

原 著

#### 4 保存血小板製剤の再評価

西郷 勝康<sup>1)</sup> 橋本 誠<sup>1)</sup> 山本 光輝<sup>1)</sup> Meiyi Jiang<sup>2)</sup>  
松本 英彬<sup>2)</sup> 小原貴代子<sup>3)</sup> 小村 武<sup>3)</sup> 神前 昌敏<sup>3)</sup>  
三戸 壽<sup>3)</sup> 寮 隆吉<sup>4)</sup> 熊谷 俊一<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>神戸大学病院輸血部

<sup>2)</sup>シスメックス株式会社

<sup>3)</sup>兵庫県赤十字血液センター

<sup>4)</sup>神戸大学医学部保健学科

(平成 12 年 6 月 15 日受付)

(平成 12 年 9 月 8 日受領)

#### RE-EVALUATION OF PLATELET CONCENTRATES STORED AT 4

Katsuyasu Saigo<sup>1)</sup>, Makoto Hashimoto<sup>1)</sup>, Mitsuteru Yamamoto<sup>1)</sup>, Meiyi Jiang<sup>2)</sup>,  
Hideaki Matsumoto<sup>2)</sup>, Kiyoko Ohara<sup>3)</sup>, Takeshi Omura<sup>3)</sup>, Masatoshi Kohsaki<sup>3)</sup>,  
Hisashi Mito<sup>3)</sup>, Ryukichi Ryo<sup>4)</sup> and Shunichi Kumagai<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Blood Transfusion Division, Kobe University Hospital

<sup>2)</sup>Systemex Corporation

<sup>3)</sup>Hyogo Red Cross Blood Center

<sup>4)</sup>Faculty of Health Science, Kobe University School of Medicine

We evaluated the feasibility of storage of platelet concentrate (PC) at 4°C. Although the number of platelets in PCs decreased during storage at both 4°C and room temperature (RT), PCs stored at 4°C had significantly fewer platelets after 5-day storage, but showed superior platelet aggregation to that of PCs stored at RT. At the same time,  $\beta$ -thromboglobulin ( $\beta$ -TG) release reaction was also detected in PCs stored at 4°C. RANTES, p-selectin and  $\beta$ -TG accumulation during PC storage at 4°C was less than that of PCs stored at RT. Although it is known that no in vitro test has been shown to correlate well with platelet in vivo survival and recovery, our results may indicate that it is worthwhile to re-evaluate the efficacy of PC storage at 4°C.

**Key words** : platelet concentrate, 4°C, RANTES,  $\beta$ -thromboglobulin, platelet aggregation, preservation

#### はじめに

血小板製剤 (platelet concentrate, PC) は室温で水平振盪器を用いて保存することと規定されている<sup>1)</sup>。これは低温保存では形態変化や膜組成の変化が著しく<sup>2,3)</sup>、輸血後の血小板寿命が極端に短い事実等に基づいている<sup>4)</sup>。一方、4°C で保存することが可能であれば、細菌感染や白血球由来の炎症

性サイトカインに起因する輸血合併症を減少できる可能性も指摘されている<sup>5,6)</sup>。今回 4°C 保存血小板の特徴について in vitro での検討を行い、水平振盪器を使用した 4°C 保存 PC では、放出反応を伴う血小板凝集能が保存され、RANTES、 $\beta$  トロンボグロブリン ( $\beta$ TG) などの血小板由来生理活性物質の蓄積が抑制されることを確認した。これら

の成績から4 保存につき今後も検討の価値があるものと考えられた。

方 法

1) 対象

健康成人男性ボランティア12名よりアミカス(Baxter),あるいはスペクトラ(Gambro)を用いてACD-A下に濃厚血小板を採取した。採取は両腕法により血液処理量は2,000mlを目標とした。ACD-Aの全血に対する比率はアミカスで9:1,スペクトラでは10:1であった。

2) 血小板の保存

採取血小板は血小板用保存バッグ(ライフセルバッグPL732,Baxter)に注し室温および4で,共に水平振盪器を用いて保存した。血小板数は $1 \times 10^5/\mu\text{L}$ 前後になるように自己血漿で調整した。3例の検体では米国で市販されているThromboSol<sup>®</sup> (0.25mM amiloride, 0.1mM adenosine, 50  $\mu\text{M}$  sodium nitroprusside, 40  $\mu\text{M}$  dipyridamole, 0.75mM ticlopidine, および 0.2  $\mu\text{M}$  quinacrine 含有)と同一組成の血小板保存剤(以下ThromboSol同等剤)を作成し,4 保存時に添加し,無添加の場合と比較した。

3) 血小板数,平均血小板容積(MPV),pHの測定

血小板数,MPVは自己血漿で希釈した検体を用いてEDTA非添加でK-1000(Sysmex)を用いて測定した。乏血小板血漿(PPP)のpHは $\Phi 71$  pH meter(Beckman)で測定した。

4) 血小板凝集能

レーザー散乱粒子計測型血小板凝集能測定装置(PA-200,Kowa)を用いて総散乱強度を測定した<sup>7)</sup>。血小板数を自己血漿で $5 \times 10^5/\mu\text{L}$ に調整した多血小板血漿(PRP)300 $\mu\text{L}$ を用いて,凝集惹起剤30 $\mu\text{L}$ を添加し終濃度20 $\mu\text{M}$ ADPでの凝集能を観察した。2例の検体では6.3,3.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のcollagenでの凝集も計測した。4例の5日間保存血小板の凝集後の検体を4,500G,15分の遠沈で分離し上清中 $\beta\text{TG}$ をradioimmunoassay(Amersham)で測定した。この際2例の健康成人由来の新鮮PRPでの凝集(ADP終濃度5 $\mu\text{M}$ )上清をコントロールとして測定した。

5) 上清中のサイトカイン p-selectin,  $\beta\text{TG}$  の測定

血小板液を4,500G,15分の遠沈で上清を分離し-40で保存後,以下のELISAキットを用いて測定した。RANTES,IL-8;BIOTRACK,Amersham Pharmacia Biotech,P-selectin;GMP-140 EIA Kit,Takara。 $\beta\text{TG}$ は項目<sup>4)</sup>に示した方法で測定した。

6) 走査電子顕微鏡による形態観察

既報の方法<sup>8)</sup>により保存前,保存後,さらに4保存後検体では37に30分再加温後にも観察した。

7) 統計処理

paired t-testで解析した。

結 果

1) 血小板数,平均血小板容積(MPV),pHの変化

血小板数は図1に示したようにいずれの保存条件でもやや減少する傾向がみられたが,4 保存においてより明瞭であった。MPVの変化(図2)では,4 保存PCで2日目の増大が室温保存に比べ対照的であった。これらの成績は血小板形態の変化(後述)と凝集塊形成程度を反映しているものと考えられた。PHはいずれでも大きな変動を認めなかった(図略)。

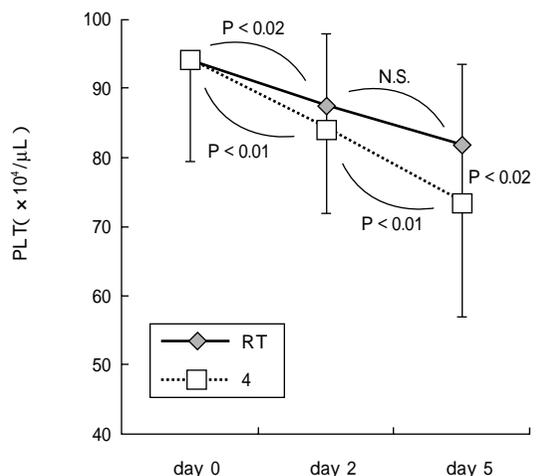


Fig. 1 Changes in platelet number during storage. n = 12. N.S. : not significant.

2) 血小板凝集能の変化

アフレーシス血小板は採取直後から血小板凝集能が不良なため、高濃度の ADP(20 $\mu$ M)での凝集能の変化を検討した。図3に示したように室温保存では2日目、5日目とさらに凝集能の低下を認めたが、4 保存では比較的良好に保持されていた。なお、図3では総散乱強度での比較を示したが、比濁法による凝集率の比較でも同様であった。さらに5日目の4 保存血小板では凝集による $\beta$ TGの放出反応を伴っていることが確認でき

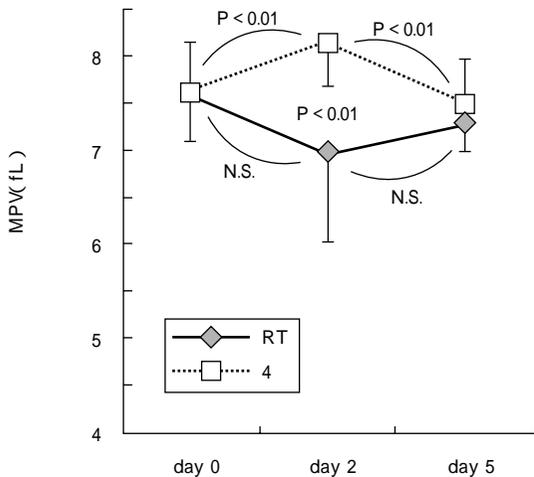


Fig. 2 Changes in mean platelet volume (MPV) during storage. n = 12. N.S. : not significant.

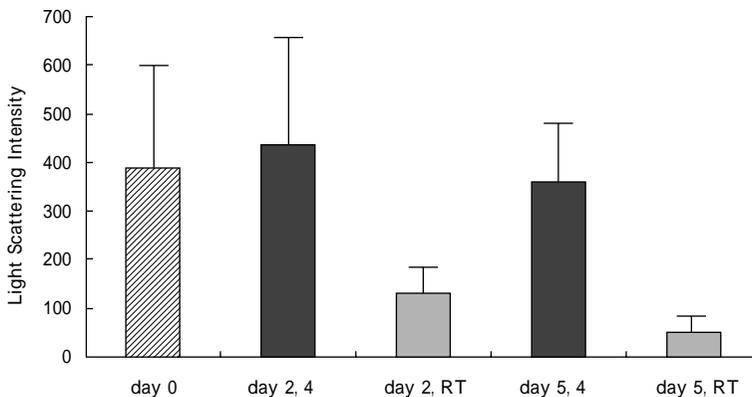


Fig. 3 Platelet aggregation induced by 20 $\mu$ M ADP. Light scattering intensity was measured using a PA-200 system (Kowa) n = 12.

た(表1). Collagen凝集では、高濃度では室温保存検体も比較的良好に凝集能が維持されていたが、低濃度 collagen の場合はやはり4 保存血小板が良好な凝集能を保持していた(図略). なお ThromboSol 同等剤添加血小板ではいずれの凝集惹起剤でも凝集はみられなかった。

3) 上清 RANTES, p-selectin 濃度の変化

上清中 RANTES 濃度は図 4a のように室温保存に比べ、4 保存ではその上昇が少なかった(2日目, 5日目共に p < 0.01). これは血小板活性化の指標のひとつである可溶性 p-selectin<sup>9)</sup>,  $\beta$ TG においても同様であった(図 4b, c). なお、3 検体では IL-8 を測定したが、保存前および5日間保存後(室温, 4 )とも測定限界以下であった. ThromboSol 同等剤添加 4 保存血小板では、非添加に

Table 1  $\beta$ -TG release after ADP-induced platelet aggregation.  $\beta$ -TG levels in platelet-poor plasma were determined by radioimmunoassay.

	RT		4	
	before	after	before	after
Case 1	14,900	11,600	11,800	17,000
Case 2	15,100	13,100	8,240	11,700
Case 3		nd	5,950	11,500
Case 4		nd	14,100	22,300
control 1	129	1,690		nd
control 2	419	8,580		nd

(ng/mL)

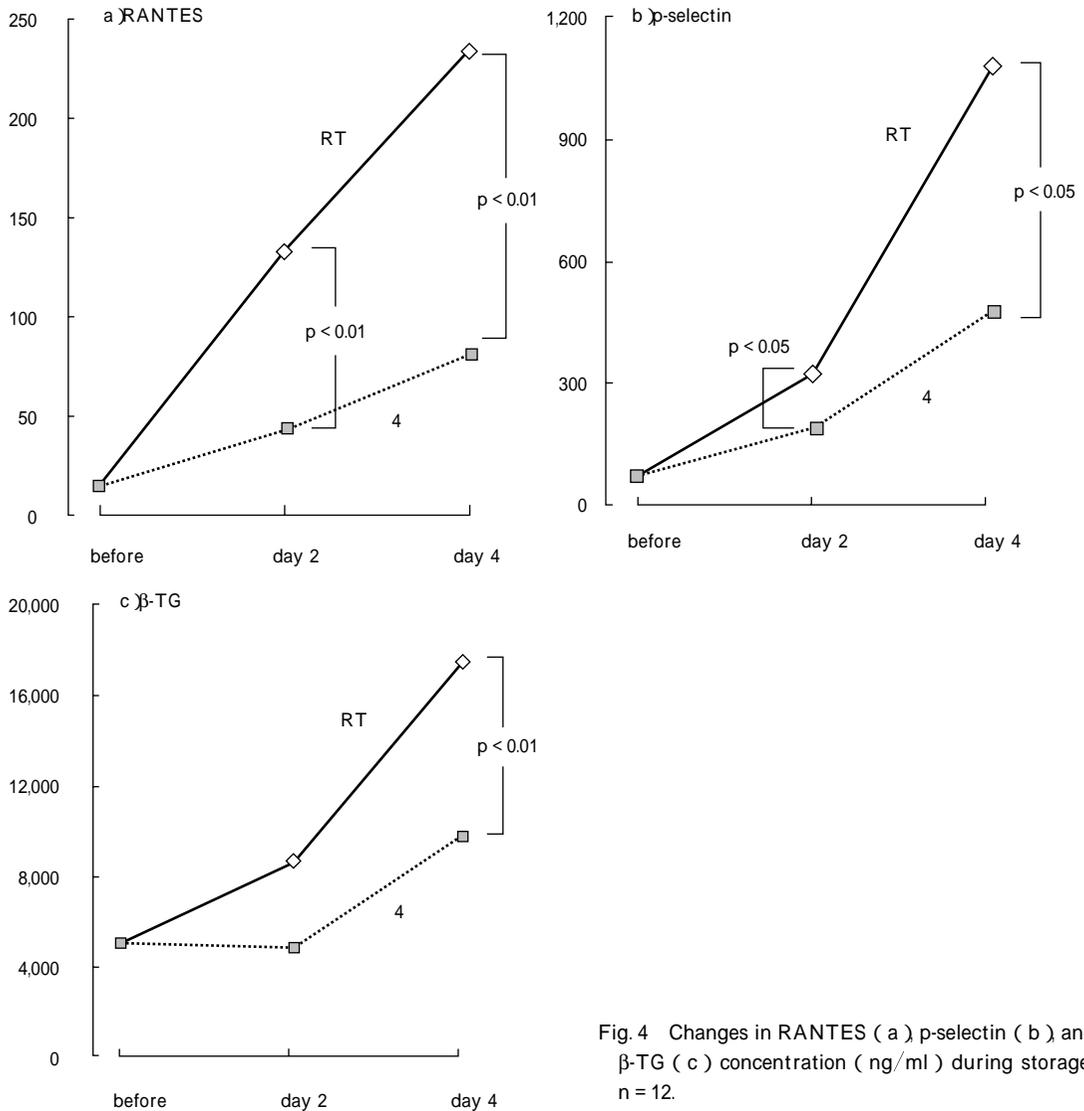


Fig. 4 Changes in RANTES ( a ) p-selectin ( b ) and β-TG ( c ) concentration ( ng/ml ) during storage. n = 12.

比較し RANTES , βTG はやや低値を示した ( 表 2 , n = 3 ) . しかし , この現象は p-selectin では確認できなかった .

#### 4) 走査電子顕微鏡像

4 2 日間保存では既報のように<sup>2) (10) (11)</sup> , 血小板の球状化や突起の形成が著明であった ( 図 5a , b , c ) . しかし , 4 保存血小板を 37 °C で 15 分間インキュベートすると ( 図 5d ) , 突起の形成は減少する傾向が認められた . 5 日間保存後の形態も同様の变化であった . また ThromboSol 同等剤添加 4

保存血小板も非添加の場合と同様の形態を呈していた .

#### 考 察

PC は 4 保存では形態変化が顕著であるが室温保存ではその変化が小さいこと<sup>2) (10) (11)</sup> , 輸血後の回収率 , 血小板寿命が良好であること等の理由により室温保存が望ましい<sup>1) (9)</sup> . しかし , 4 保存が可能であれば , 輸血副作用の減少 , 長期保存の可能性<sup>5) (8)</sup> があり in vitro の検討を行った .

血小板を低温に保存すると室温保存に比し著明

Table 2 Effects of ThromboSol(TS) on RANTES, p-selectin and -TG accumulation. Levels before and after storage at 4 with and without Thrombsol (n=3) are shown .

	before	day 2		day 5	
		4	4 + TS	4	4 + TS
RANTES	71.0 ± 8.7	123.0 ± 15.9	89.7 ± 14.6*	156.3 ± 27.3	127.7 ± 31.6**
p-selectin	91.7 ± 37.9	265.3 ± 64.7	233.7 ± 34.5	511.3 ± 91.1	338.0 ± 73.0
-TG	4,146 ± 629	7,376 ± 1,133	5,656 ± 701**	12,634 ± 1,405	9,303 ± 2,780

\*p < 0.01 , \*\*p < 0.05.

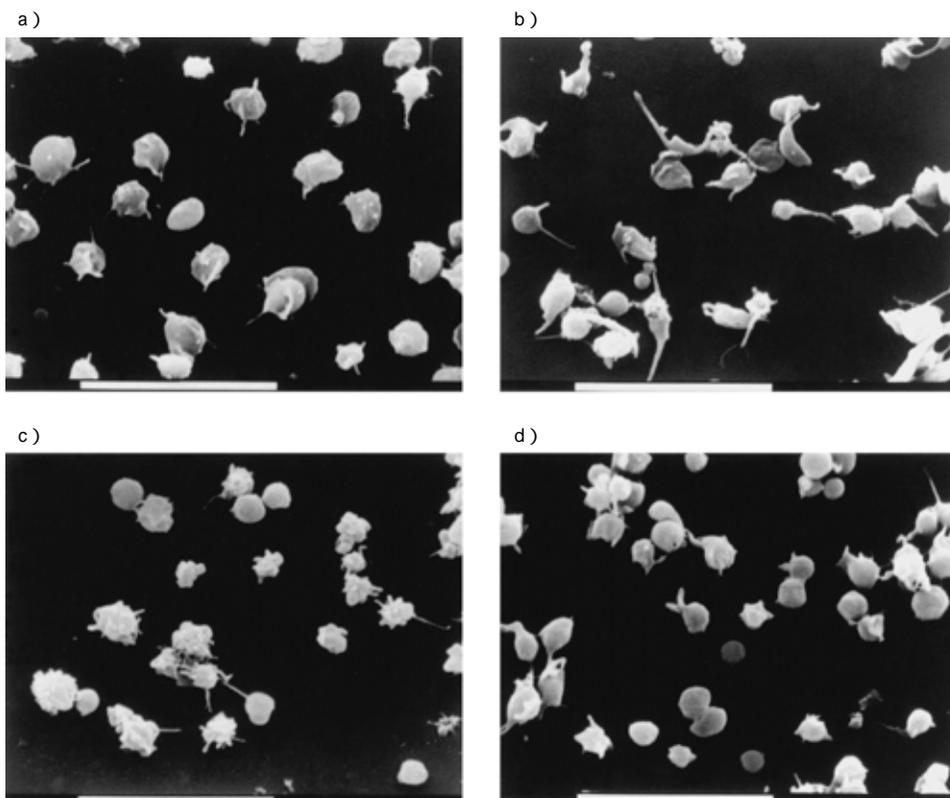


Fig. 5 Scanning electron microscopic observation of platelets. Immediately after apheresis ( a ), PCs stored at room temperature ( b ) or at 4 ( c ) for 2 days. Panel ( d ) shows platelets after re-incubation at 37 of PCs stored at 4 . Each bar represents 10µm.

な血小板形態の変化が観察され，cold activation あるいは cold-induced shape change と呼ばれている<sup>2)</sup> . その機序として，15 ~ 18 での細胞膜リン脂質の gel 化，microtubules band の崩壊，血小板内カルシウム濃度の上昇，あるいはアクチンの

重合によること等が報告されている<sup>2)(3)(2)</sup> . 今回の走査電顕で観察した形態は，これまでの報告と同様に<sup>2)(3)(4)</sup> で明らかな球状化や突起の形成を誘発した . また 37 に保存することによりある程度突起の減少を認めたが，細胞内顆粒の減少など不可

逆的な変化を認めるとも報告されている<sup>2)13)</sup>。Membrane integrity の検討では4 保存により低下することが細胞内蛍光色素の流出により証明されている<sup>3)14)</sup>。4 保存での形態変化や膜の変化を小さくする方法が検討されつつあるが<sup>12)15)12)</sup>、臨床応用のためには安全で確実な方法の確立が必須である。なお形態変化と関連のあるMPVが2日目で大きくなり、5日目に減少した理由は電顕観察からは明らかではなかった。

ADPによる血小板凝集能については、4 保存でも保持されていることが以前から認められている<sup>4)15)</sup>。血小板表面糖蛋白(GP)IIb/IIIa複合体が活性化されやすいこと<sup>4)</sup>、マイクロパーティクルの増加によること<sup>13)</sup>が理由と考えられている。一方4 保存では室温保存に比しGPIbの減少やリストセチンによる凝集の低下が報告されている<sup>13)</sup>。

低温保存時の血漿中への放出反応はこれまでの報告でも一致をみていない。Wattsら<sup>16)</sup>は血小板保存時の血漿中へのβTG放出を観察しRT>4 >37 の順に放出量が少なくなるとし、Scottら<sup>17)</sup>はβTGの放出が4 >RTと報告している。坂本はアフエーシス血小板でβTGの血漿中への放出は22 より4 の方が小さいとしている<sup>15)</sup>。これらの差異は血小板浮遊液の作成方法、保存時の血小板濃度等にも影響されるものと推測されるが明らかではない。今回の検討ではβTGやp-selectinの放出は4 の方が小さかった。また、血小板輸血においてもアレルギー反応との関連を示す報告がなされているRANTES濃度<sup>18)-20)</sup>の上昇も低く抑えられていた。

血小板数は4 では5日目に有意に室温保存に比べ減少していたが、今回の検討からは4 保存ではむしろ血小板の活性化が抑制されていたので、放出反応を伴わないagglutinationによる現象ではないかと推測される。

米国では抗血小板剤等を組み合わせた血小板保存試薬(ThromboSol)が使用され<sup>5)</sup>、4 保存により血小板輸血副作用の軽減と同時に保存期間の延長の可能性が論議されている。ThromboSol同等剤添加検体では強力な抗血小板作用の結果凝集能

は殆ど認められず、また4 保存でのRANTES、βTG放出反応をさらに有意に抑制していた。P-selectinについてもThromboSol添加で放出が減少する傾向がみられたが、ばらつきが若干大きく有意な変化としてはとらえられなかった。なおThromboSol同等剤添加でも、Lozanoら<sup>21)</sup>の報告同様、形態変化を抑えることはできなかった。

## 結 語

In vitroの成績から輸血効果を推測することは困難といわれている<sup>4)</sup>。しかし、放出反応を伴ったADP凝集能の保持やRANTES、p-selectinの放出減少などのin vitroの成績、あるいは細菌感染リスクの減少など4 保存のメリットも認められる。臨床的に確立された室温保存時と同様な輸血後の血小板数回復、止血効果を得るための新たな保存剤の開発や、緊急時などの限られた適応等に関する検討は今後もすすめる価値があるものと思われた。

## 文 献

- 1) 神谷 忠, 他: 濃縮血小板製剤(PC)の保存条件と輸注後の血小板回収率および止血効果に関する検討. 日輸血会誌, 31: 418-422, 1985.
- 2) Winokur, R., Hartwig, J.H.: Mechanism of shape change in chilled human platelets. Blood, 85: 1796-1804, 1995.
- 3) Reid, T.J., et al.: Cooling and freezing damage platelet membrane integrity. Cryobiology, 38: 209-224, 1999.
- 4) Vostal, J.G., Mondoro, T.H.: Liquid cold storage of platelets: a revitalized possible alternative for limiting bacterial contamination of platelet products. Transfus Med Rev, 11: 286-295, 1997.
- 5) Currie, L.M., et al.: Inhibition of cytokine accumulation and bacterial growth during storage of platelet concentrates at 4 °C with retention of in vitro functional activity. Transfusion, 37: 18-24, 1997.
- 6) Connor, J., et al.: Recovery of in vitro functional activity of platelet concentrates stored at 4 °C and treated with second-messenger effectors. Transfusion, 36: 691-698, 1996.
- 7) Tohgi, H., et al.: Development of large platelet aggregates from small aggregates as determined by laser light scattering: effects of aggregant concentration and antiplatelet medication. Thromb Haemostasis, 75: 838-843, 1996.

- 8) 松本英彬, 他 : ADP 凝集による血小板粒度分布と走査電子顕微鏡を用いた血小板形態の観察 . *Sysmex Journal* , 5 : 12-17, 1982.
  - 9) Kosteljik, E.H., et al. : Soluble p-selectin as parameter for platelet activation during storage. *Thromb Haemostasis*, 76 : 1086-1089, 1996.
  - 10) Sturk, A., et al. : The effect of storage on platelet morphology. *Transfusion*, 22 : 115-120, 1982.
  - 11) Holme, S., et al. : Studies on platelets exposed or stored at temperatures below 20 °C or above 24 °C. *Transfusion*, 37 : 5-11, 1997.
  - 12) Tablin, F., et al. : Membrane phase transition of intact human platelets : Correlation with cold-induced activation. *J Cell Physiol*, 168 : 305-313, 1996.
  - 13) Bode, A.P., Knupp, C.L., et al. : Effect of cold storage on platelet glycoprotein IB and vesiculation. *Transfusion*, 34 : 690-696, 1994.
  - 14) Reid, T.J., et al. : Platelet membrane integrity during storage and activation. *Transfusion*, 39 : 616-624, 1999.
  - 15) 坂本久浩 : 血小板の低温下での長期保存の研究 . 厚生省血液研究事業 . 平成 8 年度研究報告書 , 197-199, 1997.
  - 16) Watts, S.E., et al. : Storage of platelets for tests of platelet function : Effects of temperature on platelet aggregation, platelet morphology and liberation of  $\beta$ -thromboglobulin. *Thromb Res*, 44 : 365-376, 1986.
  - 17) Scott, N.J., et al. : Effect of storage on platelet release and aggregation responses. *Vox Sang*, 45 : 359-366, 1983.
  - 18) Kluter, H., et al. : Febrile and allergic transfusion reactions after the transfusion of white cell-poor platelet preparations. *Transfusion*, 39 : 1179-1184, 1999.
  - 19) Fujihara, M., et al. : Effects of filtration and gamma radiation on the accumulation of RANTES and transforming growth factor- $\beta$ 1 in apheresis platelet concentrates during storage. *Transfusion*, 39 : 498-505, 1999.
  - 20) Bubel, S., et al. : Chemokines in stored platelet concentrates. *Transfusion*, 36 : 445-449, 1996.
  - 21) Lozano, M., et al. : Effects of the addition of second-messenger effectors to platelet concentrates separated from whole-blood donations and stored at 4 °C or -80 °C. *Transfusion*, 40 : 527-534, 2000.
-