ー【原 著】------Original --

# 血小板製剤の A 群溶血性レンサ球菌汚染の原因調査

松本 真実 $^{1}$  小界 萌 $^{1}$  髙橋 秀行 $^{1}$  松林 圭二 $^{1}$  佐竹 正博 $^{2}$  谷 慶 $\mathrm{gr}^{1}$ 

血小板製剤から A 群溶血性レンサ球菌 Streptococcus pyogenes (S. pyogenes)が検出され、世界的な S. pyogenes 感染症の流行から、原因調査のため献血者の聞き取りと採血および皮膚、口腔咽頭からスワブ検体採取を行った. 血液は培養と白血球から real-time PCR による Streptococcus 属 DNA 検出を行い、スワブ検体は培養後に菌種同定した. 菌株の病原性については emm 型を解析した.

献血者は献血 6 日前に左拇趾の陥入爪による化膿で皮膚科を受診し、抗生剤を数日服用していた。献血後 33 日目の血液培養は陰性であったが、PCR により Streptococcus 属 DNA が検出され菌血症であったと推測された。スワブからは複数の Streptococcus 属が同定されたが S. pyogenes は検出されなかった.

問診基準では抗生剤服用から3日以内は採血不可であるが,申告がなく化膿病巣の存在を確認できなかった.日本 赤十字社では問診に加え,白血球除去や初流血除去など複数細菌対策を講じているが,さらに細菌スクリーニング導 入を検討しており血液製剤の安全性向上が期待される.

キーワード: A 群溶血性レンサ球菌, 血小板製剤, 輸血細菌感染

#### はじめに

日本赤十字社では血液製剤の細菌汚染対策について、採血前の問診、皮膚消毒、初流血除去、保存前白血球除去、外観検査等、複数の対策を講じている。しかし、血小板製剤(PC)から年間数例の細菌検出事例が発生しており、その多くが混入原因は不明となっている。2023年3月、採血後3日目に出庫前の外観検査により凝集塊が多数認められ、回収されたPCから溶血性レンサ球菌であるStreptococcus pyogenes(S. pyogenes)が検出された、当該製剤は同一原料から分割PCが製造されており、分割製剤にも凝集塊が確認され同様にS. pyogenes が検出された.

S. pyogenes はグラム陽性の  $\beta$  溶血を示す A 群レン サ球菌(GAS)で、健康な人の咽頭や口腔にも存在するが、咽頭炎や扁桃炎など多くの感染症の起炎菌にもなり、皮膚感染症が重症化すると壊死性筋膜炎や敗血症などを引き起こすことがある。新型コロナウイルス感染症 COVID-19 パンデミックの収束後、S. pyogenes 感染症の世界的な増加が注目されている。フランスやイギリス、スウェーデンなどの国々では、2022 年以降、感染症患者数の顕著な増加が報告されており $1^{10-4}$ , 日本

でも 2023 年夏から急増している<sup>5</sup>. ストレプトコッカス毒素ショック症候群は劇症型溶血性レンサ球菌感染症(STSS)とも呼ばれ、S. pyogenes をはじめとする溶血性レンサ球菌によって起こる重篤な感染症である. 2024 年の約半年間に日本国内で確認された STSS 症例532 例のうち、194 例(36.5%)から病原性と伝播性の高い M1UK 系統株が分離されており<sup>6</sup>、感染拡大が懸念されている.

血液製剤においては、2010年から2024年9月までの期間にPCから細菌検出事例が65件発生しており、そのうち10件の原因菌がStreptococcus属であった。Streptococcus属の菌種内訳はS. pyogenes 2件、Streptococcus agalactiae 2件、Streptococcus dysgalactiae 6件であり、平均して年に1件検出される程度で、現在のところStreptococcus属検出事例発生数の増加傾向は見られていない(図1)。

本研究では GAS 流行状況から献血者由来の S. pyogenes 検出の増加の可能性を考え、献血者の同意を得て聞き取り調査と検体採取を行い S. pyogenes の血液製剤への混入原因について調査を行ったので報告する.

1) 日本赤十字社血液事業本部中央血液研究所

2) 日本赤十字社血液事業本部

連絡責任者:松本 真実, E-mail: m-matsumoto@jrc.or.jp [受付日:2024年12月9日, 受理日:2025年2月25日]

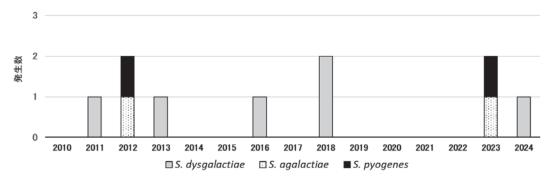


図 1 血小板製剤からの Streptococcus 属検出事例発生数 (2010 年~ 2024 年 9 月)

### 材料と方法

## 1) 再来時調査

献血者は30代男性で献血歴90回以上の頻回献血者であった. 当該PC献血から33日後の再来時に献血者の健康状態等の聞き取り調査と,全血採血および常在菌調査のために肘窩皮膚,口腔,咽頭からスワブ検体を採取した.

#### 2) 血液培養検査

再来時に採血した血液の培養検査は、血液培養自動分析装置バクテアラート VIRTUO (VIRTUO) (ビオメリュー) と平板塗抹培養法で行った。 VIRTUO については、血液を BPA (好気)、BPN (嫌気) 培養ボトル(ビオメリュー)に 10ml ずつ接種し 10 日間培養測定を行った。

平板塗抹培養法は、ソイビーンカゼインダイジェスト(SCD)培地(栄研化学)、5% 羊血液寒天培地(日本ベクトンデッキンソン)および変法 GAM 寒天培地 (島津ダイアグノスティクス)に検体を 0.1 m I ずつ塗抹し 25% と 35% で 7 日間培養した.

### 3) スワブ検体採取と菌種同定

肘窩皮膚および口腔、咽頭からスワブキット(オプティスワブトランスポートシステム LA106)(Puritan Medical Products)を使用し検体を採取した.皮膚については、直径 2.5cm の円をくり貫いた滅菌済アルミホイル型を使用して、円内の面積約  $5 \text{cm}^2$ をスワブした.スワブ回収液を SCD 培地および血液寒天培地に塗抹し35℃ で  $3 \sim 5$  日間培養後、生育したコロニーから多様な菌種を網羅するよう外観の異なるコロニー、および Streptococcus 属様コロニーの合計 415 コロニーについて微生物分類同定分析装置 MALDI Bio Typer (ブルカー)で菌種を同定した.

## 4)白血球層から real-time PCR による Streptococcus 属 DNA の検出

献血者が Streptococcus 属の菌血症であることを想定し、白血球から Streptococcus 属特異的 DNA の検出を行った. 再来時の採血血液約 30ml から Whole Blood

Polymorphonuclear Cell Isolation kit(abcom)を使用 して顆粒球層を分離し、分離液をビーズチューブ Pathogen Lysis tubes L(Qiagen) & TissueLyser LT(Qiagen) で10分間破砕処理後,全自動核酸抽出装置 magLEAD (Precision System Science) により細菌 DNA を抽出し た. Real-time PCR は Picard FJ らの方法に従い<sup>7)</sup>, Streptococcus 属特異的な tuf gene (197 bp) をターゲット とした. 使用したプライマー・プローブは, forward primer: 5'-GTACAGTTGCTTCAGGACGTATC-3', reverse primer: 5'-ACGTTCGATTTCATCACGTTG-3', probe: 5'-FAM-TGTTACTGGTGTTGAAATGTTC CG-TAMRA-3'である. PCR 反応液は 50µl の反応系で, DNA 抽出液 25μl に各プライマー(0.4μM)およびプロー ブ (0.2µM) を含む DNA 増幅試薬 QuantiTect Probe PCR Kit (Qiagen) 25ul を加えて調製した. PCR 反応 は StepOne (Applied Biosystems) を使用し、95°C 10 分間の初期加熱後,95℃ 15 秒/60℃ 1 分間を 50 サイク ル繰り返した. 解析は自動解析機能を用いて行った.

## 5) S. pyogenes 菌株の emm 型解析

S. pyogenes には数多くの表層抗原因子が存在し、この中でも病原因子として知られる M 蛋白質は型特異的である。この M 蛋白質をコードする emm 遺伝子の塩基配列を決定することで病原性のタイピングが可能である $^{8(9)}$ . 特に emm 1型の M1UK 株は、2010年代に英国で猩紅熱患者から分離された毒性および流行性の高い株であり $^{10(11)}$ , COVID-19パンデミック後,M1UK系統株が国内外で多く分離され注目されている $^{6(12)\sim14)}$ . そのため、今回分離された S. pyogenes 菌株の emm型について「国立感染症研究所 A 群溶血レンサ球菌 (Streptococcus pyogenes)検査マニュアル $^{15}$ に従って解析を行った.

#### 結 果

### 1) 再来時調査

献血者は、献血時に歯科治療や服薬等の問診事項について該当なしと回答していた.しかし、再来時の聞

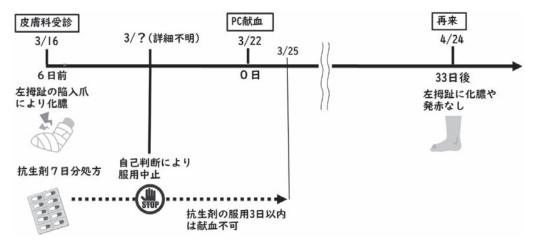


図2 献血者の皮膚科受診から再来までのイベント時系列

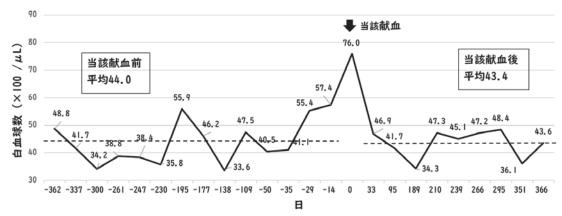


図3 当該献血者における献血時白血球数の推移

当該献血時を「0日」として当該献血前後の白血球数推移を示す。グラフ中の破線は、当該献血前後1年間に行われた献血時の白血球数の平均値を示す。

き取り調査において、献血6日前に左拇趾の陥入爪による化膿のため皮膚科を受診し、抗生剤を7日分処方されたが数日間の服用後に自己判断で服用を中止していたことが判明した。再来時には化膿していた左拇趾の患部は治癒しており、発赤等の症状も見られなかった。皮膚科受診から献血後再来までの献血者のイベント時系列を図2に示す。

また、当該献血者の献血時における白血球数の推移を調査した結果、当該献血時の白血球数は 7,600 個/ $\mu$ l であったのに対し、当該献血前 1 年間に行われた 14 回の献血時の白血球数(平均  $\pm$  SD)は 4,395  $\pm$  778 個/ $\mu$ l, 当該献血後 1 年間に行われた 9 回の献血時の白血球数は 4,340  $\pm$  482 個/ $\mu$ l であった。これらの結果から、当該献血時の白血球数が、当該献血前後と比較して高値であったことが確認された(図 3).

### 2) 血液培養検査

当該献血者の再来時に採血した血液の培養検査は、 VIRTUO および平板塗抹培養ともに陰性であった.

## 3) スワブ検体採取と菌種同定

当該献血者の再来時に採取した肘窩皮膚スワブ検体から多数の菌種が検出されたが、S. pyogenes は検出されなかった。また、口腔、咽頭スワブ検体から 10 菌種の Streptococcus 属が検出されたが、S. pyogenes は検出されなかった(表 1).

## 4) 白血球層から real-time PCR による Streptococcus 属 DNA の検出

当該献血者の再来時に採血した血液約 30ml から分離した顆粒球層約 16ml 中の好中球数は  $49.8 \times 10^2/\mu l$ , 単球数は  $2.1 \times 10^2/\mu l$  であった. この顆粒球層全量から抽出した DNA をすべて使用して Streptococcus 属 DNA の検出を行った結果, 80 測定中 4 測定で陽性となった. 陽性となった 4 測定の Cycle Threshold (CT) 値は, 44.7, 45.0, 45.9, 47.2 であった.

### 5) S. pyogenes 菌株の emm 型解析

今回分離された S. pyogenes の emm 型は4型であり、 世界的に流行が報告されている病原性の高い emm 1

咽頭・口腔		Streptococcus infantis	
			Streptococcus pneumoniae
	Streptococcus 属 10 菌種	Streptococcus mitis/oralis*	
		Streptococcus sanguinis	
		Streptococcus parasanguinis	
		Streptococcus cristatus	
		Streptococcus salivarius	
			Streptococcus vestibularis
			Streptococcus anginosus
			Streptococcus australis
	その他菌種		Rothia mucilaginosa
			Rothia aeria
			Haemophilus parainfluenzae
			Neisseria flavescens/subflava group*
			Bifidobacterium dentium
			Neisseria sicca group
			Granulicatella adiacens
肘窩皮膚	右 2		Janibacter melonis
		27 CFU/cm <sup>2</sup>	Paracoccus sp.
		27 CFU/cm <sup>2</sup>	Micrococcus luteus
			Cutibacterium acnes
	左		Janibacter melonis
		73 CFU/cm <sup>2</sup>	Microbacterium kitamiense
			Micrococcus luteus
			Cutibacterium acnes

表1 口腔咽頭および肘窩皮膚のスワブから検出された菌種

型の M1UK 系統株ではなかった.

### 考 察

COVID-19 が第 5 類に移行した 2023 年夏以降, GAS 咽頭炎の報告数が増加している。この理由としては, パンデミック中の感染対策で感染症全般が抑制されていたが, 制限解除に伴う接触増加や集団免疫の低下, 適切な治療の遅れが影響した可能性がある。また, 感染力や重症化リスクの高い病原体株の出現も寄与したと考えられる。本研究では血液製剤から S. pyogenes 検出事例は 1 例のみであるが, 世界的流行状況から献血者由来の GAS 検出数増加の可能性を考え, 混入原因の調査を行った。

本事例の血液製剤から検出された S. pyogenes 株は、国内で以前から報告されている emm 4型であった<sup>16</sup>. 侵襲性 GAS 感染症の原因株は emm 1型が多く報告されているが<sup>17</sup>, 今回検出された株は比較的, 強力な病原因子をもつ型ではなかった. そのため当該献血者の炎症症状も重症のリスクには至らず, 流行株とは異なる感染経路や環境に由来し, 献血者の生活環境条件下で存在していた株が分離されたことを示唆している.

血液製剤からの S. pyogenes 検出事例については,2012年にも PC による輸血細菌副作用事例が発生している<sup>18)</sup>.この事例の献血者は 20 代女性, 受血者は骨髄異形成症候群疾患の 80 代女性で, 採血 4 日目の PC が輸血され,

悪寒,戦慄,呼吸苦等を発症した. その後,受血者は回復したが,細菌混入の原因については不明であった.

今回の調査結果から、当該献血時の献血者の健康状態、白血球数の増加に加えて、約1カ月後の再来時血液の白血球層から Streptococcus 属 DNA が微量ながら検出されたことから、献血者は Streptococcus 属の菌血症であったと推測された. 白血球からの細菌 DNA 検出法は、敗血症診断用のキットにも用いられており有効な方法である<sup>19</sup>. Jin らは大腸菌を用いた in vitro 実験系において、細菌の 16S rRNA がマクロファージに貪食されてから 120 分後も分解されていないことを報告している<sup>20</sup>. 一方で、貪食後の経過時間に伴う細菌 DNA 断片化の詳細な過程については、現在のところ十分に検討されていない。また、細菌 DNA の分解速度や安定性は、宿主の免疫活性や菌種によっても異なる可能性があると考える.

本細菌 DNA 検出法を用いると、菌種によりターゲット遺伝子は異なるが、黄色ブドウ球菌(SA)を貪食させた好中球(貪食率 95.5%)を 2 個まで検出できた。また、 $2\sim2\times10^4$ 個の SA 貪食好中球を測定すると、好中球数の対数値とその CT 値には高い直線性( $R^2=0.98$ )があることが確認されている。培養試験陰性の全血 8 ロットついて、本検出系で Streptococcus 属特異的 realtime PCR により 8 測定ずつ検出を行った結果は全て陰性であった。陽性事例検体の顆粒球数と同等の条件で

<sup>\*</sup>判別不可

比較できるよう, さらにデータ解析を行い本検出法の 検証を進める. 白血球内の細菌 DNA の安定性について, 今後さらなる研究が必要であるが, 本症例における献 血時の菌血症については, 献血者の白血球数の推移等 を合わせて考えると, 検出された細菌 DNA が菌血症の 存在を示唆していると考えられる. 今後この系につい て, さらにデータを蓄積し評価したい.

また、献血時の問診基準では、「抗生剤の服用3日以 内は採血不可」であるが、今回の事例では献血者から の申告は無く, 化膿病巣の存在を把握できなかった. 今回のように献血者が処方された抗生剤の服用を自己 判断で中止してしまう場合もあるため、薬剤の服用に ついてだけではなく、受診や薬剤処方の有無について も問うなど、問診でいかに情報を得るかが重要である. しかし、限れた問診時間内で献血者の表にでない健康 状態を把握し、細菌感染リスクのある献血者を全て除 外するには限界がある. そのため日本赤十字社では初 流血除去、白血球除去等複数の細菌対策を行っている が、さらなる対策として血小板製剤について培養法に よる細菌スクリーニングの有効性を評価し21),細菌スク リーニングの導入を検討している. 細菌スクリーニン グでは、ごく少数の細菌が PC 中に混入した場合でも、 できるだけ細菌が増殖した時点で検出できるよう、採 血後 40 時間以上経過した PC から採取した検体を血液 培養自動分析装置で24時間培養し、陰性と判定された 製剤を供給する方法を計画している.新たな細菌対策 を導入することにより、輸血血液製剤の安全性がさら に向上することが期待される.

著者のCOI 開示:著者全員が血液製剤を販売している日本赤十字社の職員である。

#### 文 献

- World Health Organization: Increased incidence of scarlet fever and invasive Group A Streptococcus infection multi-country.
  - https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news/item/2022-DON429 (2024/11 accessed).
- Burckhardt I, Burckhardt F: Epidemiology of Streptococcus pyogenes Disease before, during, and after COVID-19 Pandemic, Germany, 2005-2023. Emerg Infect Dis, 30: 2435—2438, 2024.
- Alcolea-Medina A, Snell LB, Alder C, et al: The ongoing Streptococcus pyogenes (Group A Streptococcus) outbreak in London, United Kingdom, in December 2022: a molecular epidemiology study. Clin Microbiol Infect, 29: 887—890, 2023.

- Lassoued Y, Assad Z, Ouldali N, et al: Unexpected Increase in Invasive Group A Streptococcal Infections in Children After Respiratory Viruses Outbreak in France: A 15-Year Time-Series Analysis. Oxford Academic, 10: 2023. https://academic.oup.com/ofid/article/10/5/ofad188/7
- 5) 厚生労働省ホームページ: 劇症型溶血性レンサ球菌感染症 (STSS).

109853.

- https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0 000137555\_00003.html(2024 年 11 月現在).
- 6) 国立感染症研究所ホームページ:国内における劇症型溶血性レンサ球菌感染症の増加について. https://www.niid.go.jp/niid/ja/group-a-streptococcus-m/2656-cepr/12594-stss-2023-2024.html(2024年11月現在).
- Picard FJ, Ke D, Boudreau DK, et al: Use of tuf Sequences for Genus-Specific PCR Detection and Phylogenetic Analysis of 28 Streptococcal Species. J Clin Microbiol, 42: 3686—3695, 2004.
- Beall B, Facklam R, Thompson T: Sequencing emmspecific PCR products for routine and accurate typing of group A streptococci. J Clin Microbiol, 34: 953—958, 1996.
- Steer AC, Law I, Matatolu L, et al: Global emm type distribution of group A streptococci: systematic review and implications for vaccine development. Lancet Infect Dis, 9: 611—616, 2009.
- 10) Lynskey NN, Jauneikaite E, Li HK, et al: Emergence of dominant toxigenic M1T1 Streptococcus pyogenes clone during increased scarlet fever activity in England: a population-based molecular epidemiological study. Lancet Infect Dis, 19: 1209—1218, 2019.
- 11) Zhi X, Li HK, Li H, et al: Emerging Invasive Group A Streptococcus M1 UK Lineage Detected by Allele-Specific PCR, England, 2020. Emerg Infect Dis, 29: 1007— 1010, 2023.
- 12) Bertram R, Itzek A, Marr L, et al: Divergent effects of emm types 1 and 12 on invasive group A streptococcal infections-results of a retrospective cohort study, Germany 2023. J Clin Microbiol, 62: e0063724, 2024.
- 13) Maldonado-Barrueco A, Bloise I, Cendejas-Bueno E, et al: Epidemiological changes in invasive Streptococcus pyogenes infection during the UK alert period: A molecular comparative analysis from a tertiary Spanish hospital in 2023. Enferm Infecc Microbiol Clin, 42: 34— 37, 2024.

- 14) Vieira A, Wan Y, Ryan Y, et al: Rapid expansion and international spread of M1UK in the post-pandemic UK upsurge of *Streptococcus pyogenes*. Nat Commun, 15: 3916, 2024.
- 15) 国立感染症研究所ホームページ: A 群溶血レンサ球菌 (Streptococcus pyogenes) 検査マニュアル (2024年1 月版).
  - https://www.mhlw.go.jp/content/001236947.pdf( 2024 年 11 月現在).
- 16) 勝川千尋, 田丸亜貴, 森川嘉郎, 他:Streptococcus pyogenes の M 蛋白遺伝子 (emm) 型別. 感染症学雑誌, 76:238—245, 2002.
- 17) 厚生労働科学研究成果データベース:重症型のレンサ球菌・肺炎球菌感染症に対するサーベイランスの構築と病因解析,その診断・治療に関する研究.
  https://mhlw-grants.niph.go.jp/project/21448 (2024年11月現在).

- 18) 日本赤十字社ホームページ: 輸血情報 1310-136. https://www.jrc.or.jp/mr/relate/info/pdf/yuketsuj\_1 310-136.pdf (2024 年 11 月現在).
- Shimada J, Hayashi I, Inamatsu T, et al: Clinical trial of in-situ hybridization method for the rapid diagnosis of sepsis. J Infect Chemother, 5: 21—31, 1999.
- 20) Jin Y, Tian Y, Zhang W, et al: Tracking bacterial infection of macrophages using a novel red-emission pH sensor. Anal Bioanal Chem, 398: 1375—1384, 2010.
- 21) 松本真実, 池田洋平, 蕎麦田理英子, 他:血小板製剤の 細菌検査における BacT/ALERT VIRTUO の評価. 日本 輸血細胞治療学会誌, 67:432—439,2021.

# INVESTIGATION OF GROUP A HEMOLYTIC STREPTOCOCCUS CONTAMINATION IN A PLATELET CONCENTRATE

Mami Matsumoto<sup>1)</sup>, Moe Kozakai<sup>1)</sup>, Hideyuki Takahashi<sup>1)</sup>, Keiji Matsubayashi<sup>1)</sup>, Masahiro Satake<sup>2)</sup> and Yoshihiko Tani<sup>1)</sup>

1) Central Blood Institute, Blood Service Headquarters, Japanese Red Cross Society

#### Abstract:

Group A hemolytic Streptococcus, *Streptococcus pyogenes* (*S. pyogenes*), was isolated from a platelet concentrate. To investigate the cause, a follow-up interview was conducted with the index donor, and samples were collected from the antecubital skin, oral cavity, and oropharynx. Blood samples were subjected to bacterial culture and real-time PCR to detect *Streptococcus* species in granulocytes, and swabs were cultured for bacterial identification. *Emm*-type of *S. pyogenes* was identified, enabling strain virulence assessment.

The donor had visited a dermatologist six days prior to donation for suppuration from an ingrown large toenail of the left foot and had been taking antibiotics. Peripheral blood obtained 33 days after the *S. pyogenes*-contaminated donation was culture-negative, although real-time PCR detected *Streptococcus* DNA, suggesting possible donor bacteremia. While ten *Streptococcus* species were identified in the oral and oropharyngeal swabs, *S. pyogenes* was not isolated.

Interview criteria state that donations should not be made within three days of antibiotic use, but the antibiotic regimen of the donor was not disclosed in the medical interview, and no suppurating lesions were noted. The Japanese Red Cross Society has implemented preventive measures against bacterial contamination, including initial blood flow diversion and pre-storage leukoreduction, and is considering bacterial screening to enhance blood product safety.

## Keywords:

Group A hemolytic Streptococcus, Platelet Concentrate, transfusion-transmitted bacterial infection

<sup>&</sup>lt;sup>2)</sup>Blood Service Headquarters, Japanese Red Cross Society