

血液保存における中枢神経影響物質の 変化に関する研究 (第1編)

——血小板濃縮液の保存中におけるアンモニアの蓄積——

岡山大学医学部脳代謝研究施設機能生化学部門 (主任: 森 昭胤教授)

石 居 昭 夫

(昭和60年6月25日受稿)

Key words : ammonia
glutamine
glutamic acid
platelets
blood preservation

緒 言

血液製剤はその保存状態や保存期間に応じて種々の生化学的変化が生じるが、そのうち特に変化の大きな代謝産物の一つにアンモニアがある。たとえば、全血を4°Cで21日間保存すると、NH₃値が500~600μg/dlまで増加することが知られている¹⁾²⁾。このアンモニアの蓄積は輸血用血液製剤にとって好ましいことではなく、時に大きな問題となることがある。たとえば、血中のアンモニアレベルが上昇すると中枢神経系の障害や肝性昏睡を引き起こすことなどが示唆されている³⁾⁴⁾。生体内ではアンモニアは主として肝臓の尿素サイクルによって処理されるが、肝機能の未熟な小児や重症肝疾患などアンモニアの処理能力の低下した患者の輸血時には、できるだけアンモニア含量の少ない血液製剤を用いることが望ましい。

ところで、血液製剤のうち血小板濃縮液(PC)は通常22°C付近の温度で保存されるため、特にアンモニアの経時的上昇が著しいことが報告されている⁵⁾。しかし、PCの保存中に生成するアンモニアの由来やその抑制方法については知られていない。著者はこれらの点を明らかにするため、血小板濃縮液の保存中におけるアンモ

ニア値に及ぼす種々の保存条件の影響について調べ、特に血漿中のアンモニア値とアミノ酸値の関係について検討した。さらに、PC保存中のアンモニアの上昇を抑制する保存方法について検討した。

方 法

血小板濃縮液(PC)の製造には通常の二段階遠心法を用いた。すなわち、CPD-トリプルバッグ(テルモ、PVCバッグ)を用いて約200ml採血し、1900rpm、5分(IEC, DPR-6000)で軽遠心を行い、分離した多血小板血漿(PRP)を重遠心(3500rpm、5分)によって血小板を沈降させる。1時間静置後、穏やかに振盪し、血小板ペレットを20~25mlの血漿に再浮遊させPCを調製する。PCの平均血漿量は24.5±3.5mlであり、平均血小板数は $170 \times 10^4/\mu\text{l}$ であった。血小板の振盪保存には、水平振盪機(Taiyo R-I改良型、50cpm)とellipticalモードの振盪機(Fenwal PR-1、6rpm)を用いた。

乏血小板血漿(PPP)は、1単位のCPD-bloodを4000rpm、5分の遠心条件で分離した血漿から、さらに4000rpm、5分の遠心によって血小板や赤血球を完全に除去したものをを用いた。また、PCからのPPPは、PCを4000rpmで5分

間遠心分離したものを用いた。

アンモニアの測定は Tada 等⁶⁾の超微量拡散法を応用したアミテストメーター（中外製薬）を用いて行った。

pH の測定には、Horiba F-AD 型 pH メーターと 0.3ml 用の微量 pH 電極（オリオン電極 pH90-03）を用いた。同一の PC から数回サンプリングする場合は、ガス交換を防ぐため、サンプリングカップラー（川澄化学工業、S-1）を輸血口に接続し、これを通してディスポーザブルシリンジ（テルモ、2.5ml、23G）で採取した。

アミノ酸分析には高速アミノ酸分析計（医理科工業、A-5500）を用いた。測定用試料には、被検血漿 100 μ l を 60% スルホサリチル酸 5 μ l で除蛋白した後、3000 rpm、5 分間の遠心によって分離した上清液を用いた。サンプルは測定時まで -40°C 以下で冷凍保存した。分離用カラムにはイオン交換樹脂（医理科工業、SCX-1005）を用い、ニンヒドリン法で全アミノ酸を検出した。

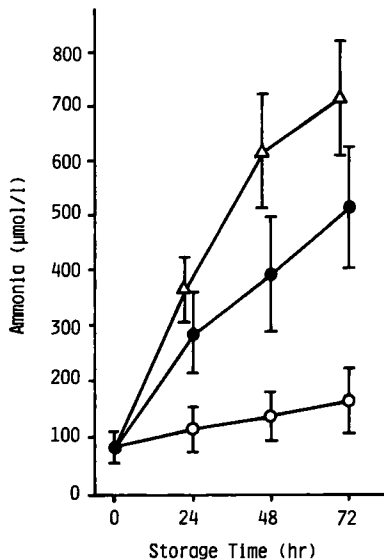


図 1. PC のアンモニア値におよぼす保存温度の影響 (Mean \pm SD, $n=12$).

0 hr における 3 群のアンモニア値の差、及び 24hr 後における 22°C と 37°C の差は統計学的に有意でないが、その他の測定時における 3 群の差はいずれも有意である ($p < 0.05$)

○ : 4°C 静置保存, ● : 22°C 静置保存, △ : 37°C 静置保存

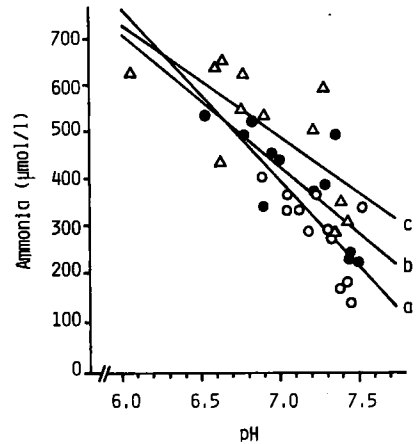


図 2. PC の保存中における pH 値とアンモニア値の関係。

○ : 22°C で 24 時間静置保存 (回帰直線 a, $y = -330x + 2710$, $r = -0.70$, $n = 12$)

● : 22°C で 48 時間静置保存 (回帰直線 b, $y = -295x + 2523$, $r = -0.76$, $n = 12$)

△ : 22°C で 72 時間静置保存 (回帰直線 c, $y = -235x + 2173$, $r = -0.70$, $n = 12$)

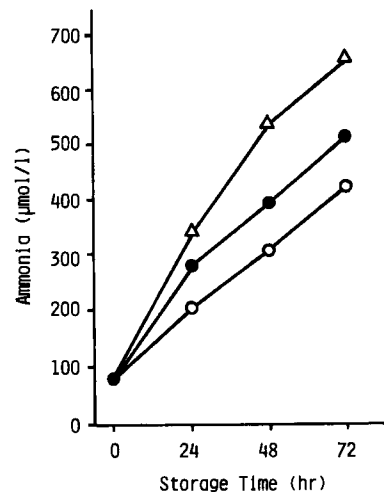


図 3. PC のアンモニア値に及ぼす振盪の影響。

ABO 同型の PC 3 単位をプールし、よく混合した後 3 個のバッグに等量ずつ分注し、 22°C で保存した。

○ : 水平振盪 (50 cpm), ● : 静置, △ : elliptical モードによる振盪 (6 rpm)

結 果

血小板濃縮液 (PC) を種々の条件下で3日間保存し、血漿中のアンモニア値の経時変化を調べた。まず、保存温度の影響を調べたところ、NH₃ 値は 4°C, 22°C, 37°C と温度の上昇に応じて著しく増加した (図 1)。通常の PC の保存温度である 22°C では、72hr 後の NH₃ 値は約 500 μmol/l まで上昇した。

PC の保存中の pH 変化とアンモニア値の関係のデータを図 2 に示す。保存期間が 24 時間、48 時間、72 時間のいずれにおいても、pH が低くなるほど NH₃ 値が高くなる傾向がみられた。すなわち、PC の保存中の pH 値と NH₃ 値の間には負の相関関係が認められた。

次に、PC 保存中の振盪の影響を調べたところ、水平振盪を加えた場合が静置保存よりアンモニアの上昇率が若干低かった (図 3)。しかし、elliptical モードの振盪では静置保存よりむしろ高いアンモニア値を示した。

PC 値の保存中に上昇するアンモニアの起源を明確にするため、PC から血球成分を完全に分離した血漿 (PPP) を先に示した PC と同条件で保存した。その結果、PPP の保存においても、温度に応じてアンモニア値がかなり上昇することが認められた (図 4)。

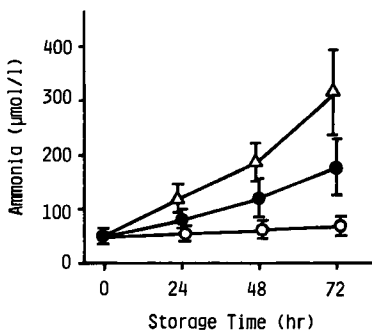


図 4. PPP のアンモニア値に及ぼす保存温度の影響 (Mean±SD)。3 群のアンモニア値の差は、0 hr 以外全ての測定時において有意である (p<0.05)
○ : 4°C 静置保存 (n=5) ● : 22°C 静置保存 (n=7) △ : 37°C 静置保存 (n=5)

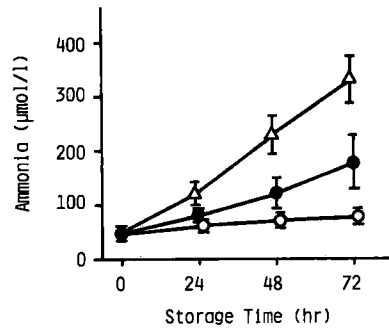


図 5. PPP のアンモニア値に及ぼすグルタミン及びグルタミン酸の影響 (Mean±SD)。3 群のアンモニア値の差は、0 hr 以外全ての測定時において有意である (p<0.05)。
○ : PPP20ml にグルタミン酸 50mg/dl (終濃度) を添加し、22°C で静置保存した (n=5)。
● : control. PPP20ml を 22°C で静置保存した (n=7)。
△ : PPP20ml にグルタミン 50mg/dl (終濃度) を添加し、22°C で静置保存した (n=5)。

この PPP の保存中に発生するアンモニアの由来として、アミノ酸の分解反応が推定される。そこで、比較的血中濃度の高いアミノ酸を PPP に添加して保存したところ、グルタミンを添加した場合にアンモニアの経時的上昇が最も顕著であった (図 5)。一方、グルタミン酸を添加した場合は、アンモニアの蓄積が 1/2 ~ 1/3 に抑制された (図 5)。その他、アラニン、アルギニン、グリシン、ヒスチジン、リジン、フェニルアラニン、スレオニンなどを添加した場合は、血漿アンモニア値にほとんど変化がなかった (データ省略)。

アンモニアの発生がグルタミンの分解に由来するかどうかを確かめるため、同一の血液から製造した PC と PPP を 22°C で 3 日間保存し、そのアンモニア値とグルタミン及びグルタミン酸の経時変化の関係について調べた。その結果、PPP ではアンモニアの上昇度、グルタミンの減少度、及びグルタミン酸の上昇度の 3 者の間にモル比でほぼ 1 : 1 の関係が認められた (表 1)。一方、PC の場合は、アンモニアがグル

表1. PPP及びPCの保存中におけるアンモニア値とグルタミン及びグルタミン酸の経時変化の関係

	Storage Time		
	0 hr	72hr	change
PPP			
ammonia($\mu\text{mol/l}$)	46	229	+183
glutamic acid($\mu\text{mol/l}$)	100	272	+172
glutamine($\mu\text{mol/l}$)	476	235	-241
PC			
ammonia($\mu\text{mol/l}$)	46	346	+340
glutamic acid($\mu\text{mol/l}$)	100	354	+254
glutamine($\mu\text{mol/l}$)	476	242	-234

同一ロットの血液から製造したPPPとPCを用い、それぞれ22°Cで水平振盪によって72時間保存した。PPP及びPCの容量はいずれも約20 mlに調整した。

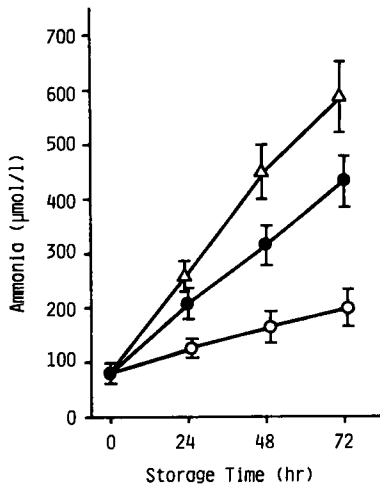


図6. PCのアンモニア値に及ぼすグルタミン酸の影響(Mean±SD).

3群のアンモニア値の差は、0 hr以外全ての測定時において有意である($p < 0.05$).

○: PCにグルタミン酸50mg/dl(終濃度)を添加し、22°Cで水平振盪によって保存した($n = 5$).

●: control (PCを22°Cで水平振盪によって保存した, $n = 10$).

△: PCにグルタミン50mg/dl(終濃度)を添加し、22°Cで水平振盪によって保存した($n = 5$).

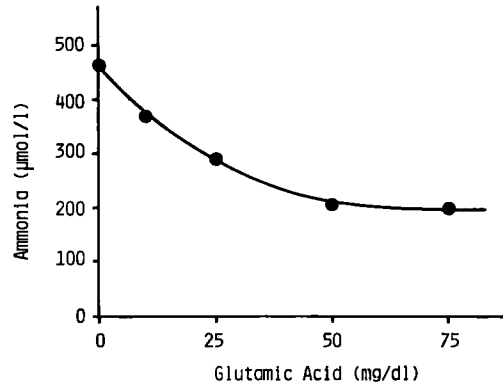


図7. グルタミン酸による保存PCのアンモニア生成抑制効果.

PC 5単位をプールし、よく混合した後5個のバッグに分注した。各バッグに一定量のグルタミン酸を添加し、22°Cで水平振盪によって72時間保存した。グルタミン酸の添加量は添加直後の終濃度で示す。

グルタミン酸よりさらに大きな変化を示した(表1)。

PPPの保存中に発生するアンモニアの抑制に効果のみられたグルタミン酸をPCに添加したところ、この場合もアンモニアの蓄積は顕著に抑制された(図6)。このグルタミン酸によるアンモニアの生成抑制効果はグルタミン酸の濃度に応じて上昇したが、約50mg/dl以上になるとその効果は一定となる傾向がみられた(図7)。

考 察

血小板濃縮液(PC)を保存するとアンモニア値が経時的に上昇することは従来から知られていたが、その由来や抑制方法については明らかではなかった。本研究は、PCの保存中のアンモニアの上昇度は保存条件によって大きく影響されること、またその起源が主として血漿中のアミノ酸濃度の変化と関連することを示した。

まず、保存条件の影響に関する検討から、PCの保存中のアンモニアの蓄積度は保存温度の上昇とpHの低下に応じて増大することがわかった。この現象はUkrainski等⁹⁾によっても指摘されていたが、今回の実験によってより明確に

示された。すなわち、PCのアンモニアレベルは保存温度を4°C、22°C、37°Cと上昇させるに応じて著しく増加した。従って、PCの保存中のアンモニアの蓄積を抑制する目的においては、できるだけ低い保存温度を用いることが望ましいと思われる。しかし、血小板を4°Cで保存するとmicrotubulesなどの細胞内器官の変性が大きく、輸注後の回収率や生体内寿命が22°C保存に比べて低下することが知られている⁷⁻¹⁰。実際にも、最近では血小板は22°C付近の温度で保存されることが多い。この相反する問題を解決するには、血小板の機能に及ぼす保存温度の影響を4~22°Cの範囲で詳細に検討し、血小板が良好に保存され得る最も低温側の限界温度を見出すことが必要であると思われる。

一方、PCのpH値とアンモニア値の間には負の相関関係が認められた。PCの保存中のpHの低下を抑制するには振盪することが有効であることが知られている¹¹⁻¹³。実際に、50cpmの穏やかな水平振盪をかけたところ、アンモニア値は静置法より若干低値に抑制された(図3)。しかし、ellipticalモードのような強い振盪を加えると、逆にアンモニア値が上昇する傾向がみられた。この原因は明らかではないが、強い振盪ストレスにより血小板膜が損傷を受け、血小板内からアンモニアが若干漏出してくる可能性が推定される。いずれにしても、穏やかな水平振盪は血小板機能の維持のためにも良好な方法であるので¹¹⁻¹³、両者の目的に適合した方法と言える。

PCの保存中に増加するアンモニアの起源に関しては、血小板の代謝に由来するものだけでなく、血漿成分自体の分解も大きく寄与していることがわかった。すなわち、血漿中に最も高濃度に存在するアミノ酸の一つであるグルタミンの加水分解がアンモニアの主たる起源であると推定される。この推定は次のような事実から裏づけられる。たとえば、PPPやPCにグルタミンを添加して保存するとアンモニアレベルが顕著に増加したこと(図5)、また、PPPを22°Cで保存すると、アンモニア値の上昇度に応じてグルタミン濃度が低下し、一方グルタミン酸濃度は逆に上昇したこと(表1)などである。

しかも、この変化率はモル比で約1:1であることから、血漿中のグルタミンが加水分解し、グルタミン酸とアンモニアが等量生成したものと考えられる。一般に、血球や血漿中には肝臓や腎臓などと異なりglutaminase活性は存在しないと報告されている¹⁴ことを考慮すれば、このグルタミンの分解は非酵素的反応であると思われる。いずれにしても、その他の血中濃度の比較的高いアミノ酸類のレベルにはほとんど経時的変化がみられないことから、血漿から発生するアンモニアの大部分はグルタミンの分解に由来すると考えられる。

一方、PCのアンモニアの上昇率はPPPの約2.5倍の値を示した。両者の差に相当するアンモニアは血小板の代謝に由来すると思われる。しかし、PCにおけるグルタミンの減少度がPPPに比べて大きな差が認められなかったことから(表1)、血小板自体がグルタミンを直接分解する可能性は小さいと考えられる。赤血球から発生するアンモニアの主たる起源はadenosine deaminaseによる脱アミノ化によることとされていることから¹⁵、血小板においても同様な反応に起因することが推定される。

PCのアンモニア値に及ぼすアミノ酸の影響に関する実験から得られたもう一つの知見は、グルタミン酸をPCに添加するとアンモニアの上昇が抑制されたことである。グルタミン酸のアンモニア抑制効果は濃度依存性を示し、グルタミン酸を約50mg/dl以上添加すれば、3日間保存したPCのアンモニア値を通常値の1/2以下(約200μmol/l)に抑えることができた。このグルタミン酸の添加量は血漿中のグルタミン量の5~10倍に相当することを考慮すると、グルタミン酸によるグルタミン分解の抑制作用は最終生成物の濃度上昇によるproduct inhibition効果に基づくと推定される。

生体内では発生してくるアンモニアを尿素サイクルで尿素に変換して処理することができるが、一度体外に出た血液ではこの反応は起こらず、アンモニアはそのまま血液中に蓄積される。実際に、尿素サイクルに係る尿素のレベルはPCの保存中ほとんど変化しなかった。生体内においても、脳には尿素サイクルが存在し

ないのでアンモニアはグルタミン酸によってグルタミンに変換して一時的に解毒される¹⁶⁾。ここで、必要なグルタミン酸は血中からではなく、脳内で合成されると言われている¹⁷⁾。また、最近、牛の小脳中に極長鎖脂肪酸である lignoceric acid が特異的にグルタミン酸に変換される代謝経路が存在することが示唆された¹⁸⁾。これらと似た原理により、血液製剤の保存中に生成するアンモニアをグルタミン酸によってトラップすることは、輸血時のアンモニアによる副作用や肝臓の負担を軽減する観点から有効な方法の一つであると思われる。特に、血小板製剤はアンモニアの上昇率が高く、しかも一度に20単位以上使用されることも少なくないので、アンモニアレベルの観点による品質管理も必要であると思われる。また、生体の脳中にはグルタミン酸が通常約150mg/100g存在する¹⁹⁾と言われていることを考慮すれば、保存液として必要な50mg/dlのグルタミン酸は生体の安全性の面においても特に問題はないと思われる。

以上のことから、PCの保存中に蓄積するアンモニアの主たる起源は血漿中のグルタミンの加水分解に由来し、これを抑制するにはグルタミン酸の添加が有効であると結論される。将来グルタミン酸を血液保存液の一成分として実用化することも検討する価値があると思われる。

結 語

輸血用血液製剤の品質管理を目的とし、血液製剤の保存中における中枢神経影響物質の変化について調べた。今回は、血小板濃縮液の保存中におけるアンモニア値に及ぼす保存条件の影

響について調べ、さらにアンモニアの発生源、及びアンモニアの抑制方法について検討し、次の結果を得た。

(1)血小板濃縮液のアンモニア値はその保存温度に応じて著しく上昇し、通常の保存温度である22°Cでは72時間後に約500 μ mol/lの高値を示した。

(2)血小板濃縮液を静置保存すると、振盪保存に比べpHの低下が速く、これに応じてアンモニア値も上昇した。すなわち、血小板のpH値とアンモニア値の間に負の相関関係が認められた。

(3)血小板濃縮液の保存中に生成するアンモニアの起源として、血小板の代謝に起因するものだけでなく、共存する血漿中のグルタミンの加水分解が大きな割合を占めていることがわかった。

(4)血小板濃縮液のアンモニアの蓄積を抑制するには、保存中に穏やかな水平振盪によってpHの低下を抑制すること、及びグルタミン酸(終濃度:50mg/dl)の添加によってグルタミンの加水分解を抑制することが有効であった。

謝 辞

稿を終えるにあたり、終始御懇篤なる御指導ならびに御校閲を賜った岡山大学森 昭胤教授に深甚の謝意を表します。種々有益な御助言ならびに御討論頂いた岡山県赤十字血液センター宇多正行博士に深謝致します。また、本研究の実験に協力して頂いた岡山県赤十字血液センター山村 一修士、橋口裕子修士、宮本愛子修士の各士に心から感謝致します。

文 献

1. Bailey, D.N. and Bove, J.R.: Chemical and hematological changes in stored CPD blood. *Transfusion* 15, 244-249, 1975.
2. Latham Jr, J.T., Bove, J.R. and Weirich, F.L.: Chemical and hematological changes in stored CPDA-1 blood. *Transfusion* 22, 158-159, 1982.
3. Walker, C.O. and Schenker, S.: Pathogenesis of hepatic encephalopathy — with special reference to the role of ammonia. *Am. J. Clin. Nutr.* 23, 619-633, 1970.
4. Schenker, S., Breen, K.J. and Hoyumpa Jr, A.M.: Hepatic encephalopathy: current status. *Gastroenterology* 66, 121-151, 1974.
5. Ukrainski, C.T., Goldfinger, D., Pomerance, J.J., Lee, H.C., Farber, S. and Sanchez, R.: Ammonia

- accumulation in platelet concentrates during storage. *Transfusion* 21, 113—117, 1981.
6. Tada, K., Tateda, H. and Metoki, K.: A new method for screening of hyperammonemia. In *Advances in Experimental Medicine and Biology*, Vol 153 (Urea cycle diseases), ed. A. Lowenthal, A. Mori and B. Marescau, Plenum Press, New York and London, pp. 19—27, 1982.
 7. Murphy, S. and Gardner, F.H.: Platelet preservation. Effect of storage temperature on maintenance of platelet viability. Deleterious effect of refrigerated storage. *N. Engl. J. Med.* 280, 1094—1098, 1969.
 8. Valeri, C.R.: Hemostatic effectiveness of liquid preserved and previously frozen platelets. *N. Engl. J. Med.* 290, 353—358, 1974.
 9. Slichter, S.J. and Harker, L.A.: Preparation and storage of platelet concentrates II. Storage variables influencing platelet viability and function. *Br. J. Haematol.* 34, 403—419, 1976.
 10. Filip, D.J. and Aster, R.H.: Relative hemostatic effectiveness of human platelet stored at 4° and 22°C. *J. Lab. Clin. Med.* 91, 618—624, 1978.
 11. Holme, S., Vaidja, K. and Murphy, S.: Platelet storage at 22°C: Effect of type of agitation on morphology, viability, and function in vitro. *Blood* 52, 425—435, 1978.
 12. Snyder, E.L., Koerner, T.A.W., Kakaiya, R., Moore, P. and Kiraly, T.: Effect of mode of agitation on storage of platelet concentrates in PL-732 containers for 5 days. *Vox Sang.* 44, 300—304, 1983.
 13. 宇多正行, 岡田英俊, 内藤俊二, 石居昭夫, 西崎太計志: CPD液を用いた濃縮血小板血漿の調製法と保存法についての検討. *血液事業*, 6, 139—147, 1983.
 14. 勝沼信彦, 富野郁子: グルタミンエースアイソエンザイムと臓器固有代謝. *代謝*, 5, 783—793, 1968.
 15. Lowenstein, J.M.: Ammonia production in muscle and other tissues: the purine nucleotide cycle. *Phys. Rev.* 52, 382—414, 1972.
 16. Tsukada, Y., Takagaki, G., Sugimoto, S. and Hirano, S.: Changes in the ammonia and glutamine content of rat brain induced by electric shock. *J. Neurochem.* 2, 295—303, 1958.
 17. Berl, S., Takagaki, G., Clarke, D.D. and Waelsch, H.: Metabolic compartments in vivo. Ammonia and glutamic acid metabolism in brain and liver. *J. Biol. Chem.* 237, 2562—2569, 1962.
 18. Uda, M., Singh, I. and Kishimoto, Y.: Glutamate formed from lignoceric acid by rat brain preparation in the presence of pyridine nucleotide and cytosolic factors: A brain-specific oxidation of very long chain fatty acids. *Biochemistry* 20, 1295—1300, 1981.
 19. Tallan, H.H.: A survey of the amino acids and related compounds in nervous tissue. In *Amino Acid Pools: Distribution, Formation and Function of Free Amino Acids*. ed. J.J. Holden, Elsevier, New York, pp. 471—485, 1962.

**Changes in substances affecting the central nervous system
in stored blood products. I. Ammonia accumulation
in platelet concentrates during storage**

Akio ISHII

Department of Neurochemistry, Institute for Neurobiology,

Okayama University Medical School

(Director: Prof. A. Mori)

To study how to control the ammonia level in platelet concentrates during storage, the effects of storage conditions on ammonia accumulation in the product were examined. The ammonia level increased significantly with increasing storage temperature from 4°C to 37°C and reached approximately 500 $\mu\text{mol/l}$ after 72 hours of storage at 22°C. There was a negative relationship between the ammonia level and pH value of the product. The ammonia accumulation due to a fall in pH was depressed by applying a gentle flat-bed mode of agitation during storage. More vigorous agitation, such as elliptical agitation, resulted in higher ammonia accumulation. Analysis of changes in amino acids of the product showed that ammonia was mainly derived from non-enzymatic hydrolysis of glutamine in plasma. Glutamic acid had a preventing effect on the ammonia accumulation. The effect was dose-dependent and required approximately 50 mg/dl final concentration to reduce the ammonia level to about half of the normal value. I consider the addition of glutamic acid to the blood preservative to be useful in reducing transfusion reactions due to ammonia.