

## 冷蔵保存した血小板保存液置換血小板の品質に対する 保存期間中の一時的室温曝露の影響

福田 香苗<sup>1)</sup> 小池 敏靖<sup>1)</sup> 平山 順一<sup>1)</sup> 宮田 茂樹<sup>1)</sup> 柴 雅之<sup>1)</sup>  
五十嵐 滋<sup>1)</sup> 永井 正<sup>2)</sup> 佐竹 正博<sup>1)</sup>

我々は、血漿の約65%をplatelet additive solution置換した血小板(PAS-PC)を冷蔵保存した際の*in vitro*での品質が14日間維持されることを既に本誌に報告した。しかし、保管中に一旦病棟へ払い出すなど、保冷庫から出した際の温度変化による品質変化が危惧される。冷蔵保存(18時間)後にPAS-PCを室温曝露した影響を調べるため、一時的(30分, 4時間)に25℃(室温温度とした)へ曝露した場合と、30分間25℃へ曝露した後、24時間22℃(PC保管温度)で振とう保存した場合の品質変化を検討した。

室温曝露は、血小板濃度, pHに影響しなかった。血小板凝集能(ADP+Collagen同時添加)と低浸透圧ショック回復率は、室温曝露時間が長くなるに従い上昇する傾向を示した。CD62P平均蛍光強度は、冷蔵保存を継続した対照に比し4時間以上の曝露で有意に高値を示した。PAS-PCの冷蔵保存中の一時的な室温曝露は、短時間(30分間)を除き徐々に血小板活性化を促進させることが示唆され、保存後の室温曝露が、その輸血効果に影響を与える可能性がある。よって、品質を考慮すると、短時間に抑えることが望ましい。

キーワード：冷蔵保存血小板, 血小板保存液, 室温曝露, 血小板活性化, CD62P

### 緒 言

血小板製剤(platelet concentrate: PC)は、1970年代には冷蔵(4℃)保存が行われており<sup>1)</sup>、日本赤十字社においてもPCを製造開始した(1967年)当初は、5℃で調製および保存を行っていた。しかし、輸血後血小板生存率が低下することや<sup>2)3)</sup>、保存に伴い凝集塊が形成され、血小板濃度が有意に減少する<sup>4)</sup>といった欠点のため、遅くとも1975年には5℃に代わり22℃が採用され、その後、現状の22±2℃での振とう保存が標準的保存法となった。

そんな中、冷蔵保存PCは、22℃保存PCと比較し輸血した際の止血効果が高いことが報告されており<sup>5)~7)</sup>、さらに冷蔵保存すると細菌増殖が抑制できるといった利点もあるため、冷蔵保存PCが再び注目されている<sup>1)</sup>。特に、PCの血漿の一部を血小板保存液(platelet additive solution: PAS)で置換したPAS血小板(PAS-PC)の冷蔵保存では、PCの場合とは異なり凝集塊の形成が抑制され、保存中の血小板濃度が維持されることが明らかになり、再び冷蔵保存の有効性、安全性に対する検討が進められている<sup>4)8)</sup>。また、PASに置換した分の血漿は血漿原料への有効利用にも役立つ。既に我々は、

PASとしてT-PAS+(テルモBCT社製)を用いて、血漿の65%を置換したPAS-PCを調製し、冷蔵保存した際の品質を解析し、CD62P陽性率やAnnexin-V結合率等の上昇がみられるものの、14日間凝集塊は発生せず血小板濃度やpH、血小板凝集能が良好に維持されることを報告している<sup>9)</sup>。

冷蔵保存された血液製剤は、搬送時や輸血検査、一旦病棟へ払い出した場合など、一時的に保冷庫から出した際の温度変化によって品質が変化する可能性がある<sup>10)11)</sup>。しかし、PAS-PCについて、一時的な室温への曝露が、製剤の品質に影響を与えるのか検討した報告はない。

今回、冷蔵保存したPAS-PCを一時的(30分, 4時間)に25℃へ曝露した場合と、30分間25℃へ曝露した後、24時間継続して22℃で振とう保存した場合の品質変化を実験的に検討し、一時的な室温曝露による温度変化が血小板機能に与える影響を検討した。

### 対象および方法

#### 1. PAS-PCの調製

検査不適格の分割対象血小板原料血液由来の10単位

1) 日本赤十字社血液事業本部中央血液研究所

2) 栃木県赤十字血液センター

[受付日: 2019年9月6日, 受理日: 2020年3月15日]

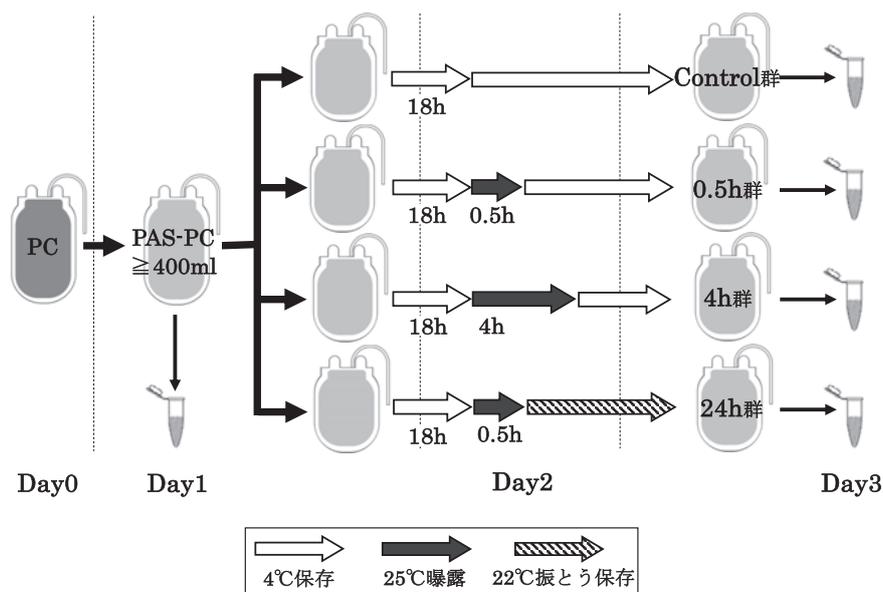


図1 4℃ 保存 PAS-PC に対する室温曝露の影響の検討

Day 2 まで18時間4℃ 静置保存した5単位相当のPAS-PCを用い、以下の4群に分けて検討した。

- ①対照として引き続き4℃ 静置保存 (Control 群)
- ②30分間25℃ へ振とうせずに曝露したのち再び4℃ 静置保存した群 (0.5h 群)
- ③4時間25℃ へ振とうせずに曝露したのち再び4℃ 静置保存した群 (4h 群)
- ④30分間25℃ へ振とうせずに曝露したのち24時間継続して22℃ で振とう保存した群 (24h 群)

PCを使用した。採血日を Day 0 として、Day 1 にて10 単位 PC2 本 (同一ドナー由来) をプール後、大容量冷却遠心機 (CR7N, 日立工機社製) で遠心分離 (2,560 g, 22℃, 10 分) し、全容量の 65% 分の血漿を除去し 30 分静置した。その後、同量の T-PAS+ を添加し、血小板振とう機 (PRK-Mini-S, PRECI 社製) で1時間振とう (22℃, 60 サイクル/分) することにより再懸濁した。その後、血液分離用バッグ (KBP-600FPN, 川澄化学工業社製) に4等分し、5単位相当 (約 100ml) の PAS-PC を4バッグ作製した。

## 2. 血液バッグ内の温度測定

冷蔵 (4℃) 保存した PAS-PC を室温 (25℃) へ曝露した際の血液バッグ内の温度上昇および4時間後に再び4℃ 保存した際の温度下降を測定した。測定にはデータロガー (おんどとり TR-71U, T&D Corporation) を使用した。上述の方法で調製した5単位相当の PAS-PC の血液バッグ内部に温度センサーを取り付け、測定を行った (n=3)。なお、室温として、赤血球製剤の検討において、品質に著しい変化を引き起こすことが報告されている<sup>12)13)</sup>25℃ を選択した。

## 3. 4℃ 保存 PAS-PC の室温曝露

調製した5単位相当の PAS-PC は、全て Day 2 まで18時間4℃ 静置保存した。その後、保冷库 (4℃) 外へ曝露された影響を調べるために、4バッグ中3バッグは、

それぞれ、30分間25℃ へ振とうせずに曝露したのち再び4℃ 静置保存した群 (0.5h 群)、4時間25℃ へ振とうせずに曝露したのち再び4℃ 静置保存した群 (4h 群)、30分間25℃ へ振とうせずに曝露したのち24時間継続して22℃ で振とう保存した群 (24h 群) に分けて検討した (図1)。残りの1バッグは対照として引き続き4℃ 静置保存 (Control 群) した。本検討は、異なる5製剤を用いて実施した。なお、0.5h 群と4h 群は、搬送時や、輸血部門、病棟での準備・検査等で「一時的に」保冷库から出された場合を想定しているため、実際に輸血に使用するまで再び保冷库 (4℃ 静置) に戻した後に評価することとした。

## 4. 試験用検体の採取

無菌接合装置 (TSCD-II, テルモ BCT 社製) を用いて、PAS-PC と血液分離用バッグ (KBP-50C-2, 川澄化学工業社製) を接続し、試験用検体を採取した。検体の採取は、Day 1 (PAS-PC 調製後分割前) と Day 3 に行った (図1)。

## 5. 試験方法

血小板濃度は、多項目自動血球分析装置 (xs800i, シスメックス社製) を用いて測定した。

pH, 二酸化炭素分圧 (pCO<sub>2</sub>), 酸素分圧 (pO<sub>2</sub>) およびグルコース濃度は血液ガス分析装置 (Rapid Point 405, SIEMENS 社製) を用いて測定した。

血小板凝集能および低浸透圧ショック回復率(%HSR)には、AB型血漿で試験用検体を血小板濃度 30 万/ $\mu$ l<sup>14)</sup>に希釈した多血小板血漿 (PRP) を用いた。血小板凝集能は、血小板凝集能測定装置 (PRP313M, タイヨウ社製) を用いて測定した。PRP に CaCl<sub>2</sub> (和光純薬工業社製, 最終濃度 4mM) 存在下で, Collagen (モリヤ産業社製, 最終濃度 2.5 $\mu$ g/ml) と ADP (アークレイファクトリー社製, 最終濃度 5 $\mu$ M) を同時添加した際の最大凝集率, および Collagen (最終濃度 5 $\mu$ g/ml), ADP (最終濃度 10 $\mu$ M), または Ristocetin (ABP 社製, 最終濃度 1.5mg/ml) をそれぞれ単独添加した際の最大凝集率を血小板凝集能とした。%HSR は, PRP に 1/2 容量の蒸留水を加えた際の透過度の変化を分光光度計 (UV-2550, 島津製作所社製) で測定した<sup>15)</sup>。

血小板表面マーカー (CD42b, CD62P, CD63, PAC-1 および Annexin-V) は, フローサイトメーター (Cytomics FC 500, ベックマン・コールター社製) を用いて測定した。

CD42b 陽性率と平均蛍光強度 (MFI) は, 血小板を PE 標識抗 CD42b 抗体 (eBioscience 社製) と PerCP 標識抗 CD61 抗体 (BD Bioscience 社製), CD62P 陽性率と MFI は, PE 標識抗 CD62P 抗体 (BD Bioscience 社製) と PerCP 標識抗 CD61 抗体, CD63 陽性率と MFI は, PE 標識抗 CD63 抗体 (ベックマン・コールター社製) と PC5 標識抗 CD41 抗体 (ベックマン・コールター社製), PAC-1 陽性率は, FITC 標識抗 PAC-1 抗体 (BD Bioscience 社製) と PerCP 標識抗 CD61 抗体を用いて染色した細胞を 1% パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液 (和光純薬工業社製) で固定した後に測定した。この際, 陰性コントロールに CD42b は PE 標識抗マウス IgG1 $\kappa$  抗体 (eBioscience 社製), CD62P は PE 標識抗マウス IgG1 抗体 (BD Bioscience 社製), CD63 は PE 標識抗マウス IgG1 抗体 (ベックマン・コールター社製) を, PAC-1 は競合阻害剤である RGDS ペプチド (Sigma-Aldrich 社製) を用いた。Annexin-V 結合率は, Annexin-V-FITC Apoptosis Detection Kit (Sigma-Aldrich 社製) を用いて測定した。評価方法は, PE および FITC log スケール上で, 陰性コントロールの 0.5% が陽性となる位置を陽性細胞決定のための境界とした。

## 6. 統計処理

結果は平均値  $\pm$  標準偏差で示した。Control 群の値を比較対象とし, 0.5h 群, 4h 群, 24h 群において One-way ANOVA で検定後, Dunnett test を用い多重比較検定を行った。危険率 (P) 5% 未満を有意差ありと判定した。統計解析ソフトは GraphPad Prism 7J (エムデーエフ) を用いた。

## 7. 研究倫理

本研究は日赤倫理委員会による承認のもと行った。

## 結 果

### 1. 血液バッグ内の温度変化

4°C 保存した PAS-PC を 25°C へ曝露し, 再び 4°C 保存した際の血液バッグ内の温度変化を図 2 に示した。4°C 保存した血液バッグ内の温度は, 25°C へ曝露後 3 分で 10°C を上回り, 30 分で 18.7°C, その後緩やかに上昇し, 22°C まで上昇するには 1 時間以上を要し, 25°C まで達するには 4 時間程度かかった。その後, 再び 4°C 保存したのち血液バッグ内の温度が十分に冷却される (6°C 以下) までには平均 52 分を要した

### 2. 容量, 総血小板数

調製後の PAS-PC と 4 分割後の PAS-PC の容量と総血小板数を表 1 に示した。

### 3. 血小板濃度, 血液ガス分析

血小板濃度と pH は, Control 群といずれの群との間においても有意差は認められなかった (表 2)。

pCO<sub>2</sub> は, 室温曝露時間が長くなるに従い上昇する傾向を示したが, Control 群といずれの群との間においても有意差は認められなかった。pO<sub>2</sub> は, 室温曝露時間が長くなるに従い Day1 との差が縮まり, 24h 群で有意に低値を示した。グルコース濃度は, 室温曝露時間が長くなるに従い減少する傾向を示したが, Control 群といずれの群との間においても有意差は認められなかった。Day3 で外観を観察したところ, 全ての群でスワリングは消失した。また, 血小板凝集塊の発生はみられなかった (データ示さず)。

### 4. 血小板凝集能, 低浸透圧ショック回復率

Collagen と ADP を同時添加した凝集能は, 室温曝露時間が長くなるに従い上昇する傾向がみられ, 4h 群と 24h 群で有意に高値を示した (表 3)。Collagen 単独添加でも, 室温曝露時間が長くなるに従い上昇する傾向がみられ, 24h 群で有意に高値を示した。ADP および Ristocetin 単独添加では, Control 群といずれの群との間においても有意差は認められなかった。%HSR は, 4h 群および 24h 群で有意に高値を示した。

### 5. 血小板表面マーカー

CD42b 陽性率と MFI は, Control 群といずれの群との間においても有意差は認められなかった (表 4)。CD62P 陽性率と MFI は, どちらも 4h 群および 24h 群で有意に高値を示した。CD63 陽性率は, Control 群といずれの群との間においても有意差は認められなかった。また, CD63-MFI は, 24h 群で有意に高値を示した。PAC-1 陽性率と Annexin-V 結合率は, どちらも Control 群といずれの群との間においても有意差は認められなかった。

## 考 察

本検討において, 測定した全ての項目で Control 群と

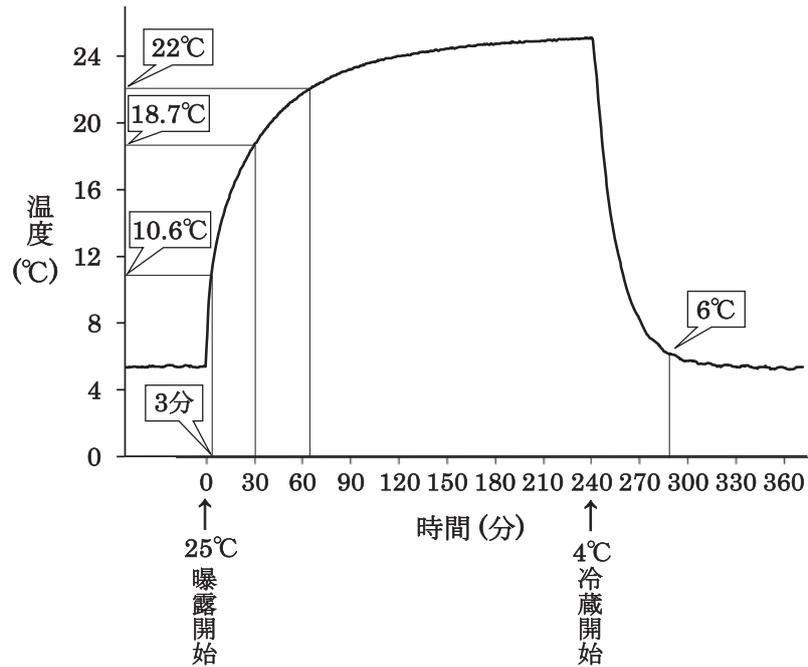


図2 PAS-PC血液バッグ内温度変化  
4°C保存したPAS-PCを25°Cへ曝露し、再び4°C保存した際の血液バッグ内の温度変化について、温度センサーを取り付けて測定。3回測定した結果を平均したグラフを示す。

表1 容量, 総血小板数 (Mean ± SD, n = 5)

	調製後	4分割後			
		Control群	0.5h群	4h群	24h群
容量 (ml)	427.6 ± 11.8	98.8 ± 6.2	99.0 ± 6.4	99.3 ± 7.3	100.3 ± 7.6
総血小板数 (×10 <sup>11</sup> 個)	4.3 ± 0.4	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0

表2 血小板濃度, 血液ガス分析 (Mean ± SD, n = 5)

	Day1	Day3			
		Control群	0.5h群	4h群	24h群
血小板濃度 (×10 <sup>4</sup> /μl)	100.1 ± 7.4	102.7 ± 6.9	103 ± 8.4	103 ± 8.0	101.4 ± 6.8
pH (at 22°C)	7.36 ± 0.02	7.24 ± 0.04	7.22 ± 0.03	7.2 ± 0.04	7.23 ± 0.05
pCO <sub>2</sub> (mmHg)	7.1 ± 0.8	8.3 ± 0.7	8.6 ± 0.5	9.1 ± 0.6	9.3 ± 0.9
pO <sub>2</sub> (mmHg)	47.6 ± 6.4	152.2 ± 18.6	150.2 ± 11.5	136.9 ± 9.1	55.9 ± 5.0*
グルコース濃度 (mg/dl)	143.6 ± 20.1	129.4 ± 15.4	125.6 ± 19.3	124.4 ± 20.9	120 ± 17.0

\*vs. Control : 1way ANOVA Dunnett test, P<0.05

表3 血小板凝集能, 低浸透圧ショック回復率 (Mean ± SD, n = 5)

	Day1	Day3			
		Control群	0.5h群	4h群	24h群
Collagen + ADP (%)	77.2 ± 4.7	64.8 ± 8.6	72.4 ± 5.5	75.2 ± 4.9*	79.4 ± 3.6*
Collagen (%)	63.6 ± 20.8	16.8 ± 9.8	23.8 ± 16.8	40.2 ± 16.7	62.8 ± 18.5*
ADP (%)	27.0 ± 11.0	15.0 ± 3.2	15.4 ± 2.4	16.2 ± 2.3	17.6 ± 5.5
Ristcetin (%)	84.4 ± 5.2	85.8 ± 4.5	85.2 ± 5.5	84.8 ± 5.9	81.4 ± 5.9
低浸透圧ショック回復率 (%)	77.7 ± 6.2	42.0 ± 9.6	45.4 ± 6.0	56.9 ± 4.5*	72.3 ± 4.4*

\*vs. Control : 1way ANOVA Dunnett test, P<0.05

表4 血小板表面マーカー (Mean ± SD, n=5)

	Day1	Day3			
		Control 群	0.5h 群	4h 群	24h 群
CD42b (%)	99.8±0.08	99.9±0.09	99.9±0.05	99.8±0.04	99.6±0.34
CD42b (MFI)	73.4±8.1	64.4±4.9	65.6±3.9	64.1±4.7	58.8±6.3
CD62P (%)	38.2±5.9	56.6±5.1	65.3±4.9	75.5±5.4*	66.2±6.0*
CD62P (MFI)	5.1±1.0	4.9±0.8	5.2±0.9	9.6±1.2*	11.8±1.4*
CD63 (%)	10.2±5.3	9.0±5.1	10.6±5.7	13.5±5.6	13.8±4.9
CD63 (MFI)	3.5±0.3	3.4±0.3	3.6±0.2	3.8±0.3	4.1±0.6*
PAC-1 (%)	1.3±0.5	1.1±0.3	1.9±1.3	3.3±2.3	2.8±0.7
Annexin-V (%)	2.9±0.7	6.9±2.4	5.4±1.2	8.6±1.3	8.8±2.3

\*vs. Control : 1way ANOVA Dunnett test, P<0.05

0.5h 群の間に有意差は認められなかった。しかし、CD62P および CD63 の MFI が経時的に増加したことから、室温曝露時間が長くなるに従い血小板の活性化が促進されることが示唆された。

CD62P は、 $\alpha$  顆粒の膜成分であり、血小板が活性化された際に顆粒の放出とともに血小板表面での発現増加が認められる活性化マーカーである<sup>16)17)</sup>。CD62P 陽性率と MFI は、血小板表面マーカーの中でも特に値の変化が顕著であり、4 時間以上の曝露で有意に高値を示した。

CD63 は、CD62P と同様に顆粒の放出とともに血小板表面での発現増加が認められるが<sup>18)19)</sup>、CD62P と比べて値の上昇は緩やかであった。CD63 はリソソーム顆粒の膜成分であり、CD62P とは由来する顆粒が異なり、血小板保存後期に上昇する活性化マーカーである。そのため、4 時間まで曝露しても CD63 の有意な上昇はみられなかったが、24h 群では MFI が高値を示したため、より活性化が進行していると考えられる。

血小板凝集能 (Collagen 単独添加) は、室温へ曝露した 0.5h, 4h, 24h 群に比べて Control 群が低下傾向であった。実際、PAS-PC は、冷蔵後に Collagen 凝集能の低下がみられると報告されている<sup>8)9)</sup>。そのため、0.5h, 4h, 24h 群は Control 群よりも一見その低下は緩やかであるように判定できるが、18 時間 4℃ 静置した時点では、Control 群と同程度まで一旦低下しており、その後、室温曝露したことによって、Control 群よりも上昇したと考えられる。つまり、冷蔵保存中に室温曝露することで Collagen 凝集能が回復することが示唆された。凝集能 (ADP+Collagen 同時添加) と %HSR についても、過去の論文<sup>20)</sup>にて冷蔵後に低下することが報告されるため、Collagen 凝集能と同様に、Control 群と同程度まで一旦低下したものが室温曝露したことによって回復していると考えられる。実際、室温曝露の時間が長い程、グルコースの低下が認められることなどを踏まえると、血小板での代謝が進行していることが示唆される。しかし、本検討では、血小板の活性化による脱顆粒反応は不可逆的であり、室温曝露時間が長い

程亢進する結果が得られた。特に CD62P は Control 群に対して 4h 群で陽性率が約 1.3 倍上昇し、さらに MFI では約 2.0 倍まで上昇した。CD62P の発現が高値になると、輸血後血小板生存率が低下することが指摘されている<sup>21)~23)</sup>。そのため、製剤として期待される一定の輸血効果を得るためには、搬送時や、輸血部門、病棟での準備・検査等で偶発的に起こる室温曝露は、短時間に抑えることが望ましいと考える。

本検討では、30 分または 4 時間を一時的な室温曝露の時間として設定した。30 分は緒言で述べたように、血液の搬送時や、輸血部門、病棟での準備・検査等得ず保冷庫から出した場合を想定しており、4 時間は、図 2 の検証の通り、室温へ曝露して十分 25℃ まで上昇する時間として設定した。室温曝露の時間がどこまで許容されるのか判断するためには、今後、1 時間や 2 時間の曝露や輸血時を想定した検討を行う必要があると考える。

血小板は冷蔵保存中に、室温保存よりある程度活性化され、輸血後に迅速に止血能を発揮する状態となる (ただし、血小板生存率及び回収率は低下すること、このいわゆる “priming effect” は、長期間冷蔵では、不可逆的な変化であることが指摘されている<sup>24)</sup>。一方、本検討では室温曝露するまでの冷蔵保存時間を 18 時間と設定したが、過去の論文<sup>24)</sup>では、冷蔵保存時間が 18 時間以内であれば、血小板の冷蔵保存による形態的、機能的変化は一時的であると報告されている。また、Vostal らの報告<sup>3)</sup>では、凝集能や %HSR は、継続して冷蔵保存した血小板に比べて、冷蔵保存中に周期的に (11 時間毎に 1 時間 37℃) 加温した血小板の方が良好であり、生体内での循環動態も良好であったと報告されている。よって、本検討でも、血小板機能は室温曝露後も保持されている、もしくはむしろ良好である可能性が考えられる。PAS-PC を用いたこのような検討は、本検討が初めての報告となるが、PAS-PC も冷蔵後 18 時間で室温へ再加温したことによって、同様の回復すなわち “priming effect” からの解除が起きた可能性

が示唆される。この現象を活用した製剤開発や、製剤の保管管理を行うことで、さらなる有効期限の延長など、より効果的な血小板輸血が実施できる可能性も否定できない。今後、冷蔵保存の環境条件の最適化に向けて、より詳細に検討する必要がある。また、*in vitro*での評価には限界があり、必ずしも*in vivo*の成績につながる可能性もあるため、最終的には室温曝露が輸血後血小板生存率や止血能に与える影響を*in vivo*で検証する必要があると考える。

本検討から、冷蔵PAS-PCの品質変化を抑えるためには、保存中は保冷庫からできる限り出さないことが望ましいと考えられる。しかし、冷蔵PAS-PCを保冷剤入りの発泡スチロールのボックス内で保存したところ、6時間経過してもCD62P陽性率とMFIは上昇しなかった(データ示さず)。そのため、常に保冷庫のある環境でなくても、上述のような簡易的な方法で使用前の活性化を抑えることが可能であると示唆される。また今回、少なくとも30分程度の室温曝露は品質変化に影響を与えない可能性を示唆できたことは、今後、臨床試験を行う際のプロトコル作成、評価基準の検討に有意義な情報となりえると思われる。

## 結 語

血液製剤としての品質の同等性を保持するためには、冷蔵保存PAS-PCの搬送時や、輸血部門、病棟での準備・検査等に起こる一時的な室温曝露は、できるだけ短時間に抑えることが望ましいと考えられた。また、室温曝露によって冷蔵による血小板活性化の程度が変化する可能性が示唆され、この現象の詳細をさらに検討することで、より効果的な血小板輸血が実施できる可能性が示唆された。

著者のCOI開示：宮田茂樹：受託研究費(田辺三菱製薬, 第一三共), 講演料(第一三共)

## 文 献

- 1) Apelseh TO, Cap AP, Spinella PC, et al: Cold stored platelets in treatment of bleeding. ISBT Science Series, 12: 488—495, 2017.
- 2) Murphy S, Gardner FH: Effect of storage temperature on maintenance of platelet viability--deleterious effect of refrigerated storage. N Engl J Med, 280: 1094—1098, 1969.
- 3) Vostal JG, Gelderman MP, Skripchenko A, et al: Temperature cycling during platelet cold storage improves *in vivo* recovery and survival in healthy volunteers. Transfusion, 58: 25—33, 2018.
- 4) Getz TM, Montgomery RK, Bynum JA, et al: Storage of platelets at 4°C in platelet additive solutions prevents aggregate formation and preserves platelet functional responses. Transfusion, 56: 1320—1328, 2016.
- 5) Becker GA, Tucceli M, Kunicki T, et al: Studies of platelet concentrates stored at 22C and 4C. Transfusion, 13: 61—68, 1973.
- 6) Apelseh TO, Kristoffersen EK, Kvalheim VL, et al: Transfusion with cold stored platelets in patients undergoing complex cardiothoracic surgery with cardiopulmonary bypass circulation: effect on bleeding and thromboembolic risk. Abstract Presentations from the AABB Annual Meeting, San Diego, CA, Oct 9, 2017.
- 7) Stolla M, Fitzpatrick L, Gettinger I, et al: *In vivo* viability of extended 4°C-stored autologous apheresis platelets. Transfusion, 58: 2407—2413, 2018.
- 8) Johnson L, Tan S, Wood B, et al: Refrigeration and cryopreservation of platelets differentially affect platelet metabolism and function: a comparison with conventional platelet storage conditions. Transfusion, 56: 1807—1818, 2016.
- 9) 小池敏靖, 福田香苗, 平山順一, 他: 血漿を血小板保存液に置換した血小板製剤の冷蔵保存時の品質. 日本輸血細胞治療学会誌, 64: 726—732, 2018.
- 10) 内藤 祐, 秋野光明, 柴 雅之, 他: 低温保存から10°Cまたは28°Cに曝露された赤血球製剤の品質. 日本輸血細胞治療学誌, 63: 748—756, 2017.
- 11) Thomas S, Hancock V, Cardigan R: Repeated short-term warming of red blood cell concentrates has minimal effect on their quality. Vox Sanguinis, 103: 113—121, 2012.
- 12) Ruddell JP, Lippert LE, Babcock JG, et al: Effect of 24-hour storage at 25 degrees C on the *in vitro* storage characteristics of CPDA-1 packed red cells. Transfusion, 38: 424—428, 1998.
- 13) Reid TJ, Babcock JG, Derse-Anthony CP, et al: The viability of autologous human red cells stored in additive solution 5 and exposed to 25 degrees C for 24 hours. Transfusion, 39: 991—997, 1999.
- 14) VandenBroeke T, Dumont LJ, Hunter S, et al: Platelet storage solution effects on the accuracy of laboratory tests for platelet function: a multi-laboratory study. Vox Sanguinis, 86: 183—188, 2004.
- 15) Holme S, Moroff G, Murphy S: A multi-laboratory evaluation of *in vitro* platelet assays: the tests for extent of shape change and response to hypotonic shock. Biomedical Excellence for Safer Transfusion Working Party of the International Society of Blood Transfusion. Transfusion, 38: 31—40, 1998.

- 16) George JN, Pickett EB, Saucerman S, et al: Platelet surface glycoproteins. Studies on resting and activated platelets and platelet membrane microparticles in normal subjects, and observations in patients during adult respiratory distress syndrome and cardiac surgery. *J Clin Invest*, 78: 340—348, 1986.
- 17) Stenberg PE, McEver RP, Shuman MA, et al: A platelet alpha-granule membrane protein (GMP-140) is expressed on the plasma membrane after activation. *J Cell Biol*, 101: 880—886, 1985.
- 18) Nieuwenhuis HK, van Oosterhout JJ, Rozemuller E, et al: Studies with a monoclonal antibody against activated platelets: evidence that a secreted 53,000-molecular weight lysosome-like granule protein is exposed on the surface of activated platelets in the circulation. *Blood*, 70: 838—845, 1987.
- 19) Metzelaar MJ, Wijngaard PL, Peters PJ, et al: CD63 antigen. A novel lysosomal membrane glycoprotein, cloned by a screening procedure for intracellular antigens in eukaryotic cells. *J Biol Chem*, 266: 3239—3245, 1991.
- 20) Skripchenko A, Gelderman MP, Awatefe H, et al: Automated cold temperature cycling improves in vitro platelet properties and in vivo recovery in a mouse model compared to continuous cold storage. *Transfusion*, 56: 24—32, 2016.
- 21) Rinder HM, Murphy M, Mitchell JG, et al: Progressive platelet activation with storage: evidence for shortened survival of activated platelets after transfusion. *Transfusion*, 31: 409—414, 1991.
- 22) Holme S, Sweeney JD, 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.
- 23) Baimukanova G, Miyazawa B, Potter DR, et al: The effects of 22°C and 4°C storage of platelets on vascular endothelial integrity and function. *Transfusion*, 56: S52—S64, 2016.
- 24) McGill M: Temperature cycling preserves platelet shape and enhances in vitro test scores during storage at 4 degrees. *J Lab Clin Med*, 92: 971—982, 1978.

## IMPACT OF TEMPORAL WARMING OF ROOM TEMPERATURE ON THE QUALITY OF REFRIGERATED PLATELET CONCENTRATES IN A PLATELET ADDITIVE SOLUTION: AN *IN VITRO* EXPERIMENTAL EVALUATION

Kanae Fukuda<sup>1)</sup>, Toshiyasu Koike<sup>1)</sup>, Junichi Hirayama<sup>1)</sup>, Shigeki Miyata<sup>1)</sup>, Masayuki Shiba<sup>1)</sup>, Shigeru Igarashi<sup>1)</sup>, Tadashi Nagai<sup>2)</sup> and Masahiro Satake<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Central Blood Institute, Blood Service Headquarters, Japanese Red Cross Society

<sup>2)</sup>Tochigi Prefecture Red Cross Blood Center

### **Abstract:**

Our previous *in vitro* study suggested that platelet concentrates (PCs) suspended in 35% plasma with 65% platelet additive solution (PAS) can be refrigerated (2-6°C) with good quality for 14 days. In clinical practice, however, refrigerated PAS-PCs may be exposed to room temperature, e. g., when issued to wards. The possibility of a change in platelet function during warming is therefore of concern.

We evaluated the impact of exposure to 25°C (room temperature) for 30 minutes or 4 hours during storage, or to 25°C for 30 minutes followed by 24-hour storage at 22°C (PC-storage temperature) with agitation on the *in vitro* quality of PAS-PCs after refrigeration for 18 hours.

Temporal warming to 25°C or 24-hour exposure to 22°C did not alter the pH or platelet concentration of refrigerated PAS-PCs. However, hypotonic shock response and maximal platelet aggregation response to collagen and ADP increased as a function of exposure time. The mean fluorescence intensity of CD62P became significantly higher 4 hours after exposure to 25°C than that in continuously refrigerated PAS-PCs, suggesting that temporal warming (except within 30 minutes) to room temperature gradually activates platelets in refrigerated PAS-PCs. Temporal warming may influence the efficacy of refrigerated PAS-PC transfusion. Exposure to room temperature should therefore be minimized to achieve the expected transfusion efficacy.

### **Keywords:**

cold-stored platelets, platelet additive solution, exposure to room temperature, platelet activation, CD62P