Japanese Journal of Transfusion and Cell Therapy, Vol. 69. No. 4　69（4）：553―561, 2023

【論文記事】　Secondary Publication

流路下で再構成血液の白色血栓形成における血小板製剤の寄与を評価する新しい定量法

渕崎　晶弘[1)]　保井　一太[1)]　林　智也[1)]　田中　光信[1)]　永里　朋香[2)]
大西（和田）朋子[2)]　細川　和也[2)]　藤村　吉博[1)]　下垣　一成[1)]　平山　文也[1)]
瀧原　義宏[1)]　木村　貴文[1)]

【背景と目的】現在，血小板（Platelet：PLT）製剤の品質評価は，検査材料としてのPLTのみを分析する一連の *in vitro* 試験で行われている．しかしながら，連続的な止血過程に近い条件下でPLT生理機能を評価することが理想的である．そこで本研究では，マイクロチャンバーを用いて，一定のせん断応力（600/s），赤血球（Red blood cell：RBC）および血漿の存在下，PLT製剤の血栓形成能を評価する *in vitro* システムの開発を試みた．
【材料と方法】血液サンプルは，PLT製剤，標準ヒト血漿（Standard human plasma：SHP），標準RBCを混合して再構成した．各成分は，他の二成分を定値とし連続的に希釈した．このサンプルをフローチャンバーシステム（Total Thrombus-formation Analysis System［T-TAS］）に供して，大動脈せん断応力条件で白色血栓形成（White thrombus formation：WTF）を評価した．
【結果】試験サンプルのPLT数とWTFは良好な相関性を示した．SHP 10% 以下含むサンプルのWTFは，SHP 40% 以上含むサンプルより有意に低値であり，SHP 40%～100% の範囲では差を認めなかった．赤血球非存在下においてWTFは有意に低下したが，赤血球存在下においてWTFはヘマトクリット値12.5%～50% の範囲で差を認めなかった．
【結論】再構成血液を用いてT-TASで評価されたWTFは，PLT製剤の品質を定量的に判断するための新しい生理学的血栓試験として役立つと考えられる．

キーワード：凝固関連因子，ヘマトクリット，血小板数，血栓形成能解析システム，白色血栓形成

この論文記事は，John Wiley & Sons社の許可のもと，Vox Sanguinis誌（2023; 118 (5): 367―375）に最初に報告された研究に基づくものである．（Akihiro Fuchizaki, Kazuta Yasui, Tomoya Hayashi, Mitsunobu Tanaka, Tomoka Nagasato, Tomoko Ohnishi-Wada, Kazuya Hosokawa, Yoshihiro Fujimura, Kazushige Shimogaki, Fumiya Hirayama, Yoshihiro Takihara and Takafumi Kimura: A novel quantitative method to evaluate the contribution of platelet products to white thrombus formation in reconstituted blood under flow conditions. Vox Sanguinis 118 (5): 367―375, 2023）

はじめに

止血はいくつもの反応から構成され，損傷した血管から過剰な出血を防ぐ重要な機構である．一次止血は，血小板（Platelet：PLT）が傷ついた内皮に接着し脱顆粒により凝集を起こす反応であり，二次止血は，それに続く凝固カスケードによるフィブリン塊形成から構成されている[1)～3)]．血流せん断応力の違いにより形成される血栓の特性は異なる．すなわち，高せん断応力下ではPLTを主とした白色血栓が形成されるが，低せん断応力下ではフィブリンを主とした白色血栓または赤血球（Red blood cell：RBC）を含む赤色血栓が形成される[4)～6)]．炎症に伴う凝固因子の増加，線溶阻害因子の増加，脱水による血液粘度の上昇などの血液組成の変化は，血栓形成に促進的役割を果たす[7)]．それゆえ，血流と血液組成はVirchow3徴（①血流の鬱滞，②血管内皮の障害，③血液凝固能の亢進）の血液関連因子として止血部位での血栓形成に影響を与える[8)]．

血液センターではPLT減少症の患者に輸血されるPLT製剤の品質をPLTの形態，代謝特性，表面抗原，低浸透圧ショック回復反応，凝集能などに基づいて評価し

1）日本赤十字社近畿ブロック血液センター
2）藤森工業株式会社
〔受付日：2023年5月8日，受理日：2023年6月22日〕

表1　標準ヒト血漿（SHP）中の凝固関連因子濃度

SHP (%)	FII (IU/m*l*)	FV (IU/m*l*)	FVII (IU/m*l*)	FVIII (IU/m*l*)	FIX (IU/m*l*)	FX (IU/m*l*)	FXI (IU/m*l*)	FXII (%)	FXIII (IU/m*l*)	VWF：Rco (IU/m*l*)	Fibrinogen (g/*l*)	AT (IU/m*l*)	Plasminogen (%)
100	0.93	0.87	0.84	0.92	0.86	0.88	0.89	94	0.99	0.89	2.5	0.91	93

略語：AT，antithrombin；F，factor；VWF RCo，von Willebrand factor ristocetin cofactor activity.

ている[9)10)]. Multiplate（Dynabyte Medical, Munich, Germany）と VerifyNOW（Accriva Diagnostics, San Diego, CA, USA）は非血流条件で PLT 活性化剤に対する PLT の反応性を評価している．一方，PFA-100（Siemens Healthcare Diagnostics GmbH, Marburg, Germany）は血流条件下，PLT 凝集塊形成に伴うキャピラリーの閉塞を評価しているが，この PLT 機能検査では二次止血を反映できていない[11)]．ROTEM（Tem Innovations GmbH, Munich, Germany）は，非血流条件下，外因性または内因性の凝固活性化試薬を用いた凝固試験として血液粘弾性の変化を測定できるが，PLT 機能については感度が比較的低い[11)]．それゆえ，これらの検査で PLT 輸血による患者血栓形成能回復の全体像を予測することは難しい．近年，血栓形成能解析システム（Total Thrombus-formation Analysis System, T-TAS；Fujimori Kogyo, Tokyo, Japan）という新しく簡単に血栓形成能を評価することが可能な装置が登場した．この装置はすべての資材がキット化されており，フローチャンバーシステムを利用し，血栓形成に伴う流圧をモニタリングすることで，全血の血栓形成能を評価することが可能な自動化システムである[12)～14)]. 本システムは，コラーゲンと組織トロンボプラスチンを塗布したマイクロチップに全血サンプルを加え，白色血栓形成（White thrombus formation：WTF）によりキャピラリーがほとんど完全閉塞するまでの閉塞時間（T_{80}：80kPa までの時間）と血栓形成に伴う圧力上昇を測定し，それらの積分値を解析（Area under the curve for 30 min［AUC_{30}］）することで，活性化 PLT とフィブリンからなる WTF の定量が可能である．このように，T-TAS は一次止血及び二次止血を包括的に評価することができるため，既存の評価システムと比較して，生体内に近い環境を提供することが可能である．

本研究では PLT 製剤，標準ヒト血漿（Standard human plasma：SHP），標準 RBC で再構成した人工血液を用いて，せん断応力下，血液成分の比率や濃度が WTF 能に及ぼす影響を T-TAS で評価し，血栓形成能における PLT 製剤の寄与を評価する生理的システムの開発を試みた．

材料と方法

倫理声明

日本赤十字社の血液事業本部倫理委員会にて本研究が承認された（倫理審査番号：2019-016）．

PLT，血漿，RBC のサンプル供給源

PLT 製剤に由来する PLT を試験サンプルとして使用した．PLT 製剤は，成分採血装置（Trima Accel；Terumo BCT, Lakewood, CO, USA or CCS；Haemonetics Co., Boston, MA, USA）で採取した．PLT は採血後2日目の製剤でアラニンアミノトランスフェラーゼ（Alanine aminotransferase：ALT）値が安全基準値（100IU/*l*）を超えたため，病院に供給されなかったものを使用した．血漿サンプルとして，0.84～0.99IU/m*l* の凝固関連因子（CRFs：coagulation-related factors）と 2.5g/*l* のフィブリノゲンを含む SHP（Siemens Healthcare Diagnostic Products GmbH, Marburg, Germany）を使用した（表1）．400 m*l* 全血採血後に白血球除去処理し，自動血液分離装置 TACSI（Terumo BCT, Lakewood, CO, USA）により RBC 分離後，マンニトール・アデニン・リン酸溶液 95m*l* に浮遊した RBC 製剤を使用した[15)]．端的に記載すると，RBC 製剤に等量のリン酸緩衝生理食塩水を添加して 500g，15 分間遠心分離により洗浄し，得られた RBC 沈査を RBC サンプルとして使用した．RBC は採血後3日目の製剤で ALT 値が安全基準値を超えたため，病院に供給されなかったものを使用した．

再構成血液サンプルの調製

PLT 数，CRF 濃度，RBC 数が WTF 能に与える影響を調べるため，試験サンプルとして各成分の希釈系列（表2）からなる再構成血液を調製した（N=10）．なお，再構成血液は，各成分の影響を評価するため，異なる PLT サンプルから調製した．任意の一成分を評価時，残りの二成分は定値とした．試験サンプルの PLT 数とヘマトクリット（Haematocrit：Hct）値は，抗凝固剤を含まない試験管（Eppendorf, Hamburg, Germany）を用いて，自動血球計数装置（XN-1000；Sysmex Co., Kobe, Japan）で測定した．

T-TAS を使用した再構成血液試験の繰り返し精度

PLT 数 $10 \times 10^{10}/l$，Hct 値 40% の再構成血液を調製し，5回繰り返し測定した際の再現性を確認した．

血栓形成能解析システム（Total Thrombus-formation Analysis System：T-TAS）

キャピラリーチャネル（幅 300μm×深さ 80μm）内部にⅠ型コラーゲンと組織トロンボプラスチンを塗布したマイクロチップ（AR-chip；Fujimori Kogyo, Tokyo, Japan）上で血栓形成を流圧変化の数値として測定可能な

表2　再構成血液サンプルの希釈系列

評価成分	希釈系列		
	PLT 数（$10^{10}/l$）	CRF 濃度（%）	HCT 値（%）
PLT 数（図 2）	0，5，10，20，40	100	40
CRF 濃度（図 3）	30	0，10，20，40，60，80，100	40
HCT 値（RBC 数の代替）（図 4）	15	100	0，12.5，25，50

略語：CRF，coagulation-related factor；Hct，haematocrit；PLT，platelet；RBC，red blood cell.

T-TAS を用いた（図 1a）. 試験サンプルがマイクロチップに添加されると，37℃，せん断応力（600/s）で PLT のコラーゲンへの接着と組織トロンボプラスチンを開始因子とする凝固カスケードが促進され，PLT とフィブリンからなる WTF が得られる. WTF は崩壊と再形成を繰り返しながら徐々に大きくなり，チップ内の流路が閉塞される．試験時間は 30 分以内である．典型的な分析パターンと測定パラメータを図 1b に示す.

統計解析

統計的な有意差は，GraphPad Prism 8（Graph Pad, Inc., La Jolla, CA, USA）を用いて，一元配置分散分析後，ポストホック分析として Tukey-Kramer 多重比較検定を行った. $P<0.01$ の時に統計的に有意であると判断した．スピアマンの順位相関係数を算出し，T-TAS パラメータと血液成分の総合的な相関性を評価した.

結　果

再構成血液における PLT 数と WTF 能との相関性

試験サンプルにおける T_{10}, T_{80}, $T_{10\text{-}80}$, AUC_{30} パラメータと PLT 数の相関性を図 2 に示す. PLT を含まない試験サンプルでは，WTF が観察されなかった．WTF による閉塞開始時間（T_{10}）と閉塞終了時間（T_{80}）はサンプルの PLT 数増加に伴い短縮され, PLT 数と高い相関性を示した（それぞれ r=0.91，0.91，図 2a，b）. WTF 成長速度の指標である $T_{10\text{-}80}$ も同様に PLT 数と高い相関性を示した（r=－0.74，図 2c）．また，WTF 定量性の直接的な指標である AUC_{30} も，試験サンプルの PLT 数と高い相関性を示した（r=0.97，図 2d）．これらの結果から, 再構成血液の WTF 能は PLT 数に強く依存する可能性があることが示唆された.

WTF 能における CRF 濃度の閾値

CRF を含まない試験サンプルでは，予想通り白色血栓は形成されなかった．CRF 濃度と WTF 能の相関性は，PLT 数と WTF 能の相関性よりも低かった（それぞれ T_{10}：0.54，T_{80}：0.63，$T_{10\text{-}80}$：0.70，AUC_{30}：0.76，図 3）. SHP 10% 以下の試験サンプルの WTF 能は, SHP 40% 以上の試験サンプルより有意に低かった．また，SHP 40%～100% では $T_{10\text{-}80}$ に顕著な差を認めなかったことから，SHP 40% 以上の再構成血液では血栓成長速度が安定していることが示唆された. SHP 40% 以上の試験サンプルで全てのパラメータに有意差を認めなかったことから，CRF がトリガーとなる WTF 能は，CRF 濃度ではなく SHP 閾値（40%）に依存する可能性がある．これらの結果から，CRF は再構成血液の WTF に必要不可欠であり，WTF 能は正常値 40% 以上含有している SHP で CRF 濃度の影響を受けないことが示唆された.

WTF 能は RBC 非存在下で低下した

Hct 値 12.5%～50% の RBC 存在下では, WTF 能に有意な差を認めなかった（図 4）. RBC 非存在下では, $T_{10\text{-}80}$ を除くすべての WTF 能パラメータが有意に低下した. WTF 能のいずれのパラメータも Hct 値と高い相関性を示さなかった（それぞれ T_{10}：0.55，T_{80}：0.67，$T_{10\text{-}80}$：0.50，AUC_{30}：0.60）．これらの結果から，PLT 製剤単独での WTF 能は RBC 存在下より低値であり, RBC 存在下では, Hct 値 12.5%～50% の範囲で WTF 能に差がないことが示唆された.

T-TAS を使用した再構成血液検査の繰り返し精度

5 回の実験結果を表 3 にまとめた．T_{10}，T_{80}，$T_{10\text{-}80}$，AUC_{30} の変動係数は，それぞれ 6.4%，5.3%，4.4%，6.7% であった.

考　察

本研究では，再構成血液を用いて PLT，CRF，RBC が関与する, より生理的な条件下で PLT 製剤中の PLT が血栓形成にどの程度寄与しているかを定量的に評価可能な血液センター用 *in vitro* システムの構築を試みた. マイクロフローチャンバーシステムである T-TAS において，PLT 数，CRF 濃度，RBC 数に代わる Hct 値が WTF 能に与える影響を評価した. Weiss らは，健常者または PLT 異常患者の血液サンプルを 650/s のせん断応力でウサギ大動脈セグメントに供したところ，PLT がフィブリン沈着に不可欠な役割を果たし, PLT 数と WTF に良好な相関性（r=0.8）を認めたことを報告した[16)17)]. これらの報告と同様に, 本研究においても PLT は WTF に必須であることが確認され, 再構成血液サン

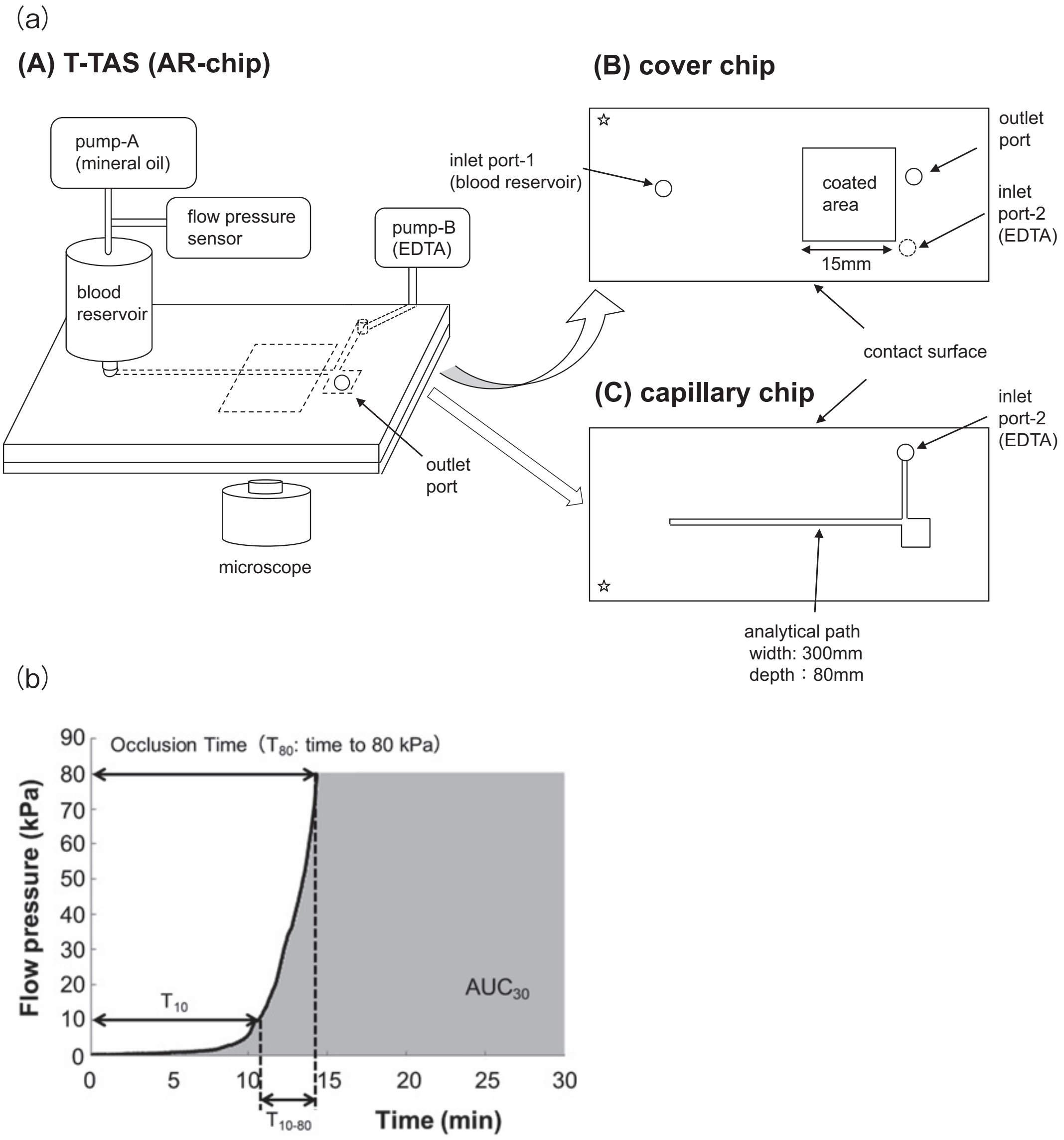

図1 血栓形成能解析システム（Total Thrombus-formation Analysis System：T-TAS）（AR-chip）と解析結果
（a）T-TAS（AR-chip）の模式図
（A）AR-chipは，カバーチップとキャピラリーチップから構成されている．（B）カバーチップの一部にI型コラーゲンと組織トロンボプラスチンが塗布されている．（C）血液サンプルは，キャピラリーチップ上の分析経路に灌流される．Pump-A（ミネラルオイル）は，血液サンプルをリザーバーから分析経路へ押し出す．血栓はコラーゲンと組織トロンボプラスチンでコーティングされた箇所に形成される．血栓形成により背圧が発生し，それを流圧センサーでモニターする．白色血栓形成は顕微鏡でも観察される．Pump-B（EDTA）は出口ポートの血栓形成を防ぐために使用される．
（b）血流条件下での再構成血液サンプルの代表的なT-TAS結果は，流圧曲線で示される．分析パラメータであるT_{10}（流圧が10kPaに達するまでの時間（分）），$T_{10\text{-}80}$（流圧が10～80kPaまでの時間（分）），T_{80}（80kPaまでの時間：閉塞時間（分）），AUC_{30}（30分間の曲線下面積：グレー濃淡）を図に示す．

プルのPLT数はWTF能と高い相関性を示した（図2）．山口らは，25歳から62歳（平均値±標準偏差，39±11歳）の健康なボランティア（男性11名，女性20名）から採取した全血をT-TASで検査して，個々のT-TASパラメータの正常値を示した（T_{10}：11分39秒±2分15秒，T_{80}：15分48秒±2分56秒，$T_{10\text{-}80}$：4分08秒±1分11秒，AUC_{30}：1,318.5±203.2min・kPa）[18]．これらの値は，PLT数とHct値が正常範囲でCRFが十分あるSHPを用いた我々の結果と同程度である．外傷後の大量出血と凝固障害の管理に関する欧州ガイドラインでは，臨床的な止血閾値がほとんどの凝固因子で20%～25%であるのに対し，フィブリノゲンは40%～60%（1～

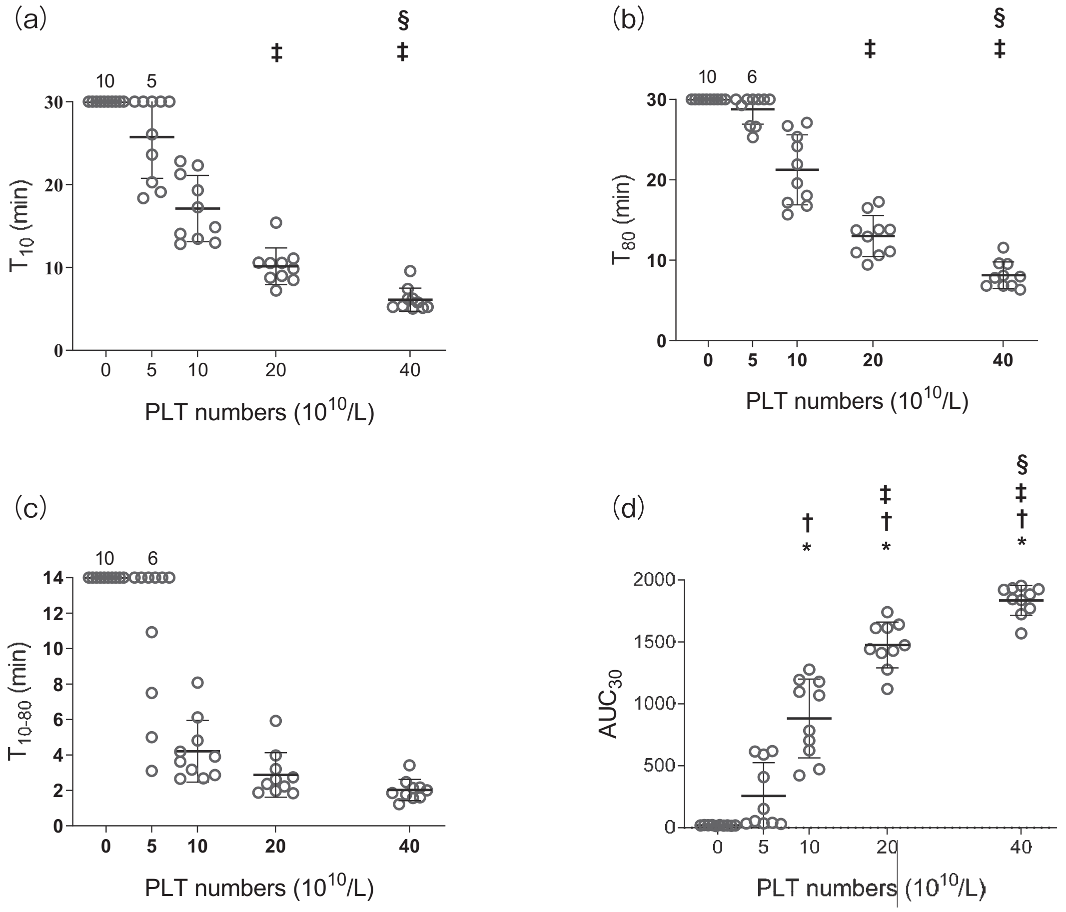

図2　血流条件下での白色血栓形成能における血小板（PLT）数の影響
実験は，表2の「評価成分：PLT数」に記載の条件で実施した．再構成血液サンプルのPLT数と各パラメータ，T_{10}（10kPaまでの時間），T_{80}（80kPaまでの時間），$T_{10\text{-}80}$（10～80kPaまでの時間），AUC_{30}（30分間の曲線下面積）の関係をそれぞれ（a），（b），（c），（d）に示す（N＝10）．ドットプロット上の数字は，T_{10}またはT_{80}の値が30分を超える頻度を示す．有意水準は，*$p<0.01$（vs. PLTs 0），†$p<0.01$（vs. PLTs 5），‡$p<0.01$（vs. PLTs 10），§$p<0.01$（vs. PLTs 20）とした．PLT数に対するスピアマンR値は，それぞれT_{10}：－0.91，T_{80}：－0.91，$T_{10\text{-}80}$：－0.74，AUC_{30}：0.97であった．

1.5g/*l*）で最も高値である[19)20)]．我々の研究においてもCRFはWTFに必須であり，WTF能に関するそれぞれの閾値は，臨床的に必要なフィブリノゲンの閾値と同程度であった（図3）．The British Regional Heart Studyにおいて，年齢，身体活動，コレステロール，肥満度，喫煙の因子調整後，虚血性心疾患がHct高値の人で30%増加することを報告している．他の疫学研究でも，Hct値の上昇と動脈血栓症との関連が認められている[21)22)]．Hct値の増加により血液粘度が上昇し，RBCによりPLTが血管内皮に押し出される（マージネーション）ことで血栓形成が促進されると主張する研究もある[23)24)]．しかしながら，本研究ではRBC存在下であるHct値12.5%～50%でWTF能に差は認められず，RBC非存在下でWTF能が低下することが確認された（図4）．血液は生体内では脈動的なせん断応力を受けて流れているが，本研究では血液サンプルに一定のせん断応力（600/s）を与えている．それゆえRBCによる影響の違いは，脈動と一定のせん断応力により生じたのかもしれない．我々は一定のせん断応力ではなく，脈動的なせん断応力が血液粘度を変化させ，Hct値に応じてRBCがPLTをコラーゲンに押し付ける力を強め，結果としてHctが生体内のWTF能に影響を与えると想定したが，本システムではそのようなことは確認されなかった．血流条件下で一次止血を評価できるPFA-100において，PLT数（5×10^{10}/*l*以下）とHct値（10%）の著しい減少により，閉鎖時間が延長されることが報告されており，本研究においても同様の傾向が示された[25)26)]．一方，PFA-100の閉鎖時間は，トロンビン生成とフィブリン形成にいたるまでの比較的短時間で形成されるPLT血栓を評価するため，凝固因子（フィブリノゲン，第V因子，第VIII因子，第IX因子など）がなくても，ほとんど影響されないことが報告されている[27)]．T-TASは，二次止血の中心となるCRFを含むWTFを評価することが可能であり，一次止血のみを評価対象とする機器と比

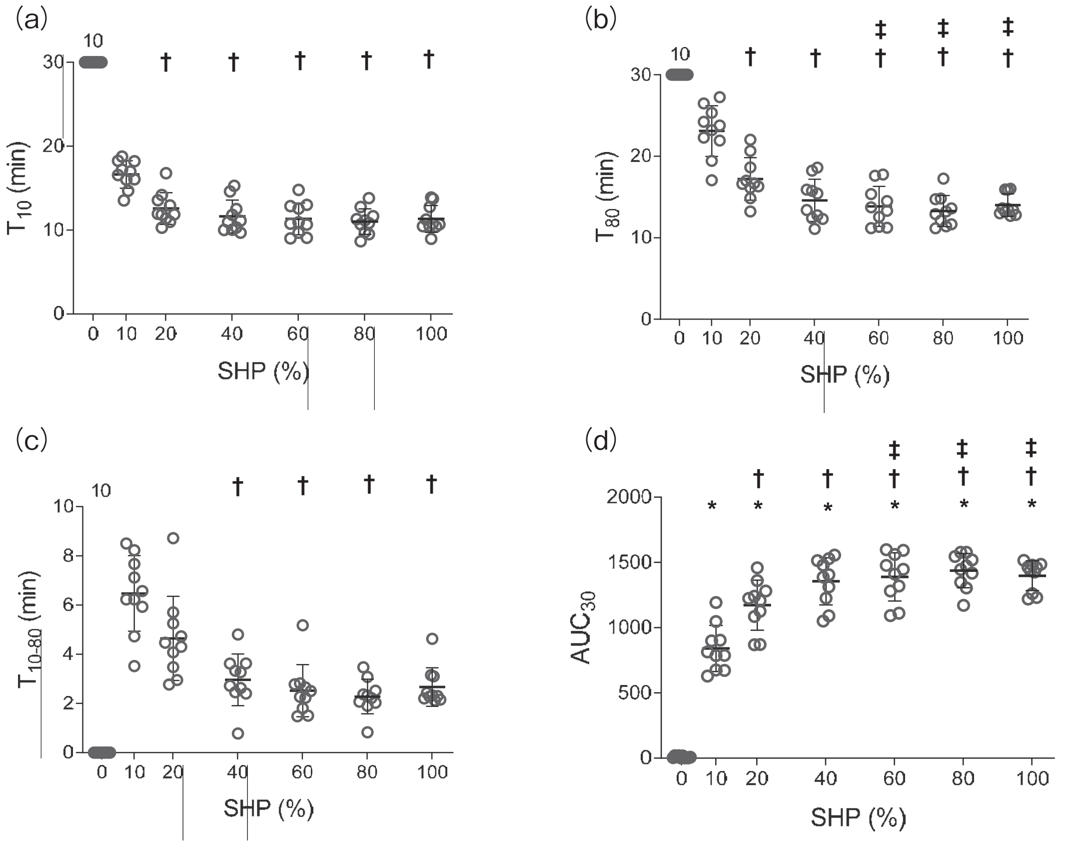

図3　血流条件下での白色血栓形成能における凝固関連因子（CRF）濃度の影響
実験は，表2の「評価成分：CRF濃度」に記載の条件で実施した．再構成血液サンプルのCRF濃度と各パラメータ，T_{10}（10kPaまでの時間），T_{80}（80kPaまでの時間），$T_{10\text{-}80}$（10～80kPaまでの時間），AUC_{30}（30分間の曲線下面積）の関係をそれぞれ（a），（b），（c），（d）に示す（N＝10）．ドットプロットの上の数字は，T_{10}またはT_{80}の値が30分を超える頻度を示す．有意水準は，*$p<0.01$（vs. 標準ヒト血漿［SHP］0%），†$p<0.01$（vs. SHP10%），‡$p<0.01$（vs. SHP20%）とした．CRF濃度に対するスピアマンR値は，それぞれT_{10}：－0.54，T_{80}：－0.63，$T_{10\text{-}80}$：－0.70，AUC_{30}：0.76であった．

較して，より生理的な条件下で血栓形成能評価が可能であることが確認された．また，Atariらは，AUC_{30}がPLT減少による出血リスクやPLT輸血の治療効果とよく相関することを報告しており，T-TASが輸血後のPLT止血機序を比較的よく反映していることを示唆している[28]．これらの結果から，血漿をCRF濃度40%以上，フィブリノゲン濃度1g/*l*以上，RBCをHct値12.5～50%となるよう混和することで，より生理的な条件下でのWTFにおけるPLT製剤の寄与を評価することが可能であると結論付ける．

現在のPLT製剤の品質検査は，輸血前のPLT *in vitro*特性に着目しているが，輸血されたPLT製剤が患者の血栓形成能にどの程度寄与しているかをほとんど反映していない．例えば，PLT凝集能を評価するための比濁法でさえ，非生理的な濃度において，1種類もしくは2種類の活性化剤を使用しているのみである．一方，実験動物を用いた止血検査は，ヒトと異種ではあるが，PLT製剤の輸血効果を評価する上で極めて有用である．しかし，日々のルーチン検査として行うことは，時間と労力を要するため困難であり現実的でない[29]．それゆえ，マイクロフローチャンバーを使用した再構成血液のWTF評価は半生理的な条件を提供し，現在の*in vitro*品質試験と*in vivo*止血試験の中間的な品質試験として利用されることが期待される．

マイクロチップフローチャンバーと再構成血液を使用した我々の研究には，5つの制限事項がある．第一に，再構成血液に含まれる血液成分が調製時に多少損傷している可能性がある．第二に，再構成血液には好中球を含む白血球がほとんど含まれていない．近年，好中球は，炎症時にしばしば発生する好中球細胞外トラップやダメージ関連分子パターン放出など，幅広い凝固促進事象が確認されている[30]．我々の評価システムは，このような白血球の血液凝固に対する影響を反映していない．第三に，PLT数やCRF濃度がWTFに及ぼす影響は，本システムと患者や健常者で同様の傾向であったが，Hct値の影響はそうでなかった．今後，これらの

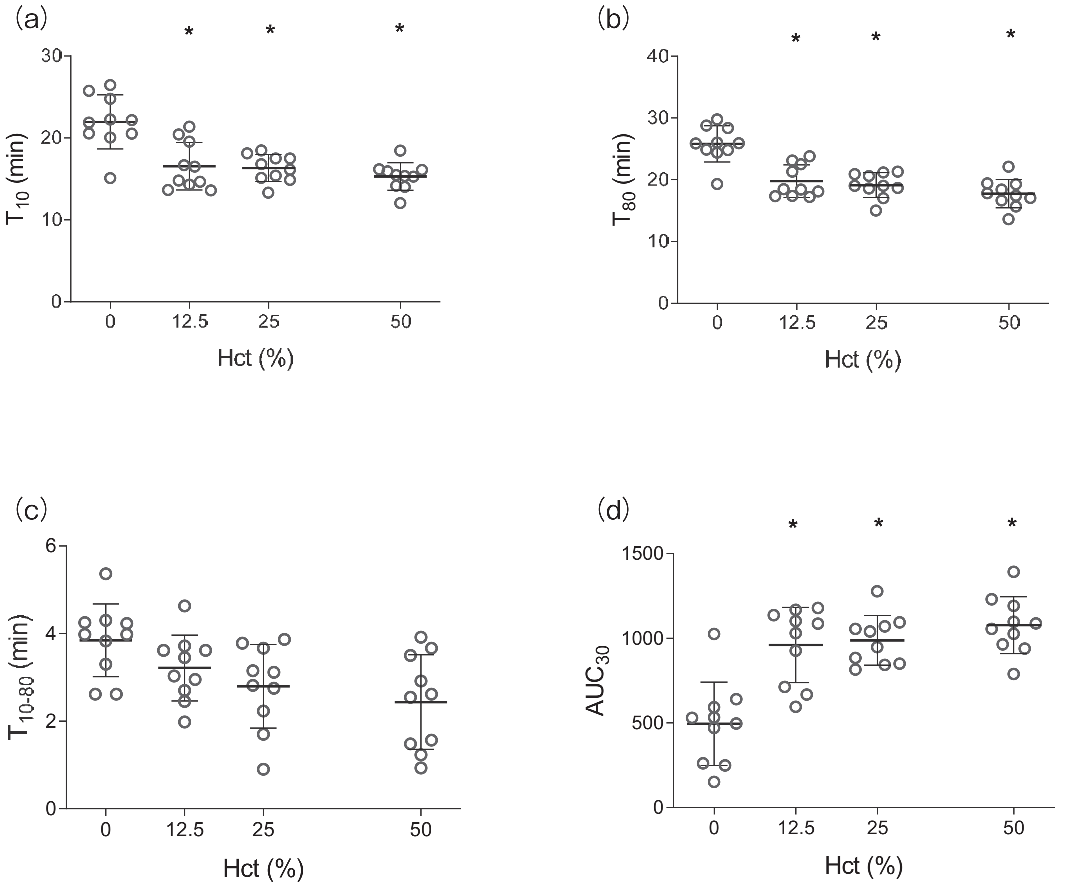

図4　血流条件下での白色血栓形成能における赤血球（RBC）数の影響

実験は，表2の「評価成分：ヘマトクリット（Hct）値」に記載の条件で実施した．再構成血液サンプルのRBC数（その代替としてHct値）と各パラメータ，T_{10}（10kPaまでの時間），T_{80}（80kPaまでの時間），$T_{10\text{-}80}$（10～80kPaまでの時間），AUC_{30}（30分間の曲線下面積）の関係をそれぞれ（a），（b），（c），（d）に示す（N＝10）．有意水準は，*$p<0.01$（vs. Hct 0%）とした．Hct値に対するスピアマンR値は，それぞれT_{10}：－0.55，T_{80}：－0.67，$T_{10\text{-}80}$：－0.50，AUC_{30}：0.60であった．

表3　T-TASを使用した再構成血液検査の繰り返し精度

No.	T_{10}（min）	T_{80}（min）	$T_{10\text{-}80}$（min）	AUC_{30}
1	14.4	17.0	2.6	1,143
2	14.0	16.4	2.4	1,195
3	15.6	18.0	2.4	1,072
4	14.1	16.4	2.3	1,206
5	16.1	18.4	2.3	1,033
平均値	14.9	17.3	2.4	1,130
標準偏差	0.9	0.9	0.1	76
変動係数（%）	6.4	5.3	4.4	6.7

注：特定ドナー由来の血小板製剤/赤血球と標準ヒト血漿を混合した同じ再構成血液を5回の繰り返し実験に用いた．
略語：AUC_{30}，area under the curve for 30 min；
T_{10}，time to 10kPa；$T_{10\text{-}80}$，time from 10 to 80kPa；T_{80}，time to 80kPa.

制限事項を克服するためには，サンプル調製時のRBC損傷を減らし，血液サンプルに十分な白血球を加え，*in vivo*と類似した経時的なせん断応力の変化が必要なのかもしれない．第四に，WTF能パラメータとPLT品質パラメータである形態，代謝の特徴，表面抗原，低張性ショック回復能，凝集能との関係が不明な点である．最後に，我々のT-TAS評価システムは煩雑で多くの労力を必要とする．T-TASは，一定PLT数のPLT製剤のみで測定することで，血流条件下での一次止血と二次止血の解析が可能である．このT-TASの応用に

より，既存の分析方法と比較して，より短時間でPLT製剤のWTF能に関する情報を取得可能である．しかしながら，この方法ではRBCの影響が反映されない．RBCを含まないPLT製剤のみで測定する際は，結果を慎重に解釈する必要がある．このように，現在の方法はいくつか不完全な部分があり，生体内における血栓形成を十分に反映できていないかもしれない．しかしながら，より良いシステムの確立により，これらの課題を克服できれば，再構成血液と圧力変化を利用した高感度フローチャンバーシステムにより，PLT品質を血栓形成能として定量的に評価されることが期待される．

著者のCOI開示：渕崎 晶弘，保井 一太，林 智也，田中 光信，藤村 吉博，下垣 一成，平山 文也，瀧原 義宏，木村 貴文は血液製剤を製造している日本赤十字社の職員である．永里 朋香，大西—和田 朋子，細川 和也はT-TASを製造している藤森工業株式会社の職員である．

謝辞：血液サンプルの調製にご協力いただいた近畿ブロック血液センター製剤部の皆様に感謝いたします．英文校正についてEditage（www.editage.com）に感謝いたします．

渕崎 晶弘，林 智也が研究を行い，渕崎 晶弘が原稿の第一稿を執筆した．渕崎 晶弘，保井 一太，田中 光信，下垣 一成が研究デザインを担当した．永里 朋香，大西（和田）朋子，細川 和也がT-TAS解析を行った．藤村 吉博，平山 文也，瀧原 義宏，木村 貴文が研究を監督し，原稿を確認・編集した．著者全員が結果について議論し，原稿についてコメントした．著者全員が原稿の公開を承認している．

文　献

1）Virchow R: Gesammalte Abhandlungen zur wissenschaftlichen medtzin, Medinger Sohn & Co., Frankfurt, 1856, 219—732.
2）Bertolini F, Murphy S: A multicenter evaluation of reproducibility of swirling in platelet concentrates. Biomedical Excellence for Safer Transfusion (BEST) Working Party of the International Society of Blood Transfusion. Transfusion, 34: 796—801, 1994.
3）Tanaka S, Hayashi T, Tani Y, et al: Removal of biological response modifiers associated with platelet transfusion reactions by columns containing adsorption beads. Transfusion, 54: 1790—1797, 2014.
4）Gillespie AH, Doctor A: Red blood cell contribution to hemostasis. Front Pediatr, 9: 629824, 2021.
5）Barshtein G, Ben-Ami R, Yedgar S: Role of red blood cell flow behavior in hemodynamics and hemostasis. Expert Rev Cardiovasc Ther, 5: 743—752, 2007.
6）Sakariassen KS, Joss R, Muggli R, et al: Collagen type III induced ex vivo thrombogenesis in humans. Role of platelets and leukocytes in deposition of fibrin. Arteriosclerosis, 10: 276—284, 1990.
7）Kurachi K, Kurachi S: Molecular mechanisms of age-related regulation of genes. J Thromb Haemost, 3: 909—914, 2005.
8）Chung I, Lip GYH: Virchow's triad revisited: blood constituents. Pathophysiol Haemost Thromb, 33: 449—454, 2003.
9）Patscheke H, Dubler D, Deranleau D, et al: Optical shape change analysis in stirred and unstirred human platelet suspension. A comparison of aggregometric and stopped-flow turbidimetric measurements. Thromb Res, 33: 341—353, 1984.
10）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.
11）Kaikita K, Hosokawa K, Dahlen JR, et al: Total Thrombusformation Analysis System (T-TAS): clinical application of quantitative analysis of thrombus formation in cardiovascular disease. Thromb Haemost, 119: 1154—1162, 2019.
12）Hosokawa K, Ohnishi T, Kondo T, et al: A novel automated microchip flow-chamber system to quantitatively evaluate thrombus formation and antithrombotic agents under blood flow conditions. J Thromb Haemost, 9: 2029—2037, 2011.
13）Hosokawa K, Ohnishi T, Sameshima H, et al: Analysing responses to aspirin and clopidogrel by measuring platelet thrombus formation under arterial flow conditions. Thromb Heamostasis, 109: 102—111, 2013.
14）Ogiwara K, Nogami K, Hosokawa K, et al: Comprehensive evaluation of haemostatic function in von Willebrand disease patients using a microchip-based flow chamber system. Haemophilia, 21: 71—80, 2015.
15）Cicha I, Suzuki Y, Tateishi N, et al: Gamma-ray-irradiated red blood cells stored in mannitol-adeninephosphate medium: rheological evaluation and susceptibility to oxidative stress. Vox Sang, 79: 75—82, 2000.

16) Weiss HJ, Turitto VT, Baumgartner HR: Role of shear rate and platelets in promoting fibrin formation on rabbit subendothelium. Studies utilizing patients with quantitative and qualitative platelet defects. J Clin Invest, 78: 1072—1082, 1986.
17) Weiss HJ, Turitto VT, Baumgartner HR: Platelet adhesion and thrombus formation on subendothelium in platelets deficient in glycoproteins IIb-IIIa, Ib, and storage granules. Blood, 67: 322—330, 1986.
18) Yamaguchi Y, Moriki T, Igari A, et al: Studies of a microchip flow-chamber system to characterize whole blood thrombogenicity in healthy individuals. Thromb Res, 132: 263—270, 2013.
19) Spahn DR, Bouillon B, Cerny V, et al: The European guideline on management of major bleeding and coagulopathy following trauma: fifth edition. Crit Care, 23: 98, 2019.
20) Hiippala ST, Myllylä GJ, Vahtera EM: Hemostatic factors and replacement of major blood loss with plasma-poor red cell concentrates. Anesth Analg, 81: 360—365, 1995.
21) Byrnes JR, Wolberg AS: Red blood cells in thrombosis. Blood, 130: 1795—1799, 2017.
22) Wannamethee G, Shaper AG, Whincup PH: Ischaemic heart disease: association with haematocrit in the British Regional Heart Study. J Epidemiol Community Health, 48: 112—118, 1994.
23) Weisel JW, Litvinov RI: Red blood cells: the forgotten player in hemostasis and thrombosis. J Thromb Haemost, 17: 271—282, 2019.
24) Flamm MH, Diamond SL: Multiscale systems biology and physics of thrombosis under flow. Ann Biomed Eng, 40: 2355—2364, 2012.
25) Harrison P, Robinson MS, Mackie IJ, et al: Performance of the platelet function analyser PFA-100 in testing abnormalities of primary haemostasis. Blood Coagul Fibrinolysis, 10: 25—31, 1999.
26) Kundu SK, Heilmann EJ, Sio R, et al: Characterization of an in vitro platelet function analyzer—PFA-100. Clin Appl Thromb Hemost, 2: 241—249, 1996.
27) Hayward CPM, Harrison P, Cattaneo M, et al: Platelet function analyzer (PFA)-100® closure time in the evaluation of platelet disorders and platelet function. J Thromb Haemost, 4: 312—319, 2006.
28) Atari B, Ito T, Nagasato T, et al: A modified microchip-based flow chamber system for evaluating thrombogenicity in patients with thrombocytopenia. Thromb J, 18: 31, 2020.
29) Watanabe N, Nogawa M, Ishiguro M, et al: Refined methods to evaluate the in vivo hemostatic function and viability of transfused human platelets in rabbit models. Transfusion, 57: 2035—2044, 2017.
30) Ghasemzadeh M, Hosseini E: Platelet-leukocyte crosstalk: linking proinflammatory responses to procoagulant state. Thromb Res, 131: 191—197, 2013.

A NOVEL QUANTITATIVE METHOD TO EVALUATE THE CONTRIBUTION OF PLATELET PRODUCTS TO WHITE THROMBUS FORMATION IN RECONSTITUTED BLOOD UNDER FLOW CONDITIONS

Akihiro Fuchizaki[1], Kazuta Yasui[1], Tomoya Hayashi[1], Mitsunobu Tanaka[1], Tomoka Nagasato[2], Tomoko Ohnishi-Wada[2], Kazuya Hosokawa[2], Yoshihiro Fujimura[1], Kazushige Shimogaki[1], Fumiya Hirayama[1], Yoshihiro Takihara[1] and Takafumi Kimura[1]
[1]Japanese Red Cross Kinki Block Blood Center
[2]Fujimori Kogyo Co., Ltd.

Keywords:
coagulation-related factors, haematocrit, platelet numbers, Total Thrombus-formation Analysis System, white thrombus formation

Ⓒ2023 The Japan Society of Transfusion Medicine and Cell Therapy
Journal Web Site: http://yuketsu.jstmct.or.jp/