

総合論文

生物発光式エンドトキシン検出法の開発 及び透析液測定への応用

八幡 悟史¹, 野田 健一¹, 下村 亜依¹, 小田 侑¹,
荒川 智¹, 八谷 宏光^{*1}, 黒田 章夫²

従来のエンドトキシン検出法では、分析時間が長い、感度が不足などの問題点が存在していた。これらを解消すべく、新規な測定原理である生物発光式エンドトキシン検出法を開発した。高輝度ルシフェラーゼを用いた生物発光法とライセート反応を融合して、15 分間測定で検出下限: 0.0005 EU mL⁻¹ を実現した。透析液中塩化ナトリウム (NaCl) でも感度が減少しない耐塩性ルシフェラーゼを開発し、透析液測定用エンドトキシン計へ応用した。20 分間測定で検出下限: 0.0003 EU mL⁻¹ であり、他の諸特性を含めて、透析液測定に有用であることを確認した。耐熱性ルシフェラーゼも開発し、1 段階反応型エンドトキシン計を開発した。10 分間測定で検出下限: 0.001 EU mL⁻¹ であり、より迅速なエンドトキシン検出が可能となった。透析液測定に有用な新規エンドトキシン検出法であり、優れた特徴から透析液測定現場へ急激に普及している。

1 緒 言

エンドトキシン (endotoxin, ET) はグラム陰性菌の細胞壁に存在し、菌が死んだ際に溶液中に放出されて作用する内毒素であり、LPS (lipopolysaccharide) と呼ばれることもある。体内に入ると発熱やショック症状を引き起こすことがあるため、日本薬局方¹⁾をはじめとする国内外の薬局方、透析液水質基準²⁾などで管理基準値が定められており、製薬用水、各種医薬品、透析液などの ET 濃度が問題ないレベルであるように管理されてきている。

グラム陰性菌表層部の構造を Fig. 1 に示した。死菌となって外膜が破れて ET が液中に放出され、毒素として作用して前述の症状を発現させている。

ET 検出は、以前には試料をウサギに注射した際の発熱具合から有無を判断していたこともあったが、現在は、カプトガニの血液製剤であるライセート試薬と ET とのライセート反応を用いた検出法が使用されている。従来から、ゲル化法、比濁法、比色法の 3 法が用いられており、分析装置化されている比濁法や比色法での測定が一般的であった。しかし、これらの検出法では、分析時間が非常に長い、定量下限値が透析液測定での管理基準値である 0.001 EU mL⁻¹ (EU: endotoxin unit) 未満に対応できていないなどの問題点があった。透析治療現場では、病院で調製した透

析液の ET 濃度を確かめるのが透析治療開始後ということも少なくない状態であった。加えて、近年ではオンライン HDF 治療が普及してきており、透析液中の ET 濃度をより低濃度で管理することの必要性がさらに高まってきている。このような状況から、より迅速で高感度な新たな ET 検出方法及び検出装置の出現が長年にわたって待望されていた。

これらに対応すべく、迅速で高感度な検出が期待できる生物発光法に基づいた ET 検出方法及び検出装置を開発した。高輝度ルシフェラーゼ³⁾⁴⁾を用いた生物発光法とライセート反応を融合した新 ET 検出法⁵⁾⁶⁾である。

2 従来のエンドトキシン検出法と問題点

2・1 エンドトキシン検出法

本法を含む各種エンドトキシン検出法の測定原理を、Fig. 2 へ示した。いずれも ET とカプトガニ血液製剤とのライセート反応に基づいた方法であり、結果判定で用いる検出方法がそれぞれで異なっている。

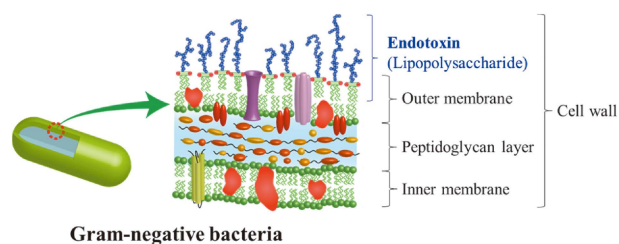


Fig. 1 Surface area of Gram-negative bacteria

* E-mail: hachiya@toadkk.co.jp

¹ 東亜ディーケーケー株式会社: 350-1388 埼玉県狭山市北入曾 613

² 広島大学大学院統合生命科学研究科: 739-8530 広島県東広島市鏡山 1-3-1

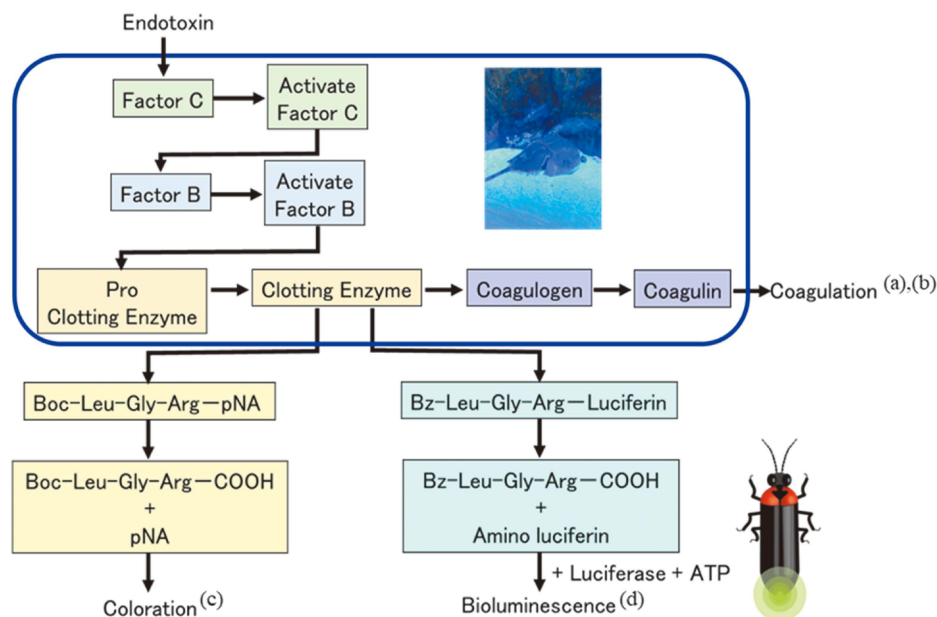


Fig. 2 Principle of endotoxin measurement using Lysate reagent (encircled in blue)

(a) Coagulation (gel-clot method): If a clot is apparent on inversion of the tube after 37 °C for one hour, the result is positive. (b) Coagulation (turbidimetric method): The amount of gel resulted from the cleavage of coagulogen is optically measured. (c) Coloration (colorimetric method): pNA produced from the cleavage of substrate by clotting enzyme is optically measured. (d) Luminescence (bioluminescence method): D-luciferin produced from the cleavage of substrate by clotting enzyme is measured.

Table 1 Comparison of reaction time and detection limit in endotoxin detection methods⁵⁾

Method	Reaction Time /min	Detection Limit /EU mL ⁻¹
End-point turbidimetric	15	0.01
End-point chromogenic	15	0.1
End-point chromogenic (Long reaction time)	30	0.01
Turbidimetric kinetic	138	0.0005
Kinetic chromogenic	90	0.002
Bioluminescence (This method)	15	0.0005

(a) ゲル化法と (b) 比濁法では凝固反応を使用しており、ゲル化法は 37 °C で 1 時間静置後に凝固するか否かによって、比濁法は濁度変化を光学検出することによって判定している。(b) 比色法は、*p*-ニトロアニリンの離脱反応による色変化を光学検出して判定している。

本報で報告する (c) 生物発光法は、ET 存在時に離脱するルシフェリンとルシフェラーゼとの反応による発光現象を利用している。発光検出法は光学測定法の中でも高感度検出が期待できる検出法であり、本法の高感度へ貢献していると考えられる。

2・2 従来法での問題点

ゲル化法、比濁法、比色法の従来法では、定量下限値が高いゲル化法を使用できる用途は限定的であり、比濁法か比色法で測定することが多くなっていた。

Table 1 に、従来法である比濁法と比色法、及び本報で報告する生物発光法の反応時間と検出下限を示した。

比濁法と比色法は、透析液測定で要求される 0.001 EU mL⁻¹ 以下の感度を得るのにかなりの長時間が必要であり、改善しなければいけない重要課題として存在していた。

3 生物発光式エンドトキシン検出法の開発

従来法での重要課題を解決すべく、ET とカプトガニ血液製剤とのライセート反応へ高輝度ルシフェラーゼを用いる生物発光法を融合させた生物発光式 ET 検出法を開発した。

3・1 高輝度ルシフェラーゼ

高感度化を目指し、Fig. 3 に示した高輝度ルシフェラーゼ FM を用いた。PCR 時の複製エラーによるランダム変異を利用するエラープローン PCR 法を用いて作製し、ルシフェラーゼ DNA の 423, 436 及び 530 部位を変異させた 3 重変異体が、天然ルシフェラーゼの 12 倍以上の発光量を呈することを見いだした。この変異体を高輝度ルシフェラーゼ FM とした (Fig. 4)。

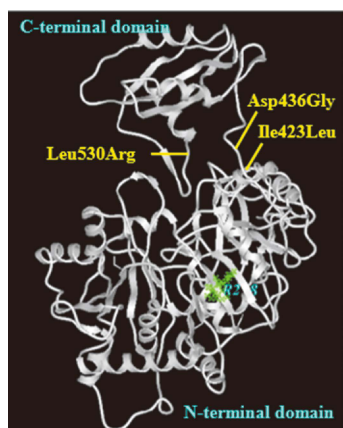


Fig. 3 The three-dimensional structure of North American firefly luciferase and amino acid substitution positions of high-luminescence mutants³⁾

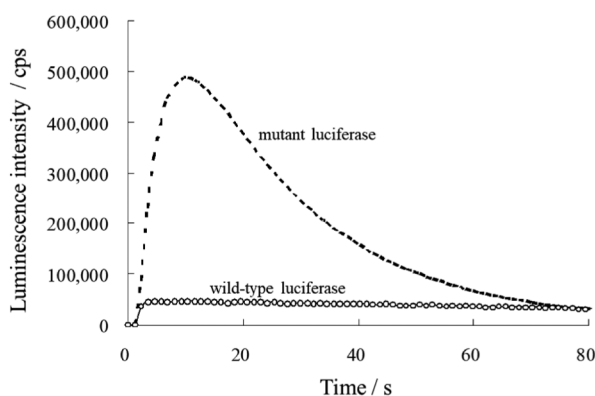


Fig. 4 Time-course changes of bioluminescence intensities of mutant luciferase FM and wild-type luciferase⁴⁾

Reactions contained 100 μL of luciferase (0.25 mg mL^{-1}) and 100 μL of substrate (10^{-8} mol ATP and 10^{-9} mol D-luciferine), both in tris/HCl buffer.

3.2 生物発光式エンドトキシン検出法の開発

新規開発した生物発光式 ET 検出法の測定原理を, Fig. 2 に (d) 反応系として示した. ライセート反応の最終判定で使用する検出に生物発光法を用いるのが特徴である.

Fig. 5 に, 反応時間: 15 分間, 反応温度: 37°C の条件でライセート反応を行った後に, 生物発光法及び比色法で ET 標準液を測定して得た検量線を示した. いずれもライセート反応を手分析で測定した結果であり, 生物発光法が測定時間: 15 分間で検出下限: $0.0005 \text{ EU mL}^{-1}$ と非常に優れた ET 検出法であることを確認できた. 一方, 比較検討した比色法は検出下限: 0.01 EU mL^{-1} であった. 本法が, 迅速で高感度な高性能な ET 検出法であることを確認できた.

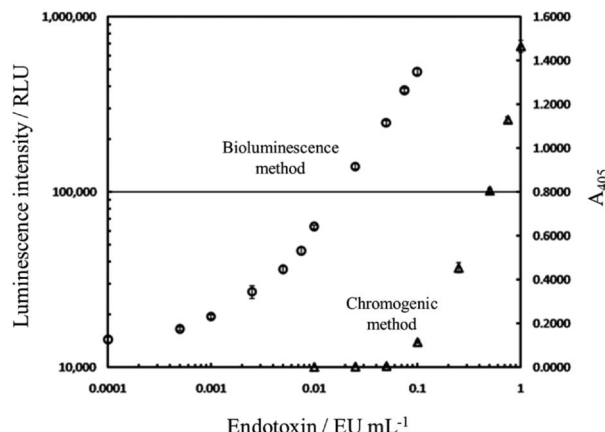


Fig. 5 Comparison of endotoxin detection curves by bioluminescence and chromogenic methods⁵⁾

4 透析液中エンドトキシン検出への応用

高性能な生物発光式 ET 検出法を開発できたことから, 実用化第一弾として透析液中 ET 検出への応用を検討した.

透析液中には生物発光量へ影響を及ぼす NaCl が含まれており, 問題ない程度までその影響を軽減する対策が必要であった. はじめに耐塩性を呈する変異体ルシフェラーゼ CR⁷⁾を開発し, それに続いて, 耐塩性ルシフェラーゼ CR を用いた生物発光式 ET 検出法⁸⁾に基づく分析装置を開発し, 透析液中 ET 検出への応用を検討した.

第三者機関が行われた評価試験でも十分に良好な性能であることが証明され, 迅速で高感度な新たな ET 検出装置として透析治療現場で広く使用され始めている.

4.1 透析液測定への課題

生物発光量は, 溶液中塩化物イオン (Cl^-) によって影響されることが多い. Fig. 6 に, 野生型ルシフェラーゼの活性がさまざまな溶液によってどのように変化するかを相対的生物発光量として示した. 酢酸ナトリウム (CH_3COONa) 溶液では濃度が高くなっても生物発光量への影響はほとんどなかったが, それ以外の Cl^- を含む 4 種類の溶液では生物発光量への影響が大きく, 濃度が高くなるほどその影響は甚大であった.

透析液には 140 mmol L^{-1} NaCl が含まれている. 生物発光式 ET 検出法へ影響を及ぼす可能性があるために, Fig. 7 にて前述の変異型ルシフェラーゼ FM を用いた場合の生物発光量と溶液中 NaCl 濃度との関係を調べた. その結果, NaCl 濃度が高くなるほど生物発光量の減少が大きくなり, 透析液と同じ 140 mmol L^{-1} NaCl では生物発光量が Cl^- を含まない場合の半分程度まで減少することを確認した.

透析液測定へ応用するためには対策を講じなければいけ

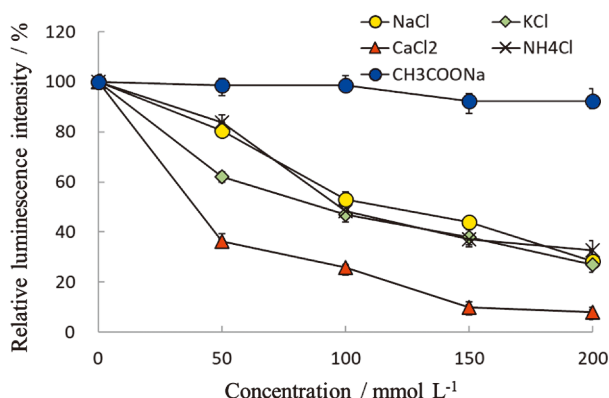


Fig. 6 Effects of various concentrations of sodium chloride, potassium chloride, calcium chloride, ammonium chloride, and sodium acetate on the activity of the wild-type luciferase⁷⁾

The relative luminescence intensity (%) was calculated by dividing the recorded intensity of luminescence in the presence of an indicated salt by that in the absence of a salt. The values are represented as means $\pm$ SD ($n = 3$).

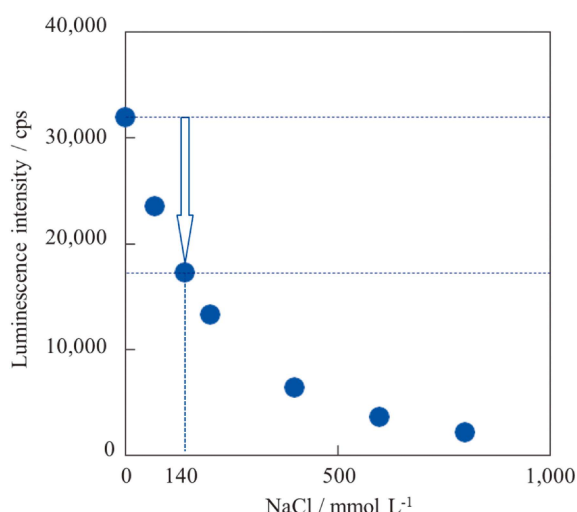


Fig. 7 Effect of NaCl concentration on luminescence intensities of luciferase FM

ない重要課題であり、4・2において耐塩性ルシフェラーゼを開発しての対策を目指すこととした。

4・2 耐塩性ルシフェラーゼの開発

はじめに、3・1の変異型ルシフェラーゼ FM を使用した場合の Cl^- の影響を調べた。Fig. 8 に、0 mmol L^{-1} 及び 140 mmol L^{-1} の NaCl 溶液へルシフェリンを添加した溶液における生物発光量を示した。Fig. 9 に、注射用水及び透析液へ ET を添加した ET 標準液における生物発光量を示した。ルシフェリンや ET の濃度上昇とともに生物発光量もほぼ直線的に増えるが、 Cl^- の有無によって生物発光量は大きく異なり、Fig. 7 と同様に、生物発光量が 1/2 ~ 1/3 程度

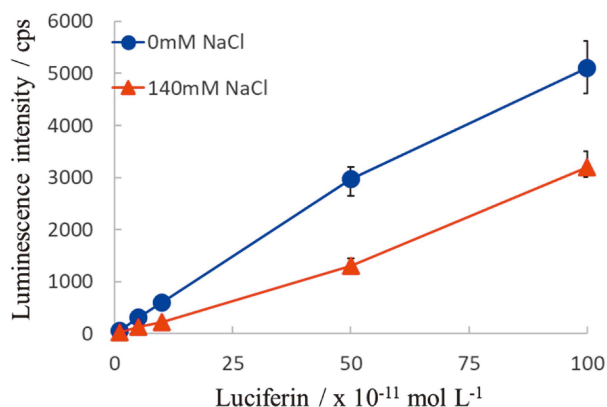


Fig. 8 Effect of NaCl on bioluminescence method using luciferase FM⁸⁾

Luminescence intensities were measured at various concentration of luciferin.

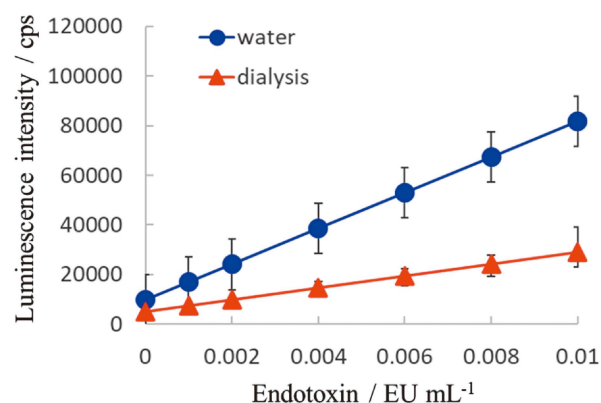


Fig. 9 Luminescence intensities of bioluminescence method using luciferase FM under dialysis condition⁸⁾

Luminescence intensities were measured at various concentration of endotoxin.

へ大きく減少することを確認した。

上記ルシフェラーゼ FM では透析液測定へ応用できないために、エラーブローン PCR にて耐塩性ルシフェラーゼの開発を行った。

140 mmol L^{-1} NaCl 存在下でも 60 % 以上の活性を維持する二つの株が別々に得られ、それぞれでの変異部位である 288 部位と 488 部位でアミノ酸の効果を検討した。非極性のアミノ酸で耐塩性が向上することなどを確認し、最適化を図った。288 部位での検討結果を Table 2 へ、488 部位での検討結果を Table 3 へ示した。その結果、288 部位は Ile へ、488 部位は Val へ変異したもので高い活性を維持することがわかった。さらにこれらの二つの変異を組み合わせたルシフェラーゼ CR を調製したところ、Fig. 10 に示したように最も高い耐塩性を呈することがわかった。これらの結果から、この二つの変異を組み合わせたルシフェラーゼ CR を耐塩性ルシフェラーゼとして用いることとした。

Table 2 The effect of Val288 substitutions on luciferase activity in the presence of 140 mmol L⁻¹ sodium chloride⁷⁾

Luciferase	Substituted amino acid	Molecular weight /g mol ⁻¹	Polarity and charge	Relative luminescence intensity/ %
Wild type	Val	117.15	Nonpolar	44.0 ± 0.6
Mutant	Gly	75.07	Nonpolar	16.3 ± 0.1
Mutant	Ala	89.09	Nonpolar	21.9 ± 1.3
Mutant	Pro	115.13	Nonpolar	19.6 ± 0.4
Mutant	Ile	131.17	Nonpolar	67.2 ± 2.9
Mutant	Leu	131.17	Nonpolar	46.8 ± 0.6
Mutant	Met	149.21	Nonpolar	47.3 ± 0.7
Mutant	Phe	165.19	Nonpolar	46.2 ± 0.8
Mutant	Trp	204.23	Nonpolar	28.9 ± 0.9
Mutant	Ser	105.09	Polar	16.3 ± 0.1
Mutant	Thr	119.12	Polar	25.6 ± 0.5
Mutant	Cys	121.16	Polar	46.5 ± 1.3
Mutant	Asn	132.12	Polar	29.3 ± 0.5
Mutant	Gln	146.15	Polar	32.8 ± 0.3
Mutant	Tyr	181.19	Polar	38.3 ± 0.9
Mutant	Lys	146.19	Positive	23.8 ± 1.8
Mutant	His	155.15	Positive	31.1 ± 1.4
Mutant	Arg	174.20	Positive	40.8 ± 0.8
Mutant	Asp	133.10	Negative	16.1 ± 0.4
Mutant	Glu	147.13	Negative	25.1 ± 1.0

Table 3 The effect of Glu488 substitutions on luciferase activity in the presence of 140 mmol L⁻¹ sodium chloride⁷⁾

Luciferase	Substituted amino acid	Molecular weight /g mol ⁻¹	Polarity and charge	Relative luminescence intensity/ %
Wild type	Val	147.13	Negative	44.0 ± 0.6
Mutant	Gly	75.07	Nonpolar	50.2 ± 0.2
Mutant	Ala	89.09	Nonpolar	43.4 ± 1.1
Mutant	Pro	115.13	Nonpolar	54.5 ± 1.2
Mutant	Ile	117.15	Nonpolar	78.7 ± 1.3
Mutant	Leu	131.17	Nonpolar	58.0 ± 0.5
Mutant	Met	131.17	Nonpolar	62.0 ± 0.5
Mutant	Phe	149.21	Nonpolar	73.1 ± 0.7
Mutant	Trp	165.19	Nonpolar	56.6 ± 1.1
Mutant	Ser	204.23	Nonpolar	40.0 ± 1.2
Mutant	Thr	105.09	Polar	50.9 ± 1.0
Mutant	Cys	119.12	Polar	66.8 ± 1.7
Mutant	Asn	121.16	Polar	69.5 ± 1.1
Mutant	Gln	132.12	Polar	30.9 ± 1.1
Mutant	Tyr	146.15	Polar	34.8 ± 1.4
Mutant	Lys	181.19	Polar	40.2 ± 0.7
Mutant	His	146.19	Positive	22.9 ± 1.3
Mutant	Arg	155.15	Positive	32.8 ± 0.5
Mutant	Asp	174.20	Positive	43.1 ± 1.0
Mutant	Glu	133.10	Negative	68.1 ± 1.2

Fig. 11 に, 耐塩性ルシフェラーゼ CR における変異部位を含む 3 次元構造を示した. 左図に北米産ホタルルシフェラーゼを示した. 耐塩性を得るための二つの変異部位は, 288 部位は活性中心付近に, 488 部位はルシフェラーゼの表面に存在している. 右図は基質類似体との活性サイトである 288 部位付近の拡大図である. 耐塩性ルシフェラーゼ CR におけるアミノ酸置換点を赤で示した.

Fig. 12 に, 野生型ルシフェラーゼ, 3・1 の高輝度ルシ

フェラーゼ FM, 及び耐塩性ルシフェラーゼ CR の生物発光量と NaCl 濃度との関係を示した. 野生型ルシフェラーゼとルシフェラーゼ FM では 50 mmol L⁻¹ 程度の低濃度 NaCl が存在した場合でも生物発光量が減少したが, 耐塩性ルシフェラーゼ CR では 150 mmol L⁻¹ NaCl までは生物発光量がほとんど変化しなかった. 透析液の NaCl 濃度: 140 mmol L⁻¹ NaCl に十分に耐え得る耐塩性であり, 本データからも透析液測定に使用可能であることを確認できた.

耐塩性ルシフェラーゼ CR を用いて 0 mmol L^{-1} 及び 140 mmol L^{-1} の NaCl 溶液にルシフェリンを添加した溶液を測定した際の生物発光量を Fig. 13 へ、耐塩性ルシフェラーゼ CR を用いて注射用水及び透析液へ ET を添加した ET 標準液を測定した際の生物発光量を Fig. 14 に示した。いずれにおいても溶液の違いによる生物発光量の減少はなく、透析液レベルの Cl^{-} 濃度であれば影響なく測定できるという結果であった。耐塩性ルシフェラーゼ CR の透析液測定での有用性を確認することができた。

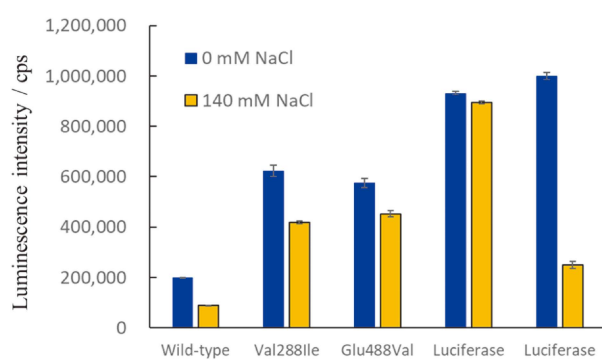


Fig. 10 Inhibition of the activity of wild-type and mutant luciferases by sodium chloride⁷⁾

The luminescence intensity of luciferase reactions in the absence or presence of 140 mmol L^{-1} sodium chloride was measured. The values are represented as means $\pm$ SD ($n = 3$).

4.3 エンドトキシン検出装置の開発及び透析液測定

耐塩性ルシフェラーゼ CR を含む発光試薬とライセート試薬を別々に凍結乾燥した試薬キットを用い、透析液測定を想定した ET 検出装置 (Fig. 15) を開発した。ライセート試薬を含む試薬チューブに試料液を適量注入して装置へセットし、自動的に測定する装置である。37℃ で 19 分間のライセート反応の後に、発光試薬を自動的に混合して生物発光させる 2 段階反応に基づく測定を行っている。比濁法や比色法などの従来法よりも短い測定時間: 20 分間で検出下限: $0.0003 \text{ EU mL}^{-1}$ を実現しており、透析液測定における管理基準値: 0.001 EU mL^{-1} 未満にも十分に対応可能な性能である。

低濃度域も測定できることから透析液測定へ応用できる

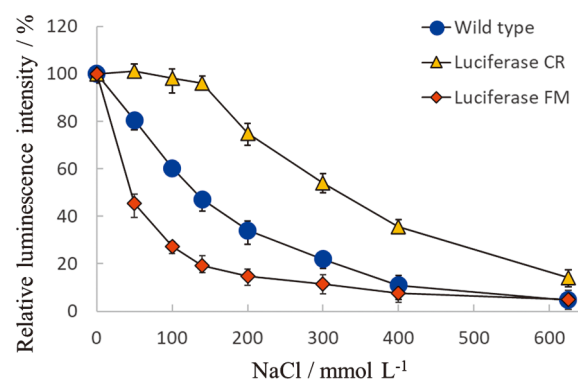


Fig. 12 The effect of sodium chloride concentration on the activity of wild-type luciferase, luciferase FM and luciferase CR⁷⁾

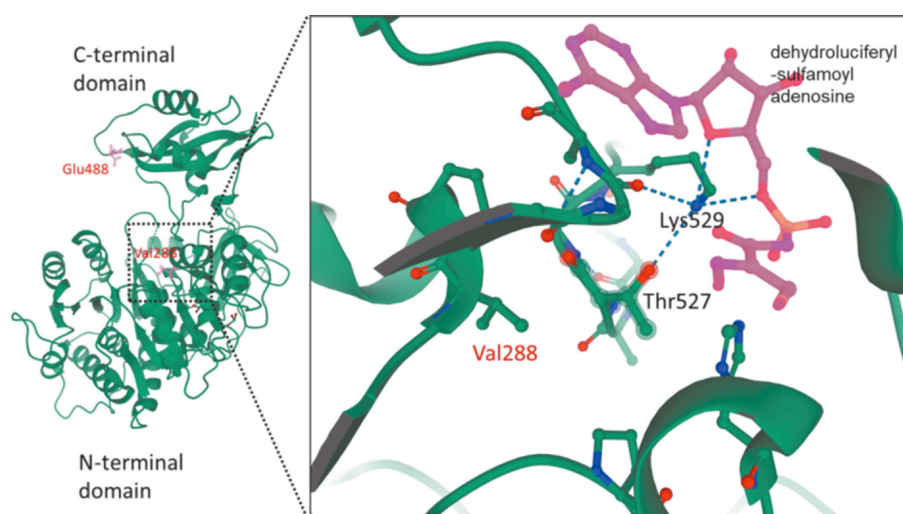


Fig. 11 The three-dimensional structure of *Photinus pyralis* luciferase and the locations of mutations in the luciferase CR⁷⁾

The active sites with a substrate analog (dehydroluciferylsulfamoyl adenosine) are indicated in the right box. The amino acid substitutions (red) in the luciferase CR are indicated. This figure was created based on the crystal structure (Protein Data Bank ID code 4G36) of *Photinus pyralis* luciferase.

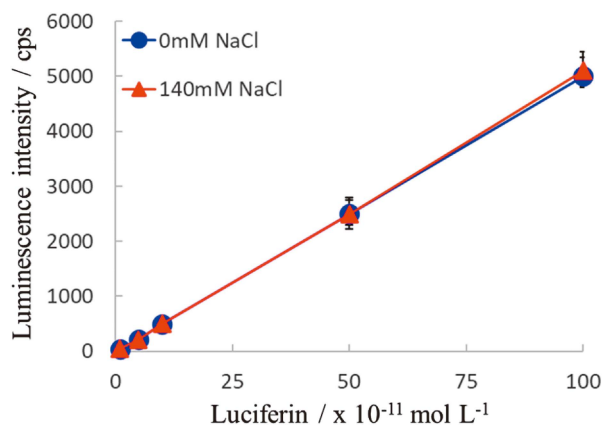


Fig. 13 Effect of NaCl on bioluminescence method using luciferase⁸⁾

Luminescence intensities were measured at various concentrations of luciferin.

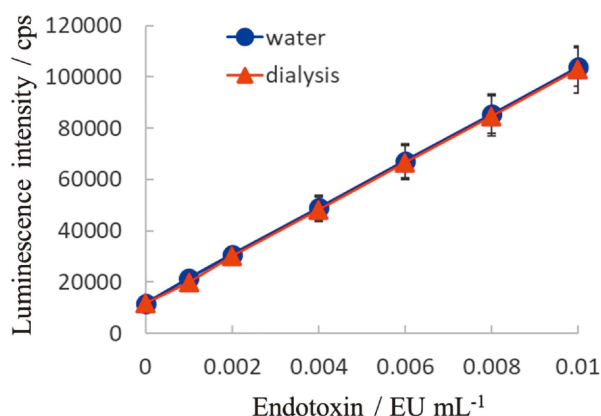


Fig. 14 Luminescence intensities of bioluminescence method using luciferase CR under dialysis condition⁸⁾

Luminescence intensities were measured at various concentrations of endotoxin.

可能性がある。ユーザーとなり得る6機関が合同で企画され、反応干渉因子試験などの所定の試験をそれぞれの機関で行われた。良好な試験結果を得られ、透析液測定への有用性を検証された⁹⁾¹⁰⁾。検証データの一例として、Fig. 16に注射用水中ET濃度測定値と透析液中ET濃度測定値の整合性を検討した結果を示した。6機関すべての測定値が規定範囲内で一致しており、良好な相関を検証できている。

本計器は、第三者機関による評価試験でその有用性が認められたこともあり、短期間のうちに透析液中ET測定現場などへ普及してきている。

5 1段階反応型エンドトキシン検出法の開発

小型でシンプルな装置で手軽にET検出を行えることを目指し、1段階反応型ET検出装置 (Fig. 17) を開発した。



Fig. 15 Two-step reaction type bioluminescence ET analyzer

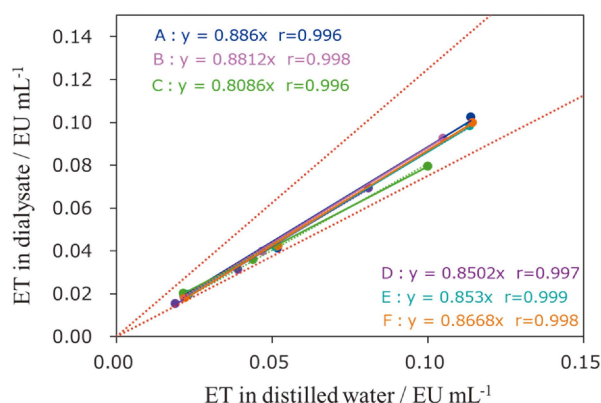


Fig. 16 Evaluation of the bioluminescence method by other groups⁹⁾

Six third parties measured endotoxin concentrations under dialysis and water conditions.



Fig. 17 One-step reaction type bioluminescence ET analyzer

前述の2段階反応型ET検出法と、この1段階反応型ET検出法の反応系の違いをFig. 18に示した。

1段階反応でET検出を行うためには試薬を1剤化する必要があり、ライセート反応時の37℃の温度条件下でも活性を維持できる耐熱性ルシフェラーゼが必要であった。耐熱性ルシフェラーゼと同様な開発プロセスを経て、前述の温度条件に対する耐熱性を有するルシフェラーゼを開発した。測定時間: 10分間で検出下限: 0.001 EU mL⁻¹ とい

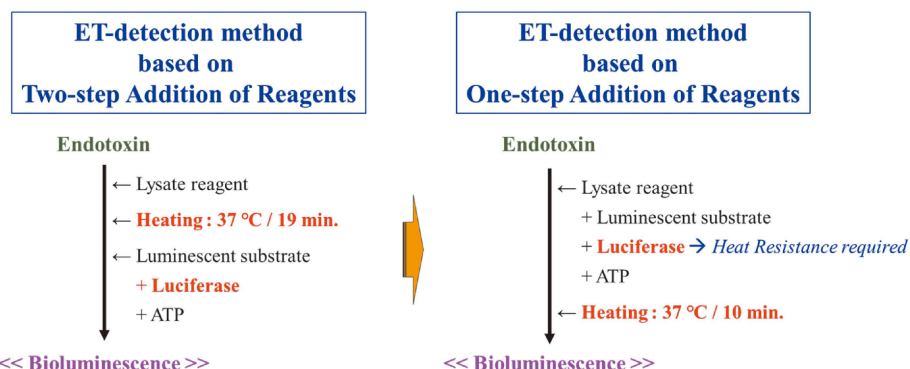


Fig. 18 ET-detection biochemiluminescence methods: Two-step reaction versus One-step reaction

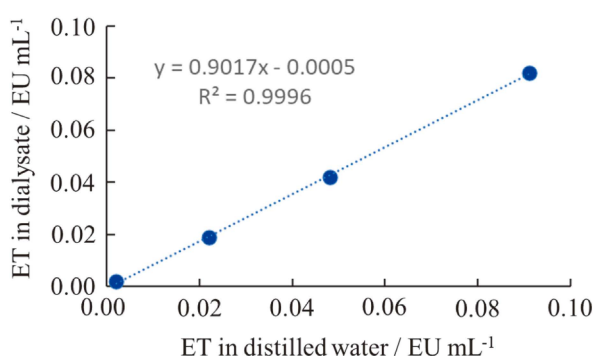


Fig. 19 Relationship of measured endotoxin in distilled water and endotoxin in dialysis solution by using bioluminescence endotoxin detection based on one-step addition of reagent

う良好な性能が得られ、透析液及び注射用水に ET を添加した溶液を測定して比較した反応干渉因子試験でも良好な結果 (Fig. 19) が得られた。

透析液成分の影響を受けない ET 測定が可能であり、本計器でも透析液を含むさまざまな試料の ET 測定が可能であることが示唆された。

6 結 言

生物発光法とライセート反応を融合した、生物発光式 ET 検出法を開発した。迅速、高感度、精確性などの特性をルシフェラーゼに付加する必要がある、エラープローン PCR などの手法を用いて要求仕様を満足する変異型ルシフェラーゼを開発した。

これらの試薬に基づいた生物発光式 ET 検出法によって従来法での迅速性や感度が不足という問題点を解決することができた。耐塩性ルシフェラーゼを用いる 2 段階反応型 ET 検出法では測定時間：20 分間で検出下限：0.0003 EU mL⁻¹ に到達し、耐熱性ルシフェラーゼを用いる 1 段階反応型 ET 検出法では測定時間：10 分間で検出下限：0.001 EU mL⁻¹ という高性能を実現した。いずれも透析液測定への応

用も可能であり、長年にわたって待望されていた迅速で高感度な ET 検出法及び装置を実現することができた。

2010 年開発の 3 段階反応である生物発光式 ET 検出法、2017 年開発の 2 段階反応型生物発光式 ET 検出器、及び 2022 年開発の 1 段階反応型生物発光式 ET 検出器に関して、それぞれの主な特徴を含めて Fig. 20 に示した。迅速で高感度な ET 検出法及び ET 計であり、透析液測定に応用できて、分析試薬の 1 剤化も実現できた。

第三者機関によって透析液測定への有用性も検証されており、透析治療現場を中心に普及が進んでいる。

国内外の薬局方に基づいた製薬プロセスでの ET 測定も巨大市場として存在している。本法は迅速で高感度な優れた特性を呈する差別化技術であり、今後、製薬市場を含む新たな用途・市場へ展開できる可能性も大いにあるので、前向きに対応していきたい。

謝 辞

本法の透析液測定での有用性確認試験を行われて貴重な情報を報告された、芝本隆先生、内野順司先生、村上淳先生、山下芳久先生、桒村友隆先生及び近土真由美先生に感謝申し上げます。

本稿で述べた一連の研究は、関係していただいたすべての皆様に協力いただいた結果であり、厚くお礼申し上げます。

文 献

- 1) 厚生労働省編：“第十八改正日本薬局方”，2021。
- 2) 峰島三千男，川西秀樹，阿瀬智暢，川崎忠行，友雅司，中元秀友：透析会誌，**49**, 697 (2016)。
- 3) H. Fujii, K. Noda, Y. Asami, A. Kuroda, M. Sakata, A. Tokida : *Anal. Biochem.*, **366**, 131 (2007)。
- 4) K. Noda, T. Matsuno, H. Fujii, T. Kogure, M. Urata, Y. Asami, A. Kuroda : *Biochnol. Lett.*, **30**, 1051 (2008)。
- 5) K. Noda, H. Goto, Y. Murakami, A. B. F. Ahmed, A. Kuroda : *Anal. Biochem.*, **397**, 152 (2010)。
- 6) 黒田章夫，野田健一，八幡悟史，八谷宏光：日血浄化技会誌，**23**, 365 (2015)。
- 7) S. Yawata, K. Noda, A. Shimomura, A. Kuroda :

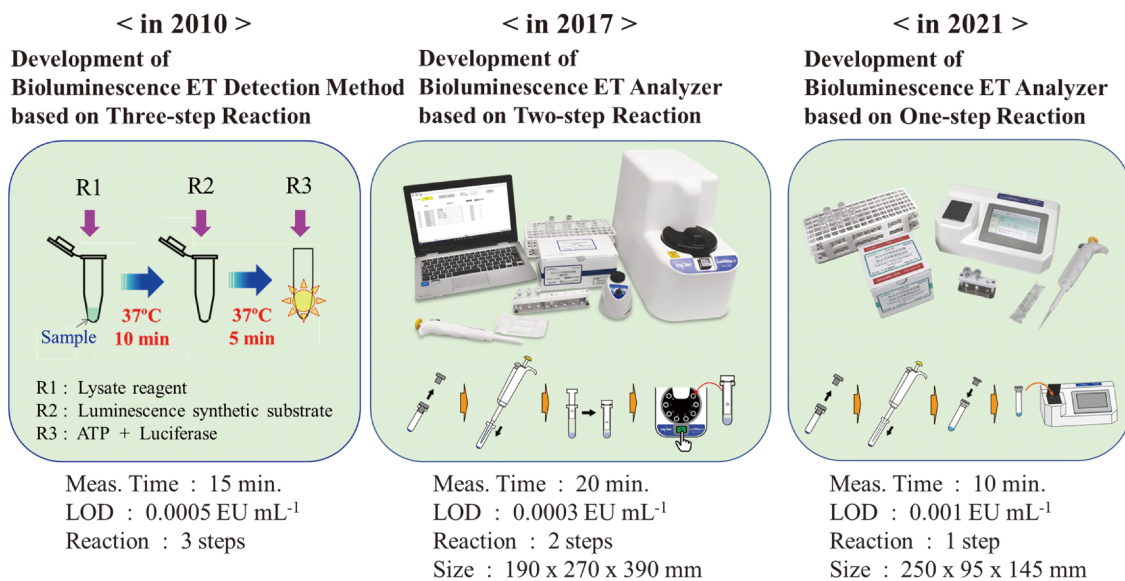


Fig. 20 Developments of bioluminescence ET detection method and analyzers

Biotechnol. Lett., **43**, 1585 (2021).

8) S. Yawata, K. Noda, A. Shimomura, A. Kuroda :

Anal. Biochem., **633**, 114408 (2021).

9) 近土真由美, 内野順司, 村上 淳, 星野武俊, 山下

芳久, 榑村友隆, 芝本 隆: 透析会誌, **51**, 591 (2018).

10) 小田 侑, 八幡悟史, 野田健一, 荒川 智: エンドトキシン・自然免疫研究, **22**, 17 (2018).

Development of a Bioluminescence Detection Method for Endotoxin and Its Application to Dialysate Analysis

Satoshi YAWATA¹, Kenichi NODA¹, Ai SHIMOMURA¹, Atsumu ODA¹,
Satoshi ARAKAWA¹, Hiromitsu HACHIYA^{*1} and Akio KURODA²

^{*} E-mail : hachiya@toadkk.co.jp

¹ DKK-TOA CORPORATION, 613, Kita-Iriso, Sayama-shi, Saitama, 350-1388

² Graduate School of Integrated Sciences for Life, Hiroshima University, 1-3-1, Kagamiyama, Higashi-Hiroshima-shi, Hiroshima, 739-8530

(Received December 23, 2022; Accepted March 27, 2023)

A novel endotoxin detection method was developed that combines a bioluminescence method using a high-luminant mutant luciferase and a lysate reaction. This method reached the detection limit of 0.0005 EU mL⁻¹ in a 15-min duration. A salt-resistant mutant luciferase was developed whose sensitivity was not decreased by sodium chloride (NaCl) in dialysate; it was applied to the endotoxin analyzer for dialysate measurement. It was useful for dialysate measurement with a detection limit of 0.0003 EU mL⁻¹ at 20 min and exhibited other properties under dialysis conditions. A thermostable luciferase was also developed and applied to a single-reaction type endotoxin analyzer. The detection limit was 0.001 EU mL⁻¹ for 10 min, enabling a more rapid endotoxin detection. This novel endotoxin detection method has rapidly been becoming popular in the field of dialysate measurement because of its excellent features.

Keywords: bioluminescence; endotoxin; detection; luciferase; lysate; dialysate.