



(21)申請案號：112117922

(22)申請日：中華民國 112 (2023) 年 05 月 15 日

(51)Int. Cl.：

A61K35/19 (2015.01)

A61K9/08 (2006.01)

A61K47/02 (2006.01)

A61K47/12 (2006.01)

A61K47/18 (2006.01)

A61P17/02 (2006.01)

(30)優先權：2022/05/16 日本

2022-080038

(71)申請人：日商耶迪波席茲股份有限公司(日本)ADIPOSEEDS, INC. (JP)

日本

(72)發明人：宇留賀友佳子 URUGA, YUKAKO (JP)；松原由美子 MATSUBARA, YUMIKO (JP)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：6 項 圖式數：10 共 26 頁

(54)名稱

血小板之新穎保存方法

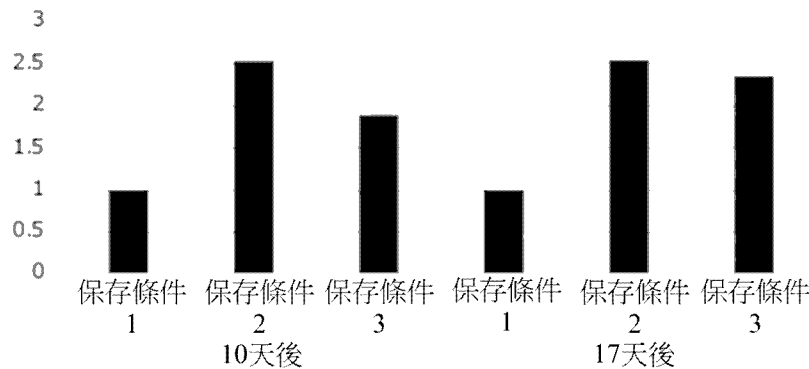
(57)摘要

本發明之課題在於提供一種於更多地保持血小板之功能之情況下，於冷藏或冷凍狀態下保存血小板之方法、及用於該方法之血小板保存液等。

本發明係關於一種含有電解質及抗凝固劑之冷藏用或冷凍用之血小板保存液。又，本發明係關於一種血小板之保存方法等，該血小板之保存方法包括：使血小板懸浮於本發明之血小板保存液中之步驟、及將懸浮液於 10°C 以下進行冷藏保存或冷凍保存之步驟。

指定代表圖：

每片血小板細胞片之細胞激素分泌能力



【圖3】

【發明摘要】

【中文發明名稱】

血小板之新穎保存方法

【中文】

本發明之課題在於提供一種於更多地保持血小板之功能之情況下，於冷藏或冷凍狀態下保存血小板之方法、及用於該方法之血小板保存液等。

本發明係關於一種含有電解質及抗凝固劑之冷藏用或冷凍用之血小板保存液。又，本發明係關於一種血小板之保存方法等，該血小板之保存方法包括：使血小板懸浮於本發明之血小板保存液中之步驟、及將懸浮液於10°C以下進行冷藏保存或冷凍保存之步驟。

【指定代表圖】

圖3

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

血小板之新穎保存方法

【技術領域】

【0001】 本發明係關於一種血小板之新穎保存方法、及血小板保存液等。更詳細而言，係關於一種於更多地保持血小板之功能之情況下，於冷藏或冷凍狀態下保存血小板之方法、及用於該方法之血小板保存液等。

【先前技術】

【0002】 血小板之醫療用途主要有輸血用途、及富血小板血漿 (Platelet Rich Plasma：以下亦顯示為「PRP」)療法用途。PRP係對自己之血液進行離心分離等，僅使血液中所含之3種血球(紅血球、白血球、血小板)中之血小板濃縮成高濃度而成者。PRP中例如含有EGF(表皮生長因子：Epidermal Growth Factor)、PDGF(血小板衍生生長因子：Platelet-Derived Growth Factor)、VEGF(血管內皮生長因子：Vascular Endothelial Growth Factor)、IGF(似胰島素生長因子：Insulin-like Growth Factor)、FGF(纖維母細胞生長因子：Fibroblast Growth Factor)、HGF(肝細胞生長因子：Hepatocyte Growth Factor)、TGF(轉型生長因子：Transforming Growth Factor)等細胞激素。

【0003】 PRP被用於治療變形性膝關節病及難治性皮膚潰瘍等多種疾病(例如，專利文獻1)及美容整形。PRP療法係將PRP注入患部。認為已注入至患部之血小板於患部產生細胞激素，該等細胞激素促進細胞於患部中之再生，而對創傷癒合及組織再生發揮有效作用。因此，於PRP療法中，切實地保持要注入至患部之血小板之細胞激素產生功能變得極其重

要。而且，於PRP療法中，血小板存在採血後其功能隨著時間經過而下降之問題(專利文獻2)。

因此，PRP療法通常在由採自患者之血液製備PRP後，於數小時以內注入至患者本人中，如需實施複數次PRP療法，則通常在每次實施時都自患者中採集血液來製備PRP。如上所述，對於PRP療法而言，切實地保持要注入至患部之血小板之細胞激素產生功能極其重要，因此一開始就沒有要將PRP保存數小時以上之想法，又，亦無要進行冷藏保存及冷凍保存之想法。

【0004】 另一方面，輸血用之血小板製劑係在自製造日起在室溫下保存4天左右之時間內處理。就保持血小板凝集能力等血小板功能之觀點而言，認為保存溫度必須為室溫。

[先前技術文獻]

[專利文獻]

【0005】 專利文獻1：日本專利特開2009-195739號公報

專利文獻2：日本專利特開2021-147333號公報

【發明內容】

[發明所欲解決之問題]

【0006】 本發明之課題在於提供一種於更多地保持血小板之功能之情況下，於冷藏或冷凍狀態下保存血小板之方法、及用於該方法之血小板保存液等。

[解決問題之技術手段]

【0007】 本發明人等為解決本發明之課題而進行了銳意研究，結果發現，藉由使血小板懸浮於含有電解質及抗凝固劑之血小板保存液中，並

將該懸浮液於10°C以下進行冷藏保存或冷凍保存，可在保持血小板之功能之情況下保存血小板等，從而完成了本發明。

【0008】 即，本發明係關於諸如下述者。

(1)一種冷藏用或冷凍用之血小板保存液，其含有電解質及抗凝固劑。

(2)如上述(1)中記載之血小板保存液，其中電解質係選自由氯化鈉、氯化鉀、氯化鈣、氯化鎂、碳酸氫鈉、乳酸鈉、及乙酸鈉所組成之群中之1種或2種以上，且抗凝固劑係選自由檸檬酸、EDTA(乙二胺四乙酸)、DTPA(二乙三胺五乙酸)、DCTA(1,2-二胺基環己烷四乙酸)、EGTA(乙二醇雙(2-胺基乙基醚)四乙酸)、草酸、或其等之鹽所組成之群中之1種或2種以上。

(3)一種含有血小板之組合物，其含有如上述(1)或(2)中記載之血小板保存液、及血小板。

(4)一種含有血小板之組合物之製造方法，其包括使血小板懸浮於如上述(1)或(2)中記載之血小板保存液中之步驟。

(5)一種血小板之保存方法，其包括使血小板懸浮於如上述(1)或(2)中記載之血小板保存液中之步驟、及將懸浮液於10°C以下進行冷藏保存或冷凍保存之步驟。或

(6)如上述(5)中記載之血小板之保存方法，其中使血小板懸浮於血小板保存液中之步驟係使血小板懸浮於相對於血小板中之血漿之體積為0.1倍以上之體積之血小板保存液中的步驟。

[發明之效果]

【0009】 根據本發明，可提供一種於更多地保持血小板之功能之情

況下，於冷藏或冷凍狀態下保存血小板之方法、及用於該方法之血小板保存液等。

【圖式簡單說明】

【0010】圖1係表示將血小板之細胞激素分泌能力進行比較所得之結果的圖。縱軸表示血小板之培養液中之VEGF(血管內皮生長因子：Vascular Endothelial Growth Factor)之濃度(pg/mL)。於刺激前、刺激後之各者中，左條形圖表示於-20℃下保存之情形時之結果，右條形圖表示於4℃下保存之情形時之結果。

圖2係表示將血小板之凝集能力進行比較所得之結果的圖。縱軸表示血小板凝集率(%)。圖中之左條形圖表示於-20℃下保存之情形時之結果，右條形圖表示於4℃下保存之情形時之結果。該結果示出血小板膜受體之黏附功能之保持情況、經由膜受體之血小板凝集之訊號傳遞能力之保持情況。

圖3係表示將每片血小板細胞片之細胞激素分泌能力進行比較所得之結果的圖。縱軸係表示當將在保存條件1下保存後，經CaCl₂刺激之情形時之VEGF之濃度作為基準時，相對於該濃度之比。

圖4係表示將血小板之凝集能力進行比較所得之結果的圖。縱軸表示血小板凝集率(%)。該結果示出血小板膜受體之黏附功能之保持情況、經由膜受體之血小板凝集之訊號傳遞能力之保持情況。

圖5係表示將血小板濃度濃縮率進行比較所得之結果的圖。縱軸表示將濃縮前之樣本中之血小板濃度設為1之情形時濃縮後之樣本中之血小板濃度之比率。橫軸之時間表示樣本製備所用之供體之血液的保管時間。

圖6係表示將血小板之凝集能力進行比較所得之結果的圖。縱軸表示

血小板之最大凝集率(%)。橫軸之時間表示樣本製備所用之供體之血液之保管時間。

圖7係表示將血小板濃度濃縮率進行比較所得之結果的圖。縱軸表示將濃縮前之樣本中之血小板濃度設為1之情形時濃縮後之樣本中之血小板濃度之比率。橫軸之#1、#2表示為了識別各供體而標註之供體編號。每2個排列之條形圖中左側之條形圖表示初次PRP之血小板濃度濃縮率，右側之條形圖表示用本發明之血小板保存液保存該初次PRP後之PRP之血小板濃度濃縮率。

圖8係表示於利用本發明之血小板保存液進行保存之前後將血小板濃度進行比較所得之結果的圖。縱軸表示血小板濃度($\times 10^3$ 個/ μL)。左側之條形圖表示進行3週保存前之初次PRP之血小板濃度，右側之條形圖表示保存3週後之初次PRP之血小板濃度。

圖9表示保存後之血小板之最大凝集能力相對於保存前之血小板之最大凝集能力的比率(「最大凝集變化率」)(%)。縱軸表示將濃縮前之樣本中之血小板濃度設為1之情形時的濃縮後之樣本中之血小板濃度之比率。橫軸之#1、#2表示為了識別各供體而標註之供體編號。

圖10係表示將血小板之VEGF分泌能力進行比較所得之結果的圖。縱軸之VEGF分泌能力係用將由採血供體#1製備之保存前之PRP之VEGF分泌能力設為100之情形時的相對值來表示。橫軸之#1、#2表示為了識別各供體而標註之供體編號。每2個排列之條形圖中左側之條形圖表示進行3週保存前之PRP之VEGF分泌能力，右側之條形圖表示保存3週後之PRP之VEGF分泌能力。

【實施方式】

【0011】 本發明包含諸如下述之實施方式。

[1]一種冷藏用或冷凍用之血小板保存液(以下亦顯示為「本發明之血小板保存液」)，其含有電解質及抗凝固劑。

[2]一種含有血小板之組合物(以下亦顯示為「本發明之含有血小板之組合物」)，其含有本發明之血小板保存液、及血小板。

[3]一種含有血小板之組合物之製造方法(以下亦顯示為「本發明之製造方法」)，其包括使血小板懸浮於本發明之血小板保存液中之步驟。

[4]一種血小板之保存方法(以下亦顯示為「本發明之保存方法」)，其包括：

使血小板懸浮於本發明之血小板保存液中之步驟、及
將懸浮液於10°C以下進行冷藏保存或冷凍保存之步驟。

【0012】 (血小板)

作為本說明書中之「血小板」，可例舉哺乳動物之血小板，更具體而言，可例舉：人、小鼠、大鼠、倉鼠、豚鼠、兔、狗、貓、馬、牛、綿羊、豬、山羊、猴等之血小板，其中，可較佳地例舉人之血小板。

【0013】 本說明書中之血小板亦可為輸血用之血小板，就更多地享受本發明之意義之觀點而言，較佳為PRP療法用等組織修復促進用之血小板。

【0014】 血小板之製備法並無特別限制，可為由哺乳動物之血液進行單離或濃縮而獲得之血小板，亦可為對哺乳動物之多能幹細胞等進行分化誘導而獲得之血小板等。作為由哺乳動物之血液進行單離或濃縮而獲得之血小板，可例舉富血小板血漿(PRP)、及洗滌血小板，就製備之簡便性之觀點而言，可較佳地例舉富血小板血漿。又，血小板亦可不為源自投予

對象之血小板，但就排斥反應之可能性更低之觀點而言，較佳為源自投予對象之血小板。

【0015】 作為由人等哺乳動物之血液製備血小板之方法，並無特別限制，可使用公知之任意方法。具體而言，可例舉對血液進行離心分離處理而獲得富血小板血漿之方法。離心分離處理可例舉進行1次之方法(一步離心)、及進行2次之方法(兩步離心)。作為一步離心，例如可例舉於100~300 G下離心分離5~20分鐘之方法，作為兩步離心，例如可例舉於100~300 G下離心分離5~20分鐘後，進而於200~300 G下離心分離5~20分鐘之方法。再者，於由血液製備血小板之情形時，該血液可為自哺乳動物採集後經保管者。作為保管之時間，例如可例舉：120小時以內、96小時以內、72小時以內、48小時以內。作為保管之溫度，並無特別限制，只要為10°C以下，則無論是冷藏保存還是冷凍保存均可，就更多地保持血小板之功能之觀點而言，保管之溫度可較佳地例舉高於0°C且為5°C以下、或0°C以下。就0°C以下而言，可例舉：-80°C以上0°C以下、-60°C以上-5°C以下、-40°C以上-10°C以下、或-30°C以上-15°C以下等。

【0016】 (本發明之血小板保存液)

作為本發明之血小板保存液，並無特別限制，只要含有電解質及抗凝固劑即可。

【0017】 (電解質)

作為上述之「電解質」，並無特別限制，只要能將含有該電解質之水溶液投予至任一哺乳動物中來使用即可，例如可例舉選自由氯化鈉、氯化鉀、氯化鈣、氯化鎂、碳酸氫鈉、乳酸鈉、及乙酸鈉所組成之群中之1種或2種以上。

【0018】 作為本發明之血小板保存液中所含有之電解質之濃度，並無特別限制，只要可獲得本發明之效果即可，就電解質之總毫當量(mEq/L)而言，例如可例舉：160~400 mEq/L，較佳為180~360 mEq/L，更佳為180~320 mEq/L。

【0019】 於製備本發明之血小板保存液時，可使用粉末之電解質，亦可使用市售之電解質輸液等。作為此種「電解質輸液」，可例舉：生理鹽液、林格氏溶液、乳酸林格氏溶液(亦包括含糖林格氏乳酸溶液)、乙酸林格氏溶液(亦包括含糖乙酸林格氏溶液)、林格氏碳酸氫鹽溶液(亦包括含糖者)等，其中，可較佳地例舉林格氏碳酸氫鹽溶液。該等可僅使用1種，亦可併用2種以上。

【0020】 (抗凝固劑)

作為上述之「抗凝固劑」，可例舉：藉由對作為血液凝固之因素之鈣離子進行配位來抑制血液凝固之螯合劑、及含有抑制作為血液凝固之因素之凝血酶活性之肝素的抗凝血酶劑，其中，可較佳地例舉螯合劑。關於作為螯合劑之抗凝固劑，可例舉選自由檸檬酸、EDTA(乙二胺四乙酸)、DTPA(二乙三胺五乙酸)、DCTA(1,2-二胺基環己烷四乙酸)、EGTA(乙二醇雙(2-胺基乙基醚)四乙酸)、草酸、或其等之鹽所組成之群中之1種或2種以上，其中，可較佳地例舉檸檬酸或其鹽。作為上述鹽，可較佳地例舉鹼金屬鹽，可更佳地例舉鈉鹽。

作為含有抗凝固劑之水溶液(抗凝固液)，具體而言，可例舉：ACD-A液(含有檸檬酸鈉水合物、檸檬酸水合物及葡萄糖之水溶液)、CPD液(含有檸檬酸鈉水合物、檸檬酸水合物、葡萄糖及磷酸二氫鈉水合物之水溶液)、CPDA-1液(含有檸檬酸鈉水合物、檸檬酸水合物、葡萄糖、磷酸二

氫鈉水合物及腺嘌呤之水溶液)等，其中，可較佳地例舉ACD-A液。

作為抗凝固劑，可僅使用1種，亦可併用2種以上。抗凝固劑或抗凝固液可使用市售者。

【0021】 作為保存液中之抗凝固劑之濃度，並無特別限制，只要可獲得本發明之效果即可，例如，於抗凝固劑為檸檬酸或其鹽之情形時，於本發明之血小板保存液中，以檸檬酸換算濃度計，例如可例舉：0.2~3 w/v%、較佳為0.5~2 w/v%。同樣地，於抗凝固劑為EDTA或其鹽之情形時，以EDTA換算濃度計，例如可例舉：0.2~3 w/v%、較佳為0.5~2 w/v%，於抗凝固劑為DTPA或其鹽之情形時，以DTPA換算濃度計，例如可例舉：0.2~3 w/v%、較佳為0.5~2 w/v%，於抗凝固劑為DCTA或其鹽之情形時，以DCTA換算濃度計，例如可例舉：0.2~3 w/v%、較佳為0.5~2 w/v%，於抗凝固劑為EGTA或其鹽之情形時，以EGTA換算濃度計，例如可例舉：0.2~3 w/v%、較佳為0.5~2 w/v%，於抗凝固劑為草酸或其鹽之情形時，以草酸換算濃度計，例如可例舉：0.2~3 w/v%、較佳為0.5~2 w/v%。又，於併用2種以上之抗凝固劑之情形時，可將其總濃度設為例如0.2~3 w/v%、較佳為0.5~2 w/v%。

【0022】 於製備本發明之血小板保存液時，可使用粉末之抗凝固劑，亦可使用市售之抗凝固液(含有抗凝固劑之水溶液)等。

【0023】 本發明之血小板保存液之製備方法並無特別限制，可將電解質、抗凝固劑及水進行混合來製備，亦可將電解質輸液與抗凝固液進行混合來製備。作為使用電解質輸液及抗凝固液之情形時的電解質輸液與抗凝固液之體積比(電解質輸液：抗凝固液)，例如可例舉：0.5：1~10：1、較佳為1：1~5：1、更佳為1.5：1~3.5：1、進而較佳為1.8：1~3：

1。又，作為使用電解質輸液及抗凝固液之情形時的保存液中之電解質輸液之濃度，例如可例舉：20~90 v/v%、較佳為40~90 v/v%、更佳為60~80 v/v%、進而較佳為65~75 v/v%。

【0024】 作為本發明之血小板保存液之滲透壓，並無特別限制，只要可獲得本發明之效果即可，例如可例舉：230~400 mOsm/L、較佳為250~380 mOsm/L、更佳為265~350 mOsm/L、進而較佳為270~330 mOsm/L、更佳為275~310 mOsm/L、進而較佳為280~300 mOsm/L。

【0025】 (任意成分)

本發明之血小板保存液可僅含有電解質、抗凝固劑及水，亦可含有其他任意成分。作為該任意成分，可例舉葡萄糖、麥芽糖等糖。

【0026】 作為本發明之血小板保存液中所含有之糖之濃度，並無特別限制，只要可獲得本發明之效果即可，以血小板保存液中之糖之總濃度計，例如可例舉：0.1~25 w/v%、或0.5~20 w/v%、或1~10 w/v%、或2~5 w/v%等。

【0027】 (容器)

本發明之血小板保存液可收容於容器內。作為該容器，可例舉：袋子、注射器、安瓿、瓶子等。

【0028】 (血小板之保存方法)

作為本發明之血小板之保存方法，並無特別限制，只要包括使血小板懸浮於本發明之血小板保存液中之步驟；及將懸浮液於10°C以下進行冷藏保存或冷凍保存之步驟即可。

【0029】 作為上述之「使血小板懸浮於本發明之血小板保存液中之步驟」(以下亦顯示為「懸浮步驟」)，並無特別限制，只要為成為血小板

懸浮於本發明之血小板保存液中之狀態的步驟即可。例如，可將血小板添加於血小板保存液中而使血小板懸浮，亦可將血小板保存液添加於血小板中而使血小板懸浮，亦可將電解質輸液添加於血小板中，繼而添加抗凝固劑而使血小板懸浮，亦可將血小板添加於電解質輸液中，繼而添加抗凝固劑而使血小板懸浮，亦可將電解質輸液及抗凝固劑添加於血小板中而使血小板懸浮，亦可將抗凝固劑添加於血小板中，繼而添加電解質輸液而使血小板懸浮，亦可將血小板添加於抗凝固劑中，繼而添加電解質輸液而使血小板懸浮。

【0030】 作為上述懸浮步驟中之本發明之血小板保存液之使用量，並無特別限制，只要可獲得本發明之效果即可，例如可例舉相對於血小板中之血漿之體積為0.1倍以上之體積之血小板保存液，就更多地保持血小板之功能之觀點而言，可例舉：較佳為0.3倍以上、更佳為0.5倍以上、進而較佳為0.8倍以上、更佳為1倍以上之體積之血小板保存液。本發明之血小板保存液之使用量之上限並無特別限制，例如可例舉相對於血小板中之血漿之體積為1000倍以下、500倍以下、200倍以下等。

【0031】 作為上述之「將懸浮液於10°C以下進行冷藏保存或冷凍保存之步驟」(以下亦顯示為「保存步驟」)，並無特別限制，只要為對懸浮步驟中所獲得之懸浮液進行冷藏保存或冷凍保存之步驟即可。

【0032】 作為保存步驟之保存溫度，並無特別限制，只要為10°C以下，則無論是冷藏保存還是冷凍保存均可，就更多地保持血小板之功能之觀點而言，可較佳地例舉高於0°C且為5°C以下、或為0°C以下。就0°C以下而言，可例舉：-80°C以上0°C以下、-60°C以上-5°C以下、-40°C以上-10°C以下、或-30°C以上-15°C以下等。

【0033】 作為保存步驟之保存時間，並無特別限制，就更多地享受本發明之意義之觀點而言，例如可例舉：3小時以上、較佳為1天以上、更佳為3天以上、進而較佳為7天以上、更佳為10天以上、15天以上或25天以上。又，作為保存時間之上限，例如可例舉：6個月以下、3個月以下、2個月以下或1個月以下。

【0034】 (含有血小板之組合物之製造方法)

作為本發明之含有血小板之組合物之製造方法，並無特別限制，只要包括使血小板(較佳為PRP)懸浮於本發明之血小板保存液中之步驟即可。懸浮步驟如上文中在本發明之血小板之保存方法中所述。

【0035】 又，本發明之含有血小板之組合物之製造方法較佳為於懸浮步驟之前，進而包括製備血小板(較佳為PRP)之步驟。

【0036】 作為製備血小板之方法，如上文所述，可例舉：自哺乳動物之血液單離或濃縮血小板之方法、及將哺乳動物之多能幹細胞等分化誘導為血小板之方法，就簡便性之觀點而言，可較佳地例舉自哺乳動物之血液單離或濃縮血小板進行之方法。作為自哺乳動物之血液單離或濃縮血小板之方法，可例舉對血液進行離心分離處理之方法。關於離心分離處理，可例舉進行1次之方法(一步離心)、及進行2次之方法(兩步離心)。作為一步離心，例如可例舉於100~300 G下離心分離5~20分鐘之方法，作為兩步離心，例如可例舉於100~300 G下離心分離5~20分鐘後，進而於200~300 G下離心分離5~20分鐘之方法。

【0037】 (本發明之含有血小板之組合物)

作為本發明之含有血小板之組合物，並無特別限制，只要含有本發明之血小板保存液、及血小板即可。本發明之含有血小板之組合物可為血

小板製劑。

【0038】 作為本發明之含有血小板之組合物中之血小板之濃度，並無特別限制，例如可例舉： $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^{30}$ 個/mL、較佳為 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^{25}$ 個/mL、更佳為 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^{20}$ 個/mL。

【0039】 本發明之含有血小板之組合物可僅含有本發明之血小板保存液、及血小板，亦可含有除此以外之任意成分。

【0040】 本發明之含有血小板之組合物可藉由將血小板與本發明之血小板保存液進行混合來製造。

【0041】 (更多地保持血小板之功能)

於本說明書中，「更多地保持血小板之功能」意指與不使用本發明之血小板保存液而於相同保存條件下保存相同之血小板之情形相比，於使用本發明之血小板保存液進行保存之情形時，血小板之功能更多地得到了保持。又，於本說明書中，「血小板之功能」意指細胞激素分泌能力、及/或血小板凝集能力。作為細胞激素分泌能力，可較佳地例舉VEGF分泌能力。

【0042】 以下，藉由實施例對本發明詳細地進行說明，但本發明並不限定於該等實施例。

實施例

【0043】 [試驗1]針對血小板之保存溫度的評估

於對血小板進行了冷藏保存或冷凍保存之情形時，為了確認血小板之功能是否得到了保持而進行了以下試驗。

【0044】 (1.PRP之製備)

自採血供體中採集血液。將該血液於200 G下離心分離(一步離心)10

分鐘，或於200 G下離心分離10分鐘後進而於200~300 G下離心分離(兩步離心)10分鐘而獲得PRP。

【0045】 (2.PRP之保存)

將PRP放入至注射器中並加以密封後，於4°C或-20°C之條件下保存1個月。

【0046】 (3.PRP中之血小板之功能之評估)

(1)細胞激素分泌能力之評估

向經保存之PRP中添加CaCl₂ 4.5 mM、ADP(二磷酸腺苷)5 μM及膠原蛋白2.5 μg/mL來進行血小板刺激。於血小板刺激開始前、及自血小板刺激開始後1小時以內測定培養液中之VEGF(血管內皮生長因子：Vascular Endothelial Growth Factor)之濃度。將其結果示於圖1中。

【0047】 根據圖1之結果表明，於4°C、-20°C之任一溫度下保存了1個月之情形均保持了細胞激素分泌能力。又，表明與在-20°C下進行了保存之情形相比，於4°C下進行了保存之情形更多地保持了細胞激素分泌能力(圖1)。

【0048】 (2)血小板凝集能力之評估

向經保存之PRP中添加CaCl₂ 4.5 mM、ADP 5 μM及膠原蛋白2.5 μg/mL作為血小板凝集引起物質後，利用血小板凝集能力測定裝置(PR313M：TAIYO公司製造)求出血小板凝集率(%)。將其結果示於圖2中。

【0049】 根據圖2之結果表明，於4°C、-20°C之任一溫度下保存了1個月之情形均保持了血小板凝集能力。又，表明在4°C下進行了保存之情形相比，於-20°C下進行了保存之情形更多地保持了血小板凝集能力(圖2)。

【0050】 [試驗2]由本發明之血小板保存液所致之影響之評估1

為了確認本發明之血小板保存液對保持血小板之功能產生了怎樣的影響，而進行了以下試驗。

【0051】 (1.PRП之製備)

自採血供體中採集血液。將該血液於200 G下離心分離(一步離心)10分鐘，或於200 G下離心分離10分鐘後進而於200~300 G下離心分離(兩步離心)10分鐘而獲得PRP。

【0052】 (2.本發明之血小板保存液之製備)

準備林格氏碳酸氫鹽溶液(大塚製藥公司製造之「BICANATE」或AY Pharma公司製造之「Bicarbon」)及ACD-A液(TERUMO公司製造)，以林格氏碳酸氫鹽溶液：ACD-A液之體積比達到2.3：1之方式進行混合，而製備本發明之血小板保存液。

【0053】 再者，林格氏碳酸氫鹽溶液(「Bicarbon」)之組成如表1所示，ACD-A液之組成如表2所示。

【0054】 [表1]

林格氏碳酸氫鹽溶液		
成分名稱	500 mL中	濃度
氯化鈉	3.07 g	0.614 w/v%
氯化鉀	0.15 g	0.03 w/v%
氯化鈣水合物	0.11 g	0.022 w/v%
氯化鎂	0.051 g	0.0102 w/v%
碳酸氫鈉	1.05 g	0.21 w/v%
檸檬酸鈉水合物	0.245 g	0.049 w/v%

【0055】 [表2]

ACD-A液	
成分名稱	濃度
檸檬酸鈉水合物	2.20 w/v%
檸檬酸水合物	0.80 w/v%
葡萄糖	2.20 w/v%

【0056】再者，上述ACD-A液中含有2.2 w/v%之檸檬酸鈉水合物($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$)、0.8 w/v%之檸檬酸水合物($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$)，上述林格氏碳酸氫鹽溶液中含有0.049 w/v%之檸檬酸鈉水合物($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$)。因此，以林格氏碳酸氫鹽溶液：ACD-A液之體積比達到2.3：1之方式進行混合而獲得之本發明之血小板保存液中之檸檬酸濃度(檸檬酸換算濃度)約為0.75 w/v%。又，上述林格氏碳酸氫鹽溶液之電解質為286 mEq/L，上述ACD-A液之電解質為57 mEq/L。因此，以林格氏碳酸氫鹽溶液：ACD-A液之體積比達到2.3：1之方式進行混合而獲得之本發明之血小板保存液之電解質約為217 mEq/L。

【0057】 (3.PRIP之保存)

作為PRIP之保存條件，設定為3種。

【0058】 保存條件1(僅限PRIP)

將PRIP放入至注射器中並加以密封後，於4°C 或-20°C 之條件下保存10天或17天。

【0059】 保存條件2(PRIP50%，血小板保存液50%)

以PRIP中之血漿與本發明之血小板保存液之體積比達到50：50之方式，將PRIP及本發明之血小板保存液放入至注射器中並加以密封後，於4°C 或-20°C 之條件下保存10天或17天。

【0060】 保存條件3(PRIP65%，血小板保存液35%)

以PRIP中之血漿與本發明之血小板保存液之體積比達到65：35之方式，將PRIP及本發明之血小板保存液放入至注射器中並加以密封後，於4°C 之條件下保存10天或17天。

【0061】 (4.PRIP中之血小板之功能之評估)

(1)細胞激素分泌能力之評估

利用與上述試驗1中記載之方法相同之方法評估經保存之各PRP之VEGF之分泌能力。再者，細胞激素分泌能力(VEGF分泌能力)係每片血小板細胞片進行評估。又，細胞激素分泌能力(VEGF分泌能力)係用以於保存條件1下進行保存後，經CaCl₂刺激之情形時之VEGF之濃度作為基準，相對於該濃度之比來表示。將其結果示於圖3中。

【0062】 根據圖3表明，使用有本發明之血小板保存液之保存條件2、3之任一情形與不使用本發明之血小板保存液之保存條件1之情形相比，均保持了約2~2.5倍之細胞激素分泌能力。

【0063】 (2)血小板凝集能力之評估

利用與上述試驗1中記載之方法相同之方法評估經保存之各PRP之血小板凝集能力。再者，血小板凝集能力係用以於保存條件1下進行保存後之血小板凝集率(%)作為基準，相對於該比率之比來表示。將其結果示於圖4中。

【0064】 根據圖4表明，使用有本發明之血小板保存液之保存條件2、3之任一情形與不使用本發明之血小板保存液之保存條件1之情形相比，均更多地保持了血小板凝集能力。又，表明於4℃下保存10天之情形與於4℃下保存17天之情形相比，更多地保持了血小板凝集能力。

【0065】 [試驗3]長期保管血液試樣所致之影響

試驗1及試驗2中使用由剛自供體採集之血液製備之PRP。因此，針對使用由自供體採集後經過長時間保管之血液製備之PRP的情形，進行了以下試驗。

【0066】 (1.初次PRP之製備)

自採血供體中採集血液。將該血液於4℃條件下保管特定時間(48小時、72小時、96小時、或120小時)。其後，將各血液於100~300 G下離心分離(一步離心)10分鐘，或於100~300 G下離心分離10分鐘後進而於200~2500 G下離心分離10~20分鐘(兩步離心)，獲得初次PRP。

【0067】 (2.本發明之血小板保存液之製備)

利用上述之試驗2中記載之方法製造本發明之血小板保存液。

【0068】 (3.血小板濃度濃縮率之評估)

將對初次PRP中之血小板濃度濃縮率進行評估所得之結果示於圖5中。根據圖5可知，初次PRP之血小板濃度濃縮率即便於供體之血液(全血)之保管時間為120小時之情形時亦保持為與48小時之情形時等大致相同之程度。

【0069】 (4.血小板凝集能力之評估)

利用與上述試驗1中記載之方法相同之方法對初次PRP之血小板凝集能力進行評估。將其結果示於圖6中。根據圖6可知，初次PRP之最大凝集率即便於供體之血液(全血)之保管時間為120小時之情形時亦保持在與48小時之情形時等大致相同之程度。

【0070】 [試驗4]由本發明之血小板保存液所致之影響之評估2

為了確認於使用由自供體採集後經過長時間保管之血液製備之PRP之情形時，本發明之血小板保存液對於保持PRP中之血小板之功能產生了怎樣的影響，而進行了以下試驗。

【0071】 (1.初次PRP之製備)

自採血供體中採集血液。將該血液於4℃條件下保管120小時。其後，將各血液於100~300 G下離心分離(一步離心)10分鐘，或於100~

300 G下離心分離10分鐘後進而於200~2500 G下離心分離10~20分鐘(兩步離心)，獲得初次PRP。

【0072】 (2.本發明之血小板保存液之製備)

利用上述之試驗2中記載之方法製造本發明之血小板保存液。

【0073】 (3.PRP之保存)

以PRP中之血漿與本發明之血小板保存液之體積比達到20：7之方式，將上述初次PRP及本發明之血小板保存液放入至注射器中並加以密封後，於4℃之條件下保存3週。

【0074】 (4.血小板濃度濃縮率之評估)

對初次PRP中之血小板濃度濃縮率、及利用本發明之血小板保存液將初次PRP保存了3週後之血小板濃度濃縮率進行評估，將評估所得之結果示於圖7中。根據圖7可知，所有樣本中，利用本發明之血小板保存液進行了保存之PRP之血小板濃度濃縮率均保持在與初次PRP之血小板濃度濃縮率大致相同之程度。

【0075】 (5.血小板濃度之評估)

於上述之(3.PRP之保存)中，對將初次PRP保存3週之前之血小板濃度、及保存3週後之血小板濃度進行測定，將測定所得之結果示於圖8中。根據圖8可知，於利用本發明之血小板保存液保存了PRP之情形時，即便於保存長達3週後，亦將血小板濃度保持為足夠高之濃度為。

【0076】 (6.血小板凝集能力之評估)

於上述之(3.PRP之保存)中，利用與上述試驗1中記載之方法相同之方法，對將初次PRP保存3週之前、及保存3週後之血小板凝集能力進行評估。將保存後之血小板之最大凝集能力相對於保存前之血小板之最大凝集

能力的比率(即，「最大凝集變化率」)示於圖9中。根據圖9可知，於利用本發明之血小板保存液保存了PRP之情形時，即便於保存長達3週後，最大凝集率亦相對充分地得到了保持。

再者，針對在不向初次PRP中添加本發明之血小板保存液之情況下直接於4°C之條件下保存了3週者，評估血小板凝集能力，結果完全未觀察到凝集能力。

【0077】 (7.VEGF分泌能力之評估)

於上述之(3.PR之保存)中，利用與上述試驗2中記載之方法相同之方法，對進行3週保存前之初次PRP之VEGF分泌能力、及保存3週後之PRP之VEGF分泌能力進行評估。VEGF分泌能力係用將由採血供體 # 1製備之保存前之PRP之VEGF分泌能力設為100之情形時的相對值來表示。將其結果示於圖10中。根據圖10之結果表明，若利用本發明之血小板保存液保存PRP，則表現出保存前之2倍以上之VEGF分泌能力。

再者，針對在不向初次PRP中添加本發明之血小板保存液之情況下直接於4°C之條件下保存了3週者，評估VEGF分泌能力，結果完全未觀察到VEGF之分泌。

[產業上之可利用性]

【0078】 根據本發明，可提供一種於更多地保持血小板之功能之情況下，於冷藏或冷凍狀態下保存血小板之方法、及用於該方法之血小板保存液等。

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種冷藏用或冷凍用之血小板保存液，其含有電解質及抗凝固劑。

【請求項2】

如請求項1之血小板保存液，其中電解質係選自由氯化鈉、氯化鉀、氯化鈣、氯化鎂、碳酸氫鈉、乳酸鈉、及乙酸鈉所組成之群中之1種或2種以上，並且抗凝固劑係選自由檸檬酸、EDTA(乙二胺四乙酸)、DTPA(二乙三胺五乙酸)、DCTA(1,2-二胺基環己烷四乙酸)、EGTA(乙二醇雙(2-胺基乙基醚)四乙酸)、草酸、或其等之鹽所組成之群中之1種或2種以上。

【請求項3】

一種含有血小板之組合物，其含有如請求項1或2之血小板保存液、及血小板。

【請求項4】

一種含有血小板之組合物之製造方法，其包括使血小板懸浮於如請求項1或2之血小板保存液中之步驟。

【請求項5】

一種血小板之保存方法，其包括：

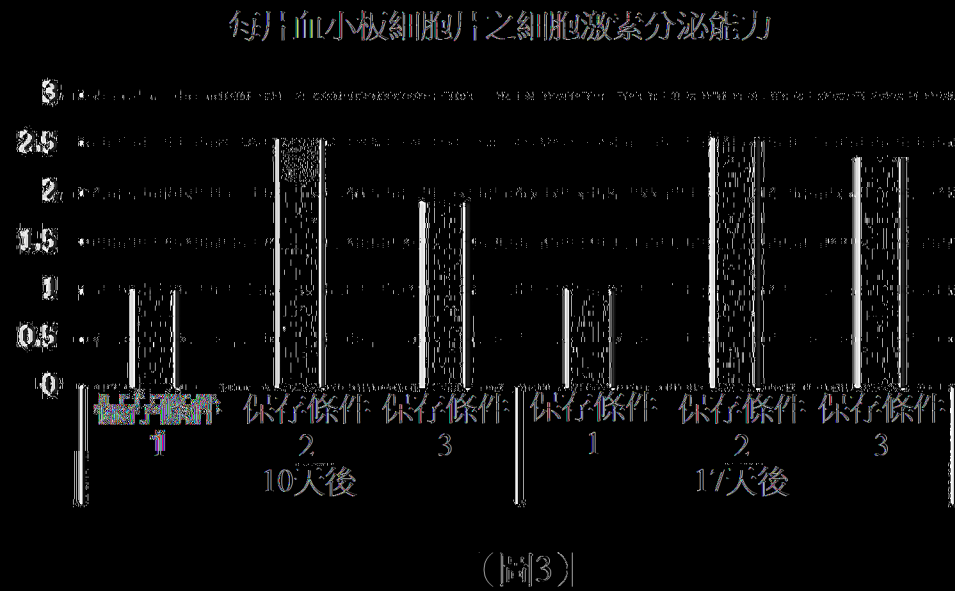
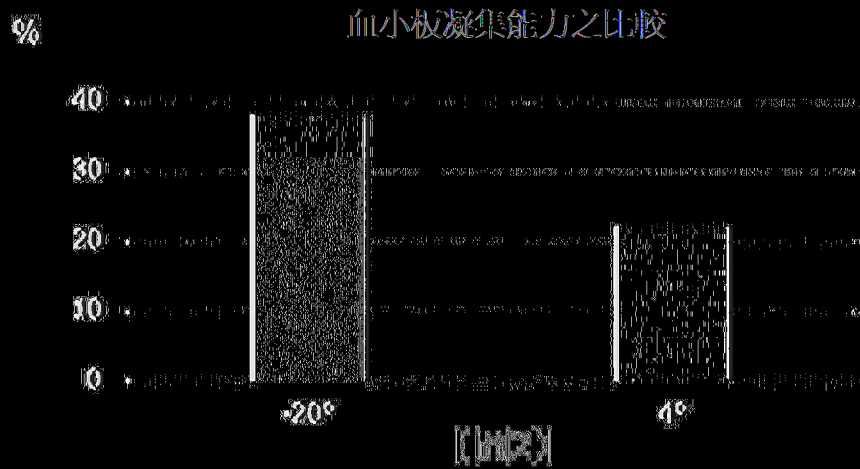
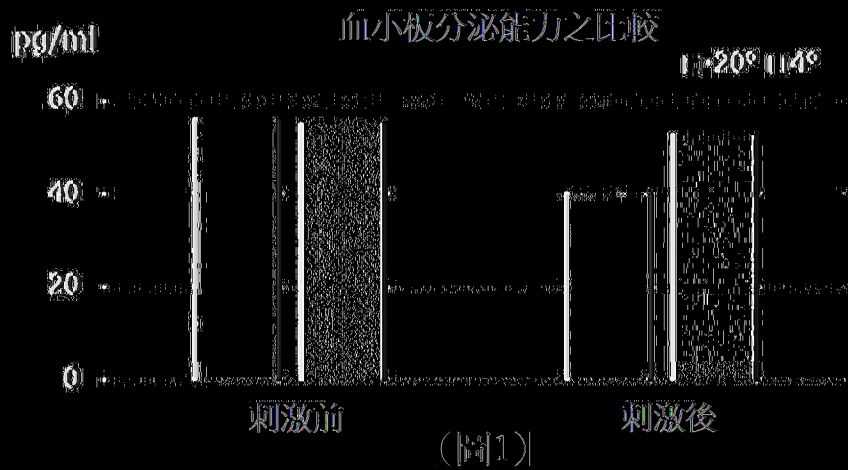
使血小板懸浮於如請求項1或2之血小板保存液中之步驟、及

將懸浮液於10°C以下進行冷藏保存或冷凍保存之步驟。

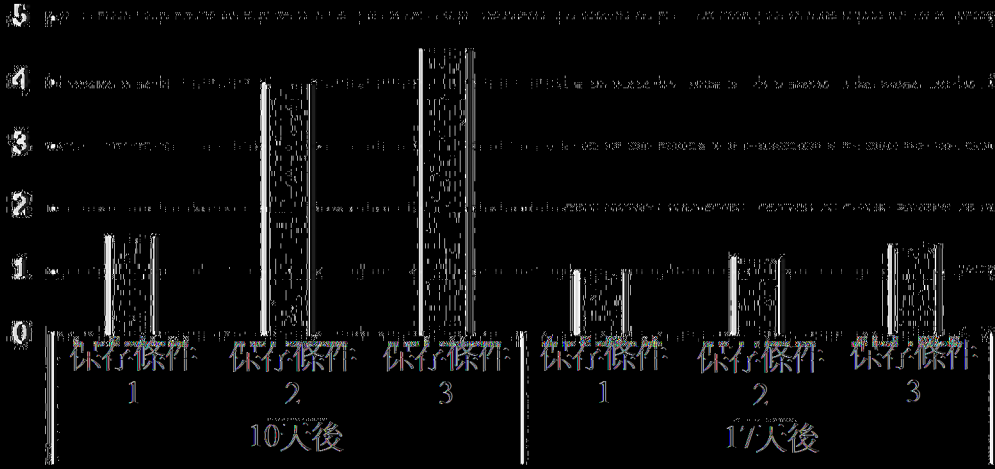
【請求項6】

如請求項5之血小板之保存方法，其中使血小板懸浮於血小板保存液中之步驟係使血小板懸浮於相對於血小板中之血漿之體積為0.1倍以上之體積之血小板保存液中之步驟。

(發明圖式)

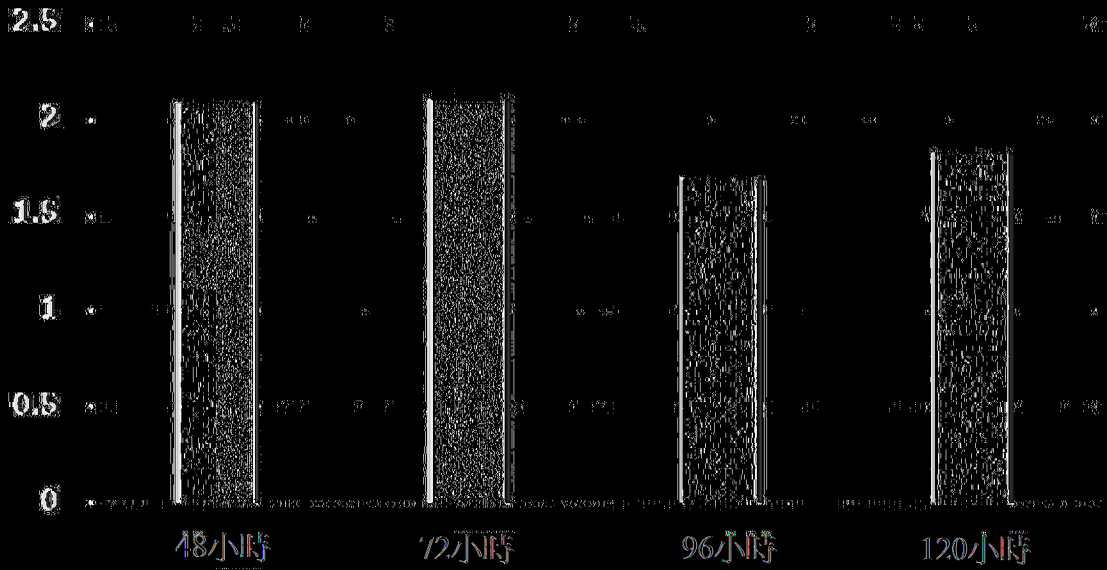


血小板凝集能力之比較



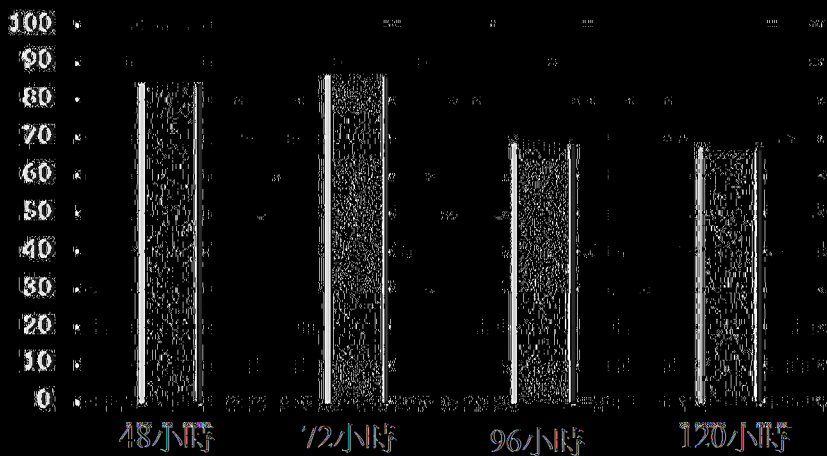
(圖4)

血小板濃度濃縮率



(圖5)

初次PRP最大凝集率



(圖6)

血小板濃度濃縮率

