

リムルス試験によるグラム陰性菌汚染血小板製剤の迅速検出

宮崎 卓¹⁾ 白木 喜子¹⁾ 中村 仁美²⁾ 相良 康子²⁾ 松崎 浩史¹⁾²⁾

血小板 (PC) 輸血に起因する細菌感染症は、輸血の安全性確保にとって長年の課題となっている。細菌汚染 PC による輸血副作用を低減化する試みとして、混入細菌の検出法の開発や細菌不活化の技術開発が進められてきた。これらの方法は細菌あるいは細菌に汚染された製剤の排除に有効であるものの、その多くには判定までに日数を要する、操作が煩雑である、特殊な装置を必要とするといった難点がある。輸血後細菌感染症の致死的な症例では高い確率でグラム陰性菌がその原因菌となっている。グラム陰性菌による細菌感染症では多臓器不全やショックの原因物質としてエンドトキシンが検出されるが、我々はグラム陰性菌とエンドトキシンの関係に着目し、リムルス試験のゲル化転倒法によりエンドトキシンを測定し、PC 中のグラム陰性菌汚染を迅速に検出する方法を考案した。本法は操作が簡便で短時間で実施でき、輸血直前にエンドトキシン試験を行うことにより、重篤な症状を引き起こす可能性のあるグラム陰性菌汚染 PC を高い確率で検出・排除することが可能である。

キーワード：リムルス試験、血小板製剤、細菌汚染、グラム陰性菌、エンドトキシン

緒 言

輸血用血小板製剤 (PC) は 20℃～24℃ で振とう保存され、この保存条件が細菌の増殖にも適しているため、PC の細菌汚染は輸血による重篤な副反応を引き起こす原因となっている。この PC の細菌汚染は輸血の安全性確保にとって長年の課題であり、細菌汚染 PC による輸血後感染症を低減化する試みとして、培養法¹⁾²⁾や核酸増幅法^{3)～5)}、イムノアッセイ³⁾⁶⁾、フローサイトメトリー⁷⁾などの細菌検出法が開発され、また UV 照射等による種々の細菌の不活化法⁸⁾⁹⁾が検討されてきた。これらの方法は細菌あるいは細菌に汚染された製剤の排除に有効であるものの、その多くには判定までに日数を要する、操作が煩雑である、特殊な装置を必要とするといった難点がある。日本赤十字社では、献血時の問診の強化、皮膚消毒の徹底、初流血除去、保存前白血球除去等の安全対策を行っているが、2008 年～2021 年に輸血による細菌感染の確定例が 21 例発生しており、そのうち 1 例が死亡事例であった。また 2022 年にも死亡事例 1 例が報告されており、いずれも原因菌はグラム陰性菌である。海外における死亡事例でも、原因菌の 75% 以上がグラム陰性菌であったとの報告がある¹⁰⁾¹¹⁾。グラム陰性菌による細菌感染例で、多臓器不全やショックを惹起する原因の多くはエンドトキシン¹²⁾である。我々はグラム陰性菌とエンドトキシンの関係に着目し、リ

ムルス試験のゲル化転倒法によりエンドトキシンを測定し、PC 中のグラム陰性菌汚染を簡便かつ短時間で検出する方法を考案した。

材料および方法

1. PC

輸血用血液製剤として製造された PC で、ALT 検査不合格の、採血から 3 日目のものを用いた。

2. エンドトキシンの定量

エンドトキシンの定量は、市販の Limulus Amebocyte Lysate (LAL) 試薬 (富士フィルム和光純薬) を用いたゲル化転倒法により行った。注射用蒸留水を用いて調製した 2 倍希釈系列の試料溶液について試験し、ゲル化する最大希釈倍率に LAL 試薬の表示力価 (0.015 EU/ml) を乗じてエンドトキシン濃度 (EU/ml) を求めた。

3. エンドトキシン試験における反応干渉因子試験

PC を注射用蒸留水で 100 倍～800 倍に希釈したものに、LAL 試薬付属のコントロール標準エンドトキシン (CSE) を添加した試料を用いて反応干渉因子試験を行った。反応干渉因子試験の方法は第 17 改正日本薬局方に従い、PC 3 ロットを用いて試験した。

4. 細菌株

Escherichia coli (NBRC 15034), *Escherichia coli*

1) 福岡県赤十字血液センター

2) 日本赤十字社九州ブロック血液センター

〔受付日：2023 年 3 月 31 日、受理日：2023 年 6 月 12 日〕

(PDI-3-18-00047), *Klebsiella pneumoniae* (PDI-3-17-00072), *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter) Migula (ATCC 27853), *Pseudomonas aeruginosa* (clinical isolate), *Serratia marcescens* (ATCC 14756), *Serratia marcescens* Bizio (ATCC 43862) の7種類の細菌株を用いた。IDにPDIが付いた細菌2株は、本邦における輸血副作用事例で検出され単離された臨床株である。

5. エンドトキシン検出法によるPC中のグラム陰性菌の検出感度

L-broth (LB) 3mlに、各細菌株のグリセリンストック 50 μ l~100 μ lを加え、37 $^{\circ}$ C (*S. marcescens* のみ 26 $^{\circ}$ C) 水浴中で16時間振とう培養した。この培養液をLBで 5×10^6 倍に希釈し普通寒天培地に100 μ l播種し、37 $^{\circ}$ C (*S. marcescens* のみ 26 $^{\circ}$ C)で24時間培養しコロニー数を計測した。また注射用蒸留水で400倍に希釈した細菌培養液を原点とする2倍希釈系列の被検溶液を調製し、エンドトキシン定量を行った。PCを試料とする場合には、後述のとおり反応干渉因子の影響を除くため注射用蒸留水で400倍に希釈する。LAL試薬の表示感度0.015EU/mlを乗じて得られる6EU/mlが本検討におけるPC中のエンドトキシンの検出限界となる。各細菌株の培養液について得られるコロニー数とエンドトキシン定量値から、6EU/mlに相当するコロニー数を算出し、PC中の細菌の検出限界とした。

6. PCへの細菌接種試験

(1) 接種用菌液の調製と接種量

前出の方法により各細菌株を培養し、培養液100 μ lをLBで適宜希釈し、6.3CFU/ml~ 3.22×10^3 CFU/mlの接種用菌液を調製した。採血時に混入する細菌量は5~62CFU/bag, 1CFU/ml以下と推定されているため^{13)~15)}、1バッグ200mlとして0.05CFU/ml(PCバッグ中)を基準接種量として設定し、基準接種量で細菌の増殖が認められない場合に適宜接種量を増やした。

(2) PCへの接種用菌液の接種と接種後の振とう培養

接種試験では細菌株、接種量毎にPC5ロットを用いたが、菌の増殖が認められない場合に接種量を増やす予備検討では適宜ロット数を減じた。

接種試験に用いるPCには無菌的に連結管を接続しPC内容物で満たし、連結管チューブを介して注射器で菌液の接種及びサンプリングを行った。1mlの菌液を接種したPCは水平振とう機に載せ、20~24 $^{\circ}$ Cで60回/分で振とうした。

(3) サンプリングと試験

菌液接種当日をday1とし、day5まで24時間毎に1mlをサンプリングし、直ちに氷中に置いた。この試料をLBで適宜希釈しコロニー数を計測した。また、同試料を注射用蒸留水で適宜希釈しエンドトキシン定量を行った。コロニー数計測では、day3(接種48時間後)

でコロニーが観察されない場合、接種した菌が死滅したと判定した。またday2でコロニーが観察されずday3から観察されるロットを増殖遅延ロットと定義した。

試料のサンプリング時に外観異常(スワーリングの消失または減弱、色調変化、凝集・凝固の発生、気泡の発生)の有無を目視により観察した。また異臭も外観異常に含めた。

7. エンドトキシン試験におけるインキュベート時間の検討

常法で60分であるインキュベート時間の短縮が可能かどうかを知るため、0.03EU/ml~0.25EU/mlの濃度のCSE溶液を用いて、インキュベーション時間とゲル化の濃度依存性を調べた。

結果

1. エンドトキシン試験における反応干渉因子試験

結果を表1に示す。PCを注射用蒸留水で100倍及び200倍に希釈した試料にCSEを添加した時、 3.00×10^{-2} EU/mlの濃度で添加した試料でもほとんどゲル化せず、PC中の共存物質がゲル化反応を阻害した。400倍及び800倍に希釈した試料では、注射用蒸留水と同様のゲル形成を示した。PCを試料とする場合、共存物質の影響を除くため注射用蒸留水で400倍に希釈することとした。

2. エンドトキシン検出法によるPC中のグラム陰性菌の検出感度

各細菌株の検出限界は 2.52×10^4 ~ 3.20×10^5 CFU/mlであった(表2)。

3. 接種された細菌の増殖

表3にday3での細菌増殖の状況をまとめた。基準接種量で試験した*E. coli* (NBRC 15034)では1ロットで死滅したが4ロットで正常に増殖した。*E. coli* (PDI-3-18-00047)では基準接種量で試験した3ロットとも増殖が認められず、基準接種量の20倍~100倍(0.9~5.7 CFU/ml)で接種した6ロットでも増殖が認められなかった。この菌株については更に5ロットに基準接種量の約200倍~300倍(9.4~14.8CFU/ml)で接種し、増殖が認められたのは2ロットで、内1ロットは増殖遅延であった。*K. pneumoniae* (PDI-3-17-00072)では2ロットで死滅したが、3ロットで正常に増殖した。基準接種量で試験した*P. aeruginosa* (ATCC 27853)では4ロットで死滅、1ロットで増殖遅延となったが、基準接種量の約10倍またはそれ以上(0.52~1.07CFU/ml)では、1ロットで死滅したものの4ロットで正常な増殖が認められた。*P. aeruginosa* (clinical isolate)と*S. marcescens* (ATCC 43862)では4ロットで正常に増殖し、1ロットで増殖遅延となった。*S. marcescens* (ATCC 14756)では試験した3ロットとも増殖が認め

表1 試料の希釈がPC中のエンドトキシン検出に与える影響

注射用蒸留水				
	CSE* ¹ 濃度 (EU/ml)	ゲル形成		
		試験 1	試験 2	試験 3
	0 (n.c.)	--	--	--
	3.75×10^{-3}	--	--	--
	7.50×10^{-3}	--	--	--
	1.50×10^{-2}	--	--	--
	3.00×10^{-2}	++	++	++
PC* ²				
希釈倍率	CSE* ¹ 添加濃度 (EU/ml)	ゲル形成		
		試験 1	試験 2	試験 3
×100	0 (n.c.)	----	----	----
	3.75×10^{-3}	----	----	----
	7.50×10^{-3}	----	----	----
	1.50×10^{-2}	----	----	----
	3.00×10^{-2}	----	----	----
×200	0 (n.c.)	----	----	----
	3.75×10^{-3}	----	----	----
	7.50×10^{-3}	----	----	----
	1.50×10^{-2}	----	----	----
	3.00×10^{-2}	----	----	-+--
×400	0 (n.c.)	----	----	----
	3.75×10^{-3}	----	----	----
	7.50×10^{-3}	----	----	----
	1.50×10^{-2}	----	----	----
	3.00×10^{-2}	++++	++++	++++
×800	0 (n.c.)	----	----	----
	3.75×10^{-3}	----	----	----
	7.50×10^{-3}	----	----	----
	1.50×10^{-2}	----	----	----
	3.00×10^{-2}	++++	++++	++++

*1 標準エンドトキシン (Control Standard Endotoxin)

*2 試験1～試験3についてそれぞれ1ロットずつの計3ロットを用いて試験を行った

表2 エンドトキシン検出によるPC中の細菌の検出限界 (CFU/ml)

<i>Escherichia coli</i> (NBRC 15034)	5.11×10^4
<i>Escherichia coli</i> (PDI-3-18-00047) *	2.78×10^4
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (PDI-3-17-00072) *	3.20×10^4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Schroeter) Migula (ATCC 27853)	4.20×10^4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (clinical isolate)	2.52×10^4
<i>Serratia marcescens</i> (ATCC 14756)	3.20×10^5
<i>Serratia marcescens</i> Bizio (ATCC 43862)	2.18×10^5

*本邦における輸血副作用事例で検出, 単離された臨床株

られず, 基準接種量の20倍 ($0.8 \sim 0.9 \text{CFU/ml}$) で接種した2ロットでも増殖が認められなかった。

4. 接種された細菌のPC中での増殖とエンドトキシンの検出

E. coli (NBRC 15034) の基準接種量における細菌の増殖曲線及び検出されるエンドトキシン量の推移を図1-1に示す。試験した5ロット中4ロットがday2から増殖し, コロニー数はday3で *E. coli* (NBRC 15034) の検出限界値 ($5.11 \times 10^4 \text{CFU/ml}$) を超え, day4で 10^8CFU/ml を超えた。エンドトキシンはday3からコロニー数の増加に伴い検出された。 *S. marcescens* (ATCC 14756) 以外の細菌株についてもほぼ同様の結果が得られた。細菌の増殖が認められたが^g day3でエンドトキシンを検出できなかった2例を図1-2に示した。 *P. aeruginosa* (clinical isolate) のLot2, *S. marcescens* (ATCC 43862) のLot4に増殖遅延が見られ, day3でのコロニー

表3 細菌接種濃度と day3 における細菌増殖の状況

細菌	接種濃度 CFU/ml in bag	試験ロット数	区分		
			正常に増殖*1	増殖遅延*2	死滅*3
<i>Escherichia coli</i> (NBRC 15034)	0.04 ~ 0.06	5	4	0	1
	0.5 ~ 1.0	5	5	0	0
<i>Escherichia coli</i> (PDI-3-18-00047)	0.03 ~ 0.08	3	0	0	3
	0.9 ~ 1.4	3	0	0	3
	2.1 ~ 5.7	3	0	0	3
	9.4 ~ 14.8	5	1	1	3
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (PDI-3-17-00072)	0.05 ~ 0.10	5	3	0	2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Schroeter) Migula (ATCC 27853)	0.03 ~ 0.04	5	0	1	4
	0.52 ~ 1.07	5	4	0	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (clinical isolate)	0.05 ~ 0.11	5	4	1	0
<i>Serratia marcescens</i> Bizio (ATCC 43862)	0.06 ~ 0.07	5	4	1	0
<i>Serratia marcescens</i> (ATCC 14756)	0.03 ~ 0.05	3	0	0	3
	0.8 ~ 0.9	2	0	0	2
ロット数合計		54	25	4	25

■ 基準接種量を接種した群

*1 day2 からコロニーが観察されたロット

*2 day2 ではコロニーが観察されず day3 でコロニーが観察されたロット

*3 day3 でコロニーが観察されなかったロット

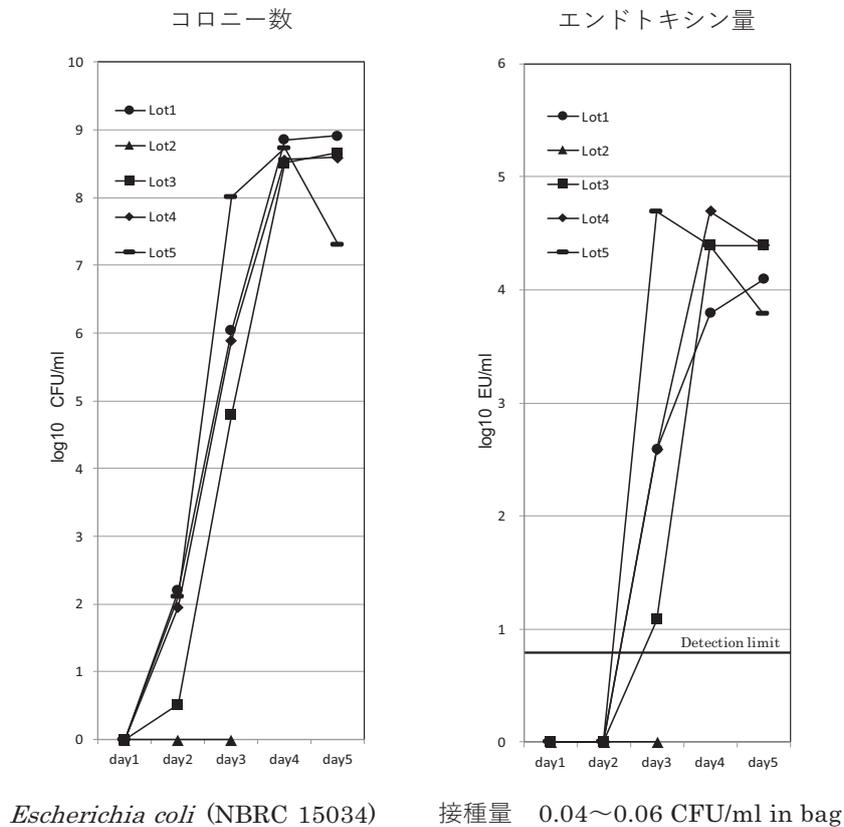


図1-1 PCに接種した細菌の増殖とエンドトキシンの検出

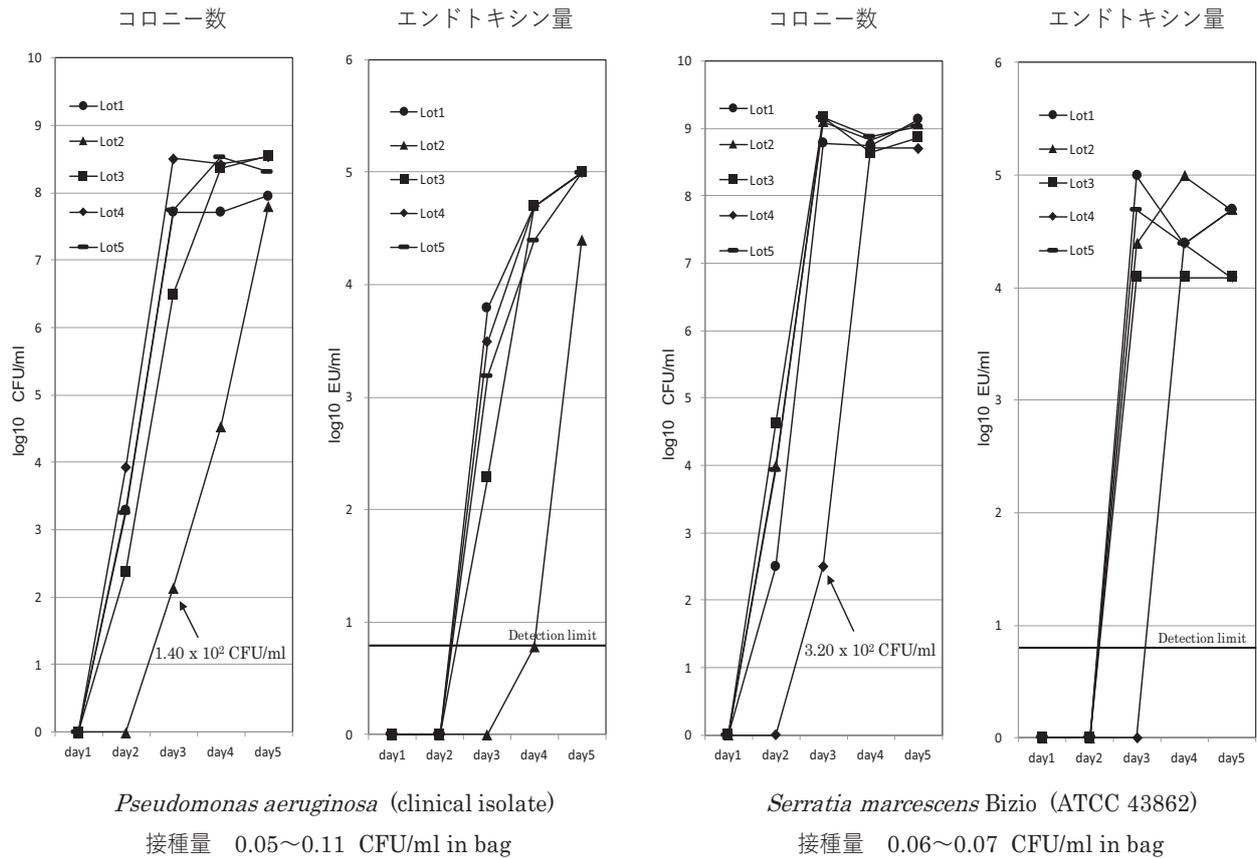


図 1-2 PCに接種した細菌の増殖とエンドトキシンの検出

数はそれぞれ 1.40×10^2 CFU/ml, 3.20×10^2 CFU/ml であった。

5. コロニー数とエンドトキシン量との相関

E. coli (NBRC 15034) の基準接種量例で, day3 におけるコロニー数とエンドトキシン量を常用対数変換し相関を調べた(図2)。 R^2 値が 0.9926 となり, 対数増殖期ではコロニー数とエンドトキシン量との間に高い相関があることが明らかとなった。

6. 外観検査結果

細菌接種試験で細菌が増殖したPCについて, 外観変化を検出できたロット数を表4に集計した。day2ではすべてのロットで外観変化は認められなかった。day3では *K. pneumoniae* の3ロット中2ロット, *S. marcescens* の5ロット中4ロットで何らかの外観変化が認められたのに比較して, *E. coli* では11ロット中1ロット, *P. aeruginosa* では10ロット中0ロットとほとんど外観変化が観察されず, 細菌種による違いが見られた。day4以後は *E. coli*, *P. aeruginosa* でも外観変化を示すロット数が増加したが, *P. aeruginosa* ではday5でも外観変化が観察されたのは10ロット中5ロットであった。

7. 外観試験とエンドトキシン試験の比較

表5にday3における外観試験による細菌汚染の検出とエンドトキシン試験による細菌汚染の検出を比較し

た。 *E. coli* や *P. aeruginosa* で何らかの外観変化が検出されたのは両者合わせて21ロット中1ロットであったが, 我々の系では増殖遅延の1ロットを除く20ロットでエンドトキシンが検出された。

8. インキュベーション時間とゲル化の関係

表6に被検溶液のエンドトキシン濃度及びそのエンドトキシン濃度に相当する *E. coli* (NBRC 15034) のコロニー数と, ゲル化に要するインキュベート時間の関係を示した。エンドトキシン濃度が高くなるにつれ短時間のインキュベートで検出可能であることが分かった。

考 察

血液中に混入した細菌の増殖を決定づける要因として, 細菌自体の血漿中の免疫能に対する感受性(plasma sensitivity) が報告されている¹⁶⁾¹⁷⁾。しかし我々の接種試験では, 通常の採血で混入すると思われる細菌量を接種した時, 同じ細菌株でも細菌が正常に増殖する例と全く増殖しない例, 増殖が遅延する例が混在した(表3)。これらの差異は細菌の特性ではなく献血者側の補体活性等の免疫能の違いに起因すると推測される。正常な増殖の場合には, 接種した細菌はday2からday4にかけて対数増殖し, 細菌数は急激に増加する。Jacobs

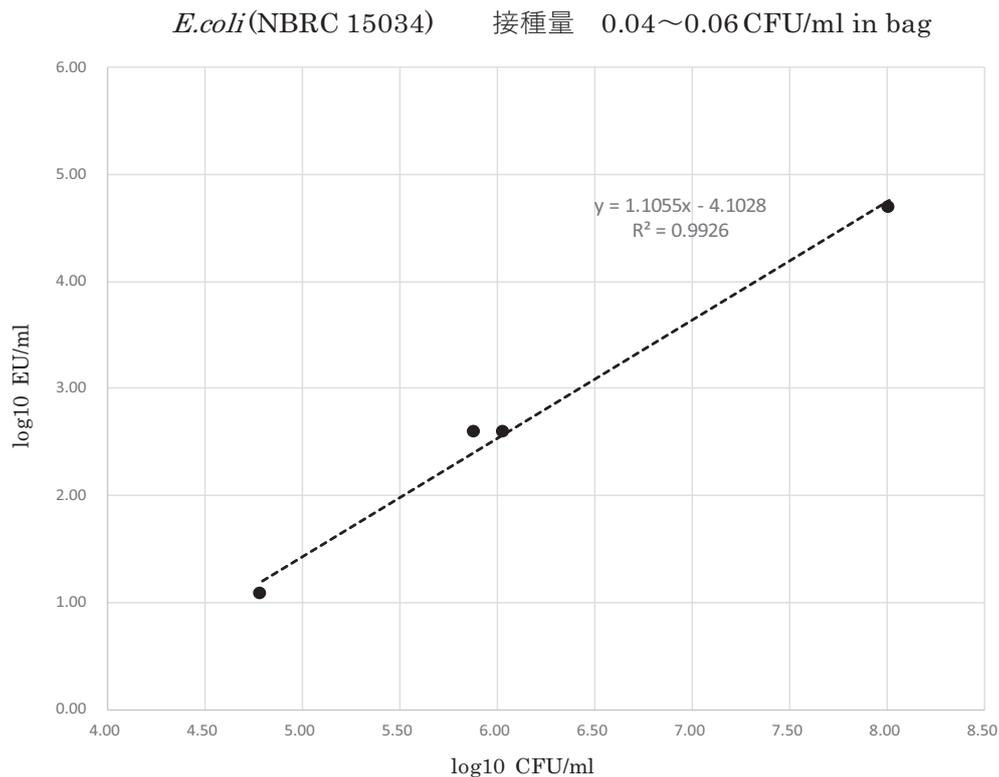


図2 day3における細菌数とエンドトキシン量の相関

等¹⁰⁾は、輸血による細菌感染での死亡例3例の原因菌はすべてグラム陰性菌で、その細菌濃度は 10^6 CFU/mlを超えていたと報告している。接種した細菌が正常に増殖した25ロット(表3)のうち23ロットでday3でのコロニー数が 10^6 CFU/mlを超えていた(データは示していない)。エンドトキシンは25ロットすべてで検出された。増殖遅延の2ロット(図1-2)ではday3でエンドトキシンが検出されなかったが、その時点でのコロニー数が 3.20×10^2 CFU/ml以下で、ほとんど臨床的な症状を惹起しない細菌濃度¹⁰⁾であった。

S. marcescens (ATCC 14756) と *E. coli* (PDI-3-18-00047) はPC中で増殖し難く(表3) plasma sensitivityが高い細菌株であると考えられる。特に *E. coli* (PDI-3-18-00047) は通常の採血時での混入量では死滅すると考えられるが、このような細菌株でも、輸血による細菌感染の原因菌たり得ることを示す例である。

グラム陰性菌汚染製剤での輸血副作用事例でエンドトキシン定量が行われている報告¹⁰⁾¹¹⁾¹⁷⁾では、あくまで致死的な症状を引き起こす生理活性物質の産生量として測定されており、細菌汚染の検出を目的として測定されている報告例は無い。エンドトキシンはグラム陰性菌の外皮を構成するリポ多糖(LPS)であり、通常的环境下では菌体そのものまたはその断片として存在するため¹²⁾、細菌の培養液を注射用蒸留水で希釈した系で

は、菌体あるいはその断片をエンドトキシン量として定量していると考えられる。しかし生体内ではLPS binding proteinのようなLPSと特異的に結合するタンパク質に結合・抽出され、複合体として生理活性を示すとされており^{12)18)~21)}、PCに接種された細菌のエンドトキシンが、増殖する過程でどのような形態で存在するのかは明らかでない。しかし今回、対数増殖期では細菌量と検出されるエンドトキシン量に高い相関があり(図2)、エンドトキシンを測定することにより細菌汚染PCを正確に検出・排除し得ることを初めて明らかにした。

細菌汚染の簡便な検出法として外観試験が行われているが、外観異常を認めないPCによる死亡事例も起きており信頼性は高くない。我々の検討でも外観変化を呈し難い細菌種があることが明らかとなったが、そのような細菌種でもエンドトキシンを検出できており、エンドトキシン試験により、外観試験では発見が困難な細菌汚染製剤を高い確率で検出・排除することが可能であることが分かった。

エンドトキシン試験によるPC中の細菌汚染の検出は、輸血直前に実施できるよう簡便かつ短時間で実施することが望ましい。リムルス試験のゲル化転倒法は試験操作及び判定は簡便であるが、常法では60分間のインキュベーションが必要である。このゲル化反応はエンドトキシン濃度が高くなるにつれ必要なインキュベーション

表4 細菌接種後のPCの外観試験結果

細菌	接種量 CFU/ml in bag	外観変化	外観変化を呈したロット数/ 細菌増殖が確認されたロット数			
			day2	day3	day4	day5
<i>Escherichia coli</i> (NBRC 15034)	0.04 ~ 0.06	スワーリング消失/減弱	0/4	0/4	4/4	4/4
		色調変化	0/4	0/4	1/4	2/4
	0.5 ~ 1.0	凝固	0/4	0/4	0/4	1/4
		スワーリング消失/減弱	0/5	1/5	5/5	5/5
<i>Escherichia coli</i> (PDI-3-18-00047)	9.4 ~ 14.8	色調変化	0/5	0/5	5/5	5/5
		スワーリング消失	0/1	0/2	2/2	2/2
計			0/10	1/11	11/11	11/11
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (PDI-3-17-00072)	0.05 ~ 0.10	スワーリング消失/減弱	0/3	2/3	3/3	3/3
		気泡発生	0/3	1/3	3/3	3/3
		凝集	0/3	0/3	0/3	2/3
		色調変化	0/3	1/3	1/3	1/3
計			0/3	2/3	3/3	3/3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Schroeter) Migula (ATCC 27853)	0.03 ~ 0.04	スワーリング消失/減弱	0/1	0/1	0/1	0/1
		色調変化	0/1	0/1	0/1	0/1
	0.52 ~ 1.07	スワーリング消失/減弱	0/4	0/4	1/4	3/4
		色調変化	0/4	0/4	2/4	2/4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (clinical isolate)	0.05 ~ 0.11	微小凝集	0/4	0/4	0/4	2/4
		スワーリング消失/減弱	0/4	0/5	2/5	2/5
計			0/9	0/10	4/10	5/10
<i>Serratia marcescens</i> Bizio (ATCC 43862)	0.06 ~ 0.07	スワーリング消失	0/4	4/5	4/5	5/5
		気泡発生	0/4	2/5	0/5	1/5
		凝集	0/4	0/5	4/5	5/5
		異臭	0/4	0/5	0/5	4/5
計			0/4	4/5	4/5	5/5

計：何らかの外観変化を呈したロット数/同一細菌種内での細菌増殖が確認されたロット数の合計

表5 day3における外観試験とエンドトキシン試験による細菌検出の比較

細菌	接種量 CFU/ml in bag	検出されたロット数/ 細菌増殖が確認されたロット数	
		外観試験	エンドトキシン試験
<i>Escherichia coli</i> (NBRC 15034)	0.04 ~ 0.06	0/4	4/4
	0.5 ~ 1.0	1/5	5/5
<i>Escherichia coli</i> (PDI-3-18-00047)	9.4 ~ 14.8	0/2	2/2
計		1/11	11/11
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (PDI-3-17-00072)	0.05 ~ 0.10	2/3	3/3
計		2/3	3/3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Schroeter) Migula (ATCC 27853)	0.03 ~ 0.04	0/1	1/1
	0.52 ~ 1.07	0/4	4/4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (clinical isolate)	0.05 ~ 0.11	0/5	4/5
計		0/10	9/10
<i>Serratia marcescens</i> Bizio (ATCC 43862)	0.06 ~ 0.07	4/5	4/5
計		4/5	4/5

計：検出されたロット数の合計/同一細菌種内で細菌増殖が確認されたロット数の合計

表6 エンドトキシン濃度とゲル化時間の関係

被検溶液の エンドトキシン濃度	<i>E. coli</i> (NBRC 15034) コロニー数 (換算値)*	ゲル化反応							
		インキュベーション時間 (分)							
		10	15	20	25	30	35	40	45
0.03 EU/ml	1.03 × 10 ⁵ CFU/ml				--	--	±±	++	++
0.06 EU/ml	2.05 × 10 ⁵ CFU/ml			--	--	±±	++	++	
0.12 EU/ml	4.10 × 10 ⁵ CFU/ml		--	--	±±	++	++		
0.25 EU/ml	8.55 × 10 ⁵ CFU/ml	--	--	±±	++	++			

**E. coli* (NBRC 15034) の検出限界を算出した際のデータを用いて EU/ml を CFU/ml に換算した。

時間が短くなり、10⁶ CFU/ml の細菌は 25 分間で検出が可能である (表 6)。細菌の迅速検出法 (rapid detection methods) として PGDprime や BacTx などの検出キットがあり³⁾、前者は PC 検体への試薬の添加から判定までの試験時間が約 30 分、後者は PC 検体の前処理として溶解、ペレット化、ペプチドグリカンの抽出、中和の工程があり煩雑な操作が必要だが、前処理した試料と試薬との反応時間は 30 分以内である。本法もそれらと同等の時間で試験可能であり、PC 検体の前処理は注射用蒸留水での希釈のみで最も簡便である。

今回我々が構築したエンドトキシン検出系は、輸血直前に単独で実施可能な point-of-care test³⁾として位置づけられる。グラム陰性菌汚染 PC を簡便かつ短時間に、かつ高い確率で検出・排除することが可能であり、重篤な症状を引き起こす可能性のある輸血後感染症を未然に防止する有用な系である。本法ではグラム陽性菌の混入を検出できないが、日本赤十字社では培養法による製品スクリーニングを導入予定である。出庫前スクリーニングに、必要に応じて輸血直前に行うエンドトキシン試験を組み合わせれば、細菌汚染 PC による重篤な輸血後感染例の更なる減少が期待される。

著者の COI 開示：本論文発表内容に関連して特に申告なし

文 献

- Pietersz RNI, Reesink HW, Panzer S, et al: Bacterial contamination in platelet concentrates. *Vox Sang*, 106: 256—283, 2014.
- Kamel H, Ramirez-Arcos S, McDonald C: The international experience of bacterial screen testing of platelet components with automated microbial detection systems: An update. *Vox Sang*, 117: 647—655, 2022.
- Schmidt M, Ramirez-Arcos S, Stiller L, et al: Current status of rapid bacterial detection methods for platelet components: A 20-year review by the ISBT Transfusion-Transmitted Infectious Diseases Working. *Vox Sang*, 117: 983—988, 2022.
- Zweitzig DR, Riccardello NM, Pester JM, et al: A novel approach for rapid detection of bacterially contaminated platelet concentrates via sensitive measurement of microbial DNA polymerase activity. *Transfusion*, 54: 1642—1651, 2014.
- Garson JA, Patel P, McDonald C, et al: Evaluation of an ethidium monoazide-enhanced 16S rDNA real-time polymerase chain reaction assay for bacterial screening of platelet concentrates and comparison with automated culture. *Transfusion*, 54: 870—878, 2014.
- Jacobs MR, Smith D, Heaton WA, et al: Detection of bacterial contamination in prestorage culture-negative apheresis platelets on day of issue with the Pan Genera Detection test. *Transfusion*, 51: 2573—2582, 2011.
- Muller B, Walther-Wenke G, Kalus M, et al: Routine bacterial screening of platelet concentrates by flow cytometry and its impact on product safety and supply. *Vox Sang*, 108: 209—218, 2015.
- Cloutier M, Korte DD: Residual risks of bacterial contamination for pathogen-reduced platelet components. *Vox Sang*, 117: 879—886, 2022.
- Jutzi M, Taleghani BM, Rueesch M, et al: Nationwide Implementation of Pathogen Inactivation for All Platelet Concentrates in Switzerland. *Transfus Med Hemother*, 45: 151—156, 2018.
- Jacobs MR, Good CE, Lazarus HM, et al: Relationship between Bacterial Load, Species Virulence, and Transfusion Reaction with Transfusion of Bacterially Contaminated Platelets. *Clin Infect Dis*, 46: 1214—1220, 2008.
- Kuehnert MJ, Roth VR, Haley NR, et al: Transfusion-transmitted bacterial infection in the United States, 1998 through 2000. *Transfusion*, 41: 1493—1499, 2001.
- 棚元憲一：エンドトキシンと医薬品の品質管理. *Bull. Natl. Inst. Health Sci.*, 126: 19—33, 2008.
- Spindler-Raffel E, Benjamin RJ, McDonald CP, et al: Enlargement of the WHO international repository for platelet transfusion-relevant bacteria reference strains. *Vox Sang*, 112: 713—722, 2017.

- 14) Pearce S, Rowe GP, Field SP: Screening of platelets for bacterial contamination at the Welsh Blood Service. *Transfus Med*, 21: 25—32, 2011.
- 15) Murphy WG, Foley M, Doherty C, et al: Screening platelet concentrates for bacterial contamination: low numbers of bacteria and slow growth in contaminated units mandate an alternative approach to product safety. *Vox Sang*, 95: 13—19, 2008.
- 16) Taha M, Kyliuk-Price D, Kumaran D, et al: Bacterial survival in whole blood depends on plasma sensitivity and resistance to neutrophil killing. *Transfusion*, 59: 3674—3682, 2019.
- 17) Taha M, Kalab M, Yi Q-L, et al: Bacterial survival and distribution during buffy coat platelet production. *Vox Sang*, 111: 333—340, 2016.
- 18) Fujihara M, Muroi M, Tanamoto K, et al: Molecular mechanisms of macrophage activation and deactivation by lipopolysaccharide: roles of the receptor complex. *Pharmacol Ther*, 100 (2): 171—194, 2003.
- 19) Wurfel MM, Kunitake ST, Lichenstein H, et al: Lipopolysaccharide (LPS)-binding Protein Is Carried on Lipoproteins and Acts as a Cofactor in the Neutralization of LPS. *J Exp Med*, 180: 1025—1035, 1994.
- 20) Vesey CJ, Kitchens RL, Wolfbauer G, et al: Lipopolysaccharide-Binding Protein and Phospholipid Transfer Protein Release Lipopolysaccharides from Gram-Negative Bacterial Membranes. *Infect Immun*, May: 2410—2417, 2000.
- 21) Gioannini TL, Teghanemt A, Zhang D, et al: Isolation of an endotoxin-MD-2 complex that produces Toll-like receptor 4-dependent cell activation at picomolar concentrations. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101 (12): 4186—4191, 2004.

RAPID DETECTION OF GRAM-NEGATIVE BACTERIA-CONTAMINATED PLATELET CONCENTRATES USING THE LIMULUS TEST

*Takashi Miyazaki*¹⁾, *Yoshiko Shiraki*¹⁾, *Hitomi Nakamura*²⁾, *Yasuko Sagara*²⁾ and *Koji Matsuzaki*¹⁾²⁾

¹⁾Fukuoka Red Cross Blood Center

²⁾Japanese Red Cross Kyushu Block Blood Center

Abstract:

Bacterial infections resulting from platelet concentrate (PC) transfusion have been a longstanding issue in ensuring transfusion safety. In an attempt to reduce the adverse effects of transfusion caused by bacterial-contaminated PCs, development of methods to detect contaminating bacteria and techniques to inactivate bacteria have been promoted. Although these methods are effective in eliminating bacteria or bacteria-contaminated preparations, many of them have drawbacks such as requiring a number of days to determine the presence of bacteria, complicated operations, and special equipment. Gram-negative bacteria are the causative organisms in a high percentage of fatal cases of post-transfusion bacterial infection. Endotoxin is detected as a causative agent in multiple organ failure and shock in Gram-negative bacterial infection. We focused on the relationship between gram-negative bacteria and endotoxin and developed a rapid method to detect Gram-negative bacteria contamination in PCs by measuring endotoxin using the gel-clot technique of the Limulus test. This method is simple and quick to perform, and by performing the endotoxin test immediately before platelet transfusion, it is possible to detect and eliminate Gram-negative bacteria-contaminated PC that may cause serious symptoms with high probability.

Keywords:

Limulus test, platelet concentrates, bacterial contamination, gram-negative bacteria, endotoxin