

201427007A

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

(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業)

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 26 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 27 (2015) 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

(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業)

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 26 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 27 (2015) 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-P11

#### 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 P12-P19

#### 3. 赤血球製剤における病原体不活化法の開発

岡田 義昭 P20-P25

#### 4. 血液製剤における C 型肝炎ウイルスの加熱による不活化機構の解明

下池 貴志 P26-P32

#### 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

野島 清子 P33-P40

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表

P41

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  
(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業)

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. 赤血球の生体内生存率に関与する赤血球変形能を検討し、20°Cで66時間保存しても変形能の低下を認めなかった。これまでの検討から10°Cで72時間、20°Cで66時間放置しても、品質に関するパラメーターには大きな影響は認められなかった。
2. 血小板の長時間冷却と加温で生じる形態回復の低下(不可逆的な形態変化)とGPIb複合体の質的・量的変化の関連性、さらにこれらが血小板機能へ及ぼす影響について検討した。その結果、加温にともなうGPIb複合体の部分的な切断が形態回復を抑制している可能性を認めた。血小板の止血機能に対しては、加温に加えて長時間冷却も影響を及ぼしていることが示された。
3. メチレンブルーと赤色光を組み合わせることで、白色光よりも赤血球液において飛躍的に不活化効率が向上した。また、赤血球に吸収されることなく深い部位まで到達でき、深さ10mmの赤血球液においても3Logの不活化が認められた。
4. C型肝炎ウイルスの60°C液状加熱による不活化の機序を解析し、加熱によってHCVの核酸が障害されるのではなく細胞への吸着、又は侵入課程が障害されることを明らかにした。
5. 培養可能なC型肝炎ウイルスクローン(JFH-1)を用いてエタノール25%のCohnフラクション法を行い、HCVの不活化について解析した。上清のFra.(II+III)Sのアルブミン分画と、沈殿のFra.(II+III)Pのグロブリン分画に感染性が残存していた。また、血漿由来HCVは分画工程でJFH-1と類似した挙動を示した。これらは、ウイルス及び感染性の解析から牛下痢症ウイルスは適したモデルウイルスであることが示された。

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 課長  
寺田 周弘 日本赤十字社血液事業本部  
中央血液研究所 係長  
野島 清子 国立感染症研究所 研究員  
下池 貴志 国立感染症研究所  
主任研究官

#### A. 研究目的

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、適正な温度が保持できなくなった赤血球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した。また、本研究班では、赤血球製剤に使用できる病原体不活化法の開発を目指した。

また、HCV の培養が可能な JFH 株と血漿由来 HCV を用いて Cohn の分画法を行い、感染性とウイルス粒子の上清及び沈殿分画への挙動を解析し、ウシ下痢症ウイルス (BVDV) との相違を解析した。

#### B. 研究方法と結果

##### 1. 赤血球製剤の保存方法の開発

同型 RCC-LR-2 を 3 本プールし混和後、200mL 用血液分離バッグ 6 本に再分割し、以下の条件下で保存した。RCC-LR の品質に及ぼす温度依存的な影響をみるために 4, 10, 15, 20, 25, 30°C の条件で 96 時間保存した。経時的にサンプリングを行い、pH 試験、ATP 濃度、2, 3-DPG 濃度、上清 Hb 濃度、血球関連試験、赤血球形態および赤血球変形能について検討した。

赤血球の変形能は、RheoScan-Dsystem (Sewon Meditech, Inc.) を用い測定し、Elongation index で評価した。pH は温度に依存して低下し、ATP 濃度は 15°C までは影響がみられず、20°C 以上では温度に依存して低下した。2, 3-DPG 濃度は温度に依存して低下し、特に 20°C 以上で著しく低下した。上清 Hb 濃度は 25°C までは影響はみられなかった。体内での赤血球の生存率を反映するとされる赤血球変形能は 20°C で 66 時間保存しても低下しなかった。

##### 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

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。PC を 22°C 及び 4°C において 4 時間 (短時間) または 48 時間 (長時間) 静置保存した (n=3)。4°C で冷却後、37°C 水浴中で 1 時間加温した。それぞれ、pH 及びグルコース濃度、形状、フローサイトメトリーによる血小板膜タンパク (GPIb $\alpha$ 、GPIX、GPV)、上清中の GPIb の量、リストセチンによる血小板凝集機能

等を解析した。血小板を冷却すると22℃で保存した場合と比較してpH やグルコース濃度の変化は小さいものの、形態変化が顕著であった。冷却時間が長くなると血小板の形態変化の可逆性は低下を示した。冷却後の加温がGPIb 複合体に及ぼす影響を調べたところ、長時間冷却後の加温でGPIb  $\alpha$ 量は約30%低下し、上清中に遊離のGPIb  $\alpha$ が検出された。GPIb複合体の切断はメタロプロテアーゼADAM17 によるものが知られており、これらの結果は、血小板膜表面でGPIb 複合体の一部が切断を受けたことを示唆している。GPIb 複合体の質的・量的変化が血小板の形態変化に関与することが推察され、長時間冷却後の加温の過程を工夫することで、GPIb 複合体を維持し、冷却血小板の生体内寿命を改善する可能性が見出された。しかし、GPIb 複合体を介するリストセチン凝集は、48 時間目に4℃保存と4/37℃で20%低下したことから、機能面には加温よりも長時間冷却が影響を及ぼしていることが示唆された。今後、血小板の低温保存方法を開発するためには、冷却と冷却後の加温の両過程が及ぼす影響を考慮する必要がある。

### 3. 赤血球製剤における病原体不活化法の開発

昨年度はメチレンブルー (MB) 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%の赤血球液において牛下痢症ウイルスやシンドビスウイルスが 3 Log 以上不活

化できることを示した。今年度は、不活化効率を向上させるために単波長の赤色光を用いて検討を行なった。コントロールとして昨年度検討した白色光を用いた。MB10  $\mu$ M に 20,000 ルクス照射を 10 分間(約 0.6J)、20 分間(約 1.2J) それぞれ行なった。深さ 4 mm では 0.6J の赤色光の照射によって不活化効率が飛躍的に向上し白色光より約 1000 倍高まった。さらに深さ 10mm では 1.2J の照射によってシンドビスウイルスを約 3Log 不活化することができた。赤色光を用いることで赤血球に吸収されることなく深い部位まで達するためと考えられた。

MBの誘導體と赤色光を用いて同様の件で不活化効率を検討し、MBよりも低濃度で強い不活化活性が認められたが、細胞毒性もあった。細胞毒性が認められない濃度での不活化活性はMBの約 10倍高かった。照射後除去するなど至適条件を検討する必要がある。

### 4. C型肝炎ウイルスの加熱による不活化機構の解明

培養可能な JFH-1 株を用いて 60℃、10 時間の液状加熱を行なうと効率良く不活化されることを明らかにして来た。今年度は、そのメカニズムの解析を行なった。60℃、10 時間の不活化前後の検体から RNA を抽出し、HCV-RNA 量を RT-PCR で比較したところ不活化前後で変化しなかった。また、不活化前後の HCV-RNA を細胞にトランスフェクションしたところ感染性を有する HCV が得

られた。その力価も著明な差は認められなかった。また、不活化前後の HCV を細胞に感染させ、1 時間後に細胞から RNA を抽出し、HCV-RNA 量を解析したところ、不活化処理した HCV は細胞への吸着、侵入が不活化前よりも 3Log 低下していた。

##### 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

血漿分画製剤はプール血漿を 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実験室レベルで Cohn エタノール法により分画法を確立した。血漿に培養可能な HCV 株である JFH-1 とウインドー期の HCV 陽性血漿をスパイクし、Cohn エタノール分画法により分画、HCV の感染性、及びウイルス粒子がどの画分に移行するかを検討した。また、HCV のモデルウイルスである牛下痢症ウイルスについても同様に解析し、HCV との相違を解析した。25%エタノールで分画すると上清の Fra. (II+III) S と沈殿の Fra. (II+III) P に感染性が認められ、25%エタノールでは不活化されずに感染性が残存した。また、JFH-1 と血漿由来 HCV はウイルス粒子の挙動に差は認めなかった。牛下痢症ウイルスも同様な挙動を示した。

##### C. 考察

赤血球製剤が災害等で保存温度の管理ができなくなった場合を想定して各種温度に

保存した場合の品質の変化を解析した。20℃以下に保った場合、66 時間程度はパラメーターからは赤血球の品質に著明な差は、認められなかった。

また、血小板の保存方法の研究では、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。低温保存した後加温した血小板の膜タンパクをフローサイトメトリーを用いて解析したところ GPIb $\alpha$  が切断されることが判明し、血小板の質的・形態変化をもたらしていることが推察された。一方、リストセチンによる凝集も抑制されたことから低温保存と加温がそれぞれ血小板に影響を与えていることが示唆された。

赤血球の病原体不活化法の開発では、可視光を色々な波長が混在する白色光から単波長の赤色光に変えたところ赤血球に吸収されずに深部まで到達することが期待でき、その結果、不活化効率が大幅に向上した。また、10mm の深さの赤血球液も 3Log 程度不活化できるようになった。LED ランプを用いることで熱を生じることがなく高エネルギーの照射も可能になった。今回は、白色光との比較のため 20000 ルクスで検討したが、50000 ルクスの照射も可能である。

HCV の培養系を用いた液状加熱による不活化の機序解析では、感染性を失ったウイルスが RNA を保持していることは驚きであった。また、細胞への吸着あるいは侵入過程が障害されたために感染できないことを明らかにすることができた。このような解析は血漿分画製剤の不活化関係では例がな

い。

Cohn のフラクションでは、25%エタノールによる分画法を JFH-1、HCV、牛下痢症ウイルスの3つを用いて検討し、3者とも同様な挙動を取ることを示すことができた。JFH-1 が感染者由来の HCV と同じ挙動を取ったことは、血液製剤の不活化を評価する際に特別な HCV でないことを示したことになる。また、牛下痢症ウイルスは、これまで世界中で HCV のモデルウイルスとして血液製剤の不活化・除去の評価に用いられてきた。このウイルスがモデルウイルスとして適切であったことも示すことができた。

#### D. 結論

1. 赤血球製剤の保存温度が適正に保てなくなった災害時では 20℃以下であれば、66 時間程度は品質を保てることが示唆された。
2. 血小板の低温保存における機能変化は、低温保存中及び再加温中に生ずることが示唆された。
3. メチレンブルーと赤色光を組み合わせることによってウイルスの不活化効率が飛躍的に向上した。
4. HCV の液状加熱による不活化機序を解析し、ウイルス核酸の分解ではなく細胞への吸着又は侵入過程が障害されるためであることを明らかにできた。
5. 25%エタノールによる Cohn 分画を行い、JFH-1、血漿由来 HCV、牛下痢症ウイルス間に挙動の差がないことを証明した。

E. 健康危機情報  
なし

#### F. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表
  1. 鈴木雅之、青木麻衣子、加藤光洋、玉栄建次、内野富美子、山田攻、小林清子、池淵研二、岡田義昭：同種骨移植のための骨保管支援業務の現状、第 62 回日本輸血・細胞治療学会総会、平成 26 年 5 月、奈良
  2. 岡田義昭、小林清子、池淵研二：リアルタイム RT-PCR を用いた B19-RNA 定量による B19 感染評価系の開発、第 62 回日本輸血・細胞治療学会総会、平成 26 年 5 月、奈良
  3. 山田攻、加藤光洋、鈴木雅之、内野富美子、小林清子、池淵研二、岡田義昭：当院における産婦人科緊急輸血症例の分析とその対策、第 62 回日本輸血・細胞治療学会総会、平成 26 年 5 月、奈良
  4. 下池貴志、野島清子、脇田隆字、岡田義昭「血液製剤における C 型肝炎ウイルスの不活化機構の解明」第 62 回日本ウイルス学会学術集会 2014 年 11 月 横浜

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし



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  
(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業)

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

大規模災害時において血液を安定供給するには、血液製剤輸送時あるいは保存時の温度等の逸脱した場合の性状について検討しておく必要があると考えられる。そこで、血液製剤の保存温度の影響について検討した。pH は温度に依存して低下した。ATP 濃度は 15°C までは影響がみられず、20°C 以上で温度に依存して低下した。2, 3-DPG 濃度は温度に依存して低下し、特に 20°C 以上で著しく低下した。上清 Hb 濃度は 25°C までは影響はみられなかった。赤血球の生体内生存率に關与する赤血球変形能は、20°C で 66 時間保存しても変形能の低下を認めなかった。

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°C) 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。これまで、ATP 濃度、2, 3-DPG 濃度および上清 Hb 濃度について検討してきた。今回、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、赤血球の生体内生存率に關与す

るなど重要な赤血球の機能評価の指標である赤血球変形能について検討した。

B. 研究方法

同型 RCC-LR-2 を 3 本プールし混和後、200mL 用血液分離バッグ 6 本に再分割し、以下の条件下で保存した。RCC-LR の品質に及ぼす温度依存的な影響をみるために 4, 10, 15, 20, 25, 30°C の条件で 96 時間保存した。経時的にサンプリングを行い、pH 試験、ATP 濃度、2, 3-DPG 濃度、上清 Hb 濃度、血球関連試験、赤血球形態および赤血球変形能について検討した。

赤血球の変形能は、RheoScan-Dsystem (Sewon Meditech, Inc.) を用い測定し、Elongation index で評価した (図

-1)。

### C. 結果

RCC-LR を各温度条件で保存した場合、pH は温度に依存して低下した。ATP 濃度は 15℃までは影響がみられず、20℃以上で温度に依存して低下した。2, 3-DPG 濃度は温度に依存して低下し、特に 20℃以上で著しく低下した。上清 Hb 濃度は 25℃までは影響はみられなかった。赤血球変形能は 20℃で 66 時間保存しても低下しなかった。

### 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性状についても把握しておくことは重要である。そこで、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。

2, 3-DPG 濃度は温度に依存して低下、特に 20℃以上で著しく低下したが、ATP 濃度は 15℃までは影響がみられず、

20℃以上の温度で低下することが示された。上清 Hb 濃度についても 25℃までは影響はみられなかった。赤血球変形能は 20℃で 66 時間保存しても低下しなかった (図-2)。赤血球変形能は表-1 に示す要因の影響を受け、赤血球膜の粘弾性、赤血球内粘度、赤血球形態 (表面積/容積比) が挙げられる。30℃で保存した場合、MCHC が低下していること、溶血が亢進していることから、この変形能低下の機序として赤血球形態の球状化によるものと考えられた。

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り、赤血球の酸素運搬能と共に赤血球の生体内生存率が重要である。今回の結果から、赤血球の生体内生存率に影響する赤血球変形能も 20℃までは 66 時間放置しても低下しないことから、大規模災害等における緊急避難的な場合における使用可能性が示唆された。

### E. 結論

大規模自然災害等に備えた血液製剤の保存法の開発を進める上で、現行の輸血用血液の問題点を把握するためまず、停電等で保管温度を維持できなかった場合を想定した。RCC-LRは 10℃, 72時間、20℃, 66時間放置しても、in vitroにおける品質には大きな影響を認めなかった。

### F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

瀧崎晶弘、松本真美、岩間輝、柴雅之、佐竹正博、田所憲治. 凍結融解を繰り返した400mL全血採血由来新鮮凍結血漿の品質について. 日本輸血・細胞治療学会誌. 印刷中.

### 2. 学会発表

1. 瀧崎晶弘、松本真美、岩間輝、柴雅之、佐竹正博、田所憲治. 凍結融解を繰り返した新鮮凍結血漿の品質について. 第62回日本輸血・細胞治療学会総会. 奈良、2014.

2. 岩間輝、野川誠之、柴雅之、佐竹正博、田所憲治. 自動血球洗浄装置を用いて調製した洗浄血小板の性状評価. 第62回日本輸血・細胞治療学会総会. 奈良、2014.

3. 栗田良、船戸興自、須藤和寛、寛山隆、野川誠之、三好浩之、柴雅之、佐竹正博、中村幸夫、田所憲治. ヒトiPS細胞を用いた高効率赤血球分化誘導法の検討. 第62回日本輸血・細胞治療学会総会. 奈良、2014.

4. 内藤祐、柴雅之、秋野光明、本間稚広、加藤俊明、紀野修一、池田久實、高本滋. 保存温度の変化が照射赤血球濃厚液-LRの品質に及ぼす影響について. 第38回日本血液事業学会総会. 広島、2014.

5. 藤原満博、若本志乃舞、内藤祐、林宜亨、秋野光明、小野寺秀一、榎本圭介、茶谷真、栗原勝彦、柴雅之、本間稚広、加藤俊明、紀野修一、池田久實、高本滋. 全血液の分離までの時間と温度に関する検討～新鮮凍結血漿-LRの品質について～. 第38回日本血液事業学会総会. 広島、2014.

6. 布施久恵、内藤祐、藤原満博、林宜亨、若本志乃舞、秋野光明、小野寺秀一、榎本圭介、茶谷真、栗原勝彦、柴雅之、本間稚広、加藤俊明、紀野修一、池田久實、高本滋. 全血液の分離までの時間と温度に関する検討～赤血球濃厚液-LRの品質について～. 第38回日本血液事業学会総会. 広島、2014.

7. 瀧崎晶弘、大野裕貴、柴雅之、関原章司、佐竹正博、田所憲治. 過冷却制御で凍結した血漿製剤及び赤血球製剤の品質について. 第38回日本血液事業学会総会. 広島、2014.

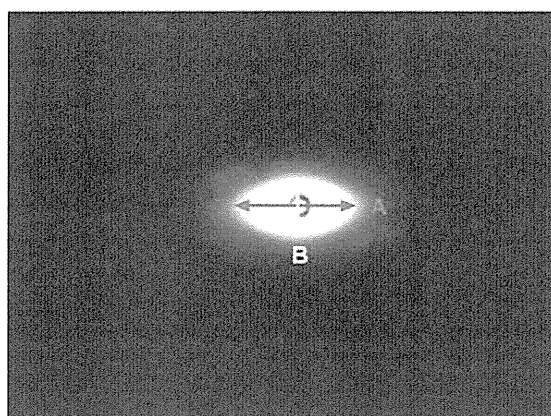
8. 船戸興自、長部隆広、常山初江、栗田良、小笠原健一、柴雅之、内川誠、佐竹正博、中村幸夫、田所憲治. ヒトiPS細胞由来不死化赤血球前駆細胞株を用いた血液型検査用パネル細胞作製の試み. 第38回日本血液事業学会総会. 広島、2014.

9. 一杉芽美、寺田周弘、柴雅之、佐竹正博、田所憲治. 血小板製剤中の血小板粒度分布および凝集状況の検討.

第38回日本血液事業学会総会. 広島、なし  
2014.

H. 知的財産権の登録状況

**Diffraction pattern of deformed cells.  
(RheoScan-D System, Laser :635 nm)**



3Pa

Cell deformability is represented in terms of the elongation index defined as following

$$\text{Elongation Index (EI)} = (A-B)/(A+B)$$

A :The length of major axis in the ellipoidal diffraction image

B :The length of minor axis in the ellipoidal diffraction image

図-1 赤血球変形能の測定方法

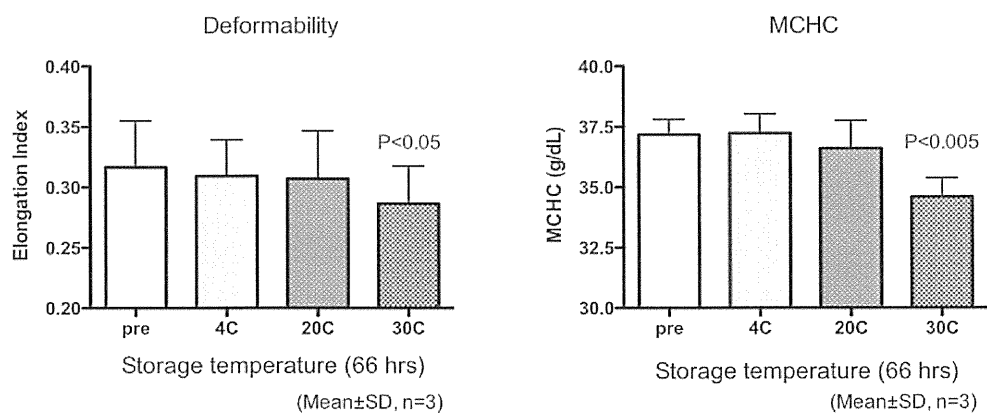


図-2 RCC-LR の変形能に対する保存温度の影響

## 赤血球変形能の要因

1.赤血球膜の粘弾性	
脂質二重層の組成変化	コレステロール／リン脂質比
膜の構造タンパクの性状変化	スペクトリン、アクチン etc
細胞質成分の膜への影響	Caの蓄積、Hbの糖化、NO消費
2.赤血球の内部粘度	
ヘモグロビン濃度	Caイオンの増加、 $\gamma$ 線照射
異常ヘモグロビン	重合化、変性
3.赤血球の形態	
表面積／容積の比率	金平糖状、球状、内包陥没型赤血球

表-1 赤血球変形能に影響する因子

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  
(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業)  
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

細菌増殖防止の観点から、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、冷却が血小板へ及ぼす影響は短時間冷却のみでは生じず、長時間冷却とその後の加温過程で生じやすいことを明らかにしてきた。そこで、本年度は長時間冷却と加温で生じる形態回復の低下（不可逆的な形態変化）と GPIb 複合体の質的・量的変化の関連性、さらにこれらが血小板機能へ及ぼす影響について検討した。その結果、加温にともなう GPIb 複合体の部分的な切断が形態回復を抑制している可能性を認めた。血小板の止血機能に対しては、加温よりも長時間冷却が影響を及ぼしていることが示された。今後、血小板の低温保存方法を開発するためには、冷却と冷却後の加温の両過程が及ぼす影響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、細菌増殖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。

我々はこれまで、開発した高周波散乱光法を用いて、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を報告し、形態変化の可逆性が低下すると Glycoprotein Ib $\alpha$ /IX/V 複合体 (GPIb 複合体) の質的・量的変化は亢進すること、その質的・量的変化は冷却後の加温 (4/37 $^{\circ}$ C) の段階で生じやすいことを明らかにした。そこで、本年度は、形態回復の低下 (不可逆的な形態変化) と GPIb 複合体の質的・量的変化の関連性、さらにこれらが血小板機能へ及ぼす影響について詳細に検討した。

## 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。PC をポリプロピレンチューブに 1.5 mL ずつ分注し、22 $^{\circ}$ C 及び 4 $^{\circ}$ C において 4 時間 (短時間) または 48 時間 (長時間) 静置保存した (n=3)。4/37 $^{\circ}$ C は冷却後、37 $^{\circ}$ C 水浴中で 1 時間加温した。

### 2) pH 及びグルコース濃度の測定

pH 及びグルコース濃度は血液ガス分析装置 (Rapid Point、シーメンス) で測定した。

### 3) 走査型電子顕微鏡観察

0.2% グルタルアルデヒド溶液で試料を 1 時間固定、エタノール脱水、真空蒸着装置 (JFC-1600、JEOL) で白金コーティングを施し、走査型電子顕微鏡 (JCM-5700、JEOL) で観察した。

### 4) 血小板形状の評価

1% パラホルムアルデヒド溶液で試料を固定 (血小板最終濃度  $5 \times 10^4$  個/ $\mu$ L)、画像解析型粒度分布計 (IF-200nano、ジャスコ) を用いて測定した。粒子径と粒子形状の解析結果から球状血小板領域と微小凝集領域を設定した。

### 5) フローサイトメトリーによる血小板膜タンパクの測定

試料を PBS で希釈し (血小板最終濃度  $1 \times 10^4$  個/ $\mu$ L)、各種抗体 [PE 標識抗 CD62P 抗体、FITC 標識抗 GPIb $\alpha$  抗体 (Beckman

Coulter)、FITC 標識抗 GPIX 抗体 (eBioscience)、PE 標識抗 GPV 抗体 (R&D Systems)] で染色し、1% パラホルムアルデヒド溶液で固定後、フローサイトメーター (Cytomics FC 500、Beckman Coulter) で測定した。冷却前の平均蛍光強度を 1 とし、保存後はその相対値で示した。CD62P については陽性率で評価した。

### 6) 上清中の GPIb $\alpha$ の測定

PC を遠心 (2000RPM、6 分、22 $^{\circ}$ C)、上清除去後、Hepes-Tyrode 液 (pH7.4) に血小板を再浮遊させた (血小板最終濃度  $20 \times 10^4$  個/ $\mu$ L)。各条件で保存後の洗浄血小板上清中の GPIb $\alpha$  を抗 GPIb $\alpha$  抗体を用いて、ウェスタンブロッティングにより調べた。

### 7) 血小板凝集機能の評価

自己血漿を用いて、血小板最終濃度  $30 \times 10^4$  個/ $\mu$ L に調整した。GPIb 複合体を介した血小板凝集能を調べるため、1.2 mg/mL のリストセチン (abp) で刺激したときの最大凝集率を血小板凝集能測定装置 (ヘマトレーサー 313M、タイヨウ) で測定した。

## C. 研究結果

### 1) pH、グルコース濃度 の変化

pH とグルコース濃度は、保存にともない 22 $^{\circ}$ C で低下する一方、4 $^{\circ}$ C と 4/37 $^{\circ}$ C において大きな変化は見られなかった (図 1)。

### 2) 血小板形態の変化

静止時の血小板は直径 2~4  $\mu$ m で円盤状の形態を呈するが、冷却すると活性化し、形態を球状に変化させ、偽足を伸ばす (図 2)。画像解析型粒度分布計を用いて測定した結果、保存 4 時間の球状血小板の割合は、22 $^{\circ}$ C 保存で  $29.4 \pm 8.7\%$ 、4 $^{\circ}$ C 保存で  $68.9 \pm 3.3\%$  であり、冷却によって球状化が亢進したが、加温により有意に低下し ( $39.5 \pm 11.2\%$ 、 $p < 0.05$ )、円盤状血小板への可逆的な形態復帰が認められた (図 3)。一方、48 時間冷



却後に増加した球状血小板の割合は加温しても低下せず、形態復帰の可逆性は認められなかった。また、保存期間中の微小凝集の形成を調べると、微小凝集は 4℃保存と 22℃保存で有意差はなく、4 時間から 48 時間に 5 倍増加したものの、4/37℃で有意に低下した ( $p < 0.05$ )。

### 3) 血小板膜タンパクの変化

4 時間冷却後の GPIb  $\alpha$  量は  $0.87 \pm 0.13$ 、加温後は  $0.91 \pm 0.12$  であり、有意な差はみられなかった (図 4)。しかし 48 時間冷却後の GPIb  $\alpha$  量は  $0.94 \pm 0.06$  に対し、加温後では  $0.70 \pm 0.14$  と有意な低下を示し ( $p < 0.05$ )、上清中には遊離の GPIb  $\alpha$  量が増加した (図 5)。一方、GPIX と GPV については、発現量は変化せず、冷却及び加温の影響を受けなかった。CD62P の発現量について保存条件による有意な差は認められなかった。

### 4) 冷却/加温による血小板機凝集能の変化

GPIb 複合体と von Willebrand 因子の結合を調べるため、リストセチンによる血小板凝集能を評価した。4 時間では、22℃保存と比較して 4℃保存及び 4/37℃で凝集能の有意な変化はみられなかった (図 6)。一方、48 時間冷却すると加温の有無に関わらず、22℃保存に比べて約 20% 低下した ( $p < 0.05$ )。

## D. 考察

血小板を冷却すると 22℃で保存した場合と比較して pH やグルコース濃度の変化は小さいものの、形態変化が顕著であった。血小板の形態変化は冷却活性化の重要な指標となるため、画像解析型粒度分布計を用いて詳細に調べた。画像解析型粒度分布計は、高解像度カメラで撮影した粒子画像をもとに、粒子一つ一つの大きさと形状に関する情報を簡便に得ることができる。今

回、冷却保存にともなう球状血小板の割合の変化を調べると、高周波散乱光法による結果と一致し、冷却時間が長くなると血小板の形態変化の可逆性は低下を示した。また、微小凝集の形成は、4℃保存と比較して 4/37℃で有意に低下した。低温保存中に形成された微小凝集の一部は可逆的であることが示唆されたが、詳細なメカニズムは不明である。冷却後の加温が GPIb 複合体に及ぼす影響を調べたところ、長時間冷却後の加温で GPIb  $\alpha$  量は約 30% 低下し、上清中に遊離の GPIb  $\alpha$  が検出された。GPIb 複合体の切断はメタロプロテアーゼ ADAM17 によるものが知られており、これらの結果は、血小板膜表面で GPIb 複合体の一部分が切断を受けたことを示唆している。GPIb 複合体の質的・量的変化が血小板の形態変化に関与することが推察され、長時間冷却後の加温の過程を工夫することで、GPIb 複合体を維持し、冷却血小板の生体内寿命を改善する可能性が見出された。しかし、GPIb 複合体を介するリストセチン凝集は、48 時間目に 4℃保存と 4/37℃で 20% 低下したことから、機能面には加温よりも長時間冷却が影響を及ぼしていることが示唆された。今後、血小板の低温保存方法を開発するためには、冷却と冷却後の加温の両過程が及ぼす影響を考慮する必要がある。

## E. 結論

粒度分布計を用いて血小板形態を観察した結果、長時間冷却後の加温で形態回復の低下を認めた。加温にともなう GPIb 複合体の部分的な切断が形態回復を抑制している可能性がある。GPIb 複合体を介する血小板の止血機能に対しては、加温よりも長時間冷却が影響を及ぼしていることが示唆された。

G. 研究発表

1) 寺田 周弘、一杉 芽美、柴 雅之、  
佐竹 正博、田所 憲治：冷却が血小板の  
血栓形成へ及ぼす影響、第 63 回日本輸血・  
細胞治療学会総会、東京、2015 年

2) 一杉 芽美、寺田 周弘、柴 雅之、  
佐竹 正博、田所 憲治：冷却／加温によ

る血小板膜糖タンパク GPIb 複合体の質  
的・量的変化、第 63 回日本輸血・細胞治  
療学会総会、東京、2015 年

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

図1. pH、グルコース濃度の変化

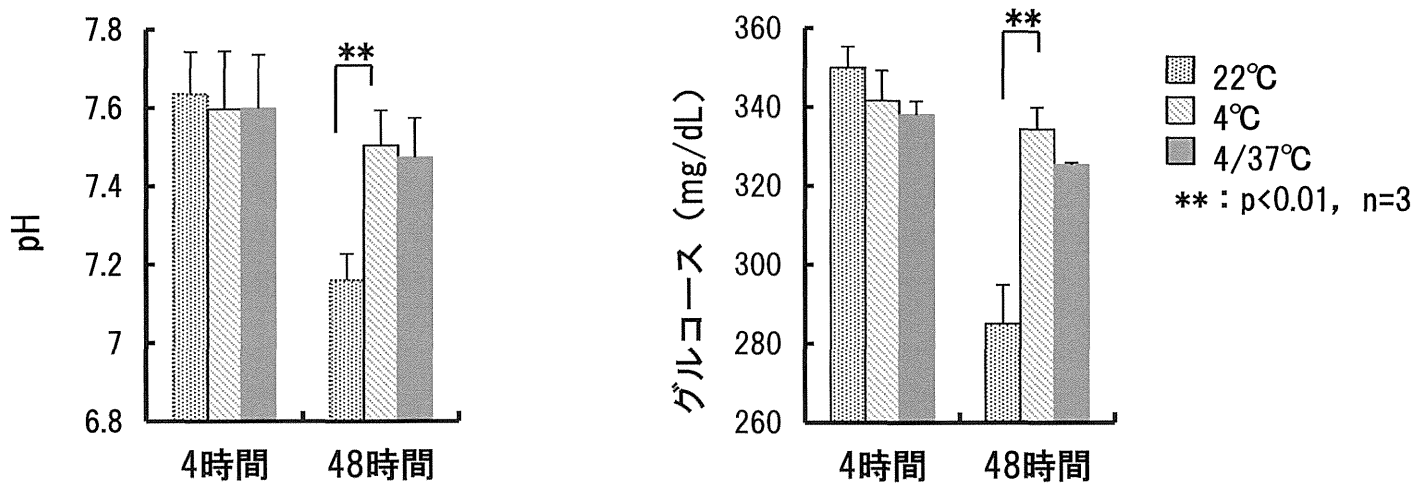


図2. 電子顕微鏡による観察

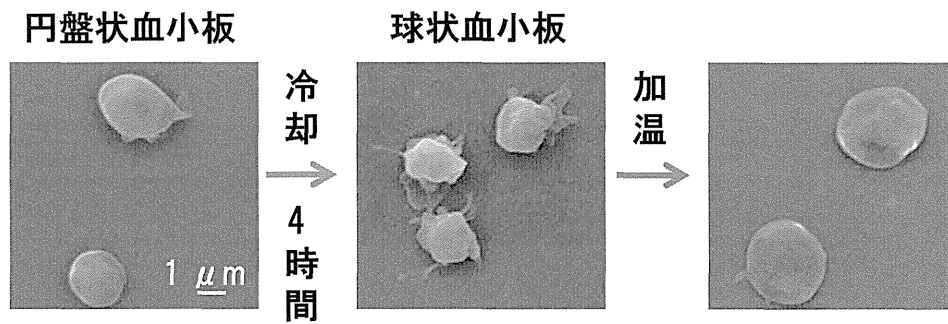
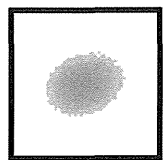


図3. 粒度分布計による血小板形態の評価

円盤状血小板



4°C  
↓

球状血小板

