# Feature Article

特集論文

# 1細胞レベルのATPを高感度に検出する 微生物迅速検査装置 Rapica

Introduction of "Rapica" for Sensitive and Rapid Detection of ATP at the Level of One Microbial Cell

# 小牧 直人

**KOMAKI** Naoto

# 中山 秀喜

NAKAYAMA Hideki

## 深尾 嘉希

FUKAO Yoshiki

### 中井 陽子

NAKAI Yoko

微生物は目視で確認できないため、対象の微生物に応じた培地や温度条件で培養を行い、目視で観察できるサイズまでコロニー形成をさせることで検出することができる。しかし、微生物のコロニー形成までには微生物種にもよるが数日~数週間の時間を要する。医薬品の製造工程で使用される製薬用水では4~7日間、無菌医薬品の出荷試験に使われる無菌試験では14日間もの培養を行う必要がある。しかし、近年の技術発展により微生物の成分や代謝物を直接測定することで直接(非培養)もしくは短時間の培養で微生物検出ができる装置が開発されており、HORIBAでは、微生物が持つ極めて微量のATPを短時間で検出できる微生物迅速検査装置Rapicaを開発した。その特長及び測定事例について紹介する。

\*ATP: Adenosine triphosphate(アデノシン三リン酸)

#### キーワード

微生物迅速法, ATP法

Since microorganisms are invisible to the naked eye, and they can be visually confirmed when forming colonies by incubating under the appropriate culture media and temperature. Cultivation of microorganisms takes time: 4 to 7 days for pharmaceutical water used in pharmaceuticals, and 14 days for sterility tests used in release testing for sterile pharmaceutical products. HORIBA has developed Rapica, a rapid microbiological test system that can detect extremely small amounts of ATP possessed by microorganisms in a short time without culturing. We introduce its features and applications in this article.

#### key words

RMM: Rapid microbiological method, ATP method

#### はじめに

微生物は増殖する過程で腐食や変質、見た目の悪化など、製品の品質に影響を与える要因となるため、様々な業界において、微生物の制御を目的とした殺菌や滅菌、抗菌などの処理や微生物検査が行われている。微生物検査は一般的に培地において微生物を増やす「培養法」が使われている。しかし、培養法には「数日単位の培養時間が必要」、「培養できない微生物は検出できない」、「手作業が多い」など、いくつかの課題もある。特に培養時間がかかることで、「汚染検知の遅れ」、「出荷検査結果待ちによる在庫管理費の上昇」、「環境中の微生物試験結果待ちによる生産効率の低下」、「開発期間の長期化」など、いくつかの点で品質やコストに直結する課題となる。

これに対し、微生物を増殖させずに検出する方法や、従来よりも短時間の培養で早期に検出する方法が研究開発されており、これらはまとめて微生物迅速法(RMM: Rapid



Figure 1 Appearance of Rapica, the rapid microbial detection system

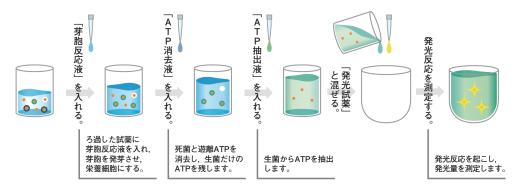


Figure 2 Overview of the measurement principle

microbiological methods)と呼ばれている。飲料や食品などの業界ではすでに積極的に微生物迅速法を活用した検査が行われており、近年、製薬業界でもいくつかの手法が採用されてきた。また、遺伝子治療や細胞治療のような再生医療の領域では、製品の特性上、患者へ投与するまでの時間が短いため、検査結果を待たず出荷されており、短時間での微生物検査が求められている。

今回開発した微生物迅速検査装置Rapica (Figure 1)は、1 細胞が持つATPを検出できる「高感度ATP法」を用いており、通常約2.5時間で微生物の検出が可能である。さらに試薬分注操作の自動化により、測定者からの微生物汚染リスクの低減、24検体の同時多検体処理、分注作業の技能差を無くすことによる高精度な測定を実現している。

#### 高感度ATP法の測定原理

ATPとは、アデノシン三リン酸(Adenosine triphosphate) の略称であり、生物におけるエネルギーの使用や貯蔵を行うために使用される。ATPは、すべての生物が利用しており、生物由来の汚染指標として食品業界などで多く使われている。

ATPの発光反応は以下の通りである。

D-ルシフェリン+酸素+ATP

↓ ルシフェラーゼ, Mg<sup>2+</sup>

オキシルシフェリン+AMP+ピロリン酸+発光

\*AMP: Adenosine monophosphate(アデニル酸)

発光基質であるD-ルシフェリン, ATP, 酸素存在下で, 酵素であるルシフェラーゼの触媒作用により, オキシルシフェリンが生成され, その際に発光する。光電子増倍管にて測定した発光量からATP量に換算される。ATP量の単位はamol(10<sup>18</sup> mol)である。

Rapicaの測定手順の概要をFigure 2に示す。

Rapicaの測定で使用する試薬は以下の5種類である。

- [1] 前処理
- [2] ATP抽出液
- [3] 発光試薬
- [4] 校正用ZERO液
- [5] 校正用ATP標準液(1000 amol)

「前処理液」は、①芽胞の発芽、②遊離ATPの消去という2種類の機能がある。ATP消去機能により、死菌由来のATPを消去し、生菌のみがサンプル中に残る。

次に、「ATP抽出液」によって、生菌の細胞膜、細胞壁を破壊し、ATPを抽出する。

最後に、「発光試薬」を投入することで、ATPは発光反応を起こし、その発光量を測定する。

「ZERO液」と「ATP標準液」は、測定毎のキャリブレーションに用いられ、発光量からATP量への換算を行う。

#### 測定手順

Rapicaの測定手順は、サンプルをろ過し、測定機に入れるという非常にシンプルな操作である。測定時の試薬分注や発光測定は装置内ですべて自動的に実施される。各工程の詳細を以下に記載する。(Figure 3)



Figure 3 Measurement procedure

#### ろ過工程

100 mLまでサンプルを入れることができる「ろ過容器」と 0.4 umのフィルタが付いた「サンプルカートリッジ」を組み 立てる。(**Figure 4**) そこにサンプルを入れ, ろ過機にセッ トし, 0.1 mLまで自動吸引ろ過を行う。サンプルカートリッジのフィルタ上に微生物が捕集される。ろ過機では同時に12検体処理が可能である。

#### 測定

ろ過終了後、サンプルカートリッジをろ過容器から取り外し、測定装置にセットする。また、分注に使用する「ピペットチップ」、発光測定時に使用する「発光チューブ」、測定に使用する5種類の「試薬」を測定装置にセットし、専用ソフトが搭載されたノートパソコンで測定を開始する。

測定結果は約2.5時間後に24検体同時に表示され,結果は PDF形式で保存される。

測定装置には、自動分注機及びターンテーブルが搭載されており、測定操作は自動化されている。(Figure 5)



Figure 4 Installing the Sample Cartridge and Filtration Container

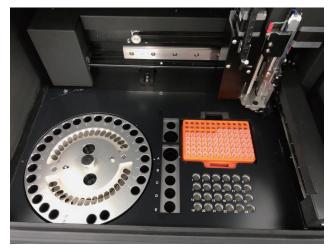


Figure 5 The inside of the system

#### 装置性能

#### ATP標準液を用いた装置性能評価

ATP標準液を用いて直線性の確認を行った。(Figure 6)自動分注機にて、ATP標準液を希釈し、複数の濃度サンプル (0, 1, 2, 4, 10, 20 amol)を調整し、サンプルサイズn=3で測定を行った。傾きは1.01、相関係数 $(R^2)$ は0.9988と高い直線性が得られた。

また、0 amolの測定結果から算出した検出限界 $(3.3\sigma)$ は 0.6 amolとなった。

#### 薬局方収載標準菌株における1 cfu当たりのATP量

市販されている標準菌株を用いて、培養法との比較を行い、 1 cfu当たりのATP量を算出した。評価方法は、以下の通りである。

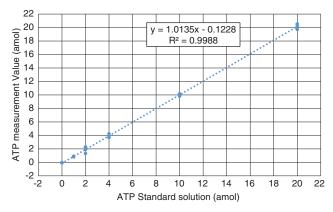
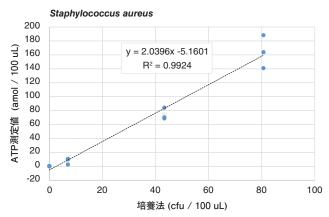


Figure 6 Linearity with ATP standard solution



使用菌株	培養条件	ATP量 (amol/cfu)
Staphylococcus aureus (NBRC 13276)	SCD培地/30℃/5日間	2.0
Bacillus subtilis (NBRC 3134)	SCD培地/30℃/5日間	2.3
Pseudomonas aeruginosa (NBRC 13275)	SCD培地/30℃/5日間	0.5
Pseudomonas fluorescens (NBRC 15842)	R2A培地/30℃/5日間	1.2
Candida albicans (NBRC 1594)	SCD培地/30℃/5日間	84

Figure 7 Measurement of ATP amount in standard strains

注射用蒸留水に48時間静置して飢餓処理を行った標準菌株を各濃度に段階希釈し、ATP測定及び寒天培地での培養を行った。培養結果は、サンプルサイズn=3の平均値をグラフにプロットした。近似曲線の傾きが1 cfu当たりのATP量となる。Figure 7には、Staphylococcus aureusの測定事例と他4菌種の1 cfu当たりのATP量を算出した結果を記載した。

Staphylococcus aureusやBacillus subtilis, Pseudomonas fluorescensなどの細菌が持つATP量は1 amol前後, 酵母であるCandida albicansのATP量は84 amolであった。細菌よりも細胞が大きい酵母の方が多くのATPを保有している。その他の菌については参考文献<sup>[1]</sup>に記載があり, グラム陰性菌で平均1.48 amol, グラム陽性菌で平均5.54 amolである。

#### 測定事例

Rapicaの測定手順には、ろ過工程が入っているため、粒子や固形物が含まれない液体が測定対象となる。しかし、サンプルによっては微生物の捕集方法や前処理に工夫をすることによって測定できる可能性がある。例えば、付着菌は、スワブでふき取ったのち、無菌水に微生物を遊離させることで測定ができる。また、空中浮遊菌は、無菌水に捕集可能なエアーサンプラが市販されており、それを用いることでRapicaでの測定が可能となる。

ここでは、純水設備の測定事例、市販点眼剤の測定事例、 また、培養等で使用される生理食塩水や各種緩衝液を対象 とした測定事例を紹介する。

#### 純水設備の測定事例

純水ラインで測定を行った事例を紹介する。(Figure 8)この純水ラインでは、規定以上の微生物が検出された場合、薬液を用いた洗浄を行っている。薬液での洗浄前後において、①UVランプ後段、②最終フィルタ後段、③純水タンクの戻りライン、④試薬調整タンクの出口にてサンプリングを行い、培養法とRapicaでの測定を行った。培養法では、貧栄養状態で微生物が増殖しやすいR2A (Reasoner's Agar No.2)培地を用いて30℃にて5日間の培養を行った。

一定の汚染が存在するサンプリングポイント①, ②, ④では, 洗浄後のATP値及び培養法の結果は, 両者ともに洗浄前と比較して減少しており, 洗浄による汚染低減の効果を捉えることができた。

また, 汚染レベルが低い, サンプリングポイント③では, 洗浄前後でも両者はいずれもゼロ付近を示しており, 傾向 が一致していた。



		ATP法	培養法
測定箇所	洗浄	amol/ml	cfu/ml
①UVランプ後	前	75.6	47.7
	後	5.2	0.7
②最終フィルタ後	前	15.2	16.0
	後	2.1	7.3
③純水タンク戻り	前	0.5	0.0
	後	0.5	0.0
④調整タンク出口	前	2.5	1.7
	後	0.2	0.3
③純水タンク戻り	後前後前	15.2 2.1 0.5 0.5 2.5	16.0 7.3 0.0 0.0 1.7

Figure 8 Sampling positions and measurement results of pure water generation facility

培養法では5日間必要な測定時間がRapicaでは即日で結果がわかるため、洗浄効果の確認に有用だと言える事例である。

#### 点眼剤の測定事例

点眼剤は、何度も開閉することによって微生物が混入することを想定しており、微生物の増殖による製品の劣化を防ぐために防腐剤が添加されている。防腐剤として使われることが多い塩化ベンザルコニウムは、ATP測定で使用するルシフェラーゼの酵素活性に影響を与えることがわかっている。そこで、日本薬局方第18改正 4.06無菌試験法に記載されている抗菌活性を除去する方法に倣い、注射用水50mLで3回洗浄を行い、その後菌液(10,40 cfu/mL)を添加し、測定を行った。使用した菌株はBacillus subtillis (枯草菌・芽胞)である。

Figure 9の通り、点眼剤の有無によるBacillus subtillisの 測定結果に差はなく、同程度のばらつきの範囲内に収まっ た。点眼剤の有無によるATP測定への差が見られなかった

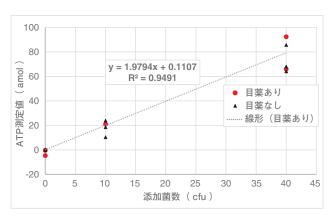


Figure 9 Measurement results of eye drops

Table 1 Measurement results of samples used for cell culture

サンプル名	洗浄前		洗浄後
	20 mLのろ過時間 (m:s)	ATP値 (amol/0.1 mL)	ATP値 (amol/0.1 mL)
生理食塩液	5:38	-0.3	_
0.1Mリン酸緩衝液	5:17	-0.3	_
リン酸緩衝生理食塩水 (PBS)	5:00	-0.3	_
ペプトン緩衝液	12:58	10.2	1.3
ペプトン緩衝液 (中和剤含有)	7:53	191.4	0.7

ことから、点眼剤によるATP測定への影響は認められな かった。このように適切な前処理をすることで測定に影響 する成分を除去し、ATP測定を行える可能性を示す事例で ある。

#### 培養で使用する標準的なサンプルの測定

バイオ医薬品では目的物質を産生する細胞を増殖させる培 養工程がある。培養時には様々な液体が使用されており、 よく使用されるものとして, 生理食塩水, リン酸緩衝液, ペプトン緩衝液などがあり、それらのろ過時間の確認及び ATP測定を行った。(Table 1)

ペプトン緩衝液を除くサンプルのろ過時間は,5分程度で あった。注射用水20 mLのろ過時間は3-5分であることか ら, これらのサンプルは注射用水とろ過時間に大きな差が 見られないため、サンプル由来の成分によるろ過影響は少 ないと考えられる。一方、ペプトン緩衝液2種は、注射用水 よりろ過時間が長く、サンプル由来の成分によるろ過影響 を受けていると考えられる。

ATP測定結果では、ペプトン緩衝液2種でATPの含有が認 められた。これらについて、注射用水20 mLで2回洗浄を 行ったところ1.3 amol, 0.7 amolと検出限界付近までATP 値の低減ができた。

このように生物由来成分を含むペプトン緩衝液のようなサ ンプルにおいても適切な前処理により, 測定できる可能性 がある。

#### おわりに

今回紹介した微生物迅速検査装置Rapicaは、微生物汚染の 予防保全や生産再開の早期判断などの観点から, より高度 な品質管理に貢献するとともに, 生産性の向上にも役立て ていただける装置である。今後、多くのアプリケーション や各業種での測定事例を積み、多くのお客様に使用いただ けるよう努めていく。

\*編集局注:本内容は特段の記載がない限り、本誌発行年 時点での自社調査に基づいて記載しています。

#### 参考文献

[1] N. Hattori et al./Analytical Biochemistry 319(2003)287-295



**KOMAKI Naoto** 株式会社堀場アドバンスドテクノ Bio Industry 事業部 Rapica チーム Bio Industry Business Dept. Rapica Team HORIBA, Advanced Techno, Co., Ltd.



NAKAYAMA Hideki 株式会社堀場アドバンスドテクノ

Bio Industry 事業部 Rapica チーム 博士 Bio Industry Business Dept. Rapica Team HORIBA, Advanced Techno, Co., Ltd.



FUKAO Yoshiki 株式会社堀場アドバンスドテクノ Bio Industry 事業部 Rapica チーム Bio Industry Business Dept. Rapica Team HORIBA, Advanced Techno, Co., Ltd.



中井 陽子 **NAKAI** Yoko

中山 秀喜

深尾 嘉希

株式会社堀場アドバンスドテクノ Bio Industry 事業部 Rapica チーム マネジャー Bio Industry Business Dept. Rapica Team Manager HORIBA, Advanced Techno, Co., Ltd.