〈原 著〉

アデノシン三リン酸測定器および試薬間における相関関係と 医療分野における適切な活用

大石 貴幸¹⁾・四宮 聡²⁾・伏見 了³⁾・大久保 憲³⁾

Correlation Between Instrument Reagent Adenosine Triphosphate and Tolerance Settings and Appropriate Use in The Medical Field

Takayuki OHISHI¹⁾, Satoshi SHINOMIYA²⁾, Ryo FUSHIMI³⁾ and Takashi OKUBO³⁾¹⁾Department of Infection Control and Prevention, Osaki Citizen Hospital,²⁾Department of Infection Control and Prevention, Mino City Hospital,³⁾Tokyo Healthcare University Postgraduate School

(2013年4月10日 受付・2013年7月26日 受理)

要 旨

国内で汎用されているアデノシン三リン酸(Adenosine Tri-Phosphate; ATP)測定器と試薬を用いて、ATP 標準液と標準菌株懸濁液を測定し相関関係を明確にすることで、ATP を指標とした医療分野における医療機器の清浄度評価と再洗浄の目安となる許容値設定について検討した。Lumitester PD-20 と ATP 測定試薬 LuciPac Pen (A 法)、CleanTrace UNG3 と ATP 測定試薬 CleanTrace UXL (B 法)および UNG3 と ATP 測定試薬 CleanTrace AQT (C 法)を用いて、蒸留水、ATP 粉末試薬を蒸留水に溶解した標準液、主要 4 菌種の標準菌株懸濁液を測定した。結果、蒸留水は ATP 陽性となり、一般細菌、真菌の測定限界値は各々 $10^2 \sim 10^3$, 2.0 CFU/assay だった。ATP 標準液および標準菌株懸濁液の測定値は A 法, B 法, C 法の順に高値となり、いずれの方法でも測定値は相関係数 0.98 以上と高い相関を示したが絶対値ではなく、各測定法間での測定値の比較には問題があると考えられた。また、どの方法でも高感度、低特異度なため、医療現場で ATP を清浄度評価とする際は、医療機器洗浄後など菌残留が許容される場合に有用であることが示唆された。許容値に関しては、洗浄後の残留 ATP の平均値を調べ、洗浄方法別の値を設定する必要がある。

Key words : アデノシン三リン酸, 試薬間比較, 相関係数, 許容値

はじめに

医療現場での再処理業務を行う上で、医療機器が確実に清浄化されたかを判定することは、医療の質を担保するための重要な要素のひとつである。清浄度の判定法としては細菌培養が恒常的に実施されてきたが、培養検査は判定まで約 24 時間必要であり、現場での迅速な判定は困難で、かつ、培養方法によっては検出不可能な細菌類があることも問題となってきた¹⁾。

このような欠点を補える方法として、近年、アデノシン三リン酸(Adenosine Tri-Phosphate; ATP)を指標とした清浄度評価が注目されている²⁾。ATP 測定法は簡便、迅速、高感度との理由から、主に食品衛生の分野で利用され、細菌培養検査との相関性が高く、医療現場での清浄度評価にも有効との報告がある^{2~7)}。

国内で市販されている ATP 測定器は、ATP の分解産物であるアデノシン一リン酸(adenosine Mono-Phosphate; AMP)も測定可能な Lumitester® PD-20 (Kikkoman 社)、ATP のみの測定となる CleanTrace™ UNG3 (3M 社)、SystemSure Plus, Ensure (ともに

¹⁾大崎市民病院感染管理部, ²⁾箕面市立病院チーム医療推進部,

³⁾東京医療保健大学/大学院感染制御学

Hygiena 社), AccuPoint (Neogen 社)などあるが, 国内の医療分野においては, Lumitester® PD-20(PD-20)と CleanTrace™ UNG3(UNG3)の使用頻度が高い. しかし, PD-20 と UNG3 では, 同一検体を測定しても結果に差異があり, メーカー発表ながら感度や特異度にも相違があるとされており, 学術発表等において ATP 測定により医療機器の清浄度を評価した場合, 使用した ATP 測定器を明記しなければ, 誤った解釈に繋がる可能性がある.

そこで, 本研究では PD-20 と PD-20 専用 ATP 測定試薬である LuciPac® Pen (LPP), UNG3 と UNG3 専用 ATP 測定試薬である CleanTrace™ UXL (UXL), CleanTrace™ AQT(AQT)を用いて, ATP 粉末試薬を注射用蒸留水(大塚蒸留水: 以下, 蒸留水)に溶解した標準液と主要な標準菌株懸濁液を測定し, 各機種・試薬間の相関関係を明確にした上で, ATP を指標とした医療現場における医療機器の清浄度評価と再洗浄の目安となる許容値設定について検討する.

材料と方法

PD-20 と LPP(A 法), UNG3 と UXL(B 法)および UNG3 と AQT(C 法)を用いて, 蒸留水と ATP 標準液, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Escherichia coli* (*E. coli*), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), *Candida albicans* (*C. albicans*)の標準菌株懸濁液を測定した. 実験環境は室温約 23°C の屋内, ATP 測定試薬は使用前に 1 時間以上室温放置し, 検体採取棒に検体を 10 μ L 滴下後, 30 秒以内に 10 回ずつ計測した. 測定単位は測定試薬ごとにどれほどの量が採取されたかの換算値表現で, ATP 標準液は mol/assay, 標準菌株懸濁液は McFarland/assay とした. 測定に使用した ATP 測定試薬のロット番号は LLP が 20121107P, UXL は 20JUL 2013, AQT で 09JUL 2013 であった.

1. コントロール測定

ATP 測定器は, ATP が全く存在しない場合でも, 発光試薬自体がある程度発光を生じるため 0 とはならない⁸⁾. このためコントロールが必要であり, 本研究では ATP 粉末試薬や標準菌株を溶解する蒸留水をコントロールとし, 10 μ L を各 ATP 測定試薬にてそれぞれ 10 回測定し平均値を算出した.

2. ATP 標準液測定

ATP 粉末試薬 (Adenosine-5'-triphosphate: オリエンタル酵母工業株)を蒸留水に溶解し, 10⁻¹² mol/L, 10⁻¹¹ mol/L, 10⁻¹⁰ mol/L, 10⁻⁹ mol/L, 10⁻⁸ mol/L, 10⁻⁷ mol/L, 10⁻⁶ mol/L, 10⁻⁵ mol/L の希釈系列を作製後, 各々を各試薬で 10 回ずつ測定し, 平均値を算出した.

3. 標準菌株懸濁液測定

測定には, *S. aureus* の ATCC 29213 株, *E. coli* の ATCC 25922 株, *P. aeruginosa* の ATCC 27853 株, *C. albicans* の ATCC 10231 株の 4 標準菌株を用いた. 標準菌株を初代から継代(24 時間 35°C 培養)して得られた第 3 世代株を蒸留水に懸濁し, BD フェニックス™スベック (BD 社)を用いて 0.50 McFarland に調製, 0.5 $\times$ 10⁻¹ McFarland, 0.5 $\times$ 10⁻² McFarland, 0.5 $\times$ 10⁻³ McFarland, 0.5 $\times$ 10⁻⁴ McFarland, 0.5 $\times$ 10⁻⁵ McFarland の希釈系列を作製後, 各試薬にて 10 回測定し, 平均値を算出した. 標準菌株懸濁液の生菌数確認のため, *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* はトリプチケースソイ寒天培地, *C. albicans* はレシチン・ポリソルベート 80 添加トリプチケースソイ寒天培地に各希釈系列の懸濁液を 10 μ L 添加塗布した. この方法を各々 3 回実施し, 平均値を算出した.

結 果

ATP 測定値は発光度 (Luminescence) で表し, 単位は RLU (相対的発光量), 実測値は全て対数変換 (log₁₀) した. **Table 1** には蒸留水と ATP 標準液を測定した際の平均値 (average: AV) と標準偏差 (standard deviation: SD), **Fig. 1** には平均値をもとにした ATP 測定曲線を示す. また, 各 ATP 測定試薬で ATP 標準液を測定した際の相関係数と近似直線式はそれぞれ, A 法-B 法: 0.99786, $y = 1.0564x + 0.3709$ (**Fig. 2**), A 法-C 法: 0.98781, $y = 1.0823x + 0.6644$ (**Fig. 3**), B 法-C 法: 0.99760, $y = 1.0303x + 0.2677$ (**Fig. 4**) となり, いずれも正の相関を示した.

各標準菌株懸濁液の ATP 測定曲線と相関係数, 平均値をもとにした近似直線式を **Fig. 5** に表す. いずれも正の相関を呈した.

Table 1 Measurement of standardized ATP (n=10)

ATP (mol/assay)	AV (log)			SD		
	A test	B test	C test	A test	B test	C test
10 ⁻¹⁷	0.84	1.15	1.33	0.16	0.10	0.07
10 ⁻¹⁶	0.94	1.16	1.38	0.07	0.09	0.06
10 ⁻¹⁵	1.02	1.39	1.68	0.10	0.07	0.06
10 ⁻¹⁴	1.35	1.99	2.37	0.08	0.04	0.15
10 ⁻¹³	2.21	2.87	3.42	0.04	0.06	0.06
10 ⁻¹²	3.21	3.90	4.44	0.11	0.05	0.08
10 ⁻¹¹	4.22	4.90	5.31	0.06	0.05	0.09
10 ⁻¹⁰	5.23	5.70	5.97	0.11	0.03	0.05
Distilled water	0.70	1.14	1.29	0.06	0.05	0.09

A test: Lumitester PD-20 and Luci Pac Pen

B test: Clean Trace UNG 3 and Clean Trace UXL

C test: Clean Trace UNG 3 and Clean Trace AQT

Fig. 1 Measurement of standardized ATP in each reagent

Fig. 2 Measurement of *S. aureus* suspension in each reagent Fig. 3 Measurement of *E. coli* suspension in each reagent

考 察

各 ATP 測定試薬における ATP 標準液と測定値の相関では A, B, C 全ての方法において、 $10^{-16} \sim 10^{-17}$ mol/assay のレンジで、測定曲線がプラトー化し測定限界値と考えられた。各測定値の間には、全て非常に強い相関($R=0.98$ 以上)を認めたが、A 法, B 法, C 法の順に高値となることが判明した。また、3 方法間の近似直

Fig. 4 Measurement of *P. aeruginosa* suspension in each reagent Fig. 5 Measurement of *C. albicans* suspension in each reagent

線の傾きはほぼ 1 となり、切片が A 法-B 法間で 0.3 log, A 法-C 法間で 0.6 log, B 法-C 法間で 0.3 log となったことから、各方法間での測定値を補正するには、A 法の測定値に 0.3 log を加算した値が B 法の測定値に、A 法の測定値に 0.6 log を加算した値が C 法の測定値に、B 法の測定値に 0.3 log を加算した値が C 法の測定値に相当することが示唆された。

ATP 測定試薬には、細菌の細胞壁や細胞膜を溶解し ATP を抽出するための試薬と、抽出された ATP を発光させるための発光試薬が添加されている⁸⁾。今回の実験では、ATP 単体の試薬を検体としているため、抽出試薬が測定結果に影響を及ぼすことは考えにくく、発光試薬の添加量の差が、発光を数値化する際の係数が ATP 測定試薬間で異なる可能性がある。B 法と C 法は、同じ測定器を用いて測定するため、同じ検体の結果に差異を認めることは、発光量自体に差があることを意味することから、各 ATP 測定試薬間での測定値の相違は、発光試薬量が関係している可能性が強く示唆された。

各標準菌株懸濁液の測定値と菌数との相関では、全てにおいて A 法が最も低値となり、次いで B 法, C 法の順となり、ATP 標準液の測定結果と整合性があった。*S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* では全ての方法において $10^2 \sim 10^3$ CFU/assay, *C. albicans* では 2.0 CFU/assay

で蒸留水と近似値になり測定限界値と考えられた。一般細菌に比べて、*C. albicans* で ATP 測定値が高値となったのは、微生物によって細胞当りの ATP 含量が異なる（一般細菌で 10^{-18} mol/cell, 酵母・真菌で 10^{-15} mol/cell）ことが要因と考えられた⁹⁾。

標準菌株懸濁液を測定した際の各 ATP 測定試薬における相関では、全ての試薬において $R=0.95$ 以上の高い相関を示し、測定値は A 法を基準とした場合、B 法では 1.2~1.3 倍、C 法では 1.4~1.5 倍となった。3 方法間の近似直線の傾きは、どの菌種においてもほぼ 1 となったことから、各方法間での補正を実施する場合、乗算する必要はないが、各菌種、方法間で切片の相違が著しいため定数を加算することができない。つまり菌種・方法別の切片に応じた数値を加算することになる。

以上により、ATP 標準液や標準菌株懸濁液測定における A 法、B 法、C 法の相関は非常に強く、近似直線の傾きはほぼ 1 となり、測定値は同一の検体量を測定すると、A 法、B 法、C 法の順で 0.3 log 間隔で高くなることが判明した。しかしながら、実測の際には、本研究のような一定量を滴下しての測定ではなく、先端が綿棒タイプの試薬(UXL, LPP)は拭き取って、溝状タイプ(AQT)では液体に浸けるため測定量に差が生じる。このためひとつの測定対象物に対して複数の ATP 試薬を混在させて測定することは、測定結果の標準性に欠け、誤評価に繋がるため注意が必要である。

また、実際の医療現場で ATP を測定する場合、ATP 標準液のような ATP のみで構成された検体を計測することは考えにくく、様々な細菌や有機物の混合液、あるいは付着物とともに測定すると推測される。特に綿棒タイプの試薬は、拭き取り時の圧力によって、吸収あるいは付着する有機物等の検体量に差異ができ、誤差を生じる原因となるため、慎重な結果の解釈が必須となろう。

このような現状と本研究結果から医療現場での ATP 測定の利用法について言及する。既に国内外から ATP 測定による環境や軟性内視鏡の清浄度評価、手洗い効果の判定に有用との報告がある^{2,10,11)}。環境や軟性内視鏡の清浄度評価では測定値が低い場合、清浄と判断できるとしている報告が多く、一方、手洗い効果の判定では、手洗い後の測定値と細菌数の相関が悪いため、清浄効果の判定には不向きとする意見が多数を占める。本研究で示した通り、ATP 測定ではコントロールとした蒸留水でも測定値が 0 とはならず、ATP 標準液や標準菌株懸濁液の低濃度では、測定限界があるため、低測定値を無菌とするには特異度が低く問題がある。また、ATP は細胞内のミトコンドリアや TCA サイクルによって産生される物質であり、これらを持たないウイルスでは、ATP を指標とした清浄度評価は意味をなさない。

つまり、医療現場で ATP を測定した結果、測定値が

低くなったとしても、対象物に微生物が存在しない証左とはなり得ない。この観点から、微生物が検出されてはいけない滅菌物や、特定の微生物を殺滅する消毒効果の指標として ATP 測定を用いるのは問題といえる。しかし、測定値はある程度の菌量があれば必ず上昇することから、測定対象物がコントロール値より高値となった場合は、ATP がほぼ確実に存在していることになり、対象物の汚染度の評価としては感度が高く有用となる。ゆえに、医療現場で ATP を清浄度評価に用いる際は医療機器の洗浄後など菌残留が許容される場合の評価に有用であり、無菌性を求める消毒や滅菌の場合には不適切であると考えられる。

実際の評価方法としては洗浄後に ATP を複数回測定し、ネガティブコントロールとなる数値を決定した後、使用後の対象物の洗浄が終了した時点で ATP を測定し、ネガティブコントロール値より 2SD を超えた結果が得られた場合は再度洗浄をやり直す、といった方法が有効であろう。従って、ATP 測定は目的とする対象物がどのような工程を経てきたものかを確認し、背景を考慮した判定方法を確立する必要があると考えられた。また、その際には同じ測定器および試薬を継続して使用することが、誤判定を回避できる方法となる。

利益相反について：ATP の測定にあたっては、キッコーマンバイオケミファ株式会社から試薬と測定器、スリーエムヘルスケア株式会社からは試薬の提供を受けた。

文 献

- 1) 渡部博一, 関川浩司: ATP・AMP ふき取り検査を用いた消化器内視鏡の再処理工程管理に関する検討. 感染制御 2010; 6(3): 237-44.
- 2) Fushimi R, Takashina M, Yoshikawa H, Kobayashi H, Okubi T, Nakata S, et al.: Comparison of adenosine triphosphate, microbiological load, and residual protein as indicators for assessing the cleanliness of flexible gastrointestinal endoscopes. Am J Infect Control 2012; 41: 161-4.
- 3) 白根智子, 稲垣典子, 今井さゆり, 勝野綾子, 山本久代, 山森美也子, 他: ATP ふき取り検査を用いた給食管理実習における汚染度調査. 医と生物学 2011; 155(10): 648-56.
- 4) 石橋佳世子, 尾山容子, 縫田和宏, 梅下浩司, 伏見了, 宮下義弘, 他: アデノシン三リン酸(ATP)を指標とした上部消化管内視鏡表面汚染の把握と洗浄効果の判定. 日手術医学会誌 2011; 32: 165-7.
- 5) 久田友治, 太田光紀, 垣花シゲ: アデノシン三リン酸測定を用いた手術時手洗い評価の臨床的意義. 環境感染誌 2011; 26: 83-6.
- 6) 吉本和仁, 花村祥太郎, 山村詠一, 先山あゆみ, 阿曾沼邦央, 猪 聡志, 他: 内視鏡の器械と技術 アルカリイオン水の送水による内視鏡レンズ洗浄の有用性. Prog Dig Endosc 2011; 78: 34-6.
- 7) 岡山晴香, 久田友治, 具志堅興治, 宮城孝徳, 謝名堂昌人: アデノシン三リン酸(ATP)測定を用いたグロー

- ブジュース法の開発. 日手術医学会誌 2011; 32: 60-1.
- 8) 羽毛田靖: ATP 法による細菌数測定装置の基礎と応用. 防菌防黴 1997; 25: 457-66.
- 9) 間潤 創, 木川りか, 佐野千絵: 文化財公開施設等における ATP 拭き取り検査の活用について. 保存科学 2009; 49: 1-11.
- 10) Alfa MJ, Fatima I, Olson N: The adenosine triphosphate test is a rapid and reliable audit tool to assess manual cleaning adequacy of flexible endoscope channels. Am J Infect Control 2013; 41: 249-53.
- 11) Alfa MJ, Fatima I, Olson N: Validation of adenosine triphosphate to audit manual cleaning of flexible endoscope channels. Am J Infect Control 2013; 41: 245-8.
- 〔連絡先: 〒989-6183 宮城県大崎市古川千手寺 2-3-10
大崎市民病院感染管理部 大石貴幸
E-mail: ict-och@h-osaki.jp〕

Correlation Between Instrument Reagent Adenosine Triphosphate and Tolerance Settings and Appropriate Use in The Medical Field

Takayuki OHISHI¹⁾, Satoshi SHINOMIYA²⁾, Ryo FUSHIMI³⁾ and Takashi OKUBO³⁾

¹⁾*Department of Infection Control and Prevention, Osaki Citizen Hospital,*

²⁾*Department of Infection Control and Prevention, Mino City Hospital,*

³⁾*Tokyo Healthcare University Postgraduate School*

Abstract

Recently, adenosine triphosphate (ATP) has been developed as an index for cleanliness evaluation. In Japan, Kikkoman's Lumitester® PD-20 (PD-20) with the reagent LuciPac® Pen (LPP) and 3M's CleanTrace™ UNG3 (UNG3) with the reagents Clean Trace™ UXL (UXL) or Clean Trace™ AQT (AQT) are frequently used. However, correlation of the test results between these devices and reagents as well as permissible values are not clear. This study clarified the correlation and measurement limits with standardized ATP solutions and major bacterial suspensions measured using the following ATP devices and reagents: PD-20 with LPP (A-test), UNG3 with UXL (B-test), and UNG3 with AQT (C-test). Furthermore, cleanliness evaluation in medical field as an index of ATP and tolerance settings for repeat processing (cleaning, disinfection or sterilization) were assessed. Distilled water (control), standardized ATP solution, and four types of strain suspensions were measured 10 times with 10 μ L of each reagent. All measured values were logarithmically converted. Distilled water had the following values: A-test 0.70 RLU, B-test 1.14 RLU, C-test 1.29 RLU. In all reagents, standardized ATP solution was within the range measurement limit of 10^{-16} ~ 10^{-17} mol/assay. The quantitative relationship for each reagent was positively correlated within the measurement range of the standardized ATP solution. The measured values of the standardized ATP and standardized strain suspensions increased in the order A-test, B-test and C-test. The measured values showed a high correlation with a coefficient of greater than 0.98 for any method and the slope of the regression line was close to unity. The measurement limits of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa* were estimated at 10^2 ~ 10^3 CFU/assay by all reagents, and for *Candida albicans* was 2.0 CFU/assay. The measured values were not absolute; comparison of the measured values is a problem in any method. Therefore, further evaluation with the same instruments and reagents should be continued. In addition, despite the considerably high sensitivity, specificity was thought to be low. Therefore, post washing that allows for some bacterial residue would be an ideal use for an index of ATP cleanliness in the medical field, as opposed to testing sterilized or disinfected medical devices. Tolerance values must be set for each method of cleaning by identifying the average ATP values.

Key words : adenosine tri-phosphate, reagent comparison, correlation, tolerance value