

# 図13. フィルター部分の保管条件と酸素濃度測定 (ミューラー-ヒュントン液)

血小板濃厚液：採血後日数：6日、白血球数：100/mm<sup>3</sup>  
 フィルター部分：ミューラー-ヒュントン液12mlで洗浄  
 室温保管と37°C保管を比較

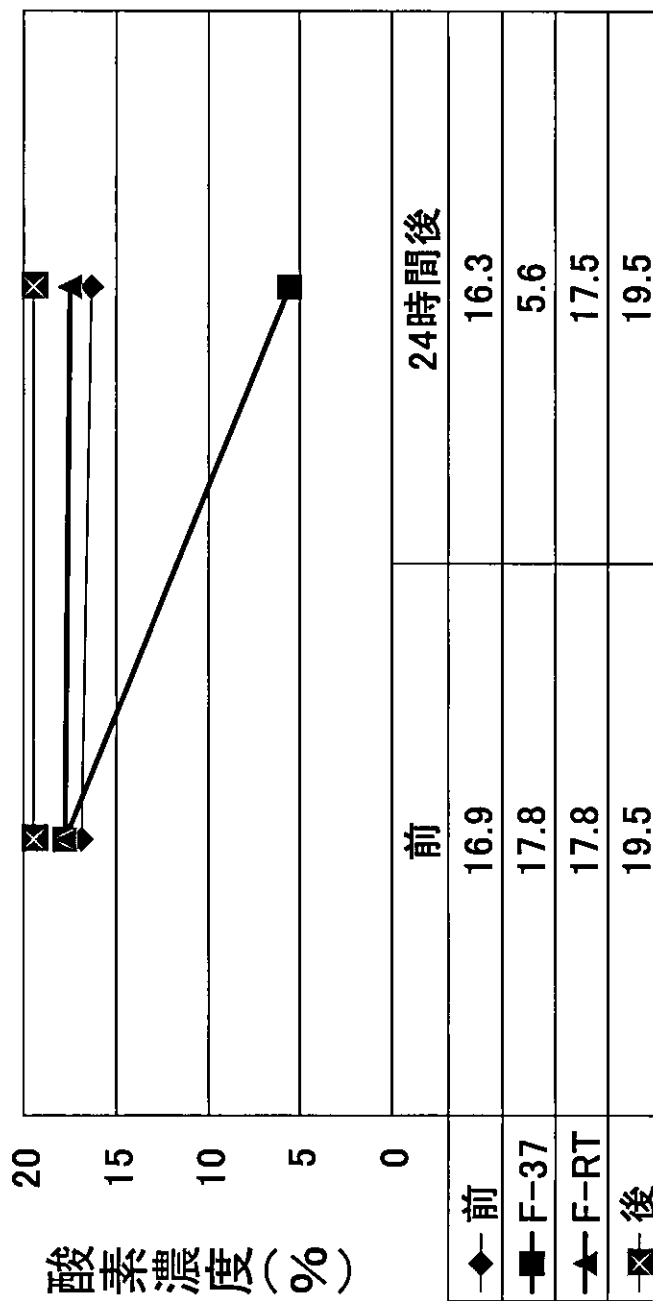
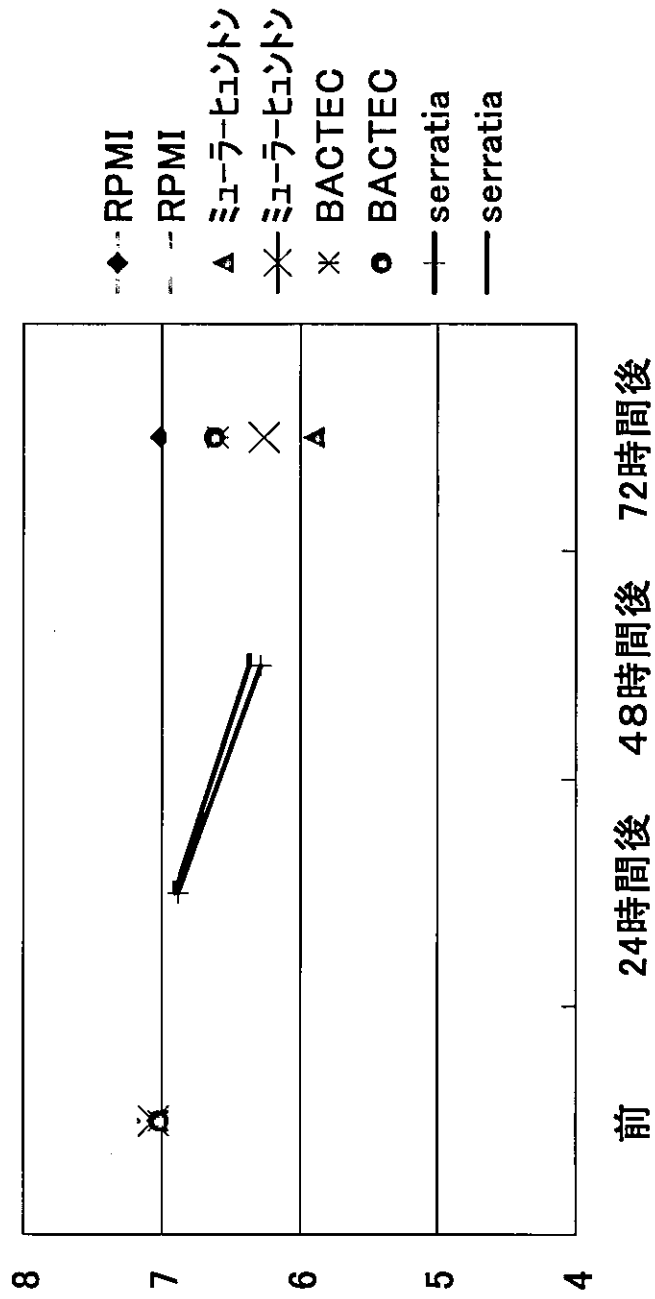


図14. PC濾過後フィルタ一部各培養液のpH変化(無菌状態と菌接種後)



「血小板製剤の有効期限延長と安全性確保に関する研究」

血小板製剤中での細菌の増殖

分担研究者：高松純樹 名古屋大学医学部附属病院輸血部 教授

研究協力者：大蔵照子 名古屋大学医学部附属病院検査部

研究要旨：

細菌に感染した血小板を早期に検出することを目的に、実験的に血小板製剤に細菌を接種して、生菌数を時系列的に測定した。敗血症患者から得られた臨床分離株（グラム陰性菌3種11株、グラム陽性菌4種15株を終濃度 $10^3-10^4$ /mLとなるように接種した。

グラム陰性菌のうち、*Serratia marcescens* の4株中2株は接種直後から対数増殖したが、2株ははじめの数時間は一旦減少した後に対数増殖するV字状のカーブを示した。大きな凝集塊が形成された。*Escherichia coli* と *Pseudomonas aeruginosa* は1株のみ増殖したが、残りの3株と2株は増殖しなかった。肉眼的変化も観察されなかった。グラム陽性菌のうち、*Bacillus cereus* は接種直後から著しい増殖を呈し、製剤は白濁した。*Bacillus subtilis* 白血球除去緩やかな増殖を示し、菌塊の浮遊が観察された。*Staphylococcus aureus* は接種後10時間から増殖を示し、白色凝集塊を形成した。*Staphylococcus epidermidis* は緩やかな増殖スピードを呈した。

グラム陰性菌は菌株間で増殖パターンに大きな差異が見られたことから、製剤中の因子によって増殖が影響を受けているものと考えられた。グラム陽性菌は菌株間で増殖パターンに大きな差異は見いだされなかった。病原性の大きいことなどもあり、グラム陰性菌への対策が重要である。また、細菌感染によって血小板製剤の肉眼的変化があるので、汚染製剤の発見に結びつく可能性は大きい。

1. 研究目的

現在輸血用血小板製剤は、血小板機能保持の観点から20-25℃にて振盪した状態で

保存されているため、万一細菌の混入があった場合には、保存中に製剤内で細菌が増殖し、輸血により副作用をもたらす可能性

がある。HIV、HCV、HBV 等のウイルス汚染については核酸増幅法により早期に検出が可能となったが、細菌汚染については、輸血後感染症をおこす可能性のある細菌種の多様性から、核酸による検出には限界があり、培養による検出は採血後 72 時間という現在の血小板製剤の有効期限内では難しい。

我々は、細菌汚染をより早期に、あるいは輸血前に確実に検出する方法を見出すことを目的とし、それを探索する上で、細菌が血小板製剤中に混入した場合に製剤の保存状態下でどのような動態を示すかを認識するために、実験的に血小板製剤中に細菌を接種し、経時的に生菌数を測定した。

## 2. 方法

### 1) 使用製剤

赤十字血液センターに献血され製剤化された濃厚血小板液のうち、有効期限内に輸血されなかった製剤を、期限超過後すぐに使用した。

### 2) 使用菌株

グラム陰性菌 3 菌種 11 株 (*Serratia marcescens* 4 株、*Escherichia coli* 4 株、*Pseudomonas aeruginosa* 3 株)、グラム陽性菌 4 菌種 15 株 (*Bacillus cereus* 3 株、*Bacillus subtilis* 4 株、*Staphylococcus aureus* 4 株、*Staphylococcus epidermidis* 4 株) を使用した。これらはすべて異なる敗血症患者の血液培養より分離された、遺伝的背景の異なる臨床分離株である。

### 3) 血小板製剤への細菌接種

同一 lot. の製剤中における、異なる複数菌株の増殖特性を調べるため、製剤を

血液バッグ内から滅菌プラスチック容器に無菌的に分注して使用した。BHI broth にて培養した細菌を、製剤中の細菌の終濃度が  $10^3 - 10^4$  CFU/ml となるように添加した。無菌操作のコントロールとして、細菌を接種していない BHI broth を同様に添加した。

### 4) 接種後の生菌数の測定

細菌を接種した血小板製剤を 20 - 25℃にて振盪し、輸血用製剤と同様の保管状態に保った。経時的に製剤の一部を取り出し、BHI 寒天平板培地上で普通培養し、コロニー数をカウントした。コントロールも同様に行い、コロニーが認められないことを確認した。

### 5) 細菌の増殖曲線

使用菌株自身の増殖特性をみるために、BHI broth にて 37℃、振盪培養し、経時的に吸光度を測定した。

## 3. 結果

### 1) BHI broth 中での増殖

すべての菌株において典型的な S 字状の増殖曲線が得られた。菌種ごとに増殖スピードに差があったが、同一菌種内における菌株間の大きな差はなかった (図 1)。

### 2) 血小板製剤中でのグラム陰性桿菌の増殖と製剤の肉眼的変化

*S. marcescens* は、4 株中 2 株は接種直後から対数増殖を示し、残り 2 株ははじめの数時間に一度減少した後に対数増殖する V 字状のカーブを示した (図 2a)。また、4 株すべてにおいて、接種から 48 時間前後で製剤に肉眼的に白い大きな凝集塊の形成が見られ、残りの液は透明化

した(図 3a)。顕微鏡下で観察すると、透明化した溶液中には多数のグラム陰性桿菌が認められたが、凝集塊中には菌体は認められなかった。凝集塊形成時の菌量は  $10^9 \sim 10^{11}$  CFU/ml であり、凝集塊が形成された後は生菌数が減少した。

*E. coli*, *P. aeruginosa* は、各 1 株のみ対数増殖し、残りの株は増殖しなかった(図 2b, c)。また、これらの 2 菌種は増殖しても製剤に肉眼的変化はまったく認められなかった。

### 3) 血小板製剤中での *Bacillus spp.* の増殖と製剤の肉眼的変化

*B. cereus* は 3 株とも接種直後から著しく増殖した(図 2d)。10 時間後には  $10^6$  CFU/ml 以上の菌数に達し、その後生菌数が減少することはなかった。接種後約 24 時間前後から、製剤の白濁化が肉眼的に明らかに認められるようになった(図 3b)。*B. subtilis* は 4 株とも緩やかな右上がりの増殖特性を示した(図 2e)。生菌数は増加し続け、50 時間後には  $10^4 \sim 10^6$  CFU/ml に達した。接種後 40~50 時間で *B. subtilis* のカサカサな菌塊が浮遊するのが肉眼的にもわかるようになった(図 3c)。今回使用した菌株に関しては、血小板製剤中での増殖パターンは、BHI broth 中での増殖パターンとよく類似していた。*B. cereus* の方が *B. subtilis* よりも増殖速度がすべての菌株において速かったが、この差も BHI broth の場合と同様であり、菌種による差と考えられる。

### 4) 血小板製剤中での *Staphylococcus spp.* の増殖と製剤の肉眼的変化

*S. aureus* は、接種後 10 時間は生菌数

が変化はしなかったが、その後 4 株ともに増殖した。(図 2f)。3 株は 10 - 24 時間に著しい増殖期があり、生菌数が  $10^8$  CFU/ml に達したが、その後は変化しなかった。増殖の遅かった 1 株(strain 2)は BHI broth 中でも他の 3 株より遅く、全株を通じて、血小板製剤中での増殖パターンは、BHI broth 中での増殖パターンとよく類似していた。4 株ともに、生菌数が  $10^8$  CFU/ml に達する頃から製剤中にフィブリンと考えられる白い凝集塊の形成が肉眼的にも明らかにわかるようになり、残りの液は透明化した(図 3d)。*S. epidermidis* は、*S. aureus* の様な著しい増殖期はなかったが、接種後早期から増殖し続け、50 時間後には *S. aureus* と同様  $10^8$  CFU/ml に達した(図 2g)。製剤の肉眼的変化は認められなかった。*S. aureus* の方が *S. epidermidis* よりも増殖スピードがやや速かったが、BHI broth の場合と同様であり、菌種による差と考えられる。

## 4. 考察

血小板製剤の保管条件下での製剤中の細菌の増殖特性は、特にグラム陰性桿菌において同一菌種内であっても菌株間で大きく異なることが明らかになった。同一菌種の場合、細菌用培地中での増殖には差がなかったため、各菌株の増殖能そのものに大きな差はないと考えられる。しかし血小板製剤に接種した場合、同一 lot. の製剤であるにも関わらず、一方は著しく増殖しもう一方は数時間以内に死滅するというほどに結果が異なったことから、製剤中の何らかの因子が、菌株毎に異なる影響を与えるもの

と考えられる。つまり、血小板製剤中でのこれらの菌種の増殖特性に一定の傾向を見出すことは困難である。しかし、増殖できない菌株が存在するとはいえ、病原性の強さを考えるとグラム陰性桿菌は非常に注意すべき細菌である。参考までに、当院の敗血症患者を発症前後の血小板輸血歴の有無で分け、血液培養からの分離菌種内訳を調査した結果、両者とも分離菌種は上位から腸内細菌（中でも *S. marcescens* が1位、*E. coli* が2位）、次いで *P. aeruginosa* を代表とするブドウ糖非発酵グラム陰性桿菌であり、さらに、血小板輸血歴のない患者（264人）に比べ、輸血歴のある患者（192人）の方が、分離される菌種の数少なく、上位菌種の占める割合が有意に高いことがわかった。この結果は患者背景、基礎疾患は考慮しておらず、また輸血と敗血症の直接の因果関係を示すものではないが、血小板輸血を必要とする患者においてこれらのグラム陰性桿菌がより大きく関与するということが示唆される。

一方、グラム陽性菌においては、製剤中でよく増殖し、同一菌種内の菌株間で大きく異なることはなかった。全体的に細菌用培地中での増殖パターンと類似しており、

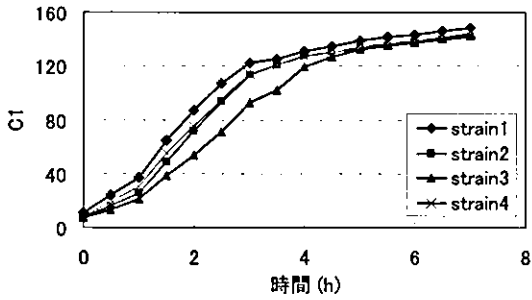
血小板製剤中の因子がこれらの細菌の増殖に与える影響は少ないと考えられるので、製剤中の細菌の増殖をパターンにより検出する事が可能であると考えられる。また、今回使用したような環境や皮膚に生息する細菌種が万一製剤中に混入した場合、非常によく増殖し得るということが明らかになったので、汚染を防ぐことが重要であり、採血時の消毒は更に徹底すべきである。

製剤の肉眼的変化が知られている菌種については、同様な変化が異なる複数の臨床分離株に共通して確認されたことから、製剤の目視観察が汚染製剤の発見につながる可能性は大きいと考えられる。

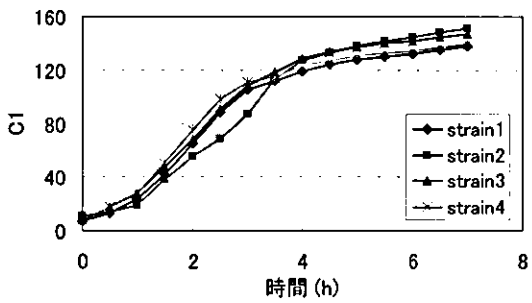
この研究を通して最も明らかになったことは、血小板製剤中の細菌の増殖特性が、菌種だけでなく菌株毎に異なることである。細菌の増殖を検出するにはあらゆる細菌が典型的なパターンでよく増殖する培地で培養する方が確実かと思われるが、抜き取り検査は製剤の一部しか検査できない点で不十分であり、製剤バッグ全体を対象として検出する方法を今後も模索していくべきだと考える。そしてその場合、菌種のみでなく、異なる複数菌株を用いた解析が必要である。

図1 BHI broth 中での増殖

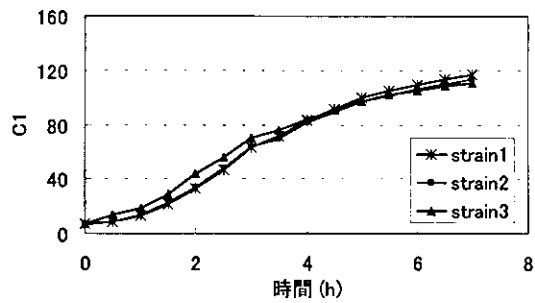
a. *Serratia marcescens*



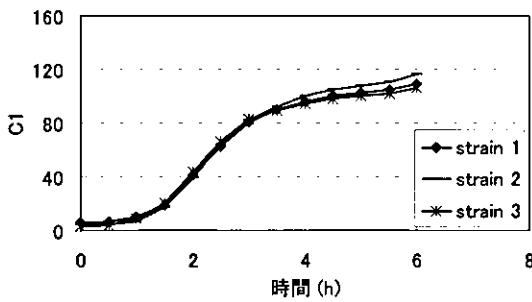
b. *Esherichia coli*



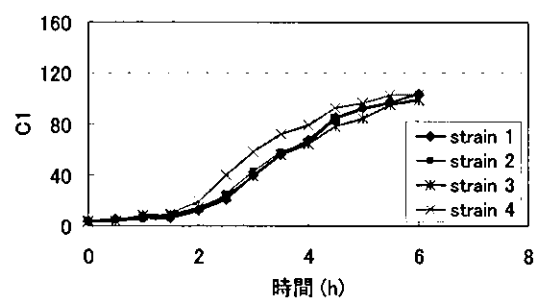
c. *Pseudomonas aeruginosa*



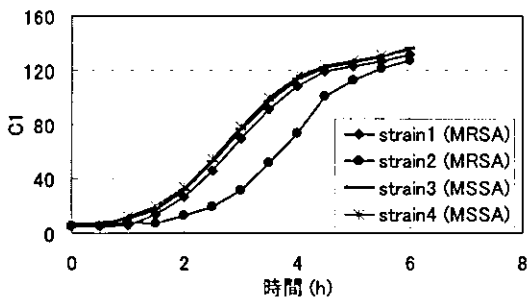
d. *Bacillus cereus*



e. *Bacillus subtilis*



f. *Staphylococcus aureus*



g. *Staphylococcus epidermidis*

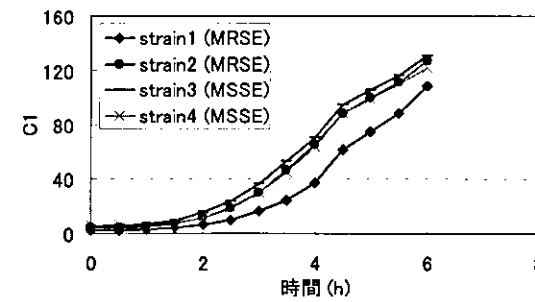
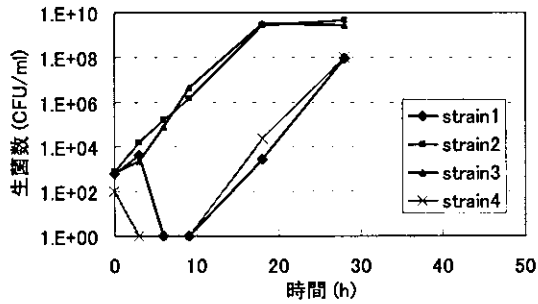
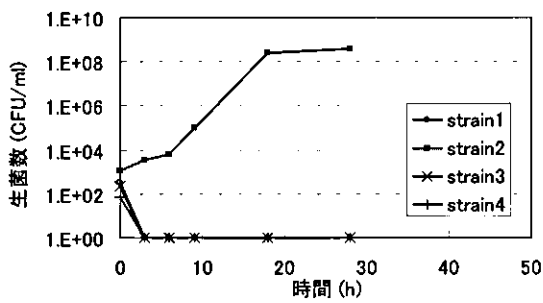


図2 血小板製剤中での各種細菌の増殖

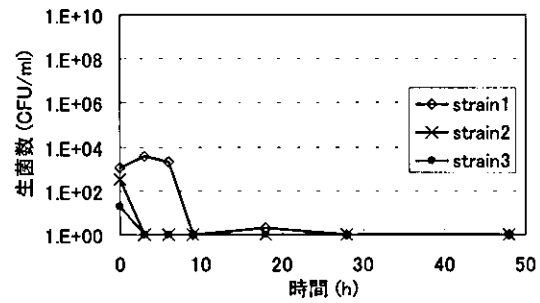
a. *Serratia marcescens*



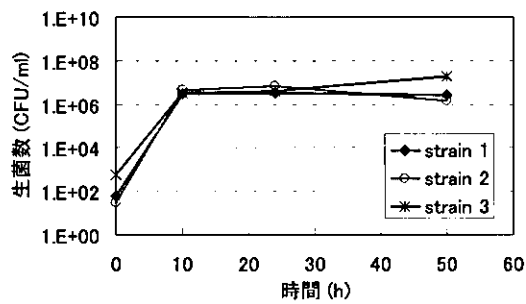
b. *Escherichia coli*



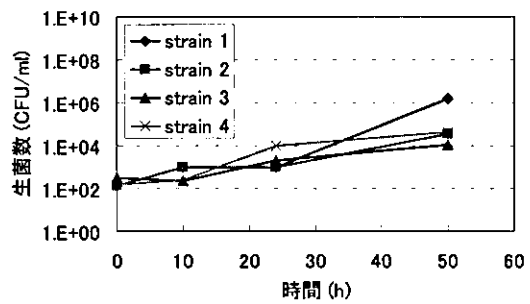
c. *Pseudomonas aeruginosa*



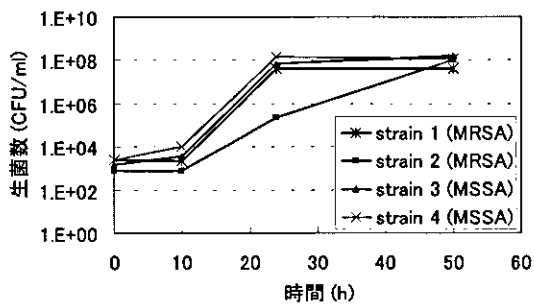
d. *Bacillus cereus*



e. *Bacillus subtilis*



f. *Staphylococcus aureus*



g. *Staphylococcus epidermidis*

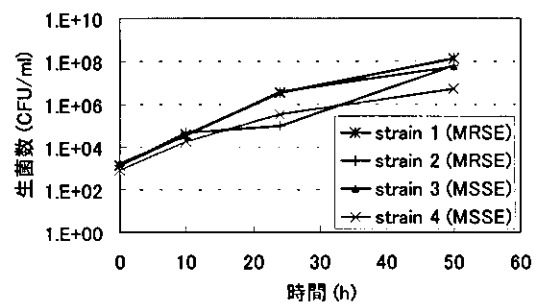
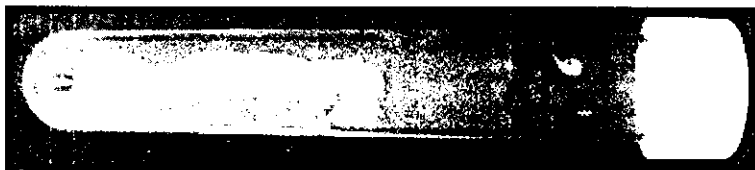


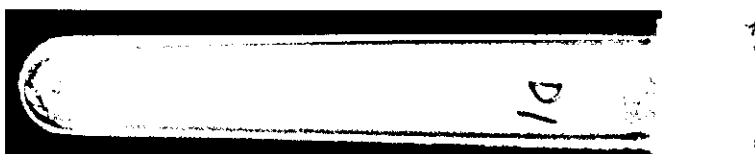


図3 細菌の増殖時にみられた血小板製剤の肉眼的変化

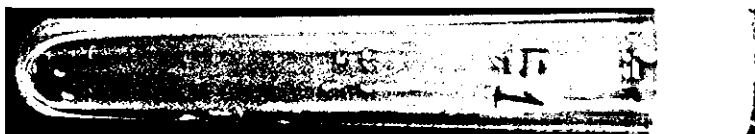
a. *Serratia marcescens*



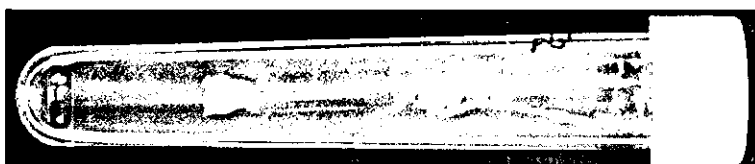
b. *Bacillus cereus*



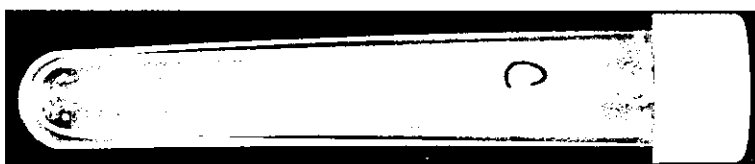
c. *Bacillus subtilis*



d. *Staphylococcus aureus*



e. control



## 平成14-16年度研究総括報告書

### 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

#### 血小板製剤の有効期限延長と安全性確保に関する研究

#### 血小板製剤の有効期限延長に関する血液センターからの視点と問題

分担研究者 佐竹正博 東京都赤十字血液センター 副所長

#### 研究要旨：

血小板製剤（PC）の有効期限延長の問題について、製造供給している血液センターの立場で、3点を研究検討した。

1. 有効期限が3日である現在、とくに1999年のウイルス核酸検査（NAT）導入によって、製剤供給は遅れ気味になってはいるが、センター内での期限切れ増加はもたらしていないことがわかった。しかし、有効期限の残り期間が短いPCが医療機関に供給される実態があるので、有効期限が延長されれば、供給業務と医療機関の両者にもたらされるメリットは大きい。
2. 採血の際の初流血除去による皮膚プラグと細菌混入回避の可能性についてイヌを用いて実験研究した。初流血 30mL を取り分ければ十分に細菌の混入を防げることが判明した。さらに、東京都血液センターで展開研究を実施している。
3. 外観試験（色調、凝固・凝集の有無、スワーリング、臭気、異常ガスの有無）が血液センターと医療機関において有用であるかを、5種の細菌をPCに接種して経時的に観察した。多くの細菌は接種48時間後には混濁、スワーリングの消失、凝固・凝集の出現が見られた。このときの細菌は $10^7$ – $10^8$ CFU/mLで重篤な症状を引き起こす濃度であった。したがって、外観試験は汚染による最悪の事態を防ぐ意味では価値があるものと考えられる。画像化などして血液センターや臨床現場に供えておくことも一法であろう。

#### 1. 研究の背景と目的

血小板製剤（PC）の有効期限を延長するというテーマについて、これらの製剤を製造供給している血液センターの側か

らの問題点を検討した。1) 有効期限が3日である現時点で、血液センターの製造供給体制にどのような負荷がかかっているか、血液センターにとって期限が延

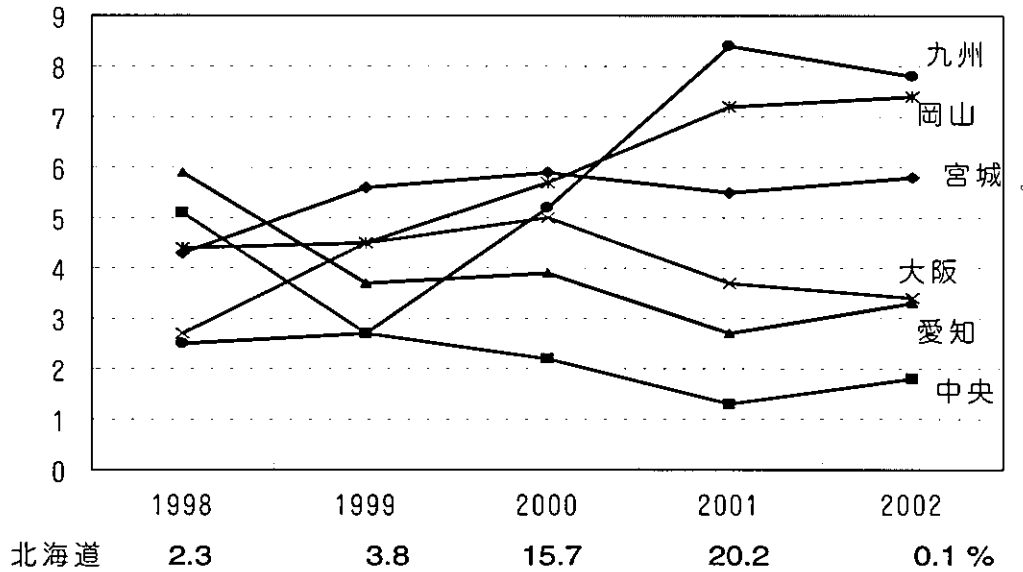
長されるメリットがあるか、2) 有効期限を延ばす上で安全性の点で最も危惧されるのは、PC中の細菌の増殖である。細菌汚染を検出する方法には培養法などがあるが、簡便で導入しやすい方法として、初流血除去法の効果はどの程度のものであるか、3) さらに、万一細菌の汚染が起こった場合、これを外観試験で防ぐことができるか、の3つの側面から検討した。

## 2. 血液センターでのPC供給の時間的制約について

1999年にHBV、HCV、HIVについて核酸増幅検査が導入され、ウイルスに対する安全性は向上したが、一方製剤の供給が遅れ気味となっている。これによりPCのセンター内での期限切れが増加していないかどうかを調べたが、そのような傾向がNAT導入後顕著になった兆候はまったくみられなかった。これに対し、血液センター間での製剤の需給調整が頻繁に行われるようになったことが見出された。元来PCは血液型、単位数などの違いから多くの製剤品目があるうえ、採血数も全血より少ない。このため採血数の特別多いところを除いては、不可避的に型、単位数による偏りが生じ、血液センター間で必要製剤を授受調整しなければならない。いっぽう全国3箇所にあるNAT

センターにその日の内に検体を送らなければならないため、郊外や非都市部でPCを採取するとNATに間に合わなくなる可能性がある。このため、PCは大都市で採取されて遠隔地の血液センターへ、さらにその管内の医療機関へ輸送されるようになった。とくに北海道などで顕著にみられる。すなわち、PCをNAT施行下で3日間の有効期限で供給するには、血液センターの地理的条件により、センター間の採血の分業化(例えばNATセンターへの搬送に都合の良い地域でのみPCを採取するなど)、品目別の偏りを解消するための供給の広域化、ひいては血液センターの業務集約などが必要となってくるといえる。しかしながらこれらの対策には限度があるのは明かで、有効期限の残りの少ないPCが医療機関に供給される実態はあまり改善されない。日赤内での検討においても、あと1日有効期間が延びるだけで供給業務に大いに余裕が生ずることが示唆されている。一方、医療機関においても期限の残り少ない製剤の供給を受けることは歓迎されないのは当然のことである。さらに、頻繁・長時間のPCの輸送は、保管温度・振とう条件などの点から品質の維持にとっても望ましいものではない。これらの点において、PCの有効期限が延長されることは利点の多いことといえることができる。

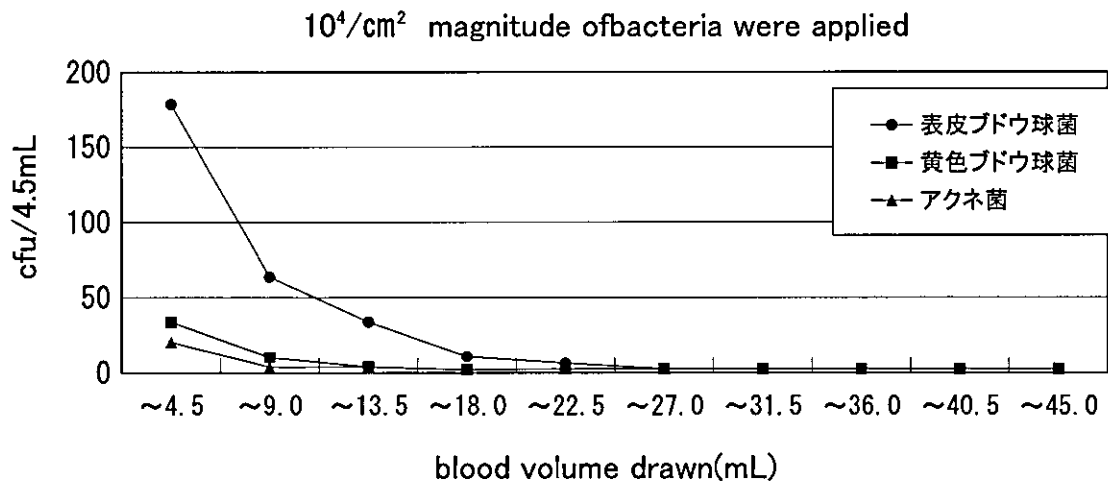
## PC受入れ率



### 2. 初流血除去の効果

採血の最初に流出してくる血液中には、皮膚を穿通した際に皮膚に存在していた細菌が混入している可能性が高い。これを側副の回路に取り分けてから本採血をする方法である。イヌの頸部に細菌を塗布し、そこを穿刺採血する実験を行って、最初の 30mL を取り分ければ十分に細菌の混入を防げることがわかった。またこの方法を成分採血回路にとり入れて通常の献血業務に導入できることもわかった。当然ながらこの方法では菌血症の状態の献血者からの細菌混入を防ぐことはできない。しかしながら、アメリカ合衆国の最近の BaCon study の結果をみる

と PC の汚染は、赤血球製剤の汚染が献血者の血液に由来するものの方が多いのに比べて、皮膚常在菌によるもののほうが多いとの結果が出ている。したがって、PC の採取にこれを導入する効果はあるものと期待できる。ただ、日本では元来 PC の細菌汚染の頻度が低いので、これを導入した効果が数字として示すことができるまでには相当の数の採血を検討しなければならないだろう。現在東京都血液センターで、従来法と初流血除去法とを全血採血に導入して、バッグ本体の汚染度を培養法によって比較検討している。



### 3. 製剤の外観試験の効果

最も簡便な PC の細菌汚染の検出方法は、その色、凝固・凝集の有無、スワーリング、臭気、異常ガスの有無などをチェックする外観試験である。これは血液センターだけではなく、輸血を行う直前にも励行すべき手技である。これまで汚染の原因として挙げられてきた代表的な細菌を PC にスパイクし、外観の変化を時間の経過とともに追った。多くの細菌は 48 時間後には、混濁、スワーリングの消失、凝固・凝集の出現などが見られるようになった。このとき製剤中の細菌濃度はほとんどが  $10^7 \sim 10^8$  cfu/mL で、臨床的に重大な症状を引き起こす濃度である。したがって外観試験は製剤の細菌検出と

しての感度は低いですが、汚染による最悪の事故を防ぐという意味では価値があるものといえる。また、その外観を典型的な例として映像化、または画像化して、血液センターや輸血の臨床の現場で参照できるようにするのも一法と考えられた。

#### 血小板製剤(PC)の細菌汚染による外観の変化

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

#### 4. まとめ

当班員の分担は、血液センター側からみた PC の有効期限延長の実現可能性である。現在の血液センターにおける PC の製造供給状況は、3 日という有効期限のなかでぎりぎりの調整管理をしているものであり、有効期限延長のもたらすメリットは大きいものと考えられる。期限延長によりもたらされるかもしれない大きな障害は PC の細菌汚染であるが、これを少しでも防ぐ現実的な方策として、初流血除去回路の導入がある。その有効性は実験的に確認できた。血液センターでも成分採血回路への導入を計画している。ただ日本の現状でその有効性を数字としてあらわすのは非常に困難である。さらにすぐにでも導入できる方法として、PC の外観試験の励行がある。これにより、感度は低いが最悪の事例を防ぐことはできる。そのためのテキストの整備などが望まれる。

#### 5. 業績

(論文)

1. 松田好美、首藤加奈子、佐竹正博、荒川典雄、田所憲治、十字猛夫：初流血除去回路つき採血バッグによる皮膚常在菌および皮膚片の混入の防止。日本輸血学会雑誌 49：761-766, 2003.
2. Satake Masahiro: Infectious risks associated with the transfusion of blood components and pathogen inactivation in Japan. International Journal of Hematology 80: 306-310, 2004.

平成14-16年度研究総括報告書

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

「血小板製剤の有効期限延長と安全性確保に関する研究」

血小板保存に伴う損傷、及び血小板機能の評価

分担研究者 尾崎 由基男 山梨大学医学工学総合研究部 臨床検査医学講座 教授  
医学部付属病院輸血部

研究要旨：

日赤濃縮血小板血漿の保存期間中の血小板機能を評価した。多血小板血漿の保存開始2日目より、ADPによる血小板凝集は低下したが、中濃度コラーゲンによる血小板凝集能は7日まで保たれていた。高ずり応力により血小板凝集能はコラーゲンと同様な傾向を示した。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、5日目では軽度であったが、7日目には優位に増加した。血小板マイクロパーティクル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するが、評価項目によりその程度が異なることが示唆された。コラーゲン凝集では比較的長期血小板機能は維持されるが、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は早期に増加した。

次に血小板機能保持を延長する試みを行った。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、GPIb $\alpha$ 、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GPIb $\alpha$ 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

1) 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、 $\alpha$  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マイクロパーティクル産生 (microparticle formation; MP) 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したものである。

2) 我々は、上記の平成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き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  $\alpha$  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  $\alpha$  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が示唆される。これらの結果をふまえ、我々は今回 MMP 阻害剤により 血小板のアポトーシス様変化が抑制できないかどうか、保存期間中の血小板機能低下が軽減できないかどうかの評価を平成16年度研究と



して行った。

## B. 研究方法

### 研究1 (平成14, 15年度)

日赤血液センターより入手した濃縮血小板血漿を使用した。通常、成分採血した濃縮血小板血症であり、1バッグあたり10単位の血小板血漿を含む。肝機能異常、不規則抗体等で検査落ちしたものを採血後2日目より評価した。血小板は20℃振盪の通常血小板保存条件下に置く。以降2日、5日、7日、10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GPIIb、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。

### 研究2 (平成16年度)

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GM6001 25 $\mu$ M (GM(+))、残りの一本(GM(-))に溶媒のみを1日一回添加した。通常血小板保存条件下(20℃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GPIIb $\alpha$ 、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

### 研究1

#### 1)血小板凝集

採血後2日目より、10 $\mu$ M ADP惹起による血小板凝集は低下しており、2次凝集を惹起できなかった。7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 $\mu$ g/mlコラーゲンによる血小板凝集は、7日目より軽度の低下傾向を示したが、5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、7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。7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2日目には認めなかったが、5日、7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、5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

前回の検討により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。この分解は高ずり応力により calpain

が活性化され、それにより PECAM-1 が分解されると考えられた。

高ずり応力による PECAM-1 の分解は、2 日目、5 日目では軽度であったが、7 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。

## 研究 2

### 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 GPI b  $\alpha$  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 GPI b  $\alpha$  の発現量は 7 日目まで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

### 研究 1

保存期間中の日赤濃縮血小板血漿の血

小板機能を評価するためには、ADP 刺激血小板凝集能は 2 目にしてすでに 2 次凝集が惹起できず、ではその低下が急速すぎ、不適當と思われた。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 7 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。

前回の研究と同様、今回の研究でも、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だし

た。

前回の研究と異なり、今回は実際に日赤から供給される濃縮血小板血漿を用いて保存期間中における血小板機能検査を行ったが、結果的には前回の実験室で作成した多血小板血漿を保存した結果とほぼ同様であった。血小板機能は採血後5～7間ではコラーゲン凝集、高ずり応力により凝集で判定する限りは保持されると考えられる。

#### 研究2

GPIbはGPIb $\alpha$ 、GPIb $\beta$ 、GPIX、GPVから成るヘテロ複合体であり、血小板の保存中にGPIb $\alpha$ 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 $\alpha$ 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A<sub>2</sub>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。

## E. 結論

### 研究1

濃縮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7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、5日目では軽度であったが、7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。

### 研究2

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 $\alpha$ 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. 研究業績

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. *Cyto metry* 48: 194-201, 2002
2. Kaneko, M., Cuyun-Lira, O., Takafuta, T., Suzuki-Inoue, K., Satoh, K., Arai, M., Yatomi, Y., and Ozaki, Y. Mechanisms of platelet retention in the collagen-coated bead column. *Journal of Clinical and Laboratory Medicine*, 1 42, 258-267, 2003
3. Satoh, K., Yatomi, Y., Osada, T., Takeda, S., Tsuruguchi, N., Kubota, F., and Ozaki, Y. Clear visual detection of circulating platelet aggregates in acute myocardial infarction using a flow cytometer equipped with an imaging device. *Platelets* 15, 61 -62, 2004
4. Naganuma, Y., Satoh, K., Yi, Q., Asazuma, N., Yatomi, Y., and Ozaki, Y. Cleavage of platelet endothelial cell adhesion molecule-1(PECAM-1) in platelets exposed to high shear stress. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2,1998-2008, 2004
5. Takano, K., Asazuma, N., Satoh, K., Yatomi, Y., and Ozaki, Y. Collagen - induced generation of platelet-derived microparticles in whole blood is

dependent on ADP released from red blood cells and calcium ions. *Platelets* 15, 223-229, 2004