

## 貯血式自己血輸血製剤の採取に伴う細菌汚染の評価

田野口優子<sup>1)</sup> 比嘉 初子<sup>1)</sup> 山根 誠久<sup>1)~3)</sup> 仲宗根 勇<sup>3)</sup> 渡嘉敷良乃<sup>3)</sup>

貯血式自己血輸血では採血時の細菌汚染が危惧される。琉球大学医学部附属病院で採取した自己血製剤の初流血を培養して細菌汚染の頻度を評価し、その生菌数濃度と白血球除去の影響を解析した。2005年7月以降、2,209件の初流血5mlを培養し、4件(0.18%)で陽性となった。分離菌種は *Staphylococcus hominis* 2件、*S. warneri* 1件、*S. capitis* 1件で、血液培養装置での陽性判定時間と生菌数濃度との回帰式から4件中3件の初流血は0.06~5.3 colony-forming units(cfu)/ml、*S. warneri* の分離された1件で  $1.4 \times 10^4$  cfu/ml の生菌数濃度を示した。白血球除去フィルターを通過させた製剤では、添加した *S. hominis* が室温放置で対数増殖を開始したが、通過させなかった全血製剤ではほとんど生菌数の増加が観察されず、グラム染色標本では添加した細菌を好中球が多数貪食している像が確認された。以上の結果から、貯血式自己血採血での細菌汚染の頻度は極低値にあるものの皆無ではなく、製剤の調製には十分な注意が必要なこと、また白血球の除去については、その長短についてさらなる検討が必要と考えた。

キーワード：細菌汚染、貯血式自己血輸血、コアグラゼ陰性ブドウ球菌、生菌数濃度、白血球除去

## 緒 言

自己血輸血は、同種血輸血でみられる白血球、血小板、各種血漿蛋白に対する特異抗体に起因する発熱、蕁麻疹、さらに日本人に多いとされる輸血後移植片対宿主病、B型肝炎ウイルスに代表される輸血感染症などの潜在的な問題を回避できるより安全な輸血療法として推奨されている<sup>1)</sup>。しかし自己血輸血、特に貯血法では、採血時および製剤保管期間の細菌汚染による感染症が重大な医療事故と看做される。これは、同種血製剤を供給する日本赤十字血液センターが、法的に定められた製造管理及び品質管理規則 (Good Manufacturing Practice : GMP) に則った製造責任をもって採血、品質管理をしているのに対し、自己血製剤は多くの場合、輸血を施行する医療機関の自己責任に委ねられていることにも起因している。

貯血式自己血製剤に細菌が混入する原因としては、一過性の菌血症患者からの採血、あるいは不適切な皮膚消毒や注射針によって切り取られた微細な皮膚片の混入が考えられ、汚染の原因となる細菌のほとんどは採血開始直後の血液、いわゆる初流血に含まれている<sup>2)3)</sup>。このような背景から、2007年以降、日本赤十字血液センターでは初流血除去回路付き採血バッグによる貯血を行っているが<sup>4)</sup>、一般医療機関ではこの型式の採血バ

ッグを入手することが出来ない現状にある。

琉球大学医学部附属病院でも貯血式自己血輸血を積極的に推進しているが、細菌で汚染された自己血製剤の輸注による医療事故の発生を未然に防ぐ対策として、採血時に採取した初流血の細菌培養(血液培養)検査を全例対象に実施している。今回、本附属病院で貯血式自己血輸血を目的に院内採血された血液製剤での細菌汚染の発生状況と検出された汚染菌の生菌数濃度の定量、さらに白血球除去処理の有無による保存期間中の生菌数濃度への影響を評価、検討したので報告する。

## 材料・方法

## 1. 自己血製剤の採血

2005年7月から2009年5月までの期間、琉球大学医学部附属病院にて貯血式自己血採血を行った2,209件を解析対象とした。採血方法は本院制定の「自己血採血マニュアル」に則り、まず最初に採血用ベッドで仰臥位にある患者の肘関節穿刺部位を中心に消毒用エタノールで皮膚表面を拭き、次いで10%ポピドン・ヨード液を浸した滅菌綿棒で半径10cm程度の円を描くように塗布消毒した。十分乾燥させた後、採血セットの注射針を穿刺して採血を行った。

貯血した自己血からフィブリン糊を作成する場合に

1) 琉球大学医学部附属病院輸血部

2) 琉球大学医学部臨床検査医学分野

3) 琉球大学医学部附属病院検査部

〔受付日：2009年6月10日、受理日：2009年10月27日〕

Table 1 Isolation of coagulase-negative staphylococci (CNS) from the first blood samples collected for autologous blood transfusion and from diagnostic blood cultures

Year of study	No. of blood cultures	No. of positives for CNS (% positivity)	Significance <sup>a</sup>
2005 to 2009	2,209	4 (0.18)	
2005 <sup>b</sup>	2,535	74 (2.9)	$p < 0.01$
2006	3,008	119 (4.0)	$p < 0.01$
2007	2,911	62 (2.1)	$p < 0.01$
2008	2,946	61 (2.1)	$p < 0.01$

<sup>a</sup>Significance in positivity for the respective year was determined by Fisher's two-tail analysis.

<sup>b</sup>The results in the respective years from 2005 to 2008 were based on the isolation of CNS from diagnostic blood cultures.

は mannitol adenine phosphate (MAP) 入り, それ以外の場合には citrate phosphate dextrose adenine (CPDA) 入り血液バッグ (テルモ, 東京) に落差式採血で貯血した。貯血は 20~40 分間かけて実施し, 循環血液量の 10% を超えない範囲で 200~400ml ずつ採血した。使用するまでは専用保冷庫 (2~6°C) に保存した。保存期間は MAP 製剤で平均 17 日, CPDA 製剤で 15 日であった。

## 2. 初流血の細菌培養と同定

採血時, 採血セットに三方活栓を接続し, 初流血 5 ml を専用の血液培養ボトル (BACTEC Plus Aerobic/F 培養ボトル, Becton, Dickinson Co, Sparks, MD, U.S.A.) に接種した。細菌の検出は全自動血液培養装置 BACTEC 9120 (Becton, Dickinson Co) を用いて 35°C, 最長 7 日間培養した。培養陽性に判定された場合には, 常法により分離培養を行い, 陽性判定の翌日に菌種を確定した。また, 初流血の培養で陽性に判定された場合のみ, 保存されている貯血バッグより全血製剤 5ml を採取して BACTEC Plus Aerobic/F 培養ボトルに接種し, 細菌分離を試みた。

## 3. 汚染細菌の菌濃度算出

初流血より分離された汚染細菌の菌浮遊液を段階希釈した後, Mueller-Hinton 寒天培地に塗布接種した。培養後に形成された菌集落数を計測して生菌数濃度 (colony-forming unit: cfu/ml) を定量した。さらに, 段階希釈した同じ菌浮遊液 1ml と無菌正常ヒト血液 5 ml を BACTEC Plus Aerobic/F 培養ボトルに接種し, 陽性判定に要した培養時間を計測した。陽性判定に要した培養時間と生菌数濃度との直線回帰式を個々の分離菌について算出し, 初流血培養で陽性判定した時間からその生菌数濃度を算出した。

## 4. 白血球除去有無の影響評価

Spacell Integra<sup>®</sup> C-MAP 400ml 採血用バッグ (川澄化学工業, 東京) を用いて志願した輸血部職員より採

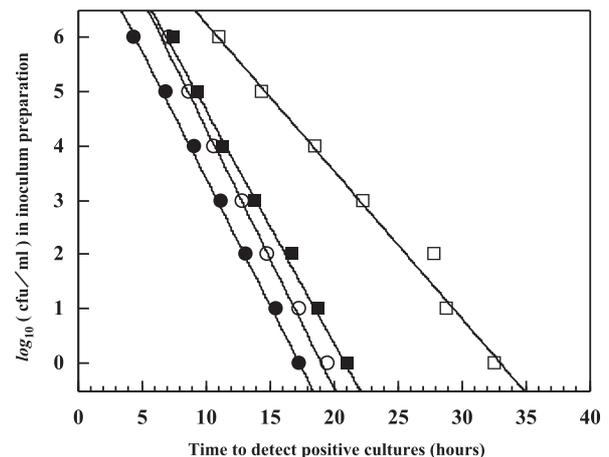


Fig. 1 Linear regression between time to detect positive cultures by the BACTEC 9120 and colony-forming units (cfu/ml) of bacterial cells for the respective contaminants. *S. hominis* in case 1: ●—●; *S. warneri* in case 2: ○—○; *S. hominis* in case 3: ■—■; and *S. capitis* in case 4: □—□.

血した後, 白血球除去フィルターを通過させて白血球分画を除去した血液製剤と白血球を除去しない全血製剤を調製した。自己血製剤初流血より分離された *Staphylococcus hominis* の菌浮遊液を調製し, その最終生菌数濃度が  $10^2$  cfu/ml 濃度になるようにそれぞれの血液製剤に添加した。よく攪拌した後, 室温 (22°C) に放置し, 添加直後から 2 時間毎に血液製剤の一部 (5ml) を採取して BACTEC Plus Aerobic/F 培養ボトルに接種, 培養し, 陽性判定を得るのに要した培養時間を計測した。

## 結 果

### 1. 初流血からの細菌検出

2005 年 7 月から 2009 年 5 月までの 47 カ月間で, 琉球大学医学部附属病院では 2,209 件の貯血式自己血採血が実施された。これら 2,209 件中 4 件 (0.18%) の初流血の培養で coagulase-negative staphylococci (CNS) が検出された (Table 1)。同時期の 2005 年から 2008 年までの期間, ほぼ同じ採血手順で採取された菌血症診断を目的とする血液培養検査での CNS 陽性率は 2.1%~4.0% にあり, 自己血採血における CNS 混入率はいずれの年についても有意に低値であった。

### 2. 検出された汚染菌種と菌濃度

4 件の初流血から検出された CNS の同定結果は, *S. hominis* 2 件, *S. warneri* 1 件, *S. capitis* 1 件であった。個々の菌株で求めた生菌数濃度 (cfu/ml) と陽性判定に要した培養時間の直線回帰を Fig. 1 に示したが, いずれの菌株についても対数変換した生菌数濃度と陽性判定時間との間には高い直線性が認められ, 個々に一次直線回帰式が得られた。 *S. hominis* 2 株と *S. warneri*

Table 2 Recovery of bacterial contaminants from the first blood samples collected for autologous blood transfusion

No. of cases	Species identified	Time to detect positive cultures (hours) (expected viable cells/ml <sup>a</sup> )	Recovery from transfusion bag
1	<i>S. hominis</i>	22 (0.07 cfu/ml)	negative
2	<i>S. warneri</i>	12 ( $1.4 \times 10^4$ cfu/ml)	negative
3	<i>S. hominis</i>	26 (0.06 cfu/ml)	negative
4	<i>S. capitis</i>	35 (5.3 cfu/ml)	negative

<sup>a</sup>Expected viable bacterial cells were calculated using the respective linear regression between colony-forming units (cfu)/ml and time to detect positive cultures (see Fig. 1)

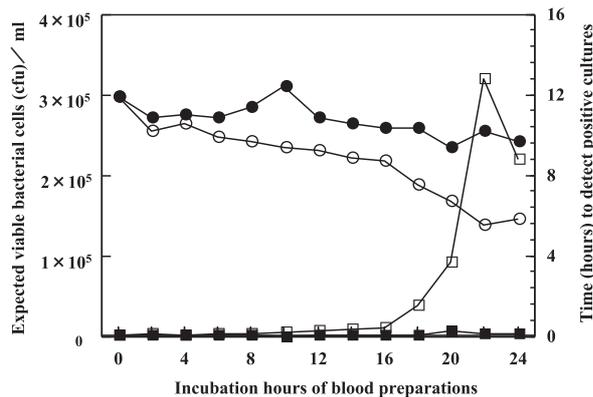


Fig. 2 Effect of white blood cells (WBC) on viable bacterial cell concentrations in blood preparations. Time to detect positive cultures for blood specimens with (○—○) and without (●—●) WBC removal treatment, and expected viable bacterial cell concentrations for preparations with (□—□) and without (■—■) WBC removal treatment.

1 株は相互に極めて近似する回帰式を示し、同じ生菌数濃度では陽性判定時間に3~4時間の差しか認められなかった。しかし *S. capitis* は回帰式の傾きが他の3株とは大きく異なり、より低い生菌数濃度でその差が大きくなる傾向を認めた。理論的には1cfu/ml濃度の生菌数濃度の場合、他の3菌株との陽性判定時間の差は最大18時間に算出された。

Table 2には、得られた回帰式と初流血培養での陽性判定時間から算出された生菌数濃度を個々の事例毎にまとめている。4件中3件については、初流血中の生菌数濃度は0.06~5.3 cfu/mlと比較的低濃度であったが、*S. warneri*の検出された1例では $1.4 \times 10^4$  cfu/mlと極めて高い生菌数濃度を示した。また、陽性判定された時点で貯血された全血製剤から5mlを採取してBACTEC Plus Aerobic/F培養ボトルに接種、培養したが、7日間の培養でも最終判定はいずれも陰性であった。なお、初流血培養で陽性に判定された時点で、担当医師にその結果を報告した結果、4件の陽性例すべてについて使用不可、製剤廃棄と判断された。

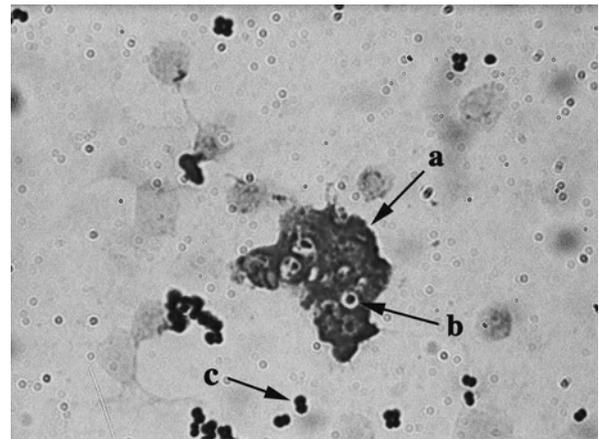


Fig. 3 Microscopic examination of blood sample collected for autologous blood transfusion (Gram staining, magnification  $\times 1,000$ ). A number of neutrophils in a whole blood preparation had phagocytosed the spiked staphylococcal cells. (a): neutrophil leukocyte; (b): staphylococcal cell in a phagosome; (c): spiked free staphylococcal cells.

### 3. 白血球除去の影響評価

Fig. 2に、白血球除去処理の有無別に、*S. hominis*を $10^2$  cfu/ml濃度に添加した血液製剤を室温に放置した後の試料での陽性判定時間とFig. 1の回帰式から算出された生菌数濃度を放置時間の推移で示した。白血球を除去しない全血製剤では、観察した24時間まで、添加した*S. hominis*はほとんど増殖することなく、 $10^2 \sim 10^3$  cfu/ml濃度のままで推移した。他方、白血球を除去した製剤では、添加後16時間まではほとんど増殖する傾向を示さなかったが、16時間以降急速に対数増殖して22時間後に最高値に達した。陽性判定時間から評価すると、室温放置16時間以前においても培養陽性が次第に短時間で判定されており、生菌数濃度の増加が推測されるが、その変化は白血球を除去した製剤でより顕著に観察された。白血球を除去しない全血製剤を72時間放置した時点で採取し、その塗抹グラム染色像をFig. 3に示しているが、添加した*S. hominis*が白血球(好中球)に貪食されている像が数多く観察された。

### 考 察

輸血による敗血症は、皮膚常在菌による細菌汚染が主な原因となっている<sup>5)</sup>。採血時の皮膚消毒を徹底することで細菌汚染を低減できるが<sup>6)</sup>、消毒困難な毛嚢を貫いた採血の場合、細菌の混入を避けることが出来ない可能性がある<sup>7,8)</sup>。しかし、採血時に混入した細菌のほとんどは採血直後の血液、いわゆる初流血に含まれているため、理論的には皮膚常在菌数が $10^4$  cfu/cm<sup>2</sup>以下であれば、採血時の初流血を27ml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ともされている<sup>4)</sup>。

今回我々は、本院における自己血採血での細菌汚染の発生頻度と白血球の有無が細菌の増殖に与える影響を検討した。検討期間中に自己血初流血中より検出された細菌は、いずれも皮膚常在細菌のCNSであった。検討にあたっては、好気培養ボトルのみを使用したため、皮膚常在細菌叢を構成する代表的な偏性嫌気性菌、*Propionibacterium acnes*などを検出できない可能性があるが、臨床的に問題となる菌血症の原因菌のなかで偏性嫌気性菌の占める比率は近年極端に減少し、嫌気培養ボトルを敢て使用しない検査方法も提案されている<sup>9)10)</sup>。また、今回の検討で分離、同定された3種類のCNSは、患者由来の血液培養検査で、検体採取に伴って混入する代表的な皮膚常在菌種である<sup>11)</sup>。血液培養検査での皮膚常在菌の混入頻度は、施設毎に大きく異なるが、目標値として3~5%に管理するように勧告されている<sup>12)</sup>。その意味からすると、本院での血液培養検査でのCNS陽性率はほぼ勧告を満たす状況にあるが、ほぼ同じ採血手順で採取される自己血採血でのCNS混入率は、いずれの年においても有意に低値であった。確かに近年、血液培養から分離されるCNSのなかで真の菌血症に由来する頻度が増加しており、本院の血液培養から分離されたCNSがすべて汚染菌とは即断できない。しかし、Mirrettら<sup>13)</sup>の報告したCNSによる汚染頻度、67%を今回の我々の成績に適用しても、有意の差( $p < 0.01$ )が確認された。この有意差は、血液培養検査では数多くの異なる医師、看護師が採血するのに対し、自己血採血では専任の一人の看護師が担当していることに起因すると考えられ、安全で、品質の保証された自己血輸血を推進するうえで、採血マニュアルを正しく遵守できる専任の看護師の配属が強く求められる根拠となろう。

全自動血液培養装置での陽性判定時間は、検体中の生菌数濃度を反映するとされているが<sup>12)</sup>、今回の検討で対数変換した生菌数濃度と陽性判定時間との間には高い直線性が確認された。しかし、検出された細菌の種類によって直線回帰式の傾きが異なり、特に*S. capitis*は遅発育の性状から他のCNSとは大きく異なる回帰式を示した。従って今後、初流血の培養で細菌が検出され、その生菌数濃度を培養装置での陽性判定時間から推測する場合には、分離された個々の菌株について直線回帰式を求め、生菌数濃度を算出する手順が必要となる。

*S. warneri*が初流血より分離された事例で、その生菌数濃度が $1.4 \times 10^4$  cfu/mlと極めて高い菌濃度であったにも拘わらず、採取された貯血バッグの製剤からは細菌が検出されなかった。その原因のひとつとして、貯血された全血製剤中の白血球による貪食、殺菌機序が考えられるが、事実、白血球を除去した製剤では貯血

放置後の細菌増殖が顕著であり、白血球を除去しない製剤では細菌を多数貪食した白血球が観察された。自己血製剤について、白血球を除去するか否か、除去するとすれば採血後のどの時点が最もよいのかという点については議論があり<sup>14)</sup>、今後の検討が必要であろう。

現在、自己血製剤の管理は個々の医療機関の自己責任に委ねられている。他方、自己血製剤の採血にあたっての細菌混入の可能性は皆無ではなく、一般医療施設での初流血除去回路付き採血バッグの採用、簡便で有効な自己血初流血の培養方法の考案など、今後とも自己血輸血の安全性を高める検討が必要と考えられる。

本研究の一部は平成21年度科学研究費補助金奨励研究課題番号21931023によって実施された。また、本研究において使用したSpacell Integra<sup>®</sup> C-MAP 400ml採血用バッグは沖縄県日本赤十字血液センターより提供された。

## 文 献

- 1) 佐川公矯, 面川 進, 古川良尚: 自己血輸血の指針改定版(案). 自己血輸血, 20: 10—34, 2007.
- 2) 名雲英人, 篠崎久美子, 木村 奏, 他: 初流血除去による細菌汚染低減効果の検証. 日本輸血細胞治療学会誌, 53: 598—601, 2007.
- 3) 吉田治彦, 久保諒修, 木下 智, 他: 血液採血部位の細菌汚染に関する実験的検討. 自己血輸血, 13: 117—122, 2000.
- 4) 松田好美, 首藤加奈子, 佐竹正博, 他: 初流血除去回路付き採血バッグによる皮膚常在菌及び皮膚片の混入防止. 日本輸血細胞治療学会誌, 46: 761—766, 2003.
- 5) Puckett A, Davison G, Entwistle CC, et al: Post transfusion septicaemia 1980-1989: Importance of donor arm cleansing. J. Clin. Pathol., 45: 155—157, 1992.
- 6) Lee CK, Ho PL, Chan NK, et al: Impact of donor arm skin disinfection on the bacterial contamination rate of platelet concentrates. Vox Sang, 83: 204—208, 2002.
- 7) Goldman M, Lowe P, Roy A, et al: Evaluation of donor skin disinfection methods. Transfusion, 37: 309—312, 1997.
- 8) Buchta C, Nedorost N, Regele H, et al: Skin plugs in phlebotomy puncture for blood donation. Wien Klin Wochenschr, 117: 141—144, 2005.
- 9) Sharp SE: Routine anaerobic blood cultures: Still appropriate today? Clin. Microbiol. NewsL, 13: 23—25, 1991.
- 10) 宮川静代, 山根誠久, 戸坂雅一: 全自動血液培養システム, BacT/Alertでの成績解析—1年間の使用経験から—. 日本臨床検査自動化学会誌, 19: 130—136, 1994.
- 11) Hall KH, Lyman JA: Updated review of blood culture contamination. Clin. Microbiol. Rev., 19: 788—802, 2006.

- 12) Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI): Principles and procedures for blood cultures. Approved guideline M47-A, CLSI, Wayne, Penn, 2007.
- 13) Mirrett S, Weinstein MP, Reimer LG, et al: Relevance of the number of positive bottles in determining clinical significance of coagulase-negative staphylococci in blood cultures. *J. Clin. Microbiol.*, 39: 3279—3281, 2001.
- 14) 名雲英人, 松田裕一, 茶谷 真, 他: 赤血球 M・A・P 中の *Yersinia enterocolitica* の白血球除去フィルターによる除去効果—汚染菌量と除去時期との関係—. *日本輸血学会雑誌*, 40: 32—38, 1994.

## LABORATORY-BASED EVALUATION OF BREAKTHROUGH BACTERIAL CONTAMINATION DURING PREDEPOSIT-TYPE AUTOLOGOUS BLOOD TRANSFUSION PREPARATION

Yuko Tanokuchi<sup>1)</sup>, Hatsuko Higa<sup>1)</sup>, Nobuhisa Yamane<sup>1)~3)</sup>, Isamu Nakasone<sup>3)</sup> and Yoshino T. Tokashiki<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>Blood Transfusion Units, University Hospital of the Ryukyus

<sup>2)</sup>Department of Laboratory Medicine, Graduate School and Faculty of Medicine, University of the Ryukyus

<sup>3)</sup>Clinical Laboratories, University Hospital of the Ryukyus

### Abstract:

Breakthrough bacterial contamination during blood collection is a potential risk in predeposit-type autologous blood transfusion. A total of 2,209 blood samples were collected from July 2005 to May 2009 for autologous blood transfusion at the University Hospital of the Ryukyus. The first 5 ml of blood samples was cultured in BACTEC Plus Aerobic/F blood culture bottles to detect bacterial contamination. Bacterial growth was monitored by an automated blood culture system, BACTEC 9120. Of 2,209 blood samples, 4 (0.18%) were positive, with two strains of *Staphylococcus hominis*, and one each of *S. warneri* and *S. capitis*. Bacterial concentrations in blood samples were determined using linear regression between the time (hour) to detect positive and colony-forming units (cfu)/ml of the respective isolates. It was demonstrated that three positive blood samples contained 0.06 to 5.3 cfu/ml while the other, positive for *S. warnerii*, was  $1.4 \times 10^4$  cfu/ml. To evaluate the benefit of removing white blood cells, *S. hominis* isolate was spiked into an aseptic blood sample from which white blood cells were removed. This preparation revealed significant exponential bacterial growth after standing for 16 hours at room temperature. However, an aseptic blood sample containing a normal number of white blood cells did not show any significant bacterial growth within a 24-hour period. Microscopic examination confirmed that a number of white blood cells had phagocytosed the spiked staphylococcal cells. From these results, we concluded that the breakthrough bacterial contamination ratio was significantly low, but not negligible. Thus, care is necessary in the collection of blood, particularly in disinfection procedures. The benefits of removing white blood cells from the preparation for autologous blood transfusion is an issue that should be discussed further.

### Keywords:

Breakthrough bacterial contamination, predeposit-type autologous blood transfusion, coagulase-negative staphylococci (CNS), colony-forming unit, removal of white blood cells