凍結保存による血小板膜糖蛋白質

Glycoprotein Ib 損失の機構

瀬川紀美子¹⁾ 高橋 恒夫¹⁾ 半田 誠²⁾ 片山 政彦³⁾

池田 康夫⁴⁾ 諸井 将明⁵⁾ 関口 定美

¹⁾北海道赤十字血液センター, ²⁾慶応義塾大学病院輸血センター, ³⁾宝酒造バイオ研究所

⁴⁾慶応義塾大学医学部血液内科, ⁵⁾久留米大学分子生命科学研究所

(平成6年4月4日受付)

THE MECHANISM OF LOSS OF GLYCOPROTEIN Ib FROM PLATELET MEMBRANE BY FREEZING AND THAWING

Kimiko Segawa¹⁾, Tsuneo A. Takahashi¹⁾, Makoto Handa²⁾,
Masahiko Katayama³⁾, Yasuo Ikeda⁴⁾, Masaaki Moroi⁵⁾
and Sadayoshi Sekiguchi¹⁾

¹⁾Hokkaido Red Cross Blood Center

²⁾Blood Center, Keio University Hospital

³⁾Biochemical Research Institute, Takara Shuzo, Co.

⁴⁾Department of Internal Medicine, Keio University School of Medicine

⁵⁾Life Science Institute, Kurume University

Although cryopreservation of platelets has been attempted for the last two decades, the results are not still satisfactory. To investigate the reasons for the functional loss of cryopreserved platelets, glycoproteins (GPs), such as GPIb, GPIb/IX, GPIa/IIa, GPIIb/IIIa, GPIIIa, GPIV and GMP-140 on the platelet membrane before and after cryopreservation were analyzed by monoclonal antibodies and flow cytometry (FCM). Platelets loaded with 5% dimethylsulfoxide (DMSO) were extracellularly frozen at -5°C , cooled to -80°C at $0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$, and then thawed rapidly in a water bath (37°C). There was no change of expression of GPs except for GPIb. GPIb was lost from about half of the cell population after freezing and thawing. When platelets were extracellularly frozen without DMSO, GPIb was progressively lost from the population as temperature decreased. At -40°C or below, most of the platelets lost GPIb from the membrane. In contrast, the rapid cooling of platelets ($-20^{\circ}\text{C}/\text{min}$) did not cause the loss of GPIb.

To investigate the mechanism of GPIb loss due to freezing and thawing, platelets were osmotically stressed in hyperosmotic plasma made by addition of NaCl, resuspended in isosmotic plasma, and then GPs were analyzed by FCM. GPIb was lost at osmotic stresses greater than 1000 mOsm/kg. An enzyme immunoassay to quantify GPIb as glycocalicin, which was released to the medium by freezing-thawing or osmotic stress (1500 mOsm/kg), showed a good correlation with the loss of GPIb on the platelet membrane detected by FCM. SDS-gel electrophoresis and immunoblotting analysis indicated that GPIb was released to the suspending medium as glycocalicin. It is known that membrane GPIb is cleaved to glycocalicin by intracellular Ca^{2+} -dependent proteinases. Platelets frozen with proteinase inhibitors, such as N-ethylmaleimide, EDTA or EGTA, did not show the loss of GPIb. These results indicated that the loss of GPIb from the platelet membrane can be explained by the cleavage of GPIb to glycocalicin by the

intracellular Ca^{2+} -dependent proteinases which leaked from the osmotically damaged platelets as a result of freezing and thawing.

緒 言

血小板輸血は各種の血液疾患等における支持療法として不可欠であり、血小板製剤の需要は年毎に増大している。さらに、HLA (human leukocyte antigen) 適合血小板や CMV (cytomegalovirus) 陰性血小板といった製剤が血液センターに対して求められるようになり、さらに血小板特異抗原の研究が進むにつれ、それらにも対応した血小板製剤が必要になってきている。血小板は生体内での寿命が短く、室温での液状保存による製剤の有効期限は日本で3日間、欧米で5日間と短期間であるため、血液センターから臨床側への血小板製剤の供給は必ずしも万全のものではない。

この問題の解決法の一つに凍結保存があり、これまで多くの研究が行われている^{1)~4)}が、凍結保存後の血小板を輸注したときの生体内回収率や *in vitro* における機能維持については、研究者間で必ずしも一致した成績が報告されているわけではなく、血小板の凍結保存法は確立したとはいえないのが現状である。

我々はこれまで、血小板の長期保存を目的として血小板の凍結保存について種々の検討を行い、凍結融解後の血小板は回収率が高いものの機能が著しく低下すること、凍結融解時に血小板膜から Glycoprotein Ib (GPIb) が失われ、その損失が血小板機能の低下と高い相関がみられることを報告してきた⁵⁾⁶⁾。

本研究では、血小板の凍結融解におけるどの過程において GPIb の損失が起こるのかを明らかにし、またその損失を防ぐ方法について検討したので報告する。

材料および方法

1. 血小板の調製

健康人より、抗凝固剤 citrate phosphate dextrose (CPD) 56ml の入ったクオドラップルバッグに全血を400ml 採血した。4,540×g, 6分, 25°C で遠心してパフィーコート72ml を得、これを280×g, 6分, 25°C で遠心して濃厚血小板 (PC:

platelet concentrate, 約40ml) を調製した。

2. PC 凍結時における冷却速度の影響

凍結融解後の血小板膜糖蛋白 GP Ib の損失が、PC 凍結時の冷却速度の影響を受けるかどうか調べた。PC を1.5ml ずつ凍結用のチューブ (Nunc Cryo Tube, Denmark) に分注し緩速法または急速法で凍結し、37°C 水浴中で融解し、血小板を回収した。

緩速凍結: 試料チューブをプログラムフリーザー (Bio Cool, FTS SYSTEMS, N.Y., USA) 中で冷却速度0.5°C/分で-5°Cまで温度を下げ15分間静置した後、ドライアイスの小片をPCに入れて植水し、更に15分間-5°Cで保持した後冷却速度0.5°C/分で-80°Cまで冷却した。

急速凍結: 試料チューブをドライアイスエタノール冷媒 (-80°C) に入れ急速凍結した。その時の冷却速度は約20°C/分 (-20~-40°Cの間) であった。

3. PC 凍結時の凍害保護液の影響

PC 凍結保存後の GPIb 損失が、凍害保護液の添加によりどのような影響を受けるかを調べた。ポリプロピレン製チューブ (容量15ml) に分注した PC 7ml に対し、ジメチルスルフォキシド (DMSO: dimethylsulfoxide, Sigma Chemical Co., USA) 最終濃度が0または5%になるように、生理食塩液 (大塚製薬, 東京) または DMSO と生理食塩液を1:5で混合した DMSO 溶液を3ml 加えた。その後-80°Cディープフリーザー中で凍結・保存した。融解は37°C水浴中で行い、抗凝固剤 anticoagulant citrate dextrose (ACD) を15%加えた AB 型プール血漿を、融解 PC 10ml に対し6ml ゆっくりと添加後遠心 (1,850×g, 8分, 10°C) し、上清を除去して DMSO を除いた。回収した血小板ペレットは、AB 型プール血漿7ml に再浮遊した。

4. PC の浸透圧ストレス処理

血小板に浸透圧ストレスを加えた場合の GPIb 変化を調べた。PC 5ml に9mM

Ethylenediaminetetra-acetate(EDTA, 片山化学工業, 大阪)を含み, NaCl(関東化学, 東京)含量を変えた水溶液を同量添加し, PCの最終血漿浸透圧を300~1,500mOsm/kgまでそれぞれ変化させて, 1.5時間インキュベートした。その後, 15% ACD添加プール血漿4.3mlを加えて遠心し, 上清血漿を除去した。回収した血小板ペレットをAB型プール血漿5mlに再浮遊した。

5. 凍結融解時の GPIb への Ca^{2+} 依存性蛋白分解酵素阻害剤による影響

凍結融解時の GPIb 損失を防止するために, 液状保存において GPIb α 鎖を切断する Ca^{2+} 依存性蛋白分解酵素の阻害剤を DMSO 溶液に添加し PC 凍結を行った。阻害剤としてシステインプロテアーゼインヒビターである leupeptin (Boehringer, Mannheim, Germany) および antipain (Chemicon International Inc., USA), チオール基のアルキル化によってチオールプロテアーゼを阻害する N-Ethylmaleimide (NEM, 和光純薬, 大阪), Ca^{2+} のキレートにより Ca^{2+} 依存性プロテアーゼを阻害する EDTA, Glycoetherdiamine-tetraacetic acid (EGTA, 片山化学) を用いた⁷⁾。それぞれの最終濃度が 0.2mM, 2mM, 50mM, 10mM, 10mM になるように阻害剤を添加した DMSO 溶液 3ml を, PC 7ml に添加し -80°C のディープフリーザー中で凍結および保存した。37°C 水溶液中で融解し, 3.と同様にして血小板を回収した。

6. フローサイトメトリー (FCM) 法による膜糖蛋白の測定

上記1~5. で得られた血小板の膜糖蛋白の変化についてフローサイトメトリー法により調べた。

PC中の血小板数をコールターカウンター (Model S-Plus IV, Coulter Electronics, Hialeah, FL, USA) を用いて測定後, 9mM EDTA-PBS で 5×10^5 個/ μl に希釈した。希釈後の PC 45 μl に対し, FITC 標識モノクローナル抗体, 抗 GPIa/IIa (Coulter Immunology, USA), 抗 GPIb (自家調製および DAKO, Denmark), 抗 GPIIIa (DAKO), 抗 GPIIb/IIIa (Immunotech S. A., France), 抗 GPIV (Ortho Diagnostic Sys-

tems K.K., NJ, USA), 抗 GMP-140 (自家調製) をそれぞれ 5 μl 加えて 30分インキュベートした。また FITC 標識されていない抗体, 抗 GP Ib/IX (コスモバイオ, 東京) については, 希釈 PC 90 μl に抗体 10 μl を加えて同様に 30分インキュベートした。インキュベート後, 2.5%パラホルムアルデヒド (自家調製, キシダ化学, 大阪) 50 μl (抗 GPIb/IX では 100 μl) を加えて 30分間固定, 9mM EDTA-PBS で洗浄した。抗 GPIb/IX では, さらに GAM-FITC (Coulter Immunology) 5 μl で標識した後, 検体をフローサイトメーター (Ortho Cytoron, Ortho Diagnostic Systems, 東京) で測定した。

7. 血小板膜糖蛋白のイムノプロットングによる解析

PCを15%のACD液を添加した10mM 2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propandiol (Tris, 関東化学) -1mM EDTA-150mEq NaCl 緩衝液で洗浄後, Triton X-100 (半井化学薬品, 京都) で可溶化し, 4~15% Ready Gel (Bio Rad, Richmond, CA, USA) を用いて常法に従い SDS-PAGE を行った。泳動後のゲルをメンブランに転写し, ウサギ・抗ヒト GPIb ポリクローナル抗体 (自家調製) またはマウス抗ヒト GP Ib モノクローナル抗体 (Takara, 京都) と反応後アビジン-ビオチン染色またはアルカリフォスファターゼ染色した。

8. PC 上清中 GPIb および GMP-140 濃度の測定

各処理後の PC を強遠心 (1,850 $\times$ g, 30分, 20°C) した後上清を分取し, -80°C ディープフリーザーで保存した検体について, EIA 法⁸⁾⁹⁾を用いて測定した。なおこの時の GPIb 濃度は, GPIb が血小板内や血漿中に存在する蛋白分解酵素などによって切断され, 血小板膜上から上清血漿中に遊離する¹⁰⁾ことが報告されている Glycocalicin (Gc) の濃度として定量した。

9. 統計処理

Student の paired t-test を用いて, 危険率 5% 未満を有意とした。

表1 血小板凍結時の各膜糖蛋白の蛍光強度および陽性細胞の割合の変化

膜糖蛋白		緩速凍結 (n = 6)		急速凍結 (n = 3)	
		凍結前	融解後	凍結前	融解後
CPIa/IIa	平均	81.8±10.8*	70.1±9.6*	N.T.	N.T.
	陽性%	98.0±0.8*	90.5±5.6*		
GPIb	平均	103.4±10.4	69.6±12.2	93.0±2.8	76.9±1.2
	陽性%	99.6±0.1	41.8±26.5	97.4±1.2	66.6±5.7
GPIIb/IIIa	平均	138.5±9.4	131.9±8.5	118.7±1.9	117.2±1.3
	陽性%	99.9±0.1	99.8±0.1	98.9±0.3	99.3±0.1
GPIIIa	平均	74.4±9.1**	70.6±10.1**	119.5±3.4	120.3±3.2
	陽性%	98.5±0.8**	94.3±5.9**	99.1±0.3	99.3±0.2
GPIV	平均	104.5±11.6*	88.9±13.7*	75.6±11.2	72.3±12.8
	陽性%	98.6±0.9*	96.6±3.5*	83.0±21.5	84.2±17.2
GPIb/IX	平均	169.5±8.2**	162.5±10.3**	N.T.	N.T.
	陽性%	99.5±0.2**	99.3±0.4**		
GMP-140	平均	51.5±1.7	49.8±2.2	N.T.	N.T.
	陽性%	7.0±8.9	4.7±4.3		

(平均±1SD)

N.T. : not tested

* : n=4 ** : n=5

結 果

1. 凍結時の冷却速度と膜糖蛋白の変化

FCM 法により測定した血小板膜上の各膜糖蛋白(GPIa/IIa, GPIIb/IIIa, GPIIIa, GPIV, GPIb/IX, GMP-140)は, 緩速凍結および急速凍結の両方において, GPIb 以外に凍結融解による大きな変化はみられなかった(表1)。

GPIb は緩速凍結において, PC を細胞外凍結状況下で-5℃まで冷却した場合は陽性の単一ピーク, -10℃以下に冷却した場合は二峰性のピークを示した(図1)。到達温度の低下, すなわち細胞外凍結に伴い陰性ピークの割合は増加した。

一方, 急速凍結では陽性ピークの割合は凍結前に比べほぼ同じ値を示した(図2)。

2. 凍結融解および浸透圧ストレス処理時における上清中 GPIb および GMP-140 の変化

凍結融解および浸透圧ストレス処理後の PC 上清中の Gc (GPIb) および GMP-140 量を EIA 法で測定した。血漿の浸透圧にほぼ等しい300mOsm/kg の NaCl 溶液処理において Gc は, control 値とほぼ同じ2μg/ml を示したが, DMSO 非存在下での緩速凍結の場合は 5 倍の10μg/ml, 5%

表2 上清血漿中の Glycocalicin および GMP-140 濃度

処理条件		Glycocalicin (μg/ml)	GMP-140 (ng/ml)
処理前	control	2.01±0.65	121.5±48.0
凍結融解	0 %DMSO	10.16±4.49	530.6±381.4
	5 %DMSO	6.33±4.49	241.1±150.3
浸透圧	300 mOsm/kg	1.97±0.53	149.4±71.0
ストレス	1500 mOsm/kg	11.40±4.29	98.0±10.3

(n=7, 平均±1SD)

DMSO 存在下の緩速凍結では 3 倍の6μg/ml, 1,500mOsm/kg の浸透圧ストレスでは5.5倍の11 μg/ml と PC 上清中で有意に高い値を示した(表2)。

GMP-140は, 凍結融解に関しては GPIb と同様の傾向がみられ, DMSO で非存在下の531ng/ml, 5%DMSO 存在下の緩速凍結で241ng/ml と有意に高い値を示した。しかし浸透圧ストレスでは GMP-140濃度は各処理によっても control に近い値を示し, 1,500mOsm/kg の浸透圧ストレスの場合でも98ng/ml と control との差はなかった。

3. イムノプロットティングによる GPIb, Gc の検出

図1 緩速凍結時の GPIb 変化

上段：PC の温度変化，下段：融解後血小板の FCM による GPIb 測定結果

図2 急速凍結時の GPIb 変化

左図：凍結前血小板の FCM による GPIb 測定結果，右図：融解後血小板の FCM による GPIb 測定結果

図3に各処理を行った血小板およびその上清血漿のイムノプロットングの結果を示した。凍結融解を行った血小板では、DMSO 非存在下では GPIb のバンドがほとんど失われたが、5% DMSO 存在下では control に比べて薄くなったものの GPIb のバンドが検出された。浸透圧スト

レスを加えた血小板は、300mOsm/kg では control と同程度の濃度で GPIb のバンドが検出されたが、1,500mOsm/kg では GPIb バンドがほとんどみられなくなり、この結果は FCM 法での結果と一致していた。また上清血漿中では、還元・非還元ともに Gc と同じ位置にバンドが検出され

図3 血小板膜および上清血漿のイムノブロッティングによる GPIb の検出
 上段左：血小板膜—非還元，下段左：血小板膜—還元，上段右：上清血漿—非還元，
 下段右：上清血漿—還元
 各条件とも，1. 凍結前，2. 0 %DMSO 凍結融解後，3. 5 %DMSO 凍結融解後，4.
 300mOsm/kg 浸透圧ストレス付加後，5. 1,500mOsm/kg 浸透圧ストレス付加後，6.
 Glycocalicin，7. 可溶化血小板（上清血漿のみ）

た。

4. Ca^{2+} 依存性蛋白分解酵素阻害剤による血小板凍結融解後の GPIb への影響

leupeptin, antipain を添加し 5 %DMSO 存在下で凍結保存した PC では，血小板膜上の GPIb は二峰性ピークを示し，DMSO のみで凍結融解を行った場合と同じ結果となった（図4）。一方，NEM, EDTA, EGTA を添加したものでは，ピーク位置が若干陰性側にシフトしたものの単峰性を示した。

考 察

各種血液疾患などの支持療法のため，高単位血小板や CMV 陰性血小板などの血小板製剤の需要および供給が増大している。血小板の採取・調製法，保存バッグの改良は近年著しく進歩しているが，現行のバッグによる液状保存では保存期間が7日間を越えると大幅な血小板機能の低下が起ることは避けられない¹¹⁾。血小板長期保存法としての凍結保存は，凍結融解後の血小板機能が著し

く低下することが現在までに報告されてきた¹²⁾。われわれのデータでは，5 %DMSO 凍結融解後の血小板は約90%の回収率を示すが，凝集能などの機能面では凍結前の20～40%と著しい低下がみられる⁵⁾。その原因を調べるため，まず種々の血小板アゴニストのレセプターである血小板膜糖蛋白の凍結融解前後の状況を FCM 法で調べたところ，GPIa/IIa, GPIIIa, GPIIb/IIIa, GPIV, GMP-140, GPIb/IX については陽性細胞の割合や平均蛍光強度が若干低下したものの大きな変化はみられなかった（表1）。しかし凍結前に陽性のシングルピークを示した GPIb は，DMSO 非存在下では最終到達温度が低くなるにつれ二峰性ピークへと変化した。 -40°C 以下に冷却された場合はほとんどの血小板が GPIb 陰性を示した（図1）。一方急速凍結の場合には GPIb 陽性率が凍結前に比べほとんど変化しなかった（図2）。これは GPIb の損失が緩速凍結における細胞外凍結の進行に起因していると考えられ，血小板に血漿浸透圧の約5倍で

図4 Ca^{2+} 依存性蛋白分解酵素阻害剤による影響

左図：凍結前血小板のFCMによるGPIb測定結果，右図：融解後血小板のFCMによるGPIb測定結果

上段左：5%DMSOのみによる凍結，上段中：5%DMSO+0.2mM leupeptin，上段右：5%DMSO+2mM antipain，下段左：5%DMSO+50mM N-ethylmaleimide，下段中：5%DMSO+10mM EDTA，下段右：5%DMSO+10mM EGTA

ある1,500mOsm/kgの高浸透圧ストレスを加えた場合にも，GPIb陽性細胞がほとんどみられなくなったことでも明らかである（データ示さず）。

GPIbは、止血の第1段階である血管内皮下細胞への血小板の粘着において重要な働きをする膜糖蛋白質¹³⁾である。その一方で血小板細胞内に存在する Ca^{2+} 依存性の蛋白分解酵素(calpain)により容易にGcに切断され¹⁰⁾，PCの保存に伴いGcが上清血漿中に移行する¹⁴⁾ことが知られている。

凍結融解や浸透圧ストレス処理後の血小板の膜糖蛋白に関するイムノプロットングの結果と，FCM法による血小板膜糖蛋白の結果は一致し，細胞外凍結あるいは浸透圧ストレス処理によって血小板膜上からGPIbが損失することは明らかである(図3)。このGPIbの損失を定量的に得るため，PC上清血漿中に含まれるGcをEIA法により測定した。その結果，DMSO非存在下での緩速

凍結および1,500mOsm/kgの各処理を行った血小板の上清中には処理前の約5倍のGcが検出され，5%DMSO存在下で緩速凍結させた場合は約3倍のGcが検出された(表2)。

図3に示すように今回の検討ではGPIb，Gcともにバンドが2本ずつ検出されたが，これは検体に用いた献血者の血小板GPIbの α 鎖分子量が異なる2種類の分子種からなる¹⁵⁾¹⁶⁾ことが予想される。

このような凍結融解や浸透圧ストレスによるGPIb損失の機構として，血小板膜上からGPIbが離脱する，あるいは血小板から放出された Ca^{2+} 依存性蛋白分解酵素によりGcに切断される，という2つの可能性が考えられる。そこで Ca^{2+} 依存性蛋白分解酵素阻害剤を凍害保護液(DMSO最終濃度5%)に添加し，血小板の凍結融解を行った。NEM，EDTA，EGTAを添加したものでは，陽性

ピーク位置が陰性側に多少シフトしたものの単峰性を示した(図4)。従って凍結融解により血小板膜上から GPIb が失われたのは Ca^{2+} 依存性 proteinase により Gc となって上清血漿中に遊離した可能性が高い。このことは上清血漿のイムノプロットングにおいて、検出されたバンドが可溶化血小板(主に GPIb)ではなく Gc と同じ位置に検出されたことから裏付けられた(図9)。

血小板内の Ca^{2+} 依存性蛋白分解酵素は凍結融解によって細胞外に漏出してくることが考えられるが、凍結融解後の血小板上清血漿に新鮮血小板を浮遊させインキュベートした場合でも血小板の GPIb にほとんど変化がみられないことは前報で報告した⁵⁾⁶⁾。従ってこの蛋白分解酵素は血小板から放出される際に GPIb の Gc 部分を切断し血漿中に移行すると活性を失い易い、あるいは分子量が大きく血漿中に存在していても GPIb 分子の血小板膜近くの Gc の切断部分までその活性部位が到達できない、こと等が推察される。

凍結融解後の血小板は 5% DMSO 存在下で凍結した場合、GPIb を介してのリストセチン凝集は明らかに低下する⁵⁾⁶⁾が、その一方で蛋白分解酵素阻害剤、NEM, EDTA, EGTA を添加して凍結融解を行った FCM 法での測定において GPIb がほとんど失われていない血小板でも、凍結融解後の血小板機能は DMSO のみで凍結融解した場合と同等かそれ以下のレベルを示した(未発表データ)。従って現段階では凍結融解による血小板機能の低下は GPIb の損失のみでは説明することはできないと考える。今回明らかにした GPIb 損失の機構とそれを防ぐ方法の他に、凍結融解や浸透圧ストレスによって引き起こされるシグナル伝達系を含めた血小板変化の検討をさらに進めていくことが、今後の血小板の凍結保存法の確立に必要と考えられる。

結 語

血小板の凍結融解時に起こる血小板膜糖蛋白 GPIb の損失は、凍結時の冷却速度、到達温度等によって影響を受けた。

GPIb の血小板膜からの損失は、FCM 法およびイムノプロットングによって定性的に、EIA 法に

よって定量的に測定されること、さらに GPIb は血小板の各処理によって Glycocalicin となって上清血漿中に移行していることが確認された。

浸透圧ストレスによる GPIb の上清血漿への移行は、凍結融解によるものと同様の傾向を示したが、GMP-140 は浸透圧ストレス処理時と凍結融解時で異なる挙動がみられ、凍結融解による血小板の変化は浸透圧ストレス以外の要因も関与していることが示唆された。

凍結保護液に各種 Ca^{2+} 依存性蛋白分解酵素阻害剤を添加することにより、凍結融解後の GPIb 変化が抑制された。

文 献

- 1) Lazarus, H.M., Kaniecki-Green, E.A., Warm, S. E., Aikawa, M. and Herzig, R.H.: Therapeutic effectiveness of frozen platelet concentrates for transfusion. *Blood*, 57: 243—249, 1981.
- 2) Melaragno, A.J., Carciro, R., Fein gold, H., Talarico, L., Weintraub, L. and Valeri, C.R.: Cryopreservation of human platelets using 6% dimethyl sulfoxide and storage at -80°C ; Effects of 2 years of frozen storage at -80°C and transportation in dry ice. *Vox Sang.*, 49: 245—258, 1985.
- 3) Dayian, G., Harris, H.L., Vlahides, G.D. and Pert, J.H.: Improved procedure for platelet freezing. *Vox Sang.*, 51: 292—298, 1986.
- 4) Das, P.C. and Smit Sibinga, C. Th.: Platelet freezing. Cryopreservation and Low Temperature Biology in Blood Transfusion. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p. 167—178, 1990.
- 5) 瀬川紀美子, 薬師寺千明, リヒターエカルド, 高橋恒夫, 関口定美: 凍結保存血小板の機能低下と膜糖蛋白 GPIb の損失. 凍結及び乾燥研究会誌, 38: 42—47, 1992.
- 6) 瀬川紀美子, 薬師寺千明, 高橋恒夫, 半田 誠, 諸井将明, リヒターエカルド, 関口定美: 凍結融解および浸透圧ストレスによる血小板膜からの Glycoprotein Ib の損失. 「血小板輸血の展望」関口定美編, エフ・コピント・富士書院, p. 154—167, 1993.
- 7) Yoshida, N., Weksler, B. and Nachman, R.: Purification of human platelet calcium-activated protease. *J. Biol. Chem.*, 258: 7168—7174, 1983.
- 8) 片山政彦, 半田 誠, 川合陽子, 池田康夫, 渡辺清明: マウスモノクローナル抗体による血中グライコカリシン測定エンザイムイムノアッセイ法の

- 開発. 第13回日本血栓止血学会抄録集, p. 422, 1990.
- 9) Katayama, M., Handa, M., Araki, Y., Hirai, S., Kato, I., Kawai, Y., Watanabe, K. and Ikeda, Y.: A monoclonal antibody-based enzyme immunoassay for human GMP-140/P-selectin. *J. Immunol. Method.*, 153: 41—48, 1992.
- 10) 半田 誠, 池田康夫: Glycocalicin, 臨床検査, 33: 1584—1589, 1989.
- 11) 薬師寺千明, 高橋恒夫, 一戸和則, 丸山 暢, 関口定美: 二重バッグシステムによる血小板長期液状保存. 日輸血会誌, 37: 822—829, 1991.
- 12) Owns M., C. Cimino and J. Donnelly: Cryo-preserved platelets have decreased adhesive capacity. *Transfusion*, 31: 160—163, 1991.
- 13) Roth, G.J.: Platelets and blood vessels: the adhesion event. *Immunology Today*, 13: 100—105, 1992.
- 14) 半田 誠, 片山政彦, 池田康夫: 可溶性血小板膜糖蛋白—その測定の意義—. 日本臨床, 50: 360—365, 1992.
- 15) 諸井将明: Platelet Glycoprotein Ib—その生化学的, 生理学的性質—. 血液と脈管, 15: 211—222, 1984.
- 16) Moroi, M., Jung, S.M. and Yoshida, N.: Genetic Polymorphism of platelet glycoprotein Ib. *Blood*, 64: 622—629, 1984.
-