

2014270078

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業)

大規模自然災害等に備えた血液製剤の保存法と

不活化法の開発に関する研究

(H24-医薬一般-007)

平成 24 年度～平成 26 年度 総合研究報告書

研究代表者 岡田 義昭

(埼玉医科大学)

平成 27(2015)年 3 月

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業)

大規模自然災害等に備えた血液製剤の保存法と

不活化法の開発に関する研究

(H24-医薬-一般-007)

平成 24 年度～平成 26 年度 総合研究報告書

研究代表者 岡田 義昭

(埼玉医科大学)

平成 27(2015)年 3 月

## 目次

### I. 総合研究報告書

大規模自然災害等に備えた血液製剤の保存法と不活化法の開発に関する研究

研究代表者 岡田 義昭 P 1-P 10

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 P 11

III. 研究成果の刊行物・別刷 P 12-P 39

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業  
(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業)

総合研究報告書

大規模自然災害等に備えた血液製剤の保存法と不活化法の開発に関する研究

研究代表者 岡田義昭 埼玉医科大学病院 輸血・細胞移植部 部長

研究要旨

1. 自然災害等で赤血球製剤の保存温度が逸脱した場合の温度と品質を解析した。20℃を超えると ATP 濃度の低下、2,3-ジホスホグリセリン酸(2,3-DPG)濃度の低下が認められた。生体内生存率に關与する赤血球変形能は、20℃で 66 時間保存しても低下は認めなかった。
2. 血小板の低温保存が血小板形態へ及ぼす影響と血小板上の GPIb 複合体の質的・量的変化との関連性を解析した。冷却による形態変化は加温により可逆性があるが、冷却時間が長くなると形態の回復は著明に低下した。その原因として GPIb 複合体の部分的な切断が加温時に認められ、形態回復を抑制している可能性が明らかになった。
3. 赤血球製剤の病原体不活化法の研究を行い、紫外線照射単独、メチレンブルー (MB) 添加と白色光照射、MB 添加と赤色光の照射等、を検討し改良を重ねた。MB を添加した赤血球製剤に赤色光を照射することで飛躍的に不活化効率が向上した。赤色光は、赤血球に吸収されることなく深い部位まで到達でき、深さ 10mm の赤血球液 (ヘマトクリット 40%) においても 3Log の不活化が認められた。
4. C 型肝炎ウイルス (JFH-1 株) の 60℃の液状加熱によって 5.7Log 以上不活化されることを明らかにした。その機序として、加熱によって HCV の核酸が障害されるのではなく細胞への吸着、又は侵入課程が主に障害されることを明らかにした。
5. アルブミンに JFH-1 株を添加し、最終濃度 8%及び 40%になるようにエタノールを加え不活化を検討した。8%では不活化されなかったが、40%では検出感度以下まで不活化された。
6. C 型肝炎ウイルス (JFH-1 株) と感染者由来の HCV を用いて Fraction II までの Cohn フラクション法を行い、HCV の不活化とウイルス粒子の挙動を解析した。FractioI だけでなく Fra. (II+III) S 分画や Fra. (II+III) P の分画にも感染性が残存していた。感染者由来 HCV は、JFH-1 株と類似した挙動を示した。これらは、従来から HCV のモデルウイルスとして用いられてきた牛下痢症ウイルス (BVDV) と類似していた。BVDV が HCV のモ

デルとして適するウイルスであることを実験的に示すことができた。

7. 末梢血単核球から赤芽球を誘導し、パルボウイルス B19 (B19V) への感受性を検討した。全血から調整した末梢血単核球は、エリスロポイエチン等の成長因子を添加することによって実験に充分使用できる赤芽球細胞が得られた。B19 を感染させるとウイルス抗原や B19V-DNA の複製が確認できた。誘導されたこれらの赤芽球は不活化等の評価に有用であると考えられた。

8. エキソソーム精製試薬を用いてアルブミン液に添加したウイルスを回収したところ、感染性を有したウイルスが沈殿中に濃縮されることがわかった。この方法は、低速遠心機があれば、ウイルスを簡便に感染性を有したまま濃縮できた。

#### 分担研究者

柴 雅之 日本赤十字社血液事業本部  
中央血液研究所 課長  
寺田 周弘 日本赤十字社血液事業本部  
中央血液研究所 係長  
野島 清子 国立感染症研究所 研究員  
下池 貴志 国立感染症研究所  
主任研究官

赤血球製剤に使用できる病原体不活化法の開発も目指した。さらに、HCV の培養が可能な JFH 株と感染者由来 HCV を用いて Cohn の分画法を行い、感染性とウイルス粒子の上清及び沈殿分画への挙動を解析し、JFH-1 と感染者由来の HCV との相違、及び HCV のモデルウイルスとしてこれまで用いられてきたウシ下痢症ウイルス (BVDV) との相違を明らかにすることを目的とした。

#### A. 研究目的

本研究は、大規模自然災害や輸血を介して感染する感染症のパンデミックが発生した場合に備えて、1) 輸血用血液を備蓄するための保存技術の開発、2) 輸血用血液製剤における病原体不活化法の開発、及び不活化評価法の開発を行い、輸血用血液の供給と安全性の確保をはかることを主な目的とした。赤血球製剤の保存に関しては、適正な温度が保持できなくなった赤血球製剤の品質の変化を解析した。また、血小板の保存技術開発では、低温下での血小板の活性化メカニズムを解明し、低温保存への応用を目指した。また、本研究班では、

#### B. 研究方法と結果

##### 1. 赤血球製剤の保存方法の開発と品質の評価

大規模災害時において血液を安定供給するには、血液製剤輸送時あるいは保存時の温度等の逸脱した場合の性状について検討しておく必要があると考えられる。そこで、血液製剤の保存温度の影響について検討した。赤血球濃厚液-LR「日赤」(RCC-LR)を各温度条件で保存した場合、pH は温度に依存して低下した。アデノシン

5'-三リン酸 (ATP) 濃度は 15°C までは影響がみられず、20°C 以上で温度に依存して低下した。2,3-ジホスホグリセリン酸 (2,3-DPG) 濃度は温度に依存して低下し、特に 20°C 以上で著しく低下した。上清ヘモグロビン (Hb) 濃度は 25°C までは影響はみられなかった。赤血球の生体内生存率に関与する赤血球変形能は、20°C で 66 時間保存しても変形能の低下を認めなかった。0°C では、保存 144 時間でも pH、ATP、2,3-DPG 等の項目については良好に保たれており、赤血球の品質に影響はないと思われたが、上清 Hb および溶血率の上昇が認められ、製剤中の電解質濃度に注意する必要があると示唆された。赤血球内のエネルギー代謝経路についての解析を進めることで、2,3-DPG 維持に有効な成分を見出すなど赤血球用保存液の改良が必要である。

## 2. 血小板の低温保存法の開発と血小板機能の解析

細菌汚染防止の観点から、濃厚血小板製剤は低温での保存が望ましい。しかし、低温に曝された血小板は生体内寿命が短くなるため実用化されていない。そこで、低温下における血小板活性化メカニズムを解明するため、冷却が血小板形態へ及ぼす影響と血小板 GPIIb 複合体の質的・量的変化との関連性について検討した。その結果、① 開発した高周波散乱光法を用いて冷却で生じる形態変化には加温により disc 状へ戻る可逆性 (形態回復) があること、②

形態回復は冷却時間が長くなると冷却温度に関係なく低下し、4°C においては 4 時間冷却後は加温による形態回復が維持されるが、48 時間冷却後は形態回復が顕著に低下すること、③ 48 時間冷却後の血小板上では GPIIb 複合体の部分的な切断が生じ、この切断は冷却ではなく、冷却後の加温の段階で生じて形態回復を抑制している可能性があることが明らかになった。今後、血小板の低温保存方法を開発するためには、長時間冷却と冷却後の加温の両過程が及ぼす影響を考慮する必要があるだろう。

## 3. 赤血球製剤での病原体不活化法の開発

短波長の紫外線単独照射による血小板製剤の病原体不活化法に従って赤血球製剤のヘマトクリットを 40%、製剤の深さを 4mm として以下の実験を実施した。紫外線照射によって病原体は効率良く不活化されるが赤血球へのダメージもあることから赤血球の保護剤を検討し、照射前にビタミン C 添加が有効であることを明らかにした。より赤血球にダメージを与えない方法としてメチレンブルー (MB) に 6000 ルクス of 可視光を照射する方法を検討した。牛下痢症ウイルスやシンドビスウイルスなどシングル鎖の RNA ウイルスに対しては、3 Log 以上不活化される効果があった。一方、二重鎖 DNA ウイルスである仮性狂犬病ウイルスに対しては全く効果が認められなかった。さらに不活化効果を向上させるために単波長の赤

色光の検討を行なった。コントロールとして白色光を用いた。MB10  $\mu$ M に 20,000 ルクス照射した。深さ 4mm では 0.6J の赤色光の照射によって不活化効率が飛躍的に向上し白色光より約 1000 倍高まった。さらに深さ 10mm では 1.2J の照射によってシンドビスウイルスを約 3Log 不活化することができた。赤色光を用いることで赤血球に吸収されることなく深い部位まで達するためと考えられた。しかし、二重鎖 DNA ウイルスである仮性狂犬病ウイルスに対しては全く効果が認められなかった。仮性狂犬病ウイルスに対しても効果が得られるように MB の誘導体に注目し、検討した。赤色光を照射して同様の条件下に不活化効率を検討したところ、MB よりも低濃度で強い不活化活性が認められたが、細胞毒性もあった。細胞毒性が認められない濃度での不活化活性は MB の約 10 倍高かった。照射後除去するなど至適条件を検討する必要がある。

#### 4. C型肝炎ウイルスの不活化の評価

培養可能な JFH-1 株を用いて 5%アルブミン製剤中での 60°C 液状加熱の不活化効果を検討した。アルブミン製剤中では、60°C、2 時間の液状加熱で HCV の感染価は少なくとも 5.7 Log 減少し、HCV は効率よく不活化されることが明らかになった。そのメカニズムの解析を行うために以下の実験を行なった。60°C、10 時間の不活化後と氷中 10 時間保存した検体（感染性あり）から RNA を抽出し、HCV-RNA 量を RT-PCR で比較した

ところ不活化の有無によって HCV-RNA 量に変化は認められなかった。また、それぞれから抽出した HCV-RNA を細胞にトランスフェクションしたところ感染性を有する HCV が得られた。その力価も著明な差は認められなかった。また、不活化された HCV と不活化されていない HCV をそれぞれ細胞に感染させ、1 時間後に細胞から RNA を抽出し、HCV-RNA 量を解析したところ、不活化処理された HCV は細胞への吸着・侵入が不活化前よりも 3Log 低下していた。これらから液状加熱によって HCV が不活化されるのは、加熱によって HCV の核酸が障害されるのではなく細胞への吸着、又は侵入課程が主に障害されることが明らかとなった。

#### 5. Cohn の血漿分画法による C 型肝炎ウイルスと牛下痢症ウイルスの挙動の解析

血漿分画製剤はプール血漿を Cohn エタノール法により分画して製造される。これまでにグロブリン、アルブミン製剤における HCV 感染事故はほとんどない。この理由を科学的に明らかにするために実験室レベルで Cohn エタノール法により分画法を確立した。血漿に培養可能な HCV 株である JFH-1 とウインドー期の HCV 陽性血漿をスパイク後、Cohn エタノール分画法により分、HCV の感染性、及びウイルス粒子がどの画分に移行するかを検討した。また、HCV のモデルウイルスである牛下痢症ウイルスについても同様に解析し、HCV との相違を解析した。血漿をクリオと脱クリオ画分

に分画するクリオ/脱クリオ分画、さらに8%EtOHを添加しフィブリノゲン沈殿画分であるフラクションI (Fra. 1画分) とそれ以外の上清S1画分とに分けるFra. 1/S1分画を行い、HCVの感染性がどの画分にもどれだけ存在するかを調べた。その結果、クリオ/脱クリオ分画では99.9%のHCVが脱クリオ画分に分画され、Fra. 1/S1分画では0.7%のHCVがFra. 1であるフィブリノゲン沈殿画分に分画され、99.3%のHCVがS1上清画分に分画されることが明らかとなった。25%エタノールで分画すると上清のFra. (II+III) Sと沈殿のFra. (II+III) Pに感染性が認められ、25%エタノールでは不活化されずに感染性が残存した。クリオ、脱クリオ、8%エタノール、25%エタノール分画におけるJFH-1のウイルスリダクション指数(LRV)はそれぞれ、2.4、0.6、2.7、1.5であった。また、JFH-1と血漿由来HCVはウイルス粒子の挙動に差は認めなかった。牛下痢症ウイルスも同様な挙動を示した。

#### 6. 末梢単核球由来の赤芽球を用いたパルボウイルス増殖系の開発

パルボウイルスB19(以下B19)はin vitroで増殖させることは困難であるが、全血から分離調整したバフフィコートでFilippone(PLoS one 2010. e9496)らの報告に従って培養したところ、実験に使用できる十分な細胞数の赤芽球細胞を得ることができた。得られた赤芽球細胞は、B19に感受性を示し、感染細胞においてB19-DNA

の複製とウイルスタンパク質の発現が確認できた。従来の白血病細胞株ではRNAへの転写が確認されたがB19-DNAの複製やタンパク質への翻訳は確認できなかった。PBMCから誘導した赤芽球を用いた感染系は実際のB19感染を反映している系と考えられた。

#### 7. エキソソーム精製試薬を用いたアルブミン液からのウイルス回収活性化法

病原体の不活化・除去の評価のためには、高い感染価のウイルス液を得る必要がある。これまでは超遠心法や限外濾過法などを用いてウイルスを濃縮していたが、ウイルスによっては濃縮操作によって失活してしまうこともある。今回、市販のエキソソーム精製キットを用いて5%アルブミンに添加したBVDVを沈殿として回収したところ、沈殿中にBVDVが濃縮され、しかも高い感染性を有していることを明らかにした。

#### C. 考察

赤血球製剤が災害等で保存温度の管理ができなくなった場合を想定して各種温度に保存した場合の品質の変化を解析した。20℃以下に保った場合、66時間程度は赤血球の品質に著明な差はなかった。20℃以下は、秋後半から春までの季節が相当する。また、2,3-ジホスホグリセリン酸(2,3-DPG)濃度は現在の保存液では4℃保存でも急速に低下する。保存法の改良にこのマーカーは非常に良い指標になると思われた。各種温度での検討では0℃で保存すると2,3-DPGの



低下が抑制できた。溶血が増加傾向にあったが 4℃よりも低い温度での保存は興味深い。

また、血小板の保存方法の研究では、血小板は低温に曝されると活性化することが問題である。低温保存した後加温した血小板の膜タンパクをフローサイトメトリーを用いて解析したところ GPIb $\alpha$  が切断されることが判明し、血小板の質的・形態変化をもたらしていることが推察された。一方、リストセチンによる凝集も抑制されたことから低温保存と加温がそれぞれ血小板に影響を与えていることが示唆され、血小板製剤の保存の困難さを改めて認識した。

赤血球の病原体不活化法の開発では、可視光を色々な波長が混在する白色光から単波長の赤色光に変えたところ赤血球に吸収されずに深部まで到達することが期待でき、その結果、不活化効率が大幅に向上した。10mm の深さの赤血球液も 3Log 程度不活化できるようになった。LED ランプを用いることで熱を生じることがなく高エネルギーの照射も可能になった。今回は、白色光との比較のため 20000 ルクスで検討したが、50000 ルクスの照射も可能である。また、MB は赤血球に浸透し難いので赤血球内に存在するようなマラリア等の原虫に対しての不活化能力が弱い欠点がある。また、HBV のような二本鎖 DNA を有するウイルスにも効果が弱かった。これらを克服するために MB 誘導体を用いて検討したところ、MB よりも低濃度で不活化効果が認められたが、細胞毒

性も出現した。効果的な使用法を検討する必要がある。

HCV の培養系を用いた液状加熱による不活化の機序解析では、感染性を失ったウイルスが RNA を保持していることは驚きであった。また、細胞への吸着あるいは侵入過程が障害されたために感染できないことを明らかにすることができた。このような解析は血漿分画製剤の不活化関係では例がない。

Cohn のフラクションでは、25%エタノールによる分画の上清と沈殿の両者に HCV の感染性が認められた。かつて人免疫グロブリン製剤投与と HCV 感染の関連が問題になったことがあったが、世界的に見て因果関係があったのは 2 つの製剤だけであり、通常の製法で製造されたグロブリン製剤による感染例の報告はない。25%エタノール処理だけでは感染性は残存することが判明したが、グロブリン製剤は、得られた沈殿をさらに精製する工程がある。これらの工程で HCV は除去され、最終製剤まで感染性を有する HCV は残存しなかったものと推定される。今後、我々の使用したシステムで本当に除去されるのか、機会があれば検証したい。また、Cohn 分画法を JFH-1、HCV、牛下痢症ウイルスの 3 つを用いて検討し、3 者とも同様な挙動を取ることを示すことができた。JFH-1 は、不活化・除去を評価する上で特別な HCV でなく感染者由来の HCV と同じであることを示すことができた。また、牛下痢症ウイルスは、これまで世界中で HCV のモ

デルウイルスとして血液製剤の不活化・除去の評価に用いられてきた。このウイルスがモデルウイルスとして適切であったことも示すことができた。

#### D. 結論

1. 赤血球製剤の保存温度が適正に保てなくなった災害時では 20°C 以下であれば、66 時間程度は品質を保てることが示唆された。
2. 血小板の冷温保存における機能変化は、低温保存中及び再加温中に生ずることが示唆された。
3. メチレンブルーと赤色光を組み合わせることでウイルスの不活化効率が飛躍的に向上した。
4. HCV は 60°C の液状加熱によって効率良く不活化された。その不活化機序は、ウイルス核酸の分解ではなく、主に細胞への吸着又は侵入過程が障害されるためであることを明らかにした。
5. Cohn 分画を行い、JFH-1、血漿由来 HCV、牛下痢症ウイルス間に挙動の差がないことを明らかにした。

#### E. 健康危機情報

なし

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

(英文)

1. Krayukhina E, Uchiyama S, Nojima K, Okada Y, Hamaguchi I, and Fukui K.: Aggregation analysis of pharmaceutical human

immunoglobulin preparations using size-exclusion chromatography and analytical ultracentrifugation sedimentation velocity. *J. Biosci Bioeng.* 2013.115(19): 104-10.

2. Miyauchi K, Urano E, Takeda S, Murakami T, Okada Y, Cheng K, Yin H, Kubo M, and Komano J. : Toll-like receptor (TLR)3 as a surrogate sensor of retroviral infection in human cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012.424(3):519-23

3. Odaka C, Kato H, Ostubo H, Takamoto S, Okada Y, Taneich m, Okuma K, Sagawa K, Hoshi Y, Tasaki T, Fujii Y, Yonemura Y, Iwao N, Tanaka A, Okazaki H, Momose S, Kitazawa J, Mori H, Matsushita A, Nomura H, Yasoshima H, Ohkusa Y, Yamaguchi K, and Hamaguchi I.: Online reporting system for transfusion-related adverse events to enhance recipient haemovigilance in Japan, A pilot study. *Transfus Apher Sci.* 2012 Sep.3

4. Nogawa M, Naito Y, Chatani M, Onodera H, Shiba M, Okazaki H, Matsuzaki K, Satake M, Nakajima K, and Tadokoro K. Parallel comparison of apheresis - collected platelet concentrates stored in four different additive solutions *Vox Sang.* Vol 105, 4, 305-312. 2013.

5. Baylis SA, Blumel J, Mizusawa S, Matsubayashi K, Sakata H, Okada Y,

NublingCM, Hanschmann KM,  
HEV collaborative Study Group.:  
World Health Organization  
International Standard to harmonize  
Assays for detection of hepatitis E  
Virus RNA. Emerg.Infect.Dis.  
2013.19(5):729-735.3)

6.Terada C, Mori J, Okazaki H, Satake  
M, Tadokoro K. Effects of riboflavin  
and ultraviolet light treatment on platelet  
thrombus formation oncollagen via integrin  
IIb 3activation. Transfusion 2014; 54:  
1808-16.

(和文)

1. 活化技術の現状と新規技術の開発。  
検査と技術、42巻、4～7ページ、2014年
2. 瀧崎晶弘、松本真美、岩間輝、柴雅之、  
佐竹正博、田所憲治. 凍結融解を繰り返した  
400mL全血採血由来新鮮凍結血漿の品質  
について.日本輸血・細胞治療学会誌. 印刷  
中

## 2. 学会発表

(海外)

1. Kiyoko Nojima, Takuo Mizukami, Madoka  
Kuramitsu, Chieko Matsumoto, Rieko  
Sobata, Kazu Okuma, Masahiro Satake,  
Kenji Tadokoro, Kazunari Yamaguchi, and  
Isao Hamaguchi Development of

effective prevention method of HTLV-1  
infection by using HTLV-1 sero-positive  
serum in vitro. 2013 AABB ;Denver, USA

2. Evaluation of Hepatitis C Virus JFH-1  
Infectivity and RNA Distribution During  
Plasma Fractionation. Kiyoko Nojima,  
Takashi Shimoike, Takaji Wakita, Isao  
Hamaguchi, and Yoshiaki Okada. 2014  
AABB(アメリカ輸血学会)2014年10月 フ  
ィラデルフィア

(国内)

1. 岡田 義昭、野島 清子、浜口 功 : 末  
梢血単核球から誘導した赤芽球のヒトパ  
ルボウイルス B19 に対する感受性の解析、  
第 60 回日本ウイルス学会、大阪、2012 年
2. 岡田 義昭 : 血液製剤のウイルス感染症  
対策、第 60 回日本ウイルス学会、大阪、2012  
年
3. 下池 貴志、野島 清子、脇田 隆字、  
岡田 義昭 : 血液製剤における C 型肝炎ウ  
イルスの不活化の検討、第 60 回日本ウイル  
ス学会、大阪、2012 年
4. 水澤 左衛子、岡田 義昭 : 核酸増幅試  
験法のための E 型肝炎ウイルスの WHO 国際  
標準品の制定のための共同研究と日本の国  
内標準品の作成について、第 60 回日本輸血  
細胞治療学会、郡山、2012 年

5. 内藤祐、森純平、茶谷真、小野寺秀一、柴雅之、秋野光明、本間稚広、加藤俊明、池田久實、高本滋、田所憲治. 新規赤血球二次製剤（洗浄赤血球、解凍赤血球、合成血）の製剤設計変更および有効期間延長について. 第61回日本輸血・細胞治療学会総会. 横浜, 2013.
6. 森純平、岩間輝、茶谷真、小野寺秀一、榎本圭介、金子祐次、篠崎久美子、松本真実、吉田芳生、内藤祐、林宣亭、栗原勝彦、桑名敏彦、吉田昭治、秋野光明、柴雅之、岡崎仁、佐竹正博、田所憲治. 成分由来FFP-LRの融解後の品質について. 第61回日本輸血・細胞治療学会総会. 横浜, 2013.
7. 岡田 義昭、水沢 左衛子、浜口 功 : 血漿分画製剤からの簡便なウイルスの濃縮法:第61回日本輸血・細胞治療学会、 横浜、2013年
8. 岡田 義昭 : 血漿及び血漿分画製剤からの簡便なウイルス濃縮法とその応用、第61回日本ウイルス学会、神戸、2013年
9. 鈴木雅之、青木麻衣子、加藤光洋、玉栄建次、内野富美子、山田攻、小林清子、池淵研二、岡田義昭:同種骨移植のための骨保管支援業務の現状、第62回日本輸血・細胞治療学会総会、平成26年5月、奈良
10. 岡田義昭、小林清子、池淵研二:リアルタイム RT-PCR を用いた B19-RNA 定量による B19 感染評価系の開発、第 62 回日本輸血・細胞治療学会総会、平成26年5月、奈良
11. 山田攻、加藤光洋、鈴木雅之、内野富美子、小林清子、池淵研二、岡田義昭 : 当院における産婦人科緊急輸血症例の分析とその対策、第 62 回日本輸血・細胞治療学会総会、平成 2 6 年 5 月、奈良
12. 下池貴志、野島清子、脇田隆字、岡田義昭 「血液製剤における C 型肝炎ウイルスの不活化機構の解明」第 62 回日本ウイルス学会学術集会 2014 年 11 月 横浜
13. 浜崎晶弘、松本真美、岩間輝、柴雅之、佐竹正博、田所憲治. 凍結融解を繰り返した新鮮凍結血漿の品質について. 第62回日本輸血・細胞治療学会総会. 奈良、2014.
14. 岩間輝、野川誠之、柴雅之、佐竹正博、田所憲治. 自動血球洗浄装置を用いて調製した洗浄血小板の性状評価. 第62回日本輸血・細胞治療学会総会. 奈良、2014.
15. 栗田良、船戸興自、須藤和寛、寛山隆、野川誠之、三好浩之、柴雅之、佐竹正博、中村幸夫、田所憲治. ヒトiPS細胞を用いた高効率赤血球分化誘導法の検討. 第62回日本輸血・細胞治療学会総会. 奈良、2014.

16. 内藤祐、柴雅之、秋野光明、本間稚広、加藤俊明、紀野修一、池田久實、高本滋 . 保存温度の変化が照射赤血球濃厚液-LR の品質に及ぼす影響について. 第 38 回日本血液事業学会総会. 広島、2014.

17. 藤原満博、若本志乃舞、内藤祐、林宜亨、秋野光明、小野寺秀一、榎本圭介、茶谷真、栗原勝彦、柴雅之、本間稚広、加藤俊明、紀野修一、池田久實、高本滋. 全血液の分離までの時間と温度に関する検討～新鮮凍結血漿-LR の品質について～. 第 38 回日本血液事業学会総会. 広島、2014.

18. 布施久恵、内藤祐、藤原満博、林宜亨、若本志乃舞、秋野光明、小野寺秀一、榎本圭介、茶谷真、栗原勝彦、柴雅之、本間稚広、加藤俊明、紀野修一、池田久實、高本滋. 全血液の分離までの時間と温度に関する検討～赤血球濃厚液-LR の品質について～. 第 38 回日本血液事業学会総会. 広島、2014.

19. 湊崎晶弘、大野裕貴、柴雅之、関原章司、佐竹正博、田所憲治. 過冷却制御で凍結した血漿製剤及び赤血球製剤の品質について. 第38回日本血液事業学会総会. 広島、2014.

20. 船戸興自、長部隆広、常山初江、栗田良、小笠原健一、柴雅之、内川誠、佐竹正

博、中村幸夫、田所憲治. ヒト iPS 細胞由来不死化赤血球前駆細胞株を用いた血液型検査用パネル細胞作製の試み. 第 38 回日本血液事業学会総会. 広島、2014.

21. 一杉芽美、寺田周弘、柴雅之、佐竹正博、田所憲治. 血小板製剤中の血小板粒度分布および凝集状況の検討. 第38回日本血液事業学会総会. 広島、2014.

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表

#### 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

#### 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
M.Nogawa, Y.Naito, M.Chatani, H.Onodera, M.Shiba, K.Matsuzaki, M.Satake, K.Nakajima and K.Tadokoro	. Parallel comparison of spheresis-collected platelet concentrates stored in four different additive solutions	Vox Sanguinis	105	305~312	2013
S.A.Baylis, J.Blumel, S.Mizusawa, K.Matsubayashi, H.Sakata, Y.Okada, C.M.Nubling, K-M. o.Hanschmann, and the HEV Collaborative Study Group	World Health Organization International Standard to Harmonize Assays for Detection Of Hepatitis E Virus RNA	Emerging infection Diseases	19	729~735	2013
C.Terada, J.Mori, aaH.Okazaki, M. Satake, and K.Tadokoro	Effects of riboflavin and ultraviolet light Treatment on platelet Thrombus formation on collagen via integrin $\alpha$ IIb $\beta$ 3 activation	Transfusion	54	1808~1816	2014
岡田 義昭	輸血用血液における病原体不活化技術の現状と新規技術の開発	検査と技術	42	4~7	2014

## ORIGINAL PAPER

# Parallel comparison of apheresis-collected platelet concentrates stored in four different additive solutions

M. Nogawa,<sup>1</sup> Y. Naito,<sup>1,2</sup> M. Chatani,<sup>3</sup> H. Onodera,<sup>3</sup> M. Shiba,<sup>1</sup> H. Okazaki,<sup>1</sup> K. Matsuzaki,<sup>4</sup> M. Satake,<sup>1</sup> K. Nakajima<sup>4</sup> & K. Tadokoro<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Central Blood Institute, Blood Service Headquarters, Japanese Red Cross Society, Tokyo, Japan

<sup>2</sup>Japanese Red Cross Hokkaido Block Blood Center, Sapporo, Japan

<sup>3</sup>Japanese Red Cross Kanto-Koshinetsu Block Blood Center, Tokyo, Japan

<sup>4</sup>Japanese Red Cross Tokyo Metropolitan Blood Center, Tokyo, Japan

## Vox Sanguinis

**Background and Objectives** Partially replacing plasma with additive solutions in platelet (PLT) concentrates (PCs) may help to reduce transfusion reactions. Constituents of PLT additive solutions (PASS) have been revealed to affect the quality of PCs. Previous studies involved pairwise comparison of identical PLTs with two different PASS or multicomparison using random PLTs with three or more PASS. In this study, we performed parallel comparison using PCs from identical donors with four PASS. In addition to traditional parameters, the release of bioactive substances and plasma proteins was assessed.

**Materials and Methods** Platelets collected four times by apheresis from three donors were suspended in Intersol, SSP+, Composol or M-sol with 35% autologous plasma. The PC parameters, including PLT activation markers, glucose consumption, chemokines and plasma proteins, were assessed during 5-day storage.

**Results** Mean PLT volumes were decreased in SSP+, Composol and M-sol after 5-day storage, with significant differences, whereas the hypertonic shock response (HSR) was decreased only in Intersol. Glucose consumption was faster in Intersol and M-sol than in SSP+ or Composol. PLT activation, determined as CD62P, sCD62P, sCD40L and RANTES, was significantly higher in Intersol than the other three PASS. No marked change was observed in fibrinopeptide A and C3a in any PASS.

**Conclusions** M-sol, SSP+ and Composol effectively preserved the quality of PCs. PLT activation was significantly enhanced in Intersol compared with the other three PASS. These effects seem to depend on magnesium and potassium as a constituent. Parallel comparison further verified that the PC quality largely depended on PASS but not donors.

**Key words:** C3a, CD62P, glucose consumption, platelet additive solution, RANTES, sCD40L.

Received: 1 February 2013,  
revised 20 May 2013,  
accepted 2 June 2013,  
published online 27 June 2013

## Introduction

During the past decade in Japan, the rationale for replacing plasma with additive solutions in platelet (PLT)

concentrates (PCs) has shifted to the prevention of non-haemolytic transfusion reactions from the collection of additional source plasma for the manufacture of fractionated products such as coagulation factor VIII. In addition, PLT additive solutions (PASS) may improve the retention of PLT properties on storage compared with PCs stored in plasma.

T-sol (PAS-II) and Intersol (PAS-III) were sequentially developed in the 1990s and widely used in Europe. PCs containing 70% T-sol and 30% autologous plasma

*Correspondence:* Masayuki Nogawa, Research and Development Department, Central Blood Institute, Blood Service Headquarters, Japanese Red Cross Society, Tatsumi 2-1-67, Koto-ku, Tokyo 135-8521, Japan  
E-mail: m-nogawa@jrc.or.jp

provided an acceptable pH and glucose consumption during 5–6 days' storage [1]. Intersol consists of sodium chloride, sodium citrate, sodium acetate and sodium phosphate. However, the inclusion of phosphate was found to lead to a significant increase in glycolysis even though the pH remained satisfactory [2]. To further improve the PC quality, magnesium and potassium were added to Intersol to prepare SSP+ (PAS-IIIIM). PLTs stored in SSP+ show decreased glycolysis and better retention of the HSR response compared with those stored in Intersol [3]. The combined presence of magnesium and potassium reduces the expression of CD62P on PLTs [4]. Magnesium sulphate has been postulated to interfere with the binding of fibrinogen to GPIIb/IIIa, resulting in the inhibition of PLT aggregation [5]. Besides SSP+, Composol, another PAS that contains magnesium and potassium, similarly stabilizes the pH during storage [6].

M-sol, a novel PAS developed by the Japanese Red Cross Hokkaido Blood Center, was designed to be prepared by mixing clinically approved crystalloid solutions and includes both magnesium and potassium [7]. The marked difference of M-sol from commercially available PASs is that it contains glucose, calcium and bicarbonate. M-sol is similar in composition to one of the first PASs reported by Holme *et al.* [8]. PLTs stored in M-sol exhibited more favourably maintained *in vitro* properties for up to 14 days compared with those stored in plasma or SSP+ [7]. Recently, calcium in M-sol has been shown to play an important role in preserving PLTs' *in vitro* properties during storage [9] although some investigators have questioned the role of calcium because it would be chelated by citrate [10]. Moreover, undesirable effects of glucose have been described regarding PLT activation, the morphology score, swirling, glucose metabolism and pH [11].

All PCs in Japan are collected by apheresis, and therefore, it is worthwhile to investigate the properties of PCs in M-sol using apheresis PCs as well as the buffy coat-derived PCs used in the study reported by Hirayama *et al.* [7]. In this study, we compared the *in vitro* properties of apheresis PCs stored with M-sol as well as those stored with Intersol, SSP+ or Composol. We collected PCs from the same donor four times with an interval of more than 2 weeks, each of which was then treated with one of the four PASs to allow parallel comparisons among PASs. In addition, to investigate the effects of PAS on the release of bioactive substances from PLTs during storage, we included the measurement of bioactive substances reported to be associated with non-haemolytic transfusion reactions such as soluble CD40 ligands (sCD40L), RANTES and C3a in addition to traditional PLT storage parameters.

## Materials and methods

### Apheresis and storage of PCs

Platelet concentrates were collected from three donors. Apheresis was performed four times for one donor with an interval of more than 2 weeks. This study design was approved by the Institutional Ethics Committee, and documented informed consent was obtained from the donors. PLTs were collected using the MCS+ blood cell separator (Haemonetics, Braintree, MA, USA) and automatically suspended in either PAS, Intersol (Baxter, Deerfield, IL, USA), SSP+ (MacoPharma, Mouvoux, France), Composol (Fresenius, Bad Homburg, Germany) or M-sol [7], each containing 35% autologous plasma. The composition of the PASs used is shown in Table 1. The PLT yield was targeted to  $2.0 \times 10^{11}$ . Collected PCs were transferred into a gas-permeable polyolefin bag (KBP1000FPN; Kawasumi, Tokyo, Japan) through a leucocyte-removal filter (LRF6-H; Pall, Tokyo, Japan). Contaminating leucocytes were under the detection limit ( $<1 \times 10^5$ /bag) in all PCs evaluated with a flow cytometric method using LeucoCOUNT with FACSCalibur (BD Biosciences, Tokyo, Japan). After standing for 1 h at room temperature without agitation, PCs were stored at 22°C on a flatbed shaker with reciprocal agitation (50 cycles/min) for 5 days. A 10 ml aliquot was taken into a polyvinyl chloride pouch bag using a sterile connecting device (TSCD, Terumo, Tokyo, Japan) for measurements before and after agitation as day 0 and on days 1, 3 or 5, respectively.

### Parameters of PCs

The PLT concentration and mean PLT volume (MPV) were measured using an automated blood cell counter (SF-3000; Sysmex, Kobe, Japan). The total PLT number was calculated by multiplying the PLT concentration by

**Table 1** Composition of platelet (PLT) additive solutions (PASs) (mmol/l)

	Intersol	SSP+	Composol	M-sol
NaCl	77.3	69.3	90	77
KCl	–	5	5	3
MgCl <sub>2</sub> /MgSO <sub>4</sub>	–	1.5	1.5	1.6
CaCl <sub>2</sub>	–	–	–	1
NaHCO <sub>3</sub>	–	–	–	42
Na <sub>3</sub> -citrate	10.8	10.8	10.9	9.4
Citric acid	–	–	–	4.8
Na-acetate	32.3	32.3	27	21
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6.7	6.7	–	–
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	21.5	21.5	–	–
Na-gluconate	–	–	23	–
Glucose	–	–	–	15



the PC volume (weight of PC/specific gravity, 1.01). The pH at 37°C was measured using an automated gas analyzer (RapidPoint 405; Siemens Healthcare Diagnostics, Munich, Germany). On diluting PLTs to  $3.0 \times 10^5/\mu\text{l}$  with autologous plasma, the hypertonic shock response (HSR) was measured using a spectrophotometer (UV-2550; Shimadzu, Kyoto, Japan) according to the method described by VandenBroeke *et al.* [12]. The amount of protein was determined using a BCA protein assay kit (Pierce, Rockford, IL, USA). The ratio of residual plasma in PCs was calculated from the protein content of PC supernatant divided by the value of autologous plasma.

A PC supernatant was prepared by centrifugation at 8000 g for 5 min at 22°C for the measurement of PLT-derived microparticles (PMP), glucose and lactic acid. The PMP were examined by sandwich ELISA employing anti-GPIX and anti-GPIb monoclonal antibodies (Otsuka Pharmaceutical, Tokyo, Japan). The amount of glucose or lactic acid was determined by the Glucose CII Test Wako (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) and Determiner LA kit (Kyowa Medex, Tokyo, Japan), respectively.

#### PLT activation markers

The surface expression of CD62P on PLTs was measured with a flow cytometric method. After fixation with paraformaldehyde followed by washing, PLTs were stained with anti-CD61-fluorescein isothiocyanate and anti-CD62P phycoerythrin (BD Biosciences) in one tube or with the corresponding isotype antibodies as a negative control. The CD61<sup>+</sup> PLTs were counted for up to 10 000 events using an FC 500 flow cytometer (Beckman Coulter, Tokyo, Japan). The proportion of CD62P<sup>+</sup> PLTs was expressed as a fraction of CD62P<sup>+</sup>/CD61<sup>+</sup> events in all CD61<sup>+</sup> events. The supernatant prepared as described above was applied for the measurement of sCD40L, RANTES and soluble P-selectin (sCD62P). The ELISA kits for sCD40L and RANTES were obtained from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA) and sCD62P from PromoCell (Heidelberg, Germany).

#### Plasma proteins

Fibrinopeptide A (FPA) and C3a in the supernatant were measured using Zymutest FPA ELISA kits from Hyphen BioMed (Neuville-sur-Oise, France) and OptEIA human C3a ELISA kits from BD Bioscience, respectively, according to the manufacturer's instructions.

#### Statistical analysis

Differences in the values between storage periods of days 0 and 5 were analysed by a paired *t*-test for each PAS group using the computer software PRISM 5.0 (GraphPad

software, San Diego, CA, USA). For glucose consumption, the significant differences were analysed by one-way ANOVA followed by the Tukey–Kramer test using PRISM 5.0. A *P*-value of <0.05 was considered significant.

## Results

### PC preparation

The characteristics of PCs are given in Table 2. The target number of PLTs was collected in all four PAS units in the range from  $2.49 \pm 0.31 \times 10^{11}$  to  $2.74 \pm 0.19 \times 10^{11}$ . In one of three apheresis PCs using Intersol, the process was cycled five times and resulted in an increase in the PC volume, whereas the others were processed in four cycles. Although the SD value of the volume in Intersol was greater than those in the other three PASs, no significant difference was detected. In addition, the contents of residual plasma were equivalent among the four PASs. These results could additionally allow parallel comparisons of the parameters among the four PAS units.

### Changes in PC parameters during storage

No significant change in PLT concentrations was observed in any PASs between day 0 and 5 values (Table 3). The pH of M-sol was higher than those of the other three PASs throughout the storage period. The increase in the pH between days 0 and 5 was significant only in Composol. The MPV was significantly decreased in SSP+, Composol and M-sol but not in Intersol. On the contrary, a decrease in HSR was evident only in Intersol. PMP increased in all PAS units with a significant increase only in Intersol.

### PLT metabolism

Alterations in PLT metabolism were evaluated by measuring glucose and lactate. Glucose was decreased and lactate was increased with significant differences during 5 days of

**Table 2** Characteristics of platelet concentrates

	Intersol	SSP+	Composol	M-sol
Volume (ml)	237.3 ± 23.3	223.1 ± 3.5	224.1 ± 5.1	222.2 ± 1.8
Plasma fraction (%)	34.5 ± 1.1	35.6 ± 3.9	35.3 ± 3.4	37.3 ± 0.9
Number ( $\times 10^{11}$ )	2.74 ± 0.19	2.49 ± 0.31	2.63 ± 0.32	2.59 ± 0.09

Data are expressed as means ± SD.

**Table 3** Properties of PCs in PASs during 5-day storage

In vitro variable	PAS	Days			
		0	1	3	5
PLT concentration ( $\times 10^{10}/l$ )	Intersol	109.4 $\pm$ 12.3	107.8 $\pm$ 11.0	104.3 $\pm$ 12.6	104.5 $\pm$ 10.7
	SSP+	105.6 $\pm$ 13.0	105.7 $\pm$ 12.8	103.8 $\pm$ 12.6	103.8 $\pm$ 12.5
	Composol	107.1 $\pm$ 10.8	106.5 $\pm$ 9.5	106.5 $\pm$ 11.2	104.4 $\pm$ 8.5
	M-sol	109.3 $\pm$ 3.8	107.7 $\pm$ 2.5	105.7 $\pm$ 2.7	104.8 $\pm$ 2.6
pH (37°C)	Intersol	7.07 $\pm$ 0.01	7.04 $\pm$ 0.02	7.03 $\pm$ 0.03	7.00 $\pm$ 0.05
	SSP+	7.07 $\pm$ 0.01	7.08 $\pm$ 0.01	7.15 $\pm$ 0.02	7.19 $\pm$ 0.06
	Composol	6.94 $\pm$ 0.18	7.01 $\pm$ 0.02	7.12 $\pm$ 0.03	7.17 $\pm$ 0.05*
	M-sol	7.41 $\pm$ 0.17	7.56 $\pm$ 0.08	7.63 $\pm$ 0.05	7.68 $\pm$ 0.05
MPV (fl)	Intersol	7.8 $\pm$ 0.4	7.8 $\pm$ 0.3	7.8 $\pm$ 0.4	7.9 $\pm$ 0.4
	SSP+	8.3 $\pm$ 0.4	8.2 $\pm$ 0.3	7.9 $\pm$ 0.2	7.8 $\pm$ 0.2*
	Composol	8.4 $\pm$ 0.4	8.3 $\pm$ 0.2	8.1 $\pm$ 0.2	7.9 $\pm$ 0.2*
	M-sol	8.2 $\pm$ 0.2	7.9 $\pm$ 0.3	7.9 $\pm$ 0.2	7.9 $\pm$ 0.2*
HSR (%)	Intersol	81.9 $\pm$ 12.0	75.1 $\pm$ 12.8	66.8 $\pm$ 2.7	66.7 $\pm$ 12.6*
	SSP+	82.8 $\pm$ 4.5	87.4 $\pm$ 5.3	86.1 $\pm$ 6.7	80.0 $\pm$ 8.2
	Composol	77.8 $\pm$ 2.0	83.0 $\pm$ 4.4	80.6 $\pm$ 6.9	79.3 $\pm$ 11.5
	M-sol	80.0 $\pm$ 6.8	88.0 $\pm$ 7.6	78.0 $\pm$ 3.9	78.4 $\pm$ 7.7
PMP (U/10 <sup>8</sup> PLT)	Intersol	5.15 $\pm$ 0.93	5.96 $\pm$ 0.4	9.49 $\pm$ 1.99	10.38 $\pm$ 1.91*
	SSP+	9.06 $\pm$ 2.63	7.46 $\pm$ 3.44	8.82 $\pm$ 3.49	10.46 $\pm$ 2.74
	Composol	6.72 $\pm$ 2.39	7.1 $\pm$ 1.94	8.74 $\pm$ 1.1	12.03 $\pm$ 1.43
	M-sol	13.85 $\pm$ 3.82	11.66 $\pm$ 4.59	13.33 $\pm$ 3.31	15.5 $\pm$ 1.97
Glucose (mmol/l)	Intersol	8.07 $\pm$ 0.62	7.73 $\pm$ 0.81	6.70 $\pm$ 0.78	5.37 $\pm$ 0.58*
	SSP+	7.77 $\pm$ 0.61	7.63 $\pm$ 0.38	6.97 $\pm$ 0.40	6.13 $\pm$ 0.45*
	Composol	7.77 $\pm$ 0.46	7.50 $\pm$ 0.54	6.97 $\pm$ 0.41	6.0 $\pm$ 0.41*
	M-sol	16.3 $\pm$ 0.46	16.1 $\pm$ 0.33	14.67 $\pm$ 0.39	13.5 $\pm$ 0.22*
Lactate (mmol/l)	Intersol	0.40 $\pm$ 0.22	1.13 $\pm$ 0.05	2.00 $\pm$ 0.16	5.2 $\pm$ 0.41*
	SSP+	0.60 $\pm$ 0.08	1.30 $\pm$ 0.08	2.37 $\pm$ 0.33	4.17 $\pm$ 0.56*
	Composol	0.43 $\pm$ 0.09	1.17 $\pm$ 0.25	2.57 $\pm$ 0.83	4.17 $\pm$ 0.83*
	M-sol	0.53 $\pm$ 0.05	1.33 $\pm$ 0.09	3.13 $\pm$ 0.26	5.30 $\pm$ 0.14*
CD62P (% positive PLTs)	Intersol	7.6 $\pm$ 2.0	19.8 $\pm$ 6.5	26.1 $\pm$ 7.5	32.3 $\pm$ 7.7*†
	SSP+	7.8 $\pm$ 2.6	9.5 $\pm$ 2.7	6.5 $\pm$ 0.1	11.3 $\pm$ 1.0
	Composol	9.5 $\pm$ 7.2	8.9 $\pm$ 4.2	7.3 $\pm$ 2.7	9.8 $\pm$ 3.0
	M-sol	9.7 $\pm$ 4.6	5.1 $\pm$ 1.5	6.9 $\pm$ 3.2	12.0 $\pm$ 5.0
sCD62P (ng/ml)	Intersol	42.9 $\pm$ 2.2	69.2 $\pm$ 22.4	133.6 $\pm$ 51	194.2 $\pm$ 57.9*†
	SSP+	45.1 $\pm$ 5.6	59.0 $\pm$ 10.7	72.0 $\pm$ 14.2	90.1 $\pm$ 23.5*
	Composol	52.2 $\pm$ 7.6	64.4 $\pm$ 9.1	78.3 $\pm$ 10.2	96.9 $\pm$ 16.2
	M-sol	51.6 $\pm$ 1.6	59.9 $\pm$ 5.5	84.8 $\pm$ 15.2	114.5 $\pm$ 23.6

PLT, platelet; PCs, PLT concentrates; PAS, PLT additive solutions; HSR, hypertonic shock response; MPV, mean PLT volume; PMP, PLT-derived microparticles

Data are shown as means  $\pm$  SD.

\* $P < 0.05$ , paired *t*-test between days 0 and 5.

† $P < 0.05$ .

CD62p and sCD62p data on day 5 analysed by one-way ANOVA followed by the Tukey–Kramer test.

storage in any PAS (Table 3). Furthermore, glucose consumption was accelerated in the units of Intersol and M-sol compared with those of Composol and SSP+ (Fig. 1).

#### PLT activation and bioactive substances

Surface expression of CD62P on PLTs was elevated in the four PAS units with a storage time in parallel with the

increase in sCD62P. Both the ratio of CD62P<sup>+</sup> PLTs and the amount of sCD62P on day 5 were significantly higher in Intersol than the other three PASs (Table 3).

The levels of sCD40L and RANTES in PC supernatant elevated with an increasing storage time in all donors (Fig. 2). The level of increase did not significantly differ among donors, which is true for all PAS groups. However, the mean values for day 5 sCD40L and RANTES

from the three donors were significantly higher in Intersol than the other three PASs ( $P$ -value  $< 0.05$ ).

### Influence on coagulation cascade and complement system

Because diluting plasma with PAS may disrupt the plasma protein balance, we investigated the generation of FPA and C3a as activation indexes of the coagulation

cascade and complement system, respectively. Figure 3 shows that no significant change was observed in FPA during the 5-day storage in any PAS. On the other hand, C3a showed an increasing tendency during the storage period without significance except for SSP+.

### Discussion

We conducted a comparative investigation of the effects of four PASs on apheresis PCs in the context of conventional PLT storage parameters and levels of bioactive substances during the storage period. In order to allow parallel comparison of PASs, we sequentially collected four apheresis-derived PCs from one donor with intervals of more than 2 weeks, which were each processed with four kinds of PAS. This procedure was repeated for three blood donors.

The pH of M-sol-PCs increased during storage up to 7.7 on day 5 in our study. This was probably caused by the excessive loss of carbon dioxide from PCs that contain a large amount of bicarbonate added as a principal ingredient of M-sol. While concerns may arise regarding the high pH of PCs in terms of the PLT function, Radwanski *et al.* [13] recently reported no clear influences on PLT function variables for PCs with a high pH due to bicarbonate in PAS. In fact, a clinical trial using M-sol revealed an acceptable 24-h corrected count increment [14], although these results were observed in PCs with a 5% plasma carry-over.

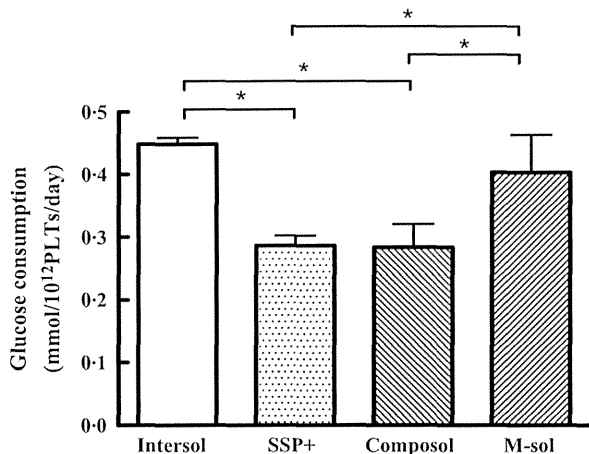


Fig. 1 Glucose consumption rates of platelet (PLT) concentrates (PCs) in PLT additive solutions (PASs) during 5-day storage. Data were analysed by one-way ANOVA followed by the Tukey–Kramer test. Columns and error bars present the mean ( $n = 3$ ) and SD, respectively. \* $P < 0.05$ .

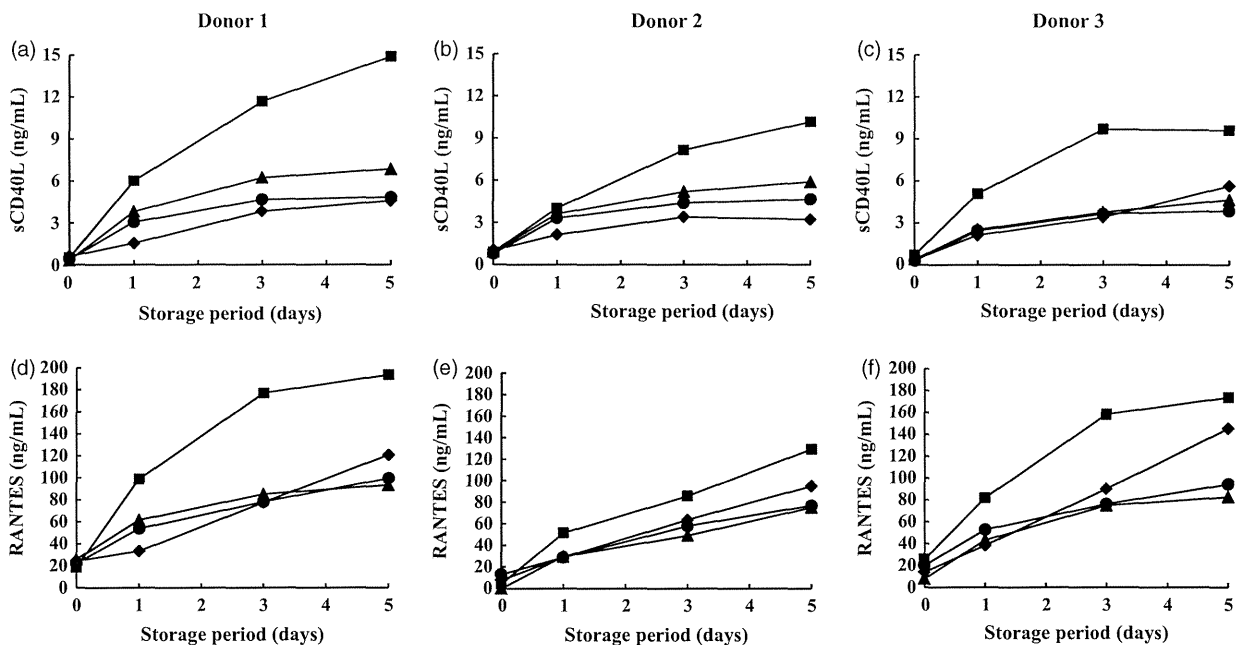


Fig. 2 Changes in sCD40L and RANTES contents in (PLT) concentrates (PCs) supernatant. Concentrations of sCD40L (a–c) and RANTES (d–f) in Intersol (■), SSP+ (▲), Composol (●) and M-sol (◆) for donor 1 (a, d), donor 2 (b, e) or donor 3 (c, f).

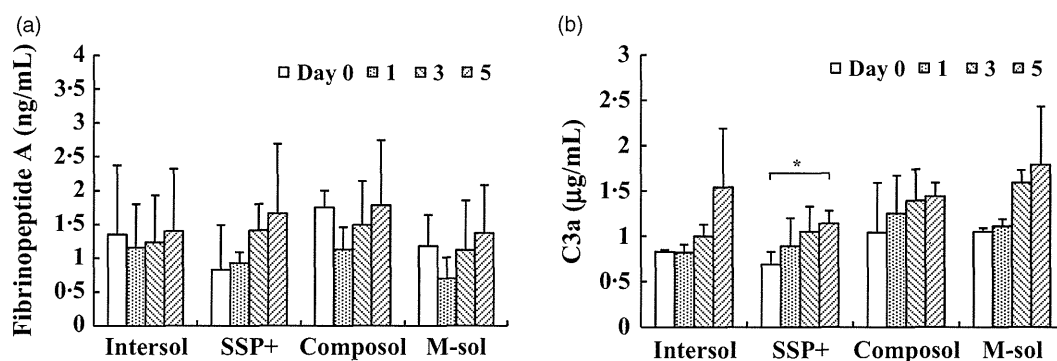


Fig. 3 Changes in fibrinopeptide A (a) and C3a (b) during storage in (PLT) concentrates (PCs). Columns and error bars present the mean ( $n = 3$ ) and SD, respectively.  $^{\dagger}P < 0.05$ , paired  $t$ -test.

In the present study, glucose consumption was lower, and PLT functional variables such as HSR and CD62P expression were maintained more favourably in SSP+ or Composol than in Intersol units. This indicates that the magnesium and potassium in SSP+ and Composol are effective for both preserving the *in vitro* properties of PLTs and preventing accelerated glycolysis. These results are in accordance with those reported by Gullikson *et al.* and de Wildt-Eggen *et al.*, who described the preferential effects of potassium and magnesium in PAS on *in vitro* PLT functions [3, 4]. It is intriguing that in M-sol units that also contain magnesium and potassium, PLT properties are well preserved in spite of the enhanced glycolysis. While the higher glucose content in the initial M-sol unit might have triggered glycolysis enhancement, a recent experiment showed that the high pH in PAS augments glucose metabolism [15]. It is certain that PLT activation and other functional properties are regulated complexly by multiple factors, and further study is needed to elucidate to what extent each of the factors of a high glucose content, high pH or other factor(s) in the initial M-sol units contributes to the augmented glycolysis. It is also necessary to conduct a study to evaluate the post-transfusion recovery or survival of PLTs stored in magnesium- and potassium-containing PAS in a clinical setting.

Recently, calcium was proposed as a key constituent for the maintenance of *in vitro* PLT properties for PCs with a low plasma carry-over ( $\leq 5\%$ ) [9]. In the present study, however, no significant difference in PLT properties was observed between calcium-containing M-sol and SSP+ or Composol that do not contain calcium at a 35% plasma carry-over for 5-day storage. In agreement with this, Sandgren *et al.* [16] reported no significant difference between calcium-containing and calcium-free PAS using PCs with a 20% plasma carry-over. The discordant results among these studies were probably derived from the difference in the plasma carry-over rate in the PCs used.

Microparticles derived from the cell membrane in blood are potential agents that modulate thrombosis and inflammation [17]. PMP have been observed to be generated in blood products during storage [18, 19]. Although the starting level of PMP varied among PAS units in this study, the PMP concentration generally tended to increase with storage in all PAS groups. The significantly higher level of PMP throughout storage observed in M-sol may have resulted from the fragility of the cell membrane against the high extracellular pH [20]. In SSP+ and M-sol groups, the amount of PMP decreased on day 1 as compared to day 0. In one of the three subjects, two (SSP+ and M-sol) of the four samples collected on day 0 showed a markedly higher level of PMP, which elevated the mean value for the day 0 PMP. Possibly, the PLTs from this subject were vulnerable to mechanical damage, and sample manipulation might have caused the degradation of PLT membranes particularly on day 0 just after apheresis collection. Recently, it was reported that PMP are involved in the amplification of inflammation in rheumatoid arthritis via the production of IL-1 [21]. It might therefore be beneficial to keep the PMP content low during storage, although direct evidence for the pathogenicity of PMP in PCs has yet to be presented.

Numbers of studies have argued that cytokines accumulated in PCs during storage are responsible for transfusion reactions [22–24]. The accumulation of cytokines or chemokines produced by leucocytes, but not PLTs, can be reduced by prestorage leucoreduction [25, 26], whereas factors released from PLTs such as RANTES or sCD40L [27] could accumulate in PCs during storage even after leucoreduction [28]. All these factors are known to cause some of the transfusion reactions [29, 30], which provides another rationale for replacing plasma with PASs in PCs [14]. For this reason, we measured the amount of bioactive substances accumulated in PCs in relation to the storage period. As shown in Fig. 2, sCD40L and RANTES increased more slowly in SSP+, Composol and M-sol as