



ルシフェラーゼ応用の過去・現在・未来～ATP ふき取り検査の20年～

キッコーマンバイオケミファ(株) 本間 茂氏

本稿は、キッコーマンバイオケミファ(株)が2015年8月、東京大学・弥生講堂において開催した「ルミテスターセミナー100回記念講演会」において、同社の本間茂氏が行った講演の要旨である(ルミテスターは、キッコーマンバイオケミファ社が取り扱うATP ふき取り検査装置の名称)。

ルミテスターセミナーは、ATP ふき取り検査の普及を目的に1999年から開催されている。通算100回に到達したことを記念して開催された同セミナーでは、本間氏の他、(一財)日本食品分析センター学術顧問の一角賢司氏(北海道大学名誉教授)、(一財)東京顕微鏡院・食と環境の科学センター名誉所長の伊藤武氏、女子栄養大学短期大学部教授の金田雅代氏、(株)すかいらーくコーポレートサポート本部品質管理グループの三牧国昭氏による講演も行われた(4氏による講演の要旨は別に100回記念セミナー講演録となっている)。

「ATP測定」の開発の経緯

～酵素を工業的に大量生産～

ATP測定技術の開発は、「ホタルの発光に関わる酵素(ルシフェラーゼ)を大量生産し、それを微生物の高感度な計測技術に応用する」という発想から始まりました。ルシフェラーゼに関する研究の歴史は古く、1887年にフランスのデュボア(Dubois)が、ヒカリコメツキムシから発光に関与する耐熱性および非耐熱性の成分(ホタルの発光に関与する成分)を見出し、それぞれルシフェリン、ルシフェラーゼと命名。その後、1916年にアメリカのハーベイ(Hervey)らがホタルやウミホタルにも同様な成分があることを実証した他、1956年には米国のマックルロイ(McElroy)らが、ホタルの発光にATP(アデノシン3リン酸)が必要であることを見出し、ホタルのルシフェリン、ルシフェラーゼの抽出・結晶化に成功しました。こうした知見により、「ホタルのルシフェラーゼを利用することで高感度のATP測定が可能である」という認識が持たれるようになりました。

キッコーマングループがATP関連の研究に着手した1980年代の状況について紹介すると、当時はルシフェラーゼはホタルのしっぽから精製するしかありませんでした。しかも、1gのルシフェラーゼを得るために、約10万匹のホタルが必要でした。そのため、酵素の精製にコストがかかるだけでなく、

当時のルシフェラーゼは北米産ホタルからの抽出精製物に限られていたため、安定供給にも限界がありました。そこで、1988年に遺伝子組換え大腸菌を用いてルシフェラーゼを大量生産する技術を確認しました(図1)。ただし、ホタルの酵素とまったく同じものを工業的に生産できるようにしたわけではありません。検査で使用する際に“使い勝手”が良くなるように、耐熱性を高めたり、界面活性剤への耐性を高めるなど、さまざまな改良を施しています。

ATP測定(当時は臨床検査薬や研究用試薬として商品化)では、図2のようなホタルの発光の原理を用いることで、ATPを超高感度に測定します。ATP量と発光量の相関性を図3に示しましたが、ATP量が 10^{-18} mol/mlという濃度でも測定することが可能です。 10^{-18} mol/mlというとイメージしにくいかもしれませんが、これは「1gのATPが約20億トンの水に溶けている」という濃度です。約20億トンの水というのは、「中禅寺湖2杯分の水」に相当します。非常に高感度で

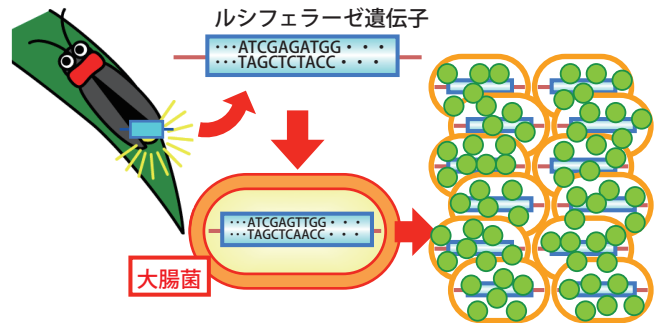


図1 遺伝子組換えによるルシフェラーゼを工業的に大量生産する技術を確認



図2 ATPの超高感度測定の原理

測定できることが、直感的にイメージできるのではないでしょう
か。

「微生物を測る」から「汚れを測る」へ概念を転換

以上のように、ATP 量を測定することで微生物数を測定する技術が確立され、商品化もされました。しかし、80～90年代はこの技術を用いた微生物検査には、非常にコストがかかることもあり、目立った需要がありませんでした。後に ATP 測定の用途を「微生物を測る」から「汚れを測る」へと転換したのですが、この発想の転換が「ATP ふき取り検査の普及」へとつながる重大な転機となりました。

ここで食品における衛生検査の考え方を振り返ってみます。微生物検査の目的は、大きく分けて①食材の微生物汚染検査と②食品製造環境の清浄度検査——という2種類があります。①は、汚染微生物の定性・定量評価を行うことで、その食材の利用可否を判断します（衛生指標菌の評価を行い、その衛生的取扱いの程度を判断する）。②では、機器表面などの汚染物質を定量し、その清浄度を判定します。こうした考え方は当時も今も、変わらずに引き継がれています。

さて、②の場合、「汚染指標として何を選ぶか?」という問題があります。当時は主に微生物を汚染指標としていました。なぜなら、培養法を用いることで微生物は非常に高感度な測定ができるからです。ここで、我々は「清浄度検査の汚染指標は、必ずしも微生物にこだわる必要はない」と考えました。当時も、微生物以外（例えばタンパク質など）を汚染指標とした考え方もあったので、「ATP を汚染指標にできないか?」ということを考えました。

微生物を汚染指標とするメリットもありますが、培養を伴うので結果判定までに数日を要します。しかし、ATP を汚染指標にできれば、「その場で検査結果が得られる（測定時間は約 10 秒）」「食品残さも含めた環境の汚染状況が評価できる」などのメリットが得られます。

ただし、当時は「食品残さも含めた評価ができる」という説明には、若干のわかりにくさもあったようです。食品残さにはたくさんの ATP が含まれているため、「ATP が存在する」ということは「汚れが残存している」という状況を示唆しています。図 4 は、微生物指標と ATP 指標の関係について、まな板の汚れを例に説明したものです。図 4 の上段は「まな板の上に食品残さも微生物も存在する」という状況です。この場合、微生物検査でも ATP ふき取り検査でも「不合格（不潔）」と判断されます。では、このまな板を殺菌して、図 4 の中段のような「微生物は存在しないが、食品残さは存在する」という状況になった場合を考えてください。この場合、微生物検査では「合格（清潔）」と判断されますが、ATP 検査では「不合格（不潔）」と判断されます。もし、このような状況で、

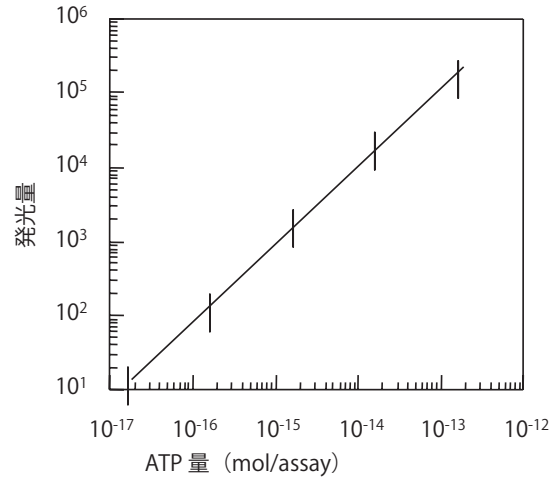


図 3 ルシフェリン・ルシフェラーゼ反応の感度。理論上は 10^{-18} mol/ml の ATP を検出可能

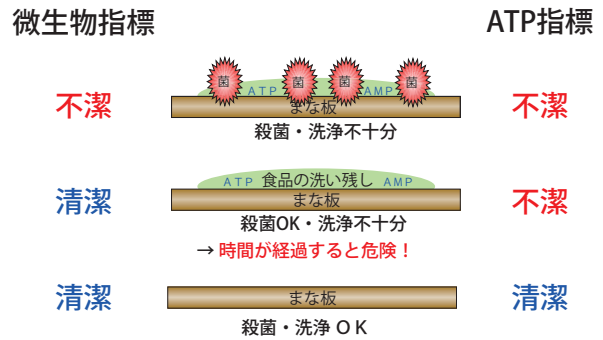


図 4 微生物指標と ATP 指標（まな板の汚れ）

まな板の表面に二次汚染が起こった場合、食中毒が発生するリスクがあるかもしれません。理想的には、図 4 の下段のように微生物も食品残さも存在しない状況（微生物検査でも ATP ふき取り検査でも「合格（清潔）」と判断される状況）を目指すべきです。

しかも、ATP 検査であれば、測定時間は 10 秒程度なので、もし測定結果が悪かった場合（基準値を逸脱した場合など）は、「その場で洗浄をやり直す」などの改善活動も可能です。現場の衛生検査の手法として、非常に有用であると考えました。以上のように、我々は「器具・機械類などの清浄度検査に ATP ふき取り検査を用いる」という、新しい価値観を創出し、その普及・浸透を目指しました。

酵素技術に支えられて、装置を小型・軽量・低価格化

現在では ATP ふき取り検査で用いる装置は小型かつ軽量になっているので、「いつでも、どこでも、誰にでも検査ができる」というメリットがあります。しかし、80年代当時の ATP 測定装置はデスクトップパソコンくらいのサイズのものが一般的でした。当社が 1993 年に販売した初代の ATP ふき



写真 キョーマングループが取り扱ってきた ATP ふき取り検査の測定装置。左は1993年発売の初代機種「ルミテスター『K-100』」、右は最新機種「ルミテスター『PD-30』」

取り検査の測定装置「ルミテスター『K-100』」は 2.5kg (100万円) でした (写真)。当時としては画期的な小型化・軽量化を実現しましたが、それでもユーザーの方からは「もっと小型に」「もっと安く」という声をいただきました。そうした声にお応えして、1997年に発売したのが「ルミテスター『C-100』」でした (700g、60万円)。続いて2001年に「ルミテスター『PD-10』」(350g、20万円)、2009年に「ルミテスター『PD-20』」(235g、10万円)、そして2014年に「ルミテスター『PD-30』」を発売し、小型・軽量・低価格化を進めてまいりました。

電子機器メーカーでも計測器メーカーでもない当社が、この20年間で装置の小型・軽量・低価格化を実現できた背景には、当社が伝統的に培ってきた酵素技術を生かした商品開発があります。一例を挙げると、同じATP量を与えた場合、酵素量を増やして発光強度を上げると、ATPの消費速度は速くなり、短時間で光は減衰します。ATPの消費を抑えれば発光強度は小さくなりますが、安定した光が長時間続きます。つまり、測定装置の感度の低さを補うために高い発光強度を得ようとする、短時間で発光強度が減衰し、測定のタイミングによって測定値のバラツキも大きくなって、精度の高い測定ができなくなるわけです。そのため、通常のATP測定では高感度の測定装置を使用し、ルシフェラーゼ濃度を下げて、弱くても安定した発光強度の得られる条件で測定を行うのが一般的です。図5は、当社が市販している2種類のATP測定試薬の発光パターンを比較したものです。白丸は一般的な感度での測定を目的とした試薬(250プラス)で、発光強度の減衰はほとんど見られません。一方、高感度測定を実現するためにルシフェラーゼ量を増やし、20倍程度の発光強度を与えるように調整した試薬(発光試薬HS)では発光強度の大幅な減衰が見られています。強い光であるなら小型化・軽量化が容易なフォト・ダイオード(Photo Diode, PD)という検出器が使えますが、発光強度を上げると減衰が激しくなってしまうのです。

そこで、当社では、強く安定した光を得るために、「減少

したATP(AMPに分解されたATP)を再びATPに戻せばよい」と考えました。光エネルギーを供給したATPは、AMP(アデノシン1リン酸)とピロリン酸に分解されますが、このAMPとピロリン酸を再度結合させ、ATPを再生させることができれば、発光強度は高い状態で維持されるはずですが、AMPからATPを作り出す酵素(pyruvate orthophosphate dikinase, PPK)を用いて、図6のような「ルシフェラーゼの発光反応」と「PPDKによるATP再生反応」を組み合わせた、「ATP ⇌ AMP サイクル反応」を成立させる技術「PPDK生物発光酵素サイクリング反応」を開発・確立しました(図7)。

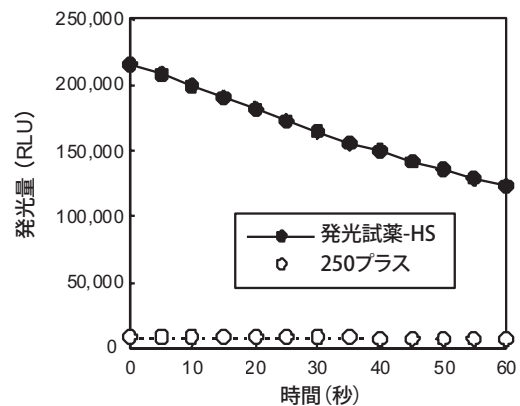
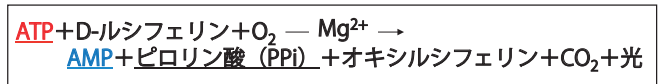
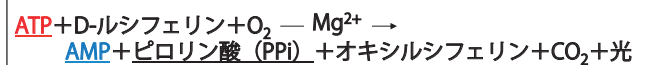


図5 ルシフェラーゼの発光反応

ルシフェラーゼの発光反応



PPDKによるATP再生反応



図6 強く安定した光を得るために、ATPとAMPを同時に測る技術を開発

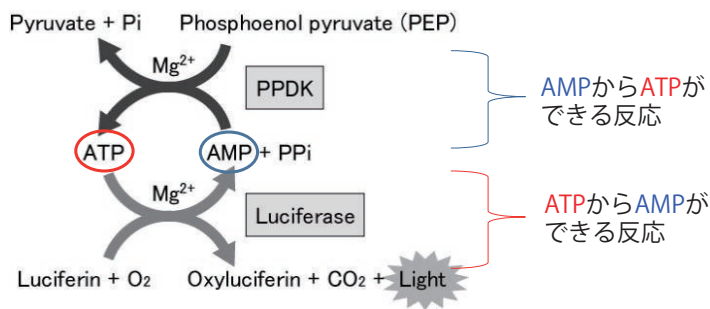


図7 PPK 生物発光酵素サイクリング反応

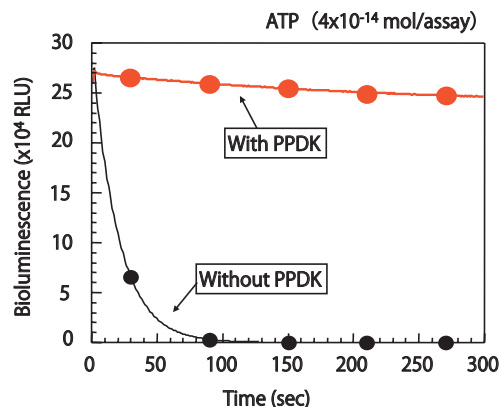


図8 PPK システムによる発光の安定化

PPK 生物発光酵素サイクリング反応を取り入れることで、安定した発光強度が得られるようになりました (図8)。

ATP + AMP ふき取り検査

また、上記のように、ATPとAMPを同時に測定することで、汚れ(食品残さ)のさらに高感度な検出が可能となりました。表1の右端の欄は、さまざまな食品で「ATP + AMP ふき取り検査」と「ATPのみのふき取り検査」を比較しています。ATP + AMP ふき取り検査の方が、ソーセージでは51万倍、だしでは16万倍といったように高感度な検出が可能となっています。つまり、「ATP含量が少ない食材」を取り扱う現場であっても有用な検査法であると期待できます。

新しい概念の検査法の普及、

市場への正しい情報発信のために

以上のような経緯で、「『培養法で微生物を測る検査』から『環境中の汚れを簡易・迅速に測る検査』へ」という新しい衛生検査の価値観を提

案しました。しかし、新しい検査法でしたので、当初はなかなか普及しませんでした。普及が進み始めたのは、1995年に発売した「ルミテスター『K-200』」をマイカル商品研究所とサラヤ㈱がスーパーマーケット店舗におけるバックヤードの衛生管理に活用し始めたこと、1997年に発売した「ルミテスター『C-100』」をつば八㈱がチェーン展開している店舗厨房の衛生管理に活用し始めたことがきっかけでした。

90年代後半になって、徐々にATPふき取り検査が普及し始めましたが、他社もこの検査法に注目するようになり、一時期は国内外で10社を超える会社からさまざまな装置が販売されるようになりました。それと同時に、検査法の原理や特徴、検査の制約や限界などについて十分に理解していない状態で営業活動を行う事業者も見られるようになってきました。例えば、「ATPにより微生物そのものが測定できる」といった間違った説明をする業者や、「微生物そのものは測れないので、衛生検査では役に立たない」といった誤解をしているユーザーも当時は見られました。

市場へ正しい情報を発信するためには「できること」と「できないこと」を明確に伝えることが重要です。また、ATPふき取り検査の信頼性を確保するためには、「各社の機器の計測値を相互比較できるようにする必要がある」「価値のある使い方とそうでない使い方を示す(適切な活用方法、不適切な使用方法などについて周知を図る)必要がある」といったことも感じました。

そこで、関連企業が集まり、1999年に「ATPふき取り検査研究会」を組織しました(現在はATP・迅速検査研究会に改称)。同研究会では、

肉、加工品	サンプル中の濃度(pM)		(ATP+AMP) ATP
	ATP	ATP+AMP	
豚肉 (ミンチ)	3.6	39	11
ソーセージ	0.0017	870	510,000
マグロ (冷凍)	1.6	110	69
イカ (冷凍)	0.12	720	6,000
緑茶	220	390	1.8
コーヒー	0.026	16	620
ビール	0.0022	4.9	2,200
小麦粉	0.029	1.5	52
ゆで麺	0.00074	27	36,000
白米 (米粒)	1.5	7.9	5.3
米飯 (炊飯後)	0.16	3.3	21
だし かつお	0.057	9,400	160,000

表1 ATPとAMPを同時に測ると感度が上がる

ATP ふき取り検査に関する正しい情報の提供や、検査法の活用事例の紹介などを中心に活動を展開しています。活動の成果の一つとして、2004年・2015年に改訂された「食品衛生検査指針（微生物編）」^{1~2)}にはATP ふき取り検査が記載されています。

広がる ATP 測定の可能性

以上、ATP 測定の技術について、主にふき取り検査の用途で普及を進めてきた経緯を説明してきました。その一方で、ATP 測定の技術は、迅速な微生物測定にも活用されています。以下に、いくつかの例を紹介します。

(1) 無菌充填飲料の微生物測定

無菌充填飲料が無菌であることを保証するための保存試験では、従来は製品をパッケージごと数日間保温した後に培養試験が行われますが、ATP 測定を導入することで培養が不要になり、迅速な試験が可能となります。検査期間の短縮を図ることは、出荷判定の迅速化だけでなく、在庫の圧縮、倉庫費用の削減、製造・物流の円滑化などにもつながっています。

(2) 繊維製品の抗菌性評価

繊維製品における微生物やカビの増殖を抑制する加工として抗菌加工や抗カビ加工が行われますが、その性能を評価する方法としても、ATP 測定技術が活用されています。検査法については ISO に記載されています^{3~5)}。

(3) 免疫反応の標識酵素として

ルシフェラーゼは生体に存在しない酵素なので、「バックグラウンドが低く高感度化が容易」という側面があります。そこで、ビオチンとルシフェラーゼを結合させたタンパク質（ビオチン化ルシフェラーゼ）が抗原抗体反応を見つけるための標識酵素として用いられています（図9）。この技術は現在、医療分野におけるウイルス検出などで利用されています。

(4) 生物発光サイクリングによる ATP 測定

ろ過後のフィルター上の微生物を発光させ、CCDカメラによって光の点として測定するという検査法があります（図10）。この検査法自体は10年ほど前からすでに実用化されていますが、この方法は「感度があまり高くない」という課題があるため、どうしても「フィルター上にトラップした微生物を培養する」というステップが必要でした。

そこで、「PPDK 生物発光酵素サイクリング反応を用いることで、無培養で高感度の検出ができるようになる」

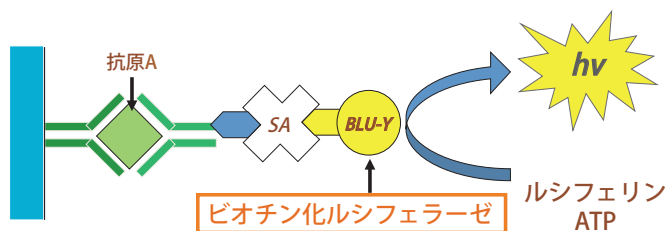


図9 抗原抗体反応の標識酵素としての活用

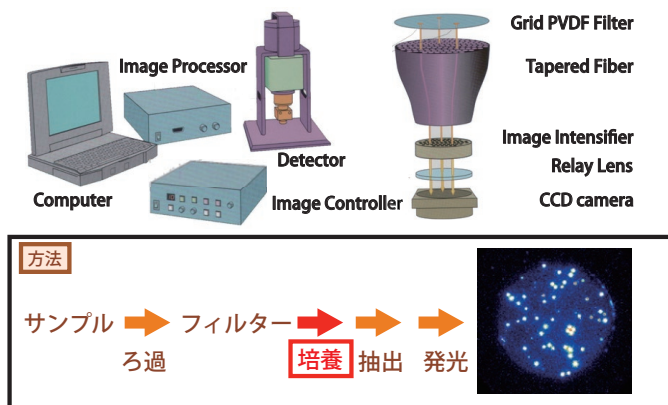


図10 CCDカメラによる微生物検出

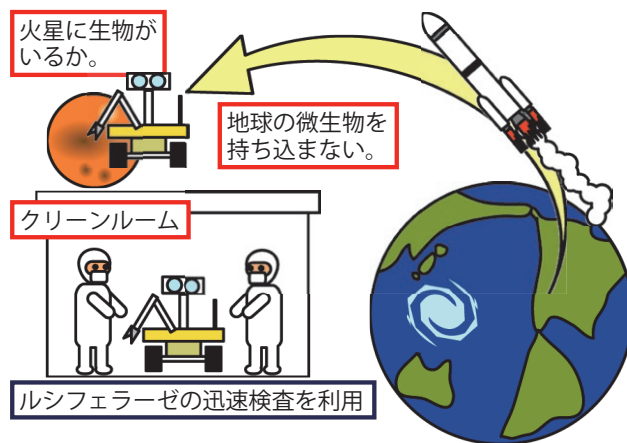


図11 NASAの火星探査計画

と考え、将来的な実用化に向けて検討を進めているところです。

(5) NASA の火星探査計画での活用

最近のトピックとして、NASAの惑星探査においてもATPによる清浄度検査が活用されています。図11のように、惑星に生物がいるかどうかを調査する際、地球上の微生物が持ち込まれてしまったら正確な調査ができなくなってしまいます。そこで、ATP法を用いた検査がNASAのテクニカルハンドブック6に記載されています。

ATP ふき取り検査がもたらしたもの

ATP ふき取り検査の普及が進んだことで、どのような変化がもたらされたのでしょうか。私見ではありますが、大きな変化の一つは「衛生検査の主体が『品質管理室』から『現場』へと移行した」という点が挙げられると思います。私自身、食品工場で工場長を務めた経験がありますが、一般論として品質管理担当者と現場の仲が悪い（円滑なコミュニケーションがとられていない）という場面は、往々にして見られます。その理由の一つは、検査が品質管理室の中で（現場からは見えない場所で）行われ、検査結果だけが書面として現場に渡されるからではないでしょうか。

しかし、ATP ふき取り検査には「いつでも、どこでも、誰にでも検査できる」という特徴があります（しかも、培養が不要なので、安全な検査が可能です）。また、現場において10秒程度で検査結果が数値化されるので、現場で検査結果をフィードバックできます（例えば、再洗浄の指示、衛生教育の実施など）。多くの方から「清浄度を『見える化』したことで、現場と管理者のコミュニケーションがより円滑になった。また、現場における教育・訓練の効果が飛躍的に高まった」といった感想をいただいています。

今後も皆様からご意見をいただく中で、ATP 測定技術はさらに可能性を広げていくでしょう。当社としても、さらに新しい衛生検査の概念を提案していきたいと考えています。

参考文献

- 1) 厚生労働省監修、食品衛生検査指針(微生物編)、2004年、(社)日本食品衛生協会
- 2) 厚生労働省監修、食品衛生検査指針(微生物編)、2015年、(公社)日本食品衛生協会
- 3) JIS L 1902:2002「繊維製品の抗菌性試験方法・抗菌効果」(注：2007年のISO登録を受けて一部改訂。現在はJIS L 1902:2008「繊維製品の抗菌試験方法及び抗菌効果」として収載)
- 4) ISO 20743:2007 (Textiles-Determination of antibacterial activity of antibacterial finished products)
- 5) ISO 13629-1:2012 (Textiles-Determination of antifungal activity of textile products-Part 1: Luminescence method)
- 6) NASA-HDBK-6022 "HANDBOOK FOR THE MICROBIAL EXAMINATION OF SPACE HARDWARE"

[発行元]

kikkoman

キッコーマンバイオケミファ株式会社

TEL03-5521-5490 FAX03-5521-5498
Email: biochemifa@mail.kikkoman.co.jp

