

報 告

初流血除去回路つき採血バッグによる皮膚常在菌
及び皮膚片の混入の防止

松田 好美¹⁾ 首藤加奈子²⁾ 佐竹 正博¹⁾
荒川 典雄³⁾ 田所 憲治⁴⁾ 十字 猛夫⁵⁾

¹⁾東京都赤十字血液センター

²⁾東京都東赤十字血液センター

³⁾テルモ(株)研究開発センター

⁴⁾東京都西赤十字血液センター

⁵⁾日本赤十字社中央血液センター

(平成 15 年 4 月 23 日受付)

(平成 15 年 8 月 27 日受理)

REDUCTION OF BACTERIAL CONTAMINATION USING A BLOOD COLLECTION
SYSTEM WITH INTEGRATED PRE-DONATION DIVERSION POUCH

Yoshimi Matsuda¹⁾, Kanako Shuto²⁾, Masahiro Satake¹⁾,
Norio Arakawa³⁾, Kenji Tadokoro⁴⁾ and Takeo Juji⁵⁾

¹⁾Tokyo Metropolitan Red Cross Blood Center

²⁾Tokyo East Red Cross Blood Center

³⁾Terumo Corporation R & D Center

⁴⁾Tokyo West Red Cross Blood Center

⁵⁾Japanese Red Cross Central Blood Center

In order to decrease the contamination of blood components by bacteria, a diversion pouch-integrated blood collection system is being introduced to blood donation programs in some countries in Europe. The system is designed to collect the first 20 ~ 30 mL of blood into a diversion pouch before blood collection, thereby eliminating the blood that may be contaminated by the highest number of bacteria residing on the skin. To verify the efficacy of this system on bacterial removal, blood aliquots drawn from the bacteria-coated jugular vein of dogs were serially cultured. It was observed that the number of cfu of bacteria decreased as the pre-donation sampling volume increased and no bacterial colony was detected in tubes after diversion of the first 27.0 mL of blood. A blood collection kit for platelet apheresis was integrated with this satellite bag circuit and was tried on a volunteer for platelet collection. No serious problems were encountered except for the unusable volume of 20 mL of blood collected in the pouch. The strategy of discarding the first 20 ~ 30 mL of blood before collection may decrease the rate of bacterial contamination of blood components, especially of apheresis-derived platelet concentrates.

Key words : bacterial contamination, blood donation, skin disinfection, diversion pouch

1. 緒 言

輸血によるウイルス感染症が、スクリーニング法の発達にともなって激減したのに伴い、細菌感染症が大きくクローズアップされてきた。実際、輸血による敗血症の頻度は、アメリカ合衆国では血小板製剤輸血5万回につき1回、赤血球輸血50万回につき1回ともいわれ、輸血製剤の安全性を脅かす大きな要因となっている¹⁾²⁾。

輸血用血液製剤の細菌汚染を防ぐ方法には、1)採血時に混入を防ぐ、2)細菌の増殖を最小限に抑える、3)汚染した製剤を検出する、4)細菌を何らかの方法で死滅させる、などの方法があるが、採血血液への細菌の混入を防ぐことができればその後の戦略はほぼ不要となり、おそらくもっとも安価で、もっとも本質的な予防法であろう。特に血小板製剤は常温で保存されるので、いったん菌が混入すれば保存中に極めて速い速度で増殖し、臨床的に敗血症や菌血症を引き起こす濃度に容易に達し得る。

輸血用血液製剤に混入する菌として重要なものに皮膚に存在する菌があるが、これらの菌の製剤への混入は、穿刺部の皮膚の消毒を厳重にすることによって少なくできるはずである。日本赤十字社の血液センターでは、1999年に、皮膚消毒薬をそれまでのヒピテンから、より殺菌力が強くスペクトラムが広いポビドンヨードに変え、また皮膚消毒法についても職員の教育訓練を徹底してきた。それにもかかわらず、センター内での工程検査として行われる定期的な無菌試験では、皮膚常在菌による培養陽性例が報告されている³⁾。その原因の一つは、穿刺針が皮膚を穿刺する際に不可避免的に皮脂腺を通過することや、穿刺針で切り取られる小皮膚片がバッグ内に混入することにあると考えられている。

このため、採血の際、最も細菌が高濃度であると思われる初めの20~30mLを側副のバッグにとりわけ、その後に本バッグに採血する方法が考え出された⁴⁾。ヨーロッパではすでに実用化され、多くの血液センターで日常の業務に取り入れられているが、我々も日本の血液事業へ適用する上で、その効果を確認し、取り扱い方を検証する必要が

あると考え、イヌを用いた動物実験を行い、またこのシステムを取り入れた成分採血キットを用いて実際の採血に支障がないかどうかを確認した。

2. 材料および方法

(1) 細菌の塗布と採血

イヌの頸部に細菌を一定量塗布し、そこから採血を行った。

実験動物には体重22.0~28.5kgの雌雄の雑種秋田犬(セイケン資材)を用いた。ペントバルビタール(25~30mg/kg 大日本製薬)の腹腔内投与にて全身麻酔を行い、頸部を電気バリカン及び安全カミソリで剃毛したのち、細菌を塗布した。使用した菌は、表皮ブドウ球菌 *Staphylococcus epidermidis* (ATCC14990)、黄色ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus* (ATCC29213)、及びアクネ菌 *Propionibacterium acnes* (ATCC11827)の3種である。一定濃度に希釈した菌液を綿棒で皮膚上に塗布し、ドライヤー(冷風)で乾燥させて細菌を皮膚につけた。塗布菌数は塗布前後の綿棒の重量を測定し、その差を塗布面積で除して求めた。

頸静脈を17G採血針で穿刺し、初流血液除去回路(Fig.1)を使用して採血した。採血開始後の血液を初流血液除去側の回路に通し、約4.5mLずつ5本の無菌試験管に採取した後、本採血側の回路に切り替え、さらに同量ずつ5本、計10本を採集した。試験管には抗凝固剤としてACD液0.5mLをあらかじめ加えておいた。各菌種、各塗布菌数について2例ずつ実験を行った。これらは「実験動物の飼育および保存等に関する基準」に基づいた施設ガイドラインに則って行った。

(2) 培養

採血した試料は直ちに培養に供した。除去回路側の1~5本目は表皮ブドウ球菌と黄色ブドウ球菌についてはBHI寒天培地(ニッスイ)、アクネ菌についてはGAM寒天培地(ニッスイ)で嫌気培養し、培地上に発育した菌数を計測して血液1mL中に存在した生菌数を求めた。本採血側の6~10本目の試料は無菌性の確認を血液培養用のカルチャーボトル(栄研化学)を用いて行った(Table 1)。

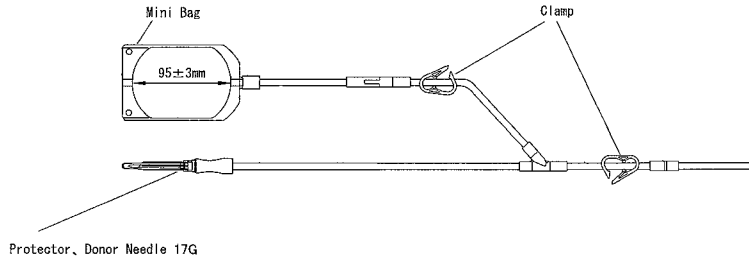


Fig. 1 Diagram of the blood collection kit with integrated diversion pouch.

Table 1 Bacteria and culture conditions used for the animal experiment

bacteria	No. of applied bacteria (cfu/cm ²)	media	Culture conditions
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	10 ⁴ , 10 ³ , 10 ²	BHI agar	37 , 24h
<i>Staphylococcus aureus</i>	10 ⁴ , 10 ³	BHI agar	37 , 24h
<i>Propionibacterium acnes</i>	10 ⁴ , 10 ³ , 10 ²	GAM agar	37 , 96h, anaerobic

(3) 皮膚片除去の確認

ラットの背中部分の皮膚を剃毛後、皮弁を切り取り、円筒状の16ゲージ針でパンチカットして小皮膚片を作成した。この皮膚片を、視認性をよくするために1% トルイジンプルーで染色した。これを、初流血除去回路付き血液バッグと同一のY字管分岐路のついた17G採血針の中に挿入し、イヌの前腕部静脈より血流量0.5~1.0mL/秒で採血し、5mLずつのフラクションを計50mL採血した。各フラクションの血液をガーゼで濾過し、ガーゼ上に回収される皮膚片を目視でみつけることにより、どのフラクションで除去排出されたかを確認した。全部で15例の試験を実施した。

(4) ボランティアによる成分採血

テルモ社の成分採血用キットに初流血除去回路を組み込んだものを成分採血装置テルシスに装着し、ボランティアの肘静脈に穿刺した。この際、初流血を除去し、その実際の諸手順を検討した。

3. 結果

(1) 表皮常在菌の除去効果

表皮ブドウ球菌、黄色ブドウ球菌及びアクネ菌の何れの場合も、皮膚表面付着菌数が10⁴/cm²以下であれば、採血を開始してから27.0mL以降では菌は検出されなかった(Fig. 2)。また、菌数は採

血初期のものほど多く、後のほうで再び菌数が多くなることはなかった。除去血と本採血とでは培養法が異なるが、本採血側のカルチャーボトル法は定量性はないものの、感度に大きな差はないと思われる。

以上は試作した除去回路を用いた実験であり、実際の採血キットでは回路分岐部の形状のわずかの違いにより、初流血の一部が分岐部にとどまって本採血側に混じる可能性もある。そのため、完成したキットと同じ形状の採血アームを用いて同様の実験を行ったが、本採血側には細菌は検出されなかった。

(2) 皮膚片除去の確認

小皮膚片を採血針内において採血し、どのフラクションで皮膚片が回収されたかをTable 2に示す。15例中14例で採血後10.0mL以内に小皮膚片は排出され、採血回路途中での停滞、付着等は生じなかった。残り1例は採血針内部に付着したままであった。

(3) 初流血除去回路付き成分採血キットによる採血

初流血除去回路を成分採血キットに組み込んで成分採血装置に装着し、その穿刺針をボランティアの肘正中静脈に穿刺した。バッグ本体側のクレ

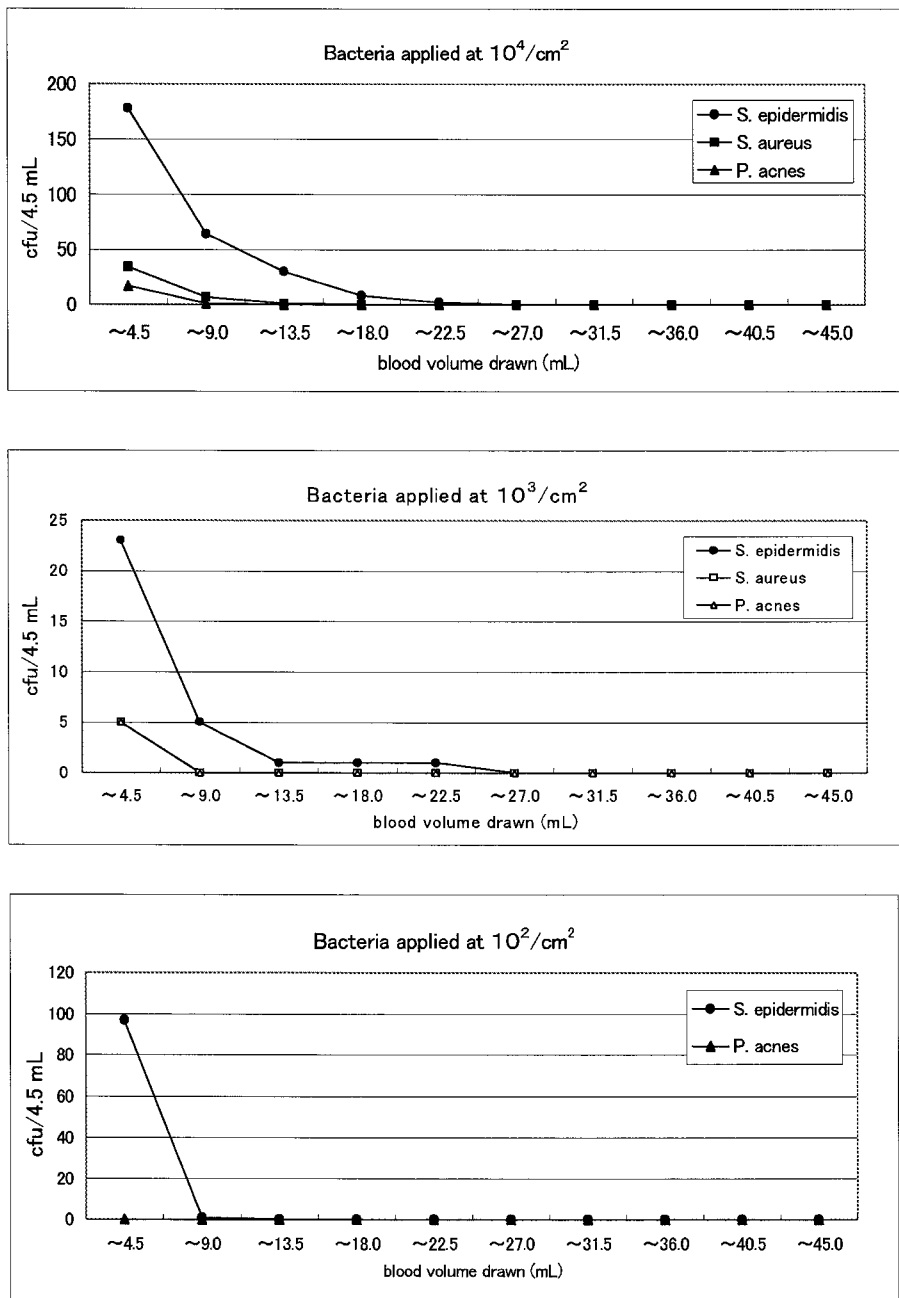


Fig. 2 Relationship between the number of bacterial cfu and the volume of blood drawn.

ンメを閉じ除去回路のクレンメを開けて初流血を約 20mL 採取し、次に除去回路を閉じて本体側に採血した。キットを装置に装着することによって回路内圧が変化し、初流血の流出に影響を与える

ようなことはなかった。本採血を通じて次のような点に気付いた .1) 初流血を入れる小バッグがある程度の大きさでないと血液がたまるにたがって内圧が高まり、流速が落ちる .2) 側副回路全体

Table 2 Collection experiment for skin plug

Fractions where skin plug was found	frequency
0 ~ 5mL	13
5 ~ 10mL	1
10 ~ 15mL	0
others	1*

* Skin plug was found inside the needle after blood was drawn.

の長さで採血中に静置する場所を慎重に決めないと、その重さで採血回路を献血者の前腕から引きずり落としかねない³⁾。小バッグに入った血液は利用されずに採血終了までそのまましておかれる。これらの点を除いては、総じて操作性に大きな問題はなかった。

4. 考 察

ウイルスの場合と異なり、輸血用血液製剤中の細菌はバッグの中でダイナミックに増殖または死滅するので、安定したマーカーでスクリーニングすることが困難である。したがって、採血時のサンプルで陽性の結果を得ても、臨床的に意味のない検査結果を生ずる恐れがあり、できるだけ輸血する時に近い時点のサンプルを用いて細菌の同定・定量をしなければならない。しかしながら、輸血実施までにこの結果を出すのは技術的に困難であり、検出・スクリーニングという手法は、現在の日本の少なくとも血小板製剤に関しては適用が難しい。

これに対して、採血時に細菌の混入を防ぐ方法は最も本質的な解決法といえる。輸血用血液製剤に混入する細菌には、穿刺する皮膚に存在するものと、献血者の血中に存在するものとの二つがある。後者については、菌血症の可能性のある献血者を問診の段階で的確に排除するしか現時点では手段がない。いっぽう穿刺部位の皮膚に存在する菌については、皮膚の消毒を徹底することが基本的な予防策であるが、毛嚢や皮脂腺などに存在する菌を死滅させることは事実上不可能であり、穿刺針がここを通過した場合には採血血液に細菌が混入する確率が高くなる。さらに、筒状の穿刺針が皮膚を貫く時に皮膚片が切り取られて採血血液

に混入し、その中に潜んでいた細菌が保存中に増殖する可能性も考えられる。赤血球製剤中に検出される細菌は献血者の菌血症に由来するものが多いが、血小板製剤中に増殖する細菌は、穿刺時に皮膚から混入する球菌が比較的多いといわれる⁵⁾。したがって、採血の初期にとくに混入する皮膚に付着する菌を排除する方策は、血小板成分採血においてより意義が高いと考えられる。

今回の検討では、代表的なヒトの皮膚の常在菌である表皮ブドウ球菌、汚染が起こった場合に重大な症状を呈する可能性のある黄色ブドウ球菌、及び血液センターの工程管理で最も高頻度に検出されるアクネ菌の3種を使用した。実験で用いた $10^4/\text{cm}^2$ という菌数は、消毒をしていないヒトの手指の平均的な細菌数である⁶⁾。この実験で、皮膚常在菌数が $10^4/\text{cm}^2$ 以下であれば、採血時初流血を27.0mL以上除去することにより、細菌の混入を防止できる可能性が高いことが示された。また培養で検出された菌数が、初流血のあとのほうほど少なくなることは、穿刺時にのみ細菌の混入が起こることを示唆しており、初流血の除去に意義があることを裏付けている。また、初流血を10mL以上除去することにより、皮膚片の混入を防止できる可能性が高いことも示された。

初流血除去回路はどの採血法にも適用できるが、前述のように、細菌汚染の最も起こりやすい血液製剤は血小板製剤であるので、まずこれを成分採血装置の血小板採血用キットに組み込み、その実際の使い勝手を検証した。その結果、20mLの血液が献血者の目の届くところに何も利用されずに最後まで残ることが問題となったが、これがそのまま検査用に利用することができれば、採血量の増加を防ぐ意味からも都合がよい。現在、採血バッグの無菌性を保ちつつここから検体採取ができる方法を検討中である。

初流血除去回路はすでにヨーロッパの主要国では献血時の採血に導入されて効果も検証されている^{4) 7) 8) 9)}。これによっても皮膚からの細菌の混入がまったくなくなるわけではないが、少しでも細菌の混入数を少なくすることに意義がある。すなわち初期混入数を少なくすることにより増殖カーブ

のたちあがりを遅くし、期限内に重大な細菌濃度に達する製剤の数を少なくすることができれば、製剤の細菌汚染に関する安全性は高まるものと期待できる。

文 献

- 1) Blajchman, M.A., Goldman, M. : Bacterial contamination of platelet concentrates : incidence, significance, and prevention. *Semin Hematol*, 38 (Suppl 11) : 20-26, 2001.
- 2) Blajchman, M.A. : Incidence and significance of the bacterial contamination of blood components. *Dev. Biol(Basel)* 108 : 59-67, 2002.
- 3) 輸血情報 0203-69, 日本赤十字社中央血液センター医薬情報部, 2002.
- 4) Bruneau, C., Perez, P., Chassaigne, M., Allouch, P., Audurier, A., Gulian, C., Janus, G., Boulard, G., De Micco, P., Salmi, L.R., Noel, L. : Efficacy of a new collection procedure for preventing bacterial contamination of whole-blood donations. *Transfusion*, 41 : 74-81, 2001.
- 5) Kuehnert, M.J., Roth, V.R., Haley, N.R., Gregory, K.R., Elder, K.V., Schreiber, G.B., Arduino, M.J., Holt, S.C., Carson, L.A., Banerjee, S.N., Jarvis, W.R. : Transfusion-transmitted bacterial infection in the United States, 1998 through 2000. *Transfusion*, 41 : 1493-1499, 2001.
- 6) 都築正和 : 殺菌・消毒マニュアル, 医歯薬出版株式会社, 東京, 1991, 30-37.
- 7) Andreu, G., Morel, P., Forestier, F., Debeir, J., Rebibo, D., Janvier, G., Herve, P. : Hemovigilance network in France : organization and analysis of immediate transfusion incident reports from 1994 to 1998. *Transfusion*, 42 : 1356-1364, 2002.
- 8) Bos, H., Yedema, Th., Luten, M., van Buul, C., Puy-laert, C. : Reduction of the incidence on bacterial contamination by pre-donation drawing blood for safety tests. *Vox Sang.*, 83 (Suppl. 2) : 6, 2002.
- 9) Schneider, Th., Tunes, V., Fontaine, O., Carnoy, S., Vens, Th., Huart, J.J. : Benefits of the pre-donation sampling pouch in order to reduce bacterial contamination of pooled platelets concentrates. *Vox Sang.*, 83 (Suppl. 2) : 162, 2002.