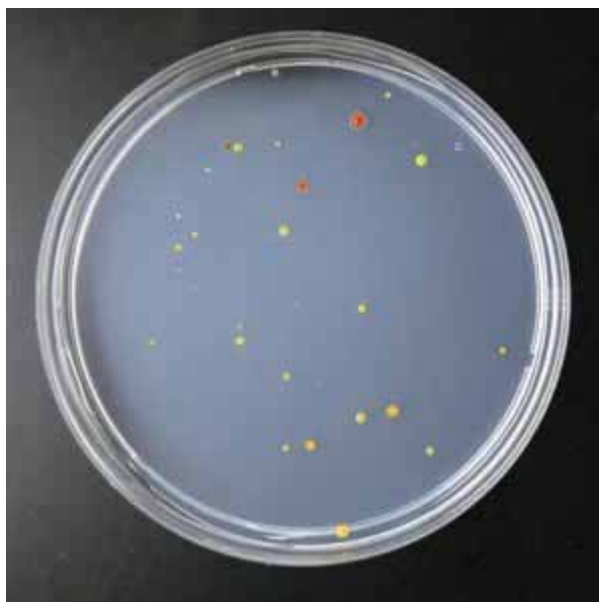




Helping all people
live healthy lives

透析液の生菌数測定に関する

Q & A



R 2 A 寒天培地の操作説明および関連情報はBDホームページに
掲載されています。ご利用ください。

<http://www.bdj.co.jp/>

日本ベクトン・ディッキンソン株式会社
2010年4月 作成

日本ベクトン・ディッキンソン株式会社

〒107-0052 東京都港区赤坂4-15-1 赤坂ガーデンシティ



Helping all people
live healthy lives

1. 従属栄養細菌（HETEROTROPHIC BACTERIA）は、どのような菌種ですか？

有機栄養物を比較的低温濃度を含む培地を用いて低温で長時間培養したとき、培地に集落を形成する全ての菌を従属栄養細菌といいます。

水中には、本来、自然の水環境を生息場所としている多数の細菌がいます。これらは有機炭素濃度が数 mg/L 以下といった低有機栄養環境下で生息しているため、それらの環境に適応して微量の有機物を利用できる能力を獲得しています。従って、一般細菌試験で用いられる標準寒天培地のような高濃度の有機栄養を含む培地では増殖できないか、あるいは増殖できたとしても集落を形成するほどには増殖できないものが多いです。このため同じ組成の培地であっても栄養物濃度を低くし、培養温度を下げた長時間培養することにより、検出される細菌数は一般的に多くなります。

（出典：上水道試験方法・解説 / 2001 / 日本水道協会）

2. 生菌数測定の方法について教えてください。

生菌数測定法には下記 3 種類の方法があります。

1) 混釈平板培養法

試料液と寒天培地とをシャーレの中で混和凝固させ、培養後発生した集落数から試料中の生菌数を算出します。

2) 塗抹平板培養法

試料を寒天平板培地上に塗抹し、培養後発生した集落数から試料中の生菌数を算出します。

3) ろ過法（メンブランフィルター法）

試料液を滅菌メンブランフィルターでろ過し、フィルター上に捕捉された細菌をフィルターごとに培養し、発生する集落数から細菌数を算出します。

（出典：衛生試験法注解 / 2000 / 日本薬学会）



Helping all people
live healthy lives

3. 生菌数測定を実施するためには、どのような器具が必要なのでしょうか？

生菌数測定の検査には下記の器具が必要です。

- 寒天培地（R2A 寒天培地または TGEA 寒天培地）
- サンプリング用のシリンジ（5～10mL 程度採取可能なもの×サンプリングポイント数）
- コンラージ棒（検体塗抹に必要な場合）
- ビニール袋（ファスナーつきのもの）
- ふらん器（低温インキュベーター；設定温度 20 ± 3）
- コロニーカウンター（ 必要な場合）
- 手袋
- アルコール綿（70%エタノールまたはイソプロパノール）

4. 各培地組成成分について教えてください。

1) R 2 A 寒天培地の組成：精製水 1 L あたり

酵母エキス	0.5 g	
プロテオースペプトン No.3	0.5 g	
カザミノ酸	0.5 g	
ブドウ糖	0.5 g	
溶性デンプン	0.5 g	
リン酸一水素カリウム	0.3 g	
硫酸マグネシウム・7水和物	0.05 g	
ピルビン酸ナトリウム	0.3 g	
寒天	15.0 g	（最終 pH 7.2 ± 0.2）

2) T G E A (Tryptone Glucose Extract Agar) の組成：精製水 1 L あたり

牛肉エキス	3.0 g	
トリプトン	5.0 g	
ブドウ糖	1.0 g	
寒天	15.0 g	（最終 pH 7.0 ± 0.2）



Helping all people
live healthy lives

5. 寒天生培地の取り扱いについて教えてください。

1) 培地は室温で保存できますか？培地の保存方法を教えてください。

使用前までは培地を冷蔵保存（2～8℃）してください。

冷蔵庫で保管する場合は、箱のまま保管していただくことをお勧めいたします。

* 箱から取り出した状態で保管すると、培地の水分が飛び過ぎて培地が収縮してしまう可能性があります。

2) 冷蔵庫から取り出した培地はすぐに使用できますか？

寒天生培地は、冷蔵庫から出した直後はシャーレのフタ表面部分に水滴が溜まっていることがあります。すぐに使用したい場合は、この水滴をアルコール綿で拭い取ってご使用ください。

急がない場合は、使用する1時間前に培地を取り出し室温で放置すると、水滴は乾燥してなくなります。

3) 使用前には必ず寒天培地を室温に戻しておく必要があるのでしょうか？

水中に生息する細菌は温度に感受性が高いので、使用する寒天培地は室温に戻してお使いいただく事をお勧めします。

4) 外箱と袋から取り出した後、残った未使用の寒天培地は使用することができますか？

検査を実施する1時間前に袋を開封し使用する枚数の培地だけ取り出します。未使用の培地は再度袋に入れた状態で冷蔵保存（2～8℃）します。適切な保管をした場合にはパッケージに記載がある有効期限内まで使用できます。

5) 培地の有効期限を教えてください。

寒天生培地の有効期限は製造より90日（約3ヶ月）です。

各製品の外箱・袋・シャーレ裏面に製品名と有効期限の印字記載がありますので、ご確認下さい。



Helping all people
live healthy lives

6) 有効期限が過ぎてしまった寒天培地を検査に使用できますか？

パッケージに表示されている使用期限を過ぎた寒天培地は、発育性能について保証ができないため、生菌数測定 of 培養検査には使用しないで下さい。正しい検査結果を得られない場合があります。

6. 試料採取について教えてください。

1) サンプリングの方法を教えてください。

* 採取した試料は無菌容器に入れて取り扱いをして下さい。

配水システムの出口からのサンプリング

検体採取に先立って出口の内部を 70%エタノールまたはイソプロパノールを用いて出口の内部を消毒します。暴露時間は 15 秒以上おき、その後アルコールを洗い流すために 200mL ~ 500mL の水を流してください。

採取可能なシリンジを使用し、試料をサンプリングしてください。

透析液のサンプリング

透析機前のサンプリングポートからのサンプリング

適当なサンプリングポートはシリコン膜製で、採取前に 70%エタノール又はイソプロパノールに浸し消毒します。暴露時間は 15 秒以上おき、その後空気で乾燥させます。

採取可能なシリンジを使用し、試料をサンプリングしてください。

透析機入り口ラインからのサンプリング

多くの場合、コネクター部分が皮膚由来の微生物叢で汚染されているので、適切な消毒が必要です。

採取可能なシリンジを使用し、試料をサンプリングしてください。



Helping all people
live healthy lives

7. 寒天培地への試料接種（分注操作）について詳しく教えてください。

1) 接種：ピペットまたはスポイト使用の場合

培地を裏返しにして（フタを上にして）分注の準備をします。

滅菌容器に採取した試料を、滅菌ピペットで取り培地に接種します。この時、培地のフタの開閉は最小限で操作します。

2) 塗抹：

コンラージ棒使用の場合

試料を分注して培地のフタをおき、滅菌コンラージ棒で試料を均一に伸ばします。

この方法は培地あたりの試料が少ない場合に均一化させるのに有効です。

コンラージ棒未使用の場合

試料を分注後、シャーレにフタをして試料を分注した培地を両手でしっかり持ち、左右前後に傾けながら均一に伸ばします。

この方法は、試料が少ない場合には均一化しづらい反面、落下細菌などのコンタミネーションが防げるメリットがあります。

3) 浸透確認作業：

試料の塗抹が終了した培地は、その状態で培地に試料が染込むまで静置します。

保管条件にもよりますが、通常1枚の培地1枚の培地あたり0.5mL塗抹した場合、1～2時間程度で染込みます。

試料の染込みを確認し、裏返して（フタが下になるようにして）重ねます。

8. 試料を寒天培地に塗布する量について教えてください。

1) 規定はありますか？奨励する添加試料の量はどのくらいですか？

試料を寒天培地へ完全に浸透をさせることを考慮し、試料を添加して検査をしてください。1プレートあたりの添加量は0.5mL以下をお勧めします。1mL以下の試料を測定する場合は0.5mL×2プレートとなります。



Helping all people
live healthy lives

9. 培養操作について教えてください。

1) 培養する際に使用する器具は必要ですか？

ふらん器は必ず必要ではありませんが、長時間培養するため ビニール袋または タッパウエアールを用いて培養を行ってください。

ビニール袋：

培養のため、寒天培地をビニール袋で梱包しますのでファスナー等のついたものを用意します。培地を入れた後に、少し空気口を開けた状態で口を折ります。

タッパウエアール：

タッパウエアールなどでも培養できますが、菌が多数いる可能性のある試料の場合はガス産生が多いため、この場合も若干口を開けておくことをお勧めいたします。

ふらん器（低温インキュベーター）：

一定温度で長時間培養するため、ふらん器（低温インキュベーター）を使用する場合も、湿度も保てるよう ビニール袋や タッパウエアールに入れて培養することをお勧め致します。

2) ふらん器（低温インキュベーター）を使用する必要がありますか？

一定温度で長時間培養するため、ふらん器（低温インキュベーター）を使用し湿度も保てるような環境で培養することをお勧め致します。ふらん器が無い場合には室温で放置しますが、30 を越えると一部の菌の発育に影響を与えることがありますので、できるだけ30 を越えない場所で放置します。

3) 培養温度と培養日数などの培養条件を教えてください。

培養時間（日数）は7日間培養してください。

培養温度は17～23 で培養してください。

上記培養条件は ISO/CD 23500 Draft に基づいています。



Helping all people
live healthy lives

4) 培養の際、培地シャーレを重ねてもいいのですか？

培地表面を下向きにして数枚重ねることは可能です。ふらん器（低温インキュベーター）に培地を入れ培養する際にも室温で培養する時と同様に、培地をビニール袋で梱包し少し空気口を開けた状態で口を折ります。

10. 判定について教えてください。

1) 判定方法を教えてください。

培養期間が終了した培地の袋をあけ、培地を取り出し一枚ずつ寒天培地上のコロニーの有無を確認します。コロニーが認められた培地は取り置きます。コロニーが認められた培地のコロニー数を数えます。

2) コロニーカウントの方法を教えてください。

コロニーが認められた培地のコロニー数を数えます。

コロニーカウンターを使用し、培地にマーキングしながらコロニー数を数えます。

コロニーの大きさは関係ありません。あくまでコロニーの数が重要です。

複数枚にコロニーが認められる事がありますが、その場合は複数の培地のコロニー数の合計が、当該試料のコロニー数となります。

3) 10枚全部にコロニーが認められた場合、単純に合計数でいいのでしょうか？もしくは、合計数を10で割って算定するのでしょうか。この解釈がわかりません。

コロニーが認められた培地のコロニー数を全て数えます。複数の培地のコロニー数の合計が、当該試料のコロニー数となりますので、試料1mL中から検出されたコロニー数は試料量で等分してください。

4) CFU はどのような意味ですか？

Colony Forming Unit(集落形成単位)の略です。1mLの試料から50個の集落が検出された場合、50 CFU/mLと表示します。



Helping all people
live healthy lives

1 1 . 使用済み器具及び培養後の寒天培地の廃棄方法について教えてください。

培養済みの培地には多数のコロニーが形成され菌量が増えている場合や環境菌以外の病原細菌も発育している場合も考えられます。検査に使用した器具及び検査室から出された培地などは「感染性病原微生物に関連した試験検査等に用いられたもの」に該当しますので、感染性廃棄物として処理してください。

1 2 . 購入方法・価格について教えてください。

1) 購入方法を教えてください。

貴院でご購入可能の最寄の代理店をお調べします。お客様情報センター(0120-8555-90)までご連絡をお願い致します。

2) 包装単位と価格を教えてください。

カタログ番号 (251258)	R 2 A 寒天培地	20 枚/箱	4,720 円
-------------------	------------	--------	---------

カタログ番号 (223000)	T G E A 寒天培地	500g	20,900 円
-------------------	--------------	------	----------

* カタログ番号 (252127) T G E A 寒天培地 20 枚/箱 は販売中止品です。



Helping all people
live healthy lives

< 参考資料 >

透 析 液 清 浄 化 へ の デ ザ イ ン

1. 微生物管理に関する戦略

透析液の清浄化のための戦略は、ひとえに微生物制御戦略ともいえ、適切なシステム設計とその確実な操作、配管系などの洗浄消毒に関する方法と計画のデザインおよび実行が重要である。

具体的には微生物増殖とバイオフィルムの形成を回避する為の施策を積極的に実施することが必要で、使用している透析液生成システム系での透析液生成の各段階における適切な微生物制御法の確立が欠かせない。

透析液の清浄化には、プロセスマネジメントシステムを取り入れた透析清浄化プランの立案と実施が必要である。

具体的には・・・

- 透析液の生成プロセスにおける微生物学的リスクの分析。
- そのリスクを制御するために必要なクリティカルポイントの決定。
- クリティカルポイントに対する管理基準の設定。
- モニタリングの実行。
- モニタリングにて管理基準を逸脱した場合の改善措置の実施。
- 検証の手段確立
- 記録付け、文書化の手段確立

を取り入れた、透析液清浄化マニュアルの作成が目標達成の第一歩である。

透析液清浄化のためのプロセスマネージメントフロー - HACCPシステムからのアプローチ -

< アメリカで生まれたHACCP >



HACCPとは、**Hazard Analysis Critical Control Point**の略で、食品の製造品質管理に欠くことのできないシステムとして、既に日本の食品製造業界に定着しています。HACCPは1960年代にアメリカの宇宙開発計画の一環として、宇宙食の安全性を確保することを目的に、アメリカ航空宇宙局（NASA）とビルズベリ社によって開発されたシステムです。このシステムが食品汚染の危険性の調査・分析からコントロール方法となって、一般の食品製造にも応用されてきています。

以前、食品の安全性は「最終製品の抜き取り調査しによって汚染を調べる」のに対して、HACCPシステムは「事前に食品汚染の危険性を調査し、その原因となる作業を修正する」のが特徴であり、1970年代よりHACCPを基にしたガイドラインがアメリカで導入されました。

今回、このHACCPシステムを応用した清浄化マニュアルを作成し、実践的なモニタリング方法および検証方法の一例をご紹介します。



Helping all people
live healthy lives

< 参考資料 >

透析液清浄化マニュアルの作成 : ハセップシステムからのアプローチ

危害要因の分析 : 透析システム内への微生物汚染と定着

- Contamination & Biofilm -

必須管理点決定(CCP) : 危害の発生上極めて重要な工程・ポイントの選定

- A液、B液混合タンク, セントラル, カットフィルター前後, コンソール, カプラー -

許容限界確立(C L) : エンドトキシン濃度, 生菌数(CFU/mL)

- 危害を管理する上で許容できるか否かを判断するモニタリングパラメータの基準 -

CCPのモニタリング方法の確立 : サンプルングの時期, 量, 試験方法

- コンソール: 2台/月(全てのコンソールを1回/年), 塗抹法: 1mL …

許容限界の逸脱に対する是正措置の確立: 洗浄消毒薬の変更, 洗浄工程の再検討

検証の手段確立

記録をつけ、文書化の手段確立



Helping all people
live healthy lives

< 参考資料 >

実践的なモニタリング方法と検証方法

許容限界値(管理目標値):達成目標値の設定

現状の把握:少量での清浄度評価 : 塗抹法

ステップ1

洗浄消毒

効果の確認:少量での清浄度評価 : 塗抹法

ステップ2

洗浄消毒効果の評価を繰り返し、清浄度を改善させる。

少量評価での清浄度の達成

大量サンプリングによる評価 : MF法

ステップ3

洗浄消毒

大量サンプリング評価での清浄度達成 : モニタリングの継続 : 洗浄システムの検証