

图1. 遠心分離回轉數と血漿中細菌数

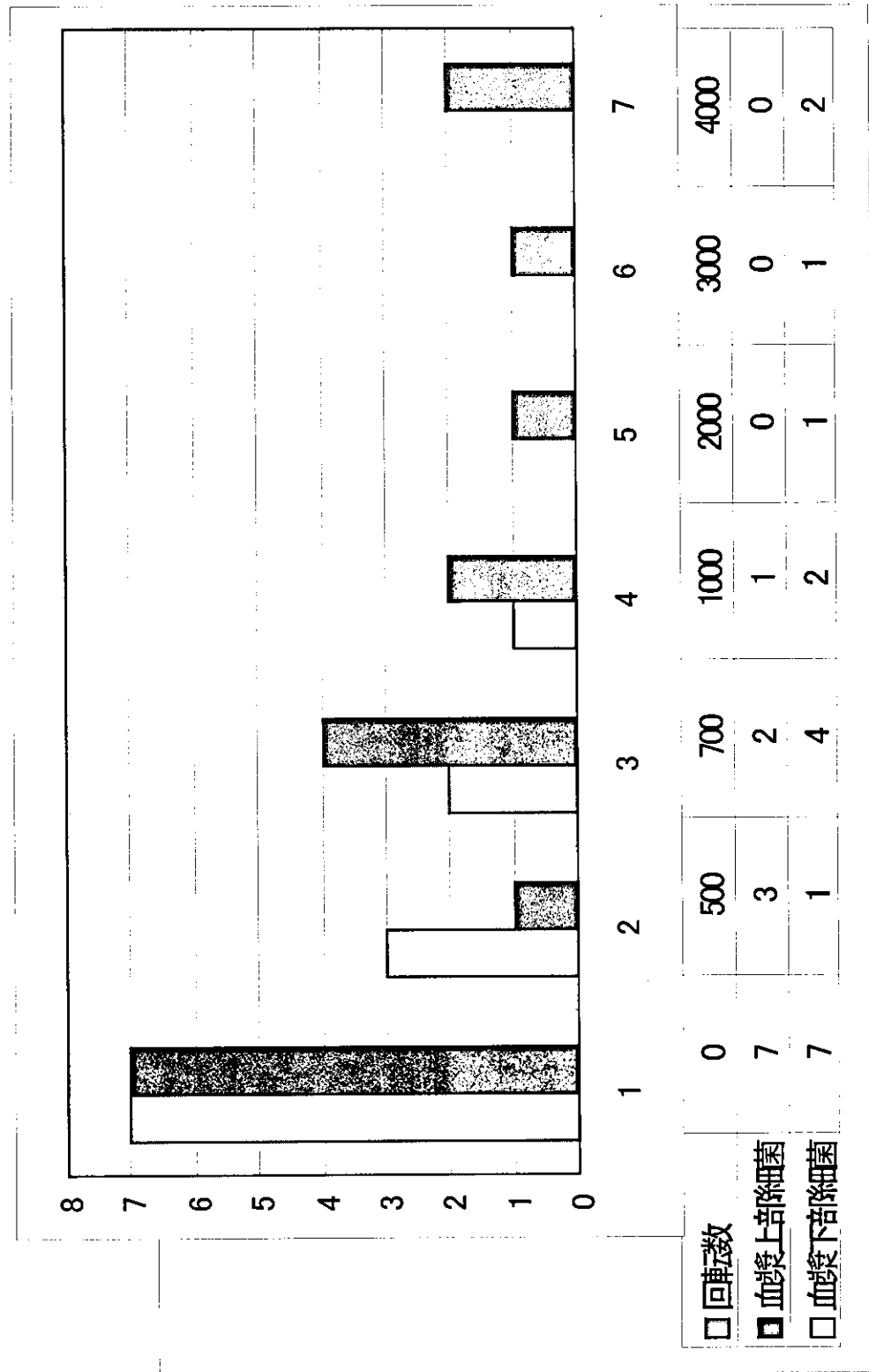


図2. 遠心分離回転数と血漿中白血球数および血小板数

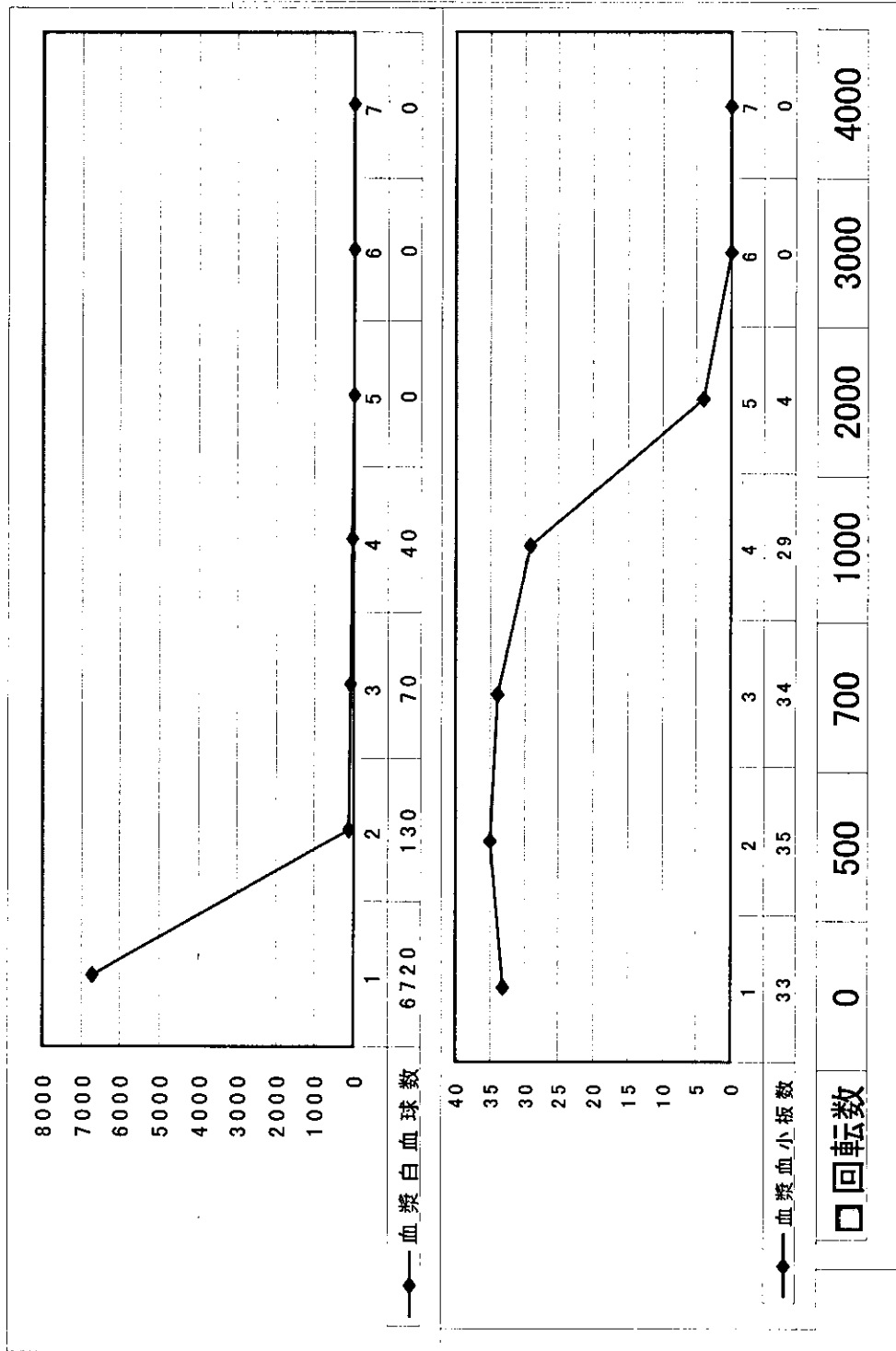


図3. 細菌数が多い場合の遠心分離回転数と血漿中細菌数

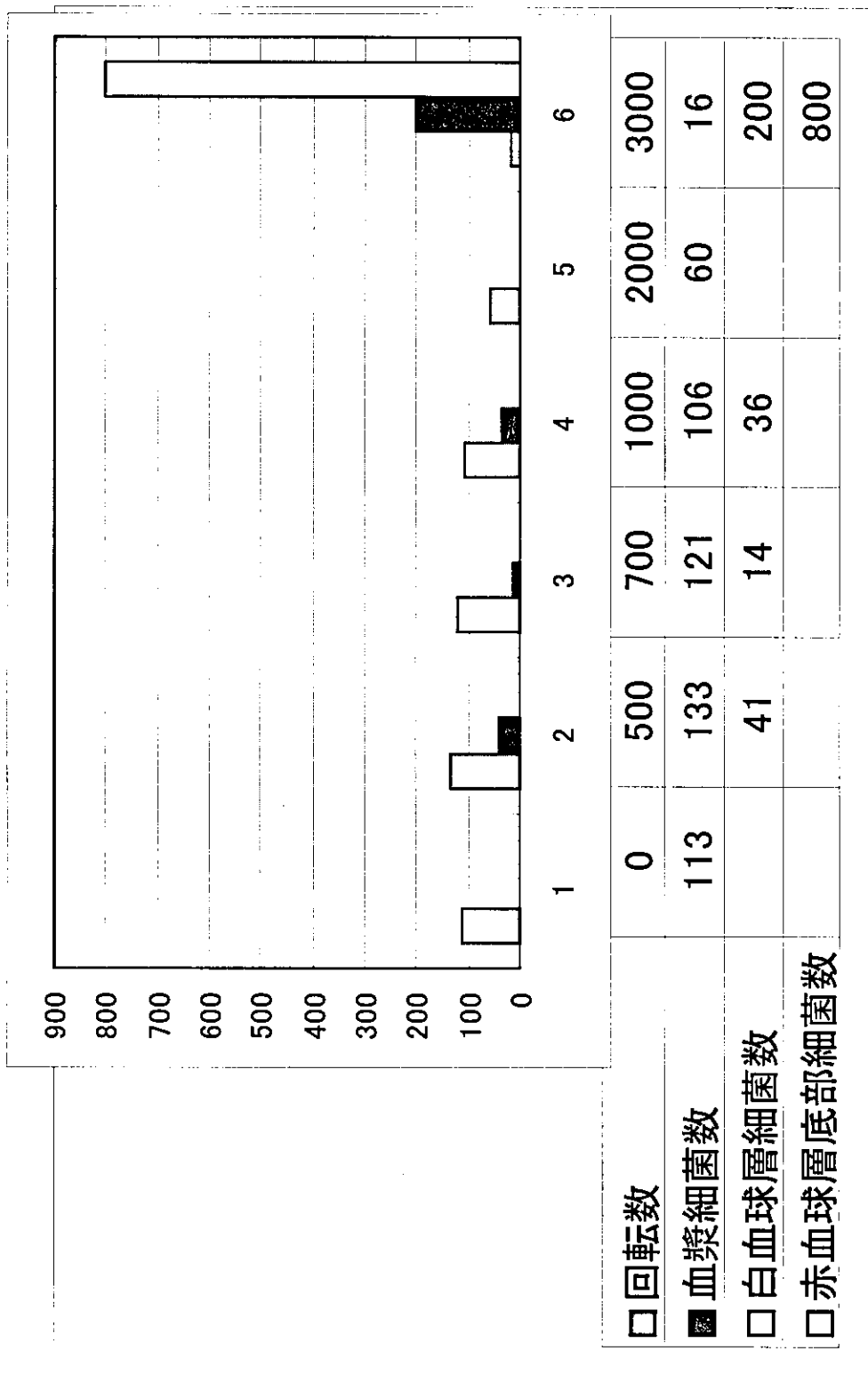


図4. 疑似新鮮血液に接種した細菌数の変動

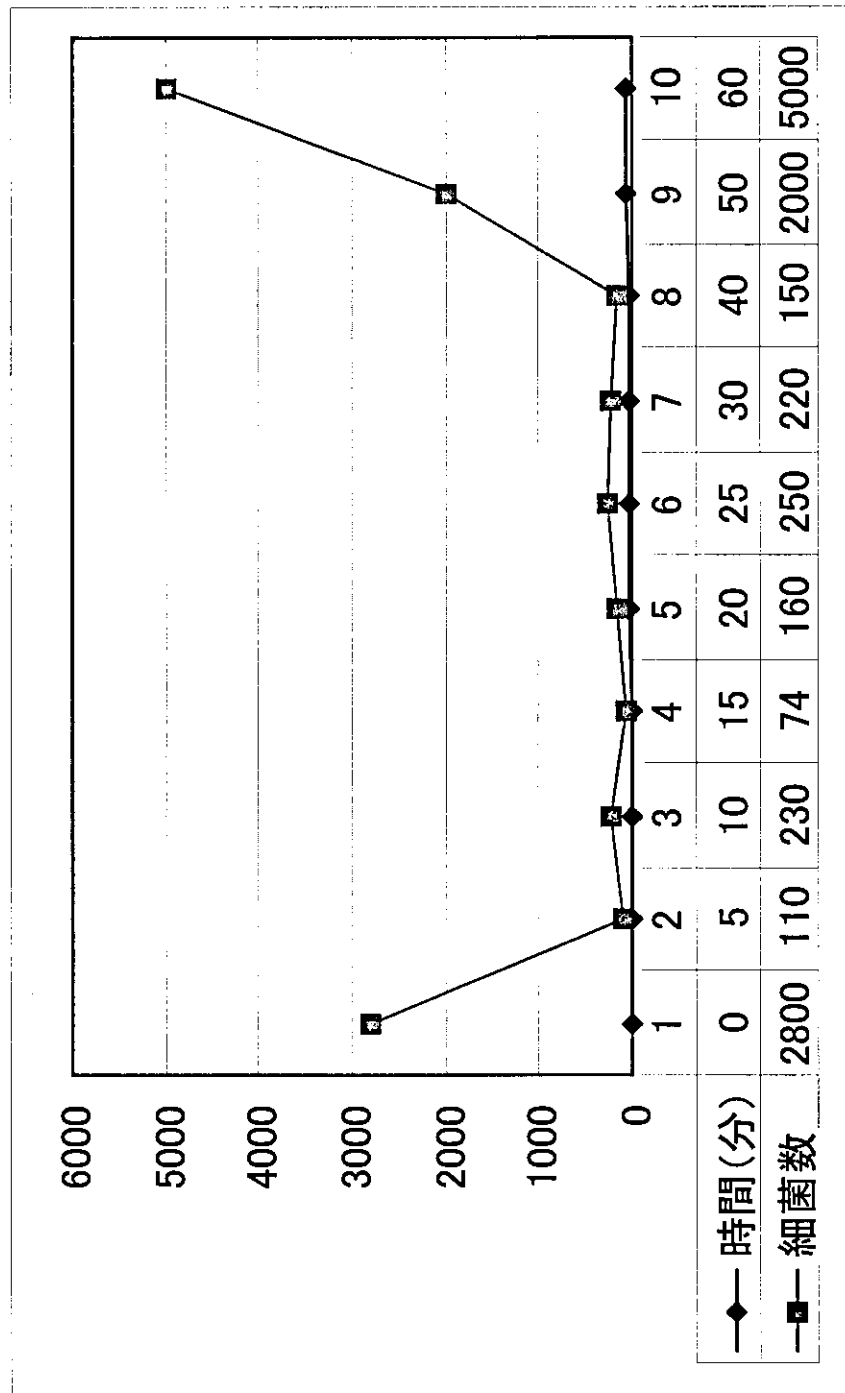


図5. 血小板濃厚液に接種した細菌数の変動—1

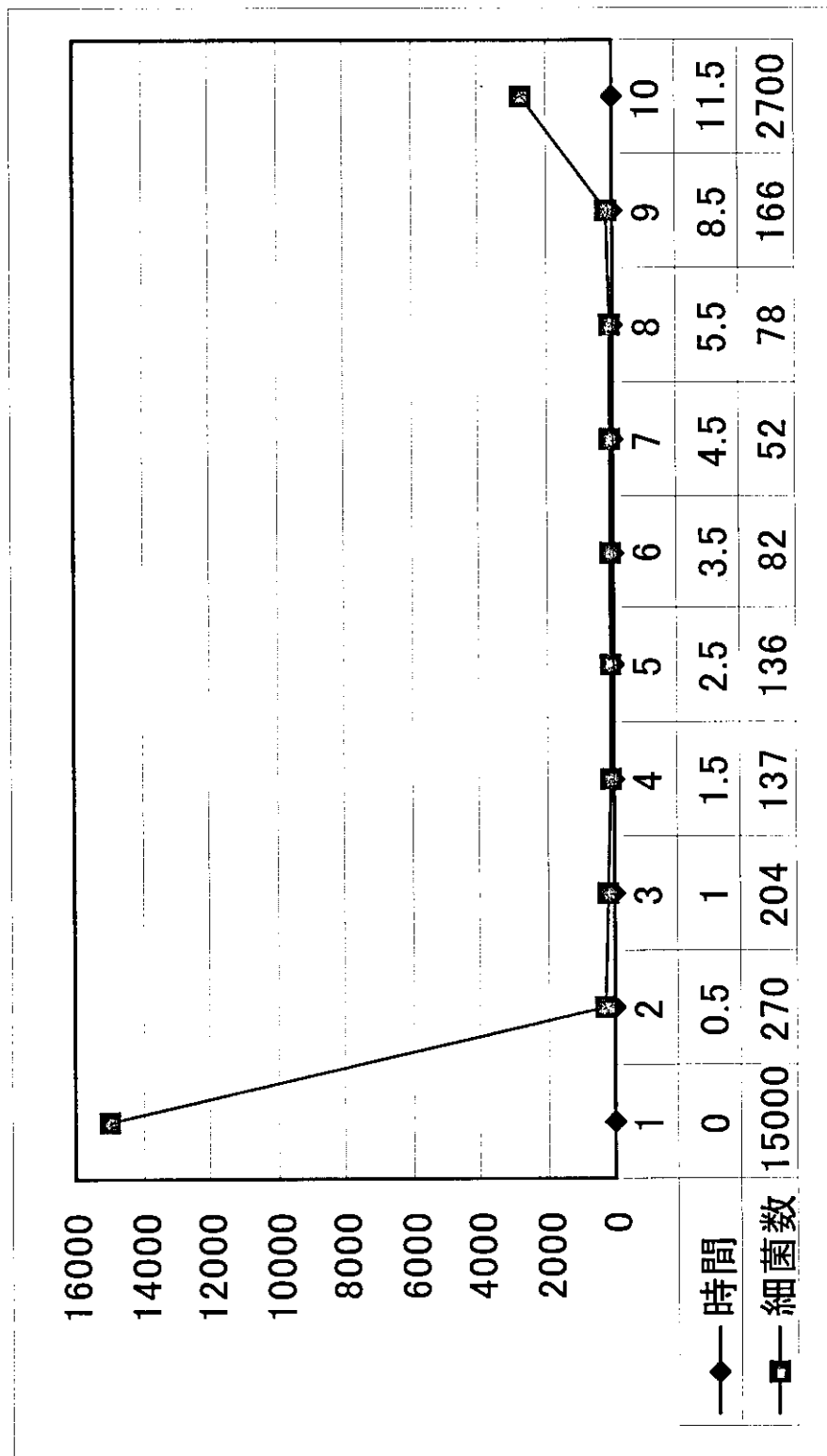


図6. 血小板濃厚液に接種した細菌数の変動一2

血小板数: 185万個・mm³
 白血球数: 340個・mm³

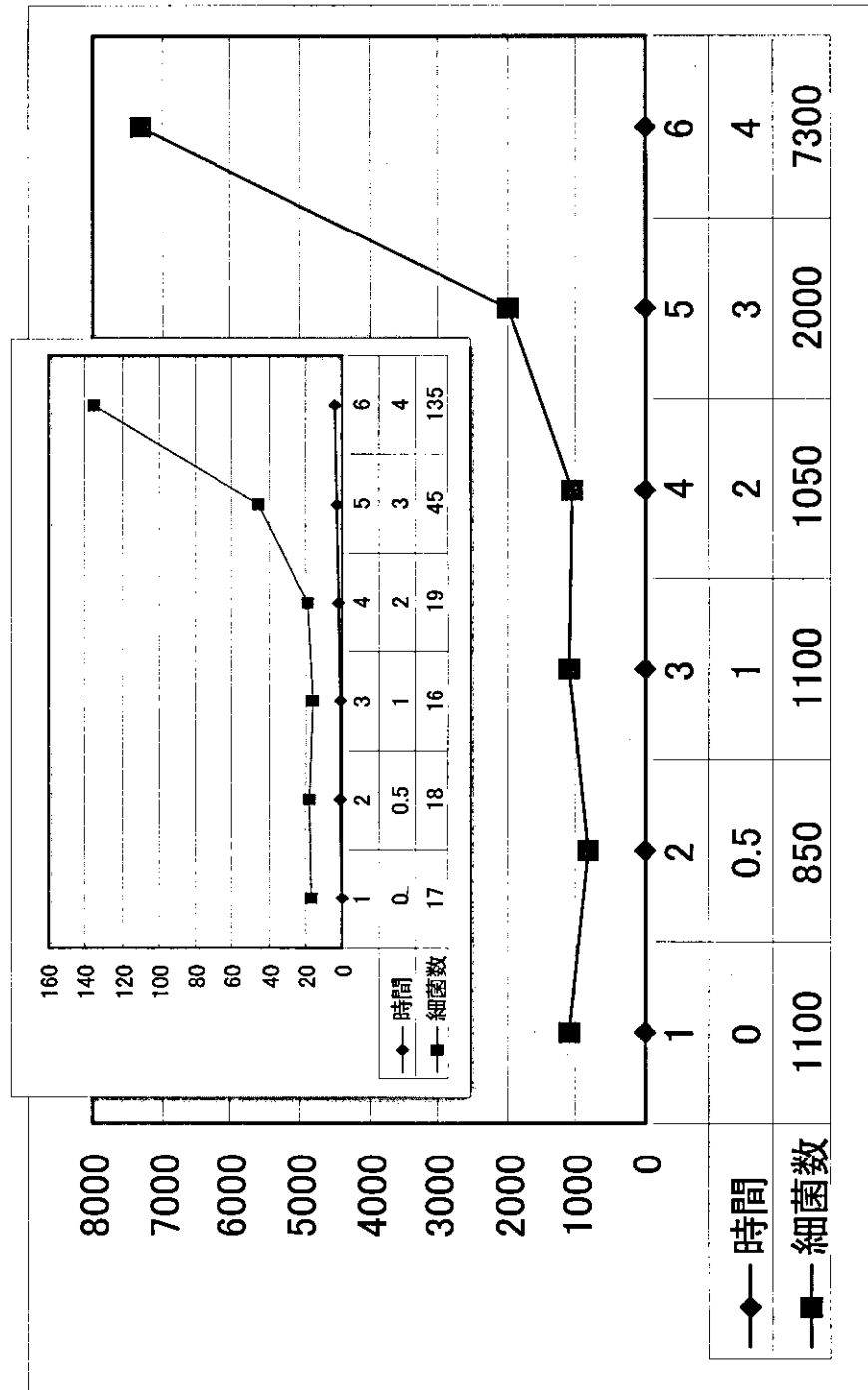


図7. 24時間後濾過の細菌数の細菌数

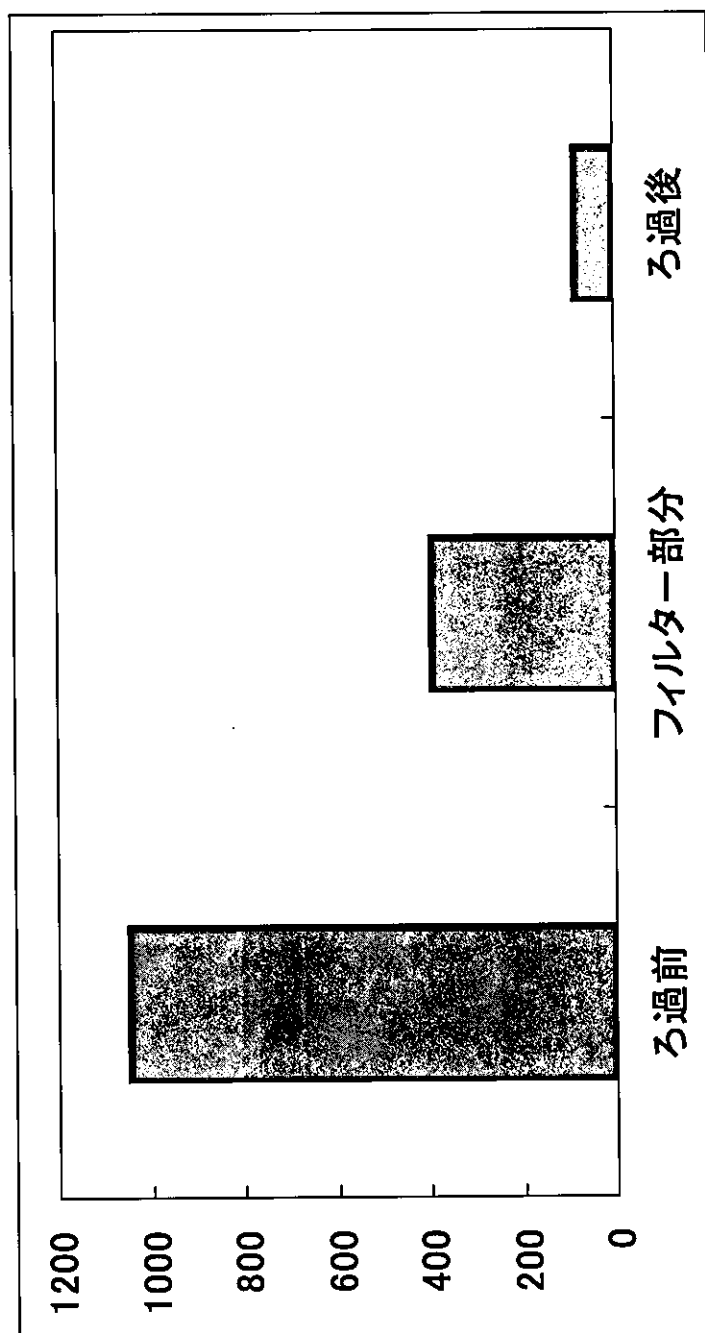


図8. フィルター一部分の保管条件と細菌数

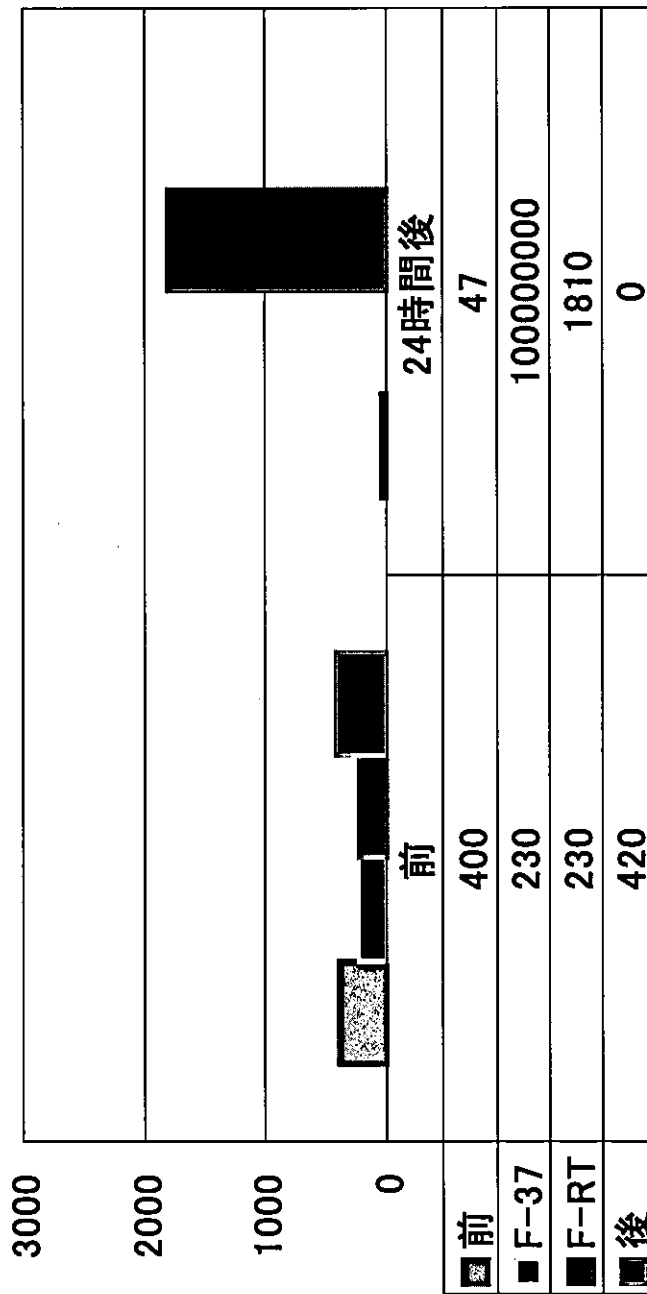


図9. 白血球除去フィルターによる細菌除去効果とフィルター一部細菌収集効果一1

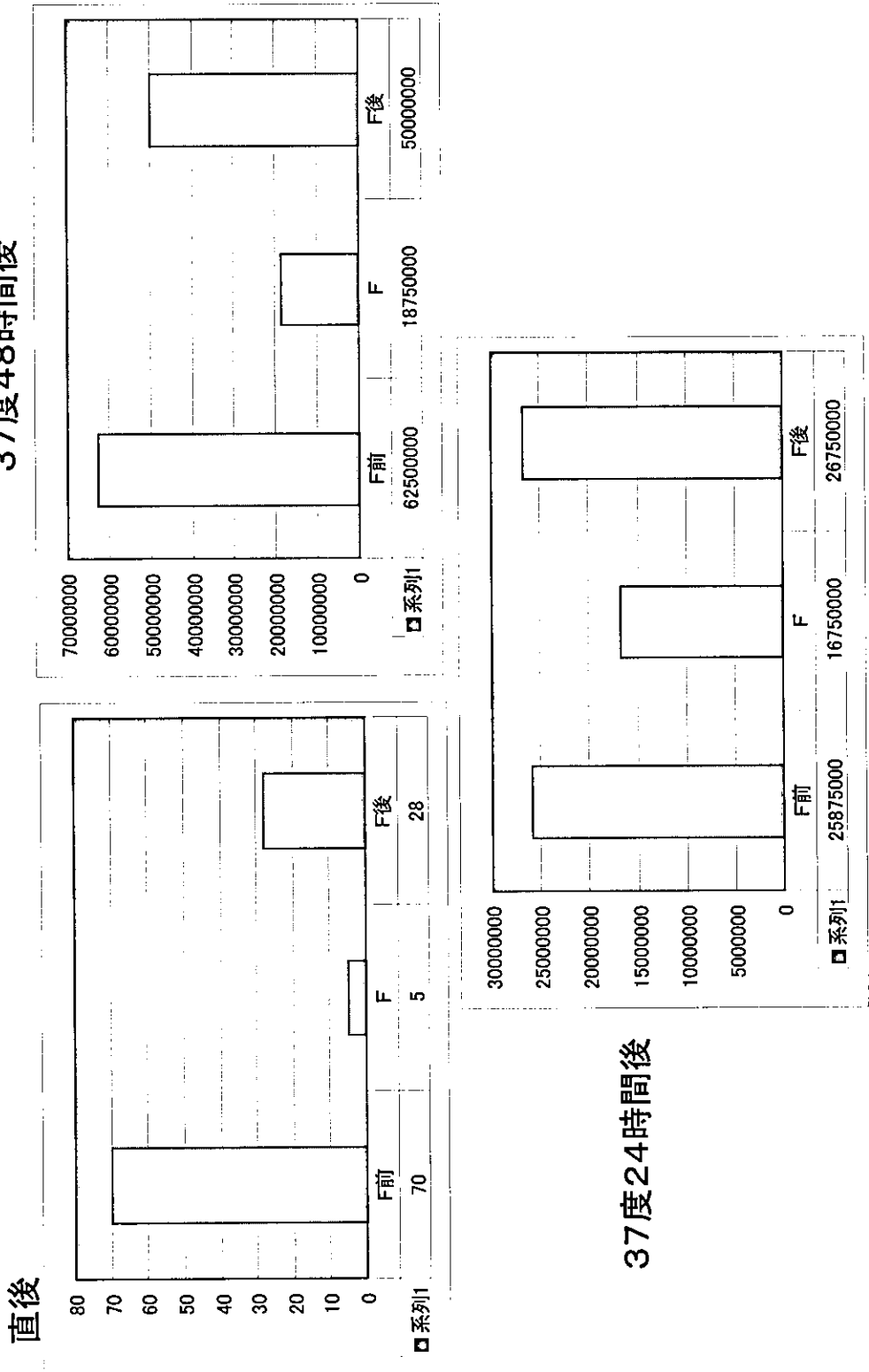


図10. 白血球除去フィルターによる細菌除去効果と
フィルター部細菌収集効果-2

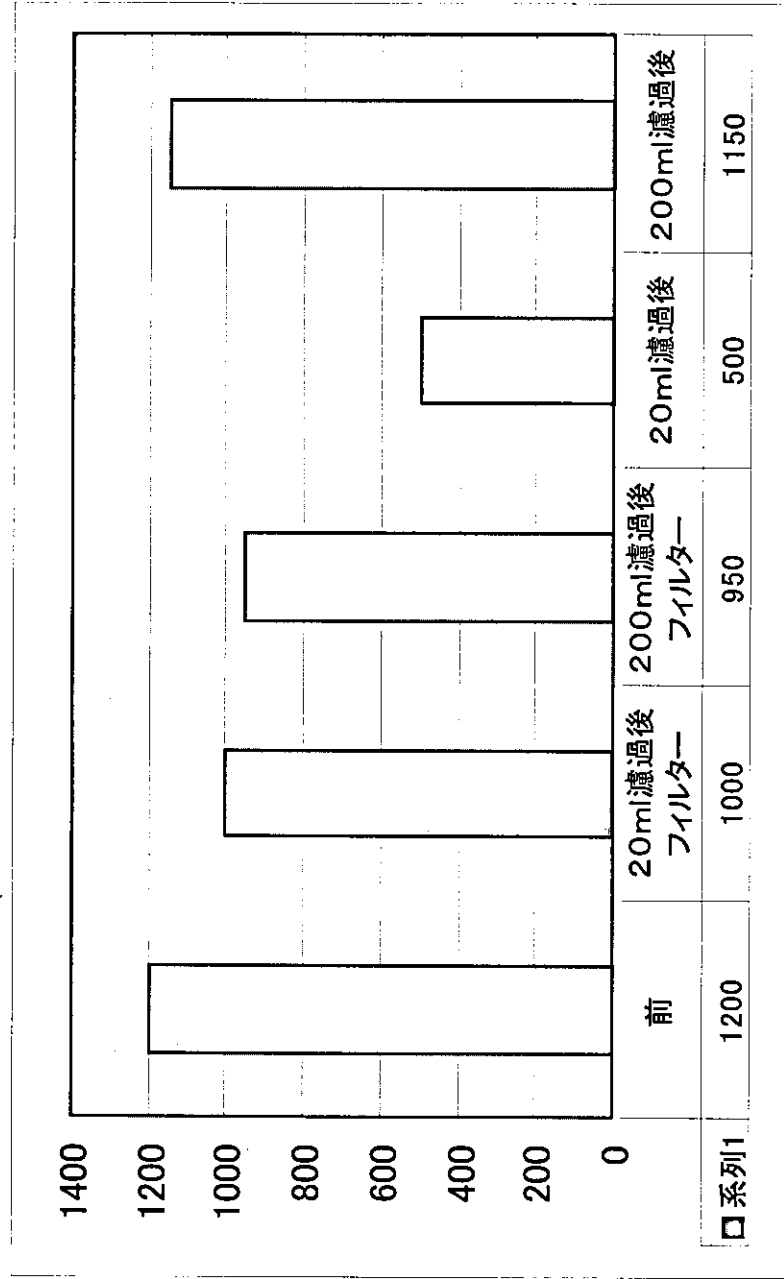
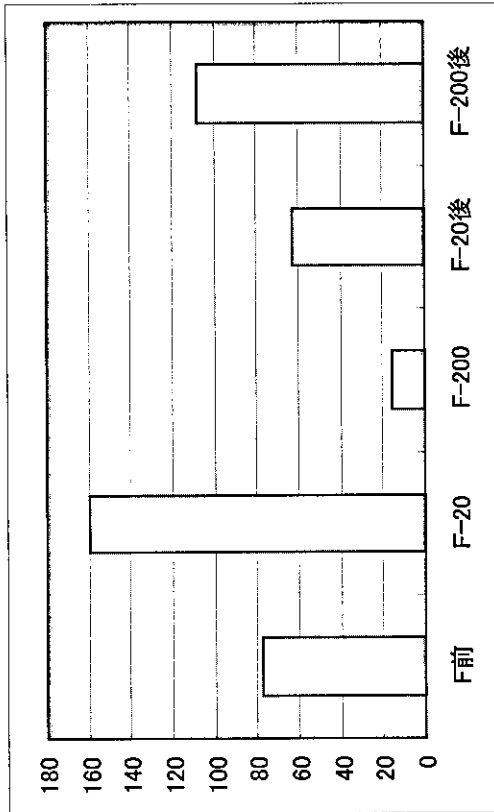
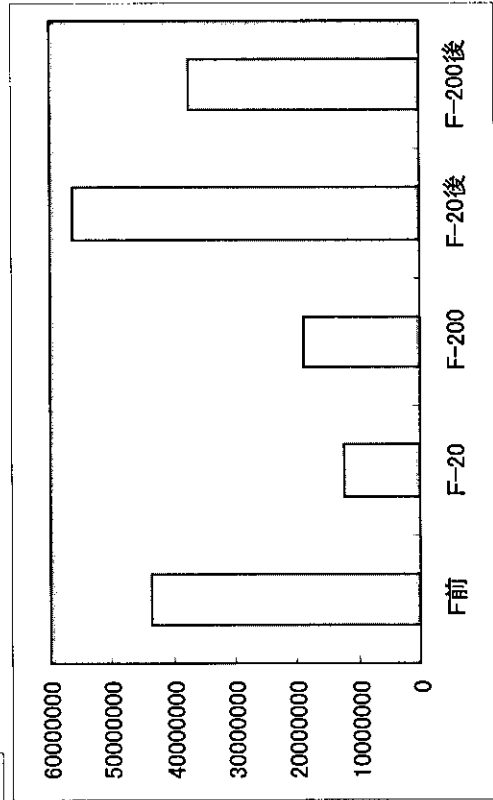


図11. 白血球除去フィルターによる細菌除去効果と
フィルター部細菌収集効果—3



濾過後24時間37度静置後



濾過直後

厚生労働省科学研究費補助金
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16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
(H16-医薬-073)

分担研究報告書

分担研究報告: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 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 教授
大蔵 照子 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:

血小板製剤は室温で保存されるために、細菌混入があった場合は、受血者に重篤な副作用をもたらす可能性がある。混入細菌が血小板製剤中でどのような動態を調べる目的で、細菌を培地と期限超過血小板製剤に接種し、経時的に測定した。Bacillus cereus は接種直後から著増した。B. subtilis は緩やかな増殖を示した。Staphylococcus aureus は接種後10-24時間後に著しく増加した。Staphylococcus epidermidis は接種後早期から増殖し続けた。また、製剤中に凝集塊が形成された。S. aureus のほうが S. epidermidis よりも増殖スピードがやや早かった。培地と血小板製剤での増殖パターンに大きな差異は見られなかった。今回使用した皮膚に存在する細菌が血小板製剤に汚染した場合はよく増殖するというを示している。採血時における消毒の徹底が重要である。

1. 研究の背景と目的

輸血用血小板製剤は、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ので報告する。

2. 研究方法

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

グラム陽性菌のうち環境や皮膚に常在するとされる菌種を対象とした。*Bacillus cereus* 3 株、*Bacillus subtilis* 4 株、*Staphylococcus aureus* 4 株（うち MRSA 2 株）、*Staphylococcus epidermidis* 4 株（うち MRSE 2 株）を使用した。これらの菌株はすべて敗血症患者血液由来の臨床分離株である。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ており、菌株間の遺伝的背景は異なるものと考えられる。

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 $10^3 - 10^4$ 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 を同様に添加した。

4) 接種後の生菌数の測定

細菌を接種した血小板製剤を 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。経時的に製剤の一部を取り出し、BHI 寒天平板培地上で培養後、コロニー数をカウントした。

5) 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 *Bacillus spp.* の増殖

すべての菌株において典型的な S 字状の増殖曲線が得られた。*Bacillus* 属 2 菌種の増殖速度は、*B. cereus* の方が *B. subtilis* よりもすべての菌株において速かったが、同一菌種内における菌株間の大きな差はなかった (図 1a,1b)。

2) 血小板製剤中での *Bacillus spp.* の増殖と製剤の肉眼的変化

B. cereus は 3 株とも接種直後から著しく増殖した (図 2a)。10 時間後には 10^6 CFU/ml 以上の菌数に達し、その後生菌数が減少することはなかった。接種後約 24 時間前後から、製剤の白濁化が肉眼的に明らかに認められた (図 3)。*B. subtilis* は 4 株とも緩やかな右

上がりが増殖特性を示した(図 2b)。生菌数は増加し続け、50 時間後には $10^4 \sim 10^6$ CFU/ml に達した。接種後 40~50 時間で *B. subtilis* のカサカサな菌塊が浮遊するのが肉眼的にもわかるようになった(図 3)。今回使用した菌株に関しては、血小板製剤中での増殖パターンは、BHI broth 中での増殖パターンとよく類似していた。*B. cereus* の方が *B. subtilis* よりも増殖速度がすべての菌株において速かったが、この差も BHI broth の場合と同様であり、菌種による差と考えられる。

3) BHI broth 中での *Staphylococcus spp.* の増殖

すべての菌株において典型的な S 字状の増殖曲線が得られた。*Staphylococcus* 属 2 菌種の増殖速度は、*S. aureus* の方が *S. epidermidis* よりもすべての菌株において早かったが、同一菌種内における菌株間の大きな差は見られなかった(図 4a,b)。

4) 血小板製剤中での *Staphylococcus spp.* の増殖と製剤の肉眼的変化

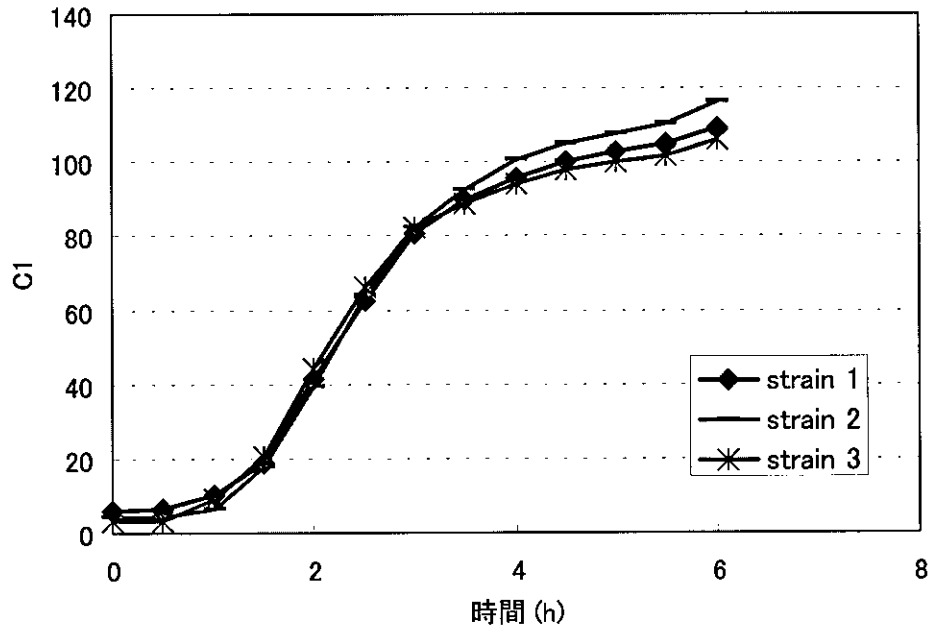
S. aureus では、接種から 10 時間以内には菌数の大きな変化はなかった(図 5a)。3 株は 10 - 24 時間に著しく増殖し、生菌数が 10^8 CFU/ml に達し、その後再び生菌数の大きな変化を認めなくなった。増殖の遅かった 1 株 (strain 2) は BHI broth 中でも他の 3 株より遅く、全株を通じて、血小板製剤中での増殖パターンは、BHI broth 中での増殖パターンとよく類似していた。4 株ともに、生菌数が 10^8 CFU/ml

に達する頃から製剤中にフィブリンと考えられる白い凝集塊の形成が肉眼的にも明らかにわかるようになり、残りの液は透明化した(図 6)。*S. epidermidis* に関しては、*S. aureus* の様な著しい増殖期はなかったが、接種後早期から増殖し続け、50 時間後には *S. aureus* と同様 10^8 CFU/ml に達した(図 5b)。製剤の肉眼的変化は認められなかった。*S. aureus* の方が *S. epidermidis* よりも増殖スピードがやや速かったが、BHI broth の場合と同様であり、菌種による差と考えられる。

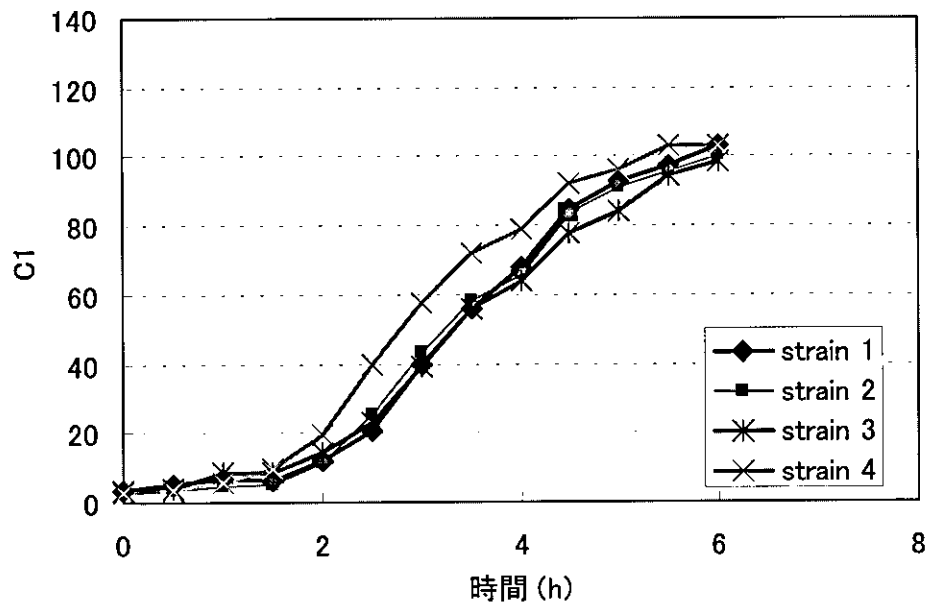
4. 考察

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、今回使用した菌株に関しては、菌種間による差に留まり、同一菌種では菌株間で大きく異なることはなかった。全体的に細菌用培地中での増殖パターンと差は見られなかったことから、血小板製剤中の因子がこれらの細菌の増殖に与える影響は少ないものと考えられる。このことは、今回使用したような環境や皮膚に生息する細菌種が万一製剤中に汚染した場合、非常によく増殖し得るということを示している。採血時における消毒の更なる徹底が重要であると考えられる。また、製剤の肉眼的変化が知られている菌種については、同様な変化が異なる複数の臨床分離株に共通して確認されたことから、製剤の目視観察が汚染製剤の発見につながる可能性は大きいと考えられる。

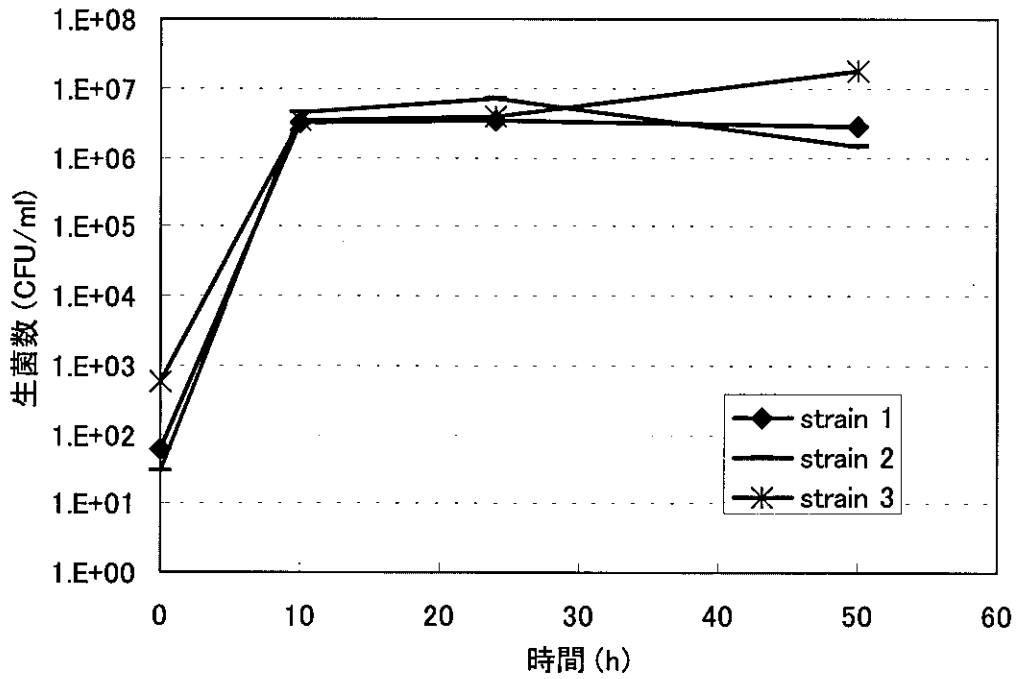
(図 1a) BHI broth中での増殖 *Bacillus cereus*



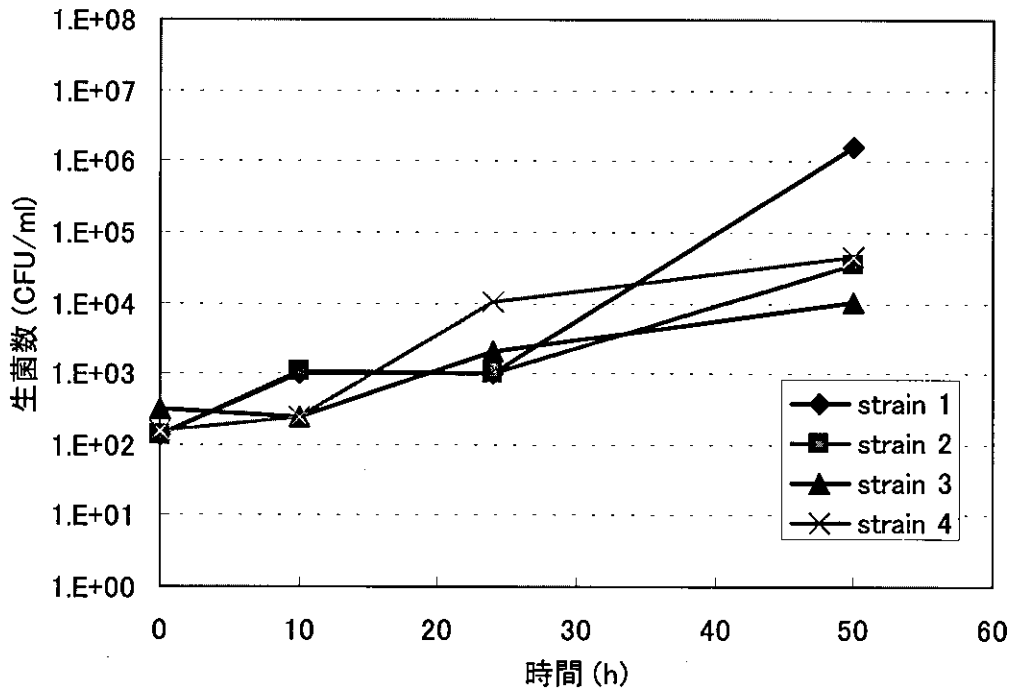
(図 1b) BHI broth中での増殖 *Bacillus subtilis*



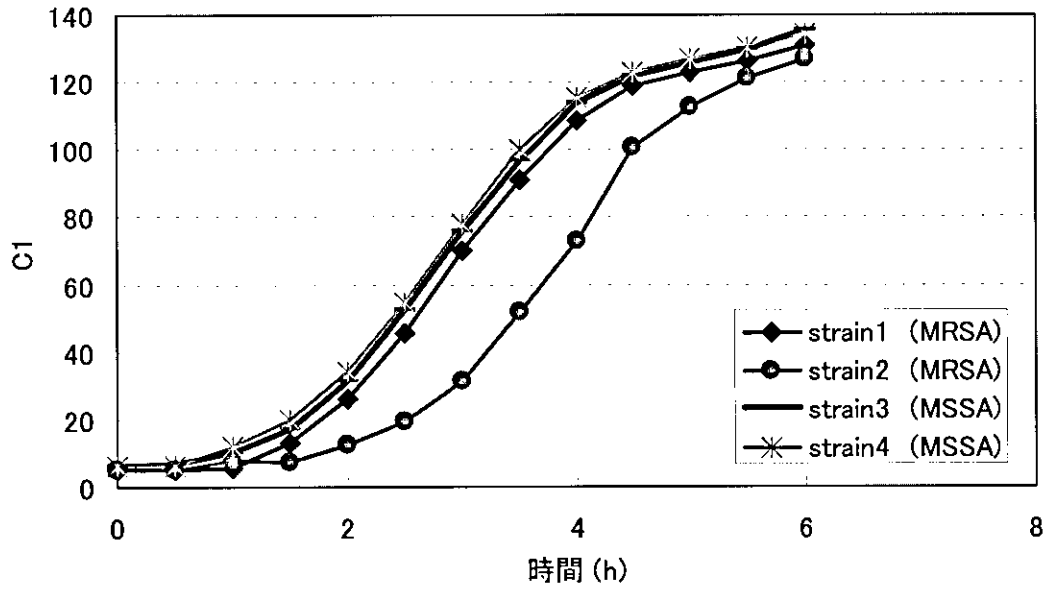
(図 2a) 血小板製剤中での増殖 *Bacillus cereus*



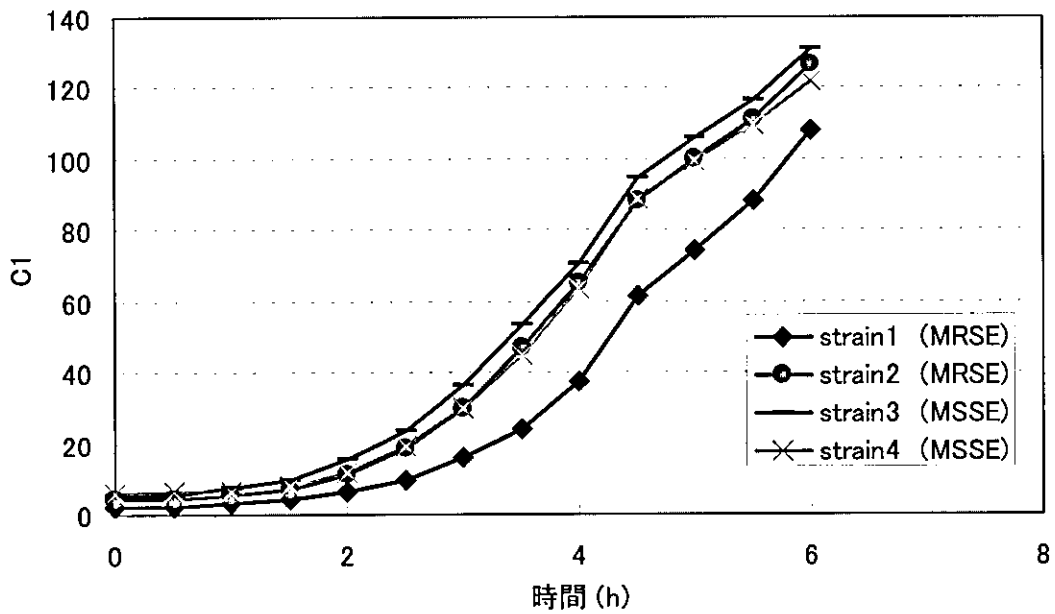
(図 2b) 血小板製剤中での増殖 *Bacillus subtilis*



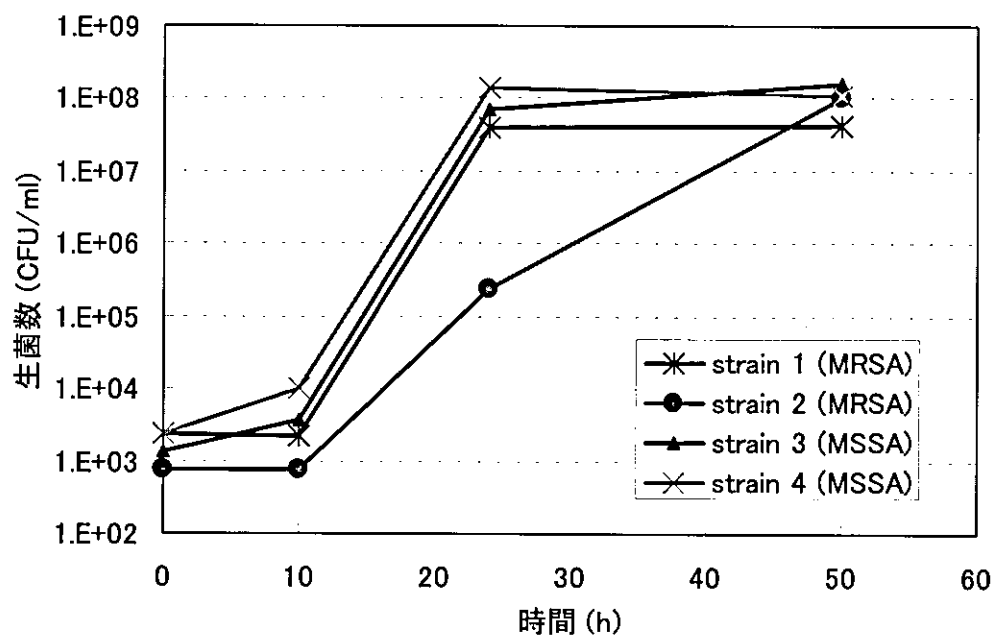
(図 4a) BHI broth 中での増殖 *Staphylococcus aureus*



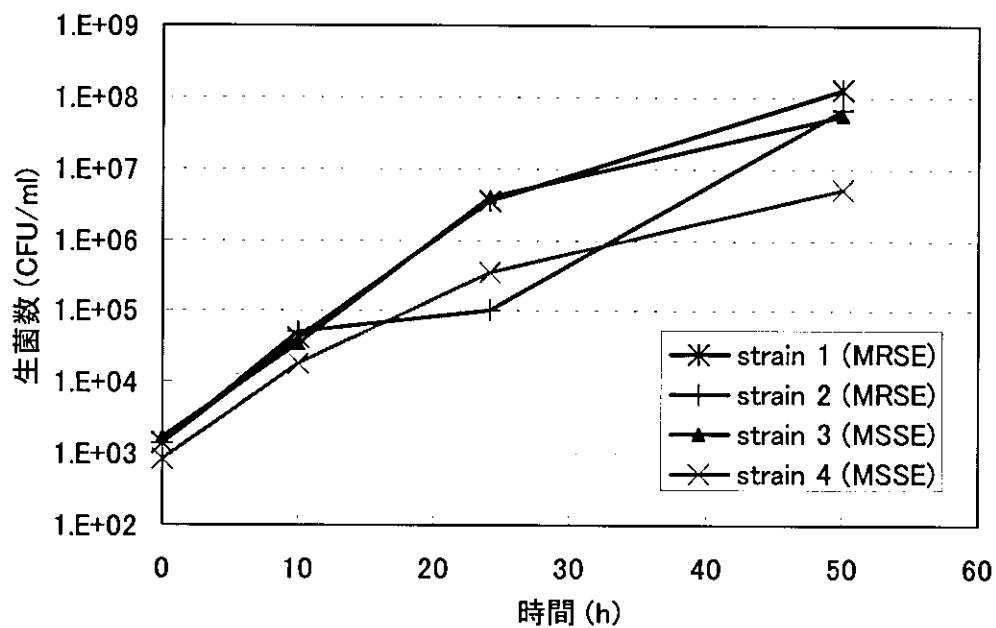
(図 4b) BHI broth 中での増殖 *Staphylococcus epidermidis*



(図5a) 血小板製剤中での増殖 *Staphylococcus aureus*



(図5b) 血小板製剤中での増殖 *Staphylococcus epidermidis*



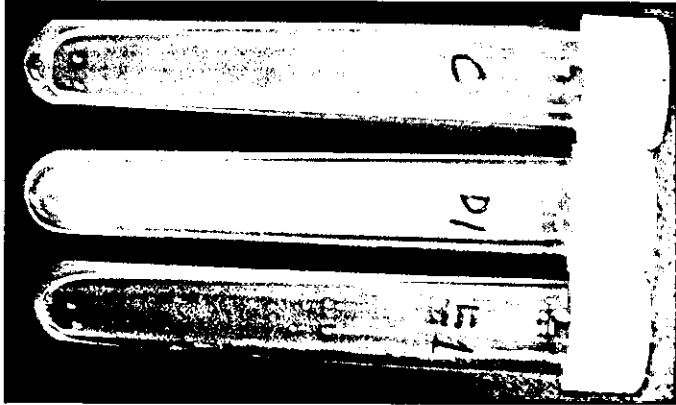


図3 *Bacillus spp.* 増殖時の肉眼的変化
上から control, *B. cereus*, *B. subtilis*

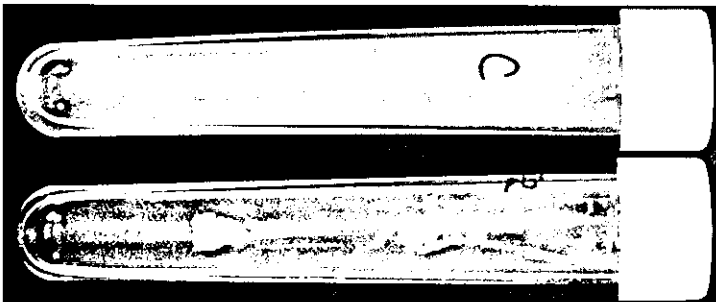


図6 *Staphylococcus spp.* 増殖時の肉眼的変化
上 ; control
下 ; *S. aureus*

厚生労働省科学研究費補助金
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16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
(H16-医薬-073)

分担研究報告書

輸血用血液製剤の細菌汚染と外観検査

分担研究者

東京都赤十字血液センター 佐竹正博 副所長

研究要旨：

血小板など血液製剤の外観試験は血液センターや臨床輸血の現場で実施可能な簡便な汚染血液鑑別手段である。今回、血小板製剤や赤血球製剤に細菌をスパイクして、経時的にその変化を観察した。これまでに得られている知見にわれわれのデータを合わせて報告し、簡便な観察手段に供されることを期待する。

A. 研究の背景と目的

輸血用血液製剤のもととなる血液は、問診を通じて健康な献血者から得られるとはいえ、一人一人が異なる環境・健康状態・疾患背景にある人間の集団からのものであるため、本質的にウイルスや細菌などの感染性病原因子を含みうる製剤である。細菌による製剤の汚染を検出するためには培養法や核酸増幅検査などのハイテクノロジーを駆使した方法もあるが、

これらがすぐ導入される状況にない現在、血液センターや臨床の現場でもっと手軽に汚染製剤を見分ける方法も見直されるべきである。そのひとつが製剤の外観検査で、出庫前や使用直前に製剤の色調、ガスの有無、異物の存在、臭気などを意識的に確認するものである。これらの指標の感度は、細菌数が $10^7 \sim 10^9 \text{cfu/mL}$ とかなり低いものであり、また使用前にそこまで細菌が増殖することもまれであ