

# 蛍光染色法バイオプロローラの使用経験

医療法人社団愛和会 南千住病院 臨床工学技士

守山直行 井内義夫 鈴木康彦 佐京鉄也 堀内崇史

内科 高橋正毅 零淳一 蒲谷堯

愛和クリニック 臨床工学技士

松田敏浩

## 背景

今日の透析医療の発展にはめざましいものがあり、高性能透析器の使用やオンライン HDF の普及に伴い、透析液清浄化の必要性が求められている。

日本臨床工学技士会発行の「透析液清浄化ガイドライン Ver.2.0」に於いて、多人数用透析液供給装置の「生菌数」の基準値は ET 活性値：0.001EU/mL 未満、生菌数：0.1CFU/mL 未満（検体採取量：10mL～100mL）という指標があり、逆濾過透析液を用いたマシンを使用する場合 ET 活性値：0.001EU/mL 未満、生菌数：0.1CFU/mL 未満（検体採取量：50mL～100mL）。

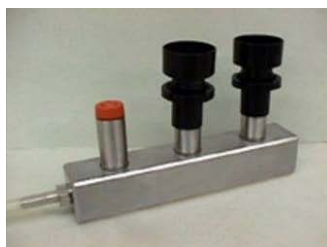
オンライン HDF に於いてもガイドラインでは専用装置製造販売メーカの添付文書に記載された管理基準に準じるが、専用装置入口の水質レベルは、透析液生物学的汚染管理基準を推奨するとされており、実際には  $10^{-6}$  CFU/mL を遵守しなければならない、より厳格な水質管理が求められている。

## 目的

培養期間を要さず短時間で測定でき、細菌数を single cell level で直接計測でき、培養困難な細菌でも検出可能な蛍光染色法の使用経験を報告する。

## 蛍光染色法

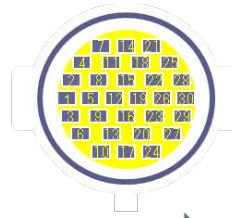
- ① ろ過チップを構成するファンネル内に、検体を 10mL 注入しアスピレータにて吸引。
- ② ファンネル内のプレフィルターに蛍光染色試液を滴下し、10 分間染色する。
- ③ メンブレフィルターをバイオプロローラのディスクステージ上に乗せて測定
- ④ 細菌を染色し蛍光発光した数をカウントする



サンプルの投入

濾過

染色（約10分）



チップをバイオプローラにセットして測定開始（約5分）

## MF法の問題点

これまで、生菌数の検出方法として、日本ポール社製 37mm Quality Monitor (M-TGE Broth)、以下 TGEA 培地 ※TGEA : Tryptone Glucose Extract Agar) を用いた培養法であるメンブレフィルター法（以下 MF 法）を用いて透析液の細菌数測定を行っている。培養法は簡便で精度が高く、広く利用されているモニタリング法であるが、

- ① 適正な培養条件（時間・培地の種類・温度）が必要
- ② 培養日数を要する
- ③ 検体量の検討が必要
- ④生物学的に如何なる条件下でも培養困難な VBNC 化した細菌の存在

※VBNC (viable but nonculturable)

といった問題がある。



## 蛍光染色法の特徴

- ①蛍光染色法は、細胞膜を透過する特性を有し、核酸と特異的に反応する試薬を用いて細菌を蛍光染色し、蛍光発光した点を画像処理によって細菌と認識してカウントする方法がある。
- ② 細菌数を single cell level で直接計測する。
- ③短時間で測定可能（1検体、濾過工程を含め 5～30 分）
- ④VBNC も検出可能

また、生菌だけが有しているエステラーゼと反応する 6-Carboxyfluorescein diacetate, solution (6-CFDA) を用いてエステラーゼ活性を指標とした生菌数を測定するものや蛍光グルコースを用いて蛍光基質を取り込むことで、生菌を蛍光染色し、蛍光発光した点を画像処理によって細菌と認識してカウントする方法がある。

6-CFDA はそれ自体では蛍光を持たないが、細胞内でエステラーゼにより分解され蛍光性のカルボカルボキシルフルオレセインとなるので、生菌数のみ測定することができる。

## 対象及び方法

RO 水及び透析液中の生菌数をそれぞれ、蛍光染色フィルタ法、並びに培養法にて測定した。

### 蛍光染色フィルタ法

光洋産業株式会社製バイオプローラ KV-VKH02、試料 10mL を専用キットにて濾過後、専用試薬にて蛍光染色し測定した。

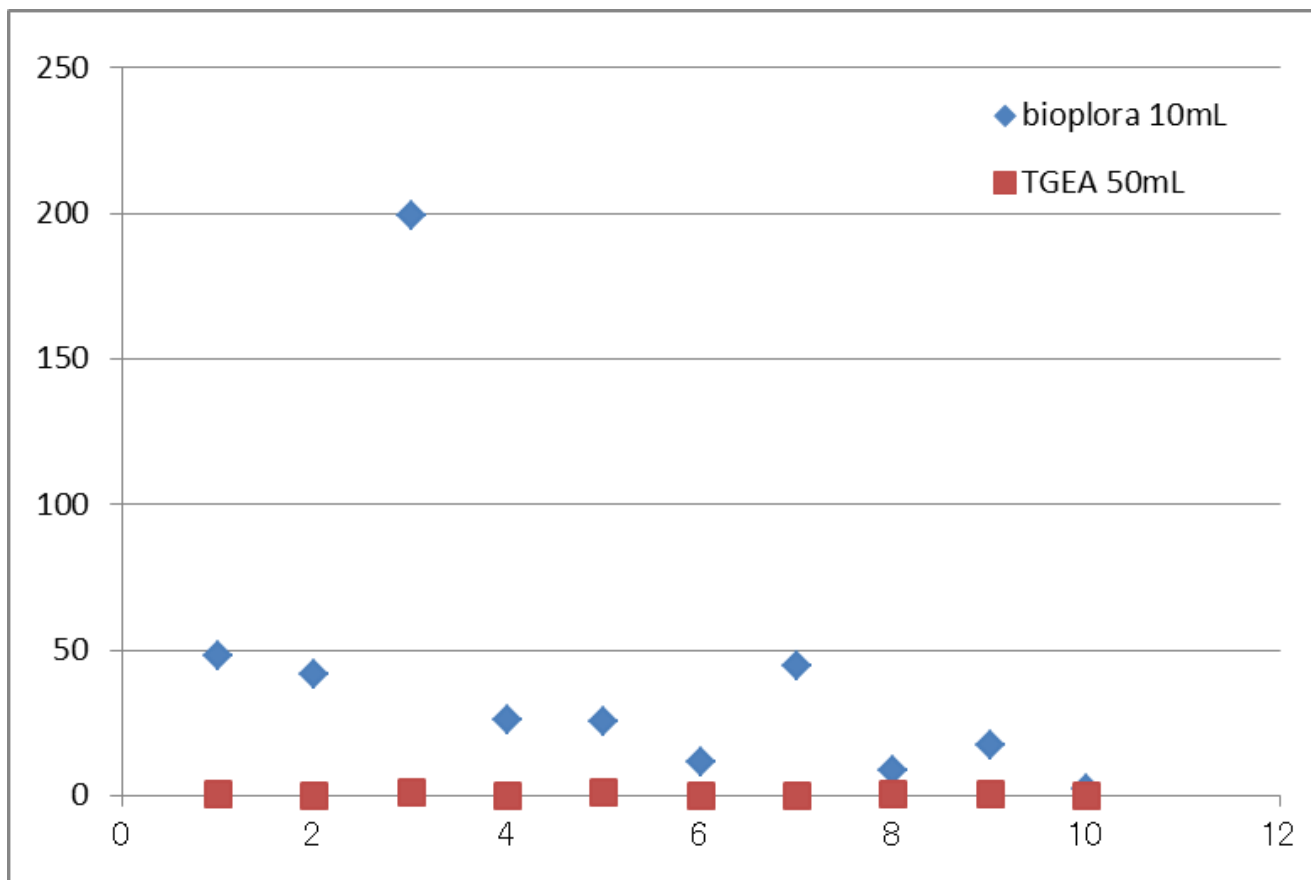
### 培養法

日本ポール社製 37mm Quality Monitor (M-TGE Broth) を使用し透析液 50mL をろ過後、30℃で 7 日間培養し測定した。

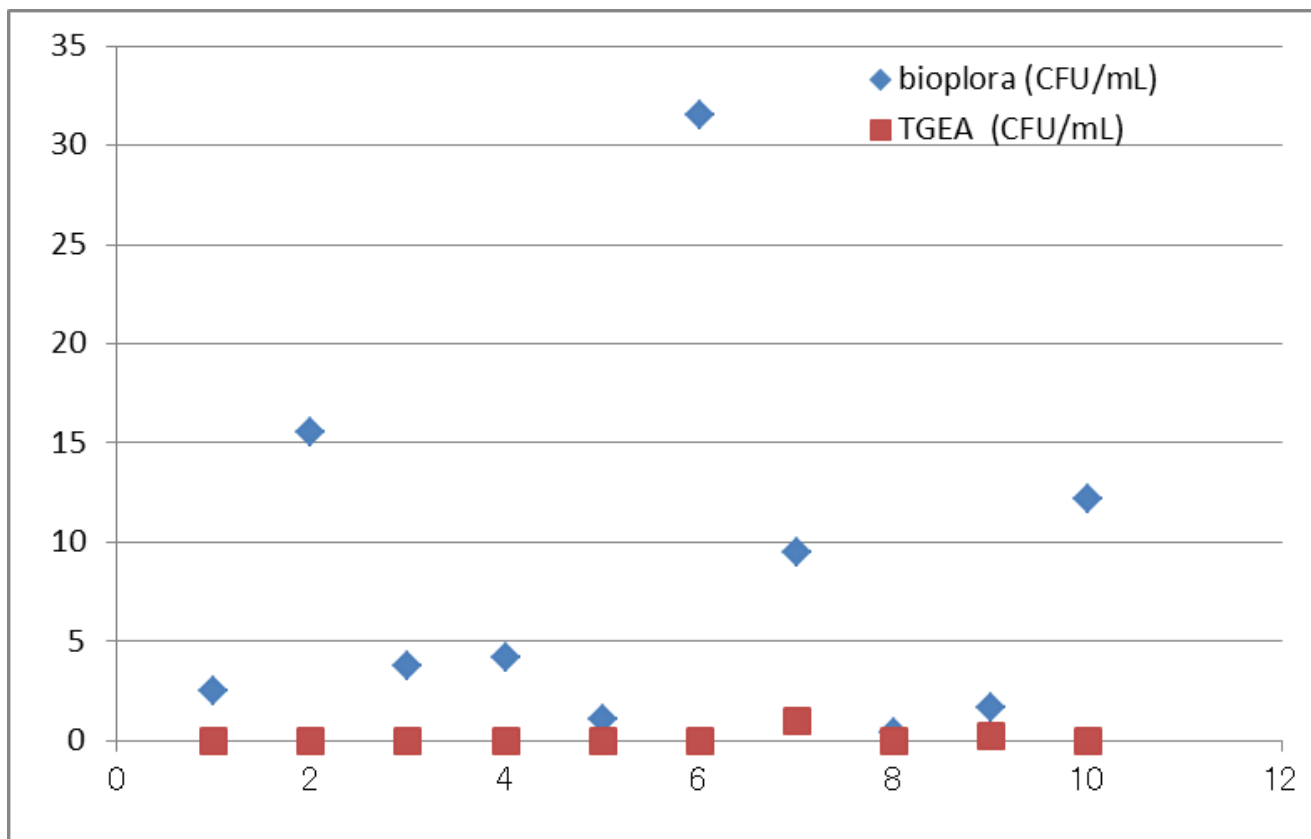


## 結果

RO 水及び透析液の結果を表に示す。 (n=10)



RO 水 (RO タンク循環ライン)



透析液（コンソール）

- ① RO 水では、蛍光染色フィルタ法で、平均 42.504CFU/mL(±18.11)、MF 法を使った培養法で 0.388CFU/mL(±0.128)。透析液では、蛍光染色フィルタ法で、平均 8.232CFU/mL(±3.05)、MF 法を使った培養法で 0.126CFU/mL(±0.09)と蛍光染色フィルタ法の方が多くの生菌を確認できた。
- ② 培養法では、生菌が検出されない検体であっても、バイオプローラによる蛍光染色フィルタ法では生菌が確認できた。
- ③ バイオプローラによる蛍光染色フィルタ法は VBNC 化した細菌を含め、短時間で生菌数の測定ができ、培養法よりも短時間・高精度であることが確認された。

RO水	bioploral 10mL	TGEA 50mL
平均	42.504	0.388
標準誤差	18.11188825	0.128450596
中央値 (メジアン)	25.725	0.25
標準偏差	57.2748196	0.406196449
範囲	196.77	0.9
最小	2.52	0
最大	199.29	0.9
合計	425.04	3.88
標本数	10	10
信頼区間(95.0%)	40.97193774	0.290575435

透析液	bioploral 10mL	TGEA 50mL
平均	8.232	0.126
標準誤差	3.047983596	0.097754795
中央値 (メジアン)	3.99	0
標準偏差	9.638570433	0.309127805
範囲	31.08	0.98
最小	0.42	0
最大	31.5	0.98
合計	82.32	1.26
標本数	10	10
信頼区間(95.0%)	6.895017923	0.22113671

考察

透析液中に存在する細菌の中には、芽胞や R2A 培地や TGEA などの低栄養培地では培養困難であるといわれている菌が含まれているといわれているが、蛍光染色フィルタ法を使用するにあたり、その存在が改めて示唆された。

蛍光染色法は、生菌の測定法として必要な迅速性、高感度を併せ持っているが、精度が高い為に検体の採取、

測定手技がよりシビアになると考えられた。

## 結語

オンラインHDFにおいては  $10^{-6}$  CFU/mL をデリバリーすることが求められていることから、より精度の高い蛍光染色法をオンライン HDF に向けた透析液清浄化の一つの指標にしていきたい。