

表5. 細菌接種した血小板濃厚液のSensiMediaによる細菌増殖測定

細菌接種血小板濃厚液量 (ml) * 1, 2	孵置温度	陽性表示までの時間 (時間)
1	35度	12.2
0.5		14.4
0.2		20.03
0.1		22.4
1	室温	47.8

* 1. 接種細菌の種類と濃度

種類 : *Staphylococcus epidermidis*

濃度 : 約50万個 / ml

* 2. 血小板濃厚液の血算値

WBC (個 / cmm)	RBC (万個 / cmm)	HGB (g / dl)	HCT (%)	PLT (万個 / cmm)
2	3	0	0.1	141.1

表6. 採血直後のPCのみ(無菌)での偽陽性の有無を測定

検体量(ml)	陽性表示までの時間
1	13.4
2	6.1
3	5.1
5	3.1
10	1.9

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18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期限延長に関する研究」
(H17－医薬－一般－051)

分担研究報告書

低温保存条件における接種細菌の増殖抑制効果

分担研究者： 高松純樹 教授 名古屋大学医学部附属病院輸血部

共同研究者： 大藏照子 名古屋大学医学部附属病院検査部
太田美智男 教授 名古屋大学大学院医学系研究科分子病原細菌学

研究要旨：

血小板製剤の有効期限を延長する上で、細菌汚染による敗血症は避けなければならない障害である。低温保存による細菌混入増殖抑制効果を検討した。臨床分離菌3種10株を血小板製剤に接種し、増殖を観察した。*Staphylococcus aureus* 増殖は4℃、10℃ともに4日間抑制された。*Serratia marcescens* は、低温で増殖スピードが遅くなり、現状の保存条件では1日で達する菌数に、10℃静置では5日後に達した。低温保存によって増殖スピードが遅くはなったが、4℃でも菌の発育を阻止することはできなかった。*Escherichia coli* は3株とも4℃ではほぼ増殖が抑制されたが、10℃では増殖スピードが遅くなったものの、菌の発育を阻止することはできなかった。

さらに、異なる菌種の複数汚染条件での菌数変化を観察した。2菌種混在しても、それぞれを単独で接種した場合とほぼ同様の発育を示した。4℃で *S. aureus* は発育せず、*S. marcescens* はゆっくりと発育したが、48時間までは接種時点の菌数の比がそのまま保たれていた。室温では接種後2菌種とも増殖し、48時間後には、より増殖スピードの速い *S. marcescens* の菌数が逆転し多くなった。

【研究背景と目的】

血小板製剤の有効期限延長を目指す上で、細菌汚染製剤の輸血後敗血症のリスクが懸念されている。細菌汚染を検出するため、主に培養による方法が諸外国で導入されているが、まだ検出限界に問題がある。初流血除去や白血球除去フィルターの使用によって、汚染菌を減らすことはできるが完全には除去できない。現在の製剤の保存条件は血小板機能保持の観点から必要であるが、混入した細菌の増殖には好都合である。今後、低温保存でも血小板機能を保持できる技術が開発されれば、万一汚染があったとしても細菌の増殖が抑えられ、輸血後に生命を脅かすほどの菌量に達しないと期待される。低温保存による接種細菌の増殖抑制効果について検討した。

【実験1】

低温保存であっても菌種によっては製剤中での増殖が抑制されないことを報告してきたが、汚染報告例の代表的な菌種について、さらに詳しく検討した。

【方法】

1) 使用製剤

赤十字血液センターに献血され製剤化された人濃厚血小板液のうち、有効期限内に輸血されなかった製剤を、期限超過後すぐに使用した。

2) 使用菌株

すべて異なる敗血症患者の血液培養より分離された、遺伝的背景の異なる臨床分離株を使用した。同一菌種であっても菌株ごとに結果が異なることか

ら、複数の菌株を使用し同時に実験を行った。3菌種10株 (*Staphylococcus aureus* 4株、*Serratia marcescens* 3株、*Escherichia coli* 3株) を使用した。

3) 血小板製剤への細菌接種

同一 lot. の製剤中における、異なる複数菌株の増殖特性を調べるため、製剤を血液バッグ内から滅菌プラスチック容器に無菌的に分注して使用した。BHI broth にて培養した細菌を、製剤中の細菌の終濃度が $10^2 - 10^3$ CFU/ml となるように添加した。無菌操作のコントロールとして、細菌を接種していない BHI broth を同様に添加し、以後同様に操作した。

4) 製剤の低温保存

細菌を接種した血小板製剤を 4℃ または 10℃ の低温で最大 6 日間静置保存した。

5) 接種後の生菌数の測定

細菌を接種した後、経時的に製剤の一部を取り出し、BHI 寒天平板培地上で普通培養し、コロニー数をカウントした。コントロールも同様に行い、コロニーが認められないことを確認した。

【結果】

Staphylococcus aureus は、4 菌株とも生菌数に大きな変化が見られず、増殖は 4℃、10℃ とともに 4 日間抑制された (図 1a)。
Serratia marcescens は、低温で増殖スピードが遅くなり、現状の保存条件 (室温、振盪) の場合 1 日で達する菌数に、10℃ 静置では 5 日後に達した (図 1b)。低温保存によって増殖スピードが遅くはなったが、4℃ でも菌の発育を阻止することは

できなかった。

Escherichia coli は3株とも4℃ではほぼ増殖が抑制されたが、10℃では増殖スピードが遅くなったものの菌の発育を阻止することはできなかった（図1c）。

【実験2】

低温保存により製剤中での増殖スピードを遅くできることを明らかにしたが、増殖スピードの異なる菌種が同時に汚染した場合の菌数の変化について検討した。

【方法】

1) 使用製剤

実験1と同じ。

2) 使用菌株

実験1の使用菌株のうち、*Staphylococcus aureus* 1株、*Serratia marcescens* 1株を使用した。

3) 血小板製剤への細菌接種

実験1と同様に操作した。接種菌量を *Staphylococcus aureus* : *Serratia marcescens* = 10 : 1 となるようにし、同時に接種した。

4) 製剤の低温保存

細菌を接種した血小板製剤を4℃または室温で静置保存した。

5) 接種後の生菌数の測定

実験1と同じ。

【結果】

2菌種混在する場合も、それぞれを単独で接種した場合とはほぼ同様の発育を示した（図2）。4℃で *S. aureus* は発育せず、*S. marcescens* はゆっくりと発育したが、48時間までは接種時点の菌

数の比がそのまま保たれていた。室温では接種後2菌種とも増殖し、48時間後には、より増殖スピードの速い *S. marcescens* の菌数が逆転し多くなった。

【考察】

今回の低温保存による接種菌の増殖抑制効果の検討結果（実験1）から、採血時に混入する可能性のある皮膚常在菌（主にブドウ球菌属）は、10℃程度で保存することにより菌の発育を阻止し、輸血後感染を防止できると考えられる。一方、グラム陰性菌（主に腸内細菌科細菌）が混入することは皮膚常在菌に比べ稀であると考えられるが、万一混入してしまったら4℃でさえもゆっくりと発育するので、重篤な輸血後副作用をもたらす菌量に達する時間を稼ぐことはできるが、やはり長期保存することのリスクは減少しないと考えられる。

また、増殖スピードの異なる2菌種について菌量に差をつけて接種した実験2からは、輸血後細菌感染の疑い事例が発生した場合の対応を考える上での重要な知見を得た（表）。疑い事例について細菌検査を実施し、患者血液、バッグに残った製剤、セグメントチューブから同一菌が検出された場合は、輸血による感染と断定できるが、汚染菌が検出されないと判断に苦慮することになる。例えば次のようなケースを想定する。献血時にドナー由来のブドウ球菌が混入した場合、その菌量は現状の保存条件では輸血時までには敗血症を起こす菌量に達している可能性が過去の実験結果から十分考えられる。

輸血後に針を抜く際、点滴ライン等からセラチア菌が逆流しバッグに混入したとする。受血者が輸血後に敗血症を発症した場合、輸血後のバッグに残った製剤の細菌検査をする。真の汚染菌のブドウ球菌に比べ、偽の汚染菌であるセラチア菌の菌量は混入時には非常に少ないと考えられるが、バッグを室温に置いてある間に菌量が逆転し、バッグの残りを用いて細菌検査を実施した時にはセラチア菌が優勢になってブドウ球菌が検出できないことも予想される。使用後のバッグを4℃に保存しておくことで、少なくとも2日間は輸血時のバッグ内の菌量をそのまま保つことができ、真の汚染菌を検出できるので望ましいと考える。また、セグメントチューブは冷蔵あるいは冷凍保存されているため菌の検出感度が低く偽陰性の結果となる場合がある。セグメントチューブは、バッグ本体の輸血用製剤と同じ条件で保存するという意味も含め、できる限り輸血直前に作製し、室温に保存

する方が望ましい。輸血後感染はあつてはならないが、疑い事例が発生した際により適切に対応するために、使用後のバッグやセグメントチューブに残った製剤の保存方法について提案したい。

【健康危険情報】

健康に影響を及ぼした事象は発生しなかった。

【研究発表】

研究論文
なし。

学会発表

大藏照子、馬場尚志、高松純樹、太田美智男．輸血用血小板製剤中における各種細菌の増殖．第80回日本細菌学会総会、2007年3月．

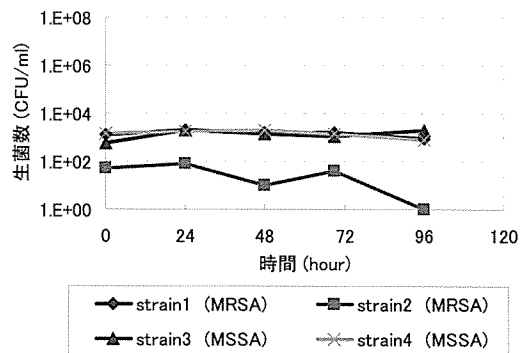
【知的所有権の発生】

なし。

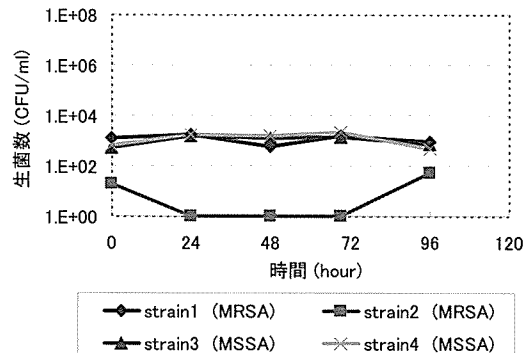
図1 低温静止保存した血小板製剤中での各種細菌の増殖

a. *Staphylococcus aureus*

(1) 4℃

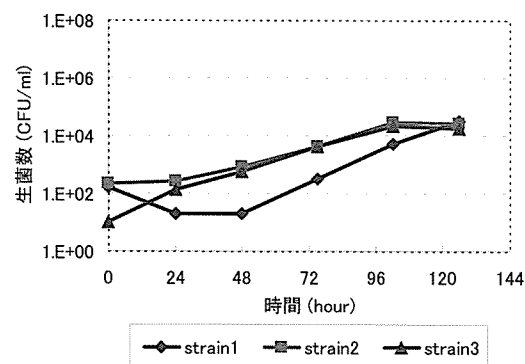


(2) 10℃

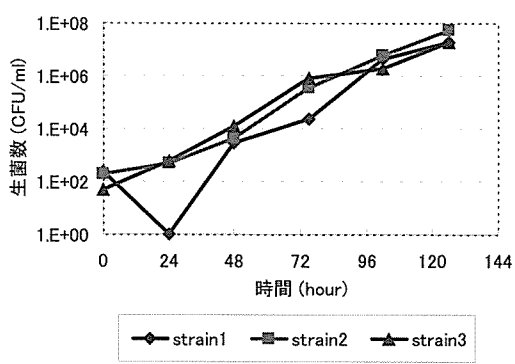


b. *Serratia marcescens*

(1) 4℃

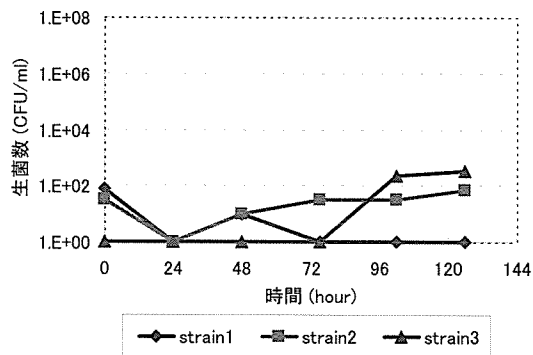


(2) 10℃



c. *Escherichia coli*

(2) 4℃



(2) 10℃

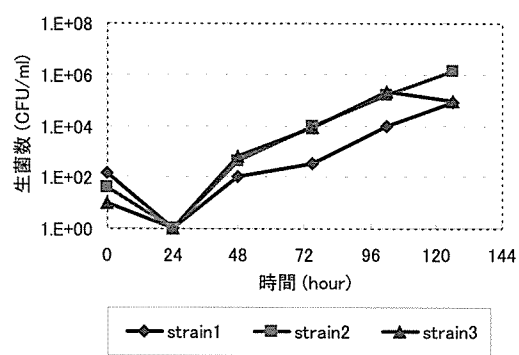
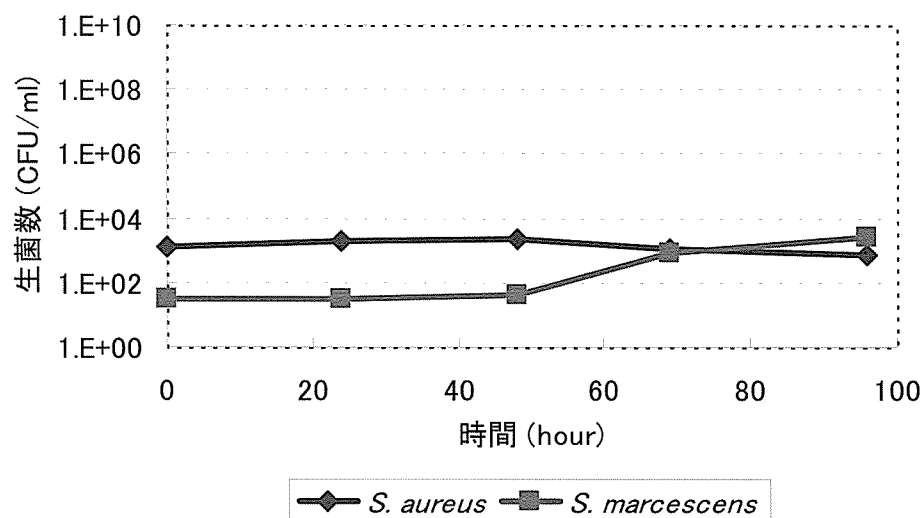


図2 増殖スピードが異なる2菌種が混在する場合の製剤中での増殖

(1) 4℃に保管した場合



(2) 室温に保管した場合

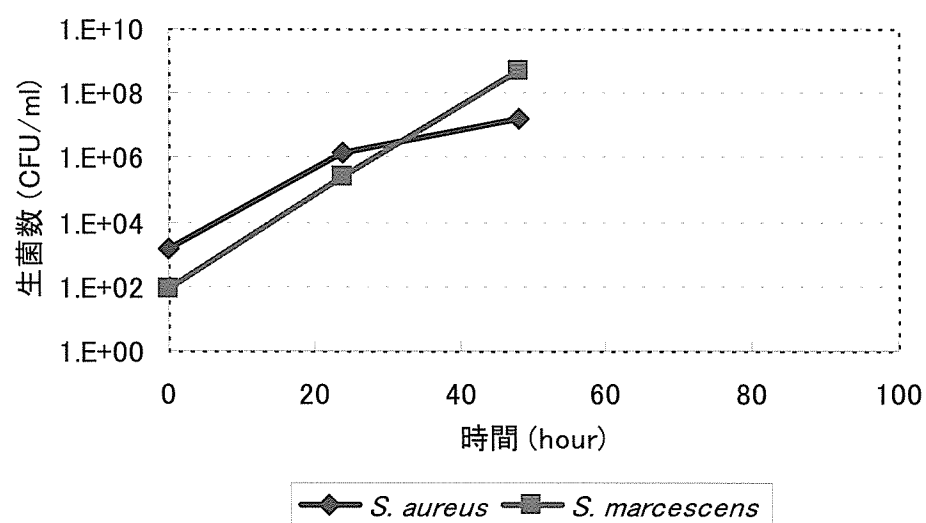


表 細菌検査結果例とその解釈における問題点と対策

事例	細菌の検出結果			製剤による 感染の可能性	対策
	患者 血液	使用後のバッグ (室温保存)	セグメント (低温保存)		
1	A 菌	A 菌	A 菌	断定	
2	A 菌	A 菌	(－)	否定できない	セグメントを室温保存し 検出感度を上げる
3	A 菌	B 菌	(－)	否定できない	バッグを低温保存し 輸血時の菌量をできる限り 保持する

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18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期限延長に関する研究」
(H17-医薬-一般-051)

分担研究報告書

高酸素透過性バッグを用いて保存した高単位血小板製剤の生体内寿命評価

主任研究者：大戸 斉 教授

研究協力者：江月将史 川畑絹代 菅野隆浩

福島県立医科大学輸血・移植免疫部

研究要旨：

これまでに国内で血小板保存用として新しく開発された血小板保存用高酸素透過性バッグ（PO-80）にて長期間（9日）保存した血小板機能を *in vitro* で評価したところ、安定して、血小板機能が保存されることを報告してきた。このバッグの有効性を示す次のステップとして、*in vivo* での評価を行なった。健常人ボランティアより採取した血小板製剤を PO-80 にて7日間保存した後、返血当日に全血採血して作成した新鮮血小板とともにそれぞれインジウムとクロムの放射性同位元素でラベルし、一部をドナーへ返血し、生体内の回復率と血小板寿命を測定し比較した。保存血小板は回復率が新鮮血小板の82%、生体内寿命が83%であり、Murphy が提唱した回収率67%以上、生体内寿命50%という基準を全例満たしていた。PO-80 は *in vivo* 評価でも、その回復率および血小板寿命は良好に保たれており、臨床使用が十分可能であると考えられた。PO-80 バッグは血小板製剤の有効期限延長において非常に有用であろう。

A. 研究の背景と目的

医学の進歩に伴い血小板製剤の需要は増加している。多くの先進国における急速な高齢人口の増加によって近い将来、輸血用血液製剤の需要バランスの破綻することが危惧されている。重症患者で 사용되는ことの多い血小板製剤の供給が不足することは深刻な問題である。特に日本では、有効期間は3日間（2007年1月現在）であり世界標準に比べ短い。さらに1999年から導入されたウイルス核酸検査（NAT）により、実質的な有効期限は2日程度と短く、血小板製剤の供給体制は大変厳しくなっている。

血小板製剤の有効期限は国際的には5日間で、欧州の一部の国ではすでに7日に延長されており、世界的に有効期限を7日間に延長させようという大きな流れが形成されている^{1),2)}。血小板製剤の有効期限の延長には、主に2つの大きな課題がある。一つは製剤の細菌汚染の問題であり、もう一つは血小板機能を良好に維持することである。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)}、血小板保存液の改良^{5),6)}、アフエレーシス血小板の導⁷⁾などが研究され、導入されてきた。

保存による血小板機能の劣化は保存バッグの酸素と二酸化炭素とのガス透過性を向上させることによって改善されてきた。酸素供給を増加させて、嫌気性代謝を抑制し、乳酸産生を抑え、その結果pHが至適に維持され、血小板機能は良好に保たれる。我々は血小板製剤の有効期限延長を目的として、さらに酸素透過性を向上させた新しいポリオレフィンバッグ

（PO-80,川澄化学工業）を開発した⁴⁾。

このバッグを用いて長期保存血小板の機能と形態を *in vitro* 試験で評価して、これまでの既存バッグよりも品質の良い血小板機能を保持・保存できることも報告してきた⁷⁾。

今回の研究では、健常人ボランティアよりアフエレーシス採血した高単位血小板20単位をPO-80で7日間保存した後、ドナーへ自己返血することにより、その%回復率と生体内寿命を測定することで、その血小板保持効果を *in vivo* で比較評価した。

B. 研究材料及び方法

1. 血小板採取

本研究は、福島県立医科大学倫理委員会承認のもと行なわれた。血小板は自動成分採血装置（Amicus, Baxter 社）を用いて、同意の得られた5名の健常人よりアフエレーシスにより20単位相当（平均 4×10^{11} cell）をドナー血漿250 mLとともに採取した。採取後、血小板製剤を国内で開発された高酸素透過性血小板バッグ（PO-80, 1000 mL、酸素透過度 $2,660 \text{ mL/m}^2/\text{day/atm}$, 川澄化学工業）へ移し、血小板保存装置にて室温（22~24℃）で7日間水平振塗保存した。

2. 無菌試験

保存した血小板製剤の無菌性はBacT/ALERT (Biomérieux) および eBDS (Pall/川澄) を用いて行なった。採取翌日にクリーンベンチにてサンプリングを行い、BacT/ALERTにて37℃で培養し、返血当日まで継続的に細菌汚染が無いこ

とを確認した。さらに返血前日にサンプリングバッグへ無菌的に採取し、専用インキュベータにて浸透しながら 35℃で培養し、eBDS にて細菌汚染が無いことを確認した後ドナーへ返血した。

3. 血小板機能の *in vitro* 評価

製剤採取直後、保存 0 日目、5 日目、7 日目に無菌的にサンプリングを行って、以下の機能をチェックした。

①血小板数および平均血小板容積(MPV)

血小板数及び平均血小板容積はサンプル 500 μ L を生理食塩水にて十倍希釈し、多項目自動血球成分計測器 (Sysmex, K-2000) を用いて測定した。

②pH 測定

pH は血液 1mL が残ったシリンジを pH・血液ガス分析装置 (ABL3, Radiometer, Copenhagen, Denmark) に装着して 37℃にて測定した。

③スワーリングと肉眼的観察

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

④血小板凝集能測定及び低浸透圧ショック回復率 (%HSR) 測定

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

サンプル調整を行った。血小板凝集能は惹起試薬 (ADP5 μ /mol+コラーゲン 5 μ g/mL) で希釈し、ヘマトレーサー 212 (PAC-8L, MC Medical)

で測定を行った。低浸透圧ショック回復率 (%HSR) はサンプルベースライン (%T₀) 及び最大透過率 (%T_{max}) を分光光度計 610nm (UVIDEC, Jasco) で測定し、%HSR

$= 100 \times (\%T_{max} - \%T_0) / (\%T_{300} - \%T_0)$ の計算式で %HSR を算出した。

⑤グルコース及び乳酸

血漿中の標準酵素活性で測定した。

⑥p-セレクチンの測定

血小板活性化マーカーである P-セレクチンの測定は 1%パラホルムアルデヒド/0.1%NaN₃を含む PBS 固定液でサンプルを固定後、2%牛胎児血清アブミン/0.1%NaN₃を含む PBS 染色液で染色し、各抗体で染色し、フローサイトメトリー測定機器 (FACSCalibur, BD Biosciences) で測定を行った。

4. *In vivo* 評価

PO-80 血小板製剤に対する比較対照として、返血当日にドナーから採取した新鮮血小板を用いた。保存血小板を返血する当日に、ドナーより 84mL の全血採血を行い CDP 液 14mL と混和し、血小板を分離した。保存血小板および新鮮血小板にそれぞれ ¹¹¹In、⁵¹Cr で交互にラベリングし、それぞれ 20 μ Ci を上限としてを同時に返血した。返血より、1 日目から 7 日まで毎日採血し、その放射活性を測定した。生体内でのラベルした血小板の放射活性を 10 日目に測定値補正のための

採血をした。このようにして得られた 7 日間のデータは、COST⁹⁾と言うプログラムを用いて、Multiple hit model にて放射活性の減衰曲線を得た。その曲線について %Recovery と Survival time という指標を用いて評価した。

5. 被験者のバイタルサイン、末梢血、生化学的検査

被験者の健康状態に異常がないかどうか検証するために、返血前、返血 15 分後、1 時間後、3 時間後、および 1～7 日までの毎日、10 日後において、採血を行い末梢血の血球数、CRP 定量、Na, Cl, K の電解質値、AST, ALT 値、クレアチニン値、LDH 値、ALP 値等の検査を行なった。採血の際に、体温測定、収縮期血圧、拡張期血圧、心拍数の測定を行なった。

C. 結果

1. 7 日間保存血小板機能の in vitro 評価

試験に参加した 5 名において。血小板数および MPV にはほとんど変化しなかった。血小板の性質の指標として重要な pH は、アフエレーシスによる採取日の平均値は 7.0 であり、7 日目で 6.9 であった (Table 1)。7 日目において 5 例すべての製剤において pH は 6.7 以上であった。スワーリングは全例において、容易に観察された。血小板凝集能及び低浸透圧ショック回復率 (%HSR)、グルコース値、乳酸値、P-selectin とともに報告した in vitro 試験の 7 日目の値と同等の値を示した (Table 1)。

2. 7 日間保存血小板機能の in vivo 評価

今回検討した 5 名における新鮮血小板の回復率は $64.9 \pm 10\%$ であり、PO-80 にて 7 日間保存した血小板の回復率は $53.0 \pm 12.5\%$ であった。新鮮血小板の生体内寿命の平均は 7.1 ± 0.7 日であり、7 日間保存血小板は、 5.9 ± 1.1 日であった (Fig. 1)。7 日間保存血小板の新鮮血小板に対する比は、回収率が $81.6 \pm 10.1\%$ 、寿命は $83.4 \pm 12.8\%$ であった (Fig. 2)。

この試験の期間中、被験者の体温が 37°C を越えることはなかった。白血球数も大きな変化はなく、 $8000/\mu\text{L}$ を越える例はなかった。体調の変化もなく、また、血圧、心拍数の変化、肝機能、腎機能等に対する生化学的な検査でも異常は見られなかった。

D. 考察

本研究では、これまで行なってきた血小板製剤の in vitro 機能評価の次のステップとして、健常人ボランティアドナーの in vivo での評価を行なった。約 20 単位の高単位血小板製剤を高酸素透過性バッグ (PO-80) で 7 日間保存した後、返血当日同じドナーより全血採取により作成した新鮮血小板とともに、それぞれランダムに放射性同位元素 ^{111}In と ^{51}Cr で標識し、ドナーへ返血した。その回復率と寿命を比較検討した。今回の評価においては、回復率が対照製剤の 82%、寿命が 83% であり、Murphy ら¹⁰⁾が提唱した回復率 67% 以上、生体内寿命 50% という基準を全例満たしていた。このことにより、PO-80 血小板製剤について今まで in vitro で報告してきた結果が、in vivo によ

る評価でも臨床的に非常に有用であることをことが示された。

本研究においては、試験血小板製剤に対する比較対照として、返血当日に全血採血により分離したドナーの新鮮血小板を用いた。この方法は米国の AABB による BEST Collaborative で 2003 年に提唱された方法である^{11),12)}。この方法にはいくつかの利点がある。たとえば、血小板の回復率と生体内寿命を、まったく同じ個体の状態で比較することができるということ、また、試験施設間での評価もしやすいという点である。本研究では更に、高単位の血小板製剤を試験できるという利点に着目し、この方法を採用した。この試験によって、PO-80 は高単位での血小板保存でもその有効性が示された。

現在、血小板製剤は採血後、酸素・二酸化炭素の透過性が十分なバッグに入れられて室温（20～24℃）で 1 分間約 60 サイクルの速さで穏やかに平行振盪して保存されている。振盪をくわえないと血小板のエネルギー代謝が嫌氣的になり、血小板機能が著しく低下する¹³⁾。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¹⁴⁾を持ち、また、バッグの膜の厚さを薄くするなどの条件が必要である。今回我々が新しく開発した高酸素透過性バッグ PO-80 はバッグの表面積を保ちながら膜の厚さを薄くし、さらに材料の配合を変更することにより、より高い酸素透過性を有するポリオレフィンバッグ（1 L）であることが特徴である。これに対し、世界で市販されている血小板バッグには 1) PL2410（ポリオレフィ

ン；Baxter Healthcare、米国）、2) CLX-Plastic（PVC；MedSep Corp., 米国）、3) ELP（PVC；Gambro BCT, 米国）等がある。しかし、これらのバッグは通常バックの容積を大きくすることによって、バッグ全体の酸素透過性を向上させている。

同様の新鮮血小板を用いた評価では、AuBuchon らの 2005 年の報告¹⁰⁾がある。ELP バッグで日本における 15 単位相当の血小板を 7 日間保存し、%回復率が 84.5%、生体内寿命の比が 75.9%と良好なデータを報告している。本研究では、このデータよりも優位性を示すことはできなかった。本研究では、1 L の PO-80 バッグに、20 単位製剤を 250 mL の血漿とともに保存した。AuBuchon らの報告には、バッグの容量、血漿量が記載されておらず単純な比較はできないが、保存条件の違いが関与しているものと推察される。

今回の評価では、*in vitro* の評価も改めて行い、保存 7 日目の *in vitro* データは前回の報告同様良好に維持されることが確かめられた¹⁵⁾。特に血小板製剤の有効性の評価としては pH が重要であるが、試験を行なったすべての製剤で pH が 6.7 以上を示したことによって、本バッグの pH 変動を抑える効果が再確認された。このことは *in vivo* での良好な評価と関係しているものと考えられる。

血小板製剤の有効期限は 1985 年米国で 7 日間保存に延長されたが、細菌汚染の危険性が増大した為、5 日間保存に戻された¹⁵⁾。しかし、血小板製剤の 7 日間への期限延長は細菌検出システムや不活化

技術の導入により、欧州では有効期限を7日間に延長した国もでてきた。米国でも再度、有効期限を7日間に延長しようと現実的な臨床検討がスタートしている。今回、2つの異なる細菌検出システム、BacT/ALERT(Biomerieux)およびeBDS(Pall/川澄)使用し、細菌汚染がないことを確認した。保存第1日目に採取したサンプルをBacT/ALERT(Biomerieux)で継続的に7日まで培養監視し、返血前日に採取したサンプルをeBDS(Pall/川澄)にて24時間後に判定する方法は、それぞれの機種の特徴を生かした細菌汚染監視システムと考えられる。しかしながら、実際の供給システムに組み込むには、コストの問題をはじめ、導入体制の整備など更なる検討が必要である。

E. 結論

日本で開発された高酸素透過性血小板保存バッグPO-80は20単位血小板製剤で7日間保存し、ボランティアドナーへ返血したin vivo評価でもその回収率および血小板寿命は良好に保たれており、臨床使用が十分可能であると考えられた。本バッグによって、機能的には血小板有効期限を7日へ延長することも十分可能であることが示唆された。

参考文献

1. Dumont L, Van den Broeke T. Seven-day storage of apheresis platelets: report of an in vitro study. *Transfusion* 2003;43: 143-50.
2. Dumont L, AuBuchon J, Whitley P, et al. Seven-day storage of single-donor platelets: recovery and survival in an autologous transfusion study. *Transfusion* 2002;42:847-54.
3. Boomgaard MN. Platelets stored for 6 days in a polyolefin container in a synthetic medium with minimal plasma carry-over. *Vox Sanguinis* 1994;66:18-24.
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* 2004;126:153-9.
5. Murphy S. The efficacy of synthetic media in the storage of human platelets for transfusion. *Transfusion Medicine Reviews* 1999;13:153-63.
6. Yuasa T, Ohto H, Suzuki A, Shishido F. New plasma-reduced synthetic media, Fukushima cocktails for the storage of platelets for transfusion. *Transfusion Science* 2000;23(37-46).
7. Jacobson J, McQuail E, Murphy R, et al. Trima Accel: improved platelet collection efficiency, split platelet collection rate, and donor staff satisfaction. *Transfusion* 2003; 43(Suppl):15A.
8. 江月将史、伊藤隆俊、川畑絹代、大戸 斉他. 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;51,578-584.
9. Lötter M, Rabe W, Zyl JV, et al. A computer program in compiled basic for the IBM personal computer to calculate the mean platelet survival

time with the multiple-hit and weighted mean methods. Comput Biol Med 1988;18:305-15.

10. Murphy S, Rebulla P, Bertolini F, et al. In vitro assessment of the quality of stored platelet concentrates. The BEST (Biomedical Excellence for Safer Transfusion) Task Force of the International Society of Blood Transfusion. Transfus Med Rev 1994;8:29-36.
11. AuBuchon J, Herschel L, Roger J. Further evaluation of a new standard of efficacy for stored platelets. Transfusion 2005;45: 1143-50.
12. AuBuchon J, Snyder E. The rationale for a standardized approach to assessment of platelet kinetics. Transfusion 2006;46 (3 Suppl): 44S-8S.
13. Murphy S. Improved storage of platelets for transfusion in a new container. Blood 1982;60:194-200.
14. de Wildt-Eggen Jd. Improvement of platelet storage conditions by using new polyolefin containers. Transfusion 1997;37:476-81.
15. Kuehnert J, Virginia R, Roth N. Transfusion-transmitted bacterial infection in the United States, 1998 through 2000. Transfusion 2001;41: 1493-9.

F. 健康危険情報

健康に影響を及ぼした事象は発生しな

かった。

G. 研究発表

研究論文

1. Pietersz RNI, Engelfriet CP, Reesink HW, Ohto H, Satake M, Miyata S, et al. Logistics of platelet concentrates. Vox Sanguinis 2007;92:160-181.
2. Shigeki Miyata, Masahiro Satake, Hitoshi Ohto. Japanese Special Situations – Universal prestorage leukocyte-reduced apheresis platelet concentrates with very short shelf-life (72 hours). Transfusion Today. March 2007;9-10.
3. Ezuki S, Kawabata K, Kanno T, Ohto H. Culture-based bacterial detection systems for platelets: the effect of time prior to sampling and duration of incubation required for detection. (Submitted)
3. 大戸 斉、血小板輸血の課題。医学のあゆみ 2006;218(6):607-611.

学会発表

- 1) Ezuki S, Kanno T, Kawabata K, Ohto H: In vitro and in vivo evaluation of apheresis-derived platelets stored for 7days in container (PO-80) with high oxygen permeability. Transfusion, 2006;46(9):67A.

2) 菅野隆浩、江月将史、川畑絹代、尾形隆、池田和彦、大戸 斉：Multiple hit model を用いた生体内血小板寿命の測定．第 54 回日本輸血学会総会．日本輸血学会雑誌、2006；52(2):231

輸血学会総会．日本輸血学会雑誌、2006；52(2):327

3) 江月将史、川畑絹代、菅野隆浩、大戸 斉：細菌混入した血小板製剤内のグルコースと乳酸値の推移．第 54 回 日本

H. 知的所有権の発生

なし。

Table 1

Time course of biochemical data in 7-days stored platelet (Mean $\pm$ S.D., n=5)						
Time	pH	Glucose (mmol/l)	Lactate (mmol/l)	aggregation (%)	%HSR (%)	P-selectin (%)
Day 0	7.0 $\pm$ 0.1	18.3 $\pm$ 1.0	1.4 $\pm$ 0.5	83 $\pm$ 6	72 $\pm$ 2	31 $\pm$ 17
Day 5	7.0 $\pm$ 0.1	12.6 $\pm$ 1.7	6.3 $\pm$ 1.2	78 $\pm$ 7	72 $\pm$ 7	29 $\pm$ 9
Day 7	6.9 $\pm$ 0.1	9.5 $\pm$ 1.5	8.9 $\pm$ 0.7	77 $\pm$ 4	69 $\pm$ 6	37 $\pm$ 9

Figure 1. In vivo study confirmed excellent function of platelets stored in a polyolefin container (PO-80) with higher oxygen and carbon-dioxide permeability (n=5; mean $\pm$ SD)

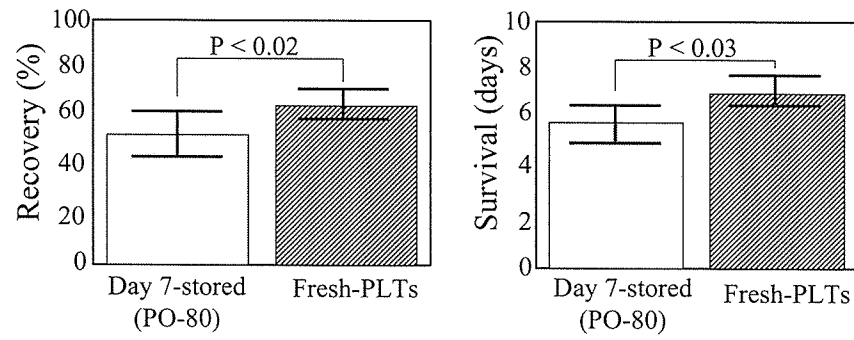
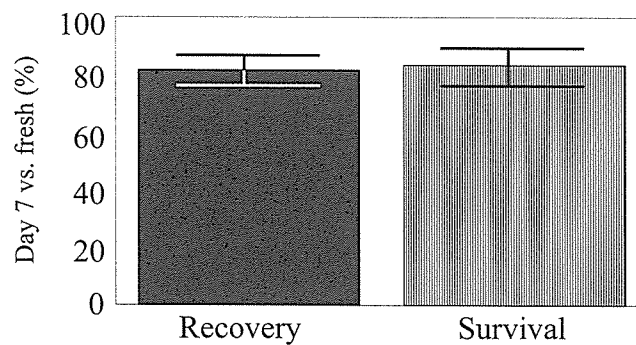


Figure 2. Extrapolation of results to storage of platelets to 7 days



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18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期限延長に関する研究」
(H17-医薬一般-051)

分担研究報告書

高酸素透過性バッグを用いて保存した濃厚血小板の
ずり応力下血栓形成能を用いた評価

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延長を考慮する際、長期保存による細菌汚染と血小板機能低下が危惧される。血小板機能低下を最小限に抑制するための検討として、長期保存後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 $2,660 \pm 200$ 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、従来からの汎用バッグ PO-65 (1,000ml 容量、酸素透過性 $2,200 \pm 200$ ml/m²/day/atm)を用いて保存した濃厚血小板製剤と比較した。

測定は、長期保存（7日間保存）後の血小板機能を、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て行った。健康成人から通常のアフェ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日間保存した後に測定した。コントロールは赤十字血液センターから、汎用バッグ PO-65 を用いてアフェ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、測定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、その血小板血栓形成能を評価した。本年度は症例数を増やして検討した。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。

高酸素透過性バッグ PO-80 を用いた濃厚血小板製剤では、汎用バッグ保存で認められた3次元的血栓形成過程の障害が軽微となり、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の供給が可能なが示唆された。