

原 著

## *Serratia liquefaciens* 接種赤血球製剤の色調変化

杉浦さよ子<sup>1)</sup> 山田 高義<sup>1)</sup> 井上千加子<sup>1)</sup>

中島 正三<sup>1)</sup> 小澤 和郎<sup>1)</sup> 神谷 忠<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>愛知県赤十字血液センター

<sup>2)</sup>愛知県豊橋赤十字血液センター

(平成 16 年 2 月 9 日受付)

(平成 16 年 3 月 31 日受理)

### VISUAL IDENTIFICATION OF *Serratia liquefaciens*-CONTAMINATED RED BLOOD CELLS

Sayoko Sugiura<sup>1)</sup>, Takayoshi Yamada<sup>1)</sup>, Chikako Inoue<sup>1)</sup>, Syozo Nakashima<sup>1)</sup>,  
Kazuo Ozawa<sup>1)</sup> and Tadashi Kamiya<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>Aichi Red Cross Blood Center

<sup>2)</sup>Aichi Toyohashi Red Cross Blood Center

Lethal transfusion reactions due to *Serratia liquefaciens* have been reported. To study the growth of this organism, 4 RBCs were inoculated with 1 or 10 colony forming units (cfu)/bag of *Serratia liquefaciens* (each concentration, n = 2) and stored at 5.6 °C. Each of the inoculated RBCs showed an apparent darkening in color on day 10 (10 cfu/bag) or 11 (1 cfu/bag).

At that time, the number of *Serratia liquefaciens* had increased to  $8.3 \times 10^7$  and  $2.7 \times 10^8$  cfu/ml, respectively. We then used a chroma meter to evaluate the change in RBC color more objectively and also photographed the samples for the three-week storage period. Supernatant Hb levels increased rapidly after day 7 and were 14.3 g/dl on day 10 (1 cfu/bag). Endotoxin was detected after day 9. These findings indicate that *Serratia liquefaciens* showed strong growth in RBCs stored at 5.6 °C, and that this proliferation of bacteria was associated with an increase in supernatant Hb and endotoxin level followed by darkening in color of RBCs. Although discoloration is not an early index of *Serratia liquefaciens* contamination of RBCs, pretransfusion visual inspection may contribute to reducing the risk of transfusion-related sepsis.

**Key words** : *Serratia liquefaciens*, supernatant Hb, endotoxin, chroma meter, transfusion reaction

### はじめに

*Serratia liquefaciens* (*S. liquefaciens*) は腸内細菌科に属するグラム陰性の通性嫌気性短桿菌で、健康者における感染症は極めてまれである。しかし、グラム陰性桿菌が血液製剤に混入した場合、致死的な輸血副作用を生じる確率が高い<sup>1,2)</sup>。また、*S. liquefaciens* は *Yersinia enterocolitica*<sup>3,4)</sup> と同様に低温でも増殖し、赤血球製剤に混入した場合、血

液製剤の黒色化を生じることが知られている<sup>5)</sup>。*S. liquefaciens* 標準株を用いて 2 単位 RC-MAP 製剤へ bag 当たり 1, 10 cfu (コロニー形成単位) の濃度で接種し、冷蔵保存における経時的な色調変化について写真撮影と色彩色差計を用いた測色を行い、生菌数、上清ヘモグロビン (Hb) およびエンドトキシン濃度を測定した。

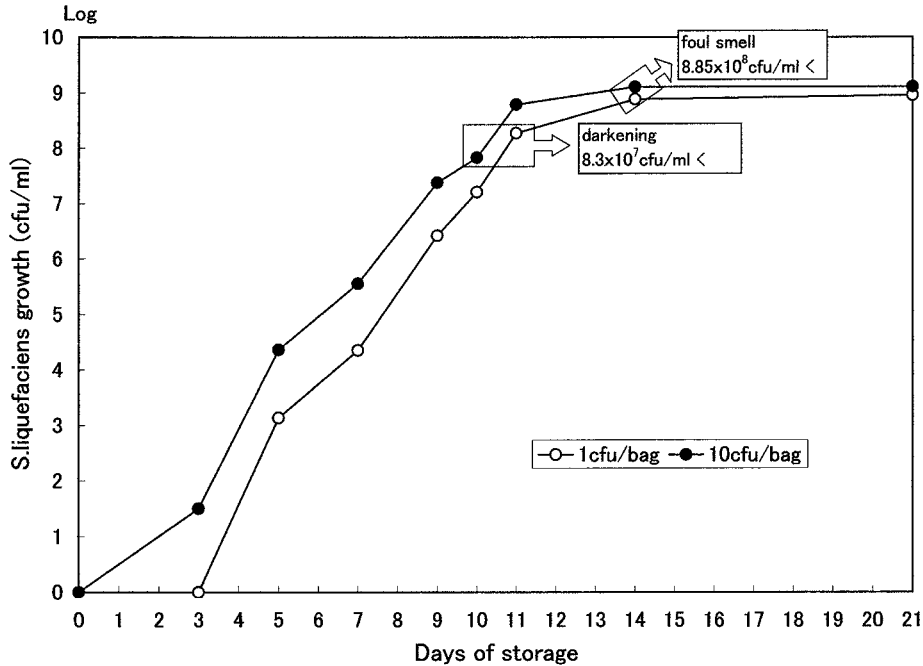


Fig. 1 Proliferation of *Serratia liquefaciens* in RC-MAPs stored at 5.6 °C. Data is the mean of two samples each.

## 対象および方法

### 赤血球製剤

当研究に同意の得られた供血者 6 名より 400ml 採血を行い,RC-MAP2 単位を作成した.製剤中の混入白血球数は  $1.16 \sim 4.56 \times 10^6 / \text{ml}$  であった. *S. liquefaciens* 標準株 (ATCC 27592) を 1, 10 cfu/bag (各  $n=2$ ) の濃度で接種し,対照 ( $n=2$ ) とともに 21 日間冷蔵 (平均 5.6 °C) 保存した.

### 菌の接種方法

*S. liquefaciens* の単一コロニー (1 個の生菌がもとになって形成される集落) を普通ブイヨン (栄研) で対数増殖期まで増菌し,希釈法により普通寒天培地上に播種後,37 °C で 24 時間後に発育したコロニー数と希釈倍率から生菌数を算出した.生食 (川澄化学工業) で 1 cfu/ml および 10 cfu/ml の濃度で各 bag 当たり 1ml を接種した.

### 菌増殖数の測定

菌接種直後 (0), 3, 5, 7, 9, 10, 11, 14, 21 日目に各 bag を混和し,無菌的に 1ml 採取後,希釈法により 37 °C で寒天培地上に発育したコロ

ニー数を 24 時間後に算出した.

### 上清 Hb およびエンドトキシン濃度の測定

経時的に採取した上清を,測定当日まで -80 °C に保存した.上清 Hb 濃度はヘモコン-N (コントロール濃度 15.3g/dl,アズウェル)を用い,Leuco Crystal Violet 法にて測定し,エンドトキシン濃度はエンドスベック ES テスト TE (生化学工業) にて測定した.

### 写真撮影および色彩色差計による測色

0, 5, 7, 9, 10, 11, 14, 21 日目に経時的な色調変化を写真撮影した.

色彩色差計による測色は室温下 (24 °C) で, bag ラベル面を下側にして机上に置き, bag 中央部を色彩色差計 (MINOLTA CR-300) で 0, 3, 5, 7, 9, 10, 11, 14, 21 日目に色調を測定した.測色値は,  $L^*a^*b^*$  ( $L^*$ : 明度,  $a^*$ : 色相/赤 緑,  $b^*$ : 色相/黄 青) と  $L^*C^*h^\circ$  ( $L^*$ : 明度,  $C^*$ : 彩度,  $h^\circ$ : 色相角度) の表色系で測定した.

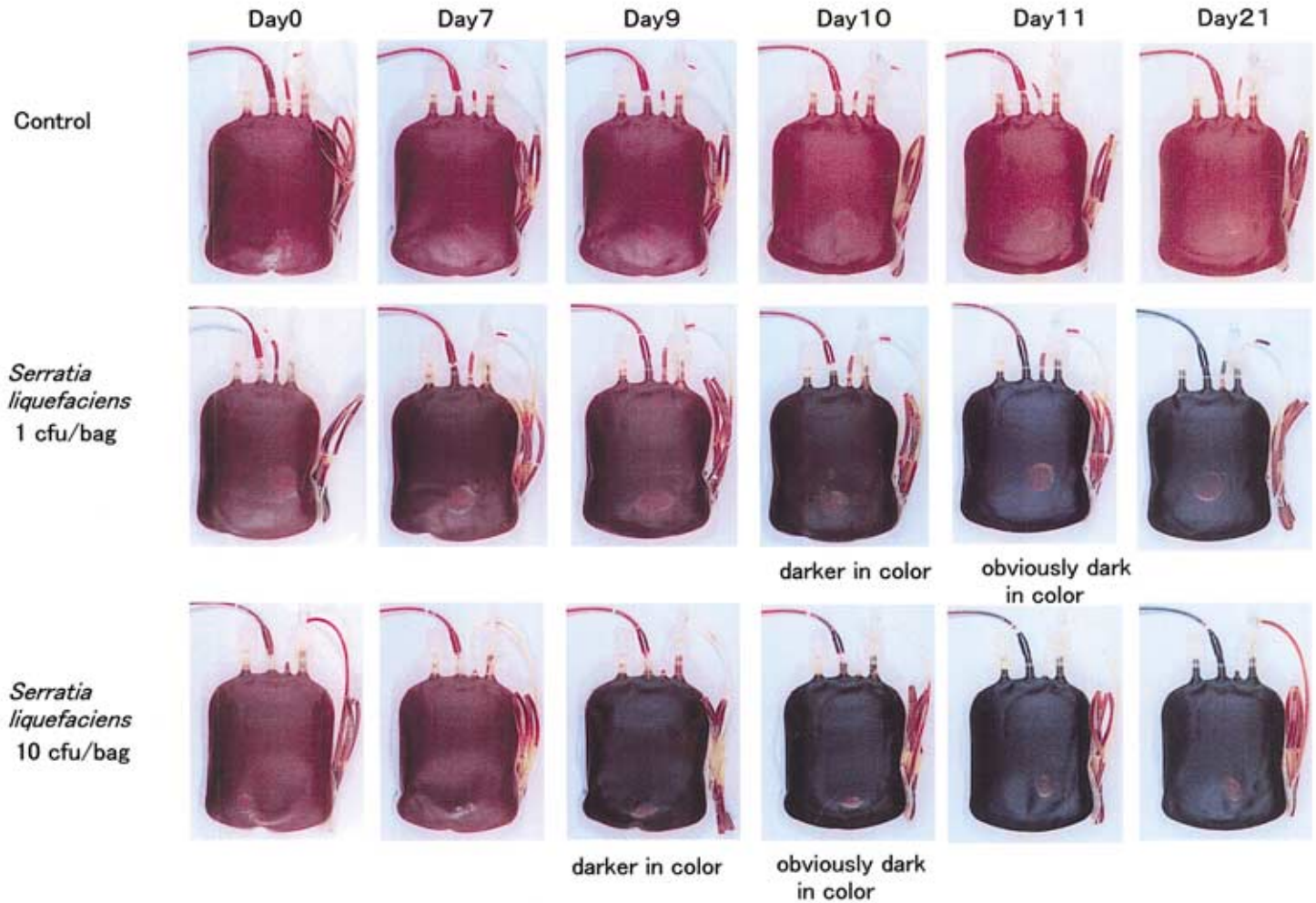


Fig. 2 Change in color tone over time on refrigeration of *Serratia liquefaciens*-inoculated RC-MAP. The inoculated samples show darkening over time, while the control samples show an increase in vividness. Color tone of the blood bags and their accompanying segments differs.

Table 1 Supernatant Hb in Red Cell MAP deliberately inoculated with *Serratia liquefaciens*

Inoculum Days of storage	0 mg/dl	1 cfu/bag mg/dl (g/dl)	10 cfu/bag mg/dl (g/dl)	Normal range mg/dl
0	9	18	20	8 ± 5
7	13	97	128	11 ± 5
9	N.T	1,300 ( 1.3 )	15,100 ( 15.1 )*	N.T
10	N.T	14,300 ( 14.3 )*	15,300 ( 15.3 )**	N.T
11	N.T	15,300 ( 15.3 )**	15,300 ( 15.3 )	N.T
14	25	15,300 ( 15.3 )†	15,300 ( 15.3 )†	17 ± 6
21	34	15,300 ( 15.3 )	15,300 ( 15.3 )	26 ± 13

Reference : 8 ) N.T : not tested Data ( n=2 ) are represented by the mean

\* darker in color \*\* obviously dark in color †foul smelling

Red Cell MAP were preserved for 21 days at a cold temperature ( mean 5.6 )

## 結 果

### 菌の増殖と色調変化

菌の増殖経過を Fig. 1 に示した .

菌接種後 3 日目で , 1 cfu/bag ではコロニーの発育がなく , 10 cfu/bag では 15 cfu/ml の増殖を認めた . 5 日目以後 , 1 , 10 cfu/bag ともに対数的増殖を示した .

保存経過に伴う経時的色調変化の写真を Fig. 2 に示した . 色調変化が疑われたのは , 1 cfu/bag では 10 日目 ( 菌数  $2.05 \times 10^7$  cfu/ml ) , 10 cfu/bag では 9 日目 ( 菌数  $3.75 \times 10^7$  cfu/ml ) であった . 明らかな黒色化は , 1 cfu/bag では 11 日目 ( 菌数  $2.7 \times 10^8$  cfu/ml ) , 10 cfu/bag では 10 日目 ( 菌数  $8.3 \times 10^7$  cfu/ml ) であった . 菌接種群は 14 日目には 1 , 10 cfu/bag ともに硫黄様臭気が bag 表面から発生し , 保管庫内に充満した . この時点の菌数は  $8.85 \times 10^8 \sim 1.1 \times 10^9$  cfu/ml であった . 経過とともに臭気は弱まったものの 21 日目でも消臭しなかった . *Serratia* はマンニトールやスクロースを発酵しガスを産生するものが多いが , その産生量は少ないとされている<sup>6)</sup> .

### 上清 Hb 濃度

Table 1 に保存経過に伴う上清 Hb 濃度を示した . 菌接種群は 7 日目より上昇し , 色調異常が疑われた時点 ( 黒色化の前日 ) には , すでに 1 cfu/bag は 14,300mg/dl ( 10 日目 ) , 10 cfu/bag は 15,100 mg/dl ( 9 日目 ) と異常高値を示し , 黒色化時点で両濃度とも完全に溶血値 ( 15,300mg/dl ) を示した .

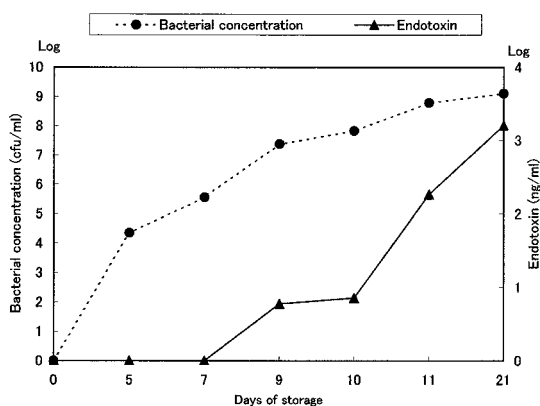


Fig. 3 Endotoxin level in the supernatant of *Serratia liquefaciens*-inoculated ( 10 cfu/bag ) RC-MAP, and bacterial proliferation. Data is the mean of two samples.

### エンドトキシン濃度

Fig. 3 に 10 cfu/bag の濃度で接種した RC-MAP の菌数増加に伴うエンドトキシン濃度を示した . 菌数が  $10^5$  cfu/ml 以下ではエンドトキシンは検出限界 ( 4pg/ml ) 以下で検出できなかったが , 菌数  $10^7$  cfu/ml 以上では菌増加とともに高値を示した .

### 色彩色差計による測色

Fig. 4 に RC-MAP の  $L^*a^*b^*$  ,  $L^*C^*h^*$  の測定結果を示した . 明度  $L^*$  は採血当日 ( 0 ) ではコントロール ( 28.0 ) と菌接種群の 1 cfu/bag ( 26.34 ) , 10 cfu/bag ( 26.51 ) との間各差はみられなかったが , 11 日目には菌接種群で低下傾向を示した ( 各

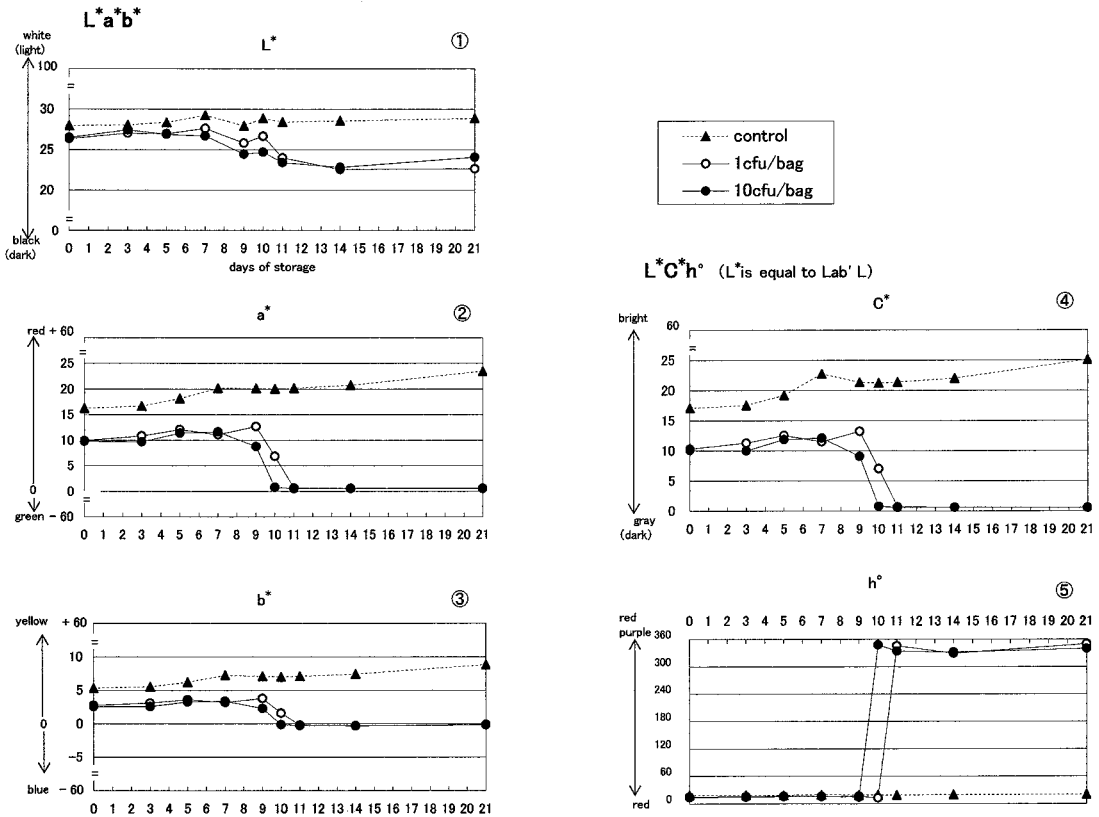


Fig. 4 Time color tone change of RC-MAP as measured with a chroma meter.

Data show the mean of two samples each used to obtain  $L^*a^*b^*$  and  $L^*C^*h^\circ$  readings. Both 1 and 10 cfu/bag samples showed obvious decreases in  $L^*$  on day 11 and  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $C^*$  on days 10 and 9 respectively, compared to control. On day 21,  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  and  $C^*$  of the controls were visibly increase compared to the initial color value.

- ①  $L^*$ ; Luminance is an indicator of black (= dark, 0) and white (light, 100)
- ②  $a^*$ ; Hue relates to red (+60) green (-60) color axes.
- ③  $b^*$ ; Hue relates to yellow (+60) blue(-60) color axes.
- ④  $C^*$ ; Chroma is an indicator of gray (= dark, 0) and brightness (60)
- ⑤  $h^\circ$ ; Hue angle relates to red (0) red purple (360°) color axes.

24.00, 23.42).色相  $a^*$ ,  $b^*$ および彩度  $C^*$ では経時的な変化傾向は、菌接種群の両者で類似パターンを示した。コントロール群では採血当日の色相は  $a^* + 16.23$ ,  $b^* + 5.35$ であったが、日ごとに徐々に上昇傾向を示し21日目には  $a^* + 23.49$ ,  $b^* + 8.83$ と赤および黄方向への変化を示した。彩度  $C^*$ も、採血直後 17.08 から21日目には 25.09と保存に伴いあざやかさが増加した。一方、菌接種群においては、色調変化が認められた 1 cfu/bag の10日

目、10 cfu/bag の9日目で色相(赤・黄)と彩度のわずかな低下がみられ、黒色化に伴い赤は緑方向へ、黄は青方向へ、彩度はくすみ方向への急激な変化を認めた。色相角度  $h^\circ$ は、コントロールでは21日目においても、赤方向を示しほとんど変化をしなかったが、菌接種群については、黒色化を認めた11日目(1 cfu/bag), 10日目(10 cfu/bag)で、赤紫への変化を示した。

## 考 察

*S. liquefaciens* は動・植物や動物生息場所から検出され、5 歳でも発育良好で溶血毒を持つ<sup>7)</sup>。*S. liquefaciens* を低濃度 (1, 10 cfu/bag) で赤血球製剤 (RC-MAP 2 単位) に接種後、冷蔵保存下で経時的に検討を行った結果、24 時間毎にほぼ 1log の菌増殖を認めた。赤血球製剤の黒色化については、これまでの報告では溶血との関連や、細菌増殖による酸素分圧の低下が原因とされているが<sup>3), 5)</sup>、裏づけとなる実験結果は示されていない。1 cfu/bag では接種後 10 日目、10 cfu/bag では 9 日目に色調がやや暗くなり、色彩色差計ではそれまでの「暗い赤」から「ごく暗い赤」に変化した。しかし、この時点での色調変化は、継続的な色調観察を行ったため観察できた結果であって、一時点だけの観察で異常を判別するのは困難と思われた。完全に製剤の色調変化 (黒色化) を認識できたのは各々その翌日で、菌数は  $2.7 \times 10^8$  cfu/ml (1 cfu/bag),  $8.3 \times 10^7$  cfu/ml (10 cfu/bag) であった。

上清 Hb 濃度は 7 日目に、通常の 21 日間保存での赤血球製剤の上清 Hb 平均値 ( $26 \pm 13$  mg/dl)<sup>8)</sup> を越え、以後急激に増加した。黒色化前日には、上清 Hb 値は赤血球がほぼ 100% 溶血した値に近似していた。エンドトキシンは 7 日目までは検出されなかったが、9 日目 (黒色化前日) には 7.76 ng/ml と高値を示した。赤血球製剤の色調変化は、上清 Hb の許容範囲逸脱やエンドトキシン検出時期より遅れて出現していたことから、*S. liquefaciens* による輸血副作用を回避するためには、色調による外観試験だけでは不十分であり、菌の混入予防策を講じたり、高感度検出法や増殖低減措置を導入することなどが必要であると考えられる。

輸血に伴う *S. liquefaciens* 敗血症として、CDC に 1992 年 7 月から 1999 年 1 月までの間に報告された 4 例 (赤血球製剤 3 例、プール血小板製剤 1 例) は、20~80ml の輸血を受けたところで、悪寒、発熱、頻脈、胸や腰の痛み、呼吸困難、血圧低下 (ショック) などの症状を示しいずれも致死的であった。70 歳以上の高齢者に使用され、エンドト

キシン値の異常高値、赤血球製剤の黒色化が報告されている。これらの製剤の献血者は 1 例に鼻閉があった他は健康で、*S. liquefaciens* の混入原因は不明とされている<sup>5)</sup>。日本では、色調異常に気付いた医療機関から血液センターに連絡があり、未使用の照射赤血球製剤 (採血後 14 日目) から *S. liquefaciens* を検出した事例が 1 例ある<sup>9)</sup>。一方、英国の透析施設における *S. liquefaciens* 院内感染事例として、院内でプールされた高用量エリスロポエチン製剤、詰め替え容器使用抗菌ソープ、ハンドローションおよび複数のスタッフの手指から *S. liquefaciens* が検出され、患者の血液培養から検出された菌とパルスフィールド電気泳動法にて同一の型を示したとの報告がある<sup>10)</sup>。*S. liquefaciens* の混入経路はあきらかではないが、消毒用資材や手指洗浄 (消毒) 剤などを適切な管理下におき、*S. liquefaciens* のリザーバーとなりうる条件を排除しておくことの重要性を示唆している。血液センターでは採血関連資材はすでに可能な限りディスプレイ製品が採用されており、それらの適切な管理、採血手技教育などに加え、検診時における献血者の健康状態に留意した問診の継続が当面の予防対策と思われる。

保存前白血球低減導入による細菌増殖予防効果は、細菌の種類により異なる可能性がある<sup>11)</sup>。検索した範囲では、*S. liquefaciens* に関して保存前に白血球除去フィルターを使用しての評価報告はなかった。高感度細菌検出法や混入細菌不活化による増殖低減措置なども今後の検討課題である。

血液製剤の色調は個体差が大きく、わずかな色調の変化を識別するのは困難である。しかし黒色化した製剤でもセグメントの血液は正常色調に保たれていたとする報告が多く<sup>3)-5)</sup>、血液センターではセグメントと血液製剤本体の色調差を目安として輸血実施前の外観検査を行うように呼びかけている。また、今回の実験で対照とした菌未接種群は、保存経過とともに鮮明さが増し、色彩色差計による測色では「暗いくすんだ赤」から「暗いあざやかな赤」へ変化した。これは保存中に RC-MAP 製剤中の 2, 3-DPG の減少により赤血球の酸素親和性が増加するためである<sup>12), 13)</sup>。通常の赤

血球製剤の保存に伴う色調の鮮明化に関する情報提供も、輸血外観試験の参考となるかもしれない。

### 結 語

*S. liquefaciens* を低濃度で接種した赤血球製剤の異常所見は、上清 Hb 上昇、エンドトキシン検出、色調変化(黒色化)、臭気発生の順でそれぞれ1日から数日の間隔をおいて出現した。*S. liquefaciens* が血液製剤から検出された頻度は少ないが、重篤な輸血副作用が報告されている。より安全な血液製剤を目的とした対策や技術の進歩が望まれるが、現在のところは少なくとも色調変化が疑われる血液製剤が使用されないよう、ベッドサイドで使用時に色調確認を実施することが輸血副作用回避に重要である。

### 文 献

- 1) Perez, P., et al. : Determinants of transfusion-associated bacterial contamination : results of the French BACTHEM Case-Control Study. *Transfusion*, 41 ( 7 ): 862 - 872, 2001.
- 2) Kuehnert, M.J., et al. : Transfusion-transmitted bacterial infection in the United States, 1998 through 2000. *Transfusion*, 41 ( 12 ): 1493 - 1499, 2001.
- 3) Kim, D.M., et al. : Visual identification of bacterially contaminated red cells. *Transfusion*, 32 ( 3 ): 221 - 225, 1992.
- 4) 幸豊重ほか：RC-MAP より検出されたエルシニア菌について。血液事業，17 ( 2 ): 106, 1994.
- 5) Roth, V.R., et al. : Transfusion-related sepsis due to *Serratia liquefaciens* in the United States. *Transfusion*, 40 ( 8 ): 931 - 935, 2000.
- 6) 横田正春ほか：日和見感染症としてのセラチア感染。日細誌，56 ( 3 ): 527 - 535, 2001.
- 7) 藪内栄子：セラチア属菌，編者 竹田美文，林英生，細菌学，朝倉書店，東京，2002，384 - 387.
- 8) 柴 雅之ほか：MAP 加濃厚赤血球の製造と長期保存試験。日輸会誌，37 ( 3 ): 404 - 410, 1991.
- 9) 日本赤十字社中央血液センター：照射赤血球 M・A・P「日赤」からの細菌検出例について。輸血情報，0203 - 69, 2002.
- 10) Grohskopf, L.A., et al. : *Serratia liquefaciens* blood stream infections from contamination of epoetin alfa at a hemodialysis center. *N. Engl. J. Med.*, 344 ( 20 ): 1491 - 1497, 2001.
- 11) Buchholz, D.H., et al. : Effects of white cell reduction on the resistance of blood components to bacterial multiplication. *Transfusion*, 34 ( 10 ): 852 - 857, 1994.
- 12) 日本赤十字社，事務局，血液事業部編：輸血用血液及び分画用原料血漿調整管理。業務標準・技術部門。製剤部門，41 - 43, 1999.
- 13) 濱崎直孝：赤血球中の血色素 赤血球代謝と血色素の協同作用。蛋白質 核酸 酵素，32( 6 ): 542 - 548, 1987.