

# Technical Report

BL N0.210004 微生物迅速検査装置

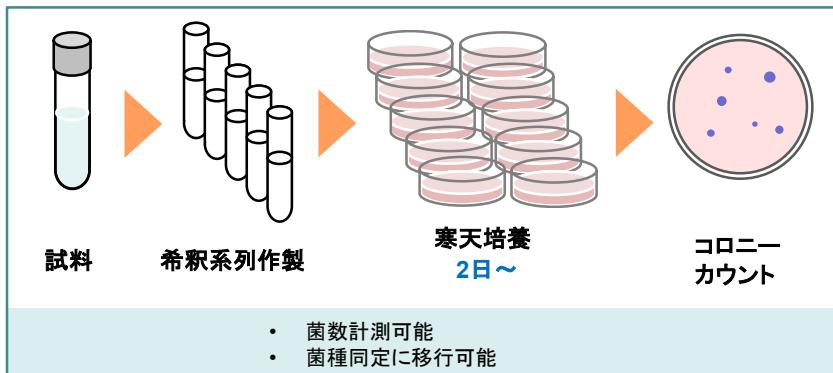
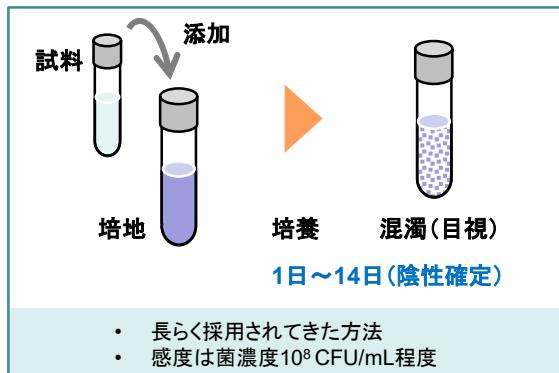
## Lumione 測定手順

Lumione BL-2000の測定対象はATPである。従来のATP法では「低検出感度(数百amol)」「芽胞形成菌(芽胞菌)検出不可」「菌体外ATPによる高バックグラウンド」等が課題であった。感度については既に、テクニカルレポート [BL N0.210001, 2] にて示したように、1 amolの検出が可能である。芽胞菌検出およびバックグラウンドATP(BG-ATP)低減については、専用試薬と前処理法を開発し、検出感度を向上した。本稿では、テクニカルレポート [BL N0.210003] で触れた「Lumioneの前処理」について、より詳細に紹介する。

### 従来法とLumioneの検出時間比較

従来の微生物試験は1日以上を要するのに対し、Lumioneでは最短2時間で検出可能である(非培養で菌検出可能な場合)。

#### 1. 従来法



#### 2. Lumione BL-2000



表1 ATP法と従来法の比較

	利点	課題
無菌検査(液体培養法)との比較	濁度法・CO <sub>2</sub> 法と比較して高感度	BG-ATP量と要求される菌検出感度に応じて前培養が必要
菌数検査(コロニーカウント法)との比較	<ul style="list-style-type: none"> <li>判定が当日中(迅速)</li> <li>培地準備・希釀系列作製が不要</li> <li>ATP発光は自動計測</li> <li>廃棄物が少ない</li> </ul>	菌数換算が困難なため新管理基準が必要

## Lumione 消耗品

Lumioneの前処理には専用消耗品「専用試薬キット」「フィルタアセンブリ」「計測チューブラック」を使用する。

表2 専用消耗品

数量	専用試薬キット	フィルタアセンブリ	計測チューブラック
販売単位	24テスト/キット	24個/袋	計測チューブ24本/ラック
	5キット	10袋	12ラック
外観	<p>ATP抽出液 活性消去液 ポジコン(100 amol ATP標準液) 発光液 洗浄液</p>	<p>↑ フィルタ ↓ カバー</p>	<p>計測チューブ ラック</p>

# Technical Report

BL N0.210004 微生物迅速検査装置

## Lumioneの前処理法

Lumioneの前処理法には大別して2種類あり、試料をフィルタろ過して菌を濃縮し、フィルタ上でATP試料を調製する「Lumione 濃縮ろ過法」と、試料から直接ATP試料を調製する「Lumione 混合法」がある。試料のろ過性および目的とする感度により、前処理法を選択する。

表3 前処理法の特徴と用途

	Lumione 濃縮ろ過法	Lumione 混合法
特長	高感度	低コスト、簡便
用途	ろ過可能、菌の希薄な試料 (製薬用水など)	菌濃度の高い試料、ろ過できない試料 (保存効力試験、増菌培養後の試料など)

## Lumione 濃縮ろ過法

試料をフィルタアセンブリで吸引ろ過する。数mL以上の試料の場合、別途販売の100 mL用ファンネルを、フィルタアセンブリに接続してろ過する。製薬用水100 mLでは10分以内にろ過可能である。ろ過後、活性消去液をフィルタ内に添加し、37°Cのプロックヒータで40分インキュベーションする。この工程で、試料に含まれるBG-ATPを分解し、また芽胞菌を発芽・活性化させる。その後、洗浄液で洗浄して、遠心ろ過により残った洗浄液を除去する。フィルタアセンブリのカバーを外し、フィルタ部のみを計測チューブに乗せる。フィルタにATP抽出液を添加し、室温で5分静置して生菌からATPを抽出する。遠心ろ過により抽出液を計測チューブに回収する。計測チューブをラックにセットしてLumioneにて自動発光計測を行う。測定時間は1試料当たり約5分である。

ATP検査フロー



前処理を含め、最速1時間で検出が可能

図3 Lumione 濃縮ろ過法手順

# Technical Report

BL N0.210004 微生物迅速検査装置

## Lumione 混合法

試料10 μLを採取し、洗浄液20 μLと混合する。室温で30分静置してATP消去反応を行う。さらに、ATP抽出液30 μLを添加し、生菌のATPを抽出した後、50 μLを計測チューブに分注してラックにセットし、Lumioneにて自動発光計測を行う。

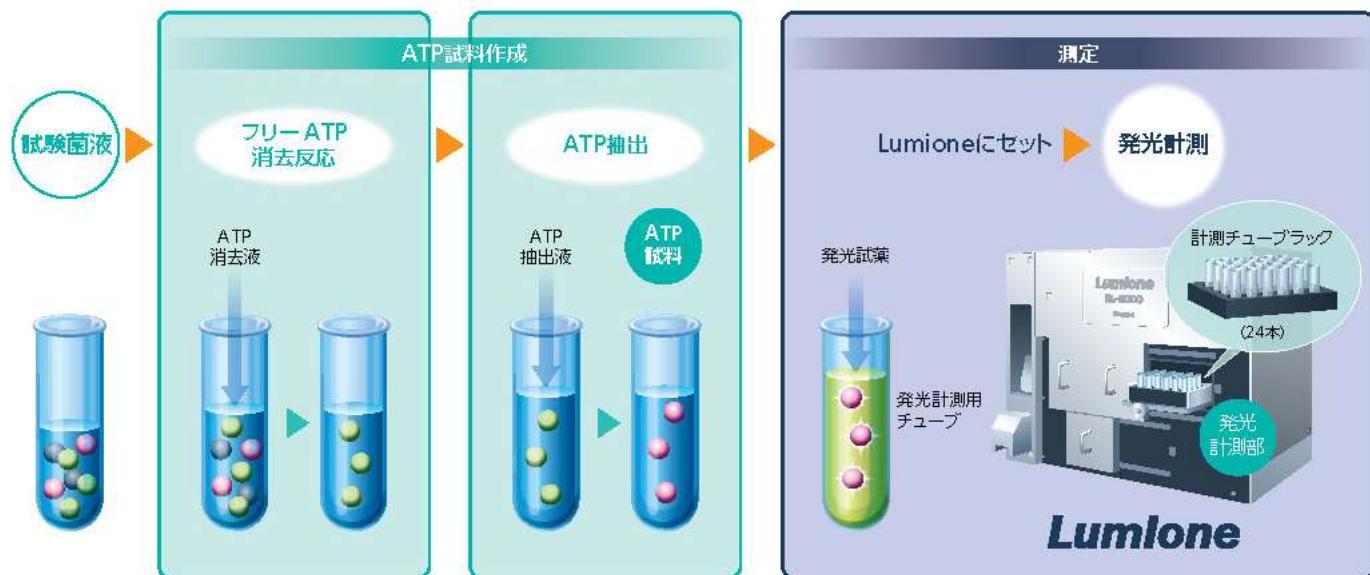


図4 Lumione 混合法手順

## 測定対象

Lumione 濃縮ろ過法およびLumione 混合法で測定可能な試料を表4に紹介する。前提として、Lumione 濃縮ろ過法はろ過可能な試料のみ対象となる。Lumione 混合法ではろ過工程がないことから、試料の溶媒がATP抽出後試料に含まれるため、試料溶媒成分によって発光反応が阻害される場合には試料の希釈が必要となる。この他、培養細胞試料や飲料の全量検査(試料500 mL以上)について前処理法を検討中である。

表4 測定可能な試料例

試験内容	目的	測定対象例		前処理
微生物試験	品質管理	医薬品	常水・精製水・注射用水 医薬中間品 設備洗浄水	Lumione 濃縮ろ過法
		飲料	設備・容器洗浄水	
	出荷試験	製薬・医療部材	輸液剤・透析液・注射剤	Lumione 濃縮ろ過法
		飲料、食品材料	清涼飲料水 100 mL (ミネラルウォーター・アルコール飲料)	
		衛生剤・化粧品	除菌シート・メイク落としシート・化粧水	
殺菌/消毒/抗菌効果試験 保存効力試験	研究・処方開発	医薬品 医薬部外品	消毒・抗菌薬 点眼薬・コンタクトレンズ保存液	Lumione 混合法
		衛生剤	抗菌材料	

# Technical Report

BL N0.210004 微生物迅速検査装置

## Lumione適用可否判断

Lumioneで測定する試料について、適用可否および必要な前処理法を判断可能なフローチャートを以下に示す。

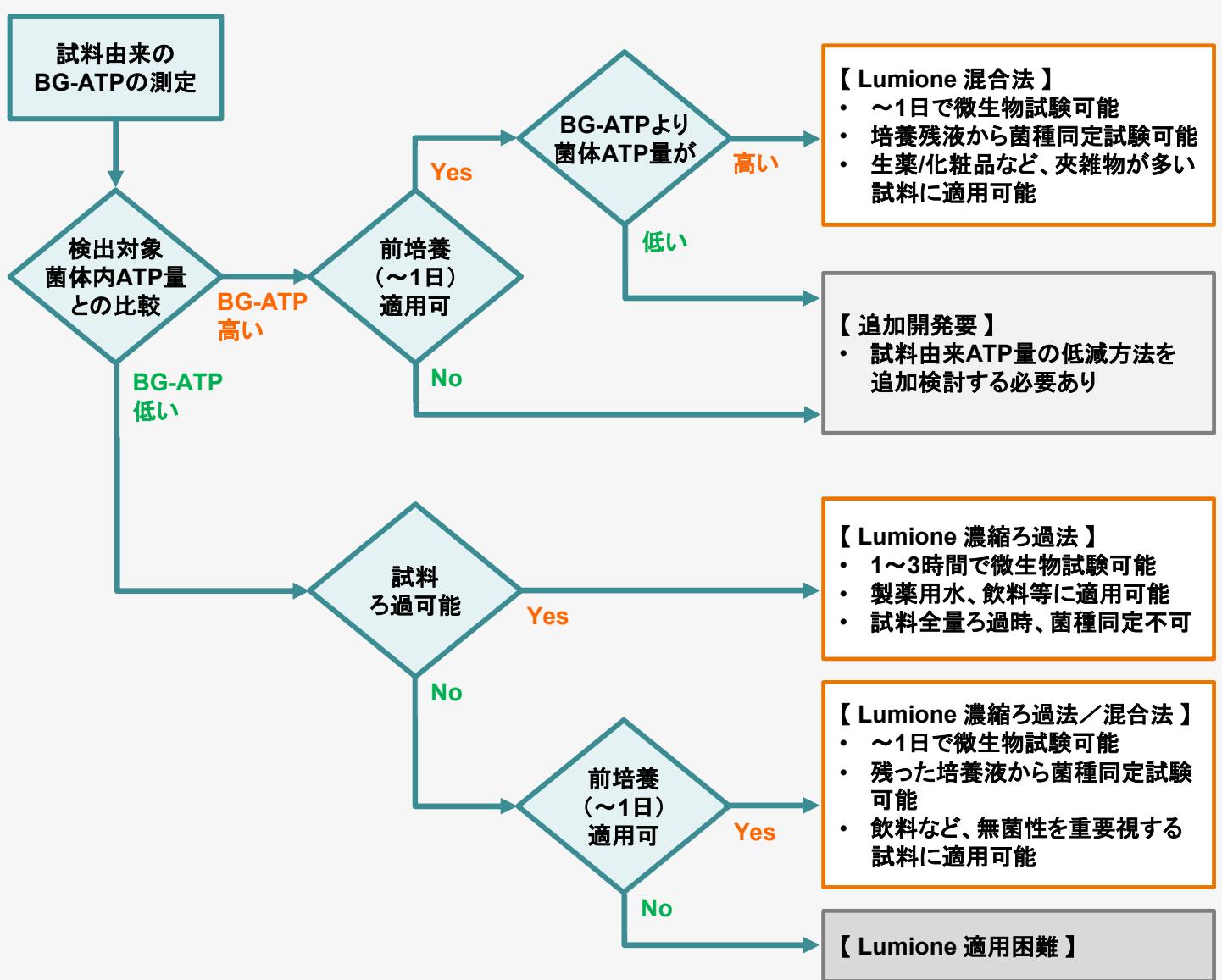


図5 前処理手順選択フローチャート

## 略称紹介

ATP : アデノシン三リン酸 ; Adenosine Triphosphate  
amol : アトモル ; attomole / 1amol =  $10^{-18}$  mol  
CFU : コロニー形成単位 ; Colony Forming Unit

BG-ATP : バックグラウンドATP ; 検出対象(生菌由来ATP)以外のATPを指す。試料に混入する死菌や、試料自体に由来する。

### 文献.

- 厚生労働. 第十八改正日本薬局方. 厚生労働省告示第220号. 2021年6月7日.  
<https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000066530.html>
- 厚生労働. 第十八改正日本薬局方. 参考情報. 微生物迅速試験法(G4-6-170). 2021年6月7日.  
<https://www.mhlw.go.jp/content/11120000/000788362.pdf>
- 一般財団法人医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス財団 編. 必携 日本薬局方試験法ガイド(日局16対応), 株式会社じほう, 2011, 447p.
- 五十君静信, 江崎孝行, 高島浩介, 土戸哲明. 微生物の簡易迅速検査法. 第1版, 株式会社テクノシステム, 2013, 758p.
- 坂上吉一. 第17改正 図説 日本薬局方微生物試験法の手引き. 文教出版, 2016, 260p.
- 厚生労働. 食品別の規格基準について. 清涼飲料水. 厚生省告示第370号, 1959.  
<https://www.mhlw.go.jp/content/11120000/000788362.pdf>
- 佐々木次雄, 棚元憲一, 菊池裕. 実践 微生物試験法Q&A 医薬品・食品衛生管理の正しい理解とアプローチ. 第1版, 株式会社じほう, 2017, 228p.