

ならず、細菌汚染が近年で 2 例報告され、1 例は死亡している^{4,5)}。これは有効期限が短くとも細菌汚染の危険性があることを意味している。また、輸血の細菌感染症の事故報告がごくまれであるのは、血小板輸血が行われる患者の多くが血液疾患の患者で感染症などを併発し、輸血時に抗生物質の投与を受けているため、敗血症があっても軽度で原病との鑑別が難しいことが考えられる。

米国では通常採血されてから 24 時間後に細菌検出システム用にサンプリングが行われ、スクリーニングが実施されている。欧州ではもっと短い時間でのサンプリングも一部の国で実施されているが、以前としてスクリーニング結果が判別されるまでに 24~48 時間かかる。今回、世界的に導入されている細菌検出システム 2 機種を検出感度と時間を確認するために、通常適用されている条件よりもサンプリングまでの時間を短く、また、スクリーニング合否のための培養時間を短くするという厳しい条件下で試験を行った。

その結果、BacT/ALERT では低濃度の細菌を接種した直後にサンプリングを行っても 20 時間培養すれば検出が可能であった。また、接種後 24 時間後にサンプリングを行っても 20 時間培養しなくては検出ができず、サンプリング採取時間による検出感度の差はなかった。一方、eBDS は接種直

後にサンプリングした場合に 16、20、24 時間培養すべてで検出できない菌種が存在した。また、接種 24 時間後サンプリングでは、20 時間培養で検出が可能であった。今回評価した細菌検出システムは 2 機種ともにサンプリング時の細菌数が多ければ検出までの時間は短縮された。これは検出原理が培養式であることに起因している。逆に細菌数が極端に少なくともサンプルボトルまたはパウチ内に細菌を取り込むことができれば時間はかかるが検出は可能である。つまり、35-37℃培養によって細菌を加速して増殖させ、BacT/ALERT では CO₂ を多く産生させ、eBDS では O₂ を急速消費させていることに関係している。原理的には検出に要する最低細菌数は 1mL 中に 1CFU/mL の割で細菌が存在すればよいとされている。

欧米では 5 日が標準的な血小板製剤の有効期限であり、欧州の COE ガイドラインでは細菌検査を実施することによって、さらに 7 日まで保存可能と規定している。ベルギー、オランダ、スウェーデン等では既に 7 日保存を実施している⁶⁾。1980 年代初め、米国では輸血用血小板は 7 日間まで使用が認められていたが、細菌敗血症が多発したために、5 日間の有効期限に短縮された経緯がある。そのため AABB は 2004 年 3 月から 5 日保存血小板製剤からの細菌検査を行うようになった⁷⁾。さらに 2005 年 3

月に FDA が細菌検査することを条件にアフエレーシス血小板の 7 日保存を一部認可した。同 9 月から市販後調査に協力する血液センターから 7 日保存血小板の供給をはじめており、着実に 7 日間へ有効期限が延長されている^{8),9)}。

今回の評価で、2 機種ともに標準条件より短い時間での検出が可能であったが、培養式という原理上、飛躍的にスクリーニング合否までの時間を短くすることは困難であった。血小板製剤に細菌が混入して変動する標識として、グルコースと酸素のようなエネルギー源や、乳酸と二酸化炭素のような代謝産物の変化等が知られている。培養式の細菌検出システムはこれまでの欠点を改善されており、現在のところ他の標識検査法に比べ、検出感度を含めても最も優れたスクリーニング法である^{10),11)}。日本では血小板製剤に対する細菌検査がまだ実施されていない。しかし、血小板製剤の有効期限延長には細菌検出は必須項目になるであろう。今回の評価からも培養式の細菌検出システムは高感度に細菌合否判定をできることから、導入するに値するものと思われる。

E. 結論

輸血関連敗血症をおこした菌種など 7 種の細菌接種実験で BacT/Alert と eBDS を用いて評価を行った。24 時間後のサンプリ

ング試験で見ると *S. aureus*, *E. coli*, *S. marscecens*, *K. oxytoca*, *S. liquefaciens*, *B. cereus*, *E. cloaca* については両機種間に感度の差は認めなかった。しかし、*S. Epidermidis* については eBDS の方が、*P. Aeruginosa* については BacT/ALERT の方が感度良く検出した。以上より、両機種はほぼ同等の細菌検出力を有していると考えられた。

F. 健康危害情報

今回行った研究は、試験管内実験であるので、健康に影響を及ぼした事例は発生しなかった。また、研究に使用した器具類はその室内で滅菌消毒し、室外への漏出にも十分に配慮し、院内感染をもたらすことはなかった。

G. 研究発表

研究論文

- 1) 江月将史、伊藤貴俊、大戸 齊、他：高酸素透過性バッグによる高単位血小板の室温長期（9 日間）保存。日本輸血学会雑誌、2005; 51(6):578-584.

学会発表

- 1) 川畑絹代、江月将史、大戸 齊：血小板製剤における接種細菌の増殖性と検査法の検討。第 53 回日本輸血学会総会。日本輸血学会雑誌、2005; 51(2):194.

- 2) 江月将史、川畑絹代、大戸 斎、他：ア
フェレーシス由来血小板製剤の高酸素
透過性バッグによる9日間保存評価。
第53回日本輸血学会総会。日本輸血
学会雑誌、2005; 51(2):194.
- 3) Kawabata K, Ezuki S, Ohto H:
Spike test comparing two bacterial
detection systems. *Transfusion*,
2005;45(3S):54A
- 4) Ezuki S, Kawabata K, Ohto H:
Long-day storage of a low platelet
concentration at room temperature
in a polyolefin container with higher
oxygen permeability. *Transfusion*,
2005;45(3S):77A
- H. 知的所有権の発生
特になし。

参考文献

- 1) Lee JH. Bacterial Contamination of
Platelets Workshop, Bethesda,
September 24, 1999. (Cited May 3,
2000). Available from
<http://www.fda.gov/cber/minutes/bact092499.pdf>.
- 2) Kuehnert MJ, Roth VR, Haley NR et
al: Transfusion-transmitted bacterial
infection in the United States, 1998
through 2000. *Transfusion*, 41:
1493-1499, 2001.
- 3) Dorothy S, Hannah C, Hilary J, on
behalf of the SHOT steering Group:
Haemovigilance in the UK – the
SHOT scheme. *Blood Bank Transfus
Med*, 2(1): 27-30, 2004.
- 4) 片山俊夫、神谷昌弓、保科定頼 他：
肺炎球菌に汚染された血小板濃厚液の
輸血直後に発症した敗血症性ショック
と横紋筋融解症の致死的合併例。臨床
血液, 44(6): 381-385, 2003.
- 5) 石田 明、上村知恵、橋詰賢一 他：血
小板輸血後に敗血症性ショックを呈し、
Morganella morganii 菌による輸血後
感染症が強く示唆された1例。日本輸
血学会雑誌, 50: 726-729, 2004.
- 6) Council of Europe. Guide to the
preparation, use and quality
assurance of blood components – 11th
edition, 2005.
- 7) AABB Standard. Standards for Blood
Banks and Transfusion Services –
23rd edition, 2004.
- 8) AABB Weekly Report, Vol. 11, No. 11,
April, 1, 2005.
- 9) AABB Weekly Report, Vol. 11, No. 33,
September, 16, 2005.
- 10) Holme S, McAlister M. B, Ortolano
G.A etc: Enhancement of a culture-
based bacterial detection system

(eBDS) for platelet products based on measurement of oxygen consumption.

Transfusion, 45: 984-993, 2005.

- 11) Brecher ME, Hay SN, Rothenberg SJ: Evaluation of a new generation of plastic culture bottles with an automated microbial detection system for nine common contaminating organisms found in PLT components. Transfusion, 44: 359-363, 2004.

Table 1 Bacterial species

Organism	ATCC order number	Inoculation bacterial level (CFU/mL) 5
<i>Staphylococcus aureus</i>	29213	6.5 (3-10)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	49134	12.11 (7-15)
<i>Bacillus cereus</i>	10876	1.25 (1-2)
<i>Escherichia coli</i>	25922	3.25 (1-9)
<i>Serratia marcescens</i>	43862	20.13 (2-48)
<i>Serratia liquefaciens</i>	27592	1.25 (1-2)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853	6 (1-13)
<i>Enterobacter cloacae</i>	13047	6.25 (1-22)
<i>Klasiella oxytoca</i>	43086	18.75 (1-56)

†Data are reported as median (range).

Fig. 1 Bact/ALERT result: mean time to detection following 16-24 hour incubation at 37 °C

Organism	Mean time (hour)		P-value
	Time 0 [†]	Time 24 ^{††}	
<i>S. aureus</i>	12.1 ± 0.6	7.4 ± 0.4	0.001
<i>S. epidermidis</i>	17.9 ± 0.3	15.9 ± 1.2	0.05
<i>B. cereus</i>	9.6 ± 0.3	4.8 ± 0.3	0.001
<i>E. coli</i>	11.7 ± 0.5	6.4 ± 1.0	0.001
<i>S. marcescens</i>	11.2 ± 0.8	5.2 ± 2.0	0.004
<i>S. liquefaciens</i>	18.2 ± 0.5	12.4 ± 0.0**	0.001
<i>P. aeruginosa</i>	16.9 ± 0.9	9.4 ± 1.2*	0.001
<i>E. cloacae</i>	12.3 ± 0.9	13.2 ± 0.0*	N.S.
<i>K. oxytoca</i>	11.8 ± 0.9	3.7 ± 0.1	0.001

†Sampling immediately after inoculation (sample time, 0 hr).

††Sampling 24hours after inoculation (sample time, 24 hr).

Values are the mean ± SD, n=4, * ; n=3, * * ; n=1.

Fig. 2 eBDS result: mean levels of %O₂ following 16-24 hour incubation at 35 °C

Organism	Mean percent oxygen (%)		P-value
	Time 0 [†]	Time 24 ^{††}	
<i>S. aureus</i>	3.14 ± 0.4	1.38 ± 0.3	0.002
<i>S. epidermidis</i>	6.89 ± 0.9	4.33 ± 0.7	0.002
<i>B. cereus</i>	4.65 ± 3.1	1.37 ± 0.3	0.006
<i>E. coli</i>	4.68 ± 0.6	1.49 ± 0.5	0.001
<i>S. marcescens</i>	2.28 ± 0.5	0.55 ± 0.1	0.02
<i>S. liquefaciens</i>	9.60 ± 1.7	0.80 ± 0.0**	0.001
<i>P. aeruginosa</i>	14.21 ± 2.0	2.68 ± 1.9*	0.001
<i>E. cloacae</i>	0.00 ± 0.0	0.39 ± 0.8*	N.S.
<i>K. oxytoca</i>	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	N.S.

[†]Sampling immediately after inoculation (sample time, 0 hr).

^{††}Sampling 24hours after inoculation (sample time, 24 hr).

Values are the mean ± SD, n=4, * ; n=3, * * ; n=1.

Fig. 3 Detection rates of *S. aureus*, *E. coli*, *S. marcescens*, *K. oxytoca* (N=4) and *E. cloacae* (Time 0; N=4, Time 24; N=1)

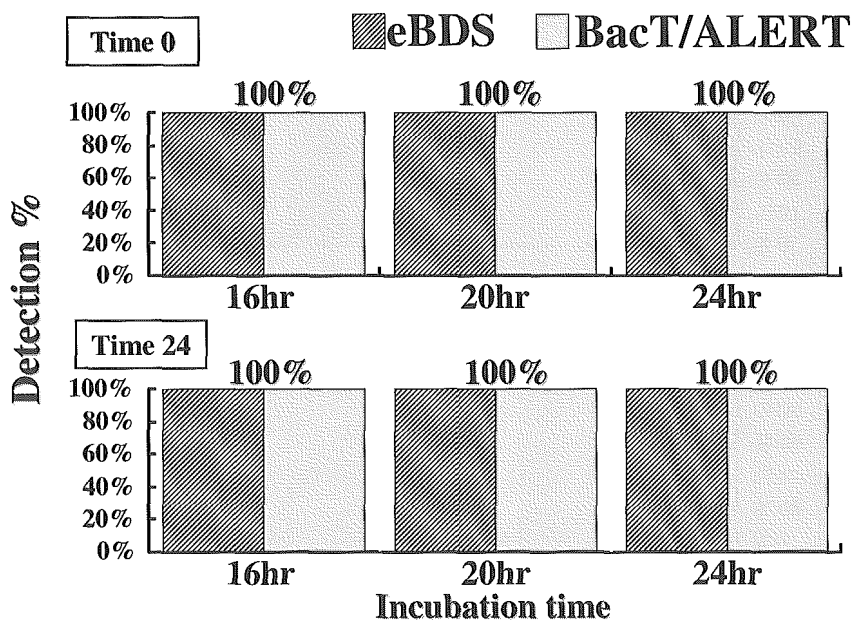


Fig. 4 Detection rates of *S. epidermidis* (N=4)

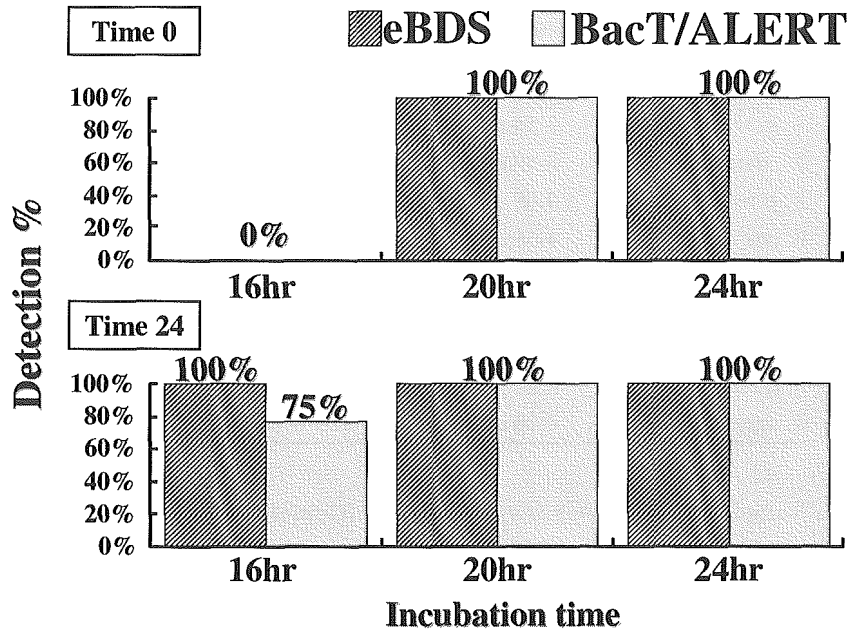


Fig. 5 Detection rates of *S. liquefaciens* (Time 0; N=4, Time 24; N=1)

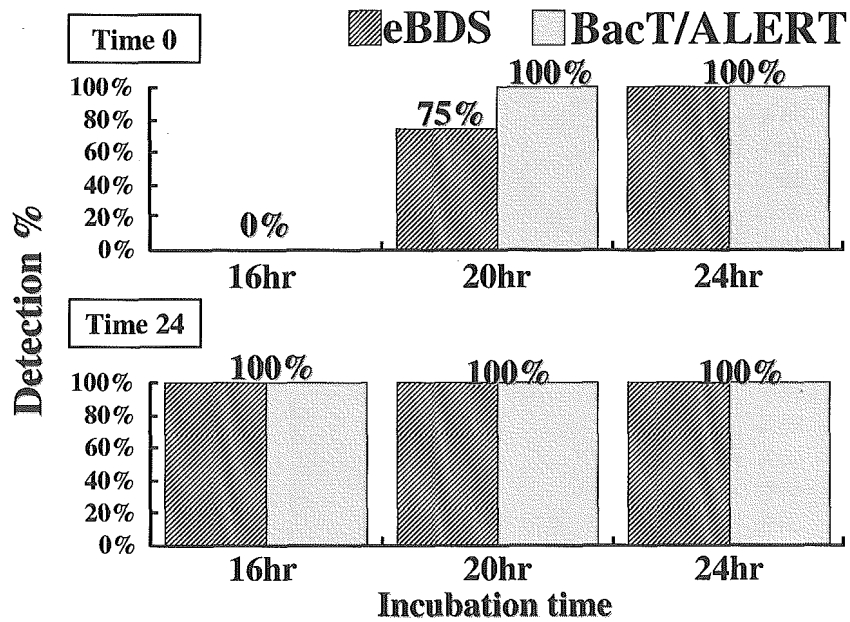


Fig. 6 Detection rates of *B. cereus* (N=4)

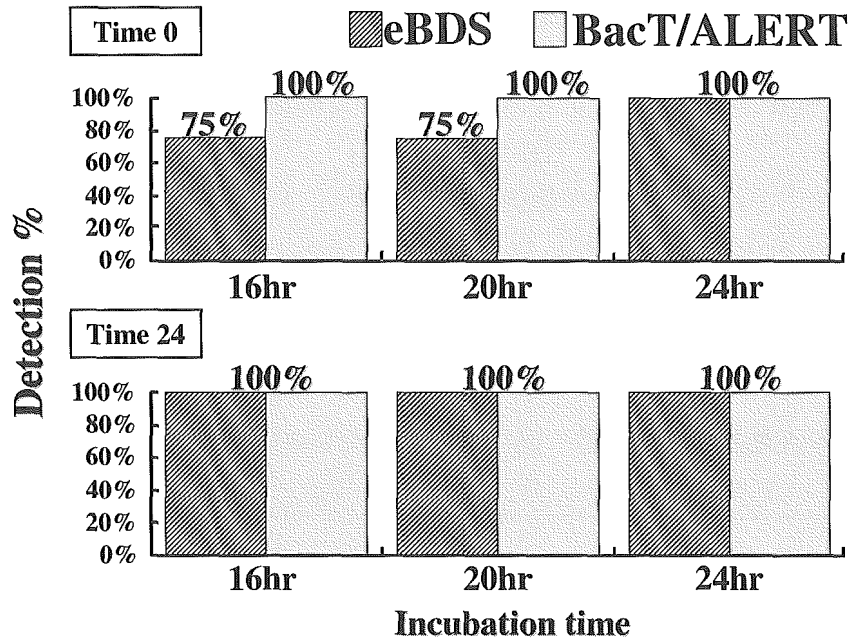
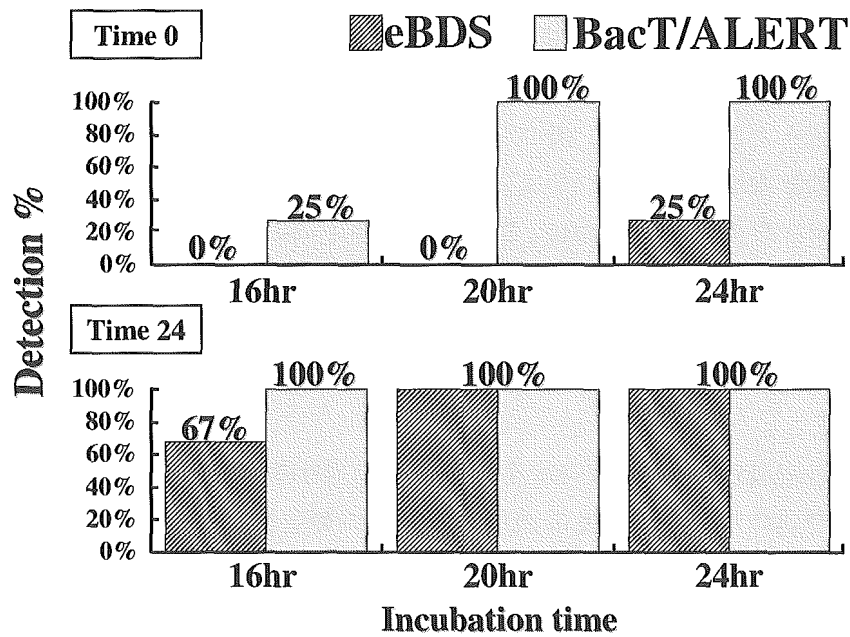


Fig. 7 Detection rates of *P. aeruginosa* (Time 0; N=4, Time 24; N=3)



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事業
平成 17 年度研究報告書

輸血用血液の細菌汚染防止と血小板製剤の有効期限延長に関する研究
(H17-医薬 - 051)
分担研究報告書

高酸素透過性バッグを用いた輸血用血小板の 7 日間保存：
ずり応力下血小板機能測定系による評価

分担研究者 宮田茂樹 国立循環器病センター輸血管理室医長

研究要旨：

血小板製剤の有効期限を延長することの妥当性を検討するために、長期保存においても血小板機能が保持できるバックとして期待される高酸素透過性バッグ PO-80 (1,000ml 容量、酸素透過性 $2,660 \pm 200 \text{ ml/m}^2 \text{ day atm}$) を用いて保存した濃厚血小板製剤中の血小板機能を、従来の汎用バッグ PO-65 (1,000ml 容量、酸素透過性 $2,200 \pm 200 \text{ ml/m}^2 \text{ day atm}$) を用いた濃厚血小板製剤と比較することで、高酸素透過性バッグが、長期保存 (7 日間保存) 血小板機能に与える影響について、生理的流動状況下を模倣するずり応力下血小板機能評価系を用い検討した。健康成人から、アフエレーシス採血を行ない、高酸素透過性バッグ PO-80 を用いて、7 日間保存した後、試験当日に供与を受けた。一方、コントロールとして赤十字血液センターから、汎用バッグ PO-65 を用いてアフエレーシス採血を行った濃厚血小板の中で、有効期限切れ、検査落ち等の理由で医療機関で使用できない濃厚血小板製剤について 1,3,5,7 日間保存後、試験当日に供与を受けた。

輸血のプロセスを模倣するために、これらの製剤中の血小板を含んだ再構成全血を作成し、コラーゲン type I を固相化したガラスプレートを組み込んだ平行板型フローチャンバーを用いたずり応力下血小板機能測定系にて、その血栓形成能を評価した。血栓形成過程をリアルタイムに観察するとともに、注入開始 10 分後に形成された血栓の状態と高さを測定した。

結果、高酸素透過性バッグ PO-80 を用いた濃厚血小板製剤では、汎用バッグ PO-65 の 7 日間保存で認められた 3 次元的血栓形成過程の障害が、高酸素透過性バッグを用いることで軽微となり、3 次元的血小板血栓形成過程が 7 日保存後でも比較的良く保持され、汎用バッグの 5 日間保存後の血小板機能と比しても遜色ない結果となった。血小板製剤の保存バッグの改良、保存条件の検討により、長期保存に耐えうる血小板機能を保持した濃厚血小板製剤を供給することが、可能となることが示唆された。

A. 研究目的

濃厚血小板製剤は、有効期限が欧米の5日間(7日間)と比較して日本では3日間(72時間)と短い。近年、悪性腫瘍、特に血液疾患に対する化学療法の進歩により、その支持療法、さらには心臓血管外科手術等の増加による止血のための濃厚血小板製剤の需要が増大しつつある。一方、少子高齢化により献血者数は頭打ちの傾向にあり、必要血小板製剤の確保が問題になりつつある。血小板製剤の有効期限の延長は血小板製剤の有効期限切れを防ぎ、供給の増加につながるため、早急に検討すべき問題である。血小板製剤の有効期限を現在の72時間から欧米と同程度の5日間もしくは7日間へ延長することの妥当性を評価する一つの要件として、長期保存によっても血小板機能が保持されているかどうかの検討が重要となる。しかしながら、現時点で *in vivo* 血小板機能を的確に反映できる *in vitro* 測定系は存在しない。

近年、血小板機能を評価する場合に、生体内で血小板が存在する環境である流動状況下での血小板機能を考慮する必要性が指摘され、ずり応力下血小板機能評価の新しい概念が確立されつつある。生理的条件に近い系として、長期保存が血小板機能に与える影響を *in vitro* で、血小板膜レセプターと各種粘着蛋白との相互作用を含めた詳細な評価が可能となる。

今回、我々は、新たに開発された高酸素透過性バッグを用いて保存した濃

厚血小板製剤中の血小板機能を、従来から汎用されているバッグを用いた濃厚血小板製剤と比較することで、高酸素透過性バッグが、長期保存(7日間保存)血小板機能に与える影響について、生理的流動状況下を模倣するずり応力下血小板機能評価系を用い検討した。

B. 研究方法

1) ずり応力下血小板機能測定

コラーゲン Type I を固相化したガラスプレートを組み込んだ平行板型フローチャンバー内に、血小板を蛍光色素(メバクリン)で標識した全血を流し込み、高ずり応力(2000/s)のかかる部位でのコラーゲン固相表面上での血小板血栓形成過程を倒立型蛍光顕微鏡でリアルタイムに観察した。また、これらの画像を CCD カメラによりコンピュータに取り込みデジタル化し、画像解析を行った。さらに形成された血小板血栓を Z 方向にスキャンすることにより血小板血栓の 3 次元イメージを再構築し、血小板血栓の高さを測定することにより血小板機能のもう一つの指標とした。

2) 血小板除去再構成血の作成

評価する血小板製剤と ABO 式ならびに Rh(D) 同型で、なおかつ不規則抗体の陰性を確認した健康成人からインフォームドコンセントを得て採血を行い、抗凝固剤として選択的抗トロンビン剤であるアルガトロバンを終濃度 125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるよう添加した。採血した全血を 800 rpm で 10 分間遠心し、その血小

板富血漿 (platelet rich plasma: PRP) を採取した。残った血液から buffy coat を注意深く取り除いた後、3,600 rpm にて 10 分間遠心し、その上清を血小板欠乏血漿 (platelet poor plasma: PPP) として採取した。

最終的に残った赤血球成分と PPP をヘマトクリットが 45% になるように混合し、血小板除去再構成血とした (陰性コントロール: PPP 加再構成血)。また、PRP と PPP を最終血小板濃度が 150,000/ μ l、ヘマトクリットが 45% となるように赤血球成分と混合し、正常コントロール (PRP 加再構成血) とした。

3) 保存濃厚血小板の機能評価

インフォームドコンセントを得た健康成人から、新たに開発された高酸素透過性バッグ PO-80 (1,000ml 容量、酸素透過性 2,660 \pm 200 ml/m²/day/atm, 川澄化学工業、British Journal of Haematology. 126: 153-9, 2004) を用いて赤十字血液センターの標準手順 (SOP) に則り、従来の濃厚血小板製剤と同様にアフエレーシス採血を行なった。さらに、大阪府赤十字血液センターにて Good Manufacturing Practice (GMP) に則った標準手順書に基づき 7 日間保存した後、swirling 陽性を確認の上、試験対象製剤として試験当日に供与を受けた。

一方、コントロールとして大阪府赤十字血液センターから、従来使用している保存バッグ (PO-65: 1,000ml 容量、酸素透過性 2,200 \pm 200 ml/m²/day/atm, 川澄化学工業) を用いてアフエレーシ

ス採血を行った濃厚血小板の中で、有効期限切れもしくは検査落ち等の理由で医療機関で使用できない濃厚血小板製剤について GMP に則った標準手順書に基づき 1,3,5,7 日間保存され、swirling 陽性が確認できた製剤を、試験対象製剤として試験当日に供与を受けた。

試験対象製剤と ABO 式ならびに Rh(D) 同型で、なおかつ不規則抗体の陰性を確認した健康成人全血から、上述した方法で、赤血球成分、血小板富血漿 (PRP)、血小板欠乏血漿 (PPP) を作成した。供与を受けた濃厚血小板を最終血小板数が約 150,000/ μ l、ヘマトクリットが 45% となるように、赤血球成分ならびに PPP と混合し、再構成血を構築した (PC 加再構成血)。

これら検体を、生体内で血小板が存在する環境である流動状況下を模倣できるシステムであるコラーゲン type I を固相化したガラスプレートを組み込んだ平行板型フローチャンバーを用いたずり応力下血小板機能測定系にて、その血栓形成能を評価した。血栓形成過程をリアルタイムに観察するとともに、注入開始 10 分後に形成された血栓の状態と高さを測定した。

C. 研究結果

1) 再構成血のずり応力下血小板血栓形成過程の検討

健康成人 (n=11) からの血液を用い、正常コントロールと陰性コントロールの測定を行った。正常コントロールとしての PRP 加再構成血 (最終血小板数

155,818 (平均) \pm 15,236 (1 S.D.) / μ l, n=11)と陰性コントロールとしてのPPP加再構成血(最終血小板数 20,545 \pm 7487/ μ l, n=11)との比較検討を行った。

それぞれの検体を並行板型フローチャンバーに流し込み、2,000/sの高ずり速度下で、測定開始後3分、5分、10分後形成された血小板血栓の経時的変化をFigure 1に示す(血栓の高さが中央値を示した実験の像の代表値)。PRPを用いた陽性コントロールは上段、PPPを用いた陰性コントロールを下段に示す。PRP加構成血では、コラーゲンを固相化した表面への血小板のrollingから初期粘着、その後の血小板凝集、さらには、3次元的血小板血栓形成過程が観察された。一方、陰性コントロールとして用いたPPP加構成血を用いた実験では、血小板がまばらにコラーゲンを固相化した表面に粘着するのみで、三次元的な血栓成長は認められなかった。

測定開始10分後に形成された血小板血栓をZ方向にスキャンすることで血小板血栓の3次元イメージを再構築し、血小板血栓の高さを測定した。陰性コントロールとして用いたPPP加構成血の最終的な血栓の高さは、3.36 \pm 0.9 μ m (n=11)であり (figure 5: PPP)、正常コントロールとして用いたPRP加構成血の、血小板血栓の高さは21.7 \pm 3.0 μ m (n=11)であった (figure 5: PRP)。血小板再添加による血栓形成の回復が有意に認められた。

2) 従来汎用されているバッグ (PO-65)

を用いて保存した濃厚血小板製剤のずり応力下血栓形成能に対して保存期間が与える影響

従来汎用されているバッグ (PO-65)を用いてアフレーシス採血を行った保存期間の異なる(1、3、5、7日後)濃厚血小板製剤を研究方法の項に示した方法で、血小板終濃度150,000/ μ lとなるよう添加したPC加再構成血の血小板血栓形成過程を観察した。上記コントロール実験と同様に2,000/sの比較的高ずり速度下で、測定開始後3分、5分、10分後形成された血小板血栓の経時的変化を観察した。1日保存血小板製剤では、正常コントロールであるPRP加再構成血 (figure 1: 上段) とほぼ同様に、コラーゲンを固相化した表面への血小板のrollingから初期粘着、その後の血小板凝集、さらには、3次元的血小板血栓形成過程が観察された (figure 2: 上段)。しかしながら、保存期間3日の血小板製剤を用いた実験では (figure 2: 下段)、初期粘着はほぼ正常に認められるものの、3次元的血栓成長過程に若干の障害が観察された。さらに、5日間保存 (figure 3: 上段)、7日間保存 (figure 3: 下段) では、より3次元的血栓形成過程の障害が明らかとなり、個々の血小板血栓の集合が小さくなる現象が観察された。測定開始10分後に形成された血小板血栓をZ方向にスキャンすることで血小板血栓の3次元イメージを再構築し、血小板血栓の高さを測定した。

1日保存血小板製剤を添加したPC加再構成血(最終血小板数142,000/ μ l,

n=1) の最終血小板血栓の高さは、18.8. μm で、正常コントロールである PRP 加再構成血とあまり差が無かった[figure 5: 1 day (PO-65)]。しかしながら、3 日間保存血小板製剤 (最終血小板濃度 $169,600 \pm 8,000 / \mu\text{l}$, n=3)、5 日間保存血小板製剤 (最終血小板濃度 $155,500 \pm 12,400 / \mu\text{l}$, n=6)、7 日間保存血小板製剤 (最終血小板数 $154,800 \pm 9,400 / \mu\text{l}$, n=4) を加えた PC 加再構成血を用いた実験では、最終的な血小板血栓の高さは 3 日間保存で $14.6 \pm 5.54 \mu\text{m}$ [figure 5: 3 days (PO-65)], 5 日間保存で $10.3 \pm 0.59 \mu\text{m}$ [figure 5: 5 days (PO-65)], 7 日間保存で $7.0 \pm 0.82 \mu\text{m}$ [figure 5: 7 days (PO-65)] と、保存期間が長くなるにつれて最終的な血小板血栓の高さが低くなる傾向が認められた。また、7 日間保存血小板では、血栓形成過程において、一旦形成された血小板血栓が崩壊していく過程が観察され、長期保存による 3 次元的血栓形成過程への不可逆的な障害が起こることが示唆された。5 日間保存で正常コントロールに比して血小板血栓の高さは約 50% に減少した (figure 5)。

3) 高酸素透過性バッグ (PO-80) が長期保存(7 日間)濃厚血小板製剤中の血小板機能 (ずり応力下血栓形成能) に与える影響

新たに開発された高酸素透過性バッグ PO-80 を用いてアフレーシス採血を行い 7 日間保存した濃厚血小板製剤を研究方法の項に示した方法で、血小板終濃度 $150,000 / \mu\text{l}$ となるよう添加した PC 加再構成血の血小板血栓形成過

程を観察した (最終血小板濃度 $152,000 / \mu\text{l}$, n=1)。上記コントロール実験と同様に $2,000/\text{s}$ の比較的高ずり速度下で、測定開始後 3 分、5 分、10 分後形成された血小板血栓の経時的変化を figure 4 に示す。コラーゲンを固相化した表面への血小板の rolling から初期粘着、その後の血小板凝集、さらには、3 次元的血小板血栓形成過程が観察された。

驚いた事に、従来汎用されているバッグ (PO-65) の 7 日間保存で認められた 3 次元的血栓形成過程の障害が、高酸素透過性バッグ (PO-80) を用いることで軽微となり、その結果、測定開始 10 分後に形成された血小板血栓を Z 方向にスキャンすると得られた最終血小板血栓の高さは、 $11.8. \mu\text{m}$ [figure 5: 7 days (PO-80)] となった。これは、従来汎用されているバッグ (PO-65) の 7 日間保存血小板製剤の最終血小板血栓の高さ $7.0 \pm 0.82 \mu\text{m}$ [figure 5: 7 days (PO-65)] と比較して非常に良好な値であり、従来汎用されているバッグ (PO-65) の 5 日間保存の最終血小板血栓の高さ $10.3 \pm 0.59 \mu\text{m}$ [figure 5: 5 days (PO-65)] に比しても遜色ない値であった。

D. 考案

血小板製剤を支持療法として長期間必要とする悪性腫瘍、特に血液疾患患者での濃厚血小板製剤の使用、止血困難に陥り易い心臓、肝臓外科等に代表される外科疾患患者の増加により、濃厚血小板製剤の必要性がますます増加することが予想される。一方、日本社

会の少子高齢化に伴う献血者数の頭打ちや、その減少が現実となりつつあり、血小板製剤の需給バランスの悪化とともに、安全な輸血療法に支障を来たすことが懸念される。血小板製剤の有効期限の延長は、血小板製剤の有効期限切れを減少させ、血小板製剤の需給関係の改善に対して有効な手段となりうるため、期限延長の早期導入が待たれる。実際、日本における3日間(72時間)と比較して欧米では5日間と血小板製剤の保存可能期間が長い。さらに、欧米では7日間に延長、もしくはその試みもなされている。

血小板製剤の保存期間延長に当たっては、特に細菌汚染ならびに血小板機能の2つの観点について慎重に考慮する必要がある。本研究では、保存期間が血小板機能に与える影響について、*in vitro*での評価を行った。

欧米における血小板製剤の機能に対する保存期間の与える影響についての報告を見てみると、*in vitro*測定系では、血小板活性化マーカーの一つであるp-selectinの発現、血小板凝集計を用いたADP等アゴニストに依存した血小板凝集能、Hypotonic shock response、Extent of shape change等が機能評価指標として用いられており、*in vivo*測定系では、血小板回収率等を用いて評価されている。しかしながら、最近、血小板機能を検討する際の測定環境の重要性が指摘されている。すなわち、血小板は生体内では、血管内皮近傍を流れ、血流の特性による速度勾配によって生じる

ずり応力に絶えず晒されながら循環している。血管内皮細胞は nitric oxide, prostaglandin I₂等を産生し、血小板粘着が起こらないように血管のダイナミクスを支えている。しかし、一旦血管内皮に、外傷等で損傷が起こると、血管内皮下組織(主にコラーゲンからなる)と反応する形で血小板粘着が起こり、それに引き続いて血小板凝集、血栓形成が引き起こされる。この際、ずり応力依存性に血小板粘着、凝集が引き起こされることが明らかとなっている。したがって、生体内での血小板機能を評価する際には、血流存在下(ずり応力下)における血小板の機能を常に考慮する必要がある。

今回、我々は、血小板製剤の有効期限を延長することの妥当性を検討するために、長期保存においても血小板機能が保持できるバッグとして期待される高酸素透過性バッグ PO-80(1,000ml容量、酸素透過性 2,660 ± 200 ml/m²/day/atm)を用いて保存した濃厚血小板製剤中の血小板機能を、従来から汎用されているバッグ PO-65(1,000ml容量、酸素透過性 2,200 ± 200 ml/m²/day/atm)を用いた濃厚血小板製剤と比較することで、高酸素透過性バッグが、長期保存(7日間保存)血小板機能に与える影響について、生理的流動状況下を模倣するずり応力下血小板機能評価系を用い検討した。

従来汎用されているバッグ(PO-65)では、血小板の初期粘着はいずれの保存期間においても保持されていたが、

保存期間が1日、3日、5日、7日と長くなるにつれて血小板血栓の3次元成長が障害され、形成された血小板血栓の高さが減少する傾向が認められた。5日間保存で正常コントロールに比して血小板血栓の高さは約50%に減少した。また、7日間保存血小板では、血栓形成過程において、一旦形成された血小板血栓が崩壊していく過程が観察された。このことは、濃厚血小板製剤において、長期間保存により血小板の活性化過程に不可逆的な障害が起きる可能性が示唆された。

ところが、新たに開発された高酸素透過性バッグ PO-80 を用いた濃厚血小板製剤では、従来汎用されているバッグ (PO-65) の7日間保存で認められた3次元的血栓形成過程の障害が、高酸素透過性バッグを用いることで軽微となり、コラーゲンを固相化した表面への血小板の rolling から初期粘着、その後の血小板凝集、さらには、3次元的血小板血栓形成過程が7日保存後でも比較的良く保持されていた。高酸素透過性バッグ PO-80 を用いた濃厚血小板製剤の7日保存後でも、従来汎用されているバッグ (PO-65) の5日間保存後の血小板機能と比しても遜色ない結果となった。

今回は、実施数が少なく、preliminary な結果に過ぎず、今回確立した方法で、今後実施症例数を重ねることが重要であるが、今回の実験結果から、血小板製剤の保存バッグの改良、保存条件の検討により、長期保存に耐えうる血小

板機能を保持した濃厚血小板製剤を供給することが、可能であると思われた。より血小板機能が保存される条件を今後、さらに検討していく予定である。

E. 結論

- 高酸素透過性バッグ PO-80 を用いた濃厚血小板製剤では、汎用バッグ PO-65 の7日間保存で認められた3次元的血栓形成過程の障害が、高酸素透過性バッグを用いることで軽微となり、血小板機能、特に3次元的血小板血栓形成過程が7日保存後でも比較的良く保持され、汎用バッグの5日間保存後の血小板機能と比しても遜色ない結果となった。
- 血小板製剤の保存バッグの改良、保存条件の検討により、長期保存に耐えうる血小板機能を保持した濃厚血小板製剤を供給することが、可能となることが示唆された。

F. 健康被害など

特になし。

G. 関連する発表論文

1. 宮田茂樹: 心臓外科における輸血. 外科. 2005; 67: 313-318.
2. 宮田茂樹: 自己血輸血と血液準備. 新心臓血管外科管理ハンドブック. 国立循環器病センター心臓血管外科部門編 南江堂 2005; 5-8.
3. 宮田茂樹、亀井政孝: 術後出血と管理輸血. 新心臓血管外科管理ハンドブック

国立循環器病センター心臓血管外科部
門編 南江堂 2005; 81-83.

関連する学会発表

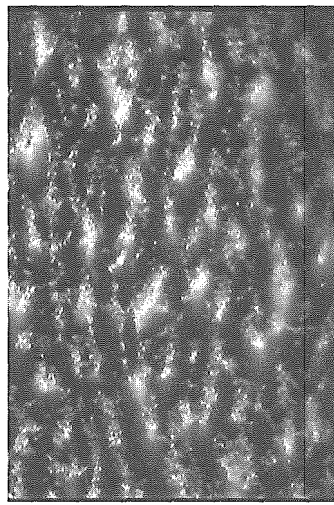
- 1) 宮田茂樹: 血小板保存期間と血小板機能. 第 29 回日本血液事業学会. 仙台、2005.

H. 特許・知的所有権など

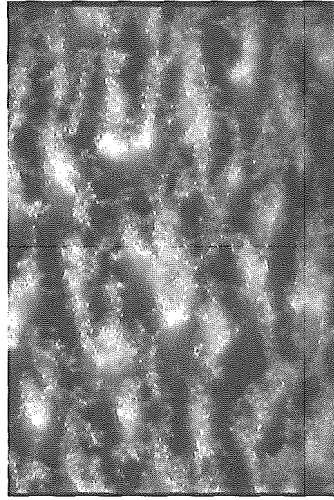
特になし。

Time-course images of platelet thrombus growth under shear stress conditions

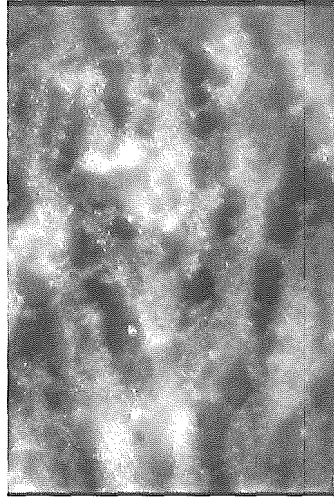
Positive control



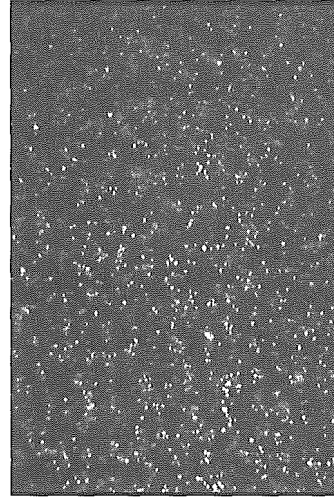
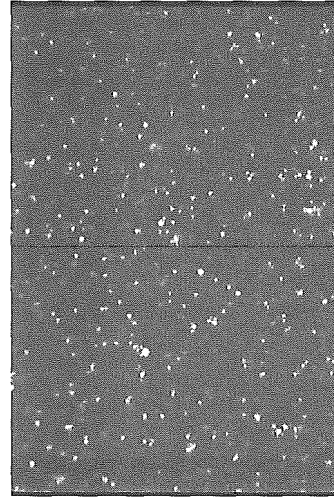
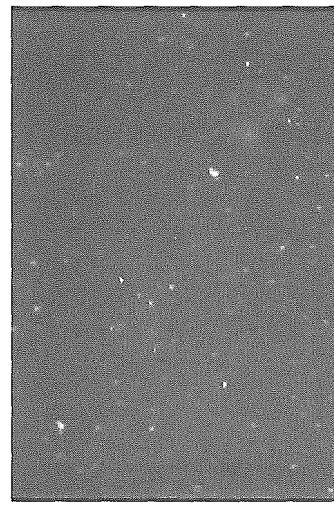
3 min



5 min

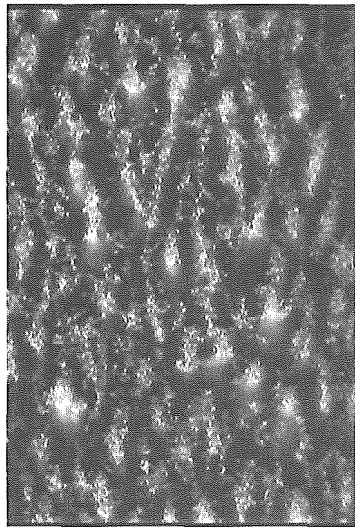


10 min



Negative control

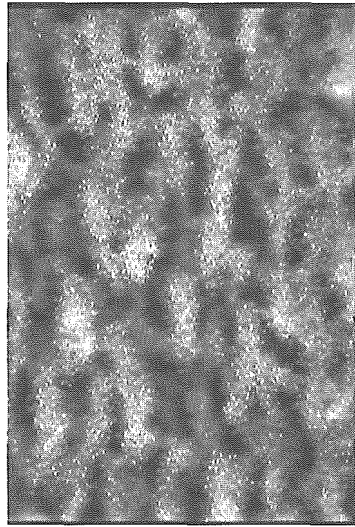
1-day-stored PC in PO-65 bag



3 min

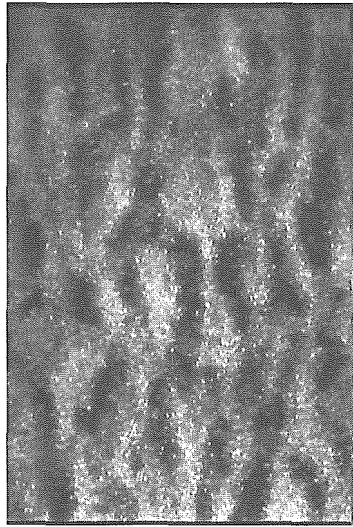
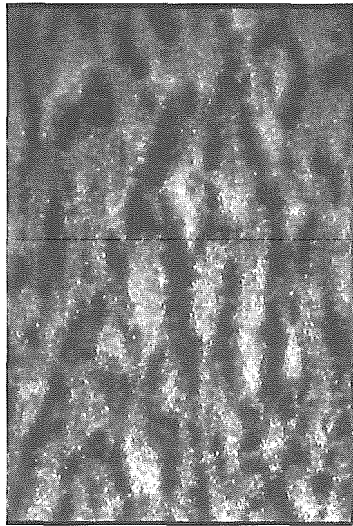


5 min

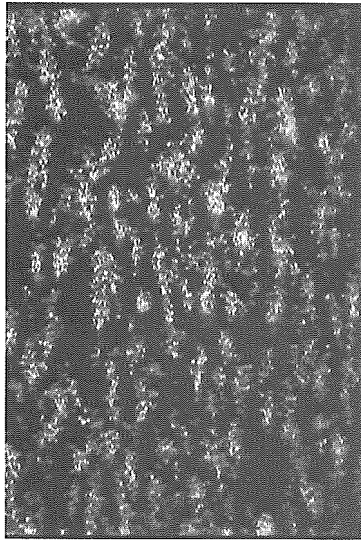


10 min

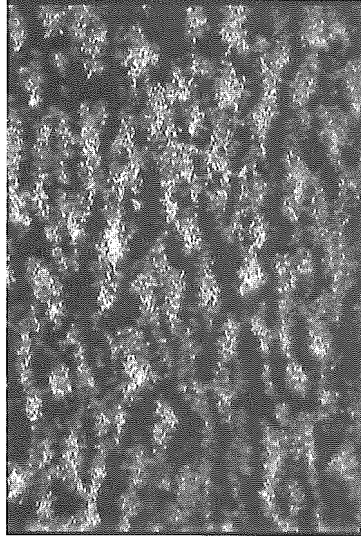
3-day-stored PC in PO-65 bag



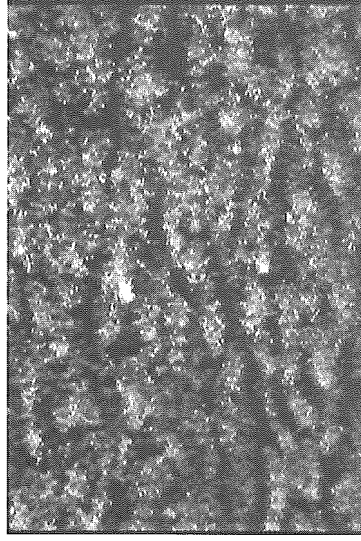
5-day-stored PC in PO-65 bag



3 min

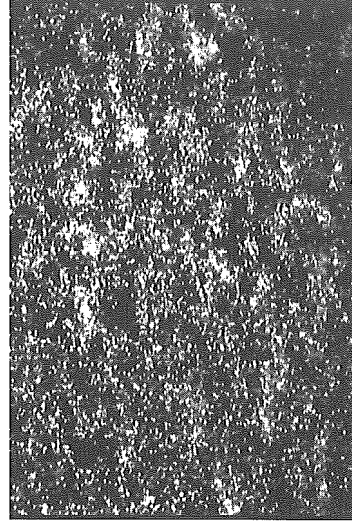
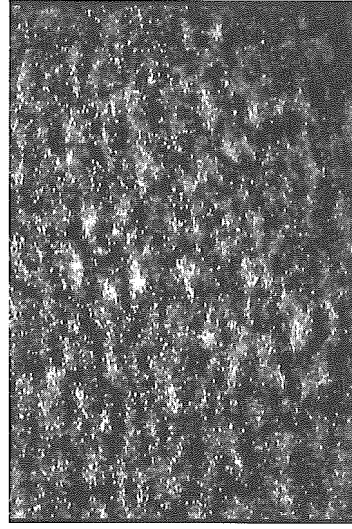
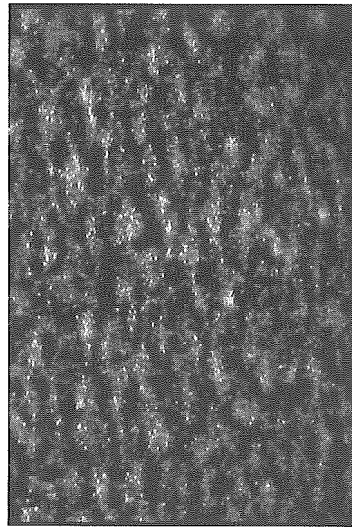


5 min

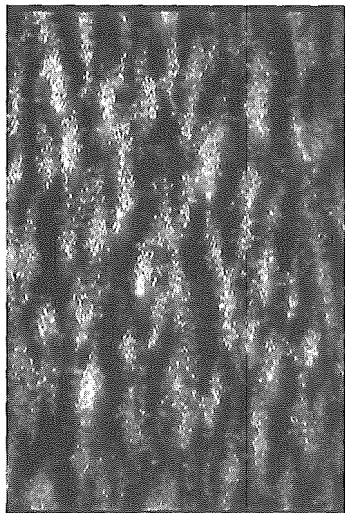


10 min

7-day-stored PC in PO-65 bag



7-day-stored PC in PO-80 bag



3 min



5 min



10 min