

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08382

研究課題名（和文）内因性生理活性ガスの応用による新たな血小板保存液の開発

研究課題名（英文）Development of a new platelet preservation solution using endogenous bioactive gases

研究代表者

矢倉 富子（Yakura, Tomiko）

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号：20722581

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：輸血に用いる血小板製剤は、予防的投与と治療的投与の目的で使用され、その需要は医療の高度化に伴い増加の一途にある。しかしながら、血小板製剤には安定供給や長期間の高い品質という点に関して、未だ多くの課題があり、安定した高い品質を担保したまま血小板を供給することは喫緊の課題である。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た。さらに、低濃度の外因性COによる抗炎症、抗アポトーシス、抗増殖作用などの細胞保護作用およびその作用機序に関する理解が深まり、COが新たな治療薬などの医療応用に期待されている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

内因性生理活性ガスの医療への応用が先行する一方、血小板は極めて特殊な細胞であり、その活性化シグナルにCOがどのように関与しているかの分子学的、形態変化のメカニズムなどの学術的基盤となる研究や理論的解明は進んでいない。特に血小板の医療応用へ向けたCOの研究開発は急務である。本研究は、COを直接人体に投与するのではなく、その効果を血小板製剤に応用するため、保存液にCOを溶存させる方法であり唯一である。溶液にCOを溶存する技術は、血小板のみならず他の血液製剤にも応用可能であり、「輸血関連事業」を革新するものであると考える。この研究は、新たな未来を開く革新的な手法として世界へ発信するものである。

研究成果の概要（英文）：Platelet preparations for transfusion are used for preventive and therapeutic administration, and the demand for them is steadily increasing with the advancement of medical care. However, there are still many issues with platelet preparations in terms of stable supply and long-term high quality, and supplying platelets while ensuring stable high quality is an urgent issue.

In recent years, it has become clear that platelets contain an endogenous carbon monoxide (CO)-generating enzyme, which is a bioactive gas, and controls platelet aggregation and platelet function. Furthermore, our understanding of the cytoprotective effects of low concentrations of exogenous CO, such as anti-inflammatory, anti-apoptotic, and anti-proliferative effects, and the mechanisms of their action, has deepened, and CO is expected to be used in medical applications such as new therapeutic drugs.

研究分野：医歯薬学

キーワード：血小板 一酸化炭素 血小板保存液

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

輸血に用いる血小板製剤は、予防的投与と治療的投与の目的で使用され、その需要は医療の高度化に伴い増加の一途にある。しかしながら、血小板製剤には安定供給や長期間の高い品質という点に関して、未だ多くの課題があります。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た。一般的に一酸化炭素(CO: carbon monoxide)は、毒ガスとして認知されているが、COはヘムオキシゲナーゼ(HO: heme oxygenase)によるヘム代謝によって生体内で産生する内因性生理活性ガスであり、生理活性作用やミトコンドリア代謝などの生命にとって重要な機能を制御していることも明らかになってきた。そこで、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)に着目した。現在、内因性生理活性ガスをUFB化し無菌状態でのUFB化が可能な完全閉鎖型UFB作成装置の開発に成功している。本研究課題は、血小板の機能制御や品質を向上することを目指し、臨床応用へと展開し、新しい輸血医学への道を切り開くものである。

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。必要なときに必要な量の血小板を高い品質を担保したまま供給することは、世界中から切望されている課題である。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。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。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

I. ヒト血小板の検討

① 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°C下で1回目をPRP調整法に準じ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。

- ・本研究に使用する血小板製剤は、「安全な血液製剤の安定供給の確保等に関する法律第12条に規定する採血等の制限の考え方について」の一部改正について(令和2年8月26日付薬生血発0826第3号厚生労働省医薬・生活衛生局血液対策課長通知)に基づき、日本赤十字社にて承認されている(承認番号:31J0005)。血小板製剤は、使用前に少なくとも3時間、フラット攪拌機(60サイクル/分)上で24°Cで保管し、使用期限内に使用しました。

② 各種溶液

- ・血小板保存液(PAS液): PAS液は、25 mLのACD-A液(川澄化学研究所)を500mL

の BICANATE 液（大塚製薬）に加えて、1:20 の比率で調製しました。

- LPS : LPS (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) は、敗血症における凝固状態をシミュレーションするために血小板の活性化をするために使用された。大腸菌由来の LPS の中で最も一般的に使用されている O111:B4 を使用した。内因性生理活性ガス (CO) を含有する
- UFB (CO-UFB) : PAS 液「ACD-A 液:Bicanate 液= 1:20」に CO を含有し、UFB 化する。
- CO 溶存 (CO-Dissolve) : PAS 液「ACD-A 液:Bicanate 液= 1:20」を用いて調整し、CO を 1:1 の比率で 1 時間以上、24°C 下で浸透し作成する。
- CORM-2 : 近年、遷移金属カルボニルが潜在的な CO 放出分子 (CORM) であることが確認され、CO を対象の組織や臓器に送達することで、CO の医薬品としての使用を促進する能力が明らかになってきた。なかでも、CORM-2 は抗炎症作用を示すことが報告され、LPS 刺激によるマクロファージの炎症性サイトカインの産生を抑制する。至適条件検討により、CORM-2 を DMSO に溶解して最終濃度 50 μM を血小板の最適条件とした。

II. ヒト血小板の形態学的評価

血小板数、平均血小板容積 (MPV)、電子顕微鏡(TEM、SEM)にて検証した。

4. 研究成果

ヒト血小板の数の変化を示す(Fig. 1)。平均血小板容積 (MPV) は、各群において変化は、なかった (Fig. 1a)。通常の血小板保存液 (PAS) にて処置した時よりも、CO-UFB に置換すると血小板数の減少を抑制する (Fig. 1b)。

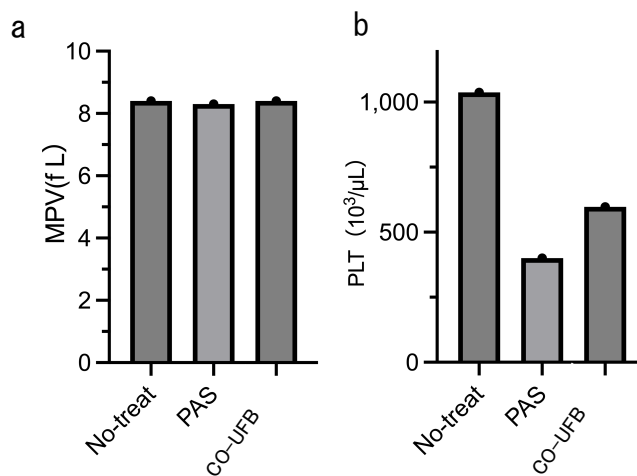


Fig. 1 ヒト血小板数(多項目自動血球数装置 XN-9000)

次に、ヒト血小板の形態変化を走査型電子顕微鏡写真にて観察した (Fig. 2a)。LPS (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を投与した群は、血小板の球状化や凝集の形成が増加し、偽足の伸長が促進し細胞形状の不可逆的な変化などの形態変化が示された。血小板の活性化を促進しました (図 2b)。しかしながら、CO-UFB 群では、血小板の球状化や凝集の形成が減少し、偽足の伸長が抑制傾向にあった (Fig. 2c)。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、血小板機能制御に関与していることを示唆した。

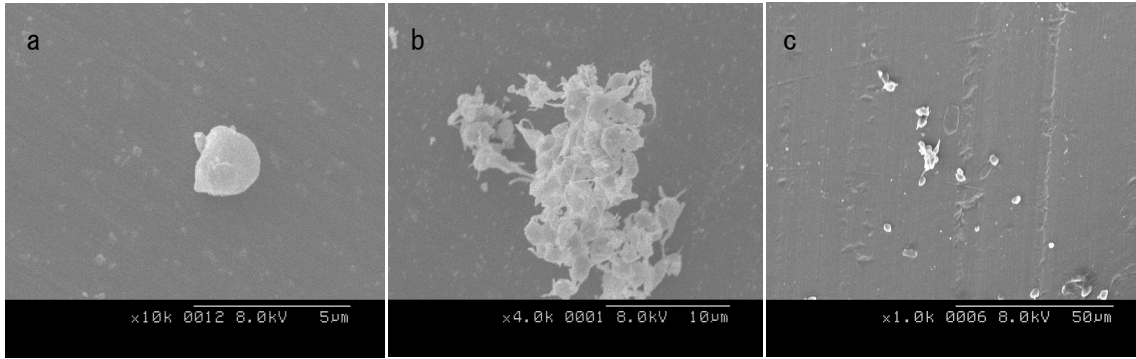


Fig.2 ヒト血小板の形態変化（走査型電子顕微鏡） a. 正常血小板 b. LPS（10 µg/mL） c. CO-UFB

次に、血小板活性化に関連する膜変化と放出された α 顆粒の形態学的変化について観察するため、ヒト血小板の形態変化を透過型電子顕微鏡写真にて観察した(Fig. 3a)。LPS(10 µg/mL)では、 α 顆粒・開放小管系が表面膜へ移動し、不可逆的な変化を認めている(Fig. 3b)。次に、LPSにCO-Dissolve および CORM-2を投与すると、 α 顆粒の細胞膜への移行を阻害する傾向があった(Fig. 3c and 3d)。

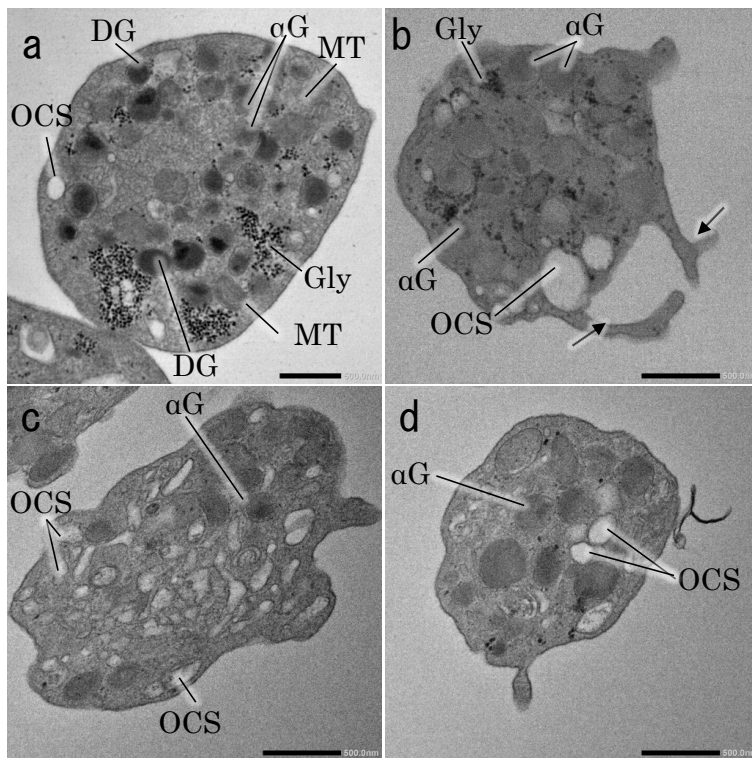


Fig. 3 ヒト血小板の形態変化（透過型電子顕微鏡 JEM-1400 PLUS）

COは血小板の活性化に伴う α 顆粒エキソサイトーシスを抑制に影響するとされている。今回、COを含有したCOの含有溶液がこれまでの報告と同様に明らかな α 顆粒エキソサイトーシスを抑制する形態学的変化や突起の形成を抑制していることが示された。更なる解析のためには、機能的評価を行う必要がある。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し、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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 矢倉富子、名仁澤英理、内藤宗和、李忠連、河田晋一、夏山裕太郎、小川夕輝、倉升三幸、伊藤正裕
2. 発表標題 血小板への内因性生理活性ガスの効果
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 矢倉富子、島田和幸
2. 発表標題 一酸化炭素の応用による血小板機能制御と形態変化
3. 学会等名 第65回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2023年

〔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
研究分担者	伊藤 正裕 (Itoh Masahiro) (00232471)	東京医科大学・医学部・主任教授 (32645)	
研究分担者	内藤 宗和 (Naito Munekazu) (10384984)	愛知医科大学・医学部・教授 (33920)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	畑山 直之 (Hatayama Naoyuki) (80534792)	愛知医科大学・医学部・准教授 (33920)	
研究分担者	福重 香 (Fukushige kaori) (30805023)	愛知医科大学・医学部・助教 (33920)	
研究分担者	名仁澤 英里 (Nanizawa Eri) (10879464)	愛知医科大学・医学部・助教 (33920)	
研究分担者	永堀 健太 (Nagahori Kenta) (50759561)	東京医科大学・医学部・客員研究員 (32645)	
研究分担者	河田 晋一 (Kawata Shinichi) (00527955)	東京医科大学・医学部・助教 (32645)	
研究分担者	夏山 裕太郎 (Natuyama Yutaro) (60976926)	東京医科大学・医学部・助教 (32645)	

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
---------	---------