
当院透析液ラインの生菌検査と エンドトキシン活性測定について

酒樹 勤、大谷 匠、金野裕介、嵯峨まゆ子、佐々木由実、小野一美
佐藤啓子、鎌田道子、勝又麻子、藤原夕子、三浦由紀恵、能登宏光
秋田泌尿器科クリニック

Examination of Bacteria by Sensi Media Method and Measurement of Endotoxin Activity of the Dialysate Line in Our Clinic

Tsutomu Sakaki, Takumi Otani, Yusuke Konno, Mayuko Saga
Yumi Sasaki, Hitomi Ono, Keiko Satoh, Michiko Kamada
Asako Katsumata, Yuko Fujiwara, Yukie Miura and Hiromitsu Noto
Akita Urologic Clinic

<緒 言>

ダイアライザーの高性能化に伴い、透析液がダイアライザーを通して血液内に入る内部濾過が問題となり、透析液清浄化は重要な課題となってきている¹⁾。これまでは、透析液清浄化対策として、エンドトキシン (ET ; endotoxin) 活性を指標としてその低減化が進められてきた。しかし最近、透析液中の ET 活性が検出感度以下であっても、透析液中に生菌が検出されたという報告²⁾があり、透析液中の細菌も問題として取り上げられ、生菌検出法についても検討されるようになってきた。

今回、当クリニックでも ET 活性の経時的測定とともに、透析液ラインの細菌の有無と生菌数についても検討を行ったので報告する。

<方 法>

(1) 透析液ラインのエンドトキシン活性の測定

ET 活性は3ヶ月に1度測定した。検体は、Ro 出口部、セントラル供給装置出口部、および透析液ライン末端の、個人用透析装置カプラ出口部の3カ所で採取し、ET 活性はエンドスペーシー法で測定した。

(2) 透析液ラインの細菌検査

生菌検査用の検体採取場所は、Ro 出口部、セントラル供給装置出口部、およびコンソール6台 (ET カットフィルター装着3台、非装着3台) とした。コンソールでの検体採取は、透析液供給側のカプラにダイアライザーを装着し、ダイアライザー出口部から採取した。

生菌検査法としては、マイクロバイオ社のセンシメディア³⁾を使用した。検体数は、Ro

出口部で10本、セントラル出口部とコンソール部ではそれぞれ5本ずつ採取した。センシメディアに検体を6mlずつ注入し、それを室温に置いて10日間観察して、センシメディアの色の変化から生菌の有無を判定した。生菌数はセンシメディアの陽性本数から、表1に示したように推定可能である。

表1. センシメディア判定基準
Sensi Media 5本にそれぞれ検体を6mlずつ添加して検査した場合

センシメディア陽性本数	細菌数
0本陽性	30ml中に細菌は1個未満 (<0.033 個/ml)
1本陽性	30ml中に細菌は1個以上2個未満 (0.033 個/ml \leq <0.066 個/ml)
2本陽性	30ml中に細菌は2個以上3個未満 (0.066 個 \leq <0.1 個/ml)
3本陽性	30ml中に細菌は3個以上4個未満 (0.1 個 \leq <0.133 個/ml)
4本陽性	30ml中に細菌は4個以上5個未満 (0.133 個 \leq <0.166 個/ml)
5本陽性	30ml中に細菌は5個以上 (0.166 個/ml \leq)

また、Ro水と、センシメディア法で生菌陰性だったコンソール1台からの透析液を、それぞれ1ℓ採取し、マイクロバイオ社でデジタル顕微鏡方式細菌検出装置 (DMCS)⁴⁾ を用いて、生菌数の定量測定を行った。

細菌の同定は、保健科学細菌検査室で、センシメディア法で生菌反応が陽性だった検体の一部を、R2A培地で培養して行った。

また、検体の採取時期は、カプラ洗浄日の朝の洗浄前としたが、カプラの洗浄間隔やカプラ・ジョイント管理法と、細菌検出との関係を検討するため、これまでは4週間に1度のカプラ洗浄で、カプラ・ジョイントを通常通りに管理していたのを、守澤ら⁵⁾ が報告した、滅菌バックを用いたカプラ・ジョイントの清潔管理法に変更し、カプラ洗浄間隔を2週間に1度、1週間に1度と短くして検体を採取した。

<結果>

(1) 透析液のエンドトキシン活性

ET活性は、平成9年5月の開院後40ヶ月目頃から上昇したが、Ro装置のモジュール追加により、コンソール末端で5 EU/ℓ以下を維持してきた(図1)。しかし、平成16年3月頃から再び徐々に上昇し始め、平成17年5月にRo出口で33.2EU/ℓ、コンソール末端で28.9EU/ℓとなったため、Roモジュールを3本全て交換した。

モジュール交換後にET活性は低下し、平成18年3月現在、コンソール末端でも1.0EU/ℓ未満を維持している。また、ETカットフィルターを装着しているコンソールでは、ET活性は常に検出感度未満であった。

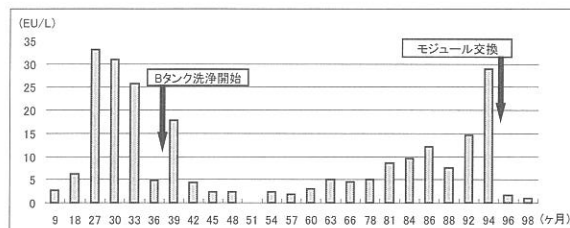


図1. エンドトキシン活性の経時変化

(2) 透析液ラインの細菌検査

カプラ洗浄後4週間目の朝、洗浄前に採取した検体の、センシメディア法での生菌検査結果は、コンソール1台では5本全て陰性だったが、他の5台では2～5本に陽性反応があった。Ro水とセントラル出口では、それぞれ10本と5本の全てが陰性だった(表2)。ETカットフィルター装着の有無と生菌検出結果との間には有意差がなかった。

表2. カプラ洗浄4週間後のセンシメディア法による検査結果

検体採取場所	判定:					陽性: □	陰性: ■
Ro水	■	■	■	■	■		
セントラル出口	■	■	■	■	■		5本陰性
コンソールN0.1	■	■	■	■	□		3本陰性・2本陽性
コンソールN0.6	■	■	■	■	■		5本陰性
コンソールN0.7	■	■	■	■	■		5本陽性
コンソールN0.13	■	■	■	■	■		5本陽性
コンソールN0.21	■	■	■	■	■		5本陽性
コンソールN0.22	■	■	■	■	■		5本陽性

カプラ・ジョイントの清潔管理を行い、カプラ洗浄を2週間に1度に変更して検査したところ、コンソール3台では5本全てが陰性であったが、2台では1本陽性、1台では5本陽性だった。Ro水とセントラル出口では、それぞれ10本と5本の全てが陰性だった(表3)。

表3. カプラ洗浄2週間後のセンシメディア法による検査結果

検体採取場所	判定:					陽性: □	陰性: ■
Ro水	■	■	■	■	■		
セントラル出口	■	■	■	■	■		5本陰性
コンソールN0.1	■	■	■	■	□		4本陰性・1本陽性
コンソールN0.6	■	■	■	■	■		5本陽性
コンソールN0.7	■	■	■	■	□		4本陰性・1本陽性
コンソールN0.13	■	■	■	■	■		5本陰性
コンソールN0.21	■	■	■	■	■		5本陰性
コンソールN0.22	■	■	■	■	■		5本陰性

2週間に1度の洗浄時の、カプラ洗浄翌日の検査では、コンソール4台は5本全てが陰性、1台は1本陽性、1台は3本陽性だった(表4)。

表4. カプラ洗浄翌日のセンシメディア法による検査結果

検体採取場所	判定:					陽性: □	陰性: ■
Ro水	■	■	■	■	■		
セントラル出口	■	■	■	■	■		5本陰性
コンソールN0.1	■	■	■	■	■		5本陰性
コンソールN0.6	■	■	■	■	■		5本陰性
コンソールN0.7	■	■	□	□	■		2本陰性・3本陽性
コンソールN0.13	■	■	■	■	■		5本陰性
コンソールN0.21	■	■	■	■	□		4本陰性・1本陽性
コンソールN0.22	■	■	■	■	■		5本陰性

カプラ洗浄を1週間に1度にしたところ、Ro水、セントラル出口、およびコンソール5台の全ての検体が陰性だった。

センシメディア法による検査が陰性だったコンソールからの透析液と、Ro水をそれぞれ1ℓ採取し、DMCSで生菌数を測定したが、どちらも生菌数は0だった。

センシメディア法で陽性だった検体の、細菌培養同定した結果を表5に示した。

表5. センシメディア法で陽性だった検体をR2A培地で培養した結果

検出された細菌
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>
<i>Pseudomonas stutzeri</i>
<i>Flavimonas oryzihabitans</i>

<考 察>

透析液清浄化の指標として、透析液ラインのET活性の測定と細菌の有無および生菌数について検討を行った。

ET活性は、Ro装置のモジュール交換後に、測定部の全てで1.0EU/ℓ未満となり、ETカットフィルターなしでも、透析医学会で定められている目標値⁶⁾をクリアしていた。今回の検討後、当クリニックではETカットフィルターを全コンソールに装着したが、ETカットフィルターに入る透析液のETを出来るだけ低減化しておくことは、ETフィルター損傷時の生体への影響を少なくする上で重要である。

今回の検討では、生菌検出をセンシメディア法³⁾とDMCS法⁴⁾で行った。センシメディアとは、滅菌済みの試験管の中に、液体培地と二酸化炭素の増加量を検知するセンサーを内蔵した、非接触性密閉型の細菌検査用具⁷⁾である。生菌を含む試料を添加して培養すると、菌が発生する二酸化炭素をセンサーが吸着し、その量が一定値に達すると、センサーの色が青色から黄色に変化する。センシメディアの特徴としては、試料を添加するだけで検査できるという簡便性と、生菌1個でも検出可能なこと、試料が多量に添加できること、二次汚染の心配がないこと等が挙げられ、最近では透析液ラインの生菌検査にももちいられるようになってきた^{8,9,10)}。

DMCS装置とは、試料を添加した寒天培地を、シャーレのまま培養しながらレーザー光線などの光を照射して、試料内の細菌の増殖結果によるコロニー数の映像を半導体センサーに投影させ、それを画像イメージとして取り込んだ後に、コンピューターに転送して解析し、正確なコロニー数をリアルタイムで把握できる、定量試験用の検査システムである。

今回行ったセンシメディア法での生菌検査では、4週に1度のカプラ洗浄でカプラ・ジョイントを通常通り管理していた時は、多くのコンソールで生菌陽性反応を示した。しかし、カプラ・ジョイントを清潔管理して、カプラ洗浄を2週に1度にしたところ、生菌陽性反応は減少し、週

1回の洗浄では生菌反応は認められなくなった。守澤ら⁴⁾が報告したカプラジョイントの清潔管理法とは、ジョイントを透析中に滅菌し、滅菌バック内でアルコールガーゼで清拭したカプラとジョイントを連結し、カプラ・ジョイントを滅菌バックで包んだ状態で、ホルダーに置く方法である。

今回の検討で、Ro水とセントラル出口部では、生菌の反応が5回の測定で一度もなかったことと、センシメディア法で陰性だったコンソールからの透析液とRo水が、DMCS法での測定で生菌数0だったことを考えると、コンソールに送られる透析液のカプラ前の生菌数は多くとも0.001個/ml未満だったと考えられた。したがって、センシメディアで検出された生菌は、カプラ部分に存在していた可能性が高いと考えられた。

一般に使用されているカプラは、構造上、Oリング部にデッドスペースがあり、それが細菌やETの蓄積場所となっていると考えられる。田岡ら¹¹⁾は、ETフリーの透析液を使用して3年経過した、カプラのOリング部でのET活性を調べたところ、平均1600EU/lだったと報告している。透析液清浄化のためには、Oリングまたはカプラの交換や、抗菌カプラ、クリーンカプラ等の導入^{12,13,14)}なども検討する必要がある。

しかし、今回私たちが行った、週1回のカプラ洗浄とカプラジョイントの清潔管理により、センシメディア5本法の生菌検査で陽性反応が出なかったことを考えると、手間をいとわなければ、従来のカプラであっても満足する結果が得られるものと考えられた。

今回の検討結果、従来のカプラ・ジョイントの管理下では、ETカットフィルターを装着してET活性を測定限界以下にしても、接続したダイアライザー出口からの検体で、生菌が検出されたことから考えると、透析液清浄化にはET活性の低減化だけではなく、生菌対策が重要だと改めて考えさせられた。したがって、今後はデッドスペースや細菌付着のないカプラの使用や、カプラジョイントの清潔管理の重要性が増すと思われる。また、センシメディア法は、透析液ラインの生菌検査法として、簡便で有用と考えられた。

参 考 文 献

- 1) 酒井良忠、加藤信行、斧 博志：細菌およびエンドトキシン管理についての報告、臨床透析 21: 217-226、2005
- 2) Ledebro, I .and Nystrand, R: Defining the microbiological quality of dialysis fluid. Artif, Organs 23: 37-43, 1999.
- 3) 小川廣幸：確実な細菌検出 SensiMedia 法とその応用、食品工業46: 48~56、2003
- 4) 小川廣幸：デジタル顕微鏡法、サイエンスフォーラム、食品微生物の簡便迅速測定法はここまで変わった、37: 158-165、2002
- 5) 守澤隆仁、能登宏光、大谷 匠、齊藤雅子、嵯峨まゆ子、佐々木由実、佐藤真紀、佐々木佳奈、松尾恵美、成田裕子、三戸由紀子：当クリニックにおける透析液エンドトキシン活性の経時的变化及びカプラ汚染対策—準無菌的保存法—、透析会誌33 suppl1: 673、2000

-
- 6) 川西秀樹、峰島三千男、竹澤真吾：新たな透析液の水質基準と血液浄化器の機能分類、透析会誌38 suppl: 149-154、2005
 - 7) 小川廣幸：“細菌検査の自動化：センシメディア法とデジタル顕微鏡法”食品機械装置40: 97-103、2003
 - 8) 小野信行、佐藤香奈、後藤至宏、衛藤由香、後藤綾香、田邊恵子、原 賢策、松山和弘、友雅司、松山家昌：透析液ラインにおける生菌検査の試み、透析会誌38 suppl: 776、2005
 - 9) 牧尾敏昭、菅野有造、吉本 裕、芝本 隆、桑原道雄、佐々木成：長期調査結果からの多施設透析液清浄化の現状について 第2報、透析会誌38 suppl: 707、2005
 - 10) 菅野有造、吉本 裕、牧尾敏昭、芝本 隆、桑原道雄、佐々木成：市販される低栄養培地を用いた透析液細菌培養について、透析会誌38 suppl: 1023、2005
 - 11) 田岡正宏、山本千恵子、金成 泰、高杉昌幸：バイオクリーンカプラの開発、腎と透析別冊 HDF 療法 ‘01: 123-126、東京医学社、東京、2001
 - 12) 河上由加：カプラによる透析液汚染—カプラ消毒は有効か？—：腎と透析44別冊 HDF 療法 ‘98: 70-73、東京医学社、東京、1998
 - 13) 河上由加：カプラによる透析液汚染—クリーンカプラとシリコンカプラー腎と透析47別冊 HDF 療法 ‘99: 30-34、東京医学社、東京、1999
 - 14) 下玉利隆行：汚染防止カプラの評価：腎と透析47別冊ハイパフォーマンスメンブレン99: 35-38、東京医学社、東京、1998