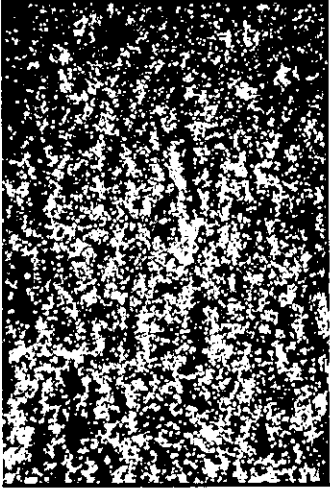


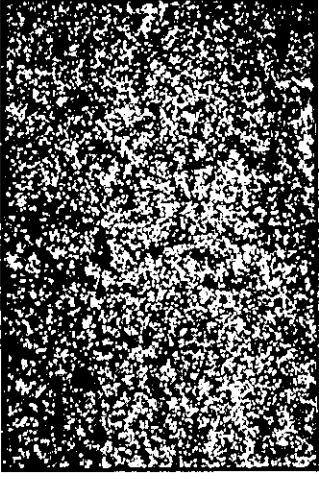
Whole blood drawn from a patient  
treated with aspirin 1T(100 mg)/day



3 min

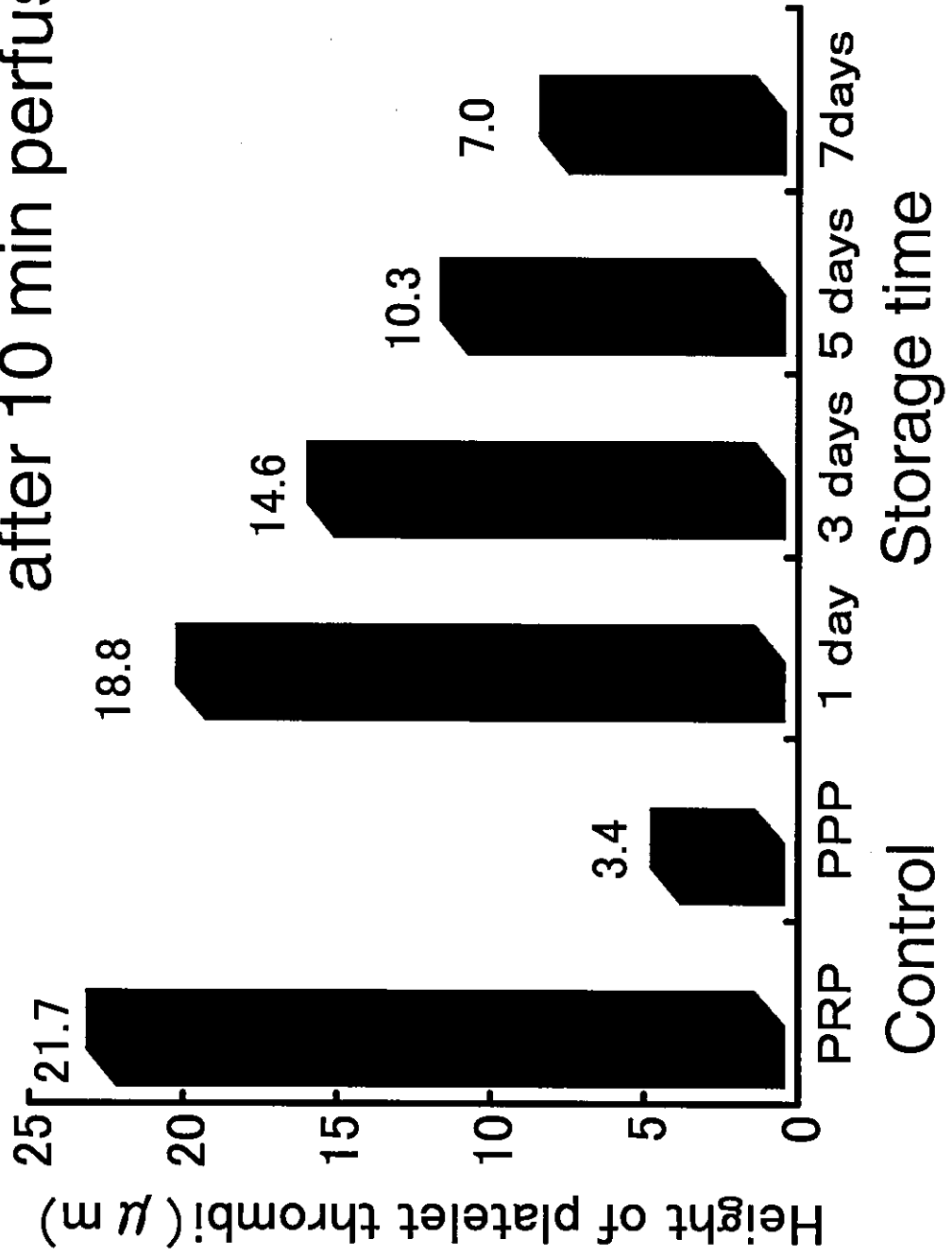


5 min



10 min

# The height of stored platelet thrombi after 10 min perfusion



厚生労働省科学研究費補助金  
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 教授 福島県立医科大学 輸血・移植免疫部

分担研究：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

主任研究者：大戸 斉 教授  
研究協力者：江月将史 川畑絹代 尾形隆  
福島県立医科大学輸血・移植免疫部

研究要旨：

これまでに国内で血小板保存用として新しく開発された血小板保存用高ガス透過性バッグ (PO-80) はアフレーシス由来高単位血小板を安定して7日間保存可能であることを報告してきた。長期間 (9日) 保存の可能性を評価したところ、世界的に汎用されている PL2410 バッグ (7日間保存使用ライセンス取得) よりも安定して、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。PO-80 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。

A. 研究の背景と目的

血小板製剤の有効期限は国際的には5日間で、欧州の一部の国ではすでに7日に延長されており、世界的に有効期限を7日間に延長させようという大きな流れが形成されている<sup>1)2)</sup>。それに対し現在、日本では有効期間は3日間で、世界標準に比べ短い。さらに、わが国では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、日本を含め、多くの先進国における急速な高齢人口の増加によって近い将来、輸血用血液製剤の需要バランスの破綻が予測されている。特に重症患者で使用されることの多い血小板製剤の供給が不足することは深刻な問題である。

血小板製剤の長期保存及び品質の改善として、現在までにポリオレフィン保存バッグの開発<sup>3),4)</sup>、血小板保存液の改良<sup>5),6)</sup>、アフエレーシス血小板の導入<sup>7)</sup>などが研究され、導入されてきた。

保存による血小板機能の劣化は保存バッグの酸素と二酸化炭素とのガス透過性を向上させることによって改善されてきた。酸素供給を増加させて、嫌気性代謝を抑制し、乳酸酸性を抑え、その結果 pH が至適に維持され、血小板機能は良好に保たれる。我々は血小板製剤の有効期限延長を目的として、さらに酸素透過性を充進させた新しいポリオレフィンバッグを開発した<sup>3)</sup>。このバッグを用いて長期保存血小板の機能と形態評価して、これまでの既存バッグよりも品質の良い血小板機能を保持・保存できる可能性を報告してきた。

本研究では、日本で開発された高酸素透過性バッグ PO-80 と世界で最も汎用されている外国製品バッグを用い、アフエレーシス採血した高単位血小板 20 単位を

9 日間保存し、その血小板保持効果を比較評価したので報告する。

## B. 研究材料及び方法

### 1) 血小板採取

血小板は自動成分採血装置 (Amicus, Baxter 社又は Spectra, Gambro 社) を用いて、同意の得られた 12 名の健常人よりアフエレーシスにより 20 単位相当 (平均  $4 \times 10^{11}$  cell) を採取した。採取後、同一血液型 2 名分を一旦プールし、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、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 (n=6)。

### 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, 1,000mL 容量、酸素透過度  $2,660\text{mL}/\text{m}^2 \times \text{day} \times \text{atm}$ , 川澄化学工業) と対照バッグ (PL2410, 1,000mL 容量、酸素透過度  $2,024\text{mL}/\text{m}^2 \times \text{day} \times \text{atm}$ , Baxter, 米国) をコントロールとして比較評価した (Table 1)。

### 3) 血小板機能の評価項目

#### ① 血小板数及び平均血小板容積 (MPV)

血小板数及び平均血小板容積はサンプル  $500 \mu\text{L}$  を栄研チューブに移し、多項目自

動血球成分計測機 (Sysmex, K-2000) を用い生理食塩液にて十倍希釈して測定した。

## ② スワーリングと肉眼的観察

スワーリングパターンはバッグ全体を蛍光灯に照らし、バッグ下側から観察した。観察時に、容易にスワーリングが観察可能なもの 2+、よく観察する必要があったもの 1+、全くスワーリングが見られないもの 0 と 3 段階評価した。同時に凝集塊の有無についても肉眼的に観察を行った。

## ③ pH 及び血液ガス (pO<sub>2</sub>/pCO<sub>2</sub>) 測定

pH 及び血液ガス (pO<sub>2</sub>/pCO<sub>2</sub>) は血液 1mL が残ったシリンジを pH・血液ガス分析装置 (ABL3, Radiometer, Copenhagen, Denmark) に装着して測定した。

## ④ 血小板凝集能測定及び低浸透圧ショック回復率 (%HSR) 測定

まず、サンプルは注射器で採取した血小板サンプル 2mL を測定検体中の血小板数が、約  $3.0 \times 10^5$  cell/ $\mu$ L となるように -40°C で保存しておき、37°C で解凍したサンプルと同一の血漿を用いて希釈してサンプル調整を行った。

血小板凝集能は惹起試薬 (ADP  $5 \mu$ mol/L+コラーゲン  $5 \mu$ g/mL) で希釈し、ヘマトレーサー 212 (PAC-8L, MC Medical) で測定を行った。低浸透圧ショック回復率 (%HSR) はサンプルベースライン (%T<sub>0</sub>) 及び最大透過率 (%T<sub>max</sub>) を分光光度計 610nm (UVIDEC, Jasco) で測定し、%HSR

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

の計算式で %HSR を算出した。

## ⑤ グルコース及び乳酸

血漿中の標準酵素活性で測定した。

## ⑥ P-セレクチンの測定 (n=4)

血小板活性化マーカーである P-セレクチンの測定は 1%パラホルムアルデヒド/0.1%NaN<sub>3</sub> を含む PBS 固定液でサンプルを固定後、2%牛胎児血清アルブミン/0.1%NaN<sub>3</sub> を含む PBS 染色液で染色し、各抗体で染色し、フローサイトメトリー測定機器 (FACSCalibur, BD Biosciences) で測定を行った。

## ⑦ 細菌混入試験 (一般細菌/真菌)

9 日目の血小板製剤から 2 つの BACTEC Plus Aerobic/F と Plus Anaerobic/F (BD Biosciences) で細菌培養試験を行った。

## C. 結果

### ① 血小板数及び平均血小板容積 (MPV)

20 単位製剤の 9 日間保存評価について、血小板数は PO-80 及びコントロール両バッグ群において 9 日間変化無く推移した。MPV は PO-80 バッグ群では 9 日目まで変化は見られなかったが、コントロールバッグ群では 7 日目以降値が上昇した (Table 2)。

### ② スワーリングと肉眼的観察

スワーリングパターンは PO-80 バッグ群ではすべての血小板製剤において 9 日間までスワーリングパターンが確認された。

一方、コントロール群においては保存期間9日目に50%の血小板製剤(3/6)でスワーリングパターンが消失した(Table 3)。

### ③ pH及び血液ガス( $pO_2/pCO_2$ )測定

pHはPO-80バッグ群では保存7日目まですべての血小板製剤でpH 6.2以上を維持したが、9日目に1例(1/6)でpH 6.0を示した。コントロールバッグ群は保存7日目で3例(3/6)においてpH 6.2以下を示し、9日目においてこの3例は各々pH 6.0, 5.7, 5.7と低い値を示した(Table 3)。血液ガス測定結果として、 $pO_2$ では製剤調整直後(84.9±15.6mmHg)と比較して、PO-80バッグ群の1日目で約26%減少したが(1日目, 59.3±13.4mmHg)、その後、1日目から9日目までは安定していた。コントロールバッグ群でも1日目に製剤調整直後と比べ47%減少し(1日目, 38.0±8.9mmHg)、その後、1日目、2日目と低値を示し、7日目以降高値(9日目, 116.0±39.0mmHg)を示すbiphasic patternを示した。 $pCO_2$ においては両バッグともに9日目まで徐々に減少していく傾向を示した(Fig. 1)。代謝物質はコントロールバッグ群でグルコースの著しい低下(4.4mmol/l)と明らかな乳酸の増加(15.08mmol/l)が9日目で観察されたが、PO-80バッグではコントロールバッグに比べ穏やかな推移を示した。

### ④ 血小板凝集能測定及び低浸透圧ショック

### 回復率(%HSR)測定

%HSR及び凝集能は7日目まで両バッグともに緩やかに減少するという同様な推移を示したが、9日目のコントロールバッグ群では50%(3/6)で著しい減少が観察された(Fig. 3)。

### ⑤ グルコース及び乳酸

PO-80バッグ群及びコントロールバッグ群ともに保存期間中におけるグルコース消費量ならびに乳酸の産生量は経時的には逆相関していた(Fig. 2)。

### ⑥ P-セレクチンの測定

膜型P-セレクチン発現率は7日目以降、PO-80バッグ群よりもコントロールバッグ群で発現率が高く、9日目ではPO-80バッグ群が平均発現率54.8%(n=4)に対し、コントロールバッグ群では80.5%(n=4)と高い発現率を示した(Fig. 4)。

### ⑥ P-セレクチンの測定

細菌培養試験の結果、細菌・真菌の汚染はすべての血小板製剤で検出されなかった(Table 4)。

## D. 考察

現在、血小板製剤は採血後、酸素・二酸化炭素の透過性が充分なバッグに入れられて室温(20~24℃)で1分間約60サイクルの速さで穏やかに平衡振盪して保存されている。振盪を加えないと血小板のエネルギー代謝が嫌気性になり、pHが

下がり、血小板機能が著しく低下する<sup>9)</sup>。また、血小板の呼吸が充分に行われるためには、血小板濃度が適切であること、保存バッグも適切な表面積<sup>9)</sup>を持ち、また、厚さを薄くするなどの条件が必要である。今回我々が新しく開発した高酸素透過性バッグ PO-80 はバッグの表面積を保ちながら厚さを薄くし、さらに材料の配合を変更することにより、より高い酸素透過性を有するポリオレフィンバッグである。現在、世界で市販されている血小板バッグには 1) PL2410 (ポリオレフィン; Baxter Healthcare, 米国)、2) CLX-plastic (PVC; MedSep Corp., 米国)、3) ELP (PVC; Gambro BCT, 米国)がある。その中で酸素透過性が最も良く、世界的に汎用されている PL2410 をコントロールバッグとして選択した。

活性化を受けていない血小板は薄い円盤状の形をしているが、日数が経つにつれて球状に変化してくる。この形態の変化は輸血後生存率と最も相関の高い指標であり、円盤状から球状への変化はスワーリング現象の低下として肉眼的に観察することができる。また、血小板の球状化に伴い平均血小板容積 (MPV) が見かけ上増加するので、この数値を測定することも血小板機能を測定するのに有用である<sup>10)</sup>。今回の研究では PO-80 バッグ群すべてのバッグで 9 日間スワーリングパ

ターンが確認できたが、コントロールバッグ群では保存 9 日目に 50% の血小板製剤 (3/6) でスワーリングパターンが消失した。MPV もコントロールバッグ群で 7 日目以降上昇する傾向にあった。スワーリングテストは客観性には欠けるが、ルーチンの工程検査として、また輸血前の品質の確認検査として簡便に施行することができる利点がある。今回の結果でも血小板機能が低下したバッグではスワーリングパターンが消失したことからも裏付けになる。

保存中の血小板の機能・活性の指標として pH が良く使われている。pH の低下は血小板にとって最も有害な条件で、pH7.6 以上は細胞に有害なダメージを与えるとされ<sup>9)</sup>、また、pH が 6.8 になると生理的な代謝が損なわれはじめ、6.2 以下になると血小板の融解が起こることが報告されている<sup>11)12)</sup>。今回の結果からは両バッグともに 9 日間 pH が 7.2 以上になることはなかった。また、コントロールバッグ群で 7 日目に 3 例 (3/6)、PO-80 バッグ群では 9 日目に 1 例 (1/6) が pH 6.2 以下まで低下した。この現象は Demont *et al* (2002,2003) 及び Yuasa *et al* (2004) が報告した 7 日間保存の試験で、保存 5 日目に pH6.2 以下を示した結果と似ており、血小板機能低下の指標として信頼性がある。また、pH レベルと乳酸生成間には緊密な

関係があることが知られている<sup>8),14),9)</sup>。今回の pH が 6.2 以下に低下した 4 例（コントロールバッグ群 3 例、PO-80 バッグ群 1 例）では乳酸値が非常に高かった。また、乳酸生成の上昇が見られたバッグでは、同時にグルコースの著しい減少が観察され、経時的に逆相関関係を示していた。

血小板の止血効果の指標として低浸透圧ショック回復率（%HSR）と凝集能試験がある。%HSR は細胞の低浸透圧を利用して、球状になった血小板の光透過性を測定し、球状から円盤状に血小板が回復する膜の状態を測定する試験である。凝集能試験は血小板浮遊物に ADP+コラーゲンを加え、凝集が生じると光の透過性が増すことを測定原理にして血小板の凝集能をみる試験である。今回の結果、%HSR では PO-80 バッグ群の 9 日目で平均 59.8%を示したのに対し、コントロールバッグ群では平均 32.2%と膜の回復率が低かった。また、凝集能試験においても PO-80 バッグ群の 9 日目で平均 62.7%を示したのに対し、コントロールバッグ群では平均 42.3%と凝集率が低かった。

P-セレクチンは血小板製剤調整直後から血小板表面に検出され、保存の日数とともに陽性細胞数が増加するので血小板活性のマーカーとして有用とされている<sup>13)</sup>。今回、膜型 P-セレクチン発現率は PO-80 バッグ群 55%に対して、コントロ

ールバッグ群では 80%以上と高い発現率を示した。in vivo での研究をしていない為、実際の止血効果は不明であるが、この 3 つの測定項目は輸血後の血小板の生存率と比較的高い相関を示すことから、高酸素透過性バッグで保存した血小板の方が輸血後の止血効果が高いことが推測される。

血小板製剤の有効期限は 1985 年米国で 7 日間保存に延長されたが、細菌汚染の危険性が増大した為、5 日間保存に戻された<sup>15),16)</sup>。しかし、血小板製剤の 7 日間への期限延長は細菌検出システムや不活化技術の導入により、欧州では有効期限を 7 日間に延長した国もでてきた。米国でも再度、有効期限を 7 日間に延長しようと現実的な臨床検討がスタートしている。現在、日本では血小板製剤の有効期限は 3 日である。

今回の評価により、血小板機能の保持に関して、高酸素透過性バッグを使用することにより、5 日もしくは 7 日間への有効期限の延長はまったく問題なく可能であると考えられる。今回、コントロールバッグとして使用した PL2410 は 2004 年に米国食品安全局から 7 日間保存への使用許可がおりている。しかし、われわれの観察では高単位の血小板製剤の有効期限を PL2410 で 7 日間以上に設定した場合には、7 日目、9 日目と血小板機能と pH



が低下するものが出現し、9日目ではスワーリングパターンの消失をも確認された。一方、コントロールバッグよりも30%酸素透過度を向上させた高酸素透過性バッグPO-80ではグルコースの消費速度、乳酸の蓄積スピードにおいて好気性代謝が良好に維持されることが確認できた。このことから新しく開発された高酸素透過性バッグPO-80は世界で汎用されているコントロールバッグよりも、高単位血小板を保存するのに大変有用であることが示された。

#### E. 結論

日本で開発された高酸素透過性血小板保存バッグPO-80は世界で汎用されている血小板保存バッグに比較して、9日間保存における血小板機能保持効果が優れている可能性が示唆される。

#### F. 健康危険情報

血小板採取の際に、採血針を複数回に亘って穿刺をおこなった事例が3例発生したが、その後健康に影響を及ぼした事象は発生しなかった。

#### G. 研究発表

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.

#### H. 知的所有権の発生

なし。

#### 文献

- 1) Dumont L.J & van den Broeke T. Seven-day storage of apheresis platelets: report of an in vitro study. *Transfusion* 2003; 43: 143-150.
- 2) Dumont L. j, AuBuchon J. P, Whitley P, Herschel L. H, Johnson A, McNeil D, Sawyer S & Roger J.C. Seven-day storage of single-donor platelets: recovery and survival in an autologous transfusion study. *Transfusion* 2002; 42: 847-854.
- 3) Murphy S. The efficacy of synthetic media in the storage of human platelets for transfusion. *Transfusion Medicine Review* 1999; 13: 153-163.
- 4) Yuasa T, Ohto H, Yasunaga R, Kai T, Shirahama N & Ogata T. Improved extension of platelet storage in a polyolefin container with higher oxygen permeability. *British Journal of Haematology* 2004; 126: 153-159.

- 5) Boomgaard M.N., Gouwerok, C.W., de Korte D et al. Platelets stored for 6 days in a polyolefin container in a synthetic medium with minimal plasma carry-over. *Vox Sang* 1994; 66: 18-24.
- 6) Yuasa T, Ohto H, Suzuki A, Shishido F. New plasma-reduced synthetic media, Fukushima cocktails, for the storage of platelets for transfusion. *Transfusion Science* 2000; 23: 37-46.
- 7) Jacobson J.L, McQuail E.J, Murphy R.M, Thomas J.E & Kliemisch A.P. Trima Accel: improved platelet collection efficiency, split platelet collection rate, and donor staff satisfaction. *Transfusion* 2003; 43(Suppl.): 15A.
- 8) Murphy S, Kahn R.A, Holme S, Phillips G.L, Sherwood W, Davisson W & Buchholz D.H. Improved storage of platelets for transfusion in a new container. *Blood* 1982; 60: 194-200.
- 9) de Wildt-Eggen J, Schrijver J.G, Bouter-Valk H.J, Fijnheer R, Bins M & van Prooijen H.C. Improvement of platelet storage conditions by using new polyolefin containers. *Transfusion* 1997; 37: 476-481.
- 10) Schrire I. Blood transfusions and the production of circulatory overloading. *South African Med J* 1949; 23: 795.
- 11) Ishikawa Y, Sasakawa S. Platelet storage in glow discharged-treated polyvinylchloride bags: Effects of a plasticizer on platelet hypotonic shock response. *Vox Sang* 1984; 47: 330-334.
- 12) Bunker JP, Stetson JB, Coe RC, et al. Citric acid intoxication. *JAMA* 1955; 157: 1361-1367.
- 13) Larson CP. Venous air embolism. Report of four cases, suggested method of treatment. *Am J Clin Path* 1951; 21:247-250.
- 14) Van der Meer P, Pietersz R & Reesink H. Leucoreduced platelet concentrates in additive solution: an evaluation of filters and storage containers. *Vox Sang* 2001; 81: 102-107.
- 15) Lee D.H & Blajchman M.A. Novel platelet products and substitutes. *Transfusion Medicine Reviews* 1998; 12: 175-187.
- 16) Kuehnert J.M, Virginia R, Roth N at al. Transfusion-transmitted bacterial infection in the United States, 1998 through 2000. *Transfusion* 2001; 41: 1493-1499.

Table1. The capacity and oxygen permeability of the polyolefin containers studied

Name	Oxygen permeability (ml/m <sup>2</sup> × day × atm)	Volume (mL)
PO-80	2,660	1,000
PL2410 (Control)	2,024	1,000

Table2. Platelet count and Mean platelet volume (MPV)

		day0	day1	day3	day5	day7	day9
Platelet count (× 10 <sup>4</sup> Cell/μl)	PO-80	176.7±16.8	177.0±16.9	177.0±24.6	165.2±18.1	166.8±19.5	165.3±17.7
	Control	176.7±16.8	171.8±16.3	174.5±23.4	167.7±15.7	167.5±14.9	159.5±17.3
MPV (fl)	PO-80	7.3±0.2	7.0±0.2	6.9±0.2	7.1±0.4	7.1±0.3	7.2±0.3
	Control	7.3±0.2	7.1±0.2	7.1±0.3	7.1±0.4	7.4±0.6	7.8±0.9

Table3. Characteristics of high concentration PCs (4×10<sup>11</sup>/250ml plasma/bag) during storage in PO-80 and Control bags

Number of PCs with pH value

	pH at day 7			pH at day 9		
	<6.2	6.2-6.8	>6.8	<6.2	6.2-6.8	>6.8
PO-80	0	5	1	1	5	0
Contral	3	1	2	3	3	0

Number of PCs with swirling score

	Score at day 7			Score at day 9		
	0	1+	2+	0	1+	2+
PO-80	0	0	6	0	3	3
Contral	0	3	3	3	2	1

Table4. Sterility test

	Bacterial	Fungal
	day 9	day 9
PO-80	0/6	0/6
Control	0/6	0/6

Fig.1 The change of pO<sub>2</sub>/pCO<sub>2</sub>

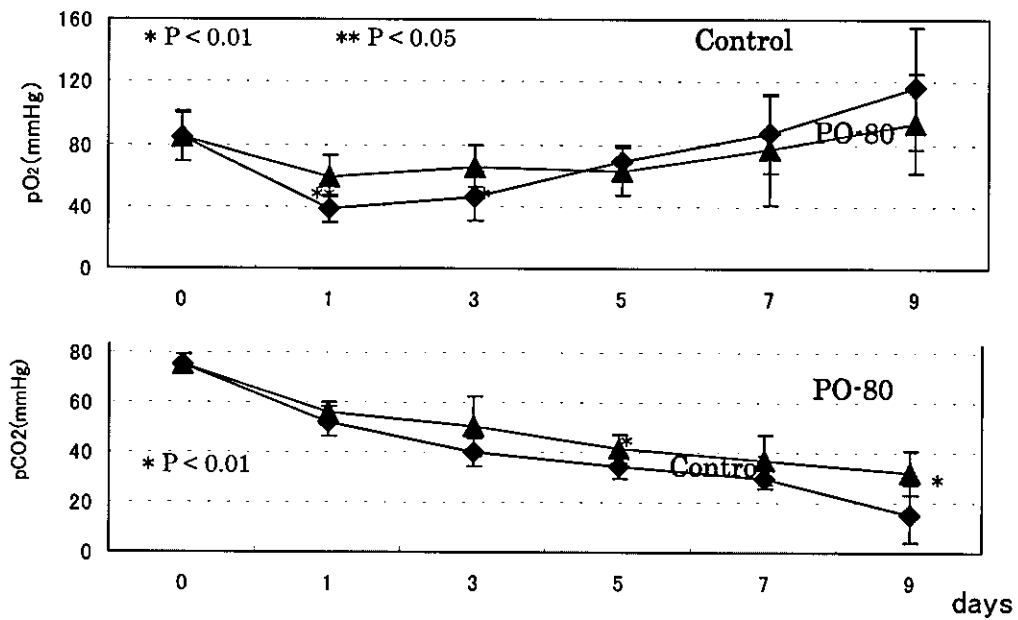


Fig.2 Glycolysis metabolite (Glucose/Lactate)

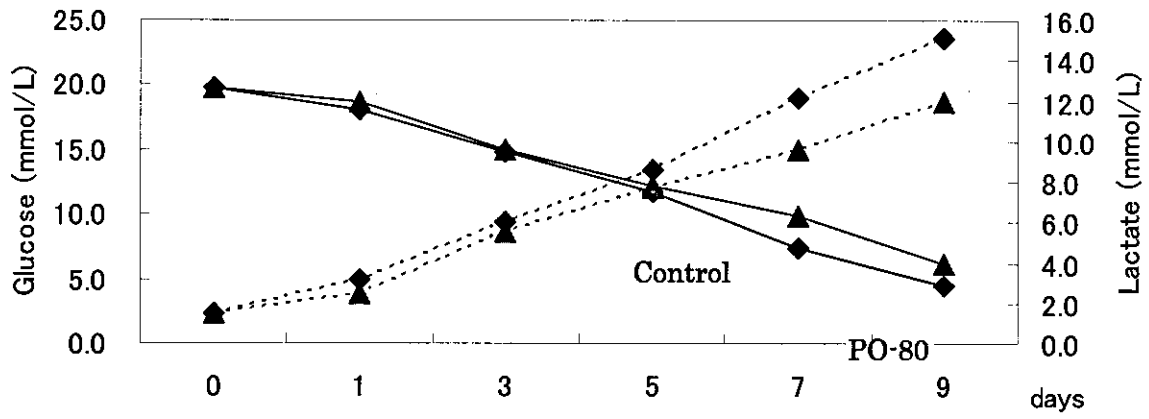


Fig.3 Hypotonic shock response (%HSR) and Aggregation with ADP and collagen

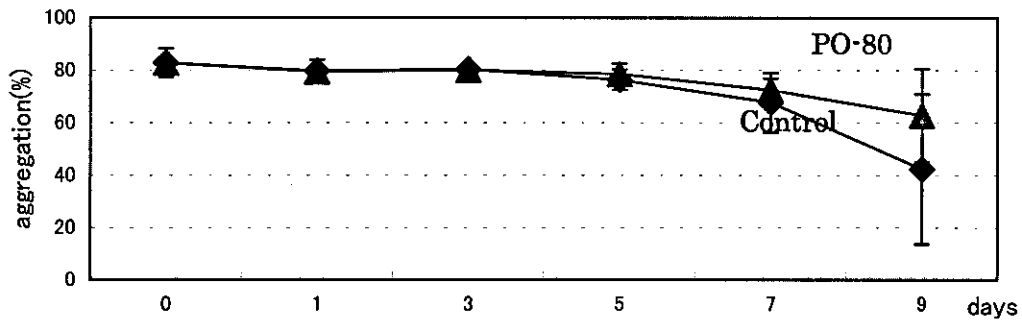
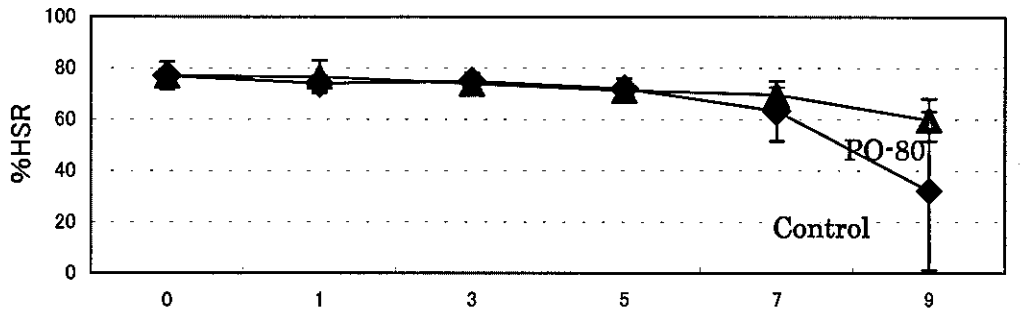
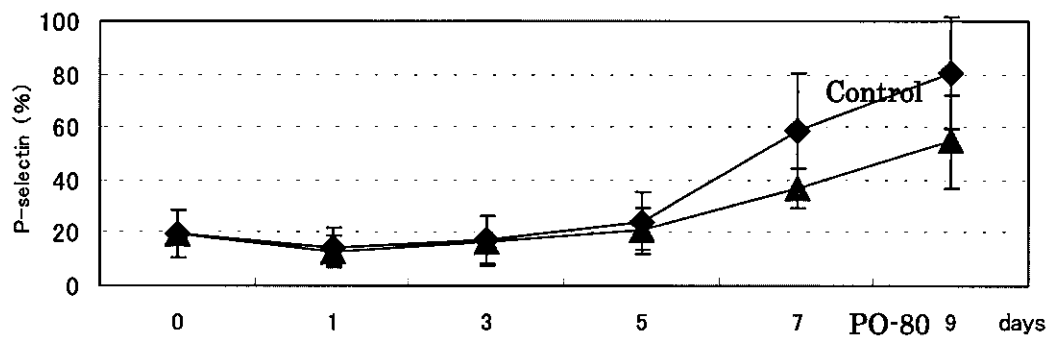


Fig.4 P-selectin expression



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

〔外国人研究者招へい事業〕  
(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究推進事業)

研究実績報告書

1. 招へいされた外国人研究者  
所属・職名：ベルギー（フランダース）赤十字血液センター所長  
兼 アントワープ大学客員教授  
Belgian (Flanders) Red Cross, Medical Director  
Guest Professor, University of Antwerp  
氏 名：ルド・M・ムレ 博士  
Ludo M. Muylle, MD
2. 招へい申請者  
所属・職名：福島県立医科大学医学部 教授  
氏 名：大戸 斉
3. 受け入れ研究者  
所属・職名：福島県立医科大学医学部 教授  
氏 名：大戸 斉
4. 招へい期間：平成 16 年 11 月 3 日より平成 16 年 11 月 11 日（9 日間）
5. 研究課題：輸血用血液製剤細菌混入の危険性と有効な検出による血小板  
輸血安全性の確保
6. 研究活動の概要  
11 月 4 日から 5 日までの間は福島市において、主に東日本の輸血医学関係者を対象に、血小板輸血の細菌混入の可能性とその安全対策について、講演と討論を行った。（参加者約 80 名）  
11 月 6 日から 7 日までの間は香川県高松市において、輸血医学研究者と日本赤十字社輸血業務対象者を中心に、血液製剤の細菌混入の実態とその安全確保について、講演と討議を行った。（参加者約 700 名）  
11 月 8 日から 10 日までは愛知県瀬戸市と名古屋市において、赤十字血液センター関係者と輸血医学関係者を対象に、血小板輸血の際に問題となる細菌混入汚染の世界と欧州における実情の講演とその対策について討議を行った。（参加者約 100 名）



## 7. 研究課題の成果

当研究班のテーマである輸血血液製剤（特に血小板）の細菌混入汚染の実情とその安全対策について輸血関係者を集め、講演、討議と研究を行った。

ベルギー（フランダース）赤十字血液センターは世界に先駆け、1998年11月から全ての血小板製剤について、細菌混入スクリーニング検査（BacT/ALERT）を導入した。4年間（107,827本）で0.96%が細菌混入スクリーニング陽性で、真の陽性は0.52%（803本）であった。試験24時間以内に陽性検体の60%、48時間以内に75%が検出できた。しかし、嫌気性菌や好気性菌でも緩徐に増殖する菌種は4日ほどかかることが多かった。

この細菌混入スクリーニングを開始してから細菌混入陽性血小板製剤の45%（357本）は患者に輸血されてしまった。しかし、致命的な有害事象の発生は記録されていない。203例の報告が届き、うち12例に症状（発熱6例、紅潮2例、敗血症2例、戦慄1例、血圧低下1例）が出現した。55%（446本）は輸血されずに廃棄された。

2本は細菌混入スクリーニング検査が偽陰性であった。2本ともプール血小板製剤で、1本はDay2に再検して *Staphylococcus epidermidis* が検出されたが、バッグにリークが認められた。患者には使用されなかった。もう1本は患者に輸血症状が出現したので再検した。患者と残血小板製剤から *Bacillus cereus* が検出されたが、やはりバッグに傷が見つかった。

検査のサンプリングをいつ行うかは重要な問題である。メーカーは採取翌日の検査を薦めているが、採血2時間以内のほうが検出に要する時間が短縮され、結果的により高感度となる。

また、初流血をバッグに入れないで排除する Diversion は細菌混入を減少させるのに良い方法である。Diversion を 10ml (de Korte)、20ml (Bos)、42ml (Schneide) に設定した場合、細菌検出率は0.21%、0.48%、0.98%であった。通常採血方法(0.35%、1.03%、2.32%)と比較しておよそ半分以下に低下している。われわれも Diversion を導入する予定である。

結論を言うと、細菌混入スクリーニング検査は血小板輸血関連敗血症予防に有効な手段である。この細菌スクリーニングと初流血 Diversion を併用することで、血小板製剤の有効期限を7日に延長することが可能である。

外国人研究者を招へいして得られた成果は、血小板製剤有効期限延長にあたってはこれまで見逃されてあまり気づかなかった、細菌混入の実情が明らかにされたことである。加えて、その問題解決には細菌混入スクリーニング検査と初流血 Diversion が極めて有効であることも判明した。わが国でも血小板製剤の有効期限延長は高齢社会に突入していることもあって、避けては通れない差し迫った問題である。政策決定に当たり、大変示唆に富む情報を得た。

## 8. 外国人研究者のレポートは別添のとおりである。

## Four years experience of culturing platelet concentrates for bacterial contamination in routine blood service operations

Muylle L, Blood Service, Red Cross-Flanders, Mechelen, Belgium

From the first hemovigilance reports in countries, such as France and the United Kingdom, where hemovigilance systems had been implemented, it was clear that the transfusion-associated morbidity and death following transfusion of bacterial contaminated platelet concentrates (PC) was a matter of serious concern. Therefore, in order to prevent the transfusion of bacterially contaminated platelets and associated reactions, we started in November 1998 to screen all single and pooled donor platelet concentrates, prepared in the centers of our blood service, for bacterial growth using an automated culture system.

The same procedure for preparation of PC, sampling and testing was implemented in the centers. All platelet concentrates are leukocyte depleted during preparation. Pooled PC are derived from 5 –to 6 buffy coats. Immediately

after preparation of the PC, i.e. shortly after collection of a single-donor PC (SD-PC), and approximately 22 h after collection of whole blood for preparation of buffy-coat derived PC (BC-PC), 15-20 ml of the PC are transferred into an integrated (BC-PC) or sterile docked satellite bag (SD-PC). Samples are taken from this bag and divided over an aerobic and an anaerobic culture bottle ( $\pm 7$  ml/bottle). Then, the samples are monitored continuously during 5 days for bacterial contamination by the BacT/Alert microbial detection system (BacT/Alert 240, Bio-Merieux, France).

A quarantine period is not imposed on the PC. The PC may be issued once the culture has been started. However, at the time the PC is issued to the hospitals the culture must be negative. Negative cultures are followed-up for 5 days, i.e. the shelf life of the PC. When a

culture becomes positive, the respective vial is sent for confirmation to an independent reference laboratory and if the PC is available a new sample for culturing is taken. The PC concerned is blocked and destroyed when still in stock, or recalled. If the PC has already been administered to a patient, the treating physician is notified and asked to report adverse reactions, if any. Red cells from the same donations are blocked and recalled if gram-negative bacteria are identified.

Over a period of four years, the initial culture was found positive in 0.96 % of the 107,827 PC tested. The number of false-positive cultures (positive signal in the BacT/Alert system with no bacteria identified in the culture fluid) averaged 0.16% over 4 years, but was particularly high in 1999 (0.33% of the cultures) due to some software problems. After these problems had been resolved, the number of false positives gradually decreased to 0.05% in 2002. 59.9% of the bacterial contaminants were detected within 24 h of culture and

74.5% within 48 h of culture. The detection time is largely dependent on the type of bacteria. Most of the aerobic bacteria (83.9%) were detected within 48 h of culture and 67.9 % were detected within 24 h. However most of the anaerobic bacteria (74.5%), and some slowly growing aerobic bacteria (e.g. *Corynebacterium*), became detectable only after 2-4 days of culture .Gram-negative bacteria were identified 6 times over the 4-year period. In total, 52.4% of bacterial screen-positive PC could be blocked in the blood centers or returned after recall. Of the latter, a new sample for bacterial control culture was taken and for 75.6 % the contamination was confirmed. So far, we did not receive any report of an adverse reaction during or after the transfusion of PC for which the BacT/Alert signal became positive after transfusion of the unit. Furthermore, evidence for two confirmed incidences of false-negative results was also obtained in two patients (a transfusion reaction related to the PC transfusion was noticed). In both cases the same bacteria was identified in

the patients and in the PC, while the original cultures remained culture negative. In one case a defect of the platelet bag was noted.

In conclusion, screening for bacterial contamination is an effective strategy to prevent septic transfusion reactions to platelets because contaminated products are withdrawn before levels of bacteria become clinically significant. In order to decrease the rate of contaminated PC, we are considering the implementation of the diversion of the first 20 ml of whole blood from the main container. In Belgium, the storage time of PCs is legally limited to 5 days. However, as some strains of bacteria only become positive after a longer period of incubation (> 96 h), a prolonged storage time does not seem to be appropriate without testing for bacterial growth. The option to increase the maximum storage time of PC from 5 to 7 days has been included in the European Commission Directive, published this year, on the condition that bacterial contamination is detected or reduced.

Extension of the storage time of the PC will probably also increase the average storage time of the PC before transfusion. The storage time has an effect on the number and the function of the platelets in the PC. Therefore, there is some concern that extension of the average storage time would have an effect on the quality of the platelet product delivered.