赤血球の保存状態の指標としての Morphology Score の有用性

大 熊 重 則 宇 多 正 行

岡山県赤十字血液センター

(昭和61年1月23日受付)

EFFECTIVENESS OF A MORPHOLOGY SCORE AS AN INDEX OF THE STORAGE CONDITION OF RED BLOOD CELLS

Shigenori Ohkuma and Masayuki Uda

Japanese Red Cross Okayama Blood Center

A quantitative index of the change in the shape of red blood cells during storage, a morphology score, was devised. The score is calculated from the percentage of red cells of each of the four morphological types multiplied by the following factors: discocyte x3, echinocyte-I x2, echinocyte-II x1 and spherocyte x0. The decrease in the morphology score of red cells during storage was similar to that in ATP levels, though at a little slower pace. The pattern of changes in the morphology score showed an almost negative relationship to that of hemolysis. A comparison of the data of these indices with those of post-transfusion viability suggested that the morphology score correlates more directly to in vivo viability than ATP levels and hemolysis do. The score was used to evaluate various artificial preservatives containing adenine and the integrity of modified red cells such as washed red cells and frozen-thawed red cells during storage. We think that the morphology score is useful as an index for judging the storage condition of red blood cells.

結 言

赤血球は、正常状態では中くぼみ円盤形、いわゆる biconcave disc 状の形態を呈するが、ある条件下では discocyte-echinocyte transformation^{1)~4)}、または discocyte-stomatocyte transformation^{3)~6)}のような2種の形態変化が起こることが知られている。これらの現象は、いずれも赤血球の劣化の度合を反映すると言われているので、赤血球製剤の保存状態を評価する指標として有効であると思われる。しかし、従来の報告では、形態変化を赤血球の保存状態の定量的指標として用いることは困難であった¹⁾⁷⁾⁸⁾。

最近、藤井等は赤血球の形態を走査型電子顕微鏡で観察し、その形態変化を morphological index として定量化できることを示した^{9)~11)}。我々は、この原理を赤血球の保存状態の指標として応用するため、形態の分類とその score をさらに簡略化した morphology score を考案した。ま

た、形態の観察は、操作の簡便な光学顕微鏡で可能であることを示した。

本研究では、最初にこの morphology score と従来からよく用いられてきた ATP レベルや溶血率との関係について検討し、赤血球の保存状態の指標として morphology score の有用性について評価した。さらに、morphology score を用い、最近考案されてきた各種の adenine 添加保存液の保存効果の比較、及び洗浄赤血球や解凍赤血球などの特殊赤血球製剤の品質の判定を試みた。

方 法

本研究で用いた赤血球濃厚液、洗滌赤血球、白血球除去赤血球及び解凍赤血球は、採血後6時間以内の CPD-全血(約230ml)を原料とし、常法¹⁰⁾にしたがって製造した。これらの製剤のヘマトクリット値はいずれも約65%に調整した。また、赤血球の保存液として用いた saline-adenine-glucose (SAG)液¹³⁾、adenine-phosphate-glucose

(APG) 液¹⁴⁾, saline-adenine-glucose-mannitol (SAGM) 液¹⁵⁾, saline-adenine-glucose-phosphate-maltose (SAGP-maltose) 液¹⁶⁾はそれぞれ文献の報告にしたがって調製した。これらの保存液に赤血球を浮遊させる場合は、血漿を赤血球層との界面直前まで除去した後、各保存液70m/を加え、ヘマトクリット値を約65%に調整した。

Morphology score は次の方法で算出した。まず、検体赤血球を0.25%glutaraldehyde 含有固定染色液(日本抗体研究所)で固定し、1,000倍の光学顕微鏡(オリンパス社, BH-2)で形態を観察する。赤血球の形態は、次の4群に分類した。(1) Discocyte: 正常な中凹みのある円盤状を呈するもの。(2) Echinocyte-I: 細胞の表面に突起が生じ、まだ球状化していないもの(Bessis³⁾の分類の echinocyte stage-1と stage-2に相当)。(3) Echinocyte-II: 細胞がかなり球状化し、突起が細く鋭いもの(Bessis³⁾の分類の echinocyte stage-3に相当)。(4) Spherocyte: 細胞が完全に球状化し、体積も小さく、表面が滑らかになったもの。ただし、突起がわずかに残るものはこのグループに含む(Bessis³⁾の分類の echino-spherocyte と spherocyte に相当)。1検体につき、350~400個の赤血球を計数し、各群の存在率(%)にそれぞれ3, 2, 1, 0を乗じ、total scoreを算出する。たとえば、すべての赤血球が discocyte の場合、morphology

score は300となり、すべての赤血球が spherocyte の場合は0となる。

赤血球の保存においては、通常上記の形態変化がみられるが、もし discocyte-stomatocyte transformation が認められる場合は、(1) discocyte, (2) stomatocyte-I (Bessis³⁾の分類の stomatocyte stage-1に相当)、(3) stomatocyte-II (Bessis³⁾の分類の stomatocyte stage-2に相当)及び、(4) spherocyte (Bessis³⁾の分類の spherostomatocyte stage-1と stage-2に相当)の4種に分類し、それぞれのグループの存在率に3, 2, 1, 0を乗じ、同様に total score を算出する。

ATP 値は ATP kit (BMJ 社, No. 123897)を用い、溶血率は tetramethylbenzidine 法¹⁷⁾を用いてそれぞれ測定した。

統計学的有意差検定は、Student の t 検定を用い、 $p < 0.05$ の場合を有意とした。

結 果

図1に、赤血球濃厚液を4~6℃で42日間保存した時の morphology score, ATP レベル及び溶血率の経日変化を示す。CPD 加赤血球の ATP レベルは28日目まではほぼ一定の速度で徐々に減少したが、その後急激に低下した。Morphology score も28日以後低下速度が速くなる傾向がみられたが、減少速度は ATP レベルより若干ゆるやかであった。溶血率は、28日後までは軽微であっ

図1 赤血球濃厚液を4~6℃で保存した時の morphology score (—○—), ATP レベル (—●—), 及び溶血率 (—△—) の変化 (Mean±SD, n=5).

表1 各種の保存液に浮遊させた赤血球を4~6℃で保存した時の morphology score の変化 (Mean±SD, n=5)

Preservative	Storage Time (Days)						
	0	7	14	21	28	35	42
CPD	299±1	292±4	279±5	249±18	206±37	112±32	68±15
APG	298±1	277±6	271±6	258±7	249±8	216±12	184±13
SAG	294±7	276±10	282±7	260±14	257±9	227±19	178±23
SAGM	297±4	291±4	283±5	267±6	264±7	238±10	212±23
SAGP-maltose	298±1	289±4	287±4	280±5	275±13	257±13	230±41

表2 特殊赤血球製剤を4~6℃で保存した時の morphology score の変化 (mean±SD, n=4)

赤血球製剤	浮遊液	Storage Time (Days)				
		0	1	3	7	14
洗滌赤血球 (1回洗滌)	saline	293±1	287±2	284±3	274±5	237±2
洗滌赤血球 (3回洗滌)	saline	279±7	281±1	NT	214±17	155±28
洗滌赤血球 (3回洗滌)	SAGP-maltose	290±4	285±7	NT	269±3	239±9
白血球除去赤血球	saline	295±1	289±6	284±5	277±10	234±10
解凍赤血球	saline	298±1	286±7	271±3	219±28	169±1

NT=Not tested

たが、その後急激に上昇した。

表1に、CPD液、APG液、SAG液、SAGM液及びSAGP-matose液に浮遊させた赤血球を4~6℃で保存した場合の morphology score の経日変化を示す。SAG液、APG液、SAGM液、及びSAGP-maltose液を用いた保存では、いずれの場合も28日以降CPD液による保存より著明に高い score を示した ($p<0.05$)。35~42日後では4グループの間にも若干差が生じ、特に21日以降SAGP-maltose液が他の3種の保存液より高値を示した ($p<0.05$)。ただし、42日後におけるSAGP-maltose液とSAGM液の差は統計学的に有意ではなかった。SAGP-maltose液による保存では、35~42日後の score がCPD液による保存21日後の score とほぼ同等のレベルを示した。

表2に、特殊赤血球製剤である洗滌赤血球、白血球除去赤血球及び解凍赤血球を製造後生理食塩液またはSAGP-maltose液に浮遊させ、4~6℃で保存した時の morphology score の経日変化を示す。生理食塩液による保存の場合、解凍赤血球と3回洗滌の洗滌赤血球の morphology score が、1回洗滌の洗滌赤血球や白血球除去赤血球に

比べて7日以降に著明な低下が認められた ($p<0.05$)。しかし、3回洗滌の洗滌赤血球を製造後SAGP-maltose液に浮遊させると、 morphology score が顕著に改善された (7日以降の差: $p<0.05$)。

考 察

一般に、赤血球の保存状態を判定する最も重要な指標は輸注後の生存率であると言われている。しかし、この判定には通常放射活性物質を用いる必要があるなど、実用上の制限がある。今回我々は、藤井等^{9)~11)}の morphological index を簡略化した morphology score を考案したところ、この指標は in vivo の viability を最も直接的に反映することが示唆された。たとえば、CPD液で保存した赤血球の輸注24時間後の生存率は21日後で79.4%¹⁸⁾、28日後で70.7%¹⁸⁾、または69.2%¹⁹⁾であることが報告されている。ここで、 morphology score のデータを初期値に対する百分率に換算すると、21日後83.0%、28日後68.7%となり、上記の生存率の値とよく一致する。

赤血球の in vivo viability を推定する指標として一般的によく用いられているものに、ATPレ

ベルや溶血率がある。特に、ATP レベルが赤血球の形態の維持や *in vivo* の *viability* と密接な関係を有することは、Nakao 等の報告²⁰⁾以来多くの研究^{21)~23)}から指摘されている。これらの指標と *morphology score* との比較においても、基本的には一定の関係を有する傾向がみられた。すなわち、*morphology score* は、ATP レベルの低下よりやや遅れて減少する傾向を示し、一方溶血率とは負の相関関係に近いパターンを示すことが認められた(図1)。

しかし、ATP や溶血率の値から直接 *in vivo* の *viability* を推定することは困難であると思われる。たとえば、ATP レベルが初期値の50%以上維持されている場合は、ATP レベルと *viability* の関係は必ずしも直線的でないことや²³⁾、ATP レベルに大きな差がみられても輸注後の生存率に差がない場合があること²⁴⁾などが報告されている。また、ATP レベルは形態維持に重要な役割をはたすが、ATP 非依存性の形態変化もみられ、その関係は直接的とは言えないことが指摘されている²⁵⁾²⁶⁾。一方、溶血率は最終的な劣化を示し、溶血に至る途中の変化を細かく反映するものではない。従って、両者の中間に位置し、しかもその他の要因も関係する形態変化のパラメーターが赤血球の *viability* をより詳細に反映すると考えられる。

この *morphology score* の適用として、今回赤血球の合成保存液の評価を試みた。最近、SAG 液¹³⁾、APG 液¹⁴⁾、SAGM 液¹⁵⁾、SAGP-maltose 液¹⁶⁾など、各種の新しい保存液が考案されてきたが、その有効性の差異は ATP レベルなどのデータだけでは必ずしも明確ではなかった。ここで、*morphology score* を用いて比較すると、最も高いレベルを維持したのは SAGP-maltose 液であり、続いて SAGM 液、SAG 液、APG 液の順になることが示された(表1)。すなわち、同じ adenine 添加保存液においても、その他の成分の種類やその比率などによって赤血球の *viability* に若干差が生じると考えられる。特に SAGP-maltose 液はリン酸一水素ナトリウムと maltose を含むことに特徴があり、それぞれ ATP レベルの上昇及び溶

血の抑制に寄与し、結果的に *morphology* の高レベルの維持をもたらしたものと推定される。

また、*morphology score* を用いて、洗滌赤血球、白血球除去赤血球、解凍赤血球などの特殊赤血球製剤の品質について調べたところ、いずれの製剤も現行の有効期限内では高い *score* を保持しており、輸血用血液製剤として特に問題がないことが示された。しかし、これらの製剤を 4~6℃で1週間以上保存すると、特に3回洗滌の洗滌赤血球及び解凍赤血球において *morphology score* が大きく低下することが認められたので、生理食塩液に浮遊させた状態では3日程度が保存限界であると思われる。これらの製剤は輸血副作用を軽減するためには有用であるが、その有効期限が12~24時間という、非常に短いことに使用上の制限があるので、将来有効期限の延長が望まれる。その方法の1つとして、合成保存液を用いることが有効であろう。たとえば、3回洗滌の洗滌赤血球を SAGP-maltose 液に浮遊させて保存すれば、14日後の *morphology score* が通常の赤血球製剤の有効期限である21日後の *score* とほぼ同等の値を示すことがわかったので(表2)、無菌性を維持できればこの期間まで保存可能であると思われる。

以上のように、赤血球の形態変化を定量的に表わすことができる *morphology score* は、赤血球製剤の品質管理や保存法の改良研究などにおいて、赤血球の保存状態の指標として有用であると考えられる。

結 語

赤血球の保存状態の判定のための指標として *morphology score* を考案した。この指標は、赤血球の保存中の形態変化を定量的に表示できるように、*score* として数値化したことに特徴がある。また、従来の代表的指標である ATP レベルや溶血率とも相関傾向を示し、さらに赤血球の *in vivo* の *viability* をより直接的に反映することが示唆された。今回、*morphology score* の応用として、赤血球の種々の合成保存液の評価や、特殊赤血球製剤の品質の判定に有効であることを示したが、この指標は赤血球の *viability* を推定する *in vitro* 検査として一般的に有用であると考えられる。

文 献

- 1) Longster, G.H., Buckley, T., Sikorski, J. and Derrick Tovey, L.A.: Scanning electron microscope studies of red cell morphology. Changes occurring in red cell shape during storage and post transfusion. *Vox Sang.*, 22: 161—170, 1972.
- 2) Brecher, G. and Bessis, M.: Present status of spiculated red cells and their relationship to the discocyte-echinocyte transformation: A critical review. *Blood*, 40: 333—344, 1972.
- 3) Bessis, M.: Red cell shapes. An illustrated classification and its rationale. *Nouv. Rev. Fr. Hematol.*, 12: 721—746, 1972.
- 4) 藤井達三: 形質膜と細胞の形—赤血球の変形を中心に, 膜, 1: 82—92, 1976.
- 5) Deuticke, B.: Transformation and restoration of biconcave shape of human erythrocytes induced by amphiphilic agents and changes of ionic environment. *Biochim. Biophys. Acta*, 163: 494—500, 1968.
- 6) Weed, R.I. and Bessis, M.: The discocyte-stomatocyte equilibrium of normal and pathologic red cells. *Blood*, 41: 471—475, 1973.
- 7) Högman, C.F., Arro, E. and Hedlund, K.: Red blood cell preservation in protein-poor media. 2. Studies of changes in red cell shape during storage. *Haematologia*, 13: 135—144, 1980.
- 8) Herve, P., Lamy, B., Peters, A., Toubin, M. and Bidet, A.C.: Preservation of human erythrocytes in the liquid state: Biological results with a new medium. *Vox Sang.*, 39: 195—204, 1980.
- 9) Fujii, T. and Tamura, A.: Asymmetric manipulation of the membrane lipid bilayer of intact human erythrocytes with phospholipase A₂, C, or D induces a change in cell shape. *J. Biochem.*, 86: 1345—1352, 1979.
- 10) Fujii, T., Sato, T., Tamura, A., Wakatsuki, M. and Kanaho, Y.: Shape changes of human erythrocytes induced by virous amphipathic drugs acting on the membrane of the intact cells. *Biochem. Pharmacol.*, 28: 613—620, 1979.
- 11) Tamura, A., Morita, K. and Fujii, T.: Interaction of added amphiphilic lipids with the membrane of intact human erythrocytes to induce changes in the cell shape. *J. Biochem.*, 91: 73—78, 1982.
- 12) 赤十字血液センター業務標準・技術部門, 日本赤十字社血液事業部, 1978.
- 13) Högman, C.F., Hedlund, K., Åkerblom, O. and Venge, P.: Red blood cell preservation in protein-poor media. I. Leukocyte enzymes as a cause of hemolysis. *Transfusion*, 18: 233—241, 1978.
- 14) Silbert, J.A.: The storage of washed human erythrocytes in a protein-free medium. *Transfusion*, 23: 8—10, 1983.
- 15) Högman, C.F., Åkerblom, O., Hedlund, K., Rosén, I. and Wiklund, L.: Red cell suspensions in SAGM medium: Further experience of in vivo survival of red cells, clinical usefulness and plasma-saving effects. *Vox Sang.*, 45: 217—223, 1983.
- 16) Uda, M., Ohkuma, S., Ishii, A. and Nishizaki, T.: Preparation of blood components with saline-adenine-glucose-phosphate-maltose quadruple-pack system. *Transfusion*, 25: 325—329, 1985.
- 17) Levinson, S.S. and Goldman, J.: Measuring-hemoglobin in plasma by reaction with tetramethylbenzidine. *Clin. Chem.*, 28: 471—474, 1982.
- 18) Orina, A.R. and Josephson, A.M.: Comparative viability of blood stored in ACD and CPD. *Transfusion*, 9: 62—69, 1969.
- 19) Bowman, H.S.: Red cell preservation in citrate-phosphate-dextrose and in acid-citrate-dextrose: Comparison of erythrocyte viability after 28 days refrigerated storage. *Transfusion*, 10: 364—367, 1963.
- 20) Nakao, K., Wada, T., Kamiyama, T., Nakao, M. and Nagano, K.: A direct relationship between adenosine triphosphate-level and in vivo viability of erythrocytes. *Nature*, 194: 877—878, 1962.
- 21) Simon, E.R., Chapman, R.G. and Finch, C.A.: Adenine in red cell preservation. *J. Clin. Invest.*, 41: 351—359, 1962.
- 22) de Verdier, C.H., Garby, L., Hjelm, M. and Högman, C.F.: Adenine in blood preservation: posttransfusion viability and biochemical changes. *Transfusion*, 4: 331—338, 1964.
- 23) Dern, R.J., Brewer, G.J. and Wiorkowski, J.J.: Studies on the preservation of human blood. II. The relationship of erythrocyte adenosine triphosphate levels and other in vitro measures to red cell storageability. *J. Lab. Clin. Med.*, 69: 968—978, 1967.
- 24) Wood, L. and Beutler, E.: The viability of human blood stored in phosphate adenine media. *Transfusion*, 7: 401—408, 1967.
- 25) Sheets, M.P. and Singer, S.J.: On the mechanism of ATP-induced shape changes in human erythrocyte membranes. I. The role of the spectrin complex. *J. Cell. Biol.*, 73: 638—646, 1977.
- 26) Birchmeier, W. and Singer, S.J.: On the mechanism of ATP-induced shape changes in human erythrocyte membranes. II. The role of ATP. *J. Cell. Biol.*, 73: 647—659, 1977.