

細菌のATP検査によるモニタリングシステムの評価

浅野 梨沙・杉山 章

Evaluation of ATP Bioluminescence Rapid Hygiene Monitoring System on the Bacteriological Examination

Risa ASANO and Akira SUGIYAMA

Abstract

Bacteriological examination and ATP Bioluminescence Rapid Hygiene Monitoring were performed at the same time using a lactobacillus as one of the model bacteria.

This ATP test data was collected as per the Biotrace System protocols to obtain results in RLU (relative light units).

While the range of RLU was above 151 points, the results of measurement between RLU and number of lactobacillus suggests an adequate correlation. But, when it was under 150 points, no correlation was found, and 150 points was considered the bottom limit of the effective range of this test.

はじめに

近年、食品衛生検査のうち一般細菌の定量的試験の代替として、ATP(アデノシン三リン酸)量を測定することによる方法が用いられる場合がある。ATPは全ての動物、植物、微生物などの生命体中に存在する化学物質で、このATPによるルシフェリンの発光量を測定することで生命体の量(本実験では細菌量)を知ることができる¹⁾。この原理を応用して検査対象の表面や内部に存在する細菌量を測定することができる。測定値は光量の単位であるRLU(relative light units)として求められ、この数値が高いほど生命体の量すなわち細菌数が多いことになる。しかし、細菌数とRLUの関係が比例関係であることは確認されているものの、測定有効範囲、数値の変動幅や精度などについての基本的な知見が乏しいまま使用している現状である。

そこで、細菌数とRLUを同時に検査することにより、細菌数に対応するRLU値の関係を詳細に明らかにするための実験を試みた。

方 法

ATP量の測定に用いた機器はUni-Lite Xcel(エアブラウン株式会社製)で、測定原理は次のようである。Uni-Lite XcelはATPによる発光量をカウントする計測器である。ATPはルシフェラーゼ及び酸素の存在下でルシフェリンを生物発光し、その光の量はATPの量に比例しているので、光の量を計測することでATPの総量を測定できる。測定方法は次に示される手順で行った。

- 1) 専用の綿棒をケースから抜き取る.
- 2) 検体に綿棒をこすりつけてふき取る.
- 3) ふき取った綿棒を元のケースに戻し, 綿棒の先が試薬液中に完全に入るまで押し込む.
- 4) 綿棒を10秒間振って試薬が充分反応してから測定器にかけ, 表示されたRLU値を記録する.

まず, ATP量の測定をいくつか試みた. 綿棒で10種類の試料(①メラミン皿 ②アルミ皿 ③ステンレス皿 ④テーブルクロス ⑤実験台 ⑥窓ガラス ⑦雑巾を絞った手 ⑧手でこすった皿 ⑨ドアノブ ⑩木製まな板)を測定方法に従いふき取った. ふき取りにあたってはいずれの場合も綿棒を5cm幅で20往復動かした.

次に, 本実験で使用する細菌として, 病原性がないこと, 安定して容易に入手できること, 培養条件が簡易であることなどの条件を満たすものとして乳酸菌を選んだ. 菌株の準備は, 市販のヨーグルトをエーゼで取り, BCP加プレートカウントアガール寒天培地²⁾に塗布し, 72時間培養した. その後, この培地上にできた典型的な乳酸菌コロニー(コロニーの周囲が黄色の変化をしているもの)についてその1コロニーを採取し, 同様の培地を用いた混釈培養を行い純粋培養された乳酸菌を得た. 使用したBCP加プレートカウントアガール寒天培地は乳酸菌数測定用の培地であり, 組成は次の通りである.

酵母エキス	2.5g	
ペプトン	5.0g	
ブドウ糖	1.0g	
ポリソルベート80	1.0g	
L-システイン	0.1g	
ブロムクレゾールパープル	0.06g	
寒天	15.0g	
水	1000ml	(pH7.0±)

なお, 純粋培養により得られた乳酸菌をグラム染色した後顕鏡したところ, グラム陽性の長径2 μm , 短径1.5 μm の桿菌であり, 乳酸菌の特色に合致した³⁾.

RLU値に対応する細菌数を知るための実験では, RLUの測定と順次希釈法による細菌数検査を同時に行った.

予備実験としてコロニーごとの細菌数を検査したところ, $2.0 \times 10^5 \sim 5.0 \times 10^5$ の範囲の値が得られたことから, 同一条件で培養したコロニー間で細菌数のあまり大きな変動はないと考えられた. そこで同一平板培地上のコロニーを2つ選び, そのうちの1つのコロニーをRLU専用綿棒で直接採取しRLUを測定した. もう一方のコロニーはエーゼで採取し滅菌水10mlに分散し原液とし, 順次希釈法によりBCP加プレートカウントアガール寒天培地で混釈培養し, 細菌数検査をした. 各希釈段階の分注量は1mlであり, 培養時間は72時間であった. さらに細菌数が少ない場合のRLU値については, 原液や希釈液について各々0.05mlを専用綿棒に吸収させ, RLUを測定した. これらの試料についても細菌検査を同時に行い, 対応する細菌数を明らかにした.

以上の実験から得られた細菌数とRLU値について, 綿棒にふき取られたり吸収されたと考えられる細菌数を推定し, それに対応するRLU値を整理した.

結果及び考察

食器、手、生活用品などについてUni-Lite Xcelを使用したATP量の測定結果を示すと表1のようであった。本機の使用説明書によれば、RLU値150以下は「問題なし」、151～299は「要注意」、300以上は「汚染されている」との判定であるので、これに従うと皿、テーブルクロス、実験台、窓ガラス、ドアノブはRLU150以下で「問題なし」であった。木製まな板や手でこすった(汚れを付けた)皿は「要注意」に入る値で、雑巾を絞った後の手は「汚染されている」と判定された。一般に細菌は乾燥に弱く⁴⁾、一見汚れていると考えられるドアノブなどでも乾燥状態であれば付着している細菌類は少ないようである。今回の実験では皿、テーブルクロス、窓ガラスなどはいずれも乾燥状態にあり、細菌類は少なかったものと思われる。「要注意」と判定された木製まな板は細菌の繁殖しやすいものであり、木の組織中に水分があり、多孔質で細菌の生息場所も多いと思われる。手でこすった皿は当然手からの汚れが付着した結果このような値になったものである。雑巾を絞った後の手は大変大きな値であり、細菌の量が多いことが認められた。雑巾から付着した細菌に加え、水分の付いた手は指紋やしわから細菌が浮き出して細菌が多い状態になると考えられる。食品衛生上の注意事項としての手洗いの励行や健康のための手洗いが行われているが、水だけで簡単に済ませた場合はかえって細菌汚染を広げることになる。従って、石鹸などを使用し指先や爪の細菌をていねいに洗浄する手洗いが衛生的には有効な手洗いと言えよう⁵⁾。皿が何らかの方法(ここでは手でこする)で汚染された場合、RLU値は上昇して「要注意」の判定となっており、またその原因になったもの(ここでは手)は衛生上「問題あり」と判定されたことで、得られたRLU値による判定は一般的に納得できるものであり、通常の衛生検査に使用できるものと考えられた。

次に乳酸菌数とRLU値との関係を調べた結果は表2のようであった。17回の試験を細菌数が少ない順に示した。対応するRLUは菌数が少ない範囲では大きく変動しているが、細菌数が多

Table 1 Results RLU

Sample	RLU
① dish(melamine)	56
② dish(aluminium)	87
③ dish(stainless steel)	51
④ table cloth(vinyl resin)	89
⑤ table top	19
⑥ window glass	53
⑦ hand after mop washing	3868
⑧ dish after hand touch	276
⑨ door knob	72
⑩ cooking plate(wood)	200

Table 2 Results of Bacteriological examination and RLU

Sample	No of lactobacillus	RLU
1	44	29
2	55	70
3	95	52
4	155	48
5	1150	51
6	1150	22
7	1300	33
8	2650	34
9	8000	396
10	31000	3889
11	82000	4218
12	230000	4100
13	230000	10373
14	260000	11855
15	370000	8832
16	530000	14113
17	740000	14375

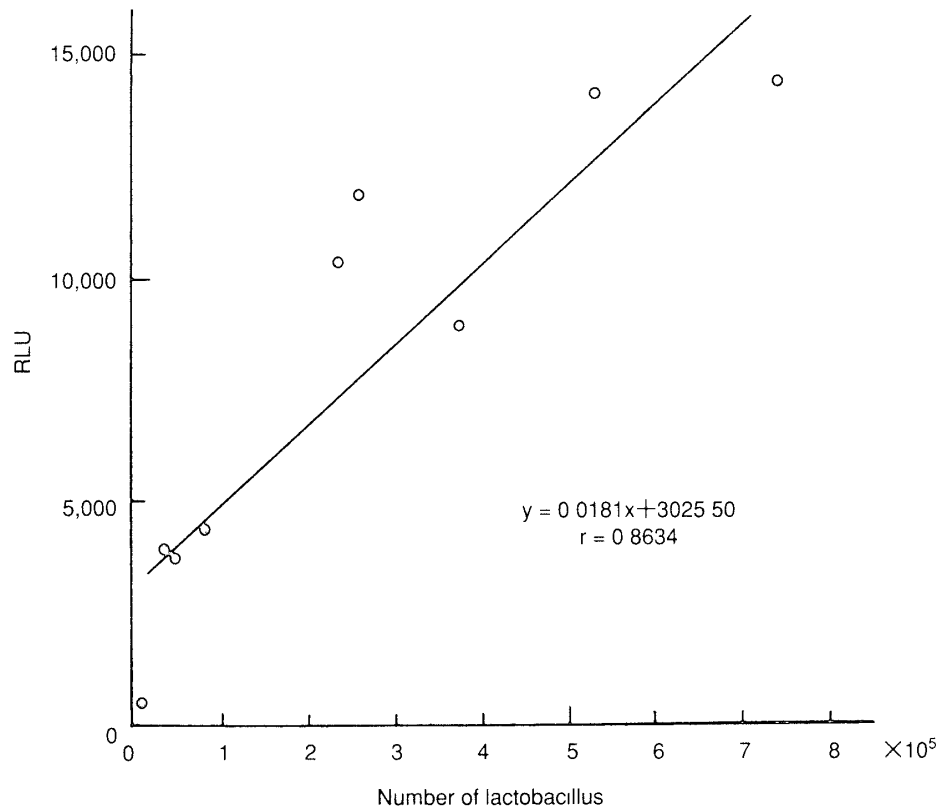


Fig.1 Relationship between number of lactobacillus and RLU point as it was been above 151point.

い範囲では細菌数とRLU値は正相関が伺える。そこでさらに、RLU値による判定基準で「問題なし」と「要注意」を区別する値150の上下で分けて散布図を示すと図1と2のようであった。図1はRLU151以上を示した範囲の乳酸菌数であり、図2はRLU150以下の場合である。図1からわかるように、RLU151以上の場合では回帰直線が $Y=0.0181X+3025.50$ と求められ、回帰係数は0.8634と高いことから細菌数との関係はかなり明確な正の相関が認められた。一方、RLU150以下では一定の関係は認められなかった。この範囲では、実際得られたRLU値が70以下であり判定としては「問題なし」に区分されている。これらのRLUに対応する細菌数は2650個以下であった。

以上のことからATPによる細菌数モニタリングの有効性や精度を検討すると、RLU値150以下の「問題なし」と判定される範囲では細菌数はおよそ3000個以下であり、細菌数とRLUの間には特別な相関関係は見られない。従ってこの範囲は本測定法の精度としても、測定数値としても下限と考えられる。RLU値151~299の「要注意」と判定される範囲では今回の実験では実際の数値が得られていないが、図1と2に示された間の部分に相当することから推測すると、細菌数は数千個~数万個の範囲であると考えられ、さらに、この範囲ではRLUとほぼ正比例の関係であろう。RLU値300以上の衛生上「問題あり」と判定される範囲では、図1のように回帰直線が得られるほどの精度で、正比例の関係が明らかで細菌数は 10^5 個のオーダーとなっている。さらに、一連の実験の結果から少なくともRLU値15000,細菌数 8×10^5 個まではこの比例関係が認められる。従ってRLU300~15000の間では、この測定法により高い精度で衛生判定ができ、また条件を考慮すれば細菌数検査との整合性も高い範囲と考えられる。これ以上の高

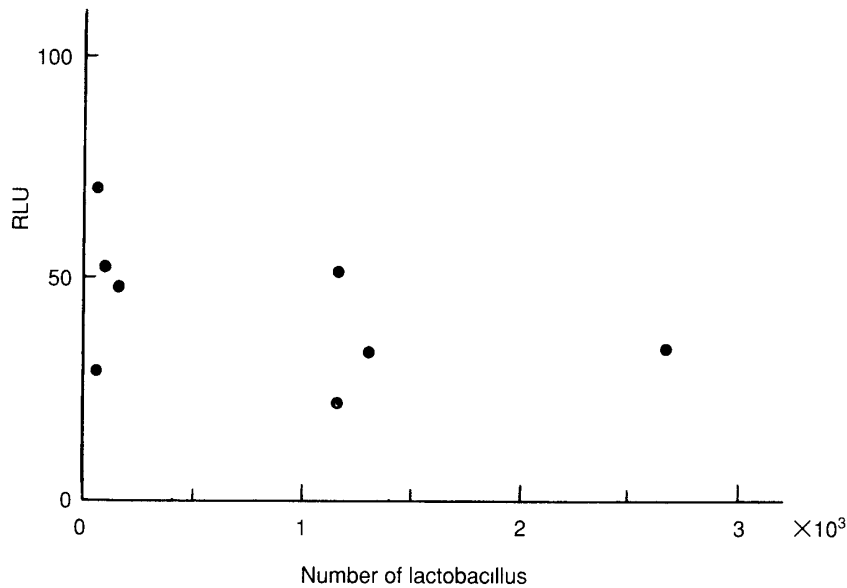


Fig.2 Relationship between number of lactobacillus and RLU point as it was been under 150point.

い値が互いに測定される範囲では、測定法としての上限が表れ精度も低下すると思われるが、今回の結果ではその範囲については推定できない。今回対象とした乳酸菌は他の細菌と比較して小型である⁶⁾ことから、菌1個体当たりのATP量も少ないためRLU値と菌数の間の相関が表れにくいことも考えられる。今後は他の細菌での同様な検討によりATP試験と細菌数の整合性を明らかにすることで、さらにこのような検査の応用領域を広げることができよう。

食品、調理器具、食器、容器包装などが細菌に汚染された場合、食中毒をはじめ重大な健康被害が起きることは周知の事実である⁷⁾。細菌汚染の実態を調査したり汚染被害を防ぐ為には迅速な細菌検査が必要であるが、最も基礎的な細菌数を求める検査にも最低1日の培養時間がかかる。滅菌などの準備や培養後の処理などを考慮すると数日を費やすことになる。あらかじめ滅菌された寒天培地等も市販されているが、細菌培養を行う限り培養時間を短縮することはできない。一方、今回使用したUni-Lite Xcelであれば即座にRLU値を得ることができ、細菌汚染の現状を把握できるばかりでなく汚染経路、汚染源、緊急対策、対策の有効性の検討など利用できる場面は広範囲になると考えられる。しかも、細菌数とRLU値の間にいくつかの条件設定はあるものの正の相関関係が認められたことは、細菌数予測の可能性も視野に入れた応用ができると考えられる。

要 約

ルシフェリンのATPによる生物発光を利用した衛生学的な検査について、その有効使用範囲や精度を乳酸菌を用いて検討した。ATP検査によって得られる測定値は光量の単位であるRLUであるが、これが150以下の範囲では対応する乳酸菌数に変動し一定の関係は認められなかった。もっとも、この範囲は衛生学的に「問題なし」と判定される範囲であり、またこの範囲は測定の下限以下と考えられた。RLU値151以上の範囲では正の相関があり、検査の目的が達せられる範囲と考えられた。乳酸菌以外の色々な細菌でも同様な検査を行うことにより、ATP検

査の応用領域拡大が示唆された。

文 献

- 1) 石橋 貞彦：ルシフェリン・ルシフェラーゼ法，ATPと代謝制御，**34**，東京大学出版会(1989)
- 2) 日本薬学会：乳酸菌数，乳製品試験法・注解，**123**，金原出版株式会社(1990)
- 3) 乳酸菌研究集談会：乳酸菌の定義，乳酸菌の科学と技術，**9～12**，株式会社学会出版センター(1996)
- 4) 坂部 美雄：微生物の性質とその特徴，新編食品衛生学，**5～13**，東京教学社(1992)
- 5) 河端 俊治・春田 三佐夫・細貝 祐太郎：手洗いの衛生，実務食品衛生，**418～419**，中央法規出版株式会社(1987)
- 6) 内田 泰・岡田 早苗：細胞の形態観察，乳酸菌実験マニュアル，**36～40**，朝倉書店(1992)
- 7) 松浦 栄一・金井 美恵子：細菌性食中毒，食品衛生学，**73～104**，建帛社(1987)