

連続血球洗浄装置 ACP215 を用いて赤血球保存液を加えた FTTC の有効期間延長に関する検討

田村 暁 秋野 光明 佐藤 雅子 本間 稚広 山本 定光
加藤 俊明 池田 久實

赤血球保存液を添加した解凍赤血球濃厚液 (FTTC) について, *in vitro* における長期保存試験を実施した. 冷凍赤血球 (FRC) および FTTC の製造には血球洗浄装置 ACP215 (ヘモネティクス) を用いた. はじめに, FTTC の製造法を検討したところ, Meryman 改良法は Valeri 法よりも洗浄効果が高いことが示された. 次に, 保存液として米国で用いられている AS-3 液, または国内での使用が認められている MAP 液を FTTC に添加・保存し, その性状を調べた. AS-3 を添加した FTTC の製造後 7 日目と 14 日目の溶血率はそれぞれ 1.0 ± 0.2 と $1.2 \pm 0.2\%$ であった. MAP 液を添加した FTTC の製造後 7 日目と 14 日目の溶血率はそれぞれ $0.8 \pm 0.2\%$ と $1.4 \pm 0.3\%$ であった. これらの値を現行の FTTC の 12 時間目の溶血率 ($2.9 \pm 1.4\%$) と比較すると, はるかに低値であることを確認した.

ACP215 を用いて MAP 液を加えた FTTC を製造した場合, 米国食品医薬品局の溶血許容値 (溶血率 1% 未満) を参考にすると, その有効期間を最長 7 日間へ延長する事が可能であると考えられた.

キーワード: 解凍赤血球濃厚液, ACP215, Meryman 改良法, 保存液, 有効期間の延長

はじめに

赤血球にグリセロールを添加し凍結保存する冷凍赤血球 (FRC: frozen red cells) の調製技術が 1950 年に Smith により報告され¹⁾, その臨床使用も含め様々な研究が行われてきた²⁾. 我が国では, 1965 年に隅田らが初めて冷凍血液の臨床使用に成功している³⁾. その後, 日本赤十字社 (日赤) は 1978 年に稀な赤血球型をもつ輸血用赤血球製剤を医療機関へ安定的に供給する目的で, 解凍赤血球濃厚液 (FTTC: frozen thawed red cells) と解凍赤血球浮遊液 (FT RCS: frozen thawed red cells suspension) の供給を開始した. しかし, FT RCS は 1999 年に製造を中止したため, 2004 年には生物学的製剤基準から削除され, 現在は FTTC のみが供給されている.

FTTC の製造には幾つかの方法が知られている. 日赤では米国赤十字社 (ARC: American red cross society) で用いられていた Meryman らの方法⁴⁾を一部改変 (Meryman 改良法) し, 赤血球の凍結・解凍・洗浄を行っている. 従来は FTTC の製造が血液バッグを開放して行われることからクリーンルーム内で行う必要があった. しかし, 最新の血球洗浄装置 ACP215™ (Automated Cell Processor 215, ACP215, ヘモネティクス社製) を用いた場合は閉鎖系回路を持つため, クリーンルーム以外での製造が可能である. 我々は ACP215

を用いて製造された FTTC の性状について検討し, 従来の方法に比べて凍害保護液の除去率が向上している事を確認した. ACP215 は凍害保護液の添加や解凍後の遠心・洗浄操作を装置 1 台で行う機能を備え調製工程も自動化され簡便であるなどの利点も多く, 今後の FTTC の製造に有用な装置と考えられている⁵⁾.

Valeri らは, ACP215 を用いて解凍洗浄した赤血球に, 赤血球保存液 (AS-3 液) を添加することで, その有効期間を従来の 24 時間から 15 日間まで延長させることが可能であったと報告しており⁶⁾, 米国食品医薬品局 (FDA) は, この方法で製造された FTTC に限り, 有効期間を 14 日間まで延長することを承認している⁷⁾. 他方, 我が国では FTTC の製造法が米国とは異なり, また, 赤血球保存液を用いずに赤血球濃厚液としていくことから, 赤血球の長期保存が難しく, 有効期間は製造後 12 時間と日赤が供給する輸血用血液製剤の中で最も短い. FTTC の有効期間の延長には, 製造方法や保存液の効果を明確にする必要がある.

我々は FRC 解凍後の洗浄方法において, Valeri らが推奨している 2 液洗浄法 (Valeri 法) と日赤で用いられている 3 液洗浄法 (Meryman 改良法) との違いを検証し, さらに FTTC の有効期間の延長を目的として, AS-3 液及び日赤で用いられている MAP 液の FTTC への添

Table 1 Composition of the preservative solutions (mg/100ml)

	Dextrose	Adenine	NaH ₂ PO ₄	Mannitol	NaCl	Sodium citrate	Citric acid
① MAP solution	721	14	94	1,457	497	150	20
② AS-3 solution	1,100	30	276	0	410	588	42
③ saline	0	0	0	0	900	0	0

加が、性状や品質に与える影響を検討した。

材料および方法

1. 原料血液

文書にて同意の得られたボランティアドナーから400ml全血採血(抗凝固剤:ACD液)を行い、常法に従って赤血球濃厚液(RC-MAP:red cells-MAP)を得た。血液型が同型のRC-MAPを2または3バッグプールした後、それを等分割し、FRCを調製するための原料血液として、4±2℃で3~5日間保管した。

2. FRCの調製

FRCの調製にはACP215専用の凍結防止剤添加用回路セット225(FRC調製セット225:ヘモネティクス社製)、無菌接合装置T-SCD(テルモ社製)、凍害保護液SF-60(扶桑薬品社製,組成:濃グリセロール60.0,70%乳酸ナトリウム2.57,塩化カリウム0.02,リン酸二水素ナトリウム0.26w/v%)を用いた。はじめに原料血液を室温で2~3時間静置し、その後、T-SCDを用いてFRC調製セット225と接続してACP215に装着した。次にACP215により原料血液に凍害保護液SF-60を400ml添加した。その後、遠心(3,290rpm,8.0×10⁵g・sec,25℃)して上清の大部分を除去し、赤血球層を-80℃のフリーザーにて緩速凍結させてFRCとした。

3. FTRCの製造

約4カ月間凍結保存したFRCを37℃の恒温水槽にて急速解凍後、ACP215を用いて希釈・洗浄操作を行った。洗浄はACP215専用の凍結防止剤除去用回路セット235(FTRC製造セット235:ヘモネティクス社製)に解凍したFRCを接続後、以下の各々の方法で行った。

3-1. Valeri法(2液洗浄法)

12w/v%塩化ナトリウム液50mlを添加後、0.9w/v%塩化ナトリウム-0.2w/v%グルコース液(扶桑薬品社製)を用いた反復遠心(全量1,470ml)による洗浄操作を行った。

3-2. Meryman改良法(3液洗浄法)

8w/v%塩化ナトリウム液100mlを添加後、1.6w/v%塩化ナトリウム液450mlを用いて洗浄し、続いて0.8w/v%塩化ナトリウム-0.2w/v%グルコース液(リン酸水素ナトリウム0.294%,リン酸二水素ナトリウム0.049w/v%含む,扶桑薬品社製)を用いた反復遠心(全量1,000ml)による洗浄操作を行った。

いずれの方法においても、洗浄操作終了後は遠心(3,530rpm,1.0×10⁵g・sec,22℃)して、上清を除去し、FTRCとした。

4. 赤血球保存液を加えたFTRCSの製造

3-2. Meryman改良法によるFTRCの製造後、上清を除去せずにACP215を用いてTable1に示す3種類の溶液を添加した。①赤血球濃厚液の保存液として日赤で使用されているMAP液(テルモ社製テルモ血液バッグMAP液[®]付属)、②FDAにおいてFTRCを14日間保存するための保存液として認可されているAS-3液(Pall Medical社製Leukotrap[™]付属)、及び③生理食塩液(生食)である。MAP液とAS-3液中の成分はほぼ同一であるが、MAP液にのみマンニトールが含まれる。

赤血球保存液(240ml)の添加はACP215により自動で行い、FTRCSを製造した。FTRCSは保存液の種類に応じてMAP添加FTRCS(MAP)群、AS-3添加FTRCS(AS-3)群、生食添加FTRCS(生食)群とし、全て2~6℃で14日間静置保存した(n=3)。

5. 検査項目および測定法

FTRCの製造方法の比較試験においては、FTRCの製造直後および保存12時間、24時間後にサンプルを採取した。赤血球保存液を加えたFTRCSの試験では、FTRCSを14日間保存し定期的にサンプルを採取した。

本論文で使用した検査項目とその方法をTable2にまとめた。

6. 統計処理

Valeri法およびMeryman改良法によるFTRCの比較は、paired t-testを用いて危険率(P)5%未満を有意とした。3種類の保存液によるFTRCSの比較は、repeated measures ANOVAにより危険率5%未満で有意差がみられた群間に対しBonferroni検定を用い、危険率1%未満を有意とした。

結 果

1. FTRCの製造法の比較

Valeri法またはMeryman改良法で製造されたFTRCの性状をTable3に示した。

生物学的製剤基準では、「解凍人赤血球濃厚液」の規格として、重量試験の結果が血液200ml全血採血由来あたり63g(400mlの場合126g)以上であり、且つヘモグロビン(Hb)含量が24.0g/dl以上であることとさ

Table 2 Methods for measuring in vitro qualities of FTRCs and FTRCSSs.

Measurements	Method
Volume	For the calculation of FTRCSSs, specific gravity 1.063 was used.
Cell counting (RBCs, WBCs, PLTs)	K-4500 TM (Sysmex)
Hb, Ht, MCV	K-4500 TM (Sysmex)
ATP	Luminescence enzyme method using Gene Light 55 TM (Microtec Niton)
2,3-DPG	2,3-DPG 「RD」 TM (Roche Diagnostic)
Morphological index	Usry's method ⁸⁾ , fixed with 0.25% glutaraldehyde
Supernatant K ⁺	644 Na ⁺ /K ⁺ /Cl ⁻ analyzer (Bayer Medical)
Supernatant pH (at 37°C)	248 pH/blood gas analyzer (Chiron Diagnostics)
Supernatant Hb	LCV method ⁹⁾ by UV-2500PC TM (Shimadzu)
Percent hemolysis	$Percent\ hemolysis\ (\%) = (100 - Ht) \times \frac{sup. Ht\ (mg/dl)^{10})}{Total\ Hb\ (mg/dl)}$
Supernatant glycerol	F-Kit Glycerol TM (Roche Diagnostic)
Removal percent of sup. glycerol	removal percent from sup. glycerol of FRC
Supernatant Osmolality	Cryoscopic method
Bacterial culturing test	Signal Blood Culture System TM (Oxoid), incubated at 37°C and examined for 7 days growth.

Table 3 In vitro qualities of FTRCs that had been deglycerolized by different methods and stored at 4°C for 24 hours.

Variable	Deglycerolization method	FTRC		
		0hr	12hr	24hr
Supernatant hemoglobin (mg/dl)	Valeri	188 ± 86	1,656 ± 1,018	2,389 ± 1,239
	Meryman	106 ± 55		
Percent hemolysis (%)	Valeri	0.4 ± 0.2	3.1 ± 2.0	4.5 ± 2.4
	Meryman	0.2 ± 0.1		
Supernatant K ⁺ (mEq/l)	Valeri	1.9 ± 0.8	33.4 ± 7.3	45.9 ± 8.4
	Meryman	1.9 ± 0.5		
Supernatant osmolality (mOsm/kg·H ₂ O)	Valeri	333.3 ± 22.4	333.1 ± 15.0	334.1 ± 12.8
	Meryman	319.8 ± 11.1		
Supernatant glycerol (mg/dl)	Valeri	223.2 ± 117.5		
	Meryman	142.7 ± 76.7		
Removal of glycerol from FRC (%)	Valeri	99.6 ± 0.1		
	Meryman	99.8 ± 0.1		

Data are shown as mean ± SD (n = 9), *P < 0.05, **P < 0.01

All units met the weight and Hb concentration criteria specified in "Minimum Requirements for Biological Products".

All samples were negative on sterility tests performed after 24 hours of storage.

れている。今回検討したいずれの解凍・洗浄方法においても、製剤試験の基準を満たしていた。

上清 Hb 濃度および溶血率は、製造直後では Valeri 法に比べ Meryman 改良法が低値を示したが、保存 12 時間後には両者に有意差はみられなかった。上清カリウム値は両群で有意な差がみられず保存と共に上昇した。上清浸透圧値は Meryman 改良法由来 FTRC が Valeri 法由来 FTRC に比べ、保存期間中は常に低値を示していた。製造直後の上清グリセロール濃度とグリセロール除去率については Meryman 改良法由来 FTRC が有意に低値を示していた。保存 24 時間後に行った無菌試験の結果は 7 日間の培養で全て陰性であった。

2. 赤血球保存液を添加した FTRCS の長期保存

各赤血球保存液を添加した FTRCS の製造直後の性状は、MAP 液、AS-3 液、生食の各群間で有意差は認められず、容量は平均 264ml、ヘマトクリット値が平均 49%、ヘモグロビン (Hb) 濃度及び Hb 回収率は平均でそれぞれ 15.8g/dl 及び 73.7% であった。

赤血球保存液を添加した FTRCS を 14 日間保存し、赤血球機能等の変化を調べた (Fig. 1)。

赤血球機能の重要な指標となる ATP 濃度は、保存中に値が徐々に低下し、14 日間保存後は三群間で差が認められなかった (Fig. 1-a)。2,3-DPG 濃度は、各群とも保存初期から著しく低下し、保存 7 日目以降は三群間

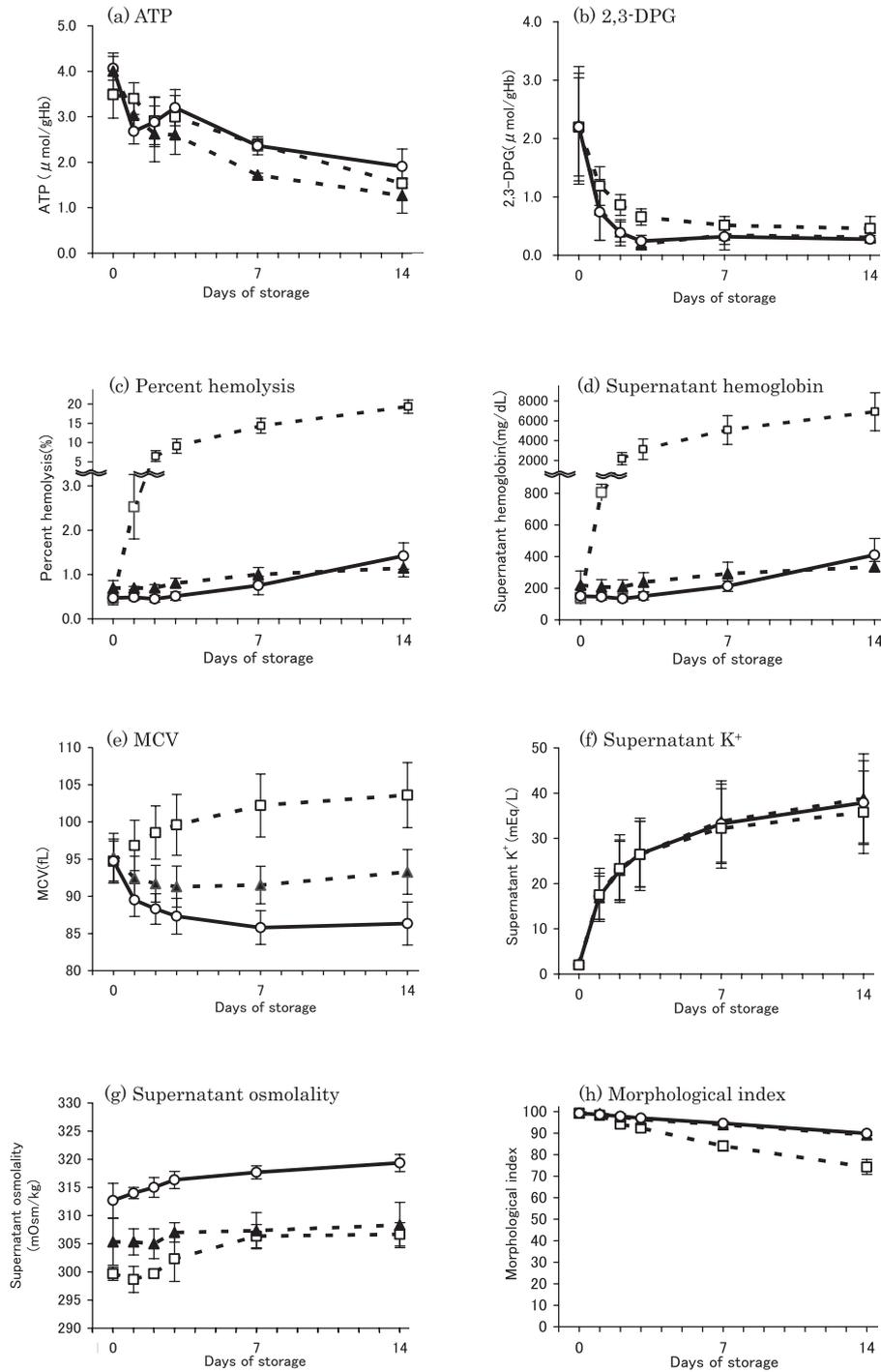


Fig. 1 In vitro qualities of FTRCSs stored for 2 weeks at 4°C in each preservative solution. In vitro qualities of FTRCSs suspended in MAP —○—, AS-3 -▲- and saline -□- are shown. All units were prepared by an ACP215 using the modified Meryman method. For the measurements, ATP (a), 2,3-DPG (b), percent hemolysis (c), supernatant hemoglobin (d), MCV (e), supernatant K⁺ (f), supernatant osmolality (g) and morphological index (h) are shown. Data are shown as mean ± SD (n = 3).

で差が認められなかった (Fig. 1-b).

溶血率については、製造直後は MAP 群が $0.5 \pm 0.1\%$ 、AS-3 群が $0.7 \pm 0.2\%$ 、生食群が $0.5 \pm 0.1\%$ と三群間に差はみられなかったが、生食群は保存初期から急激な溶血の進行を認めた (Fig. 1-c)。MAP 群と AS-3 群は、保

存 3 日目までは製造直後の値を維持し、保存 7 日目にはそれぞれ $0.8 \pm 0.2\%$ 、 $1.0 \pm 0.2\%$ と製造直後に比べ若干上昇した。保存 14 日目には MAP 群で $1.4 \pm 0.3\%$ 、AS-3 群で $1.2 \pm 0.2\%$ と有意差は認められなかったが、それらの値は生食群の保存 1 日目より低値であった (P <

0.01). 上清 Hb 濃度の変化は、溶血率と同様の傾向を示し、保存 14 日目の MAP 群, AS-3 群の値がそれぞれ、 $410 \pm 104 \text{mg/dl}$, $336 \pm 33 \text{mg/dl}$ であった (Fig. 1-d).

MCV 値は製造直後では三群間に差がみられなかったが、生食群では保存 1 日目以降から値が上昇した ($P < 0.01$). MAP 群は保存と共に MCV 値が低下したものの、AS-3 群は保存中ほぼ一定であった (Fig. 1-e).

上清 K^+ 濃度は保存と共に上昇したが、保存液による違いは認められなかった (Fig. 1-f). 7 日間保存した MAP 群の上清 K^+ 濃度は、保存液を含まない FTRC の 12 時間保存の値と同等であった。

上清 pH の製造直後の平均値は MAP 群が 6.6, AS-3 群が 6.4, 生食群は 6.8 を示し、14 日間保存中は生食群において pH の低下傾向がみられたが、MAP 群と AS-3 群は製造直後の値を維持していた (図示さず).

上清浸透圧は製造直後から MAP 群と生食群で有意差がみられた ($P < 0.01$). 生食群では、保存と共に値がやや上昇する傾向がみられたが、MAP 群と AS-3 群では変化がみられなかった (Fig. 1-g).

赤血球形態の指標となる、morphological index は製造直後から保存 2 日目までは三群間に差が認められなかったが、保存 3 日目以降は生食群が他群と比較して有意に値が低下していた (Fig. 1-h).

製造直後のグリセロール濃度は三群間に差は認められず、いずれの群も 99% 以上のグリセロールが除去されていた (図示さず).

考 察

FTRC の総供給本数は年間 500 本程度と少ないものの、輸血医療にとっては稀な血液型の確保などに不可欠な製剤である。しかし、日赤から供給される FTRC は赤血球保存液を添加していない状態で保存されているため、保存に伴う溶血の進行が懸念され、その有効期間が製造後 12 時間と短い。今後、有効期間の延長が可能となれば、医療機関における当該製剤の使用、血液センターでの製造及び遠隔地への供給体制に時間的な余裕が生まれる。本報は、最新型の血球洗浄装置を用いて FTRC を製造し、国内で唯一承認されている赤血球保存液 (MAP 液) を添加することで、FTRC の有効期間延長の可能性を検討したものである。

FTRC は他の輸血用赤血球製剤と異なり、製造時に複数の薬液を添加する必要がある。そのため、血液バッグが開放され、細菌汚染の防止にはクリーンルームでの操作が必須である。我々が検討に使用した ACP215 は、T-SCD と併用することで、閉鎖的かつ自動的に血球洗浄操作が行え、クリーンルームが不要である⁵⁾。大容量遠心機をもたない医療機関等も ACP215 により、それらの製造を容易に行える可能性があり、今後の輸

血や細胞治療の分野で広く使用される期待が高い。そこで我々は FTRC の製造に ACP215 を使用した。

ACP215 を用いて FTRC を製造した欧文報告は数多くあるが^{8)11)~13)}、それらは全て Valeri 法が用いられている。一方、日赤では Meryman 改良法を用いている。そこで今回我々は、各法で製造された FTRC の性状を調べた。Meryman 改良法由来 FTRC は、Valeri 法由来 FTRC に比べて、血球の洗浄効果の指標となる FRC からのグリセロール除去率が高いことを確認した。Valeri らは洗浄液量の増加と、洗浄に要する時間の延長を考慮し、2 液洗浄法を推奨している¹⁴⁾。しかし、我々の検討結果では、現行の Meryman 改良法に必要な洗浄液量は Valeri 法とほぼ同量であり、製造に要した時間も大きく変わらなかった (データ示さず)。隅田らは人赤血球の浸透圧抵抗の臨界域は体液浸透圧の約 0.5~4.0 倍 ($150 \sim 1,200 \text{mOsm/l}$) であるとし、グリセロールの添加や洗浄操作時の臨界域からの逸脱を防ぐには、グリセロールを極めて緩徐に添加し、洗浄時には洗浄液の浸透圧を徐々に低下させる事が大切であると述べている¹⁵⁾。そのため、希釈・洗浄法は、塩濃度が異なる 2 液の洗浄法よりも、3 液による三段階の方が、緩やかな浸透圧の低下を伴った高い洗浄効果が得られると考えられる。そこで我々は、赤血球保存液を加えた FTRC の製造法の検討に Meryman 改良法を用いることとした。

FTRC に赤血球保存液を添加し、その有効期間を延長させる試みは幾つか報告されている。Lagerberg ら¹²⁾ は ACP215 を用いた Valeri 法由来 FTRC に AS-3 液あるいは SAGM 液を添加した場合、有効期間が AS-3 液では 14 日間、SAGM 液では 2 日間であったと報告している。AS-3 液中のリン酸ナトリウムやクエン酸をマンニトールに変更した AS-1 液といった赤血球保存液が知られているが、Ross ら¹⁶⁾ は Meryman 法由来 FTRC に AS-1 液を添加することで、有効期間を 10~14 日間へ延長することが可能であると報告している。一方、別のグループの報告では Valeri 法で AS-1 液を添加した場合は、最大 3 日間まで期間の延長が可能であるとしている¹³⁾。潘ら¹⁷⁾ は赤血球の可逆凝集反応を用いてグリセロールを除去する Huggins 法¹⁸⁾ 由来 FTRC に MAP 液を添加し、製造後 7 日間は保存可能としているが、7 日保存後の溶血率は本報の 14 日保存 FTRC-MAP よりも高い値を示している。このように、FTRC を保存可能な日数が異なるのは、製造法や保存液の違いによる影響が大きいと推察される。

今回我々は、生食を添加した FTRC を対照とし、赤血球保存液として MAP 液と AS-3 液を比較検討した。保存期間中の ATP 濃度や 2,3-DPG 濃度は三群間で顕著な差は認められなかったが、MAP 群や AS-3 群に比べ生食群では保存初期から赤血球細胞の膨化が認められ、

保存と共に溶血が亢進した。生食群の機能低下が著しいことは morphological index から確認された。MAP 群と AS-3 群の比較では、MCV 値や上清浸透圧の値に差が認められた。マンニトールは赤血球膜を透過せず、膜の浸透圧抵抗性亢進作用により赤血球の膨化を抑えて溶血を防止するとされており¹⁹⁾²⁰⁾、クエン酸は赤血球膜の保護作用を持つとされている¹²⁾。クエン酸が多量に含まれる AS-3 群とマンニトールを含む MAP 群の比較では、マンニトールの作用により MAP 群の MCV 値が低値を、上清浸透圧値が高値を示したと推察される。MAP 群の MCV 値は、液状保存 RC-MAP の採血後 5 日目の値と同等であり、また上清浸透圧値は欧州における解凍洗浄赤血球の基準(340mOsm/l 未満)²¹⁾を満たし、浸透圧が体液に近い値まで低下していることが確認された。MAP 液を FTRC へ添加した場合、AS-3 液以上の溶血防止効果が予想されたが MAP 群と AS-3 群の上清 Hb 濃度や溶血率に差はみられず、MAP 液と AS-3 液の溶血防止効果は同等であった。また、Valeri ら⁶⁾の報告では AS-3 液が添加された解凍赤血球の保存 15 日目の血液 Hb 濃度は平均で 14.4g/dl、上清 Hb 濃度は 174 ± 51 mg/dl (溶血率: $0.6 \pm 0.2\%$) であったとし、本報における保存 14 日目の上清 Hb 濃度の約 1/2 であった。この理由としては、本報の製品 Hb 濃度が高かったことや血液のサンプリング方法、上清 Hb 濃度の測定法の違いなどの点が影響した可能性が考えられるが、明らかな要因は見出せなかった。

FTRC は上清の大部分が除去され、赤血球が濃厚液の状態(Ht 値: 約 78%)である。生物学的製剤基準に FTRC の製剤試験として規定されているのは、外観試験、重量試験、Hb 含量試験、無菌試験の 4 項目であり、溶血に関する明確な基準がない。欧州では輸血時の溶血率の上限を 0.8% と定め²¹⁾、米国 FDA では 1% 未満を推奨値としている²²⁾。現行の FTRC の状態では溶血が著しく、保存 12 時間目には FDA が推奨する溶血率 1% 未満を満足することは困難である。そのような意味からも赤血球保存液に浮遊させた FTRCS の早期導入が期待される。本報の ACP215 を用いて MAP 液を加えた FTRC の溶血率を欧州の基準に当てはめた場合は約 3 日間、FDA が推奨する値では約 7 日間の保存が可能と考える。

今回の検討では、MAP 群と AS-3 群の一部の測定項目に差が認められたが、輸血時に問題となる値ではなかった。ATP 濃度や 2,3-DPG 濃度を指標とした赤血球の機能検査の結果は同等であった。しかし、最近では赤血球細胞の生存率の指標として CD47 発現率の減少や phosphatidylserine の上昇を検査している報告もあり²³⁾²⁴⁾、そのような項目の検査も大切であると考え。また、保存液が添加された FTRC を輸血した場合の赤

血球の生体内寿命や代謝状態を知る上でも、*in vivo* での追跡調査は必須であると考えられ、より良好な品質を保持した FTRC の製造とその輸血を行うために、これらの検討を進めていく事が重要であると思われる。

まとめ

現在、解凍赤血球浮遊液の製造は行われていないが、ACP215 を用いることで遠心・洗浄後の解凍赤血球に MAP 液を閉鎖的に添加することにより、その有効期間を現行の 12 時間から 7 日間へ延長することが可能であることを示した。MAP 液を添加することで現行の解凍赤血球よりも良好な品質を保持した製剤の輸血が実施可能となり、また血液センターにおける製造・供給体制にも有益であると考えられる。

文 献

- 1) Smith AU: Prevention of hemolysis during freezing and thawing of red blood cells. *Lancet*, 2: 910—911, 1950.
- 2) Chaplin H, Mollison PL: Preservation of blood. Preservation and Transplantation of normal tissues, J. & A. Churchill, London, 1954, 121—126.
- 3) 隅田幸男, 顧 一介, 柴野良一, 他: 赤血球の冷凍保存に関する研究. *日本輸血学会雑誌*, 14: 231—233, 1967.
- 4) Hornblower M, Meryman HT: Relative efficiency and interchangeability of Huggins and American Red Cross red cell freezing procedures. *Transfusion*, 17: 417—424, 1977.
- 5) 秋野光明, 小原幸平, 本間雅広, 他: 新たに開発された自動血球洗浄装置を用いて製造された解凍赤血球製剤の性状. *血液事業*, 30: 37—44, 2007.
- 6) Valeri CR, Ragno G, Pivacek LE, et al: A multicenter study of in vitro and in vivo values in human RBCs frozen with 40-percent (wt/vol) glycerol and stored after deglycerolization for 15 days at 4°C in AS-3: assessment of RBC processing in the ACP215. *Transfusion*, 41: 933—939, 2001.
- 7) FDA clearance letters for ACP215 Glycerolization/ Deglycerolization system. Reference number 05-0006, 2005.
- 8) Usry RT, Moore GL, Manalo FW: Morphology of stored, rejuvenated human erythrocytes. *Vox Sang*, 28: 176—183, 1975.
- 9) Takayanagi M, Yashiro T: Development of a new colorimetric determination of hemoglobin in plasma. *Jap. J. Clin. Chem.*, 14: 247—252, 1985.
- 10) Sowemimo-Coker SO: Red blood cell hemolysis during processing. *Transfusion Medicine Reviews*, 16: 46—60, 2002.

- 11) Valeri CR, Ragno G, Van Houten P, et al: Automation of the glycerolization of red blood cells with the high-separation bowl in the Haemonetics ACP215 instrument. *Transfusion*, 45: 1621—1627, 2005.
- 12) Lagerberg JWM, Truijens-de Lange R, de Korte D, et al: Altered processing of thawed red cells to improve the in vitro quality during postthaw storage at 4°C. *Transfusion*, 47: 2242—2249, 2007.
- 13) Valeri CR, Srey R, Tilahun D, et al: The in vitro quality of red blood cells frozen with 40 percent (wt/vol) glycerol at -80°C for 14 years, deglycerolized with the Haemonetics ACP 215, and stored at 4°C in additive solution-1 or additive solution-3 for up to 3 weeks. *Transfusion*, 44: 990—995, 2004.
- 14) Valeri CR: Simplification of the Methods for Adding and Removing Glycerol During Freeze-Preservation of Human Red Blood Cells with the High or Low Glycerol Methods: Biochemical Modification Prior to Freezing. *Transfusion*, 15: 195—218, 1975.
- 15) 隅田幸男：冷凍血液—その理論と実際—, 日本医事新報社, 東京, 1978, 103—139.
- 16) Ross DG, Heaton WAL, Holme S: Additive solution for the suspension and storage of deglycerolized red blood cells. *Vox Sang*, 56: 75—79, 1989.
- 17) 潘 偉軍, 柴 雅之, 高良真一, 他：高濃度グリセリンを用い 20 年間凍結保存した赤血球の検討. 低温生物工学会誌, 44 : 1—13, 1998.
- 18) Huggins CE: Reversible agglomeration used to remove dimethylsulfoxide from large volume of frozen blood. *Science*, 139: 504—505, 1963.
- 19) 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.
- 20) 笹川 滋, 柴 雅之, 村 徹, 他：濃厚赤血球用添加液 MAP について. 日本輸血学会雑誌, 37 : 398—403, 1991.
- 21) Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components, Council of Europe 14th, 2008, 117—144.
- 22) FDA summary basis of approval for red cells frozen and red cells deglycerolized. Reference number 86-0335, 1986.
- 23) Stewart A, Urbaniak S, Turner M, et al: The application of a new quantitative assay for the monitoring of integrin-associated protein CD47 on red blood cells during storage and comparison with the expression of CD 47 and phosphatidylserine with flow cytometry. *Transfusion*, 45: 1496—1503, 2005.
- 24) Khandelwal S, van Rooijen N, Saxena RK: Reduced expression of CD47 during murine red blood cell (RBC) senescence and its role in RBC clearance from the circulation. *Transfusion*, 47: 1725—1732, 2007.

EXTENDED STORAGE OF FROZEN THAWED RED CELLS FOLLOWING DEGLYCEROLIZATION WITH AN AUTOMATED CELL PROCESSOR ACP215 AND STORAGE IN PRESERVATIVE SOLUTIONS

*Satoru Tamura, Mitsuaki Akino, Masako Sato, Chihiro Homma, Sadamitsu Yamamoto,
Toshiaki Kato and Hisami Ikeda*
Hokkaido Red Cross Blood Center

Abstract:

We carried out two *in vitro* studies aimed at extending the shelf life of frozen thawed red cells (FTRC). In both studies, an automated cell processor ACP215 (Haemonetics) was used to prepare frozen red cells (FRC) and FTRC. In the first study, we compared two washing methods, the modified Meryman and Valeri methods. The results indicated that FTRC prepared by the former method showed better washing effects. In the second study, we compared two preservative solutions, AS-3 used in the US and MAP used in Japan. After washing with ACP215, FTRC were stored in either AS-3 or MAP until further investigation. The percentage of hemolysis in FTRC after 7 and 14 days storage in AS-3 was $1.0 \pm 0.2\%$ and $1.2 \pm 0.2\%$, respectively. For FTRC in MAP, these percentages were $0.8 \pm 0.2\%$ and $1.4 \pm 0.2\%$. These results were much better than that achieved currently using FTRC, which was $2.9 \pm 1.4\%$ after 12 hours storage.

Given that the Food and Drug Administration currently recommends a hemolysis level below 1% for FTRC, these findings indicate that the shelf life of FTRC in MAP can be extended up to 7 days.

Keywords:

frozen thawed red cells (FTRC), automated cell processor (ACP215), modified Meryman method, preservative solution, extended storage