原著

ATP を指標とした医療現場における洗浄プロセス評価 － ATP 抽出法の有用性の検討 －

土方俊介* 染谷 拓^{*1}

Assessment of Cleaning Process in Health Care Setting Using Adenosine Tri-phosphate as an Indicator
- Validation of Effectiveness of ATP Extraction Method -

Shunsuke Hijikata*, Taku Someya^{*1}

Abstract

We have reported the qualification result of Adenosine Tri-phosphate (ATP) extraction as an alternative cleaning process assessment method described in Guideline for Sterilization Assurance in Clinical Setting published by Japanese Society of Medical Instrumentation (JSMI) in 2010 at JSMI Annual Conference 2012. This study result indicated the possibility of that ATP extraction method is practical in clinical setting and can be an alternate to protein mass measurement because of the evaluation result regarding the correlation study result between ATP and protein measurements. In this article, additional study result of cleaning process assessment is reported using clinically-used surgical instruments and artificial soil devices at clinical site. ATP extraction and conventional ATP swabbing as well as protein extraction was performed after two different cleaning processes to evaluate the effectiveness of these cleaning processes for determining which cleaning process to take. It is observed that ATP swabbing is not appropriate for surgical instrument having such narrow lumen and/or space where swab cannot access to, because high ATP value was detected by extraction method from a surgical instrument after sampling with swab for ATP measurement. ATP measurement result from standardized artificial soil devices after one cleaning process was from 66 to 478 relative light unit (RLU) while ATP measurement result after another cleaning process was from 30 to 73 RLU (p value = 0.025). However, such statistical analysis was not achieved for protein measurement as detected protein level was under limitation for all protein measurements. ATP extract method is practical cleaning process assessment method at clinical setting, and this method has quantitative capability as well as excellent sensitivity compared to protein measurement method. In addition to these advantages, this extraction method can be applied to more devices which have physically-complex design and lumen devices compared to conventional swabbing method.

* 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：2014 年 4 月 30 日)

1. 目 的

手術器械等の再生医療器材の機能性および安全性を保証する上で、再生処理プロセスのモニタリングと評価は重要である。再生処理の全

体プロセスのうち、初期段階に位置する洗浄プロセスの有効性は、その後のプロセスの有効性にも影響をおよぼすため、そのプロセス管理の重要性は日本医療機器学会、米国周手術看護師協会、米国疾病管理予防センターなどから勧告されているところである^{1~4)}。

これらの背景から、現在、より多くの医療施設が洗浄プロセスの有効性評価への関心を高めている一方、医療現場において洗浄プロセスの評価を実践するにあたっては未だ多くの課題が存在する。従来、生菌数や蛋白質量が洗浄効果判定の指標として主に採用されてきたが、簡便性や結果判定に要する時間が医療現場で実践する上での技術的課題であり、実施頻度や対象器材の選定、費用対効果の検証などは運用面での課題として挙げられる。

前者の技術的課題に関連して、我々は本学会の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）²⁾ 準拠の洗浄効果試験へのアデノシン三リン酸（以下、ATP）の適用の可能性を検討報告した⁵⁾。この報告では、手術器械の残存汚染を抽出した液体に含まれる ATP 量から蛋白質量を概算でき、ガイドライン 2010 準拠の蛋白質量測定法（ブラッドフォード法）の代替法としての可能性が示唆された。ATP 法はより簡便、迅速、安全であるため、ATP 抽出法を代替法とし、ガイドライン 2010 に準じた洗浄効果試験の実践が医療現場において促進されることが期待される。

しかしながら、この報告はガイドライン 2010 に準じた洗浄効果試験のみを対象としている。そのため、医療現場における実際の洗浄プロセスに基づいた検証をおこない、汎用的および日常的な洗浄効果試験としての適格性の検証が必要である。そこで、医療現場における 2 種類の洗浄プロセスに対して ATP 抽出法の有用性評価を実施した。併せて、ATP 拭き取り法、蛋白質量測定法も実施し、ATP 抽出法との比較検討についておこなった内容も報告する。

2. 方 法

1) 比較評価した洗浄プロセス

今回比較した洗浄プロセスと洗浄評価法を図 1 に示す。

2) 材料・装置

試験には 3MTM 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。残存汚染の採取と発光反応には、2 種類の測定用試薬を使用した。1 つは、拭き取り試薬 3MTM クリーントレースTM ATP 測定用試薬 UXC で、スワブで残存汚染を拭き取り、もう 1 つは 3MTM クリーントレースTM ATP 測定試薬 H2O で一定量の残存汚染の抽出液を採取し発光反応させ、発光量を 3MTM クリーントレースTM ATP 測定器ルミノメーター NGi で ATP 値（単位：RLU）として測定した。

3) 残存汚染の器械からの抽出法

① 器械からの抽出法

測定する器械の 1 つを厚手のチャック付ポリエチレン袋に入れ 0.5% アルカリ洗剤液 10mL を加え、チャックの封をした。その器械入りの袋ごと、50℃/30 分間超音波照射をおこない、器械に付いている汚れを抽出した。

② 残存汚染量の測定

チャック付ポリエチレン袋から器械を取出した後、袋を手で持って斜めにし袋の下角がコーヒードリッパーの底の位置にくるように置き、清潔なハサミで袋をコーヒードリッパーの底面に平行に袋の下角から 10cm 以上の位置で切り取る。この状態で逆円錐状の袋の下角に溜まった液を抽出液とした。

図 1 比較した洗浄プロセスと洗浄評価法

初めに、Coomassie Protein Assay Kit(Thermo SCIENTIFIC Co.)を用いて、ブラッドフォード法により蛋白質量を測定した。抽出液 1 mL をマイクロピペットで採取し、試料液とした。またブラッドフォード法の検量線作成のため、Kit 添付のアルブミンスタンダードを 0.5% アルカリ洗剤液で 5, 10, 20, 30 および 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に希釈し標準液とした。標準液と試料液各 1 mL に Coomassie Protein Assay Reagent 3 mL を加え、分光光度計で 595nm の吸光度を測定し、試料液の蛋白質濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) を計算した。

次に抽出液に 3MTM クリーントレースTM 水中 ATP 測定試薬 H2O の捕集リングを浸け、その一定量を採取し、ATP 値を測定した。

4) ガイドライン 2010 疑似汚染物を用いた洗浄効果試験

止血鉗子 (14.5cm 長) と病院使用器械のボックスロック部にガイドライン 2010 擬似汚染物 50 μL を塗布、室温にて 24 時間乾燥させて汚染モデルを作製した。ガイドライン 2010 汚染モデルについては、バスケット当り、汚染モデル 5 本と未塗布の止血鉗子 35 本を一緒に入れた。病院器械汚染モデルについては、バスケット当り、通常積載する器械セットと共に 8 本入れた。図 2 に示すとおり、病院器械を用いた洗浄効果試験でのバスケット積載量は、ガイドラインに準じた方法よりも積載量が多かった。作製した汚染モデルは図 1 に示す 2 つのプロセスで洗浄した。洗浄後に汚染モデルを取り出し、残存汚染の抽出液について、ATP 値とブラッドフォード法で蛋白質量 (μg) を測定した。

5) 実際の病院使用器械の洗浄効果試験

実際の病院使用器械について洗浄効果試験をおこなった。洗浄前に目視で血液付着のある器材を選択し、機械洗浄のみと、浸漬・用手後

機械洗浄の 2 つのプロセスで洗浄をおこない、洗浄後の器械の抽出液について ATP 値とブラッドフォード法で蛋白質量を測定した。また、ATP 抽出法との比較のため、一部器械については ATP 拭き取り法も実施した。拭き取り試験は、洗浄されにくい箇所である鉗子類のボックスロック部と把持部を、3MTM クリーントレースTM ATP 測定用試薬 UXC のスワブで一定 (箇所・往復回数等) に拭き取り ATP 値を測定した。

3. 結果

1) 汚染モデルおよび病院使用器械の洗浄試験結果

汚染モデルの洗浄後の清浄度評価結果を表 1 に示した。目視とブラッドフォード法では残存汚染が検出されなかったが、ATP 抽出法では洗浄後の鉗子の ATP 値は、機械洗浄のみで 66 ~ 478 RLU, 浸漬・用手洗浄および機械洗浄後では 32 ~ 73 RLU であった。

表 2 に病院使用器械の洗浄後の清浄度評価結果を示す。汚染モデルの試験成績と同様に、目視とブラッドフォード法では残存汚染が検出されなかったが、ATP 抽出法では、機械洗浄のみで 71 ~ 587 RLU, 浸漬・用手洗浄および機械洗浄後では 25 ~ 244 RLU であった。

2) 実際に使用された器械の洗浄効果評価

表 3 に機械洗浄のみの洗浄プロセスで洗浄した 8 本の器械について清浄度評価結果を示した。1 番と 2 番の拭き取り法での残存汚染の ATP 値は、ボックスロック部が 14 RLU, 28 RLU, 把持部が 21 RLU, 16 RLU であったのに対して、同じ器械の抽出法での対応する残存汚染の ATP 値は、2,721 RLU, 348 RLU であった。それ以外 3 ~ 8 番の器械についての抽出法による残存汚染の ATP 値は、18 ~ 99,009 RLU, 全体の平均値は 12,806 RLU (n=8) であり、7 番の器械は特に高い ATP 値を示した。

表 4 に浸漬・用手洗浄と機械洗浄の両方を含む洗浄プロセスで洗浄した 7 本の器械の清浄度評価結果を示した。1 番と 2 番の器械の拭き取り法での残存汚染の ATP 値は、ボックスロック部が 10 RLU, 13 RLU, 把持部が 11 RLU,

ガイドライン汚染モデル

病院器械汚染モデル

図2 バスケットへの器械の積載

表1 ガイドライン汚染モデルの洗浄効果評価

洗浄プロセス	器械番号	目視	抽出法による ATP値(RLU)	抽出液のブラッドフォード法 蛋白質量(μg/器械)
機械洗浄	1	検出されず	66	検出限界以下*
	2	検出されず	177	検出限界以下
	3	検出されず	478	検出限界以下
	4	検出されず	256	検出限界以下
	5	検出されず	179	検出限界以下
	平均値		231	
	SD		153.7	
予備洗浄 + 機械洗浄	1	検出されず	30	検出限界以下
	2	検出されず	40	検出限界以下
	3	検出されず	73	検出限界以下
	4	検出されず	32	検出限界以下
	5	検出されず	32	検出限界以下
	平均値		41	
	SD		18.1	

* 10μg/器械以下

表2 病院器械汚染モデルの洗浄効果評価

洗浄プロセス	器械番号	目視	抽出法による ATP値(RLU)	抽出液の ブラッドフォード法蛋白質量(μg/器械)
機械洗浄	1	検出されず	186	検出限界以下*
	2	検出されず	242	検出限界以下
	3	検出されず	162	検出限界以下
	4	検出されず	117	検出限界以下
	5	検出されず	587	検出限界以下
	6	検出されず	71	検出限界以下
	7	検出されず	299	検出限界以下
	8	検出されず	91	検出限界以下
	平均値		219	
予備洗浄 + 機械洗浄	SD		167.1	
	1	検出されず	135	検出限界以下
	2	検出されず	50	検出限界以下
	3	検出されず	25	検出限界以下
	4	検出されず	71	検出限界以下
	5	検出されず	141	検出限界以下
	6	検出されず	244	検出限界以下
	7	検出されず	49	検出限界以下
	8	検出されず	149	検出限界以下
	平均値		108	
	SD		72.8	

* 10μg/器械以下

表3 実際に使用された病院器械の洗浄効果評価 (機械洗浄)

器械番号	1	2	3	4	5	6	7	8
拭き取り法ATP値 (RLU)	14(ボックスロック部) 21(把持部)	28(ボックスロック部) 16(把持部)						
抽出法ATP値 (RLU)	2,721	348	225	18	38	32	99,009	58

表4 実際に使用された病院器械の洗浄効果評価 (予備洗浄+機械洗浄)

器械番号	1	2	3	4	5	6	7
拭き取り法ATP値 (RLU)	10(ボックスロック部) 11(把持部)	13(ボックスロック部) 19(把持部)					
抽出法ATP値 (RLU)	1,209	2,813	16	30	18	47	32

19 RLUであったのに対して、同じ器械の抽出法による残汚染のATP値は、各々1,209 RLU, 2,813 RLUであった。それ以外の、3～7番の器械についての抽出法による残存汚染のATP値は、16～47 RLU、全体の平均値は777 RLU (n=7)であり、機械洗浄のみの洗浄プロセスに比べて全般的に低い値を示した。

4. 考 察

2種類の汚染モデルを用いた洗浄効果評価において、目視、ATP抽出法およびブラッドフォード法による判定方法を比較した。目視とブラッドフォード法では残存汚染を検出することができず、洗浄プロセスの効果を分析することが困難であったが、より微量の残存汚染を検出できるATP抽出法では、残存汚染量の数値化とプロセス分析が可能であった(表1および表2)。得られたATP値を用いて有意差検定をおこなった結果、機械洗浄をおこなったガイドライン汚染モデル群と、浸漬・用手洗浄および機械洗浄をおこなったガイドライン汚染モデル群の間のATP値による残存汚染は有意差が認められた〔図3： $p<0.05$ (片側), Welch t-test ($p=0.0253$)〕。一方、病院使用器械について、機械洗浄のみの群と浸漬・用手洗浄および機械洗浄の群で統計的な有意差は明確には認められなかったものの〔図4： $p=0.0580$ (片側), Welch t-test〕、得られたATP値は約半分であったことからサンプルサイズや器械積載量の影響が考えられる。従って、浸漬・用手洗浄の有効性が示唆されると共に、ブラッドフォード法

では成し得ない洗浄効果のより詳細な分析が可能であることがわかった。

また、実際に臨床使用された器械の洗浄効果評価では、ATPを汚染指標とし、拭き取り法と抽出法を比較した。同じ洗浄後器械について実施した拭き取り法によるATP値と抽出法によるATP値は、いずれも抽出法の方が拭き取り法より高値となった(表3および表4)。拭き取り法はより簡便な評価方法である一方、器械全体の残存汚染を把握できないため、正確に洗浄効果を評価できないと考えられる。特に、表3の7番(機械洗浄のみ)の器械について、抽出法による測定結果が99,009 RLUであり、ボックスロック部の奥から組織片が確認された。拭き取り法では、このような間隙部位の残存汚染を回収できないこと、かつ、機械洗浄のみではボックスロック部の汚染を十分に洗浄できない場合があるという重要な情報が得ることができた。

以上の検討により、ATP抽出法は、高い検出感度に加え、器械の表面全体の残存汚染を測定することが可能なため、器械当たりの汚染量に基づく洗浄効果評価を医療現場において実践することがわかった。特に、残存蛋白質が検出限界以下であり、蛋白質を指標として評価できないような洗浄プロセスについても、ATPを指標とすることで、さらに詳細な評価・検討が可能となる場合があることから、より良い洗浄の質や日常の業務効率向上のための洗浄プロセス評価の手段として有用であると考えられる。

図3 ガイドライン汚染モデルの抽出法 ATP 値の統計解析

図4 病院器械汚染モデルの抽出法 ATP 値の統計解析

ただし、ATP を指標とした洗浄効果判定あるいは、今回の実験から得られたデータには、今後も調査検討が必要な課題が存在する。まず、生物の血液や体液に含まれる ATP 量には種差や個体差が存在することが報告されており¹⁰⁾、臨床使用した器械の汚染は血液、体液、組織片など様々な成分から構成されることから、実際に臨床使用された器械に含まれる ATP 量の平均値や分布、さらには安定性などについて今後も調査が必要と考えられる。

5. 結 論

汚染モデルや臨床使用した手術器械を用いて、ATP 抽出法とともに洗浄評価判定法のうち代表的な直接法である ATP 拭き取り法、ブラッドフォード法による蛋白質質量測定をおこない、試験手順や評価結果について比較検討をおこなった。

ATP 拭き取り法との比較結果から、ATP 抽出法は細部や間隙からの残存汚染の回収が可能であり、複雑な形状や間隙を有する手術器械等の洗浄効果試験により適していることを確認した。ブラッドフォード法との比較結果から、ATP 抽出法はより簡便かつ短時間で実施可能であり、より高い感度で残存汚染を検知できるため、ブラッドフォード法よりも詳細な分析が可能であることを証明した。

ATP 抽出法の詳細な解析性能に基づき、洗浄現場の2つの異なる洗浄プロセスを評価することで、洗浄効果におよぼす用手洗浄の効果を検証することができ、また ATP 抽出法を実施することで洗浄効果を明らかにし、用手洗浄の効果について考察する情報を得ることができた。

以上の検討結果から、3MTM クリーントレースTM ATP モニタリングシステムを活用した ATP 抽出法が洗浄の質向上や費用対効果の検証に有用なことが示唆された。

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) AORN. Perioperative Standards and Recommended Practices 2013 Edition.
- 4) CDC. Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities, 2008.
- 5) 土方俊介, 染谷 拓, 木村 登, 上林裕始. ATP を指標とした医療現場での洗浄評価判定法の検討. 医療機器学. 2014 ; 84(3) : 19-26.
- 6) 和光純薬. ATP Adenosine 5'-triphosphate (disodium salt) crystalline.
- 7) 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. 2010 ; 80(5) : 39-40.
- 8) 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. 2013 ; 41(2) : 161-164.
- 9) AAMI TIR30 : 2011. A compendium of processes, materials, test methods, and acceptance criteria for cleaning reusable medical devices.
- 10) 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. 1993 ; 1175 : 133-139.