

外国で導入されているが、検出に時間がかかるという欠点がある。今回我々は、細菌の核酸増幅による検出を検討した。

【実験】

16S rRNA 遺伝子を PCR 法により増幅し、検出した。16S rRNA 遺伝子に着目した理由は、細菌に安定に保持されているため、細菌に共通の領域をターゲットとすることにより非特異的に細菌を検出できるため、1 菌体中(1 ゲノム中)に複数存在することから高感度が期待できるためである。

【方法】

1) 使用菌株

臨床分離株 8 菌種 29 株 (*Serratia marcescens* 4 株、*Escherichia coli* 4 株、*Pseudomonas aeruginosa* 4 株、*Bacillus cereus* 3 株、*Bacillus subtilis* 4 株、*Staphylococcus aureus* 4 株、*Staphylococcus epidermidis* 4 株、*Propionibacterium acnes* 2 株) を使用した。これらは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株である。また、ゲノム情報が公開されている実験用菌株 3 菌種 3 株 (*Serratia marcescens* SM28 株、*Bacillus cereus* NC7401 株、*Staphylococcus aureus* N315 株) を使用した。

2) 菌浮遊液の調整

上記の菌株それぞれについて、 10^8 - 10^9 CFU/ml 相当の菌浮遊液となるように、滅菌精製水を用いて 10 倍希釈系列を作り、その $1\mu\text{l}$ をテンプレートと

して PCR 反応液に添加した。

3) 増幅、検出

使用した PCR プライマーは、5' - GCAAACAGGATTAGATACCC - 3' と 5' - CGTCATCCCCACCTTCCTCC - 3' であり、温度条件は、95 °C 10 min、(95 °C 30 sec、58 °C 45 sec、72 °C 90 sec) × 35 回、72 °C 7 min で増幅を行った (Richard E. Rothman *et. al*, J Infect Dis 2002;186:1677-81)。Ex Taq ポリメラーゼ (TaKaRa) を用いて $10\mu\text{l}$ の反応系で PCR を行った後、1.5% アガロースゲル電気泳動により 418bp の増幅産物のバンドを確認した。

【結果】

今回使用したすべての菌種、菌株を検出することができた。検出限界は菌液濃度 10^4 - 10^6 CFU/ml (1 反応チューブあたり菌 10^1 - 10^3 個) であった (表)。

【考察】

諸外国で導入されている製剤の細菌検査は主に培養法によるものであるが、培養法の最大の問題点は判定までの時間である。発育良好な菌や混入菌量の多い場合は 24 時間以内に陽性になるが、発育の遅い菌や混入菌量の少ない場合は、数日から 1 週間以上経って陽性になる場合もあり、陰性と判定できるまでの検査期間の設定が困難である。これに対して 16S rRNA 遺伝子増幅法は菌種に関わらず数時間で結果を得られるうえ、検出工程に要する時間が一定であり、製剤の出庫時までには判定を終えることができ有用である。また、これまでに我々は、製剤中の

生きた細菌の数が一時的に減少した後に再び増加する可能性があることを報告してきた。生菌数が減少している間にサンプリングする可能性もあり、培養法では検出限界以下で偽陰性となる場合であっても、16S rRNA 遺伝子増幅法では DNA が残っていれば検出可能と考えられる。

一方、16S rRNA 遺伝子増幅法の問題点として、複数菌混在の場合や増幅する DNA 領域が短い場合は菌の同定、型別は難しいことが挙げられる。培養法では菌株が得られるので輸血後感染症発生時の

精査に使用できる。また、培養法は無菌操作のみで十分であるが、16S rRNA 遺伝子増幅法は細菌 DNA の混入を防がねばならず、機具や試薬の選択、取り扱いにより注意が必要である。

【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。

表

| 菌種 | 菌株名 | 検出限界 | |
|-----------------------------------|---------|-----------------|-----------------|
| | | (CFU/ml) | (CFU/tube) |
| <i>Serratia marcescens</i> | 臨床分離株 1 | 10 ⁵ | 10 ² |
| | 臨床分離株 2 | 10 ⁴ | 10 ¹ |
| | 臨床分離株 3 | 10 ⁵ | 10 ² |
| | 臨床分離株 4 | 10 ⁵ | 10 ² |
| | SM28 | 10 ⁵ | 10 ² |
| <i>Escherichia coli</i> | 臨床分離株 1 | 10 ⁵ | 10 ² |
| | 臨床分離株 2 | 10 ⁵ | 10 ² |
| | 臨床分離株 3 | 10 ⁴ | 10 ¹ |
| | 臨床分離株 4 | 10 ⁴ | 10 ¹ |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 臨床分離株 1 | 10 ⁴ | 10 ¹ |
| | 臨床分離株 2 | 10 ⁴ | 10 ¹ |
| | 臨床分離株 3 | 10 ⁴ | 10 ¹ |
| | 臨床分離株 4 | 10 ⁵ | 10 ² |
| <i>Bacillus cereus</i> | 臨床分離株 1 | 10 ⁶ | 10 ³ |
| | 臨床分離株 2 | 10 ⁵ | 10 ² |
| | 臨床分離株 3 | 10 ⁶ | 10 ³ |
| | NC7401 | 10 ⁶ | 10 ³ |
| <i>Bacillus subtilis</i> | 臨床分離株 1 | 10 ⁵ | 10 ² |
| | 臨床分離株 2 | 10 ⁵ | 10 ² |
| | 臨床分離株 3 | 10 ⁵ | 10 ² |
| | 臨床分離株 4 | 10 ⁵ | 10 ² |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 臨床分離株 1 | 10 ⁵ | 10 ² |
| | 臨床分離株 2 | 10 ⁵ | 10 ² |
| | 臨床分離株 3 | 10 ⁵ | 10 ² |
| | 臨床分離株 4 | 10 ⁵ | 10 ² |
| | N315 | 10 ⁴ | 10 ¹ |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> | 臨床分離株 1 | 10 ⁴ | 10 ¹ |
| | 臨床分離株 2 | 10 ⁴ | 10 ¹ |
| | 臨床分離株 3 | 10 ⁴ | 10 ¹ |
| | 臨床分離株 4 | 10 ⁵ | 10 ² |
| <i>Propionibacterium acnes</i> | 臨床分離株 1 | 10 ⁵ | 10 ² |
| | 臨床分離株 2 | 10 ⁶ | 10 ³ |

「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)

血小板製剤の細菌汚染と有効期限延長について

分担研究者 東京都西赤十字血液センター 所長
佐竹正博

研究要旨：

血小板製剤細菌汚染を避けるために採用した2つの安全対策(血液センターでの外観試験と保存前白血球除去)を検証した。1)外観変化の8割以上はスワーリングの消失として観察された、2)細菌の増殖が原因でスワーリングが消失したものはなかった、3)採血後きわめて早期にスワーリングの消失する特定のドナーが存在する。*Salmonella choleraesuis*はドナー血中で白血球に貪食されている場合が多いが、白血球除去で完全に除去できず、菌数は格段に減るがわずかにろ過血にも残っており、それらは適切な条件下では急速に増殖することがわかった。白血球除去フィルターの種類によっては、混入した *Serratia marcescens* の菌数をかなり減らすことができるが完全ではなく、また実際に血液に浮遊させた場合にはほとんど効果がなくなり、セラチア菌を除去する効果を期待することが実際上はできない。

平成19年11月より日赤の供給する血小板製剤の有効期限が、採血後3日目の午後12時まで(最長96時間)延長された。すなわちこれまでの有効期限72時間目にあたる日の深夜12時まで使用可能となった。血小板製剤有効期限延長の効果について調査した。東京都赤十字血液センター内の有効期限切れ数が月平均70.3本から27本へと62%減少した。

血小板製剤の細菌汚染のリスクに関して、その安全対策として現在血液センターでとられている2つの対策、1. 血液センター製剤課、供給課での外観試験、2. 保存前白血球除去の現状と、平成19年11月より開始された血小板製剤有効期限延長の効果について調査した。

1. 血液センターでの外観試験について

血小板製剤が細菌に汚染され一定以上の細菌数に達した時に、製剤の外観に変化が生ずることがある。主な外観上の変化は、色調の変化、濁りの有無、スワーリングの消失、凝集・凝固物の析出などである。血液センターでは、製剤課で製

造が完了して供給課に製品を出荷する際に製剤課職員が外観をチェックし、異常な外観を呈したものを減損にしている。また供給課では、医療機関への出庫の際に供給課職員が再び外観をチェックしている。これらのチェックで減損された製剤は品質課に引き渡され、そこで細菌の培養試験がおこなわれる。培養は東京都血液センターでは全自動培養装置 BacT/Alert を使用し、好気ボトルと嫌気ボトルの両方で培養している。これまでの東京都血液センターでの実績を下に示す。

製剤課外観チェック (平成 18 年 4 月～19 年 12 月)

外観による減損件数： 113 件

異常とされた外観： スワーリングなし 96 件、色調異常 17 件、凝固・凝集物 0 件

培養結果： 陽性 0 件、陰性 113 件

供給課外観チェック (平成 18 年 4 月～19 年 12 月)

外観による減損件数： 15 件

| | 血小板献血回数 | スワーリング不適 | 不適率 % |
|---|---------|----------|-------|
| 1 | 10 | 4 | 40.0 |
| 2 | 4 | 2 | 50.0 |
| 3 | 4 | 2 | 50.0 |
| 4 | 12 | 2 | 16.7 |
| 5 | 8 | 2 | 25.0 |
| 6 | 5 | 3 | 60.0 |

採血後短時間でスワーリングが消失する血小板のドナーが少なからずおり、原

異常とされた外観： スワーリングなし 12 件、色調異常 3 件、凝固・凝集物 0 件
培養結果： 陽性 0 件、陰性 15 件

当血液センターの製剤課での血小板の製品化は、採血後 24 時間以内に行なわれている。外観に異常を呈するのは、細菌濃度が 10^7 個/mL 以上に増えた場合であるのが通常であるので、増殖の速い細菌の混入があったとしても 24 時間以内にこの濃度に達することは起こりにくい。したがって、製剤課で観察されたスワーリングの消失は、細菌の増殖によって血漿の pH が下がって血小板の viability が低下したためではなく、そのドナーの血小板の固有の性質によるものと思われる。細菌培養の結果が陰性であることがこれを裏付けている。この観点から、スワーリングの消失したドナーの過去の採血についての記録をたどると、製剤課でスワーリングの消失したドナー 42 人のうち、6 人は過去にも消失した記録があった。消失した回数とその割合は下表の通りである。

因は不明であるがその血小板に固有の問題があることが推察される。

次に、供給課での外観チェックは採血後 24 時間から 65 時間ぐらいの間に行なわれる。この時間では、混入細菌が外観に異常を呈するほどの濃度に増殖することがあり得る。しかしながら、スワーリングの消失した 12 件と色調異常の 3 件の培養は全て陰性であった。したがって、この場合のスワーリングの消失も細菌の増殖によるものではないと判断できる。製剤化で見られたより早い時期での消失と同じ原因が引き続いている場合が含まれていると思われる。

以上より、血液センター内での外観試験の効果は次のようにまとめられる。1) 外観の変化の 8 割以上はスワーリングの消失として観察される、2) 細菌の増殖によってスワーリングが消失したものはなかった、3) 採血後きわめて早期にスワーリングの消失する特定のドナーが存在する。アメリカ合衆国において、スワーリングの消失は外観スクリーニングの項目には入っていないのは今回の調査と同様の事例が圧倒的に多いからであろう。しかしながら、前回の班研究でのスパイク実験からも明らかなように、細菌が増殖した際の外観変化の一つにスワーリングの消失がありことも事実であり、製剤減損となる数が採血・供給に大きな影響を及ぼすことがない限り、観察項目として重要であることには変わりはないと考えられる。

一方、スワーリングが消失するという事は血小板の代謝が低下して円盤状の形態を失い膨化したことを意味するので、細菌の混入がなかったとしても、その機能が低下しており、輸血用に使用する意

味がないともいえる。この意味でもスワーリングの有無の観察は重要であるといえる。ただしきわめて早期に円盤状の形態を失う血小板の場合、それがドナーの血中で生理的にどのような機能を果たしているか、またその球状になった血小板が輸血された場合、正常の血小板と比べてどのくらい機能が異なっているかについては、これからの検討課題である。

2. 保存前白血球除去の特定の細菌に対する除去効果について

保存前白血球除去の主な効果は、発熱性輸血副作用を減らすこと、白血球抗原による同種免疫を減らすこと、サイトメガロウイルスの伝播を減らすこと、の 3 つであるが、白血球に取り込まれた細菌を白血球ごと除去できる効用も報告されている。これは食中毒菌エルシニア・エンテロコリチカにおいて顕著であり、新鮮全血にこの細菌をスパイクし、一定時間後に白血球除去フィルターを通したあとの血液からは、その血液を長期間保存した場合でも全く細菌の再増殖が認められないデータが数多く出されている。したがってエルシニア菌と同様に、ドナー血中において白血球に貪食された状態で存在しやすいその他の細菌についても、保存前白血球除去が細菌除去として有効である可能性がある。

日本赤十字社血液センターでは、血小板製剤の細菌汚染の正確な頻度を求めるために、平成 17 年より、期限切れとなった血小板製剤を基幹センターにて培養に供している。その過程において、あるドナーから得られた血小板製剤が

Salmonella choleraesuis (ブタコレラ菌) に汚染されている事例が見出された。このドナーからその 1 ヶ月後に得られた全血を遠心分離して培養すると、血漿と赤血球沈渣では陰性であったがバフィーコートでの培養のみで同細菌が検出された。文献でも明らかなことであるが、これによりサルモネラ菌も白血球に貪食されてしばしばドナー血中に長期存在することが示された。そこで、サルモネラ菌が保存前白血球除去で効果的に除去できるかどうかを検証した。

1) 方法

2 人のドナーより 400mL 全血を採血する。それぞれに上記のドナーから得

られた *Salmonella choleraesuis* を終濃度が 10^2 CFU/ml となるように接種する。接種後の全血を 2~3 時間室温に静置保存する。サンプルを採取して細菌を定量する。全血を 2 分割し、一方は白血球除去フィルターを通し、もう一方は通さずにコントロールとする。それぞれからサンプルを採取し、細菌を定量する。24、48 時間後、1、2、3 週間後にサンプルを採取し同様に定量する。培養はすべて全自動細菌培養装置 BacT/Alert を使用した。

2) 結果

| ドナー | 1 | | 2 | |
|--------------|-----|-----|-----|-----|
| 容量 mL | 451 | | 450 | |
| 接種菌濃度 CFU/mL | 150 | | 163 | |
| 白血球除去 | 有 | 無 | 有 | 無 |
| 容量 mL | 199 | 225 | 201 | 223 |
| 0 hr CFU/mL | <5 | 150 | 5 | 180 |
| 24 hr | 5 | 90 | <5 | 180 |
| 48 hr | 5 | 120 | 5 | 180 |
| 1 週 | 5 | 80 | <5 | 135 |
| 2 週 | <5 | 40 | <5 | 50 |
| 3 週 | <5 | <5 | <5 | <5 |

ここで、定量用プレートには $200 \mu\text{L}$ を撒いているので、プレートに 1 個コロニーが見つかったときに 5CFU/mL となり、1 個もみつからなかった場合には <5 CFU/mL となる。フィルター通過 24 時間後の検体は BacT/Alert で培養すると二つとも 0.58 日という短時間で培養陽性のシグナルが出た。すなわち <5 CFU/mL で

あってもサンプル量を増やせば実際には細菌が存在しており、またこの細菌は非常に短時間で細菌が増殖することも示された。したがって、*Salmonella choleraesuis* はドナー血中で確かに白血球に貪食されている場合が多いが、白血球除去で完全に除去できるわけではなく、菌数は格段に減るがわずかにろ過血にも

残っており、それらは適切な条件下では急速に増殖することがわかった。

次に、*Serratia marcescens* についても同様の検討を行った。グラム陰性桿菌 *Serratia* 属は日和見感染を起こす院内感染菌の代表的なもので、病院内の湿潤な環境に多く存在している。易感染患者で重大な感染を起こし、呼吸器感染、尿路感染、手術部位感染、敗血症などで死に

至ることもしばしばある。この意味において特に入院患者での自己血採血では注意を要する細菌である。*Salmonella choleraesuis* の場合と同様に、4人のドナーから得られた新鮮全血に *Serratia marcescens* を接種し、二つにスプリットして一方を通常の MAP 血、他方を白血球除去血として保存した。1日後と7日後にサンプルを採取して菌数を定量した。

| ドナー | 1日後 CFU/mL | | 7日後 CFU/mL | |
|-----|------------|-----|------------|-----|
| | MAP | 白除血 | MAP | 白除血 |
| 1 | 10 | 0 | 260 | 40 |
| 2 | 35 | 0 | 550 | 5 |
| 3 | 75 | 10 | 1930 | 120 |
| 4 | 30 | 5 | 245 | 340 |

フィルターの種類により細菌の除去効果が異なる可能性もあるため、市販されている3週類のフィルターを用いて、生理食塩液、RC-MAP、血漿にそれぞれ浮

遊させた *Serratia marcescens* の除去効果を見た。実験条件は上記とほぼ同じである。

単位 CFU/mL

| 浮遊液 | | 生食浮遊 | | | RC・MAP浮遊 | | | Plasma浮遊 | | |
|-----------|----|------|------|------|----------|-------|-------|----------|-------|-------|
| ろ過前 | | 7766 | 7920 | 8008 | 14210 | 17500 | 13500 | 26570 | 23130 | 26160 |
| フィル ター | A社 | 4035 | 3865 | 3975 | 13000 | 12000 | 12000 | 20500 | 20500 | 21500 |
| | B社 | 115 | 100 | 90 | 1650 | 1655 | 1425 | 16000 | 17000 | 19500 |
| | C社 | 0 | 0 | 0 | 240 | 525 | 565 | 15000 | 8500 | 14500 |

以上により、白血球除去フィルターはその種類によっては、混入した *Serratia marcescens* の菌数をかなり減らすことができるが完全ではなく、また実際に血液に浮遊させた場合にはほとんど効果がなくなり、セラチア菌を除去する効果を期待することが実際にはできないことが

わかった。

3. 血小板製剤有効期限延長の効果について

平成19年11月17日より日赤の供給する血小板製剤の有効期限が、採血後3日目の午後12時まで（最長96時間）延長

された。すなわちこれまでの有効期限 72 時間目にあたる日の深夜 12 時まで使用可能となった。その効果については、運用が始まってまだ日が浅いため適切なデータは得られていないが、東京都血液センターで収集したデータからある程度類推することができる。以下は、延長前 1

年間のデータから得られた 1 ヶ月平均の数値と、延長後の 1 ヶ月（平成 19 年 11 月 25 日から 12 月 25 日まで）のデータの比較である。ここからは常に少数製造され減損されている 1、2 単位製剤を除いてある。

| | 延長前 | | 延長後 |
|----------|----------------------------|--------|--------------------|
| | 06 年 11 月 ～07 年 10 月 | 1 ヶ月平均 | 07.11.25～ 12.25 |
| 期限切れ (本) | | | |
| PC5 | 2 | 0.2 | 0 |
| PC10 | 96 | 8.0 | 1 |
| PC15 | 4 | 0.3 | 0 |
| PC20 | 3 | 0.3 | 1 |
| IRPC5 | 45 | 3.8 | 1 |
| IRPC10 | 523 | 43.6 | 18 |
| IRPC15 | 32 | 2.7 | 1 |
| IRPC20 | 138 | 11.5 | 5 |
| 本数計 | 843 | 70.3 | 27 |
| 納品 (本) | | | |
| PC5 | 599 | 50 | 18 |
| PC10 | 29,254 | 2,438 | 2,597 |
| PC15 | 1,441 | 120 | 87 |
| PC20 | 1,603 | 134 | 216 |
| IRPC5 | 3,142 | 262 | 186 |
| IRPC10 | 48,910 | 4,076 | 3,950 |
| IRPC15 | 3,349 | 279 | 198 |
| IRPC20 | 6,022 | 502 | 687 |
| 本数計 | 94,320 | 7,860 | 7,939 |

| | 延長前 | | 延長後 |
|------------|---------------------------|--------|--------------------|
| | 06 年 11 月～07 年 10 月 | 1 ヶ月平均 | 07.11.25 ～12.25 |
| 需給調整払出 (本) | | | |
| PC5 | 6 | 1 | 0 |
| PC10 | 98 | 8 | 4 |
| PC15 | 7 | 1 | 0 |
| PC20 | 10 | 1 | 0 |
| IRPC5 | 261 | 22 | 18 |
| IRPC10 | 3,846 | 321 | 373 |
| IRPC15 | 295 | 25 | 20 |
| IRPC20 | 317 | 26 | 46 |
| 本数計 | 4,840 | 403 | 461 |
| 需給調整受入 (本) | | | |
| PC5 | 2 | 0 | 0 |
| PC10 | 41 | 3 | 3 |
| PC15 | 2 | 0 | 1 |
| PC20 | 1 | 0 | 0 |
| IRPC5 | 37 | 3 | 0 |
| IRPC10 | 1,188 | 99 | 95 |
| IRPC15 | 194 | 16 | 11 |
| IRPC20 | 99 | 8 | 6 |
| 本数計 | 1,564 | 130 | 116 |

医療機関への納品数、すなわち需要は不変であるにもかかわらず、血液センター内の有効期限切れ数が月平均 70.3 本から 27 本へと 38%に減少した。それに伴い血液センター内においては次のような利点が明らかに認められている。

- 1) 有効期限（採血時刻）を気にすることなく朝から採血可能となった。（午前中に採血すると医療機関で午前中に期限切れとなる可能性があるため、そのような採血はなるべく避けるようにしていた。）
- 2) PC-HLA の確保において、登録者へ献血を依頼できる期間が 1 日多くなった。
- 3) 製品の有効時刻別の管理が不要となり、在庫管理が容易になった。
- 4) 使用日当日に期限が切れる製剤を使用日当日に供給することが容易になった。
 - ▶ 使用日当日の有効期限の製品を使って貰うための医療機関への交渉（電話）の回数が削減された。
 - ▶ 使用日当日の 12 時、14 時の有効期限の製品を使用して貰うために、定時配送便とは別に要望の時刻に合わせて医療機関へ出勤しなければならなかったが、その必要がなくなった
 - ▶ 上述の結果として、駒込出張所エリアの辰巳への受注集約と供給エリアの変更が可能となった。

他センター血の購入数は不変であるが、これはオーダーに対し採血本数が絶対

的に不足しているためであり、有効期限延長によって在庫を繰り越すことは元来期待できない。

一方、医療機関からの意見・データはまだ集計していないが、次のような効果が医療機関内で想定されていた。

- 1) 院内廃棄の減少。
- 2) 製品の有効時刻の管理が不要となり、運用が容易になる。
（有効時刻を気にせずに臨床へ払い出せる。）
（期限切れ間近の製品使用に関する患者・患者家族からの苦情が減る。）

4. まとめ

血小板製剤の有効期限が 3 日間 72 時間に制限されていた日本の血小板製剤は、血液センターと医療機関の両者において多くの運用上の困難さがあったことが今回の調査でも明らかである。今回最大 96 時間に延長されたことにより少なくとも血液センターにおいては多くのメリットが確認できた。特に在庫期限切れの減少は、輸血関係者だけではなく、血液を提供してくれる献血者にとっても大きな意味がある。

有効期限延長によって血小板製剤中の細菌増殖のリスクは少なくとも理論上は大きくなった。新たに導入された初流血除去は、特に皮膚に付着していた菌の混入を低く抑えることが期待されている。いっぽう保存前白血球除去や外観試験などの対策については、エルシニア菌以外についてはそのリスクの低下に寄与している具体的なデータをあげることができ

なかった。しかし理論的には何らかの効用があるはずであり、以後も長期的な観察とデータの蓄積が必要と思われる。

5. 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。

6. 発表業績

1. 講演：北海道輸血シンポジウム

輸血細菌感染症と白血球除去・初流血除去の効果. 平成 19 年 7 月 札幌.

2. 発表：The fifth Red Cross & Red Crescent Symposium

Bacterial Contamination in Platelet Concentrate in Japan and the Introduction of Diversion System. 平成 19 年 11 月 バンコク.

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

「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

血小板製剤の有効期限延長による効率的血小板補充療法への寄与

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：

本邦では、長らく血小板製剤の有効期限は 72 時間と非常に短く、予測困難な術中の大量出血や危機的出血の際に、その確保にしばしば困難をきたすことがあった。今回、2007 年 11 月に漸く血小板製剤の有効期限が 72 時間から、4 日間（採血日を含む）に延長された。この有効期限延長が、血小板製剤の供給にどのように影響を与えているかを知ることは、今後、有効期限をさらに欧米なみに延長することの妥当性を検討する際に重要な情報となる。当院では、血小板製剤の大部分が心臓血管外科手術周術期に使用され、その使用予測が困難な場合や、緊急性を必要とした使用が多い。このような医療環境のもとで、有効期限延長によって血小板製剤の供給体制が改善しているかどうかの検討を試みた。

当院では、イントラネットを用いた輸血管理システムを導入しており、使用直前の実施入力により血液製剤の使用日時をほぼ正確に把握することが可能である。このシステムを用い、有効期限が延長された 2007 年 11 月 14 日から 12 月 25 日に使用された血小板製剤の使用日時を抽出し、使用場所（病棟）、単位数等の情報を確認した。さらに、それぞれの血小板製剤の従来の 72 時間の保存期間とした場合の有効期限について赤十字血液センターの協力を得て確認し、72 時間の有効期限を越えて使用した、すなわち、今回の有効期限延長により使用可能となった血小板製剤に関して検討を行った。

従来の 72 時間から、4 日間（採血日を含む）への有効期限延長によって、当院における使用血小板製剤全体の 8%が、本来ならば有効期限切れで廃棄となっていたが、今回の有効期限延長によって使用可能となった。これらのほとんどは、手術室で使用されていた。今回の有効期限延長は、心臓血管外科手術等で、大量出血、危機的出血に対して日々緊急性をもって対応する必要がある医療機関における効果的、効率的な血小板補充療法に貢献していることが示唆された。

A. 研究目的

濃厚血小板製剤は、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、肝疾患手術等の止血のために、代替のない必要不可欠な血液製剤である。特に手術等の大量出血、危機的出血に関して、事前の予測が困難であるにもかかわらず、緊急性を有することも多く、患者予後を大きく左右する重要な治療である。しかしながら、本邦では、長らく血小板製剤の有効期限は、欧米に比し72時間と非常に短く、その確保にしばしば困難をきたすことがあった。今回、2007年11月に漸く血小板製剤の有効期限が72時間から、4日間(採血日を含む)に延長された。これは、従来と比較して半日程度の延長となる(従来、採血後4日目の10時、12時、14時等で有効期限となっていたものが、その日の24時まで使用可能となった)。

この有効期限延長が、血小板製剤の供給にどのように影響を与えているかを知ることが、今後、有効期限をさらに欧米なみに延長することの妥当性を検討する際に重要な情報となる。

当院では、血小板製剤の大部分が心臓血管外科手術周術期に使用され、その使用予測が困難な場合や、緊急性を必要とした使用が多い。このような医療環境のもとで、有効期限延長によって血小板製剤の供給体制が改善しているかどうかの検討を試みた。

B. 研究方法

当院では、輸血管理システムと病院情報システムが院内イントラネットでリン

クし、血液製剤の使用に関しては、ベッドサイドでバーコードを用いて使用直前に実施入力される(Miyata S, et al.: Network computer-assisted transfusion management system for accurate blood component-recipient identification at the bedside. Transfusion 2004, 44: 364-372)。このシステムは、ベッドサイドでの使用直前の患者-血液製剤の認証を行うことにより、輸血過誤防止に有効であるばかりでなく、血液製剤の使用状況がリアルタイムに把握できる利点を持つ。したがって、ほぼ正確に血液製剤の使用時間を把握できる。

このシステムを用いて、有効期限が延長された2007年11月14日から12月25日に使用された血小板製剤の使用日時を抽出した。また、それらの血小板製剤の使用場所(病棟)ならびに単位数等の情報を確認した。

さらに、それぞれの血小板製剤について従来の72時間を保存期間とした場合の有効期限について、供給先である大阪府赤十字血液センターの協力を得て、確認した。上記使用血小板製剤の中から従来の72時間の有効期限を越えて使用した、すなわち、今回の有効期限延長により使用可能となった血小板製剤に関して検討を行った。

C. 研究結果

有効期限が延長された2007年11月14日から12月25日までに、使用された血小板製剤は135製剤あった。このうち、2単位製剤1製剤、10単位製剤57、15単位製剤33、20単位製剤44製剤であった。

また、A 型 38、O 型 54、B 型 35、AB 型 8 製剤であった。

この 135 製剤のうち、従来の 72 時間の有効期限を越えて使用した、すなわち、今回の有効期限延長により使用可能となった血小板製剤は、11 製剤であった。したがって、この間に使用した血小板製剤の 8.1%が、従来の有効期限であれば有効期限切れで廃棄となっていた可能性がある。

この 11 製剤のなかで、10 単位が 4、15 単位が 2、20 単位製剤が 5 製剤であった。単位数別では、10 単位製剤の中で今回の有効期限延長により使用可能となった血小板製剤は 7%、15 単位製剤では、6.1%、20 単位製剤では、9.1%であり、20 単位製剤で多い傾向にあった。

血液型別に見ると、A 型製剤の中で今回の有効期限延長により使用可能となった血小板製剤は 10.5%、O 型では 3.7%、B 型では 14.3%、AB 型は 0%であり、A 型、B 型が多かった。

これら今回の有効期限延長により使用可能となった血小板製剤 11 製剤は、8 製剤が手術室で、2 製剤が外科系集中治療室（ICU）で、1 製剤は内科系集中治療室（CCU）で使用されていた。

今回の有効期限延長後も、血小板製剤の止血効果について、特に問題は発生しておらず、また、細菌汚染製剤もなかった。

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

りやすい心臓、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。しかしながら、本邦では、有効期限が 72 時間と極端に短く、血小板製剤の有効期限切れで廃棄となる割合は、約 7%に上ると推定されている。

したがって、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。

当院は、循環器疾患に特化した病院であり、血小板製剤のほとんどを心臓血管外科周術期に使用する。この血小板製剤使用状況の特徴は、人工心肺使用手術では、それに伴う希釈性や消費性凝固障害、血小板機能障害が起り、止血困難となりやすい。また、大動脈瘤破裂などにより危機的出血となる症例も少なくなく、大量出血、危機的出血の際の止血のための血小板製剤使用が大多数を占める。したがって、事前に使用予測することが困難な場合が多く、また、緊急性をもって使用する頻度も少なくなく、血小板製剤の確保に難渋することも少なくなかった。

今回、2007 年 11 月によりやく本邦にお

いても血小板製剤の有効期限が従来の 72 時間から、4 日間（採血日を含む）に延長された。これは、従来と比較して半日程度の延長となる（従来、採血後 4 日目の 10 時、12 時、14 時等で有効期限となっていたものが、その日の 24 時まで使用可能となった）。半日程度の有効期限延長であるが、今回の有効期限延長で、本来ならば有効期限切れで廃棄となっていた血小板製剤で、今回の有効期限延長によって使用可能となった製剤の割合は、全使用血小板製剤の 8%にも及んだ。したがって、今回の有効期限延長は、当施設において、血小板製剤の有効使用に大きく貢献していると考えられる。その理由として、当院では、心臓血管外科周術期に血小板製剤の大多数が使用される。心臓血管外科待機手術において、午前 9 時に開始しても、人工心肺を離脱し、止血を試みるのはどうしても午後遅く、場合によっては、夜にずれ込むことも少なくない。この場合、昼間、もしくは午後早くに有効期限切れを迎える血小板製剤は、使用できなくなる。したがって、この半日程度の有効期限延長であっても、ちょうど血小板製剤の使用の多い時間帯である、午後遅くをカバーできるようになったため、このように明らかな有効利用につながったものと推測される。実際、これら今回の有効期限延長により使用可能となった血小板製剤 11 製剤の中で、8 製剤が手術室で使用されていた。

このように、我々の施設のような、心臓血管外科等で、大量出血、危機的出血に対して日々緊急性をもって対応する必要がある医療機関では、今回の約半日間

の有効期限延長であっても、血小板製剤の有効期限切れを防ぐ有効利用につながっていることが判明した。特に 20 単位の高単位製剤でその傾向が強かった。

過去の我々の検討において、濃厚血小板製剤を特に現在のように高酸素透過性バッグを用いた場合には、欧米並みに 5 日間に有効期限を延長しても、その保存血小板機能は充分保たれていることが明確となっている。止血困難、危機的出血に安全に、有効に対応するためには、更なる血小板製剤の有効期限の延長が望まれる。このことにより、止血困難、危機的出血に陥った患者の予後改善に大きく貢献できるものとする。

E. 結論

1. 今回実施された血小板製剤の従来の 72 時間から、4 日間（採血日を含む）への有効期限延長によって、当院における使用血小板製剤全体の 8%が、本来ならば有効期限切れで廃棄となっていたが、今回の有効期限延長によって使用可能となった。これらのほとんどは、手術室で使用されていた。
2. 今回の有効期限延長は、心臓血管外科手術等で、大量出血、危機的出血に対して日々緊急性をもって対応する必要がある医療機関における効果的、効率的な血小板補充療法に貢献していることが示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 関連する研究報告

1. 発表論文

- 1) 藤井康彦、松崎道男、宮田茂樹、東谷孝徳、稲葉頌一、浅井隆善、星 順隆、稲田英一、河原和夫、高松純樹、高橋孝喜、佐川公矯: ABO 不適合輸血の発生原因による解析. 日本輸血細胞治療学会誌 2007; 53(3): 374-382.

2. 学会発表

- 1) 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製剤使用状況と有効期限延長の与える影響. 第 55 回日本輸血学会総会、名古屋、2007.
- 2) 宮田茂樹、佐々木啓明、亀井政孝、山本 賢、角谷勇実、阪田敏幸、佐野隆宏、荻野 均: 医療機関における分画製剤の使用状況と対応策. 第 55 回日本輸血学会総会、名古屋、2007.
- 3) 宮田茂樹、阪田敏幸、山本 賢、角谷勇実、佐野隆宏、佐藤 清、亀井政孝、佐々木啓明、荻野 均: 大量出血の副作用対策・異型輸血. 第 51 回日本輸血学会近畿支部総会、和歌山、2007.
- 4) 佐野隆宏、角谷勇実、山本 賢、阪田敏幸、佐藤 清、宮田茂樹: イントラネットを用いた輸血部門におけるアルブミン製剤一元管理. 第 51 回日本輸血学会近畿支部総会、和歌山、2007.
- 5) 宮田茂樹: 輸血管理料の問題点について. 第 6 回 京阪神輸血・免疫・血液研究会、大阪、2007

厚生労働省科学研究費補助金
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 19 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」
(H18-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 *in vivo* 試験

主任研究者：大戸 齊 教授

研究協力者：菅野隆浩 江月将史 川畑絹代

福島県立医科大学附属病院 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、安定して、血小板機能が保存されることを報告してきた。PO-80 バッグの有効性を示す次のステップとして、*in vivo* 試験を行い非劣性試験で評価した。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 81.7%、生体内寿命が 81.1%と良好であった。新鮮血小板に対し回収率、生体内寿命の 67%以上という基準内で非劣性試験に適合した。PO-80 による濃厚血小板製剤の 7 日間保存は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ると思われる。

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。一方、急速な高齢人口の

増加による献血者の減少により近い将来、

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。日本では、2007年11月14日、濃厚血小板製剤の有効期間は3日目の終日までに、実質4日間に延長された。しかし、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、有効期限を7日間に延長させようというのが世界の趨勢である^{1), 2)}。

血小板製剤の有効期限の延長には、細菌汚染防止の問題と、血小板機能を良好に維持することの2つの大きな課題がある。本研究では血小板の機能保持に取り組んできた。製剤中の血小板機能維持には酸素供給が有効であることから、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³⁾。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・保存することも報告してきた⁴⁾。

臨床使用へ向かうためのステップとして、*in vitro*試験の血小板製剤の*in vivo*評価は必要不可欠である。本研究では健常ボランティアドナー8名より高単位(20単位)の血小板を採取し、PO-80で7日間保存後その一部を放射性同位元素でラベリングし、ドナーへ返血し生体内寿命および回復率を測定する方法で評価した。また、本評価には非劣性試験を導入した⁵⁾。

非劣性試験とは、医薬品の効能が既存品のそれに勝るとは言えないが、皮下注で使用していたものが経口投与可能になる等、患者さんに利点を持つ薬が開発されたときに、その効能が臨床的に許容範囲であるこ

とを統計学的に評価し、安全に臨床使用へ導入しようというものである。血小板製剤長期保存によって血小板機能が低下することは避けられないが、その許容範囲に関しては、血小板の回復率、生体内寿命を指標として、すでに議論がなされている。しかし、非劣性試験にて統計学的に厳密に評価した論文はまだ見当たらない。

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の承認のもと行なわれた。血小板は自動成分採血装置(Amicus, Baxter社またはCOBE spectra, Gambro社)を用いて、同意の得られた8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250mL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2,660mL/m²/day/atm, 川澄化学工業)へ移し、血小板保存装置にて室温(22~24°C)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(Biomerieux)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°C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°C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. 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⁶⁾。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、COST⁷⁾ とい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。

4. 非劣性試験

Dumont の方法⁵⁾に従って評価を行った。同一被験者でコントロールと試験製剤の差を取り、その平均と UCL(upper confidential limit) と MAD (maximum acceptable difference) を以下の式で求めた。

$$UCL_{95} = \delta_{(control-test)} + t_{\alpha,d.f.} (sd/\sqrt{n})$$

$$MAD = \bar{X}_{control} - \bar{X}_{control} \times 0.667$$

MAD に関して今回の試験では、%回復率、生体内寿命ともに、対照である新鮮血小板の 66.7% を許容範囲とした。

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、LD 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 vivo 評価
保存 7 日目において 8 例すべての製剤において pH は 6.7 以上であり、細菌の混入は一例も検出されなかった。今回検討した 8 名における新鮮血小板の回復率は $61.2 \pm 13.0\%$ であり、PO-80 にて 7 日間保存した血小板の回復率は $50.3 \pm 13.4\%$ であった。新鮮血小板の生体内寿命の平均は 7.8 ± 1.1 日であり、7 日間保存血小板は、 6.3 ± 1.2 日であった。7 日間保存血小板の新鮮血小板に対する比は、回収率が $81.7 \pm 9.2\%$ 、寿命は $81.1 \pm 12.8\%$ であった。95% の危険率で計算した UCL95 は回復率で 15.3% でその MAD 20.4% より低かった。同様に生体内寿命では UCL95 2.1 日であり、その MAD 2.6 より低かった。これによって PO-80 で 7 日間保存した製剤は、新鮮血小板に対して、許容範囲にあると評価された。(Table 1)。

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/ μ 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* 試験を行い、それを非劣性試験で評価した。対照群である新鮮血小板に対して、PO-80 を用いて 7 日間保存した血小板製剤は、試験で設定した条件の許容範囲内にあり、臨床使用に対して信頼性が高いことが示された。

今回の評価においては、回復率が対照製剤の 81.7%、寿命が 81.1%であり、Murphy ら⁸⁾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。現在、生体内寿命は 58%や 66.7%を提唱する研究者もおり⁹⁾、今回は 66.7%を許容範囲としたが、この条件も試験製剤はクリアすることができた。

本研究における非劣性試験は、やや難解で単なる%だけによる評価と大差がないように見られるが、大きな違いがある。試験製剤の値を%の平均値として、Murphy らの方法で評価された場合、そのデータのばらつきが無視されている。すなわち、対照群に対する試験群のばらつきが大きくてもその平均値が 66.7%を超えてしまえばその試験は合格と判定されてしまう。しかし、非劣性試験では、試験製剤の測定値のばらつきが大きい場合に、その平均値が 66.7%を満たしていても UCL の値が大きくなるために、検定で許容範囲を超えてしまう場合が生じう

る⁵⁾。試験製剤の測定値のばらつきは、試験した製剤の品質の不安定性を示すものであり、非劣性試験では、製剤の質までの評価できるのが特徴といえる。

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^{6,10)}。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¹¹⁾。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¹²⁾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。