

201328016A

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

大規模自然災害等に備えた血液製剤の保存法と
不活化法の開発に関する研究

(H24-医薬一般-007)

平成 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 岡田 義昭

(埼玉医科大学)

平成 26 (2014) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

大規模自然災害等に備えた血液製剤の保存法と

不活化法の開発に関する研究

(H24-医薬-一般-007)

平成 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 岡田 義昭

(埼玉医科大学)

平成 26 (2014) 年 3 月

目次

I. 総括研究報告書

大規模自然災害等に備えた血液製剤の保存法と不活化法の開発に関する研究

研究代表者 岡田 義昭 P 1-P 5

II. 分担研究報告

1. 赤血球製剤の保存方法の開発

柴 雅之 P 6-P 12

2. 低温下における血小板活性化メカニズムの解明と保存への応用

寺田 周弘 P13-P16

3. 赤血球製剤における病原体不活化法の開発

岡田 義昭 P17-P23

4. Cohn の血漿分画法による C 型肝炎ウイルスの不活化の評価

下池 貴志 P24-P30

野島 清子

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

P31

厚生労働科学研究費補助金

(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)

総括研究報告書

大規模自然災害等に備えた血液製剤の保存法と不活化法の開発に関する研究

研究代表者 岡田義昭 埼玉医科大学病院 輸血・細胞移植部 部長

研究要旨

1. 赤血球製剤を 0～20 度に保存し、品質の変化を解析した。0 度保存では、pH、ATP、2,3-DPG の値は 4℃保存よりも同等か優れていた。特に 2,3-DPG はよく保たれていた。一方で、有意な差はなかったが、溶血が認められた。
2. 高周波散乱光法を用いて血小板の形態を検討したところ、冷却によって血小板の形態は変化するが再加温によって可逆性を有していることが判明した。冷却時間が長いと可逆性は低下したが、GPIb 複合体の構造を解析したところ、低温保存では変化がなく、加温によって構造変化が生じることを明らかにした。
3. 紫外線照射による赤血球障害の保護剤の検討をしている際にメチレンブルーと可視光を組み合わせることで、赤血球溶液において牛下痢症ウイルスなど 1 本鎖 RNA ウイルスを効率良く不活化できることを明らかにした。
4. ゼーター電位を応用したフィルターによってウイルスが約 1/10 減少できることを明らかにした。除去法としてさらに検討する必要がある。
5. 培養可能な C 型肝炎ウイルスクローンを用いて Cohn のフラクション法を行い HCV の不活化とウイルスの移行について解析した。クリオ沈殿から 8%エタノール処理まで検討したが、8%エタノールでは不活化されなかった。また、HCV は主に各分画の上清に存在することが判明した。クリオやフラクション 1 の沈殿にも感染性を有したまま存在していた。H

分担研究者

下池 貴志 国立感染症研究所

柴 雅之 日本赤十字社血液事業本部

主任研究官

中央血液研究所 課長

A. 研究目的

寺田 周弘 日本赤十字社血液事業本部

本研究は、大規模自然災害や輸血を介して感染する感染症のパンデミックが発生した場合に備えて、1) 輸血用の血液を備

中央血液研究所 係長

野島 清子 国立感染症研究所 研究員

蓄するための保存技術の開発、2) 輸血用の血液製剤における病原体不活化法の開発、及び不活化評価法の開発を行い、輸血用血液の供給と安全性の確保をはかることを主な目的としている。赤血球製剤の保存に関しては、赤血球を0度で保存した場合の品質の変化を解析した。また、血小板の保存技術開発では、低温下での血小板の活性化メカニズムを解明し、低温保存への応用を目指す。また、本研究班では、最も重要な赤血球製剤の病原体不活化法の開発を目指し、新しい病原体不活化法の開発を目指す。

また、HCVの培養が可能なウイルス株が作成され、我々はこれまでモデルウイルスとして使用されてきたウシ下痢症ウイルス(BVDV)との各種ウイルス不活化法における相違を解析し、よく似た挙動をすることを明らかにしてきた。今年度は、血漿分画製剤の製造で用いられているCohnのフラクションによるHCVの挙動や不活化について検討した。

B. 研究方法と結果

1. 赤血球製剤の保存方法の開発

血液の長期保存を目的として、赤血球内の物質代謝を抑制するため温度を下げ、0°C以下で保存する試みが報告されている。-5°Cくらいまでは凍結のおそれがないとされているが、保護効果を有する血漿存在下(全血)での検討でRCC-LRでは検討されていない。そこで、RCC-LRについて、0、

4、10、20°C保存と時間経過による品質への影響について検討した。0°Cでは、保存144時間でもpH、ATP、2,3-DPG等の項目については良好に保たれており、赤血球の品質に影響はないと思われたが、有意差はないが上清Hbおよび溶血率の上昇が認められ、製剤中の電解質濃度に注意する必要があると思われた。低温下に保存することで2,3-DPGの維持は良好であるものの、溶血が認められることから、エネルギー代謝経路についての解析を進め、赤血球用保存液の改良を試みたい。

2. 低温下における血小板活性化メカニズムの解明と保存への応用

細菌汚染防止の観点から、濃厚血小板製剤は低温での保存が望ましい。しかし、低温に曝された血小板は生体内寿命が短くなるため実用化されていない。この低温による寿命の短縮は血小板の形態変化と深く関係していると言われている。そこで、低温下における血小板活性化メカニズムを解明するため、開発した高周波散乱光法を用いて冷却が血小板形態へ及ぼす影響について検討した。その結果、冷却による形態変化には再加温で復帰可能な可逆性があることがわかった。冷却時間が長くなると、可逆性は冷却温度に関係なく低下したが、冷却温度が高いほど維持されていた。本年度は形態変化の可逆性が生体内でどのような意味をもつかを明らかにするため、冷却した血小板の生体内寿命の長さの

一因と考えられている血小板GPIb 複合体の構造変化との関連性について検討した。その結果、形態変化の可逆性が低下すると GPIb 複合体の変化は亢進すること、この変化は冷却 (4°C) →加温 (37°C) の段階で生じやすいことがわかった。形態変化の可逆性は、GPIb 複合体を介した血小板の生体内代謝を反映していることが示唆された。

3. 赤血球製剤における病原体不活化法の開発

赤血球製剤では、実用可能な病原体の不活化法は開発されていないが、我々はこれまでの研究によって紫外線照射による赤血球製剤の病原体不活化が可能なことを示した。不活化効果を高めるためには照射量を増加させることが必要だが、同時に赤血球の障害が増加することが予想される。そこで赤血球へのダメージを少なくするための赤血球保護剤の検討を行った。その実験中にメチレンブルー (以下 MB) が可視光と組み合わせることによって赤血球製剤でも不活化効果が認められた。可視光による赤血球へのダメージは溶血を見る限り少なかった。牛下痢症ウイルスやシンドビスウイルスなどシングル鎖の RNA ウイルスは 3 Log 以上不活化され効果的だった。一方、二重鎖 DNA ウイルスである仮性狂犬病ウイルスに対しては全く効果が認められなかった。ウイルス遺伝子の性状によって感受性が異なることが示唆された。

4. ゼータ電位によるウイルス除去法の開発

ゼータ電位を応用したフィルターが開発され、粒子を吸着することが知られている。そこでウイルスをパルスした培養液を濾過紙、除去効率を検討した。シンドビスウイルス及び仮性狂犬病ウイルスは、濾過することによって感染ウイルスは 1Log 減少した。

5. Cohnの血漿分画法によるC型肝炎ウイルスの不活化の評価

C型肝炎ウイルス (HCV) は JFH-1 を細胞にトランスフェクションし、培養上清中に産生されるウイルスを集めた。ウイルスは、さらに限外濾過カラムを用いて濃縮し、感染価の高い HCV を作製した。

血漿分画製剤は献血血を原料としたプール血漿を Cohn エタノール法により分画して製造される。これまでに、C型肝炎ウイルス (HCV) に汚染された第IX因子製剤、フィブリノゲン製剤の投与による HCV 感染事例が報告されて来た。一方、グロブリン、アルブミン製剤における HCV 感染事故はほとんどない。この理由を科学的に明らかにするために、まず、実験室レベルで Cohn エタノール法により分画する系を確立した。次に、血漿に HCV をスパイクし、Cohn エタノール分画法により分画し、HCV 感染性がどの画分に移行するかを検討した。本年度は、血漿をクリオと脱クリオ画分に分画するクリオ/脱クリオ分画、さらに 8%EtOH を添加し

フィブリノゲン沈殿画分であるフラクション I (Fra. 1 画分) とそれ以外の上清 S1 画分とに分ける Fra. 1/S1 分画を行い、HCV の感染性がどの画分にどれだけ存在するかを調べた。その結果、クリオ/脱クリオ分画では 99.9% の HCV が脱クリオ画分に分画され、Fra. 1/S1 分画では 0.7% の HCV が Fra. 1 であるフィブリノゲン沈殿画分に分画され、大部分の HCV が感染性を保持した状態で S1 上清画分に分画されることが明らかとなった。

C. 考察

赤血球製剤は現状の保存液を用いて 4°C 保存では 42 日間 (エルシニア感染の対策として 21 日で運用) 有効であるが、4°C よりも低い凍結しない程度の温度で保管すれば有効期間を延長できる可能性がある。それによって在庫が多くなるが、災害時に速やかに供給できるメリットが生じる。今年度 0°C に保存した検討では、品質は 4°C よりも同等かそれ以上に保たれた。有意差はないが溶血が増加したことは保存液の改良によって解決する可能性がある。

また、血小板の保存方法では、血小板は低温に曝されると活性化することが問題である。GPIb の構造を低温保存時と加温時に比較検討したところ、低温保存では構造に変化が認められなかったが、加温すると構造変化が認められた。このことから加温する際に構造変化を抑制する薬剤や温度変化を工夫することで構造変化を抑制できると考えられた。この発見は、低温保存そのもの

のが血小板にダメージを与えるのではなく加温時に問題があることを示唆した有益な結果だと考えられた。

赤血球の病原体不活化法は、メチレンブルー (MB) と可視光の組み合わせが有用であることが判明した。MB は臨床に使用され、遠心で容易に除去できることが有利な点である。

HCV の培養系を用いた Cohn のフラクションでは、来年度グロブリン分画の解析をする予定であり、グロブリン製剤による感染が生じなかった科学的な理由が明らかにされると期待している。

D. 結論

1. 赤血球製剤を 0°C に保存すると 2, 3-DPG の値が 4°C よりもよく保たれた。有意差はないが溶血が認められた。
2. 血小板の冷温保存による GPIb の構造変化を解析したところ、低温保存中は変化は認められなかったが、再加温することで GPIb は減少した。
3. メチレンブルーと可視光を組み合わせることによってヘマトクリット 40% の赤血球溶液に存在する 1 本鎖 RNA ウイルスを効率良く不活化できることがわかった。
4. ゼーター電子を応用したフィルターによってウイルスを吸着できた。更なる条件検討が必要である。
5. 感染性 HCV を用いて Cohn 分画を行い、分画の上清に主にウイルスが感染性を保持したまま存在することを明らかにした。

E. 健康危機情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Krayukhina E,Uchiyama S,Nojima K,Okada Y,Hamaguchi I, and Fukui K.: Aggregation analysis of pharmaceutical human immunoglobulin preparations using size-exclusion chromatography and analytical ultracentrifugation sedimentation velocity. J.Biosci Bioeng. 2013.115(19): 104-10.

2) Baylis SA, Blumel J, Mizusawa S, Matsubayashi K, Sakata H, Okada Y, Nubling CM, Hanschmann KM, HEV collaborative Study Group.: World Health Organization International Standard to harmonize Assays for detection of hepatitis E Virus RNA. Emerg. Infect. Dis. 2013.19(5):729-735.3)

3) 岡田 義昭、輸血用血液における病原体不活化技術の現状と新規技術の開発。検査と技術、42巻、4～7ページ、2014年

2. 学会発表

1) 岡田 義昭、水沢 左衛子、浜口 功：血漿分画製剤からの簡便なウイルスの濃縮法：第61回日本輸血・細胞治療学会、横浜、2013年

2) 岡田 義昭：血漿及び血漿分画製剤からの簡便なウイルス濃縮法とその応用、第61回日本ウイルス学会、神戸、2013年

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

大規模自然災害等に備えた血液製剤の保存法と不活化法の開発に関する研究

分担研究：赤血球製剤の保存方法の開発

分担研究者：柴 雅之

(日本赤十字社 血液事業本部 中央血液研究所)

研究要旨

血液の長期保存を目的として、赤血球内の物質代謝を抑制するため温度を下げ、0℃以下で保存する試みが報告されている。-5℃くらいまでは凍結のおそれがないとされているが、保護効果を有する血漿存在下(全血)での検討でRCC-LRでは検討されていない。そこで、RCC-LRについて、0、4、10、20℃保存と時間経過による品質への影響について検討した。0℃では、保存144時間でもpH、ATP、2,3-DPG等の項目については良好に保たれており、赤血球の品質に影響はないと思われたが、上清Hbおよび溶血率の上昇が認められ、製剤中の電解質濃度に注意する必要があると思われた。低温下に保存することで2,3-DPGの維持は良好であるものの、溶血が認められることから、エネルギー代謝経路についての解析を進め、赤血球用保存液の改良を試みる。

B. 研究方法

A. 研究目的

輸血用血液製剤はその品質を維持するために定められた貯法のもと保管され、不必要に保存温度の範囲外に曝してはならない。また、輸送時においても製品の安全性を担保しなければならない。しかし、大規模災害時においては停電等で適正な保管および輸送温度を保てない場合があり得る。このような通常の温度条件(2~6℃)と異なる温度で保存した場合の赤血球製剤の性状についても把握しておくことは重要である。そこで、前年度は赤血球濃厚液-LR「日赤」(RCC-LR)の性状に影響を及ぼす温度および放置時間について検討を行った。今年度はさらに血液の長期保存の可能性として、氷晶を形成しない低温下で赤血球を保存した場合の保存性能について検討した。

同型の400mL採血由来保存前白血球除去製剤(RCC-LR-2)を2本プールした。十分に混和後、200mL用血液分離バッグ4本に分割し、以下の条件下で保存した。RCC-LRの品質に及ぼす低温の影響をみるために0、4、10、20℃の条件で144時間保存した。RCC-LRの保存機器として、0℃(電子氷温インキュベーター：二宮産業NH60S)、4℃(薬用ショーケース：日本フリーザBMS-500F3)、10℃および20℃(Cool incubator：三菱電機エンジニアリングCN-25C)を用いた。経時的にサンプリングを行い、pH試験、アデノシン5'-三リン酸(ATP)濃度、2,3-ジホスホグリセリン酸(2,3-DPG)濃度、上清ヘモグロビン(Hb)濃度、血球関連試験について検討した。各条件での測定値について、Two-way ANOVAおよび4℃を対照とし

て Bonferroni Post test により多重比較検定を行った。

C. 結果

1. pH (Fig. 1.)

各保存温度で、時間経過により pH は低下した。0°C 保管で pH が高く維持されており、0, 4, 10°C 保存では、保存時間による差は見られなかったが、20°C で 48 時間以降に有意差が認められた。

2. 上清 Hb 濃度および溶血率 (Fig. 2.)

上清 Hb 濃度および溶血率は、保存温度ごとに経時変化により上昇する傾向が見られた。0°C 保管が最も溶血が多い傾向にあったが、有意差は認めなかった。

3. ATP 濃度 (Fig. 3.)

0°C 保存では 4°C に比べ低値を示していたが保存時間による濃度の減少は見られなかった。10°C 保存では 4°C と比べて大きな変化は見られなかった。10, 20°C 保存では、保存時間によりピーク値 (24 および 72 hour) を迎え、その後減少した。20°C 保存では、144 時間の保存で 4°C に比べて低値を示した。

4. 2,3-DPG 濃度 (Fig. 4.)

各保存温度で時間経過とともに濃度は減少していた。4°C に比して 20°C 保存では 24 時間以降大きく減少し、10°C 保存で 48 時間以降、減少していった。0°C 保存では、4°C 保存に比べ時間経過後も高値に保たれていた。

D. 考察

大規模自然災害等に備えた新たな赤血球製剤の保存方法の開発を進めることは

重要であるがまず、現行の赤血球製剤の性状について検討することとした。輸血用血液製剤はその品質を維持するために定められた貯法のもと保管され、不必要に保存温度の範囲外に曝してはならない。また、輸送時においても製品の安全性を担保しなければならない。しかし、大規模災害時には停電等で適正な保管および輸送温度を保てない場合があり得る。本来有効期間中 4°C で保存すべきであるが、何らの事情により保管温度が上昇してしまい代謝が亢進し、ATP が消費されているが、これを有効期間の短縮と捉えることも可能と思われる。保存中に一過性に温度が上昇した RCC-LR の保存 18-20 日目の ATP 残存量は 70% と RC-MAP を 42 日間保存した場合の 50% を上回っており生体内生存率については 70% 以上を保持している可能性がある。ATP の残存率のみで赤血球の生体内生存率を論じることはできないが、緊急避難的な使用においては検討に値するものと思われた。しかし、赤血球輸血の目的である酸素運搬能に関与する 2,3-DPG は、保存あるいは輸送時等における温度上昇の影響を受け速やかに消失しまう。

血液の長期保存を目的として、赤血球の物質代謝を抑制するため、0°C 以下で保存する試みが報告されている。三島らは、全血製剤を、精度良く温度管理された氷温区(-0.4°C)と冷蔵区(4°C)を設けて保存し、両者の各指標とする数値の変化を経時的に比較した。氷温区は冷蔵区に比べ、乳酸の産生が少なく、pH の降下も抑え、ATP、2, 3-DPG を高値に保持したが、遊離ヘモグロビン値は、氷温区はやや高値を示した。恒

温庫内の温度振幅を小さく抑えた環境下で、全血製剤を氷温域に保存した場合、遊離ヘモグロビン値は高くなるが血液の代謝を抑制し、輸血後の赤血球の寿命と相関するATPの保持や、鮮度の指標となる2,3-DPGを高値に保つことに優れたことから、氷温域は全血製剤の長期間の品質保持に有効性を示すと報告している。また山村は、赤血球製剤の過冷却状態での保存に関して検討した。0°C、-2°Cおよび5°Cの比較から、糖代謝は保存温度の低下により抑制され、ATPは0°Cと-2°Cで良好に保持され赤血球形態も良好であるが、一方溶血は-2°Cで増加することから、0°Cが適温であると報告している。

ただし、これらの検討は保護効果を有する血漿存在下（全血）での検討でRCC-LRでは検討されていない。RCC-LRは、全血採血後、強遠心により血漿の90%以上を除去し、マンニトールを含むMAP液に浮遊したものである。これまで、2~8度の温度で保存した場合、溶血を防止できることが報告されている。しかしながら、0°C以下で保存した場合の赤血球性状について検討した報告はない。三島らも述べているようにこのような0~5°Cの温度の影響を検討する場合、温度振幅を抑えた状態で精度よく温度を保持することが必要である。そこでまず、氷温冷蔵庫と電子氷温インキュベーターの温度振幅について検討した。電子氷温インキュベーターの方が氷温冷蔵庫より温度振幅が小さいことを確認し使用することとした。しかしながら、保存温度帯として-2~3°Cでも検討したいところであったが、外気の影響を受け、安定的に温度を維持することが困難であったため、今回の検討で

は0°Cで保存することとした。

今回の検討でも0°C保存において、赤血球の酸素運搬能の指標である2,3-DPGは良好に維持可能なことが示されたが、全血の場合と異なり、溶血の亢進が認められた。赤血球輸血の本来の目的は組織に酸素を供給することであることから、より有効な輸血とするためには、赤血球の酸素運搬能の向上が必要であるが、現行の赤血球保存液MAPでは2,3-DPGを維持できないことから、赤血球用保存液の改良が必要と考えられた。

E. 結論

RCC-LRについて、0、4、10、20°C保存と時間経過による品質への影響について検討した。0°Cでは、保存144時間でもpH、ATP、2,3-DPG等の項目については良好に保たれており、赤血球の品質に影響はないと思われたが、上清Hbおよび溶血率の上昇が認められ、製剤中の電解質濃度に注意する必要があると思われた。RCC-LRを現行より低温下に保存することで2,3-DPGの維持は良好であるものの、溶血亢進が認められることから、保存温度は現行のままとし、赤血球内のエネルギー代謝経路についての解析を進めることで、2,3-DPG維持に有効な成分を見出すなど赤血球用保存液の改良を進める。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Nogawa M, Shiba M, Matsumoto S, Okazaki H, Satake M, and Tadokoro K. Comparison of in vitro characteristics of apheresis-derived platelet concentrates with low residual plasma during storage in different platelet additive solutions. *Vox Sang.* Vol 101, Suppl.2, 25. 2011.

Naito Y, Mori J, Chatani M, Onodera H, Yamaguchi R, Shinozaki K, Shiba M, Okazaki H, Satake M, and Tadokoro K. Optimal plasma volume for blood component used for exchange transfusion. *Vox Sang.* Vol 101, Suppl.2, 71. 2011.

Nogawa M, Naito Y, Chatani M, Onodera H, Shiba M, Okazaki H, Matsuzaki K, Satake M, Nakajima K, and Tadokoro K. Platelet components, Platelet concentrates, Platelet function, Apheresis Parallel comparison of apheresis-collected platelet concentrates stored in four different additive solutions *Vox Sang.* Vol 105, 4, 305-312. 2013.

解後の品質について. 第 61 回日本輸血・細胞治療学会総会. 横浜, 2013.

2. 学会発表

内藤 祐、森 純平、茶谷 真、小野寺 秀一、篠崎 久美子、名雲 英人、南齋 博英、柴 雅之、岡崎 仁、佐竹 正博、田所 憲治. 合成血-LR の血漿添加量についての検討. 第 59 回日本輸血・細胞治療学会総会. 東京, 2011.

内藤 祐、森 純平、茶谷 真、小野寺 秀一、柴 雅之、秋野 光明、本間 稚広、加藤俊明、池田 久實、高本 滋、田所 憲治. 新規赤血球二次製剤 (洗浄赤血球、解凍赤血球、合成血) の製剤設計変更および有効期間延長について. 第 61 回日本輸血・細胞治療学会総会. 横浜, 2013.

森 純平、岩間 輝、茶谷 真、小野寺 秀一、榎本 圭介、金子 祐次、篠崎 久美子、松本 真実、吉田 芳生、内藤 祐、林 宣亭、栗原 勝彦、桑名 敏彦、吉田 昭治、秋野 光明、柴 雅之、岡崎 仁、佐竹 正博、田所 憲治. 成分由来 FFP-LR の融

H. 知的財産権の登録状況

なし

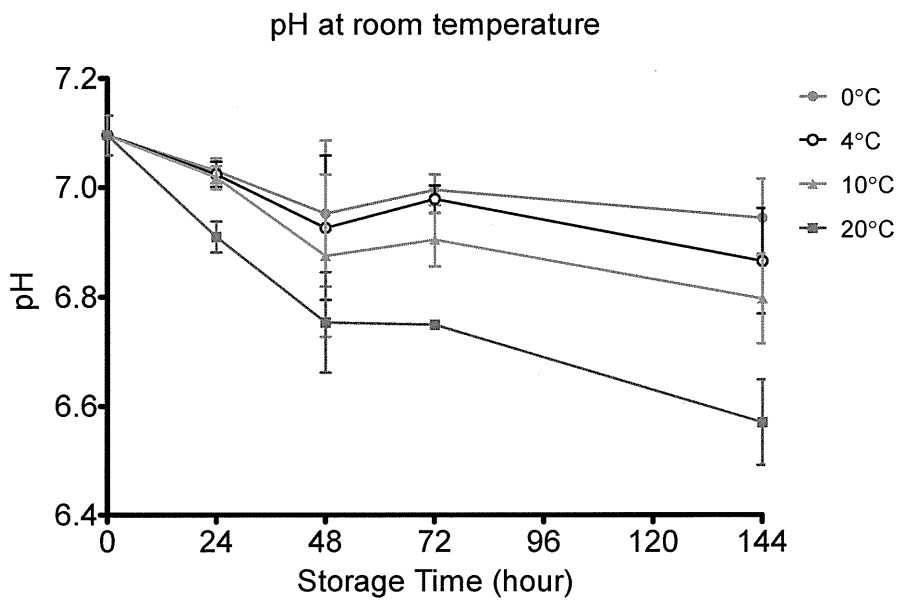


Fig.1. pH at room temperature per each storage temperature (n=3).

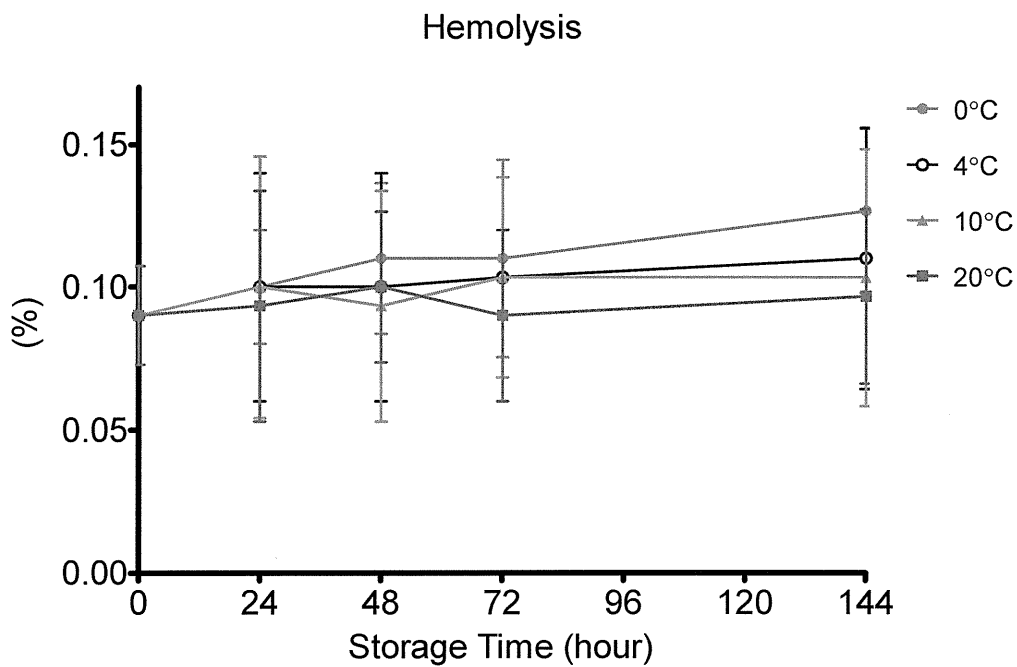
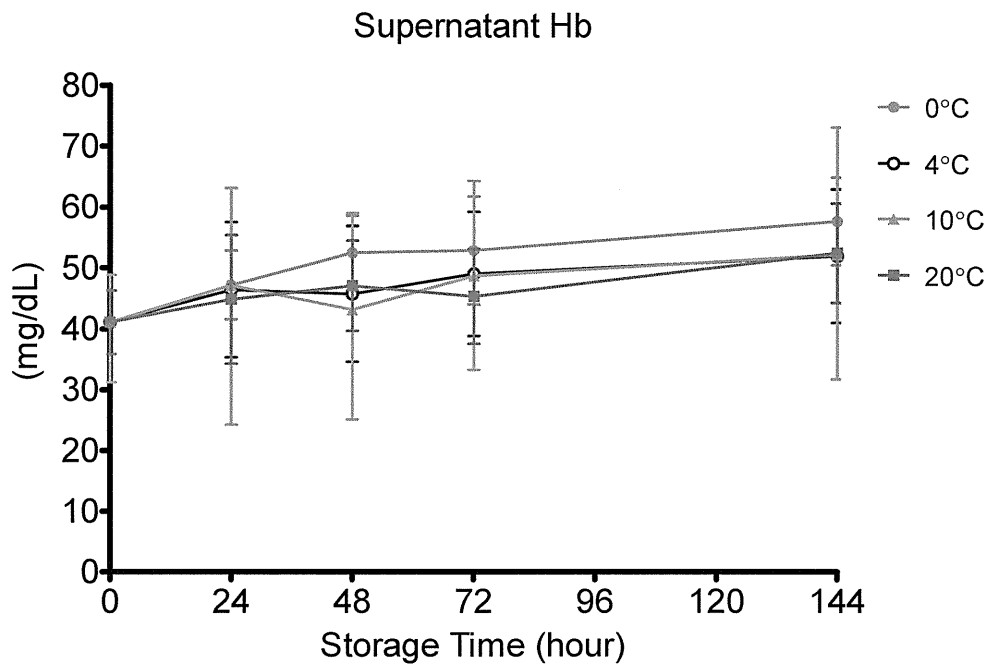


Fig.2. Supernatant Hb and Hemolysis rate per each storage temperature (n=3)

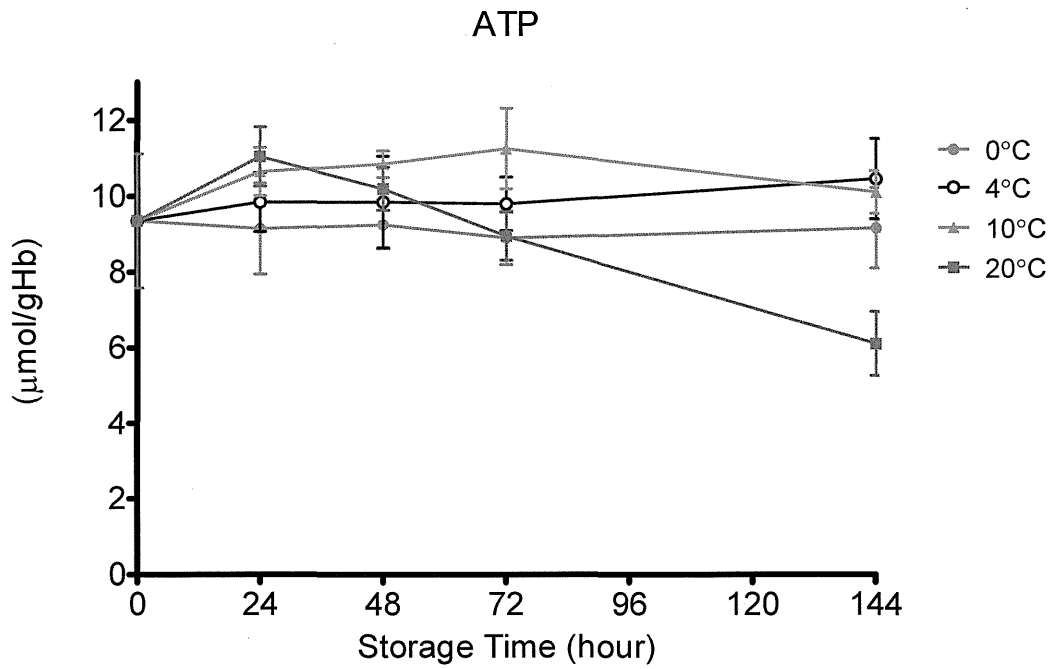


Fig. 3. ATP concentration per each storage temperature (n=3)

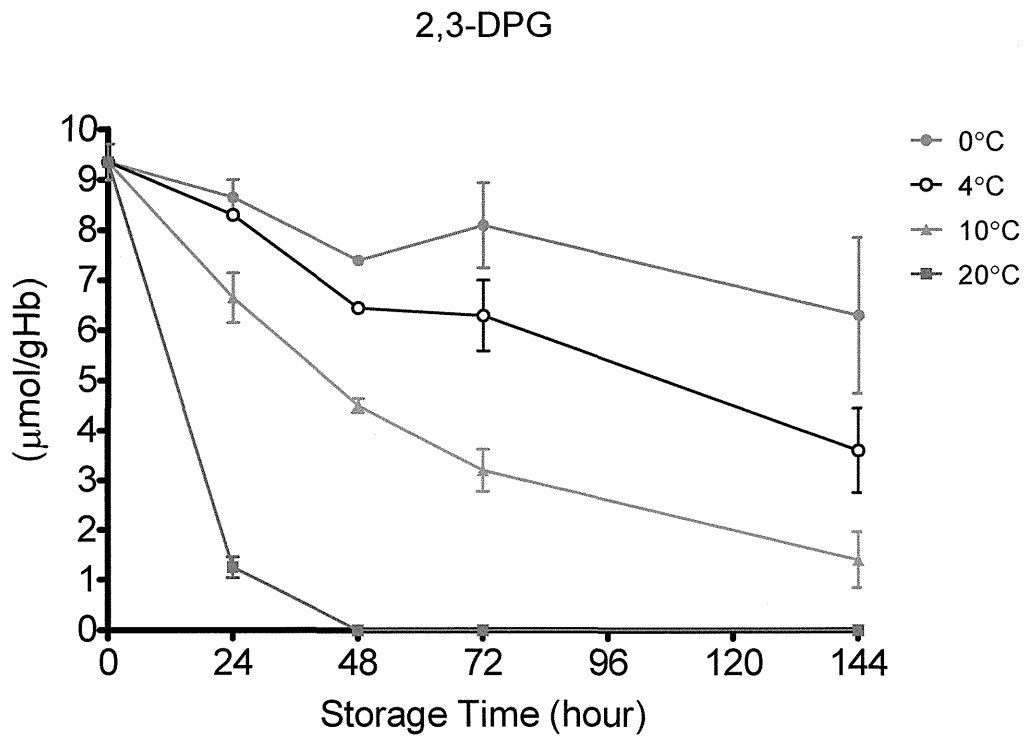


Fig. 4. 2,3-DPG concentration per each temperature (n=3)

厚生労働科学研究費補助金
(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)
分担研究報告書

「大規模自然災害等に備えた血液製剤の保存法と不活化法の開発に関する研究」
低温下における血小板活性化メカニズムの解明と保存への応用

分担研究者：寺田周弘 日本赤十字社 中央血液研究所 研究三課研究一係長
研究協力者：一杉芽美 日本赤十字社 中央血液研究所 血液製剤技術専門員

研究要旨

細菌汚染防止の観点から、濃厚血小板製剤は低温での保存が望ましい。しかし、低温に曝された血小板は生体内寿命が短くなるため実用化されていない。これまでの研究成果から、冷却により生じる血小板の形態変化は冷却条件（温度、時間）によって異なる可逆性を示すことが明らかになった。そこで、本年度は形態変化の可逆性が生体内でどのような意味をもつかを明らかにするため、冷却した血小板の生体内寿命の短さの一因と考えられている血小板 GPIb 複合体の構造変化との関連性について検討した。その結果、形態変化の可逆性が低下すると GPIb 複合体の変化は亢進すること、この変化は冷却(4℃)→加温(37℃)の段階で生じやすいことがわかった。形態変化の可逆性は、GPIb 複合体を介した血小板の生体内代謝を反映していることが示唆された。今後、血小板の低温保存を考えるには、冷却過程と加温過程の両方を考慮する必要があるだろう。

A. 研究目的

濃厚血小板製剤 (platelet concentrate, PC) の需要は年々増加する傾向にあり、安全な製剤を安定して供給することは重要な課題である。現在、PC は室温 (22℃) で水平振とうしながら保存することと規定されているが、細菌汚染防止の観点から他の血液製剤同様、PC も低温で保存するほうが望ましい。しかし、低温に曝された血小板は活性化(cold activation)して、輸血後の生体内寿命が短くなるため実用化されていない。この低温保存した血小板の生

体内寿命の短縮は形態変化や膜組成の変化が深く関係していると言われている。血小板は循環血液中では disc (円盤) 状の形態をしているが、低温に曝露されると sphere (球) 状に丸くなり、偽足を伸ばすなどの形態変化をおこすことが古くから知られている。冷却した血小板の形態変化は低温下での活性化を解明する上で重要な血小板機能と言える。

一方、形態変化は活性化の指標として鋭敏であるが、凝集計のように標準的な測定手段はなく、客観的な評価は難しい。透過

光や散乱光など光学的な手法を用いて形態変化の測定は試みられてきたが、凝集など二次的な反応も影響を及ぼすので形態変化のみの測定はできず、定性的な評価に留まっている。我々は、disc 状血小板比率と散乱光の高周波成分(高周波散乱光)に良い相関がある点に着目し、形態変化のみを特異的に捕捉できる測定系を開発した。本法を用いてこれまでのところ、冷却により生じる血小板の形態変化は冷却条件(温度、時間)によって異なる可逆性を示すことが明らかになった。そこで今回、形態変化の可逆性が生体内でどのような意味をもつかを明らかにするため、冷却した血小板の生体内寿命の短さの一因と考えられている血小板 glycoprotein (GP) Ib 複合体の構造変化との関連性について検討した。

B. 研究方法

1) 血小板試料の調製

血小板試料として、常法に従い採取した成分採血由来 PC を用いた。この PC あるいは自己血漿により調製した PRP (血小板最終濃度 20×10^4 個/ μ L) を 4~48 時間、 4°C 保存した

2) 形態変化の評価

4°C 保存した PC を PBS に希釈浮遊させて測定用試料(血小板最終濃度 $8 \sim 10 \times 10^4$ 個/ μ L)とし、高周波散乱光法を用いて形態変化を測定した。測定した散乱光データは攪拌する角速度とサンプリング時間に依存した周波数データとして周波数解析を行い、高周波散乱光成分($0.5 \sim 3.0\text{Hz}$)を抽出した。抽出した散乱光成分の振幅の大きさ(*amp*)を形態変化の指標(disc 状血小板比率)とした。*amp* は散乱強度の実効値として算出し、冷却前の *amp* を 1 とし、冷却後、加温後はその相対値で示した。

3) GPIb 量の測定

冷却条件の異なる PRP (血小板最終濃度 20×10^4 個/ μ L) を FITC 標識抗 GPIb α モノクローナル抗体 (SZ2, Beckman Coulter) で、室温で 20 分間染色した。1%パラホルムアルデヒドで固定後、フローサイトメーター (Cytomics FC 500, Beckman Coulter) で測定した。冷却前の GPIb α の平均蛍光強度を 1 とし、冷却後、加温後はその相対値で示した。

C. 研究結果

1) 冷却/加温による形態変化の可逆性

保存→輸血の温度変化を想定して、冷却(4°C)→加温(37°C)したときの形態変化について高周波散乱光法を用いて測定した(図1)。 4°C で4時間冷却後加温すると、*amp* はしだいに大きくなり ($0.15 \pm 0.07 \rightarrow 0.41 \pm 0.07$, $p < 0.01$)、disc 状血小板への可逆的な形態復帰が認められた。しかし、 4°C で48時間冷却後は加温しても *amp* はほとんど変わらず、disc 状血小板への可逆的な形態復帰は認められなかった。

2) 冷却/加温による GPIb 複合体の変化

4°C で冷却した直後と、さらに 37°C で1時間加温した後の GPIb 量を比較した(図2)。 4°C で4時間冷却後の GPIb 量は 0.87 ± 0.13 、加温後は 0.91 ± 0.12 であり、有意な差は見られなかった。しかし48時間では、冷却後の GPIb 量が 0.94 ± 0.06 に対し、加温後では 0.70 ± 0.14 と有意な低下を示した($p < 0.05$)。

D. 考察

高周波散乱光を用いて、cold activation の指標である血小板の形態変化を測定した。 4°C で4時間冷却後、加温すると形態は可逆的に約40%復帰した。一方、 4°C で48時間冷却すると可逆的な形態復帰は損なわれた。4時間冷却直後の GPIb 量は冷却前に比べてわずかに低下したが、加温に

よる影響はなかった。48 時間冷却直後の GPIb 量は 4 時間冷却とほぼ同じだったが、加温により有意に低下した。形態変化の可逆性と GPIb 量の間には関連があることが示唆された。可逆的な形態変化と GPIb 複合体がどのように関わっているか詳細なメカニズムは不明であるが、GPIb 複合体は血小板の膜骨格と細胞骨格を繋ぎ止めて形態保持を担っていると言われている。GPIb の構造変化が形態変化の可逆性へ影響を与えている可能性がある。最近の報告によれば冷却した血小板の生体内寿命が短い原因として、GPIb 複合体の構造変化とそれともなう肝代謝が挙げられている。この代謝メカニズムは十分明らかになっていないが、cold activation で生じる形態変化は GPIb 複合体とともに冷却した血小板の生体内代謝解明する手掛かりになるかもしれない。

今回我々は、「冷却時間+加温過程」が形態変化の可逆性や GPIb の構造変化に影響を与えて、結果的に冷却した血小板の生

体内寿命を短くしている可能性を示唆した。従来は単に冷却方法の議論ばかりされてきたが、今後は、どのくらい冷やして、どのように温めるかを考える必要がある。形態変化の可逆性と GPIb 複合体の構造変化はその良い指標となるだろう。

E. 結論

形態変化の可逆性が低下すると GPIb 複合体の構造変化は亢進すること、この変化は冷却 (4°C) →加温 (37°C) の段階で生じやすいことがわかった。形態変化の可逆性は、GPIb 複合体を介した血小板の生体内代謝を反映していることが示唆された。今後、血小板の低温保存を考えるには、冷却過程と加温過程の両方を考慮する必要があるだろう。

G. 研究発表

発表予定である。

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

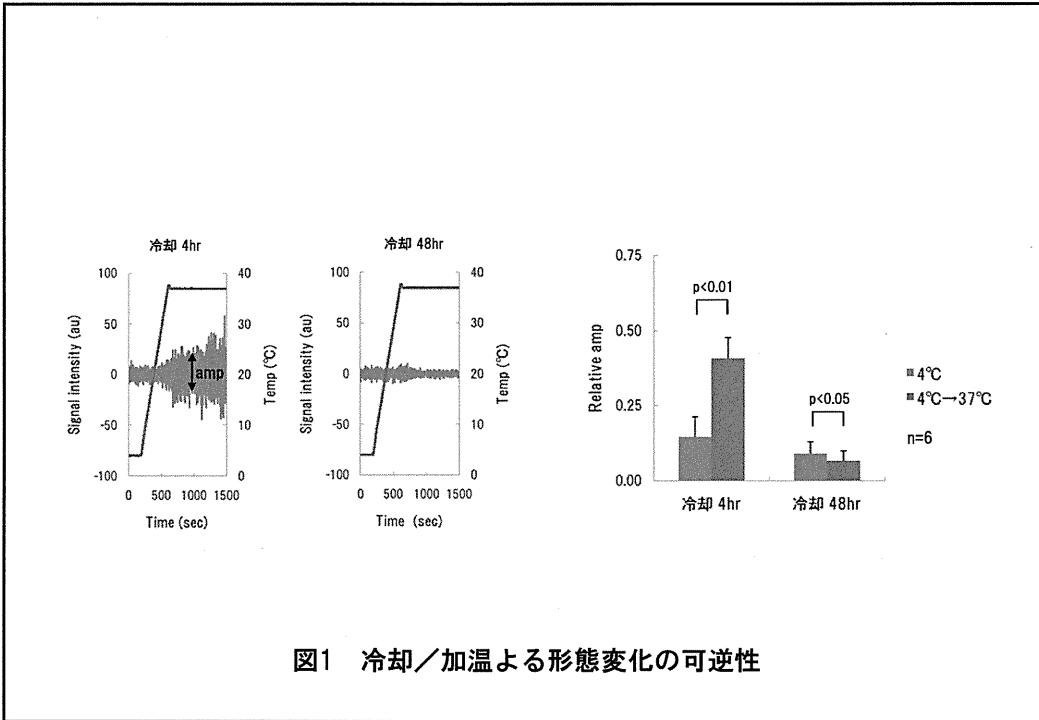


図1 冷却/加温による形態変化の可逆性

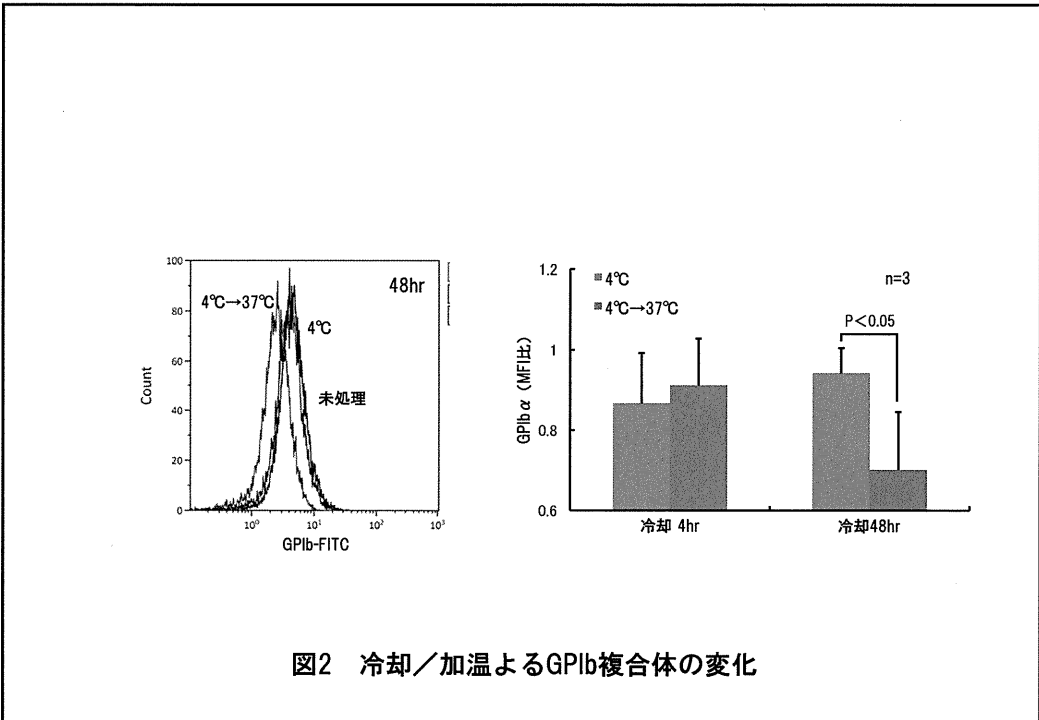


図2 冷却/加温によるGPIIb複合体の変化

厚生労働科学研究費補助金

(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)

分担研究報告書

赤血球製剤における病原体不活化法の開発

研究代表者 岡田義昭 埼玉医科大学病院 輸血・細胞移植部 部長

研究要旨

1. 赤血球製剤の不活化法は開発されていないが、我々は紫外線照射による病原体不活化が可能であることを示した。紫外線照射による赤血球へのダメージを少なくするために保護剤を検討したところ、意外にもメチレンブルー（以下 MB）が可視光と組み合わせることによって赤血球製剤でも不活化効果が認められた。可視光による赤血球へのダメージは溶血を見る限り少なかった。牛下痢症ウイルスやシンドビスウイルスなどシングル鎖の RNA ウイルスは 3Log 以上不活化され効果的だった。一方、二重鎖 DNA ウイルスである仮性狂犬病ウイルスに対しては全く効果が認められなかった。ウイルス遺伝子の性状によって感受性が異なることが示唆された。
2. 赤血球製剤から病原体を不活化するために異なる不活化を組み合わせることは赤血球の劣化につながる。そこで赤血球製剤に応用できる病原体の除去法としてゼーター電位による病原体の除去を試みた。ゼーター電位によりシンドビスウイルスや仮性狂犬病ウイルスは、吸着によってウイルス量は約 1 /10 に減少した。

A. 研究目的

輸血用血液は、スクリーニング検査の進歩に感染症の発生頻度は激減した。しかし、全ての病原体をスクリーニングすることは困難であり、更なる輸血用血液製剤の安全性を向上させるためには、病原体不活化技術の開発は不可欠である。既に血小板製剤や新鮮凍結血漿では不活化技術が開発され、一部の国や地域で導入されている。一方、最も重要な赤血球製剤の病原体不活化法はいまだ実用化されていない。我々は、赤血球製剤に使用できる新しい病原体の不活化技術の開発を目指し、本研究を行っている。

昨年度は、短波長の紫外線 (UV-C) 照射による赤血球製剤の病原体不活化によって生じる赤血球の劣化を予防するためにビタミン C などの抗酸化剤を添加してその影響を解析した。抗酸化剤を添加すると不活化効果も減弱することもあり、解決することは困難であった。検討していた最中にメチレンブルー (MB) が蛍光灯の可視光の照射によって病原体が不活化できること (これは既に知られていることだが) を認めた。そこでヘマトクリット 40% の赤血球製剤においても病原体が不活化できるのか、検討した。MB は、メトキシヘモグロビン血症の