

## フローチャンバーシステムである血栓形成能解析システムに搭載された新しい血液希釈チップが低濃度血小板/高せん断応力における血小板製剤の安定した分析を可能にした

瀧崎 晶弘<sup>1)</sup> 保井 一太<sup>1)</sup> 林 智也<sup>1)</sup> 田中 光信<sup>1)</sup> 小山田千秋<sup>2)</sup>  
大西 (和田) 朋子<sup>2)</sup> 細川 和也<sup>2)</sup> 藤村 吉博<sup>1)</sup> 下垣 一成<sup>1)</sup> 平山 文也<sup>3)</sup>  
木村 貴文<sup>1)</sup> 瀧原 義宏<sup>1)</sup>

【背景と目的】血栓形成能解析システム (Total Thrombus-formation Analysis System : T-TAS) は、再構成血液サンプルを用いることで血小板製剤の止血への寄与を定量的に解析することが可能である。しかしながら、血小板数が少ない検体には不向きである。我々はチャンバーの深さが浅い血液希釈 (haemodilution : HD) チップを導入することで、低血小板検体への適応と高せん断応力条件 ( $1,500\text{s}^{-1}$ ) による止血能評価システムの開発を試みた。

【材料と方法】血液サンプルは、赤血球製剤、標準ヒト血漿、血小板製剤を混合して調製され、最終血小板数は  $50 \times 10^3/\mu\text{l}$  とした。凝集試験にはコラーゲン、アデノシン二リン酸 (ADP)、リストセチンを凝集惹起剤として用いた。血小板製剤 (N = 10) の 2 日目、4 日目、9 日目にサンプルを評価した。

【結果】HD チップにより、血小板数  $50 \times 10^3/\mu\text{l}$  の全サンプルの止血能を安定的に解析することができた。止血能は ADP 凝集 (10kPa までの時間  $[T_{10}]$  :  $r = -0.53$ , 30 分間曲線下面積 :  $r = 0.40$ ) および保存期間 ( $T_{10}$  :  $r = 0.44$ ) と関連していた。

【結論】HD チップ搭載 T-TAS は、高せん断応力条件で低血小板検体の止血能を安定的に解析することが可能である。このアプローチは血小板製剤の止血能解析において、実験動物を用いた *in-vivo* 止血試験への橋渡しとなることが期待される。

キーワード：止血, 高せん断応力, 低濃度血小板, 血栓形成能解析システム

この論文記事は、John Wiley & Sons 社の許可のもと、Vox Sanguinis 誌 (2024; 119 (8): 883–887) 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, Chiaki Oyamada, Tomoko Ohnishi-Wada, Kazuya Hosokawa, Yoshihiro Fujimura, Kazushige Shimogaki, Fumiya Hirayama, Takafumi Kimura, and Yoshihiro Takihara: A novel haemodilution chip mounted on the total thrombus-formation analysis system, a flow chamber system, enables stable analysis of platelet products under low platelet concentration/high shear conditions. Vox Sanguinis 119 (8): 883–887, 2024.)

### はじめに

止血機構は血管損傷部位への血小板接着、接着した血小板が凝集塊を形成する血小板血栓 (一次止血)、およびフィブリノーゲンが血小板血栓にフィブリンとして蓄積するフィブリン血栓 (二次止血) からなる。In vitro では、一次止血は多血小板血漿を用いた凝集試験で、二次止血は乏血小板血漿を用いた凝固試験で分析

されている<sup>1)2)</sup>。しかしながら、これらの *in vitro* 試験によって *in vivo* の止血メカニズムを正確に反映させることは困難である。これは血小板が赤血球により押し出されることで血管内皮に接着し (マージネーション)、活性化された血小板が凝固因子との相互作用により止血が進行するためである<sup>3)</sup>。これらを克服するために、流動条件下で血栓形成過程をリアルタイムで観察・解

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

3) 日本赤十字社大阪府赤十字血液センター

連絡責任者：瀧崎 晶弘, E-mail : a-fuchizaki@kk.bbc.jrc.or.jp

〔受付日：2024 年 5 月 29 日, 受理日：2024 年 12 月 6 日〕

析できるフローチャンバーシステムが止血メカニズムの理解向上に大きく貢献している。

流動条件下で全血サンプル中の一次止血と二次止血を総合的に評価するために、血栓形成能解析システム (Total Thrombus-formation Analysis System : T-TAS, 藤森工業, 東京, 日本) と呼ばれる簡易血栓形成評価キットが開発された (補足図 1)<sup>4)</sup>。T-TAS に用いられるマイクロチップは I 型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ており、血小板とフィブリンを多く含む血栓の形成に伴う流圧変化を測定する。我々はこれまでの研究において、健康人由来の赤血球, 標準ヒト血漿 (SHP ; シーメンス・ヘルスケア・ダイアグノスティックス, フォルクハイム, ドイツ), および様々な濃度の血小板製剤から調製した再構成血液を用いることで血小板製剤の止血に対する寄与を定量的に解析する新しい *in vitro* 試験として, T-TAS の有用性を報告した<sup>5)</sup>。このシステムは他の従来の *in vitro* 止血試験と比較して血小板輸血後の止血環境を模倣しており, 試験管内における血小板輸血と考えることができるが, いくつかの制限事項がある。第一に, T-TAS は血栓形成に伴う流圧変化を定量化するため, 低濃度血小板では測定できない可能性がある。第二に, 高せん断応力条件を再現できない。最近, これらを克服するために, チャンバーの深さを浅くした改良チップ (Haemodilution [HD] チップ ; 藤森工業) が開発され, 低濃度血小板での評価において, 血栓形成に伴う T-TAS 分析チャンバー閉塞による流圧上昇をより高感度に検出することが可能になった<sup>6)</sup>。HD チップは従来チップと比較して高せん断応力 ( $1,500\text{s}^{-1}$ , 従来チップ :  $600\text{s}^{-1}$ ) における止血能評価が可能であり, 血漿因子よりも血小板機能に起因する止血能を包括的に評価することを可能にした。Samanbar ら<sup>7)</sup> は, 血小板減少症患者における血小板輸血後の止血評価の新しい方法として, HD チップ搭載 T-TAS の有用性を報告している。

血小板製剤の止血能を輸血後の生体内に近い環境で定量することができれば, その品質管理に大きく寄与することが期待される。本研究では HD チップ搭載 T-TAS を用いて, 低濃度血小板/高せん断応力における濃厚血小板 (PC) の止血能の変化を高感度かつ定量的に検出する評価法の確立を目指した。加えて, PC 保存による止血能の変化を HD チップ搭載 T-TAS を用いて測定し, 従来の凝集試験結果との相関性を確認して T-TAS を用いた新規止血検査の生理的・機能的意義について考察した。

## 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)。

### PC の調製

PC は日本赤十字社の採血基準を満たし, 同意を得られた献血者からアフレーシスシステムである Trima Accel (テルモ BCT, 東京, 日本) もしくは Component Collection System (ヘモネティクス, ボストン, マサチューセッツ州, 米国) を用いて採取した。採取した PC に  $15\text{Gy}$  の X 線を照射し (MBR-1530A-TW ; 日立ヘルスケアシステムズ, 東京, 日本),  $22^\circ\text{C}$ ,  $60\text{ cycles/min}$  で攪拌しながら保存した (NR-30 ; パナソニック, 大阪, 日本)。

### 新規の止血試験と従来の凝集試験

血小板サンプルは研究利用可能で最も新鮮な保存 2 日目 (血小板採取日を 1 日目), 有効期限である 4 日目, および最初の検体採取から 1 週間後の 9 日目にサンプリングした。サンプリングは  $80\text{ml}$  バッグ (BB-T008 FJ ; テルモ BCT) を用いて  $3\text{ml}$  ずつ無菌的に行った。

HD チップ搭載 T-TAS (藤森工業) を用いた<sup>4)6)</sup>。HD チップ搭載 T-TAS 装置の概要と解析パラメータを補足図 1 に示す。試験検体はクエン酸塩処理した標準赤血球, SHP, 血小板検体を混合した再構成血液であるため, 既報の通り<sup>5)</sup>, 凝固システムを回復させるために分析前に  $1.25\text{mg/ml}$  のコントリプシン阻害剤を含む  $0.3\text{ M}$  の  $\text{CaCl}_2$  を  $20\mu\text{l}$  添加した。簡潔に要点を記載すると, 再構成血液は  $4^\circ\text{C}$  で 3 日間保存した赤血球製剤に等量のリン酸緩衝生理食塩水を加え  $500\text{g}$ , 15 分間遠心分離による洗浄で調製した赤血球沈査と抗凝固剤としてクエン酸処理した輸血用ではない SHP ( $0.86\sim 1.06\text{IU/ml}$  の凝固因子と  $2.57\text{g/l}$  のフィブリノーゲンを含有) と血小板サンプルから調製した。目標血算値は血小板数  $50\times 10^3/\mu\text{l}$ , ヘマトクリット値  $40\%$  とした。止血試験は異なるドナー由来の 10 本の PC で実施した。標準赤血球は試験日ごとに無作為のドナーから入手し, SHP は同一ロット製品を使用した。流速は  $4\mu\text{l/min}$  もしくは  $10\mu\text{l/min}$  に設定することが可能である。高いせん断応力は凝固因子よりも血小板に起因する止血能解析を可能にするため, チャンバー内の初期せん断速度が約  $1,500\text{s}^{-1}$  に相当する  $10\mu\text{l/min}$  とした。

従来の凝集試験として, Born, O'Brien らにより考案された透過率測定法を用いた。最大凝集率は凝集計 (PRP 313M ; タイヨウ, 大阪, 日本) を用いて測定した。最大凝集率測定用サンプルは, 血小板サンプルに血小板サンプルを遠心分離 ( $1,810\text{g}$  ; 10 分間) して得られた自己血漿を混合し調製した。目標血小板数は  $300\times 10^3/\mu\text{l}$  とした。凝集惹起剤として, コラーゲン, アデノシン二リン酸 (ADP) およびリストセチンを既報に従い調製した<sup>8)</sup>。血小板数, 平均血小板容積, および CD62 P, プロカスパーゼ活性化化合物-1 (PAC-1), アネキシ

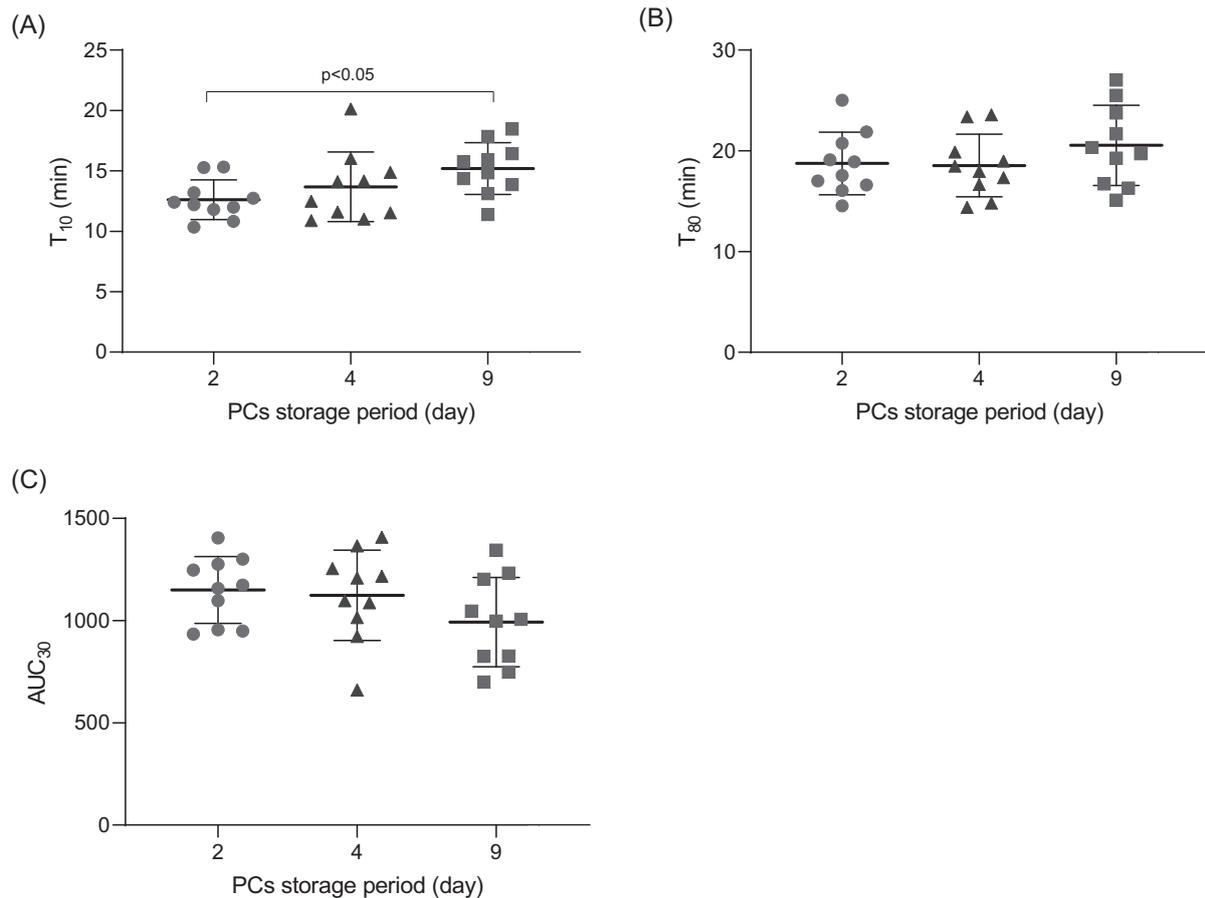


図1 22℃ 振とう保存時の濃厚血小板 (PCs) における止血能

(A) T<sub>10</sub> (流圧が 10kPa に到達するまでの時間), (B) T<sub>80</sub> (80kPa までの時間: 閉塞時間), (C) AUC<sub>30</sub> (30 分間曲線下面積) を図に示した. 我々は血液希釈チップ搭載の血栓形成能解析システム (藤森工業, 東京, 日本) を導入した. 試験検体は血小板サンプル, 標準赤血球および標準ヒト血漿から調製した再構成血液 (血小板数  $50 \pm 2 \times 10^3/\mu\text{l}$ , ヘマトクリット値  $37.3 \pm 0.9\%$ ) を用いた. データは平均値 ± 標準偏差, N=10 で示した. 血小板採取 2 日目, 4 日目, 9 日目の T-TAS パラメータは反復測定分散分析後, ポストホック分析として Dunnett の多重比較検定によって比較された. 統計的な有意差は  $p < 0.05$  とした.

ン V の発現量の測定法を補足方法に示した.

#### 赤血球製剤のドナーの違いが止血能に及ぼす影響

血漿と血小板は同一試料源を使用し, 赤血球のみ異なるドナー由来の試料源を用いて, 血小板数  $50 \times 10^3/\mu\text{l}$ , ヘマトクリット値 40% の再構成血液を調製し止血能を測定した. SHP は  $0.86 \sim 1.06 \text{ IU/ml}$  の凝固因子と  $2.57 \text{ g/l}$  のフィブリノーゲンを含む同一ロットを使用し, 血小板は単一のドナーから採取した製剤を保存 2 日目に使用した. 一方, 赤血球は異なる 5 名のドナーから採取し保存 3 日目に使用した.

#### 統計解析

データ解析は GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) を用いて行った. 結果は平均値 ± 標準偏差で示した. 血小板採取 2 日目を対照として 4 日目および 9 日目の全パラメータについて反復測定分散分析後, ポストホック分析として Dunnett の多重比較検定を行った. スピアマン順位相関係数を PC における *in vitro* 特性と T-TAS パラメータの間で算出した.

統計的な有意差は  $p < 0.05$  とした.

#### 結 果

初期血栓形成の指標であり 10kPa に至るまで時間 (T<sub>10</sub>) (平均値 ± 標準偏差) は, 2 日目, 4 日目および 9 日目にサンプリングした血小板で  $12.6 \pm 1.6$  分,  $13.7 \pm 2.9$  分 ( $p=0.108$ ),  $15.2 \pm 2.1$  分 ( $p < 0.05$ ) に延長した (図 1A). 血栓による閉塞の指標であり 80kPa に至るまでの時間 (T<sub>80</sub>: キャピラリーをほぼ完全に閉塞するのに十分な時間) は, 2 日目, 4 日目および 9 日目にサンプリングした血小板で  $18.7 \pm 3.1$  分,  $18.5 \pm 3.1$  分 ( $p=0.954$ ),  $20.5 \pm 4.0$  ( $p=0.225$ ) であった (図 1B). 止血能の定量性の指標である 30 分間曲線下面積 (AUC<sub>30</sub>) は, 2 日目, 4 日目および 9 日目にサンプリングした血小板で  $1,150 \pm 164$ ,  $1,124 \pm 221$  ( $p=0.814$ ),  $993 \pm 218$  ( $p=0.063$ ) であった (図 1C). 最大凝集率は血小板サンプリング 4 日目と 9 日目のコラーゲン, ADP, およびそれらの同時凝集で減少した (図 2). 血小板活性化マ

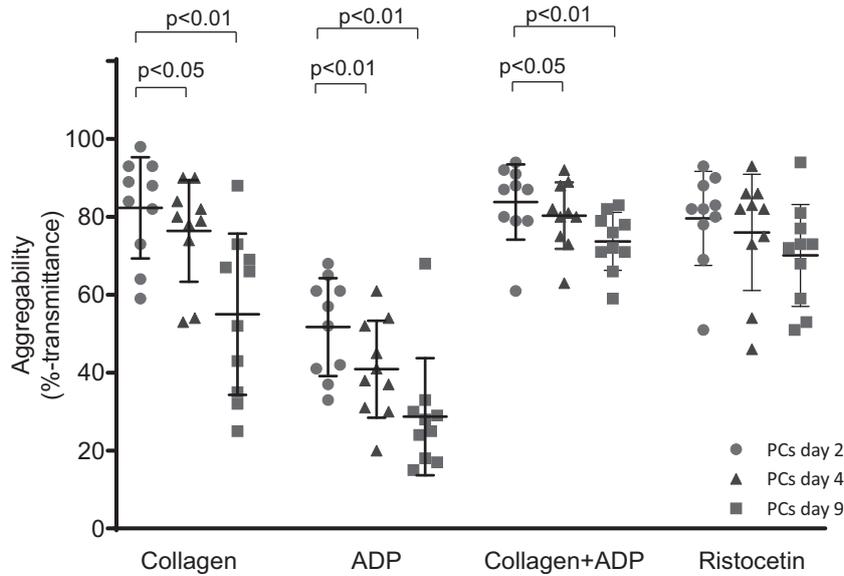


図2 22℃ 振とう保存時の濃厚血小板（PCs）における凝集能  
 凝集能は凝集計（PRP313M；太陽，大阪，日本）を用いて，血小板サンプルおよび自己血漿から調製した多血小板血漿（血小板数  $295 \pm 10 \times 10^3/\mu\text{l}$ ）を用いて測定した。データは平均値±標準偏差，N=10で示した。血小板採取2日目，4日目，9日目の凝集パラメータは反復測定分散分析後，ポストホック分析としてDunnettの多重比較検定によって比較された。統計的な有意差は  $p < 0.05$  とした。

表1 濃厚血小板における *in-vitro* 特性と Total Thrombus-formation Analysis System パラメータ間の Spearman 順位相関係数

	T <sub>10</sub>	T <sub>80</sub>	AUC <sub>30</sub>
Storage period	0.44*	0.21	-0.29
Collagen	-0.35	0.02	0.16
ADP	-0.53**	-0.27	0.40*
Collagen + ADP	-0.30	0.10	0.07
Ristocetin	-0.36	-0.15	0.31
Platelet count	-0.27	-0.06	0.12
Mean platelet volume	0.15	0.15	-0.12
CD62P	0.26	0.08	-0.13
PAC-1	0.00	-0.05	0.04
Annexin V	0.23	0.03	-0.09

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  (N=10).

略語：AUC<sub>30</sub>, area under the curve for 30min；ADP, adenosine diphosphate；PAC-1, procaspase activating compound-1；T<sub>10</sub>, time to 10kPa；T<sub>80</sub>, time to 80kPa

カーである CD62P とアネキシン V の結合は 4 日目と 9 日目に増加し，PAC-1 結合は 9 日目に増加した（補足表 1）。止血能は保存期間（T<sub>10</sub>： $r = 0.44$ ）および ADP 凝集（T<sub>10</sub>： $r = -0.53$ ；AUC<sub>30</sub>： $r = 0.40$ ）と相関関係があった（表 1）。

5 名の異なるドナー由来赤血球から再構成した血液サンプルの止血能を補足表 2 に示す。T<sub>10</sub>，T<sub>80</sub>，および AUC<sub>30</sub> の変動係数はそれぞれ 5.1，4.9，および 5.8% であった。

## 考 察

本研究では低濃度血小板/高せん断応力における PC 保存に伴う止血能変化を測定するために，現行 T-TAS 試験と比較してより高感度かつ定量的な評価法を確立する目的で T-TAS 試験に改良を加えた。従来チップを使用した以前の研究では，血小板数  $50 \times 10^3/\mu\text{l}$  を用いた定量的評価において 10 例中 4 例のみで安定した止血能解析が可能であったが，チャンバーの深さを浅くした HD チップを使用することで，すべての低血小板濃度の再構成血液サンプルにおける止血能を高せん断応力で安定的に解析することが可能となった<sup>3)</sup>。

赤血球は血流の中心に移動し，せん断力とヘマトクリット値に依存して血小板を血管内皮に向かって押し出すことで止血に寄与している<sup>3)9)</sup>。赤血球の止血への寄与は膜障害や変形能の低下により充進することが知られている<sup>3)</sup>。本評価システムにおけるせん断力（1,500  $\text{s}^{-1}$ ），ヘマトクリット（40%）はそれぞれ定値である。加えて，再構成血液に用いた赤血球は保存 3 日目の新鮮な血液であるため，異なるドナー由来であったとしても多くが円板状であり膜障害が少なく変形能は維持されている<sup>10)</sup>。その結果，T-TAS パラメータの変動係数は 10% 未満になったと考えられる（補足表 2）。

新規 T-TAS 止血試験は低濃度血小板/高せん断応力で止血能を包括的に定量することが可能であった。従って，この試験は従来の凝集試験よりも，生理学的により適切な条件における血小板製剤の止血能評価を可能

にすると考えられる。このシステムは血小板輸血後の臨床状況をより反映している可能性があり、受血者を問わない試験管内での血小板輸血とみなすことができるのかもしれない。新規 T-TAS 止血試験は従来の凝集試験から実験動物を用いた *in vivo* 止血試験への橋渡しとして期待される。

この研究には2つの制限事項がある。第一に、再構成血液中の血液成分は調製工程で損傷している可能性がある。第二に、生体内とは異なり再構成血液サンプルには白血球がほとんど含まれておらず、好中球細胞外トラップのような凝固促進事象を反映していない<sup>11)</sup>。したがって、現在の我々の方法は実験動物やヒトにおける止血能をまだ適切に反映しきれていないかもしれない。しかしながら、新規 T-TAS 止血試験は倫理、労力、再現性において *in vivo* 止血試験よりも優れている。我々の評価法は低濃度血小板/高せん断応力における血小板製剤の止血能を評価する方法として、*in vivo* 止血試験の代替となる可能性がある。

著者の COI 開示：瀧崎 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、木村 貴文、瀧原 義宏は血液製剤を製造している日本赤十字社の職員である。小山田 千秋、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職員の職員である。

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の皆様へ感謝いたします。研究の支援をいただいた永里 朋香先生、英文校正をサポートいただいた Editage (www.editage.com) に感謝いたします。瀧崎 晶弘が研究を実施し、原稿の第一稿を執筆した。瀧崎 晶弘、保井 一太、林 智也、田中 光信、下垣 一成が研究デザインを担当した。小山田 千秋、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、木村 貴文、瀧原 義宏が研究を監督し、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) Born GV: Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature*, 194: 927—929, 1962.

- 2) Flieder T, Gripp T, Knabbe C, et al: The Sysmex CS-5100 coagulation analyzer offers comparable analytical performance and excellent throughput capabilities. *Pract Lab Med*, 6: 38—47, 2016.
- 3) Weisel JW, Litvinov RI: Red blood cells: the forgotten player in hemostasis and thrombosis. *J Thromb Haemost*, 17: 271—282, 2019.
- 4) 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.
- 5) Fuchizaki A, Yasui K, Hayashi T, et al: A novel quantitative method to evaluate the contribution of platelet products to white thrombus formation in reconstituted blood under flow conditions. *Vox Sang*, 118: 367—375, 2023.
- 6) 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.
- 7) Samanbar S, Piñeyro JA, Moreno-Castaño AB, et al: T-TAS<sup>®</sup> 01 as a new tool for the evaluation of hemostasis in thrombocytopenic patients after platelet transfusion. *Blood Transfus*, 22: 166—175, 2024.
- 8) Mitsuhashi H, Ochi Y, Fuchizaki A, et al: Automated preparation of washed platelet concentrates through spinning-membrane filtration. *Transfusion*, 62: 2262—2270, 2022.
- 9) 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.
- 10) Marin M, Roussel C, Dussiot M, et al: Metabolic rejuvenation upgrades circulatory functions of red blood cells stored under blood bank conditions. *Transfusion*, 61: 903—918, 2021.
- 11) Ghasemzadeh M, Hosseini E: Platelet-leukocyte cross-talk: linking proinflammatory responses to procoagulant state. *Thromb Res*, 131: 191—197, 2013.

## **A NOVEL HAEMODILUTION CHIP MOUNTED ON THE TOTAL THROMBUS-FORMATION ANALYSIS SYSTEM, A FLOW CHAMBER SYSTEM, ENABLES STABLE ANALYSIS OF PLATELET PRODUCTS UNDER LOW PLATELET CONCENTRATION/HIGH SHEAR CONDITIONS**

*Akihiro Fuchizaki<sup>1)</sup>, Kazuta Yasui<sup>1)</sup>, Tomoya Hayashi<sup>1)</sup>, Mitsunobu Tanaka<sup>1)</sup>, Chiaki Oyamada<sup>2)</sup>, Tomoko Ohnishi-Wada<sup>2)</sup>, Kazuya Hosokawa<sup>2)</sup>, Yoshihiro Fujimura<sup>1)</sup>, Kazushige Shimogaki<sup>1)</sup>, Fumiya Hirayama<sup>3)</sup>, Takafumi Kimura<sup>1)</sup> and Yoshihiro Takihara<sup>1)</sup>*

<sup>1)</sup>Japanese Red Cross Kinki Block Blood Center

<sup>2)</sup>Fujimori Kogyo Co., Ltd.

<sup>3)</sup>Japanese Red Cross Osaka Blood Center

### **Keywords:**

haemostasis, high shear stress, low platelet count, total thrombus-formation analysis system

---

©2025 The Japan Society of Transfusion Medicine and Cell Therapy

Journal Web Site: <https://yuketsu.jstmct.or.jp/>

## 補足方法

## 血小板数、平均血小板容量、CD62P 陽性率、PAC-1 結合率、アネキシン V 結合率

血小板数と平均血小板量は、自動血球カウンター (XS-1000i ; シスメックス、神戸市、日本) を用いて測定した。血小板活性化マーカーCD62P の表面発現と血小板 GPIIb/IIIa 複合体上の立体構造エピトープの自発発現をフローサイトメトリーで測定した。端的に記載すると、血小板サンプルを PerCP 標識抗ヒト CD61 モノクローナル抗体 (mAb) (BD Bioscience, San Jose, USA)、PE 標識抗ヒト CD62P mAb (BD Bioscience)、および FITC 標識抗ヒト PAC-1 mAb (BD Bioscience) と共にインキュベートした。陰性コントロールとして、CD62P には PE 標識抗マウス IgG1 抗体 (BD Bioscience) を使い、PAC-1 にはブロッキングペプチドであるフィブロネクチン活性フラグメント (RGDS ; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) を用いた。染色した血小板はパラホルムアルデヒドリン酸緩衝液 (最終濃度 1% ; 富士フイルム和光純薬株式会社、大阪、日本) で固定した。血小板膜へのホスファチジルセリン露出は、アネキシン V-FITC アポトーシス検出キット (Sigma-Aldrich) を用いて添付文書に従い、フローサイトメトリーにより測定した。

補足表 1 濃厚血小板保存時の *in-vitro* 特性

		Days after the platelet collection				
		day 2	day 4	p value	day 9	p value
Haematology analyzer values	Platelet counts ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	1,054 $\pm$ 85	1,061 $\pm$ 94	0.413	995 $\pm$ 87	<0.01
	Mean platelet volume (fl)	9.0 $\pm$ 0.6	9.1 $\pm$ 0.5	<0.05	9.3 $\pm$ 0.5	<0.01
Platelet surface markers	CD62P positive platelet (%)	15 $\pm$ 5	23 $\pm$ 10	<0.01	60 $\pm$ 11	<0.01
	PAC-1 binding (% positive)	1.2 $\pm$ 0.5	1.6 $\pm$ 1.2	0.234	2.8 $\pm$ 1.5	<0.01
	Annexin V binding (% positive)	3.3 $\pm$ 0.6	3.9 $\pm$ 0.6	<0.05	8.8 $\pm$ 3.8	<0.01

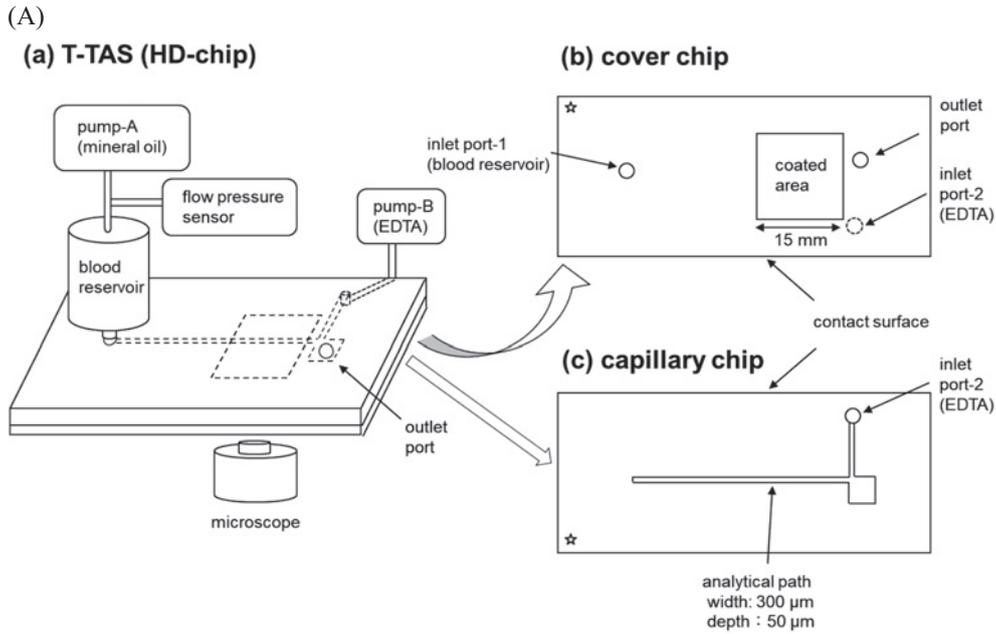
ノート：データは平均値  $\pm$  標準偏差で示した (N=10)。

反復測定分散分析後、ポストホック分析として Dunnett の多重比較検定による 2 日目、4 日目、9 日目の濃厚血小板の *in-vitro* 特性の比較

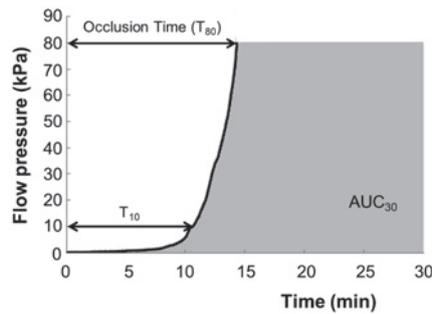
補足表 2 5 名の異なる赤血球献血者から調製した再構成血液サンプルの止血能

No.	T <sub>10</sub> (min)	T <sub>80</sub> (min)	AUC <sub>30</sub>
1	13.8	17.5	1,147.6
2	15.3	18.9	1,015.1
3	15.3	18.5	1,069.2
4	15.8	20.0	1,005.8
5	15.2	19.0	1,008.5
Means	15.1	18.8	1,049.2
Standard deviation	0.8	0.9	60.8
Coefficient of Variation (%)	5.1	4.9	5.8

略語：T<sub>10</sub>, time to 10kPa ; T<sub>80</sub>, time to 80kPa ; AUC<sub>30</sub>, area under the curve for 30min



(B)



補足図1 血液希釈チップ (HD チップ) 搭載血栓形成能解析システム (T-TAS) と解析結果

(A) T-TAS (HD チップ) の概略図 (a) HD チップはカバーチップとキャピラリーチップで構成されている。HD チップ (深さ 50 $\mu\text{m}$  チャンバー) は従来チップ (深さ 80 $\mu\text{m}$  チャンバー) と比較して、T-TAS 解析チャンバー内の血栓成長による流路閉塞に伴う圧力上昇の検出感度が高い。(b) I 型コラーゲンと組織トロンボプラスチンがカバーチップの一部にコーティングされている。(c) 流速は 10 $\mu\text{l}/\text{min}$  に設定され、これはチャンバー内の初期壁せん断速度約 1,500 $\text{s}^{-1}$  に相当する。血液サンプル (480 $\mu\text{l}$ ) は、凝固系を回復させるため、分析前に 1.25 $\text{mg}/\text{ml}$  のコーントリプシンインヒビターを含む 0.3M  $\text{CaCl}_2$  20 $\mu\text{l}$  と混和した。血液サンプルはキャピラリーチップの分析経路を通して灌流される。ポンプ A (ミネラルオイル) はリザーバー内の血液サンプルを分析経路に押し出す。血栓形成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領域で起こる。血栓形成により背圧が発生し、流圧センサーでモニターされる。白色血栓形成も顕微鏡でモニターされる。ポンプ B (エチレンジアミン四酢酸; EDTA) は出口ポートでの凝固阻害に使用される。

(B) フロー条件下で再構成血液サンプルを用いた T-TAS の代表的な結果は流圧曲線として示される。解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)),  $T_{80}$  (80kPa に達するまでの時間: 閉塞時間 (分)), AUC<sub>30</sub> (30 分間曲線下面積: グレーの濃淡) を図中に示す。