

原 著

血小板製剤中ブドウ糖消費量と血小板活性化の関連性

中條 聖子 小田 淳 秋野 光明
山本 定光 池淵 研二 池田 久實

北海道赤十字血液センター

(平成12年7月31日受付)

(平成12年8月28日受領)

RELATION BETWEEN GLUCOSE CONSUMPTION AND PLATELET ACTIVATION IN PCS.

Satoko Nakajo, Atsushi Oda, Mituaki Akino, Sadamitsu Yamamoto,
Kenji Ikebuchi and Hisami Ikeda
Hokkaido Red Cross Blood Center

Glucose is a major source of ATP synthesis in platelets. As activated platelets incorporate glucose more rapidly than resting platelets, we measured the loss of glucose from extracellular media during the storage of platelet concentrates (PCs). Results showed that the loss of glucose from the extracellular media was facilitated by filter treatment or by transient formation of platelet aggregates. Further, statistically significant differences in the loss were noted among PCs prepared using different apheresis devices. Rapid loss of glucose from the extracellular media was often accompanied by platelet shape changes in PCs examined by phase contrast microscopy but not by increased expression of P-selectin on the surface of platelets. Thus, the measurement of loss of glucose from the extracellular media may detect subtle platelet activation in PCs, contributing to our better characterization of PCs prepared with different devices or passed through different filters.

Key words : Leukocyte reduction filter, Apheresis devices, P-selectin, Morphology score

緒 言

濃厚血小板製剤 (platelet concentrate : PC) 中の上清ブドウ糖濃度のモニタリングは一部の細菌による汚染およびその繁殖を検知するスクリーニングに有用である可能性が報告されている¹⁾⁻³⁾。一方で、血小板は豊富にグルコーストランスポーター3を発現し、未刺激状態でもブドウ糖を消費し、この消費量は血小板活性化に伴い増加する⁴⁾⁻⁶⁾。取り込まれたブドウ糖は主にアデノシン3リン酸(ATP)産生に使用されている⁷⁾。このようなエネルギー代謝の基質としてブドウ糖以外にも脂肪酸などが知られており、上清中から消失(消費)したブドウ糖の全てがATP産生に使われて

いるとは限らないが、ブドウ糖消費量と血小板内のATP含有量に関連がある⁸⁾ことが報告されており、上清中のブドウ糖消費量は、血小板の活性化やエネルギー代謝の状況を反映していると思われる。

保存や白血球除去フィルター処理などに伴う製剤中の血小板の性状を推定するために多くの指標(上清βトロンボグロブリン濃度⁹⁾、血小板膜表面上のPセレクトイン発現率¹⁰⁾、形態スコア¹¹⁾等)が用いられている。そこで、血小板の性状を示すマーカーとして用いられている%discs及びpセレクトイン発現率とブドウ糖消費量の関係を調べ、血小板採取機種や白血球除去フィルター処理の有

無等の調製法の違いによって生じる血小板の性状(活性化)の差を見ることが出来るかどうか検討を行った。

材料と方法

1. 全血由来 PC 及び成分献血由来 PC (アフェレシス PC) の調製と保存

全血由来 PC は、抗凝固剤 ACD(adenin citrate dextrose)を含む4連バッグ(テルモ, 東京)に健康人から400mL全血を採取し、パフィーコート法にてPCを調製した。アフェレシス PC は、CS-3000 plus(バクスター, USA), アミカス(バクスター, USA), スペクトラ(コープ, USA), MCS-3P(ヘモネティクス, USA), CCS(ヘモネティクス)を用いて採取した。MCS-3P及びCCSで採取したアフェレシス PCの一部は、採取キットに保存前白血球除去を目的とした on line フィルター(LRF6HおよびLRFXL: ポール・USA, Sepacell PLX-5A: 旭メディカル・東京)が組み込まれたキットを用いた。調製後のPCは室温で水平振盪(60cpm)保存した。

2. ADP による血小板刺激

全血由来 PC 1mL に 1mM ADP あるいは PBS を 10 μ L 添加し、22 $^{\circ}$ C で 5 時間静置した。

3. 血小板性状検査

%discs の測定: 2.5% グルタルアルデヒド溶液を用いて固定した血小板の形態を位相差顕微鏡(OPTIHOT, 日本光学, 東京)を用いて観察した。血小板形態を Kunicki らの方法¹¹⁾に準じて判定し、円盤状血小板の占める割合を百分率で表した。

CD62p(p セレクチン)発現率の測定: 1% パラホルムアルデヒド溶液で固定した血小板を PE 標識抗 P セレクチンモノクローナル抗体(ベクトン・デッキンソン, USA)あるいは陰性コントロール(PE 標識マウス免疫グロブリン: ダコ, USA)を用いて染色し Ortho Cytoron (オーソ・ダイアグノスティック・システムズ社, 東京)を用いて血小板領域に表示された細胞の赤色蛍光(PE)の陽性率を測定した¹⁰⁾。

上清ブドウ糖濃度の測定: アフェレシス PC ないしは全血由来 PC を 1900xg・10分・22 $^{\circ}$ C で遠心後、得られた上清中のブドウ糖濃度を Glu-DH

法を用いたキット(グルコース CII テストワコー, 和光純薬, 東京)を用いて測定した。

4. 統計処理

実験で得られた各種測定値は unpaired t-test により検定し、 $p < 0.05$ をもって有意な差とした。フィルター処理前後のブドウ糖濃度は paired t-test により有意差 ($p < 0.05$) を検定した。

結果

1. ADP 刺激による PC 中ブドウ糖消費量に対する影響

最初に、血小板の活性化に伴いブドウ糖消費量が亢進するかどうかを確かめるために、血小板に一過性の形態変化を起こすような条件で ADP を添加し、ブドウ糖消費量の測定を行った。ADP 惹起顆粒放出は主として凝集依存性に起こるので本実験では ADP 添加後のサンプルは 22 $^{\circ}$ C で静置した。ADP 添加 5 時間後のブドウ糖消費量は、ばらつきは極めて大きいものの未刺激状態と比較して平均約 1.5 倍亢進して(Fig. 1), この差は統計的に有意であった ($p < 0.05$)。この時の %discs は刺激直後は、著しく低下しているが、刺激 5 時間後には刺激前と同程度に回復していた (Table 1)。一方、刺激 5 時間後の p セレクチン発現率は刺激前と比較して上昇していた。以上の結果から、血小板の活性化に伴い、ブドウ糖消費量が亢進す

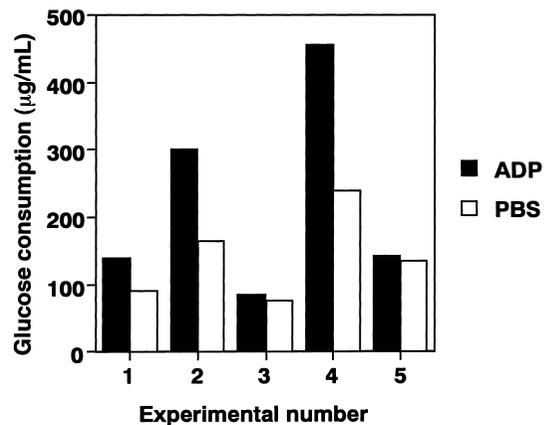


Fig. 1 Correlation between platelet activation and glucose consumption.

ADP PBS

ることが確認された。

2. 血小板採取機種と血小板ブドウ糖消費量の関係

アフレス PC は機種毎に異なる原理で採取されているため、血小板の性状も機種毎に異なる可能性がある。そこで、CS-3000 plus あるいは、スペクトラで採取した製剤のブドウ糖消費量を調べた。スペクトラと比較して、CS-3000 plus で採取したアフレス PC では、有意にブドウ糖消費量が亢進していた (Table 2)。また、保存 72 時間後では、CS-3000 plus で採取した PC の方が、円盤状の形態を保っていた血小板の割合 (%discs) が統計上有意に低値を示し、多くの血小板に形態変化を生じていることが示唆された。一方で、P セレクチン発現率は、両機種間で有意な差は認められなかった。

3. 一過性の凝集塊発生が確認されたアフレス PC の保存 72 時間後の血小板ブドウ糖消費量

北海道センターで採取したアフレス PC の一部には採血直後に一過性に凝集塊を含む製剤が存在する。このような PC の凝集能や %HSR (低浸透圧ショック回復率) などの血小板機能は凝集を起こしていない製剤と比較して差は認められない事

を報告した¹²⁾が、今回、統計的には有意差は無い ($p = 0.48$) もの、ブドウ糖消費の亢進傾向が認められた (Table 3)。さらに、一過性に凝集を起こした PC の保存 3 日目の P セレクチン発現率は凝集が認められなかった製剤と比較して統計上有意な差は認められなかったが、%discs の値は有意に低値を示した ($p < 0.05$)。

4. 保存前白血球除去フィルター処理の影響

2 種類の白血球除去フィルターを用いて白血球除去処理を行ったところ、いずれのフィルターにおいても処理後にブドウ糖消費の亢進が認められた (Fig. 2)。さらに、保存 72 時間後におけるブドウ糖消費量を調べたところ、フィルター処理群はフィルター未処理製剤と比較してブドウ糖消費量が有意に亢進していた ($p < 0.05$) が、P セレクチン発現率には差は認められなかった (Table 4)。一方で、保存一日目における %discs は、フィルター処理製剤において統計上有意に低値を示した ($p < 0.05$)。

考 察

血小板活性化に伴うブドウ糖消費の亢進についてはこれまでもいくつか報告がなされている^{5,6)}。今回の我々の成績もこれらと一致し、PC 中のブドウ糖消費が血小板活性化を反映している

Table 1 ADP-induced platelet activation

time reagents	pre	5 minutes		5 hours	
		ADP	PBS	ADP	PBS
%discs	84 ± 5	0	82 ± 4	81 ± 6	81 ± 6
CD62p expression (%)	3.7 ± 1.6	17.3 ± 8.0	3.8 ± 2.0	10.4 ± 4.8	4.3 ± 1.7

(n = 6 : mean ± Standard Deviation [SD])

Table 2 Plasma glucose in apheresis platelet concentrates stored at 22

devices	Spectra	CS-3000 plus
n	6	6
glucose consumption (μg/10 ⁹ platelets/72hrs)*	225 ± 57	337 ± 71
%discs (day 0)	81 ± 3	74 ± 8
%discs (day 3)*	74 ± 2	51 ± 9
CD62p expression (day 0)	2.1 ± 0.9	2.5 ± 0.6
CD62p expression (day 3)	12.8 ± 4.1	12.3 ± 2.2

* : $p < 0.05$

(mean ± SD)

Table 3 Platelet glucose consumption in apheresis platelet concentrates with or without clump formation

clump formation	control	transient clump formation
n	6	8
glucose consumption($\mu\text{g}/10^9$ platelets/72hrs)	337 \pm 71	388 \pm 151
%disc(day 3)*	51 \pm 9	34 \pm 9
CD62p expression(day 0)	2.5 \pm 0.6	3.6 \pm 1.6
CD62p expression(day 3)	12.3 \pm 2.2	9.9 \pm 2.7

* : p < 0.05

(mean \pm SD)

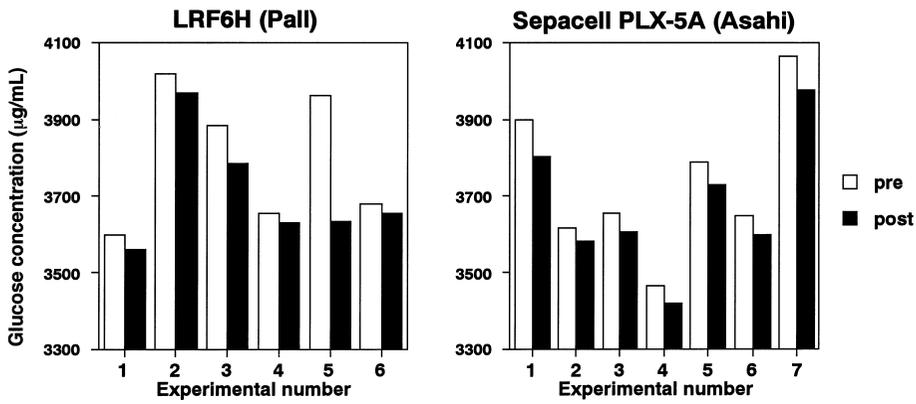


Fig. 2 Immediate effects of prestorage filtration on glucose consumption in apheresis platelet concentrates.

pre post

Table 4 Effects of prestorage filtration on glucose consumption in apheresis platelet concentrates stored at 22

devices	control	on line filter
n	3	3
glucose consumption($\mu\text{g}/10^9$ platelets/72hrs)*	247 \pm 71	404 \pm 80
%disc(day 0)*	78 \pm 4	67 \pm 5
%disc(day 3)	53 \pm 13	56 \pm 4
CD62p expression(day 0)	2.6 \pm 0.1	0.9 \pm 0.4
CD62p expression(day 3)	3.1 \pm 0.1	4.4 \pm 1.8

* : p < 0.05

(mean \pm SD)

ことを支持していた。

PC中のブドウ糖消費には血小板に加えて混入白血球が大きく関与していることが報告されている¹³⁾¹⁴⁾。採取機種によって異なるものの成分献血由来PC中には $10^4 \sim 10^9$ 個の白血球が混入しており、ブドウ糖消費量に与える混入白血球の影響も

考慮に入れなければならないと思われる。しかしながら、全血由来PC製剤の検討結果ではあるが、血小板濃度に差が無い場合、混入白血球数が $0.6 \sim 1.2 \times 10^3/\mu\text{L}$ の範囲の時のブドウ糖消費量に大きな差は認められない¹⁵⁾。一方で、スペクトラ及びCS-3000 plusで採取したPC中の混入白血球数は

両者ともに平均 10^6 個前後¹⁴⁾で、濃度に換算すると $30/\mu\text{L}$ 前後であり、製剤中のブドウ糖濃度に影響を与えるほどの濃度ではないと考えられる。従って、CS-3000 plus で採取した PC でブドウ糖消費量が亢進していたが、この亢進に関しては混入白血球の影響は少ないと考えられる。また、フィルター処理の影響を調べた実験で使用した PC 中の混入白血球数は、フィルター未処理製剤で 10^7 個オーダー、フィルター処理製剤で 10^4 個オーダーであり¹⁵⁾、フィルター未処理製剤の方が混入白血球数が多いにも関わらず、フィルター処理した製剤でブドウ糖消費の亢進が確認された。従って、このブドウ糖消費の亢進も、混入白血球の影響よりもフィルター処理中に生じる血小板の活性化によるものと推察される。

ブドウ糖消費量の亢進が血小板の *in vivo* における生存率や機能に与える影響については、今後の検討が必要と思われる。しかしながら、ブドウ糖消費量が亢進している血小板の ATP 含有量が低下している⁸⁾事や、%discs が低下している血小板の *in vivo* における生存率が低下している¹¹⁾事などが報告されている。今回の実験ではブドウ糖消費量が亢進している製剤で %discs が低下する傾向が認められた。従って、保存中にブドウ糖消費量が亢進している製剤では、*in vivo* における生存率に何らかの傷害が出ている可能性も否定できない。

血小板形態学的観察は検者の熟練を必要とし、結果に検者間でバラツキが生じうる¹⁶⁾上に時間がかかり大量検体処理に不向きである。P セレクション発現の検出にはフローサイトメーターおよび特異的抗体が必要である。ブドウ糖濃度は多くの血液センターに配備されている自動検査装置で簡便かつ安価に測定可能であり、簡便性や再現性などの点から、PC におけるブドウ糖消費量の測定は有用かもしれない。また、PC では今回の検討結果のように、一過性に血小板の形態変化を生じる事があるが、位相差顕微鏡では一過性のものと持続性のものを区別するためには複数回の観察が必要である。これに対して、一過性の血小板活性化でもブドウ糖消費亢進に反映される可能性がある。

実際、白血球除去フィルター処理による一過性の血小板活性化がブドウ糖消費亢進に反映されている可能性が今回の検討でも示唆された。この一過性のブドウ糖消費の亢進はこれまでの報告では有意なものではない、とされていた¹⁷⁾。それは、彼らの検討結果では、PC 中における総ブドウ糖量に比し、消費量が比較的僅か（フィルター処理前後のブドウ糖濃度の差が約 $30\mu\text{g}/\text{mL}$ ）であるという点が見落とされていたためであろう。実際、この報告でも白血球除去フィルター処理後のブドウ糖濃度には本稿の結果と一致する程度の減少が認められていた。

さて、保存 PC における著しいブドウ糖の消失は一部の細菌感染・増殖を示している可能性が報告されており、PC の細菌汚染の有無の確認のために上清ブドウ糖濃度をモニタリングする検討がなされている。PC 中の各細菌の増殖パターンは菌種により異なり、その増殖パターンに対応して、ブドウ糖消費量も異なっている³⁾。増殖スピードの遅い菌種に関しては保存中のブドウ糖消費量の亢進は認められないため、血小板の活性化と菌混入の区別はつかない可能性がある。しかしながら、今回の検討結果から、ブドウ糖濃度のモニタリングには細菌感染或いは血小板の活性化など、通常の PC とは異なる何らかの異常を検知できる可能性があることを示していると思われる。

結 語

ブドウ糖消費量は、血小板の比較的軽度な活性化状態を鋭敏に検出している可能性が示唆された。上清ブドウ糖濃度の測定は血小板製剤に対する採取機種や白血球除去フィルターなどの影響を考察する際の補助的指標になりうる可能性がある。

文 献

- 1) Wagner, S.J. and Robinette, D. : Evaluation of swirling, pH, and glucose tests for the detection of bacterial contamination in platelet concentrates. *Transfusion*, 36 : 989 - 993, 1996.
- 2) Burstain, J.M., Brecher, M.E., Workman, K., et al. : Rapid identification of bacterially contaminated platelets using reagent strips : glucose and pH analysis as markers of bacterial metabolism.

- Transfusion, 37 : 255 258, 1997.
- 3) 橋本浩司, 布施ひとみ, 須合奈留美, 他 : 血小板製剤における簡便な細菌汚染確認法の評価 . 血液事業, 22 : 491 497 2000.
 - 4) Craik, J.D., Stewart, M., Cheeseman, C.I. : GLUT-3 (brain-type) glucose transporter polypeptides in human blood platelets. *Thromb Res*, 79 : 461 469, 1995.
 - 5) Heijnen, H.F., Oorschot, V., Sixma, J.J., et al. : Thrombin stimulates glucose transport in human platelets via the translocation of the glucose transporter GLUT-3 from alpha-granules to the cell surface. *J Cell Biol*, 138 : 323 230, 1997.
 - 6) Sorbara, L.R., Davies-Hill, T.M., Koehler-Stec, E. M., et al. : Thrombin-induced translocation of GLUT3 glucose transporters in human platelets. *Biochem J*, 328 : 511 516, 1997.
 - 7) Kilkson, H., Holme, S., Murphy, S. : Platelet metabolism during storage of platelet concentrates at 22 degrees C. *Blood*, 64 : 406 414, 1984.
 - 8) Savage, B. : Platelet adenine nucleotide levels during room-temperature storage of platelet concentrates. *Transfusion*, 22 : 288 291, 1982.
 - 9) Snyder, E.L., Hezzy, A., Katz, A.J., et al. : Occurrence of the release reaction during preparation and storage of platelet concentrates. *Vox Sang*, 41 : 172 177, 1981
 - 10) Dumont, L.J., VandenBroeke, T., Ault, KA., and Biomedical Excellence for Safer Transfusion (BEST) Working Party of the International Society of Blood Transfusion (ISBT) : Platelet surface P-selectin measurements in platelet preparations : an international collaborative study. *Transfus Med Rev*, 13 : 31 42, 1999.
 - 11) Kunicki, T.J., Tuccelli, M., Becker, G.A., et al. : A study of variables affecting the quality of platelets stored at " room temperature ". *Transfusion*, 15 : 414 421, 1975.
 - 12) Nakajo, S., Hirayama, F., Niwa, K., et al. : Clump formation in apheresis platelet concentrates . *Transfusion*, 39 : 913 915, 1999.
 - 13) Beutler, E. and Kuhl, W. : Platelet glycolysis in platelet storage. IV. The effect of supplemental glucose and adenine. *Transfusion*, 20 : 97 100, 1980.
 - 14) Sekiguchi, S., Sato, N. and Yamamoto, S. : Changes in donor apheresis in Japan. *Ther Apher*, 1 : 319 324, 1997.
 - 15) 山本定光, 中瀬俊枝, 佐藤典宏, 他 : 自動的プレストレージフィルトレーションの可能な成分採取システムの開発 . 医科器械学, 66 : 482 488 , 1996.
 - 16) Bertolini, F., Murphy, S. and Biomedical Excellence for Safer Transfusion (BEST) Working Party of the International Society of Blood Transfusion (ISBT) : A multicenter evaluation of reproducibility of swirling in platelet concentrates. *Transfusion*, 34 : 796 801, 1994.
 - 17) Moog, R., Muller, N., Kobke, AC., et al. : Leukocyte filtration of single-donor platelet units through an integrated filter system for the Fresenius AS 104 blood cell separator. *Vox Sang*, 72 : 107 110, 1997.
-