

水環境中に存在する細菌の新規

リアルタイムモニタリングシステム

2013年9月

九州保健福祉大学大学院

(通信制) 保健科学研究科

保健科学専攻

D211004 檜村 友隆

## [ABSTRACT]

Microbial contamination in dialysis fluid is usually assessed by culture dependent method such as plate counting. However, culture dependent methods often underestimate bacterial number, because many bacterial species such as mycobacteria cannot be cultivated by conventional means. In addition, culturing processes are time-consuming and increase the risk of biohazard. So, I evaluated using fluorescent staining methods for the monitoring of the microbiological contamination in dialysis fluid production process.

As a result, a large number of bacteria retained physiological activity, while most could not form colonies on culture method. Fluorescent staining method could detect almost of microbial cells. In addition, with the fluorescent staining method, it is possible to get a result within 1 hour while it usually takes approximate 7-14 days to get it by using the culture method.

Unfortunately, these microscope methods are done manually, so they require time and also results may change according to the worker's skills. In order to spread the bacteria detecting method using the fluorescent microscope, an image analysis system or automatic image scanning system is being developed. In recent years, flow cytometry has been used for bacteria detection. Flow cytometry can measure a large number of cells in a short amount of time with high reliability, and is able to analyze a number of biological characteristics simultaneously.

All methods above require preparation such as filtration or dyeing using fluorescent chemicals. Also they requires sampling of the test sample so they are not done in real-time.

Therefore, I have focused on the autofluorescence substance in the bacteria to detect them, and developed a sensor to measure the bacteria in real-time, without any pretreatments or addition of any reagents. This system uses a 405nm laser focused on the sample flowing through the flow-cell in order to detect the fluorescent light from the bacteria as well as scattered light. Fluorescent light and scattered light are separated by a dichroic mirror, and the number of viable particles (bacteria) and that of non-viable particles are obtained. I tested this system using fluorescent polystyrene latex particles and several bacterial strains, and confirmed that it had good detection

capability. I believe that this system will become a next-generation bacteria detection system and help the introduction of PAT (process analytical technology) to all areas where real time and on-site detection is needed.

## [目次]

1. 緒言	1
2. 人工透析治療の概要	3
2.1 透析液の製造・供給システム	
2.1.1 水処理システムの基本構成とその目的	
2.1.2 透析液製造供給装置と供給システム	
2.2 人工透析治療に用いる透析液の清浄化と臨床効果	
2.3 透析液水質基準	
2.3.1 国内における透析液水質基準	
2.3.2 海外における透析液水質基準	
2.4 本邦における透析液微生物管理の現状	
3. 透析液製造工程中の細菌検出における問題点	9
3.1 水環境中に存在する細菌の特徴	
3.2 水環境中に存在する細菌の検査法	
3.2.1 培養原理に基づく細菌検出法	
3.2.2 培養操作を必要としない細菌検出法	
3.2.3 培養検出を迅速化した細菌検出法	
4. RO水製造工程中に存在する細菌現存量の計測【検討1】	14
4.1 試料と方法	
4.1.1 試料	
4.1.2 細菌現存量の計測	
4.1.3 ET活性の計測	
4.2 結果	
4.3 考察	
5. 透析液製造工程中に存在する細菌現存量の計測【検討2】	19
5.1 試料と方法	
5.1.1 試料	
5.1.2 細菌現存量の計測	

5.1.3	ET 活性の計測	
5.2	結果および考察	
6.	高精度・迅速細菌検出法の自動化	20
6.1	Bp による蛍光染色法の概要	
6.2	透析液製造工程における評価	
6.2.1	対象	
6.2.2	細菌現存量の評価方法	
6.2.3	検出信頼限界	
6.3	結果および考察	
7.	自家蛍光を利用した水環境中に存在する細菌の リアルタイムモニタリングシステムの開発	25
7.1	装置の概要	
7.1.1	装置原理	
7.1.2	散乱光の検出	
7.1.3	自家蛍光の検出	
7.2	上記原理を用いて試作した試作機の評価【検討 4】	
7.2.1	対象および方法	
7.2.2	結果	
7.2.3	考察	
7.3	信号の処理とプログラミング	
7.4	細菌リアルタイムモニタリング装置の性能評価 1【検討 5】	
7.4.1	蛍光粒子による性能評価	
7.4.2	スパイク試験による性能評価	
7.4.3	環境試料による性能評価	
7.4.4	結果および考察	
7.5	細菌リアルタイムモニタリング装置の性能評価 2【検討 6】	
7.5.1	対象および方法	
7.5.2	結果	
8.	おわりに	40

謝辞	.....	41
文献	.....	42
図 (1~70)	.....	47
表 (1~10)	.....	117

## 1. 緒言

腎臓は老廃物の排出、体内の水分量調節、体の酸塩基平衡・電解質の調節に加え、ビタミンDの活性化や赤血球増加因子の分泌などさまざまな働きを担っている。これらの働きが障害された状態を腎不全と呼び、急性腎不全は保存的療法にて回復することが多いが、慢性に移行するとこれらの腎機能を代替する方策を施さないと生命を維持することは困難となる。

腎機能を代行する方策としては、透析治療および腎移植があり、提供される腎臓の件数に比べ、圧倒的に慢性腎不全患者の人数が多いことから、多くの患者が人工透析治療を受けており、日本は透析大国とも呼ばれている。

人工透析療法の歴史は浅く、保険が適応となり、腎不全の標準的治療として本邦に定着してから約40年ほどであるが、技術の進歩は著しく、数ある人工臓器の中でも、最も成功した人工臓器であると位置づけられている。本邦における透析患者数は2011年度末ですでに30万人を越えており、全国で透析治療を施行している病院・医院は4200施設におよび、今後暫くの間は増加が続くと予想されている。国際的にみても、本邦の透析医療は冠たる成績を有しており、人工透析患者の生命予後は欧米諸国の追従を許さない非常に優れたものであり、最長透析患者の透析歴は44年を刻んでいる。

人工透析治療は、血液中の尿毒素等を除去する治療であり、尿毒素の除去にはダイアライザと呼ばれる半透膜で作成された人工腎臓（中空糸フィルタ）を用いる。人工透析治療では、ダイアライザを介して血液と透析液が触れ合い、血液中の不純物を拡散および限外濾過の原理で除去し、血中に不足している重炭酸などを透析液側より補充する。標準的な治療では、週3回4時間の治療が施されるが、1回4時間の治療で使用される透析液は約120Lにもおよぶ（500mL/min×4時間）。血液中の不純物を除去する傍ら、一方で、透析液の一部が血液中に移行するため、人工透析治療に使用される透析液に生理活性物質などの不純物が含まれていると、生体に炎症反応を引き起こし、各種透析関連合併症を誘発することが従来から知られている。

そこで、関連諸学会が透析液水質基準を定め、透析液の清浄度を規定している。一方、関連諸学会が定めている透析液水質基準は推奨およびガイドラインにすぎず、法的規制等がないため、各施設にて柔軟な対応が可能であり、透析液の安全

性は各施設に委ねられている。

前述の如く、人工透析治療は絶えず供給される透析液がその管理ターゲットであり、注射剤などのロット管理とは異なり、いかに迅速にその不具合を検出するかが非常に重要である。しかしながら、細菌検出手法の代表ともいべき培養法は、環境微生物の場合、結果を得るまでに約7日間を要し、決して高精度・高感度な細菌検出法とはいえない。そのため、結果を即座にフィードバックすることができず、安全面に課題が残る。

さらに、環境中に生息する細菌の殆どは通常の培養法による検出が困難であることが知られている。通常の培養で検出可能な細菌は地球上に存在する全細菌の1%にも満たないとされ、培養できない細菌は場合によっては「存在しないもの」として扱われていることになる。今では、圧倒的多数の細菌は「生きているが培養できないもしくは培養困難である(VBNC: Viable but non-culturable)」状態にあるとされ、培養できる状態の細菌のほうがむしろ自然界の例外中の例外であると考えられている。

そこで、現在の透析液製造工程中におけるより正確な微生物現存量を、現在環境微生物学分野にて一般的に用いられている培養操作に依存しない検出法を用いて調査・把握し、より高精度でリアルタイムに水環境中に存在する細菌を計数できる装置の開発を目指し検討を行った。

## 2. 人工透析治療の概要

### 2.1 透析液の製造・供給システム

人工透析治療に用いられる人工透析液は、通常 500mL/min の流量でダイアライザに供給され、4 時間の標準治療を行う際は 120L を必要とする。治療同時施行患者数 100 名の透析施設では、実に毎分 50L もの透析液を必要とする。よって、透析液は製薬メーカーから濃縮透析液を液体もしくは粉末の状態で購入し、各透析施設において透析用水（逆浸透膜処理した水（RO 水））で希釈し、規定の濃度にしたうえで患者ベッドサイドまで供給する。

透析治療は大量の透析液が膜を介して血液と触れ合う治療であり、血液中の不純物を除去することに加え、透析液中の物質を血液中に移行させる二面性を有している。その透析液の大部分を占めるのが RO 水であり、基となる原水には、水道水・井水などが用いられるが、これらの中に混在する生物学的および化学的汚染は生体にさまざまな有害作用を及ぼすため、適切な手段で処理し透析液を作製することが求められる。

#### 2.1.1 水処理システムの基本構成とその目的

透析分野にて一般的に使用されている RO 装置（reverse osmosis system：逆浸透装置）の基本構成を図 1 に示す。

##### ① 原水加温システム

主に原水を RO 膜で処理する際に、水温が低いと膜透過率が上がらないため、一定の回収率維持を図るために設置される。通常、25℃ 付近になるよう調整される。加温によりシリカの許容濃度が高まり、RO 膜へのシリカスケール付着を防止できる。また、活性炭での触媒作用が向上し、残留塩素の除去効率が向上する。

##### ② プレフィルター

原水中に含まれる粗いゴミの除去を目的として設置される。通常、孔径 5～25μm の深層濾過フィルタ（糸巻きタイプ）を使用する

##### ③ 軟水化装置

原水中に存在している硬度成分の除去を目的として設置される。

軟水化装置に用いられている陽イオン交換樹脂は高濃度の NaCl を用いて再置換を行うことで、繰り返し使用することが可能である。

原水由来の重金属イオンが多く含まれる透析液を長期的に使用すると、生体内に蓄積し、骨障害や神経障害、造血障害などの中毒症を生じることが知られている<sup>1)</sup>。特にアルミニウム汚染は脳症を代表とするさまざまな中毒症を引き起こすため、原水中から必ず除去しなければならない。その他、カルシウムやマグネシウムなど、透析液自体に含まれる物質でも、その量が大量となると硬水症候群などの問題を起こすケースがあるので、原水中から除去する必要がある。

#### ④ 活性炭濾過装置

活性炭は、原水中に存在する残留塩素を触媒作用により塩素イオンまで分解(分解過程で一部吸着)することに加え、有機不純物を吸着除去することを目的に設置される<sup>2)</sup>。クロラミンは反応が極めて緩慢なため、通常の用いられ方では分解が不十分であり、2次側にリークしやすい<sup>3)</sup>。RO膜での除去効率も悪いため、活性炭筒を2段直列で設置するなどの対策を施すケースもある。活性炭濾過装置通過後は、遊離塩素が除去されているため、特に細菌汚染に注意が必要である。水道水の消毒として用いられている遊離塩素は溶血の原因となるので必ず除去する必要がある。

#### ⑤ チェックフィルタ

粉碎された軟水樹脂・活性炭粒子などを除去することを目的に設置される。通常、孔径は5~10 $\mu\text{m}$ 程度のものが選択される。

#### ⑥ 逆浸透モジュール (RO膜)

高い分離能を有する膜で、前処理水(1次)側から加圧することで、原水中の有機・無機不純物、溶解塩類(イオン類)の殆どを除去することが可能である。素材には芳香族ポリアミド膜や合成複合膜などが用いられ、スパイラル形状をしたものが多い。芳香族ポリアミド膜や合成複合膜は塩素に対して弱いため、前述した活性炭濾過装置の管理が重要である。透過水の回収率(%) (透過水量/原水供給水量)は通常50~75%程度に設定される。

#### ⑦ ROタンク

RO膜で処理された処理水を一時貯留し、瞬時的な透析用水需要増大時などのバッファーとしての役割を目的として設置されている。

ROタンク内には、細菌増殖を抑制するため紫外線殺菌灯が設置されている。汚染防止のため、非稼働時はROタンク内を空に(抜水)した状態で紫外線殺菌

灯が点灯するようプログラムされている。

### 2.1.2 透析液製造供給装置と供給システム

透析液の製造は図 2 に示すように A 剤・B 剤の 2 つを使用直前に調整して製造する。製造方法には A・B 剤とも市販されている濃縮原液を用いる「液-液タイプ」、B 剤のみ市販の粉末製剤を用い、B 粉末溶解装置を用いて施設内で B 濃縮原液を製造する「液-粉タイプ」、A・B 剤ともに粉末製剤を用いて施設内にて A・B 濃縮原液を製造する「粉-粉タイプ」の 3 パターンが存在する。この濃縮液と前述の RO 水を A : B : RO 水 = 1 : 1.26 : 32.74 の比率で混合し、患者ベッドサイドの透析監視装置に供給するのが透析液製造供給装置の役割である。

製造・供給された透析液は通常 UF 膜を通過した後、透析液供給配管を通じて各透析監視装置に供給され、透析治療に使用される。この透析液供給配管は全長数百メートルに及ぶことも珍しくなく、適切な管理を行わないと汚染の原因ともなり得る。

## 2.2 人工透析治療に用いる透析液の清浄化と臨床効果

1983 年、Henderson ら<sup>4)</sup>は、透析液中の ET を代表とする生理活性物質が血液中に流入することで、単球を刺激してインターロイキン（以下、IL）-1 の産生を誘導し、種々の透析合併症発症の母体となっていることを報告した（インターロイキン仮説）。また、1985 年に Gejyo ら<sup>5)</sup>によって透析アミロイド症の前駆物質が  $\beta$ 2-microglobulin であることが明かとなり、血中の低分子量蛋白除去を目的とした HPM の開発に拍車がかかり、現在のダイアライザの主流を占めるまでになった。その後、Man ら<sup>6)</sup>は *in vitro* にて ET を含んだ透析液を HPM に供給すると、血液側では IL-1 産生が誘導されることを報告した。これらの歴史的背景から、透析液の汚染が生体へ与える影響を危惧する傾向が強まり、透析液清浄化の重要性が認識されるようになってきた<sup>7)</sup>。

透析液を清浄化することでもたらされる臨床効果としては、手根管症候群発症率の低下<sup>8)</sup>、エリスロポエチン投与量減少<sup>9)</sup>、栄養状態改善<sup>10)</sup>、赤血球寿命延長<sup>11)</sup>、血清ペントシジン低下<sup>12)</sup>等が報告されている。また、Stenvinkel ら<sup>13)</sup>が提唱した MIA 症候群は腎不全患者にみられる低栄養（Malnutrition）、炎症

(Inflammation) 状態が動脈硬化 (Atherosclerosis) に関連し、心血管系合併症を招くとする疾患であり、透析液汚染との関連が深い。低栄養状態や慢性炎症の発症に透析液の水質は深く関与しており、透析液中の生物学的汚染 (グラム陰性菌由来の ET、グラム陽性菌由来のペプチドグリカン、真菌由来の 1→3,β-D-グルカンなど) は生体に様々な悪影響をもたらすことから、これらの物質が含まれない透析液を供給するべきである。特に生理活性が強い ET はサイトカイン誘導因子であり、発熱、血圧低下、凝固異常などを引き起こし、その量が過剰であればショックを誘発し死に至る。生理活性が強力なことに加え、測定系が確立されていることが、透析液清浄化の指標として長年 ET 活性が採用されてきた所以である。また、低濃度の ET でも、繰り返される透析治療の中で長期的に負荷されると、さまざまな合併症の発生母体となる可能性があり、ET は検出限界以下にするべきである。透析液の汚染レベルが透析関連合併症の発症を左右することは明白な事実であり、透析治療を施行するに当たって透析液清浄化は必須であると言える。

## 2.3 透析液水質基準

### 2.3.1 国内における透析液水質基準

我が国における透析液水質基準は、1995年に日本透析医学会より最初の提示が行われた<sup>14)</sup>。その後、HPMの普及やオンラインHDF療法などの治療方法バリエーションの増加に合わせて1998年<sup>15)</sup>、2005年<sup>16)</sup>に改定が行われ、厳しいET基準を設けて透析液清浄化の普及が進められてきた(表1)。一方、欧州腎臓・透析移植会議 ERA/EDTA (European Renal Association/European Dialysis Transplantation Association) や米国標準化・先端医療用具機構 ANSI/AAMI (American National Standardization Institute/Association for the Advancement of Medical Instrumentation) は本邦を上回る厳しい透析液基準を提示し<sup>17),18)</sup>、さらに ANSI/AAMI の内容は国際標準化機構 ISO (International Standardization Organization) に色濃く反映され<sup>19)</sup>、2011年、透析液製造・管理関連 ISO 規格 (11663,13958,13959,26722,23500) の5案件が成立し、正式に発行された<sup>20)</sup>。

本邦では、①細菌はダイアライザを通過しない、②原水中の濃度が高い、②故

に、透析液中への出現頻度が高い、③測定方法が確立されている（透析液中における細菌の検出方法に関しては最適条件を見出せなかった）、④その生理活性が強力である、などの理由から ET に重きを置いた水質基準を制定し、水質管理に努めてきた。よって、本邦では細菌数に関して明確な基準を示していなかったが、諸外国においては細菌数に重きを置いた水質基準が主流であったため、ISO 規格案にも細菌数基準が盛り込まれる見通しとなり、本邦でも微生物基準を含んだ新たな基準の作成と臨床での微生物検査実施が求められることとなった。このような背景のもと、日本透析医学会は 2008 年に透析液水質基準を改定し、現在、2008 年に発行された基準<sup>21)</sup>が採用されている（表 2）。標準透析液は血液透析を行う場合の最低限の水質を意味し、通常の治療は超純粋透析液レベルの透析液を用いて治療することを推奨している。

### 2.3.2 海外における透析液水質基準

諸外国における透析液水質基準を表 3 に示す<sup>22)</sup>。USP（米国薬局方）や EP（欧州薬局方）には透析液に関する基準が一部存在するが、JP（日本薬局方）には透析用濃縮原液製剤に関する記載しか存在しない。また、欧州では、スウェーデンのように透析液水質基準において EP よりも国独自の基準（SLS）のほうが強い規制力を有するケースもある。米国では、基準の遵守を診療報酬制度に反映させる制度が確立しており、定期的に施設の査察が行われ、AAMI 基準を遵守できていない場合、国から診療報酬を支払ってもらえないシステムが存在している。つまり、AAMI 基準は本邦の基準に比べてかなり甘いものとなっているが、全ての透析施設がこの基準をクリアしているものと考えられる。本邦の場合、水質基準は recommendation の域を出ず、次項の如く全ての透析施設が基準をクリアできているわけではない。

## 2.4 本邦における透析液微生物管理の現状<sup>23)</sup>

日本透析医学会統計調査委員会が毎年行っている現況調査によると、ET に関しては回答施設（4,041 施設）の 95.8%で少なくとも年 1 回以上の透析液 ET 活性測定が行われており、72.0%の施設では月 1 回以上（日本透析医学会水質基準）施行されていた。透析液 ET 活性値は 3,854 施設（92.4%）から回答が得られ、

日本透析医学会標準透析液水質基準 0.05EU/mL 未満は 93.0%の施設で達成されており、2009 年末（84.2%）、2010 年末（91.7%）と比較して改善傾向が継続している。

細菌に関しては、回答施設（3,980 施設）の 91.6%で細菌検査が行われており、70.1%の施設で月 1 回以上（日本透析医学会水質基準）施行されていた。透析液細菌数は 3,571 施設（85.7%）から回答が得られ、日本透析医学会標準透析液水質基準 100cfu/mL 未満は 98.3%の施設で達成されていた。超純粋透析液基準である 0.1cfu/mL\*未満は 56.4%の施設で達成されており、2010 年末（53.1%）と比較して改善傾向が継続している。

### 3. 透析液製造工程中の細菌検出における問題点

#### 3.1 水環境中に存在する細菌の特徴

透析液は殆どの場合、通常の水道を浄化して透析用水を作成した上で調合される。水道水中にはありとあらゆる不純物が溶存しており、細菌も例外ではない。大腸菌については「検出されないこと」と記されているが、一般細菌に関しては「2000cfu/ml 以下」となっている<sup>24)</sup>。よって、経口摂取するには問題とならないが、多くの細菌を含んでいる可能性がある。細菌は病原菌よりも環境細菌のほうが圧倒的に種類も数も多いといわれており、まだ菌名も決められずその特徴も明らかにされていない菌が多数存在する。環境細菌の中には温度や湿度、栄養条件などの点においてかなり厳しい環境下で生存できる細菌もいる。これらの細菌の多くは栄養の乏しい環境に適応して発育することが可能であり、従属栄養細菌である。

透析分野ではエンドトキシンが水質検査の主流となる以前から微生物検査（培養検査）が実施されていたが、水棲菌の特徴をあまり把握せずに高栄養の培地を使用し培養を行っていたため結果は殆ど全てが陰性であった。このような結果を受け、透析液の培養検査はあまり積極的に行われて来なかったが、近年、本邦でも低栄養培地で培養するとコロニーが確認できることが報告され、多くの施設にて培養による細菌検査が行われている。

水道水から製造される不純物を殆ど含まない逆浸透膜処理水（以下、RO 水）中のような貧栄養環境で生存している生菌を高栄養な培地で培養すると代謝が活発となり、その結果自ら産生したフリーラジカルにより自滅してしまう。また、自然界のさまざまな環境ストレスにより死には至らない程度の損傷を受けた生菌は、活性を持つがコロニーを形成する能力を失ってしまう。現在水棲菌検出に用いられている R2A 寒天培地は低栄養であり且つ、損傷菌の発育を促進する目的で可溶性デンプンやピルビン酸ナトリウムが添加されている。これらの培地を用いて培養することで細菌の現存量をより正確に把握することが可能となる。

#### 3.2 水環境中に存在する細菌の検査法

透析液の水質管理を行うには、適したモニタリング手法を選択し、正しく結果を評価することが非常に重要である。検査に入る前に、用いる検査方法が目標

値に対して妥当か、精度や信頼性はどの程度かなどを把握した上で、得られた結果をもとに議論しなければならない。水中に存在する細菌の特徴としては、世代時間が長くコロニー形成が遅い、比較的低温での培養が適している、栄養素の低い培地でしか増殖しない、損傷していることが多く培養困難である、などが挙げられる。標準的な細菌検出法として、平板塗抹法・メンブレンフィルター（MF）法といった培養操作に基づく生菌測定が行われている。また、操作時のコンタミネーション減少や簡便化を目的とした各種簡易生菌検出キットが市販され、施設にて汎用されている<sup>25)</sup>。

### 3.2.1 培養原理に基づく細菌検出法

培地上、もしくは培地中にて細菌の数を増幅し検出する方法が培養法である。培養法には、標準的な方法として平板塗抹法、平板混釈法、MF法がある（定量法）。これらは、細菌を増殖させて集落（コロニー）を形成させる方法であり、通常一つの細菌は増殖することにより一つのコロニーを形成するため、その数をカウントすることで細菌の数を計数できる。コロニーの数をカウントするため、単位はコロニー形成単位（colony forming unit：CUF）であらわされる。一方、液体培地を利用した細菌検出法もある（定性法）。増殖した細菌が培地に濁りを生じさせたり、試薬を変色させることで細菌の存在を判断することができ、日本薬局方における無菌試験法もこれに該当する。

#### i) 定量法

##### a) 平板塗抹法

水中に存在する従属栄養細菌の検出には、低栄養で損傷菌の回復効果もあるR2A寒天培地が好んで用いられる。RO水、透析液中の細菌を検出する際は、培地上に試料を滴下（0.1～0.2 mL）し、培地全体に塗抹して比較的低温（17～25℃付近）で長時間（7日間程度）培養することが推奨される。

平板塗抹法の変法にシート状培地培養法がある。これは、培地中に特殊な試薬が混合されており、形成したコロニーが着色されコロニーカウントが容易である。着色原理はコロニーを形成した細菌が有している酵素（エステラーゼ）活性・呼吸活性による反応に基づいており、培養環境のO<sub>2</sub>濃度などが通常の平板塗抹法

とは異なることもあり、平板塗抹法とシート状培地培養法でカウントされるコロニー数が必ずしも一致するとは限らない。

#### b) MF 法

MF にて試料を濾過し、平板培地に貼り付けて培養する方法である。一度に多くの試料を処理することが可能であり、菌数の少ない検体を処理する際に好んで用いられる。また、MF による濾過により、試料中の発育阻害物質を容易に除去することも可能である。一方、施設で MF 法を行う場合、環境や操作条件が制限され、操作上のコンタミネーションが発生する可能性が常に生じる。また、汎用されている MF 法は専用のフィルターホルダーやマニホールド等を必要とし、作業工程も増え操作が煩雑である。そのような背景から、簡便に MF 法を施行できる製品も市販されている<sup>26)</sup>。

#### ii) 定性法

##### a) 日本薬局方無菌試験法

規定どおり調整された液体培地の中に、規定された量の試料を入れ、規定された方法に従って試験をした際に、培地が濁るか否かで細菌の有無を判断する。無菌試験の目的は、無菌性が十分にバリデーションされている工程で製造された試料の無菌性を保証するための一手段であり、無菌試験の結果のみで試料の無菌性を保証するものではない。よって、無菌試験に適合しても、培地や検体量、試験方法を変えれば検出可能となる細菌の存在を否定するものではない。試験環境なども詳細に規定されており、一般施設で行うことは困難である。

##### b) 呈色反応法（センシメディア法）

呈色反応法をキット化した製品が市販されており、透析分野では RO 水用と透析液用の 2 種類が用いられている。センシメディア法は細菌が呼吸活性を有していることを利用し、キャップ付ケースに R2A 液体培地に加え、CO<sub>2</sub> に反応して呈色反応をおこす試薬をガス透過性の高い膜に封入した検査用具であり、試料中に存在する細菌を容易に確認することができる。しかしながら、全ての細菌が呼吸活性を持っているとは限らず、透析液では重炭酸由来の CO<sub>2</sub> が発生することなど

からも、陰性結果が必ずしも細菌の存在を否定するものではないことや、細菌が存在しなくても陽性と出てしまう可能性などが指摘されている<sup>27)</sup>。特に新たな透析液カーボスターなどの登場により、透析液の重炭酸濃度のバラエティーも多様化してきたため、透析液での測定には用いるべきではない。

### 3.2.2 培養操作を必要としない細菌検出法

透析液製造工程中の細菌を検出するためには、より高感度・高精度な検出法が用いられるべきである。一方で、原水となる水道水には塩素が含まれ、細菌が増殖するのを阻害するため、培養法による検出ではその現存量を低く見積もってしまう。また、RO膜通過後の水では、細菌自体が急激に減少するため、非常に細菌密度が低くなり、より検出が困難となる。より高感度に計測するには、平板塗抹法や混釈法よりもメンブレンフィルタ（以下、MF）法が適する<sup>28)</sup>。MF法では、試料中の細菌を濾過回収することで、微量の細菌を含む透析液の評価が可能である。また、透析液に含まれる何らかの抗菌物質が増殖を阻害している場合、これらを洗浄することで抗菌物質の影響を除去することができる。近年では、細菌学を専門としない人でも用意に扱うことが可能である簡易的MF法が普及しており、これらを使用することも有効である<sup>26)</sup>。しかしながら、MF法自体も万能な手法ではない。

パスツールやコッホは1 cellの細菌を目に見える大きさの集落（colony）を形成するまで増殖させて細菌の存在を確認する手法、いわゆる培養法を確立し、今日の細菌学の基盤的技術を創出した。しかし、近年の分子生物学・光学系技術の発展は著しく、細菌を蛍光染色剤で標識し、蛍光顕微鏡下でその数を直接計測する蛍光染色法が開発されて以来、環境中に生息する細菌の殆どは通常の培養法による検出が困難であることが認識されている<sup>29)</sup>。培養困難な細菌はVNC (Viable But Non-Culturable)と称され、本質的にコロニーを形成しないものに加え、コロニーの形成条件が知られていないもしくは培地が適当でない、あるいは飢餓などのストレスにより一過性にコロニー形成不全に陥っている細菌などが含まれる<sup>34)</sup>。我々が培養可能な細菌は地球上に存在する全細菌の0.1%にも満たないとされ、培養困難な細菌はいままで「存在しないもの」として扱われてきた。一方で、細菌を培養することなく計測する方法として直接計数法がある。この方法では、MF

上に捕集した細菌を直接蛍光染色試薬で染め、蛍光顕微鏡で観察することによって、細菌をシングルセルレベルで検出することができる。また、細菌の持つ生物活性に特異的な蛍光染色剤を用いると、その細菌の性状を知ることができる。核酸結合型の蛍光染色剤やエステラーゼ活性、呼吸活性などの生理活性に特異的な蛍光染色剤を用い、蛍光顕微鏡下で各試薬に対応した励起光を照射すると蛍光発光する細菌を観察することができる。蛍光染色法は、それまで見過ごされてきた培養困難な細菌を含めて検出できるだけでなく、通常7日間程度かかる培養時間を必要とせず、1時間以内での細菌検出が可能である（図3）。

例えば、核酸結合型の蛍光染色剤を用いた全菌数計測法がある。核酸結合型染色剤には Acridine orange(AO)や 4',6-diamidino-2-phenylindole(DAPI)などがあり、これらは殆ど全ての細菌の細胞膜透過性があり、DNA や RNA と結合すると考えられている<sup>30,31)</sup>。この方法では細菌の生死に関する情報を得ることは困難だが、数分で全菌数を把握することができる。また、Propidium iodide(PI)や Ethyidium bromide(EB)などの蛍光染色剤は細胞膜障害を受けた細菌の細胞膜を透過して染色する特徴があり、死菌のみを染色することができる<sup>32)</sup>（図4）。つまり、DAPI染色とPI染色を組み合わせた二重染色を行ない、両者の差から生菌数を理論的に推定することができる。さらに、生理活性を持つ細菌を同時に計数することも可能である。生理活性を持つ細菌、つまり生菌を計測する方法として 5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride(CTC)を用いると、細菌の呼吸により CTC は CTC-formazan に還元され、Green の励起光を照射すると赤色に蛍光発光し、呼吸活性を持つ細菌が計測できる<sup>32)</sup>。また、6-carboxyfluorescein diacetate(6CFDA)を用いると、6CFDA は細胞内のエステラーゼにより加水分解され、6-carboxyfluorescein になり、細胞内に蓄積される。Blue の励起光を照射すると緑色に蛍光発光し、エステラーゼ活性を持つ細菌を計測することができる<sup>32)</sup>（図5）。これらの方法は、通常の培養法より高感度にかつ短時間での生菌計測が可能である。

## 4. RO 水製造工程中に存在する細菌現存量の計測【検討 1】

上述の如く、現行の培養法には、i) 培養に時間がかかる、ii) 生きているが培養困難な細菌が存在することにより細菌数を過小評価する可能性があるなどの課題が存在する。

そこで、透析液の調整に用いられる RO 水の製造工程を対象として、RO 水製造工程内 5 箇所の細菌現存量を培養法に加え、迅速検出法の代表ともいえる蛍光染色法にて計測し、実際の製造システムの細菌現存量を計測した。

### 4.1 試料と方法

#### 4.1.1 試料

採水は 1 ヶ月おきに計 3 回行った。各日の試料は順に Sample A、B、C とし、解析に用いた。図 6 に示す 5 箇所の採水地点（原水、軟水処理水、活性炭処理水、RO 膜処理水、RO タンク後 RO 水）について、試料を 30 分間以上放流した後、乾熱滅菌済みのガラス瓶を 2 回共洗いし、試料 500 mL を採取した。

#### 4.1.2 細菌現存量の計測

細菌現存量の計測には、培養法に併用して蛍光染色法の一つである蛍光活性染色法およびマイクロコロニー法を用いた。

##### 1) 蛍光活性染色法による全菌数ならびにエステラーゼ活性を持つ細菌の検出

蛍光活性染色法には 4',6'-diamidino-2-phenylindole [DAPI (Sigma)] および 6-carboxyfluorescein diacetate [6CFDA (Sigma)] を用いた<sup>32)</sup>。試料 100 mL をポリカーボネート製メンブレンフィルター（直径 25 mm、孔径 0.2  $\mu\text{m}$ 、ADVANTEC）にろ過し、試料中の細菌をメンブレンフィルター上に捕集した。CFDA バッファー [100 mmol リン酸バッファー（pH 8.5）、5% NaCl, 0.5 mmol EDTA  $\cdot$  2Na] 800  $\mu\text{L}$  に、10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  DAPI 溶液 80  $\mu\text{L}$  および 1% 6CFDA 溶液 12  $\mu\text{L}$  を混合した染色液をメンブレンフィルター上に添加し、細菌を 3 分間染色した。染色後、染色液は吸引ろ過で取り除き、滅菌水約 5 mL を添加・吸引ろ過を行うことにより、メンブレンフィルターを洗浄した。メンブレンフィルターをイマージョンオイル (Olympus) で封入し、蛍光顕微鏡で計測を行った。蛍光顕微

鏡は 1,000 倍の倍率で、まず B (青色) 励起光によりエステラーゼ活性保有細菌を計数し、続いて同一視野の全菌数を UV 励起光により計数した。20 視野を計数後、ろ過量、ろ過面積および視野面積から各試料中の細菌数を求めた。なお、測定にあたり、1 視野あたりの細胞数の平均が 2 個未満 ( $4.2 \times 10^4$  cells/100 mL 未満) の試料は検出限界以下 (以下、N.D.) とした。

## 2) マイクロコロニー形成細菌の検出

マイクロコロニー形成細菌の検出には Kawai らの方法を用いた<sup>11)</sup>。試料 100 mL をポリカーボネート製メンブレンフィルター (直径 25 mm、孔径 0.2  $\mu$ m、ADVANTEC) にろ過し、試料中の細菌をメンブレンフィルター上に捕集した。メンブレンフィルターを R2A (Difco) 培地上に静置し、25°C で 48 時間培養した。培養後、メンブレンフィルターを培地からはずし、4%ホルマリン溶液を染み込ませたろ紙 (Whatman no. 2) の上にろ過面を上にして 30 分間静置して細菌を固定した。次に染色液 [ $\times 10$  SYBR GOLD (Molecular probes)、2% Polyoxyethylene (20) Sorbitan Monolaurate (Wako)] を染み込ませたろ紙の上にメンブレンフィルターを移し、10 分間遮光下で静置することにより染色した。その後、無菌水を染み込ませたろ紙にメンブレンフィルターを移し、1 分間静置することでメンブレンフィルターを洗浄した。メンブレンフィルターをイマージョンオイル (Olympus) で封入し、蛍光顕微鏡で計測を行った。計数は B 励起光下、400 倍の倍率で全視野を計数し、ろ過量を元に各試料中のマイクロコロニー形成細菌数を求めた。なお、マイクロコロニー数が 10 個未満 (10 mcfu/100 mL 未満) の試料は N.D. とした。

## 3) メンブレンフィルター法によるコロニー形成菌の検出

試料 100 mL をセルロース混合エステル製メンブレンフィルター (直径 47 mm、孔径 0.45  $\mu$ m、ADVANTEC) にろ過し、試料中の細菌をメンブレンフィルター上に捕集した。メンブレンフィルターを R2A (Difco) 培地上に静置し、25 °C で 7 日間培養した。培養後、形成したコロニー数を目視により計数した。なお、コロニー数が 10 個未満 (10 cfu/100 mL 未満) の試料は N.D. とした<sup>33)</sup>。

### 4.1.3 ET 活性の計測

Wellreader SK-603 (生化学工業) に endospecy ES-24S (生化学工業) を用い、カイネティック比色反応速度法にて測定した。なお、1.0 EU/L 未満の試料は N.D. とした。

## 4.2 結果

各採水地点における細菌現存量および ET 活性の計測結果を表 4 に示し、さらに各地点における計測値の推移を図 7 に示す。原水において全菌数は  $3.2 \times 10^6 \sim 1.7 \times 10^7$  cells/100 mL であり、エステラーゼ活性保有細菌数は全菌数の 10~63% であった。一方、原水におけるマイクロコロニー法やメンブレンフィルター法の計測結果は Sample A のメンブレンフィルター法を除き、N.D. であった。軟水処理後の水においても、全菌数は  $1.8 \times 10^6 \sim 1.1 \times 10^7$  cells/100 mL と原水の場合とほぼ同等であった。また、エステラーゼ活性保有細菌数も原水とほぼ同等の結果 (全菌数の 5.2~51%) であった。一方、軟水処理後におけるマイクロコロニー法やメンブレンフィルター法の結果は  $1.6 \times 10^1 \sim 1.1 \times 10^3$  mcfu/100 mL (マイクロコロニー法)、 $5.7 \times 10^1 \sim 1.1 \times 10^2$  cfu/100 mL (メンブレンフィルター法; Sample C は over growth) であり、原水よりも増加していた。また、活性炭処理後の水においても全菌数やエステラーゼ活性保有細菌数は、原水や軟水処理後とほぼ同等の値であった。マイクロコロニー法やメンブレンフィルター法では、軟水処理後と比べ、さらに細菌数が増えており、 $10^3$  mcfu/100 mL もしくは over growth であった。RO 膜処理後の水は、RO タンク前・後ともに全菌数やエステラーゼ活性保有細菌数は N.D. であった。また、マイクロコロニー法やメンブレンフィルター法は、RO タンク前ではそれぞれ  $2.1 \times 10^1 \sim 1.5 \times 10^2$  mcfu/100 mL、N.D.~ $6.4 \times 10^2$  cfu/100 mL であり、RO タンク後は全て N.D. であった。各採水地点における ET 活性は RO 膜処理前でおおよそ  $10^4$  EU/L と高値を示したが、RO 膜処理後は N.D. であった。

## 4.3 考察

今回用いた DAPI 染色法は、細菌の核酸を染色して、生きた細菌および死んだ細菌の全てを染色するため、全菌数計測に用いられる。また、6CFDA 染色法は、

酵素（エステラーゼ）活性を持つ細菌のみを特異的に検出する手法であり、生きている細菌の数を酵素活性の有無を指標に計測できる。一方、マイクロコロニー法は直径 10～100  $\mu\text{m}$  程の微小なコロニーを蛍光染色し、蛍光顕微鏡を用いて計数する方法であり、現行の培養法で目視計数できる大きさまで増殖できない細菌を含め、増殖能をもつ細菌を迅速に検出することが可能である。我々は、これらの蛍光染色法を用いて RO 水製造工程中の各地点における細菌現存量の変化を計測し、現行の培養法や ET 活性の結果と比較した。

まず、原水においては塩素処理が行われているため、現行の培養に基づく手法では細菌はほとんど検出されないが、DAPI 染色や 6CFDA 染色では多数の細菌が検出された。原水と同様の傾向は軟水処理水についても見られたが、軟水処理水では、現行の培養法でも細菌が検出された。これは培養法による細菌数のみが増加していることから、軟水処理工程内に細菌の温床となる部分が存在しており、そこに生息している細菌を検出した可能性が考えられる。ただし、この時点で細菌が存在しても後述するように RO 膜処理により細菌や ET の殆どは除去可能であり、通常問題にはならない。次に、活性炭処理を行うと、水中の塩素が除去されるため、現行の培養法による計測値は大幅に上昇した。一方、元々多くの細菌が検出される DAPI-6CFDA 染色の計測値や ET 活性は原水や軟水処理水と比べ、ほとんど差は見られなかった。続いて、RO 膜処理水では DAPI 染色や 6CFDA 染色による計測結果は N.D.となったが、現行の培養法では細菌が検出された。この原因として、RO 膜処理の際に少量の細菌は除去しきれずに通過している、もしくは RO 膜自体が汚染巣となっている可能性が考えられる。また、DAPI 染色や 6CFDA 染色は今回用いた測定条件では検出限界が  $4.2 \times 10^4$  cells/100 mL と高く、少量の細菌は検出できずに見逃してしまう。そのため、より細かな細菌数変化を計測するには、現状では蛍光活性染色法だけでなく現行法を併用することが効果的であると考えられる。ET 活性は、DAPI 染色や 6CFDA 染色の測定結果と同様に RO 膜処理により検出限界以下まで低下していた。しかし、現行の培養法の一部ならびにマイクロコロニー法においては少量の細菌が RO 膜処理後も検出されたことから、ET 活性のみの管理では不十分であると言える。ただし、RO タンク貯留後では全ての手法で検出限界以下となった。これは、タンク内に設置してある紫外線殺菌灯が細菌の増殖能を抑制したものと考えられる。しかし、紫外線殺

菌灯は通常 254 nm 付近で使用され、細菌の核酸に二量体を形成させることより、細胞分裂の際の複製を停止させる効果を持つが、水中では減衰が著しく、殺菌まで至らないケースも多い<sup>34)</sup>。これらの細菌は損傷菌<sup>35)</sup>となり、増殖能が一時的に低下しているため培養法では検出されないが、蛍光活性染色法を用いれば検出できるケースも報告されている<sup>36)</sup>。また、当 RO 装置に装備されている RO 水ダブル逆浸透機構により、RO 膜通過後の RO 水が、さらに清浄化された RO 水によってタンク内で希釈されたことも、検出限界以下となった要因の一つではないかと考えられた。

Kawai ら<sup>37)</sup>は医薬品製造用水中に培養法では検出困難な細菌が多く存在し、試料中に存在する細菌の優占種はエステラーゼ活性を有するにも関わらず、培地上でコロニーを形成する細菌とは属種が異なることを報告している。よって、現行の培養法に蛍光染色法を併用することは、製造工程中の新たな汚染菌の発見などに有効であると考えられる。さらに、より高い安全性を確保するには、RO 膜処理前において細菌をできる限り繁殖させないように管理することも必要である。活性炭処理に伴う塩素除去により細菌数が上昇する<sup>38,39)</sup>ことはすでに報告されているが、今回の計測では塩素が効いている段階でも細菌の温床がある可能性が示唆された。そのため、これらの段階でのモニタリングには、評価法として蛍光染色法が有効であったと考えられる。

これらの検討結果の一部は「透析会誌 40:1051-1056, 2007」に掲載された<sup>40)</sup>。

## 5. 透析液製造工程中に存在する細菌現存量の計測【検討 2】

RO 水製造工程中には、培養法で検出できない細菌が多く存在していることが確認された。そこで、兵庫県下 4 施設における透析液を含む透析液製造工程中の細菌現存量を DAPI-6CFDA 二重染色による蛍光活性染色法、マイクロコロニー法、培養法により計測した。

### 5.1 試料と方法

#### 5.1.1 試料

3 箇所の採水地点（原水、RO 水、調整透析液）について、試料を 30 分間以上放流した後、乾熱滅菌済みのガラス瓶を 2 回共洗いし、試料 500 ml を採水して解析に用いた。採水は 1 ヶ月おきに計 3 回行った。

#### 5.1.2 細菌現存量の計測

4.1.2 に示す方法と同様の方法にて行った。

#### 5.1.3 ET 活性の計測

4.1.3 に示す方法と同様の方法にて行った。

### 5.2 結果および考察

結果を表 5 に示す。a~c の施設では、原水において MC・MF 法で細菌が検出されなかったが、蛍光活性染色法では培養法に比し  $10^5\sim 10^6$  倍多く細菌が検出された。井戸水や塩素が有効濃度に達していない場合は原水ラインでも細菌の増殖が見られることがあり、注意が必要であると考えられた。D の施設は、原水に井戸水を使っているものと考えられ、原水ラインからの管理が必須である。RO 膜処理以降は、MC・MF 法で一部の試料に細菌が検出されたが、今回の検討では蛍光活性染色法の検出限界が  $4.2\times 10^4$  cells/100ml であることから、殆ど全ての施設の試料にて N.D.となった。RO 膜処理以降で検出されなかった細菌が、調整透析液にて検出された施設においては、RO タンクから透析液調整装置までのラインまたは A 原液・B 原液ラインの汚染が疑われる。このように、試料によって適切な検査手法を採択することでより詳細に細菌学的汚染をモニタリングできる。

## 6. 高精度・迅速細菌検出法の自動化【検討3】

検討1、2にて、RO水や透析液中に存在する細菌を、蛍光顕微鏡を用いた蛍光染色法および蛍光活性染色法にて計数し、実際にはコロニー形成菌数の数万倍の細菌が存在していることを確認した。しかしながら、蛍光顕微鏡を用いた計数は目視による計数のため、時間と労力および技術を要する。一方、光洋産業株式会社製微生物迅速検査装置バイオローラ(以下、Bp)は、目視計数の自動化により細菌計数作業の省力化と定量性の向上、測定者間に生じる計数誤差の低減が可能であり、簡便にバイオバーデンの迅速高精度な把握が可能である。

そこで、Bpを用いて蛍光染色法、Microcorony (以下、MC)法・蛍光グラム染色法を用いて透析液製造工程中に存在する細菌の現存量を計測した。さらに、現行Bpの改造を行い、別波長での細菌計数を試みた。

### 6.1 Bpによる蛍光染色法の概要

Bpの概要を図8,9に示す。専用の Cell separation unit (以下、CSU) Membrane filter (以下、MF)上にトラップした細菌に、図4に示す4',6'-diamidino-2-phenylindole (以下、DAPI)を主成分とする試薬αと Propidium iodide (以下、PI)を主成分とする試薬βを浸透させ染色する。Bp本体にMFをセットし、パソコン上で操作を行うことで自動計数が開始される。試薬αは生菌・死菌とともに染色し総菌数として検出する。試薬βは死菌のみを染色する。試薬α、βは細菌細胞内の核酸とインターカレート結合し、試薬に応じた励起光を照射することで細菌が発光する(試薬αはUV励起光照射にて青色発光、試薬βはGreen励起光照射にて赤色発光)。発光した細菌はBpに内蔵されたCCDカメラにて撮りこまれ、デジタル処理することで各発光点を一個の細菌として認識する。専用のCSUのMF部分は直径9mmであり、このMF上の約50%の面積にあたる30ポイントを計数し、計数したMFの面積比からMF全体の細菌数を求める。生菌数は試薬αで染色された総菌数から試薬βで染色された死菌数を差し引くことで算出され、濾過から測定まで約15分で計数が可能である。

### 6.2 透析液製造工程における評価

#### 6.2.1 対象

5箇所の採水地点(a. 原水、b. 軟水化処理水、c. 活性炭処理水、d. RO膜処理水、e. ROタンク後RO水、f. 調整透析液)について、試料を30分間以上放流した後、滅菌済みのガラス瓶を2回共洗いし、試料500 mLを採水した(図10)。

### 6.2.2 細菌現存量の評価方法

細菌現存量の評価には、現行・改造型 Bp および培養法を用いた。

1) 蛍光染色法(総菌数: Bp total cell、生菌数: Bp living cell、死菌数: Bp dead cell)

試料を CSU にて濾過し、試薬  $\alpha$ 、 $\beta$  にて二重染色後、現行 Bp にて計数した。

2) 蛍光活性染色法(エステラーゼ活性保有菌数: Bp CFDA)

現行 Bp の波長を変更し、生菌が有するエステラーゼ活性を捉えることで生菌数の計数が行えるよう Bp を改造した。蛍光染色法と同様、試料を CSU にて濾過し、6-carboxyfluorescein diacetate (以下、6-CFDA: Sigma Co.,Ltd.) にて染色後、改造型 Bp にて計数した。

3) 蛍光グラム染色法(グラム陽性菌数: Gram positive)

試料を CSU にて濾過し、ViaGram Red bacterial gram stain and viability kit (以下、ViaGram Red: Molecular Probe Co.,Ltd.) にて染色後、現行 Bp にて計数した。

4) MC 法(MC 形成菌数: Microcorony method)

a~c 地点の試料は 0.2mL、d~f 地点の試料は 100 mL を CSU にて濾過し、R2A 粘性培地を染み込ませた無菌 8φ パットおよび無菌 18φ パットを MF 裏側に貼り付け 25°C にて培養した。12 時間 (h) 培養後、余剰な粘性培地を除去し、試薬  $\alpha$  にて染色後、MC 検出用に調整した現行 Bp にて計数した。

5) 培養法(コロニー形成菌数: Culture method)

a~c 地点の試料は 0.2mL を直接、d~f 地点の試料は 100 mL を MF (0.45  $\mu$ m, Millipore Co.,Ltd.) (以下、Millipore MF) で濾過し、R2A 培地上で 25°C にて 168 h 培養した。

### 6.2.3 検出信頼限界

両 Bp ともシングルセルレベルでの検出においては 100 個/filter を検出信頼限

界とし、それ未満は N.D. (Not detected)とした。一方、Bp による MC 法においては、10 個 (10 mcfu/0.2 or 100 mL) 未満の試料は N.D.とした。培養法のコロニーカウントは目視にて行い、平板塗抹法は 30 cfu/0.2mL、Millipore MF 法は 10 cfu/100mL を検出信頼限界とし、それら未満は N.D.とした。また、> 300 cfu/plate は O.G. (Over growth)とした。

### 6.3 結果および考察

現行 Bp に用いる試薬  $\alpha$  の主成分 DAPI は疎水的分子であるため、生細胞の細胞膜も透過し、核酸の A-T 領域にインターカレーション(分子または分子集団が、他の 2 つの分子または分子集団の間に入り込む可逆現象)することで生菌・死菌両者を染色できるため、総菌数計測に用いられる。また、試薬  $\beta$  の主成分 PI はイオン性分子であり、通常、細胞膜は透過できないが、細胞膜に損傷部位が存在すると、そこから内部に入り込み、2 本鎖核酸にインターカレーションすることで死菌を染色することができる。この際、細胞膜損傷を有している細菌は損傷菌として扱うこともあるが、便宜上死菌として定義している。

改造型 Bp に用いた 6-CFDA では、生菌が有する細胞内のエステラーゼにより加水分解され、蛍光分子である 6-carboxyfluorescein となって細胞内に蓄積するため、生きている細菌の数を酵素活性の有無を指標に染色することができる<sup>40)</sup>。MC 法はコロニー形成の初期段階である直径 10~100  $\mu\text{m}$  程の微小なコロニーを蛍光染色して計数する方法である。この方法では、通常の培養法で目視計数できる大きさまで増殖できない細菌を含め、増殖能をもつ細菌を迅速に検出することが可能である<sup>40)</sup>。培養操作やプログラム変更がやや煩雑ではあるが、試薬  $\alpha$  もしくは  $\beta$  を用いて Bp で検出可能である。

蛍光グラム染色に用いた ViaGram Red は、小麦胚芽レクチン (WGA)が、グラム陽性菌細胞壁構成成分のペプチドグリカン層に存在する糖鎖 N-acetylglucosamine 周辺に凝集する性質を利用し、WGA に FITC ラベル標識した染色試薬を用いることでグラム陽性菌を特異的に検出することができる<sup>41)</sup>。この試薬は Green 励起光で励起するため、現行 Bp での計数が可能であり、試薬  $\alpha$  を併用して二重染色することもできる。

各採水地点における細菌現存量の評価結果を表 6 に示す。まず a 地点では、塩

素が有効に作用しているため培養法による細菌検出は困難であるが、改造型 Bp にて生菌が検出された。一方で、現行 Bp では殆どの細菌に試薬 B が浸透し死菌と判断されたため、生菌数としては N.D.であった。このことから、損傷の程度は不明であるが、試薬 B は一部の損傷菌にも浸透し、死菌として検出する可能性があることが示唆され、b 地点でも同様の傾向が見られた。b 地点では培養法で若干細菌が検出されることから、細菌の増殖活性はあがっているものと考えられた。また、改造型 Bp での値増加は軟水化処理装置内に汚染の温床が存在することを示唆した。MC 法は培養法と同等の値を示したが、透析液中の細菌が形成する MC は 48 時間培養でも形成されるとする文献<sup>42)</sup>も存在するかたわら、我々が別に行った検討では、特に透析液において MC 形成まで 72 時間ほど要することを確認しており、更に培養時間を延長すればコロニー数は増えたものと考えられる。ただし、長期間培養することは MC 法の特徴でもある迅速性を欠き、成長の遅いコロニーに成長の早いコロニーが覆い被さる可能性もあるため、48 時間までの培養時間が妥当であると考えられる。

c 地点では、塩素除去に伴い細菌の増殖活性が著しく増加し、数え切れないほどのコロニーを形成した。a~c 地点まで蛍光グラム染色にて検出されたグラム陽性菌は総菌数の 1%に満たなかったが、水環境中における細菌は染色性にやや劣るということを我々は確認しており、Bp プログラムの露光時間もしくは最小輝度の設定値が小さかったためにグラム陽性菌の一部しか検出できなかったという可能性が考えられた。しかしながら、露光時間もしくは最小輝度の設定値を上げると、水中の不溶性微粒子やグラム陰性菌の一部を捉えてしまうことを確認しており、設定値に関してはさらなる検討が必要であると思われた。

d 地点では、培養細菌数・エステラーゼ活性保有細菌数ともに N.D.であったのに対し、現行 Bp では生菌が検出された。これは、① 試薬 a が細菌以外の不溶性粒子を染色した、② UV 励起光下で蛍光を発する物質が細菌としてカウントされた、③ RO 膜処理水中の細菌のエステラーゼ活性が低く検出ができなかった、などが原因として考えられた。これらの結果から、生菌の定義や測定方法次第でその現存量は大きく異なることが示された。

Bp は高精度且つ迅速な細菌検出が可能であり、Bp に使用する各試薬を場面によって使い分けることで、治療開始前のバイオバーデンの高精度且つ迅速な把握

に非常に有用であると考えられた。

これらの検討結果の一部は「Clinical Engineering21 : 843-849, 2010」に掲載された<sup>43)</sup>。

## 7. 自家蛍光を利用した水環境中に存在する細菌のリアルタイムモニタリングシステムの開発

細菌検査は、医薬および水道、食品業界における衛生管理をはじめとして、さまざまな分野で施行されている。例えば、製薬用水の品質管理においては、温度や導電率、TOC (total organic carbon) 値、製造環境中の微粒子濃度などさまざまな管理項目でリアルタイム測定が行われている。しかしながら、細菌測定に関しては従来から培養法が主体となっており、結果が出るまでに最短でも1日、場合によっては1週間以上を必要とする。そのため、結果を即座にフィードバックすることができず、安全面に課題が残る。さらに、細菌を蛍光色素で標識し、蛍光顕微鏡下で観察する直接計数法の登場により、自然環境中には通常の培養法では検出困難な細菌が多く存在していることが明らかとなっており、透析液製造工程中に存在する細菌現存量も例外ではないことを上述の検討1,2にて証明した。培養できない細菌の存在は細菌数の過小評価につながり、場合によっては「存在しないもの」として扱われることとなる。

現在、これらの問題解決のため、迅速・高精度をキーワードに、蛍光染色法を中心とした培養操作に依存しない細菌検出法が多数開発されている<sup>44-49)</sup>。これらの細菌検出法は、培養困難な細菌を検出できるだけでなく、通常数日から数週間程度かかる培養期間を必要とせず、迅速に細菌を検出することが可能である。しかしながら、蛍光顕微鏡を用いた計数は目視による計数のため、時間と労力および技術を要し、さらに測定者間に生じる計数誤差などの課題が残る。培養操作に依存しない細菌検出法を普及させ、有効に利用していくには、その標準化、自動化が重要である。そこで、画像解析システムや蛍光顕微鏡画像の自動取り込みシステムの研究も併せて進行しており、上述の検討3にてこれらの操作を自動化した装置 Bp の評価を行った<sup>50-52)</sup>。近年では、液中を移動する個々の細胞にレーザーを照射し、得られる散乱光や蛍光を解析できるフローサイトメトリーの細菌検出への応用も増えつつある<sup>48,53-54)</sup>。フローサイトメトリーは短時間で多くの細胞を測定できることに加え、定量性が高く、さまざまな生物学的特徴を同時に測定することが可能である。

しかしながら、いずれの手法も濾過や蛍光試薬による染色作業などの前処理を必要とし、さらにサンプリングによる試料採取が必要となるため、リアルタイム

に検出することは不可能である。

水環境中の細菌リアルタイムモニタリング装置は、未だ世界的に開発まで至っておらず、透析液中の細菌をリアルタイムに測定するには、水環境中の細菌リアルタイムモニタリング装置の開発が不可欠である。また、当該装置が開発された暁には、透析分野のみならず、前述した医薬品、水道、食品などの分野にも利用が可能であると考えられ、当該装置がもたらす効果は計り知れない。

そこで、流水中に存在する細菌を前処理なしでリアルタイムに検出できる装置の開発を博士後期課程における研究の最終目標として定め、当該装置の開発および評価を行った。

## 7.1 装置の概要

### 7.1.1 装置原理

試作機の検出部構造を図 11 に示す。レーザーをフローセルの粒子検出部に照射し、中を流れる粒子から生じる散乱光および生物粒子から生じる自家蛍光を計測して、生物粒子か非生物粒子かを識別し、それぞれの数をリアルタイムに計数、表示させる。装置には、微粒子を検出するための光学系および生物粒子を検出するための光学系の 2 種類の検出系を装備し、微粒子にレーザーを照射することによって得られる散乱光と生物粒子にレーザーを照射することによって得られる自家蛍光をそれぞれダイクロイックミラーを用いて散乱光検出部と蛍光検出部へ分光する。散乱光からは粒子の個数及び大きさの情報を得ることができ、自家蛍光からは粒子の自家蛍光の有無、すなわち生物粒子か否かの情報を得ることができる。

### 7.1.2 散乱光の検出

前述したように、散乱光検出部では、検出領域を流れる粒子（生物粒子を含む）の数と大きさを計測する役割を担っている。検出方法は、一般的な液中パーティクルカウンターと同じ、光散乱方式を用いた。光の一部が粒子に当たった場合、吸収、屈折、反射などの現象が生じ光の進行方向が変更あるいは妨げられる（図 12）。ある方向における散乱光の強さは、Maxwell の電磁方程式を微小粒子に適用した Mie の理論で計算される<sup>55)</sup>。一般的に、光の波長よりも十分に粒子が小

さい場合は Rayleigh 散乱<sup>56)</sup>、粒子の大きさと光波長が近い場合または粒子が大きい場合は Mie 散乱と呼ばれている。対象となる試料中の粒子径は 0.2 $\mu\text{m}$ ～数  $\mu\text{m}$  程度と想定され、粒子の大きさと光の波長が近い場合 Mie 散乱の領域である。光源には、波長 405nm レーザーを採用した。本来、散乱光の強さは粒子の大きさだけではなく粒子及び媒質の屈折率に大きく依存し、粒子の屈折率が媒質の屈折率に近い場合には散乱光強度は弱くなる。通常では測定する粒子の組成は不明のことが多く屈折率は未知である。したがって、パーティクルカウンターで表示する粒径は真円に近いポリスチレンラテックス粒子 (PSL) を標準粒子とした光散乱相当径を参照した値として表示される<sup>57)</sup> (図 13)。特に生物粒子は組成に水分が多く含まれるため、媒質の屈折率に近く、その粒子径は絶対的な長さより小さめに表示される傾向がある。

### 7.1.3 自家蛍光の検出

生物細胞の多くは自家蛍光を持つことが古くから知られており、自家蛍光を持つ細胞は、それぞれに対応した波長で励起させると蛍光を放つ性質がある。生細胞中で自家蛍光を持つものとして、トリプトファン、Nicotinamide Adenine Dinucleotide (NADH)、リボフラビン等が知られている<sup>58,59)</sup>。そこで、開発する装置では、細胞内でのエネルギー代謝に関わるリボフラビンに照準を合わせて設計を行った。図 14 にリボフラビンの吸収 (励起) 波長および蛍光特性を示す。

フローセル内に試料を流し、リボフラビンに対応した波長のレーザー (405nm) を照射して、流れてくる個々の粒子の蛍光を計測する。このとき、粒子にリボフラビンが含まれていれば蛍光を発し、生物粒子であると判定することができる。逆に、蛍光を発しなければ非生物粒子であると判断する。

## 7.2 上記原理を用いて試作した試作機の評価【検討 4】

既存の微粒子計数装置に蛍光発光および受光のためのレーザー駆動装置、受光フィルタを装着し、基礎的検討を行った。

### 7.2.1 対象および方法

実験諸条件は下記とした。

レーザー波長 405nm

レーザー駆動電流 103.6mA(約 120mW)

蛍光側後段アンプゲイン；最小

散乱側後段アンプゲイン；最小

蛍光側ホトマル帰還抵抗；39.2Ω、コンデンサあり

蛍光側長波長カットフィルタ 490nm

試料流速 10mL/min

実験系の概要を図 15 に示す。

活性炭処理水より採取・培養したコロニー（赤・スムーズ、黄・スムーズ）を白金耳にて滅菌蒸留水に溶菌して菌液を作成し、500mL のミリ Q 水中にマイクロピペットを用いて菌液 100μL を混濁させ試験に供した。

値を計数するためのプログラムの開発には、生物粒子から出される蛍光強度や水中での散乱光ノイズなどのデータ採取が不可欠であるため、生物粒子が当該システムにより蛍光発光し、受光部にて捉えることができているかに加え、その閾値電圧やノイズをオシロスコープにて確認した。

### 7.2.2 結果

オシロスコープ画像を図 16、17 に示す。また、標準蛍光粒子および標準粒子、臨床分離した菌株使用による計数効率評価の結果を図 18～20 に示す。

### 7.2.3 考察

活性炭処理水から分離培養したコロニー（赤・スムーズ、黄・スムーズ）について、試作機にて測定を行った。

赤・スムーズでは微粒子計数の結果より、光散乱相当径で 0.3um～1.0um の範囲で多く検出され、比較的大きい菌サンプルであることが確認された。また、散乱信号と同期したノイズレベルを上回る蛍光信号が数多く検出されている為、現状の試作機がリアルタイム細菌計数を行うための十分な能力を有していると考えられる。

黄・スムーズは、光散乱相当径で  $0.3\mu\text{m}\sim 0.5\mu\text{m}$  の範囲で多く検出され、赤・スムーズよりも粒子径が少し小さいことが確認された。その影響か、蛍光信号は赤・スムーズよりも、ノイズレベルを上回る信号が少なかった。黄・スムーズのコンディションを確認するため 2 次培養を試みたが、コロニーを形成しなかった。恐らく、滅菌蒸留水もしくはミリ Q 水への混濁後、死滅もしくは VBNC 化したものと考えられる。

赤・スムーズは蛍光信号が検出可能であることが分かったが、黄・スムーズでは、蛍光検出感度が不足していることが示唆された。これらの結果から、レーザー出力の調整を行い、図 18 の応答カーブより検出の際の閾値電圧を設定した。蛍光側では平均  $155.8\text{mV}$  のノイズが確認されたため、 $156\text{mV}$  に閾値電圧を設定した。

### 7.3 検出信号の処理とプログラミング

検討 4 の結果より、試作機の検出信号処理におけるプログラム開発を行った。流れてくる粒子がフローセル中のレーザー照射領域にやってくると、その領域を横切っていく間だけ散乱光を発する。散乱光はレンズで集光され、光電変換素子によって電気信号へ変換される。こうして得られた電気信号は幅を持ったパルス状の波形となる。光電変換素子から出力された信号の模式図を図 21 示す。散乱光強度は粒子径によって変わるため、電気パルスの波高値から粒子の大きさ (PSL 相当径) を判別することができる。またパルスの個数を計数することで粒子の個数を知ることができる。その粒子が生物粒子である場合、リボフラビンによる自家蛍光パルスも同時に発生する (図 22)。

散乱光、自家蛍光パルスともに電気パルスの波高値が設定したスレシヨッド電圧値を超えると、信号の AD 変換を行う。測定領域に入ってきた粒子は約  $15\mu$  秒でフローセル中のレーザー照射領域を通過するが、粒子の大きさや流れる位置による流速の違いなども考慮し、余裕を見て、1 個の粒子に対し  $1\mu$  秒間隔で 20 回連続して AD 変換を行うよう設定した。こうして得られた AD 変換値の中で最大の値をこの粒子の散乱光パルス波高値とし、この値を使って Fig.3 から粒径 (PSL 相当径) を求めるよう設計した。なお、図 13 の特性曲線を使って  $0.2\mu\text{m}$  (PSL 粒子相当径) より大きい粒子のみが測定できるようスレシヨッド電圧値を設定した。AD 変換された信号の処理プログラムは Visual Basic for Applications (VBA:

マイクロソフト社)により作成した。

## 7.4 細菌リアルタイムモニタリング装置の性能評価 1【検討 5】

### 7.4.1 蛍光粒子による性能評価

ガラスビーカーに超純水を 1000mL 用意し、その中に蛍光粒子 (Thermo Fisher Scientific 社製 Fluorescent Microsphere Suspensions、Specified color : Green、Diameter : 0.20 $\mu$ m) を混濁させた。その後、段階希釈を行い、試料を定速シリンジポンプを用いて流速 10ml/min で試作機に導入し、総粒子数および蛍光粒子数を計測した (図 23)。

### 7.4.2 スパイク試験による性能評価

供試菌株は標準菌株 (*Escherichia coli* (以下、*E. coli*) (NBRC 3301)、*Staphylococcus aureus* (以下、*S. aureus*) (NBRC 13276)、*Methylobacterium extorquens* (以下、*M. extorquens*) (NBRC 15911)、*Pseudomonas fluorescens* (以下、*P. fluorescens*) (NBRC 15842) の 4 菌種を用いた。

*E. coli*、*S. aureus* は SCDA 培地 (SCDA medium) (NIKKEN BIOMEDICAL LABORATORY INC.) に塗抹し、35℃で 24 時間培養した後、それぞれのコロニーを釣菌して 10<sup>7</sup>cfu/mL の濃度になるように生理食塩液中に混濁させた。

*M. extorquens*、*P. fluorescens* は R2A 培地 (R2A medium) (NIPPON BECTON DICKINSON COMPANY, LTD.) に塗抹し、25℃で 168 時間培養した後、それぞれのコロニーを釣菌して 10<sup>6</sup>cfu/mL の濃度になるように滅菌精製水中に混濁し、25℃で 3 日間静置して飢餓状態にした。

ガラスビーカーに超純水を 1000mL 用意し、その中に前述した菌液を混濁させて試験に供した。

#### i) 試作機による計測

試料を定速シリンジポンプを用いて流速 10ml/min で試作機に導入し蛍光粒子数を計測した。

#### ii) 培養法による計測

*E. coli*、*S. aureus* は試料を適当な倍率で希釈した後、0.1 mL を SCDA medium 上に塗抹し、35℃で 48 時間培養した。*M. extorquens*、*P. fluorescens* は試料を

適当な倍率で希釈した後、0.1 mL を R2A medium 上に塗抹し、25 °C で 168 時間培養した。培養後、形成したコロニー数を目視により計数し、希釈倍率を乗じてコロニー数を算出した。

#### 7.4.3 環境試料による性能評価

ガラスビーカーに水道水もしくはナチュラルミネラルウォーター（欧州産）1000mL を入れ、試験に供した。

##### i) 試作機による計測

試料を定速シリンジポンプを用いて流速 10ml/min で試作機に導入し、蛍光粒子数を計測した。

##### ii) 培養法による計測

水道水は、試料 100 mL をセルロース混合エステル製メンブレンフィルター（直径 47 mm、孔径 0.45 μm、ADVANTEC）にてろ過し、試料中の細菌をメンブレンフィルター上に捕集した。メンブレンフィルターを R2A medium 上に静置し、25 °C で 14 日間培養した。培養後、形成したコロニー数を目視により計数した。

ナチュラルミネラルウォーターは、試料を適当な倍率で希釈した後、0.1 mL を R2A medium 上に塗抹し、25 °C で 14 日間培養した。培養後、形成したコロニー数を目視により計数し、希釈倍率を乗じてコロニー数を算出した。

##### iii) 蛍光活性染色法による計測(EFM: epifluorescence microscopy method)

蛍光活性染色法の染色試薬は 6-carboxyfluorescein diacetate [6CFDA (Sigma 社)] を用いた<sup>32)</sup>。試料 100 mL をポリカーボネート製メンブレンフィルター（直径 25 mm、孔径 0.2 μm、ADVANTEC）にてろ過し、試料中の細菌をメンブレンフィルター上に捕集した。CFDA バッファー [100 mmol リン酸バッファー（pH 8.5）, 5% NaCl, 0.5 mmol EDTA・2Na] 800 μL をメンブレンフィルター上に添加し、細菌を 3 分間染色した。染色後、染色液は吸引ろ過で取り除き、滅菌水約 5 mL を添加、吸引ろ過を行うことにより、メンブレンフィルターを洗浄した。メンブレンフィルターを無蛍光イメージンオイル（Nicon 社）で封入し、蛍光顕微鏡（Nicon 社）で計測を行った。蛍光顕微鏡は 1,000 倍の倍率で、B（青色）励起光によりエステラーゼ活性保有細菌を計数した。20 視野を計数後、ろ過量、ろ過面積および視野面積から試料中の細菌数を求めた。

#### 7.4.4 結果および考察

臨床医学の中では、以前より細胞の自家蛍光を診断に用いてきたが<sup>60)</sup>、一方で、より精度よく検出・観察するためにノイズとなりうる細胞の自家蛍光を遮断する方向で検出系の開発が進められてきた分野も多い。今回開発した装置は、従来まで問題視されてきた細胞の自家蛍光を、逆に検出系に利用した新手法である。空気中の細菌を同様の原理にて検出する検討はすでに行われているが<sup>61,62)</sup>、流水中は溶媒の屈折率などに影響され、空気中に比べはるかにノイズが多く、測定が困難であるため、現在のところ流水中に存在する細菌のリアルタイム検出に関する検討は存在しない。そこで、この原理に基づいて作成した試作機に最大限の工夫を凝らし、流水中に存在する細菌のリアルタイムモニタリング装置を開発し検証した。

蛍光粒子による性能評価の結果を図 24 に示す。蛍光粒子を  $10^2 \sim 10^5$  個/10ml レベルの濃度に調整した溶液測定では、試作機により計数した総粒子数と蛍光粒子数との間に極めて強い相関がみられた。これにより、レーザー照射により蛍光を放つ粒子、すなわち生物粒子を高効率に検出可能であることが示された。

スパイク試験の結果を図 25 に示す。各々の菌液を  $10 \sim 10^3$  個/10ml レベルの濃度に調整した溶液測定では、試作機により計数した蛍光粒子数は培養細菌数と同等もしくは若干少なめの値を示し、両者の間に良好な相関がみられた (*E. coli*:  $y=0.819x+10.923$ ,  $r=0.994$ . *S. aureus*:  $y=0.755x+4.481$ ,  $r=0.994$ . *M. extorquens*:  $y=1.456x-2.768$ ,  $r=0.95$ . *P. fluorescens*:  $y=0.687x+5.858$ ,  $r=0.813$ .)。これにより、流水中を浮遊する細菌にレーザー照射を行うことで放出される蛍光を、試作機が十分に検出可能であることが示された。

水道水およびナチュラルミネラルウォーターを用いた試験の結果を表 7 に示す。水道水は塩素処理が行われているため、現行の培養操作に基づく細菌検出法ではコロニーを形成しない細菌が多く存在しているため、過少評価につながるものが指摘されている<sup>40)</sup>。一方、EFM では、 $1.9 \times 10^5 \pm 1.1 \times 10^5$  cells/10ml もの生菌が存在していることが確認された。しかしながら、試作機により計測した蛍光粒子数は  $1.0 \times 10^4 \pm 85.2$  cells/10ml と 1 オーダー低い値であった。ナチュラルミネラルウォーターでも、培養細菌数  $5.8 \times 10^4 \pm 7.8 \times 10^3$  cfu/10ml、EFM  $2.5 \times 10^5 \pm 1.2 \times 10^5$  cells/ml であったのに対して、試作機により計測した蛍光粒子数は

$1.3 \times 10^4 \pm 1.5 \times 10^2$  と EFM と比べ 1 オーダー低い値であり、培養細菌数の 1/5 程度の値しか示さなかった。この理由として、自然環境の水圏中に存在している細菌のリボフラビン活性が極めて微弱である可能性が考えられた。そこで、ナチュラルミネラルウォーターより培養分離した菌株と標準菌株 (*E. coli*, NBRC3301) を生理食塩液に混濁して菌液を作製し、超純水 1000mL に混濁させ、試作機に導入してその自家蛍光パルスの波高値をオシロスコープにより観察した。その結果、スレショルド電圧値を超えないレベルの微弱な蛍光しか放たない細菌も在していることが確認された(図 26)。現状では、貧栄養で小さくなった細菌については検出が難しいケースもあり、蛍光性異物との区別も困難である。しかしながら、サンプリングを行わない本方法では、継続的なモニタリングが可能となるため、品質管理に有効であると考えられる。今後はレーザー光の出力をさらに上げる方向での検討が必要である。

試作機の測定精度に関しては、他の手法に比べ極めてバラツキが小さく、非常に良好であることが確認された。

## 7.5 細菌リアルタイムモニタリング装置の性能評価 2【検討 6】

レーザー出力を上げ、再度細菌リアルタイムモニタリング装置の性能評価を行った。最終評価は一般社団法人北里環境科学センター微生物部バイオ技術課に依頼して行った。以下は、当該センターにより行った性能評価試験および結果を提示する。

### 7.5.1 対象および方法

30～3,000 CFU/mL を目安に調製した菌液について、試験品を用いて粒子数と微生物数を測定した。次いで、同じ菌液について培養法により菌数を測定した。試験に供した微生物は下記の 8 菌種とした。

- ① *Staphylococcus aureus* NBRC 13276 (黄色ブドウ球菌)
- ② *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (枯草菌) (芽胞) (SBS-08、NAMSA)
- ③ *Pseudomonas aeruginosa* NBRC 13275 (緑膿菌)
- ④ *Pseudomonas fluorescens* NBRC 15842 (蛍光菌)
- ⑤ *Methylobacterium extorquens* NBRC 15911 (メチロバクテリウム)

⑥ *Clostridium sporogenes* NBRC 14293 (クロストリジウム)

⑦ *Candida albicans* NBRC 1594 (カンジダ)

⑧ *Aspergillus brasiliensis* NBRC 9455 (クロコウジカビ) (孢子)

## 1) 器具の洗浄

水道蛇口に接続した純水装置に 0.1  $\mu\text{m}$  フィルタおよび 0.04  $\mu\text{m}$  フィルタを取り付け、粒子数が非常に少ないろ過水（最大で 10 個/mL 程度）を用いて器具を洗浄した。すなわち、50 mL 遠沈管については、容器の外側、および蓋の内側と外側をろ過水ですすぎ（約 30 秒）、次いで口を 45°逆さに傾けて容器の内側を 10 回転（約 30 秒）、500mL 採水瓶については、同様に 20 回転（約 2 分）させて洗浄した。

また、白金耳およびコンラージ棒については菌と接触する部分を、5 mL ピペットについては内側と外側をろ過水ですすいだ（約 10 秒）。

## 2) 菌液の調製

凍結保存した菌株を前培養し、さらに表 8 の条件で培養した。

試験菌①～⑦については、発育した集落を白金耳でかき取り、50 mL 遠沈管に入れたろ過水約 30 mL に懸濁した。この菌液を表 9 の条件で遠心し、菌塊を沈降させた。上清を適宜希釈し、OD 660nm=0.2 を目安に調製した（このときの菌数は、試験菌①～⑥が約  $10^8$  CFU/mL、試験菌⑦が約  $10^6$  CFU/mL となる）。試験菌⑧については、培養後の PDA 培地にろ過水 5 mL を滴下し、コンラージ棒で集落をこすって孢子を分散させた。この操作を PDA 培地 10 枚に対して行い、菌液を 50 mL 遠沈管に集め、表 9 の条件で遠心して孢子を沈降させた。上清を捨て、新たなろ過水を加えて孢子を洗浄した。この洗浄操作を合計 2 回行った後、セルカウンターで菌数（孢子数）を数えた（このときの菌数は、約  $10^6$  個/mL となる）。調製した菌液を約 100～10,000 倍希釈して 3,000 CFU/mL とした後、3 倍希釈と 3.3 倍希釈を順次繰り返して 1,000、300、100、30 CFU/mL の菌液を調製した。なお、3 倍希釈と 3.3 倍希釈の操作については、できるだけ機材に付着した他粒子によるコンタミを避けるためにピペットを使用せず、採水瓶から新たな採水瓶へと電子天秤を用いて直接希釈した。すなわち、3 倍希釈の

操作は、500 mL 採水瓶にろ過水 320 g を入れ、ここに菌液 160 g を加えた。  
3.3 倍希釈は、ろ過水 350 g に菌液 150 g を加えた。

### 3) リアルタイムモニタリング装置による粒子数と微生物数の測定

表 10 に示したプログラムでシンリンジサンプラを動作させ、菌液を生物粒子測定器に導いた。すなわち、プログラム 1 でリアルタイムモニタリング装置に内蔵される測定部を 2 回共洗いした後、プログラム 2 で菌液の粒子数と微生物数を 3 回測定した。

### 4) 培養法による菌数測定

リアルタイムモニタリング装置により粒子数と微生物数を測定した同じ菌液について、培養法により菌数を測定した。すなわち、各菌数に設定した菌液をそれぞれ試料原液とし、表 2 の希釈液で 10 倍段階希釈列を作製した。その試料原液または希釈液を表 2 の方法で培地へ接種した（各希釈段階で  $n=2$ ）。また、試料原液の 10 mL をメンブランフィルタで濾過し、フィルタを寒天培地表面に貼り付けた（ $n=2$ ）。これらの工程を 3 回繰り返した後、寒天培地を表 8 の条件で培養した。その後、発育した集落を数え、菌液 1 mL あたりの菌数を求めた。

## 7.5.2 結果

結果を図 27～70 に示す。

なお、リアルタイムモニタリング装置による測定単位は 10 mL あたりであったので、測定値を 10 で割り、1 mL あたりに換算して図表に載せた。また、図表中の略語は、リアルタイムモニタリング装置からの出力データをそのまま引用した。これらの略語は以下のことを意味する。

「散」：散乱光（＝粒子数）

「蛍」：蛍光（＝微生物数）

「cumm」：累積個数

「diff」：分級個数

### (1) 黄色ブドウ球菌の結果

顕微鏡観察の結果(図 27)、菌体 1 つの大きさは 0.5~1 um 程度であった。また、菌体は単体、あるいは 2~3 連鎖した状態で観察された。リアルタイムモニタリング装置の測定値のうち、特に培養法による菌数と比例関係を示したものは、散 cumm (図 28)、散 diff (図 29)、蛍 cumm (図 30) では 0.2 um と 0.3 um、蛍 diff (図 31) では 0.3 um であり、相関の強さを示す近似式の決定係数 ( $R^2$ ) はいずれも 0.99 以上と高い相関を示した。試験菌は、顕微鏡で観察した菌体の大きさ (0.5~1 um 程度) よりも少し小さい粒径 (0.2~0.5) として検出されたが、生物粒子測定器により感度良く検出されたと判断された。

### (2) 枯草菌 (芽胞) の結果

顕微鏡観察の結果 (図 32)、菌体 1 つの大きさは幅 0.5 um、長さ 1.5 um 程度であった。また、菌体は連鎖がなく、ほとんど単体の状態で観察された。生物粒子測定器の測定値のうち、特に培養法による菌数と比例関係を示したものは、散 cumm (図 33)、蛍 cumm (図 34) では 0.2 um、0.3 um、0.5 um、0.6 um、散 diff (図 35)、蛍 diff (図 36) では 0.3 um、0.5 um、0.6 um であり、相関の強さを示す近似式の決定係数 ( $R^2$ ) はいずれも 0.99 以上と高い相関を示した。244125/24\_0311 試験菌は、顕微鏡で観察した菌体の大きさ (幅 0.5um、長さ 1.5 um 程度) と同程度の粒径 (0.3~1 um) として検出され、リアルタイムモニタリング装置により感度良く検出されたと判断された。

### (3) 緑膿菌の結果

顕微鏡観察の結果 (図 37)、菌体 1 つの大きさは幅 0.5um、長さ 2 um 程度 (長いものは 10 um 以上) であった。また、菌体は一部連鎖していたが、ほとんど単体の状態で観察された。リアルタイムモニタリング装置の測定値のうち、特に培養法による菌数と比例関係を示したものは、散 cumm (図 38)、蛍 cumm (図 39) では 0.2 um、0.3 um、散 diff (図 40)、蛍 diff (図 41) では 0.3 um であり、相関の強さを示す近似式の決定係数 ( $R^2$ ) はいずれも 0.98 以上と高い相関を示した。試験菌は、顕微鏡で観察した菌体の大きさ (幅 0.5um、長さ 1.5 um 程度) よりも少し小さい粒径 (0.3~0.5 um) として検出されたが、リアルタイム

ムモニタリング装置により感度良く検出されたと判断された。

#### (4) 蛍光菌の結果

顕微鏡観察の結果（図 42）、菌体 1 つの大きさは幅 0.5um、長さ 1.5 um 程度であった。また、菌体は一部連鎖していたが、ほとんど単体の状態で観察された。リアルタイムモニタリング装置の測定値のうち、特に培養法による菌数と比例関係を示したものは、散 cumm（図 43）、散 diff（図 44）、蛍 cumm（図 45）では 0.2 um と 0.3 um、蛍 diff（図 46）では 0.3 um であり、相関の強さを示す近似式の決定係数（ $R^2$ ）はいずれも 0.99 以上と高い相関を示した。試験菌は、顕微鏡で観察した菌体の大きさ（幅 0.5um、長さ 1.5 um 程度）よりも少し小さい粒径（0.3~0.5 um）として検出されたが、リアルタイムモニタリング装置により感度良く検出されたと判断された。

#### (5) メチロバクテリウムの結果

顕微鏡観察の結果（図 47）、菌体 1 つの大きさは幅 0.5~1 um、長さ 2 um 程度であった。また、菌体は一部連鎖していた。この試験菌は、菌体内に空胞を有するのが特徴である。リアルタイムモニタリング装置の測定値のうち、特に培養法による菌数と比例関係を示したものは、散 cumm（図 48）、蛍 diff（図 49）では 0.2 um、0.3 um、0.5 um、0.6 um、散 diff（図 50）では 0.2 um、0.3 um、0.5 um、蛍 diff（図 51）では 0.6 um であり、相関の強さを示す近似式の決定係数（ $R^2$ ）はいずれも 0.99 以上と高い相関を示した。試験菌は、顕微鏡で観察した菌体の大きさ（幅 0.5~1 um、長さ 2 um 程度）と同程度の粒径（0.6~1 um）として検出され、リアルタイムモニタリング装置により感度良く検出されたと判断された。

#### (6) クロストリジウムの結果

顕微鏡観察の結果（図 52）、菌体 1 つの大きさは幅 0.5~1 um、長さ 2 um 程度であった。また、菌体は一部連鎖していた。この試験菌は、試験菌②と同じく芽胞を形成するが、試験に供したものは一部芽胞を形成していたが、ほとんどが芽胞ではなく栄養体の状態であった。また、この試験菌は絶対嫌気性菌であり、

特に栄養体の状態では空気中の酸素により殺菌されやすい特徴をもつ。

このような試験菌の特徴から、培養法による菌数が目標数（30～3,000 CFU/mL）に設定できず、リアルタイムモニタリング装置による測定値を合計 2 回実施した。リアルタイムモニタリング装置の測定値のうち、特に培養法による菌数と比例関係を示したものは、1 回目、2 回目ともに、散 cumm（図 53、57）、蛍 cumm（図 54、58）では 0.2 um、0.3 um、0.5 um、0.6 um、散 diff（図 55、59）、蛍 diff（図 56、60）では 0.3 um、0.5 um、0.6 um であり、相関の強さを示す近似式の決定係数（ $R^2$ ）はいずれも 0.98 以上と高い相関を示した。試験菌は、顕微鏡で観察した菌体の大きさ（幅 0.5～1 um、長さ 2 um 程度）と同程度の粒径（0.3～1 um）として検出され、リアルタイムモニタリング装置により感度良く検出されたと判断された。

#### （7）カンジダの結果

顕微鏡観察の結果（図 61）、菌体 1 つの大きさは 3 um 程度であった。また、菌体は一部連鎖していた。この試験菌は、細菌ではなく酵母に分類される。リアルタイムモニタリング装置の測定値のうち、特に培養法による菌数と比例関係を示したものは、散 cumm（図 62）、蛍 cumm（図 63）では 0.2 um、0.3 um、0.5 um、0.6 um、1 um、散 diff（図 64）、蛍 diff（図 65）では 1 um であり、相関の強さを示す近似式の決定係数（ $R^2$ ）はいずれも 0.98 以上と高い相関を示した。

試験菌は、顕微鏡で観察した菌体の大きさ（3 um 程度）を正しく識別（1～ um）し、リアルタイムモニタリング装置により感度良く検出されたと判断された。

#### （8）クロウジカビ（孢子）の結果

顕微鏡観察の結果（図 66）、菌体 1 つの大きさは 5 um 程度であった。この試験菌は、細菌ではなく糸状菌（カビ）に分類される。リアルタイムモニタリング装置の測定値のうち、特に培養法による菌数と比例関係を示したものは、散 cumm（図 67）、蛍 cumm（図 68）では 0.2 um、0.3 um、0.5 um、0.6 um、1 um、散 diff（図 69）では、0.2 um、0.3 um、1 um、蛍 diff（図 70）では 1 um であり、相関の強さを示す近似式の決定係数（ $R^2$ ）はいずれも 0.98 以上と高い

相関を示した。試験菌は、顕微鏡で観察した菌体の大きさ（5 um 程度）を正しく識別（1～ um）し、リアルタイムモニタリング装置により感度良く検出されたと判断された。

これらの結果から、当該細菌リアルタイムモニタリング装置は、30～3000 CFU/mL に調整したさまざまな菌種を対象とした菌液において、試験菌①～⑧の粒径をほぼ正しく識別し、また高精度に検出可能であることが確認された。

## 8. おわりに

高精度かつ迅速な細菌検出法を検討し、結果、細菌リアルタイムモニタリング装置の開発まで至った。また、開発した装置の性能は、非常に優れていることが確認された。この水環境中に存在する細菌を高精度にリアルタイムモニタリングできる装置は、現在のところ世界初であり唯一無二である。現在、透析液製造工程を含むさまざまな分野への応用展開を図っており、本研究成果は、細菌を高精度かつ迅速に検出する技術を必要とする分野において変革をもたらし、新たな時代を築くものと考えている。

## 謝辞

本論文をまとめるにあたり、九州保健福祉大学大学院保健科学研究科保健科学専攻 竹澤真吾教授から終始多大なるご指導およびご助言を賜りましたことに心より感謝申し上げます。また、九州保健福祉大学大学院保健科学研究科保健科学専攻 近藤照義教授、戸畑裕志教授、吉武重徳教授から多大なるご指導およびご助言を賜りましたことに心より感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、(医社) いでクリニック理事長・院長 井出孝夫先生には研究への理解と多大なるご協力を頂きましたことに厚くお礼申し上げます。蛍光染色法および蛍光活性染色法について、大阪大学大学院薬学研究科遺伝情報解析学分野 那須正夫教授、山口進康准教授、馬場貴志助手、および日本食品エコロジー研究所 松島哲也社長、奥野登志広博士、および松下エコシステムズ株式会社 バイオセンシング事業プロジェクト 田代義和博士、島北寛仁博士から多大なるご指導およびご助言を頂きました。ここに厚くお礼申し上げます。

最後に、大学院進学および研究への理解と支援を頂いた家族に心より感謝致します。

## 引用文献

- 1) 信楽園病院腎センター. 透析療法マニュアル-水処理装置. 鈴木正司 監. 東京: 日本メディカルセンター, 2005, p143-152.
- 2) 檜村友隆, 井出孝夫. 水処理システム. 臨床透析 2011; 27: 1741-1746.
- 3) 佐野博之, 葛岡孝一郎, 佐藤和弘, 他. 繊維状活性炭フィルタに求められる性能. 腎と透析 別冊 HDF 療法'10 2010; 69: 225-229.
- 4) Henderson LW, Koch KM, Dinarello CA. Hemodialysis hypotension: The interleukin hypothesis. Blood Purif 1983; 1: 3-8.
- 5) Gejyo F, Odani S, Yamada T, *et al.* Beta 2-microglobulin: a new form of amyloid protein associated with chronic hemodialysis. Kidney Int 1986; 30: 385-390.
- 6) Man NK, Ciancioni, C, Faivre JM, *et al.* Dialysis-associated adverse reaction with high-flux membrane and microbial contamination of liquid bicarbonate concentrate. Contr Nephrol 1988; 62: 24-34.
- 7) 久野勉. 透析液清浄化と臨床効果. Clinical Engineering 2008; 19: 892-897.
- 8) Baz M, Durand C, Ragon A, *et al.* Using ultrapure water in hemodialysis delays carpal tunnel syndrome. Int J Artif Organs 1991; 14: 681-685.
- 9) Schifffl H, Lang SM, Bergner A. Ultrapure dialysate reduces dose of recombinant human erythropoietin. Nephron 1999; 83: 278-279.
- 10) Schifffl H, Lang SM, Stratakis D, *et al.* Effects of ultrapure dialysate fluid on nutritional status and inflammatory parameters. Nephrol Dial Transplant 2001; 16: 1863-1869.
- 11) 武本佳昭, 土田健司, 谷山哲秀, 他. 透析液清浄化による赤血球寿命の変化. 腎と透析 別冊ハイパフォーマンスメンブレン'00 2000; 49: 170-172.
- 12) Izuhara Y, Miyata T, Saito K, *et al.* Ultrapure dialysate decreased plasma pentosidin, a marker of carbonyl stress. Am J Kidney Dis 2004; 43: 1024-1029.
- 13) Stenvinkel P, Heimbürger O, Paultre F, *et al.* Strong association between malnutrition, inflammation, and atherosclerosis in chronic renal failure. Kidney Int 1999; 55: 1899-1911.
- 14) 山上征二. 透析液安全基準策定報告. 透析会誌 1995; 28: 1487-1493.

- 15) 森井浩世, 浅野泰, 内藤秀宗, 他. ガンプロ社 AK100-Ultra のための透析液安全基準・施設基準について. 透析会誌 1998 ; 31 : 1107-1109.
- 16) 川西秀樹, 峰島三千男, 竹澤真吾, 他. 新たな透析液水質基準と血液浄化器の機能分類. 透析会誌 2005 ; 38 : 149-154.
- 17) ERA/EDTA. European Best Practice Guidelines for haemodialysis IV - dialysis fluid purity. Nephrol Dial Transplant 2002 ; 17(suppl. 7) : 45-62.
- 18) Association for the Advancement of Medical Instrumentation. American National Standard- Dialysate for Hemodialysis. ANSI/AAMI RD52 2004.
- 19) International Organization of Standardization. ISO/CD 23500- Fluids for haemodialysis and related therapies 2005.
- 20) 檜村友隆. 透析液清浄化および透析装置に関する国際標準化機構 (ISO) 会議への参加報告. 日臨工会誌 2012 ; 44 : 3-6.
- 21) 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 2008 ; 41 : 159-167.
- 22) 酒井良忠, 井越忠彰, 仲川郁夫, 他. 透析液清浄化基準 - 海外の最近の動向. 秋澤忠男 監, 峰島三千男 編. 透析液清浄化に向けて. 大阪 : 医薬ジャーナル社, 2010, p67-73.
- 23) 中井滋, 渡邊有三, 政金生人, 他. わが国の慢性透析療法の現況. 透析会誌 2013 ; 46 : 1-76.
- 24) 厚生労働省. 水道基準における水質基準 2008.
- 25) 檜村友隆, 井出孝夫(2010)細菌測定関連機器. 秋澤忠男 監, 峰島三千男 編. 透析液清浄化に向けて. 大阪 : 医薬ジャーナル社, 2010, p164-175.
- 26) 檜村友隆, 佐藤和弘, 堀内賢一, 他. 透析液中の細菌に対する各種メンブレンフィルター法の測定精度の検討. 透析会誌 2009 ; 42 : 85-90.
- 27) 小池直人. 細菌検出方法. 竹澤真吾・松本哲哉 編. 透析液のバイ菌がよくわかる本. 東京 : 東京医学社, 2008, p83-102.
- 28) 山本英則, 檜村友隆, 島北寛仁, 他. 細菌検出法の実際 - 透析室にて可能なメンブレンフィルター (MF) 法 -. 臨牀透析 2007 ; 23 : 579-586.
- 29) 山口進康, 那須正夫. 蛍光染色による細菌の可視化と迅速・高精度検出. 細菌学雑誌 2006 ; 61 : 251-260.

- 30) Porter KG, Feig YS. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol Oceanogr* 1980 ; 25 : 943-948.
- 31) 齊藤美佳子, 松岡英明. 微生物の迅速検出法. *防菌防黴* 2008 ; 36 : 99-105.
- 32) Kawai M, Yamaguchi N, Nasu M. Rapid enumeration of physiologically active bacteria in purified water used in the pharmaceutical manufacturing process. *J Appl Microbiol* 1999 ; 86 : 496-504.
- 33) 佐々木次雄. 日本薬局方 15 局へ向けての新しい考え方. *PDA Journal of GMP and Validation in Japan* 2004 ; 6 : 38-45.
- 34) 鹿島田浩二. 紫外線消毒における光回復. *用水と廃水* 1996 ; 38 : 359-364.
- 35) 森地敏樹. 損傷菌の特性. *防菌防黴* 2006 ; 34 : 429-437.
- 36) 仲島道子, 博美, 信子, 他. 蛍光活性染色法を用いた紫外線殺菌水の衛生微生物学的評価. *防菌防黴* 1998 ; 245-249.
- 37) Kawai M, Matsutera E, Kanda H, *et al.* 16S ribosomal DNA-based analysis of bacterial diversity in purified water used in pharmaceutical manufacturing processes by PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* 2002 ; 68 : 699-704.
- 38) Kawai M, Yamagishi J, Yamaguchi N, *et al.* Bacterial population dynamics and community structure in a pharmaceutical manufacturing water supply system determined by real-time PCR and PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *J Appl Microbiol* 2004 ; 97 : 1123-1131.
- 39) 荒賀昌幸, 山口進康, 那須正夫. 蛍光活性染色法による注射用水製造工程の衛生微生物学的評価. *防菌防黴* 2005 ; 33 : 7-12.
- 40) 檜村友隆, 佐藤和弘, 井出孝夫, 他. 蛍光染色法を用いた RO 水製造工程中に存在する細菌の迅速評価. *透析会誌* 2007 ; 40 : 1051-1056, 2007.
- 41) Sizemore RK, Caldwell JJ, Kendrick AS. Alternate gram staining technique using a fluorescent lectin. *Appl Environ Microbiol* 1990 ; 56 : 2245-2247.
- 42) Yamaguchi N, Baba T, Nakagawa S, *et al.* Rapid monitoring of bacteria in dialysis fluids by fluorescent vital staining and microcolony methods. *Nephrol Dial Transplant* 2006 ; 22 : 612-616.

- 43) 檜村友隆, 山本英則, 井出孝夫. 培養操作に依存しない細菌の迅速高精度検出技術. *Clinical Engineering* 2010 ; 21 : 843-849.
- 44) Wilkins JR, Grana DC, Fox SS. Combined membrane filtration-electrochemical microbial detection method. *Appl Environ Microbiol* 1980 ; 40 : 852-853.
- 45) Maiwald M, Kissel K, Srirnuang S, *et al.* Comparison of polymerase chain reaction and conventional culture for the detection of *Legionellas* in hospital water samples. *J Appl Bacteriol* 1994 ; 76 : 216-226.
- 46) Reynolds DT, Fricker CR. Application of laser scanning for the rapid and automated detection of bacteria in water samples. *J Apple Microbiol* 1999 ; 86 : 785-795.
- 47) Matsuoka H, Oishi K, Watanabe M, *et al.* Viable cell detection by the combined use of fluorescent glucose and fluorescent glycine. *Biosci Biotechnol Biochem* 2003 ; 67 : 2459-2462.
- 48) Yamaguchi N, Sasada M, Yamanaka M, *et al.* Rapid detection of respiring *Escherichia coli* O157:H7 in apple juice, milk, and ground beef by flow cytometry. *Cytometry* 2003 ; 54 : 27-35.
- 49) Yamaguchi N, Torii M, Uebayashi Y, *et al.* Rapid, semiautomated quantification of bacterial cells in freshwater by using a microfluidic device for on-chip staining and counting. *Apple Environ Microbiol* 2010 ; 77 : 1536-1539.
- 50) Ogawa M, Tani K, Yamaguchi N, *et al.* Development of multicolor digital image analysis system to enumerate actively respiring bacteria in natural river water. *J Appl Microbiol* 2003 ; 95 : 120-128.
- 51) Pernthaler J, Pernthaler A, Amann R, *et al.* Automated enumeration of groups of marine picoplankton after fluorescence in situ hybridization. *Appl Environ Miclobiol* 2003 ; 69 : 2631-2637.
- 52) Shimakita T, Yamamoto H, Naramura T, *et al.* Rapid count of microbial cells in dialysate. *Ther Apher Dial* 2007 ; 11 : 363-369.
- 53) Gunasekera TS, Attfield PV, Veal DA. A flow cytometry method for rapid

detection and enumeration of total bacteria in milk. *Appl Environ Microbiol* 2000 ; 66 : 1228-1232.

54) Müller S, Nebe-von-Caron G. Functional single-cell analysis: flow cytometry and cell sorting of microbial populations and communities. *FEMS Microbiol Rev* 2010 ; 34 : 554-587.

55) G. Mie. Beiträge zur Optik trüber Medien. *Ann d Physik* 1908; 25: 377-445.

56) Wolff M, Dollfus A. Calculating Rayleigh scattering from particulate surfaces and saturn's rings. *Appl Opt* 1990 ; 29 : 1496-1502.

57) Kerker M. *The Scattering of Light and Other Electromagnetic Radiation, Scattering by a Sphere*. New York : ACADEMIC PRESS INC, 1969, p27-93.

58) Aubin JE. Autofluorescence of viable cultured mammalian cells. *J Histochem Cytochem* 1979 ; 27 : 36-43.

59) Li JK, Asali EC, Humphrey AE, *et al*. Monitoring cell concentration and activity by multiple excitation fluorometry. *Biotechnol Prog* 1991 ; 7 : 21-27.

60) Chwirot BW, Chwirot S, Jedrzejczyk W, *et al*. Ultraviolet laser-induced fluorescence of human stomach tissues: detection of cancer by imaging techniques. *Lasers Surg Med* 1997 ; 21 : 149-158.

61) Steven CH, Ronald GP, Paul N, *et al*. Aerosol-fluorescence spectrum analyzer: real-time measurement of emission spectra of airborne biological particles. *Applied Optics* 1995 ; 34 : 7149-7155.

62) Peter PH, Jim H, Frederick RQ. Design of instrument for real-time detection of bioaerosols using simultaneous measurement of particle aerodynamic size and intrinsic fluorescence. *J Aerosol Sci* 1997 ; 28 : 471-482.

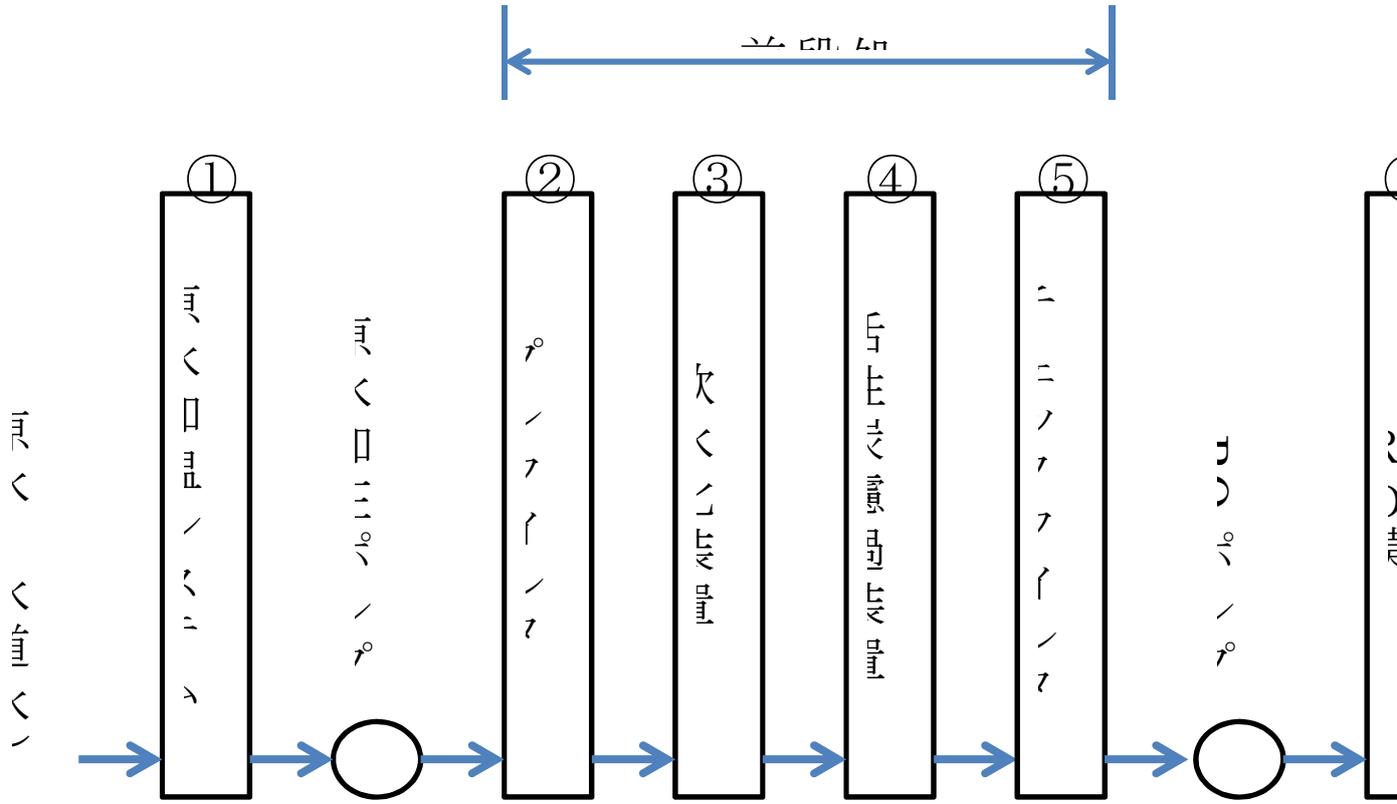


図 1 RO 装置の基本構成

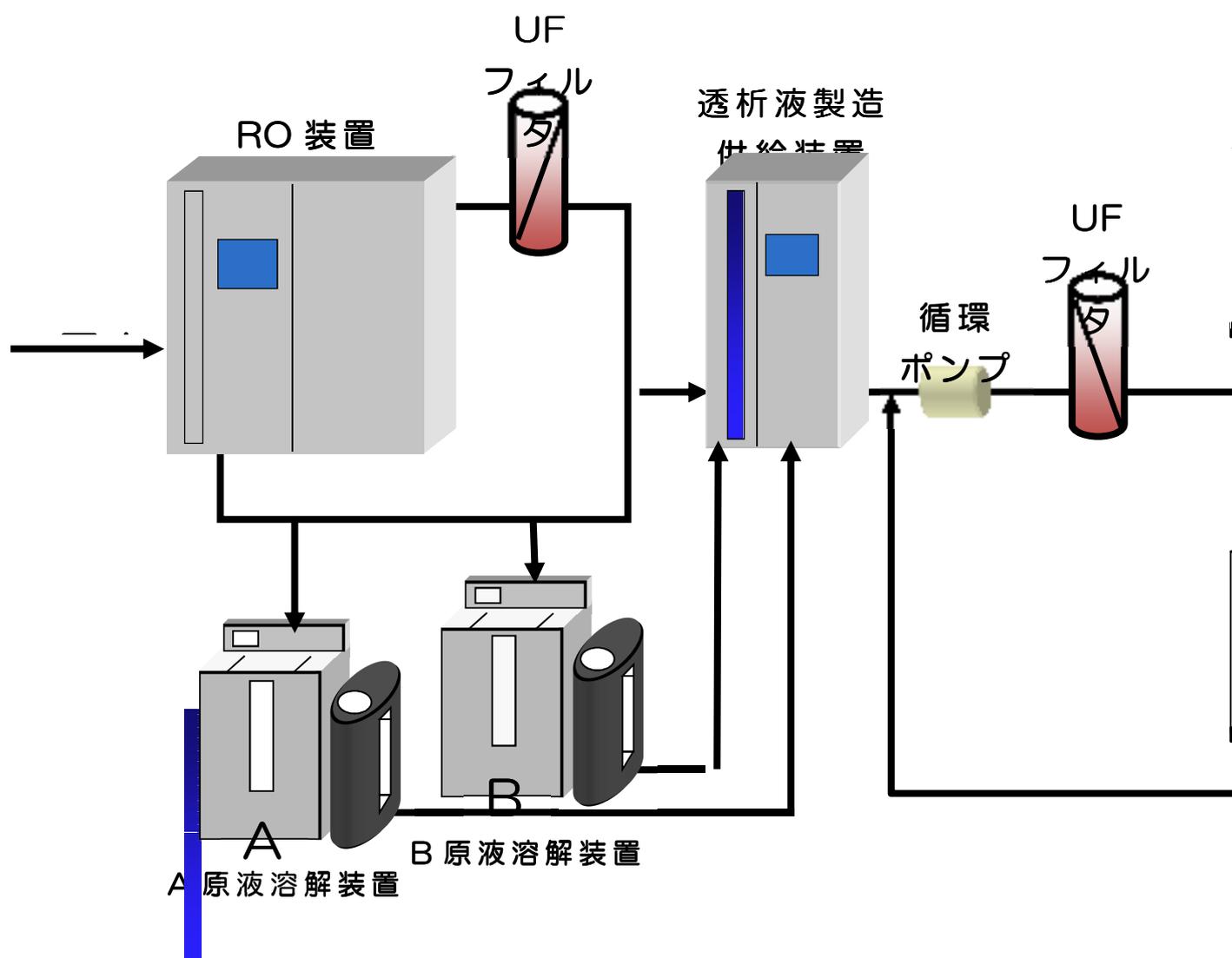


図 2 透析液製造工程の概要

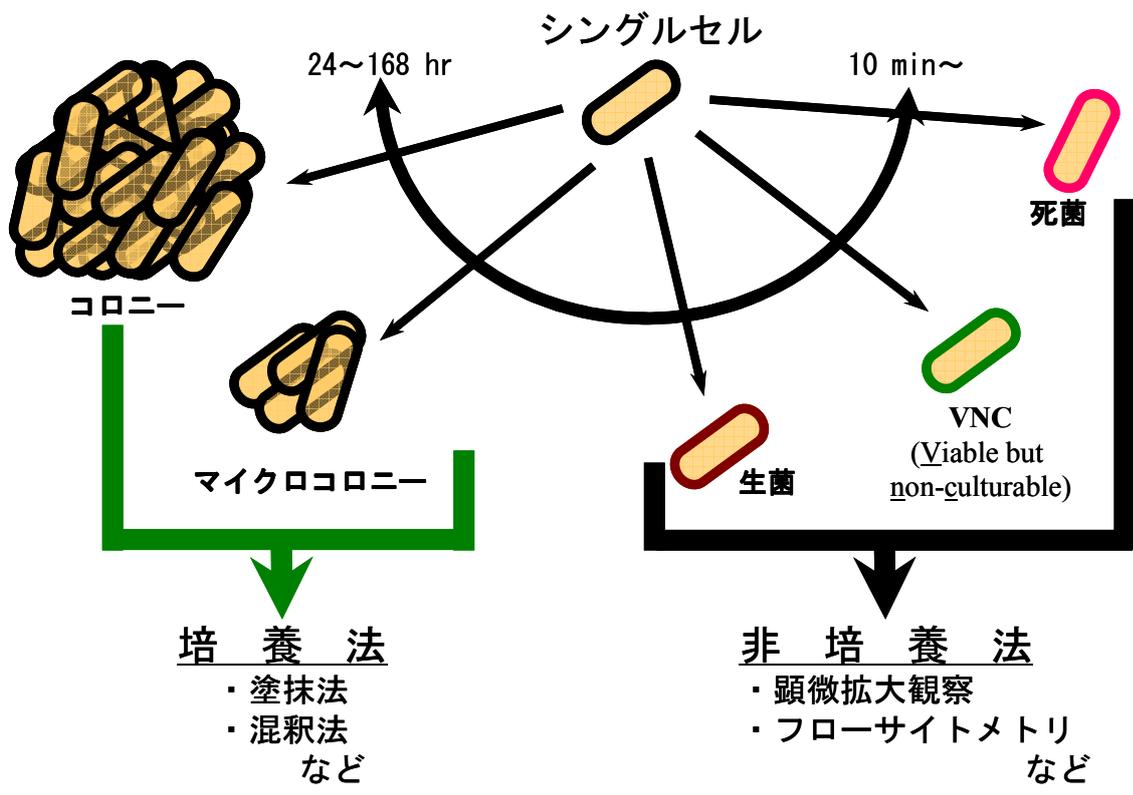


図 3 培養法と非培養法

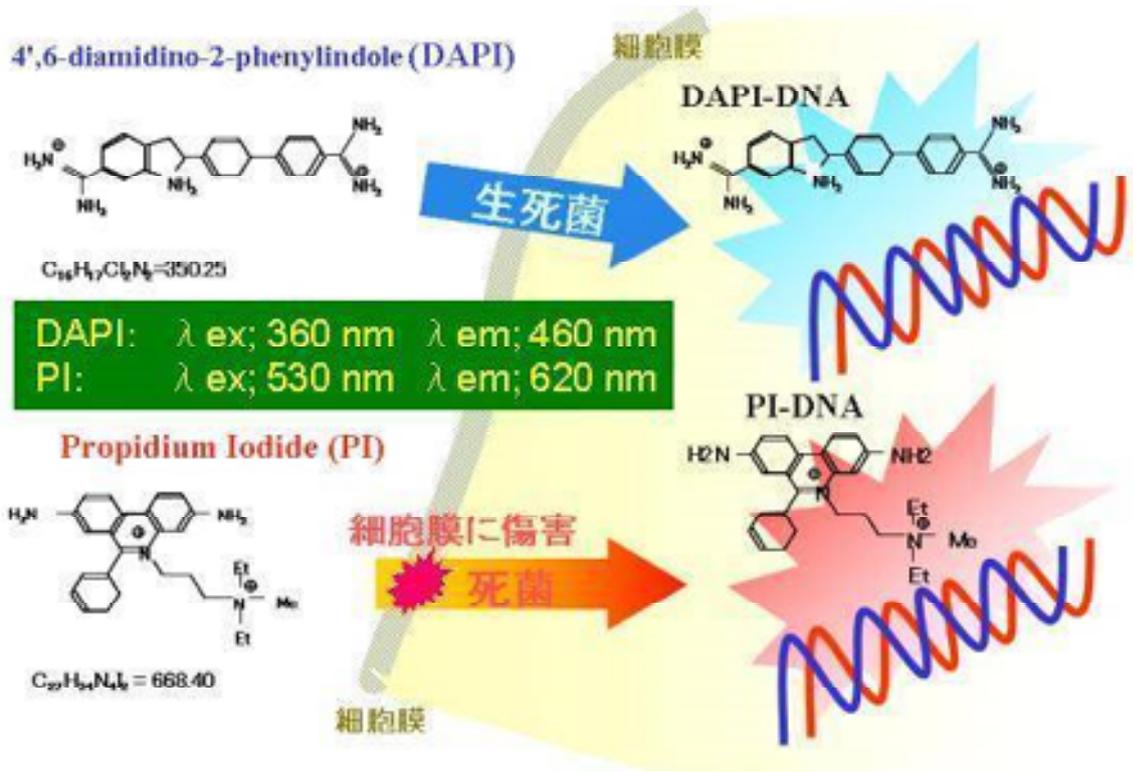


図 4 核酸結合型染色剤の化学構造と特徴 (DAPI, PI)

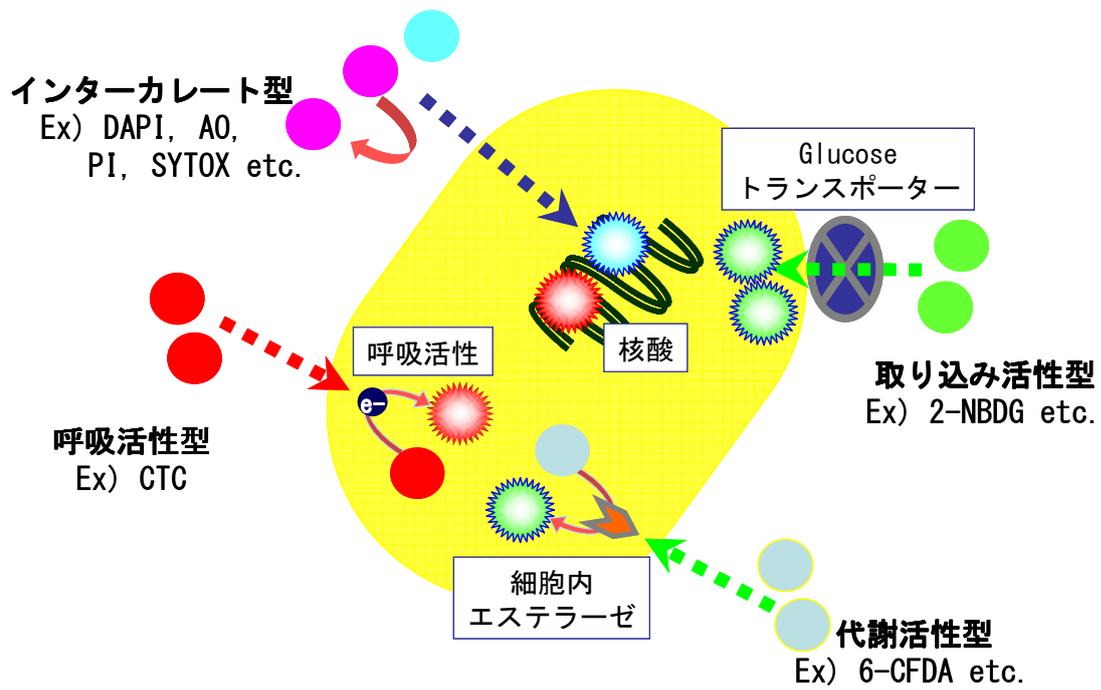


図 5 各種生理活性保有細菌の検出に用いられる蛍光染色剤（CTC, 6-CFDA, 2-NBDG）

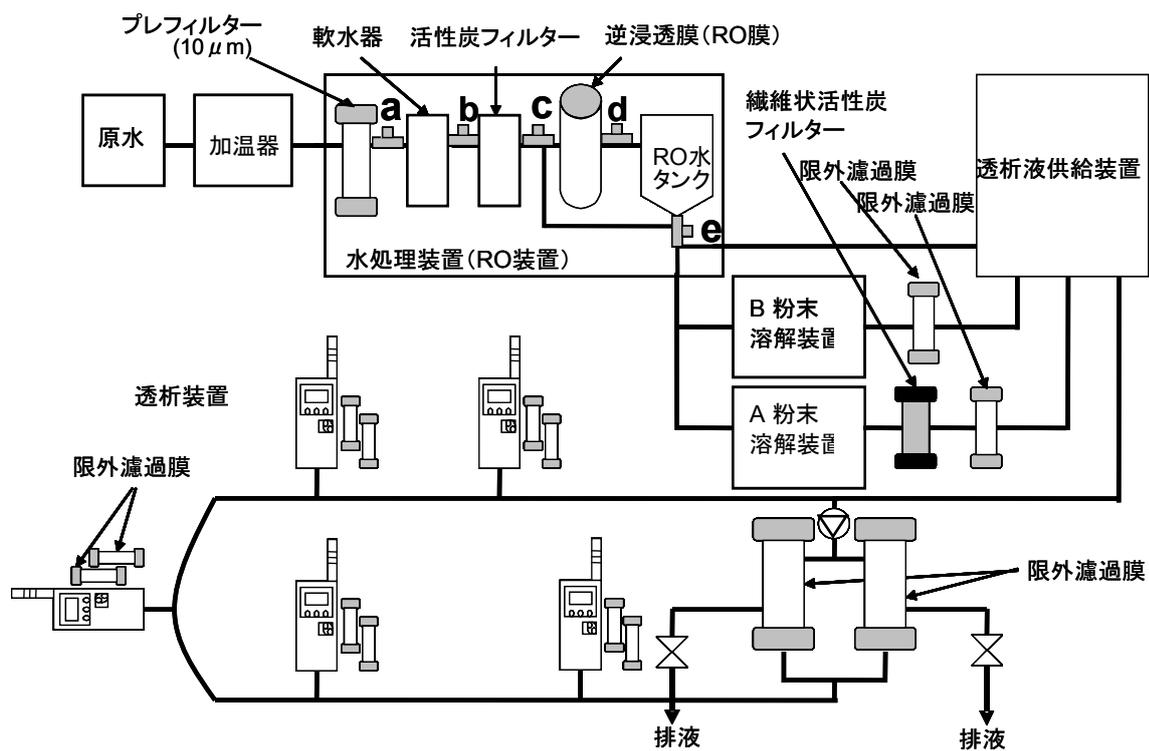


図 6 採取箇所

- (a) 原水, (b) 軟水化処理水, (c) 活性炭処理水, (d) RO 膜処理水,  
 (e) RO タンク後 RO 水

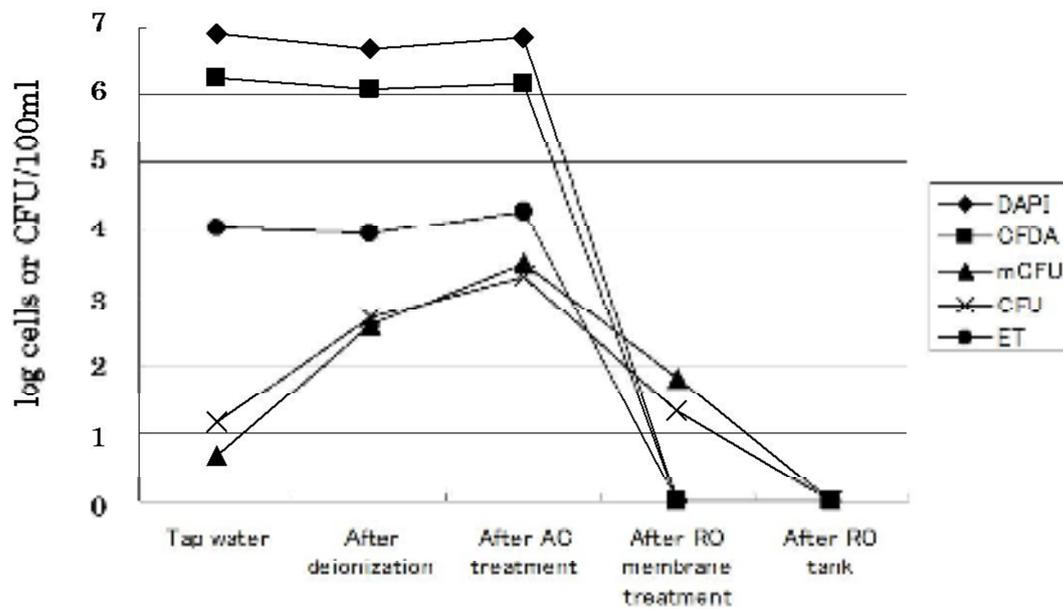


図 7 RO 水製造工程内の各採取箇所における細菌現存量

: DAPI 染色により検出された全菌数

: 6-CFDA 染色により検出されたエステラーゼ活性保有菌数

: R2A 培地によりマイクロコロニーを形成した細菌数

: R2A 培地によりコロニーを形成した細菌数

: エンドトキシン活性

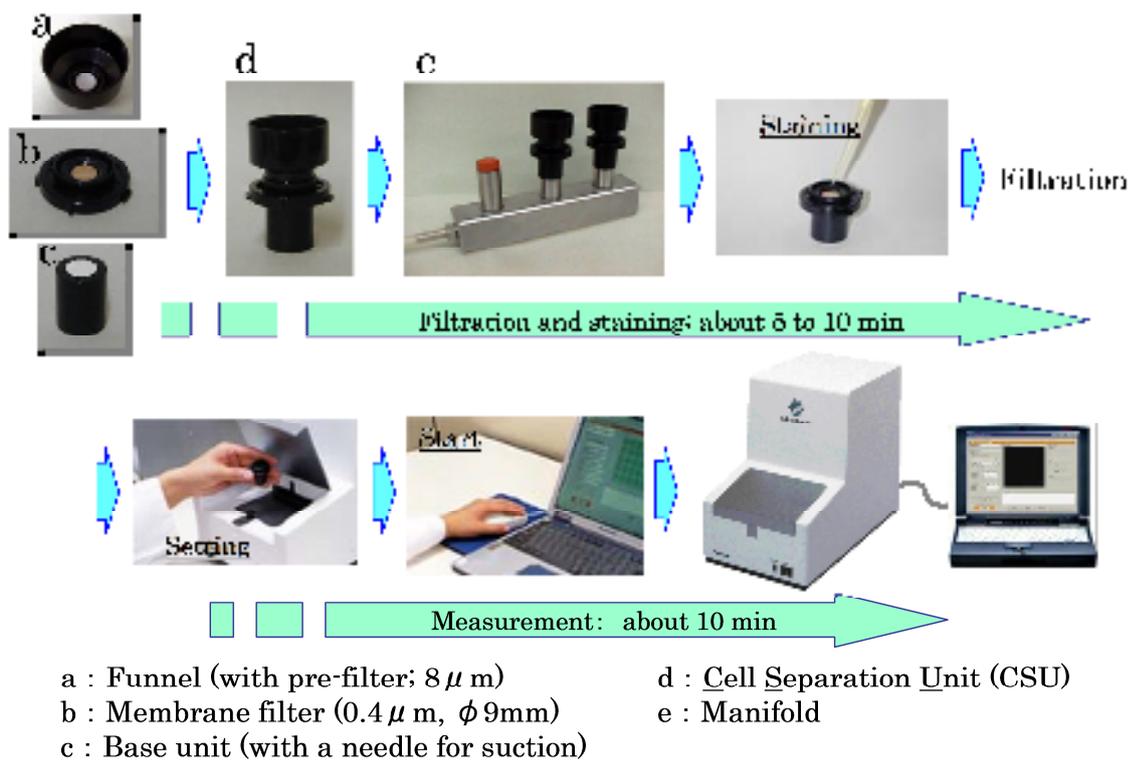


図 8 バイオフローラの概要

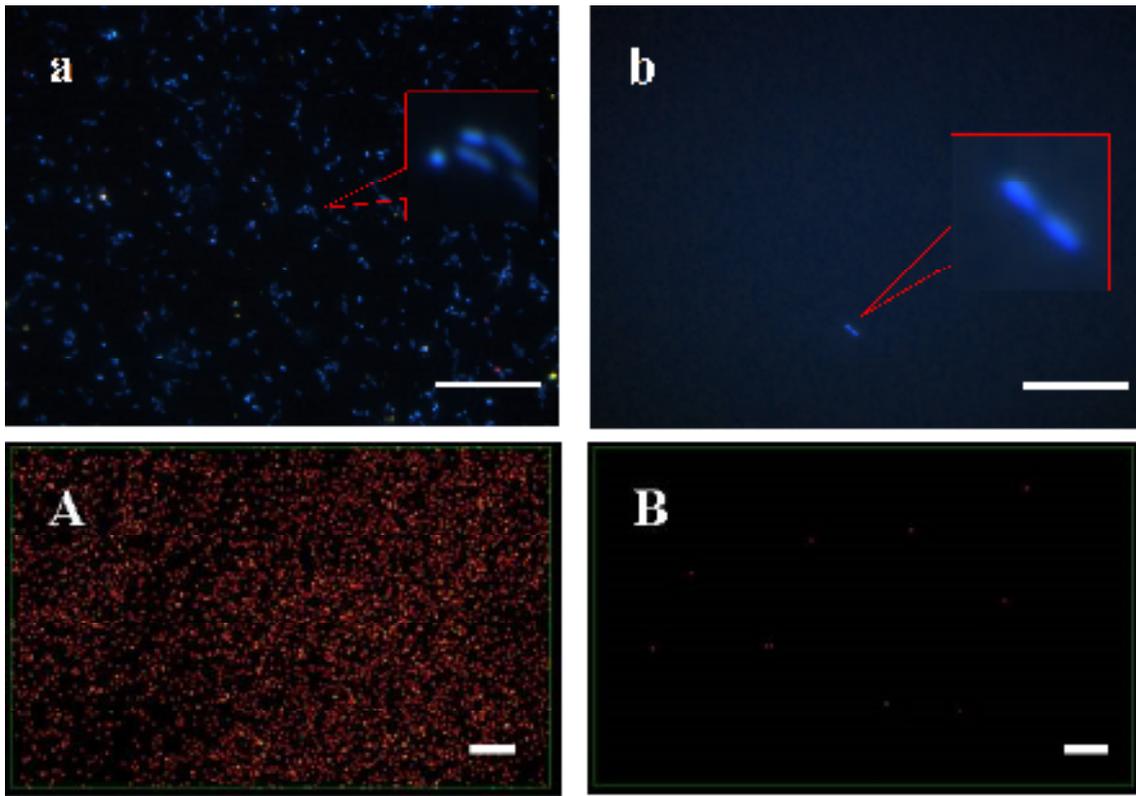


図 9 活性炭処理水および透析液中の細菌検出画像

a、A; 活性炭処理水                      b、B; 透析液

a、b; 蛍光顕微鏡画像 : スケールバー 10 $\mu$ m

A、B; バイオプローラ画像 : スケールバー 100 $\mu$ m

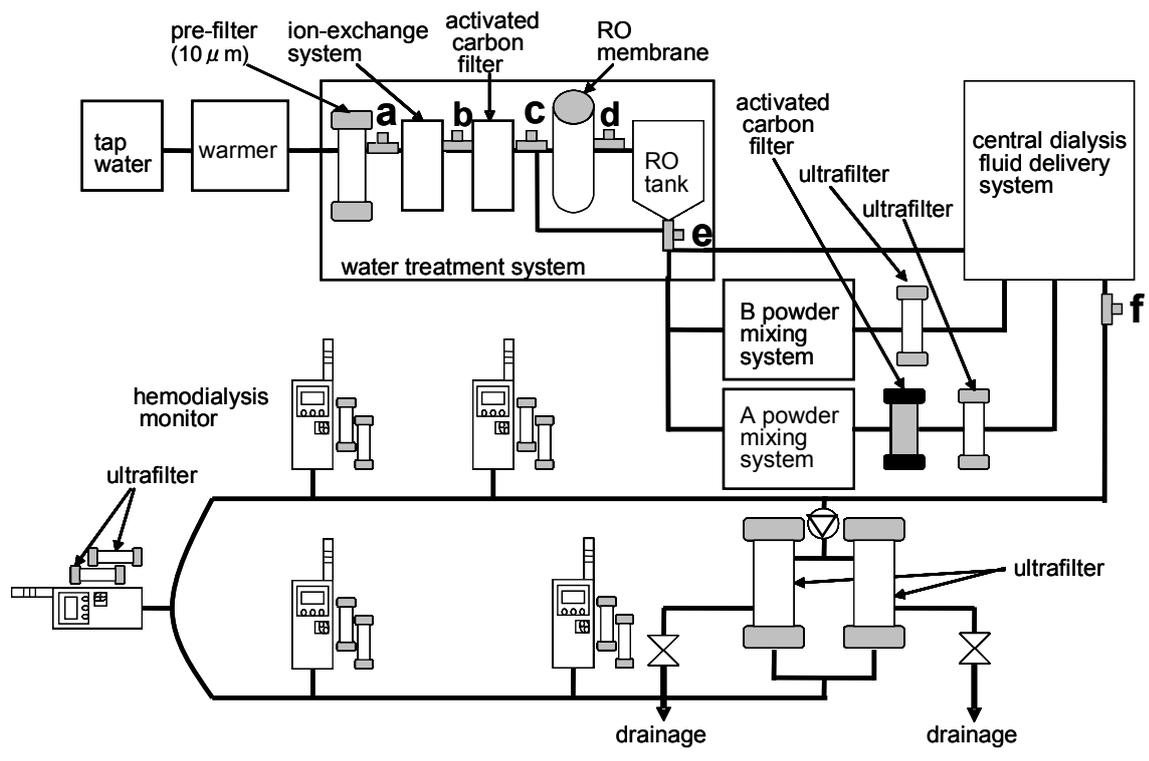


図 10 透析液製造工程と採水地点

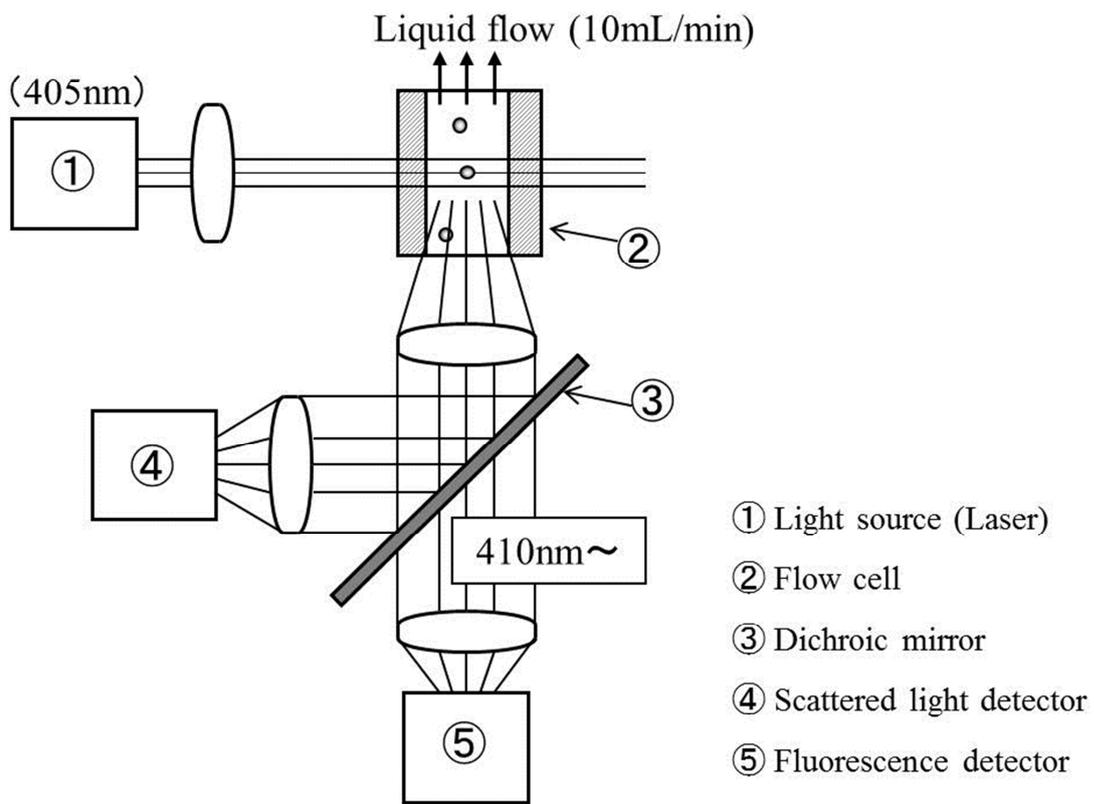


図 11 検出部構造 (模式図)

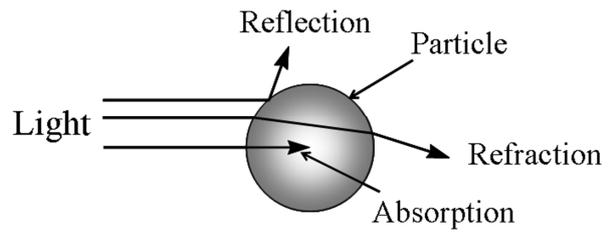


図 12 光と粒子の相互作用

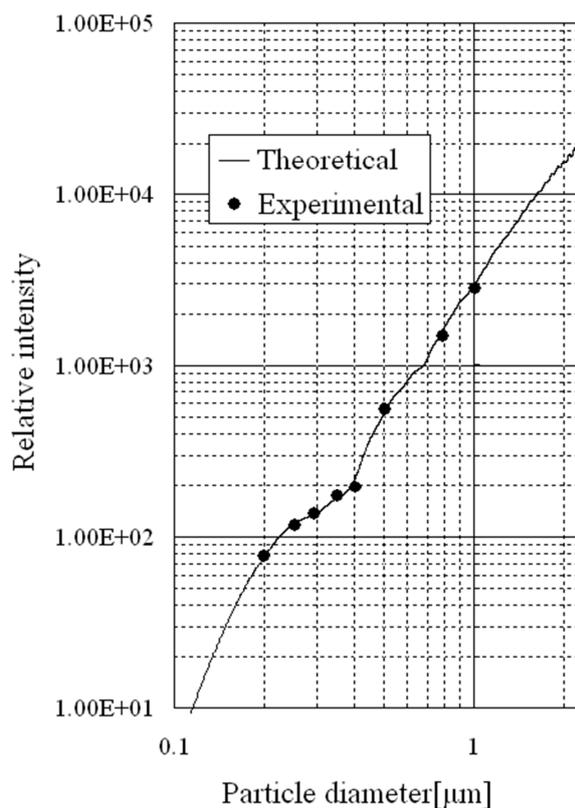


図 13 粒子径と散乱光強度（計算値と実測値）

実線は Mie 散乱理論による計算値を、● は標準粒子（ポリスチレンラテックス粒子）を測定した実測値である。理論計算上、光の波長に対して十分に小さな粒子に適用される Rayleigh 散乱領域では散乱光強度が直線的に推移するが、大きな粒子に適用される Mie 散乱領域では複雑な散乱光強度を示す。

実測値は理論値とよく一致している。

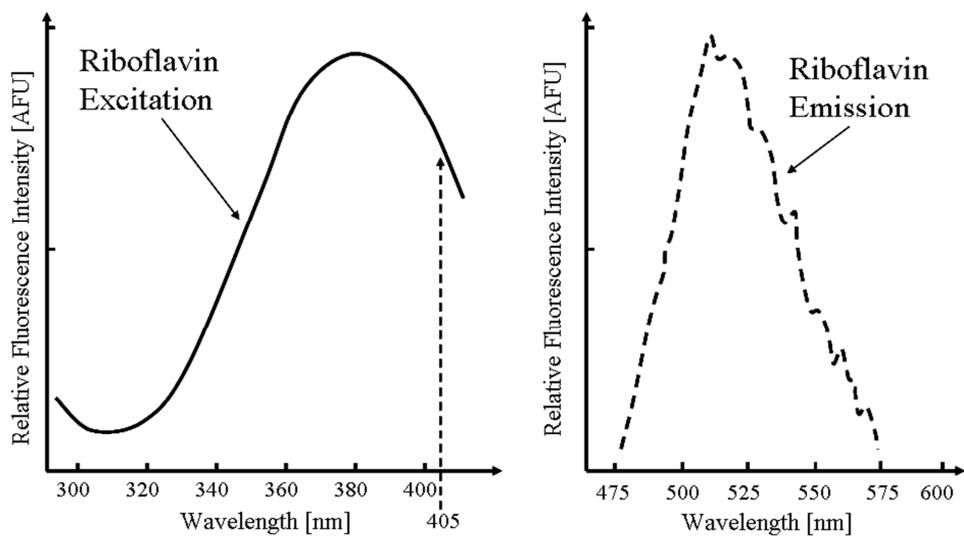
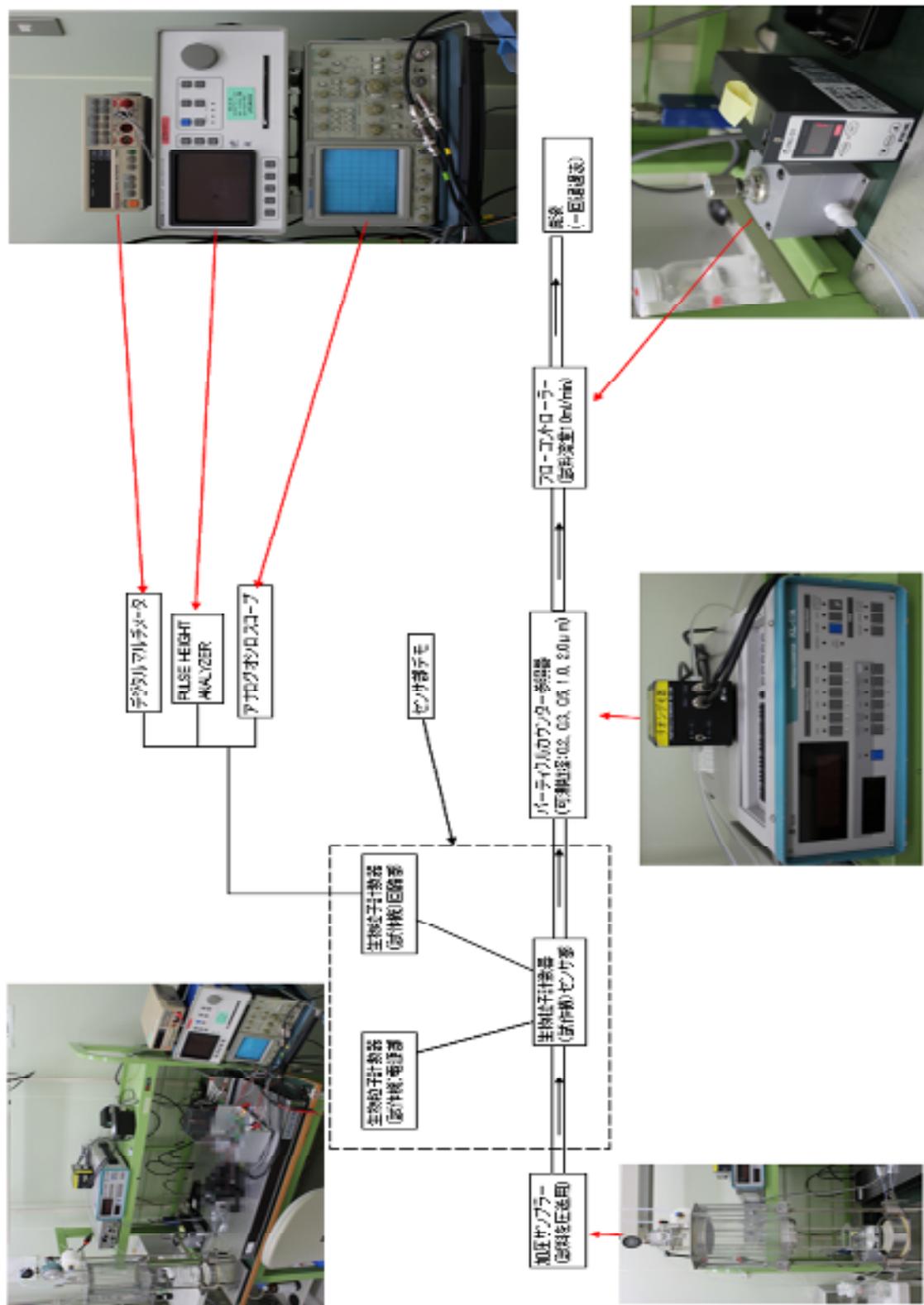


図 14 リボフラビンの吸収（励起）と蛍光スペクトル

図 15 実験系概要



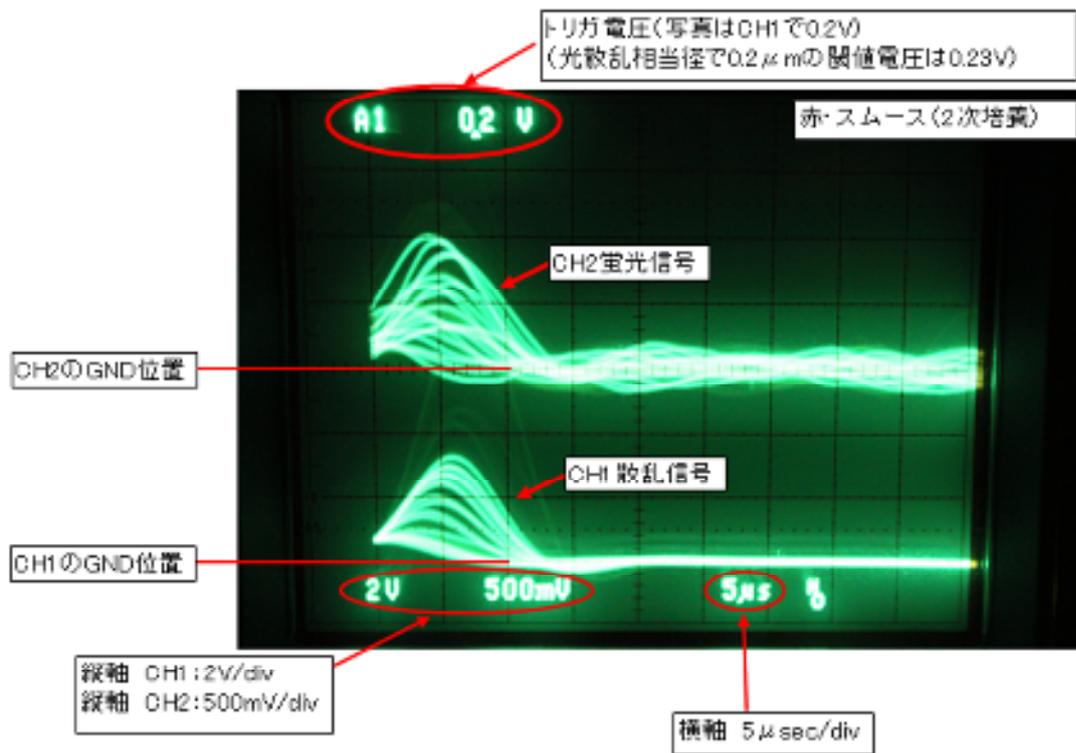


図 16 オシロスコープ観察による粒子信号 (赤・スムーズ)

ch1(散乱信号) : 2V/div、ch2 (蛍光信号) : 500 V/div

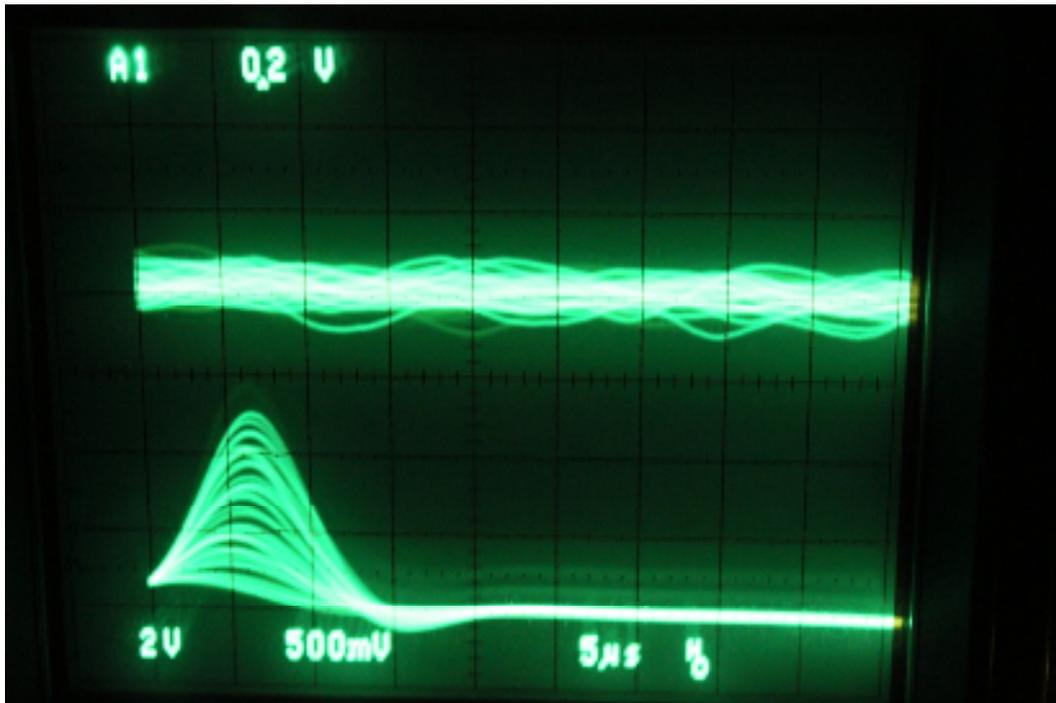


図 17-a 非生物粒子（ 粒子）のみを用いたオシロ波形

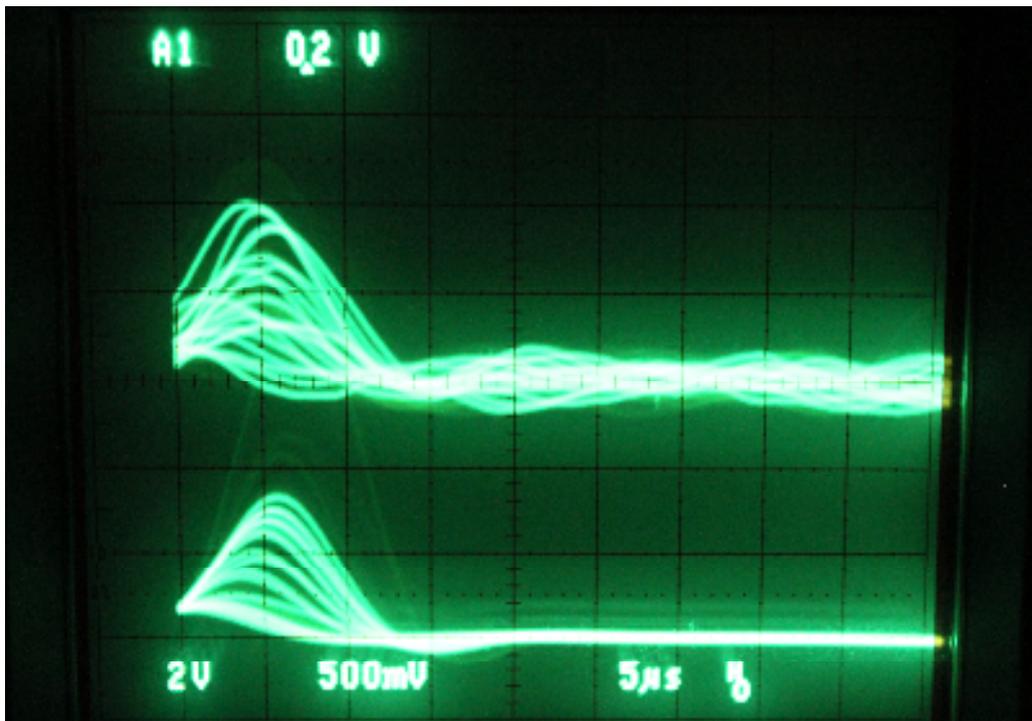
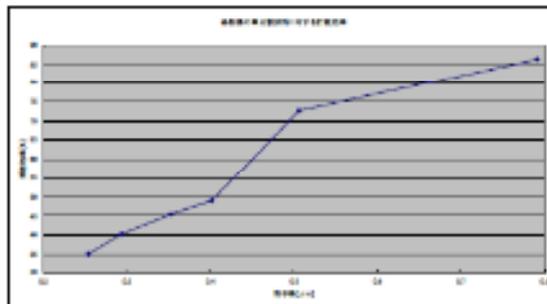


図 17-b 生物粒子によるオシロ波形（赤・スムーズ）



機種名: 801-140-01  
 測定装置: 801-140-01 (標準)  
 測定標準: JIS S 5000 (標準)  
 測定単位: 1.000 (標準)  
 測定範囲: 0.000~99.999  
 測定精度: ±0.001  
 測定速度: 1.000 (標準)  
 測定時間: 1.000 (標準)  
 測定回数: 1.000 (標準)  
 測定条件: 1.000 (標準)  
 測定結果: 1.000 (標準)  
 測定エラー: 1.000 (標準)  
 測定モード: 1.000 (標準)  
 測定設定: 1.000 (標準)  
 測定履歴: 1.000 (標準)  
 測定ログ: 1.000 (標準)



標準粒子濃度 (個/mL) × 標準粒子検出率 (%)  
 標準粒子濃度 (個/mL) × 標準粒子検出率 (%)

標準粒子濃度 (個/mL)	標準粒子検出率 (%)	標準粒子濃度 (個/mL) × 標準粒子検出率 (%)
0.1	10	1.0
0.2	20	4.0
0.3	45	13.5
0.4	65	26.0
0.5	75	37.5
0.6	80	48.0
0.7	85	59.5
0.8	90	72.0

図 19 標準蛍光粒子および標準粒子、臨床分離菌株使用による計数効率の評価



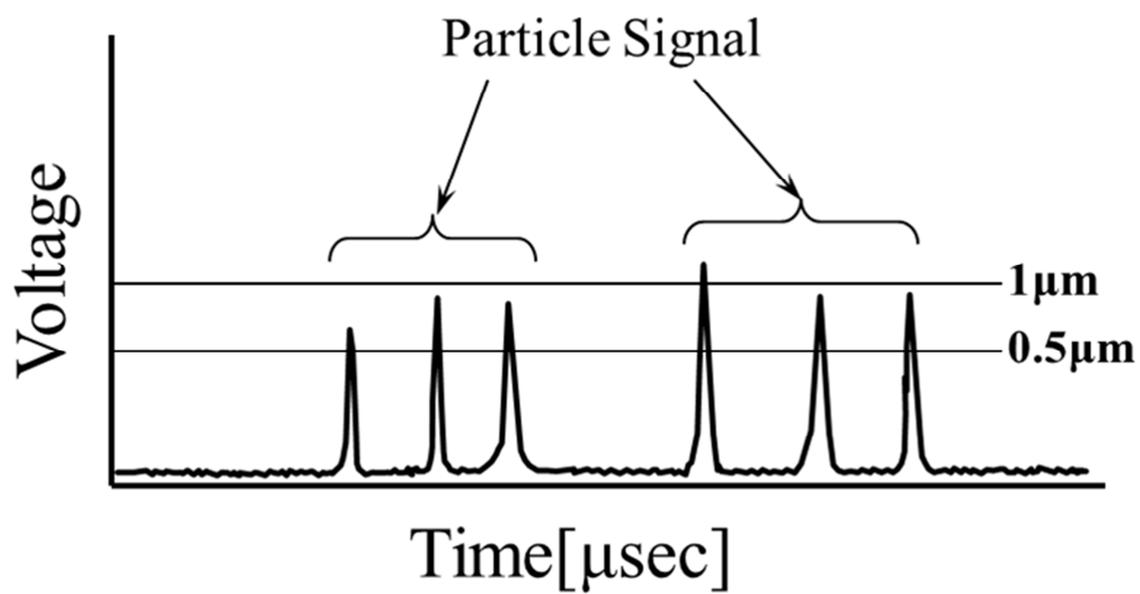


図 21 光電変換素子から出力された信号

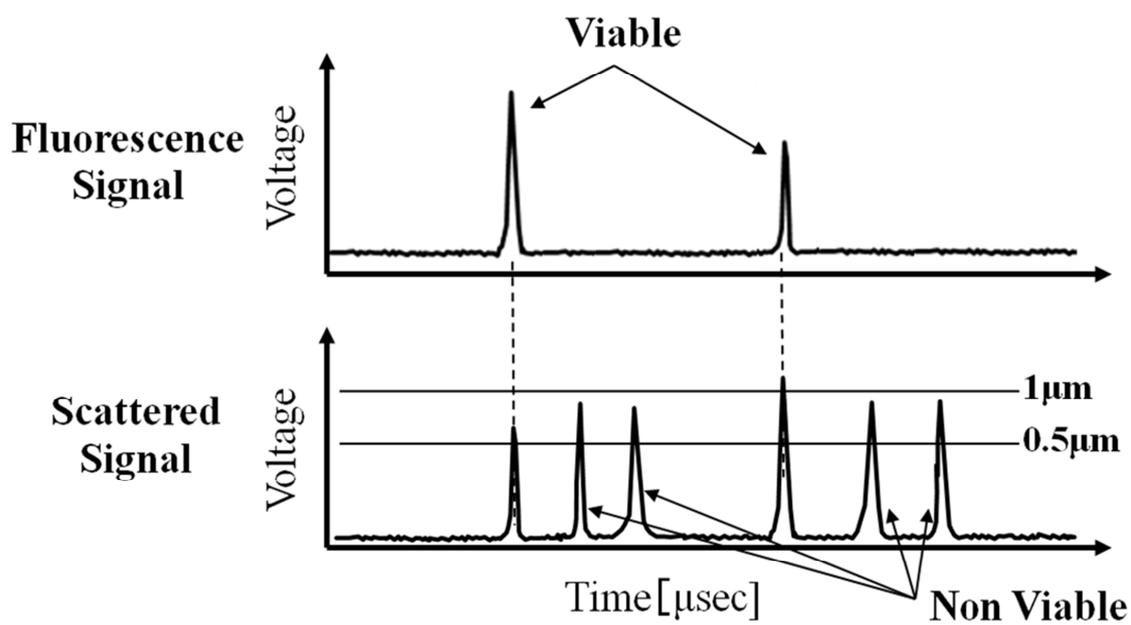


図 22 生物粒子 / 非生物粒子の判定方法

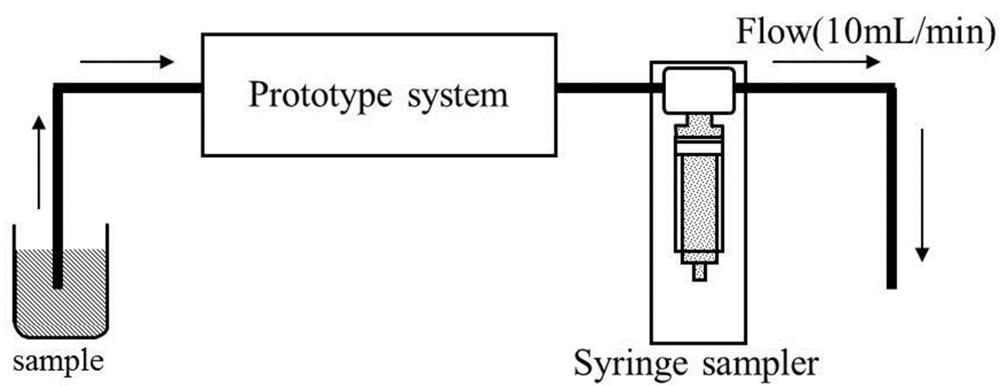


図 23 実験系概要

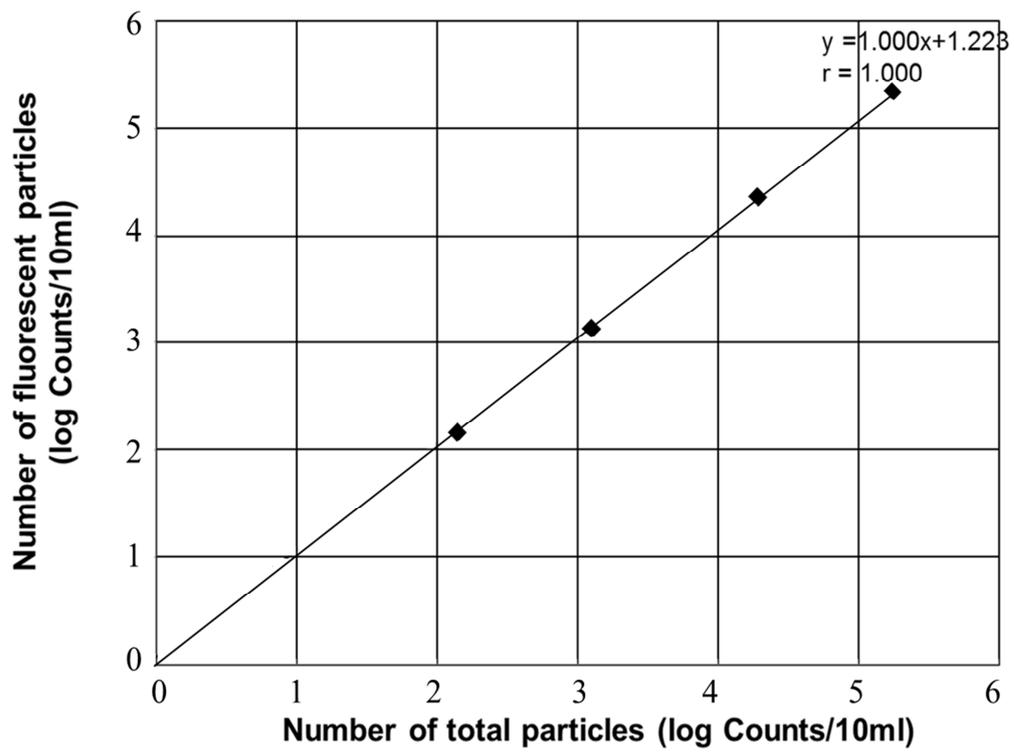


図 24 試作機による蛍光粒子および非蛍光粒子との相関

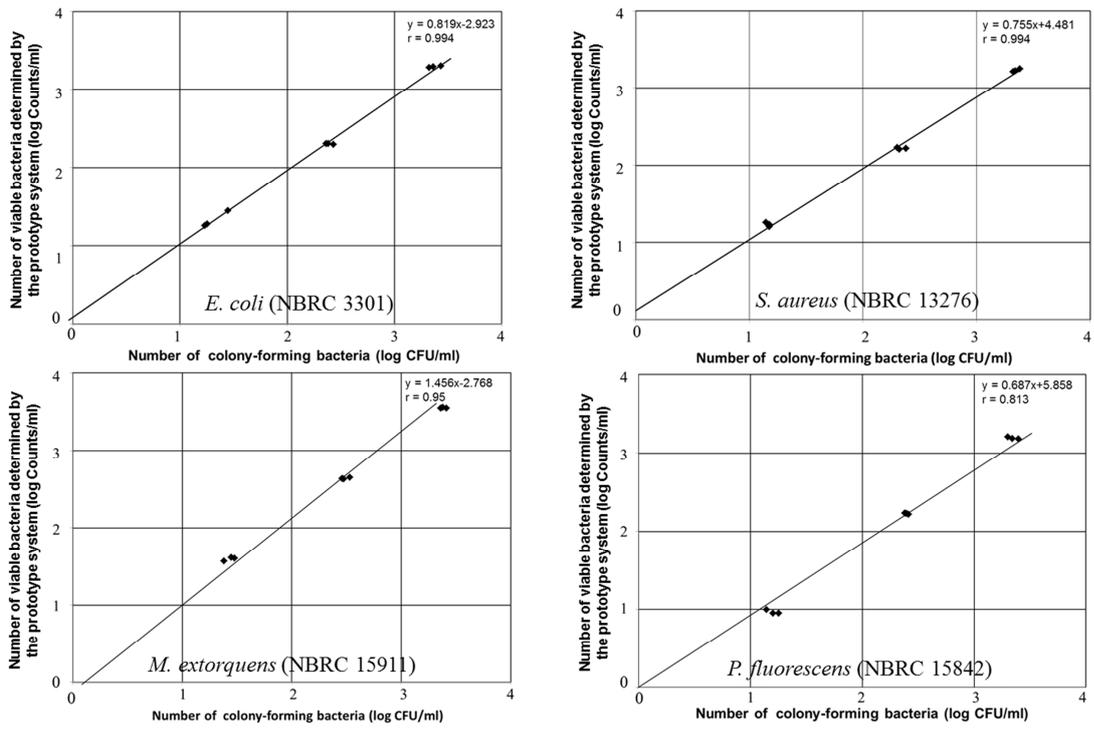


図 25 各種菌種によるスパイク試験の結果

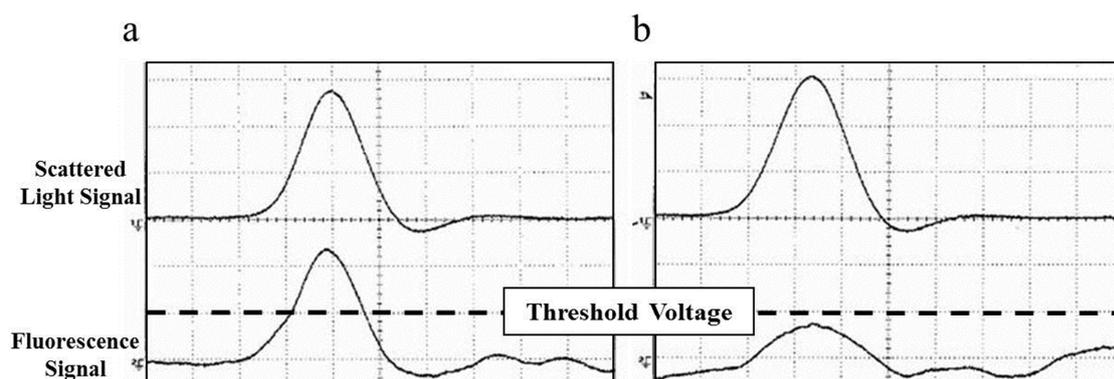


図 26 異なる細菌による自家蛍光の波高値

散乱光は a、b ともに Threshold Voltage を超えているため計測されているが、b では自家蛍光パルスの波高値が Threshold Voltage を超えていないため、非生物粒子として計測されている。

a : 標準菌株 (*E.coli*, NBRC3301) の自家蛍光パルスの波高値

b : ナチュラルミネラルウォーターより培養分離した菌株の自家蛍光パルスの波高値

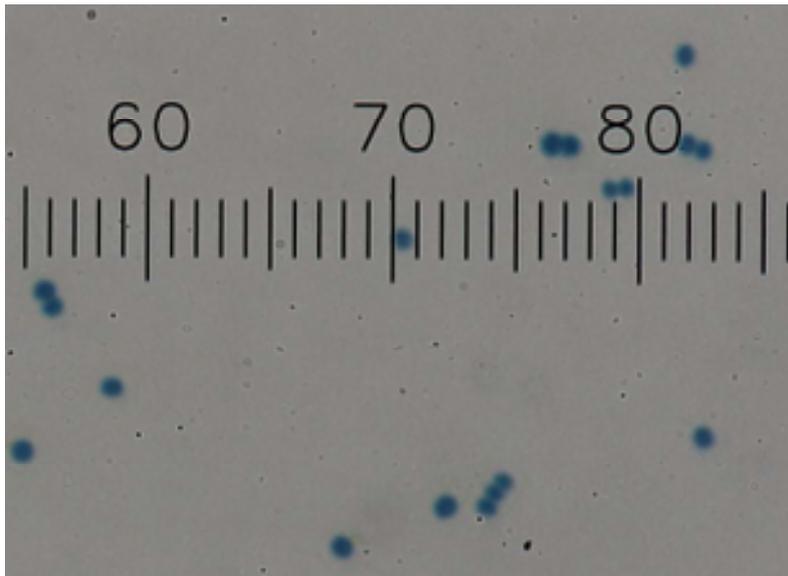


図 27 黄色ブドウ球菌 (1 目盛 = 1  $\mu$ m)

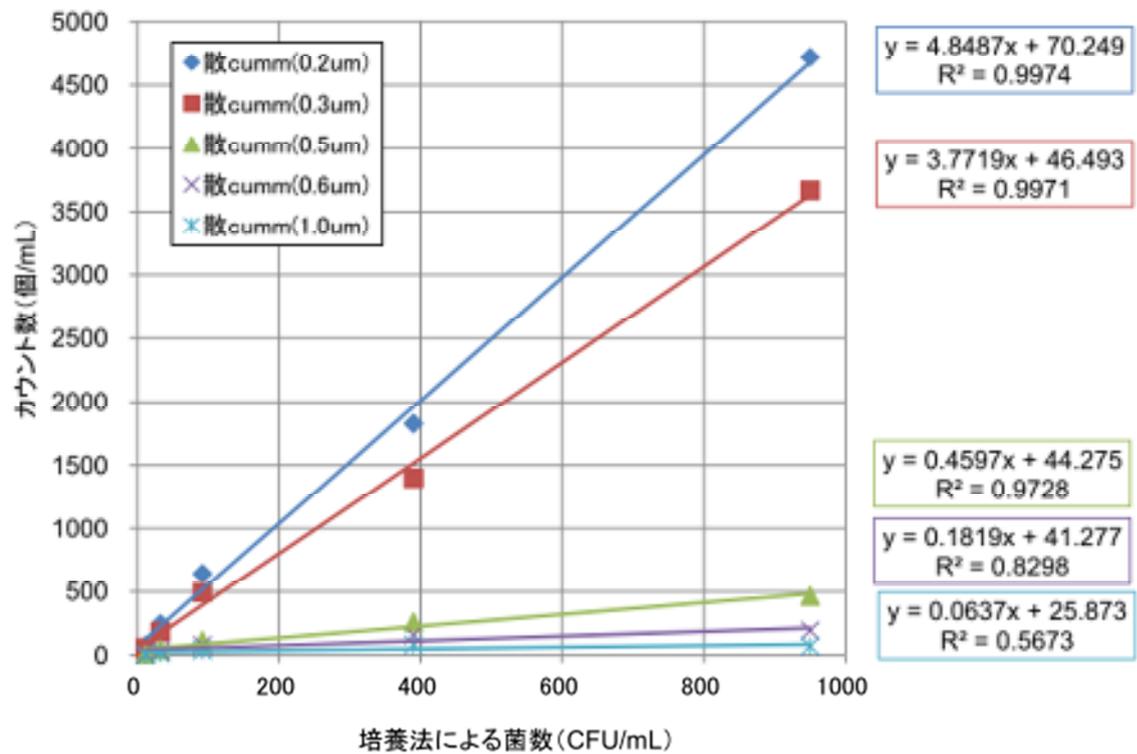


図 28 黄色ブドウ球菌の測定値 (散 cumm)

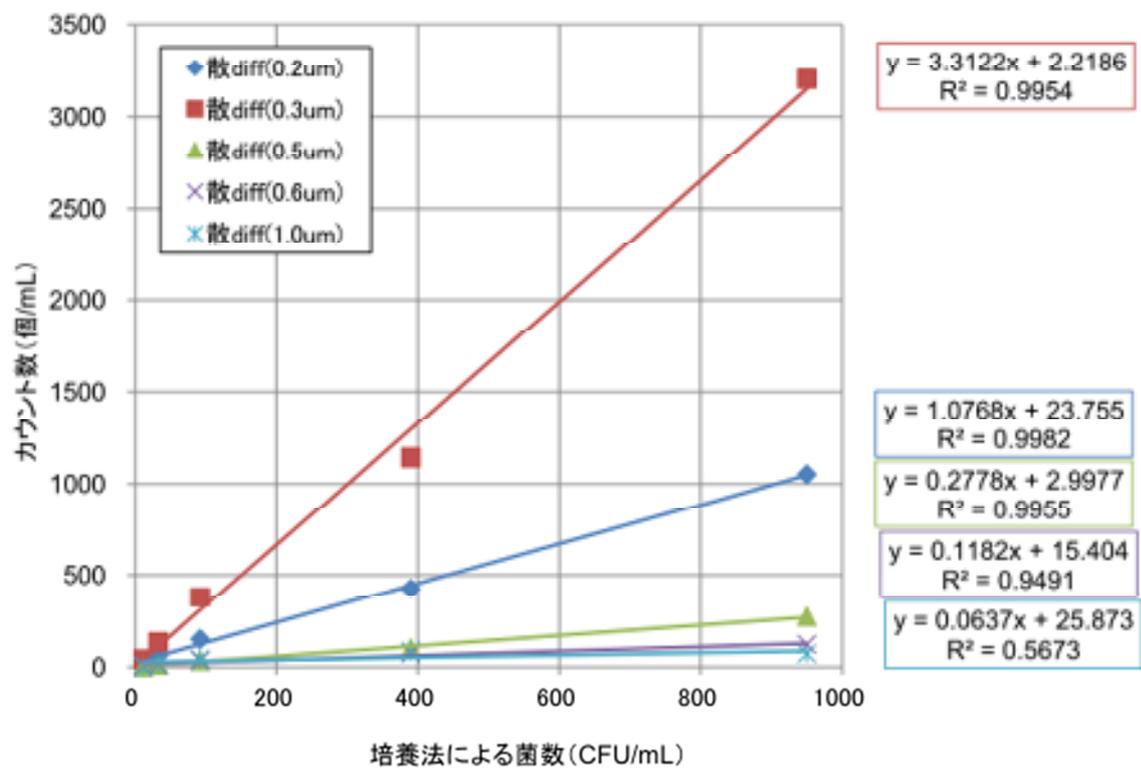


図 29 黄色ブドウ球菌の測定値 (散 diff)

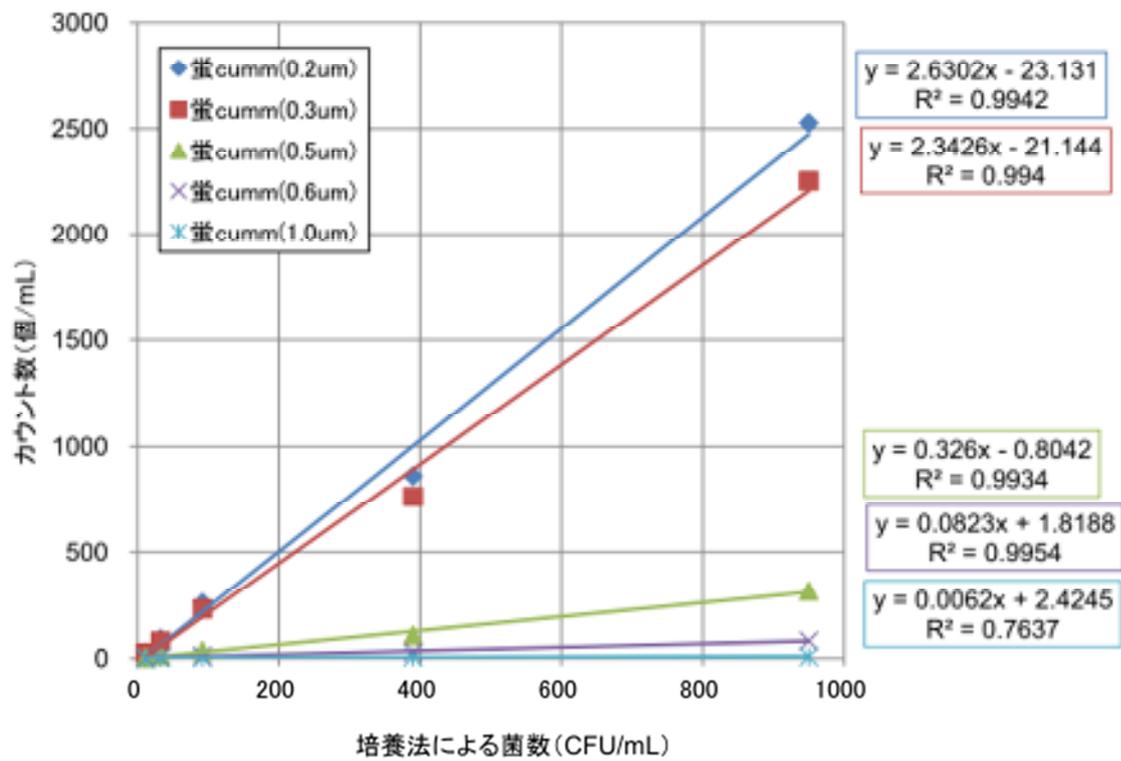


図 30 黄色ブドウ球菌の測定値（蛍 cumm）

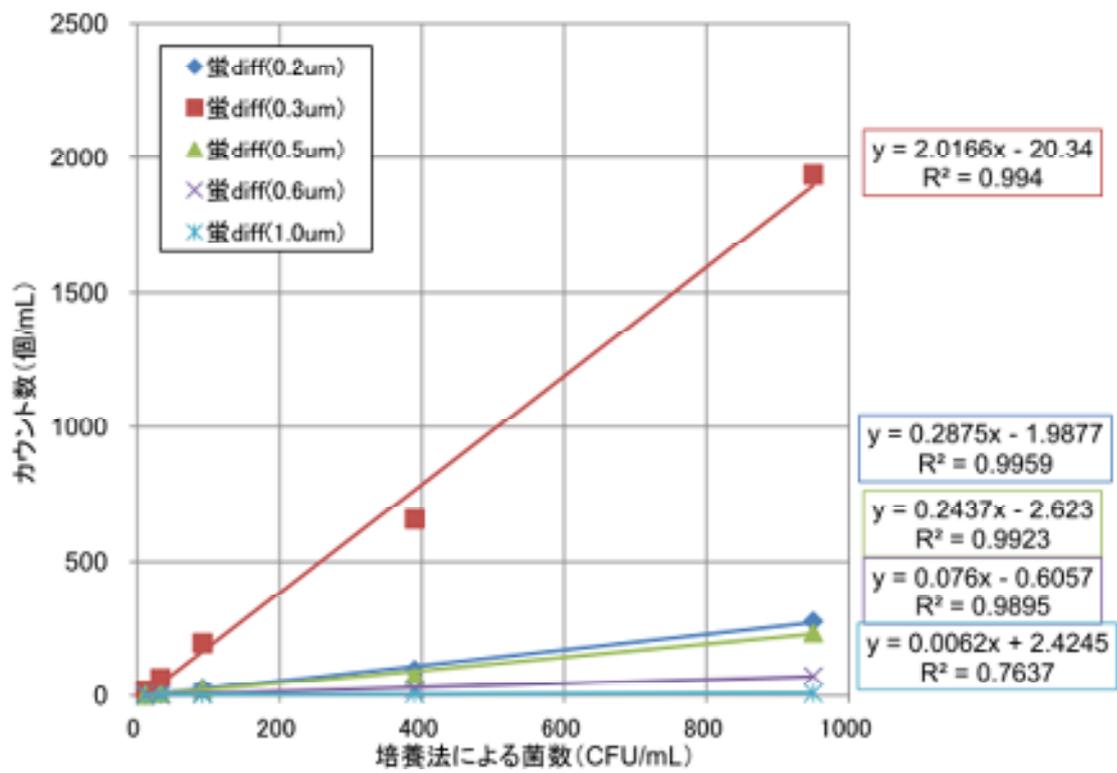


図 31 黄色ブドウ球菌の測定値 (蛍 diff)

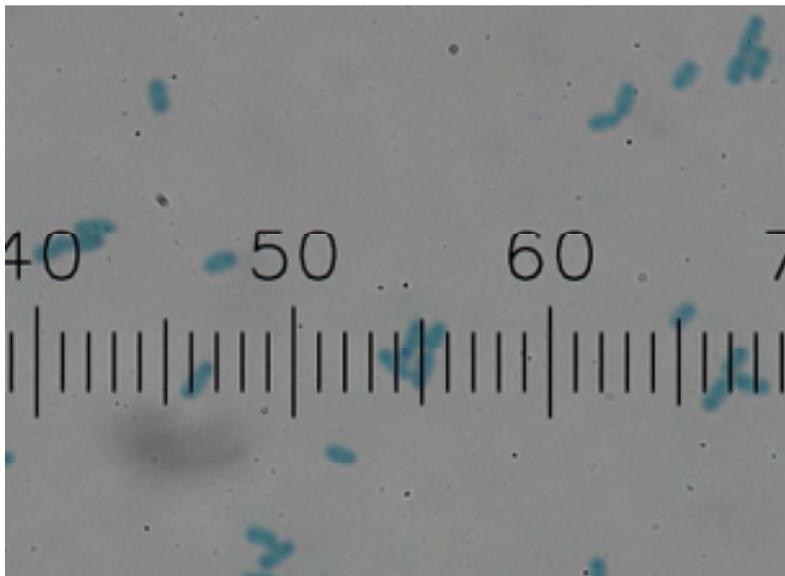


图 32 枯草菌（芽胞）（1 目盛 = 1 μm）

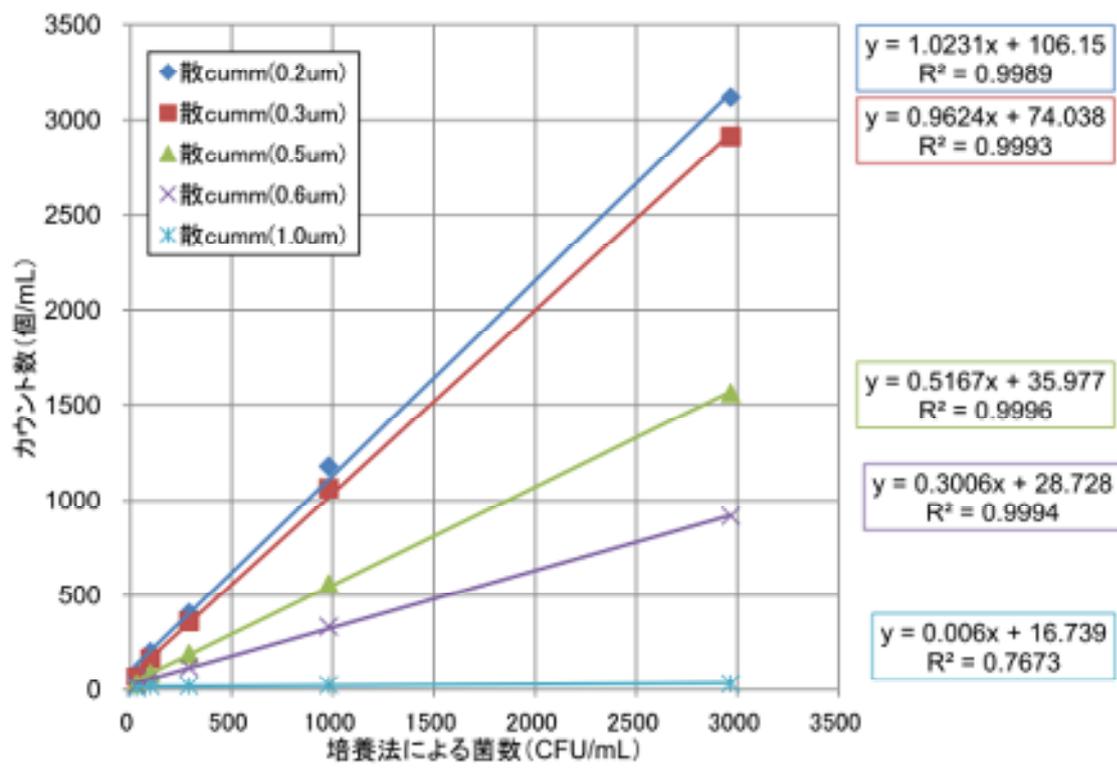


図 33 枯草菌（芽胞）の測定値（散 cumm）

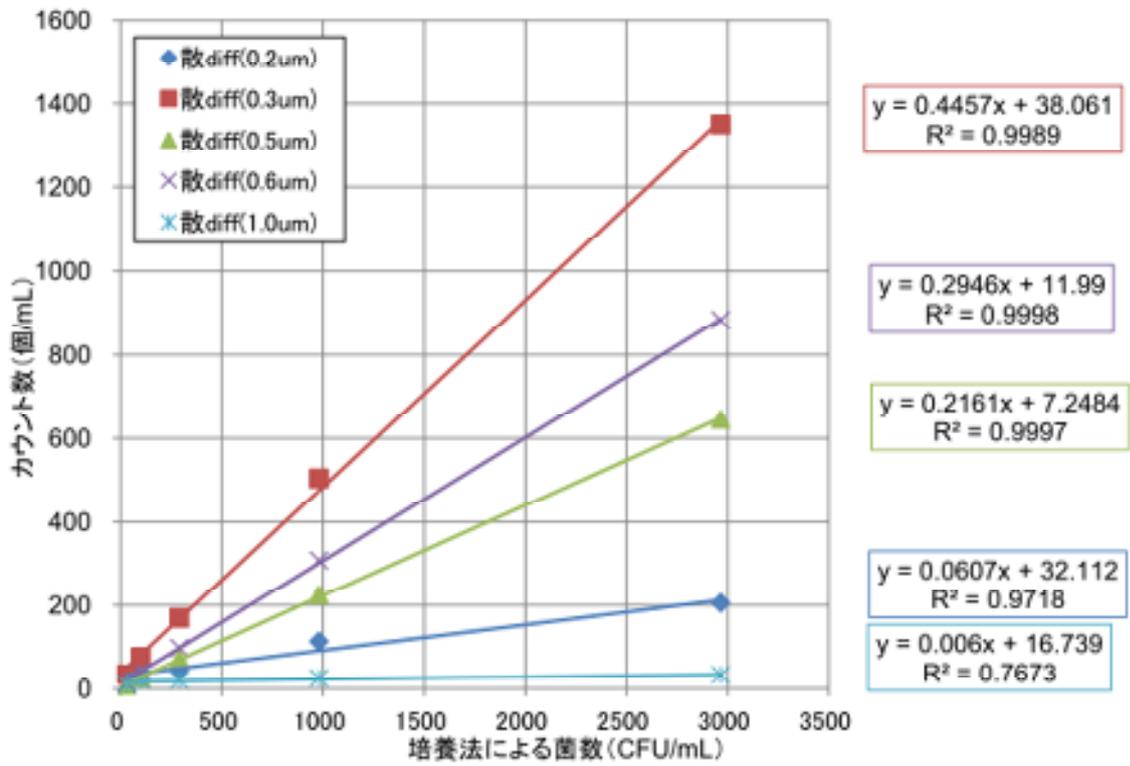


図 34 枯草菌（芽胞）の測定値（散 diff）

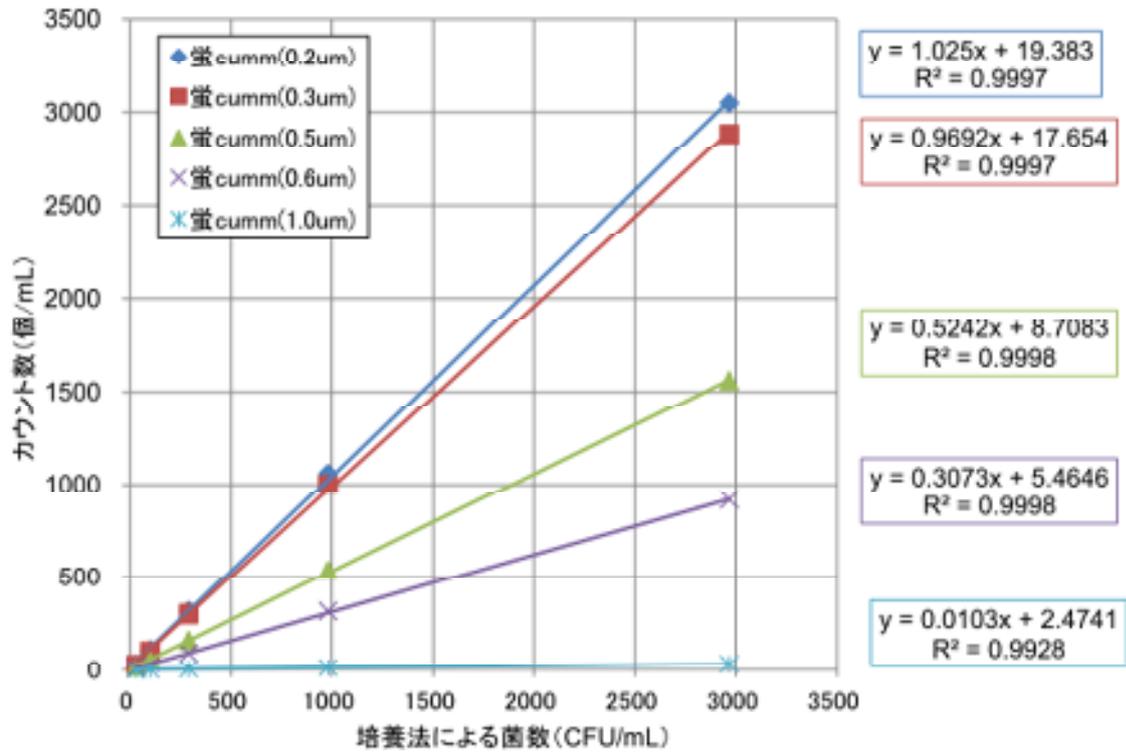


図 35 枯草菌（芽胞）の測定値（蛍 c u m m）

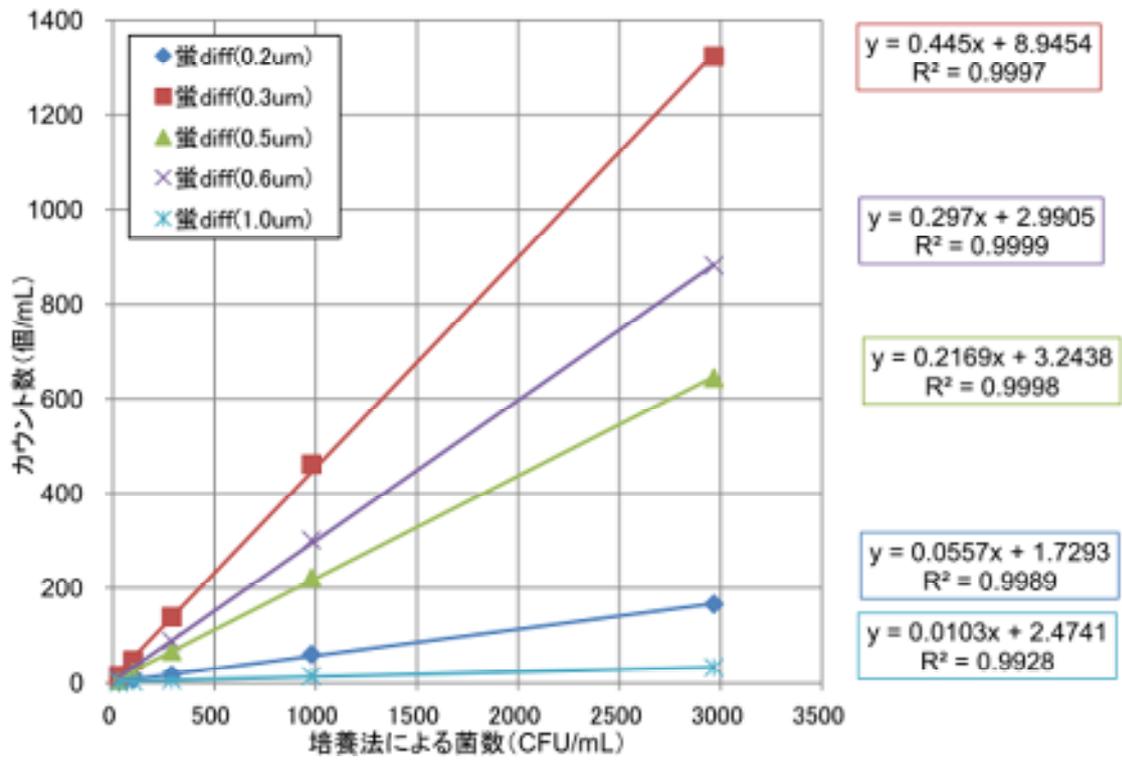


図 36 枯草菌（芽胞）の測定値（蛍 diff）

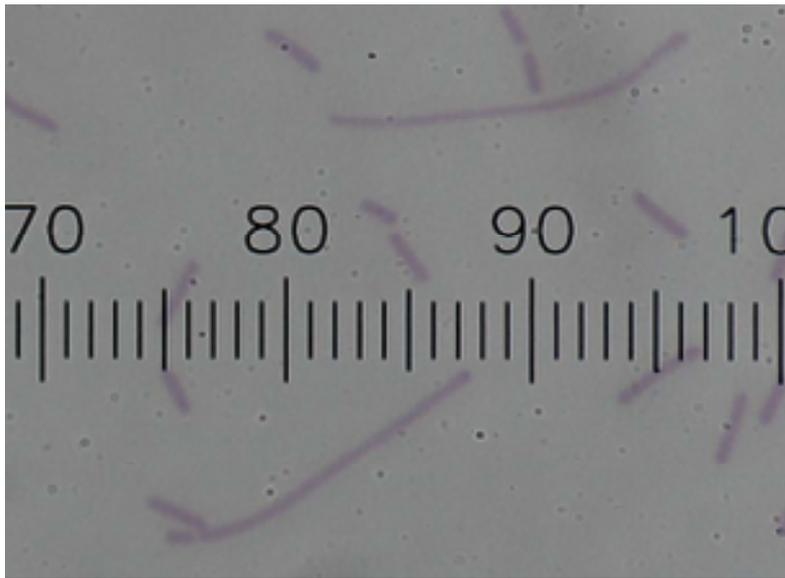


図 37 緑膿菌 (1 目盛 = 1  $\mu$ m)

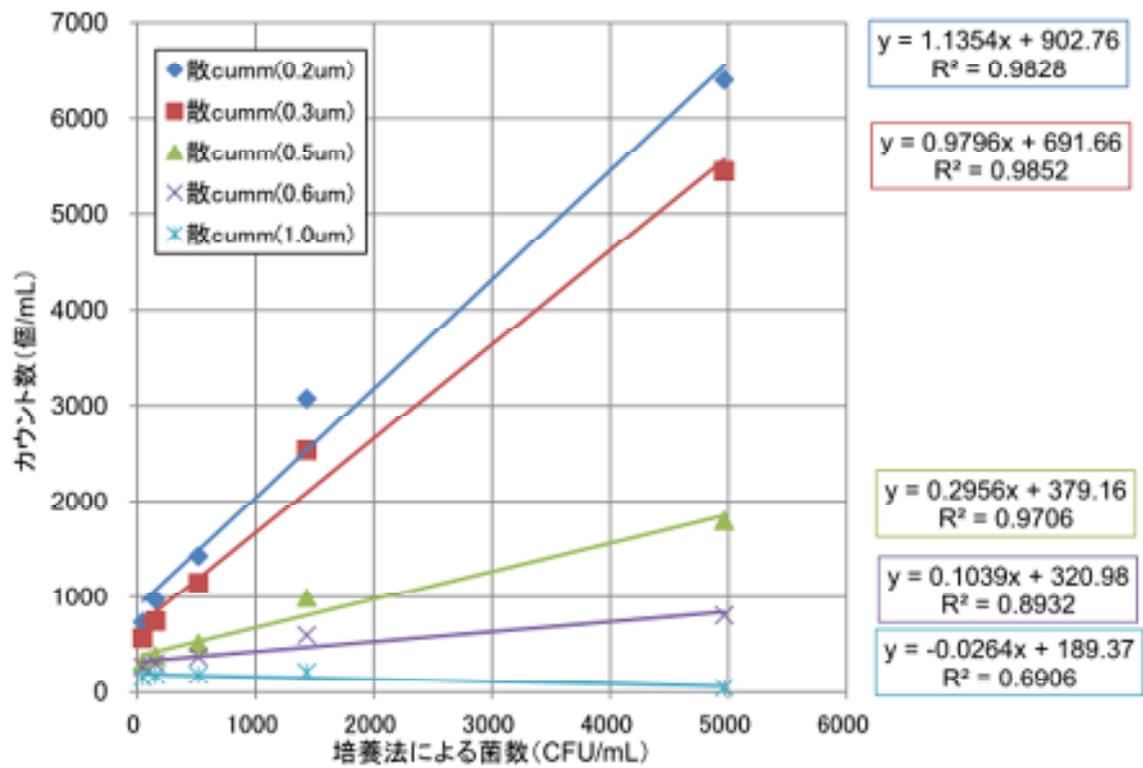


図 38 緑膿菌の測定値 (散cumm)

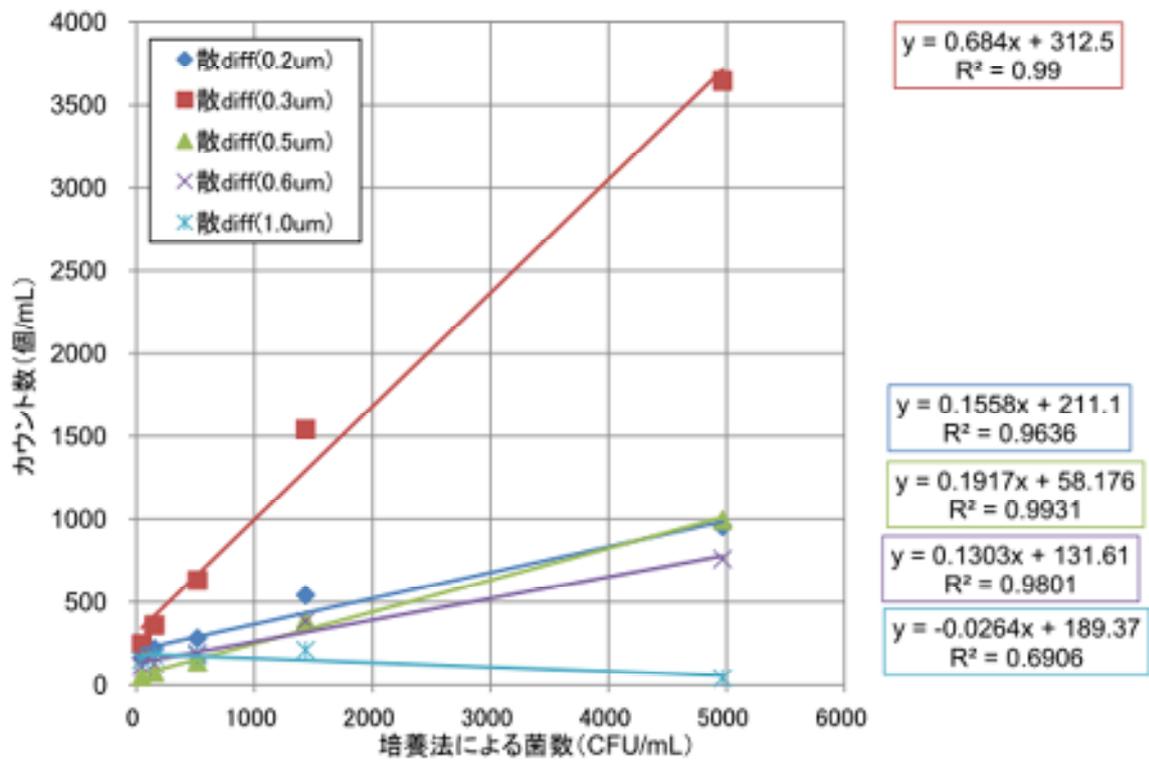


図 39 緑膿菌の測定値 (散 diff)

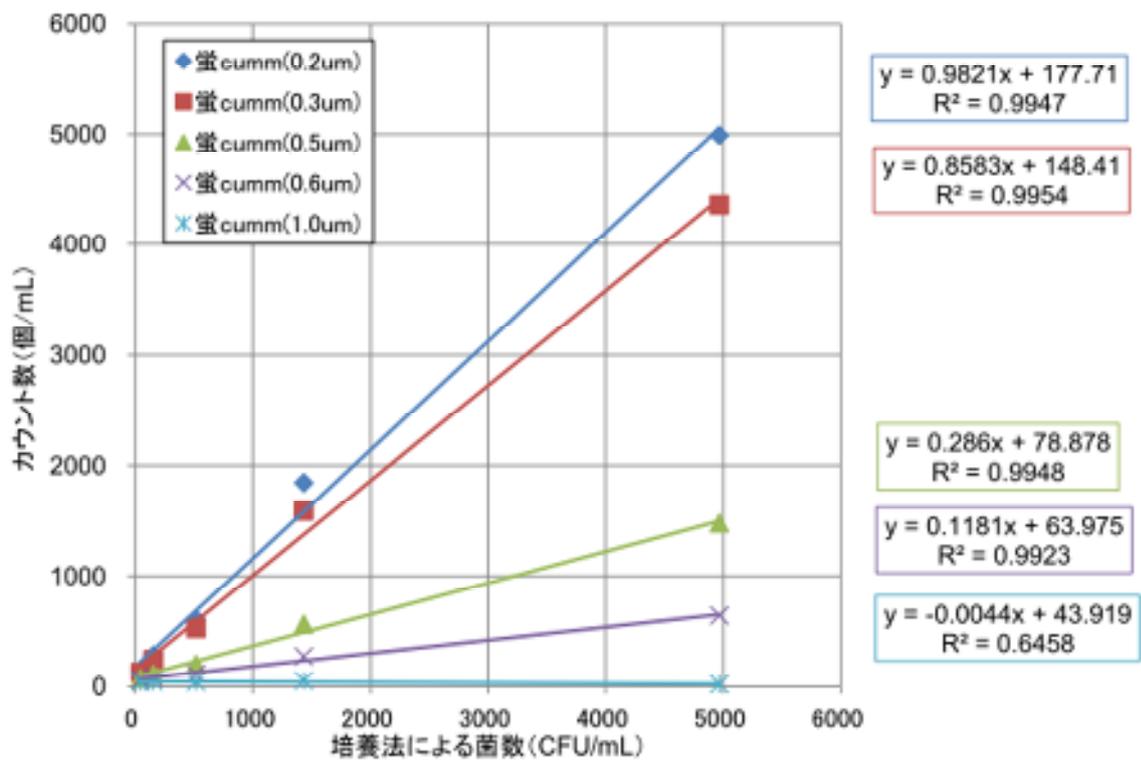


図 40 緑膿菌の測定値（蛍 cumm）

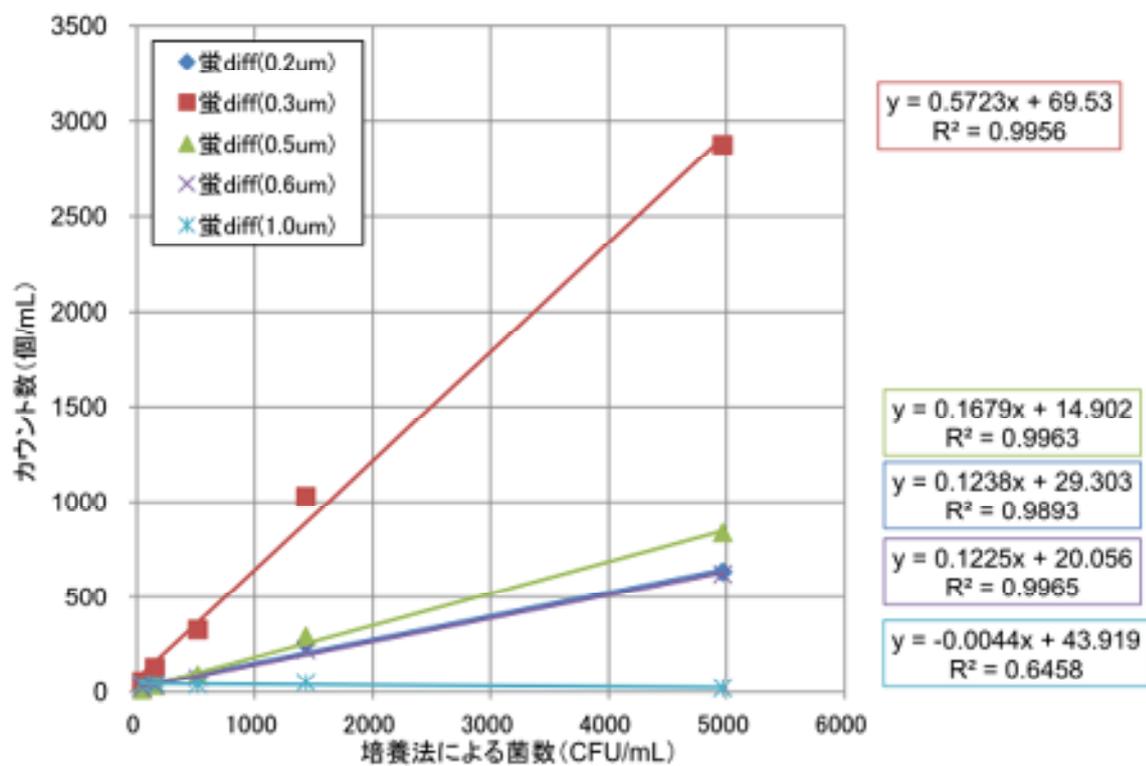


図 41 緑膿菌の測定値 (蛍 diff)

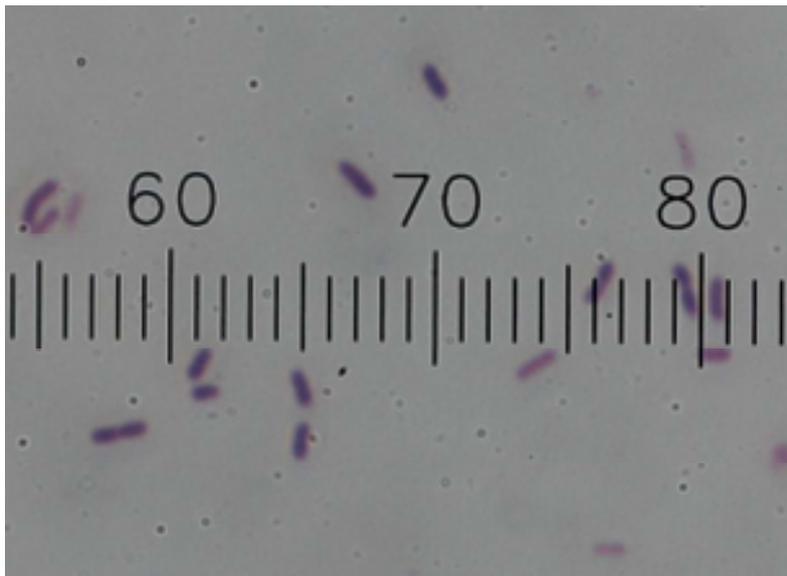


图 42 萤光菌 (1 目盛 = 1  $\mu$ m)

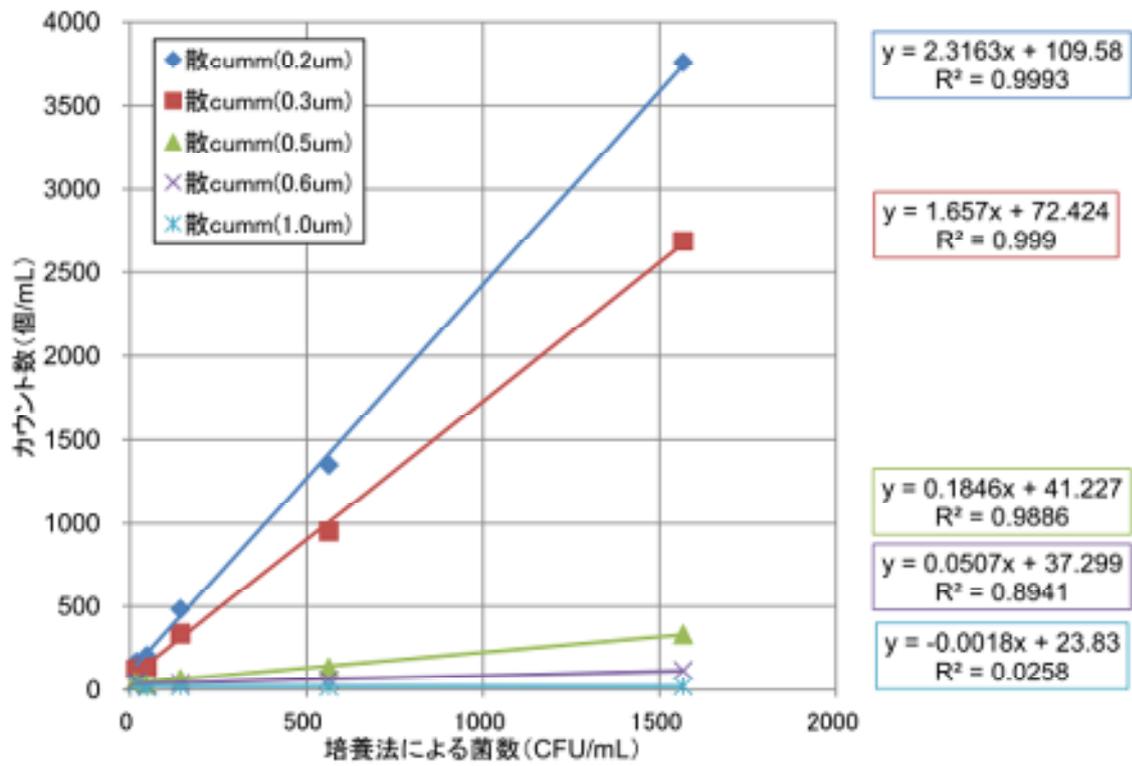


図 43 蛍光菌の測定値（散 cumm）

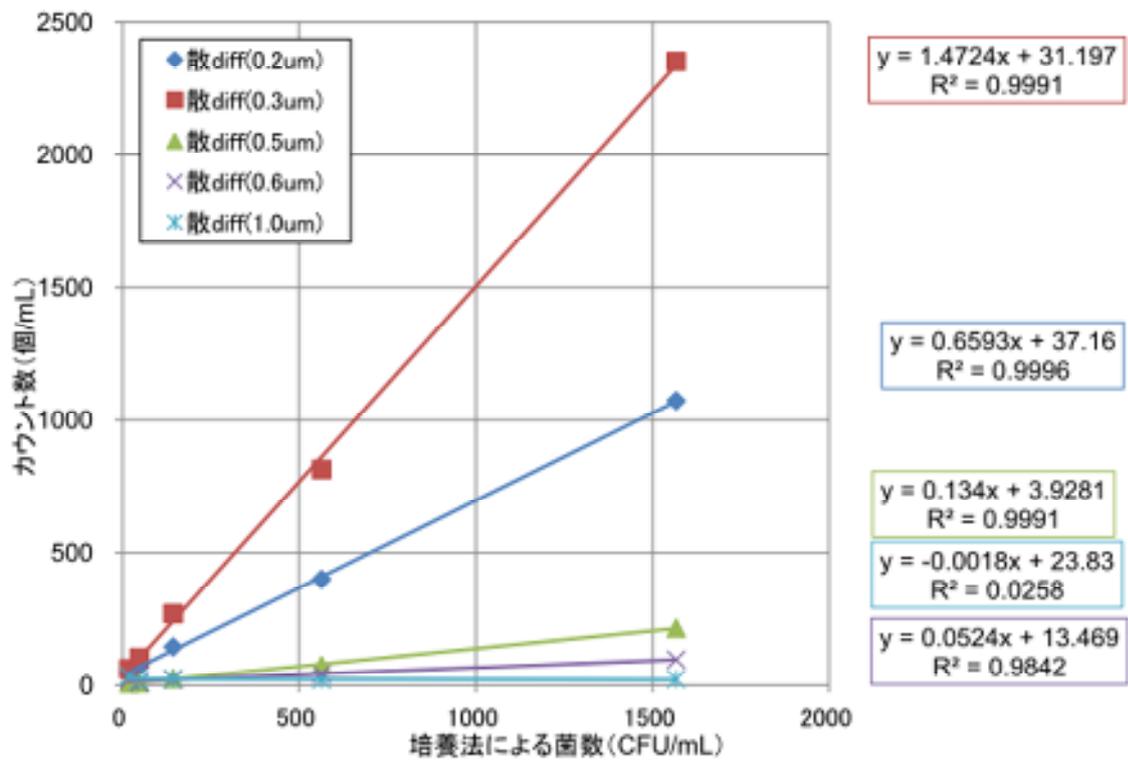


図 44 蛍光菌の測定値 (散 diff)

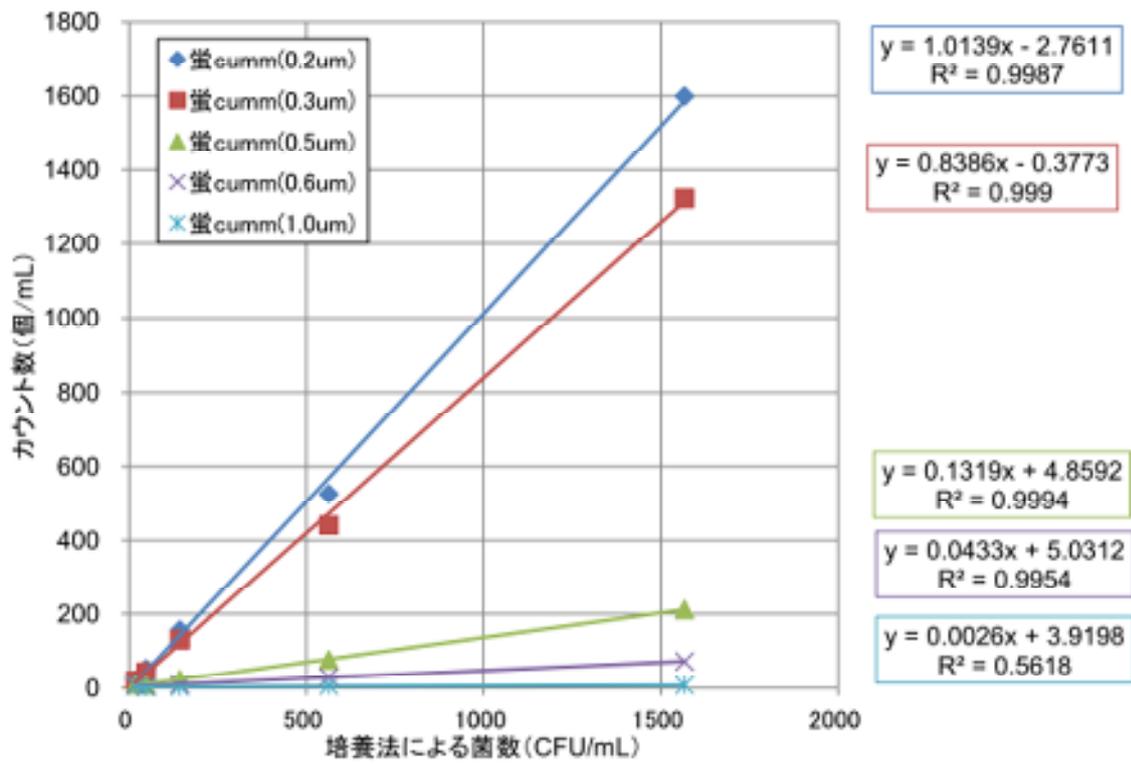


図 45 蛍光菌の測定値 (蛍 cumm)

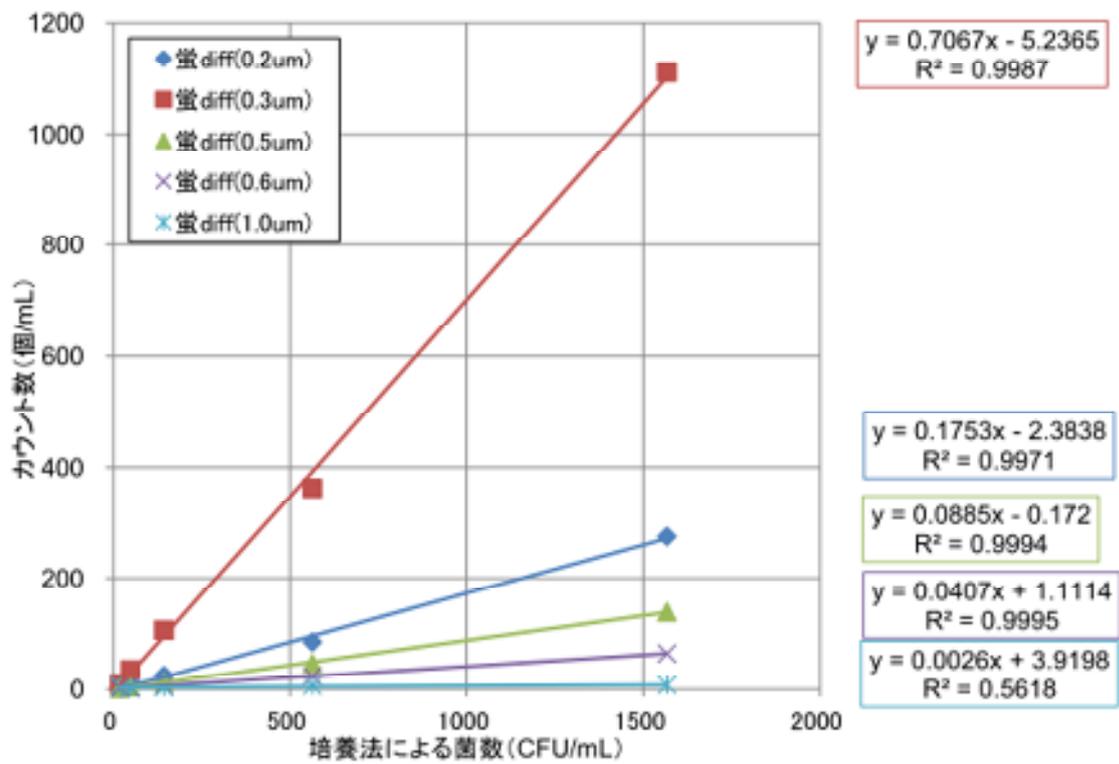


図 46 蛍光菌の測定値 (蛍 diff)

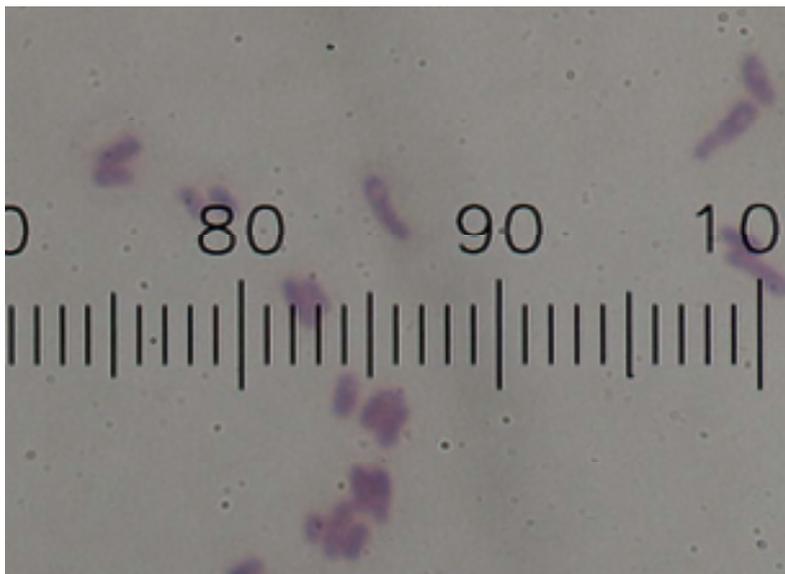


図 47 黄色ブドウ球菌 (1 目盛 = 1  $\mu$ m)

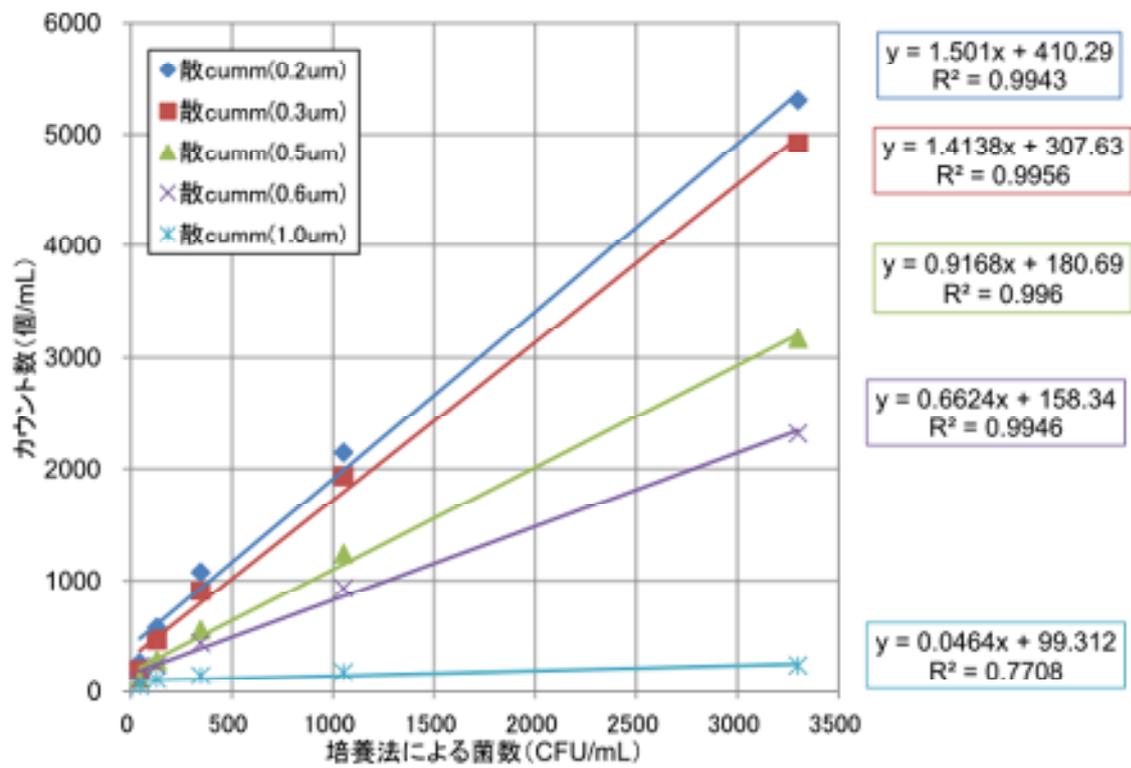


図 48 黄色ブドウ球菌の測定値 (散 cumm)

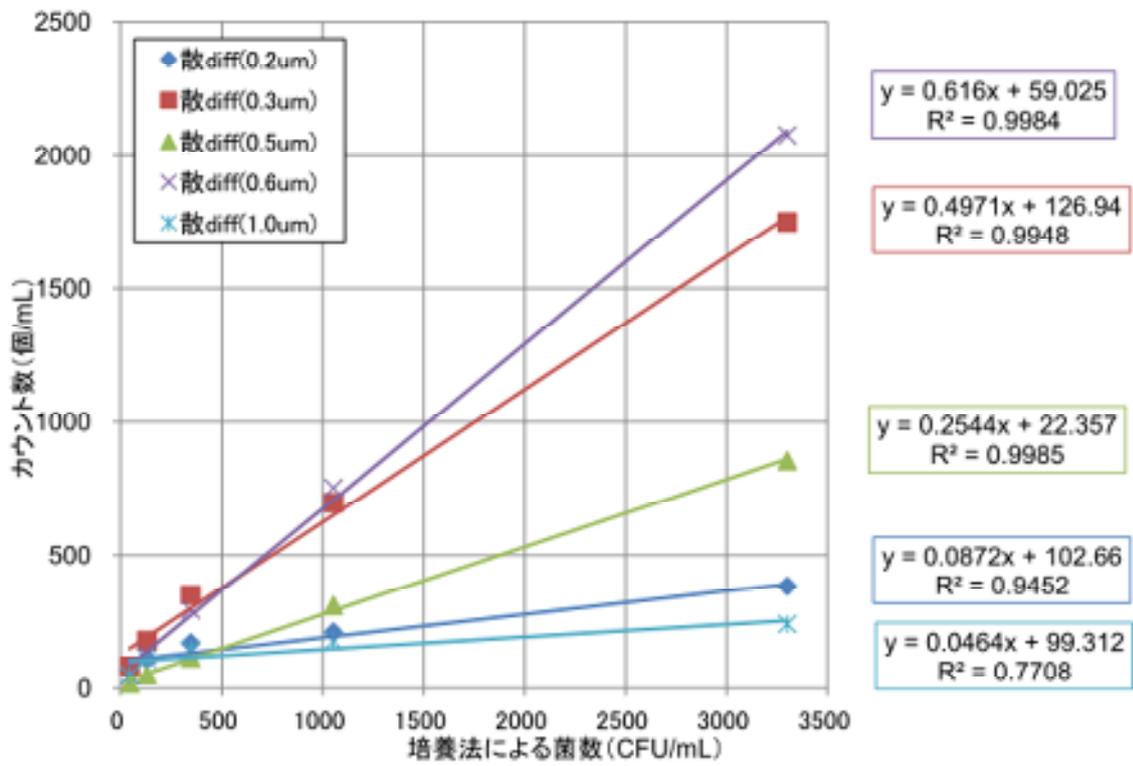


図 49 黄色ブドウ球菌の測定値 (散 diff)

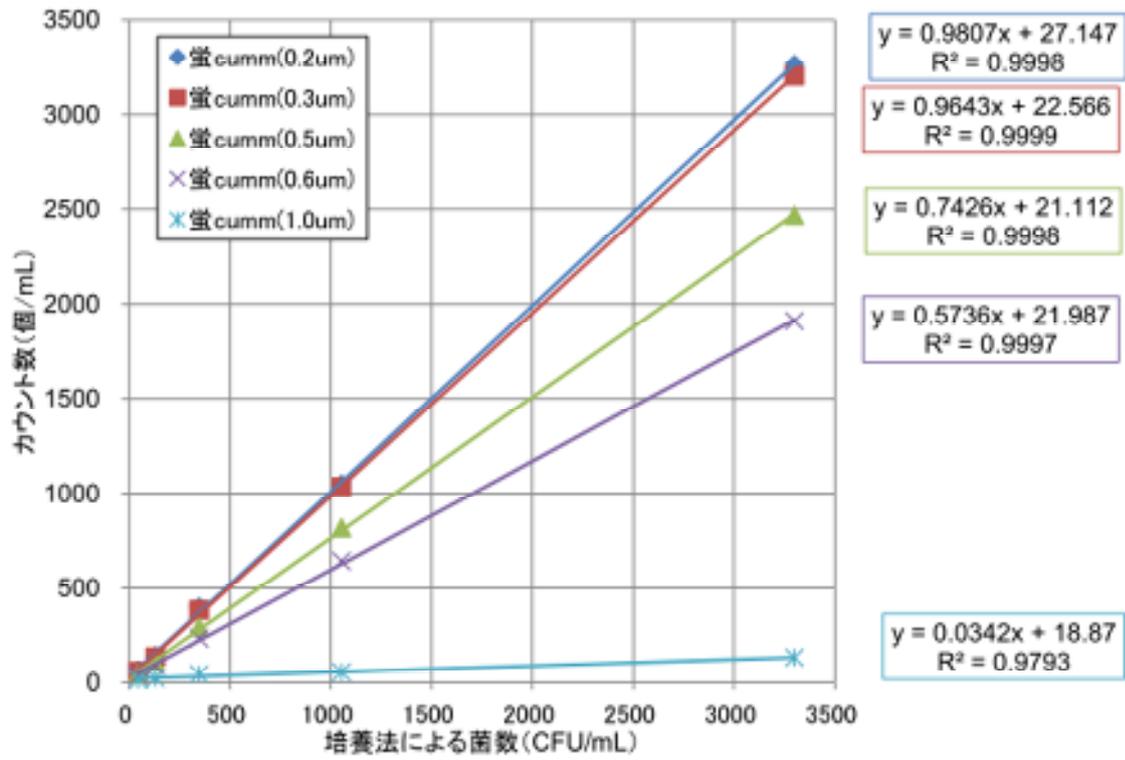


図 50 黄色ブドウ球菌の測定値 (蛍 cumm)



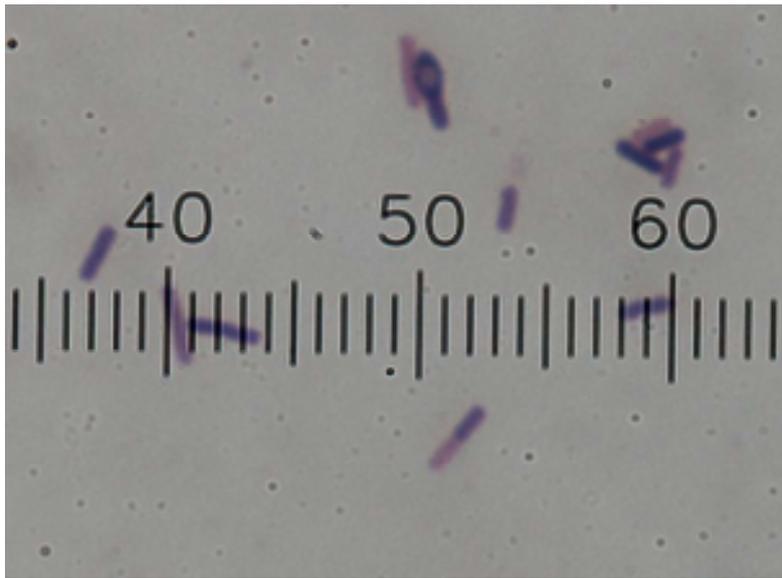


図 52 コリストリジウム (1目盛=10 μm)

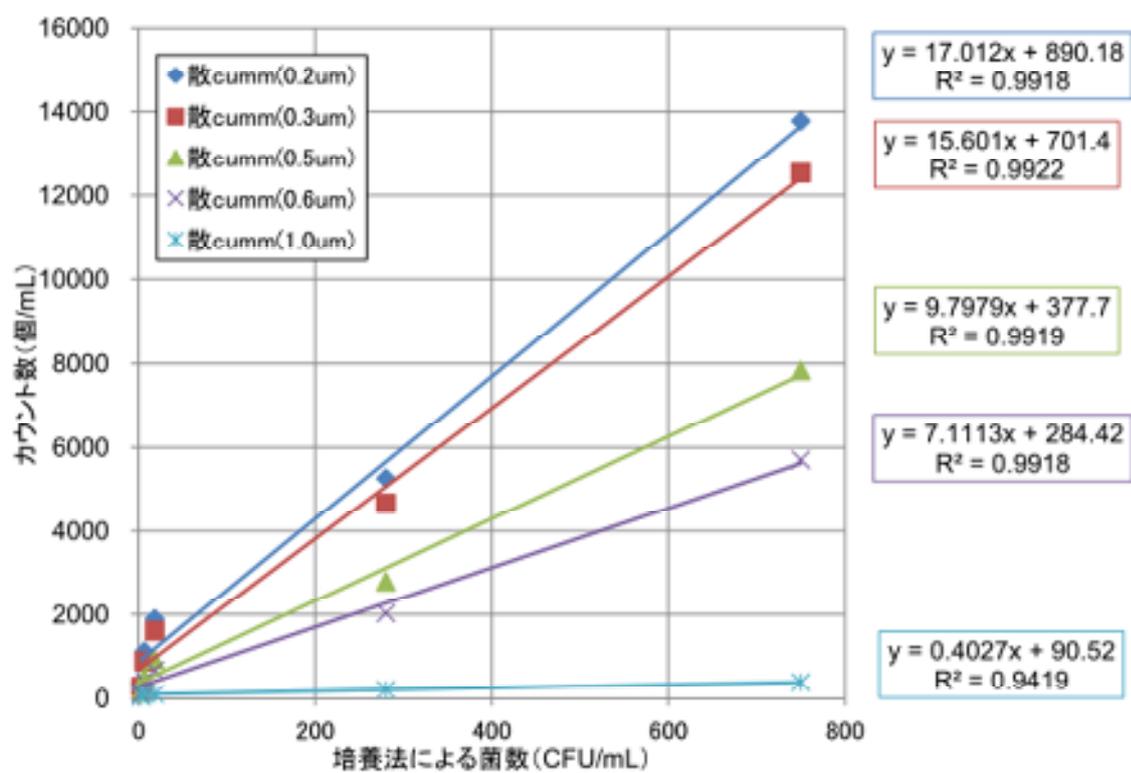


図 53 クリストリジウムの測定値 (1回目、散cumm)

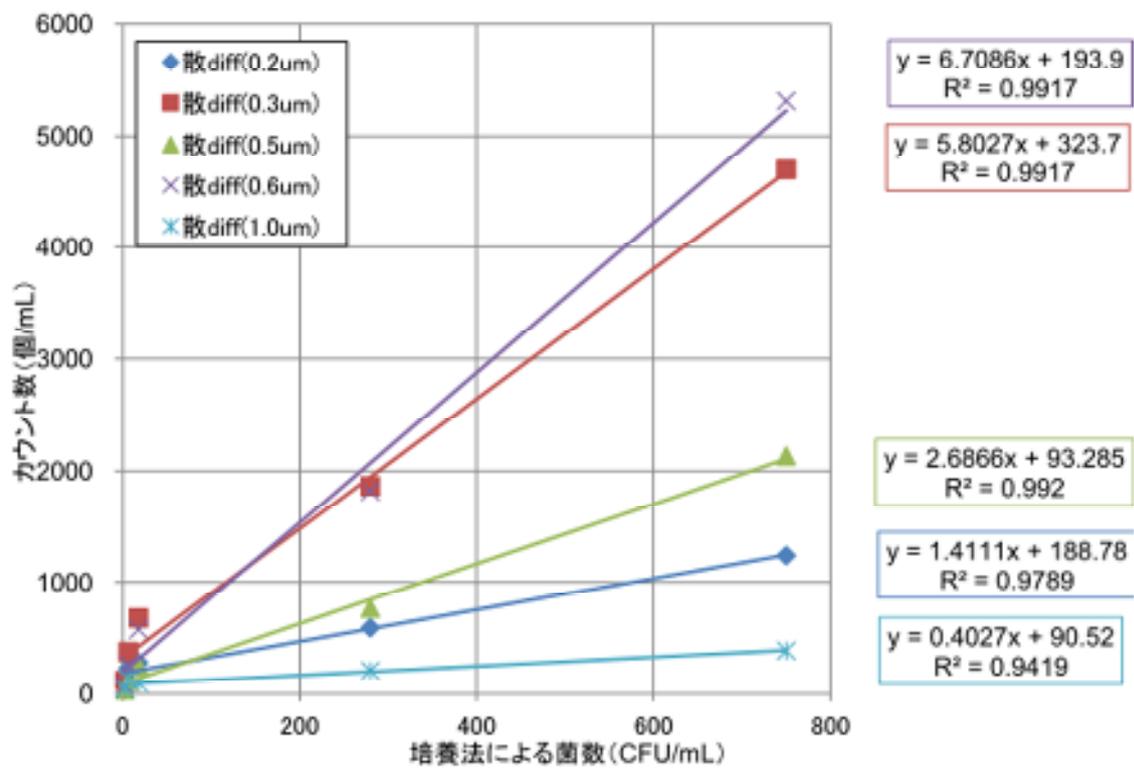


図 54 クリストリジウムの測定値（1回目、散 diff）

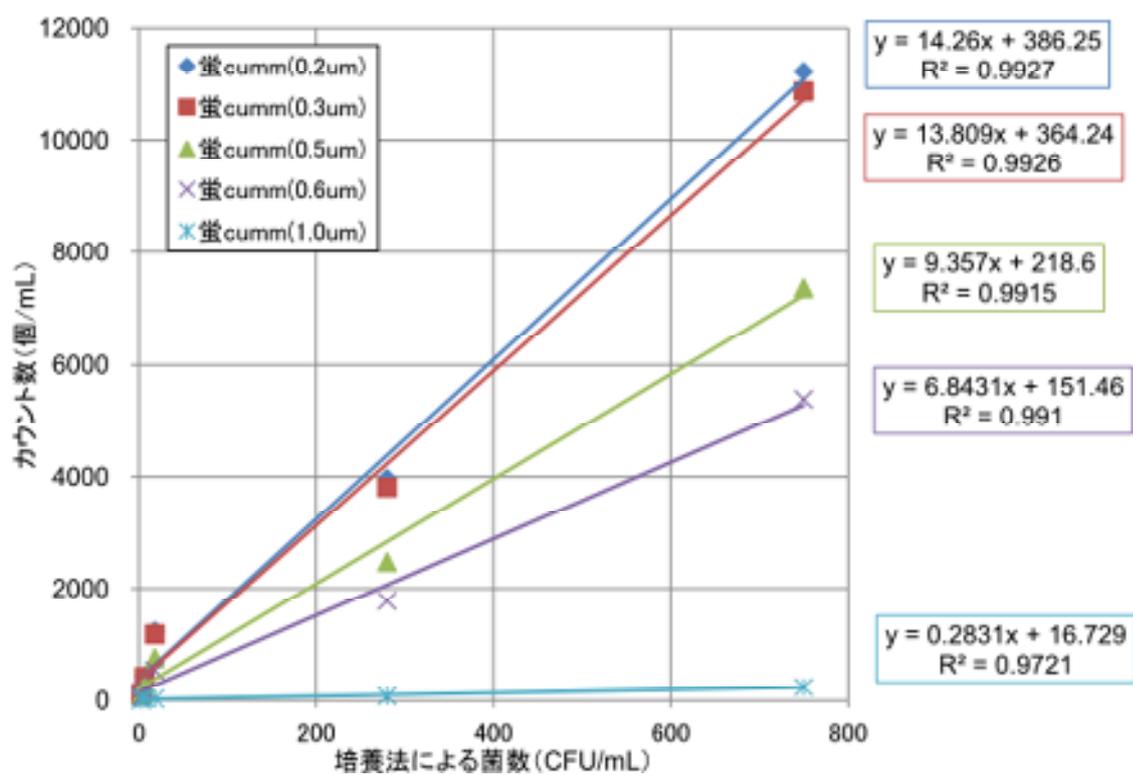


図 55 クリストリジウムの測定値 (1 回目、蛍 cumm)

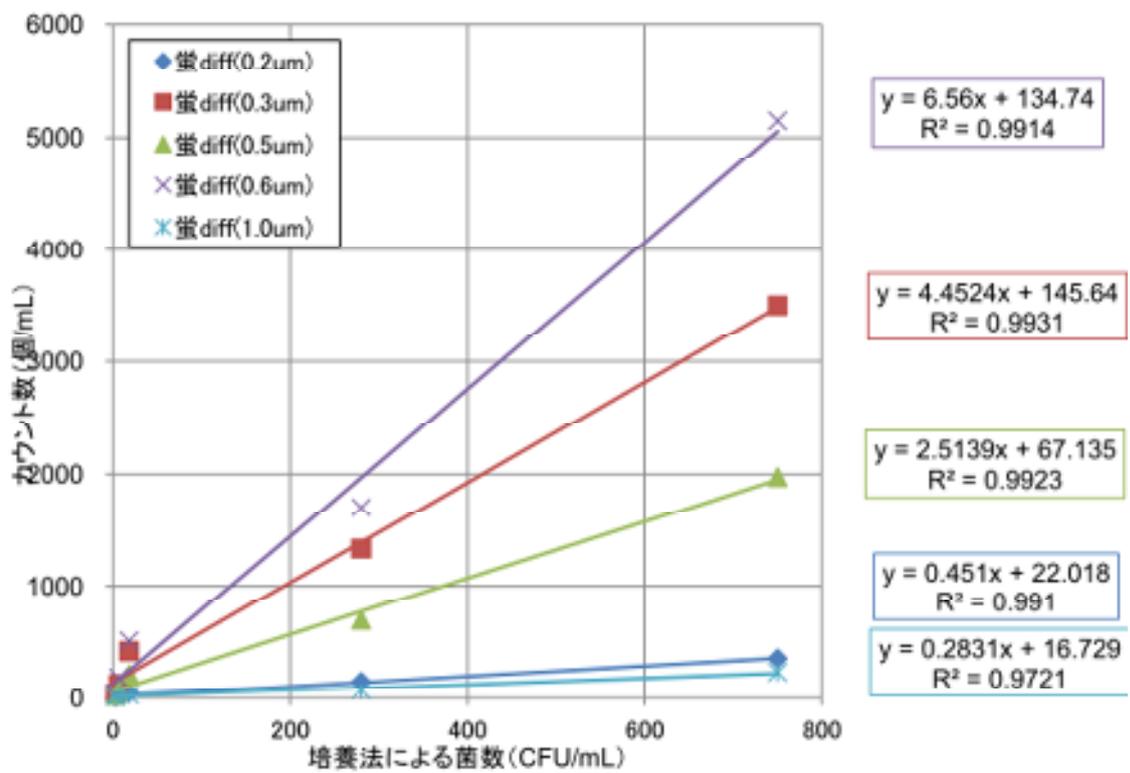


図 56 クリストリジウムの測定値 (1回目、蛍 diff)

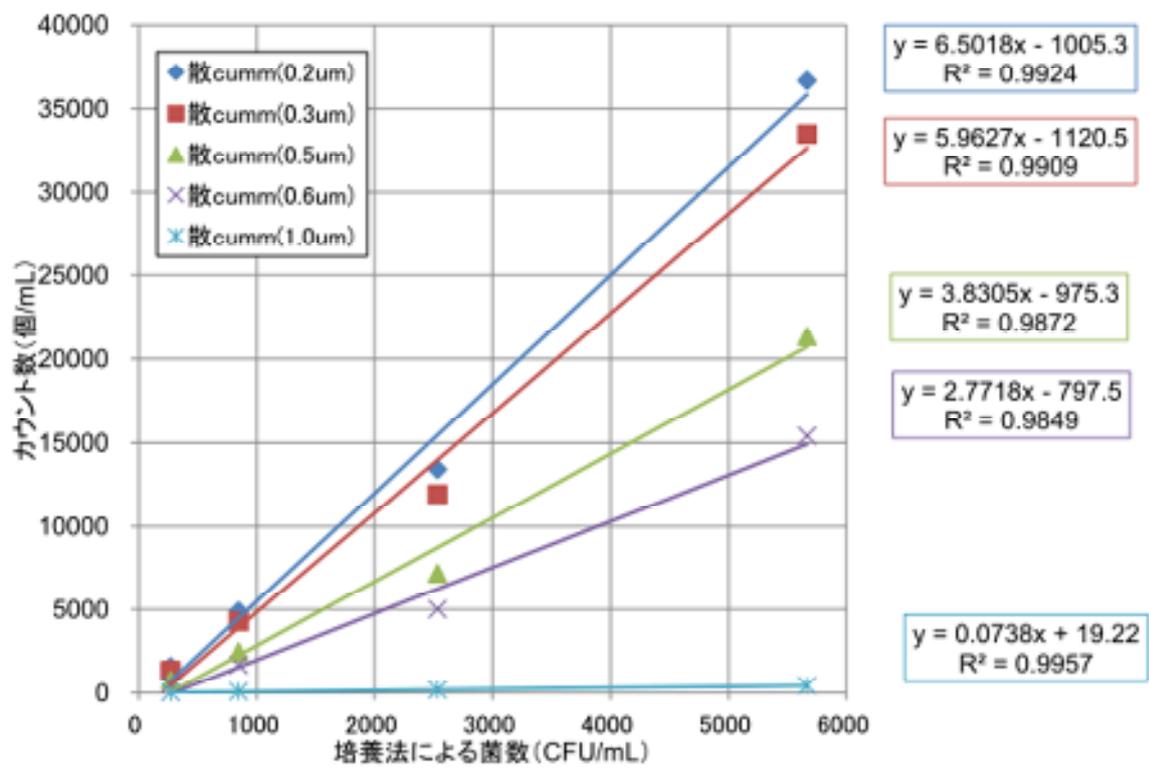


図 57 クリストリジウムの測定値（2回目、散cumm）

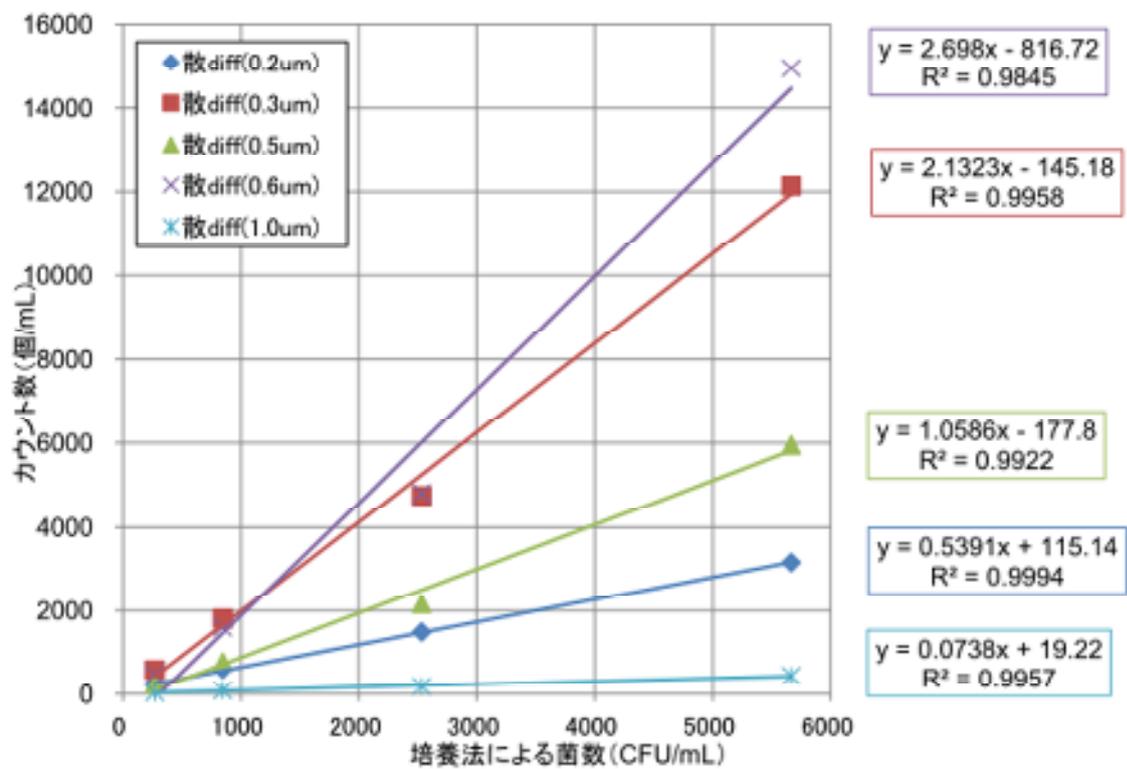


図 58 クリストリジウムの測定値 (2 回目、散 diff)

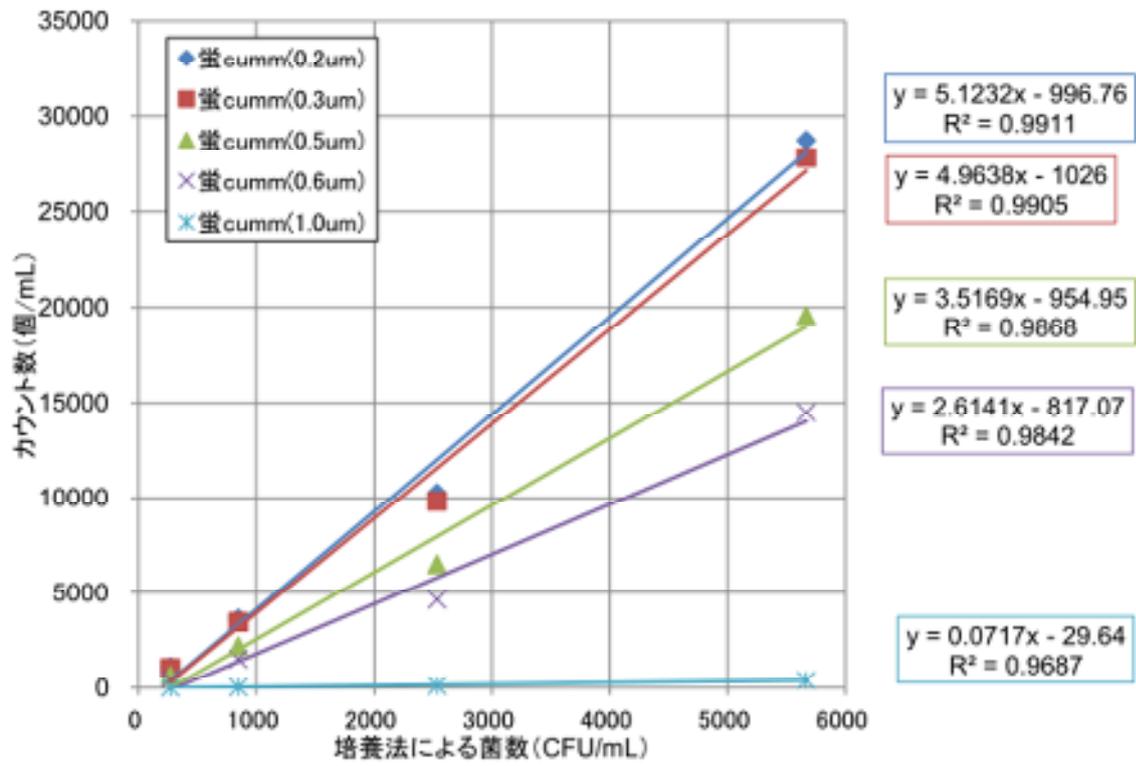


図 59 クリストリジウムの測定値（2回目、蛍 cumm）

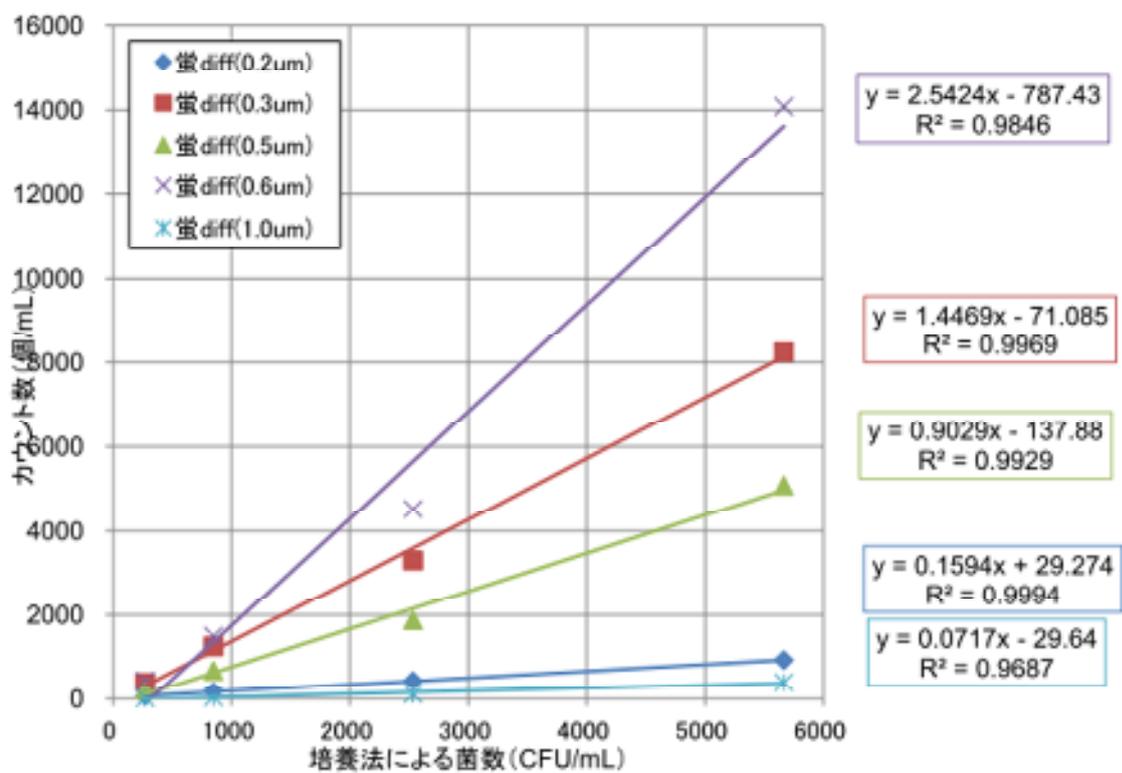


図 60 クリストリジウムの測定値 (2回目、蛍 diff)

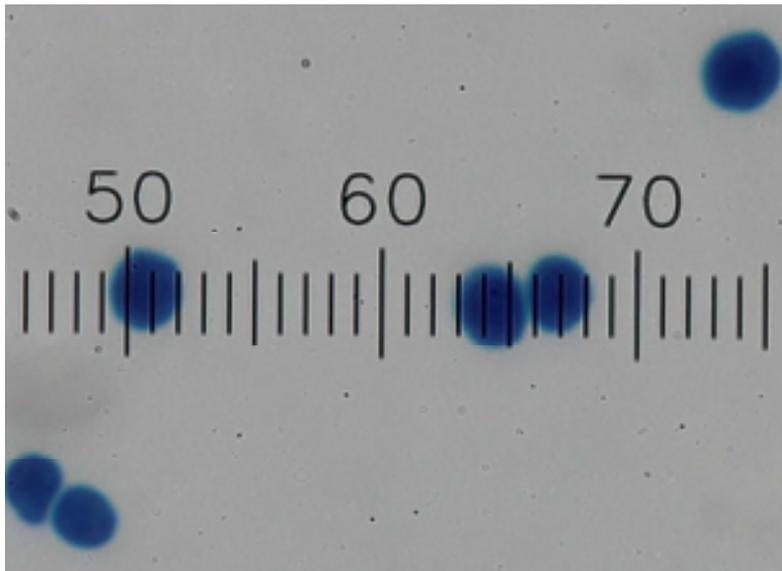


図 61 カンジダ (1 目盛 = 1  $\mu$ m)

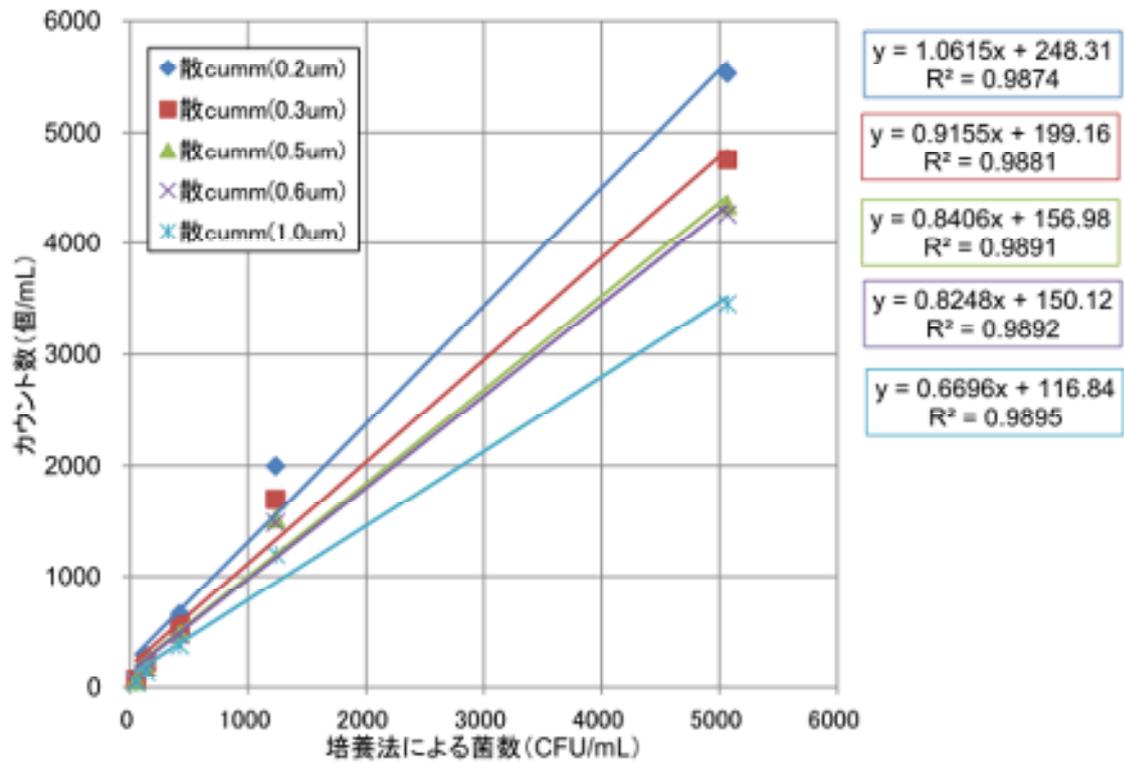


図 62 カンジダの測定値 (散 cumm)

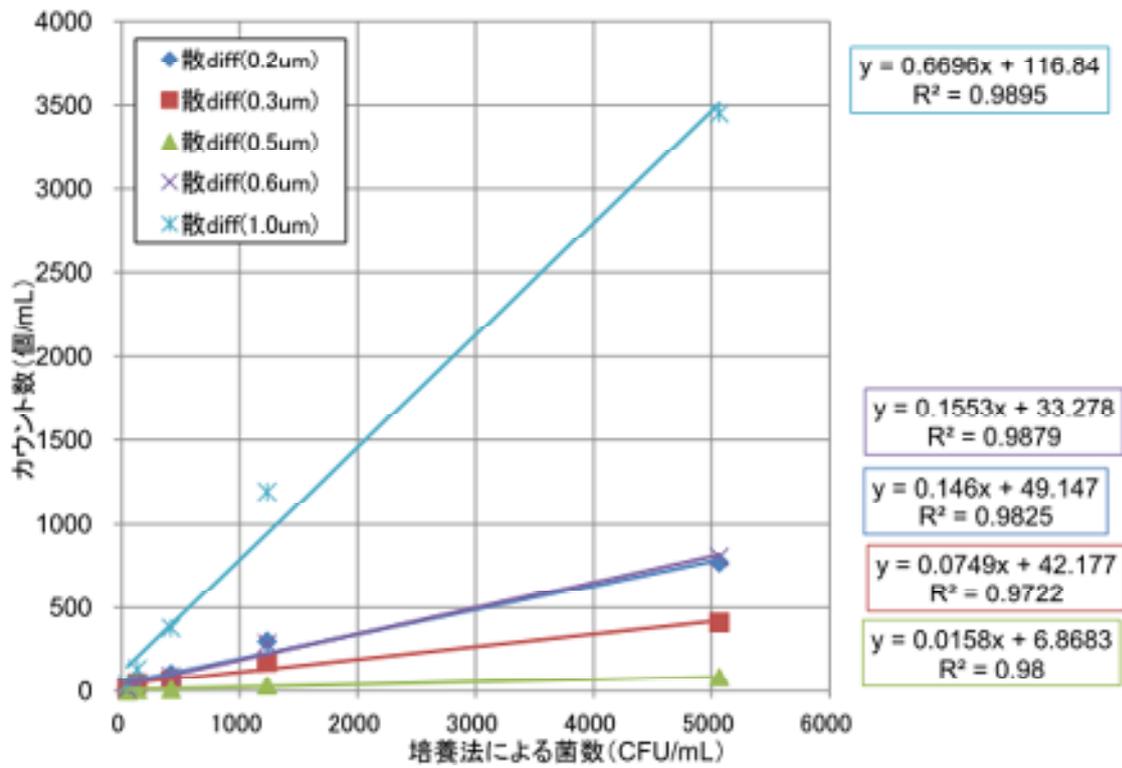


図 63 カンジダの測定値 (散 diff)

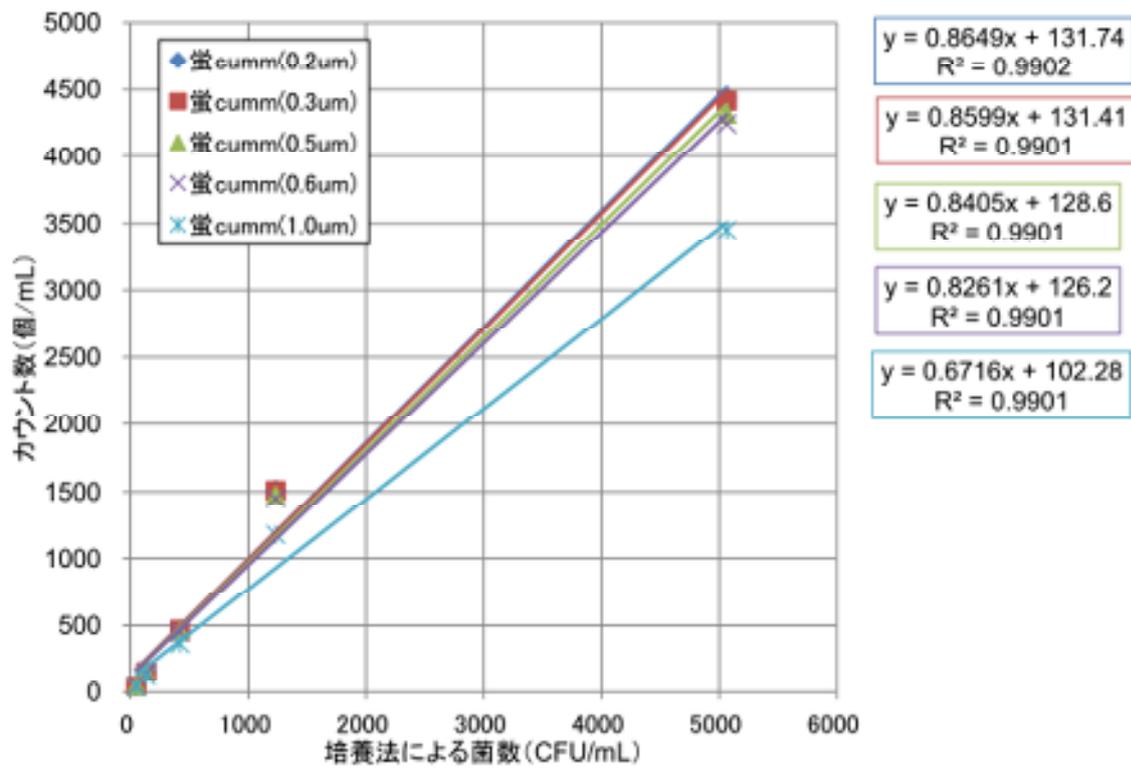


図 64 カンジダの測定値（蛍 cumm）

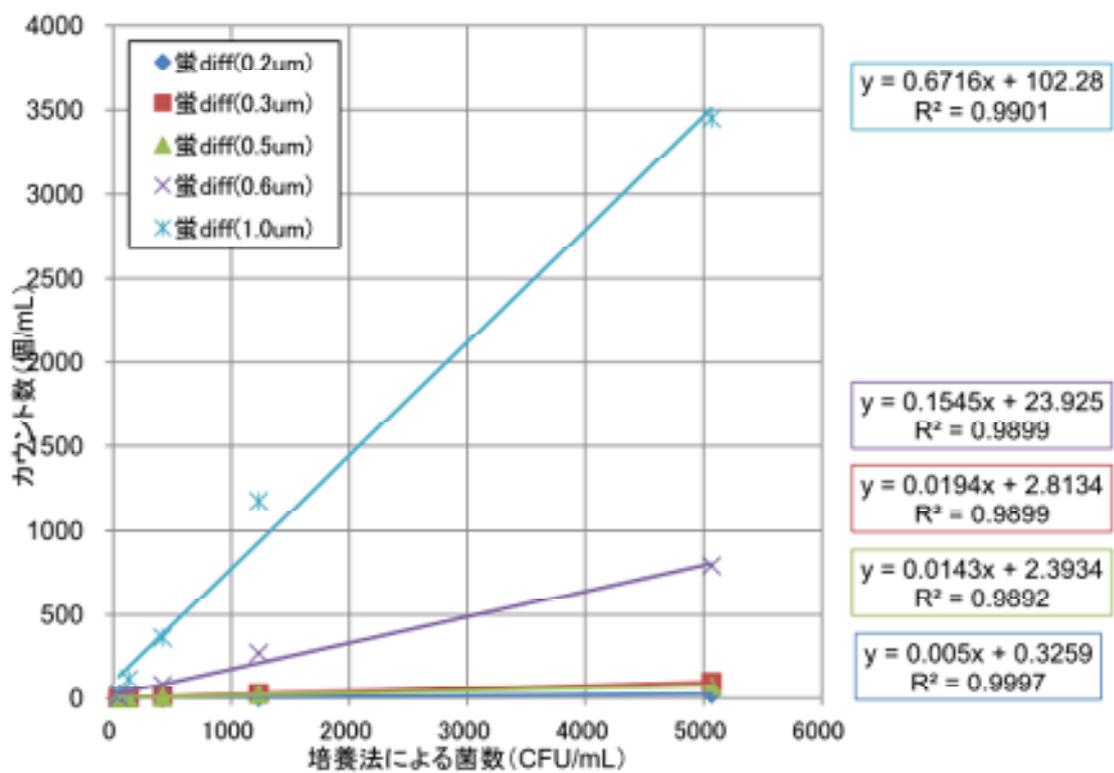


図 65 カンジダの測定値 (蛍 diff)

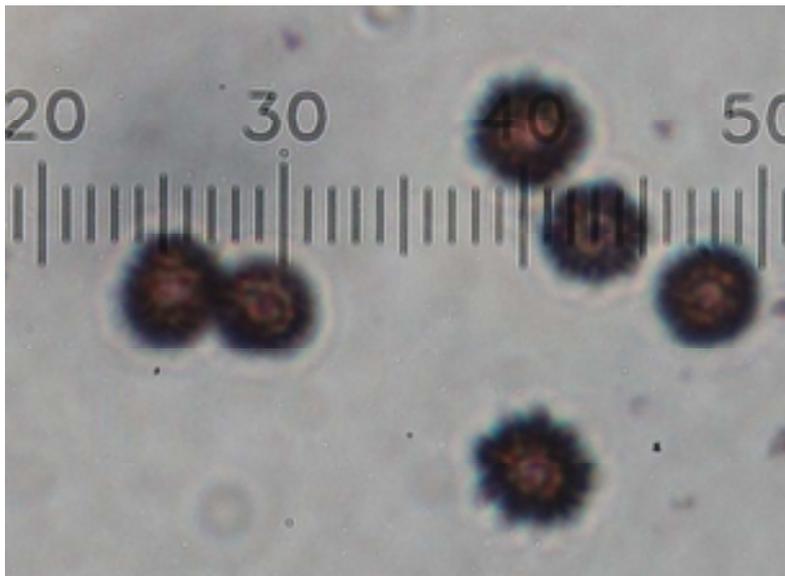


図 66 クロコウジカビ（孢子）（1目盛=1 m）

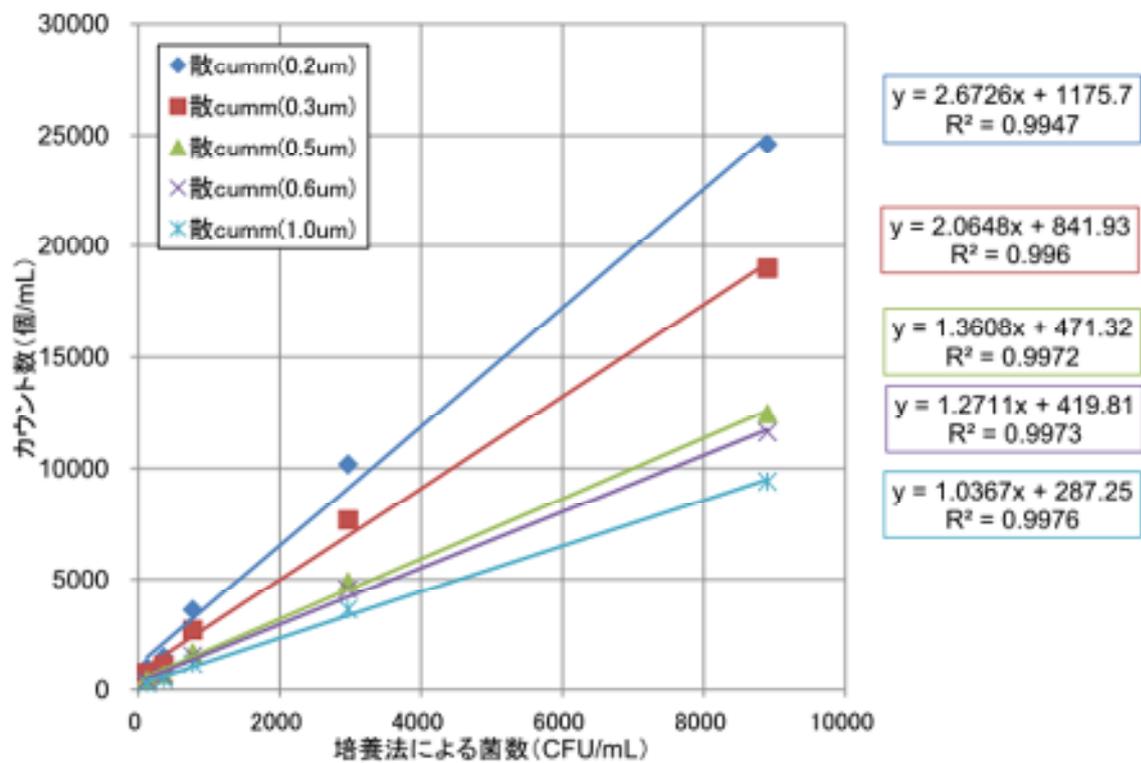


図 67 クロウジカビ（孢子）の測定値（散 cumm）

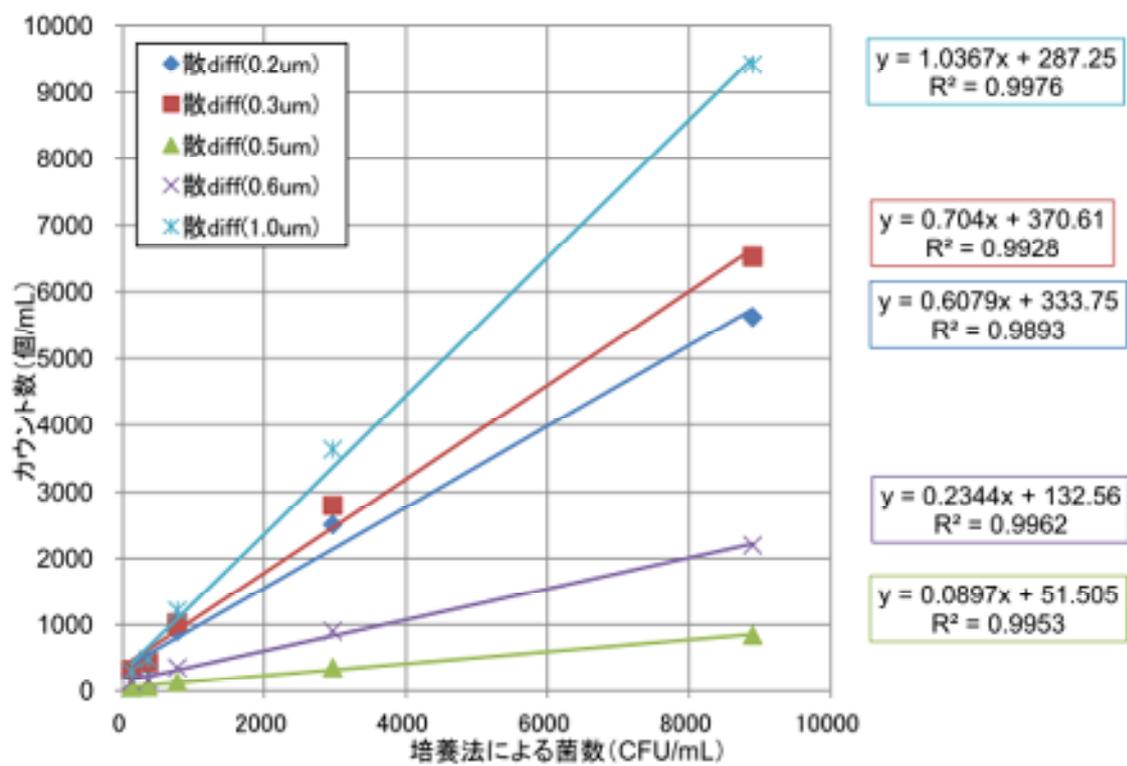


図 68 クロウジカビ（孢子）の測定値（散 diff）

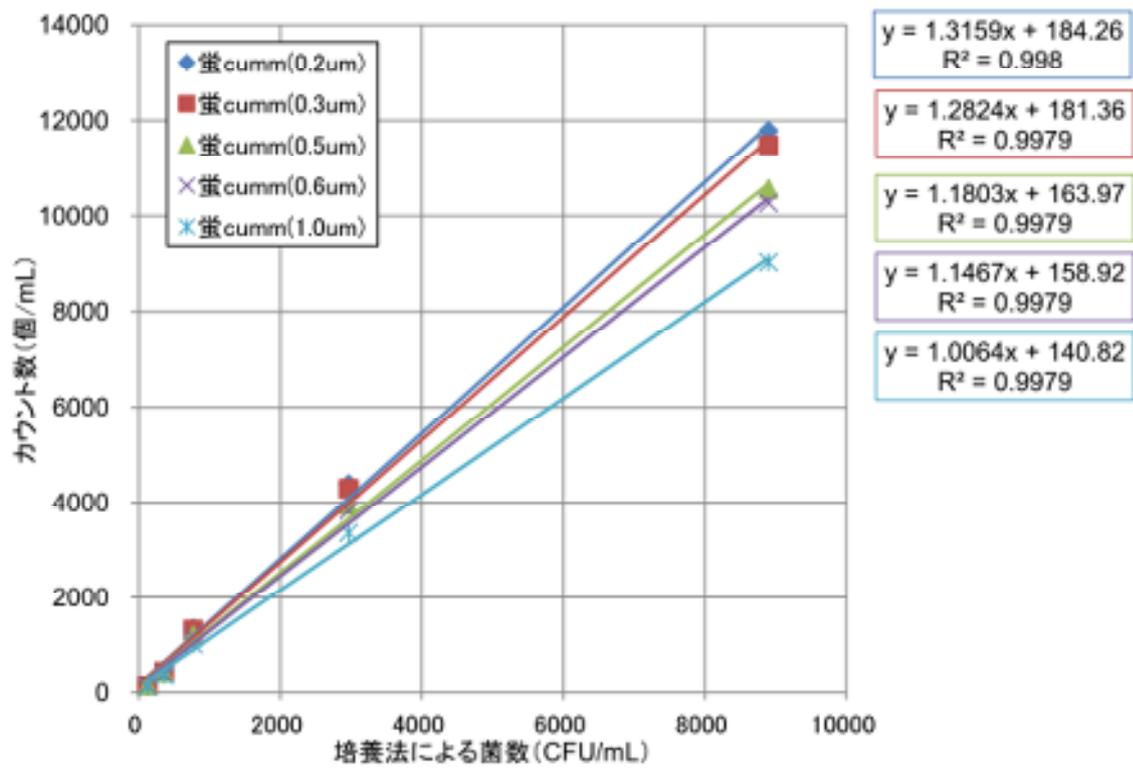


図 69 クロウジカビ（孢子）の測定値（篩 cumm）

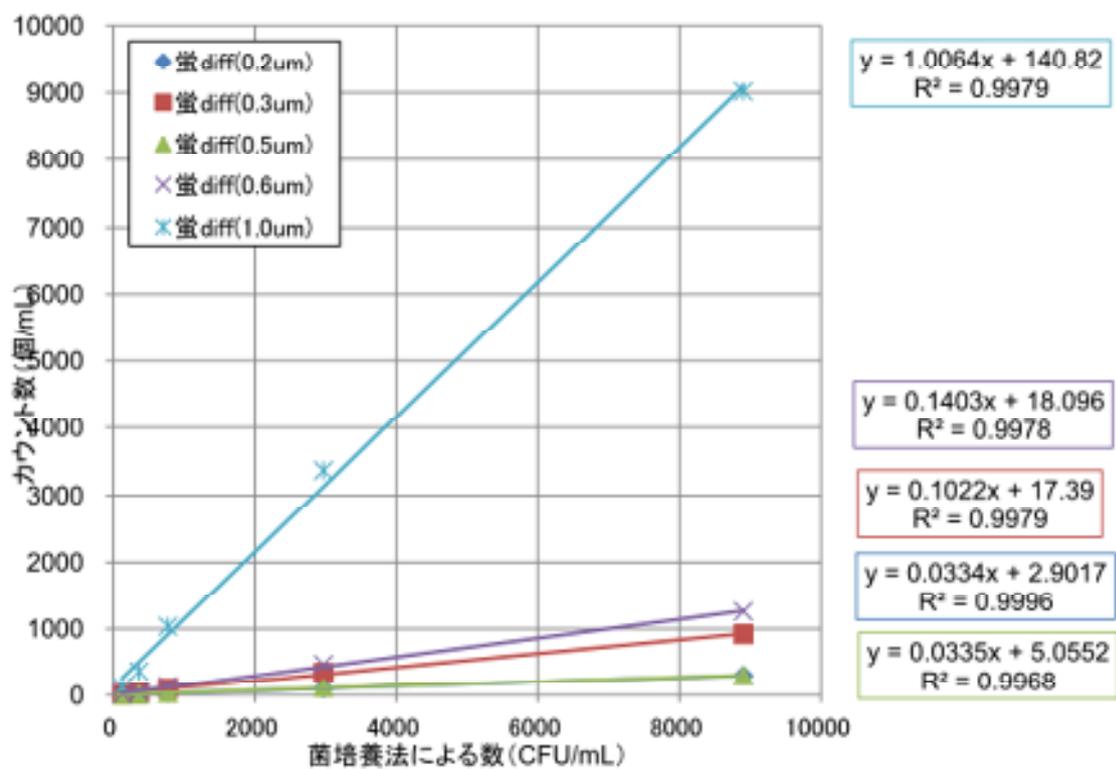


図 70 クロコウジカビ（孢子）の測定値（蛍 diff）

表 1 本邦の透析液水質基準の変 と欧米の透析液水質基準

発表者	発表年	種類	細菌数 (CFU/mL)	エンドトキシン (EU/mL)
日本透析医学会	1995	透析液	< 100	< 0.25
透析医学会 (AK 100 ultra)	1998	希釈用水	< 100	< 0.25
		透析液 置換液	< 0.1 < 0.001	< 0.1 < 0.001(ND)
日本透析医学会	2001	透析液	規定なし	< 0.05
ANSI/AAMI	2002	希釈用水	< 200	< 2
		透析液	< 200	< 2
ISO	2002	希釈用水	< 100	< 5
		透析液	規定なし	< 1
ERA/EDTA	2002	通常透析液	< 100	< 0.25
		ultra-pure 透析液	< 0.1	< 0.03(ND)
		輸液用透析液	< 10~6	< 0.03(ND)
ANSI/AAMI	2004	希釈用水	< 200	< 2
		透析液	< 200	< 2
		ultra-pure 透析液	< 0.1	< 0.03(ND)
		輸液用透析液	< 10~6	< 0.03(ND)
日本透析医学会	2005	希釈用水	別途規定	< 0.05
		透析液(通常HD)	別途規定	< 0.05
		透析液(内部濾過促進HD)	別途規定	< 0.01
		透析液(大量置換HDF)	別途規定	< 0.001(ND)
		置換液	別途規定	< 0.001(ND)

ND : not detected

表 2 日本透析医学会水質基準および関連団体からの指

	日本透析医学会基準2008		日本臨床工学技士会 透析液清浄化ガイドラインVer2.00		ISO 11663	
	生菌数 (CFU/mL)未満	ET活性値 (EU/mL)未満	生菌数 (CFU/mL)未満	ET活性値 (EU/mL)未満	生菌数 (CFU/mL)未満	ET活性値 (EU/mL)未満
透析用水 Dialysis water	100	0.05	10 目標 1	0.01 目標 0.001	100 アクション レベル50	0.25
透析液 Dialysis fluid	100	0.05	0.1	0.001	100 アクション レベル50	0.5
超純粋透析液 Ultrapure Dialysis fluid	0.1	0.001			0.1	0.03
置換用透析液 Substitution	10 <sup>-6</sup> 超純粋透析液を 担保	0.001 検出限界未満	専用装置製造販売メーカーの定める管理基準に準じるが、透析用水生物学的汚染管理基準の目標値と専用装置入口は透析液生物学的汚染管理基準の水質レベルを推奨する。また、臨床運用にあたっては各施設の透析機器安全管理委員会で適切に管理する。		適切な局方の要求事項に準じ、生存する微生物がないこと	0.03 検出限界未満
生菌数測定 検体量	・Ultrapure Dialysis fluid 10 mL以上		・透析用水 1~100 mL ・透析液 1~100 mL ・逆濾過透析液応用全自動装置 50~100 mL		・透析液10~25 mL以上1000 mL	
測定頻度	・透析用水:1回/3カ月 ・透析液:2台/月以上、1年で全台 ・オンライン補充液:ET活性値2か所/月、生菌2台/月以上、1年で全台		・透析用水:1回/月以上 ・透析液:月1回以上、1年で全台 ・逆濾過透析液応用全自動装置 オンラインHDF/HF:メーカーの添付文書に記載された管理基準に準ずる。		・サンプリングスケジュールは、各装置が少なくとも年1回サンプリングされるようにし、頻度は月1回モニタリングすることが多い	



表 4 RO 水製造工程内の細菌現存量と ET 活性

Sample A	TDC (cells/100ml)		CFDA (cells/100ml)		mCFU (mCFU/100ml)	CFU (CFU/100ml)	Endotoxin (EU/l)		
原水	1.7	10 <sup>7</sup>	1.7	10 <sup>6</sup>	N.D.	43	1.0	10 <sup>4</sup>	
軟水化処理水	1.1	10 <sup>7</sup>	1.4	10 <sup>6</sup>	95	1.1	10 <sup>2</sup>	1.4	10 <sup>4</sup>
活性炭処理水	1.5	10 <sup>7</sup>	9.7	10 <sup>5</sup>	4.3	10 <sup>3</sup>	O.G.	2.1	10 <sup>4</sup>
RO膜処理水	N.D.		N.D.		21	64	N.D.		
ROタンク後RO水	N.D.		N.D.		0	0	N.D.		
Sample B	TDC (cells/100ml)		CFDA (cells/100ml)		mCFU (mCFU/100ml)	CFU (CFU/100ml)	Endotoxin (EU/l)		
原水	3.2	10 <sup>6</sup>	2.0	10 <sup>6</sup>	0	N.D.	9.7	10 <sup>3</sup>	
軟水化処理水	1.8	10 <sup>6</sup>	9.2	10 <sup>5</sup>	16	57	1.3	10 <sup>4</sup>	
活性炭処理水	2.1	10 <sup>6</sup>	7.4	10 <sup>5</sup>	1.4	10 <sup>3</sup>	O.G.	2.0	10 <sup>4</sup>
RO膜処理水	N.D.		N.D.		1.5	10 <sup>2</sup>	0	N.D.	
ROタンク後RO水	N.D.		N.D.		0	N.D.	N.D.		
Sample C	TDC (cells/100ml)		CFDA (cells/100ml)		mCFU (mCFU/100ml)	CFU (CFU/100ml)	Endotoxin (EU/l)		
原水	3.9	10 <sup>6</sup>	1.6	10 <sup>6</sup>	N.D.	0	1.3	10 <sup>4</sup>	
軟水化処理水	2.5	10 <sup>6</sup>	1.3	10 <sup>5</sup>	1.1	10 <sup>3</sup>	O.G.	1.1	10 <sup>4</sup>
活性炭処理水	4.6	10 <sup>6</sup>	2.8	10 <sup>6</sup>	O.G.	O.G.	1.9	10 <sup>4</sup>	
RO膜処理水	N.D.		N.D.		32	N.D.	N.D.		
ROタンク後RO水	N.D.		N.D.		N.D.	0	N.D.		

TDC: 全菌数 (DAPI染色: 3分)  
 CFDA: エステラーゼ活性保有菌数 (CFDA染色: 3分)  
 mCFU: マイクロコロニー形成菌数 (R2A培地, 48時間)  
 CFU: コロニー形成菌数 (R2A培地, 168時間)  
 OG: 過度の増殖のため計数不能

表 5 透析液製造工程中の細菌数およびエンドトキシン活性値

		TDC (cells/100ml)	CFDA (cells/100ml)	mCFU (mCFU/100ml)	CFU (CFU/100ml)	Endotoxin (EU/l)
a	Tap water	$3.6 \times 10^6$	$5.9 \times 10^5$	ND	ND	$1.1 \times 10^3$
	After RO membrane treatment	$4.7 \times 10^4$	ND	11	ND	ND
	Dialysis fluid	$6.6 \times 10^4$	ND	$1.6 \times 10^2$	55	8.8
b	Tap water	$9.5 \times 10^5$	$4.5 \times 10^5$	ND	ND	$9.9 \times 10^2$
	After RO membrane treatment	ND	ND	ND	ND	21
	Dialysis fluid	$6.5 \times 10^4$	ND	ND	ND	2.7
c	Tap water	$9.6 \times 10^5$	$2.2 \times 10^5$	ND	ND	$1.3 \times 10^3$
	After RO membrane treatment	ND	ND	ND	ND	1.2
	Dialysis fluid	ND	ND	ND	ND	ND
d	Tap water	$5.5 \times 10^5$	$2.4 \times 10^5$	OG	OG	$1.0 \times 10^3$
	After RO membrane treatment	ND	ND	ND	ND	ND
	Dialysis fluid	ND	ND	17	ND	ND

TDC: total direct count of bacterial cells (DAPI staining: 3 min).  
 CFDA(+): number of esterase active cells (CFDA staining: 3 min).  
 mCFU: number of microcolony forming units on R2A media (incubation: 48 h).

CFU: number of colonforming units on R2A media (incubation: 168h).  
 OG: over growth

表 6 各採水地点における細菌現存量

Sample	Bp total cell (cell/100ml)	Bp living cell (cell/100ml)	Bp dead cell (cell/100ml)	Bp CFDA (cell/100ml)	Gram positive (cell/100ml)	Microarray method (cfu/g or 100ml)	Culture method (cfu/g or 100ml)
(a) Tap Water	$6.0 \times 10^5$	N.D.	$6.0 \times 10^5$	$3.2 \times 10^4$	$1.4 \times 10^2$	N.D.	N.D.
(b) After ion-exchange treatment	$1.1 \times 10^5$	N.D.	$1.1 \times 10^5$	$6.1 \times 10^2$	$2.5 \times 10^2$	50	60
(c) After AC treatment	$1.2 \times 10^5$	$3.8 \times 10^5$	$7.8 \times 10^5$	$9.8 \times 10^5$	$1.8 \times 10^2$	O.G.	O.G.
(d) After RO membrane treatment	$9.3 \times 10^3$	$5.1 \times 10^3$	$4.1 \times 10^3$	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
(e) After RO tank	$2.9 \times 10^2$	N.D.	$2.5 \times 10^2$	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
(f) Dialysis fluid	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

表 7 各種検出法による環境試料中に存在する細菌の検出結果

	<b>Prototype System (counts/10ml)</b>	<b>EFM (cells/10ml)</b>	<b>Culture Method (cfu/10ml)</b>
Tap water	$1.0 \times 10^4 \pm 85.2$ (CV = 0.8%)	$1.9 \times 10^5 \pm 1.1 \times 10^5$ (CV = 53.8%)	$2.1 \pm 0.6$ (CV = 26.6%)
Natural mineral water	$1.3 \times 10^4 \pm 1.5 \times 10^2$ (CV = 1.1%)	$2.5 \times 10^5 \pm 1.2 \times 10^5$ (CV = 46.1%)	$5.8 \times 10^4 \pm 7.8 \times 10^3$ (CV = 13.3%)

EFM: epifluorescence microscopy method

CV: coefficient of variation

SD: standard deviation

表 8 菌液調製時および培養法による菌数測定時における試験菌の培養条件

No	菌種	培地	温度	時間	培養条件
①	<i>S.aureus</i>	TSA 培地	32.5±1 °C	18~24 h	好気培養
②	<i>B.subtilis</i>	"	"	"	"
③	<i>P.aeruginosa</i>	"	"	"	"
④	<i>P.fluorescens</i>	"	"	"	"
⑤	<i>M.extorquens</i>	"	"	3 days	"
⑥	<i>C.sporogenes</i>	RC 寒天	"	18~24 h	嫌気培養
⑦	<i>C.albicans</i>	サブロー寒天	22.5±1 °C	3 days	好気培養
⑧	<i>A.brasiliensis</i>	"	24.0±1 °C	1 week	"

※試験菌⑧については、サブロー寒天で孢子形成が不良であったため、  
菌液調製時には PDA 培地で 3 week 培養した。

表 9 菌液の遠心条件

No	菌種	遠心条件			測定に供したものの
		回転数 (rpm)	遠心力 ( <i>xg</i> )	時間 (秒)	
①	<i>S.aureus</i>	3,000	1,680	30	上清
②	<i>B.subtilis</i>	"	"	"	"
③	<i>P.aeruginosa</i>	"	"	"	"
④	<i>P.fluorescens</i>	"	"	"	"
⑤	<i>M.extorquens</i>	"	"	"	"
⑥	<i>C.sporogenes</i>	"	"	"	"
⑦	<i>C.albicans</i>	2,000	750	30	"
⑧	<i>A.brasiliensis</i>	"	"	"	2回洗浄した沈渣

表 10 シリンジサンプラの動作プログラム

設定項目	プログラム 1 (測定部の共洗い)	プログラム 2 (粒子数・微生物数の測定)
吸引速度	70 mL/min	10 mL/min
吸引液量	20 mL	11 mL <sup>*</sup>
排出速度	70 mL/min	70 mL/min
排出液量	20 mL	11 mL