

平成21年 5月 19日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590118
 研究課題名（和文） 迅速法を用いた透析液調製システムの衛生微生物学的安全性評価法の構築
 研究課題名（英文） Rapid monitoring of bacteria in dialysis fluids and reverse-osmosis water purification system by fluorescent vital staining method
 研究代表者
 山口 進康（YAMAGUCHI NOBUYASU）
 大阪大学・大学院薬学研究科・准教授
 研究者番号：20252702

研究成果の概要：

透析液中の微生物モニタリングは、衛生微生物学的に安全な透析液の供給のために重要である。そこで、これまでに開発・検討してきた迅速検出法を用いて、透析液およびその原料となるRO水調製システムにおける細菌の動態解析を行った。その結果、透析液中の細菌数の迅速モニタリングには、蛍光活性染色法およびマイクロコロニー法が適していること、透析液調製過程における細菌群集構造の変化および優占種の推定は、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法により可能であることがわかった。これらの方法を用いることにより、透析液やその調製システムの微生物学的な管理を高精度に行えることがわかった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：環境微生物学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：透析液、RO水、細菌モニタリング、蛍光活性染色法、増殖活性、群集構造解析

1. 研究開始当初の背景

日本における慢性透析患者数は、年々増加する傾向にある。人工透析の一般的な方法である血液透析は、血液を体外の透析装置を通し、透析膜を通して老廃物を血液から透析液中へ除去する方法である。透析液は膜を介して血液と触れるため、透析液の安全性の確保は、患者の健康を保証する上で非常に重要である。特に、透析液への微生物の混入はエンドトキシンの発生源となるため、透析液中の微生物現存量の直接的かつ高精度な把握

は、その衛生微生物学的な安全性の確保のために重要である。そこで、透析液中のエンドトキシン測定のみではなく、微生物の直接検出の重要性が認識されてきている。これらの背景のもと、透析液中の微生物検出に関する研究が、培養法によって始められてきている。ここで課題となるのが、環境中の細菌検出に対して培養法がもつ課題である。

環境微生物学分野における研究の進展にともない、環境中の細菌の多くは患者体内の細菌とは生理状態が異なり、通常の培養法で

は十分には捉えられないことが明らかになってきている。そこで日本を始め、欧米においても培養に依存しない新たな微生物検出法が盛んに検討され、その一部は環境微生物学分野を中心に普及してきている。そこで、これまでに開発・検討してきた微生物迅速検出法を用いて、透析液およびその原料となる RO 水調製システムにおける細菌の動態解析を行った。

2. 研究の目的

本研究では、より微生物学的に安全な透析液を供給するために、これまでに検討・開発してきた蛍光活性化染色法や分子微生物生態学的手法を用い、透析液および RO 水調製システムにおける細菌現存量と細菌群集構造の変化を明らかにし、透析液の迅速・高精度な微生物管理法を提案することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究においては、蛍光染色法で細菌数の測定を、また rRNA 遺伝子を標的として、透析液の原料となる RO 水の調製システム (図 1) における細菌の動態を明らかにした。

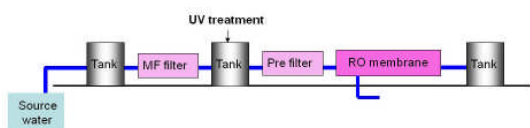


図 1. RO 水製造システムの一例.

細菌の現存量の測定には、核酸結合性の蛍光染色剤 DAPI を用いた。生理活性 (エステラーゼ活性) をもつ細菌の検出には、carboxyfluorescein diacetate (CFDA) を用いた。増殖能をもつ細菌の測定には、マイクロコロニー法を用いた。マイクロコロニー法は、フィルター上に捕集した細菌を培地上で短時間培養し、形成された直径 10~50 μm 程度の微小なコロニー (マイクロコロニー) を蛍光顕微鏡下で検出・計数する方法である (図 2)。本方法は、増殖能力を有する細菌を迅速に定量できるという利点がある。さらに、環境中には培地上では目に見えるサイズのコロニーを形成できないが、マイクロコロニーは形成できる細菌が多く存在することが明らかになっており、増殖能力を有する細菌の迅速かつ高精度な計数法として有用である。同時に、R2A 培地を用いた平板培養法により生菌数を測定した。培養は 25°C で 1 週間行った。

RO 水調製システムにおける細菌の動態の解析には、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動

(DGGE) 法を用いた。各試料水から DNA を抽出し、rRNA 遺伝子の部分配列をユニバーサルプライマーを用いて PCR で増幅した後、DGGE を行った。また DGGE ゲルにおいて特徴的なバンドを切り出し、クローニングを行った後、その配列を解析した。

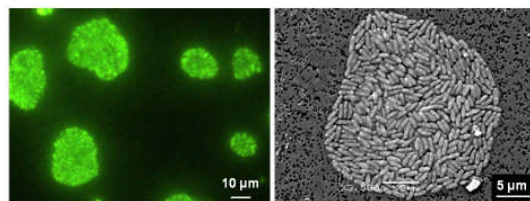


図 2. マイクロコロニー法による細菌の検出。(図・左) 増殖初期の微小なコロニーを蛍光染色して観察する。(図・右) マイクロコロニーの走査型電子顕微鏡観察結果.

4. 研究成果

蛍光活性化染色法やマイクロコロニー法は、30 分から 48 時間以内に細菌の現存量、酵素活性あるいは増殖活性などの有無を測定できる。そこで、これらの手法を用いて、透析液調製システムにおける細菌数や生理状態の変化を明らかにした。また適切な微生物管理を行うためには、細菌の現存量だけでなく、その属種を明らかにすることも重要である。そこで、PCR-DGGE 法などの分子微生物学的手法を併用し、透析液の原料となる RO 水の調製システムに存在する細菌の群集構造および優占種を明らかにした。

2007 年度の成果は以下のとおりである。

(1) 透析液および調製システムにおける細菌現存量を迅速・高精度に測定し、またその生理状態を評価するために、蛍光活性化染色法およびマイクロコロニー法を用いた。

その結果、

① 原水に比べて活性炭処理後に細菌現存量が増加し、また細菌の生理活性が上がること、
② RO モジュールを通すことにより、細菌現存量は大きく減少すること、
③ RO 水をタンクに貯留することにより、再び細菌現存量が増加すること
が、わかった。

(2) 上記の結果より、調製システムの適切な管理には、蛍光活性化染色法を用いた細菌モニタリング法が有効であることを示した。

(3) 透析液中の細菌の現存量は、一般的な水環境に比べて、はるかに少ない。そこで、新たに開発された細菌数自動測定システムを用いて、極少量 (数 cell) の細菌を検出するためのプロトコールを作成した。

(4) 透析液中の細菌群集構造解析にあたっては、透析液中の細菌現存量が少ないことから、

細菌の DNA を効率よく抽出し、また微量の DNA を偏り無く増幅させることが重要であった。

2008 年度の成果は以下のとおりである。

- (1) 前年度の結果より、透析液およびその原水 (RO 水) 中の細菌数は、通常の蛍光顕微鏡法の検出限界に近いことがわかったことから、より細菌数の少ない試料について高精度な測定ができる細菌数自動測定システムを用いた研究を進めた。その結果、検出限界を大幅に改善できた。
- (2) RO 水調製プロセスにおける細菌群集構造の変化を、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法により明らかにした。また得られた rRNA 遺伝子増幅産物の配列解析を行なった結果、ろ過や貯留などの各処理により、優占種が大きく変化することがわかった (図 3)。
- (3) 蛍光活性染色法およびマイクロコロニー法と細菌数自動測定システムを併用することにより、透析液調製システムにおける細菌数の変化の迅速モニタリングが可能であること、透析液調製過程における細菌群集構造の変化および優占種の推定は変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法により可能であったことから、これらの方法により、透析液調製システムの適切な維持管理が可能となると考えられる。

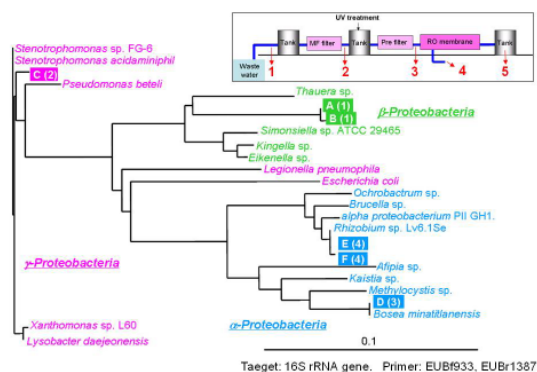


図 3. RO 水調製システムにおける細菌群集構造の変化. 処理が進むにつれて、Alphaproteobacteria が優占種となった。

今回検討した蛍光染色法や分子微生物学的手法を用いて、透析液調製システムにおける細菌の動態に関する知見を蓄積することにより、透析液の衛生微生物学的安全性の確保のために、さらに適切な施設管理手法を確立するうえでの重要な知見を得ることができる。また新たな人工透析技術として、腹腔内に透析液を直接入れる腹腔透析や透析液を血液に入れる血液透析療法など、厳密な安全管理を求められる透析方法も行われ

つつあり、より迅速かつ高精度な微生物検出法が必要とされている。したがって、今回得られた成果は、セントラル方式を採用している日本だけでなく、腹腔透析法や血液透析療法の割合が高くなってきている欧米における、透析医療の衛生微生物学的な質の向上にも貢献するものである。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

1) N. Yamaguchi, T. Baba, R. Matsumoto and M. Nasu. Bacterial population dynamics in a reverse-osmosis water purification system determined by fluorescent staining and PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Microbes Environ.*, in press. (査読あり)

2) 馬場貴志, 山口進康, 那須正夫. 透析液製造ラインにおける細菌の動態. 腎と透析別冊「HDF 療法' 07」, 186-188 (2007) (査読なし)

3) N. Yamaguchi, T. Baba, S. Nakagawa, A. Saito and M. Nasu. Rapid monitoring of bacteria in dialysis fluids by fluorescent vital staining and microcolony methods *Nephrology Dialysis Transplantation*, 22: 612-616 (2007) (査読あり)

[学会発表] (計 6 件)

1) N. Yamaguchi. Features and effectiveness of rapid bacterial detection system for contaminated blood products. American Association of Blood Bank 2008 Annual Meeting. 2008 年 10 月 4 日. モントリオール

2) 山口進康. 血小板製剤中の細菌の蛍光活性染色法による迅速・高精度モニタリング. 第 81 回日本細菌学会総会. 2008 年 3 月 26 日. 京都

3) N. Yamaguchi. Rapid enumeration of bacteria in contaminated platelet concentrates using a newly developed bio-imaging system following fluorescent vital staining. International Congress of International Society of Blood Transfusion. 2008 年 6 月 9 日. マカオ

4) N. Yamaguchi. Rapid and sensitive detection of bacterial cells in contaminated platelet concentrates using a newly

developed bio-imaging system. American Society for Microbiology 2008 General Meeting. 2008年6月3日. ボストン

5) 山口進康. 蛍光活性染色法による血小板製剤の迅速・高精度な細菌モニタリング. 第56回日本輸血・細胞治療学会総会. 2008年4月27日. 福岡 (招待講演)

6) 山口進康. 透析液製造工程における細菌の動態解析. 日本薬学会第127年会. 2007年3月28日. 富山

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口 進康 (YAMAGUCHI NOBUYASU)
大阪大学・大学院薬学研究科・准教授
研究者番号：20252702