

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

— (B) 配管内バイオフィームの消毒後一過性の培養不能な損傷の評価法 —

大藪英一*^{1,2} 本田和美*¹ 井上有紀*¹ 市村恭子*¹ 鎌野千佐子*¹ 野呂瀬嘉彦*^{1,2}
高久 俊*² 新谷英滋*² 岡松健太郎*³ 土戸哲明*⁴

*1 越谷大袋クリニック *2 日本医科大学微生物学免疫学 *3 駒込あおば内科

*4 大阪府立大学研究推進機構微生物制御研究センター

key words : 熱水洗浄, 過酢酸, 次亜塩素酸, 蛍光二段染色法, 損傷菌

要 旨

血液透析システムの微生物汚染は、機器が医療機関に納品される以前から存在するバイオフィームに由来する。培養法では、洗浄消毒によりいったん菌の検出が陰性化するが、数時間～数日で同一菌種・株の菌が再度分離されるようになる。これはメーカーが推奨する洗浄消毒法ではバイオフィーム内の菌叢は完全には殺滅されず、一過性の培養不能な損傷菌が一過性に誘導されたためである。一方、DNA 蛍光染色を用いると、洗浄消毒後も総菌数や生菌数には変化がないことから、同法は損傷菌の存在を推定し適正に汚染度を評価しうる可能性が示された。

序

通常、透析液・透析用水中の微生物汚染は、R2A 培地か TGEA などの標準寒天培地を用いた生菌数試験のコロニー形成数で評価される。さらに同じ試験法を用い「菌が検出されないこと」で超純粋透析液およびオンライン血液透析ろ過 (HDF) 補充液の無菌性を保証している¹⁾。洗浄消毒は、エンドトキシン捕捉フィルター (ETRF) による膜ろ過と共に透析液製造系の清浄度の維持に不可欠とされ²⁾、菌数の低減に寄与している。しかし一旦菌が陰性となった部位から再度菌が

検出された場合、汚染源を考慮して対処されることは少ない。

これまでの検討で、透析液製造とメンテナンスなどの機器取扱いで汚染防止操作が順守されると、ETRF 上流側の非滅菌 (バイオバーデン) 部透析液から分離される菌の種類と株が年単位で固定すること³⁾、納品時の透析機器にすでに存在する菌が年単位で分離され、その起源が配管壁のバイオフィームであること⁴⁾を証明した。今回、バイオフィームの存在を踏まえたうえで、バイオバーデン部から分離される菌の動向と血液透析システムに対して行われた洗浄消毒とを併せて検討し、消毒による水棲菌損傷が検査結果に与える影響を観察した。

目的：培養法による菌の検出に洗浄消毒が影響しているか検討した。

1 方法と材料

1-1 透析用水・透析液の採取と通常培養⁴⁾

埼玉県内の利根川水系の施設 A、都内の三園-三郷水系および金町-三郷水系の施設 B・C の、バイオバーデン部の透析用水・透析液を、透析終了後洗浄直前に清潔操作で採取した。三施設とも日常的な透析液製造やメンテナンスを汚染防止操作で清潔に行っている⁵⁾。今回観察の対象とした施設 A の中央供給装置～

Studies of the ecological control of bacterial flora after system disinfection toward the improvement of dialysis fluid quality in hemodialysis system. (B) Evaluation method for bacterial contamination in the middle of transient inability of bacterial culture after disinfection of biofilm in dialysis fluid related piping

Koshigaya Ohbukuro Clinic

Eiichi Osono

Kazumi Honda

Yuki Inoue

患者監視装置末端部は、透析終了後90分水洗置換したあと、週4日次亜塩素酸200 ppm・週3日過酢酸300 ppmで60分洗浄し、翌朝まで8時間消毒薬を滞留させた。施設Bの逆浸透（RO）装置は週1回、後に週2回Ao（80℃換算-秒）値900で熱水洗浄を行いその前後の経過を追い、施設Cで連日行われているROタンク下流の次亜塩素酸10 ppm封入夜間滞留前後の経過を、施設Aで年4回行われるROモジュール以下の過酢酸（PAA、ミンケア：DVS、東京）450 ppm消毒前後の経過を追った。

採取後直ちにφ50 mm フィルター（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）、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。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。培地を転倒・遮光して25℃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、グラム染色の結果と併せて記録した⁶⁾。

1-2 全菌検索

培養系との対比のためにジアミノフェニルインドールカルボキサマイド（DAPI）を用いた菌の直接染色を行った⁴⁾。検体採取後すぐに3 mlを注射用水（大塚製薬工場、徳島）で均一にろ過できる容量（10 ml前後）にして、φ37 mmのフィルター（クオリティーモニター、Pall Japan、東京）でろ過した。同量の注射用水で洗浄してからフィルターを取り出し、遮光・室温で1,000倍希釈したDAPI試薬（Dortide、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%パラホルムアルデヒド（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（Microphoto-FXA：Nikon、大阪）で観察した。

観察の汎用化を考え、微生物迅速測定装置（バイオプロウラ：光洋産業、東京）とその染色キットを用いる方法も行った。菌が損傷を受けている場合、通常の二重染色ではヨウ化プロピジウム（PI）の染色性が強くなり、DAPIによる総菌数を死菌数が上回る問題がある⁷⁾。そこで採取した検体3 mlを専用のフィルターでろ過後、DAPI染色で総菌数を計測してから同じフィルターをPI染色し、陽性数の比から死菌数を割出

し、両者の差から生菌数を算出する二段染色法を行った。

1-3 菌種・菌株の同定^{3,4)}

培養後培地をBSL2の施設に移送し、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。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1510r⁸⁾）を用いてPCRで増幅した。得られたバンドを精製（Nucleospin gel and PCR clean-up, Machery-Nagel, Duren, Germany）後、5'側の8F Primerを用い、自動解析装置（Applied Biosystems 3730 DNA analyser, Fostercity, CA, USA）で塩基配列を決定した。~810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。

パルスフィールドゲル電気泳動法（PFGE：Bio Rad, Hercules, CA, USA）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。2014年3月~17年8月の間に単離した菌を-40℃でストックし、再度培養後アガロースゲル中に包埋し、リゾチームおよびProtease Kで溶菌後、制限酵素（Spe I, New England 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、同一の菌株と判定した。ゲノムパターンから判定して、経時的観察と合わせてその菌の起源を推定した。

2 結果

2-1 透析機器のPerformance Qualification (PQ) 期の分離菌の起源

新規に納品された透析監視装置の上流にUF膜を設置し、洗浄液・透析液から菌が検出されない条件で初期洗浄を行った。臨床に使用を開始してからは、日常工程のPerformance Qualification (PQ) として、4週毎にメンブレンフィルター法による培養を行うと、26台中15台から菌が分離された⁹⁾。その後60~80週観察を継続すると、いずれも搬入後初期洗浄時の10³~

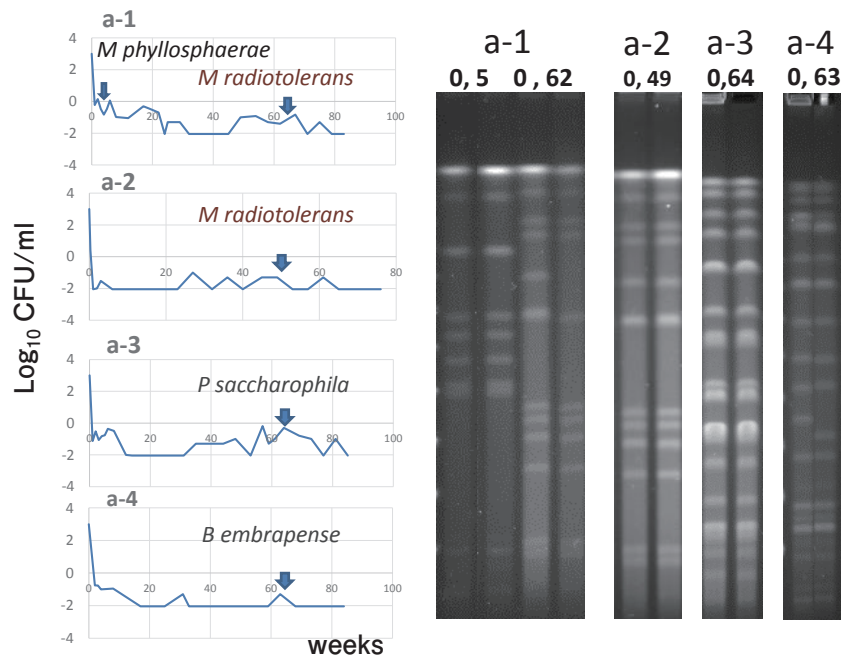


図1 透析監視装置の納品後初期洗浄 (Installation Qualification) から臨床使用中 (Performance Qualification) までの ETRF1 次側の透析汚染菌数の推移とその起源
 左：0～80 週の培養法によるコロニー形成数の推移と分離菌種。どの装置も納品時の汚染が最も高度であったが、台ごとに推移は異なった。PQ 期に分離された菌は納品時にも観察されていた。矢印：PQ 期の試料採取時期。
 右：PFGE 法による制限酵素処理ゲノムの遺伝子型の同一性。どの台も納品時と長期経過後に分離された菌の PFGE で展開したゲノム DNA 断片のバンドパターンが同一、もしくは偏位が 3 バンド未満 (a-4) であり、同一の菌株と判定した。

10^4 CFU/ml から 10^{-2} ～ 10^0 CFU/ml に減少した。一旦菌が分離し始めると、陽性が 20 週以上継続するものが 2 台認められた (図 1 左 a-1, a-3) が、多くは一過性であった。

台ごとにコロニー性状が一定で、分離菌で最も多かったものはコロニーが赤色の *Methylobacterium* 属 (図 1 左 a-1, a-2) で、他にベージュの *Pelomonas saccharophila* が 1 台、黄色の *Bradyrhizobium* 属が 2 台から分離された。いずれの菌も初期洗浄時 (0 週) と長期経過後に分離されたものとで制限酵素処理をした遺伝子パターンが同じで、機器納品時に観察された菌と同一の株と考えられた (図 1 右)。菌が年余に渡り継代生存していくことを示していて、透析液の流れる配管壁に、駆逐されないバイオフィルムとして存在していることが想定⁴⁾される。なお設置後、初期洗浄開始時の数時間を除きエンドトキシン活性は常に定量限界未満であった。

2-2 洗浄消毒前後の培養法によるコロニー形成数と DNA 蛍光染色による菌数の推移

図 2 左は、Ao (80℃ 換算時間-秒) 900 で熱水洗浄を土曜日に施行する前と翌月曜日、および次の熱水洗浄処理前と経時的に観察したものである¹⁰⁾。翌週の初めには培養法で陰性となったが、次の洗浄前にはまた菌が分離された。どちらも *Delftia acidovorans* で同一の菌種であった。膜ろ過した検体を DAPI 染色し、蛍光顕微鏡を用いて観察した全菌検索では、100～200 cells/ml と変化が見られなかった。菌株の確認のために行った Spe I 処理した遺伝子の PFGE 法によるバンドパターンは一致し、両者は同じ遺伝子を持つ同一の菌であった。つまり新たに汚染が生じたのではなく、培養法では菌が見え隠れしたと考えられる。

同様に、RO タンクに夜間低濃度 (10 ppm) 次亜塩素酸封入を行った場合、採取時間を朝から消毒をする直前に変更すると菌が分離されるようになった。RO タンク後の透析用水を、消毒前・翌朝・翌日消毒前で連続計測した (図 2 右)。朝一番の採取検体では生菌は分離されなかったが、消毒直前は両日とも陽性で菌

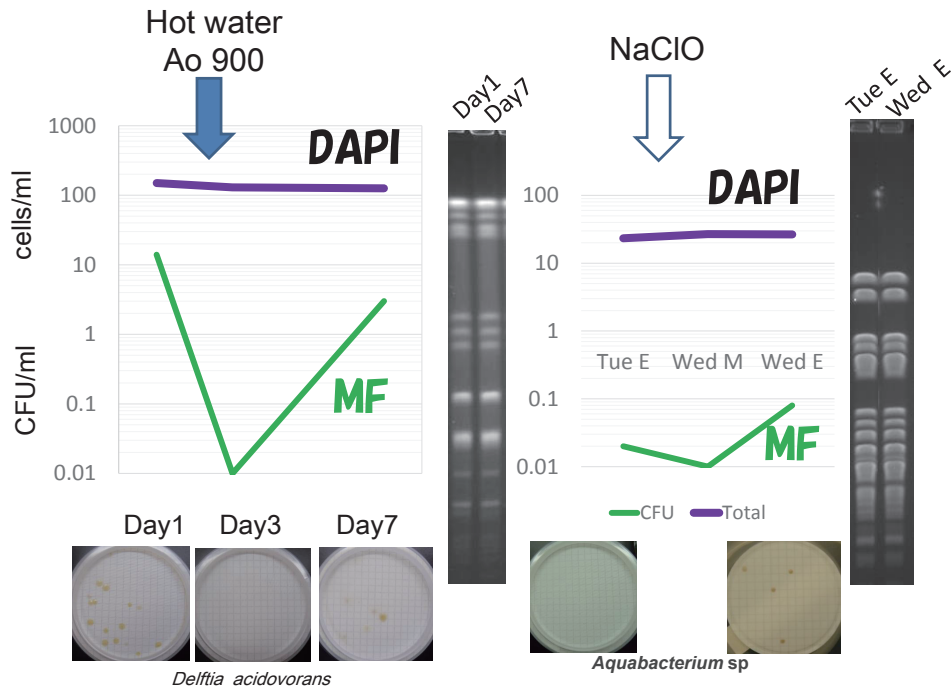


図2 洗浄消毒前後の培養法によるコロニー形成数 (MF) と DNA 蛍光染色 (DAPI) による菌数の推移
 左：熱水洗浄前後・次回熱水洗浄前、右：次亜塩素酸 (NaClO) 封入前・翌朝水洗後・翌日封入前、便宜的に培養陰性を 0.01 にした。

種も同一、PFGE 法による菌株も同一であった。しかし DAPI 蛍光染色での菌数は 20~30 cells/ml と一定であり、生菌数の変動とは乖離した。

2-3 洗浄消毒前後の培養法によるコロニー形成数と

DAPI/PI 二段染色による総菌数・死菌数の推移

自動計測により蛍光染色による菌数の定量性を向上させる目的で、膜ろ過した検体を、DAPI 染色で総菌数を測定した後に PI で染色して死菌数を計測する二

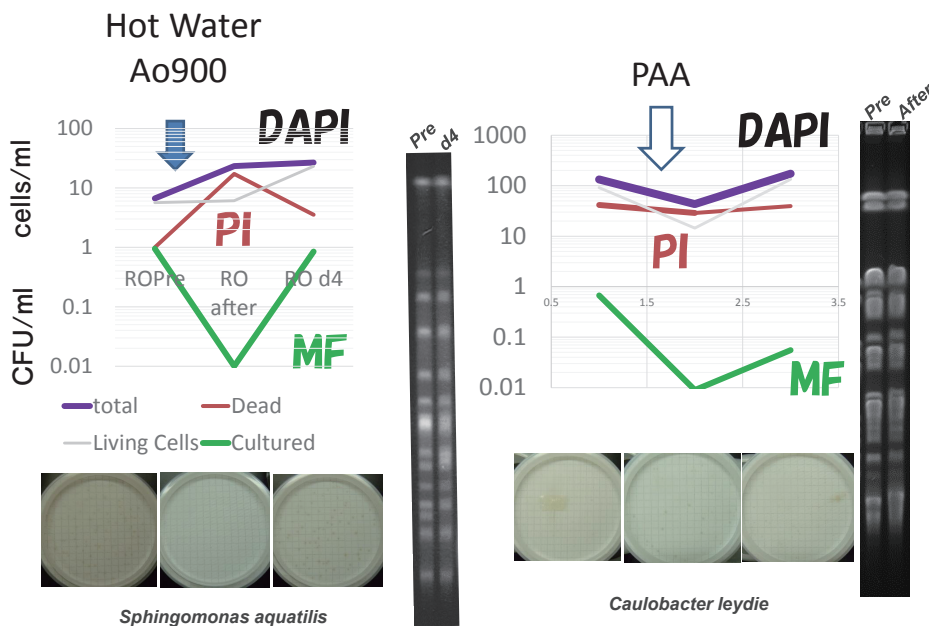


図3 洗浄消毒前後の培養法によるコロニー形成数と DAPI/PI 二段染色による総菌数・死菌数の推移
 左：熱水洗浄前後・次回熱水洗浄前、右：過酢酸 (PAA) 洗浄前・3 日後・10 日後、便宜的に培養陰性を 0.01 にした。

段染色法を採取後直ぐに行い、消毒の菌への影響を見た。熱水洗浄で末端コンソールのAo900に設定した透析用水を、熱水洗浄直前・水洗冷却後および次の熱水洗浄前で採取した(図3左)。熱水洗浄直後は培養陰性となったが、DAPIによる総菌数はむしろ増加傾向にあった。PIによる死菌数も増加傾向にあり、洗浄直後が最多となっているが、両者の差で見た生菌数は横ばい～増加傾向にあり、洗浄後の溶液中の菌数と培養によるコロニー形成数には乖離が見られた。このケースも洗浄前後で検出された菌のコロニー性状は同等で、前後の菌種・菌株も同一であった。

過酢酸(PAA)による洗浄消毒は日曜日に施行し、毎水曜日の採取で消毒前週、翌週、翌々週の観察で、消毒後に同様のコロニー形成の消失が見られた。推移はDAPIで1/3、生菌数で1/5に低下し、その後、同等に復帰する唯一異なる推移パターンを示した。しかし前後の菌種は *Caurobacter leydie*³⁾で、PFGEによる菌株は同一であった。

3 考察

日常的な透析液製造やメンテナンスを汚染防止操作で行うと⁵⁾、バイオバーデン部の透析液・透析用水から分離される細菌は、機器納品時と同一の菌種でかつ遺伝子型で見た菌株も同一(図1)のものが年単位で確認された。この事象は、透析用水供給装置からベッドサイド供給装置まで、どのメーカーの機器⁴⁾でも観察され、汚染は機器納品時に既に存在するバイオフィルムを起源としている(図4)と考えられる¹¹⁾。

透析液・透析用水中から分離される菌はその配管壁のバイオフィルムから出立(departure)、あるいは出芽(budding out)したものであり、菌数が少ないため確率論的に培養法によるコロニー形成が陽性となる場合とならない場合が生じた⁴⁾と考えられる。この状況の推定には、バイオバーデン管理として、生菌数の他に菌の種類を見る必要があるが、生化学法ではいわゆる従属栄養菌は同定できず、当研究で採用した16SリボゾームDNAの相同性の検討は汎用性に乏しい。

近年、外部検査会社で質量分析(MALDI-TOFI:BML, 川越)を用いて水棲菌を同定し、生菌数と一緒に結果が報告されるようになった。同一菌種であれば、新たな汚染ではなく汚染源が配管内のバイオフィルムであることが推定可能となり、対処の選択に有力な情報を与えてくれると思われる。

一方、消毒前後でコロニー形成数は変動し消毒前の状態に回復した(図2,3)。これも前述のように(図1)、菌の殺滅により検出されなくなったとも考えられるが、半日～数日で状態は回復する。そこでDNA染色法を、迅速法としてのみならず菌数(生菌数)を別の角度から評価する方法として同時に行った。低濃度次亜塩素酸封入(図2右)・熱水洗浄(図2左・図3左)ともその前後でDAPI総数に大きな変化はなく、消毒直後のみ蛍光法での陽性数とコロニー形成数の差が拡大した。PAA消毒では死菌がcluster形成する傾向にあり⁷⁾総菌数、DAPI-PIの差による生菌数とも減少したが、前後の菌種菌株は同一であった(図3右)。

今回の検討は、洗浄消毒後・消毒薬を水洗し、RO

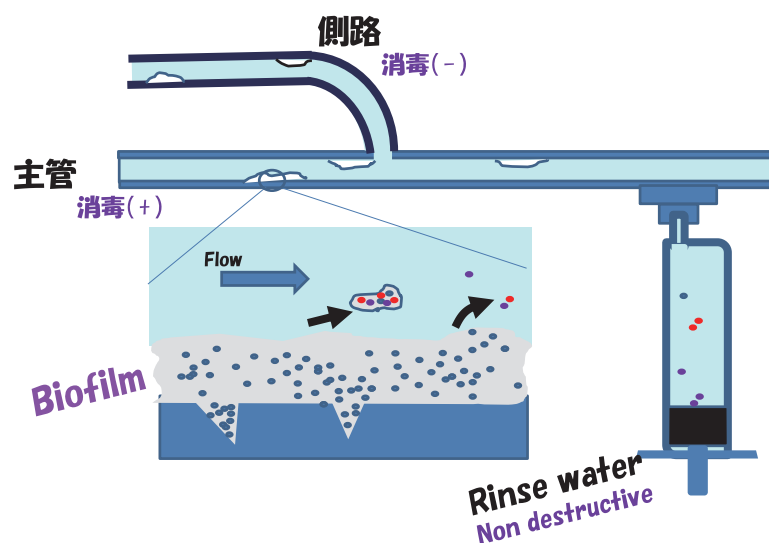


図4 配管内バイオフィルムと消毒損傷菌の起源

水で完全に置換あるいは常温になるまで放置して透析用水として使用可能な状態となつてから行っており、配管内の溶液中に消毒薬は残っていない(図4)。つまり、バイオフィームがこれらの洗浄・消毒の影響を受ける部位にあつたために菌が修飾を受けて培養不能となつたと考えられる。DAPI単独、もしくはDAPI-PIの二段染色の併用で、菌が殺滅に至らず一過性の培養不能な損傷状態であることを明らかにすることが可能となつた。

各機器の取扱説明書に記載されている洗浄消毒法の順守が推奨¹⁾されている。これは試験菌懸濁法¹²⁾という浮遊菌に対する消毒薬の効果比較のための試験を根拠にしている。比較的低濃度・短時間で芽胞形成菌も殺滅するが、この方法では機器から菌は駆逐されない¹¹⁾。経験則で行われている対応に限界を迎えた理由の一つは、配管内の菌叢がバイオフィームであるという認識に欠けていることにあると考えられる。

次亜塩素酸は15時間かけても100 μ m以上のバイオフィームの深部まで進達せず¹³⁾、PAAも高分子ポリマー製の部品の劣化を理由に、化学滅菌薬としての濃度が許容されない。熱水洗浄も、松尾ら¹⁴⁾の報告以降広く導入されたが、厳格な製造工程の清潔管理を基に施行した結果であることはあまり知られていない。Ao値3,000を滅菌同等と扱うのも浮遊菌に対するものであり、24時間連続で80 $^{\circ}$ C以上が維持されている製薬工場の注射用水でも成り行きで温度が低下すると菌が検出されるようになる¹⁵⁾のは、バイオフィームとして存在するからである。壁在の菌叢に日常的に洗浄消毒を行うことで、爆発的な菌数の増加を防いでいる。しかし、いわゆるCIP(cleaning in place, 配管系を分解せず設置したままで洗浄消毒する方法)では、バイオフィームの形成を完全に防ぐことも形成されたバイオフィームを根絶することもできない²⁾。

現在多くの施設でプライミングや返血用の補充液・オンライン補充液としてETRFを透過した透析液を数〜数十リッター患者に投与している。ろ過法による滅菌¹²⁾を模しているが、ETRFを6カ月再生利用するうえに、分子分画6,000前後以上でもエンドトキシン捕捉と称し、全ろ過(デッドエンドフロー)で本来のクロスフローで用いていない¹¹⁾。ろ過後に菌の漏出はないとしても、ろ過前のバイオバーデン部の汚染が透析液の質に影響を及ぼす¹⁶⁾。AJKDのEditorialで、日

本のエンドトキシン測定法の精度をどう正すか指摘を受けた¹⁷⁾のと同様に、生菌数試験も見かけ上の培養不能に惑わされない大量輸液としての精度管理¹⁸⁾が必要である。

本来、迅速法であるDNA蛍光染色法を併用することで、消毒損傷の有無を見ることが可能になると思われた。

本研究は、平成28年度透析医会公募研究助成によってなされた。

利益相反：本研究における申告すべきCOIはありません。

文 献

- 1) 峰島三千男, 川西秀樹, 阿瀬智暢, 他: 2016年版透析液水質基準. 透析会誌 2016; 49: 697-725.
- 2) ISO: Guidance for the preparation and quality management of fluids for haemodialysis and related therapies. ISO 23500: 2014.
- 3) 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.
- 4) 大藪英一, 富岡敏一, 本田和美, 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.
- 5) 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.
- 6) 大藪英一, 葉山修陽: 透析室で可能なメンブレンフィルタ法. 峰島三千男編. 透析液清浄化に向けて 改訂版. 大阪: 医薬ジャーナル, 2015: 206-215.
- 7) 大藪英一, 井上有紀, 本田和美, 他: DNA蛍光染色法による消毒損傷菌の検出. 腎と透析 2018; 85(別冊HDF療法'18): 213-216.
- 8) Weisberg WG, Barns SM, Pelletier DA, et al.: 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. J Bacteriol 1991; 173: 697-703.
- 9) 大藪英一, 野呂瀬嘉彦, 本田和美, 他: 人工透析用透析液製造システムの微生物汚染の起源. Bacterial Adherence & Biofilm 2016; 30: 95-99.
- 10) 大藪英一, 本田和美, 井上有紀, 他: 臨床使用中の人工透析機器から検出される菌の動向. Bacterial Adherence & Biofilm 2017; 31: 43-48.
- 11) 本田和美, 大藪英一: 血液透析の医療現場におけるバイオフィーム形成の問題点と解決への糸口. 松村信吉編. バイオ

- フィルム制御に向けた構造と形成過程. 東京：シーエムシー出版, 2017; 123-136.
- 12) 厚生労働省：第十七改正日本薬局方. 参考情報 G4 微生物関連. 消毒法及び除染法 2411-7, 滅菌法及び滅菌指標体 2429-2434, 2016.
- 13) Lee WH, Wahman DG, Bishop PL, et al. : Free chlorine and mono-chloramine application to nitrifying biofilm: comparison of biofilm penetration, activity, and viability. *Environ Sci Technol* 2011; 45: 1412-1419.
- 14) 松尾賢三, 松山玲子, 中本雅彦：熱水消毒によるバイオフィルムの制御. *臨牀透析* 2007; 23 : 613-620.
- 15) 中島隆規, 小松未佳, 平山重光：無菌製剤関連のフィルター, 製薬用水システムおよび洗浄バリデーション. *PHARM TECH JAPAN* 2009; 25 : 2865-2875.
- 16) 大藪英一：透析の安全性とその舞台裏の脆弱性. *防菌防黴* 2013; 41 : 439-445.
- 17) Meyer KB : Dialysate fluid endotoxin : assaying claims to cleanliness. *Am J Kidney Dis* 2015; 65 : 817-819.
- 18) 藤古真人：輸液剤等の大量輸液製剤の無菌性保証. 佐々木次雄, 棚元憲一, 川村邦夫編. *新 GMP 微生物試験法第 2 版*. 東京：じほう, 2013; 454-462.