

3. 21世紀における共生と競争

ATP 測定応用技術の将来

—新しい衛生検査手法の確立を目指して—

本間 茂*

ホタルルシフェラーゼによる ATP 測定はその発光の効率のよさから原理的にもっとも高感度を実現できる測定手法であることは 1950 年代より知られていた。この手法を微生物検査などの衛生管理に利用しようとする試みは古くからなされていたが、研究者レベルの利用に止まっていた。80 年代初めには微生物や生物化学的な知識が乏しいと思われる商社が、あたかも数個の微生物が瞬時に測定できるかのような紹介の仕方で非常に高価なシステム（1 千万円を超えていたと記憶している）の導入をはかった。しかし、培養液のような汙過可能な検査対象はともかく、一般的な食品試料への適用は困難であった。結果としてこの商社の動きは「ATP 法は食品衛生管理の役に立たない」とのネガティブな印象を遺す結果となった。

キッコーマン（株）では醤油醸造技術にルーツを持つバイオ事業を昭和 30 年代より続けており、80 年代初めには消化酵素製剤の原料や、臨床検査用酵素を製造していた。

開発陣は食品衛生ばかりでなく、さまざまな生体成分の検出感度を飛躍的に向上させることが可能なルシフェラーゼによる ATP 測定に着目し、測定に必須である酵素、ホタルルシフェラーゼを、組み替え DNA の手法によって生産する技術を開発した。

ここでは、80 年代末にほとんどゼロに等しかった「ATP 測定による衛生管理」の市場を測定試薬製造の鍵となるホタルルシフェラーゼの微生物生産をきっかけとして、小型軽量低価格の測定器の開発と普及等、さまざまな障害を取り除くことによって、現在「清浄度検査のスタンダード」と見なされるに至った経緯について紹介する。

1. 遺伝子組み替え技術による ATP 測定試薬の安定供給と使い勝手の向上

ホタル・ルシフェラーゼによる高感度 ATP 測定の原理は 1950 年代に明らかになり、生化学研究の分野

で要求されるさまざまな高感度測定に応用されてきた。しかし測定に必要なルシフェラーゼの入手がホタル（主にアメリカホタル）からの抽出精製に頼るほかなかったため、高価であるばかりでなくロットごとの品質のばらつきが大きいこと、供給が不安定であること等、産業用に応用することは不可能であった。

キッコーマンでは 80 年代末にこのロット差、供給の不安定さを解消するために遺伝子をクローニングし微生物にこのルシフェラーゼを生産させる技術を完成し、世界で初めて遺伝子組み替え技術によって生産されたホタルルシフェラーゼの販売を開始した。微生物生産によって供給の不安定さとロット間品質差の問題が解決されたわけだが、遺伝子の供給源としてアメリカホタルではなく日本固有のゲンジボタルを選んだことが思わぬメリットをもたらした。

従来市販されていたアメリカホタルのルシフェラーゼは耐熱性が悪く、長時間の測定では氷水中で冷却しながら測定しなければならないなどの不便があった。ゲンジボタルはアメリカホタルに比べからだが小さいために、まとまった量の酵素の入手が困難であり、微生物生産が実現する以前にはその酵素の性質をアメリカホタルと詳細に比較することは困難であったが、微生物によって生産したゲンジボタルルシフェラーゼをアメリカホタルのそれと比べてみたところ非常に高い安定性を持っていることがわかった。

現在のわれわれの試薬に使用されている酵素は、遺伝子レベルで酵素を改変することによって得られた「耐熱性ゲンジボタルルシフェラーゼ」であり、さらに高い安定性が付与されている。アメリカホタルのルシフェラーゼを使用している試薬もさまざまな添加物の工夫などによってそれなりの使い勝手を維持しているが、精度の高い測定には微妙な取り扱いを強いられる。その点この耐熱性ゲンジボタルルシフェラーゼの開発は試薬の使い勝手の向上に大きく貢献したと考えている。

* Shigeru HONMA; キッコーマン（株）バイオケミカル事業部

2. 需要創造に向けた発想の転換 “微生物を測る” から “汚れを測る” へ

当時の食品衛生検査はもっぱら“微生物検査”によって行われていた。われわれも当初“ATP測定による微生物検査”を前面に出して市場へアプローチを開始したが、この手法はユーザーに高い技術レベルが要求されること、微生物検査が「公定法」へのこだわりの非常に強い分野であったことなどから、市場の立ち上がりに相当の期間が必要であることが明らかとなった。

食品製造の安全性を確保する衛生管理手法としては、原材料や製品を対象とした検査と、作業員の手指や食品製造機器・器具類を対象としたふき取り検査の二つに大きく分けられるが、当時はこの両者とも対象に付着している微生物を測定することによって検査が行われていた。前者は微生物汚染の程度を測定することがどうしても必要である。しかし、後者は必ずしもそうではない。

従来の微生物を汚染指標（汚れ＝微生物）として行われてきた検査法では、検査に時間がかかるばかりでなく、微生物汚染が起きる以前の“汚れ”を検出することができない。

これに対しタイトルにある「ATPふき取り検査」は、食品製造環境の汚れに広く含まれている“ATP”を汚染指標とすることにより、迅速かつ的確な検査結果が得られ、食品製造環境の清浄度の維持に有効な情報を与える検査法である。手指や器具機械類を媒介とした二次汚染が、食中毒事故要因の8割以上を占めることから考えて、この簡便で迅速な検査法を普及させることは、食中毒事故の劇的な減少をもたらすことが期待できる。

この検査手法で捉えられているATPの大部分は微生物由来のATPではなく、その増殖の温床となる有機物に含まれているATP（微生物由来のATPと区別する場合には遊離ATPと呼ばれる）である。詳細は割愛するが、この遊離ATPは“ATP法による微生物測定”を行う際には測定の障害となるやっかいなものであり、かつてATP法の衛生検査への応用を阻む一番の障害と言われていた。

ここを逆手に取って、この遊離ATPを“汚染指標”と捉える考え方を取り込むことにより、まったく新しい需要を生む可能性があると考えたのである。実際、現在市場に出回っているATP測定関連機器および試薬のかなりの部分がこの「ATP法ふき取り検査」を対象としたものであり、ATP測定利用の牽引役となっている。

3. 小さく、軽く、安価なルミノメーターの開発

ATPの測定はルシフェラーゼによる発光反応を利用するわけだが微弱な発光を検出するためには、ルミノメーターと呼ばれる特殊な検出装置が必要となる。90年代初めのこの種の装置としては、デスクトップパソコンを2台重ねたほどの大きさで、20kgを超える重量の製品しかなく、価格も200万円を超えるようなものが主流であった。

このような装置では価格もさることながら、ふき取り検査のために現場に気軽に持ち込むことが不可能である。そこでキッコーマンでは93年にA4サイズで重量2.5kgのルミノメーター「ルミテスター K100」を開発し、当時としては破格の100万円程度で発売した。

現在はこの装置の発展型として開発されたビデオカセットサイズ、700gの「ルミテスター C100」がキッコーマンの主力機種となっている。初代のK100を開発し、本格的に「ATPふき取り検査」を前面に出した展開を始めた際に、この概念がすんなり受け入れられたわけではなく、本格的な手応えが感じられたのはPL法が施行された95年であった。

4. 市場拡大の速度を超えた参入増加による市場の混乱

95年頃から市場の拡大を予感した国内メーカーや、海外製品を扱う商社がこの「ATPふき取り検査」市場に参入してきた。その数は10社以上が数えられ、市場拡大のスピードを増す効果は大きかったと考えられるが、一方で弊害が出たのも事実である。

検査法がこれまでになかった手法であるため、装置を売りっぱなしではユーザーの有効な活用はおぼつかないわけであるが、装置の販売数量を伸ばそうとするマーケティング活動に比べ、販売後のフォローが少なく購入後ユーザーが十分に活用できないような状況が生まれたケースも多かったと感じている。同じ理由から販売にはかなりの手間と時間がかかるが、競合による装置の価格低下によって販売代理店にとって魅力の乏しい商品と感じられたケースがあり、販売チャネルの整備にはマイナスに働いたと思われる。

また、各社、各様の表示形式を採用しているために「清浄度基準」の認識が統一されなかったこと、清浄度検査と微生物検査が十分に区別されずに紹介されたことなどから、ユーザーが混乱したことも少なからずあったと思う。

このようなマイナス要因のためか、景気低迷が長引いたためかははっきりしないが、98年にはそれまで急

速に拡大してきた市場の伸びが鈍化するような傾向が見られた。

5. 標準化に向けて一無秩序な競争から秩序ある競争へ

先にも述べたようにこの「ATP ふき取り検査」を目的としたシステムは国内外の十社を超えるメーカーから発売されているが、表示単位や使い方等がまちまちでユーザーの混乱を招きかねない状況にある。

この点を改善することが、この検査手法を普及拡大するために重要であるとの意見をお持ちであった日本食品保全研究会 前会長 春田三佐夫先生（故人）と東京顕微鏡院 食と環境の科学センター所長 伊藤武先生が業界各社に声をかけて、99年の6月に関連の十数社が集まった、「ATP ふき取り検査研究会」が発足した。発足時会長であった春田三佐夫先生は残念ながら昨年5月に急逝されたが、その後伊藤武先生はじめ、食品衛生分野で精力的な活動をされている理事の先生方の助言を得ながら、標準化に向けた活動と有効活用法を普及するための事例紹介を中心に、これまでに3回の講演会を実施するなど精力的に活動を進めている。

6. ATP 測定応用技術の将来—微生物測定への応用—

この「ATP ふき取り検査」の普及をまず進めようと考えたことは、ATP 測定を利用した衛生検査市場拡大のスピードアップという点で大変大きな効果を上げた。

なかでも、市場の拡大によって高性能で安価な装置が調達可能になったことは、それまでである意味で特殊な測定法であった ATP 測定を誰でもが行えるポピュラーなものにした点で非常に大きなことであったと考えている。現在この種の用途に使われている装置は全国で数千台あると考えられるが、これらの装置は今後応用が広がって行くと考えられる微生物測定の分野でも活躍することが期待される。

ATP 測定を利用した微生物検査への応用拡大の鍵は、はじめに述べた測定の邪魔をする「遊離 ATP」をいかに少なくするかである。

遊離 ATP を少なくする手法としてもっとも一般的なのは検査試料を汜過してフィルタ上に捕捉し、遊離 ATP を洗い流した後に微生物から取り出した ATP を測定する手法である。しかしこの手法は汜過できない大部分の食品に応用が不可能であるという問題点を抱えており、この点に注目したキッコーマンは遊離 ATP を効率よく短時間で分解する酵素を開発することに成功した。

この酵素の開発によって、一般生菌測定については、高感度タイプの試薬を使えば細菌濃度で 100 個/ml（試料容量は 0.1 ml なので菌数としては 10 個）が測定できるようになってきた。この試薬の性能を引き出すためには、適切な ATP 消去と発光測定がポイントであるが、この点を乳製品あるいは食肉向けに最適化した試薬キット「ルシフェール Milk」「ルシフェール Meat」を製品化している。この試薬システムでは乳製品特有の、試料の濁り、ATP 消去の困難さ、夾雑物による微生物からの ATP 抽出効率の低下等の問題を、抽出剤である界面活性剤に抵抗性のあるルシフェラーゼを開発することによって解決した。ATP 消去効率はさまざまな食品成分によって影響を受けるため、食品の性質ごとに消去剤の使い方を微調整する必要があるが、現在これらに続いて野菜用など微生物汚染レベルの高い食品向けに最適化したキットを開発中である。

使い勝手が向上したことから、食品衛生分野以外にも ATP による微生物迅速測定の応用が始まっており、繊維の抗菌加工評価の分野や、医療における感染症対策に向けた病原菌の抗生物質感受性評価の迅速化等でも検討が進められている。

また詳細は割愛するが、この生物発光による ATP 測定に関わる2つの物質「ルシフェリン」と「ルシフェラーゼ」も ATP と同様に短時間超高感度測定が可能である。このことを利用して酵素免疫測定法の標識酵素にルシフェラーゼを利用することによって高感度化を実現したり、ルシフェリンの誘導体を特定の酵素の合成基質として利用することによって、その酵素活性測定の高感度を可能にしている。これらの技術は、黄色ブドウ球菌や大腸菌群等の食中毒菌や食品衛生に関わる指標菌を特定して検出するシステムに応用して製品化しており、サルモネラの迅速測定に向けた製品開発も進行中である。

この種の生物発光を最終検出系とするシステムは、従来のシステムに比べバックグラウンドが低い等の利点があり、比色法にくらべるのであれば一万倍以上、現在もっとも高感度の化学発光法と比べても一桁程度の感度向上が期待できるといわれており、臨床検査分野等各方面での実用化へ向けた研究が進められている。

後半では ATP 法による微生物測定について述べたが、現状での現場活用度合いから見ると、おそらく 90% が前半で紹介した「ATP ふき取り検査」であろう。この検査手法が普及するもっとも重要な鍵は検査の意義とその効果がユーザーに広く受け入れられたことであるが、普及の過程を振り返ってみるとこの手法を取

り入れるにあたってユーザーが使いやすく、適切な価格で手に入れることが可能な装置・試薬類の開発が必須であった。まず組み換え DNA の手法によるルシフェラーゼ生産が実用化し、測定に欠かせない試薬の供給面での不安がとりのぞかれたのに続いて、測定器の小型・軽量・低価格化が進み、作業現場に持ち込んで測定することが可能な装置が 100 万円を大きく下回る価格で販売されるようになった。さらに試薬の使い勝手も、初期の段階では複数の試薬を別々に準備し、ピペットを用いて操作する必要があったが、現在では点眼容器にさまざまな試薬が収められていたり、綿棒、抽出試薬、発光試薬すべてが 1 本のスティック状の容器にセットされていて、煩わしいピペット操作が不要な試薬システムが開発され、専門的な訓練を受けてい

ない従業員でも手軽に信頼性の高い検査ができるようになっていく。

このような状況の後押しもあって、この新しい清浄度管理手法は食肉関連、練り製品、あるいは日配品製造メーカーなどから導入が始まり、最近ではスーパーマーケットのバックヤードやレストランチェーンの厨房の衛生管理への利用も進んで、まさに清浄度検査のスタンダードとなるきざしが見えてきている。

食中毒事故の多くが洗浄不良による二次汚染であることが分かっているが、迅速な清浄度検査手法が無かったために「清浄度確認」が習慣化されてこなかった。ATP ふき取り検査がさらに普及し、この種の食中毒事故が一掃されることを期待したい。

“化学装置”のバックナンバーはつぎの書店にいつでもご覧になれます。

●東京・日本橋……………丸善本店

☎ 103-0027 東京都中央区日本橋 2-3-10
電話 03(3272)7211

●東京・神田……………三省堂書店 神田本店

☎ 101-0051 東京都千代田区神田神保町 1-1
電話 03(3233)3314

●東京・神田……………書泉グランデ

☎ 101-0051 東京都千代田区神田神保町 1-3
電話 03(3295)0011

●神戸市……………ジュンク堂書店・ブックセンター

☎ 530-0096 神戸市中央区雲井通(サンパル 3F)
電話 078(252)0777

●神戸市……………ジュンク堂書店・三宮店

☎ 650-0021 神戸市中央区三宮町 1-6-18
TEL. 078(392)1001 Fax. 078(392)1024

●大阪市……………旭屋書店本店

☎ 530-0057 大阪市北区曽根崎 2-12-6
電話 06(6313)1191

●京都市……………アバンティ・ブックセンター

☎ 601-8003 京都市南区東九条西山王町 31
電話 075(671)8987

●東京・神田……………書泉ブックタワー 3F

☎ 101-0025 東京都千代田区神田佐久間町 1-11-6
電話 03(5296)0051

●東京・八重洲……………八重洲ブックセンター本店

☎ 104-0028 東京都中央区八重洲 2-5-1
電話 03(3281)1811

●京都市……………ジュンク堂書店京都店

☎ 600-8005 京都市下京区四条柳馬場東入ル立売
東町 20-1
電話 075(252)0101

●大阪・梅田……………紀伊國屋書店梅田店

☎ 530-0012 大阪市北区芝田 1-1-3 阪急三番街
電話 06(6372)5821

●大阪市……………ユーゴ書店

☎ 545-0052 大阪市阿倍野区阿倍野筋 1-3-18
電話 06(6623)2341

＜最近の主要テーマ＞

- | | | |
|--------|-------|---------------------------|
| 1999 年 | 1 月号 | 今、注目される新世代経営パラダイム |
| | 2 月号 | 超臨界流体技術の最前線 |
| | 3 月号 | 新食品製造プロセスと HACCP 対応の現状 |
| | 4 月号 | フレッシュマンのための廃棄物処理技術 |
| | 5 月号 | 粉体技術者の粉体ハンドリング技術 |
| | 6 月号 | ターニングポイントを迎えたコストエンジニアリング |
| | 7 月号 | '99 環境保全技術と新商品 |
| | 8 月号 | 液体清澄化技術と廃水処理技術 |
| | 9 月号 | 化学技術者のための「化学工学系ソフトウェアと利用」 |
| | 10 月号 | 多様化するニーズに応える化学装置 |
| | 11 月号 | 1999 年化学機器・装置の最新情報 |
| | 12 月号 | 配管技術トラブル改善事例集 |
| 2000 年 | 1 月号 | ネットワーク・マニファクチャリング |
| | 2 月号 | 2000 年の食品技術 |
| | 3 月号 | 2000 年の洗浄技術 |
| | 4 月号 | エンジニアリング産業の環境管理 |
| | 5 月号 | 粉体処理におけるトラブルシューティング |
| | 6 月号 | 2000 年のバッチプラントとユニット機器 |
| | 7 月号 | 2000 年の環境保全技術 |
| | 8 月号 | 2000 年の排水処理技術 |
| | 9 月号 | 2000 年の膜分離技術 |
| | 10 月号 | 競争激化する電池材料の製造技術 |
| | 11 月号 | 粉粒体機器・装置の最新技術情報 |
| | 12 月号 | 21 世紀のプラント設備の安全管理 |
| 2001 年 | 1 月号 | 21 世紀の企業イメージ e-エンタープライズ |

●特集内容および書籍につきましては、(株)工業調査会・販売部(Tel. 03(3817)4706)へお問合せ下さい。最寄りの書店にて年間講読をご利用いただくと、毎月確実に入手できます。