厚生労働科学研究費補助金

医薬品等医療技術リスク評価研究事業

血小板製剤の有効期限延長と安全性確保に関する研究

（H15－リスク－025）

平成15年度　総括・分担研究報告書

主任研究者　大戸　斉

平成16（2004）年3月

目次

Ⅰ．　総括研究報告書

血小板製剤の有効期限延長と安全性確保に関する研究---------- 1

大戸 斉

平成15年度研究班会議プログラム---------- 7

Ⅱ．　分担研究報告書

白血球除去フィルターによる細菌の収集・除去---------- 9

浅井隆善

血小板製剤中での細菌の増殖---------- 24

高松純樹

初流血除去により血液製剤の細菌汚染を低減化させる試み---------- 35

佐竹正博

血小板保存に伴う損傷の評価---------- 43

尾崎由基男

ずり応力下血小板機能測定を用いた保存血小板の血栓形成能評価--- 47

宮田茂樹

白血球除去フィルターによる細菌除去---------- 58

佐藤雅子

国内で新たに開発した血小板保存用バッグの外国製品との比較評価- 67

大戸 斉

Ⅰ．総括研究報告書

厚生科学研究費補助金
医薬品等医療技術リスク評価研究事業
平成15年度総括研究報告書

血小板製剤の有効期限延長と安全性確保に関する研究

主任研究者　大戸 斉　福島県立医科大学　教授

研究要旨：
1. 超高齢少子が間近な日本では近い将来に輸血血液の需給バランスが崩れるものと予測されている。とりわけ，血小板製剤は3日間の有効期限に設定されているが，世界的には5日から7日に延長する国が出てきた。ウィルス核酸検査がなされるようになって以来，日本の血小板供給のひっ迫が顕在化しつつある一方で，1%～10%の血小板は期限切れ廃棄されている。
2. 血小板製剤の有効期限延長にあたって最も重要なことは細菌汚染の防止である。既に，日本の血小板輸血は世界最良の水準にあるが，さらに安全にするために種々の方策を実施されつつある。とくに，採血初流血を取り分けることで，塗布細菌と穿刺針切り取り小皮膚片の混入はかなり防止できた。
3. *Yersinia enterocolitica* 以外の菌種に白血球除去フィルターを用いた場合，菌数の減少は期待できるが完全除去は難しいことが判明した。しかし，そのフィルター部分からの洗浄液を回収することにより，細菌検出能の感度を増強できた。
4. 接種菌種が同じであっても株によって増殖の有無とスピードには大きな差異がある。とくに *Serratia marscence* は一旦検出感度以下になっても数時間後にV字状に増殖するので注意を払うべきである。
5. 血小板保存にともなう損傷評価にはコラーゲン惹起血小板凝集とずり応力下PECAM-1分解を指標に用いるのが適当である。7日間保存すると保存期間に比例して漸次機能低下が観察されるが，血小板血栓形成能と粘着能は保持されていた。
6. 血小板の有効期限延長を障害する案件は解決されようとしている。

分担研究者

浅井　隆善	千葉大学医学部	副部長
高松　純樹	名古屋大学医学部	教授
佐竹　正博	東京都赤十字血液センター	副所長
尾崎由基男	山梨大学医学部	教授
宮田　茂樹	国立循環器病センター	室長

A. 研究の背景と目的

我が国の急速な超高齢少子化の進行に伴って、近い将来に輸血血液の需給のバランスが崩れ、不足する事態の発生が危惧されている。特に血小板製剤は、重篤な患者に使用されることが多く、供給されない場合は生命にかかわってくる。欧米では５日間の有効期間が設定されているが、日本では20年以上に亘って３日間に限定されている。さらに、ウィルス核酸増幅検査（NAT）の導入によって、供給における血液センターの区域を越えた需給調整作業は極限に近い水準で維持されている。しかし昨年度の研究から，採血血小板の２％から４％ほどが血液センターで廃棄されていることも明らかとなった。さらに病院での使用可能時間は平均24～36時間程度しか残っていない。そのため、病院内で廃棄される血小板の本数も多いものと推定される。

しかし、成分採血の普及、採血手技の改善などによって問題となる細菌混入は大変低下してきた。また、酸素透過性の高い血液バッグの開発、保存条件の改善によって現在廃棄されている採取後72時間以上経過した血小板でも、その機能は良好に保存されている。

この研究班では下記の３つの研究を柱に、血小板製剤の安全性確保と良好な機能を保持して、有効期限の延長が可能であるかを評価し，可能であるならば延長を目標に障害となる問題の解決を目指す。

１） 細菌混入防止対策と細菌除去技術
２） ５～７日間保存血小板の形態変化及び機能評価
３） 至適保存条件の検討と血小板保存保護液の改良

今年度は前年に得られた血小板保存と供給に関する問題，細菌混入の実態とそれを克服するための方策，押さえなければならない項目を検討する。あわせて各研究者が立案した研究テーマに沿って血小板の機能を安全にかつ有効に維持しつつ，採血後５～７日間の有効期限に延長可能であることを科学的に実証する研究をすすめる。

B. 研究方法

研究目標

1. 細菌混入の予防と除去
2. 長期(５日)保存血小板の機能と形態評価
3. 血小板の長期保存を可能とする保存条件の検討

上記３点を研究することにより、５～７日間保存血小板の安全性の確立と機能面からの有効性を証明し、血小板製剤の安定的供給に寄与する。

1. 細菌混入の予防と除去対策

1) 技術の工夫と向上、ドナー選択などからのアプローチ

採血時に最初の10-30mlを廃棄することなどにより細菌混入を防止する技術を発展改良する。

前年度の佐竹らの調査によって，日本の血小板輸血製剤の細菌検出率は諸外国と比較して数段低いことが明らかになったが，さらに細菌混入防止技術を研究した。

2)たとえ，細菌混入しても、その細菌を除去・不活化する技術の可能性を探索した。白血球除去フィルターが排除可能な細菌と不可能な細菌を同定し、その機序を明らかにすることを目指した。

3)細菌混入して、増殖した場合にそれを容易に判定できる技術や細菌が産生する内毒素・外毒素を検出する簡便なモニター（マーカー）の開発と評価を行なった。

2．　長期保存血小板の機能と形態評価

1)各種血小板活性化マーカーの経時的評価
血小板活性化分子をマーカーにして、保存による血小板損傷の評価。

2)新しく日本で開発した血小板保存バッグと外国製品との比較評価：酸素透過性を向上させた血液バッグなどによる血小板機能保持効果を評価。

3)ずり応力下血小板血栓能測定による保存血小板の機能評価：ずり応力下血小板血栓形成能は生体内の血小板機能を反映していると考えられている。長期間保存血小板の機能をこの点から詳細に評価。

倫理面への配慮

当面3日間の有効期限を過ぎた血小板を患者に輸血することは予定していないので、倫理的な問題は発生しない。地域の血液センターから有効期限が過ぎた血小板の譲渡を受けたが、善意の献血によるものであることを自覚して、丁重な研究を心掛けた。

C.　研究結果

各分担研究員の研究成果は以下のごとくであった。

1）浅井隆善　班員

市販の白血球除去フィルターは白血球の除去とともに細菌の収集効果があることも見いだした。院内感染原因菌として問題になるセラチア菌は接種後一旦検出限界以下に減少するが，48時間以後再度検出され，増加する。この際，白血球除去フィルター（セパセル PLX-5A，旭メディカル）を使用すると，血小板液から30％～90％の細菌を除去できることと白血球除去フィルターの洗浄液から高濃度でセラチア菌が回収可能であることを見いだした。

また，同時に酸素濃度を指標とした血小板製剤用細菌検出装置 PBDS（ポール社）を用いると，細菌数に比例した動きがみられ，PBDS の細菌混入における有効性が示唆された。しかし，製剤液中のｐＨの変化は有用でないことも見いだした。

2）高松純樹　班員

臨床患者から検出した菌株 *Pseudomonas aeruginosa*（4 株），*Serratia marscence*(4株)，*Escherichia coli*（4 株)を期限切れ血小板製剤に添加の後，室温振盪保存して菌数をカウントした。

*Serratia marscence*の４株中２株は接種直後から対数増殖を示し，２株は数時間減少ののち，Ｖ字状に対数増殖した。*Pseudomonas aeruginosa* と，*Escherichia coli* は共に４株中１株は対数増殖を示したが，３株は増殖しなかった。これらの観察から同一菌種であってもドナーの獲得抗体の有無と菌株自体が特異の増殖特性を有している可能性が考えられた。しかし，同一菌株を異なるドナー血小板に接種しても同様な増殖曲線を示したことから，菌株自身の性質に依存すると考えている。

3）佐竹正博　班員

イヌを用いた初流血の側副バッグへの取り分け実験を行なった。*Staphylococcus epidermidis*，*Staphylococcus aureus*，*Propionium acnes* の３種の常在菌を塗布した後，4.5ml ずつ分注採血した。３種菌とも27ml 以内に限定して菌が検出された。菌数も初期のものほど多かった。塗布菌数を少なくすると，より初期の血液に限定

して検出された。

また，採血針による小皮膚片は 15 例中14例で最初の10ml以内に回収された。

初流血除去回路付き成分採血キットをボランティアに試用した。手技はやや複雑になったが，総じて操作性に大きな問題はないと評価した。

4）尾崎由基男　班員

検査落ちした血小板製剤の保存に伴う機能と表現系（血小板凝集，P-selectin, microparticle 産生，PECAM-1）の変化を指標に評価した。

ADP 惹起血小板凝集は２日目から低下したが，コラーゲン凝集は７日まで保たれていた。P-selectin の発現は２日目から出現，漸次増加した。高ずり応力によるPECAM-1分解は７日目に増加した。これらの観察から，保存血小板の機能評価にはコラーゲン惹起血小板凝集と高ずり応力下でのPECAM-1分解が適している。

5）宮田茂樹　班員

コラーゲン固相化ガラスプレート組み込み平行板型フローチャンバーを用いたずり応力下血小板機能測定系にて，保存血小板の血栓形性能を評価した。

血小板の保存期間が長くなるに比例して，血小板血栓の三次元成長が障害されたが，７日保存後でもずり応力下血栓形成能と粘着能は保持されていた。保存期間中に血小板の活性化過程に障害がおきる可能性が示唆されたが，個人によって血小板血栓形成能に格差があることも認められた。

6）佐藤雅子　研究協力員

白血球除去フィルター(セパセルPLX-5A，旭メディカル)処理がアフェレーシス血小板製剤の細菌汚染除去に役立つかを研究した。

血小板製剤に４種の菌を接種して５日間の保存期間で増殖性を調査した。*Bacillus cereus* と *Klebsiella pneumoniae* は速やかな増殖を観察した。*coagulase-negative Staphylococci* は２日後から増殖を開始した。*Propionium acnes* はさほど増殖しなかった。*Klebsiella pneumoniae* を血小板製剤に接種の後，白血球除去フィルターを通過させたが完全には除去されず，保存中に菌の増殖が観察された。以上より，白血球除去フィルターによる細菌の除去を期待するのは *Yersinia enterocolitica* 以外には難しい。

7）大戸 斉　班員

日本で新しく開発した血小板保存用ポリオレフィンバッグ(PO-８0)と世界で最も汎用されている血小板バッグ(PL2410, バクスター社）の比較を行なった。酸素透過性はPO-80が３割ほど高いので，長期保存によって，血小板機能に差が出るものと予想されたが９日までの観察期間で乳酸濃度，グルコース濃度，ｐＨ，pO2/pCO2，%HSR，血小板凝集能に差を認めなかった。以上から，両バッグは血小板保存性において有意差はないものと思われる。

D.　考察

血小板製剤の有効期限は世界的には５日間でさらに既に一部の地域・国では７日間に延長されている。日本では３日間に限定されているが，ウィルス核酸検査の導入によって血小板の実質的な需給調整時間は短くなっており，また，超高齢

社会にあって献血者の増加は見込めなくなっているので，血小板製剤の有効期限の再評価は現実の問題となっている。

有効期限延長を考慮するにあたっては，二つの案件をクリアしなければならない。細菌感染の回避と血小板機能を良好に維持することである。だが，最も重要なのは細菌汚染の回避である。

すでに，昨年度の本研究班報告で日本の血小板製剤は現時点でも細菌学的には世界で最も安全な製剤であることを示した。さらに，安全な製剤にするための研究を行なった。

佐竹正博班員の研究で側副バッグを取り付けこれに初流血を排除することで，皮膚常在菌と切り取り小皮膚片の混入を激減させることが可能であることが判明した。しかし，アフェレーシスの際には若干であるが操作者の手技が複雑になること，初流血排除によって頻回ドナーではトータルではかなりの量が余計に採血されることになってしまうことなど，一概には結論を導くことはできない。新年度に行なう予定の数千人規模の評価が待たれる。

高松純樹班員からは同じ菌種であっても増殖性に大きな差があることが報告され，細菌混入対策の際に考慮しなくてはならないことが示唆された。とくに院内感染で問題となっている *Serratia marscence* は一旦検出限界以下になってもV字状に再度増殖することが示された。この菌にはとくに注意を払わなければならない。

浅井隆善班員と佐藤雅子研究協力員からは白血球除去フィルターの細菌除去能力に大きな期待はできないと報告された。昨年度，浅井隆善班員は白血球に貪食されやすい *Yersinia enterocollitica* 除去に白血球除去フィルターの有効性が示したが，今年度は他の細菌にはフィルターによる細菌の減少作用はあっても，限界があることが証明された。しかし，フィルターの細菌トラップ効果を利用して細菌感染をより感度良く検出できることも報告された。

次に保存血小板機能の評価を行なった。宮田茂樹班員の研究によって，保存期間に比例してその機能は漸減していくが7日間保存血小板でもずり応力下血栓形成能と粘着能は保持されていることが証明された。尾崎由基男班員は保存血小板の機能評価にはコラーゲン惹起血小板凝集と高ずり応力下PECAM-1分解を指標にするのが適当であることを報告した。

大戸 斉班長は昨年度新しいポリオレフィンバッグ（PO-80）の血小板保存性能はこれまでの日本市販品よりも優れていることを報告したが，今年度は世界で流通している外国製品（PL2410）と比較して同等水準であることを報告した。

欧米と比較して日本の血小板製剤の細菌学的安全性が高いことが言われている。それは血小板製剤がほぼ100%アフェレーシス由来であることに起因する。しかい，それでも稀にではあるが輸血細菌感染症は発生している。*Yersinia enterocolitica* は白血球除去フィルターを併用することで完全に除去可能であることは昨年報告した。しかし，他の細菌はフィルター除去に抵抗し，この方法では除去できないことが判明した。

保存血小板機能は保存期間に比例して漸減するものの，7日間経ても血小板粘着と血栓形成機能は保存されていることから5日以上保存血小板輸血の臨床応用の可能性が期待される。また機能評価にはずり応力下PECAM-1とコラーゲン凝

集が適していることが明らかになったので，来年度はこれらの点からも多数例に新バッグ（PO-80）保存を試み，評価・進展させたい。

E. 健康危険情報

健康に危険をおよぼす事象は発生しなかった。

F. 研究発表

（研究論文）

1. Miyata S, Kawai T, Yamamoto S, Takada M, Iwatani Y, Uchida O, Imanaka H, Sase K, Yagihara T, Kuro M: Network computer-assisted transfusion management system for accurate blood component-recipient identification at the bedside. Transfusion 2004, 44: 364-372.

2. 大戸 斉. 血小板輸血と細菌感染. 血液フロンティア. 13：643-649, 2003.

3. Ohto H, Miyata S. Evaluation of stored platelets. International Forum. Vox Sanguinis, (in press) 2004.

4. Yuasa T, Ohto H, Yasunaga R, Kai T, Shirahama N, Ogata T. Improved extension of platelet storage in a polyolefin container with higher permeability. British Journal of Haematology, (in press), 2004.

（学会発表）

1. 橋本眞一郎，清水直美，成田光朗，浅井隆善，他. 輸血実施記録用紙による輸血副作用モニター. 日本輸血学会雑誌. 49 (2)：293, 2003.
2. 佐竹正博. 輸血用血液の病原因子不活化の考え方. 日本輸血学会雑誌. 49 (2)：223, 2003.
3. Miyata S. Network computer-assisted transfusion management system for accurate unit-recipient identification at the bedside. American Association of Blood Banks 2003 Annual Meeting (Educational Program). San Diego, U.S.A. 2003
4. 山本 賢、吉村尋典、岩谷泰之、河合健、大戸 斉、柴田 弘俊、宮田茂樹：保存期間が濃厚血小板製剤の機能に与える影響－ずり応力下血栓形成能を用いた評価－. 第52回日本輸血学会総会. June 23-25, 2004, 札幌 (発表予定)
5. 宮田茂樹、亀井政孝. 人工心肺使用時における輸血. 第52回日本輸血学会総会(シンポジウム). June 23-25, 2004, 札幌 (発表予定)
6. 佐藤雅子，秋野光明，他. 保存前白血球除去全血の *Propionibacterium acnes* 除去効果. 日本輸血学会雑誌. 48（学会総会号）：P-099, 2002.
7. 佐藤雅子，秋野光明，他. 貯血式自己血輸血における細菌汚染防止の一手段. 自己血輸血. 16（第16回学術総会抄録集）：29, 2003.
8. 安永礼子，湯浅武史，尾形 隆，池田和彦，柳掘浩克，大戸 斉. 血小板長期保存における高酸素透過性バッグの有用性. 日本輸血学会雑誌. 49 (2)：247, 2003.

G. 知的所有権

なし.

2003年度　厚生労働省科学研究費補助金　医薬品等医療技術リスク評価研究事業

「血小板製剤の有効期限延長と安全性確保に関する研究」班会議

日時：2003年8月2日，3日
会場：福島県立医科大学　第1臨床講義室

内容：　（各発表の後に10分ずつの討論）
2日（土）

13：30-13：35　　**主催者　あいさつ**　　大戸 斉（福島県立医科大学）

13：35-14：10　**輸血細菌感染症 Overview**　　座長　浅井隆善

演者　大戸 斉　（福島県立医科大学）

座長　尾崎由基男

14：20-14：50　**血小板製剤の需給調整と期限切れの現状と将来予測**

演者　佐竹正博　（東京都赤十字血液センター）

15：00-15：30　**ずり応力下血栓形成能による保存血小板の機能評価**

演者　宮田茂樹　（国立循環器病センター）

休憩（20分）

16：00-16：30　　座長　宮田茂樹

PECAM-1（血小板血管内皮接着分子）による血小板アポトーシスの評価

演者　尾崎由基男（山梨大学臨床検査医学）

16：40-17：10

高酸素透過性バッグ保存による血小板機能の長期安定保持

演者　薬師寺千明　（川澄化学工業）

17：20-17：50　**血液からの細菌検出法 Review**

演者　高松純樹　（名古屋大学輸血部）

3日（日）

8：30-9：00　**輸血血液への細菌接種実験**　座長　高松純樹

演者　浅井隆善　（千葉大学輸血部）

9：10-9：40　**皮膚常在菌 Overview**

演者　西嶋攝子　（関西医大香里病院皮膚科）

9：50-10：10　**初流血除去による細菌混入防止**

演者　荒川典雄　（テルモ）

休憩（20分）

10：40-11：00　**白血球除去フィルターによる細菌除去**　座長　佐竹正博

演者　佐藤雅子　（北海道赤十字血液センター）

11：10-11：30　**血小板製剤中の混入白血球数**

演者　秋野光明　（北海道赤十字血液センター）

11：40-12：00　**血小板製剤と赤血球製剤からの細菌検出**

演者　井上千加子（愛知県赤十字血液センター）

12：10-12：30　**微生物不活化法の進歩**

演者　Lily Lin　(Cerus , USA)

Ⅱ．分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金
医薬品等医療技術リスク評価研究事業
平成１５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
（H15-リスク-025）

主任研究者：大戸 斉 教授　福島県立医科大学 輸血医学・移植免疫部

分担研究：白血球除去フィルターによる細菌の収集・除去

分担研究者：浅井隆善　千葉大学医学部附属病院 輸血部

研究要旨

血小板製剤の細菌汚染の対策として、白血球除去フィルターは白血球・細菌の除去とともに細菌の収集効果があることが見いだされ、血液製剤バッグ内の血液を採取することなく細菌検査をできることが利点と考えられた。そして、この白血球除去フィルター部分の捕捉された細菌を、充填する培養液の内容や、孵置時間を設けることによって、より効率的に検出できることを確認した。濃厚血小板製剤の有効期限延長を検討するために、血小板機能の保持とともに、この細菌検出方法を追求することは意義あるものと考える。

１．研究目的

輸血用血液の細菌汚染は、これまでのの経験や調査において、一定の頻度で発生していると考えられており、熟練者による採血でも0.01－0.04％の感染があるとの説もある。血液製剤の種類別では、血小板製剤は、有効期限は短いながらも、保存温度が室温（20-24℃）で有ることから、混入した細菌の急速な増殖が考えられる。従って、何らかの検出方法が開発、確率されることが望まれている。

この細菌汚染検出のための、保管後色調変化観察による外観検査は、赤血球製剤においては細菌の増殖が著しくなって溶血を伴わなければ検出は困難であるために、検出感度は鋭敏ではない。また、採血直後の血液培養は低温で死滅するであろう細菌をも検出する可能性がある。一方、血小板製剤では、スワーリングの観察によって血小板の形態保持を推し量ることができ

るが、その感度の鋭敏については、まだ十分に確認されていない。これらの細菌の有無に関する間接的な検査は鋭敏さの問題が常に残るが、細菌を直接検出する培養検査のためには、検査用検体血液の確保が問題になる。ウイルスと異なり、混入した細菌は保管中の条件によって減少・死滅したり、逆に増殖・増加する筈である。従って、保存前の血液を検体として採取すると、まだ増殖しておらずに少数にとどまっている強毒菌を見逃す恐れがあり、逆に、その後死滅し輸血副作用に直結しない菌を検出する可能性もある。また、一旦製剤にして保存してあるバッグ中の血液を一部採取するためには、バッグを無菌的保持しながら採血する必要があり、普遍的に行うことに対して工夫の余地が残されている。

一方、輸血用血液の白血球除去は、同種免疫を予防できることに加えて、貯血前に行うことにより、サイトカインによる輸血副作用を予防できる効果が報告されてきている。この白血球除去は、血小板輸血においても、同種免疫の予防とともに、サイトカインの影響を予防したり、非特異的免疫抑制反応の予防効果が期待されるとの報告も見られ、今後、全ての血液に白血球除去を行うべしとの意見もある。

そして、最近では、白血球除去フィルターを使用し、細菌を貪食した白血球を除去することによって、その後の保管中に汚染細菌が再増殖することを阻止できる効果も報告されてきている。

そこで、我々は、この白血球除去による汚染細菌除去と同時に、白血球除去を行った血液における細菌汚染の有無を検査することを目的に、白血球除去フィルター洗浄液を培養した。つまり、白血球除去フィルター洗浄液を培養することが、汚染細菌の検出に有用であるか否かを、実験的に検討した。

さらに、血小板製剤に細菌を接種し、酸素濃度減少を指標として、血小板濃厚液中における菌増殖の有無を検出する方法をも試みたので、その有用性についても報告する。

2．方法

（1）濃厚血小板製剤

細菌接種実験に用いた濃厚血小板製剤は、千葉県赤十字血液センターに依頼し、製剤の使用期限内に輸血に使われなかった等の理由で有効活用できなかった製剤を譲り受け、今回の実験に使用した。製剤の採血後経過日数は採血後４－６日で、放射線照射済みのものを使用した。製剤の供与を受けた後に、塩化ビニール性の小バッグ（１００ｍｌ）に小分け（約５０ｍｌ）して、各条件の実験に供した。

（2）接種菌

接種実験に使用した細菌は、当院の臨床分離株で細菌検査室に保管してあったセラチア菌（*Serratia marcescens*）を使用した。凍結保存してあった臨床分離株を逐次溶解し、寒天培養を行って細菌数を再測定した後に、使用時に細菌数を調整して接種した。

（3）細菌コロニー測定

細菌培養は、０．５ｍｌの血液検体を５％ヒツジ血液寒天培地に塗布し、２４時間、および、７２時間の３７培養後に細菌コロニー数を測定して、1 ml当たりの細菌コロニー数で表した。

（4）白血球除去と検体採取

セラチア菌を接種して、室温に一定時間（直後、６時間、２４時間、２７時間、４

８時間、７２時間）静置した後、白血球除去フィルターを用いて白血球除去を行った。白血球除去フィルターは、血小板用白血球除去フィルターであるセパセルＰＬＸ－５ＡのＩＬＳ型タイプ(旭メディカル社、東京）を使用した。白血球除去の方法は、血液バッグに接続後にクレンメを解放し、自然落下にてフィルターを通過させて行った。

この白血球除去を行った際の、白血球除去前血液と、白血球除去後血液と、そして、白血球除去後のフィルター洗浄液とを細菌培養の検体とした。白血球除去フィルター洗浄液の採取は、フィルター下流部から、12mlのミューラーヒュントンブイヨン培養液、または、１０ｍｌのBACTEC用血液培養液(ベクトン＆ディキンソン社、米国)を勢い良く注入し、フィルター上流部から排出された培養液を採集して行った。

（５）白血球除去フィルター部分の細菌培養

前記のように白血球除去フィルターに、細菌接種後血液を通過させた後に、白血球除去フィルター部分に前記培養液(ミューラーヒュントンブイヨン培養液、または、BACTEC用血液培養液）を充填した後、一定時間室温、あるいは３７℃に静置して、細菌の増殖を測定した。

（６）ＰＢＤＳによる酸素消費測定

血小板製剤中における菌増殖を検出する方法として、日本Pall社の血小板製剤用菌検出システム（Pall Bacteria Detection System、以下PBDS）を使用した。PBDSは、菌増殖を促進するサンプルパウチと血球除去用フィルターを内蔵したシステムで、検体血液をサンプルパウチに採取した後に３７℃で静置培養した。一定期間の静置培養後に、専用の酸素濃度測定機でパウチ内の空気中O^2濃度を測定した。

（７）製剤のｐＨ測定

検体血液、または培養液内の経時的なpH測定は、血液ガス分析装置（ＡＢＬ５０５、ラジオメータートレーディング社、コペンハーゲン）を用いて測定した。

３．結果

（１）濃厚血小板中の接種細菌数変化

約２０００個／ｍｌの濃度で接種したセラチア菌は、濃厚血小板を室温で振とう保存することにより数時間後から２７時間後の間に減少して検出感度以下になるが、４８時間後から再び検出されるようになり、接種７２時間後には接種時の細菌数より明らかに増加していた（図１）。

この時の細菌数を測定した検体の一部を、PBDSのサンプルパウチに採取し，その後の酸素消費を測定した。細菌接種２４時間後の検体では正常範囲の酸素濃度を示していることから酸素消費が見られなかった。しかし、細菌接種後３時間の検体では酸素消費が少し見られ、細菌接種後７２時間の検体ではさらに酸素消費が多く見られ、コロニー数測定検査で見られた細菌数の動きと一致していた（図２）。

（２）接種後細菌の白血球除去フィルターによる濾過効果

細菌を接種した濃厚血小板を白血球除去フィルターで濾過し、その前後における細菌濃度をコロニー数で測定した。細菌接種後３時間経過した濃厚血小板では、濾過前は５０／ｍｌであった細菌数が濾過後は３７／ｍｌと減少しており、濃厚血小板中細菌の一部が白血球除去フィルターによって除かれた可能性が考えられた（図

3）。ちなみに白血球除去フィルター部分を洗浄した液では９３／ｍｌと細菌数がむしろ増加していた。次に、細菌接種後２４時間経過した濃厚血小板についても同じ測定を行ったが、濾過前の検体から接種細菌が検出されず、濾過効果は判定出来なかった（図４）。しかし、この濾過前後の検体を２４時間室温に静置した後に細菌数を調べると、濾過前の細菌数が１０５０／ｍｌと増加し、濾過後には８７／ｍｌとかなり減少していた。白血球除去フィルターの洗浄液には４００／ｍｌの細菌数が検出された（図５）。

（３）白血球除去フィルター部分の保管条件と細菌数

細菌接種直後の濃厚血小板を、白血球除去フィルターで濾過し、前後の検体とともに、部分の洗浄液を室温で２４時間静置すると同時に、フィルター部分の一部を37℃に静置して検出細菌数の変化をみた。濾過前後の細菌数は、４７／ｍｌ、０／ｍｌと減少していたが、白血球除去フィルター部分は、室温で１８１０／ｍｌ、３７℃で１億／ｍｌと著しく増加していた（図６）。これを、洗浄に用いた培養液をミューラーヒュントン液から、BACTEC血液培養液に変えて同様の測定を行うと、白血球除去フィルター部分の検体は３７℃静置とともに、室温静置でも１億／ｍｌと細菌数が著しく増加していた（図７）。これらの、検体についてＰＢＤＳを用いた酸素消費量を測定すると、細菌数の動きに相応して酸素消費の増加が見られた（図８，図９）。

（４）濃厚血小板の濾過後白血球除去フィルター部分のｐＨ

濃厚血小板を濾過した白血球除去フィルターの洗浄液についてｐＨの変動を測定した。セラチア菌を接種した濃厚血小板の濾過後白血球除去フィルター部分では、２４時間後から４８時間後にかけてｐＨが酸性に変化する傾向が見られたが、これらの傾向は、細菌を接種しなかった濃厚血小板の濾過後白血球除去フィルター部分の直後から７２時間後までのｐＨ変化と程度にほぼ同程度であった（図１０）。

４．考察

濃厚血小板中の接種細菌数変化では、接種したセラチア菌が、濃厚血小板を室温で振とう保存することにより数時間後から２７時間後の間に減少して検出感度以下になるが、４８時間後から再び検出されるようになり、接種７２時間後には接種時の細菌数より明らかに増加していた。この傾向は、昨年度の検討でも認められた減少であり、さらに、ＰＢＤＳによる酸素消費測定にても、細菌数の増減と一致して酸素消費が増減していた。

細菌を接種した濃厚血小板を白血球除去フィルターで濾過し、その前後における細菌濃度をコロニー数で測定すると、濃厚血小板中細菌の一部が白血球除去フィルターによって除かれる傾向が見られた。この傾向は、細菌接種から白血球除去までの時間が３時間よりも２４時間の方が顕著に認められた。これは、時間の経過とともに細菌が白血球に貪食された後に白血球除去フィルターに補足された可能性が考えられて興味深い。また、細菌接種後２４時間後の白血球除去では、濾過前から接種細菌が検出感度以下に減少していたが、検体を静置する事により細菌が再増加して検出されるようになった。このことは、検出感度以下の検体でも、このような処理により細菌の存在を確認できることを示していると思われる。

そこで、白血球除去フィルター部分の保管条件を変えて、接種細菌の検出効果に対する影響を検討した。まず、室温静置と３７℃では明らかに３７℃静置により細菌の増殖を促し、検出を容易にする効果があると考えられた。また、培養液をミューラーヒュントン液から、BACTEC血液培養液に変えてみるとこの細菌増殖効果がさらに顕著になった。そして、この変化はＰＢＤＳによる酸素消費の変化でも知ることができ、細菌数が１億以上になった場合でも酸素消費の程度には差が見られ、このような過剰な細菌増殖状態での測定に利点が見られた。従って、濃厚血小板製剤中に混入した細菌を感度よく検出するには、一定時間の間に白血球に細菌を貪食させ、それを効率的に白血球除去フィルターで収集・捕捉し、この細菌を感度よく迅速な方法で検出できることが望まれる。

それでは、このように白血球除去フィルター部分に捕捉され、一定の条件と時間とで増殖した細菌を簡便で迅速な検出方法が望まれる。ｐＨは細菌の増殖により変化する事が知られているので、白血球除去フィルター部分のｐＨを測定してみた。しかし、この場合のｐＨ変化は、無菌状態でのｐＨ変化の域を出ていなかった。これは、白血球除去フィルターに捕捉された白血球や血小板等の細胞成分の代謝によるｐＨの変化が大きかったことに由来すると思われた。

今後、貯血前白血球除去が行われる際には、白血球除去フィルター部分は廃棄される部分であるが、この白血球除去フィルター部分に捕捉・収集された細菌を効率よく検出する事により、製剤から検体を採取することなく製剤中から由来した細菌の存在を検査することができる。そして、感度のよい方法を用いることにより、細菌の存在を高い確率で否定できることになり、製剤の無菌を証明する方法に繋がると思われる。従って、濃厚血小板製剤の有効期限を延長するにあたっては、血小板の機能が保持されていることの証明とともに、細菌汚染やその増殖に対する懸念を払拭することが必要であり、その一助になるために、本方法にさらに検討を重ねることは意義があるものと考える

５．結語

接種後細菌の白血球除去フィルターによる濾過効果は、３時間後よりも２４時間後に明らかであり、白血球除去フィルター部分の保管条件を工夫する事により、捕捉された細菌をより鋭敏に検出できた。また、細菌検出方法は細菌コロニー形成方法とともに、酸素消費測定が有用であったが、ｐＨ変化の測定は有用ではなかった。

健康危険情報

とくに，健康に影響を及ぼす事象は発生しなかった。

研究発表

橋本眞一郎，清水直美，成田光朗，浅井隆義，他．　輸血実施記録用紙による輸血副作用モニター．　日本輸血学会雑誌.49（2）：293，2003.

知的所有権

なし.

図1. 血小板濃厚液中細菌数の時間的変化

血小板濃厚液: 採血後日数:4日、白血球数:200／mm3
血小板数:115万／mm3

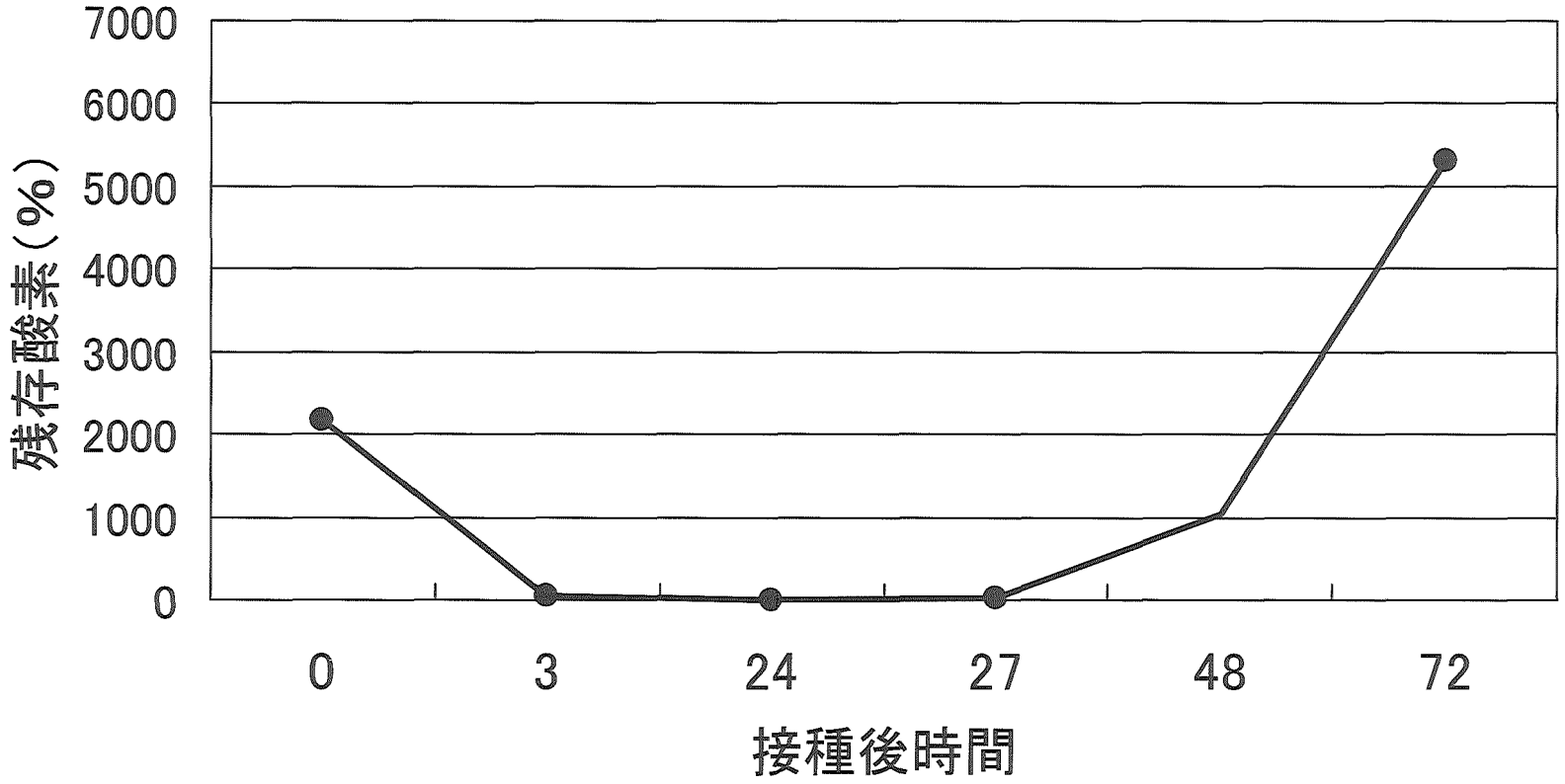


図2. 血小板濃厚液中細菌数と酸素消費の的変化

血小板濃厚液: 採血後日数:4日、白血球数:200／mm3
血小板数:115万／mm3

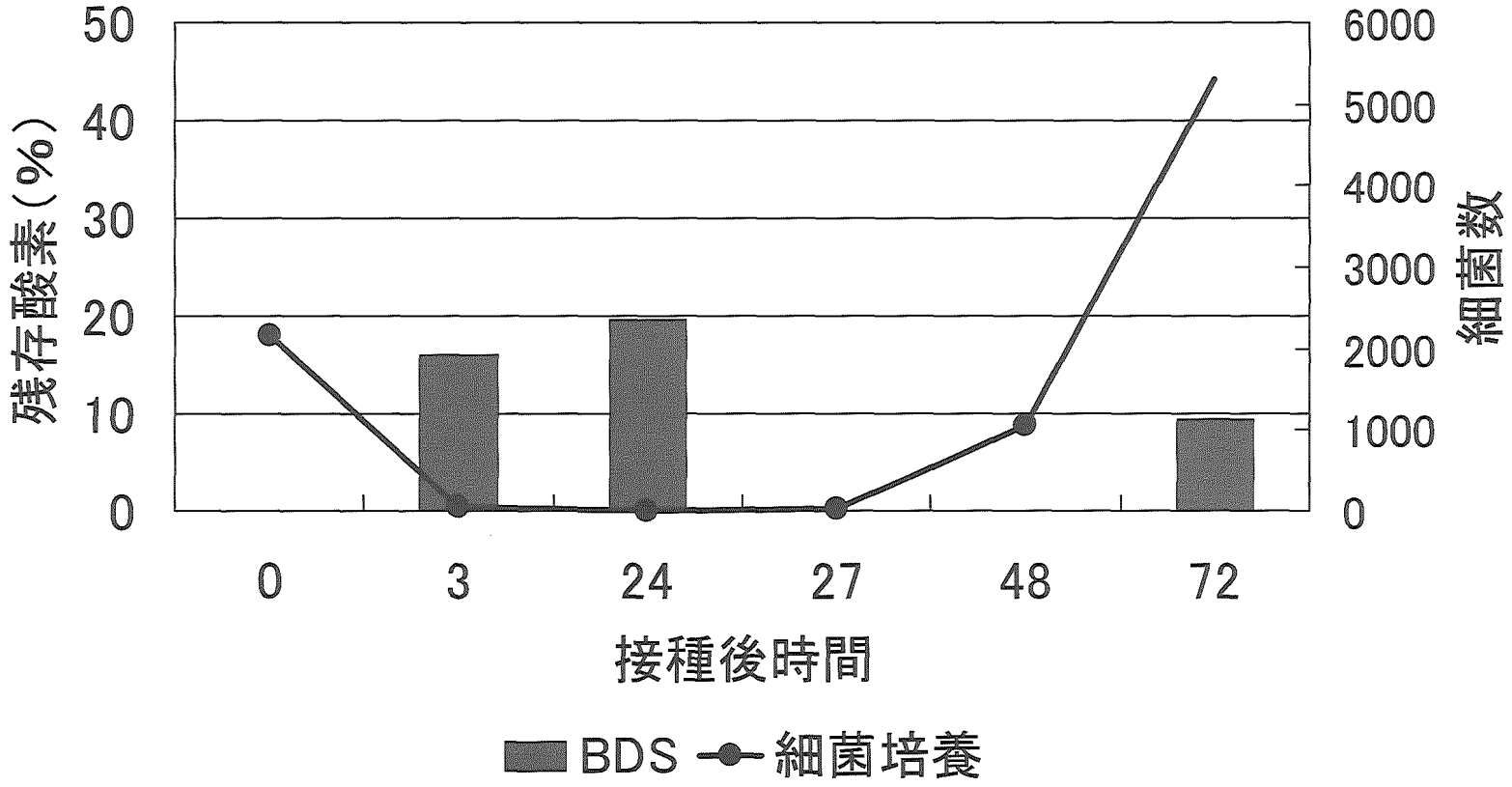
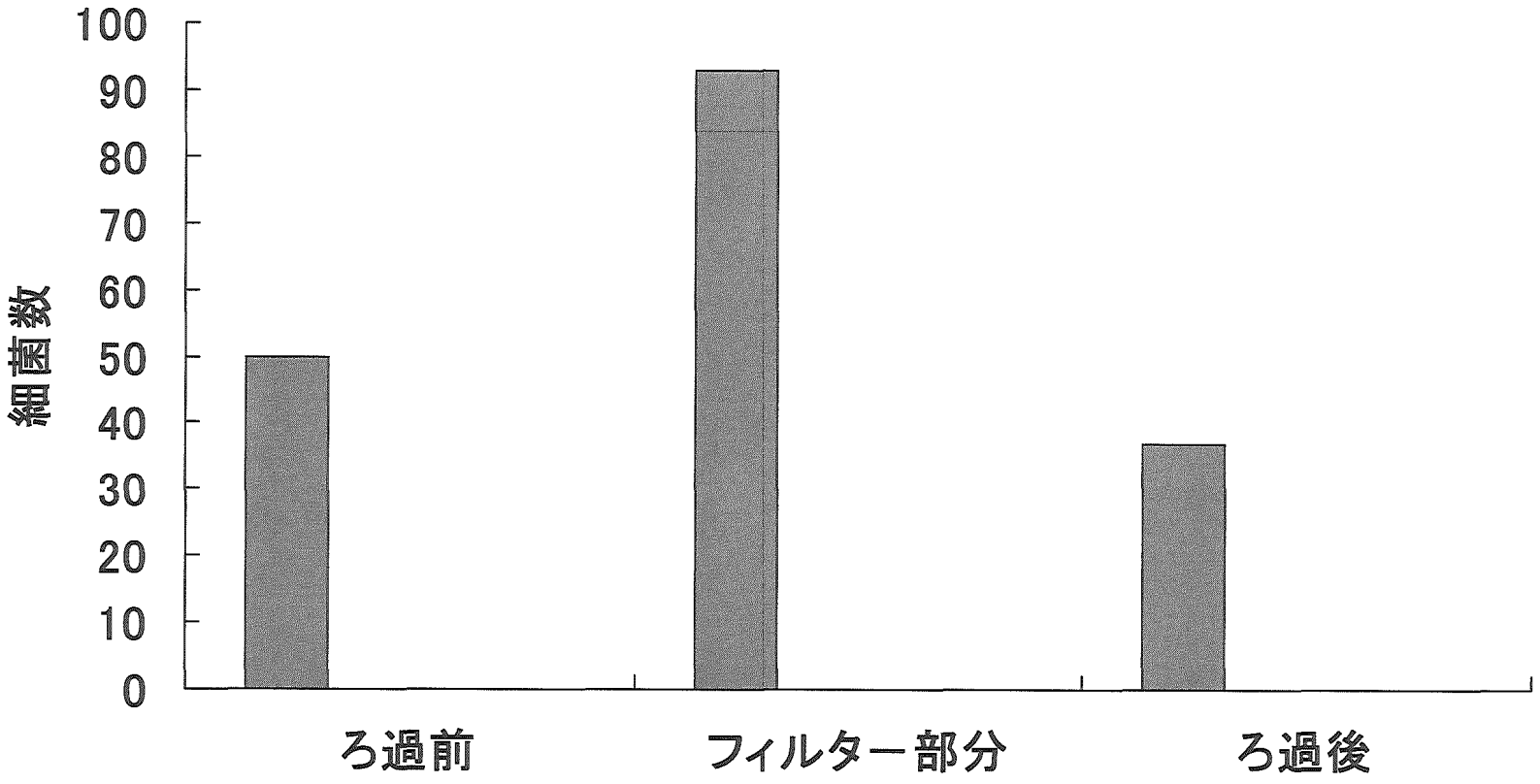


図3. 細菌接種後3時間のフィルター濾過効果

血小板濃厚液　　採血後日数:5日
白血球数:200／mm3
フィルター部分　　ミューラーヒュントン液12mlで洗浄