

採血後 42 日目まで保管した照射赤血球製剤の品質

林 宜亨¹⁾ 藤原 満博¹⁾ 若本志乃舞¹⁾ 布施 久恵¹⁾ 内藤 祐¹⁾
 秋野 光明¹⁾ 生田 克哉²⁾ 山本 哲²⁾ 池田 久實²⁾ 牟禮 一秀²⁾
 紀野 修一¹⁾

MAP 加赤血球製剤の有効期間は採血後 42 日間であったが、細菌汚染が懸念され、1995 年に 21 日間となった。細菌汚染の問題を除くと、現在の未照射赤血球製剤では 42 日間使用可能と推測される。照射赤血球製剤の有効期間は、採血後 21 日目以降も未照射赤血球製剤の 42 日目と品質が同等以上であれば、延長できる可能性がある。そこで、赤血球液-LR「日赤」を 2 分割して未照射及び照射群とし、42 日間保存して両群の品質を比較した。

照射群の保存に伴う溶血率の上昇、ATP 濃度及び赤血球変形能の低下は未照射群より顕著であったが、照射群のこれらの値は 35 日目まで未照射群の 42 日目の値より良好または同等に維持された。赤血球の CD47 発現、フォスファチジルセリン表出及び赤血球由来マイクロパーティクル産生には照射の影響はなかった。保存に伴う上清 K⁺濃度の増加は照射により亢進した。

以上の結果より、照射赤血球製剤の有効期間は、上清 K⁺濃度の増加を留意すれば、採血後 35 日目まで延長可能であると考えられた。

キーワード：赤血球製剤、放射線照射、有効期間、赤血球品質

緒 言

本邦の赤血球製剤の有効期間は、添加液である MAP 液が承認された 1992 年には、未照射製剤として 42 日間であったが、1995 年にエルシニア菌による細菌汚染が懸念され、21 日間に短縮された。血液製剤の安全性向上のため、1998 年に放射線照射（照射）、2007 年に保存前白血球除去（白除）及び初流血除去が導入されたが、有効期間は照射・未照射に関わらず、現在も 21 日間である。有効期間の延長は廃棄血の低減に貢献すると考えられるが、赤血球製剤の有効期間を 7 日間延長すると、医療機関における有効期限切れ赤血球製剤の 9 割の廃棄を回避できる可能性がある¹⁾と試算され¹⁾、さらに最近の多施設後方視調査研究において廃棄を 73～88% 削減できる可能性が報告されている²⁾。

保存した赤血球製剤の評価においては、輸血後 24 時間の回収率が 70% 以上であることが必要とされる。未照射赤血球製剤の以前の有効期間であった 42 日は、この基準を満たしている。白除は赤血球の品質向上が期待されること³⁾、また白除導入後に変更された抗凝固剤 CPD は ACD よりも赤血球の品質を良好に維持する

ことから、現行の未照射赤血球製剤については、細菌混入の問題を除くと、現在でも 42 日間の使用が可能と考える。一方、照射赤血球製剤では、未照射赤血球製剤よりも保存に伴う品質の低下が大きいことが知られている⁴⁾⁵⁾。照射赤血球製剤の有効期間を延長するためには、照射赤血球製剤の採血後 21 日目以降の品質が、未照射赤血球製剤の採血後 42 日目と同等以上の品質を維持している必要があると考える。この点に関して、本邦の未照射赤血球製剤及び照射赤血球製剤の品質については、採血後 28 日目までの安定性試験成績が公開されているが⁶⁾、両製剤の採血後 28 日間以上保存した品質は、詳細には比較検討されていない。

そこで、本検討では、照射赤血球製剤の有効期間延長の可能性を見出すため、照射赤血球製剤および未照射製剤の採血後 42 日間の品質を比較し、照射赤血球製剤の品質が未照射赤血球製剤の保存 42 日目の品質と同等以上である保存日数について精査した。品質評価の指標として、標準的な in vitro 評価項目に加え、赤血球膜の性状にかかわる赤血球変形能⁷⁾⁸⁾、CD47 の発現⁹⁾¹⁰⁾、フォスファチジルセリン (PS) の表出¹¹⁾及び赤血球由来

1) 日本赤十字社北海道ブロック血液センター

2) 北海道赤十字血液センター

〔受付日：2020 年 7 月 17 日、受理日：2021 年 1 月 28 日〕

Table 1 Standard RBC quality measurements

Parameters	Samples	Methods
RBC volume	Bags containing RBCs	RBC volume = (a-b)/c a: The weight of the bags containing RBCs, b: The tare weight of the bags, c: The specific gravity of RBCs (1.06)
RBCs, Hb, MCV, MCHC	RBCs	Automated Hematology Analyzer (XS-1000i™, Sysmex)
pH (at 37°C)	RBCs	Blood Gas Analyzer (Cobas b221, Roche Diagnostics K.K.)
Glucose, Lactate, K ⁺ , Na ⁺	Supernatants of RBCs ^{a)}	
Ht	RBCs	Ht: The measured values were multiplied by the correction value ^{b)} to calculate the predicted value of Ht obtained by the centrifugation method.
ATP	Supernatants of deproteinized RBCs	Bioluminescence method Reagents: ATP measurement assay (Lucifer 250) and standard reagent set (Kikkoman Biochemifa Company) Equipment: Gene Light 55 Luminometer (Mi-crotech)
2,3-DPG		Enzyme method Reagent: 2,3-DPG test[RD] (Roche Diagnostics K.K.) Equipment: UV/vis spectrophotometer (U-2900: Hitachi Co.)
Morphological index	1% glutaraldehyde-fixed RBCs	100 erythrocytes were classified by the shape variation into four score groups under microscopic observation as follows: discocytes (= 3), echinocytes I (= 2), echinocytes II (= 1), echinocytes III or spherocytes (= 0). ^{c)} Morphological index was calculated as sum of the values multiplying the number of erythrocytes in each group by the each score. All measurements were carried out twice by the same observer. Equipment: Differential interference microscope (High-resolution light microscope BX53DIC, Olympus Corporation)
Supernatant Hb and hemolysis (%)	Supernatants of RBCs ^{a)}	Leuco crystal violet method Percent hemolysis (%) = (100-Ht) × sup. Hb (mg/dl) / Total Hb (mg/dl). Certified Reference Material for Total Hemoglobin Measurement JCCRM912 (Reference Material Institute for Clinical Chemistry Standards) was used as a standard reagent. Equipment: UV/vis spectrophotometer (U-2900: Hiachi Co.)

a) The supernatants were obtained by centrifugation (1,880 g, 10 minutes, 4°C) of RBCs and additional centrifugation step of the resultant supernatant at the same condition.

b) Correction value = 1.11: The correction value was calculated by dividing the Ht values measured by the centrifugation method by Ht values measured with Cobas b221 obtained from additional six independent experiments performed on four RBC components at different storage time points (7, 14, 21, 35, 42 and 56 days).

c) Echinocytes I: discocytes with a few or several protrusions, echinocytes II: spherocytes with several protrusions, echinocytes III: spherocytes with several or multiple spicules.

マイクロパーティクル (RBC-MPs)¹²⁾を検討した。

材料と方法

1. 赤血球製剤の調製と検体採取

本検討においては、全血の採血当日を保存1日目とした。赤血球液-LR「日赤」(RBC-LR-2) 6バッグ (n = 6, そのうち5例は製品規格容量を超過) を、採血後3日目にRBC-LR-1相当容量の2バッグに分割し、一方は照射群、他方は未照射群とした。照射群は、採血後3日目に、日本赤十字社(日赤)の標準操作手順書に定める照射条件に従って、X線照射装置(MBR-1530A-TW, Hitachi Healthcare Systems, Inc.)により、設定吸収線量15GyのX線を照射した。照射野中心部の最大吸収線量は23.7Gy、線源から距離のある辺縁部での最低吸収線量は19.1Gyであった。各血液バッグは、照射野の中心部に置いた。各群を2~6°Cで保存し、採血

後3, 7, 14, 21, 28, 35及び42日目に、無菌的に検体を採取した。

2. 赤血球製剤の長期保存試験

(1) 標準的な品質試験

品質試験にて実施した標準的な評価項目、測定方法及び使用機器をTable 1に示した。

(2) 赤血球変形能

MAP液でHt値45%に希釈した検体を用いて、RheoScan-AnD300 (RheoMeditech) によるektacytometry¹³⁾にて測定した。37°C条件下、ずり応力によって楕円に変形した赤血球の長軸(L)と短軸(W)の長さからelongation index (EI = [L - W] / [L + W])を算出した。

(3) CD47発現とPS表出

赤血球製剤をPBSで3回洗浄し、検体(4 × 10⁶ RBCs/μl)を調製した。CD47の測定では、検体12.5μlをPE

Table 2 Changes in volume and hematologic parameters of RBCs during 42 days of storage

	day 3	day 7	day 14	day 21	day 28	day 35	day 42
Volume (ml)							
non-irradiated	150.8±6.7	143.7±6.6	137.5±6.6	131.4±6.7	124.2±6.6	118.0±6.5	111.9±6.5
irradiated	150.6±7.0	143.5±6.8	137.4±7.1	131.4±7.1	124.3±7.1	118.2±7.0	112.1±6.9
RBC (10 ⁴ /μl)							
non-irradiated	708.3±65.0	711.7±69.1	713.3±63.3	714.0±64.1	713.5±67.5	712.2±66.5	711.0±65.0
irradiated	712.0±67.4	715.3±66.1	712.7±62.1	714.0±65.7	712.2±67.2	711.3±64.4	711.7±64.9
Hb (g/dl)							
non-irradiated	19.5±1.3	19.6±1.3	19.5±1.3	19.6±1.2	19.4±1.4	19.5±1.2	19.5±1.2
irradiated	19.5±1.2	19.6±1.3	19.8±1.3	19.5±1.2	19.5±1.3	19.5±1.2	19.5±1.2
Ht (%)							
non-irradiated	66.3±1.9	65.1±2.3	63.1±1.6	61.6±1.7	60.2±1.7	58.9±1.8	57.8±2.0
irradiated	66.0±2.7 †	60.5±1.9 * †	57.8±1.9 *	56.0±2.1 * †	55.5±2.4 * †	54.3±2.1 * †	54.1±2.7 *
MCV (fl)							
non-irradiated	94.1±7.6	92.1±7.7	88.9±6.9	86.8±6.9	84.9±7.3	83.2±6.8	81.7±6.9
irradiated	93.2±7.5 †	85.0±6.7 * †	81.5±5.6 *	78.8±6.5 * †	78.4±6.2 * †	76.8±5.9 * †	76.5±6.9 *
MCHC (%)							
non-irradiated	32.6±1.8	33.3±2.0	34.4±1.8	35.2±1.6	35.7±2.0	36.8±1.7	37.5±1.4
irradiated	32.7±1.6 †	35.9±1.8 * †	38.0±1.8 *	38.7±1.7 * †	39.0±1.8 * †	39.8±1.8 * †	40.0±1.2 *

Data are represented as mean ± SD (n=6).

* <0.05: significant difference between irradiated RBCs and non-irradiated RBCs analysed by paired t-test.

† <0.05: significant difference compared to value of non-irradiated RBCs on day 42.

標識マウス抗ヒト CD47 抗体 (クローン B6H12, サブクラス IgG₁, Becton Dickinson Biosciences(BD)) または PE 標識マウス IgG₁ 抗体 (BD) 10μl で 30 分間, 染色した. PS の測定では, 検体 5μl を FITC 標識 Annexin V 5μl と Annexin V binding buffer または PBS (陰性対照) 90μl で 15 分間, 染色した. いずれの検体も染色に使用した buffer で 500μl とした. フローサイトメーター (Cytomics FC-500, Beckman Coulter) にて Scatter gram 上で赤血球領域 (CD235a [Glycophorin A] 陽性細胞率: 97%) をゲートした. CD47 の発現は平均蛍光強度で, PS の表出は Annexin V 陽性細胞率 (%) で評価した.

(4) 上清 RBC-MPs

検体 25μl, アネキシン V 5μl, アネキシン V binding buffer 100μl (または陰性対照の PBS), PE 標識マウス抗ヒト CD235a 抗体 (クローン GA-R2, サブクラス IgG_{2b}, BD) または PE 標識マウス IgG_{2b} 抗体 (BD) 5μl を BD Trucount™ Absolute Counting Tubes に添加し, 15 分間染色し, binding buffer または PBS 165μl を添加した. フローサイトメーター (Cytomics FC-500) にて, Megamix beads を指標とし, 0.9μm 以下を MPs 領域としてゲートした. CD235a 陽性 (+) または CD235a (+) かつ アネキシン V (+) を RBC-MPs として濃度を測定した.

3. 統計学的処理

各保存日数における未照射群及び照射群の差の検定は対応のある t-検定で行った. この検定で採血後 42 日目に差があった項目は, 未照射群 42 日目の値に対する照射群 3~35 日目の値の差を Repeated measures

ANOVA で検定後, Dunnett's test で検定した. いずれも危険率 (p) 5% 未満を有意とした. 統計処理には Kaleida Graph 4.0 (Synergy Software, USA) を用いた.

4. 倫理

本検討は, 日赤血液事業研究倫理委員会の承認のもと実施した.

結 果

1. 容量, RBC 数, Hb 濃度, Ht, MCV, MCHC

容量は経時的な検体採取により減少した. RBC 数及び Hb 濃度は, 未照射群及び照射群の間に差を認めなかった (Table 2). 未照射群と照射群との比較では, 採血後 7~42 日目において, 照射群の Ht 値及び MCV が低値を示し, MCHC は高値を示した. Ht, MCV 及び MCHC について未照射群 42 日目と照射群の値を比較した結果, 21 日目を以降の照射群で Ht 及び MCV が低値を示し, MCHC は高値を示した.

2. 上清 Hb 濃度, 溶血率

上清 Hb 濃度及び溶血率は, 未照射群及び照射群ともに保存に伴い上昇し, 採血後 21 日目を以降に照射群が未照射群よりも有意に高値を示した (Fig. 1). 未照射群の 42 日目の値と比較して, 照射群の上清 Hb 濃度及び溶血率は, 採血後 35 日目までは同等以下であった.

3. pH, 上清 glucose 濃度, 上清 lactate 濃度, ATP 濃度, 2,3-DPG 濃度, 赤血球形態

赤血球の代謝に関わる指標と赤血球形態の結果を Table 3 に示す. 未照射及び照射群の pH, 上清 glucose 濃度, アデノシン-5'-三リン酸 (ATP) 濃度, 2,3-ジホス

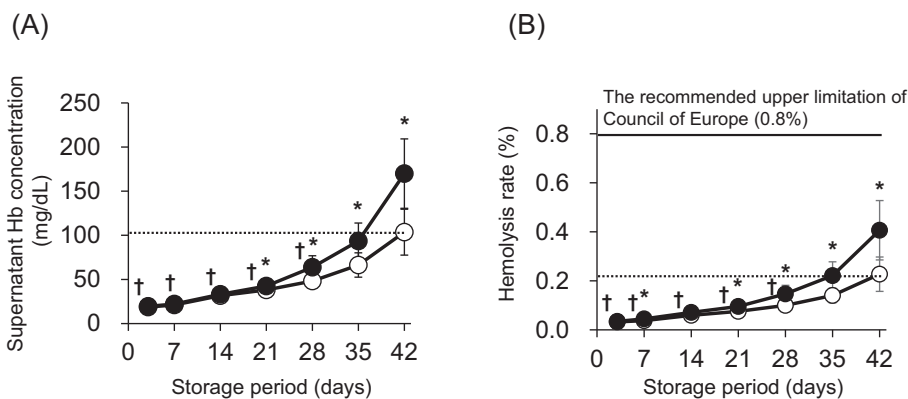


Fig. 1 Changes in the Hb concentration (A) and hemolysis rate (B) in the supernatant of irradiated (●) and non-irradiated RBCs (○) during 42 days of storage.

Data are the mean ± SD (n = 6).

* < 0.05: significant difference between irradiated and non-irradiated RBCs.

† < 0.05: significant difference compared with value of non-irradiated RBCs on day 42.

Line (.....) indicates the value of the non-irradiated RBCs on day 42.

Table 3 Changes in metabolic parameters, morphological index, K⁺ and Na⁺ concentrations of RBCs during 42 days of storage

	day 3	day 7	day 14	day 21	day 28	day 35	day 42
pH							
non-irradiated	6.81 ± 0.05	6.72 ± 0.06	6.58 ± 0.07	6.49 ± 0.08	6.41 ± 0.09	6.36 ± 0.09	6.30 ± 0.09
irradiated	6.81 ± 0.05	6.74 ± 0.06	6.59 ± 0.07 *	6.48 ± 0.08	6.40 ± 0.10	6.35 ± 0.09	6.31 ± 0.08
Glucose (mg/dl)							
non-irradiated	464.3 ± 27.7	415.0 ± 28.3	322.5 ± 43.9	257.5 ± 52.7	205.0 ± 54.1	163.3 ± 55.0	127.5 ± 56.2
irradiated	463.3 ± 27.0 †	415.0 ± 26.8 †	315.8 ± 41.3 †	243.3 ± 48.3 * †	190.8 ± 54.4 * †	150.8 ± 56.0 *	115.0 ± 52.0 *
Lactate (mg/dl)							
non-irradiated	73.0 ± 17.0	127.5 ± 24.0	197.5 ± 31.7	249.2 ± 37.7	293.3 ± 41.7	326.7 ± 49.1	348.3 ± 43.0
irradiated	73.8 ± 17.1	135.8 ± 27.5 *	213.3 ± 34.6 *	272.5 ± 45.7 *	317.5 ± 47.6 *	344.2 ± 49.8 *	362.5 ± 56.5
ATP (μmol/gHb)							
non-irradiated	5.3 ± 0.6	5.0 ± 0.7	4.8 ± 0.8	4.2 ± 0.7	3.2 ± 0.7	2.4 ± 0.7	1.7 ± 0.6
irradiated	5.2 ± 0.7 †	5.2 ± 0.4 †	4.7 ± 0.6 †	3.8 ± 0.6 * †	2.8 ± 0.6 * †	2.0 ± 0.6 *	1.4 ± 0.5 *
2,3-DPG (μmol/gHb)							
non-irradiated	10.3 ± 2.1	7.6 ± 1.7	2.6 ± 1.1	0.6 ± 0.3	not test	not test	not test
irradiated	10.4 ± 2.2	7.1 ± 1.9 *	1.9 ± 0.8 *	0.4 ± 0.1	not test	not test	not test
Morphological index							
non-irradiated	281.5 ± 16.1	249.1 ± 25.2	225.4 ± 36.3	207.4 ± 41.0	192.9 ± 40.6	173.3 ± 46.0	146.5 ± 63.6
irradiated	283.2 ± 13.8	241.1 ± 35.7	214.6 ± 54.0	197.9 ± 42.5	192.1 ± 43.8	154.7 ± 46.1 *	131.0 ± 45.2
K ⁺ (mmol/l)							
non-irradiated	7.5 ± 0.8	18.1 ± 2.7	31.4 ± 4.3	42.1 ± 5.0	49.8 ± 5.1	56.3 ± 5.8	63.7 ± 5.2
irradiated	9.4 ± 1.7 †	44.2 ± 4.5 * †	61.8 ± 4.2 *	70.0 ± 4.1 * †	75.1 ± 4.3 * †	78.3 ± 4.6 * †	81.6 ± 5.6 *
Na ⁺ (mmol/l)							
non-irradiated	112.42 ± 1.59	not test	not test	91.57 ± 2.60	not test	not test	79.43 ± 2.58
irradiated	110.58 ± 2.35 * †	not test	not test	71.42 ± 1.71 * †	not test	not test	66.87 ± 1.51 *

Data are represented as mean ± SD (n = 6 except morphological index, n = 5).

* < 0.05: significant difference between irradiated RBCs and non-irradiated RBCs analysed by paired t-test.

† < 0.05: significant difference compared to value of non-irradiated RBCs on day 42.

ホグリセリン酸 (2,3-DPG) 濃度及び赤血球形態スコアは、保存に伴って低下し、上清 lactate 濃度は増加した (Table 3). 2,3-DPG 濃度は両群とも採血後 21 日目で 1 μmol/gHb 以下であった。未照射群と照射群の比較では、照射群において上清 glucose 濃度及び ATP 濃度は 21~42 日目に低値を示した。照射群の上清 lactate 濃度は 7~

35 日目まで未照射群よりも高値を示したが、42 日目では差は認められなかった。形態スコアは 35 日目のみ、照射群が低値であった。上清 glucose 濃度及び ATP 濃度について未照射群の 42 日目と照射群の値を比較した結果、照射群は 3~35 日目まで同等以上であった。

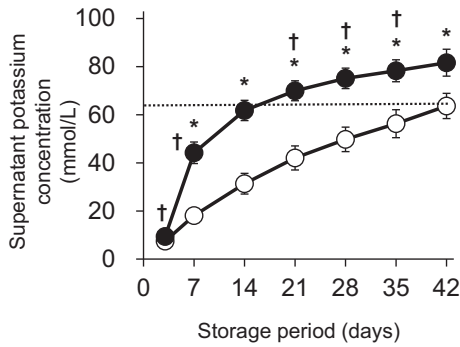


Fig. 2 Changes in potassium concentration in the supernatant of irradiated (●) and non-irradiated RBCs (○) during 42 days of storage. Data are the mean ±SD (n=6). *<0.05: significant difference between irradiated and non-irradiated RBCs. †<0.05: significant difference compared with the value of non-irradiated RBCs on day 42. Line (.....) indicates the value of the non-irradiated RBCs on day 42.

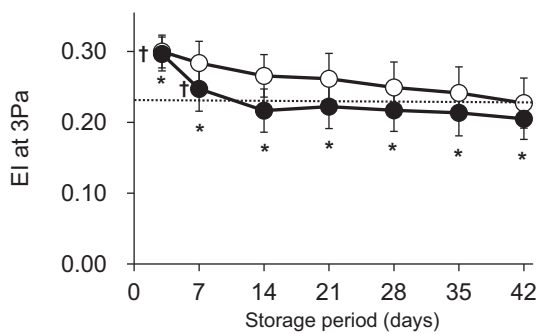


Fig. 3 Changes in RBC deformability of irradiated (●) and non-irradiated RBCs (○) during 42 days of storage. RBC deformability was expressed as the elongation index (EI) at a shear stress level of 3 Pascal (Pa). Data are the mean ±SD (n=6). *<0.05: significant difference between irradiated and non-irradiated RBCs. †<0.05: significant difference compared with the value of non-irradiated RBCs on day 42. Line (.....) indicates the value of the non-irradiated RBCs on day 42.

4. 上清 K⁺, Na⁺濃度

照射群の上清 K⁺濃度は、採血後 7~42 日目において、未照射群よりも高値を示し、上清 Na⁺濃度は、いずれの保存日数でも低値を示した (Table 3, Fig. 2)。未照射群 42 日目の値と比較して、照射群の上清 K⁺濃度は、21~35 日目で高値を示し、上清 Na⁺濃度は、21 日目で低値を示した (Table 3)。

5. 赤血球変形能

赤血球変形能は、循環内で受けるずり応力とされる

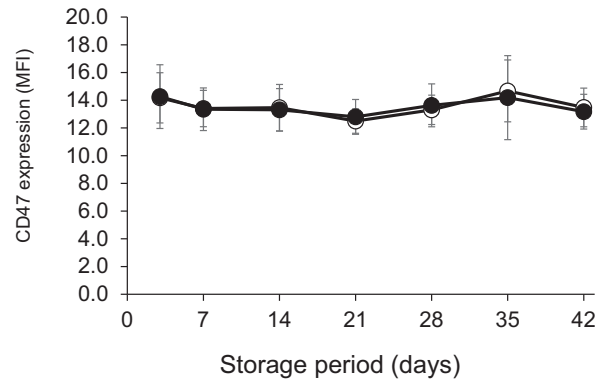


Fig. 4 Changes in CD47 expression of irradiated (●) and non-irradiated RBCs (○) during 42 days of storage. Data are the mean ±SD (n=5). No significant differences were observed between irradiated and non-irradiated RBCs by the paired t-test.

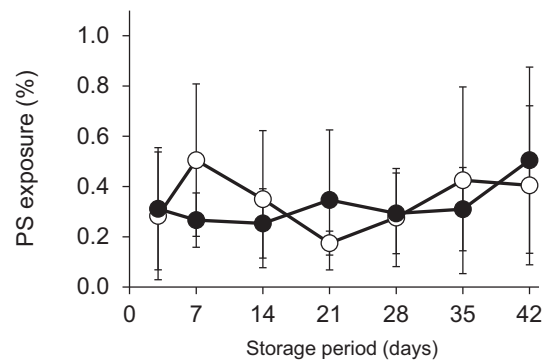


Fig. 5 Changes in phosphatidylserine (PS) exposure of irradiated (●) and non-irradiated RBCs (○) during 42 days of storage. Data are the mean ±SD (n=6). No significant differences were observed between irradiated and non-irradiated RBCs by the paired t-test.

3パスカル (Pa) のずり応力での EI 値により評価した (Fig. 3)。EI 値が大きいほど、変形し易い事を示す。未照射群及び照射群の赤血球変形能は、いずれも保存に伴って低下した。照射群の変形能は、保存日数に関わらず、未照射群と比較して低値を示した。照射群は、採血後 14 日目で未照射群 42 日目の値より低値となったが、統計的には採血後 35 日目まで有意差は認められなかった。

6. CD47 発現, PS 表出

未照射及び照射群の CD47 発現及び赤血球膜の PS 表出に保存中の変動及び両群間の差は認められなかった (Fig. 4, 5)。

7. 上清 RBC-MPs

照射群の 42 日目における CD235a(+)MPs は、3 日目と比較して高い傾向を示したが、未照射群及び照射群の間に差は認められなかった (Fig. 6A)。CD235a(+)/

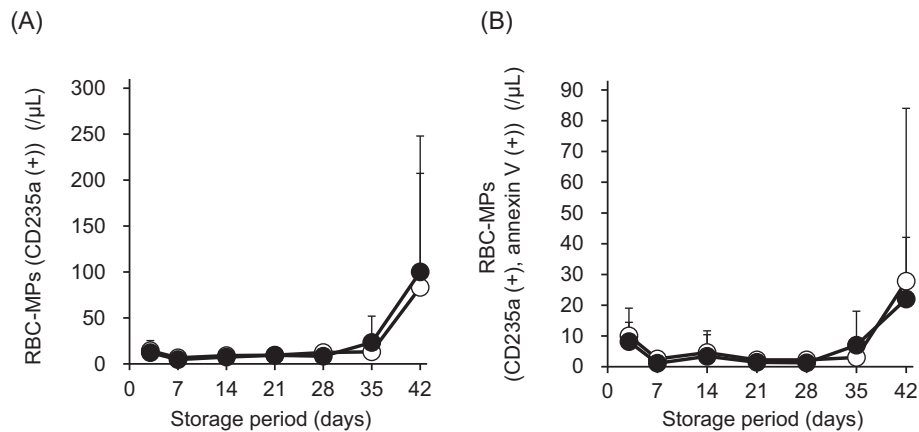


Fig. 6 Changes in the RBC-MP concentration of irradiated (●) and non-irradiated RBCs (○) during 42 days of storage.

RBC-MPs were determined by CD235a (+) staining alone (A) or CD235a (+), annexin V (+) double staining (B). Data are the mean \pm SD (n=6). No significant differences were observed between irradiated and non-irradiated RBCs by the paired t-test.

アネキシン V(+)-MPs においても、保存に伴う変動及び両群間の差は認められなかった (Fig. 6B).

考 察

赤血球膜の障害によって引き起こされるヘモグロビンの遊離 (溶血) は、溶血性輸血反応の要因となる¹⁴⁾。保存に伴う溶血率の増加が、これまでの報告⁴⁾⁵⁾と同様に照射によって亢進したが、照射群の値は採血後 35 日目まで未照射群の 42 日目の値と同等に維持されていた (Fig. 1, Table 3)。本邦の製造及び品質管理基準では溶血率の値は規定されていないが、照射群の 42 日目の溶血率の値 ($0.41 \pm 0.12\%$) は、Council of Europe の基準 (0.8% 未満)¹⁵⁾ を十分に満たした。また、採血後翌日に照射し、44 日保存した海外の多施設評価の値 ($0.74 \pm 0.10\%$)⁵⁾ よりも低値であった。これは MAP 液が海外の添加液よりも溶血抑制効果に優れていること¹⁶⁾によるものと考えられた。

赤血球内 ATP 濃度は、赤血球の形態維持や輸血後の生存率と関連する¹⁴⁾。保存に伴う ATP 濃度の低下も、これまでの報告⁴⁾⁵⁾と同様に照射によって亢進したが、採血後 35 日目まで未照射群の 42 日目の値と同等に維持されていた (Fig. 1, Table 3)。一方、赤血球の酸素運搬能に関わる 2,3-DPG は、照射の有無に関わらず保存直後から急速に減少した (Table 3)。しかし、保存によって消失した 2,3-DPG は、輸血後 7 時間で正常値の 50% 以上に、48~72 時間で正常値の 95% に回復することが報告されている¹⁷⁾。

赤血球の変形能は、赤血球より細い血管を通過するための重要な生理的機能であり、変形能の低下は微小循環内での血流流動や酸素運搬能の低下に関与すると考えられている⁷⁾⁸⁾。未白除の MAP 加赤血球製剤の赤血

球変形能については保存や照射によって低下することが既に報告されている⁷⁾。本検討では、白除製剤においても、未白除製剤と同様に保存や照射により赤血球変形能が低下することを明らかにし、照射群の採血後 35 日目までは未照射群の 42 日目の値と統計的な有意差がないことを確認した (Fig. 3)。しかしながら、赤血球変形能は、採血直後の値および保存中の低下の程度においてドナーの個体差が大きいことが知られている¹⁸⁾。実際、我々の検討においても、測定値のばらつきが大きいことから、今後さらに検討が必要と思われる。

CD47 は貪食細胞の抑制性免疫受容体 SIRP α との相互作用により貪食を抑制する “don't eat me” シグナルを伝達する¹⁹⁾。マウスの検討では、野生型に輸血された CD47 欠損赤血球は、循環血中から排除される事が報告されている²⁰⁾。また、PS は本来、細胞膜の内側に局在するが細胞外に表出すると貪食細胞に認識される²¹⁾。そのため、CD47 及び PS は赤血球クリアランスの指標と考えられている。未白除製剤では、保存及び照射による CD47 の発現低下が報告されている⁹⁾。白除製剤では、Stewart ら¹⁰⁾が、保存に伴い CD47 の発現が低下すると報告しているが、Sparrow ら²²⁾や Almizraq ら²³⁾は変動がないとし、報告によって結果が異なる。我々の結果は Sparrow らや Almizraq らを支持し、さらに照射の影響も認められない事を示した (Fig. 4)。赤血球製剤の PS 表出についても、保存に伴って僅かに増えるとする報告¹¹⁾²⁴⁾と、42 日保存においても変動が無いとする報告²³⁾²⁵⁾がある。本検討では、赤血球の PS 表出は保存と照射による影響を受けなかった (Fig. 5)。従って、本邦の未照射及び照射赤血球製剤では、採血後 42 日目までの保存において、CD47 発現の低下及び PS 表出の増加に起因するクリアランスの亢進はないことが示唆され

た。

赤血球製剤の保存や照射により RBC-MPs が増加することが報告されている¹²⁾²³⁾²⁴⁾。RBC-MPs は in vitro においてプロコアグulant 活性や白血球活性化作用を有することから、輸血後の血栓症の誘発や炎症反応に関与する可能性が指摘されている²⁶⁾。MPs が全て PS を表出しているわけではないため²⁷⁾、本検討では、PS に結合するアネキシン V が陽性の RBC-MPs だけでなく陰性も含む RBC-MPs を測定した。いずれも採血後 35 日目までは変動がなく、42 日で僅かに増加傾向を示したのみであり、照射による増加も認められなかった (Fig. 6)。よって、本邦の未照射及び照射赤血球製剤を 42 日間の長期保存したとしても、RBC-MPs の上昇に起因する輸血合併症の可能性は低いと考える。

上清 K⁺濃度は、これまでの報告⁴⁾⁵⁾と同様に保存に伴って増加し、さらに照射により亢進した。照射群の 21 日目の値は未照射群の 42 日目の値より高値であった (Table 2, Fig. 2)。そのため、有効期間内において照射赤血球製剤を新生児・腎不全患者、急速大量輸血時に使用する場合は、日本輸血・細胞治療学会のガイドラインの通り K⁺値の上昇に注意する必要がある²⁸⁾。また、21 日目以降の上昇についてはカリウム吸着フィルターにより、低減できる可能性が考えられる²⁹⁾。

以上、未照射群と照射群を 42 日間保管し、両群の品質を比較した結果、照射群の溶血率は採血後 42 日目まで Council of Europe の基準を満たすこと、照射群の溶血率、ATP 濃度、赤血球変形能については、採血後 35 日目まで未照射群の 42 日目の値と同等以上であることが示された。また、CD47 発現、PS 表出および RBC-MPs は照射の影響を受けなかった。照射群の上清 K⁺濃度は、21 日目で既に未照射群の 42 日目の値よりも高値になるため留意する必要があるものの、品質のみを考慮した場合、照射赤血球製剤の有効期間は、採血後 35 日目まで延長できる可能性が示唆された。なお、今回の検討においては、使用血液の 6 バッグ中 5 バッグが日赤の容量基準を超過した血液であることから、通常の製剤よりも赤血球に対する MAP の容量比率が相対的に低く、結果に影響した可能性は否定できない。そのため、製品規格での検討が重要と考える。

照射赤血球製剤の供給割合は、2010 年は 83% であったが 2019 年には 93% まで増加している³⁰⁾。我が国では最低吸収線量 15Gy を保証した照射赤血球製剤が 1998 年から供給されているが、日本輸血・細胞治療学会のガイドラインの記載とおり、この照射条件下で輸血後 GVHD の予防効果は十分と考えられる。血液センターでの照射は 15Gy が基本であり、我々が調べた限りでは、ここ数年間に 15Gy 以外の条件で照射され供給された製剤はなかった。残り 7% の未照射製剤は医療機関で照

射されたのか、あるいはそのまま輸血に用いられたのかは明らかではないが、本邦における照射は 15Gy が主であると思われる。

本報では日赤が製造販売している製品と同一の条件で照射赤血球製剤を調製することとし、設定吸収線量を 15Gy として検討した。なお、日赤では、照射装置の状態を定期的にバリデートし、また、標準操作手順書に定める手順により照射作業時には、設定条件で照射が完了したことを確認している。本検討では、最大で 23.7Gy、最小は 19.1Gy が照射され、この値は全国の血液センターのバリデーション結果と比較して同等であり (データ示さず)、検体を照射野の中心部に置いたことで、概ね最大吸収線量が照射された血液製剤を評価したといえる。

Xu ら³¹⁾は 15Gy から 55Gy で照射した赤血球の変化を調べている。35Gy 照射した赤血球の 21 日目の形態は、未照射の 28 日目と同等であるとし、また 45Gy 照射であれば 7 日目までが未照射の 28 日目と同等であると報告している。海外の報告や諸外国のガイドラインで用いられる照射条件は中心線量として表現されているのに対し、我が国では慣習的に最低線量が用いられている。そのため、諸外国のデータと直接比較することはできないものの、高線量を照射したことによる赤血球への影響については、更に詳細な検討を要すると考える。

赤血球製剤の有効期間を 7 日間延長することにより、医療機関において有効期限切れで廃棄される赤血球製剤の 9 割を回避できる可能性がある¹⁾と試算され¹⁾、最近の多施設後方視調査研究においても 73~88% 削減できる可能性が示唆された²⁾。そのため、有効期間の延長により廃棄血を低減することが可能で、献血者の善意をより有効に活用することができると考えられる。また、血液事業の運営や輸血医療の効率化に有用と考えられる。採血時初流血除去や保存前全血白除が導入された 2007 年以降、有効期限である採血後 21 日目までの使用において、赤血球製剤に関する細菌感染の報告はない³²⁾、赤血球保存性能だけでなく、21 日間以上の保存に伴う細菌増殖の危険性を明らかにする事が有効期間延長には必要と考える。

著者の COI 開示：著者は日本赤十字社職員である。

文 献

- 1) 河原和夫, 中島一格, 松崎浩史, 他: 赤血球製剤の有効期間の延長が血液事業に及ぼす影響に関する研究, 平成 29 年度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 研究分担報告書。

- 2) 石田 明, 奥田 誠, 加藤陽子, 他: 赤血球製剤の有効期限延長によって期待される廃棄血削減効果に関する多施設後方視調査研究. 日本輸血細胞治療学会誌, 66: 350, 2020.
- 3) 秋野光明, 山本定光, 才川 聡, 他: 全血処理型白血球除去フィルタークローズドバッグシステム(セパセルインテグラ MAP) を用いた血液製剤の調製と長期保存試験. 日本輸血学会雑誌, 46: 521—531, 2000.
- 4) Moroff G, Holme S, AuBuchon JP, et al: Viability and in vitro properties of AS-1 red cells after gamma irradiation. *Transfusion*, 39: 128—134, 1999.
- 5) de Korte D, Thibault L, Handke W, et al: Timing of gamma irradiation and blood donor sex influences in vitro characteristics of red blood cells. *Transfusion*, 58: 917—926, 2018.
- 6) 日本赤十字社ホームページ, 医薬品情報, 製品情報, 輸血用血液製剤資料表.
<http://www.jrc.or.jp/mr/product/list/>(2020年7月現在).
- 7) Cicha I, Suzuki Y, Tateishi N, et al: Gamma-ray-irradiated red blood cells stored in mannitol-adenine-phosphate medium: rheological evaluation and susceptibility to oxidative stress. *Vox Sang*, 79: 75—82, 2000.
- 8) Relevy H, Koshkaryev A, Manny N, et al: Blood banking-induced alteration of red blood cell flow properties. *Transfusion*, 48: 136—146, 2008.
- 9) Anniss AM, Sparrow RL: Expression of CD47 (integrin-associated protein) decreases on red blood cells during storage. *Transfus Apher Sci*, 27: 233—238, 2002.
- 10) 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 CD47 and phosphatidylserine with flow cytometry. *Transfusion*, 45: 1496—1503, 2005.
- 11) Verhoeven AJ, Hilarius PM, Dekkers DWC, et al: Prolonged storage of red blood cells affects aminophospholipid translocase activity. *Vox Sang*, 91: 244—251, 2006.
- 12) Rubin O, Crettaz D, Canellini G, et al: Microparticles in stored red blood cells: an approach using flow cytometry and proteomic tools. *Vox Sang*, 95: 288—297, 2008.
- 13) Shin S, Hou JX, Suh JS, et al: Validation and application of a microfluidic ektacytometer (RheoScan-D) in measuring erythrocyte deformability. *Clin Hemorheol Microcirc*, 37: 319—328, 2007.
- 14) 佐竹正博: 血液製剤の種類と製法・保存法, 赤血球の凍結保存, 編者 前田平生, 大戸 斉, 岡崎 仁, 輸血学, 第4版, 中外医学社, 東京, 2018, 69—93.
- 15) Chapter 5. Component monographs Part B. Red cell components, European Committee (Partial Agreement) on Blood Transfusion (CD-P-TS), Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components, 20th Edition, Council of Europe Publishing, Strasbourg, 2020, 206—219.
- 16) 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.
- 17) Heaton A, Keegan T, Holme S: In vivo regeneration of red cell 2,3-diphosphoglycerate following transfusion of DPG-depleted AS-1, AS-3 and CPDA-1 red cells. *Br J Haematol*, 71: 131—136, 1989.
- 18) Matthews K, Myrand-Lapierre ME, Ang RR, et al: Microfluidic deformability analysis of the red cell storage lesion. *J Biomech*, 48: 4065—4072, 2015.
- 19) Barclay AN, van den Berg TK: The interaction between signal regulatory protein alpha (SIRP α) and CD47: structure, function, and therapeutic target. *Ann Rev Immunol*, 32: 25—50, 2014.
- 20) Oldenburg PA, Zheleznyak A, Fang YF, et al: Role of CD47 as a marker of self on red blood cells. *Science*, 288: 2051—2054, 2000.
- 21) Schroit AJ, Madsen JW, Tanaka Y: In vivo recognition and clearance of red blood cells containing phosphatidylserine in their plasma membranes. *J Biol Chem*, 260: 5131—5138, 1985.
- 22) Sparrow RL, Healey G, Patton KA, et al: Red blood cell age determines the impact of storage and leukocyte burden on cell adhesion molecules, glycophorin A and the release of annexin V. *Transfus Apher Sci*, 34: 15—23, 2006.
- 23) Almizraq R, Tchir JDR, Holovati JL, et al: Storage of red blood cells affects membrane composition, microvesiculation, and in vitro quality. *Transfusion*, 53: 2258—2267, 2013.
- 24) Qadri SM, Chen D, Schubert P, et al: Early γ -irradiation and subsequent storage of red cells in SAG-M additive solution potentiate energy imbalance, microvesiculation and susceptibility to stress-induced apoptotic cell death. *Vox Sang*, 112: 480—483, 2017.
- 25) Bennett-Guerrero E, Veldman TH, Doctor A, et al: Evolution of adverse changes in stored RBCs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104: 17063—17068, 2007.
- 26) García-Roa M, del Carmen Vicente-Ayuso M, Bobes AM, et al: Red blood cell storage time and transfusion: current practice, concerns and future perspectives. *Blood Transfus*, 15: 222—231, 2017.

- 27) Willekens FLA, Werre JM, Groenen-Dopp YAM, et al: Erythrocyte vesiculation: a self-protective mechanism? *Br J Haematol*, 141: 549—556, 2008.
- 28) 日本輸血・細胞治療学会ホームページ, 指針/ガイドライン, 輸血によるGVHD予防のための血液に対する放射線照射ガイドライン V.
<http://yuketsu.jstmct.or.jp/medical/guidelines/> (2020年7月現在).
- 29) 福島 豊, 北川裕利, 野坂修一: カリウム吸着除去フィルターを用いた急速輸血におけるカリウム除去性能の検討. *蘇生*, 34: 22—24, 2015.
- 30) 日本赤十字社ホームページ: 数値で見る血液事業.
<http://www.jrc.or.jp/activity/blood/data/> (2020年10月現在).
- 31) Xu D, Peng M, Zhang Z, et al: Study of damage to red blood cells exposed to different doses of γ -ray irradiation. *Blood Transfus*, 10: 321—330, 2012.
- 32) 日本赤十字社ホームページ: 医薬品情報. 輸血の副作用.
<http://www.jrc.or.jp/mr/reaction/infection/bacterium/> (2020年7月現在).

QUALITY OF IRRADIATED RED BLOOD CELL COMPONENTS DURING 42 DAYS OF STORAGE AFTER COLLECTION

Yoshiaki Hayashi¹⁾, Mitsuhiro Fujihara¹⁾, Shinobu Wakamoto¹⁾, Hisae Fuse¹⁾, Yu Naito¹⁾, Mitsuaki Akino¹⁾, Katsuya Ikuta²⁾, Tetsu Yamamoto²⁾, Hisami Ikeda²⁾, Kazuhide Mure²⁾ and Shuichi Kino¹⁾

¹⁾Japanese Red Cross Hokkaido Block Blood Center

²⁾Hokkaido Red Cross Blood Center

Abstract:

The shelf-life of red blood cell (RBC) components in mannitol-adenine-phosphate additive solution was previously set at 42 days, but this was shortened to 21 days in 1995 due to the risk of bacterial contamination. Apart from this risk of bacterial contamination, however, the quality of current non-irradiated RBC components is assumed to be acceptable for usage up to 42 days after collection. If the quality of current irradiated RBCs beyond storage for 21 days is comparable to that of non-irradiated RBCs on Day 42, the shelf life of irradiated RBC components may be extended.

Here, we compared the quality of irradiated and non-irradiated RBCs on storage for 42 days. The increase in hemolysis and decreases in ATP concentration and deformability during storage were greater in irradiated than non-irradiated RBCs. Nevertheless, levels in irradiated RBCs up to 35 days were superior or equal to those in non-irradiated RBCs on Day 42. Irradiation did not effect CD47 or phosphatidylserine expression on RBCs, nor RBC microparticle production. In contrast, it enhanced the increase in supernatant potassium concentration by storage.

These results suggest that the shelf life of irradiated RBC components may be extended up to 35 days, with attention to increases in supernatant potassium concentration.

Keywords:

red blood cell components, irradiation, shelf life, red blood cell quality