

M-sol で調製した洗浄血小板および多血小板血漿 (PRP) 中での細菌増殖

平山 順一 東 寛 藤原 満博 秋野 光明 本間 稚広

加藤 俊明 池田 久實

濃厚血小板 (PC) により引き起こされる輸血副作用の防止には洗浄血小板が有効である。血漿には菌の増殖を抑制する補体成分が含まれているため、洗浄により血漿濃度が減少した洗浄血小板中では、菌の増殖が促進される可能性がある。本研究では、M-sol で調製した洗浄血小板中での菌の増殖動態を多血小板血漿 (PRP) 中でのそれと比較検討した。

PRP に菌を播種し (Day0), 20~24℃ で 24 時間振とう保存した後、PRP を 2 等分 (コントロール群とテスト群) した。テスト群の遠心上清を出来るだけ除去し、M-sol を添加した (Day1)。両群はポリオレフィンバッグ中で Day 7 まで保存した。菌数測定は寒天培地を用いたプレート法により行った。

PRP 中での場合と比較すると、洗浄血小板中では *Streptococcus dysgalactiae* や *Escherichia coli* の増殖は促進され、*Staphylococcus epidermidis* と *Staphylococcus aureus* の増殖は抑制された。洗浄血小板中での *Bacillus cereus* の増殖は PRP 中の場合とほとんど差がなかった。*Propionibacterium acnes* や *Serratia marcescens* の場合、PRP および洗浄血小板のいずれにおいても増殖しなかった。

M-sol で調製した洗浄血小板中で増殖が促進される菌株が存在するという点に注意が必要である。

キーワード：M-sol, 細菌増殖, 洗浄血小板

緒 言

血小板輸血において、血漿成分に由来する輸血副作用を繰り返す患者に対しては、濃厚血小板 (PC) の代替として洗浄血小板を使用することにより副作用の発症を防止することが可能である^{1)~4)}。以前われわれが開発した血小板保存液 M-sol は、市販輸液を無菌的に混合するだけで調製でき、血小板保存性能も優れているため、洗浄血小板調製のため現在いくつかの血液センターや医療機関で使用されている^{5)~10)}。

輸血による細菌感染は稀にしか発生しないが、20~24℃ で保存する血小板製剤の場合、低温で保存する赤血球製剤よりも細菌が増殖しやすく、特に注意が必要である。血清学的検査や核酸増幅検査はウイルスに対してのみであり、細菌には行われていない。血小板輸血による細菌感染リスクは病原体感染の重要な課題となっている^{11)~13)}。

血漿には殺菌作用を有する補体成分が含まれている。それ故、PC よりも血漿濃度の低い置換血小板 (血漿濃度：30~40%) や洗浄血小板 (血漿濃度：約 5%) に細菌が混在すると、輸血による細菌感染のリスクが大きくなるおそれがある。置換血小板において数種の菌で

増殖が促進されたという報告がある^{14)~16)}。

PC および M-sol で調製した洗浄血小板に対して同数の菌を播種し、増殖動態の比較検討を行った結果、洗浄血小板中で増殖が促進される菌や逆に抑制される菌が存在することを既に報告した¹⁷⁾。しかし洗浄操作は PC を調製した翌日または翌々日に行われることが多く、既報の実験系では洗浄されるまでの間に血漿が菌に及ぼす影響について考慮されていない。穿刺時に混入した感染例¹⁸⁾や血液バッグなどの汚染に起因した感染例も報告されており¹⁹⁾²⁰⁾、そのような場合、洗浄するまでの間に殺菌される可能性もある。また洗浄操作そのものが菌数や増殖に影響することも考えられる。本研究ではこれらの点を考慮した実験系により検討を行った。

方 法

期限切れ PC (採血後 4~5 日経過) と同型の新鮮凍結血漿 (採血後 6 時間以内に全血から調製し使用直前まで凍結保存) を混合することにより PRP (355±1 ml, 87.0±12.7×10⁴/μl) を調製した。M-sol は既報のとおり調製した⁵⁾⁶⁾⁸⁾¹⁰⁾。

本研究で使用した細菌は Table 1 に示した。P. acnes

Table 1 Test panel microorganisms

Organism	Source	Gram stain property
<i>Propionibacterium acnes</i>	ATCC#6919	positive
<i>Serratia marcescens</i>	ATCC#14756	negative
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC#10876	positive
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC#49134	positive
<i>Staphylococcus aureus</i>	NBRC13276	positive
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	Clinical Isolate	positive
<i>Escherichia coli</i>	ATCC#11775	negative

Table 2 Bacterial growth in PRP and washed PLTs (\log_{10} (CFU/ml))

	Day 0	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 7	n
<u><i>B. cereus</i></u>							
Control	0.60 ± 0.31	5.37 ± 0.47	7.29 ± 0.35	7.21 ± 0.39	NT	7.40 ± 0.64	6
Washed PLTs	NT	4.56 ± 1.09	7.10 ± 0.23	7.40 ± 0.26	NT	6.90 ± 0.60	6
<u><i>P. acnes</i></u>							
Control	0.56 ± 0.30	0.35 ± 0.22	NT	0.36 ± 0.32	NT	0.85 ± 0.65	5
Washed PLTs	NT	0.18 ± 0.27	NT	0.58 ± 0.34	NT	0.57 ± 0.40	5
<u><i>S. epidermidis</i></u>							
Control	0.63 ± 0.31	0.82 ± 1.18	2.83 ± 0.65	4.80 ± 0.48	6.03 ± 0.73	7.76 ± 0.61	7
Washed PLTs	NT	0.39 ± 0.48	2.65 ± 0.49	3.87 ± 0.64*	4.61 ± 0.88*	6.73 ± 0.60*	7
<u><i>S. aureus</i></u>							
Control	0.28 ± 0.14	0.17 ± 0.34	4.98 ± 0.94	6.44 ± 0.37	7.34 ± 0.66	7.69 ± 0.92	7
Washed PLTs	NT	0.43 ± 0.62	3.20 ± 0.35*	5.10 ± 0.64*	6.58 ± 0.70*	7.93 ± 0.62	7
<u><i>S. dysgalactiae</i></u>							
Control	0.27 ± 0.43	1.14 ± 1.12	3.48 ± 1.24	5.74 ± 1.31	NT	7.06 ± 0.54	7
Washed PLTs	NT	1.15 ± 0.82	5.18 ± 1.35*	7.31 ± 0.64*	NT	7.20 ± 0.42	7
<u><i>S. marcescens</i></u>							
Control	0.92 ± 0.17	<0	<0	<0	NT	<0	8
Washed PLTs	NT	<0	<0	<0	NT	<0	8

Data represent the mean ± S.D. NT = not tested. *P < 0.05 < 0 = under detectable limit

以外の好気性菌については、液体培地 (BacT/ALERT BPA, BIOMERIEUX Inc., USA) により好气的条件下で一晩振とう培養 (37°C) した。 *P. acnes* (嫌気性菌) は液体培地 (BacT/ALERT BPN, BIOMERIEUX Inc., USA) により嫌气的条件下で振とうせずに 72 時間以上培養 (30°C) した。このように培養された菌を PRP に播種した (Day0)。菌が播種された PRP を 22~24°C で 24 時間振とう保存 (50~60 回/分) した後、2 分割 (コントロール群とテスト群) した (Day1)。テスト群の遠心 (2,560g, 10 分) 上清を除去し M-sol を添加した。コントロール群 (171 ± 6ml, 血漿 100%) とテスト群 (171 ± 3ml, 血漿 4.19 ± 1.63%) は引き続き Day7 まで振とう保存した。保存にはポリオレフィン製血液バッグ (KBP1000FP および KBP600FPN, 川澄化学工業) を用いた。

Day0 (接種直後), 1, 2, 3, 4, 7 に各バッグから無菌的にサンプルを採取し、希釈法により寒天培地上に塗布し、培養後に出来たコロニーの数を計測することにより菌数を算出した。 *P. acnes* 以外はトリプトソーヤ寒天培地 (日本製薬) を用い好气的条件下 37°C で 24 時間 (*S. dysgalactiae* は 48 時間) 培養した。 *P. acnes*

は血液寒天培地 (プルセラ HK 寒天培地, 極東化学) を用い嫌气的条件下 30°C で 7 日間培養した。

コントロール群とテスト群の間の統計処理は Two-tailed paired t-test により行った。P 値 0.05 未満を有意差ありとした。

結 果

本研究では 7 種の菌について検討を行った (Table 1)。唯一の嫌気性菌である *P. acnes* は、コントロール群とテスト群のいずれの場合においても好气的条件下での 7 日間保存中にほとんど増殖しなかった。両群の菌数間に有意差はなかった (Table 2)。

S. marcescens の場合、菌接種直後の菌数は 0.92 ± 0.17 \log_{10} (CFU/ml) であったが、両群において Day1, 2, 3, 7 で検出限界以下であった (Table 2)。

B. cereus はいずれの群においても経時的に増殖し、その速度は 7 種の中で最も速かった。7 日間の保存中、コントロール群とテスト群の菌数の間に有意差はなかった (Table 2)。

S. epidermidis も両群において経時的に増殖したが、テスト群の菌数はコントロール群よりも Day3, 4, 7

Table 3 Growth of *E. coli* in PRP and washed PLTs (\log_{10} (CFU/ml))

	Day 0	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 7	n
<i>E. coli</i> (Exp.#1, 4, 5, 8)							
Control	0.51 ± 0.20	<0	<0	<0	<0	<0	4
Washed PLTs	NT	<0	<0	<0	<0	<0	4
<i>E. coli</i> (Exp.#6)							
Control	0.301	<0	<0	<0	<0	<0	1
Washed PLTs	NT	<0	1.47	5.70	7.90	7.85	1
<i>E. coli</i> (Exp.#7)							
Control	1.778	<0	<0	<0	<0	<0	1
Washed PLTs	NT	1.00	5.45	7.45	7.60	8.20	1
<i>E. coli</i> (Exp.#2)							
Control	0.954	0.301	2.28	3.58	5.85	7.78	1
Washed PLTs	NT	1.301	6.43	7.81	7.60	8.00	1
<i>E. coli</i> (Exp.#3)							
Control	1.778	1.30	3.15	4.36	7.48	7.30	1
Washed PLTs	NT	0.78	5.15	7.15	7.78	7.60	1

Data represent the mean ± S.D. NT = not tested. <0 = under detectable limit

で有意に低かった。同様に *S. aureus* もテスト群の菌数はコントロール群よりも Day2, 3, 4 で有意に低かった (Table 2)。

S. dysgalactiae も両群で経時的に増殖したが、テスト群の菌数はコントロール群よりも Day2, 3 で有意に高かった (Table 2)。

E. coli に関しては 8 例 (n=8, Exp#1~8) の実験を行った。Exp#1, 4, 5, 8 の場合、PRP に接種直後 (Day 0) の菌数は $0.51 \pm 0.20 \log_{10}$ (CFU/ml) であったが、両群において Day1 以降検出限界以下であった (Table 3)。Exp#6, 7 の場合、テスト群では経時的に菌は増殖したが、コントロール群は Day1 以降検出限界以下であった (Table 3)。Exp#2, 3 の場合、両群で経時的に菌は増殖したが、Day2 以降でテスト群の方が菌数は多かった (Table 3)。

考 察

PRP および洗浄血小板中での 7 種の菌 (グラム陰性菌 2 種, グラム陽性菌 5 種) の増殖動態について比較検討を行った。洗浄 24 時間前に菌を PRP に接種した本実験系では、グラム陰性菌である *S. marcescens* の場合、PRP および洗浄血小板いずれにおいても Day1 以降検出限界以下であった (Table 2)。以前われわれが行った PRP および洗浄血小板に対して菌を播種した実験系の場合、洗浄血小板中では増殖したが PRP 中では増殖しなかった¹⁷⁾。グラム陰性菌は特に血漿の影響を受けやすい。PRP に播種してから洗浄するまでの 24 時間の間に *S. marcescens* が血漿中の補体成分などによって殺菌されたものと考えられる。

E. coli (グラム陰性菌) の増殖動態は、1) 両群で増殖しなかった、2) 洗浄血小板中でのみ増殖した、3) 両群で増殖したが洗浄血小板中の方が増殖が速かった、

の 3 つのパターンに分かれた (Table 3)。1) の場合は PRP に播種してから洗浄を行うまでの 24 時間の間に殺菌されたものと考えられる。2) の場合、播種後 24 時間は殺菌もされず増殖もしない静菌的な状態にあったが、2 分割後、PRP 中の場合のみで殺菌され、テスト群は洗浄により血漿濃度が低下したため増殖が開始したと考えられる。3) の場合は血漿濃度の違いが反映され、血漿濃度の低い洗浄血小板中でより早く増殖したと考えられる。増殖動態が 3 パターンに分かれたのは、各実験で使用した血漿の個体差が反映されたためであろう。血漿の細菌増殖抑制効果に個体差があるのは杉浦らの報告¹⁴⁾でもみられた (PRP に播種した *E. coli* が 3 例中 1 例で増殖した)。

グラム陽性菌である *S. dysgalactiae* の場合も、洗浄血小板中の方が Day2 と Day3 で有意に菌数が多かったが、*E. coli* の場合の Exp#2, 3, 6, 7 ほど顕著な差ではなかった (Table 2)。血漿の影響は *S. marcescens* や *E. coli* の場合ほど大きくないと考えられる。

一方、*S. epidermidis* および *S. aureus* の場合は洗浄血小板中で増殖が抑制された (Table 2)。PC に鉄イオンのキレート剤を添加すると *S. epidermidis* および *S. aureus* の増殖が抑制された、という報告がある²¹⁾。鉄イオンはこれらの菌の増殖にとって不可欠な栄養素である。洗浄によって鉄イオンの濃度が減少したために *S. epidermidis* や *S. aureus* 増殖が抑制されたものと考えられる。これら 2 種のグラム陽性菌の場合、血漿が減少することによる増殖促進効果よりも、鉄イオンなど必須栄養素が減少することによる増殖抑制効果の方が菌の増殖に対してより大きく影響しているであろう。

今回の実験系での実験結果と以前行った実験系でのそれを比較すると¹⁷⁾、*S. marcescens* では顕著な違いが

あったものの、その他の菌については大きな違いはみられなかった。すなわち以前の系でも *S. dysgalactiae* (データ示さず) および *E. coli* は洗浄血小板中で増殖が促進され、*S. epidermidis* や *S. aureus* は洗浄血小板中で増殖が抑制され、*B. cereus* は PRP でも洗浄血小板中でも増殖速度に大きな違いはなく、*P. acnes* はいずれの場合も増殖しなかった¹⁷⁾。従って *S. marcescens* 以外の菌については、洗浄前の血漿中 24 時間培養や洗浄操作が増殖動態に大きく影響することはないと考えられる。

PRP の場合にくらべ、洗浄血小板中では菌の増殖が促進または抑制される場合があることを本研究で明らかにした。今回は期限切れ PC 由来の血小板を用いて実験を行ったが、今後は新鮮な PC 由来のものを用いた検討も必要であろう。いずれにしても洗浄により増殖が促進される菌株が存在するという点に注意が必要である。M-sol で調製した洗浄血小板は PC と同等以上の血小板保存性能を有するが、洗浄血小板の有効期限に関しては輸血による細菌感染という観点からの考慮が必要である。

謝辞：本研究を遂行するに当たり愛知県赤十字血液センターの方々からご協力及びご指導いただきましたことに深く感謝いたします。

文 献

- 吉田久博, 万木紀美子, 伊藤和彦, 他: 血小板保存液“セト液”の臨床応用. 日本輸血学会雑誌, 40: 589—592, 1994.
- 田中マサヨ, 百木圭子, 江川佐登子, 他: 洗浄血小板の機能と輸血効果. 血液事業, 23: 41—51, 2000.
- Vo TD, Cowles J, Heal JM, et al: Platelet washing to prevent recurrent febrile reactions to leucocyte-reduced transfusions. *Transfus. Med.*, 11: 45—47, 2001.
- Tobian AAR, Savage WJ, Tisch DJ, et al: Prevention of allergic transfusion reactions to platelets and red blood cells through plasma reduction. *Transfusion*, 51: 1676—1683, 2011.
- Hirayama J, Azuma H, Fujihara M, et al: Storage of platelets in a novel additive solution (M-sol), which is prepared by mixing solutions approved for clinical use that are not especially for platelet storage. *Transfusion*, 47: 960—965, 2007.
- 平山順一, 東 寛, 藤原満博, 他: 市販輸液製剤の混合物である新たな洗浄置換液 (M-sol) による血小板の保存. 日本輸血・細胞治療学会誌, 54: 17—22, 2008.
- Azuma H, Hirayama J, Akino M, et al: Reduction in adverse reactions to platelets by the removal of plasma supernatant and resuspension in a new additive solution (M-sol). *Transfusion*, 49: 214—218, 2009.
- 秋野光明, 平山順一, 田村 暁, 他: 洗浄・置換血小板に用いる洗浄置換液 (M-sol) の製造と保存. 日本輸血・細胞治療学会誌, 56: 365—372, 2010.
- Hirayama J, Azuma H, Fujihara M, et al: Comparison between in vitro qualities of platelets washed with commercially available additive solutions and those washed with M-sol. *Vox Sanguinis*, 99: 131—135, 2010.
- 日本輸血・細胞治療学会ホームページ: 洗浄・置換血小板の適応およびその調製の指針 <http://www.jstmct.or.jp/jstmct/Guideline/Reference.aspx?ID=9> (2011 年 1 月現在).
- 高橋雅彦, 名雲英人, 佐竹正博: 輸血による細菌感染症. 臨床検査, 48: 1131—1140, 2004.
- Blajchman MA, Beckers EA, Dickmeiss E, et al: Bacterial detection of platelets: current problems and possible resolutions. *Transfus. Med. Rev.*, 19: 259—272, 2005.
- 高橋雅彦, 名雲英人: 輸血用血液の細菌汚染と敗血症. 日本輸血・細胞治療学会誌, 54: 359—371, 2008.
- 杉浦さよ子, 高橋 勲, 平山順一, 他: 血液事業, 32: 9—16, 2009.
- Greco CA, Zhang JG, Kalab M, et al: Effect of platelet additive solution on bacterial dynamics and their influence on platelet quality in stored platelet concentrates. *Transfusion*, 50: 2344—2352, 2010.
- Dumont LJ, Wood TA, Mousman M, et al: Bacterial growth kinetics in ACD-A apheresis platelets: comparison of plasma and PAS III storage. *Transfusion*, 51: 1079—1085.
- Hirayama J, Azuma H, Fujihara M, et al: Comparison between bacterial growth in platelets washed with M-sol and that in platelet rich plasma. *Transfusion*, 51: 1592—1594.
- Gibson T, Norris W: Skin fragments removed by injection needles. *Lancet*, 2: 983—985, 1958.
- Hogman CF, Fritz H, Sandberg L, et al: Posttransfusion *Serratia marcescens* septicaemia. *Transfusion*, 33: 189—191, 1993.
- Hogman CF, Engstrand L: Serious bacterial complications from blood components-how do they occur? *Transfus Med.* 8: 1—3, 1998.
- Kim CM, Shin SH: Effect of iron-chelator deferiprone on the in vitro growth of staphylococci. *J. Korean Med. Sci.*, 24: 289—295, 2009.

BACTERIAL GROWTH IN PLATELETS WASHED WITH M-SOL AND THAT IN PLATELET RICH PLASMA

Junichi Hirayama, Hiroshi Azuma, Mitsuhiro Fujihara, Mitsuaki Akino, Chihiro Homma,

Toshiaki Kato and Hisami Ikeda

Hokkaido Red Cross Blood Center

Abstract:

Platelets (PLTs) washed with additive solution are useful for reducing adverse reactions induced by PLT concentrate (PC) transfusion. Since plasma contains certain complement components that inhibit bacterial growth, decreasing the plasma concentration by washing PC may promote bacterial growth in washed PLTs. Here, we compared bacterial growth in PLTs washed with M-sol with that in PLT rich plasma during a 7-day storage period.

Bacterial culture was inoculated into PRP (Day 0). After storage at 22-24°C on a flatbed shaker for 24 hours, PRP including bacteria was divided into two equal aliquots (control group and test group) on Day 1. After centrifugation of the test group, as much of the supernatant as possible was removed, and then the pellet was suspended in M-sol. Both groups were stored in polyolefin bags as described above until Day 7. To count bacterial colonies, aliquots were sampled from both groups and plated on agar plates.

Compared with that in PRP, the growth of *Streptococcus dysgalactiae* and *Escherichia coli* was promoted in washed PLTs, while that of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* was suppressed. The growth of *Bacillus cereus* in washed PLTs was comparable with that in PRP. There was no growth of *Propionibacterium acnes* or *Serratia marcescens* in either PRP or washed PLTs during 7 days of storage.

Consideration should be given to the presence of bacterial strains that are more prone to grow in PLTs washed with M-sol than in PRP.

Keywords:

bacterial growth, M-sol, washed platelet