

血液透析システムにおける透析液品質の維持向上のための、バイオフィルムを勘案した血液透析システム用洗浄消毒の科学的評価法の検討

— (A) 分離低栄養細菌によるバイオフィルムの形成と過酸化水素処理効果 —

小池佳都子*1 富井恵奈美*1 朝田良子*1, 2, 3 坂元 仁*2, 4 古田雅一*1, 2, 3

土戸哲明*2, 5 大藪英一*6, 7

*1 大阪府立大学研究推進機構放射線研究センター *2 大阪府立大学研究推進機構微生物制御研究センター

*3 大阪府立大学大学院工学研究科量子放射線系専攻 *4 関西大学化学生命工学部 *5 有限会社トリビオックス ラボラトリーズ

*6 越谷大袋クリニック *7 日本医科大学微生物免疫学

key words : 血液透析, 透析液汚染菌, バイオフィルム, 過酸化水素, 発育遅延

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細菌の *Sphigomonas korreensis* A4 株と *Pelomonas saccharophila* A5 株について、R2A の液体培地 (R2B) 中、30℃ での増殖挙動とプラスチックマイクロプレートウェル内でのバイオフィルム (以下 BF と略) 形成能を調べ、対照の *Escherichia coli* OW6 株による結果と比較した。A4 株は凝集性で BF の形成も顕著であったが、A5 株では凝集性はより強いもの BF の形成はほとんど認められなかった。A4 と A5 の増殖は遅くてその経過は二相性を示し、A4 株は一旦少し溶菌を起こした後に再増殖したが、A5 株は菌の原液を除いて測定時間内に第 2 相の増殖は見られず長時間培養後に見られた。接種菌量を 1 桁低下させたときの対数増殖期の一定菌数に到達所要遅延時間である G_{10} 値は、*E. coli* の 1.30 h に対して A4 は 9.62 h、A5 は 4.25 h と著しく高かった。以下、BF 形成可能な *E. coli* と A4 株について R2B 培地中で比較検討し、マイクロプレートのウェル中での BF 形成量をクリスタルバイオレット法で測定した結果、A4 株は OW6 株に比べておおよそ 10 倍程度の BF を形成し、初期接種菌量が多いほうが BF 形成能が高くなる傾向を認めた。BF の 0.2% 過酸化水素に対する感受性は G_{10} 値と形成 BF 量

との関係から、A4 株は OW6 よりも顕著に高く、前報の浮遊状態での感受性とは逆の傾向であった。得られた結果をもとに、過酸化水素を利用した透析汚染細菌の BF 制御法適用の可能性を示した。

はじめに

腎機能が低下した方々への血液透析は、我が国では透析装置・システムを保有する医療機関で実施されている。透析液は医療機関において、市販調製原末品を水道水の逆浸透膜濾過で精製した水に溶解して調製され、送液システムで各患者ベッド近傍に設置される透析監視装置からダイアライザーに送液されて血液透析が行われる。透析液自体が透析中に逆濾過によって患者体内に入るため、血液透析システムにおける微生物学的清浄化は重要な問題と認識されており、日本透析医学会など関係学会・団体のガイドラインに従って管理される^{1~4)}。

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、装置内のエンドトキシン捕捉フィルターによってエンドトキシンが排除され、また送液中に汚染菌が流入したとしても直接患者の血液に侵入することはない。さらに、わが国では次亜塩素酸ナトリウムや過酢酸による製造・送液システムの定期的な消毒が行われ、その発生を極力低減化する努力が

Scientific evaluation of washing and disinfection processes for the quality maintenance of hemodialysis system with consideration on biofilm.

(A) Biofilm formation by and the effect of hydrogen peroxide treatment on an oligotrophic bacterium isolated from dialysate in hemodialysis system

Katsuko Koike, Enami Tomii, Ryoko Asada, Jin Sakamoto, Masakazu Furuta, Tetsuaki Tsuchido, Eiichi Osono

払われている。

しかし、透析システム中のどこかに汚染菌の巣窟といえるBFが存在する可能性があり、上記薬液による消毒でも根絶不能で長期使用後に検出されるケースがあることが指摘されている²⁾。このBFの発生・存在の可能性のある場所は、上水処理装置や製造・貯液タンク、送液配管系とみられ、それらから漏出・離脱する低分子の代謝物や構成成分が血液内に混入する危険性が否定できず、細菌汚染が問題となる¹⁻⁴⁾。そもそも、上述の次亜塩素酸ナトリウムや過酢酸による消毒処理自体がBF形成を誘導しているとの指摘³⁾もある。北欧スウェーデンでは、1990年から予備フィルターと逆浸透は薬液消毒を適用するものの、透析液配送システム全体を熱水循環させる加熱消毒方式がいくつかの医療機関で採用されている⁴⁾。この方式では、透析の停止する夜間に85~90°Cでシステムを加熱するため、配管に耐熱性基材を使用するなどシステム変更の経費が必要ながら非常に高い微生物学的品質の透析液が得られ、長年にわたって稼働上の品質的安定性が維持されているという⁴⁾。

大菌⁵⁾は一連の透析液汚染菌の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を分離・同定してその微生物学的特性を検討するとともにその由来を調査し、細菌汚染が透析システムの初動設置時にすでに発生している可能性を指摘している。したがって、その対策としては、システムの製造・構築時に未然防止を図るか、それが困難とすれば強制剥離など発生後に殺除措置を取らざるをえない。現行の次亜塩素酸塩や過酢酸消毒法でも根絶が無理であるならば、その代替法として、上述の加熱法の適用の可能性があげられよう。ただ、BFは薬剤のみならず加熱にも抵抗性を示すため、実用上では薬剤との併用処理による消毒法も有効とみられる。併用対象の薬剤としては上記の薬剤も想定できるが、加熱との顕著な併用効果が認められ、なおかつ処理中に並行して熱分解による低減・消滅化も可能な過酸化水素の有用性が期待できると考えられる。

富岡⁶⁾は、以前に大菌によって透析液から分離された5株の細菌(*Leptothrix* 近縁株, *Caulobacter vibrioides*, *Sphingomonas rhizogenes*, *Sphingomonas koreensis*, *Pelomonas saccharophila*)の栄養豊富な nutrient broth 中での単独および混合培養における各低栄養細菌の増

殖特性とマイクロプレート上でのBF形成能を調べた。その結果から、とくにA2とA4の2株が明らかな凝集傾向を示すことを報告するとともに、分離菌間での混合系での共生関係によって他の株の発育を促進するケースがあることを報告した。さらに小池⁷⁾は、分離菌の制御に関する研究として、平板法が適用不可能な凝集性を示すA2株とA4株を低栄養菌用のR2A培地で培養し、浮遊状態細胞の加熱と過酸化水素感受性を平板培養法と発育遅延解析法⁸⁾によって検討した。この結果では、A2とA4株とも対照の*E. coli* OW6株よりも過酸化水素感受性であり、熱耐性はA2のみ感受性でA4株はOW6株と同程度であることを報告した。彼らはさらに、非凝集性とみられた*Pelomonas saccharophila* A5株の熱と過酸化水素による損傷菌発生について、ピルビン酸ナトリウム、チオ硫酸ナトリウム添加および無添加による2次損傷を評価するとともに、食塩とデオキシコール酸添加R2A寒天培地を用いる二重平板法で重致死的損傷を評価した。

本研究では、これら透析液汚染菌の低栄養条件下で問題視されるBFの制御を目指し、上記のA4株とA5株についてそれらの基本となる増殖挙動とBF形成能を調査したうえで過酸化水素感受性を検討した。

1 方法と材料

1-1 使用菌株とその培養および菌懸濁液の調製

前報^{6,7,9)}で述べた人工透析液由来菌のうち、ここでは*Sphingomonas korreensis* A4株と*Pelomonas saccharophila* A5株とを用いた。また対照として大腸菌、*Escherichia coli* OW6 (NBRC106482, プロリン要求株)も供試した。前報⁹⁾に準じて、保存用 Reasoner's Assay no.2 agar 平板 (pH 7.0) (以下 R2A) 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 で希釈し低下の実験に供した。

1-2 浮遊状態細胞の増殖解析

上記のように調製した各菌株の懸濁原液を KPB で10倍毎段階希釈した液を作製した。次に、これらの

原液とその希釈液の 20 μ L を 96 穴マイクロプレート内に 180 μ L の R2B 培地を分注しておいた 1 試料あたり各 3 つのウェル (n=3) に接種した。これをマイクロプレートリーダー (以下 MPR と略, Multiscan, GO, Thermo Scientific, Co. Ltd.) 内にセットし、30°C で 3 日間振盪培養した。振盪は、作動と休止の 10 秒間ごとのサイクルを繰り返した。培養中の濁度 (OD₆₅₀) 値を自動計測し、PC 上でのマクロ処理によって増殖曲線を得るとともに、対数増殖期にあたる OD₆₅₀ 0.01~0.05 の範囲内のデータから最小二乗法で直線を求めた。さらに、得られた曲線の対数増殖期における一定の濁度値 (今回の実験では OD₆₅₀=0.05) に相当する増殖量に到達するまでの増殖所要時間を、懸濁原液試料とともに、各試料の 10 倍毎段階希釈試料について計測した。なお、懸濁液調製時の OD 測定は分光光度計で光路長 1 cm のキュベットを使用するが、MPR では、ウェル内試料液は 0.2 ml でその光路長は約 0.3 cm となり、上記マイクロプレートでの OD 値は同じ波長の 650 nm であっても実測値は約 1/3 の値に低下した値となる。

また既報⁸⁾に従って、この関係から接種量を 1 桁低下させたときの発育遅延時間を G_{10} (h) と定義し、使用菌株について未処理、処理細胞集団間でこの G_{10} はほぼ等しいことを確認した。後述の過酸化水素処理の場合には、未処理集団に対する処理集団における増殖遅延時間差を τ (h) と設定し、これを算出した。後述の BF の増殖においても同様の計算処理を行い、この場合は τ をもとめるとともに、発育遅延解析法を用いて換算生存率 (IV) の定義により τ/G_{10} を計算し、過酸化水素の殺菌効果を評価した。

1-3 BF の形成と定量

上記 1-1 に示した 24 時間培養の菌懸濁液 (OD₆₅₀ =

約 0.3) の 20 μ L を、180 μ L の R2B を含むマイクロプレートの各ウェルに接種し、MPR 中で 3 日間振盪培養後、引き続き 4 日間静置培養した。培養終了後、ウェル内の培養液をマルチチャンネルピペットで除去し、滅菌水 300 μ L で遠心分離機を用いて 5 回洗浄した。この沈殿菌体に 1% クリスタルバイオレット液 220 μ L を添加して 5 分間放置後、液を除去し、滅菌水 300 μ L で 2 回、400 μ L で 3 回洗浄後、十分に水を除いた。その沈殿菌体に 80% (v/v) エタノール液 300 μ L を加えて 10 分間放置して色素を抽出した。この抽出液 200 μ L を吸光度測定用のマイクロプレートに移し、MPR で Abs. 595 を測定した。測定補正の対照に 80% エタノールを用いた。

1-4 過酸化水素処理とその感受性評価

市販の過酸化水素水 (30% 液) を希釈して最終濃度 0.2% の KPB 溶液とし、これを上記のようにマイクロプレートのウェル内に洗浄、調製した BF に注入した。30°C でそのまま保温し、各所定時間後に 1% (w/v) ピルビン酸ナトリウム液を添加して処理を停止させた。処理液を丁寧に除去後、各ウェルに R2B 培地を注入し、同温度で 3 日間振盪培養、さらに 4 日間の静置培養を行った。

1-5 顕微鏡観察

24 時間の培養後の細菌細胞の形態を光学顕微鏡 (BX51, オリンパス) で観察した。また、その培養フラスコ内での培養液の外観について写真を撮影した。

2 実験結果

2-1 MPR での培養における増殖特性

透析液汚染分離菌の増殖特性については、分離株 5 株についてこれまでも報告してきた^{6,7,9)}が、多種多様

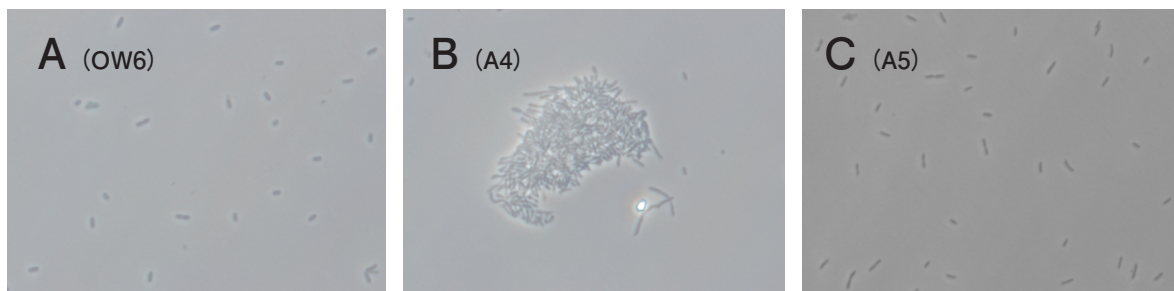


図 1 培養細菌の光学顕微鏡像
A: OW6 株, B: A4 株, C: A5 株

ながら、いずれもBF形成性をもつと考えられた⁶⁾。今回BFについての検討で *S. korreensis* A4 株、*P. saccharophila* A5 株を用いるにあたって、対照の大腸菌 OW6 株とともに R2B 培地、30°C でフラスコ培養し、の浮遊状態の増殖特性を、MPR 内で培養して改めて

調べた (図 1~3)。24 時間培養時の細胞は顕微鏡観察では、A4 株では凝集性を示し、単一細胞の存在も観察されたが、大小様々なサイズの凝集体も多く検出された (図 1B) が、フラスコ培養液の外見は *E. coli* OW6 株と同様に菌体の分散懸濁状態が示された (図

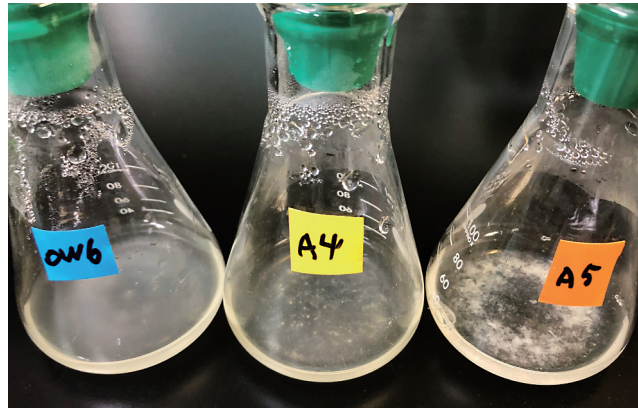


図2 フラスコ培養液の外観
培養 24 時間。

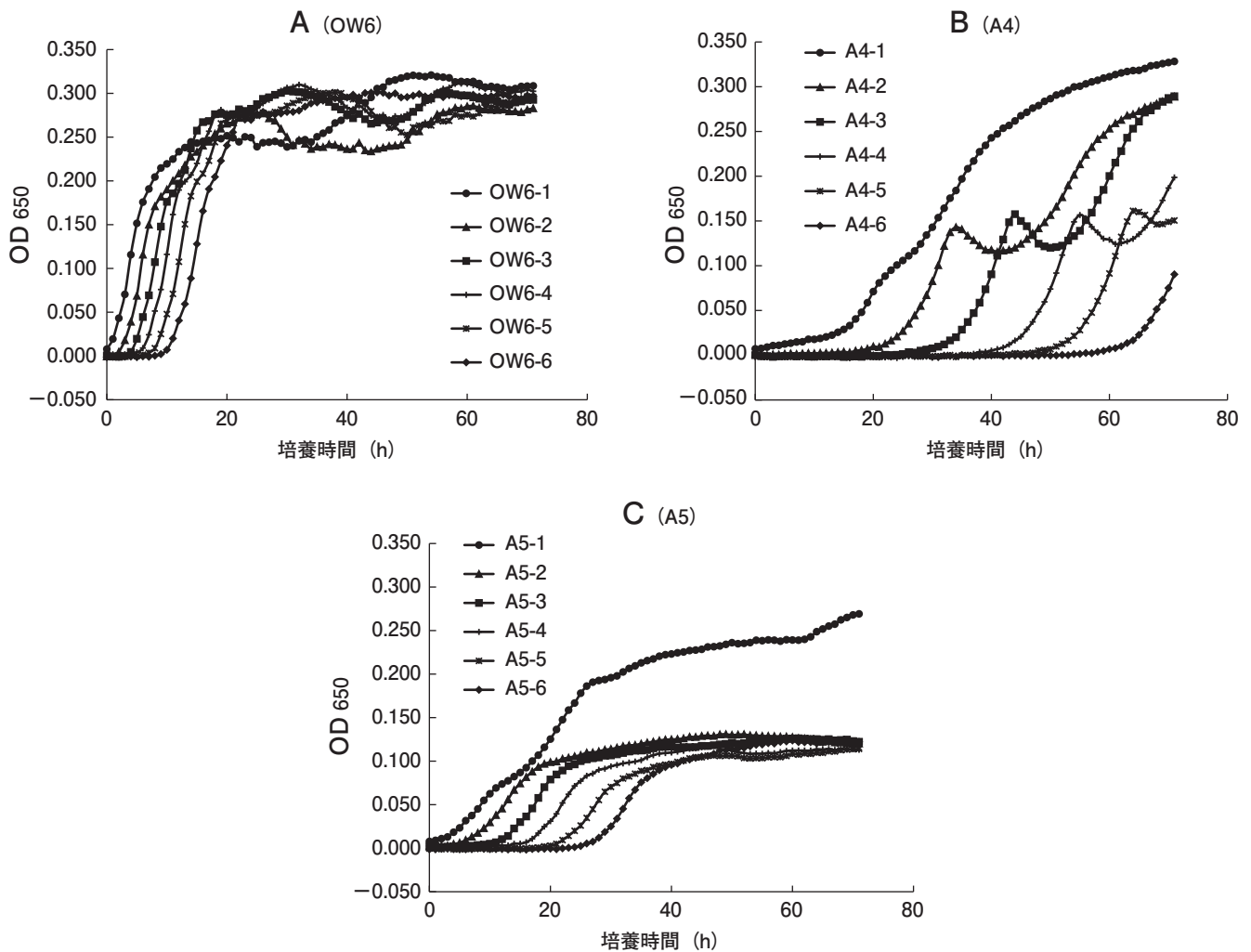


図3 マイクロプレートリーダーでの培養における増殖曲線
A: OW6 株, B: A4 株, C: A5 株。各凡例の右端の数字は希釈回数。

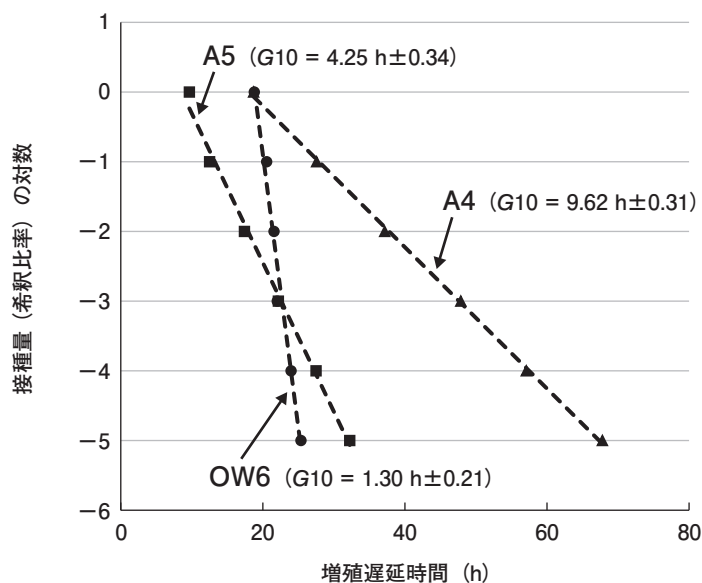


図4 接種量と増殖遅延時間の関係および G_{10} 値

2). 一方, A5 株の観察試料では一見単一細胞のみ認められた (図 1C) が, フラスコ培養液の外観では沈殿体が現れた (図 2).

次に, MPR での培養による増殖経過を調べた (図 3). 増殖遅延解析を兼ねる目的で, 菌懸濁原液とその 10 倍毎 5 段階希釈した菌液を調製し, 接種量を変化させて培養した. 対照の *E. coli* OW6 株は典型的な細菌の増殖曲線を示し, 誘導期が短く増殖速度も大きい, 接種量が多いほど低い OD で定常期に入る傾向が認められ, 培養後期での増殖挙動への接種量の影響が示唆された (図 3A).

一方, A4 株の希釈懸濁試料では誘導期が長く増殖速度も小さいが, 2 段階増殖の特徴的な傾向が認められ, OD₆₅₀ が 0.15 あたりで一時的に低下したのち再増殖した. 原液でも OD₆₅₀ 低下はないが 0.1 あたりで増殖曲線に屈曲がみられた. A5 株は原液は A4 株に類似した増殖経過を示したが, 希釈液では A4 株で見られた 2 段階増殖の 1 段階目のみの増殖に似た経過をたどり, 少なくとも測定時間内にはその後の増殖は認められなかった.

これらの結果をもとに, 段階希釈による接種量の変化による発育時間の相関関係を 図 4 に示す. 得られた直線から G_{10} 値を求めた結果, OW6 株の 1.30 h に対して A4 株で 9.62 h, A5 株では 4.25 h と大きい値を示した. OW6 と A4 株については以前⁷⁾にもこの値を求めているが, 両株とも今回はかなりの短縮した値であった.

2-2 BF の過酸化水素耐性

次に, 方法に従って 1 週間の培養で形成させた BF 量を, クリスタルバイオレット法によって測定した. この実験では, 初発の接種量によって形成量が変化するかどうかをみるため, 上記の段階希釈法によって異なる接種量 (接種時に 10 倍希釈となるので, 原液接種を 1 回目の希釈とし, 1~6 回の希釈回数となり, 原液接種で $10^7 \sim 10^2$ 細胞/ml の細胞密度に相当) で評価した.

その結果, 図 5 に示すように, 希釈回数によらず, 全体的に OW6 株では比較的少量の BF が形成されたのに対し, A4 株ではその約 10 倍もの量が形成された. しかし, A5 株では大きな凝集体の形成能が高いためか BF はほとんど形成されなかった. そこでこの結果から, 次の BF の過酸化水素耐性の検討においては, OW6 株と A4 株の両者のみ対象菌とした. この図が示すように, BF の形成は OW6 株では低密度細胞液の希釈のほうが高密度の場合よりも高い傾向にあり, A4 株では 10^4 細胞/ml 程度の密度で最大化したことを示している.

これら形成された BF に対する 0.2% 過酸化水素処理の効果, 増殖遅延時間によって評価した結果を 図 6 に示す. OW6 では BF 形成量は少ないこともあって培養約 5 時間目あたりから増殖が見られたが, 過酸化水素 10, 20, 30 分処理ではいずれも約 20 時間目から再増殖し, その処理時間の差はほとんど現れなかった. 一方, A4 株では形成量が多いこともあって約 3

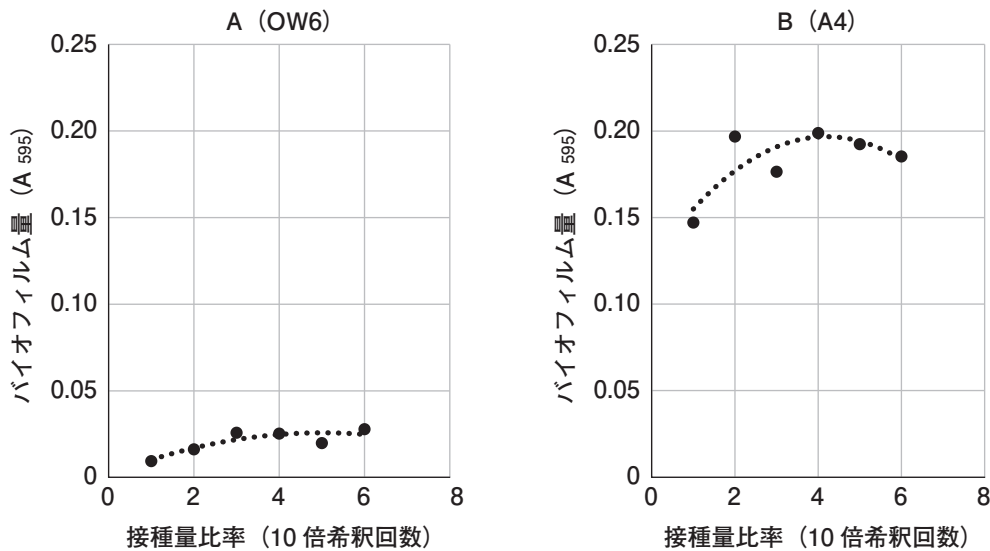


図5 バイオフィルムの形成量と接種量（希釈回数）との関係

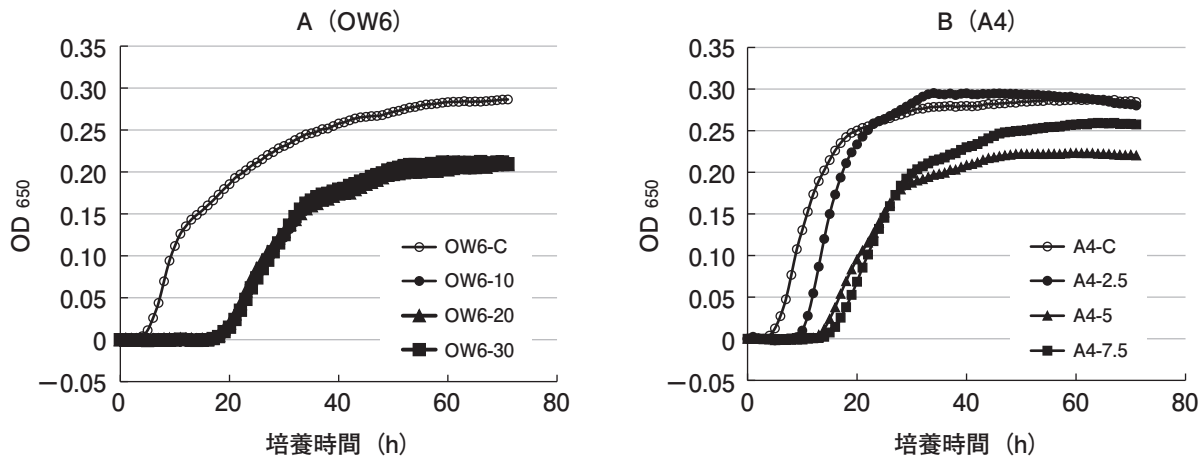


図6 形成バイオフィルムに対する過酸化水素の制御効果
各マーカーの末尾の数字は過酸化水素処理時間（min）を示す。

時間目から増殖し、過酸化水素処理 2.5, 5, 7.5 分と処理時間の拡大に対応して再増殖開始時間も増加した。未処理 A5 株の懸濁原液接種では、図 3B の浮遊細胞で見られた屈曲性のある 2 段階増殖パターンは現れず、スムーズな対数増殖を示した。

次に、これらの増殖曲線から OD₆₅₀ が 0.1 における増殖所要時間を求め、未処理のそれとの差から増殖遅延時間 τ を求め、図 7 に示した。OW6 株 BF は 0.2% 過酸化水素での 10 分の処理によって遅延時間は約 23 時間であり、他方の A4 株 BF は 7.5 分処理で約 19 時間であった。

この BF に対する過酸化水素処理の増殖遅延効果は、初期 BF 量が異なるために増殖遅延時間だけではその差を評価できない。そもそも発育遅延解析法は、寒天平板法のように細胞が浮遊独立した存在を前提にする

必要はなく、菌糸状伸長細胞や担体付着した細胞に適用可能とされる。そこで本研究では、これを BF の抵抗性評価にも活用できるものと考え、その適用の前提として、ここでは何らかの制御処理を受けた細胞が増殖する場合、BF としての増殖も想定されるものの、それがすでに十分成熟発達している場合、それからの再増殖による新生細胞は BF 本体から遊離して界面から液相内に遊離、浮遊して増殖するものと仮定する。上記の過酸化水素処理した BF 細胞における未処理集団に対する増殖遅延の結果をもとに、それぞれの菌株の増殖遅延時間を浮遊細胞の G₁₀ 値で割ることによって換算生存率 (IV) を求めることが可能とし、この値を両株間で比較した。その結果を図 8 に示す。その結果、OW6 と A4 の間では上述のように増殖遅延時間自体にはあまり差がないけれども、図 4 に示した

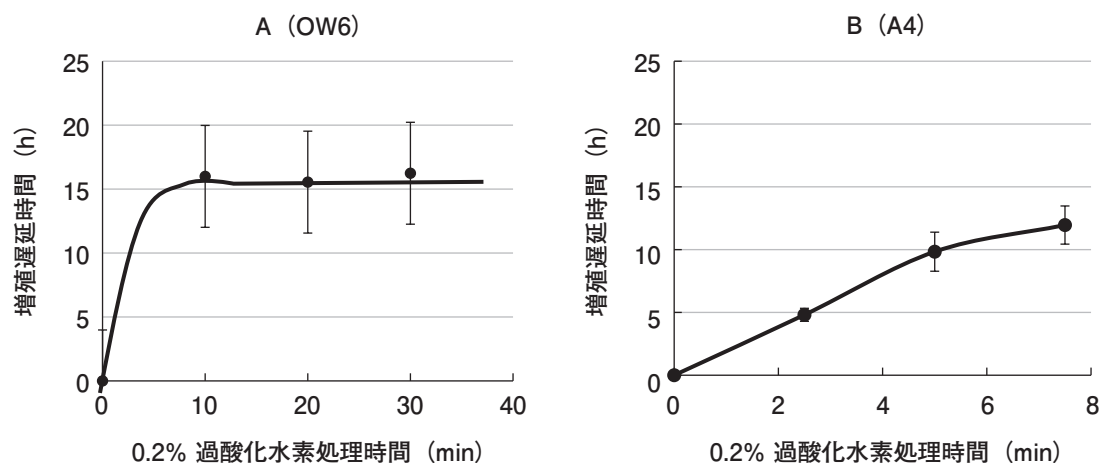


図7 バイオフィームの過酸化水素感受性
平均値±SDをプロット。

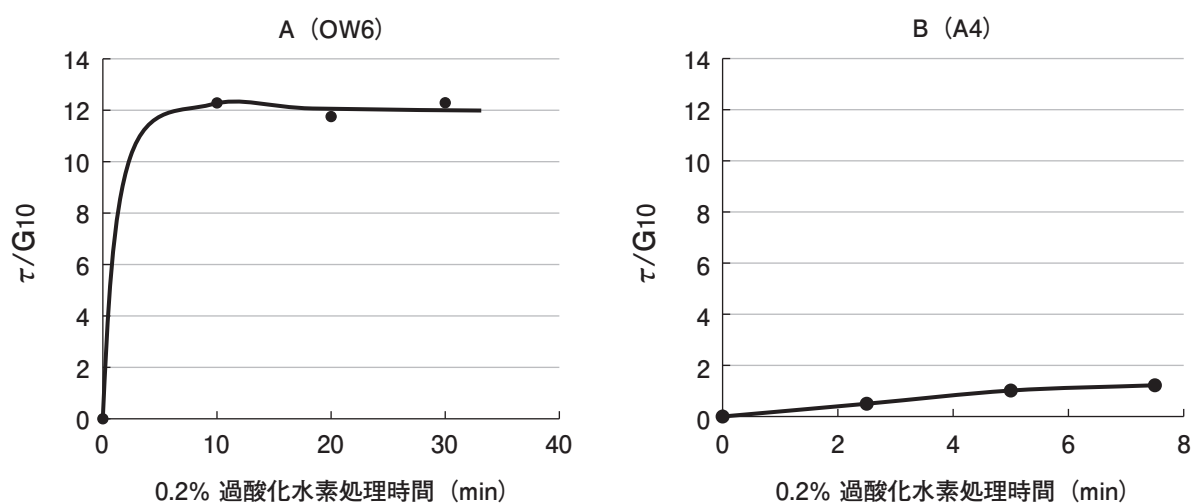


図8 バイオフィーム処理における換算生存率 (τ/G₁₀)

G_{10} 値に顕著な差があることから、IV 値は明らかな差が現れ、A4 株 BF の過酸化水素抵抗性が、OW6 株のそれよりも明らかに高いことが示された。

3 考察

血液透析液汚染性水棲細菌の形成 BF 対策の 1 つとして汎用される次亜塩素酸ナトリウムや過酢酸に代わる薬剤として、本研究では将来加熱との併用によって無残留化が期待できる過酸化水素に着目し、その単独処理の透析システム由来の水棲細菌に対する制御効果について、一般細菌の代表の *E. coli* を対照にそれらの浮遊細胞と BF を対象として検討した。

血液透析液分離菌 A4 株と A5 株は低栄養細菌とみられるが、その浮遊細胞の増殖特性を改めて検討した結果、既報⁶⁾の nutrient broth およびその 1/10 濃度培地の結果、および前回報告⁹⁾の同じ R2B 培地を用いて

得た結果とかなり異なっていた。とくに A4 株での 2 段階増殖パターンの出現、また G_{10} 値も前報⁷⁾に比べて A4 株では約 2 倍増加、対照の OW6 株では逆に約 1/2 弱に低下した。2 段階増殖の要因には酸素供給や特定栄養源の枯渇による適応変化が関係しているものと推測される。また G_{10} 値の相違の要因には、培地成分の影響や培養装置 (バイオスキャナーと MPR) の違いのほか、保存菌株自体の継代培養過程での遺伝的変化があげられるが、実態は不明である。

BF 形成量は、A4 と A5 株とでまったく異なったが、既報⁶⁾の結果と同様に A4 株の高い BF 生成能は一致しており、他方の A5 株は増殖能も低く BF 形成能も比較的低いことが一致している。BF の形成は培養の初発接種量に依存したが、これは接種量が少ないほど形成のための細胞馴化に時間的余裕があって低菌数からの増殖によって BF 形成が増進したためではないか

と推察される。

形成バイオフィームに対する0.2%過酸化水素の制御効果は、OW6株では10分の処理でかなりの増殖遅延作用が認められ、それ以上の処理時間でも効果が同じであった。この現象に対する有力な解釈の1つは、細胞集団に2つの重集団があって感受性集団は短時間処理で殺滅するが、抵抗性集団が残存したとするものである。初期の報告⁶⁾に述べたソフトBFとハードBFの違いが現れた可能性も想定される。他方、A4株では増殖速度にややバラツキが見られるが処理時間に応じた増殖遅延効果が現れた。この株では短時間のみの処理のため、OW6で示唆された2相性の存在は定かでないが、このような異種状態のBFの存在は他の低栄養細菌 *Caulobacter crescentus* のBFでも指摘されている¹⁰⁾。この菌では担体表面への付着にN-acetylglucosamineを含む多糖体であるholdfast（留め金の意味）と呼ばれる表層構造が重要とされるが、これが関与するキノコ状に発達するBFと関与しない単層のものとがあると報告されている。

細菌の殺菌・消毒処理に対する抵抗性の評価法としての発育遅延解析法は、その有用性の1つに、細胞が菌糸状に連結したり、担体表面に付着したり、BFを形成している場合にも適用できる点があげられている⁸⁾。この方法のBFへの適用においては、いくつかの条件を満足あるいは仮定されることが条件となるであろう。たとえば、BF形成細胞が処理後に再増殖するとき、すみやかに新生細胞は離脱して浮遊細胞数が増加することや、その増殖特性は基本的に元の浮遊細胞と変わらないことである。この仮定に基づき図7の結果に発育遅延解析法を適用し、 G_{10} 値を導入してみかけの換算生存率を求めた結果、OW6株に比べてA4株のBFは著しく過酸化水素に抵抗性であることが示唆された。このBFについての結果は、前報でのA4株の浮遊細胞はOW6株よりも顕著に過酸化水素に感受性であったことと逆の傾向であることを指摘するもので、低栄養細菌の本菌が形成するBFの高い抵抗性が示唆された例とみることができる。

細菌によるBFの解析や形成機構については、近年研究が急展開している^{11, 12)}が、今後、このような低栄養細菌によって形成されたBFの制御手法として、過酸化水素と加熱との併用処理についての検討が実施され、その実用上の有用性が明らかになることを期待し

たい。

本研究は、平成30年度日本透析医会公募研究助成事業による支援を受けて実施した。関係各位に謝意を表す。

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) 秋澤忠男, 峰島三千男 (共編) : 透析液の清浄化に向けて. 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) Ledebro I, Nystrand R : Defining the microbiological quality of dialysis fluid. *Artif Organs* 1999; 23 : (1), 1-23. (<https://doi.org/10.1046/j.1525-1594.1999.0.6275.x>)
- 4) Dasgupta MK : Biofilms and infection in dialysis patients. *Seminars in Dialysis* 2002; 15 : (5) : 338-346.
- 5) 大藪英一, 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.
- 6) 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生理学的群衆解析. *日透医誌* 2013; 28 : 181-197.
- 7) 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) 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.
- 8) 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.
- 9) 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. *日透医誌* 2018; 33 : 527-534.
- 10) Entcheva-Dimitrov P, Spormann AM : Dynamics and control of biofilm of oligotrophic bacterium *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol* 2004; 186 : 8254-8266.
- 11) Tolker-Nielsen T : Biofilm development, *Microbial Biofilm*, 2nd edn.. Ghannoum M, et al. ed. ASM Press, 2015; 51-66.
- 12) Wilson C, Lukowicz R, Merchant S, et al. : Quantitative and qualitative assessment methods for biofilm growth : A mini-review. *Res Rev J Eng Technol* 2017; 6(4) : 42.