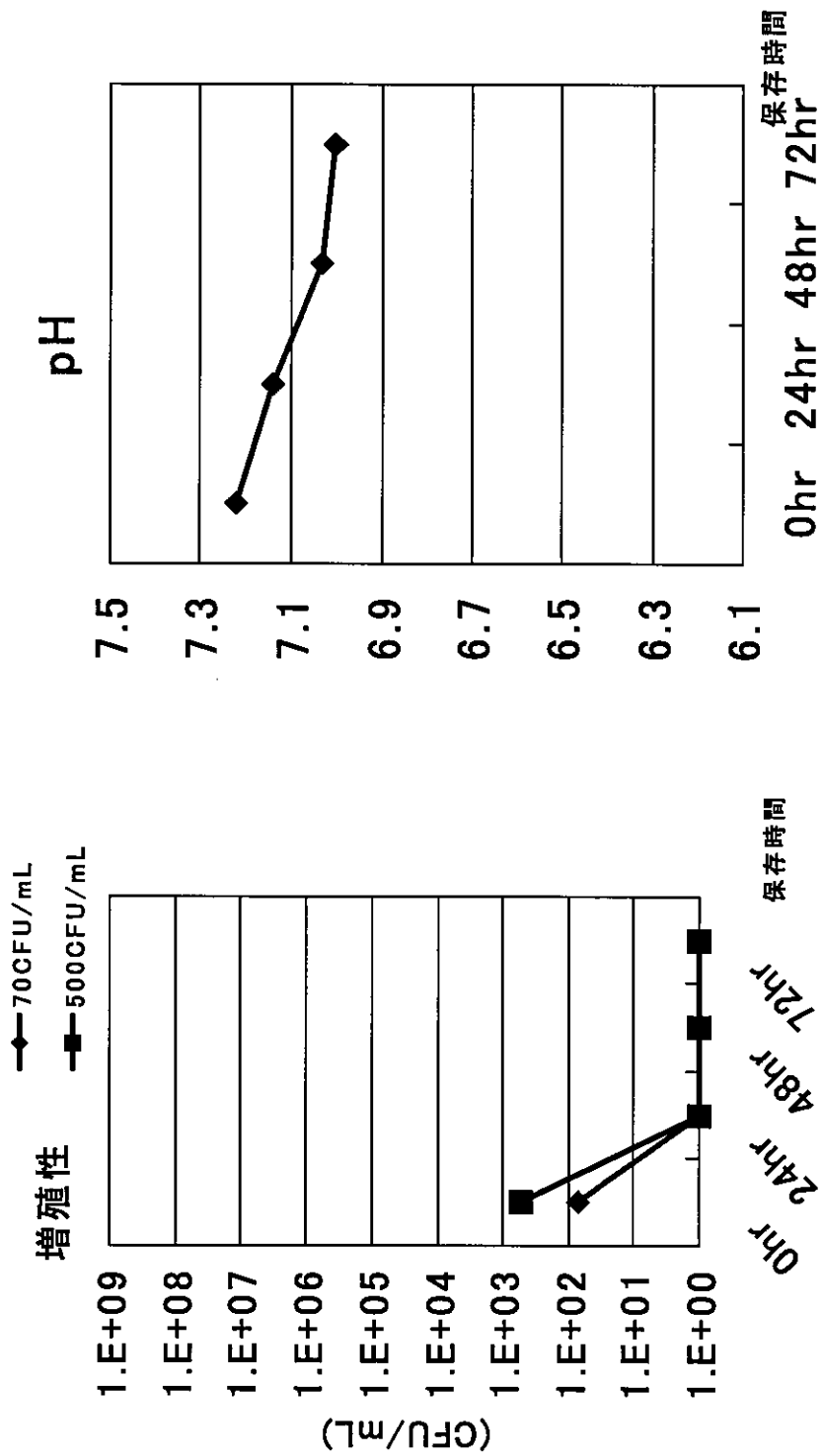
PC製剤中の *Staphylococcus epidermidis* の増殖性と PH変化



PC製剤中の*Bacillus cereus* の増殖性とPH変化



PC製剤中の*Pseudomonas aeruginosa*の増殖性とPH変化



厚生労働科学研究費補助金
医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業
平成16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
(H16-医薬-073)

分担研究報告書

「血小板機能とアポトーシス」

分担研究者 尾崎 由基男

研究協力者 佐藤 金夫

山梨大学 医学工学総合研究部 臨床検査医学講座、 医学部付属病院輸血部

研究要旨：

多血小板血漿をmatrix metalloproteinase (MMP) の阻害剤であるGM6001存在下および非存在下で7日間保存し、GPI b α 、P-セレクチンなどの血小板膜糖タンパク、マイクロパーティクルの生成、および血小板凝集能を測定した。GM6001の添加によって、MMPの基質である血小板膜上糖タンパクGPI b α のタンパク分解が抑制され、またアポトーシスの指標とされているマイクロパーティクルの産生が抑制された。この条件下でコラーゲン凝集反応がより長く保たれたことからアポトーシスの抑制が血小板機能の保持に有用と考えられた。

A. 研究目的

血小板は保存によってその機能が低下するとともに、血小板膜上の種々の形質が変化することが知られており、我々は、平成14、15年度に行った分担研究「血小板保存に伴う損傷の評価」において血小板の保存により血小板膜上の活性化マーカーや血小板膜のintegrityを示すマーカーの発現が増加することを報告した。この中でアポトーシスに伴ってみられる

現象の一つで、細胞膜の膜フラグメントであるマイクロパーティクルの放出が認められたこと、また、他の細胞系においてアポトーシスを抑制していることが報告されており、血小板機能を抑制的に制御しているPECAM-1 (CD31)のタンパク分解が見られたことから、血小板は保存に伴ってアポトーシスに類似した現象が起こっていると推察された。

最近、血小板の保存に伴って血小板膜

糖タンパク GPIb α がタンパク分解を受け、その分解は血小板由来の matrix metalloproteinase (MMP) であることが報告された (Bergmeier W, et al. Blood 102: 4229, 2003)。GPIb α の分解はミトコンドリアが傷害されることでも同様に起こり、MMPの阻害剤によってその分解が抑制されていた。これらのことから血小板保存中にアポトーシス様の反応が起こっていると考えられた。

そこで、今回我々は血小板保存に対するアポトーシスの関与について評価を行った。

B. 研究方法

健常人より採取した血液から多血小板血漿を作成し、血小板保存用バッグに入れた。同一人から二本のバッグを調整し、一本にMMP阻害剤であるGM 6 0 0 1 (GM (+))、残りの一本 (GM (-)) に溶媒のみを1日一回添加した。通常の血小板保存条件下 (20°Cで振盪) におき、0日、2日、5日、7日後に多血小板血漿を少量抜き取り、コラーゲンによる血小板凝集を測定した。さらにフローサイトメーターを用いて血小板膜上の GPIb α 、GPIX、P-セレクチンの発現、およびマイクロパーティクルの生成を評価した。

C. 研究結果

1) 血小板凝集

GM (-) ではコラーゲンによる血小板凝集は2日目で軽度低下し、7日目にはほとんど消失した。一方、GM (+) ではコラーゲン凝集は5日目で軽度の低下が

見られ、7日目でも血小板凝集が認められた。

2) フローサイトメトリー

GM (-) では GPIb α の発現量が5日目で低下し、その傾向は7日目も続いていた。一方、GPIXの発現は7日目まで不変であった。P-セレクチンの発現量およびマイクロパーティクルの生成量は経時的に増加していった。GM (+) では GPIb α の発現量は7日目まではほぼ低下することなく維持されていた。GPIXの発現も7日目まで不変であった。P-セレクチンの発現は経時的に増加していった。マイクロパーティクルの生成量はGM (-) と比較して少ない傾向にあった。

D. 考察

GPIb は GPIb α 、GPIb β 、GPIX、GPV から成るヘテロ複合体であり、血小板の保存中に GPIb α の発現量のみが低下し、GPIXの発現量は不変であったことから GPIb 複合体の発現低下ではなく GPIb α のみがタンパク分解を受けていると考えられる。この分解はMMPの阻害剤である GM6001 を添加することで抑制された。さらに、アポトーシスの指標とされているマイクロパーティクルの生成が低下していることから、GM6001 処理により血小板保存に伴うアポトーシスの進行が抑制されていると考えられる。GM6001 存在下ではコラーゲンに対する反応性は比較的たもたれており、アポトーシスを抑制することで血小板機能をより長く保つことができると考えられる。

一方、P-セレクチンの発現はGM6001 処理によっても経時的に増加しており、

顆粒放出反応はMMPの関与は少ないと考えられる。放出反応はトロンボキサンA₂やPKCに依存していることからMMPとは異なる阻害剤の必要性が示唆される。アスピリンはトロンボキサンA₂の産生抑制作用を有するが、抗血小板薬として用いられており、血小板製剤の保存に用いるのは困難と考えられる。

E. 結論

血小板保存に伴う血小板機能はMMPに依存したアポトーシスによって低下することが示唆された。アポトーシスを抑制することでGPIb α のタンパク分解が抑制され、またコラーゲン凝集がより長く保たれたことから、血小板機能の保存に

GM6001などのアポトーシス阻害剤は有効であると考えられた。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. Naganuma Y, Satoh K, Yi Q, Asazuma N, Yatomi Y, Ozaki Y. Cleavage of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) in platelets exposed to high shear stress. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2004 2:1998-2008.

H. 知的所有権の発生

なし。

厚生労働科学研究費補助金
医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業
平成 16 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
(H16-医薬-073)

分担研究報告書

延長保存した血小板製剤の血小板機能(血栓形成能)

分担研究者 宮田茂樹 国立循環器病センター 輸血管理室長

研究要旨：

血小板製剤の有効期限を現在の 3 日間から 5 日間へ延長することの妥当性を検討するために、保存期間の異なる濃厚血小板製剤の機能の差異について生理的流動状況下を模倣する評価系を用い検討した。血液センターより、有効期限切れもしくは検査落ち等で医療機関で使用できない濃厚血小板製剤の供与をうけた。血小板輸血療法を *in vitro* で模倣するために、供与を受けた製剤と同型の血液型の健康成人の全血を、buffy coat を取り除いた赤血球成分と血小板欠乏血漿に分離し、赤十字血液センターから供与された 1, 3, 5, 7 日間と保存期間の異なる濃厚血小板を最終血小板数が約 150,000/ μ l、ヘマトクリットが 45%となるように混合し再構成血を作成した。これら検体を、コラーゲンを固相化したガラスプレートを組み込んだ平行板型フローチャンバーを用いたずり応力下血小板機能測定系にて、その血栓形成能を評価した。血栓形成過程をリアルタイムに観察するとともに、注入開始 10 分後に形成された血栓の高さを測定した。7 日保存後でも、濃厚血小板製剤は、ずり応力下血栓形成能を保持していた。血小板の初期粘着はいずれの保存期間においても保持されていたが、保存期間が 1 日、3 日、5 日、7 日と長くなるにつれて血小板血栓の 3 次元的成長が障害され、形成された血小板血栓の高さが減少する傾向が認められた。濃厚血小板製剤は、保存期間中に血小板の活性化過程に不可逆的な障害が起きる可能性が示唆された。7 日間保存血小板を臨床的に用いる場合、白血病に対する化学療法中など、血液疾患に対する出血予防には問題とならない可能性が高いが、心臓大血管外科手術等の大量出血時に用いる場合には、この不可逆的な血小板機能低下が問題となる可能性がある。

A. 研究目的

濃厚血小板製剤は、有効期限が欧米の5日間と比較して日本では3日間と短い。近年、悪性腫瘍、特に血液疾患に対する化学療法の進歩により、その支持療法、さらには心臓血管外科手術の増加によるその止血のための濃厚血小板製剤の需要が増大しつつある。一方、少子高齢化により献血者数は頭打ちの傾向にあり、必要血小板製剤の確保が問題になりつつある。血小板製剤の有効期限の延長は血小板製剤の有効期限切れを防ぎ、供給の増加につながるため、早急に検討すべき問題である。血小板製剤の有効期限を現在の3日間から欧米と同様の5日間へ延長することの妥当性を評価する一つの要件として、長期保存によっても血小板機能が保持されているかどうかの検討が重要となる。

近年、血小板機能を評価する場合に、生体内で血小板が存在する環境である流動状況下での血小板機能を考慮する必要性が指摘され、ずり応力下血小板機能評価の新しい概念が確立されつつある。生理的条件に近い系として、長期保存が血小板機能に与える影響を *in vitro* で、血小板膜レセプターと各種粘着蛋白との相互作用を含めた詳細な評価が可能と思われる。

今回、我々は、保存期間の異なる濃厚血小板製剤の機能の差異について生理的流動状況下を模倣するずり応力下血小板機能評価系を用い検討した。

B. 研究方法

1) ずり応力下血小板機能測定

コラーゲン Type I を固相化したガラスプレートを組み込んだ平行板型フローチャンバー内に、血小板を蛍光色素（メバクリン）で標識した全血を流し込み、高ずり応力(2000/s)のかかる部位でのコラーゲン固相表面上での血小板血栓形成過程を倒立型蛍光顕微鏡でリアルタイムに観察した。また、これらの画像を CCD カメラによりコンピュータに取り込みデジタル化し、画像解析を行った。さらに形成された血小板血栓を Z 方向にスキャンすることにより血小板血栓の 3 次元イメージを再構築し、血小板血栓の高さを測定することにより血小板機能のもう一つの指標とした。

2) 血小板除去再構成血の作成

評価する血小板製剤と ABO 式ならびに RH(D)同型で、なおかつ不規則抗体の陰性を確認した健康成人からインフォームドコンセントを得て採血を行い、抗凝固剤として選択的抗トロンビン剤であるアルガトロバンを終濃度 125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるよう添加した。採血した全血を 800 rpm で 10 分間遠心し、その血小板富血漿 (platelet rich plasma: PRP) を採取した。残った血液から buffy coat を注意深く取り除いた後、3,600 rpm にて 10 分間遠心し、その上清を血小板欠乏血漿 (platelet poor plasma: PPP) として採取した。

最終的に残った赤血球成分と PPP をヘマトクリットが 45% になるように混合し、血小板除去再構成血とした (陰性コントロール: PPP 加再構成血)。また、PRP と PPP を最終血小板濃度が 150,000/ μl 、ヘマトクリットが 45% となるように赤血

球成分と混合し、正常コントロール (PRP 加再構成血) とした。

3) 保存濃厚血小板の機能評価

大阪府赤十字血液センターから、有効期限切れもしくは検査落ち等で医療機関で使用できない濃厚血小板製剤の供与を受けた。供与を受けた製剤と ABO 式ならびに RH(D)同型で、なおかつ不規則抗体の陰性を確認した健康成人全血から、上述した方法で、赤血球成分、血小板富血漿 (PRP)、血小板欠乏血漿 (PPP) を作成した。濃厚血小板製剤は、大阪府赤十字血液センターにて、Good Manufacturing Practice (GMP) に則った標準手順書に基づき、1,3,5,7 日間保存され、swirling 陽性を確認の上、試験対象製剤として試験当日に供与を受けた。供与を受けた濃厚血小板を最終血小板数が約 150,000/ μ l、ヘマトクリットが 45% となるように、赤血球成分ならびに PPP と混合し、再構成血を構築した (PC 加再構成血)。

これら検体を、生体内で血小板が存在する環境である流動状況下を模倣できるシステムであるコラーゲン type I を固相化したガラスプレートを組み込んだ平行板型フローチャンバーを用いたずり応力下血小板機能測定系にて、その血栓形成能を評価した。血栓形成過程をリアルタイムに観察するとともに、注入開始 10 分後に形成された血栓の状態と高さを測定した。

4) アスピリン服用患者の血小板機能評価

脳梗塞発症後の 2 次予防としてアスピリン (81mg) もしくはバイアスピリン

(100mg) を服用している患者にインフォームドコンセントを得て、抗凝固剤として選択的抗トロンビン剤であるアルガトロバンを終濃度 125 μ g/ml となるよう添加した採血管を用いて採血を行った (6ml)。

この全血中の血小板を標識するために蛍光色素 (メバクリン) を加え、コラーゲン type I を固相化したガラスプレートを組み込んだ平行板型フローチャンバーを流し込み、高ずり応力 (2000/s) のかかる部位でのコラーゲン固相表面上での血小板血栓形成過程を倒立型蛍光顕微鏡でリアルタイムに観察した。さらに、注入開始 10 分後に形成された血栓の状態と高さを測定した。

C. 研究結果

1) 再構成血のずり応力下血小板血栓形成過程の検討

健康成人 (n=11) からの血液を用い、正常コントロールと陰性コントロールの測定を行った。正常コントロールとしての PRP 加再構成血 (最終血小板数 155,818 (平均) \pm 15,236 (1 S.D.) / μ l, n=11) と陰性コントロールとしての PPP 加再構成血 (最終血小板数 20,545 \pm 7487/ μ l, n=11) との比較検討を行った。

それぞれの検体を並行板型フローチャンバーに流し込み、2,000/s の高ずり速度下で、測定開始後 3 分、5 分、10 分後形成された血小板血栓の経時的変化を Figure 1 に示す (血栓の高さが中央値を示した実験の像を代表値)。PRP を用いた陽性コントロールは上段、PPP を用いた

陰性コントロールを下段に示す。PRP加構成血では、コラーゲンを固相化した表面への血小板の rolling から初期粘着、その後の血小板凝集、さらには、3次元的血小板血栓形成過程が観察された。一方、陰性コントロールとして用いたPPP加構成血を用いた実験では、血小板がまばらにコラーゲンを固相化した表面に粘着するのみで、三次元的な血栓成長は認められなかった。

測定開始 10 分後に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、血小板血栓の高さを測定した。陰性コントロールとして用いた PPP 加構成血の最終的な血栓の高さは、 $3.36 \pm 0.9 \mu\text{m}$ ($n=11$) であり (figure 5: PPP)、正常コントロールとして用いた PRP 加構成血の、血小板血栓の高さは $21.7 \pm 3.0 \mu\text{m}$ ($n=11$) であった (figure 5: PRP)。血小板再添加による血栓形成の回復が優位に認められた ($p < 0.05$)。

2) 保存期間が濃厚血小板製剤のずり応力下血栓形成能に与える影響

大阪赤十字血液センターから供与を受けた保存期間の異なる (1、3、5、7 日後) 濃厚血小板製剤を研究方法の項に示した方法で、血小板終濃度 $150,000/\mu\text{l}$ となるよう添加した PC 加再構成血の血小板血栓形成過程を観察した。上記コントロール実験と同様に $2,000/\text{s}$ の比較的高ずり速度下で、測定開始後 3 分、5 分、10 分後に形成された血小板血栓の経時的変化を figure 2 上段に示す。1 日保存血小板製剤では、正常コントロールである PRP 加再構成血 (figure 1 上段) とほぼ同

様に、コラーゲンを固相化した表面への血小板の rolling から初期粘着、その後の血小板凝集、さらには、3次元的血小板血栓形成過程が観察された。しかしながら、保存期間 3 日の血小板製剤を用いた実験では (figure 2: 下段)、初期粘着はほぼ正常に認められるものの、3次元的血栓成長過程に若干の障害が観察された。さらに、5 日間保存 (figure 3: 上段)、7 日間保存 (figure 3: 下段) では、より 3 次元的血栓形成過程の障害が明らかとなり、個々の血小板血栓の集合が小さくなる現象が観察された。

測定開始 10 分後に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、血小板血栓の高さを測定した。1 日保存血小板製剤を添加した PC 加再構成血 (最終血小板数 $142,000/\mu\text{l}$, $n=1$) の最終血小板血栓の高さは、 $18.8 \mu\text{m}$ であり、正常コントロールである PRP 加再構成血とあまり差が無かった (figure 5: 1 day)。しかしながら、3 日間保存血小板製剤 (最終血小板濃度 $169,600 \pm 8,000/\mu\text{l}$, $n=3$)、5 日間保存血小板製剤 (最終血小板濃度 $155,500 \pm 12,400/\mu\text{l}$, $n=6$)、7 日間保存血小板製剤 (最終血小板数 $154,800 \pm 9,400/\mu\text{l}$, $n=4$) を加えた PC 加再構成血を用いた実験では、最終的な血小板血栓の高さは 3 日間保存で $14.6 \pm 5.54 \mu\text{m}$ (figure 5: 3days)、5 日間保存で $10.3 \pm 0.59 \mu\text{m}$ (figure 5: 5 days)、7 日間保存で $7.0 \pm 0.82 \mu\text{m}$ (figure 5: 7days) と、保存期間が長くなるにつれて最終的な血小板血栓の高さが低くなる傾向が認められ、5 日間保存で正常コントロ

ールに比して血小板血栓の高さは約 50% に減少した (figure 5)。

3) アスピリン服用患者での血小板血栓形成能との比較

アスピリンは、シクロオキシゲナーゼの阻害作用によりトロンボキサンA₂の産生を阻害し、血小板の活性化を抑制することで、抗血栓作用を示す。アスピリン服用患者の血小板血栓形成過程の観察では、ごく初期 (1分以内) の血小板粘着は健常人と比較しても大差なく、その後3分後には血小板の凝集が起こり、比較的小さな血小板血栓が認められる。しかしながら、アスピリン服用患者血小板血栓は脆弱なため、その後5分、10分と経過しても、血小板血栓に成長は認められず、逆に血小板血栓が崩壊していく過程が観察され、最終的 (10分後) には、ごく小さな血小板血栓が認められるのみとなる (figure 4)。

7日間保存血小板製剤の血栓形成過程においてもアスピリン服用患者血小板と同様に一旦形成された血小板血栓が崩壊していく過程が観察された (Figure 3:下段 vs Figure 4)。このことより、長期保存により濃厚血小板製剤中の血小板の活性化のプロセスに不可逆的な障害が起こることが示唆された。

D. 考案

血小板製剤を支持療法として長期間必要とする悪性腫瘍、特に血液疾患患者での濃厚血小板製剤の使用、止血困難に陥り易い心臓、肝臓外科等に代表される外科疾患患者の増加により、濃厚血小板製剤の必要性がますます増加することが予

想される。一方、日本社会の少子高齢化に伴う献血者数の頭打ちや、その減少が現実となりつつあり、血小板製剤の需給バランスの悪化とともに、安全な輸血療法に支障を来すことが懸念される。血小板製剤の有効期限の延長は、血小板製剤の有効期限切れを減少させ、血小板製剤の需給関係の改善に対して有効な手段となりうるため、期限延長の早期導入が待たれる。実際、日本における3日間 (72時間) と比較して欧米では5日間と血小板製剤の保存可能期間が長い。さらに、欧米では7日間に延長しようとする試みもなされている。

血小板製剤の保存期間延長に当たっては、特に細菌汚染ならびに保存期間が血小板機能に与える影響の2つの観点について慎重に考慮する必要がある。本研究では、保存期間が血小板機能に与える影響について、*in vitro* での評価を行った。

欧米における血小板製剤の機能に対する保存期間の与える影響についての報告を見てみると、*in vitro* 測定系では、血小板活性化マーカーの一つである p-selectin の発現、血小板凝集計を用いた ADP 等アゴニストに依存した血小板凝集能、Hypotonic shock response、Extent of shape change 等が機能評価指標として用いられており、*in vivo* 測定系では、血小板回収率等を用いて評価されている。

しかしながら、最近、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。すなわち、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（主にコラーゲンからなる）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ことが明らかとなっている。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、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用いた。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再構成血に保存期間の異なる濃厚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した。

その結果、7日間保存後でも、濃厚血小板製剤は、ずり応力下血栓形成能を保持していた。血小板の初期粘着はいずれの保存期間においても保持されていたが、保存期間が1日、3日、5日、7日と長くなるにつれて血小板血栓の3次元成長が障害され、形成された血小板血栓の高さが減少する傾向が認められた。5日間保存で正常コントロールに比して血小板血栓の高さは約50%に減少した。また、7

日間保存血小板では、血栓形成過程において、アスピリン服用患者血小板と同様に一旦形成された血小板血栓が崩壊していく過程が観察された。このことは、濃厚血小板製剤において、長期間保存により血小板の活性化過程に不可逆的な障害が起きる可能性が示唆された。従来、血小板製剤は、血液疾患における化学療法等での出血傾向を防ぐために予防投与されるための使用が多くを占めた。5日間保存血小板製剤でもずり応力下血栓形成能を保持し、正常コントロールとしてのPRP加再構成血と比較して、50%程度の血小板血栓の高さを維持しており、この血液疾患における予防投与という点では、その機能に問題がないように思われる。しかしながら、外科疾患周術期の止血のために用いる場合、この保存期間に依存したずり応力下血栓形成能の低下は問題となる可能性がある。特に、7日間保存まで延長する場合には注意が必要であると思われる。

また、この現象は、心臓大血管外科周術期に止血困難に陥った場合、生血（院内採血による新鮮血）の有効性を主張する心臓外科医、麻酔科医がいる実態をある程度反映しているのかも知れない。

今後、血小板製剤の保存バッグの改良、保存条件の検討により、より血小板機能が保存される条件を十分検討する必要があると思われる。最近、血小板膜レセプターの糖鎖を修飾することにより、血小板製剤の4℃保存による長期保存ができる可能性があるとの報告がある。今後さらに、様々な方法で、血小板機能の保持という観点で長期保存に耐えうる方法の

検討が必要であると思われる。

E. 結論

- 7日間保存後でも、ずり応力下血栓形成過程における初期粘着能は保たれていた。
- 保存期間が長くなるにつれて血小板血栓の3次元成長が障害され、形成された血小板血栓の高さが減少する傾向が認められた。
- 濃厚血小板製剤は、保存期間中に血小板の活性化過程に不可逆的な障害が起こる可能性が示唆された。
- 長期保存による障害は、血液疾患の化学療法による血小板減少に対する予防投与という点では、問題とならないと思われるが、外科疾患周術期の大量出血時の止血のために用いる場合、問題となる可能性がある。
- 今後さらに、血小板機能の保持という観点で長期保存に耐えうる方法の検討が必要であると思われる。

関連する発表論文

- 1) Ohto H. and Miyata S.: Evaluation of stored platelets. *Vox Sanguinis* 2004; 86:209-211.
- 2) Miyata S., Kawai T, Yamamoto S, Takada M, Iwatani Y, Uchida O, Imanaka H, Sase K, Yagihara T, Kuro M: Network computer-assisted transfusion management system for accurate blood component-recipient identification at the bedside. *Transfusion* 2004, 44: 364-372.
- 3) 宮田茂樹: 血小板膜糖蛋白質Ib-IX複合

体. “血液の辞典” 平井久丸、押味和夫、阪田洋一編 朝倉書店 2004; 285-288.

関連する学会発表

- 1) Miyata S., Yamamoto S., Yoshimura H., Kawai T., Sano T, Sugimoto M., Ohto H.: Functional evaluation of platelet concentrates stored for up to 7 days using a flow chamber system under physiologic flow conditions. 2004 American Association of Blood Banks Annual Meeting, Baltimore, U.S.A. 2004.
- 2) 山本賢、吉村尋典、岩谷泰之、河合健、大戸 斉、柴田 弘俊、宮田茂樹: 保存期間が濃厚血小板製剤の機能に与える影響—ずり応力下血栓形成能を用いた評価—. 第52回日本輸血学会総会. 札幌、2004
- 3) 宮田茂樹、亀井政孝: 人工心肺使用時における輸血. 第52回日本輸血学会総会. 札幌、2004
- 4) 宮田茂樹: 血小板機能から見た血小板輸血とその適応. 第23回日本臨床化学会夏期セミナー. 鹿児島、2004

Time-course images of platelet thrombus growth under shear stress conditions

Positive control



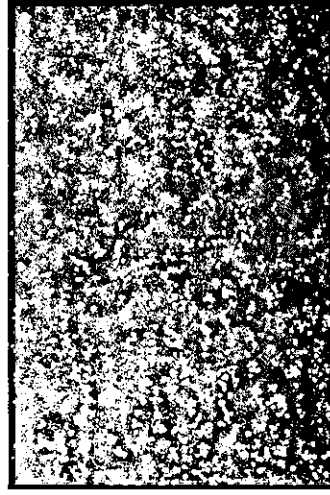
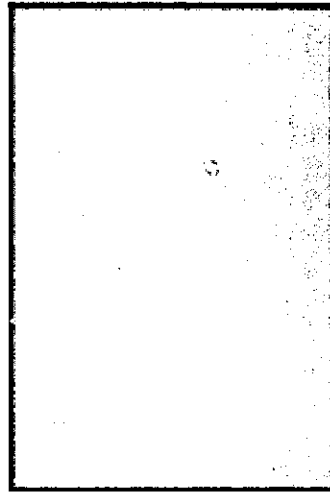
3 min



5 min

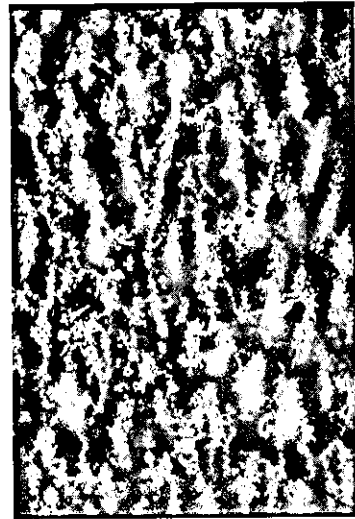


10 min



Negative control

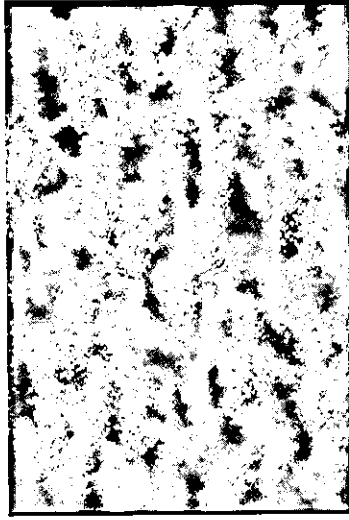
1-day-stored PC



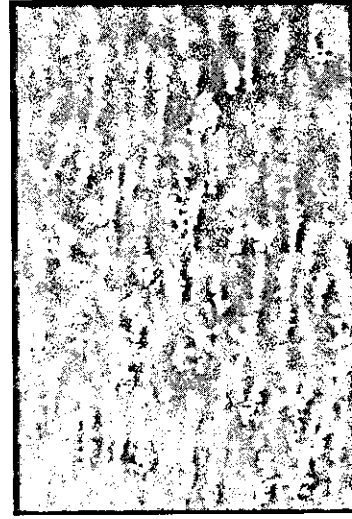
3 min



5 min



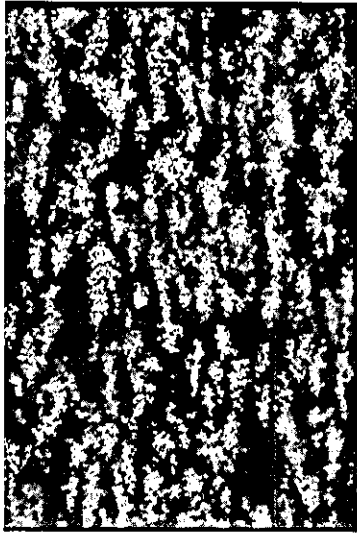
10 min



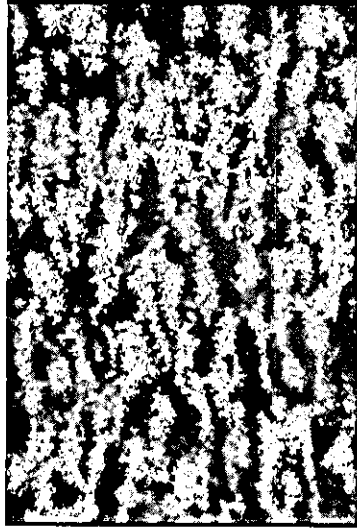
3-day-stored PC



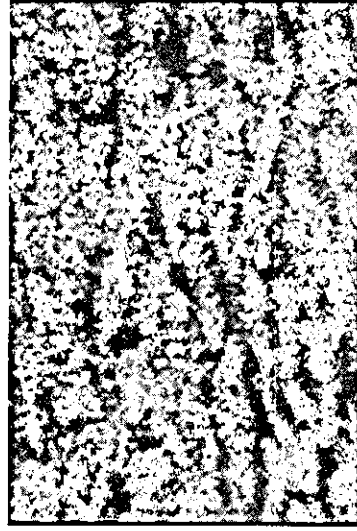
5-day-stored PC



3 min



5 min



10 min



7-day-stored PC

