

Table 1. Detailed data of each experiment

Storage Time	Blood type	Unit (U)	PLT count in (/ μ L)	Final PLT count (/ μ L)	Thrombus height (μ m)
1 day	O (+)	15	1,022,000	157,000	18.8
3 days	B (+)	10	942,000	146,000	21.0
	A (+)	10	1,044,000	185,000	11.4
	B (+)	20	1,370,000	149,000	11.4
5 days	B (+)	10	642,000	159,000	10.2
	B (+)	10	772,000	152,000	9.4
	B (+)	10	902,000	166,000	10.6
	O (+)	10	940,000	153,000	9.8
	B (+)	15	974,000	157,000	10.6
	B (+)	20	860,000	139,000	11.0
7 days	B (+)	10	790,000	147,000	7.8

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)

白血球除去フィルターによる細菌除去

研究協力者：佐藤 雅子，池田久實 北海道赤十字血液センター
主任研究者： 大戸 斉 福島県立医科大学 輸血・移植免疫部

研究要旨

成分採血由来血小板製剤（成分 PC）の有効期限を延長するためには細菌汚染を回避することが重要である。全血採血由来血液製剤においては、採血した血液を保存する前に白血球除去フィルターで処理すること（保存前白血球除去）が、細菌汚染防止に有効であるとする報告^{1~14)}があることから、成分 PC についても同様の細菌除去効果が得られるか検討した。始めに成分 PC に 4 種の細菌をそれぞれ接種し 5 日間保存中の増殖性を調べたところ、菌種により差がみられ *Bacillus cereus*、*Klebsiella pneumoniae* は速やかに増殖したが、coagulase-negative staphylococci は 2 日後から増殖を開始し、*Propionibacterium acnes* では著しい増殖はみられなかった。次に *Klebsiella pneumoniae* を採血直後の成分 PC に接種し、白血球除去フィルターにて処理したところ、PC バッグ中の *K. pneumoniae* は完全には除去されず、保存中に細菌の増殖が認められた。以上から、白血球除去フィルターによる細菌除去を一般化するのは現時点では難しい。

1. 成分 PC 中の細菌の増殖性

A. 目的

PC の有効期限を延長した場合、混在していた細菌が保存中にどの程度増殖する可能性があるかを知ることは重要である。そこで、数種類の細菌を成分 PC に接種し、菌種による増殖性の違いを検討した。また、細菌に汚染された PC は目視による外観試験にて判別することが可能か検討した^{15,16)}。また、これらの試験は平成 8 年に実施した。

B. 方法

B-1. 接種菌の選択と菌数の調製

接種菌には輸血用血液の細菌汚染の原因菌として報告例のある①*Bacillus cereus* (*B. cereus*)、②*Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*)、③coagulase-negative staphylococci (CNS)、④*Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) を用いた。各々の菌は当血液センターにおける輸血用血液および環境の落下菌により分離、純培養し、二施設による細菌同定の結果、菌種が確認されたものを使用した。

各菌種ともシグナル培地 (オクソイド社) に 37℃ で 1~7 日間培養後、シグナル培地で 10ⁿ 希釈し、接種する菌濃度に調製した。

B-2. 成分 PC への菌の接種

成分採血装置 (スペクトラ、コープ社) により採取した成分 PC を 600mL ポリオレフィン製バッグ (ニプロ社) に無菌的に 50mL ずつ分割した。それに、4 種類の細

菌を菌濃度が 1、10、100CFU/mL になるよう接種した (各々 n=3)。

B-3. 細菌を接種した成分 PC の菌数測定

成分 PC を 22℃ で 5 日間振盪保存して、24 時間ごとに混在する生菌数を調べた。*P. acnes* を除く 3 菌種の生菌数の測定はトリプトソイ寒天培地 (日水製薬社)、*P. acnes* はブルセラ HK 寒天培地 (極東製薬社) に塗布する寒天平板培地法を用いて行った。

B-4. 細菌を接種した成分 PC の外観試験

生菌数の測定と同時に成分 PC のスワーリング、凝集、混濁等の外観試験を行った。血小板の形態変化を利用したスワーリング検査¹⁷⁾ は、蛍光灯下で成分 PC バッグをゆっくり振り、PC の渦巻き状の流動を観察し、スワーリングが観察された場合を positive (+)、されない場合を negative (-) とした。また、凝集、混濁および凝固等の有無を目視により観察した。これらの外観試験結果と成分 PC 中の細菌数を比較し、外観試験の有用性を検討した。

C. 結果

成分 PC に *B. cereus*、*K. pneumoniae*、CNS、*P. acnes* の 4 菌種を 1、10、100CFU/mL 接種後の増殖パターンを示す (図 1)。*B. cereus*、*K. pneumoniae* では増殖が速く、何れの接種濃度においても保存 2 日後には *B. cereus* が 10⁷CFU/mL、*K. pneumoniae* が 10⁹CFU/mL まで増殖しプラトーに達した。CNS は *B. cereus* や *K. pneumoniae* に比べて増殖速度が遅い傾向がみられ、

各接種濃度とも2日間の lag time を経過した後に増殖し、保存3日後で $10^2 \sim 10^4$ CFU/mL となった。*P. acnes* は、いずれの接種濃度においても5日間の保存中に著しい増殖が認められなかった。

図2に各細菌を10CFU/mL接種した時の成分PCの菌数変化とその時の外観試験結果を示す。増殖の速い *K. pneumoniae* は保存翌日には菌数が 10^5 CFU/mL まで増殖したものの、スワーリングは観察された。2日後には 10^9 CFU/mL まで増殖してスワーリングが消失し、3日後には凝固などの外観異常が観察された。また、*B. cereus* は保存翌日に 10^7 CFU/mL まで増殖したものの外観は正常であり、スワーリングの消失および凝集や混濁が観察されたのは2日後以降であった。一方、増殖の遅い CNS および増殖を認めなかった *P. acnes* については、5日間保存後も外観に異常はみられなかった。

D. 考察

PCが細菌に汚染されてから、スワーリングの消失や外観に異常を認めるまでの日数およびその時の菌数は菌種により違いがみられた。

現在、血液センターでは検査確定の関係から、採血後1~2日経過したPCを医療機関に供給している。そのため、もし細菌が混入していたとしても外観上には変化が現れていない可能性もあり、医療機関では、輸血直前の外観チェックを強化することが細菌汚染防止には重要と思われる。

II. 白血球除去フィルターによる成分PC中の細菌除去

A. 目的

PCに細菌が混入した場合、バッグ内で増殖する前、すなわち保存前に細菌を除去する手段が必要となる。そこで保存前の白血球除去フィルター（以下、白除フィルター）による処理が成分PC中の細菌汚染防止に効果的であるか検討した。

B. 方法

文書にて同意の得られた健常成人ドナーから成分採血装置 CCS (Haemonetics社) を用いて成分PCを採血し、その直後に前記I.B-1で調製した *K. pneumoniae* (臨床分離株) を1或いは10CFU/mLになるように接種した。これを二分割し、一方はフィルター群として、無菌的に白血球除去フィルター (セパセル PLX-5A、旭メディカル社) を接合し、接種直後にフィルター処理を行った。もう一方は、フィルター処理を行わないコントロール群とした。両群の成分PCとも600mLポリオレフィン製バッグ (川澄化学社) にて、22℃で5日間振盪保存し、24時間ごとに菌数を測定した (各濃度、各群 n=2)。菌数の測定はトリプトソイ寒天培地 (日水製薬社) に塗布する寒天平板培地法を用いた。また、スワーリングの有無や凝集・混濁等の外観試験を実施した。

C. 結果

K. pneumoniae を接種した後に白除フィルターで処理した成分PCを保存し細

菌の増殖性を調べた（図 3, 4）。*K. pneumoniae* を 10CFU/mL 接種した場合、フィルター群では 1 日後の菌数が $10^3 \sim 10^4$ CFU/mL と、コントロール群の $10^4 \sim 10^5$ CFU/mL に比べて 1LOG 低い値であったが、2 日後には 10^7 CFU/mL まで増殖し両群間に差はみられなかった（図 3）。また、両群ともスワーリングの消失がみられたのは 2 日後、外観に凝固を認めたのは 4 日後であった（図 3）。接種菌数を 1CFU/mL に減らし同様に試験したところ、保存翌日にはフィルター群で $10^1 \sim 10^2$ CFU/mL であったのに対し、コントロール群で $10^2 \sim 10^3$ CFU/mL、2 日後にはフィルター群で $10^6 \sim 10^7$ CFU/mL、コントロール群で $10^7 \sim 10^8$ CFU/mL とフィルター群がコントロール群に比べて低値を示したものの、3 日後には両群とも同程度まで増殖した（図 4）。また、スワーリングはフィルター群で 3 日後、コントロール群で 2 日後に消失し、外観試験ではフィルター群で 4 日後、コントロール群で 5 日後から凝固がみられた（図 4）。

D. 考察

近年、成分 PC に混在する白血球数は低減化されてきている¹⁸⁾。白血球数の低減化は成分 PC の採血時に行われ、白除フィルターを使用せずに低減化が可能な装置と白除フィルターにより白血球を除去する採血装置が使用されている。全血採血由来血液製剤については保存前の白除フィルター処理が製剤に混入している *Y. enterocolitica* の除去に有効とする報告があることから、成分 PC についても同様の細菌除去効果が期待される。そこで

今回、PC 中での増殖が著しい *K. pneumoniae* を接種菌として、白除フィルターを介する機種で採血した場合を想定した接種試験を行った。PC に接種した *K. pneumoniae* の濃度が 1 或いは 10CFU/mL と低濃度であったにも関わらず、白除フィルターで処理した成分 PC の細菌は保存ともに増殖し、完全に除去することは出来なかった。*K. pneumoniae* のような増殖が著しい菌種の場合では、白除フィルターにより除去しきれず、バッグ内に残存した菌が保存中に増殖したものと推察される。

白除フィルターによる血液製剤中の細菌除去の機序としては、菌を貪食した白血球を除去する、または菌そのものをフィルターに付着させるメカニズムが考えられる。

白血球に菌を貪食させる場合、血液製剤中の白血球数や貪食させるための時間の影響が大きいと考えられるが、現行では成分 PC 中の白血球数は採血時には低減化されるため、貪食に十分な静置時間を確保することは難しい。フィルター処理により PC 中の細菌を完全に除くことが困難な限り、白除フィルターを使用しなくても低減化が可能な採血装置に新たにフィルター処理の手順を加える必要はないであろう。

さらに、菌そのものをフィルターに付着させるメカニズムを検討するため、細菌除去に影響を与える白血球と血漿を含まない、アルブミン加生理食塩液に *P. acnes* を接種しフィルター処理したところ *P. acnes* は 2~3LOG 除去された^{4,6)}。フィルターそのものに菌を吸着させる場

合、フィルターの膜素材や荷電が影響すると考え、フィルターの膜表面荷電を変化させて菌の除去効果を検討したが、荷電の違いによる明らかな差異はみられなかった⁶⁾。白除フィルターによる細菌除去としてフィルターそのものへの付着が示唆されるものの、そのメカニズムや除去率を向上させるには、今後更なる検討が必要である。

PCの保管温度は20～24℃であり、細菌が増殖するのに適した条件であることから、PCの有効期限を延長する場合、血液バッグへの細菌混入を未然に防止する手段が必要になる。

今回の試験で、成分PCに混入した*K. pneumoniae*は白除フィルター処理にて完全には除去されなかった。W. Dzikらの*Staphylococcus epidermidis*を用いた検討においても白除フィルターによる除去は困難であった⁷⁾。これらから混入する危険性のある細菌を白除フィルターで完全に除去することは難しいと考えられる。

E. 結語

PCの保管温度は20～24℃であり多くの細菌増殖に適した条件である。今回の試験では、成分PCの白除フィルター処理で菌は完全に除去されず、残存した菌は保存中に増殖した。現行の成分PC中の白血球数低減化には白除フィルターを介さない採血機種があることを考慮すると、PC中の細菌除去には白除フィルターによる処理だけではなく他法との併用などが必要であると考えられる。

<文献>

- 1) Högman C. F., Gong J., et al : The role of white cell in the transmission of *Yersinia enterocolitica* in blood components. *Transfusion*, 32:654-657,1992
- 2) Kim DM, Brecher ME., et al : Prestorage removal of *Yersinia enterocolitica* from red cells with white cell-reduction filters. *Transfusion*, 32:658-662,1992
- 3) Nusbacher J. : *Yersinia enterocolitica* and white cell filtration. *Transfusion*, 32:597-600, 1992
- 4) Wagner S J., Robinette D., et al : Factors affecting *Yersinia enterocolitica* (serotype O:8) viability in deliberately inoculated blood. *Transfusion*, 33:713-716,1993
- 5) Gong J. , Rawal B D., et al : Complement killing of *Yersinia enterocolitica* and retention of the bacteria by leucocyte removal filters. *Vox Sang*, 66:166-170,1994
- 6) 名雲英人、松田裕一 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. 日本輸血学会誌 40 (1) : 32～38,1994
- 7) Dzik W. : Use of leukodepletion filters for the removal of bacteria. *Immunol Invest*. 24:95-115,1995
- 8) Siblini L., Lafeuillade B., et al : Reduction of *Yersinia enterocolitica* load in deliberately inoculated

- blood: the effects of blood prestorage temperature and WBC filtration. *Transfusion*, 42:422-427, 2002
- 9) 佐藤雅子、秋野光明 他：全血処理型白血球除去フィルタークロスドシステムを用いた血液製剤中の *Y. enterocolitica* の除去. 日本輸血学会雑誌 45、学会総会号（第 47 回学会総会抄録集）137, 1999
- 10) 佐藤雅子、秋野光明 他：保存前白血球除去による血液製剤中の菌の除去効果. 日本輸血学会雑誌 47、学会総会号（第 49 回学会総会抄録集）P-120, 2001
- 11) 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（第 50 回学会総会抄録集）P-099, 2002
- 12) 秋野光明、佐藤雅子、粟倉裕美 他：保存前白血球除去製剤の有用性 - *Yersinia enterocolitica* の汚染防止を中心に-. 自己血輸血 14、学会総会号（第 14 回学術総会抄録集）S12, 2001
- 13) 秋野光明、佐藤雅子、粟倉裕美 他：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
- 14) 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、学会総会号（第 16 回学術総会抄録集）29, 2003
- 15) 橋本浩司：血液製剤における細菌汚染とその防止策. 新世紀の血液事業の幕開け、エフ・コピント富士書院 173-181, 2002
- 16) 橋本浩司 他：血小板製剤における簡便な細菌汚染確認法の評価. 血液事業 22（4）：491-497, 2000
- 17) Bertolini F, and Murphy S, for the Biochemical Excellence for Safer Transfusion (BEST) Working Party of the International Society of Blood Transfusion.: A multicenter evaluation of reproducibility of swirling in platelet concentrates. *Transfusion*, 34:796-801, 1994.
- 18) 吉田桂、粟倉裕美、岩原幸子、佐藤雅子 他：成分採血由来血小板製剤の混入白血球数に関する検討 -成分採血装置別の混入白血球数とその特徴-. 血液事業 25、学会総会号（第 26 回日本事業学会総会抄録集）55, 2002

図1 成分PC中における細菌の増殖性

図1-1 *B. cereus*

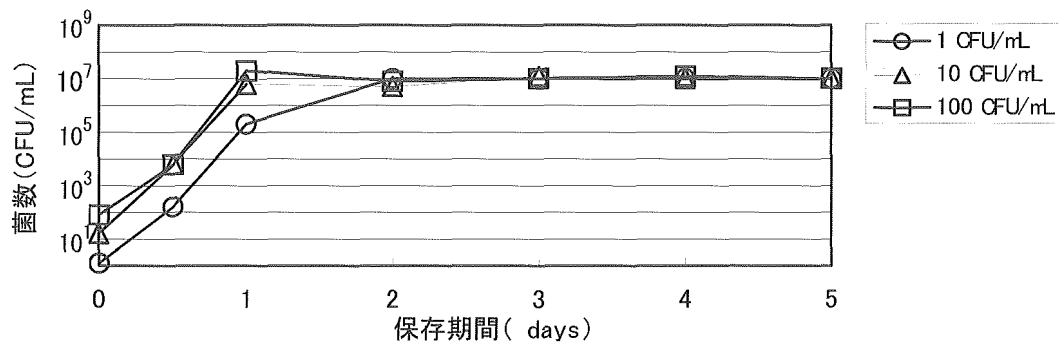


図1-2 *K. pneumoniae*

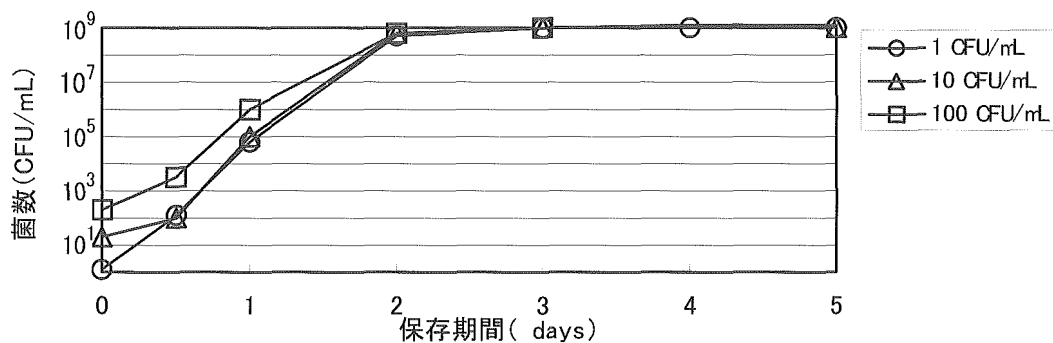


図1-3 *C. N. Staphylococci*

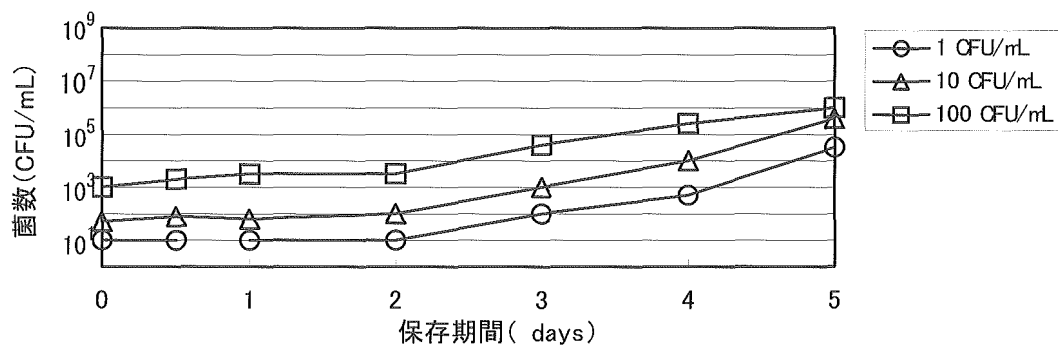


図1-4 *P. acnes*

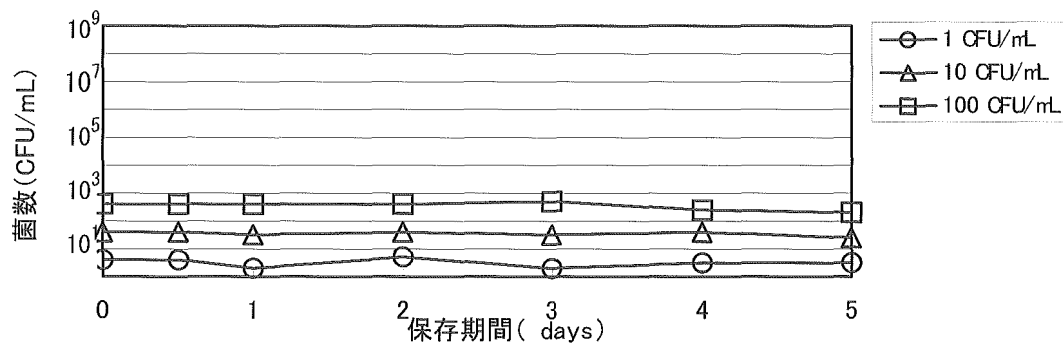
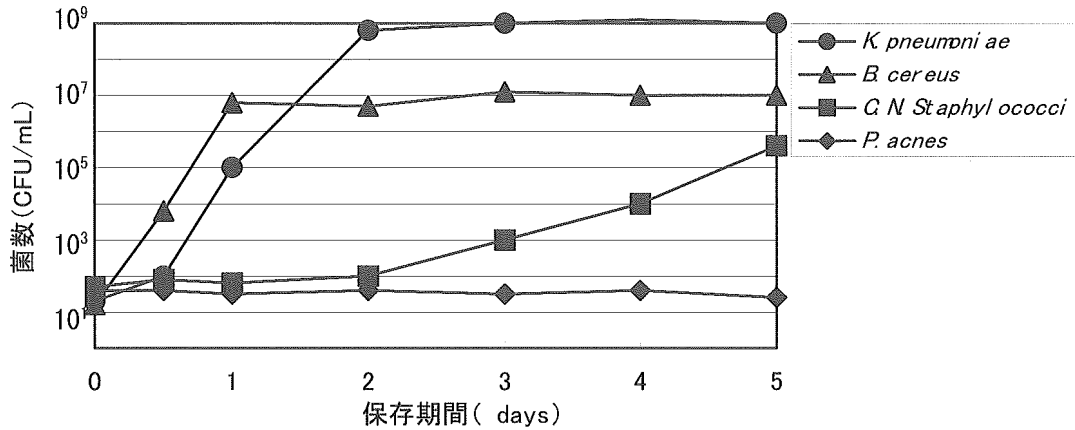


図2 成分PC中における細菌の増殖性と外観試験結果（接種菌数：10CFU/mL）

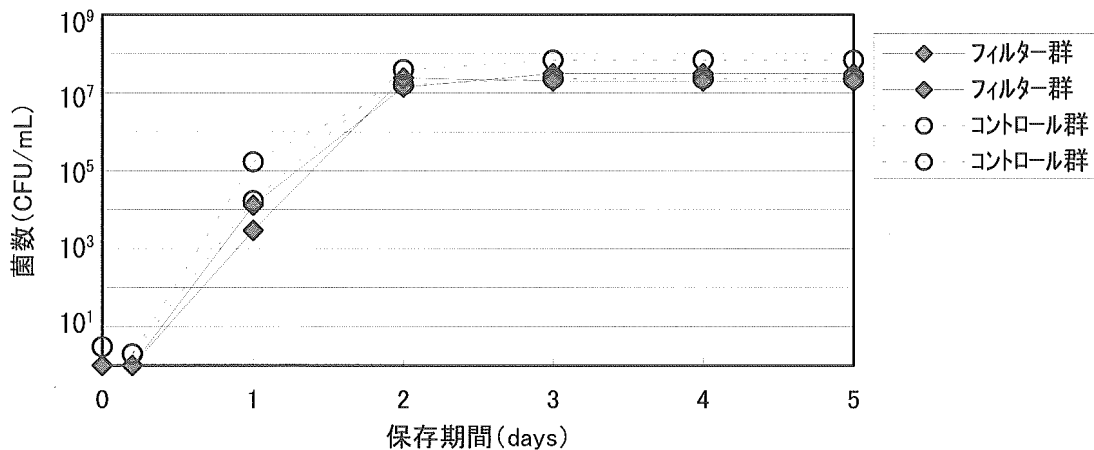


菌種	外観	0day	1day	2day	3day	4day	5day
<i>K. pneumoniae</i>	スワーリング	+	+	-	-	-	-
	凝集・混濁等	正常	正常	正常	凝固	凝固	凝固
<i>B. cereus</i>	スワーリング	+	+	-	-	-	-
	凝集・混濁等	正常	正常	凝集・混濁	凝集・混濁	混濁	混濁
<i>C. N. Staphylococci</i>	スワーリング	+	+	+	+	+	+
	凝集・混濁等	正常	正常	正常	正常	正常	正常
<i>P. acnes</i>	スワーリング	+	+	+	+	+	+
	凝集・混濁等	正常	正常	正常	正常	正常	正常
コントロール	スワーリング	+	+	+	+	+	+
	凝集・混濁等	正常	正常	正常	正常	正常	正常

+ : positive、- : negative

図3 *K. pneumoniae*を接種した白除PC保存中の細菌変化と外観試験結果

(接種菌数：10CFU/mL)

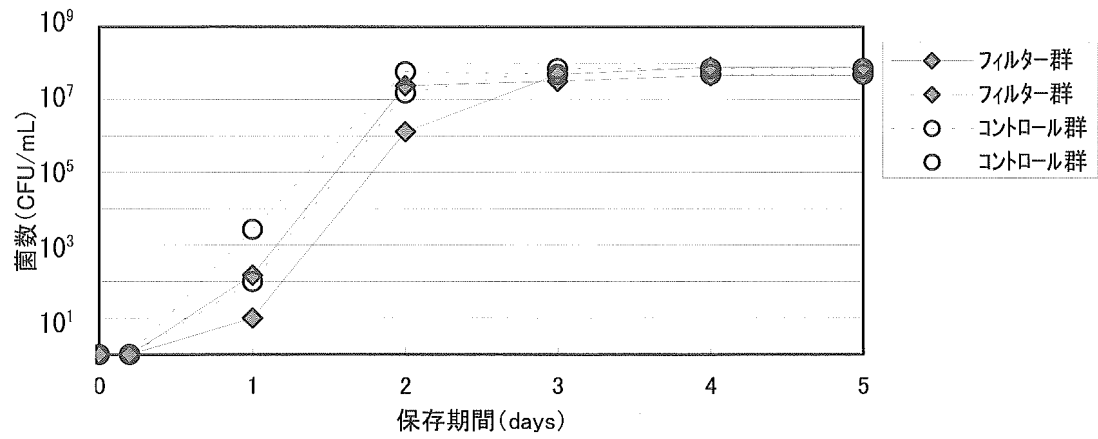


経過日数	スワーリング						凝集・混濁等					
	0day	1day	2day	3day	4day	5day	0day	1day	2day	3day	4day	5day
フィルター群	+	+	-	-	-	-	正常	正常	正常	正常	凝固	凝固
コントロール群	+	+	-	-	-	-	正常	正常	正常	正常	凝固	凝固

+ : positive、- : negative

図4 *K. pneumoniae* を接種した白除 PC 保存中の細菌変化と外観試験結果

(接種菌数 : 1CFU/mL 接種)



経過日数	スワーリング						凝集・混濁等					
	0day	1day	2day	3day	4day	5day	0day	1day	2day	3day	4day	5day
フィルター群	+	+	+	-	-	-	正常	正常	正常	正常	正常	凝固
コントロール群	+	+	-	-	-	-	正常	正常	正常	正常	凝固	凝固

+ : positive、- : negative

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)

分担研究報告書

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

主任研究者 大戸 斉 福島県立医科大学附属病院 輸血・移植免疫部

研究要旨：

血小板を長期（7日間）に保存可能な高酸素透過性バッグ（PO-80，酸素透過性2660mL/m²*day*atm）と汎用されている外国製品（PL2410，酸素透過性2024mL/m²*day*atm）を比較した。アフレーシス由来高単位血小板（20単位）を9日まで水平振盪保存して、各種血小板マーカー、生化学的レベルを評価した（n=2）。その結果、9日間の観察期間でスワーリング、乳酸値、pH、pCO₂/pO₂濃度、低浸透圧ショック回復率、血小板凝集能などにおいて、両バッグ間に差を認めなかった。試験回数が少なかったために違いを明確に出来なかった可能性もあるが、現時点では両バッグは同等の血小板機能保存能を有していると考えられる。

A. 研究の背景と目的

血小板は保存によりその機能が低下する。しかし、機能劣化は保存バッグのガス（酸素と二酸化炭素）透過性を向上させることにより緩徐にすることが可能であることを報告した。酸素供給が保たれ

ると、嫌気性代謝が抑制され、その結果、乳酸産生が抑制され、メデイウムのpHが至適に維持され、長期間（7日間）保存しても血小板の機能は良好に保たれる。昨年度は日本で開発した血小板保存バッグPO-80が既存製品よりも格段に高単位

(20 単位) 血小板製剤の機能を良好に保持可能であることを報告した。今年度はアフエレーシス採血した 20 単位の血小板製剤を高酸素透過性の高性能 PO バッグで保存し、その血小板保存性を世界で最も汎用されている外国製品バッグと比較評価した。

B. 研究方法

1) 血小板

同一血液型の二名の健常人から 20 単位 (容量 250mL) ずつ、アフエレーシス装置 (Amicus, Baxter 社) を用いて成分採取した血小板を一旦プールし、高酸素透過性バッグ (PO-80) と対照バッグ (PL2410) に等量に分割した。室温にて 9 日間水平振盪保存した。製剤直後、保存 1 日目、3 日目、5 日目、7 日目、9 日目に経時サンプリングを行って、比較評価した。

2) 血小板保存バッグ

国内で開発された高酸素透過性血小板バッグ (PO-80, 1000mL 容量, 酸素透過度 $2660\text{mL}/\text{m}^2\cdot\text{day}\cdot\text{atm}$, 川澄化学) と汎用外国製品血小板バッグ (PL2410, 1000mL 容量, 酸素透過度 $2024\text{mL}/\text{m}^2\cdot\text{day}\cdot\text{atm}$, Baxter) を比較評価した。

3) 評価項目

1. 血小板スワーリング
2. 血小板数
3. 平均血小板容積 (MPV)
4. pH
5. 血液ガス測定 (pO_2/pCO_2)
6. 低浸透圧ショック回復率(%HSR)
7. 血小板凝集能
8. 代謝物質 (グルコース/乳酸)
9. 細菌培養試験 (一般細菌/真菌)

4) 評価試験方法

●スワーリング

- 1) バッグ全体を蛍光灯に照らし、バッグ下側から血小板のスワーリングを観察する。
- 2) 観察時に、容易にスワーリングが観察可能なもの; ++, よく観察する必要があったもの; +, 全くスワーリングが見られないもの; -として評価を行う。
- 3) 同時に、凝集塊の有無についても確認を行う。

●血小板数及び平均血小板容積測定

サンプル 500 μL を栄研チューブに移し、多項目自動血球成分計測機 SF-3000 にて生理食塩液にて十倍希釈した液の血小板数及び平均血小板容積を測定する。

●pH 及び血液ガス測定

血液 1mL が入ったシリンジを pH・血液ガス分析装置に装着し、pH 及び血液ガ

スを測定する。

●血小板凝集能測定及び低浸透圧ショック回復率測定用サンプル調整方法

- 1) シリンジで採取したサンプル 2mL 栄研チューブに移す。
- 2) -40℃で保存した血漿を 37℃でインキュベーションし、解凍する。
- 3) 測定検体中の血小板数が、約 3.0×10^5 cell/ μ L となるよう、サンプルと同一の血漿を用いて希釈する。
(希釈用血漿は、37℃にて解凍後、強遠心条件で余分な血球成分や凝集塊を沈澱除去したものをを用いる)
- 4) 3)で調製したサンプルは、37℃にて 30分、インキュベーションする。

●血小板凝集能測定

1. 試薬の調整

- 1) 凍結保存している ADP を解凍し、PBS で終濃度 100 μ M となるように調整する。
- 2) 冷蔵保存しているコラーゲンに希釈保存液を添加し、終濃度 100 μ g/mL となるように調整する。
- 3) 調整した ADP 及びコラーゲンを等量の体積で混合し、測定用試薬とする。
(測定時終濃度 ADP : 5 μ M,
コラーゲン : 5 μ g/mL)

2. 測定

- 1) 検体毎に対応する自己 PPP を

37℃の恒温層にて解凍する。

- 2) 解凍した PPP を 200 μ L キュベットに分注し、装置リファレンスにセットする。
- 3) 測定用に調整した PRP サンプル 200 μ L をキュベットに分注し、サンプル測定部にセットし、インキュベーションを開始する。
- 4) 装置のインキュベーション終了アラームが鳴ったら、惹起試薬 (ADP 及びコラーゲン混合試薬) を 22 μ L キュベットに入れ測定を開始する。
- 5) 測定終了後、直ちに結果のセーブ及びプリントアウトを行う。

●低浸透圧ショック

1. サンプルベースライン(%T₀)の測定

- 1) 検体毎に対応する自己 PPP を 37℃の恒温層にて解凍する。
- 2) 解凍した PPP 1.4mL に生理食塩液 0.7mL を加え、分光光度計のリファレンス測定部にセットする。
- 3) 同じ物を同装置のサンプル測定部にセットし、610nm の透過率の 100%T 設定をする。
- 4) 測定用に調整した PRP 1.4mL に生理食塩液 0.7mL を加え、直ちに軽く 1~2 回ピペッティングを行い、サンプル測定部にセットする。

- 5) サンプルをセット後直ちに、波長 610nm の透過率変動を測定する。
- 6) 420 秒後の透過率(%T₀)を読む。

2. 最大透過率の測定

- 1) PRP 1.4mL に水 0.7mL を加え、直ちに軽く 1~2 回ピペティングを行い、サンプル測定部にセットする。
- 2) サンプルをセット後直ちに、波長 610nm の透過率変動を測定する。
- 3) サンプルセット後の最大透過率及び 300 秒後の透過率の(%T₃₀₀ 及び %T_{max})を読む。

3. 低浸透圧ショック回復率の算出

以下の計算式を用いて、浸透圧ショック回復率を算出する。

$$\%HSR = 100 \times (\%T_{max} - \%T_{300}) / (\%T_{max} - \%T_0)$$

●グルコース・総コレステロール・中性脂肪

1. 血液 1.5mL を栄研チューブに分注する。
2. 栄研チューブを 2800rpm, 10min, 22℃ で遠心分離する。
3. 遠心して得られた上清を 0.5mL 分取し、-20℃で凍結する。

●乳酸

1. タンパク液 500 μL が入った栄研チューブに血液 500 μL を添加し、ボルテックスミキサーにてよく攪拌する。
2. 攪拌後、栄研チューブを 2800rpm, 10min, 22℃で遠心分離する。
3. 遠心して得られた上清を 0.5mL 分取し、-20℃で凍結する。

●細菌培養試験（一般細菌／真菌）

血液 3mL をサンプリングし、専用ボトルに接種する。

C. 試験結果

n=3 の検体数を予定していたが血小板採取不能により、2回の検査評価となった。20 単位製剤の 9 日間保存期間において Baxter PL2410 バッグ及び PO-80 バッグ間には何れの評価項目[血小板スワーリング (表 1), 血小板数 (表 2), 血小板容積 (表 3), グルコース濃度 (表 4), 乳酸濃度 (表 5), pH (表 6), pCO₂ (表 7) / pO₂ (表 8), 低浸透圧ショック回復率 (表 9), 血小板凝集能 (表 10)]においても、有意な差は認めなかった。

D. 考察

新しい血小板保存バッグ PO-80 の酸素透過性は世界で汎用されている PL2410 より高いので、高単位血小板を保存するのに、より有利と予想して、実験を行なった。しかし、予想に反して、PO-80 の優位性を証明することは出来なかった。

PL2410 も酸素透過度 2024mL/m²*day*atm と優れた酸素透過性を有しているために、さらに 30%酸素透過度を向上させても、血小板機能維持には新たな有利な価値が加わらなかったためと推定される。グルコースの消費速度、乳酸の蓄積スピードにおいて両群に有意な差を認めなかったことは、共に好気性代謝が良好に維持されていたことを示す。

血小板にはアポトーシス機構は備わっているがその主要な機能劣化はアポトーシスによるものではないと思われる。エ

エネルギー代謝において好気性代謝から嫌気性代謝が必要になると、乳酸が早いスピードで蓄積し、pHが酸性（6.3未満）に傾くのが主要な機序と考えられている。かといって、pH7.6以上のアルカリ側に傾いても劣化が進行する。PO-80はより高いガス透過性を有しているので、PO-80で保存した血小板はアルカリ側に傾く可能性もあったが、7.2以上の値を示すことはなかった。同様にPL2410も9日間の観察期間中至適なpHを維持していた。

E. 結論

高酸素透過性血小板バッグ PO-80 は世界で汎用されている血小板保存バッグ PL2410 と同等の血小板長期保存機能を有していると判断された。

F. 健康危険情報

血小板採取の際に採血針を複数回にわたって刺入を試み、成功しなかったドナーが二人発生したが、その後、とくに健康に影響を及ぼす事象は発生しなかった。

G. 研究発表

(論文)

1. 大戸 齊. 血小板輸血と細菌感染. 血液フロンティア 13 : 643-649, 2003.
2. Ohto H, Miyata S. Evaluation of stored platelets. International Forum. Vox Sanguinis, (in press) 2004.
3. 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. 安永礼子, 湯浅武史, 尾形 隆, 池田和彦, 柳掘浩克, 大戸 齊. 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.

H. 知的所有権の発生

なし。

表1 スワーリング観察結果

サンプル			調製直後	1日目	3日目	5日目	7日目	9日目
1	Baxter PL2410	1	++	++	++	++	++	+
	20単位製剤	2	++	++	++	++	++	+
2	PO80	1	++	++	++	++	++	+
	20単位製剤	2	++	++	++	++	++	+

++;容易にスワーリングが確認された,+;十分に観察した上でスワーリングが確認された,
-;全くスワーリングが確認されない

表2 血小板数測定結果

サンプル			調製直後	1日目	3日目	5日目	7日目	9日目
1	Baxter PL2410	Bax1	149.0	161.0	147.0	137.0	148.0	130.0
	20単位製剤	Bax2	189.0	159.0	171.0	169.0	169.0	162.0
2	PO80	PO1	149.0	159.0	143.0	133.0	139.0	136.0
	20単位製剤	PO2	189.0	169.0	154.0	169.0	164.0	164.0

※単位： $\times 10^4 \text{Cell}/\mu\text{L}$

表3 平均血小板容積（MPV）測定結果

サンプル			調製直後	1日目	3日目	5日目	7日目	9日目
1	Baxter PL2410	Bax1	7.4	7.0	7.0	6.8	7.0	7.0
	20単位製剤	Bax2	7.4	7.2	7.0	7.2	7.2	7.2
2	PO80	PO1	7.4	6.8	6.9	6.9	6.9	6.8
	20単位製剤	PO2	7.4	7.1	7.1	7.5	7.3	7.4

※単位：fL

表4 グルコース測定結果

サンプル			調製直後	1日目	3日目	5日目	7日目	9日目
1	Baxter PL2410	Bax1	319.0	293.0	229.0	183.0	133.0	80.0
	20単位製剤	Bax2	333.0	308.0	262.0	216.0	169.0	141.0
2	PO80	PO1	319.0	297.0	234.0	179.0	136.0	84.0
	20単位製剤	PO2	333.0	319.0	177.0	126.0	114.0	46.0

※単位：mg/dL

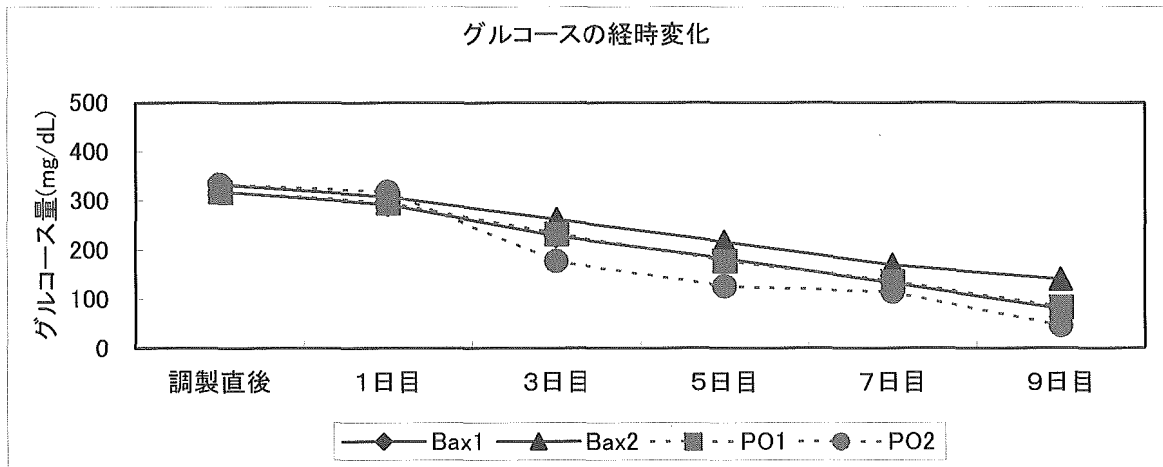


図1 グルコース測定結果

表5 乳酸測定結果

サンプル			調製直後	1日目	3日目	5日目	7日目	9日目
1	Baxter PL2410 20 単位製剤	Bax1	29.3	55.0	101.4	140.4	180.1	211.4
		Bax2	35.1	59.6	98.9	132.6	166.6	188.1
2	PO 80 20 単位製剤	P01	29.3	50.7	94.3	140.6	171.1	177.6
		P02	35.1	44.7	174.2	214.5	235.7	241.2

□ 単位 : mg / d L

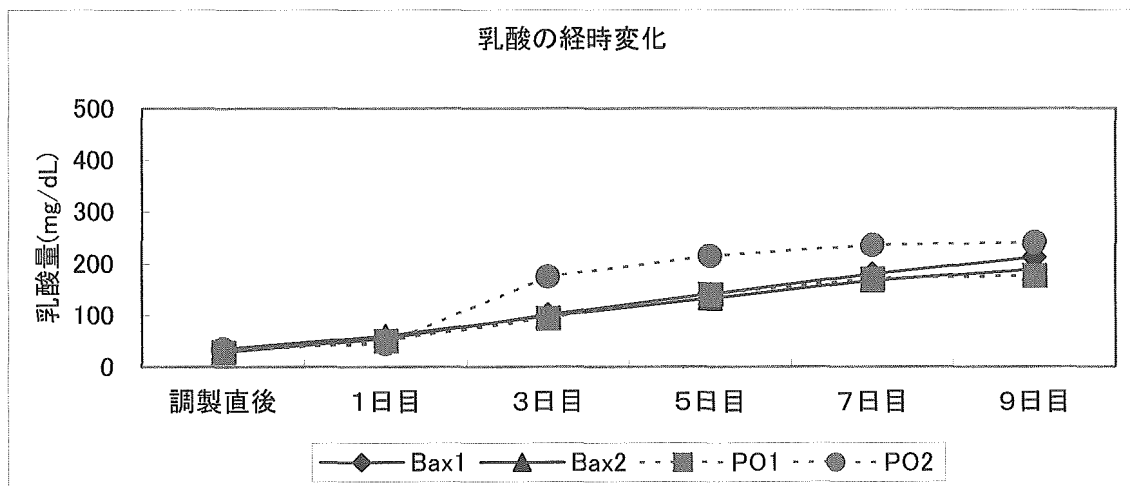


図2 乳酸測定結果

表6 pH測定結果

サンプル			調製直後	1日目	3日目	5日目	7日目	9日目
1	Baxter PL2410 20 単位製剤	Bax1	7.011	7.107	7.054	6.967	6.803	6.533
		Bax2	7.020	7.123	7.098	7.011	6.872	6.647
2	PO80 20 単位製剤	PO1	7.011	7.076	7.039	6.941	6.794	6.540
		PO2	7.020	7.115	6.997	6.934	6.519	6.308

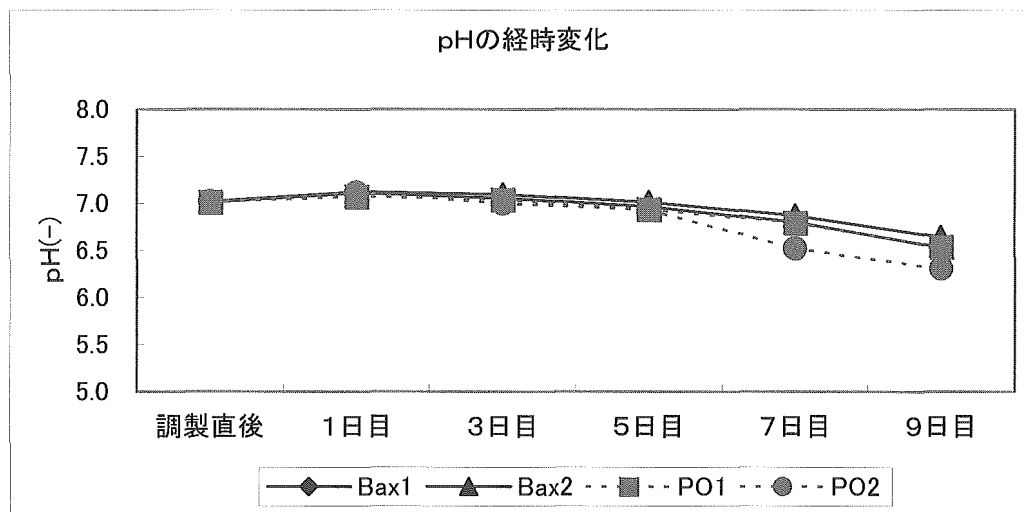


図3 pH測定結果

表7 pCO₂測定結果

サンプル			調製直後	1日目	3日目	5日目	7日目	9日目
1	Baxter PL2410 20 単位製剤	Bax1	78.2	49.9	38.1	30.4	26.9	23.7
		Bax2	76.9	49.1	36.9	33.0	34.3	29.7
2	PO80 20 単位製剤	PO1	78.2	55.5	43.6	37.0	32.1	28.5
		PO2	76.9	55.1	47.1	38.3	21.2	20.5

※単位：mmHg

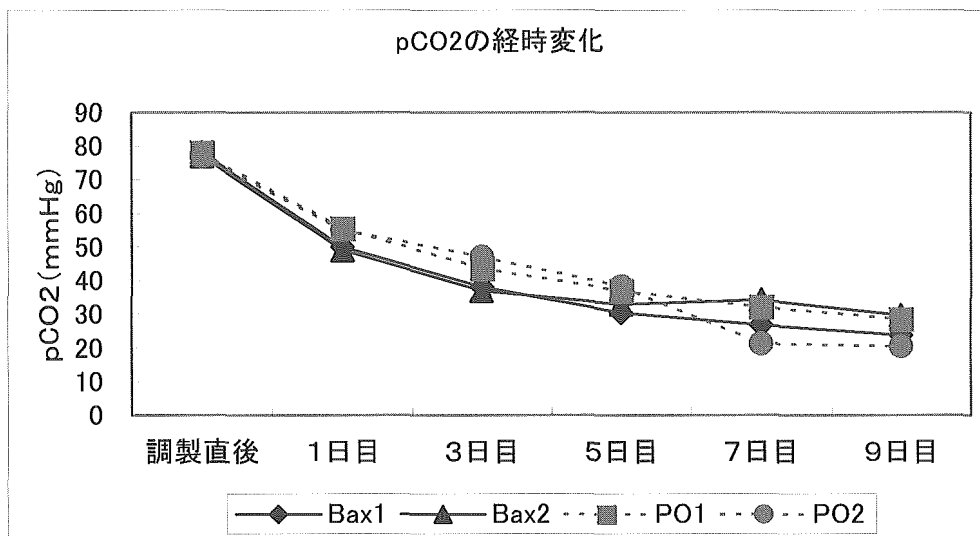


図4 pCO₂測定結果

表8 pO₂測定結果

サンプル			調製直後	1日目	3日目	5日目	7日目	9日目
1	Baxter PL2410 20 単位製剤	Bax1	56.6	29.5	41.0	88.6	108.6	105.0
		Bax2	87.9	40.8	57.6	65.1	77.0	63.0
2	PO80 20 単位製剤	P01	56.6	48.0	60.7	79.3	114.5	109.6
		P02	87.9	44.0	68.6	67.6	109.6	110.1

※単位：mmHg

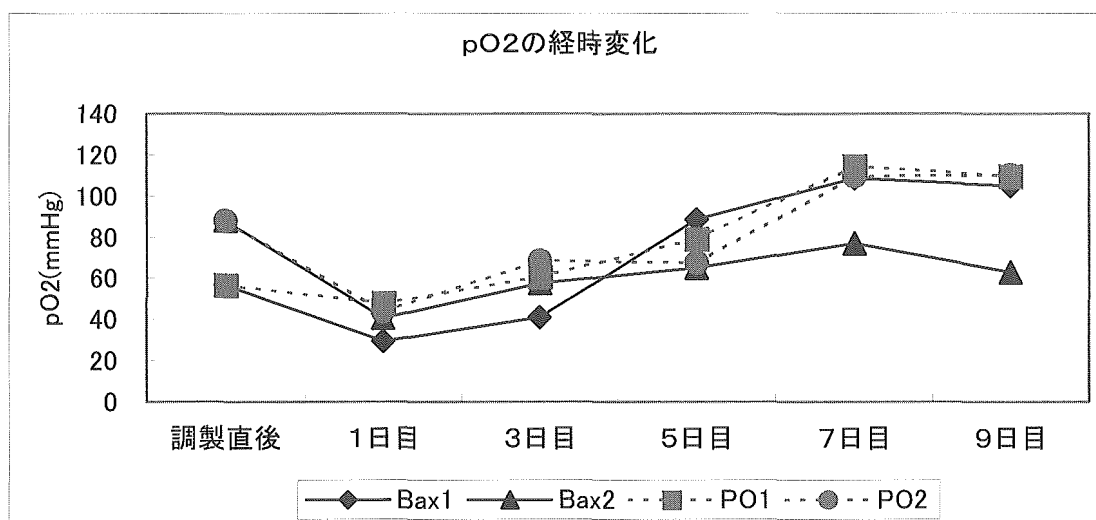


図5 pO₂測定結果

表9 %HSR 測定結果

サンプル		調製直後	1日目	3日目	5日目	7日目	9日目	
1	Baxter PL2410	Bax1	80.0	72.8	70.3	69.3	66.7	66.9
	20 単位製剤	Bax2	71.6	74.8	80.0	79.2	74.4	65.0
2	PO80	PO1	80.0	77.1	76.4	70.7	69.4	63.9
	20 単位製剤	PO2	71.6	71.7	71.1	68.9	72.5	59.6

※単位：%

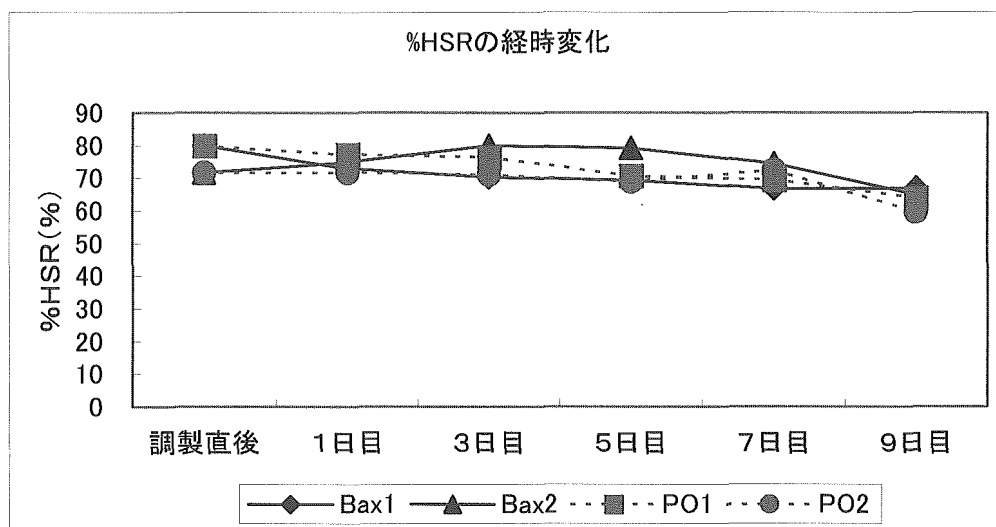


図6 %HSR 測定結果