濃厚赤血球用添加液 MAP について

笹川 滋¹⁾ 柴 雅之¹⁾ 村 徹¹⁾
中島 隆²⁾ 鈴木 洋司²⁾ 前田 信治²⁾

¹⁾日赤中央血液センター, ²⁾愛媛大学医学部第二生理

(平成 3 年 1 月 28 日受付)

DEVELOPMENT OF ADDITIVE SOLUTION MAP FOR STORAGE OF RED CELL CONCENTRATES

S. Sasakawa¹⁾, M. Shiba¹⁾, T. Mura¹⁾, T. Nakajima²⁾, Y. Suzuki²⁾ and N. Maeda²⁾

¹⁾Japanese Red Cross Central Blood Center

²⁾Department of Physiology, School of Medicine, Ehime University

Red blood cells (RBC) were concentrated to 90–95% hematocrit from CPD- or ACD-whole blood. Then, they were diluted with the MAP solution containing mannitol, adenine, phosphate, citrate, glucose and NaCl. Packed red cells suspended into MAP solution were stored for 6 weeks at 4–6°C. Several different compositions for red cell storage were tested.

After 6 weeks storage of red cells in MAP solution (adenine 1 mM), 60% of ATP level could be maintained and the 24-hours posttransfusion survivals were 86%.

80 mM mannitol maintained the supernatant Hb within an acceptable range. The deformability of red cells stored in MAP solution (mannitol 60 or 80 mM) for one week were kept well significantly ($p < 0.05$) compared with that of red cells stored in CPD solution. It was confirmed that the impairment of membrane viscoelastic properties of stored red cells was less in MAP solution than CPD solution.

Citrate in MAP solution seems to inhibit the microaggregate formation.

pH of MAP solution was adjusted to 5.6 for preventing glucose decomposition by the autoclave sterilization. However, blood pH after 6 weeks storage was 6.5.

Finally, MAP composition was decided as follows; Adenine 0.14 (g/l), Mannitol 14.57 (g/l), Na₃ Citrate·2H₂O 1.50 (g/l), Citrate·H₂O 0.20 (g/l), Glucose 7.21 (g/l), NaH₂PO₄·2H₂O 0.94 (g/l), and NaCl 4.97 (g/l).

1. 緒 言

ACD または CPD 加濃厚赤血球の有効期限は 21 日間とされている。近年、欧米諸国では、赤血球の保存期間を延長するためにアデニンを添加した SAGM 液等の赤血球用添加液が使用されている¹⁾²⁾。この様な、濃厚赤血球のための添加液利用には、赤血球輸血後寿命の向上、従って有効期限の延長が可能(5～6 週間)、より多量の血漿を回収できる、血液粘性が低下し輸血しやすい等の利点がある¹⁾。しかし、これらの添加液も溶血しやすく(6 週保存で 200mg/dl 以上)、2,3-DPG 含量は

保存 2 週でほとんど 0 になるという問題がある。

そこで、それらを改善するため CPD+SAGM を基本とし、特に溶血の改善を目的としてマンニトール添加濃度、ATP 維持のためアデニンの添加濃度、添加後の安定性及び 2,3-DPG と添加液の pH の影響等についてすでに臨床的に使用されている SAGM, ADSOL, Optisol と比較しつつ検討し MAP 液(表 1)を開発した^{3)~7)}。

2. 方 法

CPD 或いは ACD 採血した濃厚赤血球(CRC)を遠心(3,000G, 8 分)、血漿を除去し(Ht

表1 添加液組成 (g/l)

	CPD	MAP (日赤)	SAGM (Höganman)	ADSOL (Baxter)	Optisol (Terumo)
Na ₃ Citrate・2H ₂ O	26.30	1.50	—	—	—
Citrate・H ₂ O	3.27	0.20	—	—	—
Glucose	23.20	7.21	—	—	8.18
Glucose・H ₂ O	—	—	9.00	22.00	—
NaH ₂ PO ₄ ・2H ₂ O	2.51	0.94	—	—	—
NaCl	—	4.97	8.77	9.00	8.77
Adenine	—	0.14	0.17	0.27	0.30
Mannitol	—	14.57	5.25	7.50	5.25

90～95%), これを試料とした。各赤血球添加液を無菌的に添加し (Ht 60%), 4～6℃に静置保存した。赤血球サンプリングは、調製直後より毎週1回、保存6週或いは7週まで操作アダプターを介し無菌的に行なった。

ATPはシグマ社製キットを用い酵素法で、ATP・ADP・AMPはHPLC法、陰イオン交換カラム: 5-SB (ナーゲル) ϕ 7.5×50mm, 溶離液; 5mM H₂PO₄→100mM Na₂HPO₄, pH 7.2+0.5 M Na₂SO₄, 検出波長: 254nm, で測定した。アデニンは、逆相系カラム: 5-ODS-H (ケムコ), 溶離液; 5mM H₂PO₄→5mM H₂PO₄+10%CH₃CN, として254nmで検出した。2,3-DPGはシグマ社製キットを用い酵素法で、ヘモグロビン(Hb)はアザイドメトヘモグロビン法(ヘモキット-S, 日本商事)で、平均赤血球容積(MCV)及びヘマトクリット(Ht)はマイクロセルカウンターF-800 (シスメックス)で測定した。浸透圧膜抵抗性は30～150mOsm/kg NaClのリニアグラジエント(三鬼エンジニアリング)を用いCPC法で測定し、最大溶血点の浸透圧で評価した。赤血球変形能は浸透圧を変え保存赤血球の平均赤血球血色素濃度(MCHC; 内部粘度)を一定にし、レオスコープ法で測定した⁸⁾。血液pHは赤血球浮遊液のpHを室温で平衡化し測定した。赤血球の輸血後24時間生存率は⁵¹Cr法により求めた³⁾⁹⁾。

3. 結果及び考察

3-1. マンニトール添加濃度

膜不透過なショ糖、マルトースなどの二糖類及びマンニトール等の単糖類は赤血球膜の浸透圧膜抵抗性を亢進し、赤血球溶血を防止するが、高濃

度(100mM以上)ではMCVの縮小、水の流入性の低下、及び輸血後寿命と関する変形能の低下がみられる¹⁰⁾¹¹⁾。このことから、糖添加濃度は80mM以下とした。

添加糖の種類は、ショ糖は輸液に使用されていないこと、マルトースとマンニトールでは、マルトースの方が溶血が少なく、2,3-DPGも高値に維持したが、オートクレープ時の安定性からマンニトールを選択した(データ省略)。

SAGM, Optisol は28.8mM(5.25g/l), ADSOL は40mM(7.50g/l)のマンニトールが添加されている。MAPのマンニトールの添加濃度を60mM(10.93g/l), 80mM(14.57g/l)で比較した。80mMでは赤血球溶血は低く、MCVは3～5%縮小した(図1, 2)。60mMではMCVはほとんど変化しなかった。また、SAGM, Optisol液保存ではMCVの膨化傾向が認められ溶血も増大した。

MCVが過度に縮小すると赤血球内ヘモグロビン濃度が上昇、即ち、内部粘度が上昇し、変形能が低下し輸血後寿命が低下する⁹⁾¹²⁾¹³⁾。そこで、赤血球の変形能をレオスコープ法⁸⁾で測定した。変形の程度はDeformation Index (DI), $DI = (L - B) / (L + B)$, (L: 変形した赤血球の長軸の長さ B: 短軸の長さ), で表し、DIの大きい方が変形し易いことを示す。変形能は、赤血球の、i) MCHC, ii) 赤血球形態, iii) 膜粘弾性の影響を受けるが、今回の測定ではMCHCはあらかじめ一定に、保存期間も1週間なので形態的にも差はないと考えられた。その結果、CRCに比べMAP保存の方が赤血球膜の粘弾性障害が少ないこと、マンニトール添加量(60mM, 80mM)で差がないことが示さ

図 1

図 2

図 3

図 4

れた(図3)。さらに、マンニトール80mMでの輸血後寿命は6週保存で86% (n=2)³⁾と良好であることから、マンニトールの添加濃度は、溶血も低く、ばらつきも小さいので80mM(14.57g/l)でよいと結論した。

3-2. アデニン添加濃度

アデニン添加量の少ないMAP (0.14g/l) SAGM (0.17g/l)では、保存3週までにアデニンはほぼ消費された⁵⁾。一方、Optisol (0.30g/l)は、保存6週で25%、ADSOL (0.27g/l)も10%のアデニンが残存した(図4)。

アデニンはAMP, ADPを経てATPに代謝される。これらの比率(エナジーチャージ:E.C. = $(ATP + 1/2ADP)/(ATP + ADP + AMP)$)は、赤

血球のエネルギー状態の指標と考えられる¹⁴⁾。各添加液で保存した赤血球のE.C.は0週での0.87~0.89から保存6週では0.76~0.79に低下し、添加液間で有意差は認めなかった(図5)。従って、アデニン濃度0.14g/lであっても、6週保存のMAP加赤血球のエネルギー状態も良好に保たれていると思われた⁵⁾。

各添加液で保存した赤血球のATPの変化を保存0週を100%として示した。保存3及び6週でのATP残存率は各々MAPで89%, 61%, SAGMで94%, 61%, Optisolで94%, 75%, ADSOLで96%, 77%で、添加したアデニン量に依存した(図6)。また、抗凝固剤(ACDとCPD)による差は認めなかった。

図 5

図 6

ATP が輸血後寿命と相関すると報告されてきたが¹⁵⁾, 我々の PEP での結果から示唆されるように必ずしも輸血後寿命と相関するものではない⁹⁾¹³⁾. アデニン添加量が0.75mM (0.10g/l) でも6週保存後の輸血後寿命は86%という結果を得ており必ずしもアデニン添加量を増やし ATP を高く保つ必要はない¹⁶⁾. また, リン酸を添加することで低濃度アデニンでも ATP 維持, E.C.維持, ひいては輸血後寿命維持にも良いと思われる.

従って, アデニンの添加量は0.14g/l とするのが適当と考えられた.

3-3. リン酸塩濃度

MAP のリン酸塩濃度は, 濃厚赤血球混和後に CPD 加血液とほぼ同じ濃度 (終濃度2mM) になるように設定した. リン酸塩の添加は, アスコルビン酸-2-リン酸 (APS) 含有系で明かな2,3-DPG 上昇が認められたこと³⁾, 日赤が4連 Bag システムの抗凝固剤を CPD から ACD に変更すること¹⁷⁾, などから赤血球用添加液にはリン酸塩の添加は必要である. また, リン酸塩濃度は12mM に増やしても6mM での結果と同程度であったので6mM で良いと考えた (リン酸濃度より pH の影響が大).

3-4. クエン酸及びクエン酸・Na₃塩濃度

クエン酸及びクエン酸・Na₃塩はフィブリン塊の産生を抑えること¹⁸⁾を目的とし少量 (総クエン酸として CDP 液の1/6程度) 添加した.

図 7

3-5. グルコース濃度

赤血球のエネルギー源として添加した (終濃度約500mg/dl). 他の添加液に比べ低濃度であるが, 図7に示したように7週間保存後でもグルコース量は約250mg/dl 残存した⁵⁾⁷⁾.

3-6. NaCl 濃度

添加液の浸透圧調整のため添加した.

3-7. MAP の pH

MAP の pH 依存性を検討した⁶⁾. ATP レベルは pH 5.7~7.2でほとんど差はなく (図8), 2, 3-DPG レベルは, pH 7.2以上では保存1週間で0週の67%以上, 保存2週で20%以上を維持したが, pH 6.7以下では保存1週で55%以下, 2週では

図 8

図 9

図 10

15%以下と低下し、3週では差が無くなった(図9)。溶血は、pH 5.7~7.8で有意差は認めなかった(図10)。

一方、オートクレープ時の安定性は、グルコース及びリン酸を含むため pH 6 以上では変色、グルコース含量の低下を認めた。従って、グルコースの分解率 5% 以下であるためには、MAP の pH は 5.6~5.8 が適当と考えられた。

以上のことから、MAP の pH は、2,3-DPG の維持を優先するならば 7.2 以上に設定するものをもっとも良いと思われたが、オートクレープ時の安定性及び 2,3-DPG に保存 2 週以降ほとんど差(5%程度)がなくなってしまうことを考慮すると

pH は 5.6~5.8 で止むを得ない。そこで、クエン酸/クエン酸・Na₃塩比を調整し、溶解時の pH を 5.6 とした。

4. 結 語

以上の結果から、表 1 のように MAP 液の組成を決定した。本液は、CPD+SAGM を基本としたもので、液状で赤血球の 6 週間の保存が可能と考えられる。

文 献

- 1) Högman, C.F., Åkerblom, O., Hedlund, K., Roßen, I. and Wiklund, L.: Red cell suspensions in SAGM medium. Further experience of in vivo survival of red cells, clinical usefulness and plasma-saving effects. *Vox Sang.*, 45: 217-223, 1983.
- 2) Heaton, A., Miripol, J., Aster, R., DeHart, D., Hartman, P., Rząd, L., Davisson, W. and Buchholz, D.H.: 49 to 56 day storage of high hematocrit red cell concentrates using ADSOL™ preservation solution. *Transfusion*, 22: 432, 1982.
- 3) 柴 雅之, 笹川 滋, 小方英二, 清水 勝: アスコルビン酸 2-リン酸 (AP) を含む赤血球保存液. *日輸血会誌*, 34: 551-557, 1988.
- 4) 柴 雅之, 村 徹, 笹川 滋: 赤血球保存のための新しい添加液. *日輸血会誌*, 35: 305, 1989.
- 5) 笹川 滋, 柴 雅之, 村 徹: 諸外国で使用されている添加液 (SAGM, ADSOL, OPTISOL) と MAP の比較. 厚生省血液研究事業, 昭和 63 年度研究報告集, p. 307-310.
- 6) 柴 雅之, 村 徹, 笹川 滋: MAP の pH 依存性. 日本赤十字社細胞成分保存に関する特定研究

- 班, 昭和63年度研究報告書, p. 36—38.
- 7) 清水哲男, 古田 求, 額額佳子, 堀江真理子, 高橋恒夫, 宮原正行, 大軒子朗, 田山達也, 笹川 滋, 白木 洋, 長谷川岩三, 横山繁樹, 神谷 忠: 4種類の赤血球保存液の比較7施設での検討結果. 日輸血会誌, 35: 640—645, 1989.
 - 8) 前田信治, 志賀 健: 赤血球変形能異常と微小循環障害. 臨床科学, 21: 218—225, 1985.
 - 9) 笹川 滋, 柴 雅之, 田村 真, 松田 仁: 赤血球保存の為の添加液. 厚生省血液研究事業, 昭和62年度研究報告集, p. 116—118.
 - 10) 笹川 滋, 中野博子, 柴 雅之, 村 徹: 保存赤血球に及ぼす蔗糖の効果. 連続血球容積変化および赤血球浸透圧膜抵抗の測定. 臨床化学, 11: 36—42, 1982.
 - 11) Nakao, M., Nakao, T., Komatsu, Y., Sano, K. and Sasakawa, S.: Isoosmotic sucrose, adenine, inosine media for preservation of blood. Biomed. Biochim. Acta, 42: 527—535, 1983.
 - 12) 笹川 滋, 柴 雅之, 石川善英, 松本 昇, 清水勝, 河邨弘隆: 赤血球保存のための新しい添加液. 血液事業, 11: 202—203, 1988.
 - 13) Card, R.T., Mohandas, N. and Mollison, P.L.: Relationship of post-transfusion viability to deformability of stored red cells. Br. J. Haematol., 53: 237—240, 1983.
 - 14) Högman, C.F., Verdier, C.-H., de Ericson, Å., Hedlund, K. and Sandhagen, B.: Studies on the mechanism of human red cell loss of viability during storage at +4°C in vitro. I. Cell shape and total adenylate concentration as determinant factors for posttransfusion survival. Vox Sang., 48: 257—268, 1985.
 - 15) Dern, R.J., Brewer, G.J. and Wiorkowski, J.J.: Studies on the preservation of human blood. II. The relationship of erythrocyte adenosine triphosphate levels and other in vitro measures to red cell storage ability. J. Lab. Clin. Med., 69: 968—978, 1967.
 - 16) 笹川 滋, 柴 雅之, 村 徹: アスコルビン酸2-リン酸ソーダ (APS) を含む添加液. 厚生省血液研究事業, 昭和63年度研究報告集, p. 310—313.
 - 17) 田山達也: ノンボタン PC 法による血小板凝集防止対策. 日本赤十字社細胞成分保存に関する特定研究班, 昭和63年度研究報告書, p. 181—182.
 - 18) Napier, J.A.F., Ashford, P.R. and Hayward, M. M.: What is the “optimum” optimal additive solution? Vox Sang., 49: 315—318, 1985.
-