

## Lumioneの高感度ATP法の特徴

### 微生物試験とは

微生物試験とは細菌・真菌(カビ、酵母)に関する検査の総称。例えば日本薬局方(局方)には、「無菌試験法」「製薬用水の品質管理」「微生物限度試験法」「保存効力試験」などの微生物試験が記載されており、食品衛生法では2021年6月からHACCPに沿った衛生管理が義務化され、出荷試験のみならず、原材料の受け入れから保管、調合・加熱殺菌等の製造、充填、包装等の各工程において、微生物試験の厳格な実施が求められるようになった。

微生物試験で従来から用いられている「培養法」では、培地・温度などの一定の条件下で増殖可能な微生物のみを検出している。培養法には、採取したサンプル試料をフィルタでろ過後、フィルタに捕捉された菌を培養し、生育により形成されたコロニー数(CFU)を生菌数として、汚染度を評価する「メンブレンフィルター(MF)法」が主に用いられている他、寒天平板表面塗抹法(塗布法)、寒天平板混釈法(混釈法)、液体培養法などがある。

表1 微生物試験の種類

試験	対象	目的	主要な例と検出(試験)日数
無菌試験	医薬品・化粧品など無菌を求められる製品の出荷試験	一定条件下における製品中の無菌性の推定(菌有無検査)	【液体培養法】 ≥14日:真菌:SCD培地 ≥14日:好気性菌・嫌気性菌:液状チオグリコール酸培地
製薬用水試験	製薬用水(医薬品の製造、容器や設備の洗浄などに使用)	製薬用水の品質管理(生菌数試験)	【MF法】 ≥2~3日:黄色ブドウ球菌等:標準寒天培地 ≥4~7日:メチロバクテリウム等:R2A寒天培地
微生物限度試験	非無菌医薬、食品、飲料、製造環境、製造工程	非無菌の製品や原料、製造工程および環境の品質管理(生菌数試験、特定微生物試験)	【生菌数試験:MF法】 3~5日:好気性微生物:SCD寒天培地 5~7日:真菌:サブロー・ブドウ糖寒天培地
保存効力試験	医薬品・化粧品・保存剤の処方開発、保存効力能の検証	製剤もしくは添加保存剤の効力評価(生菌数の経時的減少率)	【液体培養法→塗布法・混釈法】 0~28日:好気性菌:SCD寒天培地 0~28日:真菌:サブロー・ブドウ糖寒天培地 (菌数観察日:0, 2, 4, 7, 14, 21, 28日)

### 微生物迅速試験(RMM)

微生物試験は上述したように、微生物の目視検出に至るまでに数日以上を要すること、さらに、多種多様な微生物の研究の進展により、従来の培地ではコロニー形成能が低く、培養法のみでは検出が困難な菌の存在が明らかとなってきていることから、第17改正の局方には、参考情報に微生物迅速試験(RMM)が記載された。

RMMは新技術による迅速な微生物試験で、直接的検出と間接的検出に大別される。前者は固相サイトメトリー、フローサイトメトリー、後者は免疫学的方法、核酸増幅法、生物発光法(ATP法)、蛍光法、二酸化炭素(CO<sub>2</sub>)検出法、マイクロコロニー法などがあり、Lumione BL-2000ではATP法を採用している。

### 生物発光法(ATP法)

ATP法は、マグネシウムイオン(Mg<sup>2+</sup>)、酸素(O<sub>2</sub>)の存在下で、ルシフェリン(発光基質)とATPを、ルシフェラーゼ(蛍由来酵素)が触媒することで生じる光(発光)を検出する方法。発光量とATP量は比例するため、発光計測によりATPの定量が可能となる。ATPはあらゆる生物の化学エネルギー通貨であるため、ATPによる発光が検出されれば、生物もしくは生物残渣が存在した証拠となる。



図1 ルシフェリン - ルシフェラーゼ反応

## 高感度ATP法(Lumione)

培養法では検出までの時間の長さ、限定条件下で生育する微生物のみ検出可能であること、従来のATP法では低検出感度(数百amol)、芽胞形成菌(芽胞菌)検出不可、微生物体外ATPによる高バックグラウンド等が課題であった。そこで日立は、ATPバックグラウンドを低減、および芽胞菌検出を可能とする専用試薬と前処理を開発し、ATPの検出感度を向上させたLumioneを開発した。その結果、製薬用水試験向けに、前培養なし、前処理から発光測定まで最短約1時間で、ATP 1 amol(1菌レベル)の迅速な検出を可能とした。製薬用水試験向け以外にも、様々な測定対象に合わせ前処理方法を提案可能である。

表2 培養法・ATP法・高感度ATP法の比較

試験法	培養	検出可能ライン	検出時間	菌種同定※	培地選択	生菌のみ検出	芽胞菌検出	
ATP法	Lumione	無	1 amol ~ (1 CFU相当)	1時間~	×	不要	○	○
		有	1 amol ~	1日~	× / ○	要	○	○
	従来ATP法	無	数百amol ~	~1時間	○	要	×	×
		有	1 CFU ~	18 ~ 48時間	○	要	×	○
培養法(従来法)	有	1 CFU ~	2 ~ 14日以上	○	要	○	○	

※○は菌増殖した培養液を追加培養不要でDNA解析等の同定試験に使用可、×は全量をATP検出に使用済となるため、同定試験不可



図2 Lumione BL-2000の外観

表3 装置仕様

項目	仕様
分析方式	生物発光法
測定感度	検出下限 ≤ 1 amol
測定範囲	0 - 5000 amol
架設数	24本/ラック
測定時間	24本/2h
電源	単相AC100V(50/60Hz) 1.5kVA
質量	装置本体: 125kg
寸法(W x D x H)	計測部: 770 x 450 x 600 mm 制御部: 520 x 460 x 450 mm

## Lumioneの前処理から測定まで

前処理から発光測定までは、製薬用水向けプロトコルを例とすると、「サンプル試料を専用フィルタで吸引る過」「専用試薬による活性消去反応」「ATP抽出液による菌体破碎・菌体内ATP回収」「Lumioneで自動発光測定」となる(図3)。

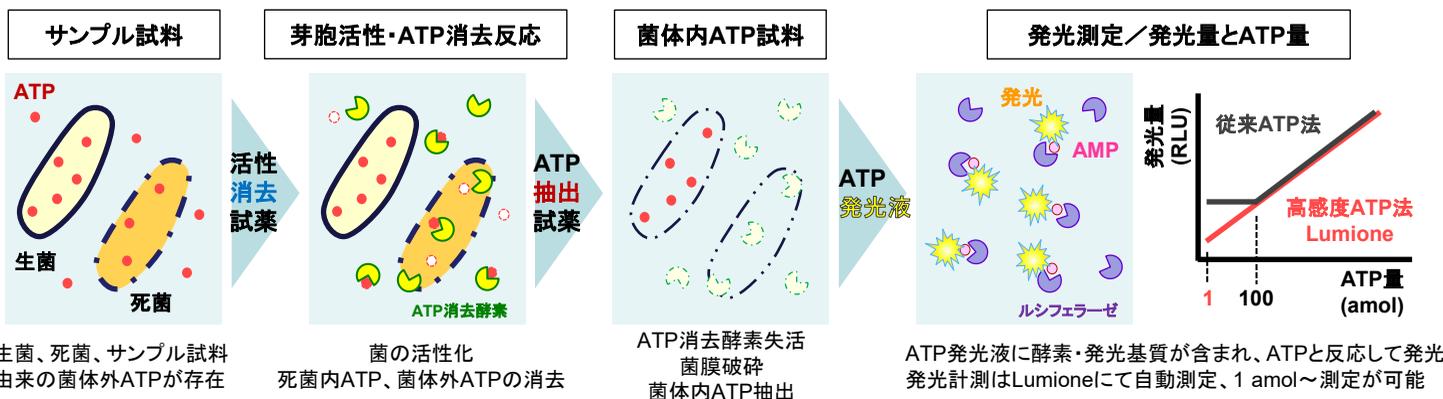


図3 前処理から測定までの流れ

## 高感度ATP法と培養法の判定基準

培養法と多くのRMMでは検出している対象、検出時の見え方が異なるため、完全な相関はない場合がある。既に述べたように、MF法などの培養法では微生物を培地上で生育し、形成したコロニー数を生菌数としてカウントするが、高感度ATP法では発光量からATP量を算出して評価する。

このため、例えば培養不能生存菌（VNC菌）は培養法では検出できず、食中毒や感染症のリスクとなるが、高感度ATP法では検出が可能となる（表 4-1）。これは、微生物の膜構造が保持されていると、ATP消去酵素が反応できず、VNC菌内部のATPは消去されずに発光検出されるためであり、培養法と高感度ATP法では陰性陽性の判定に差が生じる可能性がある（表 4-2）。

表4-3に培養法と高感度ATP法の判定差と原因について示したが、高感度ATP法の優位点についてまとめると以下と言える。

1. 結果判定が培養法より短時間で可能。偽陽性の場合、再測定でも短時間で判定確定可能。
2. 菌種を選ばない測定法で、偽陰性が少ない。（培養法は、対象菌種毎に培地選定要）

表4-1 微生物の状態と検出可否

微生物の状態	培養法	高感度ATP法
生菌（培養可能） 	○	○
生菌（培養不能：VNC菌） 	×	○
死菌（膜保持） 	×	○
死菌（膜破損） 	×	×

表4-2 微生物検出の判定

		高感度ATP法	
		陽性	陰性
培養法	陽性	陽性	①
	陰性	②	陰性

表4-3 培養法と高感度ATP法の判定差と原因

判定	主な原因		対処法	所用時間
	高感度ATP法	培養法		
① 高感度ATP法：陰性 培養法：陽性	・菌由来のATP量が少ない ・前処理誤操作（試薬添加）によるATP未検出	・誤操作によるコンタミネーションの影響	再測定	1.5～20 時間
			再培養	48～168 時間 (7 日)
② 高感度ATP法：陽性 培養法：陰性	・VNC菌/死菌（膜保持）を検出 ・菌由来以外のATPを検出 ・誤操作によるコンタミネーション	・VNC菌/死菌（膜保持）は検出不可 ・培養時間の不足 ・対象菌に適さない培地の選択	再測定	1.5～20 時間
			再培養 培地変更	48～168 時間 (7 日)

## ATP内包量

菌数とATP量は同一菌株、同一環境下では一定の相関がみられる（図 4）。模擬的に1種類の微生物をサンプル試料に添加し、高感度ATP法と培養法を同時に実施し、ATP量 (amol) と菌数 (CFU) を比較することで、一菌あたりのATP内包量 (amol/CFU) を求めることができる（図 5）。

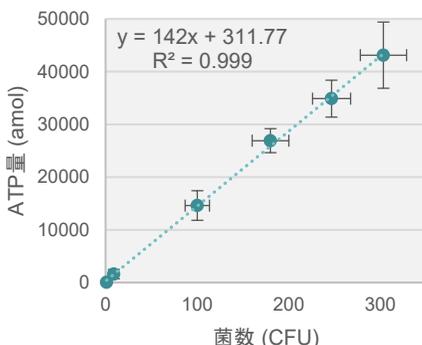


図4 菌数とATP量の相関  
(*Candida albicans* 測定例)

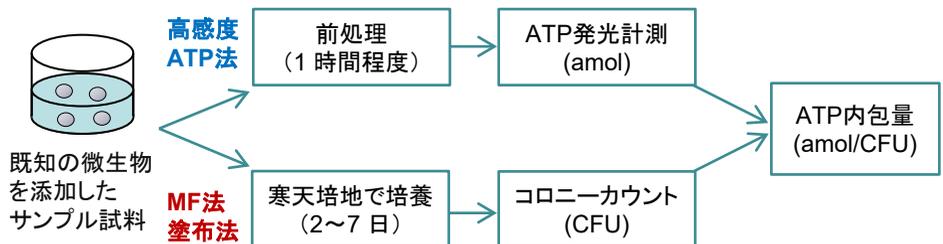
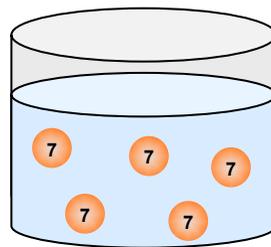


図5 ATP内包量の求め方

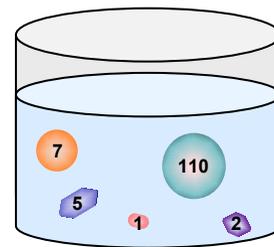
## 菌数とATP量の相関

既に述べたように、一定条件下において菌数とATP量は相関するため、事前にATP内包量を把握しておけば、測定したATP量から、サンプル試料内に混入していたおおよその菌数を求めることができる(図 6-A)。但し、ATP内包量は微生物の種類、菌によっても異なるため(表 5)、複数の微生物が混入している場合、菌数とATP量に相関は得られない(図 6-B)。

このため、高感度ATP法を用いる際には従来法とは異なる管理基準値を設定する必要がある。



A) ATP内包量7 amol/CFUの既知の微生物について、測定したATP量が35 amolであった場合、菌数は5 CFU



B) 5種の微生物が混入していた場合、従来法では5 CFU、高感度ATP法では125 amolと検出され、相関しない

図6 菌数とATP内包量の模式図

表5 ATP内包量 測定例

No.	微生物種類	株	備考	ATP内包量 (amol/CFU)	
				栄養状態	増殖期
1	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC6538	グラム陽性球菌	1.1	3.6
2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NBRC13275	グラム陰性桿菌	0.3	0.5
3	<i>Escherichia coli</i>	ATCC11775	グラム陰性桿菌	1.2	4.6
4	<i>Methylobacterium extorquens</i>	NBRC15911	グラム陰性桿菌	0.7	1.9
5	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	NBRC15842	グラム陰性桿菌	1.1	10.4
6	<i>Clostridium sporogenes</i>	ATCC11437	嫌気性芽胞形成 グラム陽性桿菌	1.3	8.7
7	<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC6633	好気性芽胞形成 グラム陽性桿菌	1.6	36.2
8	<i>Candida albicans</i>	ATCC10231	真菌(酵母)	42.7	264.1
9	<i>Aspergillus brasiliensis</i>	ATCC16404	真菌(クロコウジカビ)	14.5	-
10	<i>Propionibacterium acnes</i>	ATCC11827	グラム陽性桿菌(アクネ菌)	-	3.1

※ 同種の菌でも状態によりATP内包量は変動する

## 略称紹介

HACCP : ハサップ ; Hazard Analysis and Critical Control Point  
 CFU : コロニー形成単位 ; Colony Forming Unit  
 MF法 : メンブレンフィルター法 ; Membrane Filter Method  
 SCD : ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト ; Soybean-Casein Digest  
 RMM : 微生物迅速試験 ; Rapid Microbiological Methods

ATP : アデノシン三リン酸 ; Adenosine Triphosphate  
 AMP : アデノシン一リン酸 ; Adenosine Monophosphate  
 amol : アトモル ; attomole / 1amol = 10<sup>-18</sup> mol  
 VNC : 培養不能生存菌 ; Viable but Non-Culturable

### 文献

- 1) 日本薬局方 厚生労働省 第18改正日本薬局方(令和3年6月7日厚生労働省告示第220号)
- 2) 日本薬局方 試験法ガイド(日局16対応) : 一般財団法人医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス財団 編、JHO出版
- 3) 日本薬局方 参考情報「製薬用水の品質管理」
- 4) 第17改正 図説 日本薬局方微生物試験法の手引き: 坂上吉一 監修、文教出版
- 5) 日本薬局方・無菌試験法の実践 監修 三瀬勝利
- 6) 食品衛生法 e-GOV 法令検索
- 7) HACCP 厚生労働省
- 8) 化粧品微生物試験ガイドブック浅賀良雄 著、薬事日報社
- 9) 微生物の簡易迅速検査法: 五十君静信ら 監修、テクノシステム

注意: 本資料に掲載のデータは測定例を示すもので、性能を保証するものではありません。