

## 23 R2A寒天培地の性能評価の検討

長野赤十字病院臨床工学課 ○ 大木 政文 塚田 博久 渡辺 誠 桜井 聖崇  
山岸 哲也 監物 大介 白澤 忠敏 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

透析療法において、水質清浄化の指標としてエンドトキシン(以下ET)測定がおこなわれている。しかし、製造水中にはETだけでなく従属栄養細菌(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)が存在すると報告されている。近年、透析液、RO水中の微生物学的な検討は特に注目され、R2A寒天培地またはTEGA寒天培地を用いた細菌培養検査が行われている。

今まで細菌培養という分野は、我々臨床工学技士にとって、接点が無く未知の分野だった。しかし、安全な透析治療を行うための水質清浄化の指標の一つとしてとても重要となりました。

今回我々は、R2A寒天培地を使用し、R2A寒天培地使用前処理の乾燥時間が感度、吸収性能に影響を及ぼすか比較、検討した。

### II 方法・材料

竹澤ら<sup>1)</sup>の方法に準じ直接塗抹法を用いて細菌培養を行った。

前処理乾燥時間は4パターン 0・3・6・12時間各10検体。計80枚のR2A寒天培地を使用した。

R2A寒天培地による細菌培養を施行するにあたり、日本ベクソン・ディッキンソン社製R2A寒天

培地:以下B社、マイクロバイオ社製R2A寒天培地:以下M社を使用した。検体吸収時間により吸収性能、コロニー数により感度として測定した。

検体は当院で使用している原水を使用した。井戸水を使用している為、エンドトキシン レベルは、88EU/Lと低値だった。

サンプリング方法は、検体を15分間流し、その後、滅菌済試験管へ採取した。空中にある細菌の混入を防ぐ為に滅菌済試験管を使用した。

塗布方法は、シャーレの検体塗布面を上向きにし、マイクロピペットを用い、2ml塗布した。

検体塗布後、培地表面が上向きの状態のまま検体を培地に吸収させた。吸収終了の判断は、シャーレを傾けても液が溜まらなくなった時間とし、吸収時間として測定した。吸収終了後、シャーレの検体塗布面を下向きの状態にし、室温培養した。コロニー測定は、室温で168時間培養後に行った。

### III 結果

R2A寒天培地はウェットな状態で出荷される為、検体塗布の前処理として培地表面の乾燥状態を整える必要がある。培地表面を乾燥させることは検体を培地内部に吸収させる工程と、コロニーの孤立集落を作る工程で必須である。

図1から前処理の乾燥時間を長くすることで検体吸収時間を短縮することが認められた。

大木 政文 長野赤十字病院 臨床工学科 〒380-8582  
長野市若里五丁目22番1号 (026) 226-4131

B社のR2A培地では、3時間でコロニー数の増加を認めた。また、コロニーの孤立集落を多数認め、定量性に優れたコロニーを形成できる傾向にあった。M社のR2A培地では、各群での差を認めなかった。

M社は、検体吸収に時間がかかった為、コロニーの孤立集落を形成することができず融合してしまい、定量性の低い傾向となった。

図2から感度において、B社とM社との間には有意差を認めなかった。

図3はB社3時間乾燥の培養所見です。コロニーが孤立集落を形成していることから、定量性に優れていると思われた。

図4はM社3時間乾燥の培養所見です。吸収時間に時間がかかった為、コロニーが孤立集落を形成することができず融合してしまい、定量性の低い結果となった。

#### IV 考 察

AAMIの新しい透析液基準が策定され、引き続きそのISO版が検討されています。AAMIから提案された指針<sup>2)</sup>によると、通常の透析液中の生菌総数は100cfu/ml以下、ウルトラピュア(超精製)透析液中の生菌総数は0.1cfu/ml以下が施設として満たさなければならない生菌数の基準であるとされている。

細菌培養による透析液、RO水の水質浄化の必要性として、以下のものが上げられる。

- ① 透析液、RO水のETレベルは生菌数と必ずしも一致しない<sup>3)</sup>。
- ② 極めて微弱な透析液の細菌学的汚染でも、生体に微弱炎症を惹起してMIA症候群の発生母胎となる<sup>4)</sup>。
- ③ 高浸透性ダイアライザー、on-lineHDFの普及。

透析液、RO水の細菌培養検査には、標準寒天

培地と比べ有機栄養濃度を低値にした低栄養培地(R2A寒天培地またはTEGA寒天培地)を用いて行う。

低栄養培地は、標準寒天培地と比べ有機栄養濃度を低値にした培地である。有機栄養濃度を低値にすることにより、フリーラジカル・スーパーオキシドの消去作用と解毒作用を呈し、従属栄養細菌のコロニーを多く形成することができる。このことから、透析液、RO水中の生菌対策として、低栄養培地(R2A寒天培地またはTEGA寒天培地)が適していると考えられる。

今回の研究ではR2A寒天培地を用いた。検体塗布の前処理として培地表面の乾燥状態を整える必要がある。培地表面を乾燥させることは検体を培地内部に吸収させる工程と、コロニーの孤立集落を作る工程で必須である。R2A寒天培地使用前処理の乾燥時間が吸収性能に及ぼす影響としてB社、M社共に、培地の乾燥時間を長くすることで吸収時間を短縮することができた。

M社は、B社と比べ検体吸収に時間がかかった。検体吸収に時間がかかった為、検体が培地内に吸収される工程と培地上にコロニーが形成される工程が同時に行われてしまったと考えられる。その為、コロニーが孤立集落を形成することができず定量性が低くなってしまった。また、定量性が低い為、コロニー数を正確に測定することが難しく、感度にばらつきが出てしまったと考えられる。

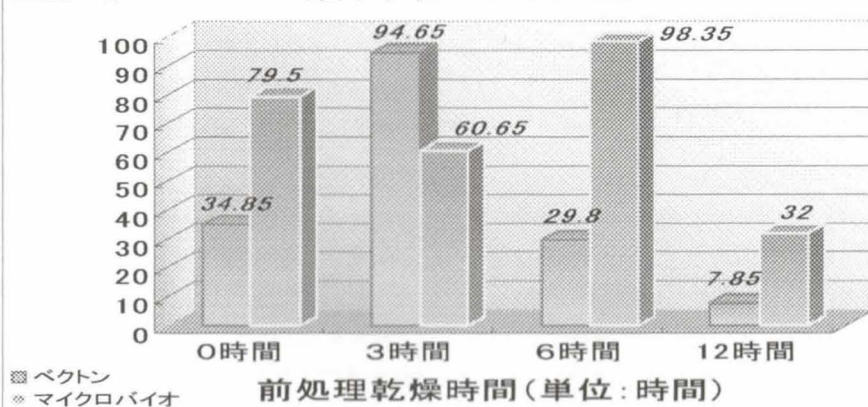
B社はM社と比べ、検体吸収に時間を要さなかった。定量性に優れた原因として、検体が培地内に吸収されてから時間をおいて培地上にコロニーが形成されたと考えられる。

R2A寒天培地使用前処理の乾燥時間が感度に及ぼす影響としてB社において、前処理3時間乾燥は12時間乾燥と比べコロニーの発生数が多かった。このことから、過度の乾燥時間はコロニー形成、発生に障害をもたらすと考えられる。

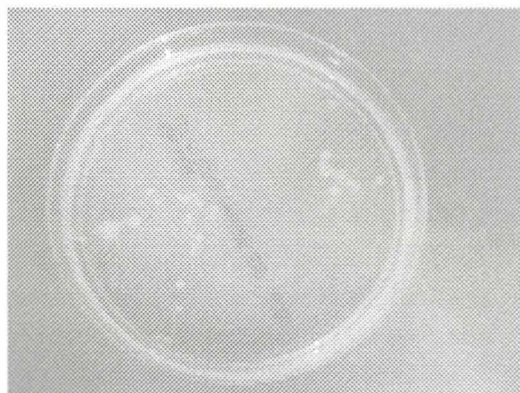
[図1] 検体吸収時間(単位:時間)



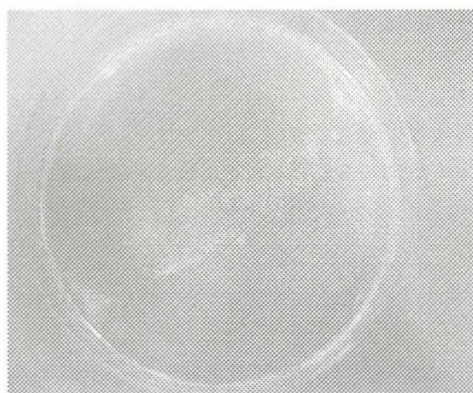
[図2] コロニー数(単位:cfu/2ml)



[図3] ベクトン3時間乾燥



[図4] マイクロバイオ3時間乾燥



## V まとめ

ペクtonのR2A寒天培地で、細菌培養使用前処理の乾燥時間は3時間が、感度、定量性においてよい傾向が認められた。

マイクロバイオのR2A寒天培地は定量性が低い為、コロニー数を正確に測定することが難しく、感度にばらつきが出てしまった。

今後、検体塗布量が感度に及ぼす影響、細菌培養検査の再現性の向上などを、クリーンベンチを使用し検討を続けていく。そして、透析液、RO水の水質清浄化、消毒効果の指標として細菌培養検査をルーチン業務にし、継続していく必要がある。

## 参考文献

- 1) 竹澤慎吾 他:すべての透析室において細菌コントロールは可能か. 腎と透析 59 別冊 HDF療法 '05:55-57, 2005
- 2) ANSI/AAMI D52:2004, Dialysate for hemodialysis, AAMI, VA USA, 2004
- 3) 佐々木雅敏:透析液供給ライン内の細菌培養法とET濃度との相関性についての検討. 透析会誌 38:759, 2005
- 4) 政金生人:HDF療法は新循環器合併症を予防できるか. 腎と透析 59 別冊 HDF療法 '05:33-35, 2005