原 著

濃厚血小板保存における血漿 pH およびガス分圧の影響

石 川 善 英 笹 川 滋

日本赤十字社中央血液センター

(平成元年 4 月10日受付)

EFFECTS OF PLASMA pH AND BLOOD GASES ON PLATELET CONCENTRATE

Yoshihida Ishikawa and Shigeru Sasakawa

Japanese Red Cross Central Blood Center

The effects of pH, P_{CO_2} in plasma on platelet concentrate (PC) were examined. For obtaining PCs with different pH and gas pressures, concentration of platelet, PC volume and bag size were altered and the PCs were stored for 72~120 hours in polyvinyl chloride bags. P_{CO_2} increased and P_{O_2} decreased by lowering pH. PC in lower than pH 6, however, exhibited the gas pressures as same as PC with pH higher than about 7.2. Mean platelet volume (MPV) increased by decreasing pH. MPV of PC in lower than pH 6 was about 1.5 times that with neutral pH. The effects of pH on platelet functions were also examined using fresh platelet rich plasma whose pH was changed with HCl or NaOH. After 24 hours-storage, ADP- and collagen-induced aggregation decreased by increasing pH. MPV, shape change ability and %HSR were maintained well in PC with pH around neutrality. These results suggest that the measurement of pH is useful for quality control of PC and suggest that P_{CO_2} , P_{O_2} can be estimated from pH. It is considered to be preferable that PC is stored with pH from 6.6 to 7.4.

結 言

方 法

濃厚血小板 (PC) の保存において、血漿 pH が 6.0 以下になると viability が低下し^{1)~3)}、7.6 以上では血小板の凝集が起きる⁴⁾⁵⁾と報告されている。200ml 全血由来 PC では保存中の pH 低下は問題とならないが、400ml 由来 PC では血小板数が多い場合明らかな pH 低下が起こる。これは血小板濃度が高い PC の場合、好氣的代謝を維持するために必要な酸素の供給および代謝により生じた二酸化炭素の排出が従来のバッグでは不十分なためである。このため PC の品質管理においてはガス分圧 (P_{CO_2} , P_{O_2}) の測定も必要であるように思われる。しかし、 P_{CO_2} は pH に反映されるものであり、pH 測定によりガス分圧は推定できるものと考えられる。

本研究では、保存血小板の品質管理における血漿 pH 測定の意義および保存中の血漿 pH の適性範囲を明らかにする目的で血漿 pH、ガス分圧の血小板への影響を調べた。

血小板の調製

常法により調製した PC (200 及び 400ml 全血由来) を一晩水平振盪保存した後 1~2 単位 pool し、テルモ社の軟質ポリ塩化ビニル製バッグ (150 ml および 300ml) 内で、最長 120 時間まで室温水平振盪保存を行った。

200ml-CPD 加全血より分離した多血小板血漿 (PRP) の pH を 1N HCl または 1N NaOH で低下あるいは上昇させ、シリコンコート採血管内で 24 時間振盪保存した。保存後血漿 pH を 7.4 に調節し、各機能を測定した。

血漿 pH およびガス分圧の測定

血漿 pH は pH メーター (電気科学計器 (株); COM-11 型, 堀場製作所; No. 6028 電極) により室温で測定した。37℃ における重炭酸イオン濃度 ($[HCO_3^-]$), P_{CO_2} , P_{O_2} および pH は溶存ガス測定装置 (コーニング 170) を用いて測定した。

血小板機能の測定

自動血球計数装置 (Sysmex, F800) により血小板数及び血小板体積を測定した。4mM CaCl_2 存在下、終濃度5~7 μM ADP および終濃度0.3~1.0 $\mu\text{g/ml}$ Collagen による凝集を測定した。PRP に1/10容の55mM EGTA 添加後、1/100容の1mM ADP により起こる透過度低下率を変形能とした⁶⁾。凝集能および変形能の測定にはNKK Hematracer 1を用いた。

0.4%NaCl を含む5mM リン酸緩衝液中での血小板体積変化を連続血球体積測定装置 (Sysmex) により測定し、体積膨張率、体積収縮率を求めた⁶⁾。

結 果

血漿のガス分圧

用いたPCの液量は150ml バッグでは16~43 ml, 300ml バッグでは32~81ml, 血小板濃度は86~196 $\times 10^4/\mu\text{l}$ であった。保存後の室温での血漿 pH は5.65~7.59であった。pH メーター (室温) と溶存ガス測定装置 (37 $^{\circ}\text{C}$) で測定した pH の間には高い相関 ($r=0.998$) が得られたが、溶存ガス測定装置では6.0以下の pH は測定できないため、pH は室温測定した値を用いた。

Fig. 1 に pH とガス分圧の関係を示した。Pco₂ は pH 低下と共に増加し、pH 6.0~6.1で最大となり、それ以下の pH では顕著に低下した (Fig.

Fig. 1 Relationships between plasma pH and blood gas.

● : 72hour-, ▲ : 96hour-, ■ : 120hour-stored PC.

1a). Po₂ は pH 7.2付近まで急激に減少し、それ以下 pH 6.0付近まではほぼ一定であった。しかし pH 6.0以下では著しい増加がみられた (Fig. 1b)。今回用いた溶存ガス測定装置では $[\text{HCO}_3^-]$ は計算式 $\log [\text{HCO}_3^-] = \text{定数} + \text{pH} + \log \text{Pco}_2$ により求めている。 $[\text{HCO}_3^-]$ は pH が低下するほど減少した。

血小板体積

血小板体積は pH 6.5より酸性域では pH が低いほど大きく、pH 6.0以下になると約1.5倍の値を示した (Fig. 2)。Fig. 3に Po₂, Pco₂ と血小板体積の関係を示したが、図から明らかなように血小板体積はガス分圧とは相関しなかった。

Fig. 2 Relationships between plasma pH and mean platelet volume. The same platelet preparations as Fig. 1 were used.

Fig. 3 Relationships between blood gas and plasma pH. The same platelet preparations as Fig. 1 were used.

Fig. 4 Effects of plasma pH on mean platelet volume. Fresh PRP adjusted pH with 1N HCl or NaOH was stored at room temperature for 24 hours. The maximum value of each platelets preparation was to be 100%. The points represent the results of four separate experiments ($\circ \triangle \bullet \blacktriangle$).

Fig. 5 Effects of plasma pH on platelet aggregability. After pH justification at 7.4, ADP- (a) or collagen- (b) induced aggregation were measured in the presence of 4mM CaCl_2 . ADP: 5~7 μM , collagen: 0.7~1.0 $\mu\text{g/ml}$ or 0.3~0.5 $\mu\text{g/ml}$ (dashed line). The points represents results of three separate experiments ($\circ \bullet \blacktriangle$). See Fig. 4 for details.

血漿 pH を HCl または NaOH により調節し保存した PRP の血小板体積を Fig. 4 に示した。血

Fig. 6 Effects of plasma pH on shape change ability. The points represents results of three separate experiments ($\circ \bullet \blacktriangle$). See Fig. 4 for details.

Fig. 7 Effects of plasma pH on shrinkage ratio. See Fig. 4 for details.

小板数は pH により影響を受けなかった。pH 7.0~7.4 の範囲で血小板体積はもっとも小さく、pH がこの範囲から離れるに従い体積は増加した。

血小板機能

ADP-, および collagen-凝集能への血漿 pH の効果を Fig. 5 に示した。いずれの凝集能も pH 7.0 以上で明らかな低下が見られた。低下の程度は collagen-凝集の方が大きく、低能度の collagen (0.3~0.5 $\mu\text{g/ml}$) を用いた場合には、pH が上昇するに従い連続的に低下した。ADP 凝集はその濃度を低下させても pH 6.2~7.0 の範囲では変化しなかった。

変形能 (Fig. 6) は pH 7.0~7.4 の範囲で、低

浸透圧ショック回復率 (Fig. 7) は pH 6.6~7.0 の範囲で最大値を示した。

考 察

血小板の viability が低下するとされている pH 6.0以下でも P_{O_2} , P_{CO_2} は pH 7.6の PC と同程度であった。すなわち pH 6.0以下では好氣的代謝に必要な酸素は充分供給されているにもかかわらず血小板は代謝をしていないことになる。このことから、この pH 領域の PC では細胞としての機能が失われており、そのため viability の低下が起きるものと考えられた。

Becker ら²⁾は次式で表される Morphology Score (MS) を提案した。

$$MS = (\% \text{ of disks} \times 4) + (\% \text{ of spheres} \times 2) \\ + (\% \text{ of dendrites} \times 1) \\ + (\% \text{ of balloons} \times 0)$$

すなわち、MS は円板形が多いほど高く、球形、偽足突出形、膨化形が増加するほど低下する。

Kunichi ら³⁾はこの MS が輸血後の recovery および survival time とよく対応することを報告している。したがって体積増加は balloon 型が増え、viability が低下していることを意味していると考えられる。

保存時間、1 バッグ中の液量、血小板濃度が異なる PC を用いたにもかかわらず、 P_{CO_2} , P_{O_2} , $[HCO_3^-]$, 血小板体積は、血漿 pH と対応して変化した。しかしガス分圧と血小板体積の間に相関関係は認められなかった。したがって、pH の変化はガス分圧およびガス分圧に伴う代謝の変化により起こるが、血小板の体積増加、すなわち viability の低下のより直接的原因はガス分圧変化ではなく pH 低下によるといえる。

血漿 pH の血小板への影響を確認するため新鮮な PRP を血漿 pH が異なる状態で保存した。その結果血小板体積、血小板機能は血漿 pH が中性

付近の場合にもっともよく維持され、血漿 pH が低い場合だけでなく、高い場合にも悪影響を受けることが明らかとなった。

以上のことより血小板製剤の品質管理において血漿 pH 測定は有用な手段であり、pH から血漿中のガス分圧もある程度推定できることが確認された。さらに、pH 6.0以下では survival が低下し^{1)~3)}、pH 7.3以上では血小板の崩壊が起きる⁷⁾という報告及び今回の結果を考え合わせると、PC 保存中の血漿 pH は 6.6~7.4 の範囲に維持することが望ましいと考えられた。

文 献

- 1) Murphy, S., Sayar, S.N. and Gardner, F.H.: Storage of platelet concentrates at 22°C. *Blood*, 35: 549—557, 1970.
- 2) Becker, G.A., Tuccelli, M., Kunicki, T.J., Chalos, M.K. and Aster, R.H.: Studie of platelet concentrates stored at 22°C and 4°C. *Transfusion*, 13: 61, 1973.
- 3) Kunicki, T.J., Tuccelli, M., Becker, G.A. and Aster, R.H.: A study of variables affecting the quality of platelets stored at "room temperature". *Transfusion*, 15: 414—421, 1975.
- 4) Murphy, S. and Gardner, F.H.: Platelet storage at 22°C: Role of gas transport across plastic containers in maintenance of viability. *Blood*, 46: 209—218, 1978.
- 5) Aster, R.H., Jenkins, J. and Tovey, D.: International forum: Which are the parameters to be controlled in platelet concentrates in order that they may be offered to the medical profession as a standardized product with specific properties? *Vox Sang.*, 40: 115—126, 1981.
- 6) 石川善英, 笹川 滋: 濃厚血小板の室温 120 時間保存. *日血会誌*, 33: 417—422, 1987.
- 7) Solberg, C., Holme, S. and Little, C.: Morphological changes associated with pH changes during storage of platelet concentrates in first-generation 3-day container. *Vox Sang.*, 50: 71—77, 1986.