

31 R2A シート状培地の臨床での有用性の検討

長野赤十字病院臨床工学課 臨床工学技士

○塚田博久 大木政文 渡辺誠 櫻井聖崇
山岸哲也 白澤忠敏 藤森淳 木村良雄
阿部秀次

同腎臓内科

市川透 出浦正 徳永真一

I 目的

透析療法と水、これは切り離せない関係にある。水質浄化の指標として今まで ET 活性値が利用されてきた。しかし近年の透析療法の進化に伴い、水質環境の管理がより重要性を増している。ET 活性値に加え液中の細菌数を規定する動きが提案され、細菌レベルにおける水質管理が要求されている。

透析液中の細菌とは、主に従属栄養細菌(有機栄養物を比較的低濃度を含む培地を用いて低温で長時間培養したときに、培地に集落を形成する全ての菌)等の水棲菌を指す²⁾。培地には TGEA または同等の性能の物が推奨され、その中に R2A が含まれる。培養方法も様々で、寒天、液体、シート、メンブレンフィルター法などがある。

シート状の R2A 培地は、寒天状の R2A 培地と同等の性能を持ち、更に簡便な生菌検出が可能とされている。また、熟練した技術や知識を要せずに簡便な操作で培養でき、更に感度も良いとされている。

そこで今回我々はニプロの R2A シート状培地(ニプロ社製:以下シート状培地)と一般的な従属栄養球菌培養に用いられる寒天形式の R2A 寒天培地(日本ペクテンディッキンソン社製:以下寒天培地)を比較し、臨床における有用性を検討した。

塚田 博久 長野赤十字病院 臨床工学課

〒380-8582 長野市若里 5-22-1 026 (226) 4131

II 材料

シート状培地とは、R2A 寒天培地とほぼ同じ栄養成分で作られた、水環境中の生菌測定用培地である(図 1)。測定範囲の目安は $10^0 \sim 10^2$ CFU/ml とされており、透析用水の水質管理に適している。使用期限は冷暗所保存にて製造日より 1 年で、寒天培地に比べ長期である。また培地が薄いため、場所をとらずに培養できる。形成されたコロニーは、培地成分に含まれる発色剤により着色されるため、定量的に測定できる。

使用方法は透明フィルムをめくり、検体を培地表面の不織布に滴下する。空気を抜きながらフィルムを被せて培養する。寒天培地のような乾燥や吸引工程は不要である。培養期間は 7 日間を目安に、最長 14 日間まで観察する。

シート状培地について

(シート状培地とは・・・?)

- R2A寒天培地とほぼ同じ栄養成分の培地。
- 使用期限は1年
- 粘着シート、培地層、不織布、透明シートで構成。
- コロニーが発色されて定量的に測定しやすい。
- 簡便な使用方法
- 培養期間は最長14日間(メーカー推奨)



図 1 シート状培地について

III 方法

培養方法は日本臨床工学技士会・透析液浄

化ガイドライン案に準じた(図2)。

**日本臨床工学技士会・透析液清浄化
ガイドライン(案) 一部抜粋**

(5-1-2)生菌数検査
 平板培養検査法を用い、R2Aまたは同等の物を用いる。R2A培地は寒天、液体、シートのいずれかを用いる。
 培養は常温(15~25℃)で7日間とする。
 チャージする量は1mLを限度とする。

図2 日本臨床工学技士会・透析液清浄化ガイドライン案

日本臨床工学技士会・透析液清浄化ガイドライン案では、常温、15~25℃で7日間の培養とされている。今回我々は、シート状培地のメーカー推奨である、最長14日間まで観察を行った。

検体は陽性反応を示すよう透析用原水を用いた。エンドキシンレベルは、38EU/Lであった。サンプリング方法は、原水を10分間流し滅菌済みシリンジで採取した。検体1mlを培地に直接塗布した。シート状培地・寒天培地は各60枚を用いた。

当院の細菌培養マニュアルに従い、クリーンベンチ内で乾燥・塗布を行った。培養は低温インキュベーターを使用し、26℃に設定した。培地状態を14日間観察し、コロニーの形成を認めた時点で「陽性」とした。

反応した培地の枚数を測定し、反応率として比較した。両培地の平均反応日数を求め、比較した。コロニー数を7日目・14日目に測定し、感度として比較した。

IV 結果

反応率(図3)では、シート状培地は8日目以降に新たなコロニーの形成が認められず、76.67%の反応にとどまった。寒天培地は10日目まで全ての培地が反応した。シート状培地の反応率は、7日目71.66%、14日目76.67%であった。寒天培地の

反応率は、7日目96.66%、10日目で100%に達した。シート状培地の反応率が低い結果となった。

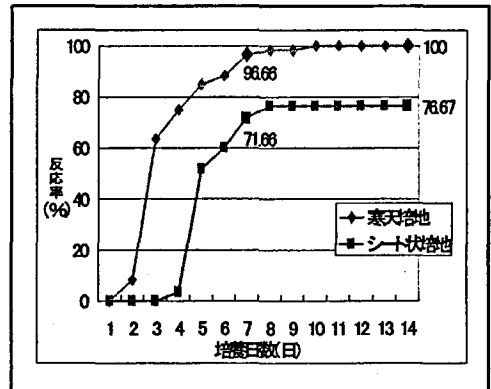


図3 反応率の比較

反応日数と反応枚数の比較(図4)では、シート状培地は培養5日目が反応のピークとなり、60枚中29枚が反応した。寒天培地は培養3日目が反応のピークとなり、60枚中33枚が反応した。平均反応日数は、シート状培地で5.6±7.73日、寒天培地で3.9±8.65日であった。シート状培地は寒天培地に比べ、遅い反応になったが、有意差は認められなかった。

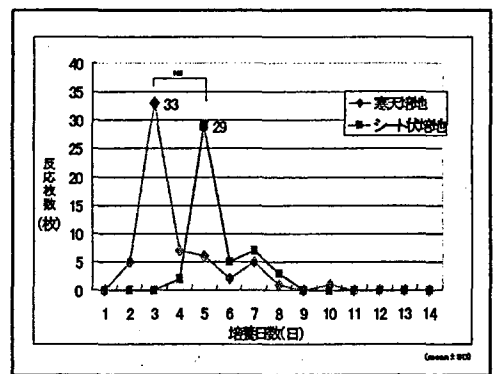


図4 反応日数と反応枚数の比較

平均コロニー数(図5)は、培養7日目のシート状培地で2.3±1.44CFU/mL、寒天培地は4.1±3.20CFU/mLであった。シート状培地が有意に低値を示した。培養14日目では、シート状培地で2.5±1.61CFU/mL、寒天培地は4.2±2.48CFU/mL

であった。有意差は認められなかった。シート状培地でコロニー数が少ない結果となった。

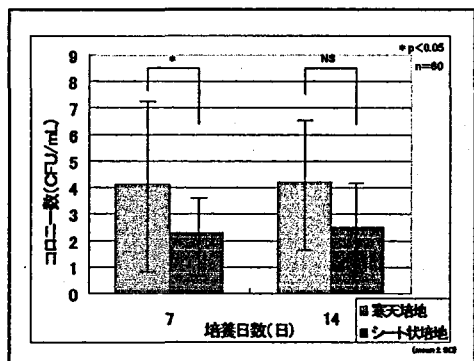


図5 平均コロニー数の比較

以上の結果より、シート状培地は寒天培地に比べやや反応の鈍い培地であることがわかった。

発生したコロニーを任意に各培地より8枚ずつ選出し、細菌の同定を行った。検出された細菌は、シート状培地で8枚中4枚よりグラム陽性桿菌が検出された。寒天培地では8枚中3枚よりグラム陽性桿菌・2枚よりグラム陰性桿菌が検出された。シート状培地では細菌の同定ができなかった。寒天培地からは *Corynebacterium* (陽性桿菌) とブドウ糖非発酵菌 *Brevundimonas diminuta/vesicularis* (陰性桿菌)、*Methylobacterium* spp. (陰性桿菌) が同定された。

V 考察

シート状培地は、操作面では培地の乾燥、吸収工程が不要であり、省スペースで培養可能であった。また、コロニーのカウント、状態確認も容易であった。

しかし、シート状培地は、R2A 寒天培地に比べ反応率、感度において低い傾向が見られた。

シート状培地は、コロニー形成の過程で、コロニーが培地層から不織布表面に押し上げられる。細菌の保持する酵素と不織布内の発色剤が反応し、コロニーの形成を確認できる。不織布表面に形成されたコロニーの色が異なることから、菌種により酵

素と発色剤の反応が異なると考えた。菌種により発色が遅れたり、発色されないことが考えられる。

反応も遅い傾向が見られた。シート状培地の構造から、培地表面を観察する R2A 培地に比べ判定に時間が要したと考えた。

臨床で細菌培養をするにあたり、水質清浄化の必要性として以下のものが挙げられる。

- ・短時間で細菌が反応する
- ・感度が良い
- ・ルーチンで培養を行うにあたり、操作が簡便

従来では、培養は時間を要し、コンタミの影響を受けやすいことから短時間で正確な結果の出る ET 活性値を代用してきた。現在 ET と細菌数に相関性がないことが挙げられ、今後は両者を併用していく必要がある³⁾。

今回使用した両培地は、透析液清浄化の指標として有用であると考えた。しかし、透析液水量による清浄化の保障には課題が残る。

シート状培地はメーカー推奨の14日目まではコロニーの形成が安定せず、7日以内では正確な結果を得られない。ガイドライン(案)では培養期間は7日とされており、時間を要するシート状培地は不適である。しかし、反応率や感度で寒天培地にやや劣るものの、シート状培地が操作性に優れていることは認められた。シート状培地は、より多くの施設がルーチンで水質管理を行うための第一歩として、有効ではないかと考える。

反応率・感度がよく、短時間で結果の出る寒天培地が、これからの水質清浄化の基準を満たしていく培地であると考えられる。

VI まとめ

シート状培地は操作が簡便で、場所をとらずに培養できた。

しかし、シート状培地は寒天培地に比べ、平均反応日数、反応率、感度で劣っている傾向がみられた。臨床で使用するには、感度および反応時間

に優れる寒天培地が有用だと考えられる。

シート状培地の更なる改良に期待したい。

<参考文献>

- 1)ANSI/AAMI RD52:2004, Dialysate for hemodialysis,AAMI,VA,USA,2004
- 2)小野信行:細菌検出システムの導入法—臨床工学士の立場より 腎と透析 vol.61 別冊 HDF 療法'06 37-40 2006
- 3)川西秀樹 他:透析液水質管理基準の策定—ISO 基準の現状と本邦における取り組み— 腎と透析 vol.61 別冊 HDF 療法'06 29-32 2006