

# 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システム消毒後の細菌の生態制御学的研究

— (A) 透析液汚染細菌の加熱および過酸化水素処理による損傷菌の発生 —

小池佳都子\*<sup>1</sup> 坂元 仁\*<sup>1</sup> 古田雅一\*<sup>1,2</sup> 大藪英一\*<sup>3,4</sup> 土戸哲明\*<sup>1</sup>

\*<sup>1</sup> 大阪府立大学研究推進機構微生物制御研究センター \*<sup>2</sup> 大阪府立大学大学院工学研究科 \*<sup>3</sup> 越谷大袋クリニック  
\*<sup>4</sup> 日本医科大学微生物免疫学教室

key words : 血液透析, 透析液汚染菌, 加熱, 過酸化水素, 損傷菌

## 要 旨

血液透析システムから分離した好気性の従属栄養性グラム陰性桿菌でかつ通性低栄養性汚染細菌の中から、とくに非凝集性の *Pelomonas saccharophila* A5 株を選抜し、その殺滅のための加熱処理および過酸化水素処理感受性を調べた。本菌は大腸菌や透析液汚染菌の A2 と A4 株よりも双方の処理に感受性で、45℃、40 分の加熱処理で生存数が 2 桁低下、0.02%、30 分の過酸化水素処理で 3 桁低下した。両処理によって発生する損傷菌を、二つの方法による二重平板法で計数した。一つ目の方法は、殺菌処理した細菌細胞が処理後の培養時に発生する過酸化水素に感受性となる損傷菌である。R2A 培地に含まれるピルビン酸ナトリウム (NaP) の濃度 (0.03%) を低下させて過酸化水素の発生を評価した。0.005% と 0.01% に低下させた場合、加熱処理では通常濃度のもと変わらず、後培養時に細胞あるいはその近傍で発生するとみられる過酸化水素に対する消去能低下に由来する損傷菌は生じないとみられたが、消毒目的で添加した過酸化水素による処理では、NaP の添加濃度が 0.005% と 0.03% との間で明らかな差が現れた。もう一つの方法は、平板培地中の塩化ナトリウム (NaCl) 感受性化で判定した細胞質膜 (内膜) 損傷と、デオキシコール酸ナトリウム (NaDC) 感受性化で判定した外膜の損傷による損傷菌の発生で

ある。グラム陰性細菌の細胞表層損傷が、内膜と外膜のどちらに強く現れるかを検討した。この化合物感受性化による損傷菌発生の評価法によれば、45℃ 加熱処理では 0.5% NaCl 感受性化損傷菌は少なく、0.01% NaDC 感受性化損傷菌が 2 桁近く出現すること、0.02% 過酸化水素処理では 0.5% NaCl 損傷菌は 1 桁ほどあり、0.01% NaDC 損傷菌でも 2 桁近く生じることが判明した。さらに、45℃ 加熱と 0.02% 過酸化水素の併用処理では顕著な相乗殺菌効果が得られ、多くの NaCl 損傷菌とさらに多くの NaDC 損傷菌の発生が示された。透析汚染菌においては殺菌処理はもちろん、これら選択能をもつ化合物への感受性も高いことが明らかとなり、その従属低栄養性の特徴に鑑み、損傷菌発生に着目した検出計数法および制御法の開発が期待される。

## はじめに

血液透析は 2016 年末現在、日本において約 32 万人が受けており、今後の高齢化社会では一層増加するものと推測されている。我が国ではこの透析液はその設備をもつ医療機関で調製され、日本透析医学会などの関係学会・団体のガイドラインに従って配管や製造装置についてその定期的な清浄化・無菌化への努力がなされている。しかし、それでも生残菌が検出されるケースがあり、その科学的な制御方法の開発が急務である<sup>1)</sup>。

Studies of the ecological control of bacterial flora after system disinfection toward the improvement of the quality of dialysate in hemodialysis system (A) Occurrence of injured cells of a bacterium contaminated in dialysate by treatments with heat and hydrogen peroxide  
Research Center for Microorganism Control, Organization for Research Promotion, Osaka Prefecture University

Katsuko Koike  
Jin Sakamoto  
Masakazu Furuta

殺菌・消毒処理の定期的な実施にもかかわらず生残菌が検出される例においては、いくつかの要因が考えられる。最も有力なものとしては、透析液の製造・送達システム内付着菌によるバイオフィルムの生成が想定される。細菌の付着やバイオフィル形成は、一般にその種々の殺菌処理に対する抵抗性を高めることが知られており<sup>2-4)</sup>、ひとたび固着した場合にはその根絶が困難になりがちである。大菌ら<sup>5)</sup>は、とくにシステムのインストール時からの混入細菌のバイオフィルムの存在の可能性を指摘している。富岡ら<sup>6,7)</sup>も、単離された透析液汚染細菌が凝集性やバイオフィルム形成性の特性を持つことを示している。

その別の要因として、殺菌処理後の生残菌検出に関わる損傷菌の存在があげられる。これまでに大腸菌など多くの細菌の加熱や薬剤処理によって損傷菌が生じ、殺滅しきれずに生残し、通常の検出法ではそれらの一部が検出されず、のちになって問題を誘起する可能性がある<sup>8-11)</sup>。とくに透析液汚染菌には従属栄養細菌の中でも低栄養細菌（貧栄養細菌）のものが主体で、健常菌でも発育が遅いうえに損傷すると回復にさらに時間を要し、検出が不能あるいは遅れがちとなる。また低栄養細菌には通常の濃度の構成成分を含む培地では発育できないが、それを100倍、1,000倍に希釈したかなり低栄養条件の培地で発育できる偏性低栄養性のもののほかに、これら希釈培地と希釈無しの原液培地の双方で発育可能な通性低栄養細菌の存在が知られている<sup>12,13)</sup>。このような低栄養細菌が損傷を受けたときには、栄養要求性や阻害性化合物感受性がさらに強くなる可能性がある。このような低栄養細菌における損傷菌発生については、蛍光染色法によってこれを検出した大菌ら<sup>14)</sup>の報告を除き、著者らの知る限りこれまで検討例はあまり見当たらない。

前報<sup>15)</sup>において、著者らはグラム陰性で凝集性透析液汚染細菌の *Caulobacter vibrioides* A2 と *Sphingomonas koreensis* A4 の加熱と過酸化水素への感受性について検討した。その感受性の評価では、それらの細菌の凝集性に鑑みて Takano and Tsuchido<sup>16)</sup> の提唱による液体培地使用の発育遅延解析法により生残性を検討した。しかしこの方法では、損傷菌を含む場合に生残性を過小評価することになるため、その後 Tsuchido<sup>17)</sup> が提唱した差分後培養法ではこの方法とともに生残数計数に損傷菌蘇生強化措置を導入した強化平板法を併

用し、これら二つの後培養法で得た生存値の差によって損傷菌数を求める手法が出されている。この強化法としては、発育培地の栄養性の向上（アミノ酸、ビタミンや天然培地などの添加）や抗酸化対策（NaP の添加）があげられる。

またその一方で、従来からの古典的な損傷菌計数法として、非凝集性の細菌にしか適用できないが、非選択培地と選択培地を用いる二重平板法がある。この場合の選択原理は、比較的高濃度の塩化ナトリウムやデオキシコール酸などの阻害性化合物への感受性化であり、非損傷菌、損傷菌および死菌をそれぞれの選択法に基づいて求める評価法である。

今回は、透析液汚染菌の加熱と過酸化水素による殺菌処理後、どのような損傷菌がどの程度発生するのか、その特性を明らかにするため、差分後培養法としての二重平板法の利用によって評価することを試みた。

## 1 方法と材料

### 1-1 使用菌株と培地および菌懸濁液の調製

既報<sup>6)</sup>研究で使用してきたグラム陰性人工透析液汚染細菌5株のうち、非凝集性でかつ比較的増殖速度が大きい株を使用することとし、*Pelomonas saccharophila* A5 株を選定した。この菌の保存用 Reasoner's Assay no.2 agar, pH7.0（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、30℃ で16時間前培養した（OD<sub>650</sub> は0.06 付近で対数増殖期後期に相当）。その2 ml を18 ml の R2B 培地を含む100 ml 容フラスコ中、30℃ で24時間本培養した（OD<sub>650</sub> は0.14 付近で定常期前の直線期に相当）。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回洗浄して濃縮し、新鮮 KPB に懸濁後、OD<sub>650</sub> が約0.3 になるよう KPB で希釈した。

### 1-2 添加化合物

過酸化水素、ピルビン酸ナトリウム（NaP）、塩化ナトリウム（NaCl）、デオキシコール酸ナトリウム（NaDC）は和光純薬株式会社製のものを使用した。一部の実験ではカタラーゼ（和光純薬工業社製）も用いた。化合物の濃度はすべて最終濃度で、%（w/v）で表わした。

### 1-3 加熱処理

前報<sup>14)</sup>と同様に、9 ml の KPB を含む 100 ml 容フラスコを予め各所定温度に予熱しておき、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。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。初発生菌数は実験ごとに変動するが、 $6 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$  の範囲である。

### 1-4 過酸化水素処理

前報<sup>14)</sup>と同様に、各最終濃度となるよう調製した過酸化水素水（市販 30% 液を適宜作製）を含む KPB 9 ml 入りの 100 ml 容フラスコを予め 30°C 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。初発生菌数は前項と同様である。

### 1-5 併用処理

上記 1.3 と 1.4 の併用による処理で、過酸化水素処理時の温度を高温にして行った。

### 1-6 生存菌と損傷菌の計数

健常菌および死菌の測定では R2A 寒天（日本製薬製、pH 7.0~7.4）平板を用いた。損傷菌計数のための損傷菌検出原理を添加ピルビン酸ナトリウム（以下 NaP）の濃度差とする場合には、その濃度を変化させた平板（R2A/NaP）を調製した。この場合、NaP は市販の R2A に 0.03%（w/v）含まれているため、NaP 以外の各組成成分を個別に入手し、これに低濃度（0.005, 0.01, 0.03%）の NaP（無菌ろ過）と寒天を添加した。なお R2A 培地の組成は、0.05% ペプトン、0.05% 酵母エキス、0.05% カザミノ酸、0.05% ブドウ糖、0.05% 可溶性デンプン、0.03% リン酸一水素カリウム、0.005% 硫酸マグネシウム（7水塩）である。また阻害剤感受性化による損傷菌の計数には塩化ナトリウム（NaCl）とデオキシコール酸ナトリウム（NaDC）をそれぞれ添加した R2A 平板（それぞれ、R2A/NaCl, R2A/NaDC）も用いた。試料を表面塗抹した平板を、30°C で静置培養した。コロニー計数は培養 4 日後に行い、計数値はコロニー形成単位（CFU）で表わした。カタラーゼ添加平板の調製においては、個別調製培地を使用し、NaP は除いた。

各実験は少なくとも 2 回繰り返して再現性を確認した。ただ、各回の結果の全体的な傾向はほぼ類似していたが、生存数の値は回ごとに全体的に変動したため典型的な結果を採用した。

## 2 実験結果

本研究では、透析汚染菌の殺菌・消毒の目的で比較的低温の加熱と過酸化水素処理を行い、それらによる損傷菌の発生と計数を、二重平板法に基づいて行った。さらに両処理の併用殺菌効果も検討した。

### 2-1 加熱および過酸化水素感受性

使用した *P. saccharophila* A5（以下 A5 株）の加熱処理と過酸化水素処理耐性を調べた。当初、処理条件は損傷菌の発生と最終的な両処理の併用を考慮して比較的温かな効果を示すよう、加熱では 43~45°C で 20 分、過酸化水素では 0.005~0.02%，20 分とした。R2A 培地における平板法によって得た生存性の結果をそれぞれ **図 1** と **図 2** に示した。この結果から、半桁~1 桁程度の生残数低下を示した。45°C、40 分の加熱処理と 0.02%、30 分の過酸化水素処理を以降の基本処理条件に設定した。

次に、この設定処理条件下での生残数低下の経時変化を調べた。45°C での加熱処理、0.02% の過酸化水素処理とも処理時間とともに生残数は低下したが、その生残曲線はともに上に凸の形状を示した（**図 3**）。以下、この生残菌のうちどれくらいの割合を損傷菌が占めるのか、損傷菌の発生について検討した。

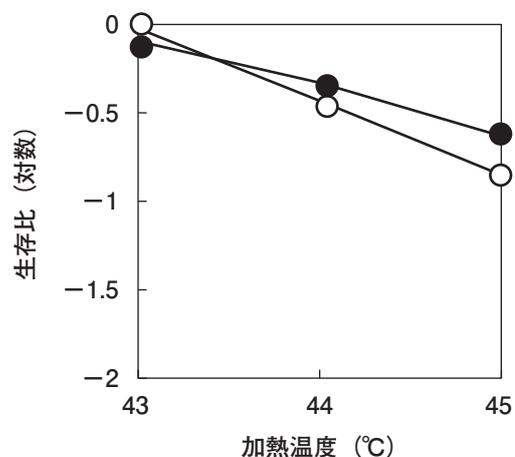


図 1 *P. saccharophila* A5 の熱感受性

異なる調製 R2A 培地中、30°C で 24 時間発育させた細胞を、リン酸緩衝液中 43~45°C で 20 分間加熱処理した。○：構成成分個別調製培地、●：市販培地

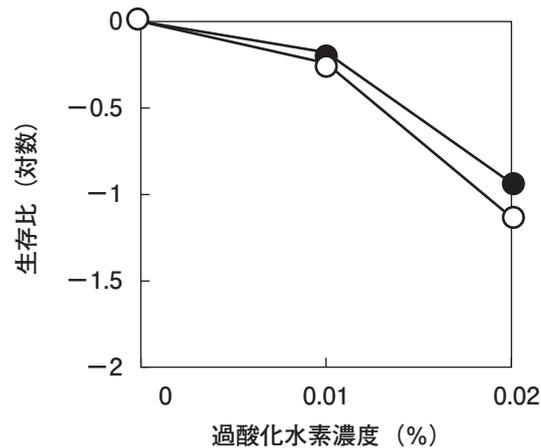


図2 *P. saccharophila* A5 の過酸化水素感受性

図1と同様に調整した細胞を、30℃保温下0.01および0.02%の過酸化水素で20分間処理した。その後、カタラーゼ溶解液(12,000 U/ml)塗布(○)または0.03% NaP混合R2A平板(●)に処理菌液を塗布した。

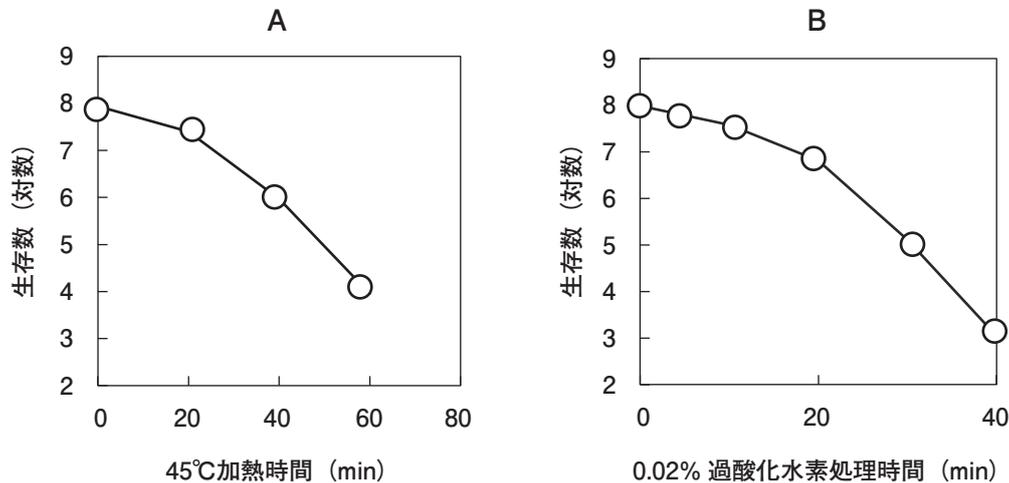


図3 *P. saccharophila* A5 の加熱(45℃)処理および過酸化水素(0.02%)処理による死滅の経時変化

## 2-2 ピルビン酸ナトリウム依存性蘇生法による損傷菌

別途大腸菌で報告<sup>18)</sup>しているNaPの細胞内で発生した過酸化水素の除去による損傷菌蘇生効果を本菌についても検討するため、その濃度を変化させて生残性を調べた。市販のR2A培地には0.03%のNaPが含まれており、通性低栄養細菌とみられるA5株はNaPが含まれていないとほとんど発育できない。したがって、培地内のNaPの濃度が低下すると、本来これに依存する損傷菌の一部は発育が低下することが期待される。また逆に、この含有濃度以上に上げた場合には、大腸菌でその存在が認められた<sup>17)</sup>ように、殺菌処理後の後培養過程で発生する2次損傷によって、最終的に死菌集団に含まれる潜在的な損傷菌が復活できるようになって、結果的に生残菌数が通常濃度での生菌数よりも

増加する可能性もありうる。

この実験を行うためには、市販のR2A培地中のNaPを除き、新たに低濃度のNaPを添加する必要がある。そこで、R2A中の各成分を入手、混合して調整した自家調製培地でA5株の熱耐性を調べたところ、図1に示すように、やや差があるもののほぼ市販の培地と同様な結果が得られた。

そこで、NaP濃度を0.005, 0.01, 0.03%と変化させたR2A平板上でのA5株の45℃での加熱処理と、0.02%の過酸化水素処理後の生存性を検討した。加熱処理の結果を図4に、過酸化水素処理の結果を図5に示す。これらの結果から、加熱処理ではほとんどその存在は認められないが、一方の過酸化水素処理では0.005% NaP添加培地で生存性が低下したことから、NaP依

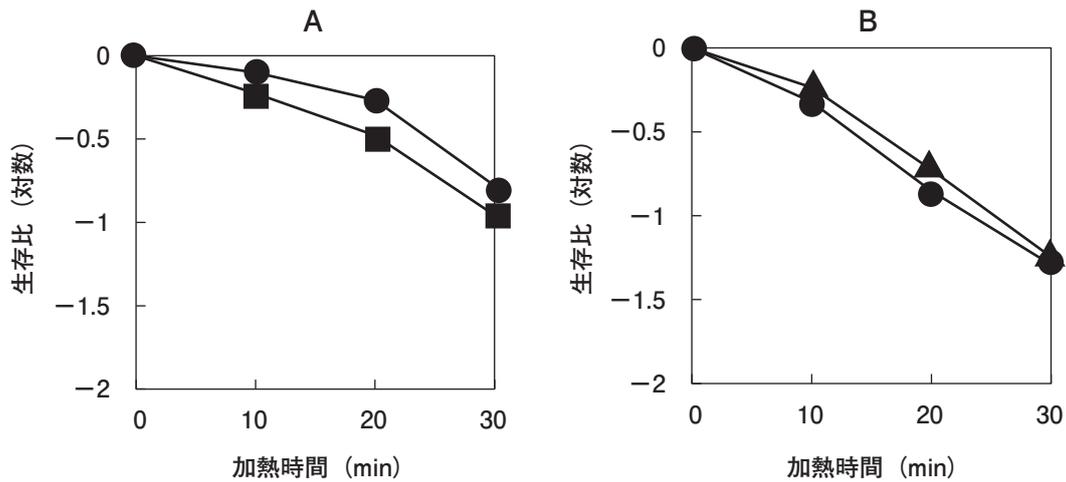


図4 *P. saccharophila* A5 の45°Cでの熱死滅に対するR2A平板培地中のピルビン酸ナトリウムの濃度の影響  
 ■ : 0.005%, ▲ : 0.01%, ● : 0.03%

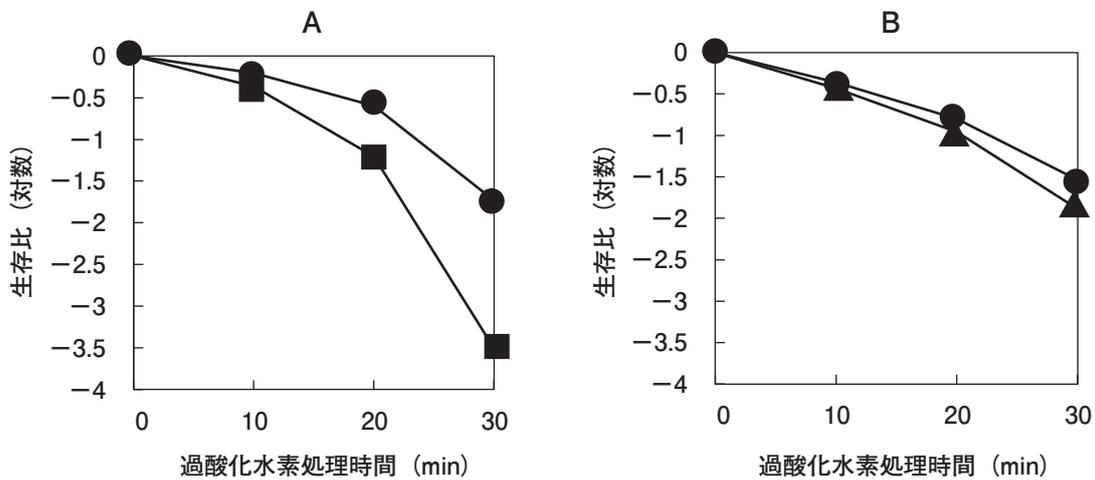


図5 *P. saccharophila* A5 の0.02%過酸化水素に対するR2A平板培地中のピルビン酸ナトリウムの濃度の影響  
 ■ : 0.005%, ▲ : 0.01%, ● : 0.03%

存的な蘇生を示す損傷菌が生じることが示唆された。なお、NaPの添加効果は、カタラーゼ(1,200 U/ml)によってもほぼ同等の効果が得られた(図2)。

### 2-3 塩化ナトリウムおよびデオキシコール酸ナトリウム感受性化法による損傷菌

ほぼ同等の殺菌効果を示す45°C、40分の加熱処理と0.02%、30分の過酸化水素処理についてR2AとR2A/NaClおよびR2A/NaDCの2種類の寒天培地を併用する二重平板法によってNaCl感受性化損傷菌とNaDC感受性化損傷菌を計数した。

図6に示すように、NaClの濃度をそれぞれ変動させた平板培地上でのCFUは、加熱処理では無添加培地で約1桁低下、NaCl0.5%添加培地でそれよりさら

に少し低下、過酸化水素処理では無添加培地で約1桁半低下、同濃度NaCl添加培地でさらに1桁程度低下した。したがって、無添加培地とNaCl添加培地とのCFU差がNaCl感受性化損傷菌数に相当する。0.6%NaClおよび結果は示さないが、それ以上1%までのNaCl濃度添加培地では未処理菌でもまったく発育できなかった。

NaDC添加培地の場合は、図7に示したように、加熱処理では無添加培地で約1桁低下、NaDC0.005%添加培地でそれよりさらに約1桁低下、0.01%添加でもさらに約2桁低下し、過酸化水素処理では無添加で約1桁半低下、NaDC0.005%添加培地でそれよりさらに約1桁低下、0.01%では同じく約2桁低下した。これらの結果に基づき、NaDC感受性化損傷菌の数を

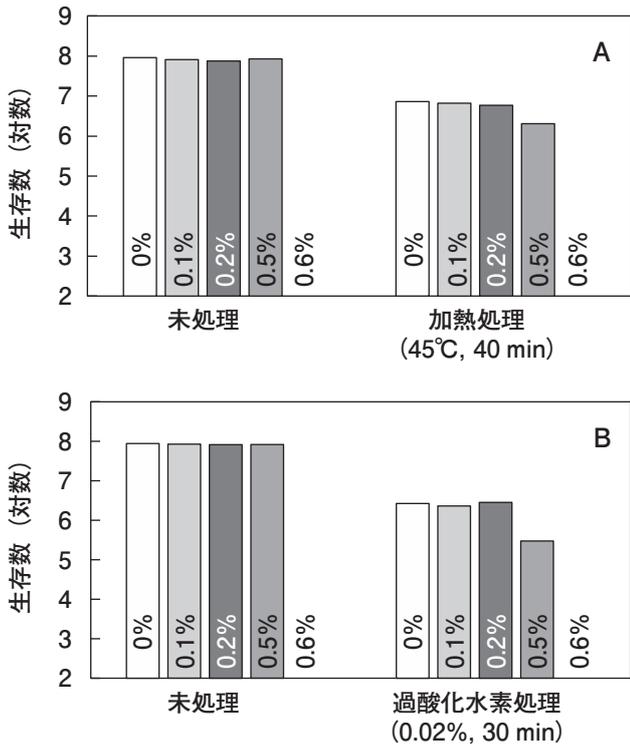


図6 *P. saccharophila* A5の加熱処理 (A) と過酸化水素処理 (B) による平板培地中の塩化ナトリウム感受性化  
加熱処理は45°C, 40分, 過酸化水素処理は0.02%, 30分, 各バー内の数字は塩化ナトリウムの添加濃度。

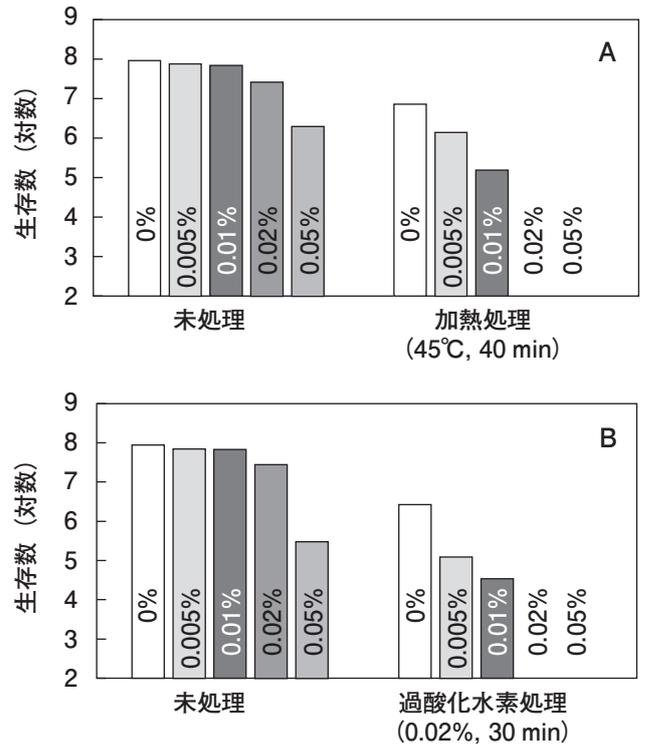


図7 *P. saccharophila* A5の加熱処理 (A) と過酸化水素処理 (B) による平板培地中のデオキシコール酸ナトリウム感受性化  
加熱処理は45°C, 40分, 過酸化水素処理は0.02%, 30分, 各バー内の数字はデオキシコール酸ナトリウムの添加濃度。

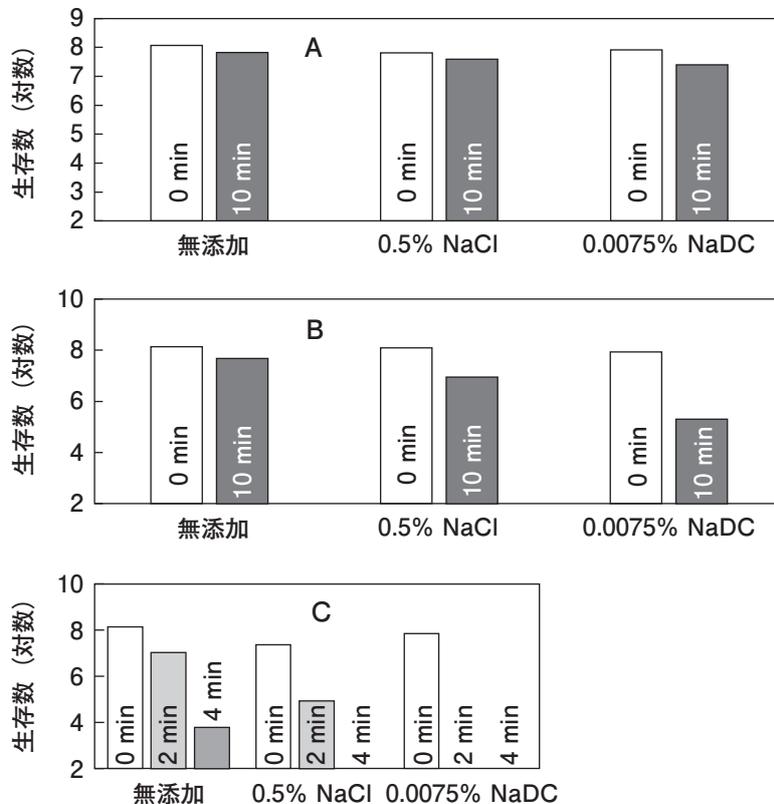


図8 *P. saccharophila* A5の加熱処理 (A) と過酸化水素処理 (B) およびそれらの併用処理 (C) による平板培地中の0.5% 塩化ナトリウムおよび0.0075% デオキシコール酸ナトリウム感受性化  
加熱処理は45°C, 過酸化水素処理は0.02%, 各バー内の数字は処理時間。

無添加培地と NaDC 添加培地との CFU 差から求めることができる。0.02% と 0.05% の NaDC では未処理菌の CFU も低下し、加熱および過酸化水素処理菌では損傷菌も検出不能となった。

#### 2-4 加熱および過酸化水素併用処理効果

加熱処理と過酸化水素処理との併用における A5 株の死滅と損傷について検討し、結果を図 8 に示した。この場合、対照となる加熱単独および過酸化水素単独処理は生存数低下があまり生じない温和な条件とするため、加熱温度と過酸化水素濃度は上述の基本処理条件と同一にしたが、処理時間を共に 10 分間の処理とした。そしてこれらの併用処理の場合は処理時間を 2 分と 4 分の短時間とした。

検討の結果、これらの併用処理によってきわめて短時間に生残数が低下し、相乗的な殺菌効果が確認された。NaCl 感受性化損傷菌と NaDC 感受性化損傷菌とも、加熱単独処理による発生は軽微であるが過酸化水素の場合は明確に現れ、併用処理では前者の損傷菌で相乗的な損傷作用の増大が認められるとともに、後者の損傷菌の発生はさらに顕著となった。

### 3 考察

血液透析液汚染菌の特徴については既報論文<sup>6)</sup>で報告したが、ここで用いた *P. saccharophila* A5 も前報<sup>14)</sup>と本研究の結果から、加熱や過酸化水素などの殺菌処理に対して大腸菌など通常の細菌よりも弱い傾向が示された。透析液は窒素源を含まないため、これに対して飢餓状態にあるとみられ、通常細菌の飢餓状態では高栄養条件下よりも殺菌処理への抵抗性が上昇することが想定されるが、本菌ではそれでもなお抵抗性が低いとみられる。単離浮遊状態では殺菌処理に感受性であることから、定期的な殺菌消毒処理でも生残する場合にはその特性が指摘されているように、透析システム内ではバイオフィルムを形成して生息しているものと推察される。

他の透析液汚染菌も同様とみられるが、A5 株は従属栄養性かつ低栄養性とみられる。既報<sup>6)</sup>実験で示した通り、これらの汚染菌は通常濃度の nutrient broth でも発育可能なことから、高低双方の栄養条件下で発育可能な通性低栄養性細菌<sup>12)</sup>とみられる。低栄養細菌の別の特性として、イオン強度に感受性であることが

知られている<sup>19)</sup>。本研究においても、A5 株は大腸菌が十分発育できる 0.6~1% 程度の NaCl 濃度ではまったく発育できないこと（図 6）はこの特性によるものと推察される。

NaP はリステリアやカンピロバクターなどの一般的な食中毒細菌用の市販培地に添加されており、大腸菌などでも補添された培地が市販されているが、その目的は培養とそれに伴う種々の操作過程で発生する過酸化水素の消去にあると考えられる<sup>20)</sup>。岩田ら<sup>21)</sup>は、大腸菌の加熱損傷菌の天然培地平板上への NaP 添加が蘇生効果を高めることを報告しているが、A5 株でも市販 R2A 培地中の NaP が含有 0.03% の濃度では健常菌では十分であっても損傷するとこの濃度や、さらに低濃度の NaP では、抗酸化能が不十分となって発育不能となる可能性が想定される。本研究ではこの想定に基づいて検討したが、本菌の加熱処理ではこの濃度差による損傷菌発生は見出せなかった。一方の過酸化水素処理では NaP の濃度差による生存の差が認められ、これは損傷菌自身のもつ消去能の低下が原因の一つとみられた。なお、NaP は過酸化水素と直接反応する捕捉剤であるが、適用過酸化水素濃度の 0.02% は処理後の希釈液中に含有させた反応停止用の 0.1% NaP により消去されるはずで、後培養時の R2A 平板上での NaP は処理後に発生する過酸化水素による損傷を消去しているものと推測される。

グラム陰性細菌である A5 株は細胞質膜と外膜をもち、健常菌では双方の膜は物質透過性を適正に制御している。しかし、それらが殺菌処理によって損傷すると、NaCl は細胞質膜を透過できるようになり、NaDC は外膜透過性となる。本研究結果において、NaCl 感受性化で検知した損傷菌は、その 0.5% の濃度において実質的な殺菌効果が現れる程度の過酸化水素処理ではある程度発生することが認められたが、加熱処理では比較的軽微であった。一方の NaDC 感受性化については、0.01% の濃度で加熱、過酸化水素双方の処理とも NaCl 以上に明確な差が現れ、外膜損傷の発生が強く示唆された。このことから、調べた条件下では、A5 株の加熱処理では大腸菌とはやや様相を異にして細胞質膜よりも外膜のほうの損傷が顕著であり、過酸化水素による損傷は双方の膜で生じる可能性が示唆された。加熱処理によって外膜のブレッピング（風船状構造形成）とその後の膜胞化による遊離現象は大腸菌

で Katsui ら<sup>22)</sup>が報告しているが、過酸化水素による細胞表層損傷はあまり知られていない。外膜にはエンドトキシンであるリポ多糖が含まれていることから、細胞が死滅しても外膜に損傷が発生するとすれば、エンドトキシンを遊離させる可能性があり留意すべき点と言える。

加熱と過酸化水素の相乗殺菌効果は広く知られている<sup>23-25)</sup>が、透析液汚染菌の A5 株でも併用による明らかな死滅促進が確認された。これに伴い、定量的な比較はできないが、NaCl と NaDC 感受性化も短時間の処理で上昇し、外膜と細胞質膜双方の損傷の拡大が生じていると推察される。この結果は、透析汚染菌の制御にこれらの併用処理が有効である可能性を示唆しており、人工透析システムにおけるそれらの付着菌やバイオフィルムを対象とした併用殺菌の効果検証が期待される。

本研究は、平成 28 年度日本透析医会の研究助成を受けて行われた。関係各位に謝意を表する。

利益相反：本研究における申告すべき COI はありません。

## 訂正

本研究で使用した A5 株 (*Pelomonas saccharophila* A5) は、初期の研究の研究報告 (日本透析医会雑誌, 28 (1), 181-197, 2013 年) の表 5 内の同定結果欄内で、前報で用いた A4 株 (*Sphingomonas koreensis* A4) と入れ替わっていることが判明した。お詫びして訂正する。

## 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) Stewart PS: Antimicrobial tolerance in biofilms. Ghannoum M, Parsek M, Whiteley M, et al. (eds.), *Microbial Biofilms* 2nd edn., Washington DC: ASM Press, 2015; 269-285.
- 3) Gilbert P, Rickard AH, McBain AJ: Biofilms and antimicrobial resistance. Fraiese AP, Lambert PA, Maillard J-Y (eds.), *Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization*, 4th edn., Oxford UK: Blackwell Publishing Ltd., 2004.
- 4) 土戸哲明: 付着細菌とバイオフィルムの薬剤・熱抵抗性と食品における制御。防菌防黴誌 2000; 28: 623-633.
- 5) 大菌英一, 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.
- 6) 富岡敏一, 大菌英一, 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: 181-197.
  - 7) 富岡敏一, 大菌英一, 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.
  - 8) Busta FF: Introduction to injury and repair of microbial cells. *Adv Appl Microbiol* 1978; 23: 195-201.
  - 9) Wesche A, Gurder JB, Marks BP, et al.: Stress, sublethal injury, resuscitation, and virulence of bacterial foodborne pathogens. *J Food Prot* 2009; 72: 1121-1138.
  - 10) 土戸哲明: 加熱殺菌において発生する損傷菌とその生理学。防菌防黴誌 2002; 30: 105-110.
  - 11) 土戸哲明, 坂元 仁: 損傷菌の特性, 発生機構と検出・計数。日本食品科学工学会誌 2018; 65: 73-79.
  - 12) 服部 勉: 微生物の基礎。学会出版センター, 1986; 35-54.
  - 13) 吉永郁生, 片野坂徳章, 上野雄介: VBNC 海洋細菌の分子生物学的検討。 *Microbes Environ* 1999; 14: 123-129.
  - 14) 大菌英一, 野呂瀬嘉彦, 高久 俊, 他: 透析機器の搬入前汚染対策に有効な施設据付後の初期洗浄法。 *Bact Adher Biofilm* 2017; 30: 101-105.
  - 15) 小池佳都子, 坂元 仁, 古田雅一, 他: 血液透析システムにおける透析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。日透医誌 2016; 31: 204-208.
  - 16) Takano M, Tsuchido T: Availability of growth delay analysis for the evaluation of total injury of stressed bacterial populations. *J Ferment Technol* 1982; 60: 189-198.
  - 17) Tsuchido T: A novel double subculture method and its theory for the enumeration of injured cells in stressed microbial population. *Biocontrol Sci* 2017; 22: 131-135.
  - 18) 岩田吏世, 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.
  - 19) 服部 勉, 服部黎子: 微生物の生育と栄養条件—低濃度栄養性細菌を中心として—。 *化学と生物* 1977; 15: 535-541.
  - 20) 和田彰浩, 小池佳都子, 富井恵奈美, 他: 大腸菌の熱耐性と加熱損傷菌発生における発育・回復培地および抗酸化系化合物の影響。日本農芸化学会大会要旨集。2018.
  - 21) 岩田吏世, 和田彰浩, 富井恵奈美, 他: 損傷大腸菌のコロニー形成時における二次的酸化損傷の発生とその防御能の蘇生特性。日本損傷菌研究会損傷菌セミナー要旨集, 2017.
  - 22) Katsui N, Tsuchido T, Hiramatsu R, et al.: Heat-induced

- blebbing and vesiculation of the outer membrane of *Escherichia coli*. J Bacteriol 1982; 151 : 1523-1531.
- 23) Block SS : Peroxygen compounds. Block SS (ed), Disinfection, Sterilization, and Preservation, 4th edn. Lea & Febiger, 1991; 167-181.
- 24) McDonnell GE : Chemical disinfection. Antisepsis, Disinfection, and Sterilization. Types, Action, and Resistance. Washington DC : ASM Press, 2007; 79-148.
- 25) Lin C-M, Moon SS, Doyle MP, et al. : Inactivation of *Escherichia coli* O157 : H7, *Salmonella enterica* serotype Enteritidis, and *Listeria monocytogenes* on lettuce by hydrogen peroxide and lactic acid and by hydrogen peroxide with mild heat. J Food Prot 2002; 65 : 1215-1220.