

報 告

## 細菌接種実験による血小板製剤中のエンドトキシンと ペプチドグリカンの測定

麻田真由美<sup>1)</sup> 菅野知恵美<sup>1)</sup> 伊藤 志保<sup>1)</sup>  
峯 佳子<sup>1)</sup> 藤田 往子<sup>1)</sup> 金光 靖<sup>1)</sup>  
芦田 隆司<sup>1)2)</sup> 椿 和央<sup>3)</sup> 金丸 昭久<sup>1)2)</sup>

<sup>1)</sup>近畿大学医学部付属病院輸血部

<sup>2)</sup>近畿大学医学部血液内科

<sup>3)</sup>近畿大学医学部奈良病院血液内科

(平成 17 年 7 月 27 日受付)

(平成 18 年 2 月 22 日受理)

我々は、血小板製剤に細菌接種実験を行い、血小板製剤中のエンドトキシン (ET)、ペプチドグリカン (PGL) および細菌増殖の測定を行った。

*E. coli* 9.6×10<sup>2</sup>CFU 接種後、10<sup>2</sup>CFU/ml 以上の細菌増殖で ET が検出された。PGL は、*S. aureus* 4.1×10<sup>2</sup>CFU 接種後 2 時間で検出され、その時の菌量は 10<sup>2</sup>CFU/ml であった。血液センターから供給された血小板製剤の ET および PGL のスクリーニングはすべて陰性で、重篤な副作用も出現しなかった。ET および PGL は短時間で測定でき、外観検査よりも早期に細菌混入の指標になると思われた。また、副作用の原因調査にも利用出来ると考えられた。

キーワード：血小板製剤，エンドトキシン，ペプチドグリカン，細菌混入

### はじめに

輸血に伴う事故・合併症のひとつに細菌汚染がある。細菌汚染の原因として、採血時の静脈穿刺部からバッグ内への混入や、菌血症者からの献血などが考えられる。冷蔵庫で保管する赤血球製剤では細菌の増殖の危険性は低いが、常温保存の血小板製剤では細菌汚染は重要な問題である。米国では 21 例の細菌に汚染された血小板製剤によると考えられる敗血症死亡例 (1986 年～1991 年) が FDA に報告されている<sup>1)2)</sup>。

本邦における血小板製剤の有効期限は採血後 72 時間と米国に比べて短い。やはり 20～24℃で振盪保存するため、細菌汚染が生じた場合には増殖して輸血後敗血症をひき起こす可能性がある。今回、われわれは、グラム陰性菌の細胞壁外膜に存在するリポ多糖であるエンドトキシンと、

グラム陽性菌およびグラム陰性菌の構成成分であるペプチドグリカンが、細菌混入の指標となるか否かを検討する目的で、実験的に細菌接種を行い、血小板製剤に含まれるエンドトキシンおよびペプチドグリカンの測定を行った。

### 対象および方法

#### 1. 血小板製剤の供給

スクリーニングとして、血液センターから供給された血小板製剤の、シールしたパイロットチューブから無菌的に血漿成分を採取し、下記に示す方法でエンドトキシン (161 検体) およびペプチドグリカン (210 検体) を測定した。また、細菌接種実験には、血液センターから有効期限内に使用されなかった血小板製剤の譲渡を受け、80～100 ml に分割して用いた。

Table 1 Growth of *E. coli* after inoculation and detection of endotoxin (ET)

Hours after inoculation		2	4	6	8	24	48	72	
Inoculated CFU	9.6 × 10 <sup>2</sup>	Colonies (CFU/ml)	N.T.	N.T.	2.0 × 10 <sup>3</sup>	N.T.	4.1 × 10 <sup>4</sup>	4.7 × 10 <sup>8</sup>	1.1 × 10 <sup>7</sup>
		ET (pg/ml)	N.T.	N.T.	1.8 × 10	N.T.	1.9 × 10 <sup>3</sup>	1.8 × 10 <sup>5</sup>	2.0 × 10 <sup>7</sup>
4.1 × 10 <sup>4</sup>	Colonies (CFU/ml)	4.1 × 10	3.0 × 10 <sup>2</sup>	6.5 × 10 <sup>2</sup>	9.0 × 10 <sup>2</sup>	N.T.	N.T.	N.T.	
	ET (pg/ml)	7.3 × 10	3.6 × 10 <sup>2</sup>	4.6 × 10 <sup>2</sup>	6.6 × 10 <sup>2</sup>	N.T.	N.T.	N.T.	

Growth of *E. coli* and detection of ET after inoculation of 9.6 × 10<sup>2</sup> CFU and 4.1 × 10<sup>4</sup> CFU of *E. coli*, respectively, into PC bags stored at room temperature

## 2. 細菌の接種方法

分割した血小板製剤にグラム陰性菌 *E. coli*, グラム陽性菌 *S. aureus*, *S. epidermidis* を各々 10~4.1 × 10<sup>4</sup> 個接種し, 20~24°C で振盪保存した.

## 3. エンドトキシンおよびペプチドグリカンの測定

エンドトキシンは, エンドトキシンシングルテストワコーを用いて測定した. 検体中のエンドトキシン濃度は, エンドトキシンガリムルス試薬と反応しゲル化する時間を透過光量の変化としてとらえ, 反応に伴う透過光量の減少が一定の割合おこる時間 (ゲル化時間) と標準エンドトキシン濃度の関係から定量した. ペプチドグリカンは SLP テストワコー (ペプチドグルカンおよび β-D グルカン定量) を用いて測定した. 検体中のペプチドグリカンは SLP 試薬と反応しメラニンを形成する. 検体のペプチドグリカン濃度の対数がメラニン形成に要する反応時間と, 標準ペプチドグルカン濃度の関係から検体中のペプチドグルカン濃度を定量した.

濃度の測定は比濁時間分析装置トキシノメーター・MT-251 を用い, 90 分間測定を行った.

## 4. 菌数の測定

細菌接種後, 経過中の製剤の一部を採取し, スパイラルクレーターによる分離培養で細菌数 (CFU) を測定した.

## 5. 細菌培養

エンドトキシンおよびペプチドグリカンを測定した血小板製剤において, 同時にカルチャーボトルによる細菌培養も行った (50 検体).

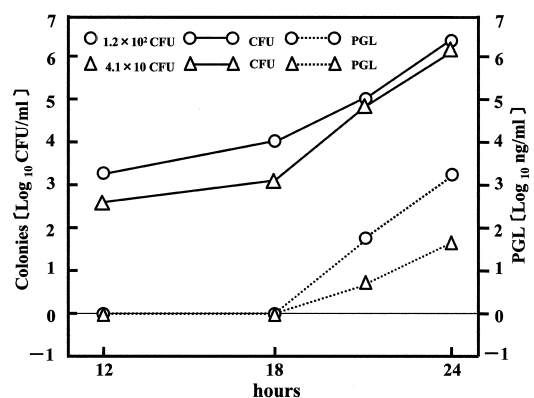


Fig. 1 Growth of *S. aureus* and detection of peptidoglycan (PGL) after inoculation of 1.2 × 10<sup>2</sup> CFU and 4.1 × 10 CFU of *S. aureus*, respectively, into PC bags stored at room temperature

## 結 果

### 1. 血小板製剤中のエンドトキシンおよびペプチドグリカンのスクリーニングと細菌培養

血液センターから供給された血小板製剤においてエンドトキシンおよびペプチドグリカンを測定したが, すべて陰性であった. また, 同時に行ったカルチャーボトルによる細菌培養についても, 1 週間培養で菌は検出されなかった. 輸血後の重篤な副作用も認められなかった.

### 2. *E. coli* 接種による増殖態度およびエンドトキシンの経時的变化 (Table 1)

*E. coli* 4.1 × 10<sup>4</sup> CFU を接種した時は接種後 2 時間で細菌数は 40 CFU/ml となり, 同時にエンドトキシンが検出された. また, エンドトキシンは *E.*

Table 2 Growth of *S. epidermidis* after inoculation and detection of peptidoglycan (PGL)

Hours after inoculation	Inoculated CFU		2	4	6	8	24
			Colonies (CFU/ml)	$4.1 \times 10^1$	$1.4 \times 10^2$	$1.4 \times 10^2$	$1.8 \times 10^2$
	$8.7 \times 10^3$	PGL (ng/ml)	—	—	—	—	—
	$3.9 \times 10^4$	Colonies (CFU/ml)	$6.9 \times 10^2$	$7.5 \times 10^2$	$7.7 \times 10^2$	$1.1 \times 10^3$	$1.7 \times 10^5$
		PGL (ng/ml)	—	—	—	—	$1.7 \times 10^2$

Growth of *S. epidermidis* and detection of PGL after inoculation of  $8.7 \times 10^3$  CFU and  $3.9 \times 10^4$  CFU of *S. epidermidis*, respectively, into PC bags stored at room temperature

*coli* の菌量に比例して増加し、測定したすべての時期で検出可能であった。

### 3. *S. aureus* 接種による増殖態度およびペプチドグリカンの経時的変化 (Fig. 1)

ペプチドグリカンは *S. aureus*  $1.2 \times 10^2$  および  $4.1 \times 10^3$  CFU の接種のどちらにおいても、接種後 21 時間から検出された。この時点での *S. aureus* の菌量は  $10^5$  CFU/ml であり、ペプチドグリカンは *S. aureus*  $10^3$  CFU/ml 以上で検出可能と考えられた。

### 4. *S. epidermidis* 接種による増殖態度およびペプチドグリカンの経時的変化 (Table 2)

*S. epidermidis* は接種後、経時的に増殖を示した。ペプチドグリカンは *S. epidermidis*  $3.9 \times 10^4$  CFU の接種後 24 時間から検出された。検出時点での *S. epidermidis* の菌量は、 $1.7 \times 10^5$  CFU/ml であった。 $8.7 \times 10^3$  CFU の *S. epidermidis* の接種後 24 時間での菌量  $1.8 \times 10^4$  CFU/ml では検出されなかったことから、ペプチドグリカンの検出には *S. epidermidis* の菌量で  $10^3$  CFU/ml 以上が必要と考えられた。

## 考 察

血液製剤中の白血球は発熱性サイトカインや生理活性物質を産生することによって、非溶血性発熱反応を発症したり、血球の障害をきたしたりする。一方、最近の成分採血由来血小板製剤中の混入白血球数は  $10^5 \sim 10^6$  レベルまで減少し<sup>3)</sup>、細菌貪食能を有する顆粒球や単球の比率も極めて少ないことが報告されている<sup>4)</sup>。

このような混入白血球数の低下は輸血による白

血球関連の副作用が減少する一方で、保存中の細菌貪食能も低下し、混入した菌種、菌数によっては室温保存の血小板製剤中で細菌増殖が急速に起こり、輸血後敗血症の原因となる可能性がある。製剤中への細菌の混入、増殖は、穿刺部分の不十分な消毒、供血時の無症候性菌血症、採血バッグの汚染、血液保存の不良などによって起こる。混入した細菌は、白血球や血漿中の成分、また冷蔵保存により不活化や増殖抑制が起こるが、室温で保存される血小板製剤では生き残った細菌は指数関数的に増殖する。汚染血液製剤における敗血症は菌数  $10^3 \sim 10^8$  CFU/ml 以上で発症するとされている<sup>5)</sup>。

Heal らは、無症候性菌血症のドナーからの血液製剤によって輸血後敗血症により死亡した症例を報告している<sup>6)</sup>。本邦でも、血小板採取装置により採取した血小板製剤がグラム陽性桿菌 (*B. cereus*) に汚染された事例<sup>7)</sup>、肺炎球菌 (*S. pneumoniae*) に汚染された血小板製剤輸血後に死亡した症例も報告されている<sup>8)</sup>。今回、我々は血小板製剤への細菌接種実験を行い、菌種、接種菌量による血漿中の細菌の増殖態度および検出時期について検討するとともに、製剤中のエンドトキシンおよびペプチドグリカンの変動についても検討を加えた。

*E. coli* の接種では、接種後に測定したすべての時期でエンドトキシンが検出され、その時の菌数の最低値は 40 CFU/ml であった。

ペプチドグリカンは、*S. aureus* 40~120 CFU の接種後 21 時間から検出された。*S. epidermidis* では  $3.9 \times 10^4$  CFU の接種で接種 24 時間後に検出され

た。

Myhre らの報告<sup>9)</sup>では, *S. epidermidis* は接種細菌数が  $10^3$  個以下の場合菌は死滅してしまい,  $10^4 \sim 10^6$  個の接種では最初の 24 時間は増殖が抑制されているものの, その後徐々に増殖が認められるとしている。ペプチドグリカンは, *S. aureus* および *S. epidermidis* のどちらにおいても増殖細菌数が  $10^5$  CFU/ml 以上になった場合に検出可能と考えられた。接種した菌種, 菌株, 菌量によって増殖特性に差が認められると考えられた。

簡便な細菌汚染確認法として, 外観試験, 尿検査試薬紙法があるが, 菌数が  $10^7$  CFU/ml 以下では検出は不可とされている<sup>10)</sup>。

佐藤らは, *Y. enterocolitica* を RC-MAP に接種し, 血液中の *Y. enterocolitica* 増殖態度とエンドトキシン産生の関係について報告している<sup>11)</sup>。グラム陰性菌特有の細胞壁毒素エンドトキシンはエンドトキシンショックによる敗血症の原因となるという報告もある<sup>12)</sup>。また, 血小板製剤中の細菌汚染に起因する輸血後敗血症の多くは, 皮膚に常在するコアグララーゼ陰性のブドウ球菌によるとされている<sup>13)</sup>。エンドトキシンおよびペプチドグリカンはこれらの血液製剤における細菌混入の影響を評価する方法にも使用できるとされる。さらに, 短時間で測定できることから, 外観検査よりも早期に細菌混入の指標になると思われ, 副作用の原因調査にも利用出来ると考えられた。

#### 文 献

- 1) Goldman, M., Blajchman, M.A. : Blood product-associated bacterial sepsis. *Transfusion Med.*, 5 : 73—83, 1991.
- 2) Sazama, K. : Bacteria in blood for transfusion. *Arch Pathol Lab Med.*, 118 : 350—364, 1994.
- 3) Takahashi, T.A., Hosoda, M., Abe, H., et al. : Comparison of highly sensitive methods used to count residual leukocytes in filtered red cell and platelet concentrates. *Clin. Appl. Leuk. Dep.*, 77—91, 1993.
- 4) Cullis, H.M. : Collection of leukocyte-depleted platelets using CS-3000 Plus separator and TNX-6 chamber. *Clin. Appl. Leuk. Dep.*, 3—17, 1993.
- 5) Burstain, J.M., Brechr, M.E., Faber, G.H., et al. : Rapid identification of bacterially contaminated platelets using reagent strips : glucose and pH analysis as markers of bacterial metabolism. *Transfusion*, 37 : 255—258, 1997.
- 6) Heal, J.M., Singal, S., Sardisco, E., et al. : Bacterial proliferation in platelet concentrates. *Transfusion*, 26(4) : 391—393, 1986.
- 7) 三谷孝子, 橋本浩司, 千葉真彰, 他 : 濃厚血小板製剤の細菌汚染—血小板献血由来血小板製剤で経験した一時例一. *日本輸血学会雑誌*, 42 (6) : 294—298, 1996.
- 8) 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敗血症ショックと横紋筋融解症の致死合併例. *臨床血液*, 44 : 381—385, 2003.
- 9) Myhre, B.A., Walker, L.J., White, M.L. : Bacterial properties of platelet concentrates. *Transfusion*, 14(2) : 116—123, 1974.
- 10) 橋本浩司, 布施ひとみ, 須合奈留美, 他 : 血小板製剤における簡便な細菌汚染確認法の評価. *血液事業*, 22 : 491—497, 2000.
- 11) 佐藤充彦, 名雲英人, 日野 学, 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一. *日本輸血学会雑誌*, 40(1) : 32—38, 1994.
- 12) 石山 賢, 玉熊正悦 : 細菌汚染輸血によるエンドトキシンショック. *外科 Mook*, 13 : 58—64, 1980.
- 13) Wagner, S.J., Friedman, L.I. and Dodo, R.Y. : Transfusion-associated bacterial sepsis. *Clin. Microbiol. Reviews*, 32 : 290—302, 1994.

PRODUCTION OF ENDOTOXIN AND PEPTIDOGLYCAN IN PLATELET CONCENTRATES  
AFTER EXPERIMENTAL INOCULATION WITH BACTERIA

Mayumi Asada<sup>1)</sup>, Chiemi Sugano<sup>1)</sup>, Shiho Ito<sup>1)</sup>, Yoshiko Mine<sup>1)</sup>, Michiko Fujita<sup>1)</sup>, Yasushi Kanemitsu<sup>1)</sup>,  
Takashi Ashida<sup>1)2)</sup>, Kazuo Tsubaki<sup>3)</sup> and Akihisa Kanamaru<sup>1)2)</sup>

<sup>1)</sup>Division of Blood Transfusion, Kinki University Hospital

<sup>2)</sup>Division of Hematology, Department of Internal Medicine, Kinki University School of Medicine

<sup>3)</sup>Division of Hematology, Department of Internal Medicine, Nara Hospital,  
Kinki University School of Medicine

We studied the detection of endotoxin (ET) and peptidoglycan (PGL), as well as bacterial growth in platelet concentrates (PC) after experimental inoculation of PC bags with bacteria. ET could be detected after inoculation of  $9.6 \times 10^2$  CFU of *E. coli* when the concentration increased to more than  $10^2$  CFU/ml. PGL was detected 21 h after the inoculation of  $4.1 \times 10$  CFU of *S. aureus*, and also when *S. aureus* concentration increased to  $10^5$  CFU/ml. ET and PGL were not detected in any PC bags supplied by the Japanese Red Cross Blood Center (ET : n = 161, PGL : n = 210), so no side effects accompanying PC transfusion were recognized. Both ET and PGL could be measured rapidly, and detected much earlier than by the inspection of appearance. These variables may represent an index of bacterial contamination. In addition, they may be useful in analyzing the cause of side effects following the infusion of PC.

**Key words** : platelet concentrates, endotoxin (ET), peptidoglycan (PGL), bacterial contamination

---