

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2014 年 6 月 19 日(19.06.2014)



(10) 国際公開番号
WO 2014/092050 A1

- (51) 国際特許分類:
C12Q 1/42 (2006.01) *C12N 9/16* (2006.01)
C12M 1/34 (2006.01) *C12Q 1/66* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2013/082972
- (22) 国際出願日: 2013 年 12 月 9 日(09.12.2013)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2012-270933 2012 年 12 月 12 日(12.12.2012) JP
- (71) 出願人: 東洋ビーネット株式会社 (TOYO B-NET CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1040031 東京都中央区京橋三丁目 7 番 1 号 Tokyo (JP). 東洋インキ S C ホールディングス株式会社 (TOYO INK SC HOLDINGS CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1048377 東京都中央区京橋三丁目 7 番 1 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 栗田 昭宏 (KURITA, Akihiro); 〒1040031 東京都中央区京橋三丁目 7 番 1 号 東洋ビーネット株式会社内 Tokyo (JP). 山岸 豊 (YAMAGISHI, Yutaka); 〒1040031 東京都中央区京

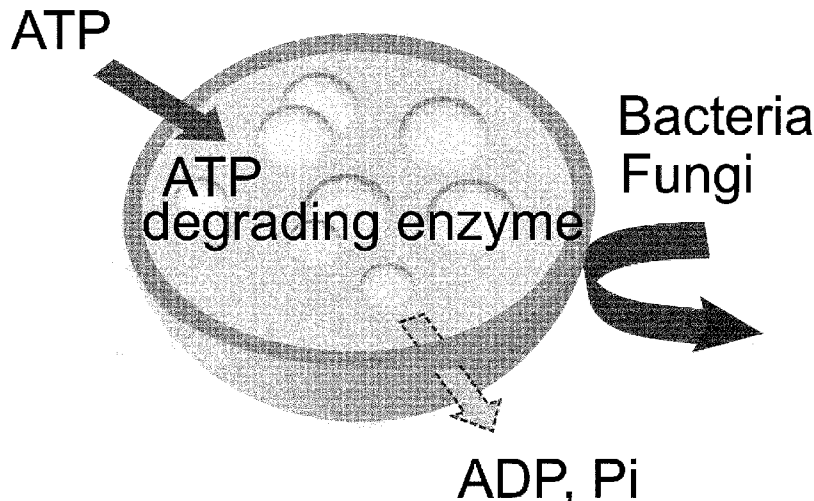
橋三丁目 7 番 1 号 東洋ビーネット株式会社内 Tokyo (JP).

- (74) 代理人: 間山 世津子, 外 (MAYAMA, Setsuko et al.); 〒2210835 神奈川県横浜市神奈川区鶴屋町 3 丁目 30 番の 1 農機会展 4 階 Kanagawa (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT,

[続葉有]

(54) Title: METHOD FOR MEASURING CELL-DERIVED ADENOSINE TRIPHOSPHATE

(54) 発明の名称: 細胞由来のアデノシン三リン酸を測定する方法



(57) Abstract: Provided is a technique for removing cell-derived ATP from a raw material by a simple procedure in a short time, and accurately evaluating microbial contamination at high sensitivity, for the efficient quality control and sampling inspection of food products such as drinks, and other products, containing large amounts of ATP. The method for measuring cell-derived adenosine triphosphate comprises degrading the free adenosine triphosphate in a sample using microcapsules that encapsulate an adenosine triphosphate degrading enzyme, then extracting the adenosine triphosphate from cells present in a microcapsule-free sample, and measuring the extracted adenosine triphosphate.

(57) 要約: ATP を多量に含む飲料などの食品、その他の製品の品質管理・抜き取り検査を効率よく行うため、原料由来の ATP を簡便な操作でかつ短時間で除去し、微生物の混入を高感度かつ正確に判定するための技術を提供する。アデノシン三リン酸分解酵素を内包するマイクロカプセルを用いて、試料中の遊離アデノシン三リン酸を分解した後、マイクロカプセルを含まない試料中に存在する細胞からアデノシン三リン酸を抽出し、抽出されたアデノシン三リン酸を測定することを含む、細胞由来のアデノシン三リン酸を測定する方法。



WO 2014/092050 A1

WO 2014/092050 A1



NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI 添付公開書類:

(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, — 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
MR, NE, SN, TD, TG).

明 細 書

発明の名称：細胞由来のアデノシン三リン酸を測定する方法

技術分野

[0001] 本発明は、細胞由来のアデノシン三リン酸を測定する方法に関し、より詳細には、アデノシン三リン酸分解酵素を内包するマイクロカプセルを用いて、試料中の遊離アデノシン三リン酸を除去した後、試料中に存在する細胞由来のアデノシン三リン酸を検出することを含む、細胞由来のアデノシン三リン酸を測定する方法に関する。

背景技術

[0002] 飲料中の微生物汚染を測定する方法として、寒天培地を用いて2～3日培養し、生じるコロニー数を計測する寒天平板法や、メンブレンフィルターを用いて試料をろ過し、フィルターを寒天培地に貼り付けてフィルター上で培養するメンブレンフィルター法が一般的に用いられている。以上の方法は、測定結果を得るために時間がかかり、工程管理法としては迅速性に欠いている。

[0003] このような問題を解決すべく、ルシフェラーゼを用いた生物発光法が、微生物細胞由来アデノシン三リン酸（以下ATP）の迅速検出法として利用されている。本法は、ルシフェリン、ルシフェラーゼ、ATPの存在下において、ルシフェリンの酸化により生じる発光量がATP量と比例する原理に基づいている。ATPは数ナノモル/Lの濃度で正確に測定することが要求される。さらに、微生物由来のATPを峻別して測定するために、非微生物由来すなわち原料由来のATPを除去する必要がある。従来、非微生物由来のATPを選択的に除去し、微生物由来のATPのみを選択的に高感度に検出する方法に腐心しており、以下の3つの方法が開発されている（特許文献1）。1つ目は、試料に非イオン界面活性剤を作用させ、非微生物細胞由来ATPを抽出後、ろ過して濃縮された微生物細胞ATPを抽出して生物発光によりATP量を見積もる方法である。本法は、ろ過に時間を要し操作も煩雑である。2つ目として、非イオン性界面活性剤を作

用させ、非微生物由来ATPを抽出して遠心分離操作で上清を除去して、微生物細胞を含む沈殿より微生物細胞由来ATPを抽出し生物発光による測定法である。本法は、遠心操作を繰り返すことにより微生物の分離は確実にするが、時間を相当要し、操作回数が増えるごとに微生物細胞の回収が悪くなる。3つ目として、測定試料に非イオン性界面活性剤などを作用させ、非微生物由来ATPを抽出した後、アピラーゼなどのATP加水分解酵素によりこれを分解し、分解完了後アピラーゼをガラスビーズで固定化することにより不動態化する方法がある。しかしこの方法ではアピラーゼの除去あるいは失活が不完全であった場合、微生物細胞由来のATPが残存アピラーゼにより分解されてしまう危険がある。また、その結果、ATPの値のバラツキが大きくなり、10⁶CFU/mL程度しか期待できない。

[0004] このような事情に鑑み、原料由来のATP量が高すぎる茶系飲料や果汁飲料などに混入している微生物由来ATPの測定を短時間かつ高感度に測定する技術の開発が強く望まれていた。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：特公昭62-4120号

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明は、ATPを多量に含む飲料などの食品、その他の製品の品質管理・抜き取り検査を効率よく行うため、原料由来のATPを簡便な操作でかつ短時間で除去し、微生物の混入を高感度かつ正確に判定するための技術を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0007] 発明者らは、これらの問題を解決すべく、鋭意努力した結果、ATP加水分解酵素を包含したマイクロカプセルが上記目的に合致していることを見出した。

[0008] すなわち、半透性を有するマイクロカプセルにATP加水分解酵素を封じ込め、マイクロカプセルの薄膜を通じてカプセル内部に入ったATPを酵素反応により分解する。試料中の原料由来のATPが完全に分解されたらマイクロカプセルを除去し、微生物由来のATPを抽出してその量を生物発光反応により検出することにより、試料由来のATPを簡便な操作でかつ短時間で除去し、微生物の混入を高感度かつ正確に判定できることを見出し、本発明を完成させるに至った（図1）。本発明の方法は、微生物に限らず、動物細胞、植物細胞などの細胞の測定にも利用することができる。

[0009] 本発明の要旨は以下の通りである。

（1）アデノシン三リン酸分解酵素を内包するマイクロカプセルを用いて、試料中の遊離アデノシン三リン酸を分解した後、マイクロカプセルを含まない試料中に存在する細胞からアデノシン三リン酸を抽出し、抽出されたアデノシン三リン酸を測定することを含む、細胞由来のアデノシン三リン酸を測定する方法。

（2）アデノシン三リン酸分解酵素が、アピラーゼ、酸性ホスファターゼ、アルカリホスファターゼ、ヘキソキナーゼ、ヌクレアーゼP及びデアミナーゼからなる群より選択される少なくとも1種の酵素である（1）記載の方法。

（3）マイクロカプセルの被膜が、分子量1000以下のイオンは透過させ、アデノシン三リン酸分解酵素は透過しない半透膜である（1）又は（2）記載の方法。

（4）マイクロカプセルの被膜が、アルギン酸、メトキシペクチン、硫酸セルロース、ゼラチン、キトサン、カラギーナン及びワックスからなる群より選択される少なくとも1種の材料を含む（1）～（3）のいずれかに記載の方法。

（5）1カプセル中のアデノシン三リン酸分解酵素含有量が0.1 ng～1 mgである（1）～（4）のいずれかに記載の方法。

（6）ルシフェリン／ルシフェラーゼ反応により、アデノシン三リン酸を測

定する（１）～（５）のいずれかに記載の方法。

（７） アデノシン三リン酸分解酵素を内包するマイクロカプセルを含む、アデノシン三リン酸測定試薬。

（８） （７） 記載のアデノシン三リン酸測定試薬を含む、アデノシン三リン酸測定キット。

発明の効果

[0010] 本発明により、原料由来のATPを簡便な操作でかつ短時間で除去し、微生物の混入を高感度かつ正確に判定することができるようになった。

本明細書は、本願の優先権の基礎である日本国特許出願、特願2012 - 270933の明細書および／または図面に記載される内容を包含する。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]本発明の概念図。

[図2]マイクロビーズ（ATP消去ビーズ）の外観。

発明を実施するための形態

[0012] 以下、本発明の実施の形態についてより詳細に説明する。

[0013] 本発明は、アデノシン三リン酸分解酵素を内包するマイクロカプセルを用いて、試料中の遊離アデノシン三リン酸を分解した後、マイクロカプセルを含まない試料中に存在する細胞からアデノシン三リン酸を抽出し、抽出されたアデノシン三リン酸を測定することを含む、細胞由来のアデノシン三リン酸を測定する方法を提供する。

[0014] アデノシン三リン酸(ATP)分解酵素としては、アピラーゼ、酸性ホスファターゼ、アルカリホスファターゼ、ヘキソキナーゼ、ヌクレアーゼP、デアミナーゼなどを例示することができるが、これらに限定されることはない。

[0015] マイクロカプセルは、無機顔料として、二酸化チタン、亜鉛華（酸化亜鉛）、酸化鉄、酸化クロム、鉄黒、コバルトブルー、アルミナ白、酸化鉄黄、ビリジアン、硫化亜鉛、リトポン、カドミウムエロー、朱、カドミウムレッド、黄鉛、モリブデートオレンジ、ジンククロメート、ストロンチウムクロメート、ホワイトカーボン、クレイ、タルク、群青、沈降性硫酸バリウム、

バライト粉、炭酸カルシウム、鉛白フェロシアン化物（紺青）、燐酸塩（マンガンバイオレット）、炭素（カーボンブラック）、有機顔料として、ローダミンレーキ、メチルバイオレットレーキ、キノリンエローレーキ、マラカイトグリーンレーキ、アリザリンレーキ、カーミン6B、レーキレットC、ジスアゾエロー、レーキレット4R、クロモフタルエロー3G、クロモフタルスカーレットRN、ニッケルアゾエロー、パーマネントオレンジHL、フタロシアニンブルー、フタロシアニングリーン、フラバンスロンエロー、チオインジゴボルドー、ペリノンレッド、ジオキサドンバイオレット、キナクリドンレッド、ナフトールエローS、ピグロントグリーンB、ルモゲンエロー、シグナルレッド、アルカリブルー、アニリンブラックなどの着色剤、さらに、酵素保護剤として、牛血清アルブミン、ゼラチン、トレハロースなどを内包してもよい。

[0016] マイクロカプセルの被膜は、ATP分解酵素を封じ込め、かつATPを通過させる半透性を有するものであればよく、このような被膜としては、ATP、ADP、AMP、ピロリン酸などの分子量1000以下のイオンは透過させ、ATP分解酵素は透過しない半透膜が適当である。

[0017] マイクロカプセルの平均粒度（ d_{50} ）は、 $10\mu\text{m}$ ～ 1mm が適当であり、 $50\mu\text{m}$ ～ $500\mu\text{m}$ が好ましく、 $100\mu\text{m}$ ～ $300\mu\text{m}$ がより好ましい。粒度分布を表す指標である標準偏差（粒度分布）の値は、1%～300%が適当であり、1%～100%が好ましく、1%～30%がより好ましい。平均粒度と粒度分布は、顕微鏡観察でカプセルの直径を顕微鏡などで実測することにより求めることができる。

マイクロカプセルの比重は、1.0以上が適当であり、1.0～3.0が好ましく、1.0～2.0がより好ましい。比重は、ピペット法（JIS Z8820-2:2004）に従い、測定することができる。

また、1カプセル中のATP分解酵素含有量は、0.1 ng～1 mgであるとよく、好ましくは1 ng～500 μg であり、より好ましくは1 ng～1 μg である。カプセルに内包させるATP分解酵素量は、カプセル形成前の溶液に投入する酵素量により調節が可能である。

- [0018] マイクロカプセルの被膜は、アルギン酸、メトキシペクチン、硫酸セルロース、ゼラチン、キトサン、カラギーナン、ワックスなどの材料を含むとよい。
- [0019] 試料としては、茶系飲料、果実酒、ジュース（果汁飲料、植物系飲料）、サイダー、コーラ、炭酸水、シロップ、コーヒー飲料（ミルク入りを含む）・紅茶飲料（ミルク入りを含む）、滋養飲料、ミネラルウォーター、ビール、清酒、清酒かす、焼酎、合成清酒、ウイスキー、味りん（本直しを含む）、ジン、ウォッカ、ブランデー、薬味酒、リキュール、ラム、老酒、梅酒などの飲料、水産練り製品、肉加工品、乳加工品、野菜加工品、果実加工品、油脂食品、嗜好食品、調味料、菓子類、冷凍食品、レトルト食品、缶詰食品、瓶詰め食品、インスタント食品などの食品を例示することができるが、これらに限定されることはない。
- [0020] ATP分解酵素を内包するマイクロカプセルと試料を混合することにより、試料中の遊離ATPがマイクロカプセル中のATP分解酵素と反応して分解される。反応は、15～45℃の温度で、pH4.0～10.0の条件下で、1～60分間行うとよい。ATPとATP分解酵素の反応は、ATP分解酵素の濃度が1ng/ml～100 mg/mlとなる反応系で行うとよい。反応系に存在するATPの量は、反応系に存在するATP分解酵素で完全に分解する量であればよく、それよりも多い場合には、適当な希釈剤（例えば、トリス緩衝液、HEPES緩衝液、MES緩衝液、TES緩衝液、純水等）で希釈した後、適量の希釈液をATP分解酵素と反応させるとよい。
- [0021] 反応後、試料中に存在する細胞からATPを抽出し、抽出されたATPを検出する。試料は、マイクロカプセルを含まない状態であるとよい。マイクロカプセルを含まない試料としては、例えば、マイクロカプセルをろ過、遠心などの操作により分離した試料、試料中のマイクロカプセルを自然沈殿、凝集沈殿などで沈殿させた上清などを挙げることができるが、これに限定されることはない。あるいは、マイクロカプセル粒子表面の電荷による反応容器への吸着により、マイクロカプセルを試料から分離してもよい。マイクロカプセルの膜表面に電荷を持たせるには、膜表面にアミノ基もしくはカルボキシル

基を付加するとよい。例えば、完成したアルギン酸ビーズ（マイクロカプセル）をアミノ基もしくはカルボキシル基を含む溶液に浸漬することにより電荷が付加されたビーズを得ることができる。アミノ基を含む溶液としては、メチルアミン、ピペリジン、スベルミン、スベルミジン、アニリン、ピリジン、トリエタノールアミン等の物質を含む溶液を例示することができる。カルボキシル基を含む溶液としては、不飽和カルボン酸（リノール酸、オレイン酸等）、ヒドロキシ酸（リンゴ酸、クエン酸等）、芳香族カルボン酸（フタル酸、安息香酸等）、ジカルボン酸（マロン酸、コハク酸）等の物質を含む溶液を例示することができる。あるいはまた、マイクロカプセルに磁性体を含ませることで、磁力による回収により、マイクロカプセルと試料を分離することができる。磁性体の例として、酸化鉄、コバルト、フェライト、酸化クロムなどが挙げられ、これらはビーズ（マイクロカプセル）の内側に封入するとよい。すなわち、酵素・色素（着色剤）・被膜となる物質と一緒にに入れて滴下することで、磁性体をビーズの内側に封入することができる。

試料中に存在する細胞からATPを抽出するには、市販のATP抽出試薬を用いればよい。さらに、細胞から抽出されたATPは、ルシフェリン／ルシフェラーゼ反応により測定することができるが、この方法に限定されるわけではない。ルシフェリン／ルシフェラーゼ反応によるATPの検出は、市販のルシフェリン／ルシフェラーゼ発光試薬（LL発光試薬）を用いて発光させ、その発光をルミノメーターで測定することにより行うことができる。ルシフェリン／ルシフェラーゼ反応はATP量に依存する反応である。ルシフェリンとATPが反応し、アデニル酸ルシフェリンとなり、このアデニル酸ルシフェリンと酸素がルシフェラーゼ酵素の存在下で酸化的脱炭酸反応により分解され、この反応の過程において得られるエネルギーの一部が発光という反応として現れる。この発光を定量することでATPの定量を行うことができる。

[化1]

甲虫ルシフェラーゼ発光反応

ルシフェラーゼ酵素



ルシフェリン／ルシフェラーゼの発光反応系におけるルシフェラーゼの濃度は、 $0.1 \mu\text{g/mL} \sim 100 \mu\text{g/mL}$ が適当であり、好ましくは $1 \mu\text{g/mL} \sim 20 \mu\text{g/mL}$ である。ルシフェラーゼは、甲虫由来のホタル・ルシフェリン、即ち多複素式有機酸D-(1)-2-(6'-ヒドロキシ-2'-ベンゾチアゾリル)- Δ^2 -チアゾリン-4-カルボン酸（以降は特に記載のない限り「ルシフェリン」と表記する）を発光基質とし、これを酸化触媒して光子を発する酵素で、ホタル科を始め、コメツキ科、ホタルモドキ科、イリオモテボタル科など甲虫由来で発光反応に与る酵素全てを含む。この中には組換えDNA技術や変異技術などにより、酵素タンパク自体の安定性や発光特性などが人為的に改変された酵素も含まれる。また、ルシフェリンの濃度は、 $0.001 \text{ mM} \sim 100 \text{ mM}$ が適当であり、好ましくは $0.01 \text{ mM} \sim 10 \text{ mM}$ である。ルシフェリンは、甲虫由来のホタル・ルシフェリン（甲虫ルシフェリン）、即ち多複素式有機酸D-(1)-2-(6'-ヒドロキシ-2'-ベンゾチアゾリル)- Δ^2 -チアゾリン-4-カルボン酸）であるとして、甲虫より直接抽出および精製されたものや、化学合成されたものを含む。さらには甲虫ルシフェリンの誘導体で、ある酵素の消化を受けた後に発光活性を持つ発光基質も含まれる。このような甲虫ルシフェリンの誘導体としては、4-メチル-D-ルシフェリン、D-ルシフェニル-L-メチオニン、6-O-ガラクトピラノシル-ルシフェリン、DEV D-ルシフェリン、ルシフェリン-6'-メチルエステル、ルシフェリン6'-クロロエチルエステル、6'-デオキシルシフェリン、ルシフェリン6'-ベンジルエステルなどを挙げることができる。ルシフェリンおよびその誘導体は塩の形態であってもよい。塩としては、カリウム塩、ナトリウム塩などを挙げることができる。

[0022] 本発明の方法により、細胞由来のATPの定量、細胞の定量（生きている細胞の定量、既知の細胞であれば、高感度かつ正確に定量ができ、未知の細胞についても検出が可能）などができる。細胞は、微生物細胞、動物細胞、植物細胞などいかなる細胞であってもよい。本発明の方法は、食品衛生管理などで要求される微生物の検出・定量、洗浄度合の検査などに利用することができる。例えば、ルシフェリン／ルシフェラーゼ反応を利用することにより、 10^{-16} molesのATPの検出が可能となり、細菌では約 10^3 個、酵母や真菌では数十個といった高感度の検出が可能となる。さらに、ATP除去から発光量測定/判定までに要する時間が1時間以内といった迅速な測定が可能となる。

[0023] また、本発明は、ATP分解酵素を内包するマイクロカプセルを提供する。

[0024] マイクロカプセルは、無機顔料として、二酸化チタン、亜鉛華（酸化亜鉛）、酸化鉄、酸化クロム、鉄黒、コバルトブルー、アルミナ白、酸化鉄黄、ビリジアン、硫化亜鉛、リトポン、カドミウムエロー、朱、カドミウムレッド、黄鉛、モリブデートオレンジ、ジンククロメート、ストロンチウムクロメート、ホワイトカーボン、クレイ、タルク、群青、沈降性硫酸バリウム、バライト粉、炭酸カルシウム、鉛白フェロシアン化物（紺青）、燐酸塩（マンガンバイオレット）、炭素（カーボンブラック）、有機顔料として、ローダミンレーキ、メチルバイオレットレーキ、キノリンエローレーキ、マラカイトグリーンレーキ、アリザリンレーキ、カーミン6B、レーキレットC、ジスアゾエロー、レーキレット4R、クロモフタルエロー3G、クロモフタルスカーレットRN、ニッケルアゾエロー、パーマネントオレンジHL、フタロシアニンブルー、フタロシアニングリーン、フラバンスロンエロー、チオインジゴボルドー、ペリノンレッド、ジオキサドンバイオレット、キナクリドンレッド、ナフトールエローS、ピグロントグリーンB、ルモゲンエロー、シグナルレッド、アルカリブルー、アニリンブラックなどの着色剤、酵素保護剤として、牛血清アルブミン、ゼラチン、トレハロースなどを内包してもよい。

[0025] マイクロカプセルの材質、物性などについては上述した。

[0026] ATP分解酵素を内包するマイクロカプセルは、相分離法、液中乾燥法、融解

分散冷却法、スプレードライ法、パンコーティング法、界面重合法、in situ 重合法、液中硬化被覆法など公知のいかなる方法で製造してもよい。

[0027] ATP分解酵素を内包するマイクロカプセルを用いて、ATPを分解除去することができる。このマイクロカプセルにより、飲料中の原料由来のATPを除去し、その後に、試料中に存在する微生物などの細胞由来のATPを抽出し、測定することにより、試料中の細胞由来のATPを測定することができる。従って、本発明は、ATP分解酵素を内包するマイクロカプセルを含む、ATP測定試薬を提供する。

[0028] 本発明のATP測定試薬において、ATP分解酵素内包カプセルは、凍結乾燥品、懸濁液（カプセル浮遊液）などのいかなる形態で包含されてもよい。懸濁液とする場合には、カプセルを適当な溶媒（例えば、トリス緩衝液、HEPES緩衝液、MES緩衝液、TES緩衝液、純水等）に分散させるとよい。

[0029] 本発明のATP測定試薬には、さらに、pH調整剤、酸化防止剤、保存料、防かび剤などを含めてもよい。

[0030] 本発明のATP測定試薬は、ATPの測定、例えば、試料中に存在する細胞由来のATPの測定に利用することができる（上述）。従って、本発明は、上記のATP測定試薬を含む、ATP測定キットを提供する。

[0031] 本発明のATP測定キットには、さらに、ルシフェリン/ルシフェラーゼ発光試薬、発光試薬溶解液、ATP抽出剤、ATP標準試薬、発光量とATP量を対応づける検量線、取扱い説明書、ATP量を換算するソフトウェアなどを含めてもよい。

実施例

[0032] 以下、実施例に基づいて本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

〔実施例1〕

I. ATP消去ビーズの調製方法

1. アピラーゼジャガイモ由来GradeIII（シグマ・アルドリッジ社）1.1 ml、アルギン酸ナトリウム（和光純薬）2 g、顔料インキ（グラフテック社

インクペン用水性顔料インク青) 200 μ lを純水200 mlに溶解した。

2. 溶解液をマイクロビーズ作製装置 (日本ビュッヒ社 Encapsulator B-390) にセットした。

3. マイクロビーズ作製装置に直径約150 μ mの液滴を生成させた。

4. 液滴を2%塩化カルシウム溶液中に滴下した。

5. 表面がゲル化した、アピラーゼおよび顔料インキを含んだマイクロビーズを0.2 μ m孔径のフィルター (ナルゲン フィルターユニット) を用いてろ過した。

6. フィルター上のろ物 (マイクロカプセル) を10 mM HEPESバッファーで洗浄した。

7. マイクロカプセルを適当量の10 mM HEPESバッファーに再懸濁した。

8. 上記操作で得られた上清100 μ lに 10^{-7} mole/lのATP標準液 (東洋ビーネット社) 10 μ lを混合し、30分間反応させた。その後、LL発光試薬 (菌士郎ATP発光試薬 LL100-1 東洋ビーネット社) 100 μ lを混合し30秒間反応させた後、その発光をルミノメーター (LB9507 ベルトールド社) で測定した。なお、測定の積算時間は10秒間とした。本操作により得られた結果と純水100 μ lに 10^{-7} mole/lのATP標準液1 μ lを添加したものの発光量を測定した結果を比較し、上清液の発光量が純水の発光量に対して95%以上であることを確認し、マイクロカプセル芯剤に含有されなかったアピラーゼが存在していないことを証明した。上清液とマイクロビーズ (ATP消去ビーズ) の外観を図2に示す。

マイクロビーズの物性値は、以下の通りである。

・平均粒度 : 155.2 μ m

・粒度分布 : 16.4%

(顕微鏡観察 (倍率40) でカプセルの直径を実測して、平均粒度と粒度分布を決定した。1回の観察で100粒測定し、それを3回繰り返した。平均粒度は300粒の平均値、粒度分布はその標準偏差で示す。)

・比重 : 1.6 (ピペット法 (JIS Z8820-2:2004) に従い測定した。)

・1カプセル中のアピラーゼ含有量 : 11.6 ng (直径150 μ mのカプセルの内側

に含まれる液量は約1.8 μ lであるので、本実験の条件では11.6 ngの酵素が含まれていると計算される。尚、カプセルに内包させる酵素量は、カプセル形成前の溶液に投入する酵素量により調節が可能である。本実験では、200mlの溶液に1.1mgのアピラーゼを混合したが、例えば、110mgのアピラーゼを混合した場合は、内包酵素量は110ngと推定される。>

[0033] II. ATP消去ビーズ 洗浄操作の必要性

I. (ATP消去ビーズの調製方法) の7. のマイクロカプセル懸濁液 (表1では、「マイクロカプセル含有液」と表示) とIの8. の上清液の各々100 μ lに 10^{-7} mole/lのATP標準液 (東洋ビーネット社) 10 μ lを混合し、30分間反応させた。その後、LL発光試薬 (菌士郎ATP発光試薬 LL100-1 東洋ビーネット社) 100 μ lを混合し30秒間反応させた後、その発光をルミノメーター (LB9507 ベルトールド社) で測定した。なお、測定の積算時間は10秒間とした。結果を表1にまとめた (表1の「洗浄操作あり」)

また、I. (ATP消去ビーズの調製方法) の5. 6. 7を省略した場合についても、同様の測定を行い、結果を表1にまとめた (表1の「未洗浄」)。

「未洗浄」の場合、上清液にマイクロカプセルに包摂されなかったと考えられるアピラーゼが残存し、これがATPを分解した結果、本来得られるはずである発光量を2桁下げていると考えられる。このことは、本来の目的物である抽出した微生物由来のATPが上清液に残存しているアピラーゼにより分解されてしまう可能性を示唆する。このため、マイクロカプセルをろ過にて回収後HEPESバッファーで洗浄する操作により、未包摂アピラーゼを除去することが好ましいと考えられる。なお、表1におけるマイクロカプセル含有液はカプセル中にアピラーゼを含んでいるのでATP分解活性がある。

[0034] 対照区は、HEPESバッファー100 μ lに 10^{-7} mole/lのATP標準液 (東洋ビーネット社) 10 μ lを混合し、30分間反応させた。その後、LL発光試薬 (菌士郎ATP発光試薬 LL100-1 東洋ビーネット社) 100 μ lを混合し30秒間反応させた後、その発光をルミノメーター (LB9507 ベルトールド社) で測定した (測定の積算時間は10秒間)。

[0035] [表1]

	未洗浄	洗浄操作あり
上清液	6,650	672,326
マイクロカプセル含有液	323	291

対照区：バッファーのみ添加 672,326

単位：RLU / 10 秒

[0036] III. サンプル中のATP消去・サンプル中の微生物由来ATP量の測定方法（一例）

1. 検体（緑茶・ジュース・ATP標準サンプルなど）200 μ lとマイクロビーズ含有液200 μ lを混合し、室温で30分間放置した。この間にマイクロビーズが沈殿した。
2. 反応後、上清100 μ lを分取し、等量のATP抽出試薬（菌士郎ATP抽出試薬 LL100-2 東洋ビーネット社）を添加した。30秒間反応させた。
3. 上記2の反応液に200 μ lのLL発光試薬（菌士郎ATP発光試薬 LL100-1 東洋ビーネット社）を添加し、その発光をルミノメーターで測定した。

[0037] IV. ビーズ処理による緑茶中のATP分解の経時変化

IIIの測定結果（検体：緑茶）を下記の表2に示す。

[0038] [表2]

処理時間（分）	本法（マイクロカプセル法）	従来法（除去試薬法）
0	663,075	636,250
10	151,564	582,178
15	5,921	425,897
30	522	391,128
60	371	56,854

発光量（RLU / 10 秒）

[0039] 緑茶に含まれているATPをマイクロカプセル法および従来法（菌士郎ATP測定キット（東洋ビーネット）の手順に従う方法）により分解を試みた。マイクロカプセル法は、緑茶200 μ lに対して200 μ lのマイクロカプセル液を添加し、表2における処理時間、室温下に静置した。時間経過後、100 μ lのサンプル液を分取して等量100 μ lのATP発光試薬（東洋ビーネット）を添加し

てその発光量を測定した。従来法においては、緑茶200 μ lに対してATP除去試薬（東洋ビーネット）200 μ lを添加して表2の処理時間室温下に静置した。経過後、100 μ lのサンプルを分取、100 μ lのATP発光試薬（東洋ビーネット）を添加して発光量を測定した。マイクロカプセル法では、30分の処理でバックグラウンドレベルまで発光量を低減できているので緑茶由来ATPの分解が完了しているのに対し、従来法では60分の処理でも発光が確認されるため、ATPの除去が不十分であると考えられる。

[0040] V. 検体（緑茶）中の大腸菌検出例

検体（緑茶）1 mlに大腸菌 5×10^5 個を混入してその存在をATP量の変化で検出した結果を下記の表3に示す。

[0041] マイクロカプセル法の微生物混入試験では、大腸菌を混入緑茶飲料200 μ lをチューブに分取し、200 μ lのアピラーゼ含有マイクロカプセル懸濁液200 μ lと混合して室温下30分間静置した。上澄み液100 μ lを、マイクロカプセルが混入しないよう注意して回収した。次に、回収した溶液に対して等量である100 μ lのATP抽出試薬（菌士郎ATP抽出試薬LL100-2 東洋ビーネット）を添加して10秒間微生物からのATP抽出処理を行った。抽出されたATPの定量を行うため、200 mlのATP発光試薬（菌士郎 ATP発光試薬 LL100-1）を加え、ルミノメーター（LB9507 ベルトールド社）にチューブをセットして10秒間の積算発光量を得た。

[0042] 従来法は菌士郎ATP測定キットの手順に従った。すなわち、大腸菌を混入緑茶飲料200 μ lをチューブに分取し、200 μ lのATP除去試薬（菌士郎ATP除去試薬 LL100-3）と混合して室温下30分間静置した。上澄み液100 μ lを回収し、その溶液に対して等量である100 μ lのATP抽出試薬（菌士郎ATP抽出試薬LL100-2 東洋ビーネット）を添加して10秒間微生物からのATP抽出処理を行った。抽出されたATPの定量を行うため、200 mlのATP発光試薬（菌士郎 ATP発光試薬 LL100-1）を加え、ルミノメーター（LB9507 ベルトールド社）にチューブをセットして10秒間の積算発光量を得た。

[0043]

[表3]

サンプル名	本法（マイクロカプセル法）	従来法（除去試薬法）
緑茶（菌混入なし）	641	332,453
緑茶（大腸菌混入）	125,829	381,196

発光量（RLU / 10 秒）

[0044] 従来法では大腸菌混入サンプルと無菌サンプル（菌混入なし）との発光量の差が、桁が変わらずわずかで、微生物由来のATPの有無の判断が困難となっている。対して、マイクロカプセル法では緑茶由来のATPを高効率で消去できるため、大腸菌から抽出されたと考えられるATP由来の生物発光がバックグラウンドレベル（無菌サンプルの発光量）と比べ200倍であった。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

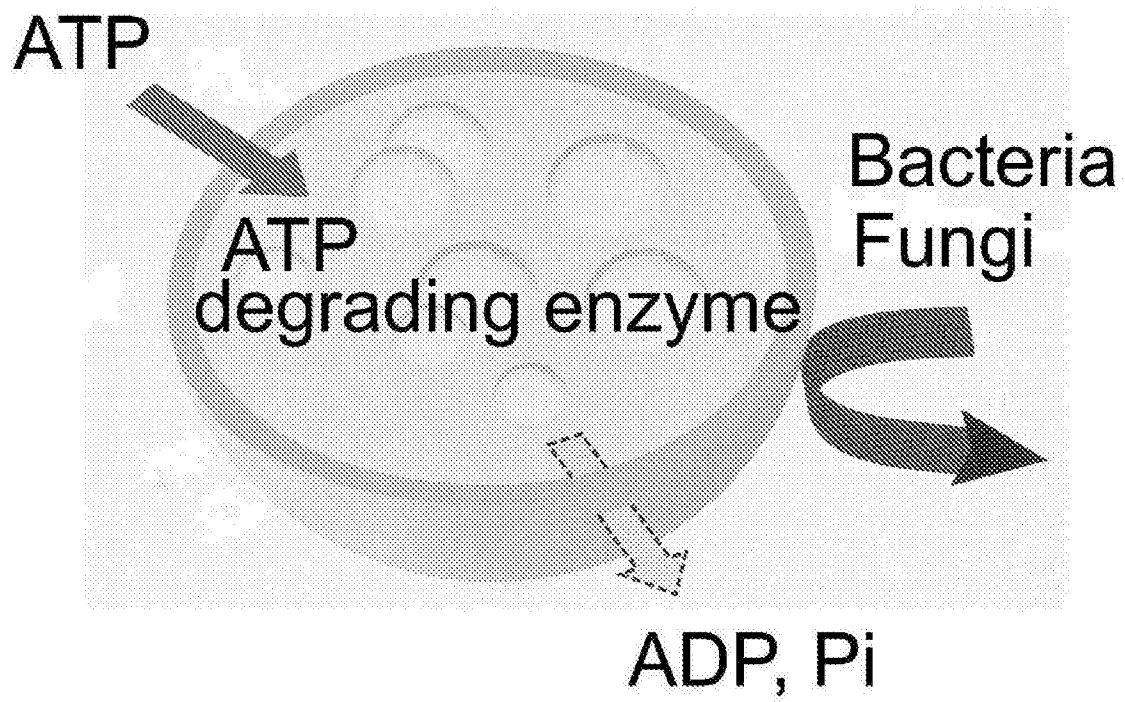
産業上の利用可能性

[0045] 本発明は、飲料などの食品中の微生物汚染の測定に用いることができる。

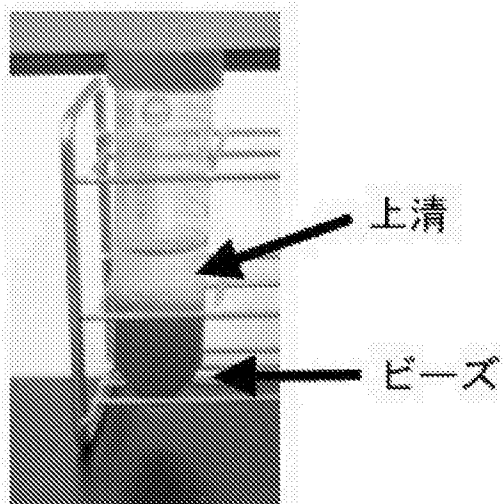
請求の範囲

- [請求項1] アデノシン三リン酸分解酵素を内包するマイクロカプセルを用いて、試料中の遊離アデノシン三リン酸を分解した後、マイクロカプセルを含まない試料中に存在する細胞からアデノシン三リン酸を抽出し、抽出されたアデノシン三リン酸を測定することを含む、細胞由来のアデノシン三リン酸を測定する方法。
- [請求項2] アデノシン三リン酸分解酵素が、アピラーゼ、酸性ホスファターゼ、アルカリホスファターゼ、ヘキソキナーゼ、ヌクレアーゼP及びデアミナーゼからなる群より選択される少なくとも1種の酵素である請求項1記載の方法。
- [請求項3] マイクロカプセルの被膜が、分子量1000以下のイオンは透過させ、アデノシン三リン酸分解酵素は透過しない半透膜である請求項1又は2記載の方法。
- [請求項4] マイクロカプセルの被膜が、アルギン酸、メトキシペクチン、硫酸セルロース、ゼラチン、キトサン、カラギーナン及びワックスからなる群より選択される少なくとも1種の材料を含む請求項1～3のいずれかに記載の方法。
- [請求項5] 1カプセル中のアデノシン三リン酸分解酵素含有量が0.1 ng～1 mgである請求項1～4のいずれかに記載の方法。
- [請求項6] ルシフェリン／ルシフェラーゼ反応により、アデノシン三リン酸を測定する請求項1～5のいずれかに記載の方法。
- [請求項7] アデノシン三リン酸分解酵素を内包するマイクロカプセルを含む、アデノシン三リン酸測定試薬。
- [請求項8] 請求項7記載のアデノシン三リン酸測定試薬を含む、アデノシン三リン酸測定キット。

[図1]



[図2]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/082972

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q1/42(2006.01)i, C12M1/34(2006.01)i, C12N9/16(2006.01)i, C12Q1/66(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q1/00-1/70, C12M1/34, C12N9/00-9/99, C12N11/00-11/18

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2013
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2013	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2013

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS/WPIX (STN),
JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580(JDREAMIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 61-056076 A (Director General, Agency of Industrial Science and Technology), 20 March 1986 (20.03.1986), (Family: none)	1-8
A	JP 2003-210197 A (Unitika Ltd.), 29 July 2003 (29.07.2003), (Family: none)	1-8
A	JP 2009-178091 A (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology), 13 August 2009 (13.08.2009), (Family: none)	1-8

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
17 December, 2013 (17.12.13)

Date of mailing of the international search report
07 January, 2014 (07.01.14)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C12Q1/42(2006.01)i, C12M1/34(2006.01)i, C12N9/16(2006.01)i, C12Q1/66(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C12Q1/00-1/70, C12M1/34, C12N9/00-9/99, C12N11/00-11/18

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 3 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 3 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 3 年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS/WPIX (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	JP 61-056076 A（工業技術院長）1986.03.20 （ファミリーなし）	1-8
A	JP 2003-210197 A（ユニチカ株式会社）2003.07.29 （ファミリーなし）	1-8
A	JP 2009-178091 A（独立行政法人産業技術総合研究所）2009.08.13 （ファミリーなし）	1-8

☐ C 欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

1 7 . 1 2 . 2 0 1 3

国際調査報告の発送日

0 7 . 0 1 . 2 0 1 4

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（I S A / J P）

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

三原 健治

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8

4 B

2 9 3 7