特 集

冷 凍 血 液 輸 血

Frozen Blood Transfusion

湯 浅 晋 治* 横 田 広 夫**
SHINJI YUASA, M.D. and HIROO YOKOTA, M.D.

は じ め に

組織や臓器の低温保存というと、一般に 0°C ～ 5°C のいわゆる低温での保存であったが、最近ではこれらを零下何十度という超低温で保存しようという試みが行なわれている。

アメリカには冷凍人間協会 (Cryonics Society) なるものがある。癌の如く不治の病いで死んだ人間を液体窒素で凍結保存し、将来癌の治療法が発見されたら再び融して蘇らせるというのだそうである。1967年心理学者の James Bedford が第1号になって以来、現在までに十数体が凍結保存されていると言う。勿論これらは現代科学からしては非現実的な夢物語であるが、近年 Cryobiology (低温生物学) の医学領域における発展にはめざましいものがある。微生物、細胞、精子等の凍結保存はすでに行なわれているが、最近では腎臓、心臓、肝臓、そして肺臓など臓器の凍結保存の研究が盛んになってきた。一方この低温による組織破壊を目的とした Cryosurgery (凍結外科) も各分野で大きな成果を上げている。ここでは特に血液の凍結保存について述べる。

現在の保存血の問題点

さて血液の凍結保存を述べる前に 現在広く用いられている ACD (acid-citrate-Dextrose) 保存血についていくつかの問題を取り上げてみたい。ま

ず第1の問題は現在の保存血の保存期間が3週間と短いことである。最近では CPD (citrate-phosphate-Dextrose) を用いて保存期間の延長を計っているが、いずれ 4°C に保存する以上長期保存はできない。貴重な献血や、探し求めた $\text{Rh}^{\ominus}$ が期限切れで廃棄されるのは血液不足の折から無駄な事である。第2は大量輸血の場合にはアチドシス、高カリウム血症、出血傾向など代謝面での問題がある。これらは ACD 抗凝固剤の使用と、 4°C の保存中でも代謝が進んでいる為で保存法に原因するものである。第3には輸血の副作用がある。赤血球は交差試験が厳しく行なわれているので発熱や悪寒戦慄等の副作用の主な原因は、輸血された白血球や血小板で感作された免疫抗体によるものが多い。貧血を目的とした輸血ではこれらは治療上好ましくないものである。第4の問題として輸血による感染がある。梅毒など細菌性疾患は容易に除かれるが、輸血後肝炎は依然として多くしかもその予防法は確立されておらず、臨床上また社会的にも大きな課題である。

輸血によるこれらの問題解決には二つの事が考えられる。一つは血液を超低温で凍結し、一切の代謝をストップさせ、その保存期間を半永久的に延長させることであり、他の一つは解凍後の操作で抗凝固剤、白血球、肝炎ウィルス等潜在的に有害な因子を除去することである。

凍 結 保 存

赤血球を凍結すると膜が破れ溶血を起こす。この原因には、1) 電解質の濃縮と浸透圧の上昇、2) 氷の結晶による機械的破壊、3) 緩衝系の pH の

* 順天堂大学医学部講師 (外科学 消化器)

** " 助手 (" ")

Department of Surgery, Juntendo University,
School of Medicine

第184回順天堂医学会学術集会 (Feb. 22, 1973)
[May. 9 1973 受付]

図 1 凍結時における電解質の濃縮

図 2

変化, 4) 膜のリポプロテインよりの水分子の離脱, 5) 溶積の膨脹など色々の説が考えられている. 1953 年 Lovelock¹⁾ は水が凍ると水の分子間で結合が起り, 氷の結晶を作るが, この時溶質は

この結合に加わらず, 氷の結晶構造から除かれ, 結晶と結晶の間にわずかに存在する水の中に濃縮されてくると説明した. 現在ではこの溶質(電解質)の濃縮による浸透圧の上昇が細胞凍結時の凍害の主な原因とされている. ヒトの赤血球の場合, 細胞液の 82% 以上が凍結すると赤血球は溶血を起こす²⁾. Huggins³⁾ はヒトの赤血球では電解質の濃度が, NaCl 0.8mol (4.6%) 相当以上の濃度となり, 浸透圧が正常の 5 倍すなわち 1,500mOsm/l を越えると細胞に不可逆的の破壊が起こると認めている(図 2). 著者⁴⁾ の実験ではリンパ球は NaCl 0.3mole を越えると傷害を受ける(図 3).

このような凍結時の細胞内電解質の濃縮と浸透圧の上昇を防ぐためには, 赤血球に凍害防止剤を添加して凍結しなければならない. 現在用いられている主な細胞内凍害防止剤(Endocellular Cryoprotective Agent)としては glycerol, Ethylen Glycol 及び DMSO (Dimethylsulfoxide) などがある(図 4). これらの物質は細胞膜を自由に通過し水分子と強力な水素結合, あるいは共軛結合をおこす親水性があり, 塩類緩衝作用を示すので保護物質として用いられる. つまり純粋な水分子による氷の発育を防ぎ, 結晶内にとり込まれる細胞水の割合を減じ, 溶質が濃縮するのを防ぐのである. 一方これに対して Polyvinylpyrrolidone, Polyglycol, Dextran, 及び Hydroxyethyl Starch 等のごとき分子量の大きい細胞外性の凍害防止剤

図 3

ENDOCELLULAR CRYOPHILACTIC AGENTS

図 4

ECA CONCENTRATION AND HEMOLYSIS

図 5 溶血は凍害防止剤の濃度が 5.0～5.7 モルの時に最小となる

(Extracellular Cryophilactant Agent) も赤血球に対して保護作用が認められているが、その効果は Glycerol や DMSO のとき細胞内性の凍害防止剤よりはるかに劣るので現在ではほとんど用いられていない。DMSO はかつて輸血用血液の凍結保存に用いられた事があるが、その薬理作用には未だ説明されない所もあり、今ではもっぱら体内にも中間代謝産物としても存在する glycerol が赤血球の凍結保存に用いられている。

赤血球を凍結し解凍する時、glycerol の濃度が 5.0 mole から 5.7 mole の範囲で溶血が最も少ない³⁾⁵⁾ (図 5)。また凍害防止剤にはある程度の浸透圧を与えておかないと、凍結保存中に溶血度が増すので 8.6mole の glycerol に 8%ブドウ糖と 1%果糖を加えている⁶⁾。

さてこのようにして glycerol を加えて凍結した赤血球は、輸血する前に glycerol を除かねばならない。血球内に glycerol が残っていると輸血時に浸透圧ショックで溶血を起こすからである。凍害防止剤をどのようにして除くかはきわめてむずかしい事である。除々に濃度を下げ血球内に入っている凍害防止剤を除くため稀釈法、透折法や沈降法、あるいは Cohn の ADL Fractionator を用いた連続遠心法⁷⁾などがあったが、いずれも大量の血液を迅速に簡便に処置する事は困難であった。米国ハーバード大学外科の Huggins は遠心分離を行なわないで、糖液中で起こる赤血球の可逆的凝集反応⁸⁾を利用して簡単に赤血球を洗浄分離する画期的な方法を考案し、冷凍血液の実用化を著しく促進した。この原理を説明すると血漿中では赤血球と γ -グロブリンは別個に存在しているが、pH 5.2～6.1の間では血漿中の γ -グロブリンと赤血球表面のリポ蛋白質が可逆的複合体を形成する (図 6 a, b)。その時非電解質溶液である糖液を加えてイオン濃度を下げると、 γ -グロブリンと γ -グロブリンは赤血球を伴ったまま結合して沈降する。この凝集した赤血球を再浮遊させるには電解質溶液を加えて γ -グロブリンと γ -グロブリンの結合を破るか、pH を上げて γ -グロブリンと

REVERSIBLE AGGLOMELATION

図 6 可逆的凝集反応

図 7

赤血球表面のリポ蛋白質との結合を破れば良いわけである(図7c, d)。実際には生食水で再浮遊を行なっているが、もちろん血漿なりプラズマネートなどでも良い。無 γ -グロブリン血症の患者の血液ではこの反応は起こらない。Hugginsはこの反応を普通の赤血球の凝集反応 agglutination と区別して reversible agglomeration (可逆的凝集反応) と名付けている。

赤血球凍結保存の実際

冷凍血液と言われているものは血液成分の中で赤血球成分だけを凍結保存したものであって、正式には解凍赤血球である。

現在行なわれている赤血球の凍結保存法には二通りの方法がある。一つは高濃度 glycerol を用い、 -85°C の deep freezer で凍結保存する緩速凍結法と低濃度 glycerol を用い -196°C の液体窒素で急速に凍結保存する方法である。

緩速凍結法

我々が現在行なっているのはいわゆる Huggins の緩速凍結法であるので、まずこの方法の実際及び結果について述べる。

採血は ACD 抗凝固剤を使用して行なう。血液

写真 1

は採血後5日以内のものが望ましい。日数の経った保存血ではすでに赤血球抵抗も弱くなっている。ので当然、凍結解凍の操作で溶血も多くなるからである。アメリカでは1回の採血量が500ml であるが本邦では200ml のためわれわれは輸血効果を考慮して同型の血液2本分を1単位として凍結保存を行なっている。

採血した血液は遠沈して血球成分と血漿成分に分離する。Hct 約80%の血球成分 (packed cells) にこれと等量の 8.6 mole Glycerol 液 (79.2% glycerol, 8.0% Glucose, 1.0% Fructose, 0.3% Na_2EDTA) を加え良く混合した上 -85°C の deep freezer で凍結保存する(写真 1)。赤血球は約60%の水を含むので 8.6 mole の glycerol は細胞水でうすめられ至適濃度である 5.6 mole となる。全体が凍結し -85°C になるのには約5時間かかる。使用時には $+40^{\circ}\text{C}$ の温水中で速やかに解凍する。glycerol を除くにはまず 50%ブドウ糖 200ml を加え続いて 5%果糖 4l で3回稀釈洗浄する。すなわち 50%ブドウ糖添加につづいて、5%果糖を 1,500ml 加える。2~3分で赤血球は可逆的凝集反応でバッグの下部へ沈降する。glycerol 及び遊離のヘモグロビンをふくんだ上清を除去し、第2回目の洗浄には 5%果糖 1,500ml、第3回目には 100ml の果糖を加え同様に上清を除去する。最後に生理的食塩水 400ml を加え赤血球を再浮遊させる。輸血に際しては Hct 80% の packed cells (解凍濃縮赤血球) として輸血する。これらに要

する時間は約 20 分である。われわれは Huggins と同様これらの操作をするのに プラスチックバッグを用いている。これは 1 つの閉鎖回路の中で凍害防止剤の添加, 凍結保存, 解凍, 糖液による血球の洗浄, 再浮遊, 更に輸血用小型バッグへの移注など一連の操作が無菌的に しかも簡単に行なえるので便利である。

解凍赤血球の機能及び代謝

解凍後の赤血球の代謝は ATP, 2-3 DPG で, 機能については赤血球抵抗試験, 各洗浄時における排液上清の遊離ヘモグロビン, 滲透圧, pH につき測定し, 溶血試験では 37°C 30分温水中に放

置後の溶血増加率を調べた。また生食水再浮遊時の電解質の組織についても測定を行なった。

まず各洗浄段階での 滲透圧の変化は (図 8) 第 1 回洗浄時約 1,800mOsm であるが, 第 3 回目では 310mOsm とほぼ体液の滲透圧にまで下がる。生食水で再浮遊させた時は 280mOsm と生食水の滲透圧と等しくなる。また各段階での溶血度を遊離ヘモグロビンでみると (図 9) 第 1 回, 2 回, 3 回目の各洗浄ではいずれも 100mg/dl 以下であるが非電解質溶液である糖液から電解質溶液の生食水で再浮遊させると 110mg/dl とやや上昇する。しかし輸血する場合は Hct 80% の packed cells として行なうので実際に輸注される全遊離ヘモグロビン量は 25mg 前後できわめて少ないものである。この赤血球を 37°C 30分温水中に放置後の溶血をみると (図 10) 平均 6 mg/dl の増加に過ぎず, その上昇率は 5.2% である。また pH の変動では各洗浄時共 6.0 以下であるが, 生食水に再浮遊すると, pH は 7.1 に上昇する (図 11)。

次に解凍赤血球の抵抗試験では図 12 の右の如く溶血開始は NaCl 0.5%, 低張で全溶血を起こす濃度は 0.3% である。これは図左の新鮮血の赤血球抵抗とほぼ等しい。しかるに期限切れに近い保存血の抵抗試験は溶血開始時 0.6%, 完全溶血は

図 8

図 9

図 10

図 11

図 13 保存期間と ATP の変化

図 12

図 13

0.4% と解凍赤血球に比べその抵抗性が著しく減弱しているのがわかる。ATP レベルを測定すると(図13)解凍赤血球では保存期間に関係なく、たとえば2.5ヶ月保存したものでも $4.2\mu\text{mole/gHb}$ と新鮮血のそれと同じレベルを維持する。これに対し保存血では15日間の保存で $2.5\mu\text{mole/gHb}$ と著明に減少する。更に 2, 3-DPG (2, 3-diphosphoglycerate) の測定でも解凍赤血球は $10.7\mu\text{m/gHb}$ で新鮮血に等しい。

生食水再浮遊時の電解質をみると K^+ は平均 3.2mEq/l と長期に保存しても低いが(図 14) 保存血では経時的に増加し、21 日では新鮮血の約 4 ～ 5 倍と高値を示す。また Na^+ , Cl^- の濃度も充分でないと輸血した場合、溶血の原因になるが、再浮遊後 Na^+ は 120mEq/l , Cl^- は 110mEq/l で

ある。回収率、すなわち凍結前の total gHb 量と解凍後の total gHb 量の比は80% である。Huggins⁵⁾ は回収率 $90\pm 5\%$, Cr^{51} での生存率は輸血後24時間で87～95%で、その半減期も ACD 保存血と等しいと報告している。また生食水 250ml に再浮遊した場合の上清の生化学的性状を参考に表に示した⁵⁾ (表 1)。白血球、血清蛋白、クエン酸などはほとんど除かれ、O 型血液では同種凝集素の抗A、抗B もほとんど除かれていることは臨床に注目すべきことである。

急速凍結法

さて -85°C より更に超低温である -196°C の液体窒素で凍結保存する方法も行なわれている。液体窒素で急速に凍結させると、赤血球内の電解質

表 1 冷凍血液と ACD 保存血の性状比較

		冷 凍 血 液 (生理的食塩水に浮遊)	ACD 保存血 4°C で20日間保存 ACD・A 液
pH		7.0	6.0
Sodium	(mEq/L)	84.3	154
Chloride	(mEq/L)	85.2	
Potassium	(mEq/L)	1.9	23
Calcium	(mg%)	1.4	8.2
Phosphate	(mg%)	1.1	7.2
Glucose	(gm%)	4	0.3
Total protein	(gm%)	0	6.4
White blood cells	(#/mm ²)	650	10,150
Citrate		0	
Anti-A titer		1:4	高力価 1:200 以上
Anti-B titer		1:4	低力価 1:200 以下

の濃縮，滲透圧の上昇も軽度となるため，Glycerol の濃度も低くてすむ。Doebbler⁹⁾，Rinfret 及び Luyet¹⁰⁾ 等は1962年低濃度 glycerol を用い赤血球を液体窒素で凍結保存することに成功した。New York Blood Center の Rowe¹¹⁾ はこの方法を実用化した。すなわち ACD 抗凝固剤で採血し，packed cells とし，これに低濃度の glycerol (28% glycerol, 3% mannitol, 0.65% NaCl) を等量に加える。最終濃度は14%と Huggins に比べ約 1/3 低い。これを stainless steel の薄型の容器に移し直接 -196°C の液体窒素の中に入れ凍結保存する方法である。凍結は2～3分で終る。解凍には同様 +40°C の温水中で行い，血液をプラスチックバッグに移す。先ずこれを遠心し遊離ヘモグロビン及び glycerol を含む上清を除く。第1回の洗浄には16%の mannitol で行い遠心して上清を除く。次いで0.9%の生食水で2回同様洗浄を行なって glycerol を除く。これらの過程は小型のプラスチックバッグを用い遠沈法で行なう。洗浄には毎回除去される上清と同量の液が用いられるので，全洗浄液は1l 内外ですむ。輸血に際しては緩速法同様 Hct 80% の packed cells として行なう。Cr⁵¹ でラベルした赤血球は24時間で約 96±1.5% が生存しており，その半減期は28～30日で ACD 保存血のそれと異ならないという。

急速法の利点は回収率が90%以上と良いこと，

洗浄液量が少なくてすむ事などあるが，液体窒素を常時補給しなければならず，運搬が不便であること更に何回も遠心を行なわねばならず，繁雑で時間がかかるなど欠点もある。しかしながら緩速法は洗浄液量が多いことが難点ではあるが，遠心機が不要で短時間に大量の血液を簡単に洗浄できるので画期的な方法である。又遠方へもドライアイスをつめ運ぶ事ができるので便利である。先般のベトナム戦争では野戦病院や病院船で大量に使用されたものである。

冷凍血液の利点

冷凍血液の特長は先ず長期保存ができること及び血球の洗浄による効果があげられる。

長期保存の面からは，1) 血液の需要と供給のバランスを調節できることである。血液の供給は時期により著しく増減があり，しかも保存期間に制限があるため各血液銀行はそのコントロールに困る。特に夏や冬には立役者である若者が山や海へ行ったり帰省したりして毎年ピンチを迎えるが普段から一定量を凍結しておけば問題はなくなるわけである。2) 廃棄血の減少。貴重な献血も期限切れで廃棄される事がある。手術を予定して大量に採血した血液が試験開腹に終ったり，ペパリン血が手術中止で使われなくなることもある。また最近の様に成分輸血が行なわれるようになると

血漿や、血小板を取った残りの血球成分が無駄になる事もあり、これらを凍結保存することになれば輸血用血液の不足を解消する上でも大いに役立つものである。3) 稀有型血液の常時保存。昨年奈良の病院でボンベイ型と言うめずらしい血液型を持った患者の心臓手術が行なわれた。日本にはその型を持った人は数人に過ぎず、国際赤十字を通じカナダから冷凍血液が送られて来た事は未だ耳新しい事である。これは特殊の例ではあるが、Rh $\ominus$ の頻度は0.5%でありAB型は10%であるからAB型Rh $\ominus$ は2,000人に1人の割である。急に必要となっても入手は困難である。それ故、稀有型の血液を一般型と同様常時保存して置く事は緊急や災害時に備えて大事な事である。昨年WHOのRare Blood TypeのCenterが日本に設置され輸血業務も国際的となったわけであるが、この意味からも血液の凍結保存の意義は大きい。4) 自己輸血の可能なこと。自分の血液を凍らせておき、必要な時にはいつでも取り出して輸血できるのも冷凍血液の特長の1つである。自分の血液を輸血する以上、適合性の問題や、免疫抗体による副作用、肝炎の心配もなくなるわけである。緊急を要しない手術の場合は、計画的に必要な量を前もって何回かに分け採血し凍結保存をした上で手術を行えば良い。輸血後肝炎の発生がまだ多い折から、この自己輸血は将来大に行なわれるべきものである。特に稀有型の血液を持った患者ではこの様な準備は必要である。この自己輸血は自分のみならず、子供や孫にまで輸血できるのも夢でなくなるであろう。

次に glycerol を除くための洗浄による効果について述べる。

1) K $^{+}$ は洗浄により 3.2mEq/l と著しく低下する。高カリウム血症が必配な心筋障害や腎不全の患者にも安心して輸血できる。ACD 保存血中では赤血球内の K $^{+}$ が血漿中に移行し、20日も保存すると正常の4~5倍にもなり大量輸血では高カリウム血症の可能性もある。2) 抗凝固剤が除去されること。保存血 200ml の中には ACD 液が 30ml も含まれているため、大量に輸血すると

クエン酸血症、アチドーシスあるいは出血傾向の原因となる事も見逃せない。3) 白血球、血小板、異種蛋白やアレルギーなども除かれる。頻回輸血された患者や何回か妊娠をした事のある人などに輸血すると発熱や悪感戦慄のみられることがあるが、これらの原因はほとんど抗白血球免疫抗体や血小板抗体によるものといわれる。解凍赤血球輸血ではこの免疫抗体産生を防ぐ事ができるのみならず、すでに抗体ができ、発熱などの副作用を起こす患者には白血球を含まない解凍赤血球で反応を防ぐ事ができる。特に移植を予定した患者の輸血や人工腎臓の回路の充填には白血球抗体産生の問題もなく、カリウムの低い冷凍血液が必要である。4) 抗A、抗B同種凝集素が除かれていること。この事は臨床上有益であるばかりでなく、血液保存の問題も非常に簡素化されるようになる。すなわち以前O型血は万能血として用いられていたが、抗A、抗Bの同種凝集素の力価が高い時は溶血反応の危険もあり現在では同型の血液のみが使用されている。しかし冷凍血液ではこれら同種凝集素がほとんど除かれているのでO型血液は真の万能血としてどの型にも輸血できる。保存もABO型4種類とそれぞれのRh $\ominus$ の計8種類を全部保存する必要がなく、O型のRh $\oplus$ 、Rh $\ominus$ の2種類だけを常時保存して置けば良い事になり、輸血及び保存が簡素化される。5) 血清肝炎の予防。血清肝炎は現在GOTやAu抗原などの厳しいスクリーニングにも拘らず、依然かなりの発生がみられる。欧米では元来肝炎の発生率が低いこともあるが、今までに数万単位の冷凍血液が輸血されているが肝炎の発生をみない。ウィルスは低温に強いので、肝炎の発生が少ないのは凍結そのものでなく、解凍後の血球洗浄で肝炎ウィルスが除かれるためと思われる。三浦¹³⁾は肝炎ウィルスの代りに poliovirus, Coliphage TW₃を用い同様の方法で血球の洗浄効果を検討したが、力価は1/100に減少し、又赤血球表面に付着しやすい New Castle Disease Virus でも1/10に低下したと報告している。肝炎ウィルスは血球内には存在せず、大部分は血清中に存在するといわれて

いるので、血清を除き、解凍後に血球を洗浄することで、臨床上肝炎の予防となるものと考えられる。肝炎の予防には γ -グロブリン、ステロイド、肝庇護剤の投与などあるがいずれも効果は不明であり島田¹³⁾の報告でも血球洗浄は今のところ肝炎を防止できる最も有効な方法であると述べている。

以上冷凍血液の特長を述べてきたが、欠点としては赤血球の生食浮遊液であるため、蛋白の補給目的としては用いられない。これには生食水の代りにプラスマネートで再浮遊するか、別にその輸液が必要となる。

Huggins が第13回日本輸血学会(林周一会長)特別講演で初めて冷凍血液を日本に紹介して以来本邦でも研究が行なわれまた三浦¹⁴⁾や隅田ら¹⁵⁾¹⁶⁾は独自の改良型冷凍血液処理装置を考案し成果を上げている。

現在ボストンのマサチューセッツ総合病院では毎月900単位以上の冷凍血液が使用されてをり、これは全輸血量の25%にもなっている。

赤血球以外の成分すなわち白血球^{17)~19)}や血小板^{20)~22)}の凍結保存研究も行なわれている。白血球の中でも移植免疫と関係のあるリンパ球の冷凍保存は著者⁴⁾²³⁾²⁴⁾もすでに -85°C 及び -196°C の液体窒素で成功しているが、顆粒球や血小板の凍結保存では未だ満足すべき報告はない。

血漿成分は新鮮凍結血漿として保存され、またこれより血液凝固第Ⅷ因子(Antihemophilic Globulin, AHG)も分離され臨床に用いられている。

む す び

血液の凍結保存とその臨床応用について述べたわれわれの結果も合せて報告した。昨今の慢性的な血液不足の折から保存期間の半永久的な延長と、血液から不必要な因子を除いた冷凍血液は臨床で種々の利点を持つものである。

Cryobiology(低温生物学)はCold学問であるが今や医学分野ではhotな課題となってきた。これらの研究は組織や臓器の凍結保存へと大きく発展して行くであろう。

文 献

- 1) Lovelock, J. E. : The Hemolysis of Human red cell by Freezing and Thawing. *Biochem. Biophys. Acta* **10**, 414, 1953.
- 2) Strumia, M. M. : Preservation of Formed Elements and Proteins of the Blood. Washington, D.C. American Red Cross, 1949.
- 3) Huggins, C. E. : Prevention of Hemolysis of Large Volume of Red Blood Cells Slowly Frozen and Thawed in the Presence of Dimethylsulfoxide. *Transfusion* **3**, 483-493, 1963.
- 4) Huggins, C. E., Yuasa, S. : 6th Annual Meeting for Cryobiology, 1968, Washington, D.C.
- 5) Huggins, C. E. : Frozen Blood. *Am Surg.* **160**, 643-649, 1964.
- 6) Huggins, C. E. : Frozen Blood. Principle of Practical Preservation. *Monographs in Surgical Science.* **3**, 133-173. 1966.
- 7) Tullis, J. L. : Studies on the in vivo Survival of Glycerolized and Frozen Human Res Blood Cells. *T.A.M.A.* **168**, 399-404, 1958.
- 8) Huggins, C. E. : Reversible Agglomeration used to Remove Dimethylsulfoxide from Large Volume of Frozen Blood. *Science* **193**, 504, 1963.
- 9) Doebbler, G. F. and Rinfret, A. P. : The Influence of Protective Compounds on Cooling and Warming Condition on Hemolysis of Erythrocytes in Frozen Glycerolized Blood. *Biodynamica* **9**, 125-136, 1963.
- 10) Rapatz, G. and Luyet, B. : Effects on Cooling rate on the Preservation of Erythrocytes in Frozen Glycerolized Blood. *Biodynamica* **9**, 125-136. 1963.
- 11) Rowe, A. W. : Liquid Nitrogen Preservation of Red Blood Cells for Transfusion. *Cryobiology* **5**, 119-128. 1968.
- 12) 三浦 健, 羽田野茂 : 冷凍血液の臨床的応用, 日本医事新報, **2363**, 7-14, 1969.
- 13) 島田信勝ほか : わが国における血清肝炎の現況と対策, 最新医学, **24**, 95-104, 1969.
- 14) 三浦 健, ほか : 冷凍血液処理用 Huggins Cyto-glomerator を改良したわれわれの Cytoglomerator,

- 日本輸血学会雑誌, **14**, 233-235, 1967.
- 15) 隅田幸男ほか：われわれの冷凍赤血球洗浄装置について, 医科器械学会雑誌, **37**, 485-488, 1967.
 - 16) 隅田幸男：冷凍血液輸血, 日本医事新報社.
 - 17) Kessel, D., et al.: Stability of Human Leukocytes Processes to Freezing-Thawing. *Cryobiology* **4**, 209-211, 1968.
 - 18) Cavins, J. S. et al.: Preservation of Viable Human Granulocytes at Low Temperature in Dimethylsulfoxide, *Cryobiology* **2**, 129-133, 1965.
 - 19) Atkins, L.: Preservation of Viable Leukocytes in Glycerol at -80°C , *Nature* **195**, 610-611, 1962.
 - 20) Weiss, A. J., Ballinger, W. F.: In vivo and In vitro Survival of glycerolized Frozen Platelets. *J.A.M.A.* **179**, 148-149, 1958.
 - 21) Coben, P. and Gardner, F. H.: Platelet Preservation IV. Preservation of Human Platelet Concentrates by Controlled Slow Freezing in Glycerol Medium. *New England. J. Med.* **274**, 1400-1407, 1966.
 - 22) Djerassi, I. and Rowe, A.: A Method for Preservation of Viable Platelet: Combined Effects of Sugars and Dimethylsulfoxide. *Blood* **22**, 703-717, 1963.
 - 23) 湯浅晋治, Huggins, C. E.: リンパ球の冷凍保存, 日本輸血学会雑誌, **17**, 134-135, 1970.
 - 24) 湯浅晋治, 最新医学, 血液の凍結保存, **27**, 637-644, 1972.