

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

輸血用血液の細菌感染防止と血小板製剤の有効性期限延長に関する研究

(H17-医薬051)

平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 大戸 齊

平成18 (2006) 年 3 月

目次

I. 総括研究報告書	
輸血用血液の細菌感染防止と血小板製剤の有効性期限延長に関する研究	1
大戸 斉	
平成 17 年度研究班会議プログラム	8
II. 分担研究報告書	
初流血除去による細菌混入の低減について	10
佐竹正博	
フィルター法と遠心法の白血球除去における混入細菌の動態	16
浅井隆善	
血小板製剤中の低温保存と混入細菌の増殖	26
高松純樹	
血小板製剤への細菌接種： 培養式細菌検出システム BacT/ALERT と eBDS による検出	33
大戸 斉	
高酸素透過性バッグを用いた輸血用血小板の9日間： ずり応力下血小板機能測定系による評価	45
宮田茂樹	
細菌混入防止対策の世界の情勢	58
山口一成	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	64
IV. 研究成果の刊行物・別冊	65
V. (財)日本公定書協会「平成 17 年度医薬品・医療機器等レギュラトリー サイエンス総合研究推進事業」に基づく外国人研究者招へい事業 研究実績報告書	72

I. 総括研究報告書

輸血用血液の細菌感染防止と血小板製剤の有効性期限延長に関する 研究 (H17-医薬-051)

主任研究者：大戸 斉 教授 福島県立医科大学 輸血・移植免疫部

研究要旨：

1. 米国を始めとして、細菌培養試験を併用することにより、血小板製剤にこれまでの5日から7日間への有効期限延長を認める国が増えている。
2. 初流血 (30mL) 除去の有用性を検証する臨床研究を献血者フィールドに実施した。菌検出率は通常採血の0.24% (7/2967) に比し、0.07% (2/2890) と低かった。初流血除去の細菌混入防止に有効である証左が得られつつある。
3. 白血球除去フィルターによる血小板製剤の細菌除去について検討した。菌種によってはフィルターによる白血球除去が可能である。遠心法による白血球除去では、細菌除去は不可能で、細菌混入防止の観点からは別途防止方法の併用が望まれる。
4. 低温保存条件での、細菌増殖態度を検討した。その結果、10℃保存ではグラム陰性菌は増殖を阻止することは不可能であった。*Serratia* は特に増殖が盛んであった。グラム陽性菌は4℃では増殖が阻止された。血小板製剤を低温 (4℃) 保存可能とする技術の開発が待たれる。
5. 二種の培養式細菌検出装置、BacT/ALERT と eBDS、を用いて9種の細菌接種比較実験をした。両機種はほぼ同等の細菌検出力を有している。さらに両機種ともに直後サンプリングは標準法 (24 時間後) よりも検出時間を短縮することができた。培養式の細菌検出システムは有用であるが、完璧ではなく、偽陰性もありうる。
6. ずり応力下血小板機能測定系にて、血栓形成能を評価した。従来バッグで保存した7日血小板は、保存期間が長くなるにつれて、血栓の3次元的成長が障害された。しかし、高酸素透過性バッグ PO-80 で保存した血小板は、3次元的血小板血栓形成過程が良く保持されていた。血小板製剤の保存バッグ、保存条件の検討により、長期保存に耐えうる血小板機能を保持した濃厚血小板製剤を供給する可能性が示された。
7. 以上の研究により、採血技術の向上、細菌混入試験の導入、改良保存バッグの導入などにより、血小板製剤の保存期限を7日間に延長しうる条件が見えてきた。しかし、それでも完璧とは言えず、更なる検討の積み重ねが必要である。

分担研究者

大戸 斉	福島県立医科大学輸血・移植免疫部	教授
浅井隆善	静岡県赤十字血液センター	所長
高松純樹	名古屋大学医学部輸血部	教授
佐竹正博	東京都赤十字血液センター	副所長
山口一成	国立感染症研究所	部長
宮田茂樹	国立循環器病センター輸血管理室	室長

A. 研究の背景と目的

多くの先進国のうち、とりわけ日本における急速な高齢人口の増加と若年人口の減少によって近い将来、輸血用血液製剤の需要バランスの維持は困難になるものと予測されている。血小板製剤の有効期限は国際的には現在5日間であったが、欧米では細菌混入スクリーニング検査を併用することで7日に延長されつつある。

現在、日本での有効期間は3日間であるが、1999年から導入されたウイルス核酸検査(NAT)により、実質的な有効期限は2日程度と短く、血小板製剤の供給は大変厳しくなっている。また、使用する病院でも有効期限が短いため、血小板数が上昇して使用する必要がなくなっても他の患者に転用することが難しい。臨床現場ではいわば「無駄な使用」と「不足」という矛盾した状態が混在している。

しかし、血小板製剤の有効期限を単純に5日あるいは7日間に延長することに対しては細菌感染症や血小板機能低下を懸念する立場があるのも事実である。特に、前者の懸念については諸外国から多くの感染による敗血症や死亡例が報告され、日本においても例数は少ないが報告例がある。

今年度は血小板製剤の7日間保存を目標に以下の3点を中心に研究計画を立てた。すなわち、

- 1) 細菌混入防止対策と細菌混入除去技術、
 - 2) 血小板製剤中における細菌増殖の解析と細菌検査システムの評価、
 - 3) 7日間保存血小板の形態変化および機能評価である。
- 今年度は細菌混入した場合の細菌増殖の動

態と細菌混入を克服するための方策と、血小板機能を有効に維持しつつ、7日間に延長可能であるかを検証し、問題を克服する研究をすすめた。

B. 研究方法

研究目標

1. 細菌混入防止対策と細菌混入除去技術、
2. 血小板製剤中における細菌増殖の解析と細菌検査システムの評価、
3. 7日間保存血小板の形態変化および機能評価

1. 細菌混入防止対策と細菌混入除去技術

1) 採血技術の工夫と向上

採血時に最初の10~30mLを廃棄することなどにより細菌混入を防止する。献血者を対象としたフィールド研究を行った。

2) 細菌混入してもその細菌を除去・不活化する技術の開発

白血球除去フィルターなどの技術を応用することにより、少量の細菌が混入した場合、それを排除できることが可能かを遠心法とフィルター法を比較しつつ評価した。

3) 病原体不活化技術

病原体の不活化技術が主に欧州で導入されつつある。この技術の日本への応用の可能性を検討する目的で、米国における第一人者を招へいして講演討論会を実施した。

2. 血小板製剤中における細菌増殖の解析と細菌検査システムの評価

- 1) 培養式細菌検出システムによる接種細菌の検出

二種の培養式細菌検出装置、BacT/ALERT(Biomerieux社)とeBDS(Pall社)、を用いて各種細菌を接種し、経時的に検出レベルに達しているかを比較検討した。あわせてサンプリング時間をメーカー推奨時間(24h)と0hの2点に設定して、早期サンプリングの可能性を検討した。

2) 血小板製剤の低温保存による混入細菌類の増殖抑制

現時点では血小板製剤の保存は室温で振盪するのが最も優れた方法である。米国で冷蔵保存を可能とする方法が開発されつつある。血小板製剤の4℃保存条件での接種細菌の増殖を検討した。

3. 7日間保存血小板の形態変化および機能評価

1) ずり応力下血小板血栓形成能測定による保存血小板の機能評価

生体内の血小板機能をよく反映していると考えられるずり応力下血小板血栓形成能の測定により、保存による血小板機能の劣化の程度を正確に評価することを目指した。とくに、日本で開発した高酸素透過性バッグを用いての保存を検討した。

倫理面への配慮

3日間の保存期間を越えた血小板製剤を患者に使用することはしていないので、倫理的に直接問題となる事態は発生しないと思われる。しかし、血小板製剤を用いての研究にあたって、赤十字血液センターから譲渡を受けるので、善意の献血によるものであることを自覚して、丁重な研究を心掛

けた。

C. 研究結果

各分担研究員の研究成果を以下に示す。

1) 佐竹正博 班員

採血の際の初流血を除去する方法を、動物実験と、実際の採血での効果を検証してきた。動物実験では、きわめて高濃度の細菌を皮膚に塗布したイヌから採血する際に、初流血を27mL取り分けることによって本採血への細菌の流入を効率よく減少させることができた。

初流血(30mL)除去を実際の献血者を対象にフィールド臨床研究を実施した。7mLずつ好気性ボトルと嫌気性ボトルに加え、BacT/ALERTにて7日間培養した。菌が検出されたのはコントロール群(7/2967, 0.24%)に比し、スタディ群(2/2890, 0.07%)は少なかったが、統計的には有意差は見られなかった。検出菌は全て、皮膚常在菌であった。

初流血除去の細菌混入防止に有効である証左が得られつつある。いくつかの問題を克服することにより、初流血除去は血小板製剤の有効期限延長に寄与できることを示した。

2) 浅井隆善 班員

血小板製剤の細菌混入について、特に菌血症状態供血者からの採血による細菌混入の可能性と、混入した細菌の動態を検討した。特に、2004年度から導入されている血小板製剤の保存前白血球除去によって、混入細菌がどのような動態を示すかについて

研究した。

フィルターによる白血球除去では、菌種によっては除去が期待できるが、除去できない菌種もあることが判明した。さらに、遠心法による保存前白血球除去では、菌種に関わりなく細菌除去効果は期待しにくく、細菌混入防止の観点からは遠心法には別途の防止方法の併用が望まれる。

3) 高松純樹 班員

血小板製剤は血小板機能保持のため、室温で保存されるので、菌の混入があれば、増殖しやすい。低温保存条件での、細菌増殖態度を検討した。その結果、10℃保存条件ではグラム陰性菌 (*Serratia Marcescens*, *E. Coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) の増殖パターンは菌種により多様で、10℃で増殖を阻止することは不可能であった。*Serratia* は特に増殖が盛んであった。グラム陽性菌 (*Bacillus*, *Staphylococcus*) は4℃では使用した全ての菌種で、その増殖が阻止された。血小板製剤を低温 (4℃) 保存可能とする技術の開発が待たれる。しかしその場合でも、低温保存でも生き残る細菌が存在するので、できる限り使用直前まで製剤を低温下に置くことが必要である。

4) 大戸 齊 班員

広く世界的に普及している二種の培養式細菌検出装置、BacT/ALERT (Biomerieux社) と eBDS (Pall社)、を用いて各種細菌を接種し、経時的に検出レベルに達しているかを比較検討した。あわせてサンプリング時間をメーカー推奨時間 (24h) と 0h の2点

に設定して、早期サンプリングの可能性を検討した。

24時間後のサンプリング試験で見ると *S. aureus*, *E. coli*, *S. marcescens*, *K. oxytoca*, *S. liquefaciens*, *B. cereus*, *E. cloaca* については両機種間に感度の差は認めなかった。しかし、*S. Epidermidis* については eBDSの方が、*P. Aeruginosa* については BacT/ALERTの方が感度良く検出した。以上より、両機種はほぼ同等の細菌検出力を有していると考えられた。さらに2機種ともに直後サンプリングは標準法 (24時間後) よりも検出時間を短縮することができた。細菌混入の判別法として培養式の細菌検出システムは検出に有用である。

5) 宮田茂樹 班員

種々の保存期間の血小板を、全血擬似検体を作成してずり応力下血小板機能測定系にて、血栓形成能を評価した。従来保存バッグで保存した7日間保存血小板は、保存期間が長くなるにつれて、血栓の3次元的成長が障害されるのを認めた。

しかし、高酸素透過性バッグ PO-80 を用いた濃厚血小板製剤では、汎用バッグ PO-65 の7日間保存で認められた3次元的血栓形成過程の障害が、高酸素透過性バッグを用いることで軽微となり、3次元的血小板血栓形成過程が7日保存後でも比較的良く保持され、汎用バッグの5日間保存後の血小板機能と比しても遜色ない結果となった。血小板製剤の保存バッグの改良、保存条件の検討により、長期保存に耐えうる

血小板機能を保持した濃厚血小板製剤を供給する可能性が示された。

6) 山口一成 班員

最近の血小板製剤の細菌混入防止対策について情報収集を行った。ここ数年でヨーロッパや北米では、血小板製剤に輸血前の細菌検出を行うために自動化培養システム（BacT/ALERT、Pall DBS、Scansystemなど）を導入する国が増加してきた。しかしながら、義務として行っているところはまだ少数である。また、さらに輸血後の敗血症のリスクを減少させるために、ヨーロッパでは、細菌や病原体を不活化する技術（INTERCEPT Blood system）が取り入れられつつある。

D. 考察

日本を除いて世界中で血小板製剤の有効期限は5日間である。近年、細菌混入試験を併用した製剤には7日間に延長を許可する国が増加している。ウイルス核酸試験を開始して以来、実質的な血小板製剤有効期間は1.5～2日に短縮している。その結果、血小板輸血が出来ないという状況と、病院施設内で他の患者に転用できないという不都合も頻発している。血小板製剤の有効期限の延長は差し迫っている問題である。

有効期限の延長にあたっては、二つの問題の解決が要求される。輸血細菌敗血症の回避と血小板機能の良好保持である。とりわけ、細菌汚染は受血者に重篤な有害反応をきたす可能性があり、重要な課題である。

欧米と比して、日本の血小板製剤は細菌

学的に安全性が高いといわれている。日本の血小板製剤はほぼ100%が成分採血由来であるためであるが、3日間の有効期限に設定しているためである可能性もある。

佐竹班員は初流血除去の有用性を献血フィールドで実証を試みた。元来、細菌混入頻度はかなり低いので、統計的有意差には至っていないが、初流血除去の有用性が示され、臨床応用が間近いという。初流血除去はその有効性が諸外国の多くの研究によっても証明されている。初流血除去血小板製剤には3日間よりも長い有効期限が設定されるべきである。

浅井班員は同じ白血球除去血小板製剤であっても、遠心法によるものはフィルター法と異なり、混入した場合細菌数は減少していないことを証明した。細菌混入防止の観点からはフィルター法と遠心法は明確に区別されるべきであろう。

高松班員は低温度保存による細菌増殖の抑制について検討した。10℃では増殖抑制は期待できないが、4℃に設定すれば、とくに常在菌であるグラム陽性菌の増殖が抑制されることを報告した。米国で現在臨床研究が実施されている、糖付加血小板製剤の4℃保存に関する有効性の成果発表が待たれる。

宮田班員によって血小板血栓3次元形成能は保存日数と比例して低下することが報告されてきた。現在の保存条件(バッグ、血漿保存など)のまま、無条件に7日に有効期限を延長すると、血栓止血機能において劣化する。しかし、高酸素透過性バッグで保存すると、機能が良く保たれることを見い

出した。In vitro のデータは昨年度までに大戸らが詳しく検討し、報告している。in vivo を模倣した血栓形成能でも優れた保存性能が示されたので、来年度以降は in vivo データを収集することが必要であろう。

大戸班員は広く世界的に普及している二種の培養式細菌検出装置、BacT/ALERT (Biomerieux 社)と eBDS(Pall 社)を比較検討した。両機種とも大変優れた性能を有し、特に BacT/ALERT は世界的に採用されている。eBDS には嫌気性菌検出にやや難があり、BacT/ALERT は必要検体量が多いという欠点が指摘されている。また、両方ともに偽陰性を生じる可能性が今年度の検討で明らかになった。

受血患者に輸血細菌混入に合致する臨床症状が出現した場合でも細菌混入を実際に証明できたケースは大変少ない。血液センター保存検体で確認検査をおこなう現在のシステムに問題がある可能性も否定できない。4℃や室温で保存した製剤中で増殖した可能性が無視できないからである。

来年度以降に向けて、当研究班は特に病医院施設での、1) 輸血血液の取り扱い、2) 輸血血液の外観試験、3) 副作用発現時の対処法、4) 細菌混入が疑われる場合、血液検査のサンプル採取保存と項目、5) 因果関係の蓋然性などについて、検討する予定である。最終年度までにこれらを含んだ指針を作成する予定である。

E. 健康危険情報

特筆すべき、健康に影響を及ぼした事象は発生しなかった。

F. 研究発表

(研究論文)

1. 江月将史、伊藤貴俊、大戸 亘、他：高酸素透過性バッグによる高単位血小板の室温長期（9日間）保存。日本輸血学会雑誌、2005; 51(6):578-584.
2. 宮田茂樹：心臓外科における輸血。外科。2005; 67: 313-318.
3. 宮田茂樹：自己血輸血と血液準備。新心臓血管外科管理ハンドブック。国立循環器病センター心臓血管外科部門編 南江堂 2005; 5-8.
4. 宮田茂樹、亀井政孝：術後出血と管理輸血。新心臓血管外科管理ハンドブック。国立循環器病センター心臓血管外科部門編 南江堂 2005; 81-83.

(学会発表)

- 1) 川畑絹代、江月将史、大戸 亘。血小板製剤における接種細菌の増殖性と検査法の検討。第53回日本輸血学会総会。日本輸血学会雑誌、2005; 51(2):194.
- 2) 江月将史、川畑絹代、大戸 亘、他。アフレーシス由来血小板製剤の高酸素透過性バッグによる9日間保存評価。第53回日本輸血学会総会。日本輸血学会雑誌、2005; 51(2):194.
- 3) Kawabata K, Ezuki S, Ohto H. Spike test comparing two bacterial detection systems. Transfusion, 2005;45(3S):54A
- 4) Ezuki S, Kawabata K, Ohto H:

Long-day storage of a low platelet concentration at room temperature in a polyolefin container with higher oxygen permeability. *Transfusion*, 2005;45(3S):77A

2005.

- 5) 宮田茂樹: 血小板保存期間と血小板機能. 第 29 回日本血液事業学会. 仙台、

H. 知的所有権の発生
なし。

輸血用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

日時：2005年7月22-23日

会場：福島県立医科大学 光が丘会館

7月22日(金)

13:30-13:40 **あいさつ** 厚生労働省血液対策課 中山 鋼 課長補佐

座長 山口一成 (各発表の後に10分ずつの討論)

13:40-14:10 **血小板製剤有効期限延長の行政的手続**
演者 荒戸 照世 (医薬品医療機器総合機構生物系審査部)

14:20-14:40 **流動状況下における血小板血栓形成能測定系を用いた
保存血小板製剤の機能評価**
演者 宮田 茂樹 (国立循環器病センター)

14:50-15:10 **9日間保存血小板製剤のin vitro 評価**
演者 大戸 斉 (福島県立医科大学輸血・移植免疫部)

15:20-15:40 **低温下における血小板活性化の評価**
演者 寺田 周弘 (大阪府赤十字血液センター)

休憩 (10分)

座長 宮田茂樹

16:00-16:20 **血小板置換液 特にM-solの性能について**
演者 東 寛 (北海道赤十字血液センター)

16:30-16:50 **フィルターによる白血球除去と遠心による白血球除去は同じか**
演者 浅井 隆善 (静岡県赤十字血液センター)

17:00-17:30 **Depletion of blood-born TSE infectivity by
ligand adsorption**
演者 David Hammond (Department Holland
Laboratory, American Red Cross)

17:40-18:00 **prion 除去フィルター**
演者 慶徳 雅人 (日本Pall)

7月23日(土)

座長 高松純樹 (各発表の後に10分ずつの討論)

8:30-9:00 **輸血後感染症報告の現況2004年**

演者 百瀬 俊也 (日本赤十字社血液事業本部)

9:10-9:40 **細菌混入増殖した血小板製剤の外観試験による見分け**

演者 佐竹 正博 (東京都赤十字血液センター)

9:50-10:10 **血小板製剤による輸血後細菌感染症例**

演者 石田 明 (慶応大学輸血・細胞治療部)

10:20-10:50 **血液製剤におけるGram陽性細菌とGram陰性細菌の増殖**

演者 高松 純樹 (名古屋大学輸血部)

休憩 (10分)

座長 浅井 隆善

11:10-11:30 **初流血分離による細菌混入の防止**

演者 佐竹 正博 (東京都赤十字血液センター)

11:40-12:10 **細菌検出装置3機種**

(BacT/ALERT, eBDS, Scansystem)の比較評価

演者 高橋 勲 (愛知県赤十字血液センター)

12:20-12:50 **Seven-day storage of platelets combining
with bacterial detection**

演者 Olivier Martinez (Biomereix)

事務局：〒960-1295 福島市光が丘1 福島県立医科大学 輸血・移植免疫部

菅野隆浩 TEL:024-547-1538 FAX:024-549-3126

Email:btkanno@fmu.ac.jp

入場整理代：1000円 (各種資料、飲み物、軽食)

Ⅱ. 分担研究報告書

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17年度研究報告書

「輸血用血液の細菌感染防止と血小板製剤の有効性期限延長に関する研究」

(H17-医薬-051)

分担研究報告書

初流血除去による細菌混入の低減について

分担研究者：佐竹正博 副所長

東京都赤十字血液センター

研究要旨：

血小板製剤の汚染の原因菌としては皮膚に付着していた菌が多い。したがって、問診で菌血症のドナーを同定・排除することが困難である現在、血小板製剤の細菌汚染率を低下させる効果的な方法は、皮膚に存在する細菌が混入するのを防ぐことである。著者たちは採血の際の初流血を除去する方法を、動物実験と、実際の採血での効果を検証することによって示してきた。動物実験では、きわめて高濃度の細菌を皮膚に塗布したイヌから採血する際に、初流血を27mL取り分けることによって本採血への細菌の流入を効率よく減少させることができた。

初流血(30mL)除去の臨床研究を実施した。7mLずつ好気性ボトルと嫌気性ボトルに加え、BacT/Alertにて7日間培養した。菌が検出されたのはコントロール群(7/2967, 0.24%)に比し、スタディ群(2/2890, 0.07%)は少なかったが、統計的には有意差は見られなかった。検出菌は全て、皮膚常在菌であった。

初流血除去の細菌混入防止に有効である証左が得られつつある。いくつかの問題を克服することにより、初流血除去は血小板製剤の有効期限延長に寄与できるであろう。

A. 研究の背景と目的

輸血用血液製剤に細菌が混入する経路には次のようなものがある。1) 採血キットなどの器材が細菌に汚染されていた場合、2) ドナーが菌血症の状態にあった場合、3) 皮膚に付着していた細菌が穿刺の際に血液に混入する場合、4) 採血後の製剤の調製工程中に細菌が混入する場合。現在1)の原因による汚染は極めてまれである。4)の原因によるものも、GMPの規制下に血液製剤が調製されている現在まれである。最も細菌汚染の危険が高いとされている血小板製剤(PC)の汚染は、2)、3)の原因によるものがほとんどである。その原因となる細菌は、赤血球製剤の場合とは違って、ドナーの菌血症に由来するものよりも、ドナーの皮膚に付着していたものの方が多いことが最近の調査で明らかになっている(アメリカでのBaCon Studyなど)。

赤血球製剤は低温で保存されるため、低温でも増殖する特殊な菌しか通常その中には検出されない。そのような菌はもともと皮膚に常在することが少ない。一方、臨床現場や一般人に認められる菌血症ではきわめて多種類の細菌が検出され、それらの中には低温好性菌が見出される。その結果赤血球製剤にはそのような特殊な細菌が検出される結果となる。常温で保存されるPCは、PCそのものが一般的な細菌培養の条件を提供しているため、PC汚染の原因菌の分布は、採血血液に細菌が混入する原因の相対的な頻度をそのまま表した結果となる。

輸血用血液の細菌汚染を防ぐ方策には次のようなものがある。1) 細菌の混入を防ぐ。ドナーの皮膚穿刺部位の消毒法の改善、

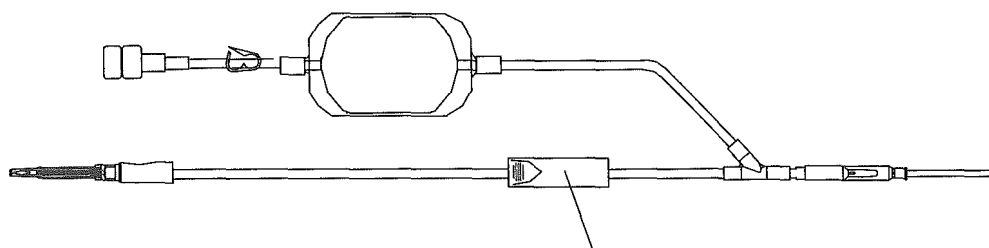
初流血の除去、菌血症の状態にあるドナーの排除、などがこれにあたる。最も根本的な方法であり、これが完成すれば他の戦略は不必要となるが、実際には効率的な方法はない。2) 細菌の混入した製剤を検出・排除する。培養法や、染色・スキニング法、核酸増幅法などの種々のスクリーニング法が開発または実用化されている。3) 細菌を増殖させない。保存法を改良して細菌をできるだけ増殖させないようにする。PCの低温保存、凍結保存など。4) 細菌を不活化する。種々の化学物質を加えて細菌の増殖能をとめる方法が考案、実用化されている。

前述したようにPCの汚染の原因菌としては皮膚に付着していた菌が多い。したがって、問診で菌血症のドナーを同定・排除することが困難である現在、PCの細菌汚染率を低下させる効率的な方法は、皮膚に存在する細菌が混入するのを防ぐことである。著者たちは採血の際の初流血を除去する方法を、動物実験と、実際の採血での効果を検証することによって示してきた。動物実験では、きわめて高濃度の細菌を皮膚に塗布したイヌから採血する際に、初流血を27mL取り分けることによって本採血への細菌の流入を効率よく減少させることができた。

海外においてはすでに初流血除去は血液事業の中に取り入れられているところもあり、オランダでは、20~30mLの初流血を除去して汚染率が1.05%から0.43%に低下したと報告されている。ノルウェーでは、30mL除去することで汚染率は0.28%から0.16%に低下した。カナダ・ケベックでは、初流血除去前は3年間に18例の細菌汚染

があり(1/2670)、2例の死亡があったが、40mL除去するようになってから2年間に1例のみの細菌汚染(1/27735)であったという。

日本ではPCの有効期限が3日であることから、PCの細菌汚染の実情は欧米と異なることが予想され、また、実際に臨床上PC輸血による敗血症の例数は欧米に比しかなり少ない。日本の血液事業にこの初流血除去を導入して現実には細菌汚染の頻度を減らすことが出来るかどうかは、実際にこの方法を献血の現場で施行して汚染率の変化をみる以外に方法はないと思われる。



後、採血ラインに100mL用の小バッグを無菌接合装置でつなぎ、よく攪拌した本採血から10mLを逆流させてとりわけ、ラインをシール分離してから小バッグを血液センター母体に速やかに搬送した。その中の血液を母体で全自動血液培養装置BacT/Alertを用いて、好気と嫌気の両ボトルに血液7mLを加えて培養を行った。スタディ群では、初流血を30mL取り分けた後通常の採血を行い、培養をコントロール群と同様に行った。培養は7日間継続し、陽性の場合には細菌種の同定を行った。PC本体は医療機関に供給されるので、それら

B. 研究方法

培養実験を実施するに当たり、文献にて欧米の実験方法を参考にすると、多くの解釈困難な事例が出る事が知られている。初流血バッグ、第二の初流血バッグ(これを本採血の代わりとする)、本採血バッグの三者の培養結果の乖離がその主なものである。この煩雑さを避けるために、われわれは本採血の血液の一部を採取してそれを評価する、最もシンプルでまた実際の血液製剤そのものの評価が出来る方法を採用した。コントロール群では、通常の400mL採血の

の医療機関にはこのスタディが施行されていることをあらかじめ知らせておき、供給後に培養陽性となることありうることを周知した。

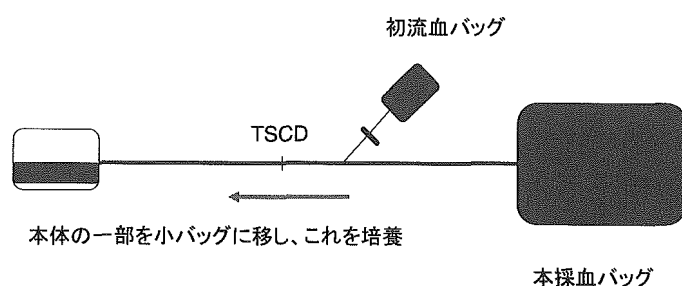
ドナーへの Informed Consent 同意

このスタディに参加する血液ドナー全員に対して、提供した血液の一部が培養に供されること、培養の結果陽性であっても献血者にはなんら負担がかかることはないこと、スタディ群については、初流血除去のために通常より10mL余計に採血される場合ありうることを説明し、署名による

承諾を得た。以上の研究計画については、
赤十字血液センター内の倫理委員会で承認

された上施行された。

採血後小バッグをTSCDでつなぎ、本体の血液の一部を小バッグに移す。その後ラインをシールして小バッグを切り離し、中の血液を培養する



C. 研究結果

コントロール群 2967 例、スタディ群 2890 例について培養解析を終了した。コントロール群でこれまで 7 例の陽性例 (0.236%)、スタディ群で 2 例の陽性例 (0.069%) が見出された。コントロール群の 7 例の細菌種は、*Propionibacterium Acnes* (アクネ菌) 4 例、コアグララーゼ陰性ブドウ球菌 (CNS) 1 例、表皮ブドウ球菌 1 例、おそらくアクネ菌と思われる嫌気性グラム陽性桿菌 1 例である。スタディ群の 2 例はいずれもアクネ菌であった。初流血を除去したほうが細菌の混入が少ない傾向があるが、有意差は出なかった。検出された菌の種類を見ても、すべて表皮に存在していた菌とみなしてもよいものであ

り、この除去法が皮膚の菌を有効に除去していることを示している。これらが血液製剤に最初に混入する菌の種類の一般的な割合であろう。一方環境菌による汚染がみられなかったことは、血液センター内でしばしば問題とされるビニールライン接合装置による接合の際の無菌性の維持について、接合装置が信頼できるものであることを示しているといえるだろう。アクネ菌はほぼ 3 日以上培養で、そのほかの菌は 24 時間以内で培養が陽性となっており、これまでいわれている BacT/Alert の性能がよく表れている。アクネ菌を除いた汚染率は、コントロールで 0.101%、初流血除去群で 0% である。

	コントロール群	初流血除去群
培養数	2,967	2,890
陽性検体	7 (0.236%) <i>P. Acnes</i> (4) <i>S. Epidermidis</i> (1) 嫌気性グラム陽性桿菌 (1) <i>Coagulase negative Staphylococcus</i> (1)	2 (0.069%) <i>P. Acnes</i> (2)

D. 考察

初流血除去を事業に導入するにあたって留意・検討しなければならない技術的な問題点がいくつかある。1) まず、初流血を取り分ける子バッグへのラインを閉じるクレンメの性能で、閉じた後ここから本採血ラインに血液の逆流があってはならない。本来の目的からいって逆流は起こってはならないことであるし、また採血開始後にここから検査用の血液検体を得るので、子バッグ中の血液は基本的に汚染された血液とみなすべきである。2) 子バッグのラインの血液は採血中に凝固すると思われる。成分採血の場合、この凝固塊の一部が採血・返血のサイクルの間にドナーの体内、または採血血液の中に入る可能性がある。これを予防するために採血開始時にこのラインを ACD で満たす手順を加える予定であるが、その効果はまだ検証されていない。また、この部分を ACD で満たしても、成分採血が終了するまで有効であるかは不明で

ある。3) 全血採血と成分採血において初流血除去の手順が異なる。これらを含めて採血課職員の、手順に関する教育訓練が非常に重要である。4) 全血採血の場合、検査用の採血はほとんど初流血から行われるので、セグメント用のライン中の血液は抗凝固剤の入っていない血液になる。このためこの部分の血液のしごきと本体バッグの攪拌が必要となり、採血課職員に大きな負担がかかる。5) 初流血の大部分は検査用の検体に利用できるが、それでも幾分かの血液は廃棄される。保存前白血球除去の導入によるフィルターデッドボリュームとあわせて、総採血量の増加、または製剤の容量の減少を引き起こす可能性がある。

E. まとめ

初流血除去を導入するにはいくつかの問題点を解決しなければならないが、初流血除去によって血小板製剤の皮膚付着菌による汚染はかなり減らすことができるのでは

ないかと思われ、血小板製剤の有効期限延長を可能とする拠りどころになるであろうと思われる。

F. 副作用や有害事象

健康危害をきたした事例は発生しなかった。

G. この研究による特許や論文、学会発表

特許はなし。

論文は準備中である。

学会発表

「初流血除去による細菌汚染の低減について」 (シンポジウム「血小板製剤の有効期限延長について」)

第29回日本血液事業学会総会 平成17年
10月13日、仙台

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17年度研究報告書

「輸血用血液の細菌感染防止と血小板製剤の有効性期限延長に関する研究」

(H17-医薬-051)

分担研究報告書

フィルター法と遠心法の白血球除去における混入細菌の動態

分担研究者：浅井隆善 所長

静岡県赤十字血液センター

研究要旨：

血小板製剤の細菌混入について、菌血症状態供血者からの採血による細菌混入の可能性と、混入した細菌の動態を検討した。特に、2004年度から導入されている血小板製剤の保存前白血球除去によって、混入細菌がどのような動態を示すかについて研究した。その結果、白血球除去フィルターを併用した白血球除去では、菌種によっては細菌除去が期待できるものもあるが、他の菌種では除去が期待できないものもあることが判明した。さらに、遠心法による保存前白血球除去では、菌種に関わりなく細菌除去効果は期待しにくく、現在の血小板採血方法に適した細菌検出方法の併用が望まれる。