

冷蔵保存した全血由来 PAS 置換血小板濃厚液の生体応答調節因子濃度の経時的变化

秋野 光明¹⁾ 若本志乃舞¹⁾ 布施 久恵¹⁾ 有澤 史倫¹⁾ 佐々木実咲¹⁾
内藤 祐¹⁾ 金敷 拓見²⁾ 藤原 満博²⁾ 鳥本 悦宏¹⁾

血小板製剤 (platelet concentrates : PC) の室温保存では、上清中に増加した血小板由来の生体応答調節因子 (biological response modifiers : BRMs) の非溶血性輸血副反応への関与が報告されている。

血漿の一部を血小板保存液 (platelet additive solution : PAS) に置換した全血由来 PC (PASPC) を冷蔵で day 21 まで保存し、上清中の BRM 濃度の変化を室温保存下と比較した。サイトカインアレイにより 105 種の BRMs を半定量解析後、10 種 (sCD40L, RANTES[CCL5], BDNF, DKK-1, GRO- α [CXCL1], sEMMPRIN, PF4[CXCL4], PDGF-BB, EGF, PAI-1) を ELISA 法で定量した。

冷蔵保存での BRM 濃度は、室温保存に比べて有意に低値であり、冷蔵保存 day 14 の各 BRM 濃度は、室温保存 day 5 の濃度を維持していた。従って、PASPC において、これら 10 種の BRMs が関与しうる非溶血性輸血副反応のリスクは、室温 day 5 と冷蔵 day 14 保存が同等であると考えられた。

キーワード：生体応答調節因子、全血由来 PAS 置換血小板濃厚液、冷蔵保存、非溶血性輸血副反応

緒 言

血小板製剤 (platelet concentrates : PC) には、成分採血由来 PC (apheresis-derived PC : APC) と全血由来 PC (whole blood-derived PC : WBPC) があり、それぞれ、血小板を血漿 100% に浮遊する場合と血漿の一部を血小板保存液 (platelet additive solution : PAS) に置換する場合がある¹⁾。PC の保存は、室温での振盪保存が標準であったが、近年、冷蔵での静置保存が注目を集めている。冷蔵保存 PC では、細菌感染リスクの低減と室温保存に比べて良好な止血能が報告されている²⁾。そのため、出血治療を対象とした冷蔵保存 PC の有効期限延長が期待され、最近のアメリカ食品医薬品局 (Food and Drug Administration : FDA) のガイドラインでは、室温保存血小板が入手できない場合において、活動性出血の治療に day 14 まで保存した冷蔵保存 PC の使用を承認している³⁾。

本邦では、現在、PC のすべてが APC であるが、将来の PC 安定供給のための一方策として、WBPC の調製も考えられる。これまでに我々は、400ml 全血から PASPC を調製し、冷蔵保存で 14 日は、止血に関わる血小板凝集能や血餅形成能が室温保存の 5 日目と同等

であることを報告した⁴⁾。

血小板の顆粒内には、凝固因子、サイトカイン、ケモカイン、成長因子など様々な生体応答調節因子 (biological response modifiers : BRMs) が含まれている。血小板の活性化により、血小板の顆粒から放出された BRMs は、白血球の活性化、炎症反応の亢進、止血や凝固などの多くの作用を有し、様々な生理学的かつ病理学的のプロセスに関与する⁵⁾。また、PC の室温保存では、保存に伴う血小板の活性化により、BRMs が放出され、PC 上清中の濃度が増加することが知られ⁶⁾⁷⁾、BRMs が高濃度になった PC と非溶血性輸血副反応 (Non-hemolytic transfusion reactions : NHTRs) との関連が報告されている^{6)8)~12)}。一方で冷蔵保存した PC は、室温保存に比べて、BRMs の蓄積が少ないことが報告されているものの、day 14 以降まで長期保存した検討は限られる¹³⁾¹⁴⁾。長期保存が期待される冷蔵保存 PC の上清中の BRM 濃度を調べることは、NHTRs を理解する上で有益と考える。本検討は、day 21 まで冷蔵保存した PASPC の上清 BRM 濃度の経時的变化を、室温保存した PASPC と比較した。

1) 日本赤十字社北海道ブロック血液センター

2) (前) 日本赤十字社北海道ブロック血液センター

連絡責任者：秋野 光明, E-mail : m-akino@hokkaido.bc.jrc.or.jp

〔受付日：2025 年 8 月 27 日, 受理日：2025 年 12 月 14 日〕

材料と方法

1. PASPC の調製

以前に我々が検討した既報⁴⁾で調製した PASPC から分離、凍結保存した上清を測定検体に用いた。PASPC の調製方法を以下に示す。採血翌日 (day 1: 採血当日を day 0 とした) の 400ml 全血から欧州仕様の TACSI (Terumo BCT) を使用して buffy coat (BC) を得た。BC の 4 または 5 バッグを混和後に PAS (T-PAS+, Terumo BCT) を添加 (4 バッグ: 220ml, 5 バッグ: 250ml) してプール BC とし、もう一度 TACSI で遠心して PASPC を調製した。調製した PASPC を、X 線 15 Gy 照射 (MBR-1350A-TW, Hitachi Healthcare Systems) し、2 バッグを混和した後に二等分し、一方は冷蔵 (2~6°C) 静置、他方は室温 (20~24°C) 振盪下で day 21 まで保存した。なお、2 バッグの PASPC の調製は、別日に 4 回実施した (各 n=4)。白血球除去 (白除) は、プール BC 調製時の TACSI 遠心工程に組み込まれている。

2. 検体調製

サンプリングポイントは、day 1, day 3, day 5, day 10, day 14, day 21 とした。Day 1 の検体は、1. でプールした PASPC バッグから採取した。なお、冷蔵で静置保存の PASPC は、均一検体を得るために 22°C で 10 分間振盪させた後に採取した。冷蔵または室温保存の PASPC から採取した検体は、室温にて遠心 (1,880g 15 分) し、その上清を再度遠心 (13,000g 10 分) して得られた上清を BRM 測定用の検体とし、使用まで -80°C で保管した。

3. サイトカインアレイ

サイトカイン抗体アレイには、105 種類の異なるサイトカイン抗体が予めスポットされた proteome profiler human XL cytokine array kit (R&D Systems, Inc.) を用いた。冷蔵または室温保存した PASPC の day 14 の上清各 4 例をそれぞれ等量プールして検体とした。各検体をブロッキング・バッファーにて 5 倍希釈し、4°C にてアレイ・メンブレンと一晩インキュベーションした。洗浄および以後のインキュベーション工程は、すべて製品プロトコールに従った。サイトカインのスポットは、化学発光法を用い、CCD デジタルイメージャー (Ez-Capture MG, ATTO) により可視化した。スポットのシグナルの強度は、CS-Analyzer (ATTO Densitograph Software Library) にて定量し、各アレイ・メンブレン上の内部コントロールの強度によって、ノーマライズした。

4. ELISA

冷蔵保存および室温保存 PASPC 各 4 例の上清中の brain-derived neurotrophic factor (BDNF), dickkopf-related protein (DKK) -1, epidermal growth factor

(EGF), growth-related oncogene (GRO)- α (CXCL1), plasminogen activator inhibitor (PAI) -1, platelet-derived growth factor (PDGF) -BB, platelet factor (PF) 4 (CXCL4), regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES) (CCL5), soluble CD40 ligand (sCD40L) および soluble extracellular matrix metalloproteinase inducer (sEMMPRIN) の各濃度は、市販の ELISA キット (R&D Systems, Inc.) を用いて測定した。

5. 統計処理

測定値は平均値 $\pm$ 標準偏差で表記した。冷蔵保存と室温保存の同日での比較は、paired t-test を用いた。室温保存の day 5 の測定値と冷蔵保存の day 10, day 14, day 21 の各測定値の比較では、one-way ANOVA で検定後、Dunnett's post-hoc test を用いた。危険率 (P) 5% 未満を有意とした。統計処理には Graph Pad Prism 9 (エムデーエフ) を用いた。

6. 倫理

本検討は、日本赤十字社 (日赤) 血液事業研究倫理委員会の承認を受け実施した (承認番号 2018-024-5)。

結 果

1. PASPC

Day 1 において、調製した PASPC 2 バッグを等量分割し、それぞれ冷蔵と室温保存した。各温度条件下で保存した PASPC (各 n=4) の容量、血小板濃度、総血小板数は、それぞれ、 219 ± 20 versus (vs.) 220 ± 20 ml, 130 ± 16 vs $131 \pm 16 \times 10^4/\mu\text{l}$, 2.87 ± 0.50 vs $2.88 \pm 0.49 \times 10^{11}/\text{bag}$ であった。なお、今回調製した PASPC の残存白血球数は、2 バッグを等量分割する前にそれぞれ検体を採取して測定し、いずれも本邦の基準 ($<1 \times 10^6/\text{バッグ}$) を満たしていることを確認した。

2. サイトカインアレイ

冷蔵または室温保存した PASPC 上清中の BRM 濃度を網羅的に比較するため、FDA が冷蔵血小板の有効期限としている day 14 の各 4 例の上清を等量プールして検体とし、サイトカインアレイを用いて解析した (Fig. 1)。サイトカインアレイのスポットの濃度をデンストメトリーにて解析し、105 種類の BRMs の内、Table 1 に示す 24 種類の BRMs は、室温保存において冷蔵保存よりも 1.5 倍以上の density を示した。

3. ELISA

上述の 24 種類の BRMs の内、sCD40L, DKK-1, EGF, sEMMPRIN, GRO- α (CXCL1), PDGF-BB, RANTES (CCL5) に加え、NHTRs や炎症反応との関連が強く示唆されている BDNF, PAI-1, PF4 (CXCL4) を含めた計 10 種類の BRMs を ELISA によって定量した (Fig. 2)。いずれの BRMs も室温保存 PASPC では、上清濃

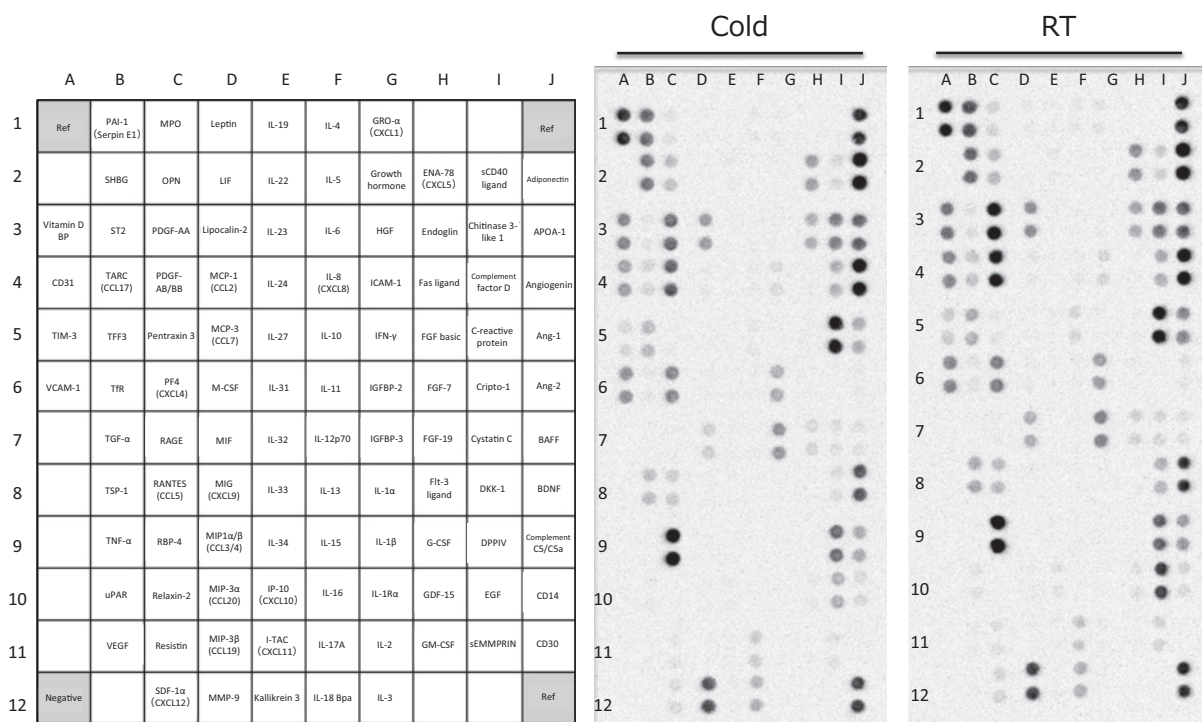


Fig. 1 Cytokine array analysis of biological response modifiers (BRMs) in the supernatant of PASPC stored under cold or room temperature (RT) conditions.

Supernatant collected from PASPC stored for 14 days at RT (20–24°C) or under cold (2–6°C) conditions was incubated with pre-spotted array membranes in accordance with the manufacturer's instructions. The array map shows the positions of protein targets and arrays from each storage condition. Ref denotes the internal positive control spot on each membrane. Negative denotes the internal negative control spot on each membrane.

Abbreviations:

APOA-1, apolipoprotein A-1; Ang-1, angiopoietin-1; BAFF, B cell activating factor; BDNF, brain-derived neurotrophic factor; sCD40 ligand, soluble CD40 ligand; DKK-1, dickkopf-related protein-1; DPPIV, dipeptidyl peptidase-4; EGF, epidermal growth factor; sEMMPRIN, soluble extracellular matrix metalloproteinase inducer; ENA-78, epithelial-derived neutrophil-activating peptide 78; CXCL, C-X-C motif chemokine ligand; FGF, fibroblast growth factor; Flt-3 ligand, FMS-like tyrosine kinase 3 ligand; G-CSF, granulocyte colony stimulating factor; GDF-15, growth differentiation factor 15; GM-CSF, granulocyte macrophage colony stimulating factor; GRO- α , growth-related oncogene- α ; HGF, hepatocyte growth factor; ICAM-1, intercellular adhesion molecule-1; IFN- γ , interferon- γ ; IGFBP, insulin-like growth factor binding protein; IL, interleukin; IL-1Ra, interleukin 1 receptor antagonist; IL-18 Bpa, IL-18 binding protein isoform a; IP-10, interferon gamma-induced protein 10; I-TAC, interferon-inducible T cell alpha chemoattractant; LIF, leukemia inhibitory factor; MCP, monocyte chemoattractant protein; CCL, C-C motif chemokine ligand; MIF, macrophage migration inhibitory factor; MIG, monokine induced by gamma-interferon; MIP, macrophage inflammatory protein; MMP-9, matrix metalloproteinase-9; MPO, myeloperoxidase; OPN, osteopontin; PDGF, platelet-derived growth factor; PF4, platelet factor 4; RAGE, receptor for advanced glycosylation end-products; RANTES, regulated on activation normal T cell expressed and secreted; RBP-4, retinol binding protein 4; SDF-1 α , stromal cell-derived factor-1 α ; PAI-1, plasminogen activator inhibitor-1; SHBG, sex hormone-binding globulin; ST2, suppression of tumorigenesis-2; TARC, thymus and activation-regulated chemokine; TFF3, trefoil factor 3; TfR, transferrin receptor; TGF- α , transforming growth factor- α ; TSP-1, thrombospondin-1; TNF- α , tumor necrosis factor- α ; uPAR, urokinase-type plasminogen activator receptor; VEGF, vascular endothelial growth factor; TIM-3, T-cell immunoglobulin mucin-3; VCAM-1, vascular cell adhesion molecule-1.

度の増加が認められ、その経時変化は BRMs によって異なっていた。sCD40L 濃度は、day 3～day 10 まで増加し、day 14、day 21 では逆に減少した。RANTES、BDNF、PF4 の各濃度は、保存とともに増加し、day 10 以降は概ね一定であった。PDGF-BB、DKK-1、GRO- α 、PAI-1 の各濃度は、day 21 まで経時的に増加し、EGF と sEMMPRIN は、day 10 以降から急増した。

一方、冷蔵保存の sCD40L は、室温保存に比べ、day 10 まで有意に低値であったが、day 21 では同日の室温保存よりも有意に高値となった。冷蔵保存での RANTES、BDNF、PF4 の濃度は、day 3 では室温保存よりも高い傾向がみられたが day 5 以降の増加は緩やかであり、室温保存に比べて有意に低値であった。冷蔵保存の PDGF-BB、DKK-1、GRO- α 、PAI-1 の濃度は、day 5 以降の増

Table 1 List of BRMs that exhibited higher density (≥ 1.5 -fold) in RT-stored PASPC than cold-stored PASPC.

BRMs	density (RT)	density (cold)	Ratio (RT/cold)
Ang-1	177,240	99,995	1.8
sCD40L	28,176	14,321	2.0
Cystatin C	15,082	7,056	2.1
DKK-1	75,258	9,559	7.9
EGF	357,447	93,614	3.8
sEMMPRIN	17,660	4,628	3.8
GDF-15	4,415	504	8.8
GRO- α (CXCL1)	3,469	413	8.4
IL-8 (CXCL8)	977	405	2.4
IL-10	14,409	1,783	8.1
Leptin	714	429	1.7
MCP-1 (CCL2)	1,018	440	2.3
MIF	83,933	30,587	2.7
MPO	19,859	3,729	5.3
PDGF-AA	593,222	285,680	2.1
PDGF-AB/BB	544,098	310,241	1.8
RANTES (CCL5)	60,717	34,457	1.8
Resistin	5,563	1,999	2.8
SDF-1 α (CXCL12)	17,916	11,303	1.6
ST2	7,854	1,961	4.0
TARC (CCL17)	49,276	21,864	2.3
TfR	4,143	2,457	1.7
TSP-1	100,778	66,358	1.5
TIM-3	36,012	18,434	2.0

The density of BRM spot as described in Fig. 1 was quantitated using CS-analyzer and normalized to the internal positive spot on each membrane. The value was shown as an average of two spots for each BRM.

Abbreviations: Ang-1, angiopoietin-1; sCD40L, soluble CD40 ligand; DKK-1, dickkopf-related protein-1; EGF, epidermal growth factor; sEMMPRIN, soluble extracellular matrix metalloproteinase inducer; GDF-15, growth differentiation factor 15; GRO- α , growth-related oncogene- α ; CXCL, C-X-C motif chemokine ligand; IL, interleukin; MCP, monocyte chemoattractant protein; CCL, C-C motif chemokine ligand; MIF, macrophage migration inhibitory factor; MPO, myeloperoxidase; PDGF, platelet-derived growth factor; RANTES, regulated on activation normal T cell expressed and secreted; SDF-1 α , stromal cell-derived factor-1 α ; ST2, suppression of tumorigenesis-2; TARC, thymus and activation-regulated chemokine; TfR, transferrin receptor; TSP-1, thrombospondin-1; TIM-3, T-cell immunoglobulin mucin-3.

加は緩やかで、PDGF-BB、DKK-1、GRO- α では day 5～day 21 まで、PAI-1 は day 10～day 21 まで、室温保存に比べて有意に低値であった。EGF、sEMMPRIN の各濃度は、day 5 まで一定であったが、day 10 から緩やかに増加し、EGF では day 5～day 21 まで、sEMMPRIN は day 10～day 21 まで室温保存に比べ有意に低値であった。

冷蔵保存における day 10 以降の各 BRM 濃度を室温保存の day 5 の濃度と比べると、冷蔵保存では、いずれ

の BRMs においても、少なくとも day 14 まで同等または低値であった。

考 察

我が国で使用されている PC は血小板を血漿 100% に浮遊させた APC であるが、欧米では血漿の 60～70% を PAS で置換した PC が広く普及している¹⁵⁾。我々は、PASPC の冷蔵保存の影響を調べるため、105 種類の BRMs をサイトカインアレイにより網羅的に解析し、室温保存と冷蔵保存で差が見られた BRMs を中心にその濃度を定量した。冷蔵と室温で PC を保存した既報では、両群を day 21 まで保存し比較している。室温保存 PC を day 7 以降も保存することは一般的にはないが、既報の結果と比較して考察するため、本検討では既報と同様の保存期間を設けた。Table 2 に本報と類似する既報の結果および本報で定量した BRMs の機能などを示す。

血小板の活性化により血小板の α 顆粒から膜に発現した CD40L は、プロテアーゼによる切断を受け、可溶性 CD40L (sCD40L) として放出され多岐の生物活性を有する^{10)~12)}。PC の室温保存において上清中に増加した sCD40L は、非溶血性発熱反応や輸血関連急性肺障害 (TRALI) と関連がある^{6)8)~12)}。APC を day 7 まで保存した検討では、室温保存に比べ冷蔵保存の上清 sCD40L 濃度が低いことが報告されている¹⁶⁾。しかし、本報と同様に T-PAS で調製した PASPC の検討では、室温保存と冷蔵保存ともに day 14 までは sCD40L 濃度の増加を認めなかったとしている¹⁷⁾。本検討では、day 10 まで冷蔵保存の方が室温保存よりも sCD40L 濃度が有意に低値であった (Fig. 2A)。PASPC を対象とした既報の結果と異なったのは、T-PAS の組成の違いや PC 容量の違いが考えられる。本検討において、sCD40L 濃度が冷蔵保存中は増加するのに対し、室温保存では上昇した後に低下する結果が得られたのでその機序を考察した。血小板から放出された sCD40L は、組み換え CD40 に結合することが報告されている¹⁸⁾。CD40 との結合を介した sCD40L の internalization は B 細胞株では報告¹⁹⁾があるが、血小板では報告がなく、不明である。一方、sCD40L は、比較的不安定であり、ELISA によって検出される sCD40L レベルは速やかに減少し、免疫沈降反応での検出から半減期はおよそ 6 時間と報告されている¹⁸⁾。従って、室温保存でみられる sCD40L 濃度の低下要因として、血小板から放出された sCD40L の CD40 への結合や、sCD40L の分解が優位となった可能性が考えられる。

RANTES (CCL5) は好塩基球や好酸球に対し強力な走化作用を有し¹²⁾、BDNF はアレルギー反応、特に搔痒感への関与²⁰⁾が知られ、上清中の RANTES と BDNF の濃度の高い PC とアレルギー性輸血副反応との関連が

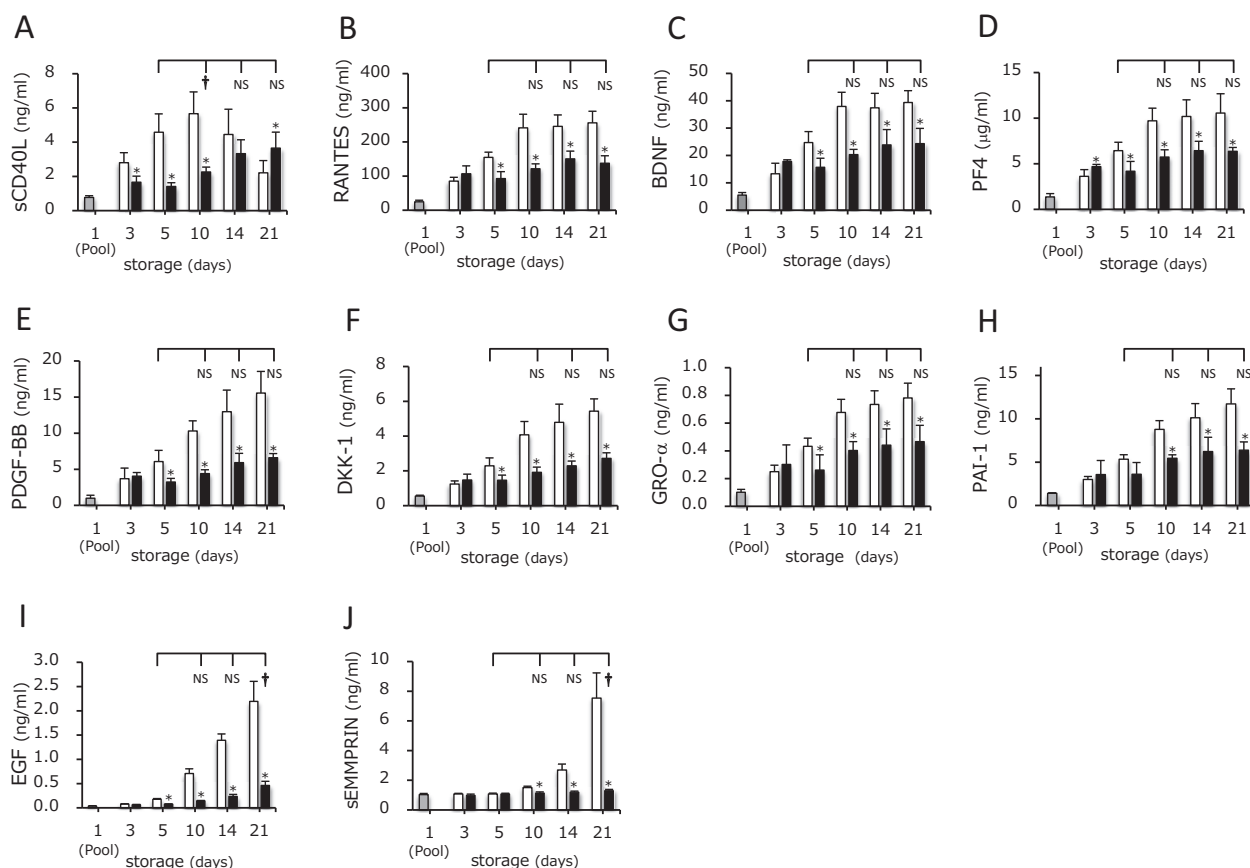


Fig. 2 Concentrations of BRMs in the supernatant of PASPC stored at RT (open column) or under cold (closed column) conditions for 21 days.

On day 1, two PASPC were pooled (Pool: gray column) and split equally for storage at either RT or cold conditions.

(A) sCD40L, (B) RANTES (CCL5), (C) BDNF, (D) PF4 (CXCL4), (E) PDGF-BB, (F) DKK-1, (G) GRO-α (CXCL1), (H) PAI-1, (I) EGF, (J) sEMMPRIN. Data are shown as mean ± SD (n = 4).

*p < 0.05: significant difference compared to PASPC stored at RT at the same time point.

†p < 0.05: significant difference compared to the value on day 5 of PASPC stored at RT.

NS: not significant difference compared to the value on day 5 of PASPC stored at RT.

示唆されている²¹⁾。本検討において、冷蔵保存におけるPASPCの上清 RANTES 濃度は、室温保存に比べ day 5～day 21 まで有意に低値であり、day 21 まで検討した既報¹³⁾¹⁴⁾と一致する結果であった (Fig. 2B)。BDNF に関しては、PC の室温保存における上清濃度の増加 (day 1～day 7) が報告²²⁾されているが、冷蔵保存における PASPC の BDNF 濃度の増加についての報告は見当たらない。我々は、冷蔵保存した PASPC の BDNF 濃度が、室温保存に比べて day 21 まで有意に抑制されることを明らかにした (Fig. 2C)。

PF4 (CXCL4) は好中球や単球の走化作用を有し¹²⁾、RANTES とヘテロダイマーを形成し、RANTES による内皮細胞への単球の接着を増強することが *in vitro* の系で示されている²³⁾。成長促進因子である PDGF-BB は創傷に関わり、EGF は血管新生作用を有する²⁴⁾。Johnson ら¹⁴⁾は、day 21 まで冷蔵保存した PASPC の検討において、PF4 と EGF の各濃度は day 5～day 21

まで、PDGF-BB 濃度は day 5～day 14 まで、室温保存に比べて有意に低値であったと報告している。我々の結果においても、冷蔵保存した PASPC におけるこれら 3 種の BRMs の上清濃度は、day 5～day 21 まで室温保存に比べて低値であり、PDGF-BB の day 21 の結果以外、Johnson ら¹⁴⁾の報告と同様であった (Fig. 2D, E, I)。

DKK-1 は β-catenin 依存性 Wnt シグナルの抑制因子で、白血球の侵入や T 細胞のサイトカイン放出において重要な調節機能の役割を果たす。好中球性の急性肺障害モデルでは、肺における好中球の移動を亢進させる²⁵⁾。PAI-1 は、プラスミノゲン/プラスミン系の重要なインヒビターで、炎症、創傷治癒、細胞接着、腫瘍プロGREッションに関連する²⁶⁾。PC の保存における上清 DKK-1 濃度については PASPC 及び PAS-APC を、上清 PAI-1 濃度については APC を対象とし、それぞれ day 7 までの経時変化が検討され、室温保存におけ

Table 2 Changes in BRM concentrations in cold-stored PCs compared to RT-stored PCs.

Platelet supernatant	BRMs	Function	References	Concentration change over storage		
				Cold Storage ^a	Published results	This study
		- enhances B-cell antibody production, B-cell immunoglobulin class switching - enhances platelet activation, aggregation, and platelet-leukocyte conjugation - involvement in TRALI, FNHTRs, allergic transfusion reaction - Induction of prostaglandin E2 in human fibroblasts - Priming of the PMN oxidase and induction of PMN-mediated pulmonary endothelial damage	Phipps et al. ⁸⁾ Khan et al. ⁹⁾ Sahler et al. ¹⁰⁾ Aloui et al. ¹¹⁾ Cognasse et al. ¹²⁾	↓ (day 5), ↔ (day 7) ↔ (≤ day 14)	Baimukanova et al. ¹⁶⁾ Winskel-Wood et al. ¹⁷⁾	↓ (day 3 ~ day 10) ↑ (day 21)
	RANTES (CCL5)	- leukocyte chemotaxis (T cells, eosinophils, basophils) - involvement in allergic transfusion reaction	Cognasse et al. ¹²⁾ Savage et al. ¹⁸⁾	↓ (day 9 ~ day 14) ↓ (day 5 ~ day 21)	Sandgren et al. ¹³⁾ Johnson et al. ¹⁴⁾	↓ (day 5 ~ day 21)
	BDNF	- involvement in pruritic skin inflammation - role in neuronal survival, function, and development - inhibition of eosinophil apoptosis in atopic dermatitis - chemotactic migration of eosinophils in atopic dermatitis - involvement in allergic transfusion reaction	Weihauch et al. ²⁰⁾ Savage et al. ²¹⁾	NA	NA	↓ (day 5 ~ day 21)
	PF4 (CXCL4)	- promotes blood coagulation - strong chemattractant for neutrophils, monocytes and fibroblasts - role in wound repair and inflammation	Cognasse et al. ¹²⁾	↓ (day 9 ~ day 14) ↓ (day 5 ~ day 21)	Sandgren et al. ¹³⁾ Johnson et al. ¹⁴⁾	↑ (day 3) ↓ (day 5 ~ day 21)
	PDGF-BB	- mitogen - wound healing - chemotaxis of neutrophils and monocytes	Mazzucco et al. ²⁴⁾	↓ (day 5 ~ day 7) ↓ (day 5 ~ day 14), ↔ (day 21)	Baimukanova et al. ¹⁶⁾ Johnson et al. ¹⁴⁾	↓ (day 5 ~ day 21)
	DKK-1	- inhibitor of β-catenin-dependent Wnt pathway - enhances the influx of neutrophils into lungs in models of inflammation	Guo et al. ²³⁾	↓ (day 4 ~ day 7)	Waubert de Puiseau ²⁷⁾	↓ (day 5 ~ day 21)
	GRO- α (CXCL1)	chemotaxis of neutrophils	Tariket et al. ⁹⁾	NA	NA	↓ (day 5 ~ day 21)
	PAI-1	- regulation of fibrinolysis - roles in inflammation, wound healing, cell adhesion, and tumor progression	Morrow et al. ²⁶⁾	↓ (day 5 ~ day 7)	Baimukanova et al. ¹⁶⁾	↓ (day 10 ~ day 21)
	EGF	- mitogen - cell proliferation and differentiation, angiogenesis	Mazzucco et al. ²⁴⁾	↓ (day 14 ~ day 21)	Johnson et al. ¹⁴⁾	↓ (day 5 ~ day 21)
	sEMMPRIN	- pro-angiogenic activity - secretion of MMP-9 and VEGF in a coculture system of human fibroblasts and monocytic-like cell line	Schmidt et al. ²⁷⁾ Amit-Cohen et al. ²⁸⁾	NA	NA	↓ (day 10 ~ day 21)

^a: Relative changes in BRM concentration in cold-stored PCs compared to RT-stored PCs at the same time point are expressed as the following:

increase ↑ ; decrease ↓ ; unchanged ↔ ; NA = no published data available.

Abbreviations: TRALI, transfusion-related acute lung injury; FNHTRs, febrile non-hemolytic transfusion reactions; PMN, polymorphonuclear leukocyte; MMP-9, matrix metalloproteinase-9; VEGF, vascular endothelial growth factor.

る上清濃度の増加と冷蔵保存における有意な抑制が報告されている¹⁶⁾²⁷⁾。本報の結果は、PASPCのDKK-1濃度については既報を支持するとともに、冷蔵保存では室温保存に比べ、day 21まで有意に低値であることを明らかにした (Fig. 2F)。また、PASPCの冷蔵保存での上清PAI-1濃度は、day 5では室温保存との差を認めなかったが、day 10~day 21において有意に低いことを確認した (Fig. 2H)。

好中球の走化作用をもつGRO- α (CXCL1)濃度は、未白除の全血由来プールPCのday 1~day 5保存で増加することが報告²⁸⁾されている一方で、白除PC製剤での室温および冷蔵保存の比較報告は見当たらない。今回、室温保存におけるPC上清中のGRO- α 濃度の経時変化が、PDGFおよびDKK-1の濃度の経時変化と類似していること (Fig. 2E, F, G)、また冷蔵保存におけるPASPC上清中のGRO- α の濃度が、室温保存に比べday 5~day 21まで有意に低値であることを明らかにした (Fig. 2G)。

EMMPRINは血小板の活性化により、 α 顆粒から血小板膜上に発現する。血小板と単球上のEMMPRINとのホモタイプックな結合により、単球からmatrix metalloproteinase-9 (MMP-9)とvascular endothelial growth factor (VEGF)の放出が誘導される²⁹⁾。可溶型 (sEMMPRIN)も生物活性があり、ヒトの線維芽細胞と単球系細胞との共培養において、単球系細胞からのMMP-9とVEGFの放出の亢進作用が報告されている³⁰⁾。PC保存におけるsEMMPRINの経時変化に関する報告は見当たらない。本検討では、PASPCの室温保存におけるsEMMPRINの上清濃度の経時変化が、EGFと同様に、day 10以降大きく増加し、RANTESやBDNFの経時変化に比し遅延することを明らかにした (Fig. 2J)。また、冷蔵保存下でのsEMMPRIN上清濃度は、室温保存に比べ、day 21まで有意に低いことも確認した (Fig. 2J)。

FDAでは、冷蔵保存PCの有効期限をday 14としている。我々は、冷蔵保存day 14のPASPCの血小板凝集能 (ADPおよびリストセチン刺激)と血餅形成能は、室温保存day 5と比較して同等であり、14日間良好に維持されることを既に報告している⁴⁾。今回の検討において、PASPCの冷蔵保存では、保存とともに各BRM濃度は増加するが、EGFとsEMMPRINはday 14まで、その他のBRMsはday 21まで室温保存のday 5の値と同等であることを示した。このことから、PASPCの冷蔵保存は、血小板の機能面のみならず、BRM放出の観点からも、少なくとも14日間は良好に保存できる可能性を示唆した。本検討ではNHTRとの関連が示唆されているBRMsの中で未測定のものもあり、また未知の因子も想定されるが、少なくとも今回測定した10種の

BRMsが関与しうるPASPCのNHTRsのリスクは、室温保存day 5と冷蔵保存day 14が同等である可能性が考えられた。

冷蔵保存day 14のPASPCが、実際に患者に輸血された際に、PASPC中の各BRM濃度が、生理学的または病的に意味を持つ濃度であるか否かを評価することは重要である。我々は、冷蔵保存day 14の10単位のPASPC (容量200ml)が60kg (循環血漿量3,000ml)の患者に輸血された場合、患者の血管内に各BRMが留まると仮定して算出される各BRM濃度を既報で報告されているヒト血中での病的濃度等と比較した (Table 3)。sCD40Lについては、Kaufmanら³¹⁾がin vitroの系で、50倍に希釈した室温保存day 3~day 5のPC上清が発熱に関与するprostaglandin E₂とinterleukin-6の産生を惹起し、抗CD40L抗体により、50%以上抑制されるとしている。本報の冷蔵保存day 14のPASPC輸血で想定されるsCD40L濃度は、Kaufmanら³¹⁾が示した値よりも高値であった。また、RANTESの患者血中推定濃度は、室温保存PC上清が好塩基球の走化能を活性化すること、この反応は抗RANTES抗体で抑制されることを示した論文³²⁾の値と同等であった。アレルギー性の輸血副作用との関与が示唆されているBDNFの患者血中推定濃度は、アレルギー性喘息患者の血中濃度よりも高濃度であった。PF4の患者血中推定濃度は、in vitroで好中球や単球の走化作用を引き起こす濃度よりは低いものの、RANTESとのヘテロダイマーの形成により、RANTESによる単球の内皮細胞への接着を増強する濃度よりは高値であった。一方、これら4種以外のBRMsの患者血中推定濃度は、いずれもin vitroで活性を示す濃度またはヒト血中での病的濃度よりも低いと推定された。

最近、day 14まで冷蔵保存したPCの有効性や安全性を評価した臨床研究が行われている。冷蔵保存PAS-APCを用いた検討では、day 7までの室温保存血小板、day 7までの冷蔵保存血小板、day 8~day 14の冷蔵保存血小板をそれぞれ輸血された患者群において、例数は少ないものの、いずれも輸血副反応はみられなかったと報告された³³⁾。また、出血性ショックに対する冷蔵保存血小板の早期輸血の有効性と安全性の臨床試験においても、day 7までの冷蔵保存APCを輸血された患者 (41例)とday 8~day 14の冷蔵保存APCを輸血された患者 (57例)において、アレルギー反応および輸血副反応の発症率はいずれも0%であったとされている³⁴⁾。Day 14まで冷蔵保存したPCの輸血副反応の頻度は、今後さらに大規模な臨床研究によって明確になると考える。

Table 3 Estimated BRM concentrations in a patient transfused with 10 units of 14-day cold-stored PASPC.

BRM	Concentration in the supernatant of PASPC (ng/ml)	Amount in PASPC (ng/bag)	Estimated circulating plasma level in a patient (ng/ml)	Biologically active concentration (biological activity)	Reference
sCD40L	3.3 ± 0.8	660	0.21	0.14ng/ml [50-fold diluted 3-5 days stored PC supernatant] (induction of COX-2, production of PGE ₂ and IL-6 in human lung fibroblasts)	Kaufman et al. ³¹⁾
RANTES (CCL5)	150.3 ± 22.8	30,060	9.39 (1.2nM)	1nM (basophil chemotaxis)	Wakamoto et al. ³²⁾
PDGF-BB	5.9 ± 1.28	1,180	0.37	0.5-1ng/ml (neutrophil chemotaxis) 5-20ng/ml (monocyte chemotaxis)	Deuel et al. ³⁵⁾
DKK-1	2.3 ± 0.3	460	0.14	100ng/ml (proliferation of endothelial colony-forming cells)	Smadja et al. ³⁶⁾
GRO-α (CXCL1)	0.44 ± 0.12	88	0.03 (0.004nM)	0.1-10nM (neutrophil chemotaxis)	Geiser et al. ³⁷⁾
BDNF	23.9 ± 5.6	4,780	1.49	0.415 ± 0.410ng/ml (plasma level in allergic asthma patients) vs 0.136 ± 0.132ng/ml (plasma level in control group)	Lommatzsch et al. ³⁸⁾
PF4 (CXCL4)	6,433 ± 1,023	1,286,600	402.06	1,000-5,000ng/ml (neutrophil/monocyte chemotaxis) 200ng/ml (amplification of RANTES-triggered monocyte adhesion on endothelium)	Deuel et al. ³⁹⁾ von Hundelshausen et al. ²³⁾
PAI-1	6.2 ± 1.7	1,240	0.39	73ng/ml (plasma median level in ALI and ARDS patients) vs 8.0ng/ml (plasma median level in normal volunteers)	Ware et al. ⁴⁰⁾
EGF	0.24 ± 0.04	48	0.01	0.1-10ng/ml (proliferation of human endothelial cells)	Gospodarowicz et al. ⁴¹⁾
sEMMPRIN	1.2 ± 0.1	240	0.08	100ng/ml [recombinant EMMPRIN] (enhancement of monocytic MMP-9 secretion in the presence of TNF-α)	Amit-Cohen et al. ³⁰⁾

The BRM concentration in an adult 60kg patient with 3,000ml of circulating plasma volume was calculated, assuming that each BRM was limited to the intravascular space.

Abbreviations: COX-2, cyclooxygenase-2; PGE₂, prostaglandin E₂; IL-6, interleukin-6; ALI, acute lung injury; ARDS, acute respiratory distress syndrome; MMP-9, matrix metalloproteinase-9; TNF-α, tumor necrosis factor-α.

結 語

PASPC の冷蔵保存では、sCD40L などの NHTRs や炎症反応に関与する 10 種の上清 BRM 濃度は、室温保存に比べて低値であり、冷蔵保存 day 14 においても室温保存 day 5 の濃度を維持した。従って、これら 10 種の BRMs が関与する NHTRs のリスクは、室温保存 day 5 の PASPC と day 14 まで冷蔵保存した PASPC が同等であると考えられた。

著者の COI 開示：著者らは日赤職員である。

文 献

- Shih DTB, Burnouf T: Preparation, quality criteria, and properties of human blood platelet lysate supplements for ex vivo system cell expansion. *New biotechnology*, 32: 199—211, 2015.
- Apelseth TO, Cap AP, Spinella PC, et al: Cold stored platelets in treatment of bleeding. *ISBT Science Series*, 12: 488—495, 2017.
- U.S.Food and Drug Administration Center for Biologics Evaluation and Research: Alternative procedures for the manufacture of cold-stored platelets intended for the treatment of active bleeding when conventional platelets are not available or their use is not practical. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/alternative-procedures-manufacture-cold-stored-platelets-intended-treatment-active-bleeding-when> (2024/5/21 accessed).
- 藤原満博, 金敷拓見, 布施久恵, 他：全血由来 PAS 置換血小板濃厚液の室温保存と冷蔵保存における品質の比較. *日本輸血細胞治療学会誌*, 69 : 589—598, 2023.
- Golebiewska EM, Poole AW: Platelet secretion: From haemostasis to wound healing and beyond. *Blood Reviews*, 29: 153—162, 2015.
- Tariket S, Sut C, Hamzeh-Cognasse H, et al: Transfusion-related acute lung injury: transfusion, platelets and biological response modifiers. *Expert Rev Hematol*, 9: 497—508, 2016.

- 7) Wood B, Padula MP, Marks DC, et al: The immune potential of ex vivo stored platelets: a review. *Vox Sang*, 116: 477—488, 2021.
- 8) Phipps RP, Kaufman J, Blumberg N: Platelet derived CD 154 (CD40 ligand) and febrile response to transfusion. *Lancet*, 357: 2023—2024, 2001.
- 9) Khan SY, Kelher MR, Heal JM, et al: Soluble CD40 ligand accumulates in stored blood components, primes neutrophils through CD40, and is a potential cofactor in the development of transfusion-related acute lung injury. *Blood*, 108: 2455—2462, 2008.
- 10) Sahler J, Spinelli S, Phipps R, et al: CD40 ligand (CD154) involvement in platelet transfusion reactions. *Transfus Clin Biol*, 19: 98—103, 2012.
- 11) Aloui C, Prigent A, Sut C, et al: The Signaling Role of CD 40 Ligand in Platelet Biology and in Platelet Component Transfusion. *Int J Mol Sci*, 15: 22342—22362, 2014.
- 12) Cognasse F, Hally K, Fauteux-Daniel S, et al: Effects and side effects of platelet transfusion. *Hämostaseologie*, 41: 128—135, 2021.
- 13) Sandgren P, Shanwell A, Gulliksson H: Storage of buffy coat-derived platelets in additive solutions: in vitro effects of storage at 4°C. *Transfusion*, 46: 828—834, 2006.
- 14) Johnson L, Tan S, Jenkins E, et al: Characterization of biologic response modifiers in the supernatant of conventional, refrigerated, and cryopreserved platelets. *Transfusion*, 58: 927—937, 2018.
- 15) Ohto H, Flegel WA, van der Meer PF, et al: The 2024 international survey of platelet products and practice. *Transfus Apher Sci*, 64: 104086, 2025.
- 16) 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.
- 17) Winskel-Wood B, Padula MP, Marks DC, et al: Cold storage alters the immune characteristics of platelets and potentiates bacterial-induced aggregation. *Vox Sang*, 117: 1006—1015, 2022.
- 18) Henn V, Steinbach S, Büchner K, et al: The inflammatory action of CD40 ligand (CD154) expressed on activated human platelets is temporally limited by coexpressed CD40. *Blood*, 98: 1047—1054, 2001.
- 19) Kedar R, Sabag O, Lichtenstein M, et al: Soluble CD40 ligand (sCD40L) provides a new delivery system for targeted treatment: sCD40L-caspase 3 chimeric protein for treating B-cell malignancies. *Cancer*, 118: 6089—6104, 2012.
- 20) Weihrauch T, Limberg MM, Gray N, et al: Neurotrophins: neuroimmune interactions in human atopic disease. *Int J Mol Sci*, 24: 6105, 2023.
- 21) Savage WJ, Savage JH, Tobian AAR, et al: Allergic agonists in apheresis platelet products are associated with allergic transfusion reactions. *Transfusion*, 52: 575—581, 2012.
- 22) Glenister KM, Payne KA, Sparrow RL: Proteomic analysis of supernatant from pooled buffy-coat platelet concentrates throughout 7-day storage. *Transfusion*, 48: 99—107, 2008.
- 23) von Hundelshausen P, Koenen RR, Sack M, et al: Heterophilic interactions of platelet factor 4 and RANTES promote monocyte arrest on endothelium. *Blood*, 105: 924—930, 2005.
- 24) Mazzucco L, Borzini P, Gope R: Platelet-derived factors involved in tissue repair—from signal to function. *Transfus Med Rev*, 24: 218—234, 2010.
- 25) Guo Y, Mishra A, Howland E, et al: Platelet-derived Wnt antagonist Dickkopf-1 is implicated in ICAM-1/VCAM-1-mediated neutrophilic acute lung inflammation. *Blood*, 126: 2220—2229, 2015.
- 26) Morrow GB, Mutch NJ: Past, present, and future perspectives of plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1). *Semin Thromb Hemost*, 49: 305—313, 2023.
- 27) Waubert de Puiseau MW, Sciesielski LK, Meyer O, et al: Pooling, room temperature, and extended storage time increase of adult-specific biologic response modifiers in platelet concentrates: a hidden transfusion risk for neonates? *Transfusion*, 60: 1828—1836, 2020.
- 28) Tung JP, Fraser JF, Nataatmadja M, et al: Age of blood and recipient factors determine the severity of transfusion-related acute lung injury (TRALI). *Crit Care*, 16: 1—14, 2012.
- 29) Schmidt R, Bültmann A, Fischel S, et al: Extracellular matrix metalloproteinase inducer (CD147) is a novel receptor on platelets, activates platelets, and augments nuclear factor κ B-dependent inflammation in monocytes. *Circ Res*, 102: 302—309, 2008.
- 30) Amit-Cohen BC, Rahat MM, Rahat MA: Tumor cell-macrophage interactions increase angiogenesis through secretion of EMMPRIN. *Front Physiol*, 4: 178, 2013.
- 31) Kaufman J, Spinelli SL, Schultz E, et al: Release of biologically active CD154 during collection and storage of platelet concentrates prepared for transfusion. *J Thromb Haemost*, 5: 788—796, 2007.

- 32) Wakamoto S, Fujihara M, Kuzuma K, et al: Biologic activity of RANTES in apheresis PLT concentrates and its involvement in nonhemolytic transfusion reactions. *Transfusion*, 43: 1038—1046, 2003.
- 33) Strandenes G, Sivertsen J, Byerkvig CK, et al: A pilot trial of platelets stored cold versus at room temperature for complex cardiothoracic surgery. *Anesthesiology*, 133: 1173—1183, 2020.
- 34) Sperry JL, Guyette FX, Rosario-Rivera BL, et al: Early cold stored platelet transfusion following severe injury: a randomized clinical trial. *Ann Surg*, 280: 212—221, 2024.
- 35) Deuel TF, Senior RM, Huang JS, et al: Chemotaxis of monocytes and neutrophils to platelet-derived growth factor. *J Clin Invest*, 69: 1046—1049, 1982.
- 36) Smadja DM, d'Audigier C, Weiswald LB, et al: The Wnt antagonist Dickkopf-1 increases endothelial progenitor cell angiogenic potential. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 30: 2544—2552, 2010.
- 37) Geiser T, Dewald B, Ehrenguber M, et al: The interleukin-8-related chemotactic cytokines GRO α , GRO β , and GRO γ activate human neutrophil and basophil leukocytes. *J Biol Chem*, 268: 15419—15424, 1993.
- 38) Lommatzsch M, Schloetcke K, Klotz J, et al: Brain-derived neurotrophic factor in platelets and airflow limitation in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, 171: 115—120, 2005.
- 39) Deuel TF, Senior RM, Chang D, et al: Platelet factor 4 is chemotactic for neutrophils and monocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 78: 4584—4587, 1981.
- 40) Ware LB, Matthay MA, Parsons PE, et al: Pathogenetic and prognostic significance of altered coagulation and fibrinolysis in acute lung injury/acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med*, 35: 1821—1828, 2007.
- 41) Gospodarowicz D, Brown KD, Birdwell CR, et al: Control of proliferation of human vascular endothelial cells. Characterization of the response of human umbilical vein endothelial cells to fibroblast growth factor, epidermal growth factor, and thrombin. *J Cell Biol*, 77: 774—788, 1978.

CONCENTRATION CHANGES IN BIOLOGICAL RESPONSE MODIFIERS IN PAS-REPLACED, WHOLE BLOOD-DERIVED PLATELET CONCENTRATES DURING COLD STORAGE

Mitsuaki Akino¹⁾, Shinobu Wakamoto¹⁾, Hisae Fuse¹⁾, Fuminori Arisawa¹⁾, Misaki Sasaki¹⁾, Yu Naito¹⁾, Takumi Kanashiki²⁾, Mitsuhiro Fujihara²⁾ and Yoshihiro Torimoto¹⁾

¹⁾Japanese Red Cross Hokkaido Block Blood Center

²⁾Japanese Red Cross Hokkaido Block Blood Center (former)

Abstract:

Non-hemolytic transfusion reactions (NHTRs) have been associated with biological response modifiers (BRMs) derived from platelets, which increase in the supernatant during the room temperature (RT) storage of platelet concentrates (PC).

In this study, whole blood-derived platelet concentrates (PASPC), in which part of the plasma was replaced with a platelet additive solution (PAS), were stored under cold conditions for up to 21 days. Changes in BRM concentrations in the supernatant were compared with those observed during RT storage. Following semiquantitative analysis of 105 BRMs using a cytokine array, 10 BRMs (sCD40L, RANTES [CCL5], BDNF, DKK-1, GRO- α [CXCL1], sEMMPRIN, PF4 [CXCL4], PDGF-BB, EGF, and PAI-1) were quantitatively measured by ELISA.

BRM concentrations were significantly lower during cold storage than during RT storage. In particular, BRM concentrations on day 14 of cold storage were similar to those observed on day 5 of RT storage. Accordingly, the risk of NHTRs involving these 10 BRMs in PASPC may be similar between 5-day RT storage and 14-day cold storage.

Keywords:

biological response modifier, PASPC, cold storage, non-hemolytic transfusion reaction