

令和 3 年 6 月 13 日現在

機関番号：33920

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16130

研究課題名(和文) 高圧メディカルガスによる血小板保存効果の検証

研究課題名(英文) Verification of the effect of high-pressure medical gas on platelet preservation

研究代表者

矢倉 富子 (yakura, tomiko)

愛知医科大学・医学部・助教

研究者番号：20722581

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：近年、血小板において内因性生理活性ガスである一酸化炭素(CO)生成酵素が存在し、血小板凝集反応や血小板機能を制御していることが明らかになっている。今回申請者は、ウサギおよびヒト血小板においてメディカルガスを用いた保存法を用いて血小板の凝集を抑制することに成功した。これにより血小板の機能制御や品質を向上することを目指し、安全・安定的に保存できる新たな血小板保存方法の確立が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血小板輸血は様々な出血性疾患や病態に対する確立した治療法である。しかしながら、血小板は温度とpHに大きな影響を受けるため安定供給が困難であり、必要なときに必要な量の血小板の安定供給を行うことは大きな課題の1つである。こうした状況を改善するために、大量の血小板を効率よく産生できるシステムと安定に安全に保存する方法の確立が望まれている。今回申請者は、ウサギおよびヒト血小板においてメディカルガスを用いた保存法を用いて血小板の凝集を抑制することに成功した。これにより安全に、安定的に保存できる新たな血小板保存方法の確立が期待される。

研究成果の概要(英文)：Recently, it has been revealed that carbon monoxide (CO), an endogenous bioactive gas, exists in platelets and regulates platelet aggregation reaction and platelet function.

In this study, the applicant has succeeded in inhibiting platelet aggregation in rabbit and human platelets using a medical gas preservation method. It is hoped that this will lead to the establishment of a new platelet storage method that can safely and stably store platelets, with the aim of controlling platelet function and improving platelet quality.

研究分野：医歯薬学

キーワード：血小板 PRP 一酸化炭素

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

1900年にKarl Landsteinerが血漿と血球に分け、血液型があることを発見し、輸血医療の道を開いて以来、輸血は医療の最も基本的な治療手段として普及している。近年、がん治療に伴う骨髄抑制から血小板製剤の需要が増大しており、ここ30年の間にがん化学療法・造血器疾患等の治療にまさに無くてはならない技術となっている。我が国での血小板製剤の供給状況は平成28年報告によれば、年間380千単位供給されている。これは、血液製剤年間供給量822千単位の46%を占める。しかし、その血小板製剤は、現在ほぼ全てを成分献血(血小板・血漿などの単一の血液成分のみを献血する献血形式)に頼っている。血小板輸血においては、その安定供給に大きな制約があり、常温保存が原則とされるが故に、短期間の保存が可能であるにすぎず、感染症の問題がつかまとう。これらの問題点により血小板製剤の有効期限はわずか4日程度と極端に短く、安定的供給が困難である。必要なときに必要な量の血小板を供給することは、全世界で重大な課題の1つである。

2. 研究の目的

血小板の保存は、温度の変動に弱く現在まで人工血小板や保存液の開発等様々な工夫がなされてきた。しかしながら、現在の血小板製剤の保存では有効期限が4日と極端に短く、常温下で振とうする方法が一般的に用いられている。また現在iPS細胞から血小板を供給できる技術が開発されており、それに伴い血小板保存の向上が再び求められている。申告者らが開発した高圧ガス保存法は、実際臓器だけでなくヒト培養細胞(血管内皮細胞、心筋細胞)を用いた場合でも高い効果を得ることができた。

近年、血小板において内因性生理活性ガスである一酸化炭素(CO)生成酵素が存在し、血小板凝集反応や血小板機能を制御していることが明らかになってきている。

そこで、常温・常圧で気体であるメディカルガスを新たなガス運搬体として注目されている気泡径が1 μ m未満で、水中安定性のあるウルトラファインバブル(UFB)を用いて検討した。本研究課題は、メディカルガスを使用し新たな血小板保存法の開発を目指すものである。

3. 研究の方法

(1)PRP (Platelet-rich plasma)至適条件の検討

・ウサギ血小板を用いたPRP (Platelet-rich plasma):New Zealand White, 10週齢, 3~4Kg

ウサギの耳静脈から、3.2%クエン酸ナトリウム処理(1/10添加)により1回につき4.5mlの採血をした。血液を1500rpm, 24℃で10分間遠心してPRP (Platelet-rich plasma)を採取した。PRP採取後の血液を3000rpm, 24℃で10分間遠心してPPP (Platelet-poor plasma)を採取した。本研究では、汎用されるPRP調整法に準じて調整されたPRPの血小板数を比較検討し、この条件をウサギPRPの最適条件とした。

・ヒト血小板を用いたPRP (Platelet-rich plasma):本研究の主旨, 方法に理解と同意を得た全身疾患を持たない被験者対象

正中皮静脈から1回につき10mlの採血を行い、抗凝固剤(10%ACD-A液、3.13%クエン酸ナトリウム)を加え軽く攪拌したあと、24℃下で1回目をPRP調整法に準じて800g10分間遠心分離し、2回目を2700gで再度遠心分離しPRPを作成する。

条件検討を重ねた結果、上記条件を最適条件として PRP 作成を行った。

(2) 血小板の機能評価

血小板凝集能測定装置 (PRP313M; タイヨウ社製) にて機能評価を行った。

ADP 「MCM」ADP (株式会社エル・エム・エス)・Collagen 「MCM」コラーゲン H (株式会社エル・エム・エス) を単独添加した際の最大凝集率を血小板凝集能とした。

血小板アゴニストである ADP・Collagen の最終濃度を $2\mu\text{g/ml}$ ・ $3\mu\text{g/ml}$ ・ $5\mu\text{g/ml}$, ADP の最終濃度を $10\mu\text{M}$ として 10 分間測定した。

(3) ウルトラファインバブル(UFB)の評価・計測

現在、UFB の数を計測するスタンダードとなっているナノ粒子トラッキング解析法(ブラウン拡散相当径を個数基準で測定)装置である Nano Sight(NS300)にて作成した UFB を測定し評価する。

4. 研究成果

血小板凝集能試験において検査結果に影響を与えるため PRP の作成手技の標準化が必要である。血小板凝集能試験は、血小板凝集能測定装置を用いて行った。ADP 「MCM」ADP (株式会社エル・エム・エス)・Collagen 「MCM」コラーゲン H (株式会社エル・エム・エス) を単独添加した際の最大凝集率を血小板凝集能とした。

血小板アゴニストである ADP・Collagen のモル濃度を PRP に添加後の ADP 最終濃度が $0.5\mu\text{M}$ から $10\mu\text{M}$ までの 9 段階, Collagen 最終濃度が $0.2\mu\text{g/ml}$ から $5\mu\text{g/ml}$ までの 10 段階にわけて調製しておき、各血小板アゴニスト溶液に対する血小板凝集能をモル濃度の低い方より 10 分間測定した (図 1)。

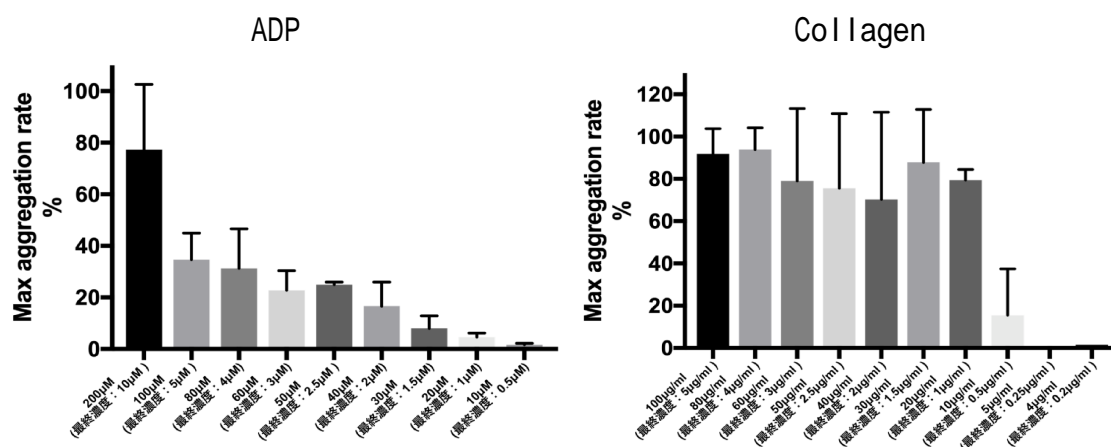


図 1 ヒト血小板の ADP・Collagen 各濃度による最大凝集率

さらに、血小板は内因性生理活性ガスである一酸化炭素(CO)生成酵素が存在し、血小板凝集反応や血小板機能を制御していることが明らかになってきている。

そこで、常温・常圧で気体である一酸化炭素(CO)を気泡径が $1\mu\text{m}$ 未満で、水中安定性のあるウルトラファインバブル(CO-UFB)を作成して用いた。至適条件にて調整したウサギ血小板に CO-UFB を添加し、血小板数の増加率を 24h・48h 測定した (図 2)。

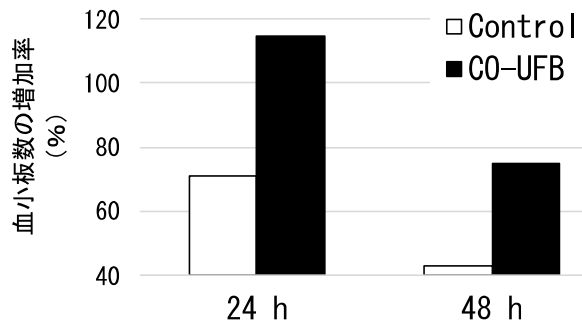


図2 CO-UFB 下にて保存した血小板数の増減率(%)

ウサギ血小板数の増加率はCO-UFB群において向上し、さらに血小板凝集能試験においてADPによる凝集がCO-UFB群において促進された。これらの結果によりCO-UFBは血小板の活性化を抑制しているのではないかと考えられ、さらに血小板機能制御に関与しているのではないかと推測される。今回新たに得た知見を基にさらに研究を進め血小板機能解析を達成するため、段階的な課題に重点をおいて血小板保存の検討に取り込む計画である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------