

## 5) 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)

## 6) 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°Cで培養した後に形成された細菌コロニー数を測定して、1 mL当たりの細菌数を求めた。

## 7) 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。

## 8) CO<sub>2</sub>センサーによる細菌検出

定性試験用呈色反応方式細菌検査用具センシメディア（Sensi Media®、マイクロバイオ社、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>ガスセンサーが試験管に封入された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。

測定用検体には、生理食塩水に浮遊した細菌浮遊液、または、無菌的に製造した血小板濃厚液を使用した。

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、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、マイクロバイオ社、東京）を用いて、35°C、あるいは22°Cに孵置して測定した。

本来のセンシメディアに内蔵されているCO<sub>2</sub>センサーは、その素材が5 Nで示される感度の高いものであるが、感度調節のために取って感度を下げた8 Nを素材にしたセンシメディアも測定に使用した。また、血小板のCO<sub>2</sub>代謝が直接にCO<sub>2</sub>センサーの届きにくいように、血小板を吸着剤に吸着させて測定することも試みた。

## 9) BACTECによる細菌検出

センシメディアの細菌検出感度を比較するために、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生理食塩水浮遊細菌液を検体として各5 mL添加した。測定結果は、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) 細菌接種した全血の白血球除去フィルター処理後細菌数

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。接種細菌には、*Escherichia coli*、*Pseudomonas aeruginosum*、*Yersinia enterocolitica*、*Staphylococcus aureus*の4菌種を用いた。白血球除去フィルター処理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1）。図1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に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。

#### 2) 細菌接種した血小板濃厚液の白血球除去フィルター処理後細菌数

同様に、血小板濃厚液に、*Escherichia coli*、*Pseudomonas aeruginosum*、*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2）。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。

#### 3) 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*Serratia marcescens*を用いて測定すると、図3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3）。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 aeruginosum*、*Yersinia enterocolitica*、*Staphylococcus epidermidis*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4の用に菌種によって菌の落下程度が異なっていた（図4）。図4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。

#### 4) 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らないようにした。合計14回の血小板採取を行ったが、そのうち

の2回（血小板採血通し番号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（血小板採血通し番号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/mm<sup>3</sup>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/mL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5）。*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5）。

## 5) 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/mL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2mLを使用し、試験管中で細菌接種後血小板濃厚液の0.1mL、または0.5mL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0.1mL添加よりも0.5mL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、細菌の存在がなくてもpHが変化することが考えられた。

## 6) CO<sub>2</sub>センサー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15mL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BACTEC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6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、BACTEC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かったが、低濃度ではBACTEC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*Staphylococcus epidermidis*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。

#### 7) 温度による検出時間の影響

4種類の細菌浮遊液を用いて、35℃、あるいは22℃における細菌検出時間を比較した。測定は、陽性の色調に変化するまでの時間を測定したが、時間測定はバイオマティック20を用いて、孵置温度を35℃、あるいは22℃に設定して時間を計測した。結果は、表6および図7に示すが、4種類の細菌株の全てにおいて、また、各濃度において、35℃孵置よりも22℃孵置では検出時間が延長した。

#### 8) 血小板濃厚液の代謝によるCO<sub>2</sub>産生と擬陽性表示

センシメディアの細菌検出は、細菌の代謝によって産生された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>も影響することが考えられる。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7と図8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。しかし、採血後74時間保管した血小板濃厚液では、検体量を3mlに増量しても擬陽性を呈することはなかった(表8、図9)。このことから、新鮮な血小板濃厚液を検体に用いた場合に偽陽性を示し易いことが確認された。

同様の実験を、従来のPOバッグより酸素やCO<sub>2</sub>ガス透過性に優れているPO-80馬ッグに保管した血小板濃厚液を用いて行った。結果は表9と図10に示すように、検体量を2mL以上に増量すると、採血後78時間保管した血小板濃厚液でも偽陽性を呈することが観察された。つまり、ガス透過性の改善した血小板濃厚液では長時間保管した後でも、新鮮な血小板に近い代謝が保持されて、相当量のCO<sub>2</sub>産生が維持されていることが示された。

### 9) CO<sub>2</sub>センサーの感度調節による偽陽性回避の試み

本来のセンシメディアに内蔵されているCO<sub>2</sub>センサーは、その素材が5 Nで示される感度の高いものであるが、感度の低い8 Nを素材にしたセンシメディアを作成して測定に使用した。また、血小板のCO<sub>2</sub>代謝が直接にCO<sub>2</sub>センサーに届きにくくするために、血小板を吸着剤に吸着させて測定することも試みた。これらの結果を表10と図11に示すが、新鮮な血小板を用いてもかわらず、血小板吸着剤を使用することにより、5 NのCO<sub>2</sub>センサーにおいて偽陽性を表示するまでの時間に延長が認められた。また、さらにCO<sub>2</sub>センサーを8 Nに変えることにより、2mL以下の検体量では、120時間の測定時間内での偽陽性表示が見られなかった(表10、図11)。

## 4. 考察

赤十字社血液センターでは、平成16年11月から血小板濃厚液製剤の貯血前白血球除去を行っているが、白血球除去の方法は、白血球除去フィルターを併用する方法(ヘモネティクス社、テルモ社)と、遠心法で白血球を除く方法(バクスター社、ガンプロ社)とが採用されている。

先ず、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1、図2)。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べきであろう。

次に、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。細菌接種した血液を試験管内で遠心分離して細菌の動態を調べたところ、*Escherichia coli*、*Pseudomonas aeruginosum*、*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た。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4)。血小板採血における成分採血装置の遠心力は、ヘモネティクス社で1400—2000 x G、テルモ社で1200-1700 x G、ガンプロ社で2400—3000回転、バクスター社で940 x G (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740 x G、3000回転で1670 x G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べきであろう。

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・集積するかは明らかになっていないことから、前記の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。ドナーの循環血液の代わりに

約800mLの合成全血を用いたが、成分採血はトリマ・アクセルを実際に使用して血小板を採血した。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、血漿層にも分離前全血濃度の約60%に残存していた。また、*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。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4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。このように、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。

現在の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と思われるものも検出されており、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CO<sub>2</sub>産生等もpHを変化させる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。このセンシメディアの細菌検出感度については、表4に示されるように、多くの菌で良好な感度を示し、検査した5菌株のうち4菌株では、2個/mLの少量の細菌浮遊液にても25時間以内で検出できた。また、孵置温度を室温の22℃に設定して同一検体を測定したが、検出時間がほぼ倍増するものの、一定の検出効果を示した。次に、この37℃における検出感度を比較するために、BacT/ALERTと同様に医療機関で血液培養用機器として汎用されている機器であるBACTECでも同一検体を測定したが、センシメディアでの細菌検出時間は、BACTECに比べて長くかかり、感度に於いてはBACTECが優っていた。この結果は、検体量がBACTECの5mLに対して、センシメディアが1mLのサンプリングで測定されていることを考慮すると、感度においては、BACTECに準ずる結果であると評価して良いと思われる。さらに、図6に示すように、比較的増殖速度の遅い菌である*Staphylococcus epidermidis*では、2個/mLから5000個/mLの細菌濃度の低い検体では、BACTECの方が遅い検出時間を示し

ていた。これは、BACTECはBacT/ALERTと同様に、細菌代謝の指標であるCO<sub>2</sub>増加や酸素の減少が、白血球等の血液細胞の代謝によるCO<sub>2</sub>増加や酸素の減少に左右されないように、指数関数的な変化を捉えた時点を検出時間として表示しているためであろう。この意味においては、センシメディアは、測定試験管内のCO<sub>2</sub>蓄積が規定の閾値に到達するとpHが変化してセンサーが変色する機序であるので、増殖が緩慢であっても一定量のCO<sub>2</sub>が産生された時点で検出できることの違いによるものと思われる。しかし、このことは、センシメディアは、血球細胞の代謝による偽陽性を生ずる危険性を示唆すると考えられる。

事実、センシメディアにおいては、無菌の血小板濃厚液で、その新鮮さや検体量に応じて敏感に偽陽性を呈することを確認した。つまり、表8や図9に示したように、採血後の期間が短いほど偽陽性を呈する時間が早く、血小板の代謝が活発なためであると想像される。このことは検体量が多いほど検出時間が早いことも一致する。然るに、血小板濃厚液を従来のPOバッグよりガス透過性の高いPO-80バッグに保管して同様の実験を行ったところ、表9と図10に示すように、採血後時間による偽陽性表示の時間延長の程度が現れ易くなっていた。このことは、PO-80バッグ保管により血小板の代謝が新鮮な時期に近い状態で維持されるようになっていたと想像される。図らずも、PO-80バッグの血小板保管効果が良いことを立証されるデータではあるが、センシメディアによる偽陽性提示という、検査特異性に欠ける問題をも再確認する結果となった。

これらの結果から、センシメディアの細菌検出感度は、BACTECに準ずる評価をすることができるものの、検査特異性については血小板濃厚液を検体とする場合には工夫を要する課題が残された。そこで、この偽陽性を改善させる目的で、センシメディ

アのCO<sub>2</sub>センサー感度を調節することを試みた。まず、血小板の代謝によるCO<sub>2</sub>産生の影響を直接受けにくくするために、血小板の吸着体を試験管内の液体培養液に挿入した。この結果、表10や図11に示されるように、従来のCO<sub>2</sub>センサーである5Nに血小板吸着体を添加すると、添加しなかった場合に比べて偽陽性を呈しにくくなり、同一検体量における偽陽性提示時間が延長した。また、CO<sub>2</sub>センサーを感度の低い8Nにしたところ、表10や図11のように、さらに偽陽性を呈する検体の必要量が増し、提示までの時間が延長した。このことから、センシメディアにおける偽陽性は、CO<sub>2</sub>センサーの感度を下げる方向で調節することにより、偽陽性を表示しにくくすることが出来た。これらの結果から、血小板濃厚液の添加量を一定以内にすることにより、偽陽性表示を防止することができる可能性が考えられた。図12に示すように、偽陽性は血小板の代謝で産生されたCO<sub>2</sub>の蓄積により生ずると考えられるため、CO<sub>2</sub>センサーの陽性表示閾値は図13に示すように、血小板由来のCO<sub>2</sub>に加えて細菌由来のCO<sub>2</sub>が蓄積された時に初めて感知する範囲に設定することが求められる。

センシメディアは他機器に比較して安価であり、経時的に各時間での陽性化の有無を判定でき、目視でも判定できることが大きな利点である。さらに、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た。現在は、スクリーキャップ付きの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、今後はバッグに収納することによって、チューブのSCD接続による閉鎖回路でのサンプリングへの改良工夫も期待したい。陽性の判定はCO<sub>2</sub>センサーの色調変化が顕著であることから、肉眼による目視も容易に判断できることも利点であり、サンプリング方法が改良されれば、臨床現場での検査も可能と思

われる。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と思われる。

米国ではBacT/ALERTを用いて全数細菌検査を行うことにより血小板製剤の使用期限を5日から7日に延長している。しかし、2007年のAABB年次総会では、これらの検査をすり抜けた細菌汚染例が報告され、今後は、保管期間中の複数回細菌検査が必要であるとの意見も聞かれた。これらの意見の成り行きには注目したいが、複数回の検査を実施するためには、製造施設とともに販売施設においても実施できる検査が必要となり、経済的に許容可能な範囲で実施出来ることが必要である。その意味では、センシメディアは利点が多く、期待できる検査方法であり、今後の工夫改良を模索したい。

## 5. 健康被害報告

健康被害など問題となる事例は発生しなかった。

## 6. 研究発表

(学会発表)

1. 浅井隆善. 初流血除去と血小板有効期限延長. 血液事業 30 (2)、第31回日本血液事業学会抄録集、シンポジウム(4)安全対策の進捗と今後、301、2007.
2. 浅井隆善、村瀬康子、伊村公良、服部隆夫、向後勝成. 血小板成分採取時に於ける混入細菌の動態. 血液事業 30 (2)、第31回日本血液事業学会抄録集、326、2007.
3. 浅井隆善、伊村公良、服部隆夫、向後勝成. : CO<sub>2</sub>センサー内蔵呈色反応方式細菌検査用具の血小板製剤無菌試

験への応用. 血液事業 30 (2)、第31回日本血液事業学会抄録集、327、2007.

4. Takayoshi Asai, Yasuhiko Fujii, Hitoshi Ohto. Evaluation of a New pH Indicator as a Detection Agent of Bacterial Contamination in Platelet Concentrates. Transfusion 47(3S), Abstract Presentations from 2007 Annual Meeting of AABB, p203A, 2007.
5. Takayoshi Asai, Yasuhiko Fujii, Hitoshi Ohto. Evaluation of a New pH Indicator as a Detection Agent of Bacterial Contamination in Platelet Concentrates. Vox Sanguinis 93 (Suppl 2), Abstract of the XVIIIth Regional Congress of the ISBT, p43-44, 2007.

## 7. 知的所有権の発生

なし。



図1. 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

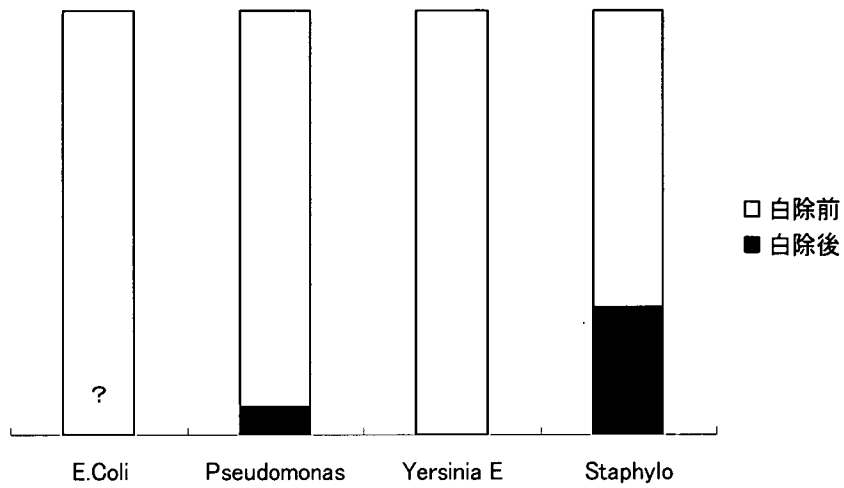


図2. 血小板濃厚液に接種された細菌数の  
白血球除去フィルターによる影響

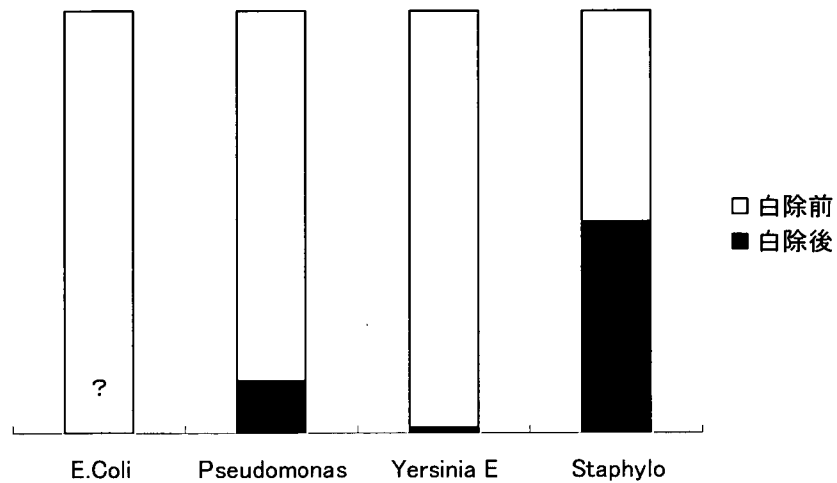


図3. 遠心分離回転数と血漿中細菌数

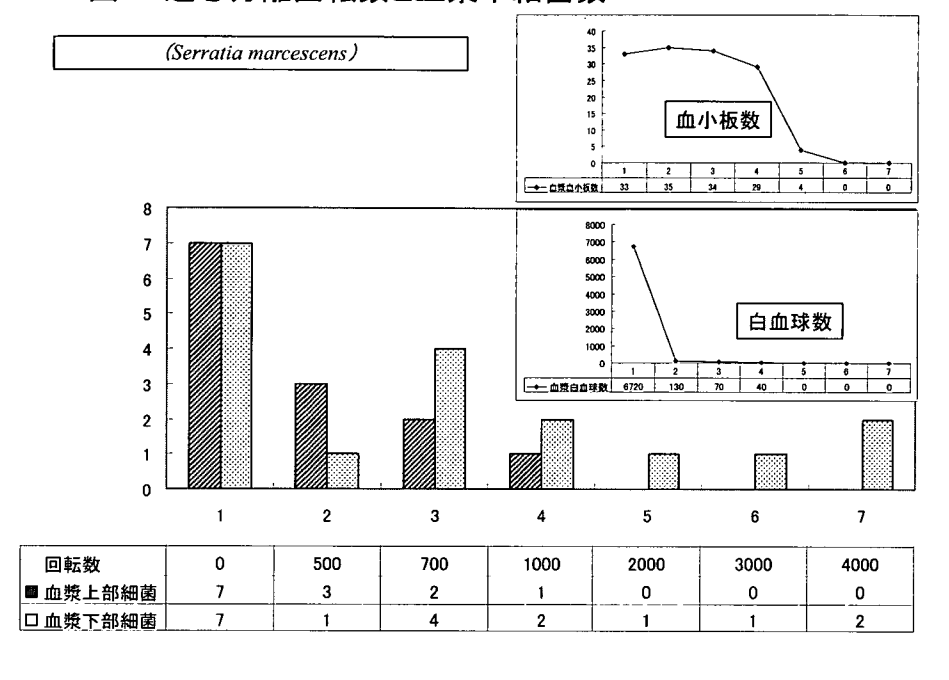


図4. 全血(合成新鮮血)に接種された細菌数の遠心分離による影響  
—試験管による遠心分離—

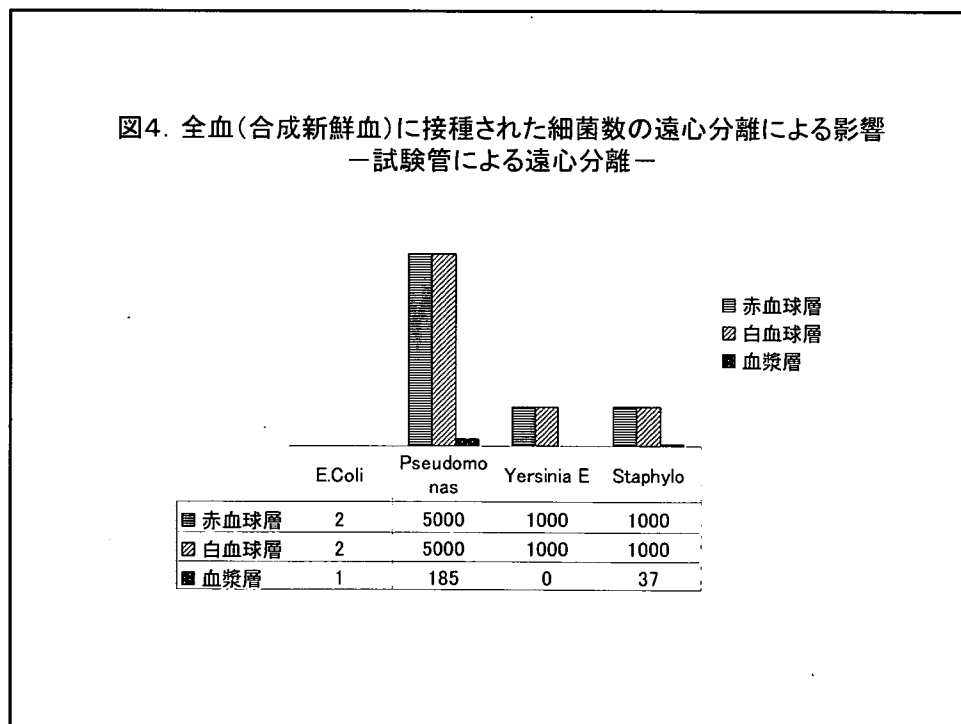


図5. 血小板成分採血時の接種細菌の動態  
 —成分採血装置(トリマ アクセル)による成分分離—

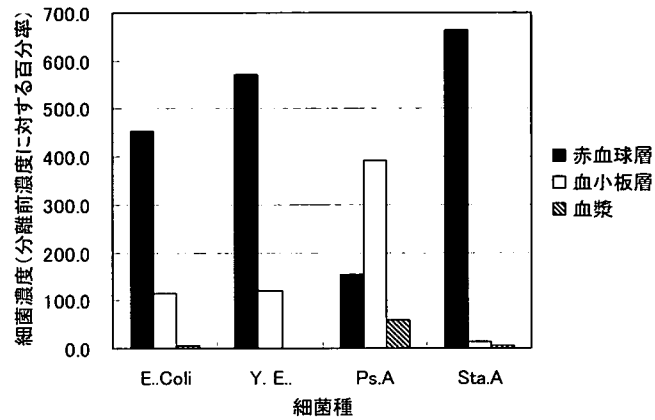


図6. Sensi Media を用いた細菌増殖検査結果—BACTECとの比較—

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

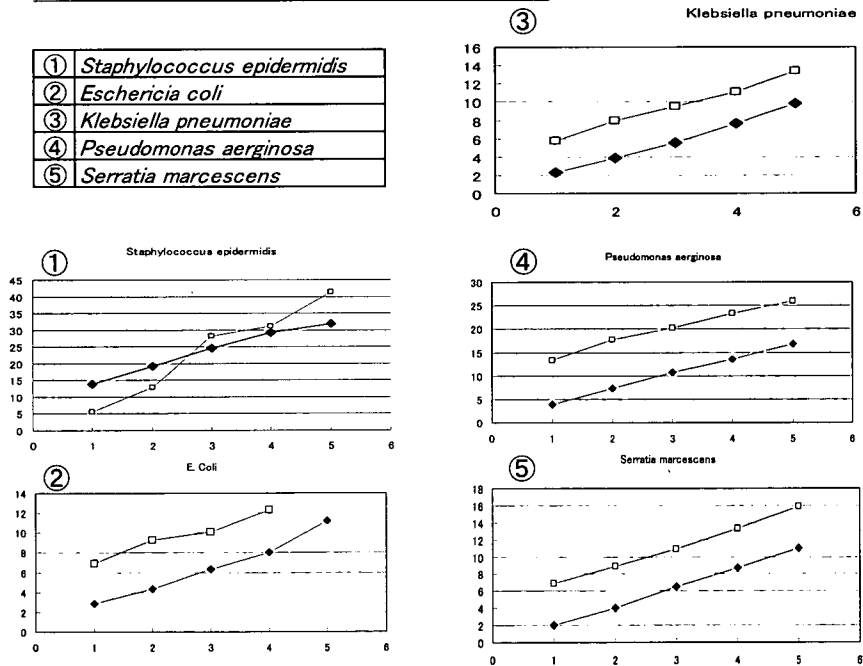


図7. 孵置温度の細菌検出時間への影響

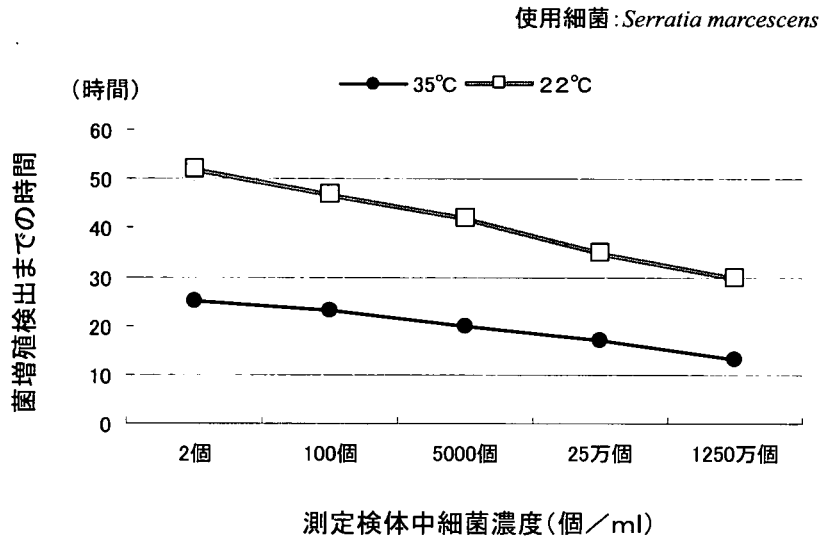
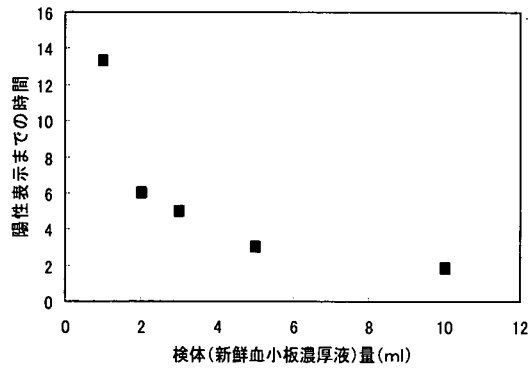


図8. Sensi Media を用いた検査結果

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

図9. SensiMedia測定における血小板代謝由来CO<sub>2</sub>の影響  
 —POバッグ保存—

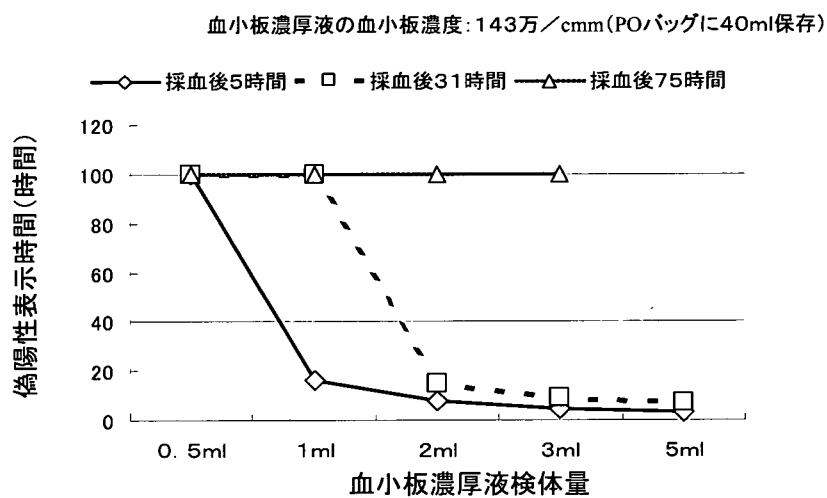


図10. SensiMedia測定における血小板代謝由来CO<sub>2</sub>の影響  
 —PO80バッグ保存—

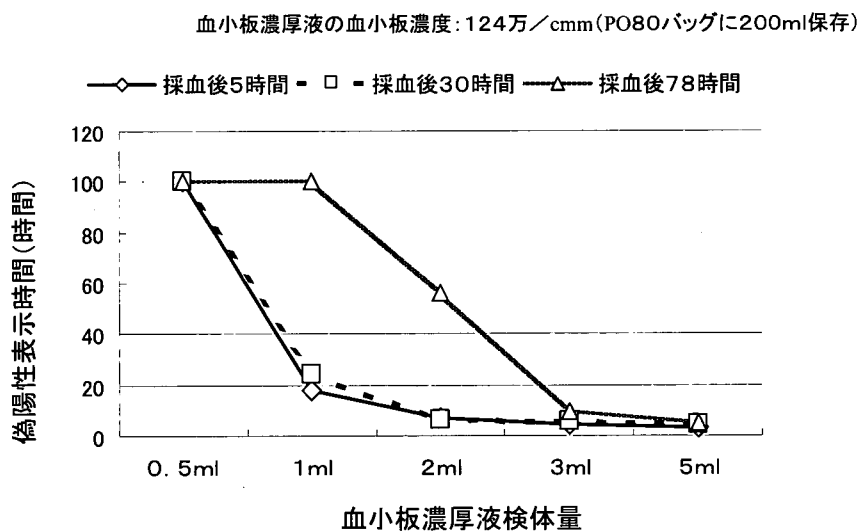


図11. CO2センサー感度の調整と血小板産生CO2による偽陽性表示の影響

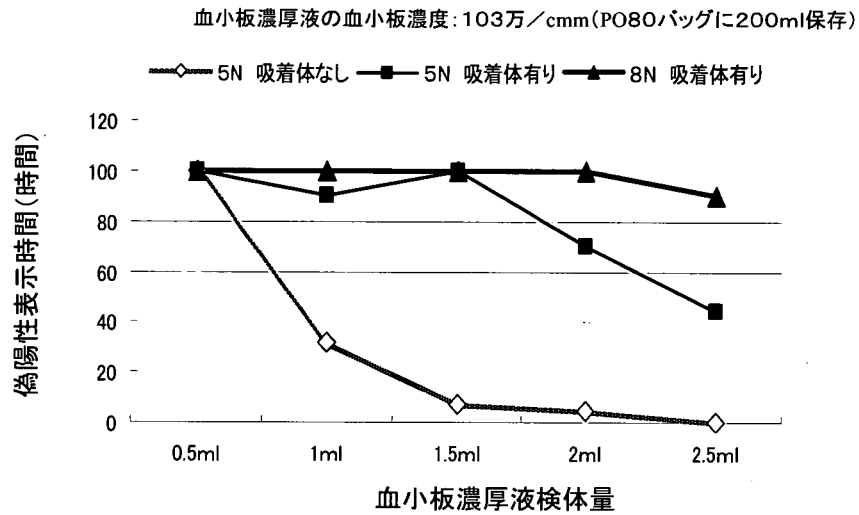


図12. 血小板代謝CO2による偽陽性表示の可能性

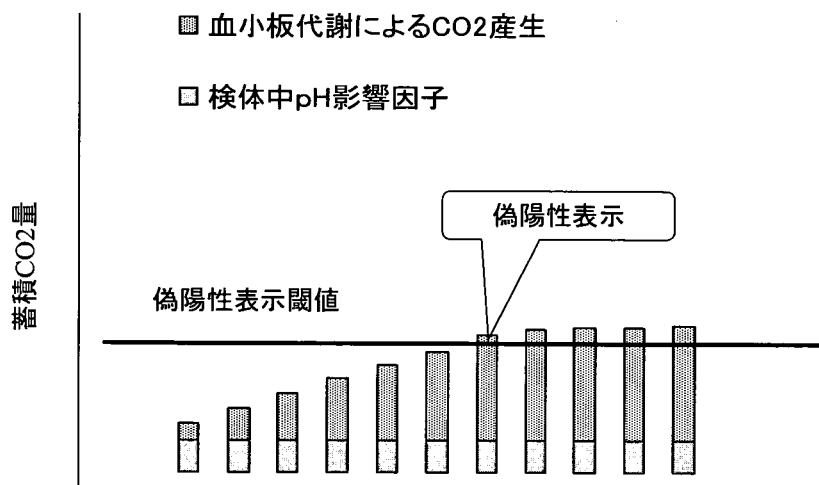


図13. 陽性表示適正閾値の設定に関する考え

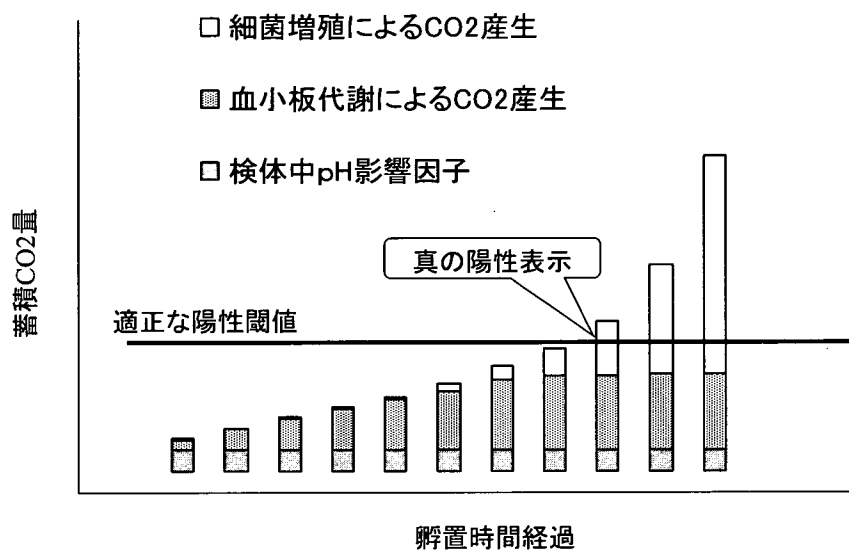


表1. 血小板成分採血時における接種細菌の動態

血小板 採血通 し番号	血算値				血小板濃厚 液採取量 (ml)	処理量 (ml)	細菌種	細菌数 (CFU/0.1ml)			
	全血 (成分採血前)		採取血小板浮遊液					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。	*	*		2250	6		
2	63.4	38.3	25	103.6	*	*	<i>Escherichia coli</i>	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		3.5	0	1	50
6	77.4	50.8	26	123.8	*	*	<i>Yersinia enterocolitica</i>	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	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	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	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	18700	245		5200
13	59.9	41.8	28.8	(spill over傾向) 34.8	20	507		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				
ハックス細胞培養液量 (Phenol Red含有)	血小板濃厚液 * 1		直後 色調	48時間後		pH
	添加量	細菌接種の有無 * 2		色調	(色パネル)	
2ml	0.1ml	有り	赤	橙	60%	7.2
2ml	0.1ml	無し	赤	薄赤	90%	7.4
2ml	0.5ml	有り	橙	黄	20%	6.8
2ml	0.5ml	無し	橙	黄	30%	7

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

\* 1. 血小板濃厚液の血算値

\* 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	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	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

表5. 細菌接種した血小板濃厚液のSensiMediaによる細菌増殖測定

細菌接種血小板濃厚液量 (ml) * 1, 2	孵置温度	陽性表示までの時間 (時間)
1	35度	12.2
0.5		14.4
0.2		20.03
0.1		22.4
1	室温	47.8

\* 1. 接種細菌の種類と濃度

種類: *Staphylococcus epidermidis*

濃度: 約50万個/ml

\* 2. 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	3	0	0.1	141.1