

初流血除去による細菌汚染低減効果の検証

名雲 英人 篠崎久美子 木村 泰 野田 三恵 小野由里子

佐竹 正博 中島 一格

献血血液の細菌汚染の防止対策として、採血時に初流血を 30ml 除去する方法の効果を検証した。初流血を除去した評価群と初流血を除去していない対照群から、本採血の一部をそれぞれ約 3,000 検体採取し、細菌培養を実施した。陽性検体数及び陽性率はそれぞれ、評価群が 2 検体、0.07%、対照群が 7 検体、0.24% であった。評価数が少なく両群間に有意差は認められなかったが、培養陽性検出数や検出菌種からみて、初流血を除去することによって献血血液への細菌汚染を低減し得ることが示唆された。

キーワード：輸血用血液，細菌汚染，皮膚消毒，初流血

はじめに

輸血による肝炎ウイルスや HIV 等のウイルス感染リスクは、高単位血液の普及、核酸増幅検査 (nucleic acid amplification testing, NAT) の導入等により限界近くまで少なくなり、現在大きな問題となりつつある輸血感染症は、血液製剤中に混入した細菌の汚染によるものである。

輸血用血液に細菌が混入する経路としては、採血時の不適切な手技や穿刺部位の不十分な消毒により皮膚常在菌が混入する場合、皮膚表面を消毒しても消毒液が行き届かない皮膚深層の毛嚢部を貫いた穿刺針から混入する場合、無症候の菌血症状態にあるドナーからの採血、その他、採血バッグ自体の汚染や破損、閉鎖系を開放して製剤を調製する二次製剤の調製工程での汚染が考えられる^{1)~4)}。

これらの細菌汚染の防止対策として、1) 皮膚消毒法の改良、2) 採血時に初流血を 15ml~30ml 除去する初流血除去、3) 混入した細菌の不活化、4) 細菌の混入した製剤を排除するための培養法や免疫学的方法によるスクリーニングなどがある。

輸血用血液製剤へ混入する細菌は、穿刺部位からのものが最も多いと考えられる。皮膚表面に常在する菌は適切な皮膚消毒を行うことにより混入を低減できるが、皮膚深層部の毛嚢などに棲息する菌は殺菌されずに残る可能性がある。そのため、毛嚢を貫いた採血針から細菌が採血血液に混入したり、採血針によってくり抜かれた皮膚片とそれに付着した細菌が混入することが考えられる。このため、採血時に最も細菌の混入

率が高いと思われる採血初めの 15ml~30ml を除去して本採血に加えないことが効果的と考えられている。初流血除去のシステムは、イギリス、フランス、オランダやカナダなどいくつかの国ですでに導入されているが、日本において導入の必要性と有効性があるかどうかを判断するためには、日本の実際の採血環境において評価をする必要があると考え、一般のドナーからの採血に初流血除去を加えてその細菌の除去効果について培養法を用いて検討した。

材料及び方法

1. 採血

事前に同意を得た献血者から採血を行い、2004 年 7 月から 2006 年 1 月まで検討を行った。初流血除去したものを評価群 (n=2,890)、初流血除去していない従来のもを対照群 (n=2,967) とした。評価群は、初流血除去用小バッグを付属した ACD 加 400ml 採血用 4 連バッグシステム (テルモ社 Fig.1) を用いて全血採血を行った。初流血除去の採血は、採血ラインから分かれている初流血用小バッグに、穿刺後落差により 30ml 採取し、その後初流血のチューブラインのクレンメを閉じて 400ml の本採血をした。小バッグに除去した血液は、検査用血液として採血ホルダー接続口から真空採血管に採取した。対照群は、現行の ACD 加 400ml 採血用 4 連バッグ (カワミ社) を用いて採血した。次に、採血血液の入った本体バッグのラインと 150 ml 用分離バッグのラインを無菌接合装置 TSCD (テルモ社) で接合し、十分に混和した本体バッグの血液約

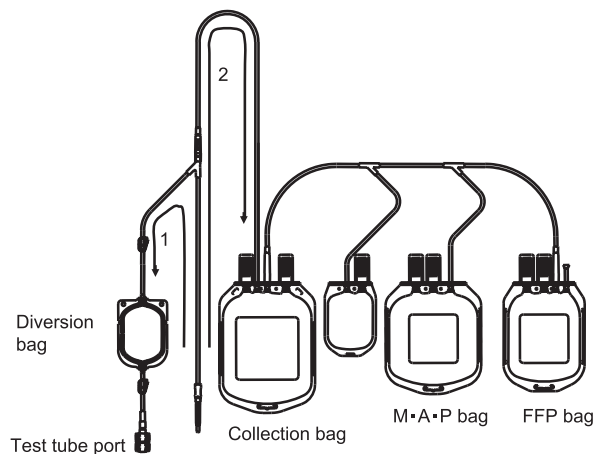


Fig. 1 Quadruple bag system attached with a diversion bag

18ml を分離バッグに移したのち、分離バッグを切り離して細菌培養用検体とした。残りの本体血液は、血液自動分離装置(テルフレックス ACA-212・テルモ社)を用いて常法により赤血球 MAP 及び新鮮凍結血漿(FFP)を調製し、培養結果がでるまで7日間保管した。培養の結果、陽性となった血液は一部を再検査したのち血液センター内で減損し、陰性のものは製品化した。

採血は、手技及び採血環境に差がないよう採血場所を東京都内の献血ルーム2カ所に限定し、事前に初流血除去を行うための教育訓練を受けた看護師により採血を行い、採血時の手技上の問題点についても検討した。

2. 培養

150ml 分離バッグに入った細菌培養用血液は常温で輸送・保管し、採血後3時間以内に培養に供した。培地への検体接種は、クリーンベンチ内で BacT/Alert 専用の針とホルダーを用い、嫌気性用 (BPN) 及び好気性用 (BPA) 培地ボトル各1本にそれぞれ約7ml を接種した。培養は、血液自動培養装置 BacT/Alert (日本ビオメリュー社) を用いて 37°C、7日間行った。

3. 陽性検体

陽性と判定された場合、陽性ボトルを用いグラム染色による直接鏡検及び細菌同定試験を行った。細菌同定試験は、検査センターである(株)エスアールエルに依頼した。また、陽性検体のもととなった全血から分離調製した赤血球 MAP 及び FFP を BacT/Alert で培養し、製剤中の菌の有無について評価した。

結 果

1. 採血

初流血除去の手順を入れた採血はほとんど問題なく行われた。30ml を正確に採取することがやや困難であったこと、腕台よりぶら下がった除去回路が穿刺針を引

Table 1 Frequency of bacterial contamination in whole blood obtained by the diversion and conventional methods (Jul. 2004 ~ Jan. 2006)

	No. of units tested	No. of units with bacterial contamination	Percentage
Diversion method	2,890	2	0.07% *
Conventional method	2,967	7	0.24% *
total	5,857	9	0.15%

* P > 0.05

き摺り下ろさないよう細心の注意が必要なこと、小バッグ中の初流血から検体を採取する作業がベッドより低い位置で行われる為に看護師にやや無理な姿勢を強いることなどが気付かれた点である。

2. 細菌培養検体の陽性率と検出菌

評価群は、培養検体数 2,890 本、陽性数 2 本、陽性率 0.07%、対照群は、培養検体数 2,967 本、陽性数 7 本、陽性率 0.24% であり、両群間に有意差は認められなかった(正規近似法 $p > 0.05$)。検出された菌は、評価群が嫌気性ボトルから *Propionibacterium acnes* 2 検体、対照群は、嫌気性ボトルから *Propionibacterium acnes* 4 検体、嫌気性グラム陽性桿菌 1 検体、嫌気性及び好気性両ボトルから *Staphylococcus epidermidis* とコアグラウゼ陰性 *Staphylococcus* が各 1 検体の計 7 検体であった (Table 1)。それぞれが BacT/Alert で陽性と判定されるまでの時間を (Table 2) に示した。

3. 陽性検体と同一の全血から分離調製した製剤の培養結果

Propionibacterium acnes が検出された評価群 2 検体、対照群 4 検体の由来した赤血球 MAP から全て *Propionibacterium acnes* が検出された。これらに対応する FFP は 6 検体全て陰性であった。*Staphylococcus epidermidis*、コアグラウゼ陰性 *Staphylococcus*、嫌気性グラム陽性桿菌が検出された対照群の 3 検体において、その赤血球 MAP 及び FFP の両製剤とも全て陽性であり、同定試験でも同じ菌種であった (Table 3)。

考 察

血小板製剤は 20~24°C で保存するため細菌増殖の危険が高く、全品を培養スクリーニングする方が欧米で導入されるようになった。しかしながら、細菌はウイルスと異なり、血液製剤のバッグ内でダイナミックに増殖したり死滅したりするため、培養試験に供したサンプルの状態が、輸血しようとしている時点の製剤の状態を必ずしも反映していないという問題がある。これに対して、採血時に何らかの方法で細菌の混入を防ぐことができれば、その後の汚染低減のための複雑

Table 2 Speed of Growth of isolated bacteria

	Bacteria	No. of positive cases	Time until positive (days)
Diversion method	<i>Propionibacterium acnes</i>	2	4.61, 6.97
Conventional method	<i>Propionibacterium acnes</i>	4	2.96, 3.96, 4.31, 6.58
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1	0.71
	<i>Coagulase-negative Staphylococcus</i>	1	0.85
	<i>Anaerobic Gram-positive rod</i>	1	3.83

Table 3 Organisms isolated from cases of contaminated whole blood and related RC-MAP and FFP

	Organism isolated from whole blood	RC-MAP	FFP
Diversion method	<i>Propionibacterium acnes</i>	+	-
	<i>Propionibacterium acnes</i>	+	-
Conventional method	<i>Propionibacterium acnes</i>	+	-
	<i>Propionibacterium acnes</i>	+	-
	<i>Propionibacterium acnes</i>	+	-
	<i>Propionibacterium acnes</i>	+	-
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	+	+
	<i>Coagulase-negative Staphylococcus</i>	+	+
	<i>Anaerobic Gram-positive rod</i>	+	+

な工程が不要になる可能性がある。採血時に細菌が混入する経路として、採血の穿刺時に皮膚に付着していた菌が混入する場合と、無症候の菌血症ドナーから採血した場合が考えられる。無症候の菌血症ドナーに由来する細菌汚染の予防策としては、菌血症の可能性のある献血者からの採血を、問診時に発熱や下痢等の有無や既往歴を確認して排除するしかない。一方、輸血用血液製剤への細菌混入の最大の原因である穿刺時の皮膚常在菌の混入の予防策としては、皮膚消毒を徹底することが最も重要であるが、皮膚表面の消毒を徹底しても毛嚢や皮脂腺などに存在する菌の消毒は難しい。しかしながら、皮膚毛嚢を貫いて混入する細菌は、採血の開始時に流出する血液中に多く混入しているものと思われ、この初流血を別にとり分けて本採血に混じらないようにすることが、細菌汚染を少なくする一つの方法とされている。松田等はイヌの頸部に菌を塗布し、頸静脈を穿刺して初流血を 4.5ml ずつ 10 本に分注してそれらを培養し、細菌の除去効果及び小皮膚片の混入の有無を調査した。その結果、塗布菌数が $10^4/\text{cm}^2$ 以下であれば採血時初流血を 27ml 以上除去することにより本採血への細菌混入を防止し、皮膚片の混入も初流の 10ml 以上を除去することにより防止できることを確

認している⁵⁾。初流血の除去はすでにヨーロッパを中心に献血時の採血に導入されて効果も検証され、初めの 15ml~30ml の除去が最適であるとされている^{6)~9)}。

初流血除去の効果を見るためには、除去した初流血液とその後の本採血の血液の培養結果を比較する方法もあるが⁶⁾、この方法は時に解釈の困難な結果を生むことがある。また、採血現場で培養用検体の採取や検査検体の採取など複雑な手順となって外部からの細菌の混入のリスクが増える可能性がある。これらを防ぐために、我々は、初流血を除去した本体の血液と、従来法で採血した本体の血液を直接比較してその効果を検証した。検体採取から培地へ接種するまでは 3 時間以内と短く、菌が混入していても少量であると思われることを考慮して、培養のための検体は採血から培地へ接種するまで常温で保管した。

採血バッグ中の菌の陽性率は、評価群が 0.07% であるのに対し対照群は 0.24% と、陽性率に有意差は認められなかったが、これは培養した検体数が 3,000 検体ずつと、予想される血液製剤中の細菌の陽性率からみても少なかったためである。しかし、検出された菌種をみると、対照群からは *Propionibacterium acnes* 4 検体の他に、ヒトに感染症を引き起こす可能性がある *Staphylococcus* 属菌が 2 検体、その他が 1 検体検出されているのに対し、評価群からは *Propionibacterium acnes* 2 検体のみであり、真に病原性のある細菌の混入を低減できる可能性が示された。

全血から採取した検体で培養陽性となった場合、それに由来する赤血球 MAP も全て同じ菌種で陽性となった。一方、FFP では全 9 検体のうち 3 検体しか陽性となっていない。このことは、全血の遠心分離により、細菌は赤血球側に集められ、FFP には殆ど残らなくなることを示唆しているのかもしれない。あるいは、採血時の細菌混入数や細菌の比重の違いによることも考えられる。

日本の輸血用血液製剤の細菌汚染率は、赤血球濃厚液の場合 25 万検体あまりの培養では 0.05%¹⁰⁾ と、欧米に比べて低いものと考えられているが、これは各血液

センターの品質管理の一つとしての抜き取り試験の結果の合算によるものであり、より正確な汚染率を知るには、平準化された判定法による再調査が必要と思われる。また頻度は低いものの、死亡例や敗血症例の報告があるという事実は、導入の可能な細菌汚染防止策は実行に移していく必要があるのではないかと考えさせる。初流血除去によって皮膚からの細菌混入が完全に防止できるわけではない。また今回の検討では汚染率について従来法との有意差は得られなかった。しかしながら、欧米の検討でもみられるように、いくつかの対策を積み重ねることによって明瞭な効果を生むことも考えられるため、比較的低コストで導入の可能な初流血除去の工程は、日本の献血の現場にも導入すべきであろうと思われる。

なお、日本赤十字社では、平成19年4月1日から全血採血すべてに初流血除去を導入した。また、血小板成分採血については平成18年10月26日から初流血除去を実施している。

文 献

- Gibson AP, Norris W: Skin fragment removed by injection needles. *Lancet*, 2: 983—985, 1958.
- 吉田治彦, 久保諠修, 木下 智, 他: 血液採血部位の細菌汚染に関する実験的検討. *自己輸血*, 13: 117—122, 2000.
- Hogman CF, Fritz H, Sandberg L: Posttransfusion *Serratia marcescens* septicemia. *Transfusion*, 33: 189—191, 1993.
- Jacobs J, et al: *Yersinia enterocolitica* in donor blood: a case report and review. *J.Clin.Microbiol*, 27: 1119—1121, 1989.
- 松田好美, 首藤加奈子, 佐竹正博, 他: 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防止. *日本輸血学会誌*, 49: 761—766, 2003.
- Bruneau C, Perez P, Chassaigne M, et al: Efficacy of a new collection procedure for preventing bacterial contamination of whole-blood donations. *Transfusion*, 41: 74—81, 2001.
- de Korte D, Marcelis JH, Verhoeven AJ, et al: Diversion of first blood volume results in a reduction of bacterial contamination for whole-blood collections. *Vox Sang*, 83: 13—16, 2002.
- Bos H, Yedema Th, Luten M, et al: Reduction of the incidence on bacterial contamination by pre-donation drawing blood for safety testes. (abstract) *Vox Sang*, 83(suppl. 2): 6, 2002.
- de Korte D, Curvers J, Marcelis JH, et al: Effects of skin disinfection method, deviation bag, and bacterial screening on clinical safety of platelet transfusion in the Netherlands. *Transfusion*, 46: 476—485, 2006.
- 日本赤十字社血液事業本部医薬情報課: 主な輸血用血液の無菌試験結果について. *輸血情報* 0609-101.

THE EFFECT OF DIVERSION OF FIRST BLOOD VOLUME ON THE FREQUENCY OF BACTERIAL CONTAMINATION IN WHOLE BLOOD COLLECTION

Hideto Nagumo, Kumiko Shinozaki, Hiroshi Kimura, Mie Noda, Yuriko Ono, Masahiro Satake and Kazunori Nakajima
Tokyo Metropolitan Red Cross Blood Center

Abstract:

The effect of diverting the first 30 ml of blood during whole blood collection on the frequency of bacterial contamination was evaluated. Nearly 6,000 blood aliquots from whole blood collected by either the conventional or diversion method were cultured using an automatic culture system. Seven of 2,967 (0.24%) and two of 2,890 (0.07%) samples collected by the conventional and diversion methods were found to be positive for bacterial contamination, respectively. Six of the nine bacterial isolates obtained were identified as *Propionibacterium acnes*. Although the data is not statistically significant, it is suggested that the diversion method may decrease the frequency of bacterial contamination in collected blood.

Keywords:

Blood component, Bacterial contamination, Skin disinfection, Diversion bag