

原 著

## 赤血球膜の脆弱な Rhnull 血液の冷凍保存法

宮原 正行 大熊 重則 直木 恭子 山村 一  
内藤 俊二 佐藤 泰司 土岐 博信

岡山県赤十字血液センター

(平成 14 年 6 月 27 日受付)

(平成 14 年 9 月 10 日受理)

### CRYOPRESERVATION OF OSMOTICALLY FRAGILE Rhnull RED CELLS

Masayuki Miyahara, Shigenori Ohkuma, Kyoko Naoki, Hajime Yamamura,  
Shunji Naito, Yasushi Sato and Hironobu Toki  
Okayama Red Cross Blood Center

To cryopreserve Rhnull red cells, we studied the osmotic fragility of the cells while seeking an effective method to protect the cells during cryopreservation. The coil planet centrifugation method, hypotonic swelling test and saponin-induced hemolysis test showed that Rhnull red cells were much more osmotically fragile than normal red cells. The osmotic fragility of Rhnull red cells was greater at lower pH levels. The recovery of frozen-thawed Rhnull red cells was approximately 68% and was about 20% lower than those of normal red cells. Autohemolysis on storage after thawing was also higher in Rhnull cells than in normal cells. The adenine-inosine-sucrose (AIS) solution was effective for increasing the osmotic resistance of Rhnull red cells. Incubation of Rhnull red cells with AIS solution before freezing resulted in approximately 80% of recovery in the freezing-thawing process. Sucrose had a marked protective effect against storage hemolysis of frozen-thawed red cells including Rhnull. These data indicate that AIS solution, which increased the osmotic resistance as well as the ATP and 2,3-DPG levels of red cells, is useful for cryopreservation of rare bloods, particularly osmotically fragile red cells like Rhnull.

**Key words** : Cryopreservation, Rare blood types, Rhnull, Osmotic fragility, Sucrose

#### はじめに

血液センターにおける赤血球の冷凍保存の目的は、①感染症や免疫学的輸血副作用の予防対策、②自己血輸血への技術協力、③Rh(-)血液の確保対策、④まれな血液型赤血球(以下、まれ血と略す)の確保対策などであるが、①と②に関しては、近年、核酸増幅検査の導入、自己血の採血・保存法の改良などにより、いずれもほとんど液状保存で行われるようになってきた。しかし、③と

④の目的には冷凍保存は現在も重要であり、特に、まれ血については緊急時対策として必須である。また、まれ血は貴重な血液であることから、長期間冷凍保存できることも求められる。

このような状況下、現在、赤血球の冷凍保存の有効期限は10年と規定されており、この期間においては、赤血球の総ヘモグロビン量、ATP、2,3-DPG、morphology score等の保存指標は良好に維持されていることが報告されている<sup>1)</sup>。しかし、10

年以上冷凍保存した赤血球の回収率は必ずしも明らかでなく、解凍後の溶血率が若干高くなることも指摘されている<sup>1)</sup>。また、まれ血の中には Rhnull のように赤血球膜が脆弱であると言われているものがあり<sup>2)</sup>、冷凍保存中の凍害などにより、解凍後溶血率の上昇だけでなく赤血球回収率そのものが低下することが危惧される。

そこで、我々は、まず比較的使用頻度の多いまれ血の一つである D(b-) について、10 年以上冷凍保存した赤血球を解凍し、その回収率や解凍後溶血率等を調べた。また、Rhnull 血液が低浸透圧や低 pH など、冷凍・解凍工程で起こり得る異常環境に晒された時の赤血球膜抵抗性について、CPC (coil planet centrifugation) 法、swelling 試験、サポニン誘導溶血試験などを用いて調べた。次いで、その赤血球膜抵抗性を強化する方法として、sucrose 等の二糖類を含む赤血球若返り液の効果について検討し、その方法を Rhnull 血液の冷凍保存法に応用することを試みた。

## 方 法

### 赤血球の冷凍保存及び解凍方法

一般の赤血球の冷凍保存及び解凍・洗浄方法は赤十字血液センター業務標準に従って行った<sup>3)</sup>。

### AIS 液による Rhnull 赤血球膜強化法

今回用いた Rhnull 赤血球は、当時 20 歳の健康な女性献血者から見つかった regulator type とみられるものである<sup>4)</sup>。この Rhnull 赤血球濃厚液約 140ml に AIS 液 90ml を添加し、37℃ で 3 時間 incubation した後、前記の方法<sup>3)</sup>で冷凍保存及び解凍・洗浄した。AIS 液は文献の処方<sup>5,6)</sup>に従い、8 mM adenine, 40mM inosine, 15mM glucose, 4 mM sodium phosphate, 10mM sodium citrate, 30 mM sodium chloride, 180mM sucrose を含み、pH を 7.4、浸透圧を 326mOsm に調整した。

### 低浸透圧抵抗試験とサポニン誘導溶血試験

CPC 法による低浸透圧抵抗試験は coil planet centrifuge system (三鬼エンジニアリング社モデル ST) を用いて行った<sup>7)</sup>。低浸透圧 swelling 試験及びサポニン誘導溶血試験は、文献の方法に従い、赤血球の MPV (mean particle volume: 平均赤血球容積) の動的変化を Continuous MPV analyzer

Table 1 In vitro storage characteristics of frozen red cells stored for more than ten years

| Storage indices                            | Period of cryopreservation |              |
|--|----------------------------|--------------|
|  | 1~2 weeks*                 | 12~14 years* |
| Red cell recovery (%)                      | 88 ± 4                     | 74 ± 7       |
| Morphology score (Maximum score: 300)      | 297 ± 3                    | 294 ± 6      |
| Supernatant Hb after thawing (1 hr, mg/dl) | 85 ± 24                    | 549 ± 75     |

\* Five units of D(b-) red cells were frozen for 1~2 weeks and then thawed for measurements (Data are mean ± SD, n = 5)

§ Five units of D(b-) red cells frozen for 12 years (1 unit) 13 years (3 units) and 14 years (1 unit) were thawed for measurements (Data are mean ± SD, n = 5)

(東亜医用電子社) を用いて測定した<sup>8,9)</sup>。

### その他の赤血球保存の指標

赤血球の morphology score は、我々が以前に報告した方法を用い<sup>10)</sup>、遊離ヘモグロビンは tetramethylbenzidine 法<sup>11)</sup>で測定した。ATP, 2,3-DPG は市販キットを使用して測定した (ATP: BMY 社 ATP キット, 2,3-DPG: Sigma 社 UV キット)。

## 結 果

最初に、まれな血液型赤血球の長期と短期の冷凍保存状態について比較した。その結果、D(b-) 赤血球を 12~14 年間冷凍保存した場合、morphology score は 1~2 週間保存したものと同等によく維持されており、また赤血球回収率も約 74% と、1~2 週間のもの比べて若干低下したが、比較的良好な値を示した (Table 1)。ただし、長期冷凍保存すると、解凍後の遊離ヘモグロビン値が高くなる傾向がみられた (Table 1)。この傾向は、解凍後の 4~6 保存の時間が長くなるほど顕著になった (Table 2)。これを改善するため、解凍後の赤血球浮遊液に sucrose を添加 (終濃度: 30 mM) したところ、解凍 24 時間後の遊離ヘモグロビン値は約 1/2 まで低下した (Table 2)。また、morphology score も改善される傾向がみられた (Table 2)。

一方、Rhnull 赤血球の冷凍保存では、解凍後の回収率が 1~2 週間の短期冷凍保存においても約 68% まで低下し、10 年以上冷凍保存すると約 23

Table 2 The protective effects of sucrose on storage of frozen-thawed red cells

| Cryopreservation method             | Period of cryopreservation | Morphology score (Maximum score: 300) |          | Supernatant Hb (mg/dl) |             |
|-------------------------------------|----------------------------|---------------------------------------|----------|------------------------|-------------|
|                                     |                            | 1 hr*                                 | 24 hrs*  | 1 hr*                  | 24 hrs*     |
| Conventional method                 | 1 ~ 2 weeks†               | 297 ± 3                               | 285 ± 6  | 85 ± 24                | 306 ± 57    |
|                                     | 12 ~ 14 years‡             | 294 ± 6                               | 267 ± 12 | 549 ± 75               | 1,568 ± 476 |
| Addition of sucrose after thawing § | 12 ~ 14 years‡             | NT                                    | 282 ± 6  | NT                     | 735 ± 95    |

\*Hours of storage at 4 ~ 6 °C after thawing

§Final concentration of sucrose: 30 mM

†Five units of D(b-) red cells were frozen for 1 ~ 2 weeks and then thawed for measurements (Data are mean ± SD, n = 5)

‡Five units of D(b-) red cells frozen for 12 years (1 unit) 13 years (3 units) and 14 years (1 unit) were thawed for measurements (Data are mean ± SD, n = 5) NT = Not tested.

Table 3 The effects of AIS solution on red cell recovery of frozen Rhnull red cells after thawing

| Cryopreservation method | Red cell recovery (%) |           |
|-------------------------|-----------------------|-----------|
|                         | 1 week*               | 15 years* |
| Conventional method     | 68                    | 23        |
| AIS method §            | 80                    | NT        |

\*Period of cryopreservation of Rhnull red cells

§Rhnull red cells were incubated with AIS solution at 37 °C for 3 hours before freezing. NT = Not tested.

%となり、例数が少ないので断定はできないが、大きく低下する傾向が認められた (Table 3)。

そこで、Rhnull 赤血球膜の脆弱性を確認するため、その低浸透圧溶血抵抗試験 (CPC 法)、低浸透圧 swelling 試験、サポニン誘導溶血試験を行った。その結果、いずれの試験においても一般の赤血球に比べて異常なパターンを示した (Figs. 1 ~ 3)。すなわち、CPC 試験では、Rhnull の溶血開始点 (HSP: Hemolytic starting point) は一般の赤血球に比べて大きく左方 (高張側) にシフトし、21 日保存赤血球よりもさらに低浸透圧抵抗性が弱いことがわかった (Fig. 1)。また、pH を 7.4 から 5.4 に下げるとその傾向はさらに顕著になった (Fig. 1)。Swelling 試験では、Rhnull は MPV の上昇速度が正常赤血球に比べて異常に速く (Fig. 2)、サポニン誘導溶血試験においても正常赤血球と比べて MPV 変化の異常なパターンを示した (Fig. 3)。

そこで、Rhnull の冷凍保存においては、あらか

じめ若返り液である AIS 液を添加し、赤血球膜を強化する方法を試みた。ただし、この保存液はその効果を発揮するのに約 1 週間を要することが難点であった。今回我々は、37 °C での incubation の効果を調べたところ、3 時間の incubation により ATP と 2,3-DPG は最高値を示し、CPC 試験による低浸透圧抵抗性が最も強化され、さらに遊離ヘモグロビン値も 3 時間まではほとんど上昇しないことがわかった (Fig. 4)。

この方法で実際に Rhnull 赤血球と AIS 液を incubation すると、CPC 試験で左方 (高張側) へ大きくシフトしていた HSP が低張側へ若干戻り、低浸透圧抵抗が改善されることが認められた (Fig. 5)。そこで、Rhnull 赤血球を AIS 液で incubation した後、冷凍保存 (1 週間) したところ、解凍後の HSP も AIS 液を添加しない場合に比べてかなり改善され (Fig. 5)、赤血球回収率も約 68% から約 80% まで上昇した (Table 3)。また、解凍後にみられる遊離ヘモグロビン値の上昇傾向も、解凍後の Rhnull 赤血球浮遊液に sucrose を添加 (終濃度: 30mM) することにより顕著に抑制された (Fig. 6)。

## 考 察

血液センターでは、まれ血はその出現頻度によって、0.01% 以下の I 群 (Bombay, -D-, Rhnull 等) と、それより頻度の高い II 群 (Fy(a-), Di(b-), Jr(a-) 等) に分けて管理されている。いずれも緊急時の対応に備えて常に在庫を確保しておか

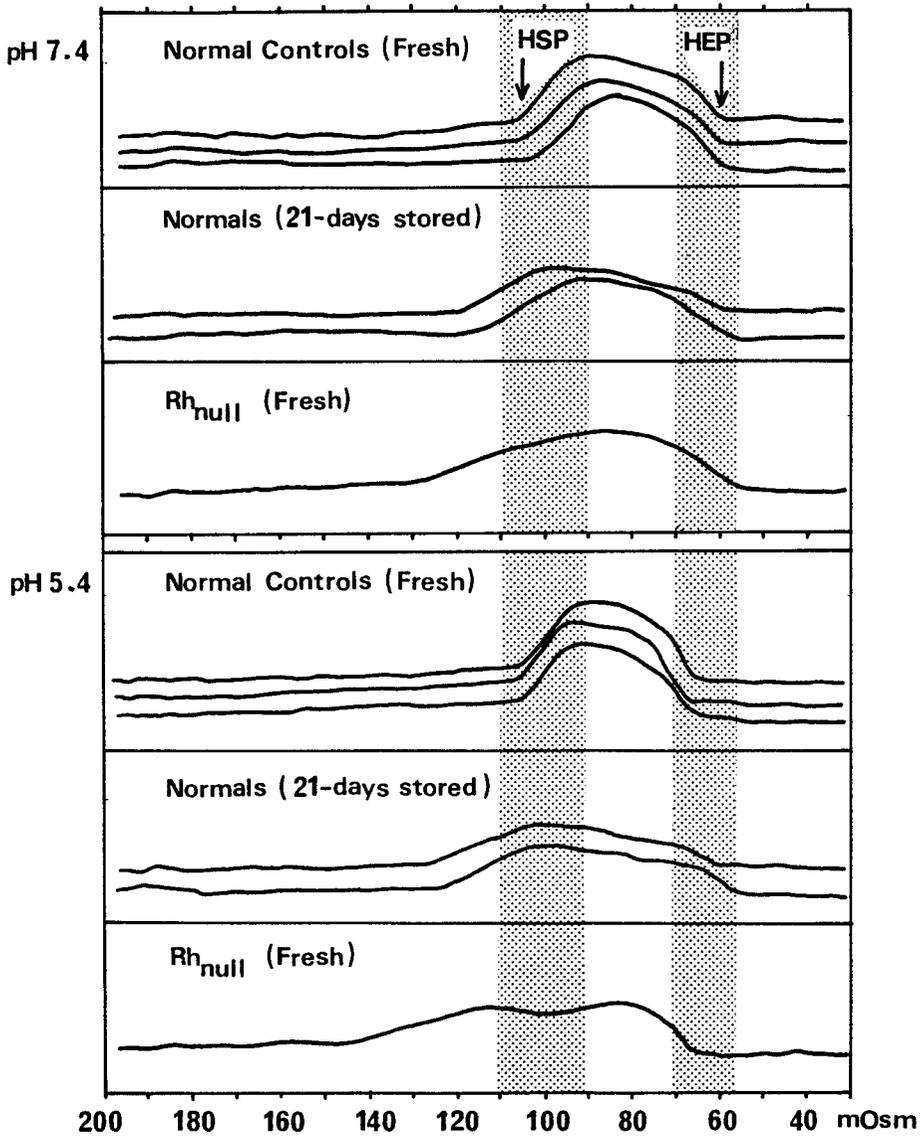


Fig. 1 The hemolytic patterns of normal red cells and Rhnull cells in CPC test. The abscissa indicates the osmotic pressure of NaCl solution in CPC coils. The shaded regions indicate the normal ranges of hemolysis starting point (HSP) and hemolysis end point (HEP)

なければならず、そのためには冷凍保存が必須であり、貴重なまれ血はできるだけ長く冷凍保存できることが望ましい。このような状況下、1993年に冷凍保存の有効期限は5年から10年に延長された。この二つの保存期間の比較研究から、

ATP, 2,3-DPG, morphology score 等には大きな差はないことが報告されており<sup>1)</sup>、その傾向は今回の我々のデータからも確認された。すなわち、12~14年間冷凍保存したD(b-)のまれ血を解凍したところ、morphology scoreは高値に維持さ

れ、回収率も約74%と比較的良好な値を示すことがわかった。また、長期冷凍保存した赤血球は、解凍後の溶血率が上昇する傾向が示唆されていたが<sup>4)</sup>、我々は、この溶血を抑制するにはsucrose等の二糖類を添加する方法が有効であることを示した。

しかし、まれ血の中にはRhnullのように赤血球膜の脆弱なものがあり<sup>2)</sup>、当研究からも、解凍後の赤血球回収率が低下し、特に長期冷凍保存におい

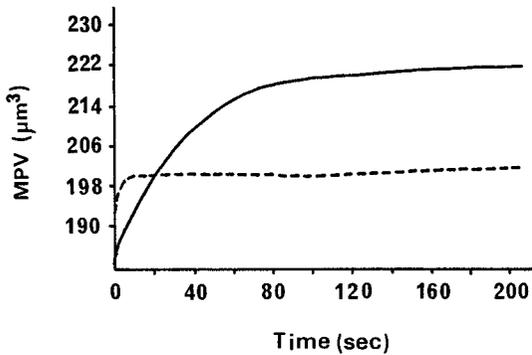


Fig. 2 The cell expansion patterns of normal red cells (—) and Rhnull cells (-----) in 0.5% NaCl-5 mM phosphate buffer in hypotonic swelling test.

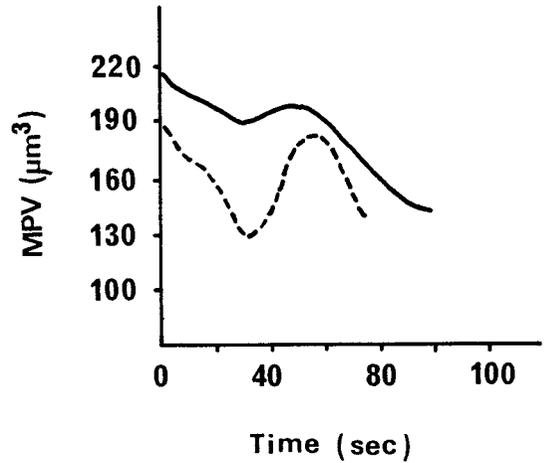


Fig. 3 The MPV-change patterns of normal red cells (—) and Rhnull cells (-----) in saponin-induced hemolysis test.

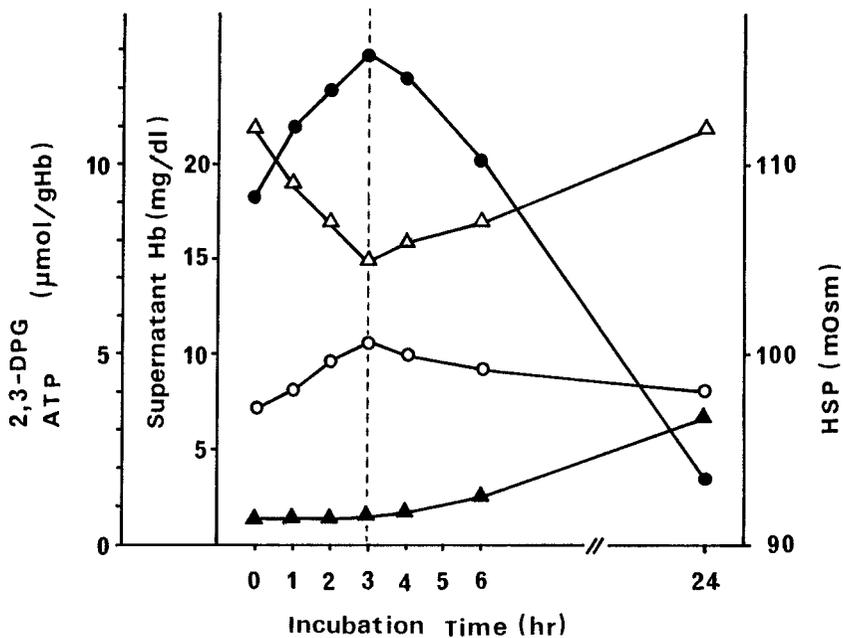


Fig. 4 The effects of AIS solution on ATP (○), 2,3-DPG (△), HSP (●) in CPC test, and supernatant Hb (▲) of red cells at 37°C.

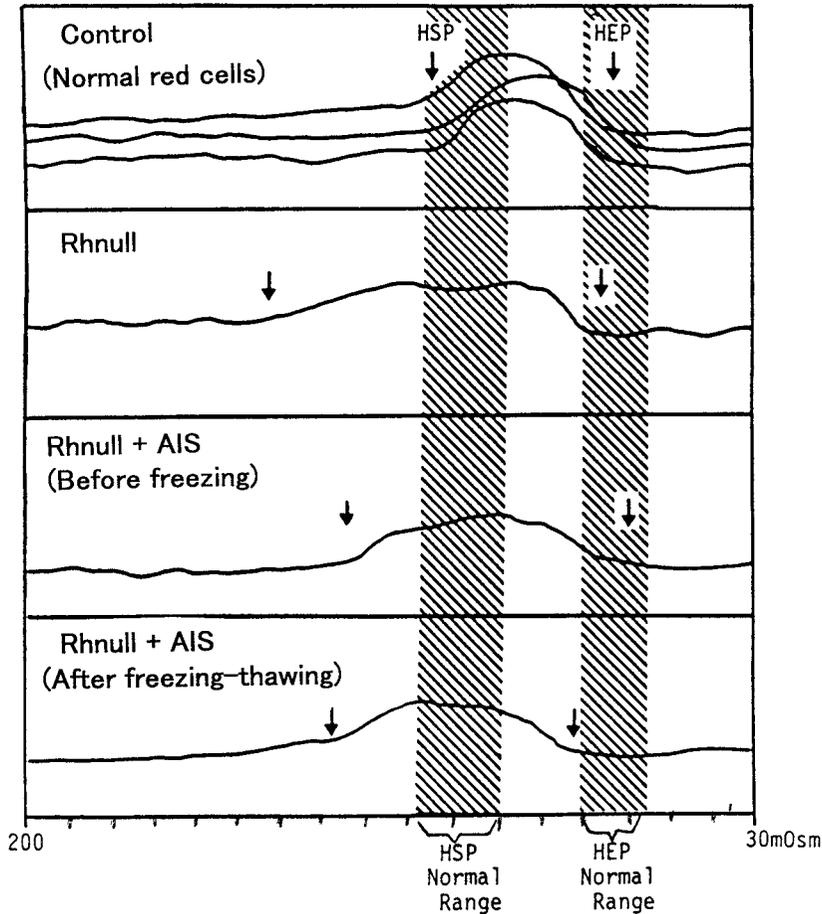


Fig. 5 The hemolytic patterns in CPC test of Rhnull red cells incubated with AIS solution.

The abscissa indicates the osmotic pressure of NaCl solution in CPC coils. The shaded regions indicate the normal ranges of hemolysis starting point (HSP) and hemolysis end point (HEP)

てその傾向が著しいことがわかった。Rhnull 血液は、まれ血の中でも特にまれなものであり、全ての Rh 抗原を欠き、reticulocytosis<sup>2,12)</sup>, stomatocytosis<sup>2)</sup>, 生体内寿命の低下<sup>12)</sup>, 軽い貧血症状<sup>2,12)</sup>等の血液学的な異常性を示す。我々が行った CPC 法や swelling 法による低浸透圧抵抗試験においても、その抵抗性が一般の赤血球に比べて顕著に低下していることが示された。また、サポニン誘導溶血試験においても Rhnull は MPV の異常なパターンを呈することがわかった。Rhnull 赤血球

の膜組成や酵素活性等は正常赤血球に比べて顕著な差はないと言われているが<sup>2)</sup>, 少なくとも低浸透圧抵抗が低いことから、もっと細部あるいは高次の膜構造に差異がある可能性が推測される。この点に関してはまだ不明な点が多いが、Rhnull 赤血球膜上のバンド 3 の SH 基に部分的変異があることなどが示唆されている<sup>13)</sup>。

いずれにしても、Rhnull の赤血球膜の脆弱性が冷凍保存における回収率の低下や解凍後溶血率の上昇の一因となっていることは間違いないと思わ

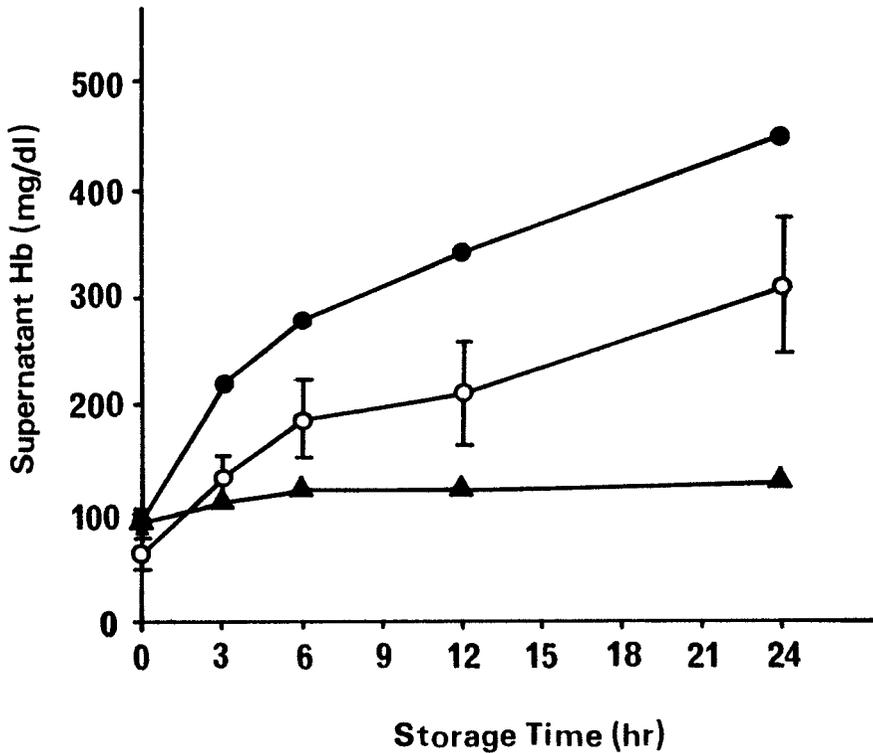


Fig. 6 The effects of sucrose on autohemolysis of frozen-thawed Rhnull red cells during storage at 4 °C.

● : Frozen-thawed normal red cells suspended in 0.9% NaCl ( Ht : 65% ) The vertical bars indicate the standard deviations ( n = 5 ).  
 ○ : Frozen-thawed Rhnull red cells suspended in 0.9% NaCl ( Ht : 65% )  
 ▲ : Frozen-thawed Rhnull red cells in 0.45% NaCl containing 30 mM sucrose ( Ht : 65% , Osmolarity : 290 mOsm )

れる．たとえば，冷凍・解凍工程では，赤血球細胞の脱水，pH の変化，氷晶による細胞の圧迫など，異常な環境に晒されるので，pH 変化の影響を受けやすい Rhnull が特に大きな傷害を受けることは容易に推測される．同様に，Rhnull は生体内においても脾臓の低 pH，高 CO<sub>2</sub> 分圧，細洞の通過などの環境に晒されると脾臓にトラップされ脾腫が起こりやすく<sup>14)</sup>，それは摘脾によって改善される現象<sup>14)</sup>とも共通すると考えられる．

我々は，この Rhnull 赤血球膜の強化対策として，赤血球の若返り効果があると言われている AIS 液<sup>3)</sup>の応用を試みた．この保存液は主成分として，adenine，inosine などの ATP 合成を助ける

nucleotide を含むだけでなく，赤血球膜の低浸透圧抵抗を強化する sucrose のような糖類を含むことが特徴である．我々は，以前に sucrose だけでなく，maltose などの二糖類や mannitol 等の糖アルコールも程度の差はあるが，同様な低浸透圧抵抗の強化効果や溶血防止効果があることを報告した<sup>15)</sup>．これらの糖類の共通点は赤血球膜透過性がないことであり，我々は，この性質により sucrose が赤血球膜の外側に結合し脂質二重層を安定化させ水の透過性を抑制するのではないかと推測している<sup>15)</sup>．ただし，AIS 液はその効果を現すのに約 1 週間の保存期間を要することに難点があった．我々は，AIS 液の添加時に 37 °C で 3 時間 incuba-

tion することによって最も大きな効果が得られることを見出した。この条件で、Rhnull 赤血球の冷凍保存を行った結果、冷凍前の低浸透圧抵抗が強化され、冷凍保存 1 週間後の回収率も改善された。さらに、解凍後の溶血率は、赤血球浮遊液に sucrose を添加することによって顕著に抑制された。

今後の課題としては、Rhnull の 10 年以上の長期冷凍保存においても AIS 液を用いた赤血球膜強化冷凍保存法が有効かどうかについて調べて行きたい。また、まれ血ではないが、心臓手術患者の冷凍貯血式自己血輸血において、解凍後の赤血球回収率が約 65% と他の自己血に比べて低値を示し、赤血球膜の低浸透圧抵抗も低いことが報告されている<sup>16)</sup>。その原因は明らかにはされていないが、このような血液の冷凍保存にも本法が有効ではないかと推測される。

以上述べてきたように、まれ血や自己血のような特殊で貴重な血液を冷凍保存する場合は、今回示した AIS 液のように、少しでも良好に冷凍保存できる条件を選ぶことが重要であると考えられる。

#### 文 献

- 1) 堀江真理子, 堀木ちさと, 飯田俊二, 他: 冷凍血の凍結保存期間の延長について. 日本輸血学会雑誌, 37: 651-655, 1991.
- 2) Hasekura, H., Ishimori, T., Furusawa, S., et al.: Hematological observations on the rh (.../...) propositus, the homozygote of amorphic Rh blood group genes. Proc. Japan Acad, 47: 579-583, 1971.
- 3) 赤十字血液センター業務標準・技術部 (日本赤十字社血液事業部), 151-155, 1992.
- 4) Naoki, K., Uda, M., Uchiyama, E., et al.: Rhnull with naturally occurring antibody. Transfusion, 24: 182-183, 1983.
- 5) Nakao, M., Nakao, T., Nakayama, T., et al.: Further investigation of ATP metabolism and red cell membrane integrity. Acta Biol. Med. Germ, 40: 1003-1008, 1981.
- 6) Sasakawa, S., Nakano, H., Shiba, M., et al.: Sucrose effects on preserved red cells: Measurements of erythrocyte membrane resistance by continuous measurements of cell volume changes and coil planet centrifuge method. Jpn. J. Clin. Chem, 11 (suppl. 1): 36-42, 1982.
- 7) Sasakawa, S., Tokunaga, E., Hasegawa, G., et al.: Osmotic fragility changes in preserved blood: Measurements by coil planet centrifuge and Parpart methods. Vox Sang, 33: 187-192, 1997.
- 8) Ueda, S., Harano, K., et al.: The saponin test and its clinical application. Jpn. J. Clin. Chem, 11 (suppl. 1): 6-12, 1982.
- 9) Tatsumi, N., Maeda, H., Im, T., et al.: A new method of red cell fragility test. Acta Haematol. Jpn, 44: 16-23, 1981.
- 10) 大熊重則, 宇多正行: 赤血球の保存状態の指標としての Morphology score の有用性. 日本輸血学会雑誌, 32: 523-527, 1986.
- 11) Levinson, S.S., Goldman, J.: Measuring hemoglobin in plasma by reaction with tetramethylbenzidine. Clin. Chem, 28: 471-474, 1982.
- 12) Schmidt, P.J., Lostumbo, M.M., English, C.T., et al.: Aberrant U blood group accompanying Rhnull. Transfusion, 7: 33-34, 1967.
- 13) 鈴木雅治, 柴雅之, 笹川 滋, 他: Rhnull 型赤血球膜の性質について(IV). 血液事業, 8: 365-366, 1985.
- 14) Seidl, S., Spielman, W., Martin, H.: Two siblings with Rhnull disease. Vox Sang, 23: 182-189, 1972.
- 15) 大熊重則, 宇多正行, 石居昭夫, 他: 赤血球製剤の保存中の溶血と糖類によるその抑制効果. 血液事業, 7: 285-292, 1984.
- 16) 田山達也, 豊田九朗, 増山哲也, 他: 自己血輸血の経験 自己解凍赤血球濃厚液の低回収率を中心に. 血液事業, 12: 393-399, 1989.