

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

— (B) 透析液中に棲息する菌の経時的観察と全菌検索との比較 —

大園英一*1,2 富岡敏一*5 井上有紀*1 本田和美*1 市村恭子*1 岡松健太郎*1,3
滝澤英明*1,4 高橋めぐみ*2 野呂瀬嘉彦*2 新谷英滋*2 坂元 仁*5 土戸哲明*5

*1 越谷大袋クリニック *2 日本医科大学微生物免疫教室 *3 駒込あおばクリニック *4 東京薬科大学附属社会医療研究所
*5 関西大学化学生命工学

key words : 水棲菌, 相同性, 菌株解析, PFGE, 全菌検索法

要 旨

エンドトキシン捕捉フィルター (Endotoxin Retentive Filter; ETRF) (UF 膜) によるろ過と製造系の洗浄・消毒のみでは透析液の無菌性は保証されず, 科学的根拠に基づいた衛生管理法の構築が求められる。遮光・密閉下で透析液を4週間培養すると DAPI 染色による総菌数の1桁以内まで菌が分離され, 通常の培養では見落とされていることが示唆された。製造系の開放作業を清潔操作化すると, 恒常的に同じ菌が分離され数年に渡り同じ菌株のものも見られた。分離可能な菌自体に普遍性があり, その棲息特性の解析が経験則を超えた理論的な清浄化法の策定につながる可能性が考えられた。

はじめに

一般に液体の流れる配管の壁には多数の菌が付着してバイオフィームを形成しており, そこで増殖した菌が液体中に放出される¹⁾。我々は透析液から分離された菌を純培養した後, 種々の組合せで菌を混合して配管内生態系の再構築を試みた。単菌の場合と比較して, *Caulobacter* 属と *Sphingomonas* 属と一緒に培養するとバイオフィームの生産量が増加し, また別の組み合わせ (*Pelomonas* 属, *Sphingomonas* 属と *Leptothrix* 属)

では増殖が速くなることを報告した²⁾。この現象は菌の生き残り戦略であり, 実際にこのような組合せで配管内に棲息している可能性が考えられた。しかし, 菌の供出から年余を経て, すでに菌叢が変化して現在の配管で起きている事象に置き換えられないのではという指摘や, 培養可能な菌のみの検討で配管内のすべての生菌を対象³⁾としたものではないという批判がみられた。

今回, これら透析液から分離された菌の増殖や, バイオフィーム形成を制御するための生態学的検討⁴⁾と並行し, 対象とした菌が配管内にどれくらいの期間棲息していたかを調査し, この検討での普遍性の裏付けとした。さらに透析液中の菌の回収法を再評価し生菌の全数計測と比較した。

1 方 法

1-1 透析液中の水棲菌の採取と通常培養⁵⁾

利根川水系の施設 (越谷大袋クリニック) のバイオペーデン部の透析液を, 透析終了後, 洗浄直前に清潔操作で採取した。採取後直ちにφ50 mm フィルタ (ミリフレックス: Merck Millipore Japan, Tokyo) でろ過し (メンブレンフィルタ法: MF 法), 単位溶液量あたりの生菌数が最多となり, かつフィルタ上に10~100 CFU となる検体量⁶⁾を探すために, 3倍容量系

Bacteriological approach on maintaining and improving the quality of dialysate in hemodialysis system (B) Comparison with whole cell inspection and consecutive observation of bacteria that live in the dialysate

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

Eiichi Osono

Faculty of Chemistry, materials, and Bioengineering, Department of Life Science and Biotechnology, Kansai University

Toshikazu Tomioka

Tetsuaki Tsuchido

(1・3・10 ml) を作製し同時に測定した。検体量が少ない場合には、50~100 ml の滅菌蒸留水を先にファンネルに入れ検体が均一にろ過されるようにした。ろ過後同量の滅菌蒸留水で洗浄した後に、専用の R2A 培地上に密着させた。培地を転倒・遮光して 25°C の恒温室の中で培養した。出現したコロニーの数と色調・性状を培養開始後 3・7・10・14 日目と経時的に観察し記録した。

1-2 菌種・菌株の同定^{5,7)}

培養後コロニーの形状ごとに釣菌し、R2A 培地で 2~3 代継代して純化を確認した。今回 (2012 年 12 月) 分離した菌株 (12) の菌種を同定し、2010 年 2 月に分離し生態学的検討を行っている菌株 (10) と比較した。

菌のゲノム DNA を精製 (QIAMP DNA mini kit, QuiAgen, Hilden, Germany) し、16SrRNA 遺伝子解析用ユニバーサルプライマー (E coli 8F および 1510r)⁸⁾ を用いて PCR で増幅した。得られたバンドを精製 (Takara easy filtration kit, Takara, Osaka, Japan) したあと、5' 側の 8 F Primer を用い自動解析装置 (Applied Biosystems 3730 DNA analyser, AB) で塩基配列を決定した。633~820 塩基が解析され、DDBJ BLAST および NCBI GenBank Blast を用いて塩基配列を系統解析し、配列の相同性 (Maximum Identification) が 99% 以上で菌種を、90% 以上で菌属を判定した。さらにその候補の中から、各菌種・属の Bergey's Manual 上の記載と培養中の性状が最も一致したものを選択した。

パルスフィールド (PFGE: Bio Rad, Hercules, CA, USA) 法による制限酵素処理ゲノムの遺伝子型 (genotype) の相同性から菌株を同定した。単離した菌をアガロースゲル中に包埋し、リゾチームおよび Protease K で溶菌後、制限酵素 (Spe I, NewEngland Biolabs Japan, 東京) で処理した。PFGE で展開し DNA 断片のバンドパターンの偏位が 3 バンド未満の場合、同一の菌株⁵⁾と判定した。

1-3 蛍光染色法⁹⁾および密封バッグを用いた

長期培養によるマイクロコロニーの同定

MF 法と同時に ϕ 9 cm の R2A 培地 (Merck) に 0.3 ml 塗抹し、食品用ジッパーバッグの中に湿潤緩衝用

のメモ紙片を一緒に入れ密封し、25°C の恒温室の中で転倒培養した。出現したコロニーの数と色調・性状を培養開始後 14 日目以降 17・21・24・28 日目と経時的に観察⁶⁾し、特に 7 日目以降に視認可能となる遅延発育 (slow growth) 株に着目¹⁰⁾した。

培養開始後、短時間で形成されたマイクロコロニーを蛍光試薬で染色する迅速診断キット (ミリフレックスオントム: MFQ, Merck) は、発育阻害物質や菌の高密度のために視覚化されないコロニーを描出しうる⁹⁾。MF 法培養 10 日目以降のフィルタを MFQ で観察し通常培養による視認の結果と比較した。

1-4 全菌検索

培養系との対比のために DAPI を用いた菌の直接染色を行った³⁾。検体採取後すぐに 1~3 ml を滅菌蒸留水で 10 ml にして ϕ 37 mm のフィルタ (クオリティモニター, Pall Japan, Tokyo) でろ過した。同量の滅菌蒸留水で洗浄してからフィルタを取り出し、遮光・室温で 1,000 倍希釈した DAPI 試薬 (同仁化学, 熊本) を透過し 5 分染色後、裏面を水洗した。遮光したまま 4% PFA (和光純薬, 大阪) で固定し風乾後、UV 励起下 460 nm 波長を蛍光顕微鏡で観察した。

2 結果

2012 年 12 月 7 日に採取した透析液から、培養 10 日目にコロニー形状から 5 種類が視認された。いずれもグラム陰性~不定染色性の桿菌であった。これらの菌株 (12) は、2010 年 2 月に分離し継代を続けている菌株 (10) と同様の形状を示し、16SrRNA 遺伝子の塩基配列で判定した菌種も同一 (白軟の *Caulobacter leidyi*, 赤正円の *Leptothrix* sp, ベージュの *Pelomonas saccharophila* と、黄色および透明の *Sphingomonas* 属 2 種) であった。

この塩基配列を菌株 (12) と (10) で比較すると、*C leidyi*, *Leptothrix* sp, *P saccharophila* の 3 菌種では、測定部両端の gap のみで完全一致した (図 1)。しかし *Sphingomonas* 属は異なり、*S koreensis* では相同性が 93% に止まり、*S rhizogenes* では 99% 相同でも Point mutation が見られた。

PFGE 法による genotype で見ても (図 2), *Sphingomonas* 属はいずれも菌株 (12) と (10) で異なるパターンを示した。しかし *C leidyi*, *Leptothrix* sp, *P sac-*

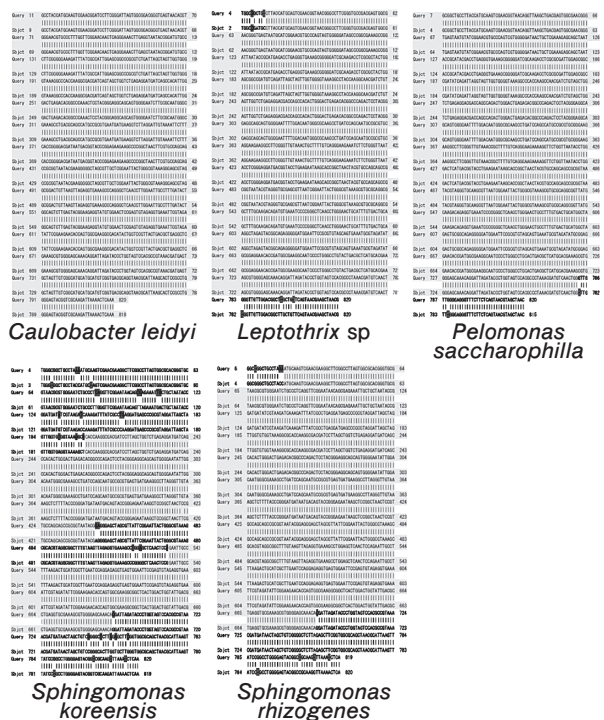


図1 透析液から分離された5菌種の16S rRNA遺伝子の塩基配列と各菌の2012年12月分離株(12)と2010年2月分離株(10)の同定性

網掛け部は100塩基以上連続して塩基配列が完全一致した部分を示す。C leidyi, Leptothrix sp, P saccharophila は、解析の起・終点のGapのみで全配列が完全一致した。しかしS koreensisでは819塩基中55塩基が異なり、S rhizogenesは818塩基中810塩基(99%)相同であったが、point mutationが3箇所(69C→G, 20A→C, 21A→C)認められた。

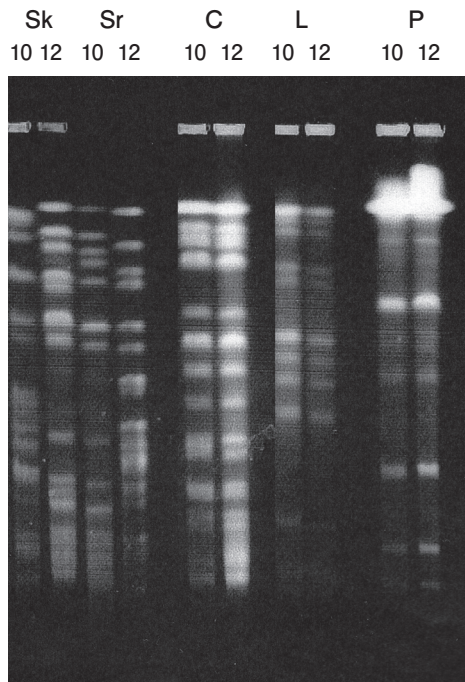


図2 制限酵素(Spe I)処理遺伝子のパルスフィールド法による解析

左からSk=S koreensis, Sr=S rhizogenes, C=C leidyi, L=Leptothrix sp, P=P saccharophila. 10は2010年2月分離株, 12は2012年12月分離株を示す。Sphingomonas属はいずれもgenotypeが異なったが、他の3菌種は一致した。

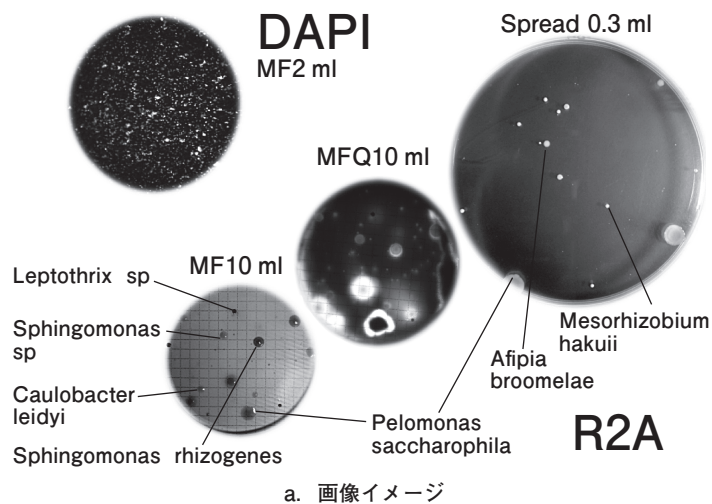
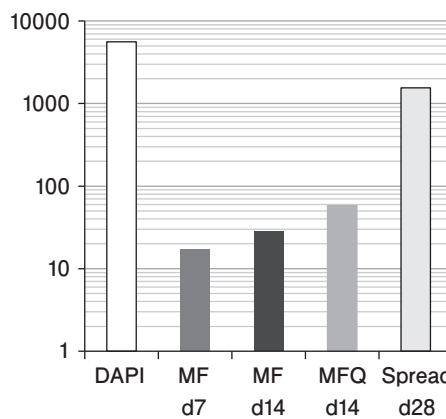


図3 R2A培地を用いた培養系とDAPIを用いた直接顕鏡による全菌検索

MF=メンブレンフィルター法14日目, MFQ=MF法で観察したフィルタを蛍光染色してマイクロコロニーを観察したもの, Spread=塗抹法で28日間長期培養したもの, DAPI=検体内の菌をフィルタに捕捉しDAPI染色したもの。容量は使用検体量, 日数は培養期間を表す。



b. 単位容量あたりの菌数(DAPIは蛍光発色数(個), 培養系はコロニー形成数(CFU))

charophila では同じ遺伝子型を示し同一クローンの株と考えられた。

生菌数試験として、通常の MF 法で 7 日目にコロニー数は 17 CFU/10 ml、形状から 5 種類視認された (図 3 a)。このフィルタを 14 日目まで培養すると視認コロニーはさらに 11 CFU 増加した。この時点でマイクロコロニーを染色すると 17+41 コロニーが観察された。0.3 ml 塗抹では、培養 7 日目では 2 CFU、14 日目で 12 CFU 増え、28 日目でさらに 33 CFU 増加し合計 47 CFU 確認された。これら slow growth の菌は R2A による継代で数代経ってもコロニー形成に 3~4 週間を要した。16SrRNA の解析から *Afpia broomelae* と *Mesorhizobium huakuii* であった。これら slow growth の菌と 7 日目までに観察できる菌との比率は、製造系への介入で増減は見せるものの通年でほぼ一定であった⁷⁾。一方、DAPI 染色では 1,120 コ/2 ml 認められた。これらを 10 ml に換算すると、全菌の直接染色 5,600 に対して、通常の MF 法では 17 CFU と Log で 3 桁の違いが見られ、マイクロコロニーの同定を培養期間の延長・蛍光染色法を用いても 2 桁差にまでしか届かなかった。しかし塗抹法で長期培養した場合には差は 1 桁となった (図 3 b)。

3 考察

3-1 透析液製造系内のバイオフィルム

限外ろ過膜 (UF=エンドトキシン捕捉フィルター: ETRF) によるろ過の上流側を定期的に観察すると、生菌数は一定値以下にならず、かつ同じ菌種が複数存在する多様性が認められた。*Sphingomonas* 属の菌株の不一致が、同一菌種の別の菌株が新たに混入したものなのか、大型のプラスミッドを持ち遺伝子の変異性が高いとされるこの属自体の特性¹¹⁾によるものなのかは定かではない。しかし、*Cleidyi*・*Leptothrix* sp および *P.saccharophila* は、経年的に同一の菌株が分離された。これは、配管内の透析液に安定して菌を供給する供給源があることを示し、透析液製造系の壁にバイオフィルムが存在していることを強く示唆するものである。

製薬業界で同一系から同一の菌が分離される状況は、洗浄・消毒が不十分な証拠とされている¹²⁾。しかし、透析液製造系に洗浄・消毒を毎日行うのみでは汚染の増悪や菌叢の変化が生じ¹³⁾、日常工程やメンテナンス

など製造系開放時の作業を清潔操作で行うように作業管理をしてはじめて菌種や菌株が一定になった⁷⁾。この状況を改善し清浄度を高めるには、熱水を用いた物理洗浄¹⁴⁾や、作用強化のための配合剤入りの消毒薬¹⁵⁾に期待がもたれた。残念ながら、現時点では透析機器の部材に問題があり、毎日の洗浄で熱や高濃度の薬剤に耐える十分な構造にはない。また消毒薬は、開発時に想定された効果が、実際の製造系配管では現れず普遍性に欠けている。研究開発の段階で効果判定に使用される標準菌による均一系の汚染が、環境中の菌の生態とは異なる²⁾ことが関与しているかもしれない。

3-2 すべての菌と培養可能な菌との差

環境から菌を分離する場合、水棲菌に適している培地を用いてもごく一部を分離しているにすぎず、すべての菌を見ているわけではない¹²⁾。しかし、血清クレアチニンや BUN 濃度を体内の老廃物の代表として測定し腎不全の指標としているように、適切に運用¹⁶⁾すれば透析液の清浄度管理の目的には十分である。さらに MFQ によるマイクロコロニーの検出は、生菌数試験の培養時間や試験量の調整のための測定法バリデーションに有効⁹⁾であった。マイクロコロニーの存在を視覚的に示す価値が大きく、嗅いで存在を推定した場合とは異なった。長期間培養法の改良により培地の蓋の結露は改善され、培地の割れや縮小・フィルタの剥離は認められなくなった。塗抹法への応用で、菌数としては 3 桁異なる³⁾とされる全菌検索と 1 桁以内の差までは詰めることが可能であった。

環境菌の分離を試みると、初代はコロニーを形成しても継代できないもの、ゲル内に潜りこみ好気状態では生育しないものや、継代中に現れる複数の形状のコロニーを単離すると生育しなくなるものがある。透析液製造系では、配管や交換消耗品の拭きとりをした検体でこのような経験をすることが多い (未発表データ)。いわゆる生きてはいるが培養できない菌 (=VNC) にも、簡易に培養ができないだけで手に届き見えない範囲にあるものもある。これらもバイオフィルムの形成に関与していることが推測され、VNC が大多数であることが分離された菌の生態的解析を等閑にしてよい理由とはならない。今後これらの菌の解析も踏まえた、新たなアプローチの方策を探究していく。

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) Donlan RM, Costerton JW : Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev*, 15; 167-193, 2002.
- 2) 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析. *日透医誌*, 28; 181-197, 2013.
- 3) Yamaguchi N, Baba T, Nasu M, et al. : Rapid monitoring of bacteria in dialysis fluids by fluorescent vital staining and microcolony methods. *Nephrol Dial Transplant*, 22; 612-616, 2007.
- 4) 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. *日透医誌*, 29; 292-300, 2014.
- 5) 大藪英一, 葉山修陽, 野呂瀬嘉彦 : 最適な透析液清浄化法選択のための基礎的検討. *日透医誌*, 24; 440-444, 2009.
- 6) 大藪英一, 葉山修陽 : 透析室で可能なメンブランフィルタ法. 透析液清浄化に向けて; 秋澤忠男, 峰島三千男編, 医薬ジャーナル, 大阪, pp.185-193, 2010.
- 7) 大藪英一 : 透析の安全性とその舞台裏の脆弱性. *防菌防黴誌*, 41; 439-445, 2013.
- 8) Weisberg WG, Barns SM, Pelletier DA, et al. : 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol*, 173; 697-703, 1991.
- 9) Osono E, Kobayashi E, Norose Y, et al. : Rapid Detection of Microbes in Dialysis Solution by the Microcolony Fluorescence Staining Method. *Biocontrol Science*, 19; 57-60, 2014.
- 10) 大藪英一, 葉山修陽, 野呂瀬嘉彦 : 損傷菌回復を目的とした透析液用培地の開発. *日透医誌*, 27; 529-535, 2012.
- 11) 本田和美, 井上有紀, 大藪英一, 他 : 手の衛生手技は透析液の清浄化に不可欠である. *透析会誌*, 43; 361-366, 2010.
- 12) Yabuuchi E, Kosaka Y : *Sphingomonas*. Vol 2 The *Proteobacteria*, part C The *alpha*-, *beta*-, *delta*-, and *Epsilonproteobacteria*. *Bergey's manual of Systemic Bacteriology*; Garrity GB, Don J, Kreig NR, et al. (eds.), 2nd ed., Springer, NY, pp. 234-259, 2005.
- 13) 浦山由巳, 小暮慶明 : 製薬用水の微生物管理について. *防菌防黴誌*, 41; 353-358, 2011.
- 14) 福井隆一 : 熱水消毒と部材交換・劣化. *防菌防黴誌*, 41; 483-490, 2013.
- 15) 濱本統久, 牧尾健司, 三軒久義, 他 : 透析機器に用いられる洗浄・消毒剤の再考. *防菌防黴誌*, 41; 459-463, 2013.
- 16) 厚生労働省 : 第16改正日本薬局方 4.05 微生物限度試験 89-97, 4.06 無菌試験法 98-100, 参考情報 G4 微生物関連 蛍光染色による細菌数の迅速測定法 2031-3, G8 水関連 製薬用水の品質管理 2063-9, 2011.