公募研究助成論文

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

大薗英一[*1,2]　本田和美[*1]　熊谷拓也[*1]　根岸秀樹[*1]　井上有紀[*1]　市村恭子[*1]
岡松健太郎[*1]　滝澤英明[*1]　高橋めぐみ[*2]　野呂瀬嘉彦[*2]　北堀泰広[*3]　川本進也[*3]
竹田徹朗[*3]　南伸　治[*4]　楢村友隆[*5]　冨岡敏一[*6]　坂元　仁[*6]　土戸哲明[*6]

＊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 獨協医科大学越谷病院　＊4 池田病院
＊5 千葉科学大学医療危機管理学　＊6 関西大学化学生命工学部

key words：RO 装置，水棲菌，汚染源，全菌検索，変形勾配ゲル電気泳動法（DGGE）

要　旨

透析液から分離される菌の起源を調べるために，人工透析を行っている 6 施設，5 社の水処理装置・4 社の中央供給装置（稼働期間 1〜8 年）で，原水・RO モジュール上流の RO1 次（RO 用水）・2 次側（RO 水）・透析液に棲息する菌の種類と優占性を全菌検索法（16SrRNA 遺伝子の変性勾配電気泳動）で検討した．採取したすべての溶液に菌は複数種存在した．上流側の菌種とその優占性が連続する下流側で保たれていたのは，RO 水-透析液間で ETRF より上流で透析液を採取した 3 施設のみであった．他の 3 施設ではこの間に ETRF が介在し，RO1 次-2 次間には RO モジュール，また原水 -RO1 次間にも何らかのろ過工程があった．その上流と下流の間で菌種は大きく異なり，その優占の順位性も保存されなかった．一般に透析液製造系全体の主要な汚染源は RO 装置の上流からのリークと想定されている．しかし今回の結果では，リークは仮にあったとしても主要な汚染源ではなく，各膜ろ過工程の下流側で別の汚染が存在していると考えられた．

はじめに

人工腎臓用透析液はダイアライザーの半透膜，あるいは HDF 用補充液として UF 膜を介して体内に流入する．このため本来無菌医薬品であるべきものである．しかし 1 回の透析に 1 人あたり 0.1 トン以上と大量に使用するために，各透析施設で調整しその管理責任も負っている[1)]．この清浄化にはエンドトキシンリテンティブフィルター（ETRF）によるろ過[1)]と消毒の有効性[2)]が知られている．しかし，この両者のみに過度に依存すると ETRF や配管の劣化を早め，亀裂や変形による密閉系の破綻が生じ，むしろ汚染状況が悪化する場合がある（複数の personal communications，第 39 回 HDF 研究会，2012 年 9 月 8 日横浜）．

私共はこれまでに品質保証として透析施設での GQP 管理の可能性や，膜ろ過や消毒損傷菌といった清浄化対策時の品質管理（細菌培養）について検討し，科学的根拠を持って細菌汚染を制御する方法を探究してきた[3〜6)]．この度，細菌生理学的手法と遺伝子学的手法の二つの観点から透析液中に棲息する菌の特性を捉えなおし，透析液の清浄化から品質の維持向上のために必要となる情報の収集と整理を試み，なぜ血液透析システムに汚染が生じるのか解析した．

この検討の一翼として細菌汚染の起源を掌握することは重要であり，透析液製造系のバイオバーデン部の汚染がどこを起源としているものか，膜ろ過前後で菌叢がどう変化するか遺伝子学的解析を行った．一般に

Bacteriological study on improving the quality of dialysis fluid in hemodialysis system.（B）Whole bacterial cell assay in the dialysis fluid by DGGE
Koshigaya Oobukuro Clinic, Department of Microbiology and Immunology, Nippon Medical School
Eiichi Osono
Department of Life science and Biotechnology, Kansai University
Toshikazu Tomioka
Tetsuaki Tsuchido

透析液の汚染は，「RO は透析液製造工程において化学汚染・生物学的汚染の両者においてもっとも低減率の高い工程であり，原水汚染・リーク率に規定される RO 水の汚染は RO 以降の汚染を規定するもっとも重要な因子である.」[1]とされ，RO 装置の上流からのリークが透析液製造系全体の主要な汚染源と想定されている．そこで，菌の培養特性の影響を受けない全菌検索法を用いて，透析施設で恒常的に透析用水を製造している RO 装置内の菌叢を観察した.

1　目　的

透析液製造用に実際に稼働している RO 装置で，原水側から菌がリークして透析用水を汚染する可能性があるか検討した.

2　方　法

維持血液透析療法を施行している 6 施設（関東圏 2，関西圏 4）で，1〜8 年稼働している 5 社の人工透析用 RO 装置（ジャパンウォーターシステム，JMS，ダイセル，東レメディカル，三菱レーヨンクリンスイ），4 社の中央供給装置（JMS，東レメディカル，日機装，ニプロ）を対象とした．平成 24 年 4 月〜8 月の期間の週の半ばに検討を行った.

透析用水および透析液の製造中に，RO 膜の上流側と下流側のそれぞれ複数個所から溶液を無菌的に 5L 採取し（図 1）直ちに冷蔵し検査施設（テクノスルガ・ラボ，静岡）に輸送した．溶液中の菌をろ過回収し溶菌して DNA を採取した後，菌種ごとに多型性を示す 16SrRNA 遺伝子の可変領域を PCR で増幅した．この

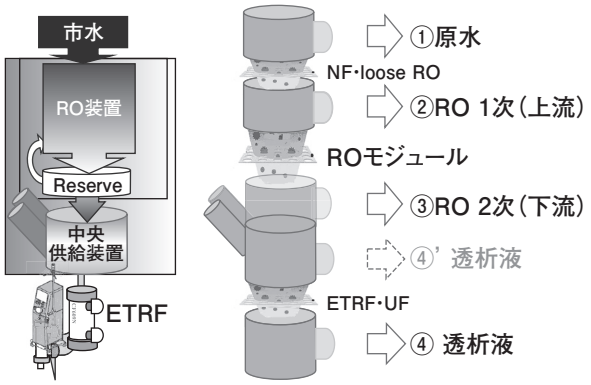

図 1　透析液製造系と採取部位の模式図
4 カ所より採取．①-②間には NF や loose RO，②-③間には RO による膜ろ過工程がある．③-④間で UF もしくは ETRF の下流で採取した施設④と上流で採取した施設④' があった.

PCR 産物をホルムアミドで変性すると，塩基配列中のグアニン・シトシン（GC）含量が多いほど二本鎖 DNA 間の水素結合が開裂し三次元構造が変化するために，尿素の濃度勾配を持つゲル上で電気泳動すると異なる位置にバンドが展開される（変性勾配ゲル泳動法，DGGE）.

この方法で観察しうるバンドは菌叢の中で少なくとも 1% 以上存在する優占性（プレドミナント）を示し，異なる泳動位置にバンドが認められれば 16SrRNA 遺伝子の塩基配列の異なる別の菌種の存在を示している[7]．ゲル上に観察されたバンドの泳動距離および強度を image J soft ware の Gel Plotting Image および Histogram で解析した．さらに比較の目的で隣接する溶液から得られたヒストグラムを重ねあわせ，同じ位置のバンドに各施設の上流側の泳動距離の長いものから順にマーク（a.〜g.）し，各泳動でのマークしたバンドの強度の順位性が下流側で保存されているかを観察し序列の維持を判定した.

3　結　果

すべての検体から DNA は採取され，16SrRNA 遺伝子が PCR で増幅された．DGGE による展開で，どの溶液にも複数の菌種・属が認められ菌叢を形成していると考えられた．PCR 産物の量から推定される菌数は種ごとに異なり均一ではなかった．水系として同じ地域にある施設が 2 グループ（利根川水系，猪名川水系）あったが，原水のパターンも施設間ですべて異なった.

各施設で各々の溶液中の菌叢を比較すると，RO2 次（RO 水）と透析液の採取部位の間に ETRF や UF 膜が設置されていなかった施設 A, B, C では，上流の菌種とその優占性の序列で見た菌叢のパターンがそのまま下流側に保存され（図 2 a〜c の Histogram 3)），さらに下流側の透析液には新たな菌の存在も観察された．施設 D, F ではこの間で 1 菌種のみ同じバンドが観察され（図 2 d, f の Histogram 3)），施設 E ではまったく異なった.

RO1 次 -2 次の間を見ると，施設 C, E では菌叢がまったく異なり（図 2 c, e の Histogram 2)），施設 B では 1 菌種のみ同じバンドが観察され，上流での優占順位が 6 位のものが下流の 1 位であった（図 2 b の Histogram 2)）．施設 A（図 2 a の Histogram 2)）では，2

図 2　各施設の 16Sr RNA 遺伝子 PCR 産生物の変性勾配電気泳動と各レーンのバンドのヒストグラム解析

個々の施設の原水・RO1 次・RO 2 次・透析液の泳動パターン，各レーンのバンド位置とその強度，さらに比較の目的で隣接する液から得られたヒストグラムを重ねあわせ，同じ位置のバンドに上流の小さいものから順にマーク（a.～g.）した．各泳動でのマークしたバンドの強度の順位性が保存されているか否かで，序列の維持を判定した．各採取部位の間にろ過工程があると，上流側の菌の優占性とその序列が保存されない．

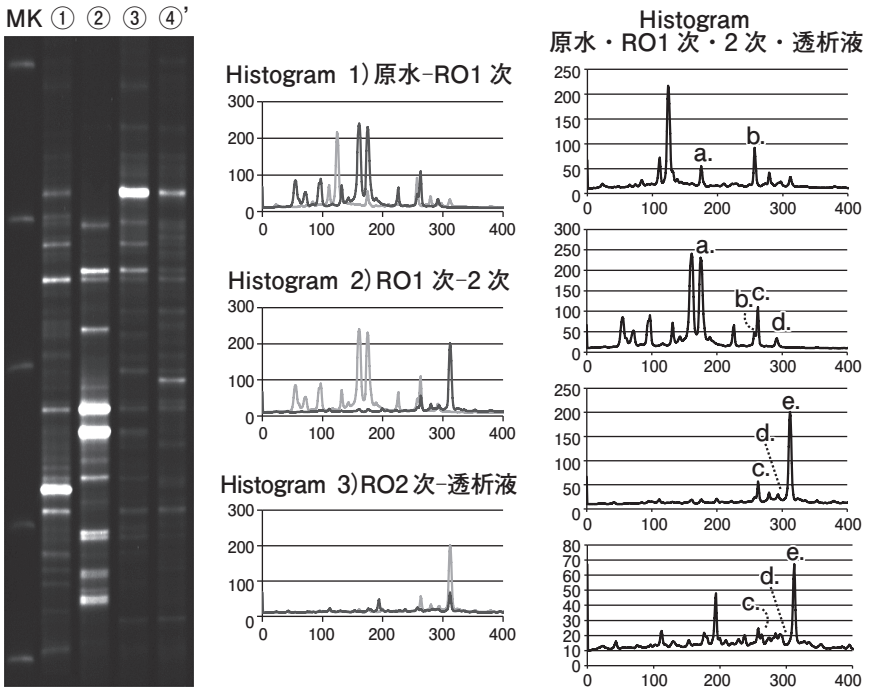

図 2a　施設 A の検体のうち④' はバンド強度が弱かった．隣接する上流-下流間でバンド位置が等しいものは，1）原水-RO1 次：a. 上流の 4 位と下流の 2 位，b. 上流の 2 位と下流の 8 位．2）RO1 次-2 次：c. 上流の 3 位と下流の 2 位，d. 上流の 10 位と下流の 3 位．3）RO2 次-透析液：e. 上流の 1 位と下流の 1 位，c. 上流の 2 位と下流の 6 位，d. 上流の 3 位と下流の 7 位であった．

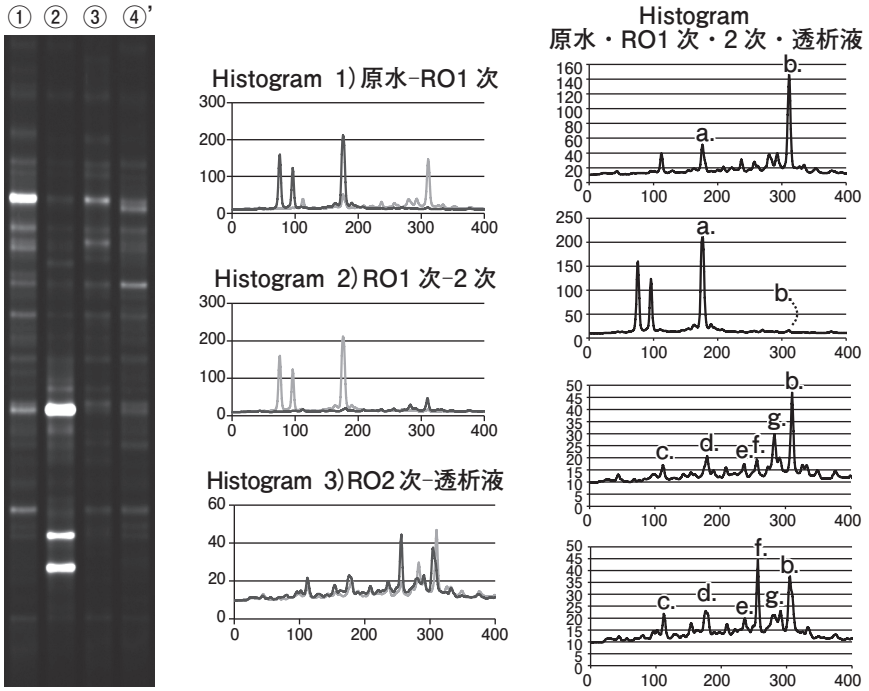

図 2b　施設 B の検体のうち③，④' のバンド強度が弱かった．隣接する上流-下流間でバンド位置が等しいものは，1）原水-RO1 次：b. 上流の 1 位と下流の 6 位，a. 上流の 2 位と下流の 1 位．2）RO1 次-2 次：b. 上流の 6 位と下流の 1 位．3）RO2 次-透析液：b. 上流の 1 位と下流の 2 位，g., 2 位と 5 位，d., 3 位と 3 位，f., 4 位と 1 位，c., 5 位と 6 位，e., 6 位と 7 位であった．

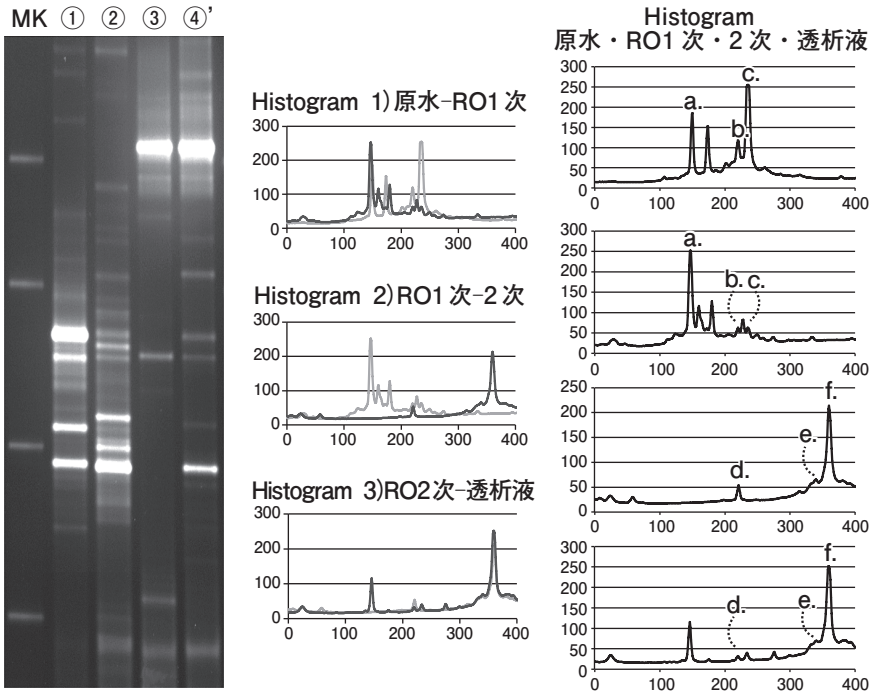

図 2c 施設 C の検体のバンド強度は全て均等であった．隣接する上流-下流間でバンド位置が等しいものは，2）RO1 次-2 次間にはなく，1）原水-RO1 次：a. 上流の 2 位と下流の 1 位，b. 4 位と 5 位，c. 1 位と 6 位．3）RO2 次-透析液：f. 上流の 1 位と下流の 1 位，e. 2 位と 3 位，d. 3 位と 6 位であった．

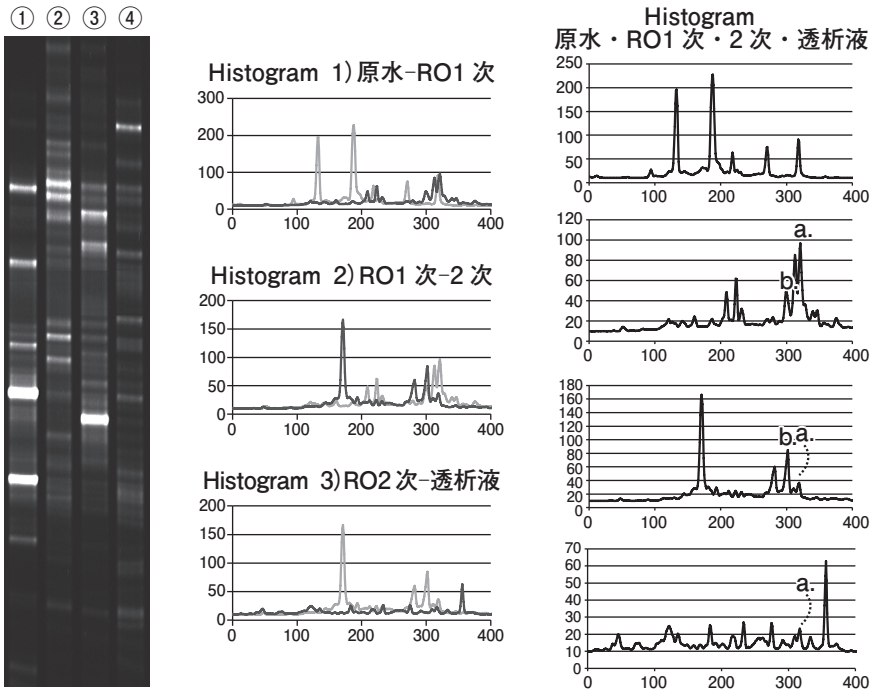

図 2d 施設 D の検体のうち④のバンド強度が弱かった．隣接する上流-下流間でバンド位置が等しいものは，1）原水-RO1 次間にはなく，2）RO1 次-2 次：a. 上流の 1 位と下流の 4 位，b. 上流の 4 位と下流の 2 位．3）RO2 次-透析液：a. 上流の 4 位と下流の 6 位であった．

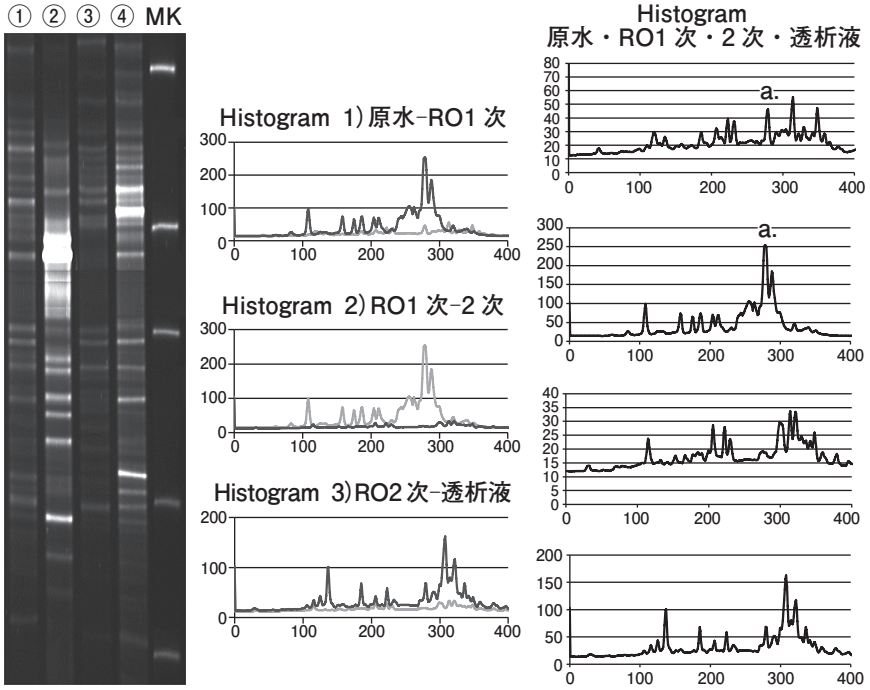

図 2e　施設 E の検体のうち③のバンド強度が弱かった．隣接する上流−下流間でバンド位置が等しいものは，1）原水−RO1 次：a. 上流の 3 位と下流の 1 位 d のみで，2）RO1 次−2 次，3）RO2 次−透析液間にはなかった．

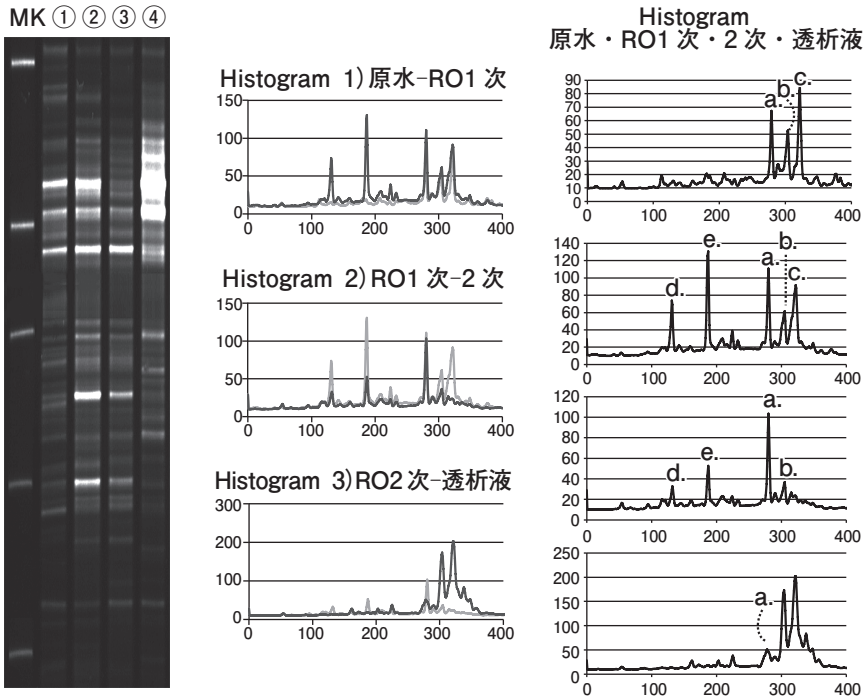

図 2f　施設 F の検体のバンド強度は全てほぼ均等であった．隣接する上流−下流間でバンド位置が等しいものは，1）原水−RO1 次：c. 上流の 1 位と下流の 3 位，a. 2 位と 2 位，b. 3 位と 5 位．2）RO1 次−2 次：e. 上流の 1 位と下流の 2 位，a. 2 位と 1 位，d. 4 位と 4 位，b. 5 位と 3 位．3）RO2 次−透析液：a. 上流の 1 位と下流の 4 位であった．

菌種上流で観察されたバンドが下流でも観察された．しかしこれらは上流での優占順位が3位と10位のものであり，1，2，4〜9位のものは下流では観察されていない．かつ下流側でこの2菌種より優占性の序列が高い菌種もあり，上流側の菌叢のパターンが下流側に保存されていなかった．施設D（図2dのHistogram 2)）でも2菌種同じバンドが観察されたが，優占順位が上流で1位のものが下流では4位，上流の4位が下流では2位へと下流側での優占性が逆転した．さらに上流の2，3位のものは下流では観察されなかった．施設Fでは4菌種（e. a. d. b.）が上流と下流で重複していた（図2fのHistogram 2)）．しかしこれも上流の1位と下流の2位，上流の2位と下流の1位，上・下流の4位，上流の5位と下流の3位と優占性の序列の逆転が認められ，さらに上流側にある菌種で下流側では観察されないものもあり，菌叢のパターンとしては完全な一致を見ていなかった．

同様に原水-RO1次の間で，施設Dでは菌種がまったく異なり，施設Eでは1菌種のみ同じバンドが観察された．施設A, Bでは2菌種，施設C, Fでは3菌種同じバンドが観察されたが上流の優占性が下流側に保存されていなかった（図2a〜fのHistogram 1)）．

4 考 察

今回の結果で，ROモジュール1次（上流）側の菌種の優占性とそのパターンがROモジュールの2次（下流）側では保存されていなかった．毎時数百リッター単位で精製されているRO水に，上流から菌が漏れて直接混入しているのではない，つまり，ROモジュールからの連続的なリークが下流側の汚染に直接影響していないことが実証された．

一般に，透析液製造系全体の主要な汚染源はRO装置の上流からの透過・漏出である，と想定されていた[1]．逆浸透圧で水分子のみを透過させるRO膜であってもモジュールとして運転させた場合，時間の経過とともに膜自体の劣化やケーキ層・ゲル層形成によるファウリングで菌が透過する可能性は否定できない[8]．たしかに，飲料用や灌漑用の淡水化プラントのように大量に水を精製する場合でも，ROモジュールの上流とは別の微生物が下流では優占化していたとの報告はある[9]．しかし，透析液製造系全体の汚染の起源を明らかにするためには，「人工透析用のRO装置」で，「各メーカーの汎用機種」を「実際に稼働している状態」で検討する必要があった．

今回の検討で，施設FのRO装置では，上流側の4菌種が下流側でも観察された．しかし優占順位が下流側で逆転するケースや下流側では観察されない優占種があり，施設A〜CのRO水-透析液間で見られるような優占性の保存は認められなかった．ROモジュールの1次側に未使用のRO水を戻し再利用するための再循環回路があり，その流入路とROモジュールの1次側との間から採取したものと考えられる．

このケースを含め，上流からリークしたもののうち水の性状の違いが菌ごとの指向性に反映し優占種の差となった可能性は否定できない．しかし，溶液として差の大きい純水と糖加リンゲル液である透析液の間でも，ろ過工程がなければ形成されている菌叢の優占性は保存されていた．また今回検討したDGGEは培養を必要としない全菌検出法のため，いわゆる生存はしているが培養できない菌（VNC）も観察結果に含まれている．しかし，いわゆるPCRバイアスと言われる16SrRNA遺伝子の増幅効率の種差を勘案する必要がある[7]．以前パルスフィールド法でRO装置内の菌を検討し，ROモジュールの上流と下流では同一の菌株が観察されず，少なくとも主要菌叢は異なり連続性がないことを報告した[10]．今回の検討はその結果の再現となった．

これまでも透析液製造系内に棲息する菌の汚染源と伝播経路の解析を行い，その汚染の多くは人為的な作業[11,12]や交換部品などの器機表面に付着[10,13]しているものが起源であることを報告してきた．今回の結果もRO装置の下流側で新たな異なる菌の存在が確認され，上流側とは別の汚染が起きていると推測された．RO水や透析液が流れる配管やタンクの壁面の菌の関与が考えられ，消毒時や消耗品交換などの予防的メンテナンスの無菌操作化や，それを規定するSOP[14]の管理が重要となると考えられた．

謝 辞

本研究は平成23年度日本透析医会研究助成事業による公募研究として実施された．なお本研究の企画から関与頂いた，関西大学生命生物工学科の土戸研究室の皆様に深謝致します．

文　献

1) 秋葉　隆，川西秀樹，峰島三千男，他：透析液水質基準と血液浄化器性能評価基準 2008．透析会誌，41；159-167，2008．

2) ISO．ISO23500：2011．血液透析用透析液および関連療法に用いる溶液の調製及び品質管理の手引．

3) 大薗英一，葉山修陽，透析液清浄化多施設共同 GQP 委員会：改定薬事法 good クオリティープラクティスに準據した透析液清浄化対策の透析専門クリニックでの取り組み．日透医誌，22；311-317，2007．

4) 大薗英一，葉山修陽，野呂瀬嘉彦，透析液清浄化多施設共同 GQP 委員会：透析液清浄化の指標となる従属栄養菌培養方法の精度管理および測定結果に対する警戒基準・処置基準設定のためのジェネラルコンセンサスの形成．日透医誌，23；495-510，2008．

5) 大薗英一，葉山修陽，野呂瀬嘉彦：最適な透析液清浄化法選択のための基礎的検討．日透医誌，24；440-444，2009．

6) 大薗英一，葉山修陽，野呂瀬嘉彦：損傷菌回復を目的とした透析液用培地の開発．日透医誌，27；529-535，2012．

7) 中山二郎，福井　学，園元謙二，他：腸内フローラの構造解析：DGGE/TGGE 法による腸内細菌叢解析．腸内細菌学雑誌，18；147-153，2004．

8) 川崎睦男：NF 膜・RO 膜における劣化・ファウリングと洗浄技術．膜の劣化とファウリング対策；NTS，東京，pp. 296-343，2008．

9) 竹内和久：海水淡水化分野でのバイオファウリングの抑制．膜の劣化とファウリング対策；NTS，東京，pp. 417-426，2008．

10) 本田和美，大薗英一，葉山修陽，他：透析用水の汚染経路の推定から考えた水質基準 0.1 CFU/ml への展望．腎と透析，67（別冊：HDF 療法 '09）；72-76，2009．

11) 井上有紀，大薗英一，本田和美，他：透析液採取時におけるコンタミネーションの発生頻度は 1% 未満である．透析会誌，41；819-825，2008．

12) 本田和美，大薗英一，井上有紀，他：透析液の清浄化に手の衛生手技は不可欠である．透析会誌，43；361-366，2010．

13) 大薗英一，野呂瀬嘉彦：壁在バイオフィルムを構成する菌と透析液中の菌の関係．九州 HDF 検討会誌，15；81-83，2011．

14) 本田和美：膜ろ過による制御．一次側と二次側の菌叢の変化．防菌防黴，41；2013．印刷中．