

血液透析システムにおける透析液品質の維持向上に関する細菌叢の生態学的研究

(A) 透析液中に棲息する菌の増殖温度依存性および付着に及ぼす基材の影響解析

富岡敏一*1 大藪英一*2 坂元 仁*1 染川侑香*1 細井庸介*1 北野篤生*1 土戸哲明*1

*1 関西大学化学生命工学部 *2 越谷大袋クリニック

key words : 水棲菌, バイオフィーム, 増殖温度, 表面粗さ, 表面接触角

要 旨

現行の透析システムでは、透析液調製後、加温状態で配管を通じて供給されている。そこで、実用上可能な低温までの範囲での、各温度における単離菌の増殖温度依存特性を5種の単離菌について試験した。その結果、低温での増殖速度の低下とともに、増殖が開始されるまでの時間すなわちラグタイム（増殖誘導期間）にも温度依存性が認められた。

したがって、透析システム配管内の流れる液温度を低下させることで、配管内の生息菌の生育を抑制できることが示唆された。

現行の透析システムでは、各種材料を組み合わせで使用されている。それぞれの材料と汚染状況の関連を調査するべく、透析液中に代表的な材料片を浸漬させ、単離菌の1株について付着経過を検討した。その結果、親水性などの指標となる接触角より導かれる湿潤張力から、付着量は材料表面粗さ（Ra）に相関することがわかった。

したがって、透析治療の現場で透析液配管の材質について疎水性材料を選択するより、表面凹凸の少ない基材材料を選択したり、配管の中で接続部を含め凹凸の少ない施工を行う配慮が、生息菌対策として有効な手段であることが示唆された。

はじめに

透析液供給装置稼働中の施設の透析液から釣菌された微生物を、R2A培地を用いて培養した。単離された微生物について5種のグラム陰性菌を得、16S rRNA遺伝子の相同性により菌種を同定した。

昨年度は、それぞれの菌株について特性を把握するために文献調査を行うとともに、得られた菌株の天然培地での増殖を個別菌および混合系で測定、バイオフィーム形成能に関しても同様に測定を行った。その結果、混合培養系で一部の菌に片利共生が認められたことから、優占菌や利他的に共生する菌が存在すると、透析液中の菌数が増大¹⁾した。

透析液中の細菌汚染の制御方法としては、エンドトキシン捕捉フィルター（ETRF）によるろ過の組み合わせが用いられ、汚染状況が増悪すると消毒の強化が行われていた。しかしこの消毒強化が奏功せず、熱水や高濃度消毒薬の使用でむしろ器機基材の劣化や損傷を来す事例があった。経験的な対応の限界を迎えていると考えられる。

この原因は、水棲菌をすべて同じものと考え、汚染を生菌数やエンドトキシン値で見ていることに帰来する。バイオフィーム形成能の高いもの、増殖能の優れたものと配管中のどこが主な棲息部位であるか、個々

Physiological and ecological studies of the bacterial flora on maintaining and improving the quality of dialysate in hemodialysis system

(A) Analysis of temperature dependence of bacterial growth and analysis of the substrate on the cell adhesion

Department of Life Science and Biotechnology, Kansai University

Toshikazu Tomioka

Tetsuaki Tsuchido

Koshigaya Ohbukuro Clinic/Department of Microbiology and Immunology, Nippon Medical School

Eiichi Osono

のバイオフィーム特性からどのような洗浄が有効かを見極めた対策はとられていない²⁾。

本年度は、形成されたバイオフィームの配管基材への付着性能および形成過程を調査すること、さらに配管基材の種類の影響を検討することとし、それらの成果を透析液の細菌汚染防止技術の確立に供することを旨とした。

1 方法と材料

1-1 単離菌と人工透析液

(1) 生息菌の単離

対象とする透析液供給装置は、医療機関（越谷大袋クリニック：埼玉県越谷市袋山 1557-25）で稼働中の多人数用透析液供給装置（ニプロ製、バッチ式連続比例混合方式 NCS-V 型、供給能力 25 L/min）である。この装置ではメンテナンス等の日常工程のバリデーションが確立され、バイオバーデン部の菌数および菌の種類が安定している（ヒトの作業で生じた汚染による菌叢の激しい入れ替わりが起きていない）。そのバイ

オバーデン部透析液の採取点である“C”より、（図 1 参照）、透析終了後、消毒開始前の清浄化操作で採取した透析液を生息菌の単離に供試した。

上記配管中に充填送液されている透析液は、ニプロ製透析液原液（リンパック透析剤 TA 3）で、その組成を表 1 に示す。

(2) 生息菌の釣菌条件

透析液水質基準（日本透析医学会 2008）の細菌検出方法として定められた手法（培養条件：R2A 培地（Reasoner's Agar No. 2））に準拠した。採取した透析液を φ50 mm フィルタ（Milliflex, Merck Japan）でろ過し、R2A 平板寒天培地上で 25℃・14 日間培養した。この間経時的に観察し、7 日目以降に初めて視認されたコロニーを遅延発育（delayed growth）株とした。コロニーの形状と初見日で分けて生息菌を釣菌した。

(3) 生息菌の同定結果

上記培養した培地から釣菌、単離された微生物をそ

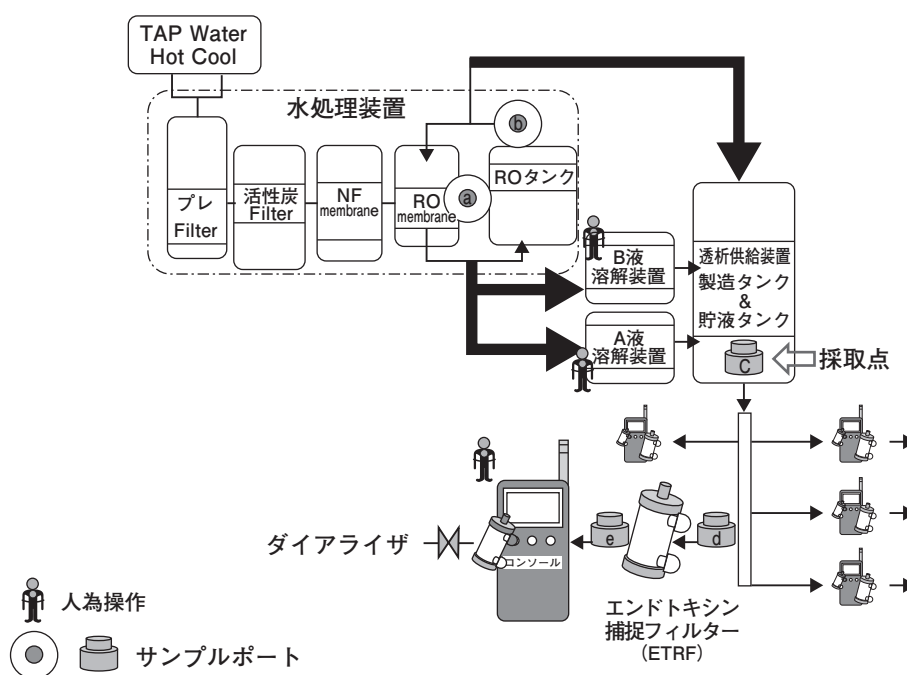


図 1 透析液供給装置および透析液採取場所

表 1 調製後の透析液組成（リンパック TA 3）

電解質濃度 (mEq/L)							ブドウ糖 (mg/dL)	浸透圧 (mOsm/L)
Na ⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Cl ⁻	CH ₃ COO ⁻	HCO ₃ ⁻		
140	2.0	2.5	1.0	112.5	10.2	25	100	298

氷酢酸（pH 調整剤）の CH₃COO⁻ 2.2 mEq/L を含む。

表 2 単離菌観察結果

菌株	特 徴	同定結果	相同性	グラム染色, 性状
A1	red delayed growth	<i>Leptothrix</i> sp.	92%	グラム陰性菌, 桿菌, 有鞘細菌
A2	clear delayed growth	<i>Caulobacter vibrioides</i>	100%	グラム陰性菌, 桿菌
A3	white	<i>Sphingomonas rhizogenes</i>	99%	グラム陰性菌
A4	yellow	<i>Pelomonas saccharophila</i>	99%	グラム陰性菌, 桿菌
A5	beige (orange brown)	<i>Sphingomonas koreensis</i>	100%	グラム陰性菌, 桿菌

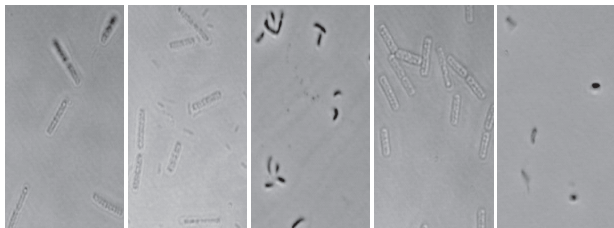


図 2 単離菌の顕微鏡観察結果

それぞれ R2A 寒天培地 (Merck) で培養した後, 16S rRNA 遺伝子の相同性により菌種を同定した。

単離されたそれぞれの菌株を A1, A2, A3, A4, A5 とし, それぞれの菌株についての文献情報を表 2 に, および顕微鏡による細胞観察結果を図 2 に示す。

生息菌株をニュートリエント・ブロス (Nutrient Broth, Difco 製, NB) 培地により液体振盪培養した後, スライドガラス上に白濁部を採取し, 光学顕微鏡 (BX 51 型, OLYMPUS 製) 下で 100 倍の対物レンズを用いて観察した。

1-2 単離菌の増殖温度特性測定

NB 培地中, 振盪恒温槽 (タイテック製) を用いて 30℃, 120 rpm で 18~20 時間前培養した A1 から A5 の各菌株の培養液を OD₆₀₀ = 0.5 になるよう希釈調製した後, 約 25℃ の約 10 ml ずつ透析液を入れた滅菌試験管にそれぞれ分注し, 各菌液の初発 OD が 0.05 になるよう植菌した。

植菌された試験管を, 直ちに振盪恒温水槽を用いてそれぞれ 5℃ から 30℃ に設定された温度で, 120 rpm で 7 日間培養した。その間, デジタル比色計簡易 OD モニター (Miniphoto 518R, タイテック社製) を用いて培養液の濁度を 650 nm で測定した。

1-3 各基材の表面特性と菌付着特性測定

(1) 試験片基材の調製

透析システムで使用している基材 (表 3 参照) について, 表面が平滑な薄平板状の市販試験片を購入し, 滅菌済み遠心沈降試験管 (遠沈管: 岩城硝子製, 品番 2343-050, 内容積 50 ml, 器壁厚 1 mm, 容器材質: ポリプロピレン) に浸漬固定挿入できるサイズ (26×40 mm) に裁断した。裁断試験片は, 正確な表面積を測定した後, アセトンで脱脂し, 70% エタノール中に浸漬することで消毒した後, 1 枚ずつ遠沈管内に固定した。得られた付着量などの測定値を表面積で除することで, 単位面積当たりの数値を計算した。

本試験を進めるに当たり, 試験容器としてポリプロピレン製の遠沈管を採用した。また収納する試験基材と試験容器接液部の面積比を計算する (基材: 20.8 cm², 遠沈管: 50.9 cm²) と, 当然試験容器のほうが大きい。このことから対照物質をポリプロピレンとし, その他の基材をこれと比較することで試験を進めた。

表 3 基材一覧

基 材	略 号	透析液供給装置での用途	試験供試材料	販売元	品 番	厚み (mm)
シリコンゴム	シリコンゴム	フレキシブル配管部材	シリコン防振板	コーナン商事	GC100-2T	2.00
ステンレス鋼	SUS	配管継手/ポンプなどの機構部品材料	ステンレス SUS 430	久宝金属製作所	H333	0.30
ポリエチレン	PE	透明配管チューブ材料	ポリエチレン保存袋	コーナン商事	KOKO5-4442	0.04
ポリプロピレン	PP (遠沈管)	付着性が低いとされる材質 (付着試験に用いた遠沈管材質)	ポリプロピレンシート	コーナン商事	ライン透明	0.75

(2) 基材表面の接触角測定

培養試験と同様に、脱脂および消毒を行った裁断試験片について、接触角計（協和界面科学(株)製、AD-31）を用いて測定した。

測定した接触角より湿潤張力 [$W = \sigma_L \times (\cos \theta)$] を計算した（図3参照）。

(3) 基材表面の表面粗さ測定

基材表面の凹凸を表す表面粗さの指標として、算術平均粗さ (Ra) を用いた。算術平均粗さ (Ra) とは、図4に示すように、粗さ曲線からその平均線の方に基準長さだけを抜き取り、この抜き取り部分の平均線（図4中の m）の方向に X 軸を、縦倍率の方向に Y 軸を取り、粗さ曲線を $y=f(x)$ で表したときに、図4中の式によって求められる値をマイクロメートル (μm) で表したものである³⁾。

培養試験と同様に、脱脂および消毒を行った一定面積 (26 mm × 40 mm) の裁断試験片について、表面粗さ計 (KOZAKA Lab. 製, Surfcoorder SE1700) を用いて Ra を測定した。

(4) 基材表面付着生成物量の測定

NB 培地中、30°C、120 rpm で 20 時間前培養した A1 から A5 各菌株の培養液を、OD ≒ 0.5 になるようそれぞれ調製した。この懸濁液約 30 ml ずつ透析液を入れた遠沈管にそれぞれ分注し、各菌液の初発 OD が 0.05 になるよう植菌した。

植菌された遠沈管を、それぞれ 30°C で、120 rpm 振盪下で 7 日間培養した。経時的に、遠沈管から試験片、菌液をそれぞれ取り出し、それぞれの基材に付着した菌体を染色するべくクリスタルバイオレット液 (CV 液：クリスタルバイオレットが 1% になるように 20% エタノールに溶かし、これを 10 倍希釈して使用) を 1 ml ずつ加え、30 分間染色した。染色後、CV 液を除去し、純水を 10 ml 入れた後、余分の洗浄液を除去した。検体表面から除去した余剰の CV 液および洗浄液は、菌液と混合してメンブレンフィルター (MERCK MILLIPORE Ltd. 製, NITROCELLULOSE MEMBRANE FILTER TYPE: 0.8 μm) で濾過し、染色された菌体をろ液と分離した。

ここでは、本試験の供試菌がすべてグラム陰性菌であるにもかかわらず、付着菌体とその生成物の細胞外高分子物質 (extracellular polymeric substances; EPS) に CV が吸着し、アルコール抽出により吸着 CV が溶出することから、その量を菌体・EPS 量の相対量として求めた。

その後それぞれの検体表面の純水をできるだけ除去し、95% エタノールを 5 ml 入れ、室温で 30 分間検体表面の CV を抽出した。抽出濃度を吸光度計 (U-1900, HITACHI 製) を用い、595 nm で吸光度を測定した。

得られた測定値をそれぞれの表面積で除することで、

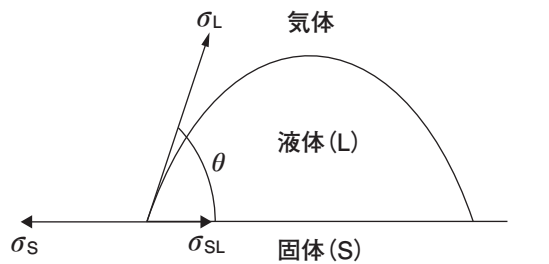


図3 接触角

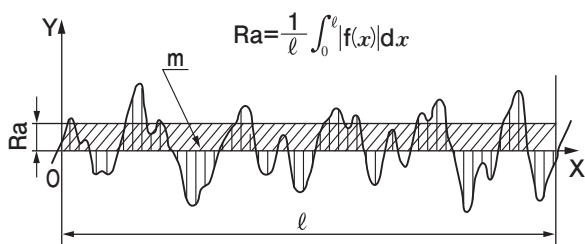


図4 表面粗さ

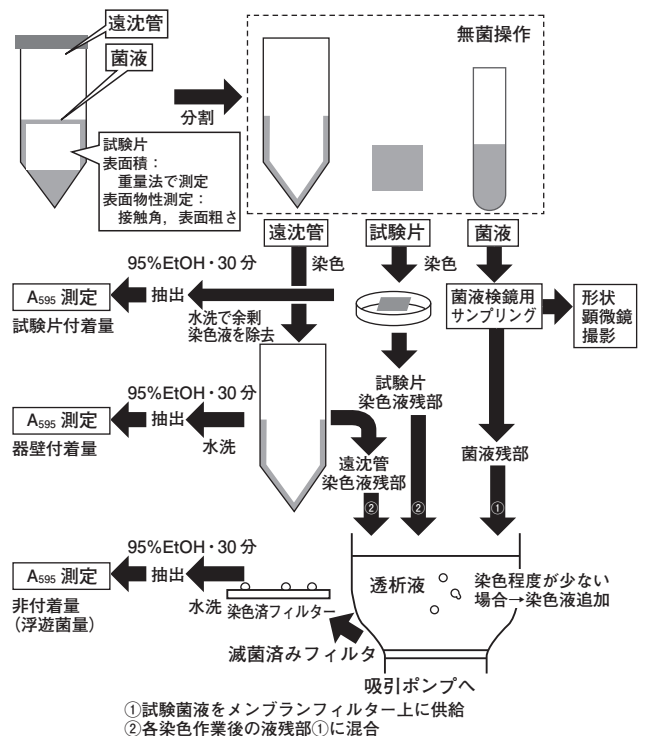


図5 基材付着測定試験の工程概要

試験片, および遠沈管の付着生成物量とし, メンブ
ンフィルターからは菌液中の浮遊物への吸着量とした.
図5に全体の試験工程を示す.

2 研究結果および考察

2-1 生育温度特性

透析は, 体温付近の温度で実施されているが, 低温
側の 5, 15, 25, 30℃ までの各温度での透析液におけ
る A1 から A5 各菌株の生育を測定した. その各単離
菌の生育曲線を図6に, その増殖曲線から対数増殖期
開始時期までの所要時間 (ラグタイム) を表4に示す.
30℃ 培養のほうが 25℃ 培養より, 対数増殖期の開

始時期が早く, A4 株を除き増殖速度は 30℃ のほうが
大きいことがわかる.

本試験では菌株にもよるが, ラグタイムや, 定常期
に至る時間にバラツキが認められる. これは, 前培養
に NB 培地を用い, 本培養を窒素源, リン源を含まな
い透析液を用いるため, 前培養の培地が本培養に持ち
込まれ, この栄養源が使用されることで, 初期に増殖
が継続されたと推察される. しかし, 培養温度が低く
なると, 対数増殖期の増殖速度は低下し, 一部の菌
(A1, A4, A5) では, 増殖誘導期間が延長した.

これらの結果から, A4 株は他の菌株と比べて低温
側に至適環境を有するが, 通常の菌株と同様に一定温

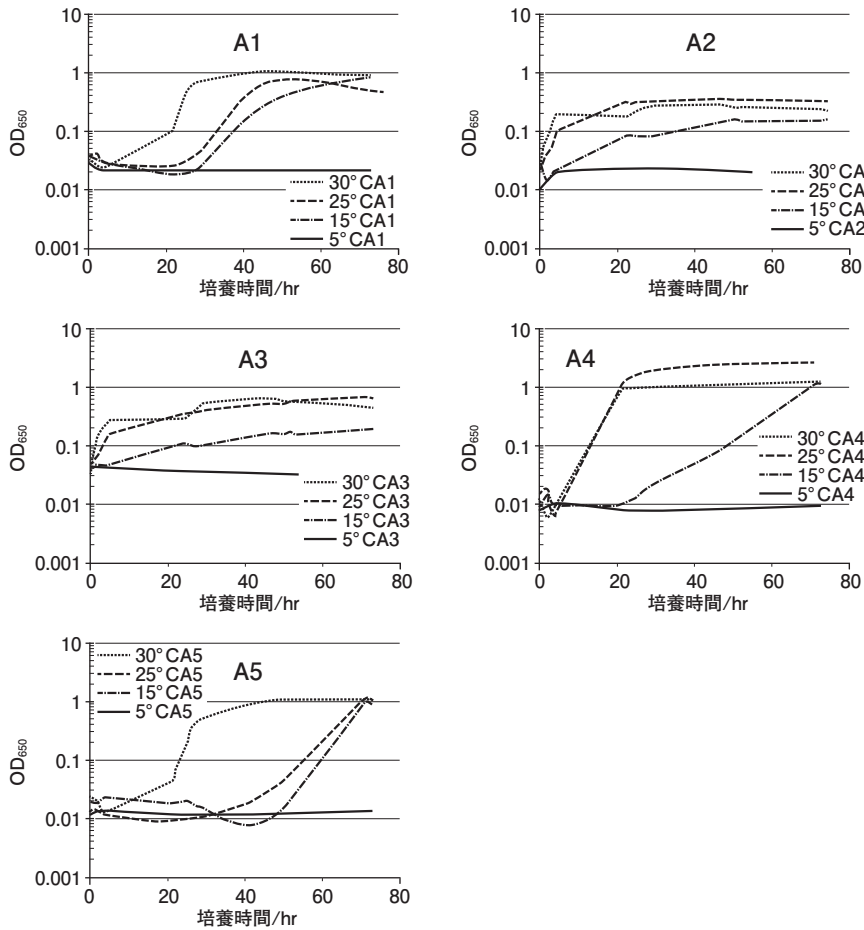


図6 各単離菌の生育曲線

表4 各単離菌のラグタイム

	A1	A2	A3	A4	A5
30℃	4~21	0~	0~	2~21	4~21
25℃	28~46	0~	0~2	4~21	23~46
15℃	28~46	29~45	4~21.5	46~71	46~71
5℃	>72	>53	>53	>72	>72

数字は増殖開始時期 (hr). > : 試験期間中に増殖開始せず.

度以下に保持することで、汚染の度合いを低減することが可能であると推測される。

透析システム特有の運用環境として、運転送液時には室温以上に加熱している液温環境が、運転送液終了後は消毒洗浄操作とともに室温まで低下する液温変動がある。この液温の上下変動を、冬場では顕著なものになることからヒートサイクルと考え、一種のヒートショックと捉えた菌株の増殖抑制に利用する方法が想定されよう。これは、運転送液時に低液温とし、夜間の消毒洗浄操作時を考えれば、夏場には逆転したヒートショックを菌株に与えることになり、ラグタイムを延長できる可能性を示唆するものである。

2-2 各基材上の菌附着特性

(1) 基材表面の接触角

附着基材の表面接触角は、バイオフィームやそれに寄与するコンディショニングフィルム形成に関与すると指摘^{4,5)}されている。

各基材および試験に用いた容器の遠沈管表面の純水に対する接触角を測定するとともに、接触角から湿潤張力を計算した結果を図7に示す。図7から、透析システムに使用されている材料のほとんどは接触角が90°以上で撥水性が強く、バイオフィーム形成を生じにくいと推察される。

(2) 基材表面の表面粗さ測定結果

洗浄後のステンレス基材の表面粗さと細菌の残存率の関係について、粗い表面ほど細菌が残存するため、ISO規格では食品工業用ステンレス配管の表面は欠損やライン傷がなく、平均表面粗さは1 μm 以下とするように規定している⁶⁾。そこで、単離菌についてその

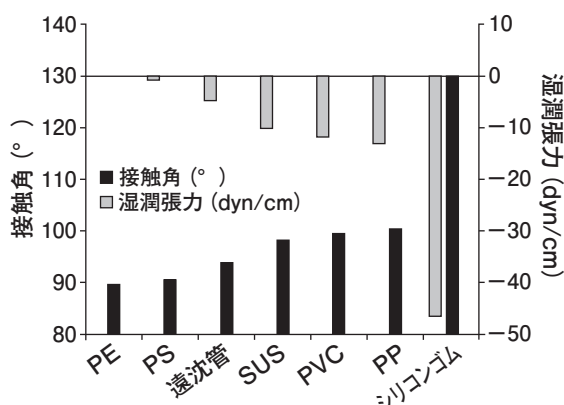


図7 基材表面の水に対する接触角

附着性能と表面粗さの関係を検討した。

各基材および試験に用いた容器の遠沈管表面の純水に対する表面粗さを測定した結果を図8に示す。これからシリコンゴム系の表面が粗いことがわかる。これは基材の弾力性や、基材の製法にも影響を受ける可能性もある。食品加工設備の配管として $Ra \leq 1 \mu\text{m}$ と規定していることから、透析システムにおいてもシリコンゴムホースが導入されている点は好ましくないとみられる。

(3) 個別菌株における基材表面への附着特性

ここでは代表株としてA1を対象とし、各基材表面への附着挙動を調べた。その結果を図9、図10に示す。図には菌接種前(無菌状態)の基材のみの附着量とともに、接種直後の附着量を示した。附着総量は基材と容器附着量の附着合計量を示し、総量とは容器を含むすべての染色量を示す。この結果より、附着量は1日目に多く、その後剥がれて7日目には総量、附着量ともに減少した。

対照実験として、菌株を接種しない「無菌」状態での附着量変化を測定した。その結果、無菌試験でも初期に濃度が増加する基材があることを確認した。試験結果を図11に示す。その結果、無菌下で附着量が上昇するのは、基材表面への色素の化学吸着による基材独自の特性で濃度変化を示すと考えられる。その後の濃度上昇は、菌体や副次生成物などによる生物由来物質と基材の関係で濃度変化を示すものと考えられる。前者を「化学吸着」、後者を「生態的吸着」と区別して検討することが妥当と考えられる。

各菌株の試験片吸着分について、試験結果のデータより「化学吸着量」「生態的吸着量」を計算した。同様に菌液について浮遊菌の「化学吸着量」「生態的吸

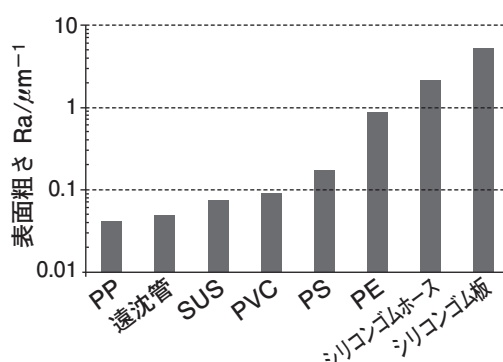


図8 基材表面のRa値

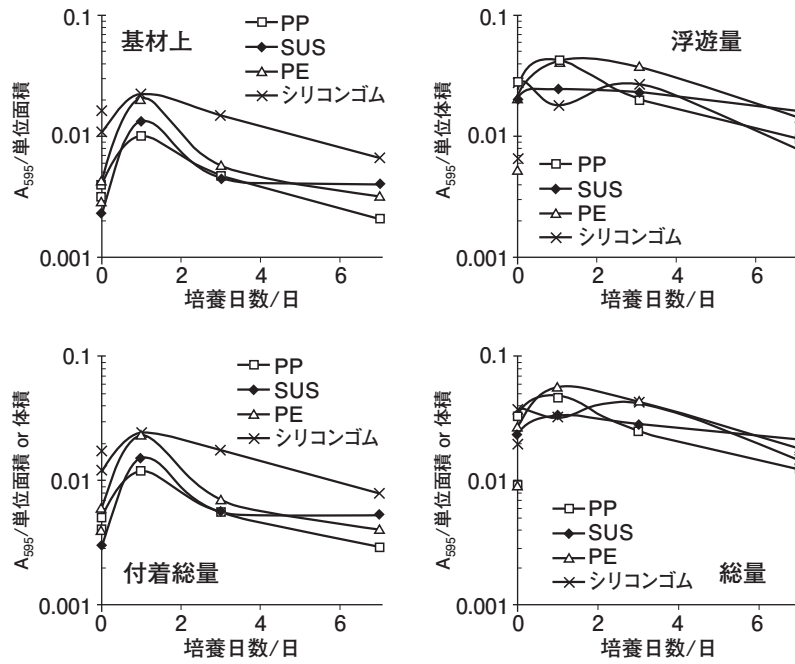


図9 A1株の各基材上での生育曲線

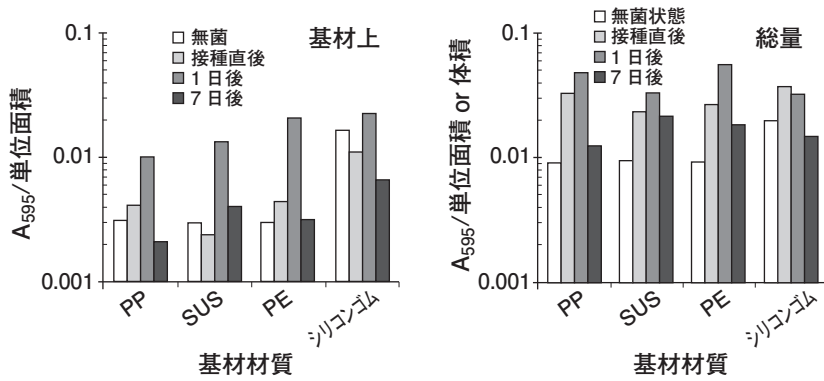


図10 各基材上でのA1株の付着変動

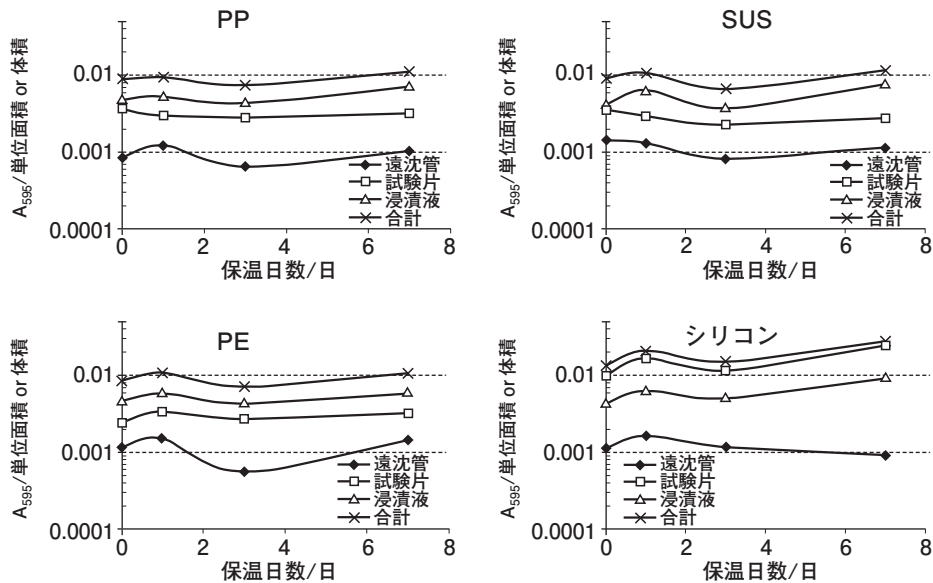


図11 各基材に対する無菌試験結果

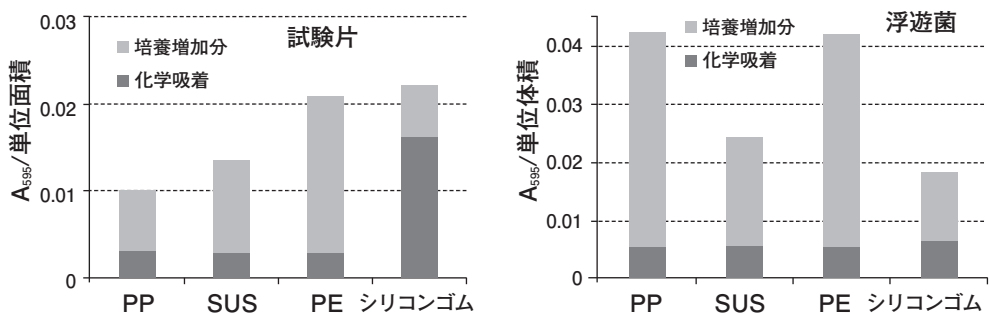


図 12 A1 株の 1 日目における「試験片」および「浮遊菌」に対するそれぞれの化学吸着・生態的吸着量

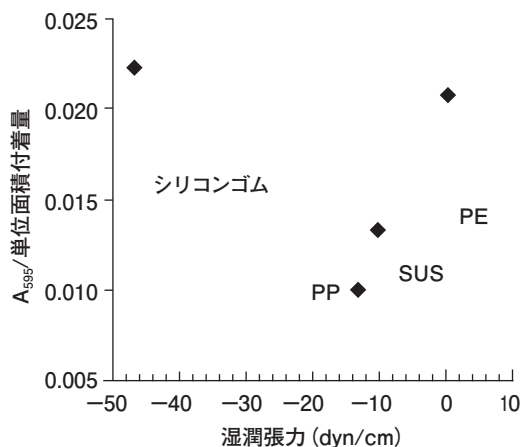


図 13 試験片における付着総量に及ぼす湿潤張力の影響

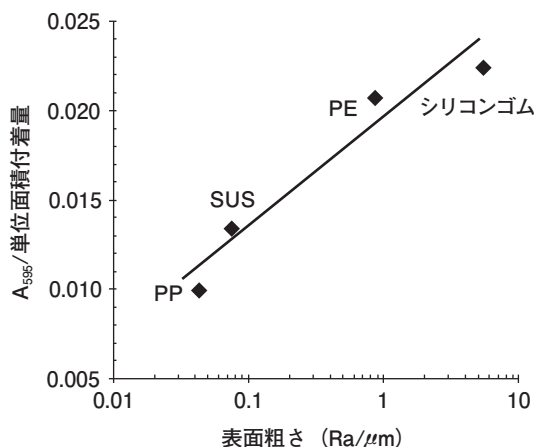


図 14 試験片における付着総量に及ぼす Ra の影響

着量」も計算し、「試験片」および「浮遊菌」に対するそれぞれの「化学吸着」「生態的吸着」を図 12 に示す。

図 12 から試験片に対する付着のしやすさを比較すると、PP を基準とした場合、SUS、PE、シリコンゴムで付着量が増加、浮遊菌に関しては、同じく PP を基準とした場合、いずれも増加が見られなかった。また、基材の中で付着量の多いのはシリコンゴムで、その内訳として化学吸着の影響を大きく受けることがわかった。それに比べて浮遊菌量はシリコンゴムで少ない傾向にあり、他の基材では化学吸着の影響を受けていないことがわかる。

この計算結果と付着に影響を与えると思われる基材の接触角から導かれる湿潤張力、および基材の表面粗さを示す Ra の関係について検討した。各基材に対する単位時間・単位面積当たりの付着量と、その湿潤張力との関係を図 13 に示す。試験片に対する化学吸着・生態的吸着の合計（付着総量と称する）に及ぼす Ra の影響を図 14 に示す。A1 株について、基材への付着量と各基材の湿潤張力との相関係数、および基材への付着量と各基材の表面粗さの間の相関係数は、それ

ぞれ 0.750 と -0.405 であった。基材への付着量は、湿潤張力との間の相関はなく、表面粗さ (Ra) とある程度であるが相関することがわかった。

菌体の基材への付着について今回検討したが、菌体同士の付着では凝集となり、基材への付着に関する数値としては増加を示さないことになる。また、実際の透析液供給システムにおいては凝集はそのまま廃水中に流れ出し、汚染の元となる菌の溜まりを形成しにくいと考えられる。菌の性質によりこの 2 種の形態をどのようにバランスをとるのかについては、本報告においては今後の課題と考えたい。また他の菌種についても今後の課題としたい。

本研究結果は、透析治療の現場で透析液配管の材質について親水性でない材料を選択するより、表面凹凸の少ない基材材料を選択したり、配管の中で接続部を含め凹凸を少なくする施工を行う配慮が、生息菌対策として有効な手段であることを示唆するものである。

食料品関連プラントで使用される配管および継手に関し、ISO (IDF) 2037, 2851, 2852, 2853 規格において、内面 $Ra \leq 1.0 \mu m$ と規定されている。日本国内においては、JIS G 3447:2009 が 2004 年に医療・医薬品工業

用途を追加した後、1992年に第2版として発行されたISO 2037の技術的内容を変更することなく翻訳して発行されている。JIS G 3447:2009は、ステンレス鋼サニタリー管に関する日本工業規格で、適用範囲を酪農、食品工業、医療・医薬品工業などに用いるステンレス鋼サニタリー管について規定すると記されている。その付属書Aは、序文にISO 2037:1992 Stainless steel tubes for the food industryを翻訳し、技術的内容および規格票の様式を変更することなく作成したものと記され、適用範囲を食品工業向けの継目なしまたは溶接ステンレス鋼管の、寸法とその許容差および表面粗さ、材料および衛生上の要求事項を規定すると明記されている。そのA.5表面粗さの項では、表面粗さは次によるとして

- ① 精密仕上げ表面 $Ra \leq 1.0 \mu\text{m}$
- ② その他の表面 $Ra \leq 2.5 \mu\text{m}$

溶接線状の表面粗さは $Ra = 16 \mu\text{m}$ を超えてはならない

と記述されている⁷⁾。

食品工業では、粘潤性の高い材料を扱うかもしれない点は透析液とは異なり、JIS G 3447に医療・医薬品工業が追加されたものの、付属書Aには食品工業向けのみとしか記載がない点があり、付着しやすい材料の付着を抑制する手段として表面粗さを規定している観点から、透析液送液系についても配管内面の表面粗さに注意して汚染防止に配慮すべきであることを指摘したい。

3 総括

まず、病院内人工透析液供給システムから単離された生息菌の温度依存特性など増殖条件に関する情報を得た。ついで、単離菌の付着特性を把握することで、付着菌制御のための情報が得られた。

単離菌の温度依存性試験の曲線から、透析システム配管内を流れる液温度を低下させることで、配管内の生息菌の増殖を抑制すること、また日常的に清掃後の運転送液開始時の液温上昇による増殖ラグタイム延長効果が期待できる可能性が示唆された。

生息単離菌の付着曲線から、透析治療の現場で透析

液配管の材質について親水性でない材料を選択するより、表面凹凸の少ない基材材料を選択したり、凹凸の少ない配管を施工する配慮が、生息菌対策の一つと考えられた。

4 今後の課題と展望

バイオフィーム形成能を有する菌が存在する場合、これを想定した、透析液製造および送液設備での付着生育制御条件および配管などの部材清浄化作業を行うことで、より効率的に安全な透析液提供環境のシステム確立に貢献できるだろう。さらに、これらの基礎情報を基にフィールド試験を実施することで、汚染防止方法の具体的な指針策定に繋げる必要がある。

人工透析液の衛生管理では、施設ごとに調製するため、異なる生息菌の個々の特性を調査してもその一施設にのみ制御対策が有効と考えられがちであるが、生息菌の予備的試験の結果によって消毒方法やシステムデザイン上の一般化も可能とみられ、今後の透析液の清浄化対策を大きく変革させる方法の開発が待たれる。

この研究は平成24年度日本透析医会公募研究助成によるものである。

文 献

- 1) 富岡敏一, 大藪英一, 坂元 仁, 他: 血液透析システムにおける透析液品質の維持向上に関する細菌学的研究 (A) 透析液中に棲息する菌の生理学的群集解, 日透医誌, 28: 181-197, 2013.
- 2) 大藪英一: 医薬品製造現場から医療現場までの水の微生物管理 (6) 透析の安全性とその舞台裏の脆弱性, 日本防菌防黴学会誌, 41: 439-445, 2013.
- 3) JIS B 0601:2013の4.2高さ方向のパラメータ 4.2.1輪郭曲線の算術平均高さ
- 4) Dwayne CS: Bacterial Adhesion—Mechanisms and Physiological Significance—; Plenum Press, p. 113, 1985.
- 5) Madilyn F: BACTERIAL ADHESION “Molecular and Ecological Diversity”; A TOHN WILEY & SONS, INC. p. 62. 1996.
- 6) 日本微生物生態学会バイオフィーム研究部会: バイオフィーム入門—環境の世紀の新しい微生物像—; 日科技連出版社, 2005.
- 7) JIS G 3447:2009の適用範囲, および付属書AのA.5表面粗さ