

原 著

採血部位消毒におけるポビドンヨードの有効性について

橋本 浩司 三谷 孝子 千葉 眞彰 関口 定美

北海道赤十字血液センター

(平成 10 年 7 月 9 日受付)

(平成 10 年 11 月 26 日受理)

EFFICACY OF POVIDONE IODINE AS A DISINFECTANT AT THE DONOR PHLEBOTOMY SITE

Hiroshi Hashimoto, Takako Mitani, Masaaki Chiba and Sadayoshi Sekiguchi
Hokkaido Red Cross Blood Center

We evaluated the efficacy of two skin disinfectants (10% povidone iodine vs. 0.5% chlorhexidine gluconate) at the donor phlebotomy site against three different species of bacteria (*Bacillus cereus*, coagulase-negative staphylococci, *Propionibacterium acnes*).

The growth of *Bacillus cereus* in apheresis-derived platelet concentrates was very rapid with a doubling time of 6 hours, and reached 10^7 CFU/ml within 72 hours. When RC-MAP prepared from whole blood inoculated with *Bacillus cereus* was stored at 4°C, growth of *Bacillus cereus* was stopped for 21 days. However, when storage temperature was increased to 22°C on Days 7 or 21, rapid proliferation occurred as was observed in apheresis-derived platelets experiments. Bacterial proliferation was also observed in buffy coat and platelet-poor plasma prepared from whole blood.

No difference was seen between 10% povidone iodine and 0.5% chlorhexidine gluconate in the efficacy of disinfectants against coagulase-negative staphylococci and *Propionibacterium acnes*. However, disinfection of *Bacillus cereus* was achieved with 10% povidone iodine only.

Bacillus cereus showed proliferation in all blood components.

These results suggest that donor skin disinfectant should be done using 10% povidone iodine in any blood collection.

Key words : *Bacillus cereus*, phlebotomy site, skin disinfectant, chlorhexidine gluconate, povidone iodine

はじめに

輸血用血液の細菌汚染に起因する輸血後敗血症は、ときに死亡に至る場合もあり、重篤な輸血副作用のひとつにあげられる。輸血後敗血症の危険率に関する報告は、さまざまだが、Högmanらは赤血球製剤で0.003% (0.3/受血者 10,000)、血小板製剤で0.11~0.5% (11~50/受血者 10,000)であり、他の輸血副作用に比べ高い危険率を有することを報告している¹⁾。細菌汚染の原因の可能性については、①採血部位の皮膚常在菌による汚染、

②無症候性菌血症献血者由来、③血液バッグの汚染、④調製工程中の汚染によるものと報告され、その半数以上が採血時の皮膚からの混入としている^{1)~4)}。

われわれは、本学会誌において *Bacillus cereus* (*B. cereus*) による血小板製剤の細菌汚染例を報告し、その原因を採血部位からの混入と推定した⁵⁾。また *B. cereus* は芽胞を有するため、芽胞菌に対しても殺菌効果の有するポビドンヨードによる消毒が血小板製剤への *B. cereus* の汚染を防止する一

方策になりえることを報告した⁵⁾。

日本赤十字社が標準皮膚消毒薬としている0.5%グルコン酸クロルヘキシジナルコール(クロルヘキシジン)は広い抗菌スペクトラムを有し、かつ殺菌効果も高く優れた消毒薬であるが、*B. cereus*等の芽胞菌や*Pseudomonas fluorescens*(*P. fluorescens*)などの一部の細菌に対しては殺菌効果はないとされている。しかしながら環境菌ならびに皮膚常在菌には、*B. cereus*のように芽胞を有する菌もあり、献血時の採血部位の消毒薬については再考する時期にある。

そこでわれわれは芽胞菌である*B. cereus*を標的とし、血小板製剤及び赤血球製剤の増殖性を検討した上で、採血部位の消毒薬としての10%ポビドンヨード(ポビドンヨード)の有効性について検討したので報告する。

材料と方法

1) 菌種

菌種は、輸血用血液の細菌汚染の原因菌として報告例のある*B. cereus*, coagulase-negative staphylococci (CNS), *Propionibacterium acnes*(*P. acnes*)の3菌種を選択した。各々の細菌は当血液センターにおける輸血用血液及び環境の落下菌より分離、純培養し、2施設による細菌同定の結果、菌種が確認されたものを使用した。

2) 菌数の調製

*B. cereus*は芽胞状態で輸血用血液に混入すると考えられることから、*B. cereus*をシグナル培地(オクソイド社)に37℃で5日~7日間培養し、Schaeffer-Fulton法により芽胞の形成を確認後、シグナル培地で10⁸希釈により各濃度に調製した。CNS及び*P. acnes*は37℃でそれぞれ1日及び7日間培養後同様に各濃度に調製した。

3) 菌数の測定

*B. cereus*はトリプトソイ寒天培地(日水製薬)に塗布して菌数を測定する寒天平板培地法を用いた。

4) 輸血用血液への*B. cereus*の接種試験

a) 成分献血由来血小板製剤(成分PC)への接種試験

成分採血装置(スペクトラ, コーブ社)により

採取したPC(20単位)を600 mlポリオレフィンバッグ(ニプロ社)に無菌接合装置(SCD, SC-201 A, テルモ社)を用いて無菌的に接続後50 mlずつ分割し、*B. cereus*を0.1, 1, 10, 100 CFU/mlの濃度で接種後、22℃で振盪保存し5日間経時的に菌数を測定した。

b) 全血への接種試験

400 ml全血2バッグをプール後、あらかじめACD-A液を除去した200 mlクオドラップルバッグ(テルモ社)にSCDを用いて無菌的に接続後4分割し、*B. cereus*を0.1, 1, 10, 100 CFU/mlの濃度で接種し、22℃で6時間保存後、3200 rpm, 6分間遠心し、赤血球M・A・P(RC-MAP), buffy coat及び乏血小板血漿(PPP)に分離調製した。調製後RC-MAPは4℃で保存し、経時的に菌数を測定した。また輸血前の室温放置を想定し、4℃保存後7日目及び21日目に、22℃保存下での増殖性を確認した。

buffy coatは22℃に保存し3日間菌数を測定した。PPPについては-80℃で7日間凍結し、融解後22℃保存下で3日間菌数を測定した。

5) 消毒薬の殺菌効果

消毒薬は0.5%グルコン酸クロルヘキシジナルコール(ヤクハン製薬)及び10%ポビドンヨード(有効ヨウ素濃度1%, 明治製薬)を用いた。消毒薬の殺菌効果の評価には、定量的浮遊菌テスト法を準用し、1~9×10⁷CFU/mlに調製した3菌種に対して殺菌効果を調べた。消毒薬の中和剤は2.5%レシチン, 5% Tween 80, 5% チオ硫酸ナトリウム溶液とした。消毒薬4.5 mlに菌液0.5 ml添加し、直ちに攪拌し10, 20, 30, 60秒経過後、その0.5 mlを中和剤4.5 mlに添加し消毒薬の反応を停止させた。その1 mlを2枚の寒天培地に塗布し、37℃で培養後、寒天培地上のコロニーを観察した。二重検定の結果、両者ともにコロニーを認めなかった場合を殺菌効果ありと判定した。

結 果

1) 輸血用血液への*B. cereus*の接種試験

a) 成分PC中での増殖性

*B. cereus*の成分PC中での増殖性を確認するため接種試験を行った。Fig. 1に示すように、0.1~

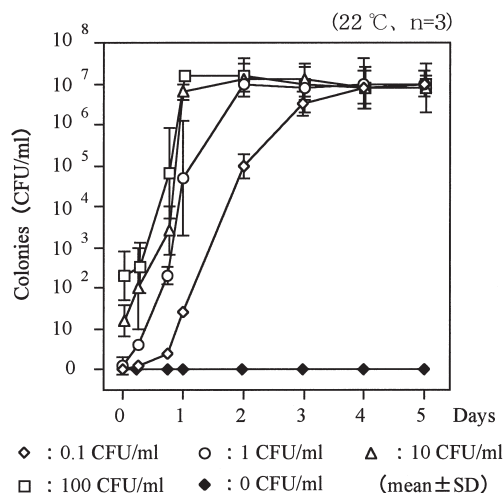


Fig. 1 Proliferation of *Bacillus cereus* in platelet concentrate

100 CFU/ml の各菌濃度で接種後6時間目に増殖が開始された。0.1 CFU/ml の微量接種では接種後3日目で、1 CFU/ml 以上では1~2日目で 10^7 CFU/ml まで対数的増殖を示しプラトーに達した。

b) RC-MAP 中での増殖性

全血から分離調製された RC-MAP, buffy coat 及び PPP 中での増殖性を確認するため、全血への *B. cereus* の接種試験を行った。

RC-MAP 中での増殖性は、4 °C 低温保存下では

0.1~100 CFU/ml のいずれの菌濃度においても21日間増殖は認められなかった。しかし、4 °C 保存後7日目から22 °C に放置した場合は、0.1 CFU/ml で約30時間、1 CFU/ml 以上では約6時間の lag time 後、PC と同様急激な増殖傾向を示し、22 °C 放置後2日目で 10^7 CFU/ml 以上にまで達した (Fig. 2-a)。4 °C 保存後21日目から22 °C に放置した場合も同様に約6~48時間の lag time 後、増殖を示した (Fig. 2-b)。

また、buffy coat (22 °C 保存) 中では、0.1, 1 CFU/ml で約24時間、10, 100 CFU/ml で約6時間の lag time 後急激に増殖した (Fig. 3-a)。さらに PPP では、10 CFU/ml 以下の全血への接種では菌の増殖は認められなかったが、100 CFU/ml の接種において増殖が認められた (Fig. 3-b)。

2) 消毒薬による殺菌効果

ポビドンヨードの消毒薬としての有効性を確認するため、クロルヘキシジンに対照に、*B. cereus*, CNS, *P. acnes* の3菌種に対する殺菌効果を比較検討した。Table 1 に示すように *B. cereus* に対してクロルヘキシジンは30秒間の消毒で10例中10例に、60秒間の消毒では8例にコロニーが観察され、殺菌効果がみられなかった。しかし、ポビドンヨードは10秒間の消毒で4例にコロニーが認められたものの、20秒~60秒間の消毒では全てに殺菌効果が認められた。以上の結果より、芽胞

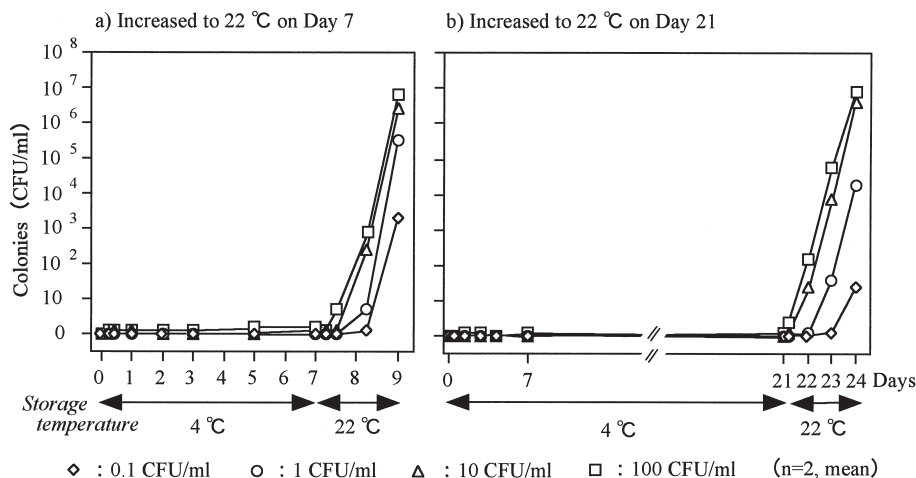


Fig. 2 Proliferation of *B. cereus* in Red cell MAP

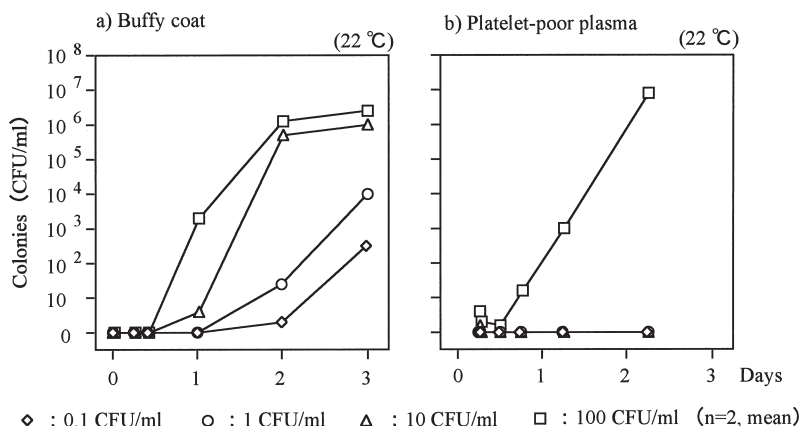
Fig. 3 Proliferation of *B. cereus* in buffy coat and platelet-poor plasma

Table 1 Comparison of effectiveness of skin disinfectants

Bacteria	Disinfectant	Disinfection time (sec)			
		10	20	30	60
<i>B. cereus</i>	Chlorhexidine gluconate	10	10	10	8
	Povidone iodine	4	0	0	0
CNS	Chlorhexidine gluconate	0	0	0	0
	Povidone iodine	0	0	0	0
<i>P. acnes</i>	Chlorhexidine gluconate	0	0	0	0
	Povidone iodine	0	0	0	0

number of positive plates n = 10

菌である *B. cereus* はクロルヘキシジンでは殺菌効果は認められず、ポビドンヨードによる 20 秒間以上の消毒で確実に殺菌されることが確認された。一方、CNS 及び *P. acnes* に対しては、両消毒薬ともに 10 秒間の消毒で殺菌効果が認められ、二者間での差は認められなかった。

考 察

今回の輸血用血液の接種試験から、成分 PC に *B. cereus* が微量に混入した場合においても対数的な増殖を示し、PC の有効期間である 72 時間以内に 10⁷CFU/ml 以上に増殖することが確認できた (Fig. 1)。また RC-MAP に混入した *B. cereus* は、RC-MAP の貯蔵温度である 4~6℃ 保存下での増殖は認められないが、22℃ の室温下に放置することにより数時間で増殖を開始し PC と同様な増殖パターンを示した (Fig. 2)。この結果から、*B.*

cereus は低温下においては一部の菌が休止状態で生存し、温度上昇が引き金となり増殖を開始するものと推定された。また *B. cereus* は buffy coat 中においても増殖することから (Fig. 3-a), buffy coat 中に存在する顆粒球数 (10⁷/ml) では貪食・殺菌は不可能であり、buffy coat より分離される PC においても増殖する可能性が示唆された。また、全血に 100 CFU/ml 以上の *B. cereus* が混入した場合は、分離される PPP にも菌が移行しうること確認された (Fig. 3-b)。さらに *B. cereus* は PC 及び PPP 中で増殖可能なことより、血漿中の補体によるオプソニン効果は期待できないものと推定された。

これらの結果は、*B. cereus* は血液センターで調製される成分由来及び全血由来の製剤の細菌汚染の原因菌となり得ることを示唆した。

B. cereus は自然界に広く分布し、血液センターの採血室及び清浄度管理された製剤分離調製室においても検出され、製造工程を取り巻く環境下にも広く存在する菌である。さらに *B. cereus* が皮膚に付着した場合は、皮膚表面で芽胞を形成し数年間生存し、アルコール薬剤に抵抗性を示すため皮膚からの排除も困難とされている⁶⁾。*B. cereus* に起因する輸血用血液の汚染例は、われわれの症例も含め 5 例あり、その混入経路の多くは採血部位の皮膚からと推定され、採血部位の皮膚消毒の重要性を示唆している⁷⁾⁸⁾。

今回の定量的浮遊菌テスト法は、消毒液中での評価方法であり、実際の皮膚消毒の消毒条件とは異なるものの、ポビドンヨードは現在日本赤十字社が標準皮膚消毒薬としているクロルヘキシジンと比較し、*B. cereus* に対する殺菌効果の優位性が確認された。またポビドンヨードは、クロルヘキシジンに比べ抗菌スペクトラムは広く、芽胞菌に対しても殺菌効力を有し、AABB テクニカルマニュアルにおいてもポビドンヨードによる皮膚消毒薬を推奨している⁹⁾。Dave らは採血部位の皮膚からの細菌汚染として、血小板製剤への *B. cereus* の汚染例を報告しており、その原因は採血部位の消毒薬にアルコールを使用したことによると推定している¹⁰⁾。また Stenhouse らは細菌汚染に起因する敗血症例として、クロルヘキシジンに対し抵抗性を示す *P. fluorescens* の輸血用血液への混入を報告している¹¹⁾。これらの報告は、採血部位の消毒薬としてポビドンヨードの導入を示唆するものである。

以上、採血環境には、芽胞菌である *B. cereus*をはじめ、様々な細菌が存在する。これらの細菌の輸血用血液への混入を防止するためには、採血部位の消毒を強化するのが最もよい手段であり、広い抗菌スペクトラムを有し、かつ一部の芽胞菌に対しても殺菌効果のあるポビドンヨードによる皮膚消毒の早期導入が必須である。

しかしながら、皮膚毛包管深部に存在する *P. acnes* や注射痕の陥凹部に存在する CNS 等は、皮膚表皮の消毒では殺菌困難という問題もある¹²⁾。これらのことを考慮し、血液センターとしては皮膚消毒薬をポビドンヨードに変更する一方、光増感物質と紫外線 (UV) を用いた細菌不活化法¹³⁾や細菌の代謝マーカーであるグルコースと pH の低下を尿検査試験紙により確認する輸血前の迅速な細菌スクリーニング法¹⁴⁾を検討することが今後の課題となるだろう。

まとめ

1) 成分献血由来血小板製剤に芽胞菌である *B. cereus* が混入した事例をもとに、採血部位の消毒法について検討した。

2) 10% ポビドンヨードは現行の 0.5% グルコ

ン酸クロルヘキシジナルコールよりも高い殺菌効果を示し、*B. cereus* に対し有効性が確認された。

3) *B. cereus* は PC 中だけでなく、RC-MAP 中においても増殖の可能性が示唆され、採血部位からの汚染を防止するためには、成分及び全血献血時の皮膚消毒薬にもポビドンヨードを早急に導入すべきである。

文 献

- 1) Högman, V.F. : Adverse effects : Bacterial contamination (Including shelf life). A brief review of bacterial contamination of blood components. Vox Sang, 70 : 78—82, 1996.
- 2) Wagner, S.J., Friedman, L.I., Dodd, R.Y. : Transfusion-associated bacterial sepsis. Clin. Microbiol. Review, July : 290—302, 1994.
- 3) Goldman, M., Blajchman, M.A. : Blood product associated bacterial sepsis. Transfusion Med. Reviews, 1 : 73—83, 1991.
- 4) Heal, J.M., Jones, M.E., Forey, J., et al. : Fatal Salmonella septicemia after platelet transfusion. Transfusion, 27 : 2—5, 1987.
- 5) 三谷孝子, 橋本浩司, 千葉真彰, 池淵研二, 関口定美 : 濃厚血小板製剤の細菌汚染—血小板献血由来血小板製剤で経験した一事例—. 日輸血会誌, 42 : 294—298, 1996.
- 6) 森 良一 : 微生物学 (第 6 版), 編者中山宏明, 三淵一二, 光山正雄, 医学書院, 東京, 1991, 172—174.
- 7) Morduchowicz, G., Pitlik, S.D., Hummer, D., et al. : Transfusion reaction due to bacterial contamination of blood and blood products. Reviews Infect. Dis., 13 : 307—314, 1991.
- 8) Halpin, T.J., Kilker, S., Epstein, J., et al. : Bacterial contamination of platelet pools—Ohio, 1991. Morbid. Mortal. Weekly Rep., 41 : 36—37, 1992.
- 9) Technical Manual. 12 th edition. American Association of Blood Banks, pp 688—689, 1996.
- 10) Dave, J., Brett, M., MacLennan, S., et al. : Sepsis associated with blood transfusion. Lancet, 347 : 1773, 1996.
- 11) Stenhouse, M.A.E. and Milner, L.V. : A survey of cold-growing Gram-negative organisms isolated from the skin of prospective blood donors. Transfus. Med., 2 : 235—237, 1992.
- 12) Anderson, K.C., Lew, M.A., Gorgone, B.C., et al. : Transfusion-related sepsis after prolonged platelet storage. Am. J. Med., 81 : 405—411, 1986.
- 13) Lily, L., Londe, H., Janda, J.M., Hanson, C.V., Corash, L. : Photochemical Inactivation of Bacteria in Human Platelet Concentrates. Blood, 83 :

- 2698—2706, 1994.
- 14) Burstein, J.M., Brecher, M.E., Workman, K., Foster, M., Faber, G.H., Mair, D. : Rapid identification of bacterially contaminated platelets using reagent strips : glucose and pH analysis as markers of bacterial metabolism. *Transfusion*, 37 : 255—258, 1997.
-