

白血球除去フィルターから調製した血小板溶解液による間葉系幹細胞の増殖支持能

若本志乃舞¹⁾ 古川 友子²⁾ 川堀 真人²⁽³⁾ 秋野 光明¹⁾ 加藤 志歩¹⁾
布施 久恵¹⁾ 大槻 純男⁴⁾ 鳥本 悦宏¹⁾ 藤村 幹³⁾ 紀野 修一⁵⁾

【背景】幹細胞治療は、疾患の回復を促進する有望な治療法として期待されており、現在、多くの細胞医薬品が開発されている。幹細胞の増殖には血液由来のサプリメントが不可欠であり、ウシ胎児血清 (fetal bovine serum : FBS) が最も一般的に使用されている。しかし、FBS には免疫反応のリスク、動物福祉に関する倫理的懸念、及び人獣共通感染症の潜在的リスクといった欠点がある。ヒト血小板を溶解して得るヒト血小板溶解液 (human platelet lysate : hPL) は、多様な成長因子を含有し、FBS の代替品として推奨されている。しかし、hPL の臨床使用に必要な十分量のヒト血小板を得ることは困難である。血液製剤の製造工程で白血球を除去するために使用された白血球除去 (白除) フィルター内には、血小板と血漿が残存している。本研究では、白除フィルター内残余血液から調製した hPL (f-hPL) について、間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell : MSC) の増幅に使用するサプリメントとしての有用性と実用化の可能性を検討する。

【方法】使用済みの白除フィルターに、白血球除去処理とは逆の方向から生理食塩水を注入してフィルター内の残余血液を回収した。血液を遠心して血小板 (f-platelet) 沈渣とその上清に分離した。f-platelet に異なる濃度の新鮮凍結血漿 (fresh frozen plasma : FFP) を添加して溶解し、hPL の性能に適したタンパク質濃度を決定した。この結果に基づき、白除フィルター内の血漿 (f-plasma) を使用して、至適なタンパク質濃度の溶解液を調製した。f-platelet ($1.1 \times 10^9/\text{ml}$) と f-plasma (27mg/ml タンパク質) を混合し、3 回の凍結融解サイクルを施して f-hPL を調製した。Small scale 及び large scale の規模で f-hPL を調製し、MSC の増幅と性状を評価して f-hPL の有用性を検討した。

【結果】白除フィルター 1 個から、 $3.5 \pm 0.6 \times 10^{10}$ 個の f-platelet が回収され、回収率は $37.1 \pm 5.3\%$ だった。細胞増幅に至適な f-plasma のタンパク質濃度は 27mg/ml 以上だった。f-hPL 100ml の調製に、白除フィルター 6 個を要した。10% f-hPL を添加した培地で培養した MSC の細胞増幅率は、市販既製品 hPL と比較して 20% 高く、FBS と比較して 300% 高かった。f-hPL で増幅した MSC の細胞表面マーカーと分化能は国際細胞・遺伝子治療学会の基準を満たしていた。f-hPL で培養した MSC は、FBS 及びヒト AB 型血清で培養した MSC と比較して同等以上の肝細胞増殖因子を産生した。さらに、f-hPL による MSC の増殖は passage 12 まで FBS より有意に高く、細胞老化を抑制した。

【結論】使用済み白除フィルター内残余血液から調製した f-hPL は優れた MSC の増幅能を示した。再生医療における廃棄血液の利活用は、持続可能で効率的な取り組みであり、高い治療効果を発揮し得る可能性を秘めている。

キーワード：血小板溶解液、間葉系幹細胞、白血球除去フィルター、血小板、血漿

本論文記事は、Springer Nature の許可 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>) のもと、Stem Cell Research & Therapy 誌 (2025 16 : 205 <https://doi.org/10.1186/s13287-025-04329-y>) に最初に報告された研究に基づくものである。(Shinobu Wakamoto, Tomoko Furukawa, Masahito Kawabori, Mitsuki Akino, Shiho Kato, Hisae Fuse, Sumio Ohtsuki, Yoshihiro Torimoto, Miki Fujimura and Shuichi Kino. Human platelet lysate produced from leukoreduction filter contents enables sufficient MSC growth)

- 1) 日本赤十字社北海道ブロック血液センター
- 2) 株式会社 RAINBOW
- 3) 北海道大学大学院医学研究院 脳神経外科
- 4) 熊本大学大学院生命科学研究部 微生物薬学分野
- 5) 日本赤十字社血液事業本部

連絡責任者：若本志乃舞, E-mail : wakamoto@hokkaido.bc.jrc.or.jp

〔受付日：2025 年 11 月 7 日, 受理日：2026 年 1 月 20 日〕

緒 言

細胞移植療法は、さまざまな疾患の回復促進に有望な治療法として注目されている。現在までに、胚性幹細胞 (ES 細胞)、人工多能性幹細胞 (iPS 細胞)、間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cells : MSC) など、複数の細胞種について研究がなされてきた。多くの場合、幹細胞を培養液中で増殖させるために、血液由来のサプリメントを添加する必要があるが、中でも、ウシ胎児血清 (fetal bovine serum : FBS) が最も一般的に使用されている¹⁾。しかし、FBS には、動物由来の病原体汚染、異種抗原に対する免疫反応、動物福祉に関する倫理的懸念などの潜在的なリスクがある^{2)~4)}。ヒト AB 型血清は代替候補の一つであり、人獣共通感染の懸念がないという利点がある。現在、多数の臨床試験において細胞増幅にヒト AB 型血清が使用されている⁵⁾⁶⁾。しかし、ヒト AB 型血清はヒト血液であるため、コストが比較的高く、産業規模の幹細胞製品の需要増加に対応するには供給が不十分となる可能性がある。最近の報告では、ヒト血小板溶解液 (human platelet lysate : hPL) が FBS の有望な代替品であることが示されており⁷⁾⁸⁾、複数の臨床試験で幹細胞培養液のサプリメントとして hPL が採用されている^{9)~15)}。ヒト AB 型血清と同様に、臨床応用には十分な量の hPL が不可欠である。しかし、原料のヒト血小板は、輸血用血小板製剤 (platelet concentrate : PC) を製造する目的で主に血液センターで採血され、hPL 製造を目的としたものではない。そのために PC の 2~4% を占める有効期限切れ PC が hPL の製造に汎用されている。有効期限切れ PC を最小限に抑える取り組みが進んでいることから、hPL の原料は減少することが予想され、細胞増幅のサプリメントとしての使用が制限される可能性がある¹⁶⁾¹⁷⁾。

白血球除去 (白除) フィルターは、輸血用血液製剤の製造工程において、輸血副作用の原因の一つであるドナー白血球を除去するために用いられている。現在、白血球除去後の使用済み白除フィルターは医療廃棄物として廃棄されている。白除フィルターは白血球を捕捉するだけでなく、全血中に存在する血小板の約 30~99% も保持する。我々は白除フィルターが hPL の製造における血小板及び血漿の代替原料となり得ると考えた。本研究では、白除フィルター由来ヒト血小板溶解液 (f-hPL) の至適な製造方法を確認し、f-hPL の有用性を評価することを目的とした。

材料と方法

1. 研究倫理

本検討は北海道大学病院倫理委員会 (承認番号 : 012-0334) 及び日本赤十字社倫理委員会 (承認番号 : 2022-019-3) により承認を受けて実施した。各ボランティア

からは、献血時及び骨髄採取時に、血液サンプルを実験に使用することについて書面による同意を得ている。Lonza 社から入手した MSC は、研究用細胞製品のためのヒト組織取得に関する倫理承認に準拠している (詳細は <https://www.lonza.com/specialized-modalities/cell-and-gene/tissue-acquisition> でオンライン参照可能)。

2. 白除フィルター

血液は日本赤十字社北海道ブロック血液センターにおいて、健常人からの献血により採血された。f-hPL の製造方法を Fig. 1 に示す。献血により得られた 400 ml の全血を白除フィルター (Sepacell RZ-2000 N, Asahi Kasei Medical, Tokyo, Japan) 処理し、白除後の血液は輸血用血液製剤製造のために無菌切断した。使用済み白除フィルターは、白除前全血が入っていたバッグ (採血バッグ) に接続された状態のまま、翌日まで 4℃ で保存した。感染症検査 (梅毒、B 型肝炎ウイルス、C 型肝炎ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス及びヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型) の検査に合格した白除フィルターを f-hPL の原料に使用した。感染症検査の詳細は、Supplementary methods に概説した。

3. 白除フィルターからの血小板 (f-platelet) の回収

生理食塩水を充填した輸液バッグ (Hicaliq IVH バッグ, HC-B1006A, Terumo, Tokyo, Japan) と使用済み白除フィルターの末端を、TSCD-II コネクター (Terumo, Tokyo, Japan) を用いて無菌的に接合した。210ml の生理食塩水を白除フィルターの逆方向から注入し、白除フィルター内残余血液を採血バッグに回収して、無菌的に切断した。2つの ABO 同型の採血バッグを 1つの採血バッグにプールし、約 420ml とした。血液を遠心分離 (180g, 10 分, 室温) (9942, Kubota, Tokyo, Japan) して上清を別の血液バッグ (KBP-66DC, SB-Kawasumi, Tokyo, Japan) に移し、再度遠心分離 (120g, 10 分, 室温) して赤血球と白血球を除去した。2回目の遠心分離後、上清を別の血液バッグ (KBP-66DC, SB-Kawasumi, Tokyo, Japan) に回収した。回収した上清から少量のサンプルを採取し、血小板数、残存赤血球数、残存白血球数を測定した (Blood Bank モード搭載自動血球計数装置 XN-1000, Sysmex, Kobe, Japan)。その後、バッグを遠心分離 (4,000g, 20 分, 室温) (9920, Kubota, Tokyo, Japan) して血小板ペレット (filter-platelet : f-platelet) と上清に分離し、使用まで -80℃ で凍結保存した。

4. PL のタンパク質濃度

PL 調製に至適なタンパク質濃度を見出すため、異なるタンパク質濃度の f-hPL を調製した。方法 3. で得た上清と有効期限切れの新鮮凍結血漿 (fresh frozen plasma : FFP) を混合して FFP 濃度が 0%, 20%, 35%, 40%, 70%, 90% の液を調製し、各 FFP 濃度の混合液を f-platelet に添加した。各血小板浮遊液の血小板濃度

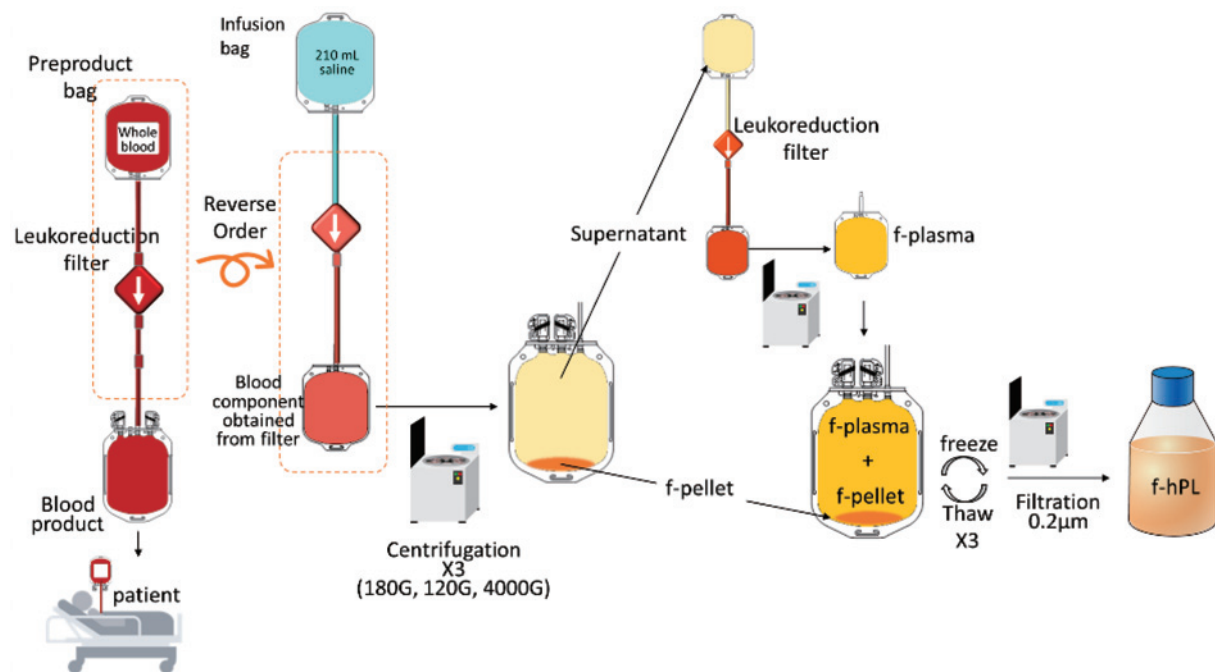


Fig. 1 Schematic Representation of f-hPL Production

The leukoreduction filter is reversely perfused with saline to recover the residual contents within the filter. The collected contents are then subjected to centrifugation to obtain the f-pellet and supernatant. The supernatant is subsequently passed through an additional leukoreduction filter to achieve a sufficient protein concentration (27mg/ml) for f-plasma. f-platelet and f-plasma are then combined, followed by three freeze-thaw cycles to facilitate platelet membrane disruption. After purification through centrifugation and filtration, the final f-hPL is collected.

は $1.1 \times 10^9/\text{ml}$ とした。f-platelet の血小板膜を十分に破壊するために 3 回、凍結 (-80°C , 4.5 時間以上) 融解 (4°C , 20 時間以上) した後、遠心分離 (4,000g, 20 分, 4°C) 及びフィルトレーション ($0.2\mu\text{m}$, Thermo Fisher Scientific) して, PL を回収した。方法 3. で得た上清と有効期限切れ FFP のタンパク質濃度はそれぞれ $5.8\text{mg}/\text{ml}$ 及び $65\text{mg}/\text{ml}$ であった。各 FFP 濃度の混合液で調製した PL のタンパク質濃度はそれぞれ, 6, 18, 27, 30, 48, $60\text{mg}/\text{ml}$ であった。タンパク質濃度は, BCA タンパク質アッセイキット (23225, Thermo Fisher Scientific) を用いて測定した。細胞増幅に至適な PL のタンパク質濃度を特定するため, 調製した PL の細胞増幅能を評価した。MEM- α (Thermo Fisher Scientific) に FFP 濃度の異なる各 PL (10%), ヘパリン ($2\text{IU}/\text{ml}$), ゲンタマイシン ($40\mu\text{g}/\text{ml}$) を添加した培地を調製した。この培地を使用して, 骨髓由来 MSC (Lonza, Walkersville, MD, USA) を 24 well プレートに $5 \times 10^3/\text{cm}^2$ で播種した。サプリメントの比較対照として, FFP 単独, 市販の hPL (nLivenPRTM, PL-PR-100, Sexton Biotechnologies, IN, USA), 及び FBS (Equitech-Bio Inc., TX, USA, Gibco, 12662-029, NY, USA) を用いた。細胞は播種 5 日後に回収して細胞数を測定し (Luna-FL, Logos Biosystems, South Korea), 細胞増幅率を培養後細胞数と播種細胞数の比率として算出した。細胞

形態を評価するため顕微鏡画像を撮影した。

5. 白除フィルター由来 PL (f-hPL) の調製

前述の検討で, 至適な細胞増幅には $27\text{mg}/\text{ml}$ 以上のタンパク質濃度が必須であることが明らかとなった。方法 3. で得た上清を再度, 別の白除フィルターに注入して, フィルター内の残余血液から血漿を分離することにより, タンパク質濃度を $27\text{mg}/\text{ml}$ に調製した (f-plasma)。f-platelet に血小板濃度が $1.1 \times 10^9/\text{ml}$ となるよう f-plasma ($27\text{mg}/\text{ml}$) を添加して f-hPL を調製した (Fig. 1)。はじめに, small scale で, 15 個の白除フィルターから 226ml の f-hPL を調製した。前述 (方法 4.) の方法で MSC を使用して f-hPL の細胞増幅能を評価した。Small scale で調製した f-hPL, 市販の hPL または FBS を 10% 添加した培地を使用して細胞増幅と表面マーカーへの影響を比較した。次に large scale で, 284~292 個の白除フィルターから 4.7l の f-hPL を調製した。f-hPL は 5l バッグ (STD FLEXSAFE[®] 5L, Sartorius Stedim Biotech) にプールし ($5\text{l}/\text{lot}$), Biowelder[®] TC (Sartorius Stedim Biotech), フィルター (Sartopore 2XLG $0.2\mu\text{m}$), ペリスタティックポンプ (630 S/R, WatsonMarlow) を用いてフィルトレーションした。前述 (方法 4.) の方法で, f-hPL の MSC の増幅能を評価した。比較対照として, FBS を使用した。

6. f-hPL で培養した MSC の評価

Large-scale f-hPL を以降の解析に使用した。前述(方法 4.)の方法で MSC を使用して f-hPL の細胞増幅能を評価した。f-hPL, FBS, またはヒト AB 血清(H6910, Sigma-Aldrich 社, MO, USA) を 10% 添加した MEM- α 培地を, 前述の方法に従って調製し, 異なるサプリメントで培養した MSC の増殖と性状を比較した。前述の培地を用いて 3 つの異なるロットの MSC (Passage 4 : P4) をフラスコで 5 日間, 培養した後, トリプシン処理して細胞を剥離し, 洗浄して細胞数を測定した。サプリメントを含まない MEM- α を使用して 24 well プレートに細胞を再播種した。培養 3 日目に培養上清を回収して hepatocyte growth factor (HGF) 濃度の測定 (Human HGF ELISA kit, DHG00B, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) とプロテオーム解析を実施した。サプリメントによって, 細胞増幅の程度が異なるため, HGF 濃度は培養 3 日目の細胞数で補正した。プロテオーム解析は上清をトリプシン処理し, 既報の方法¹⁸⁾¹⁹⁾に従い, 質量分析法により, 実施した。プロテオーム解析の詳細な手順は Supplementary methods に記載した。さらに, f-hPL, FBS, またはヒト AB 血清で培養した MSC の細胞老化を評価した。前述の MSC を, 異なるサプリメントを用いて 12 well プレートで P12 まで継代培養した。細胞は 4 日ごとに回収し, 細胞数を測定した。Population doublings (PD) は, 以下の式で求めた。

$$PD = [\log_{10} (N_h) - \log_{10} (N_i)] / \log_{10} (2)$$

N_h : 回収時の細胞数, N_i : 播種細胞数

Cumulative population doublings (CPD) は, 継代毎において得られた PD の総和とし, 本検討では P5 から P12 までを算出した。細胞老化の指標である β -ガラクトシダーゼ (β -gal) 発現は, 各サプリメントで培養した細胞の P5, P8, P12 において, Kit-SPiDER- β Gal (Dojindo, Tokyo, Japan) を用いて染色して検出した。蛍光強度を, 3 つの無作為に選択した重複のない関心領域 (randomly selected, non-overlapping regions of interest : ROIs) から, 自動蛍光カウンターアプリケーション (BZ-X Analyzer, Keyence Co., Osaka, Japan) を用いて測定した。

7. f-hPL を使用した MSC 大規模製造の評価

臨床応用に適した規模で細胞増殖を評価するために自動細胞増殖システム (Quantum cell expansion system, Terumo BCT, CO, USA) を使用した。10% f-hPL を前述の培地 (ヘパリン, ゲンタマイシンを添加した MEM- α) に添加して, 10l の培地を調製した。新鮮な骨髓液 50ml を, メーカーの取扱説明書に従って, システムにセットした。MSC に培地を供給するため, 0.1~4.0ml/分の流量で灌流した。増殖中の細胞数を評価するため, 乳酸濃度を毎日モニタリングした。骨髓液注入 21 日後

に自動細胞増殖システムから細胞を回収し, 以前に報告した方法に従って, 細胞数, 生存率, サイズ, 表面マーカー, 分化能を評価した¹⁰⁾。表面抗原及び分化能の評価に用いた抗体とキットは Supplementary table に記載した。

統計解析

すべての評価は盲検下で実施した。データは平均値 $\pm$ 標準偏差 (SD) で示した。統計解析は JMP Pro 14 ソフトウェア (SAS Institute Inc., NC, USA) または GraphPad Prism バージョン 9.0.1 (Graphpad Software, MA, USA) を用いて実施した。2 群間の統計的比較は t 検定または Wilcoxon 検定を用い, 3 群以上の群間比較は一元配置分散分析 (ANOVA) で検定後, Turkey's HSD 検定を実施した。危険率 (P) 5% 未満を有意とした。

結 果

f-platelet と白除フィルター由来の上清

596 個の白除フィルターを検討対象とした。1 個の白除フィルターから回収された血小板数は $3.5 \pm 0.6 \times 10^{10}$ 個で, フィルターからの血小板回収率は $37.1 \pm 5.3\%$ であった。1 個の白除フィルターあたりの残存白血球数及び残存赤血球数はそれぞれ, $4.1 \pm 4.0 \times 10^4$ 個と $11.3 \pm 4.5 \times 10^6$ 個であった。

PL に至適なタンパク質濃度

白除フィルター内血液の回収において, 白除フィルターに生理食塩水が注入されることにより, 血漿成分は期限切れ PC よりも大幅に低くなると考えられ, このことが f-hPL の品質に影響を与える可能性がある。そこで, PL の細胞増幅能に至適なタンパク質濃度を検討するため, 異なるタンパク質濃度の PL の細胞増幅能を評価した。その結果, PL のタンパク質濃度が高いほど, 細胞増幅が優れていることが明らかとなった (Fig. 2)。27~60mg/ml のタンパク質濃度では, 細胞増幅に有意な差はみとめられなかった。しかし, 60mg/ml 群とそれぞれ, 6mg/ml 群, 18mg/ml 群, FBS 群及び FFP 群との間には顕著な差がみられた。60mg/ml 群の細胞増幅率は FBS 群の約 4 倍であった。これらの結果は, 60mg/ml のタンパク質濃度が PL の細胞増幅能に重要であることを示している。注目すべきことは FFP 単独による培養では細胞増幅能が低値だったことである。FFP は十分なタンパク質を含有するが, 血小板を含有していない。このことは十分な性能を発揮する PL の製造には血小板と PL の液体部分のタンパク質の両方が必要不可欠であることを示している。さらに顕微鏡観察により, 6mg/ml 群では細胞形態に異常が認められ, 27mg/ml 及び 60mg/ml 群では正常な紡錘形態が確

認された (Fig. 3). これらの結果に基づき, タンパク質濃度 27mg/ml の PL を解析に用いることとした.

small-scale 及び large-scale で調製した f-hPL による MSC 増幅能評価

small-scale (白除フィルター約 15 個/lot) 及び large-scale (白除フィルター約 290 個/lot) で調製した f-hPL による MSC 増幅能を評価した. いずれの f-hPL も, 市販の hPL または FBS と比較して MSC の増幅能は約 4 倍であった (Fig. 4A : small-scale, Fig. 4B : large-scale). 顕微鏡観察により, large-scale f-hPL 及び FBS で培養した MSC は, MSC に特徴的な紡錘形態が確認された (Fig. 4C). さらに large-scale f-hPL で培養した MSC

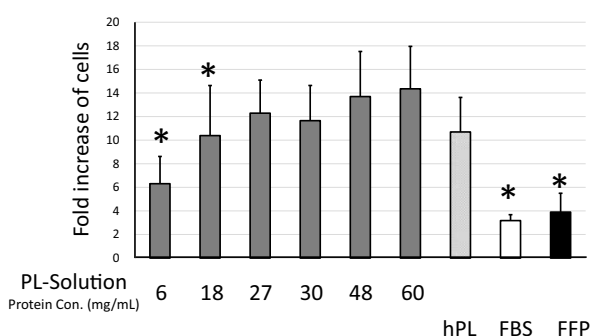


Fig. 2 Impact of protein concentration of lysate solution on MSC proliferation

MSC were grown with platelet lysate containing different protein concentration of lysate solution (6, 18, 27, 30, 48, and 60mg/ml). The results of the cell expansion assay revealed that protein concentrations ranging from 27 to 60mg/ml did not exhibit statistically significant differences. However, notable differences were observed between the 60mg/ml group and the 6mg/ml, 18mg/ml, FBS, and FFP groups.

Results are expressed as mean $\pm$ SD of MSCs from three donors.

* $p < 0.05$ compared to f-hPL plasma protein of 60mg/ml

の表面マーカーの発現は国際細胞・遺伝子治療学会 (International Society for Cell & Gene Therapy : ISCT) の基準を満たした (Table 1).

f-hPL で培養した MSC の機能評価

異なるサプリメントで培養した MSC の機能を評価した. f-hPL で増幅した MSC の HGF の分泌は FBS とヒト AB 型血清で培養した MSC と比較して同等かそれ以上であった (Fig. 5A). 培養上清のプロテオーム解析により, f-hPL で培養した MSC から分泌されたタンパク質は, FBS で培養した MSC と比較して概ね同様の発現プロファイルを示し, 1,355 種類 (82%) のタンパク質が両者で同定された (Fig. 5B, C). しかし, 両者で発現量が異なるタンパク質がみられ, FBS で培養した MSC と比較して, f-hPL で培養した MSC では 153 種類のタンパク質の発現量は高く, 135 種類のタンパク質の発現量は低値であった. Biological process Gene Ontology (GO) enrichment analysis の結果, FBS で培養した MSC と比較して, f-hPL で培養した MSC では RNA スプライシングと mRNA プロセッシングに参与するタンパク質の発現が亢進し, 一方で, 細胞外マトリックスの形成に参与するタンパクの発現は低下していた. この結果は f-hPL で培養した MSC の増殖が活発であることを示唆する (Fig. 5D, Supplementary Fig. A). さらに f-hPL で培養した MSC では FBS で培養した MSC と比較して, 幹細胞性関連タンパク質 (Myc targets v1) の発現が有意に高く, 一方でコラーゲンマトリックスタンパク質の発現は低下しており, より効率的な細胞増殖のための細胞移動能の亢進が示唆された (Supplementary Fig. B, C). また, f-hPL とヒト AB 血清を比較したデータも, f-hPL と FBS との比較で観察された結果と一致していた (データ示さず).

異なるサプリメントで培養した MSC の細胞老化も評価した. f-hPL は FBS 及びヒト AB 型血清と比較して

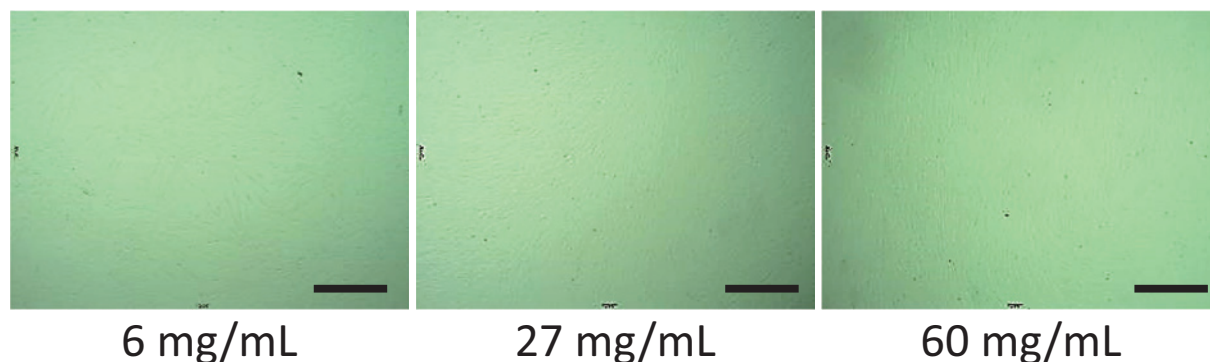


Fig. 3 Microscopic cell morphology

MSCs were expanded using human platelet lysate with varying protein concentrations in the lysate solution. The 27mg/ml and 60mg/ml groups exhibited the characteristic spindle-shaped morphology of MSCs, whereas the 6mg/ml group displayed an irregular and non-uniform cell shape. Bar = 500 μ m

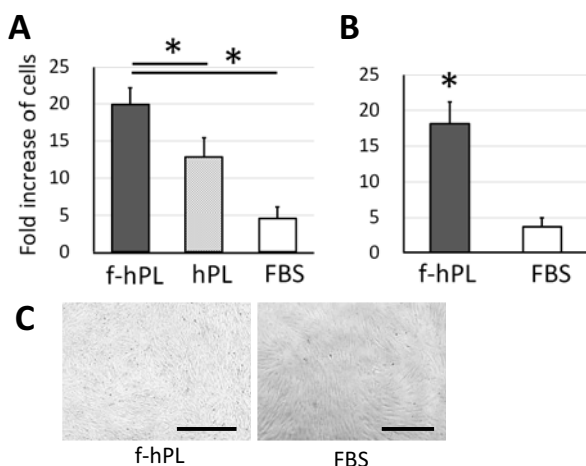


Fig. 4 Cell expansion potential for small and large-scale production of f-hPL

(A) The MSCs expansion capacity was assessed using both small-scale (approximately 50 filters) and large-scale (approximately 150 filters) production of f-hPL. Small-scale f-hPL demonstrated significantly higher cell expansion potential compared to commercial platelet lysate (PL) and fetal bovine serum (FBS). (B) Similarly, large-scale f-hPL exhibited significantly greater cell expansion capacity compared to FBS. (C) Microscopic analysis of MSCs expanded with large-scale f-hPL and FBS revealed the characteristic spindle-shaped morphology of MSCs. Bar = 500μm

P12まで有意に高い細胞増幅を示した (Fig. 6). AB型血清で培養したMSCでは, P8でβ-gal発現がより高い傾向を示したのに対し, FBS及びf-hPLでは発現が低く, 細胞増殖の結果を裏付ける結果であった. P12において, FBSで培養したMSCは顕著なβ-gal発現を示したのに対し, f-hPLで培養したMSCのβ-gal発現は比較的, 低値であった (Fig. 7A, B). f-hPLで培養したMSCでは高い増殖が観察され, より多くの細胞分裂を経たことが示唆されることから, 同じ継代数において細胞老化の指標が低値であったことはf-hPLで培養したMSCにおける良好な抗老化特性を示している.

f-hPLによる臨床応用レベルでの細胞増幅

自動細胞培養増殖システムを用いて, f-hPLの有用性を検討した. 3人の異なるドナー由来の骨髓液をQuantum cell expansion systemに投入した. 培地の品質評価の指標として, Platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB)濃度を測定した結果, 12.4~17.7ng/mlの範囲であった. f-hPL含有培地によってMSCは良好に増幅され, 増幅後の細胞数は $4.6 \sim 12.6 \times 10^7$ 個で, 高いviability (>90%)を示し, 表面マーカーの発現と分化能は所定の特性を示した (Table 2; Fig. 8).

考 察

本研究において, 白除フィルター内の残余血液を利

Table 1 Surface marker expression of MSCs grown in the medium supplemented with large scale production of f-hPL

Surface Marker	f-hPL #1	f-hPL #2	f-hPL #3
CD90	99.8%	99.9%	99.9%
CD73	95.4%	99.2%	98.6%
CD105	97.2%	98.1%	95.9%
CD44	99.6%	99.7%	99.5%
CD166	96.6%	98.3%	94.6%
CD34	0.0%	0.1%	0.1%
CD45	1.4%	0.6%	1.1%
CD19	0.1%	0.1%	0.1%
CD14	0.1%	0.1%	0.0%
HLA-DR	0.6%	1.1%	0.9%

用してヒト血小板溶解液 (hPL) を調製できることを示した. f-hPLの細胞増幅能は市販のhPLと同等で, FBSよりも優れていた. さらに, f-hPLの調製に使用する血漿のタンパク質濃度が27mg/ml以上であることが, f-hPLの調製における重要な因子であることを明らかにした. f-hPLで培養したMSCの機能は, FBS及びヒトAB型血清と比較して同等かそれ以上であった.

PCの製造方法は, バフィーコート法, platelet rich plasma法, シングルドナーアフェレーシス由来など, 多数ある. これらの方法で製造されたPCからMSCの増幅に有用なPLが製造されている. PCをPLの原料に使用することは, 患者の治療を目的とした本来の臨床使用と競合する. 我々の研究では血液製剤の製造工程で廃棄される材料を利活用しており, 国連の持続可能な開発目標 (Sustainable Development Goals: SDGs) に掲げられている「つくる責任・つかう責任」の理念に沿った新たなアプローチである. 我々は, f-plasmaに適したタンパク質濃度は27mg/ml以上であることを見出した. これは日本のPCのタンパク質の濃度 (67mg/ml) の約半分である²¹⁾²²⁾. さらに我々は, 血小板単独でも血漿単独でも, 至適な細胞増幅は得られず, 両者を混合することにより, 細胞増殖を促進する相乗効果が生じることを明らかにした. 血漿タンパク質含有量の約60%がアルブミン, 次いで15%が免疫グロブリンG, 3%がフィブリノーゲンである²³⁾²⁴⁾. この相乗効果に寄与する特定の因子についてはさらなる研究が必要である. hPL中のPDGF-BBはMSCの増幅に寄与する重要な因子と考えられており, 我々は以前, 培地中のPDGF-BB濃度とMSC増殖の程度との間に相関関係があることを報告している²⁵⁾. f-hPL中のPDGF-BB濃度は12.4~17.7ng/mlの範囲であり, これは我々の先行論文において, 同等の血小板数を含有するPC (20単位) から調製したhPL中のPDGF-BB濃度, 5~6ng/mlのほぼ2倍に相当する. この濃度の違いはPLの調製方法の違いに起因すると考えられる. 先行論文

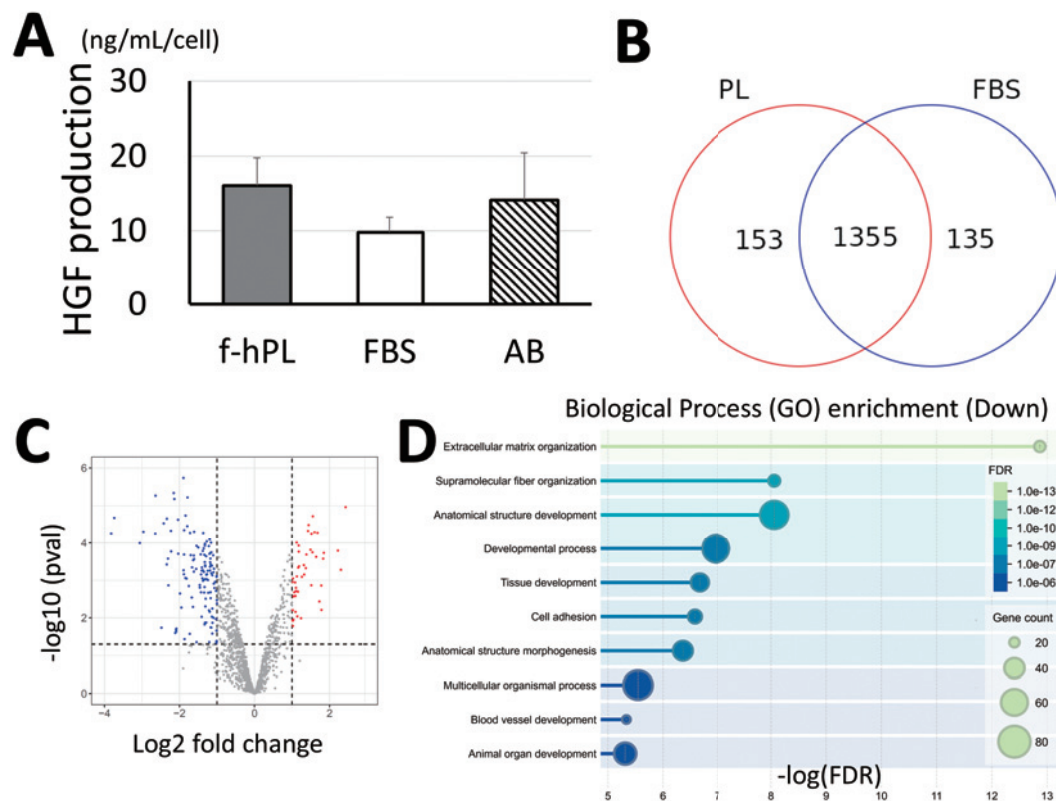


Fig. 5 MSC expression profile with different supplements

(A) Hepatocyte growth factor expression profile of MSC supernatant treated with f-hPL, FBS, or human AB serum. f-hPL demonstrated similar to superior expression compared with other supplements ($n=3$ each). (B) Venn diagram of proteomics analysis showed that proteins released from cells pre-exposed to f-hPL displayed a predominantly similar expression profile compared to those exposed to FBS. While differential expression of proteins was observed between the groups, with 153 proteins exhibiting higher expression and 135 proteins showing lower expression in the f-hPL group. (C) Volcano plots of the identified protein. (D) Biological process Gene Ontology (GO) enrichment analysis revealed that extracellular matrix organization was downregulated in the f-hPL group. $n=3$ each

と異なる点は、本検討では f-hPL の補体の非働化(56°C, 30 分)を行わなかったことである。非働化は血液中の補体による反応を低減する目的で用いられる一方で FBS 中のサプリメントを減少させることが報告されている²⁶⁾。サプリメントの補体の非働化が MSC の増幅に必要かどうかは不明である。

本研究では、輸血用血液製剤に実施される感染症検査の基準と同等の規格を満たす白除フィルターを使用した。そのため、f-hPL の病原体汚染の危険性は輸血用血液製剤と同等のレベルまで低減される。しかし、輸血用血液製剤と同様に、ウィンドウ期のウイルス混入のリスクは完全には排除できない。f-hPL の臨床応用においては、ウイルス不活化のためのガンマ線照射が必須となる。我々は MSC の増殖と機能の両方について、f-hPL, FBS 及びヒト AB 型血清の効果を比較した。MSC は老化が進むにつれてサイズがより大きく、形態がより扁平化することが報告されている²⁷⁾。また、p53/p21

及び p16 経路の活性化により β -gal 発現が増加する²⁸⁾。我々の結果は、P12 まで、f-hPL による優れた細胞増幅能を示し、この結果はより老化の指標が低値であったことと相関している。これらの知見は、PL が MSC のアポトーシス及び老化関連遺伝子の発現を抑制し、腫瘍関連遺伝子の変化を回避するという報告と一致している²⁹⁾。プロテオーム解析により、f-hPL で培養した MSC では、FBS で培養した MSC と比較して細胞外マトリックスの形成に係るタンパク質の発現が減少していたが、この現象の詳細なメカニズムは不明である。我々の観察では、f-hPL で培養した MSC は FBS で培養した MSC に比べて剥離しやすかった。この違いに細胞外マトリックスの形成に係るタンパク質に関連した MSC 形態変化が関与している可能性が示唆される。

本研究にはいくつかの限界があり、さらなる解析が必要である。第一に、f-hPL の細胞増幅能に寄与する特定のタンパク質を同定できなかった。これはヒト由来

成分に依存しない、細胞増殖を支持する合成サプリメントの開発において特に重要である。しかし血小板機能が多様で複雑であるため、候補タンパク質やエキソソームの完全な解明は依然として課題である。第二に、本研究では f-hPL の調製に至適な血小板濃度について検討していない。f-hPL の血小板濃度が高いほど細胞増幅能が向上すると考えられるが、hPL の商業的流通に際しては、有効性と経済性のバランスを見極めることが重要である。第三に、本研究では、血小板通過型（血小板を捕捉しない）白除フィルターを含む、日本の血液製剤の製造に使用されていない他の白除のフィルターについては評価できなかった。しかしながら、f-hPL の調製に使用する f-plasma に至適なタンパク質濃度は 27mg/ml 以上であることを示唆する我々の知見は、他

の白除フィルターから hPL を調製する上で重要な基準となり得る。

結 論

白除フィルター由来の f-hPL は、高い MSC 増幅能を示した。血液製剤の製造工程で廃棄される血液を再生医療に活用することは、持続可能で効率的な取り組みであり、高い治療効果を発揮し得る可能性を有している。

著者の COI 開示：若本志乃舞、秋野光明、加藤志歩、布施久恵、鳥本悦宏、紀野修一は日赤職員である。

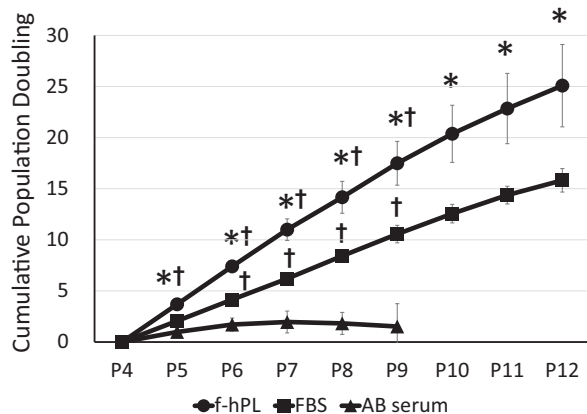


Fig. 6 Cumulative cell expansion with different supplements

f-hPL facilitated significantly better MSC expansion compared to both FBS and human AB serum up to P12. AB serum group culture were ceased after P9 because of the low cell division.

n = 3 each

*p<0.05 compared to FBS, †p<0.05 compared to human AB serum

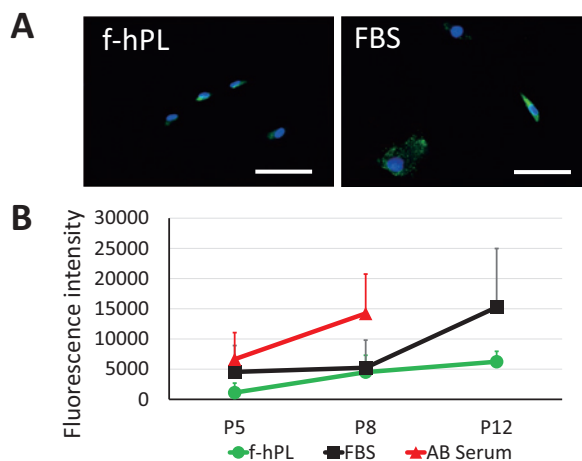


Fig. 7 Cell senescence analysis between different supplements

(A) β -gal staining of the MSC treated with either f-hPL or FBS after P12. Significantly high signals are seen in the FBS group. (B) Fluorescence intensity of MSC treated with different supplements were compared regarding different passages. Human AB serum exhibited a higher trend of β -gal expression as early as P8, whereas FBS and f-hPL showed lower levels of expression. MSCs treated with FBS exhibited substantial β -gal expression at P12, whereas f-hPL-treated MSCs displayed comparatively lower expression.

n = 3 each, Bar = 100 μ m

Table 2 Surface marker expression of MSCs grown in the medium supplemented with large scale production of f-hPL in Quantum system

		BM 1	BM 2	BM 3
f-hPL	PDGF-BB (ng/ml)	12.4	17.7	10.5
Automated cell culture	Quantity of Bone marrow (ml)	50	50	50
	Age of donor (Y)	23	25	22
	Total cell number	4.6×10^7	12.6×10^7	8.4×10^7
	Viability	91.8%	95.3%	89.4%
	Cell size (μ m)	16.5	21.5	15.6
FACS	Isotype control	2.0%	1.7%	0.9%
	CD45	3.7%	1.9%	2.3%
	CD44	94.5%	99.5%	99.7%
	CD90	95.3%	99.5%	99.5%
	CD105	92.9%	96.6%	91.7%
	CD166	88.8%	93.0%	82.1%

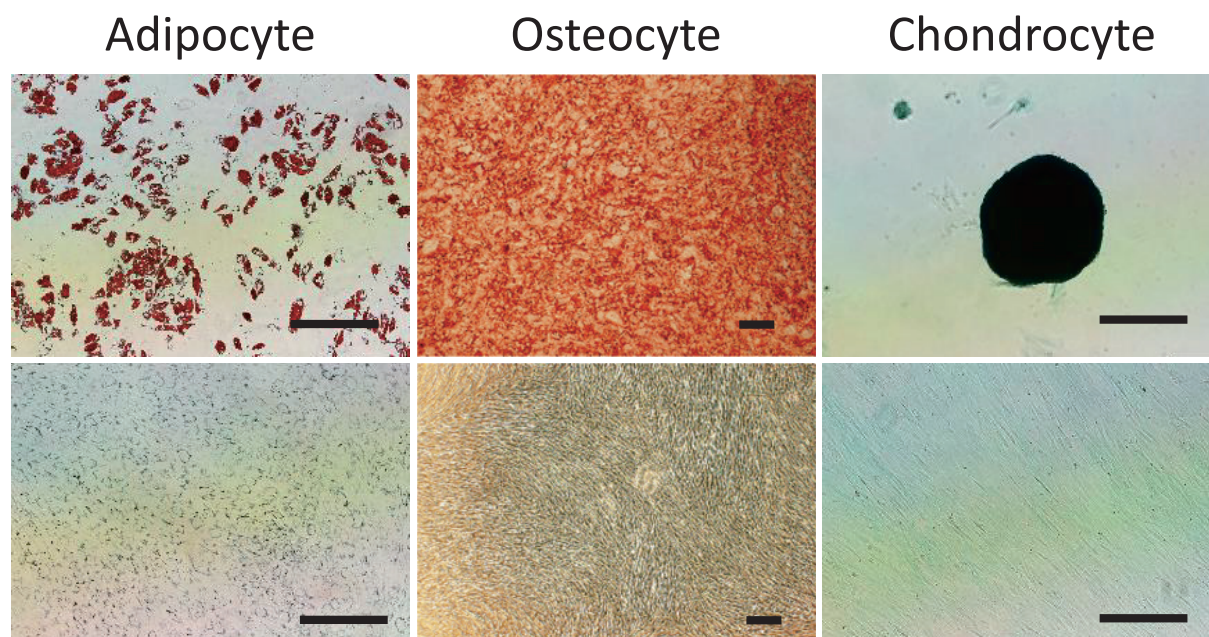


Fig. 8 MSC differentiation potential

MSCs expanded with large-scale f-hPL and cultured in the Quantum system demonstrated robust differentiation potential into three distinct lineages: adipogenesis, osteogenesis, and chondrogenesis (Lower row: control).

Bar = 200μm

謝辞：本研究に際し、技術面でご支援いただいた鈴木 藍氏に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Mendicino M, Bailey AM, Wonnacott K, et al: MSC-based product characterization for clinical trials: an FDA perspective. *Cell Stem Cell*, 14 (2): 141—145, 2014.
- 2) Selvaggi TA, Walker RE, Fleisher TA: Development of antibodies to fetal calf serum with arthus-like reactions in human immunodeficiency virus-infected patients given syngeneic lymphocyte infusions. *Blood*, 89 (3): 776—779, 1997.
- 3) Karnieli O, Friedner OM, Allickson JG, et al: A consensus introduction to serum replacements and serum-free media for cellular therapies. *Cytotherapy*, 19 (2): 155—169, 2017.
- 4) Chachques JC, Herreros J, Trainini J, et al: Autologous human serum for cell culture avoids the implantation of cardioverter-defibrillators in cellular cardiomyoplasty. *Int J Cardiol*, 95 (Suppl 1): S29—S33, 2004.
- 5) Honmou O, Yamashita T, Morita T, et al: Intravenous infusion of auto serum-expanded autologous mesenchymal stem cells in spinal cord injury patients: 13 case series. *Clin Neurol Neurosurg*, 203: 106565, 2021.
- 6) Honmou O, Houkin K, Matsunaga T, et al: Intravenous administration of auto serum-expanded autologous mesenchymal stem cells in stroke. *Brain*, 134 (Pt 6): 1790—1807, 2011.
- 7) Perez-Ilzarbe M, Diez-Campelo M, Aranda P, et al: Comparison of ex vivo expansion culture conditions of mesenchymal stem cells for human cell therapy. *Transfusion*, 49 (9): 1901—1910, 2009.
- 8) Doucet C, Ernou I, Zhang Y, et al: Platelet lysates promote mesenchymal stem cell expansion: a safety substitute for animal serum in cell-based therapy applications. *J Cell Physiol*, 205 (2): 228—236, 2005.
- 9) von Bonin M, Stolzel F, Goedecke A, et al: Treatment of refractory acute GVHD with third-party MSC expanded in platelet lysate-containing medium. *Bone Marrow Transplant*, 43 (3): 245—251, 2009.
- 10) Kawabori M, Kuroda S, Shichinohe H, et al: Intracerebral transplantation of MRI-trackable autologous bone marrow stromal cells for patients with subacute ischemic stroke. *Med*, 5 (5): 432—444, 2024.
- 11) Gjerde C, Mustafa K, Hellem S, et al: Cell therapy induced regeneration of severely atrophied mandibular bone in a clinical trial. *Stem Cell Res Ther*, 9 (1): 213, 2018.

- 12) Dhere T, Copland I, Garcia M, et al: The safety of autologous and metabolically fit bone marrow mesenchymal stromal cells in medically refractory Crohn's disease - a phase I trial with three doses. *Aliment Pharmacol Ther*, 44 (5): 471—481, 2016.
- 13) Sanchez-Guijo F, Caballero-Velazquez T, Lopez-Villar O, et al: Sequential third-party mesenchymal stromal cell therapy for refractory acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant*, 20 (10): 1580—1585, 2014.
- 14) Introna M, Lucchini G, Dander E, et al: Treatment of graft versus host disease with mesenchymal stromal cells: a phase I study on 40 adult and pediatric patients. *Biol Blood Marrow Transplant*, 20 (3): 375—381, 2014.
- 15) Kawabori M, Shichinohe H, Kahata K, et al: Phase I/II trial of intracerebral transplantation of autologous bone marrow stem cells combined with recombinant peptide scaffold for patients with chronic intracerebral haemorrhage: a study protocol. *BMJ Open*, 14 (12): e083959, 2024.
- 16) Girona-Llobera E, Jimenez-Marco T, Galmes-Trueba A, et al: Reducing the financial impact of pathogen inactivation technology for platelet components: our experience. *Transfusion*, 54 (1): 158—168, 2014.
- 17) Burnouf T, Goubran HA: Regenerative effect of expired platelet concentrates in human therapy: An update. *Transfus Apher Sci*, 61 (1): 103363, 2022.
- 18) Ogata S, Ito S, Masuda T, et al: Isolation method of brain microvessels from small frozen human brain tissue for blood-brain barrier protein expression analysis. *Fluids Barriers CNS*, 21 (1): 106, 2024.
- 19) Hamada Y, Masuda T, Ito S, et al: Regulatory Role of eIF2 α K4 in Amino Acid Transporter Expression in Mouse Brain Capillary Endothelial Cells. *Pharm Res*, 41 (11): 2213—2223, 2024.
- 20) Burnouf T, Strunk D, Koh MB, et al: Human platelet lysate: Replacing fetal bovine serum as a gold standard for human cell propagation? *Biomaterials*, 76: 371—387, 2016.
- 21) Oikawa S, Minegishi M, Endo K, et al: Impact of the platelet washing process on in vitro platelet properties, and the levels of soluble CD40 ligand and platelet-derived microparticles in the storage media. *Transfusion*, 59 (3): 1080—1089, 2019.
- 22) Oikawa S, Minegishi M, Endo K, et al: Washing of platelets can be fully automated using a closed-system cell processor and BRS-A platelet additive solution. *Vox Sang*, 111 (4): 437—440, 2016.
- 23) Burnouf T, Kuo YP, Huang CT, et al: A virally inactivated platelet-derived growth factor/vascular endothelial growth factor concentrate fractionated from human platelets. *Transfusion*, 50 (8): 1702—1711, 2010.
- 24) Burnouf T, Chang CW, Kuo YP, et al: A chromatographically purified human TGF- β 1 fraction from virally inactivated platelet lysates. *Vox Sang*, 101 (3): 215—220, 2011.
- 25) Tan C, Shichinohe H, Wang Z, et al: Feasibility and Efficiency of Human Bone Marrow Stromal Cell Culture with Allogeneic Platelet Lysate-Supplementation for Cell Therapy against Stroke. *Stem Cells Int*, 2016: 6104780, 2016.
- 26) Tonarova P, Lochovska K, Pytlik R, et al: The Impact of Various Culture Conditions on Human Mesenchymal Stromal Cells Metabolism. *Stem Cells Int*, 2021: 6659244, 2021.
- 27) Gonzalez-Gualda E, Baker AG, Fruk L, et al: A guide to assessing cellular senescence in vitro and in vivo. *FEBS J*, 288 (1): 56—80, 2021.
- 28) Liao Z, Yeo HL, Wong SW, et al: Cellular Senescence: Mechanisms and Therapeutic Potential. *Biomedicines*, 9 (12): 2021.
- 29) De Becker A, Heestermans R, De Brouwer W, et al: Genetic profiling of human bone marrow mesenchymal stromal cells after in vitro expansion in clinical grade human platelet lysate. *Front Bioeng Biotechnol*, 10: 1008271, 2022.

HUMAN PLATELET LYSATE PRODUCED FROM LEUKOREDUCTION FILTER CONTENTS ENABLES SUFFICIENT MSC GROWTH

Shinobu Wakamoto¹⁾, Tomoko Furukawa²⁾, Masahito Kawabori²⁾³⁾, Mitsuaki Akino¹⁾, Shiho Kato¹⁾, Hisae Fuse¹⁾, Sumio Ohtsuki⁴⁾, Yoshihiro Torimoto¹⁾, Miki Fujimura³⁾ and Shuichi Kino⁵⁾

¹⁾Japanese Red Cross Hokkaido Block Blood Center

²⁾R & D Division, RAINBOW. INC

³⁾Department of Neurosurgery, Faculty of Medicine, Hokkaido University

⁴⁾Department of Pharmaceutical Microbiology, Faculty of Life Sciences, Kumamoto University

⁵⁾Japanese Red Cross Blood Service Headquarters

Keywords:

Platelet lysate, Mesenchymal stem cell, Leukoreduction filter, Platelet, Plasma

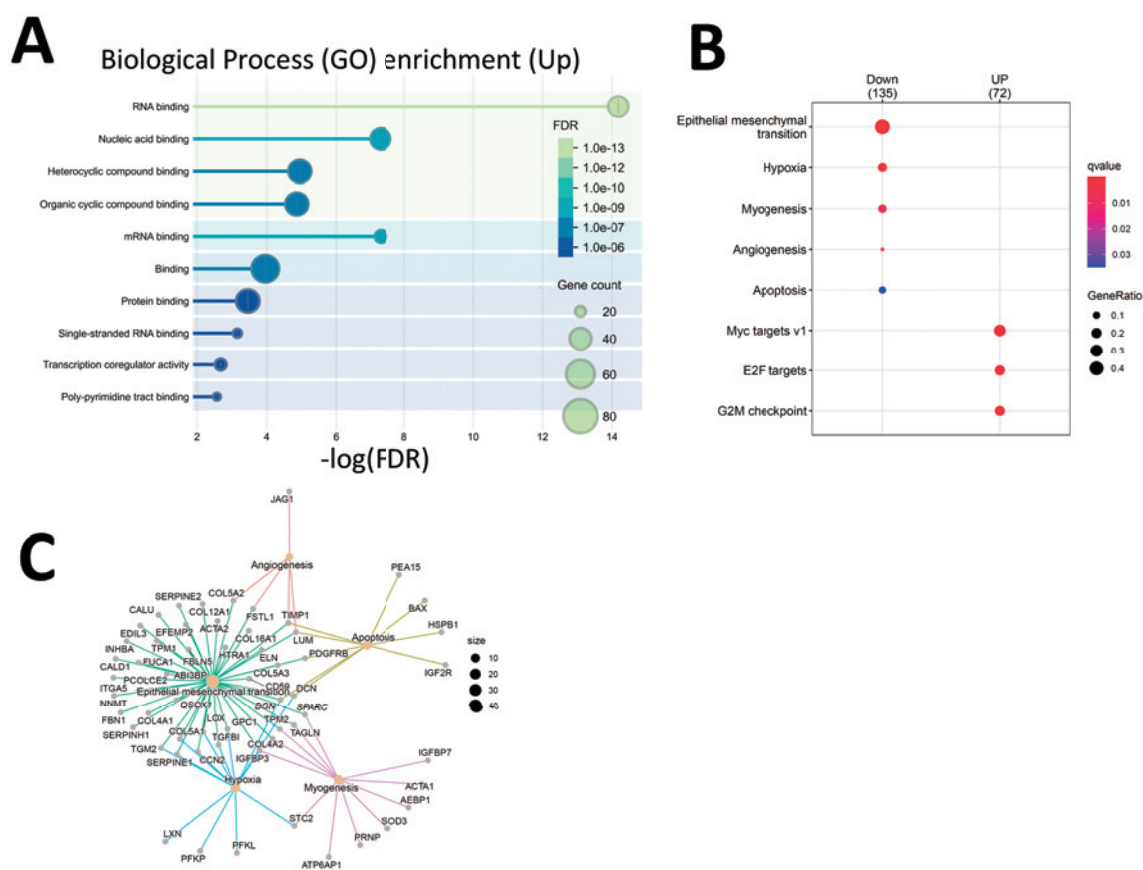
©2026 The Japan Society of Transfusion Medicine and Cell Therapy

Journal Web Site: <https://yuketsu.jstmct.or.jp/>

Supplementary table Kit used for evaluating cell quality

Antibodies used in Table 1			
	Name	Company	Cat #
	Pacific Blue Mouse IgG1, k Isotype Control	BL	400151
	PE Mouse IgG1, κ Isotype Control	BD	349043
	APC Mouse IgG1, κ Isotype Control	BD	555751
	APC/Fire 750 Mouse IgG2a, k Isotype Control	BL	400284
	Pacific Blue Mouse Anti-human CD14	BL	367122
	PE Mouse Anti-Human CD73	BD	550257
	APC Mouse Anti-Human CD105	BD	562408
	APC/Fire 750 Mouse anti-human HLA-DR	BL	307658
	Pacific Blue Mouse anti-human CD19	BL	302232
	PE Mouse Anti-Human CD34	BD	348057
	APC Mouse Anti-Human CD45	BD	555485
	Pacific Blue Mouse anti-human CD44	BL	338824
	PE Mouse Anti-Human CD166	BC	A22361
	APC Mouse anti-human CD90	BL	328114
Antibodies and kits used in Fig. 8 and Table 2			
	Name	Company	Cat #
PDGF-BB	Human PDGF-BB ELISA Kit	R&D SYSTEMS	DBB00
FACS	Human BD FcBlock	BD	564220
	PE Mouse IgG κ Isotype Control	BD	555749
	PE Mouse Anti-Human CD44	BD	550989
	PE Mouse Anti-Human CD45	BD	560975
	PE Mouse Anti-Human CD90	BD	561970
	PE Mouse Anti-Human CD105	BD	560839
	PE Mouse Anti-Human CD166	BD	560903
Differentiation capacity	StemPro™ Osteogenesis Differentiation Kit	Gibco	A1007201
	StemPro™ Adipogenesis Differentiation Kit	Gibco	A1007001
	StemPro™ Chondrogenesis Differentiation Kit	Gibco	A1007101

BL: Biolegend, BD: Becton dickinson, BC: Beckman coulter



(A) Biological process Gene Ontology (GO) enrichment analysis revealed that RNA binding was significantly upregulated in the f-hPL group. (B) Protein degree analysis revealed that stemness marker (Myc targets v1) were upregulated in f-hPL group, while epithelial mesenchymal transition was downregulated. (C) Protein-protein interaction network analysis of downregulated proteins.

Supplementary Methods.

白血球除去フィルターの感染症検査

本実験で使用する白除フィルターは、全て、日本赤十字社より提供されている。白除フィルターは、患者使用を目的とする血液製剤に適用される厳格な基準を満たした上で本研究に使用している。基準には以下の項目が含まれる：1) 健康状態自己申告書の提出、2) 梅毒抗体、HBs 抗原、HBc 抗体、HBs 抗体、HCV 抗体、HIV 抗体、HTLV-1 抗体、PVB 19 抗原に対する抗原・抗体検査合格、3) HBV、HCV、HIV、HEV に対する核酸増幅検査（NAT）合格

Data independent acquisition を用いた定量的プロテオミクス

検体は、従来法と同様に相間移動溶解剤法を用いて処理した[1, 2]。Sequential window acquisition of all theoretical fragment ion spectra mass spectrometry (SWATH-MS) には、Dionex Ultimate 3000 RSLCnano システム (Dionex, Sunnyvale, CA, USA) と ZenoTOF 7600 質量分析計 (Sciex, Framingham, MA, USA) を使用した。1% 未満の偽発見率 (false discovery rate, FDR) に基づきペプチドを選別し、同定および定量の対象とした。タンパク質の同定と定量は、data independent acquisition 法によって得られた質量分析データおよび UniProt ヒト標準プロテオームデータを用い、DIA-NN v.2.0[3]を用いて解析した。MaxLFQ アルゴリズムを用いて前駆体ピーク面積からタンパク質発現レベルを算出した[3]。タンパク質発現変動の解析は RNAseqChef [4]を用いて実施した。Network and Gene Ontology (GO) 解析は STRING バージョン 12.0 (<https://string-db.org/>) を用いて実施した[5]。

1. Masuda T, Tomita M, Ishihama Y. Phase transfer surfactant-aided trypsin digestion for membrane proteome analysis. *J Proteome Res.* 2008;7(2):731-40.
2. Mori A, Masuda T, Ito S, Ohtsuki S. Human Hepatic Transporter Signature Peptides for Quantitative Targeted Absolute Proteomics: Selection, Digestion Efficiency, and Peptide Stability. *Pharm Res.* 2022;39(11):2965-78.
3. Demichev V, Messner CB, Vernardis SI, Lilley KS, Ralser M. DIA-NN: neural networks and interference correction enable deep proteome coverage in high throughput. *Nat Methods.* 2020;17(1):41-4.
4. Etoh K, Nakao M. A web-based integrative transcriptome analysis, RNAseqChef, uncovers the cell/tissue type-dependent action of sulforaphane. *J Biol Chem.* 2023;299(6):104810.
5. Szklarczyk D, Gable AL, Nastou KC, Lyon D, Kirsch R, Pyysalo S, et al. The STRING database in 2021: customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets. *Nucleic Acids Res.* 2021;49(D1):D605-D12.