

原 著

血液製剤細菌検出装置 BDS と eBDS による

血小板濃厚液の細菌汚染の検出

比留間 潔¹⁾ 石井 加世¹⁾ 高橋 直美¹⁾ 安部久美子¹⁾
高木 朋子¹⁾ 武田 敏雄¹⁾ 國友由紀子¹⁾ 中川 美子¹⁾
小澤 直宏¹⁾ 奥山 美樹¹⁾ 江月 将史²⁾ 大重 貴昭²⁾

¹⁾東京都立駒込病院 輸血・細胞治療科

²⁾川澄化学工業株式会社

(平成 17 年 10 月 18 日受付)

(平成 18 年 3 月 1 日受理)

血液製剤の細菌汚染を予防することは輸血の安全性を確保するために重要である。今回、我々は細菌検出システム BDS およびその改良型機種 eBDS の性能を評価するために、日本赤十字社から供給された 200 製剤の PC を測定した。BDS および eBDS は細菌の消費する酸素を測定することで細菌増殖を検出するシステムである。

BDS で測定した PC 100 製剤のうち 1 製剤に細菌汚染があると判定され、eBDS で測定した PC 100 製剤はすべて陰性であった。陽性となった PC の一部を、BacT/ALERT により 1 週間培養後、測定したが菌は検出されず、偽陽性と判断された。結局、今回の検討では 200 製剤の PC はすべて細菌汚染はないと判断された。また、BDS および eBDS とともに検体採取から培養開始にかかる時間は 2~3 分であった。

eBDS は大量の検体を迅速に処理でき、結果は 24 時間で判定できるので、血小板製剤の細菌汚染のスクリーニング検査として有用性が高いものと思われた。

キーワード：細菌汚染、細菌検出装置、血小板濃厚液、eBDS

はじめに

細菌に汚染された輸血用血液はときに致命的な副作用をもたらすことが知られており、輸血によるウイルス感染が減少した今日では、重要な問題になっている¹⁾²⁾。特に血小板濃厚液 (platelet concentrate : PC) は室温で保存するために赤血球製剤や凍結血漿製剤に比較して細菌汚染の危険性が高いことが指摘されている¹⁾²⁾。このため、米国ではアメリカ血液銀行協会 (AABB) が 2004 年 3 月から全血小板製剤の細菌検査を行うことを表明した³⁾。

血液製剤の細菌をスクリーニングする場合、大量の検体を短時間で処理する技術が必要である。Pall bacterial detection system (BDS) は血液製剤

の細菌汚染の検査のために開発されたシステムで、アメリカ食品医薬品局 (FDA) で認可され 2002 年 1 月に実用化されている⁴⁾⁵⁾。細菌が増殖するときに酸素を消費するが、本システムは血液製剤中の酸素濃度を測定することにより細菌汚染を検出する。さらに、BDS の感度を向上させるために細菌の栄養源を増加し、振盪しながら培養するなどの改良を加えた Pall enhanced bacterial detection system (eBDS) が 2003 年に FDA で承認された⁶⁾。

わが国では PC に対する細菌のスクリーニング検査はまだ導入されていないが、今後検討する必要があるものと思われる。今回、我々は BDS および eBDS の性能を評価するために、日本赤十字社

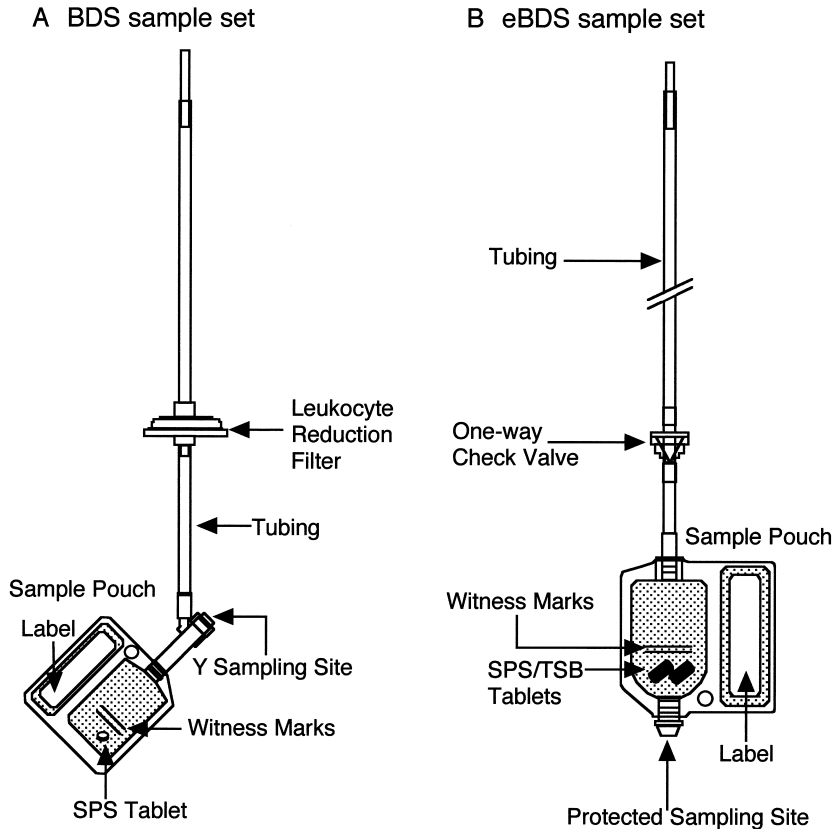


Fig. 1 Diagrams of sample sets.

A : The BDS sample set is composed of a leukocyte reduction filter and a sample pouch, including a SPS tablet.

B : The eBDS sample set is composed of one-way check valve tubing and a sample pouch, including SPA and TSB tablets.

から供給された PC を対象に測定したので報告する。

材料および方法

1. 測定対象の PC

日本赤十字社血液センターから当院に供給された PC の一部を測定した。BDS で測定した PC は 2004 年 1 月 11 日から 2004 年 4 月 11 日まで、eBDS で測定した PC は 2005 年 2 月 7 日から 2005 年 6 月 24 日まで当院に供給されたものであり、それぞれ 100 製剤を対象にした。

2. 測定検体の採取

血液センターから搬入された PC を患者に使用する前に、無菌接続装置 (TSCD, テルモ株式会社)

で無菌の小輸血バッグ KBP-50C2 (川澄化学工業株式会社) に接続し、約 6mL を採取した。

BDS (ポール株式会社, 川澄化学工業株式会社) で測定する場合は、PC の一部が入ったバッグを BDS sample set (検体セット) に TSCD で接続し、白血球除去フィルターを通過させ、規定の witness line (目盛り線) まで PC を 2~3mL 注入した (Fig. 1)。フィルターとチューブをチューブシーラーで切り離し、35℃ で 24 時間培養した。培養後 5 分間、室温に静置し、BDS sample pouch (検体パウチ) 内の気体中の酸素濃度 (%O₂) を酸素分析装置 (BDS oxygen analyzer) で測定した。細菌汚染がある場合は酸素が消費されるため酸素濃度

Table 1 O₂ measurements by BDS

PC (day after blood collection)	day1	day2	day3	total
n	8	82	10	100
storage time (hours)	25.8 ± 1.4	47.0 ± 2.5	67.4 ± 1.3	47.4 ± 9.2
% O ₂	20.3 ± 0.3	20.3 ± 0.3	20.4 ± 0.2	20.3 ± 0.3
positive cases	0	1	0	1

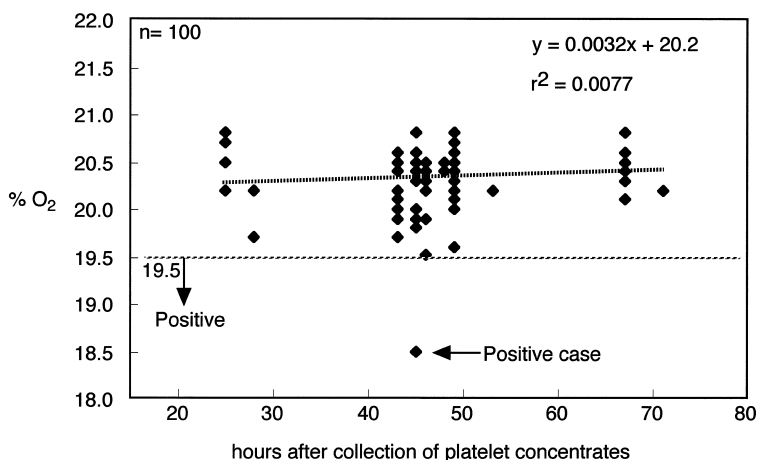


Fig. 2 Measurement of %O₂ of platelet concentrates by BDS. O₂ measurement values of 100 platelet concentrates by BDS are shown. One positive case is observed.

の低下によって細菌汚染を検出できる。大気中の酸素濃度の基礎値 (base line) を 20.9% とし、細菌汚染が陽性であると判断される酸素濃度のカットオフ値は 19.5% である。すなわち、酸素濃度が 19.5% 以下の場合、細菌汚染があると判定される。

eBDS (ポール株式会社, 川澄化学工業株式会社) で測定する場合は採血バッグに入った PC の一部を TSCD を用い eBDS 検体セットに接続し、規定量 (2~3mL) を注入し、一方向性の弁とチューブをチューブシーラーで切り離れた。35°C で 24 時間、振盪しながら培養した。培養後 5 分間、室温に静置し、eBDS 検体パウチ内の気体中の酸素濃度 (%O₂) を酸素分析装置 (eBDS oxygen analyzer) で測定した。eBDS の場合は、細菌汚染が陽性であると判断される酸素濃度のカットオフ値は 9.4% である。

3. 細菌汚染の確認検査

BDS および eBDS で陽性となった場合、その PC の一部を細菌培養検出装置である BacT/ALERT (ビオメリュー社) を用い測定した。好気性と嫌気性の培養ボトルで培養し、7 日間観察した。

結 果

1. BDS と eBDS の操作性の比較

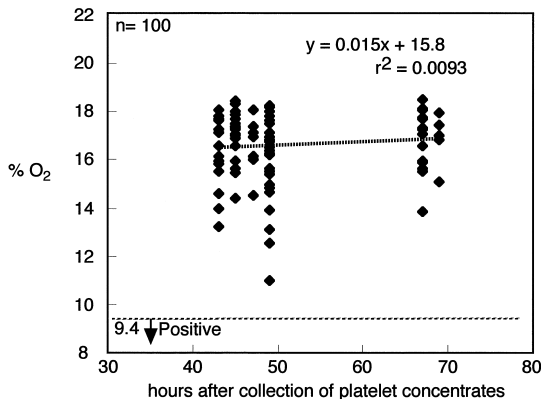
血液製剤の一部を検体パウチに採取する際、BDS では白血球除去フィルターのプライミング操作が必要であるが、eBDS には白血球除去フィルターがないので簡便になっている。培養に関しては BDS では 35°C で静置しながら 24 時間培養するが、eBDS では 35°C で振盪しながら培養する。このため eBDS では振盪培養装置が必要である。

検体パウチの気体を酸素分析装置で測定する際

Table 2 O₂ measurements by eBDS

PC (day after blood collection)	day1	day2	day3	total
n	0	76	24	100
storage time (hours)	ND	46.5±2.4	67.4±0.8	51.5±9.2
% O ₂	ND	16.5±1.5	16.9±1.1	16.6±1.4
positive cases	ND	0	0	0

ND : no data

Fig. 3 Measurement of %O₂ of platelet concentrates by eBDS.

O₂ measurement values of 100 platelet concentrates by eBDS are shown. All values are over 9.4% and are judged negative for bacterial contamination.

に、BDS 検体パウチでは Y sampling site の部分 (Fig. 1A) にプローブを刺して気体を採取するが、PC の一部がこの部分に残っていると液体を吸入し測定できなくなることがあった。eBDS では protective sampling site (Fig. 1B) から気体を採取するが、液体を吸入させない疎水性膜があるため、測定不能になることがなかった。

BDS および eBDS とともに、検体採取から培養開始までに要する時間は、2~3 分であった。

2. BDS による測定結果

BDS の対象となった 100 製剤の PC の測定結果を Table 1 に示した。PC の採血日を 0 日目 (day 0) とした場合、検体採取時において 1 日目 (day 1)、2 日目 (day 2)、3 日目 (day 3) の PC がそれぞれ 8、82、10 製剤であり、採血後 2 日目の PC がもっとも多かった。また、PC の採血後経

過時間は検体採取時において、47.4±9.2 時間であった。全体の %O₂ は 20.3±0.3% で、このうち 1 例が 18.5% となり、陽性と判定された。PC の採血後の日数を分けて解析すると、day 1、day 2、day 3 の %O₂ はそれぞれ、20.3±0.3%、20.3±0.3%、20.4±0.2% と差はなかった。また、PC の検体採取時の採血後経過時間と %O₂ との相関を Fig. 2 に示したが、相関係数は $r^2=0.0077$ で、相関があるとは言えなかった。

細菌汚染と判定された PC の一部を、BacT/ALERT により 1 週間培養し観察したが細菌は検出されなかった。本 PC 製剤は輸血に使用されているが、輸血された患者には発熱や炎症反応上昇などの細菌感染を疑わせる所見はなかったので、偽陽性と判断された。

3. eBDS による測定結果

eBDS の対象となった 100 製剤の PC の測定結果は Table 2 に示した。全体の %O₂ は 16.6±1.4% であり、細菌汚染が陽性と判定された例はなかった。採血後 day 2、day 3 の PC はそれぞれ 76、24 製剤あり、day 1 の PC はなかった。%O₂ は day 2、day 3 でそれぞれ、16.5±1.5%、16.9±1.1% と差はなかった。また、PC の採血後経過時間は検体採取時において、51.5±9.2 時間であった。PC の採血後経過時間と %O₂ 測定値との相関を Fig. 3 に示したが、相関係数 $r^2=0.0093$ と相関があるとは言えなかった。

考 察

B 型肝炎ウイルス (HBV)、C 型肝炎ウイルス (HCV)、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) などの既知の病原体による輸血感染症が著明に減少している現在、細菌感染は重要な輸血副作用として認識されつつある。アメリカ疾病対策センター (CDC)

の報告によると、米国では1998年から2000年までに、34例の輸血による細菌感染が報告され、そのうち9例が死亡している¹⁾。血液製剤別の細菌感染の発生率は、100万本の製剤あたり、単独ドナーPCで9.98、プールPCで10.64、赤血球製剤で0.21であり、死亡例はそれぞれ、1.94、2.22、0.13であった。英国での重篤な輸血副作用報告 (serious hazards of transfusion : SHOT) によると、1995年から2002年まで全体で26例の細菌感染が報告され、そのうち6例が死亡している。血小板製剤では22例の細菌感染のうち5例で死亡例が発生していた。そして細菌感染の発生率が相対的に重要な問題になっていると指摘している²⁾。

日本における輸血による細菌感染の発症率は明らかではないが、厚生労働省によれば、近年、日本赤十字社より3例が報告されたとしている⁷⁾。血小板製剤による肺炎球菌感染 (2000年)⁷⁸⁾、赤血球製剤による緑膿菌感染 (2003年)、赤血球製剤によるエルシニア菌感染 (2003年) である。いずれの症例も敗血症性ショックあるいはエンドトキシンショックで死亡している。また、血小板製剤による *Morganella morganii* 感染の一例が報告されているが、この症例はショック症状を呈したものの救命されている⁹⁾。このように、わが国でも輸血による細菌感染が目ざれ報告例が認められるようになった。しかし、多くの症例が輸血直後の死亡例あるいはショック状態を呈した例であるので主治医が輸血による原因を疑うことができるが、重篤なショック状態に至らない例は見逃されており、実際にはより多くの輸血による細菌感染例が発生している可能性は否定できない。したがって、今後、輸血による細菌感染の実態を明らかにし、その対策を講じることが重要である。

輸血による細菌感染の対策の一つとして血液製剤の細菌検査が第一に考えられる。特に細菌汚染率が高いPCを対象に細菌のスクリーニング検査を行なうことが、すでに欧米では導入されつつある³⁾。

今回、我々は、このような経緯の中で開発された細菌検出装置BDSおよびその改良型であるeBDSを評価した。すでに、BDSとeBDSの基礎

的な機能を評価するために、10種類の細菌を一定量接種したPCを用いて、感度と特異性を評価した研究が報告されている^{3)~5)}。これらの報告によるとBDSでは全ての菌種を100%検出できる濃度が100~500CFU/mLであるが、eBDSでは1~15CFU/mLと改善されている。また、eBDSでは細菌を接種していない713製剤のPCが陽性にはならなかったので特異性も優れていると報告されている⁵⁾。BDSは白血球や血小板による酸素の消費を抑制するために白血球除去フィルターを用いていたが、このために細菌も除去され感度が低下する可能性があった。eBDSでは白血球除去フィルターを付けず、菌の増殖が促進されるようにポリアネトール硫酸ナトリウム (sodium polyanethol sulfonate ; SPS) に加え栄養源として tryptone soy broth (TSB) を併用し、さらに振盪しながら培養をしている。このために菌が増殖した際の酸素消費量が増加し、他の原因による酸素消費の影響を受け難くなり感度とともに特異性が向上したと思われる。今回の研究においてもBDSでは1例(1%)で偽陽性と思われる結果が出たが、eBDSでは偽陽性はなかった。

血液製剤中の細菌をスクリーニングするためには、感度と特異性が求められるほかに、大量の検体を迅速に処理し、結果が速やかに得られることが必要である。eBDSは検体採取に関しては、血液バッグを直接検体採取パウチに無菌接続装置で接続するので無菌性を保持する利点がある。実際に採取にかかる時間は約3分であったので簡便に大量に処理しやすい利点があるものと思われた。

今回の検討でPCが病院に供給された時点での細菌汚染の実態を明らかにすることも目的としたが、200製剤の検討ではすべて陰性であり、さらに調査数を増加する必要がある。また、実際には採血後2日目のPCが最も多く、3日目のPCは少なかったが、採血後の経過時間に関連し酸素濃度が低下する傾向は見られなかった。PCの有効期限は欧米では採血後5日とする場合が多い¹⁰⁾¹¹⁾。日本では細菌汚染の予防として3日間としているために、その効果が現れている可能性もある。

一方、2003年ではPCは合計8,382,105単位が製

造され、7,920,725 単位が供給され、461,380 単位 (5.5%) がおもに有効期限切れが原因で廃棄されている⁷⁾。これは、製造者側における廃棄率であるが、医療機関での廃棄量を考慮するとさらに多くの PC が廃棄されていることになる。有効期限が短いと廃棄率が増加するので、安全性が確保されれば、有効期限を延長することは意義がある。実際にヨーロッパでは細菌汚染がないことを確認すれば PC の有効期限は採血後 7 日まで認められるとしている¹⁰⁾。したがって、わが国においても細菌のスクリーニング検査を導入し陰性ならば有効期限を延長するなどの対策を講じることは重要な検討課題である。

本研究の一部は平成 16 年度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) によって行われた。

文 献

- 1) Kuehnert MJ, Roth VR, Haley NR, et al : Transfusion-transmitted bacterial infection in the United States, 1998 through 2000. *Transfusion*, 41 : 1493—1499, 2001.
- 2) Stainsby D, Williamson L, Jones H, et al : 6 Years of shot reporting—its influence on UK blood safety. *Transfus Apher Sci*, 31 : 123—131, 2004.
- 3) AABB home page : Requirement for Implementation of Bacterial Detection Methods. http://www.aabb.org/pressroom/in_the_news/bdstd030303.htm (2006 年 1 月現在)
- 4) Rock G, Neurath D, Toye B, et al : The use of a bacteria detection system to evaluate bacterial contamination in PLT concentrates. *Transfusion*, 44 : 337—342, 2004.
- 5) Ortolano GA, Freundlich LF, Holme S, et al : Detection of bacteria in WBC-reduced PLT concentrates using percent oxygen as a marker for bacteria growth. *Transfusion*, 43 : 1276—1285, 2003.
- 6) Holme S, McAlister MB, Ortolano GA, et al : Enhancement of a culture-based bacterial detection system (eBDS) for platelet products based on measurement of oxygen consumption. *Transfusion*, 254 : 984—993, 2005.
- 7) 厚生労働省医薬食品局血液対策課 : 平成 17 年版血液事業報告, 厚生労働省, 2005.
- 8) 片山俊夫, 神谷昌弓, 保科定頼, 他 : 肺炎球菌に汚染された血小板濃厚液の輸血直後に発症した敗血症性ショックと横紋筋融解症の致死的合併例. *臨床血液*, 44 : 381—385, 2003.
- 9) 石田 明, 上村知恵, 橋詰賢一, 他 : 血小板輸血後に敗血症性ショックを呈し, *Morganella morganii* 菌による輸血後感染症が強く示唆された 1 例. *日本輸血学会雑誌*, 50 : 726—729, 2004.
- 10) Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components, 11th edition, Council of Europe, 2005.
- 11) Preparation, storage, and distribution of components from whole blood donation. In : Brecher ME, ed, *Technical Manual*, 14th edition, American Association of Blood Banks, USA, 2002, 161—187.

MEASUREMENT OF PLATELET CONCENTRATES BY A BACTERIAL DETECTION SYSTEM, BDS AND EBDS

Kiyoshi Hiruma¹⁾, Kayo Ishii¹⁾, Naomi Takahashi¹⁾, Kumiko Abe¹⁾, Tomoko Takagi¹⁾,
Toshio Takeda¹⁾, Yukiko Kunitomo¹⁾, Yoshiko Nakagawa¹⁾, Naohiro Ozawa¹⁾,
Yoshiki Okuyama¹⁾, Shoji Eduki²⁾ and Takaaki Oshige²⁾

¹⁾Division of Transfusion and Cell Therapy, Tokyo Metropolitan Komagome Hospital,

²⁾Kawasumi Laboratories Incorporation

Prevention of bacterial contamination of blood products is an important issue in maintaining the safety of transfusion. In this study, we evaluated the performance of a bacterial detection system (BDS, Pall) and its successor system, the enhanced bacterial detection system (eBDS, Pall) by measuring 200 platelet concentrations (PCs) provided by the Japan Red Cross Blood Center. These systems measure oxygen concentrations consumed by bacteria, and can detect bacterial contamination.

One of 100 PCs measured by BDS, and none of a second series of 100 PCs measured by eBDS were positive for bacterial contamination. When a part of the positive product was measured by a bacterial culture system, BacT/ALERT (bioMerieux), no bacteria was observed after culture for seven days. We therefore judged this to be a false positive result and determined no bacterial contamination occurred in any of the 200 PCs in this study. With the BDS and eBDS, culture samples could be started within 2 to 3 minutes of sampling from the PC.

It is considered that the eBDS is a useful screening test for bacterial contamination of blood products, because a high number of many samples can be handled promptly and the results are available within 24 hours of sampling.

Key words : Bacterial contamination, bacterial detection system, platelet concentrate, eBDS
