

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。しかしながら、血小板製剤の有効期限延長に際しては、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。よって、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、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、新たに開発された高酸素透過性バ

ッグによっ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長期保存（7 日間保存）後に比較した。その結果により、濃厚血小板製剤の保存バッグの改良によって、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かどうかの検討を行った。

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（再構成血）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 $\mu\text{g/ml}$ 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/ m^2 /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作業手順 (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) に則った標準作業手順書に基づき 7 日間保存した後、swirling 陽性を確認の上、測定対象製剤として測定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/ m^2 /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 に則った標準業務手順書に基づき 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測定

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、その血小板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。

4) 統計処理

従来汎用されているバッグ PO-60 を用いて 5 日ならびに 7 日間保存した濃厚血小板製剤中の血小板を添加し、最終血小板濃度が 150,000/ μ l、ヘマトクリットが 45% となるように作成した再構成血が示した血小板血栓の高さと、高酸素透過性バッグ (PO-80) を用いて 7 日間保存した濃厚血小板製剤中の血小板を添加し、最終血小板濃度が 150,000/ μ l、ヘマトクリットが 45% となるように作成した再構成血が示した血小板血栓の高さとを比較検討した。等分散の検定は Levene 検定で行い、対応のない t 検定で比較した。P < 0.05 を有意差ありとした。

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.) / μl , 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 ± 7487 / μl , 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測定を代表値として表示した)。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、 $3.36 \pm 0.9 \mu\text{m}$ (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 $21.7 \pm 3.0 \mu\text{m}$ (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) を用いてアフエ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/ μl 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 分後に形成された血小板血栓の経時的変化を観察した。Figure には血栓の高さが中央値を示した測定を代表値として表示した。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、個々の血小板血栓塊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. μ m 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/ μ 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/ μ l, n=6）、7 日間保存血小板製剤（最終血小板数 156,800 $\pm$ 9,300/ μ l, n=5）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 μ m [figure 5: 3 days (PO-65)]、5 日間保存で 10.3 $\pm$ 0.59 μ m [figure 5: 5 days (PO-65)]、7 日間保存で 7.2 $\pm$ 0.88 μ 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%に減少していた (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/ 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（最終血小板濃度 167,000 $\pm$ 14,900/ μ l, n=6）。

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 figure 4 に示す（血栓の高さが中央値を示した測定を代表値として表示した）。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。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こと得られた最終血小板血栓の高さは、9.4 $\pm$ 1.75 μ 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ク（PO-65）の 7 日間保存血小板製剤の最終血小板血栓の高さ 7.2 $\pm$ 0.88 μ m [figure 5: 7 days (PO-65)]と比較して有意差が認められた（p=0.035）。従来汎用されているバック（PO-65）の 5 日間保存の最終血小板血栓の高さ 10.3 $\pm$ 0.59 μ m [figure 5: 5 days (PO-65)]と比較した場合には有意差が認められなかった（p=0.25）。

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低下の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おこり、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、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、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 $2,660 \pm 200 \text{ ml/m}^2/\text{day/atm}$)によっ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 $2,200 \pm 200 \text{ ml/m}^2/\text{day/atm}$)を用いた濃厚血小板製剤と長期保存(7日間保存)後に比較した。その結果により、濃厚血小板製剤の保存バッグの改良によって、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かどうかの検討を行った。

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

起きる可能性を示唆している。

しかしながら、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 次元の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 次元の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、さらに症例数を増やして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 次元の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 次元の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.

学会発表

- 1) 宮田茂樹: 小児開心術における輸血トリガー値の予後に与える影響についての考察. 第 42 回小児循環器学会総会. 名古屋、2006.
- 2) 宮田茂樹: 輸血療法の適正化、効率化に輸血部門の果たす役割. 第 60 回国立病院総合医学会、京都、2006.
- 3) 亀井政孝、宮田茂樹、畔政和: 人工心肺による血小板機能障害とその対策. 第 11 回日本心臓血管麻酔学会学術大会. 長崎、2006.

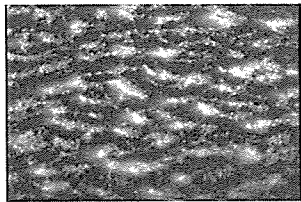
- 4) 宮田茂樹、亀井政孝、山本賢、角谷勇
実、阪田敏幸、佐野隆宏、半田誠、八
木原俊克:心臓血管外科手術における
血小板輸血が必要となる危険因子. 第
50 回日本輸血学会近畿支部会総会.
大阪、2006.

H. 知的所有権の発生

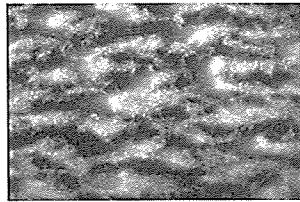
なし。

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

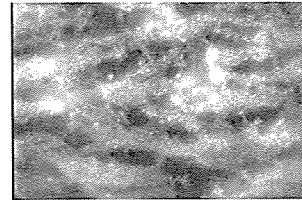
Positive control



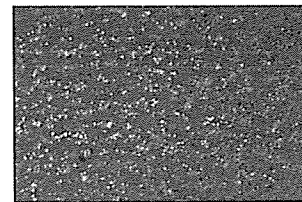
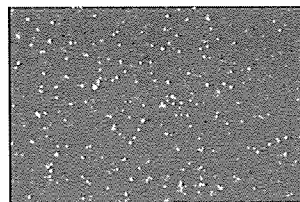
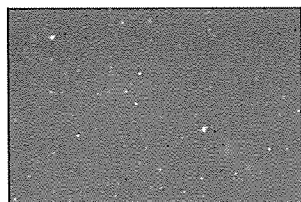
3 min



5 min

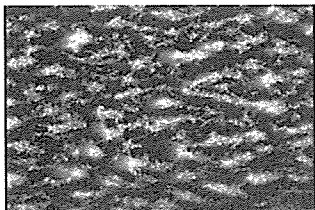


10 min

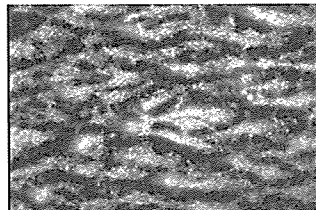


Negative control

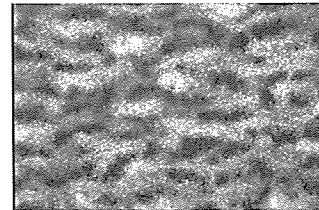
1-day-stored PC in PO-65 bag



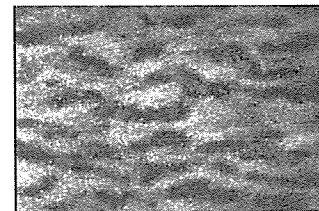
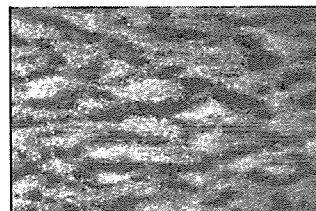
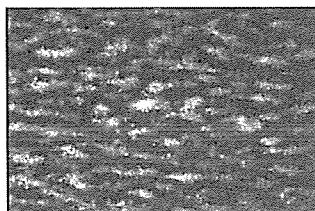
3 min



5 min

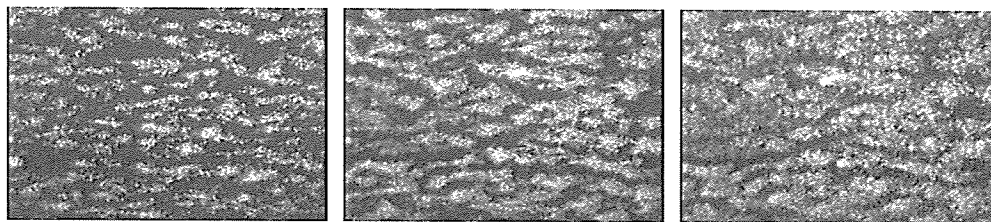


10 min



3-day-stored PC in PO-65 bag

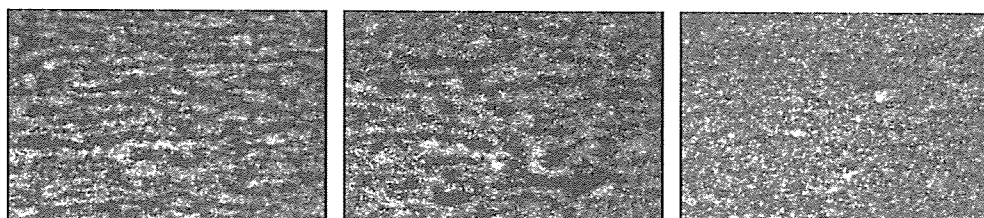
5-day-stored PC in PO-65 bag



3 min

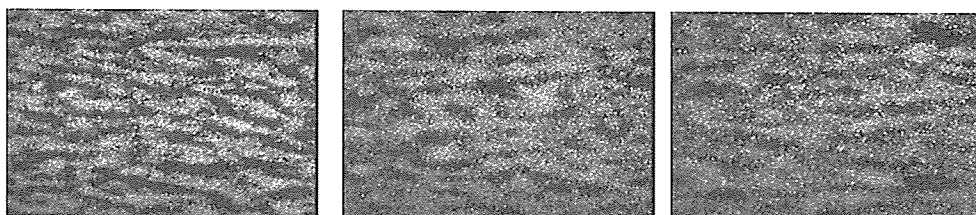
5 min

10 min



7-day-stored PC in PO-65 bag

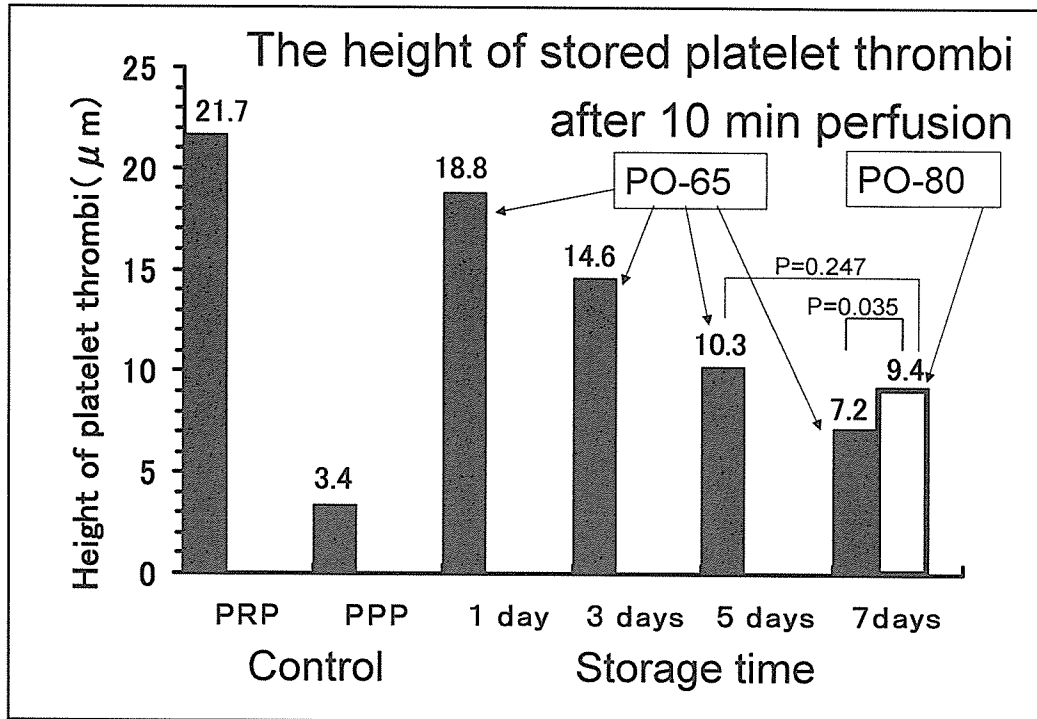
7-day-stored PC in PO-80 bag



3 min

5 min

10 min



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性期限延長に関する研究」
(H17-医薬-一般-051)

分担研究報告書

ドイツにおける血小板製剤の細菌安全性対策

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

協力研究者：内藤 誠之郎
国立感染症研究所 血液・安全性研究部

研究要旨：

ドイツにおける生物製剤を管轄する規制当局であるポール・エールリッヒ研究所 (PEI) に滞在して、血小板製剤の細菌安全性対策などについて調査した。ドイツにおいては、PEIを中心に、各州の規制当局とも連携して、血液製剤の品質保証システムが組み立てられている。ドイツには、赤十字のほかに州立、大学付属および民営の複数の採血事業者がある。ドイツにおける血小板製剤の細菌安全性対策としては、自動細菌培養検出装置である BacT/ALERT などが導入されており、多くのロットに対して細菌スクリーニングが実施されている。ドイツ赤十字においては、バフィコート由来血小板製剤の全ロットに対して細菌スクリーニングを実施している。さらに、培養によらない迅速細菌検出法や細菌不活化法についても、研究が進められている。

はじめに

協力研究者の内藤は、平成18年9月から12月にかけてドイツのポール・エールリッヒ研究所の細菌安全性研究部門に滞在して、ドイツにおける血小板製剤の細菌安全性対策の現状について調査したので報告する。

ポール・エールリッヒ研究所(PEI)

PEIは1896年、ポール・エールリッヒを所長に血清研究所としてベルリンに設立された。ほどなくフランクフルトに移転して王立研究所となった。戦後は州立研究所として再出発し、1972年からは連邦保健省の上級研究機関として生物製剤行政の枢軸を担っている(図1)。1990年代初頭に、フランクフルト近郊のランゲン市に移転した(図2)。

現在のPEIの主要な業務は、生物製剤に関する以下の5項目である。1)臨床試験の承認と製造販売承認、2)バッチリリース、3)市販後監視、4)州政府によるGMP査察の補佐、5)研究開発。すなわちPEIは単なる検定機関ではなく、生物製剤の承認から市販後のサーベイランスまで担当するRegulatory Authorityである。現在の日本にあてはめると、感染症と総合機構を合わせたような機能を果たしていると言える。

ドイツにおける血小板製剤の供給

ドイツには、ドイツ赤十字のほかに州立、大学付属および民営の複数の採血事

業者がある。採血事業を行なうためには国による医薬品販売承認が必要であり、許認可業務はPEIが担当している。血液製剤の製造方法および試験方法については最低限の基準が定められているが、それ以外については事業者任せられており、PEIはその方法に認可をあたえる。ドイツは連邦制を採用しており、GMP査察はPEIと連携しながら各州政府の担当官が行なっている。

ドイツの血小板製剤には、バフフィコート由来のものとアフエレーシス由来のものがある。アフエレーシス由来の血小板製剤は全体の6割あまりを占め、増加傾向にある。バフフィコート由来の血小板製剤は4ドナーのバフフィコートをプールして製造されている(図3)。血小板製剤の有効期限は5日である。

血小板製剤の細菌安全性

近年のウイルス安全性技術の向上により血液製剤へのウイルス混入リスクは大幅に改善されたが、細菌混入リスクは横ばい状態である¹⁾。そのため、血液製剤の細菌安全性の重要性は、相対的に高まっている。実際に、献血血液への細菌混入リスクを1/3,000、汚染血小板製剤による敗血症のリスクを1/25,000程度と見積もる報告もあり、細菌混入によるリスクはウイルス混入によるリスクを上回っている²⁾。ドイツにおいても、このような認識のもと血液の細菌安全性対策を強化しつつある。

血小板製剤の細菌安全性を向上させる方策としては、1) ドナー・スクリーニングの強化、2) 採血時の皮膚の消毒、3) 初流血の除去、4) アフェレーシス由来製剤へのシフト、5) 白血球除去工程の導入、6) 細菌スクリーニング、7) 細菌不活化工程の導入などが考えられている。

細菌検出法

血小板製剤による細菌感染リスクを低減する有力な方法として、細菌スクリーニングが多くで導入されている³⁾。細菌スクリーニングには、表1に示すように大きく二つの方法論がある⁴⁾。一つは培養による方法であり、もう一つは培養によらない迅速法である。現在、ルーチンの検査として導入されているのは、主として培養による方法である。その一方で、培養法の限界を乗り越えるために、培養によらない迅速法の検討が進められている。

細菌の自動培養検出装置として BacT/ALERT (BioMerieux) と eBDS (Pall) が欧米各国で承認されており、血小板製剤の細菌スクリーニングに利用されている³⁾。ドイツにおいても赤十字は、バフィコート由来血小板製剤の全ロットをこれらの方法で検査している。

培養によらない迅速法としては、Scansystem (Hemosystems) が実用化の段階にある⁵⁾。Scansystem は、固相サイトメトリーと蛍光顕微鏡観察を組み合わせた方法で、試験時間は 90 分程度である。研

究段階の迅速検査法として、フローサイトメトリーによる方法⁶⁾とリアルタイム PCR による方法⁷⁾などが、PEI やドイツ赤十字などの複数のグループで検討されている。

細菌不活化法

細菌スクリーニングで血小板製剤への細菌混入リスクをゼロにすることは難しい(表1)。そこで、さまざまな細菌不活化法が検討されている。INTERCEPT Blood System (Cerus)、Theraflex System (Maco Pharma)、Mirasol PRT System (Navigant) などについて臨床試験が進められている。これらの方法は、DNA または RNA にインターカレートする光反応物質を用いて光化学反応により病原体を不活化する点で共通している。光反応物質として INTERCEPT は amotosalen、Theraflex は methylene blue、Mirasol は riboflavin を利用している。これらの方法では、細菌のみならず、ウイルス、寄生虫、白血球の不活化が同時に行なわれ、未知の病原体にも対応できる可能性があることは有利な点である。しかし、一部のノンエンベロープウイルスや芽胞には無効であること、血小板への悪影響の可能性、受血者や血液センター職員へのリスクが指摘されており、導入には慎重な評価が必要と考えられている。

おわりに

以上述べたように、ドイツにおいては

PEI を中心に各州の規制当局とも連携して、血液製剤の品質保証システムが組み立てられている。血小板製剤の細菌安全性対策としては BacT/ALERT などを用いた細菌スクリーニングが多くのロットに対して実施されており、さらに迅速細菌検査法や細菌不活化法について研究が進められている。

健康有害事象

なし

この研究による特許や論文

なし

参考文献

- 1) Brecher ME, Hay SN. Bacterial contamination of blood components. Clin Microbiol Rev 2005;18(1):195-204.
- 2) Blajchman MA, Beckers EAM, Dickmeiss E, et al. Bacterial detection of platelets: Current problems and possible resolutions. Transfus Med Rev 2005;19(4):259-272
- 3) Pietersz RNI, Engelfriet CP, Reesink HW, et al. Detection of bacterial contamination of platelet concentrates. Vox Sang 2003;85:224-239.
- 4) Montag T. Platelet bacteria screening – How to apply the different approaches? Transfus Today (www.isbt-web.org.) 2006; 66:8.

- 5) Ribault S, Harper K, Grave L, et al. Rapid screening method for detection of bacteria in platelet concentrates. J Clin Microbiol 2004; 42(5):1903-1908.
- 6) Mohr H, Lambrecht B, Bayer A, et al. Basics of flow cytometry-based sterility testing of platelet concentrates. Transfus 2006;46:41-49.
- 7) Mohammadi T, Pietersz RNI, Vandenbroucke-Grauls CMJE, et al. Detection of bacteria in platelet concentrates: comparison of broad-range real-time 16S rDNA polymerase chain reaction and automated culturing. Transfus 2005;45:731-736.

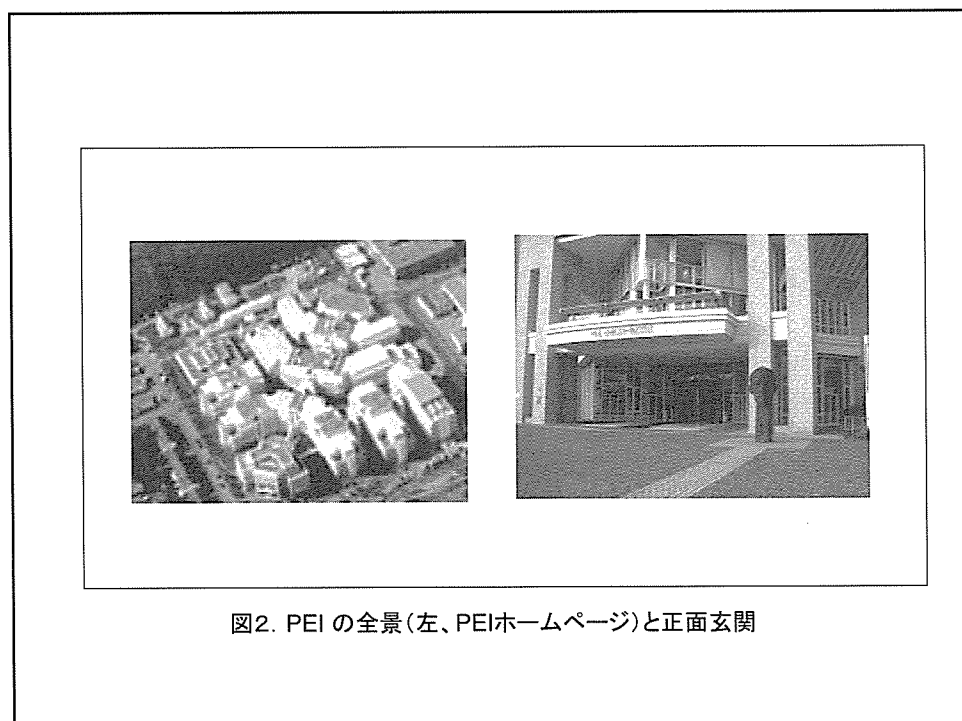
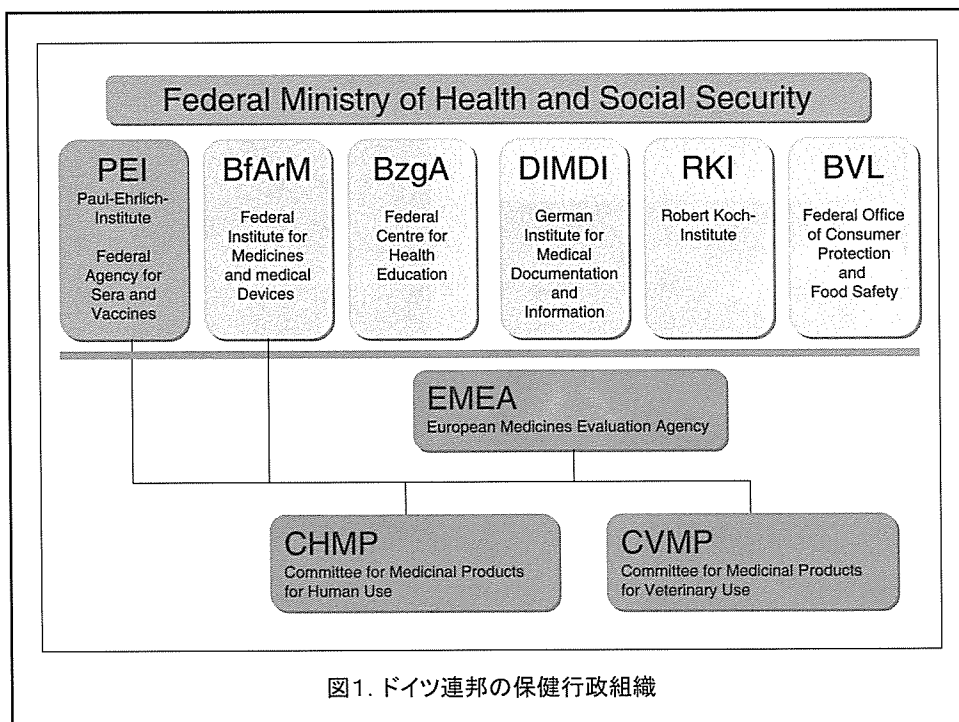




図3. バフィコートのプール。バフィーコートの入った4個のバッグと緩衝液の入ったバッグを連結する(左)。上から緩衝液で洗い流しながら、一番下のバッグにバフィコートを集める。

表1. 血小板製剤の細菌スクリーニングの2つの方法の比較

Paradigm 1	Paradigm 2
“early sampling” 24 h after donation combined with incubation method	“late sampling” before transfusion, ideally bed-side combined with rapid method
“early” sampling error bacteria count (still) too low, sample sterile, PC bacterially contaminated	“late” sampling error depends on detection limit and analyzed volume result: PC contain less than...
relevant advantage : logistics, implementation into routine uncomplicated	relevant advantage : prevention of transfusion of highly contaminated PC
relevant disadvantage : sampling error, false negative results	relevant disadvantage : logistics complicated

文献 4) より改変。PC: platelet concentrate

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
<u>宮田茂樹</u>	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
<u>宮田茂樹</u>	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 斉</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
<u>宮田茂樹</u>	心臓外科における輸血	外科	67	313-318	2005
<u>大戸 斉</u>	血小板輸血の課題	医学のあゆみ	218(6)	607-611	2006
Pietersz RNI, Engelfriet CP, Reessink HW, <u>Ohto H.</u> <u>Satake M.</u> <u>Miyata S.</u> et al.	Logistics of platelet concentrates	Vox Sanguinis	92	160-181	2007
<u>Miyata S.</u> <u>Satake M.</u> <u>Ohto H.</u>	Japanese special situations –Universal prestorage leukocyte-reduced apheresis platelet concentrates with very short shelf life (72 hours)	Transfusion Today	March	9-10	2007

IV. 研究成果の刊行物・別冊

血小板輸血の課題

Issues in platelet transfusion

大戸 斉

Hitoshi OHTO

福島県立医科大学附属病院輸血・移植免疫部

◎血小板減少症では出血していなくても血小板輸血の予防的投与が行われ、 $10,000/\mu\text{l}$ が目安となっている。外科手技などではガイドラインが設定されているが、1 回当りの適切な輸血量については決着がついていない。世界的に、細菌混入を防ぐため採血時の初流血除去などの対策が講じられ、培養試験が実施された製剤には有効期限を 7 日間に延長する国が増えている。製剤の低温保存ははまだ研究レベルにある。ほとんどの病原体に有効な不活化技術の導入はヨーロッパが先行しているが、アメリカは懐疑的である。不活化は輸血回収率に有意に影響するダメージを与えるので、必要な血小板量が 2~3 割増えてしまう。その薬効原理(核酸の傷害)からと受血者血液センター職員に対する未知の副作用が危惧される。血小板輸血効果を高める因子と低下因子が同定されている。ABO 血液型非一致血小板輸血は、HLA/HPA 適合を優先させる場合などを除き、極力避ける。不一致輸血では効果不応や重症溶血の原因となりうる。血小板輸血は概して重篤な病態に行われているが、その効果は一様ではなく、また副反応を呈しやすく、いまもって多くの課題を抱えている。



Key word : 血小板, 輸血, 予防的輸血, 有効期限, 細菌汚染

● 予防的輸血と治療的輸血, 血小板輸血のトリガー値

1. 予防的輸血の根拠

現在出血している外傷や外科患者、出血患者への投与(治療的輸血)に限らず、血小板減少患者の出血を予防するために血小板輸血を行うことは広く受け入れられている。1970 年代、白血病治療の際、出血後の血小板輸血よりも予防的輸血を行ったほうが出血頻度が少なかったことがその根拠となっている¹⁾。

2. 血小板輸血のトリガー値

現在出血していない患者への予防的投与には、血小板数 $20,000/\mu\text{l}$ が閾値としてかつて広く採用されていた。その後、血小板数が低濃度でも正確に測定可能になったこと、ランダム化対照研究などによって、 $10,000/\mu\text{l}$ の閾値に下げても出血が増加しないとの根拠を得ている。外科系患者も含めて日本では使用基準が厚生労働省のガイドライン²⁾として示されている(表 1)。

3. 1 回の血小板輸血量——高単位か、小単位か
予防的投与において、1 回当りの輸血量については論争が続いている。これまでに 4 つのランダム化対照研究³⁻⁶⁾がある。通常量(日本の 15~20 単位に相当)は高単位(25~50 単位に相当)輸血群と比べて輸血間隔(1.7~2.6 日 vs. 3.0~4.1 日)は短縮するが、輸血効率(1 日当り輸血血小板数)は高いので、総輸血投与量は通常量群が少なくなるというのが多かった。それは数学的な減衰曲線からも裏打ちされていた¹⁾。しかし最近、高単位(30 単位相当)群は、通常量(15 単位相当)群よりも投与血小板量に差がないのにもかかわらず輸血間隔が長くなり、むしろ輸血効率が優れているとの報告⁶⁾がなされ、この問題は振り出しに戻っている。

また、低単位血小板輸血ではドナー曝露数が増加して、その結果、同種免疫感作頻度が上昇する欠点も指摘されている。