

図4. 細菌接種後24時間のフィルター－濾過効果

血小板濃厚液：採血後日数：4日、白血球数：200/mm³

フィルター部分：ミューラー－ヒュントン液12mlで洗浄

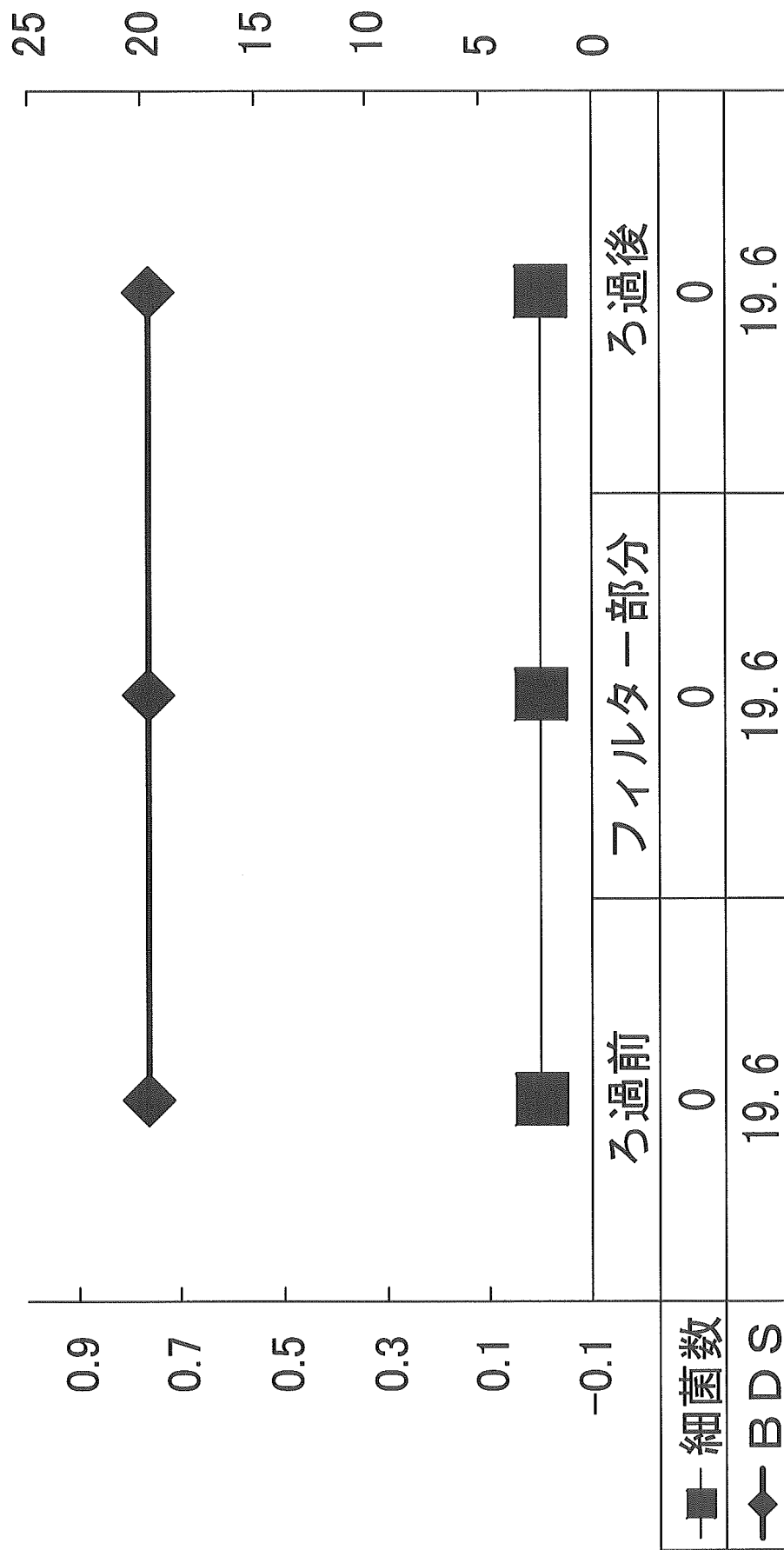


図5. 接種後24時間濾過の24時間後細菌数

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：ミュラーヒュントン液12mlで洗浄、
室温24時間静置

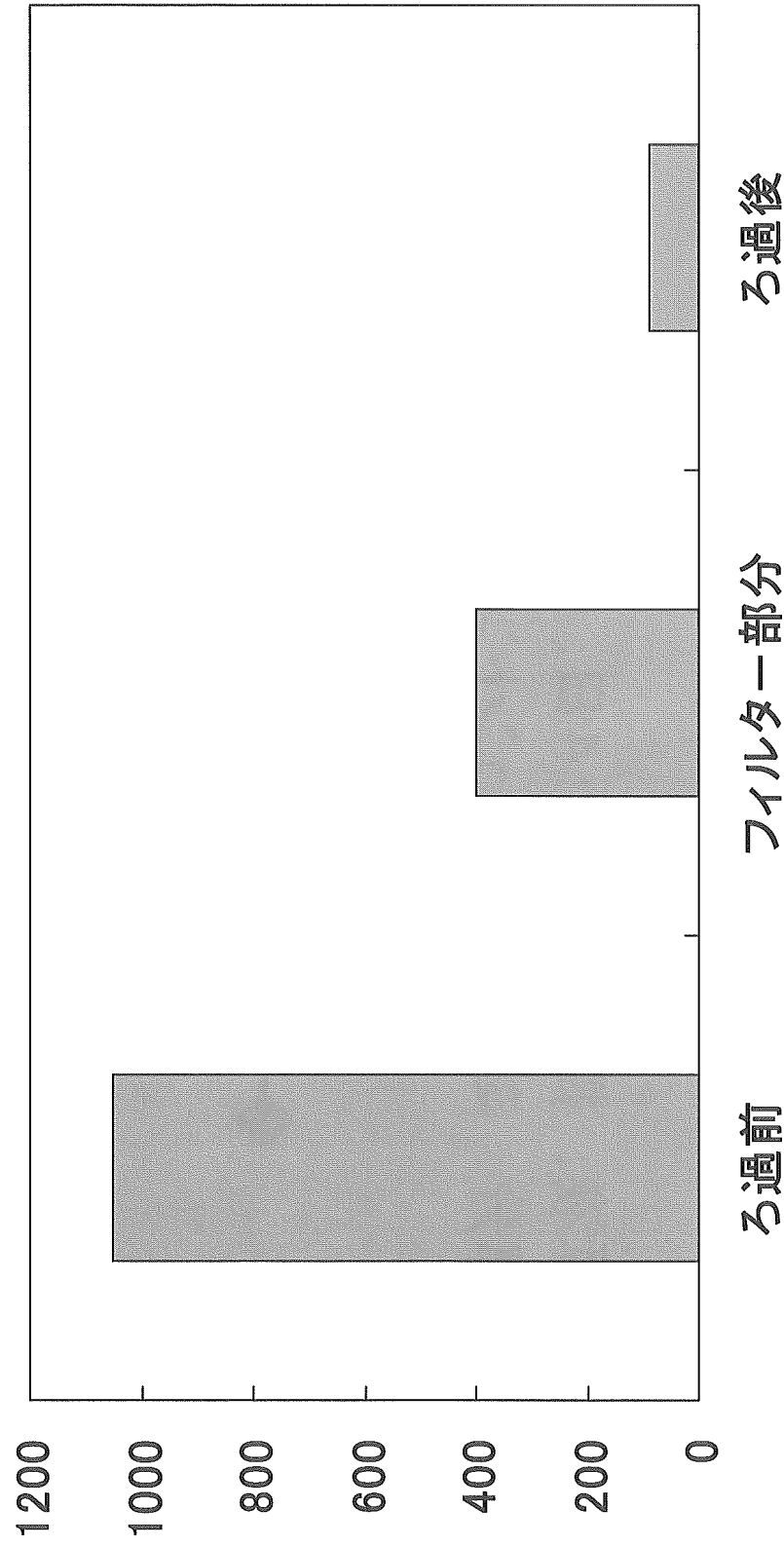


図6. フィルター部分の保管条件と細菌数
(ミューラーヒュントン液)

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

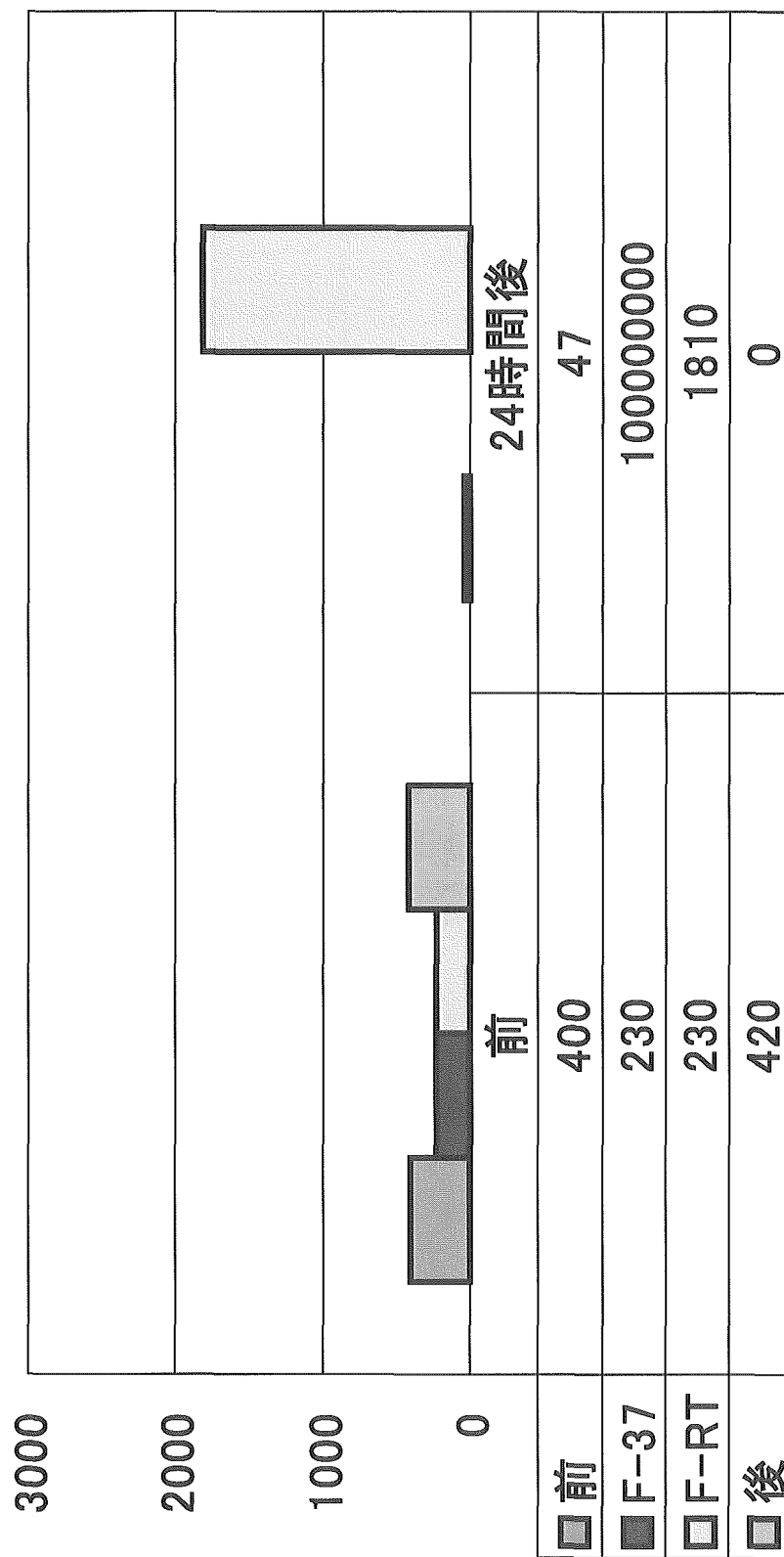


図7. フィルター一部分の保管条件と細菌数 (BACTEC液)

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: BACTEC液20mlで洗浄室温保管と37°C
 保管を比較

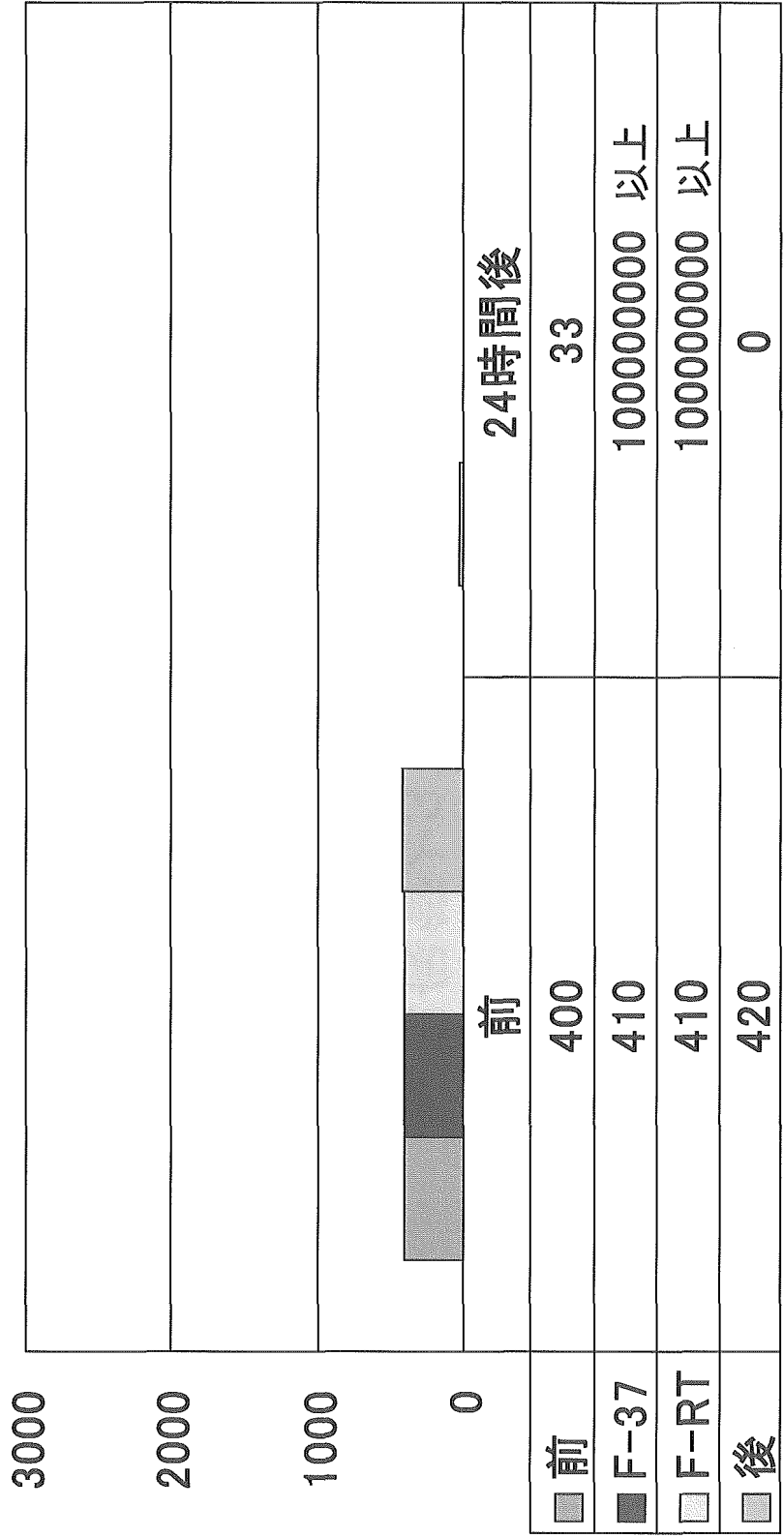


図8. フィルター部分の保管条件と酸素濃度測定 (ミューラー-ヒュントン液)

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

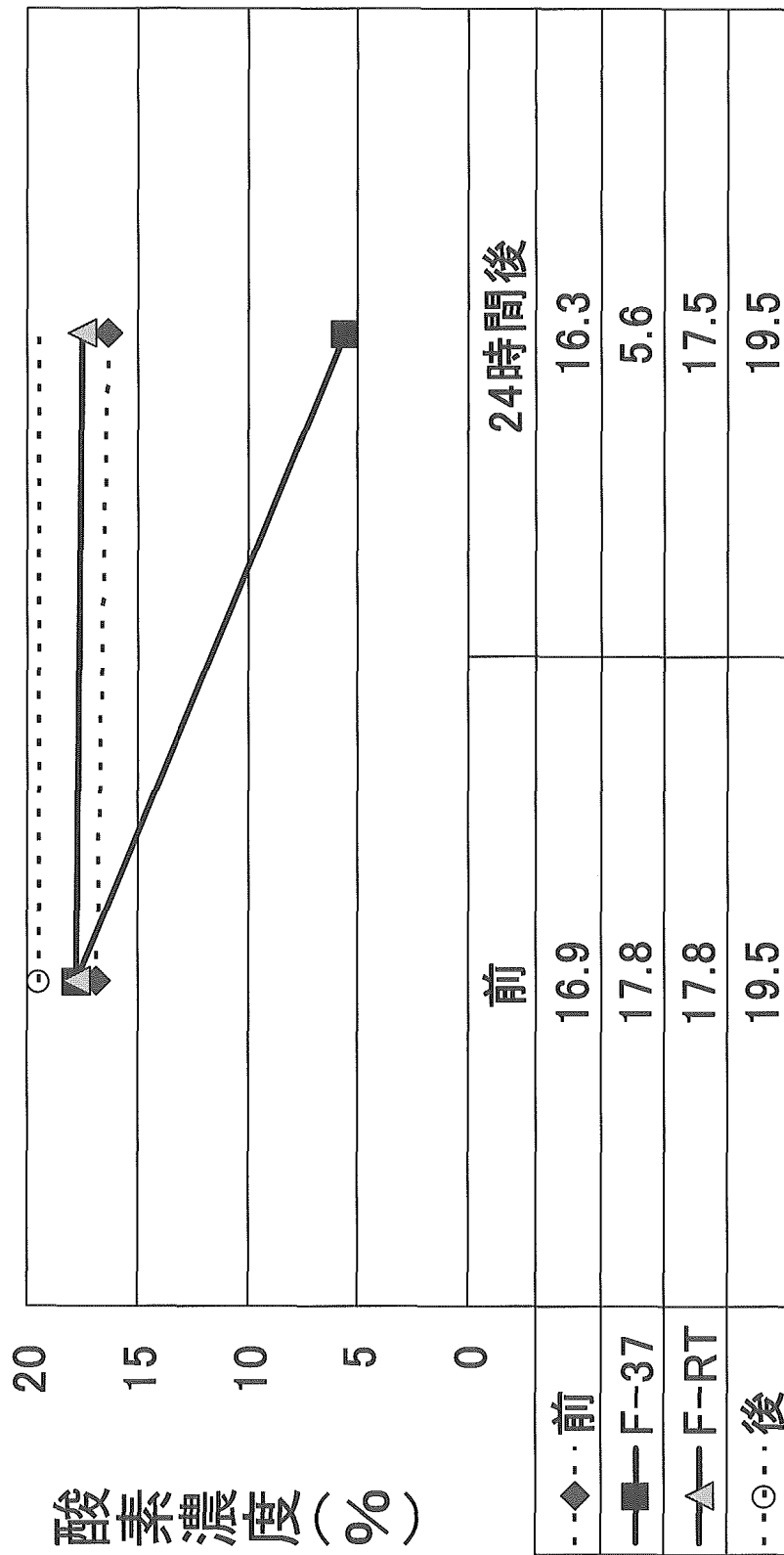


図9. フィルター一部分の保管条件と酸素濃度
(BACTEC液)

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：BACTEC液20mlで洗浄
 室温保管と37°C保管を比較

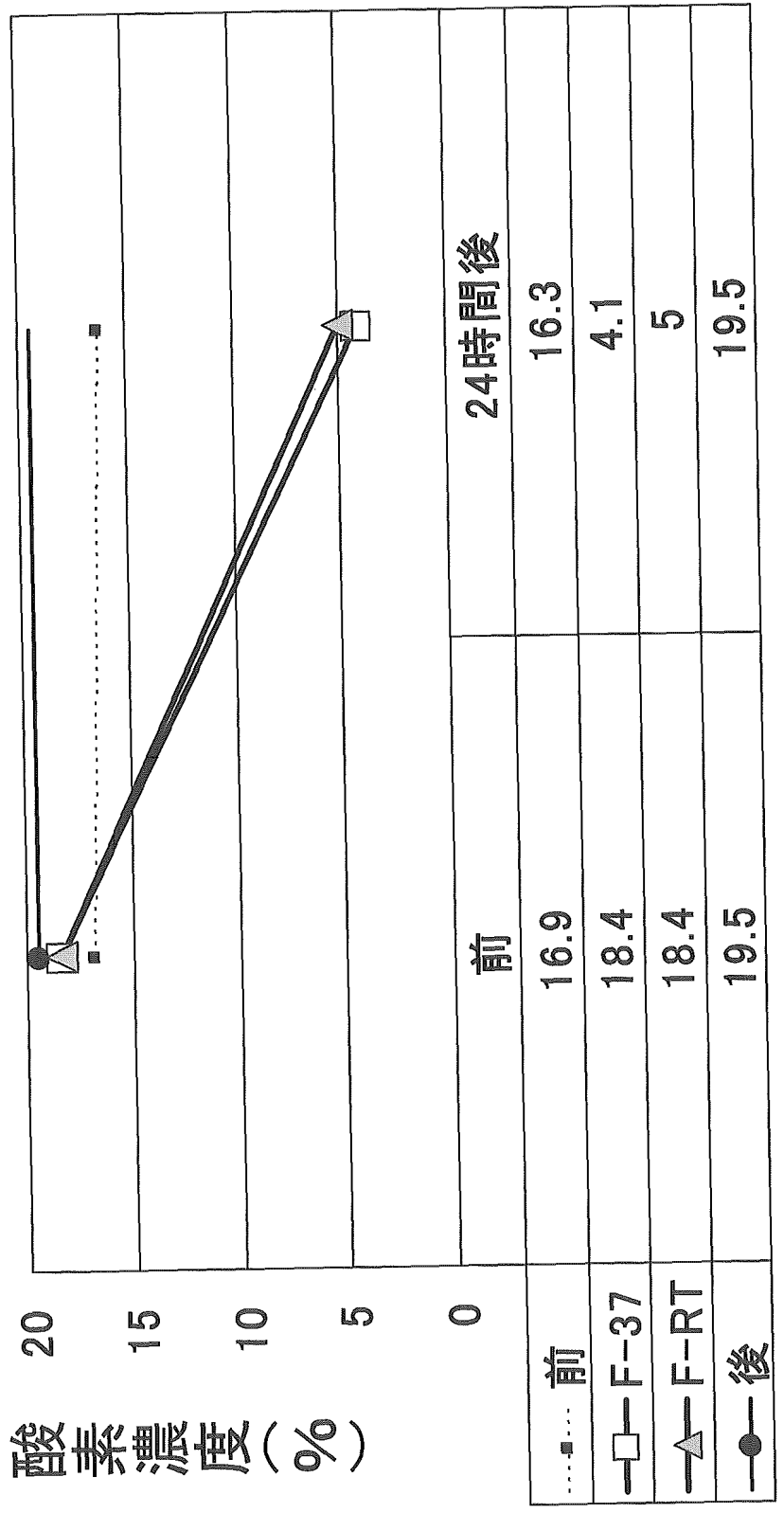
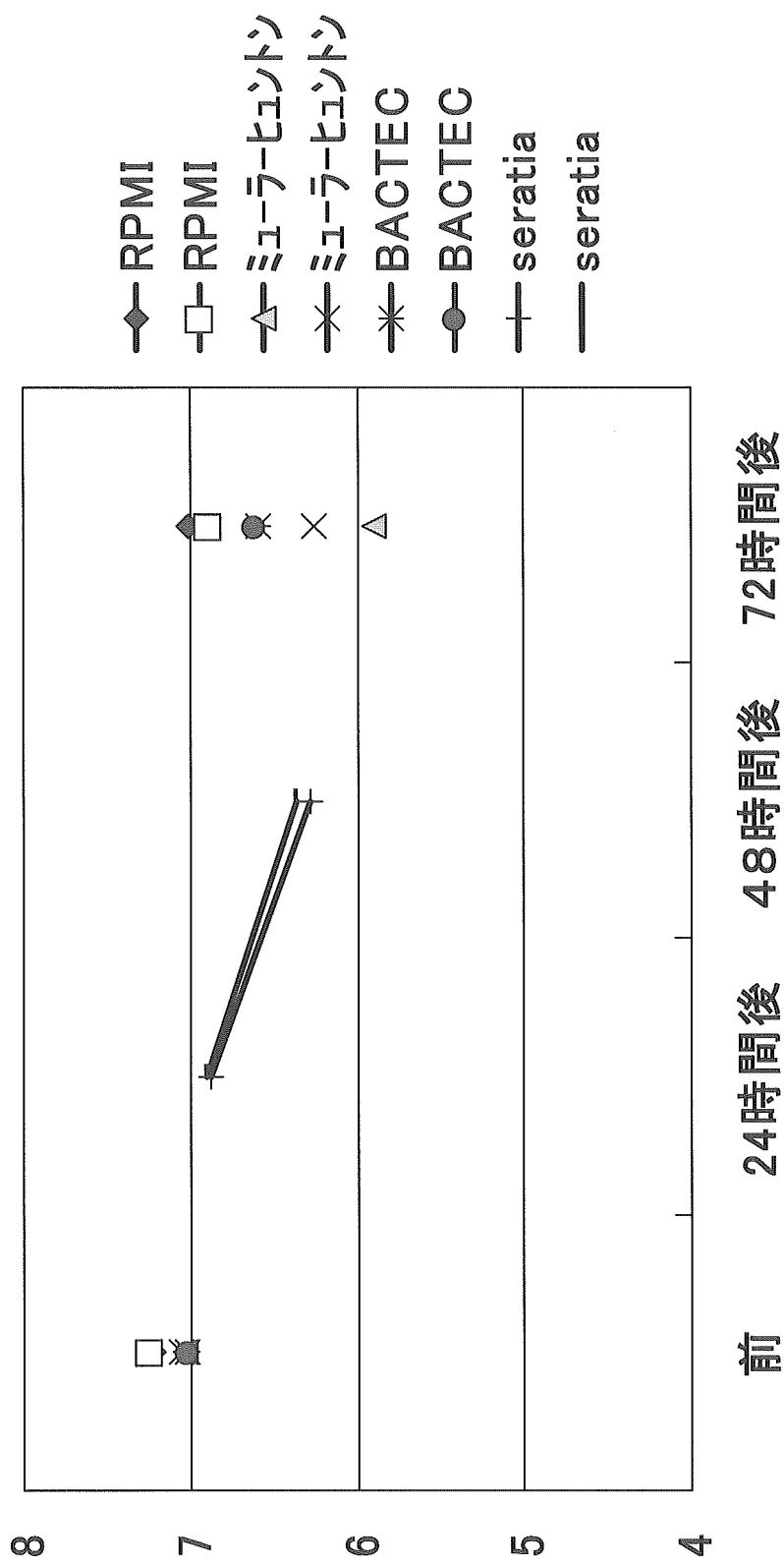


図10. PC濾過後フイルター一部各培養液のpH変化
 (無菌状態と菌接種後)



厚生労働科学研究費補助金
医薬品等医療技術リスク評価研究事業
平成 15 年度研究報告書

「血小板製剤の有効期限延長と安全性確保に関する研究」
(H15-リスク-025)
分担研究報告書

血小板製剤中での細菌の増殖

分担研究者 高松純樹 名古屋大学医学部附属病院輸血部 教授
研究協力者 大蔵照子 名古屋大学医学部附属病院検査部
太田美智男 名古屋大学医学部分子病原細菌学 教授

研究要旨

細菌汚染をより早期に検出する方法を探索する上で、まず、細菌が血小板製剤中に混入した場合に製剤の保存状態下でどのような動態を示すかを調査するために、実験的に血小板製剤中に細菌を接種し、経時的に生菌数を測定した。血小板製剤の保管条件下での製剤中の細菌の増殖特性は、同じグラム陰性桿菌でも菌種間、菌株間で大きく異なることが明らかになった。その原因としては菌株自身の性質に依存している可能性が大きいと考えられる。

1. 研究目的

輸血用血液製剤は、血小板機能保持の観点から 20-25℃で水平震とうした状態で保存されるため、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が、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。

我々は、細菌汚染をより早期に検出する方法を探索する上で、まず、細菌が血小板製剤中に混入した場合に製剤の保存状態でどのような動態を示すかを調査するために、実験的に血小板製剤中に細菌を接種し、経時的に生菌数を測定したので報告する。

2. 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) 細菌接種

使用した菌株は *Pseudomonas aeruginosa* 4 株、*Serratia marcescens* 4 株、*Escherichia coli* 4 株であり、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。同一菌種の臨床分離株については、異なる時期に異なる病棟の患者から分離されたものであり、菌株間の遺伝的背景は異なるものと考えられる。

BHI broth にて増殖させた菌を滅菌生理食塩水にて希釈し、 10^6 CFU/ml の菌液となるように調整した。血小板製剤を、血液バッグから滅菌したプラスチック容器に無菌的に移し、先に調整した菌液を 0.1% v/v 添加し、製剤中の細菌の終濃度を 10^3 CFU/ml とした。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 を同様に添加した。

1) 血小板製剤の振とう

血小板製剤の入ったプラスチック容器を 20 - 25℃にて振とうし、輸血用製剤と同様の保管状態に保った。

2) 接種後の生菌数の測定

経時的に容器の中から無菌的に製剤の一部を取り出し、滅菌生理食塩水にて 10 倍希釈系列を作製し、各 100ml を BHI 寒天平板培地に塗抹し、37℃、24 時間普通培養後、コロニー数をカウントした。

3) 細菌の増殖曲線

使用菌株自身の増殖特性をみるために、BHI broth にて 37℃、振とう培養し、経時的に吸光度を測定した。

3. 結果

1) BHI broth 中での増殖

3 菌種とも細菌の増殖曲線として典型的な S 字状のカーブを示した。増殖速度は *Serratia marcescens*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* の順に速かった。同一菌種における菌株間の差は見られなかった (図 1a,b,c)。

2) 血小板製剤中での接種細菌の増殖

Serratia marcescens の 4 株中 2 株は接種直後から対数増殖を示し、残り 2 株ははじめの数時間に一度減少した後に対数増殖する V 字状のカーブを示した (図 2)。また、*Serratia marcescens* では 4 株ともに、接種から 48 時間前後

で製剤に肉眼的に白い大きな凝集塊の形成が見られ、残りの液は透明化した(図 3)。顕微鏡下で観察すると、透明化した溶液中には多数のグラム陰性桿菌が認められたが、凝集塊中には菌体は認められなかった。凝集塊が形成された後は生菌数が減少した。凝集塊形成時の菌量は $10^9 \sim 10^{11}$ CFU/ml と考えられた。

Esherichia coli、*Pseudomonas aeruginosa* はそれぞれ、4 株中 1 株は対数増殖を示したが、残りの 3 株は増殖しなかった(図 4,5)。

3 菌種でそれぞれよく増殖した株を比較すると、BHI broth 中での増殖速度の順と同様、*Serratia marcescens*、*Esherichia coli*、*Pseudomonas aeruginosa* の順に速かった(図 6)。

4. 考察

血小板製剤の保管条件下での製剤中の細菌の増殖特性は、同じグラム陰性桿菌でも菌種間、菌株間で大きく異なることが明らかになった。同一菌種の場合、細菌用培地中での増殖に差は見られなかったことから、菌自身の増殖能に大きな差はないと考えられるが、血小板製剤に接種した場合、一方は著しく増殖し、もう一方は数時間以内に死滅するほどに結果

が異なったことから、血小板製剤中の何らかの因子が細菌の増殖に影響を与えるものと考えられる。例えば、細菌の増殖が抑えられた血小板製剤の場合、ドナーが過去これらの細菌に接触し、免疫を獲得したため製剤中に抗体が含まれていたという可能性もある。しかし、同一菌株は、異なるドナー由来の血小板製剤に接種した場合も同様な増殖特性を示したことから、菌株自身の性質に依存している可能性のほうが大きいと考えられる。つまり、血小板製剤中での細菌の増殖特性に一定の傾向を見出すことは困難である。また、早期に死滅する菌株が存在することから、細菌の遺伝子の増幅による検出は意義が低いと考えられる。今後は細菌が増殖する場合に特異的に変化する因子の探索を試みる方針である。

健康危険情報

健康に影響を及ぼす事象はとくに発生しなかった。

研究発表

予定している。

知的所有権

なし。

図1a BHI brothでの増殖曲線 *Serettia marcescens*

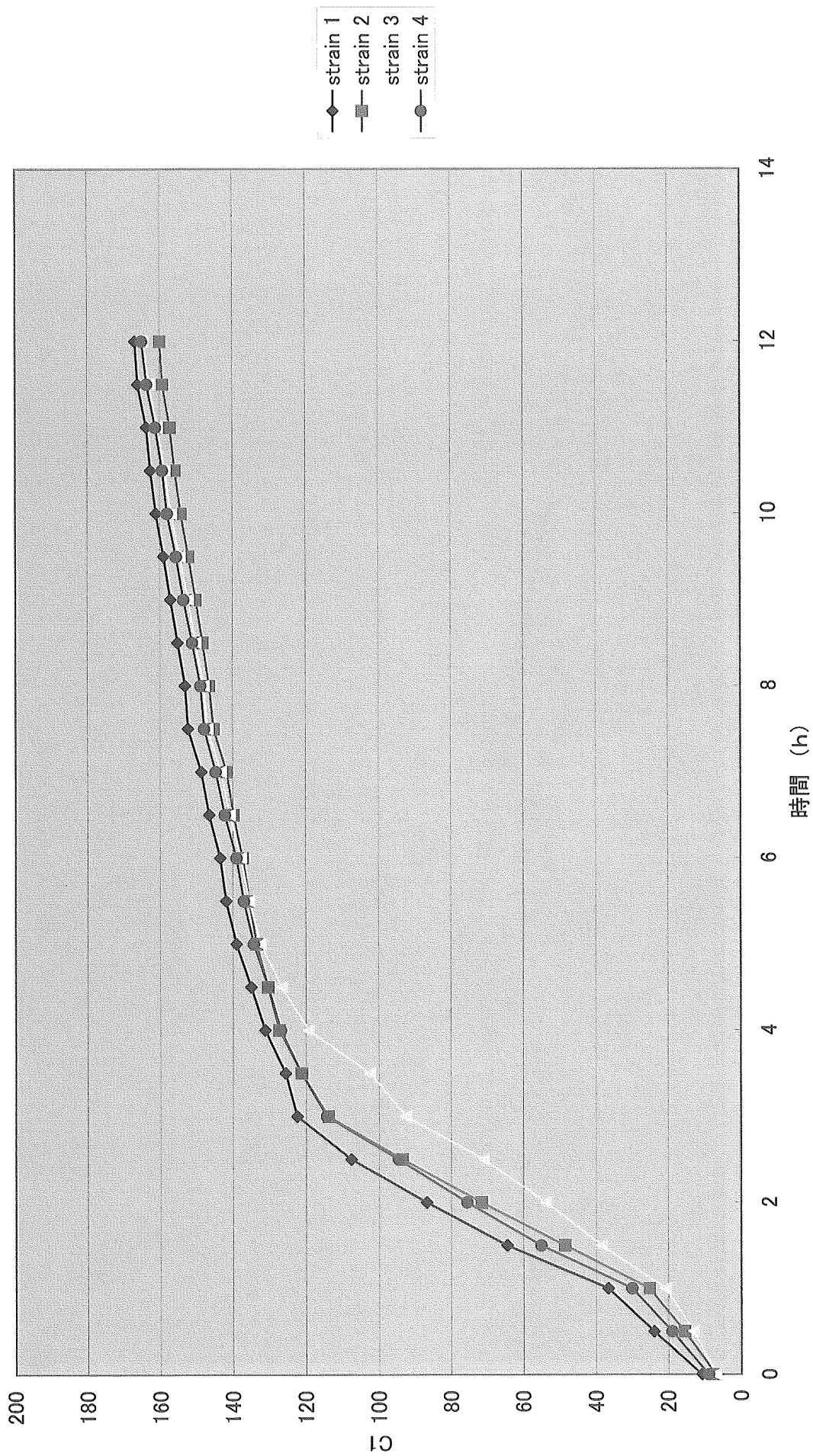


図1b BHI brothでの増殖曲線 *Escherichia coli*

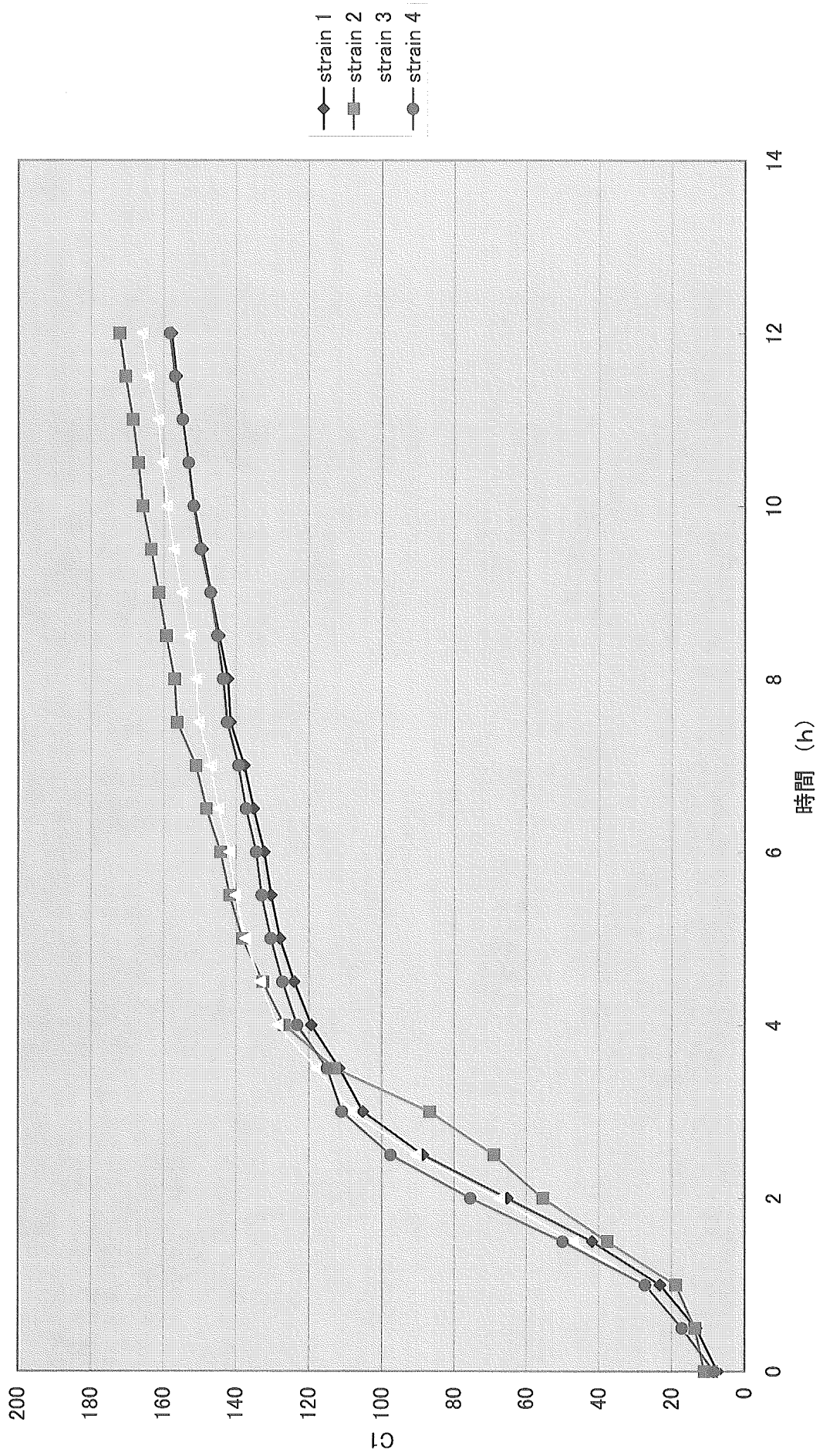


図1c BHI brothでの増殖曲線 *Pseudomonas aeruginosa*

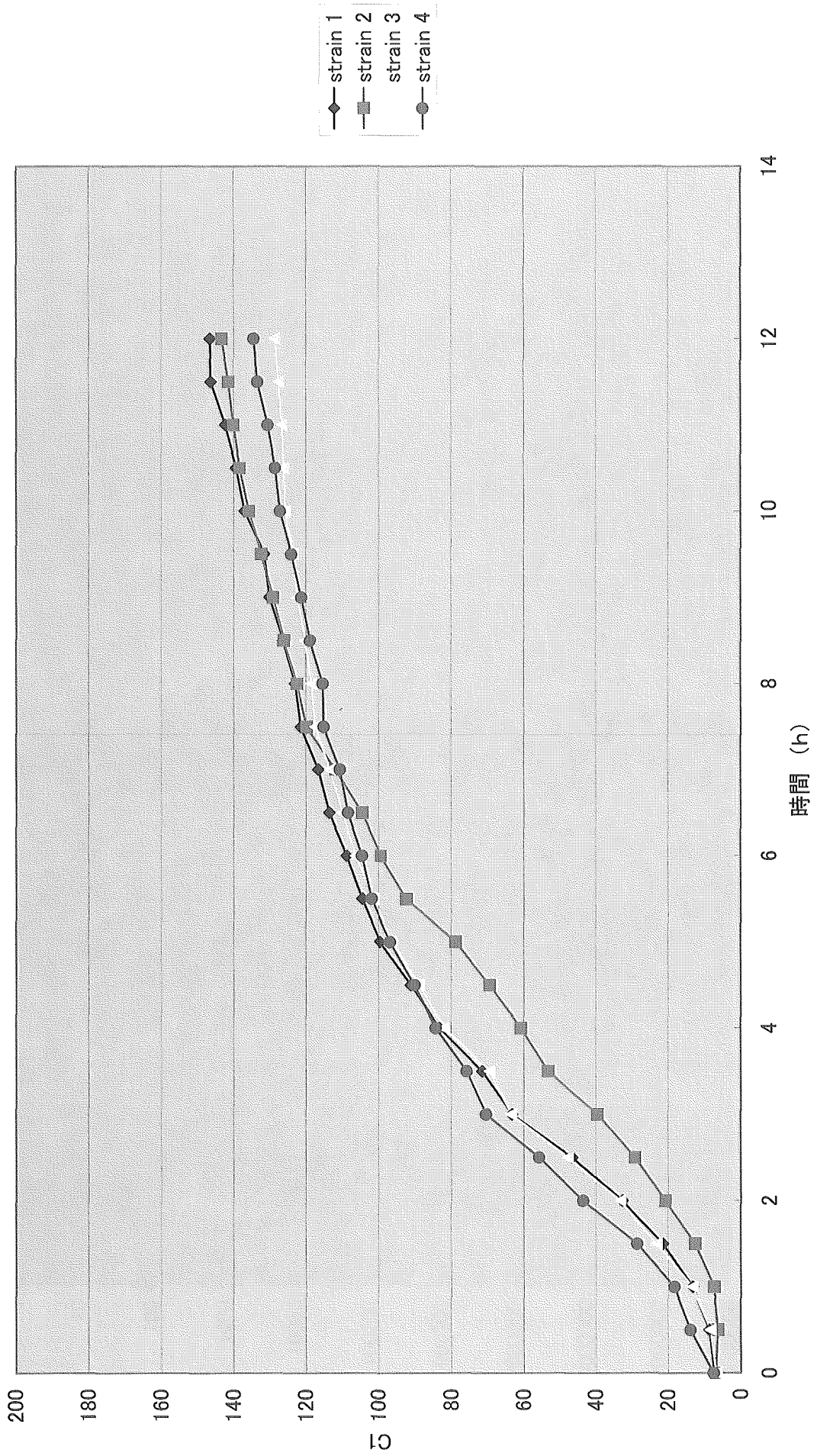


図2 血小板製剤中での増殖 *Serratia marcescens*

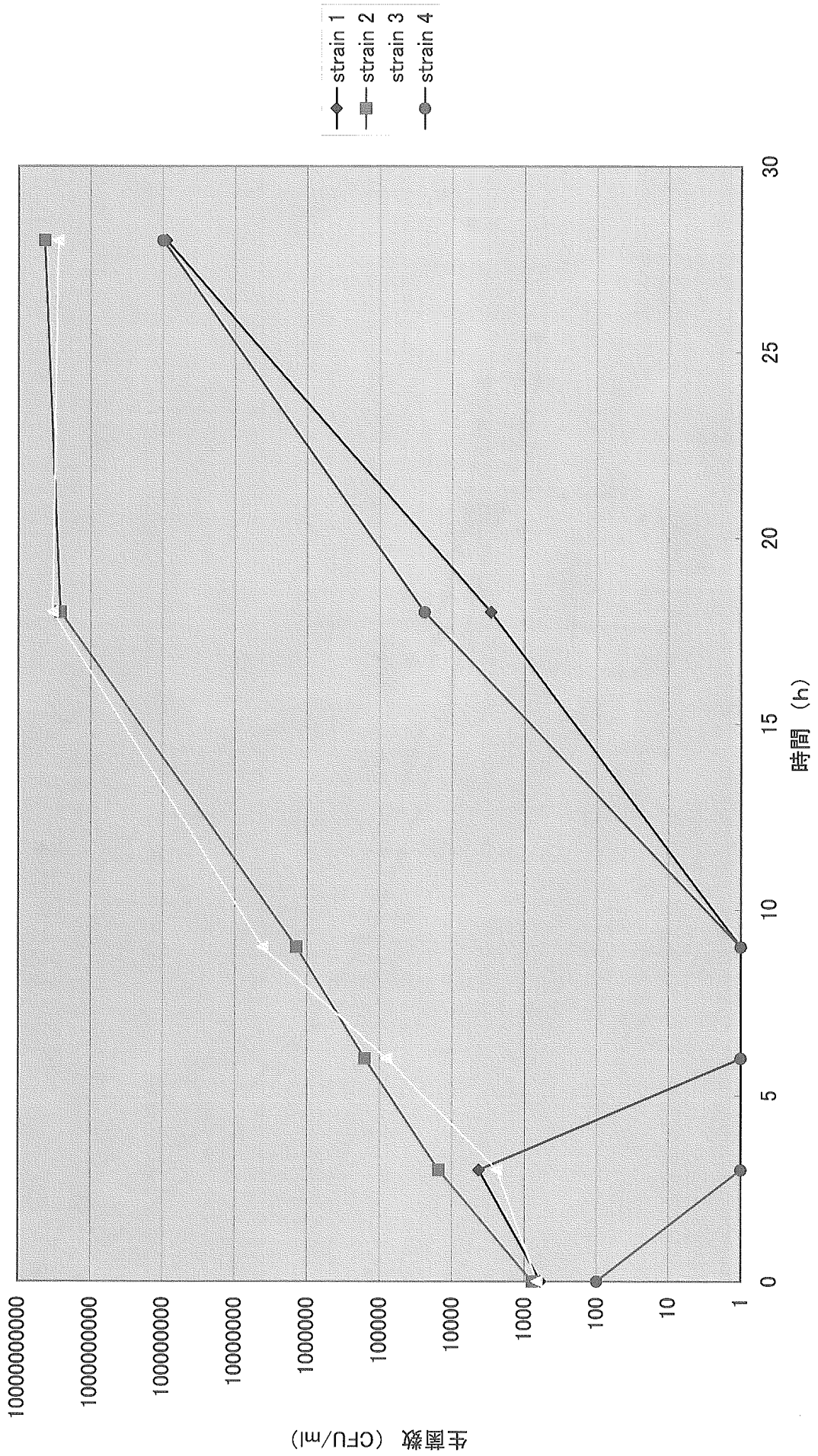


図3 セラチア菌による凝集塊の形成

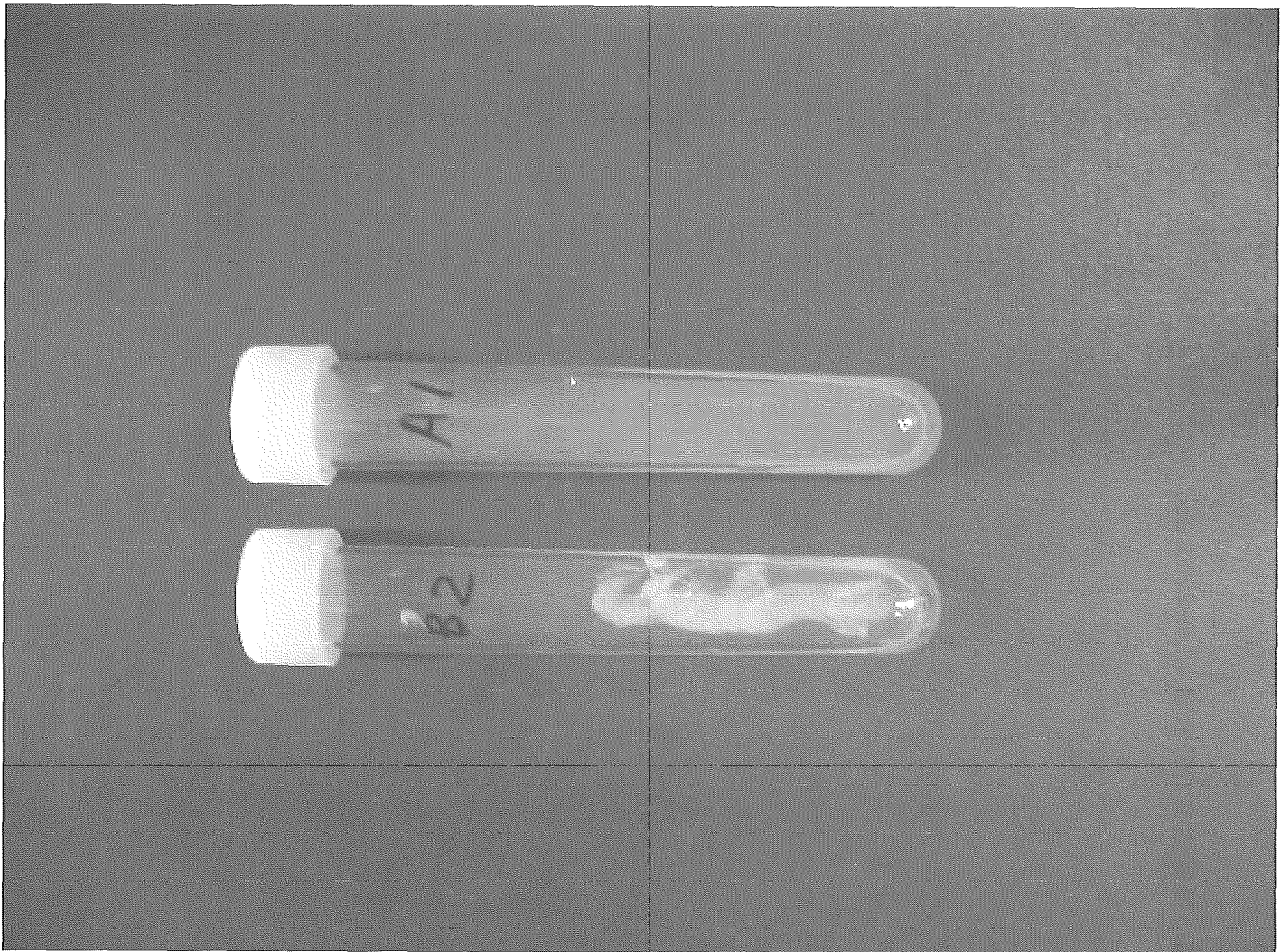


図4 血小板製剤中での増殖 *Escherichia coli*

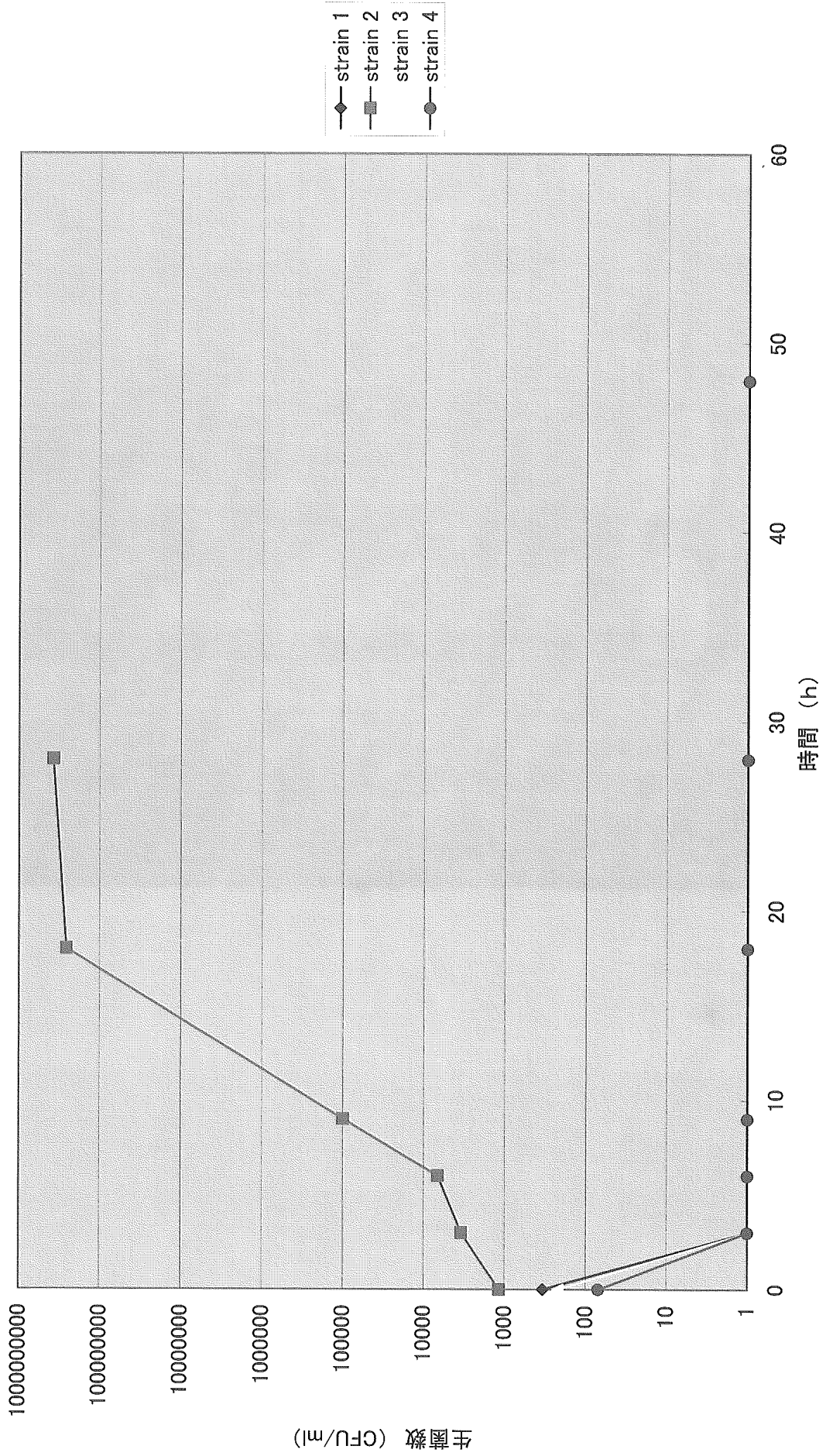


図5 血小板製剤中での増殖 *Pseudomonas aeruginosa*

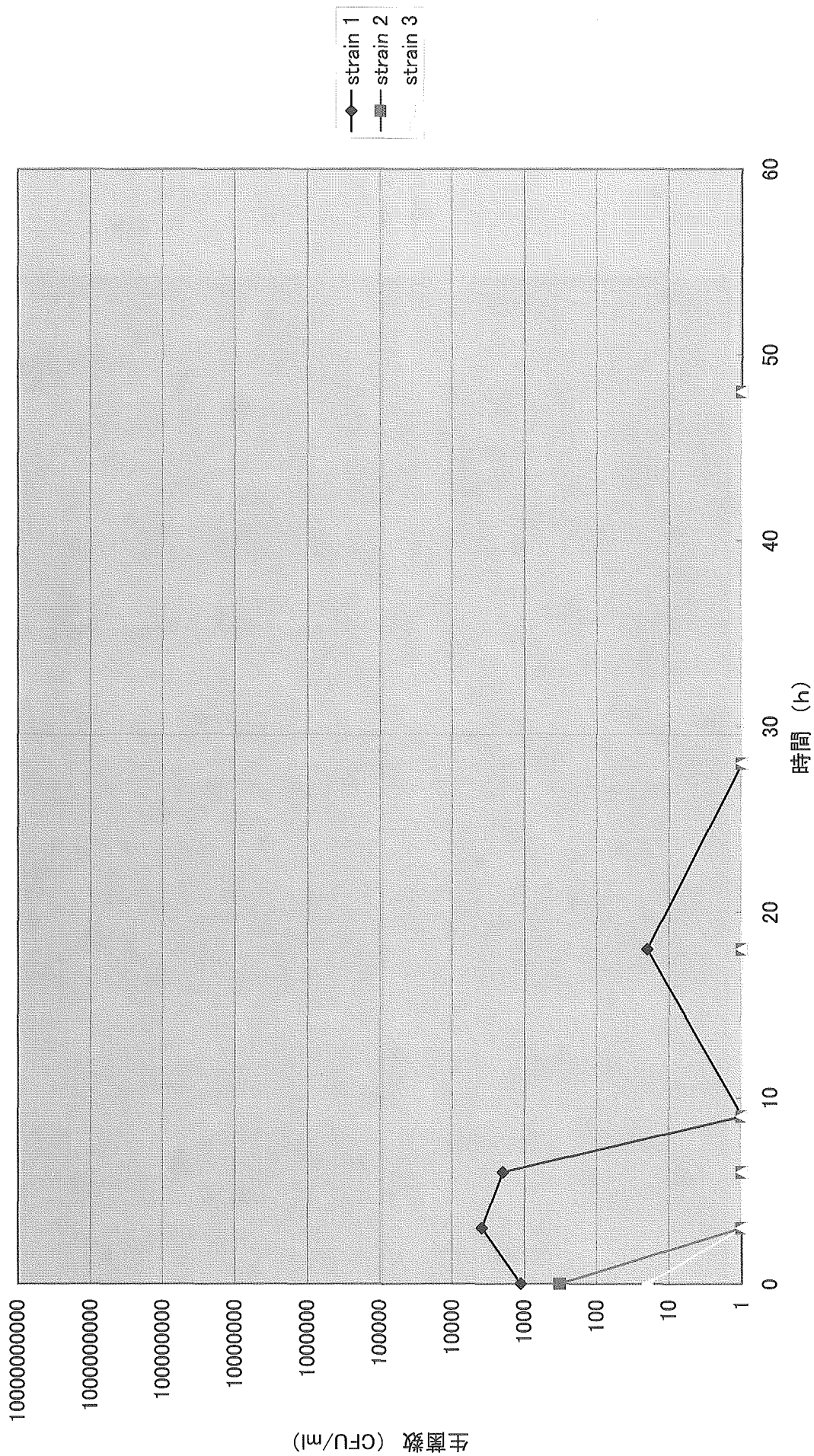
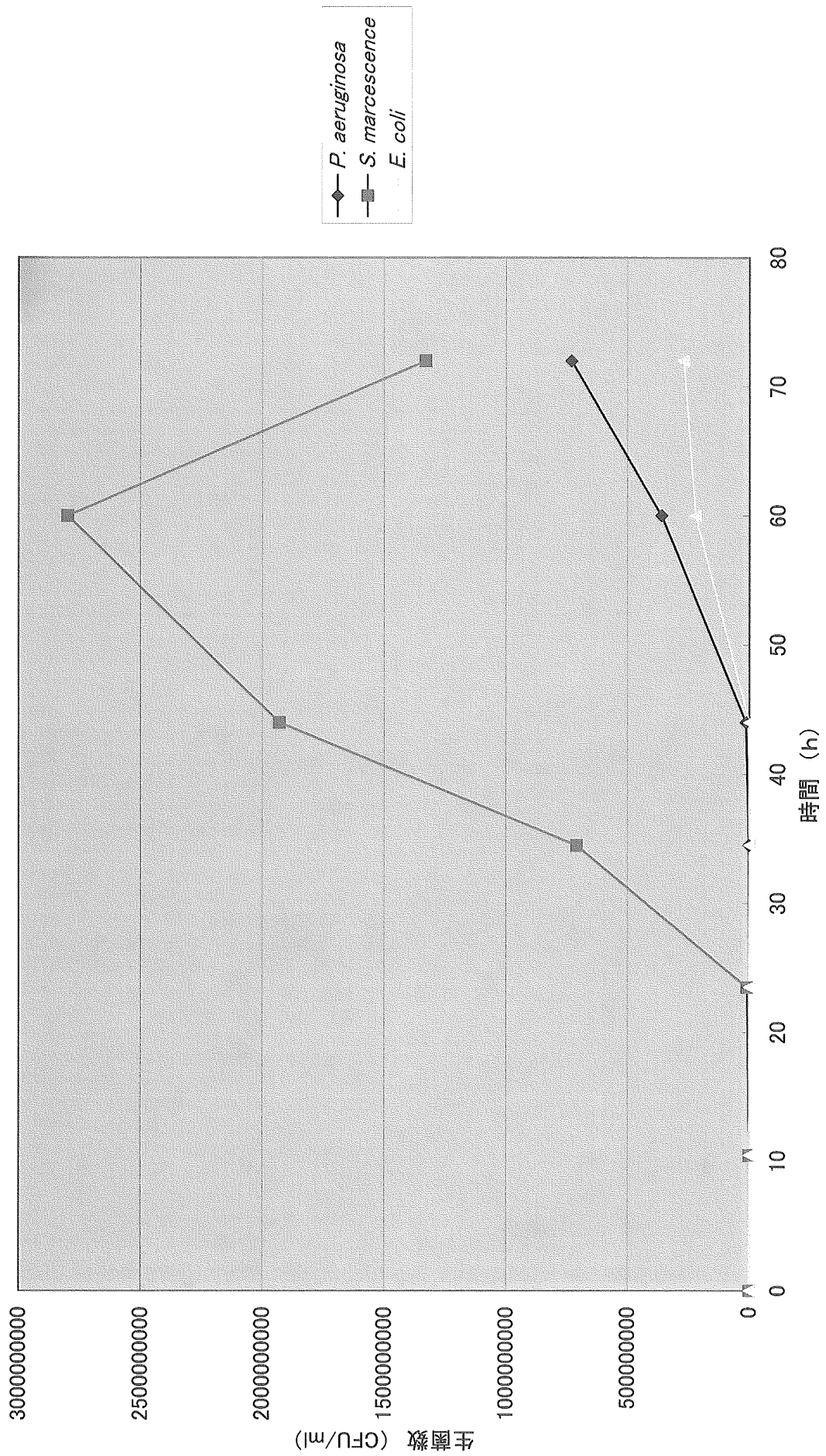


図6 血小板製剤中での増殖速度の比較



厚生労働科学研究費補助金
医薬品等医療技術リスク評価研究事業
平成15年度研究報告書

「血小板製剤の有効期限延長と安全性確保に関する研究」
(H15-リスク-025)

初流血除去により血液製剤の細菌汚染を低減化させる試み

分担研究者 佐竹正博 東京都赤十字血液センター 副所長

研究要旨：

皮膚に常在する菌の輸血血液への混入は穿刺部位の皮膚消毒を厳格に行なっても根絶することは難しい。その原因の一つに穿刺針が皮脂腺を通過することや、穿刺針で切り取られる小皮膚片がバッグ内に混入することにあると推定されている。

そこで、イヌを用いて初流血（20～30ml）の側副バッグへの取り分け実験を実施した。その結果、1) 皮膚常在菌（ $10^4/\text{cm}^2$ 塗布）は27ml以降からは検出されなくなり、また検出される菌数は採血初期のものほど多かった。2) 皮膚片は15例中14例で最初の10ml以内に回収された。また、初流血除去回路付き成分採血キットを用いて、実際に穿刺採血を行なったところ、手技がやや複雑になったが、総じて操作性に問題はなかった。

すでに、欧州では初流血除去回路付き採血キットで実効をあげている報告もあり、近いうちに側副回路付きの全血採血を多数例を対象に評価する予定である。側副回路を組み込んだ血小板採血キットによる血小板製剤は現有品よりも有効期限を延長できる可能性がある。

1. 研究の背景と目的

輸血によるウイルス感染症が、スクリーニング法の発達にともなって激減したのに伴い、細菌感染症が大きくクローズアップされてきた。実際、輸血による敗血症の頻度は、アメリカ合

衆国では血小板製剤輸血 5 万回につき 1 回、赤血球輸血 50 万回につき 1 回ともいわれ、輸血製剤の安全性を脅かす大きな要因となっている。細菌に汚染された血液製剤の輸血による死亡は、溶血性副作用による死亡と並んで、輸

血による死亡の二大原因となっている。

輸血用血液製剤の細菌汚染を防ぐ方法には次のようなものがある。

- 1) 採血時に混入を防ぐ(皮膚の消毒)、
- 2) 血液製剤保存中の細菌増殖を最小限に抑える(保存条件の適正化)、
- 3) 細菌に汚染された製剤を何らかの方法で検出する(スクリーニング)、
- 4) 細菌を何らかの方法で死滅させる(病原因子の不活化)
- 5) 菌血症の状態にあるドナーを問診で排除する。

このうち最初の段階で採血血液中への細菌の混入を防ぐことができればその後の戦略はほぼ不要となり、おそらくもっとも安価で、もっとも本質的な予防法であろう。特に血小板製剤は常温で保存されるので、いったん菌が混入すれば保存中に極めて速い速度で増殖し、臨床的に敗血症や菌血症を引き起こす濃度に容易に達し得る。

輸血用血液製剤に混入する菌として重要なものに皮膚に存在する菌があるが、これらの菌の製剤への混入は、穿刺部の皮膚の消毒を厳重にすることによって少なくできるはずである。日本赤十字社の血液センターでは、1999年に、皮膚消毒薬をそれまでのヒビテン(グルコン酸クロルヘキシジン)から、より殺菌力が強くスペクトラムが広いイソジンアルコール(ポビドンヨード・エタノール)に変え、また皮膚消毒法についても職員の教育訓練を徹底してきた。それにもかかわらず、センター内での工程検査として行われる定期的な無菌試験では、皮膚常在菌による培養陽性例が報告されている。たとえば、ここ3年間に血液センターで無菌試験が行われた17万

本の血液製剤中に61件の細菌陽性例が報告されたが、その85%は、毛囊深部に存在するアクネ菌 *Propionibacterium acnes* による汚染であった。この原因の一つは、穿刺針が皮膚を穿刺する際に不可避免的に皮脂腺を通過することや、穿刺針で切り取られる小皮膚片がバッグ内に混入することにあると考えられている。

このような汚染を防ぐため、採血の際、最も細菌が高濃度であると思われる初めの20~30mLを側副のバッグ(diversion pouch)にとりわけ、その後本バッグに採血する方法が考え出された。ヨーロッパではすでに実用化され、多くの血液センターで日常の業務に取り入れられているが、我々も日本の血液事業へ適用する上で、その効果を確認し、取り扱い方を検証する必要があると考え、イヌを用いた動物実験を行い、またこのシステムを取り入れた成分採血キットを用いて実際の採血に支障がないかどうかを確認した。

2. 材料および方法

(1) 細菌の塗布と採血

イヌの頸部に細菌を一定量塗布し、そこから採血を行った。

実験動物には体重22.0~28.5kgの雌雄の雑種秋田犬を用いた。ペントバルビタール(25~30mg/kg)の腹腔内投与にて全身麻酔を行い、頸部を電気バリカン及び安全カミソリで剃毛したのち、細菌を塗布した。使用した菌は、表皮ブドウ球菌 *Staphylococcus epidermidis* (ATCC14990)、黄色ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus* (ATCC29213)、及びアクネ菌 *Propionibacterium acnes* (ATCC11827)の3種である。一定濃度に希釈した菌液を綿棒で皮膚上に塗布