総アデニレート (ATP+ADP+AMP) を指標とする 新規な清浄度検査 (A3 法) の開発

場 家 幹 雄* 佐 藤 昇 良* 鈴 木 繁 哉*¹
桐原英理奈*² 渡邊真理子*² 三 上 繁*²

Development of a Novel Hygiene Monitoring System
Based on the Detection of Total Adenylate (ATP+ADP+AMP)

Mikio Bakke*, Nobuyoshi Sato*, Shigeya Suzuki*¹
Erina Kirihara*², Mariko Watanabe*², Shigeru Mikami*²

Abstract

Adenosine triphosphate (ATP) tests are commonly used for cleanliness verification. However, since ATP is hydrolyzed to adenosine diphosphate (ADP) and adenosine monophosphate (AMP), total adenylate (ATP+ADP+AMP, A3) could be more reliable indicators. In this study, a novel enzymatic method to measure A3 was developed based on luciferin-luciferase assay with the combination of two enzymes, pyruvate kinase and pyruvate phosphate dikinase, which can convert ADP and AMP into ATP, respectively. The A3 method afforded equivalent linear calibration curves between the measurement output (Relative Light Units) and each of the amounts of ATP, ADP and AMP. The assays using conventional ATP tests and the A3 tests demonstrated that ATP in hemolysate was decomposed easily, on the other hand, the amounts of A3 were clearly maintained. Regarding sweat samples, the amount of A3 was 20 times higher than that of ATP. Moreover, the investigation for high touch surface samples showed good correlations between the A3 method and viable bacteria counts, and the amount of A3 was about 8 times higher than that of ATP on average. Therefore, the A3 tests appeared to be more reliable for the assessment of sanitation in healthcare settings than the conventional ATP assay.

1. 目 的

医療現場における感染制御の基本的な対策として、器具・環境・手指の洗浄・消毒・滅菌を適切におこなうことが挙げられる。消毒・滅菌を効果的におこなうには、洗浄によって付着物を可能な限り分解、除去することが重要であ

るため、洗浄は感染防止の第一歩と言える。そして、洗浄を適切に実施するための基盤となるのが、「十分に洗浄できているか」「洗浄方法は適切か」を評価する方法である。

洗浄効果の確認方法として、目視による判定があるが、個人差があり、数値化が困難であるとともに、内腔等の構造上見えない部分は判定ができない。培養による菌検査法は、結果の判定に1日から数日かかるため、現場で改善措置や再洗浄などの対策を講じることは難しい。また、残留蛋白質測定法も用いられるが、抽出と

* キッコーマンバイオケミファ(株) 企画開発部

*¹ キッコーマン(株) 研究開発本部

*² キッコーマン総合病院

(原稿受付：2017 年 12 月 19 日)

測定に複雑な手技を要し、洗浄現場で容易に実施することは困難である¹⁾。近年、清浄度を確認するツールとして、見えない汚れを簡便かつ迅速に数値化できる ATP (アデノシン三リン酸) ふき取り検査が注目を集めている。ATP とは、すべての植物、動物および微生物の細胞内に存在するエネルギー分子である。したがって、ATP ふき取り検査では、血液等の生体成分や微生物の汚れが測定対象となる。ATP ふき取り検査法は、アメリカ疾病予防管理センターが、環境表面の洗浄の有効性評価法の一つとして挙げている²⁾。また、日本医療機器学会の「洗浄評価判定ガイドライン 2012」¹⁾および「医療現場における滅菌保証のガイドライン 2015」³⁾に収載されている。

しかしながら、ATP は代謝や加熱等により、ADP (アデノシン二リン酸) を経て AMP (アデノシン一リン酸) に分解される。これまでは、汚れを広く検出できる ATP + AMP 測定デバイスが利用可能であった^{4, 5)}。今回、我々は汚れをより高率で検出するため、ATP + ADP + AMP (A3) を同時に測定可能なふき取り検査法 (A3 法) を開発した。そして、溶血した血液と汗における A3 量、ATP + AMP 量、ATP 量の比較分析をおこなった。さらに、病院内の高頻度接触面の A3 量と一般生菌数との相関性解析および A3 量と ATP 量との比較をおこなったので報告する。

2. 方 法

1) A3 量, ATP + AMP 量および ATP 量の分析

A3 ふき取り検査 (ルシパック[®] A3 Surface) を、ルシフェリナーシフェラーゼを用いる ATP 検出反応に、ピルベートキナーゼ (PK) とピルベートオルトホスフェートジキナーゼ (PPDK) による ADP および AMP からの ATP への変換を組み合わせで作製した⁶⁾。発光検出はルミテスター[®] PD-30 (キッコーマンバイオケミファ社製) を用いて実施した。比較対照としての ATP および ATP + AMP の分析は、ルシパック[®] II (同上)-ルミテスター[®] C-110 (同上) とルシパック[®] Pen (同上)-ルミテスター[®]

PD-30 (同上) を用いて実施した。測定値として表示された相対発光量 (RLU) を記録した。

2) A3 法の ATP, ADP, AMP に対する検量線の確認

ATP, ADP, AMP (オリエンタル酵母社製) について、 10^{-4} M および 10 倍ずつ段階希釈した溶液をそれぞれ調製した。100 μ l の精製水で湿らせた綿棒に 10 μ l 滴下して測定し (n=10)、平均値を求めた。

3) 溶血した血液の時間経過に伴う A3 量および ATP 量の変化の計測

試薬として販売されている血液 (羊由来 日本バイオテスト研究所社製) を精製水で 10 倍希釈して溶血させ、35℃で 2 時間保存した。経時的にサンプルを 10 μ l 採取して、100 μ l の精製水で湿らせた 3 種ルシパックの綿棒に滴下し (n=5)、A3 量、ATP + AMP 量および ATP 量をそれぞれ測定して平均値を求めた。

4) 汗の A3 量, ATP + AMP 量および ATP 量の比較分析 (グローブジュース法)

未使用 (ブランク) および 4 時間装着したゴム手袋 (ニトリルゴム パウダーフリー, アズワン社, n=10) の内側に精製水 5 ml を添加して分析試料とした。3 種ルシパックの乾燥綿棒に 100 μ l ずつ滴下し、A3 量および ATP 量をそれぞれ測定した。それぞれの検体について A3 量 / ATP 量比および ATP + AMP 量 / ATP 量比を算出し、平均値を求めた。

5) 病院内の高頻度接触面における A3 量と一般生菌数の相関性解析および A3 量と ATP 量の比較

病院内の下記の高頻度接触面の清拭前後 (清拭前 68 箇所、清拭後 35 箇所) において、水道水で濡らしたルシパックの 2 本の綿棒で同時にふき取りをおこなった。

ナースステーション：受話器、マウス、照明スイッチ、ワゴン (天板・取っ手)、聴診器、
机、血圧計ポンプ、タッチパネルモニター
患者病室：ドア取っ手、ナースコール、冷蔵庫取っ手、床頭台、ベッド柵、照明スイッチ
病棟施設・設備：廊下手すり、ストレッチャー台、車いす取っ手、回診車取っ手
新生児室：保育器

図1 A3法の原理

PK：ピルベートキナーゼ，PPDK：ピルベートオルトホスフェートジキナーゼ，
PPi：ピロリン酸，Pi：リン酸

(1) A3量と一般生菌数の相関性解析

まず，1本の綿棒でA3量の測定をおこなった。もう1本の綿棒を，滅菌した1.5ml容量のマイクロチューブに分注した5%ブドウ糖液（大塚製薬社製 1ml）にて懸濁した。本検体100 μ lを一般生菌用寒天プレート培地に塗布して静置培養し，一般生菌数を計測した。なお，検体の1/10量を計測に用いたため，検出されたコロニー数に10を乗じた値を colony forming unit (cfu) とした。

(2) A3量，ATP + AMP量およびATP量の比較

(1)で調製した5%ブドウ糖液検体を，3種ルシパックの乾燥綿棒にそれぞれ100 μ lずつ滴下して，A3量，ATP + AMP量およびATP量をそれぞれ測定した。なお，検体の1/10量を計測に用いたため，得られたRLU値に10を乗じた値を測定結果とした。(1)で算出した一般生菌数 (cfu) との相関性解析をおこなった。

3. 結果

1) A3法の開発とATP，ADP，AMPに対する検量線の確認

まずA3法の原理を説明する(図1)。ホタルの発光酵素(ルシフェラーゼ)の存在下で，ホタルが持つ化合物(ルシフェリン)とATPが反応すると発光が起きる。この光の強さを

測定することで，ATP量を測定するのがATP法である。このとき，ATPはAMPに変換されるが，最初から存在するAMPも含めて，ATPに再生する酵素PPDKを添加することによって，ATP + AMPを測定できる⁶⁾。さらに今回，ADPをATPに変換する酵素PKを添加することにより⁶⁾，A3の同時測定系を構築した。すでに市販されているATP + AMP量を拭き取り検査できるルシパック[®] Penと同様の形状のデバイスであり，同じ発光検出器ルミテスター[®] PD-30を用いてA3量の計測が可能となった(図2)。

図2 A3ふき取り検査デバイス

ルシパック[®] A3 Surface (右) と発光検出器ルミテスター[®] PD-30 (左)

図3 A3法, ATP+AMP法およびATP法の標準ATP, ADP, AMP溶液に対する発光量検量線(両対数グラフ)

ATP (—●—), ADP (---△---), AMP (—×—) (A)A3法, (B)ATP + AMP法, (C)ATP法

A3法のATP, ADP, AMPに対する検量線を図3(A)に示す。A3法はATP・ADP・AMP量とRLUの両対数グラフにおいて、同等の直線が得られた。また、ATP法についてはATP量, ATP + AMP法についてはATP量とAMP量について、RLUとの両対数グラフにおける検量線を作成し、A3法と同等の検量線が得られることを確認した(図3(B), (C))。したがって、これらのA3法, ATP + AMP法, ATP法を用いて、ATP量, ADP量, AMP量の評価をおこなうこととした。

2) 溶血した血液の時間経過に伴うA3量, ATP + AMP量およびATP量の変化

血液を10倍の水で希釈した溶血サンプルについて、A3量, ATP + AMP量, ATP量を測定すると、それぞれ36,825RLU, 30,141RLU, 21,035RLUであった。このサンプルを35℃で保存し、ATP量, ATP + AMP量, A3量を経時的に分析した結果を図4に示す。ATPは1時間で20%以下に減少し、2時間ではほぼ消失していた。ATP + AMP量については、最初の15分で7%減少したが、30分以降では保存開始時よりも9~15%上昇した。一方で、A3量は±8%の範囲内で維持されていた。

3) 汗のA3量, ATP + AMP量およびATP量の比較分析

ヒト汗(n=10)のA3量/ATP量比およびATP + AMP量/ATP量比の平均値を求めた結果、それぞれ20.0, 8.5であった。

4) 病院内の高頻度接触面におけるA3量と一般生菌数の相関性解析およびA3量とATP量の比較

ナースステーション, 患者病室, 病棟施設・設備, 新生児室における各種高頻度接触面35箇所について、清拭前後のA3量と一般生菌数を調べた。すべての測定場所において、清拭後にA3量は低下し、平均として0.13倍に低減していた。例えば、ドア取っ手は、清拭前後でA3量が1,030RLUから43RLUへと低減し、一般生菌数も1,670cfuから非検出に低下していた。また、ベッド柵については、清拭前後でA3量が1,565RLUから89RLUへと低減し、一

図4 溶血血液中のATP量, ATP + AMP量およびA3量の経時変化

10倍希釈した血液を35℃で保存して分析した。保存前のRLU値を100%とした。

●: ATP, ▲: ATP + AMP, ■: A3

図5 病院内高頻度接触面における、A3法、ATP法および一般生菌数との相関性

点線は、ステンレス素材の清浄度判定の一般的な基準値例である200RLUを示す。(A)A3法、(B)ATP法 ×：清拭前、●：清拭後

般生菌数も50cfuから非検出に低下していた。

上記35箇所に加え、さらに清拭前33箇所を加えたA3量・ATP量と一般生菌数の全測定結果のまとめを図5(A)、(B)に示す。清拭前の合計68箇所について、A3量／ATP量比およびATP＋AMP量／ATP量比の平均値を求めた結果、8.0、4.5であった。

4. 考 察

今回、ATP＋ADP＋AMP(A3)を同時に測定する拭き取り検査法(A3法)を開発した。本方法と従来のATPおよびATP＋AMPの拭き取り検査法を用いて、血液、汗、医療施設の高頻度接触面の汚れの分析をおこない、各汚れのATP、ADP、AMPの構成比の算出およびA3法の有効性の評価をおこなった。

血液については、洗浄等で希釈され、溶血することを想定し、精製水で10倍希釈した。希釈直後のA3量／ATP量比およびATP＋AMP量／ATP量比はそれぞれ1.75と1.43であった。すなわちATP：ADP：AMPは1：0.32：0.43であり、ATP量が最も多かった。しかし、35℃で保存すると、図4に示したとおり、ATPは速やかに分解を受けた。したがって、従来のATP法では、溶血汚染を見逃すリスクがあることが示唆された。ATP＋AMP法では、ATPの分解産物であるAMPも同時測定できるため、溶血汚染を見逃すリスクが低減される。しかし、ATPの分解中間物であるADP

を検出できないため、一時的に測定値が減衰し、その後にADPからAMPへの分解が進行して測定値が上昇し、不安定な結果であった。一方、A3法はATP、ADP、AMPのすべてを同時測定するため、結果が経時的に安定していた。したがって、A3ふき取り検査は、医療現場における血液汚染のリスクがある場所や機器の清浄度をより正確に計測できるツールとして有効であることが示された。

汗については、10名の被験者からグローブジュース法で採取したサンプルを分析した結果、ATP：ADP：AMPは1：11.5：7.5であり、ADPの構成比が最大であった。A3法は汗の汚れを、従来のATP法よりも約20倍、ATP＋AMP法よりも約2.4倍高率で検出できることが示され、医療施設内の高頻度接触面の清浄度管理に有効であると考えられた。

そこで、病院内の高頻度接触面について、A3法と一般的な汚染の評価方法の一つである一般生菌数の結果と比較した。まず、35箇所について清拭前後の結果を解析した結果、A3量は、すべての測定ポイントで清拭後に低下し、清拭操作との相関性が確認された。一方、一般生菌数は、清拭操作との相関性がない例が2箇所存在し、その理由として、ふき取りが無菌環境ではないことや、懸濁サンプルから1／10量採取した際のサンプリング誤差が考えられた。

上記35箇所に加え、さらに清拭前33箇所を

加えた A3 量と一般生菌数の相関関係を図 5(A) に示した。本法は微生物由来の A3 を特異的に測定するものではないが、A3 量が低くなるにつれて、一般生菌数も減少する傾向が認められた。また、一般生菌数が非検出であるにもかかわらず、RLU 値が高い検体も認められた。これらは、血液、汗等の生体成分を含む何らかの有機物汚染が残存することを意味する。有機物などが付着した器材をそのまま消毒薬に浸漬すると、次亜塩素酸ナトリウムなど有機物に影響を受けやすい消毒薬において、殺菌効果が著しく低下する恐れがあることが知られている⁷⁾。また、消毒薬によっては、器材上の有機物などを凝固させてしまい、その後に洗浄処理をおこなっても十分に除去されない場合があると言われている⁸⁾。したがって、このような汚染も顕在化し、再洗浄等の処置をおこなうことは感染予防に重要である。

さらに、従来の ATP 法と一般生菌数の相関関係も図 5(B) に示した。ATP 法では、清拭前で一般生菌が検出された検体でありながら、200RLU 以下で合格判定となったサンプルが多数確認されたため、高頻度接触面の清浄度管理ツールとして感度が不十分である可能性が示唆された。また、清拭前 68 箇所について、ATP : ADP : AMP を調べた結果、1 : 3.5 : 3.5 であった。A3 法は高頻度接触面の汚れを、従来の ATP 法よりも約 8 倍高率で検出でき、高頻度接触面の清浄度管理により適することが確認された。

今回、医療現場における清浄度管理の実例として、高頻度接触面について検討をおこなった。A3 法は手術や処置に使用する鋼製小物や医療用内視鏡等の清浄度管理への活用も期待される^{4,5)}。これらのアプリケーションにおける A3 法の有用性についても、今後、検証を進めていきたい。

5. 結 論

ルシフェリン-ルシフェラーゼを用いる ATP 検出反応に、PK と PPK 2 の酵素反応を組み合わせることで、ATP + ADP + AMP (A3) の同時測定が可能となり、検出キット (A3 法) を開発した。溶血血

液では ATP は不安定で速やかに分解を受けたが、A3 量は一定であったため、A3 法は、溶血汚染を安定的に測定できることが示唆された。また、汗の検出率は、A3 法は ATP 法の約 20 倍であった。A3 法を用いて、病院内の高頻度接触面の清浄度検査を実施した結果、清拭後に A3 量が低下し、清拭操作との相関性が確認された。また、一般生菌数が多い検体では A3 量が高い傾向も認められた。したがって、A3 法は、高頻度接触面の見えない汚れの顕在化に有効なツールであることが確認された。

なお、執筆者の内、MB はキッコーマンバイオケミファ社員、SS はキッコーマン社員であるが、利益相反はない。

文 献

- 1) 日本医療機器学会 滅菌技士認定委員会. 洗浄評価判定の指針を調査・作成するための検討 WG. 洗浄評価判定ガイドライン 2012 年. 一般社団法人日本医療機器学会 2012, p.1-14.
- 2) Guh A, Carling P, the Environmental Evaluation Workgroup. CDC Environmental Checklist for Monitoring Terminal Cleaning. Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention. 2010. <http://www.cdc.gov/HAI/toolkits/Environmental-Cleaning-Checklist-10-6-2010.pdf>.
- 3) 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 2015. 一般社団法人日本医療機器学会 2015.
- 4) 内田美保, 菅原えりさ, 梶浦工ほか. 新鮮ヒト血液を用いたアデノシン三リン酸測定法の洗浄評価判定法の有用性に関する検討. 医機学. 2015, Vol.85, No.6, p577-582.
- 5) 大迫しのぶ, 伏見了, 中田精三ほか. ATP + AMP 量を指標とした上部消化管内視鏡チャンネル内の汚染と洗浄消毒の評価. 環境感染誌. 2016, Vol.31, No.5, p285-291.
- 6) Sakakibara T, Murakami S, Imai K. Enumeration of bacterial cell numbers by amplified firefly bioluminescence without cultivation. Anal. Biochem. 2003, Vol.312, No.1, p.48-56.
- 7) 小林寛伊 編集, 改訂 消毒と滅菌のガイドライ

ン、へるす出版、2004.

- 8) 伏見了, 花村亮, 中田精三ほか. 一次消毒された汚染物の洗浄障害について. 医機学. 2003, Vol. 73, No. 6, p281-289.