

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

大藪英一*^{1,2} 富岡敏一*⁶ 井上有紀*¹ 本田和美*¹ 市村恭子*¹ 岡松健太郎*^{1,3}
 青木弘之*⁴ 藤岡紀昭*⁴ 滝澤英明*^{1,5} 野呂瀬嘉彦*² 高久 俊*² 新谷英滋*²
 坂元 仁*⁷ 土戸哲明*⁷ 高橋秀実*²

*1 越谷大袋クリニック *2 日本医科大学微生物免疫 *3 駒込あおばクリニック *4 上野透析クリニック

*5 東京薬科大学社会医療研究所 *6 関西大学理工学教育開発センター *7 大阪府立大学地域連携研究機構放射線研究センター

key words : バイオフィーム, 初期洗浄, 設置時汚染, 菌株同定, パルスフィールド PFGE 法

要 旨

人工透析用機器据付時より透析液製造系内の透析用水・透析液を培養し、菌種・菌株の相同性の検討から系内の汚染源を調査した。機器から分離された菌は種類・生菌数とも据付後の初期洗浄時が最多であった。その後開放系の作業を清潔操作で行うと新たな汚染は少なく、月～年単位で同一菌種の同一菌株が分離された。搬入以前の機器汚染でバイオフィームが形成されその中で菌が継代したことが示唆され、取扱説明書掲載の洗浄消毒法ではこのバイオフィームが消失しないことが明らかとなった。この状況が看過されていた原因として、清浄度をエンドトキシン捕捉フィルタ (ETRF) に依存し、汚染度の高い場所や時間を探し是正する発想に乏しく、開放系作業時の清潔操作で汚染防止する認識が低いことが考えられた。On-line 補充液はいわゆる大量輸液製剤 (LVP) であるが、その製造系の機器で最も汚染度の高い初期洗浄時の対処法が規定されていない。清潔操作を徹底したうえで適格性評価 (IQOQPQ) から初期管理を構築し、根拠に基づいて仕様不備の是正を促す必要があると思われた。

はじめに

ISO 23500 では、透析液製造系の微生物制御戦略について、微生物の増殖やバイオフィームの形成を制限するために積極的であるべきとしている¹⁾。この制御でエンドトキシン捕捉フィルタ (ETRF) や²⁾消毒の有効性¹⁾は示されているが、制御の対象となる微生物やバイオフィームの起源について、いつから汚染が生じたものか検討された報告は少ない。この系は、ろ過滅菌工程の下流側に人為操作が入ることで新たな汚染が生じ、系内の汚染の起因菌が頻繁に入れ替わる³⁾という汚染の制御を考えるうえで致命的な問題点を孕んでいる⁴⁾。我々は24年度の報告で⁵⁾、日常生産や製造系内のメンテナンス作業を清潔操作⁶⁾で行えば、分離される菌叢が固定され菌株も変化しない事を報告した。今回、複数の施設で透析装置の据付段階の微生物汚染状況から初期洗浄後1年間微生物の汚染動向を追跡調査し、透析液製造系の普遍的な微生物汚染の起源を推定したので報告する。

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

(B) One year follow-up of microbial contamination in newly installed dialysis equipments

Koshigaya Ohbukuro Clinic/Dept of Microbiology and immunology, Nippon Medical School

Eiichi Osono

Center for Development of Instructional System of Science and Engineering, Kansai University

Toshikazu Tomioka

Radiation Research Center, Osaka Prefecture University

Tetsuaki Tsuchido

1 方法と材料

1-1 透析用水・透析液中の水棲菌の採取

2013年に首都圏で新規に透析室を開設した2施設(施設A・B)とROモジュールの交換を行った1施設(施設C)を対象とした。新規開設施設では、RO装置、透析液製造系(原末溶解装置(Ac)、中央供給装置(CDD))およびベッドサイド患者監視装置(Console)を搬入し、据付後初めて透析用水を流した時点(初回通水時)から臨床で使用するまでの初期洗浄中は週2回以上、安定稼働後も月1回以上、1日の水洗工程もしくは透析が終了した後消毒工程を入れる直前¹⁾に、UF膜・MF膜より上流側のバイオバーデン部のRO水および透析液を清潔操作で採取した⁷⁾。同様にROモジュールの交換を行った施設で交換後閉鎖系内のRO水を週1回以上採取した。施設A・Cでは採取後直ちに孔径0.45 μm の有効ろ過面積19.2 $\text{cm}^2 \cdot \phi 51 \text{ mm}$ フィルタ(Merck Millipore, Millipore Japan)でろ過した。予測菌数からろ過量を10~1,000 mlの間を3倍容量系で変え⁸⁾、検出感度を10 CFU/フィルタとして~100 (~50) CFUとなるように生菌数動向(trend)捉えるまで同時に数枚測定した。大量(1,000 ml)のサンプルをろ過する場合には、通常使用したニトロセルロース膜ではなくPVDF膜を用い、検体量が20 ml以下の場合には50~100 mlの滅菌蒸留水を先にファンネルに入れ検体が安定してろ過されるようにした。ろ過後50 ml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。培地を転倒し遮光して25°Cの恒温室の中で培養した。初回通水時など生菌数が多いことが予測される場合にはR2A培地に直接塗抹した。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・21・28日目と経時的に観察した。分離されたコロニーの初見日と色調・形状、グラム染色の形態を記録し菌種の数と推定した。施設Bでは空間精度管理にこの方法を用いたが、通常の品質管理には外部検査機関(BML, 川越, 埼玉)を利用し、 $\phi 50 \text{ mm}$ フィルタをR2A平板寒天培地上5日間の観察期間終了後にフィルタごと回収しその後28日目まで観察した。

なお施設AのRO装置はD社・AcはE社・CDDはF社製、施設BのRO装置はG社・ConsoleはH社製、施設CのRO装置はG社製であった。3施設

とも日常的な透析液製造やメンテナンスを清潔操作で行い⁶⁾、前2施設のRO装置は週2回、Ao値600で熱水消毒を行った。中央供給装置~患者監視装置末端までの消毒方法は、機器製造販売業者の取扱説明書で指定された方法に従い200 ppm次亜塩素酸消毒で行い、状況に合わせて過酢酸洗浄や消毒薬滞留を追加した。

1-2 菌種・菌株の同定⁵⁾

バイオロジカルセーフティーレベル2(BSL2)の施設にフィルタを移送して、コロニーの色調・形状ごとに鈎菌しR2A寒天培地(Merck)に接種した。週1回ずつ植え継ぎ、数代継代してコロニーが均一であることを確認してから、-40°Cもしくは室温で保存した。菌種同定のために16SrRNA遺伝子を解析用ユニバーサルプライマー(E coli 8Fおよび1510r)を用いてPCRで増幅し⁹⁾、得られたバンドを精製(Takara easy filtration kit, Takara, Osaka, Japan)したあと、5'側の8F 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。633~825塩基が解析され、DDBJ BLASTおよびNCBI GenBank Blastを用いて塩基配列の系統解析し、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。いくつかの候補があげられた場合、各菌種のBergey's Manual of systematic Bacteriology 9th Ed(2008)の記載を確認し、培養中の状態と合致するものを選定した。

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DNA型(genotype)のバンドパターンから同一菌種の菌株の相違を判定した。増菌後アガロースゲル中に包埋し、リゾチームおよびProtease Kで溶菌し、制限酵素(*Spe I*, NewEngland Biolabs Japan, 東京)で処理した。そのDNA断片をPFGEで展開し得られたバンドパターンの偏位が3バンド未満の場合、同一の菌株と判定した。これらの結果を作業日誌・経時的観察と合わせてその菌の起源を推定した。

2 結果

施設Aは2013年5月に金町-三郷水系の地域で開設された。RO装置後にUF膜、中央供給装置(CDD)後にMF膜が設置され、初期洗浄期間中に原末溶解装置(Ac)とCDDの間にもUF膜を増設した。初回

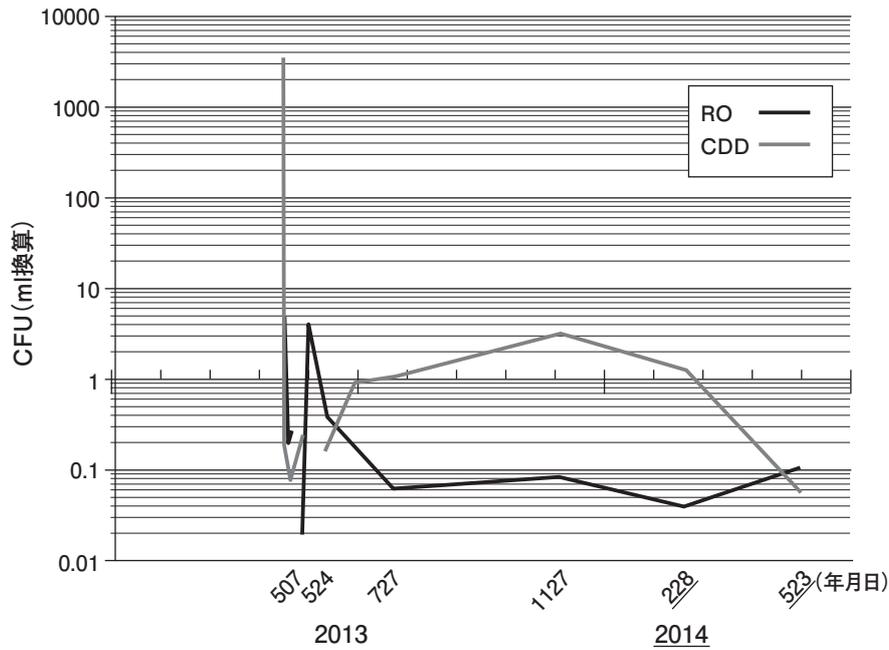


図 1a 透析機器据付後 1 年間の微生物汚染状況の推移：施設 A
生菌数の推移

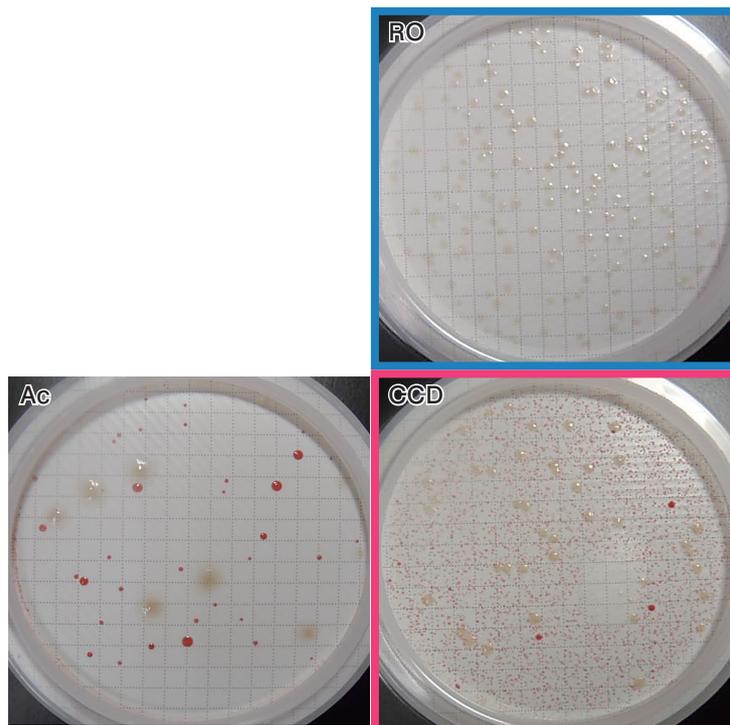


図 1b 透析機器据付後 1 年間の微生物汚染状況の推移：施設 A
初回通水時培養のフィルタ上のコロニー形状

通水時どの装置にも $2 \sim 5 \log_{10}/\text{ml}$ と大量の菌が存在した (図 1a, b)。初期洗浄で 7~14 日後に陰性化 (10 CFU/100 ml 未満) し、その後 CDD では ml 換算で 1~10 CFU を推移した。そこで通常の洗浄・消毒後過酢酸滞留を追加し再度陰性化した。しかし検体のろ過量を 1,000 ml に増やすと 1 年以上経過しても菌は分離

された (図 1a)。

初回通水時、RO から 4 種、Ac から 4 種、CDD から 7 種分離された (表 1・図 1b)。生菌数の減少後も RO からは β -Proteobacteria の *Ralstonia pickettii*, Ac~CDD からは α -Proteobacteria の *Methylobacterium orizae* が経時的に分離され、さらに PFGE 法による

表 1 初期洗浄時に分離された菌の種・属

施設 A	施設 B	施設 C
RO <i>Sphingomonas phyllosphaerae</i> * <i>Ralstonia pickettii</i> ** <i>Acidovorax soli</i> ** <i>Leifsonia aquatica</i> #	RO <i>Methylobacterium komagatae</i> * <i>Micrococcus yunnanensis</i> # <i>Delftia tsuruhatensis</i> **	RO <i>Novosphingobium capsulatum</i> * <i>Sphingomonas rhizogenes</i> * <i>Sphingobium yanoikuyae</i> * <i>Sphingomonas dokdonensis</i> *
Ac <i>Methylobacterium oryzae</i> * <i>Methylobacterium radiotolerans</i> * <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> *** <i>Sphingomonas sp</i> *	P1 <i>Micrococcus yunnanensis</i> # <i>Sphingomonas pseudosanguinis</i> * <i>Sphingobium yanoikuyae</i> *	
CDD <i>Sphingobium yanoikuyae</i> * <i>Blastomonas natatoria</i> * <i>Stenotrophomonas rhizophila</i> *** <i>Janthinobacterium sp</i> ** <i>Acidovorax soli</i> ** <i>Methylobacterium oryzae</i> * <i>Methylobacterium radiotolerans</i> *	P3 <i>Methylobacterium populi</i> * <i>Sphingobium yanoikuyae</i> *	
	P6 <i>Delftia tsuruhatensis</i> **	
	P5 <i>Methylobacterium aquaticum</i> * <i>Delftia tsuruhatensis</i> **	
	P7 <i>Sphingobium yanoikuyae</i> * <i>Methylobacterium aquaticum</i> * <i>Methylobacterium radiotolerans</i> *	

RO : RO 装置, Ac : 透析液原末溶解装置, CDD : 中央供給装置, P1-P7 : 患者監視装置 1~7 番
* : α -Proteobacteria 網, ** : β -Proteobacteria 網, *** : γ -Proteobacteria 網, # : 放線菌門

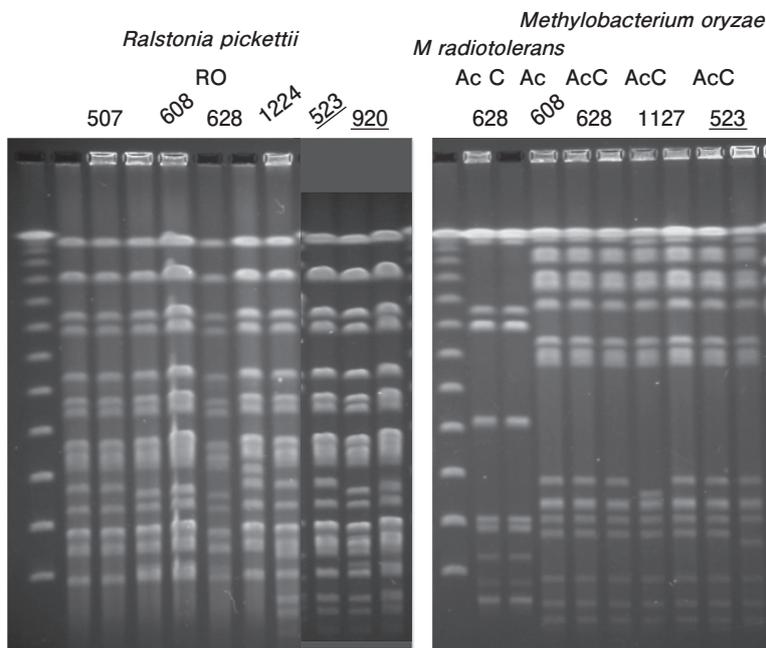


図 1c 透析機器据付後 1 年間の微生物汚染状況の推移 : 施設 A
PFGE による分離菌の genotype

genotype も同一であった (図 1c). 当初より RO と CDD の間に UF 膜が設置されていたので分離菌の連続性はなかった. しかし, 初期洗浄中 Ac と CDD とは交通があり, その後永続的に分離された *M. oryzae* の他に *M. radiotolerans* も genotype が同一の菌株が両

方の装置から分離された^{10,11)}.

施設 B は 2013 年 10 月に三園 - 三郷水系の地域で開設された. RO モジュールはホルマリン充填され搬入されたため, RO 装置単独の洗浄を 3 日行ったあと個人用患者監視装置 (Console) の洗浄を行った. 初期

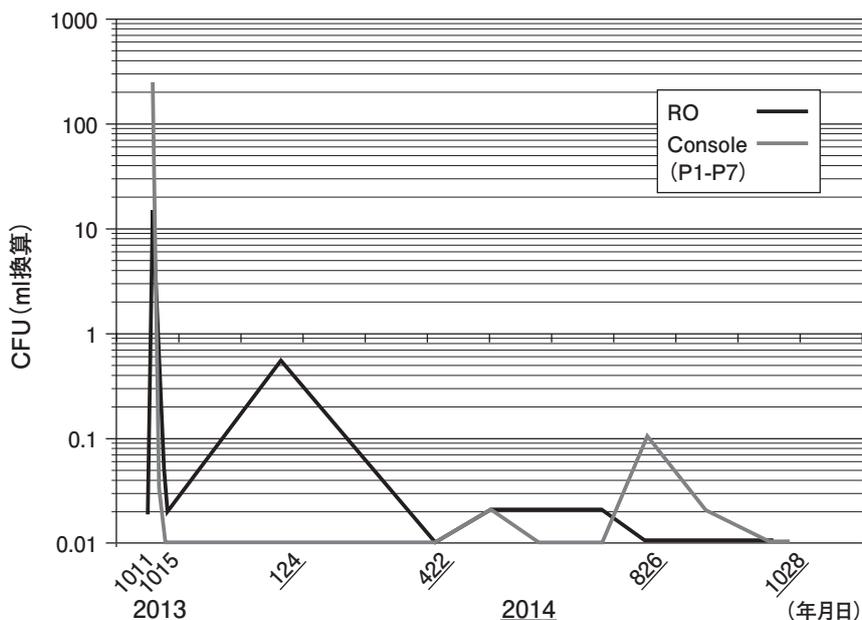


図 2a 透析機器据付後 1 年間の微生物汚染状況の推移：施設 B
生菌数の推移

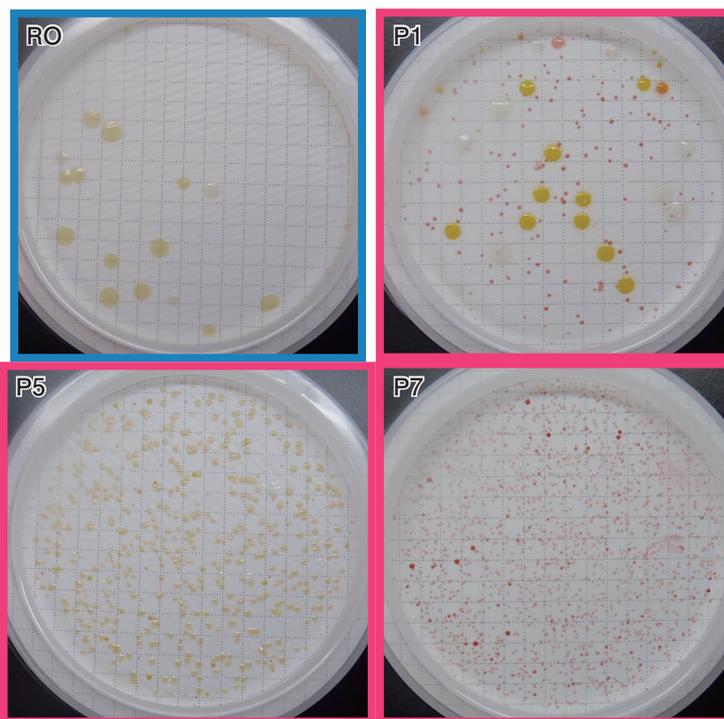


図 2b 透析機器据付後 1 年間の微生物汚染状況の推移：施設 B
初期洗浄中 (RO) および初回通水時培養のフィルタ上のコロニー形状

洗浄時の RO の生菌数は初回通水時より 4 日後のほうが多かった。Console は初回通水時が最多で、フィルタ上のコロニー形状也多様でありかつ Console ごとに異なった (図 2a, b)。分離された菌は α -および β -Proteobacteria 網の他にグラム陽性球菌の Firmicutes 網まで見られた (表 1)。PFGE 法で genotype を見ると、RO から分離された *Delftia acidovorans* と同じ株

が RO 水で水洗した Console から分離され (図 2c 左)、Console P1 と P5 から分離された *Sphingomonas* 属 (*S. pseudosanguinis*) も同一の菌株であった (図 2c 右端)。しかしこれ以外すべて菌株も異なりコロニー観察時の印象と同様の高い多様性が観察された。その後 7 日目にはいずれも陰性 (10 CFU/50 ml 未満) 化した。RO・consol とも生菌数が上昇することがあり、

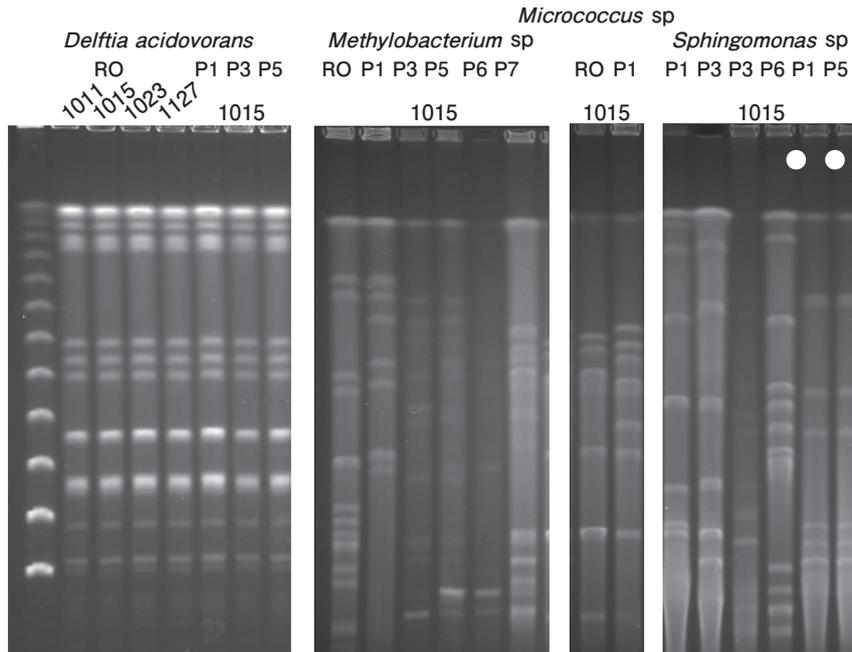


図 2c 透析機器据付後 1 年間の微生物汚染状況の推移：施設 B
初期洗浄中に分離された菌の PFGE による genotype

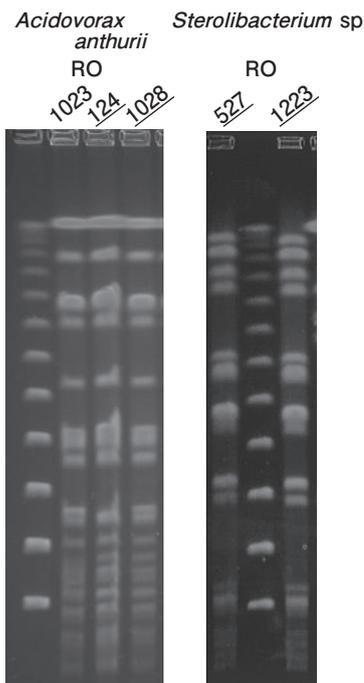


図 2d 透析機器据付後 1 年間の微生物汚染状況の推移：施設 B
経過中に分離された菌の PFGE による genotype

消毒薬滞留の追加で陰性化した。コロニーも 10 日目以降に初見となるものが大部分となり、経時的に観察すると *Acidovorax anthurii* や *Sterolibacterium sp.* が 5~6 回に 1 回分離され、genotype が同一の株であった (図 2d)。

施設 C は利根川水系にあり、2013 年 12 月に 9 年使用した RO モジュールおよび付属の電磁弁・ポンプの

交換を行い系全体の過酢酸洗浄も同時に行った。モジュール交換前より RO から菌は分離されたが、交換後新たに初見日が 3~5 日目の黄色のコロニーが分離されるようになった (図 3a)。 *Novosphingobium capsulatum* と *Sphingobium yanoikuyae* で、検体量を調整して経時的に観察すると確率論的に同一の菌株 (図 3b) が分離された⁵⁾。

3 考 察

今回の検討で、人工透析用の機器の据付時から菌は分離され、初回通水時の生菌数が最も多く (図 1a, 2a)、菌の多様性も一番高い (表 1, 図 1b, 2b, 3a) ことが明らかとなった。そのうえ初期洗浄時に発見された汚染が、その施設の透析液・補充液製造系の永続的な汚染源となる可能性が示された。適正な方法で培養に用いる検体量を増やしたり⁸⁾ (施設 A : *R. pickettii*, *M. orizae*, 施設 C : *S. yanoikuyae*)、検査頻度を上げて確率論的に分離された生菌を拾う (施設 B : *A. anthurii*, *Sterolibacterium sp.*, 施設 C : *N. capsulatum*) など培養の測定感度を上げると初期洗浄時と同じ菌種が分離された。その genotype を見ると、同じ場所から月~年単位経過した後にもまったく同じ遺伝子を受け継いだ菌が分離されていた (図 1c, 2d, 3b)。菌は自然には発生しないので汚染の起源は施設への搬入以前にあり、システム構成から機器自体の汚染・配管部材内

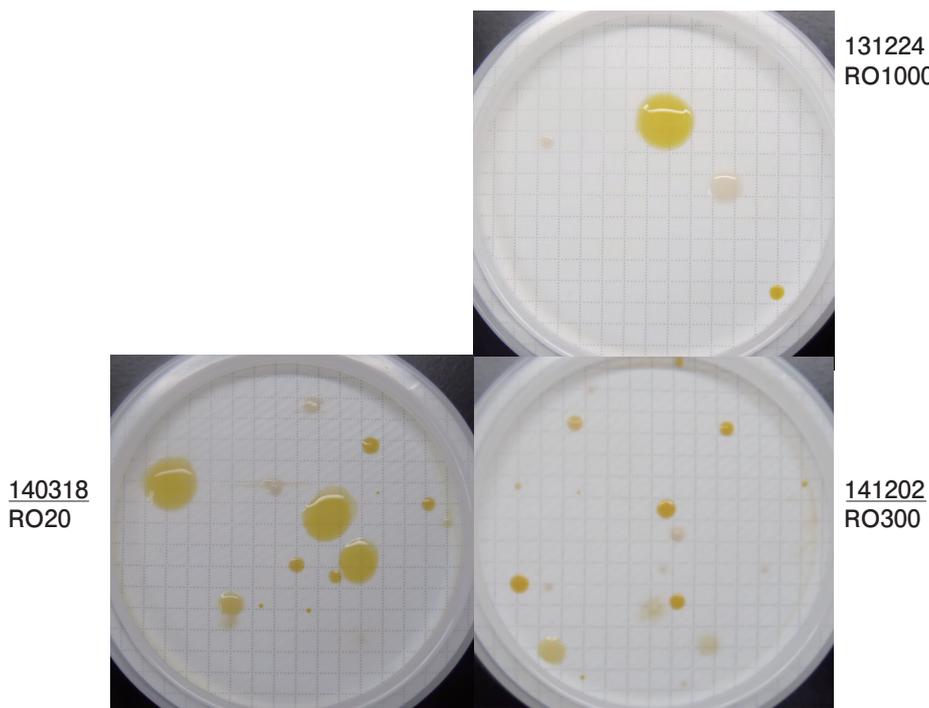


図 3a RO モジュール交換後 1 年間の微生物汚染状況の推移：施設 C
対象菌が培養された時のフィルタ上のコロニー形状

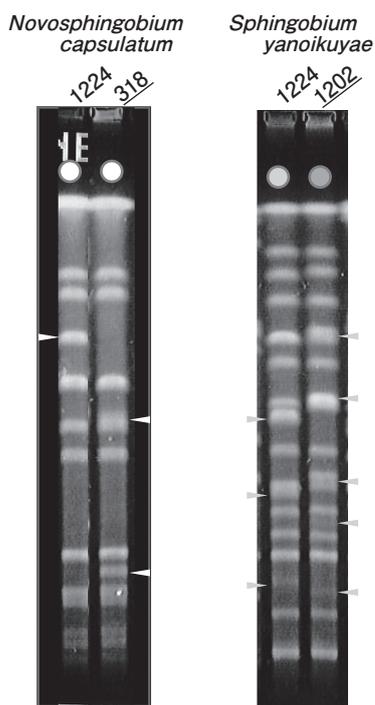


図 3b RO モジュール交換後 1 年間の微生物汚染状況の推移：施設 C
PFGE による分離菌の genotype

の汚染と配管作業による人的汚染の三つの可能性が考えられた。透析用機器は多機能に対応するために既製のポンプやソレノイドバルブなど色々なパーツが用いられ、構造も複雑で多数の分枝を持っている。部品内

汚染やこれらを組み立てるさいの製造時汚染は否定できない。さらに工場から出荷される前に作動を確認し水漏れを点検するため通水試験を行うが、分枝やデッドスペースの抜水が不完全なまま出荷される。出荷時すでにバイオフィルムの存在が疑われる状況は十分に揃っている。さらに genotype が同じということは透析液製造系内に永続的に存在していたことになり、管壁に形成されたバイオフィルムの中で菌が継代していた可能性が強く示唆される。

一方、メーカーが異なり製造場所も異なる施設 A の Ac と CDD で同一の菌株が観察された。この原因として配管作業による汚染¹²⁾の他に、上流にある Ac の汚染が CDD に広がった可能性と、最も汚染度の高い CDD の汚染が系全体に広がった可能性が考えられる。いずれの場合でも少なくとも片方の機器は、UF 膜が設置されるまでの据付後数日間の初期洗浄中に生じた汚染がその後の永続汚染の原因になったことになる。これを含め今回同一株として分離された菌は α -および β -Proteobacteria 網であったが、特定の菌種ではなく施設ごと機器ごとに異なった (表 1, 図 1c, 2d, 3b)。どの菌も潜在的にバイオフィルム形成能を有しその中で共生する¹³⁾ことと関連しているのかもしれない。

透析液が On-line HDF 用補充液へ流用されて 20 年以上この機器自体の製造時汚染が看過されていた原因の一つに、液の清浄化が ETRF による膜ろ過²⁾に偏重され、その上流側の汚染管理を言及していない^{4, 14, 15)}ことがある。汚れていない前提で透析液の清浄度基準が規定され²⁾、汚染度の高い場所や時間を採しそれを是正するという発想¹⁶⁾に乏しく、開放系作業時に清潔操作^{6, 17)}が重要となることへの認識も低い。無菌製品製造の先行業界である製薬業界では、配管から常に同じ菌が分離される状況は洗浄消毒が不十分なためとされている¹⁸⁾が、日常的に no touch technique が行われているので、菌叢の変化が起きない状態の前提に清潔操作がある事は認識されていなかった。つまり設置後に生じた汚染度が強く高頻度であった³⁾ために、いつから汚染があったのかの議論にすらならなかったことが窺える。一度形成されたバイオフィルムを消失させることは困難¹⁾なことは知られており、機器の販売・製造業者に製造時汚染の現状を認識し改善に取り組むように働きかけるべきである。2015 年 10 月現在、on-line HDF 対応の医療機器認可を受けている透析機器の取扱説明書にもこれらの規定はなく、記載された消毒法を選択した妥当性のある科学的根拠も提示されていない。数 100 ml～数 10 L 補液として流用される透析液はいわば大量注射液 (large volume product; LVP) であり^{16, 19)}、今回明らかとなった医療機器の汚染が人体に影響がないとは言いきれない。透析液製造所である透析施設²⁾として、開放系の清潔操作の維持と確実な初期洗浄法の模索による汚染の防止と低減が必須となる。さらに透析施設と機器の製造販売業者との間で機器の適格性評価 IQOQPQ^{1, 2)}を文書化し、第三者に問題を指摘される前に取扱説明書・仕様書の不備の是正など抜本的な改善を行う必要があると思われた。

本研究は平成 26 年度日本透析医会公募研究助成によってなされた。

文 献

- 1) ISO : ISO 23500 : 2014. 血液透析用透析液及び関連療法に用いる溶液の調製及び品質管理の手引.
- 2) 秋葉 隆, 川西秀樹, 西沢良記, 他 : 透析液水質基準と血

- 液浄化器性能評価基準 2008. 透析会誌 2008; 41 : 159-167.
- 3) 南 伸治, 大藪英一, 霜島正浩, 他 : 大阪府下透析施設の透析液システムの上流から下流までの菌数と菌叢変化. 防菌防黴 2013; 41 : 377-384.
- 4) 大藪英一 : 医薬品製造現場から医療現場まで水の微生物管理 6 透析の安全性—その舞台裏の脆弱性. 防菌防黴 2013; 41 : 438-452.
- 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 2014; 29 : 301-304.
- 6) 本田和美, 熊谷拓也, 根岸秀樹 : 透析液の水質管理 最重要ポイント きれいに作る 透析液製造. 透析スタッフ 2014; 2(4) : 21-27.
- 7) 大藪英一 : 透析液清浄化に不可欠なモニタリング技術とその実践方法. Clin Engineering 2011; 22 : 1127-1135.
- 8) 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. 峰島三千男編. 透析液清浄化に向けて改訂版 206-215. 大阪 : 医薬ジャーナル, 2015.
- 9) Weisberg WG, Barns SM, Pelletier DA, et al. : 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. J Bacteriol 1991; 173 : 697-703.
- 10) 青木弘之, 藤岡紀昭, 大藪英一, 他 : 透析施設開設時の透析装置の微生物汚染状況. 腎と透析 2014; 77(別冊 HDF 14) : 179-181.
- 11) 青木弘之, 藤岡紀昭, 大藪英一, 他 : 製造系の微生物汚染の起源. 腎と透析 2015; 79(別冊 HDF 15) : 193-195.
- 12) Osono E, Honda K, Inoue Y, et al. : Aquatic Bacteria Found on the Hands Are a Potential Cause of Aqueous Contamination. Biocontrol Science 2015; 20, in review.
- 13) 富岡敏一, 大藪英一, 土戸哲明, 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 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 : 181-197.
- 14) 福井隆一 : 熱水消毒と部材交換・劣化. 防菌防黴 2013; 41 : 483-490.
- 15) 大藪英一 : 透析液清浄化に向けた微生物管理細菌検査による清浄化評価の現状と問題点. 腎と透析 2014; 77(別冊 HDF 14) : 15-18.
- 16) 片山博仁 : 透析液の水質管理 近未来編 先行業界の測り方. 透析スタッフ 2014; 2(4) : 110-122.
- 17) 本田和美, 大藪英一, 井上有紀, 他 : 透析液の清浄化に手の衛生手技は不可欠である. 透析会誌 2010; 43 : 361-366.
- 18) 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 2013; 41 : 353-358.
- 19) 布目 温 : PIC/S と製薬用水 (5). PHARM TECH JAPAN 2014; 30 : 41-47.