

球減少症, 免疫抑制性薬剤の使用, 血液側ではプール血小板, 2日以上保存血小板, 9日以上保存赤血球, 21回以上献血者からの血液が危険因子と同等されている^{5,15)}。

また, 死亡にまで至る危険因子にはグラム陰性菌(78%), 血小板では保存期間が短いもの(中央値2.5日), 輸血開始短時間で症状発現した場合(中央値23分), 輸血少量で症状発現した場合(中央値86mL), 老人(中央値74歳)があげられている⁹⁾。とりわけ, 病態を悪化させるのはグラム陰性菌が産生するエンドトキシンである。

上記論文で致死的な血小板輸血敗血症を来した菌はグラム陰性が7例(*Serratia marcescens* 3件, *Enterobacter cloaca* 1件, *Providencia rettgeri* 1件, *Escherichia coli* 1件, *Klebsiella oxytoca* 1件)で, グラム陽性菌はGroup B *Streptococcus* 1件だけであった。ちなみに, 日本で1998~2000年に抜き取り検査をした血小板製剤から検出された菌種はニキビ菌とも言われる *Propionibacterium acnes* 1件だけである⁹⁾。

日本では赤血球濃厚液から検出された53件のうち, 45件は *P. acnes* で欧米とは異なっている。日本で輸血敗血症の重篤例報告が少ないのは *P. acnes* が嫌気性菌で好気状態では増殖スピードが遅く, かつエンドトキシンを産生しないためかもしれない。ただし, 輸血で敗血症が発生する可能性があること自体が知れ渡っていないために, たとえ発生しても, 当該血液バッグを残す, 患者の細菌培養を行う, 検出された菌を保存して後のDNAシーケンシングに備えるなどの診断手技がなされていないことも理由の一つであろう。

おわりに

輸血細菌感染症は稀ではあるが, 発症すると重篤化しやすい。細菌検出率は日本の赤血球からは1万本あたり4本, 血小板からは1万本あたり

0.9本であるが, 症状を呈するのはこの1/100以下である。エンドトキシンを産生する皮膚常在グラム陰性菌が危険である。

一方, 日本の急速な高齢社会化に伴って, 血小板も含め輸血血液の需給は急速に悪化すると予想されている。技術の向上(採血手術, 製造工程, 検査手技など)を加えることによって, 現在3日間の血小板の有効期限を5日(あるいは7日)に延長することが期待されている。

文 献

- 1) Blajchman MA, Goldman M: Bacterial contamination of platelet concentrates: Incidence, significance and prevention. *Sem Hematol* 38: 20-26, 2001
- 2) AuBuchon JP, Cooper LK, Leach MF, et al: Experience with universal bacterial culturing to detect contamination of apheresis platelet units in a hospital transfusion service. *Transfusion* 42: 855-861, 2002
- 3) 日本赤十字社中央血液センター: 主な輸血用血液の無菌試験結果について。輸血情報 0203-69
- 4) Perez P, Bruneau C, Chassaigne M, et al: Multivariate analysis of determinants of bacterial contamination of whole-blood donations. *Vox Sang* 82: 55-60, 2002
- 5) Kruehnet MJ, Roth VR, Haley R, et al: Transfusion-transmitted bacterial infection in the United States, 1998 through 2000. *Transfusion* 41: 1493-1499, 2000
- 6) Heltberg O, Skov F, Gerner-Smidt P, et al: Nosocomial epidemic of *Serratia marcescens* septicemia ascribed to contaminated blood transfusion bags. *Transfusion* 33: 221-227, 1993
- 7) McDonald CP, Lowe P, Roy A, et al: Evaluation of donor arm disinfection techniques. *Vox Sang* 80: 135-141, 2001
- 8) 三谷孝子・橋本浩司・千葉真彰ほか: 濃厚血小板製剤の細菌汚染—血小板献血由来血小板製剤で経験した一事例—。日輸血会誌 42: 294-298, 1996
- 9) de Korte D, Marcelis JH, Soeterboek AM: Determination of the degree of bacterial contamination of platelet concentrates. *Transfusion* 42: 855-861, 2002

- tion of whole-blood donations. *Transfusion* 41 : 74-81, 2001
- 10) Kim DM, Brecher ME, Bland LA, et al : Prestorage removal of *Yersinia enterocolitica* from red cells with white cell-reduction filters. *Transfusion* 32 : 658-662, 1992
 - 11) Andreu G, Norel P, Forestier F, et al : Hemovigilance Network in France : Organization and analysis of immediate transfusion incident reports from 1994 to 1998. *Transfusion* 42 : 1356-1364, 2002
 - 12) Brecher MK, Holland PV, Pineda AA, et al : Growth of bacteria in inoculated platelets: implications for bacterial detection and the extension of platelets storage. *Transfusion* 40 : 1308-1312, 2000
 - 13) Ness P, Braine H, King K, et al : Single-donor platelets reduce the risk of septic platelet transfusion reactions. *Transfusion* 41 : 857-861, 2001
 - 14) Callow CR, Swindell R, Randall W, et al : The frequency of bleeding complications in patients with haematological malignancy following the introduction of a stringent prophylactic platelet transfusion policy. *Br J Haematol* 118 : 677-682, 2002
 - 15) Perez P, Salmi R, Follea G, et al : Determinants of transfusion-associated bacterial contamination : results of the French Bacthem Case-Control Study. *Transfusion* 41 : 862-872, 2001

報 告

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

松田 好美¹⁾ 首藤加奈子²⁾ 佐竹 正博¹⁾
荒川 典雄³⁾ 田所 憲治⁴⁾ 十字 猛夫⁵⁾

¹⁾東京都赤十字血液センター

²⁾東京都東赤十字血液センター

³⁾テルモ(株)研究開発センター

⁴⁾東京都西赤十字血液センター

⁵⁾日本赤十字社中央血液センター

(平成 15 年 4 月 23 日受付)

(平成 15 年 8 月 27 日受理)

REDUCTION OF BACTERIAL CONTAMINATION USING A BLOOD COLLECTION SYSTEM WITH INTEGRATED PRE-DONATION DIVERSION POUCH

Yoshimi Matsuda¹⁾, Kanako Shuto²⁾, Masahiro Satake¹⁾,
Norio Arakawa³⁾, Kenji Tadokoro⁴⁾ and Takeo Juji⁵⁾

¹⁾Tokyo Metropolitan Red Cross Blood Center

²⁾Tokyo East Red Cross Blood Center

³⁾Terumo Corporation R & D Center

⁴⁾Tokyo West Red Cross Blood Center

⁵⁾Japanese Red Cross Central Blood Center

In order to decrease the contamination of blood components by bacteria, a diversion pouch-integrated blood collection system is being introduced to blood donation programs in some countries in Europe. The system is designed to collect the first 20~30 mL of blood into a diversion pouch before blood collection, thereby eliminating the blood that may be contaminated by the highest number of bacteria residing on the skin. To verify the efficacy of this system on bacterial removal, blood aliquots drawn from the bacteria-coated jugular vein of dogs were serially cultured. It was observed that the number of cfu of bacteria decreased as the pre-donation sampling volume increased and no bacterial colony was detected in tubes after diversion of the first 27.0 mL of blood. A blood collection kit for platelet apheresis was integrated with this satellite bag circuit and was tried on a volunteer for platelet collection. No serious problems were encountered except for the unusable volume of 20 mL of blood collected in the pouch. The strategy of discarding the first 20~30 mL of blood before collection may decrease the rate of bacterial contamination of blood components, especially of apheresis-derived platelet concentrates.

Key words : bacterial contamination, blood donation, skin disinfection, diversion pouch

1. 緒 言

輸血によるウイルス感染症が、スクリーニング法の発達にもなって激減したのに伴い、細菌感染症が大きくクローズアップされてきた。実際、輸血による敗血症の頻度は、アメリカ合衆国では血小板製剤輸血5万回につき1回、赤血球輸血50万回につき1回ともいわれ、輸血製剤の安全性を脅かす大きな要因となっている¹⁾²⁾。

輸血用血液製剤の細菌汚染を防ぐ方法には、1) 採血時に混入を防ぐ、2) 細菌の増殖を最小限に抑える、3) 汚染した製剤を検出する、4) 細菌を何らかの方法で死滅させる、などの方法があるが、採血血液中への細菌の混入を防ぐことができればその後の戦略はほぼ不要となり、おそらくもっとも安価で、もっとも本質的な予防法であろう。特に血小板製剤は常温で保存されるので、いったん菌が混入すれば保存中に極めて速い速度で増殖し、臨床的に敗血症や菌血症を引き起こす濃度に容易に達し得る。

輸血用血液製剤に混入する菌として重要なものに皮膚に存在する菌があるが、これらの菌の製剤への混入は、穿刺部の皮膚の消毒を厳重にすることによって少なくできるはずである。日本赤十字社の血液センターでは、1999年に、皮膚消毒薬をそれまでのヒビテンから、より殺菌力が強くスペクトラムが広いポビドンヨードに変え、また皮膚消毒法についても職員の教育訓練を徹底してきた。それにもかかわらず、センター内での工程検査として行われる定期的な無菌試験では、皮膚常在菌による培養陽性例が報告されている³⁾。その原因の一つは、穿刺針が皮膚を穿刺する際に不可避免的に皮脂腺を通過することや、穿刺針で切り取られる小皮膚片がバッグ内に混入することにあると考えられている。

このため、採血の際、最も細菌が高濃度であると思われる初めの20~30mLを側副のバッグにとりわけ、その後に本バッグに採血する方法が考え出された⁴⁾。ヨーロッパではすでに実用化され、多くの血液センターで日常の業務に取り入れられているが、我々も日本の血液事業へ適用する上で、その効果を確認し、取り扱い方を検証する必要が

あると考え、イヌを用いた動物実験を行い、またこのシステムを取り入れた成分採血キットを用いて実際の採血に支障がないかどうかを確認した。

2. 材料および方法

(1) 細菌の塗布と採血

イヌの頸部に細菌を一定量塗布し、そこから採血を行った。

実験動物には体重22.0~28.5kgの雌雄の雑種秋田犬(セイケン資材)を用いた。ベントバルビタール(25~30mg/kg 大日本製薬)の腹腔内投与にて全身麻酔を行い、頸部を電気バリカン及び安全カミソリで剃毛したのち、細菌を塗布した。使用した菌は、表皮ブドウ球菌 *Staphylococcus epidermidis* (ATCC14990)、黄色ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus* (ATCC29213)、及びアクネ菌 *Propionibacterium acnes* (ATCC11827)の3種である。一定濃度に希釈した菌液を綿棒で皮膚上に塗布し、ドライヤー(冷風)で乾燥させて細菌を皮膚につけた。塗布菌数は塗布前後の綿棒の重量を測定し、その差を塗布面積で除して求めた。

頸静脈を17G採血針で穿刺し、初流血液除去回路(Fig.1)を使用して採血した。採血開始後の血液を初流血除去側の回路に通し、約4.5mLずつ5本の無菌試験管に採取した後、本採血側の回路に切り替え、さらに同量ずつ5本、計10本を採集した。試験管には抗凝固剤としてACD液0.5mLをあらかじめ加えておいた。各菌種、各塗布菌数について2例ずつ実験を行った。これらは「実験動物の飼育および保存等に関する基準」に基づいた施設ガイドラインに則って行った。

(2) 培養

採血した試料は直ちに培養に供した。除去回路側の1~5本目は、表皮ブドウ球菌と黄色ブドウ球菌についてはBHI寒天培地(ニッスイ)、アクネ菌についてはGAM寒天培地(ニッスイ)で嫌気培養し、培地上に発育した菌数を計測して血液1mL中に存在した生菌数を求めた。本採血側の6~10本目の試料は無菌性の確認を血液培養用のカルチャーボトル(栄研化学)を用いて行った(Table 1)。

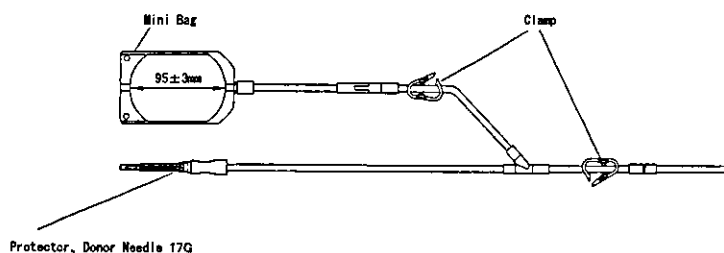


Fig. 1 Diagram of the blood collection kit with integrated diversion pouch.

Table 1 Bacteria and culture conditions used for the animal experiment

bacteria	No. of applied bacteria (cfu/cm ²)	media	Culture conditions
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	10 ⁴ , 10 ³ , 10 ²	BHI agar	37°C, 24h
<i>Staphylococcus aureus</i>	10 ⁴ , 10 ³	BHI agar	37°C, 24h
<i>Propionibacterium acnes</i>	10 ⁴ , 10 ³ , 10 ²	GAM agar	37°C, 96h, anaerobic

(3) 皮膚片除去の確認

ラットの背中部分の皮膚を剃毛後、皮弁を切り取り、円筒状の16ゲージ針でパンチカットして小皮膚片を作成した。この皮膚片を、視認性をよくするために1% トリジンブルーで染色した。これを、初流血除去回路付き血液バッグと同一のY字管分岐路のついた17G採血針の中に挿入し、イヌの前腕部静脈より血流量0.5~1.0mL/秒で採血し、5mLずつのフラクションを計50mL採血した。各フラクションの血液をガーゼで濾過し、ガーゼ上に回収される皮膚片を目視でみつけることにより、どのフラクションで除去排出されたかを確認した。全部で15例の試験を実施した。

(4) ボランティアによる成分採血

テルモ社の成分採血用キットに初流血除去回路を組み込んだものを成分採血装置テルシスに装着し、ボランティアの肘静脈に穿刺した。この際、初流血を除去し、その実際の諸手順を検討した。

3. 結果

(1) 表皮常在菌の除去効果

表皮ブドウ球菌、黄色ブドウ球菌及びアクネ菌の何れの場合も、皮膚表面付着菌数が10⁴/cm²以下であれば、採血を開始してから27.0mL以降では菌は検出されなかった(Fig. 2)。また、菌数は採

血初期のものほど多く、後のほうで再び菌数が増えることはなかった。除去血と本採血とでは培養法が異なるが、本採血側のカルチャーボトル法は定量性はないものの、感度に大きな差はないと思われる。

以上は試作した除去回路を用いた実験であり、実際の採血キットでは回路分岐部の形状のわずかの違いにより、初流血の一部が分岐部にとどまって本採血側に混じる可能性もある。そのため、完成したキットと同じ形状の採血アームを用いて同様の実験を行ったが、本採血側には細菌は検出されなかった。

(2) 皮膚片除去の確認

小皮膚片を採血針内において採血し、どのフラクションで皮膚片が回収されたかをTable 2に示す。15例中14例で採血後10.0mL以内に小皮膚片は排出され、採血回路途中での停滞、付着等は生じなかった。残り1例は採血針内部に付着したままであった。

(3) 初流血除去回路付き成分採血キットによる採血

初流血除去回路を成分採血キットに組み込んで成分採血装置に装着し、その穿刺針をボランティアの肘正中静脈に穿刺した。バッグ本体側のクレ

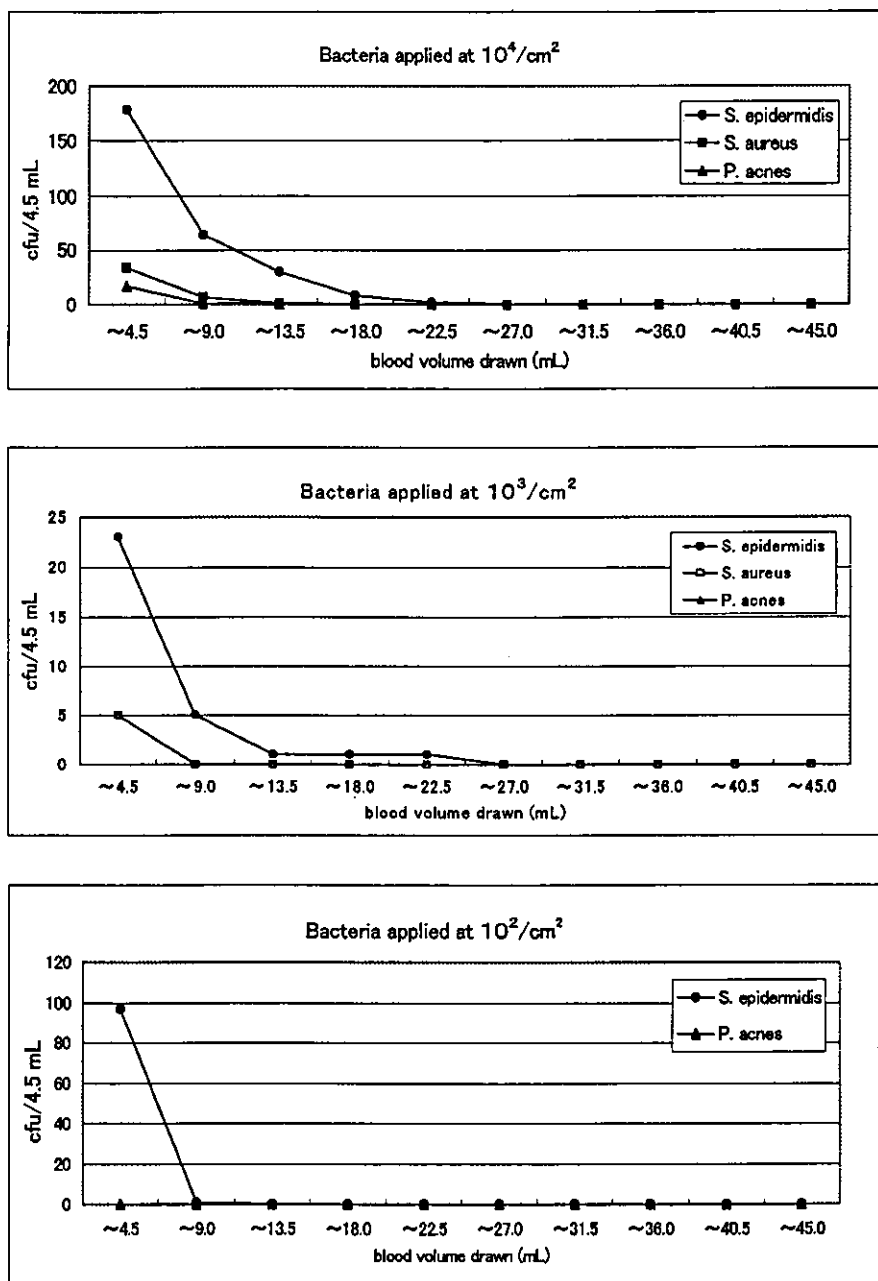


Fig. 2 Relationship between the number of bacterial cfu and the volume of blood drawn.

ンメを閉じ除去回路のクレンメを開けて初流血を約20mL採取し、次に除去回路を閉じて本体側に採血した。キットを装置に装着することによって回路内圧が変化し、初流血の流出に影響を与える

ようなことはなかった。本採血を通じて次のような点に気付いた。1) 初流血を入れる小バッグがある程度の大きさでないと血液がたまるにしたがって内圧が高まり、流速が落ちる。2) 側副回路全体

Table 2 Collection experiment for skin plug

Fractions where skin plug was found	frequency
0 ~ 5mL	13
5 ~ 10mL	1
10 ~ 15mL	0
others	1*

* Skin plug was found inside the needle after blood was drawn.

の長さと同様に静置する場所を慎重に決めないと、その重さで採血回路を献血者の前腕から引きずり落としかねない。3) 小バッグに入った血液は利用されずに採血終了までそのままにしておかれる。これらの点を除いては、総じて操作性に大きな問題はなかった。

4. 考 察

ウイルスの場合と異なり、輸血用血液製剤中の細菌はバッグの中でダイナミックに増殖または死滅するので、安定したマーカーでスクリーニングすることが困難である。したがって、採血時のサンプルで陽性の結果を得ても、臨床的に意味のない検査結果を生ずる恐れがあり、できるだけ輸血する時に近い時点のサンプルを用いて細菌の同定・定量をしなければならない。しかしながら、輸血実施までにこの結果を出すのは技術的に困難であり、検出・スクリーニングという手法は、現在の日本の少なくとも血小板製剤に関しては適用が難しい。

これに対して、採血時に細菌の混入を防ぐ方法は最も本質的な解決法といえる。輸血用血液製剤に混入する細菌には、穿刺する皮膚に存在するものと、献血者の血中に存在するものとの二つがある。後者については、菌血症の可能性のある献血者を問診の段階で的確に排除するしか現時点では手段がない。いっぽう穿刺部位の皮膚に存在する菌については、皮膚の消毒を徹底することが基本的な予防策であるが、毛嚢や皮脂腺などに存在する菌を死滅させることは事実上不可能であり、穿刺針がここを通過した場合には採血血液に細菌が混入する確率が高くなる。さらに、筒状の穿刺針が皮膚を貫く時に皮膚片が切り取られて採血血液

に混入し、その中に潜んでいた細菌が保存中に増殖する可能性も考えられる。赤血球製剤中に検出される細菌は献血者の菌血症に由来するものが多いが、血小板製剤中に増殖する細菌は、穿刺時に皮膚から混入する球菌が比較的多いといわれる⁹⁾。したがって、採血の初期にとくに混入する皮膚に付着する菌を排除する方策は、血小板成分採血においてより意義が高いと考えられる。

今回の検討では、代表的なヒトの皮膚の常在菌である表皮ブドウ球菌、汚染が起こった場合に重大な症状を呈する可能性のある黄色ブドウ球菌、及び血液センターの工程管理で最も高頻度に検出されるアクネ菌の3種を使用した。実験で用いた $10^4/\text{cm}^2$ という菌数は、消毒をしていないヒトの手指の平均的な細菌数である⁹⁾。この実験で、皮膚常在菌数が $10^4/\text{cm}^2$ 以下であれば、採血時初流血液を27.0mL以上除去することにより、細菌の混入を防止できる可能性が高いことが示された。また培養で検出された菌数が、初流血のあとのほうほど少なくなることは、穿刺時にも細菌の混入が起こることを示唆しており、初流血の除去に意義があることを裏付けている。また、初流血液を10mL以上除去することにより、皮膚片の混入を防止できる可能性が高いことも示された。

初流血液除去回路はどの採血法にも適用できるが、前述のように、細菌汚染の最も起こりやすい血液製剤は血小板製剤であるので、まずこれを成分採血装置の血小板採血用キットに組み込み、その実際の使い勝手を検証した。その結果、20mLの血液が献血者の目の届くところに何も利用されずに最後まで残ることが問題となったが、これがそのまま検査用に利用することができれば、採血量の増加を防ぐ意味からも都合がよい。現在、採血バッグの無菌性を保ちつつここから検体採取ができる方法を検討中である。

初流血液除去回路はすでにヨーロッパの主要国では献血時の採血に導入されて効果も検証されている¹⁷⁾¹⁸⁾。これによっても皮膚からの細菌の混入がまったくなくなるわけではないが、少しでも細菌の混入数を少なくすることに意義がある。すなわち初期混入数を少なくすることにより増殖カーブ

のたちあがりを遅くし、期限内に重大な細菌濃度に達する製剤の数を少なくすることができれば、製剤の細菌汚染に関する安全性は高まるものと期待できる。

文 献

- 1) Blajchman, M.A., Goldman, M. : Bacterial contamination of platelet concentrates : incidence, significance, and prevention. *Semin Hematol*, 38 (Suppl 11) : 20—26, 2001.
- 2) Blajchman, M.A. : Incidence and significance of the bacterial contamination of blood components. *Dev. Biol. (Basel)*, 108 : 59—67, 2002.
- 3) 輸血情報 0203-69, 日本赤十字社中央血液センター医薬情報部, 2002.
- 4) Bruneau, C., Perez, P., Chassaigne, M., Allouch, P., Audurier, A., Gulian, C., Janus, G., Boulard, G., De Micco, P., Salmi, L.R., Noel, L. : Efficacy of a new collection procedure for preventing bacterial contamination of whole-blood donations. *Transfusion*, 41 : 74—81, 2001.
- 5) Kuehnert, M.J., Roth, V.R., Haley, N.R., Gregory, K.R., Elder, K.V., Schreiber, G.B., Arduino, M.J., Holt, S.C., Carson, L.A., Banerjee, S.N., Jarvis, W. R. : Transfusion-transmitted bacterial infection in the United States, 1998 through 2000. *Transfusion*, 41 : 1493—1499, 2001.
- 6) 都築正和 : 殺菌・消毒マニュアル, 医歯薬出版株式会社, 東京, 1991, 30—37.
- 7) Andreu, G., Morel, P., Forestier, F., Debeir, J., Rebibo, D., Janvier, G., Herve, P. : Hemovigilance network in France : organization and analysis of immediate transfusion incident reports from 1994 to 1998. *Transfusion*, 42 : 1356—1364, 2002.
- 8) Bos, H., Yedema, Th., Luten, M., van Buul, C., Puy-laert, C. : Reduction of the incidence on bacterial contamination by pre-donation drawing blood for safety tests. *Vox Sang.*, 83 (Suppl. 2) : 6, 2002.
- 9) Schneider, Th., Tunes, V., Fontaine, O., Carnoy, S., Vens, Th., Huart, J.J. : Benefits of the pre-donation sampling pouch in order to reduce bacterial contamination of pooled platelets concentrates. *Vox Sang.*, 83 (Suppl. 2) : 162, 2002.

Improved extension of platelet storage in a polyolefin container with higher oxygen permeability

Takeshi Yuasa,^{1,2} Hitoshi Ohto,¹ Reiko Yasunaga,^{1,2} Takanori Kai,² Noriaki Shirahama² and Takashi Ogata¹

¹Division of Blood Transfusion and Transplantation Immunology, Fukushima Medical University School of Medicine, Fukushima, and ²Research and Development Division, Kawasumi Laboratories, Inc., Tokyo, Japan*

Received 29 January 2004; accepted for publication 22 March 2004

Correspondence: Hitoshi Ohto, Professor and Director, Division of Blood Transfusion and Transplantation Immunology, Fukushima Medical University School of Medicine, Fukushima City, Fukushima 960-1295, Japan.
E-mail: hit-ohito@fmu.ac.jp

*Disclosure: T.Y., T.K., N.S. and R.Y. are current and previous employees of Kawasumi Laboratories, Inc.

Summary

This study evaluated a newly developed polyolefin bag, which has a 50%/m² higher oxygen permeability to extend the shelf-life of platelets. Single-donor aphaeresis platelets were pooled, separated equally into two bags, PO-80 (0.8 l capacity) and KBP-PO (1 l capacity) for control, and stored in plasma for up to 7 d. Platelet biochemical and functional parameters were monitored in bags containing high ($4.2 \times 10^{11}/250$ ml/bag, $n = 9$) and low ($2.0 \times 10^{11}/200$ ml/bag, $n = 3$) concentrations of platelets over the storage period. After 7 d of storage, the PO-80 bags containing high concentrations of platelets had a better pH (mean pH 6.74) than those stored in KBP-PO (pH 6.32, $P < 0.01$); none of the nine PO-80 bags with a high platelet concentration had a pH below 6.2, compared with four of nine controls ($P < 0.05$). Similarly, lactate values were 20.19 mmol/l and 28.09 mmol/l respectively ($P < 0.05$). Aerobic metabolism was maintained better with greater O₂ consumption and less lactate generation in high-platelet concentration PO-80 bags than in the control bags. A significant difference was also found in pH, pCO₂ and lactate levels between the two bags containing low concentrations of platelets during the 7-d period. The *in vitro* characteristics of platelets declined less over 7 d when stored in a higher oxygen permeable container than in a marketed bag.

Keywords: platelet, preservation, lactate, pH.

The steady increase in demand for platelets because of more intense treatment schedules and the increased use of chemotherapy has placed considerable pressure on the logistics of their supply. Moreover, the rapidly ageing populations in many developed countries will reduce the supply of blood and blood components in the near future. In response to these requirements, measures have been taken to maximize platelet use, including development of polyolefin containers (Murphy, 1999) and storage media (Boomgaard *et al*, 1994) that increase the storage time, and splitting an aphaeresis-collected high platelet-yield unit into two therapeutic doses (Jacobson *et al*, 2003).

Because of the short storage time for platelets, 5 d worldwide and 3 d in Japan, more platelets for transfusion become outdated than any other blood component. The introduction of nucleic acid amplification tests for hepatitis C virus, human immunodeficiency virus and hepatitis B virus have further reduced the supply of platelets. Extending the storage time to 7 d or more would significantly increase platelet availability

and contribute to health care efficiency. The acceptable *in vivo* performance of platelets stored for 7 d has been demonstrated (AuBuchon *et al*, 2002; Dumont *et al*, 2002; Rock *et al*, 2003).

The projected increase in demand for high quality platelets has made it necessary to optimize the conditions for their preservation. A pH above 7.6 or below 6.2 has been shown to correlate with decreased *in vivo* efficacy of platelets (Murphy *et al*, 1994). Seven days storage of pooled buffy coat-derived platelet concentrates (PCs) in a second generation bag with higher platelet yields ($4.0\text{--}5.0 \times 10^{11}$) is reported often to result in a pH drop to below 6.0, platelet swelling, and disappearance of swirling (de Wildt-Eggen *et al*, 1997). The rate of pH drop during storage is proportional to the platelet count (de Wildt-Eggen *et al*, 1997).

In this study, we evaluated a newly developed polyolefin container, which has higher oxygen permeability than conventional second generation platelet storage bags. It would be anticipated that higher oxygen permeability of a container

would allow platelets to generate energy by aerobic glycolysis instead of by the anaerobic pathway, in which a higher amount of lactate is accumulated. This would maintain the pH of the medium within the appropriate range resulting in platelets in a better functional state.

Materials and methods

Platelet preparation

This study was approved by the Institutional Review Board of Fukushima Medical University. With acid-citrate-dextrose solution (ACD) (Terumo, Tokyo, Japan) as an anticoagulant, platelets were collected from donors by aphaeresis with a cell separator (Amicus; Baxter Healthcare Corp., Deerfield, IL, USA) using software for double access. The donors gave informed consent and reported no consumption of medications known to alter platelet function or of antibiotics for 7 d before donation. A high (4×10^{11}) or low (2×10^{11}) platelet collection was programmed depending on the donor's platelet counts before aphaeresis. PCs collected from two donors with the same ABO blood type were pooled using a sterile connecting device (TSCD; Terumo) and divided equally into a newly developed bag PO-80 (Kawasumi, Tokyo, Japan) and a commercially available polyolefin second generation bag (KBP-PO; Kawasumi). The characteristics of the two containers regarding oxygen permeability are shown in Table I. Units containing high and low platelet concentrations had 250 ml and 200 ml of plasma respectively, in one bag.

Evaluation of functions, biochemistry and viability of stored platelets

Platelets, stored for up to 7 d at 22°C with agitation at 50–60 strokes/min on a flat shaker, were evaluated on days 0, 1, 3, 5 and 7 of storage. Samples for analysis were removed aseptically by swabbing the sampling site coupler with 70% alcohol and then inserting a sterile needle attached to a syringe. Platelet counts and mean platelet volume (MPV) were determined using an electric cell counter (Sysmex K-2000; TOA, Kobe, Japan). Hypotonic shock response (%HSR) and aggregation were measured after diluting the concentrates to 3.0×10^8 /ml using the same donors' plasma, which had been stored frozen. The %HSR was determined using a photometer

Table I. The capacity and oxygen permeability of the polyolefin containers studied.

	Capacity (ml)	Oxygen permeability (ml/m ² × day × atm)	Oxygen permeability (ml/bag × day × atm)
PO-80	800	2660	155
KBP-PO (control)	1000	1900	125

at 610 nm (UVIDEC; Jasco, Tokyo, Japan) and was expressed as the decrement in light transmission during recovery from shock as a percentage of the total increment. Platelet aggregation response to double stimuli, 5 μmol/l ADP and 5 μg/ml collagen at final concentrations, was measured with Hematracer 212 (PAC-8L, MC Medical, Tokyo, Japan) and was expressed as the maximum change in transmittance after stimulation compared with platelet-poor plasma. P-selectin, as a marker of platelet activation, was not studied.

The pH at 37°C and blood gas (pO₂/pCO₂) of the PCs were measured using a pH/blood gas analyzer (ABL3, Radiometer, Copenhagen, Denmark). The pH measured at room temperature was automatically calculated into the value at 37°C.

To evaluate the metabolism of stored platelets, glucose and lactate levels in the plasma were measured by standard enzymatic assays. The swirling degree was estimated visually with a light source and given one of three grades from 0 (no swirling) to 2+ (optimal swirling) (Boomgaard *et al*, 1994).

All platelets were cultured on day 7 using two liquid media, BACTEC Plus Aerobic/F and Plus Anaerobic/F (both Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) for bacteria and fungi respectively and monitored for 7 d.

The *in vivo* recovery of platelets stored was not evaluated.

Statistics

Data are expressed as mean ± SD. Wilcoxon's matched-pairs test (two-tailed) and paired *t*-test (two-tailed) were used to compare values of components. Cumulative chi-square test was used for the analysis of pH values and swirling scores on days 5 and 7. Spearman's correlation coefficient (two-tailed) was used to analyse the correlation between results. A *P*-value <0.05 was considered statistically significant. All analyses were performed with the software package, STATMATE III (ATMS, Tokyo, Japan).

Results

Evaluation of platelets preserved at a high concentration

Each experiment was performed nine times (Table II). MPV of platelets stored in KBP-PO increased significantly during storage (*P* < 0.05) at days 5 and 7, whereas MPV of those stored in PO-80 were stable until day 7. The %HSR of platelets stored in PO-80 was maintained stably during the 7 d of storage but that of platelets stored in KBP-PO was decreased significantly at day 7 (*P* < 0.05).

The aggregation of platelets induced by double stimuli, ADP and collagen, decreased gradually in both bags, however, it decreased less rapidly in PO-80 than in KBP-PO over the 7 d (*P* < 0.05).

The pH of the bag contents was maintained above 6.2 for 7 d in all samples stored in PO-80, whereas the contents of four of nine KBP-PO bags had a pH <6.2 by day 7. The mean pH decreased slowly in both types of bag and the

Table II. Platelet functions and biochemical levels of high concentration PCs during 7 d of storage (mean \pm 1 SD).

	Day	PO-80 (n = 9)	KBP-PO (n = 9)	P-value by Wilcoxon's matched-pairs test (two-tailed)
Platelet count ($\times 10^9/l$)	0	1710 \pm 130 ^(a)		(a) vs. (b), (c): NS; (a) vs. (d), (e): NS
	1	1670 \pm 130	1690 \pm 100	NS
	3	1720 \pm 110	1740 \pm 130	NS
	5	1700 \pm 110 ^(b)	1730 \pm 170 ^(d)	NS
	7	1720 \pm 140 ^(c)	1730 \pm 170 ^(e)	NS
Mean platelet volume (fl)	0	7.4 \pm 0.2 ^(a)		(a) vs. (b), (c): NS; (a) vs. (d), (e): NS
	1	7.0 \pm 0.5	7.0 \pm 0.5	NS
	3	7.0 \pm 0.5	7.2 \pm 0.7	NS
	5	6.8 \pm 0.2 ^(b)	7.8 \pm 1.2 ^(d)	0.05
	7	7.0 \pm 0.2 ^(c)	8.1 \pm 1.2 ^(e)	0.05
Hypotonic shock response (%)	0	74.8 \pm 4.4 ^(a)		(a) vs. (b), (c): NS; (a) vs. (d): NS; (a) vs. (e): 0.05
	1	74.2 \pm 4.0	75.0 \pm 4.4	NS
	3	74.7 \pm 4.1	71.6 \pm 4.4	NS
	5	70.4 \pm 6.1 ^(b)	52.2 \pm 26.7 ^(d)	NS
	7	69.5 \pm 7.3 ^(c)	44.6 \pm 32.9 ^(e)	0.05
Aggregation (%) ADP (5 μ mol/l) + collagen (5 μ g/ml)	0	85.3 \pm 8.7 ^(a)		(a) vs. (b): 0.01; (a) vs. (c): 0.001; (a) vs. (d): 0.01, (a) vs. (e): 0.001
	1	80.6 \pm 7.2	80.6 \pm 6.7	NS
	3	77.6 \pm 7.0	77.2 \pm 6.0	NS
	5	69.2 \pm 4.5 ^(b)	51.3 \pm 25.4 ^(d)	NS
	7	58.7 \pm 9.6 ^(c)	37.1 \pm 27.0 ^(e)	0.05
pH at 37°C	0	7.05 \pm 0.03 ^(a)		(a) vs. (b): 0.05; (a) vs. (c): 0.01; (a) vs. (d): 0.01; (a) vs. (e): 0.01
	1	7.09 \pm 0.07	6.95 \pm 0.10	0.01
	3	7.06 \pm 0.09	6.70 \pm 0.35	0.01
	5	6.88 \pm 0.15 ^(b)	6.45 \pm 0.47 ^(d)	0.05
	7	6.74 \pm 0.22 ^(c)	6.32 \pm 0.48 ^(e)	0.01
pO ₂ (mmHg)	0	90.9 \pm 17.7 ^(a)		(a) vs. (b), (c): 0.01; (a) vs. (d), (e): NS
	1	64.4 \pm 21.3	58.6 \pm 24.2	NS
	3	68.9 \pm 16.1	55.1 \pm 19.5	0.01
	5	64.1 \pm 14.6 ^(b)	81.3 \pm 45.7 ^(d)	NS
	7	59.8 \pm 17.8 ^(c)	103.8 \pm 53.6 ^(e)	NS
pCO ₂ (mmHg)	0	67.3 \pm 7.4 ^(a)		(a) vs. (b): 0.001; (a) vs. (c): 0.001; (a) vs. (d): 0.001; (a) vs. (e): 0.001
	1	57.1 \pm 11.5	75.1 \pm 13.3	0.001
	3	46.0 \pm 9.1	65.5 \pm 16.4	0.001
	5	48.3 \pm 11.2 ^(b)	44.0 \pm 23.8 ^(d)	NS
	7	39.1 \pm 7.5 ^(c)	29.3 \pm 22.3 ^(e)	NS
Glucose (mmol/l)	0	17.86 \pm 1.09 ^(a)		(a) vs. (b): 0.001; (a) vs. (c): 0.001; (a) vs. (d): 0.001; (a) vs. (e): 0.001
	1	16.74 \pm 1.55	16.03 \pm 1.61	0.01
	3	14.12 \pm 1.66	10.94 \pm 3.91	0.01
	5	10.95 \pm 1.55 ^(b)	6.55 \pm 4.94 ^(d)	0.01
	7	7.62 \pm 2.26 ^(c)	4.42 \pm 4.27 ^(e)	0.01
Lactate (mmol/l)	0	3.41 \pm 0.75 ^(a)		(a) vs. (b): 0.001; (a) vs. (c): 0.001; (a) vs. (d): 0.001; (a) vs. (e): 0.001
	1	5.86 \pm 2.03	7.47 \pm 2.92	0.01
	3	9.80 \pm 2.23	16.10 \pm 7.46	0.01
	5	15.11 \pm 2.73 ^(b)	24.43 \pm 10.79 ^(d)	0.01
	7	20.19 \pm 4.71 ^(c)	28.09 \pm 9.97 ^(e)	0.01

difference between them was substantially significant at days 5 and 7.

The pO_2 , declined by 30% in both types of bag on day 1 compared with day 0, was stable in the PO-80 bags between days 1 and 7, whereas the pO_2 in the conventional bag showed a biphasic pattern: lowest on day 3 and highest on day 7. The pCO_2 decreased gradually in the PO-80 bags over the 7 d, however, that in the conventional bag again showed a biphasic pattern: highest on day 1 and lowest on day 7. The difference between the two bags was statistically significant on days 1 and 3 ($P < 0.001$) but not on days 5 and 7.

The drop in glucose was more obvious on day 7 in the control platelets (average, 4.42 mmol/l) than in the PO-80 platelets (7.62 mmol/l, $P < 0.01$), although the levels declined steadily in both groups during 7 d of storage ($P < 0.001$). Conversely, lactic acid levels in the supernatant increased significantly over the 7-d period in both containers ($P < 0.001$), however, as expected it was more rapidly generated between days 1 and 7 in the control bags than in the PO-80 bags ($P < 0.01$, days 1, 3, 5 and 7). There was a close relationship between the levels of glucose and lactate ($P < 0.001$, by Spearman's correlation coefficient).

The swirling pattern was clearly observed in all PCs stored in PO-80 bags over the 7 d, whereas the pattern was lost in three of nine PCs on day 5 ($P < 0.05$) and four of nine PCs on day 7 ($P < 0.01$) stored in KBP-PO containers.

No bacterial or fungal contamination was observed in any bag contents.

The initial volume per bag declined a mean of 35 ml because of sampling.

Evaluation of platelets at a low concentration

Three samples with a low platelet concentration (2.0×10^{11} /bag) in 200 ml of autologous plasma were studied (Table III). There were no significant differences between platelets stored in PO-80 and KBP-PO bags over 7 d in the studied parameters, including platelet count, MPV, %HSR, aggregation, and pO_2 (except day 3) levels and swirling pattern. However, there were significant changes from day 0 to days 5 and 7 in aggregation ($P < 0.01$), glucose ($P < 0.01$) and lactate levels ($P < 0.01$) in both types of bag.

A significant difference was also observed between the two types of bag for pH (lower in KBP-PO bag than in PO-80), pCO_2 (higher in KBP-PO bag) and lactate levels (lower in KBP-PO bag) during the observation period.

All bag contents were negative for bacterial or fungal contamination.

Discussion

The short shelf-life (5 d worldwide and 3 d in Japan) of currently available liquid-stored PCs (at 20–24°C) makes it difficult to stockpile units of platelets. Thus, shortages of random donor PCs are quite common and occur largely

because of their increased utilization related to increasingly aggressive chemotherapy and progenitor cell transplantation for patients with malignant conditions.

Freezing platelet concentrates does enable prolonged storage, but the available procedures are cumbersome and lengthy, and result in low yields after thawing and post-transfusion. For these reasons, much effort has been expended on developing methods to prepare safer, haemostatically effective platelets or substitutes, with longer shelf-lives. These include chilled storage in the liquid state, platelet membrane fragments or microparticles, rehydrated lyophilized platelets, red cells with fibrinogen bound to their surfaces, fibrinogen-coated albumin microspheres and liposomes bearing haemostatically active agents (Lee & Blajchman, 1998; Ericson *et al*, 2002; Hoffmeister *et al*, 2003).

Liquid storage of PCs was extended to 7 d in 1985 in the USA but subsequent concerns about the increased possibility of bacterial proliferation during storage resulted in regulations curtailing the shelf-life to 5 d (Lee & Blajchman, 1998). An extended storage period of 7 d has again been recently proposed along with the use of bacterial screening methods and/or pathogen inactivation technologies.

In the present study, we evaluated the quality of platelets stored in a higher gas-permeable container developed to maintain the platelet medium within appropriate ranges. Aphaeresed PCs were examined at constant platelet counts and plasma volume combinations (4.2×10^{11} platelets/250 ml/bag for high concentration; 2.0×10^{11} /200 ml/bag for low concentration) for up to 7 d of storage. Platelet parameters declined gradually during storage, and were more obvious for the high concentration of platelets.

The initial pH, average 7.05 in the high concentration and 7.12 in the low concentration, was determined primarily by the whole blood to ACD ratio and the haematocrit of the donors. Over the next 24–48 h, the bags lose CO_2 until the rate of loss from the bags more closely approximates the rate of production from metabolic sources (Dumont & van den Broeke, 2003). The component pH then begins to decline. A pH >7.6 has a detrimental effect on cell damage and *in vivo* platelet recovery dropped when stored on an elliptical agitator (Murphy *et al*, 1982). In the present study, no PCs stored in PO-80 showed a pH >7.5 in both the high and low platelet concentration bags. The generation of lactic acid from anaerobic glycolysis for ATP production was the main cause of pH decline during storage (Kilksen *et al*, 1984). PCs with higher yields showed a decline in pH after 5 d of storage. Therefore, the availability of containers with higher oxygen-permeability is essential for improving platelet storage. Both *in vitro* and *in vivo* experiments (Dumont *et al*, 2002; Dumont & van den Broeke, 2003) have demonstrated an extended platelet storage of 7 d in Extended Life Platelet (ELP) bags, however, one PC showed a pH below 6.0 before day 5 with attendant loss of all other measurements of *in vitro* function. This phenomenon was similar to four of nine high concentration PCs stored in a control bag having a pH below

Table III. Platelet functions and biochemical levels of low concentration PCs during 7 d of storage (mean \pm 1 SD).

	Day	PO-80 (n = 3)	KBP-PO (n = 3)	P-value by paired t-test (two-tailed)
Platelet count ($\times 10^9/L$)	0	1010 \pm 20 ^(a)		(a) vs. (b), (c): NS; (a) vs. (d), (e): NS
	1	1010 \pm 70	1000 \pm 60	NS
	3	1010 \pm 40	1020 \pm 60	NS
	5	1010 \pm 80 ^(b)	1000 \pm 40 ^(d)	NS
	7	1000 \pm 10 ^(c)	990 \pm 40 ^(e)	NS
Mean platelet volume (fl)	0	7.2 \pm 0.3 ^(a)		(a) vs. (b), (c): NS; (a) vs. (d), (e): NS
	1	6.9 \pm 0.4	6.9 \pm 0.4	NS
	3	6.9 \pm 0.4	6.9 \pm 0.5	NS
	5	6.8 \pm 0.4 ^(b)	6.9 \pm 0.5 ^(d)	NS
	7	6.8 \pm 0.4 ^(c)	6.9 \pm 0.4 ^(e)	NS
Hypotonic shock response (%)	0	73.6 \pm 10.4 ^(a)		(a) vs. (b), (c): 0.001; (a) vs. (d), (e): 0.001
	1	69.6 \pm 8.2	73.0 \pm 4.3	NS
	3	64.9 \pm 6.8	65.8 \pm 6.0	NS
	5	64.4 \pm 7.3 ^(b)	66.0 \pm 8.6 ^(d)	NS
	7	56.3 \pm 4.1 ^(c)	60.6 \pm 7.0 ^(e)	NS
Aggregation (%) ADP (5 μ mol/l) + collagen (5 μ g/ml)	0	94.3 \pm 3.2 ^(a)		(a) vs. (b), (c): 0.01; (a) vs. (d), (e): 0.001
	1	90.7 \pm 0.6	89.3 \pm 1.5	NS
	3	86.7 \pm 2.1	85.7 \pm 4.2	NS
	5	82.7 \pm 3.8 ^(b)	81.3 \pm 3.2 ^(d)	NS
	7	82.0 \pm 4.6 ^(c)	81.7 \pm 3.8 ^(e)	NS
pH at 37°C	0	7.12 \pm 0.01 ^(a)		(a) vs. (b), (c): NS; (a) vs. (d), (e): NS
	1	7.27 \pm 0.03	7.22 \pm 0.04	0.05
	3	7.36 \pm 0.04	7.30 \pm 0.03	0.01
	5	7.31 \pm 0.04 ^(b)	7.25 \pm 0.04 ^(d)	0.05
	7	7.19 \pm 0.05 ^(c)	7.14 \pm 0.05 ^(e)	0.01
pO ₂ (mmHg)	0	117.9 \pm 16.5 ^(a)		(a) vs. (b), (c): NS; (a) vs. (d), (e): NS
	1	112.0 \pm 6.3	90.8 \pm 12.8	NS
	3	107.1 \pm 5.3	92.6 \pm 6.6	0.05
	5	119.9 \pm 17.5 ^(b)	106.4 \pm 2.4 ^(d)	NS
	7	124.6 \pm 13.2 ^(c)	108.3 \pm 3.3 ^(e)	NS
pCO ₂ (mmHg)	0	57.4 \pm 11.6 ^(a)		(a) vs. (b), (c): 0.05; (a) vs. (d), (e): NS
	1	35.9 \pm 1.5	42.8 \pm 3.7	0.05
	3	24.7 \pm 1.4	30.2 \pm 2.1	0.05
	5	23.3 \pm 1.5 ^(b)	28.7 \pm 2.7 ^(d)	0.05
	7	24.1 \pm 1.9 ^(c)	29.4 \pm 2.7 ^(e)	0.01
Glucose (mmol/l)	0	17.39 \pm 1.24 ^(a)		(a) vs. (b), (c): 0.01; (a) vs. (d), (e): 0.01
	1	17.02 \pm 1.40	17.06 \pm 1.32	NS
	3	15.50 \pm 1.54	15.58 \pm 1.49	NS
	5	13.97 \pm 1.50 ^(b)	14.14 \pm 1.65 ^(d)	NS
	7	11.73 \pm 1.41 ^(c)	12.05 \pm 1.43 ^(e)	0.05
Lactate (mmol/l)	0	2.42 \pm 0.53 ^(a)		(a) vs. (b), (c): 0.01; (a) vs. (d): 0.01; (a) vs. (e): 0.001
	1	3.22 \pm 0.81	3.15 \pm 0.83	NS
	3	5.63 \pm 1.02	5.25 \pm 0.87	0.05
	5	8.33 \pm 1.02 ^(b)	7.77 \pm 0.84 ^(d)	0.05
	7	11.90 \pm 0.78 ^(c)	11.28 \pm 0.90 ^(e)	0.05
Swirling pattern	0	All 2+		
	1	All 2+	All 2+	
	3	All 2+	All 2+	
	5	All 2+	All 2+	
	7	All 2+	All 2+	

6.2 in the present study (Table IV). The exact mechanism was not elucidated in these studies but we assume that even a minor shortage of oxygen may interfere with aerobic energy generation, causing a shift to anaerobic glycolysis and declining

pH, worsening total platelet function. This was suggested by others from the close relationship between pH level and lactate generation (de Wildt-Eggen *et al*, 1997; van der Meer *et al*, 2001). Similarly, in our study, on day 7, all four high

Table IV. Characteristics of high concentration PCs ($4 \times 10^{11}/250$ ml plasma/bag) during storage in PO-80 and KBP-PO bags.

	Number of PCs with pH value at 37°C					
	pH at day 5*			pH at day 7*		
	<6.2	6.2–6.8	>6.8	<6.2	6.2–6.8	>6.8
PO-80	0	2	7	0	5	4
KBP-PO	4	2	3	4	3	2

	Number of PCs with swirling score					
	Score at day 5*			Score at day 7*		
	0	1+	2+	0	1+	2+
PO-80	0	1	8	0	1	8
KBP-PO	3	1	5	4	0	5

*P-value = 0.05.

P-value by cumulative chi-square test between PO-80 and KBP-PO.

concentration PCs in the control bags with a pH below 6.2 had lactate values over 36.63 mmol/l, while none of the PO-80 high concentration PCs had pH below 6.2 or lactate values above 30.53 mmol/l.

To provide a given amount of energy, more glucose must undergo glycolysis under anaerobic compared with aerobic conditions. On day 7, four high concentration PCs stored in KBP-PO simultaneously showed glucose levels <0.55 mmol/l and lactate values over 36.63 mmol/l, whereas all of the PO-80 PCs had glucose levels of more than 3.61 mmol/l and lactate values <30.53 mmol/l for up to 7 d.

The extension of PC storage from 3 to 5 d was made possible by the development of new containers that improved preservation of pH by increasing gas permeability, enabling greater amounts of oxygen and carbon dioxide to enter and exit the bag respectively (Simon *et al*, 1987). Greater gas permeability was achieved by two means: enlarging the bag to increase the surface area (de Wildt-Eggen *et al*, 1997), and decreasing the thickness of the plastic film. The higher oxygen permeability of the PO-80 container was attained both by microfolding the plastic surface with multiple insular convex-concavity, which reduced the thickness of the film and by altering the composition of the materials. Currently marketed platelet containers include PL2410 (polyolefin; Baxter Healthcare), CLX-plastic [PVC plasticized with tri-2-(ethyhexyl)trimellitate; MedSep Corp., Covina, CA, USA] and ELP (PVC plasticized with *N*-butyryl tri-*n*-hexyl citrate; Gambro BCT, Lakewood, CO, USA); all of which have a high permeability achieved by increasing the bag volume to 1–1.5 l. However, we calculated the oxygen permeability of PL2410 and that of CLX to be 2024 ml/m² × day × atm and 1300 ml/m² × day × atm respectively, which are almost the same, or less than KBP-PO, the control container in this study. Nevertheless, the parameters of platelets preserved in PL2410 or CLX have been reported to be fairly satisfactory, probably because of an efficient plasma volume of around 285 (van der Meer *et al*,

2001) to 350 ml (Kralladsiri *et al*, 2001), in which the ratios of platelets to plasma volume were around $1000 \times 10^9/l$ (Kralladsiri *et al*, 2001; Zingsem *et al*, 2001; van der Meer *et al*, 2001), the same as the low platelet concentration used in this study, thereby reducing the burden on the medium. It was reported that at day 5 of storage there were significantly increased lactate and decreased pCO₂ levels in CLX bags, but the functional parameters were not influenced (Zingsem *et al*, 2001).

Four of nine PCs stored in KBP-PO lost the swirling pattern, accompanied by a pH below 6.2 up to day 5 (Table IV), and had a pCO₂ <20 mmHg and pO₂ elevation to 140 mmHg. This paradox can be explained by the fact that non-viable platelets no longer have proper respiration or metabolism, even anaerobic glycolysis, and therefore oxygen and carbon dioxide levels reach equilibrium with the surrounding atmosphere.

Platelets contain the entire apoptosis machinery and during storage many of its elements are activated. However, as specific and non-specific caspase inhibitors failed to prevent gelsolin cleavage or promote cell viability (Perrotta *et al*, 2003), and experimental stressors did not correlate with mitochondrial $\Delta\psi_m$ (Kuter, 2002), it is suggested that other mechanisms regulate platelet viability during storage. Platelet activation, characterized by the appearance of P-selectin, might play an important role in the development of platelet storage lesions. We should evaluate activation markers and *in vivo* recovery of platelets stored in PO-80 bags, which were not studied in the present work.

The data presented in this study showed that the PO-80 container had a significant beneficial effect on the metabolism of apheresis-derived high-yield platelets during 7 d of storage, compared with a conventional second generation bag. These differences included reduced glycolysis, lower lactate production, and better preservation of pH, shock response reactivity and swirling score. These findings suggest that the PO-80 bag preserves platelet function adequately for longer storage

periods and at higher platelet yields. In addition, combining a higher oxygen permeable container and reducing the proportion of plasma carried over (Yuasa *et al*, 2000; Gulliksson *et al*, 2003) may facilitate better retention of platelet parameters while making greater amounts of source plasma available for other purposes.

Acknowledgments

This study was supported by a grant from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan and funded by Kawasumi Laboratories, Inc.

References

- AuBuchon, J.P., Cooper, L.K., Leach, M.F., Zuaro, D.E. & Schwartzman, J.D. (2002) Experience with universal bacterial culturing to detect contamination of apheresis platelet units in a hospital transfusion service. *Transfusion*, **42**, 855–861.
- Boomgaard, M.N., Gouwerok, C.W., de Korte, D. & Loos, J.A. (1994) Platelets stored for 6 days in a polyolefin container in a synthetic medium with minimal plasma carry-over. *Vox Sanguinis*, **66**, 18–24.
- Dumont, L.J. & van den Broeke, T. (2003) Seven-day storage of apheresis platelets: report of an in vitro study. *Transfusion*, **43**, 143–150.
- Dumont, L.J., AuBuchon, J.P., Whitley, P., Herschel, L.H., Johnson, A., McNeil, D., Sawyer, S. & Roger, J.C. (2002) Seven-day storage of single-donor platelets: recovery and survival in an autologous transfusion study. *Transfusion*, **42**, 847–854.
- Ericson, D., Karnicki, K., Johnson, C., St Cyr, J. & Rao, G.H. (2002) A new platelet preservative. *Platelets*, **13**, 429–430.
- Gulliksson, H., AuBuchon, J.P., Cardigan, R., der Meer, P.F., Murphy, S., Prowse, C., Richter, E., Ringwald, J., Smacchia, C., Slichter, S. & de Wildt-Eggen, J. (2003) Storage of platelets in additive solutions: a multicentre study of the in vitro effects of potassium and magnesium. *Vox Sanguinis*, **85**, 199–205.
- Hoffmeister, K.M., Josefsson, E.C., Isaac, N.A., Clausen, H., Hartwig, J.H. & Stossel, T.P. (2003) Glycosylation restores survival of chilled blood platelets. *Science*, **301**, 1531–1534.
- Jacobson, J.L., McQuail, E.J., Murphy, R.M., Thomas, J.E. & Kliemisch, A.P. (2003) Trima Accel: improved platelet collection efficiency, split platelet collection rate, and donor staff satisfaction. *Transfusion*, **43**(Suppl.), 15A.
- Kilkson, H., Holme, S. & Murphy, S. (1984) Platelet metabolism during storage of platelet concentrates at 22°C. *Blood*, **64**, 406–414.
- Krailadsiri, P., Seghatchian, J. & Williamson, L.M. (2001) Platelet storage lesion of WBC-reduced, pooled, buffy coat-derived platelet concentrates prepared in three in-process filter/storage bag combinations. *Transfusion*, **41**, 243–250.
- Kuter, D.J. (2002) Apoptosis in platelets during ex vivo storage. *Vox Sanguinis*, **83**(Suppl. 1), 311–313.
- Lee, D.H. & Blajchman, M.A. (1998) Novel platelet products and substitutes. *Transfusion Medicine Reviews*, **12**, 175–187.
- van der Meer, P., Pietersz, R. & Reesink, H. (2001) Leucoreduced platelet concentrates in additive solution: an evaluation of filters and storage containers. *Vox Sanguinis*, **81**, 102–107.
- Murphy, S. (1999) The efficacy of synthetic media in the storage of human platelets for transfusion. *Transfusion Medicine Reviews*, **13**, 153–163.
- Murphy, S., Kahn, R.A., Holme, S., Phillips, G.L., Sherwood, W., Davison, W. & Buchholz, D.H. (1982) Improved storage of platelets for transfusion in a new container. *Blood*, **60**, 194–200.
- Murphy, S., Rebull, P., Bertolini, F., Holme, S., Moroff, G., Snyder, E. & Stromberg, R. (1994) In vitro assessment of the quality of stored platelet concentrates. The Biomedical Excellence for Safer Transfusion (BEST) Task Force of the International Society of Blood Transfusion. *Transfusion Medicine Reviews*, **8**, 29–36.
- Perrotta, P.L., Perrotta, C.L. & Snyder, E.L. (2003) Apoptotic activity in stored human platelets. *Transfusion*, **43**, 526–535.
- Rock, G., Neurath, D., Cober, N., Freedman, M., Leduc, M., Nelson, E. & Lu, M. (2003) Seven-day storage of random donor PLT concentrates. *Transfusion*, **43**, 1374–1377.
- Simon, T.L., Nelson, E.J. & Murphy, S. (1987) Extension of platelet concentrate storage to 7 days in second-generation bags. *Transfusion*, **27**, 6–9.
- de Wildt-Eggen, J., Schrijver, J.G., Bouter-Valk, H.J., Fijnheer, R., Bins, M. & van Prooijen, H.C. (1997) Improvement of platelet storage conditions by using new polyolefin containers. *Transfusion*, **37**, 476–481.
- Yuasa, T., Ohto, H., Suzuki, A. & Shishido, F. (2000) New plasma-reduced synthetic media, Fukushima cocktails, for the storage of platelets for transfusion. *Transfusion Science*, **23**, 37–46.
- Zingsem, J., Glaser, A., Zimmermann, R., Weisbach, V., Kalb, R., Ruf, A. & Eckstein, R. (2001) Paired comparison of apheresis platelet function after storage in two containers. *Journal of Clinical Apheresis*, **16**, 10–14.

血小板の使用延長可能

福医大病院の大戸教授ら共同開発



現在使われている血小板保存バッグ。改良バッグもほぼ同型になる。

県立福島医科大学附属総合病院 血液内科の大戸亨(こう)教授は、国内のメーカーと共同で、血小板の使用期間を現在の採血後三日間から七日間にできる「保存バッグ」の開発に成功した。素材のポリオレフィンの酸素透過性を高める改良を加え、血小板の状態を長く保たせることが可能になった。

献血の有効活用に期待

保存バッグ改良、7日間に



大戸亨教授

血小板は血液が凝固する際に大きな役割を果たす。血小板は低温保存すると機能が著しく低下するため、二〇一四度の空気で保存されている。欧米では使用期間は五日間としているが、国内では安全性確保のため三日間となっている。

大戸教授は平成十二年から血小板の保存期間を長くする研究をしている。現在使用されているバッグで三日以上保存すると、二酸化炭素と酸素の交換が難しく、バッグ内で酸欠が起ると酸化が進んで劣化する。酸素の供給量を増やし血小板の劣化速度を遅くしようと、ポリオレフィンの酸素透過性の高い素材を開発した。改良バッグの試作を依頼した。

メーカー側は高純度の従来よりも倍以上高い酸素透過性がバッグを作った。改良バッグは効率よく酸素と二酸化炭素の交換が起るため、血小板の劣化が遅く、わずか三十六時間から四十八時間使えな

った。大戸教授が確認した。献血の使用に当たって、安全性確保のため、北海道、東京都、京都府の三方所で行っている高純度検査(緩衝液検査)が義務付けられているが、検査には輸送時間も含め二十四時間か

福島民報

発行所
福島民報
福島市大田町13-1
(郵便番号)960-8600
編集所〒7階 0210-5
電話代表 (24) 331
編集室44531-4119 広告部511
本局44531-4173 販売部41511
© 福島民報社

民報

読者・資料センター 0120-
福島民報 http://www.minpo-

▶第52回日本輸血学会

血小板濃厚液の有効期限延長の具体案を提示 高酸素透過性バッグで機能維持

高齢化がますます進むと考えられるわが国では、近い将来、輸血用血液の供給バランスが破綻すると予想されている。特に重症患者で使用されることの多い血小板が供給できなくなると、深刻な問題に発展することは目に見えている。対策の1つとして、血小板濃厚液の有効期限延長が考えられている。その可能性と具体的手法について、札幌市で開かれた第52回日本輸血学会(会長＝北海道赤十字血液センター・池田久實所長)のシンポジウム「輸血の安全性及び有効性に関する残された問題を考える」で、福島県立医科大学病院輸血・移植免疫部の大戸齊教授が報告した。

5～10%が期限切れで廃棄

現在、血小板濃厚液の有効期限は国際的には5日、欧州の一部の国では7日とされている。これに対してわが国は3日。しかも、1997年に導入された核酸増幅検査(NAT)の時間を考えると、実質的な有効期限は2日程度になる。

大戸教授によると、現在の供給バランスは血液センター職員の献身的な努力によってかろうじて持ちこたえている状態。血液センター間でのやりくりもほぼ限界に達している。また、有効期限が短いために、期限切れで廃棄される血小板は各地域の

血液センターで5～10%、全国平均で6.2%に及ぶ。病院で廃棄される血小板(平均2%)を加えると、経済的損失は年間47億円にもなる。

最初の10cc廃棄で菌混入回避

このような状況から、有効期限延長の可能性が模索されている。大戸教授は、有効期限延長に際して克服されるべきおもしな課題として、細菌混入阻止と血小板機能の維持を挙げた。

わが国の血小板製剤から細菌が検出される頻度は0.03%。検出菌のほとんどはグラム陽性菌の*Propionibacterium*だ。ただし、感染した場合

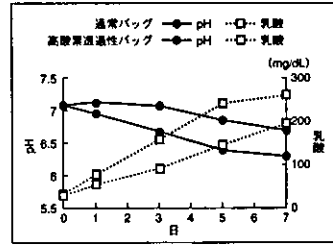
に重篤化しやすいのはグラム陰性菌であることが、欧米の報告から明らかにされている。このような細菌の混入を防ぐには、採血時の皮膚消毒が重要となるが、消毒効果は毛髪、汗腺、皮脂腺といった深部までは及ばない。したがって、これらの部位に潜む常在菌が混入する可能性は十分に考えられる。同教授はその対策として、採血血液の最初の約10ccを廃棄する方法を紹介した。イメの実験で、穿刺した皮膚から混入する細

菌のほとんどは最初の約10ccに含まれることが報告されている。欧州では既に普及しつつあるという。

酸素透過性向上でpH低下を抑制

一方、血小板機能を維持するための方策としては、酸素透過性の高い保存バッグの使用が考えられるとした。血小板は酸素を少なからず必要とする細胞で、酸素が不足すると嫌気性代謝となり、保存バッグ中で乳酸が急激に増加、pHが大きく低下する。pH6.2を下回ると血小板の機能が著しく障害されると考えられてい

〈図〉酸素透過性を向上させた血小板保存バッグと通常のバッグにおける乳酸とpHの推移



(British Journal of Haematology 2004)

る。通常のバッグを使用すると乳酸が増加するとともに、pHが直線的に低下、7日目には6.2近くまで落ち込む。これに対して、酸素透過性を大幅に向上させた日本製のバッグを使用すると、乳酸の増加およびpH低下が明らかに抑制される成績が得られたという(図)。このバッグを使えば7日目でも血小板機能を保持でき、有効期限延長に大きく貢献すると見られる。

分担研究報告書

平成14-16年度研究総括報告書

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

「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 福島県立医科大学輸血医学・移植免疫学 教授

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、細菌接種実験を行って細菌動態を調べた。また、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検討し、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確認されたことと、採血直後の製剤では白血球の機能等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適用可能であることが再確認された。この白血球除去フィルター部分の捕捉された細菌は、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、より効率的に検出されることを確認した。

1. 研究目的

輸血用血液の細菌汚染は、同種血輸血の経験や調査において、少ないながらも一定の頻度で発生していると考えられており、熟練した職員による採血でも0.01-0.04%の感染があると言われている¹⁾。自己血輸血も保存期間が長いことから同種血以上に細菌汚染のリスクを伴っていると考えべきである²⁻⁴⁾。血液製剤の種類別では、特に血小板製剤は、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ている。

この細菌汚染検出のための、保管後色

調の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ると溶血を伴わなければ検出は困難であるために、検出感度は低いと言わざるを得ない⁵⁾。一方、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。また、血小板製剤では、スワーリングの有無によって血小板の形態保持、しいては機能保持を推し量ることができるが、その感度が十分であるか否かは、まだ確認されていない。しかるに、細菌の培養検査のために保存後のバッグ中の血液を一部採取するためには、バッグを無菌的に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。

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。

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⁶⁾。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得たり、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ることから、全ての血液に白血球除去を行うべしとの意見も見られている⁷⁻⁹⁾。そして、白血球除去フィルターの使用は、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¹⁰⁻¹²⁾。

平成16年10月から血小板製剤の白血球除去が実施されているが、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) 使用血液製剤

(1) 有効期限超過濃厚血小板製剤

製剤の使用期限内に輸血に使われずに廃棄の対象となった製剤を実験に使用した。製剤の採血後経過日数は採血後4-6日で、全製剤ともに放射線照射済みであった。廃棄の対象となった後に、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) 合成濃厚血小板製剤

細菌接種実験に用いた濃厚血小板製剤や新鮮血液は、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。これらの多くは、採血後72時間以内に実験に使用した。

(3) 健常ボランティアからの成分採血濃厚血小板

細菌接種後の増殖観察には健常ボランティアからの成分採血濃厚血小板を用いた。健常ボランティアは血液センターの採血基準に準じて供血者を選択し、医療機関でヘモネティクス社のMultiを使用して、約10単位に相当する血小板を採取した。採取した血小板濃厚液は、血小板製剤用のポリオレフィンバッグにて保管した。