論文

赤血球の急速冷凍用 ステンレススチールコンテナの試作

隅 田 幸 男*

SUMIDA, Sajio

はじめに

著者は、1965年より緩速冷凍法 (slow freezing) による冷凍血液輸血の研究を行ってきた。この方法は、赤血球沈層にこれと等量の 8.6 モルという高濃度のグリセリン液を添加して写真 1 に示すような著者の考案になる大きな

写真 1 著者の落差式赤血球
冷凍洗浄用バッグ

塩化ビニール製バッグに入れて、 -85°C の超低温冷凍庫内で 5~6 時間を要して緩徐に凍結保

存する方法である。

この方法によって、著者は 1969 年 9 月までに、血液の足りない 130 人の患者に 700 本の血液を冷凍処理して輸血してきた。この方法には 2 つの欠点があった。凍害防止剤として高濃度のグリセリン液を必要とすること、脱グリセリンに際して大量のブドウ糖液と果糖液を消費することである。

赤血球の冷凍保存法には、 -196°C の液体窒素内で $100^{\circ}\text{C}/\text{sec}$ という迅速さで冷凍する方法もある。これが急速冷凍法 (rapid freezing) である。表 1 に slow freezing と rapid freezing の比較を示した。赤血球の急速冷凍保存法は Doeblner と Rinfret (1962), Rapatz と Luyet (1963) らによってその可能性が立証され、Pert (1965) および Krijnen (1965) らによって発展させられ、最近になってニューヨーク血液センターの Rowe (1966) らによって紹介された方法が、これまでの緩速冷凍法をしのぐ勢で普及しようとしている。Valeri (1968) らによって提唱されているように、過去 10 年間の諸家の報告にもとづいての赤血球の冷凍保存法に関する criteria として、1) in vitro の回収率が 90% 以上であること、2) 上清溶血ヘモグロビンの総量は 1 単位の血液につき 300 mg 以下であること、3) 解凍から輸血までの所要時間は 30 分以内のこと、4) 洗浄液の量は 3 l 以下であること、などがあげられている。以下述べる急速冷凍法はこれらの 4 つの criteria をほぼ満足するものである。ただし、赤血球を急速冷凍するには -196°C の液体窒素温度に耐久し得る丈夫な容器 (コ

*国立福岡中央病院・外科

(原稿受付: 昭和 44 年 7 月 10 日)

表 1

	緩 速 法	急 速 法
冷 凍 時 間	5 ～ 6 時間	2 ～ 3 分
解 凍 時 間	2 ～ 3 分	2 ～ 3 分
凍 害 防 止 剤	1. 高濃度 (グリセリンでは 79 %) 2. 細胞内 (細胞膜透過性) 凍害防止剤 (グリセリン, DMSO)	1. 低濃度 (グリセリンでは 28 %) 2. 細胞外 (膜非透過性) 凍害防止剤 (乳糖, PVP, デキストラン, ヒドロキシエチルでんぷん他)
脱グリセリン法	1. Cohn Fractionator 2. Cytoglomerator 3. 落差式バッグ (特殊な装置不要)	頻回遠心分離法
洗 浄 液 (血液 1 本につき)	50 %ブドウ糖液 300 ml, 5 %果糖液 2 l を要す	16 % マニトール生食水 200 ml, 生食水 600 ml を要す
Rowe 回収率 Huggins Sumida	— 90 ± 5 % 70 ～ 80 %	90 % 以上 — 92 %

ンテナ) がどうしても必要である。しかも disposable (使い捨て) でなければならない。プラスチックやアルミニウム製の容器では回収率が悪いとされているので、著者は Rowe らの記載にもとづいて、以下述べるステンレススチール容器を試作し、これによって赤血球の急速冷凍保存と輸血を行なってみた。

ステンレススチール容器

試作したステンレススチール容器は写真 2, 3 に示すように、厚さ 0.6 mm のステンレススチール板からなり、内面は十分に研磨されてい

る。この厚さは容器の硬さ・重さ・価格を考慮して決定されたものであり、Rowe らは 0.025 (約 0.636 mm) インチの厚さのステンレススチール板を用いている。これ以下の厚さでは容器に血液を充填した際に膨らんでしまうので好ましくない。

容量は 300 ml と 600 ml である。600 ml 容には Rowe らのものと全く同寸法のもので、より

写真 2 急速冷凍血液容器 (I 型)

写真 3 液体窒素から取出した容器

(54)

薄型で縦に長い型のものを作成した。

その寸法（内容積の）は次の通りである。

I 型 300 ml 38×20×0.4 cm

II 型 600 ml 26×16×0.75 cm

III 型 600 ml 26×26×0.9 cm

血液の出入口部には内径 3 mm のステンレスパイプがついており、パッキングを有するネジ込み栓によって密栓されるようになっている。

急速冷凍処理方法

血漿分離を行なったのち血球沈層をプラスチック製輸血用バッグ内に残し、これに等量の低濃度グリセリン液（28%グリセリン，3%マニトール，0.65% NaCl）を添加して充分混和したのち，ステンレススチール容器の一方の栓を開いて注入する。したがって，この段階でのグリセリン濃度は14%となっている。もう一方の栓は開放しておく。注入が完了したら両方の栓を閉める。このまま液体窒素槽内に沈めるのであるが，ステンレススチールパイプのねじ込み栓の部分まで浸すと，液体窒素は密栓したはずの入口部より容器の内面に流入するので，入口部のステンレススチールパイプはねじ込み栓と共に液体窒素液面から上に出しておかねばならない。さもなくば，液体窒素が内部に侵入すると，42～45℃の恒温槽内での解凍の際に急速に気化した窒素ガスの圧力によって容器破損または血球破壊を生じるからである。

著者の使用した液体窒素槽は大阪酸素^(株)社製の SD 20 型で 15 l の容積を有している。

液体窒素内に容器を沈めると激しく沸騰して気化するが，2～3 分後には内部まで完全に凍結して沸騰は停止する。このまま，液体窒素内（-196℃）または液体窒素蒸気内（-170℃）で凍結したまま保存する。いったん，液体窒素内で -196℃ に凍結した血液を -80℃ の普通の超低温冷凍庫に移して，冷凍保存することは氷晶の物理学的変化やそれにつづく生物学的変化を生じて赤血球が破壊するから好ましくない。

解凍は 42～45℃ の恒温槽内で行なう。2～3 分で融解する。解凍した血液をプラスチックバッグに移行する。

脱グリセリンは Rowe らの方法に準じて，ま

ずプラスチックバッグのまま 3000 回転で 7 分間の遠心分離を行ない，上清を排棄する。この時の上清溶血ヘモグロビン濃度はシアンメトヘモグロビン法によって測定するとほぼ 229 ± 16 mg/dl となる。次に 16% マニトールの 0.9% 生理食塩水を 200 ml 添加して振盪混和したのち 3000 回転で 5 分間の遠心分離を行ない上清を排棄する。この時の上清ヘモグロビン濃度はほぼ 53 ± 22 mg/dl 程度である。次に 0.9% 生理食塩水を 250 ml 添加して 3000 回転で 5 分間の遠心分離を行ない上清を排棄する。この上清ヘモグロビン濃度はほぼ 85 ± 45 mg/dl である。更にもう一度 0.9% 生理食塩水で洗浄を行なう。この最終洗浄後の上清ヘモグロビン濃度はほぼ 31 ± 13 mg/dl となる。以上の遠心分離は必ず 4℃ で低温遠心分離を行なわねばならない。

解凍後の処理過程をまとめると次の通りである。

1. 解凍した血液をそのまま 3000 回転 7 分間の遠心分離を行ない，上清を排棄する。

2. 16% マニトールの 0.9% 生理食塩水 200 ml で第 1 回目の洗浄と遠心分離を行ない，上清を排棄する。

3. 0.9% 生理食塩水 250 ml で第 2 回，3 回目の洗浄と遠心分離を行ない，上清を排棄する。

赤血球を以上のようにして急速冷凍保存した場合の回収率は上清中に溶出したヘモグロビン量より算出すると，ほぼ 92% となったが Rowe らも 90% 以上という成績を出している。最終洗浄後の急速冷凍赤血球は上清を分離したのちそのまま濃縮赤血球として輸血してもよいし，適量の生理食塩水を加えて使用してもよい。

急速冷凍赤血球の生体内生存期間

Rowe らの Volunteers を用いて Cr^{51} でラベルした自家赤血球の急速冷凍処理後の輸血法によると，輸血後 24 時間目には 96% が，14 日後には 69% が，28 日後には 54% が生存していることが確認されている。

考 察

Luyet (1949) がすでに 100℃/秒という急速冷凍による赤血球の凍結保存によって高い回収

率が得られることを認め、その後に Merymann や Kafig (1955) らが液体窒素内で ACD 血液を全血のまま散布凍結する方法をとり、Rinfret (1960) らは、これを液体窒素内に滴下する方法に改良した。しかし、いずれの方法も無菌的な操作がむずかしい、実際に輸血に役立てることの出来るような大量の血液を処理することが出来ない、という2つの欠点があった。

その後、Strumia (1958, 1960) らは、10~15%の乳糖とブドウ糖の混合液を添加した赤血球を3mmの厚さのアルミニウム板または銅板の容器で急速冷凍し、90~95%の回収率を上げ、輸血後の生体内生存期間も24時間目には88%という成績を得ることに成功している。したがって、Rowe (1966) らがステンレススチール容器を用いて低グリセリン液添加による赤血球の急速冷凍をニューヨーク血液センターにおいて行なうようになったのは最近のことである。Rowe は Krijnen らが脱グリセリンの最初に使用したソルビトールを FDA の認可しているマニトールに変更した。Pert (1964) らはテフロンバッグを用い、Krijnen (1964) らはすでにステンレススチール容器を用いて赤血球の急速冷凍を行なっている。

本邦では1965年 C. E. Huggins の来日を契機として緩速冷凍法による冷凍血液輸血の研究が進められてきたため、急速冷凍法は全く検討されないままであった。著者は現在のところ、ステンレススチール容器を完成したばかりなので、わずか15本の急速冷凍血液を7名の患者への輸血成績しか得るには至っていないが、回収率の点では緩速冷凍法よりもだんぜんすぐれているようである。

ステンレススチール容器はプラスチック製品とは違って表面積と容量との比率が常に一定であり、均等な速度で冷凍することができる。また、この容器の形態は液体窒素槽内での貯蔵と整頓とが容易である。

液体窒素槽の液面を観察しながら適当に液体窒素を補充することができるので、停電に対する自家発電の設備が不要であり、故障することもない。

脱グリセリンはたとえ低濃度のグリセリン液

を使用したとしても、細胞内グリセリン濃度が2%以下でない限りは必ず行なわねばならない。これ以上の濃度のグリセリンを含んだ赤血球をはじめとした細胞は、より低張の溶媒（たとえば血液）中に置かれると、グリセリンの膜透過性よりも水の透過性の方が大きいので細胞は膨化して破壊してしまうからである。解凍後の脱グリセリン法には現在のところ、1. Cohn fractionator による連続的遠心分離法、2. 頻回遠心分離法 (batch washing)、3. 赤血球の agglomeration を応用した稀釈法、などがある。以上述べてきた方法は頻回遠心分離法である。

洗浄液にマニトールやその他の細胞膜非透過性の糖が加えられている理由は、細胞内のグリセリンが透析してしまうまでは、細胞外の膠質滲透圧を保たせて、赤血球の膨化と溶血とが起らないようにしたものである。

洗浄の過程では緩速冷凍法の場合と同じくグリセリン、マニトール、遊離ヘモグロビン、赤血球の破壊物、血小板、白血球などは全て取除かれる。脱グリセリンの過程でも少しずつではあるが赤血球は破壊してゆくが、これは凍結によって溶血寸前 (subhemolytical) にまで損傷を受けた赤血球が選択的に溶血 (selective hemolysis) するためであるという。このことは、著者もかつて冷凍赤血球の電子顕微鏡像で観察したことではあるが、赤血球には老若いろいろの時期のものがあって、新鮮で若い赤血球ほどその膜構成々分が厚く、古く老令化したものほどその膜構成々分が少なく、最後には有孔性の細胞膜を有する赤血球となってゆくことを認めている。これを著者は老化過程と呼び、若いI型から老化したIV型へと4つの段階に分類した。凍結によって、たとえ凍害防止剤が添加されていようとも、この老化過程が進行して老化型のものが増加することも認めている。したがって、老化したIV型の赤血球は、たとえどのような処理を施しても凍結に耐えることができず、溶血してしまうことになる。こういった老化過程類似の変化は、ACD 保存血液として保存しておいても生じるので、採血後の日数を経たものほど老化型は増加しており、凍結によって損傷され破壊される赤血球も当然増加するも

(56)

のである。したがって、冷凍血液としての処理に耐え得るのは、急速冷凍法でも、緩速冷凍法でも出来る限り新鮮な血液でなければならない。著者は、その期限を採血後7日目までとしている。

すでに Rowe らは、急速冷凍法で最長1カ年間で冷凍保存した350単位の血液を各種の患者に輸血し、副作用は全く認めなかったと報告している。

お わ り に

赤血球の冷凍保存法には、急速法と緩速法との2通りがある。本邦では、C. E. Huggins の方法に準じた後者が一般に普及しているが、急速法といえども緩速法に劣らぬ利点も持っている。

著者は、急速法に必要なステンレススチール容器を試作し、これを用いて液体窒素内で低濃度グリセリン液の添加による赤血球の急速冷凍を試み、15本の急速冷凍血液を7名の患者に輸血した。副作用は全く認められず、しかも回収率の点では緩速冷凍法よりはるかにすぐれていた。

文 献

1. Doebbler, G. F., and Rinfret, A. P. The influence of protective compounds and cooling

and warming conditions on hemolysis of erythrocytes by freezing and thawing. *Biochim. Biophys. Acta*, 58: 449-458, 1962.

2. Huggins, C. E.: Preservation and storage of blood. "Human transplantation".: 669-674, 1968. Grune & Stratton, Inc.

3. Meryman, H. T.: *Cryobiology*: 407-450, 1966. Academic Press.

4. Meryman, H. T.: Observations on the present state of blood preservation by freezing. *Cryobiology* 5 (2): 144-146, 1968.

5. Rowe, A. W., E. Eyster, and A. Kellner: Liquid nitrogen preservation of red blood cells for transfusion. *Cryobiology* 5 (2): 119-128, 1968.

6. 隅田幸男: 赤血球の冷凍と洗浄の方法, 医学のあゆみ, 中付 67 (6), 1968.

7. 隅田幸男: 冷凍血液, 日医事新報 (ジュニア版) 83: 7-11, 1969.

8. 隅田幸男: 急速冷凍血液輸血, 医学のあゆみ, 71 (3): 121-123, 1969.

9. 隅田幸男: 冷凍する赤血球の鮮度と解凍後脱グリセリン法の検討, 凍結及び乾燥研究会誌, 15: 10-16, 1969.

10. Valeri, C. R. and C. E. Brodine: Current methods for processing frozen red cells. *Cryobiology* 5 (2): 129-135, 1968.