

高洗浄度が求められる領域での ATP 検査

－ATP 試薬のバックグラウンドとばらつきの影響－

【はじめに】

弊社が販売する衛生検査商品である Hygiena 社(2001 年設立)製 ATP 検査キットは、高洗浄度域における洗浄度の数値化という明確なコンセプトに基づいた装置仕様と試薬から構成される。とりわけ「低バックグラウンド」と「安定性」に対して信頼が厚く、本分野では後発商品であるものの、短期間の間に多くのユーザーに認められ、世界のトップシェアを占めるに至った。本レポートでは、実際のデータからその装置と試薬の優位性をご紹介します。

【背景】

国内での『ATP ふき取り検査』は、2004 年改訂の食品衛生検査指針(微生物編)で、洗浄度確認手法として掲載されてから、食品を扱う多くの施設や設備で使用されるようになった。また、近年価格もお手頃になったことで、病院・高齢者施設をはじめ特定建築物や一般ビルメンテナンス等の清掃効果の確認用としても導入が進んでいる。この ATP 検査の拡がりに伴い、これまで問題とされてこなかった数値精度や信頼性を重視する声も増えてきている。

ATP とはすべての生物のエネルギー源として存在する化学物質で、細菌や動植物細胞などの汚染があれば、そこには必ず ATP が存在する。一般的に ATP 検査は生物由来の汚染量に対して強い相関性があるため、洗浄度のよい指標となり、その程度を数値化できる。ただ、洗浄・清掃効果の確認を目的とする ATP 検査キットは、高洗浄度域で使用されるケースが多いため、この領域での結果の信頼性が最も強く求められる。

市販されている多くの ATP 検査キットでは、バックグラウンドと呼ばれる汚染がなくても表示される数値があり、この数値の大きさやばらつきが、高洗浄度域での数値の信頼性に影響を及ぼすことが問題となっている。(図 1)

今回は、このバックグラウンドとばらつきがどの程度測定結果に影響を与えるかを検証し、Hygiena 社商品の優位性をご紹介します。

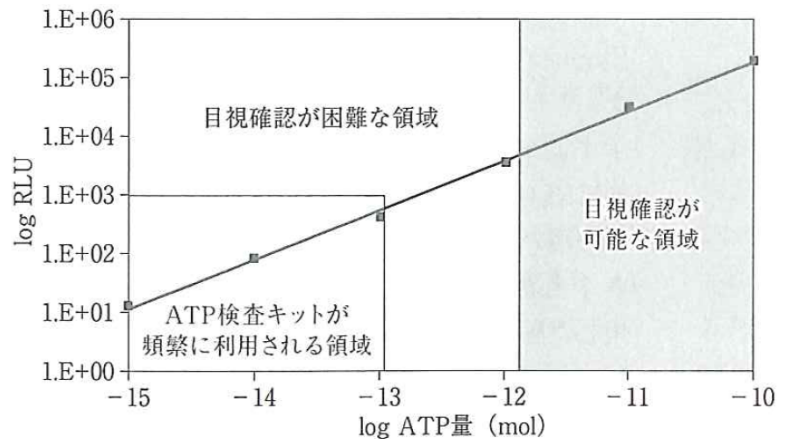


図 1 ATP検査キットの検出領域の分類

【検査方法】

① ATP 検査における性能評価

本実験の目的は、バックグラウンドの影響や測定値(RLU)の安定性を評価することで、洗浄度検査の信頼性を検証することにある。

通常、検査値のばらつきには、①装置要因によるばらつき、②試薬要因によるばらつき、③環境要因によるばらつきなど、いくつかの要因が複合的に発生する。特に、高洗浄度が要求される検査領域では、RLU 数値が低く、相対的にバックグラウンドの影響が大きくなるため、汚染値かバックグラウンドの判断は難しい。結果、この領域での検査値の信頼性は低下してしまう。このことから、ATP 検査の適用性を評価する一つの指標として、まずバックグラウンドの安定性に関して検証を行った。

さらに日常的な管理をするに当たっては、工程内の洗浄度の高いエリアから低いエリアまで、様々な検査環境が想定できる。どのような環境条件下でも同一汚染レベルであれば再現性良く検査値が示されることが求められる。実験では、バックグラウンドの安定性に加え、複数の汚染レベルを想定し、いくつかの ATP 濃度に調整した試料で RLU 数値の安定性評価も行った。

バックグラウンドとばらつきの検証及び検査値への影響

バックグラウンドやばらつきに対する支配的な要因を検証するため、Hygiena 社と比較のための A 社製品を用いて以下の 4 項目について検証した。

- ① 装置要因によるデジタルノイズとダークノイズの計測
- ② ATP 量と RLU(相対発光量単位)値の相関評価 (検出限界の判定)
- ③ 検出限界近傍における RLU 値の評価 (バックグラウンドの影響)
- ④ RLU 値の連続安定性の評価

①. 装置要因によるデジタルノイズとダークノイズの計測

装置起因によるデジタルノイズ測定に関しては、検査試薬内に活性液や粉末などの検査物質が含まれていない検査キットで検証した。一方、ダークノイズに関しては検査試薬の綿球部を含めて一切汚染をさせず、そのまま試薬で活性させた状態で評価を行った。図 2(a)に装置要因によるデジタルノイズ、図 2(b)にダークノイズの評価結果を示す。

図 2(a)では両機種とも RLU 値はゼロ値を示し Hygiena 社と A 社の製品間で大きな違いは見られない。

一方、ダークノイズに関しては図 2(b)に示すように、Hygiena 社製品では装置ノイズと同様に RLU 値はゼロの値を示したが、A 社の装置で A 社の試薬を用いたときは汚染がない状態でも RLU 値は大きく変動した。(A 社の装置で Hygiena 社の試薬を用いたときのダークノイズ試験では、RLU 値はほぼゼロ値を示した) このことから、図 2(b)で観測されたばらつきは、検査試薬要因であることが推測される。

今回用いた A 社製試薬は、検査を行う場合にふき取り綿球部を水道水や滅菌水で事前に湿らす必要があるため、実際の運用を想定した試験では、さらにベースが上昇する傾向にあった。(Hygiena 社の検査キットの綿球部は既に滅菌水で湿らされており、事前に濡らす必要はなく、今回のダークノイズ試験でもゼロが確認されている)

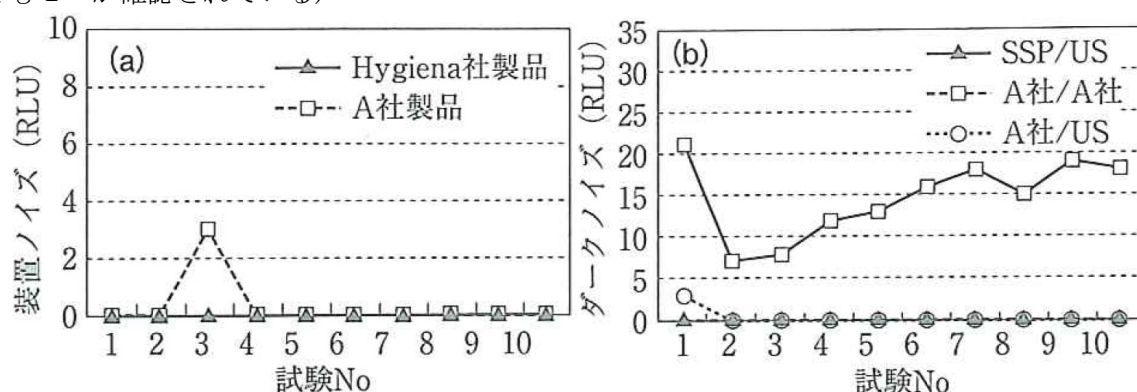


図2 装置要因によるデジタルノイズ (a) とダークノイズ (b)

SSP/US : Hygiena社装置 + 同社試薬, A社/A社 : A社装置 + 同社試薬, A社/US : A社装置 + Hygiena社試薬.

②. ATP 量と RLU 値の相関評価(検出限界の判定)

次に、ATP 量と RLU 値の相関に関する評価結果を図 3 に示す。本試験ではすべての測定条件下の RLU 値と ATP 量が両対数で比例関係にあり、両製品とも検出限界値が 10^{-15}mol 程度と同定できた。さらに、同一濃度では A 社機器の RLU 値が高めに表示される傾向にあった。A 社機器の RLU 値は検査試薬に依存せず高く表示されることから、検査器の設定によるものと思われる。

③. 検出限界近傍における RLU 値の評価(バックグラウンドの影響)

次に、検出下限濃度付近でのバックグラウンドが計測値へ与える影響を明確にするため、低濃度領域での検査を行った。その結果を図 4 に示す。A 社の検査器では RLU 値が上限 30 程度までの変動が見られた。この変動値を図 3 の検量線に載せて比較したところ、検出限界以下で見られた変動値が 10^{-13}mol 付近まで達した。

A 社の機器は相対的に高い RLU 値を表示するものの、低濃度領域ではバックグラウンドの影響を除外することはできず、この変動を考慮すれば、結果的に検出限界濃度は低く見積る必要があることが分かる。そのため、A 社の機器を清浄度検査で適用する際は、バックグラウンドと変動値、綿球部を湿らす水の影響等を十分に考慮して運用することが求められる。

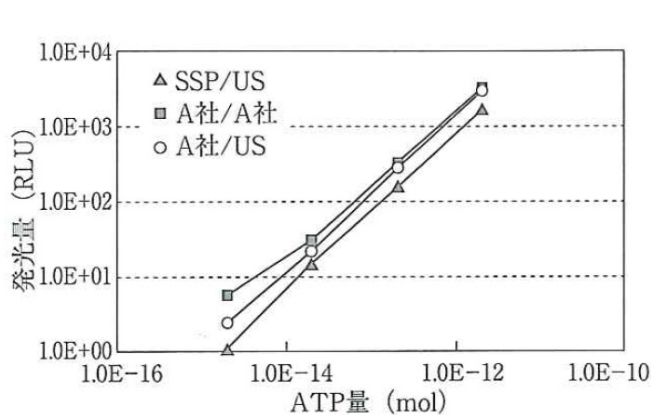


図3 ATP量とRLU発光量の相関評価（検出限界の判定）
標準溶液を所定の濃度に希釈後、100 μ Lマイクロピペットで秤量してATP量を調整。

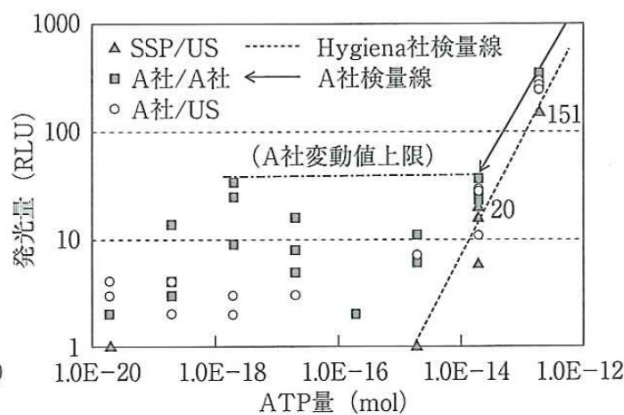


図4 検出限界近傍におけるRLU相対発光量
(バックグラウンドの影響)

④. RLU 値の連続安定性評価

さらに、RLU 相対発光量の連続安定性の評価結果を図5に示す。

本試験では 10^{-13} mol の同一条件下で連続的に検査を行った。ここではA社の機器と検査試薬の組み合わせのばらつきが1 σ で68%と最も大きく、ばらつきも不規則な挙動を示した。このばらつきの要因としては、検査試薬が粉末のため再現性良く混合することが困難であることや、検査キットの構造により検査部以外に発光液が滞留しやすいことなどが考えられる。一方、Hygiena社の検査試薬を使用した場合、検査器の種類に依存せず1 σ のばらつきが19%で、A社と比較して安定した数値を示している。このことから、RLU 値のばらつきの違いは検査試薬に起因するものと思われる。

さらに、Hygiena社とA社の機器と試薬を用いたATP濃度別RLU値の安定性評価データを図6に示す。その結果、Hygiena社製の場合、すべての濃度で安定した傾向を示すが、A社の機器と検査試薬の組み合わせでは、ばらつきが大きい結果となった。

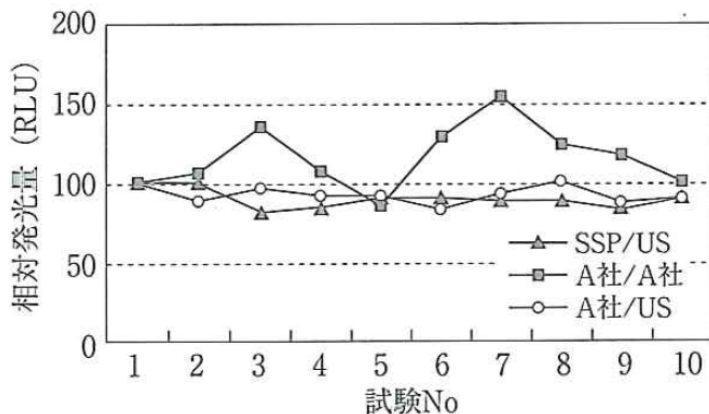


図5 相対発光量の連続安定性

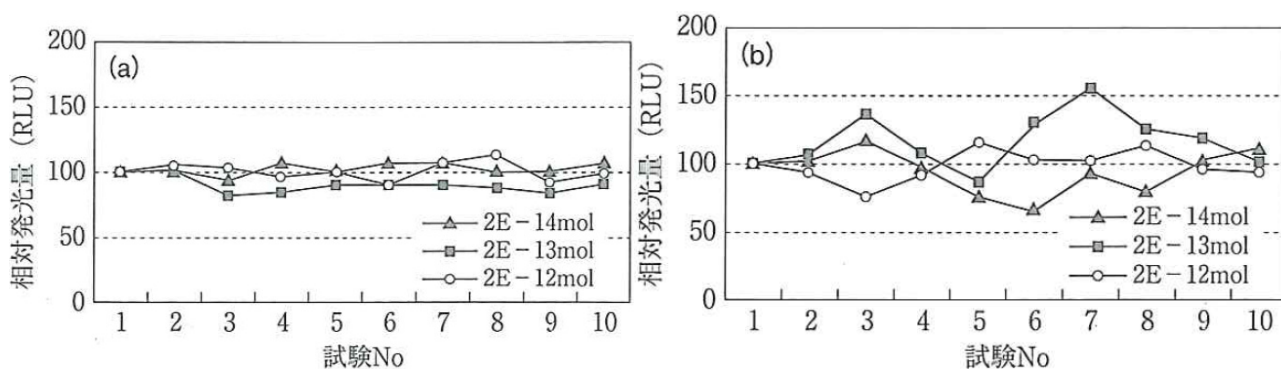


図6 RLU連続安定性におけるATP量依存性
(a)はHygiena社, (b)はA社の評価結果。

【結果・考察】

今回の評価結果から A 社の製品の RLU 値は高潔浄域でバックグラウンドの影響を受けやすく、この領域で管理を行う場合は、ふき取り面積を増やして多くの汚染をサンプリングするなどの方策が求められる。また、同一検査ポイントを日常的に管理する場合は RLU 値のばらつきの大きさを考慮して、余裕をもった合格基準を設定しなければ、変動により基準値を超えてしまう可能性が高くなる。

一方、Hygiena 社製の場合、バックグラウンドの影響も少なく、連続安定性も良好なことから、高潔浄域でもノイズや変動の影響を考慮せずに、安定した検査を行えることが分かった。また、汚染量に対しての安定した結果は、日常的な管理においてもシビアな基準値設定を可能とし、より高いレベルの衛生管理を実現することができる。

【まとめ】

ATP 検査キットの導入によって、これまで見えなかった汚染が数値化されると、洗浄剤の選定や洗浄手法の適正化につながり、従業員も汚染数値をより低く抑えようとする意識の向上が見られるようになる。また、取引先や顧客に対しては自社の衛生管理に対する姿勢を強くアピールできるなど、ATP キットは単なる汚染チェッカーとしてだけでなく、総合的な衛生管理を後押しする役割も期待できる。

これまで食品を扱う現場で広がった ATP 検査は、化粧品業界・医薬品業界・病院施設などの環境検査や原料水のスクリーニングツールとしても期待されており、それには今回問題としたバックグラウンドの解決だけでなく、より検出限界濃度の低い機器や高感度な試薬が必要とされている。

Hygiena 社では、このようなニーズに対してもお応えできるラインナップに高感度卓上タイプ Pi-102(検出限界値： 10^{-18} mol)の機器に加え、標準試薬の約 1/5 の汚染まで検出可能で pH の影響を受けにくい高感度試薬 Supersnap を取り揃えて、あらゆる場面の ATP 検査の普及に貢献している。