

## X線照射が解凍赤血球液に与える影響

## —上清ヘモグロビン濃度及び上清カリウム濃度の変動—

瀧崎 晶弘 保井 一太 田中 光信 下垣 一成 木村 貴文  
 平山 文也 瀧原 義宏

現在、照射解凍赤血球液は赤血球液から解凍赤血球液製造後に X 線照射して調製する方法と、照射赤血球液から調製する 2 種類の方法で製造されている。両者は X 線照射を解凍後に実施するか、凍結前に実施するかで異なる。X 線照射は赤血球膜障害を引き起こすことが知られており、照射時期の違いで照射解凍赤血球液のヘモグロビン回収率に差があれば、優れた製造方法を採択することが望ましい。本検討では同一原料血液を用いて、照射時期の異なる 2 種類の製造方法より照射解凍赤血球液を製造して品質データを比較した。その結果、ヘモグロビン回収率及び溶血率は照射時期の違いによる差を認めず、上清カリウムイオン濃度は照射時期により差を認めたものの、通常の輸血では両製造法とも問題のないレベルであった。

キーワード：照射解凍赤血球液、X 線照射、ヘモグロビン回収率、上清ヘモグロビン濃度、  
 上清カリウムイオン濃度

## 緒 言

解凍赤血球液(Frozen Thawed Red Cells : FTRC)は稀な赤血球型(まれ血)の患者への輸血に備え、赤血球液(Red Blood Cells : RBC)を凍結保存して、必要時に調製し医療機関に出荷している代替が非常に少ない製剤である。FTRCは赤血球の凍結・解凍・洗浄を行うため、製造工程で溶血などにより赤血球数やヘモグロビン(Hemoglobin : Hb)量の減少がみられる。特に、Rhnullのような赤血球膜が脆弱な赤血球型ではHb回収率が低値であることが知られており<sup>1)2)</sup>、製造工程における赤血球膜障害を軽減しHb回収率を向上させることができれば、有効性の向上や安定供給につながる。

多くのFTRCは、輸血後移植片対宿主病(Post-transfusion graft-versus-host disease : PT-GVHD)を防止<sup>3)</sup>するためにX線照射を実施した照射解凍赤血球液(Irradiated Frozen Thawed Red Cells : Ir-FTRC)として供給されている。日本赤十字社では2通りの方法でIr-FTRCを製造しており、一つはRBCからFTRC調製後にX線照射してIr-FTRCを製造する方法で、もう一つは原料血液として照射赤血球液(Irradiated Red Blood Cells : Ir-RBC)を用いてIr-FTRCを製造する方法である。両者はX線照射を解凍後に実施するか、凍結前に実施するかで異なり、もし照射時期の違いでHb回収率に差があれば、優れた製造方法を採択することが望ま

しい。X線照射工程での赤血球液への影響として、照射後5週間まで未照射対照と比べてATP含量、2,3-DPG含量、赤血球膜抵抗性及び赤血球形態は問題となるような有意な低下は示さないが<sup>4)</sup>、上清Hb濃度や上清カリウムイオン(K<sup>+</sup>)濃度は保存期間に応じて増加することが報告<sup>4)5)</sup>されている。また、凍結・解凍工程での赤血球液への影響として細胞内電解質濃縮による溶血が報告されている<sup>6)</sup>。そこで本研究では同一原料血液を用いて照射時期の異なる2種類の製造方法を試み、Ir-FTRCのHb回収率、上清Hb濃度、上清K<sup>+</sup>濃度に及ぼす影響について検証した。

## 倫 理

本研究は日赤倫理委員会による了承のもと行った。

## 材料および方法

## 1. 研究デザイン

400ml全血採血の常法より製造した検査不適等で輸血に適さないRBCを原料血液(採血3日目)として用いた。RBCを無菌接合装置TSCD-II(テルモ社製)で等量に分割後、一方をX線照射装置MBR-1530A-TW(日立メディコ社製)を用いて線量15Gy照射し採血5日目まで4℃保存した(凍結前照射群:Pre X-ray group)。もう一方は未照射状態で採血5日目まで4℃

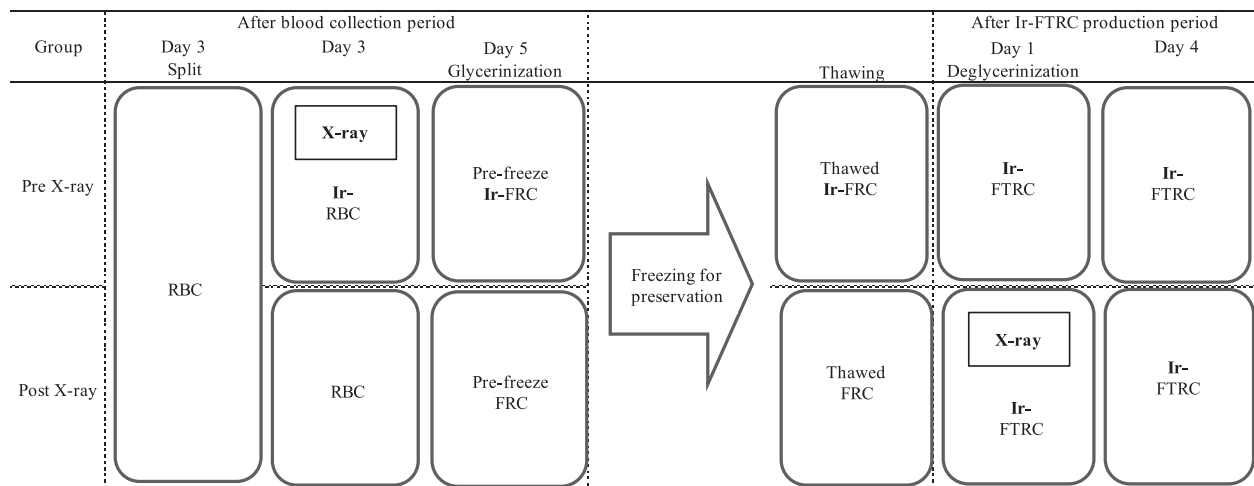


Fig. 1 Experimental design

RBCs from a 400-ml whole blood donation were divided into 2 units 3 days after the donation and stored at 4°C. RBCs in the Pre-X-ray group were irradiated with X-rays and stored at 4°C until day 5. RBCs in the Post-X-ray group were stored unirradiated at 4°C until day 5. Both groups of RBCs were glycerolized using ACP215 and frozen and stored in a -80°C deep freezer. Pre-X-ray Ir-FRCs were subsequently thawed and deglycerolized using ACP215.

Post-X-ray FRCs were subsequently thawed and deglycerolized using ACP215 and then irradiated with X-rays.

*In vitro* testing was conducted on: 1) pre-freeze (Ir-) FRCs, 2) thawed (Ir-) FRCs, 3) immediately after Ir-FTRCs and 4) on day 4 of Ir-FTRCs.

保存した（解凍後照射群：Post X-ray group）。両群共に採血 5 日目に自動血球洗浄装置 ACP215 (Haemonetics 社製) で冷凍赤血球液 (Frozen Red Cells : FRC) を調製し、-80°C 設定の超低温フリーザー MDF-594 (panasonic 社製) で凍結保存した。Pre X-ray group FRC は 37°C 恒温水槽 PERSONAL-11 (TAITEC 社製) で解凍後、ACP215 で脱グリセロールを行い Ir-FTRC を製造した。Post X-ray group FRC は解凍後、ACP215 で脱グリセロールを行い、X 線照射 (15Gy) して Ir-FTRC を製造した (Fig. 1)。

試験検体の採取は、FRC 凍結・解凍工程による品質への影響を確認する目的で凍結前 (Pre-freeze) と解凍後 (Thawed) で行い、FTRC 有効期限までの品質変化を検討する目的で製造直後、製造 4 日目に実施した。検体数は Pre X-ray group, Post X-ray group それぞれ 6 例ずつとした。

## 2. FRC 及び FTRC の調製方法

FRC 調製には、ACP215, 凍結キット (Haemonetics 社製), 凍害保護液 SF-60 (扶桑薬品社製) を用いた。はじめに RBC を室温で 2~3 時間静置後、無菌接合装置を用いて凍結キットに接続し、ACP215 に設置した。次に ACP215 の FRC 製造プロトコルに従って、RBC に SF-60 を混和・静置を繰り返しながら 400ml 添加した。SF-60 添加終了後に上清を遠心除去 (2,690g, 1.0 × 10<sup>6</sup> g · sec, 22°C) したものを FRC とした。

FTRC の調製には、ACP215, 解凍キット (Haemonetics 社製), 8 w/v% 塩化ナトリウム液 (1 号液：扶桑薬

品社製), 1.6 w/v% 塩化ナトリウム液 (2 号液：扶桑薬品社製), 0.8 w/v% 塩化ナトリウム液 (3 号液：扶桑薬品社製) を用いた。FRC を 37°C 恒温水槽 PERSONAL-11 (TAITEC 社製) で融解後、解凍キットを接続し ACP215 に設置した。次に ACP215 の FTRC 製造プロトコルに従って、FRC に 1 号液, 2 号液, 3 号液で添加・静置・遠心除去を繰り返して脱グリセロール化した。脱グリセロール化後、大容量冷却遠心機で上清を遠心除去 (3,250g, 8.0 × 10<sup>5</sup> g · sec, 22°C) し、MAP 液を 92 ml 添加したものを FTRC とした。

## 3. *In vitro* 試験

上清ヘモグロビン濃度は分光光度計 UV-2450 (島津製作所社製) を使用し、Leuco crystalviolet (LCV) 法<sup>7)</sup>にて測定した。上清 K<sup>+</sup>濃度は血液ガス分析装置 Cobasb 221 (ロシュ・ダイアグノスティックス社製) を用いて測定した。赤血球数 (RBC), Hb 濃度, ヘマトクリット (Ht), 平均赤血球容積 (MCV), 平均赤血球ヘモグロビン量 (MCH) は多項目自動血球分析装置 xs-1000i (sysmex 社製) で測定した。容量は電子上皿天秤 GX 2000R (A&D 社製) で重量を測定し、FRC 比重 (g/ml) 1.11, FTRC 比重 (g/ml) 1.06 から算出した。総 Hb 量は Hb 濃度に容量を乗じて算出した。溶血率は上清 Hb 量を総 Hb 量で除して算出した<sup>8)</sup>。Hb 回収率は製造直後 FTRC の総 Hb 量を解凍後 FRC の総 Hb 量で除して算出した。

## 4. 統計処理

測定結果は平均値 ± 標準偏差で示している。統計処

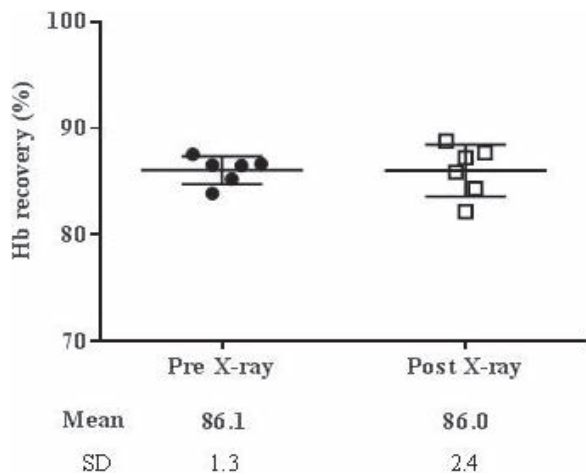


Fig. 2 Comparison of hemoglobin recovery between Pre-X-ray and Post-X-ray groups  
N=6, Pre X-ray vs Post X-ray (paired t-test)

理は Pre X-ray group, Post X-ray group の各サンプリングポイントにおいて Paired t-test を行い, 危険率(P) 1% 未満を有意とした. 統計解析ソフトは Graph Pad Prism6 (エムデーエフ社製) を用いた.

## 結 果

### 1. X線照射が FTRC 製造時の Hb 回収率に与える影響

Pre X-ray group, Post X-ray group の Hb 回収率を Fig. 2 に示した. Hb 回収率は Pre X-ray  $86.1 \pm 1.3\%$ , Post X-ray  $86.0 \pm 2.4\%$  と良好な値を示し, 両製造法に差は認められなかった.

### 2. X線照射が FRC・FTRC 製造時の上清 Hb 濃度及び溶血率に与える影響

Pre X-ray group, Post X-ray group の上清 Hb 濃度及び溶血率を Fig. 3 に示した. 上清 Hb 濃度及び溶血率は, FRC 凍結・解凍工程を経て脱グリセロール化により Ir-FTRC 製造し, 有効期限まで保存しても両製造法に差を認めなかった.

上清 Hb 濃度は Pre X-ray group において凍結前 FRC  $100 \pm 27\text{mg/dl}$ , 解凍後 Ir-FRC  $579 \pm 81\text{mg/dl}$  となり, 凍結・解凍工程で約 6 倍上昇した. 同様に Post X-ray group において凍結前 FRC  $83 \pm 36\text{mg/dl}$ , 解凍後 Ir-FRC  $524 \pm 167\text{mg/dl}$  となり, 凍結・解凍工程で約 6 倍上昇した. 脱グリセロール工程により製造された Ir-FTRC では Pre X-ray group  $40 \pm 8\text{mg/dl}$ , Post X-ray group  $33 \pm 3\text{mg/dl}$  に低減され, 製造 4 日目には Pre X-ray group  $61 \pm 15\text{mg/dl}$ , Post X-ray group  $52 \pm 7\text{mg/dl}$  に上昇した.

溶血率は Pre X-ray group において凍結前 FRC  $0.12 \pm 0.04\%$ , 解凍後 Ir-FRC  $0.72 \pm 0.25\%$  となり, 凍結・解

凍工程で約 6 倍上昇した. 同様に Post X-ray group において凍結前 FRC  $0.09 \pm 0.03\%$ , 解凍後 Ir-FRC  $0.63 \pm 0.22\%$  となり, 凍結・解凍工程で約 7 倍上昇した. 脱グリセロール工程により製造された Ir-FTRC では Pre X-ray group  $0.11 \pm 0.02\%$ , Post X-ray group  $0.09 \pm 0.02\%$  に低減され, 製造 4 日目には Pre X-ray group  $0.18 \pm 0.04\%$ , Post X-ray group  $0.16 \pm 0.03\%$  に上昇した.

### 3. X線照射が FRC・FTRC 製造時の上清 K 濃度及びその他の In vitro 試験項目に与える影響

Pre X-ray group, Post X-ray group における上清  $\text{K}^+$  濃度を Fig. 4 に示した. 上清  $\text{K}^+$  濃度は各工程により以下のような変動を示した. 凍結前 FRC においては, Pre X-ray group  $12.5 \pm 1.4\text{mEq/l}$ , Post X-ray group  $7.8 \pm 0.7\text{mEq/l}$  であり, X線照射実施の有無で約 1.6 倍の差を示した. 凍結・解凍工程を経ることにより, Pre X-ray group は  $14.6 \pm 2.0\text{mEq/l}$  となり凍結前 FRC と比較して約 1.2 倍に上昇し, Post X-ray group は  $11.8 \pm 2.9\text{mEq/l}$  となり凍結前 FRC と比較し約 1.5 倍上昇した. 製造直後 Ir-FTRC では脱グリセロール工程により Pre X-ray group  $0.7 \pm 0.3\text{mEq/l}$ , Post X-ray group  $0.9 \pm 0.4\text{mEq/l}$  と両製造法で低減した. 製造 4 日目 Ir-FTRC において, Pre X-ray group  $17.7 \pm 3.4\text{mEq/l}$  となり製造直後より約 24 倍上昇し, Post X-ray group  $25.7 \pm 4.3\text{mEq/l}$  となり製造直後より約 28 倍上昇したことから, Post X-ray group でより顕著な上清  $\text{K}^+$  濃度の上昇が認められた.

その他の In vitro 試験結果を Table 1 に示した. MCV は製造直後 Ir-FTRC で Pre X-ray group  $97 \pm 2\text{fl}$  となり, Post X-ray group  $99 \pm 2\text{fl}$  と比較して低値を示したが, 有効期限には両製造法で差を認めなかった. MCV を除くその他の In vitro 試験項目は両製造法で差を認められなかった.

## 考 察

今回, 我々は Ir-FTRC が照射時期の異なる 2 通りの方法で製造されていることに着目し, 同一原料血液を用いて両製造方法の比較を行った. 本研究の利点は, 製造方法変更に伴う製造販売承認の一部変更申請が不要であるため, 速やかに優れた方法を採用することが可能な点である. その結果, Pre X-ray group では X線照射後から FRC 調製までの保存期間中に上清  $\text{K}^+$  濃度の上昇を認めるが, 脱グリセロール工程において除去されるため, 有効期限である Ir-FTRC 製造 4 日目には Post X-ray group より低値を示した (Fig. 4). X線照射後の Ir-RBC の上清  $\text{K}^+$  濃度上昇は, 照射早期 (1~2 日目) で最も高く, 経時的に減少していくことを村岡らが報告<sup>10)</sup>しており, Ir-FTRC 製造工程においても同様の傾向が確認された. 輸血後高カリウム血症は,

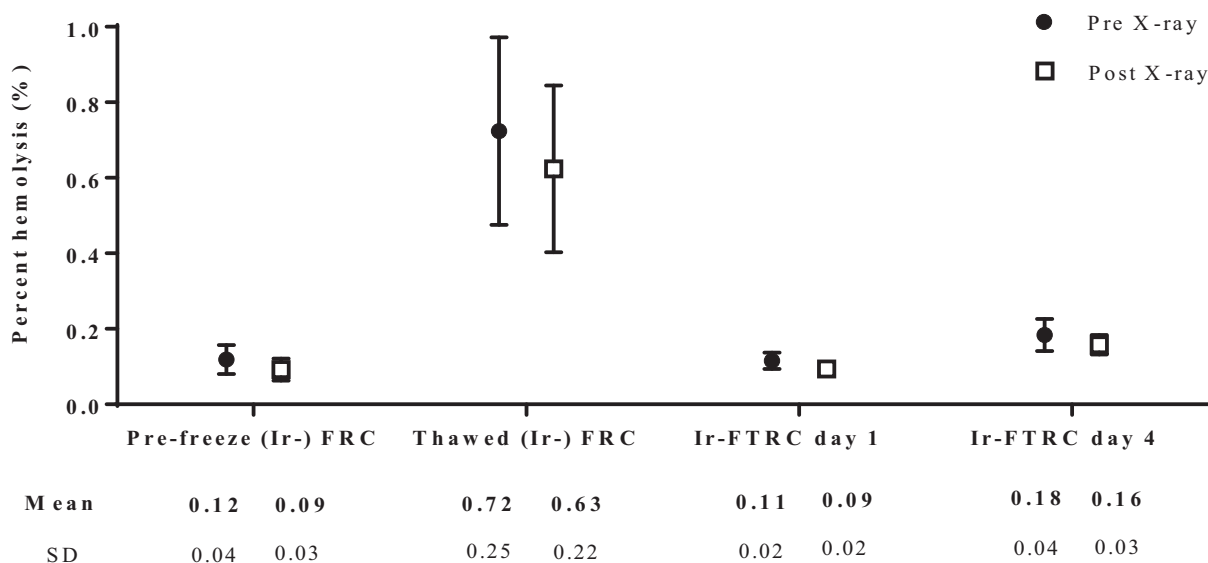
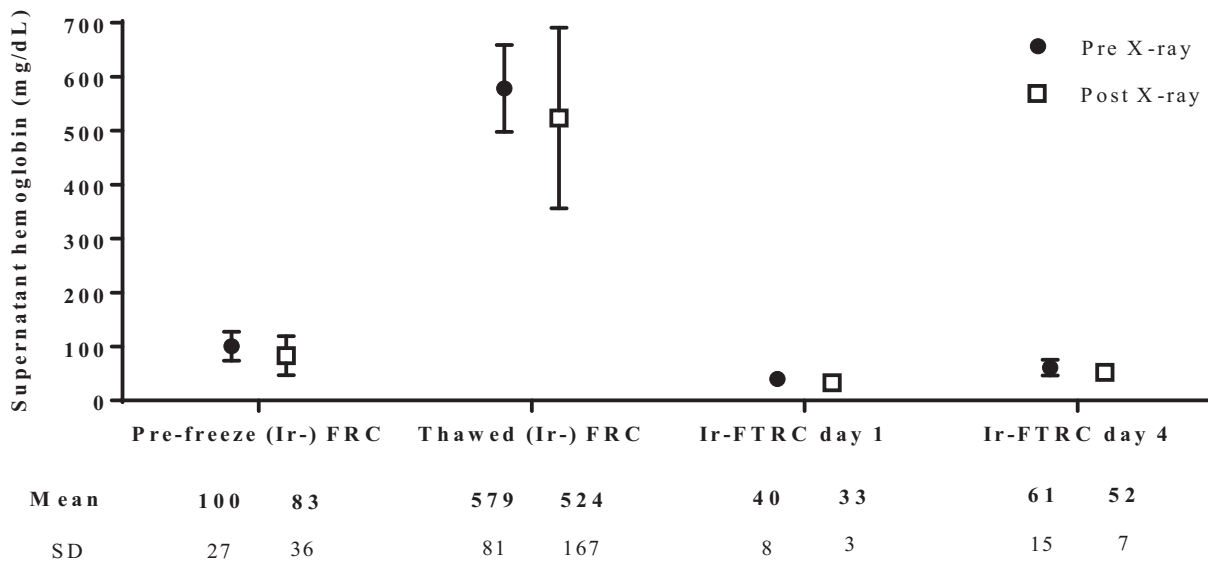


Fig. 3 Comparison of supernatant hemoglobin and percent hemolysis between Pre-X-ray and Post-X-ray groups  
N=6, Pre X-ray vs Post X-ray (paired t-test)

輸血後1時間以内に血清 K<sup>+</sup>値が5mEq/l 以上、あるいは前値より 1.5mEq/l 以上の増加を認めた場合と国際輸血学会で定義されている。仮に、今回の検討で最も総 K<sup>+</sup>量が高かった Post X-ray group における製造4日目の Ir-FTRC を循環血液量 4l の患者に投与した場合、輸血後高カリウム血症を引き起こす投与量は 43 単位となるため、通常の輸血では問題にならないと考えられる。Pre X-ray group における製造直後 Ir-FTRC の MCV が低値を示したのは、X 線照射による K<sup>+</sup>漏出量が多いため、赤血球細胞内浸透圧が低下したことが要因とし

て考えられる。

Ir-FTRC は製品規格として 1 単位当たり Hb 14g 以上含有している必要があるが、両製造法ともすべての検体で満たしていた(検体ごとのデータは示さず)。溶血率は欧州における輸血上限値 0.8%<sup>11)</sup>、米国 FDA の推奨値 1% 未満<sup>12)</sup>を両製造法とも有効期限まで満たしていた (Fig. 3)。解冻後 FRC の上清 Hb 濃度、Ir-FTRC の上清 Hb 濃度や Hb 回収率に両製造法で差がなかったことから、採血 5 日目以内の原料血液から製造し有効期限を製造後 4 日目としている条件では、X 線照射時期の違



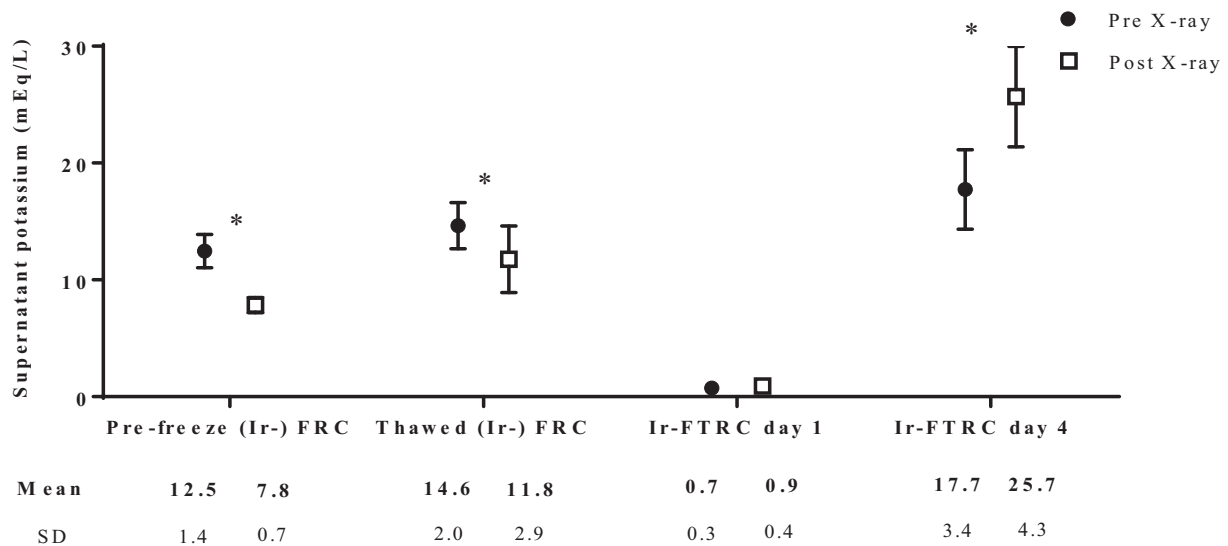


Fig. 4 Comparison of supernatant potassium levels between Pre-X-ray and Post-X-ray groups  
N=6, Pre X-ray vs Post X-ray (paired t-test), \*P<0.01

Table 1 *In vitro* properties of (Ir-) FRCs and Ir-FTRCs

Parameter	Group	(Ir-) FRC		Ir-FTRC	
		Pre-freeze	Thawed	Day 1	Day 4
Volume (ml)	Pre X-ray	-	114±11	106±9	-
	Post X-ray	-	114±10	108±8	-
Total Hb (g/bag)	Pre X-ray	-	20.5±1.8	17.6±1.5	-
	Post X-ray	-	20.6±1.8	17.7±1.6	-
Total K <sup>+</sup> (g/bag)	Pre X-ray	-	0.41±0.10	0.04±0.02	-
	Post X-ray	-	0.33±0.11	0.05±0.02	-
RBC (10 <sup>4</sup> /μl)	Pre X-ray	550±60	549±55	538±31	540±31
	Post X-ray	552±63	551±59	533±28	538±28
Hb (g/dl)	Pre X-ray	18.1±1.8	18.0±1.7	16.6±0.8	16.6±0.8
	Post X-ray	18.2±1.8	18.1±1.7	16.5±0.8	16.5±0.8
Ht (%)	Pre X-ray	73.9±6.4	74.9±6.3	52.1±2.2	50.3±2.3
	Post X-ray	74.0±6.5	75.1±6.6	52.9±2.3	50.1±2.7
MCV (fl)	Pre X-ray	135±6	137±6	97±2	93±4
	Post X-ray	135±6	137±6	99±2	93±4
MCH (pg)	Pre X-ray	33.0±1.2	32.8±1.0	30.8±1.1	30.7±0.9
	Post X-ray	33.0±1.2	32.9±1.0	30.9±1.0	30.6±0.8

N=6, Pre X-ray vs Post X-ray (paired t-test), \*P<0.01

いによる赤血球のHb漏出量は同程度であると考えられた。

以上のように照射時期の異なる Ir-FTRC 製造方法は、有効期限における上清 K<sup>+</sup>濃度に差を認めたが通常の輸血では問題のないレベルであり、Hb 回収率及び上清 Hb 濃度に影響しなかったため、製品品質に大きな影響を与えないという結論に至った。

当製造所での Ir-FTRC 製造状況に目を向けると、過去4年間に出荷した 400ml 献血由来 Ir-FTRC は 75 本であり、Pre X-ray 製造法は 63 本(製造比 84%)、Post X-ray 製造法は 12 本(製造比率 16%)であった。FRC

は FTRC の中間製品であり、規格試験として Hb 濃度測定を実施していないため、当製造所における Ir-FTRC の Hb 回収率の実測値を算出することはできないが、仮に本研究での解凍後 Pre X-ray FRC の Hb 濃度 18.0g/dl (Table 1) を用いると、Pre X-ray 製造法 77.6±10.1%、Post X-ray 製造法 76.2±10.5% と推定され、両製造法に差は認められなかった(t-test, p=0.66)。当製造所より出荷された Ir-FTRC の Hb 回収率(推定値)が本研究結果より約 10% 低値を示し、標準偏差が約 10% と高値を示しているのは、赤血球膜脆弱性<sup>1)2)</sup>を示すまれ血から製造された Ir-FTRC が含まれていることが要因とし

て考えられる。その対策として日本赤十字社では採血5日目以内の (Ir-) RBC から Ir-FTRC を製造しているが、更なる品質向上が望まれている。今後、一部のまれ血で見られるような膜脆弱性を示す赤血球液を模擬的に再現する方法を検討し、製造工程を見直していきたいと考えている。

著者の COI 開示：著者は日本赤十字社職員である。

## 文 献

- 1) Hasekura H, Ishimori T, Furusawa S, et al: Hematological observations on the rh (---/---) propositus, the homozygote of amorphic Rh blood group genes. *Proceedings of Japan Academy*, 47: 579—583, 1971.
- 2) 宮原正行, 大熊重徳, 直木恭子, 他: 赤血球膜の脆弱な Rhnull 血液の冷凍保存法. *日本輸血学会誌*, 48: 465—472, 2002.
- 3) Asai T., Ibara S., Ohto H., et al: Guidelines for irradiation of blood and blood components to prevent post-transfusion graft-vs-host disease in Japan. *Transfus Med*, 10 (4): 315—320, 2000.
- 4) 福森泰雄, 石見昭子, 田中成憲, 他: X線照射が RC-MAP 中の赤血球に与える影響. *日本輸血学会誌*, 39: 979—983, 1993.
- 5) Brugnara C., Churchill W.H.: Effect of irradiation on red cell cation content and transport. *Transfusion*, 32: 246—252, 1992.
- 6) 前田平生, 大戸 齊, 岡崎 仁: 輸血学, 改定第4版, 中外医学社, 東京, 2018, 94—95.
- 7) Takayanagi M, Yashiro T: Development of a new colorimetric determination of hemoglobin in plasma. *Japan Society of Clinical Chemistry*, 14: 247—252, 1985.
- 8) Sowemimo-Coker SO: Red blood cell hemolysis during processing. *Transfusion Medicine Reviews*, 16: 46—60, 2002.
- 9) Button LN, DeWolf WC, Newburger PE, et al: The Effect of Irradiation on Blood Components. *Transfusion*, 21: 419—426, 1981.
- 10) 村岡正人, 高橋雅彦, 五十嵐滋, 他: 全血および RC-MAP における放射線 (X線) 照射後の上清カリウム値の変化. *日本輸血学会誌*, 24: 17—25, 2001.
- 11) Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components, Council of Europe 18th, 2015.
- 12) FDA summary basis of approval for red cells frozen and red cells deglycerolized. Reference number 86-0335, 1986.

## EFFECT OF X-RAY IRRADIATION ON FROZEN-THAWED RED CELLS —DIFFERENCES IN HEMOGLOBIN AND POTASSIUM CONCENTRATIONS IN THE SUPERNATANT BETWEEN TWO PRODUCTION PROCEDURES—

*Akihiro Fuchizaki, Kazuta Yasui, Mitsunobu Tanaka, Kazushige Shimogaki, Takafumi Kimura,  
Fumiya Hirayama and Yoshihiro Takihara*  
Japanese Red Cross Kinki Block Blood Center

### Abstract:

The Japanese Red Cross Society prepares Irradiated Frozen-Thawed Red Cells from two different sources: Red Blood Cells and Irradiated Red Blood Cells. The procedures used for preparation from the two sources differ by whether X-ray irradiation is performed before or after freezing and thawing. X-ray irradiation is widely known to exert some adverse effects on erythrocytes. Therefore, if the two preparative procedures result in differences in hemoglobin recovery, it would be advisable to choose the superior of the two procedures. We compared the quality of Irradiated Frozen-Thawed Red Cells prepared using the two different preparative procedures. We found no significant differences in hemoglobin recovery or hemolysis between the procedures. The potassium concentration in the supernatant was slightly different between the irradiation timings, but the difference exerts little adverse effect on blood transfusion samples.

### Keywords:

Ir-FTRC, X-ray, Hemoglobin recovery, Supernatant hemoglobin, Supernatant potassium