濃厚血小板の室温120時間保存

石 川 善 英 笹 川 滋

日赤中央血液センター

(昭和61年11月26日受付)

120 HOURS STORAGE OF PLATELET CONCENTRATES

Y. Ishikawa and S. Sasakawa

Japanese Red Cross Central Blood Center

Platelet concentrates (PC) prepared by a centrifugation method were stored at room temperature for 120 hours with gentle agitation. Quality of PC was estimated by aggregability, extent of shape change with ADP (SC) and hypotonic shock response. ADP-induced aggregability and SC were impaired by the preparation method. ADP- and collagen-induced aggregability decreased with storage period. However, 120 hours stored PC exhibited about 80% aggregation after being incubated with fresh plasma at 37°C, when it was stimulated by 5 μ g/ml collagen. SC increased for 48 hours. And even after 120 hours storage it was about the equal with fresh PC after the incubation. Furthermore, the functions were repaired by the incubation with fresh plasma of healthy donors or patients. These results suggest that even PC stored over 48 hours is available for clinical uses.

1. 緒 言

現在濃厚血小板の有効期限は48時間であるが、血小板製剤の安定供給だけでなく、HIV 抗体、ATLAなどの検査項目の増加にも対応できるように有効期限の延長が望まれる。近年濃厚血小板の品質向上を目的として、濃厚血小板の調製法¹⁾²⁾、保存容器の改善に関する検討^{3)~7)}がなされているが、実用化にはしばらく時間が必要である。

そこで現行の調製および保存方法での有効期限延長の可能性について検討を行った。

2. 方 法

2-1) 濃厚血小板の調製および保存：健常人より200mlの全血を28mlのCPDを含むトリプルバッグ（テルモ社製）に採血し、常法により濃厚血小板(PC)を調製した。4単位の同型PCをプール後再び4つの子バッグ（150ml、膜厚0.39mm）に20mlずつ分注し、120時間まで22°Cで60rpmの振とう保存をおこなった。各時間の測定に1バッグずつを用いた。

2-2) 血小板試料の調製：保存PCをこれから分離した血漿（保存血漿）または4°Cで保存して

おいた血漿（新鮮血漿）で希釈し、多血小板血漿（PRP： 3.5×10^5 platelets/ μ l, pH 7.4）を調製した。新鮮血漿で調製したPRPは37°Cで2時間の加温を行った。また、24時間振盪保存したPCを新鮮血漿の代わりに患者血漿で希釈し、同様に加温を行った。患者血漿はAcute Lymphocytic Leukemia (ALL) 1例, Adult T Cell Leukemia (ATL) 1例, Acute Myelogenous Leukemia (AML) 1例, Aplastic Anemia (APLA) 2例, Idiopathic Thrombocytopenic Purpura (ITP) 2例, Pure Red Cell Aplasia (PRC) 1例, の6疾患, 8例であった。

2-3) 抗体の検索：患者血清中の抗HLA抗体の有無をLCT法⁸⁾で、抗血小板抗体をMPHA法⁹⁾で、血小板結合性IgGをFluorescent photometry法¹⁰⁾にてそれぞれ検索した。

2-4) 凝集能の測定：4mM CaCl_2 を添加後ADP (10 or 20 μ M), collagen (2 or 5 μ g/ml) あるいは1 μ g/ml collagenと5 μ M ADP同時添加により惹起される最大凝集率を測定した。

2-5) 変形能の測定¹¹⁾：5mM EGTA存在下10

Table 1 Platelet Concentrate Before Storage

Platelet Number($\times 10^4$ platelets/ μ l)	134 $\pm$ 10
pH	7.40 $\pm$ 0.05
ADP-aggregability(10 μ M)	36 $\pm$ 13%
ADP-aggregability(20 μ M)	49 $\pm$ 12%
Collagen-aggregability(2 μ g/ml)	68 $\pm$ 15%
Collagen-aggregability(5 μ g/ml)	74 $\pm$ 10%
Collagen+ADP-aggregability (1 μ g/ml collagen+5 μ M ADP)	75 $\pm$ 6%
Shape Change Ability	0.85 $\pm$ 0.22
Platelet Volume(μ m ³)	8.4 $\pm$ 0.7
Expansion Ratio	1.37 $\pm$ 0.04
Shrinkage Ratio	0.45 $\pm$ 0.05

Fig. 1 Change of pH during storage.

μ M ADP 添加による透過度変化率を変形能とした。

2-4, 2-5の測定には NKK HEMATRACER 1 を用いた。

2-5) 浸透圧ショック回復率の測定¹²⁾: 連続血球体積測定装置(Sysmex)を用いた。0.8% NaCl, 5mM PIPES Buffer (pH 7.0) 中での体積 (Initial Volume: IV), 0.4% NaCl 5mM PIPES Buffer (pH 7.0) 中での最大体積 (Max.), 200秒後の体積 (Min.) より次式に従い, 膨張率 (Expansion Ratio: ER), 収縮率 (Shrinkage Ratio: SR) を求めた。

$$ER = \text{Max}/IV$$

$$SR = (\text{Max}-\text{Min})/(\text{Max}-IV)$$

3. 結果と考察

3-1) 調製直後の PC の性状

保存実験に用いた PC の性状を Table 1 にまとめた。PRP では ADP 凝集能は 10 μ M で飽和値 (70~80%) を示し, また変形能は 1.4 前後の値となる。しかし, Table 1 から明らかなように, 調製直後の PC のこれらの値は PRP に比べ有意に低く, 遠心分離法による PC 調製では血小板が損傷を受けることを示している。しかし, これは変形能の保存に伴う変化 (Fig. 5 参照) から, ある程度回復可能な損傷と思われる。

3-2) 保存による変化

3-2-1) 血小板数と pH

血小板数は保存によりほとんど変化しなかった。pH は 48 時間後には 7.6 近くまで上昇したが

(Fig. 1), 坂内らの報告¹³⁾¹⁴⁾より緩やかな振盪条件であれば血小板機能への影響は小さいと思われる。

3-2-2) 凝集能

Fig. 2 に ADP 凝集能, Fig. 3 に collagen 凝集能を示した。凝集能は 48 時間までは顕著に, その後は緩やかに低下した。しかし新鮮血漿と 37℃ で加温することにより明らかな機能回復がみられた。

1 μ g/ml collagen と 5 μ M ADP の同時添加により惹起される凝集率を Fig. 4 に示した。保存時間と共にほぼ直線的に低下したが, 120 時間保存後でも新鮮血漿との 37℃ 加温により, およそ 80% の凝集率を示すまでに回復した。

3-2-3) 変形能

48 時間保存後には保存前に比べ明らかに高い値を示した (Fig. 5)。これは PC 調製時の遠心分離操作の際に変形した血小板がその形態を回復するため¹³⁾と推察される。また 37℃ で加温することによる顕著な増加は Microtubule の重合が促進され, 円板型血小板が増加するため¹⁵⁾と考えられる。

3-2-4) 浸透圧ショック回復率

Fig. 6-a には 0.4% NaCl 中での最大膨張率を示した。保存による変化はわずかであった。新鮮血漿との 37℃ 加温による膨張率の低下は保存中血小板膜に取り込まれた DEHP が新鮮血漿中に溶出した⁴⁾ためと考えられる。

Fig. 6-b には収縮率の経時変化を示した。新鮮血漿との加温により明らかな回復がみられたが,

Fig. 2 Change of ADP-induced aggregability during storage. ○: after storage, ●: after incubation with fresh plasma at 37°C for 2 hours. a) [ADP]=10μM, b) 20μM.

加温の有無にかかわらず保存時間とともにほぼ直線的に低下した。

3-3) 患者血漿との37°C加温

3-3-1) 抗 HLA 抗体陰性患者血漿の効果

Fig. 7に示したように、抗体陰性患者血漿との加温により、血小板のADP凝集能は新鮮血漿と同程度に回復した。なお図には示さなかったが、collagen凝集能でも同様の結果が得られた。また以上の結果はPC、血漿のABO型には影響されなかった。ITP患者血漿では、血小板結合性IgGが検出された(No. 7 0.52fg/血小板, No. 8 0.10fg/血小板)が、血小板抗体はNo. 7で(±), No. 8で(-)であった。

血小板結合性IgGは今回検討した限りでは凝集能回復に影響を与えなかったが、IgG量によっては影響が生ずる可能性もあると考えられる。

Fig. 3 Change of collagen-induced aggregability during storage. ○: after storage, ●: after incubation with fresh plasma at 37°C for 2 hours. a) [collagen]=2μg/ml, b) 5μg/ml.

Fig. 4 Change of collagen+ADP-induced aggregability during storage. ○: after storage, ●: after incubation with fresh plasma at 37°C for 2 hours. 1μg/ml of collagen and 5μM of ADP were added.

3-3-2) 抗 HLA 抗体陽性患者血漿の効果

陽性血漿 (Fig. 8; No. 5, No. 6) では、PC と

Fig. 5 Change of shape change ability during storage. ○: after storage, ●: after incubation with fresh plasma at 37°C for 2hours.

Fig. 6 Change of hypotonic shock response during storage. a) Expansion ratio, b) Shrinkage ratio. ○: after storage, ●: after incubation with fresh plasma at 37°C for 2hours.

混合後加温撹はんしただけで血小板数の減少と凝集率の低下がみられた。No. 2, No. 6でみられるように、血小板数の減少を生じない組み合わせの

Fig. 7 Effect of anti-HLA antibody-negative patient's plasma on the recovery of aggregability of stored platelets. 24hours-stored PCs were diluted to PRP with each patient's plasma (●), control fresh (△) or stored (□) plasma, and then incubated at 37°C for 2hours (right). +) platelet binding-IgG was detected.

Fig. 8 Effect of anti-HLA antibody-positive patient's plasma on the recovery of aggregability of stored platelets. Procedures were as same as in Fig. 7. +) anti-HLA antibody was detected. #) spontaneous aggregation was observed. *) numbers of platelets decreased.

PC と血漿の場合は対照血漿と同様に、加温による凝集能の回復がみられた。このような用いたPCによる抗体陽性血漿の回復効果の差は抗体の強さと種類によるものと思われる。

3-4) 新鮮血漿量と回復効果

PC から PRP 調製時に加える新鮮血漿量を変え37°Cで2時間加温した時の ADP 凝集能を Fig. 9に示した。血小板数が $3.5 \times 10^5 / \mu l$ となるように保存血漿と新鮮血漿を加え調製した。新鮮血漿量と凝集能回復率の間に高い相関がみられた。この結果は保存血小板の輸血を考えた場合、PCは

Fig. 9 Relationship between increased ADP aggregability and amount of fresh plasma. 24hours-stored PC was incubated with fresh plasma at 37°C for 2hours.

今回行った希釈率以上の希釈を受けるため、顕著な機能の回復が期待できることを示している。

4. 結 語

濃厚血小板を現在血液センターで行われている調製および保存方法により120時間まで保存した。今回測定した *in vitro* 機能はいずれも48時間以降の低下は小さく、また collagen, ADP の同時添加による凝集能測定の結果から120時間保存した後でも血小板として確かに機能することが示された。

すでに報告したように³⁾⁴⁾、保存血小板の機能は新鮮血漿と37°Cで加温することにより回復した。回復後の収縮率(%HSR)は、保存3日まではポリオレフィンバッグ(PL-732)で保存した血小板⁵⁾と同程度であった。凝集能については、条件、試薬が異なるため、比較は困難であるが、数値においてはPL-732保存血小板と同程度であった。

また、今回健康人の血漿だけでなく患者血漿中でも、抗血小板抗体がなければ血小板機能が回復することが確認された。従って、保存血小板の輸血により、患者の循環血中でFig. 2~Fig. 6に示したような機能回復が期待できる。

以上の結果より現行の濃厚血小板の調製、保存方法で有効期限の延長は可能と考えられた。

謝辞 患者血漿の提供ならびにITP患者血漿の血小板結合性IgG量の測定をして戴きました慶応大学医学部輸血センター池田康夫先生に深謝いたします。本研究を行うにあたり、濃厚血小板の調製をお願いしました日赤中央血液センター製剤課、田山達也、佐野秀明両氏、および抗体の検索をお願いしました同センター成分献血課、荒木千枝子女史に感謝する次第です。

最後に、本研究にご援助戴きました中央血液センター所長、徳永栄一先生に深謝します。

文 献

- 1) Pietersz, P.N.I., Loos, J.A. and Reesink, H.W.: Platelet concentrated stored in plasma for 72 hours at 22°C prepared from buffycoats of citrate-phosphate-dextrose blood collected in a quadruple-bag: Saline-adenine-glucose-mannitol system. *Fox Sang.*, 49: 81-85, 1985.
- 2) 宇多正行, 岡田英俊, 石居昭夫, 西崎太計志: Non-button PC法. 穏やかな条件を用いた血小板濃縮の製造法. *日輸血会誌*, 31: 385-390, 1985.
- 3) Ishikawa, Y., Honda, K., Sasakawa, S., Hatada, K. and Kobayashim, H.: Prevention of leakage of di-(2-ethylhexyl) phthalate from blood bags by glow discharge treatment and its effect on aggregability of stored platelets. *Vox Sang.*, 45: 68-76, 1983.
- 4) Ishikawa, Y. and Sasakawa, S.: Platelet storage in glow discharge-treated polyvinylchloride bags: Effects of a plasticizer on platelet hypotonic shock response. *Vox Sang.*, 47: 330-334, 1984.
- 5) Rock, G., Sherring, V.A. and Tittley, P.: Five day storage of platelet concentrates. *Transfusion*, 24: 147-152, 1984.
- 6) Greode, G., Miripol, J., Garber, J., Barber, T. and Buchholz, D.H.: Extended storage of platelets in a new plastic container: I. Biochemical and morphologic changes. *Transfusion*, 25: 204-208, 1985.
- 7) Snyder, E.L., Ezekowitz, M., Aster, R., Murphy, S., Ferri, P., Smith, E., Rzzad, L., Davisson, W., Pope, C., Kakaiya, R. and Buchholz, D.H.: Extended storage of platelets in a new plastic container: II. In vivo response to infusion of platelets stored for 5 days. *Transfusion*, 25: 209-214, 1985.
- 8) 荒木千枝子, 十字猛夫: 抗白血球抗体検査法. *日本臨床*, 1984年春季増刊, pp. 1499-1504.
- 9) Shibata, Y., Juji, T., Nishizawa, Y.M., Sakamoto, H. and Ozawa, N.: Detection of platelet antibodies by a newly developed mixed

- agglutination with platelets. *Vox Sang.*, 41 : 25—31, 1985.
- 10) von dem Borne, A.E.G. Kr., Helmerhorst, F.M., van Leeuwen, E.F., Pegels, H.G., von Riesz, E. and Engelfriet, C.P.: Autoimmune thrombocytopenia: Detection of platelet autoantibodies with the suspension immunofluorescence test. *Br. J. haemat.*, 45 : 319—327, 1980.
- 11) Holme, S. and Murphy, S.: Quantitative measurements of platelet shape by light transmission studies: Application to storage of platelets for transfusion. *J. Lab. Clin. Med.*, 92 : 53—64, 1978.
- 12) Watanabe, E. and Sasakawa, S.: Changes of platelet cell volumes in hypotonic solution. *Thromb. Res.*, 31 : 13—21, 1983.
- 13) 松田利夫, 坂内 誠, 笹川 滋: 濃縮血小板血漿の保存について, *日輸血会誌*, 29 : 331—339, 1983.
- 14) Bannai, M., Mazda, T. and Sasakawa, S.: The effects of pH and agitation on platelet preservation. *Transfusion*, 25 : 57—59, 1985.
- 15) Sturk, A., Burt, L.M., Hakvoort, T., Cate, J.W. T. and Crawford, N.: The effect of storage on platelet morphology. *Transfusion*, 22 : 115—120, 1982.
-