

臍帯血無菌試験における赤血球層検体の有用性

下垣 一成¹⁾ 堀江 芳典¹⁾ 池田 忠明²⁾ 藤井 浩²⁾ 平山 文也¹⁾
柴田 弘俊¹⁾ 松本加代子¹⁾

【目的】

日本さい帯血バンクネットワークに所属しているバンクでは、安全で有効な移植用臍帯血を提供するため、種々の検査項目について全数検査を実施している。無菌試験もその1つであり、感染症防止の観点からも重要な検査項目であるが、用いるサンプルの種類と量および培地がバンク毎に異なっており、統一化が望まれている。そこで、臍帯血への混入細菌を高率に検出する方法を見出すことを目的として、臍帯血中の細菌が調製工程においてどのように分布するのかを検討し、その結果を基に細菌が多く分布する部位を無菌試験検体として用いた場合の細菌検出率の評価を行なったので報告する。

【方法】

1. 臍帯血調製工程における細菌分布評価

京阪さい帯血バンクにおいて無菌試験で検出・同定された菌種並びに他のさい帯血バンクへの無菌試験に関するアンケート結果にその検出・同定が記載された菌種の中で、検出頻度が高く、かつ標準菌が入手可能であった7菌種(① *Escherichia coli*, ② *Enterococcus faecalis*, ③ *Streptococcus agalactiae*, ④ *Bacillus cereus*, ⑤ *Klebsiella pneumoniae*, ⑥ *Serratia marcescens*, ⑦ *Proteus vulgaris*)の菌を、各々対数増殖期において濃縮・小分けして-80℃で保存し、実験の都度解凍して用いた。臍帯血原料血液に上記菌を各々10⁴cfu/mlとなるよう接種してHES法による調製を行い、各工程の副産物(赤血球層、血漿層)および臍帯血最終標品中に含まれる細菌数を、コンパクトドライ「ニッスイ」(一般生菌測定用)(日水製薬)を用いて測定した。

2. 臍帯血無菌試験結果(後方視的解析)

京阪さい帯血バンクで調製した臍帯血1,201本について、チオグリコール酸培地およびソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地に赤血球層をそれぞれ5.0ml接種した群(赤血球層群)と臍帯血最終標品0.5mlを接種した群(臍帯血最終標品群)について14日間培養後の無菌試験陽性率を比較した。

【結果および結論】

各菌の赤血球層、血漿層、臍帯血最終標品への分布は、①(92.1%, 6.5%, 1.4%), ②(91.5%, 1.5%, 6.9%), ③(88.1%, 4.0%, 8.0%), ④(91.4%, 1.0%, 7.6%), ⑤(98.3%, 0.9%, 0.7%), ⑥(63.5%, 19.8%, 16.7%), ⑦(10.5%, 17.0%, 72.5%)であり、⑦の *Proteus vulgaris* 以外の細菌の大部分は赤血球層に分布することが明らかとなった。また、無菌試験の陽性率については、赤血球層群は3.5%であり、臍帯血最終標品群の1.2%と比較して細菌検出率が約3倍向上した。以上のことから、臍帯血調製工程中に細菌の大部分が移行する赤血球層を無菌試験用の検体として用いることで、より高率に移植用臍帯血中の混入細菌を検出できることが明らかとなった。しかし、菌種によってはその動態が異なり、移植用臍帯血の半製品である臍帯血最終標品に多く分布する細菌(*Proteus vulgaris*)も確認されたこと、また、調製工程における無菌性担保の観点からも、移植用臍帯血の無菌試験用検体としては赤血球層と臍帯血最終標品の両方を用いることが望ましいと考えられた。

キーワード：無菌試験, 臍帯血, 細菌

はじめに

日本さい帯血バンクネットワークに所属している各

バンクでは、安全で有効な移植用臍帯血を提供するため、母体血とともに移植用臍帯血全数について種々の

1) 大阪府赤十字血液センター

2) 京都府赤十字血液センター

[受付日：2008年3月7日, 受理日：2008年12月24日]

検査を実施しており、無菌試験もその一つである。臍帯血の無菌試験で同定された菌と臍帯血移植後の最大の死因である細菌感染症において検出された菌^{1)~6)}とでは、菌種がかなり異なっているが一部共通する菌もあり、日本さい帯血バンクネットワークでは、最終標品全数について無菌試験を実施するように定めている。しかしながら基準書⁷⁾においては同試験方法について明確に記述されておらず、各バンクにより用いる検体の量および培地が異なっている。現在、各バンクで実施している無菌試験については、多くのバンクで臍帯血最終標品の一部を無菌試験用の検体としているが、その検体量としては、移植細胞数の目減りを防ぐためにやむを得ない部分はあるが、0 (バッグリンス分) ~1.0 ml とごく少量である。我々は、臍帯血中に混入した細菌を高率に検出できる無菌試験法を見出すことを目的として臍帯血調製工程における細菌分布率の検討を行い、赤血球層への細菌分布率が高いことを明らかにした。さらに、その赤血球層を検体に用いた場合、従来の臍帯血最終標品を検体にしたときに比べ格段に細菌検出率が上がることが実証出来たので、これら検討結果について報告する。

材料及び方法

1. 臍帯血調製工程における細菌の分布

(1) 材料

1) 臍帯血原料血液

京阪さい帯血バンクに提供された臍帯血のうち、有核細胞数不足により調製不可となった採血後24時間以内の臍帯血を用いた。

2) 細菌

京阪さい帯血バンクまたは他のさい帯血バンクで調製した臍帯血の無菌試験において検出・同定された菌種の中から検出頻度が高く、入手が可能な以下に記す7菌種の標準菌(大阪府立公衆衛生研究所より分与)を選択して用いた。それらの標準菌を培養後、対数増殖期に濃縮してDMSO(終濃度10%)を添加し、小分したものを凍結保存(-80℃)した。試験に使用する時はその都度解凍して細菌数が 10^4 colony forming units (cfu)/mlになるように臍帯血原料血液に接種した。検体数は各菌種につき3例ずつとした。

- ① *Escherichia coli* (16H-238)
- ② *Enterococcus faecalis* (ATCC19433)
- ③ *Streptococcus agalactiae* (ATCC12386)
- ④ *Bacillus cereus* (BC95-001)
- ⑤ *Klebsiella pneumoniae* (16H-239)
- ⑥ *Serratia marcescens* (16H-219)
- ⑦ *Proteus vulgaris* (16A-82)

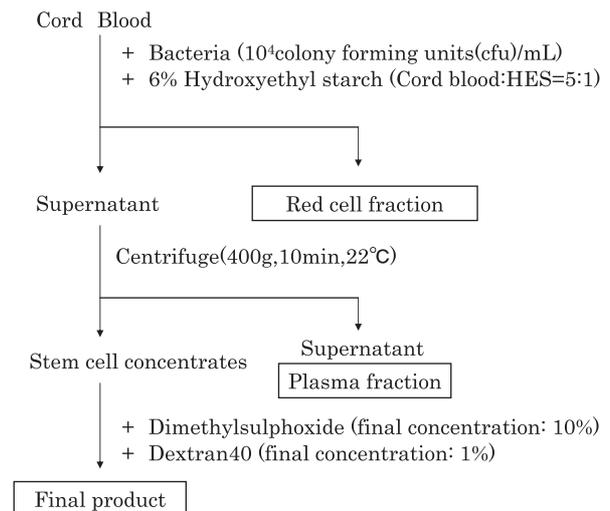


Fig. 1 Processing of cord blood.

(2) 方法

臍帯血原料血液に前述の7菌種の標準菌を最終的に 10^4 cfu/mlとなる様にしてRubinstein⁸⁾らの方法(HES法)に従い有核細胞の濃縮調製作業を行った(Fig. 1)。標準菌を接種した臍帯血に1/5容量の赤血球沈降剤HES 40(NIPRO)を添加し、充分に混和後90分間静置した。赤血球層と上清の分離を確認後、上清を分離バッグCBP-20D(NIPRO)に回収して、遠心分離(400G, 10min, 22℃)を行い、液量が21mlになる様に上清(血漿層)を除去して沈層の有核細胞を再浮遊させた。細胞浮遊液を保冷剤(約4℃)に挟み、攪拌しながらDMSO:Cryoserv(NIPRO)と10%DextranD40(TERUMO)を等量混合した凍害保護液5.6mlをシリンジポンプを用いて20ml/hの速度で添加した。これらの臍帯血調製工程で産生された副産物(赤血球層、血漿層)および臍帯血最終標品1mlをコンパクトドライ「ニッスイ」(一般生菌数測定用)(日水製薬)に滴下して加え、 $35 \pm 2^\circ\text{C}$ の恒温槽内で48時間培養した。本培地は標準寒天培地の栄養素をベースにした一般生菌数測定用の培地であり、培地中に含まれる酸化還元系指示薬であるテトラゾリウム塩が発育した多くの集落を赤色に発色させることから、その赤色集落を計数し、容量を乗じて各層への細菌分布率を求めた。

2. 臍帯血無菌試験の後方視的解析

(1) 対象

2005年2月1日から2007年10月31日までの期間に京阪さい帯血バンクで調製し、仮保存した臍帯血1,201本を対象とした。

(2) 方法

上記臍帯血調製工程中に産生された赤血球層を5mlずつ(赤血球層群)と移植用臍帯血の半製品である臍帯血最終標品を0.5mlずつ(臍帯血最終標品群)をチオ

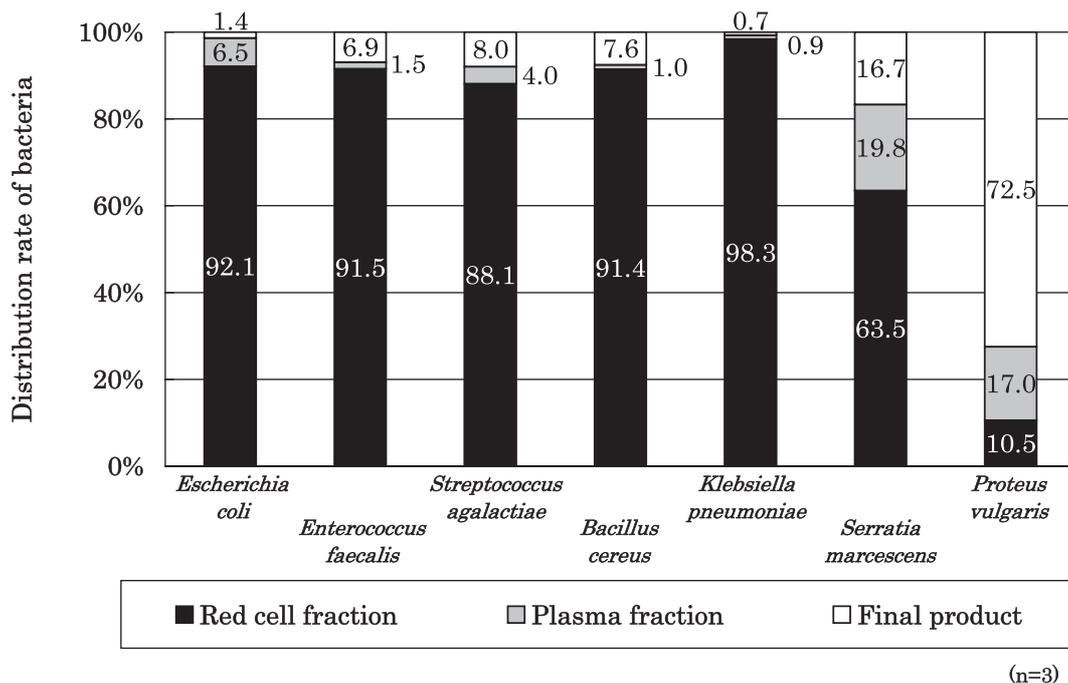


Fig. 2 Distribution of bacterial inoculation in cord blood processing.

Bacterial recovery (red cell fraction + plasma fraction + final product) from cord blood after bacterial inoculation
Escherichia coli: 12%, *Enterococcus faecalis*: 24%, *Streptococcus agalactiae*: 38%, *Bacillus cereus*: 85%, *Klebsiella pneumoniae*: 91%, *Serratia marcescens*: 48%, *Proteus vulgaris*: 62%

グリコール (TG) 酸培地 (日赤無菌試験用変法チオグリコール酸培地「栄研」)およびソイビーン・カゼイン・ダイジェスト (SCD) 培地 (日赤無菌試験用ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地「栄研」)に接種し、14日間培養した結果を比較した。また、採取施設別の無菌試験陽性率についても比較検討を行った。

結 果

1. 臍帯血調製工程における細菌分布の分析

7種類の標準菌を別個に接種した臍帯血原料血液(各菌種につき、n=3)をHES法により調製した際の各細菌の分布率をFig. 2に示した。

Klebsiella pneumoniae を接種した臍帯血原料血液については、ほとんど(98.3%)の菌が赤血球層に分布し、血漿層および臍帯血最終標品中への菌の分布はそれぞれ1%未満であった。*Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus agalactiae*, *Bacillus cereus* の4菌種についても、約90%の菌が赤血球層に分布し、血漿層および臍帯血最終標品中への分布は、各々1.0~6.5%, 1.4~8.0%であった。*Serratia marcescens* については赤血球層への分布は63.5%, 血漿層, 臍帯血最終標品中へは、各々19.8%, 16.7%分布した。*Proteus vulgaris* については他の菌種と分布が大きく異なった。同菌種の場合、赤血球層, 血漿層への分布はそれぞれ10.5%, 17.0%に留まり、大部分(72.5%)が移植用臍帯血の半

Table 1 Relative distribution of representative bacteria in each fraction.

Species of bacteria	Red cell fraction (5ml)	Plasma fraction (5ml)	Final product (0.5ml)
<i>Escherichia coli</i>	337	24	
<i>Enterococcus faecalis</i>	66	1	
<i>Streptococcus agalactiae</i>	55	2	
<i>Bacillus cereus</i>	60	1	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	686	7	
<i>Serratia marcescens</i>	19	6	
<i>Proteus vulgaris</i>	1	1	

製品である臍帯血最終標品に移行した。

上記の結果を基に、臍帯血調製工程で産生される赤血球層, 血漿層, 臍帯血最終標品の液量をそれぞれ平均的な値である50ml, 50ml, 25mlと仮定し、各々の検体5ml, 5ml, 0.5mlを無菌試験用に用いた場合に、臍帯血最終標品に含まれる細菌数を1としたときの各検体中に含まれる細菌数割合を試算すると、Table 1の結果となる。臍帯血最終標品中への分布割合が高い*Proteus vulgaris*においても、使用可能な検体量に10倍の違いがあるため、赤血球層を用いた場合も臍帯血最終標品とほぼ同数の細菌が検出可能となる。他の菌種の場合には赤血球層への移行が大きいため、同層を検体に用いることにより、従来の臍帯血最終標品を用いた場合に比べて約20倍から700倍、検出感度が上昇

Table 2 Detection ratio in red cell fraction and final product.

Samples tested	Number of samples tested	Number of samples contaminated	Detection ratio (%)
Red cell fraction (5.0ml×2)	1,201	42	3.5
Final product (0.5ml×2)	1,201	15	1.2

する。すなわち、赤血球層を無菌試験用検体とすることで臍帯血中に混入した細菌検出率が飛躍的に上昇することが予想される結果が得られた。

2. 臍帯血無菌試験の後方視的解析

先の結果を踏まえ、京阪さい帯血バンクでは2005年2月から無菌試験用の検体として臍帯血最終標品(0.5ml×2)に加え、調製工程中に産生される副産物である赤血球層(5.0ml×2)についても同検査の検体として用いることにした。2005年2月1日から2007年10月31日までの期間に仮保存した1,201例についての両群の無菌試験結果をTable 2に示す。

臍帯血最終標品群の無菌試験陽性率は1.2%であったが、赤血球層群の同陽性率は3.5%であり、後者を検体に用いることにより細菌検出率が3倍上昇した。いずれかで無菌試験結果が陽性となった43例について、その詳細をTable 3に示す。無菌試験用検体として赤血球層を用いた場合のみ同試験結果が陽性であった事例は28例であり、一方、臍帯血最終標品を用いた場合のみ陽性となった事例は1例(Case No.3)であった。なお、赤血球層のみで陽性となった事例の中から8例について保存臍帯血を解凍し、チオグリコール(TG)酸培地(日赤無菌試験用変法チオグリコール酸培地「栄研」)およびソイビーン・カゼイン・ダイジェスト(SCD)培地(日赤無菌試験用ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地「栄研」)に接種限度上限である5mlの保存臍帯血を接種することにより全て無菌試験陽性となった(data not shown)。Table 4に、採取施設別に無菌試験陽性率を集計した結果を示す。採取施設により同試験陽性率は0~9.4%の幅があり、明らかな施設間格差が認められ、採取数の最も多いa施設の無菌試験陽性率は0%であった。

考 察

臍帯血の調製は、採取後24時間以内に開始され、約3時間後には凍結されて移植直前に解凍されるまで-196℃の液体窒素中で保存されるため、採取時に菌が混入しても調製・保存工程中で菌が増殖する可能性は極めて低い。日本さい帯血バンクネットワークでは移植用臍帯血の安全性について最善を期すため、移植片と同じ成分の最終標品全数についての無菌試験を定めている。

しかしながら、基準書に定められている無菌試験の検体および方法についての記述は曖昧であり、検体量を増やせば検出感度は上昇するが、その分移植可能な細胞数が目減りすることもあり、各バンクすべて異なる方法で無菌試験が実施されているのが実状である。我々は移植用臍帯血への混入細菌をより高率に検出できる無菌試験法を見出し、その科学的データを提供することで臍帯血無菌試験の統一化に寄与したいと考え、標準菌接種による調製工程中の細菌分布分析実験を実施した。その結果、副産物である赤血球層を無菌試験用検体に用いることで細菌検出率が飛躍的に上昇することを予測する結果が得られ、約2年間にわたる実地の無菌試験結果により、それを実証することが出来た。A. Honohanら⁹⁾は、臍帯血の調製工程中に産生される赤血球層と血漿層を等量混合したものを20ml以上用いて無菌試験を行なうことで幹細胞をロスすることなしに細菌汚染を検出することが出来ると報告している。しかし、我々の検討では、菌種により調製工程中の移行特性が異なり、臍帯血最終標品中に多く分布する細菌(*Proteus vulgaris*)が認められたこと、また、43例中1例と頻度は非常に低いが、臍帯血最終標品を同試験の検体として用いた場合にのみ菌が検出された事例が認められていること、さらに、調製最終工程までの無菌性の担保という観点からも、移植用臍帯血の無菌試験用検体としては調製工程中に分離される副産物(赤血球層および血漿層)のみでは不十分であると考え、移植用臍帯血の無菌試験用検体として、臍帯血への混入細菌をより高率に検出するために、臍帯血最終標品と赤血球層の両検体の使用を提唱したい。

移植用臍帯血の無菌性を担保するためには、細菌の検出感度を上げることと合わせて臍帯血への細菌混入を防ぐことが重要である。採血方法が類似している輸血用血液製剤の無菌試験陽性率が0.01~0.04%¹⁰⁾であることを考慮すると、臍帯血における無菌試験陽性率3.6%という数字は約90倍~360倍に相当するものであり、極めて高率である。当バンクにおいて臍帯血の無菌試験により最も多く検出された菌種については、*Streptococcus agalactiae*をはじめとする*Streptococcus*属の細菌であり、同菌を含めその大半が腸内細菌であった(Table 3)。このことは、出産時に糞便等から臍帯表面が汚染され、臍帯血採取時に消毒が不十分であった場

Table 3 Difference among collection hospitals in the frequency of contaminated cord blood samples.

Case No	Red cell fraction (5ml×2)		Final product (0.5ml×2)	
	TG	SCD	TG	SCD
Case1	<i>Peptostreptococcus prevotii</i>		<i>Peptostreptococcus prevotii</i>	
Case2	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>			
Case3			<i>Actinomyces naeslundii</i> <i>Mobiluncus sp.</i>	
Case4	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>			
Case5	<i>Mobiluncus sp.</i> <i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Mobiluncus sp.</i>	
Case6	<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>		
Case7	<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>		
Case8	<i>Prevotella bivia</i>		Glam-positive rods	
Case9	<i>Clostridium sp.</i> <i>Bacteroides vulgatus</i>		<i>Bacteroides vulgatus</i> <i>Peptostreptococcus sp.</i>	
Case10	<i>Staphylococcus epidermidis</i> Glam-positive rods		<i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Bifidobacterium adolescentis</i>	
Case11	Glam-negative rods			
Case12	n.t.		n.t.	
Case13	n.t.	<i>Escherichia coli</i>		
Case14	n.t.		n.t.	
Case15	<i>Peptostreptococcus sp.</i>			
Case16	<i>Mobiluncus sp.</i>		Glam-negative rods	
Case17		<i>Escherichia coli</i>		
Case18	<i>Eubacterium sp.</i> <i>Bacteroides fragilis group</i>			
Case19	Glam-positive rods			
Case20	<i>Prevotella sp.</i>			
Case21	<i>Lactobacillus sp.</i>			
Case22	<i>Actinomyces sp.</i>		n.t.	
Case23	n.t.			
Case24	<i>Prevotella melaninogenica group</i>	<i>Corynebacterium sp.</i>		
Case25	<i>Corynebacterium sp.</i>			
Case26	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>		<i>Pseudomonas sp.</i>
Case27	<i>Corynebacterium sp.</i>			
Case28	<i>Bacteroides fragilis group</i>		<i>Corynebacterium sp.</i>	
Case29	<i>Corynebacterium sp.</i>			
Case30	<i>Streptococcus sp.</i>	<i>Strep.millieri group</i>		
Case31	<i>Lactobacillus sp.</i>		<i>Bacteroides sp.</i>	
Case32	α - <i>Streptococcus</i> <i>Bacteroides fragilis group</i>			
Case33	<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>	n.t.	n.t.
Case34	<i>Streptococcus sp.</i>			
Case35	<i>Strep.millieri group</i> <i>Aspergillus sp.</i>			
Case36	n.t.			
Case37	<i>Bifidobacterium sp.</i>			
Case38	<i>Streptococcus sp.</i>			
Case39	<i>Lactobacillus sp.</i>			
Case40	<i>Lactobacillus sp.</i> <i>Actinomyces sp.</i>			
Case41	<i>Peptostreptococcus sp.</i>		<i>Peptostreptococcus sp.</i>	
Case42	<i>Lactobacillus sp.</i>			
Case43	<i>Lactobacillus sp.</i>			

■: Positive, □: Negative, n.t.: not tested

Table 4 Results of bacteria identification.

Hospital	Number of samples tested	Number of samples contaminated	Positive ratio (%)
a	231	0	0.0
b	208	5	2.4
c	181	6	3.3
d	149	8	5.4
e	85	4	4.7
f	87	3	3.4
g	83	7	8.4
h	63	5	7.9
i	38	2	5.3
j	30	0	0.0
k	32	3	9.4
l	9	0	0.0
m	3	0	0.0
n	1	0	0.0
o	1	0	0.0
Total	1,201	43	3.6

合に臍帯血汚染の原因となっていると考えられる。一方、無菌試験陽性率は、採取施設により0~9.4%と、明らかな施設間差が認められている (Table 4)。検査数 (仮保存数) が最も多い a 施設において無菌試験陽性事例が1例も認められていないことから、細菌混入の主たる発生場所は採取施設であり、臍帯血採取が不慣れな施設 (医師) において細菌汚染が発生していることが推測出来る。採取施設毎の無菌試験陽性率を常に把握し、陽性率の高い施設に対してはその都度結果をフィードバックし、穿刺時の消毒の徹底を促すなどの地道な教育訓練も臍帯血への細菌混入を防ぐ上で重要であると考えられる。京阪さい帯血バンクでは a 施設の消毒法—まず消毒用アルコール綿で臍帯を拭いて蛋白性の汚れを取り除いた後にポピドンヨード液を含ませたガーゼで拭き、ドライガーゼで水分を除いて穿刺する方法—を手順書に盛り込み、各施設にその徹底をはかることにより平成19年度の無菌試験陽性率は1.7%までに低下した (data not shown)。今後も採取施設と力を合わせてよりよい臍帯血提供に努めたい。

謝辞：今回の細菌接種実験を実施するにあたり、7菌種の標準菌を分与して頂いた大阪府立公衆衛生研究所の塚本定三先生、勝川千尋先生、有益なデータを提供頂いた東海臍帯血バンクの矢崎信先生、東京都赤十字血液センター臍帯血バンクの高梨美乃子先生をはじめとする各さい帯血バンクの関係者の皆様、そして大阪府赤十字血液センター調製分の無菌試験結果の判定をして頂いてい

る同センター品質部の皆様に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) 加藤俊一, 森慎一郎: 臍帯血を用いる造血幹細胞移植技術の高度化と安全性確保に関する研究 (研究課題 臍帯血移植後の感染症の検討). 厚生労働科学研究費補助金 ヒトゲノム・再生医療等研究事業研究協力報告書平成18年度総括・分担報告書, 2007, 73—74.
- 2) Van Burik JA, Brunstein CG: Infectious complications following unrelated cord blood transplantation. *Vox Sang*, 92 (4): 289—296, 2007.
- 3) Parody R, Martino R, Rovira M, et al: Severe infections after unrelated donor allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in adults: comparison of cord blood transplantation with peripheral blood and marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*, 12 (7): 734—748, 2006.
- 4) Laughlin MJ, Eapen M, Rubinstein P, et al: Outcomes after Transplantation of Cord Blood or Bone Marrow from Unrelated Donors in Adults with Leukemia. *N Engl J M*, 351: 2265—2275, 2004.
- 5) Rocha V, Labopin M, Sanz G, et al: Transplants of Umbilical-Cord Blood or Bone Marrow from Unrelated Donors in Adults with Acute Leukemia. *N Engl J M*, 351: 2276—2285, 2004.
- 6) Narimatsu H, Matsumura T, Kami M, et al: Bloodstream infection after umbilical cord blood transplantation using reduced-intensity stem cell transplantation for adult patients. *Biol Blood Marrow Transplant*, 11 (6): 429—436, 2005.
- 7) 日本さい帯血バンクネットワーク: 臍帯血品質管理基準書, 改訂第十版, 2007, 7—8.
- 8) Rubinstein P, Dobrila L, Rosenfield R E, et al: Processing and cryopreservation of placental/umbilical cord blood for unrelated bone marrow reconstitution. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92: 10119—10122, 1995.
- 9) Honohan A, Olthuis H, Bernards AT, et al: Microbial contamination of cord blood stem cells. *Vox Sang*, 82: 32—38, 2002.
- 10) 日本赤十字社中央血液センター医薬情報部: 輸血情報 0203-69, 2002.

USE OF RED CELL FRACTIONS INCREASES THE SENSITIVITY OF STERILITY TESTING OF CORD BLOOD UNITS

Kazushige Shimogaki¹⁾, Yoshinori Horie¹⁾, Tadaaki Ikeda²⁾, Hiroshi Fujii²⁾, Fumiya Hirayama¹⁾, Hirotohi Shibata¹⁾ and Kayoko Matsumoto¹⁾

¹⁾Japanese Red Cross Osaka Blood Center

²⁾Japanese Red Cross Kyoto Blood Center

Abstract:

To enhance the safety and efficacy of cord blood transplantation, the Japanese Cord Blood Bank Network recommends a number of tests for all cord blood units before preservation. However, as the guidelines are not particularly strict, methods and samples used in each bank differ, with an especially large difference in sterility testing. In this test, an increase in the amount of sample increases sensitivity, but on the other hand results in the loss of cells in the cord blood unit. We therefore attempted to determine whether by-products obtained in cell processing can be utilized for this test.

We selected seven kinds of standard strain of bacteria frequently isolated from cord blood. After adding each to the starting materials, we examined how they were distributed to two by-products, red cell fraction (RCF) and plasma fraction, and to the final product (FP). Quantitative analysis revealed that the majority (64-98%) of bacteria were distributed to RCF for six strains, but for one strain distribution to RCF was low (11%) and 73% were instead distributed to FP. Even in the latter case, the total number of bacteria in the test sample from RCF was more than that from FP because the volume of RCF able to be used for the test was 10 times greater than that of FP.

In accordance with the above findings, we have used RCF for sterility tests in addition to FP since February 2005. Detection rate of bacteria has consequently increased nearly three-fold (from 1.2% to 3.5%). However, in one rare case bacteria could be detected in FP but not in RCF (1/1,201). This finding confirms that the use of both RCF and FP samples for sterility testing is important for the safety of cord blood transplantation.

Keywords:

Cord blood, sterility test, bacteria