

## 34 メンブレンフィルタを使用した細菌培養検査の有用性

JA長野厚生連 篠ノ井総合病院

臨床工学科 小林 正宏、高橋 延之、塩澤 勉

同腎臓内科 田村 克彦、長沢 正樹

### はじめに

当院透析センターでは開設から 35 年が経過しているが、開設当時から全装置で毎月 1 回細菌培養検査を施行している。従来はハートインフュージョン寒天培地を使用していた。この培地の特性は 37℃ 近辺で短時間に集落を形成する条件により増殖する細菌しか抽出されないため、透析液中の水棲菌の抽出には不向きであった。そこで 3 年前より、低栄養培地である Reasoner's Agar No2 (R2A) 培地を使用し、20℃ で 7 日間の条件で長時間低温培養させて評価してきた。しかし、従来の細菌培養検査は 1ml 採取し培養していたが、検体中に細菌が含まれていない場合や、培養が不十分な場合は、0CFU/ml という結果になり、過小評価されてしまう問題があった。そこで今回、従来の問題をクリアする目的で、10ml 以上の検体を膜に濾過し細菌をトラップさせて培養する MILLIPORE 社製 Milliflex PLUS を新規導入し、従来法と比較検討した。

### 概要

装置本体は MILLIPORE 社製 Milliflex PLUS と Pumphead からなっている(図 1)。

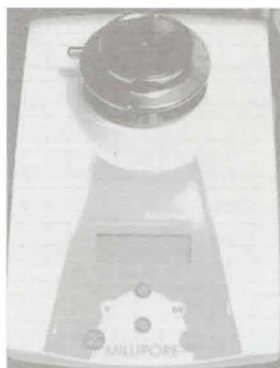


図 1 Milliflex PLUS

小林 正宏 J A 長野厚生連篠ノ井総合病院 臨床工学科  
〒388-8004 長野市篠ノ井会 666-1 TEL.026-292-2261



図 2 MILLIFLEX 100 FILTRATION FUNNEL (濾過ユニット)  
(0.45 μm membrane filter)

測定方法は、装置本体の Pumphead の上に 0.45 μm の濾過ユニット(図 2)を載せ、そこへ検体を入れ濾過させ濾過ユニットのメンブレンフィルタを R2A 培地に貼り付け培養を行う。

当院の透析液供給システムは 2 系統の供給システムからなり両系統とも PVDF ループ配管で、ループ配管内に PVDF + ETCF システムがある(図 3)。消毒剤は、1・2 系とも ECO-200 を 175 倍希釈(342ppm):AMTEC にて施行している。全台クリーンカプラを装着し、透析終了後は毎回 70%エタノールにて消毒を行い透析液清浄化を徹底している。

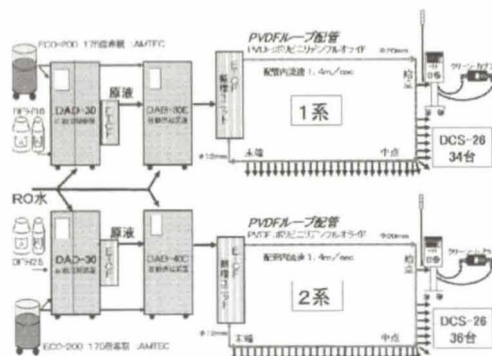


図 3 当院透析液供給装置系統図

### 対象・方法

対象は A・B・C・D 群に分け、A 群は Dialysate for

infusion (O/L HDF 置換液)、B 群は Ultra-pure dialysate (ETCF 搭載装置)、C 群は Conventional dialysate (ETCF 未搭載装置)、D 群は ETCF 循環ユニットとした。

方法は A 群では補液専用回路より、B 群はバイパスカブラ出口部より、C 群は 1・2 系ループ配管の始点・中点・末端のバイパスカブラ出口部よりサンプルし、サンプリング量は MF 法で 100ml、従来法で 1ml 採取した。D 群では日機装社製ルーアロック式サンプルバルブより、MF 法で 1000ml、従来法で 1ml 採取した。全ての群において、エンドトキシン測定も同時に行い、サンプリングのタイミングは全箇所朝の液置換立ち上がり時に行った。

なお、培地は R2A 培地を使用し、20~25°C で 7 日間培養し評価した。

## 結果

### ①A 群(図 4)

O/L HDF 置換液では、MF 法・従来法ともすべて生菌は検出されなかった。また、ET 値も検出感度以下だった。

	A-1	A-2	A-3	A-4	A-5	A-6
MF 法 CFU/100ml	0	0	0	0	0	0
MF 法 CFU/ml	0	0	0	0	0	0
従来法 CFU/ml	0	0	0	0	0	0
ET EU/L	感度 以下	感度 以下	感度 以下	感度 以下	感度 以下	感度 以下

図 4、A 群(Dialysate for infusion)

### ②B 群(図 5)

ETCF 搭載装置の透析液では、MF 法で 1~8 コロニー・0.01~0.08CFU/ml 生菌が検出されたが、従来法ではすべて生菌は検出されなかった。また、ET はすべて検出感度以下だった。

### ③C 群(図 6)

ETCF 未搭載装置の透析液では、MF 法で 1 箇所 37 コロニー検出されたがその他では 1~5 コロニー・0.01~0.05CFU/ml であり、コンタミネーションと考えられる。従来法ではすべて生菌は検出されなかった。ET は 1EU/L 以下だった。

	B-1	B-2	B-3	B-4	B-5	B-6
MF 法 CFU/100ml	0	2	4	8	1	2
MF 法 CFU/ml	0	0.02	0.04	0.08	0.01	0.02
従来法 CFU/ml	0	0	0	0	0	0
ET EU/L	感度 以下	感度 以下	感度 以下	感度 以下	感度 以下	感度 以下

図 5、B 群(Ultra-pure dialysate)

	C-1 1 始	C-2 1 中	C-3 1 末	C-4 2 始	C-5 2 中	C-6 2 末
MF 法 CFU/100ml	1	2	37	2	5	1
MF 法 CFU/ml	0.01	0.02	0.37	0.02	0.05	0.01
従来法 CFU/ml	0	0	0	0	0	0
ET EU/L	感度 以下	感度 以下	0.3945	感度 以下	0.3283	0.4582

図 6、C 群(Conventional dialysate)

### ④D 群(図 7)

ETCF 循環ユニットの透析液では、ETCF 後の MF 法・従来法で生菌は検出されなかった。ETCF 前では MF 法で生菌が検出されたが、従来法では検出されなかった。また、ET はすべてにおいて検出感度以下だった。

	1-Pre	1-Post	2-Pre	2-Post
MF 法 CFU/L	176	0	53	0
MF 法 CFU/ml	0.176	0	0.053	0
従来法 CFU/ml	0	0	0	0
ET EU/L	感度 以下	感度 以下	感度 以下	感度 以下

図 7、D 群(ETCF 循環ユニット)

## 考察

今回、メンブレンフィルタ法(100ml~1000ml)と従来法(1ml)で細菌培養検査を比較した結果、従来法では生菌が検出されずメンブレンフィルタ法で検出されたことは、単純にサンプリング量が100~1000倍となったことが関与しており、1mlでは十分に生菌がサンプリングされていないことが推察された。

細菌培養検査を施行する際、ISO 基準(案)の Ultra-pure dialysate を達成するにはメンブレンフィルタ法を用いるべきであると考えられる。本来、メンブレンフィルタ法を施行するにはクリーンベンチ等を使用し、また検体を直接採取できず手技が煩雑化してしまうため、多大な労力と時間を要してしまう。MILLIPORE 社製 Milliflex PLUS Pump を用いたメンブレンフィルタ法は、クリーンベンチを使用せずにベッドサイドで直接検査でき、各透析施設での細菌培養検査を可能とする装置であると考えられる。

今回の一連の検討から、ETCF は単純に ET を除去しているだけでなく、生菌も ETCF を通過させないことが推察された。しかし、通常的使用方法では ETCF 内に生菌が堆積されてしまうため、ETCF 内で生菌が繁殖してしまい、汚染層になりかねない。そのため、ETCF 内のフラッシングを毎日行うことが必須であると考えられる。

また、現在ほとんどの施設で、ET だけで配管・透析液の評価を行っているのが現状である。生菌の存在と ET 値には相関が無く、透析液清浄化は ET 値だけで評価できない。今回導入した Milliflex PLUS Pump も細菌培養検査のひとつの方法であるが、他にも平板培養法、センシメディア、R2A シートなどの方法があり、当院でも 1ml のサンプリング量でも細菌が検出できることを確認しているため、まず、生菌がどれぐらい存在するのかを自施設で確認することが、透析液清浄化において重要なことであると考えられる。

## 結語

MILLIPORE 社製 Milliflex PLUS Pump を用いたメンブレンフィルタ法は、簡易で精度の高い細菌培養検査を行える有用な手段といえる。