赤血球の保存に及ぼす攪拌の効果

大熊 重則 宇多 正行 石居 昭夫 西崎太計志

岡山県赤十字血液センター

(昭和61年11月18日受付)

THE EFFECTS OF CONTINUOUS AGITATION ON PRESERVATION OF RED BLOOD CELLS

Shigenori Ohkuma, Masayuki Uda, Akio Ishii and Takeshi Nishizaki

Japanese Red Cross Okayama Blood Center

To evaluate the effects of agitation on preservation of red blood cells, the cells were stored in citrate-phosphate-dextrose solution at 4 to 6°C for 35 days under two types of continuous agitation, reciprocal flat-bed and circular agitation. The pH, 2,3-diphosphoglycerate (2,3-DPG) level, adenosine triphosphate (ATP) level, morphology score and hemolysis were measured at weekly intervals. When 200 ml polyvinylchloride (PVC) bags were used, both types of agitation showed better preservation of red cells as evaluated by morphology score than non-agitation, but there was no significant improvement in the pH and levels of 2,3-DPG and ATP with either type of agitation. On the other hand, when stored in 600 ml PVC bags, agitation maintained much higher 2,3-DPG levels and morphology scores throughout storage. Flat-bed agitation did not increase hemolysis during 28 days of storage compared with non-agitation, but circular agitation caused marked hemolysis from 7 days on. These data indicate that a gentle mode of agitation and large bag size are important to preservation of red cells. Continuous flat-bed agitation seems to be effective in better maintenance of both oxygen-carrying capacity and viability of red cells during storage without causing mechanical injury to the cells.

結 言

輸血用赤血球の保存における重要な課題は赤血球の viability と酸素運搬能をできるだけ長く維持することである。Viability は ATP レベルや赤血球形態と密接な関係を有すると言われており、これらは最近新しい保存液の開発などによってかなり改善されてきた。しかし、酸素運搬能に関する 2,3-DPG レベルは保存中の低下が特に速く、これを維持する有用な方法はいまだ確立されていない。

これまで、2,3-DPG レベルを改善するためのアプローチの 1 つとして、保存中攪拌することによって pH レベルを維持しようとする試みがある¹⁾²⁾。これは、2,3-DPG が pH に敏感であることを利用している³⁾。しかし、CPD 液では攪拌の効果は小さく、bicarbonate buffer のような物質を添

加する必要があること¹⁾²⁾、また赤血球が攪拌によって損傷を受け易く、溶血が増加することなどが問題とされており⁴⁾、攪拌の有効性は必ずしも明らかではない。

そこで我々は、赤血球保存における攪拌の効果をより明確にするため、攪拌モードや血液バッグの大きさなどを変え、赤血球保存に及ぼす攪拌の影響について多面的に検討した。すなわち、穏やかな攪拌 (flat-bed 振盪) 及び強い攪拌 (circular 振盪) の 2 種の振盪モードを用い、それらの効果について静置保存と比較した。また、バッグのガス透過効率を高くする観点から、従来の 200ml bag より表面積が約 2 倍の 600ml bag を用いて赤血球を振盪保存し、その効果について検討した。振盪の効果の得失を評価する指標として、赤血球の保存中の pH, 2,3-DPG レベル, ATP レベル、

morphology score, 及び溶血率を用いた。

方 法

本研究で用いた濃厚赤血球は日本赤十字社業務標準⁵⁾に基づいて製造した。血液バッグは、通常の大サイズの200ml PVC bag (カワシミ, KBP-200, 表面積: 約250cm²) と、表面積が約2倍の600ml PVC bag (カワシミ, KBP-600, 表面積: 約508 cm²) を用いた。

濃厚赤血球の振盪には、circular 型 (face to face モード) 振盪機 (Helmer platelet agitator model PA-4, 6rpm) 及び reciprocal 型 flat-bed 振盪機 (Taiyo R-1改良型⁶⁾, 50cpm) を用いた。

pH は、pH メーター (Horiba, F-AD 型) を用いて測定し、ATP 値は ATP kit (BMY 社, No. 123897) を、2,3-DPG 値は 2,3-DPG Kit (BMY 社, No. 148334) をそれぞれ用いて測定した。溶血率は tetramethylbenzidine 法⁷⁾を用いて測定した。Morphology score は、赤血球の形態を Bessis の報告⁸⁾に基づいて分類し、これに我々が既に報告した score⁹⁾¹⁰⁾を与えて算出した。

測定値はすべて mean±SD で示し、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

Reciprocal 型水平振盪及び circular 型転倒振盪の2種類の振盪モードを用いて赤血球を振盪保存し、保存中の pH, 2,3-DPG, ATP, morphology score 及び溶血率について静置保存と比較した。

200ml bag を用いた場合の pH は、flat-bed 及び circular モードによる振盪保存が静置保存よりも若干高い傾向を示したが、統計学的有意差はなかった (Fig. 1-a)。600ml bag を用いた場合、いずれの振盪方法によっても200ml bag の静置保存 (以下 control と称す) より若干高値を示したが、静置, flat-bed 振盪及び circular 振盪の三者の間には大きな差はなかった (Fig. 1-b)。

2,3-DPG においては、200ml bag を用いた場合、circular 振盪が静置保存に比べ若干高値を示したが、個体差によるバラツキが大きく、三群の間に統計学的有意差はなかった (Fig. 2-a)。600ml bag を用いた場合、静置保存においても2,3-

Fig. 1 Plasma pH of red blood cells stored at 4 ~ 6 °C under non-agitation (—○—), flat-bed agitation (—●—) and circular agitation (—▲—). Data are mean±SD (n=5).

DPG レベルがかなり良好に維持される傾向を示し、さらに振盪を行うと保存7~21日において control より有意に高値を示した ($p < 0.05$)。しかし、circular 振盪では、予想に反して余り大きな効果は得られなかった (Fig. 2-b)。保存14日後の2,3-DPG 値を比較すると、control が初期値の約36%であるのに対し、600ml bag 静置保存が約57%、flat-bed 振盪が約70%と良好に維持された。

ATP 値はいずれの bag, いずれの振盪モードにおいても大きな差はなかった (Fig. 3)。

Morphology score においては、control が保存28日以降急激に低下するのに対し、200ml bag を用いた振盪保存ではいずれも28日以降有意に高レベルに維持された (Table 1, $p < 0.05$)。また600ml bag を用いた場合は、静置保存においても

Table 1 Morphology scores of red blood cells stored at 4~6℃ under non-agitation, flat-bed agitation and circular agitation

Bag	Agitation	Storage Time (days)						
		0	7	14	21	28	35	42
200ml bag	non-agitation	300	294±4	278±5	249±18	206±37	112±32	68±15
	flat-bed agitation	300	283±2	282±3	273±8	262±13	229±25	159±43
	circular agitation	300	292±4	285±5	285±10	280±6	257±18	214±29
600ml bag	non-agitation	300	271±6	273±8	271±9	261±19	220±5	142±20
	flat-bed agitation	300	285±8	285±10	277±13	273±7	234±30	189±36
	circular agitation	300	290±4	287±5	278±9	271±19	243±33	145±41

Values are based on a maximum of 300 and expressed as mean±SD(n=5)

Fig. 2 2,3-DPG levels of red blood cells stored at 4~6℃ under non-agitation (—○—), flat-bed agitation (—●—) and circular agitation (—▲—). Data are mean±SD (n=5).

control よりも高い score を示し (28日以降: $p < 0.05$), flat-bed 振盪ではさらに良好に維持される傾向を示した。

溶血率は, 200ml 及び600ml のいずれのバッグを用いても circular 振盪において著しい増加が

Fig. 3 ATP levels of red blood cells stored at 4~6℃ under non-agitation (—○—), flat-bed agitation (—●—) and circular agitation (—▲—). Data are mean±SD (n=5).

認められ(Fig. 4-a, b), いずれも7日以後は他の二群より有意に高値を示した ($p < 0.05$). また, 200ml bagを用いた flat-bed 振盪では control とほぼ同等であったが, 600ml bagを用いた flat-bed 振盪では, 保存28日以降において溶血が抑制

Fig. 4 Hemolysis of red blood cells stored at 4 ~ 6°C under non-agitation (—○—), flat-bed agitation (—●—) and circular agitation (—▲—). Data are mean $\pm$ SD (n=5).

される傾向が認められた。

考 察

赤血球の保存中、攪拌することによってその保存状態を改善しようとする試みはこれまでいくつか報告されているが¹⁾²⁾⁴⁾、その攪拌の方法と得られる効果の得失の関係は明らかでなかった。我々は本研究において、攪拌の利点を有効に得るには表面積の大きな血液バッグの使用と穏やかな振盪モードの選択が重要であることを示した。

今回の実験では、穏やかな攪拌モードとして reciprocal flat-bed 振盪を、また激しい攪拌モードとして circular (face to face) 振盪を選び、静置保存と比較した。その結果、通常の200ml bag

を用いた場合は、いずれの振盪を加えても pH や 2,3-DPG レベルに顕著な改善はみられず、逆に著明な溶血が circular 振盪において認められた。一方、600ml bag を用いた場合は、2,3-DPG レベルが振盪によって大きく改善されることが示された。この場合も flat-bed 振盪では溶血の増加はみられなかったが、circular 振盪では溶血が顕著に増加した。

以上の事実から、攪拌によって2,3-DPG レベルを改善するには通常の大きさのバッグ(200ml)では不十分であり、攪拌効率を高めるための何らかの工夫がバッグ側にも必要であることがわかった。Beutler 等¹¹⁾は、バッグの表面積(S)と血液量(V)の比率(S/V比)が0.9cm²/mlのものと2cm²/mlのものを比較し、後者が2,3-DPG レベルに対して良好であったことを報告している。今回我々が用いた600ml バッグのS/V比は4.2cm²/mlとさらに大きく、その結果攪拌効率やCO₂ガスの放出効率が向上し、2,3-DPG レベルが高値に維持されたものと考えられる。たとえば、14日目の2,3-DPG 値を比較すると、600ml bag の flat-bed 振盪保存が200ml bag の静置保存の約2倍の値を示した。血小板保存ではすでにこのS/V比が保存条件の一つとして重要視されており^{11)~13)}、赤血球保存においても今後この観点からの詳細な検討が必要となろう。また最近、ガス交換率を高める工夫の一つとして薄膜のバッグを用いた赤血球保存なども試みられており¹⁴⁾、同様の意味において興味深い。

もう一つの重要な知見は、攪拌力は穏やかな flat-bed 振盪で十分であり、circular モードのような転倒型振盪は赤血球に対してストレスが強過ぎ、溶血の上昇をもたらすということである。Shields⁴⁾は laboratory mixing stand による agitation を1日1時間行った場合、保存日数が長くなるにしたがって溶血が増加することを報告している。確かに保存日数が長くなると、赤血球膜の脆弱化が進み溶血し易くなると考えられるが、より重要なのは振盪モードの選択であろう。実際に、今回用いた flat-bed 振盪では、保存日数が長くなっても、また保存中連続的に振盪しても、静置

保存と同等もしくはそれ以下の溶血率に留った。

今回の研究では、主として2,3-DPG レベルの改善を目的として攪拌を行ったが、その効果は2,3-DPG レベルだけでなく、赤血球の *viability* の向上にも寄与していることが認められた。すなわち、*in vivo* の *viability* によく相関すると言われている *morphology score*⁹⁾ はいずれの振盪方法によっても顕著に高値を維持することがわかった。これらのデータは、Dern 等¹⁹⁾ が血液を攪拌することによって赤血球の *in vivo* の生存率が上昇したという報告ともよく一致する。また、*circular* 振盪においても溶血率は高くなるが、*morphology score* が良好に維持されていることを考慮すると、振盪によって溶血するのは生体内ですでに老化していた一部の赤血球だけであり、それ以外の赤血球はかなり激しい振盪に対しても耐性を有する可能性が推定される。すなわち、攪拌は本質的には赤血球の *viability* を改善する効果を示すと考えられる。いずれにしても、実用的には *flat-bed* 振盪のような穏やかな振盪モードが、溶血を増加させることなく血球の寿命に好影響を及ぼすので、より安全な攪拌方法と言えよう。

以上のように、攪拌によって2,3-DPG レベル及び *morphology score* を良好に維持することができるので、これは赤血球の酸素運搬能と *viability* の両者の改善につながると考えられる。しかし、攪拌効果の作用機構については必ずしも明確ではない。我々の予測では攪拌はバッグの CO₂ 放出効率を高め、その結果 pH の低下を抑制し、引いては2,3-DPG や ATP レベルが良好に維持されると考えられた。確かにこの効果も認められるが、攪拌による実際の pH の上昇はそれほど大きなものではなかった。このことから、攪拌の効果は単にみかけの pH の維持だけに因るのではなくむしろ赤血球が一定の場所に滞留したり集積することが防げられ、常に一様に混合された血漿中に浮遊されることが重要な因子であると推定される。例えば、赤血球が一定の場所に滞留すると、その回りの pH の低下などによる局所的環境の劣化が起これ、赤血球の代謝が大きな影響を受けることは十分あり得ると考えられる。Beutler²¹⁾ は、バッグを

縦置きで静置保存した時、“top”より“bottom”の方が ATP や2,3-DPG レベルの低下が大きいことを報告しているが、これも局所的環境に基づく差を示す一例であると思われる。また、静置保存では“bottom”の部分に赤血球が集積するので、その部分の Ht 値は極端に高くなる。そのため、赤血球間の直接的な接触が強くなり、結果的に赤血球形態の劣化や溶血が起これ易くなることが推測される。実際に、Ht 値が高くなると溶血が増加すること¹⁶⁾、また血漿の存在が溶血の抑制に有効であることが報告されており¹⁶⁾、上記の推定が支持される。

従来、2,3-DPG レベルを上昇させる方法としては、*inosine*¹⁷⁾¹⁸⁾、*ascorbate*¹⁹⁾、*dihydroxyacetone*¹⁹⁾²⁰⁾、*phosphoenolpyruvate* (PEP)²¹⁾ などの化学物質を添加し、赤血球の代謝を活発化させる方法が数多く試みられてきた。これらの方法は確かに2,3-DPG レベルの維持には有効であるが、PEP 以外はむしろ ATP レベルを低下させる傾向がみられる。また、*inosine* は生体に対する毒性が危惧され、またその他の化合物はいずれも熱に不安定である（バッグのオートクレーブ滅菌が困難）などの問題があり、いまだ実用化されるに至っていない。このような状況を考えると、バッグの改良と攪拌効果を利用する方法は、2,3-DPG レベルを維持するための一つのアプローチとして有効であろう。

しかし、本法を実用化するためにはなおいくつか解決すべき課題がある。たとえば、600ml バッグは現行のバッグに比べてかなり大型であるので、遠心時などにおいてその取扱いが不便である。一つの解決策として、現行の200ml バッグをダブルタイプとして全表面積を600ml バッグと同等にする方法が考えられる。また、攪拌を如何にして簡便に実施するかについても検討する必要がある。血小板保存に一般に利用されているラック付水平振盪機の大型化が有用かも知れない。

最後に、本法によっても保存21日以後の2,3-DPG レベルの改善はなお不十分である。このためには、バッグを大きくするだけでなく、材質的にガス透過性の優れた新しいバッグを開発すること

も必要と思われる。いずれにしても、赤血球を保存中穏やかに攪拌することによって大きな効果が得られることが示唆されたので、今後この原理を応用した赤血球の保存法の改良についてさらに検討する価値があると思われる。

まとめ

赤血球の保存に及ぼす攪拌の効果を検討し、以下の知見を得た。

(1) 通常の200ml バッグを用いた場合は、2,3-DPG や ATP レベルの改善は小さかったが、表面積が約 2 倍の600ml バッグを用いると攪拌の効果が顕著となり、特に2,3-DPG 及び morphology score が良好に維持された。

(2) 転倒回転モードの circular 振盪では、溶血が著しく増加したが、reciprocal 型 flat-bed 振盪では、静置保存と同等、またはそれ以下の溶血率に留った。

以上のように、600ml バッグを用いて水平振盪を行えば、溶血が増加することなく赤血球の酸素運搬能 (2,3-DPG) と viability の両者にかんがりの改善が認められた。赤血球保存において攪拌を有効に働かせるには、バッグを大きくすること、及び穏やかな振盪モードを選択することが重要であると考えられる。

文 献

- 1) Beutler, E. and Wood, L.A.: Preservation of red cell 2,3-DPG and viability in bicarbonate containing medium: The effect of blood-bag permeability. *J. Lab. Clin. Med.*, 80: 723-728, 1972.
- 2) Wood, L.A. and Beutler, E.: The effect of periodic mixing on the preservation of 2,3-diphosphoglycerate (2,3-DPG) levels in stored blood. *Blood*, 42: 17-25, 1973.
- 3) Beutler, E., Meul, A. and Wood, L.A.: Depletion and regeneration of 2,3-diphosphoglyceric acid in stored red blood cells. *Transfusion*, 9: 109-114, 1969.
- 4) Shields, C.E.: Studies on stored whole blood. IV. Effects of temperature and mechanical agitation on blood with and without plasma. *Transfusion*, 10: 155-162, 1970.
- 5) 日本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, 1985年度版.
- 6) 宇多正行, 岡田英俊, 内藤俊二, 石居昭夫, 西崎太計志: CPD 液を用いた濃縮血小板の調製法と保存法についての検討. *血液事業*, 6: 139-147, 1983.
- 7) Levinson, S.S. and Goldman, J.: Measuring hemoglobin in plasma by reaction with tetramethylbenzidine. *Clin. Chem.*, 28: 471-474, 1982.
- 8) Bessis, M.: Red cell shapes. An illustrated classification and its rationale. *Nouv. Rev. Fr. Hematol.*, 12: 721-746, 1972.
- 9) 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.
- 10) 大熊重則, 宇多正行: 赤血球の保存状態の指標としての morphology score の有用性. *日本輸血学会雑誌*, 32: 523-527, 1986.
- 11) Rock, G.A., Blanchette, V.S. and Wong, S.C.: Storage of platelets collected by apheresis. *Transfusion*, 23: 99-105, 1983.
- 12) 岡田英俊, 宇多正行, 石居昭夫, 西崎太計志: フェレーシスによって採取した血小板の長期保存法. *日本輸血学会雑誌*, 30: 491-493, 1984.
- 13) 大軒子郎, 青木裕紀子, 富田智津子, 山口英夫, 大久保康人: 濃縮血小板血漿保存におけるバッグの最適表面積比. *日本輸血学会雑誌*, 32: 305, 1986.
- 14) 上平 敦, 中山睦美, 岡崎真人, 小田 貢, 佐藤暢: 容器のガス透過性が保存血のガス分圧と機能に及ぼす影響について. *日本輸血学会雑誌*, 29: 694-695, 1984.
- 15) Dern, R.J., Wiorkowski, J.J. and Matsuda, M.: Studies on the preservation of human blood. V. The effect of mixing anticoagulated blood during storage on the poststorage erythrocyte survival. *J. Lab. Clin. Med.*, 75: 37-42, 1970.
- 16) 大熊重則, 宇多正行, 石居昭夫, 西崎太計志: 赤血球製剤の保存中の溶血と糖類によるその抑制効果. *血液事業*, 7: 285-292, 1984.
- 17) Strumia, and Strumia, P.V.: Conditions affecting the maintenance of ATP, 2,3-DPG and oxygen dissociation by addition of adenine and inosine to blood stored. *Transfusion*, 12: 68-74, 1972.
- 18) Oski, F.A., Travis, S.F., Miller, L.D. and Delivoria, M.: The in vitro restoration of red cell 2,3-DPG levels in banked blood. *Blood*, 37: 52-55, 1971.
- 19) Wood, L.A. and Beutler, E.: The effect of ascorbate and dihydroxyacetone on the 2,3-diphosphoglycerate and ATP levels of stored

- human red cells. Transfusion, 14: 272—277, 1974.
- 20) Brake, J.M. and Deindorfer, F.H.: Preservation of cell 2,3-diphosphoglycerate in stored blood containing dihydroxyacetone. Transfusion, 13: 84—88, 1973.
- 21) Hamasaki, N., Ideguchi, Y. and Ikehara, Y.: Regeneration of 2,3-diphosphoglycerate and ATP in stored erythrocytes by phosphoenolpyruvate. A new preservative for blood storage. Transfusion, 21: 391—396, 1981.
-