

溶存酸素消費量測定による血小板製剤内細菌検出感度についての検討

大坪 寛子¹⁾²⁾ 山口 一成²⁾ 星 順隆¹⁾

【目的】輸血による細菌感染症は致命的な副作用の一つである。

我々は溶存酸素測定装置(株式会社ダイキン工業)にて細菌接種血小板製剤における検出感度について検討した。

【方法】血小板製剤に *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Serratia marcescens*, *Bacillus cereus*, *Streptococcus pneumoniae* 及び *Propionibacterium acnes* を接種 (最終濃度 10^0 , 10^1 , 10^2 CFU/ml) した製剤から, 抽出した検体 1ml 内の溶存酸素濃度を連続測定した。【成績】検出感度は *S. aureus* において 10^0 , 10^1 , 10^2 CFU/ml でそれぞれ 28.6%, 78.6%, 85.7% であった。 *S. epidermidis* では 23.0%, 84.6%, 92.3%, *S. marcescens* で 50%, 100%, 100%, *Bacillus cereus* で 57.1%, 100%, 100% であった。好気性細菌の検出時間は 7~18.2 時間であった。【結論】好気性細菌では初期の混入濃度が 10^1 CFU/ml 以上存在すれば 20 時間以内に検出が可能であった。低コストで簡便な細菌検出システムとして血小板製剤の安全性に有用であると考えられた。

キーワード：溶存酸素濃度, 血小板製剤, 細菌汚染

緒 言

近年, 抗体測定法に加え NAT (nucleic acid amplification testing, 核酸増幅検査) によるウイルススクリーニングが行われるようになり, 輸血製剤の安全性は飛躍的に向上した。その一方で細菌混入による汚染血液製剤が重篤な副作用が問題になっている。特に室温保存である血小板濃厚液 (PC) の細菌汚染率はウイルス汚染の 50~250 倍と言われ, 米国 FDA によると, 合併率は 1/2,000 単位であり, その致死率は 1/10,000 単位と言われている¹⁾。米国においては 2004 年 3 月以降, 全血小板製剤において細菌検出検査を義務化した。本邦においても 1998 年から 2001 年の 4 年間の調査で 40 例の輸血による細菌感染の報告があり, そのうち 3 例で菌が同定されている²⁾。全てシングルドナーによるアフレーシス由来であり, 保存期間が 72 時間と諸外国に比較して短く設定されている本邦においても PC による死亡例はこれまでに 2 例³⁾⁴⁾ 報告されている。また日赤による無菌調査によると PC における細菌検出率は 0.01% である⁵⁾。血液製剤を介する細菌感染症は一旦発症すると, 敗血症などの致死的な問題を引き起こす可能性が高く, 何らかの対応を検討する必要がある。これまでに欧米では様々な細菌検出装置が導入されており^{6)~9)}。日本においてもその追試結果が報告されている^{10)~12)}。株式会社ダイキン環境・空調技術研究所は酸素電極によ

る溶存酸素濃度の測定により, 食品中の細菌汚染検出装置 (DOX™) を開発し, 食品業界において導入されている。これまでに我々はこの装置を PC に応用し, 製剤中に接種した細菌の検出感度についての検討を行った¹³⁾。本論文では嫌気性菌種を含む 6 菌種を対象に, PC 内における細菌の増殖速度及び, DOX™ による細菌の検出感度について報告する。

対象・方法

1. 対象 PC

本実験のために 2006 年 12 月 25 日から 2007 年 2 月 26 日まで日本赤十字社血液センターから研究用に提供された PC 7 製剤及び同じく日本赤十字社より臨床用に供給された後に期限切れや患者の都合のために廃棄された PC 7 製剤の計 14 製剤を対象とした。

2. PC の処理

入手した血小板製剤 1 バッグは接種細菌ごとの条件を等しくするために無菌接続装置 (SCD, TERUMO®) にて無菌的に 20 等分割し, 小容量分離バッグ (BB-TQ008J, TERUMO®) へおよそ 10ml ずつ分注した。

3. 使用菌種

接種目標菌株は *Staphylococcus aureus* (IID5220), *Staphylococcus epidermidis* (IID866), *Serratia marcescens* (IID5218), *Bacillus cereus* (IID871), *Streptococcus pneu-*

1) 東京慈恵会医科大学輸血部

2) 国立感染症研究所血液・安全性研究部

〔受付日：2007 年 6 月 19 日, 受理日：2007 年 11 月 9 日〕

moniae (IID5222), *Propionibacterium acnes* (IID912) の6菌種とした。各細菌株は東京大学医科学研究所病原微生物資源室より研究用に譲渡を受け、入手後に細菌種ごとに至適培地及び至適環境において一定時間増殖させた後、凍結保存した。

4. 細菌接種PC作成及び増殖速度の確認

生理食塩水にて希釈した各細菌調整液を、分注した分離PCに最終濃度がそれぞれ 10^0 , 10^1 , 10^2 CFU/mlとなるよう接種してから十分に混和した。細菌接種済みPCは7日間室温にて振盪保存した。接種後から12時間毎に細菌接種血小板製剤から無菌的に0.5ml採取後、希釈法により好気性4菌種は普通寒天培地に、嫌気性2菌種は血液寒天培地に播種し、それぞれ至適環境内で培養した後にコロニーカウントを行った。

5. DOXTMシステムと測定方法

溶存酸素濃度測定装置DOX-60F(株式会社ダイキン環境・空調技術研究所)を使用した。セルと呼ばれる3本の電極の付いた小型の滅菌プラスチック容器内へ標準培地(組成:ペプトン10.0mg, 酵母エキス5.0mg, ブドウ糖2.0mg/ml)1mlと細菌接種した直後のPCから採取した血液検体1mlをクリーンベンチ内でセルへ無菌的に注入後、装置へセットし、電極を介して溶液内の溶存酸素濃度を電流値として連続的に測定した。装置の内部は37℃に温度制御され、細菌増殖に適した環境が維持されている。測定電流値は装置に接続されたパソコン画面上に自動的にグラフ化され、測定開始24時間後に電流値の解析を行った。

6. 解析・判定

血液検体に電流が流れると電極に対する血漿蛋白の影響により電流値は測定開始直後に一時的に低下し、回復するまでに一定時間を要することがあるため、測定開始から200分間を不感時間と設定した。その後、30分間の変化率が0.5以下となった電流値をプラトーとした。全測定電流値はプラトー値に対する相対値に変換して表示した。酸素電極にて連続測定された溶存酸素濃度は、存在する細菌の呼吸量に比例して消費されるため、細菌数が一定以上に増殖すると電流値が低下する。プラトー値1に対して0.65をカットオフ値と設定し、計測値が0.65を連続的に下回った最初の点を陽性と判断、測定開始から経過した時間を検出時間とした。更に一部の検体においては24時間後の検体内の菌量を平板法にて確認した。

結 果

1. PC内細菌増殖速度

PC内での接種細菌の増殖速度をFig.1に示す。好気性4菌種に関しては*S. epidermidis*がやや遅れるものの24~48時間後までにプラトーに達した。特に*B. cereus*

と*S. marcescens*ではその増殖速度は著しく速く、48時間後にはそれぞれ 10^7 , 10^8 CFU/mlに達していた。嫌気性菌のうち、*S. pneumoniae*は24時間後には一旦コロニー数は減少し、その後再び緩徐に増殖し、 10^{1-2} CFU/ml接種した血小板製剤内では7日後には 10^{5-6} CFU/mlに到達した。*P. acnes*では、いずれの接種濃度においてもPC内での菌の増殖はみられず、低濃度のまま存在し続けるか、もしくは 10^0-1 CFU/mlの低濃度接種バッグ内では7日後には菌の存在が確認されなかった。

2. 溶存酸素濃度による細菌検出装置の感度

接種6菌種における平均電流値曲線をFig.2に示す。平均溶存酸素濃度を示す傾きは菌種及び、接種初期濃度により異なり、嫌気性2菌種では溶存酸素濃度は24時間連続測定中、殆ど消費されていないことがわかる。測定電流値がカットオフ0.65を連続的に下回った時点を陽性と判定し、これに基づいて算出された好気性菌4種における平均検出時間と検出率及び、接種24時間後の菌量をTable1に示す。検出感度は*S. aureus*では 10^0 , 10^1 , 10^2 CFU/ml各濃度においてそれぞれ28.6%, 78.6%, 85.7%, *S. epidermidis*では23.0%, 84.6%, 92.3%, *S. marcescens*では50.0%, 100%, 100%, *B. cereus*では57.1%, 100%, 100%であった。好気性3菌種(*S. aureus*, *S. marcescens*ならびに*B. cereus*)において、陽性と判定された培養液中の菌量は、 10^2 CFU/ml以上存在することが確認された。一方、陰性と判定されたケースでは、菌の存在が確認できなかった場合と、菌量が 10^4 CFU/mlの場合が観察された。今回の実験系では血小板製剤が10mlと少量に設定されたため、好気性3菌種で検出不能だったケースでは接種した細菌調整液中に菌が存在しなかった、もしくは培養中に殺菌された、あるいは菌量が本法の検出限界と考えられるに 10^0 CFU/ml以下の場合が考えられた。以上より、好気性3菌種に関しては、製剤内に確実に存在した細菌が増殖すれば高い確率で検出されることが示された。上記3菌種より増殖速度の遅い*S. epidermidis*を接種したサンプルのうち、陰性と判定されたケースでは、検体の菌数は 10^6 CFU/mlに到達しておらず増殖速度が遅い同菌では初期濃度が低濃度であった場合、検出できないケースがあることを示している。好気性細菌4種の検出時間をTable1に示す。*S. aureus*では 10^0 , 10^1 , 10^2 CFU/ml各接種濃度において、平均1,094.0分(911~1,293), 783.9分(595~1,111), 514.2分(374~810)を要した。*S. epidermidis*では928.分(766~1,108), 870.分(624~1,086), 564.分(502~629), *S. marcescens*では580.分(521~845), 534.分(491~616), 450.分(392~494.4), *Bacillus cereus*では674.1分(512~845), 509.9分(369~764), 420.6分(216~620)であった。いずれの濃度においても増殖速度の速い*S. marcescens*が検出までに要

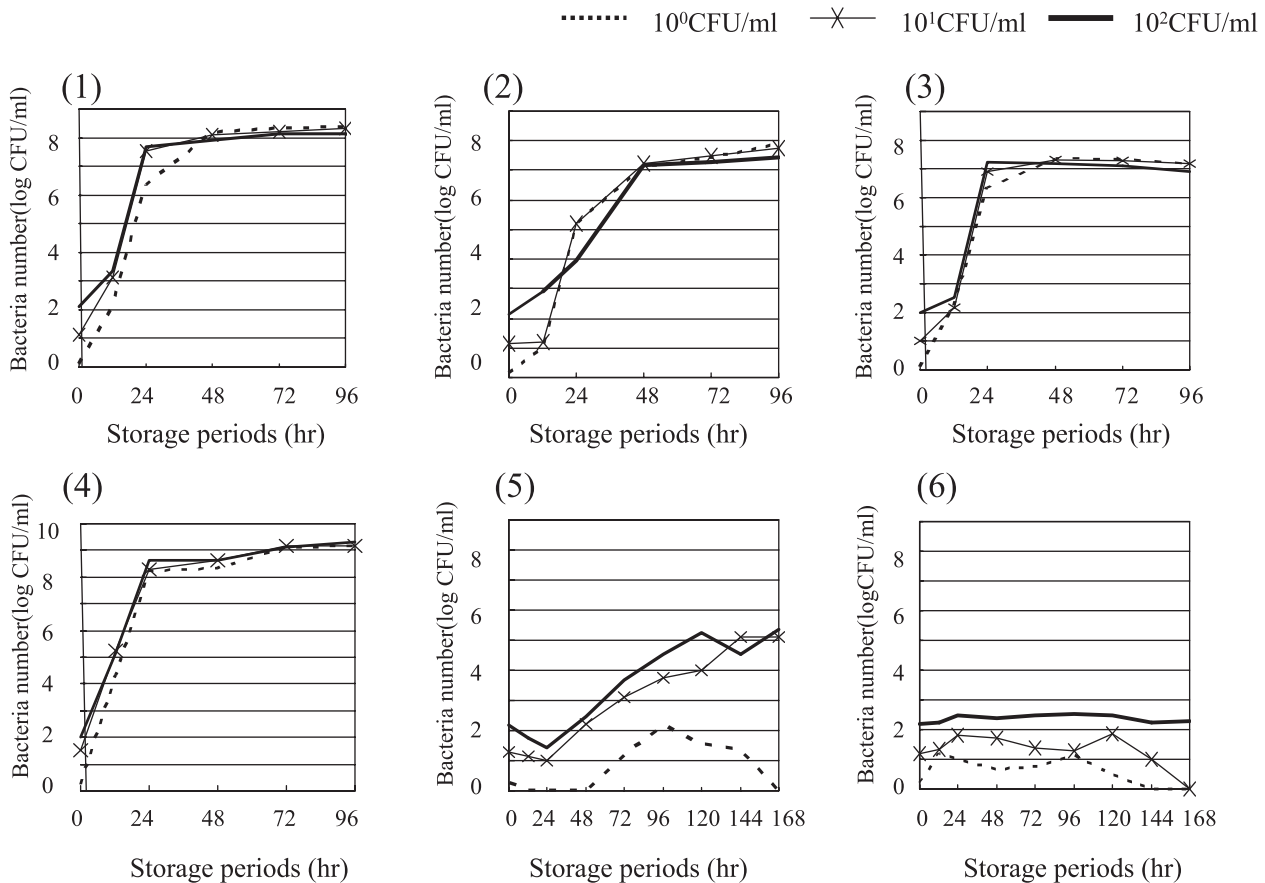


Fig. 1 6 species of bacteria were inoculated into PC and stored with agitation at room temperature for 4-7days. The number of CFU/ml was determined using standard microbiologic plating techniques on blood agar.

Almost of aerobic organisms reached the plateau growth level in 24-48hr, but no further growth was observed in anaerobic organisms.

(1) *S. aureus*, (2) *S. epidermidis*, (3) *B. cereus*, (4) *S. marcescens*, (5) *S. pneumoniae*, (6) *P. acnes*

する時間が短く、10⁰CFU/ml で平均 10 時間弱、10¹CFU/ml で平均 9 時間弱、10²CFU/ml では平均 7.5 時間であった。今回対象とした嫌気性 2 菌種ではいずれの接種濃度においても検出不可能であった。*S. pneumoniae* を 10²CFU/ml 接種した場合、24 時間後の細菌数は 10⁵⁻⁶/CFU/ml であることを確認したが⁸ (Fig. 1), 呼吸に酸素を利用しない嫌気性菌については、本法では検出されなかった。

考 察

NAT による血液製剤のウイルス感染のリスクが飛躍的に改善された一方で輸血製剤を介した細菌感染による敗血症は重要な社会的問題となっている。英国での輸血副作用報告 (serious hazards of transfusion: SHOT study) によると 1995 年から 2002 年までの 7 年間で 26 例の細菌感染症が報告され、うち 6 名が死亡している¹⁴。血小板製剤によるものは 22 例であり、そのうち 5 例が死亡している。米国での輸血副作用報告 (Bacterial Contamination of Blood: Bacon study) では 1998 年から 2000

年の 3 年間で 9 例の死亡例を含む 34 例の細菌感染症例が報告された¹⁵。血小板製剤を原因とした 29 例中 6 例が死亡しており、血小板輸血でのリスクが高いことが確認された。フランスのヘモビジランスでは敗血症の出現頻度は赤血球製剤 100 万単位当たり、5.8 に対し、全血由来血小板製剤では 71.8、成分由来血小板製剤で 31.8 とその発症率の高さが示された¹⁶。

本邦でも 2000 年以降、血小板製剤を介した致死症例が少なくとも 2 名報告されている^{3,4}。患者の体内より検出された菌種は肺炎球菌及び黄色ブドウ球菌であり、肺炎球菌検出症例での患者内菌数は 3.2 × 10⁴CFU/ml 存在したと報告されている⁴。近年、輸血を介した細菌感染症が臨床の現場で認知されるようになってきたものの、重篤なショック症状を呈するまでに至らなかった症例では見過ごされているケースも有り得るため、実際にはより多くの輸血による感染症例が発生している可能性は否定できない。米国では 2004 年 3 月から、全ての血小板製剤において細菌検出措置を義務化している。また欧米の一部の国でも血小板製剤に対する細

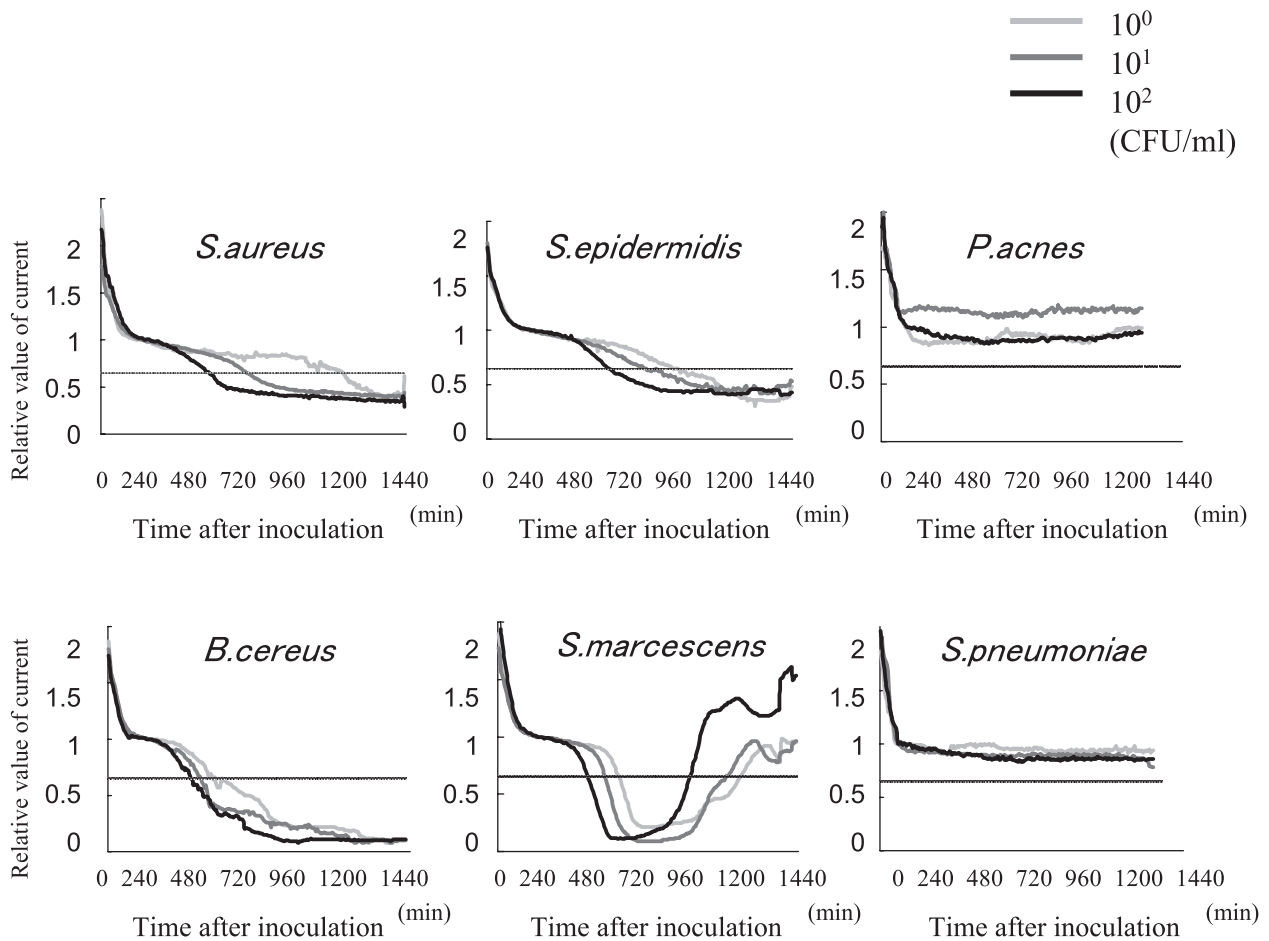


Fig. 2 Relative value of electric current in bacteria inoculated PC.

Cut-off level was set as 0.65 to each plateau level and shown as a black line in the figure. Detection time was defined as the duration from inoculation to crossing cut-off line.

Table 1 Detection time and detection ratio of 4 aerobic bacteria in bacteria inoculated PC.

| Organism | Mean (min) | Min | Max | ratio | colony (+) | count (-) |
|------------------------|------------|-------|---------|----------------|-----------------|-------------------|
| 10 ⁰ CFU/ml | | | | | | |
| <i>S. aureus</i> | 1,094.0 | 911.0 | 1,293.0 | 4/14 (28.57%) | 10 ⁷ | < 10 ⁴ |
| <i>S. epidermidis</i> | 928.7 | 766.0 | 1,108.0 | 3/13 (23.08%) | 10 ⁷ | 10 ⁴ |
| <i>S. marcescens</i> | 580.7 | 521.0 | 642.0 | 7/14 (50.00%) | 10 ⁸ | < 10 ⁴ |
| <i>B. cereus</i> | 674.1 | 512.0 | 845.0 | 8/14 (57.14%) | 10 ⁸ | < 10 ⁴ |
| 10 ¹ CFU/ml | | | | | | |
| <i>S. aureus</i> | 783.9 | 595.0 | 1,111.0 | 11/14 (78.57%) | 10 ⁸ | 10 ⁴ |
| <i>S. epidermidis</i> | 870.7 | 624.0 | 1,086.0 | 11/13 (84.62%) | 10 ⁷ | ND |
| <i>S. marcescens</i> | 534.5 | 491.0 | 616.0 | 14/14 (100.0%) | 10 ⁹ | ND |
| <i>B. cereus</i> | 509.9 | 369.0 | 764.0 | 14/14 (100.0%) | 10 ⁸ | ND |
| 10 ² CFU/ml | | | | | | |
| <i>S. aureus</i> | 514.2 | 374.0 | 810.0 | 12/14 (85.71%) | 10 ⁸ | ND |
| <i>S. epidermidis</i> | 564.6 | 502.0 | 629.0 | 12/13 (92.31%) | 10 ⁷ | 10 ⁴ |
| <i>S. marcescens</i> | 450.6 | 392.0 | 494.4 | 14/14 (100.0%) | 10 ⁹ | ND |
| <i>B. cereus</i> | 420.6 | 216.0 | 620.0 | 14/14 (100.0%) | 10 ⁹ | ND |

菌スクリーニング検査 (主に BacT/ALERT™) が導入されている. BacT/ALERT™ は細菌の増殖により消費

される酸素量を測定する本システムとは反対に発生する二酸化炭素を検知することで菌を検出する方法であ

Table 2 Comparison with other methods of bacterial detection system

| | eBDS (Pall) | BacT/ALERT (bioMerieux) | DOX (DAIKIN) |
|------------------------------|--|---|---|
| Method | O ₂ in the air of the sample | CO ₂ in the blood culture bottles | dissolved O ₂ in the sample |
| Required volume | 3-4ml | 4-5ml | 1ml |
| Capability/1time | 1bag | 60-240bags | 30-180bags |
| Costs | | | |
| instruments (million Yen) | 1.25 | 2.4-11.6 | 1.25-6.0 |
| supplies (Yen/bag) | 2,500 | 1,600 | 250 |

り、細菌増殖が自動化され多くの施設で血液培養検査として利用されている。これらの細菌スクリーニング検査導入以後も血液製剤を介した細菌感染症例は報告されており、採取時期や検体量などを考えると混入細菌に関して100%の安全性を担保することは現実的には不可能である。細菌スクリーニングの導入により、FDAでは細菌汚染頻度を1/10,000以下にすることを目標としている¹⁷⁾が、本邦では日赤の抜取り試験による汚染率からみると既にその目標は達成されている¹⁸⁾。全国の血小板製剤の年間使用本数は700から800万単位であるが、わが国では幸い、細菌感染は数年に1件の報告に留まっている状況であり、欧米諸国と同様の細菌検出装置の導入は医療経済的にも有益であるかどうかは疑問である。細菌スクリーニングの導入に際しては、感度は勿論のこと、経済性と簡便性、迅速性が求められる。欧米で導入されている機器との比較で明らかのように検出感度に遜色があれば、消耗品単価が廉価であることは医療費抑制の上でも重要な点である (Table 2)。本システムは培養容器がプラスチック製であり、従来の検出装置に比較して消耗品が低コストである。今回の実験系での結果より、好気性細菌では初期の混入濃度が10²CFU/ml以上存在すれば20時間以内に高い確率で検出が可能であることが示された。初期濃度がそれ以下の場合、検出感度は抽出されたサンプル検体1ml内に細菌が混入する確率と相関するものと考えられ、抽出サンプルの増量により対応可能である。嫌気性菌に関しては酸素消費量を測定するという本システムの原理から考えて、検出は不可能であるが諸外国においては臨床的意義や保存環境から好気性菌のみの検出を行っている国もあり、必ずしも必須ではないとする考え方もある。本邦において今後、血小板製剤保存期間延長の是非を検討するにあたっては細菌感染のリスクを可能な限り回避する何らかの対策を講じる必要があるものと思われる。

尚、本研究に際し、国立感染症研究所、細菌第二部の佐々木裕子先生にご指導頂きましたことを深謝致します。

本研究の一部は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)及び、株式会社ダイキン工業からの研究寄付金によって行われた。

文 献

- 1) AABB Bacterial Contamination Task Force Bacterial Contamination of Platelets: Summary for clinicians on potential management issue related to transfusion recipients and blood donors. AABB, Feb 23, 2005.
- 2) 輸血情報 0203-70: 日本赤十字社血液事業部, 医薬情報課, 2002.
- 3) 輸血情報 0607-101: 日本赤十字社血液事業部, 医薬情報課, 2006.
- 4) 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感染性ショックと横紋筋融解症の致死的合併症. 臨床血液, 44: 381-385, 2003.
- 5) 輸血情報 0203-69: 日本赤十字社血液事業部, 医薬情報課, 2002.
- 6) Brecher ME, Heath DG, Hay SN, et al: Evaluation of a new generation of culture bottle using an automated bacterial culture system for detecting nine common contaminating organisms found in platelet components. Transfusion, 42: 774-779, 2002.
- 7) McDonald CP, Rongers A, Cox M, et al: Evaluation of the 3D BacT/ALERT automated culture system for the detection of microbial contamination of platelet concentrates. Transfus Med, 12: 303-309, 2002.
- 8) Holmes 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.
- 9) McDonald CP, Pearce S, Wilkins K, et al: Pall eBDS: an enhanced bacterial detection system for screening platelet concentrates. Transfus Med, 15: 259-268, 2005.
- 10) Kawabata K, Ezuki S, Ohto H: Spike test comparing two bacterial detection. Transfusion, 45 (suppl): 54A, 2005.

- 11) 比留間潔, 石井加世, 高橋直美, 他: 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. 日本輸血学会誌, 52: 486—492, 2006.
- 12) 杉浦さよ子, 高橋 勲, 井上千加子, 他: 細菌を接種した血小板製剤における3種類の細菌検出システムの評価. 日本輸血学会誌, 53: 35—42, 2007.
- 13) Otsubo H, Tsuchitani E, Hoshina S, et al: Consecutive monitoring of dissolved oxygen consumption by DOX™ to evaluate bacterial contamination in platelet concentrates. *Transfusion*, 45 (suppl): 55A, 2005.
- 14) 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.
- 15) Kuehnert MJ, Roth VR, Haley NR, et al: Transfusion-transmitted bacterial infection in the United States, 1998 through 2000. *Transfusion*, 41: 1493—1499, 2001.
- 16) Perez P, Salmi LR, Folley G, et al: Determinants of transfusion-associated bacterial contamination; results of the French BACTHEM Case-Control Study. *Transfusion*, 41: 862—872, 2001.
- 17) Benjamin RJ, Mintz PD: Bacterial detection and extended platelet storage: the next step forward. *Transfusion*, 45: 1832—1838, 2005.
- 18) 高橋雅彦, 名雲英人: 血液製剤の細菌汚染と輸血による敗血症. 血液製剤品質管理情報, 27: 2—21, 2007.

CONSECUTIVE MONITORING OF DISSOLVED OXYGEN CONSUMPTION BY DOX™ SYSTEM TO EVALUATE BACTERIAL CONTAMINATION IN PLATELET CONCENTRATES

Hiroko Otsubo¹⁾²⁾, Kazunari Yamaguchi²⁾ and Yasutaka Hoshi¹⁾

¹⁾Blood Transfusion Service, Jikei University Hospital

²⁾Department of Safety Research on Blood and Biological Products, National Institute of infectious Diseases

Abstract:

Background: Transfusion-transmitted bacterial infection is a serious and unresolved problem. We evaluated the efficacy of DOX™ (Daikin Industries) which is a commercially available system that has developed to detect a contaminated food by measuring oxygen potential to detect bacterial contamination in PC.

Methods: *Staphylococcus aureus*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus cereus*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Propionibacterium acnes* were inoculated into PC at a final concentration of approximately 10⁰, 10¹ and 10² CFU/ml. Dissolved oxygen potential of the sample taken from each PC just after inoculation was measured consecutively.

Results: The detection rate by DOX™ system in samples inoculated with *S. aureus* at a concentration of 10⁰, 10¹ and 10²CFU/ml was 28.6%, 78.6% and 85.7%, respectively. That of *S. epidermidis* was 23.0%, 84.6% and 92.3%, of *S. marcescens* was 50.0%, 100% and 100%, and of *B. cereus* was 57.1%, 100% and 100%, respectively. The aerobic organisms were detected in a mean of 7.0 to 18.2 hours.

Conclusion: DOX™ system detected aerobic bacteria in PC within 20hours if their initial concentration was more than 10¹ CFU/ml. We consider that this system can be introduced as a useful method to detect the contaminated PC, and can improve the platelet transfusion safety without increasing the medical costs.

Keywords:

Dissolved oxygen consumption, Platelet concentrates, bacterial contamination