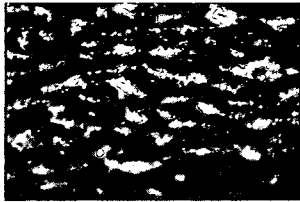


Time-course images of platelet thrombus growth under shear stress conditions

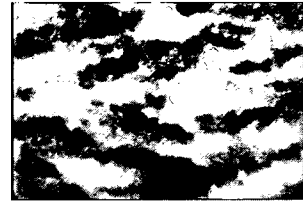
Positive control



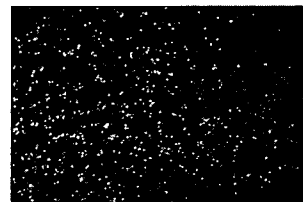
3 min



5 min

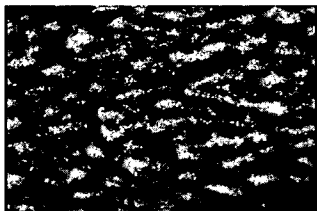


10 min

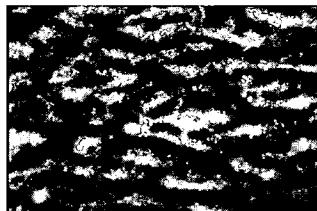


Negative control

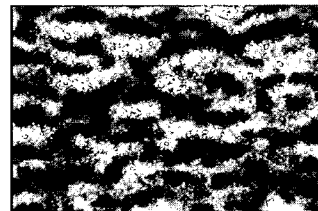
1-day-stored PC in PO-65 bag



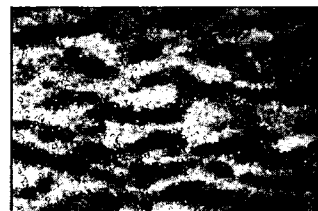
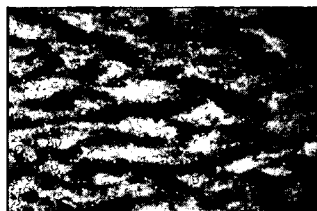
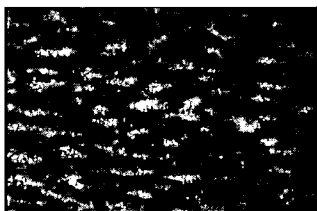
3 min



5 min

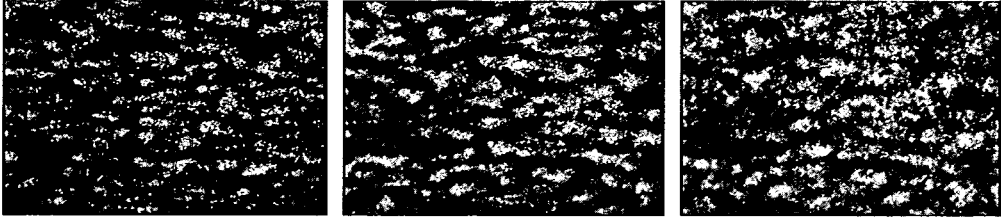


10 min



3-day-stored PC in PO-65 bag

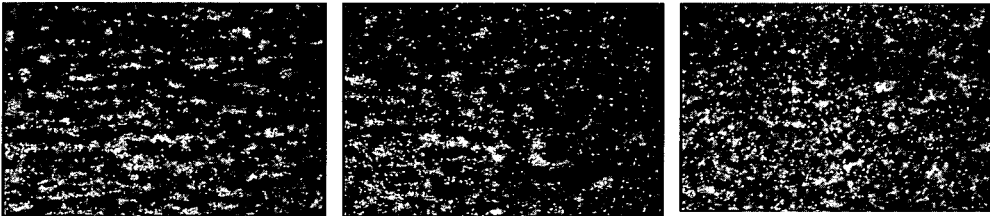
5-day-stored PC in PO-65 bag



3 min

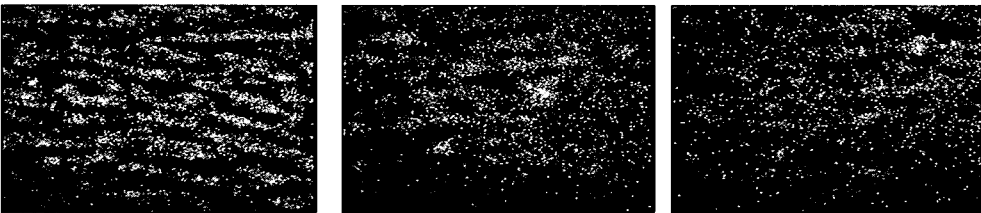
5 min

10 min



7-day-stored PC in PO-65 bag

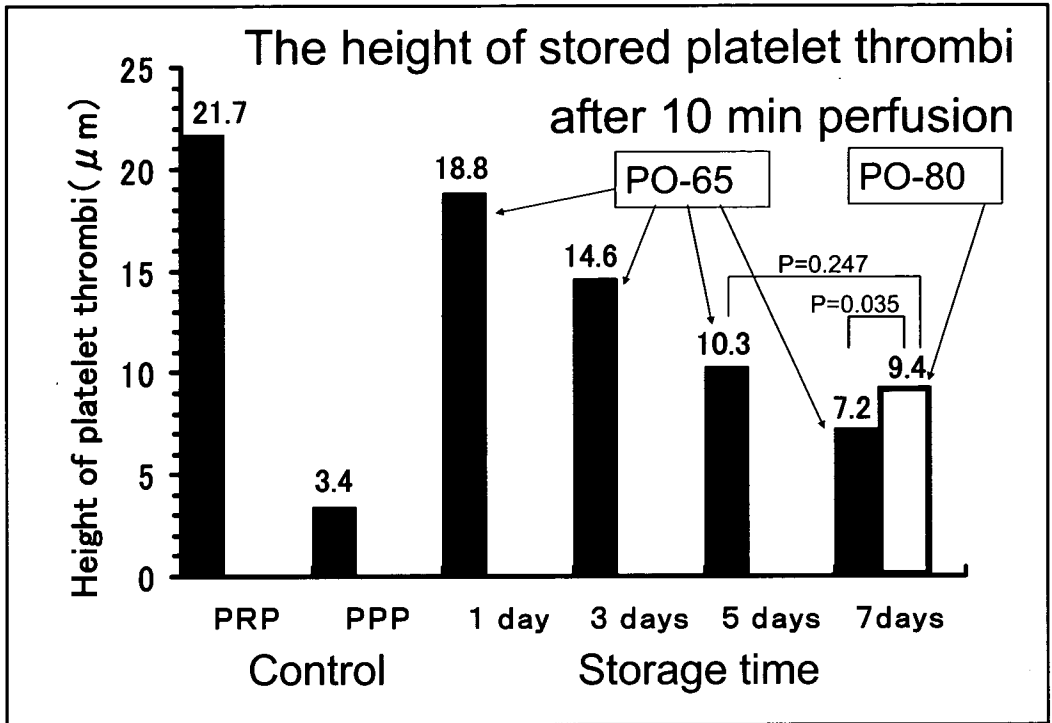
7-day-stored PC in PO-80 bag



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総合研究報告書

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

培養式細菌検出システムによる血小板製剤接種細菌の検出および
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

主任研究者：大戸 斉 福島県立医科大学附属病院 輸血・移植免疫部 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 輸血・移植免疫部

研究要旨：

1. 細菌培養検査を行った血小板製剤には、有効期限を7日への延長を許可する国が増えている。世界的に汎用されている細菌検出システム2機種（BacT/ALERTとeBDS）の検出感度と接種後サンプリング時間（直後と24時間後）について検討した。その結果、24時間後のサンプリング試験で見ると *S. aureus*、*E. coli*、*S. marcescens*、*K. oxytoca*、*S. liquefaciens*、*B. cereus*、*E. cloaca* については両機種間に感度の差は認めなかった。しかし、*S. Epidermidis* については eBDS の方が、*P. Aeruginosa* については BacT/ALERT の方が感度良く検出した。以上より、両機種はほぼ同等の細菌検出力を有していると考えられた。細菌混入の判別法として培養式細菌検出システムは検出に有用である。

2. 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。*in vivo* 試験を行って PO-80 バッグを評価した。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放射性同位元素で標識し、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り、有効期限延長に非常に有用である。

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。

通常、血液に少量の皮膚常在細菌が混入しても、血漿中の抗体と補体によって多くは溶菌・死滅するが、残存して増殖すると輸血敗血症を引き起こし、重篤な症状、時には死亡に至ることもある。世界的に広く導入されている細菌検出システム2機種を用い、その検出感度・時間について比較検討した。

同時に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重要で、酸素透過性を向上させたポリオレフィンバッグPO-80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・保存できることも報告してきた⁴⁾。*in vitro*試験に加えて、保存血小板製剤の*in vivo*評価を実施した。

研究 I 培養式細菌検出システムによる血小板製剤接種細菌の検出

I-A. 研究方法

1. 細菌検出システム

1) BacT/ALERT (Biomerieux)

BacT/ALERT の測定原理は細菌が増殖して産生される CO₂ 量により変化したボ

トル底の色調 (pH) 変化を確認する。専用培養ボトル (好気性、嫌気性) から構成されている。サンプリングはクリーンベンチ下で培養ボトルに注入する。培養ボトルは 37°C で培養され、モニタリングシステムで自動的に判定される。今回の評価には好気性ボトルのみ用いて、サンプリング量を 4mL とした。

2) eBDS (Pall)

測定原理は細菌が増殖することにより消費する O₂ 濃度を測定することによる。サンプリングには無菌接合装置 (SCD、テルモ) を用いた。パウチは専用インキュベーターで振盪しながら 35°C で培養する。オキシジェンアナライザーで 9.4% 以下の場合に陽性と判定される。サンプリング量を 2-3mL で実施した。

2. 細菌種と接種濃度

血小板製剤の細菌混入報告があった細菌を中心に、9 種の ATCC 菌株を選択した (Table 1)。

3. 評価方法

低濃度の細菌を血小板製剤に接種した (n=4)。1) 接種直後にサンプリング (Time 0 群)、2) 接種 24 時間後にサンプリング (Time 24 群) の 2 通りを実施した。各専用装置での培養は 16、20、24 時間行い、検出までの時間と感度を測定した。また、false-/true positive の確認のために培養したボトル及びパウチ内の生菌数のカウントも行った。

I-B. 研究結果

1. 2 機種の検出感度

BacT/ALERT の検出までの時間時間は、*S. aureus* の Time 0 群で 12.1 時間、Time 24 群で 7.4 時間 (P < 0.001) と接種 24 時

間後にサンプリングした方が検出までの時間が短かった (Fig.1)。同様に *S. epidermidis*, *B. cereus*, *E. coli*, *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *P. aeruginosa* 及び *K. oxytoca* の菌種においても Time 24 群の方が検出までの時間が短かった。しかし、*E. cloacae* では Time 0 と Time 24 で有意な差は見られなかった。(Fig.1)。

一方、eBDS の残存 O₂ 濃度 (%) は、*S. aureus* の接種で Time 0 群で 3.14%、Time 24 群で 1.38% (P < 0.002) と接種 24 時間後にサンプリングした方がより酸素消費が多かった (Fig.2)。同様に *S. epidermidis*, *B. cereus*, *E. coli*, *S. marcescens*, *S. liquefaciens* 及び *P. aeruginosa* の菌種においても Time 24 群の方が酸素の消費が著しく、検出感度を高めることができた。しかし、*E. cloacae* と *K. oxytoca* では Time 0 と Time 24 で有意な差は見られなかった (Fig.2)。

2. 菌種別の検出に要する時間

細菌種別に検出までの培養時間を測定した。*S. aureus*, *E. coli*, *S. marcescens*, *E. cloacae* 及び *K. oxytoca* の 5 菌種では両機種で培養 16 時間後に 100%検出が可能だった (Fig.3)。*S. epidermidis* は Time 0 の 16 時間培養で eBDS と BacT/ALERT とともに検出ができなかった。Time 24 は 16 時間培養で BacT/ALERT が 75%の検出率であった以外はすべて検出可能であった (Fig.4)。*S. liquefaciens* は Time 0 の 16 時間培養で eBDS と BacT/ALERT とともに検出ができず、20 時間培養でも eBDS が 75%の検出率であった。Time 24 では両システムともに 16 時間から 100%検出が可能であった (Fig.5)。*B. cereus* は Time 0 の 16 時間と 20 時間培養で eBDS が 75%の検出率であったが、BacT/ALET は 100%

検出が可能だった。Time 24 では両システムともに 16 時間から 100%検出が可能であった (Fig.6)。*P. aeruginosa* は Time 0 の 16 時間と 20 時間培養で eBDS が全く検出できず (0%)、24 時間培養でも 25%の検出率であった。一方、BacT/ALET は 16 時間培養で 25%の検出率であったが、20 と 24 時間では 100%検出が可能だった。Time 24 の 16 時間培養は eBDS で 67%の検出率であった (Fig.7)。

3. 真の検出陽性の確認

False-positive の可能性を否定するために測定を終えた各ボトルとパウチ内の生菌数をカウントした。False-positive は確認されなかった。また、低濃度の接種では、室温保存して 24 時間後に *S. liquefaciens* で 4 検体中 3 検体、*P. aeruginosa* と *E. cloacae* は 4 検体中 1 検体で細菌が死滅してしまった。

I-C. 考察

米国食品医薬品局 (FDA) の集計¹⁾によると、輸血に関連した死亡原因の中で、細菌汚染はウイルス感染を上回っていた。この情報に基づいて、米国では疫病管理予防センター (CDC)、米国血液銀行協会 (AABB)、米国赤十字 (ARC)、および国防省が協力して、米国における細菌感染の実態を 1998 年 1 月 - 2000 年 12 月までの 3 年間調査している。その結果、輸血による細菌敗血症あるいは感染が、34 症例確認され、細菌の確定された 34 例中 9 件が死亡していると報告されている²⁾。特に血小板製剤は 29 例中 6 例が死亡に至り、赤血球製剤と比べて発生率が 10 万に約 1 回、死亡率は 100 万に約 2 回とされている。血小板は機能を保つために室温で保存され、細菌が混入した場合に増殖し易い環境にあることが原因と考えられている。英国での

重篤な輸血副作用報告 (SHOT) では、1995年—2002年までの間に26例の細菌感染が報告され、そのうち6例が死亡している。血小板製剤では22例の細菌汚染のうち5例で死亡が発生していた³⁾。

日本においては近年で2例報告され、1例は死亡している^{4),5)}。有効期限が短くとも細菌汚染の危険性があることを意味している。

通常、採血されてから16~24時間後に細菌検出システム用にサンプリングが行われ、スクリーニングが実施されている。今回、世界的に導入されている細菌検出システム2機種種の検出感度と時間を確認するために、通常条件よりもサンプリングまでの時間を短く、培養時間を短くするという厳しい条件下で試験を行った。

その結果、BacT/ALERT、eBDS共に接種直後にサンプリングした場合に検出できない菌種が存在した。また、接種24時間後サンプリングでは、20時間培養で検出が可能であった。細菌検出システムは2機種ともにサンプリング時の細菌数が多ければ検出までの時間は短縮された。

欧米では5日が標準的な有効期限であり、欧州のCOEガイドラインでは細菌検査を実施することによって、さらに7日まで保存可能と規定しており、ベルギー、オランダ、スウェーデン等では既に7日保存を実施している⁶⁾。そのためAABBは2004年3月から5日保存血小板製剤からの細菌検査を行うようになった⁷⁾。さらに2005年3月にFDAが細菌検査することを条件にアフレーシス血小板の7日保存を一部認可した。同9月から市販後調査に協力する血液センターから7日保存血小板の供給をはじめており、確実に7日間への有効期限延長が推進されている^{8),9)}。

われわれの成績ではスクリーニング判定までの時間を短くすることは困難であった。

培養式の細菌検出システムは現在のところ他の標識検査に比べ、検出感度を含めても最も優れたスクリーニング法である^{10), 11)}。日本では血小板製剤に対する細菌検査がまだ実施されていない。培養式の細菌検出システムは高感度に細菌合否判定をできることから、導入するに値するものと思われた。

I-D. 結論

輸血関連敗血症をおこした菌種など7種の細菌接種実験でBacT/AlertとeBDSを用いて評価を行った。0時間でのサンプル採取は推奨できない。24時間後では両機種間に感度の差は認めなかった。しかし、*S. Epidermidis*についてはeBDSの方が、*P. Aeruginosa*についてはBacT/ALERTの方が感度良く検出した。

参考文献

- 1) Lee JH. Bacterial Contamination of Platelets Workshop, Bethesda, September 24, 1999. (Cited May 3, 2000). Available from <http://www.fda.gov/cber/minutes/bact092499.pdf>.
- 2) Kuehnert MJ, Roth VR, Haley NR et al: Transfusion-transmitted bacterial infection in the United States, 1998 through 2000. *Transfusion*, 41: 1493-1499, 2001.
- 3) Dorothy S, Hannah C, Hilary J, on behalf of the SHOT steering Group: Haemovigilance in the UK – the SHOT scheme. *Transfusion Medicine*, 2(1): 27-30, 2004.
- 4) 片山俊夫、神谷昌弓、保科定頼 他：肺炎球菌に汚染された血小板濃厚液の輸血直後に発症した敗血症性ショックと横紋筋融解症の致死的合併例。 *臨床血液*, 44(6): 381-385, 2003.

- 5) 石田 明、上村知恵、橋詰賢一 他：血小板輸血後に敗血症性ショックを呈し、*Morganella morganii* 菌による輸血後感染症が強く示唆された 1 例。日本輸血学会雑誌, 50: 726-729, 2004.
- 6) Council of Europe. Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components – 11th edition, 2005.
- 7) AABB Standard. Standards for Blood Banks and Transfusion Services – 23rd edition, 2004.
- 8) AABB Weekly Report, Vol. 11, No. 11, April, 1, 2005.
- 9) AABB Weekly Report, Vol. 11, No. 33, September, 16, 2005.
- 10) Holme S, McAlister M. B, Ortolano G.A etc: Enhancement of a culture-based bacterial detection system (eBDS) for platelet products based on measurement of oxygen consumption. *Transfusion*, 45: 984-993, 2005.
- 11) Brecher ME, Hay SN, Rothenberg SJ: Evaluation of a new generation of plastic culture bottles with an automated microbial detection system for nine common contaminating organisms found in PLT components. *Transfusion*, 44: 359-363, 2004.

Table 1 Bacterial species

Organism	ATCC order number	Inoculation bacterial level (CFU/mL) †
<i>Staphylococcus aureus</i>	29213	6.5 (3-10)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	49134	12.11 (7-15)
<i>Bacillus cereus</i>	10876	1.25 (1-2)
<i>Escherichia coli</i>	25922	3.25 (1-9)
<i>Serratia marcescens</i>	43862	20.13 (2-48)
<i>Serratia liquefaciens</i>	27592	1.25 (1-2)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853	6 (1-13)
<i>Enterobacter cloacae</i>	13047	6.25 (1-22)
<i>Klasiella oxytoca</i>	43086	18.75 (1-56)

†Data are reported as median (range).

Fig. 1 BacT/ALERT result: mean time to detection following 16-24 hour incubation at 37 °C

Organism	Mean time (hour)		P-value
	Time 0 [†]	Time 24 ^{††}	
<i>S. aureus</i>	12.1 ± 0.6	7.4 ± 0.4	0.001
<i>S. epidermidis</i>	17.9 ± 0.3	15.9 ± 1.2	0.05
<i>B. cereus</i>	9.6 ± 0.3	4.8 ± 0.3	0.001
<i>E. coli</i>	11.7 ± 0.5	6.4 ± 1.0	0.001
<i>S. marcescens</i>	11.2 ± 0.8	5.2 ± 2.0	0.004
<i>S. liquefaciens</i>	18.2 ± 0.5	12.4 ± 0.0**	0.001
<i>P. aeruginosa</i>	16.9 ± 0.9	9.4 ± 1.2*	0.001
<i>E. cloacae</i>	12.3 ± 0.9	13.2 ± 0.0*	N.S.
<i>K. oxytoca</i>	11.8 ± 0.9	3.7 ± 0.1	0.001

[†]Sampling occurs immediately after inoculation (sample time, 0 hr).

^{††}Sampling occurs 24hours after inoculation (sample time, 24 hr).

Values are the mean ±SD, n=4, *; n=3, **; n=1.

Fig. 2 eBDS result: mean levels of %O₂ following 16-24 hour incubation at 35 °C

Organism	Mean percent oxygen (%)		P-value
	Time 0 [†]	Time 24 ^{††}	
<i>S. aureus</i>	3.14 ± 0.4	1.38 ± 0.3	0.002
<i>S. epidermidis</i>	6.89 ± 0.9	4.33 ± 0.7	0.002
<i>B. cereus</i>	4.65 ± 3.1	1.37 ± 0.3	0.006
<i>E. coli</i>	4.68 ± 0.6	1.49 ± 0.5	0.001
<i>S. marcescens</i>	2.28 ± 0.5	0.55 ± 0.1	0.02
<i>S. liquefaciens</i>	9.60 ± 1.7	0.80 ± 0.0**	0.001
<i>P. aeruginosa</i>	14.21 ± 2.0	2.68 ± 1.9*	0.001
<i>E. cloacae</i>	0.00 ± 0.0	0.39 ± 0.8*	N.S.
<i>K. oxytoca</i>	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	N.S.

[†]Sampling occurs immediately after inoculation (sample time, 0 hr).

^{††}Sampling occurs 24hours after inoculation (sample time, 24 hr).

Values are the mean ±SD, n=4, *; n=3, **; n=1.

Fig. 3 Detection rates of *S. aureus*, *E. coli*, *S. marcescens*, *K. oxytoca* (N=4) and *E. cloacae* (Time 0; N=4, Time 24; N=1)

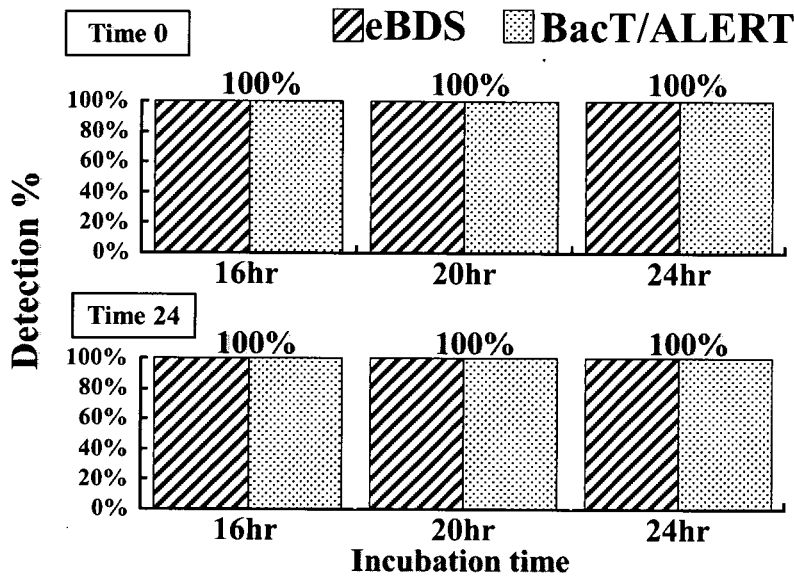


Fig. 4 Detection rates of *S. epidermidis* (N=4)

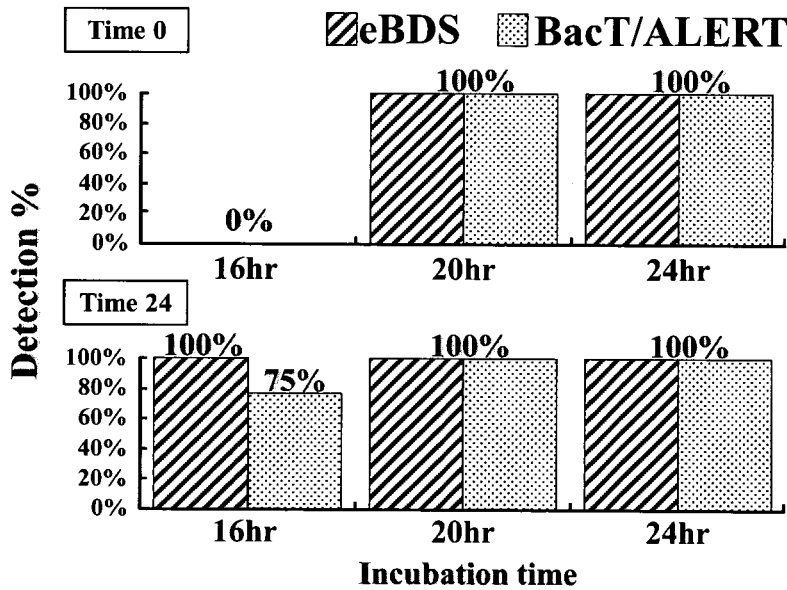


Fig. 5 Detection rates of *S. liquefaciens*
(Time 0; N=4, Time 24; N=1)

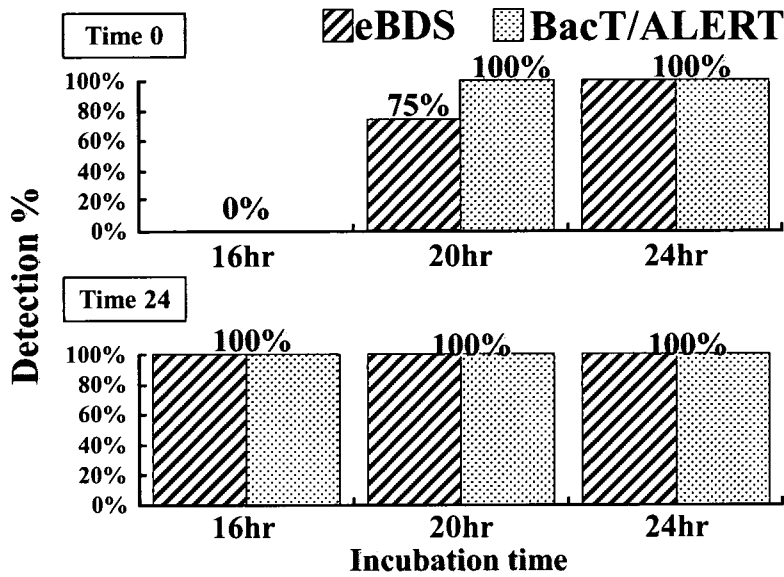


Fig. 6 Detection rates of *B. cereus* (N=4)

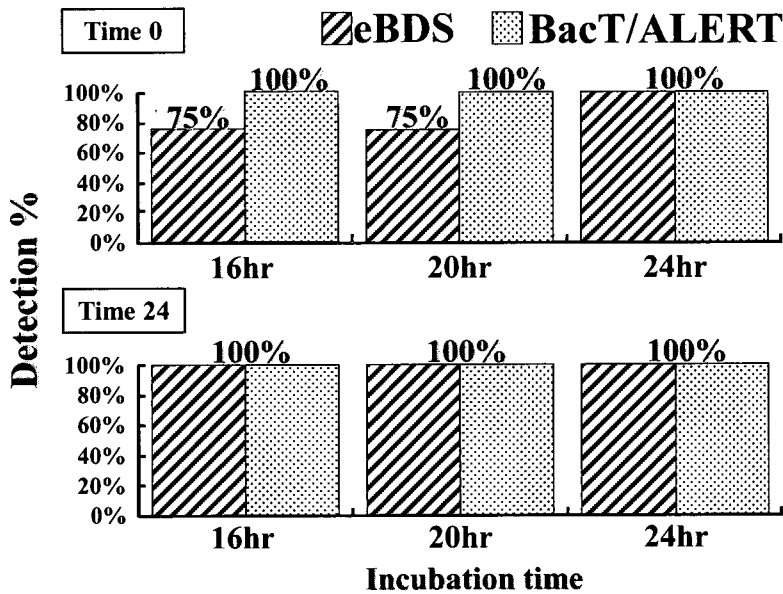
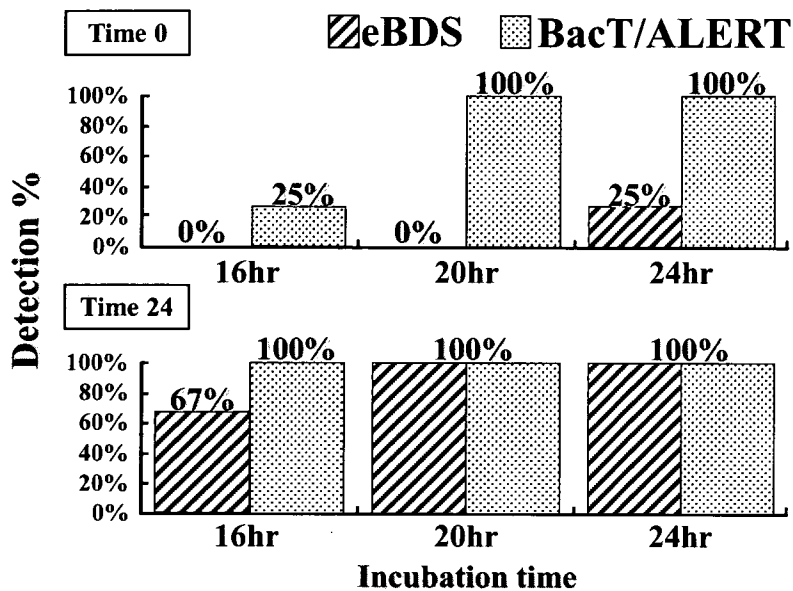


Fig. 7 Detection rates of *P. aeruginosa*
(Time 0; N=4, Time 24; N=3)



研究Ⅱ 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

Ⅱ-A. 研究材料及び方法

1. 血小板採取

福島県立医科大学倫理委員会の承認を得た。同意の得られた8名の健常人よりアフレーションにより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、高酸素透過性血小板バッグ(PO-80, 1000mL, 酸素透過度 $2,660 \text{ mL/m}^2/\text{day}/\text{atm}$)へ移し、室温(22~24°C)で7日間水平振動盪保存した。

2. In vivo 評価

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⁾。保存血小板および新鮮血小板に¹¹¹Inまたは⁵¹Crで標識し、同時に返血した。1日目から7日まで採血し、その放射活性を測定した。データは、Multiple hit model⁷⁾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指標を用いて評価した。

3. 非劣性試験

Dumontの方法⁸⁾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、新鮮血小板の66.7%を許容範囲とした。

4. 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、末梢血の血球数、CRP、電解質値、肝機能、腎機能、LDH値、ALP値等の検査を行なった。体温、血圧、心拍数の測定を行なった。

Ⅱ-B. 結果

7日間保存血小板機能のin vivo 評価

検討した8名における新鮮血小板の回復率は $61.2 \pm 13.0\%$ 、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、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%、寿命は81.1%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(許容値)20.4%より低かった。同様に生体内寿命のUCL95は2.1日であり、そのMAD2.6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、各種評価で被験者に異常は見られなかった。

Ⅱ-C. 考察

これまで行なってきた血小板製剤のin vitro機能評価に加えてin vivo試験にても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、遜色なく臨床使用にも信頼性が高いことが示された。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。生体内寿命

は 58%や 66.7%を提唱する研究者もおり⁹⁾、この条件もクリアした。

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。

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。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、また、試験施設間での評価もしやすいという点である。高単位の血小板製剤を試験できるという利点もある。この試験によって、PO-80 は高単位での血小板保存でも有効性が示された。

現在、血小板製剤は室温 (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。血小板のエネルギー代謝が嫌氣的になると、機能が著しく損傷する¹¹⁾。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、保存バッグも十分な表面積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。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。

II-D. 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いた。回復率、生体内寿命両者において新鮮血小板の 66.7%以内という厳しい条件を遜色なく満たしていた。これによ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考慮すべきである。

参考文献

1. Dumont L, VandenBroeke 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. 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;126:153-159.
4. 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.
5. Dumont, L.J. Analysis and reporting of platelet kinetics studies. *Transfusion*, 2006; 46(Suppl), 67S- 73S.
6. AuBuchon J, Herschel L, Roger J. Further evaluation of a new standard of efficacy for stored platelets. *Transfusion* 2005;45:1143-50.
7. 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; 18:305-315.
8. 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.
 9. Slichter SJ, Bolgiano D, Jones MK, Christoffel T, Corson J, Rose L, Foley J, Popovsky M, Baril LL, Corda T, Dincecco DM, Snyder EL. Viability and function of 8-day-stored apheresis platelets. *Transfusion*. 2006; 46(10):1763-1769.
 10. AuBuchon J, Snyder E. The rationale for a standardized approach to assessment of platelet kinetics. *Transfusion* 2006;46 (3 Suppl): 44S-48S.
 11. Murphy S. Improved storage of platelets for transfusion in a new container. *Blood* 1982;60:194-200.
 12. de Wildt-Eggen Jd. Improvement of platelet storage conditions by using new polyolefin containers. *Transfusion* 1997;37:476-81.
 13. Kuehnert J, Virginia R, Roth N. Transfusion-transmitted bacterial infection in the United States, 1998 through 2000. *Transfusion* 2001; 41:1493-9.

Table 1 Fresh versus stored radiolabeled autologous platelet recovery and survival

Recovery (%)					Survival (days)		
Control		Test		Difference	Control	Test	Difference
(fresh)	Radiolabel	(7-day)	Radiolabel		(fresh)	(7-day)	
54.1	⁵¹ Cr	42.7	¹¹¹ In	11.4	7.7	5.9	1.8
65.0	⁵¹ Cr	56.1	¹¹¹ In	8.9	7.9	6.7	1.2
56.2	⁵¹ Cr	44.9	¹¹¹ In	11.3	7.1	6.3	0.8
35.0	⁵¹ Cr	27.9	¹¹¹ In	7.1	9.2	7.3	1.9
71.6	¹¹¹ In	47.8	⁵¹ Cr	23.8	6.1	4.0	2.1
77.5	¹¹¹ In	73.3	⁵¹ Cr	4.2	6.7	6.7	0
65.6	¹¹¹ In	49.2	⁵¹ Cr	16.4	8.9	8.0	0.9
64.8	¹¹¹ In	60.1	⁵¹ Cr	4.7	8.5	5.2	3.3
61.2		50.3		11	7.8	6.3	1.5
13.0		13.4		6.5	1.1	1.2	1
20.4					2.6		
		15.3			2.1		

MAD represents maximum acceptable difference. UCL95 represents upper 95 percent confidence limit. Because recovery 15.3% < 20.4% and survival 2.1 days < 2.6 days, we reject the null hypothesis and accept that the test is not inferior to control.

E. 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。

F. 研究発表

研究論文

1. 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 with aerobic culture. *Transfusion* 47:2044-2049, 2007.
2. Ezuki S, Kanno T, Ohto H, et al. Survival and recovery of apheresis platelets stored in a polyolefin container with high oxygen permeability. *Vox Sanguinis* (in press)
3. 江月将史、伊藤貴俊、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(6):578-584.
4. Pietersz RNI, Engelfriet CP, Reesink HW, Ohto H, Satake M, Miyata S, et al. Logistics of platelet concentrates. *Vox Sanguinis* 2007;92:160-181.
5. 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.
6. 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
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回日本輸血学会総会. *日本輸血学会雑誌*、2006 ; 52(2):327.
4. 川畑絹代、江月将史、大戸 斉：血小板製剤における接種細菌の増殖性と検査法の検討. 第53回日本輸血学会総会. *日本輸血学会雑誌*、2005; 51(2):194.
5. 江月将史、川畑絹代、大戸 斉、他：アフレーシス由来血小板製剤の高酸素透過性バッグによる9日間保存評価. 第53回日本輸血学会総会. *日本輸血学会雑誌*、2005; 51(2):194.
6. Kawabata K, Ezuki S, Ohto H: Spike test comparing two bacterial detection systems. *Transfusion*, 2005;45(3S):54A
7. Ezuki S, Kawabata K, Ohto H: Long-day storage of a low platelet concentration at room temperature in a polyolefin container with higher oxygen permeability. *Transfusion*, 2005;45(3S):77A
8. 菅野隆浩、江月将史、川畑絹代、大戸 斉、他. Multiple hit model を用いた生体内血小板寿命の測定. *日本輸血学会雑誌* 2006; 52(2):231.
9. Kanno T, Ezuki S, Herschel L, Kawabata

K, Ohto H. Noninferiority Hypothesis Test for Evaluating Clinical Feasibility of Container (PO-80) with Higher Oxygen Permeability for Platelet Storage. *Transfusion*, 2007;47
(Abstract Presentations from the AABB Annual Meeting and TXPO)

80A.

G. 知的所有権の発生
なし。

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17-19年度 研究報告書

輸血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)

主任研究者： 大戸斉教授 福島県立医科大学 輸血医学・移植免疫学

分担研究報告書

血小板成分採血時における混入細菌の動態と検出

分担研究者： 浅井隆善 静岡県赤十字血液センター 所長

研究要旨：

血小板製剤の細菌混入について、特に菌血症状態供血者からの採血による細菌混入の可能性と、混入した細菌の動態を検討した。その結果、白血球除去フィルターを併用した白血球除去では、菌種によっては細菌除去が期待できるものの、他の菌種では除去が期待できないものもあることが示された。一方、遠心法による保存前白血球除去では、*Staphylococcus epidermidis*は、血小板成分や血漿中には残りにくい、*Escherichia coli*と*Yersinia enterocolitica*は、血小板成分中に比較的残存し、*Pseudomonas aeruginosa*では、血小板成分に高濃度に集積する傾向が認められた。

次に、白血球除去や初流血除去によって細菌汚染が減少することが期待されるものの、完全には予防されない場合を想定して、pH変化による観察を用いた汚染細菌増殖の検出について検討した。pH指示薬によって検出は可能であるが、血小板の代謝によるpH変化の影響を鑑別する問題が残された。次に、CO₂センサーを内蔵した定性試験用呈色反応方式細菌検査用具を血小板製剤の汚染細菌検出に用いることの検討を行った。やはり、血小板が産生するCO₂の影響を鑑別する問題が残されているが、検査感度や費用対効果、および簡便性の諸点において有用であったが、本用具は、特異性改良を含めて検討を行う価値があると思われた。

1. 研究目的

血小板製剤は室温で保管されることから、細菌汚染は重篤な急性副作用を生じやすい。従って、細菌汚染を限りなく皆無にするために細菌汚染の実態の究明と、無菌試験方法の改良が必要と考えた。

血小板製剤の細菌汚染予防について、採

血時の皮膚常在菌混入は、皮膚消毒の徹底とともに、初流血除去による防止効果が期待される。しかし、菌血症状態の献血者から採血した場合の対策は、問診の強化以外に確固たる対策が得られにくい。そこで、平成18年度から実施されている保存前白血球除去の処理操作が、混入した細菌にどの

ような影響を及ぼしているかを調査した。白血球除去の方法は白血球除去フィルターを用いる方法と、成分採血装置内の遠心分離による方法との何れかが用いられている。白血球除去フィルターでは細菌の種類によってはかなりの部分が除去される事は報告されているので、我々もこのことについて確認するとともに、さらに、遠心分離によって細菌はどの分画に集積するかについても検討を行う必要があると思われた。

次に、白血球除去処理によっても一定の細菌が混入することを想定し、保管中の血小板製剤中の細菌が増殖した場合のpHの変化を観察測定し、細菌増殖の検出への応用について再確認することが必要と思われた。さらに、定性試験用呈色反応方式細菌検査用具であるセンシメディアについて、細菌汚染検出の有用性についても検討を試みた。

2. 方法

1) 使用血液製剤

細菌接種実験に用いた濃厚血小板製剤や新鮮血液（全血）は、静岡県赤十字血液センターにて、MAP加赤血球製造の過程で除去されて廃棄の対象となった白血球層から得られた各成分を合成して作成した。即ち、白血球層の遠心分離を繰り返して、血漿層、血小板層、白血球層、赤血球層から各成分を分離採取して、それらを適宜組み合わせそれぞれ製の製剤を作成した。全血は約70g、血小板濃厚液は約40gであったが、再利用製造したこれらの製剤は、それぞれ塩化ビニールバッグ、またはポリオレフィンバッグにて保管した。

また、MAPの製造が中止になった後には、検査不合格等の理由により製品化に至らなかった原料血液のなかから、本研究に使用可能な血小板濃厚液の供与を受けた。

2) 白血球除去と検体採取

各菌種を実験用血液製剤に接種して、室

温に約2時間静置した後、白血球除去フィルターを用いて白血球除去を行った。白血球除去フィルターは、全血と血小板濃厚液ともに血小板用白血球除去フィルターであるセパセルPLX-5AのILS型タイプ（旭メディカル社、東京）を使用した。白血球除去の条件は、フィルターを血液バッグに接続した後にクレンメを解放し、自然落下にてフィルターを通過させた。この白血球除去を行った前後の血液から一部を採集して、細菌数計測用の献体とした。

3) 細菌接種血液の遠心分離

血液の遠心分離は、各々のサンプル血液を25mL用試験管に入れて、それぞれ毎分500, 700, 1000, 2000, 3000, 4000回転の回転数にて30分間の遠心分離をした。細菌数検査のための検体は、血漿中間部、白血球層部、そして赤血球層底部から約1mLづつを無菌ピペットにて採集した。

4) 成分採血装置による血小板採取

血小板の成分採血は、献血者の循環血液の代用として、800mLの合成全血をバッグに収納して採血回路に接続した。成分採血装置は「トリマ・アクセル」（ガンプロ株式会社、東京）を用いた。合成全血のバッグと血液回路をSCDで連結させて返血された血液がバッグ内に循環されるようにした。成分採血の条件設定は、献血者のヘマトクリットと血小板の値は、バッグ内の合成全血を測定した数値を記入し、身長と体重はそれぞれ150cmと48kg（男性で、約3380mLの循環血液量）の条件を入力した。その後、通常の血小板成分採血の条件（約470mL採取目標）で開始し、スピルオーバー（spill over、血小板採取ラインへの赤血球の混入）の兆候が見られ始めた時点で、採取バッグに赤血球が混じる前に終了した。