

A. 研究背景と研究目的

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、初流血除去による効果が期待される。しかし、菌血症状態献血者からの採血について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、昨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、細菌の混入にどのような影響を及ぼしているかを調査した。そして、製剤に混入する可能性のある細菌の検出方法として、これまで白血球除去フィルター部分の細菌検査方法への応用を検討してきたが、現在実施されている遠心分離方法による貯血前白血球除去方法には応用が困難であるため、今後の鋭敏で迅速な他の細菌検査の開発に向けて、混入細菌の採血後の動態を検討した。

B. 研究方法

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。

2) 細菌混入血液の遠心分離

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。

3) 接種菌

接種実験に使用した細菌は、以下の5菌種を用いた。血液寒天培地にて継代培養しておいたものを、使用前に細菌数を再測定して菌濃度を調整した後に血液製剤に接種した。

- ・ *Serratia marcescens*
- ・ *Escherichia coli*
- ・ *Pseudomonas aeruginosa*
- ・ *Yersinia enterocolitica*
- ・ *Staphylococcus aureus*

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、37℃で培養した後の形成された細菌コロニー数を測定して、1mL当たりの細菌数を求めた。

5) 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（旭化成メディカル、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、細菌数計測用の検体とした。

6) 異なった供血血液への同一菌接種

5名の異なった供血者の血液を用いて各々から作成した新鮮血（全血）に同一の菌を接種して、室温に24時間静置後の細菌数を測定した。接種細菌は*Escherichia coli*を用いた。

C. 結果

1) 遠心分離回転数と血漿中細菌数

昨年度にも報告したように、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*Serratia marcescens*を用いて測定した。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が、血漿下層では徐々に減少するものの、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）。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、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。

次に、*Escherichia coli*、*Pseudomonas aeruginosa*、*Yersinia enterocolitica*、*Staphylococcus aureus*の4菌種を用いて、3000回転における細菌の動態を調べると、図2の用に菌種によって菌の落下程度が異なっていた（図2）。図2では、細菌数の実数の代わりに、各細菌数の血漿中、白血球層、赤血球層底部における細菌数の比率（百分率）を示している。*Escherichia coli*では3000回転30分遠心後もかなりの菌数が血漿部分に浮遊しており、白血球層や赤血球層底部に匹敵する濃度の細菌数が浮遊

していたが、一方で、他の3菌種ではほとんどが血漿中に浮遊菌残存は見られず、特に、*Yersinia enterocolitica*は、ほぼ全部の菌が白血球層と赤血球層底部とに沈んでいた。

2) 全血に接種された菌の白血球除去フィルターの影響

Escherichia coli、*Pseudomonas aeruginosa*、*Yersinia enterocolitica*、*Staphylococcus aureus*の4菌種を用いて、新鮮血（全血）に細菌を接種して2時間室温に静置した後に白血球除去フィルターを通過させた。そして、その前後の細菌数を測定したが、遠心分離における結果と同様に、菌種によって様態が異なっていた（図3）。図3は、白血球除去フィルター通過前後の細菌数の実数の代わりに、各細菌数のフィルター通過前後における細菌数の比率（百分率）を示している。*Yersinia enterocolitica*では、白血球除去フィルター通過後は残存細菌は認められなくなったが、*Staphylococcus aureus*では約半数の細菌が白血球除去フィルターを通過していた。*Escherichia coli*は、フィルター通過後に細菌の残存は見られなかったが、白血球除去フィルター通過前から細菌数が既に著しく減少していたのでこの解釈は参考程度に留めたい。

3) 血小板濃厚液に接種された菌の白血球除去フィルターの影響

同様に、血小板濃厚液に、*Escherichia coli*、*Pseudomonas aeruginosa*、*Yersinia enterocolitica*、*Staphylococcus aureus*の4菌種を接種して2時間室温に静置した後に白血球除去フィルターを通過させて、

その前後の細菌数を測定した(図4)。全血における結果と同様に、*Yersinia enterocolitica*では、白血球除去フィルター通過後は、残存細菌は殆ど認められなくなったが、*Staphylococcus aureus*では殆どの細菌が白血球除去フィルターを通過していた。*Escherichia coli*は、やはりフィルター通過に細菌の残存は見られなかったが、血小板濃厚液においても白血球除去フィルター通過前から細菌数が既に著しく減少していた。

4) 異なった供血血液への同一菌接種

5名の供血者から得られた新鮮血(全血)に、同量の菌を接種し、24時間静置後の細菌数を測定した(図5)。図には細菌数の実数を示していないが、縦軸は各血液中に残存していた菌数の差異を示す。同様に作成した製剤に同数の同一菌を接種した後のこれらの差異は、供血者の血液性状による影響が考えられた。

5) 疑似新鮮血に接種した細菌数の変動

平成16年度に報告しているが、新鮮血(全血)に*Serratia marcescens*を接種して、室温静置下での60分間の細菌数を継続的に測定したところ、細菌接種した5分後には約25分の1に減少し、接種後15分では約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分後には接種直後の倍前後にまで増加していた(図6)。

D. 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、*Serratia marcescens*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(図1)。そこで、*Escherichia coli*、*Pseudomonas aeruginosa*、*Yersinia enterocolitica*、*Staphylococcus aureus*を用いて3000回転30分の遠心分離後の接種細菌の分布を調べてみると、*Yersinia enterocolitica*のように殆どが血漿部分の残存は見られなくなっているが、一方で、*Escherichia coli*では、遠心後も血漿中にかなりの細菌が浮遊していることが確認された(図2)。日本赤十字社では、平成16年11月から血小板濃厚液の製剤は貯血前白血球除去を行っているが、白血球除去の方法は、表1に示すように、白血球除去フィルターを併用する方法(H社、T社)と、遠心法で白血球を除く方法(B社、G社)とが採用されている(表1)。血小板採血における成分採血装置の遠心力は、H社で1400—2000G、T社で1200—1700G、G社で2400—3000回転、B社で940G(3280回転)との情報であるが、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740G、3000回転で1670Gの遠心力であったことから、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。細菌の種類によって、遠心分離時の細菌動態が異なるのは、菌の大きさ等の各菌種の性状の違いによる差が影響しているものと考えられる。しかし、いずれの菌種においても、白血球層に多くの細菌が存在しており、成分採血装置による血小板採集においては、接種した細菌の混入は避けられないものと考えらるべきであろう。

次に、白血球除去フィルターによる白血球除去処理によって混入細菌がどのような様態を示すか調べたところ、従来指摘されているように、*Yersinia enterocolitica*

ではその殆どが白血球とともにフィルターによって除去されることが示された。しかし、一方で*Staphylococcus aureus*のように白血球除去フィルターに殆ど捕捉されることなく通過する菌も認められている(図3、図4)。このことは、一旦混入した細菌を、安全な程度にまで効率よく確実に除去することは、*Yersinia enterocolitica*のような例外を除いては困難であると考えらるべきであろう。

従って、採血血液に混入した細菌を、鋭敏に、しかも確実に検出することが重要になってくる。そのためにも、混入した後の細菌の動態を理解することは有用であると思われるが、果たして、混入した細菌の血液中における増殖経過を見てみると、菌種によって異なるのと同時に、細菌と血液との組み合わせの条件にも影響を受けていることが示唆されている。これは、図5に見られたように、供血者が異なることによって細菌増殖程度に差が見られることから類推される。一方で、時間経過による細菌増殖の過程は一様ではなく、*Serratia marcescens*に見られるように一旦は減少・消滅した後に勢いよく増殖を示すこともあり(図6)、菌種、供血者との組み合わせ、さらには時間経過によって細菌増殖の様態が異なることを理解して細菌検出方法を考える必要があるであろう。

混入した細菌が、図7に示すような増殖を続けた場合に、その血液を輸血に使用する場合は、細菌毒素による傷害とともに菌血症や敗血症を招来し重篤な副作用を伴うことは疑う余地がない。さらに、図8のように混入した細菌が供血者由来の抗体や補体等によって減少・消滅する場合には、菌血症や敗血症の危険は除外できるものの、

菌体毒素や菌体抗原は、その生存期間や一過性増殖の程度に応じて蓄積・残存すると考えられ、輸血に使用された場合には、これらによる傷害を引き起こすことも考えられることから、副作用の原因となることを否定はできない。

混入した細菌を効率よく検出する可能性のある方法として、貯血前白血球除去を行う際の白血球除去フィルター部分に捕捉された細菌を培養検出する方法を検討してきた。しかし、フィルター部への捕捉の様態は細菌の種類によって異なることと、表1に示すように必ずしも貯血前白血球除去に白血球除去フィルターを用いないこともあることから、他の鋭敏で確実な方法に集約すべきであろう。また、採血時には検出不可可能な数の細菌の赤血球製剤への混入が、10日後には色調変化を呈する程に増殖することがあることも報告されており¹⁾、細菌検査時期の設定にも配慮が必要であろう。現在、欧米ではBacT/ALERTやeBDSが、輸血用血液の全数検査に取り入れられてきているが、我が国の保存前白血球除去方法等を含めた採血事情に合った細菌汚染防止や検出方法の開発が望まれる。

E. 結語

菌血症状態における供血者からの成分採血では、遠心条件と血液細胞や細菌の沈下条件とを比較すると、菌種による差は見られるものの、採血時に血液中細菌が血小板製剤に混入することは避けられないと考えられた。一方、白血球除去処理による細菌除去は、*Yersinia enterocolitica*等の一部の菌種では白血球除去フィルターによる捕捉除去が期待できるものの、菌種によってはほとんど期待できないものも見られ、さ

らに、遠心法による白血球除去では細菌除去はさらに難しいと思われた。血液製剤に混入した細菌は、菌種や血液との組み合わせ等の条件により複雑な増殖経過を呈することが示されており、細菌検出検査は、これらの特徴を凌駕する方法が望まれる。

F. 健康有害事象

なし。

G. この研究による特許や論文

特許 なし。

論文 準備している。

参考文献

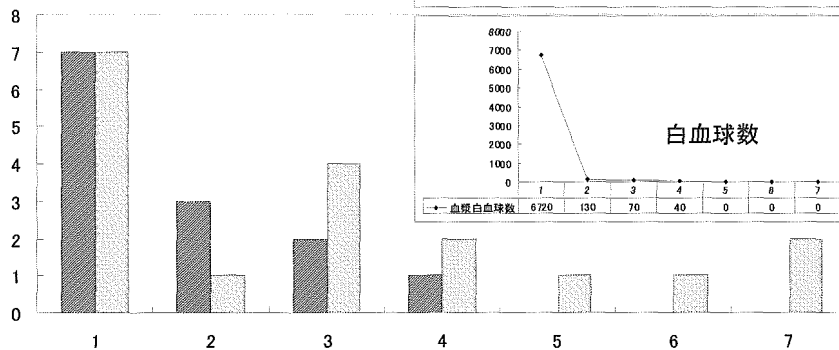
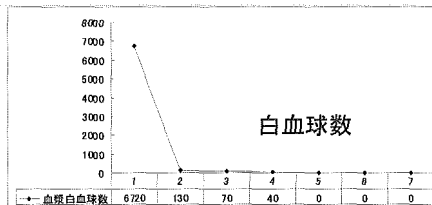
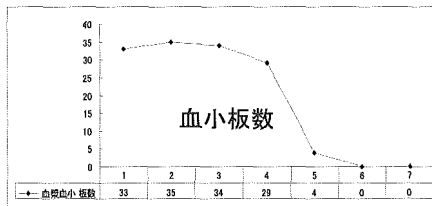
1) 杉浦さよ子、井上千加子、小澤和郎、神谷 忠：*Serratia Liquefaciens* 接種赤血球製剤の色調変化. 日本輸血学会雑誌、50(2)：362、2004.

表1. 血液センターにおける成分採血血小板濃厚液白血球除去方式

白血球除去方式	使用予定成分採血機種
フィルター法	CCS Multi テルシス テルシスS
遠心法	トリマ スペクトラ アミカス

図1. 遠心分離回転数と血漿中細菌数

(*Serratia marcescens*)



	0	500	700	1000	2000	3000	4000
■ 血漿上部細菌	7	3	2	1	0	0	0
□ 血漿下部細菌	7	1	4	2	1	1	2

図2. 全血(合成新鮮血)に接種された細菌数の遠心分離による影響

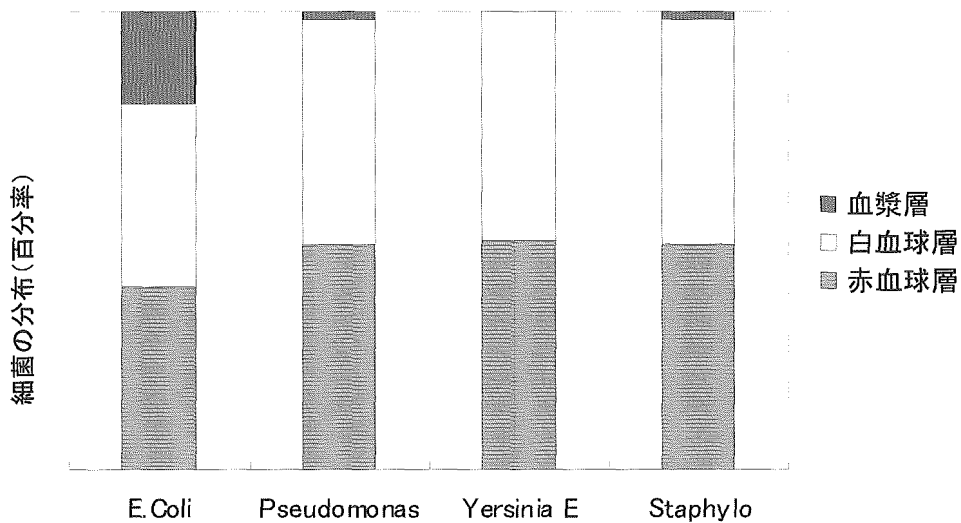


図3. 全血(合成新鮮血)に接種された細菌数の
白血球除去フィルターによる影響

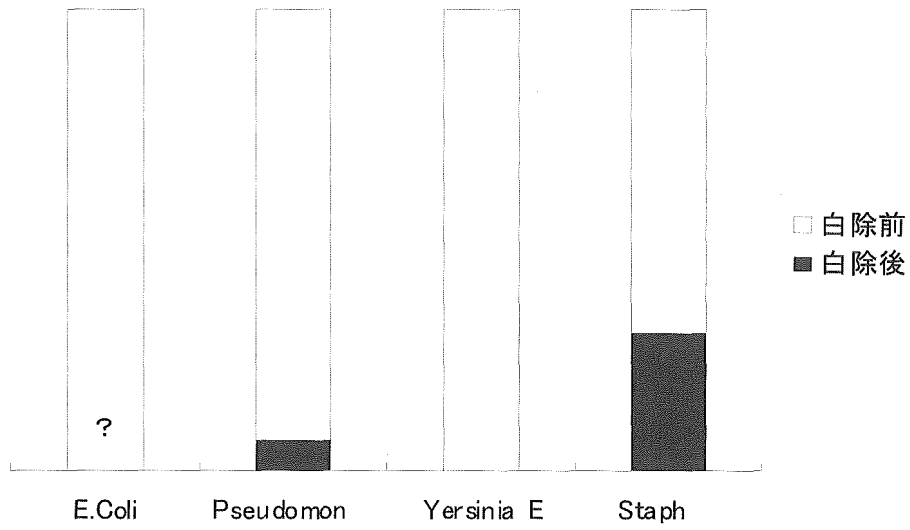


図4. 血小板濃厚液に接種された細菌数の
白血球除去フィルターによる影響

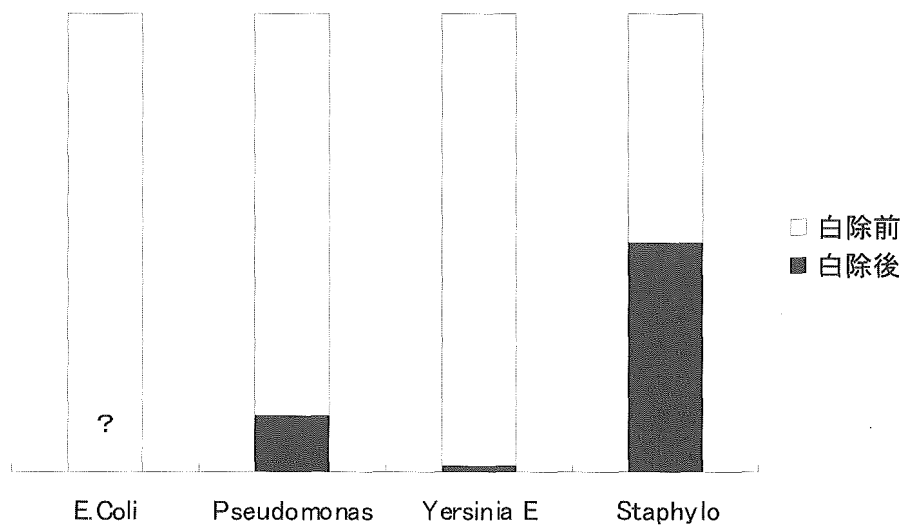


図5. 5名の供血者由来全血(合成新鮮血)に接種された
E. Coliの24時間後における細菌数増殖程度

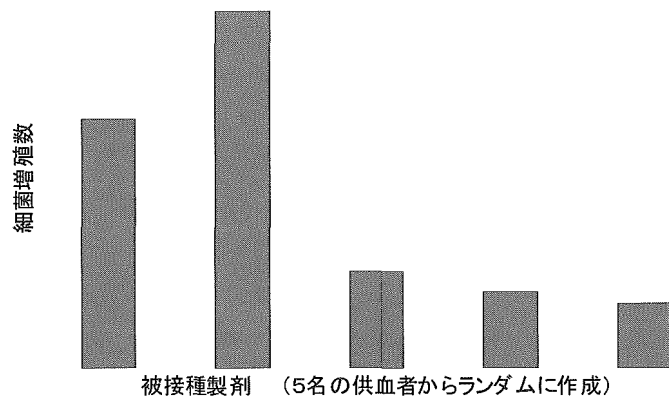


図6. 疑似新鮮血液に接種した細菌数の変動

Serratia marcescens

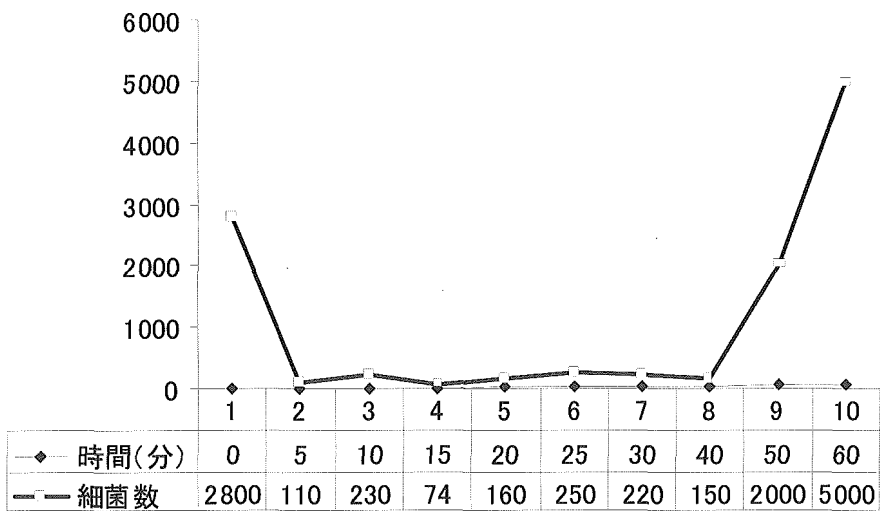
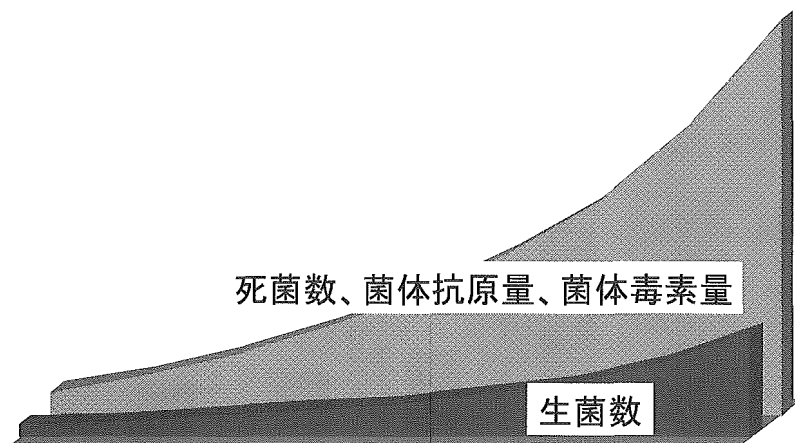
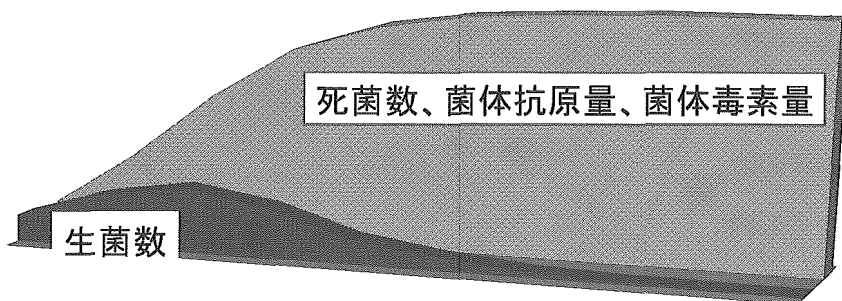


図7. 採血後漸次細菌数が増殖する場合の生菌数と死菌数の推移



採血後細菌数が漸減する場合の生菌数と死菌数の推移



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-051)

分担研究報告書

血小板製剤の低温保存と混入細菌の増殖

分担研究者：高松純樹 教授 名古屋大学医学部附属病院輸血部

共同研究者 大蔵照子 名古屋大学医学部附属病院 検査部

太田美智男 名古屋大学大学院医学系研究科分子病原細菌学

研究要旨：

血小板製剤は血小板機能保持のため、室温で保存されるので、菌の混入があれば、増殖しやすい。低温保存条件での、細菌増殖態度を検討した。10℃保存下でグラム陰性菌 (*Serratia Marcescens*, *E. Coli*, *Pseudomonas aeruginosa*)の増殖パターンは菌種により多様で、10℃で増殖を阻止することは不可能である。*Serratia*は特に増殖した。グラム陽性菌 (*Bacillus*, *Staphylococcus*)は4℃では使用した全ての菌種で、その増殖が阻止された。血小板製剤を低温(4℃)保存可能とする技術の開発が待たれる。ただしその場合でも、低温保存でも生き残る細菌がいるため、できる限り使用直前まで製剤を低温下に置くことが必要である。

A. 研究の背景と目的

現在輸血用血小板製剤は、血小板機能保持の観点から 20-25℃にて振盪した状

態で保存されているため、万一細菌の混入があった場合には、保存中に製剤内で細菌が増殖し、輸血により副作用をもた

らす可能性がある。HIV、HCV、HBV等のウイルス汚染については核酸増幅法により早期に検出が可能となった。しかし、細菌汚染については、輸血後感染症をおこす可能性のある細菌種の多様性から、核酸による検出には限界があり、培養による検出は採血後 72 時間という現在の血小板製剤の有効期限内では難しい。

有効期限を延長する上では、細菌汚染製剤による副作用の予防が重要な問題点であり、血小板機能が保持される範囲で可能な限り低温で保管する条件が検討されている。今回は、血小板製剤中に実験的に細菌を接種し、低温保存により細菌の増殖が抑制されるかどうかを検討した。

B. 方法

1) 使用製剤

赤十字血液センターに献血され製剤化された人濃厚血小板液のうち、有効期限内に輸血されなかった製剤を、期限超過後すぐに使用した。

2) 使用菌株

グラム陰性菌 3 菌種 12 株 (*Serratia marcescens* 4 株、*Escherichia coli* 4 株、*Pseudomonas aeruginosa* 4 株)、グラム陽性菌 4 菌種 16 株 (*Bacillus cereus* 4 株、*Bacillus subtilis* 3 株、*Staphylococcus aureus* 5 株、*Staphylococcus epidermidis* 4 株) を使用した。このうち、*S. marcescens* SM28、*B. cereus* NC7401、*S. aureus* N315 の 3 株は全ゲノム解読終了株であり、その他 25 株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臨床分離株である。

3) 血小板製剤への細菌接種

同一 lot. の製剤中における、異なる複数菌株の増殖特性を調べるため、製剤を血液バッグ内から滅菌プラスチック容器に無菌的に分注して使用した。BHI broth にて培養した細菌を、製剤中の細菌の終濃度が $10^2 - 10^3$ CFU/ml となるように添加した。無菌操作のコントロールとして、細菌を接種していない BHI broth を同様に添加し、以後同様に操作した。

4) 製剤の低温保管

細菌を接種した血小板製剤を 4℃ にて 3 日間静置し、その後室温にて 3 時間静置した。また、細菌を接種した血小板製剤を 10℃、静置保存状態に保ち続けた。

5) 接種後の生菌数の測定

細菌を接種した後、経時的に製剤の一部を取り出し、BHI 寒天平板培地上で普通培養し、コロニー数をカウントした。コントロールも同様に行い、コロニーが認められないことを確認した。

C. 結果

1) 4℃保存血小板製剤中での細菌の増殖 (図 1)

S. marcescens は、4℃保存中に生菌数の変化はなかったが、室温に出すと再びすぐに増殖し始めた (a)。*E. coli*、*P. aeruginosa* は 4℃保存時から室温に出して 3 時間後までの間に増加はみられなかった (b,c)。*E. coli* では製剤中で殺菌された株も存在した (b)。*Bacillus* 属細菌は 2 菌種とも同様な傾向を示し、4℃保存下で生菌数は 10CFU/ml 未満にまで減少したが、中

には室温に戻ると再び増殖し始めた株もあった (d,e)。 *S. aureus*、 *S. epidermidis* はどの株も 4℃保存下で生菌数に変化がなく、室温に出すと再び増殖し始めた (f,g)。

2) 10℃保存血小板製剤中での細菌の増殖 (図2)

グラム陰性菌では、10℃保存下で一部生菌数が減少する株もあったが、ほとんどの株は増殖が抑制されなかった (a,b,c)。グラム陽性菌は 10℃ではほとんど増加しなかった (d,e,f,g)。

D. 考察

現行の 20-25℃振盪保存条件下での製剤中の細菌の増殖特性が、特にグラム陰性桿菌において同一菌種内であっても菌株間で大きく異なることは以前報告したが、低温で保存した場合も、特にグラム陰性桿菌の増殖パターンは菌株により様々である。血小板製剤中で増殖能力の高い菌株については 10℃保存では増殖を阻止できないことが明らかとなった。病原性も増殖能も強いグラム陰性桿菌は非常に注意すべき細菌であり、血小板製剤の 10℃保管は難しい。

一方、4℃保存では、今回使用したすべての菌株の増殖が阻止されたことから、製剤の保管温度を 4℃まで下げることが望ましい。4℃においても血小板機能が保持できる技術の開発が期待される。ただしこの場合、低温保存しても生き残る細菌が存在するため、できる限り使用直前まで製剤を低温下に置くことが必要である。

E. 健康有害事象

なし。

F. この研究による特許や論文

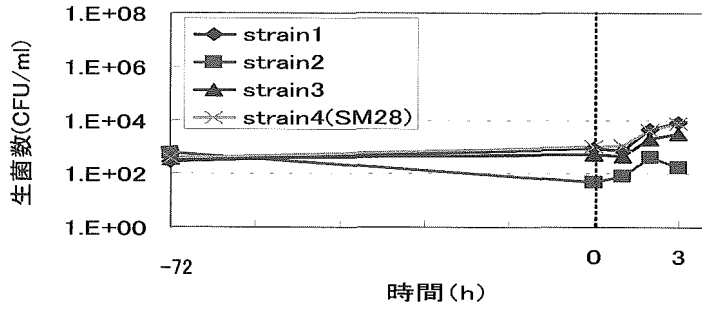
特許 なし。

論文 準備している。

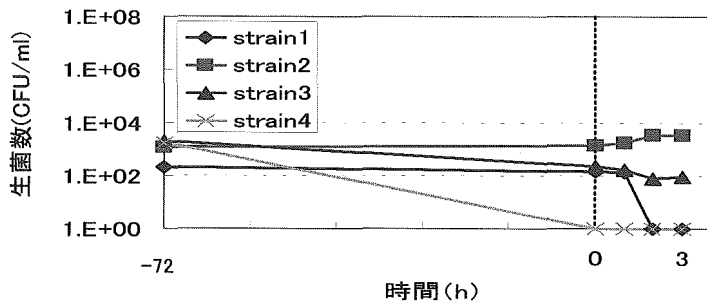
学会発表 準備している

図1 4°C保管による血小板製剤中での各種細菌の増殖抑制

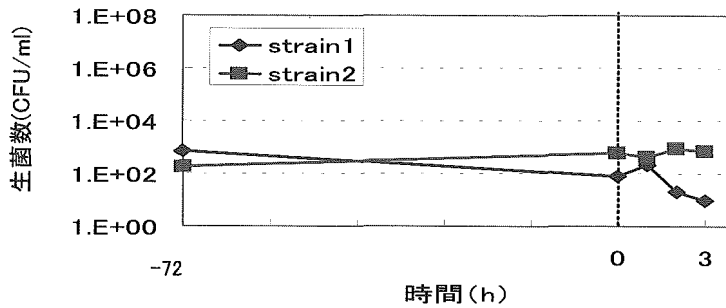
a. *Serratia marcescens*



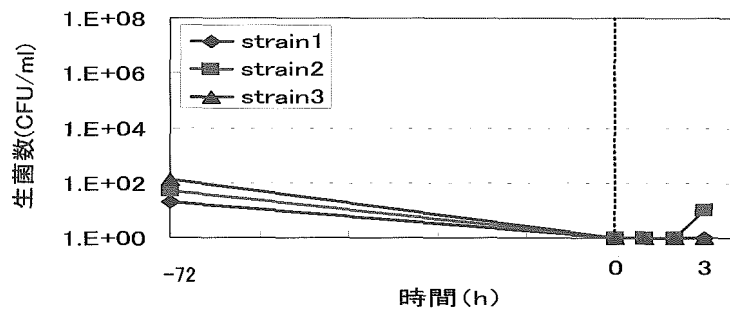
b. *Esherichia coli*



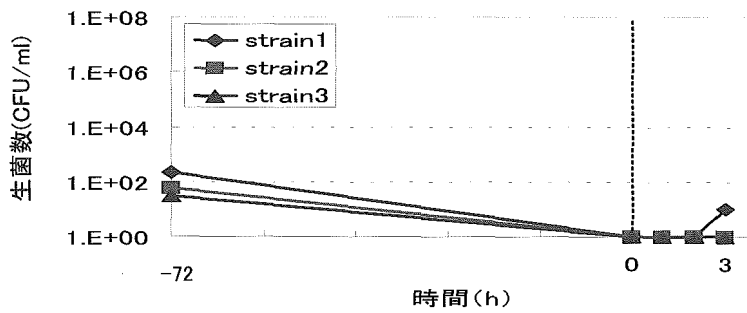
c. *Pseudomonas aeruginosa*



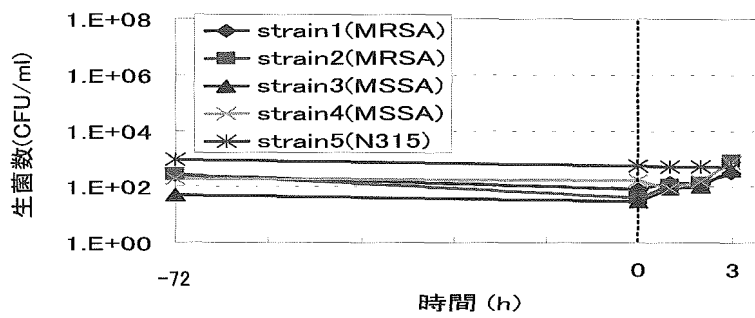
d. *Bacillus cereus*



e. *Bacillus subtilis*



f. *Staphylococcus aureus*



g. *Staphylococcus epidermidis*

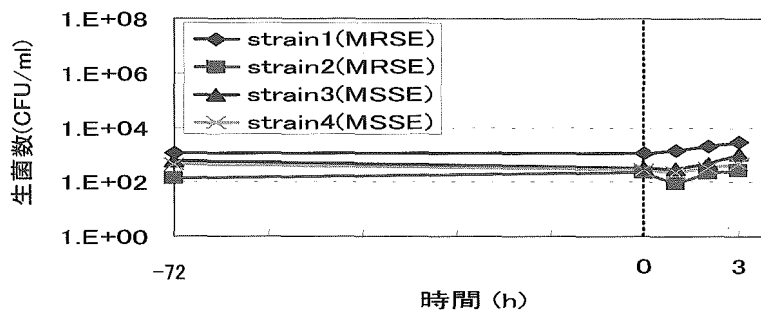
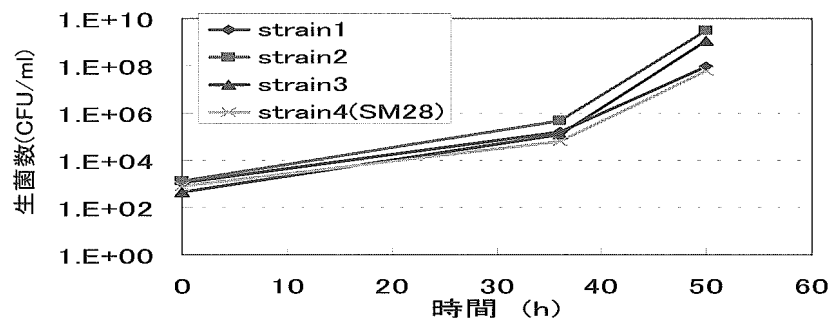
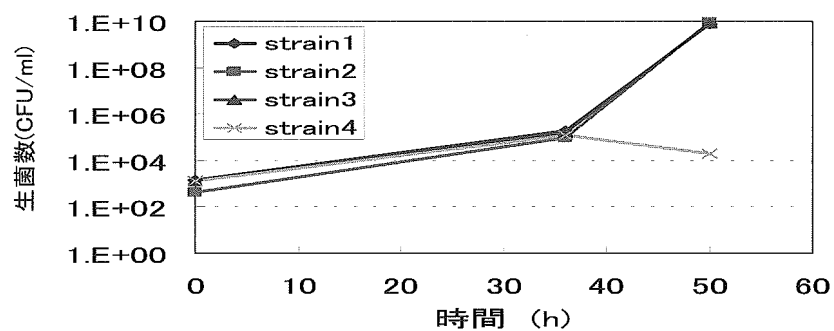


図2 10℃保管条件化における血小板製剤中での各種細菌の増殖

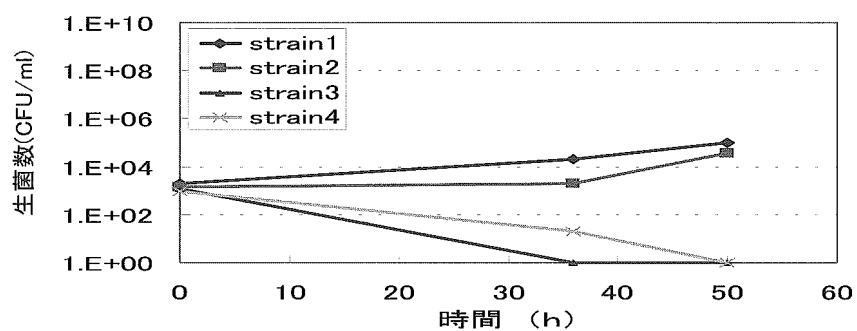
a. *Serratia marcescens*



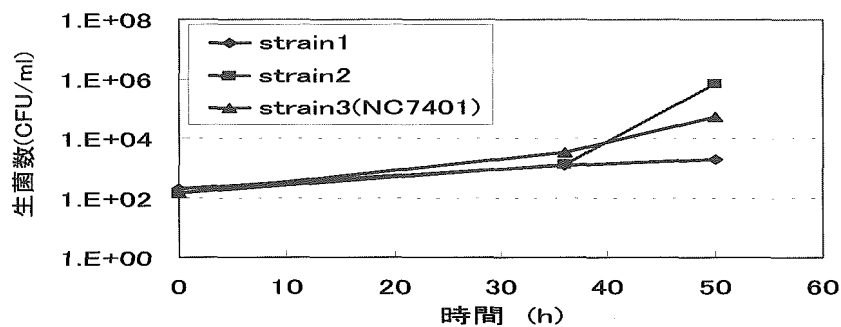
b. *Esherichia coli*



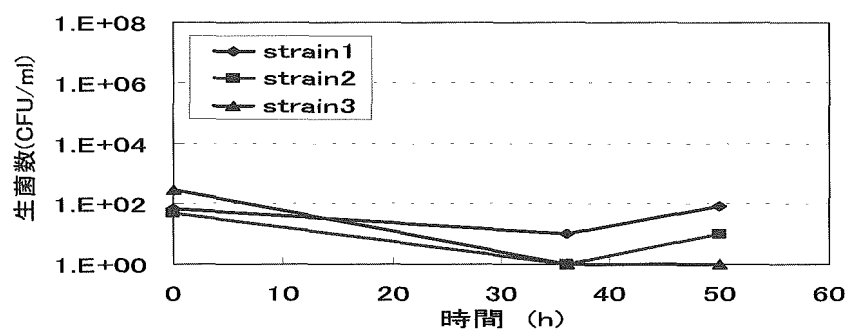
c. *Pseudomonas aeruginosa*



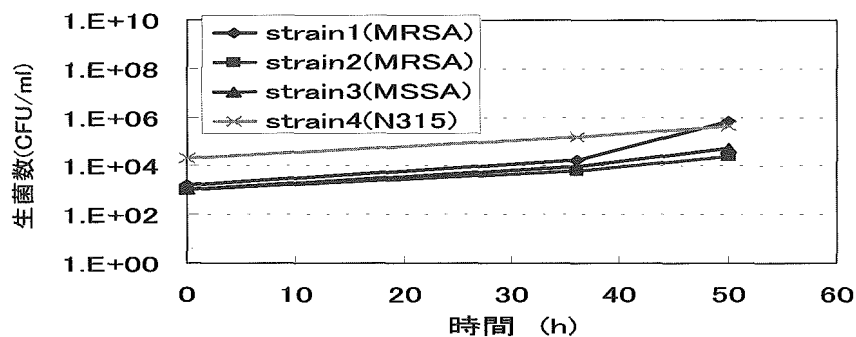
d. *Bacillus cereus*



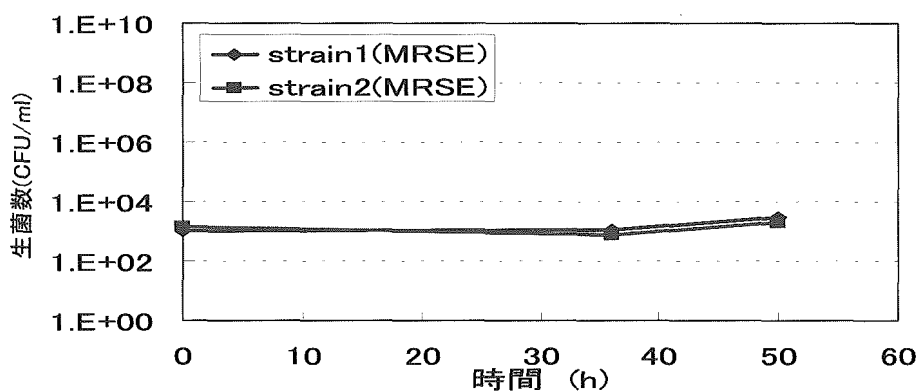
e. *Bacillus subtilis*



f. *Staphylococcus aureus*



g. *Staphylococcus epidermidis*



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-051)

分担研究報告書

血小板製剤への細菌接種：
培養式細菌検出システム BacT/ALERT と eBDS による検出

主任研究者：大戸 斉 教授
研究協力者： 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：

細菌混入した血小板製剤は室温（20～24℃）で保存するために、ときに致命的な副作用をもたらす。このため、欧米では細菌検査を勧め、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。さらに2機種ともに直後サンプリングは標準法（24時間後）よりも検出時間を短縮することができた。細菌混入の判別法として培養式の細菌検出システムは検出に有用である。

A. 研究の背景と目的

血小板製剤は採血後、その機能を良好に保持するため、室温（20～24℃）での振盪保存が必須とされている。その保存環境下は細菌増殖のための良好な培地に成り得、わずかに混入した場合でも致死的な菌数まで増殖する可能性がある。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。

現在、日本における血小板製剤の有効期限は採血後3日と短い。細菌混入の報告も諸外国に比べ非常に少ない。しかし、間近に迫った少子高齢化による血液需給のアンバランス、さらに、1999年から導入された核酸増幅検査（NAT検査）により、血小板製剤の実質的な有効期限は24～36時間と短いことが懸念材料として挙げられ、血小板製剤の有効利用を企図した期限延長が望まれる。

細菌混入の対策として、当研究班でも穿刺部位の消毒技術向上、初流血除去などを検討してきた。

血小板製剤の細菌検査には1) 検出感度が良いこと、2) 短時間で結果が得られること、3) 操作が容易であること、等が必要である。現在欧米では培養式の細菌検出システムが導入され、細菌スクリーニング

が実施されている。本研究では世界的に広く導入されている細菌検出システム2機種の検出感度・時間について比較検討した。

B. 研究方法

1. 細菌検出システム

1) BacT/ALERT (Biomérieux)

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）変化をモニターする。3Dシステム（コンピューター）、DMS（培養＋モニター）と専用培養ボトル（好気性、嫌気性）から構成されている。血小板製剤のサンプリングはクリーンベンチ下で行い、培養ボトルに注入する。器械本体に設置した培養ボトルは37℃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4 mLとした。

2) eBDS (Pall/川澄化学)

eBDSの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。オキシジェンアナライザー、専用アジテータ付インキュベーター、サンプリングパウチから構成されている。血小板製剤の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℃で培養し、培養後、オキシジェンアナライザーで測定し

た。9.4%以下の場合に陽性と判定される。今回はサンプリング量を 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

低濃度に調整した細菌種を血小板製剤に接種し、評価に用いた (n=4)。各細菌検出システムへのサンプリングは、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。

C. 研究結果

1. 2 機種種の検出感度

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 O_2 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の消費が多かった (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/ALERT 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 がまったく検出できず (0%)、24 時間培養でも 25%の検出率であった。一方、BacT/ALERT 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%の検出率であったが、それ以外は 100%検出が可能であった (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、今回行っ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。

D. 考察

ウイルス感染に対する安全性が高まるにつれて、相対的に細菌による感染の危険性が注目されてきた。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 年間調査した。その結果、輸血による細菌敗血症あるいは感染が、34 症例確定され、34 例中 9 件が死亡した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高く、発生率は 10 万に約 1 回、死亡率は 100 万に約 2 回とされている。これは血小板がその機能を保つために 20~24℃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。

欧州においても細菌汚染の報告がされている。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 例が死亡していた。血小板製剤では 22 例の細菌汚染のうち 5 例で死亡しており、細菌汚染の発生率と死亡率が高いことが問題になった³⁾。

日本においては有効期限が 3 日にもかか