

## M-sol で調製した洗浄血小板の 72 時間静置保存

平山 順一<sup>1)</sup> 藤原 満博<sup>1)</sup> 秋野 光明<sup>1)</sup> 本間 稚広<sup>1)</sup> 加藤 俊明<sup>1)</sup>  
東 寛<sup>2)</sup> 池田 久實<sup>1)</sup>

血小板製剤の機能をより良く維持するためには、振とうしながら保存することが重要であるとされている。しかし輸送中は振とうが中断される。また振とう器を保有しない医療機関の場合、患者の容態変化などにより輸血開始時間が大幅に遅れると、静置時間が長時間に及ぶ可能性も考えられる。本研究では洗浄血小板の振とうを 72 時間中断した場合の血小板機能への影響について検討した。

M-sol を用いて洗浄血小板を調製し、翌日 (Day 1) まで振とう保存した。Day 1 で 2 分割 (コントロール群およびテスト群、それぞれ 5 単位相当) した後、Day 4 までコントロール群は引き続き振とう保存し、テスト群は静置保存した。保存には 600ml 用ポリオレフィン製バッグを使用した。

静置終了後 (Day 4) での両群の性状を比較すると、MPV、%Disc、CD62P、凝集能、%HSR では有意差がなかった。pH では有意差が見られたがその差は大きくなかった。乳酸値はテスト群で有意に高値を示した。

以上の結果から、M-sol で調製した洗浄血小板を本検討で行われた条件で静置した場合、72 時間までならば血小板機能に重大な影響を及ぼすことはないと考えられる。

キーワード：M-sol、振とう中断、洗浄血小板

### 緒 言

血小板製剤 (PC) の機能をより良く維持するためには、振とうしながら保存することが重要であるとされている。振とうすることにより保存バッグ内のガス交換が促進される。その結果、保存中の pH レベルは維持され、血小板機能の低下が抑制される<sup>1)~5)</sup>。

近年わが国では血液センターの集約化が進行中であり、血液製剤の輸送時間は延長することが予想される。輸送中は振とうが中断されるため、血小板機能の低下が危惧される。輸送を想定した血小板製剤の静置保存に関しては現在までいくつかの施設で検討されてきた<sup>6)~10)</sup>。最近われわれは製品輸送容器 EBAG 中で洗浄血小板を 24 時間静置保存した場合の血小板機能への影響について検討を行い、24 時間静置が血小板機能に与える影響は大きくないことを明らかにした<sup>11)</sup>。しかし振とうが中断されるのは輸送時のみとは限らない。医療機関の中には振とう器を保有しないところもあり、患者の容態変化などにより輸血開始時間が大幅に遅れると静置時間が長時間に及ぶ可能性も考えられるが、24 時間以上の静置保存について検討した例はまれである。本研究では、振とうを 72 時間中断しても M-sol<sup>12)~14)</sup>で

調製した洗浄血小板の性状を維持できる条件が存在するか否かについて検討を行った。

### 方 法

#### 洗浄血小板の調製と保存

日本赤十字社のマニュアルに従い輸血用に調製され期限切れになった PC (採血後 4~5 日経過) を遠心 (2,560g, 10 分) 後、上清を出来るだけ除去し、M-sol を添加した (最終容量：約 200ml)。M-sol の調製は既報のとおり行った<sup>12)~14)</sup>。調製した洗浄血小板は翌日 (Day 1) まで振とう保存し (50~60 回/分)、Day 1 で 2 分割 (コントロール群およびテスト群) した後、Day 4 までコントロール群は引き続き振とう保存し、テスト群は静置保存した (72 時間)。静置は、実験台に置いた振とう器のトレイの上に血小板の入ったバッグを横たえることにより行った。両群の保存は温度管理された部屋 (20~24℃) で行われた。保存用バッグとしてポリオレフィン製血液バッグ (KBP600FPN, 600ml 用、川澄化学工業) を使用した。

#### 各種パラメータの測定

各種パラメータ測定のためのサンプリングは、2 分割

1) 日本赤十字社北海道ブロック血液センター

2) 旭川医科大学小児科学教室

〔受付日：2012 年 3 月 5 日，受理日：2012 年 5 月 16 日〕

Table 1 Changes in in vitro variables of washed PLTs during storage

	Day 1	Day 4 (Cont)	Day 4 (Test)
pH	7.20 ± 0.11	7.43 ± 0.05	7.20 ± 0.08*
pCO <sub>2</sub> (mmHg)	61.5 ± 12.5	30.2 ± 1.9	39.1 ± 4.6*
pO <sub>2</sub> (mmHg)	70.1 ± 22.6	76.1 ± 17.7	75.9 ± 12.7
MPV (fl)	7.78 ± 0.93	7.95 ± 0.82	7.95 ± 1.02
Disc (%)	55.8 ± 10.3	60.8 ± 7.8	65.6 ± 4.8
CD62P (%)	7.93 ± 3.2	6.78 ± 2.1	5.29 ± 2.4
Aggregation (%)	67.9 ± 5.8	68.5 ± 6.7	66.7 ± 6.6
HSR (%)	74.6 ± 3.9	74.6 ± 3.6	75.4 ± 5.8
Glucose (mg/dl)	220 ± 10	144 ± 12	105 ± 18*
Lactate (mg/dl)	48.2 ± 7.6	121 ± 14	158 ± 12*

\*P<0.05 (Statistical analysis was carried out between the control and test groups). The results (mean ± standard deviation) of 5 experiments are shown.

直前 (Day 1) と Day 4 に行った。Day 4 での両群からのサンプリングは、72 時間静置した洗浄血小板を 30 分間振とうして沈澱を分散させた後に行った。pH は全自動 pH/血液ガス分析装置 (バイエルメディカル 248, バイエルメディカル株式会社) で、血小板数および平均血小板容積 (MPV) は自動血球分析装置 (Sysmex XE-2100, シスメックス株式会社) で測定を行った。凝集能は血小板凝集計 (MCM HEMA TRACER 313M, MCMEDICAL Inc.) を用いて測定した。凝集は 1μg/ml コラーゲン (Horse tendon collagen, Nycomed Pharma GmbH, Munich, Germany) と 10μM ADP の同時刺激で行った。浸透圧ショック反応 (%HSR) および血小板形態 (%disk) は常法により測定した。P セレクチン陽性率は、血小板を PE 標識抗 CD62P 抗体および FITC 標識抗 CD61 抗体で染色し、フローサイトメーター (LSR, Becton-Dickinson, San Jose, CA) を用いて測定した。陰性コントロールとして PE 標識抗マウス IgG 抗体および FITC 標識抗マウス IgG 抗体を使用した。抗体は BD bioscience-Pharmingen (San Jose, CA) から購入した。

洗浄血小板中の血漿残存率は、洗浄前 PRP 上清の吸光度 (280nm での) を 100% とし、洗浄血小板上清の吸光度から算出した。

グルコースおよび乳酸の濃度はグルコース CII テストワコー (Wako Pure Chemical Industries, LTD.) およびデタミナー LA (Kyowa Medex Co., Ltd.) を用いて測定した。

#### 統計処理

統計処理は Day 4 のコントロール群とテスト群の間で Two-tailed paired t-test により行った。P 値 0.05 未満を有意差ありとした。

#### 結 果

調製した洗浄血小板の血小板濃度、コントロール群

の容量、テスト群の容量はそれぞれ、 $185 \pm 6 (\times 10^6/\mu l)$ 、 $106 \pm 11 ml$ 、 $103 \pm 12 ml$  であった。血小板数および容量から判断すると両群とも 5 単位 PC に相当する。洗浄血小板中の血漿残存率は  $4.61 \pm 2.23\%$  (n=5) であった。

Day 4 (静置終了後) の pO<sub>2</sub>、MPV、%Disc、CD62P、凝集能、%HSR は両群間で有意差がなかった。Day 4 の pH は両群間で有意差があったがその差は小さく、Day 1 での数値と大きな差がなかった。Day 4 の pCO<sub>2</sub>、グルコース値、乳酸値は両群間で明らかな差があった。

#### 考 察

本研究では採血から 4~5 日経過した PC から調製した洗浄血小板を用いたが、Day 4 での両群の pH は 7.0 以上を維持し、MPV および %HSR は既に報告した採血 2 日後の PC から調製した洗浄血小板 (通常、洗浄血小板は採血の翌日または翌々日の PC から調製する) の洗浄 24 時間後の数値<sup>14)</sup> と近い値を示している。本検討で用いた洗浄血小板の性状は Day 4 でも比較的良好に維持されていると考えられる。

Day 4 での pCO<sub>2</sub> 値はテスト群 (静置群) の方がコントロール群よりも有意に高かった (Table 1)。これは静置 (振とう中断) により保存バッグ中のガス交換 (二酸化炭素の排出) が抑制されたためと考えられる。

Day 4 での乳酸値はテスト群の方がコントロール群よりも有意に高く、グルコース値はテスト群の方が低かった (Table 1)。これは静置 (振とう中断) により保存バッグ中への酸素供給が抑制されたため、バッグ内の局所的な酸素濃度がしだいに減少し、それにより血小板細胞内部の酸素濃度も低下した結果、血小板細胞内での代謝が好氣的代謝 (酸化のリン酸化) から嫌氣的代謝 (解糖系) に転換したためと推測される。嫌氣的代謝はグルコースの消費と乳酸の産生を伴う。

乳酸が多いためか Day 4 ではテスト群の pH がコント

ロール群よりもやや低値であったが、他のパラメータ (pO<sub>2</sub>, MPV, %Disc, CD62P, 凝集能, %HSR) は両群間に有意差がなかった。以上の結果から、600ml用のポリオレフィン製バッグ中で5単位相当の洗浄血小板を本検討で行われた条件で静置した場合、72時間までならば血小板機能に重大な影響を及ぼさないと考えられる。

保存バッグ内のガス交換は、静置（振とう中断）中には抑制されるが全く行われていないわけではない。振とう保存の場合と同様、血小板濃度やバッグの材質、表面積（容量）などが血小板機能の維持に大きくかわっていると推測される。5単位以上の製剤や他のバッグを使用した場合についても同様の結果が得られるか否か、更なる検討が必要であるが、いずれにしても、製剤の容量や濃度、バッグの材質や表面積（容量）によっては72時間の静置保存が不可能ではないことを本検討は示している。

## 文 献

- 1) Murphy S, Gardner FH: Platelet storage at 22 degree C: role of gas transport across plastic containers in maintenance of viability. *Blood*, 46: 209—218, 1975.
- 2) Wallvik J, Stenke L, Akerblom O: The effect of different agitation modes on platelet metabolism, thromboxane formation, and alpha-granular release during platelet storage. *Transfusion*, 30: 639—643, 1990.
- 3) Kunicki TJ, Tuccelli M, Becker GA, et al: A study of variables affecting the quality of platelets stored at "room temperature". *Transfusion*, 15: 414—421, 1975.
- 4) Slichter SJ, Harker LA: Preparation and storage of platelet concentrates. II. Storage variables influencing platelet viability and function. *British J. Haematology*, 34: 403—419, 1976.
- 5) Murphy S: Platelet storage for transfusion. *Semin Hematol*, 22: 165—177, 1985.
- 6) Snyder EL, Koerner TA Jr, Kakaiya R, et al: Effect of mode of agitation on storage of platelet concentrates in PL-732 containers for 5 days. *Vox Sang*, 44: 300—304, 1983.
- 7) Moroff G, George VM: The maintenance of platelet properties upon limited discontinuation of agitation during storage. *Transfusion*, 30: 427—430, 1990.
- 8) Hunter S, Nixon J, Murphy S: The effect of the interruption of agitation on platelet quality during storage for transfusion. *Transfusion*, 41: 809—814, 2001.
- 9) Wagner SJ, Vassallo R, Skripchenko A, et al: The influence of stimulated shipping conditions (24 or 30 hour interruption of agitation) on the in vitro properties of apheresis platelets during 7 day storage. *Transfusion*, 48: 1072—1080, 2008.
- 10) Wagner SJ, Myrup A, Awatefe H, et al: Maintenance of platelet in vitro properties during 7-day storage in M-sol with 30-hour interruption of agitation. *Transfusion*, 48: 2501—2507, 2008.
- 11) Hirayama J, Fujihara M, Akino M, et al: Influence of a 24-hour interruption of agitation on in vitro properties of platelets washed with M-sol during 7-day storage. *Transfusion*, 52: 1158—1160, 2012.
- 12) 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.
- 13) 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.
- 14) 秋野光明, 平山順一, 田村 暁, 他: 洗浄・置換血小板に用いる洗浄置換液 (M-sol) の製造と保存. *日本輸血細胞治療学会誌*, 56: 365—372, 2010.

## EFFECT OF A 72-HOUR INTERRUPTION OF AGITATION ON IN VITRO PROPERTIES OF PLATELETS WASHED WITH M-SOL

Junichi Hirayama<sup>1)</sup>, Mitsuhiro Fujihara<sup>1)</sup>, Mitsuaki Akino<sup>1)</sup>, Chihiro Homma<sup>1)</sup>, Toshiaki Kato<sup>1)</sup>, Hiroshi Azuma<sup>2)</sup> and Hisami Ikeda<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Hokkaido Red Cross Blood Center

<sup>2)</sup>Department of Pediatrics, Asahikawa Medical University

### **Abstract:**

Platelet (PLT) products are continuously agitated during storage to ensure preservation of their in vitro and vivo properties. However, PLT products cannot be continuously agitated during shipment. Furthermore, in the case of hospitals with no agitator, a delay in the start of injection of PLT products caused by an emerging change in the condition of a patient may prolong the period of agitation interruption. Here, we studied the effect of a 72-hour interruption of agitation on the in vitro properties of PLTs washed with M-sol.

The washed PLTs, which were stored in a polyolefin bag on an agitator, were divided into two equal aliquots (control and test groups) on Day 1. The test group was removed from the agitator and placed for 72 hours on a laboratory bench. Both groups were sampled on Day 4.

The MPV, % disc, CD62P (%), aggregation, and %HSR values of the test group were not significantly different from those of the control group on Day 4, whereas the pH, pCO<sub>2</sub> and lactate values were significantly different.

These results indicate that the effect of a 72-hour interruption of agitation on the in vitro properties of washed PLTs was not particularly marked.

### **Keywords:**

Interruption of agitation, M-sol, washed platelet