

2) 細菌混入条件検討のための遠心分離
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、それぞれ500, 700, 1000, 2000, 3000, 4000 rpm/m条件にて遠心した。

3) 接種細菌

細菌接種実験には、表皮ブドウ球菌 (*Staphylococcus epidermis*, ATCC株)、ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*, ATCC株)、大腸菌 (*Escherichia coli*, ATCC株)、肺炎球菌 (*Streptococcus pneumoniae*, ATCC株)、またはセラチア菌 (*Serratia marcescens*, ATCC株) を、それぞれの実験目的に応じて使用した。

4) 細菌コロニー測定

細菌培養は、0.5mlの血液検体を5%ヒツジ血液寒天培地に塗布し、24時間後、および、72時間後に細菌コロニー数を測定して、1ml当たりの細菌コロニー数で表した。

5) 白血球除去と検体採取

菌を接種して、室温に一定時間振盪保管した後、白血球除去フィルターを用いて白血球除去を行った。白血球除去は、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、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て行った。

この白血球除去を行った際の、白血球除去前血液と、白血球除去後血液、および、白血球除去後のフィルター洗浄液とを細菌培養の検体とした。白血球除去フィルター洗浄液の採取は、フィルター下流部から、12mlのミューラーヒュントンブイヨン培養液、または、10mlのBACTEC用血液培養液(ベクトン&ディキンソン社、米国)を勢い良く注入し、フィルター上流部から排出された培養液を採集し

て行った。採集は洗浄直後以外に、白血球除去フィルターに、細菌接種後血液を通過させた後に、白血球除去フィルター部分に前記培養液(15mlのミューラーヒュントンブイヨン培養液、または、15mlのBACTEC用血液培養液)を充填した後、室温、または37℃に一定時間静置した後、検体を採集して、細菌の増殖を測定した。フィルター部分の細菌濃度を正確に測定するために、フィルター部分の容量が6mlであることから、フィルター前後の血小板浮遊液も各6mlを15mlの培養液を充填した後に洗浄液を採取した。

6) PBDSによる酸素消費測定

血小板製剤中における菌増殖を検出する方法として、日本Pall社の血小板製剤用細菌検出システム(Pall Bacteria Detection System、以下PBDS)を使用した。PBDSは、菌増殖を促進するサンプルパウチと白血球除去用フィルターを内蔵したシステムで、検体血液をサンプルパウチに採取した後に37℃で静置培養した。一定期間の静置培養後に、専用の酸素濃度測定機でパウチ内の空気中酸素濃度を測定した。

7) 製剤のpH測定

検体血液、または培養液内の経時的なpH測定は、血液ガス分析装置(ABL505、ラジオメータートレーディング社、コペンハーゲン)を用いて測定した。

3. 結果

1) 遠心分離回転数と血漿中細菌数

血液中に浮遊している細菌が遠心分離によってどのような分画に集積するかを調べるために、各回転数における細菌数の変化を測定した。細菌数は7個/mlのセラチア菌浮遊血液を用いて行った。結果は図1のように、血漿内では徐々に上層の細菌数が減少し、2000回転以上では消失していた。また血漿下層では徐々に減少するが4000回転に至っても消失する

ことなく少数の細菌が残存していた（図1）。

同時に、これらの遠心条件における血小板数と白血球数の推移は図2の如く、白血球は500回転の条件で既に減少し、2000回転以上で消失していた。血小板は1000回転を超える付近から減少し始め、3000回転では消失していた。ちなみに、成分採血装置の血小板採血における遠心力は、H社で1400-2000 x g、T社で1200-1700 x gであり、今回の実験に用いた遠心機では、試験管底部で計算すると2000回転で740 x g、3000回転で1670 x gの遠心力であったので、今回の実験の3000回転付近が血小板成分採血に近い条件と考えられた（図2）。

上記の実験を113個/mlと細菌数を増やして行ったところ、血漿中細菌は消失しないまでも回転数の増加に従って細菌数は減少した。また、白血球層ではむしろ回転数の増加とともに細菌数は増加し、赤血球層底部の細菌数は3000回転では濃縮された数を示していた（図3）。

2) 合成新鮮血に接種した細菌数の変動

採血後24時間以内に合成して作成した全血（白血球数：7670/mm³、血小板：17万/mm³）に、2800個/mlのセラチア菌を接種して、室温静置下での60分間の細菌数を継時的に測定した。細菌接種した5分後には110個/mlと約25分の1に減少し、接種後15分では最も少なく74個/mlと約38分の1にまで減少した。しかし、50分後には再び増加し始め、60分後には5000個/mlと接種直後の約2倍にまで増加していた（図4）。

3) 血小板濃厚液に接種した細菌数の変動

作成した血小板濃厚液（白血球数：280/mm³、血小板：143万/mm³）にセラチア菌を15000個/mlの濃度になるように接種し、室温で振盪保存しながら、細菌数

を継時的に測定した。接種後30分には270個/mlと接種直後の約55分の1に減少し、4.5時間後には52個/mlと最も減少して接種直後の約288分の1にまで減少した。しかし、その後は消失することなく、8.5時間ないし11.5時間から増加し始めた（図5）。さらに、同様な血小板濃厚液（白血球数：340/mm³、血小板：185万/mm³）にセラチア菌を、1100/mlまたは17個/mlの濃度になるように、細菌濃度を少なくして接種したところ、両濃度の接種ともに、接種後0.5時間から2時間の間は明らかな細菌数の変化はなかったが、3時間後から細菌数が増殖し始めた（図6）。

4) 細菌接種後血小板濃厚液の白血球除去による細菌数の変化

期限切れ濃厚血小板を用いて行った実験では、セラチア菌を接種後に室温で24時間振盪保存した後に、白血球除去フィルターで濾過すると、細菌数の変化からフィルターによる細菌除去効果が認められた（図7）。また、細菌接種直後の濃厚血小板を、白血球除去フィルターで濾過し、前後の検体とともに、フィルター部分の洗浄液を室温で24時間静置すると同時に、フィルターの一部を37℃に静置して検出細菌数の変化をみたが、濾過前後の細菌数はBACTEC用血液培養液を加えることによって24時間後には著しく増加していた（図8）。

合成血小板濃厚液を用いて行ったセラチア菌接種実験では、白血球除去フィルター部分の細菌濃度とともに、濾過前後の血小板濃厚液（白血球数：640/mm³、血小板：177万/mm³）の細菌濃度を濾過時の数値に近い比率で測定するために、濾過前後の血小板濃厚液の各6mlをBACTEC用血液培養液15mlに添加して37℃における細菌数を時間経過とともに測定した。図9のように、フィルター通過後は血小板濃厚液中の細菌数は減少したが、フィ

ルター部分の細菌数増加は認められなかった。この傾向は24時間後、48時間後も同様でそれぞれの比率はほぼ変わらずに細菌数が増加していた。

次に、濾過血小板濃厚液の量とセラチア菌除去効果との関連を見るために、20ml及び200mlの合成血小板濃厚液（白血球数：620/mm³、血小板：193万/mm³）をそれぞれ濾過して細菌数の変化を見た（図10）。白血球除去フィルター通過前の細菌数が1200個/mlであったのに対し、通過後の細菌数は20ml濾過で500個/ml、200ml濾過で1150個/mlであった。また、白血球除去フィルター部分の捕捉された細菌数は20mlで1000個/ml、200ml濾過で950個/mlであった。

同様に濾過血液量と細菌除去効果を見るために、合成新鮮血液（白血球数：7230/mm³、血小板：29万/mm³）の20ml及び200mlをそれぞれ濾過してセラチア菌数の変化を見た（図11）。この実験では、フィルター濾過前後の血小板濃厚液にBACTEC用血液培養液に添加して直後と24時間後の細菌数を測定した。濾過直後では200ml濾過に比較して20ml濾過の方がフィルター部分の捕捉されたセラチア菌数が多く、一方濾過後には20mlよりも200mlの方が多くの細菌が残存していた。しかし、24時間後の細菌数はフィルター部分の細菌数で現れる増殖は多くはなく、また濾過後の細菌数では20ml濾過後で増殖が見られた。

5) 血小板濃厚液における細菌接種と酸素消費を指標とした検出

(1) 細菌増殖結果

健常ボランティアから採血して得られた血小板濃厚液を24時間室温振盪保管した後に、表1に示す数になるように接種して、接種後16時間から72時間の間に变化した細菌数を測定すると、血小板製剤バッグ内の各菌数は10⁴~10⁸CFU/ml前後に増殖した（表1）。菌種によっては、

増殖せずに減少する細菌も認められた。

(2) 細菌増殖関連指標検査

細菌の増殖数に比較して、血小板製剤中のpH変化は軽度で、最も増殖の激しかった*E.coli*で、2.8 x 10⁷個に増殖した、接種後48時間以後になってから、pHの低下が見られてきた（表2）。スワーリングは、この*E.coli*の採血後72時間頃から消失が見られ始めた。

(3) 酸素消費量

パウチ内では全ての細菌が増殖し、パウチ中の酸素濃度は、血小板製剤由来の検体の殆ど（93%、13/14）で24時間後にはPBD Sの陽性基準である19.5%以下に減少し、細菌接種後30時間では検査した全ての検体で陽性を示した。（表3）。

6) 濃厚血小板の濾過後白血球除去フィルター部分のpH

濃厚血小板を濾過した白血球除去フィルターの洗浄液についてpHの変動を測定した。セラチア菌を接種した濃厚血小板の濾過後白血球除去フィルター部分では、24時間後から48時間後にかけてpHが酸性に変化する傾向が見られたが、これらの傾向は、細菌を接種しなかった濃厚血小板の濾過後白血球除去フィルター部分の直後から72時間後までのpH変化とほぼ同程度であった（図14）。

4. 考察

血液中に浮遊している細菌が遠心分離によりどのような分画に集積するかを調べた結果では、血漿中の細菌は徐々に減少し、2000回転以上では多くは消失していた。これらの遠心条件は、成分採血装置の血小板採血における遠心力によって多くの細菌が白血球層、または赤血球層の下部に沈んでいることを示唆していた。しかし、少数ではあるが、これらの条件でも血漿中に浮遊している細菌も認められ、特に白血球層では一定量の細菌が残存していると考えられるべきであると思われ

た(図1、2、3)。

期限切れ血小板濃厚液での実験では、白血球の機能は低下している状態での細菌接種の影響を観察していると考えべきであるが、合成新鮮血。血小板濃厚液は、不要になった白血球分画を再度遠心・浮遊を繰り返して再合成しているものの、採血後の時間が短いことから、血小板や補体とともに白血球もある程度機能を保っている状態で実験に使用できたと考えている。これらの条件で用意した新鮮血液にセラチア菌を接種すると、接種後5分後には細菌数が明らかに減少して暫くの間は少ない数値を呈し続けるが、消失することなく約1時間後に再び増加する傾向が見られた(図4)。この傾向は使用血液製剤を変えて、血小板濃厚液にても同様に認められたが、細菌が再増殖するまでの時間は、3-9時間後と異なっていた(図5、6)。しかし、同じ製剤では接種細菌量を変えてもほぼ同じ時間で再増殖を示していた(図6)。これは、使用製剤中の補体活性等によるオプソニン効果や浮遊している白血球の機能、あるいは接種した細菌に対する抗体価等の免疫状態が作用した結果と考えられた⁽¹⁴⁻¹⁵⁾。この実験では使用細菌は一種類の菌株を用いているが、実験毎に細菌の再増殖に至る経過が異なっていたのは、個々の製剤における補体や白血球の機能保持状態が異なっていたことが考えられる。また、同一製剤で接種細菌数を変えても同様の再増殖時間経過を示したことからも、白血球や補体の機能が同じであれば、混入細菌数が多くても少なくても同様な時間経過で再増殖するものと考えられた。

細菌接種後血小板濃厚液の白血球除去フィルター通過による細菌数の変化については、期限切れ血小板を用いた実験で、フィルター部分にBACTEC用血液培養液を加えて24時間後の細菌数を測定すると著しく増加していた(図8)。次に合成

濃厚血小板を用いて、白血球除去フィルター濾過前後の血小板濃厚液検体も同条件でBACTEC用血液培養液に添加して細菌数を測定した。この条件では白血球除去直後と同様に24時間後、48時間後ともに、濾過前後やフィルター部分の細菌数の比率が大きく変化することなく、細菌の増殖が見られた(図9)。従って、白血球除去フィルター部分に捕捉された細菌が特に感度よく検出される傾向が見られなかったが、これはフィルター部分に同時に捕捉されている多くの白血球によって貪食殺菌された細菌が少なくないのではないかと推測された。しかし、この部分の培養により、濾過前後の数mlに匹敵する細菌量を検出する事ができると考えられた。

濾過血小板濃厚液の量と細菌除去効果との関連では、20mlに比較して200ml濾過した血小板濃厚液では細菌数が多く残存しており、濾過液量によって細菌除去効率が低下してくることが考えられた。フィルター部分の細菌数は、少しの差であるが20ml濾過の方が多くの細菌が残存していたが、20mlの方が細菌の捕捉効率が高いことと、200mlでは、細菌に比して白血球の捕捉効率も高く、この白血球によって捕捉された細菌が貪食殺菌された可能性も考えられた(図10)。

新鮮血液についても、20ml及び200mlをそれぞれ濾過して細菌数の変化を見たが、濾過直後では同様に20ml通過後の新鮮血液の方が200ml濾過血液よりも細菌の残存が少なく、濾過液量によるフィルターの細菌除去効率の差と思われた(図11)。このことはフィルター部分の細菌数においても顕著であった。これは、新鮮血液の白血球数が血小板濃厚液の約10倍以上と多いために、フィルター部分に捕捉された白血球による貪食殺菌効果がより強く影響した結果と思われた。24時間経過した後の細菌数では、フィルター部分細菌数の差が少なくなったが、これは白血

球に貪食されたが、添加されたBACTEC用血液培養液中のSodium Polyanetholesulfonate (SPS)によって殺菌機能が抑制されたために生存した細菌が後に増殖した可能性が考えられる。また、今回使用した白血球除去フィルターが血小板製剤専用フィルターであるために、新鮮血液中の白血球除去が十分でなかったことが想定されるので、濾過後新鮮血液中細菌数の24時間後の値は、200ml濾過よりも20ml濾過した新鮮血液の方が多く増殖していることは、フィルターに捕捉されずに通過した白血球が200ml濾過の方に多く存在していたために細菌増殖が障害された可能性が考えられた。

PBDSを用いた酸素の測定は、これらの条件による接種細菌の増殖に比例して酸素消費が増加していることを示しており、増加した細菌数との酸素消費量との相関も見られ、細菌増殖の指標の一つとして有用であると思われた(図12、13)。

健常ボランティアから提供された血小板製剤に接種した細菌は、著しく増殖する菌も見られたが、一部の菌は、室温にて振盪保存しているにもかかわらず、徐々に減少する傾向も見られた(表1)。これは、供血者に依ってはある種の細菌に対して免疫を獲得し、抗体成分等の関与が疑われた。そして、血小板製剤は、接種された細菌が増殖してもpHやスワーリングの消失による反応は鈍く、これらの検査や外観検査に、まだ限界があると言えよう(表2)。

PBDSは菌増殖によって消費する酸素濃度を検知するシステムであるが、パウチ内では血小板製剤バッグ内の菌数よりも指数的に多く菌を増殖出来、それに相伴して、酸素濃度も鋭敏に下降しており、PBDS接続後24時間(採血後48時間)で菌増殖判定が簡便に出来ることが確認された。従って、酸素濃度減少を指標とした方法は鋭敏であり、血小板製剤の菌増殖検出に有用と考えられた(表3)。

このように白血球除去フィルター部分に捕捉され、一定の条件と時間とで増殖した細菌を簡便で迅速な検出方法が望まれる。pHは細菌の増殖により変化する事が知られているので、白血球除去フィルター部分のpHを測定してみた。しかし、この場合のpH変化は、無菌状態でのpH変化の域を出ていなかった(図14)。これは、白血球除去フィルターに捕捉された白血球や血小板等の細胞成分の代謝によるpHの変化が大きかったことに由来すると思われた。

平成16年10月から血小板製剤の貯血前白血球除去が開始されている。白血球除去フィルターを用いた場合には、白血球除去フィルター部分は廃棄されている。この白血球除去フィルター部分に捕捉・収集された細菌を効率よく検出する事により、製剤から検体を採取することなく製剤中から由来した細菌の存在を検査することができる可能性がある。そして、感度のよい方法を用いることにより、細菌の存在を高い確率で否定できることになり、製剤の無菌を証明する方法に繋がると思われる。従って、濃厚血小板製剤の有効期限を延長するにあたっては、血小板の機能が保持されていることの証明とともに、細菌汚染やその増殖に対する懸念を払拭することが必要であり、その一助になるために、本方法にさらに検討を重ねることは意義があるものと考えられる。

5. 結語

菌血症における全血・成分採血では、遠心条件と血液細胞や細菌の沈下条件とを比較すると、採血時に血液中細菌が混入しうると考えられた。一方、*Serratia marcescens*を接種した条件では、接種後の細菌数の変化や増殖の様態は多様であったが、接種直後の一定時期に細菌数が低下する傾向があった。従って、この細菌数が低下した時期に少量の検体で細菌検査をおこなうことは、細菌の存在を検出

できない可能性がある。また、白血球除去フィルターに補足された細菌のコロニー形成能は、濾過した血液量から推測される細菌数に比較して少なく、白血球による貪色の影響が考えられたが、白血球除去フィルター部分の細菌培養は、数m¹のサンプリングに匹敵する細菌検出効果が見られた。また、細菌検出方法は細菌コロニー形成方法とともに、酸素消費測定が有用であったが、pH変化の測定は鋭敏ではなかった。

文献

- 1) 日本赤十字中央血液センター医薬情報部：主な輸血用血液の無菌試験結果について。輸血情報0203-69, 2002.
- 2) 須貝順子、須貝勝平、布施秋久、中島順次：自己血輸血用血液の細菌汚染状況。自己血輸血 12(1):41-45, 1999.
- 3) 須貝順子、須貝勝平、布施秋久、中島順次：術中輸血の実態と自己血輸血の細菌汚染状況。自己血輸血 12(1):46-49, 1999.
- 4) 古田治彦、久保諠彦、木下智、栗林信仁、堀内薫、白数力也：血液採血部位の細菌汚染に関する実験的検討。自己血輸血 13(1):117-122, 2000.
- 5) 高瀬隆義、大屋秀人、千脇 廣、船橋茂、浅井隆善、山本浩子、伊藤道博、中島耀子：細菌汚染血液の保管と外観検査。日本輸血学会雑誌（第46回総会抄録集）44(2):172, 1998.
- 6) 比留間潔：輸血用血液のPrestorage leukocyte reduction。日本輸血学会雑誌 44(1):1-11, 1998.
- 7) 奥山美樹、比留間潔：自己血輸血における通常RC-MAPと白除RC-MAPの比較検討－凝集塊、サイトカイン濃度の比較－。自己血輸血（第14回学術総会抄録集）14:S11, 2001.
- 8) 加藤正久、脇本信博、杉山美雪、水口宏美：自己血輸血における保存前白血球除去の有用性－非特異的免疫抑制反応の予防に関して－。自己血輸血（第14回学術総会抄録集）14:S13, 2001.
- 9) 脇本信博、水口宏美、加藤正久：整形外科手術後創部感染症に対する自己血輸血の影響－保存前白血球除去群と対照群の比較検討－。日本輸血学会雑誌（第50回総会抄録集）48(2):228, 2002.
- 10) 秋野光明、佐藤雅子、栗倉裕美、他：保存前白血球除去製剤の有用性－*Yersinia enterocolitica*の汚染防止を中心に－。自己血輸血 学術総会号（第14回学術総会抄録集）14:S12, 2001.
- 11) 名雲英人、松田裕一、茶谷 真、他：赤血球M・A・P中の*Yersinia enterocolitica*の白血球除去フィルターによる除去効果－汚染菌量と除去時期との関係－。日本輸血学会雑誌 40(1):32-38, 1994.
- 12) 秋野光明、佐藤雅子、栗倉裕美、本間雅広、山本定光、池淵研二、池田久實：自己血における保存前白血球除去の有用性。自己血輸血 14(2):132-136, 2001.
- 13) Krishnan, L.A.G., Brecher, M.E. : Transfusion-transmitted bacterial infection. Hematology-Oncology Clinics of North America 9(1):167-185, 1995.
- 14) Hogman, C.F., Gong, J., Eriksson, L., et al.: White cells protect blood against bacterial contamination. Transfusion 31(7): 620 - 626, 1991.
- 15) Dzik, W.: Use of leukodepletion filters for the removal of bacteria. Immunological Investigations 24(1&2): 95-115, 1995.

表 1. 血小板製剤中の接種細菌数の変化

	接種後時間 (時間)					
	0	16	20	24	48	72
	細菌コロニー数					
<i>S. aureus</i>	4	0.5	1.5	1	1480	15640
<i>S. epidermidis</i>	4	3	12	2	18	3
<i>E. coli</i>	0.5	666	600	800	2800000	45300000
<i>S. marcescens</i>	55	1	0	0.5	0	0
<i>S. pneumoniae</i>	2	0.5	0.5	0.5	0.5	0

表 2. 血小板製剤中の細菌汚染と pH 変化

	接種後時間 (時間)					
	0	16	20	24	48	72
	p H					
<i>S. aureus</i>	6.99	7.16	7.19	7.23	7.28	7.27
<i>S. epidermidis</i>	7.04	7.17	7.20	7.23	7.29	7.30
<i>E. coli</i>	6.94	7.17	7.17	7.21	6.53	5.89
<i>S. marcescens</i>	6.98	7.18	7.21	7.23	7.29	7.27
<i>S. pneumoniae</i>	6.93	7.10	7.12	7.14	7.13	7.06

表3. PBDSによる細菌増殖の検出

	N	接種後時間 (時間)		
		24	30	48
		陽性検出数		
<i>S. aureus</i>	3	3	3	3
<i>S. epidermidis</i>	2	1	2	2
<i>E. coli</i>	3	3	3	3
<i>S. marcescens</i>	3	3	3	3
<i>S. pneumoniae</i>	3	3	3	3
陽性率		93%	100%	100%

図1. 遠心分離回転数と血漿中細菌数

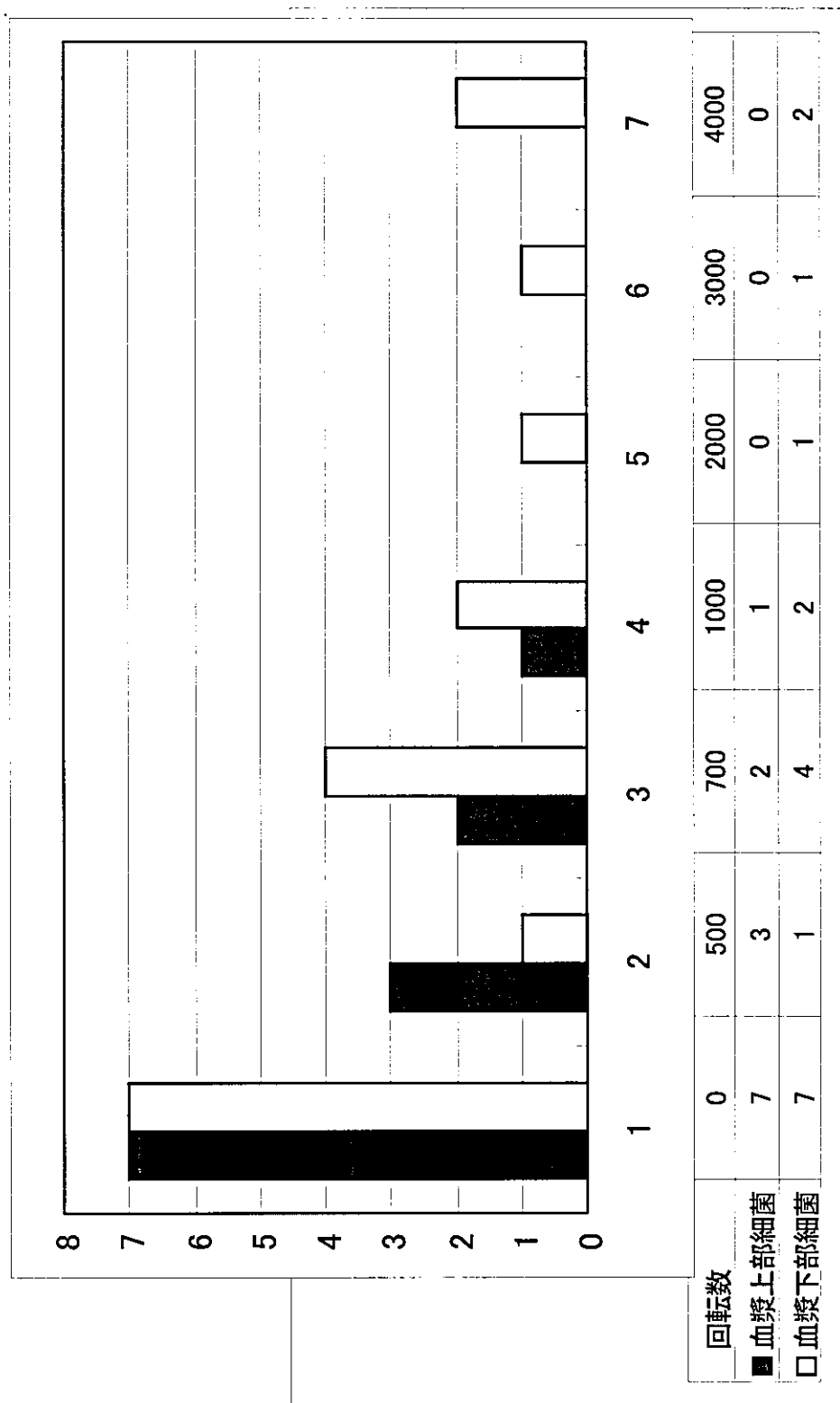


図2. 遠心分離回転数と血漿中白血球数および血小板数

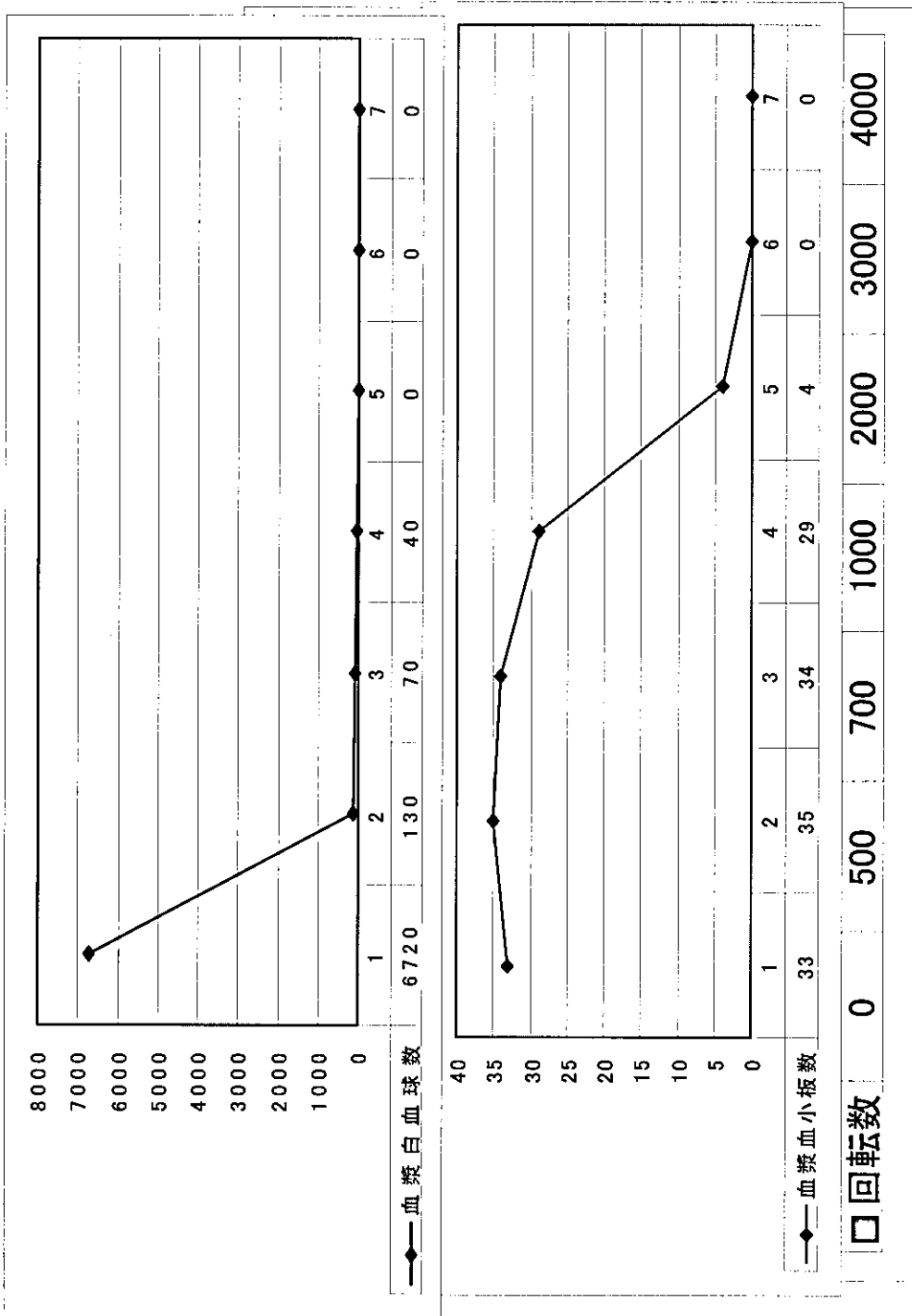


図3. 細菌数が多い場合の遠心分離回数と血漿中細菌数

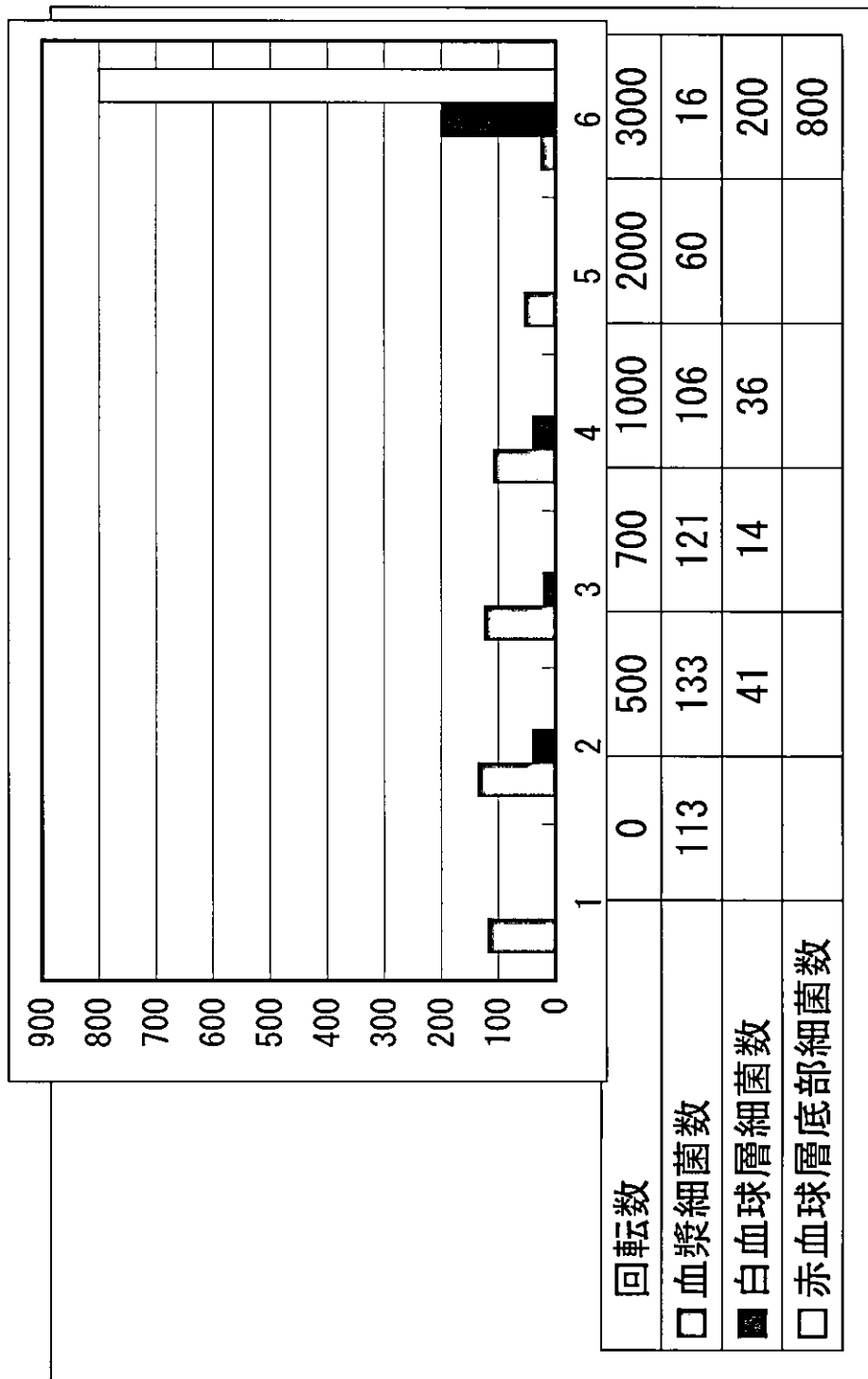


図4. 疑似新鮮血液に接種した細菌数の変動

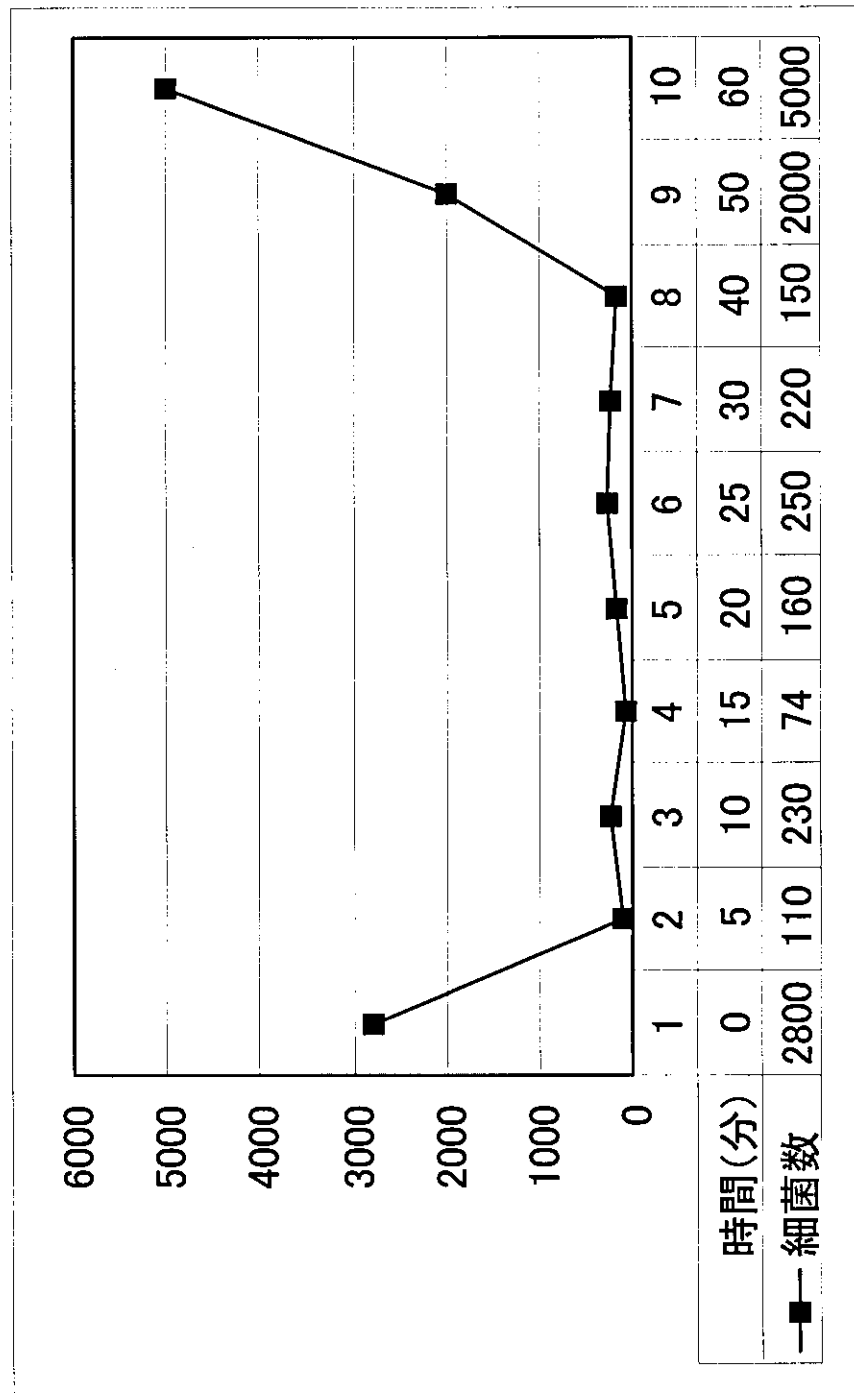


図5. 血小板濃厚液に接種した細菌数の変動—1

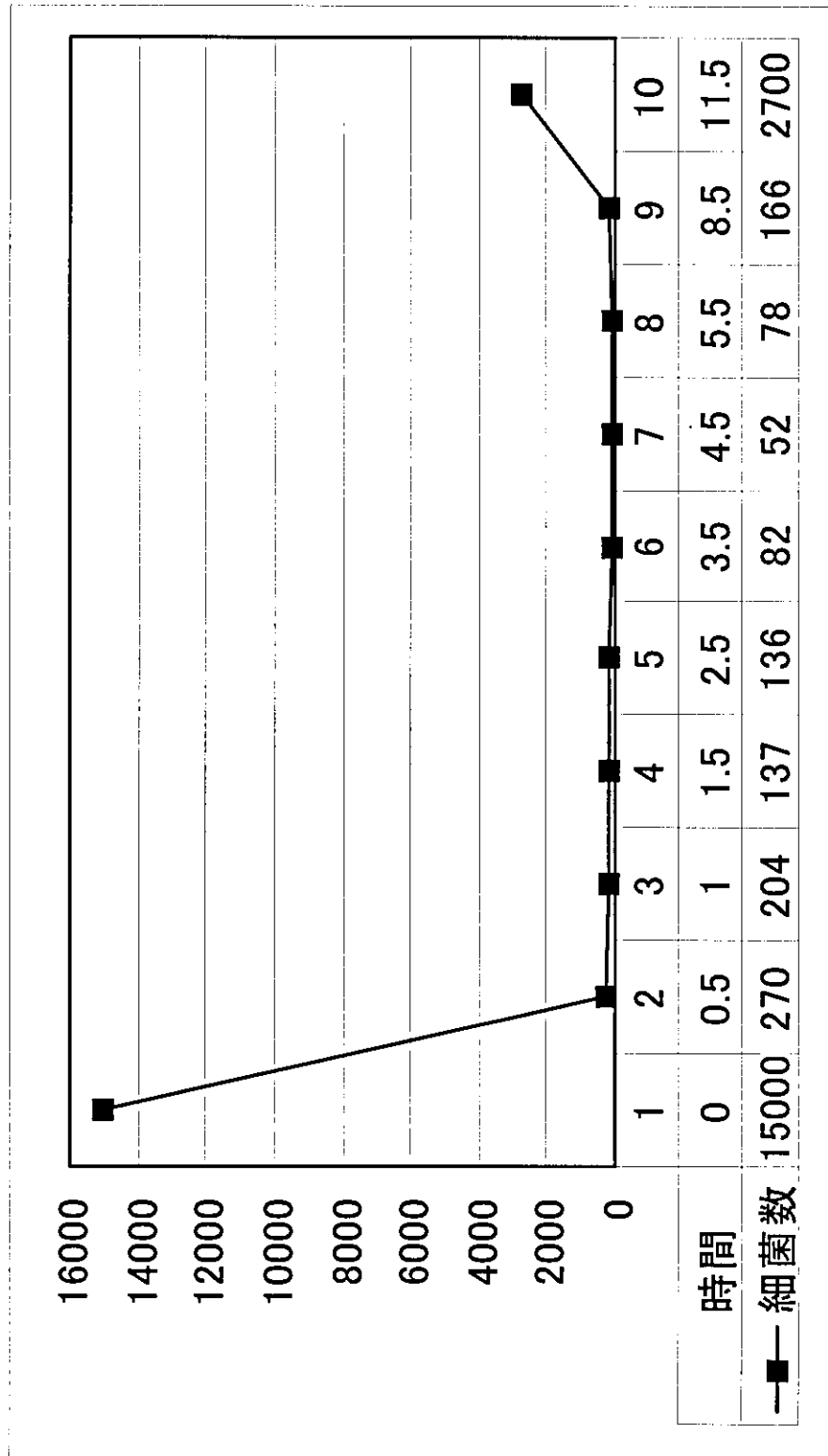


図6. 血小板濃厚液に接種した細菌数の変動—2

血小板数: 185万個/mm³
 白血球数: 340個/mm³

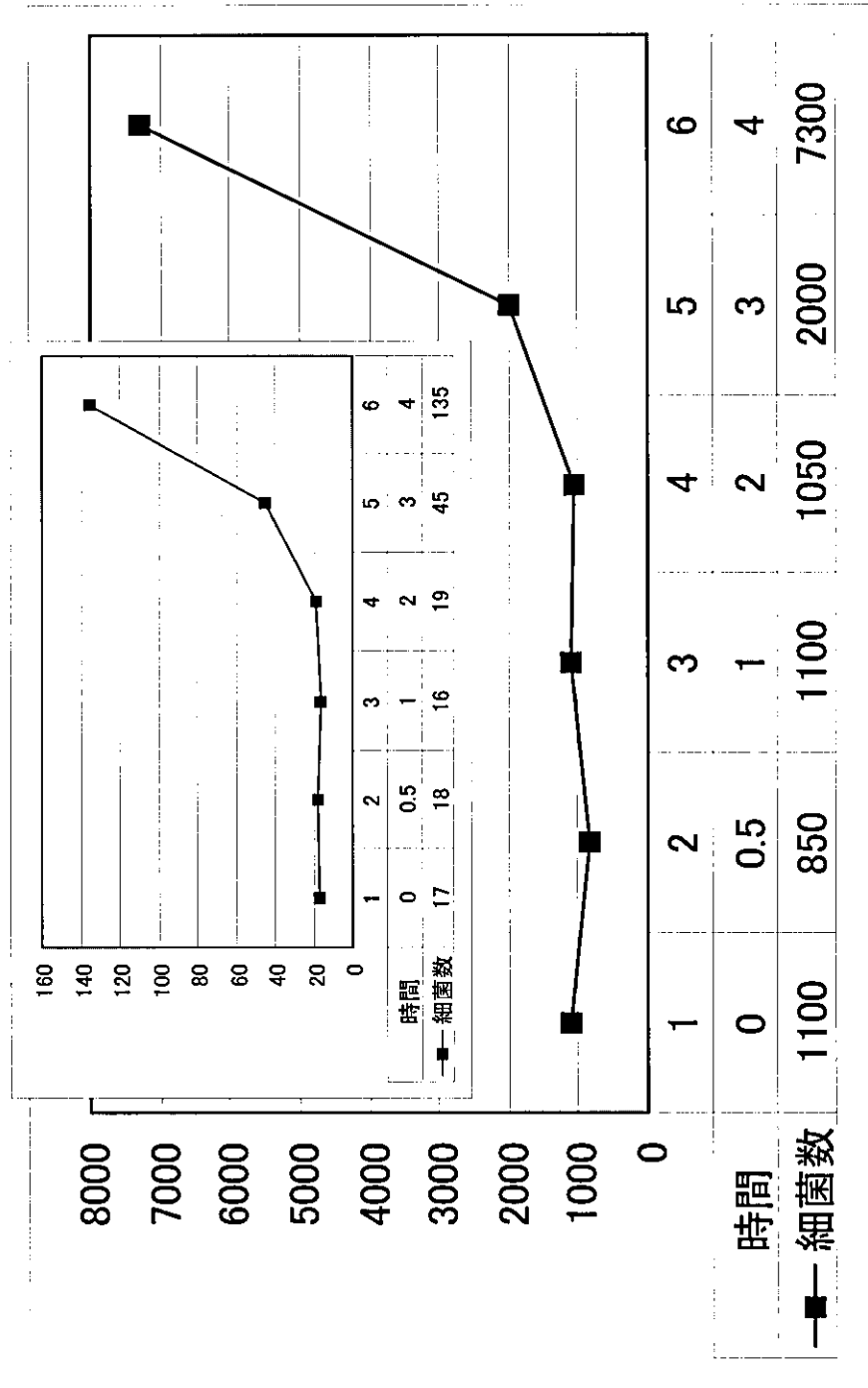


図7. 接種後24時間濾過の24時間後細菌数

血小板濃厚液: 採血後日数: 6日、白血球数: 200/mm³
フィルター部分: ミューラーヒュンツン液12mlで洗浄、
室温24時間静置

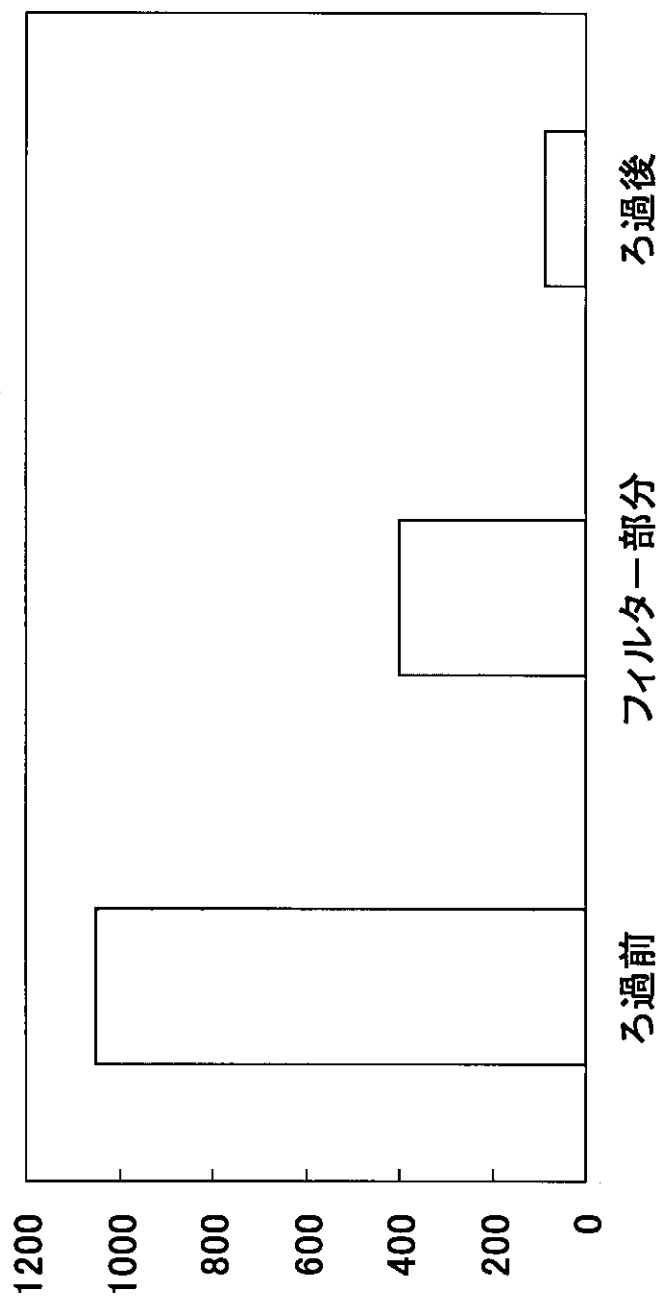


図8. フィルター一部分の保管条件と細菌数 (ミューラー-ヒュントン液)

血小板濃厚液：採血後日数：6日、白血球数：100/mm³
 フィルター一部分：ミューラー-ヒュントン液12mlで洗浄
 室温保管と37°C保管を比較

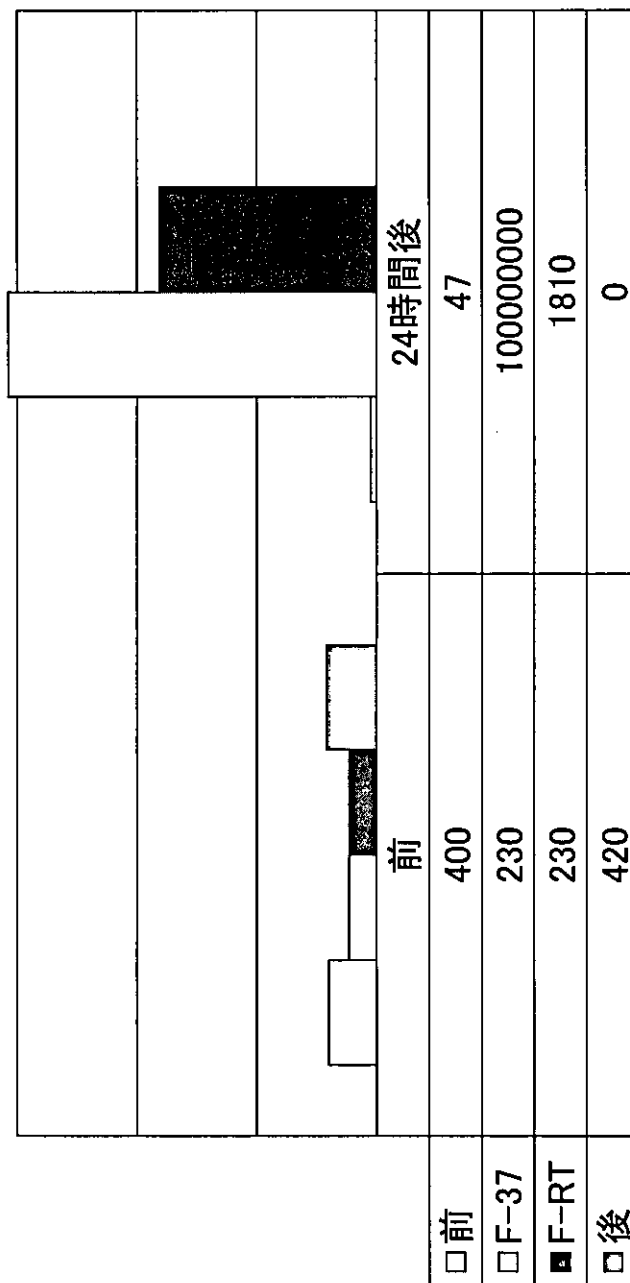


図9. 白血球除去フィルターによる細菌除去効果とフィルター部細菌収集効果-1

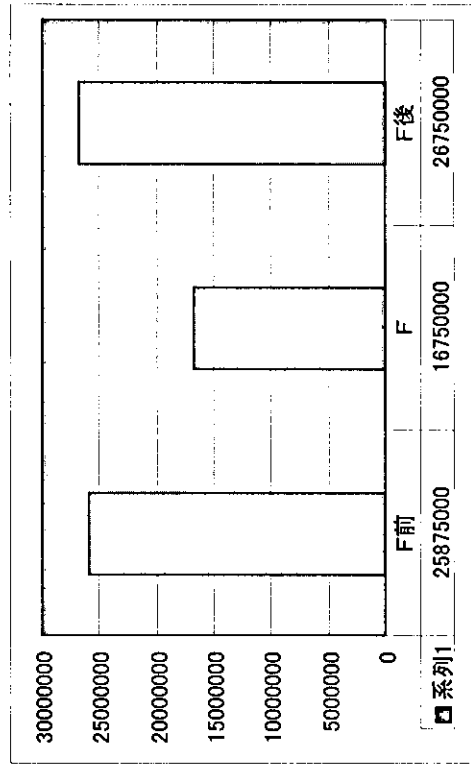
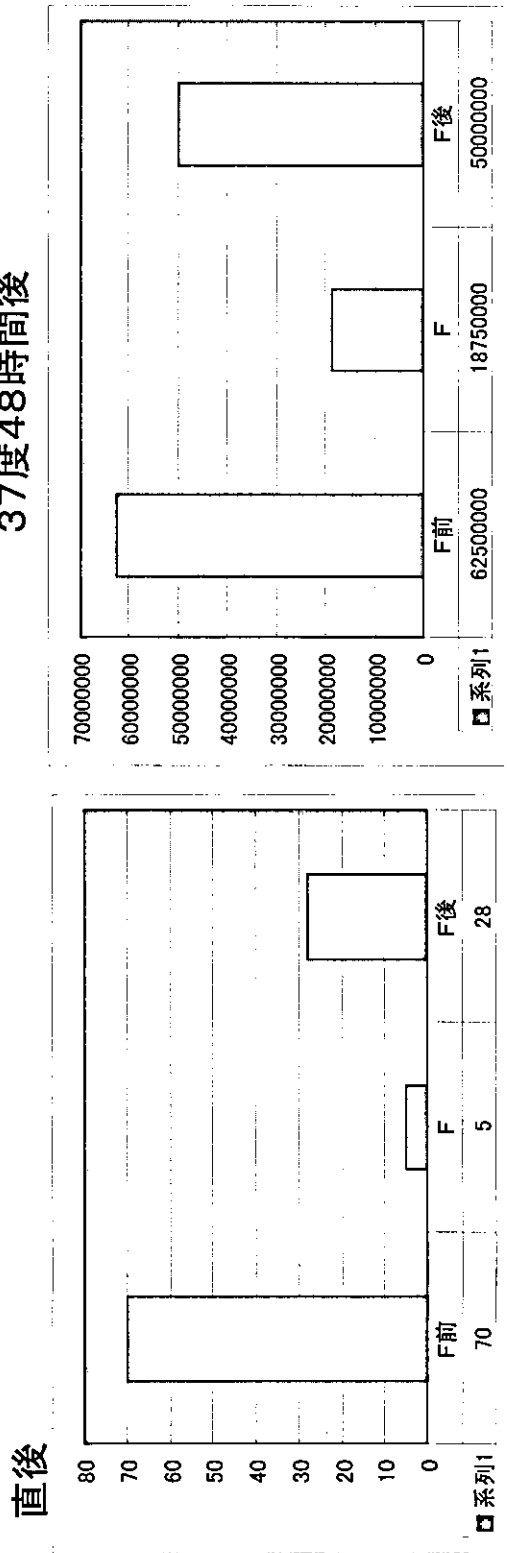


図10. 白血球除去フィルターによる細菌除去効果と
フィルター部細菌収集効果-2

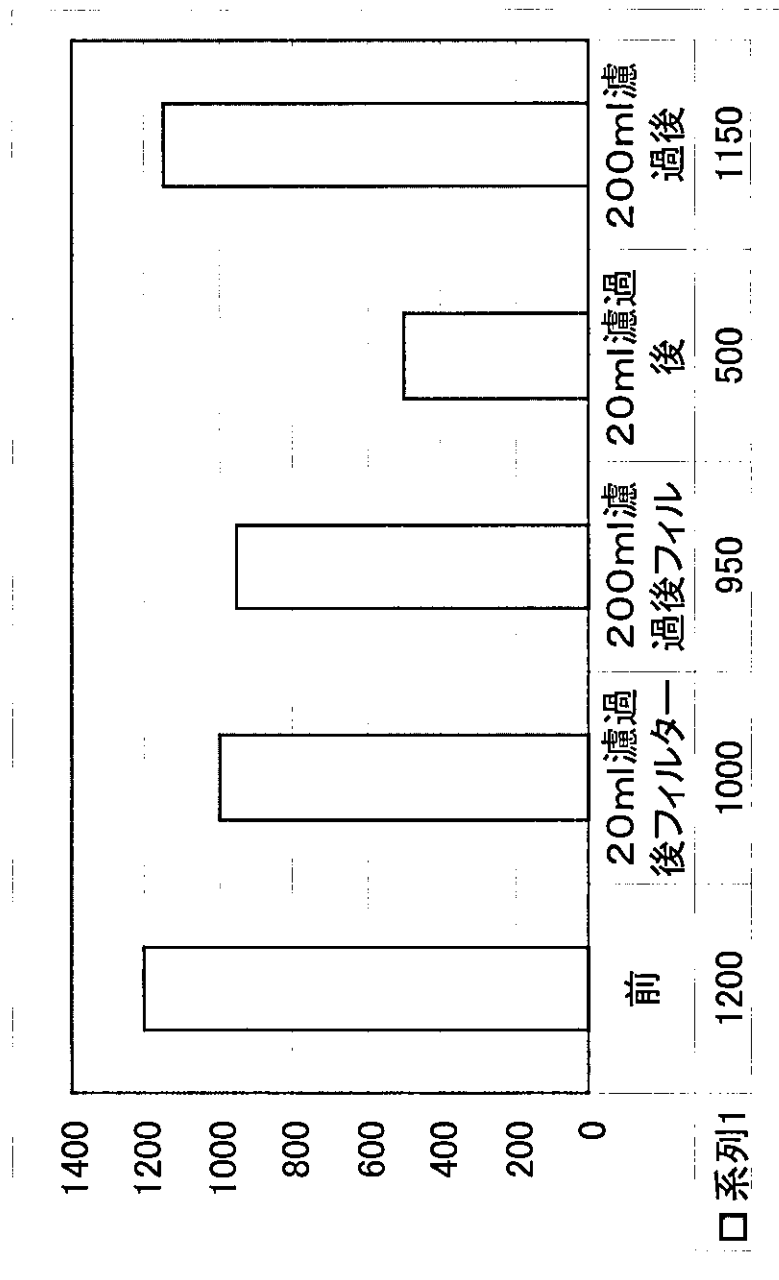
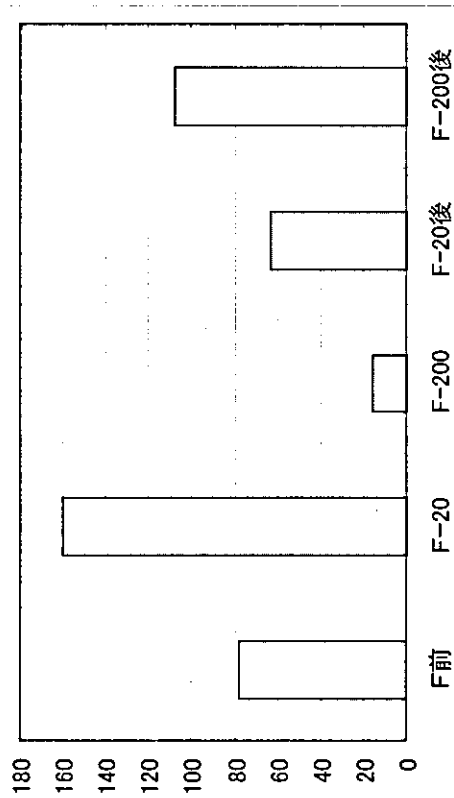
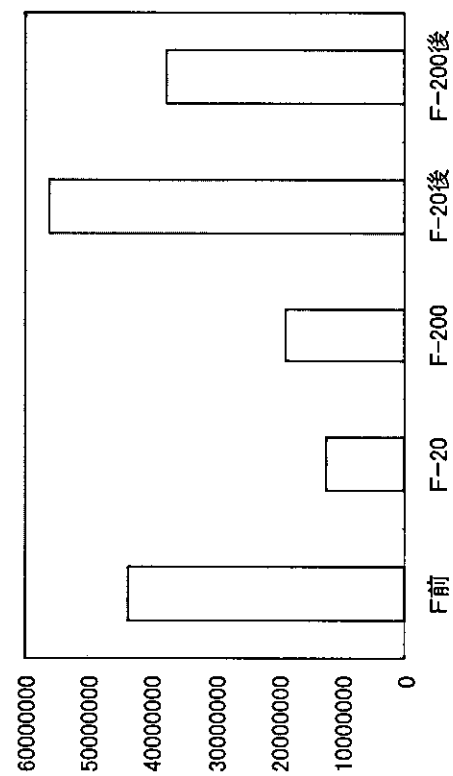


図11. 白血球除去フィルターによる細菌除去効果と
フィルター部細菌収集効果-3



濾過後24時間37度静置後



濾過直後

図12. 血小板濃厚液中細菌数と酸素消費の変化

血小板濃厚液：採血後日数：4日、白血球数：200/mm³
 血小板数：115万/mm³

