原 著

輸血用血小板の保存に関する研究

菅 原 正 弘

北海道大学医学部第1外科学教室（指導、葛西洋一教授）

（昭和57年11月17日受付）

STUDY OF PRESERVED PLATELET FOR TRANSFUSION

Masahiro Sugawara

The First Department of Surgery, University of Hokkaido

(Director: Prof. Youichi Kasai, M.D.)

The method for prolonged preservation of platelet concentrate, especially the significance of addition of PGE_1 , glycyrrhizin and α -tocopherol in the preservation of platelet concentrate, was investigated and the following results have been obtained.

1. It was found that PGE_1 added to platelet concentrate preserved under liquid form produced a desirable effect on platelet membrane integrity, mitigating the morphological change of platelet and its disintegration, and that this effect was particularly remarkable during preservation at 4°C . It should be noted, however, that PGE_1 exhibited a strong inhibitory effect on platelet aggregation.

2. Glycyrrhizin was also effective in the maintenance of platelet integrity, its inhibitory effect on platelet disintegration being particularly marked during preservation at 4°C . Further, glycyrrhizin mitigated the reduction in platelet aggregation, no matter whether platelet concentrate was preserved at 4°C or room temperature. These findings suggest that glycyrrhizin is also effective in the maintenance of functional platelet membrane integrity.

3. α -Tocopherol was effective in the maintenance of the integrity of platelet membrane, be it preserved at 4°C or room temperature; in either case it mitigated the morphological change of platelet and its disintegration. It should be noted, however, that α -tocopherol had a tendency to inhibit platelet aggregation, especially during preservation at 4°C .

It may therefore be concluded that PGE_1 , glycyrrhizin and α -tocopherol are effective in the prolonged preservation of PC.

I. 結 言

近年、血液成分療法¹⁾に多大の関心がよせられている。血小板においても、濃縮血小板血漿 (platelet concentrate: PC) が繁用され、血小板減少による出血の際には、劇的な止血効果をもたらしている^{2)~4)}。しかし、血小板輸血は、その適応からしても血小板の迅速な供給を要し、また、血液管理の点からも、血小板の有効な適用のためには、その保存が必要となる。

しかるに、現在供給されているPCの有効期限¹⁾⁵⁾が、調整後6時間以内とされているごとく、血小板のviabilityは短時日のうちに著しく低下する。この血小板viabilityの低下は、主として、

血小板膜 integrity の障害により生じるものである。そこで、著者は、血小板の液状保存において、血小板膜 integrity の障害を軽減する目的で、Prostaglandin E_1 (PGE_1), Glycyrrhizin, α -tocopherolなどをPCに添加し、その効果について検討したところ、有用と考えられる知見を得たので報告する。

II. 実験方法

1. 採血方法

健康人の静脈血200mlをACD液入り塩化ビニール製トリプルバッグ（テルモ社製）に採血した。

2. 濃縮血小板血漿 (PC) 調整法⁵⁾⁶⁾

採血した静脈血をただちに遠心分離器 (International 社製, DPR 600) で室温のもとに 1,500rpm, 10分間遠心分離した後に, 上層の血漿部分を第2バックに圧出し, 多血小板血漿 (platelet rich plasma: PRP) を得る。これを更に, 遠心分離器 (International 社製, DPR 600) で室温のもとに 3,000rpm, 10分間遠心分離し, 血小板沈層に上清の乏血小板血漿 (platelet poor plasma: PPP) 50ml を残し, 余った PPP を第3バックに圧出する。血小板沈層と PPP 50ml を容れた第2バックをひきつづき agitator (Fenwal, Elliptical Platelet Rotator, Model PR₁) にとりつけ, 15rpm, 15分間攪拌しつつ再浮遊して PC とした。

3. 実験群の設定

1) 対照群: 上記の方法により調整した PC を対照群とした。

2) 第一群: Prostaglandin E₁ (PGE₁) 添加群, 対照群に 10⁴ng/dl の PGE₁ を添加した。

3) 第二群: Glycyrrhizin 添加群。対照群に 8.0 mg/dl の Glycyrrhizin を添加した。

4) 第三群: α -tocopherol 添加群。動物実験用の dl- α -tocopherol 注を用いた。このものの中には主薬としての dl- α -tocopherol は 100mg/2ml 含むとともに, 界面活性剤 HCO-60 [Polyoxyethylene Hydrogenated castor oil derivatives 60mole ether (Nikko Chemicals, Tokyo)] を 200 mg/2ml 含んでいる。これを最終的に 500 μ g/ml の α -tocopherol と 1mg/ml の HCO-60 となるように添加した。

4. 保存方法

保存温度を 4℃ と室温とし, 上記, 各実験群をそれぞれの恒温室において agitator (Fenwal, Elliptical platelet Rotator, Model PR₁) で攪拌しながら 3 日後まで保存した。

5. 検査項目

上記, 各実験群について, 保存前および保存後 3 日までの保存各日に試料を採取し, 以下の指標について測定した。

1) 血小板数: PC をマイクロピペットにて採取し, Isoton で 3,000 倍に希釈して, Coulter

counter Model ZBI を用いて測定した。

2) 血小板の位相差顕微鏡所見: Isoton で 3,000 倍に希釈した PC について, 位相差顕微鏡 (日本光学社製) にて, 200 倍に拡大し観察, 撮影した。

3) 血小板粒度分布: Isoton 3,000 倍に希釈した試料について, channelyzer (Coulter 社製) にて, 2.0~10.0 μ m³ までの体積分布を測定した。

4) ADP 凝集能: Aggregometer (BIO/DATA 社製) を用いて, PC 0.45ml に 10M 濃度 ADP 0.05ml を加えて, 37℃ のもとで最大凝集能を測定した。

5) 浸透圧ショック回復率^{7)~10)}: (platelet response to hypotonic shock: HSR): spectrophotometer (日立製作所製, 624 型) と記録計 (同社製, QPD 54) を用い, 以下のように処理した試料について, 波長 610m μ における absorbance を連続的に 10 分間, 室温において測定した。すなわち, PC 1.4ml に Isoton 0.7ml を加え, 波長 610m μ の absorbance を記録し, これを基線とする。つづいて, PC 1.4ml に蒸留水 0.7ml を加えて, 波長 610m μ における absorbance の変化を室温のもとで 10 分間, 連続的に測定した。

6) pH: pH 計 (堀場製作所製) にて, PC の pH を室温のもとで測定した。

III. 実験成績

1. 血小板数の変化

調整直後の PC の血小板数は, 平均 331.1 $\times$ 10⁴/mm³ であった。4℃ 保存と室温保存における各群の血小板数変化は以下のである。

1) 4℃ 保存 (表 1)。

対照群: 調整直後の血小板数にたいし, 保存 1 日後, 79%, 2 日後, 78%, 3 日後, 66% となり, 保存後いずれの場合も血小板数は, 保存前に比較して有意に減少した ($p < 0.05$) しかし, 保存各日間には差が認められなかった。

PGE₁ 添加群: 保存前値にたいし, 保存 1 日後が 92%, 2 日後が 90%, 3 日後が 89% となり, いずれの場合も保存前に対して有意な差は認められなかった。

対照群と比較すると, 保存 2 日後までは差がな

表1 4℃保存における血小板数の変化

	保 存 前	保存 1 日後	保存 2 日後	保存 3 日後
control-PC (n=38)	100.0%	79.1±19.4%	77.5±24.6%	65.9±24.4%
PGE ₁ -PC (n=12)	100.0	92.0±29.3	90.2±18.4	88.6±25.2
Glycyrrhizin-PC (n=29)	100.0	94.6±25.4	88.3±24.3	76.0±23.3
α -tocopherol-PC (n=25)	100.0	104.2±17.8	89.8±17.0	73.5±19.6

(M±SD)

表2 室温保存における血小板数の変化

	保 存 前	保存 1 日後	保存 2 日後	保存 3 日後
control-PC (n=25)	100.0%	90.9±22.5%	78.3±23.9%	70.6±14.3%
PGE ₁ -PC (n=19)	100.0	115.0±28.9	114.9±22.2	99.4±36.3
Glycyrrhizin-PC (n=20)	100.0	92.0± 7.8	90.2±23.8	76.1±23.8
α -tocopherol-PC (n=14)	100.0	96.7±21.7	95.1±33.3	77.0±22.6

(M±SD)

く、保存 3 日後でのみ、PGE₁添加群の血小板数減少の程度が有意に軽度であった ($p<0.05$)。

Glycyrrhizin 添加群：保存前値にたいし、保存 1 日後で95%，2 日後で88%，3 日後で76%であった。すなわち保存前に比較して、保存 1 日後のものは差がなかったが、2 日後 3 日後ではいずれも有意に減少した ($p<0.05$)。

対照群と比較すると、保存 1 日後の場合のみ Glycyrrhizin 添加群の血小板減少の程度は軽度であったが ($p<0.05$)、他の保存日においては両群間に差異がなかった。

α -tocopherol 添加群：保存前値にたいし、保存 1 日後は104%，2 日後は90%，3 日後では74%と変化した。すなわち、保存 1 日後では保存前と差がなく、2 日後、3 日後では保存各日間いずれの場合と比較しても有意に減少した ($p<0.05$)。

対照群と比較すると、保存 1 日後および 2 日後では、 α -tocopherol 添加群が有意に高値となった ($p<0.05$)。

2) 室温保存 (表 2)

対照群：保存前値にたいして、保存 1 日後は

90%，2 日後は78%，3 日後は71%となり、いずれの場合も保存前値に比して有意に低値となった ($p<0.05$)。

PGE₁添加群：保存前値にたいし、保存後いずれの場合も差はみられなかった。

対照群に比較して、保存各日いずれにおいても、PGE₁群がより高値であった ($p<0.05$)。すなわち、PGE₁添加により血小板の経時的減少がおさえられた。

Glycyrrhizin 添加群：保存前値にたいし、保存後はいずれも低値であった ($p<0.05$)が、保存後、経日的に大きな差は見られなかった。

対照群と比較して、両群間に差がなかった。

α -tocopherol 添加群：保存前値にたいし、保存 1 日後、2 日後では差がなかったが、保存 3 日後では、保存前および 1 日後のものよりも低値となった ($p<0.05$)。

対照群と比較して、保存各日いずれにおいても両群間に差がなかった。

2. 位相差顕微鏡による血小板形状の変化

4℃保存と室温保存における各群の位相差顕微

表3 4℃保存における血小板の位相差顕微鏡像

	保 存 前		保存 1 日後		保存 2 日後		保存 3 日後	
	good*	poor**	good	poor	good	poor	good	poor
control-PC (n=12)	77.4%	22.6%	71.0%	29.0%	61.1%	38.9%	49.8%	50.2%
PGE ₁ -PC (n=3)	75.5	24.5	75.8	24.2	71.0	29.0	59.5	40.5
Glycyrrhizin-PC (n=4)	78.4	21.6	71.4	28.6	65.3	34.7	47.2	52.8
α -tocopherol-PC (n=6)	77.5	22.5	75.1	24.9	67.0	33.0	60.0	40.0

*good: discoid+sphere form

**poor: dendrite+balloon form

表4 室温保存における血小板の位相差顕微鏡像

	保 存 前		保存 1 日後		保存 2 日後		保存 3 日後	
	good*	poor**	good	poor	good	poor	good	poor
control-PC (n=11)	79.0%	21.0%	69.4%	30.6%	59.9%	40.1%	47.9%	52.1%
PGE ₁ -PC (n=4)	77.1	22.9	69.7	30.3	63.3	36.7	50.0	50.0
Glycyrrhizin-PC (n=3)	82.1	17.9	69.5	30.5	67.2	32.8	54.9	45.1
α -tocopherol-PC (n=4)	78.7	21.3	76.9	23.1	64.7	35.3	58.3	41.7

*good: discoid+sphere forme

**poor: dendrite+balloon forme

鏡下の血小板形状の変化を表3, 4に示した。なお, 血小板の位相差顕微鏡像のうち, discoidやspereを呈するものをgoodとし, dendriteやballoon状を呈するものをpoorとした。

4℃保存では, 保存各日ともPGE₁添加群と α -tocopherol添加群が対照群に対しgoodの比率が高い傾向を示した。

室温保存では, α -tocopherol添加群が対照群に比してgoodの比率が高かった。しかし, いずれの群においても, 保存日数の経過とともにgoodが減少しpoorが増大していった。

3. 血小板粒度分布

4℃保存および室温保存における血小板粒度分布の変化は以下のである。

1) 4℃保存 (図1)

保存前: 対照群, PGE₁添加群, Glycyrrhizin添加群および α -tocopherol添加群とともに, 血小板

体積4.1~5.0 μm^3 にpeakを有する一峰性のpatternを示した。とくに, 2.0 μm^3 以下の極小体積血小板の占める割合は, 対照群が4.7%に対し, PGE₁添加群, Glycyrrhizin添加群, α -tocopherol添加群ではそれぞれ3.1%, 5.9%, 3.5%となり, 対照群に比較して, PGE₁添加群および α -tocopherol添加群は有意に低値となり ($p<0.05$), Glycyrrhizin添加群では差がなかった。

保存1日後: 対照群は, 血小板体積2.0 μm^3 以下と4.1~5.0 μm^3 にpeakを有する二峰性patternを示した。これに対し, 薬剤添加群では血小板体積4.1~5.0 μm^3 のpeakは明らかであるが, 2.0 μm^3 以下の極小体積血小板の増加は著明でなく, 二峰性patternにはならなかった。極小体積血小板 (2.0 μm^3 以下) の比率は, 対照群が25.3%であるのに対し, PGE₁添加群, Glycyrrhizin添加群, α -tocopherol添加群でそれぞれ5.3%, 11.1%,

図1 4℃保存における血小板体積分布の変化

8.1%となり、対照群に比較してすべてが低値となった ($p < 0.05$).

保存2日後：対照群は極小体積血小板 (2.0

μm^3) の著しい増加を来し、保存前にみられた 4.1~5.0 μm^3 の peak はみられなくなった。これにたいし、PGE₁添加群では4.1~5.0 μm^3 に peak

があり、保存前と同様の pattern を示し、また、Glycyrrhizin 添加群及び α -tocopherol 添加群では、 $4.1 \sim 5.0 \mu\text{m}^3$ 、 $2.0 \mu\text{m}^3$ 以下とに peak を有する二峰性 pattern を示した。極小体積血小板 ($2.0 \mu\text{m}^3$ 以下) の比率は、対照群が 45.7% であるのに対し、 PGE_1 添加群、Glycyrrhizin 添加群、 α -toco-

pherol 添加群ではそれぞれ 6.1%, 22.7%, 14.8% となり、対照群に比較して添加群すべてが低値となった ($p < 0.05$)。

保存 3 日後：対照群、Glycyrrhizin 添加群および α -tocopherol 添加群では、保存前にみられた血小板体積 $4.1 \sim 5.0 \mu\text{m}^3$ の peak なみられなくな

図2 室温保存における血小板体積分布の変化

り、 $2.0\mu\text{m}^3$ 以下に高い peak を示したが、 PGE_1 添加群のみは、血小板体積 $4.1\sim 5.0\mu\text{m}^3$ と $2.0\mu\text{m}^3$ 以下とに peak を有する二峰性 pattern を示した。極小体積血小板の比率は、対照群が58.0%であるのに対し、 PGE_1 添加群、Glycyrrhizin 添加群、 α -tocopherol 添加群ではそれぞれ14.9%、37.4%、32.7%となり、対照群に比較して薬剤添加群がすべて低値となった ($p<0.05$)。

2) 室温保存 (図2)

保存前：対照群、薬剤添加群いずれも血小板体積 $4.1\sim 5.0\mu\text{m}^3$ に peak を有する一峰性 pattern を示した。極小体積血小板 ($2.0\mu\text{m}^3$ 以下) の出現比率は、対照群が6.7%に対し、 PGE_1 添加群、Glycyrrhizin 添加群、 α -tocopherol 添加群ではそれぞれ8.0%、6.0%、5.3%となり、対照群とのあいだに有意差はなかった。

保存1日後：対照群および薬剤添加各群ともに血小板体積 $4.1\sim 5.0\mu\text{m}^3$ と $2.0\mu\text{m}^3$ 以下のところに peak を有する2峰性 pattern を示した。極小体積血小板 ($2.0\mu\text{m}^3$ 以下) の出現比率は、対照群が20.8%に対し、 PGE_1 添加群、Glycyrrhizin 添加群、 α -tocopherol 添加群がそれぞれ15.1%、18.2%、11.6%となり、対照群に比較して、 α -tocopherol 添加群のみ有意に低値となったが ($p<0.05$)、他の薬剤添加群では差がなかった。

保存2日後：対照群および薬剤添加群ともに、血小板体積 $4.1\sim 5.0\mu\text{m}^3$ の peak の低下と $2.0\mu\text{m}^3$ 以下の peak の増高を示した。極小体積血小板の出現比率は、対照群が31.1%に対し、 PGE_1 添加群、Glycyrrhizin 添加群、 α -tocopherol 添加群ではそれぞれ22.6%、24.4%、21.9%となり、対

照群に比較して α -tocopherol 添加群のみ低値となったが ($p<0.05$)、他の薬剤添加群では差がなかった。

保存3日後：対照群および薬剤添加各群ともに、保存前にみられた血小板体積 $4.1\sim 5.0\mu\text{m}^3$ の peak はみられなくなり、血小板体積 $2.0\mu\text{m}^3$ 以下の peak が著しく増高した。極小体積血小板の出現比率は、対照群が38.5%に対し、 PGE_1 添加群、Glycyrrhizin 添加群、 α -tocopherol 添加群ではそれぞれ31.4%、33.0%、31.1%となり、対照群に比較して α -tocopherol 添加群でのみ有意に低値となったが ($p<0.05$)、他の薬剤添加群では差がなかった。

4. ADP による最大凝集能

4℃および室温保存群について、ADP による最大凝集能を検索した結果は以下のようである。

1) 4℃保存 (表5)

対照群では ADP による最大凝集能は、保存前45%、保存1日後は50%と差はみられず、保存2日後、3日後では32%、16%となり、保存日数に従って経時的に減少傾向を示した。

PGE_1 添加群では、保存前から対照群の45%に対しわずか10%と著しく低値であり、保存1日後、2日後、3日後はそれぞれ19%、17%、17%と変化がみられず、保存後の経日的には著明な変化はみられなかった。対照群と比較すると、保存前、保存1日後、2日後いずれも有意に低かった ($p<0.05$) が、3日後では両群間に差がなかった。

Glycyrrhizin 添加群では保存前と比較して保存1日後では差がなかったが、2日後及び3日後では有意に低値となり ($p<0.05$)、経時的低下の

表5 4℃保存によるADP凝集能の変化

	保 存 前	保存1日後	保存2日後	保存3日後
control-PC (n=38)	45±21%	50±18%	32±18%	16±8%
PGE_1 -PC (n=12)	10±7	19±13	17±7	17±6
Glycyrrhizin-PC (n=29)	57±10	56±13	47±17	21±9
α -tocopherol-PC (n=25)	37±11	35±22	16±14	12±5

(M±SD)

表 6 室温保存による ADP 凝集能の変化

	保 存 前	保存 1 日後	保存 2 日後	保存 3 日後
control-PC (n=25)	52±18%	23±13%	8 ± 6 %	3 ± 2 %
PGE ₁ -PC (n=19)	4 ± 3	3 ± 2	6 ± 4	6 ± 5
Glycyrrhizin-PC (n=20)	75±18	56±12	46±14	22± 8
α-tocopherol-PC (n=14)	35±13	18± 7	9 ± 3	4 ± 1

(M±SD)

表 7 4℃保存における%HSR の変化

	保 存 前	保存 1 日後	保存 2 日後	保存 3 日後
control-PC (n=38)	57.1±16.9%	34.2±21.6%	17.6±12.9%	12.1± 7.8%
PGE ₁ -PC (n=12)	79.3±13.4	49.4± 7.7	31.9±10.5	19.7±10.9
Glycyrrhizin-PC (n=29)	85.5±7.1	53.3±19.2	29.4±18.4	10.0± 7.8
α-tocopherol-PC (n=25)	85.2±20.4	64.3±14.0	33.9±18.6	15.9±14.5

(M±SD)

傾向がみられた。対照群に比較して保存 1 日後では差がみられなかったが、保存前、保存 2 日後および 3 日後では Glycyrrhizin 添加群が高値となった ($p<0.05$)。

α-tocopherol 添加群では保存前と比較して保存 1 日後では差がなく、2 日後、3 日後では、保存前および保存 1 日後よりも低値となり ($p<0.05$)、経日的低下の傾向を示した。対照群と比較すると、保存前では差がなかったが、保存後では α-tocopherol 添加群が低値となった ($p<0.05$)。

2) 室温保存 (表 6)

対照群：保存前の ADP による最大凝集能は 52%，保存 1 日後 23%，2 日後 6%，3 日後 3% となり、保存後のものはいずれも保存前よりも低値で ($p<0.05$)、著しい経時的低下傾向を示した。また、4℃保存に比較して室温保存のほうが低下の割合が大きかった。

PGE₁ 添加群：保存前よりわずか 4% と著しい低値を示したが、経日的変化に差は認められなかった。対照群と比較して、保存前および保存 1 日後では PGE₁ 添加群が低値となり ($p<0.05$)、保

存 2 日後および 3 日後では、両群間に差がなかった。

Glycyrrhizin 添加群：保存前の 75% に対し、保存後は 1 日後 56%，2 日後 46%，3 日後 22% といずれも有意に低値 ($p<0.05$) で、経日的低下傾向を示した。対照群に比較すると、保存前および各保存日いずれにおいても Glycyrrhizin 添加群が高値となった ($p<0.05$)。

α-tocopherol 添加群：保存前の 35% に比較して保存後は 18%，9%，4% といずれも有意に低く ($p<0.05$)、経日的低下傾向があった。対照群と比較すると、保存前では α-tocopherol 添加群が低値となり ($p<0.05$)、保存後はいずれも両群間に差がなかった。

5. 浸透圧ショック回復率 (HSP)

1) 4℃保存 (表 7)

対照群、薬剤添加群いずれの場合も、保存前に対し保存後の HSR はそれぞれ有意に経時的低下 ($p<0.05$) がみられ、保存各日間もそれぞれ有意な差が認められた ($p<0.05$)。PGE₁ 添加群では、保存前、保存後各日いずれにおいても対照群に対

表8 室温保存における%HSRの変化

	保 存 前	保存 1 日後	保存 2 日後	保存 3 日後
control-PC (n=25)	81.2±18.8%	51.1±20.3%	28.4±20.3%	14.8±12.5%
PGE ₁ -PC (n=19)	66.8±19.0	44.8±14.2	18.4± 9.5	17.5± 4.2
Glycyrrhizin-PC (n=20)	64.2± 9.4	50.7±15.3	44.9±16.5	20.8±15.3
α -tocopherol-PC (n=14)	93.2±20.5	63.6±12.8	47.6±19.9	17.2±14.0

(M±SD)

表9 4℃における pH の変化

	保 存 前	保存 1 日後	保存 2 日後	保存 3 日後
control-PC (n=38)	7.66±0.24%	7.70±0.14%	7.66±0.10%	7.68±0.17%
PGE ₁ -PC (n=12)	6.99±0.27	7.01±0.26	7.05±0.17	7.15±0.25
Glycyrrhizin-PC (n=29)	7.37±0.21	7.40±0.32	7.60±0.22	7.60±0.37
α -tocopherol-PC (n=25)	7.52±0.17	7.58±0.22	7.75±0.27	7.72±0.40

(M±SD)

して高値となった($p<0.05$)。すなわち、PGE₁添加により浸透圧ショックからの回復率が有意に良くなっていた。Glycyrrhizin 添加群及び α -tocopherol 添加群ではいずれも保存前、保存 1 日後及び 2 日後で対照群に対し有意に高値 ($p<0.05$) もなっていたが、保存 3 日後では対照群との間には差がなかった。

2) 室温保存 (表 8)

対照群、薬剤添加群いずれの場合も保存前に対し保存後の HSR はそれぞれ経時的に有意な低下 ($p<0.05$) がみられた。PGE₁ 添加群は対照群と比較すると、保存前、保存 1 日後では両群間に差はなかったが、保存 2 日後、3 日後においては PGE₁ 添加群が高値となった ($p<0.05$)。Glycyrrhizin 添加群では、保存 2 日後の場合のみ対照群より高値となった ($p<0.05$)。 α -tocopherol 添加群は、保存前、保存 1 日後、2 日後で対照群より高値となったが、保存 3 日後では差がなかった。薬剤添加群の中ではとりわけ α -tocopherol 添加群の保存前、保存 1 日後が著しい回復率の高さを示した。

6. PH

1) 4℃保存 (表 9)

対照群：pH の経時的変化はみられなかった。

PGE₁ 添加群：pH の経日的差異はみられなかったが、対照群と比較すると、保存前及び各保存日において PGE₁ 添加群が低値となった ($p<0.05$)。

Glycyrrhizin 添加群：保存 2 日後、3 日後で、保存 1 日後以前より高い pH が得られた ($p<0.05$)。対照群と比較すると、保存前及び保存 1 日後までは Glycyrrhizin 添加群が低値となり ($p<0.05$)、2 日後、3 日後では両群間に差がなかった。

α -tocopherol 添加群：保存 2 日後、3 日後では保存前及び保存 1 日後より高い pH が得られた ($p<0.05$)。対照群と比較して、保存前及び各保存日において、両群間に差はなかった。

2) 室温保存 (表 10)

対照群：保存前と比較して、保存後のものはすべて有意に高値となった ($p<0.05$) が、保存後各日間に差はなかった。

PGE₁ 添加群：保存前と比較して、保存後のも

表10 室温保存における pH の変化

	保 存 前	保存 1 日後	保存 2 日後	保存 3 日後
control-PC (n=25)	7.45±0.30%	7.65±0.29%	7.74±0.31%	7.66±0.27%
PGE ₁ -PC (n=19)	7.01±0.19	7.12±0.25	7.19±0.26	7.22±0.22
Glycyrrhizin-PC (n=20)	6.99±0.17	7.19±0.21	7.20±0.14	7.13±0.32
α -tocopherol-PC (n=14)	7.60±0.10	7.79±0.22	7.88±0.30	7.71±0.28

(M±SD)

のはすべて有意に高値となった ($p < 0.05$) が, 保存後各日間に差はみられなかった. 対照群と比較して, 保存前及び保存各日すべてにおいて, PGE₁ 添加群が低値となった ($p < 0.05$).

Glycyrrhizin 添加群: 保存 1 日後, 2 日後では, 保存前より高い pH が得られた ($p < 0.05$) が, 保存 3 日後のものは, 保存前, 保存 1 日後及び 2 日後のいずれとも差がなかった. 対照群と比較して, 保存前及び保存各日すべてにおいて Glycyrrhizin 添加群が低値となった ($p < 0.05$).

α -tocopherol 添加群: 保存 1 日後及び 2 日後のものは, 保存前よりも高値 ($p < 0.05$) であったが, 3 日後のものはいずれとも差がなかった.

IV. 総括ならびに考察

血小板の機能¹¹⁾¹²⁾には, 血小板血栓形成, 血管収縮, 血液凝固, 血餅退縮, 血管内皮の緊密性保持などがあり, これらが有機的, 連続的に作用して止血の機序が完成する. しかも, 血小板血栓形成, 血餅退縮などの機能は, viable な血小板のみが有し, 破壊された血小板では発揮し得ないものとされている¹¹⁾¹³⁾. さらに, 輸注された血小板が止血機能を発揮するためには, 生体内を循環することが必須であるが, この血小板も viable でなければならぬ¹¹⁾¹³⁾¹⁴⁾.

著者は, 血小板の保存において, その viability に影響を及ぼす要因のうち, 血小板の粘性性と血小板膜の脆弱性に注目した. 血小板は容易に互いに粘着し合いやすく, 小凝集塊を形成し (platelet clumping), やがて放出反応を来し, viability を失う^{15)~17)}. また, 血小板膜¹⁸⁾は, その脂質構成上, 保存中には容易に過酸化の障害をうけやすい¹⁹⁾こ

となどからである.

PGE₁ が, 血小板相互の粘着から凝集に至る反応を抑制することについて, Shio and Ramwell¹⁷⁾, Aster²⁰⁾らの報告がある. しかるに, 保存血小板において, その viability の低下をもたらす主たる要因として platelet clumping から血小板凝集にいたり, 血小板が破壊され小片になることが考えられる. 著者の研究では, 保存による血小板数の減少や位相差顕微鏡下の形状変化などが, PGE₁ 添加群では, 4℃保存, 室温保存ともに軽度になることを認めた. これは本薬剤の platelet clumping 防止効果によるものと考えられる. また, 血小板体積分布曲線によって, 血小板保存中に経日的に増加する極小体積血小板の出現比率が, PGE₁ 添加群では軽減することを認めた. 極小体積血小板は, platelet clumping から血小板の凝集にいたり破壊された血小板の小碎片と考えられるが, PGE₁ 添加により platelet clumping が防止され, 保存中の血小板破壊が軽減されることが明らかとなった.

PGE₁ に血小板凝集抑制作用のあることを示したのは Kloeze²¹⁾であるが, 著者の研究では, PGE₁ 添加による ADP 凝集能抑制効果は, 保存前から保存 3 日後まで同程度の強さで続き, また, 4℃保存の場合よりも室温保存のさいにより増強されることが判明した. 血小板保存において, PGE₁ の血小板凝集抑制作用は, 血小板の損傷を防止するのに有利であるが, 他方では血小板本来の止血作用が損われる懸念が生じる. しかし, Sekhar²²⁾, および Ferreira and Vane²³⁾は, PGE₁ が生体内ではすみやかに分解されることをみとめているし,

また、 PGE_1 添加時のPC浮遊血漿量との関係からしても、 PGE_1 添加による血小板の止血機能障害は生じないものとする。Carlson²⁴⁾らは、ヒトに $0.1\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ で30分間にわたり PGE_1 を注入しても、血小板のADP凝集能はなんら抑制されなかったことを報告している。

血小板膜のintegrityを反映するとされるHSR⁸⁾⁽¹⁰⁾⁽²⁵⁾は、 4°C 保存、室温保存いずれにおいても PGE_1 添加により比較的良好に保たれた。これも、主として PGE_1 によるplatelet clumpingや血小板凝集などの抑制効果から、血小板膜損傷にいたらない健全な血小板fractionがより多く存在するためと考えられる。

PGE_1 は血小板における糖の酸化を抑制すると同時に、乳酸産生の増加をもたらすとされている²⁶⁾。このことより、 PGE_1 添加PCの保存によるpHの低下が懸念されたが、本研究において、 4°C の保存、室温保存いずれにおいても PGE_1 添加によるPHの低下傾向がみられたものの、血小板viabilityに影響を及ぼす²⁷⁾とされるpH 6.0以下までの低下はみられなかった。

Lucy²⁸⁾は、 α -tocopherolが生体膜脂質の過酸化を抑制することを報告し、つづいて、Okuma²⁹⁾らは、血小板にたいする α -tocopherolの抗酸化作用をみると、本薬剤が血小板のintegrity保持に有用であるとした。また、過酸化脂質は、血小板の放出反応を促進し、血小板凝集をもたらすことも知られており、過酸化脂質の形成は、保存血小板のviability低下をもたらす要因となる。

そこで、著者は、PCに α -tocopherolを添加し、その保存成績を検討した。 α -tocopherol添加により、 4°C 保存、室温保存いずれの場合にも血小板の形状の変化や血小板の崩壊を示す極小体積血小板の出現比率などは比較的程度であった。

α -tocopherolが血小板の放出を抑制し、とくに、血小板二次凝集を抑制することは知られている³⁰⁾⁽³¹⁾。本研究でも、 4°C 保存PCにおいては、 α -tocopherol添加群のADP凝集能は、保存全期間にわたり、対照群より低値となった。しかし、室温保存の場合には、保存前においてのみ α -tocopherol添加によるADP凝集能抑制効果がみられ

たが、他の保存日においては、対照群の本指標も低下著しいため α -tocopherol添加によるADP凝集能の差異を示すことが出来なかった。

著者は、 α -tocopherol添加により、 4°C 保存、室温保存いずれの場合にも、HSRが比較的良好に保たれるとの結果を得た。HSRが、血小板膜のintegrityを反映するとされている⁷⁾⁽⁸⁾⁽¹⁰⁾⁽²⁵⁾ことから、 α -tocopherolの保存血小板にたいする抗酸化作用により血小板膜の損傷が軽減された結果と考えられる。

pHの血小板過酸化におよぼす影響として、pHの上昇にともなって、過酸化もまた亢進することが報告されている²⁹⁾⁽³²⁾。しかし、著者の成績では、 α -tocopherol添加群において、 4°C 保存、室温保存いずれの場合にも、pH 7.0以上、したがって血小板過酸化に好条件となったにもかかわらず、 α -tocopherolの抗酸化効果によって、血小板の形状の変化、極小体積血小板の増加、HSRの低下などは軽度となる傾向を示したものと考えられる。

血小板膜は、血小板血栓形成にいたる血小板の効果発現の場として重要視されている¹²⁾⁽³³⁾。Glycyrrhizinに赤血球膜の保護作用のあることを示唆する報告³⁴⁾⁽³⁵⁾がみられることから、著者は、血小板膜にたいするGlycyrrhizinの保護作用を期待して、保存PCにGlycyrrhizinを添加し、その効果について検討したところ、血小板の形状の変化、血小板膜integrityの低下などを軽減する傾向を認めた。しかし、血小板に対するGlycyrrhizinの作用について、報告は皆無であるが、著者の成績からすれば、血小板保存における血小板viability低下の軽減のために、本薬剤もまた有効と思われる。

V. 結 語

血小板の保存に関し、その延長化の方法について、とくに、血小板保存にたいする PGE_1 、Glycyrrhizin及び α -tocopherolの添加の意義について検討し、次の結果を得た。

1. PCの液状保存にさいして PGE_1 の添加は、血小板膜integrity保持にとって好ましい結果をもたらし、保存中の血小板の形状変化や破壊を軽減した。この効果は、とくに 4°C 保存の場合に顕

著であった。ただし、 PGE_1 によって血小板凝集能は強く抑制された。

2. PCの保存にさいし、Glycyrrhizinの添加は、血小板膜 integrity 保持に有効であり、特に4℃保存のさいには血小板の破壊を明らかに軽減した。また、本薬剤添加は、4℃保存、室温保存いずれの場合にも、血小板凝集能の低下を軽減し、本薬剤が血小板の functional integrity 保持にも有用であると考えられる結果を得た。

3. PCの保存にさいして、 α -tocopherolの添加は血小板膜 integrity 保持に有効であり、4℃保存、室温保存のいずれの場合にも、血小板の形状変化や破壊を軽減した。ただし、 α -tocopherol添加によって血小板凝集能が抑制される傾向を示し、これは4℃保存の場合にとくに著しかった。

以上より、 PGE_1 、Glycyrrhizin及び α -tocopherolの保存PCへの添加は、血小板 viability を低下軽減させ、血小板保存延長化に有用であると思われる。

(稿を終えるにあたり、御指導御校閲を賜った葛西洋一教授ならびに本研究にさいし多大の御協力をいただいた北海道赤十字血液センター、副所長伊藤碩侯博士ほか研究員諸氏に深く感謝いたします。)

文 献

- 関口定美：血液成分療法。北海道医学雑誌，50：439—441，1975。
- Perry, S. and Yankee, R.A.: Platelet transfusion and preservation. In the circulating platelet. Johnson, S.A. ed., Academic Press, New York, pp. 541—563, 1971.
- Becker, G.A. and Aster, R.H.: Platelet transfusion therapy. Symposium on Hemorrhagic Disorders. Med. Clin. North. Amer., 56: 81—94, 1972.
- Aster, R.H.: Clinical use of platelet concentrates. In Ikkala, E. and Nykanen, A. ed.: Plenary session lectures of the XIV Congress of the International Society of Blood Transfusion and the X Congress of the World Federation of Hemophilia. Transfusion and Immunology, Helsinki, pp. 223—234, 1975.
- 厚生大臣：医薬製造承認書，承認番号（46 E）第554号。昭和46年11月26日。
- 赤十字血液センター業務標準。技術部門，p. 36。
- Fantl, P.: Osmotic stability of blood platelet. J. Physiol., 198: 1—16, 1968.
- Handin, R.I., Fortier, N.L. and Valeri, C.R.: Platelet response to hypotonic stress after storage at 4°C or 22°C. Transfusion, 10: 305—309, 1970.
- Hardeman, M.R. and Heynens, C.J.L.: Storage of human blood platelet. The serotonin uptake and hypotonic shock response as in vitro viability test. Thrombos. Diathes. Haemorrh., 32: 405—416, 1974.
- Valeri, C.R., Feingold, H. and Marchionni, L. D.: The relation between response to hypotonic stress and the ^{51}Cr recovery in vivo of preserved platelet. Transfusion 14: 331—337, 1974.
- Conley, C.L.: Blood platelet and platelet transfusion. Arch. Int. Med., 107: 635—638, 1961.
- Stormorken, H.: Platelets in health and disease. In Ikkala, E. and Nykanen, A., ed.: Plenary session lectures of the XIV Congress of the International Society of Blood Transfusion and the X Congress of the World Federation of Hemophilia: Transfusion and Immunology, Helsinki, pp. 207—221, 1975.
- 安永幸二郎：特殊な輸血とその現況。血小板輸血。臨外，25：53—62，1970。
- Baldini, M., Costea, N. and Dameshek, W.: The viability of stored human platelets. J. Hem., 16: 1669—1692, 1960.
- Becker, G.A., Chalos, M.K., Tuccelli, M. and Aster, R.H.: Prostaglandin E_1 in preparation and storage of platelet concentrates. Science, 175: 538—539, 1972.
- 安永幸二郎：血小板輸血の実際。日本輸血学会誌，22：190—195，1976。
- Shio, H. and Ramwell, P.W.: Prostaglandin E_1 in platelet harvesting: An in vitro study. Science, 175: 536—538, 1972.
- 安藤泰彦：血小板膜と機能。日本臨床，32：45—50，1974。
- Strøm, E. and Nordøy, A.: α -Tocopherol in human platelet. Thromb. Res., 4: 73—75, 1974.
- Aster, R.H., Becker, G.A. and Filip, D.J.: Studies to improve methods of short-term platelet preservation. Transfusion, 16: 4—7, 1976.
- Kloeze, J.: Prostaglandins. Proc. II. Novel symposium. Bergstrom, S. and Samuelsson, B. ed., Almquist and Wiksell, Stockholm, pp. 241—252, 1975.
- Sekhar, N.C.: Effect of eight prostaglandins on platelet aggregation. Cardiovasc. Dis. Res., 13: 39—41, 1970.

- 23) Ferreira, S.H. and Vane, J.R.: Prostaglandins: Their disappearance from and release into the circulation. *Nature*, 216: 868—873, 1967.
 - 24) Carlson, L.A., Irion, E. and Oro, L.: Effect of infusion of prostaglandin E_1 on the aggregation of blood platelets in man. *Life Sci.*, 7: 85—90, 1968.
 - 25) Kim, B.K. and Baldini, M.G.: The platelet response to hypotonic shock. Its value as an indicator of platelet viability after storage. *Transfusion*, 14: 130—138, 1974.
 - 26) Kuramoto, A.: Inhibitory mechanism of platelet energy production and platelet functions by PGE_1 and uremic toxin. *日血会誌*, 36: 477—487, 1973.
 - 27) Becker, G.A., Tuccelli, M., Kunicki, T., Chalos, M.K. and Aster, R.H.: Studies of platelet concentrates stored at 22°C and 4°C. *Transfusion*, 13: 61—68, 1973.
 - 28) Lucy, J.A.: Functional and structural aspects of biological membranes: A suggested structural role for Vitamine E in the control of membrane permeability and stability. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 203: 4—11, 1972.
 - 29) Okuma, M., Steiner, M. and Baldini, M.: Studies on lipid peroxides in platelet. I. Method of assay and effect of storage. *J. Lab. Clin. Med.*, 75: 283—296, 1970.
 - 30) Machlin, L.J., Filipiski, R., Willis, A.L., Kuhn, D. C. and Brin, M.: Influence of Vitamine E on platelet aggregation and thrombocythemia in the rat (38787). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 149: 275—277, 1975.
 - 31) Steiner, M. and Anastasi, J.: An inhibitor of the platelet release reaction. *J. Clin. Invest.*, 57: 732—737, 1976.
 - 32) Wills, E.D.: Mechanism of lipid peroxide formation in tissues. Role of metals and hematin protein in the catalysis of the oxidation of unsaturated fatty acid. *Biochim. Biophys. Acta*, 98: 238—251, 1965.
 - 33) 安永幸二郎: 血小板の形態と代謝. *日血会誌*, 39: 619—622, 1976.
 - 34) 熊崎俊英, 榊原 修, 渡辺 晋, 岡田英也, 鈴木克昌: 強力ネオミノファーゲンCの機械的溶血防止効果. *Minophagen Medical Review*, 8: 4—6, 1972.
 - 35) 関口定美: *Minophagen News*. 札幌シンポジウム特集, 1976.
-