

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制御学的研究

(A) 凝集性透析液汚染細菌の加熱および過酸化水素感受性の評価

小池佳都子*1 坂元 仁*1 古田雅一*1,2 土戸哲明*1 富岡敏一*3 大園英一*4,5

*1 大阪府立大学地域連携研究機構放射線研究センター *2 大阪府立大学大学院工学研究科 *3 関西大学理工学教育開発センター
*4 越谷大袋クリニック *5 日本医科大学微生物免疫学教室

key words : 透析液汚染菌, 凝集性, 加熱処理, 過酸化水素処理, 発育遅延解析法

要 旨

血液透析システムから分離したグラム陰性の低栄養性汚染細菌のうち、とくに凝集傾向を示す *Caulobacter vibrioides* A2 株と *Sphigomonas korreensis* A4 株について、加熱処理および過酸化水素処理に対する感受性を評価し、それを *Escherichia coli* OW6 株と比較した。これらの分離菌は 30℃ で培養し、寒天培地は R2A、液体培地は寒天を除く R2A と同組成の液体培地 (R2B) を使用した。A2 株と A4 株は凝集性のため、感受性試験には主に発育遅延解析法を用い、処理による発育遅延時間を生存数低下に換算して算出する換算生存率によって評価した。過酸化水素については寒天平板法も併用した。

発育遅延解析法の原理に基づいて、評価用の R2B 液体培地への接種菌数を 1 桁低下させたときの発育遅延時間を G_{10} と定義し、最初にこの特性値の変動を調べた。その結果、この値は過酸化水素処理および加熱処理によっていくらか変動したが、未処理も含めて有意な差とはいえない範囲であると判断した。また、低栄養細菌でなおかつ平板法が適用不可となる凝集性であっても、A2 株と A4 株の浮遊性細胞の殺菌処理抵抗性評価に発育遅延解析法が適用できることを示した。そして、過酸化水素に対して、A2 株と A4 株はほぼ同程度の感受性を示し、対照の *E. coli* よりも明らかな

感受性を示すことが判明した。加熱に対する感受性は A2 が最も低く、A4 株は *E. coli* と大差ない程度の感受性であった。得られた結果から、低栄養細菌である透析液汚染菌は、調査した菌株に関する限り凝集性ながら加熱および過酸化水素に対して弱いとみられ、通常の殺菌処理でも制御可能とみられるが、医療機関の透析送液システム内で発生が想定されるバイオフィルムや persister (持続生存菌) の存在の可能性があり、さらなる耐性の検討が必要である。

はじめに

我が国における血液の人工透析はその装置システムを保有する各医療機関で行われており、その透析液の微生物学的清浄化は重要な問題と認識され、日本透析医会など関係学会・団体のガイドラインに従って実施されている¹⁻³⁾。医療機関での透析液供給システムにおいて問題となる汚染細菌については、エンドトキシン捕捉フィルターの利用により、エンドトキシンが排除されるとともに汚染菌が直接患者の血液に侵入することはないとされ、また調製透析液も薬液による製造・送液システムの定期的な消毒が行われている。しかし、それでもなおかつ生残する可能性があり、それによる汚染が指摘されている²⁾。具体的には、水道水からの水処理装置や製造・貯液タンク、患者ベッド近傍までの配管系などに汚染菌が付着、あるいは不可逆

Studies of the ecological control of bacterial flora on maintaining and improving the quality of dialysate in hemodialysis system

(A) Evaluation of the sensitivities to heat and hydrogen peroxide of agglutinable bacteria contaminated in dialysate

Radiation Research Center, Osaka Prefecture University

Katsuko Koike

Jin Sakamoto

Masakazu Furuta

的にバイオフィルムを形成して定着している可能性が否定できず、それらの代謝物や細胞成分の遊離・離脱などによって有害低分子成分が血液内に混入する危険性がある。

大菌らのグループは、日本透析医会の研究助成による微生物生態学的研究において、透析液製造・供給システムでの汚染細菌の起源について調査し^{4,5)}、透析液製造系全体では逆浸透 (RO) 装置とその下流に汚染源の存在を推定したが、今回の研究では装置システムの設置時に問題があることが示唆されている⁶⁾。また著者ら^{7,8)}は、分離された5株の細菌について菌種を同定するとともに、その単独および混合培養における各菌株の増殖特性、バイオフィルム形成能を調べ、貧栄養細菌としての特性とプラスチックマイクロプレート壁への付着能を確認した。また、これら分離菌の混合系での共生関係により、菌種によっては他の株の発育を促進するケースがあることも報告した。さらに、細胞の形態変化から、とくにA2とA4の2株が明らかかな凝集傾向を示すことがわかった。昨年度はこれら汚染菌の透析液供給・配管システム基材への付着能を調べ、それが基材の表面粗さに依存することを明らかにした。

これら分離菌の制御に関する研究としては、大菌ら⁹⁾が次亜塩素酸ナトリウムと80℃での加熱処理した分離株について処理後の増殖曲線の形状によって定性的に評価しているが、生存数低下の程度については未検討である。この理由として、分離菌は凝集やバイオフィルム形成の能力を持つため、単細胞として独立した存在を要件とする寒天平板法では正確な評価が困難である。そこで、本研究では、とくに凝集性と判断されたA2株とA4株を対象に、その加熱と過酸化水素感受性を発育遅延解析法¹⁰⁾によって検討することとした。この方法は寒天平板法と異なって細胞集団の発育活性を扱うため、原理的には細胞が独立して存在する必要はなく、凝集や担体付着の場合でも適用が可能である。

この方法により、透析汚染菌の殺菌処理に対する感受性を定量的に評価できると推測されることから、その検討結果を基に種々の方法の効果を比較し、有効な制御処理法の選択や処理条件についての指針を得ることが可能になると考えられる。本研究はまだ予備試験段階ではあるが、過酸化水素と加熱処理を制御法とし

て選択し、この発育遅延解析法の適用性を検証したうえで、その感受性を比較調査した。

1 方法と材料

1-1 使用菌株と菌懸濁液の調製

前報で述べた人工透析液製造・供給システムから分離された菌として、ここでは *Caulobacter vibrioides* (A2株) と *Sphigomonas korreensis* (A4株) を用いた。また対照として一般的な大腸菌, *Escherichia coli* NBRC 106482 (OW6, プロリン要求株) も供試した。保存用 Reasoner's Assay no.2 agar, pH 7.0 (以下 R2A) 培養平板から1白金耳を5 ml の Reasoner's Assay no.2 broth, pH 7.0 (以下 R2B) を含む 180 mm 試験管に接種し、16~18 h 前培養した。その2 ml を 18 ml の R2B 培地を含む 100 ml 容フラスコ中で 24 h 本培養した。これを集菌、50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0, 以下 KPB) で2回洗浄し、新鮮 KPB に懸濁し、OD₆₅₀ が約 0.3 になるように KPB で希釈した。

1-2 過酸化水素処理

最終濃度 0.1% および 0.2% となるよう調製した過酸化水素水 (市販 30% 液を 10 倍希釈したもの) を含む KPB 9 ml 入りの 100 ml 容フラスコを予め 30℃ に保温しておき、それに上記のように調製した菌懸濁液の 1 ml を注入して薬剤処理を開始した。処理中、経時的に試料 0.5 ml を採取し、0.1% ピルビン酸ナトリウム溶液で 10 倍に希釈して殺菌反応を停止した。

1-3 加熱処理

9 ml の KPB を含む 100 ml 容フラスコを予め 50℃ に予熱しておき、それに上記の菌懸濁液 1 ml を注入して加熱処理を開始した。処理中、経時的に試料 0.5 ml を採取し、KPB で 10 倍に希釈して氷上で冷却した。

1-4 生存率測定

生存率の測定は、発育遅延解析法を中心に用い、比較のため一部で寒天平板法も用いた。

(1) 発育遅延解析法

この方法は、Takano and Tsuchido¹⁰⁾により、損傷菌の発育の動力学的理論に基づいて提唱された生存率

測定法で、細胞集団を扱う点で平板法と原理的に異なっており、処理によって生じた細胞死滅や損傷による遅延時間 (τ) を接種菌数低下に相当すると考え、それを換算生存率 (IV) として求めるものである。すなわち、未処理対照菌集団に対する殺菌処理した菌集団の発育遅延時間を対数増殖期の一定の水準 (ここでは、OD₆₅₀ 値が 0.02) に到達する時間の遅れとして測定し、それが各処理での接種菌数を何桁低下させたのちの発育によるこの計測水準到達時間に相当するかを計算することによって、生存率を計算するものである。接種菌数を 1 桁低下させたときの一定水準に到達するまでの遅延時間はどの菌数水準でも一定で、 G_{10} と定義されている。未処理または処理試料の菌液を 5~6 段階程度 10 倍毎連続希釈して、別途 G_{10} 値を求めた。この IV は次式のように表される¹⁰⁾。

$$IV = -\log \tau / G_{10}$$

また、各細菌の比増殖速度 μ は、 G_{10} との間に、次の関係がある¹⁰⁾。

$$\mu = 2.303 / G_{10}$$

本研究での発育遅延解析は、マイクロプレートリーダー (Multiscan, GO, Thermo Scientific, Co. Ltd.) を使用した。予め 180 μ l の R2B 培地を 96 穴マイクロプレートの各ウェルに分注し、30°C の一定温度で保温しておき、それに個々の未処理および処理菌液試料 20 μ l を注入して培養と計測を開始した。培養中、その間の発育の経時変化を自動計測によって連続的に得た濁度 (OD₆₅₀) のデータを集積し、コンピュータで処理した。そのさい、濁度が 0.01~0.05 の間の取得データの対数値を専用ソフトウェアの利用によって直線回帰後、一定水準 OD 線との交点から遅延時間 τ を得た。

(2) 寒天平板法

上述の菌液試料を 10 倍毎段階希釈後、R2A 寒天平板に表面塗抹して培養した。A2 株と A4 株では 3 日後、*E. coli* では 1 日後に生成コロニー数を計測し、平板での生存率を求めた。

2 実験結果

2-1 マイクロプレートリーダーにおける各菌株の

発育特性値

透析液汚染分離菌 *Caulobacter vibrioides* A2 株と *Sphigomonas korreensis* A4 株の過酸化水素感受性と熱

表 1 各菌株の発育特性指標値

菌 株	比増殖速度, μ (h^{-1})	G_{10} 値 [†] (h)
A2	0.566 \pm 0.04 [†]	4.08 \pm 0.26
A4	0.518 \pm 0.04	4.46 \pm 0.36
<i>E. coli</i> OW6	1.005 \pm 0.02	2.29 \pm 0.04

発育培地は R2B (pH 7.0)、発育温度は 30°C、試料数は A2 と A4 では n=3、OW6 では n=5 (いずれも未処理と処理双方を含む)。

[†] 平均値 \pm 標準偏差

感受性の調査への発育遅延解析法の適用を検討する前に、未処理菌の発育特性をマイクロプレートリーダーでの培養・濁度計測によって調べ、対照の *E. coli* と比較した。発育温度が 30°C、計測用培地として R2B を用いた時、既報⁸⁾のように、マイクロプレートリーダーにおいても各菌株はスムーズな発育曲線を示し、凝集性ながら問題なく発育が追跡できることを確認した。

発育特性値の G_{10} 値の値は、A2 株と A4 株では未処理集団ではそれぞれ、3.86 h と 4.88 h であるが、過酸化水素処理 0.1% では 2.5 分、5 分、7.5 分、10 分の値が、A2 で 4.02~4.36 h、A4 で 3.44~4.29 h と比較的変動幅が大きく、A2 株と A4 株の 7.5 分と 10 分のデータは計測が 2, 3 点しかとれなかったため、これらを除外して未処理を含む三つの値から G_{10} 値を求めた。一方の *E. coli* OW6 株では、未処理が 2.35 h、過酸化水素処理で五つの各処理時間の値が、2.26~2.30 h とこちらは比較的小さな変動幅であった。

これらの結果から、それぞれの株での G_{10} 値は透析汚染細菌では大腸菌に比べてやや変動するが、未処理と過酸化水素処理との間ではほとんど有意な差はないものとみなし、換算生存率 (IV) の計算には未処理の G_{10} 値を用いることとした。未処理と過酸化水素処理 4 点を合わせた平均値と標準偏差を表 1 に示す。

その結果、低栄養細菌の A2 と A4 の比増殖速度は *E. coli* の 1.005 h^{-1} よりも 0.564 h^{-1} 、0.516 h^{-1} と低く、したがって G_{10} 値は逆に大きくなり、A2 株と A4 株では、4.08 h、4.46 h となり、*E. coli* での 2.29 h の 2 倍近い値であった。A2 と A4 を比較すると、前者のほうが発育が速いことがわかった。

2-2 過酸化水素感受性

発育遅延解析法によって透析液汚染細菌の過酸化水素感受性を調べ、*E. coli* と比較した。その結果、[図 1](#) から明らかなように、汚染菌の A2 株と A4 株の過酸

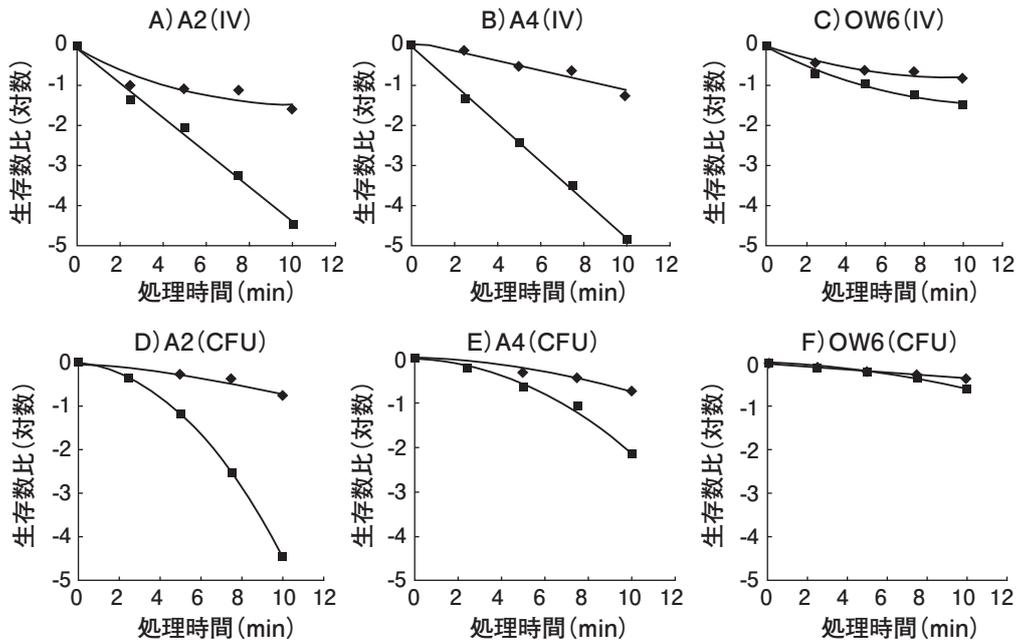


図1 透析液汚染細菌の過酸化水素感受性

(A) A2株のIV, (B) A2株のCFU, (C) A4株のIV, (D) A4株のCFU, (E) *E. coli* OW6のIV, (F) *E. coli* OW6のCFU. 過酸化水素濃度は、◆：0.1%, ■：0.2%. 処理はKPB中, 処理温度は30°C.

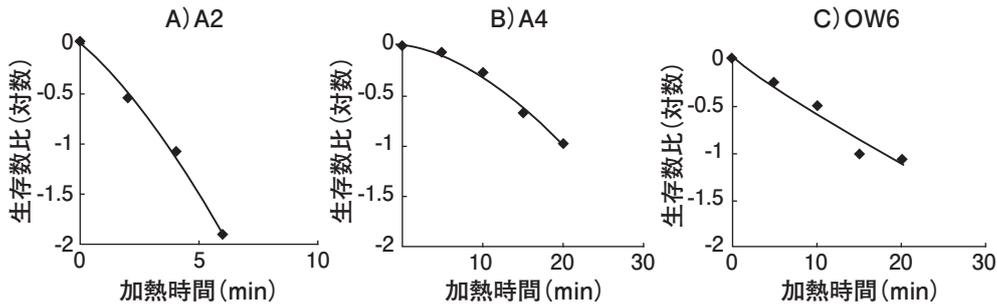


図2 透析液汚染細菌の熱感受性

生存数比は発育遅延解析法により, IVとして求めた. 加熱処理はKPB中, 温度は50°C. (A) A2株, (B) A4株, (C) *E. coli* OW6株.

化水素感受性は *E. coli* のそれよりも低く, A2株とA4株の間ではあまり差がないことが判明した.

一方, 寒天平板法では凝集細菌には本来適用できないが, そのまま解釈すれば *E. coli* との比較結果は発育遅延解析法と同様の傾向を示していると考えられるが, ただA2株よりもA4株のほうが見かけ上過酸化水素に抵抗性のようにみえる.

2-3 熱感受性

加熱処理に対する透析液汚染細菌の感受性を検討した. 図2に示すように, A2株は *E. coli* よりも熱感受性であり, A4株はほぼ *E. coli* 株と同程度の感受性であることが示された. なお, 熱感受性の実験において

は平板法を用いなかった.

3 考察

既報⁷⁾のように, 用いた対象の人工透析液製造・供給システム汚染菌はグラム陰性細菌であり, その低分子代謝物や構成成分の外膜リポ多糖体であるエンドトキシンの血液への混入のリスク上昇を阻止する必要がある. 透析液製造・供給システムの汚染微生物制御については, 種々の方法が想定されるが, 現状では次亜塩素酸ナトリウムや過酢酸などの薬液の利用が一般的とみられる. しかし, これらによっても一度形成されたバイオフィルムを根絶することは難しく, 長期経過後には汚染菌が再検出される可能性が指摘されてい

る⁶⁾。

著者らは、透析システムから分離された汚染菌を対象に、従来から検討されている加熱処理と過酸化水素処理に対するそれらの感受性を評価した。これらの汚染菌はまた低栄養性であるとともにバイオフィーム形成性であり、また浮遊状態であっても凝集性であることも報告している^{7,9)}。このような凝集性の細菌を対象として殺菌処理の効果を判定する場合、汎用される平板法は、個々の細胞が独立して存在することを前提条件としているため、適用は困難である。

そこで、著者らは、かつてその有用性を発表した発育遅延解析法¹⁰⁾を利用して凝集性汚染細菌の加熱および過酸化水素感受性を調査した。この方法は原理上、殺菌処理による生存数の低下に加えて、必然的に発生するとみられる損傷菌の修復に要する時間が初発菌数の低下に換算されるため、平板法によって判定される死滅菌のほかに損傷菌の両方の数が計数対象となり、発育遅延解析法によって得られる生存率は平板法によるものよりも一般に低い値となる¹¹⁾。この傾向はこれまでの著者ら^{11,12)}の多くの例で確認しており、本研究でも図1の換算生存率とCFUを比較したとき、A2株の0.2%の過酸化水素処理では大差ないものの、その他の場合に認められる。

過酸化水素処理の感受性を示す図1における発育遅延解析法と寒天平板法との間での生存性の結果の違いは、「固液発育活性差分法」として提唱¹¹⁾している損傷菌数の発生の相違の可能性もあるが、ここでは大きくは凝集の程度の違いが反映されているものと推察される。すなわち、以前に菌糸状発育をする細菌で報告¹⁰⁾しているように、A4株のほうがA2株よりも凝集性が強いものと推定される。

本研究で*E. coli*を対照とした相対的なA2株とA4株の過酸化水素感受性およびA2株の熱感受性の結果に基づけば、透析液汚染菌の制御がここで対象とした浮遊性の状態であれば比較的容易であると考えられる。しかし、既報^{7,9)}のように配管内に付着してバイオフィームを形成している場合には、さらに抵抗性となり制御が難しくなることが予想される。今後、さらに他の殺菌処理、他の菌種について、またバイオフィーム

を対象にした抵抗性の検討が必要である。

この研究は平成26年度日本透析医会公募研究助成により実施したものである。

文 献

- 1) 秋澤忠男, 峰島三千男 (共編): 透析液清浄化に向けて, 医薬ジャーナル社, 2010.
- 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) 透析の安全性との舞台裏の脆弱性, 防菌防黴誌 2013; 41: 439-445.
- 3) 日本臨床工学技士会編: 透析液安全管理責任者セミナー講習会テキスト, 2015.
- 4) 大藪英一, 本田和美, 熊谷拓也, 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 (B) 透析液中に棲息する菌の起源に関する細菌遺伝子学的解析, 日透医誌 2013; 28: 198-204.
- 5) 大藪英一, 富岡敏一, 井上有紀, 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 (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, 日透医誌 2013; 29: 181-187.
- 6) 大藪英一, 富岡敏一, 井上有紀, 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制御学的研究 (B) 透析機器設置後1年間の微生物汚染状況の追跡調査, 日透医誌 2016; 31: 209-216.
- 7) 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 2013; 28: 301-305.
- 8) 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 2014; 29: 301-304.
- 9) 大藪英一, 富岡敏一, 坂元 仁, 他: 人工透析用透析液から分離された菌の消毒感受性に関する検討, 防菌防黴学会要旨集, 2014.
- 10) Takano M, Tsuchido T: Availability of growth delay analysis for the evaluation of total injury in stressed bacterial population. J Ferment Technol 1982; 60: 189-198.
- 11) 土戸哲明: 微生物栄養細胞の損傷菌数測定のための, 平板法と発育遅延解析法を併用した「固液発育活性差分法」とその理論, 日本防菌防黴学会大会要旨集, 2015.
- 12) 岩田史世, 坂元 仁, 中村一郎, 他: 平板法と発育遅延解析法を併用した「固液発育活性差分法」による細菌の損傷菌数評価とその加熱損傷への応用, 日本防菌防黴学会大会要旨集, 2015.