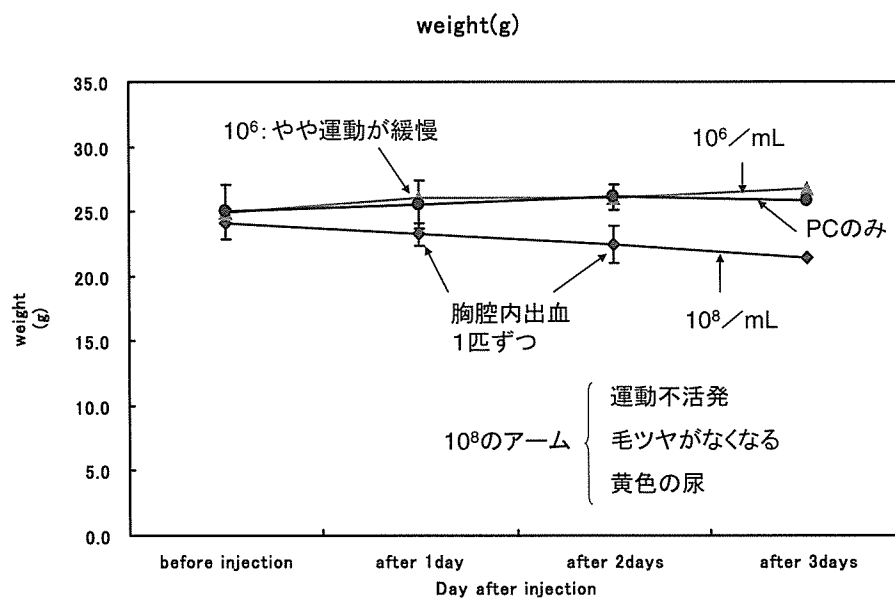
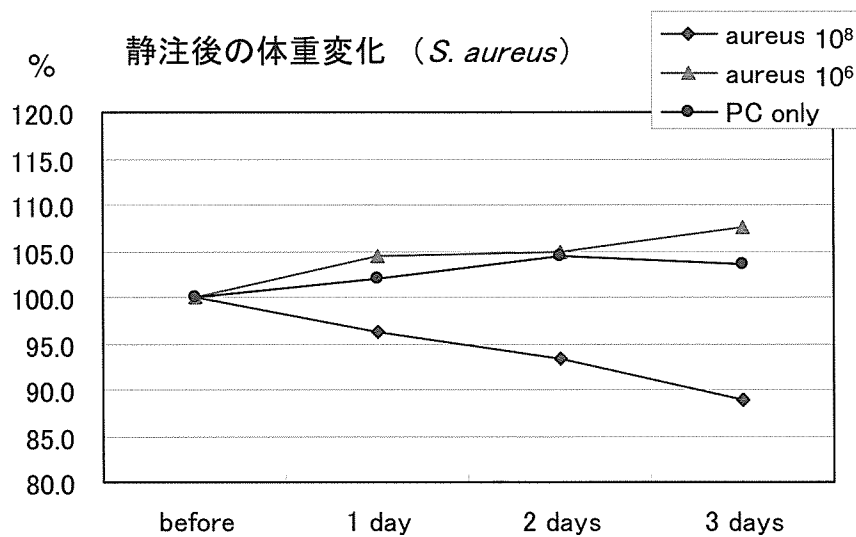
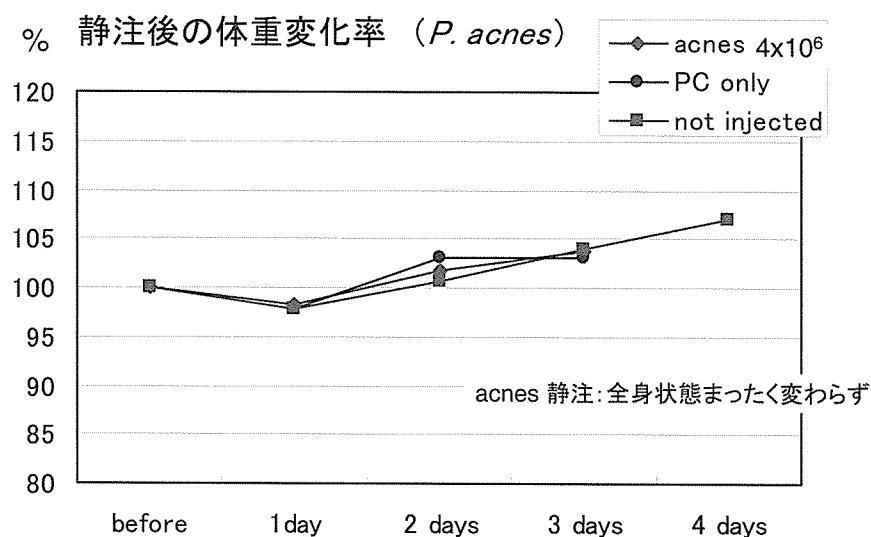


#### 4. 全身状態の変化



*S. aureus* 静注後のマウスの全身状態





*S. aureus* は、 $1.2 \times 10^8$  cfu/mL と  $1.3 \times 10^6$  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  $4.0 \times 10^6$  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。

##### 5. 細菌で汚染された血小板製剤中のサイトカイン・ケモカイン濃度

|                                               | WBC                         | PLT                         | 菌接種量     | 5日後菌濃度   |     |
|-----------------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------|----------|-----|
|                                               | $\times 10^2 / \mu\text{l}$ | $\times 10^4 / \mu\text{l}$ | CFU/ml   | CFU/ml   |     |
| <i>Serratia marcescens</i><br>ATCC: 14756     | 37                          | 177.5                       | 1.2.E+02 | 2.5.E+09 | 凝固物 |
| <i>Staphylococcus aureus</i><br>ATCC: 29213   | 4                           | 100.1                       | 5.2.E+02 | 1.8.E+08 | 凝固物 |
| <i>Salmonella choleraesuis</i><br>臨床株         | 24                          | 217                         | 2.0.E+02 | 8.7.E+08 |     |
| <i>Propionibacterium acnes</i><br>ATCC: 11827 | 20                          | 79.1                        | 3.0.E+02 | 1.2.E+02 |     |

培養に供した血小板製剤のプロフィールは上の表のとおりである。*P. acnes* は増殖速度が極めて遅く、以下の値は  $10^2$  台のレベルで得られた値であることが注目される。その他の細菌の場合は十分に増殖しきった時の値である。下表は、ひとつの血小板製剤を二分して、一方に細菌をスパイクし、もう一方には何も加えないで、同一条件で 5 日間 20~24℃ に振とう保存した時のデータである。

|                        | セロトニン | TNF- $\alpha$ | IL-1 $\alpha$ | IL-1 $\beta$ | IL-6   | IL-8  | RANTES    |
|------------------------|-------|---------------|---------------|--------------|--------|-------|-----------|
|                        | ng/ml | pg/ml         | pg/ml         | pg/ml        | pg/ml  | pg/ml | pg/ml     |
| <i>S. marcescens</i>   | 526   | 2             | <7.80         | 253          | 14     | 254   | 332,000   |
| control                | 559   | 10            | <7.80         | 8            | 4      | 114   | 651,000   |
| <i>S. aureus</i>       | 300   | 1             | <7.80         | 7            | <0.300 | 33    | 424,000   |
| control                | 401   | 1             | <7.80         | 2            | <0.300 | 16    | 380,000   |
| <i>S. choleraesuis</i> | 249   | 4             | <7.80         | 5            | 7      | 239   | 386,000   |
| control                | 912   | 3             | <7.80         | 6            | 1      | 43    | 1,170,000 |
| <i>P. acnes</i>        | 1,090 | 8             | <7.80         | 783          | 472    | 1,910 | 1,310,000 |
| control                | 249   | 4             | <7.80         | 6            | 11     | 248   | 416,000   |

*P. acnes* を添加した場合、ほとんど増殖していないにもかかわらず、5 日目にはセロトニンが約 4 倍、IL1- $\beta$  が 100 倍以上、IL-6 が 40 倍以上、IL-8 が約 7 倍、RANTES が約 3 倍に増えている。これらの値は、白血球除去をしていない製剤の輸血後に非溶血性の種々の輸血副作用を惹起するとされたサイトカイン濃度に匹敵する<sup>3, 4)</sup>。その他の場合で上昇を示したのは、*S. marcescens* の IL1- $\beta$  (約 30 倍) と *S. choleraesuis* の IL-8 (約 5 倍) のみである。

#### 【考察】

$10^6$  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こと、血液中に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される可能性が示唆された。この実験では 15 分後など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ている。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 時間以内に血液や網内系を含めたこれらの組織とは別の組織・器官に trap されてしまう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、病原性が低いということが出来る。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可能性が少ないという意味でも、病原性が低いということが出来る。

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える。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* に汚染された血小板製剤中には、 $10^2$ cfu/mL という低い細菌濃度においてもセロトニン、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8、RANTES などの炎症性サイトカイン・ケモカインが高濃度に蓄積されることがわかった。*S. marcescens* や *S. choleraesuis* などにおいてもごく一部のサイトカインの濃度が高くなるが、それは細菌濃度が  $10^8 \sim 10^9$ cfu/mL レベルのものであり、*P. acnes* のサイトカイン誘導能が非常に高くまた特異的なものであることを示している。これらの濃度の炎症性サイトカインが輸血副作用にどのように関与しているかは不明であるが、文献上、保存前白血球除去の副作用の一因としてあげられていた、混入白血球によって産生されるサイトカインの量を凌駕するものであり、発熱などの多くの副作用の原因となっている可能性がある。日赤血液センターの血小板製剤はすでに保存前白血球除去されているので、そのレベルの残存白血球で *P. acnes* が存在した場合、どのくらいのサイトカインが、またどのような kinetics で産生されるかを調べていく予定である。

*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<sup>5)</sup>の発表したもののしか存在しない。その中で彼は、血小板製剤を一時期全品培養し、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出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出庫できない状況なので、このようなデータは以後は得られないと思われる。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、汚染されて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はないかと思われる。

#### 参考文献

- 1) 輸血情報 0203-69、日本赤十字社中央血液センター医薬情報部
- 2) Vowels BR, Yang S, Leyden JJ. Induction of proinflammatory cytokines by a soluble factor of *Propionibacterium acnes* : Infect Immun : 1995 ;63: 3158-3165.
- 3) Muylle L, Joos M, de Bock R, Peetermans ME. Increased tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ), interleukin 1, and interleukin 6 (IL-6) levels in the plasma of stored platelet concentrates : relationship between TNF  $\alpha$  and IL-6 levels and febrile transfusion reactions. Transfusion 1993; 33:195-199.
- 4) Stack G, Snyder EL. Cytokine

generation in stored platelet concentrates : Transfusion 1994; 34: 20-25.

- 5) Wendel S. et al. Screening of Bacterial Contamination in a Routine Scale for Blood Components Production in a Brazilian Blood Bank : Vox Sang 2000 suppl; 79.

#### 【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。

#### 【研究発表】

##### 研究論文

1. Pietersz RNI, Engelfriet CP, Reesink HW, Ohto H, Satake M, Miyata S, et al. Logistics of platelet concentrates. Vox Sanguinis 2007;92:160-181.
2. 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.

##### 学会発表

- 1)白石紀美子、佐竹正博、他. 初流血除去対応新しいテルシス S の使用経験. 第 30 回日本血液事業学会総会抄録集. 2006;29(2):285.

**【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18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、および混入細菌増殖時pH変化

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：

血小板製剤の細菌汚染対策として、採血時の汚染細菌の動態を検討してきた。白血球除去フィルターによる影響の検索に引き続き、今年度は成分採血装置の遠心分離による白血球除去操作課程における汚染細菌の動態を調査した。その結果、*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。

混入細菌の動態を検討すると同時に細菌検出方法についても検討を行った。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pH変化の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、CO<sub>2</sub>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。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、やはり、血小板が産生するCO<sub>2</sub>の影響を鑑別する問題が残された。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

現在、保存前白血球除去製品を供給することに伴い、赤十字血液センターで製造

される血小板濃厚液は全て成分採血由来の製品になっている。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確認されているが、遠心分離によって細菌はどの分画に集積するかの詳細はまだ分かっていない。そこで、今回は模擬ドナーとして合成血液を使用することによって成分採血装置による白血球除去を実際に行い、接種した細菌数の変化を測定した。

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検討した。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した。

## 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対象となった白血球層を用いて、再遠心により分離さ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でそれぞれの製剤を作成した。全血は約800ml（約4単位）、血小板濃厚液はml約10単位に調整した。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) 接種細菌

接種実験に使用した細菌は、以下の菌種を用いた。凍結保存していた菌株は解

凍し、羊血液寒天培地にて継代培養して細菌コロニーを形成させた。使用前に細菌コロニーの一部を生理食塩水に浮遊させて細菌数を確認した後に、必要量を血液製剤に接種した。

- ・ *Escherichia coli* (ATCC 8739)
- ・ *Klebsiella pneumoniae subsp. Pneumoniae* (ATCC 13882)
- ・ *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027)
- ・ *Serratia marcescens* (ATCC14756)
- ・ *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228)
- ・ *Yersinia enterocolitica* (ATCC 23715)

### 3) 細菌コロニー測定

細菌数の測定は、細菌コロニー数を測定した。血液製剤から得られた検体は、予め生理食塩水で50倍毎に段階希釈して、各希釈細菌浮遊液の0.1mlを5%ヒツジ血液寒天培地に塗布した。37℃で培養した後に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。

### 4) 成分採血装置による血小板採取

血小板の成分採血は、献血者の代わりに800mlの合成全血を用い、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。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た。身長と体重はそれぞれ150cmと48kg（男性で、約3380mlの循環血液量）の条件を入力した後に、通常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。

### 5) pH測定

pHの測定には、pH試験紙（アドバンテック pH試験紙、東洋濾紙株式会社、東京）、またはpHメーター（ISFET pH Meter KS723、ビー・エー・エス株式会社、東京）を用いた。pH試験紙を用いた場合は、pHの値は最も近い色調のpH値を目視にて読み取った。また、pHメーターの場合は、機器の提示したpH値を記録した。

また、外観によるpH変化観察のためには、pH指示薬として、フェノール・レッド（Phenol Red；pH）またはブロモ・チモール・ブルー（Bromo Thymol Blue）を用いた。pH指示薬の色調程度は、カラーパネル（5%きざみカラーチャート、日本印刷新聞社）を用いて、最も近い色調の%を示して、赤色、または青色の程度を表した。

### 6) センシメディアによる炭酸ガス発生量測定

定性試験用呈色反応方式細菌検査用具センシメディア（SensiMedia®、マイクロバイオ株式会社、東京）を使用して、細菌増殖の検出を行った。センシメディアは、液体培地とCO<sub>2</sub>ガスセンサーが封入された試験管タイプの細菌検査用具であり、内蔵のCO<sub>2</sub>ガスセンサーが陰性の濃紺色から、陽性を示す薄黄色に変化することにより目視でCO<sub>2</sub>産生を認識することが出来る。細菌検体には、生理食塩水に浮遊した各濃度の細菌浮遊液を用いた。検出感度測定は、陽性の色調に変化するまでの時間を測定して記録した。陽性までの時間測定は、標準センシメディア専用の細菌繁殖時間計測用インキュベーターであるバイオマティック

20（Biomatic®20、マイクロバイオ株式会社、東京）を用いて、35℃孵置にて測定した。

細菌検査結果の比較対象検査として、血液培養用のBACTECシステム（日本ベクトン・ディッキンソン株式会社、東京）を用いて測定して比較した。測定は、好気性菌血液培養用レズンボトルに、センシメディアに使用したのと同じ検体を各5ml添加して、自動測定機器内蔵恒温室に設置して陽性化までの時間を記録した。

## **3. 結果**

### 1) 血小板成分採血時における接種細菌の動態

800mlの合成全血を用いた血小板成分採血の結果は、表1の如くであった（表1）。血小板の成分採血は、トリマ・アクセルを使用し、スピルオーバーの兆候が見られ始めた時点で終了することにより、血小板採取バッグに赤血球が混じないようにした。合計14回の血小板採取を行ったが、そのうちの2回（投資番号1、12）はスピルオーバーが表示されて血小板採血操作に至らなかった。これらは合成血作成の過程で生じた軽度の溶血による血漿の赤色程度から赤血球の混入と判断されて血小板採取に至らなかったと考えられる。また、その他の2回（投資番号5、13）も、血漿の微妙な赤色を時折感知して血小板採取が十分に行えなかった。これら以外の11回については、血小板数100万/cmm前後の濃厚液を20～40ml採取できた。これらの血小板採血によって得られた血小板濃厚液と、分離された赤血球層と血漿とを用いて、細菌検査を行った。

細菌検査の結果は表1の細菌数欄に示した。分離前の細菌数は、凡そ10万個

／m l になるように接種したが、表 1 の全血（分離前）の細菌数欄に示したように接種後の細菌数は一定ではなかった。成分採血後の細菌数は、各血液成分毎に増減が見られた。これらの増減の数値を分離前全血の細菌数に対する比率（百分率）で表したのが表 2 である。*Escherichia coli* における血小板層の数値に変動が見られたが、概ね一定の傾向が見られたので、各細菌毎の数値を平均して図示した（図 2）。*Escherichia coli* と *Yersinia enterocolitica* との血小板層細菌濃度は、分離前全血の濃度に近似していた。一方、血漿中の細菌は著減して、赤血球層では増加していた。*Pseudomonas aeruginosa* では、血小板中の細菌数は分離前全血の約 4 倍に濃縮されており、血漿層にも分離前全血の約 60 % が残存していた。

*Staphylococcus epidermidis* では、血漿層は 5 % 以下に減少し、血小板層においても分離前全血の約 14 % にまで減少し、殆どの細菌が赤血球層に集まっていた。これらの傾向は、昨年度の報告書に示した試験管による遠心分離の際の細菌の動態と若干異なる傾向であった（図 1）。

## 2) pH 指示薬の色調変化による細菌増殖の観察

汚染細菌の増殖を検出する方法として pH 測定が考えられているが、実際の細菌検出への応用は殆どされていない。そこで、細菌増殖の検出に応用可能であるかを検討するために、pH 指示薬を用いて観察を行った。細菌は *Escherichia coli* を用いて、約 50 万個／m l になるように接種した血小板濃厚液を使用した。pH 指示液としてフェノールレッドを成分に含むハンクス細胞培養液 2 m l を使用し、試験管中で細菌接種後血小板濃厚液の 0.1 m l、または 0.5 m l を添加

した後に、室温で静置保存した。48 時間後に変化を観察したが、結果は表 3 に示す如く、細菌接種した血小板濃厚液添加後のハンクス液は、フェノールレッドの赤色が 48 時間後には薄くなり、その傾向は 0.1 m l 添加よりも 0.5 m l 添加で顕著であった。また、色調の変化は、pH メーターや pH 試験紙により測定した pH の変化に一致していた。このことから、細菌増殖による pH 変化は pH 指示薬の色調変化による外観変化にても判断可能であった。データは示していないが、プロモチモールブルーの青色変化によっても pH 変化の外観判断は可能であった。

しかし、表 3 で細菌接種の無い血小板濃厚液のデータに示されるように、無菌状態においても血小板濃厚液の添加量に応じて、pH の変化や pH 指示薬の色調変化が認められた。これは、新鮮な濃厚血小板の代謝により、細菌が存在しなくても pH が変化することが考えられた。

## 3) 試験用呈色反応方式細菌検査用具を用いた細菌増殖の観察

主に食品分野で開発されて、最近の医用分野では透析液の無菌検査に応用されてきている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を使用して、血小板濃厚液の細菌汚染検出に応用可能か検討を行った。センシメディアは、スクリーキャップ付き 15 m l 試験管内に液体培地と CO<sub>2</sub> ガスセンサーが納められた細菌検査用具である。CO<sub>2</sub> ガスセンサーは半透析膜の袋に封入されて濃紺色であるが、試験管内の CO<sub>2</sub> 量が一定以上に達すると、薄黄色に変化する。このことを試験管外から目視で観察することにより、試験管内の CO<sub>2</sub> 産生を認識することが出来る。また、バイオマ

識することが出来る。また、バイオマ  
ティック 20を用いて、陰性陽性の機械判  
定も可能であり、検査開始から陽性まで  
の時間測定も記録できた。細菌検査結果  
については、製造会社が作成した各種細  
菌の検査結果が提供されているが、測定  
感度検査として、生理食塩水に浮遊した  
各濃度の細菌浮遊液を用いて検出に要す  
る時間を測定してB A C T E Cと比較し  
た。5種の細菌を用いて段階希釈した細  
菌浮遊液の検出時間を表4と図3に示し  
たが、*Escherichia coli*、*Klebsiella*  
*pneumoniae*、*Pseudomonas aeruginosa*、  
および*Serratia marcescens*、の4菌種で  
は低濃度においても25時間以内に検出  
可能であり、B A C T E Cに比較すると  
検出時間が長くなる傾向があるものの、  
検出感度は遜色ないものと思われた。  
*Staphylococcus epidermidis*、は、他菌  
種に比較して検出時間が長かったが、  
低濃度ではB A C T E Cよりも早い時間  
に陽性が記録された。これらの結果から、  
検体量の違いや菌種の違いを考慮に入れ  
ると、細菌検査の感度においては、従来  
の血液培養検査機器に近い細菌検出能力  
があるものと考えられた。

次に、血小板濃厚液に*Escherichia coli*  
を約50万個/mlの濃度に接種して、  
センシメディア陽性化までの時間を測定  
した。結果は表5に示したが、1mlで  
は12時間で、さらには0.1mlの検  
体量においても24時間以内に検出可能  
であった(表5)。また、室温では47.  
8時間と時間は延長したものの陽性を示  
したことは、室温孵置にても細菌検出の  
可能性が示唆された。

#### (1) 血小板濃厚液の代謝によるCO<sub>2</sub> 産生とpH変化

センシメディアの細菌検出は、細菌の  
代謝により産生されるCO<sub>2</sub>を感知する

機序を用いているが、血小板濃厚液は新  
鮮で高濃度の血小板が浮遊して室温下で  
代謝を維持している製剤であることから、  
血小板由来CO<sub>2</sub>の影響が考えられる。  
このことを検証するために、無菌血小板  
濃厚液を検体に用いてセンシメディアに  
よる陽性表示を計測した。結果は表6と  
図4に示したが、無菌状態においても陽  
性を示し、その検出時間は検体量に応じ  
て早くなる傾向が見られた(表6、図4)。  
このことから、新鮮血小板濃厚液を検体  
に用いた場合には擬陽性を示すことが有  
ることが確認された。

#### 4. 考察

現在、赤十字血液センターから供給さ  
れる輸血用血液は保存前白血球除去が実  
施されており、多くの製剤は白血球除去  
フィルターを使用して製剤化されている。  
この白血球除去フィルターにより混入細  
菌も除去されることの報告がなされてい  
るが、除去程度は部分的であり、また除  
去効果は細菌の種類によっても異なるこ  
との報告が見られており、本研究でも確  
認して一昨年に報告した。一方、我が国  
では血小板製剤の全てが成分採血で採取  
されており、その白血球除去は、ヘモネ  
ティクス社のCCSやMULTI、また  
テルモ社のテルシスS等のように白血球  
除去フィルターを組み込む方法と、ガン  
プロ社のトリマ・アクセルのように遠心  
分離操作で白血球除去を行う方法とが用  
いられている。そこで、後者の遠心分離  
による白血球除去操作の過程で、混入し  
た細菌がどの分画に移動・集積するかは  
不明であることから、昨年のin vitroで  
の検討に引き続き、ex vivoにより近い条  
件で検討を試みた。ドナーは代わりに合  
成全血を用いたが、成分採血は実際にト  
リマ・アクセルを使用して血小板採血を

実施した。その結果、*Escherichia coli* と *Yersinia enterocolitica* との血小板層細菌濃度は、分離前全血の濃度に近似しており、血漿中の細菌は著減して、赤血球層では増加していたが、*Pseudomonas aeruginosa* では、血小板中の細菌数は分離前全血の約 4 倍に濃縮されており、血漿層にも分離前全血濃度の約 60 % に残存しており、*Staphylococcus epidermidis* では、血漿層は 5 % 以下に減少し、血小板層においても分離前全血の約 14 % にまで減少し、殆どの細菌が赤血球層に集まっていた。果たして、細菌の種類によっては、血小板分画に集まり易い細菌、集まりにくい細菌、およびこれらの中間型を示す細菌と、多彩な動態を示すことが確認された。これらの傾向は、図 1 に示した昨年度報告の試験管による遠心分離の際の細菌の動態と若干異なる傾向であったが、試験管による遠心分離の際の白血球層は血小板層より赤血球層に近いことから、血小板層の実情を正確に反映していなかったと思われる。以上のことから、白血球除去フィルターで確認された多彩な現象と同様に、遠心式機序による白血球除去の際にも、血流中の混入細菌は様々な動態を示したことから、白血球除去による細菌除去効果は部分的であることが確認された。

2006年度から赤十字血液センターでは、貯留前白血球除去の実施に加えて初流血除去が開始され、採血時の表皮細菌の混入は大幅に阻止されるものと期待される。しかし、これまでに報告された血液製剤混入細菌には表皮常在菌以外も検出されており、初流血除去開始後に細菌汚染が皆無になるかは不明である。従って、当面の間は、血液製剤の無菌試験による確認の継続とともに、可能であれば全製剤の細菌検査併用への実施に対する検討も

引き続き努力することが必要であろう。一方では、ウイルスとは異なって細菌の数は指数関数的に爆発的な増殖を示すこともあることから、供給後の血液製剤の外観検査も含めて臨床の現場で細菌汚染を検査・確認する方法の開発も望まれる。その意味で、細菌増殖に伴う pH 変化の検査は、従来から指摘されてはいるが、未だ有用な手技の開発に至っていない。今回は、pH 指示薬の色調を外観検査によって観察することができるか否かを検討するために、試験管内での細菌増殖と pH 指示薬の変化を観察した。その結果、pH の変化は確認できるものの、血小板自体の代謝による pH 変化の影響が無視できない程度に伴うことの問題点が同時に確認された。

次に、pH 変化の検出に類似した機序を用いているところの、CO<sub>2</sub> 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であるセンシメディアについて、血液製剤の細菌検査の応用について検討した。5 種類の菌株を用いて、各濃度の細菌浮遊液の検出時間を測定し、血液培養検査機器の BACTEC と比較したが、検出時間が若干長くなる傾向はあったものの、低濃度の細菌浮遊液も十分に検出できた。実際に細菌を接種した血小板濃厚液を用いた細菌検出検査でも、1 ml の検体量に加えて、0.1 ml と少量の検体量でも細菌検出が可能であった。また、室温での反応も、時間は 35℃ に比較して長くかかるものの検出は可能であり、室温保管中の検査として応用される可能性も示唆された。費用は他機器に比較して安価であり、自動判定機器も備えていることから、輸血用血液の細菌検査に応用することは可能と思われる。しかし、前記の pH 測定と同様に、血小板自体の代謝による CO<sub>2</sub> 産生をも敏感に検

出するためであろうことの擬陽性を呈する可能性が高く、検体量やその他の検査条件をさらに検討すること等により細菌検査特異性を確保することが前提条件として残されている。現在は、スクリューキャップ付きの15ml試験管に収められているので、検体添加はキャップを開けて解放状態で行うが、今後はバッグへの収納によりチューブのSCD接続による閉鎖回路でのサンプリング等の改良工夫も期待したい。この方法は、陽性までの時間測定は自動機器による記録が有用であるが、陽性の判定はCO<sub>2</sub>センサーの色調の変化が顕著であることから肉眼による目視で十分に判断できることも利点である。このことから、使用方法が簡便なものに改良されれば、臨床現場での検査も可能となり、さらには、製剤の一部をこの検査に供した後に使用直前まで保管して最終判定にも使用することも可能であると思われる。このことにより、保管検体として使用直後まで保管することにも意義が付されるであろう。今後も擬陽性の除去とともに、測定条件の改善など 製造企業に提案して検討を続けたい。

## 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. 研究発表

研究論文

なし。

学会発表

なし。

## 7. 知的所有権

なし。

## 図の解説 (Figure Legends)

### 図 1. 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

#### －試験管による遠心分離－

縦軸、およびデータテーブル中の数値： 細菌数（個／0.1ml）

E. Coli: *Escherichia coli*

Pseudo: *Pseudomonas aeruginosa*

Yersinia E: *Yersinia enterocolitica*

Staphylo: *Staphylococcus epidermidis*

### 図 2. 血小板成分採血時の接種細菌の動態

#### －成分採血装置(トリマ アクセル)による成分分離－

縦軸の数値： 分離前全血中の細菌数(個／ml)を 100%とした場合の百分率(%)

E. Coli: *Escherichia coli*

Y E: *Yersinia enterocolitica*

Ps A: *Pseudomonas aeruginosa*

Sta A: *Staphylococcus epidermidis*

### 図 3. Sensi Media を用いた細菌増殖検査結果－BACTEC との比較－

白四角 (□) : BACTEC 使用による測定で得られた細菌検出時間

黒菱形 (◆) : Sensi Media使用による測定で得られた細菌検出時間

①: *Staphylococcus epidermidis*

②: *Escherichia coli*

③: *Klebsiella pneumoniae*

④: *Pseudomonas aeruginosa*

⑤: *Serratia marcescens*

### 図 4. Sensi Media を用いた検査結果

－CO<sub>2</sub> 産生物質としての血小板濃厚液の量と検出時間－

黒四角 (■) : 各検体量の細菌検出までの時間

図1. 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  
—試験管による遠心分離—

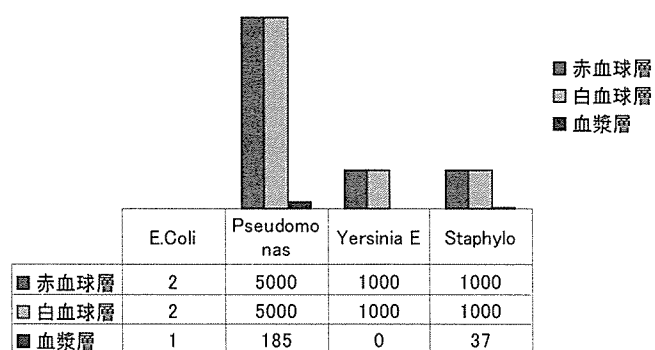


図2. 血小板成分採血時の接種細菌の動態  
—成分採血装置(トリマ アクセル)による成分分離—

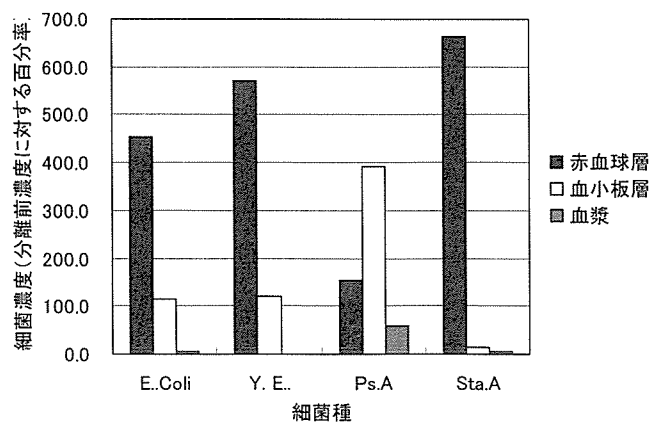


図3. Sensi Media を用いた細菌増殖検査結果－BACTECとの比較－

|   |                                   |
|---|-----------------------------------|
| ① | <i>Staphylococcus epidermidis</i> |
| ② | <i>Escherichia coli</i>           |
| ③ | <i>Klebsiella pneumoniae</i>      |
| ④ | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>     |
| ⑤ | <i>Serratia marcescens</i>        |

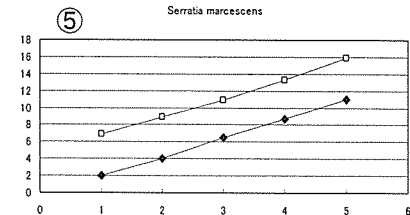
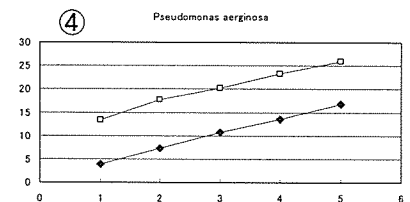
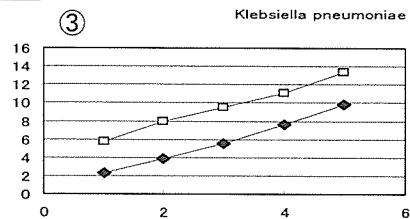
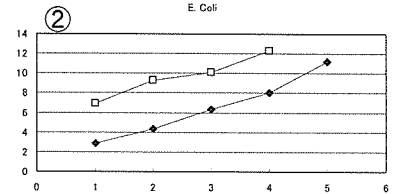
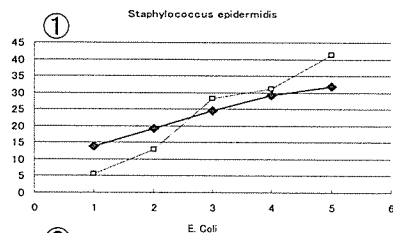
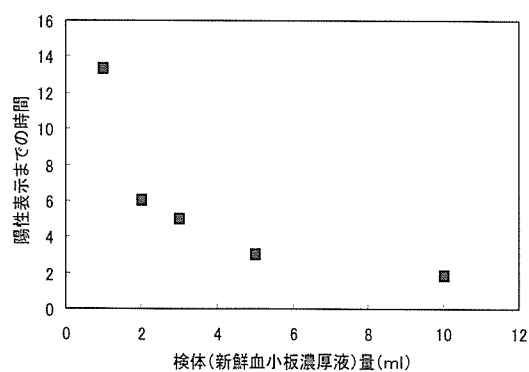


図4. Sensi Media を用いた検査結果

CO<sub>2</sub>産生物質としての血小板濃厚液の量と検出時間



| 検体血小板濃厚液の血算値、および細菌検査 |             |           |        |             |          |
|----------------------|-------------|-----------|--------|-------------|----------|
| WBC(個/cmm)           | RBC(万個/cmm) | HGB(g/dl) | HCT(%) | PLT(万個/cmm) | 細菌数(/ml) |
| 2                    | 4           | 0         | 0.1    | 154.2       | 0        |



表1. 血小板成分採血時における接種細菌の動態

| 血小板<br>採血通<br>し番号 | 血算値        |      |          |                     | 血小板濃厚<br>液採取量(m<br>l) | 処理量(ml) | 細菌種                        | 細菌数(CFU/0.1ml) |       |       |        |
|-------------------|------------|------|----------|---------------------|-----------------------|---------|----------------------------|----------------|-------|-------|--------|
|                   | 台成血(成分採血前) |      | 採取血小板浮遊液 |                     |                       |         |                            | 全血(分離前)        | 血漿成分  | 血小板層  | 赤血球層   |
|                   | WBC        | HCT  | PLT      | PLT                 |                       |         |                            |                |       |       |        |
| 1                 | 59.8       | 52.9 | 31.7     | 溶血でspill overとなり中止。 | :*                    | :*      | Escherichia coli           | 2250           | 6     |       |        |
| 2                 | 63.4       | 38.3 | 25       | 103.6               | :*                    | :*      |                            | 55000          | 6250  | 16250 | 100000 |
| 3                 | 40.6       | 46.6 | 15.3     | 137.2               | 40                    | 699     |                            | 12500          | 10    | 800   | 100000 |
| 4                 | 53.3       | 35.9 | 17.5     | 120.7               | 10                    | 52      |                            | 475            | 22.67 | 2583  | 6100   |
| 5                 | 47.2       | 39   | 20.5     | 58.3                | 46                    | 763     | Yersinia enterocolitica    | 3.5            | 0     | 1     | 50     |
| 6                 | 77.4       | 50.8 | 26       | 123.8               | :*                    | :*      |                            | 9              | 0     |       |        |
| 7                 | 47.9       | 39.9 | 24.3     | 142                 | 45                    | 739     |                            | 7500           | 26    | 5000  | 2200   |
| 8                 | 62.1       | 38.5 | 28.7     | 91.4                | 22                    | 525     |                            | 150            | 1     | 400   | 600    |
| 9                 | 48         | 38.4 | 21.5     | 104.5               | 28                    | 583     | Pseudomonas aeruginosa     | 45000          | 22500 | 無数    | 100000 |
| 10                | 77.4       | 38.7 | 22.9     | 108.3               | 22                    | 529     |                            | 13500          | 5500  | 21000 | 22500  |
| 11                | 363        | 69.3 | 8.5      | 113.5               | 40                    | :*      |                            | 5383           | 10667 | 25000 | 4017   |
| 12                | 60.9       | 39.3 | 22.6     | 溶血でspill overとなり中止。 | 12                    | 141     |                            | 18700          | 245   |       | 5200   |
| 13                | 59.9       | 41.8 | 28.8     | (spill over傾向)34.8  | 20                    | 507     | Staphylococcus epidermidis | 2942           | 226   | 483   | 29500  |
| 14                | 43.1       | 41.9 | 22.4     | 112.6               | 41                    | 705     |                            | 7075           | 127   | 817   | 22867  |

\*: 記録なし。

網掛け: 測定不能

表2. 血小板成分採血時における接種細菌種別の濃縮程度

| 細菌種                               | 血小板採血通し番号 | 処理前血液に対する細菌濃度比率(%) |       |        |
|-----------------------------------|-----------|--------------------|-------|--------|
|                                   |           | 血漿                 | 血小板層  | 赤血球層   |
| <i>Escherichia coli</i>           | 2         | 11.4               | 29.5  | 181.8  |
|                                   | 3         | 0.1                | 6.4   | 800.0  |
|                                   | 4         | 4.6                | 543.8 | 1284.2 |
|                                   | 平均        | 5.3                | 115.9 | 453.0  |
| <i>Yersinia enterocolitica</i>    | 5         | 0                  | 28.6  | 1428.6 |
|                                   | 7         | 0.3                | 66.7  | 29.3   |
|                                   | 8         | 0.7                | 266   | 400    |
|                                   | 平均        | 0.33               | 120.4 | 571.6  |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>     | 9         | 50                 | 500   | 222.2  |
|                                   | 10        | 40.7               | 155.6 | 166.7  |
|                                   | 11        | 198.2              | 464.4 | 74.6   |
|                                   | 平均        | 57.8               | 393   | 154.5  |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> | 13        | 7.7                | 16.4  | 1002.7 |
|                                   | 14        | 1.8                | 11.5  | 323.2  |
|                                   | 平均        | 4.7                | 14    | 663    |

表3. 細菌接種血小板濃厚液のpH変化とその観測

| 検査検体                          |            |             | 検査結果 |       |        |               |
|-------------------------------|------------|-------------|------|-------|--------|---------------|
| ハanks細胞培養液量<br>(Phenol Red含有) | 血小板濃厚液 * 1 |             | 直後   | 48時間後 |        | pH            |
|                               | 添加量        | 細菌接種の有無 * 2 | 色調   | 色調    | (色パネル) | pHメーター<br>試験紙 |
| 2ml                           | 0. 1ml     | 有り          | 赤    | 橙     | 60%    | 7.2<br>7      |
| 2ml                           | 0. 1ml     | 無し          | 赤    | 薄赤    | 90%    | 7.4<br>7.3    |
| 2ml                           | 0. 5ml     | 有り          | 橙    | 黄     | 20%    | 6.8<br>6.6    |
| 2ml                           | 0. 5ml     | 無し          | 橙    | 黄     | 30%    | 7<br>6.9      |

\* 1. 血小板濃厚液の血算値

| WBC(個/cmm) | RBC(万個/cmm) | HGB(g/dl) | HCT(%) | PLT(万個/cmm) |
|------------|-------------|-----------|--------|-------------|
| 2          | 6           | 0         | 0.2    | 135.7       |

\*2. 接種細菌の種類と濃度

種類: *Escherichia coli*

濃度: 約50万個/ml

表4. SensiMediaによる細菌検査－BACTECとの比較－

| 測定条件       |       |      | 陽性時間 *     |                                   |                |                              |                               |                            |
|------------|-------|------|------------|-----------------------------------|----------------|------------------------------|-------------------------------|----------------------------|
| 培養方法       | 細菌浮遊液 | 孵置温度 | 接種菌数(個/ml) | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | <i>E. Coli</i> | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | <i>Serratia marcescens</i> |
| BACTEC     | 5ml   | 35℃  | 12500000   | 5.51                              | 2.84           | 2.33                         | 3.83                          | 2.01                       |
|            |       |      | 250000     | 13.01                             | 4.35           | 3.83                         | 7.34                          | 4.02                       |
|            |       |      | 5000       | 28.2                              | 6.37           | 5.51                         | 10.68                         | 6.52                       |
|            |       |      | 100        | 31.03                             | 8.05           | 7.67                         | 13.51                         | 8.69                       |
|            |       |      | 2          | 41.42                             | 11.22          | 9.84                         | 16.73                         | 11.02                      |
| SensiMedia | 1ml   |      | 12500000   | 13.9                              | 6              | 5                            | 13                            | 6                          |
|            |       |      | 250000     | 19.1                              | 9              | 7                            | 17                            | 8                          |
|            |       |      | 5000       | 24.5                              | 10             | 9                            | 20                            | 10                         |
|            |       |      | 100        | 29.1                              | 12             | 11                           | 23                            | 13                         |
|            |       |      | 2          | 31.8                              |                | 13                           | 25                            | 15                         |

＊：生理食塩に浮遊した各濃度細菌浮遊液を検体に使用した