

厚生労働科学研究費補助金

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

平成15年度医薬品等医療技術リスク評価研究事業

平成14年度医薬安全総合研究事業

## 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)

(H15-リスク-025)

(H14-医薬-016)

平成14-16年度 総合研究報告書

主任研究者 大戸 斉

(福島県立医科大学 輸血・移植免疫部)

平成17 (2005) 年 3 月

## 厚生労働科学研究費補助金

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  
平成 15 年度医薬品等医療技術リスク評価研究事業  
平成 14 年度医薬安全総合研究事業

# 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)

(H15－リスク－025)

(H14－医薬－016)

平成14－16年度 総合研究報告書

平成17(2005)年3月

### 【研究組織】

#### 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

#### 分担研究者

佐竹正博	東京都赤十字血液センター	副所長
浅井隆善	静岡県赤十字血液センター	所長
尾崎由基男	山梨大学医学部臨床検査医学講座	教授
高松純樹	名古屋大学輸血部	教授
宮田茂樹	国立循環器病センター輸血管理室	医長

## 目次

I. 総括総合研究報告書	
血小板製剤の有効期限延長と安全性確保に関する研究……………	3
大戸 斉	
II. 参考資料……………	13
III. 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……………	39
浅井隆善	
血小板製剤中での細菌の増殖……………	63
高松純樹	
血小板製剤の有効期限延長に関する血液センターからの視点と問題 ……………	71
佐竹正博	
血小板保存に伴う損傷、及び血小板機能の評価……………	77
尾崎由基男	
保存期間が濃厚血小板製剤機能に与える影響— ずり応力下血栓形 成能を用いた評価— ……	83
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長期保存 ……	99
大戸 斉	

# 総括研究報告書

## 厚生労働科学研究費補助金

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

平成 15 年度医薬品等医療技術リスク評価研究事業

平成 14 年度医薬安全総合研究事業

### 総括総合研究報告書

## 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)

(H15－リスク－025)

(H14－医薬－016)

#### 主任研究者

大戸 齊

福島県立医科大学 輸血・移植免疫部 教授

#### 分担研究者

佐竹正博

東京都赤十字血液センター

副所長

浅井隆善

静岡県赤十字血液センター

所長

尾崎由基男

山梨大学医学部臨床検査医学講座

教授

高松純樹

名古屋大学輸血部

教授

宮田茂樹

国立循環器病センター輸血管理室

医長

研究総括：

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破綻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、血小板製剤の有効期限を延長することは有力な対策の一つである。
2. 血小板製剤の血液センターにおける期限切れ廃棄率は1%から11%（平均5%）であり、欧米の15~18%と比較すると格段に低い。これは血液センターの活発な需給調整によって支えられている。
3. 血小板製剤の有効期限延長にあたって最重要課題は細菌混入の防止である。犬を用いた実験で採血の際に10~15mLの初流血を取り分けることで、皮膚切片や塗布細菌の混入を低減できることを証明した。
4. 低温増殖性が危惧されている *Yersinia enterocolitica* の除去には白血球除去フィルターの使用が極めて有効である。しかし、他の細菌（グラム陽性、グラム陰性）には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。フィルター部分の細菌培養への応用も考えられる。
5. 敗血症患者から得られたグラム陰性菌は菌株によって増殖パターンが大きく異なる。*Serratia marcescens* は半数の菌株で始めの数時間は測定感度以下に低下した後、V字状に増殖した。*Escherichia coli* と *Pseudomonas aeruginosa* は共に4株中3株で増殖しなかった。補体や抗体が関与する自己殺菌能が増殖抑制に関与していると推定される。
6. しかし、皮膚に常在するグラム陽性菌（*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*）は敗血症患者から得られた4種ずつの菌株を変えても、同じ菌種間では、菌株が異なってもほぼ一様に急速からやや急速な増殖パターンを呈した。血小板製剤の自己殺菌能は観察されなかった。
7. 血小板の保存により、P-selectin の発現は2日目より増加した。高ずり応力負荷による PECAM-1 (CD31、血小板血管内皮接着分子) の分解は保存7日目以降増加し、microparticle 産生と比例して血小板機能低下と相関する。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。
8. 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。
9. しかし、新しく開発された高酸素透過性バッグ (PO-80) 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。
10. 新バッグ (PO-80) 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

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、欧州の一部の国では、細菌培養試験を導入することですでに7日に延長している。世界的に安全性を確保して有効期限を7日間あるいはそれ以上に延長しようとする流れになっている。

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。

本研究班は2002年からは血小板製剤の有効

効期限延長の可能性・実現性と解決すべき問題の対応について研究を行ってきた。

## B. 研究方法

### 研究目標

1. 細菌混入防止対策と混入細菌除去技術
2. 長期間保存血小板の形態と機能の評価
3. 血小板製剤の長期保存条件の検討と保存保護液の改良、保存条件の改善

### 1. 細菌混入防止対策と細菌混入除去技術

#### 1) 血小板製剤の廃棄の実態調査

全国の赤十字血液センター内での期限切れ廃棄率と血液センター間の需給調整の調査を行った。

#### 2) 採血技術の工夫と向上

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

#### 3) 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。

#### 4) 病原体不活化技術の情報収集

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性

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した機能保存を目指す。

### 2) 血小板製剤保存液による血小板機能維持

情報收拾と導入の可能性を検討する。

## C. 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かった。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。

## D. 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接種細菌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。*Yersinia enterocolitica* を接種した血小板製剤に白血球除去フィルターを使用すると菌は完全に除去可能であることを示した。

しかし、血小板製剤に *Serratia marcescens* 菌を接種すると、一旦数分の1から数百分の1まで減少するものの、3時間～10時間後ごろから再増殖する。除去は不可能であった。また、フィルター一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臨床分離株グラム陰性菌を用いて検討した。*Serratia marcescens* の4株中2株は接種直後から対数増殖を示し、残りの2株ははじめの数時間は一旦検出感度以下に減少した後V字状に対数増殖した。*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* はそれぞれ、4株中1株は対数増殖をしたが、残りの3株



は自然滅菌された。

やはり臨床分離株であるグラム陽性菌 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。すべて良く増殖した。*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、増殖態度は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

初年度は血小板製剤の需給の実態と廃棄血小板製剤について調査した。1999 年から血小板献血者は約 78 万人で一定し、供給本数は約 70 万本 (790 万単位) である。血液センターにおける期限切れ廃棄率は 1.2%~10.6% (2001 年) で、全体を平均するとおよそ 5% になるが、欧米の 17~18% と比較して格段に低い。これは血小板製剤の地域を越えた活発な需給調整に拠っている。ブロック域内を含む血小板製剤受け入れ率は 1.3%~20.2% (2001

年) となっていた。需給調整による搬送経過で医療機関に届けられた時点で残された有効期間はさらに短縮されていることも想像に難くない。

2 年次は初流血取り分けによる細菌汚染低減効果を評価した。イヌを用いて初流血を側副バッグに誘導すると塗布した皮膚常在菌は 27mL 以降は全く検出されなくなり、また検出菌数は採血初期ほど多かった。切り取られた皮膚切片は 1 例を除き、最初の 10mL 以内に回収された。

3 年次は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 liquefacince* 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 marcescens* 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

ADP による血小板凝集は保存2日目から低下するが、コラーゲンによる血小板凝集能は7日まで保たれていた。P-selectin の発現は2日目より増加し、保存期間とともに増加傾向を示した。高ずり応力による PECAM-1 の分解は7日目から増加し、血小板 microparticle の産生と比例した。

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保存されたことから、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。血液疾患などの出血予防的投与で

は問題とならない可能性が高いが、心臓外科領域の手術時など活動性大量出血時には不可逆的な血小板機能低下が問題となる可能性がある。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る。

#### 6) 大戸 齊 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バッグとして承認) と比較してもより優れていた。

血小板製剤中の pH、血液ガス分圧 (pO<sub>2</sub>/pCO<sub>2</sub>)、glucose/乳酸濃度、swirling、P-selectin、低浸透圧回復能 (%HSR)、血小板凝集能などの *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能力が示された。酸素透過性を高めることにより、血小板の嫌気性代謝を抑制し、medium の pH の変化を最小に留める効果と考えられる。*in vivo* スタディ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世界中で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。ヨーロッパの他の国々も追随を検討している。

日本ではB型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、免疫不全ウイルスに対しウイルス核酸試験(NAT)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%(センター5~6%、医療機関で2~3%)ほどに達している。佐竹班員は国内赤十字血液センターにおける期限切れ廃棄率は5%と、欧米各国の15%以上と比較して格段に低いことを明らかにした。しかし、同時にこの数字は活発なセンター間の需給調整によって辛うじて支えられていることも明らかになった。

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最も重要な問題は輸血細菌敗血症の回避のための細菌混入の防止である。佐竹班員はヨーロッパで急速に普及してきた初流血の取り分けが細菌混入防止に極めて有効であることをイヌを用いた実験で明らかにした。

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。理由として日本の血小板製剤はほぼ100%が成分採血由来であるためと、3日間の有効期限に設定しているためである可能性もある。

高松班員は敗血症患者からの臨床分離菌を用いて血小板製剤に接種実験を行った。グラム陰性菌は増殖しない場合も多く、*Escherichia coli*、*Pseudomonas aeruginosa* はともに1株は対数増殖をしたが、残りの3株は自然滅菌された。*Serratia marcescens* の4株中2株では検出感度以下に減少した後にV字状に対数増殖した。

一方、常在菌であるグラム陽性菌を用いると、*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* と *Staphylococcus epidermidis* は緩徐に増殖した。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。

佐竹班員も血小板製剤に各種細菌を接種してその増殖態度を観察した。*Staphylococcus aureus* は最急速に、*Streptococcus epidermidis*、と *Streptococcus pneumoniae*、*Bacillus cereus* はやや早い増殖態度を示した。*Serratia liquefaciens* の増殖は早く、低温度でも増殖する。*Serratia marcescens* も低温度で増殖し、赤い色素を産生する。*Pseudomonas*

*aeruginosa* は増殖しがたい。凝集塊の形成など肉眼的観察も重要である。

たとえば、細菌混入がおきても何らかの操作により細菌除去が可能であれば問題は解決される。浅井班員は細胞内に存在する菌である *Yersinia enterocolitica* 菌への白血球除去フィルターによる有効性（細菌除去）を証明した。しかし、細胞外で増殖する *Serratia marcescens* 菌には無効である。この細菌は医療現場で院内感染を引き起こし、時として致死的な反応を呈する。血小板製剤に *Serratia marcescens* 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数分の 1 に減少したものの、完全除去は不可能であった。

血小板の有効期限を延長した場合の止血効果について、臨床医からは不安の声が聞かれる。血小板機能を損なうことなく有効期間を延長可能とする技術についても研究を行った。

宮田班員は血小板血栓 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。とくに活動性出血患者には不利益が予想され、血小板製剤の延長期限

延長には機能面から改良保護する新たな付加手段が必要であるとした。

尾崎班員は保存に伴って、P-selectin の増加、PECAM-1 の分解が良い指標になることを見いだした。さらに、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機能保持に有用であることを見出した。

大戸班員は保存バッグのガス透過性の向上によって、高単位血小板製剤であっても各種血小板機能面から 5 日間保存は充分可能であることを証明した。さらに新しく開発した高酸素透過性バッグ（PO-80）を用いれば、好気性代謝が良好に維持され、嫌気性代謝は抑制され、その結果乳酸生成は最小となり、保存液中 pH は適正範囲にとどまり、9 日間保存も可能であることを示した。

## 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.
  3. Satake M. Infectious risks associated with the transfusion of blood components and pathogen inactivation in Japan. International Journal of Hematology 2004;80:306-310.
  4. Satoh K, Yatomi Y, Kubota F, Ozaki Y. Small aggregates of platelets can be detected sensitively by a flow cytometer equipped with an imaging device: mechanisms of epinephrine-induced aggregation and antiplatelet effects of beraprost. Cytometry 2002;48:194-201.
  5. Kaneko M, Cuyun-Lira O, Takafuta T, Suzuki-Inoue K, Satoh K, Arai M, Yatomi Y, Ozaki Y. Mechanisms of platelet retention in the collagen-coated bead column. Journal of Clinical and Laboratory Medicine 2003;142:258-267.
  6. Satoh K, Yatomi Y, Osada T, Takeda S, Tsuruguchi N, Kubota, F, Ozaki Y. Clear visual detection of circulating platelet aggregates in acute myocardial infarction using a flow cytometer equipped with an imaging device. Platelets 2004;15:61-62.
  7. Naganuma Y, Satoh K, Yi Q, Asazuma N, Yatomi Y, Ozaki Y. Cleavage of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) in platelets exposed to high shear stress. Journal of Thrombosis and Haemostasis 2004;2:1998-2008.
  8. Takano K, Asazuma N, Satoh K, Yatomi Y, Ozaki Y. Collagen-induced generation of platelet-derived microparticles in whole blood is dependent on ADP released from red blood cells and calcium ions. Platelets 2004;15:223-229.
  9. 大戸 齊. 血小板輸血と細菌感染. 血液フロンティア. 2003;13:643-649.
  10. 松田好美, 首藤加奈子, 佐竹正博, 荒川典雄, 田所憲治, 十字猛夫: 初流血除去回路つき採血バッグによる皮膚常在菌および皮膚片の混入の防止. 日本輸血学会雑誌 2003;49:761-766.

(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 資. 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 2003;49(2):247.
  2. 大戸 資. 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.
  3. 伊藤貴俊、大戸 資、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.
  4. 山本 賢、吉村尋典、大戸 資、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.
  5. 大戸 資. 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.
  6. 宮田茂樹、亀井政孝. 人工心肺使用時における輸血. 日本輸血学会雑誌 2004;50(2):208.
  7. 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.
  8. Miyata S, Yamamoto 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。

## 参考資料

1. 大戸 齊：血小板輸血と細菌汚染. 血液フロンティア 13:643-649, 2003.
2. 松田好美、首藤加奈子、佐竹正博、荒川典雄、田所憲治、十字猛夫：初流血除去回路つき採血バッグによる皮膚常在菌及び皮膚片の混入の防止. 日本輸血学会雑誌 49:761-766, 2003.
3. 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*. 126:153-159, 2004.
4. 新聞記事 「血小板の使用延長可能、保存バッグ改良7日間に」  
福島民報 2003年9月11日
5. 医学新聞記事「血小板濃厚液の有効期限延長の具体案を提示」  
Medical Tribune 2004年7月15日

## 5. 血小板輸血と細菌感染

大戸 齊\*  
Ohto Hitoshi

\*福島県立医科大学附属病院輸血・移植免疫部 教授

**Summary** 血小板の有効期限を5日から7日に延長しようとする世界的な動きがある。現在、日本では血小板の有効期限は3日であるが、ウイルス核酸検査の影響もあり、血小板の需給に困難が生じつつある。ごく稀に輸血後に細菌敗血症が発生することがあり、死亡に至ることもある。通常、血液に少量の皮膚常在細菌が混入していても、血漿中の抗体と補体によって殆どは溶菌・死滅してしまうが、残存して増殖すると輸血敗血症を来す。日本のアフェレーシス血小板の細菌汚染率は極めて低い(1/10,000本)が、技術の向上(採血手技、製造工程、検査手段など)を加えることによって、5日(～7日)への延長が期待される。

### はじめに

1980年代初め、米国では輸血用血小板は7日間まで使用されていたが、細菌敗血症が多発したため、5日間の有効期限となっている。しかし、欧州・米国では7日間への有効期限延長を視野に入れた方策が盛んに検討されるようになってきた。米国では現時点で製造した血小板の18%が期限切れで廃棄されている一方、不足状態も多く発生しているといわれる。

日本においては、血小板の期限は3日間と非常に短く設定されているが、病院での廃棄は0.5%、

血液センターでは1%以下と推定され、さほど大きくはない。しかし、高齢者の増加と若青年者の減少によって、近い将来に輸血血液需給のアンバランスが危惧されている。さらに、1999年から導入された輸血関連ウイルス[B型肝炎ウイルス(hepatitis B virus: HBV)、C型肝炎ウイルス(hepatitis C virus: HCV)、ヒト免疫不全ウイルス(human immunodeficiency virus: HIV)]に対する核酸検査に運搬を含め1日ほど要することから、血小板製剤の実質的な有効期間は24～36時間と短くなり、地域や季節によっては円滑な供給は大変厳しくなっている。緊急患者に輸血が間に

### 《略語一覧》

HBV (hepatitis B virus ; B型肝炎ウイルス)

HCV (hepatitis C virus ; C型肝炎ウイルス)

HIV (human immunodeficiency virus ; ヒト免疫不全ウイルス)



合わない場合も見聞される。

血小板の有効期限延長を念頭において、クリアすべき最大の問題である細菌敗血症の現状を述べ、考えられる対策をレビューしたい。

### 1. 血液製剤の細菌感染率

表1に主な輸血用血液の世界と日本の細菌検出率を示す。日本では赤血球濃厚液の細菌検出率は世界の約10倍高いが、逆に血小板(アフエーシス)は約10分の1と逆転している。致死的な輸血

敗血症の発生は少ない。短い有効期限(赤血球21日、血小板3日)のために発生自体が少ないとも推定されるが、実際には血液の細菌汚染が起きていても、低濃度で症状が軽いため気付かなかつたり、臨床的技術(バッグと患者の細菌培養)の未徹底などのために実発生数よりも少ない underdiagnosis も考えられる。しかし、血小板は室温で保存されるため、保存中の増殖スピードが早く、発症すると重症になりやすいとも言われている。おおまかに、重症輸血感染症は血小板5万回に1回、赤血球50万回に1回発生するといわれる。

表1 世界と日本における輸血血液の細菌検出率<sup>1)~4)</sup>

	世界(日本を除く)			日本		
	検出数	検査数	10万本あたり	検出数	検査数	10万本あたり
全血 <sup>1), 4)</sup>	76	3,385	2,245	2	6,977	28.7
赤血球 <sup>1)~3)</sup>	1	38,475	2.6	53	137,496	38.5
血小板 <sup>1)~3)</sup>						
プール	64	188,958	33.9	—		
アフエーシス	37	43,853	84.4	1	10,750	9.3
新鮮凍結血漿 <sup>3)</sup>	—			7	21,813	32.1

↓当該製剤：照射赤血球M・A・P「日赤」      ↓発見年月：2001年10月  
 ↓発見時の保存日数：採血後14日              ↓保管管理：4～6℃で保存  
 ↓検出菌：Serratia liquefaciens

※本事例では、セグメント中の血液(赤血球層)とバッグ中の血液の色調が異なっていました。

【参考】 正常品

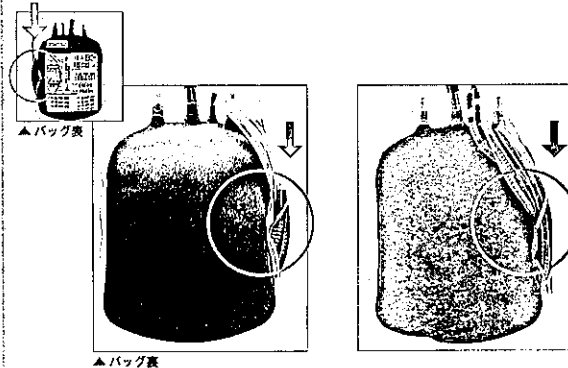


図1 赤血球濃厚液の細菌感染

左図は、Serratia liquefaciens に感染して黒色に変化した赤血球濃厚液。本体は変色しているが、セグメント部分は通常の赤色であるのが特徴的である。(文献3より引用)

参考までに図1に *Serratia liquefaciens* に感染して、黒色に変化した赤血球濃厚液を示す。本体は変色しているが、セグメント部分は通常の赤色であるのが特徴的である。血小板製剤ではスワーリング現象（正常血小板は光にかざすときらきらと輝く）が消失するのがある程度目安となる。

## 2. 輸血細菌敗血症の症状

米国食品医薬品局（Food and Drug Administration: FDA）に報告された1985年から1999年までの致死性輸血副作用694件のうち、細菌汚染は77件と一割以上を占め、溶血に次いで多かった<sup>1)</sup>。英国の重症輸血反応（Serious Hazards of Transfusion: SHOT）プログラム報告（1996年から1999年まで）によると、致死反応28件中細菌汚染は3件であった。1998年から2000年まで米国で実施されたBaCon研究<sup>5)</sup>によれば、34例の輸血細菌感染（うち血小板29例）が発生し、9例（うち血小板6例）が死亡に至っている（表2）。フランスでは1996年から1997年までの33例の死亡のうち、5例は細菌汚染血によるものであった<sup>1)</sup>。日本では輸血関連死亡は公表されていないので、どの程度のマグニチュードを有しているかは不明であるが、他の先進諸国のデータからは輸

血敗血症は重要な問題であることが窺われる。血小板輸血が原因と疑われる死亡例が発生している（星 順隆教授、私信）が、詳細は不明である。

輸血血液が細菌に汚染していると、初期症状は輸血開始2時間以内に悪寒・発熱、引き続いて低血圧、嘔気・嘔吐、呼吸器症状（呼吸困難、喘鳴）、下痢、ショックを呈するが、症状を呈さないことも多いと言われる。症状の重症度は菌種（グラム陰性菌が重症化しやすい）、菌数、増殖スピード、受血者の感染免疫状態などの因子によっても異なってくる。しかも、輸血菌血症は臨床現場では、十分には認識されていない。特に血小板輸血では非溶血性発熱反応が稀ではないので、発熱反応が起きても細菌検査を実施することは少なく、外国でも実際より underreport にあるといわれている。

## 3. 細菌混入の原因と対策

細菌汚染については以前より対策が立てられ効果を上げてきたが、現在進行中あるいは近い将来に導入される可能性がある対策について表3に示す。対策としては大きく分けて、①細菌混入の回避、②製造工程・貯蔵法の変更、③混在細菌の検出、④ドナー数の削減があげられる。

### ① 細菌混入の防止

細菌混入の防止は最も本質的な予防法である。例外的な事象（血液バッグ製造工程での汚染<sup>6)</sup>）を除けば、細菌混入の原因の殆どはドナー（流血中と皮膚）に由来する。ドナー問診の強化は、何らかの症状がある菌血症ドナーを排除することであるが、問診項目を増やしても、あるいはスクリーニングに特異抗体を用いても *Yersinia enterocolitica* 保菌者検出に効果は認めなかった<sup>1)</sup>。

表2 重篤輸血細菌汚染の頻度<sup>5)</sup> (1998.1～2000.12)

	輸血本数	発症症例数	死亡症例数
赤血球 [10万本あたり]	23,711,169	5 0.02	3 0.01
血小板 [10万本あたり]	2,838,396	29	6
プール		1.06	0.22
アフエレーシス		1.00	0.19

### 【略語一覧】

FDA (Food and Drug Administration ; 米国食品医薬品局)

SHOT (Serious Hazards of Transfusion ; 重症輸血反応)

表3 血小板輸血における細菌混入リスクを減少させる手段(文献1を改変)

1. 血液製剤の細菌混入防止
a. ドナースクリーニングの向上
b. 穿刺部位の消毒技術向上
c. 採血初めの血液棄却
2. 製造・保存工程の変更
a. 保存温度の低温移行
b. 白血球除去技術の応用
c. 保存期限の短縮
d. 病原体の不活化
3. 輸血前細菌検出
a. 視診
b. エンドトキシン検出
c. 塗抹染色
d. リボゾームアッセイ
e. NAT検査
f. 細菌培養
g. 酸素消費アッセイ
4. ドナー数の削減
a. 輸血適応の厳格化
b. 輸血トリガー値の下方移行
c. アフェレーシス由来製剤の使用

皮膚常在菌を除菌する消毒法としては、穿刺部位をまず70%イソプロピルアルコールで強くこすり、次に2%ヨードチンキを用いるのが最も効果的と報告されている<sup>7)</sup>。日本でも、それまで採用していた0.5%グルコン酸クロロヘキシジナルアルコールが無効である *Bacillus cereus* による血小板細菌汚染例<sup>8)</sup>(輸血前に発見された)を契機に消毒法が変更された。

細菌が混入する場合でも血液の最初の10~15mLにだけ細菌が検出されるので、この10~15mLを別の小バッグに導き、その後に本体に採血する方法が注目されている。この方法により、全血の細菌混入率を1/4少なく(0.39%から0.29%へ)できたという<sup>9)</sup>。この方法はアフェレーシス血小板に応用されようとしている。また、最近の論文<sup>4)</sup>には採血後まもなく検査すると全血で

の細菌検出率は2.2%と決して珍しくなく、保存の過程で多くは死滅していくことも示している。

#### ② 製造・保存工程の変更

細菌増殖を抑えるために、血小板の保存温度条件(22℃前後)を低温域(可能ならば4℃)にシフトできないかといくつかの試みがなされたが、いずれも実用化されていない。血小板を低温で保存すると血小板生存率が低下し、止血能も悪化する。

白血球除去フィルターが副次的に細菌除去、あるいは細菌除去フィルターの開発が期待されている。これまでに既に *Yersinia enterocolitica* については白血球除去フィルターの有効性が証明されている<sup>10)</sup>。その他の細菌にも応用が可能である。事実、全血液製剤に保存前白血球除去を導入したフランスにおいては輸血細菌汚染が3.8%から1.7%へ66%減少し、輸血関連発熱反応(このうちの何割かは輸血細菌感染と推定される)も41%減少したと報告されている<sup>11)</sup>。現時点では、全血採血後、室温で少なくとも8時間経過した後に白血球除去フィルターを用いることが推奨されている<sup>12)</sup>。

日本は先進国の間でも最も贅沢に(過敏に)血液の有効期限を設定している。赤血球は採血後21日、血小板は3日である。米国においては血小板は一時期7日間まで使用が許可されていたが、細菌汚染が多いとの理由で1985年以降5日間となっている。世界的に血小板の有効期限は5日である。これまで、血小板の細菌敗血症発生と保存日数は比例すると思われていた。ところが、Ba-Con 研究報告<sup>5)</sup>によれば、血小板輸血細菌汚染は保存期間2日が3件、3日が2件、4日が1件で、保存期間とは関連が薄く(全体の保存日数ごとの輸血数が不明なので、真の危険率は不明)、むしろ保存期間よりもグラム陰性菌が重要であった(後述)。実験的混入試験でも細菌数は必ずしも保存日数に比例して増殖するわけではなく、とくに増殖スピードが早い菌では2~3日後にプラトーに

達して、それ以上は増えない場合も多い<sup>12)</sup>。

近年、微生物を不活化する技術が急速に進歩してきた。現在、紫外線 B 照射、リボフラビン+可視光線、ソラレン（またはその誘導体）+紫外線 A、メチレンブルー、フタロシアニンが、微生物（ウイルス、細菌、原生動物）とリンパ球を不活化し、いくつかは治験段階で評価を受け、血小板製剤への応用が間近となっている。動物実験では血小板の止血機能が十分保持されているという。既に、ヒトにこれら化学物質で処理された血液を輸血することには、ドイツなど欧州では新鮮凍結血漿の微生物不活化に広く採用されているが、危険の念が残る。添加した化学物質を完全に除去することは可能なのか、それらが微量でも残存して長期的に受血者の遺伝子を傷つけることはないのか、また、プールして不活化するならばプリオンのような抵抗性の病原体が混入した場合に多数の受血者に被害を拡大することはないのか、などの疑問が完全に払拭されなければ、この技術を急いで日本の輸血制度に導入する必要性は感じない。

### ③ 細菌の輸血前検出

健康なドナーの消毒した皮膚を穿刺して採血するので、血液製剤中の細菌混入はあっても極少量であるために、細菌検出には高感度な検出力が要求されるはずである。しかし、細菌培養によって陽性となる菌種の多くは皮膚常在菌であるので、検査手技上のコンタミネーションによる false positive と区別が難しい。逆に血漿を含んだ状態で保存されれば、細菌に対する抗体と補体による溶菌、さらに好中球によって貪食・殺菌された死菌はもはや無害であって、核酸増幅検査（nucleic acid amplification testing：NAT）で菌の DNA 痕跡を検出しても臨床的には無意味である。事実、血小板採血の翌日に培養すると 0.6% に細菌が検出されるが、8 日目に再検査すると全例で陰

性化し、輸血しても無害であったと報告されている<sup>2)</sup>。検出される菌の 81% はグラム陽性菌（その 8 割はコアグラーゼ非産生ブドウ球菌）で、14% は *P. acnes*、5% だけがグラム陰性菌であったとのフランスからの報告がある<sup>4)</sup>。

混入している細菌を検出するいくつかの手技が提案されているが、いつ検査するのかは問題である。また、検査の結果を得るまでに長い時間を要するのであれば意味をなさない。この点を考慮して採血 3 日目に細菌検査を施行して陰性ならば、7 日まで使用期限を拡大するという案が提案されている<sup>1)</sup>。

### ④ ドナー数の削減

ドナー数削減に関しては、日本は諸外国よりも先進的である。既に 1990 年頃には血小板はほぼすべてアフエレーシスに移行している。表 1 に示したデータではアフエレーシス由来血小板の優位性は認められないが、1987～88 年の血小板輸血敗血症は年間 3 件（1/4,800 本）から 1997～98 年は年間 1 件（1/15,000 本）に減少をみた観察がある<sup>13)</sup>。アフエレーシス由来血小板が 52% から 99% に上昇した好影響と推定されている。

血小板使用に関してのアプローチには輸血適応基準の厳格化、輸血トリガー値の低め誘導があげられる。とくに、出血していない内科的な予防的血小板輸血の閾値をどこに置くべきかは最近盛んに論議され、再生不良性貧血では 5,000/ $\mu$ L、白血病では 10,000/ $\mu$ L まで下げても出血頻度は増加しない<sup>14)</sup>と言われている。

## 4. 菌種と輸血敗血症の重症度

輸血血液が細菌に汚染されていても、必ずしも症状が発現するとは限らない。受血患者の転帰は種々の因子によって影響される。患者側では汎血

【略語一覧】

NAT (nucleic acid amplification testing；核酸増幅検査)