

原 著

高酸素透過性バッグによる高単位血小板の室温長期（9日間）保存

江月 将史^{1,2)} 伊藤 貴俊²⁾ 白濱 憲昭²⁾
高木 忠之¹⁾ 池田 和彦¹⁾ 橋本 真一¹⁾
川畑 絹代¹⁾ 尾形 隆¹⁾ 大戸 斉¹⁾

¹⁾福島県立医科大学医学部附属病院 輸血・移植免疫部

²⁾川澄化学工業

(平成17年6月1日受付)

(平成17年8月12日受理)

MULTI-DAY STORAGE OF PLATELETS AT ROOM TEMPERATURE IN A CONTAINER WITH HIGH OXYGEN PERMEABILITY

Shoji Ezuki^{1,2)}, Takatoshi Ito²⁾, Noriaki Shirahama²⁾,
Tadayuki Takagi¹⁾, Kazuhiko Ikeda¹⁾, Shinichi Hashimoto¹⁾,
Kinuyo Kawabata¹⁾, Takashi Ogata¹⁾ and Hitoshi Ohto¹⁾

¹⁾Division of Blood Transfusion and Transplantation Immunology,
Fukushima Medical University School of Medicine

²⁾Kawasumi Laboratories, Inc.

The performance of platelet concentrates (PCs) for transfusion is greatly limited by their short shelf life. A highly oxygen-permeable container (PO-80, Kawasumi, Tokyo) was developed as an approach to extending the shelf-life of PCs. Here, we compared PCs containing a high number of platelets (4×10^{11} /250mL plasma/bag) stored in a PO-80 container with those stored in a standard bag (control) (PL2410, Baxter Healthcare, USA) by monitoring platelet biochemical and functional parameters for up to 9 days.

Three of six bags in the control bags had a pH below 6.2 by day 7. These PCs also showed the disappearance of swirling, a rapid drop in glucose combined with a marked increase in lactic acid, accelerated P-selectin expression on platelets and an earlier decrease in both %HSR and aggregation of platelets in the observation period. In contrast, only one of six bags had a pH below 6.2 by day 9 in the PO-80 container. Further, there was no disappearance of swirling. Other biochemical and functional parameters of PCs in PO-80 showed a slower change compared with those in the control bag. Overall, the in vitro characteristics of PCs showed a lower level of deterioration over 9 days when stored in a higher oxygen-permeable container than in a conventional bag. It is suggested that this newly developed highly oxygen-permeable PO-80 container will preserve adequate platelet function for longer storage periods and with higher PC yields.

Key words : platelet, preservation, higher oxygen-permeable container, pH, P-selectin

緒 言

血小板製剤の有効期限は国際的には5日間であるが、世界的に7日間への延長が検討され^{1,2)}、欧州の一部の国ではすでに7日に延長されている。一方、日本では有効期限が3日間と世界基準に比べ短い。さらに、1999年から導入されたウイルス核酸検査(NAT)により、実質的な有効期間は2日程度であり、血小板製剤の供給体制は大変厳しくなっている。また、日本を含め、多くの先進国における急速な高齢人口化は近い将来、輸血用血液製剤の需要バランスを破綻させることが予測され、特に重症患者に使用されることの多い血小板の供給が不足することは深刻な問題である。

血小板製剤の長期保存及び品質の改善として、現在までにポリオレフィン保存バッグの開発^{3,4)}、血小板保存液^{5,6)}、アフエレーシス血小板⁷⁾などが研究され、実用化されてきた。我が国では血小板機能の劣化が早い、高単位血小板製剤(20単位)の供給が諸外国と比べて比較的多い。そこで我々は血小板製剤の有効期限延長へのアプローチとして、高単位でも長期保存が可能な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³⁾。本研究では、アフエレーシス採血した高単位血小板製剤(20単位)を保存し、新バッグのin vitroにおける血小板機能保持効果を9日間に渡って評価した。

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 Healthcare Corp, USA 又は Spectra; Gambro BCT, USA)を用いて、同意の得られた12名の健康人ボランティアドナーよりアフエレーシス採血により20単位相当(平均 4×10^{11} cell/250ml/bag)を採取した。採取後、同一血液型2名分の血小板を一旦プールし、高酸素透過性バッグ(PO-80)とコントロールバッグ(PL2410)に等量に分割した。室温(20~24℃)にて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日目及び9日目に経時サンプリングを行って、比較評価した(n=6)。

2. 血小板保存バッグ

高酸素透過性血小板バッグ(PO-80, 1,000ml容量, 酸素透過度 $2,660 \text{ ml/m}^2 \times \text{day} \times \text{atm}$, 川澄化学工業)とコントロールバッグ(PL2410, 1,000ml容量, 酸素透過度 $2,024 \text{ ml/m}^2 \times \text{day} \times \text{atm}$, Baxter Healthcare Corp, USA)を比較評価した(Table 1)。

3. 血小板機能の生化学的評価項目

1) 血小板数及び平均血小板容積(MPV)測定
血小板数及び平均血小板容積測定はサンプル500 μl を栄研チューブに移し、生理食塩液にて10倍希釈した液を多項目自動血球成分計測機(Sysmex K-2000, シスメックス, 神戸)で測定した。

2) スワーリング(swirling)

スワーリング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。観察時に、スワーリングが容易に観察されたものを2+, 低下していたが観察可能なものを1+, 全く観察されないものを0と3段階評価し、同時に凝集塊の有無についても観察した。

3) pH及び血液ガス(pO_2/pCO_2)測定

pH及び血液ガス(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(ABL 3, Radiometer, Copenhagen, Denmark)に装着して測定した。

4) グルコース及び乳酸

血漿中濃度を標準酵素活性で測定した。

5) 血小板凝集能測定及び低浸透圧ショック回復率(%HSR)測定

-40℃で保存しておいた自己血漿を用いて、測定検体中の血小板数が約 3.0×10^5 cell/ μl となるように調整した。血小板凝集能測定は惹起試薬(ADP 5 $\mu\text{mol/l}$ + コラーゲン 5 $\mu\text{g/ml}$)で希釈し、

Table 1 Capacity and oxygen permeability of the control and PO-80 polyolefin containers

Name	Oxygen permeability ($\text{ml/m}^2 \times \text{day} \times \text{atm}$)	Volume (ml)
PO-80	2,660	1,000
PL2410 (Control)	2,024	1,000

ヘマトレーサー 212 (PAC-8L, エムシーメディカル, 東京) 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 (%T₀) 及び最大透過率 (%Tmax) を分光光度計 610nm (UVIDEC, ジャスコ, 東京) で測定し, %HSR = $100 \times (\%T_{max} - \%T_0) / (\%T_{300} - \%T_0)$ の計算式で %HSR を算出した。

6) P セレクチンの測定

血小板活性化マーカーである P セレクチンは 1% パラホルムアルデヒドと 0.1% NaN₃ を含む PBS 固定液で血小板サンプルを固定後、抗 P セレクチン抗体 (CD62P, BD Biosciences, USA) で染色し、フローサイトメトリー (FACSCalibur, BD Biosciences) で測定した。

7) 細菌と真菌培養試験

9日目の血小板製剤を2つの BACTEC Plus Aerobic/F と Plus Anaerobic/F (BD Biosciences)

を用いて細菌や真菌の汚染の有無を調べた。

4. 統計解析

測定データは平均 ± 標準偏差で表し、値を比較する為に Wilcoxon 検定, Paired-t 検定及びカイ 2 乗検定を用いた。p 値は < 0.05 で有意差があると判断した。

結 果

1) 血小板数と MPV

血小板数は PO-80 とコントロール両バッグ群において 9 日間変化無く推移した。MPV は PO-80 バッグ群に比べ、コントロールバッグ群で 7 日目以降値が上昇する傾向にあったが、両群間に統計的有意差は認められなかった (Table 2)。

2) スワーリング

PO-80 バッグ群ではすべての血小板製剤において 9 日間までスワーリングパターンが確認された。一方、コントロール群においては保存期間 9

Table 2 Platelet count and mean platelet volume (MPV) on storage for 9 days

		day 0	day 1	day 3	day 5	day 7	day 9
Platelet count ($\times 10^4 / \mu l$)	PO-80	176.7 ± 16.8	177.0 ± 16.9	177.0 ± 24.6	165.2 ± 18.1	166.8 ± 19.5	165.3 ± 17.7
	Control	176.7 ± 16.8	171.8 ± 16.3	174.5 ± 23.4	167.7 ± 15.7	167.5 ± 14.9	159.5 ± 17.3
	P-value	N.S	N.S	N.S	N.S	N.S	N.S
MPV (fl)	PO-80	7.3 ± 0.2	7.0 ± 0.2	6.9 ± 0.2	7.1 ± 0.4	7.1 ± 0.3	7.2 ± 0.3
	Control	7.3 ± 0.2	7.1 ± 0.2	7.1 ± 0.3	7.1 ± 0.4	7.4 ± 0.6	7.8 ± 0.9
	P-value	N.S	N.S	N.S	N.S	N.S	N.S

Values are the mean ± SD, n = 6.

Table 3 Characteristics of high-concentrate PCs ($4 \times 10^{11} / 250ml$ plasma/bag) during storage in PO-80 and Control bags

A) Number of PCs by swirling score						
	0	score at day 7		0	Score at day 9 *	
		1 +	2 +		1 +	2 +
PO-80	0	0	6	0	3	3
Control	0	3	3	3	2	1
B) Number of PCs by pH value						
	< 6.2	pH at day 7 6.2 ~ 6.8		< 6.2	pH at day 7 6.2 ~ 6.8	
		> 6.8	> 6.8		> 6.8	
PO-80	0	5	1	1	5	0
Control	3	1	2	3	3	0

* P-value < 0.05

P-value by cumulative chi-square test between PO-80 and Control.

日目に半数(3/6)の血小板製剤でスワーリングパターンが消失した (Table 3-A) (P < 0.05)。

3) pH と血液ガス

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 (P > 0.05)。コントロールバッグ群は保存7日目で3例(3/6)において pH 6.2 以下を示し, 9日目にこの3例は各々 pH 6.0, 5.7, 5.7 と低い値を示した (Table 3-B)。

血液ガスのうち, pO₂ は製剤調整直後 (84.9 ± 15.6mmHg) と比較して, PO-80 バッグ群の1日目で約 26% 減少したが (1日目, 59.3 ± 13.4mmHg), 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群でも1日目に製剤調整直後と比べ 47% 減少し (1日目, 38.0 ± 8.9mmHg), その後, 1日目 (P < 0.01), 3日目 (P < 0.01) と低値を示し, 7日目を以降高値 (9日目, 116.0 ± 39.0mmHg)

を示す biphasic pattern を示し, 保存初期1日目, 3日目) で有意な差が確認された (Fig. 1-A)。pCO₂ においては両バッグともに9日目まで徐々に減少していく傾向を示したが, 5日目 (P < 0.05) と9日目 (P < 0.01) に有意な差が見られた (Fig. 1-B)。

4) グルコースと乳酸

グルコース及び乳酸ともに保存1日目に両群間で有意な差が確認された (P < 0.01)。9日目のコントロールバッグ群でグルコースの著しい低下 (4.4 mmol/l) と明らかな乳酸の増加 (15.08mmol/l) が観察され, PO-80 バッグではコントロールバッグに比べ穏やかな推移を示したが, 両群間では有意な差は確認されなかった (Fig. 2)。

5) 血小板凝集能と%HSR

凝集能及び%HSR は7日目まで両バッグともに緩やかに減少する同様な推移を示し, 5日目の凝集能で有意差が認められた (P < 0.05)。また, 9日目のコントロールバッグ群では 50% (3/6) で減

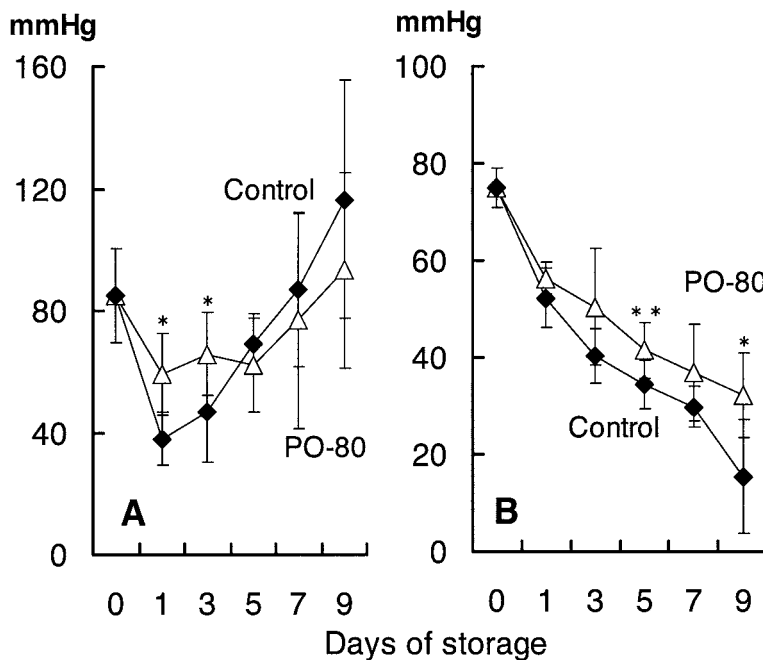


Fig. 1 Change in pO₂/pCO₂ of PCs stored for up to 9 days
 Data are expressed as the mean ± SD, n = 6.
 A ; pO₂, B ; pCO₂. ; PO-80, ; Control.*P < 0.01 ; **P < 0.05.

少が観察されたが有意な差は認めなかった (Table 4).

6) P セレクチン

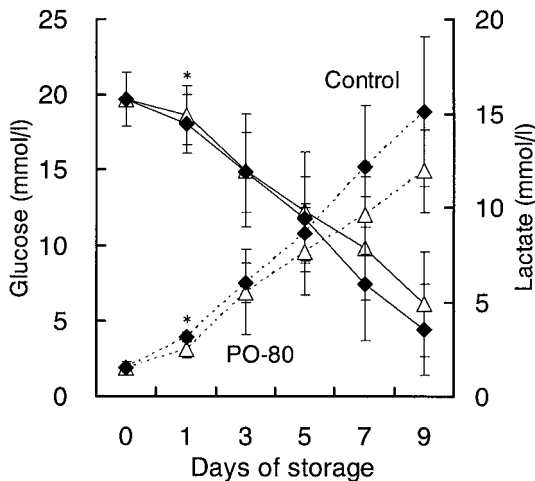


Fig. 2 Glucose level and Glycolysis metabolite (Lactate) on storage of PCs for up to 9 days
Data are expressed as the mean \pm SD, n = 6. ; PO-80, ; Control. — ; Glucose, --- ; Lactate. *P < 0.01.

膜型 P セレクチン陽性率 (n = 4) は 7 日目以降, PO-80 バッグ群よりもコントロールバッグ群で陽性率が高く, 統計的には両群間で差が見られなかったが, 9 日目では PO-80 バッグ群が平均陽性率 54.8% (n = 4) に対し, コントロールバッグ群では 80.5% と高い陽性率を示した (Table 4).

7) 細菌・真菌培養試験

細菌と真菌の培養試験では, 細菌・真菌の混入はすべての血小板製剤で否定された.

考 察

現在, 血小板製剤は採血後, 1 分間約 50~60 サイクルの速さで穏やかに水平振盪され, 室温 (20~24) 環境下で保存されている. 振盪保存が行われないと, 酸素の浸透が不十分となり, その結果, 血小板代謝が嫌気性に傾き, pH の低下, 血小板機能が著しく低下することが知られている⁹⁾. 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条件が必要である⁹⁾. 今回我々が新しく開発した高酸素透過性ポリオレフィンバッグ PO-80 は

Table 4 Platelet functions of platelets stored for up to 9 days Values are the mean \pm SD.

† by paired t-test (two-tailed)

	Day	PO-80	Control	P-value†
Aggregation (%), n = 6 ADP (5 μ mol/l) + collagen (5 μ g/ml)	0	82.8 \pm 5.5 (a)		(a) vs. (b), (c), (d), (e): 0.05
	1	79.5 \pm 4.5	79.8 \pm 4.3	N.S
	3	80.1 \pm 1.5	80.3 \pm 1.8	N.S
	5	78.5 \pm 4.2	76.3 \pm 3.9	N.S
	7	72.4 \pm 4.4 (b)	67.7 \pm 11.4 (b)	N.S
	9	62.7 \pm 17.7 (c)	42.3 \pm 28.6 (e)	N.S
Hypotonic shock response (%), n = 6	0	77.0 \pm 5.4 (a)		(a) vs. (b), (d): N.S; (a) vs. (c): 0.01; (a) vs. (e): 0.05
	1	76.6 \pm 6.4	74.1 \pm 3.1	N.S
	3	73.9 \pm 3.0	74.9 \pm 3.2	N.S
	5	71.2 \pm 2.1	71.9 \pm 4.1	N.S
	7	69.7 \pm 3.0 (b)	63.3 \pm 11.8 (d)	N.S
	9	59.8 \pm 8.3 (c)	32.2 \pm 31.0 (e)	N.S
P-selectin-positive (%), n = 4	0	19.68 \pm 8.9 (a)		(a) vs. (b): N.S; (a) vs. (c), (d): 0.05; (a) vs. (e): 0.01
	1	12.69 \pm 6.3	14.60 \pm 7.3	N.S
	3	16.91 \pm 9.3	17.08 \pm 9.0	N.S
	5	21.37 \pm 7.7	23.76 \pm 11.9	N.S
	7	36.61 \pm 7.6 (b)	58.83 \pm 21.4 (d)	N.S
	9	54.80 \pm 17.6 (c)	80.54 \pm 21.1 (e)	N.S

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可能とした。現在、世界で販売されているアフエーシス血小板バッグには1) PL2410 (ポリオレフィン; Baxter Healthcare Corp., USA), 2) CLX-plastic (PVC; MedSep Corp., USA), 3) ELP (PVC; Gambro BCT, USA), 国内では4) KBP-PO 及び5) HM-1000P (ともにポリオレフィン; 川澄化学工業) などがある。その中では酸素透過性が最良で、世界的に最も汎用されている PL2410 をコントロールバッグとして PO-80 を比較評価した。

血小板は通常、薄い円盤状の形をしており、時間経過と共に活性化してくると球状に変化する。この形態の変化は輸血後生存率と最も相関の高い指標とされ、円盤状から球状への変化はスワーリングパターンの低下として肉眼的に観察することができる。今回の研究では PO-80 バッグ群 6 個すべてのバッグで 9 日間スワーリングが確認できたが、コントロールバッグ群では保存 9 日目に半数の血小板製剤でスワーリングが消失した。スワーリング検査は客観性には欠けるが、ルーチンの工程検査として、また輸血前の品質の確認検査として簡便に施行することができる利点がある。今回の結果からもスワーリングが消失した血小板製剤は著しい機能の低下が見られた為、スワーリングが低下・消失した血小板は使用しない方がよい。

保存中の血小板の機能・活性の指標として pH がよく使われている。pH の低下は血小板にとって最も有害な条件で、pH 7.6 以上は細胞に有害なダメージを与える⁸⁾、また、pH が 6.8 になると生理的な代謝が損なわれはじめ、6.2 以下になると血小板の融解が起こると報告されている¹⁰⁾。今回の評価は両バッグ群ともに 9 日間 pH が 7.2 以上になることはなかった。また、コントロールバッグ群で 7 日目に半数が、PO-80 バッグ群では 9 日目に 6 バッグ中 1 バッグで pH 6.2 以下まで低下した。この現象は Demont *et al* (2002, 2003) 及び Yuasa *et al* (2004) が報告した 7 日間保存試験で、保存 5 日目に pH 6.2 以下を示した結果と同様で、血小板機能低下の指標として信頼性があると考え

られる。また、pH レベルと乳酸生成間には緊密な関係があることが知られている⁴⁾⁸⁾¹¹⁾。今回の結果で pH が 6.2 以下に低下した 4 例 (コントロールバッグ群 3 例、PO-80 バッグ群 1 例) では乳酸値が非常に高かった。また、乳酸生成の上昇が見られたバッグでは、同時にグルコースの著しい減少が観察され、経時的に逆相関関係を示していた。

血小板の止血効果の指標として低浸透圧ショック回復率 (%HSR) と凝集能がある。%HSR は細胞の低浸透圧を利用して、球状になった血小板の光透過性を測定し、球状から円盤状に血小板が回復する膜の状態を測定する試験である。凝集能試験は血小板に ADP + コラーゲンを加え、凝集が生じると光の透過性が増加することを原理とし、血小板の凝集能を測定する試験である。今回の結果、%HSR では PO-80 バッグ群の 9 日目で平均 60% を示したのに対し、コントロールバッグ群では平均 32% と膜の回復率が低かった。凝集能試験においても PO-80 バッグ群の 9 日目で平均 63% を示したのに対し、コントロールバッグ群では平均 42% と凝集率が低かった。また、P セレクチンは血小板製剤調整直後から血小板表面に検出され、保存の日数とともにその陽性数が増えてくるので血小板活性のマーカーとして有用とされている¹²⁾。膜型 P セレクチン陽性率は高いほど血小板が劣化しているとされ¹³⁾、今回の保存 9 日目には PO-80 バッグ群 55% に対して、コントロールバッグ群では 80% 以上とより高い陽性率を示し、活性化されている可能性が示唆された。

現在日本で市販されている第二世代バッグ (KBP-PO, 1,000ml 容量, 酸素透過度 1,900ml/m² × day × atm, 川澄化学工業) では、高単位血小板を保存してから 5 日目に代謝性の減少、乳酸の著しい蓄積、pH 低下、スワーリングの消失が認められた⁴⁾。今回試験した *in vitro* の評価項目では、現保存期間である 3 日間でも新バッグ PO-80 はそのまま代用でき、かつ 5 日又は 7 日間に有効期限が延長されても血小板をより容易に保存できる可能性が考えられた。しかし、止血効果や血小板機能を評価する為には最終的に *in vivo* での回収率評価が必要であり、今後の検討を予定している。

血小板製剤の有効期限は1985年米国で7日間保存に延長されたが、細菌汚染の危険性が增大した為、5日間保存に戻された¹⁴⁾¹⁵⁾。しかし、細菌検出システムや不活化技術の導入により、欧州諸国では有効期限を7日間に延長した国もある。今回、コントロールバッグとして使用したPL2410は酸素透過度 $2.024\text{ml}/\text{m}^2 \times \text{day} \times \text{atm}$ と優れた酸素透過性を有しているため、血小板製剤を良好に保存でき、米国FDAから7日間保存のライセンスを得ている。このことから血小板製剤を保存するのに、高酸素透過性バッグを使用した方がより良いと考えられる。今回の成績からPO-80はグルコースの消費速度、乳酸の蓄積スピードにおいて好気性代謝がより良好に維持される可能性が示唆された。酸素透過性を向上したバッグは高単位血小板を保存するのにより適しているものと考えられる。

文 献

- 1) Dumont L.J & van den Broeke T : Seven-day storage of apheresis platelets : report of an in vitro study. *Transfusion*, 43 : 143 150, 2003.
- 2) Dumont L.J, AuBuchon J.P, Whitley P, et al : Seven-day storage of single-donor platelets : recovery and survival in an autologous transfusion study. *Transfusion*, 42 : 847 854, 2002.
- 3) de Wildt-Eggen J, Schrijver J.G, Smid W.M, et al : Platelets stored in a new-generation container. *Vox Sang*, 75 : 218 223, 1998.
- 4) Yuasa T, Ohto H, Yasunaga R, et al : Improved extension of platelet storage in a polyolefin container with higher oxygen permeability. *British Journal of Haematology*, 126 : 153 159, 2004.
- 5) Pieter F, van der Meer, Ruby N.I. Pietersz, et al : Storage of platelets in additive solution for up to 12 days with maintenance og good in-vitro quality. *Transfusion*, 44 : 1204 1211, 2004.
- 6) Yuasa T, Ohto H, Suzuki A, et al : New plasma-reduced synthetic media, Fukushima cocktails, for the storage of platelets for transfusion. *Transfusion Science*, 23 : 37 46, 2000.
- 7) Edwin AB, Jeffrey L.W, Alvaro A.P : Paired comparison of Gambro Trima Accel versus Baxter Amicus single-needle plateletpheresis. *Transfusion*, 44 : 1612 1620, 2004.
- 8) Murphy S, Kahn R.A, Holme S, Phillips G.L, et al : Improved storage of platelets for transfusion in a new container. *Blood*, 60 : 194 200, 1982.
- 9) de Wildt-Eggen J, Schrijver J.G, Bouter-Valk H.J, et al : Improvenment of platelet storage conditions by using new polyolefin containers. *Transfusion*, 37 : 476 481, 1997.
- 10) Ishikawa Y, Sasakawa S : Platelet storage in glow discharged-treated polyvinylchloride bags : Effects of a plasticizer on platelet hypotonic shock response. *Vox Sang*, 47 : 330 334, 1984.
- 11) Van der Meer P, Pietersz R & Reesink H : Leucoreduced platelet concentrates in additive solution : an evaluation of filters and storage containers. *Vox Sang*, 81 : 102 107, 2001.
- 12) Fijnheer R, Modderman P.W, Veldman H, et al : Detection of platelet activation with monoclonal antibodies and flow cytometry. *Transfusion*, 30 : 20 25, 1990.
- 13) Holme S, Sweeney J.D, Sawyer S, et al : The expression of p-selectin during collection, processing, and storage of platelet concentrates : relationship to loss of in vivo viability. *Transfusion*, 37 : 12 17, 1997.
- 14) Lee D.H & Blajchman M.A : Novel platelet products and substitutes. *Transfusion Medicine Reviews*, 12 : 175 187, 1998.
- 15) Kuehnert J.M, Virginia R, Roth N, et al : Transfusion-transmitted bacterial infection in the United States, 1998 through 2000. *Transfusion*, 41 : 1493 1499, 2000.