

血小板製剤バッグは室温で振盪保存し、パウチは24時間後まで35°C静置培養し、24時間以降は血小板製剤バッグと同条件で保存した。

(6) 細菌増殖関連指標検査

経時的に、パウチ内O₂濃度、菌濃度、pH、および、血小板製剤バッグ中の菌濃度を測定した。

3. 結果

1) 白血球除去フィルター部分洗浄液培養による細菌検出

(1) 接種後細菌の動態検査

細菌接種直後に比較して、15分、ないし30分室温静置後では、接種した血液バッグ中の*Pseudomonas aeruginosa*は、時間経過とともに菌数の減少が見られた(表1)。

(2) 15分室温静置後白血球除去前後の血液およびフィルター洗浄液の細菌培養

細菌接種後15分間室温静置した血液の白血球除去実験では、13.8個/mlの*Yersinia enterocolitica*を接種した5バッグの血液のなかで、白血球除去前血液4バッグに1-16個/0.5ml、白血球除去フィルター洗浄液4バッグに2-7個/0.5mlが、また、白血球除去後の2バッグに2-16個/mlの細菌が検出された。さらに、1.4個/mlの*Yersinia enterocolitica*を接種した5バッグの血液では、白血球除去前血液2バッグにそれぞれ2個/0.5ml、白血球除去フィルター洗浄液1バッグに2個/0.5mlが、また、白血球除去後の1バッグに3個/mlの細菌が検出された(表2)。

増菌培地にて行った細菌培養検査では、13.8個/mlを接種した血液において、白血球

除去フィルター洗浄液3バッグで、および、白血球除去後2バッグで細菌が検出された。また、1.4個/mlを接種した血液では、白血球除去フィルター洗浄液と白血球除去後血液ともに細菌は検出されなかった。

(3) 24時間室温静置後白血球除去前後の血液およびフィルター洗浄液の細菌培養

細菌接種後24時間室温静置した血液の白血球除去実験では、3,175個/mlの*Yersinia enterocolitica*を接種した血液5バッグでは、白血球除去前血液1バッグに1個/0.5ml、白血球除去フィルター洗浄液1バッグに1個/0.5mlが検出されたが、白血球除去後では全てのバッグに細菌が検出されなかった。さらに、635個/mlを接種した血液では、白血球除去前血液、白血球除去フィルター洗浄液、および、白血球除去後血液の3条件ともに5バッグ中1バッグに1個/mlの細菌が検出された(表3)。

増菌培地の細菌培養検査では、3,175個/ml、および、635個/0.5mlの細菌を接種した両条件の血液において、白血球除去フィルター洗浄液では5バッグ中2バッグに細菌が検出されたが、白血球除去後では何れのバッグからも細菌が検出されなかった。

2) 血小板濃厚液における細菌接種と酸素消費を指標とした検出

(1) 細菌増殖結果

接種後16時間から72時間の間に血小板製剤バッグ自体の菌数は10⁴~10⁸CFU/ml前後に増殖した(表4)。菌種によっては、増殖せずに減少する細菌も認められた。

(2) 細菌増殖関連指標検査

細菌の増殖数に比較して、血小板製剤中のpH変化は軽度で、最も増殖の激しかつ

た*E.coli*で、 2.8×10^7 個に増殖した、接種後48時間以後になってから、pHの低下が見られてきた(図5)。スワーリングは、この*E.coli*の採血後72時間頃から消失が見られ始めた。

(3) 酸素消費量

パウチ内では全ての細菌が増殖し、パウチ中の O_2 濃度は、血小板製剤由来の検体の殆ど($13/14=93\%$)で24時間後でPBDSの陽性基準である19.5%以下に減少し、細菌接種後30時間では検査した全ての検体で陽性を示した。(表6)。

(4) 白血球除去の影響

白血球除去群と非白血球除去群の間には、菌増殖数、酸素濃度の値について、それぞれ有意な差は見られなかった。

4. 考察

接種された血液中細菌の数を時間的に観察した実験では、細菌接種直後に比較して、接種後15分間、乃至は30分間室温に静置した後では、接種細菌数は明らかに減少していた。これは、血液中の補体等によるオプソニン効果や、血液中のライソザイム等の殺菌作用も考えられた¹³⁾。また、今回の実験では白血球層を用いており、通常よりも多く含まれている白血球の食食や殺菌による効果も少なくないと思われる¹⁴⁾。これらの結果から、細菌接種後15分間の白血球除去に比較して、24時間後の白血球除去では、より多くの細菌接種が必要であることが示された。

次に、細菌接種した血液を白血球除去フィルターで処理することにより、接種した細菌数がどのように変化するかを調べたが、何れも白血球除去とともに細菌数が減

少した。今回の実験では、使用血液量が少ないことから、不必要なスペースの少ない血小板用白血球除去フィルター(セパセルPLX-5A)を用いた。他種の白血球除去フィルターとの比較は行っていないが、除去後の白血球数は $100/mm^3$ 以下に低下しており、白血球除去効果は得られていると思われた。

白血球除去による汚染細菌数の変化は、今回の使用血液製剤が、赤血球MAP製造過程の白血球層を用い、しかも血小板製剤用白血球除去フィルターを使用していることから、細菌の除去効率は諸家の報告に比較して劣るものの、白血球除去フィルターで処理することによって、15分静置、24時間静置の両条件で、ともに細菌数が減少する傾向が見られた^{10, 11, 15)}。また、細菌接種から白血球除去までの静置時間による影響についてみると、15分に比較して、24時間では白血球除去前から細菌数が減少し、さらに、白血球除去後にも細菌数が減少していた。

白血球除去フィルターに捉えられた細菌量について調査するために、フィルター部分の洗浄液について細菌培養を行ったところ、細菌コロニー形成数では明らかではないが、増菌培地による細菌検出結果によると、15分静置後では、白血球除去前後に比べて、洗浄液では決して多くはなく、むしろ、やや少ない傾向が見られた。しかし、24時間静置後では、細菌培養の検査では差が見られないものの、増菌培地では、白血球除去後に比べて、フィルター洗浄液で細菌が多く検出された。これは、室温に一定時間静置することによって白血球に食食された細菌が、フィルター部分に多く捕獲されて、後に洗浄液に洗い出されてき

たと考えられる。このことから、接種後に残存している細菌を検出するためには、一定時間の静置後に白血球除去フィルター処理して、その洗浄液についての細菌培養検査をすることによって、検出感度を上げられる可能性が考えられた。

白血球除去フィルターは、同種免疫の予防に加えて、サイトカインによる輸血副作用の予防等の効果も期待され、貯血前白血球除去が行われ始めてきている。このサイトカインによる輸血副作用は自己血輸血においても同様の効果が期待され、最近では術前貯血式自己血輸血においても貯血前白血球除去の効果が報告されてきている⁷⁻⁹⁾。このような際に、白血球除去した後のフィルター部分を、そのまま廃棄するのではなく、汚染細菌検出のために応用する方法が開発されれば有効に活用できることになる。

汚染細菌を調べる場合、ウイルスと異なって保存期間中に増殖し、菌数が増加する可能性があるために、保存前血液の一部を調べても十分ではない。むしろ、保存バッグ内で生き残って保存期間中に増殖した細菌の有無を検出する必要があるが、その実施のためには若干の問題が残る。その点、白血球除去フィルター洗浄液の培養は、汚染細菌を感度良く検出できる可能性があり、このための技術を開発することは有益であると思われる。

血小板製剤に接種した細菌は、著しく増殖する菌も見られたが、一部の菌は、室温にて振盪保存しているにもかかわらず、徐々に減少する傾向も見られた。これは、供血者に依ってはある種の細菌に対して免疫を獲得し、抗体成分等の存在による関与が疑われた。そして、血小板製剤は、接

種された細菌が増殖してもpHやスワーリングの消失による反応は鈍く、これらの検査や外観検査に、まだ限界があると言えよう。

PBDSは菌増殖によって消費するO₂濃度を検知するシステムであるが、パウチ内では血小板製剤バッグ内の菌数よりも指数的に多く菌を増殖出来、それに相伴して、O₂濃度も鋭敏に下降しており、PBDS接続後24時間（採血後48時間）で菌増殖判定が簡便に出来ることが確認された。従って、酸素濃度減少を指標とした方法は鋭敏であり、血小板製剤の菌増殖検出に有用と考えられた。

5. 結語

400ml由来白血球層40mlに細菌を接種し、接種後30分の間に細菌数は徐々に減少したが、一定の割合で細菌数が残存していた。

細菌接種後24時間静置して白血球除去を行った場合、フィルター処理前に比べて、処理後は、接種した*Yersinia enterocolitica*菌は減少していた。これは、白血球除去フィルターで処理することにより、白血球とともに接種細菌もフィルター部分に捕捉されていると考えられた。さらに、このフィルター部分を洗浄し収集する事によっても、残存している接種細菌を検出できることが可能と思われた。

PBDSは、菌増殖によって消費するO₂濃度低下を簡便に検知でき、酸素濃度減少を指標とした方法は、血小板製剤の菌増殖検出に有用と考えられた。

文献

- 1) 日本赤十字中央血液センター医薬情報部: 主な輸血用血液の無菌試験結果について. 輸血情報0203-69, 2002.
- 2) 須貝順子、須貝勝平、布施秋久、中島順次: 自己血輸血用血液の細菌汚染状況. 自己血輸血 12(1):41-45,1999.
- 3) 須貝順子、須貝勝平、布施秋久、中島順次: 術中輸血の実態と自己血輸血の細菌汚染状況. 自己血輸血 12(1):46-49,1999.
- 4) 古田治彦、久保諠彦、木下 智、栗林信仁、堀内 薫、白数力 也: 血液採血部位の細菌汚染に関する実験的検討. 自己血輸血 13(1):117-122, 2000.
- 5) 高瀬隆義、大屋秀人、千脇 廣、船橋茂、浅井隆善、山本浩子、伊藤道博、中島耀子: 細菌汚染血液の保管と外観検査. 日本輸血学会雑誌 44(2)(第46回総会抄録集):172,1998.
- 6) 比留間 潔: 輸血用血液のPrestorage leukocyte reduction. 日本輸血学会雑誌 44(1):1-11,1998.
- 7) 奥山美樹、比留間潔: 自己血輸血における通常RC-MAPと比除RC-MAPの比較検討—凝集塊、サイトカイン濃度の比較—. 自己血輸血 14 (第14回学術総会抄録集):S11,2001.
- 8) 加藤正久、脇本信博、杉山美雪、水口宏美: 自己血輸血における保存前白血球除去の有用性—非特異的免疫抑制反応の予防に関して—. 自己血輸血 14 (第14回学術総会抄録集):S13,2001.
- 9) 脇本信博、水口宏美、加藤正久: 整形外科手術後創部感染症に対する自己血輸血の影響—保存前白血球除去群と対照群の比較検討—. 日本輸血学会雑誌 48(2)(第50回総会抄録集):228,2002.

10) 秋野光明、佐藤雅子、栗倉裕美、他: 保存前白血球除去剤の有用性—*Yersinia enterocolitica*の汚染防止を中心に—. 自己血輸血 14、学術総会号(第14回学術総会抄録集)、S12,2001.

11) 名雲英人、松田裕一、茶谷 真、他: 赤血球M・A・P中の*Yersinia enterocolitica*の白血球除去フィルターによる除去効果—汚染菌量と除去時期との関係—. 日本輸血学会雑誌 40(1):32-38,1994.

12) 秋野光明、佐藤雅子、栗倉裕美、本間雅広、山本定光、池淵研二、池田久實: 自己血における保存前白血球除去の有用性. 自己血輸血 14(2):132-136,2001.

13) Krishnan, L.A.G., Brecher, M.E.: Transfusion-transmitted bacterial infection. Hematology-Oncology Clinics of North America 9(1):167-185, 1995.

14) Hogman, C.F., Gong, J., Eriksson, L., et al.: White cells protect blood against bacterial contamination. Transfusion 31(7): 620-626, 1991.

15) Dzik, W.: Use of leukodepletion filters for the removal of bacteria. Immunological Investigations 24(1&2): 95-115, 1995.

6. 研究成果

1. Naomi Shimizu, Miki Nishimura, Chiaki Nakaseko, Takayoshi Asai, Yasushi Saito. Role of IL-12 in reducing the rate of leukemic relapse after allogeneic stem cell transplantaion. Chiba Medical Journal 78; 75-82: 2002
2. Takayoshi Asai. Board certifi-

- cation of medical doctors and medical technologists in Transfusion Medicine in Japan. *Transfusion and Apheresis Science* 26;115-119: 2002
3. Shinichiro Hashimoto, Michihiro Itoh, Miki Nishimura, Takayoshi Asai. Effect of 8 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ administrations of filgrastim for steady state mobilization of peripheral blood stem cells. *Therapeutic Apheresis* 6 (6);413-418:2002
4. N Shimizu, T Asai, S Hashimoto, M Narita, M Kobayashi, M Ito, M Onoda, A Yokota, R Cho, C Nakaseko, M Nishimura, Y Saito. Mobilization factors of peripheral blood stem cells in healthy donors. *Therapeutic Apheresis* 6;431-436:2002
5. 浅井隆善 血液製剤の種類とその特徴. *産科と婦人科* 69(8); 977-984:2002
6. 浅井隆善 輸血の確認ポイント. *臨床看護*8(6); 776-780:2002

表1. 接種後バッグ内細菌数の経時的変化に関する基礎検討

	Pseudomonas aeruginosa 接種後検査時間		
	直後	10分	30分
接種菌数	細菌コロニー数 (個/ml)		
296/ml (n=4)	40	13	22
414/ml (n=4)	62	16	8

表 2. 15 分間室温静置後白血球除去時の細菌検出

Yersinia enterocolitica		
接種細菌数	検体	細菌コロニー形成数 (個/0.5ml)
		通常培地 増菌培地*
<u>13.8個/ml</u>		
	白除フィルター通過前血液	5
	白除フィルター洗浄液	4 2
	白除フィルター通過後血液	3 3
<u>1.4個/ml</u>		
	白除フィルター通過前血液	1
	白除フィルター洗浄液	0.6 0
	白除フィルター通過後血液	0.1 0

増菌培地における検出* : 陽性検体数 / 5 検体

表 3. 24 時間室温静置後白血球除去時の細菌検出

Yersinia enterocolitica		
接種細菌数	検体	細菌コロニー形成数 (個/0.5ml)
		通常培地 増菌培地*
<u>3175個/ml</u>		
	白除フィルター通過前血液	0.2
	白除フィルター洗浄液	0.2 2
	白除フィルター通過後血液	0 0
<u>635個/ml</u>		
	白除フィルター通過前血液	0.2
	白除フィルター洗浄液	0.2 2
	白除フィルター通過後血液	0.2 0

増菌培地における検出* : 陽性検体数 / 5 検体

表 4. 血小板製剤中の接種細菌数の変化

	接種後時間 (時間)					
	0	16	20	24	48	72
	細菌コロニー数					
<i>S. aureus</i>	4	0.5	1.5	1	1480	15640
<i>S. epidermidis</i>	4	3	12	2	18	3
<i>E. coli</i>	0.5	666	600	800	2800000	45300000
<i>S. marcescen</i>	55	1	0	0.5	0	0
<i>S. pneumoniae 2</i>	0.5	0.5	0.5	0.5	0	

表 5. 血小板製剤中の細菌汚染と pH 変化

	接種後時間 (時間)					
	0	16	20	24	48	72
	p H					
<i>S. aureus</i>	6.99	7.16	7.19	7.23	7.28	7.27
<i>S. epidermidis</i>	7.04	7.17	7.20	7.23	7.29	7.30
<i>E. coli</i>	6.94	7.17	7.17	7.21	6.53	5.89
<i>S. marcescen</i>	6.98	7.18	7.21	7.23	7.29	7.27
<i>S. pneumoniae</i>	6.93	7.10	7.12	7.14	7.13	7.06

表6. PBDSによる細菌増殖の検出

	N	接種後時間 (時間)		
		24	30	48
<i>S. aureus</i>	3	3	3	3
<i>S. epidermidis</i>	2	1	2	2
<i>E. coli</i>	3	3	3	3
<i>S. marcescen</i>	3	3	3	3
<i>S. pneumoniae</i>	3	3	3	3
陽性率		93%	100%	100%

厚生労働科学研究費補助金（医薬安全総合研究）
平成14年度研究報告書

「血小板製剤の有効期限延長と安全性確保に関する研究」
(H14-医薬-016)

分担研究報告

血液製剤中に混入する細菌の迅速な検出法について

分担研究者 高松純樹 名古屋大学医学部附属病院輸血部 教授

研究要旨

血液製剤中に混入する細菌の早期検出は、汚染された血液製剤による副作用回避から重要な問題で、特に室温保存されて有効期間の短い血小板製剤では重要な課題である。現在までに報告された製剤中に混入する細菌検査の方法を文献学的に検索比較検討を行ったところ、最近培養法では以前に比して改良され血小板製剤をのぞいては、ほぼ基準を満たしているのではと思われる。遺伝子増幅法は迅速であるが、ルーチン化に当たっては、試薬、器具の無菌化と、特異性および感度の検討が求められることが明らかになった。

A. 研究目的

安全な輸血療法にとって、ABO不適合輸血と並んで輸血による感染症は重要かつ普遍的な問題である。感染症についていえば、HIV、HCV、HBV等かつては重篤な感染症については核酸増幅法による早期の対策が可能となり、例外的に感染は成立したとの報告はあるが、先進工業国では対策は十分といえる。

血小板製剤は機能保持の観点から、

20-24℃で水平震盪した状態で保存される。これは万が一製剤中に細菌の混入があった場合には増殖し、輸血により副作用を惹起する可能性がある。そこで、このような細菌汚染についての早期検出システム、報告システムの構築は重要な課題となっている。

今後の検出システムの開発に資する目的で現在までに報告された血液製剤に混入する細菌検出の主な方法を文献

的に検討した。

1. 現行の検出システム（日本赤十字社による）

現在の日本赤十字社では目視検査、溶血、ガス発生などによる判定と、一部製剤からの抜き取り検査による培養検査によっている。

2. 全自動血液培養装置による検出

杉浦らは1990年にオルガノン社が開発した全自動血液培養装置を用いて、6種類の好気性菌（黄色ブドウ球菌、大腸菌、表皮ブドウ球菌、エルシニア菌、セレウス菌、緑膿菌）、*Candida albicans* および嫌気性菌である *Propionibacterium acnes*（アクネ菌）の検出能力を日赤で行っている日赤業務標準に規定された無菌試験法と比較検討した。生食で接種した好気性菌、および *Candida* はいずれも全自動血液培養装置で早期に検出され（11.7-34.9時間）、現行法の24-48時間位比して有意の差異が見られた。しかしながら、アクネ菌は現行法が96時間に比して108-186時間と明らかな差異が見られた。

アクネ菌を生食に接種したのではなく、製剤に接種した検討では、MAP赤血球、全血、血小板製剤、照射血小板ではいずれも現行の無菌試験法に比して早期に検出されたが、FFPでは検出不能もしくは著しい延長が見られた。しかし、血小板製剤ではその検出時間は3.8-4.6日と現行法よりも早期に検出されたものの、有効期限以内である3日間以内には検出されなかった。

3. 遺伝子増幅法を用いた無菌試験

1) 16S リボゾーム DNA 遺伝子増幅法

国島らによる細菌の16S リボゾーム DNA 遺伝子増幅による細菌の迅速な検出、同定に関する検討では用いた6種類の菌（黄色ブドウ球菌、エルシニア菌、セレウス菌、緑膿菌、*Propionibacterium acnes*（アクネ菌）、表皮ブドウ球菌）については遺伝子増幅後、塩基配列を決定することにより、菌種の同定が可能であることが明らかにされた。

2) *gyrB* 領域遺伝子増幅法

福島らは既存の16S リボゾーム DNA 遺伝子では分類できない近縁菌種でもその特異的な塩基配列により、解像度の高い系統樹解析が可能であると考えられている *gyrB* 領域遺伝子増幅をマイクロアレイを用いることによる新しい検出法を考案した。文献では血液に混入する細菌ではなく、抗酸菌や食中毒菌が中心であったが、従来法である培養法やアンプリコアー法と比べても、7-8時間で判定が可能であった。

4. 各方法の問題点

現行の日赤業務標準に規定された無菌試験法は前述したように、時には数週間を要するなど時間がかかること、実際に混入する菌量が少ないために陽性率が低いこと、血小板製剤や乳ビ血漿製剤では判定が困難である。

全自動血液培養装置を用いた方法では、日赤業務標準に規定された無菌試験法に比して多くの菌で早期に検出されたが、アクネ菌では検出が遅れること、放射線照射した製剤やFFP製剤では特にアクネ菌の検出が困難であったこと等の問題が指摘できる。

遺伝子増幅法は上記二つの培養法に比して時間が短縮できることは大きな特徴であるが、16S リボゾーム DNA 遺伝子を用いる方法ではこの遺伝子領域は全ての細菌が保有しているために、幅広い菌の検出には適しているが、しかし近縁種の区別は困難である。

さらにユニバーサルプライマーを用いた遺伝子増幅法一般については以下のような注意点、問題点がある。まず試薬、器具の細菌汚染で、例えば制限酵素には微量の大腸菌 DNA が混入しているといわれており、ロット管理が重要となる。さらにはいくら遺伝子増幅法といえども、検出限度が問題となる。現在の技術では10cfu/mlの敗血症の病原体は検出されないといわれている。

B. 今後の方向

血液製剤中に混入する細菌については、特に血小板のように室温保管する製剤では特に問題である。早期の検出体制が必要となるが、従来法では時間がかかり過ぎること等により、ルーチン化は困難である。全自動血液培養装置も改良されているが、実際問題となる血小板製剤に混入するアクネ菌検出は問題がある。一方、遺伝子増幅法は時間的な制約は免れるが、実際の運営上厳密な無菌管理が必要であることと、特異的な菌検出にはまだ改良すべき点がある。

C. 研究成果

1. Junki Takamatsu, Hidenori Toyoda, Yoshihide Fukuda. GB Virus C and Mortality from HIV Infection. N Eng J Med 346:377-379, 2002.
2. Nobuo Aoki, Tamotsu Matsuda, Hidehiko Saito, Kiyoshi Takatsuki, Kenji Okajima, Hoyo Takahashi, Junki Takamatsu, Hidesaku Asakura, Nobuya Ogawa for the CTC-111 IM clinical research group. A comparative double-blind randomized trial of activated protein C and unfractionated heparin in the treatment of disseminated intravascular coagulation. Int J Hematol 75:540-547, 2002
3. Hideki Otagiri, Yoshihide Fukuda, Isao Nakao, Yoshiaki Katano, Hidenori Toyoda, Shoichi Yokozaki, Kazuhiko Hayashi, Tetsuo Hayakawa, Youji Fukuda, Moritoshi Kinoshita and Junki Takamatsu. Evaluation of a new assay for hepatitis C virus genotyping and viral load determination in patients with chronic hepatitis C. J Virol Meth 103:137-143, 2002

厚生労働科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）
平成 14 年度研究報告書

「血小板製剤の有効期限延長と安全性確保に関する研究」
(H14-医薬-016)

分担研究報告

血小板製剤の需給動向

分担研究者 佐竹正博 東京都赤十字血液センター 副所長

研究要旨

血小板製剤の有効期限は3日と設定されているので、在庫数が少なければ、必要な型・単位数の供給は困難となる可能性がある。1999年から開始したウィルス核酸検査によって以前より供給は1日遅れることが余儀なくされている。現在血液センター所内での期限切れ血小板の割合は1.2%から10.6%で年次毎の変化はあまり認められなかったが、他センターからの受け入れは1.3%から20.2%と大きなバラツキを認めた。総じて現在の血小板供給は、所内での期限切れを増加させる状況までは至っていないが、地域内での製剤の激しい移動によって供給をまかなっている状態であるといえる。病院に届くまでに時間がかかってさらに有効期間をさらに短くしている可能性もあり、決して望ましい状況ではないことが判明した。以上より、血小板製剤の有効期限延長は、医療機関と血液センターの双方に意義があるものと考えられる。

A. 研究の背景、目的と方法

血小板製剤（以下 PC と略す）は予約製剤であり、本来あらかじめ予約を受けてから献血者から採血し、供給する製剤である。しかしながら現実には、患者の早朝の血小板数をみて当日 PC の輸血を必要とすることが多く、又実際、地域に

よっては製剤の半数近くは当日のキャンセル待ちで受注を受けているところもある。このような状況で PC 製品の在庫が少なければ、必要とされる型・単位数の PC を供給することが困難となる。この場合もし PC の有効期限が1日又は2日

延長されれば、製品在庫数は著明に増加し、患者に適合した PC を供給できる可能性が高くなる。

さらに 1999 年 10 月からは、PC を含む全血液製剤が核酸増幅検査 (NAT) を受けてから供給されることになり、これによって PC の供給はそれまでより約 1 日遅れることを余儀なくされた。したがって種々の条件が重なると、地方によっては供給されてからの有効期間が 1 日を切る場合も珍しくなくなってきた。この場合にも、PC の有効期限の延長は、医療機関での輸血の実施をより容易なものとするだけでなく、血液センターにおいても採血・製造・検査・供給のあらゆる分野において工程に余裕が生まれてくる。

当班員の研究は、日本赤十字社血液事業部から発表されている血液事業四季報に基づいて、血液センターでの PC の製造・供給の実態を把握し、PC の有効期限延長の意義を探ることに焦点を置いた。

B. 研究結果

1. PC の採血・検査状況

表 1 にみるように、97 年から 99 年までは PC のための献血者は増えつづけているが、99 年からは年約 78 万人で一定している。PC の総供給単位数もここ 3 年間ほぼ一定している。血液センターに在庫がなく供給不能となる事態は少ないと考えられることから、この供給数はほぼ需要単位数にあたると思われる。1 バッグあたりの平均単位数は上昇傾向にあり、現在 11.3 単位である。

表 2 に献血者全体の検査不合格率を検

査項目毎に挙げたが、不規則抗体の陽性率は年を経てもまったく変わらないのに対し、HBV、HCV などのウイルスマーカー陽性者は年毎に少なくなっている。ALT による不合格率が減少してきているのは、採血前の ALT の検査が普及してきているためと思われる。梅毒の陽性率が一定なのが注目される。PC 献血者の多くは複数回献血者であり、自分の感染症検査結果を確認しているため、検査による不合格率はこれらの全体の不合格率に比べてかなり低い。

以上をまとめると、PC 製剤獲得のための献血者の募集についてはとくに大きな問題は起きていないと思われる。NAT による感染症陽性 (HBV、HCV、HIV) の献血者は 1 年に 100 人を超える程度で、検査不合格者全体に占める割合はきわめて小さい。

2. 血液センターでの期限切れ PC の実態

日本には北海道の千歳・東京・京都府福知山の 3 箇所に NAT センターがあり、日本のどこで献血された血液でも、その検体はすべてこのうちの 1 つのセンターに運ばれる。NAT センターに近い地域ではその日の深夜に検査に入ることができるが、運送の手段と地理的な条件から翌日早朝に検査にはいる場合もある。さらに、現在の NAT は 50 検体をプールして PCR をかけるので、そのマスタープールが陽性になると、50 本のうちどれが陽性かを特定されるまでその 50 本はさらに 6 時間ぐらい出庫停止となる。このようにして、NAT の導入が PC の製品化を遅らせ、欠品・供給不能の状態を引き起こし

ているかどうかをみるために、地域別に期限切れの PC の数を算出した。

日本を 7 つの地域に分けたが、中央とは新潟を含めた関東地方、岡山は中国・四国地方をさし、沖縄は九州に含めた。期限切れ数は、2000 年からは公表されているが、それ以前には集計されたデータはない。したがって、1997 年から 1999 年までは以下のようにしてこれを算出した。製造・供給の由来から製剤を分類すると、自センターで製造されたもの、他センターで製造されて受け入れたもの、自センター管内に供給したもの、他センター管内に供給したもの、返品、期限切れなどの種類があり、これらが複雑に組み合わせられて供給されている。PC に限っていえば、これらのうち、PC は返品を受け付けておらず、また他センターに払い出した PC (したがって他センターから受け入れた PC も) が期限切れとなることもほとんどないと考えられることから、所内期限切れ数は、[自センター製造数] - [自センター製剤の管内・管外への総供給数] で近似させることができる。実際この方法で計算された数値が 2000 年の公表されている期限切れの数値とほぼ一致することが確認された。表 3、図 1 に所内期限切れの総単位数を % で示した。この図表で見ると、北海道を除いて 2000 年には期限切れがやや増加したが、その後 2001 年には少なくなりつつあり、全体として NAT 導入によって PC の期限切れが増加した状況は捕まえられない。

3. 他センターからの受け入れの動向

上記のように少なくとも期限切れの発

生数には、NAT の導入は影響を与えておらず、期限切れにはむしろ、そのセンターの採血・製造体制 (効率) のほうがより大きく影響すると考えられる。そこで次に、期限切れ発生の前の段階に変化がないかどうかをみるために、他センターからの PC の受け入れ率を単位換算のパーセントで表した (表 4、図 2)。

ここでいう地域別の受け入れとは、各都道府県に 1 つ以上ある血液センター (全国で 55 センター、北海道は 5 センター) のそれぞれで自センター以外から受け入れた数の、その地域での総和をいい、その地域が他の地域から受け入れた数をそのまま示すものではない。したがって、この数はその地域内でのセンター間の製品の移動と、地域外から受け入れた数との和となる。この図から 1999 年以降、PC 受け入れに関して地域により 2 つの傾向に分かれつつあることがわかる。北海道・九州・岡山 (中国・四国) 地域では他センターからの受け入れが増加し、中央・愛知・大阪では受け入れが減少している。これは NAT センターへのアクセスの難易度によって生じた現象であろう。本州の中央部から遠ざかるほど受け入れ率が高い傾向がある。ただし北海道の千歳に NAT センターがあるが、北海道の海浜に近い地域からの検体搬送には実際にはかなりの長時間を要している。このようなことから、地域によっては PC の採血を一日の早い時期に打ち切って検体を早めに送り出したり、PC の採取を交通の便のよい都市中心部に集中させ、周辺地域ではもはや PC 献血者の募集をし

ない、あるいは血液センターそのものの間で PC 採取について役割分担をするなどの対応をして PC の供給が滞らないようにしている。本州の中央部はこういった問題が少ない。この統計で明らかになった他センターからの受け入れの増加は、血液センター内での採血プログラムの分業化、採血供給の広域化、血液センターの業務集約化などの表れということができる。

総じて、現在の PC の供給状況は、所内での期限切れを増加させるところまではいっていないが、地域内での製剤の激しい移動によって供給をまかなっている状態であるといえる。

C. まとめ

血小板製剤の 72 時間という短い有効期限に対して、血液センターでの核酸増幅検査の導入などが、PC の期限切れの増加などにつながっているかどうかを調

べたが、数値の上では明らかな傾向は認められなかった。しかしながら、これは期限切れとなる直前に、血液センター間で頻繁な製剤の需給調整が行われていてようやく食い止められているためである事が明らかとなった。これは決して望ましい状況ではない。すなわち、その調整のため製剤が病院に届くまでに時間がかかって有効期間をさらに短くし、輸血の施行をあわただしいものに行っている可能性があるからである。また、需給調整のため搬送中の PC の保存状態は必ずしも理想的なものではない。したがって PC の品質の上からも長時間の搬送は避けたほうがよい。また、いったん交通事情に問題が起こればこれらの搬送は遅延・途絶し、医療機関に期限内に供給できなくなる場合が生ずる。以上のことから、PC の有効期間の延長は、医療機関・血液センターの双方にとって大いに意義のあるものであると考えられる。

表 1 血小板献血者の推移

	1997年	1998年	1999年	2000年	2001年
PC献血者 (千人)	714	757	779	783	775
PC (L)	136	147	156	153	152
供給本数 (千本)	706	705	710	705	699
供給単位 (千単位)	7445	7743	7971	7978	7898
平均単位/バッグ	10.5	11.0	11.2	11.3	11.3

表2 献血者全体の検査不合格率 (%)

	1997年	1998年	1999年	2000年	2001年
梅毒	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
HBs抗原	0.2	0.2	0.2	0.1	0.1
HBc抗体	2	2.2	2	1.9	1.5
HCV抗体	0.4	0.4	0.3	0.3	0.2
ALT	3.1	2.9	2.3	2.1	2
不規則抗体	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
検査不合格合計	7.1	7.3	6.9	6.9	6.5

表3 地域別血液センターでの期限切れ血小板数の割合 (%)

	1997年	1998年	1999年	2000年	2001年
北海道	3.2	2.3	2.6	1.1	1.2
宮城	9.7	8.8	8.1	8.9	9.9
中央	2.3	4.4	4.3	4.9	3.6
愛知	4	3.7	4.1	5.5	5.6
大阪	7.5	8.9	8.4	10.2	7.8
岡山	5.9	9	8.6	11.1	10.6
九州	7.2	6.9	7.2	7.4	7.4

表4 他センターからの血小板製剤受け入れ率 (%)

	1997年	1998年	1999年	2000年	2001年
北海道	1	2.3	3.8	15.7	20.2
宮城	6.5	4.3	5.6	5.9	5.5
中央	10.9	5.1	2.7	2.2	1.3
愛知	8.2	5.9	3.7	3.9	2.7
大阪	3.5	2.7	4.5	5	3.7
岡山	7.3	4.4	4.5	5.7	7.2
九州	5.9	2.5	2.7	5.2	8.4

図1 所内期限切れ単位 (%)

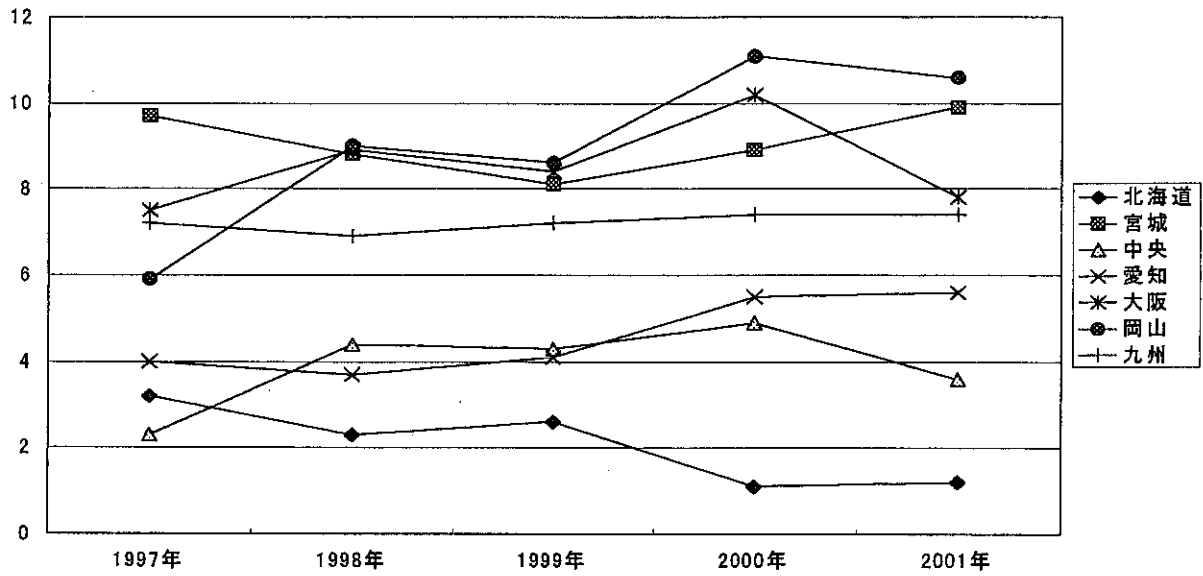
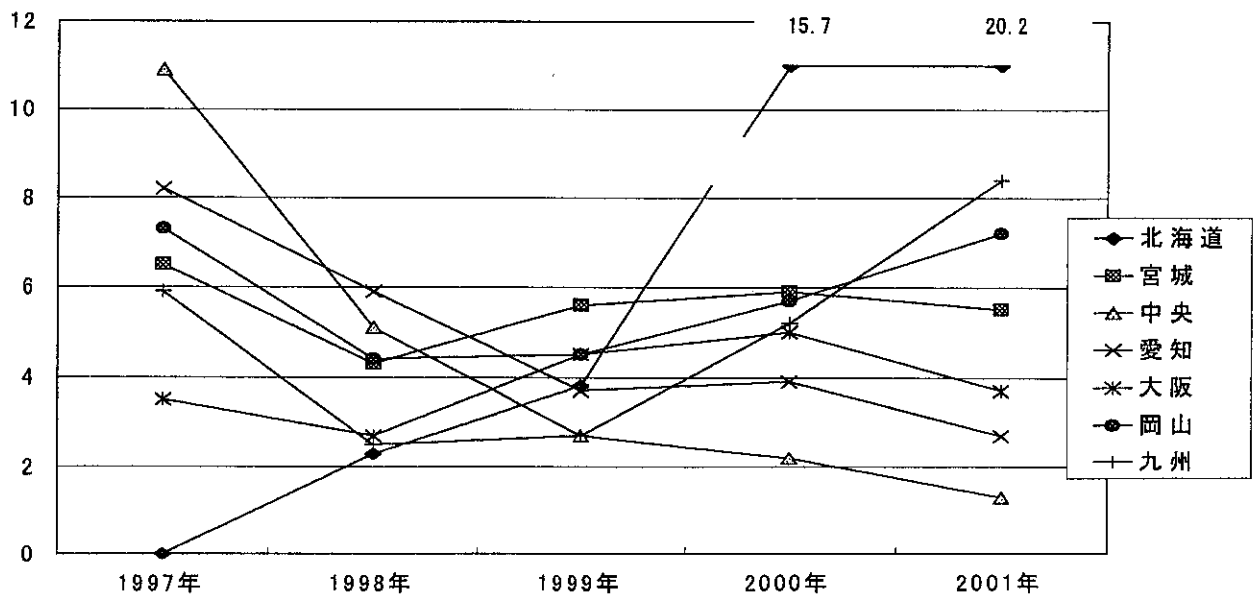


図2 他センターからの受け入れPCの総単位数の割合 (%)



D. 研究成果

1. Satake M. Residual Risk of Transfusion-Transmitted Diseases in Japan and Pathogen Inactivation. *Vox Sanguinis* 2002; 83 suppl 1 : 277-280.

厚生労働科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）
平成 14 年度研究報告書

「血小板製剤の有効期限延長と安全性確保に関する研究」
(H14-医薬-016)

分担研究報告

ずり応力下血小板血栓形成能測定による保存血小板の機能評価

分担研究者 宮田茂樹 国立循環器病センター輸血管理室医長

研究要旨：

血小板製剤の有効期限を現在の3日間（72時間）から5日間へ延長することの妥当性を検討するために、保存期間の異なる血小板の機能の差異について生理的流動状況下を模倣する評価系を用い検討した。平行板型フローチャンバーを用い、正常健康人の全血より作成した血小板除去再構成血に保存期間の異なる血小板製剤を添加した検体のコラーゲン固相表面上へのずり応力下血小板血栓形成能を測定した。血小板除去再構成血と比較して3日ならびに5日保存血小板添加検体は、明らかにずり応力下血小板血栓形成能が回復し、保存血小板もずり応力下での血栓形成のための機能を保持していることが明らかとなった。今後、検体数を増やし至適保存条件等について詳細な検討を行う予定である。

A. 研究目的

血小板製剤の有効期限を現在の3日間（72時間）から5日間へ延長することの妥当性を検討するためには、長期保存の血小板機能に与える影響を詳細に検討する必要がある。長期保存血小板の有効性を検討する際、その測定系が重要となる。近年、血小板機能を評価する場合に、生体内で血小板が存在する環境である流動状況下での血小板機能を考慮する必要性が指摘され、ずり応力下血小板機能評価の新しい概念が確立されつつある。この新

しい測定系を用いることで生理的条件に近い系での長期（5日）保存が血小板機能に与える影響について、血小板板膜レセプターと各種粘着蛋白との相互作用を中心とした詳細な評価が可能となると考えられる。

今回我々は、長期保存の血小板機能に与える影響について評価するための新しい測定系の確立について検討した。

B. 研究方法

1) ずり応力下血小板機能測定

コラーゲンを固相化したガラスプレートを組み込んだ平行板型フローチャンバー内に、血小板を蛍光色素で標識した全血を流し込み、低ずり応力、高ずり応力のかかる部位でのコラーゲン固相表面上への血小板血栓形成過程を倒立型蛍光顕微鏡でリアルタイムに観察した。また、これらの画像をCCDカメラによりコンピュータに取り込みデジタル化し、画像解析を行った。血小板血栓がコラーゲン固相化表面に粘着した割合、すなわち表面占有率を血小板機能評価の一つの指標とした。また、形成された血小板血栓をZ方向にスキャンすることにより血小板血栓の3次元イメージを再構築し、血小板血栓の高さを血小板機能のもう一つの指標とした。

2) 血小板除去再構成血の作成

インフォームドコンセントを得た健康成人から選択的抗トロンビン剤であるアルガトロバンを終濃度 125 µg/ml で添加し抗凝固して採血した。全血を 800 rpm で 10 分間遠心し、その血小板富血漿 (PRP) を採取した。残った血液から buffy coat を注意深く取り除いた。また、採取した PRP は二つにわけ、一つを 3,600 rpm 10 分間遠心し、その上清を血小板欠乏血漿 (PPP) として採取した。buffy coat を取り除いた赤血球成分と PPP をヘマトクリットが 45% になるように混合し、血小板除去再構成血とした。また、PRP と PPP を最終血小板濃度が 160,000/µl となるように buffy coat を取り除いた赤血球成分と混合し、正常コントロール (PRP 加再構成血)

とした。

3) 保存濃厚血小板の機能評価

大阪府赤十字血液センターより、有効期限切れの濃厚血小板製剤の供与をうけた。供与を受けた濃厚血小板製剤と同型の血液型のインフォームドコンセントを得た健康成人の全血より、上記の方法で作成した buffy coat を取り除いた赤血球成分と PPP に、3 日ならびに 5 日間保存濃厚血小板を最終血小板数が約 150,000/µl となるように混合した。作成した再構成血を前述したずり応力下血小板機能測定系にて評価し、保存期間の血小板機能に与える影響について検討した。

C. 研究結果

1) ずり応力下血小板血栓形成過程

我々は、平行板型フローチャンバーを用い生理的血流存在下 (流動状況下)、すなわちずり応力下血小板血栓形成のメカニズムを以下のように明らかにした¹⁾。①血管傷害部位において、血液中の vWF 分子が露出された血管内皮下組織に結合し、内皮下組織中 vWF と合わせて徐々に血栓形成部位の vWF 密度が上昇していく。引き剥がそうとするずり応力に対抗できる以上の vWF 密度になると血小板が血管障害部位で GPIIb と vWF A1 ドメインの反応を通して rolling をおこす²⁾。②この rolling 過程は、vWF-GPIIb 反応による inside-out シグナルをもたらすと同時に、コラーゲンと GPVI、GP Ia/IIa との反応に十分な時間を与え、GPVI とコラーゲンの反応を中心に inside-out シグナルを GPIIb/IIIa の細胞内ドメインを介して伝達し、GPIIb/IIIa のリガンドに対する親和性を上昇させ、