

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 - 一般 - 051)

平成18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 大戸 齊

平成19 (2007) 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 18年度研究班会議プログラム	9
II. 分担研究報告書	
<i>Propionibacterium acnes</i> の病原性について	11
佐竹正博	
血小板成分採血時における混入細菌の動態、および混入細菌増殖時pH変化	23
浅井隆善	
低温保存条件における接種細菌の増殖抑制効果	39
高松純樹	
高酸素透過性バッグを用いて保存した高単位血小板製剤の生体内寿命評価	47
大戸 斉	
高酸素透過性バッグを用いて保存した濃厚血小板のずり応力下血栓形成能を用いた評価	57
宮田茂樹	
ドイツにおける血小板製剤の細菌安全性対策	69
山口一成	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	75
IV. 研究成果の刊行物・別冊	77
V. (財)日本公定書協会「平成18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」による外国人研究者招へい事業研究実績報告書	83

I. 総括研究報告書

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18年度総括研究報告書

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-一般-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、ドイツ、オランダ、ベルギーなど、血小板製剤に細菌培養試験を実施する国が増加している。加えて細菌混入スクリーニングを施した血小板製剤には従来の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. 初流血除去は殆どの先進国では導入している。昨年度の初流血（30mL）除去についての報告（細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）を受けて、初流血除去は2007年3月から全国の赤十字血液センターに導入されることになった。1年以内を目処に有効期限は現在の採血後72時間から72時間+ α （3日後の夜12時まで）に延長される見込みである。
3. 日本で血液製剤から検出される菌種の半数以上を *Propionibacterium acnes* が占める。*P. acnes* を接種した血小板製剤をマウスに静注し、病原性を評価した。製剤中のケモカインとサイトカイン（IL-1 β 、IL-6、IL-8、RANTES）の蓄積は著しかった。しかし、菌の増殖速度はきわめて遅く、組織学と臓器コロニー数からは病原性は証明できなかった。
4. 低温保存条件での、細菌増殖態度を検討した。グラム陽性菌 (*Staphylococcus aureus*) は4 $^{\circ}$ C、10 $^{\circ}$ Cでは増殖が抑制された。グラム陰性菌 (*Serratia marcescens*, *Escherichia coli*) 10 $^{\circ}$ C保存では増殖を阻止することは不可能であった。4 $^{\circ}$ Cでは *E. coli* は増殖抑制されたが、*Serratia* は抑制できなかった。
5. 臨床現場を想定して複数菌の混入による菌相互の干渉を検討した。*S. aureus* と *S. Marcescens* を血小板製剤に混合接種すると両菌とも干渉を受けることなく、本来の増殖パターンを呈した。
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。
7. 高酸素透過性バッグ PO-80 で7日間保存した血小板を RI ラベルしてドナーに返血し、回収率と血小板寿命を新鮮血と比較した。極めて優れた保存能力を示す結果が得られた。
8. 以上の研究により、初流血除去など採血技術の向上、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。

分担研究者

大戸 齊	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

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、輸血用血液製剤の需要バランスの良好な維持は困難になりつつある。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「不適切な使用」と「不床」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が懸念される。特に、前者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 日間保存延長の可能性を検証するために以下の 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 日間保存血小板の機能評価である。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を、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討し、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

昨年度は採血時に最初の 10~20mL 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。今年度は実際に全国血液センターに導入される見通しが立った。

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

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について評価した。また、冷蔵保存によって増殖速度を緩徐にすることが可能かも検討した。

3) 病原性の評価

日本の血液製剤から検出される菌種の 80% は *Propionibacterium acnes* であるが、その病原性について評価を試みた。

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ことは昨年度に報告した。成績はまとめ、早期サンプリングは偽陰性 false negative 率が高まるので勧められない。

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は室温で振盪保存が機能上最も優れた方法である。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、および生体内生存率

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、高酸素透過性 PO-80 バッグ保存による血小板機能を評価した。

また、PO-80 バッグにて 7 日間保存した血小板の回収率と生体内血小板寿命を検討した。

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、丁寧な研究を心掛けた。

C. 研究結果

各研究員の研究成果を以下に示す。

1) 佐竹正博 班員

これまで採血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。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 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ことは一昨年に報告した。

初流血 (30mL) 取り分け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 (昨年度)。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、2007 年 3 月を目処に全国の赤十字血液センターでこの手技が導入される見通しである。

今年度は輸血用血液から検出される菌の 80% を占める *Propionibacterium acnes* (アクネ菌) の毒性評価を試みた。*P. acnes*、または *Staphylococcus aureus* を接種した血小板をマウスに静注し、肝機能、臓器コロニー数、組織学、体重変化、サイトカイン・ケモカイン類を測定した。*P. acnes* は増殖速度が極めて遅かった。組織学、臓器コロニー数からは *P. acnes* の病原性の存在は証明できなかった。しかし、*P. acnes* 接種血小板製剤には菌数自体は少ない状態であっても、IL-1 β , IL-6, IL-8, RANTES の炎症性サイトカイン・ケモカインが高濃度で蓄積されていた。しかし、これまで日本で

は年間 70 本ほどの *P. acnes* 混入血小板製剤が医療施設に供給されている可能性があるが、感染症副作用報告が見当たらないことから、*P. acnes* の毒性は副作用を呈さない程度に低いものと考えられた。

2) 浅井隆善 班員

採血時の混入細菌の動態を検討してきた。今年度は成分採血装置の遠心分離による細菌の動態を調査した。その結果、*Staphylococcus epidermidis* は、血小板成分や血漿中には残りにくい、*Escherichia coli* と *Yersinia enterocolitica* は、血小板成分中に比較的残存し、*Pseudomonas aeruginosa* では、血小板成分に高濃度に集積する傾向が認められた。

pH 変化による汚染細菌増殖の検出について検討した。pH 変化による細菌検出に適用可能であるが、血小板代謝による pH 変化の影響を鑑別する問題が残る。また、CO₂ センサーを内蔵した定性試験用呈色反応方式細菌検査を血小板製剤の汚染細菌検出に用いることの検討を行った。検査感度や費用対効果、および簡便性の諸点において有用であったが、血小板が産生する CO₂ の影響を鑑別する問題が残る。本機種は、特異性改良を含めて検討を行う価値がある。

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。臨床分離菌 3 種 10 株を血小板製剤に接種し、増殖を観察した。

Staphylococcus aureus は低温条件 (4℃、10℃ともに) で増殖が 4 日間抑制された。*Serratia marcescens* は、低温で増殖スピードが遅くなり、現状の保存条件では 1 日で達する菌数に、10℃静置では 5 日後に達した。低温保存によっ

て増殖スピードが遅くはなったが、4℃でも菌の発育を阻止することはできなかった。

Escherichia coli は 3 株とも 4℃ではほぼ増殖が抑制されたが、10℃では増殖スピードが遅くなったものの、菌の発育を阻止することはできなかった。

さらに、異なる菌種の複数汚染条件での菌数変化を観察した。2 菌種混在しても、それぞれを単独で接種した場合とほぼ同様の発育を示した。

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。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 斉 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) と早期 (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。二機種ともに直後サンプリングは特に菌数が少ない場合に偽陰性 false negative が生じた。標準法 (24 時間後) サンプリングが適切な使用方法である。24 時間後のサンプリング試験で見ると、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。

これまでに血小板保存用高酸素透過性バッグ (PO-80) にて長期間 (9 日) 保存した血小板機能は in vitro では、安定して、血小板機能が保存されることを報告してきた。次のステップとして、in vivo での評価を行なった。健康人ボランティア

アより採取した血小板製剤を PO-80 にて 7 日間保存した後、返血当日採取新鮮血小板とともにそれぞれ Indium と Chromium の放射性同位元素で標識し、一部をドナーへ返血し、生体内の回復率と血小板寿命を測定した。保存血小板は回復率が新鮮血小板の 82%、生体内寿命が 83% であり、Murphy が提唱した回収率 67% 以上、生体内寿命 50% という基準を全例満たしていた。PO-80 は in vivo 評価でも、その回復率および血小板寿命は良好に保たれており、臨床使用が十分可能であると考えられた。

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、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、汎用バックの 5 日間保存後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の供給が可能なが示唆された。

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。ドイツにおける生物製剤を管轄する規制当局であるポール・エールリッヒ研究所 (PEI) に滞在して、血小板製剤の細菌安全性対策などについて調査した。ドイツにおいては、PEI を中心に、各州の規制当局とも連携して、血液製剤の品質保証システムが組み立てられている。ドイツには、赤十字のほかに州立、大学付属および民営

の複数の採血事業者がある。ドイツにおける血小板製剤の細菌安全性対策としては、自動細菌培養検出装置である BacT/ALERT などが導入されており、多くのロットに対して細菌スクリーニングが実施されている。ドイツ赤十字においては、バフィコート由来血小板製剤の全ロットに対して細菌スクリーニングを実施している。

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 日間であった。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。

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し、その成果は今年度中の全国赤十字血液センターでの導入という形で国民に還元された。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、現行の 72 時間以上に設定変更の申請がなされた。1 年以内の認可が期待される。

さらに血液製剤から最も検出される *Propionibacterium acnes* の病原性は証明されなかったことから他の病原性細菌と同様な扱いをすることには賛成できない。

来年度はより臨床状況に似たモデルを用いた実験を予定している。

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血小板層に集積している可能性もあることを証明した。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。

さらに、血小板製剤の細菌混入スクリーニングに pH や CO₂ を用いる可能性と乗り越えるべき問題点を示した。

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、グラム陽性菌の増殖がある程度抑制されることを報告した。また、異なる複数菌に汚染された状況で互いに干渉を受けることなく増殖することを見出した。

宮田班員は血小板血栓 3 次元形成能は保存日数と比例して低下することを報告してきた。現在の保存バッグで 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出した。In vitro のデータは一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。

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 (Biomérieux 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ているが、ともに早期のサンプリングでは偽陰性 false negative を生じる可能性を明らかにした。

また血小板保存用高酸素透過性バッグ (PO-80) にて 7 日間保存した血小板の生体内の回復率と血小板寿命を測定した。回収率と生体内寿命がともに新鮮血の 80% 以上であり、PO-80 バッグは臨床使用が十分可能である。

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 齊、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.
5. Pietersz RNI, Engelfriet CP, Reesink

- HW, Ohto H, Satake M, Miyata S, et al. Logistics of platelet concentrates. Vox Sanguinis 2007; 92:160-181.
6. Shigeki Miyata, Masahiro Satake, Hitoshi Ohto. Japanese Special Situations – Universal prestorage leukocyte-reduced apheresis platelet concentrates with very short shelf-life (72 hours). Transfusion Today. March 2007;9-10.
7. Ezuki S, Kawabata K, Kanno T, Ohto H. Culture-based bacterial detection systems for platelets: the effect of time prior to sampling and duration of incubation required for detection. (Submitted)
8. 大戸 斉, 血小板輸血の課題. 医学のあゆみ 2006;218(6):607-611.
- (学会発表)
- 1) 川畑絹代、江月将史、大戸 斉. 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 斉、他. アフェ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.
- 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、2005.
- 6) Ezuki S, Kanno T, Kawabata K, Ohto H: In vitro and in vivo evaluation of apheresis-derived platelets stored for 7days in container (PO-80) with high oxygen permeability. Transfusion, 2006; 46(9):67A.
- 7) 菅野隆浩、江月将史、川畑絹代、尾形隆、池田和彦、大戸 斉: Multiple hit model を用いた生体内血小板寿命の測定. 第 54 回日本輸血学会総会. 日本輸血学会雑誌、2006 ; 52(2):231.
- 8) 江月将史、川畑絹代、菅野隆浩、大戸 斉: 細菌混入した血小板製剤内のグルコースと乳酸値の推移. 第 54 回日本輸血学会総会. 日本輸血学会雑誌、2006 ; 52(2):327.
- 9) 宮田茂樹: 小児開心術における輸血トリガー値の予後に与える影響についての考察. 第 42 回小児循環器学会総会. 名古屋、2006.
- 10) 宮田茂樹: 輸血療法の適正化、効率化に輸血部門の果たす役割. 第 60 回国立病院総合医学会、京都、2006.
- 11) 亀井政孝、宮田茂樹、畔政和: 人工心肺による血小板機能障害とその対策. 第 11 回日本心臓血管麻酔学会学術大会.

長崎、2006.

12) 宮田茂樹、亀井政孝、山本賢、角谷勇
実、阪田敏幸、佐野隆宏、半田誠、八木
原俊克：心臓血管外科手術における血
小板輸血が必要となる危険因子. 第 50
回日本輸血学会近畿支部会総会. 大阪、
2006.

13) 大藏照子、馬場尚志、高松純樹、太田
美智男. 輸血用血小板製剤中における各
種細菌の増殖. 第80回日本細菌学会総会、
2007年3月.

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：2006年7月28－29日

会場：福島県立医科大学 光が丘会館ホール

7月28日(金)

12：20－13：20 **輸血による細菌感染防止対策と感染疑い事例発生時の
対応指針作成検討** (非公開：会議室) 班員

(これより公開：ホール)

13：25－13：30 **あいさつ** 武末文男課長補佐 厚生労働省血液対策課

座長 山口一成 (各発表の後に10分ずつの討論)

13：30－13：50 **輸血関連感染症2005**
百瀬 俊也 (日本赤十字社 血液事業本部)

14：00－14：20 **血小板輸血後の敗血症死亡例**
加藤 栄史 (愛知医科大学 輸血部)

14：30－14：50 **アクネ菌の病原性について**
佐竹 正博 (東京都赤十字血液センター)

15：00－15：20 **低温保存条件における接種細菌の増殖抑制効果**
高松 純樹 (名古屋大学 輸血部)

休憩 (10分)

座長 佐竹正博

15：40－16：00 **高酸素透過性バッグを用いた血小板製剤の長期保存：
ざり応力下血小板血栓形成能測定系を用いた機能評価**
宮田 茂樹 (国立循環器病センター)

16：10－16：30 **7日間保存血小板製剤の生体内寿命と回収率の評価**
菅野 隆浩 (福島県立医科大学 輸血・移植免疫部)

16：40－17：10 **Bacterial Detection and 7-day Storage of Platelets
Practical implementation and experience in the USA**
Helena Bunkens, PhD (Gambro BCT Global Marketing)

7月29日(土)

座長 高松純樹 (各発表の後に10分ずつの討論)

8:30-8:50 **細菌検出装置BacT/ALERTとeBDSの細菌検出能比較**

川畑 絹代 (福島県立医科大学 輸血・移植免疫部)

9:00-9:20 **細菌接種血小板製剤のglucoseとlactateの経時的変化**

江月 将史 (福島県立医科大学 輸血・移植免疫部)

9:30-10:00 **1. 血小板成分採血装置による白血球除去と接種細菌の動態**

2. 血小板製剤への細菌接種とpH変化

浅井 隆善 (静岡県赤十字血液センター)

10:10-10:30 **酸素電極による酸素消費を指標とした血小板製剤細菌混入の同定**

大坪 寛子 (東京慈恵会医科大学 輸血部)

休憩 (10分)

座長 浅井隆善

10:50-11:10 **全国国公立大学病院における血液製剤の使用と廃棄状況**

高橋 俊二 (山形大学病院 輸血部)

11:20-11:40 **赤血球製剤の保存期間延長の可能性**

秋野 光明 (北海道赤十字血液センター)

11:50-12:20 **超高压処理による病原体の不活化**

梅森清子、岡田義昭、山口一成

(国立感染症研究所 血液・安全性研究部)

12:30 - 12:50 **旭化成メディカルにおけるプリオン除去技術**

三浦 司和 (旭化成メディカル セパセル事業部)

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18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期限延長に関する研究」
(H17-医薬-一般-051)

分担研究報告書

Propionibacterium acnes の病原性について

分担研究者 東京都赤十字血液センター 佐竹正博 副所長
研究協力者 慈恵会医科大学臨床検査医学 保科定頼 助教授

研究要旨：

輸血用血液から検出される菌種の80%は臨床的には害をもたらさないとされる細菌 *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*、アクネ菌)である。*P. acnes* 菌の毒性評価を試みた。*P. acnes*、または *Staphylococcus aureus* を接種した血小板をマウスに静注し、肝機能、肝臓・脾臓・腎臓コロニー数、組織学、体重変化、サイトカイン・ケモカイン類を測定した。*P. acnes* は増殖速度が極めて遅かった。組織学、臓器コロニー数からは *P. acnes* の病原性の存在は証明できなかった。しかし、*P. acnes* に汚染された血小板製剤には菌数自体は少ない状態であっても、IL-1beta, IL-6, IL-8, RANTES の炎症性サイトカイン・ケモカインが高濃度で蓄積されていることが判明した。しかし、これまで日本では年間70本ほどの *P. acnes* 混入血小板製剤が医療施設に供給されている可能性があるが、感染症副作用報告が見当たらないことから、*P. acnes* の毒性は副作用を呈さない程度に低いものと考えられる。より感受性の高いマウスでの研究を予定している。

【研究の背景と目的】

欧米においては血小板製剤の有効期限は5日間である。これは、血液センター

側で採血・供給を余裕のあるものにし、医療機関においては患者への輸血スケジュールを組み立てやすくしている。その

一方、血小板製剤中での細菌の増殖の可能性を大きくしている。細菌に汚染された製剤を排除するために、全品培養によるスクリーニングを取り入れる血液センターが多くなってきている。

細菌スクリーニングをルーチンに施行することでわかってきたことの一つは、患者に敗血症などの重篤な症状をもたらす可能性のある細菌とともに、かなりの高濃度に増殖していても臨床的には害をもたらさないとされる細菌も多数検出されることである。その代表的なものが *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*、アクネ菌) である。日本赤十字社血液センターでは品質管理のひとつとして 100 バッグに一つの割合 (赤血球製剤の場合) で血液製剤の培養を行っており、その結果では、検出される菌の約 80% が *P. acnes* である¹⁾。この頻度から言えば、*P. acnes* に汚染された血小板製剤は実際に多くの患者に輸血され、しかも臨床的には問題となっていない可能性を示唆する。

日本でも血小板製剤の有効期限が延長されれば、欧米のように全品培養をスクリーニングに導入することも考慮しなければならないであろう。その際、*P. acnes* が検出された場合、製剤をどのように扱うべきか、また出荷後に *P. acnes* が検出された場合に医療機関でどのように対応すべきか等が問題となってくる。現在においても、品質管理業務において抜き取り試験で細菌が検出されると、膨大な調査をして報告書を整えなければならないが、そのほとんどはおそらく病原性のない *P. acnes* に関してである。したがって、*P. acnes* の病原性について明確にするデ

ータをできるだけそろえて、臨床と品質管理業務での対応の仕方を模索することが必要であると考えられる。

P. acnes の病原性を論ずるには、最終的には臨床での結果を待つ以外にない。すなわち、1) 輸血後敗血症の原因として *P. acnes* が挙げられる頻度を調べる、2) *P. acnes* で汚染された血小板製剤を輸血された患者で、敗血症あるいはより軽度な発熱などの副作用がどのくらいの頻度で起きているかを調べることである。しかしながら、元来まれな事象の臨床データの蓄積には長い年月を要し、いつまでたっても明快なデータは得られない可能性が高い。そこでわれわれは、動物実験で *P. acnes* の大量投与の起こす事象を調べ、少しでもその病原性についてヒントとなるデータを得ようと考えた。

本来 *P. acnes* は病原性が低いことはわかっているため、この実験では、明らかに有害事象を引き起こす細菌を陽性コントロールとして並置し、それに比べて *P. acnes* はどうであるかを見る比較試験をした。

また、*P. acnes* はヒトリンパ球に働いて種々の炎症性サイトカインを産生することがわかっている²⁾。これが、*P. acnes* に汚染された血小板製剤の輸血副作用に関連する可能性がないかどうかを探る為に、*P. acnes* をはじめとする細菌を血小板製剤にスパイクして保存し、その後の製剤中のサイトカイン濃度を比較した。

【研究方法】

検討対象となる *P. acnes* は実際の献血者から得られた株を使用し、毒性の高い

細菌としては *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*、臨床分離株) を選んだ。まず凍結保存されているこれらの細菌を confluent 状態になるまで培養し、予想される菌濃度にしたがってその希釈系列を作成した。これらをフェレーシスで得た血小板製剤に添加して、マウスに投与する血小板液を作成した。血小板液の一部は寒天上で培養して正確な菌数を求めた。また、菌液を加えない血小板だけのコントロールを適宜設けた。マウスは C57BL6 を用い、尾静脈から 50 μ L 静注した。静注後 1 時間、1 日、2 日、3 日にそれぞれと殺して次の項目を測定した。GPT、血液培養による血中の細菌数、肝臓・脾臓・腎臓中の細菌数、肝臓・脾臓・腎臓の組織像。静注前と静注後 1 日、2 日、3 日の全身状態の変化と体重の変化。臓器中の細菌数は、血液、肝臓、脾臓、腎臓を無菌的に取り出してホモジナイズし、変法 GAM ブイヨン 500 μ l で懸濁し、100 μ l を変法 GAM 寒天培地 (ニッスイ製薬) に塗布して 48 時間培養し、単位重量あたりの細菌数を測定した。

細菌に汚染された血小板製剤中のサイトカインの測定の実験では、フェレーシ

スで得られた白血球除去をしていない血小板製剤に、*P. acnes*、*S. aureus*、*Serratia marcescens*、*Salmonella choleraesuis* を 100~500 cfu/mL の濃度でスパイクし、そのまま 5 日間通常の血小板の保存温度で振とう保存した。5 日後 EIA キットを用いて、血漿中のサイトカイン・ケモカイン濃度を測定した。

【結果】

マウスに静注した血小板液の菌濃度は最終的に、*S. aureus* は 1.2×10^8 cfu/mL と 1.3×10^6 cfu/mL の 2 種であったが、*P. acnes* は細菌の増殖速度が遅いため、実験開始前に得られた菌液の最高濃度は 4.0×10^6 cfu/mL と 1.3×10^7 cfu/mL の 2 種であった。基本的に、細菌-血小板液の 1 つについて 8 匹のマウスに投与、1 時間後、1 日後、2 日後、3 日後にそれぞれ 2 匹ずつと殺し、上記の項目について計測した。したがって、結果の表はあるマーカーの一連の変化のように表してあるが、同じマウス個体について経時的に計測したものではない。そのプロトコールの一例を下に示す。

S. aureus	after 1 hr	after 1 day	after 2 days	after 3 days
1.2x10 ⁸ cfu/mL 50 μL i.v.	X			
	X			
		X		
		X		
			X	
			X	
				X
Platelet only				X
				X

1. ALT

細菌感染による臓器障害の指標のひとつとして血液中の ALT の動きを追った。

	After 1 hr	After 1 day	After 2 days	After 3 days
Platelet + <i>P. acnes</i> 4.0 × 10 ⁶ cfu/mL	44	45	21	22
	44	39	45	2
				34
Platelet (Control)	98	124	41	29
	67	26	28	23
Platelet + <i>S. aureus</i> 1.2 × 10 ⁸ cfu/mL	81	285	46	31
	46	103	128	15
Platelet + <i>S. aureus</i> 1.3 × 10 ⁶ cfu/mL	18	84	42	34
	110	32	38	39

コントロールで静注した血小板液は、*P. acnes* に用いたものである。この実験ではコントロールでの ALT の方が高かった。*S. aureus* を 10⁸ cfu/mL レベルで投与すると、1 日後に ALT が上昇し 2~3 日後には正常に戻るデータが得られたが、*P. acnes* のほうが病原性が低いので、4.0 × 10⁶ cfu/mL の *P. acnes* と 1.3 × 10⁶ cfu/mL

の *S. aureus* を比較すべきである。*S. aureus* 投与群でわずかに ALT が上昇する傾向があるが、*P. acnes* 投与群では全く ALT の上昇は見られなかった。後述のコロニー形成実験の結果とあわせると、ALT は早期に上昇して低下してしまう可能性もあるので、静注後の急性実験を行った。この際の *P. acnes* の濃度は 1.3 ×

10⁷ cfu/mLであった。下表にみるように3時間までの経過で、静注後に上昇 (>60) したのが3匹であるのに対し、残り

の5匹では全く変化がなく、有意差は見られなかった。

	15 min	30 min	1 hour	3 hour
Platelet + <i>P. acnes</i> 1.3×10 ⁷	25	92	89	39
	70	49	30	45
Platelet only			40	

2. 臓器コロニー数

いくつかの検討を行ったが、たとえば病原性の高い *S. aureus* を濃度を変えて投与した時の肝臓へのコロニー形成は以下のようになり、濃度依存性、クリアランスの動態などから信頼性の高い実験であることが示されている。

	after 1hr	after 1day	after 2days	after 3days
Platelet + <i>S. aureus</i> 1×10 ⁸	99200	21900	9200	250
	91800	55900	1900	889
Platelet + <i>S. aureus</i> 1×10 ⁶	279	39	0	7
	828	85	15	0
Platelet only				0
				0

前述のように、*P. acnes* の病原性が低いことを示す為には、*S. aureus* の濃度を同じか低くして、4.0×10⁶ cfu/mL の *P. acnes* と 1.3×10⁶ cfu/mL の *S. aureus* を比較すべきである。この濃度による血液、肝臓、脾臓、腎臓中のコロニー数を下に示す。

		1hr	1 day	2 days	3 days
血液	<i>P. acnes</i> 4.0×10 ⁶	2	0	0	0
		0	0	0	0
	<i>S. aureus</i> 1.3×10 ⁶	0	0	0	0
		0	0	0	0
肝臓	<i>P. acnes</i>	0	0	0	0
		0	0	0	0
	<i>S. aureus</i>	279	39	15	7
		828	85	0	0

脾臓	<i>P. acnes</i>	0	0	0	0
		0	0	0	0
	<i>S. aureus</i>	190	77	18	3
		289	105	16	1
腎臓	<i>P. acnes</i>	0	0	0	0
		0	0	0	0
	<i>S. aureus</i>	0	2	0	0
		0	0	0	0

P. acnes の場合血液を含めすべての臓器でコロニー形成がほとんどみられないことから、投与後のクリアランスが非常に速いことが考えられた為、投与後3時間までの短時間での各臓器のコロニー形成をみた。このときの *P. acnes* の濃度は 1.3×10^7 cfu/mL であった。

	15分	30分	1時間	3時間
血液	6	0	1	0
	1	4	3	0
肝臓	293	0	1027	1
	1011	0	1429	0
脾臓	897	0	981	0
	428	0	1021	0
腎臓	0	0	2	0
	2	0	2	0

3時間後にはどの臓器においてもほとんどコロニーは見られなくなっており、*P. acnes* のクリアランスが非常に早い、または組織に着床しづらいことが想像されるが、30分後においても同様であるので結論付けることはできなかった。

3. 組織像

S. aureus を投与したマウスの腎臓において、腎皮膜下の膿瘍形成、実質での白血球の巣状の集積などが認められた。*P. acnes* 投与群では全く正常の組織像であった。