

このような状況を補う有効な手段として病原体不活化技術が進化してきた。ガンマ線、紫外線、リボフラビン+可視光線照射などが挙げられる。添加物の残存、変異原生・催奇性、芽胞菌への有効性など懸念材料は解決していない⁷⁾。その一方でソラレン誘導体であるアモトサレンと紫外線 A を組み合わせた INTERCEPT Blood System (Cerus) がフランスでは導入されている⁸⁾。2005 年以降のフランスのヘモビジランスの結果報告から感染症への有効性の検証を待ちたい。

ヘモビジランスに関しては HIV 感染以降、ヨーロッパでは輸血・血液の安全性対策が図られ、血液安全監視体制が国レベルで確立している¹⁾。1995 年に EC 評議会において、加盟各国がヘモビジランスシステムを構築するよう決議されたことを受けて加盟各国はその取り組みを開始した。1998 年には、EU 15 カ国にスイスとノルウェーを加えて「ヨーロッパヘモビジランスネットワーク」が結成されている。EU 加盟国の 3 分の 2 では、国が血液事業の責任主体とされており、国のイニシアチブの下でヘモビジランスが運営されている。国あるいは赤十字を問わず、国内を一元的に管理した安全監視体制を持つ国としては、フランス、イギリス、およびアイルランドなどが挙げられるが、取り扱われる報告は軽微なものから重篤なものまですべての有害事象とする国もあれば、死亡・重篤例のみあるいは感染症のみとする国もあり、様々である。

特に、指導的な立場であるフランスでは 1986 年に提唱され、1992 年には実施に向けて、その定義および概念を規定した。1993 年には全国の実施を法律で定めており、翌年実施された。フランスの基本方針は、有害事象を単に検出するだけでなく、

それが国の保健医療のなかで持つ意味を理解できるよう疫学的に評価することにある。このため、医療機関と血液センターとを問わず、すべての有害事象を報告することを法律で義務付けている。有害事象症例は、ヘモビジランスコーディネーターおよび各医療機関等に配置されたヘモビジランス担当者を通して、当該医療機関および血液センターの連携のもとにその原因が調査されフランス血液局 (AFSSaPS) に報告される。AFSSaPS はこれらの情報を管理し、その調査・研究に必要な対応を取るとともに、結果を一般に公開している。2004 年の報告によると、輸血血液の年間供給数約 255 万単位中、有害事象の報告数は 7557 件であった^{10) 11)}。一方、イギリスでは 1994 年からヘモビジランスシステム構築準備を開始し、EC の決議を受けて 1996 年から実施している。フランスとは対照的に、有害事象の報告は医療機関や血液センターから自発的に、かつ匿名性が守られた特別なルートを通じてなされており、後に訴追されることがないように配慮されている。また、イギリスの基本方針は、実際に輸血の現場で起きている有害事象のプロフィールを把握することであり、人為的過誤の防止を安全監視の第一目標に掲げているため疫学的評価を目ざすものではない。そのシステムは、SHOT (Serious Hazards of Transfusion) と呼ばれ、国立臨床病理学者協会 (Royal College of Pathologist) の下で運営されている。2005 年は 403 病院が SHOT に参加しており 609 件の有害事象が報告された¹²⁾。

3) 日本

わが国では血小板の保存期間は 3 日であり、ほとんどがアフレーシス由来であ

る。そのため血小板製剤の細菌検出に関してはいかなる装置も導入されておらず、赤十字社にて品質保証のために培養系検出装置をランダムに行っているのみであるが、2000年以降、細菌混入血小板製剤との関連性が高い致死症例として2例が報告されているのみである。1例が*S.pneumoniae*で他方は*S.aureus*であった。1999年以前にも疑い症例の報告はあったものの関連性は明確にされていない。

本邦では血液事業は赤十字社1社が取り扱っており、1993年に日本赤十字社による全国一律の医薬情報システムが組織され、副作用・感染症情報の収集を開始した。日赤では、医療機関から報告される「副作用・感染症報告」、献血後に献血者又は検査データから得られた安全性に関する情報に基づく「献血者発の遡及調査」、製品又は原料に由来する感染症に関する論文等から得られた知見の評価に基づく「感染症定期報告」及び、海外措置情報や研究報告に関する情報に基づく「海外措置・研究報告」などを対象にしている。1993年に収集された輸血副作用に関する症例数は228件であったが、2005年には1,882件を数えるまでになった。

このように日本赤十字社の輸血副作用に関する集計は成果をあげてきたが、さらに日本におけるヘモビジランスの体制を進める必要がある。その理由として、副作用に関する情報は基本的には医療施設の自主申告であり、重症例に偏りがちである。2005年の日赤血液センターへの副作用報告は約1,882件であるが、実態はその10倍(20,000件、輸血件数(100万)の2%前後)であると推定されている¹³⁾。

5. まとめ

平成15年に「安全な血液製剤の安定供

給の確保等に関する法律」が制定され、血液製剤の安全性に関わる法的な位置付けが明確化された。輸血の安全性の向上のためには、更なる努力が必要である。

文献

- 1) 田山達也、世界のヘモビジランス事情、血液製剤調査機構だより、71:6-9,2004
- 2) Kuehnert MJ, Roth VR, Haley NR, et al.: Transfusion-transmitted bacterial infection in the United States, 1998 through 2000. *Transfusion*, 41:1493-1499, 2001
- 3) Eder AF, Kennedy JM, Dy BA, et al.: Bacterial screening of apheresis platelets and the residual risk of septic transfusion reactions: the American Red Cross experience (2004-2006). *Transfusion*, 47: 1134-1142, 2007
- 4) AABB weekly news 13(43) Nov 16, 2007
- 5) Brecher ME, Hay SN, Rothenberg SJ: Validation of BacT/ALERT plastic culture bottles for use in testing of whole-blood-derived platelets and leukoreduced platelet-rich-plasma-derived platelets. *Transfusion*, 44 1174-1178, 2004
- 6) Pietersz RNI, Meer PF, Dijkstra MJ, Reesink HW: European experience with extended storage of platelet pools.
<http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/03/briefing/3940b1-15-pietersz.htm>
- 7) Castro E, Bueno L, Gonzalez R et al: Feasibility of implementing an automated culture system for

bacteria screening in platelets in the blood bank routine. Transfusion Medicine, 15:185-195,2005

- 8) McCullough J, Vesole DH, Benjamin RJ, et al. Therapeutic efficacy and safety of platelets treated with a photochemical process for pathogen inactivation: the SPRINT Trial. Blood, 104:1534-1541, 2004
- 9) Blajchman MA, Goldman M, Baeza F: Improving the bacteriological safety of platelet transfusion. Transfusion Medicine Reviews, 18:11-24, 2004
- 10) France-Haemovigilance Annual Report :2-3,2004
- 11) Haemovigilance in France: annual report.2004
- 12) SHOT Annual Report 2005 p17-18
- 13) 高本 滋、免疫学的輸血副作用の把握とその対応に関する研究、厚生労働科研究費補助金 平成 18 年度報告書、2007

6. 健康危険情報

健康に影響を及ぼした事象は発生しな

かった。

7. 研究発表

(和文)

1. 浜口 功、山口一成：輸血・移植と感染症. 小児感染症学 特殊な状況下での感染症 155-161 診断と治療社 2007
2. 山口一成：輸血医療・医学の新展開はじめに 医学のあゆみ 第1土曜特集 218 No.6 555, 2006

(発表)

1. Otsubo H, Sasaki Y, Yamaguchi K, Hoshi Y. Consecutive Monitoring of Dissolved Oxygen Consumption by DOXTM to Evaluate Bacterial Contamination in Platelet Concentrates. AABB Annual Meeting & TXPO 2007. Anaheim CA USA
2. 大坪寛子, 山口一成, 星 順隆. 溶存酸素濃度測定による血小板内混入細菌の同定. 第55回日本輸血・細胞治療学会総会 (名古屋,2007)

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期限延長に関する研究」
(H17-医薬-一般-051)

血小板製剤の低温保存による混入細菌の増殖抑制および 核酸増幅法を用いた細菌検出の可能性

分担研究者： 高松純樹 教授 名古屋大学医学部附属病院輸血部

共同研究者： 大藏照子 名古屋大学医学部附属病院検査部

研究要旨：

低温保存でも血小板機能保持可能となった場合、実際に細菌の増殖がどれほど抑制されるかを検討した。10℃あるいは4℃に置いた血小板製剤中で、細菌の増殖スピードは抑制されたが、一部の菌種（特に汚染菌として重要である *Serratia marcescens*）においては増殖自体が抑制されずゆっくりと増殖したため、製剤の有効期限が延長された場合の細菌感染リスクは変わらないと考えられる。

増殖スピードの異なる複数菌を菌数に差をつけて血小板製剤に同時に接種し4℃あるいは室温に置いた場合、4℃では菌数の差が保たれたが室温では菌数の逆転が見られたことから、輸血後感染症の精査に用いる目的で製剤を保管する際、使用済みバッグは4℃に、セグメントチューブは室温に保管することが望ましいといえる。

また混入した血小板製剤を高感度で検出する目的で16S rRNA 遺伝子増幅法を検討し、検出限界は菌液濃度 $10^4 \cdot 10^6$ CFU/ml（1反応チューブあたり菌 $10^1 \cdot 10^3$ 個）であった。培養法と比較し検査時間は短縮できる一方で、16S rRNA 遺伝子増幅法は細菌 DNA の混入を防がないと偽陽性なるため、機具や試薬の選択、取り扱いにより厳重な注意が必要である。

【研究背景と目的】

血小板製剤の有効期限延長を目指す上で、細菌汚染製剤の輸血後敗血症のリスクが懸念されている。細菌汚染を検出するため、主に培養による方法が諸外国で導入されているが、まだ検出限界に問題がある。初流血除去や白血球除去フィルターの使用によって、汚染菌を減らすことはできるが完全

には除去できない。現在の製剤の保存条件は血小板機能保持の観点から必要であるが、混入した細菌の増殖には好都合である。混入菌の増殖を抑制する保存条件として低温保存による増殖抑制効果について検討した。また、増殖スピードの異なる複数菌が混入した場合の生菌数の変化をみた。

さらに、より迅速かつ高感度な検出法と

して細菌の 16S rRNA 遺伝子を標的とした PCR 法による検出を検討した。16S rRNA 遺伝子に着目した理由は、細菌に安定に保持されているため、細菌に共通の領域をターゲットとすることにより非特異的に細菌を検出できるため、1 菌体中(1 ゲノム中)に複数存在することから高感度が期待できるためである。

1. 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

臨床分離株 8 菌種 29 株 (*Serratia marcescens* 4 株、*Escherichia coli* 4 株、*Pseudomonas aeruginosa* 4 株、*Bacillus cereus* 3 株、*Bacillus subtilis* 4 株、*Staphylococcus aureus* 4 株、*Staphylococcus epidermidis* 4 株、*Propionibacterium acnes* 2 株) を使用した。これらは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株である。これに加えて、ゲノム情報が公開されている実験用菌株 3 菌種 3 株 (*S. marcescens* SM28 株、*B. cereus* NC7401 株、*S. aureus* N315 株) を使用した。

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 $10^2 - 10^3$ 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、以後同様に操作した。

4) 製剤の保存条件

a. 細菌を接種した血小板製剤を 4℃ にて 3 日間静置保管し、その後室温に戻して 3 時間静置した。b. 細菌を接種した血小板製剤を 10℃、静置保管状態に保ち続けた。c. *S. marcescens*、*B. cereus*、*S. aureus* の 3 菌種について、細菌を接種した血小板製剤を 4℃ または 10℃ の低温で最大 6 日間静置保存し、b より短い間隔で生菌数の変化を調べた。

5) 接種後の生菌数の測定

細菌を接種した後、経時的に製剤の一部を取り出し、BHI 寒天平板培地上で普通培養し、コロニー数をカウントした。コントロールも同様に行い、コロニーが認められないことを確認した。

6) 増殖スピードの異なる菌種を同時に接種した場合の菌数の変化

S. aureus、*S. marcescens* を各 1 株使用し、*S. aureus* : *S. marcescens* = 10 : 1 となるように同時に接種し、血小板製剤を 4℃ または室温で静置保存し生菌数を測定した。

7) 16S rRNA 遺伝子の増幅、検出

各菌株について、 $10^8 - 10^0$ CFU/ml 相当の菌浮遊液を滅菌精製水を用いて作製し、

その 1 μ l をテンプレートとして PCR 反応液に添加した。使用したプライマーは、5' - GCAAACAGGATTAGATACCC - 3' と 5' - CGTCATCCCCACCTTCCTCC - 3' であり、温度条件は、95 $^{\circ}$ C 10 min、(95 $^{\circ}$ C 30 sec、58 $^{\circ}$ C 45 sec、72 $^{\circ}$ C 90 sec) \times 35 回、72 $^{\circ}$ C 7 min で増幅を行った (Richard E. Rothman et. al, J Infect Dis 2002;186:1677-81)。Ex Taq ポリメラーゼ (TaKaRa) を用いて 10 μ l の反応系で PCR を行った後、1.5% アガロースゲル電気泳動により 418bp の増幅産物のバンドを確認した。

2. 結果

1) 4 $^{\circ}$ C 保存後室温に戻した場合の血小板製剤中の生菌数の変化

S. marcescens は 4 $^{\circ}$ C 保存下では生菌数に変化がなかったが、室温に出すと再びすぐに増殖し始めた (図 1a)。*E. coli*、*P. aeruginosa* は 4 $^{\circ}$ C 保存時から室温に出して 3 時間後までの間に増加はみられなかった (図 1b,c)。*E. coli* では製剤中で殺菌された株も 1 株あった (図 1b)。*Bacillus* 属細菌は 2 菌種とも同様な傾向を示し、4 $^{\circ}$ C 保存下で生菌数は 10CFU/ml 未満にまで減少したが、中には室温に戻ると再び増殖し始めた株もあった (図 1d,e)。*S. aureus*、*S. epidermidis* はどの株も 4 $^{\circ}$ C 保存下で生菌数に変化がなく、室温に出すと再び増殖し始めた (図 1f,g)。

2) 10 $^{\circ}$ C 保存血小板製剤中での生菌数の変化

グラム陰性菌では、10 $^{\circ}$ C 保存下で一部生菌数が減少する株もあったが、ほとん

どの株は増殖が抑制されなかった (図 2a,b,c)。グラム陽性菌は 10 $^{\circ}$ C ではほとんど増加しなかった (図 2d,e,f,g)。

3) 低温保存中の血小板製剤中の *S. aureus*、*S. marcescens*、*E. coli* の生菌数変化

S. aureus は、4 菌株とも生菌数に大きな変化が見られず、増殖は 4 $^{\circ}$ C、10 $^{\circ}$ C とともに 4 日間抑制された (図 3a)。*S. marcescens* は、低温で増殖スピードが遅くなり、現状の保存条件 (室温、振盪) の場合 1 日で達する菌数に、10 $^{\circ}$ C 静置では 5 日後に達した (図 3b)。低温保存によって増殖スピードが遅くはなったが、4 $^{\circ}$ C でも菌の発育を阻止することはできなかった。*E. coli* は 3 株とも 4 $^{\circ}$ C ではほぼ増殖が抑制されたが、10 $^{\circ}$ C 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 (図 3c)。

4) 増殖スピードが異なる 2 菌種が混在する場合の製剤中での生菌数変化

2 菌種混在する場合も、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 (図 4)。4 $^{\circ}$ C で *S. aureus* は発育せず、*S. marcescens* はゆっくりと発育したが、48 時間までは接種時点の菌数の比がそのまま保たれていた。室温では接種後 2 菌種とも増殖し、48 時間後には、より増殖スピードの速い *S. marcescens* の菌数が逆転し多くなった。

5) 核酸増幅法の検出限界

今回使用したすべての菌種、菌株を検出することができた。検出限界は菌液濃度 10⁴-10⁶ CFU/ml (1 反応チューブあたり菌 10¹-10³ 個) であった (表 2)。

3. 考察

現行の 20-25℃振盪保存条件下での製剤中の細菌の増殖特性が、特にグラム陰性桿菌において同一菌種内であっても菌株間で大きく異なることは以前報告したが、低温で保存した場合も、特にグラム陰性桿菌の増殖パターンは菌株により異なる。採血時に混入する可能性のある皮膚常在菌（主にブドウ球菌属）は、10℃程度で保存することにより菌の発育を阻止し、輸血後感染を防止できると考えられる。一方、グラム陰性菌（主に腸内細菌科細菌）が混入することは皮膚常在菌に比べ稀であると考えられるが、万一混入してしまったら 4℃でさえもゆっくりと発育するので、重篤な輸血後副作用をもたらす菌量に達する時間を稼ぐことはできるが、やはり長期保存することのリスクは減少しないと考えられる。

また、増殖スピードの異なる 2 菌種について菌量に差をつけて接種した実験からは、輸血後細菌感染の疑い事例が発生した場合の対応を考える上での重要な知見を得た（表 1）。疑い事例について細菌検査を実施し、患者血液、バッグに残った製剤、セグメントチューブから同一菌が検出された場合は、輸血による感染と断定できるが、汚染菌が検出されないと判断に苦慮することになる。例えば次のようなケースを想定する。献血時にドナー由来のブドウ球菌が混入した場合、その菌量は現状の保存条件では輸血時までには敗血症を起こす菌量に達している可能性が過去の実験結果から十分考えられる。輸血後に針を抜く際、点滴ライン等からセラチア菌が逆流しバッグに混入したとする。受血者が輸血後に敗血症を発症した場合、輸血後のバッグに残った製剤

の細菌検査をする。真の汚染菌のブドウ球菌に比べ、偽の汚染菌であるセラチア菌の菌量は混入時には非常に少ないと考えられるが、バッグを室温に置いてある間に菌量が逆転し、バッグの残りをを用いて細菌検査を実施した時にはセラチア菌が優勢になってブドウ球菌が検出できないことも予想される。使用後のバッグを 4℃に保存しておくことで、少なくとも 2 日間は輸血時のバッグ内の菌量をそのまま保つことができ、真の汚染菌を検出できるので望ましいと考える。また、セグメントチューブは冷蔵あるいは冷凍保存されているため菌の検出感度が低く偽陰性の結果となる場合がある。セグメントチューブは、バッグ本体の輸血用製剤と同じ条件で保存するという意味も含め、できる限り輸血直前に作製し、室温に保存する方が望ましい。輸血後感染疑い事例が発生した際により適切に対応するために、使用後のバッグやセグメントチューブに残った製剤の保存方法について提案したい。

現在、諸外国で導入されている製剤の細菌検査は主に培養法によるものであるが、培養法の最大の問題点は判定までの時間である。発育良好な菌や混入菌量の多い場合は 24 時間以内に陽性になるが、発育の遅い菌や混入菌量の少ない場合は、数日から 1 週間以上経って陽性になる場合もあり、陰性と判定できるまでの検査期間の設定が困難である。これに対して 16S rRNA 遺伝子増幅法は菌種に関わらず数時間で結果を得られるうえ、検出工程に要する時間が一定であり、製剤の出庫時までには判定を終えることができ有用である。また、これまでに我々は、製剤中の生きた細菌の数が一時的

に減少した後に再び増加する可能性があることを報告してきた。生菌数が減少している間にサンプリングする可能性もあり、培養法では検出限界以下で偽陰性となる場合であっても、16S rRNA 遺伝子増幅法では DNA が残っていれば検出可能と考えられる。

一方、16S rRNA 遺伝子増幅法の問題点として、複数菌混在の場合や増幅する DNA 領域が短い場合は菌の同定、型別は難しいことが挙げられる。培養法では菌株が得られるので輸血後感染症発生時の精査に使用できる。また、培養法は無菌操作のみで十分であるが、16S rRNA 遺伝子増幅法は細菌 DNA の混入を防がねばならず、機具や試薬の選択、取り扱いにより注意が必要である。今後は、生菌の核酸のみを検出する方法も検討したい。

【健康危険情報】

健康に影響を及ぼした事象は発生しなかった。

【研究発表】

研究論文

なし。

学会発表

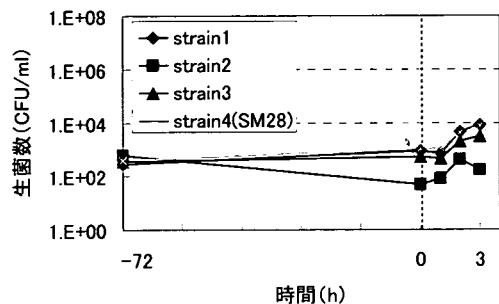
大藏照子、馬場尚志、高松純樹、太田美智男. 輸血用血小板製剤中における各種細菌の増殖. 第 80 回日本細菌学会総会、2007 年 3 月.

【知的所有権の発生】

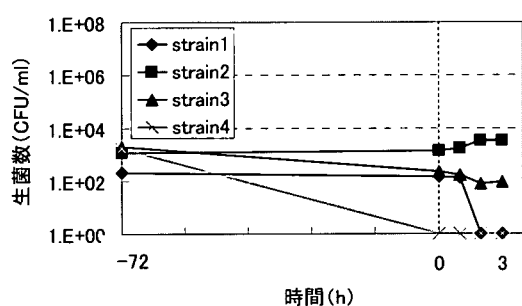
なし

図1. 4°C保存下および室温に戻した後の血小板製剤中の各種細菌の生菌数変化

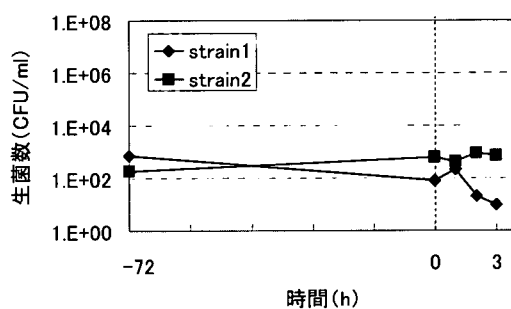
a. *Serratia marcescens*



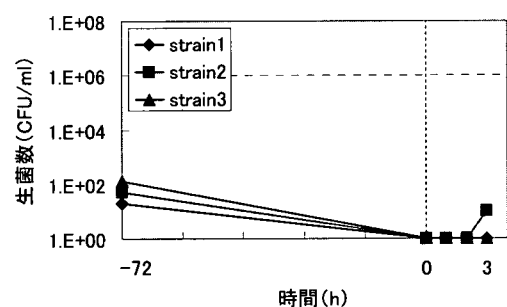
b. *Escherichia coli*



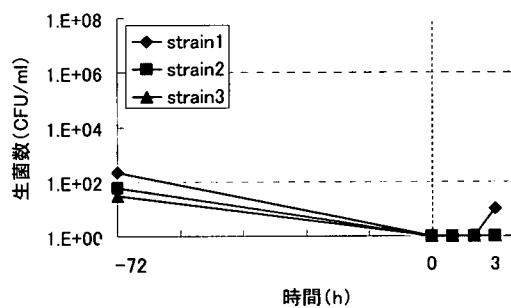
c. *Pseudomonas aeruginosa*



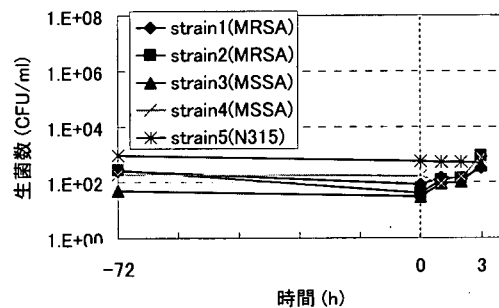
d. *Bacillus cereus*



e. *Bacillus subtilis*



f. *Staphylococcus aureus*



g. *Staphylococcus epidermidis*

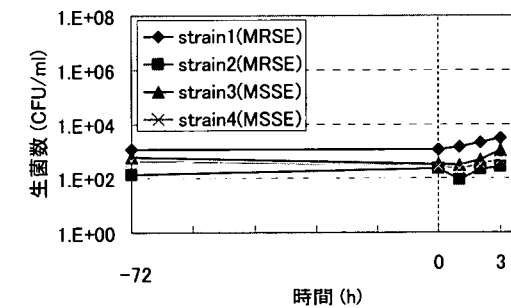


図 2. 10°C保存下における血小板製剤中での各種細菌の生菌数変化

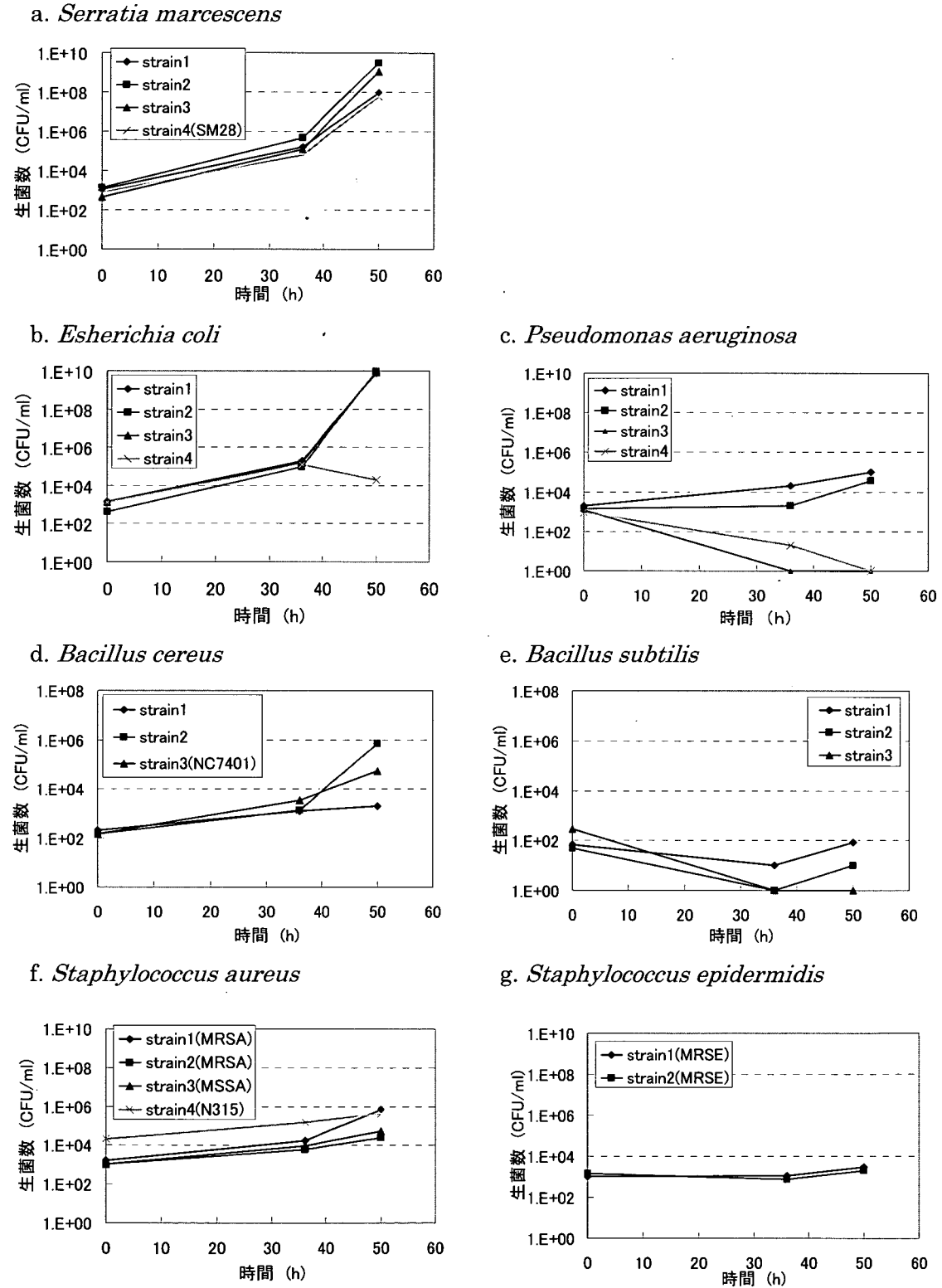
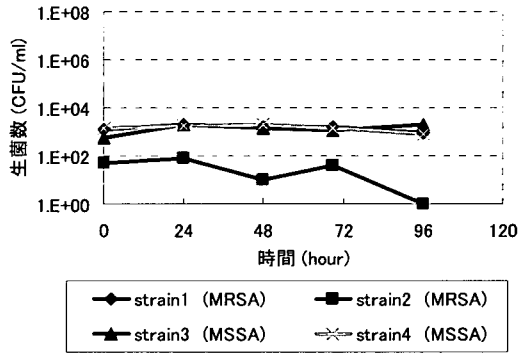


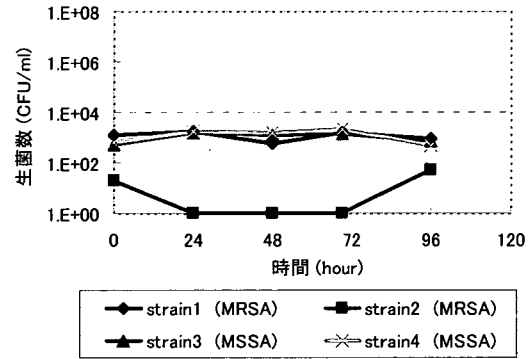
図3. 低温保存中の血小板製剤中の *S. aureus*、*S. marcescens*、*E. coli* の生菌数変化

a. *Staphylococcus aureus*

(1) 4°C

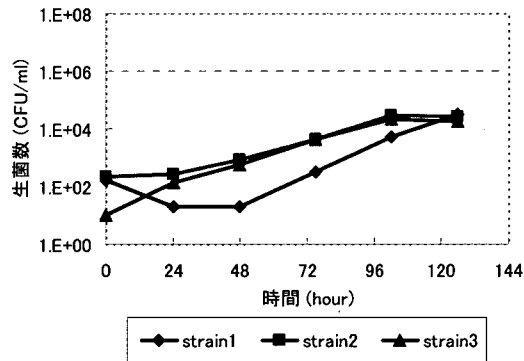


(2) 10°C

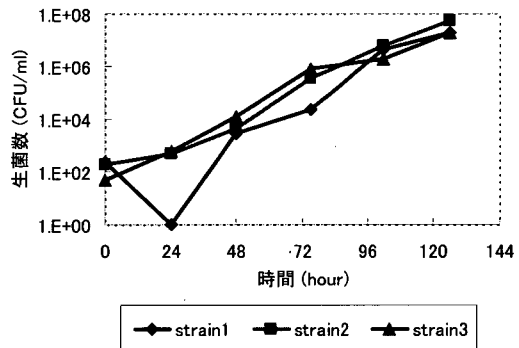


b. *Serratia marcescens*

(1) 4°C

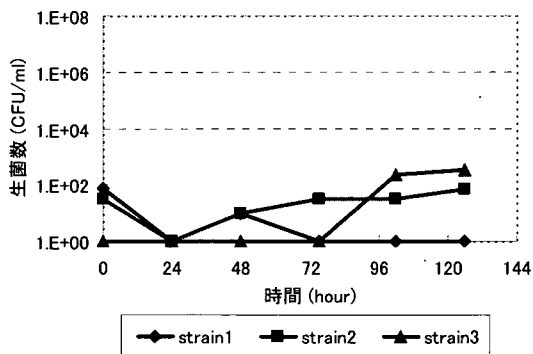


(2) 10°C



c. *Escherichia coli*

(1) 4°C



(2) 10°C

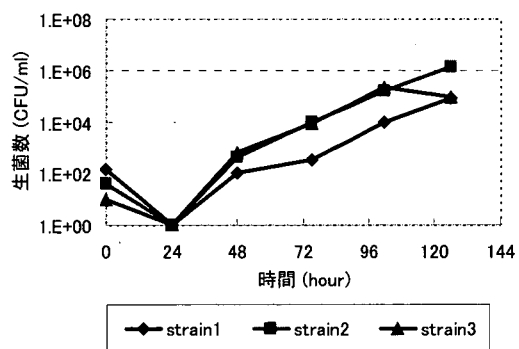
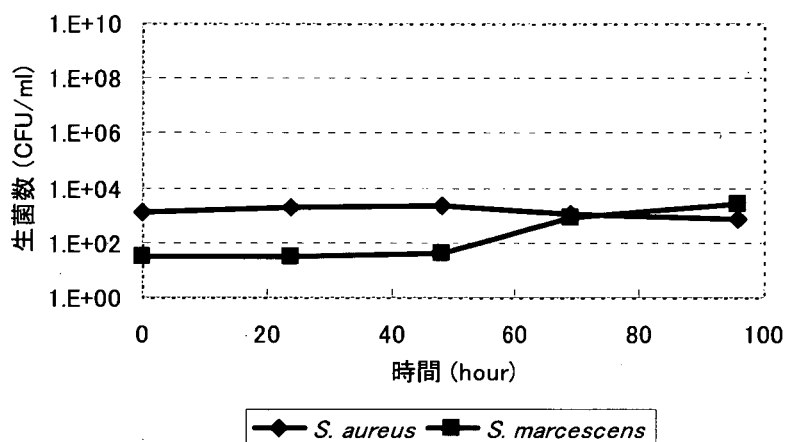


図 4. 増殖スピードが異なる 2 菌種が混在する場合の製剤中での生菌数変化

(1) 4℃に保管した場合



(2) 室温に保管した場合

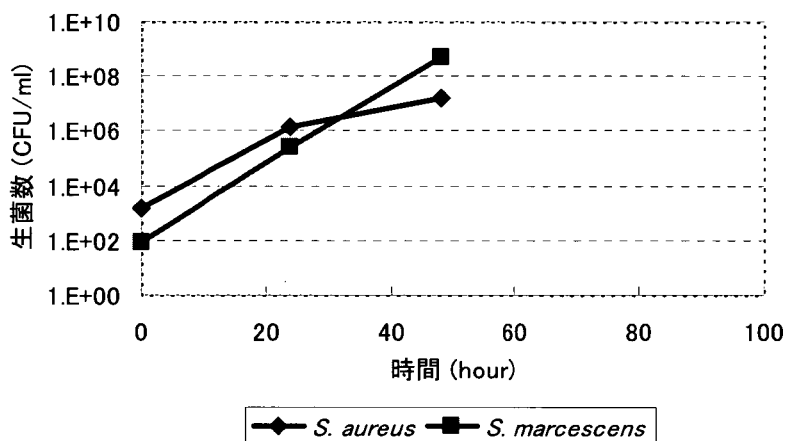


表 1. 細菌検査結果例とその解釈における問題点と対策

事例	細菌の検出結果			製剤による 感染の可能性	対策
	患者 血液	使用後のバッグ (室温保存)	セグメント (低温保存)		
1	A 菌	A 菌	A 菌	断定	
2	A 菌	A 菌	(-)	否定できない	セグメントを室温保存し 検出感度を上げる
3	A 菌	B 菌	(-)	否定できない	バッグを低温保存し 輸血時の菌量を保存する

表 2. 核酸増幅法の検出限界

菌種	菌株名	検出限界	
		(CFU/ml)	(CFU/tube)
<i>Serratia marcescens</i>	臨床分離株 1	10 ⁵	10 ²
	臨床分離株 2	10 ⁴	10 ¹
	臨床分離株 3	10 ⁵	10 ²
	臨床分離株 4	10 ⁵	10 ²
	SM28	10 ⁵	10 ²
<i>Escherichia coli</i>	臨床分離株 1	10 ⁵	10 ²
	臨床分離株 2	10 ⁵	10 ²
	臨床分離株 3	10 ⁴	10 ¹
	臨床分離株 4	10 ⁴	10 ¹
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	臨床分離株 1	10 ⁴	10 ¹
	臨床分離株 2	10 ⁴	10 ¹
	臨床分離株 3	10 ⁴	10 ¹
	臨床分離株 4	10 ⁵	10 ²
<i>Bacillus cereus</i>	臨床分離株 1	10 ⁶	10 ³
	臨床分離株 2	10 ⁵	10 ²
	臨床分離株 3	10 ⁶	10 ³
	NC7401	10 ⁶	10 ³
<i>Bacillus subtilis</i>	臨床分離株 1	10 ⁵	10 ²
	臨床分離株 2	10 ⁵	10 ²
	臨床分離株 3	10 ⁵	10 ²
	臨床分離株 4	10 ⁵	10 ²
<i>Staphylococcus aureus</i>	臨床分離株 1	10 ⁵	10 ²
	臨床分離株 2	10 ⁵	10 ²
	臨床分離株 3	10 ⁵	10 ²
	臨床分離株 4	10 ⁵	10 ²
	N315	10 ⁴	10 ¹
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	臨床分離株 1	10 ⁴	10 ¹
	臨床分離株 2	10 ⁴	10 ¹
	臨床分離株 3	10 ⁴	10 ¹
	臨床分離株 4	10 ⁵	10 ²
<i>Propionibacterium acnes</i>	臨床分離株 1	10 ⁵	10 ²
	臨床分離株 2	10 ⁶	10 ³

輸血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

血小板製剤の細菌汚染の低減化と有効期限延長

分担研究者 東京都西赤十字血液センター 佐竹正博 所長

研究の要旨：日本赤十字社血液センターが出庫している濃厚血小板製剤は、これまで72時間の有効期限があった。世界でももっとも短い有効期限は、混入した細菌の増殖を低く抑え、細菌汚染血小板製剤の輸血による敗血症の発生を少なくしてきたと考えられる。一方、この有効期限は血液センターと医療機関の双方において、多大の運用上の困難を強いてきた面がある。このため、細菌の増殖を抑える方策を導入しつつ有効期限を延長することが求められていた。本研究は、昨年までの3年間の大戸班の研究を踏まえて、新たな安全対策を検証し有効期限を延長するための基礎データとすることを目的とした。

研究の概要は以下の通りである。

1. 初流血除去法の効果を実際の採血現場で検討し、期限延長の基礎データとした。有意差は得られなかったが、皮膚付着菌の汚染の頻度を低下させる可能性が示唆された。
2. もう一つの安全対策である、血小板製剤の外観試験の効果を、血液センター内部データから検証した。これまでの東京都血液センターのデータでは、血小板製剤のスワーリングの消失が細菌の増殖を示した例はなかった。しかしながら、依然重要な外観試験の一項目である。
3. さらに、保存前白血球除去がどのような細菌の除去に有効であるかを、実験的に示した。*Yersinia enterocolitica*の除去に極めて有効であることはこれまで知られているが、同様に白血球に貪食されて血中に存在する *Salmonella* 菌を完全に除去することは不可能であった。*Serratia* 菌の除去はできなかった。
4. 細菌汚染のデータにおいてもっとも汚染頻度の高い *Propionibacterium acnes* (ニキビ菌) が臨床的に重大な結果をもたらす菌であるかどうかをマウスを用いた実験で示した。マウスにおいては、コントロールとした *S. aureus* と比較して毒性は圧倒的に低いことが示された。

以上の安全対策が施された上で、平成19年11月に、血小板製剤の有効期限が3日目の午後12時まで延長された。

I. 初流血除去による細菌混入の低減について

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である。

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く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という結果になる。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止める方法が考案、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

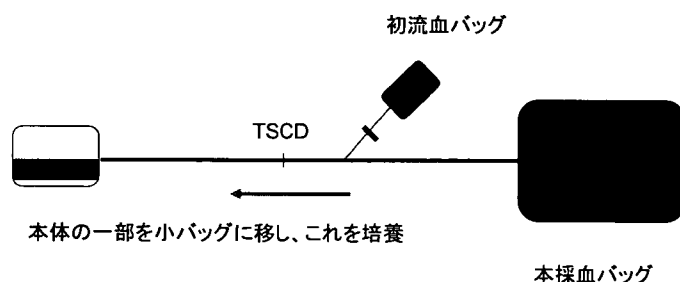
あり (1/2670)、2 例の死亡があったが、40mL 除去するようになってから 2 年間に 1 例のみの細菌汚染 (1/27735) であったという。

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。

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に遭遇することが知られている。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、好気培養と嫌気培養に供した。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、コントロール群と同様に培養した。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がありうることを周知した。

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



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 7 例 (0.236%)、スタディ群で 2 例 (0.069%) の陽性例が見出された。

コントロール群の 7 例の細菌種は、*Propionibacterium Acnes* (アクネ菌) 4 例、コアグラージェ陰性ブドウ球菌 1 例、表皮ブドウ球菌 1 例、アクネ菌に類似す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してみると、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。また、菌血症に由来すると思われる菌は検出されておらず、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、それ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	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) CNS (1)	2 (0.069%) <i>P. acnes</i> (2)

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の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。

これらの問題点を解決すれば、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。

II. 血液センターでの外観試験について

血小板製剤が細菌に汚染され一定以上の細菌数に達した時に、製剤の外観に変化が生ずることがある。主な外観上の変化は、色調の変化、濁りの有無、スワーリングの消失、凝集・凝固物の析出などである。外観チェックは、細菌に汚染された可能性のある製剤を感度よく同定する為のものではなく、高度に細菌汚染された製剤のうちたまたま外観に異常を呈した製剤を確実に除外して、少しでも敗血症の発生を防ぐ為の方策である。血液センターでは、製剤課で製造が完了して供給課に製品を出荷する際に製剤課職員が外観をチェックし、異常な外観を呈したものを減損にしている。また供給課では、医療機関への出庫の際に供給課職員が再び外観をチェックしている。これらのチェックで減損された製剤は品質課に引き渡され、そこで細菌の培養試験がおこなわれる。培養は東京都血液センターでは全自動培養装置 BacT/Alert を使用し、好気ボトルと嫌気ボトルの両方で培養してい

る。これまでの東京都血液センターでの実績を下に示す。

製剤課外観チェック（平成 18 年 4 月～19 年 12 月）

外観による減損件数： 113 件

異常とされた外観： スワーリングなし 96 件、色調異常 17 件、凝固・凝集物 0 件

培養結果： 陽性 0 件、陰性 113 件

供給課外観チェック（平成 18 年 4 月～19 年 12 月）

外観による減損件数： 15 件

異常とされた外観：スワーリングなし 12 件、色調異常 3 件、凝固・凝集物 0 件

培養結果：陽性 0 件、陰性 15 件

当血液センターの製剤課での血小板の製品化は、採血後 24 時間以内に行なわれている。外観に異常を呈するのは、細菌濃度が 10^7 個/mL 以上に増えた場合であるのが通常であるので、増殖の速い細菌の混入があったとしても 24 時間以内にこの濃度に達することは起こりにくい。したがって、製剤課で観察されたスワーリングの消失は、細菌の増殖によって血漿の pH が下がって血小板の viability が低下したためではなく、そのドナーの血小板の固有の性質によるものと思われる。細菌培養の結果が陰性であることがこれを裏付けている。この観点から、スワーリングの消失したドナーの過去の採血についての記録をたどると、製剤課でスワーリングの消失したドナー 42 人のうち、6 人は過去にも消失した記録があった。消失した回数とその割合は下表の通りである。

PCドナー	血小板献血回数	スワーリング不適	不適率 %
1	10	4	40.0
2	4	2	50.0
3	4	2	50.0
4	12	2	16.7
5	8	2	25.0
6	5	3	60.0

採血後短時間でスワーリングが消失する血小板のドナーが少なからずおり、原因は不明であるがその血小板に固有の問題があることが推察される。

次に、供給課での外観チェックは採血後24時間から65時間ぐらいの間に行なわれる。この時間では、混入細菌が外観に異常を呈するほどの濃度に増殖することがあり得る。しかしながら、スワーリングの消失した12件と色調異常の3件の培養は全て陰性であった。したがって、この場合のスワーリングの消失も細菌の増殖によるものではないと判断できる。製剤化で見られたより早い時期での消失と同じ原因が引き延びている場合が含まれていると思われる。

以上より、血液センター内での外観試験の効果は次のようにまとめられる。1)外観の変化の8割以上はスワーリングの消失として観察される、2)細菌の増殖によってスワーリングが消失したものはなかった、3)採血後きわめて早期にスワーリングの消失する特定のドナーが存在する。アメリカ合衆国において、スワーリングの消失は外観スクリーニングの項目には入っていないのは今回の調査と同様の事例が圧倒的に多い

からであろう。しかしながら、前回の班研究でのスパイク実験からも明らかなように、細菌が増殖した際の外観変化の一つにスワーリングの消失がありことも事実であり、製剤減損となる数が採血・供給に大きな影響を及ぼすことがない限り、観察項目として重要であることには変わりはないと考えられる。

一方、スワーリングが消失するということは血小板の代謝が低下して円盤状の形態を失い膨化したことを意味するので、細菌の混入がなかったとしても、その機能が低下しており、輸血用を使用する意味がないともいえる。この意味でもスワーリングの有無の観察は重要であるといえる。ただしきわめて早期に円盤状の形態を失う血小板の場合、それがドナーの血中で生理的のどのような機能を果たしているか、またその球状になった血小板が輸血された場合、正常の血小板と比べてどのくらい機能が異なっているかについては、これからの検討課題である。

Ⅲ. 保存前白血球除去の特定の細菌に対する除去効果について

保存前白血球除去の主な効果は、発熱性

輸血副作用を減らすこと、白血球抗原による同種免疫を減らすこと、サイトメガロウイルスの伝播を減らすこと、の3つであるが、白血球に取り込まれた細菌を白血球ごと除去できる効用も報告されている。これは食中毒菌エルシニア・エンテロコリチカにおいて顕著であり、新鮮全血にこの細菌をスパイクし、一定時間後に白血球除去フィルターを通したあとの血液からは、その血液を長期間保存した場合でも全く細菌の再増殖が認められないデータが数多く出されている。したがってエルシニア菌と同様に、ドナー血中において白血球に貪食された状態で存在しやすいその他の細菌についても、保存前白血球除去が細菌除去として有効である可能性がある。

日本赤十字社血液センターでは、血小板製剤の細菌汚染の正確な頻度を求めるために、平成17年より、期限切れとなった血小板製剤を基幹センターにて培養に供している。その過程において、*Salmonella choleraesuis* (ブタコレラ菌) に汚染されている血小板製剤が見出された。このドナー

からその1ヵ月後に得られた全血を遠心分離して各分画を培養すると、血漿と赤血球沈渣では陰性であったがバフィーコートの培養のみで同細菌が検出された。文献でも明らかなことであるが、これによりサルモネラ菌も白血球に貪食されてしばしばドナー血中に長期存在することが示された。そこで、サルモネラ菌が保存前白血球除去で効果的に除去できるかどうかを検証した。

1) 方法

2人のドナーより400mL全血を採血する。それぞれに上記のドナーから得られた *Salmonella choleraesuis* を終濃度が 10^2 CFU/ml となるように接種する。接種後の全血を2~3時間室温に静置保存する。サンプルを採取して細菌を定量する。全血を2分割し一方には白血球除去フィルターを通し、もう一方は通さずにコントロールとする。それぞれからサンプルを採取し細菌を定量する。24、48時間後、1、2、3週間後にサンプルを採取し同様に定量する。培養はすべて全自動細菌培養装置 BacT/Alert を使用した。

2) 結果

ドナー	1		2	
容量 mL	451		450	
接種菌濃度 CFU/mL	150		163	
白血球除去	有	無	有	無
容量 mL	199	225	201	223
0 hr CFU/mL	<5	150	5	180
24 hr	5	90	<5	180
48 hr	5	120	5	180
1 週	5	80	<5	135
2 週	<5	40	<5	50
3 週	<5	<5	<5	<5