

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：82602

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23560656

研究課題名(和文)透析用水製造過程におけるATP測定による細菌迅速定量法の開発

研究課題名(英文)Development of rapid screening method for viable microbes using ATP analysis in the course of dialysis water production process

研究代表者

島崎 大(Simazaki, Dai)

国立保健医療科学院・生活環境研究部・上席主任研究官

研究者番号：60322046

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：医療施設内の透析用水の製造工程ならびに原水である水道水中のATP濃度の測定により、細菌の迅速スクリーニングが可能であるか検討した。公共水道と地下水を併用する病院を調査対象として、透析用水原水、製造工程、透析用水および透析液を採水した。ATP濃度が 5×10^3 mol/Lを超えると全ての試料から生菌が検出されたが、両者の相関性は確認されなかった。試料の20倍濃縮により大部分の試料からATPが検出され、検出感度の向上に有効であった。ATP測定法は、従来の平板培養法による生菌モニタリングを補う迅速スクリーニング法として、日常的な透析用水の衛生管理に適用できることが示された。

研究成果の概要(英文)：Applicability of adenosine triphosphate (ATP) assay for rapid screening of viable microbes in raw water and in the course of dialysis water production process was examined in this study. Samples were collected from Hospital A, where water for medical care was supplied by both public water supply and private water supply from groundwater. Viable microbes were robustly detected when ATP exceeded 5×10^3 mol/L, however, there was not significant correlation between total viable microbial count (TVC) and ATP. Twenty-fold concentration of the samples could increase detection sensitivity of ATP. The ATP assay would be considered as complementary to conventional TVC monitoring in terms of rapid screening of the presence of viable microbial contamination for ensuring microbial safety of dialysis water on a daily basis.

研究分野：水道工学、衛生工学

キーワード：透析用水 衛生管理 生菌 ATP エンドトキシン

1. 研究開始当初の背景

わが国の医療施設において、透析液中の生菌数の検査を日常的に行っている施設は限られており、日本透析医学会の推奨する月1回以上の検査を行っている施設は2013年末時点で74.7%、毎日検査は0.3%にとどまっている¹⁾。とりわけ、生菌数の測定が平板培養法に依っており、測定結果が出るまでに7日間程度の培養時間を要する点に留意する必要がある。仮に、透析用水の製造工程などにおいて機器不良等が生じた場合や、漏水等の事故により原水である水道水の水質劣化が生じた場合など、突発的な細菌汚染が発生した際に、現状では汚染のすみやかな把握と汚染への対応が困難となる可能性がある。

そこで筆者らは、日常的な透析用水の衛生管理への適用を想定した簡易かつ迅速な生菌のスクリーニング手法として、アデノシン三リン酸(ATP)測定法に注目した。ATP測定法はホタルの生物発光と同じ機構であるルシフェリン-ルシフェラーゼ反応によりATPをアデノシン一リン酸(AMP)に分解し、その際に放出される光エネルギーを発光量として検出、ATP濃度と発光量との相関関係によりATP濃度を測定する。ATP測定法は食品加工等での衛生管理において実績があり²⁾、また、温浴施設のレジオネラ対策における衛生状態の迅速検査にも適用される³⁾。

2. 研究の目的

透析用水の製造工程や原水である水道水および地下水における水中のATP濃度を直接、あるいは濃縮して測定することで、生菌の迅速スクリーニングが可能であるか検討し、その適用性や課題点、ならびに重視すべき測定地点を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 試料の採水

医療用水に公共水道(河川水由来)および専用水道(地下水由来)を併用するA病院を調査対象とした。A病院は多人数透析設備を30床有しており、年間の透析実施件数は約10,000件(平成23年度)である。夏季(平成24年8月)および冬季(平成25年2月)の週初めと週末の計4回、いずれも午前10~12時の時間帯にかけて、地下水槽(浄水処理前)、地下水(浄水処理後)と公共水道が混和された貯水槽、高架水槽、透析用水原水(病院内水道水)、透析用水製造装置内(活性炭ろ過フィルター後)、UV照射、RO、ETRF(エンドトキシン除去フィルター)を経た透析用水製造装置後、透析液(透析コンソールカプラ)から採水した。各地点から採水した試料は、冷蔵して筆者らの実験室に持ち運び、6時間以内に各種の水質試験に供した。

(2) 分析方法

生菌数

透析液清浄化ガイドラインに示されている生菌数検査法は、上水試験方法における従

属栄養細菌の検査法であるR2A寒天培地法とほぼ同等であるため、後者に準じた測定を行った。すなわち、R2A培地を用いた平板表面塗抹法または平板混釈法によりプレートを作成し、培養温度20℃、培養期間7日間とした。各試料は10倍希釈法によりリン酸緩衝希釈水で段階希釈し、1枚当たり30~300個のコロニーが形成されるように調整した。1試料につき同一の希釈倍率となるプレートを3枚作成し、3枚の平均値を生菌数とした。

ATP濃度

採水試料中のATP濃度の測定は、ルシフェリン-ルシフェラーゼ反応および光電子倍增管による光子計測法により行った(キッコマンバイオケミファ ルミテスターC-110, ルシフェールHSセット)。各試料を0.1mL採取して専用試験管(キッコマンバイオケミファ ルミチューブ)に滴下し、ATP消去試薬を0.1mL加え、30分間静置して生菌細胞外の遊離ATPを消去した。その後、細胞溶解試薬を0.1mL加え、20秒間混和して生菌細胞内のATPを抽出し、さらに発色試薬を0.1mL加え、10秒間混和した後に試験管を測定器に挿入し、10秒後の発光量(単位RLU: Relative Luminescence Unit)の値を記録した。

エンドトキシン活性

エンドトキシン活性の測定は、リムルス試験法(比濁時間分析法)により行った。リムルス試薬入り反応試験管(和光純薬工業 透析用LALミニ)に各試料を0.3mL添加、試験管ミキサーで10秒間静かに混和した後、測定器(和光純薬工業 トキシノメーターミニ)に挿入した。結果の解析には専用ソフトウェア(和光純薬工業 トキシマスターIVD4ミニ)を用い、ゲル化判定しきい値は92%とした。定量範囲は当該のリムルス試薬に記載されている0.001~0.25EU/mLと設定し、この範囲を超えた試料については超純水で希釈した後に再度測定した。また、この範囲を下回る試料は全て不検出とした。

その他水質項目

地下水槽、貯水槽、高架水槽、透析用水原水において、採水現場にて遊離残留塩素、総残留塩素(いずれもDPD法: HACH Pocket Chlorimeter II)および水温(液体温度計)を測定した。また、実験室にてpH(電極法: 東亜 DKK ION METER M-55G)および全有機炭素(乾式酸化法: 島津製作所 TOC-V CPH)を測定した。

試料の濃縮

冬季に採水した各試料については、試料の濃縮によるATP検出感度の向上を試みた。遠心式フィルターユニット(Merck Millipore Centriprep® 50Kユニット)に各試料を15mL満たし、卓上遠心機(久保田製作所 5200)にて2,500rpmで10分間遠心し、ろ過側の液体を除いた。さらに2,500rpmで5分間遠心し、最終的に0.75mL(20倍濃縮)の試料を得た。各濃縮試料は、未濃縮の試料と同様にATP濃度の測定に供した。

4. 研究成果

(1)各採水地点における生菌数・ATP 濃度・エンドトキシン活性値の推移

各採水地点における生菌数、ATP 濃度、および、エンドトキシン活性値を図 1 に示す。生菌数は地下水から最大で 450CFU/mL 検出された。各貯水槽では 1~67 CFU/mL の範囲まで低減したものの、病院内の水道水では 130~6,300CFU/mL まで増大した。透析用水製造装置での処理を経た透析用水、および、コンソールカプラから採水した透析液からはほとんど検出されることはなかった。

ATP 濃度は地下水の値が一様に高く、最大で 2.9×10^{-12} mol/L が検出された。その後、貯水槽中や病院内の水道水中では低減し、透析用水製造装置での活性炭ろ過後に地下水と同程度まで再び増加する傾向が見られた。透析用水ならびに透析液中からはほとんど検出下限未満の値であったが、それぞれ一度、 7.8×10^{-13} 、 7.6×10^{-13} mol/L が検出されることがあった。

エンドトキシン活性値は地下水中では 0.67~0.86EU/mL の範囲であったものの、現場での浄水処理を経たのち公共水道と混和された貯水槽中では大幅に増大し、特に夏季の週初めにおいて最大 11.4EU/mL に達した。その後、病院内の水道水や透析用水製造過程では低減する傾向にあり、透析用水ならびに透析液中の値はほぼ定量下限値未満であった。

冬季に 2 回採水した試料について、生菌を遠心濃縮した後に ATP 濃度を測定した結果を図-3 に示す。透析液を除いて、いずれの試料からも検出下限値を上回る ATP が確認された。なお、冬季の週初めに貯水槽から採取した 1 試料については、濃縮後の ATP 濃度が濃縮倍率をはるかに上回って増大したため、測定の際に外部からの ATP 汚染が生じたと判断し、解析から除外した。

その他の水質項目について、遊離残留塩素および総残留塩素は地下水中からはいずれも不検出、各水槽や病院内の水道水ではそれぞれ 0.44~0.56mg/L、0.47~0.68 mg/L の範囲であり、特段、夏季における残留塩素の低下は観察されなかった。水温は夏季の地下水が 18.0 前後、貯水槽以降は 19.9~23.0 まで上昇した。冬季の水温は 13.8~15.8 の範囲であった。TOC は地下水が 0.16~0.34 mg/L、貯水槽以降は 0.27~0.53 mg/L と上昇する傾向にあった。

(2)ATP 濃度測定を用いた生菌迅速スクリーニングの適用性

本研究で用いた ATP 濃度の測定法は、先に生菌の細胞外に存在する遊離 ATP を消去し、続いて生菌内の ATP を抽出、発色試薬と反応させて RLU を測定するため、生菌細胞に由来する ATP のみを検出可能である。

各地点から採水した全 28 試料のうち、生菌と ATP が共に検出された 18 試料を対象と

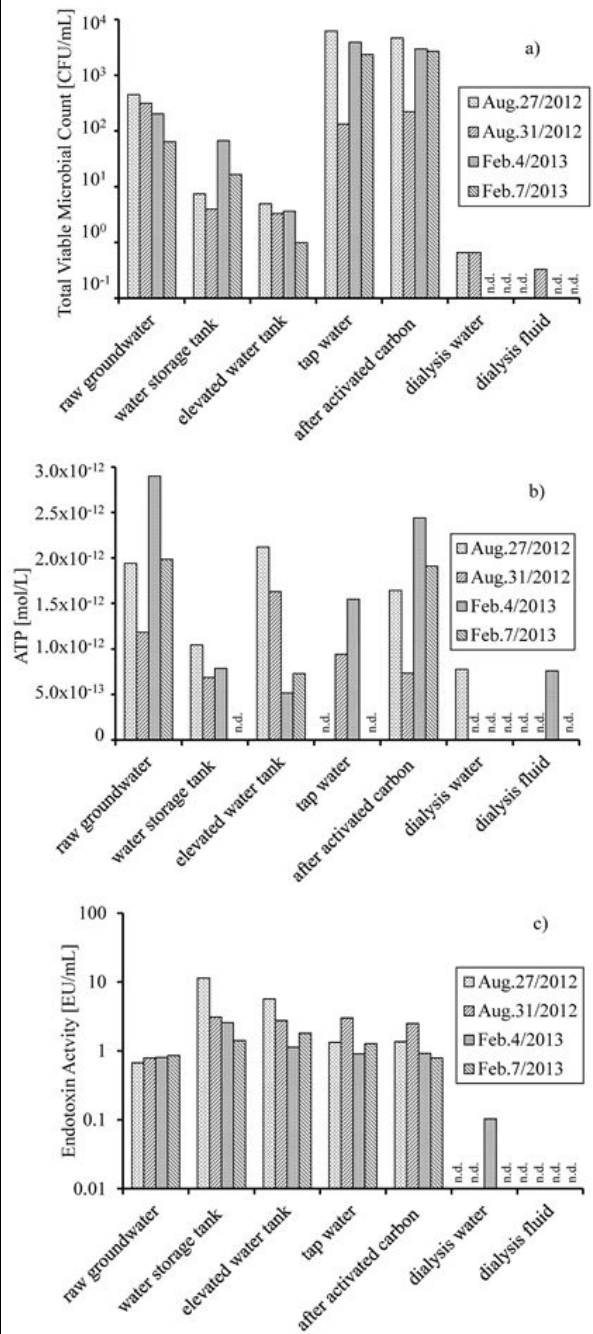


図 1 各採水地点の水質変化 (a)生菌数, (b)ATP 濃度, (c)エンドトキシン活性⁴⁾

して、生菌数および ATP 濃度との関連性を確認した。図 2 に破線で示すように、ATP 濃度が 5×10^{-13} mol/L を超える場合に、全ての試料中から生菌が検出された。しかしながら、ATP 濃度を独立変数、生菌数を従属変数とした線形回帰における決定係数 R^2 は 0.13 であり、両者にほとんど相関は見られなかった。

本研究では、透析用水の原水である水道水、地下水や透析用水の製造過程を含めた様々な箇所を対象として、夏季および冬季に採水を行ったため、各試料の細菌叢は採水箇所や時期に応じて多様であったことが想定される。具体的には、水道水や地下水に存在する浮遊状態の生菌や、水道管壁面に付着状態 (バイオフィーム) で存在する生菌は、多様

な従属栄養細菌から構成されることが知られており⁵⁾、また、同一の細菌種であっても増殖段階が異なる場合にはATPの合成量が異なる⁶⁾。このことにより、各試料の生菌あたりのATP含有量が大幅にばらついたものと考えられる。

全28試料におけるATPおよび生菌の検出、不検出の状況を比較したところ、ATPは検出されたが生菌は検出されなかった偽陽性の試料は1試料(3.6%)、ATPは検出下限未満であったが生菌は検出された偽陰性の試料は5試料(17.9%)存在した。前者の要因として、本論文における培養条件ではコロニー形成が確認できない生菌の存在や、ATP測定作業の過程における外部からのATP汚染の可能性が、後者の要因として、ATP測定に対する金属等の障害物質による影響や、生菌数が僅少である場合のATP検出感度の不足が、それぞれ考えられる。

生菌数の迅速スクリーニング法としてATP測定を適用する際に、ATPが不検出であるにもかかわらず生菌が存在する偽陰性となることは望ましくない。このため、冬季に採取した試料を対象として、20倍の遠心濃縮を行うことでATP検出感度の向上を試みたところ、全ての濃縮後の試料から検出下限値を超えるATPが確認された。また、偽陽性となる試料は1試料から2試料に増加したものの、偽陰性となる試料は見られなかった。このことから、試料の濃縮によるATP検出感度の向上が有効であることが確認された。ATP測定法は、従来の平板培養法による生菌数の定量をそのまま代替することはできないものの、試料の遠心濃縮作業を含めた測定に要する時間は1時間未満であることより、生菌汚染の有無を示唆することが可能な迅速スクリーニング手法として有用であると言える。

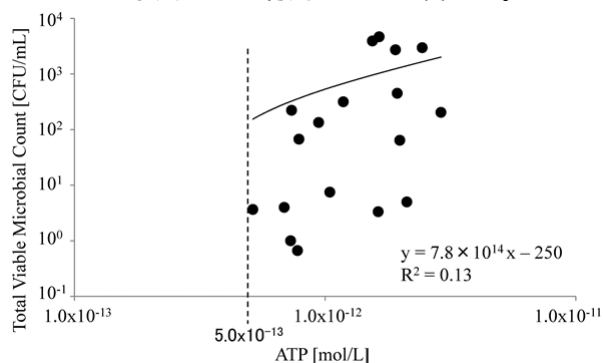


図2 透析用水処理工程等の採水試料における生菌数とATP濃度の相関性⁴⁾

(2) 病院内給水設備における生菌数等の挙動
ならびに生菌モニタリング地点の検討

本研究で対象としたA病院では、医療用水として河川水に由来する公共水道、および、敷地内の地下水を浄水処理する専用水道を併用しているため、生菌数、エンドトキシン活性値ともに特徴的な挙動を示した。生菌数の迅速スクリーニング手法としてATP測定を適用する際に、重視すべきモニタリング地点

について以下に考察する。

生菌数について、未処理の地下水に含まれる生菌は後段の浄水処理を経て、かつ、貯水槽にて公共水道と混和することで、67~99%低減した。当該の浄水処理設備、さらに公共水道の水道水に含まれる残留塩素とも接触することで、生菌が除去ならびに不活化されたと考えられる。さらに、冬季の週初めの採水日の翌日には、貯水槽および高架水槽ともに年1回の定期清掃が行われており、清掃後の生菌数はそれぞれ75%、73%低減した。A病院における公共水道と専用水道の年間給水量は約1:9の割合(平成23年度)であること、また、公共水道中の生菌数は東京都23区部における給水栓での測定結果例として1~100CFU/mL未満となる⁷⁾ことより、A病院における貯水槽内の生菌はほとんどが地下水に由来すると考えてよい。

一方で、貯水槽および高架水槽を出てから病院内の末端の水道水に至る過程で、生菌は大幅に増大することが確認された。夏季、冬季いずれも週初めにおいて、比較的高い生菌数が観察されており、週末や夜間の水道水の滞留による残留塩素の低減あるいは消失により、速やかな生菌の再増殖が生じた可能性が考えられる⁵⁾。今回の調査では、3分間以上の放水により滞留水を排除した後に採水を行ったため、現場において残留塩素を測定した際には全て残留塩素が検出されたものの、特に、滞留が生じやすい夜間や休日を経た後には、水道水中の生菌数の増大や残留塩素の消失の可能性について留意する必要がある。

透析用水製造過程のうち、活性炭ろ過フィルター後の生菌数は、病院内の水道水と同程度であった。水道水中に含まれる残留塩素は活性炭ろ過により完全に除去されるため、この箇所においても、生菌数が大幅に増大する可能性がある。その後、RO、UV、ETRFを経た透析用水や透析液からはほとんど生菌が検出されなかったものの、前者については濃縮試料中から検出下限値を超えるATPが確認されたことから、本論文における培養条件ではコロニー形成が確認できない生菌の存在する可能性が示唆された。

以上のことから、生菌の迅速スクリーニングを行う際に重視すべき測定地点として、生菌数の濃度が高まりやすい、生菌数の変動が大きい、水道水の滞留が生じやすい地点を中心に、優先度の高い順に透析用水原水(病院内水道水)、透析用水製造過程(活性炭ろ過後等)、貯水槽、透析用水を選定する必要があると考えられた。各地点において日常的にATPの現存量を測定し把握することで、もしも異常に高濃度のATPが確認された場合には、臨時の水質検査による細菌汚染箇所の発見や透析用水製造過程の洗浄の強化といった、衛生上の措置をすみやかに講じることができると考えられる。

<引用文献>

- 1) 日本透析医学会透析調査委員会：図説わが国の慢性透析療法の現況 2013 年 12 月 31 日現在 ,p.33,日本透析医学会,東京, 2014.
- 2) 食品衛生協会：食品衛生検査指針微生物編 2004 ,pp.41-42,食品衛生協会,東京, 2004.
- 3) 村上光一,野田多美枝,久良木亜由子,他：レジオネラ対策に資する ATP 値測定による浴槽の衛生状態の評価,福岡県保健環境研究所年報, 35, pp.117-119, 2008.
- 4) 島崎大,秋葉道宏：透析用水製造過程および原水における ATP 測定による生菌迅速スクリーニング手法の検討,土木学会論文集 G(環境), 70(7), III_25-31.
- 5) 前田裕太,春日郁朗,栗栖太,古米弘明：培養法と分子生物学的手法を用いた給水末端における細菌群の多様性評価,第 60 回全国水道研究発表会講演集 ,pp.530-531, 2009.
- 6) Hironaka, I., Iwase, T., Sugimoto, S. *et al.*: Glucose triggers ATP secretion from bacteria in a growth-phase-dependent manner, Applied Environmental Microbiology, 79(7), pp. 2328-2335, 2013.
- 7) 島崎大,金見拓,岸田直裕,秋葉道宏：医療における水供給の課題災害時の医療用水確保および人工透析用水の利用を例として,保健医療科学 59(2) pp.100-108, 2010.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

- 1) 島崎大,秋葉道宏：透析用水製造過程および原水における ATP 測定による生菌迅速スクリーニング手法の検討,土木学会論文集 G(環境), 査読有, 70(7), III_25-31.

〔学会発表〕(計 4 件)

- 1) 島崎大,秋葉道宏：透析用水製造過程および原水における ATP 測定による生菌迅速スクリーニング手法の検討,第 51 回土木学会環境工学研究フォーラム, 2014 年 12 月 20-22 日,山梨大学甲府キャンパス(山梨県甲府市).
- 2) Dai SIMAZAKI, Michihiro AKIBA: Rapid screening of viable microbes in the course of dialysis water production process using adenosine triphosphate (ATP) assay, 7th Congress of the International Society for Hemodialysis, 25-27th, April, 2014, Okinawa Convention Center (Ginowan, Okinawa).
- 3) 島崎大,秋葉道宏：透析用水製造過程における ATP 測定を用いた生菌数の迅速定量,第 48 回日本水環境学会年会, 2014 年 3 月 17-19 日,東北大学河内キャンパス

(宮城県仙台市).

- 4) 島崎大,秋葉道宏：透析用水製造過程における ATP 測定による生菌迅速検査法の開発,第 58 回日本透析医学会学術集会・総会, 2013 年 6 月 21-23 日,マリンメッセ福岡(福岡県福岡市).

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
なし

〔その他〕
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

島崎 大 (SIMAZAKI, Dai)
国立保健医療科学院・生活環境研究部水管理研究領域・上席主任研究官
研究者番号： 6 0 3 2 2 0 4 6

(2) 研究分担者

秋葉 道宏 (AKIBA, Michihiro)
国立保健医療科学院・統括研究官
研究者番号： 0 0 1 5 9 3 3 6