

審査の結果の要旨

氏名 榊原 達哉

医薬品原材料や医薬品のみならず、食品・飲料の品質管理において、微生物検査法は必須の分析法である。従来、迅速な微生物検出法としてホタルルシフェラーゼを利用する菌体内 ATP の発光検出法（ATP 法）が知られているが、試料由来の菌体外 ATP がバックグラウンドノイズとなるため、シグナルノイズ比が低く、微生物を高感度検出できないという欠点が残されていた。また、飲料などの濾過性のよい試料に適用される RMDS 法（メンブレンフィルター上に捕捉した微生物を CCD カメラで検出する手法）においては、ATP 発光試薬の積算発光量が低く、メンブレンフィルター上の微生物を培養して微小なコロニーを形成させてから測定する必要があり、迅速性に欠けていた。

榊原達哉氏は上記の状況を考慮し、菌数を無培養条件下で高感度かつ迅速に定量する微生物検出法の確立を目的として、

①ATP 法による菌数定量の高感度化、②RMDS 法による無培養状態での菌数定量について、研究を行った。

①において、同氏は、ATP 法による菌数定量の高感度化のためには菌体外 ATP を完全に消去し、バックグラウンド発光を低減させることでシグナル-ノイズ (SN) 比を向上させ、高感度化を図ることができると考えた。様々な ATP 分解酵素を探索した結果、ATP、ADP、AMP 等のアデニンヌクレオチド類からの脱アミノ化反応を触媒するアデノシンリン酸デアミナーゼ及び ATP、ADP、ITP、IDP 等からの脱リン酸化反応を触媒するアピラーゼに着目し、両酵素を併用する新規 ATP 消去法を確立した。これを用いることで、バックグラウンド発光量を従来法の 1% 以下にまで低減させることに成功し、ATP 法による菌数定量の高感度化を達成した。

②において、同氏はピルビン酸オルトリン酸ジキナーゼ (PPDK ; AMP、ピロリン酸及びホスホエノールピルビン酸より、ATP、ピルビン酸及びリン酸の生成を触媒する酵素) に着目した。従来の RMDS 法にてホタルルシフェラーゼにより消費された ATP から生じる AMP 及びピロリン酸を、再び ATP に変換する新規なサイクリング系を構築すれば (PPDK-RMDS 法)、従来法よりも高い積算発光量が得られると考えた。そこで、PPDK とホタルルシフェラーゼを組み合わせた発光試薬 (PPDK 発光試薬) を調製し、ATP (5.0×10^{-15} mol) に適用した結果、高い発光量が安定して持続でき、従来の RMDS 法に比べて約 40 倍の高感度化が達成された。本 PPDK-RMDS 法は AMP も同時測定が可能であった。

PPDK-RMDS 法を、無培養条件下での各種微生物検出に適用したところ、いずれも輝点として計数することができ、また、操作にかかる時間を含めても 30 分以内で検出でき、測定の迅速化も達成した。

次いで、同氏は栄養源（糖）を含まない試料（医薬品製造における原料水中菌数測定等）へ PPDK-RMDS 法の適用を試みたところ、本法では糖非存在下のサンプルでも、微生物を十分に検出することができた。その原因を調べるために、同氏は、各アデニンヌクレオチド (AMP、ADP、ATP) の分別定量が可能な新規発光系を開発し、糖の有無による微生物中のアデニンヌクレオチド組成を調べた。その結果、糖非存在下では ATP の割合が数%と極端に少なくなる微生物もあったが、菌体内 ATP 及び AMP の合計量は、糖の有無に関らず総アデニンヌクレオチドの約 80%以上を占めていた。したがって、ATP とともに AMP を測定する本 PPDK-RMDS 法

によって、栄養源（糖）が存在しない条件下においても微生物検出が可能になったことが判明し、本法が十分に実用に供し得る微生物検出法であることが明らかとなった。

以上のように、榊原達哉氏は、従来のホタルルシフェラーゼを用いる ATP 発光検出法（ATP 法）を一層高感度化し、また、ATP のみならず AMP も同時検出できる実用に耐えうる迅速かつ高感度な微生物検出法を開発した。これら一連の研究は、生物発光を利用する高感度検出法の実用性を高めるものであり、分析化学の進展に寄与すると考えられ、博士（薬学）の学位をうけるに値すると判断した。