保存血液に関する研究 輸血直前細菌汚染検知法の実験的研究

北 研

黒 川 正 治 佐 野 知 子

STUDIES ON SIMPLIFIED METHOD TO CHECK THE STORED BLOOD CONTAMINANTS IN BLOOD TRANSFUSION

By

Masaharu KUROKAWA and Tomoko SANO

Kitasato Institute

The relation between color reduction and the number of contaminants was investigated.

For the purpose of the identification of bacteria contaminated in stored blood, a small amount of samples was incubated overnight on culture media. But in practice, it is quite necessary to check the contaminants at the bed side of patients.

We adopted the reduction method of a suitable hydrogen acceptor by bacteria. 2,6-dichlorophenol indophenol was used as hydrogen acceptor. Glucose, pyruvate, lactate, formate and succinate were used as hydrogen donors, but the reduction was most active when glucose or succinate was used as hydrogen donor. Half ml of the supernatant of stored blood, 0.2ml of 1/10M of phosphate buffer at pH 6.0, 0.2 ml of 1/10 M glucose and 0.1 ml of 0.2 mg/ml of 2,6 dichlorophenol indophenol were mixed and incubated at 37°C. After 30 minutes' incubation, the absorption of 2,6-dichlorophenol indophenol at the wave length of 605 m μ was determined.

保存血液の細菌汚染に因る事故は、保存血液の利用上の重大な問題として、汚染の原因、汚染の時期、及び汚染菌の分類の研究¹⁾²⁾³⁾が繰返し論議されて来て居り、又事故防止の一手段として血液銀行に於いては採血後細菌検索を行うことが許さ

れている。がこの菌検索法は、保存初期に行われるので濃厚汚染の場合は検出されるのであるが、従来検討されて来た様に低温菌（水棲菌）軽い汚染をうけた場合は検出漏れのおそれがあり保存期間中に増殖してゆく可能性を否定することは出来ない。輸血事故防止の観点から輸血直前に無菌試験を行うのが最も確実であるが、培養操作に伴う繁雑性は時間的にも又労力的にも多くの困難を招き実際問題としては不可能な現状である。私共は、輸血直前に短時間に汚染の有無を検する方法の探求を目的として、汚染細菌の代謝産物の定性反応及び定量測定、代謝過程の酵素系の反応の測定及び保存期間中に於ける菌の消長等一連の実験を行つた。その結果、汚染菌の有する脱水素酵素により色素 2,6, d'chlorophenol indophenol（青色）を還元型色素（無色）に還元することを肉眼的に観察することが出来た。

実験材料

1) 使用菌株

① 汚染保存血より分離したものをを用いた（実験記号B—16—1）。寒天平板上にて室温7日培養の菌を用いて発育状態を検したところ27°Cにて良好、37°Cは不良、10°Cはやゝ良であつた。各温度に於ける発育状態を比濁測定した結果を表1—a。

表 1-a B-16-1 菌の各温度に於ける発育状態

温度 培養日数	4°	10°(室温)	27°C	37°C
24時間	0	0.025	0.180	0.013
2 日	0	0.125	0.217	0.013
4 日	0	0.146	0.320	0.015

表 1-b Y 菌の各温度に於ける発育状態

温度 培養日数	4°	27°C(室温)	37°C
24時間	0.015	0.017	0.007
2 日	0.053	0.042	0.008
4 日	0.060	0.068	0.006

数字は比色計の吸光係数

に記した。検鏡の結果は、双球菌状を呈し、大きさ $1.5 \times 0.5 \mu$ である。平板上には大小二種のコロニーを形成した。動物に対する毒性は、乾燥重量約 1mg でモルモット、 $\frac{1}{2}$ mg でラッテ、 $\frac{1}{4}$ mg でハムスター及びマウスを殺し、剖検所見では出血性敗血症の症状を呈した。同定の結果 *Pasteurella* と思われた。

② 水道水を人為的に培養して得た低温菌（実験記号 Y）で平板上に黄色不透明のコロニーを形成する。グラム陽性球菌で溶血作用はない。各温度に於ける発育状態を前記同様測定し、表 1-b に記した。

③ この他に対照として当室保存のブドウ球菌（K-372）及び大腸菌（松井）を使用した。

2) 保存血液

当血液銀行より分与された新鮮保存血を使用した。

実験方法及び結果

I. 細菌汚染により培地中に産生される代謝産物の測定

菌の発育に伴って産生される中間代謝産物として、乳酸、焦性ブドウ酸、分解産物として蛋白分解によつて生ずるアンモニア、遊離アミノ酸及び第一、第二アミン等のニンヒドリン陽性物質が考えられる。

実験方法は、保存血液上清を無菌的に 20ml づつ分注し、これに低温菌を接種、低温培養後、そ

の上清部分について定量分析⁴⁾⁵⁾したもので、その結果は汚染されたものに乳酸及び焦性ブドウ酸のいちごしい蓄積はみられなかつた。これ等は正常血液中に存在し、保存血各ロットにより含有量も異なる故、僅少の差では汚染の有無を論ずることは困難である。

次に、アンモニア、遊離アミノ酸及び第一第二アミン等の定性試験は、同上人為的に汚染を起さしめた保存血上清を用いて、Nessler 試薬、Ninhydrin 反応を行つた。何れも陰性であつた。又、菌の発育に伴う pH の低下は発育量が 6.1×10^4 個/ml に到達しても、A.C.D. の緩衝作用のため測定出来ない。

II. 汚染菌の脱水素酵素による色素の還元

基質として、コハク酸、乳酸、焦性ブドウ酸、ブドウ糖を用意し、常法に従つて水素受容体として methylene blue を用いた Thunberg tube 法を行つたところ、明らかに細菌汚染の保存血上清のみ脱色が認められたので、この事実を基礎として実験をすゝめた。

II-1) 実験条件の設定

色素還元系の実験条件としては次の項目について考察を行つた。

- 使用する色素
- 色素の濃度
- 基質
- 作用至適 pH

a. 使用する色素

酸化還元電位の異なる色素、2,6, dichlorophenol indophenol, methylene blue, phenosaflanine を用い、Thunberg tube を用いて実験した。実験に供した菌は、前述の汚染血より分離した低温菌を血漿中で 5°C、48 時間放置したものである。その結果 2,6, dichlorophenol indophenol, methylene blue は、30 分後に完全に還元型となり肉眼的に脱色したことが観察された。

次いで 2,6, dichlorophenol indophenol は電位が高いので（219 mV）、空気中に於いても自動酸化されない故、普通小試験管を用いて同様実験をくり返した。その結果脱色の程度を肉眼的に観

察する目的のためには、好氣的条件で色素還元系の実験を行つて差支えない結論に達した。但し、この様な好氣的条件では、反応即ち脱色は試験管底よりはじまり、上層部は最後まで色素の青色が残存するので、脱色の程度を比色によつて測定する時は誤差が大きくなり定量は比較的困難であつた。

以降の実験は、色素として2,6, dichlorophenol indophenol を使用し普通小試験管を用いた好氣的条件下で行つたものである。

b. 色素の濃度

色素の濃度と吸光係数との間に Lambert-Beer の法則の成立する限界は、比色計 Coleman, (Junior), キュベット 内径 7mm を使用した場合 20γ 以下であつたので終濃度 20γ となるよう 0.2 mg/ml に調整した。これはその10倍の濃度の溶液を作り氷室に保存し 6 カ月間使用した。又、この色素の比色には波長 605mμ を採用した。

c. 基質

ブドー糖、乳酸、コハク酸、焦性ブドー酸、蟻酸を用いて実験を行つたが、表 2 に示すように、15分間作用時の色素還元の活性度は、ブドー糖が最大で、蟻酸を除く他の基質は何れも優劣きめ難く基質も加えないでも同程度の活性を呈している(色素還元への活性度の読みについては後述、実験条件の項参照)。このことは血漿中より水素供与体として提供されるためであろう。なお血漿中には A.C.D. の一成分としてブドー糖が存在しているが保存期間の長短により消費されている場合が考えられるので、反応系の中には基質としてブドー

糖の添加を行つた。

d. 作用至適 pH

終濃度 M/15 の磷酸緩衝液を用いて pH 7.4～5.8 の間域に亘つて実験を行つた。その結果、pH が低い程反応は速かであつたが、5.6 以下になると色素自体が赤紫色に変ずる。pH 5.8 の緩衝液を用いた場合、反応系では血漿の緩衝作用により約 6.2～6.6 を示し、その間で実験を行つた。

実験条件について

これ等予備実験の結果を総括すると表 3 の如き反応系が成立した。即ち、今まで述べたような条件下で、酵素液(汚染保存血の上清部分)、基質(ブドー糖)、緩衝液(pH 5.8 磷酸緩衝液)をキュベットに加え、作用前10分間、37℃恒温槽で温度一定となしその後、水素受容体として色素 2,6 dichlorophenol indophenol を加え、直ちに攪拌後の比色計の吸光度を出発点とした。blank は最後にチオ硫酸ソーダを加えて完全脱色した場合の吸光度である。色素還元の活性度(脱色の度合い)で表示した。

表 3 色素還元の測定法

1.0ml	保存血液上清部分
1.0ml	M/10 ブドー糖溶液
0.15ml	pH 5.8 1 M 磷酸緩衝液
0.2ml	0.2 ml/ml 2,6 Dichlorophenol indophenol
作用条件	37℃30分間
比色	Coleman Junior
波長	605mμ

Ⅱ—2) 作用時間及び菌液濃度と色素還元能

実験的に低温菌 B—16—1 を用いて菌懸濁液を作り血漿を用いて倍数稀釋を行つて、各濃度の菌液について、5 分間隔の吸光係数を測定した。その結果は、図 1—a に示すように各濃度毎に作用時間 t と色素還元能 y の間に

$$\log y = -k \log t + \alpha$$

の近似曲線が得られた。従つて両対数グラフ用紙を用いて t 及び y の値をプロットすると作用開始後一定時間を経て、ほぼ直線にのることが表示されてくる(図 1—b)。

初速のおくれは、一連の実験に関しては濃度に

表 2 基質と脱色度との関係

作用時間	基 質	作用後の吸光度 (605mμ)	作用後の色素の濃度 γ/ml	脱色度 (%)
15分	ブドー糖	0.010	0.2	1.3
	乳 酸	0.032	0.8	5.3
	コハク酸	0.095	2.0	13.3
	焦性ブドー酸	0.062	1.4	10.0
	蟻 酸	0.205	4.6	30.6
	—	0.067	1.7	11.3
—	—	0.625	15.0	100.0

図 1-a 各濃度菌液の作用時間に伴う色素還元能の変化-I

図 1-b 各濃度菌液の作用時間に伴う色素還元能の変化-II (図 1-a, 時間及び吸光係数を log で表したもの)

逆比例しているが各実験毎にまちまちであつた。
Ⅱ-3) 肉眼的に脱色の認められる菌の濃度の限界

低温菌 2 株の菌懸濁液の血漿倍数稀釋液を用いて各濃度の菌液の色素還元能を検査した。作用時間 30 分で脱色が肉眼的に顕著に認められた菌液の濃度の限界は表 4 に示すように生菌数にして 1×10^4 個/ml であつた。但し、この場合用いた菌は 18 時間発育のものであり、稀釋後直ちに実験を行ったものである。

Ⅲ. 保存血液中に於ける汚染菌の態度
保存血液に或一定数の細菌が混入した場合 4 ~

表 4 脱色を認められる菌数の限界

菌の種類	原液の菌数	脱色の認められた稀釈度	菌数
Y	1×10^7	256倍	4×10^4
B-16-1	3×10^6	128倍	2.5×10^4

6℃の温度条件下で細菌はどのような態度をとるであろうか。低温菌 2 株、大腸菌、ブドウ球菌を用い、人為的に保存血液に汚染を起さしめて、一定時間毎にその一部を採取して生菌計算(正確にはコロニー形成能を有する菌数)を行つた。接種菌量は、10 倍稀釋段階として 1 ml 当り 1×10^6 個より零までとして広範囲にわたる汚染について汚染の傾向を探知しようとした。保存血液は型物質の影響を避ける意味で O 型を使用し、採血後直ちに均等に分注し菌を接種後 5℃に保存した。

その結果は図 2 及び表 5 に示すように、大腸菌、ブドウ球菌は日数を経るに従つて生菌数が減少し、1 週間以降もその状態を持續している。低温菌はこれと対稱的に保存初期には生菌数の減少がいちゞるしいが直ちに徐々に増殖を開始し、1 週間後には汚染された菌数を凌ぐ状態となりそのまゝ増殖を続けてゆくことが觀察された。

Fig. 2. Changes of the number of bacteria after inoculation in fresh whole blood containing A.C.D. solution

Ⅳ. 保存血液の人為的汚染度と色素還元能
低温菌を保存血液中に接種して、生存する菌数と色素還元能の関係を保存日数を追つて調べた。その結果は表 6 に示した。前述の如く新しい菌の有する肉眼的脱色の限界は 1×10^4 個/ml の濃度であつたが、長期間保存され且菌の消長が現われ

表5 保存血液中に於ける大腸菌（松井）の消長（5℃）

tube no	接種菌数/ml	保 存 日 数					
		24時間	3 日	7 日	14日	21日	45日
1							
2							
3		冊	冊	冊	冊	冊	冊
4	冊	3100	2600	3000	1700	450	13
5	5000~6000	240	240	290	130	9	0
6	642	31	16	11	16	1	0
7	86	2	0	0	2	0	0
8	7	2	0	0	0	1	0
9	2	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0

冊 はコロニー数 1×10⁴ 以上を表わす

表6 保存血液中に低温菌（Y，B-16-1）を人為的に汚染させた場合の汚染度（生菌数）と色素還元能（脱色度）

接種菌数	3 日 保 存				7 日 保 存				21 日 保 存			
	Y		B-16-1		Y		B-16-1		Y		B-16-1	
1×10 ⁶		+		+		+		+		+		+
1×10 ⁵		+	冊	+		+		+		+		+
1×10 ⁴	冊	+	1581	+	冊	+	冊	+		+		+
1×10 ³	145	—	279	—	1590	±	2000	+	12000	+		+
1×10 ²	7	—	31	—	190	—	411	—	3360	+	3000	+
1×10 ¹	1	—	13	—	13	—	41	—	235	+	318	+
1	0	—	2	—	0	—	4	—	4	—	27	+
0	0	—	0	—	0	—	0	—	0	—	0	+

数字は生菌数 冊は1×10⁴ 個以上の菌数 +，—は脱色度

ると色素還元の活性が増加して、遂には上清のみで色素還元をみる例もあった。しかしながら例外として全く脱色能を有しない場合もあったことを附記しておく。この2、3の例外を除いては全体として脱色能は培地中に菌が長時間存在した時活性が上る傾向を有していると思われた。

考 察

これ等一連の実験を通じて私共は低温保存時の細菌汚染の状態は菌移植後24時間に菌数は急速に減少すること、及び血液の殺菌力によつて移植された汚染菌の発育を完全に阻止することの出来る菌数は1 ml 当り10個以下であること、更に低温の影響で大腸菌・ブドウ球菌は30個程度も発育が

阻止されること等を知つた。低温保存の場合についてのみ追究したので、実際問題として保存中に室温に放置される機会に出遇えば、更に増殖を開始する危険性にさらされていることがわかつた。血液の殺菌性の問題は、白血球の喰菌作用及び血清中の殺菌因子⁶⁾⁷⁾が従来検討されて来た。白血球が喰菌作用を営む最良の条件は、流血中でも血管壁に附着した状態で偽足をのぼした細胞の運動性が高い時であるといわれ⁸⁾、適温も37℃である。又血清中の殺菌因子として、Properdin 系は15℃以上に於いて殺菌性を起生すると報告されている⁶⁾。従つて、血液の殺菌作用を高めるためには保存直後或一定時間37℃に保存することが望

ましい条件と考えられるし、又そうした条件下では汚染菌の発育を阻止出来る菌数も変ってくるであろう。

汚染保存血のこのような状態下での細菌検査は、所謂無菌試験によつて検出される。もし、血液の殺菌作用の最も高められた時期に無菌試験を行えば、検出漏れの危れをまぬがれないとも限らない。こゝに使用直前の細菌検査法の必要性を生じ、種々試みたわけであつたが、細菌の脱水素酵素による色素の還元について考察をすゝめる。

色素 2,6 dichlorophenol indophenol を水素受容体とし、ブドウ糖を水素供与体とした酵素の還元系に於いては、目的とする汚染菌以外の酸化還元酵素の存在を除いてやらなければならない。全血液中では、赤血球の解糖系で乳酸及び焦性ブドウ酸脱水素酵素をはじめ、2～3の脱水素酵素が存在するが、これは細胞中に於いて代謝が営まれ、血漿中には乳酸及び焦性ブドウ酸が放出されるので、遠心沈澱によつて赤血球を除くことにより反応系外に出すことが出来る。又白血球は、それ自体に非常に多くの脱水素酵素を有し、0～3℃保存の場合は、白血球が死滅してもなお脱水素酵素の活性は1週間保存後はその70～80%残存している⁹⁾から、長時間低温保存の場合は、全血より遠心沈澱によつて血球部分を除いても、死滅した白血球の細胞から、ミトコンドリアその他の粒子が浮出し、血漿中にあつてその粒子に附着した酵素による色素還元が行われる可能性が生じて来る。そこで、コントロール実験として、無菌的保存血液の上清部分について色素還元能の試験を行つたが、21日保存までは脱色することがなかつたから、無菌的に保存された場合は、白血球の影響はないものと思われる。

次に、肉眼的に脱色を認め得る菌数の最低限界が 1×10^4 の単位であること。これは菌数として非常に多いので、この程度の感度が細菌検査法としてどれ程の意味を持つかが問題である。がしかしこの実験に於いて興味ある問題は、汚染された血液の場合、保存時間が長くなりしかも菌数が増加する傾向にある状態にある時には、脱色を認

める菌数の最低限界は 1×10^2 の単位、即ち10個～100個の菌を検出することが可能となつて来ることである。これはおそらく、細菌の存在のために、それを喰菌した白血球が或いは細菌の何等かの影響をうけて白血球が崩壊し易い状態となり、ミトコンドリア、マイクロゾーム及び崩壊産物中の色素還元能を有する小粒子等が浮遊して血漿中に存在するためと解釋される。これも保存血液の成分が供血者によつて各々異つているために例えば喰菌能と細菌処理能の関連性、細菌処理能とミトコンドリア量の平行性とか数多くの因子を含んでいるので非常にむづかしい問題であろう。

まとめ

保存血液を使用直前に短時間で細菌汚染の有無を検索する方法の探求を目的として、汚染細菌の代謝産物及び分解産物の測定、代謝過程中的汚染菌の脱水素酵素活性の測定、及び保存期間中に於ける汚染菌の消長等について行つた実験について記述した。

その結果、保存の初期に於いては、血液の殺菌作用と低温の影響で汚染菌は一時減少するが、その後低温菌は増殖をはじめ、コントロールとしての大腸菌は低温のため増殖はないが温度が変れば増殖を開始する。

低温(5℃)での殺菌力は、菌の種類によつて異なるが10～100個/mlであつた。

汚染細菌の代謝産物及び分解産物として、乳酸・コハク酸・アミン・アミノ酸・アンモニア等の測定を行つたが、正常保存血との間にいちづるしい差を見出すのは困難と思われる。

汚染細菌の脱水素酵素により水素受容体としての色素 2,6 dichlorophenol indophenol を無色の還元型に脱色する能力の測定については、汚染の程度により差があるが新鮮菌の場合 1×10^4 r.i.、保存血中に長時間存在し増殖をはじめた状態の場合 1×10^2 /ml が測定の限界であつた。

文 献

- 1) 相磯、飯田、小島：血液と輸血，3，177（昭32）。
- 2) 山口：保存血の細菌汚染防止に関する研究。

- 血液と輸血, 4, 244 (昭33),
- 3) 小島: 保存血に於ける細菌汚染の実験的研究.
日本輸血学会誌, 7, 1 (1960),
- 4) S.B. Barker & W.H. Summerson: The colorimetric determination of lactic acid in biological material. J. Biol. Chem. 138, 535 (1941)
- 5) T.E. Friedemann & G.E. Haugen: Collection of blood for the determination of pyruvic and lactic acids. J. Biol. Chem. 144, 67 (1940), 147, 415 (1943)
- 6) A.C. Wardlaw & L. Pillemer: The properdin system and immunity. V. The bactericidal activity of the properdin system. J. Exp. Med 103, 553 (1956)
- 7) 平井: Properdin—血清中の殺菌性物質. 日本臨床, 17 (4), 651 (1959)
- 8) 榎本他: 白血球の貪食について, 日本血液学会誌, 22, 785 (1959)
- 9) Mitsuhashi 他: The use of 2,3,5, triphenyl tetrazolium chloride as a measure of the activity of phagocytes. J.J. Exp. Med. 28, 35 (1958)
-