

Optimization of biotinylation protocol for next generation studies of red blood cell survival after transfusion

次世代輸血後赤血球生存研究のためのビオチン化プロトコルの最適化

Tamir Kanias, et al :

Transfusion. 2025;65:1360–1372.

Abstract (要約)

背景: 赤血球 (RBC) のビオチン化は、RBC 輸血後回復 (PTR) を定量化するための好ましい方法になってきている。この研究では、ビオチン標識自己赤血球 (Bio BC) を輸血 48 時間前に輸血することの実現可能性を評価した。その目的は、製造拠点から遠隔地の臨床拠点への BioRBC 製品の配送を容易にすることである。

研究要綱 : 白血球除去赤血球単位を 12 名の健康な個人から採取し、1~6°C で 42 日間保存した後、輸血の 48 時間前と 4 時間前に、2 つのビオチン濃度 (3 および 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$) でビオチン化し保存した。各被験者に BioRBC 製剤それぞれ 10mL が輸血し、その後フローサイトメトリー解析により輸血後 RBC 20 時間および長期生存率 (30 日および 90 日) が測定した。更なる属性の評価には、BioRBCs におけるホスファチジルセリン (PS) の露出と、溶血の i 試験管内測定が含まれた。

結果: ビオチン化 48 時間後の赤血球輸血は、ビオチン化 4 時間後の赤血球輸血と比較して、BioRBC の 20 時間 PTR や 30 日および 90 日生存率に変化は生じなかった (例: 20 時間 PTR: $85.7\% \pm 8.4\%$ vs. $87.5\% \pm 7.3\%$; それぞれ 48 時間と 4 時間、 $p > 0.05$)。同様に、BioRBC 群間で、すべての時間点において BioRBC の PS 露出に有意な差は観察されませんでした。BioRBC の長期生存率は、20 時間 PTR ではなく、ドナーヘモグロビン (ピアソン相関係数 $r = -0.71$, $p = 0.001$) および浸透圧溶血 ($r = -0.783$, $p = 0.003$) と負の関連を示した。試験期間中、参加者のいずれからも BioRBCs に対する抗体が検出されなかった ($p = 0.003$)。

結論: 輸血 48 時間前の赤血球ビオチン化は、BioRBC 製品の品質と安全性を損なうものではない。BioRBC の長期生存は、循環血中の赤血球寿命に影響を与えるドナー特性を特定するために有用である。

1 | INTRODUCTION (始めに)

輸血後の赤血球 (RBC) 回復率 (PTR) の定量化は、米国における新しい血液製剤の開発や、ドナー特性が RBC 輸血の有効性に与える影響を評価する研究において不可欠なステップである¹。歴史的に、米国食品医薬品局 (FDA) は、添加溶液を含む改変または新規の赤血球製品の規制承認には、⁵¹Cr-放射線標識赤血球 (⁵¹Cr-RBC) の使用を認可してきた。この方法は、輸血後 RBC を評価するためのゴールドスタンダードであり続けているが、放射性標識 RBC に関連する最近の出来事やいくつかの欠点により、輸血された RBC の循環内での動態と生存を調べるための代替方法を探す必要が生じている。具体的には、放射性標識赤血球の使用が成人集団のみに限定されていること³、循環血中の⁵¹Cr-赤血球の寿命が比較的短い (約 28 日)、赤血球からの⁵¹Cr の溶出によってエラーが発生し、評価が単一の赤血球集団に限定されていること、適正製造基準 (GMP) グレードの⁵¹Cr の入手が限られていること、および肝臓と脾臓における⁵¹Cr-赤血球の一時的な残留によってエラーが発生する可能性があることが挙げられる⁴。

RBC のビオチン化は、RBC PTR を定量化する有望な代替方法である。この方法は、赤血球膜上の第一級アミンに不可逆的に結合するビタミン B7 含有化合物であるスルホ N-ヒドロキシスルホスクシンイミドビオチン (s-NHS-ビオチン) を赤血球に結合させることに基づいている。3,5 ビオチン結合赤血球 (BioRBCs) は、ストレプトアビジン (SA) を用いたフローサイトメトリーで検出することができ、SA ビオチンと強く結合し、フィコエリトリン (PE) のような蛍光プローブと通常はコンジュゲートする。

BioRBC は、⁵¹Cr-RBC に比べて複数の利点を提供する。s-NHS ビオチンが非放射性であるため、小児患者への使用が可能となった点⁶、および s-NHS ビオチンと赤血球膜との共有結合の耐久性が、赤血球の寿命を通じて維持される点が挙げられる。5. 7 この特性により、研究者は輸血後 146 日経過した時点でも BioRBC の生存動態を研究することが可能である。8 もう一つの注目すべき利点は、異なる s-NHS-ビオチン密度で赤血球を標識することにより、複数の興味のある赤血球集団を研究できることである。3 例えば、最近の研究では、RBC を 1 週間および 6 週間冷蔵保存した後の BioRBC の動態と生存を比較している。8

現在までに、BioRBC 研究のほとんどは単一の臨床現場で実施されており、そこでは少量の RBC (例: 10 mL) のみがビオチン化され、BioRBC 輸血自体はサンプル調製後すぐ

に（数時間後）行われていた。このモデルでは、特に臨床施設が BioRBC 製造施設から遠く離れている場合、複数施設での研究実施が制限される。研究者がこの輸血後 RBC 法を選択することを躊躇させるもう 1 つの問題は、RBC ビオチン化のための標準化されたプロトコルが存在しないため、異なる研究グループ間でのデータの比較と解釈が困難になる。これには、ビオチン密度、輸血された BioRBC の量、および s-NHS-ビオチンの供給源（研究グレードと GMP グレード）のばらつきが含まれる。さらに、FDA が発行した規制要件では、米国でバイオ RBC を含む臨床試験を実施するには、治験薬（IND）プロトコルの承認が必要とされている。バイオ RBC 法に関する重要な安全性上の懸念事項は、Bio RBC に対する抗体が形成される可能性があることであり、これは様々な密度の Bio RBC の自己輸血後 1~5 か月で観察されている。8,9 新しい知見では、抗バイオ RBC 抗体は Bio RBC の輸血後 24 時間の寿命には影響せず、最初の検出から 1~4 か月後に抗体反応が低下することからわかるように、一時的なものであることが示唆されている。8,10,11

Bio RBC に対する免疫反応の発生は、s-NHS ビオチンの濃度と輸血された Bio RBC の量によって影響を受ける可能性があります。11 例えば、ある研究では、ビオチン濃度 $\leq 18 \mu\text{g/mL}$ の使用が推奨されている。10

Bio RBC に対する免疫反応を起こした個人において有害事象は報告されていないが、追加の輸血による Bio RBC への再曝露は、循環血から急速に排出される可能性があるため、避けるべきである。10

国立心肺血液研究所（NHLBI）は、将来のドナー成分受血者の連携研究のための標準化された BioRBC プロトコルの開発を推進している。その根拠は、バイオ RBC を製造する中央研究所と、GMP 条件下でバイオ RBC を調整するための基盤を欠く遠隔地の臨床施設との間の複数拠点連携を促進することである。このような協同では、輸送に十分な時間を確保するために、BioRBC 製品の保存期間を延長する必要がある。したがって、本研究の主な目的は、輸血の 48 時間前に冷蔵保存（35~42 日間）された白血球除去（LR）-RBC ユニットから調製された BioRBC と、輸血当日に同じ供給源から調製された BioRBC とを同時輸血した場合の 20 時間自己 PTR を定量化することであった。さらなる目標は、循環血中の 2 つの BioRBC 集団の 30 日生存率と 90 日生存率を決定すること、および各 BioRBC 集団における赤血球ホスファチジルセリン（PS）量（赤血球老化のバイオマーカー）の発現を比較することであった。

2 | MATERIALS AND METHODS（試薬と方法）

2.1 | Human subjects（検体）

この研究は、NHLBI、FDA（IND # 29509）、臨床検討機構（NCT06788080）などの連邦機関によって維持されている全てのヒト被験者研究に適用される規制の下で実施された。ヒト被験者プロトコルおよび同意書に関する機関審査委員会の承認は、WIRB-Copernicus Group（WCG; # 20233358）から取得した。ヒト被験者研究のコンプライアンスの監視は、REDS-IV-P のデータ調整センター（Westat、メリーランド州ロックビル）、実行委員会、および観察研究監視委員会（OSMB）によって実施された。さらに、コロラド大学の臨床研究サポート チーム（CReST）は、コロラド大学（CU）の臨床トランスレーショナル リサーチ センター（CTRC、コロラド州オーロラ）での臨床手順（BioRBC 輸血）を監督しました。

2.2 | Study procedures（検討方法）

Vitalant 研究所の調達 & 専門収集スタッフは、この研究への参加に同意した 12 人の健康な個人を募集した。各被験者は、初回スクリーニング来院（来院 1）、添加剤溶液 1 で白血球除去 RBC ユニートを製造するための全血献血（来院 2）、2 種類の BioRBC 製剤の自己血輸血（来院 3）、および 20 時間、 30 ± 5 日間、 90 ± 5 日間の BioRBC PTR/生存率評価のための採血（それぞれ来院 4~6）を含む 6 回の試験来院を行うよう求められた。この検討の訪問回数と方法は図 1 に示している。

2.3 | Preparation of BioRBC products（Bio RBC 製品の作成）

2 回目の訪問時に採取した白血球除去 RBC ユニートは $37 \sim 42$ 日間（ $1 \sim 6^\circ\text{C}$ ）保存され、その中から 2 つの分割（各 50 mL）が目的の濃度（3 または $15 \mu\text{g/mL}$ ）でビオチン化した。最初の分割分は BioRBC 輸血の 48 時間前にビオチン化し（冷蔵保存 35~40 日目）、2 番目の分割分は輸血当日にビオチン化した（冷蔵保存 37~42 日目）。ビオチン濃度が輸血後 RBC に及ぼす影響の可能性を考慮するために、参加者 1~6 の保存済み RBC は $3 \mu\text{g/mL}$ （最初のアリコート）および $15 \mu\text{g/mL}$ （2 番目のアリコート）の s-NHS ビオチン密度で標識され、その後、参加者 7~12 については s-NHS ビオチン

濃度の順序が逆にした（つまり、最初の RBC 分割分は 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で標識され、2 番目は 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で標識した）。

RBC ビオチン化は、国際標準化機構 (ISO) 5、7、8 クラスの認定を受けたクリーンルームで実施した。ビオチン調製保存を除くすべての手順は、親赤血球ユニットと分割血液バッグ間の滅菌ドッキングを使用した閉鎖系で実施した。ビオチン化の前に、各 RBC アリコート をサテライト バッグ (Origen C250) に移し、0.9% 生理食塩水と混合 (1:1

の比率) した後、遠心分離 (2000 \times 相対遠心力 [RCF]、5 分、4 $^{\circ}$ C、Sorvall BP8、Thermo Scientific) して上清を除去した。ビオチンストック溶液は、s-NHS-ビオチンバイアル (1 mg/mL、EZ-Link Sulfo-NHS-Biotin、Thermo Fisher 社製、品番 PIA39256) を抗凝固剤クエン酸デキストロース USP 溶液 A (ACD-A、pH 4.5~5.5、Terumo BCT 社製、品番 40817) で再構成し、その後 USP グレードの 0.9% 生理食塩水 (Grifols 社製、品番 NDC 76297-001-12) で希釈して、目的のビオチン濃度を達成することによって調した。次に、滅菌接続器を使用してビオチンストック溶液を RBC 濃縮物に加え、続いて 22 $^{\circ}$ C で 30 分間転倒ミキサーでインキュベートしました。インキュベーション後、赤血球は 0.9%生理食塩水で 3 回洗浄 (2000 RCF、5 分、4 $^{\circ}$ C) された。BioRBC 濃縮液 (約 30 mL) を新しい血液バッグ (150 mL、Charter Medical # T3000) に移し、20 mL の AS-1 (Fenwal # PL2209) と混合し、冷蔵 (1~6 $^{\circ}$ C) した。

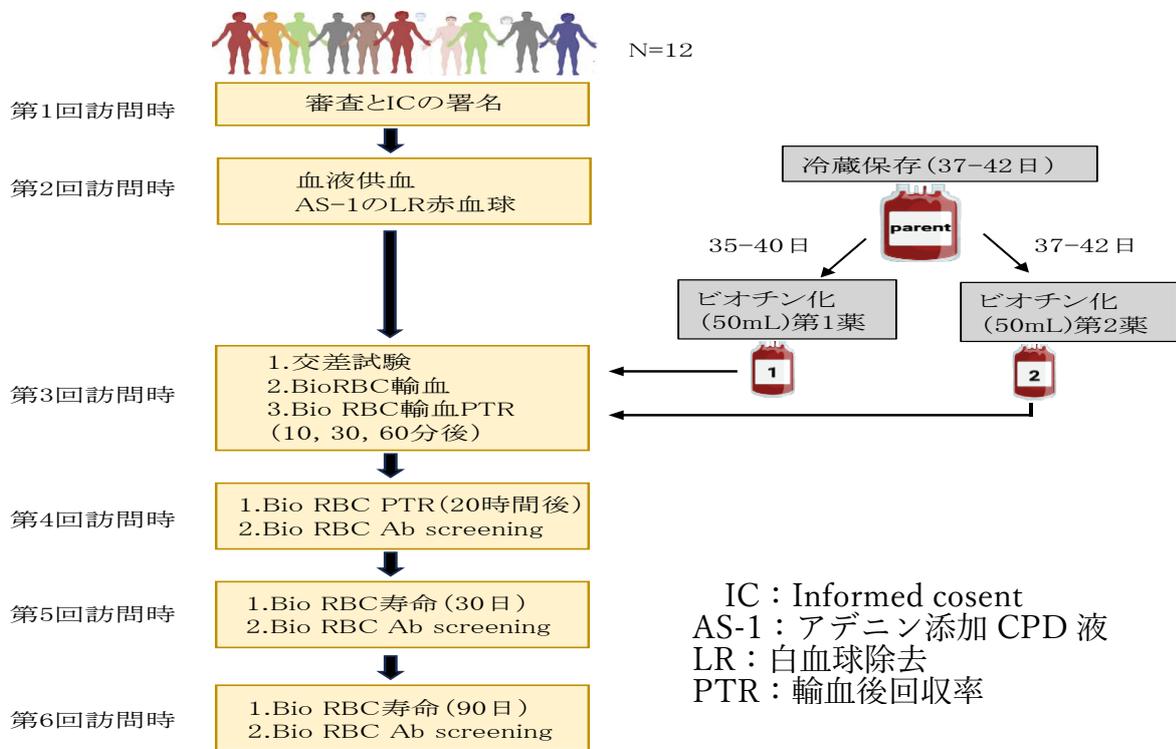


図1 レシピエント疫学およびドナー評価研究-IV-ビオチン標識小児赤血球研究に参加した 12 人のボランティアの人種および特性。

2.4 | Quality and safety assessment of the BioRBC products (BioRBC 製剤の品質と安全性の評価)

Two release criteria were implemented prior to the release of the BioRBC products for autologous transfusion, including hemolysis <1% and a negative endotoxin test on the transfusate.

自己血輸血用の BioRBC 製品のリリース前に、溶血 <1% および輸血液のエンドトキシン検査陰性という 2 つのリリース基準が実施された。

The concentration of hemoglobin (g/dL) in supernatants from BioRBC bags was determined by the HemoCue method,¹² and total hemoglobin was quantified by a blood bank hematology analyzer (Sysmex).

BioRBC バッグから採取した上清中のヘモグロビン濃度 (g/dL) は HemoCue 法 12 で測定し、総ヘモグロビンは血液分析装置 (Sysmex) で定量しました。

These parameters were used for the calculation of percent hemolysis.

これらのパラメータは溶血率の計算に使用された。

The endotoxin test was performed using a limulus amoebocyte lysate (LAL) pyrosate kit (0.125 EU/mL lower limit of detection) according to the manufacturer's manual (Associates of Cape Cod).

エンドトキシン試験は、製造元のマニュアル (Associates of Cape Cod) に従って、リムルス血球溶解液 (LAL) ピロセートキット (検出下限値 0.125 EU/mL) を使用して実施した。

2.5 | BioRBC transfusions (Bio RBC の輸血)

On the day of transfusion, both BioRBC bags were packed in a blood transport container (CF-45, Vitalant) with temperature monitoring (1–10° C) and sent to CU's hospital for type and screen and crossmatching with the transfusion recipient's own blood. After clearance of the study participant, a blood sample (5 mL) was drawn prior to BioRBC transfusion (baseline).

輸血当日、両方の BioRBC バッグは温度モニタリング (1~10°C) 機能付きの血液輸送容器 (CF-45, Vitalant 社製) に詰められ、CU 病院に送られ、型判定およびスクリーニング検査、ならびに輸血患者自身の血液との交差適合試験が行われた。試験参加者の許可を得た後、BioRBC 輸血前に血液サンプル (5mL) を採取した (ベースライン)。

Each participant was transfused with a portion (10 mL) of autologous BioRBCs from each bag sequentially over 5 min (120 mL/h) through one intravenous line. Two (6 mL) EDTA tubes were drawn at each post-transfusion time point of 10 ± 5, 30 ± 5, and 60 ± 5 min. 各被験者には、各バッグから自己 BioRBC (10 mL) が、1 本の静脈ラインを通して 5 分かけて (120 mL/時) 順次輸血された。輸血後 10 ± 5 分、30 ± 5 分、60 ± 5 分の各時点で、2 本の EDTA チューブ (6 mL) から採血された。

2.6 | Quantification of BioRBC PTR/survival and membrane PS exposure

by flow cytometry (2.6 | フローサイトメトリーによる BioRBC PTR/生存率および膜 PS 露出の定量) PTR: 輸血後回収率

この研究では、「BioRBC PTR」は輸血後 20 時間の時点を指し、「BioRBC 生存」は 30 日と 90 日の時点を指す。BioRBC の濃度は、BioRBC 輸血前、および輸血後 10 ± 5 分、30 ± 5 分、60 ± 5 分、20 時間、30 ± 5 日、90 ± 5 日に採取した全血サンプル中の RBC SA-PE 陽性イベントのフローサイトメトリー分析によって決定した。

$$\text{BioRB 回収 \%} = \frac{30 \pm 5 \text{ 分、} 60 \pm 5 \text{ 分、} 20 \text{ 日、} 30 \text{ 日、または } 90 \text{ 日後の平均赤血球回収率}}{10 \pm 5 \text{ 分後の平均赤血球回収率 (参考値)}}$$

全血サンプルを、SA-PE (最終濃度 1 μg/mL、BD Pharmingen # 554061) を含むリン酸緩衝液 (PBS) で 1:60 に希釈し、暗所で 22° C で 20 分間インキュベートした。インキュベーション後、サンプルを遠心分離 (5 分、1000 RCF、22°C) し、カウンティングビーズ (CountBright Plus Absolute Counting Beads、Invitrogen # C36995) を含む 500 μL の PBS で再懸濁した。BioRBC サンプルの取得は、BD FACSLyric (BD Biosciences) サイトメーターを用いて 1,000,000 イベントで行った。2 つの BioRBC 集団の計数は、各 BioRBC ピークの陽性 SA-PE イベントを計算することによって行われ、それを使用して全 RBC 集団の割合を BioRBC 輸血後に収集された最初のデータポイント (10 ± 5 分) は、基準 (100% BioRBC 回収率と定義) として使用され、30 ± 5 分、60 ± 5 分、20 時間、30 ± 5 日、および 90 ± 5 日での BioRBC PTR を計算した。各時点での BioRBC 回収率は次のように計した: BioRBC PS 露出 (%) は、全血をラクタドヘリンおよび SA-PE で染色することにより、ナイーブ RBC、BioRBC 3 μg/mL、および BioRBC 15 μg/mL の各時点で測定した。サイトメーター設定は、ラクタドヘリン-FITC (BLAC-FITC、Prolytix) を添加した BioRBC PTR の場合と同様である。BioRBC 標識効率率は、2 つの BioRBC 集団 (3 μg/mL と 15 μg/mL) 間の分離と、各 BioRBC ピークと非標識 RBC ピークの分離を決定する分離指数 (SI) によって評価した。このメトリックは、2 つの BioRBC 集団と BioRBC 3 μg/mL と非標識 RBC を区別する能力の品質評価を提供した。この研究では、SI ≥ 10 は、2 つの BioRBC ピーク間に重複がないことを示し

ており、したがって許容可能であった。SI は、FlowJo ソフトウェアを使用して、蛍光強度の中央値 (MFI) とその標準偏差 (SD) を使用して計算された。

$$SI (a) = \frac{MFI \ 3 \mu g/mL - MFI \ 非標識}{84th \text{percentile} \ 中央値背景シグナル - 中央値背景シグナル} / 0.995)$$

$$SI (a) = \frac{MFI \ 15 \mu g/mL - MFI \ 3 \mu g/mL}{(84th \text{percentile} \ 3 \mu g/mL \ 中央値シグナル - 3 \mu g/mL \ 中央値背景シグナル) / 0.995)}$$

$$SI (c) = \frac{MFI \ 15 \mu g/mL - MFI \ 3 \mu g/mL}{(84th \text{percentile} \ 3 \mu g/mL \ 中央値シグナル - 3 \mu g/mL \ 中央値背景シグナル) / 0.995)}$$

※87th percentile：データを小さい順に並べたときに、下から数えて87%の位置にある値のこと。つまり、データ全体の87%の値がこの値以下であることを意味する。例えば、テストの点数で87パーセンタイルであれば、全体の87%の人がその点数以下だったことを示す。

2.7 | Quality assessments of the BioRBC products (BioRBC 製剤の品質評価。)

BioRBC 輸血後に採取された輸血液 (血液バッグ内の BioRBC の残留内容物) に対して、いくつかの RBC 機能アッセイと血液学的特性検査が実施された。これらの検査には、酸化溶血、浸透圧溶血、および赤血球の血液学的指標の全血球算定が含まれていた。これらのアッセイの詳細な説明は、以前の出版物の補足方法とデータファイルに記載されている。14-16

2.8 | Determination of immune reaction to BioRBC transfusions (2 バイオ RBC 輸血に対する免疫反応の判定)

研究参加者からの検体は研究訪問時の 1、4、5、6 回目に採取され、前述のようにゲルカード BioRBC 抗体検出アッセイによって抗 BioRBC の検査が行われた。11 可能性のある抗 BioRBC 抗体を特定するための最後の検査日は、輸血後 90 日であった。

2.9 | Statistical analysis (統計分析)

データは GraphPad Prism 10 (GraphPad Software, Inc.) を用いて解析しました。2 つの BioRBC 集団間の PTR/生存率の差は、Geisser-Greenhouse 補正および Bonferroni の多重比較検定を用いた反復測定二元配置分散分析によって検定した。このモデルは、変動の原因 (ドナーや BioRBC の密度など) の値 (%) も提供した。欠損値 (BioRBC PS 曝露) の場合、Geisser-Greenhouse 補正および Bonferroni の多重比較検定を用いた Prism の多変量混合効果モデルを使用して解析を実施した。2 つの BioRBC 製品の in vitro 品質測定値 (溶血率およびヘマトクリット) の差は、対応のない t 検定によって決定され、p 値が ≤ 0.05 の場合に有意であると判断されました。溶血、血液型、または赤血球の血液学的指標の in vitro 測定値と BioRBC 輸血後生存率との相関分析をピアソン γ 検定を用いて実施した。

3. RESULTS (結果)

3.1 | Participant demographics (参加者の人種および特性)

2024 年 3 月から 2024 年 5 月の間に 12 名がこの研究に参加するために採用され、参加者全員が 2024 年 11 月までに研究訪問を完了した。彼らの統計学的決定要因は表 1 にまとめられている。この集団には女性 7 名と男性 5 名が含まれ、すべての ABO 血液型の個人が示されてが、最も一般的な血液型は O 型と A 型でした (それぞれ参加者の 42% と 33%)。参加者のうち 11 人はヨーロッパ系白人、1 人はヒスパニック系ある。

3.2 | Quality assessments of BioRBC PTR and survival by flow cytometry (3.2 | フローサイトメトリーによる BioRBC PTR と生存率の品質評価)

溶血 $>1\%$ またはエンドトキシン検査陽性を理由に BioRB 製剤を排除されることはなかった。 $0.245\% \pm 0.05\%$ and $0.256\% \pm 0.06\%$, respectively (N = 12 per biotin density).

3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ または 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で標識した BioRBC バッグ内の平均溶血率はそれぞれ 0.245% \pm 0.05% および 0.256% \pm 0.06% であった (ビオチン濃度あたり N = 12)。SA-PE 染色を用いたフローサイトメトリー解析による BioRBC PTR および生存率の長期的 (90 日間) 評価では、輸血後 90 日を含むすべての試験時点で、両方の BioRBC 集団 (3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ および 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$) が明確に検出されることが示された (図 2)。バイオ RBC 輸血後の時間は、両方のバイオ RBC 集団の MFI 値の左シフトと関連しており、非標識ナイーブ RBC とバイオ RBC 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (図 3A) またはバイオ RBC 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (図 3B) との間の SI 値の減少 (輸血後 30 日目と 90 日目にそれぞれ 30%~35% と 40%~45%) を示しました。これらの変化にもかかわらず、2 つの BioRBC 集団間の SI は研究全体を通じて一定のままであった (図 3C)。

表 1 レシピエント疫学およびドナー評価研究-IV-ビオチン標識小児赤血球研究に参加した 12 人のボランティアの人種および特性

| | 平均 \pm SD (範囲) | N | 割合 |
|---------------|----------------------------|----|-----|
| 年齢 | 41 \pm 10.4 (30-57) | 12 | |
| BMI | 28.1 \pm 5 (22.3-35.5) | 12 | |
| ヘモグロビン (g/dL) | 14.6 \pm 1.6 (12.6-18.2) | 12 | |
| 男性供血者 | | 5 | 42% |
| 人種 | | | |
| ヒスパニック | | 1 | 8% |
| 白人 | | 11 | 92% |
| ABO血液型 | | | |
| A | | 4 | 33% |
| B | | 1 | 8% |
| AB | | 2 | 17% |
| O | | 5 | 42% |

BMI : 体格指数 SD : 標準偏差

3.3 | BioRBC transfusion 48 h after labeling is not associated with altered PTR or BioRBC PS exposure (標識後 48 時間のバイオ RBC 輸血は、PTR またはバイオ RBC PS の曝露量の変化とは関連がない)

2 つの BioRBC 集団 (標識後 48 および 4 時間) は、テストされたすべての時点にわたって同様の回復を示しました。図 4A や表 2 にまとめられているように、20 時間 PTR の平均は、標識後 48 時間および 4 時間でそれぞれ 85.7% \pm 8.4% および 87.5% \pm 7.3% であった。90 日後、BioRBC はすべての血液検体でまだ検出可能であり、平均で約 18% であった。検定統計に基づく、2 つの BioRBC 集団間ですべての時点で有意差はなく、変動の原因 (%) は輸血後の時間 (96.4%, $p < .0001$) とドナー (1.6%, $p < .0001$) であった。個々の BioRBC PTR および生存データは表 S1 にまとめられている。さらに、2 つの BioRBC 集団間で BioRBC PS 露出に有意差はなかったが、輸血後 30 日目と 90 日目に、両方の調製物から 42 日間冷蔵保存した BioRBC を輸血した場合の PS 露出は、標識されていないナイーブ RBC と比較して有意に高くなった (図 4B)。

3.4 | Differences in RBC biotinylation densities were not associated with spontaneous hemolysis or BioRBC PTR and survival (赤血球ビオチン化濃度の差は、自然溶血や BioRBC PTR、生存率とは関連していなかった。)

これまでの研究では、54 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の密度で s-NHS ビオチンで赤血球を標識すると、循環血中の BioRBC の生存期間が短くなることが実証されている。3,17 輸血前の BioRBC バッグにおける自然溶血の評価では、2 つの BioRBC 密度 (3 および 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、図 5A) 間に有意差は見られず、すべてのケースで溶血は 0.4% 未満であった。同様に、48 時間保存した BioRBC では、輸血の 4 時間前に調製した BioRBC と比較して、溶血マーカー (保存、浸透圧、酸化) の増加は見られなかった (図 S1)。さらに、標識後 48 時間または標識後 4 時間に輸血した場合、2 つの BioRBC 濃度間で BioRBC の PTR および生存率に有意差は認められなかった (図 5B、C)。さらに、参加者の誰も、選択されたビオチン密度の BioRBC に対する免疫反応を発現しなかった。

3.5 | In vitro metrics of hemolysis and hemoglobin concentration in BioRBC bags are associated with BioRBC PTR and survival (BioRBC バッグにおける溶血とヘモグロビン濃度の in vitro 指標は、BioRBC の PTR および生存率と関連している。)

輸血液の浸透圧性溶血は、30 日後の BioRBC の生存率と負の相関を示した ($p = 0.0026$; 図 6A)。輸血後 90 日時点でも同様の傾向が観察された。ドナーの酸化溶血スコアと BioRBC PTR/生存率との間にも負の相関が観察されたが、これらの関連は有意ではなかった (図 6B) 同じ解析により、輸血液のヘモグロビン濃度と 90 日後の BioRBC 生存率との間に有意で負の関連性が認められました ($p = 0.0096$; 図 6C)。すべてのケースにおいて、輸血後 30 日と 90 日では、20 時間 PTR と比較して、相関係数 (r) の値が上昇し、より強い相関が観察された。赤血球 (RBC) の血液学的指標と BioRBC PTR/生存率との更なる相関関係は、表 S2 にまとめられている。その他の注目すべき観察結果としては、BioRBC の生存率における性差が挙げられる。具体的には、輸血の 48 時間前と 4 時間前にラベル付けされた男性ドナー由来の BioRBC において、生存率が低い傾向が観察された (図 S2)。ドナーの ABO 血液型も BioRBC の生存率の差と関連しており、A 型は輸血後 30 日および 90 日における生存率が、他の血液型 (O 型、B 型、AB 型) に比べて高いことが示された (図 S3 および表 S3)。これらの差は、血液型 A と O の間の分析において有意であった ($p < 0.05$ 、二要因分散分析)。(それぞれ $N = 4$ と $N = 5$)

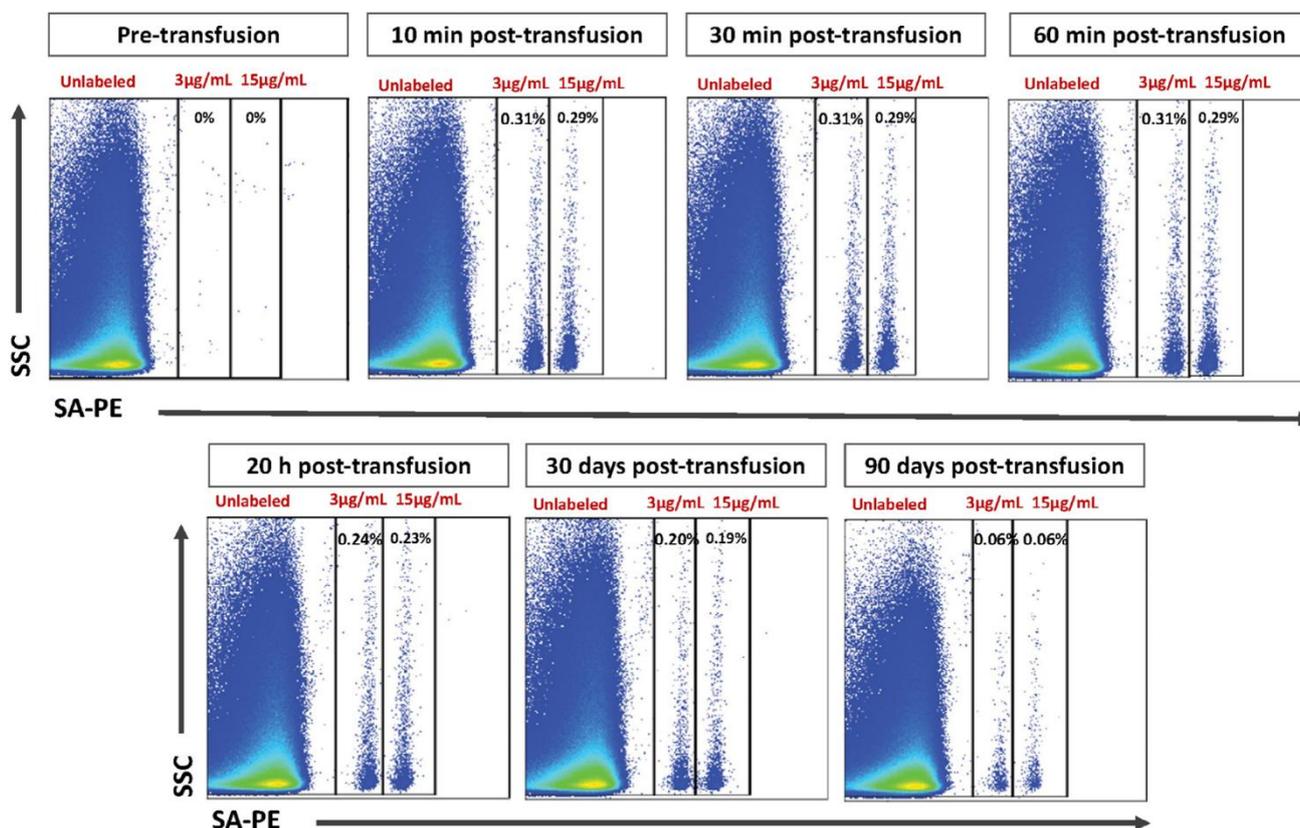
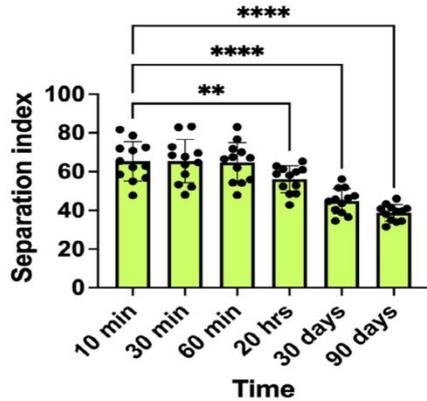
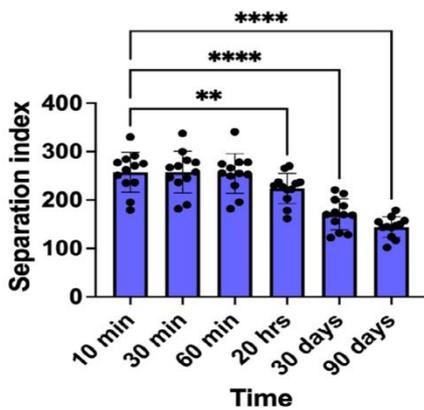


図 2 ビオチン標識赤血球 (BioRBC) の輸血後の回復および生存のフローサイトメトリーによる定量。
 代表的な図を各テスト時点における 2 つの BioRBC 密度 (3 および 15 µg/mL) の側方散乱 (SSC) および SA-PE 陽性 RBC (パーセンテージで表示) を示している。データは 90 日間の試験期間を通じて 1 人の被験者から得られたもの。[カラー図は wileyonlinelibrary.com でみることができる]

(A) SI unlabeled RBC ↔ Bio RBC 3 μg/mL



(B) SI unlabeled RBC ↔ Bio RBC 15



(C) SI Bio RBC 3 μg/mL ↔ 15 μg/mL

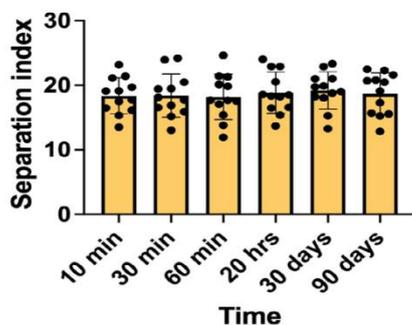
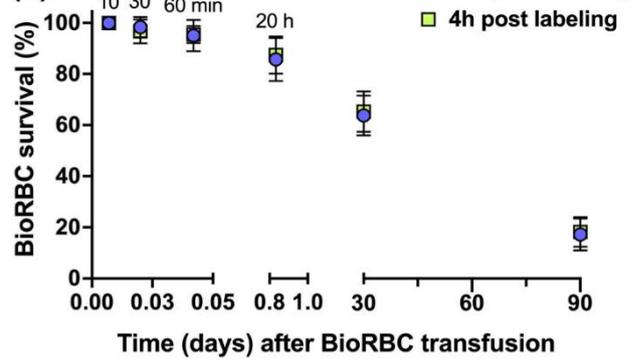


図3 ビオチン標識赤血球 (BioRBC) 分離指標のフローサイトメトリー評価。分離指数 (SI) は、セクション 2 で説明したように、2つの BioRBC 集団 (3 および 15 μg/mL) とナイーブ (未標識) RBC の蛍光強度の中央値を使用して計算した。
(A) BioRBC 3 μg/mL と非標識 RBC 間の計算された SI。
(B) BioRBC 15 μg/mL と非標識 RBC 間の計算された SI。
(C) BioRBC 3 μg/mL と BioRBC 15 μg/mL 間の SI 値の計算値。N = 12。平均値 ± 標準偏差。
p < .002, **p < .0001 by repeated measures one-way ANOVA and Bonferroni's multiple comparisons test. [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

(A) ● 48h post labeling
■ 4h post labeling



(B) ▲ Unlabeled
● 48h post labeling
■ 4h post labeling

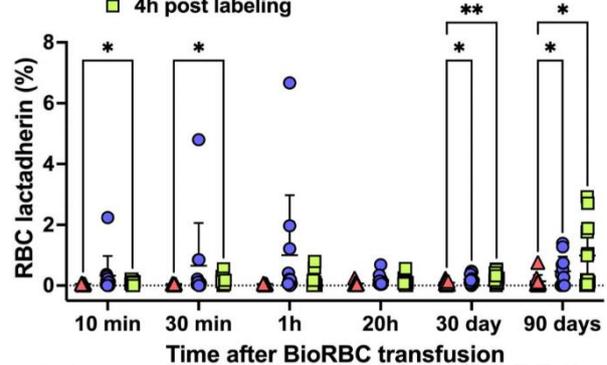


図4 ビオチン標識赤血球 (BioRBC) の輸血後回復率 (PTR)、生存率、およびホスファチジルセリン発現量。12名の健康なボランティアから採取した赤血球を 40~42 日間保存し、第 2 節で述べたように、輸血の 48 時間前と 4 時間前に、異なる濃度 (3 μg/mL) (A) 2 種類の BioRBC 製剤を用いた自己血輸血後の BioRBC PTR (10 分、30 分、60 分、20 時間) および生存率 (30 日および 90 日)。平均値 ± 標準偏差 (SD)。反復測定二元配置分散分析 (2 元配置分散分析) による p = .753。

(B) RBC 膜ホスファチジルセリン発現は、BioRBC 輸血後の各時点で採取された全血検体から得られたナイーブ RBC および BioRBC におけるラクトドヘリン陽性イベント (%) のフローサイトメトリー定量化によって評価した。平均 ± 標準偏差。*p < .05, **p < .01 (Prism の多変量混合効果モデルと Fisher の LSD 検定による)。[カラー図は wileyonlinelibrary.com で閲覧可能]

表2 ビオチン化赤血球 (BioRBC) の輸血後回復率 (PTR) および 90 日間の生存率。12 名の患者に、輸血前の赤血球ビオチン化のタイミング (48 時間 vs. 4 時間) が異なる 2 種類の自己保存 (40~42 日間) BioRBC が輸血された。

| Bio RBC | PTR (%mean±SD) | | PTR (%mean±SD) | |
|---------|-------------------|----|-------------------|----|
| | 48時間後 | | 4時間後 | |
| 輸血後時間 | ラベリング | N | ラベリング | N |
| 10分 | 100 (参照値) | 12 | 100 (参照値) | 12 |
| 30分 | 98.3±4.0 | 12 | 96.6±4.7 | 12 |
| 60分 | 95.0±6.1 | 12 | 95.4±3.3 | 12 |
| 20時間 | 85.7±8.4 | 12 | 87.5±7.3 | 12 |
| 30日 | 63.7±7.8 | 12 | 65.3±7.9 | 12 |
| 90日 | 17.3±6.3 | 12 | 18.2±5.8 | 12 |

図 5 ビオチン濃度が溶血、ビオチン標識赤血球 (BioRBC) の輸血後回収率

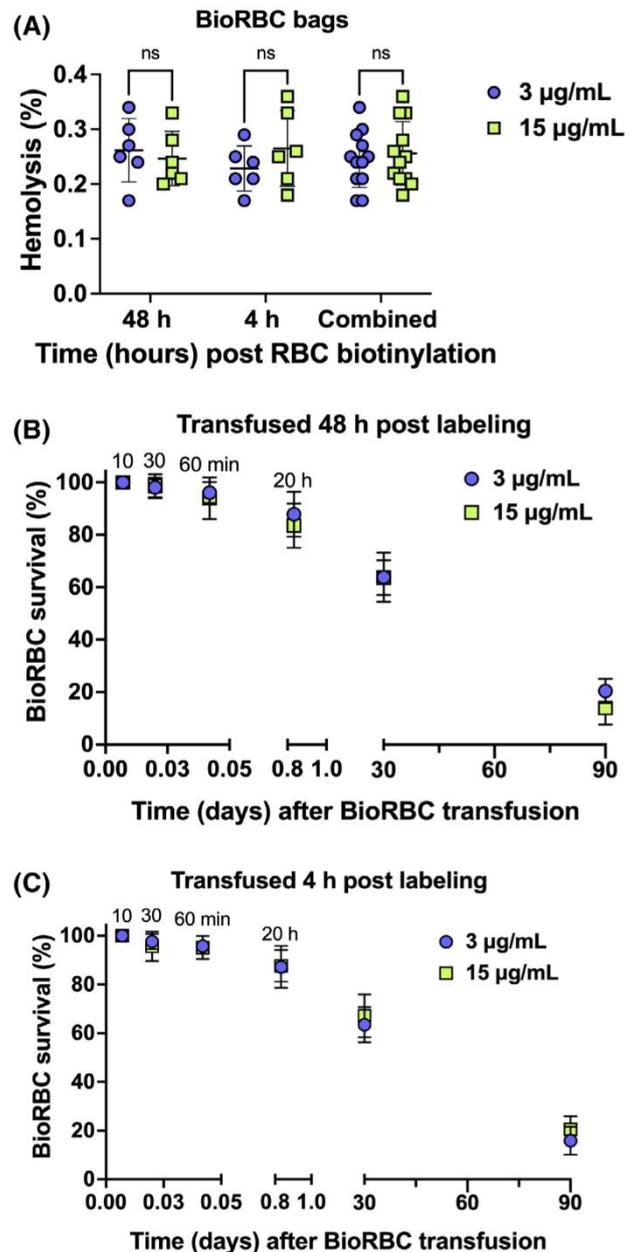
ビオチン標識濃度 (3 および 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$) が溶血および BioRBC PTR に及ぼす可能性のある影響を、輸血前の BioRBC バッグ (A) と標識後 48 時間 (B) および 4 時間 (C) に輸血された BioRBC で評価した。

(A) 自己血輸血当日に測定した BioRBC 血液バッグ中の溶血率 (平均±標準偏差[SD]) を、各準備時間群 (48 時間および 4 時間; N = 6) または併用群 (N = 12) で測定した。NS: *t* 検定では有意差なし

(B および C): RBC ビオチン化後 48 時間 (B) および 4 時間 (C) に輸血した各 BioRBC 密度群における BioRBC PTR (10 分、30 分、60 分、20 時間) および生存率 (30 日および 90 日)。

平均±SD。N = 6/ビオチン濃度群の $p = .418$, $p = .471$, (B) および (C)、それぞれ反復

測定二元配置分散分析による。[カラー図は wileyonline-library.com で閲覧で可能]



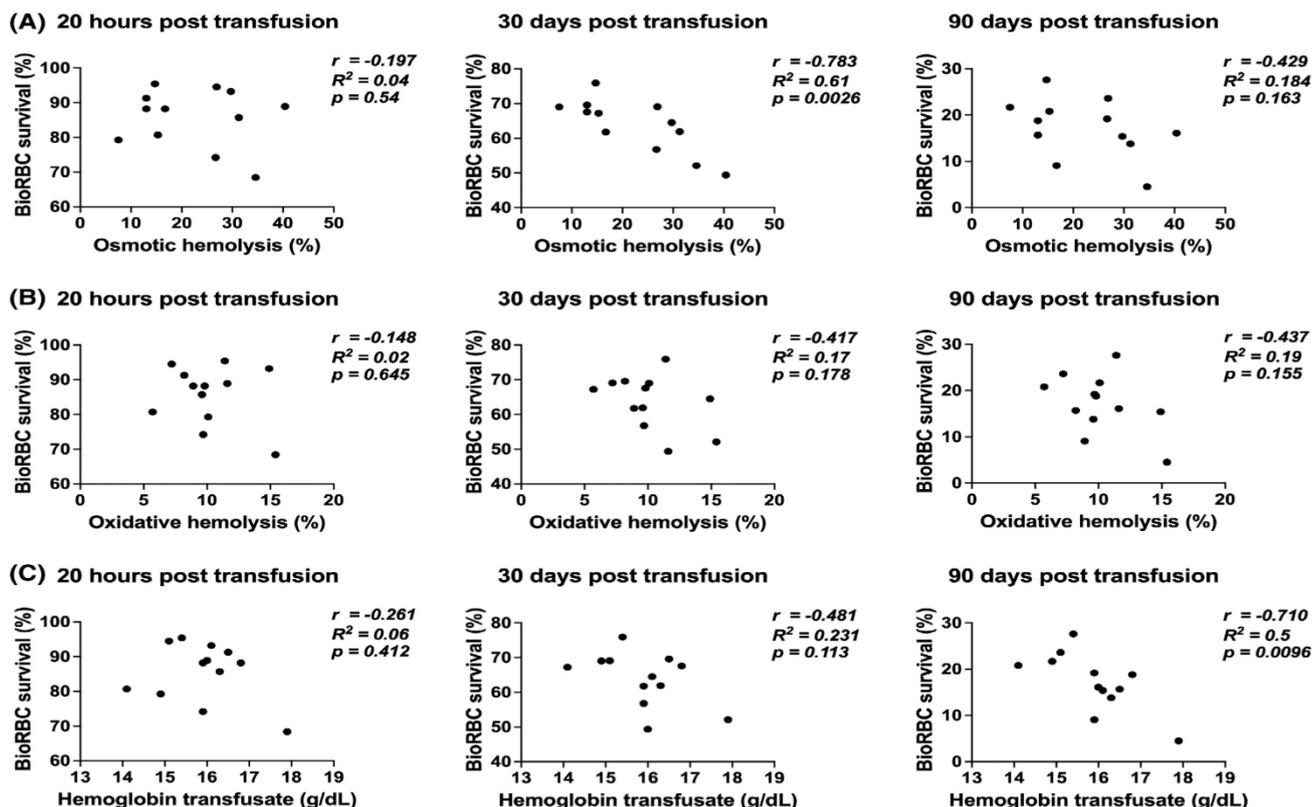


図 6 ビオチン標識赤血球 (BioRBC) の輸血後回収率 (PTR) または生存率と、輸血液中の溶血またはヘモグロビン濃度の指標との相関関係。

BioRBC PTR/生存率と (A) 浸透圧溶血 (%) 間の相関関係 (ピアソンの r)。 (B) AAPH 誘発性酸化溶血、および (C) 輸血液 (BioRBC バッグ) 中のヘモグロビン濃度 (g/dL)。 $N = 12$ 。

r : ピアソンの相関係数 . R^2 : 回帰分析

4 | DISCUSSION (考察)

本研究は、輸血後の赤血球 (RBC) の回収率と生存率を定量化するプロトコルの最適化に向けた継続的な取り組みを支援するものである。5,7,8,10,18-20 これは、放射性標識された ^{51}Cr -RBCs の非毒性に対し、信頼性の高い代替品を見つける必要性が高まっていることから動機付けられました。現在まで、ほとんどの BioRBC 研究は単一の臨床施設で実施されており、赤血球のビオチン化は輸血の直前に (数時間前) に行われている。この慣行は、特に臨床バイオ RBC 輸血施設がバイオ RBC 製造施設から遠く離れている場合、研究グループ間の連携の機会を制限している。したがって、この研究の主な目的は、臨床現場への輸送と処理 (交差適合試験など) に適切な時間を確保するために、輸血の 48 時間前に BioRBC を製造する実現可能性を評価することであった。主な安全性に関する懸念は、輸血当日に調製されたバイオ RBC と比較して、バイオ RBC 製品における自然溶血および細菌汚染の増加である。結果は、RBC ビオチン化のタイミング (輸血の 48 時間前と 4 時間前) が、溶血、エンドトキシン反応性、BioRBC に対する免疫反応の発生、BioRBC PTR および生存率などの測定結果に有意な影響を与えないことを示した。この研究における赤血球ビオチン化は GMP 条件下で実施され、ほとんどの手順は血液バッグ間の滅菌連結を使用した閉鎖系で実施された。このアプローチは、赤血球と血小板の生存研究を実施した他のグループからヒントを得たもので、細菌汚染のリスクが大幅に減少した 5,20-23。さらに、FDA 承認の小容量 RBC 血液バッグ (円錐チューブではなく) を BioRBC の保管に使用すると、輸送中の漏れのリスクが低減し、臨床上的理由または BioRBC の品質評価のために輸血液を無菌サンプリングでき、ベッドサイドでの現在の輸血装置と互換性があるなどの利点がある。

RBC ビオチン化プロトコルを最適化するには、ネイティブ (ラベルなし) RBC と簡単に区別できる密度で s-NHS-ビオチンでラベル付けする必要がある。この研究で使用したビオチン標識濃度 ($3\mu\text{g/mL}$ と $15\mu\text{g/mL}$) は PE チャネル上で容易に視認でき、2つの

BioRBC 集団と非標識 RBC を明確に分離できた。SI を使用することで、長時間の保存による BioRBC クリアランスとおそらく影響を受けるであろう BioRBC 老化の SA-PE MFI の縦断的变化を評価するための重要な品質指標が得られた。これは、時間の経過とともに各 BioRBC 集団とラベルなし RBC 間の SI 値が大幅に減少することが観察されたことを説明できるかもしれない。一方、2 つの BioRBC 集団間で SI に差は見られず、MFI 比率に大きな変化がないことが示唆されている。このような変化が見られた場合、重複の可能性を示したり、定量化エラーを生成したりする可能性がある。注目すべきは、バイオ RBC の SI を計算するための確立された方法は存在しないということである。これは、異なる研究グループで使用されるビオチン密度のばらつきや、SI を計算する数学的手法の違いによるところが大きい（例えば、Donnenberg et al.⁷ を参照）。

この研究の主な結論は、輸血の 48 時間前にバイオ RBC を調製した場合、輸血当日（標識後 4 時間）にビオチン化された RBC と比較して、20 時間の PTR および 90 日生存に有意な影響がなかったということである。さらに、BioRBC バッグ内での自然溶血に関しては、2 つの BioRBC 製剤間に有意差は見られず、テストされたすべての製品にはエンドトキシンが含まれていなかった。これらの観察結果は、製造現場から地理的に離れている可能性のある臨床現場で、輸血の最大 48 時間前に調製された BioRBC 製品の使用を支持している。新しい赤血球製剤の承認における重要なステップは、輸血後 24 時間以内に 75%以上の PTR という FDA の要件を満たすことである。24,25 両方の BioRBC 製剤の平均 20 時間 PTR（それぞれ 85.7% ± 8.4% と 87.5% ± 7.3%；ラベル付与後 48 時間と 4 時間後）はこの要件を満たしており、これは RBC ビオチン化法が RBC 輸血動態の信頼性の高い指標を提供する可能性をさらに裏付けるものである。RBC PTR と生存率に加え、本研究では PS 曝露の評価を通じて、BioRBC の老化と損傷のマーカーに関する知見を提供した。これらの分析により、BioRBC PS の曝露量は、輸血後 30 日目と 90 日目には非標識赤血球よりも有意に高かったことが示された。これは、非標識赤血球には若い赤血球の割合が高いことを考えると予想される結果で、BioRBC の両集団は 42 日間冷蔵保存された後に輸血された。注目すべきことにあるヒトの BioRBC は、輸血後すぐに PS の高発現を示した（10、30、60 分；図 4B）。しかし、この観察結果は、これらの時点あるいは 20 時間後の BioRBC PTR の減少とは関連していなかった（表 S1、ドナー 4）。2 つの BioRBC グループ間で PS 露出に大きな差がないという結果は、溶血および PTR データと一致しており、BioRBC の高度な製剤の使用をさらに裏付けている。

本研究で測定された結果はビオチン標識濃度によって混乱することはなく、溶血および BioRBC PTR/生存率に関して、3 μg/mL 標識赤血球と 15 μg/mL 標識赤血球の間に有意差は認められなかった。これらの濃度を選択した理由はいくつかありますが、その中には、同じ濃度のバイオ RBC 輸血に関する過去の臨床経験^{5,8}、そしてこの分野の先駆者たちによる安全性に関する推奨事項（ビオチン濃度が 18 μg/mL を超えるとバイオ RBC に対する免疫反応のリスクが高まり、循環血中のバイオ RBC の生存期間が短くなることを示したこと^{10,19}）が含まれる。これらの推奨事項を裏付けるように、この研究に参加した 12 名の参加者のうち、バイオ RBC に対する免疫反応を示した者は一人もいなかった。同じビオチン濃度を用いた最近の研究では、6 人中 2 人がバイオ RBC に対する一時的な免疫反応を示しました。8 しかし、輸血された血液の Bio RBC (> 25 mL/ビオチン濃度) の量は、この研究（10 mL/ビオチン密度）よりも少なくとも 2.5 倍多かった。したがって、より低いビオチン濃度を選択することに加えて、大量の Bio RBC 輸血を避けることが推奨される。実際、この研究では、3 μg/mL ビオチンで標識され、少量（10 mL）で輸血された赤血球は、輸血後 90 日経過した後でも全血中で容易に検出できることが実証されている。

いくつかの研究では、献血者の特性（遺伝的変異、性別、テストステロン補充、性ホルモン摂取、喫煙など）と赤血球 PTR との関連が特定されている。^{14,26-29} この研究ではドナーとレシピエントの関連分析を行う力が限られていたものの、ドナー血の浸透圧溶血またはヘモグロビン濃度と BioRBC 生存率の間には有意な負の相関が観察された。ドナーヘモグロビン濃度と赤血球生存率との間に負の相関関係があるという知見は、輸血後 24 時間以内にドナーヘモグロビンが患者のヘモグロビン増加と関連していたとするレトロスペクティブ的研究と矛盾している。³⁰ 生体赤血球の生存における性差の可能性の観察は、冷蔵保存中および浸透圧ストレスまたは酸化ストレス下での赤血球の溶血に対する感受性が男性の方が高いことと関連しており、そのメカニズムには部分的にテストステロンが関与しているという以前の研究を裏付けている。^{14,16,31-33} ドナーの血液型が赤血球寿命に与える影響は明らかではなく、本研究のサンプル数が少ないことを考慮すると、ドナーの特徴は輸血後、より遅い時点（すなわち、輸血後 20 時間後ではなく、30 日目と 90

日目) でより明らかになるという結論しか出せない。この点は、将来のドナーとレシピエントの関連研究を計画する際に考慮すべきである。

この研究にはいくつかの限界があった。まず、サンプル数 (N = 12) が比較的少なかったため、BioRBC 同種免疫などの稀な有害事象を検出したり、参加者の特性と BioRBC PTR および生存率との確実な比較を実施したりすることが困難であった。今後の研究では、より大きなサンプル数を検討するとともに、カリウム流出、ATP、2,3-ジホスホグリセロールの減少、そして冷蔵保存に伴う赤血球形態変化など、赤血球保存病変の品質指標におけるドナー間の差異について、より包括的な評価を行う必要がある。34 ほとんどの放射性標識またはビオチン化 RBC プロトコルに共通するもう 1 つの制限は、標識付け後に RBC を徹底的に洗浄する必要があることである。この手順により、損傷した赤血球が除去され、輸血されたバイオ赤血球の生存率が向上する可能性がある。Donnenbergらは論じている。8 これは、長期間冷蔵保存する前に赤血球をビオチン化することで回避できる可能性があるが、そのような条件下でのバイオ赤血球の長期生存は確立されておらず、さらなる調査が必要である。最後に、同種輸血はこの研究には含まれていないため、結果の一般化が制限される可能性があるが、同種 BioRBC バイオが輸血の 48 時間前に標識付けされた場合に異なる反応を示すと考える理由はない。

結論として、本研究では、輸血の 48 時間前に赤血球をビオチン化しても、赤血球生着率および生存率の研究に使用される BioRBC 製品の品質と安全性が損なわれないことが実証されました。これにより、バイオ RBC 製品の製造拠点から遠隔地の臨床現場への流通が容易になり、科学連携が促進されます。本プロジェクトのために開発された赤血球ビオチン化プロトコルと臨床手順は、バイオ RBC を用いた将来の研究への指針となるだろう。