

## 洗浄・置換血小板に用いる洗浄置換液 (M-sol) の製造と保存

秋野 光明 平山 順一 田村 暁 内藤 友紀 勝又 雅子  
本間 稚広 藤原 満博 東 寛 加藤 俊明 池田 久實

洗浄・置換血小板 (W/R-PC) は血小板製剤による輸血副作用を防止する目的で調製されている。我々は血小板製剤の洗浄および置換には臨床使用が認められた輸液および電解質溶液を混和させることで製造される洗浄置換液 (M-sol) を用いている。M-sol の製造はクリーンルームにて用時行っているが、本研究では以下の二点を中心に製造方法の改良を行った。1) 除菌フィルター付バッグを使用することで、クリーンルーム外での製造を可能とした。2) 調製した M-sol はアルミ蒸着袋に真空保存することで、pH を一定に保つことが可能となり最短でも 1 年間の保存が可能であった。さらに我々は W/R-PC 1 バッグ分の M-sol を製造する方法 (単品式) と一度に多量の M-sol を製造する方法 (多量式) を考案し、両法による M-sol に差がないことを確認した。真空包装した M-sol は 30°C で 1 年間保存しても pH に変化はなかった。さらに、製造直後の M-sol と長期保存した M-sol により調製された置換 PC (R-PC) には血小板機能に差はみられなかった。また、長距離輸送した M-sol を用いて調製した洗浄 PC (W-PC) についても、血小板への影響はみられなかった。改良された方法では M-sol の製造時間に制限されずに W/R-PC の調製が可能となるであろう。

キーワード：洗浄・置換血小板, M-sol の保存, 真空包装, アルミ蒸着袋

### はじめに

血小板製剤 (PC : Platelet concentrates) による輸血副作用の多くが蕁麻疹, 搔痒感, アナフィラキシーショック等の非溶血性輸血副作用である。このような非溶血性輸血副作用の原因は, PC 中に含まれる血漿蛋白成分や炎症性サイトカインに起因するものと考えられており, 血漿成分をできるだけ除去することで, そのような副作用の発生を減少させることが可能とされている<sup>1)~4)</sup>。また, ABO 不適合 HLA 適合 PC における抗 A 抗 B 抗体価が高力価の場合に, 抗 A 抗 B 抗体除去を目的として W/R-PC を調製するケースも少なくはない<sup>1)</sup>。

当施設では, PC による非溶血性輸血副作用の防止や抗 A 抗 B 抗体価が高力価の HLA 適合 PC に対して, 医療機関への技術協力として, 洗浄・置換血小板 (W/R-PC : Washed/Replaced-platelet concentrates) の調製を続けてきた。

W/R-PC の調製に用いる洗浄置換液としては, PAS-II や PAS-IIIM, セト液など数種類の溶液が報告<sup>4)~9)</sup>されている。近年, わが国において, 血小板機能をより長時間維持することが可能な洗浄置換液 (M-sol) が開発された<sup>10)</sup>。M-sol は, 酢酸リンゲル液, 炭酸水素ナトリウム液, 硫酸マグネシウム液, ACD-A 液といった現

在市販されている輸液や電解質溶液のみで製造することが可能であり, 国内で広く使用されているブドウ糖加酢酸リンゲル液を主液とした洗浄置換液に比べて血小板の保存性能に優れている<sup>11)12)</sup>。わが国では W/R-PC に関する明確な指針がなく, 使用する洗浄置換液も各施設によって異なっているのが現状である。

我々は, M-sol の製造をクリーンルーム内で行っているが, 輸血用血液製剤の製造工程に除菌フィルター付バッグの使用が承認されたことに伴い, それを用いてクリーンルームの外で M-sol を製造する方法を考案した。この方法により, W/R-PC の調製本数に応じて, 用時 1 バッグずつ製造している M-sol を, 置換 PC (R-PC : replaced-platelet concentrates) 用で 12 バッグまたは洗浄 PC (W-PC : washed-platelet concentrates) 用で 6 バッグ分を一度に製造することが可能となる。

本報では, M-sol の製造法や保存法を紹介すると共に, M-sol の長期保存試験結果および長期保存した M-sol によって調製された W/R-PC の血小板機能などを調べたので報告する。

Table 1 Reagents and materials for M-sol preparation

Reagents and materials	Product name (catalog No.)	Manufacturer	Volume/ bottle	Quantity for preparation method	
				Single	Multiple
Reagent					
Acetate Ringer's solution	Solacet F (TP-A05SAF)	Terumo Corporation	500ml	1	6
7% sodium bicarbonate solution	Meylon 7% (3783)	Otsuka Pharmaceutical Co., LTD	250ml	1	1
0.5 M MgSO <sub>4</sub> solution	Magnesium sulfate 20 mEq syringe (or Corrective use magnesium sulfate)	Terumo Corporation (or Otsuka Pharmaceutical Co., LTD)	20ml	1	1
Distilled water	Otsuka distilled water (2065)	Otsuka Pharmaceutical Co., LTD	500ml	1	1
ACD-A solution	Karmipack ACD-A (ACD-A300)	Kawasumi Laboratories, INC.	300ml	1	2
Material					
Blood separation bag set KBP-66DC	Kawasumi bag set (KBP-66DC)	Kawasumi Laboratories, INC.	—	1	1*
Blood bag spike connector	Blood bag spike connector (TC-MP)	Terumo Corporation	—	1	1
Bacteria barrier filter integrated bag	Kawasumi bag set (KBP-1000F)	Kawasumi Laboratories, INC.	—	1	6
Blood separation bag set KBP-300C	Kawasumi bag set (KBP-300C)	Kawasumi Laboratories, INC.	—	1	—
Total parenteral nutrition bag set	Kawasumi total parenteral nutrition bag set (H-1000)	Kawasumi Laboratories, INC.	—	—	1

M-sols were vacuum-packed in aluminum packages, and preserved for one year.

\*For preparation of replaced-platelet concentrates, seven bag sets are necessary.

## 方 法

### 1. M-sol の製造法

M-sol の製造に用いる原料・資材および各々使用する数量を示した (Table 1). 用いた部材は現在のところ全て市販されている<sup>11)</sup>.

M-sol の製造法として, W/R-PC の調製数に応じて 1 バッグずつ製造する方法 (単品式) と R-PC 用で 12 バッグ (W-PC 用で 6 バッグ) 分を調製するのに必要な M-sol を一度にまとめて製造する方法 (多量式) を示す (Fig. 1).

1-1. 単品式 (W/R-PC1 バッグを調製するのに必要な M-sol を製造する方法)

注射用水に血液分離バッグ KBP-66DC のプラスチック針を刺し, 460ml の注射用水を分取した. それに操作アダプター TC-MP を接続し, 0.5M 硫酸マグネシウム液 20ml を加え, 硫酸マグネシウム希釈液を調製した (A 液). 血液分離バッグ KBP-300C のプラスチック針を ACD-A 液に刺し, 85ml の ACD-A 液を分取した. それに 7% 炭酸水素ナトリウム液 35ml を加えた (B 液). B 液が入っている血液分離バッグのプラスチック針を A 液へ刺し替え, A 液 50ml を B 液に加えた (A+B 液). A+B 液が入っている血液分離バッグのプラスチック針を酢酸リンゲル液へ刺し替え, A+B 液の全量と酢酸リンゲル液 (500ml) を混合した. その混合液を除菌フィルター付バッグ KBP-1000F に接続し, 除菌フィルターを通じて, 付属の分離バッグに回収することで, 単品式製造法由来の M-sol (単 M-sol) を製造した.

1-2. 多量式 (W-PC6 バッグまたは R-PC 12 バッグを調製するのに必要な M-sol を一度に製造する方法)

単品式の調製法に従い A 液 (硫酸マグネシウム希釈液) を調製した. B 液は, 高カロリー輸液セット H-1000 に付属の 3 本の採液チューブのうち 2 本に ACD-A 液 (300ml) を 2 バッグ, 残りの 1 本に 7% 炭酸水素ナトリウム液 (250ml) を接続し, 各々の溶液の全量を混合して調製した. B 液が入っている高カロリー輸液セットと A 液を接続し, A 液 355ml を B 液に加えた (A+B 液). 酢酸リンゲル液 (500ml) に A+B 液 170ml を混合したものを 6 本調製し, それぞれに除菌フィルター付バッグ KBP-1000F を接続して, 除菌フィルターで濾過滅菌した. 濾過後は, それぞれに付属の分離バッグへ溶液を回収し, 多量式製造法由来の M-sol (多 M-sol) とした.

W/R-PC の調製法<sup>13)</sup>が洗浄法の場合は, このまま 6 バッグとし, 置換法の場合には, 多 M-sol を 300ml ずつ, 無菌チューブ接合装置 T-SCD (テルモ社) で接続した血液分離バッグへ小分けし, 12 バッグの多 M-sol を製造した.

### 2. M-sol の真空包装保存法

単品式または多量式で製造された M-sol を保存する場合は, 血液分離バッグに移し, バッグ中のエアを除去した後, そのバッグを気体遮断性が高いアルミ蒸着袋 (ラミジップ AL-J, 生産日本社) に入れた (Fig. 2a). 次に, アルミ蒸着袋内の空気を卓上密封包装機 (SQ-303W, 旭化成パックス, 吸気圧: -66Kpa) を用いて真空状態にした後, ヒートシーラーで密封した (Fig. 2b).

### 3. M-sol の性状および R-PC の血小板機能等の測定

W/R-PC の調製は置換法<sup>13)</sup>で行った. 採血 2 日目の成分採血由来 PC を遠心 (2,560×g, 10min, 22℃) し,

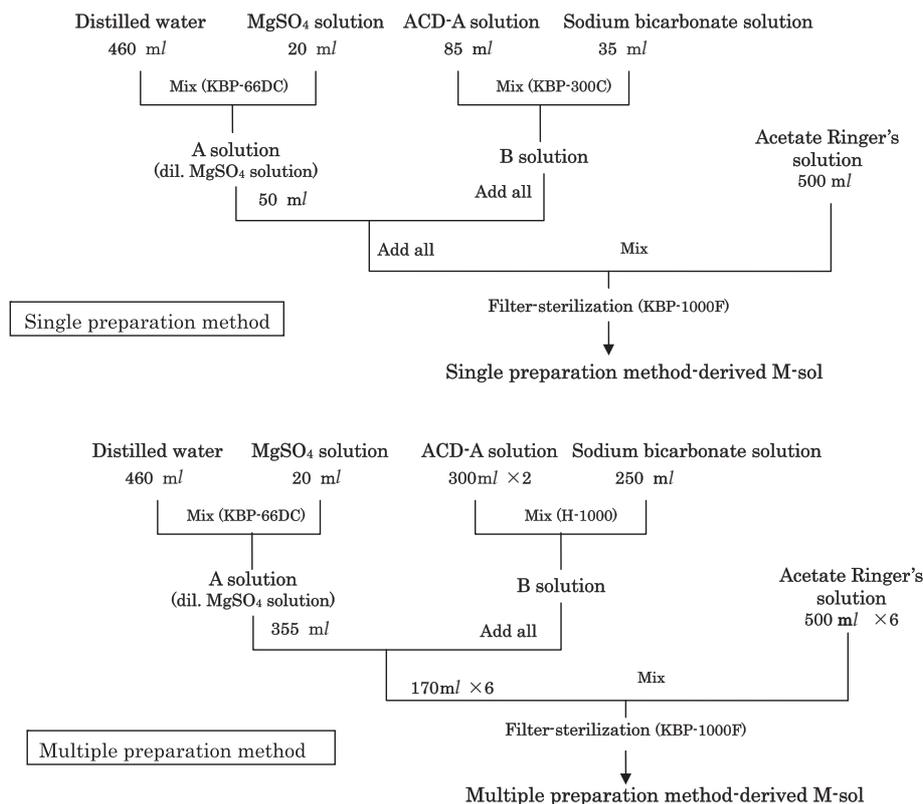


Fig. 1 Preparation of Single and Multiple M-sol

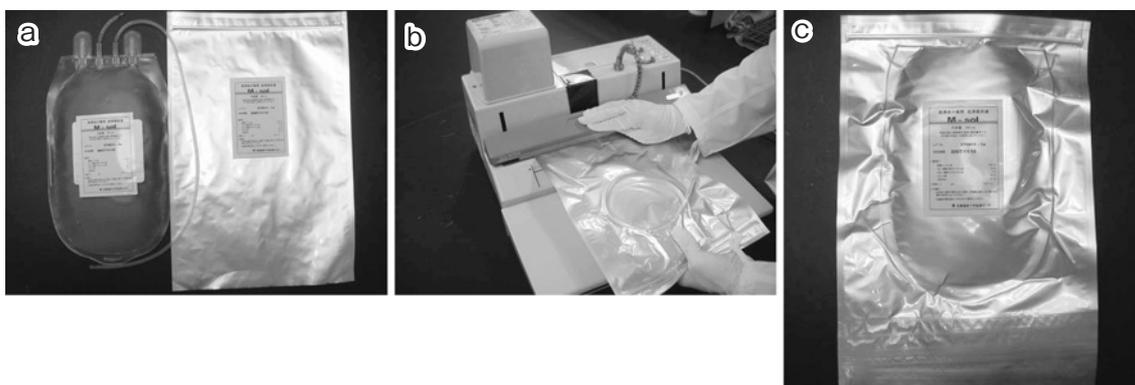


Fig. 2 Preservation of M-sol a) Filter-sterilized M-sol and aluminum package. b) Packaging with vacuum sealing machine. c) Vacuum packed M-sol.

上清をできるだけ除去した後、M-sol を 220ml 添加した。30 分間静置した後、血小板を再浮遊させ R-PC とした。

M-sol および R-PC 中の pH は血液ガス分析装置 (SIEMENS 248 pH/bood gas analyzer) で測定した。また、M-sol に含まれる Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> イオン濃度を電解質測定装置 (SIEMENS 644 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> analyzer), Mg<sup>2+</sup> イオン濃度をキシリジルブルー法 (マグネシウム B-テストワコー, 和光純薬) で各々測定した。

R-PC はポリオレフィン製の血液分離バッグ (KBP-1000FPN, 川澄化学工業株式会社) にて調製後 120 時間 (PC 採血後 7 日間) 水平振盪保存し、保存 24, 48, 120 時間目に血小板機能検査などを実施した。血小板数、

平均血小板容積 (MPV) は自動血球分析装置 (Sysmex K-4500), 凝集能は測定サンプルを AB 型血漿にて血小板濃度  $3.5 \times 10^5 / \mu l$  に調製 (調製 PRP) し, CaCl<sub>2</sub> (最終濃度 3mM) 存在下, Collagen (最終濃度 10 $\mu$ g/ml) を加えたときの最大凝集率を血小板凝集能測定装置 (MCM HEMA TRACER 313M) を用いて測定した。浸透圧ショック回復率 (%HSR) は調製 PRP に 1/3 容量の蒸留水を加え, 分光光度計 (Hitachi U-2000) で 610 nm の透過度の変化を計測した。P-セレクチン陽性率は, Hagberg らの方法<sup>14)</sup>に従い, 血小板を PE 標識抗 CD62P 抗体および FITC 標識抗 CD61 抗体 (いずれも Becton Dickinson) で染色し, フローサイトメーター (BD LSR)

Table 2 In vitro variables of single-use and multiple-use M-sols

	Single-use	Multiple-use
pH	6.8 ± 0.1 (6.7~7.1)	6.8 ± 0.1 (6.8~7.0)
Na <sup>+</sup> (mmol/l)	150.0 ± 2.4 (144~156)	152.3 ± 1.0 (151~155)
K <sup>+</sup> (mmol/l)	2.7 ± 0.1 (2.5~2.7)	2.7 ± 0.1 (2.7~2.8)
Cl <sup>-</sup> (mmol/l)	80.5 ± 1.6 (76~83)	81.4 ± 1.2 (78~83)
Mg <sup>2+</sup> (mmol/l)	1.6 ± 0.1 (1.5~1.9)	1.6 ± 0.03 (1.5~1.6)

n=30, mean ± SD (MIN ~ MAX)

により測定した。グルコースの濃度をグルコース CII テストワコー (和光純薬株式会社), 乳酸の濃度はデタミナル LA (協和メデックス株式会社) を用いて算出した。乳酸脱水素酵素 (LDH) 量の測定は, LDH カイノス (カイノス) を用い, 乳酸を基質とした比色法で定量した。無菌試験は, オクソイドシグナル血液培養システム (Oxoid) を用いて実施した。

#### 4. 施設間を移動させた M-sol の性能評価

400ml 全血採血由来バフィーコート を 8 バッグプールし, 同型の血漿を加え, 遠心後の上清を PC とした。PC を二等分し, 室温下で 48 時間振盪保存した後, 一方は施設間を移動させた M-sol を用いて W-PC を調製 (Test-W-PC) し, もう一方の PC は, 移動させずに静置保存された M-sol で W-PC を調製 (対照-W-PC) した。W-PC は, PC に 1/10 容量の抗凝固剤 ACD-A 液と M-sol 250ml 添加し, それを遠心して上清をできるだけ除去した後, 再び M-sol を 220ml 添加して調製した。施設間の M-sol の移動は, 血液輸送用容器 (SS-BOX-120, ティーピーパック) に真空包装の状態の多 M-sol を入れ, 製造施設から約 700km (鉄道を利用し 8 時間) を輸送した。W-PC については, 原材料 PC からの血小板回収率を算出し, また含有蛋白量をビシンコニン酸法 (BCA Protein Assay kit, PIERCE) で測定して血漿除去率を求めた。調製直後には外観試験として, 凝集塊の有無の確認およびスワーリング検査 (適・否) を実施した。W-PC 調製後 24, 48 時間 (PC 調製後 72, 96 時間) に P-セレクチン陽性率を測定した。

#### 5. 統計

製造法の違いによる M-sol の性状比較および施設間を移動させた M-sol の性能評価に関する検定には Wilcoxon-t 検定を用い, M-sol の保存温度および長期保存における pH の影響については Friedman 検定と Bonferroni 補正 Wilcoxon-t 検定を用いた。いずれも危険率 1% 未満を有意差ありと判定した。なお, 統計処理には Microsoft Excel<sup>®</sup>2003 上で統計演算プログラム ystat2006 を用いた。

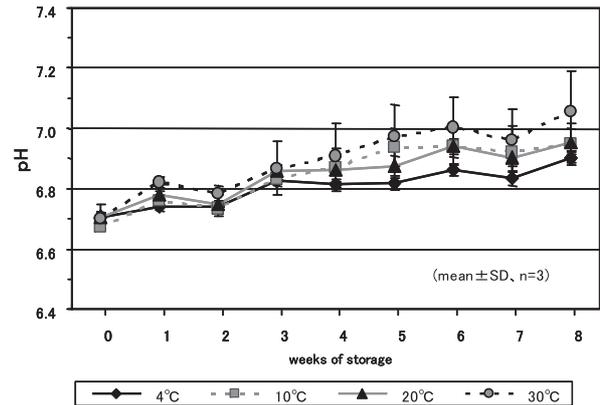


Fig. 3 pH changes in vacuum packed M-sols under various preservation temperatures

## 結 果

### 1. M-sol 製造法の違いとその性状

単品式で製造された単 M-sol および多量式で製造された多 M-sol の製造直後の性状を Table 2 に示した。両群には何れの測定項目についても有意差は認められなかった (n=30)。各法による M-sol に差がなかったことから, 保存方法の検討には多 M-sol のみを使用した。

### 2. M-sol の保存温度の影響

保存温度の影響を検討するため, 真空包装した多 M-sol を 4 群に分け, それぞれ 4°C, 10°C, 20°C, 30°C の各環境下で 8 週間静置保存して, 1 週間毎にサンプリングし pH を測定した (Fig. 3)。製造直後に  $6.70 \pm 0.02$  であった M-sol の pH は, 4°C, 10°C, 20°C, 30°C に 8 週間保存後に, それぞれ  $6.90 \pm 0.02$ ,  $6.95 \pm 0.06$ ,  $6.95 \pm 0.04$ ,  $7.06 \pm 0.14$  に上昇した。しかし, 各々の温度に保管された M-sol の pH には差が認められなかった。

### 3. M-sol の真空包装長期保存の影響

M-sol の長期保存の影響を調べるため, 多 M-sol を 2 群に分け, 一方を真空包装群, もう一方は真空包装せずに常圧下で保存した群 (非包装群) とし, 両群を 30°C で 1 年間保存して M-sol 中の pH 変化を調べた (Fig. 4)。非包装群では保存と共に急激な pH 上昇がみられ, 製造の翌々日には pH が製造直後から約 0.8 上昇したのに対し, 真空包装群では, 製造直後に比べて 2 カ月後に 0.05, 1 年後で 0.10 と pH の上昇が極めて軽微であった (n=5)。1 年間保存した M-sol には, 沈殿や白濁などの外観異常はみられなかった。また, 試験に使用した M-sol については, 1 年間保存後に無菌試験を実施したが, 結果は全て陰性であった。

### 4. 1 年真空包装保存の M-sol で調製された R-PC の血小板機能

ABO 型が同型な成分採血由来 PC (採血後 2 日目) を 2 本プールし, 15 単位に相当する血小板を含むように

等分割して、一方は試験用 PC として 1 年保存後の真空包装群の M-sol を用い、もう一方はコントロール群として、製造直後の保存していない M-sol を用いて、それぞれ R-PC を調製した (Table 3)。製造直後の M-sol 群と 1 年間真空包装した M-sol 群との間には、今回実施した血小板機能等の試験項目において差はみられなかった (n=5)。

**5. 施設間を移動させた M-sol で製造された W-PC の性状**

長時間陸送された多 M-sol を用いて製造された W-

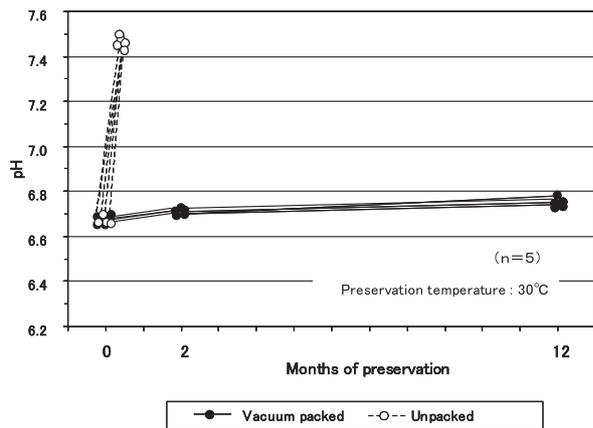


Fig. 4 pH changes in M-sols during preservation for one year

PC の性状を調べた (Table 4)。Test- W-PC と対照- W-PC の血小板回収率は、それぞれ  $89.1 \pm 0.8\%$ ,  $89.3 \pm 0.3\%$  であり、血漿蛋白除去率はそれぞれ  $96.9 \pm 1.2\%$ ,  $96.5 \pm 1.5\%$  と有意差は認められなかった (n=6)。何れの W-PC にも凝集塊は確認されず、スワーリングは全て良好であった。P-セレクチン陽性率については、両群間で有意差は認められず、48 時間保存 (PC 調製後 96 時間) 後も調製前の値が維持されていた。

**考 察**

W/R-PC は血小板製剤の非溶血性輸血副作用を防止する目的で用いられており、その効果については幾つか報告<sup>1)~4)</sup>されている。また、HLA 適合 PC の輸血患者で、適合ドナー数が少ないため ABO 型不適合の PC を使用せざるを得ない場合にも、抗 A 抗 B 抗体の影響を回避する一手段として W/R-PC の有用性が高いと考えられている<sup>4)</sup>。

当施設では 2004 年から医療機関への技術協力として、W/R-PC を調製しており、2005 年 3 月からは洗浄置換液をそれまでのブドウ糖加酢酸リンゲル液を主とした液 (G-sol) から M-sol へと変更した。M-sol は抗凝固作用を有するクエン酸、緩衝作用を有するリン酸イオン、血小板での ATP 産生に重要な TCA サイクルの基質であるアセチル CoA を産生する酢酸イオン、乳酸を二酸化炭素と水に変換し、pH の低下を抑制する重炭酸イオ

Table 3 In vitro qualities of R-PC prepared by fresh M-sol and stored M-sol

	M-sols	Storage period of R-PC*		
		24 hrs	48 hrs	120 hrs
Total PLT count ( $\times 10^{11}$ /bag)	Fresh <sup>†</sup>	$3.1 \pm 0.8$	NT	NT
	Stored <sup>‡</sup>	$3.1 \pm 0.8$	NT	NT
MPV (fl)	Fresh	$7.8 \pm 0.6$	$7.9 \pm 0.7$	$8.1 \pm 0.3$
	Stored	$7.8 \pm 0.5$	$7.8 \pm 0.5$	$8.1 \pm 0.3$
pH	Fresh	$7.58 \pm 0.06$	$7.65 \pm 0.06$	$7.67 \pm 0.03$
	Stored	$7.61 \pm 0.05$	$7.65 \pm 0.05$	$7.68 \pm 0.03$
P-selectin (%)	Fresh	$2.6 \pm 2.0$	$1.6 \pm 1.4$	$3.9 \pm 1.3$
	Stored	$2.7 \pm 2.5$	$1.5 \pm 1.5$	$3.7 \pm 1.6$
Aggregation (%) 10 $\mu$ g/ml collagen	Fresh	$79.0 \pm 1.4$	$88.5 \pm 6.4$	$84.0 \pm 5.2$
	Stored	$82.0 \pm 0.0$	$88.0 \pm 8.5$	$85.7 \pm 6.4$
%HSR (%)	Fresh	$71.7 \pm 4.5$	$72.1 \pm 6.4$	$73.9 \pm 3.8$
	Stored	$70.4 \pm 7.1$	$72.1 \pm 3.7$	$74.1 \pm 5.8$
Glucose (mmol/ $10^{12}$ plts)	Fresh	$10.3 \pm 2.7$	$9.9 \pm 2.5$	$7.0 \pm 2.2$
	Stored	$10.9 \pm 2.7$	$10.1 \pm 2.5$	$7.4 \pm 2.1$
Lactate (mmol/ $10^{12}$ plts)	Fresh	$2.1 \pm 0.4$	$3.4 \pm 1.0$	$6.2 \pm 0.9$
	Stored	$2.0 \pm 0.5$	$3.3 \pm 0.9$	$6.4 \pm 0.9$
LDH (IU/l)	Fresh	$64.8 \pm 27.7$	$83.0 \pm 24.6$	$119.1 \pm 32.1$
	Stored	$58.8 \pm 20.9$	$81.8 \pm 27.4$	$122.0 \pm 35.8$

n=5, (mean  $\pm$  SD)

PLT: platelets, %HSR: hypotonic shock response, LDH: lactate dehydrogenase

NT=not tested.

\* Apheresis-derived PCs were stored for 48 hrs after collection and then replaced.

<sup>†</sup> Fresh: Used during the day of preparation without preservation.

<sup>‡</sup> Stored: Preserved for one year before usage.

Table 4 In vitro variables of W-PC prepared with transported M-sol

	Test-W-PC	Control-W-PC
Volume of W-PC (ml)	228.5 ± 6.7	233.4 ± 7.8
Total PLT count (×10 <sup>11</sup> /bag)	2.06 ± 0.17	2.10 ± 0.19
Recovery (%)	89.1 ± 0.8	89.3 ± 0.3
Total protein (mg/bag)	387.0 ± 145.1	466.7 ± 237.6
Removal (%)	96.9 ± 1.2	96.5 ± 1.5
Aggregation	negative	negative
Swirling	positive	positive
P-selectin (%)		
Right after washing and replacement*	2.3 ± 0.6	1.6 ± 0.3
24 hrs storage	1.8 ± 0.2	1.7 ± 0.4
48 hrs storage	2.1 ± 0.2	1.6 ± 0.3

n=6, (mean ± SD)

\* Apheresis-derived PCs were stored for 48 hrs after collection and then washed.

ン、血小板の活性化を抑制するマグネシウムやカリウムを組成とした洗浄置換液である。M-sol で調製された W/R-PC は、血小板機能を長時間維持することができ、また輸血副作用の抑制効果や輸血効果 (CCI) が良好であることが平山ら<sup>10,11)</sup>や東ら<sup>15)</sup>によって報告されている。

我々はクリーンルーム内で M-sol の製造を開始したが、血液センターにおける冷凍赤血球及び解凍赤血球の製造工程で除菌フィルター付バッグ (KBP-1000F) を使用することが可能になったのを機に、クリーンルームを使用せず、清浄度管理を要しない場所でも M-sol を製造できるような製造法を考案した。M-sol の製造には、Table 1 に示したように、現在市販されている輸液製剤や輸血用血液の製造工程などで使用されている資材を用いている。クリーンルームで M-sol を製造するには、原料資材の他に、無塵衣や資材の滅菌、消毒薬などの準備、さらに無菌環境の構造設備を維持する必要がある。本報の KBP-1000F を用いた M-sol の製造では、クリーンルームが不要であるため、製造にかかるコストは使用する原料資材のみであり、クリーンルーム法に比べて M-sol の製造費用が単品式では約 1/2、多量式を用いた製造では 1/3 以下に削減することができた。単品式の製造はクリーンルームへの入室を除いても、製造前の準備に時間がかかり、また用時調製のため M-sol の製造本数の増加に伴い製造に要する時間も長くなるため、緊急時の要請に対応することが難しいといった問題もあった。しかし、M-sol の調製を多量式で行うことにより、同じ時間 (約 1.5 時間) で、R-PC 12 バッグ (W-PC 6 バッグ) 分を調製するのに必要な M-sol を一度に製造することが可能になった。M-sol の製造時間が大幅に短縮することは、W/R-PC 調製に関わる作業効率向上と考える。

製造法が簡便になるものの、今後さらに W/R-PC

の需要が高まった場合には、洗浄置換液を長期間保存することが求められる。M-sol は、大量の炭酸水素ナトリウムを含むため、常圧の条件下では炭酸ガスの発生に伴い pH が上昇しやすいが、平山ら<sup>11)</sup>はガス透過性の低い包装袋を用いて真空包装を行えば pH を上昇させることなく M-sol を 4℃ で 3 カ月間、凍結保存で 70 日間保存可能であることを明らかにしている。今回我々は、多 M-sol を 20℃ または 30℃ の過酷条件下で 1 年間真空包装保存して、M-sol の pH の変化を調べた。M-sol を真空包装保存する際の温度に関しては、4~30℃ の温度帯では溶液中の pH に差がないことを確認した (Fig. 3)。今回検討した結果では、製造直後の M-sol に比べ、保存と共に pH が 0.4 程度上昇したが、これは pH を測定するために、包装袋の開封と再包装を頻回に繰り返し行ったことが測定値に影響を与えたと考えられる。30℃ に保存した場合であっても、8 週間の保存期間中に一度もサンプリングを行わなかったケースについては、pH は軽度な上昇 (0.1 未満) にとどまった (Fig. 4)。このことから、使用する分だけを予め小分けし真空包装して保存することは有用であり、また、開封後は速やかに使用することが実際に使用する上での注意事項として重要であると考えた。Fig. 3 に示したように M-sol は低温保存も可能であるが、実際に使用する際には、血小板への影響を防ぐため、液中の温度を 20℃ 前後に戻す必要がある。そのため、実際の使用を想定すると血小板の貯蔵温度に近い、常温帯で M-sol を保存する方が、より利便性が高いと考える。長期保存された M-sol の安定性については、真空包装された多 M-sol の一年後の pH の変動は製造直後に比べ軽微であり、M-sol の主要な成分であるカリウム、マグネシウムについても、1 年間の保存中に変化がみられず (データ示さず)、沈殿物の形成や色調異常などの外観上の異常も全く認められなかった。さらに、30℃ に 1 年間保存した M-sol を用いて R-PC を調製し、その血小板機能などを測定したが、製造直後の M-sol を用いた R-PC と比較し、両群には有意差は認められなかった (Table 3)。これらのことから、M-sol は少なくとも 1 年間の長期真空包装保存が可能であるといえる。

現在、我々は M-sol を自家調製し、自施設のみで使用している。今後、他施設で使用する場合や将来的に試薬製造業者等からの供給が可能となる場合を考慮し、輸送による影響を調べた。約 8 時間陸送された M-sol により製造された W-PC を 48 時間 (PC 調製後 96 時間) 保存したときの P-セレクチン陽性率は、平均 2% と血小板の活性化が認められず、血小板機能が良好に保たれていた。

現在、血液センターでは製造施設の集約化が進められているが、W/R-PC の洗浄置換液を多量に製造し、

かつ長期保存が可能になれば、緊急時への対応も可能になる。今回考案した M-sol の製造法は、W/R-PC の調製本数に応じて単品式と多量式を使い分けることができるため、製造の効率化が期待できる。さらに、炭酸水素ナトリウムを含む組成であるが、真空包装された状態であれば製造後 1 年間は pH の変動が軽微である。このように M-sol の長期保存が可能であることが確認されたことから、今後の製造施設の集約化や緊急時に対応するための洗浄置換液として、M-sol が有用であると考える。

## まとめ

W/R-PC の洗浄置換液 M-sol の製造方法と保存方法について検討した。多量式では置換 PC 12 バッグ分の M-sol を製造することが可能であり、また製造後 1 年間室温で保存しても性状に変化がないことを確認した。洗浄置換液をあらかじめ製造しておくことは W/R-PC の調製を容易にし、緊急時への対応が可能になると考える。

## 文献

- 1) 麻田真由美, 菅野知恵美, 川本佳代, 他: 洗浄血小板による輸血副作用の防止. 日本輸血学会誌, 48: 32—36, 2002.
- 2) 麻田真由美, 芦田隆司, 金光 靖, 他: 近畿大学附属病院における輸血に伴う非溶血性副作用. 日本輸血細胞治療学会誌, 53: 24—27, 2007.
- 3) Vo TD, Cowles J, Heal JM, et al: Platelet washing to prevent recurrent febrile reactions to leucocyte-reduced transfusions. *Transfus Med*, 11: 45—47, 2001.
- 4) 吉田久博, 万木紀美子, 伊藤和彦: 血小板保存液“セト液”の臨床使用. 日本輸血学会誌, 40: 589—592, 1994.
- 5) Van der Merr PF, Pietersz RNI, Reesink HW: Comparison of two platelet additive solutions. *Transfus Med*, 11: 193—197, 2001.
- 6) Jurgen R, Fruke A, Robert Z, et al: Washing platelets with new additive solutions: aspects on the in vitro quality after 48 hours of storage. *Transfusion*, 46: 237—243, 2006.
- 7) Hans G: Defining the optimal storage conditions for the long-term storage of platelets. *Transfus Med Reviews*, 17: 209—215, 2003.
- 8) Shimizu T, Shibata K, Kora S: Plasma-depleted platelet concentrates prepared with a new washing solution. *Vox Sang*, 64: 19—23, 1993.
- 9) Yuasa T, Ohto H, Suzuki A, et al: New plasma-reduced synthetic media, Fukushima cocktails, for the storage of platelets for transfusion. *Transfus Sci*, 23: 37—46, 2000.
- 10) Hirayama J, Azuma H, Fujihara M, et al: Storage of platelets in a novel additive solution (M-sol), Which is prepared by mixing solutions approved for clinical use that are not especially for platelet storage. *Transfusion*, 47: 960—965, 2007.
- 11) 平山順一, 東 寛, 藤原満博, 他: 市販輸液製剤の混合物である新たな洗浄置換液 (M-sol) による血小板の保存. 日本輸血細胞治療学会誌, 54: 17—22, 2008.
- 12) 平山順一, 東 寛, 藤原満博, 他: M-sol による洗浄置換血小板に関する研究. 血液事業, 31: 443—448, 2009.
- 13) 秋野光明, 田村 暁, 平山順一, 他: 二種類の洗浄・置換血小板の調製法に関する検討. 日本輸血細胞治療学会誌, 55: 698—704, 2009.
- 14) Hagberg IA, Lyberg T: Blood platelet activation evaluated by flow cytometry: optimized methods for clinical studies. *Platelets*, 11: 137—150, 2000.
- 15) Azuma H, Hirayama J, Akino M, et al: Reduction in adverse reactions to platelets by the removal of plasma supernatant and resuspension in a new additive solution (M-sol). *Transfusion*, 49: 214—218, 2009.

## PREPARATION AND PRESERVATION OF M-sol, A NOVEL ADDITIVE SOLUTION FOR WASHING AND REPLACEMENT OF PLATELET CONCENTRATES

*Mitsuaki Akino, Junichi Hirayama, Satoru Tamura, Yuki Naito, Masako Katsumata, Chihiro Homma, Mitsuhiro Fujihara, Hiroshi Azuma, Toshiaki Kato and Hisami Ikeda*

Hokkaido Red Cross Blood Center

### **Abstract:**

Washed/replaced-platelet concentrates (W/R-PC) are effective in avoiding adverse transfusion-reactions caused by plasma-containing platelets. For washing and replacement of plasma from platelet concentrates, we use M-sol, an additive solution prepared by mixing several solutions approved for clinical use. M-sols are prepared on-demand in a bio-clean room, which is not convenient for preparing W/R-PC. We have modified the method for preparing M-sols with regard to the following two points. 1) The bacteria barrier filter-integrated bag can be effectively used to avoid the use of a bio-clean room. 2) The pH of M-sols can be stabilized by vacuum-packing M-sol bags with aluminum packages, which allows preservation for at least one year. In addition, no differences were observed between M-sol preparations for single use and multiple use. There was no change in pH during storage for one year at 30°C with vacuum-packed M-sol. No significant difference was observed in the quality of replaced-platelet concentrates (R-PC) between freshly prepared and stored M-sols. Use of M-sols transported from a distant place did not affect the quality of washed-platelet concentrates (W-PC). W/R-PC can be readily prepared using M-sols prepared by this modified method.

### **Keywords:**

Washed/replaced-platelet concentrates, M-sol preservation, Vacuum-packing, Aluminum package