

ここで、定量用プレートには 200 μ 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。

IV. *Propionibacterium acnes* の病原性について

欧米においては、細菌に汚染された製剤を除くために、全品培養によるスクリーニングが取り入れられる血液センターが多くなってきている。細菌スクリーニングでわかってきたことの一つは、患者に敗血症などの重篤な症状をもたらす可能性のある細菌とともに、かなりの高濃度に増殖していても臨床的には害をもたらさないと思われる細菌も多数検出されることである。その代表的なものが *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*、アクネ菌) である。日本赤十字社血液センターでは品質管理のひとつとして 500 バッグに一つの割合で血液製剤の培養を行っており、その結果では、検出される菌の約 80% が *P. acnes* である。この頻度から言えば、*P. acnes* に汚染された血小板製剤は実際に多くの患者に輸血され、しかも臨床的には問題となっていないことを示す。

日本でも血小板製剤の有効期限が延長されれば、欧米のように全品培養が義務づけられる可能性がある。その際、*P. acnes* が検出された場合、製剤をどのように扱うべきか、また出荷後に *P. acnes* が検出された場合に医療機関でどのように対応すべきか等が問題となってくる。現在においても、

品質管理業務において抜き取り試験で細菌が検出されると、膨大な調査をして報告書を整えなければならないが、そのほとんどはおそらく病原性のない *P. acnes* である。したがって、*P. acnes* の病原性について明確にするデータをできるだけそろえて、臨床・品質管理業務での対応の仕方を模索することが必要であると考えられる。

P. acnes の病原性を言うには、最終的に臨床での結果を待つ以外にない。すなわち、1) 輸血後敗血症の原因として *P. acnes* が上げられる頻度を調べる、2) *P. acnes* で汚染された血小板製剤を輸血された患者で、敗血症あるいはより軽度な発熱などの副作用がどのくらいの頻度で起きているかを調べることである。しかしながら、元来まれな事象の臨床データの蓄積には長い年月を要し、いつまでたっても明快なデータは得られない可能性が高い。そこでわれわれは、動物実験で *P. acnes* の大量投与の起こす事象を調べ、少しでもその病原性についてヒントとなるデータを得ようと考えた。

本来 *P. acnes* は病原性が低いことはわかっているため、この実験では、明らかに有害事象を引き起こす細菌を陽性コントロールとして並置し、それに比べて *P. acnes* はどうであるかを見る比較試験をした。

【方法】

検討対象となる *P. acnes* は実際の献血者から得られた株を使用し、毒性の高い細菌としては *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*、臨床分離株) を選んだ。まず凍結保存されているこれらの細菌を confluent 状態になるまで培養し、予想される菌濃度にしたがってその希釈系列を作成した。これらをフ

エレーシスで得た血小板製剤に添加して、マウスに投与する血小板液を作成した。血小板液の一部は寒天上で培養して正確な菌数を求めた。また、菌液を加えない血小板だけのコントロールを適宜設けた。マウスはC57BLを用い、尾静脈から50 μ L静注した。静注後1時間、1日、2日、3日にそれぞれと殺して次の項目を測定した。GPT、血液培養による血中の細菌数、肝臓・脾臓・腎臓中の細菌数、肝臓・脾臓・腎臓の組織像。静注前と静注後1日、2日、3日の全身状態の変化と体重の変化。臓器中の細菌数は、血液、肝臓、脾臓、腎臓を無菌的に取り出してホモジナイズし、変法GAMブイヨン500 μ lで懸濁し、100 μ lを変法GAM寒天培地(ニッスイ製薬)に塗布して48時間培養し、単位重量あたりの細菌数を測定した。

【結果】

マウスに静注した血小板液の菌濃度は最終的に、*S. aureus*は 1.2×10^8 cfu/mLと 1.3×10^6 cfu/mLの2種であったが、*P. acnes*

は細菌の増殖速度が遅いため、実験開始前に得られた菌液の最高濃度は 4.0×10^6 cfu/mLと 1.3×10^7 cfu/mLの2種であった。基本的に、細菌-血小板液の1つについて8匹のマウスに投与、1時間後、1日後、2日後、3日後にそれぞれ2匹ずつと殺し、上記の項目について計測した。したがって、結果の表はあるマーカーの一連の変化のように表してあるが、同じマウス個体に対して経時的に計測したものではない。

1. ALT

細菌感染による臓器障害の指標のひとつとして血液中のALTの動きを追ったが有意差は見られなかった。

2. 臓器コロニー数

いくつかの検討を行ったが、たとえば病原性の高い*S. aureus*濃度を変えて投与した時の肝臓へのコロニー形成は以下のように、濃度依存性、クリアランスの動態などから信頼性の高い実験であることが示されている。

	after 1hr	after 1day	after 2days	after 3days
platelet + <i>S. aureus</i> 1x10 ⁸	99200	21900	9200	250
	91800	55900	1900	889
platelet + <i>S. aureus</i> 1x10 ⁶	279	39	0	7
	828	85	15	0
platelet only				0
				0

前述のように、*P. acnes*の病原性が低いことを示す為には、*S. aureus*の濃度を同じか低くして、 4.0×10^6 cfu/mLの*P. acnes*

と 1.3×10^6 cfu/mLの*S. aureus*を比較すべきである。この濃度による血液、肝臓、脾臓、腎臓中のコロニー数を下に示す。

		1hr	1 day	2 days	3 days
血液	<i>P. acnes</i> 4.0 × 10 ⁶	2	0	0	0
		0	0	0	0
	<i>S. aureus</i> 1.3 × 10 ⁶	0	0	0	0
		0	0	0	0
肝臓	<i>P. acnes</i>	0	0	0	0
		0	0	0	0
	<i>S. aureus</i>	279	39	15	7
		828	85	0	0
脾臓	<i>P. acnes</i>	0	0	0	0
		0	0	0	0
	<i>S. aureus</i>	190	77	18	3
		289	105	16	1
腎臓	<i>P. acnes</i>	0	0	0	0
		0	0	0	0
	<i>S. aureus</i>	0	2	0	0
		0	0	0	0

P. acnes の場合血液を含めすべての臓器でコロニー形成がほとんどみられないことから、投与後のクリアランスが非常に速いことが考えられた為、投与後 3 時間までの

短時間での各臓器のコロニー形成をみた。このときの *P. acnes* の濃度は 1.3×10^7 cfu/mL であった。

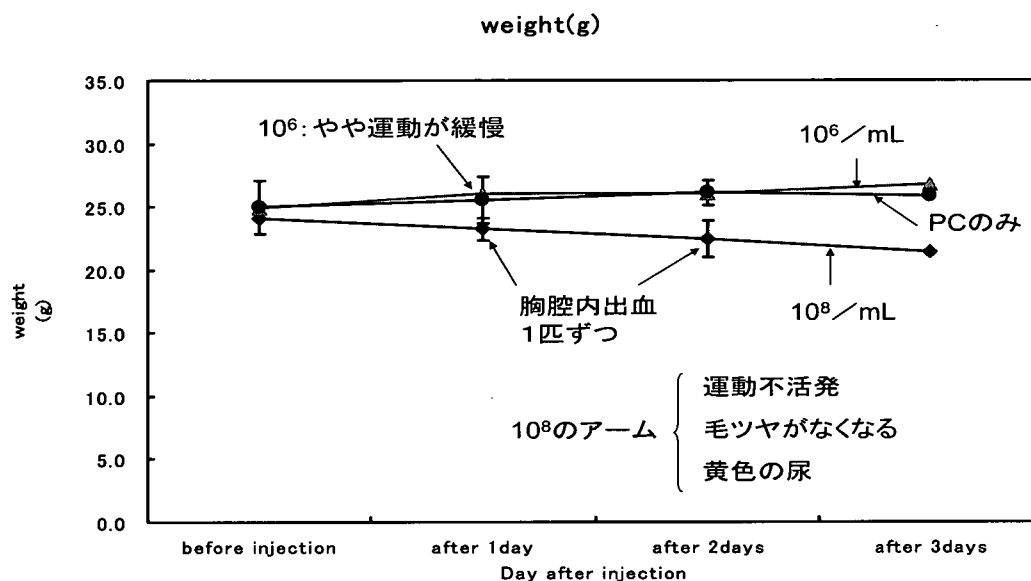
	15分	30分	1時間	3時間
血液	6	0	1	0
	1	4	3	0
肝臓	293	0	1027	1
	1011	0	1429	0
脾臓	897	0	981	0
	428	0	1021	0
腎臓	0	0	2	0
	2	0	2	0

3 時間後にはどの臓器においてもほとんどコロニーは見られなくなっており、*P. acnes* のクリアランスが非常に早い、または組織に着床しづらいことが想像されるが、30 分後においても同様であるので結論付けることはできなかった。

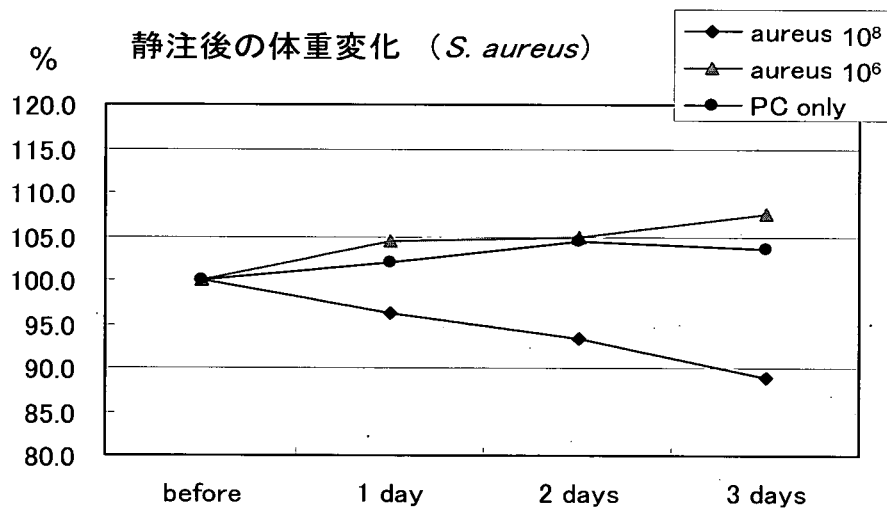
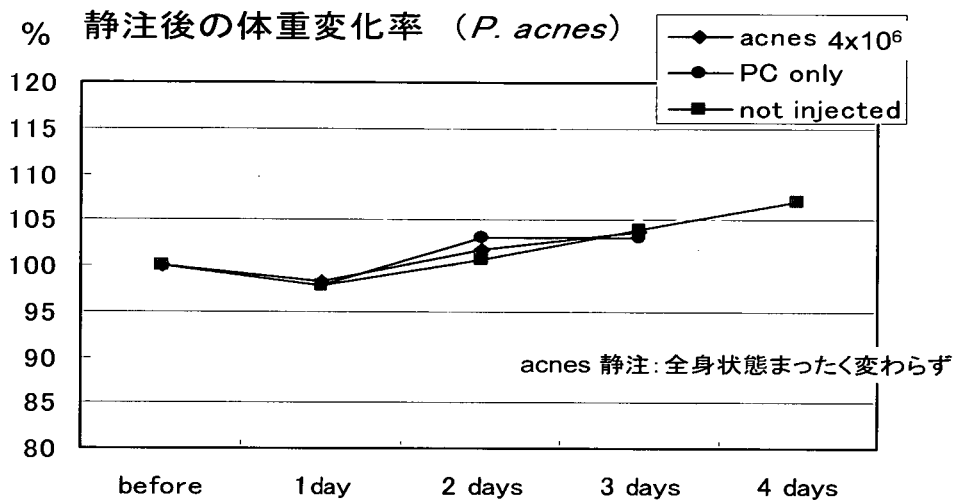
3. 組織像

S. aureus を投与したマウスの腎臓において、腎皮膜下の膿瘍形成、実質での白血球の巣状の集積などが認められた。*P. acnes* 投与群では全く正常の組織像であった。

4. 全身状態の変化



S. aureus 静注後のマウスの全身状態



*S. aureus*については、 1.2×10^8 cfu/mL と 1.3×10^6 cfu/mL の 2 種類の濃度を静注したマウスについて、また *P. acnes* は 4.0×10^6 cfu/mL の濃度を静注したマウスの、体重とその他の全身状態を観察した。図に示すように、 10^8 レベルの *S. aureus* を投与した群で明らかな全身状態の悪化と体重の

減少が見られたが、 10^6 レベルでは投与翌日に動作が緩慢になるなどの変化しか見られなかった。同じ 10^6 レベルの *P. acnes* では全くコントロールと見分けがつかず、この投与レベルでは両群間に明らかな違いは見出せなかった。

【考察】

10⁶ cfu/mL レベルの菌濃度の血小板製剤をマウスに静注した場合、*P. acnes* を投与した群では血中、肝臓、脾臓、腎臓でほとんど菌が検出されなかったのに比べ、その約3分の1濃度の *S. aureus* を投与した群においては、肝臓・脾臓・腎臓で高い濃度の菌の着床が見られた。その場合でも3日目までにはほとんどの細菌は臓器内から駆逐されていく。マウスはこれらの細菌に抵抗性があるため、一時的に感染巣ができて最終的には回復するものと思われる。それ以前の段階で比較すると、*P. acnes* は *S. aureus* よりも臓器に捕捉され難いと言える。その分血中にとどまっているかという点、血液中でもほとんど認められていない。投与直後の動態を見るために、投与後3時間までについて同様に臓器中の細菌数を調べたが、kinetics としてはやや説明困難な結果となった。しかし早期に無毒化する可能性は示唆された。この実験で15分後に培養寒天上に盛んなコロニーが形成されたことから、*P. acnes* についてもこの培養検出系に問題がないことも示された。したがって3日間の実験で、もし血中・組織中に intact な細菌が拡散して存在していれば、この培養系で検出できるはずである。検出されないということは、細菌が実際にそれらの組織内に存在しないか、または存在しても増殖不可能な状態になっているかのどちらからであろう。大量に投与された *P. acnes* が1時間以内に血液を含めたこれらの組織とは別の組織・器官に trap されることは考えがたいことから、生体の防御機構によって増殖不可能な状態になったと考えるのが妥当であろう。そうであれば、*P.*

acnes は生体の防御機構に非常に感受性があることになり、病原性が低いといえることができる。また、これらの臓器での増殖が見られないことは、これらの臓器の機能を損なうことがないという意味でも、病原性が低いといえることができる。

細菌に対する感受性は動物種によって異なることは当然であり、以上の推論がヒトにそのまま当てはまるわけではないが、ヒトでの実験が不可能である以上、動物実験で傍証を積み重ねていく意義はあるものと考えられる。さらに他の種類の病原性の高い細菌を用いて陽性コントロールを設けるか、またはより細菌への感受性の高い状態のマウスを用いて実験を重ねる予定である。

P. acnes の血小板製剤汚染原因菌としての意義は、最終的には臨床データから得るしかない。臨床的に輸血感染症として重大であるか否かを示すデータは、Wendel の発表したものしか存在しない。彼は、血小板製剤を全品培養し、培養の結果が出る前に製剤を出荷している。患者に輸血されてからそれが *P. acnes* に汚染されていることがわかった例が数十例あるが、そのいずれも全く副作用や症状は現れなかった。今日では、培養の結果は製品の在庫前にわかるようになったので、あるいは結果が出る前には在庫できない状況なので、以後はこのようなデータを得るのは困難と思われる。

しかしながら日本においては次のような推論が可能である。血液センターの品質管理のデータでは血小板製剤の0.01%が *P. acnes* で汚染されていることになっている。これは1年に *P. acnes* に汚染された血小板製剤が約70バッグ医療機関に出荷されている計算になる。それでも医療機関からの

副作用報告または感染症報告の中には *P. acnes* によるものはこれまで見当たらないことから、おそらく、汚染されある程度増殖していたとしても副作用は起こさないのであると思われる。

V. まとめ

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

	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	3,349	279	198
IRPC20	6,022	502	687
本数計	94,320	7,860	7,939

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。）

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。

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）

総合研究報告書

輸血用血液の細菌汚染防止と血小板製剤の有効性期限延長に関する研究

(H17-医薬-一般-051)

分担研究報告書

長期保存血小板製剤の機能評価と有効期限延長に伴う供給体制の改善

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。高酸素透過性バッグを用いて保存した濃厚血小板機能を、従来から汎用されているバッグを用いて保存した濃厚血小板製剤と比較した。測定は、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行った。血小板を含んだ再構成全血を作成し、平行板型フローチャンバーを用い、そのずり応力下血小板血栓形成能を評価した。結果、高酸素透過性バッグを用いた濃厚血小板製剤では、汎用バッグの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軽微となり、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。

また、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。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。

有効期限が延長された期間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、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に関して検討を行った。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。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緊急に対応する必要がある医療機関において効果的、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。

欧米並みに5日間に有効期限を延長しても、高酸素透過性バッグを用いた場合、その保存血小板機能は充分保たれていることが本研究で明確となった。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。

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 of 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。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 時間から延長し、さらに欧米と同程度の 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。

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。生理的条件下に近い系として、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。

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

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パー内に、血小板を蛍光色素（メパクリン）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 µg/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/µl、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±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±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/µl、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ざ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。

5) 有効期限延長が臨床に与えるインパクト

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 (Transfusion 2004, 44: 364-372)。このシステムでは、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

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 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 $21.7 \pm 3.0 \mu\text{m}$ ($n=11$)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 $150,000/\mu\text{l}$ 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。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 $142,000/\mu\text{l}$, $n=1$) の最終血小板血栓の高さは、 $18.8 \mu\text{m}$ 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 $169,600 \pm 8,000/\mu\text{l}$, $n=3$)、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 $156,800 \pm 9,300/\mu\text{l}$, $n=5$) 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 $14.6 \pm 5.54 \mu\text{m}$ [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 $7.2 \pm 0.88 \mu\text{m}$ [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 を用いてアフエ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 $167,000 \pm 14,900/\mu\text{l}$, $n=6$)。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(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、 $9.4 \pm 1.75 \mu\text{m}$ [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 $7.2 \pm 0.88 \mu\text{m}$ [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)] と比較した場合には有意差が認められなかった ($p=0.25$)。

4) 有効期限延長が臨床に与えるインパクト
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製剤であった。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。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。

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、高齢化による、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、日本における従来の72時間(2007年11月から3日間に延長)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ズリ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、ズリ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（ズリ応力下）における血小板の機能を常に考慮する必要がある。

本研究では、生理的流動状況下を模倣するズリ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±200 ml/m²/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±200 ml/m²/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。

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 次元的成長が障害され、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 次元的血栓形成過程の障害が軽微となり、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。

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こり、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い。

今回、2007年11月によろ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：したがって、欧米の定義では3日間となる）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。

本研究において、濃厚血小板製剤を特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た。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考えられる。

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製剤中血小板機能としての3次元的血小板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。
- 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。
- 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. 関連する発表論文

- 1) Miyata S, Satake M, Ohto H. Japanese special situations: universal prestorage leukocyte-reduced apheresis platelet concentrates with very short shelf-life (72 hours). *Transfusion Today*. March 2007; 9-10.
- 2) Pietersz RNI, Engelfriet CP, Reesink HW, Ohto H, Satake M, Miyata S, et al. Logistics of platelet concentrates. *Vox Sanguinis* 2007; 92: 160-181.
- 3) 宮田茂樹：心臓外科における輸血。外科。2005; 67: 313-318.
- 4) 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外科部門編。南江堂 2005; 5-8.
- 5) 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外科部門編。南江堂 2005; 81-83.
- 6) 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.

関連する学会発表

- 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) 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
- 5) 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.

- 6) 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
- 7) 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
- 8) 亀井政孝、宮田茂樹、畔 政和: 人工心臓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
- 9) 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. 知的財産権の発生

なし。