

凍結赤血球液製造におけるプログラムフリーザー法とディープフリーザー法の比較

瀧崎 晶弘 保井 一太 田中 光信 三橋 久子 下垣 一成
木村 貴文 瀧原 義宏 平山 文也

解凍赤血球液 (Frozen-Thawed Red Cells : FTRCs) は、中間製品である凍結赤血球液 (Frozen Red Cells : FRCs) として 10 年間保存可能であるため、まれな血液表現型を持つ患者にとって有用な血液製剤である。しかしながら、FTRCs は、凍結・融解工程に起因する溶血により、製品規格である総ヘモグロビン (Haemoglobin : Hb) 含有量を満たさない場合がある。本研究では凍結工程に着目し、溶血を抑制することで FTRCs の Hb 含有量の向上を目指した。採血 5 日目 (5-day-old : 5D) または 9 週目 (9-week-old : 9W) の赤血球液 (Red Blood Cells : RBCs) をグリセロール化し、プリーング後に 2 分割した。グリセロール化 RBCs はプログラムフリーザー (Programmed Freezer : PF) 法またはディープフリーザー (Deep Freezer : DF) 法で凍結した。凍結 4~8 週間後、FRCs を融解して脱グリセロール化した。9W の原料血液は、Hb 回収率が低値で製品規格を満たさない FTRCs の模倣品とみなした。結果、PF 法は DF 法より高い Hb 回収率を示した (5D : 85.9 ± 2.1 vs $81.1 \pm 3.5\%$, $p < 0.001$) (9W : 56.8 ± 4.0 vs $52.4 \pm 3.5\%$, $p < 0.001$)。赤血球内 ATP および 2,3-DPG 量は PF 法と DF 法で変わらなかった。以上のことから PF 法は DF 法よりもグリセロール化 RBCs の凍結に適していると考えられ、まれ血を対象とした FTRCs の安定供給に貢献すると考えられる。

キーワード：ディープフリーザー、凍結融解、ヘモグロビン回収率、溶血、プログラムフリーザー

この論文記事は、John Wiley & Sons 社の許可のもと、Vox Sanguinis 誌 (2022; 117 (6): 812–821) に最初に報告された研究に基づくものである。(Akihiro Fuchizaki, Kazuta Yasui, Mitsunobu Tanaka, Hisako Mitsuhashi, Kazushige Shimogaki, Takafumi Kimura, Yoshihiro Takihara, and Fumiya Hirayama: Comparison of program-freezing method and deep freezer method in manufacturing of frozen red blood cell products. Vox Sanguinis 117 (6): 812–821, 2022)

はじめに

まれな血液表現型 (まれ血) を持つ赤血球液 (Red Blood Cells : RBCs) は、登録ドナーが十分多い場合、製剤確保のために献血者を手配することが可能であるが、ドナーが少数の場合、容易ではない¹⁾。そのため、まれ血の患者輸血には、しばしば凍結赤血球液 (Frozen Red Cells : FRCs) が使用される²⁾。

FRCs は、受注後に融解・洗浄され、解凍赤血球液 (Frozen Thawed Red Cells : FTRCs) として出荷される。FTRCs 調製方法は各国で異なっており、日本では生物学的製剤基準に従い、採血後 5 日以内の RBCs から FRCs を調製後、 -65°C 以下で最長 10 年間保存することが可能である。また、外観試験とヘモグロビン (Haemoglobin : Hb) 含量試験がある一方で、溶血基準はない。総 Hb 量は、400ml 全血由来 RBCs から FTRCs を調製する場合、2020 年 8 月までは 28g/Bag 以上が製

品基準として定められ、それ以降は 24g/Bag 以上に変更された。当センターでは、2012 年 4 月から 2020 年 3 月までに調製した全 FTRCs の 18.6% (156 本中 29 本) が総 Hb 量の基準を満たしていなかった。特に Hb 回収率は製品群で $69.7 \pm 9.0\%$ ($54.2 \sim 89.0\%$)、非製品群で $44.9 \pm 8.2\%$ ($20.8 \sim 53.2\%$) と大きな差がある。従って、FTRCs の安定供給や有効成分を増加させるために、より高い Hb 回収率を得られる技術的な進歩が望まれている。

Hb 回収率を向上させるためには、溶血の主要因である赤血球膜の損傷を凍結・融解・洗浄工程で可能な限り低減させる必要がある。現在、グリセロール化 RBCs の凍結には、凍結速度の異なる 2 種類の凍結法、すなわち、緩速凍結法と急速凍結法が用いられている^{3)~5)}。緩速凍結法はグリセロール化 RBCs を -65°C 以下のディープフリーザー (Deep Freezer : DF) で凍結およ

び保存する方法であり、その簡便さから、日本を含む多くの国で使用されている。一方、急速凍結法は液体窒素を必要とし、保存温度を -150°C 以下にする必要がある。

現在、凍結時の細胞内電解質濃縮に伴う浸透圧上昇が、溶血の最も大きな原因と考えられている^{6)~8)}。細胞レベルでは、細胞内電解質濃縮を最小限に抑えるために、凝固点を速やかに通過させる凍結法が溶血抑制に重要である。製品レベルでは、小林ら⁹⁾が、予冷により試料の中心部と表面部の温度差を小さくした後に急速凍結することで、氷結晶を均一かつ微細にすることが重要であることを報告している。このように、急速凍結法は赤血球膜の損傷を軽減することができるが、液体窒素を必要とするため、多くの国では採用されていない。

本研究では、プログラムフリーザー (Programmed Freezer: PF) を用いて、振盪しながら凍結速度を調節し、赤血球製品に均一な温度分布が得られるような新しい凍結法の開発を目指した。PF法は、2段階の凍結工程で構成されている。第1段階 (precooling step) では、グリセロール化 RBCs を振盪しながら、緩やかに冷却することでバッグの中心部と表面部の温度差を抑制し、徐々に凝固点近くまで冷却した。第2段階 (rapid freezing step) では、グリセロール化 RBCs を急速凍結させることで、凝固点を速やかに通過させた。凍結によるバッグの破損を避けるため、目標温度は -120°C とした。PF法より製造した FTRCs の特性解析のために、採血5日目 (standard RBCs) と9週目の RBCs (old RBCs) を原料血液として用いて、現行凍結法 (DF法) 由来製剤と比較した。我々は、old RBCs を原料血液とした FTRCs が Hb 回収率低値である非製品群を模倣することを仮定した¹⁰⁾¹¹⁾。

材料と方法

RBCs の採血、調製方法、および研究倫理について

56ml 抗凝固剤 (Citrate Phosphate Dextrose Solution: CPD 液) 入りポリ塩化ビニルバッグを用いて 400 ml 全血採血を行い、フィルター処理により白血球除去を行った。その後、遠心分離機 (9942; 久保田商事社製) を用いて $4,780 \times \text{g}$, 22°C で 12 分間遠心分離し、自動分離装置 (AC-215; テルモ BCT 社製) を用いて血漿を除去した。血漿除去後の赤血球層に 95ml 赤血球保存液 (Mannitol-Adenine-Phosphate Solution: MAP 液) を添加した¹²⁾。RBCs はすべて容量規格である 220~320 ml を満たした。RBCs は、15Gy の X 線照射 (MBR-1530A-TW; 日立ヘルスケアシステムズ社製) 後、 4°C で保存 (MPR-415R; パナソニック社製) された。採血後 5 日間保存した RBCs (standard RBCs) は製品群を

表1 プログラムフリーザープロトコル

	Step 1		Step 2	
	precooling		rapid freezing	
設定温度 ($^{\circ}\text{C}$)	-20		-120	
時間 (min)	1	29	3	12
設定凍結速度 ($^{\circ}\text{C}/\text{min}$)	-40.0	0*	-33.3	0*

*設定温度で維持

模倣することを想定し、採血後9週間保存した RBCs (old RBCs) は非製品群を模倣することを想定した。

本研究は、日本赤十字社血液事業本部倫理委員会の承認を得ており (倫理審査番号: 2019-015)、試験に用いた RBCs はすべて献血の同意説明書により、同意の得られた健常人ドナーから採血した。

グリセロール化 RBCs

製造工程は、グリセロール化キット (225j; ヘモネティクス社製) および ACP215 (ヘモネティクス社製) を用いて閉鎖系で行った。RBCs を室温で 3 時間静置後、100 ml の 60% グリセロール溶液 (SF-60; 扶桑薬品工業社製) を 2 分間かけて添加した。室温で 5 分間静置後、さらに SF-60 を 300ml 添加した。グリセロール添加後の RBCs を $3,250 \times \text{g}$, 22°C , 10 分間で遠心分離し、上清除去したものをグリセロール化 RBCs とした。グリセロール化 RBCs の Hct は $80 \pm 5\%$ であり、グリセロール最終濃度は、原料 RBCs の容量により 33~39% である。

DF法とグリセロール化 RBCs の凝固点

DF法では、ディープフリーザー (MDF-594; パナソニック社製) を用いて、凍結温度を -80°C とした。グリセロール化 RBCs の凝固点は、血液バッグ (平均容量: 240ml) に温度記録計 (TR-81; T&D 社製) の温度センサーを挿入して、経時的に製品内部温度をモニタリングすることで測定した。

PF法

プログラムフリーザーは、凍結速度と振盪速度の両方を制御することができる CM-21 (太陽日酸社製) を用いた。PF法の第一段階 (precooling step) では、設定温度をグリセロール化 RBCs の凝固点より約 5°C 高い -20°C (速度= $-40^{\circ}\text{C}/\text{min}$) とし、30分間冷却した。PF法の第二段階 (rapid freezing step) では、グリセロール化 RBCs を -120°C まで急速凍結 (速度= $-33.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$) し、15分間、その温度を維持した。振盪速度は両段階とも 120rpm に設定した (表1)。加えて、PF法で凍結時のグリセロール化 RBCs 内部温度を測定した。

保存、融解、洗浄方法

保存工程は、DF法、PF法ともに、設定温度 -80°C の DF でグリセロール化 RBCs を 4~8 週間保存した。保存後の洗浄工程は、日本赤十字社で採用している 3

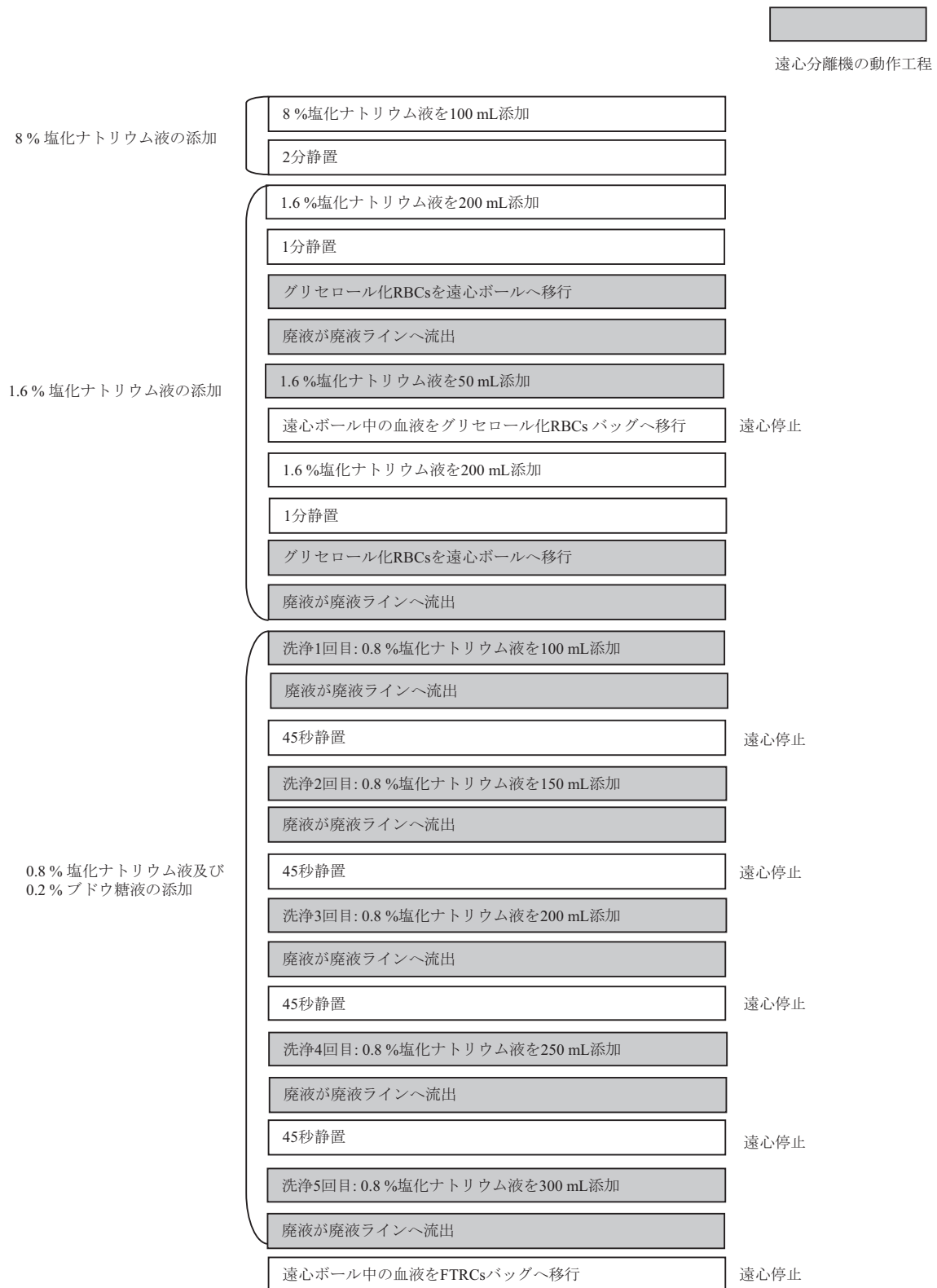


図1 3液洗浄法のプロトコル

液洗浄法 (Meryman 改良法) で行った⁸⁾¹³⁾。DF 法または PF 法で凍結したグリセロール化 RBCs を 1 ペアとして同時に融解し、以下の洗浄工程を行った。37℃ の恒温水槽 (personal-11; タイテック社製) で融解後、ACP

215, 洗浄キット (235j; ヘモネティクス社製) を用いて、100ml の 8% 塩化ナトリウム液、450ml の 1.6% 塩化ナトリウム液、最後に 1l の 0.8% 塩化ナトリウム、0.2% のブドウ糖液 (扶桑薬品工業社製) で洗浄した。

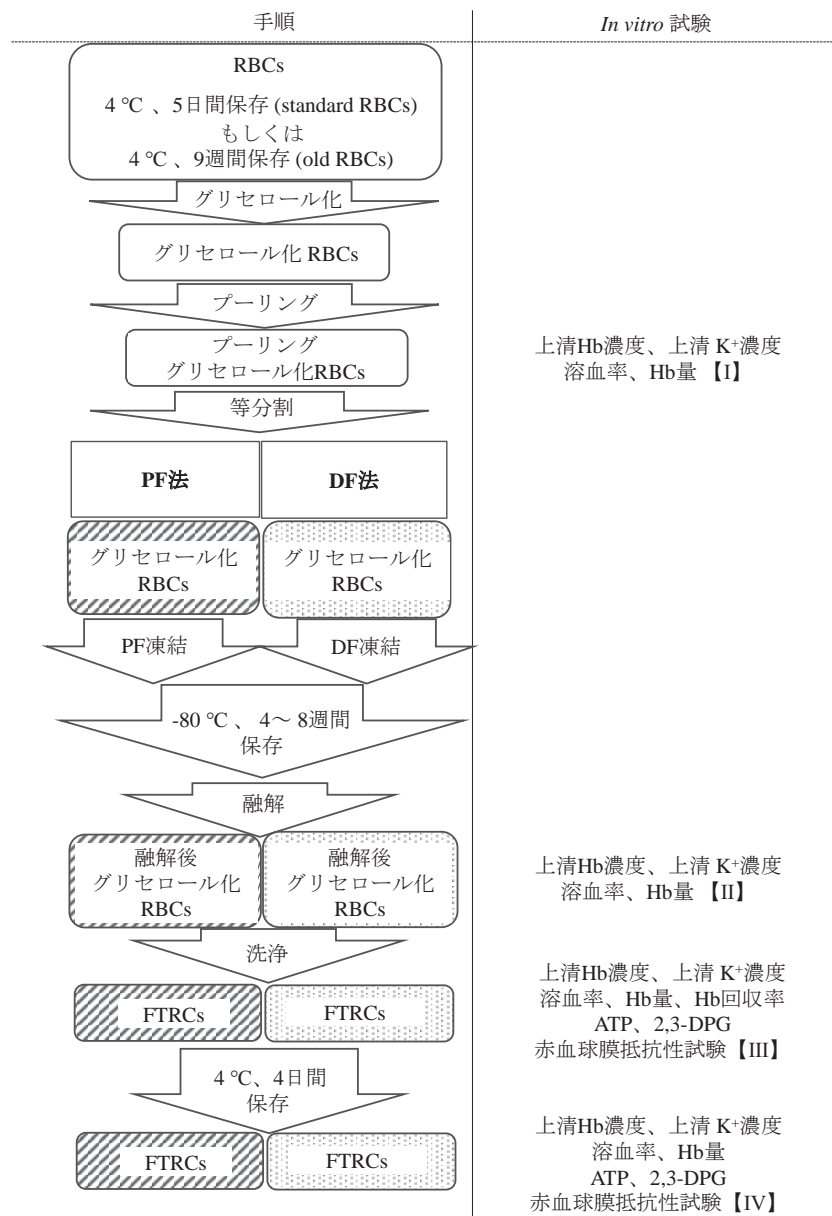


図2 研究のワークフロー

RBCsは、4°Cで5日間もしくは9週間保存した。2本の5日保存RBCsをグリセロール化し、プーリング後2分割した。一方はPF法で凍結し、もう一方はDF法で凍結した。9週保存RBCsも同様に処理した。4~8週間後、グリセロール化RBCsを融解し、洗浄した。In vitro試験には、[I]凍結直前のグリセロール化RBCs、[II]融解直後洗浄前のグリセロール化RBCs、[III]製造直後のFTRCs (Day 1)、[IV]4°C、4日間保存後のFTRCs (Day 4)から試験用試料をサンプリングした。

Meryman改良法の詳細な工程は、図1に示した。洗浄後、2,690×g、22°Cで12分間遠心分離し、赤血球層に95mlのMAP液を添加した。

“old RBCs”としての保存期間の判断基準

ABO同型RBCsを3Bagプーリング後、3分割することで同品質のRBCsを製造した。各RBCsを4°Cで6、8、10週間保存後にそれぞれグリセロール化しDFで保存した。保存4~8週間にそれぞれのFRCsを恒温水槽で融解後、洗浄した。製造されたFTRCsのHb

回収率が50%未満となる保存期間を“old RBCs”と定義した。Hb回収率は以下のように算出した。

$$\text{Hb回収率 (\%)} = \frac{\text{FTRCs Hb (g/unit)}}{\text{グリセロール化 RBCs Hb (g/unit)}} \times 100$$

研究のワークフロー

ワークフローを図2に示す。RBCsは、4°Cで5日間保存したstandard RBCsと、FTRCs製造工程でHb回収率が50%未満の原料血液であるold RBCsの2種類を用意した。standard RBCsをグリセロール化後、2

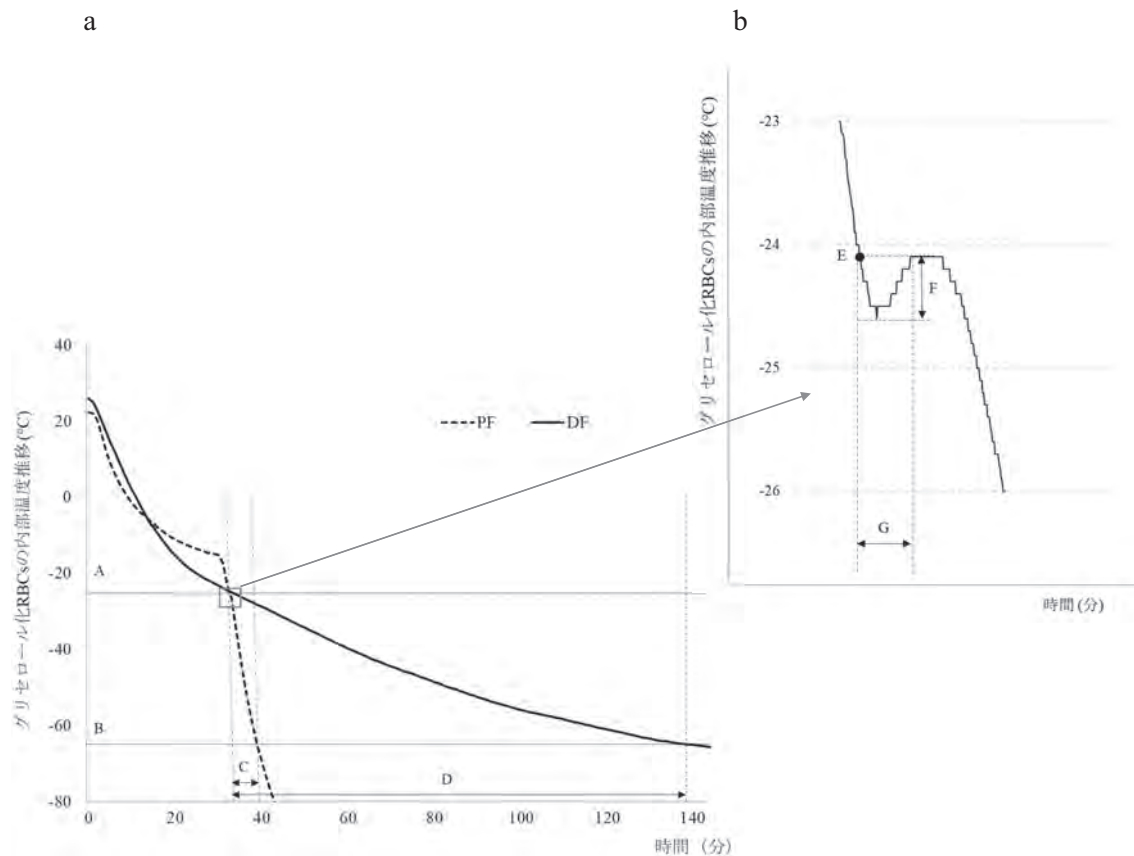


図3 PF法とDF法による凍結時のグリセロール化RBCs内部温度推移の違い

PF法(点線)またはDF法(実線)で凍結時のグリセロール化RBCs内部温度推移を(a)に示す。凝固点付近の冷却温度曲線を(b)に示す。横線Aは凝固点(-24.1°C)、横線Bは保存温度(-65.0°C)をそれぞれ示す。点CはPF法の凍結時間(6分)、点DはDF法の凍結時間(107分)を示す。点Eは凝固点、点Fは過冷却をそれぞれ示す。点Gは過冷却時間を示しており、106秒であった。

Bagsをプーリングして分割することで、同品質の製剤を得た。得られたグリセロール化RBCsの一方をPF法で凍結し、他方をDF法で凍結した。old RBCsも同様の方法で処理した。4~8週間後、DF法またはPF法で凍結したグリセロール化RBCsをペアで同時に融解・洗浄した。PF法とDF法より製造されたFRCs及びFTRCsの*in vitro*試験を行った。

In vitro 試験

1) サンプリングポイント

*in vitro*試験には、[I]凍結直前のグリセロール化RBCs、[II]融解直後洗浄前のグリセロール化RBCs、[III]製造直後のFTRCs (Day 1)、[IV]4°C、4日間保存後のFTRCs (Day 4)から試験用試料をサンプリングした。

2) 試験項目と方法

上清サンプルは、2回の遠心分離(1,710×g, 4°C, 10分)より取得し、Hb濃度またはK⁺濃度の測定に用いた。Hb濃度はロイコクリスタルバイオレット法¹⁴⁾¹⁵⁾を用いて定量し、22°CでのK⁺濃度は血液ガス・電解質分析装置(Cobas b 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。

重量は電子天秤(GX2000R; A&D社製)で測定し、容量は、重量と比重から算出した(比重:グリセロール化RBCs:1.11, FTRCs:1.06)。Hbとヘマトクリット値(Hct)は、自動血球計数装置(xs-1000i;シスメックス社製)を用いて測定した。ユニットあたりのHb換算は以下の通りである。Hb(g/unit)=Hb(g/dl)×容量(dl/unit)。溶血は、[(100-Hct)×上清Hb濃度(g/l)/全Hb濃度(g/l)]として算出した。赤血球膜抵抗性試験はParpart法¹⁶⁾により、10, 30, 50%の溶血率となる塩化ナトリウム濃度で算出した。アデノシン三リン酸(Adenosine 5'-triphosphate:ATP)および2,3-ジホスホグリセレート(Diphosphoglycerate:DPG)は、それぞれ酵素法を用いた市販キットであるルシフェール250プラスキット(キッコマン社製)およびロシュ診断キット(Roche Diagnostics社製)を用いて、添付文書に従い測定した。

統計処理

結果は、平均値±標準偏差で示した。PF法とDF法の統計学的有意差を確認するために、paired t-testで検定した。統計解析はGraphPad Prism6 software

表2 Standard RBCs を用いた PF 法 vs. DF 法の特性解析の比較

		凍結法	グリセロール化 RBCs			FTRCs on Day 1		FTRCs on Day 4	
			凍結直前 [I]	融解直後 洗浄前 [II]	p 値	製造直後 [III]	p 値	4℃、4日間 保存後 [IV]	p 値
上清	Hb 濃度 (mg/dl)	PF	95 ± 43	1,232 ± 347	<0.01	39 ± 8	0.42	66 ± 11	0.15
		DF		2,413 ± 988		42 ± 9		61 ± 9	
	K ⁺ 濃度 (mEq/l)	PF	13.0 ± 2.1	20.3 ± 3.0	<0.01	1.6 ± 0.6	0.32	16.3 ± 1.9	0.01
		DF		25.8 ± 5.1		1.7 ± 0.3		18.0 ± 1.9	
溶血率 (%)	PF	0.07 ± 0.03	0.9 ± 0.3	<0.01	0.11 ± 0.02	0.18	0.18 ± 0.03	0.58	
	DF		1.7 ± 0.7		0.12 ± 0.02		0.18 ± 0.03		
バッグ検体	Hb 量 (g/unit)	PF	51.9 ± 3.3	51.7 ± 3.3	0.11	41.3 ± 3.2	<0.001	41.3 ± 3.2	<0.001
		DF		51.8 ± 3.3		39.2 ± 3.4		39.3 ± 3.4	
	10% 溶血点 (% NaCl)	PF	NT	NT		0.57 ± 0.02	<0.01	0.54 ± 0.02	0.57
		DF				0.58 ± 0.02		0.53 ± 0.06	
	30% 溶血点 (% NaCl)	PF	NT	NT		0.51 ± 0.02	<0.01	0.49 ± 0.02	0.94
		DF				0.52 ± 0.02		0.49 ± 0.02	
	50% 溶血点 (% NaCl)	PF	NT	NT		0.49 ± 0.01	<0.01	0.46 ± 0.02	0.42
		DF				0.49 ± 0.01		0.46 ± 0.02	
	ATP (μmol/g Hb)	PF	NT	NT		5.3 ± 0.5	0.41	4.9 ± 0.4	0.28
		DF				5.3 ± 0.4		4.8 ± 0.4	
	2,3-DPG (μmol/g Hb)	PF	NT	NT		4.8 ± 2.7	0.55	1.6 ± 1.2	0.50
		DF				4.5 ± 2.1		1.5 ± 1.0	

データは、平均値 ± 標準偏差で示している。(N=10)
 PF 法と DF 法の統計学的有意差は paired t-test で検定した。
 NT = not tested (試験未実施)

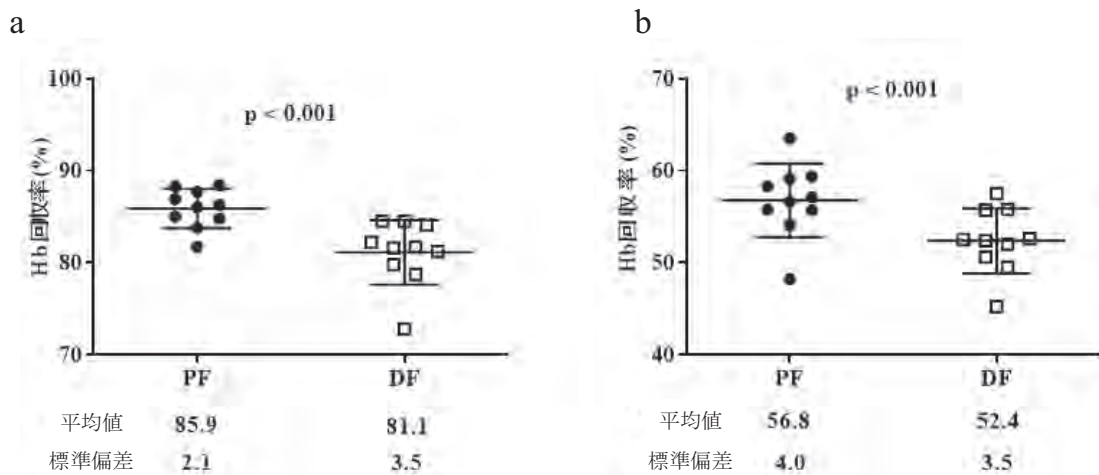


図4 PF 法と DF 法の Hb 回収率の比較
 standard RBCs (a) および old RBCs (b) の Hb 回収率を示した。すべての結果は、平均値と標準偏差で示した (N=10)。統計処理は、paired t-test を使用した。

(GraphPad 社製)を用いた。P<0.01 のときに統計学的に有意であると判断した。

結 果

凝固点とグリセロール化 RBCs の内部温度推移

DF 法で凍結したグリセロール化 RBCs の内部温度推移を図 3a に実線で示した。凝固点付近の冷却温度曲線を拡大したのが図 3b で、点 F は凝固熱による一過性の温度上昇を示す。点 E (-24.1℃) を凝固点と推定した。

この結果から、PF プロトコルは、precooling step で凝固点より約 4℃ 高い -20℃ で 30 分間インキュベートする設定にした。rapid freezing step では、-120℃ (-33℃/min) で急速凍結する設定にした (表 1)。PF 法で凍結したグリセロール化 RBCs の内部温度推移を図 3a に点線で示した。凝固点 (-24.1℃) から FRCs 保存温度 (-65.0℃) への冷却に要する時間は、PF 法 (点 C) が 6 分、DF 法 (点 D) が 107 分であった。点 E は凝固点、点 F は過冷却をそれぞれ示す。点 G は過冷却時間を示

表3 Old RBCs を用いた PF 法 vs. DF 法 の特性解析の比較

		凍結法	グリセロール化 RBCs			FTRCs on Day 1		FTRCs on Day 4	
			凍結直前 【I】	融解直後 洗浄前 【II】	p 値	製造直後 【III】	p 値	4℃, 4日間 保存後 【IV】	p 値
上清	Hb 濃度 (mg/dl)	PF	511±157	2,740±503	<0.01	117±19	0.13	176±29	0.54
		DF		5,649±2,066		129±23		183±43	
	K ⁺ 濃度 (mEq/l)	PF	22.7±0.6	30.2±1.2	<0.001	0.7±0.2	0.66	5.4±1.0	0.33
		DF		35.3±2.2		0.7±0.2		5.1±0.6	
	溶血率 (%)	PF	0.44±0.17	2.3±0.5	<0.001	0.45±0.08	0.02	0.68±0.13	0.09
		DF		4.7±1.4		0.55±0.13		0.77±0.21	
バッグ検体	Hb 量 (g/unit)	PF	50.2±1.4	50.1±1.6	0.07	26.7±2.5	<0.001	26.7±2.5	<0.001
		DF		50.2±1.6		24.7±2.1		24.7±2.2	
	10% 溶血点 (% NaCl)	PF	NT	NT		0.67±0.02	<0.001	0.67±0.03	0.03
		DF				0.71±0.01		0.70±0.02	
	30% 溶血点 (% NaCl)	PF	NT	NT		0.54±0.03	<0.01	0.54±0.02	<0.01
		DF				0.57±0.02		0.56±0.02	
	50% 溶血点 (% NaCl)	PF	NT	NT		0.48±0.01	<0.01	0.47±0.02	0.02
		DF				0.49±0.01		0.48±0.02	
	ATP (μmol/g Hb)	PF	NT	NT		1.0±0.2	0.55	0.8±0.2	0.71
		DF				1.0±0.2		0.8±0.2	
	2,3-DPG (μmol/g Hb)	PF	NT	NT		0.1±0.2*	0.72	0.1±0.2*	0.54
		DF				0.0±0.1*		0.0±0.1*	

データは、平均値±標準偏差で示している。(N=10)

PF 法と DF 法の統計学的有意差は paired t-test で検定した。

NT = not tested (試験未実施)

*10 サンプル中 9 サンプルで検出限界 (0.02μmol) 以下であった。

しており、106 秒であった。

PF 法で DF 法より高い Hb 回収率を達成 (standard RBCs)

standard RBCs を用いた *in vitro* 試験の結果を表 2 に示した。PF 法では、融解後のグリセロール化 RBCs の上清 Hb 濃度、上清 K⁺濃度、溶血率が DF 法よりも有意に低かった。グリセロール化 RBCs の凍結前および融解直後の総 Hb 量は、PF 法と DF 法に有意な差を認めなかった。FTRCs では、損傷による溶血赤血球が洗浄工程で除去されるため、総 Hb 量が両法でグリセロール化 RBCs より減少した。PF 法での総 Hb 減少量が DF 法よりも少ないため、Hb 回収率は PF 法 (85.9±2.1%) で DF 法 (81.1±3.5%) より有意に高値を示した (図 4 a)。Parpart 法の結果から、製造直後の DF 法由来 FTRCs は、PF 法由来 FTRCs よりも溶血しやすいことが示された。FTRCs の ATP および 2,3-DPG 含有量は、PF 法と DF 法に有意な差を認めなかった。

PF 法で DF 法より高い Hb 回収率を達成 (old RBCs)

old RBCs の保存期間を決定するために、RBCs を 6, 8, 10 週間保存後、DF 法で凍結し、Hb 回収率を算出した。その結果、Hb 回収率はそれぞれ 58, 55, 44% と経時的に低下した。9 週間後には約 50% の Hb 回収率が得られるため、9 週目の RBCs を “old RBCs” として使用した。

old RBCs を用いた *in vitro* 試験の結果を表 3 に示し

た。old RBCs においても standard RBCs と同様に PF 法では、融解後のグリセロール化 RBCs の上清 Hb 濃度、上清 K⁺濃度、溶血率で DF 法よりも有意に低値を示した。PF 法における FTRCs の総 Hb 量 (g/unit) は、DF 法よりも高かった。Hb 回収率は PF 法 (56.8±4.0%) で DF 法 (52.4±3.5%) より有意に高値を示した (図 4 b)。Parpart 法の結果から、製造直後の DF 法由来 FTRCs は、PF 法由来 FTRCs よりも溶血しやすいことが示された。FTRCs の ATP 含有量は、PF 法と DF 法に有意な差を認めなかった。2,3-DPG は old RBCs 調製時の保存期間で枯渇している可能性がある。そのため、凍結法にかかわらず old RBCs 由来 FTRCs では 10 サンプル中 9 サンプルで検出限界 (0.02μmol) 以下であった¹⁷⁾。

考 察

本研究では、まれ血 RBCs の新しい凍結方法の有用性を、凍結融解後の Hb 回収率に着目し、現行法 (DF 法) と新法 (PF 法) の *in vitro* 特性を比較した。その結果、PF 法は DF 法に比べて Hb 回収率が約 4~5% 向上し、standard RBCs のみならず old RBCs でも同様の傾向を示した。

PF 法では、製剤温度を均一にした後、急速凍結するために、振盪と 2 段階の温度制御を行った。PF 法におけるグリセロール化 RBCs の内部温度は、precooling step 後半において DF 法よりも緩やかに低下した (図

3a). 一方、凝固点 (-24.1°C) から FRCs 保存温度 (-65.0°C) まで冷却するのに要した時間は、PF 法で 6 分であり、DF 法の 107 分より非常に短かった。この PF 法特有の温度変化が、製品の中心部と表面部の温度差を小さくして氷結晶を均質で微細にし⁸⁾、かつ、細胞内電解質濃縮に伴う浸透圧上昇の抑制につながったと推測される。

Valeri らは、緩速凍結法由来 FRCs を 14 年間保存後、2 液洗浄法 (Valeri 法) で洗浄した場合、Hb 回収率が $80 \pm 7\%$ であったことを報告している¹⁸⁾。Lagerberg らは緩速凍結法由来 FRCs を 2 週間保存後、Valeri 法で洗浄した場合、FRCs の Hb 回収率は $81 \pm 5\%$ であったことを報告している¹⁹⁾。日本では、Meryman 改良法を採用しており、欧米と洗浄方法は異なるが、Hb 回収率 ($81.1 \pm 3.5\%$) は同程度であった。

日本における FTRCs の調製は、諸外国と同様に緩速凍結法を用いているが、日本独自の製造工程も存在する。原料 RBCs は凍結前に X 線照射し、融解後の FRCs を Meryman 改良法で洗浄し、FTRCs 保存液として MAP 液を使用している。Turner らは、凍結前もしくは洗浄後の照射タイミングの違いにより、FTRCs における K^+ 濃度に影響を及ぼすが、Hb 回収率に影響はなかったことを報告している²⁰⁾。Tamura らは、Meryman 改良法と Valeri 法の 2 つの洗浄法を比較し、洗浄 24 時間後の溶血率に有意差はないことを報告している²¹⁾。また、彼らは 2 種類の RBCs 保存液として AS-3 液と MAP 液を用いて、FTRCs の溶血率に及ぼす影響も検討している。MAP 液には膜保護作用のあるマンニトールが多く含有されているが、その他の成分は、欧米で使用されている AS-3 液と大きな違いはない²²⁾²³⁾。保存 7 日目の FTRCs の溶血抑制作用は、MAP 液と AS-3 液で同程度であったことが報告されている。これらの報告は、日本独自の FTRCs 製造工程が品質に及ぼす影響として、あまり大きくないことを示唆している。

PF 法では、現行法と比較して、old RBCs 由来 FTRCs で 4.4% (図 4b)、standard RBCs 由来 FTRCs で 4.8% (図 4a) の Hb 回収率向上が確認された。前者の結果を、当施設における過去 8 年間の非製品群 (156 本中 29 本) に適用すると、約 34% (29 本中 10 本) が製品基準を満たすことになる。これらの結果は、小さな改善であるが、有意差が示されている。また、製品群 FTRCs においても、同様に Hb 含有量の増加が期待できるため、輸血効果の向上につながることが示唆されている。

一方、本研究には 4 つの限界がある。第一に、我々は、Hb 回収率が低値で非製品となるまれ血 RBCs を模倣するため、old RBCs を原料血液として用いた。この old RBCs 由来 FTRCs の Hb 回収率は、非製品群と同程度低値であるが、実際のまれ血を用いていないので、

我々の仮説は誤っているかもしれない。今後、McLeod²⁴⁾ など、従来法では FTRCs 製品基準を満たすことが難しいまれ血 RBCs を対象に、PF 法の評価を進めることが望まれる。第二に、PF 法における FTRCs の品質向上に、温度制御と振盪の二つの要因が、それぞれどの程度寄与しているか不明な点である。第三に、赤血球膜が standard RBCs よりも old RBCs で脆弱であるにもかかわらず、PF 法凍結時、Hb 向上率が同程度であった理由を解明することができていない。最後に、PF 法は液体窒素を用いるため、その管理が別途必要になることである。

著者の COI 開示：著者全員が凍結赤血球製剤を製造している日本赤十字社の職員である。

謝辞：血液サンプルの調製にご協力いただいた近畿ブロック血液センター製剤部の皆様に感謝いたします。

文 献

- 1) Red Cell Immunogenetics and Blood Group Terminology ISBT Working Party.
<https://www.isbtweb.org/> (2021/10/26 accessed).
- 2) Lecak J, Scott K, Young C, et al: Evaluation of red blood cells stored at -80°C in excess of 10 years. *Transfusion*, 44: 1306—1313, 2004.
- 3) Meryman HT, Hornblower M: A method for freezing and washing red blood cells using a high glycerol concentration. *Transfusion*, 12: 145—156, 1972.
- 4) 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.
- 5) Krijnen HW, de Wit JJ, Kuivenhoven AC, et al: Glycerol treated human red cells frozen with liquid nitrogen. *Vox Sang*, 9: 559—572, 1964.
- 6) Hess JR: Red cell freezing and its impact on the supply chain. *Transfus Med*, 14: 1—8, 2004.
- 7) Lovelock JE: The hemolysis of human red blood-cells by freezing and thawing. *Biochim Biophys Acta*, 10: 414—426, 1953.
- 8) Meryman HT: Red cell freezing by the American National Red Cross. *Am J Med Technol*, 41: 265—282, 1975.
- 9) Kobayashi R, Kanesaka N, Watanabe M, et al: Effect of the breaking temperature of supercooling on ice characteristics and drip loss of foods in supercooled freezing method (in Japanese). *Transactions of Japan Society of Refrigeration and Air Conditioning Engineers*, 31: 297—303, 2014.

- 10) Holovati JL, Wong KA, Webster JM, et al: The effects of cryopreservation on red blood cell microvesiculation, phosphatidylserine externalization, and CD47 expression. *Transfusion*, 48: 1658—1668, 2008.
- 11) Gelderman MP, Vostal JG: Rejuvenation improves roller pump-induced physical stress resistance of fresh and stored red blood cells. *Transfusion*, 51: 1096—1104, 2011.
- 12) Yang P, Zhou J, Kang Y, et al: Mannitol-adenine-phosphate: a novel solution for intraoperative blood salvage. *Transfusion*, 54: 1146—1152, 2014.
- 13) Hornblower M, Meryman HT: Relative efficiency and interchangeability of Huggins and American Red Cross red cell freezing procedures. *Transfusion*, 17: 417—424, 1977.
- 14) Kikuchi G, Kurita R, Ogasawara K, et al: Application of immortalized human erythroid progenitor cell line in serologic tests to detect red blood cell alloantibodies. *Transfusion*, 58: 2675—2682, 2018.
- 15) Takayanagi M, Yashiro T: Development of a new colorimetric determination of hemoglobin in plasma. *Jpn J Clin Chem*, 14: 247—252, 1985.
- 16) Parpart AK, Lorenz PB, Parpart ER, et al: The osmotic resistance (fragility) of human red cells. *J Clin Invest*, 26: 636—640, 1947.
- 17) Hogma CF: Preparation and preservation of red cells. *Vox Sang*, 74 (Suppl 2): 177—187, 1998.
- 18) 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 Heamonetics ACP215, and stored at 4°C in additive solution-1 or additive solution-3 for up to 3 weeks. *Transfusion*, 44: 990—995, 2004.
- 19) Johan WM Lagerberg, Rosa Truijens-de Lange, Dirk De Korte, 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.
- 20) Turner TR, Lautner L, Hill A, et al: Evaluating the quality of red blood cell concentrates irradiated before or after cryopreservation. *Transfusion*, 60: 26—29, 2020.
- 21) Tamura S, Akino M, Sato M, et al: Extended storage of frozen thawed red cells following deglycerolization with an automated cell processor ACP215 and storage in additive solutions (in Japanese). *Japanese Journal of Transfusion and Therapy*, 55: 508—515, 2009.
- 22) 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, 2003.
- 23) Hansen AL, Kurach JDR, Turner TR, et al: The effect of processing method on the in vitro characteristics of red blood cell products. *Vox Sang*, 108: 350—358, 2015.
- 24) Kuypers FA, van Linde-Sibenius Trip M, Roelofsen B, et al: The phospholipid organisation in the membranes McLeod and Leach phenotype erythrocytes. *FEBS Lett*, 184: 20—24, 1985.

COMPARISON OF PROGRAM-FREEZING METHOD AND DEEP FREEZER METHOD IN MANUFACTURING OF FROZEN RED BLOOD CELL PRODUCTS

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

Keywords:

deep freezer, freeze-thawing, haemoglobin recovery, haemolysis, programmed freezer