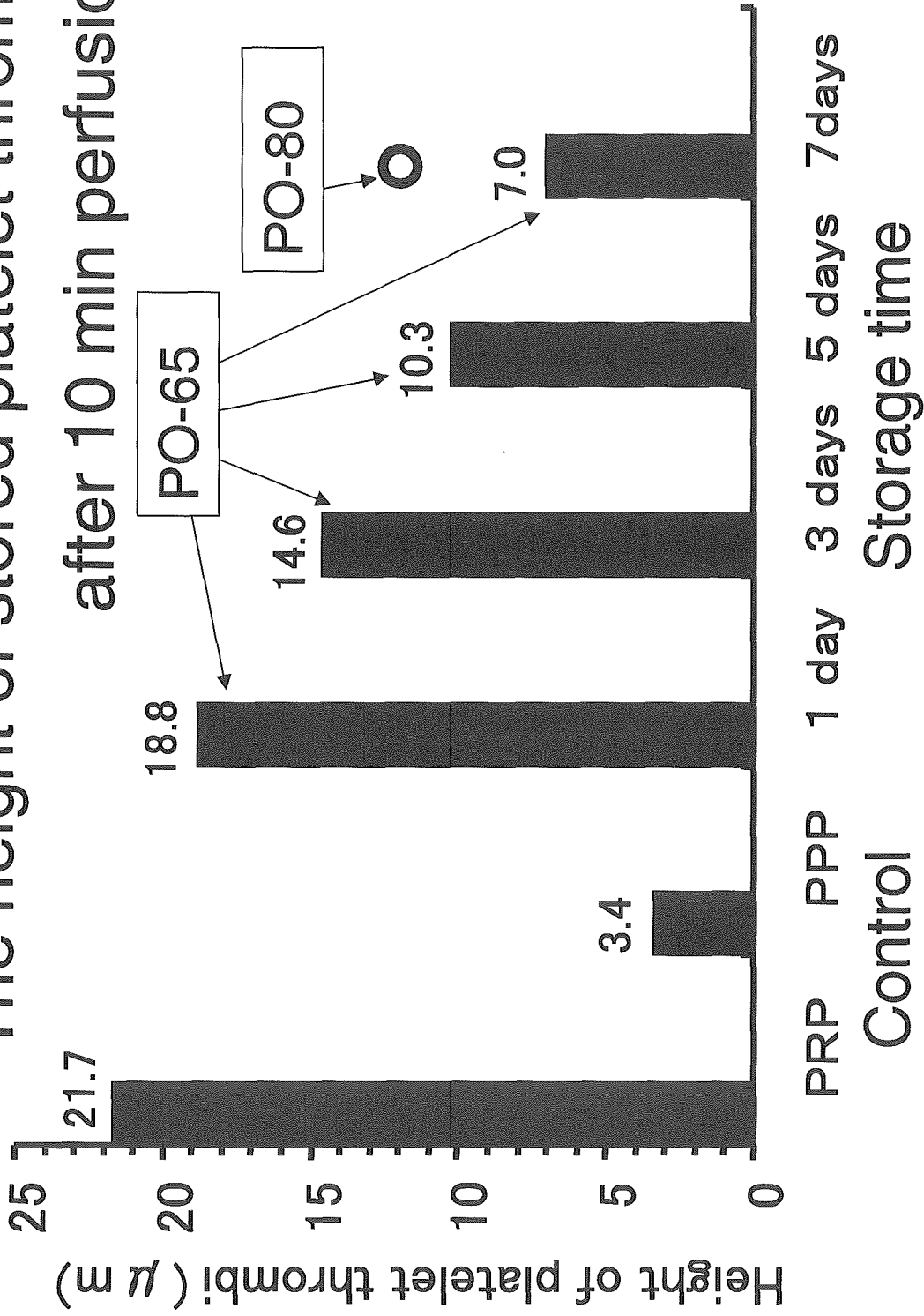


The height of stored platelet thrombi after 10 min perfusion



厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

平成17年度研究報告書

「輸血用血液の細菌感染防止と血小板製剤の有効性期限延長に関する研究」

(H17-医薬-051)

分担研究報告書

細菌混入防止対策の世界の情勢

分担研究者： 山口一成 部長

国立感染症研究所 血液・安全性研究部

共同研究者： 前山順一 国立感染症研究所 血液・安全性研究部

研究要旨：

ここ数年でヨーロッパや北米では、血小板製剤に輸血前の細菌検出を行うために自動化培養システム(BacT/ALERT、Pall DBS、Scansystem など)を導入する国が増加してきた。しかしながら、義務として行っているところはまだ少数である。また、さらに輸血後の敗血症のリスクを減少させるために、ヨーロッパでは、細菌や病原体を不活化する技術(INTERCEPT Blood system)が取り入れられつつある。

はじめに

現在、WHO の安全な血液および血液製剤に関する指針¹⁾にもあるように、世界的に血小板の有効期限は5日であることが多い。血小板の保存温度は20～24℃であり、保存期間中の細菌汚染の危険がある。日本では、血小板の保存期間は3日であり、細菌汚

染の点からは危険性がより低いと考えられる。

しかしながら一方で NAT 検査の導入等により実質的な有効期限が短くなっているため血小板の受給に問題が生じる可能性がある。また、有効期限を長くすることにより、使用率も高くなると考えられる。このため、有効期限

を5日(〜7日)に延ばすための有効性と安全性の研究が活発に行われている。

さまざまな細菌混入防止対策

細菌の混入そのものの頻度は、ウイルスやプリオンよりも高く、輸血後敗血症はまれではあるが、死に至ることがある。細菌の混入を防ぐための方法としては、一般に1)採血時の混入防止策として、菌血症の患者から採血しないためのドナースクリーニングの向上、穿刺部分の皮膚の消毒、採血初期の血液の廃棄、2)ドナー数の削減策としてアフエレーシス由来製剤の使用、3)白血球除去技術の応用などが各国とも行われている²⁾。日本では、アフエレーシス由来製剤の使用が大半でそのことが血小板輸血敗血症の減少に好影響を与えている。一方、諸外国では、バッフィコート由来プール血小板製剤も多く用いられている(米国ではアフエレーシス由来が69%程度である)。そのために輸血後敗血症の危険性を除くさらなる手段として細菌の輸血前検出が注目され、自動化された検出システムが導入されつつある。

米国で用いられる細菌検出システム

米国では、血小板の保存を5日としている。1983年にFDAが一旦7日に延長したが保存期間の長かった製剤での細菌性敗血症例が報告され、再び5日に戻したという経緯がある。

米国では、細菌の輸血前検出で2つの方法がまずFDAに認可された。一つは、BacT/ALERT (bioMerieux, Durham, N.C.)である。これは比色定量のためのセンサーを備えた培養ビンを用い、細菌の増殖によって生じたCO₂の増加を培養液の色の变化で検出する液体培養システムである。これはセンサーからのデータをコンピュータに取り込み、経時的に変化をとらえることができ

る。また広いスペクトルの細菌を検出できる上に、多くの細菌で12〜24時間で5CFU/ml以下の検体で検出できる感度の高い方法でヨーロッパでも広く用いられている³⁾。

もう一つの方法は、Pall eDBS (Pall, New York, USA)で、これはBacT/ALERTと異なり閉鎖系で行われる。まず約5〜6mlの検体を白血球や血小板を除くフィルターを通過させて培養バックに入れる。このとき、大部分の細菌(細菌によって通過率は異なる)が血漿とともに培養バックに入ることになる。バックには、ポリアネートルスルフェートナトリウムが入っており、これによって、血漿中の補体やライゾームタンパク質、細菌の増殖を阻害する血漿中のリポタンパク質などを不活化し、グラム陰性菌の増殖を促進する。検出は35℃で、少なくとも24時間培養後のバック上部の酸素濃度を測定することにより、その減少が細菌の増殖を示している。このシステムでは、偏性嫌気性菌は検出できない。このシステムで血小板製剤にしばしば混入することで知られている10種ほどの細菌が100〜500 CFU/ml混入した場合、24時間で96.5%、30時間で100%検出したという⁴⁾。感度の向上と培養時間減少のためにバックに血小板凝集剤と培地が入っている(Pall eDBS)。

近年、米国においては、9百万の血小板製剤が輸血されており、1000から3000に一つの細菌混入が発生している。この危険性を減少させるために、アメリカ血液銀行協会(AABB)は、2004.3.1に全ての血小板製剤について細菌混入の防止策と検出方法の基準(5.1.5.1)を適用した⁵⁾。血小板製剤には、アフエレーシス由来と全血由来があるが、上記の基準に基づいて米国の大部分の血液センターでは、アフエレーシス由来について、培養法を用いた後にリリースしている。一方、病院輸血部では、全血由来の血小板について細菌検出の責任があるが、輸血の直前に

プールされるため、培養法は難しい。このような場合は、感受性の低い方法(グラム染色、ブドウ糖・pH 測定など)を用いざるを得ないので、しばしば偽陰性という結果が得られ、致死的な細菌性敗血症の例が報告されている⁹⁾。

ヨーロッパで用いられる細菌検出システム

ヨーロッパでは、上記の細菌を培養する方法に加え更に2種類の方法が認可されている。Scansystem (Hemosystem, Marseilles, France)は、レーザーを用いた固相サイトメトリー法⁷⁾で、迅速に $10\sim 10^3$ CFU/mlの細菌が検出できる。試験時間が90分程度で終わるのは利点の一つであるが、採血後30~70時間の検体を用いる必要がある。また陽性サンプルは顕微鏡下での確定検査が必要である。最近、米国においてもScansystemがFDAによって認可された。もう一つは誘電泳動法を用いた迅速な方法(Cell Analysis, Slough, U.K.)である。(表1)

現在、このような培養法を必須の工程として経常的に行っているのが、ベルギー、オランダ、ウェールズ、香港、米国の血液センターであり、北アイルランド、スウェーデン、デンマーク、ノルウェーも多くの血小板製剤について行っている^{8,9)}。

一方、ドイツでは、品質保証のためにランダムサンプリングを行っているのみである。そのほか、米国、カナダ、中国、ブラジル、イングランド、アイルランドは、限定的な使用に留まっている。(表2)

全血由来の血小板製剤について、米国、カナダ、香港などにおいて、保存前のプールが認められておらず、個々のバックについて培養しなくてはならなくなり、容量の減少とコストに問題が生じるため、このような場合は、感受性の低い方法を用いざるを得ない。一方、ヨーロッパでは、全血由来のバッフィコー

ト血小板を保存前にプールするので、上記の培養法での細菌検出を行うのは合理的である。

ヨーロッパの幾つかの国では保存期間を7日にのばすために1日目、3日目に細菌の培養試験を施行している。スウェーデン、ノルウェーでは、白血球除去血小板製剤について、細菌培養法を用いて7日間の保存している^(8,10)。このようにヨーロッパの国々では、血小板の保存期間を7日に延ばしている国が認められる。

ベルギー、オランダ、デンマークなどヨーロッパの国々で培養法を導入した後の報告から、細菌の検出には培養法がもっとも良いと考えられており、これによる細菌混入のスクリーニングは細菌敗血症を防ぐための効果的な戦略であり、これによって保存期間を7日にのばすことができるとする報告がある。その一方で培養法だけでは延長するべきでないとする報告もある。すなわち、培養法では結果がでるまでに時間がかかり、輸血後に陽性反応がでることがあり、またわずかながら偽陰性を示すこともある。このことからその報告では輸血後感染症の全てを防ぐことはできないと結論づけている。このため更に迅速で鋭敏な細菌検出系の開発と適用が望まれている^{11,12)}。

病原体の不活化

このような状況を補う有効な手段として、病原体の不活化する技術が進歩してきた。ガンマ線照射、紫外線照射、リボフラビン+可視光線など挙げられる。現在、光化学的不活化法が注目されているが、添加物の残存の可能性、その変異源性・催奇性や芽胞菌への有効性について懸念を示している報告もある¹²⁾。また病原体の不活化処理によって、血小板の機能が維持できているかどうかという問題もあり、そのような場合は、血小板製剤

の使用量の増加が懸念されている。その一方で現在までにソラレン(psoralen)の誘導体であるアモトサレン(amotosalen)と紫外線 A を組み合わせた INTERCEPT Blood system について第三相の Clinical Trial が行われた¹³⁻¹⁵⁾。この方法は、ゼロリスクとまでは言えないながら、グラム陰性および陽性菌、好気性および嫌気性菌、芽胞菌と幅広く効果が認められ、必要な安全性を確認されている¹⁵⁾。これらの結果をもとにして、ヨーロッパではこのシステムの使用が認可された^{15,16)}。

終わりに

以上のように1)採血時の混入防止、2)ドナー数の削減、3)白血球除去技術の応用などの細菌混入防止策とともに、ここで述べた細菌の検出システムや不活化法が欧米で徐々に取り入れられつつある状況を報告した。

健康有害事象

なし。

この研究による特許や論文

特許 なし。

論文 なし。

文献

1. WHO. Safe blood and Blood products. Manual on the management, maintenance and use of blood cold chain equipment. p.7-8. 2005.
2. Brecher, M.R. and Hay, S.N. Bacterial contamination of blood component. Clin.Microbiol.Rev. 2005;18(1)195-204.
3. Brecher ME, Holland PV, Pineda AA, Tegtmeier GE, Yomtovian R. Growth of bacteria in inoculated platelets: Implications for bacteria detection and the extension of platelet storage. Transfusion 2000; 40: 1308-12.
4. Ortolano GA, Freundlich LF, Holme S, Russell RL, Cortus MA, Wilkins K, Nomura H, Chong C, Carmen R, Capetandes A, Wenz B. Detection of bacteria in leukocyte-reduced platelet concentrates using percent oxygen as a marker for bacterial growth. Transfusion 2003; 43: 1276-85.
5. AABB. Standards for blood banks and transfusion services, Bethesda, MD:AABB;2004
6. CDC. Fatal Bacterial Infections Associated with Platelet Transfusions --- United States, 2004. MMWR. 2005; 54(07);168-170, <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5407a2.htm>
7. Jacobs, M. R, Bajaksouzian, S, Windau, A, Elizabeth L, Palavecino, Yomtovian, R. et al. Evaluation of the Scansystem method for detection of bacterially contaminated platelets. Transfusion 2005; 45 :265-269.
8. Brecher, M.E., Hay, S.N., Rothenberg S.J.. Validation of BacT/ALERT plastic culture bottles for use in testing of whole-blood-derived leukoreduced platelet-rich-plasma-derived platelets. Transfusion 2004;44:1174-1178.
9. Wood, E. M., Coghlan, P. J., Keller, A. J. et al. Detection of bacterial contamination of platelete concentrates. Vox sang 2003; 85:224-239.
10. Pietersz; R.N.I., Meer, P.F., Dijkstra, M.J., Reesink. H.W. 2003. European experience with extended storage of platelet pools. <http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/03/briefing/3940b1-15-pietersz.htm>
11. Blajchman, M.A., Becker, E.A.M., Muylle,

- L. et al. Bacterial detection of platelets: current problems and possible resolutions. *Transfusion Medicine Rev.* 2005; 19:259-272.
12. Castro,E., Bueno, L., Gonzalez, R. et al Feasibility of implementaing an automated culture system for bacteria screening in platelets in the blood bank routine. *Transfusion Medicine* 2005; 15:185-195.
13. McCullough, J., Vesole, D. H., Benjamin, R. J. et al. Therapeutic efficacy and safety of platelets treated with a photochemical process for pathogen inactivation: the SPRINT Trial. *Blood* 2004;104: 1534-1541.
14. Rhenen, D., Gulliksson, H., Cazenave, J.-P. et al. Transfusion of pooled buffy coat platelet components prepared with photochemical pathogen inactivation treatment: the euroSPRITE trial. *Blood* 2003;101: 2426-2433.
15. Blajchman, M.A., Goldman M., Baeza, F. Improving the bacteriological safty of platelet transfusion. *Transfusion Medicine Rev.* 2004;18:11-24.
16. Klein, H. G. Pathogen inactivation technology: cleansing the blood supply. *J. Internal Medicine* 2005;257:224-237.

表 1. 承認されている細菌検出システム

細菌検出システム	BacT/ALERT	Pa11 BDS	Scansystem
検出方法	CO ₂ 産生	酸素消費	蛍光ラベル
感受性 (CFU/ml)	0.1	1-100	1000
検出時間	8-24時間	24時間以上	90分
閉鎖系	×	○	○

文献7)より改変

表 2. 2003年に報告された各国の細菌検出システムの導入状況

国	導入率	導入年	方法
ベルギー (フランダース)	100%	1998	Bact/ALERT
オランダ	100%	2001	Bact/ALERT
ウェールズ	100%	2003	Bact/ALERT
北アイルランド	75%	2000	Bact/ALERT
スウェーデン	60%	1996	Bact/ALERT//Pa11BDS
デンマーク	60%	1996	Bact/ALERT
ノルウェー	60%	1996	Bact/ALERT
スコットランド	10%	2000	Bact/ALERT
アイルランド	限定的		Bact/ALERT
ドイツ	限定的		Pa11BDS
アメリカ	限定的		Bact/ALERT//Pa11BDS
カナダ	限定的		Bact/ALERT
中国	限定的		Bact/ALERT
ブラジル	限定的		Bact/ALERT
英国	限定的		Bact/ALERT

文献7)より改変

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

別紙5

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
宮田茂樹	自己血輸血と血液準備	国立循環器病センター心臓血管部門	心臓血管外科管理ハンドブック	南江堂	東京	2005	5-8
宮田茂樹	術後出血と管理	国立循環器病センター心臓血管部門	心臓血管外科管理ハンドブック	南江堂	東京	2005	81-83

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
江月将史、伊藤貴俊、白濱憲昭、高木忠之、池田和彦、橋本真一、川畑絹代、尾形 隆、 <u>大戸 齊</u>	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	51(6)	578-584	2005
宮田茂樹	心臓外科における輸血	外科	67	313-318	2005

IV. 研究成果の刊行物・別冊

原 著

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

江月 将史¹⁾²⁾ 伊藤 貴俊²⁾ 白濱 憲昭²⁾

高木 忠之¹⁾ 池田 和彦¹⁾ 橋本 真一¹⁾

川畑 絹代¹⁾ 尾形 隆¹⁾ 大戸 齊¹⁾

¹⁾福島県立医科大学医学部附属病院 輸血・移植免疫部

²⁾川澄化学工業

(平成 17 年 6 月 1 日受付)

(平成 17 年 8 月 12 日受理)

MULTI-DAY STORAGE OF PLATELETS AT ROOM TEMPERATURE IN A CONTAINER WITH HIGH OXYGEN PERMEABILITY

Shoji Ezuki¹⁾²⁾, Takatoshi Ito²⁾, Noriaki Shirahama²⁾,
Tadayuki Takagi¹⁾, Kazuhiko Ikeda¹⁾, Shinichi Hashimoto¹⁾,
Kinuyo Kawabata¹⁾, Takashi Ogata¹⁾ and Hitoshi Ohto¹⁾

¹⁾Division of Blood Transfusion and Transplantation Immunology,
Fukushima Medical University School of Medicine

²⁾Kawasumi Laboratories, Inc.

The performance of platelet concentrates (PCs) for transfusion is greatly limited by their short shelf life. A highly oxygen-permeable container (PO-80, Kawasumi, Tokyo) was developed as an approach to extending the shelf-life of PCs. Here, we compared PCs containing a high number of platelets (4×10^{11} /250mL plasma/bag) stored in a PO-80 container with those stored in a standard bag (control) (PL2410, Baxter Healthcare, USA) by monitoring platelet biochemical and functional parameters for up to 9 days.

Three of six bags in the control bags had a pH below 6.2 by day 7. These PCs also showed the disappearance of swirling, a rapid drop in glucose combined with a marked increase in lactic acid, accelerated P-selectin expression on platelets and an earlier decrease in both %HSR and aggregation of platelets in the observation period. In contrast, only one of six bags had a pH below 6.2 by day 9 in the PO-80 container. Further, there was no disappearance of swirling. Other biochemical and functional parameters of PCs in PO-80 showed a slower change compared with those in the control bag. Overall, the in vitro characteristics of PCs showed a lower level of deterioration over 9 days when stored in a higher oxygen-permeable container than in a conventional bag. It is suggested that this newly developed highly oxygen-permeable PO-80 container will preserve adequate platelet function for longer storage periods and with higher PC yields.

Key words : platelet, preservation, higher oxygen-permeable container, pH, P-selectin

緒 言

血小板製剤の有効期限は国際的には5日間であるが、世界的に7日間への延長が検討され¹⁾²⁾、欧州の一部の国ではすでに7日に延長されている。一方、日本では有効期限が3日間と世界基準に比べ短い。さらに、1999年から導入されたウイルス核酸検査 (NAT) により、実質的な有効期間は2日程度であり、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化は近い将来、輸血用血液製剤の需要バランスを破綻させることが予測され、特に重症患者に使用されることの多い血小板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³⁾⁴⁾、血小板保存液⁵⁾⁶⁾、アフエーシス血小板⁷⁾などが研究され、実用化されてきた。我が国では血小板機能の劣化が早い、高単位血小板製剤(20単位)の供給が諸外国と比べて比較的多い。そこで我々は血小板製剤の有効期限延長へのアプローチとして、高単位でも長期保存が可能な酸素透過性を亢進させた新しいポリオレフィンバッグを開発した³⁾。本研究では、アフエーシス採血した高単位血小板製剤(20単位)を保存し、新バッグのin vitroにおける血小板機能保持効果を9日間に渡って評価した。

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 Healthcare Corp, USA 又は Spectra; Gambro BCT, USA) を用いて、同意の得られた12名の健康人ボランティアドナーよりアフエーシス採血により20単位相当(平均 4×10^{11} cell/250ml/bag) を採取した。採取後、同一血液型2名分の血小板を一旦プールし、高酸素透過性バッグ (PO-80) とコントロールバッグ (PL2410) に等量に分割した。室温 (20~24°C) 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日目及び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

高酸素透過性血小板バッグ (PO-80, 1,000ml 容量, 酸素透過度 $2,660 \text{ ml/m}^2 \times \text{day} \times \text{atm}$, 川澄化学工業) とコントロールバッグ (PL2410, 1,000 ml 容量, 酸素透過度 $2,024 \text{ ml/m}^2 \times \text{day} \times \text{atm}$, Baxter Healthcare Corp, USA) を比較評価した (Table 1)。

3. 血小板機能の生化学的評価項目

1) 血小板数及び平均血小板容積 (MPV) 測定
血小板数及び平均血小板容積測定はサンプル500 μ l を栄研チューブに移し、生理食塩液にて10倍希釈した液を多項目自動血球成分計測機 (Sysmex K-2000, シスメックス, 神戸) で測定した。

2) スワーリング (swirling)

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、スワーリングが容易に観察されたものを2+, 低下していたが観察可能なものを1+, 全く観察されないものを0と3段階評価し、同時に凝集塊の有無についても観察した。

3) pH 及び血液ガス (pO_2/pCO_2) 測定

pH 及び血液ガス (pO_2/pCO_2) は血液1mlが残ったシリンジをpH・血液ガス分析装置 (ABL 3, Radiometer, Copenhagen, Denmark) に装着して測定した。

4) グルコース及び乳酸

血漿中濃度を標準酵素活性で測定した。

5) 血小板凝集能測定及び低浸透圧ショック回復率 (%HSR) 測定

-40°C で保存しておいた自己血漿を用いて、測定検体中の血小板数が約 3.0×10^5 cell/ μ l となるように調整した。血小板凝集能測定は惹起試薬 (ADP 5 μ mol/l + コラーゲン 5 μ g/ml) で希釈し、

Table 1 Capacity and oxygen permeability of the control and PO-80 polyolefin containers

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

ヘマトレーサー 212 (PAC-8L, エムシーメディカル, 東京) 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 (%T₀) 及び最大透過率 (%T_{max}) を分光光度計 610nm (UVIDEC, ジャスコ, 東京) 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.

6) P-セレクチンの測定

血小板活性化マーカーである P-セレクチンは 1% パラホルムアルデヒドと 0.1% NaN₃ を含む PBS 固定液で血小板サンプルを固定後, 抗 P-セレクチン抗体 (CD62P, BD Biosciences, USA) で染色し, フローサイトメトリー (FACSCalibur, BD Biosciences) で測定した.

7) 細菌と真菌培養試験

9 日目の血小板製剤を 2 つの BACTEC Plus Aerobic/F と Plus Anaerobic/F (BD Biosciences)

を用いて細菌や真菌の汚染の有無を調べた.

4. 統計解析

測定データは平均 ± 標準偏差で表し, 値を比較する為に Wilcoxon 検定, Paired-t 検定及びカイ 2 乗検定を用いた. p 値は < 0.05 で有意差があると判断した.

結 果

1) 血小板数と MPV

血小板数は PO-80 と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 バッグ群に比べ, コントロールバッグ群で 7 日目以降値が上昇する傾向にあったが, 両群間に統計的有意差は認められなかった (Table 2).

2) スワーリング

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

Table 2 Platelet count and mean platelet volume (MPV) on storage for 9 days

		day 0	day 1	day 3	day 5	day 7	day 9
Platelet count ($\times 10^4 / \mu l$)	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
	P-value	N.S	N.S	N.S	N.S	N.S	N.S
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
	P-value	N.S	N.S	N.S	N.S	N.S	N.S

Values are the mean ± SD, n = 6.

Table 3 Characteristics of high-concentrate PCs ($4 \times 10^{11} / 250ml$ plasma/bag) during storage in PO-80 and Control bags

A) Number of PCs by swirling score						
	score at day 7			Score at day 9 *		
	0	1 +	2 +	0	1 +	2 +
PO-80	0	0	6	0	3	3
Control	0	3	3	3	2	1
B) Number of PCs by 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
Control	3	1	2	3	3	0

* P-value < 0.05

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

日目に半数 (3/6) の血小板製剤でスワーリングパターンが消失した (Table 3-A) ($P < 0.05$).

3) pH と血液ガス

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 ($P > 0.05$). 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日目にこの3例は各々 pH 6.0, 5.7, 5.7 と低い値を示した (Table 3-B).

血液ガスのうち, pO_2 は製剤調整直後 (84.9 ± 15.6 mmHg) 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 ± 13.4 mmHg), 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 ± 8.9 mmHg), その後, 1日目 ($P < 0.01$), 3日目 ($P < 0.01$) と低値を示し, 7日目以降高値 (9日目, 116.0 ± 39.0 mmHg)

を示す biphasic pattern を示し, 保存初期 (1日目, 3日目) で有意な差が確認された (Fig. 1-A). 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が, 5日目 ($P < 0.05$) と9日目 ($P < 0.01$) に有意な差が見られた (Fig. 1-B).

4) グルコースと乳酸

グルコース及び乳酸ともに保存1日目に両群間で有意な差が確認された ($P < 0.01$). 9日目のコントロールバッグ群でグルコースの著しい低下 (4.4 mmol/l) と明らかな乳酸の増加 (15.08 mmol/l) が観察され, 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が, 両群間では有意な差は確認されなかった (Fig. 2).

5) 血小板凝集能と%HSR

凝集能及び%HSR は7日目まで両バッグともに緩やかに減少する同様な推移を示し, 5日目の凝集能で有意差が認められた ($P < 0.05$). また, 9日目のコントロールバッグ群では 50% (3/6) で減

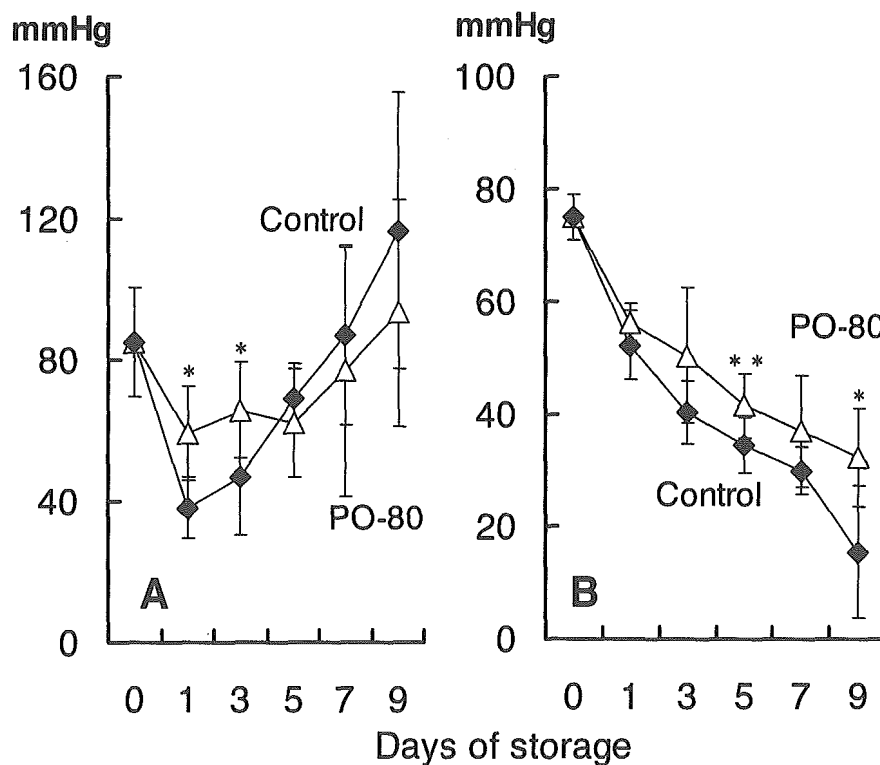


Fig. 1 Change in pO_2/pCO_2 of PCs stored for up to 9 days
Data are expressed as the mean \pm SD, $n = 6$.
A ; pO_2 , B ; pCO_2 . \triangle ; PO-80, \blacklozenge ; Control. * $P < 0.01$; ** $P < 0.05$.

少が観察されたが有意な差は認めなかった (Table 4).

6) P-セレクチン

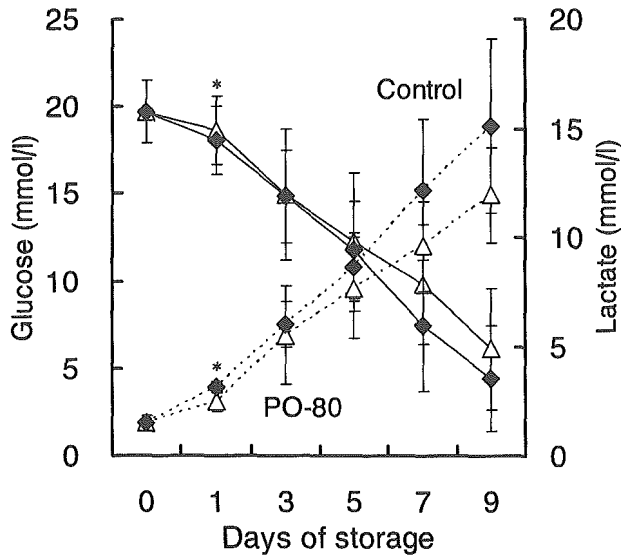


Fig. 2 Glucose level and Glycolysis metabolite (Lactate) on storage of PCs for up to 9 days
Data are expressed as the mean ± SD, n = 6. △ ; PO-80, ◆ ; Control. — ; Glucose, --- ; Lactate. *P<0.01.

膜型 P-セレクチン陽性率 (n=4) 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陽性率が高く、統計的には両群間で差が見られなかったが、9 日目では PO-80 バッグ群が平均陽性率 54.8% (n=4) に対し、コントロールバッグ群では 80.5% と高い陽性率を示した (Table 4).

7) 細菌・真菌培養試験

細菌と真菌の培養試験では、細菌・真菌の混入はすべての血小板製剤で否定された。

考 察

現在、血小板製剤は採血後、1 分間約 50~60 サイクルの速さで穏やかに水平振盪され、室温 (20~24℃) 環境下で保存されている。振盪保存が行われないと、酸素の浸透が不十分となり、その結果、血小板代謝が嫌気性に傾き、pH の低下、血小板機能が著しく低下することが知られている⁸⁾。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を持ち、また、厚さを薄くするなど条件が必要である⁹⁾。今回我々が新しく開発した高酸素透過性ポリオレフィンバッグ PO-80 は

Table 4 Platelet functions of platelets stored for up to 9 days Values are the mean ± SD.

† by paired t-test (two-tailed).

	Day	PO-80	Control	P-value†
Aggregation (%), n = 6ADP (5 μmol/l) + collagen (5 μg/ml)	0	82.8 ± 5.5 (a)		(a) vs. (b), (c), (d), (e) : 0.05
	1	79.5 ± 4.5	79.8 ± 4.3	N.S
	3	80.1 ± 1.5	80.3 ± 1.8	N.S
	5	78.5 ± 4.2	76.3 ± 3.9	N.S
	7	72.4 ± 4.4 (b)	67.7 ± 11.4 (b)	N.S
	9	62.7 ± 17.7 (c)	42.3 ± 28.6 (e)	N.S
Hypotonic shock response (%), n = 6	0	77.0 ± 5.4 (a)		(a) vs. (b), (d) : N.S; (a) vs. (c) : 0.01; (a) vs. (e) : 0.05
	1	76.6 ± 6.4	74.1 ± 3.1	N.S
	3	73.9 ± 3.0	74.9 ± 3.2	N.S
	5	71.2 ± 2.1	71.9 ± 4.1	N.S
	7	69.7 ± 3.0 (b)	63.3 ± 11.8 (d)	N.S
	9	59.8 ± 8.3 (c)	32.2 ± 31.0 (e)	N.S
P-selectin-positive (%), n = 4	0	19.68 ± 8.9 (a)		(a) vs. (b) : N.S; (a) vs. (c), (d) : 0.05; (a) vs. (e) : 0.01
	1	12.69 ± 6.3	14.60 ± 7.3	N.S
	3	16.91 ± 9.3	17.08 ± 9.0	N.S
	5	21.37 ± 7.7	23.76 ± 11.9	N.S
	7	36.61 ± 7.6 (b)	58.83 ± 21.4 (d)	N.S
	9	54.80 ± 17.6 (c)	80.54 ± 21.1 (e)	N.S

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可能とした。現在、世界で販売されているアフエーシス血小板バッグには1) PL2410 (ポリオレフィン; Baxter Healthcare Corp., USA), 2) CLX-plastic (PVC; MedSep Corp., USA), 3) ELP (PVC; Gambro BCT, USA), 国内では4) KBP-PO 及び5) HM-1000P (ともにポリオレフィン; 川澄化学工業) などがある。その中では酸素透過性が最良で、世界的に最も汎用されている PL2410 をコントロールバッグとして PO-80 を比較評価した。

血小板は通常、薄い円盤状の形をしており、時間経過と共に活性化してくると球状に変化する。この形態の変化は輸血後生存率と最も相関の高い指標とされ、円盤状から球状への変化はスワーリングパターンの低下として肉眼的に観察することができる。今回の研究では PO-80 バッグ群6個すべてのバッグで9日間スワーリングが確認できたが、コントロールバッグ群では保存9日目に半数の血小板製剤でスワーリングが消失した。スワーリング検査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。今回の結果からもスワーリングが消失した血小板製剤は著しい機能の低下が見られた為、スワーリングが低下・消失した血小板は使用しない方がよい。

保存中の血小板の機能・活性の指標として pH がよく使われている。pH の低下は血小板にとって最も有害な条件で、pH 7.6 以上は細胞に有害なダメージを与える⁸⁾、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と報告されている¹⁰⁾。今回の評価は両バッグ群ともに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日目に半数が、PO-80 バッグ群では9日目に6バッグ中1バッグで 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日間保存試験で、保存5日目に pH 6.2 以下を示した結果と同様で、血小板機能低下の指標として信頼性があると考え

られる。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⁴⁾⁸⁾¹¹⁾。今回の結果で 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に ADP+コラーゲンを加え、凝集が生じると光の透過性が増加することを原理とし、血小板の凝集能を測定する試験である。今回の結果、%HSR では PO-80 バッグ群の9日目で平均 60% を示したのに対し、コントロールバッグ群では平均 32% と膜の回復率が低かった。凝集能試験においても PO-80 バッグ群の9日目で平均 63% を示したのに対し、コントロールバッグ群では平均 42% と凝集率が低かった。また、P-セレクトイ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その陽性数が増えてくるので血小板活性のマーカーとして有用とされている¹²⁾。膜型 P-セレクトイン陽性率は高いほど血小板が劣化しているとされ¹³⁾、今回の保存9日目は PO-80 バッグ群 55% に対して、コントロールバッグ群では 80% 以上とより高い陽性率を示し、活性化されている可能性が示唆された。

現在日本で市販されている第二世代バッグ (KBP-PO, 1,000ml 容量, 酸素透過度 1,900ml/m² × day × atm, 川澄化学工業) では、高単位血小板を保存してから5日目に代謝性の減少、乳酸の著しい蓄積、pH 低下、スワーリングの消失が認められた⁴⁾。今回試験した *in vitro* の評価項目では、現保存期間である3日間でも新バッグ PO-80 はそのまま代用でき、かつ5日又は7日間に有効期限が延長されても血小板をより容易に保存できる可能性が考えられた。しかし、止血効果や血小板機能を評価する為には最終的に *in vivo* での回収率評価が必要であり、今後の検討を予定している。

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¹⁴⁾¹⁵⁾。しかし、細菌検出システムや不活化技術の導入により、欧州諸国では有効期限を7日間に延長した国もある。今回、コントロールバッグとして使用したPL2410は酸素透過度 $2,024\text{ml}/\text{m}^2 \times \text{day} \times \text{atm}$ と優れた酸素透過性を有しているため、血小板製剤を良好に保存でき、米国FDAから7日間保存のライセンスを得ている。このことから血小板製剤を保存するのに、高酸素透過性バッグを使用した方がより良いと考えられる。今回の成績からPO-80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より良好に維持される可能性が示唆された。酸素透過性を向上したバッグは高単位血小板を保存するのにより適しているものと考えられる。

文 献

- 1) Dumont L.J & van den Broeke T : Seven-day storage of apheresis platelets : report of an in vitro study. *Transfusion*, 43 : 143—150, 2003.
- 2) Dumont L.J, AuBuchon J.P, Whitley P, et al : Seven-day storage of single-donor platelets : recovery and survival in an autologous transfusion study. *Transfusion*, 42 : 847—854, 2002.
- 3) de Wildt-Eggen J, Schrijver J.G, Smid W.M, et al : Platelets stored in a new-generation container. *Vox Sang*, 75 : 218—223, 1998.
- 4) 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*, 126 : 153—159, 2004.
- 5) Pieter F, van der Meer, Ruby N.I, Pietersz, et al : Storage of platelets in additive solution for up to 12 days with maintenance og good in-vitro quality. *Transfusion*, 44 : 1204—1211, 2004.
- 6) Yuasa T, Ohto H, Suzuki A, et al : New plasma-reduced synthetic media, Fukushima cocktails, for the storage of platelets for transfusion. *Transfusion Science*, 23 : 37—46, 2000.
- 7) Edwin AB, Jeffrey L.W, Alvaro A.P : Paired comparison of Gambro Trima Accel versus Baxter Amicus single-needle plateletpheresis. *Transfusion*, 44 : 1612—1620, 2004.
- 8) Murphy S, Kahn R.A, Holme S, Phillips G.L, et al : Improved storage of platelets for transfusion in a new container. *Blood*, 60 : 194—200, 1982.
- 9) de Wildt-Eggen J, Schrijver J.G, Bouter-Valk H.J, et al : Improvement of platelet storage conditions by using new polyolefin containers. *Transfusion*, 37 : 476—481, 1997.
- 10) Ishikawa Y, Sasakawa S : Platelet storage in glow discharged-treated polyvinylchloride bags : Effects of a plasticizer on platelet hypotonic shock response. *Vox Sang*, 47 : 330—334, 1984.
- 11) Van der Meer P, Pietersz R & Reesink H : Leucoreduced platelet concentrates in additive solution : an evaluation of filters and storage containers. *Vox Sang*, 81 : 102—107, 2001.
- 12) Fijnheer R, Modderman P.W, Veldman H, et al : Detection of platelet activation with monoclonal antibodies and flow cytometry. *Transfusion*, 30 : 20—25, 1990.
- 13) Holme S, Sweeney J.D, Sawyer S, et al : The expression of p-selectin during collection, processing, and storage of platelet concentrates : relationship to loss of in vivo viability. *Transfusion*, 37 : 12—17, 1997.
- 14) Lee D.H & Blajchman M.A : Novel platelet products and substitutes. *Transfusion Medicine Reviews*, 12 : 175—187, 1998.
- 15) Kuehnert J.M, Virginia R, Roth N, et al : Transfusion-transmitted bacterial infection in the United States, 1998 through 2000. *Transfusion*, 41 : 1493—1499, 2000.

V. (財)日本公定書協会

「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」による外国人研究者招へい事業

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：米国赤十字社ホランド研究所 部長
Pathogen Management and Blood Product Improvement
Director, American Red Cross Holland Laboratory

氏 名：ステファン・J・ワーグナー 博士
Stephen J. Wagner, PhD
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 齊
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 齊
4. 招へい期間：平成 18 年 1 月 26 日より平成 18 年 2 月 6 日 (12 日間)
5. 研究課題：輸血用血小板製剤の細菌混入の検出と予防対策
Detection and prevention of bacterial contamination in platelet components
6. 研究活動の概要
1 月 27 日から 29 日までの間は福島市（こらっせ）において、主に東日本の輸血医学関係者と赤十字輸血事業関係者を対象に、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 130 名）
1 月 30 日から 2 月 2 日までの間は大阪府赤十字血液センターにおいて、西日本の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 120 名）
2 月 3 日から 5 日までは北海道赤十字血液センターにおいて、北海道地域の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米国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

Wagner 博士は米国赤十字社研究所の病原体対策血液製剤改良部長として、輸血感染症対策において、米国赤十字社の第 1 人者である。研究成果は多くの原著論文としてまとめられ、米国だけでなく世界的に大きな影響力を持っている。

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、3 か所（福島、大阪、札幌）で講演をおこなった。のべ、350 名の日本の輸血関係者と、輸血血液感染症に関する問題とその対策について、討議と検討を行った。

米国では輸血敗血症による死亡は ABO 血液型不適合に次いで多く、輸血死亡の 17-22% を占める。成分献血由来血小板製剤の 1 本/2000~5000 本が細菌混入しているが、輸血症状が出現して同一微生物が患者と血小板バッグから検出されるのは 1 本/10 000~100 000 本の割合である。死亡は血小板輸血 50 000~500 000 回に 1 人である。

採血部位の消毒と初流血排除は細菌汚染予防に特に重要である。初流血をバッグに入れなくて排除する Diversion は細菌混入を減少させる。世界中で採用されつつある。初流血排除により、表皮常在菌の混入を半分（0.35% から 0.21% に）に、また臨床的敗血症を 10 分の 1 に減少させることが可能である。「イソプロピルアルコール+ヨードチンキ法」がより有効で、綿棒は「上下消毒」が「らせん消毒法」よりも有効である。

細菌混入検出感度と検査に要する時間は反比例する。感度に優れた装置は検査時間がかかり、低感度検査法は逆に迅速に測定できる。米国では成分献血由来血小板製剤は全数が、細菌培養スクリーニング装置（BacT/ALERT、または eBDS）によって検査されている。BacT/ALERT 微生物検出装置は細菌などが混入した場合には検出培養ボトル内の二酸化炭素が増加して、ボトル底部の色調が変化することを利用した装置である。また、eBDS は酸素圧をモニターして細菌汚染を検出する装置である。両培養法とも 2 日（サンプリング待ちに 1 日、培養反応に 1 日）かかる。米国では 5 日から 7 日間に延長使用許可され、7 日血小板製剤は大規模市場後調査が行われて、その細菌検出システム（BacT/ALERT）の有用性が現在評価されている。

また、病原体不活化技術についても Wagner 博士は多くの研究を行ってきており、その意見は多くの米国輸血関係者とも符合する。病原体不活化技術は血小板製剤には Amotosalen (S-59)+紫外線、Riboflavin+紫外線が検討されている。両方法とも核酸に入り込み、架橋や一重鎖の切断などして微生物や細胞の増殖を不可能にする機序によって効果を発現する。