厚生労働科学研究費補助金平成１４～１６年度総合研究報告書
(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」

保存期間が濃厚血小板製剤機能に与える影響－ずり応力下血栓形成能を用いた評価—

分担研究者　宮田茂樹　国立循環器病センター輸血管理室　医長

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（若しくは７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を評価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。まず、ずり応力下血小板血栓形成のメカニズムについて詳細に検討をおこなった。次に、これらの基礎的検討を踏まえ、濃厚血小板製剤機能に保存期間の与える影響について検討した。血小板輸血療法を in vitro にて模倣するために、対象血小板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/μl、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。これら検体について、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なる。

今回、我々は測定系確立のために、流動状況下血小板血栓形成のメカニズムについて詳細に検討を行った。

さらに、これらの基礎的検討を踏まえ、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平行板型フローチャンバーを用いずり応力下血小板機能評価系で検討した。

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（メパクリン）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 μg/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うけた。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/μl、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観察した。

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から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 μg/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（メパクリン）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観察した。

C. 研究結果

1) ずり応力下血小板血栓形成過程

平行板型フローチャンバーを用い生理的血流存在下（流動状況下)、すなわちずり応力下血小板血栓形成のメカニズムを以下のように明らかにした（figure 1)。①血管傷害部位において、血液中の vWF 分子が露出された血管内皮下組織に結合し、内皮下組織中 vWF と合わせて徐々に血栓形成部位の vWF 密度が上昇していく。引き剥がそうとするずり応力に対抗できる以上の vWF 密度になると血小板が血管障害部位で GPIb と vWF A1 ドメインの反応を通して rolling をおこす。②この

rolling 過程は、vWF−GPIb 反応による inside-out シグナルをもたらすとともに、コラーゲンと GPVI、GP Ia/IIa との反応に充分な時間を与え、GPVI とコラーゲンの反応を中心に inside-out シグナルを GPIIb/IIIa の細胞内ドメインを介して伝達し、GPIIb/IIIa のリガンドに対する親和性を上昇させ、vWF、フィブリノーゲン等の2価以上のリガンドが結合する。③GPIIb/IIIa に2価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。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 GPIb 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。⑤最後に、血小板血管内腔側の GP IIb/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 GP IIb/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) 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）±15,236（1 S.D.）/μl, 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±7487/μl、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 2 に示す（血栓の高さが中央値を示した実験の像を代表像として示した）。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±0.9 μm (n=11)であり（figure 6: 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±3.0 μm (n=11)であった（figure 6: 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（$p<0.05$)。

3) 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/μl 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/sの比較的高ずり速度下で、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観察した。1日保存血小板製剤では（figure 3上段)、正常コントロールであるPRP加再構成血(figure 2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 3：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 4：上段)、7日間保存(figure 4：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/μl, n=1）の最終血小板血栓の高さは、18.8. μmであり（figure 6: 1 day)、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。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±8,000/μl, n=3)、5日間保存血小板製剤（最終血小板濃度155,500±12,400/μl, n=6)、7日間保存血小板製剤（最終血小板数 154,800±9,400/μl, 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±5.54 μm（figure 6: 3days)、5日間保存で 10.3±0.59 μm（figure 6: 5 days)、7日間保存で 7.0±0.82 μm（figure 6: 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 6)。

4) 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A_2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 5）。

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 4:下段 vs Figure 5）。このことより、長期保存により濃厚血小板製剤中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た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 I_2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おこり、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、正常健常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。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、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℃保存を可能とすることで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

- 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。
- 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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 関連する発表論文

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.

5) Ohto H. and Miyata S.: Evaluation of stored platelets. Vox Sanguinis 2004; 86:209-211.

6) 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.

7) 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.

2. 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) Miyata S. Network computer-assisted transfusion management system for accurate unit-recipient identification at the bedside. American Association of Blood Banks 2003 Annual Meeting (Educational Program). San Diego, U.S.A. 2003.

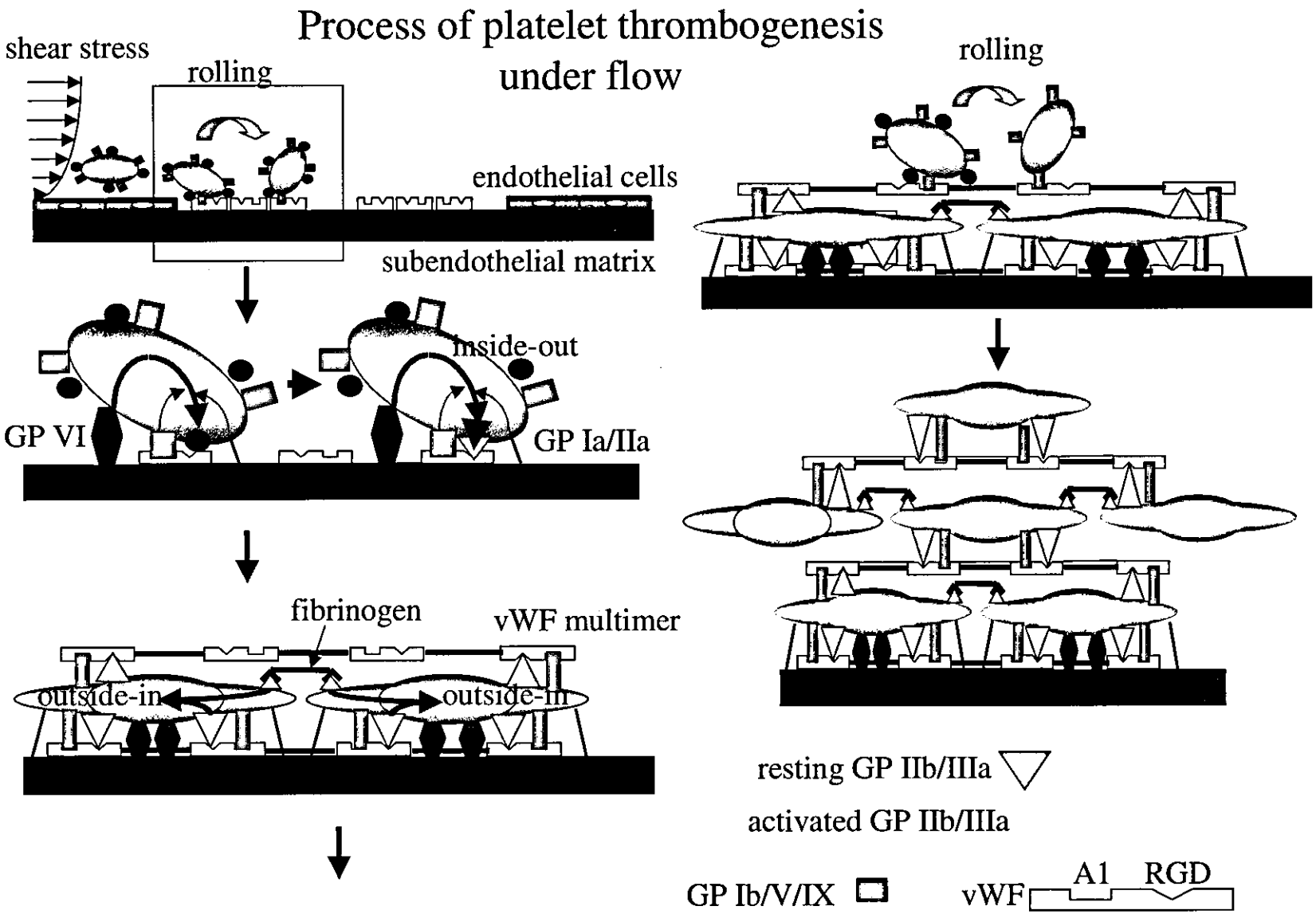
3) 山本賢、吉村尋典、岩谷泰之、河合健、大戸 斉、柴田 弘俊、宮田茂樹:保存期間が濃厚血小板製剤の機能に与える影響－ずり応力下血栓形成能を用いた評価－. 第 52 回日本輸血学会総会. 札幌、2004

4) 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

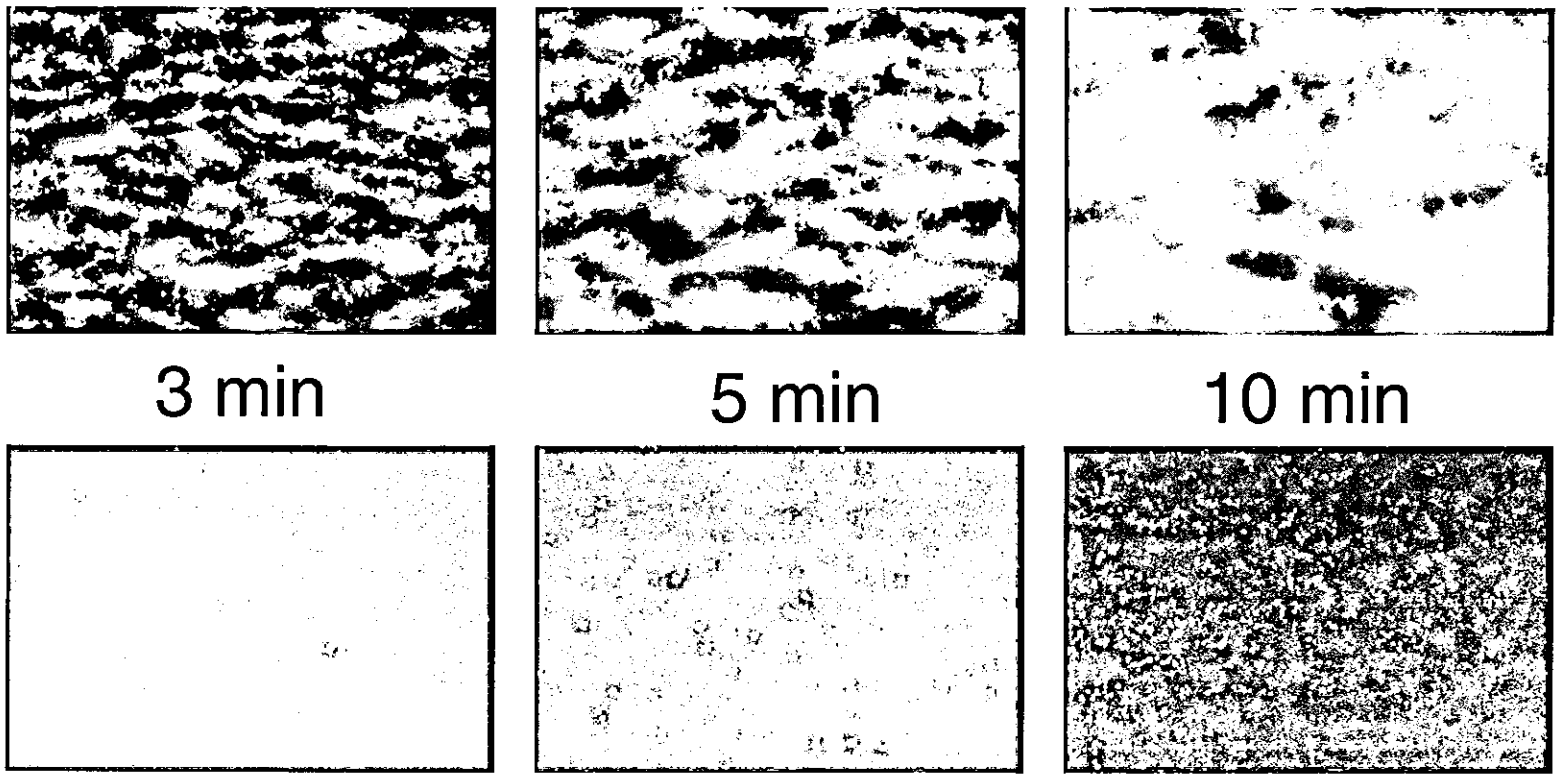
5) 宮田茂樹:血小板機能から見た血小板輸血とその適応. 第 23 回日本臨床化学会夏期セミナー. 鹿児島、2004

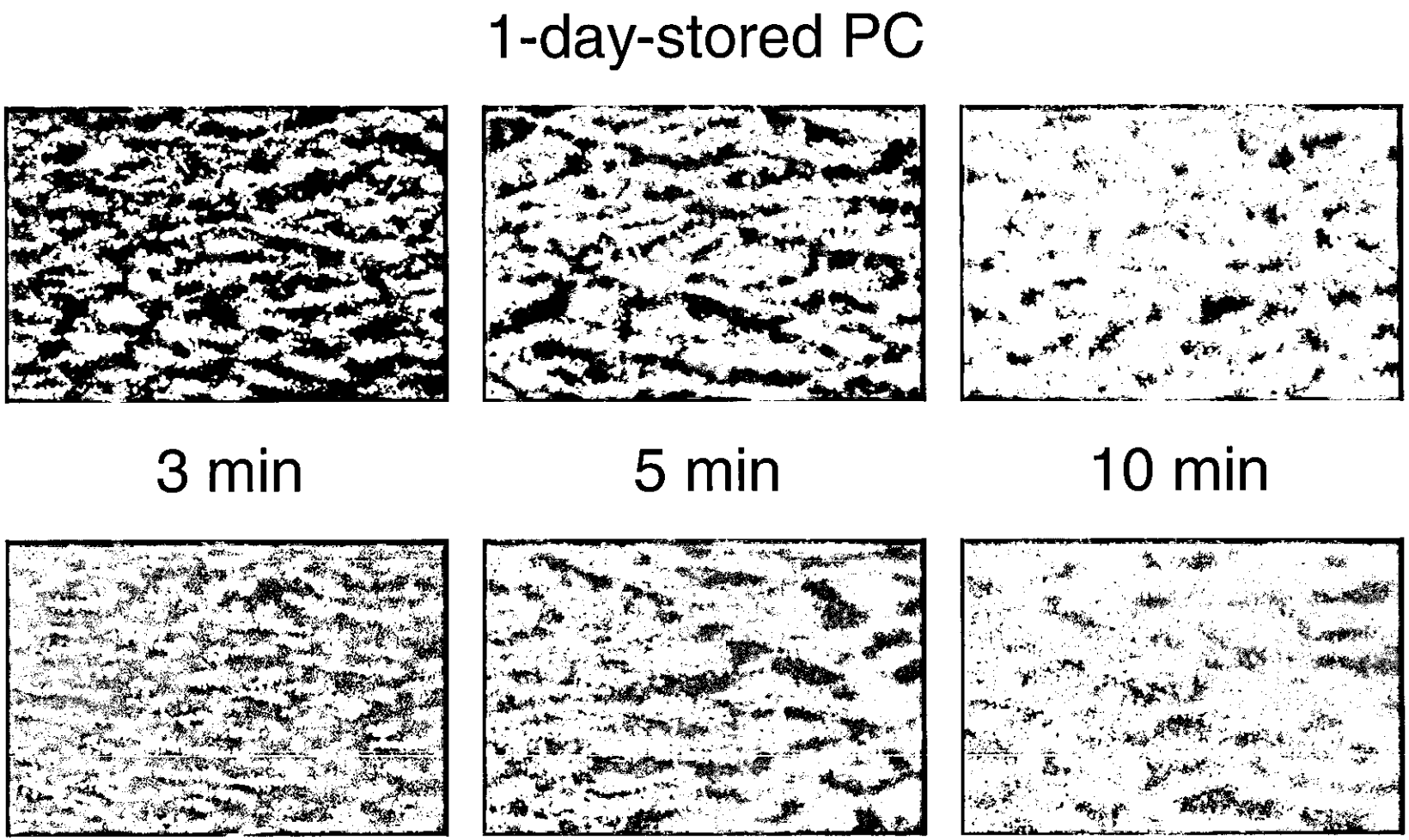
H. 知的所有権の取得状況

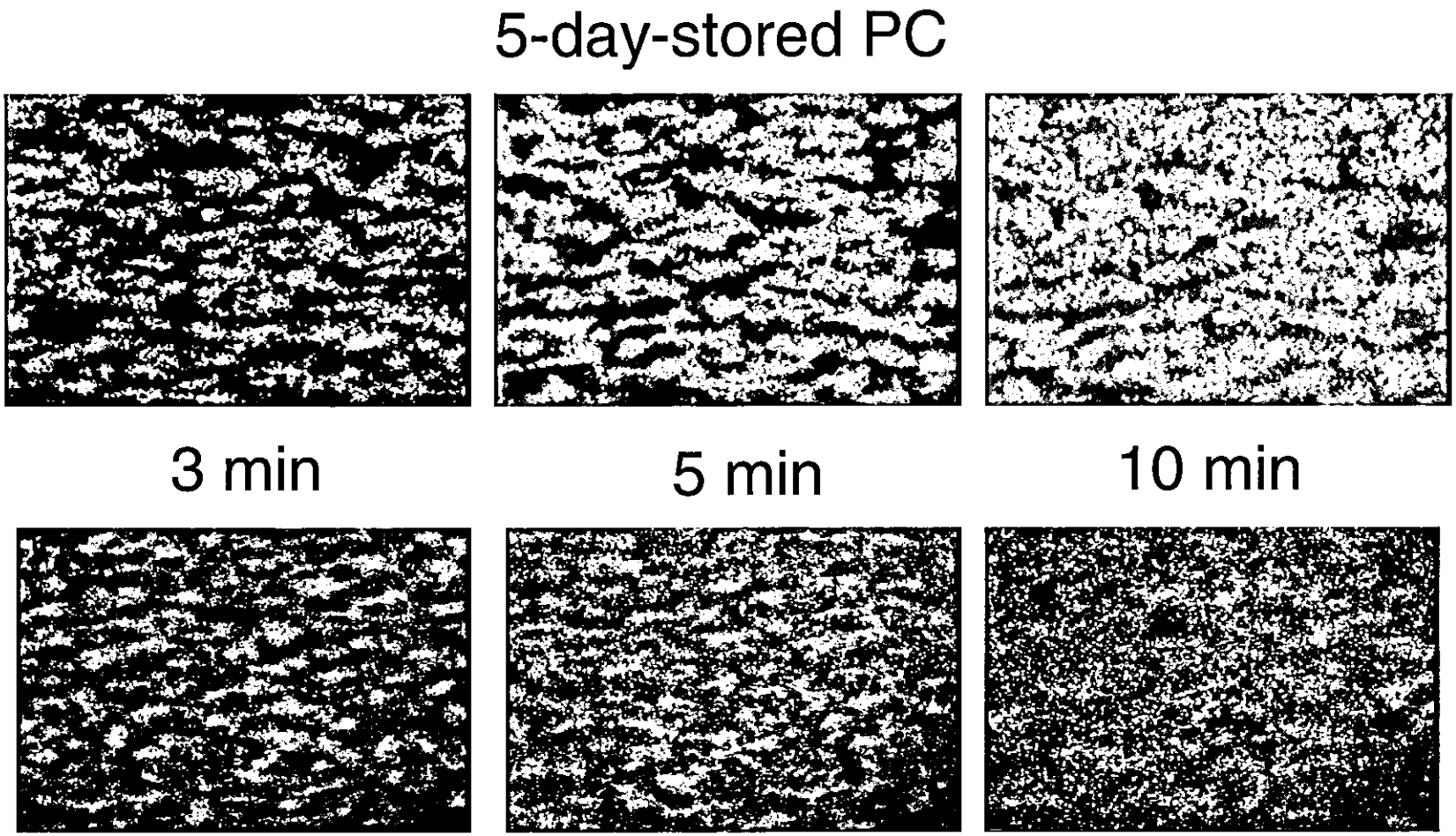
1. 特許取得
   現在とのころなし
2. 実用新案登録
   現在のところなし
3. その他
   現在のところなし


Process of platelet thrombogenesis under flow
shear stress
rolling
endothelial cells
subendothelial matrix
inside-out
GP VI
GP Ia/IIa
fibrinogen
vWF multimer
outside-in
outside-in
rolling
resting GP IIb/IIIa
activated GP IIb/IIIa
GP Ib/V/IX
vWF
A1
RGD

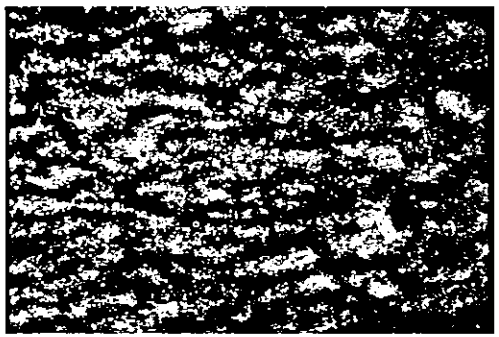
Time-course images of platelet thrombus growth under shear stress conditions



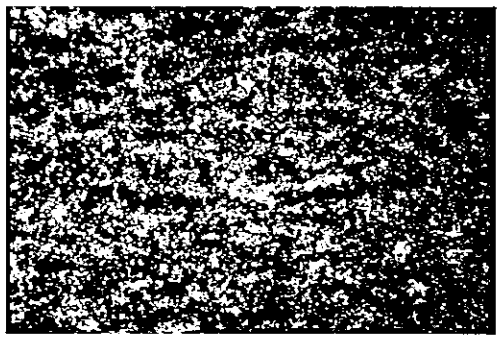

1-day-stored PC
3 min
5 min
10 min
3-day-stored PC


5-day-stored PC
3 min
5 min
10 min
7-day-stored PC

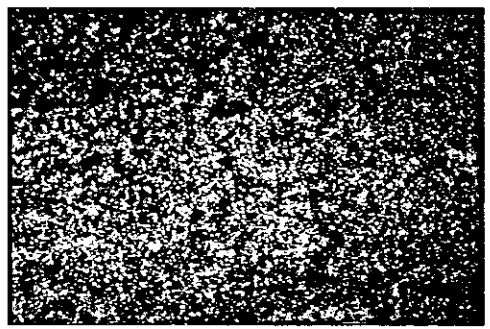
Whole blood drawn from a patient
treated with aspirin 1T(100 mg)/day



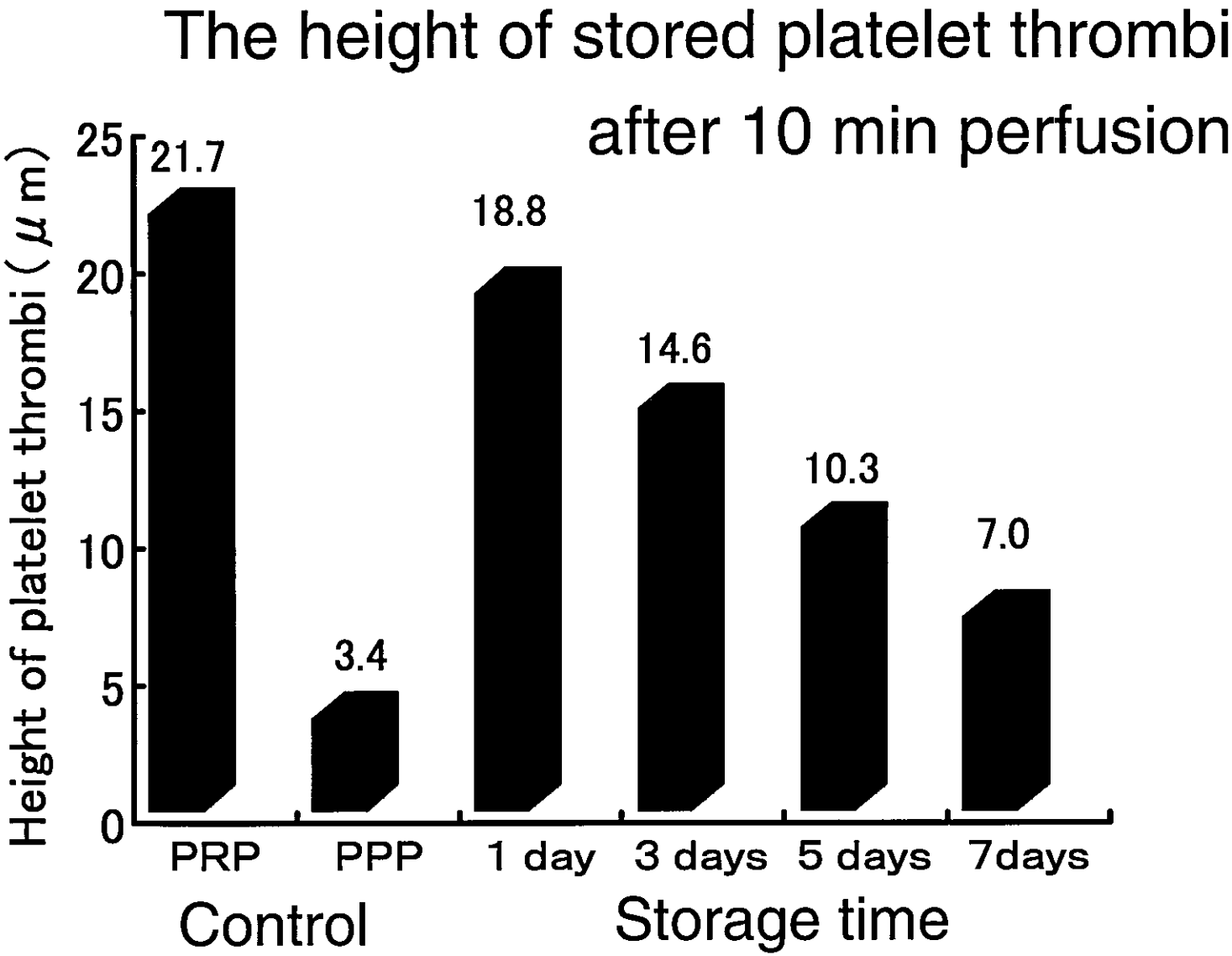
3 min



5 min



10 min


The height of stored platelet thrombi after 10 min perfusion
Height of platelet thrombi (μm)
25
20
15
10
5
0
21.7
3.4
18.8
14.6
10.3
7.0
PRP
PPP
1 day
3 days
5 days
7days
Control
Storage time

平成１４－１６年度研究総括報告書

厚生労働省科学研究費補助金
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
(H16－医薬－073)
(H15－リスク－025)
(H14－医薬－016)

主任研究者：大戸　斉　教授　福島県立医科大学　輸血・移植免疫部

高酸素透過性バッグを用いた高単位血小板製剤の長期保存

主任研究者：大戸　斉　教授

福島県立医科大学輸血・移植免疫部

研究要旨:
日本で新たに血小板保存用として開発した血小板保存用高ガス透過性バッグ（PO-80）は高単位（20単位）血小板製剤を機能的に安定して室温振盪長期（７日～９日間）保存が可能であることを見いだした。PO-80バッグで保存すると血小板の機能と生化学的マーカー（平均血小板容積、血小板凝集能、低浸透圧回復率、pH変化、グルコース消費/乳酸産生、血液ガス分圧pO2/pCO2、swirling、P-selectin発現率など）が長期に亘って良好に維持された。酸素透過性が良好なため、好気性代謝が維持され、反面嫌気性代謝は抑制され、乳酸生成は最小に抑えられるので、pHは安定して血小板機能・形態・表面マーカーが良好に保持されるためと解される。このバッグの性能は日本で市販されているバッグや米国で７日間保存のライセンスを得ているバッグよりも優れていたことから、成分採血由来高単位血小板製剤を９日間保存の可能性にもおよんできた。細菌混入した場合の問題をクリアできれば、血小板製剤の安定的供給に寄与するであろう。

A. 研究の背景と目的

輸血用血小板製剤の有効期限は日本では３日間に限定されているが、世界的には５日で、さらに７日間に延長させようという流れになっている。実際、欧州では細菌混入検査を施行した製剤は７日に延長した国・地域が現れている。

日本を含め、多くの先進国では急速な高齢人口の増加によって輸血用血液製剤の需要が増加し、日本では需給バランスの破綻が予測されている。さらに日本ではウイルス核酸検査（NAT）が1999年から導入され、実質的な有効期限は1.5～２日程度と短く、血小板製剤の供給は大変厳しい。特に重症患者で使用されることの多い血小板製剤の供給不足が発生すれば深刻な問題となる。

室温振盪保存技術の開発、ポリオレフィン保存バッグの開発、アフェレーシス由来血小板の導入によって血小板製剤の長期保存と品質の改善が進んできた。

保存に伴う血小板機能の劣化は振盪保存技術の確立と保存バッグの酸素と二酸化炭素とのガス透過性を向上させることによって改善されてきた。両技術によって保存バッグ内への酸素供給を増加させて、血小板の嫌気性代謝を抑制し、乳酸産生を抑え、その結果メディウムpHが至適に維持され、血小板機能は良好に保たれる。

我々は血小板製剤の有効期限延長を目的として、さらに酸素透過性を亢進させた新しいポリオレフィンバッグを開発した。このバッグを用いて長期保存血小板の機能と形態評価して、これまでの既存市販バッグよりも血小板機能を良好に保持できる可能性を報告してきた。

本研究では、日本で開発された高酸素透過性バッグPO-80を用いて、１）高(20)単位と通常(10)単位血小板製剤の保存性（初年度）、２）高単位血小板製剤の７日間保存性（二年目）、３）高単位血小板製剤の９日間保存性（三年目）を検討してきた。初年度は市販日本製品（C3553）との比較を、2年次と3年次は世界的に最も汎用されている外国製品バッグ（PL2410）との比較評価を行った。

B. 研究材料及び方法

1）血小板採取

血小板は自動成分採血装置（Amicus, Baxter社又はSpectra, Gambro社）を用いて、同意の得られた健常人よりアフェレーシスにより20単位相当（平均4×10^{11}cell）、または10単位相当（平均2×10^{11}cell）を採取した。採取後、同一血液型２名分を一旦プールし、高酸素透過性バッグ（PO-80）と対照バッグに等量に分割した。室温にて最長９日間水平振盪保

存し、製剤直後、保存1日目、3日目、5日目、7日目、9日目に経時サンプリングを行って、比較評価した。

2) 血小板保存バッグ

国内で開発された高酸素透過性血小板バッグ PO-80（800mL容量（初年度）、1,000mL 容量（2年次3年次)、川澄化学工業)と対照バッグとしてC3553(1,000mL容量、川澄化学工業）(初年度)、またはPL2410（1,000mL容量、Baxter, 米国）(2年次3年次）を用いて比較評価した(Table 1)。

3) 血小板機能の評価項目

① 血小板数及び平均血小板容積(MPV)

血小板数と平均血小板容積はサンプル500μLを生理食塩液にて10倍希釈して、多項目自動血球成分計測機（Sysmex, K-2000）を用い測定した。

② swirling と凝集塊の肉眼的観察

swirling パターンはバッグ全体を蛍光灯に照らし、バッグ下側から観察した。swirlingが良く観察可能なもの 2+、減弱しているもの1+、全く観察されないもの0と3段階評価した。同時に凝集塊の有無についても肉眼的に観察を行った。

③ pH 及び血液ガス(pO_2/pCO_2)測定

pHと血液ガス分圧(pO_2/pCO_2)は血液1mLが残ったシリンジをpH・血液ガス分析装置（ABL3, Radiometer, Copenhagen, Denmark）に装着して測定した。

④ 血小板凝集能測定及び低浸透圧ショック回復率(%HSR)測定

まず、サンプルは注射器で採取した血小板サンプル2mLを測定検体中の血小板数が、約3.0×10^5 cell／μLとなるように、凍結(-40℃)保存しておいたサンプルと同一の血漿を用いて希釈調整を行った。

血小板凝集能は惹起試薬（ADP 5 μmol/L+コラーゲン 5μg/mL）で希釈し、ヘマトレーサー212 (PAC-8L, MC Medical)で測定を行った。

低浸透圧ショック回復率（%HSR）はサンプルベースライン($\%T_0$)及び最大透過率（%Tmax）を分光光度計610nm（UVIDEC, Jasco）で測定し、$\%HSR=100\times(\%Tmax-\%T_0)/(\%T_{300}-\%T_0)$の計算式で算出した。

⑤グルコース及び乳酸

血漿中の濃度を標準酵素活性で測定した。

⑥P-セレクチンの測定

血小板活性化マーカーであるP-セレクチンの測定は1%ﾊﾟﾗﾎﾙﾑｱﾙﾃﾞﾋﾄﾞ/0.1%NaN3を含むPBS固定液でサンプルを固定後、2%牛胎児血清ｱﾙﾌﾞﾐﾝ/0.1%NaN3 を含む PBS染色液で染色し、各抗体で染色し、フローサイトメトリー測定機器（FACSCalibur, BD Biosciences）で測定を行った。

⑦ 細菌混入試験(一般細菌／真菌)

9 日目の血小板製剤から 2 つの BACTEC Plus Aerobic/F と Plus Anaerobic/F (BD Biosciences) で細菌培養試験を行った。

C. 結果

① 血小板数及び平均血小板容積(MPV)

10 単位製剤は PO-80 バッグとコントロールバッグ(C3553)間で 7 日間の観察では有意差を認めなかった (データ示さず)。

20 単位製剤の 9 日間保存評価について、血小板数は PO-80 及ぶコントロール(PL2410)両バッグ群において 9 日間変化無く推移した。MPV は PO-80 バッグ群では 9 日目まで変化は見られなかったが、コントロールバッグ(PL2410)群では 7 日目以降値が上昇した (Table 2)。

② スワーリングの肉眼的観察

10 単位製剤は PO-80 バッグとコントロールバッグ(C3553)間で 7 日間の観察では swirling パターンに有意差を認めなかった (データ示さず)。

20 単位製剤の swirling パターンは PO-80 バッグ群ではすべての血小板製剤において 9 日間まで確認された。一方、コントロール(PL2410)群においては保存期間 9 日目に 50%の血小板製剤で swirling パターンが消失した (Table 3)。

③ pH 及び血液ガス(pO_2/pCO_2)測定

pH と血液ガス分圧は 10 単位製剤では PO-80 バッグとコントロールバッグ(C3553)間で 7 日間の観察では有意差を認めなかった (データ示さず)。

20 単位製剤の pH は PO-80 バッグ群では保存 7 日目まですべての血小板製剤で pH 6.2 以上を維持したが、9 日目に 1 例 (1/6) で pH 6.0 を示した。コントロールバッグ(PL2410)群は保存 7 日目で半数において pH 6.2 以下を示し、9 日目においてこの 3 例は各々pH 6.0, 5.7, 5.7 と低い値を示した (Table 3)。

20 単位製剤の血液ガス分圧は、pO_2 が製剤調整直後と比較して、PO-80 バッグ群の 1 日目で約 26%減少したが、その後、1 日目から 9 日目までは安定していた。コントロールバッグ(PL2410)群でも 1 日目に製剤調整直後と比べ 47%減少し、その後、1 日目、2 日目と低値を示し、7 日目以降高値を示す biphasic pattern を示した。pCO_2 は両バッグともに 9 日目まで除々に減少していく傾向を示した (Fig. 1)。

④ 血小板凝集能測定及び低浸透圧ショック回復率(%HSR)測定

10 単位製剤は PO-80 バッグとコントロールバッグ(C3553)間で 7 日間の観察では血小板凝集能と%HSR において有意差を認めなかった (データ示さず)。

20 単位製剤の%HSR 及び凝集能は 7 日目まで両バッグともに緩やかに減少するという同様な推移を示したが、9 日目のコントロールバッグ(PL2410)群では 50%で

著しい減少が観察された（Fig. 3）。

⑤グルコース及び乳酸値

10単位製剤はPO-80バッグとコントロールバッグ(C3553)間で7日間の観察では有意差を認めなかった（データ示さず）。

20単位製剤のグルコース濃度はコントロールバッグ(PL2410)では著しく低下し、顕著な乳酸値の上昇が観察された。一方、PO-80バッグでは2成分の濃度変化はマイルドであった。PO-80バッグ群及びコントロールバッグ(PL2410)群ともに保存期間中におけるグルコース消費量ならびに乳酸の産生量は経時的には逆相関していた（Fig. 2）。

⑥P-セレクチンの測定

20単位製剤において、膜型P-セレクチン発現率は7日目以降、PO-80バッグ群よりもコントロールバッグ(PL2410)群で発現率が高く、9日目ではPO-80バッグ群が平均発現率55%（n=4）に対し、コントロールバッグ(PL2410)群では80%（n=4）と高い発現率を示した（Fig. 4）。

⑥細菌と真菌の測定

細菌培養試験の結果、細菌・真菌の汚染はすべての血小板製剤で検出されなかった（データ示さず）。

D. 考察

現在、血小板製剤は採血後、酸素・二酸化炭素の透過性が充分なバッグに入れられて室温（20～24℃）で1分間約60サイクルの速さで穏やかに平衡振盪して保存されている。振盪を加えないと血小板のエネルギー代謝が嫌気性に傾き、pHが下がり、血小板機能が著しく傷害される。また、血小板の呼吸が充分に行われるためには、血小板濃度が適切であること、保存バッグも適切な表面積を持ち、また、厚さを薄くするなどの条件が必要である。

我々が新しく開発した高酸素透過性バッグPO-80はバッグの表面積を保ちながら厚さを薄くし、さらに材料の配合を変更することにより、より高い酸素透過性を有するポリオレフィンバッグである。現在、世界で市販されている血小板バッグには1) PL2410（ポリオレフィン；Baxter Healthcare、米国）、2) CLX-plastic (PVC；MedSep Corp.，米国）、3) ELP (PVC；Gambro BCT, 米国)がある。その中で酸素透過性が最も良く、世界的に汎用されているPL2410をコントロールバッグとして選択した。

活性化を受けていない血小板は薄い円盤状の形をしているが、日数が経つにつれて球状に変化してくる。この形態の変化は輸血後生存率と最も相関の高い指標であり、円盤状から球状への変化はswirling現象の低下として肉眼的に観察することができる。また、血小板の球状化に伴い平均血小板容積（MPV）が見かけ