原著

ATP を指標とした医療現場での洗浄評価判定法の検討

土方俊介*, 染谷 拓^{*1}, 木村 登*, 上林裕始*

Research on Practical Assessment of Medical Instrumentations Cleanliness in Healthcare Setting Using Adenosine Tri-phosphate as an Indicator

Shunsuke Hijikata*, Taku Someya^{*1}, Noboru Kimura*, Hiroshi Uebayashi*

Abstract

The Luciferin/Luciferase/Adenosine Tri-Phosphate (ATP) bioluminescent method is commonly used for cleanliness verification of medical instruments. In Japanese Society of Medical Guideline for assessing the cleanliness of medical instrumentations in healthcare setting, the ATP measurement method is adopted as one of swabbing test methods. As the advantages of ATP method, high sensitivity, easy measurement and rapid readout capability are cited in this document. The guideline consecutively describes the ATP swabbing test method is not suitable to verify the cleanliness of narrow and lumen structure because it has limitation on access there. To solve this limitation of the ATP swab test method, we developed a test method of measuring residual soil from whole instrument surface using extract liquid. 3M™ Clean-Trace™ ATP Monitoring Systems of Water ATP liquid test (Product Code: H2O) and Luminometer (Product Code: NGi) were used. To verify the performance of the extract liquid, we investigated the influence of the extract liquid on the measurement result and the performance of the extract liquid. ATP stability of two types of commercially available preserved sheep blood (heparinized or Alsever solution added) were examined. A soil model device was prepared by applying mixture of sheep blood and 1.0% sulfate protamine to forceps box lock and drying. Using the selected extract liquid, the contaminant was extracted with ultrasonic cleaning process at 50 °C for 30 min and quantitatively thorough extraction was confirmed by protein measurement. ATP value of each diluents of sheep blood was measured, and the correlation between protein and ATP was evaluated.

1. 目的

「医療現場における滅菌保証のガイドライン 2010 (以下, ガイドライン 2010)¹⁾」では, 洗浄効果試験の指標値としてブラッドフォード法等による器材当りの残留蛋白質量が採用され

た。かねてより洗浄の質管理の重要性は広く認識されていたが, 器材当りの蛋白質量の許容値および目標値が規定されたことで洗浄の質管理についてより一層の意識が注がれることになったと言える。しかしながら, 医療現場において蛋白質量の測定の実施は容易ではなく, 洗浄効果試験が医療現場に広く普及し, 日常の洗浄業務の質向上につなげるためには課題が多い。

近年, ハンドヘルド型 ATP 測定器や簡易に測定が可能な試薬が開発され, 医療器材の洗浄評価の指標として ATP が多く使用されるよう

* スリーエム ヘルスケア株式会社 技術本部 感染管理製品技術部

^{*1} スリーエム ヘルスケア株式会社 医療用製品事業部 感染管理製品学術グループ
(原稿受付: 2013 年 10 月 17 日)

になった。ATP 法は「洗浄評価判定ガイドライン 2012 年 8 月（以下、洗浄評価判定ガイドライン）²⁾」では、拭き取り判定法として分類され、高感度・簡便・迅速であるメリットと共に、綿棒を挿入し難い狭い隙間や内腔などの測定が困難で、汚染が残存し易い部分の評価ができないことや、拭き取り面積や綿棒を押し付ける強度が測定値に影響する可能性が課題として記載されている。

今回、我々は、ATP 拭き取り判定法における問題点の解消を目的として抽出判定法を採用して検討をおこなった。その際、ガイドライン 2010 における洗浄効果試験に準じた手順の下、蛋白質量および ATP 値を測定することで両者の相関性を評価し、汚染の代替指標としての ATP の有用性を評価した結果を報告する。

2. 方 法

1) ATP 値の測定に用いた試薬と装置

試験には図 1 に示す 3 MTM クリーントレースTM ATP モニタリングシステムを使用した。水中 ATP 測定試薬 H2O を用いて一定量の試料液を採取し発光反応させ、発光量を 3 MTM クリーントレースTM ATP 測定器ルミノメータ NGi で ATP 値（単位：RLU）として測定した。

2) ATP 抽出液の選定

ガイドライン 2010 で規定されているブラッドフォード法の抽出液である 0.2mol/L 水酸化ナトリウム水溶液、医療現場でも容易に入手できる医療用アルカリ洗浄剤 3 MTM アルカリ クリーナー 70504 の 0.5% 希釈液および医療用酵素洗

浄剤 3 MTM ラピッド マルチ エンザイム クリーナー 70503 の 1% 希釈液を選択し、ATP 標準液（3 MTM Microbial Luminescence System ATP Reagent Control Kit, 公称値 22.5ng/vial）を用いて、各抽出溶液の ATP 測定への影響を検討した。

3) 使用する羊保存血液の選定

羊保存血液としては、ヘパリン添加羊血液とアルセバー氏液添加羊血液が現在市販されている。ガイドライン 2010 では擬似汚染物の作製にはヘパリン添加羊血液が用いられているが、ATP の含有量や安定性については不明であったため、ヘパリン添加羊血液（緬羊全血液 抗凝固剤：ヘパリン、(株)日本バイオテスト研究所）と、アルセバー氏液添加羊血液（緬羊全血液 アルセバー氏液 保存液：血液 = 1 : 1、株式会社日本バイオテスト研究所）について、冷蔵条件下で 3 日間保存後の ATP 安定性を確認した。ATP 値（単位：RLU）の測定は、蒸留水、生理食塩水または 0.5% アルカリ洗浄剤液で蛋白質濃度が 20μg/mL と希釈調整した試料液について実施した。

4) 抽出方法の検討

器材からの残留汚染の抽出は、図 2 に示すようにガイドライン 2010 に準拠した手順で起こない、得られた抽出液の ATP 値を測定する方法にて実施した。

抽出率を検討するため、ガイドライン 2010 に従い、マイクロピペットを用いて擬似汚染物 50μL を 14.5cm 止血鉗子のボックスロック部に塗布し、室温にて 24 時間乾燥させて汚染

試薬・装置	測定方法	
3 M TM 水中 ATP 測定用試薬 (H2O)
3 M TM クリーントレース TM ルミノメーター (NGi)

図 1 ATP 測定に使用した試薬と装置

モデルを作製した。汚染モデルを図2に示した手順に従いチャック付ポリエチレン袋に入れ、0.5%アルカリ洗浄剤希釈液 10mL または 1 % 酵素洗浄剤希釈液 10mL を加えた。50℃/30 分間の超音波照射後、ブラッドフォード法に基づき、希釈した抽出液の吸収度 (595nm) を分光光度計 (U-2900, 日立製作所) で測定した。擬似汚染を直接抽出液に加えた対照サンプルについても同様な操作をおこない、汚染モデルの抽出液の吸光度と比較した。

5) 羊保存血液希釈液の蛋白質濃度と ATP 値の相関性の確認

アルセバー氏液添加羊血液を、試験成績書の蛋白質量 (Lowry 法による測定値) を基に 0.5% アルカリ洗浄剤で希釈し、5～100μg/mL の

試料溶液を作製し、ATP 値を測定した。

6) ガイドライン 2010 残留蛋白質基準値
に対応する蛋白質濃度における、羊保存
血の ATP 値ロット間変動の確認

アルセバー氏液添加羊血液を、各ロットの試験成績書の蛋白質量を基準に蒸留水で希釈し、ガイドライン 2010 の許容値 (200μg/器材) と目標値 (100μg/器材) に対応する蛋白質濃度 (200μg/10mL および 100μg/10mL) の試料液を調製し、ATP 値を測定し、ロット間の変動を確認した。

3. 結 果

1) ATP 抽出液の選択

ATP 抽出液の試験結果を表1に示した。ガ

図2 汚染モデルからの汚染物の抽出法

表1 抽出液のATP測定値への影響

抽出液	測定した試料液	ATP (RLU)			
		1	2	3	平均値
0.2mol/L 水酸化ナトリウム溶液	蒸留水	27	28	20	25
	蒸留水 9 mL+ATP 標準液 1 mL	2,423	2,676	2,648	2,582
	0.2mol/L 水酸化ナトリウム溶液	40	42	56	46
	0.2mol/L 水酸化ナトリウム溶液 9 mL+ATP 標準液 1 mL	35	25	28	29
0.5% アルカリ洗浄剤液	蒸留水	15	12	20	16
	蒸留水 9 mL+ATP 標準液 1 mL	1,519	1,688	1,809	1,672
	0.5% アルカリ洗浄剤溶液	15	20	13	16
	0.5% アルカリ洗浄剤溶液 9 mL+ATP 標準液 1 mL	1,750	1,671	1,970	1,797
1 % 酵素洗浄剤液	蒸留水	13	10	9	11
	蒸留水 9 mL+ATP 標準液 1 mL	1,641	1,233	1,141	1,338
	1 % 酵素洗浄剤溶液	15	10	20	15
	1 % 酵素洗浄剤溶液 9 mL+ATP 標準液 1 mL	1,259	1,156	1,056	1,157

イドライン 2010 で規定されているブラッドフォード法の抽出液である 0.2mol/L 水酸化ナトリウム溶液においては, ATP 標準溶液添加時の ATP 値が大幅に低下し, 顕著な分解が認められた. 一方, 医療用アルカリ洗浄剤希釈液と医療用酵素洗剤希釈液は共に, それ自体の ATP 値は十分に小さく, ATP 標準溶液添加時の ATP 値も蒸留水添加時と同等と安定であり, ATP 測定値への影響は無かった.

2) 羊保存血中の ATP 安定性

ヘパリン添加羊血液とアルセバー氏液添加羊血液の, 3 日後までの冷蔵保存時の ATP 値を図 3 および図 4 に示した. ヘパリン添加羊血

液中では, ATP 値の低下が認められたが, アルセバー氏液添加羊血液中ではその低下は認められず安定であった.

また希釈液により ATP 値に差があり, 生理食塩水で希釈した場合は, 蒸留水より ATP 値が小さく測定された. さらに, ATP 値のロット間変動も認められ, アルセバー氏液添加羊血液の ATP 値は変動が少なかった.

3) 汚染モデルからの蛋白質抽出率

0.5% アルカリ性洗浄剤希釈液を用いた際の汚染モデルからの抽出率の試験成績を表 2 に示す. 疑似汚染物を塗布・乾燥して作製した汚染モデルからの抽出率は 99.7% であった.

図 3 ヘパリン添加羊血液の ATP 安定性 (冷蔵保存, 蛋白質濃度: 20 μ g/mL)

図 4 アルセバー氏液添加羊血液の ATP 安定性 (冷蔵保存, 蛋白質濃度: 20 μ g/mL)

4) 羊保存血液希釈液の蛋白質濃度と ATP 値

蛋白質濃度 $5 \sim 100 \mu\text{g/mL}$ に調整した試料の ATP 値の測定結果を表 3 および図 5 に示す。蛋白質濃度と ATP 値の測定結果は、高い相関性 ($R^2 > 0.997$) を有することを確認した。また ATP 法はブラッドフォード法と比較して検出感度が高く、繰り返し再現性も良好であった。

5) 羊保存血液のロット間による ATP 値変動の検討

蛋白質濃度 $10 \mu\text{g/mL}$ と $20 \mu\text{g/mL}$ に希釈・調整したアルセバー氏液添加羊血液の ATP 測

定値のロット間変動を図 6 に示す。使用した羊血液のロット間における ATP 値には多少の変動が認められたものの、同一オーダー内であった。

4. 考 察

従来から用いられている管理評価手法について、迅速性・簡便性・高感度・定量性の全ての特性を満たす方法は見当たらない。そこで今回我々はこれらの特性を満たす方法として、器材から残存汚染を抽出し、水中 ATP 測定試薬を用いて抽出液の ATP 値を測定することで器

表 2 汚染モデルを用いた抽出率試験

抽出液/抽出液量		測定液の 希釈率	測定液の吸光度 (595nm)		抽出率
				平均値	
0.5% アルカリ洗浄剤液/10mL	汚染モデル (擬似汚染物 50μL + 鉛子)	100	0.590	0.591	99.7
		100	0.607		
		100	0.575		
	擬似汚染物 50μL	100	0.592	0.593	
		100	0.598		
		100	0.588		

表 3 羊保存血液希釈液の蛋白質濃度と ATP 値

蛋白質濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	ATP 値 (RLU)					
	1	2	3	平均	SD	変動係数 (%)
100	140598	140291	158904	146,598	10,659	7.3
20	34319	33302	33005	33,542	689	2.1
10	17519	17946	18947	18,137	733	4.0
5	7998	8363	7786	8,049	292	3.6

図 5 羊保存血液の ATP 値と蛋白質濃度の相関性 (n=3 の平均値)

図 6 羊保存血液の ATP 値のロット間変動 (8 ロット)

表4 従来の一般的な洗浄効果評価方法

汚染の指標		感度	時間	費用	簡便	定量	相関*
擬似汚染物	間接法	○	○	×	○	×	×
目視	直接法	×	○	○	○	×	○
細菌	直接法	○	×	×	×	○	○
蛋白質	直接法	○	×	×	×	○	○

*実際の医療器材との相関

材の洗浄評価を実施する技法に着目し、従来の課題を解消できる新たな方法として検討した。

従来の医療器材の洗浄の質を管理するための評価手法として、表4に示したとおり、間接法としては洗浄インジケータと汎称される擬似汚染が塗布された試験片、直接法としては目視、生菌数、蛋白質量が挙げられる^{1,6)}。間接法に該当し、TOSI[®](PEREG GmbH)に代表される洗浄インジケータでは定量評価は容易でなく、かつ実際の医療器材の汚染を反映しているわけではない。目視での評価は、簡単に実施できるという特長がある一方、他の方法と比べて感度と客観性・定量性が劣り、間隙や管腔内を評価することは困難である。生菌数や蛋白質量は、定量性を有することから数多くの研究で洗浄評価の管理指標として採用されてきているが、評価に時間と費用を要すること、および／または特別な設備や測定機器が必要となるために、日常の実践の観点から課題が多い。

器材からの残留汚染物抽出のための溶液について検討した結果、ガイドライン2010で規定されるブラッドフォード法の抽出液である0.2mol/L水酸化ナトリウム水溶液中において、ATP値が低くなることを確認した。一方、今回使用したアルカリ洗浄剤希釈液や酵素洗浄剤希釈液ではATP値の低下は認められず、抽出液として使用が可能であることがわかった。ATPはpHが12を超えると水溶液中における安定性が低下して分解されるが³⁾、今回使用したアルカリ洗浄剤希釈液のpHは12未満であったためと考えられる。そのため、本ATP抽出法で抽出液にアルカリ洗浄剤を使用する場合は使用濃度でのpHに留意する必要がある。水酸化ナトリウムが5%以上含有される場合は劇物指定されることも考慮すると、医療現場にお

いて容易に入手できる医療用洗浄剤希釈液をATPの抽出液として利用できることは大きな利点と考えられる。

羊保存血液のATPについては、保存液により安定性に差があることが確認された。ガイドライン2010の擬似汚染物に使用されているヘパリン添加羊血液のATPは冷蔵保存でも不安定であったが、アルセバー氏液と羊血液を1:1で混合したアルセバー氏液添加羊血液は冷蔵保存で1週間程度まで安定であった。この結果よりアルセバー氏液添加羊血液を羊保存血液として選択し、採血後1週間以内使用することで、試験結果の有効性が担保できることを確認した。

また、生理食塩水で希釈した羊保存血液のATP値は、蒸留水や0.5%アルカリ洗浄剤液での希釈時に比べ低値になった。生理食塩水は、ルシフェラーゼ/ルシフェリン発光反応を阻害することが一般的に知られているため、それに起因するものと推測される。

器材からの残留汚染の抽出方法については、ガイドライン2010で規定されるブラッドフォード法と同じ手順で、器材をチャック付ポリエチレン袋に入れた後に抽出液10mLを注入し、ポリエチレン袋に入った状態で器材を超音波照射し抽出した。汚染モデルを使用した試験において、50℃/30分間で擬似汚染を高率(99.7%)に抽出でき、医療用洗浄剤希釈液を用いた際の抽出条件の適格性を確認することができた。

羊保存血液のATP値と蛋白質濃度間には、ガイドライン残留蛋白質基準値に対応する蛋白質濃度付近で高い相関性($R^2 > 0.997$)が認められた。この結果から、ガイドライン2010に準じた洗浄評価判定の実践にあたり、汚染モデ

ルにアルセバー氏液添加羊血液を用いるのであれば、ATP 値から蛋白質量への換算が可能であると考えることができる。同様な研究例として、伏見ら^{4,5)}は洗浄前後の消化器内視鏡チャンネルに蒸留水を通して残留汚染を抽出し、抽出液について生菌数、ATP 値およびブラッドフォード法による蛋白質量を測定し、ATP 値の測定において生菌数と同等の検出感度の試験成績を得ている。

一般的にルシフェラーゼ/ルシフェリン発光反応は高感度であることが知られており、今回の試験結果においても、ATP 値（単位：RLU）は蛋白質濃度（単位： $\mu\text{g/mL}$ ）の約 1,000 倍の高感度であることが確認された。蛋白質量を洗浄評価の管理指標とした際には、検出感度の限界などでじゅうぶんな比較評価が実施できない場合であっても、ATP 値を管理指標とすることで、さらに詳細な検討が可能になる場合があると言える。

羊保存血液の ATP 値はロット間での多少の変動（個体差）が認められたが、いずれも同一オーダー内であった。Miseta らの研究⁷⁾によると、羊血液中の ATP 値には種差や個体差があるとの知見が得られており、羊血液を使用して蛋白質量に対する ATP 値を検討する場合、羊血液 ATP 値のロット間変動について、一定の考慮は必要があると考ええる。今回の試験結果についても、ATP 値の変動を考慮すると、残存蛋白質量のガイドライン許容値（ $200\mu\text{g}$ /器材）に対する ATP 値は、30,000RLU 以上、目標値（ $100\mu\text{g}$ /器材）に対する ATP 値は 10,000RLU 以上となった。

ただし、本研究で検証した洗浄効果試験方法を医療現場で実践するには課題が残っている。今回、蛋白質の代替指標としての ATP の有用性を検証し、ATP 値としての許容値ならびに目標値の同定について検討をおこない、洗浄効果試験における現場の課題解決に向けた結果を得た。一方、今回の結果は羊血液を特定の保存液にて処理した際の残留蛋白質量と ATP 値の相関を求めた結果であることは最後に改めて言及しなければならない。したがって、他の対象物や環境における洗浄効果試験としての ATP

抽出法の有用性は今後の検討課題であり、より汎用的な洗浄効果試験方法としての有用性の検証を目指して、現在も継続的に取り組んでいるところである。

5. 結 論

- 1) ガイドライン 2010 において規定されている洗浄効果試験手順に基づき、蛋白質量の代替指標としての ATP 値の有用性を検証した。
- 2) 洗浄現場で入手可能な医療用 0.5% アルカリ洗浄剤希釈液や医療用 1% 酵素洗浄剤希釈液は、ATP を分解することなく、また 50°C /30 分間の超音波照射をおこなうことで汚染モデルからほぼすべての擬似汚染物を抽出でき、定量的に検証できることを確認した。
- 3) 羊保存血液として、アルセバー氏液添加保存血液を選択することで、安定かつ許容範囲内のロット間変動にて ATP を測定可能であり、かつ ATP 値と蛋白質量の間には高い相関性 ($R^2 > 0.997$) を確認した。
- 4) ATP 法における従来の課題として、拭き取り法では器材の細部や全体からの残存汚染の回収が困難であったが、抽出法を用いることで、これらの課題を解決し、より正確に洗浄評価判定を実践できることを示した。
- 5) 今回検討した ATP を用いる方法は、ブラッドフォード法と比較して、より検出感度が高く、かつ簡便・迅速・安全であるため、ガイドライン 2010 で規定されている洗浄効果試験を洗浄現場において実践するにあたり有用であると考えられた。

文 献

- 1) 日本医療機器学会. 洗浄評価判定ガイドライン 2012年 8月.
- 2) 日本医療機器学会. “医療現場における滅菌保証のガイドライン2010”.
- 3) 和光純薬. “ATP Adenosine 5'-triphosphate (disodium salt) crystalline”.
- 4) 宮下義弘, 伏見 了, 影平雅久. “アデノシン

三リン酸量を指標とした軟性内視鏡の清浄度評価について”. 医療機器学. 80(5), 39-40, 2010.

- 5) Ryo Fushimi, Masashi Takashina, Hideki Yoshikawa, Hiroyoshi kabayashi, Takashi Okubo, Seizoh Nakata and Mitsuo Kaku. “Comparison of adenosine triphosphate, microbiological load, and residual protein as indicators of assessing the cleanliness of flexible gastrointestinal endoscopes. American Journal of Infection Control. 41(2), 161-164, 2013.

- 6) AAMI TIR30 : 2011. A compendium of processes, materials, test methods, and acceptance criteria for cleaning reusable medical devices.

- 7) Attila Miseta, Peter Bogner, Ervin Berenyi, Miklos Kellermayer, Casaba Galambos, Denys N. Wheatley and Ivan Cameron. “Relationship between cellular ATP, potassium, sodium and magnesium concentrations in mammalian and avian erythrocytes”. Biochimica et Biophysica Acta. 1175, 133-139, 1993.