

# イヌの血小板輸血の臨床応用に向けた基礎的研究

麻布大学大学院 獣医学研究科

獣医学専攻 博士課程 獣医内科学

DV1004 瀬川 和仁

# 目次

略語一覧 .....	2
緒論.....	4
第1章 輸血用血小板濃厚液作製技術の改良 .....	6
はじめに .....	6
材料と方法.....	8
結果 .....	15
考察 .....	20
小括 .....	22
第2章 輸血用血小板製剤冷蔵保存の検討.....	23
はじめに .....	23
材料と方法.....	26
結果 .....	31
考察 .....	37
小括 .....	39
総括.....	40
謝辞.....	43
参考文献 .....	44

This (a part of this dissertation) is the peer reviewed version of the following article:

FULL CITE, which has been published in final form at 10.1111/j.1939-1676.2011.00881.x.

This article may be used for non-commercial purposes in accordance with Wiley Terms and Conditions for self-archiving.

# 略語一覽

ADP	Adenosine diphosphate
ANOVA	Analysis of variance
BEST	Biomedical excellence for safer transfusion
CPDA-1	Citrate-phosphate dextrose adenine 1
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ESC	Extent of shape change
HSR	Hypotonic shock response
LDH	Lactate dehydrogenase
MPV	Mean platelet volume
PBS	Phosphate buffered saline
PC	Platelet concentrates
pCO <sub>2</sub>	Partial pressure of carbon dioxide
PE-SA	Phycoerythrin-streptavidin
PGE <sub>1</sub>	Prostaglandin E <sub>1</sub>
pO <sub>2</sub>	Partial pressure of oxygen
PPP	Platelet poor plasma
PRP	Platelet rich plasma
PSL	Platelet storage lesion
SD	Standard deviation

## 緒論

輸血療法の目的は、血液成分の欠乏あるいは機能不全が臨床上問題となった場合に、その成分を補充して一時的に病態の改善を図ることにある。輸血療法は全血輸血及び成分輸血に大別され、ドナーからの貴重な血液資源の有効利用やレシピエントの安全性の点から、近年は獣医療でも成分輸血に注目が集まっている。成分輸血には主に赤血球、血漿、血小板輸血がある。獣医療では多くの場合に全血輸血が行われているが、貧血症例に対する赤血球輸血及び血液凝固異常症例に対する血漿輸血は一部の施設で行われている<sup>1)</sup>。

血小板輸血は、血小板減少あるいは血小板機能異常による出血傾向を示す動物に対して行われる。特に血小板減少症例の手術前や、免疫介在性血小板減少症による重篤な出血傾向を呈している動物に対して有効とされている<sup>1)</sup>。さらに、ヒトでは再生不良性貧血などの骨髄不全をはじめとして、骨髄移植や抗がん治療など、治療行為に随伴する血小板減少性の出血傾向を防ぐためにも極めて重要な位置を占めている<sup>2)</sup>。

一方、特に日本の獣医療では、血小板輸血はほとんど行われていない。その理由として、日本に動物の血液バンクが存在しないことが挙げられる。各診療施設で血小板製剤の作製や保存に取り組まなくてはならないため、実施は容易でない。そして、獣医療における血小板製剤は、作製方法や保存方法に関する情報が少なく、さらにヒトのように適切な投与量を繰り返し輸血して血小板数を一定以上に維持するためには、数多くのドナーを確保しなくてはならない。したがって、血液バンクを持つ海外の獣医療でさえ、日常的な血小板輸血の実施は困難な傾向である<sup>1,3)</sup>。

そこで本研究では、獣医療、特にイヌにおける血小板輸血の臨床応用に向けて、基礎的検討を行った。まず第1章では、血小板製剤の作製方法の改良を検討した。血小板製剤の作製段階における強遠心により、血小板が活性化してその後の操作が困難と

なる。その改善策として血小板機能を可逆的に抑制するプロスタグランジン E<sub>1</sub> (Prostaglandin E<sub>1</sub>; PGE<sub>1</sub>) を、強遠心直前の血小板製剤へ添加する方法について検討した。そして第 2 章では、血小板製剤の保存方法について検討した。他の血液製剤と異なり、血小板製剤は室温保存されているが、室温での保存は細菌増殖リスクが懸念される。そこで、現行の室温保存と冷蔵保存が血小板の機能や代謝などに及ぼす影響を比較し、イヌにおける適切な保存方法を検討した。

# 第1章 輸血用血小板濃厚液作製技術の改良

## はじめに

血小板の補充を目的とした血液製剤には、新鮮全血、新鮮全血から血小板及び血漿を分離した多血小板血漿 (Platelet rich plasma; PRP)、PRP をさらに濃縮した血小板濃厚液 (Platelet concentrates; PC) がある。しかし、溶血性輸血反応、循環過負荷、多血症など、目的とする血小板以外の成分により生じる副作用の危険性を考慮すると、血小板輸血をもっとも効率的に行える血液製剤は PC といわれている<sup>4</sup>。イヌの PC は、新鮮全血から遠心を用いて作製する方法<sup>5</sup>あるいは成分採血 (アフエレーシス) にて作製する方法<sup>6</sup>が報告されている。アフエレーシス法は非常に品質の高い PC を作製することが出来るが、特殊な機器が必要である。また、ヒトと異なり、イヌではアフエレーシスを行う 2 時間あまりの間、全身麻酔下での管理が必要となってしまう。したがって、イヌにおいては、新鮮全血からの遠心法がもっとも現実的な PC 作製方法である。

新鮮全血から遠心により PC を作製する方法は、イヌでは 1993 年に Abrams-ogg らによって初めて報告された<sup>5</sup>。この方法では、まず新鮮全血を 20-24 °C・1,000 G・4 分間遠心 (弱遠心) することで PRP を分離し、その後、PRP を 20-24 °C・2,000 G・10 分間遠心 (強遠心) することで PC を得る。しかしながら、PC 作製時の強遠心により血小板が活性化するため、血液バッグ内に沈殿している血小板集塊を再浮遊させることは極めて困難である。さらに、このような PC 作製過程の血小板の活性化は、血小板製剤の保存障害 (Platelet storage lesion; PSL) を惹き起こし、輸血後の生体内での活性や寿

命にも悪影響を与えるとされている<sup>7,9</sup>。したがって、PC 作製上の血小板の活性化を最小限に抑える方法は重要である。

PGE<sub>1</sub>は、血小板内のサイクリック AMP レベルを上昇させることで血小板の活性化を可逆的に阻害する物質である<sup>7,10</sup>。ヒトにおいては、PRP 強遠心直前に PGE<sub>1</sub>を添加することで、PC 作製時の血小板再浮遊効率が上昇したとする報告<sup>7,11-13</sup>がある。そこで、第1章では、イヌのPC 作製過程において PGE<sub>1</sub>を添加することの有用性を、PRP 強遠心後の血小板再浮遊効率、輸血前後の血小板機能、そして輸血後の血小板体内寿命の点から評価した。

# 材料と方法

## 概要

PGE<sub>1</sub> 添加 PC の有用性を評価するため、血小板輸血前の PC 中の血小板凝集能、そして輸血された血小板の体内寿命及び機能を測定した。まず、血小板凝集能の評価では、PGE<sub>1</sub> 添加前後の血小板を用いて、PGE<sub>1</sub> の血小板機能抑制効果の可逆性を確認した (n = 5)。続いて、血小板輸血後の体内寿命では、輸血血小板を事前にビオチン標識しておき、フローサイトメトリーにより評価した (n = 5)。その際、輸血 1 時間後を第 0 日目とし、その後、第 7 日目まで毎日同様の時刻に採血した。輸血後の体内寿命は、ビオチン標識陽性血小板の末梢血からの消失速度から算出した。最後に、輸血後の血小板機能の評価では、同様にビオチン標識した血小板を輸血し、輸血 1、24 時間後に採血した (n = 5)。そして、採材した血小板をトロンビンで刺激することにより、ビオチン標識陽性血小板の P-selectin 発現量をフローサイトメトリーにて評価した。

## 供試動物

麻布大学生物科学総合研究所内と獣医臨床センター内で飼育管理している臨床的に健康なビーグル犬 15 頭 (雌 4 頭、雄 11 頭、年齢 1-12 歳、体重 9-15 kg) を反復して用いた。これらは、屋内ケージで飼育し、自由飲水をさせ、1 日 2 回市販のドックフードを与えた。なお、これらはいずれも、過去 2 週間以内に血管内または筋肉内への注射、あるいは抗生物質や消炎剤などの薬物投与や採血をしていない個体である。また、採血前は 12 時間の絶食とし、採血終了後に給餌した。なお、本実験は麻布大学動物実験委員会より承認を受け (承認番号: 第 110708-2 号)、動物実験指針に沿って

適切に人道的に取り扱われた。

## PC 作製方法

### 1) 採血

抗凝固剤として Citrate-phosphate dextrose adenine 1 (CPDA-1) を含む 200 mL 容量の血液バッグ<sup>a</sup>を用いて頸静脈より 200 mL 採血した。組織液の混入や複数回の穿刺による血小板の活性化を避ける為に採血は 1 回で行い、採血中は血液と CPDA-1 が混和されるようにバッグを静かに転倒混和した。採取した血液は、血小板へのストレスを軽減する為に 30 分間室温にて静置した。

### 2) PRP 分離

大容量遠心機<sup>b</sup>を用いて血液バッグを 22 °C・1,000 G・3.5 分間遠心（弱遠心）した。その上清を、血液分離スタンドを用いて白血球層を含まないように分離バッグ<sup>c</sup>に押し出し、60-80 mL の PRP を得た。分離した PRP は、15 分間室温にて静置した。

### 3) PRP からの PC 作製

PRP に 1 mmol/L の PGE<sub>1</sub><sup>d</sup>を添加（最終濃度 1 μmol/L）してから丁寧に混和した。その PRP を大容量遠心機にて 22 °C・2,000 G・10 分間遠心（強遠心）した。強遠心によりパックされた血小板と血小板再浮遊のための血漿を 20 mL 程残し、それ以外の約 40-60 mL の上清（乏血小板血漿; Platelet poor plasma; PPP）を血液分離スタンドにて分離バッグに移した。そして、分離した血小板及び少量の血漿が入ったバッグを 60 分間室温にて静置した。静置後、PC を手で静かに攪拌して再浮遊させた。再浮遊の際、

---

a テルモ血液バッグ CPDA、BB-SCD207J1、テルモ株式会社、日本

b 大容量冷却遠心機 9810、久保田商事株式会社、日本

c テルモ分離バッグ、BB-T015CJ、テルモ株式会社、日本

d Prostaglandin E1、P5515、Sigma-Aldrich Corporation、USA

激しく動かすと非可逆的な血小板の活性化を起こす為、攪拌は極力緩やかに行った。

## PGE<sub>1</sub> 添加 PC 中の血小板凝集能の評価

PGE<sub>1</sub> 添加 PC 中の血小板凝集能を評価するため、PC 作製過程で次のとおり 4 種類のサンプルを採取した (Fig 1)。まず、PRP を分離する際に採材 (PRP サンプル) し、残りの PRP を 2 個の分離バッグに均等に分離した。続いて、片方の PRP バッグには PGE<sub>1</sub> を添加して採材 (PGE<sub>1</sub>+PRP サンプル) した。その後、PRP 及び PGE<sub>1</sub>+PRP を強遠心し、上述のように遠心上清を除去して PC を作製した。その際、PRP から作製した PC を比較対照用に採材 (コントロール PC サンプル) した。また、PGE<sub>1</sub> の血小板機能抑制効果が可逆的であることを確認するため、PGE<sub>1</sub>+PRP は強遠心後に上清の血漿を完全に除去し、10 mL 程度の PGE<sub>1</sub> を含まない自己血漿と入れ替えて採材 (PGE<sub>1</sub> 除去 PC サンプル) した。

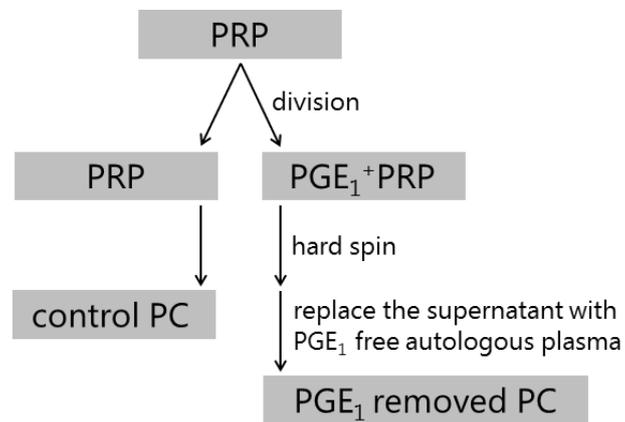


Fig 1. Schematic image of the sampling strategy for the aggregability of platelets in PC prepared with PGE<sub>1</sub>.

4種類のサンプルを用いて、光学法により最大凝集率を測定<sup>e</sup>した。凝集惹起物質にはコラーゲン<sup>f</sup>とアデノシン2リン酸 (Adenosine diphosphate; ADP)<sup>g</sup>を使用 (最終濃度はそれぞれ 100 µg/mL、20 µmol/L) した。また、各サンプルの血小板数を自動血球計数器<sup>h</sup>にて測定し、血小板数が約  $250 \times 10^3/\mu\text{L}$  となるように自己血漿にて希釈した。その際、サンプルに塩化カルシウム溶液を添加 (最終濃度 15 mmol/L) して血小板が活性化しやすい状況を作製し、その直前には塩化カルシウムにより血液凝固が生じないように低分子量ヘパリン<sup>i</sup>も添加 (0.6 IU anti-Xa/mL) した。

## 血小板輸血後の体内寿命の評価

### 1) 血小板のビオチン標識および輸血

PGE<sub>1</sub> 添加 PC 及び PGE<sub>1</sub> 非添加 PRP 輸血後の血小板体内寿命の変化を、Heilmann らのビオチン標識法<sup>14,16</sup>に従い測定した。この方法では、dimethylsulphoxide にて 20 mg/mL に溶解したビオチンを、PC あるいは PRP 1 mL に対して 0.2 mg となるように添加した。そのまま 10 分間静かに混和して血小板をビオチン標識し、標識後直ちに橈側皮静脈より輸血した。また、ビオチン標識した PC あるいは PRP を約 100 µL 残し、これをビオチン標識陽性コントロールとした。

### 2) 輸血後の血小板体内寿命測定のための継時的採血

輸血直前及び 1 時間後、2.5 mL 採血してエチレンジアミン四酢酸 (Ethylenediaminetetraacetic acid; EDTA) を用いて抗凝固処理し、これを陰性コントロ

---

e Chrono-log C550 dual-channel aggregometer, Chrono-log Corporation, USA

f Chrono-collagen, P/N 385, Chrono-log Corporation, USA

g Chrono-ADP, P/N 384, Chrono-log Corporation, USA

h Sysmex F-820, シスメックス株式会社, 日本

i FRAGMIN iv 5,000, Pfizer Inc., USA

j Biotin N-hydroxysuccinimide ester, H1759, Sigma-Aldrich Corporation, USA

ール及び輸血後 0 日目のサンプルとした。その後 7 日間、1 日 1 回同様の採血を行った。採取した血液は 2,000 G・1 分間遠心して上清の 7 割を PRP として分離し、後述するフローサイトメトリーによる測定を行うまで、4 °C で保存した。

### 3) フローサイトメトリーによる血小板輸血後の体内寿命測定

輸血 0-7 日目までのサンプルが揃った後、血小板数が  $10 \times 10^3/\mu\text{L}$  となるように 3% 牛血清アルブミンを含む pH 7.2 のリン酸緩衝生理食塩水 (Phosphate buffered saline; PBS) に再浮遊させた。その血小板浮遊液 100  $\mu\text{L}$  に対して 10  $\mu\text{L}$  の Phycoerythrin-streptavidin (PE-SA)<sup>k</sup> を添加して 10 分間混和し、フローサイトメトリーにて血小板のビオチン/PE 陽性率を測定した。

サンプルは Epics XL<sup>l</sup>あるいは Cyflow SL<sup>m</sup>にて解析した。散乱光及び蛍光のデータはログスケールにて収集し、Flow-check ビーズ<sup>n</sup>を用いて機器を校正した。前方散乱光についてはデブリや機器のノイズを軽減させるように閾値を設定した。血小板は前方及び側方散乱光にてゲーティングし、少なくとも 2,000 個以上の細胞について解析した。バックグラウンドの蛍光はビオチン標識していない陰性コントロールを用いて評価し、約 5%が陽性となるようにゲートを設定した。

フローサイトメトリーにて得られた血小板のビオチン/PE 陽性率の推移から、直線回帰モデルを用いて輸血後の体内寿命を算出した<sup>17,18</sup>。

---

k Streptavidin-R-Phycoerythrin from *Streptomyces avidinii*, S3402, Sigma-Aldrich Corporation, USA

l EPICS XL, Beckman Coulter, USA

m Cyflow SL, Partec GmbH, Germany

n Flow-Check, 6605359, Beckman Coulter, USA

# 輸血された血小板の体内における機能保持状態の評価

## 1) ビオチン標識血小板の輸血及び継時的採血

血小板輸血後の機能を評価するため、トロンビン刺激に対する P-selectin 発現量解析<sup>19</sup>を用いた。P-selectin は血小板の  $\alpha$  顆粒中に存在する細胞接着分子であり、血小板が活性化すると血小板膜表面に発現するため、血小板活性化マーカーとして汎用されている。

本実験においても、輸血血小板とその他の血小板を区別するため、上述のビオチン標識法<sup>14,16</sup>を使用した。PGE<sub>1</sub> 添加 PC をビオチン標識して輸血し、輸血 1、24 時間後に抗凝固剤として 3.8%クエン酸ナトリウムを使用して採血した。P-selectin 発現量は採血後の時間の経過とともに変化していくため、直ちに次の操作手順により解析に移った。

## 2) フローサイトメトリーによる輸血血小板の機能評価

採血後、上述したように PRP を分離し、15 分間静置した。次いで、1 mmol/L の PGE<sub>1</sub> を最終濃度が 1  $\mu$ mol/L となるように PRP へ添加し、2,000 G・3 分間遠心した。上清を全て除去し、血小板数が  $10 \times 10^3/\mu$ L となるように PBS に再浮遊させた。その血小板浮遊液 100  $\mu$ L に対して 20  $\mu$ L の FITC 標識抗ヒト P-selectin マウスモノクローナル抗体<sup>o,14,20</sup> 及び 10  $\mu$ L の PE-SA を添加して混和した。血小板と抗体を反応させる際、トロンビン<sup>p</sup>を最終濃度が 0.25 U/mL となるように添加<sup>14,20</sup>した。20 分間の反応後、2 回遠心洗浄して 150  $\mu$ L の PBS に再浮遊させ、直ちにフローサイトメトリーにて解析した。

陽性及び陰性コントロールは、輸血していない血小板について、トロンビン刺激したものと刺激しないもののデータを予備実験から得た。

アイソタイプコントロールとして FITC 標識マウス IgG<sub>1</sub> 抗体<sup>q</sup>を使用し、非特異的な

<sup>o</sup> Anti-human CD62P-FITC, clone AC1.2, Becton Dickinson, USA

<sup>p</sup> Thrombin from bovine plasma, T4648, Sigma-Aldrich Corporation, USA

<sup>q</sup> Mouse IgG1 isotype control-FITC, clone MOPC-21, Becton Dickinson, USA

反応が無いことを確認した（データは示さない）。基本的には上述したフローサイトメーターの設定を使用した。バックグラウンドの蛍光はトロンビン刺激していない血小板を用いて評価した。また、二重染色したサンプルについては蛍光の漏れこみ補正を行った。

## 統計解析

すべての統計解析は市販のソフトウェア<sup>r</sup>を用いて行った。正規性の確認には Kolmogorov-Smirnov 検定を行った。血小板の最大凝集率の変化は One way analysis of variance (ANOVA) にて解析し、posthoc 検定には PRP サンプルを対照とした Dunnett's 法を使用した。異なる血小板製剤を輸血した場合の血小板体内寿命の違いは Unpaired Student's *t* 検定にて解析した。また、血小板輸血後の P-selectin 発現量については、陽性コントロールと輸血後サンプル間の解析に Unpaired Student's *t* 検定を用い、輸血 1 時間と 24 時間後の比較に Paired Student's *t* 検定を用いた。データは平均値±標準偏差 (Standard deviation; SD) にて示した。P < .05 の場合に有意とした。

---

<sup>r</sup> Prism, Version 5.0, Graphpad Software, USA

# 結果

## 血小板強遠心後の再浮遊効率

PGE<sub>1</sub> 添加の有無にかかわらず、PRP 中の血小板は強遠心後にバッグ底部にペレット状にパックされた (Fig 2A)。遠心時に PGE<sub>1</sub> 添加された血小板ペレットについては、20 分間丁寧に混和すると均一に再浮遊できた (Fig 2B)。一方、PGE<sub>1</sub> 非添加の血小板ペレットについては、20 分間混和しても肉眼で観察できる程の血小板集塊がバッグ内に残存していた (Fig 2C)。しかしこの血小板集塊も、30 分間かそれ以上混和を続けると均一に再浮遊できた (データは示さない)。

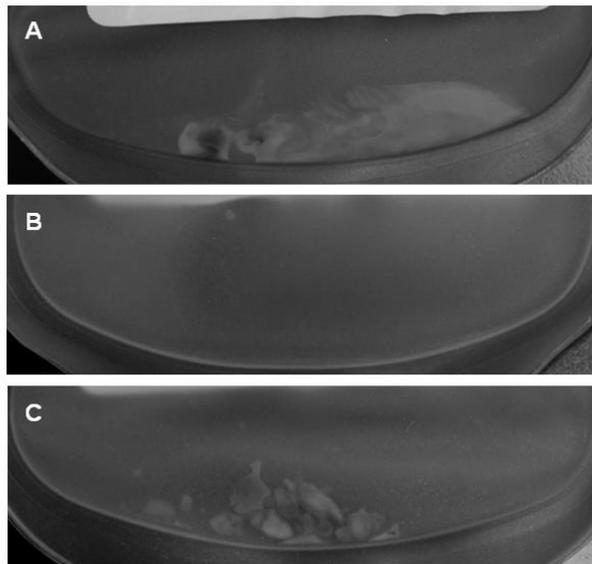


Fig 2. The platelet resuspension after hard spin and a 1-hour resting period with (B) and without (C) PGE<sub>1</sub> in dogs. Platelet pellets (A) were manipulated gently by hand for 20 minutes to achieve uniform resuspension. A lot of platelet aggregates were still found in bag C.

## 添加 PC 中の血小板凝集能の評価

PGE<sub>1</sub><sup>+</sup>PRP サンプル中血小板は著しく低い凝集活性を示し、PRP サンプルとの間に有意な差を認めた (コラーゲン:  $P < .001$ ;  $n = 5$ 、ADP:  $P < .001$ ;  $n = 5$ 、Fig 3)。一方、PGE<sub>1</sub> 除去 PC サンプルと PRP サンプル中血小板の凝集活性に有意な差を認めなかった。すなわち、PGE<sub>1</sub> により機能低下した PC 中血小板は、上清を PGE<sub>1</sub> 非添加血漿と入れ替えることで、凝集能が PRP サンプルと同程度まで回復した。

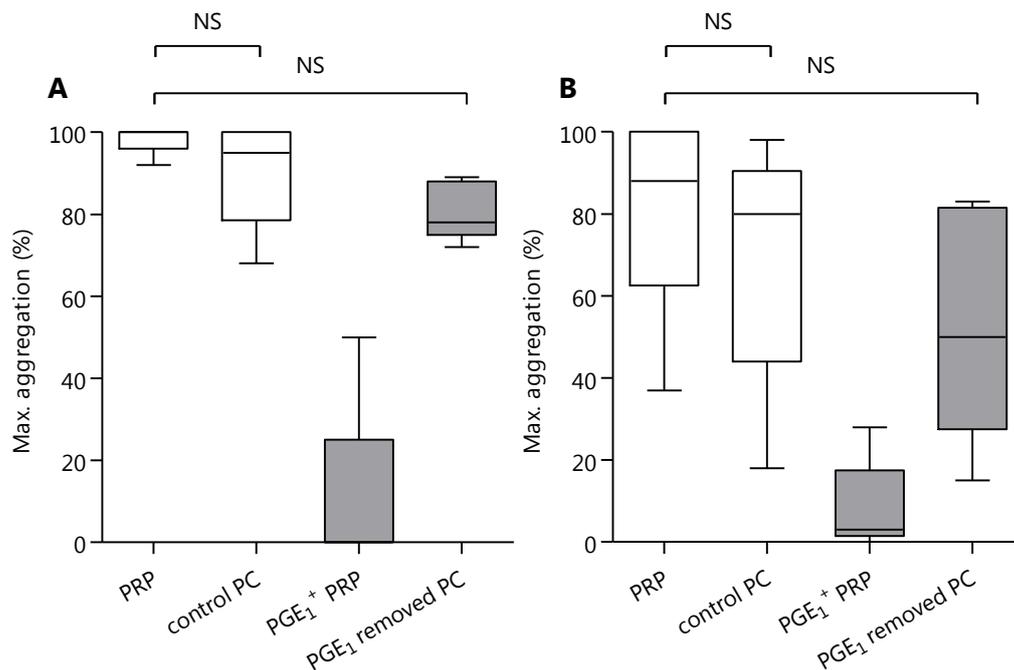


Fig 3. The aggregability of platelets in PC prepared with PGE<sub>1</sub> as analyzed by turbidimetric aggregometry in dogs. The samples of PRP, control PC (without PGE<sub>1</sub>), PGE<sub>1</sub><sup>+</sup>PRP, and PGE<sub>1</sub> removed PC were collected from transfusion bags at each step of PC preparation. The final concentrations of collagen (A;  $n = 5$ ) and ADP (B;  $n = 5$ ) were 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and 20  $\mu\text{mol}/\text{L}$ , respectively. Dunnett's posthoc test was used to compare the PRP and other fractions. For box graphs, the line within the box represents the median value, the limits of the box represent the 25th and 75th percentile values, and the whiskers represent the range. NS, not significant (same in Fig 7).

## 血小板輸血後の体内寿命の評価

輸血血小板はビオチン/PE 陽性細胞として他の血小板と区別した (Fig 4)。PGE<sub>1</sub> 非添加 PRP 及び PGE<sub>1</sub> 添加 PC 中血小板の輸血後体内寿命は、それぞれ 8.0 ± 0.5 日、7.6 ± 0.8 日であった (いずれも n = 5、Fig 5)。両者の間には有意な差を認めなかった (P = .3)。

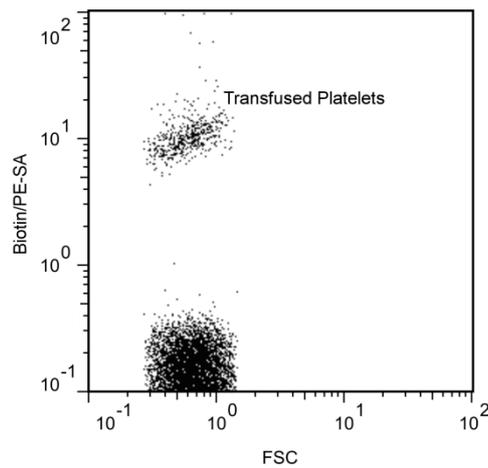


Fig 4. A dot plot of the transfused platelets evaluated by flow cytometry in dogs. Biotin/phycoerythrin-streptavidin (PE-SA) labeled platelets were discriminated as PE positive events (upper scatters).

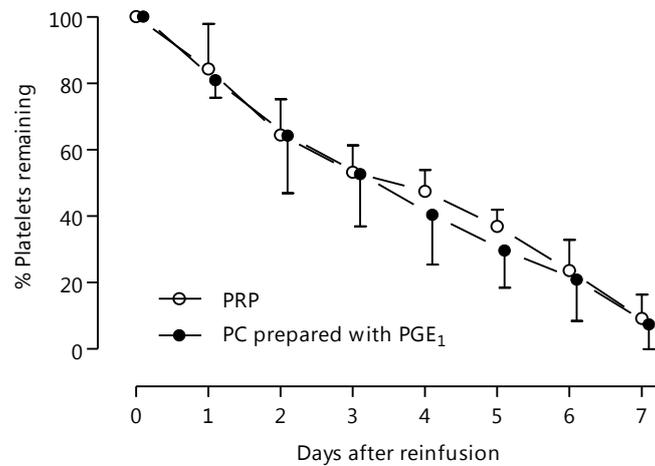


Fig 5. The survival of biotin-labeled autologous platelets in dogs, reinfused as PRP (open circle; n

= 5) or PC prepared with PGE<sub>1</sub> (closed circle; n = 5). The percentage of biotinylated platelets at various times was quantitated by flow cytometry as indicated in Fig 4. The percentage of biotin-positive platelets on Day 0 in each dog was estimated as 100% remaining. Each point represents the mean  $\pm$  SD. According to the consensus opinion of the Biomedical Excellence for Safer Transfusion (BEST) Collaborative, only time points beyond 20 hours after infusion were used to analyze the survival of platelets after transfusion. No significant difference in the platelet survival was found between the groups according to the unpaired *t*-test.

## 血小板輸血後の機能保持状態の評価

トロンビン刺激により P-selectin を発現した輸血血小板は、ビオチン/PE 陽性、FITC 陽性細胞として他の血小板と区別した (Fig 6)。PGE<sub>1</sub> 添加 PC として輸血された血小板と輸血していない陽性コントロールの血小板との P-selectin 発現量の比較では、有意な差を認めなかった (陽性コントロール:  $53.7 \pm 5.1\%$ ; n = 5、輸血 1 時間後:  $42.0 \pm 13.0\%$ ; n = 5、輸血 24 時間後:  $47.9 \pm 13.3\%$ ; n = 5、Fig 7)。また、輸血 1 時間後と 24 時間後の比較でも、有意な差を認めなかった。

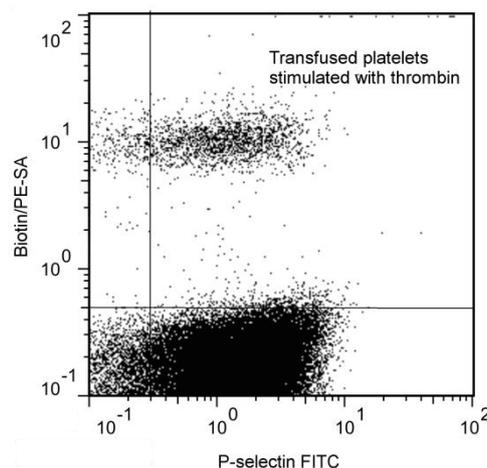


Fig 6. A dot plot of the transfused platelet responses to thrombin as quantitated by the P-selectin expression in dogs. To detect platelet surface P-selectin, an FITC-labeled anti-human P-selectin

monoclonal antibody was used. Transfused platelets were discriminated as indicated in Fig 4.

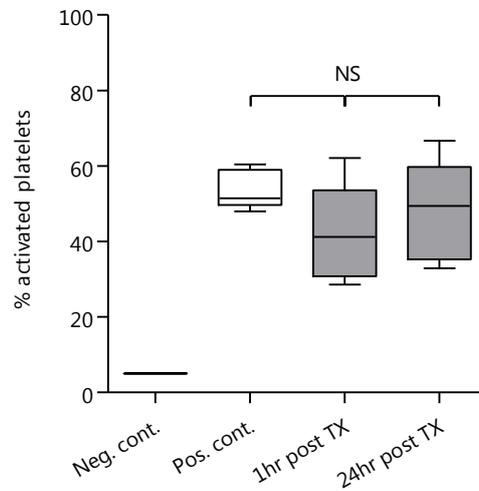


Fig 7. The reactivity of the transfused platelets in dogs. The platelet responses at 1 and 24 hours after transfusion were quantitated by thrombin-induced P-selectin expression as indicated in Fig 6. The positive and negative controls were derived from platelets before transfusion with and without thrombin stimulation ( $n = 5$ ). There were no significant differences between the positive control and transfused platelet concentrates as determined by the unpaired  $t$ -tests. There was also no significant difference found between the values at 1 and 24 hours after transfusion by the paired  $t$ -test. Neg. cont., negative control; Pos. cont., positive control; after TX, after transfusion.

## 考察

過去に報告されているイヌの PC 作製法<sup>5,21</sup>では、PRP 強遠心によりパックされた血小板ペレットの再浮遊は非常に困難であり、30 分間混和した後に血小板凝集塊が残存していることも多い。そこで、血小板の活性化を抑制する PGE<sub>1</sub> を添加したところ、容易かつ速やかに強遠心後の血小板を再浮遊させることができた。

血小板減少や機能不全による出血傾向を是正するためには、PGE<sub>1</sub> 添加 PC 中の血小板が輸血後も生体内で正常に止血能を発揮する必要がある。PGE<sub>1</sub> の血小板機能抑制効果は可逆的とされている<sup>7,10</sup>が、PGE<sub>1</sub> 添加 PC を輸血する前に、*in vitro* にて確認しておくことは重要である。結果の項で示したように、PGE<sub>1</sub> 処理した血小板の凝集能は明瞭に抑制されていたが、上清を PGE<sub>1</sub> 非含有血漿と入れ替えることで顕著に回復した。したがって、PGE<sub>1</sub> の凝集能抑制効果は可逆的であり、PGE<sub>1</sub> 添加 PC が輸血後に生体内に存在する大量の血漿で希釈されることにより、生体内でも正常に凝集能を発揮できる可能性が示唆された。

また、新しい方法で血小板製剤を作製する際、輸血後の体内寿命を測定することは必須とされている<sup>17,18</sup>。本研究でも輸血後体内寿命を確認したが、PGE<sub>1</sub> 添加 PC は PGE<sub>1</sub> 添加していない PRP と比較しても同等の体内寿命を示していた。

上述したように、血小板凝集能については PGE<sub>1</sub> の凝集能抑制効果が可逆的であることを確認したが、実際に PGE<sub>1</sub> 添加 PC が輸血後にその機能を発揮できるかどうかは定かでない。しかしながら、通常用いられている血小板機能解析方法では、輸血後の *in vivo* における機能を評価できるような方法は存在しない。そこで、本研究では、血小板輸血後の機能保持状態を、輸血血小板を他の血小板と区別する Heilmann らのビオチン標識法<sup>14,16</sup>とトロンビン刺激後の P-selectin 発現量解析を組み合わせた独自の方法により評価した。その結果、*in vitro* の血小板凝集能の実験から推測したように、

PGE<sub>1</sub> 添加により抑制された PC 中血小板の機能は、輸血後に回復しており、少なくとも輸血 24 時間後まではトロンビン刺激に対する P-selectin 発現能を維持していることが明らかとなった。

PGE<sub>1</sub> は容易に入手可能であり、さらに静脈内投与可能な製剤も販売されているため、本研究で有用性が明らかとなった PC 作製過程における PGE<sub>1</sub> 添加法は実現可能性が極めて高い。しかしヒトにおいては、PGE<sub>1</sub> 添加 PC 及び PGE<sub>1</sub> 非添加 PC を 5 日間保存してから輸血したところ、PGE<sub>1</sub> 添加 PC は輸血後体内寿命がわずかに短縮したことが示されている (PGE<sub>1</sub> 添加 PC:  $5.8 \pm 1.6$  日、PGE<sub>1</sub> 非添加 PC:  $6.9 \pm 1.4$  日)<sup>7</sup>。本研究では、PGE<sub>1</sub> が輸血後体内寿命を短縮させなかったが、PGE<sub>1</sub> 添加 PC を保存していないためその影響は不明である。さらに、イヌの血小板製剤の保存方法はまだ検討すべき課題が多いため、イヌの PGE<sub>1</sub> 添加 PC は新鮮な状態での使用に限定されるべきと思われた。

## 小括

イヌの PC 作製過程において PGE<sub>1</sub> を添加することにより、PC 作製効率を上昇させることに成功した。PGE<sub>1</sub> 添加 PC は輸血後体内寿命が PGE<sub>1</sub> 非添加 PRP と同等であるだけでなく、輸血後の機能も維持されていた。この PC 作製方法は極めて有用であるが、PGE<sub>1</sub> が保存中の血小板に対して及ぼす影響を評価していないため、PGE<sub>1</sub> 添加 PC の使用は新鮮時に限定されるべきと思われた。

## 第2章 輸血用血小板製剤冷蔵保存の検討

### はじめに

イヌの血小板製剤を臨床で広く利用するためには、製剤の作製方法に続き、その保存条件について検討する必要がある。現在、ヒトの血小板製剤は、冷蔵保存により輸血後体内寿命の短縮を認めることから、室温での保存が推奨されている<sup>2,22</sup>。そこでイヌの血小板製剤も、ヒトと同様の室温保存が推奨されているが<sup>1</sup>、室温での保存には大きく分けて2つの問題点が存在する。

1つ目は、保存中の血小板の代謝、特に嫌氣的代謝により pH が低下し、血小板が不可逆的な PSL を受けることである<sup>23</sup>。PSL を回避するため、ヒトの医療では、血小板数、血漿の量、保存用血液バッグ（形態、表面積、厚さ、素材、ガス透過性など）、血小板製剤作製方法、ガス交換を促進するための保存中の振盪方法など、様々な因子が検討されている<sup>24-29</sup>。その結論として得られているコンセンサスは、血小板保存には専用のガス透過性の高い保存用バッグを用い、そこへ保存バッグのサイズに見合った量の血小板含有血漿を充填し、ガス交換を促進するために毎分 50-70 回程度水平方向に浸透しながら保存すること、とされている。

2つ目は、細菌増殖リスクの高さである<sup>30</sup>。上述のような保存方針により、ヒトの血小板製剤の PSL は可能な限り排除できているが、室温保存による細菌増殖リスクの高さを懸念して、保存期間は 4-7 日程度であり、他の血液製剤と比較して著しく短い。この保存期間の短さが災いし、日本だけでも年間約 15 万単位（300 万 mL）もの血小板製剤が期限切れなどにより廃棄されている<sup>31</sup>。それだけ配慮していても、血小板輸

血による敗血症の発生率は赤血球製剤と比較して約 50 倍も高いと報告されている<sup>32</sup>。

このように、ヒトの血小板製剤の室温保存には問題点があるものの、冷蔵保存による輸血後体内寿命の短縮がデメリットとなり、現在も室温保存されている。また、イヌにおいても、過去に室温保存と冷蔵保存の違いが検討されたことはないが、ヒトと同様の室温保存が推奨されている。

一方、ヒトとイヌの血小板輸血には、その利用目的の面で大きな違いがある。ヒトでは患者の血小板数を常に一定以上に保つために、2-3 日間隔で繰り返し血小板輸血が行われる (Fig 8A)<sup>33</sup>。しかしながら、豊富な輸血用血液の供給体制を持たず、また経済的な制約も大きいイヌにおいては、そのような治療は困難であり、手術中の出血予防や緊急時の止血効果を目的とする単回ないしは短期間の投与が現実的である (Fig 8B)。したがって、ヒトの血小板輸血では輸血後の体内寿命が重要となるが、イヌの場合、この点の事情は若干異なる。ヒトと比べて体表汚染が激しいイヌにおいては、むしろ、採血時の細菌汚染による輸血関連敗血症リスクの方がより強く懸念されるべきかもしれない。

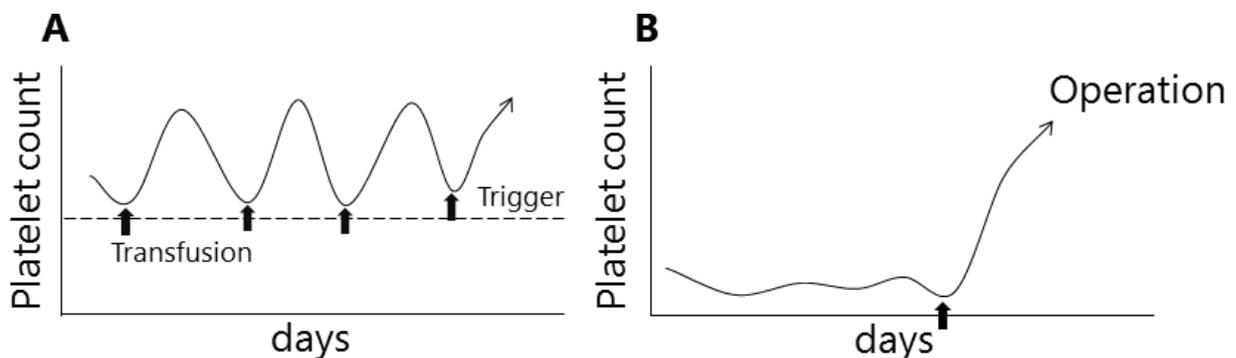


Fig 8. Schematic images for the strategy of human (A) and canine (B) platelet transfusion. In human, platelets are administered prophylactically when a patient's platelet count falls to the trigger count. In dog, because of lacking the rich blood resources, platelets are administered therapeutically just before the surgery or only while presenting the life threatening bleeding symptoms.

そこで第2章では、室温保存したイヌの血小板製剤を対照とし、冷蔵保存したイヌの血小板製剤が、その保存条件から受ける影響を明らかにすることを目的とした。なお、上述したように、血小板製剤のPSLを回避するためには、ある程度の血漿量が必要となる。1個体のイヌから得られるPC中の少量の血漿では検討が難しいと考え、本章ではPRPを用いて保存の影響を検討した。

# 材料と方法

## 概要

室温、冷蔵保存の影響を比較検討するため、イヌの PRP を 22 °C 及び 4 °C で 7 日間保存した (n = 5)。保存 1、7 日目に無菌的に採材し、血小板数、平均血小板容積 (Mean platelet volume; MPV)、円盤状血小板が全体に占める割合 (% discs)、また、代謝指標として遠心上清のグルコース濃度、乳酸濃度、重炭酸イオン濃度、pH、酸素分圧 (Partial pressure of oxygen;  $pO_2$ )、二酸化炭素分圧 (Partial pressure of carbon dioxide;  $pCO_2$ )、乳酸脱水素酵素 (Lactate dehydrogenase; LDH)、電解質濃度 ( $Na^+$ 、 $K^+$ 濃度)、さらに、血小板機能試験として血小板凝集能、血小板の形態反応 (低張ショック反応; Hypotonic shock response; HSR 及び球状化反応強度; Extent of shape change; ESC) を評価した。以上の *in vitro* での検討とともに、*in vivo* では 1 日間冷蔵、7 日間室温あるいは冷蔵保存した PRP 中血小板の輸血後回収率及び体内寿命を測定し、両保存条件の影響を比較評価した。

## 供試動物

本学生物科学総合研究所内と獣医臨床センター内で飼育管理している臨床的に健康なビーグル犬 5 頭 (雌 1 頭、雄 4 頭、年齢 3-4 歳、体重 10-13kg) を反復して用いた。飼育管理方法は第 1 章と同様である。なお、本実験は麻布大学動物実験委員会より承認を受け (承認番号: 第 131009-1 号)、動物実験指針に沿って適切に人道的に取り扱われた。

## PRP 作製方法

第1章と同様に抗凝固剤として CPDA-1 を用いて 200 mL 採血し、遠心法により PRP を作製した。その際、血小板回収効率の点から、第1章で用いた遠心条件の見直しを行い（データは示さない）、遠心条件は 22 °C・2,000 G・3 分間とした<sup>34</sup>。また、通常分離バッグの素材に用いられている塩化ビニルはガス透過性が低く、保存中の血小板の代謝により分離バッグ内が嫌気的環境に傾いてしまうため、血小板製剤の保存には不適とされている<sup>24,26,35,36</sup>。そこで、本研究でもガス透過性の高いポリオレフィンを用いた分離バッグ<sup>s</sup>を使用した。

## In vitro 実験

PRP を 22 °C あるいは 4 °C で毎分 70 往復水平振盪<sup>u</sup>させて 7 日間保存<sup>28,37</sup>し、1、7 日目に分離用チューブから無菌的に約 5 mL ずつ採材して、次のとおり各種項目を測定して PRP の品質を評価した。

血小板数と MPV は自動血球計数器にて測定した。% discs は、Kunicki らの方法<sup>38</sup>に準じて、位相差顕微鏡<sup>v</sup>を用いて血小板形態を 100 個以上観察して算出した<sup>14,39</sup>。37 °C における pH 及び血液ガス分圧 (pO<sub>2</sub>、pCO<sub>2</sub>)、重炭酸イオン濃度は血液ガス分析装置<sup>w</sup>を用いて測定した。PRP を 2,000 G・10 分間遠心し、上清のグルコース濃度、LDH 活性、Na<sup>+</sup>濃度、K<sup>+</sup>濃度を自動分析装置<sup>x</sup>により測定した。乳酸濃度はラクテート分析装置<sup>y,40</sup>を用いて測定した。血小板凝集能は、第1章と同様、凝集惹起物質にコラーゲン

s カワスミ分離バッグ PO、KBP-600CP、川澄化学工業株式会社、日本

t 振盪機用恒温チャンバーFMS-100、東京理化工機株式会社、日本

u 振盪機 MMS-310、東京理化工機株式会社、日本

v AX80N-05、オリンパス株式会社、日本

w 汎用血液ガス分析装置 Gastat-600、株式会社テクノメディカ、日本

x 日立自動分析装置 9000 シリーズ、株式会社日立ハイテクノロジーズ、日本

y ラクテート・プロ TM、アークレイ株式会社、日本

及び ADP を用いて光学法にて測定した。なお、血小板凝集惹起効果や汎用性を考慮し、コラーゲンと ADP 試薬を第 1 章で用いたものから変更した<sup>z,aa</sup>（データは示さない）。

HSR 及び ESC は BEST working group の提唱する方法<sup>41</sup>に準じて、血小板凝集能測定装置を用いて測定した。その方法は次のとおりである。

HSR では、凝集計にセットした 500 μL の PRP に対して 250 μL の生理食塩水あるいは蒸留水を添加し、その直後にみられるピークから 4 分後の光透過率の変化を測定した (Fig 9)。蒸留水を添加した場合、浸透圧差により血小板内に水が流れ込むため、一旦体積が増加して透過率が上昇する。その後、血小板の細胞膜骨格やエネルギー代謝が正常であると、血小板が収縮するため透過率が低下する。

一方、ESC では、凝集計にセットした 500 μL の PRP に対し、EDTA を最終濃度が 2 mmol/L となるように添加して血小板凝集反応を抑制した。その 10-15 秒後に ADP を最終濃度が 20 μmol/L となるように添加して、血小板の球状化の程度を透過率の変化として測定した (Fig 10)。正常な円盤状の形態を示す血小板のみ球状化を示すため、上述した % discs と関連した値を示すことが知られている。

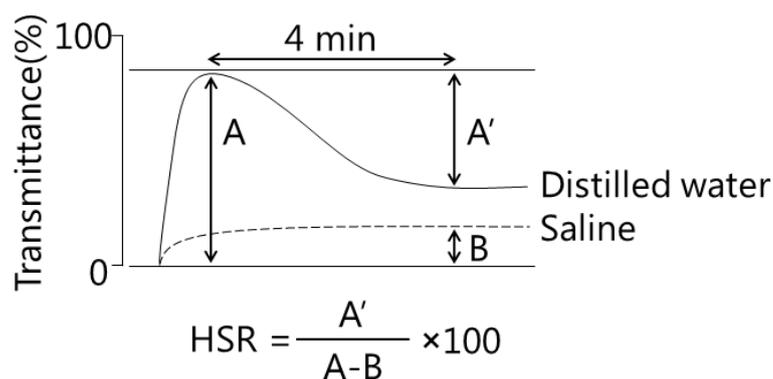


Fig 9. Schematic image and calculation method for the HSR. The HSR measures the platelet's ability to recover its normal volume after swelling when exposed to a hypotonic environment.

<sup>z</sup> MCM コラーゲン H、HTR-210105、株式会社エル・エム・エス、日本

<sup>aa</sup> MCM ADP、HTR-210202、株式会社エル・エム・エス、日本

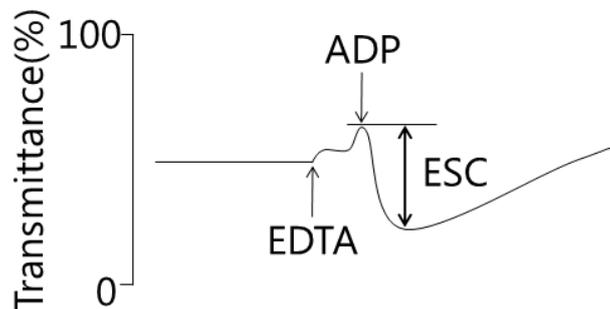


Fig 10. Schematic image for the ESC. The ESC measures the disc-to-sphere transformation which is induced by the addition of ADP following EDTA.

## In vivo 実験

1 日間冷蔵、7 日間室温保存及び 7 日間冷蔵保存した 3 種類の PRP 中血小板の輸血後回収率及び体内寿命を測定した。第 1 章と同様に、Heilmann らのビオチン標識法<sup>14-16</sup>を用いて輸血し、輸血 1 時間後から 7 日後まで、ビオチン標識血小板が検出されなくなるまで採材した。輸血後回収率は、輸血 1 時間後にビオチン標識した血小板がどの程度循環しているかを表している。Appleman らのイヌにおける報告<sup>14</sup>に基づき、以下の計算式によって算出した。

$$\text{輸血後回収率} = \frac{\text{ビオチン標識血小板陽性率}}{\text{計算上の輸血血小板率}} \times 100$$

計算上の輸血血小板率

$$= \frac{\text{輸血血小板総数 (PRP 中の血小板数}[\mu\text{L}] \times \text{PRP 量}[\text{mL}] \times 1000)}{\text{輸血後血小板総数 (輸血血小板総数 + 輸血直前の血小板総数)}}$$

$$\text{輸血直前の血小板総数} = \text{体重}[\text{kg}] \times 90\text{mL} \times \text{輸血直前血小板数}[\mu\text{L}] \times 1000$$

また、輸血後体内寿命の算出には、第 1 章と同じく直線回帰モデルを用いた<sup>17,18</sup>。

## 統計解析

すべての統計解析は上述の市販のソフトウェアを用いて行った。正規性の確認には Kolmogorov-Smirnov 検定を行った。保存 1 日目あるいは 7 日目の室温と冷蔵保存の比較（保存温度による変化）、または、室温あるいは冷蔵保存した場合の 1 日目と 7 日目の比較（時間の経過による変化）を Unpaired Student's *t* 検定にて解析した。なお、正規性が確認できなかったデータは Mann-Whitney *U* 検定にて解析した。データは平均値±SD にて示した。 $P < .05$  の場合に有意とした。

# 結果

## In vitro 実験

血小板数は、室温保存では保存7日目まで安定していたが、冷蔵保存では保存1日目から室温保存と比較して有意に低値を示していた (Fig 11A)。冷蔵保存の血小板を位相差顕微鏡にて観察すると、多数の血小板が凝集あるいは粘着して大きな集塊を形成していたため (データは示さない)、冷蔵保存の血小板数低値は見かけ上のものと思われた。MPV は、室温保存では保存期間を通じて著しい増加は無いものの、鏡顕において血小板形態が小型円盤状から大型球状に変化しており、% discs は明らかに減少した。一方、冷蔵保存では保存1日目から MPV が高値を示しており、鏡検においても小型円盤状の血小板がほとんど存在しなかったため、% discs は低値を示した (Fig 11B、C)。

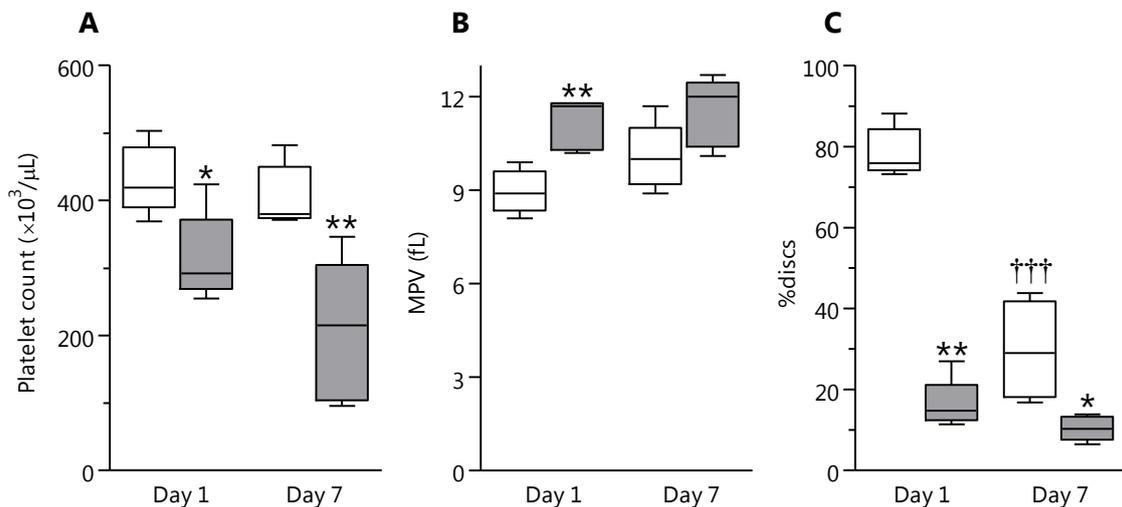


Fig 11. Changes of platelet count (A), MPV (B), and % discs (C). Symbol \*/† indicate a significant difference between the groups at each time point/temperature analyzed by unpaired *t*-test or Mann-Whitney *U* test. \*/† indicates  $.01 \leq P < .05$ , \*\*/†† indicate  $.001 \leq P < .01$ , and

\*\*\*/††† indicate  $P < .001$ . For box graphs, the line within the box represents the median value, the limits of the box represent the 25th and 75th percentile values, and the whiskers represent the range. The white/gray boxes represent the groups stored at 22/4 °C (same in the figures below).

グルコース濃度は、室温保存で明らかに減少したが、冷蔵保存ではそれほど大きな変動はみられなかった (Fig 12A)。乳酸濃度は、室温保存で明らかに上昇した。冷蔵保存でも乳酸濃度の上昇がみられたが、室温保存と比較すると有意に低値であった (Fig 12B)。重炭酸イオン濃度は、室温と冷蔵ともに保存中に減少したが、乳酸の蓄積と相まって、室温保存の方が減少の程度は顕著であった (Fig 12C)。pH は、乳酸濃度の増加と、重炭酸イオン濃度の減少に伴い、室温保存では著しく低下した (Fig 12D)。pO<sub>2</sub> は、冷蔵保存と比較して有意に低値を示した (Fig 12E)。pCO<sub>2</sub> は、室温保存の pH 低下を代償するように低値を示していたが、保存 7 日目には使用した血液ガス分析装置の検出限界値を下回っていた (Fig 12F)。これらの代謝指標の変化は、保存中の血小板の好氣的代謝及び嫌氣的代謝によるものと思われた。

一方、LDH は、7 日目の冷蔵保存サンプルで高値を示すことがあった (Fig 12G)。% discs でみたように、冷蔵により血小板膜骨格が正常な円盤状を維持出来なくなっていたため、一部の血小板は崩壊しやすくなって LDH が細胞外に遊離したものと思われた。

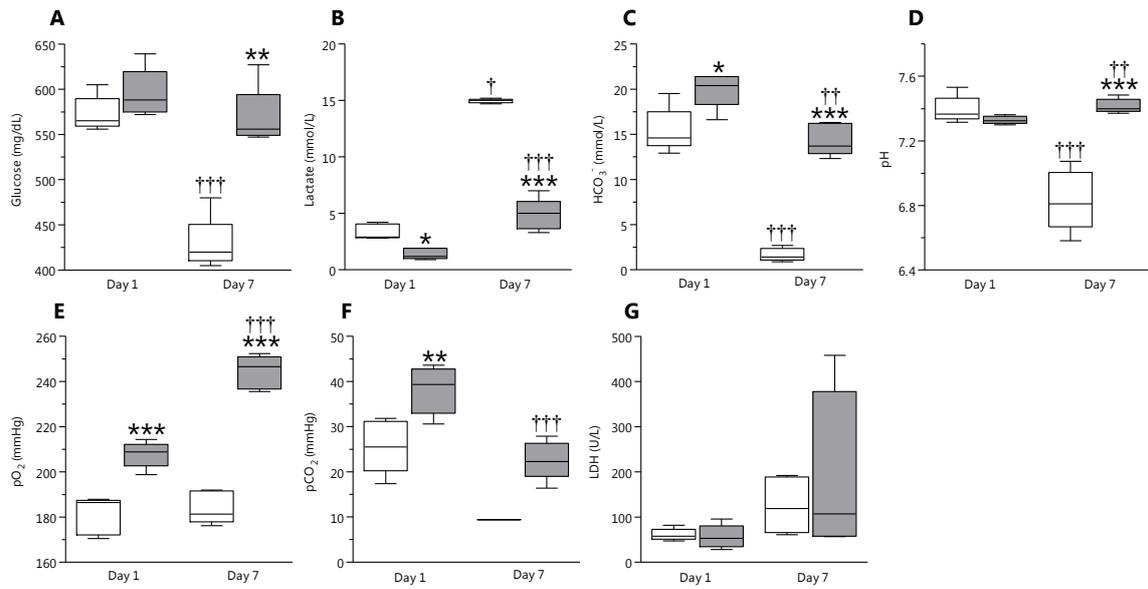


Fig 12. Changes of metabolic parameters (A: Glucose concentration, B: Lactate concentration, C: Bicarbonate ion concentration, D: pH, E: pO<sub>2</sub>, F: pCO<sub>2</sub>, and G: LDH activity).

冷蔵保存では上清中の K<sup>+</sup>濃度が有意に上昇していたが、これは低温下では血小板内の Na<sup>+</sup>と K<sup>+</sup>濃度を調整する Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase の酵素活性<sup>42</sup>が低下したためと思われた (Fig 13A、B)。

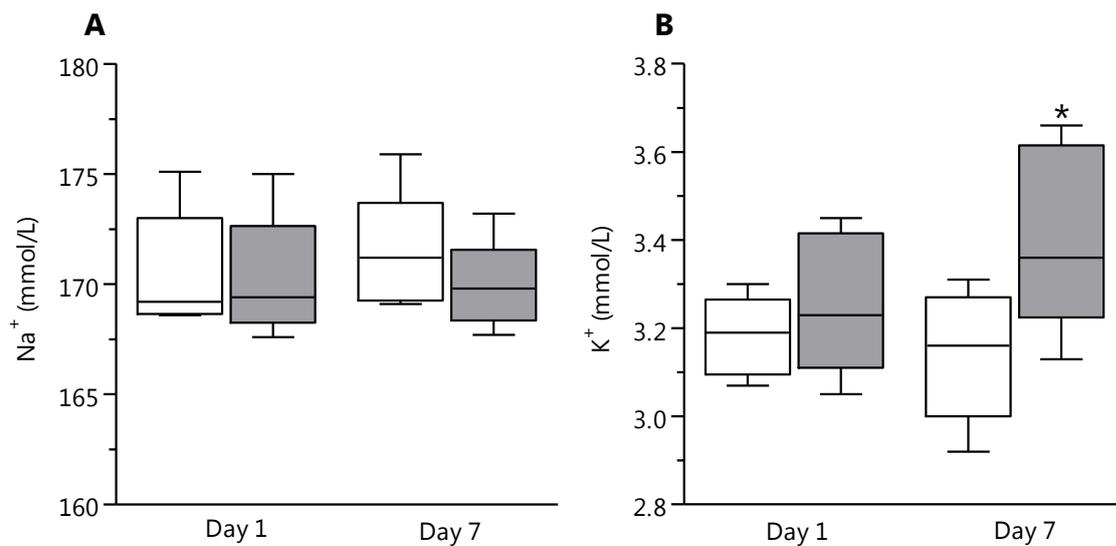


Fig 13. Changes of electrolyte parameters (A: Na<sup>+</sup> and B: K<sup>+</sup> concentration).

血小板凝集能の検査では、凝集惹起物質にコラーゲン及び ADP を使用したが、いずれの刺激に対する反応も、冷蔵保存の方が良好に維持されていた (Fig 14)。

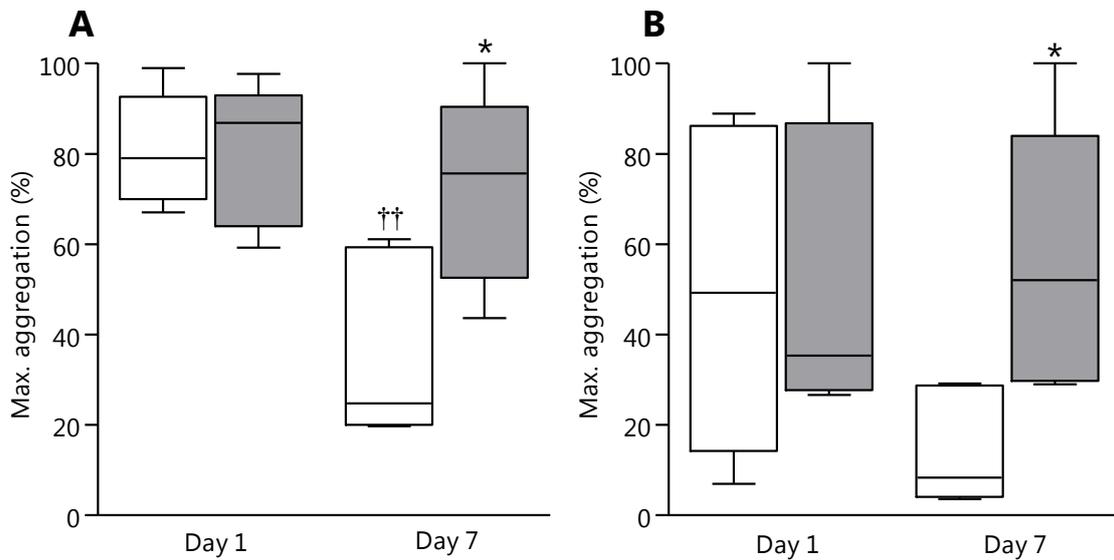


Fig 14. Changes of collagen (A) and ADP (B) induced platelet aggregations. The final concentrations of collagen and ADP were 100  $\mu$ g/mL and 20  $\mu$ mol/L respectively.

HSR は、冷蔵保存では血小板内の水分を排出することができずに低値を示した (Fig 15A)。ESC も同様に、冷蔵保存は低値を示した (Fig 15B)。これらの変化も、冷蔵により血小板膜骨格が正常な円盤状を維持出来なくなっていることに起因していると思われた。

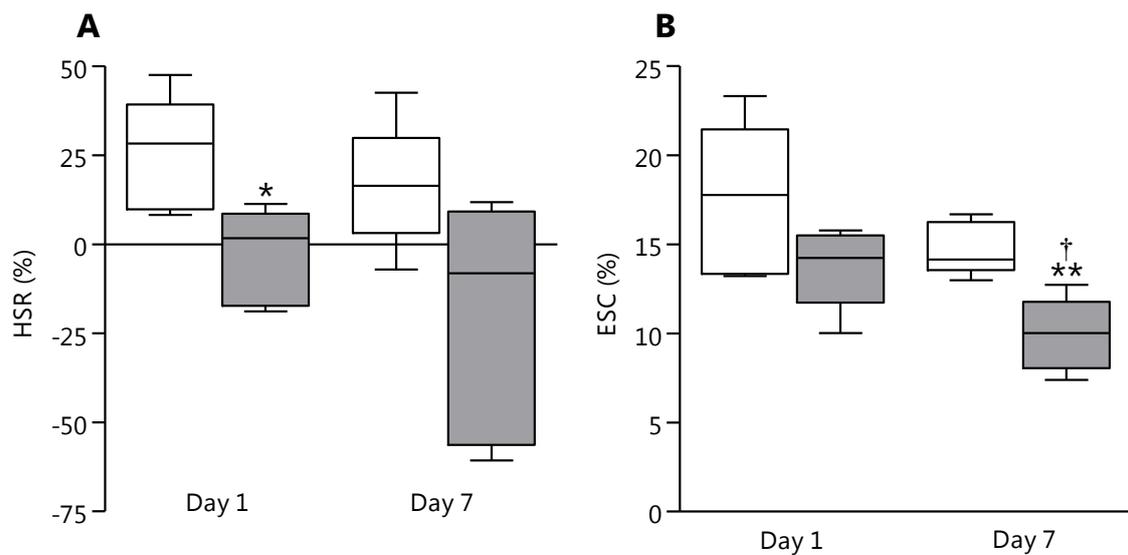


Fig 15. Changes of HSR (A) and ESC (B).

## In vivo 実験

血小板の輸血後回収率は、冷蔵で1日間保存したものが  $61.9 \pm 6.3\%$  と最も高値を示しており、冷蔵で7日間保存したもの ( $39.2 \pm 12.7\%$ ) と室温で7日間保存したもの ( $42.6 \pm 9.8\%$ ) の間では明らかな差はみられなかった (Fig 16A)。一方、輸血後体内寿命では、室温で7日間保存したものが  $4.8 \pm 0.8$  日であり、第1章で得られた新鮮 PRP 輸血後の体内寿命 ( $8.0 \pm 0.5$  日) と比較して短縮していた。また、冷蔵で1日間保存したものが  $2.8 \pm 0.5$  日、冷蔵で7日間保存したものが  $1.8 \pm 0.4$  日であり、冷蔵保存による体内寿命の短縮は明らかであった (Fig 16B)。

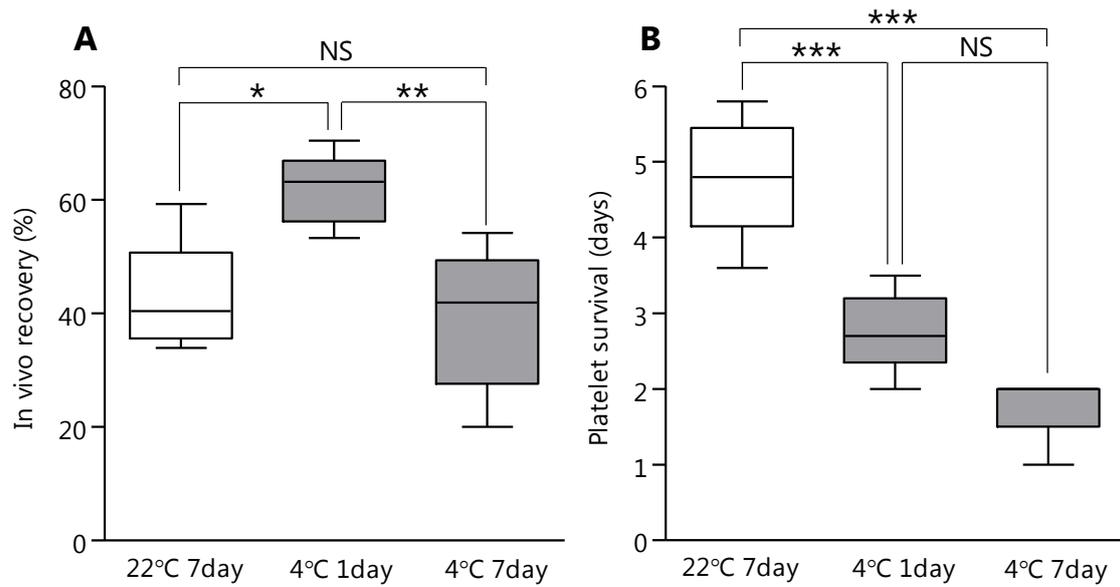


Fig 16. In vivo recovery (A) and survival (B) of stored PRP assessed by autologous transfusion of biotinylated platelets. Symbol \* indicates a significant difference between the groups analyzed by unpaired *t*-test. \* indicates  $.01 \leq P < .05$ , \*\* indicate  $.001 \leq P < .01$ , and \*\*\* indicate  $P < .001$ . NS, not significant.

## 考察

イヌの血小板製剤が室温あるいは冷蔵保存により受ける影響を比較評価した。室温保存では、過去のイヌの報告<sup>21</sup>と同様に、経時的な PSL の進行によって血小板のサイズや形態、代謝指標、凝集能など血小板製剤の品質が低下していった。また、過去にイヌでの報告はみられないものの、輸血後体内寿命も、新鮮 PRP を輸血した場合と比較して短縮していた。しかしながら、pH6.4 以上かつ輸血後体内寿命が新鮮血小板製剤を輸血した場合の 50%以上、というヒトの血小板製剤で一般的に要求される条件<sup>26,43,44</sup>は満たしていた。さらに、血小板凝集能の不可逆的な障害など、血小板製剤として使用不可と思われるような結果はみられなかった。

一方、冷蔵保存では、血小板の代謝指標の変化は明らかに軽度であり、凝集能は室温保存と比較して良好に維持されていた。輸血効果持続性の点では、冷蔵保存による輸血後体内寿命の短縮は著しく、7 日間保存した場合では、2 日以内にほとんどすべての輸血血小板が消失していた。

しかし、上述したようにイヌの血小板輸血は手術時など短期間の輸血効果を図ることがより実践的である。したがって、保存中の細菌増殖リスクの軽減効果も考慮すれば、状況によっては冷蔵保存の方がイヌでは優れているかもしれない。

今回の検討と同様に、細菌増殖リスクの点からイヌの血小板製剤の保存性の改善を目指したものには、血小板製剤の冷凍保存<sup>14,21,45,46</sup>及び凍結乾燥保存<sup>47,48</sup>が挙げられる。冷凍保存は、血小板のもっとも重要な機能の一つである凝集能が明らかに低下することが複数報告<sup>14,21,46</sup>されており、さらに輸血後体内寿命の短縮<sup>14</sup>も認められるとされている。一方、凍結乾燥保存はそのような基礎的検討がなされないまま、心肺バイパス法の実験犬や血小板減少症罹患犬に投与されている。心肺バイパス法の実験犬に投与している報告<sup>47</sup>では、出血時間の短縮を認めたことから凍結乾燥血小板製剤が有効で

あるとしており、また、血小板減少症罹患犬に投与している報告<sup>48</sup>では、症例の転帰が新鮮血小板製剤を輸血した場合と変わらないことから凍結血小板製剤が有効であるとしている。凍結乾燥保存については、今後、凝集能を含めた基礎的な検討が必須であると思われるが、冷凍保存については、凝集能の低下がみられたことは極めて大きな欠点である。その点で、冷蔵保存は良好に凝集能を維持しており、より有効性が高いと思われる。

上述のように、冷蔵保存は輸血後体内寿命が短縮するため、使用は短期間の輸血効果を期待する場面に限定的である。しかしながら、この体内寿命の短縮さえ克服できれば、イヌはもとより、ヒトの医療においても大きな影響を与えることは間違いない。近年、ヒトの医療において、血小板製剤の冷蔵保存が見直されつつあり、主にマウスを用いた基礎的検討が進んでいる<sup>49-53</sup>。それらの動向に注目しつつ、イヌにおいても血小板輸血の実用化を目指し、血小板製剤保存性の改善についてさらなる検討が必要である。

## 小括

イヌの血小板製剤を室温保存した結果、経時的な PSL の進行により *in vitro* 及び *in vivo* における血小板製剤の品質が低下していた。しかしながら、pH や輸血後体内寿命など、ヒトの血小板製剤で要求される条件の一部は満たしていた。

一方、冷蔵保存では、血小板の代謝指標の変化は軽度であり、凝集能は室温保存と比較して良好に維持されていた。輸血効果持続性の点では、冷蔵保存により輸血後体内寿命が著しく短縮していた。

ヒトのように長期的な輸血効果を図る場合は室温保存の方が適しているが、イヌの血小板輸血では短期間の輸血効果を図ることが現実的である。保存中の細菌増殖リスク軽減効果も考慮すれば、凝集能をより良好に維持している冷蔵保存の方が、イヌでは優れている場面もあると思われた。

# 総括

本研究では、イヌにおける血小板輸血の臨床応用に向けて基礎的検討を行った。

第1章では、血小板製剤の作製方法について検討した。従来の方法では、PC作製過程における強遠心後、血液バッグ内に沈殿している血小板のペレットを均一に再浮遊させることは極めて困難である。これは強遠心時の血小板の活性化が関与しており、時として再浮遊操作時に不可逆的な血小板の凝集塊が出来てしまうこともある。そこで、血小板の機能を可逆的に抑制する  $\text{PGE}_1$  を強遠心直前の PRP に添加し、問題の解決を図った。

その結果、 $\text{PGE}_1$  の添加により血小板の再浮遊効率は著しく改善した。また、血小板凝集能検査により  $\text{PGE}_1$  の血小板機能抑制効果が可逆的であることを確認した。さらに、 $\text{PGE}_1$  添加 PC の輸血後体内寿命は短縮しておらず、輸血後も血小板の機能のひとつである P-selectin 発現能を維持していた。この改良は有用性が高い方法であると思われるが、イヌの血小板製剤は保存方法がまだ十分に検討されていない。したがって、 $\text{PGE}_1$  添加 PC の使用は、新鮮時に限るべきであろうと思われた。

そこで第2章では、イヌの血小板製剤の保存方法について検討した。PRP を室温あるいは冷蔵で7日間保存し、その影響を比較した結果、室温保存では、経時的な PSL の進行によって血小板のサイズや形態、代謝指標、凝集能など血小板製剤の品質が低下した。また、輸血後体内寿命も、新鮮 PRP を輸血した場合と比較して約 60%程度まで短縮していた。しかしながら、不可逆的な機能障害など、血小板製剤として使用不可と思われるような結果はみられなかった。

一方、冷蔵保存では、血小板の代謝指標及び凝集能は室温保存と比較して良好に維持されていた。しかしながら輸血効果持続性の点では、冷蔵保存による輸血後体内寿命の短縮は室温保存の場合と比べて顕著であった。

ヒトとイヌの血小板輸血には、その利用目的の面で大きな違いがある。ヒトでは患者の血小板数を常に一定以上に保つために、2-3 日間隔で繰り返し血小板輸血が行われる。しかしながら、イヌにおいてはそのような治療は困難であり、手術中の出血予防や緊急時の止血効果等を目的とする単回ないしは短期間の投与が現実的である。しかも、施設や人員の制約が大きい獣医療においては、血液製剤保存中の細菌増殖リスクは、ヒトの場合に比べ遙かに大きい。そのリスクの軽減効果も考慮すれば、イヌの血小板製剤については、状況によっては冷蔵保存の方が優れているかもしれない。

今後は、第1章で確立した血小板製剤作製技術及び第2章で検討した保存技術を改良し、輸血効果の持続性を高めれば、イヌの血小板輸血がより実践的になるだろう。具体的には、PGE<sub>1</sub> 添加 PC を長期保存する方法を考えたが、少数のイヌを用いた我々の予備的検討では難航している。すなわち、PGE<sub>1</sub> 添加の有無にかかわらず、保存前に PC まで濃縮すると、室温保存 4-5 日目頃より pH が著しく低下して不可逆的なレベルの PSL が生じた。これは、1 頭のイヌから得られる 20 mL 程度の PC の血漿量及び血小板数では、保存中の血小板の好氣的代謝を充分維持できない<sup>25,54,55</sup> ためと思われた。代謝を抑制する冷蔵保存であればその点は改善できるかもしれないが、まだ検討できていない。

また、PRP であれば 7 日間室温保存可能であるため、7 日間保存した PRP から PGE<sub>1</sub> 添加 PC を作製する方法も有効であると思われる。この技術は、小児の血小板輸血用に PC をさらに濃縮する volume reduction 法<sup>55-57</sup> に近いものであるが、特に小型犬が多い日本の獣医療では輸血量を抑えられる上で有効である。PGE<sub>1</sub> を添加することによる細菌のコンタミネーションリスクや、保存中に PGE<sub>1</sub> が血小板に及ぼす影響を考慮しなくて良いため、今後の検討が期待される。

そして上記のような基礎的検討に加え、今後は症例への血小板輸血の適応をよく考慮し、その有効性を血小板数の増加や出血傾向の消失、症例の転帰などから十分に検討していく必要があるだろう。

本論文の一部は以下に公表した。

- Segawa K, Kondo T, Kimura S, Fujimoto A, Kato T, Ishikawa T, Neo S, Hisasue M, Yamada T, Tsuchiya R. Effects of prostaglandin E<sub>1</sub> on the preparation of platelet concentrates in dogs. J Vet Intern Med. 2012;26:370-376.

# 謝辞

本研究を進めるにあたり、お忙しいなか終始適切な助言を賜り、また丁寧に指導して下さいました土屋 亮教授に感謝いたします。また、日常の議論を通じて多くの示唆を頂いた山田 隆紹名誉教授、久末 正晴准教授、根尾 櫻子助教、渡辺 征博士をはじめとした麻布大学内科学第二研究室の皆様、そして同学薬理学研究室の浅井 史敏教授、同学附属動物病院の伊藤 哲郎助教に心より感謝いたします。

日本赤十字社の平山 文也先生、岡崎 仁先生には的確な助言を賜り、とくに同社の寺田 周弘先生にはその豊富な血小板輸血研究の経験から、ひとかたならぬお世話になりました。ここに感謝の意を表します。

そして、本研究のために貴重な検体を提供してくれたイヌ達に深く感謝いたします。ありがとうございました。

## 参考文献

1. Callan MB, Appleman EH, Sachais BS. Canine platelet transfusions. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 2009;19:401-415.
2. Stroncek DF, Rebulla P. Platelet transfusions. *Lancet* 2007;370:427-438.
3. Lanevski A, Wardrop KJ. Principles of transfusion medicine in small animals. *Can Vet J* 2001;42:447-454.
4. Hux BD, Martin LG. Platelet transfusions: treatment options for hemorrhage secondary to thrombocytopenia. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 2012;22:73-80.
5. Abrams-Ogg AC, Kruth SA, Carter RF, et al. Preparation and transfusion of canine platelet concentrates. *Am J Vet Res* 1993;54:635-642.
6. Callan MB, Appleman EH, Shofer FS, et al. Clinical and clinicopathologic effects of plateletpheresis on healthy donor dogs. *Transfusion* 2008;48:2214-2221.
7. Hawker RJ, Turner VS, Mitchell SG. Use of prostaglandin E1 during preparation of platelet concentrates. *Transfus Med* 1996;6:249-254.
8. Rinder HM, Snyder EL. Activation of platelet concentrate during preparation and storage. *Blood Cells* 1992;18:445-460.
9. Shrivastava M. The platelet storage lesion. *Transfus Apher Sci* 2009;41:105-113.
10. Feinstein MB, Fraser C. Human platelet secretion and aggregation induced by calcium ionophores. Inhibition by PGE1 and dibutyryl cyclic AMP. *J Gen Physiol* 1975;66:561-581.
11. Becker GA, Chalos MK, Tuccelli M, et al. Prostaglandin E 1 in preparation and storage of platelet concentrates. *Science* 1972;175:538-539.
12. Shio H, Ramwell PW. Prostaglandin E 1 in platelet harvesting: an in vitro study. *Science* 1972;175:536-538.

13. Valeri CR, Zaroulis CG, Rogers JC, et al. Prostaglandins in the preparation of blood components. *Science* 1972;175:539-542.
14. Appleman EH, Sachais BS, Patel R, et al. Cryopreservation of canine platelets. *J Vet Intern Med* 2009;23:138-145.
15. Heilmann E, Friese P, Anderson S, et al. Biotinylated platelets: a new approach to the measurement of platelet life span. *Br J Haematol* 1993;85:729-735.
16. Tsuchiya R, Yagura H, Hachiya Y, et al. Aggregability and post-transfusion survival of canine platelets in stored whole blood. *J Vet Med Sci* 2003;65:825-829.
17. Dumont LJ. Analysis and reporting of platelet kinetic studies. *Transfusion* 2006;46:67S-73S.
18. The Biomedical Excellence for Safer Transfusion (BEST) Collaborative. Platelet radiolabeling procedure. *Transfusion* 2006;46:59S-66S.
19. Yeo EL, Gemmell CH, Sutherland DR, et al. Characterization of canine platelet P-selectin (CD 62) and its utility in flow cytometry platelet studies. *Comp Biochem Physiol B* 1993;105:625-636.
20. Wills TB, Wardrop KJ, Meyers KM. Detection of activated platelets in canine blood by use of flow cytometry. *Am J Vet Res* 2006;67:56-63.
21. Allyson K, Abrams-Ogg AC, Johnstone IB. Room temperature storage and cryopreservation of canine platelet concentrates. *Am J Vet Res* 1997;58:1338-1347.
22. Murphy S, Gardner FH. Effect of storage temperature on maintenance of platelet viability--deleterious effect of refrigerated storage. *N Engl J Med* 1969;280:1094-1098.
23. Murphy S. Platelet storage for transfusion. *Semin Hematol* 1985;22:165-177.
24. Carmen R. The selection of plastic materials for blood bags. *Transfus Med Rev* 1993;7:1-10.
25. Dijkstra-Tiekstra MJ, Kuipers W, Setroikromo AC, et al. Platelet capacity of various platelet pooling systems for buffy coat-derived platelet concentrates. *Transfusion* 2008;48:2114-2121.

26. Ezuki S, Kanno T, Ohto H, et al. Survival and recovery of apheresis platelets stored in a polyolefin container with high oxygen permeability. *Vox Sang* 2008;94:292-298.
27. Kilksen H, Holme S, Murphy S. Platelet metabolism during storage of platelet concentrates at 22 degrees C. *Blood* 1984;64:406-414.
28. Mitchell SG, Hawker RJ, Turner VS, et al. Effect of agitation on the quality of platelet concentrates. *Vox Sang* 1994;67:160-165.
29. Welch M, Champion AB. The effect of temperature and mode of agitation on the resuspension of platelets during preparation of platelet concentrates. *Transfusion* 1985;25:283-285.
30. Palavecino EL, Yomtovian RA, Jacobs MR. Bacterial contamination of platelets. *Transfus Apher Sci* 2010;42:71-82.
31. 日本赤十字社. 血液事業年度報 平成 23 年度統計表. 2011.
32. Kuehnert MJ, Roth VR, Haley NR, et al. Transfusion-transmitted bacterial infection in the United States, 1998 through 2000. *Transfusion* 2001;41:1493-1499.
33. Wandt H, Schaefer-Eckart K, Wendelin K, et al. Therapeutic platelet transfusion versus routine prophylactic transfusion in patients with haematological malignancies: an open-label, multicentre, randomised study. *Lancet* 2012;380:1309-1316.
34. Roback JD. Technical manual, 16th ed. Bethesda, Md.: AABB; 2008.
35. Prowse CV, de Korte D, Hess JR, et al. Commercially available blood storage containers. *Vox Sang* 2013.
36. Yuasa T, Ohto H, Yasunaga R, et al. Improved extension of platelet storage in a polyolefin container with higher oxygen permeability. *Br J Haematol* 2004;126:153-159.
37. Holme S, Vaidja K, Murphy S. Platelet storage at 22 degrees C: effect of type of agitation on morphology, viability, and function in vitro. *Blood* 1978;52:425-435.
38. Kunicki TJ, Tuccelli M, Becker GA, et al. A study of variables affecting the quality of

platelets stored at "room temperature". *Transfusion* 1975;15:414-421.

39. Maurer-Spurej E, Chipperfield K. Past and future approaches to assess the quality of platelets for transfusion. *Transfus Med Rev* 2007;21:295-306.

40. Thorneloe C, Bedard C, Boysen S. Evaluation of a hand-held lactate analyzer in dogs. *Can Vet J* 2007;48:283-288.

41. 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* 1998;38:31-40.

42. Padmavathi P, Reddy VD, Maturu P, et al. Smoking-induced alterations in platelet membrane fluidity and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity in chronic cigarette smokers. *J Atheroscler Thromb* 2010;17:619-627.

43. Murphy S. Radiolabeling of PLTs to assess viability: a proposal for a standard. *Transfusion* 2004;44:131-133.

44. van der Meer PF, Tomson B, Brand A. In vivo tracking of transfused platelets for recovery and survival studies: an appraisal of labeling methods. *Transfus Apher Sci* 2010;42:53-61.

45. Guillaumin J, Jandrey KE, Norris JW, et al. Assessment of a dimethyl sulfoxide-stabilized frozen canine platelet concentrate. *Am J Vet Res* 2008;69:1580-1586.

46. Guillaumin J, Jandrey KE, Norris JW, et al. Analysis of a commercial dimethyl-sulfoxide-stabilized frozen canine platelet concentrate by turbidimetric aggregometry. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 2010;20:571-577.

47. Bode AP, Lust RM, Read MS, et al. Correction of the bleeding time with lyophilized platelet infusions in dogs on cardiopulmonary bypass. *Clin Appl Thromb Hemost* 2008;14:38-54.

48. Davidow EB, Brainard B, Martin LG, et al. Use of fresh platelet concentrate or lyophilized platelets in thrombocytopenic dogs with clinical signs of hemorrhage: a preliminary trial in 37

dogs. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 2012;22:116-125.

49. Hoffmeister KM, Felbinger TW, Falet H, et al. The clearance mechanism of chilled blood platelets. *Cell* 2003;112:87-97.

50. Rumjantseva V, Grewal PK, Wandall HH, et al. Dual roles for hepatic lectin receptors in the clearance of chilled platelets. *Nat Med* 2009;15:1273-1280.

51. Rumjantseva V, Hoffmeister KM. Novel and unexpected clearance mechanisms for cold platelets. *Transfus Apher Sci* 2010;42:63-70.

52. Sorensen AL, Rumjantseva V, Nayeb-Hashemi S, et al. Role of sialic acid for platelet life span: exposure of beta-galactose results in the rapid clearance of platelets from the circulation by asialoglycoprotein receptor-expressing liver macrophages and hepatocytes. *Blood* 2009;114:1645-1654.

53. Wandall HH, Hoffmeister KM, Sorensen AL, et al. Galactosylation does not prevent the rapid clearance of long-term, 4 degrees C-stored platelets. *Blood* 2008;111:3249-3256.

54. Pisciotto PT, Snyder EL, Napychank PA, et al. In vitro characteristics of volume-reduced platelet concentrate stored in syringes. *Transfusion* 1991;31:404-408.

55. van der Meer PF, Bontekoe IJ, Kruit G, et al. Volume-reduced platelet concentrates: optimization of production and storage conditions. *Transfusion* 2012;52:819-827.

56. Moroff G, Friedman A, Robkin-Kline L, et al. Reduction of the volume of stored platelet concentrates for use in neonatal patients. *Transfusion* 1984;24:144-146.

57. Simon TL, Sierra ER. Concentration of platelet units into small volumes. *Transfusion* 1984;24:173-175.