

200401229A

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュトリーサイエンス総合研究事業

# 血小板製剤の有効期限延長と安全性 確保に関する研究

(H16-医薬-073)

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 大戸 齊

平成17 (2005) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

血小板製剤の有効期限延長と安全性確保に関する研究

(H16-医薬-073)

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 大戸 齊

平成17 (2005) 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 齊	
平成 16 年度研究班会議プログラム -----	8
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と除去 -----	10
浅井隆善	
血小板製剤中での細菌の増殖 -----	27
高松純樹	
輸血用血液製剤の細菌汚染と外観検査 -----	35
佐竹正博	
血小板機能とアポトーシス -----	43
尾崎由基男	
延長保存した血小板製剤の血小板機能（血栓形成能） -----	46
宮田茂樹	
高酸素透過性バッグを用いた高単位血小板製剤の 9 日間保存性評価 --	58
大戸 齊	
III. (財) ヒューマンサイエンス振興財団 「平成 16 年度医薬品・医療 機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業」に基づく研究班事 業ならびに研究実績報告書 -----	70

# 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  
(H16-医薬-073)

主任研究者：大戸 齊 教授 福島県立医科大学 輸血・移植免疫部

研究要旨：

1. 少子高齢化が急速に進行している日本では血小板製剤などの血液製剤の需給バランスが近い将来崩壊するものと予想され、根源的な対策が必要となるであろう。その中でも、約8%が期限切れ廃棄されている血小板製剤の有効期限延長は有力な候補である。
2. グラム陰性菌である *Serratia marcescens* 菌は血小板製剤に摂取した後、一旦減少し、3～10時間後から再上昇する。この細菌へ白血球除去フィルターを用いても除去することは不可能である。
3. グラム陽性菌(*Staphylococcus* や *Streptococcus*)は敗血症患者から得られた4種ずつの菌株を変えても、菌種間では、ほぼ一様な急速からやや急速な増殖パターンを呈した。
4. グラム陽性菌(*Staphylococcus* や *Streptococcus*)は増殖スピードが速く、*Serratia* 菌は低温度でも増殖すること、*Pseudomonas aeruginosa* は血小板製剤中では増殖しがたい。
5. 保存血小板の機能低下には apoptosis が関与し、その機能保持には apoptosis 阻害剤の添加が有効である可能性が示された。
6. 血小板血栓形成能は7日間経過しても観察されるが、保存期間と比例して低下するので、現在の保存条件を進歩させることなく、7日間などに延長するのは不適切である。
7. しかし、新しく開発された高酸素透過性バッグは高単位血小板を安定して7日間をこえて、9日保存しても安定して、血小板機能(pH、乳酸産生、swirling、P-selectin発現など)が保存されることを見いだした。
8. 新バッグを用いることにより、成分採血由来高単位血小板製剤を9日間保存することも実現性が見えてきた。細菌混入などの問題がクリアできれば、少子高齢社会でさらに要求される血小板製剤の安定的供給に寄与するであろう。

分担研究者

大戸 齊	福島県立医科大学輸血・移植免疫部	教授
浅井隆善	静岡県赤十字血液センター	所長
高松純樹	名古屋大学医学部輸血部	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	山梨大学医学部検査医学	教授
宮田茂樹	国立循環器病センター輸血管理室	室長

## A. 研究の背景と目的

多くの先進国のうち、とりわけ日本における急速な高齢人口の増加と若年人口の減少によって近い将来、輸血用血液製剤の需要バランスの維持は困難になるものと予測されている。血小板製剤の有効期限は国際的には現在 5 日間で、欧州の一部（デンマーク）の国ではすでに 7 日に延長されている。世界的に有効期限を 7 日間あるいはそれ以上に延長されつつある。

現在、日本での有効期間は 3 日間であるが、1999 年から導入されたウイルス核酸検査（NAT）により、実質的な有効期限は 2 日程度と短く、血小板製剤の供給体制は大変厳しくなっている。また、使用する病院でも有効期限が短いため、血小板数の上昇などで使用する必要がなくなっても他の患者に転用することも難しく、現場ではいわば「無駄な使用」と「不足」という矛盾した状態が混在している。

しかし、血小板製剤の有効期限を単純に 5 日あるいは 7 日間に延長することに対しては細菌感染症や血小板機能低下を危惧する意見があるのも事実である。特に、前者の懸念については諸外国から多くの感染による敗血症や死亡例が報告され、日本においても例数は少ないが報告されている。

今年度は血小板製剤の 7 日間保存を目標に以下の 3 点を中心に研究計画を立て

た。すなわち、

- 1) 細菌混入防止対策と細菌混入除去技術、
- 2) 7 日間保存血小板の形態変化および機能評価、
- 3) 至的保存条件の検討と血小板保存保護液の改良長期保存及び品質の改善である。今年度は細菌混入した場合の細菌増殖の動態と細菌混入を克服するための方策、あわせて、各研究班員が立案した研究テーマに沿って、血小板機能を有効に維持しつつ、7 日間に延長可能であるかを検証し、問題を克服する研究をすすめる。

## B. 研究方法

### 研究目標

1. 細菌混入防止対策と細菌混入除去技術、
2. 7 日間保存血小板の形態変化および機能評価、
3. 至的保存条件の検討と血小板保存保護液の改良長期保存及び品質の改善

### 1. 細菌混入防止対策と細菌混入除去技術

#### 1) 採血技術の工夫と向上

採血時に最初の 10~20mL を廃棄することなどにより細菌混入を防止する。

#### 2) 細菌混入してもその細菌を除去・不活化する技術の開発

白血球除去フィルターなどの技術を応用することにより、たとえ少量の細菌が混入したとしても、それを排除できる技

術の開発を目指す。

### 3) 病原体不活化技術

病原体の不活化技術が主に欧州で導入されつつある。この技術の日本への応用を検討する。

## 2. 7日間保存血小板の形態変化および機能評価

### 1) 各種血小板活性化マーカーによる経時的評価

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を評価する。加えて、血小板保存傷害を抑制作用のある薬剤の検討を行う。

### 2) 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

生体内の血小板機能をよく反映していると考えられるずり応力下血小板血栓形成能即手により、保存による血小板機能の劣化の程度を正確に評価する。

## 3. 至的保存条件の検討と血小板保存保護液の改良長期保存及び品質の改善

### 1) 高酸素透過性保存バッグによる血小板の長期安定保存

日本で開発した高酸素透過性バッグによる血小板製剤の安定保存を目指す。

### 2) 血小板製剤保存液による血小板機能維持についての情報収集と導入の可能性を検討する。

## 倫理面への配慮

3日間の保存期間を越えた血小板製剤を患者に使用することは予定していないので、倫理的に直接問題となる事態は発生しないと思われる。しかし、血小板製剤の研究にあたっては地域の赤十字血液センターから譲渡を受けるので、善意の献血であることを自覚して、丁寧な研究を心掛けた。

## C. 研究結果

各分担研究員の研究成果は以下に示す。

### 1) 浅井隆善 班員

白血球除去フィルターによる混入細菌 (*Serratia marcescens*) の除去効果と捕捉細菌の細菌検出検査への応用価値について検討した。血小板製剤に *Serratia marcescens* 細菌を大量 (15,000/mL) 接種すると、一旦約 300 分の 1 まで減少するものの、10 時間ごろから再増殖する。少量接種では 3 時間後から増殖する。白血球除去フィルターを用いることにより血小板製剤中の細菌数は 2~3 分の 1 に減少したものの、除去は不可能であった。また、フィルター部分を細菌培養試験に使用することで検出感度の向上を示唆した。

### 2) 高松純樹 班員

敗血症患者から由来するグラム陽性菌 4 種を血小板製剤に接種して、細菌の増

殖曲線を観察した。

*Bacillus cereus* 3株は接種直後から著増し、10時間後には  $10^6$  CFU/mL に達した。*Bacillus subtilis* 4株は緩やかな増殖特性を示し、50時間後には  $10^4 \sim 10^6$  CFU/mL に達した。*Staphylococcus aureus* は3株では10時間ほど経過してから増加を始め、 $10^8$  CFU/mL に達した。1株は緩徐に増加した。*Staphylococcus epidermidis* は接種直後からゆっくりと増殖し、50時間後には  $10^8$  CFU/mL に達した。

グラム陽性菌は陰性菌と異なり、増殖態度に菌株による差異は小さく、血小板製剤中の因子が細菌の増殖に与える影響は少ないことが示唆された。

### 3) 佐竹正博 班員

代表的な菌種を血小板製剤にスパイクしてその増殖態度、外観などを経時的に評価した。*Staphylococcus aureus* は急速に増殖し、48時間後には  $10^8$  CFU/mL まで増加した。フィブリン塊が形成されることもある。*Streptococcus epidermidis* はやや増殖速度は遅く、72-96時間後に  $10^8$  CFU/mL に達する。フィブリン塊は形成されない。*Streptococcus pneumoniae* は72時間後に  $10^8$  CFU/mL に達する。スワーリングは消失する。*Bacillus cereus* は血漿が乳び状に混濁する。スワーリングは早期に消失する。*Serratia liquefacinse* の増殖は早く、24時間で  $10^8$  CFU/mL に達す

る。スワーリングは48時間程度で消失し、凝集塊も認められる。低温度でも増殖する。*Serratia marscens* も低温度で増殖し、赤い色素を産生するのが特徴である。*Pseudomonas aeruginosa* は増殖しがたい。その理由ははっきりしない。

### 4) 尾崎由基男 班員

血小板は保存によって、アポトーシス類似の現象が起きていると推定される。Matrix metalloproteinase(MMP)阻害剤である GM6001 を添加することで、保存によっても血小板膜上 GP1b  $\alpha$  の蛋白分解が抑制され、アポトーシスの指標とされる microparticle の産生も抑制された。この条件で血小板コラーゲン凝集がよくほぞんされたことから、アポトーシスの抑制が血小板機能の保持に有用であると考えられる。

### 5) 宮田茂樹 班員

種々の保存期間の血小板を、全血擬似検体を作成してずり応力下血小板機能測定系にて、血栓形成能を評価した。7日間保存血小板でも血栓形成能は保存されていたが、保存期間が長くなるにつれて、血栓の3次元的成長が障害されるのを認めた。現行の血小板保存バッグでは保存期間中に非可逆的な障害が起きている可能性を示唆した。しかし、下記の PO-80 保存バッグで保存した血小板血栓形成能



の評価が必要であろう。

#### 6) 大戸 斉 班員

新しく国内で開発された高ガス透過性血小板製剤保存ポリオレフィンバッグ (PO-80、川澄化学) を用いると、高単位 (20 単位) 血小板製剤を安定して 9 日間まで保存可能であることを示した。現在、市販されている最高性能の血小板製剤保存用バッグ (PL2410、Baxter 社、2004 年 11 月に米国 FDA から 7 日間保存に適合した唯一のバッグとして認可) と比較しても、製剤中の pH、乳酸濃度、swirling、p-selectin、%HSR、凝集能などの in vitro の検査マーカーで、血小板機能をより良好に保持する可能性が示された。研究を進めて、In vivo でも同様な成績が得られることが期待される。

#### D. 考察

日本を除いて血小板製剤の有効期限は 5 日間である。デンマークは細菌混入試験の導入を行い、7 日間に延長した。日本では高齢社会の進展に加えて、ウィルス核酸試験を開始して以来、実質的な血小板製剤有効期間は 1.5~2 日に短縮している。その結果、血小板製剤の期限切れ廃棄率は 8%ほどに達している。しかも、瞬間的な不足と病院施設内で他の患者に転用できないという不都合も緊迫している。血小板製剤の有効期限の延長は緊迫

している問題である。

有効期限の延長にあたっては、二つの問題の解決が要求される。輸血細菌敗血症の回避と血小板機能の良好保持である。とりわけ、細菌汚染は受血者に重篤な有害反応をきたす可能性があり、重要な課題である。

欧米と比して、日本の血小板製剤は細菌学的に安全性が高いといわれている。それは日本の血小板製剤はほぼ 100%が成分採血由来であるためであるが、3 日間の有効期限に設定してためである可能性もある。

浅井班員は医療現場で院内感染を引き起こし、時として致命的な反応を呈するグラム陰性 *Serratia marcescens* 菌の接種実験について報告した。血小板製剤に *Serratia marcescens* 細菌を接種すると、一旦減少するものの、3~10 時間ごろから再増殖する。白血球除去フィルターを用いることにより血小板製剤中の細菌数は 2~3 分の 1 に減少したものの、完全除去は不可能であった。白血球除去フィルターの細胞内に存在する菌である *Yersinia enterocolitica* 菌への有効性は示されているが、細胞外で増殖する *Serratia marcescens* 菌には無効である。

高松班員は常在菌であるグラム陽性菌について接種実験を行った。*Bacillus cereus* 菌は急速な増加曲線、*Bacillus subtilis* 4 株は緩やかな増殖特性を示した。

*Staphylococcus aureus* は 10 時間後からやや緩徐な増加を、*Staphylococcus epidermidis* は接種直後からゆっくと増殖した。グラム陽性菌は陰性菌と異なり、増殖態度に菌株による差異は小さいことを報告した。

佐竹班員も血小板製剤に各種細菌を接種してその増殖を観察した。*Staphylococcus aureus* は最急速に増殖した。*Streptococcus epidermidis*、*Streptococcus pneumoniae*、*Bacillus cereus* はやや早い増殖速度を示した。*Serratia liquefacinse* の増殖は早い。低温度でも増殖する。*Serratia marscens* も低温度で増殖し、赤い色素を産生するのが特徴である。*Pseudomonas aeruginosa* は増殖しがたい。細菌学的特徴を提示し、肉眼的観察の重要性を示した。

尾崎班員は保存に伴う血小板機能低下にはアポトーシスが関与している可能性を示し、アポトーシス阻害剤が血小板保存に役立つことを見出した。

宮田班員はやはり血小板血栓 3 次元形成能は保存日数と比例して低下することを観察した。現在の保存条件(バッグ、血漿保存など)のまま、無条件に 7 日に有効期限を延長すると、血栓止血機能において劣化した血小板製剤が供給される可能性を示した。血小板製剤の延長期限延長には機能面からも保護する新たな付加が必要であるとした。

大戸班員は保存バッグの酸素透過性の向上によって、各種血小板機能から 5 日間保存は充分可能であること、さらに新しく開発した高酸素透過性バッグを用いれば、乳酸生成が抑制され、保存液中 pH は適正範囲にとどまり、9 日間保存も出来ることを示した。

#### E. 健康危険情報

特筆すべき、健康に影響を及ぼした事象は発生しなかった。

#### F. 研究発表

(研究論文)

1. Yuasa T, Ohto H, Yasunaga R, et al. Improved extension of platelet storage in a polyolefin container with higher oxygen permeability. *British Journal of Haematology* 2004;126:153-159.
2. Ohto H, Miyata S, Pietersza RNI, et al. Evaluation of stored platelets. *Vox Sanguinis* 2004;86:203-223.

(学会発表)

1. 大戸 亘. 血小板濃厚液の有効期限延長の可能性. 日本輸血学会雑誌 2004;50(2):209.
2. 伊藤貴俊、大戸 亘、尾形 隆、池田和彦. PO-80 による高単位血小板製剤の

- 7日間保存. 日本輸血学会雑誌 2004;50(2):373.
3. 山本 賢、吉村尋典、大戸 齊、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 -. 日本輸血学会雑誌 2004;50(2):376.
4. 大戸 齊. 輸血用血小板の有効期限延長. 日本輸血学会雑誌 2004;50(4):538.
5. Ohto H, Ezuki S, Ito T, Kawabata K. Nine-day storage of apheresis-derived platelets in a container with higher oxygen permeability. Transfusion 2004;44(suppl):66A.
6. Miyata S, Yoshimura H, Kawai T, Sano T, Ohto H, Sugimoto M. Functional evaluation of platelet concentrates stored for up to 7 days using a flow chamber system under physiologic flow conditions. Transfusion 2004;44(suppl):67A.
- H. 知的所有権の発生  
なし。

## 血小板製剤の有効期限延長と安全性確保に関する研究

日時：2004年7月23-24日

会場：福島県立医科大学 光が丘会館

(各発表の後に10分ずつの討論)

7月23日(金)

13:30-13:40 **あいさつ** 主任研究者 大戸 斉

13:40-14:10 **輸血関連細菌感染症** 座長 浅井隆善

演者 大戸 斉 (福島県立医科大学)

座長 高松純樹

14:20-14:50 **高角度散乱光を用いた低温保存血小板の形態評価**

演者 寺田周弘 (大阪府赤十字血液センター)

15:00-15:20 **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)

15:30-16:00 **ヒト血小板機能の小動物を用いた in vivo 評価**

演者 山口美樹 (北海道赤十字血液センター)

休憩 (20分)

座長 宮田茂樹

16:30-16:50 **血小板保存に伴う損傷の評価**

演者 佐藤金夫 (山梨大学臨床検査医学)

17:00-17:20 **高単位血小板の高酸素透過バッグでの9日間保存**

演者 江月将史 (福島県立医科大学)

17:30-17:50 **血小板製剤中での細菌の増殖性**

演者 高松純樹 (名古屋大学輸血部)

7月24日(土)

座長 大戸 齊

8:30-9:00 **輸血感染症の現状**

演者 池田和代 (赤十字中央血液センター)

9:10-9:30 **血液製剤中細菌の増殖性と外観試験**

演者 佐竹正博 (東京都赤十字血液センター)

9:40-10:00 **細菌接種血液製剤における検出時間：品質管理への応用**

演者 杉浦さよ子 (愛知県赤十字血液センター)

10:10-10:30 **白血球除去フィルターによる細菌の収集と除去**

演者 浅井隆善 (静岡県赤十字血液センター)

休憩 (20分)

座長 佐竹正博

11:00-11:20 **BacT/ALERT による細菌検出**

演者 原茂照夫 (Biomerieux)

11:40-12:10 **Scansystem による細菌検出**

演者 Jean-Pierre Hermet (HemoSystem, France)

12:20-12:40 **eBDS を用いた細菌検出**

演者 堀内賢一 (日本 Pall)

興味のある方は聴講を歓迎します。聴講希望者は事務局まで予約してください。

事務局：〒960-1295 福島市光が丘1 福島県立医科大学輸血・移植免疫部

小幡悠子 024-547-1536, e-mail: [y-obata@fmu.ac.jp](mailto:y-obata@fmu.ac.jp)

入場整理代：1000円(各種資料, 飲み物, 軽食)

## Ⅱ. 分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金  
医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業  
平成16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」  
(H16-医薬-073)

主任研究者：大戸 斉 福島県立医科大学輸血・移植免疫部教授

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と除去

分担研究者：浅井隆善 静岡県赤十字血液センター 所長

**研究要旨：**

血小板製剤の細菌混入について、特に菌血症状態での採血による細菌混入の可能性と、混入した細菌の動態を検討した。今年度は採血後の比較的早い時間の製剤を用いて、白血球機能が保持されている条件での細菌接種実験を行い、より生体内に近い条件の細菌動態を調べた。また、過去2年間に行った白血球除去フィルターにおける混入細菌の除去効果と、除去されて捕捉されている細菌の細菌検出検査への応用価値について再検討した。この結果、菌血症状態の供血者からの採血による細菌混入の可能性が認められたことと、採血直後の製剤では白血球の機能によって細菌数に修飾が認められるものの白血球除去フィルター部分の細菌検査は、製剤中混入細菌検出に应用可能であることが確認された。

**1. 研究の背景と目的**

血小板製剤の安全性を求めて細菌汚染の可能性を考慮する際に、その原因は大別して、採血時に細菌混入と、献血者における軽微な菌血症状態とである。採血時の混入は、皮膚消毒の徹底と消毒法の工夫とにおける基本的な注意とともに、最近では初流除去に予防効果に期待がもたれている。また、献血者菌血症状態の対策は問診において献血者の体調や下痢・歯科治療等の有無を詳細に聴取する

事によってリスクのある献血者を除外する事が徹底されてきている。しかし、これらの努力によって細菌汚染が完全に予防できると考えることは、これまでの抜き取り検査における製剤の無菌試験の結果から考えても早計であろう。そこで、仮に細菌が混入した場合の、細菌除去や、鋭敏で迅速な検査についての開発は必要である。

我々は、白血球除去フィルターを使用することにより、混入細菌を除去する効

果や、フィルター部分に集積した細菌を効率よく検査する事が鋭敏な検出法に応用できるのはいかと考えて検討してきた。今年度もその追加検討を行ったので報告する。

## 2. 方法

### (1) 使用血液製剤

細菌接種実験に用いた濃厚血小板製剤や新鮮血液は、静岡県赤十字血液センターにて、MAP加赤血球製造の過程で除去されて廃棄の対象となった白血球層を再利用し、再度遠心分離を繰り返して、血小板層、血漿層、白血球層、赤血球層を適宜組み合わせそれぞれ製の製剤を作成した。再利用製造したこれらの製剤は、それぞれの規格を満たしたバッグ内にて保管した。

### (2) 細菌混入条件検討のための遠心分離

血液の遠心分離は、各々のサンプル血液を25mL用試験管に入れ、それぞれ500、700、1,000、2,000、3,000、4,000回転/分にて遠心した。

### (3) 接種菌

接種実験に使用した細菌は、セラチア菌 (*Serratia marcescens*, IF012648 (ATCC14756)) を使用した。寒天培地にて継代培養したものを、使用時に細菌数を再測定した後に調整して接種した。

### (4) 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、37℃で培養した後の形成された細菌コロニー数を測定して、1mL当たりの細菌数として表した。

### (5) 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、48時間、72時間）振とう保管した後、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、血液バッグに接続した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、および、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。

### (6) 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

（15mLのミューラーヒュントンブイヨン培養液、または、15mLの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。フィルター部分の細菌濃度を正確に測定するために、洗浄液の量はフィルター部分の内容量が6mLであることを事前に測定し、フィルター前後の血小板浮遊液も各6mLを15mLの培養液に充填して採取した。

## 3. 結果

### (1) 遠心分離回転数と血漿中細菌数

血液中に浮遊している細菌が遠心分離によってどのような分画に集積するかを調べるために、各回転数における細菌数の変化を測定した。細菌数は7個/mLの



細菌浮遊血液を用いて行った。結果は図1のように、血漿内では徐々に上層の細菌数が減少し、2,000回転以上では消失していた。また血漿下層では徐々に減少するが4,000回転に至っても消失することなく少数の細菌が残存していた(図1)。同時に、これらの遠心条件における血小板数と白血球数の推移は図2の如く、白血球は500回転の条件で既に減少し、2,000回転以上で消失していた。血小板は1,000回転を超える付近から減少し始め、3,000回転では消失していた。ちなみに、成分採血装置の血小板採血における遠心力は、H社で1,400-2,000 x g、T社で1,200-1,700 x gであり、今回の実験に用いた遠心機では、試験管底部で計算すると2,000回転で740 x g、3,000回転で1,670 x gの遠心力であったので、今回の実験の3,000回転付近が血小板成分採血に近い条件と考えられた(図2)。

上記の実験を113個/mLと細菌数を増やして行ったところ、血漿中細菌は消失しないまでも回転数の増加に従って細菌数は減少した。また、白血球層ではむしろ回転数の増加とともに細菌数は増加し、赤血球層底部の細菌数は3,000回転では濃縮された数を示していた(図3)。

### (2) 疑似新鮮血に接種した細菌数の変動

採血後24時間以内に合成作成した全血(白血球数:7,670/mm<sup>3</sup>、血小板:17万/mm<sup>3</sup>)に、2,800個/mLのセラチア菌を接種して、室温静置下での60分間の細菌数を継時的に測定した。細菌接種した5分後には110個/mLと約25分の1に減少し、接種後15分では最も少なく74個/mLと約38分の1にまで減少した。しかし、50分後には再び増加し始め、60分後には5,000個/mLと接種直後の約倍

にまで増加した(図4)。

### (3) 血小板濃厚液に接種した細菌数の変動

作成した血小板濃厚液(白血球数:280/mm<sup>3</sup>、血小板:143万/mm<sup>3</sup>)にセラチア菌を15,000個/mLの濃度になるように接種し、室温で振とう保存しながら、細菌数を継時的に測定した。接種後30分には270個/mLと接種直後の約55分の1に減少し、4.5時間後には52個/mLと最も減少して接種直後の約288分の1にまで減少した。しかし、その後は消失することなく、8.5時間ないし11.5時間後から増加し始めた(図5)。さらに、同様な血小板濃厚液(白血球数:340/mm<sup>3</sup>、血小板:185万/mm<sup>3</sup>)にセラチア菌を、1,100/mL、または17個/mLの濃度になるように、細菌濃度を少なくして接種したところ、両濃度の接種ともに、接種後0.5時間から2時間の間は明らかな細菌数の変化はなかったが、3時間後から細菌数が増殖し始めた(図6)。

### (4) 細菌接種後血小板濃厚液の白血球除去による細菌数の変化

昨年度の実験では、セラチア菌を接種した濃厚血小板を24時間室温で振とう保存した後に、白血球除去フィルターで濾過し、細菌数の変化からフィルターによる細菌除去効果を認めている(図7)。また、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、フィルター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°Cに静置して検出細菌数の変化をみたが、濾過前後の細菌数はBACTEC用血液培養液を加えると24時間後には著しく増加していた(図8)。

白血球除去フィルター部分の細菌濃度

とともに、濾過前後の血小板濃厚液（白血球数：640/mm<sup>3</sup>、血小板：177万/mm<sup>3</sup>）の細菌濃度を濾過時の数値に近い比率で測定するために、濾過前後の血小板濃厚液の各6mlをBACTEC用血液培養液15mLに添加して37℃における細菌数を時間経過とともに測定した。図9のように、フィルター通過後は血小板濃厚液中の細菌数は減少したが、フィルター部分の細菌数増加は認められなかった。この傾向は24時間後、48時間後も同様でそれぞれの比率はほぼ変わらずに細菌数が増加していた。

次に、濾過血小板濃厚液の量と細菌除去効果との関連を見るために、20mL及び200mLの血小板濃厚液（白血球数：620/mm<sup>3</sup>、血小板：193万/mm<sup>3</sup>）をそれぞれ濾過して細菌数の変化を見た（図10）。白血球除去フィルター通過前の細菌数が1200個/mLであったのに対し、通過後の細菌数は20mL濾過で500個/mL、200mL濾過で1,150個/mLであった。また、白血球除去フィルター部分の捕捉された細菌数は20mLで1,000個/mL、200mL濾過で950個/mLであった。

同様に濾過血液量と細菌除去効果を見るために、20mL及び200mLの模擬新鮮血液（白血球数：7,230/mm<sup>3</sup>、血小板：29万/mm<sup>3</sup>）をそれぞれ濾過して細菌数の変化を見た（図11）。この実験では、フィルター濾過前後の血小板濃厚液もBACTEC用血液培養液に添加して直後と24時間後の細菌数を測定した。濾過直後では200mL濾過に比較して20mL濾過の方がフィルター部分の捕捉された細菌数が多く、一方濾過後には20mLよりも200mLの方が多くの細菌が残存していた。しかし、24時間後の細菌数はフィルター部分の細菌数で現れる増殖は多くはなく、また濾過後の細菌数では20mL濾過後で多くの細菌数増

殖が見られた。

#### 4. 考察

血液中に浮遊している細菌が遠心分離によりどのような分画に集積するかを調べた結果では、血漿中の細菌は徐々に減少し、2,000回転以上では多くは消失していた。これらの遠心条件は、成分採血装置の血小板採血における遠心力多くの細菌が白血球層、または赤血球層の下部に沈んでいることを示唆していた。しかし、少数ではあるが、これらの条件でも血漿中に浮遊している細菌も認められ、特に白血球層では一定量の細菌が残存していると考えられるべきであると思われた（図1-3）。

昨年度までは、試験に用いる血液や血小板濃厚液を地区の血液センターから供与される事情から、採血直後の血液製剤が入手困難であり、白血球の機能は低下している状態で実験を行ったことが否めない。今年度は本分担研究者が血液センターに移動したため、献血された血液の製剤化途中で不要になった白血球分画を再度遠心・浮遊を繰り返して、新鮮血液や血小板濃厚液を再合成して試験に用いた。これらの血液製剤は、血小板や補体とともに白血球もある程度機能を保っている状態で実験に使用できたと考えている。これらの条件で用意した新鮮血液にセラチア菌を接種すると、接種後5分後には細菌数が明らかに減少し暫くは少ない数値を呈し続けるが、消失することなく約1時間後に再び増加する傾向が見られた（図4）。この傾向は使用血液製剤を変えて、血小板濃厚液にても同様に認められたが、細菌が再増殖するまでの時間は、3-9時間後と異なっていた（図5, 6）。しかし、同じ製剤では接種細菌量を変えてもほぼ同じ時間で再増殖を

示していた（図6）。

これは、使用製剤中の補体活性等によるオプソニン効果や浮遊している白血球の機能、あるいは接種した細菌に対する抗体価等の免疫状態が作用した結果と考えられた。今回の実験では使用細菌は一種類の菌株を用いているが、実験毎に細菌の再増殖に至る経過が異なっていたのは、個々の製剤における補体や白血球の機能保持状態が異なっていたことが考えられる。また、同一製剤で接種細菌数を変えても同様の再増殖時間経過を示したことからも、白血球や補体の機能が同じであれば、混入細菌数が多くても少なくとも同様な時間経過で再増殖するものと考えられた。

細菌接種後血小板濃厚液の白血球除去フィルター通過による細菌数の変化については、昨年度の実験で、フィルター部分にBACTEC用血液培養液を加えて24時間後の細菌数を測定すると著しく増加していた（図8）。そこで今回は、白血球除去フィルター濾過前後の血小板濃厚液検体も同条件でBACTEC用血液培養液に添加して細菌数を測定した。この条件では白血球除去直後と同様に24時間後、48時間後ともに、濾過前後やフィルター部分の細菌数の比率が大きく変化することなく、細菌の増殖が見られた（図9）。従って、白血球除去フィルター部分に捕捉された細菌が特に感度よく検出される傾向が見られなかったが、これはフィルター部分に同時に捕捉されている多くの白血球によって貪食殺菌された細菌が少なくないのではないかと推測された。しかし、この部分の培養うにより、濾過前後の数mLに匹敵する細菌量を検出する事ができると考えられた。

濾過血小板濃厚液の量と細菌除去効果との関連では、20mLに比較して200mL濾過

した血小板濃厚液では細菌数が多く残存しており、濾過液量によって細菌除去効率が低下してくることが考えられた。フィルター部分の細菌数は、少しの差であるが20mL濾過の方が多く残存していた。これは、20mLの方が細菌の捕捉効率が高いことと、200mLでは、細菌に比して白血球の捕捉効率も高く、この白血球によって捕捉された細菌が貪食殺菌された可能性も考えられた（図10）。

新鮮血液についても、20mL及び200mLをそれぞれ濾過して細菌数の変化を観察したが、濾過直後では同様に20mL通過後新鮮血液の方が200mL濾過血液よりも細菌の残存が少なかった。濾過液量によるフィルターの細菌除去効率の差と思われた。このことはフィルター部分の細菌数においても顕著であった。これは、新鮮血液の白血球数が血小板濃厚液の約10倍以上と多いために、フィルター部分に捕捉された白血球による貪食殺菌効果がより強く影響した結果と思われた。24時間経過した後の細菌数では、フィルター部分細菌数の差が少なくなった。これは細菌は白血球に貪食されたが、添加されたBACTEC用血液培養液中のSodium Polyanetholesulfonate (SPS) によって殺菌機能が抑制されたために生存細菌が増殖した可能性が考えられる。また、今回使用した白血球除去フィルターが血小板製剤専用フィルターであるために、新鮮血液中の白血球除去が十分でなかったことが想定されるので、濾過後新鮮血液中細菌数の24時間後の値は、200mL濾過よりも20mL濾過した新鮮血液の方が多く増殖していることは、フィルターに捕捉されずに通過した白血球が200mL濾過の方に多く存在していたために細菌増殖が障害された可能性が考えられた。

## 5. 結語

菌血症における全血・成分採血では、遠心条件と血液細胞や細菌の沈下条件とを比較すると、採血時に血液中細菌が混入しうると考えられた。一方、*Serratia marcescens*を接種した条件では、接種後の細菌数の変化や増殖の様態は多様であったが、接種直後の一定時期に細菌数が低下する傾向があった。従って、この細菌数が低下した時期に少量の検体で細菌検査をおこなうことは、細菌の存在を検出できない可能性がある。また、白血球除去フィルターに補足された細菌のコロニー形成能は低下しており、白血球による貪食の影響が考えられたが、白血球除去フィルター部分の細菌培養は、数mLのサンプリングに匹敵する細菌検出効果が見られた。

## 6. 有害事象

有害事象は発生しなかった。

## 7. 知的所有権

特許など申請はなし。