

## 人工透析液製造工程における熱水消毒後の温度管理による配管内従属栄養細菌の 増殖抑制に関する検討

### Study on the growth suppression of heterotrophic bacteria by a continuous heat control after hot water disinfection in dialysate preparation process

木村 主幸\* 佐々木 雅浩\*\* 菅原 俊継\*  
黒田 聡\* 相川 武司\* 渡邊 翔太郎\*

Kazuyuki Kimura Masahiro Sasaki Toshitsugu Sugawara  
Satoshi Kuroda Takeshi Aikawa and Shotaro Watanabe

#### Abstract

To keep a bacterial static condition in dialysate preparation process which made by the hot water disinfection, a growth suppression of heterotrophic bacteria at 40°C or 50°C incubation were investigated. Three clinical isolates of heterotrophic bacteria were incubated at 40°C or 50°C for 3 days in RO water or R2A liquid medium. At 40°C incubation, 2 strains of 3 employed bacteria showed markedly growth, whereas most of bacteria decreased at 50°C incubation. A decrease of bacterial number at 50°C incubation was considered one of a bactericidal effect by heating. On the other hand, a heat stability or heat tolerance of heterotrophic bacteria at 50°C incubation were also observed. These findings indicate that the growth suppression of heterotrophic bacteria by a continuous heat control after hot water disinfection could not expect. Furthermore, some of heat tolerance bacteria might be appeared during this process. Hot water disinfection has several advantages such as no dead space in disinfection area or low toxicity. The authors suggest that we need more information against the property of heterotrophic bacteria for its incubation temperature range.

#### 1. はじめに

近年、人工透析治療技術の向上により透析患者の寿命が延び、透析治療を受ける患者が30万人を超えた<sup>(1)</sup>。これに伴って、透析患者の生活の質(QOL)の向上など、安全でかつ快適な透析治療と治療による日常生活の提供がこれまで以上に求められるようになった。このような医療の提供の実現に欠かせないのが透析液の清浄化であり、その基本となる透析用希釈水である逆浸透(Reverse Osmosis; RO)水の清浄化も同様に求められるようになった。特に透析用希釈水の細菌汚染は、透析患者に対して発熱や透析治療間における様々な悪影響の原因となるため、透析液の品質を決定する重要な要件となっている。

このような背景から、透析液の微生物学的品質基準は特に厳格となり、管理基準が従来の100CFU/mL未満から10CFU/mL未満へと改訂されて

いる<sup>(2)</sup>。そのためこれまで以上に厳格な微生物管理が必要となり、透析液ラインの再構築や機器更新の際に様々な微生物管理手法が提案されている。このような微生物管理法の一つに透析液製造工程、特に透析液調整に使用する透析用希釈水製造ラインの消毒では熱水消毒法が普及しつつある。熱水消毒法は、配管内の温度を熱水(80°C)で満たし、10分から15分維持することで目的領域の微生物を消毒する方法である。熱水消毒法の特徴は、消毒薬を使用した際に生じる薬剤の届かないデッドスペースが生じないことや併用する薬剤がクエン酸のみであり、薬剤の残留毒性を次亜塩素酸消毒のように考慮する必要が低い点が挙げられる。熱水消毒は、安全面では有効であるが、消毒薬のような封入消毒ができないため、消毒効果の維持が難しい、熱による金属部品やゴムパッキンの劣化が生じる、初期の設備投資が高額になるなどの問

\* 北海道科学大学保健医療学部臨床工学科

\*\* (株)ニックス グローバル事業本部

題も指摘されている。

我々は従来から透析液製造工程ラインにおける細菌汚染の実態を調査するため、札幌市内の医療施設で実際に稼働している透析用水製造工程を対象とした調査を行い、透析ラインの各所から同種の細菌が分離され続けることを示してきた<sup>(3)</sup>。さらに、分離した細菌の多くが低栄養かつ低温（至適培養温度 25℃前後）で増殖する従属栄養細菌であることを示し、さらにこれらの細菌がRO水中での培養においても1日で100倍程度の増殖を示すことを報告してきた<sup>(4)</sup>。

今回我々は、熱水消毒後の透析液製造ライン清浄度を出来るだけ薬剤を使わず効果的に維持する方法として熱水消毒装置の加熱システムをそのまま利用し、ラインを一定の温度で保温することで従属栄養細菌の復帰や増殖を抑制できるのではないかと考えた。この可能性を検討するため、従属栄養細菌が25℃前後の培養温度に至適領域があることに着目し、従属栄養細菌を40℃と50℃で維持（培養）した場合の菌の増殖抑制について検討した。

## 2. 実験材料

### 2.1 逆浸透水（RO水）

RO水とは、水道水や井戸水などの原水を逆浸透膜（RO膜）と呼ばれる微細な孔径（0.5～1nm）を持つ半透膜を通過させることにより作成する純水である。原水を加圧してRO膜を通過させ、有機物・溶解イオン・重金属や微生物を95～99%を除去する<sup>(5)</sup>。一般的な医療施設における透析液希釈用RO水の製造工程は、プレフィルタによる大口径の粒子除去、イオン交換樹脂による軟水化に続いて活性炭カラムによる塩素除去、再度のポストフィルタでの微粉炭の除去を経て逆浸透膜モジュール（ROモジュール）で純水を取得し、これをタンクで貯水し、場合によってはこの貯水したRO水を再度逆浸透膜処理して使用している。一般的な透析用希釈水の製造工程における熱水による微生物管理は、RO水の貯留タンクにヒーターを設置して、タンク内を80℃に昇温し、この状態を15分間維持することで透析用希釈水を消毒している。Fig. 1 に一般的なRO水製造ラインの概略を示した。Fig. 中の網掛けの部分が発熱ヒーターを設置する部分である。なお、本報告で使用したRO水は、理化学研究用RO水製造装置 ADVANTEC 社

PWU-400 で製造した。また、実験で使用する際にはRO水をオートクレーブ（121℃, 2 気圧, 15 分間）で滅菌してから使用した。

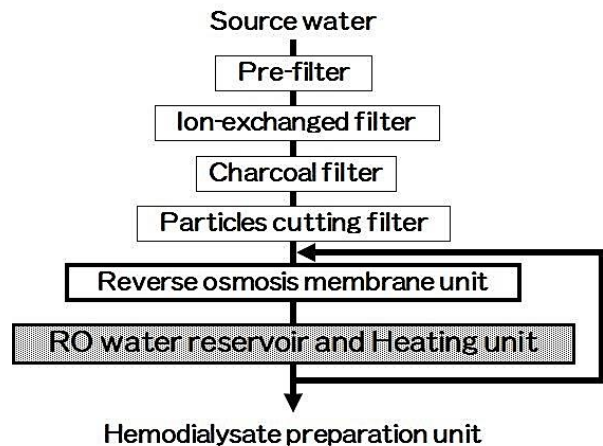


Fig. 1 Flow chart of RO water preparation system

### 2.2 被験細菌（従属栄養細菌）

従属栄養細菌とは、有機栄養物を低濃度に含む培地を用いて低温で長時間培養したとき、培地に集落を形成するすべての菌と定義されている。本来、水中には自然の水環境を生息場所としている多数の細菌が存在し、それらは有機炭素濃度が数mg/L以下といった低有機栄養環境下で生息している。そのため、それぞれの環境に適応して微量の有機物を利用できる能力を獲得しているものが多い。このように微量の有機物を利用し、かつ温度環境も病原性細菌のようにヒトの深部体温に一致する37℃よりも低温の20℃から25℃前後で増殖する細菌を従属栄養細菌と呼ぶ。

従属栄養細菌の特性は、一般細菌試験で用いられる標準寒天のような高濃度の有機栄養を含む培地では増殖できないか、あるいは増殖できたとしても集落を形成するほどには増殖できない点にある。また、温度条件も一般の病原性細菌の培養温度である37℃では良好な増殖を望めないとされている<sup>(5)</sup>。

本報告で使用した従属栄養細菌は、当研究室において以前に札幌市内の医療施設に設置されていた透析用水製造装置各部位から採水した試料水を従属栄養細菌の増殖用培地であるR2A寒天培地に接種し、25℃で7日間培養して出現したコロニーから分離したものである。これらの細菌を純培養の後、日本バイオメリュー株式会社製グラム陰性細菌同定検査キットAPI20NEを用いて同定した。今回の実験では、同定した菌種の中から比較的増

殖能が発達した 3 菌種を選択して使用した。使用した菌株は、*Ralstonia pickettii*、*Pseudomonas luteola* そして *Brevundimonas vesicularis* である。これらのうち *Ralstonia pickettii* は代表的な院内感染起因菌の一種であり、*Pseudomonas luteola* は緑膿菌に代表される *Pseudomonas* 属に属する細菌で日和見感染起因菌としても知られている。また *Brevundimonas vesicularis* は、サンプリングに協力頂いた医療施設から頻繁に分離される菌であった。これら細菌の共通した性状は、ブドウ糖非発酵グラム陰性桿菌で土壌環境やヒトの粘膜に存在する常在菌であり、病原性は弱い抵抗力の低下した宿主に対して日和見感染の原因となる点である<sup>(6)</sup>。加えてグラム陰性菌であることから死滅した際に細菌内毒素であるエンドトキシン（ET）を放出する可能性がある。本報告では、これら 3 菌種を日常的に透析液製造工程から分離される従属栄養細菌として考え使用した。

## 2.3 R2A寒天培地

R2A (Reasoner's Agar No. 2) 培地は、従属栄養細菌のような水環境に生息する細菌を高率に検出・培養するための培地である。水環境に合わせた組成に調整されており、水質検査用の培地として上水道法でも推奨されている。栄養価が普通寒天培地の 5 分の 1 程度である<sup>(5)</sup>。本報告では、当研究室にて自家調整した R2A 培地を培養に使用した。また、当該寒天培地から調整時に寒天成分のみを除去したものを R2A 液体培地として使用した。

## 3. 実験方法

### 3.1 菌液の調整

R2A 液体培地で被験細菌を前培養した後に、培地成分を除去するため遠心分離（3500rpm、20分、10℃）を行い、沈渣に滅菌 RO 水を加えてボルテックスで再度混合した。この菌液と RO 水を 1 : 9 の割合で 10 倍階段希釈し、菌液濃度を 10<sup>3</sup>CFU/mL 程度に調整して実験に使用した。

### 3.2 培養温度の設定

従属栄養細菌は 2.2 で述べたように、20℃から 25℃前後の比較的低温に至適増殖温度がある細菌である。一方多くの医療施設では、熱水消毒後消毒した RO 水製造ラインの温度を自然に低下させて室温に置き、次の利用まで待機させている。しかし、筆者らの医療施設における従属栄養細菌の

採取実験における経験では、消毒後比較的短時間で細菌が再出現することを確認していた<sup>(4)</sup>。この様な背景から我々は、熱水消毒後の温度管理を従来の室温（おおよそ 25℃で従属栄養細菌の至適培養温度とされている）よりも高温である 40℃または 50℃で管理することで従属栄養細菌の再出現を抑制できるのではないかと考えた。なお、培養温度を 40℃と 50℃に設定した理由は、牛乳などの殺菌に用いられる低温殺菌の処方温度が 60℃であることから、この温度に比較的近い温度（殺菌に近い培養温度と仮定）である 50℃、そして出来るだけ加熱によるコストを低減するため、加熱にかかる経費と軽減するため、従属栄養細菌の至適増殖温度よりも 15℃程度高い温度（従属栄養細菌の増殖には不向きな高温と仮定）として 40℃を設定した。

具体的な培養は、それぞれの温度を設定したウォータバスで行った。培養期間は、3 日間とした。対照の培養温度を従属栄養細菌の至適培養温度である 25℃として、この温度でも同様に培養した。なお、培養は水分の喪失及び、外部の影響を遮断するため滅菌遠心管を使用して密閉した状態で行った。培養液として使用した滅菌 RO 水の代わりに R2A 液体培地で培養したものを陽性対照とした。

### 3.3 菌数の測定と統計検定法

それぞれの実験で、培養開始時における植え込み菌液と 3 日間培養後の菌液を採取し、滅菌 RO 水で一定の希釈を行った後、最終的に希釈調整した菌液 100  $\mu$ L を R2A 寒天培地に接種し、スプレッターで塗抹した。塗抹後、シャーレを湿らせたペーパータオルを入れた発泡スチロール容器に入れ、25℃に調整したインキュベーターにて 7 日間培養した。培養後、出現したコロニー数を計測し、希釈率を乗じて被験菌液の菌数を算出した。各実験群における菌数の統計処理には、スチューデントの片側 *t* 検定を用いた。

### 3.4 培養温度の馴化に関する検討

50℃で 3 日間の培養（温度処理）に対する菌の馴化を検討するため、以下のような実験を行った。

50℃で 3 日間培養した後、被験菌液の菌数測定のために R2A 寒天培地に菌液を塗抹し、25℃で 5 日から 7 日間培養して菌数を測定した。この際に出現したコロニーを釣菌し、一旦 R2A 液体培地に接種後 25℃で 3 日間培養した。培養後、菌液の

菌数を計測するとともに菌液を25℃と50℃の二つの培養温度で改めて培養した。この培養を2回目の50℃培養（温度処理）とする。2回目の培養開始から3日目に菌数の測定を行い、この際に寒天平板上に出現したコロニーから釣菌して、2回目と同様の操作をさらに行った。この培養を3回目の50℃培養（温度処理）とした。このような実験スケジュールを組み、それぞれ1回目から3回目までの50℃培養後の出現菌数が実験に供した前培養（25℃、R2A液体培地、3日間）菌液の菌数と比較してどの程度になるかを検討することで被験菌の50℃培養に対する馴化の可能性を検討した。

## 4. 実験結果

### 4.1 40℃培養での増殖動態

40℃で培養した場合の *R. pickettii* および *P. luteola* の増殖の様子を Fig. 2 および Fig. 3 に示す。*R. pickettii* では、菌数が増加する傾向を観察した。（Fig. 2）データとしては提示していないが、*B. vesicularis* においても同様の結果となった。これに対して *P. luteola* では、培養後の菌数が接種菌量の約 1/20 に減少していた。（Fig. 3）以上の結果から、本報告で当初期待していた従属栄養細菌を40℃という従属栄養細菌の至適増殖温度よりも15℃程度上昇させるだけで菌の増殖を抑制できるかもしれないという期待は、否定される結果となった。

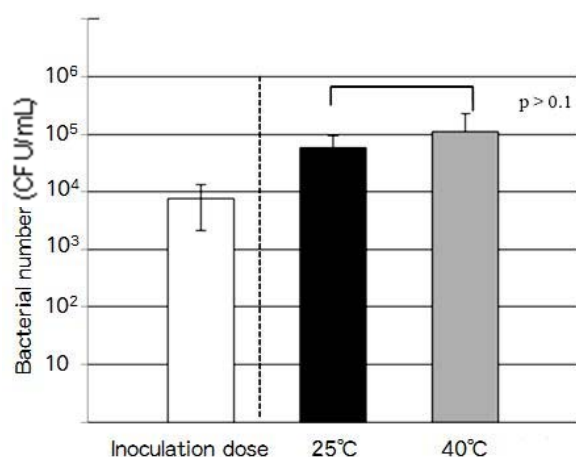


Fig. 2 Bacterial number of *R. pickettii* after 3 days incubation at 40°C

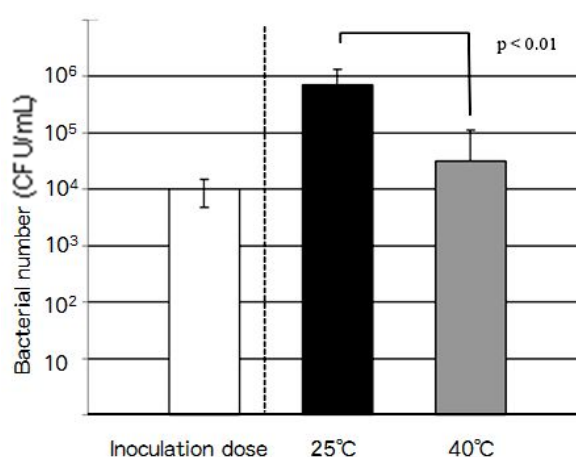


Fig. 3 Bacterial number of *P. luteola* after 3 days incubation at 40°C

### 4.2 50℃培養での増殖動態

4.1 と同様 50℃で培養した場合の *R. pickettii* および *P. luteola* の増殖の動態を Fig. 4 および Fig. 5 に示す。3種類の従属栄養細菌を50℃で培養した場合、*B. vesicularis* では3日後にはコロニーの出現を認めず *R. pickettii* および *P. luteola* では、培養開始時の接種菌量よりもほぼ 1/10 に菌数が減少していた。（Fig. 4 および Fig. 5）この結果から今回使用した3菌種の従属栄養細菌に関してのみの知見ではあるが、菌液を50℃で維持した場合には、増殖の抑制よりも殺菌的な影響が現れることが示唆された。ただし、3日間の培養（温度処理）でも菌がほぼ死滅したと考えられたのは、*B. vesicularis* のみで他の2菌種では、生存菌数がある程度維持されていることもわかった。

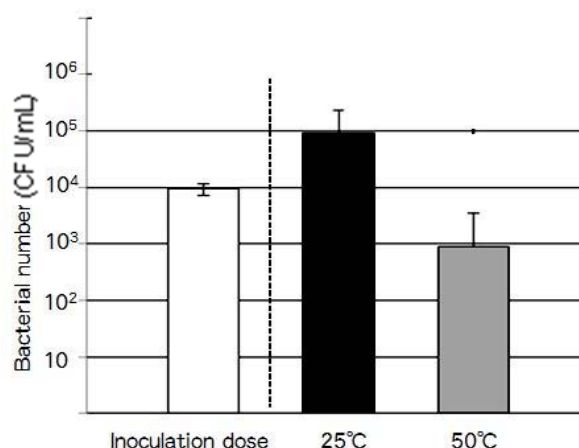


Fig. 4 Bacterial number of *R. pickettii* after 3 days incubation at 50°C



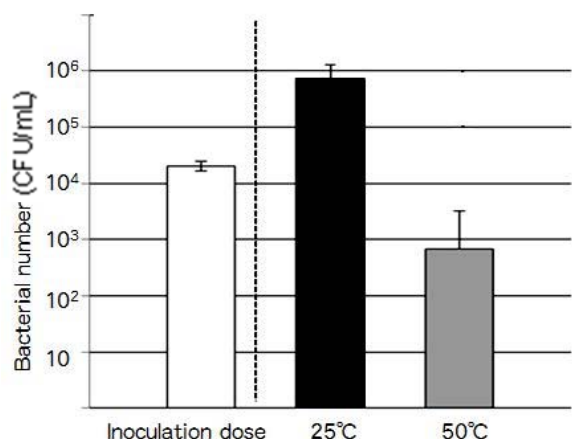


Fig. 5 Bacterial number of *P. luteola* after 3 days incubation at 50°C

#### 4.3 50°C培養（温度処理）に対する馴化の可能性

4.2 に示した 50°Cでの温度処理実験において、もっとも接種菌量に対する菌数の減少率が低い傾向を示した *R. pickettii* を用いて処理温度(50°C)に対する馴化の可能性について検討した。Fig. 6 は、3.4 に示した実験方法で 50°Cの培養（温度処理）を繰り返した場合、3 回それぞれの 50°C培養後の菌数を示している。棒グラフは、左からそれぞれの回数における被験菌液の菌数の平均値（ $1 \times 10^4$  CFU/mL 付近でほぼ一定）、それぞれの 50°C培養を行った際の対照となる 25°C培養での菌数の平均値（ $6 \times 10^4 \pm 1 \times 10^4$  CFU/mL）で、さらに左から 1 回目、2 回目そして 3 回目の 50°C培養（温度処理）後の菌数を表している。実験の結果、50°C培養を繰り返すとともに残存菌数が多くなる傾向を認めた。なお 1 回から 3 回の実験で 50°Cの

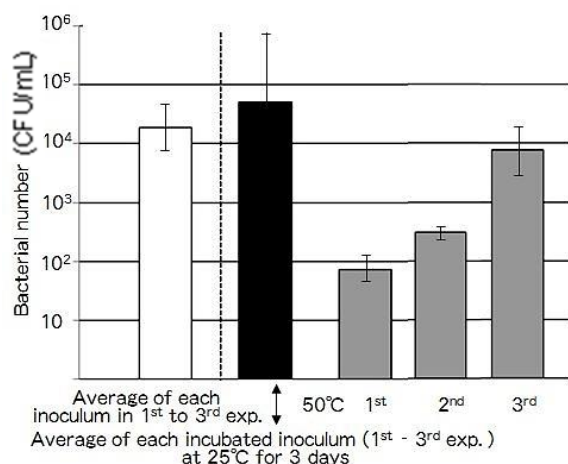


Fig. 6 Bacterial number of *R. pickettii* after 3 days incubation at 50°C in 1st to 3rd repeat heating

培養後に計測できた菌数をそれぞれの回で使用した前培養菌液（50°C→菌数測定で出現したコロニー→釣菌→R 2 A 液体培地 25°C3 日間培養した菌液）の菌数と比較して、植え込み菌数を基準とした出現率を計算した場合、1 回目が 0.0039%、2 回目が 0.027%そして 3 回目が 0.44% となった。この結果は、今回使用した従属栄養細菌は、当初想定していた以上に培養温度に耐性があるだけでなく、殺菌的な温度でも繰り返しの処理を受けると、馴化する可能性があることを示す結果となった。

#### 5. 考察

従属栄養細菌の自然環境中での生態や増殖については、近年いくつかの報告があるが、温度条件による調査研究はほとんどなく、主に栄養成分と増殖期間に関する調査が主であった<sup>(7,8,9,10)</sup>。一方、治療に大量の水を使用する人工透析治療では、透析液の希釈用に使用する逆浸透水（RO水）の製造工程で従属栄養細菌の汚染が以前から報告されていた<sup>(11)</sup>。また、これら細菌の大部分が菌体内毒素いわゆるエンドトキシンを包含するグラム陰性細菌であることから、透析液製造工程ラインの細菌に対する消毒処置はより重要なものとなっている。そのため透析液製造工程ラインの消毒には十分な配慮を加えるよう指示されている<sup>(2)</sup>が、同時にコスト面との関係から多くの医療施設では次亜塩素酸ナトリウムなどの酸化剤による消毒が行われてきた。しかし、消毒剤は消毒後の残留が常に問題となる。そのため残留毒性の心配のない透析液ラインの微生物管理法が求められるようになった。この様な背景から登場したのが透析ラインをヒーターで加熱して消毒する、いわゆる熱水消毒法である。熱水消毒法は、消毒薬を使用した場合に問題となる消毒薬の届かないデッドスペースが生じないことや添加薬剤にクエン酸などの毒性の低いものを使用するため、残留毒性をあまり考慮する必要がないなどの利点がある。その一方で耐熱性を有する材料でラインを構成することや消毒後比較的速やかにライン中から細菌の再出現があることなどの問題点も想定されていた。

本報告では、上記の問題点のうち消毒処方後の微生物制御の手法として、熱水消毒に使用するヒーターをそのまま使用し、消毒後の配管内温度をこれまでの環境温度よりも高い温度で維持する

ことで微生物の再出現を抑制できるのではないかと考えて、培養温度を 40℃および 50℃として検討したが、今回使用した 3 種類の従属栄養細菌は、40℃で培養した場合には 3 菌種中 2 菌種が至適培養温度である 25℃培養とほぼ同様の増殖傾向を示し、1 菌種のみで 25℃培養よりも菌数の減少が見られた。しかし、この例でも初期の植え込み菌数よりも若干菌数が増加していることから、40℃培養では従属栄養細菌の増殖抑制は期待できないとの結論となった。一方 50℃での培養では、初期の植え込み菌数よりも明確な菌数の減少を確認できた。しかし、この効果は従属栄養細菌の増殖を抑制するというよりも 50℃の温度処理による殺菌的な作用の結果と考えたほうが妥当であった。

本報告では、従来従属栄養細菌がいわゆる“比較的低温”(一般病原細菌の培養温度 37℃に比べて 25℃前後と低いとの意味)に至適増殖域があることから一般細菌よりも 40℃での培養でも大きな菌数の減少があるものと期待したが、40℃での培養で被験菌が明瞭に増殖抑制を示す結果は得られなかった。さらに、実験に使用した菌株の中で 50℃培養(温度処理)でも細菌数の減少が大きいとは考えにくかった *R. picketti* を用いて 50℃培養(温度処理)を 3 回繰り返し、それぞれの回での植え込み菌数と温度処理後の菌数を比較したところ、回を追うにしたがって出現する菌数が多くなる傾向を認めた。細菌の耐熱性は、特に発酵性細菌でその機序が調査されており、熱耐性蛋白質(Heat Shock Protein; HSP)遺伝子やその他の耐熱性遺伝子や誘導蛋白が知られている<sup>(12)</sup>。これらの遺伝子や因子は、発酵熱や生育環境などから誘導されたものと考えられているが、従属栄養細菌は従来から低温、低栄養でよく発育すると定義されているように加熱処理には耐性がないと想定していた。しかし今回の実験から、50℃での温度処理では殺菌効果が望めないこと、さらにこのような温度での処理を繰り返した場合、菌が温度に対して馴化する可能性があることを示す結果となった。これらの結果は、今後の透析治療における透析液ラインの微生物制御に勘案すべき問題点があることを指摘することとなり、今後は、従属栄養細菌の耐熱性獲得の機序や一般細菌との相違などを調査検討する必要があることを示したものと考えている。

## 6. まとめ

透析用水製造工程から分離した従属栄養細菌を 40℃および 50℃で培養し、その増殖動態を調査した。その結果、40℃程度の培養温度では、今回使用した従属栄養細菌についてのみであるが増殖抑制が期待できないことが判明した。さらに培養温度を 50℃にした場合、一定の殺菌効果が期待できるものの、場合によっては菌が培養温度に馴化して増殖能を向上させる可能性があることも示唆された。透析液製造工程での熱水消毒は、安全性だけでなく様々な利点を有することが知られているが、本消毒の対象となる従属栄養細菌には熱処理に対する抵抗性を示す可能性が認められたことから、今後のさらなる検討が必要であると思われる。

## 参考文献

- (1) (社)日本透析医学会 統計調査委員会,わが国の慢性透析療法の現況, 2014
- (2) 血液浄化関連標準化委員会,透析液清浄化ガイドライン Ver. 1.07,日本臨床工学技士会,2010
- (3) 塚本 和幸,“透析液製造工程における微生物汚染に関する検討”,北海道工業大学研究紀要第 36 号,pp.263-267,2008
- (4) 飯川 雄大,“透析液製造工程から分離した従属栄養細菌の増殖動態に関する検討”,北海道工業大学研究紀要第 37 号,pp.229-233,2009
- (5) 竹澤 真吾・松本 哲哉,(編著)透析液のバイ菌が良くわかる,(株)東京医学社,pp.64-68,105-106,172,2008
- (6) Stelzmueller I, et al.: *Ralstonia pickettii* innocent bystander or a potential threat. Clin. Microbiol. Infect. 12 (2): 99~101, 2006
- (7) 堀内 雅人,“山梨県の水環境における従属栄養細菌調査”,山梨衛公研年報第 53 号 pp.69-70 2009
- (8) 保坂 三継,眞木 俊夫,“水の従属栄養細菌試験における培地並びに培養条件の検討”,東京衛研年報 Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H., 52, 245-249, 2001
- (9) 福田 翼,古下 学,芝 恒男“鮮魚の 35℃培養公定法による生菌数と 20℃細菌培養法による生菌数の比較”, Journal of National Fisheries University 60 (4) 183 - 188

2012

- (10) Furuhata Katsunori, Kato Yuko, Goto Keiichi,  
Hara Motonobu, Fukuyama Masafumi  
“Diversity of heterotrophic bacteria isolated  
from biofilm samples and cell surface  
hydrophobicity”, The Journal of General and  
Applied Microbiology Vol.55 (1), 69-74
- (11) 林 宏樹, 檜村 友隆, 山本 英則, 葛岡 孝一  
郎, 十倉 秀臣, 佐藤 和弘, 古閑 尚栄, 柏木  
博子, 井出 孝夫 “透析液製造工程における細  
菌動態の評価”, 日本血液浄化技術学会会誌  
17 巻 1 号 Page85-87, 2009
- (12) 山田 守, 赤田倫治, 高坂智之, 東 慶直,  
星田尚司, 松下一信 “耐熱性発酵微生物の  
耐熱性を賦与する分子機構”, 化学と生物 Vol.  
53, No. 11, 763-773 2015