

平成 28 年 6 月 27 日現在

機関番号：37128

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860642

研究課題名(和文)人工透析液製造過程における新規リアルタイム細菌検出技術の開発

研究課題名(英文) Novel System to Detect Bacteria in Real Time in Dialysis fluid production process

研究代表者

榎村 友隆 (NARAMURA, TOMOTAKA)

純真学園大学・保健医療学部・講師

研究者番号：60632338

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は、細菌自身が有する自家蛍光を直接検出することで、染色などの前処理を一切必要とせずに水環境中の細菌を検出する技術を開発した。この新規リアルタイム細菌検出技術を腎不全患者の治療に用いられる人工透析液中の細菌検出に利用し、インラインにて細菌をリアルタイムにモニタリングすることが可能であることを検証した。

結果、培養細菌数との相関は良好であり、蛍光顕微鏡下で計数した細菌数と近似値を示した。また、長期使用下でも精度よく細菌が検出されることが確認され、本研究により、当該新規リアルタイム細菌検出技術は、人工透析液製造過程における微生物検出に十分に適用可能であることが示された。

研究成果の概要(英文)：Bacteria tests are conducted in quality control of dialysis fluid for hemodialysis treatment. But regular cultivation method take long period of time to obtain results and has a problem of not being able to count bacteria which are difficult to cultivate. I have focused on the auto-fluorescence substance in the bacteria, to use its auto-fluorescence allowing us to develop a system to measure the bacteria in real-time, without any pretreatments nor addition of any reagents.

I have tested using actual dialysis fluid production process, and it has shown good detection capability. I believe that this system will become the next generation bacteria detection system to dialysis fluid production process where real time and on-site detection is needed.

研究分野：血液浄化学

キーワード：透析液 清浄化 細菌 自家蛍光 リアルタイム 人工透析

1. 研究開始当初の背景

人工透析治療は、半透膜で作成された人工腎臓を用いて血液中の尿毒素等を除去する治療であり、人工腎臓内で血液と透析液を接触させ、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人工透析液側より血液中に補充する治療である。1回の人工透析治療で約120Lもの人工透析液が使用され、これを週3回行う。血液中の不純物を除去する傍ら、人工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人工透析液の細菌汚染は、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。よって、透析液の厳密な細菌管理が求められている。

多くの人工透析医療施設では、人工透析液の細菌検査を培養法にて行っているが、人工透析液製造のための透析用水や人工透析液中に存在する細菌を、蛍光顕微鏡による直接計数法や、直接計数法を自動化した装置にて計数することによって、培養法によるコロニー形成菌数の数百倍の細菌が人工透析液中に存在しているケースがあることがすでに分かっている¹⁾。すなわち、人工透析液中の細菌は通常の培養法では検出困難であり、培養することなく細菌を検出できる技術が現在注目されている²⁾。培養しない細菌検出技術は、通常数日から数週間程度かかる培養期間を必要とせず、1時間以内での検出が可能となる。人工透析液は製造直後に人工腎臓に供給されるため、より迅速に、且つ、精度よく細菌汚染を検出できる検査技術が必要とされている。

2. 研究の目的

そこで、細菌自身が有する自家蛍光を直接検出することで、染色などの前処理を一切必要とせずに水環境中の細菌を検出する技術を開発した。この技術が腎不全患者の治療に用いられる人工透析液中の細菌検出に利用できるかを明らかにし、臨床応用へと展開するための基盤を確立することを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

本研究では、

1. 人工透析液中に細菌と同類の自家蛍光を発する物質が存在しているかを明らかにする。

2. 人工透析液中に存在する細菌の自家蛍光強度の把握を行い、すべての細菌を検出可能であるかを明らかにする。

以上の、2つの研究を並行して行い、これらの研究成果が出た後、開発したシステムを実際の人工透析システム中に設置し、インラインにて細菌をリアルタイムにモニタリングすることが可能であるかを検証した。

4. 研究成果

生物細胞は自家蛍光を発する性質を持つことが知られており、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。生物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)、リポフラビン等が知られている。

この性質を利用し、レーザーをフローセルの粒子検出部に照射して、中を流れる粒子から生じる散乱光および細菌(生物粒子)から生じる自家蛍光を計測し、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。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細菌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ことで、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。

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。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を判別することが可能であり、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、自家蛍光パルスも同時に発生する。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た際に信号のAD変換を行い、AD変換された信号情報をパーソナルコンピュータの専用プログラムにて処理し、画面に細菌の存在状況がリアルタイムに映し出されるように設計されている(図1、2)³⁾。

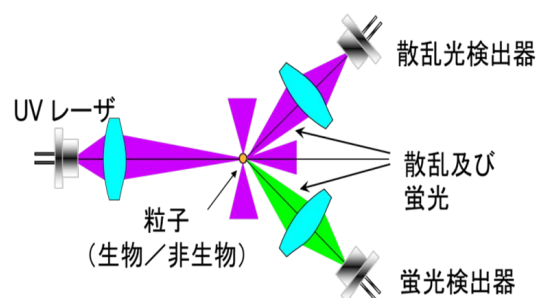


図1 リアルタイム細菌検出技術の原理

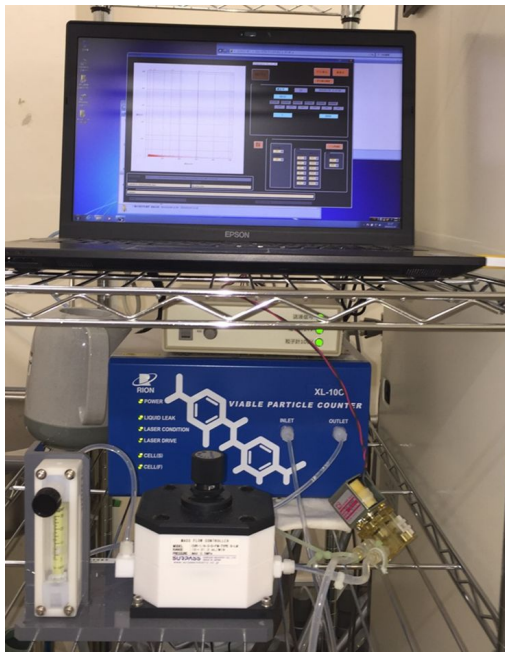


図2 リアルタイム細菌検出技術の外観

まず、蛍光顕微鏡下にて人工透析液中に細菌と同類の自家蛍光を発する物質が存在しているかを確認したところ、ケイ素化合物およびマイクロバブルの存在が確認された。そこで、ケイ素化合物に関しては、PC上で大きさの違いによる篩分けを行うようプログラミングを行い、解決に至った。また、マイクロバブルは、それほど問題となる量が発生していないことが確認されたため、特に対策は施さなかった。

次に、人工透析液中に存在する細菌の自家蛍光強度の把握を行い、すべての細菌を検出可能であるか検討を行った。結果、自家蛍光強度の弱い細菌が一部確認されたため、レーザー光の強度を上げ、システムの再構築を行った。

システムの仕様が定まった後、開発したシステムを実際の人工透析システム中に設置し、インラインにて細菌をリアルタイムにモニタリングすることが可能であるかを検証した。まず、基礎検討として、限外濾過膜を接続して無菌状態にした透析液供給ラインに装置を接続し、そこに標準菌である *Escherichia coli* (NBRC 3301) を溶解した菌液をショットで注入して、菌液を入れた直後、1分後、5分後でどのような値が検出されるかを本装置と培養法にて評価した。ここで、本検討の培養に用いた培地は、ショット注入した細菌を95%以上回収できることが確認されている培地を用いて検討を行った。ショット直後、培養法で検出された細菌と同等の値を本装置でも検出することができ、1分後の値も同様であった。5分後、培養法で検出されなくなったときは、今回の装置でも0を示すことが確認された。

表 インラインでの基礎検討

	培養法 (cfu/mL)	本装置 (cell/mL)
ブランク透析液	0	0
菌株ショット直後	$2.3 \times 10^3 \pm 3.8 \times 10^2$	$1.7 \times 10^3 \pm 0$
菌株ショット1分後	$1.1 \times 10^2 \pm 32$	$1.8 \times 10^2 \pm 0$
菌株ショット5分後	0	0

その後、長期（最長1年間）に渡りインラインにて細菌を検出可能であるか検証を行った。結果、培養不能な細菌を検出するため、その値は培養法よりも高値を示すことが確認され、培養細菌数との相関は良好であった。また、蛍光顕微鏡下にて計数した細菌数と近似値を示した。長期間使用下でも精度よく細菌が検出されることが確認され、本研究により、新規リアルタイム細菌検出技術は、臨床にて十分に応用可能であることが示された（図3）。

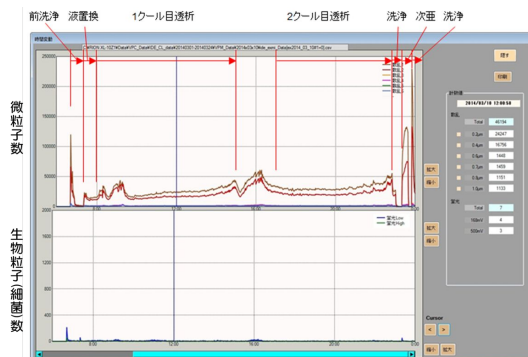


図3 透析液製造過程におけるインライン細菌リアルタイムモニタリング

引用文献

- 1) 榎村友隆、佐藤和弘、松浦浩美、十倉秀臣、井ノ口亜紀、古閑尚栄、井出孝夫：RO水製造工程中に存在する細菌の現存量評価。日本透析医学会会誌 40巻：1051-1056, 2007
- 2) 榎村友隆：第7章 高精度簡易迅速検査法の事例：医薬品・第2節 透析液製造過程における微生物迅速検査。微生物の簡易迅速検査法。テクノシステム, pp415-424, 2013
- 3) Naramura T, Ide T, Sekimoto K, Takesawa S : Novel System to Detect Bacteria in Real Time in Aquatic Environments. Biocont Sci 18 : 75-82, 2013

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 1件)

榎村友隆、細菌の自家蛍光を利用した細菌リアルタイムモニタリング、日本血液浄化技術学会会誌、査読無、23巻、2015、357-361
DOI : ISSN2185-5927

〔学会発表〕(計 5 件)

Naramura T, Recent Trends in Dialysis Fluid Purification. 2015 Keimyung University Dongsan Kidney Institute Symposium“Therapeutic Options for Hemodialysis / Online Hemodiafiltration”, Daegu, Korea, 2015

Naramura T, Kojima M, Dialysis Fluid Purification. The Cambodian and International Seminar for Nephrology and Dialysis 2015, Phnom Penh, Cambodia, 2015

榎村友隆、透析液清浄化の最前線、第 17 回北部九州透析工学研究会、2015

榎村友隆、透析液はいつもおなじ? - 水質の推移と管理方法について再考する -、第 25 回日本臨床工学会、2015 年

榎村友隆、細菌の自家蛍光を利用した細菌リアルタイムモニタリング、第 42 回日本血液浄化技術学会、2015

〔図書〕(計 2 件)

榎村友隆、水質管理の実際、「最新透析医療：先端技術との融合」、医薬ジャーナル社、2016、pp112-118

榎村友隆、細菌測定関連機器、「透析液清浄化に向けて」、医薬ジャーナル社、2015、184-196

〔産業財産権〕

○出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

榎村 友隆 (NARAMURA, Tomotaka)

純真学園大学・保健医療学部・講師

研究者番号：6 0 6 3 2 3 3 8

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：