

研究報告

水道水中の従属栄養細菌に関する検討

小嶋和恵

中部大学 生命健康科学部 臨床工学科

要 旨

慢性腎臓病の末期に必要な不可欠となる透析療法の多くは、水道水または地下水を医療施設内で処理して作成した透析液を使用する。この透析液に汚染がないかを確認するために行われる検査のうち、生菌検査については「従属栄養細菌」が目的菌とされているが、その測定方法は報告によって差異が認められ、検査を実施する医療施設の采配に委ねられている。

そこで、本報告の「研究 1」では、透析液の原水として一般的に使用される水道水中の従属栄養細菌の至適培養温度について検討した。その結果、インキュベーターを用いて 20℃前後で培養することが望ましいことが示唆された。

また、本報告の「研究 2」では、水道水中の従属栄養細菌の性質(コロニー性状、グラム染色性)について検討した。その結果、コロニー性状が同一であってもグラム染色性に相違の認められる細菌が存在することが明らかとなり、コロニー性状のみで細菌の種類を判断することはできないことが示唆された。

1. はじめに

慢性腎臓病の末期となると、透析療法が必要不可欠となる。本邦において、この透析療法を受けている患者総数は 329,609 名(2016 年 12 月 31 日時点)である。このうち、水道水または地下水を医療施設内で処理して作成した透析液を使用する治療法(血液透析および血液濾過透析)を選択している患者は 318,521 名であり、患者総数の 96.6%を占めている¹⁾。

この透析液が汚染されていると、治療を介して汚染物質が患者体内へ流入することとなり、様々な悪影響(貧血、透析アミロイドーシス、慢性炎症、栄養障害、動脈硬化、等)を及ぼすことが知られている^{2,4)}。そこで、透析液に汚染がないかを確認するため、エンドトキシン検査や生菌検査が行われている。

本邦では、エンドトキシン検査は「透析液安全基準策定報告」⁵⁾がなされて以降、多くの医療施設で実施されている。そのため、その測定方法やエンドトキシンの生体に及ぼす影響は、透析医療に携わる医療従事者には周知のものとなっている。

一方の生菌検査については、「透析液水質基準と血液浄化器性能評価基準 2008」⁶⁾において初めて基準が策定された項目であり、「従属栄養細菌」が目的菌とされ

ている。しかし、その測定方法(使用培地、培養温度、培養期間)は報告によって差異が認められ、検査を実施する医療施設の采配に委ねられている。

そこで、本報告の「研究 1」では、透析液の原水として一般的に使用される水道水中の従属栄養細菌の至適培養温度について検討した。

また、従属栄養細菌が目的菌とされているが、その種(微生物の分類における最小単位)が特定されていないばかりか、その性質さえ明らかになっていない。そこで「研究 2」では、水道水中の従属栄養細菌の性質(コロニー性状、グラム染色性)について検討した。

研究1

2. 従属栄養細菌の至適培養温度

2.1 研究概要

2.1.1 細菌の培養

多くの細菌は様々な方法により、それらを培養することができる。その方法の多くは、検体を接種した寒天培地をインキュベーター (incubator) に入れておくことで検体中の細菌が増殖し、寒天培地上にコロニー (colony) と呼ばれる細菌の集落が形成されることを利用している。

細菌自体は、その大きさが $1\ \mu\text{m}$ 程度の微小な生物である。そのため肉眼で捉えることはできないが、コロニーとしてならば肉眼で確認することが可能となる。このコロニーは、原則として検体中の1個の細菌が増殖したもので、1つのコロニー中に約 10^8 個の細菌が集まっている。

また、細菌が増殖する際の酸素要求性によっても、細菌を分類することができる（表1参照）。

表1 細菌の酸素要求性による分類⁷⁾

分類	特徴
好気性菌 (偏性好気性菌)	増殖に必ず酸素が必要な細菌
通性嫌気性菌	好氣的な呼吸と発酵の両方の機能を備える細菌 通常は好氣的に生育し、無酸素条件下でも増殖できる
嫌気性菌 (偏性嫌気性菌)	酸素のある環境下では増殖できないか、死滅する細菌
酸素耐性嫌気性菌	無酸素状態で発育し、酸素存在下でも死滅しない細菌
微好気性菌	3-15%程度の酸素濃度でしか増殖できない細菌

2. 1. 2 従属栄養細菌と培養温度

水中には自然の水環境を生息場所としている多数の細菌が存在し、これらは有機炭素濃度が数 mg/L 以下といった低濃度の有機栄養環境下で生息している。このように、水環境に適応して微量の有機物を利用できる能力を獲得した細菌は、有機栄養物を比較的低濃度に含む培地を用いて低温で長時間培養したとき、培地に集落を形成する。このような細菌をまとめて「従属栄養細菌」という⁸⁾。したがって、一般細菌試験で用いられる標準寒天のような高濃度の有機栄養を含む培地では増殖できないか、あるいは増殖できたとしても集落を形成するほどには増殖できないものが多い。

これら従属栄養細菌の培養温度については、各分野の試験方法でいくつか異なった方法が採用されており統一されていない（表2参照）。本邦の透析療法分

野における試験方法についても同様のことがいえる（表3参照）。

このため、今回の研究では、透析液の原水として一般的に使用される水道水中の従属栄養細菌の至適培養温度について検討する。

表2 各分野の試験方法における
従属栄養細菌の培養温度⁹⁾

試験方法	策定団体	培養温度
上水試験方法	日本 水道協会	$20 \pm 1^\circ\text{C}$
Standard Methods for The Examination of Water and Wasterwaters	American Public Health Association	35°C または $20\text{-}28^\circ\text{C}$
用水・排水中の 従属栄養細菌 試験法	日本 規格協会	$25 \pm 1^\circ\text{C}$

表3 本邦の透析療法分野における
従属栄養細菌の培養温度¹⁰⁻¹¹⁾

ガイドライン	策定団体	培養温度
2016年版 透析液水質基準	日本 透析医学会	$17\text{-}23^\circ\text{C}$
透析液清浄化 ガイドライン Ver2.01	日本 臨床工学 技士会	$20\text{-}25^\circ\text{C}$ または $30\text{-}35^\circ\text{C}$ の いずれかで 検出率の 高い方

2. 2 使用機器

2. 2. 1 R2A寒天培地

今回の研究で使用したR2A（Reasoner's Agar No.2）寒天培地は、Difco™ R2A Agar（和光純薬工業株式会社／LOT：6074556）である（培地

の組成：表 4 参照）。この培地は、従属栄養細菌が生育しやすいよう、有機栄養分(酵母エキスなど) が少ない組成となっている。また、ピルビン酸ナトリウム溶液の有害な過酸化物を除去する作用で、本来であれば集落の形成に至らない損傷菌の回復を可能とし、水環境に合わせた組成に調整されている⁷⁾。

表 4 R2A 寒天培地の組成

酵母エキス	0.50 g
プロテオースペプトン	0.50 g
カサミノ酸	0.50 g
ブドウ糖	0.50 g
デンプン	0.50 g
ピルビン酸ナトリウム溶液	0.30 g
リン酸水素カリウム	0.30 g
硫酸マグネシウム	0.05 g
寒天	15.00 g
精製水	1 L

2. 2. 2 メンブレンフィルター

今回の研究で使用したメンブレンフィルターは、37 mm クオリティモニター (PALL 社製、販売元：ニプロ株式会社／LOT：44535) (以下、モニター) である (図 1 参照)。なお、従属栄養細菌の多くは 0.45 μm 以上の大きさの細菌であることから¹²⁾、使用したメンブレンフィルターの孔径は 0.45 μm とした。



図 1 モニター外観

通常の寒天培地を用いての細菌培養では、寒天培地へ直接塗布できる検体量は 1 mL に及ばない。しかし、メンブレンフィルターを用いることで、1 mL 以上の検体でも測定できる。これは、1 mL 以上の検体をメ

ンブレンフィルターに濾過させ、細菌をメンブレンフィルター上に捕捉し、それを寒天培地上に乗せて培養することで、コロニーの観察が可能となるためである。

2. 3 方法

水道水を、従属栄養細菌の培養に適している R2A 寒天培地を用いて培養した。培養には、メンブレンフィルター法を併用した。

2. 3. 1 検体の採取

検体は、中部大学 550707 研究室の水道の蛇口で採取した。採取時には、水道水はできる限り長い時間 (1 分以上) 流し¹¹⁾、その後に流水中ヘシリンジの先端部を挿入して 50 mL を採取した。

2. 3. 2 R2A寒天培地の作成

- ① 必要量の Difco™ R2A Agar を、電子天秤 PB3002-L (メトラー・ドレド株式会社) を用いて準備する。
 - ② 必要量の精製水を、メスシリンダーを用いて準備する。
 - ③ ①と②を三角フラスコに入れ、混和する。
 - ④ ③を高圧蒸気滅菌 (121℃、15 分) する。
 - ⑤ ④を滅菌シャーレに分注する。
- ※ 作成した培地外観を図 2 に示す。



図 2 培地外観

2. 3. 3 メンブレンフィルターによる濾過

- ① 検体をシリンジで採取後、モニター流入口にシリンジを接続し、徐々に加圧していき検体を濾過させる。
- ② 検体を全て濾過し、その後にモニター流出口側に残った検体を抜き取るため、流出口ヘシリンジを

接続し直して残液を吸引する。

- ③ モニターからメンブレンフィルターを取り出し、「2.3.2」で作成した寒天培地に乗せ、蓋をする。

※ 濾過操作工程を図3に示す。

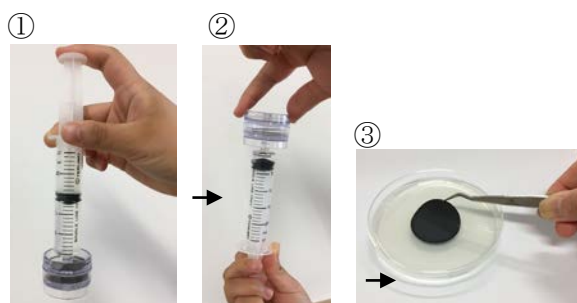


図3 濾過操作工程

2.3.4 培養および観察

滅菌シャーレの蓋側を下にして、3パターンの温度下（室温、25、37℃）で培養した。室温の記録には、温度ロガーRC-5（Elitech）を用い、培養期間中は常に30分間隔で温度を測定し記録した。また、培養温度が25、37℃の検体は、培養期間の温度を安定した環境とするためにインキュベーターを用いて培養した。使用したインキュベーターは、25℃の検体はMEDELSIT-105（株式会社三商）、37℃の検体はIC-450A（アズワン株式会社）である。なお、いずれの培養も大気中で行ったため、この培養で観察される細菌は、好気性菌（偏性好気性菌）または通性嫌気性菌である。

培養期間は7日間とし、期間中は毎日観察を行い、培地上に肉眼で確認できるコロニー数を確認した。

2.4 結果

コロニー数の観察結果を表5に示す。

表5 培養経過日数でのコロニー数の推移

培養 温度	培養経過日数 [日目]			
	1 - 4	5	6	7
室温	0	0	39	41
25℃	0	11	12	17
37℃	0	0	0	0

2.5 考察

今回の研究結果から、37℃の培養温度ではコロニーは確認されなかった。

室温と25℃の培養温度での結果を比較したところ、室温で多くのコロニーが確認された。しかし、培養期間中の室温は平均値20.1℃（最小値16.1℃、最大値23.6℃、中央値20.2℃）であり、コロニーの増殖しやすい温度であったと考えられた。

今回は培養期間が冬期であり、常時空調設備の稼働している環境であった。しかし、培養時期が夏期となり、夜間や休日は空調設備の稼働しない環境であると、室温が37℃近い環境となることも想定された。

2.6 結論

37℃の培養温度は、従属栄養細菌の培養には適さない。また、水道水中の従属栄養細菌を培養する場合には、インキュベーターを用いて20℃前後で培養することが望ましいことが示唆された。

研究2

3. 従属栄養細菌の性質(コロニー性状、グラム染色性)

3.1 研究概要

3.1.1 コロニー性状

前述の研究1では「コロニー数」に注目したが、この研究2では「コロニー性状」に注目する。これは、コロニー性状（色、透明度、大きさ、形、厚さ）も合わせて観察することで、細菌の分類や同定に必要な試験を行うにあたっての判断材料となるためである（図4参照）。

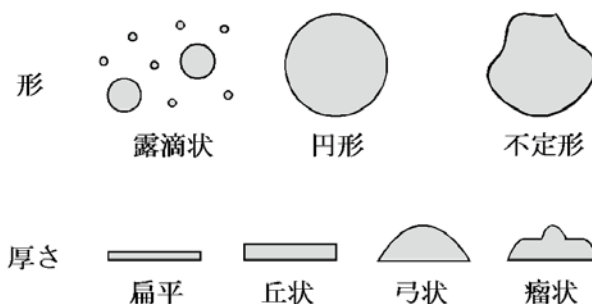


図4 コロニー性状（形・厚さ）

3. 1. 2 グラム染色性

グラム染色は、1880 年にデンマークの Christian Gram により考案された染色法である。細菌はグラム染色により、グラム陰性菌とグラム陽性菌に大別される。

染色原理は、細菌の細胞壁構造の相違による。具体的には、グラム陽性菌は外膜を持たず、厚い細胞壁（最大 40 層）を持ち、アルコールによって脱色されにくい。一方、グラム陰性菌は薄い細胞壁（1 - 2 層）の外側に外膜を持ち、アルコールによって容易に脱色される（図 5 参照）。この細胞壁構造の相違により、グラム陽性菌は紫色、グラム陰性菌は赤色となって観察される（図 6 参照）。また、この染色により、細菌の形状を観察することができる（図 7 参照）。

細菌に関するこのような情報は、コロニー性状と同じく、細菌の分類や同定に必要な試験を行うにあたっての判断材料となる。

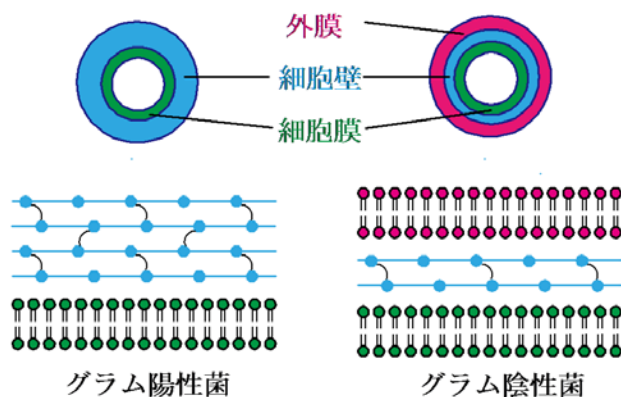


図 5 細胞壁構造の模式図

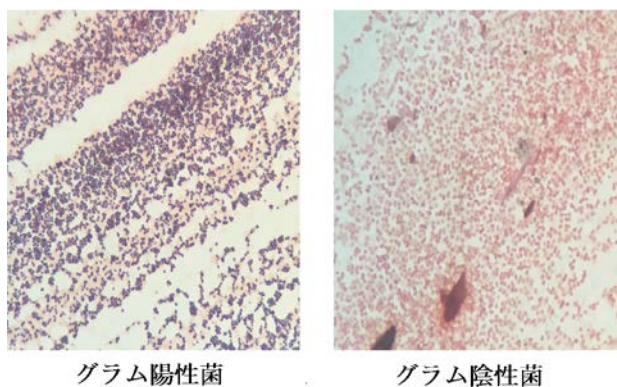


図 6 グラム染色

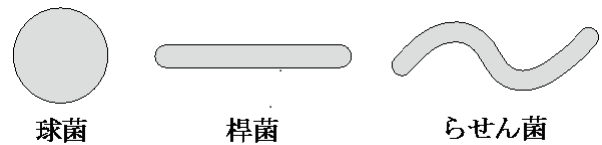


図 7 細菌の形状

3. 1. 3 顕微鏡

顕微鏡は、肉眼では見ることはできない微小なものを拡大し、観察するための装置である。

3. 1. 3. 1 顕微鏡の分類

顕微鏡の種類は、生物顕微鏡、工業用顕微鏡、実体顕微鏡に分類される（表 6 参照）。どの顕微鏡を使用するかは、観察する標本や目的によって選択する。なお、生物顕微鏡、工業用顕微鏡には、対物レンズが標本の上に位置する正立型と、標本の下に位置する倒立型がある。

表 6 各顕微鏡における標本の特徴¹³⁾

分類	特徴
生物顕微鏡	染色されたもの、あるいは染色されていない透明な生物標本を観察
工業用顕微鏡	工業用途（半導体ウェハ検査、液晶基板検査）や金属標本を観察
実体顕微鏡	標本を立体的に観察

3. 1. 3. 2 顕微鏡の観察法

顕微鏡の観察法は、明視野観察、暗視野観察、位相差観察、微分干渉観察、蛍光観察、偏光観察などがある（表 7 参照）。どの観察法とするかは、顕微鏡の種類と同じく、観察する標本や目的によって選択する。

3. 2 使用機器

3. 2. 1 グラム染色液

今回の研究で使用したグラム染色液は、BDTM グラム染色キット（日本ベクトン・ディッキンソン株式会社／LOT：6335725）である（図 8 参照）。

表 7 各観察法の特徴¹³⁾

観察法	特徴
明視野観察	標本を透過または反射した光を観察
暗視野観察	特殊なコンデンサを使用し、標本を斜めから照明して標本により散乱した光を観察
位相差観察	光の回折と干渉を利用し、透明な標本に明暗のコントラストを付けて観察
微分干渉観察	無染色の標本を光が通過する際の屈折率の違い、標本表面の形状による光路差を、明暗のコントラストに変えて観察
蛍光観察	特定の波長の光で照明し、標本や対象物から出る蛍光を観察
偏光観察	標本の偏光特性を明暗のコントラストや色の変化として観察



図 8 グラム染色液外観

BD™ グラム染色キットは、グラムクリスタルバイオレット溶液、グラム脱色液、グラムヨード溶液、グラムサフラニン溶液から構成されている（各液の組成：表 8-11 参照）。

表 8 グラムクリスタルバイオレット溶液

クリスタルバイオレット	3.0 g
イソプロパノール	50 mL
エタノール／メタノール	50 mL
精製水	900 mL

表 9 グラム脱色液

アセトン	250 mL
イソプロパノール	750 mL

表 10 グラムヨード溶液

ヨウ化ポリビニルピロリドン錯体	100 g
ヨウ化カリウム	19 g
精製水	1 L

表 11 グラムサフラニン溶液

サフラニン O パウダー（純粋色素）	4 g
エタノール／メタノール	200 mL
蒸留水	800 mL

3. 2. 2 顕微鏡

今回の研究では、染色されたプレパラート標本の観察を行うため、生物顕微鏡の正立型である ECLIPSE E200(株式会社ニコン)を使用して(図 9 参照)、明視野観察を行った。



図 9 顕微鏡外観

3. 3 方法

3. 3. 1 従属栄養細菌の培養および観察

「2.3 方法」の手順に沿い、水道水中の従属栄養細菌を培養した。また、培養にて肉眼で確認できるコロニーの性状（色、透明度、大きさ、形、厚さ）を観察し記録した。

3. 3. 2 グラム染色

- ① スライドガラス上にコロニーから釣菌した細菌を薄く均一に塗抹する。
- ② 空気中で自然乾燥させる。
- ③ 塗抹面を上にして、火炎の中を 5-6 秒間で 2-3 往復させる。
- ④ 加熱されたスライドガラスの温度が下がり手で触れられるようになったら、塗抹面にグラムクリスタルバイオレット溶液を注いで 1 分

間静置する。

- ⑤ 塗抹面を下にして、水道水を静かに流し、水が無色になるまで流す。
- ⑥ 塗抹面にスライドグラスにグラムヨード溶液を注いで1分間静置する。
- ⑦ 塗抹面を下にして、水道水を静かに流し、水が無色になるまで流す。
- ⑧ 塗抹面をグラム脱色液で、色素が溶け出さなくなるまで30-60秒静置する。
- ⑨ 塗抹面を下にして、水道水を静かに流す。
- ⑩ 塗抹面にグラムサフラニン溶液を注いで30-60秒静置する。
- ⑪ 塗抹面を下にして、水道水を静かに流し、水が無色になるまで流す。
- ⑫ 給水紙またはペーパータオルで、スライドグラスから水分を吸い取る。または、スライドグラスを風乾させる。

3.3.3 観察

グラム染色を行ったスライドグラスを、顕微鏡でグラム染色性（陽性または陰性および形状）を観察した。この際、顕微鏡の倍率は1,000倍（接眼レンズ10倍、油浸用対物レンズ100倍）とした。

3.4 結果

コロニー性状およびグラム染色性の結果を表12に示す。

3.5 考察

今回の研究結果から、コロニー性状が一致するものが2組（コロニー番号で4と9、5と10）確認された。しかし、コロニー性状が同一であっても、グラム染色性も一致するもの（4と9）と、一致しないもの（5と10）とに分かれた。

表12 コロニー性状およびグラム染色性

コロニー番号	コロニー性状 (色、透明度、大きさ、形、厚さ)	グラム染色性
1	アイボリー（半透明）、大、円、瘤	陽性、球菌
2	白、小、円、扁平	陽性、球菌
3	桃（半透明）、大、円、弓	陰性、球菌
4	桃、中、円、丘	陰性、桿菌
5	黄、小、円、扁平	陰性、桿菌
6	白、中、円、丘	陽性、球菌
7	アイボリー（半透明）、中、円、丘	陽性、球菌
8	黄（半透明）、中、円、丘	陰性、桿菌
9	桃、中、円、丘	陰性、桿菌
10	黄、小、円、扁平	陽性、桿菌
11	クリアー（透明）、中、円、丘	陰性、桿菌
12	白（半透明）、中、円、丘	陽性、球菌
13	クリアー（透明）、小、円、扁平	陰性、桿菌

※コロニーの大きさは、大:5 mm 以上、中:2 mm 以上5 mm 未満、小:2 mm 未満とした。

3.6 結論

透析液中に多数の従属栄養細菌が確認された場合、その細菌の種から汚染源の特定を試み、細菌混入防止策を講ずることとなる。しかし、コロニー性状が同一であってもグラム染色性に相違の認められる細菌が存在することが明らかとなり、コロニー性状のみで細菌の種を判断することはできないことが示唆された。

4 まとめ

今回の研究では、水道水中の従属栄養細菌の至適培養温度および性質（コロニー性状、グラム染色性）について検討した。

今後は細菌の分類や同定に必要な試験となる、糖分解試験（OF 試験等）、呼吸酵素に関する試験（オキシ

ダーゼ試験、カタラーゼ試験、等)、運動性試験などについても検討を加え、水道水中に存在する従属栄養細菌のより細かな性質を把握していく予定である。

本論文で使われているシステム・製品名は、一般に各社の商標または登録商標である。

参考文献

- 1) 一般社団法人 日本透析医学会 統計調査委員会:
「わが国の慢性透析療法の現状(2016 年 12 月 31 日現在)」(2017)
- 2) Stenvinkel P, Heimburger O, Paultre F, et al:
「Strong association between malnutrition, inflammation, and atherosclerosis in chronic renal failure」、Kindney Int 55、p1899-1011(1999)
- 3) Sitter T, Bergner A, Schiffel H:「Dialysate related cytokine induction and response to recombinant human erythropoietin in haemodialysis patients」、Nephrol Dial Transplant 15、p1207-1211 (2000)
- 4) Furuya R, Kumagai H, Takahashi M, et al:
「Ultrapure dialysate reduces plasma levels of β_2 -microglobulin and pentosidine in hemodialysis patients」、Blood Purif 23、p311-316(2005)
- 5) 山上征二:「透析液安全基準策定報告」、透析会誌 28 巻 11 号、p1487-1493(1995)
- 6) 秋葉隆、川西秀樹、峰島三千男、他:「透析液水質基準と血液浄化器性能評価基準 2008」、透析会誌 41 巻 3 号、p159-167(2008)
- 7) 竹澤真吾、松本哲哉:「透析液のバイ菌がよくわかる本」、東京医学社(2008)
- 8) 日本水道協会:「上水試験方法 2001 年版」(2001)
- 9) 保坂三継、眞木俊夫:「水の従属栄養細菌試験における培地並びに培養条件の検討」、東京衛研年報 52 号、p245-249 (2001)
- 10) 日本透析医学会 学術委員会:「2016 年版 透析液水質基準」、透析会誌 49 巻 11 号、p697-725(2016)
- 11) 日本臨床工学技士会 透析液等安全委員会:「透析液清浄化ガイドライン Ver.2.01」(2014)

12) アドバンテック東洋株式会社:「2017～18 版総合カタログ」、http://saas2.startialab.com/acti_books/1-045173776/13429/_SWF_Window.html (2018 年 2 月 13 日アクセス)

13) 株式会社ニコン:「顕微鏡の基礎知識」、<http://www.nikon-instruments.jp/jpn/learn-know/microscope-abc> (2018 年 2 月 13 日アクセス)

Title: Studies on heterotrophic bacteria in the tap water

Author: Kazue Kojima

Address: Department of Clinical Engineering, College of Life and Health Sciences, Chubu University, 1200 Matsumoto-cho, Kasugai, Aichi 487-8501, Japan.

Keywords: heterotrophic bacteria, tap water