

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

— (B) CDC バイオフィルムリアクターを用いた洗浄消毒効果の検証モデルの構築 —

大園英一*1,2 本田和美*1 井上有紀*1 鎌野千佐子*1 野呂瀬嘉彦*2 高久 俊*2
森田林平*2 秋元敏雄*3 川本進也*4 土戸哲明*5

*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 同 実験動物管理 *4 獨協医科大学埼玉医療センター腎臓内科
*5 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 : メチロバクテリウム, 次亜塩素酸ナトリウム, 過酢酸, JIS 規格

要 旨

透析監視装置の消毒に関して、透析機器メーカーは、操作マニュアルに記載している消毒法の遵守を求めている。しかし JIS 規格に沿って浮遊菌で検証した条件では、Spaulding 分類の中水準消毒薬が芽胞形成菌を殺滅し、“高水準薬”相当になる矛盾を抱えながら装置には菌が遺残するので、効果を疑問視するユーザーが多くいた。そこで、近年硬質表面上のバイオフィルムに対する消毒薬の評価法として米国環境保護庁 EPA が採用した、疾病管理センターバイオフィルムリアクター CDC-BFR を用いて、透析液から経時的に分離される *Methylobacterium radiotolerance* のバイオフィルムを作製して消毒剤の効果を観察した。

血液透析システムの消毒に用いられる濃度で、浮遊菌は短時間で完全に殺滅された。しかしバイオフィルム中の菌は長時間暴露しても遺残し、現場で観察される状況が再現された。同じ濃度なら暴露時間に応じて、同じ時間なら濃度依存的に対数減数率 LRV が増加した。消毒剤の定量的評価法として妥当性があると考えられた。またバイオフィルムに対する消毒剤の殺菌効果は、濃度や時間の単純な比率には当てはまらないことが明らかになった。施設ごとに異なる棲息菌に対し、最適な消毒法を選択する手段として、CDC-BFR は有用と思われた。

序

血液透析システムの微生物制御戦略¹⁾は、システムの適切な設計²⁾・運用³⁾と消毒が必要不可欠とされる。このうち消毒に関して、透析装置・透析監視装置のメーカーは、高度管理医療機器であることから操作マニュアルの遵守を求めている⁴⁾。JIS-T0601-2-16 (医用電気機器-第2-16部人工腎臓装置の基礎安全および基本性能に関する個別要求事項)に則り、浮遊菌による試験菌懸濁法⁵⁾で検証した条件をマニュアルに記載しているが、Spaulding 分類の中水準消毒薬^{±1)}が芽胞形成菌を完全に殺滅し“高水準薬”相当となる矛盾がある。ところがこの条件ではしばしば装置から菌が分離され⁶⁻⁸⁾、設計や運用と同様に施設ごとの経験則で良し悪しが語られることが多い。このために消毒ですべての菌が駆逐されるというメーカーの誤った品質保証と、消毒後も菌が遺残するので無効とするユーザー側の誤解が生じている。透析液から分離される菌の起源は壁在のバイオフィルムにあり³⁾、装置を無菌操作で扱って二次汚染を防げば製造時の汚染が経年的に観察される^{7,8)}。近年、米国環境保護庁 (Environmental Protection Agency; EPA) は硬質表面上のバイオフィルムに対する消毒薬の評価法として、疾病管理センター (Center for Disease Control and Prevention; CDC) バイオフィルムリアクター (CDC-BFR)^{±2)}を採用した。

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

(B) Attempt to build a verification model of the cleaning and disinfection for hemodialysis using a CDC-biofilm reactor

Eiichi Osono, Kazumi Honda, Yuki Inoue, Chisako Kamano, Yoshihiko Norose, Shun Takaku, Rinpei Morita, Toshio Akimoto, Shinya Kawamoto, Tetsuya Tsuchido

高 Sheer 圧・高流量下でバイオフィームを形成すると、院内環境消毒の対象となる黄色ブドウ球菌や緑膿菌の場合、浮遊菌では殺滅される条件でもバイオフィーム内の菌の対数減数率が低いことが報告されている⁹⁾。この CDC-BFR を血液透析システムから分離された水棲菌に応用し、透析装置に用いられる消毒の濃度と作用時間でも検証可能か検討した。

1 材料と方法

透析液から分離した水棲菌⁸⁾ (*Methylobacterium radiotorelance* と *Sphingomonas koreensis*) を試験菌とした。浮遊菌に対する消毒薬の限界濃度の検討¹⁰⁾では、R2B 液体培地 (DAIGO, 富士フィルム和光純薬) 中で増殖させ菌液とした。pH 5.4, 50 ppm の次亜塩素酸ナトリウムを $\phi 0.22 \mu\text{m}$ のフィルタ (メルクミリポア) でろ過し、注射用水 (大塚製薬工場) で 50・15 ppm および注射用水のみ (blank) に調整し薬液とした。ボルテックスミキサーで攪拌し均一となった菌液 100 μl を薬液 900 μl 中にピペットで混和し 28°C で 30 分処理した。処理液 10 μl を 9 倍容の中和薬 (75 mM チオ硫酸ナトリウム, 富士フィルム和光純薬) で反応停止後さらに R2B 液体培地 900 μl 中に混和し 28°C で静置培養し、経時的に濁度を測定 (OD 565, ThermoFisher scientific) して増殖曲線を作成した。

バイオフィームに対する消毒効果の検討には *M radiotorelance* を用い、Trypticate Soy broth (TSB, 日本 BD) で 3 日間 28°C で振盪培養し、3 McFarland 相当の濁度になるまで増菌した。EPA および米国試験材料協会 (ASTM) の公定書¹¹⁾に従った規格試験として、CDC-BFR (CBR90-1, Biosurface Technologies Corp) でシリコンクーポンディスク上にバイオフィームを作製した。概要は、反応槽を 1:10 TSB で満たし菌液を添加後、室温で 125 rpm で攪拌しながら 72 時間反応させ、次の 24 時間は 1:100 TSB を毎分 10.5~11.7 ml で連続注入しながら攪拌した (持続攪拌反応期: CSBR)。洗浄後クーポンを 1 つずつ 50 ml の試験管に移してから試験液を 4 ml 加え 28°C で静置し、10 分反応後に 9 倍量の中和液を添加して反応を停止した。試験液として医薬品の 6% 次亜塩素酸ナトリウム (NaOCl: Purelox, Ohyalox, 東京) を注射用水で機器消毒に用いられる実用濃度に希釈し、一部は実用時間反応させた。さらに透析用洗浄剤として市販されている

もののうち NaOCl 系を 3 剤 (A, B, C), 過酢酸 (PAA) も 3 剤 (X, Y, Z), 洗浄剤メーカー指定の倍率で希釈して用いた。さらに PAA は Spaulding 分類¹²⁾で化学滅菌薬相当のもの (Minicare および Actril (CANTEL), V, W) も検討した。製品 V を透析機器に使用する場合、透析装置メーカーは劣化防止の目的で暫定的に希釈倍率を 100 倍から 150 倍に変更することを推奨しており、その場合の効果も検証した (V2:3)。NaOCl 系の中和には 11.7 g/l のチオ硫酸ナトリウム (富士フィルム和光純薬) 溶液⁹⁾を、PAA には Gibson 処方¹²⁾にカタラーゼを 100 ppm 添加したものをを用いた¹¹⁾。超音波洗浄と Voltex 攪拌でバイオフィームを剥離・均一化しその 10 倍希釈系列を R2A 培地 (メルクミリポア) に塗抹、もしくは 1 ml~全量メンブランフィルター (MF) でろ過し、7 日間 28°C で培養してコロニー形成数を測定した。これとは別に日本薬局方 17 改定に掲載されている試験菌懸濁法⁵⁾として、反応槽中の浮遊菌に対し前出の消毒薬の限界濃度の観察と同じ方法で反応時間を 10 分にして試験液の効力を観察した。消毒薬・透析用洗浄剤の種類・濃度と反応時間による条件ごとに 1 回の試験でクーポンを 3 つずつ行いその平均値を求めた。注射用蒸留水・中和液を試験液とした対照で求められた生菌数と、各試験条件で回収された生菌数の比から対数減数率 (LRV) を求めた。なおコロニー (-) の場合、希釈系列の最高濃度または MF で最多量の陰性を 1 未満 (0.9) CFU として対数換算した。

2 結果

液体培地を用いた *M radiotorelance* と *S koreensis* の浮遊菌の増殖曲線 (図 1) で、blank は 72 時間で降定常期に達し、NaOCl 50 ppm で増殖が完全に抑えられた。*S koreensis* に対して 15 ppm の NaOCl を反応させると lag 期が延長し log 期が遅れて始まったが (図 1b), 増殖速度 (傾き) は blank と同等であった。一方 *M radiotorelance* は NaOCl 15 ppm に耐性を示し blank と同等の増殖性を示し阻害されなかった (図 1a)。

CDC-BFR の系で、*M radiotorelance* によるバイオフィームとしてクーポン 1 つあたり 8.24 log CFU (7.78~9.08) 回収され、CSBR 期終了時の反応槽内の溶液中の浮遊菌は 7.99 (7.28~8.88) log CFU/ml であった。この浮遊菌に対して、NaOCl はすべての濃度におい

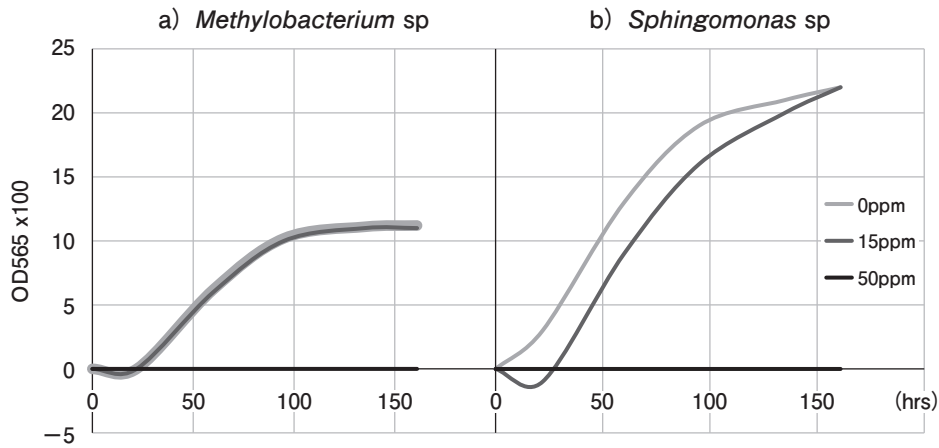


図1 透析液から分離された水棲菌の浮遊状態での次亜塩素酸ナトリウム耐性
縦軸は OD565 で測定した濁度，横軸は時間 (hr).

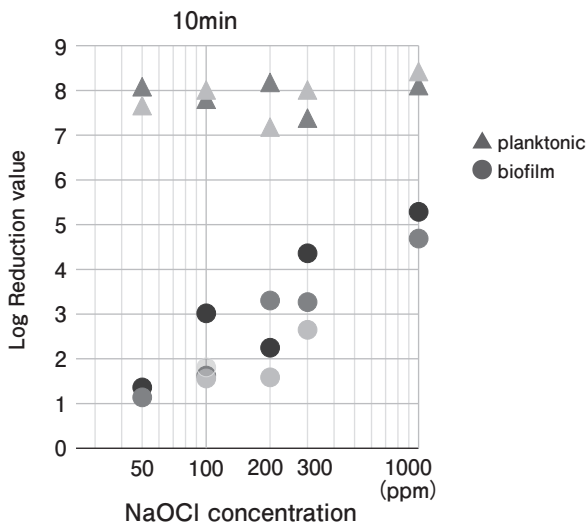


図2 次亜塩素酸ナトリウム 10 分暴露によるバイオフィーム中の菌の対数減数率に及ぼす濃度の影響
縦軸は対数減数率，横軸は濃度 (ppm).

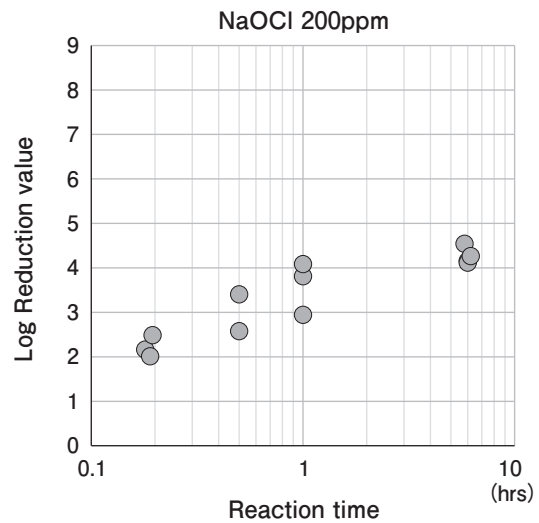


図3 200 ppm 次亜塩素酸ナトリウムによるバイオフィーム中の菌の対数減数率に及ぼす時間の影響
縦軸は対数減数率，横軸は時間 (hr).

て 10 分の反応で完全に殺滅した (図 2 の▲). バイオフィームに対する効果は 50 ppm で LRV 1~2 であり, 100 ppm で LRV 1~3, 200 ppm で LRV 2~3, 300 ppm で LRV 3~4, 1000 ppm では LRV 5 前後と濃度依存的に増強した (図 2). 操作マニュアルの記載にある洗浄後消毒薬を滞留させる場合の濃度 200 ppm で反応時間を 10 分 (0.18) から 0.5, 1, 6 時間と延長すると, 反応時間に応じて LRV が 1~2 増加した (図 3).

次に NaOCl 系の洗浄剤では, いずれも希釈後 NaOCl として同じ濃度のものと同等の殺菌性を示した (図 4). PAA では製剤ごとに LRV にばらつきがあり, 化学滅菌薬に指定されたものは LRV 6~7, 透析用洗浄剤は LRV 4~6 であった (図 5). 透析装置メーカー側の推奨で希釈倍率を 100 倍から 150 倍に落とす

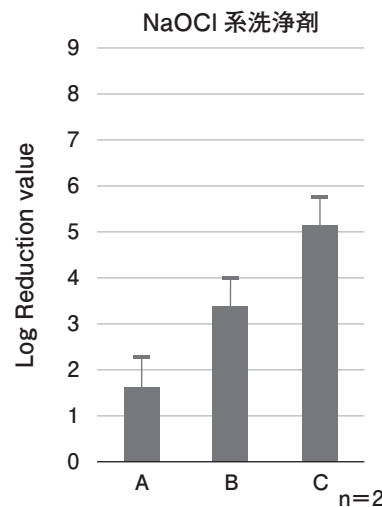


図4 次亜塩素酸系洗浄剤によるバイオフィーム中の菌の対数減数率
縦軸は対数減数率. 各製剤の希釈後の NaOCl 濃度は, A=50, B=200, C=1,000 ppm.

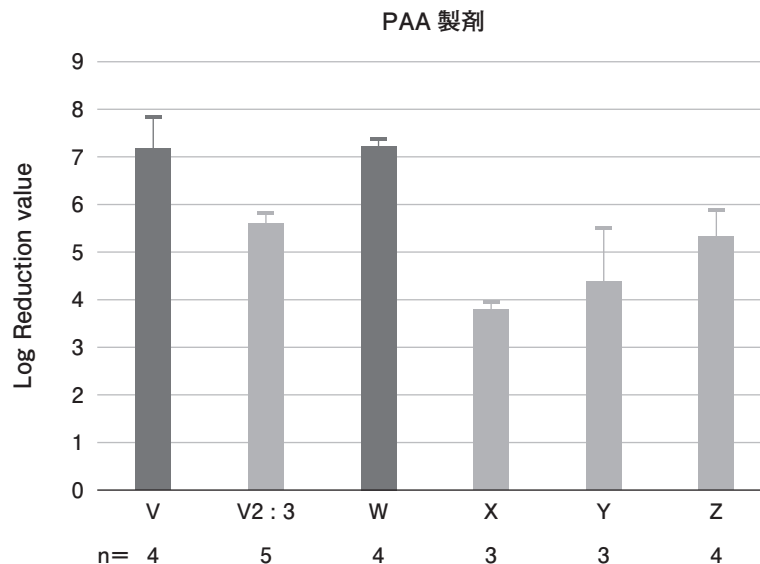


図5 過酢酸化学滅菌薬・洗浄剤によるバイオフィルム中の菌の対数減数率
縦軸は対数減数率。

と LRV は 5~6 へ低下した。これらの製品の酸性度は V と W は pH 1~3, X, Y, Z も pH 1~3 と幅があった。

3 考察

3-1 バイオフィルムに対する消毒薬の効果評価

CDC-BFR を用いて作成した *M radiotolerance* のバイオフィルムに対して、NaOCl を 10 分反応させると濃度に比例して (図 2) LRV が増加し、同じ濃度であれば反応時間に応じて (図 3) 殺菌性が増強した。容量依存性と時間依存性があり、消毒の定量的評価法として妥当と考えられた。静置法や環流法で作製したバイオフィルムでも消毒に対する耐性増強が観察される。しかし NaOCl で数 10~100 ppm⁹⁾ 以上では懸濁試験菌と同様に殺滅された。今回の検討で操作マニュアルに記載されている消毒薬の濃度と反応時間で、JIS 規格に沿った試験法では殺滅された (図 2 の▲)。そのうえ日常の装置消毒では翌日の消毒前には時々分離されるという、現場で起きている状況を説明する根拠 (図 2 の●, 図 3) を示すことができたことになる。一方、日本薬局方が調和を目指す欧米の薬局方では、消毒を殺菌効果の数値化で定義している。欧州標準 (Europa Normal; EN)¹³⁾ および米国¹²⁾ の、消毒剤 (sanitizer) としての LRV 3, 99.9% 除去という基準に 1,000 ppm なら短時間で到達した。実際の装置でも水洗後、消毒薬に置換して濃度が安定し、10 分以上経てば十分な消毒効果が期待される。また 200 ppm でも 6 時間かけ

れば到達する有効性の高い消毒法であることが明らかとなった。

3-2 消毒薬および透析用洗浄剤の効果比較

洗浄剤メーカーから市販されている透析用洗浄剤のバイオフィルムに対する殺菌性能を、10 分の反応で観察した。NaOCl 系洗浄剤 (A~C) には、キレート剤や剥離剤・除錆剤などが添加されている。論理的に効果の増強が期待されるが、CDC-BFR では製品希釈による NaOCl の濃度相当の LRV (図 4) を示した。一方、PAA 系洗浄剤 (X~Z) はメーカー指定の濃度で消毒剤の基準を満たしていた。透析施設からの酸性排水で公共の下水道管が崩壊した事例の報告¹⁴⁾ から、pH の低い PAA の使用自体を疑問視する意見もある。しかし NaOCl と作用点が異なり、かつ高濃度の NaOCl と同等以上の効果が確認され安易な否定は危険である。化学滅菌薬¹⁾ として EPA に承認され安全性情報を年次更新している製品 (V, W) の殺菌性はいずれも 99.9999% であった。今回検討した PAA では pH が低いほど殺菌性が高いとは限らなかった。洗浄消毒の本来の目的は装置の清浄度維持であり、排液処理装置の設置¹⁵⁾ を必須にすべきである。

3-3 メチロバクテリウム (*Methylobacterium*) 属

今回の検討では、透析液から分離された菌の中で最も NaOCl 耐性の高い (図 1) メチロバクテリウム属

を用いた。当施設の装置内に棲息する⁸⁾ものである。バイオバーデン部の清潔操作を確実に実行して二次汚染を防ぐと、他の施設でも製造時汚染が遺残して同じ菌種が観察される^{6,7)}。元来、水道水のような貧栄養状況で数カ月間生存し、浴槽¹⁶⁾のピンクのバイオフィームの原因となる廃水系の汚染と囚われがちである。しかし水処理システムからも分離され、無菌医薬品製造ラインの汚染後に改善の過程で最後まで遺残する菌³⁾として知られている。透析装置の施設設置時にバイオバーデン部から2~6菌種分離されたが、洗浄消毒でメチロバクテリウム属に収束した。その後も同じ遺伝子型の単一株が同じ装置から年単位で観察され^{7,8)}、バイオフィームとして機器配管の壁に生息している³⁾と推定した。この選択によって物理・化学洗浄消毒の耐性が高い菌¹⁷⁾に収束したと考えられる。

3-4 施設に合った洗浄消毒

洗浄消毒後も菌が遺残する原因に、装置の構造上の問題があげられる。

- ① 配管が複雑で再灌流時の気泡形成が故障の原因になるため洗浄後に乾燥させられない。
- ② シリコンチューブをねじ込みでつなぐ部品がサニタリー構造でない。
- ③ 常に液の流れていない配管やデッドレグがあり、通水されない部分があるなどである。

今回の結果から、水棲菌の生物特性としてバイオフィーム自体の化学消毒耐性の関与も大きいことが明らかになった。

一方、劣化防止の観点から、PAAの希釈倍率を100倍から150倍に変更した場合、殺菌性は1/10~1/100に低下した(図5, V, V2:3)。滞留用にNaOClの濃度を1/5にすると、同等の効力を得るのに36倍反応時間を要し(図2, 3)、洗浄性を上げるための添加物の利点が殺菌性能としての数値には現れない(図4)。バイオフィームに対する消毒剤の殺菌効果は、濃度や時間の単純な比率には当てはまらずこれまでの理屈通りにいかないようである。さらに、施設ごとに運用が異なる^{3,6,7)}ため菌種が異なり、消毒剤の感受性が異なる(図1)。実測して菌を同定しその菌に対する消毒効果をCDC-BFRで検討すれば、各施設の汚染状況に応じた洗浄消毒法の選択⁴⁾が可能となる。差し迫った問題なく皆やっている、という経験論ではなく、科学

的根拠に基づいて膜ろ過の手前から清浄度を上げ、品質の高い透析液・補充液の提供が実現するようになると思われる。

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。この報告の一部を第33回バイオフィーム学会(2019年7月5日 久留米)・第46回防菌防黴年次大会(2019年9月24日 豊中)・第34回バイオフィーム学会(2020年8月28日 Web開催)で報告した。

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) ISO : Guidance for the preparation and quality management of fluids for haemodialysis and related therapies, ISO 23500 : 2019.
- 2) 大藪英一, 富岡敏一, 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 (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.
- 3) 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, バイオフィー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.
- 4) 内野順司 : 透析装置の消毒・洗浄. Clinical engineering 2019; 30 : 474-481.
- 5) 厚生労働省 : 消毒法および除染法. 日本薬局方 17 改定 : 2016; 2414-2417.
- 6) 大藪英一, 野呂瀬嘉彦, 葉山修陽, 他 : 最適な透析液清浄化法選択のための基礎的検討—透析液中に棲息する菌の経時的菌株追跡—. 日透医誌 2009; 24 : 440-444.
- 7) 大藪英一, 富岡敏一, 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.
- 8) 大藪英一, 本田和美, 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. 日透医誌 2018; 33 : 536-342.
- 9) Buckingham-Meyer K, Goeres DM, Hamilton MA : Comparative evaluation of biofilm disinfectant efficacy tests. J Microbiol Method 2007; 70 : 236-244.
- 10) 大藪英一, 井上有紀, 本田和美, 他 : 消毒後培養不能に関

- する実験的検証. 腎と透析 2018; 85(別冊 HDF 療法 '18) : 166-168.
- 11) ASTM E2565-2017, EPA MLB SOP MB-19. Growing a biofilm using CDC biofilm reactor, ASTM E2871-2019, EPA MLB SOP MB-20. Single tube method for determining the efficacy of disinfectants against bacterial biofilms. ASTM E1054-2013 Standard Test Methods for Evaluation of Inactivators of Antimicrobial Agents microbicidal properties.
- 12) Gibson H, Taylor JH, Hall KE, et al. : Effectiveness of cleaning techniques used in the food industry in terms of the removal of bacterial biofilms. J Appl Microbiol 1999; 87 : 41-48.
- 13) Europe Normal 1040-2005 : Chemical disinfectants and antiseptics. Quantitative suspension test for the evaluation of basic bactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics. Test method and requirements (phase 1). 12. EN 1275 : 2005.
- 14) 高橋明宏 : 透析排水による下水道施設の損傷事故. Clinical engineering 2020; 31 : 333-339.
- 15) 青木弘之, 藤岡紀昭, 小原瑞貴, 他 : 透析用消毒剤と透析排水の pH 調査. 腎と透析 2020; 89(別冊 HDF 療法 '20) : 158-160.
- 16) Yano T, Kubota H, Hanai J, et al. : Stress tolerance of *Methylobacterium* Biofilms in bathroom. Microbes Environ 2013; 28 : 87-95.
- 17) Peneau S, Chassaing D, Carpentier B : First evidence of division and accumulation of viable but non-culturable *Pseudomonas fluorescens* cells on a surface subjected to conditions encountered at meet premises. App Environ Microbiol 2007; 73 : 2839-2846.

参考 URL

- ‡ 1) Rutala WA, Weber DJ, HICPAC 「Guideline for disinfection and sterilization in healthcare facilities, 2008. Atlanta (GA) : Centers for Disease Control and Prevention; 2008」 <https://www.cdc.gov/infectioncontrol/pdf/guidelines/disinfection-guidelines-H.pdf> (2020/11/3)
- ‡ 2) EPA 「Methods and Guidance for Testing the Efficacy of Antimicrobial Products against Biofilms on Hard, Non-Porous Surfaces; 2017」 <https://www.epa.gov/pesticides/methods-and-guidance-testing-efficacy-antimicrobials-against-biofilm-bacteria-hard-non> (2020/11/3)
- ‡ 3) 小暮慶明 「非蒸留法による注射用水の製造に係る Q&A: 逆浸透とバイオフィーム及び管理戦略. European Medicines Agency final reports」 http://www.ph-s.com/uploads/technical_documents/2017/09/tech20170905.pdf, 2017. (2020/11/3)