

原 著

[原著]

アルミ蒸着外袋を使わずに24時間保存したM-solの 経時的pH変化と血小板への影響

日本赤十字社北海道ブロック血液センター

平山順一, 藤原満博, 秋野光明, 本間稚広, 加藤俊明, 池田久實, 高本 滋

pH changes in M-sol additive solution stored without an alluminium-evaporated bag and the effects on platelet function

*Japanese Red Cross Hokkaido Block Blood Center*Junichi Hirayama, Mitsuhiro Fujihara, Mitsuaki Akino, Chihiro Homma,
Toshiaki Kato, Hisami Ikeda and Shigeru Takamoto

抄 録

血小板洗浄保存液M-solはpHが上昇しやすく、それを防ぐため調製後は速やかにアルミ外袋中でバキュームシールするが、アルミ袋を使用せずに保存した場合、M-solのpHが経時的にどう変化するか、またそのように長時間保存したM-solで洗浄すると血小板に影響を及ぼすか否か、について詳細な報告がないため検討を行った。

アルミ袋不使用でM-solを室温保存すると、バッグ中およびそのセグメント中のpHは経時的に上昇したが、その上昇率はバッグ中の方が小さく、5時間程度ならバッグ中のpHはほとんど変化しないと考えられた。

PCを2分割し、一方をアルミ袋不使用で24時間保存したM-solにより、もう一方をアルミ袋中で24時間保存したものにより洗浄し、振とう保存した。Day1(調製翌日)およびDay3での性状を比較したところ、いずれの測定日においてもpHやCD62P値などで両群間に有意差はなかった。アルミ袋不使用で24時間保存したM-solで洗浄しても血小板の性状に影響を及ぼさないと考えられた。

Key words: M-sol, pH, segment, washed platelets

目 的

血小板製剤(PC)輸血で輸血副作用を繰り返す患者に対し、副作用を予防する目的で洗浄血小板を輸血する場合がある^{1)~6)}。洗浄血小板の調製に使用する洗浄保存液としては、多くの血液センターや病院でM-solが使用されている^{4)~11)}。しかしM-solは市販されていないため、各施設で自家

調製しているのが現状である^{7)~11)}。

M-solにはpHが上昇しやすいという特徴がある。これはM-solの一成分である重炭酸(44mM)がCO₂としてバッグ外に抜けることによると考えられる(HCO₃⁻ + H⁺ ⇌ CO₂ ↑ + H₂O)。このpH上昇を防ぐため、M-solはガス透過性が極めて低いアルミ蒸着外袋中にバキュームシールした状態

で保存する^{8), 9), 11)}。

M-sol調製後、品質チェックのためのpH測定は通常、バッグに接続されているチューブをセグメント化し、その中の液を測定するが、セグメント中のpHはバッグ本体中よりも上昇しやすい傾向があり、M-sol調製後はできるだけ速やかに測定を行うよう心がけている。M-sol調製後何時間以内に測定を行うべきかなど、当センターに問い合わせがあるが、pH上昇に関する詳細な検討は行っておらず、他施設からのそのような報告も見当たらないため、明確な返答ができていない。

本研究では、アルミ蒸着外袋を使わずにM-solを室温で保存した場合、セグメント中およびバッグ中のM-solのpHがどう変化するか検討した(Exp.1)。さらにアルミ蒸着外袋を使わずに24時間室温で保存したM-solで洗浄した場合、血小板の性状に影響があるか否か、についても検討を行った(Exp.2)。

方 法

M-sol および洗浄血小板の調製・保存

Exp.1：調製したM-solのセグメント中およびバッグ本体中pHの経時的変化

臨床使用のための調製マニュアルにしたがって

M-solを3バッグ調製後、それぞれを2分割し、実験開始前検体とした(合計6バッグ、350mL/バッグ)。M-solの保存用バッグとして塩化ビニル製血液バッグ(KBP66DC、川澄化学工業)を用いた。調製後は速やかに6バッグすべてのチューブをシールし、できたセグメント中のpHを測定し(保存直前pH)、温度管理された部屋のベンチ上で静置保存を開始した(25℃)。保存開始1時間後、6バッグのうちの1バッグのチューブをシールし、セグメント中のpHを測定した(1時間保存後セグメント中pH)(図1参照)。次に無菌接合装置でこのバッグに80mL用バッグ(BB-T008FJ、テルモ)を接続し(図1参照)、そこに数十mL流し込んだ後、チューブ中央付近をシールし、できたセグメント中のpHを測定し、バッグ本体中pHとした(1時間保存後バッグ中pH)(図1参照)。同じことを保存開始2, 3, 4, 5, 24時間後に残り5バッグそれぞれに対して行った。

Exp.2：アルミ袋中あるいはアルミ袋不使用で24時間保存したM-solによる洗浄血小板の調製・保存

上述と同様、マニュアルにしたがって調製し2分割したM-sol(350mL/バッグ)の一方のみをアルミ蒸着外袋(ラミジップ AL-J、生産日本社)

I) セグメント中のpH測定

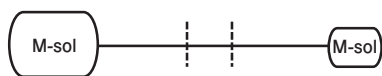


チューブの端をセグメント化し、その中のpHを測る。

II) バッグ本体中のpH測定



1) 空の小バッグと無菌接続し、M-solを数十mL流し込む。



2) チューブの中央付近をセグメント化し、その中のpHを測る。

図1 一定時間保存した(セグメント中およびバッグ本体中)M-solのpH測定方法

中にバキュームシールし(コントロール群), もう一方(テスト群)とともに室温(25℃)で24時間ベント上に静置保存した。20単位PC(採血後4-5日経過)を2分割後, 既報^{7),8)}のとおりコントロール群またはテスト群M-solを用いて洗浄血小板を調製した(Day0)。調製した洗浄血小板はDay3まで振とう保存(50-60cycles/min, 20-24℃)した。保存には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

pH, pCO₂, pO₂測定はCobas b 221(ロシュダイアグノスティクス株式会社)で行った。血小板数および平均血小板容積(MPV)は血球分析装置(XS1000i, シスメックス株式会社)で測定した。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1 μg/mL コラーゲン(Horse tendon collagen, Nycomed Pharma GmbH, Munich, Germany)と10 μM 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セレクトリン陽性率は, 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。血小板サンプルの固定に用いたパラホルムアルデヒドは4%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液(和光純薬工業株式会社)をDulbecco's PBS (Sigma Aldrich)で4倍に希釈したものを使用した。

表1 セグメントおよびバッグ本体中のpH変化

保存時間 (時間)	保存直前	保存後 セグメント中	保存後 バッグ本体中
<u>pH</u>			
1	6.878 ± 0.052 ^b	7.042 ± 0.036 ^{a,c}	6.864 ± 0.031 ^b
2	6.871 ± 0.062 ^b	7.173 ± 0.020 ^{a,c}	6.876 ± 0.022 ^b
3	6.874 ± 0.028 ^b	7.245 ± 0.026 ^{a,c}	6.900 ± 0.015 ^b
4	6.869 ± 0.033 ^b	7.313 ± 0.018 ^{a,c}	6.905 ± 0.035 ^b
5	6.873 ± 0.020 ^b	7.390 ± 0.027 ^{a,c}	6.913 ± 0.012 ^b
24	6.866 ± 0.056 ^{b,c}	7.917 ± 0.038 ^{a,c}	7.146 ± 0.024 ^{a,b}
平均 [†]	6.872 ± 0.041 [†]		
<u>pCO₂(mmHg)</u>			
1	>178.9 ± 20.6*	117.6 ± 5.9 ^c	184.3 ± 9.7 ^b
2	>184.7 ± 20.7*	87.8 ± 3.3 ^c	181.2 ± 6.6 ^b
3	179.9 ± 15.8 ^b	72.2 ± 3.5 ^{a,c}	169.7 ± 5.0 ^b
4	>181.8 ± 17.0*	58.8 ± 3.3 ^c	166.8 ± 7.8 ^b
5	>182.7 ± 17.6*	49.3 ± 3.3 ^c	160.8 ± 5.9 ^b
24	>183.0 ± 20.3*	10.6 ± 0.9 ^c	93.2 ± 3.0 ^b
<u>pO₂(mmHg)</u>			
1	171.4 ± 5.7	180.2 ± 2.8 ^c	169.1 ± 2.0 ^b
2	172.4 ± 6.2 ^b	184.4 ± 2.1 ^{a,c}	171.1 ± 2.6 ^b
3	172.6 ± 4.4 ^b	184.3 ± 1.8 ^{a,c}	167.2 ± 1.0 ^b
4	173.4 ± 4.5	185.7 ± 2.7 ^c	170.5 ± 2.1 ^b
5	172.2 ± 3.9 ^b	187.0 ± 3.1 ^{a,c}	167.2 ± 1.5 ^b
24	173.0 ± 7.0 ^b	192.0 ± 2.3 ^{a,c}	184.2 ± 0.9 ^b

mean ± SD, n=5。

†: 本検討で使用了全M-solの保存直前pHの平均値

*: 測定範囲を超えた値は200mmHgとして計算し、統計処理は行わなかった。

^aP < 0.01 vs 保存直前, ^bP < 0.01 vs 保存後セグメント中, ^cP < 0.01 vs 保存後バッグ本体中。

統計処理

統計処理は、Exp.1では各バッグの保存直前pH、保存後セグメント中pH、保存後バッグ本体中pHの間で、Exp.2ではコントロール群とテスト群の間で、Two-tailed paired t-testを行った。P値0.01未満を有意差ありとした。

結 果

Exp.1

M-solのpHの経時的变化を検討した(表1)。セグメント中、バッグ中いずれの場合も時間とともに上昇したが、調製直後に6.872(平均値)であったpHは24時間後、セグメント中が7.917まで上昇したのに対し、バッグ中では7.146までしか上昇しなかった。

pCO₂に関しては、セグメント中、バッグ中いずれの場合も経時的に減少した。24時間後、セグメント中では10.6mmHgまで減少したのに対し、バッグ中では93.2mmHgにとどまった。

pO₂に関しては、24時間の保存中、セグメント中、バッグ中いずれの場合も大きな変化は見られなかった。

Exp.2

本検討で使用した洗浄直前のM-solのpH(平均値、n=5)はコントロール群用が6.86、テスト群用が7.12であった。これらのM-solで調製した洗浄血小板の性状を表2に示した。さらにDay1(洗浄翌日)およびDay3での血小板機能の測定結果を表3に示した。Day1、Day3いずれの場合も、測定したすべてのパラメータ(pH、pCO₂、pO₂、

%disc、CD62P、MPV、%HSR、凝集能)において両群間に有意差はなかった。

考 察

M-solをアルミ蒸着袋中でバキュームシールすると、室温で1年間保存してもpHがほとんど変化しないことはすでに報告した⁹⁾。アルミ袋を使わずに保存したときのM-solのpHは、バッグ中もセグメント中も時間とともに上昇したが、上昇率はセグメント中の方が大きかった。これは単位液量あたりの(塩化ビニル素材との)接触面積がセグメント中の方が大きく、より多くの重炭酸が抜けたため、セグメント中pHの上昇率の方が大き

表3 洗浄血小板の性状変化

	Day1	Day3
<u>pH</u>		
Control	7.51 ± 0.03	7.52 ± 0.04
Test	7.52 ± 0.05	7.53 ± 0.04
<u>pCO₂ (mmHg)</u>		
Control	34.0 ± 2.2	29.2 ± 1.9
Test	32.3 ± 2.8	29.5 ± 1.8
<u>pO₂ (mmHg)</u>		
Control	116 ± 8	126 ± 10
Test	111 ± 9	124 ± 10
<u>MPV (fL)</u>		
Control	8.92 ± 0.93	9.16 ± 0.87
Test	8.90 ± 0.84	9.17 ± 0.85
<u>Disc (%)</u>		
Control	60.6 ± 6.0	61.6 ± 6.3
Test	60.6 ± 5.3	61.3 ± 4.0
<u>CD62P (%)</u>		
Control	22.7 ± 8.7	22.2 ± 5.2
Test	21.9 ± 8.3	23.2 ± 6.4
<u>HSR (%)</u>		
Control	81.5 ± 4.2	79.1 ± 2.7
Test	80.9 ± 4.3	79.7 ± 4.0
<u>Aggrigation (%)</u>		
Control	67.2 ± 24.6	65.1 ± 10.0
Test	66.4 ± 23.6	62.9 ± 6.2

mean ± SD, n=5. *P<0.01

表2 調製した洗浄血小板の性状

	Control	Test
Volume (mL)	124 ± 3	123 ± 2
PLTs concentration (× 10 ⁴ /μL)	157 ± 16	160 ± 14
PLTs content (× 10 ¹¹ /bag)	1.94 ± 0.19	1.97 ± 0.17
洗浄で使用した M-solのpH	6.86 ± 0.02	7.12 ± 0.01

mean ± SD, n=5.

かったと推測される。pCO₂の数値の減少率がセグメントの方が大きかったという実験結果はこの推測を支持しているものと思われる(表1)。いずれにしてもセグメント中のpHは短時間でバッグ中のpHと乖離していくため、調製から一定時間が経過した後でpHを測定する場合は、バッグ本体中の液を測定するような工夫が必要である。

アルミ蒸着袋を使用せずに24時間保存すると

バッグ中のpHは7.12まで上昇したが、このM-solで洗浄血小板を調製しても血小板の性状に影響がないことを表3の結果は示している。したがってバキュームシールするまでの期限をM-sol調製後24時間としても実質的には問題ないと思われるが、安全性を考慮すればできるだけ調製当日中に行うのが無難であろう。

文 献

- 1) 吉田久博ほか：血小板保存液“セト液”の臨床応用. 日本輸血学会雑誌, 40: 589-592, 1994.
- 2) 田中マサヨほか：洗浄血小板の機能と輸血効果. 血液事業, 23: 41-51, 2000.
- 3) 麻田真由美ほか：洗浄血小板における輸血副作用の防止. 日本輸血学会雑誌, 48: 32-36, 2002.
- 4) Azuma H. *et al*: Reduction in adverse reactions to platelets by the removal of plasma supernatant and resuspension in a new additive solution (M-sol). *Transfusion* 2009, 49:214-8.
- 5) 林 宜亨ほか：北海道赤十字血液センターにおける洗浄血小板の技術協力(過去4年間の実績). 日本輸血・細胞治療学会誌, 58: 552-554, 2012.
- 6) Yanagisawa R. *et al*: Replaced platelet concentrates containing a new additive solution, M-sol: safety and efficacy for pediatric patients. *Transfusion* 2013, 53:2053-60.
- 7) Hirayama J. *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* 2007, 47: 960-5.
- 8) 平山順一ほか：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.
- 9) 秋野光明ほか：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.
- 10) 小嶋俊介ほか：置換液M-solを用いた置換血小板(R-PC)調製のプロセスバリデーションに関する検討. 日本輸血・細胞治療学会誌, 57: 379-385, 2011.
- 11) 日本輸血・細胞治療学会ホームページ：洗浄・置換血小板の適応およびその調製の指針 <http://www.jstmct.or.jp/jstmct/Document/Guideline/Ref9-5.pdf>. (2013年11月現在)