

新たに開発された limulus amebocyte lysate (LAL) 反応を用いた生物発光式エンドトキシン活性値測定装置 (ルミニッツ[®]-ET) の多施設評価

近土 真由美¹ 内野 順司² 村 上 淳³ 星野 武俊⁴
山下 芳久⁵ 檜村 友隆⁶ 芝 本 隆¹

¹群馬パース大学保健科学部臨床工学科 ²みはま病院

³東京女子医科大学臨床工学科 ⁴明理会中央総合病院臨床工学科

⁵埼玉医科大学保健医療学部臨床工学科 ⁶東亜大学医療学部医療工学科

キーワード：透析液清浄化，エンドトキシン，生物発光法，高感度測定，迅速測定

〈要旨〉

透析液清浄化は透析医療の安全性を担保する手段の1つである。透析液中のエンドトキシン(ET)は強力かつ広範囲な生理活性を有することから、安全管理を行ううえで重要な指標となる。そこで、生物発光技術を応用して新たに開発されたET測定法について、多施設で共通プロトコルを用い、測定精度および真度の評価を行った。評価は日本HDF研究会作成のバリデーション指針に準じて、検量線の有効性、ブランク試験、反応干渉因子試験、検出限界、透析液定量限界について共通プロトコルを作成し、6施設で実施した。多施設にて評価した結果、ET測定での手技確認、試薬のバリデーションは、日本HDF研究会作成のバリデーションに要求される事項を満たした。さらに、高感度かつ迅速測定を可能とし、透析液生物学的汚染管理に生物発光法によるET測定の有用性が確認された。

Multi-institutional study of a newly developed bioluminescent endotoxin measurement method based on the limulus amebocyte lysate reaction

Mayumi Kondo¹, Junji Uchino², Jun Murakami³, Taketoshi Hoshino⁴, Yoshihisa Yamashita⁵,
Tomotaka Naramura⁶, Takashi Shibamoto¹

¹Department of Clinical Engineering, Faculty of Health Sciences, Gunma PAZ University; ²Mihama Hospital;

³Department of Clinical Engineering, Tokyo Women's Medical University; ⁴Department of Clinical Engineering, Meirikai Central General Hospital; ⁵School of Clinical Engineering, Faculty of Health and Medical Care, Saitama Medical University; ⁶Department of Medical Technology, Faculty of Medical Science, University of East Asia

Keywords: dialysis fluid purification, endotoxin, bioluminescence, high-sensitivity measurement, quick measurement

〈Abstract〉

Dialysis fluid purification is one way to ensure the safety of dialysis therapy. The level of endotoxins (ET) is an important index for safety management during dialysis because ET exhibit strong and extensive physiological activity. We evaluated the accuracy of a newly developed ET measurement method based on bioluminescence technology, using a common protocol at multiple facilities. In accordance with the validation guidelines prepared by the Japanese Society for Hemodiafiltration, we prepared a common protocol and performed the following evaluations at 6 facilities: the validity of the calibration curve, a blank test, a reaction interfering factor test, and assessments of the assay's detection limit and the quantitation limit for dialysate measurement. These evaluations indicated that the bioluminescence-based method fulfilled the validation requirements of the HDF

近土 真由美 群馬パース大学保健科学部臨床工学科 〒370-0006 群馬県高崎市間屋町 3-3-4

Mayumi Kondo Tel: 027-386-8166 Fax: 027-386-8594 E-mail: kondo@paz.ac.jp

〔受付日：2018年3月29日，受理日：2018年9月6日〕

Research Group. In conclusion, since it exhibits high sensitivity and allows quick measurements, the new method was confirmed to be useful for biological contamination control of dialysis fluid.

緒 言

透析液清浄化は血液透析療法における安全性を確保するうえで重要な条件であり, 透析液を利用した自動プライミングや自動返血, さらには on-line HDF 治療では必須である。したがって, 化学的汚染や生物学的汚染のない透析液の管理が求められる。日本透析医学会が行った 2015 年の調査報告¹⁾によると, 回答が得られた 4,109 施設中 79.5% が生物学的汚染基準²⁾における超純粋透析液のエンドトキシン (endotoxin: ET) 濃度 0.001 EU/mL 未満を達成しており, 透析液の清浄化に対する意識の向上とともに ET 濃度を低値で管理する施設が増加している。

一方, limulus amebocyte lysate (LAL) 反応を用いた比濁法や比色法による ET 測定では, 低濃度測定に 30 分から 90 分を要するため, 測定結果の判明と臨床現場との間にタイムラグが生じる。さらに, 測定 (範囲) 下限値が生物学的汚染管理基準値に近似しているなどの問題も抱えている。そこで, ET 測定を高感度で迅速に行う必要性が生じ, 生物発光法³⁾が着目された。生物発光法は, LAL 反応に生物発光⁴⁾を組み合わせた新たな ET 測定法である。

本研究では, 生物発光法による透析液 ET 測定の有効性について, 日本 HDF 研究会作成の「透析液エンドトキシン測定 (阻害・促進試験, 安定剤, 外注検査) に関するバリデーション指針 (草案 96B)⁵⁾」に準じ,

6 施設により測定精度および真度を中心に共通プロトコルを作成し評価した。

I. 生物発光法による ET 測定原理

生物発光法は, LAL 反応と生物発光を用いた ET 測定法である。LAL 反応は, プロテアーゼ前駆体の活性化を伴うカスケード反応であり, 生物発光は, ホタル由来の発光酵素 (ルシフェラーゼ) がアデノシン三リン酸 (ATP) と発光基質 (ルシフェリン) によって発光する生物由来の酵素反応を利用する。図 1 に測定原理を示す。ET が LAL 試薬と反応すると, Factor C, Factor B, proclotting enzyme が順次活性化され, 凝固酵素の clotting enzyme へ変換される。これに bioluminescence (BL) 試薬が添加されると, clotting enzyme がペプチドを付加したルシフェリンを認識, LAL 反応によってペプチドが切断され, 遊離したルシフェリンは ATP およびルシフェラーゼと結合することで発光する (生物発光)。遊離したルシフェリンの量は ET 活性値に比例することから, 発光量を測定することにより ET 活性値として得られる^{3,4,6)}。

II. 方 法

1. 手技確認試験

6 施設による手技のばらつきを確認するため, 以下の試験を実施した。

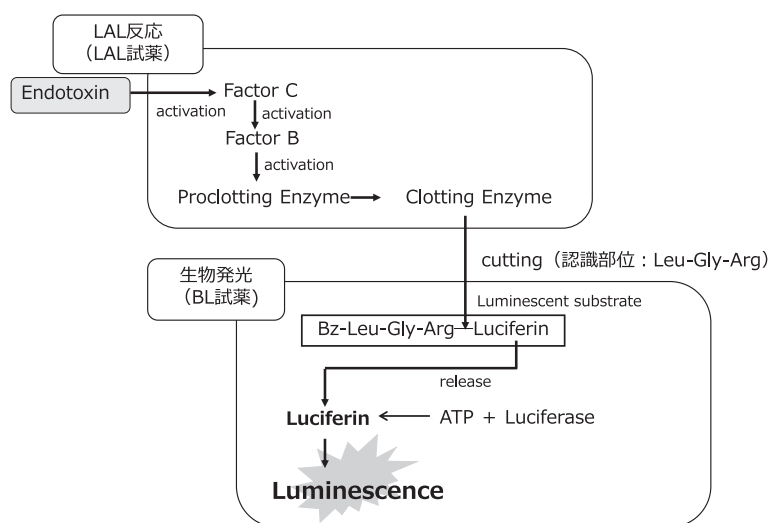


図 1 生物発光法によるエンドトキシン測定原理
(LAL: limulus amebocyte lysate, BL: bioluminescence)

1) 検量線有効性の判定

検量線を作成し，その信頼性を評価した．ET 試験用水（大塚蒸留水[®]：大塚製薬工場（株），徳島）（以下，蒸留水）で希釈した ET 標準品（U.S. pharmacopeia reference standard endotoxin: USP-RSE）を用い，低濃度用検量線として 0.0005 EU/mL, 0.001 EU/mL, 0.005 EU/mL, 0.007 EU/mL の 4 濃度，高濃度用検量線として 0.007 EU/mL, 0.01 EU/mL, 0.1 EU/mL, 0.2 EU/mL の 4 濃度に調製した各サンプルを 3 重測定し，測定装置の信号強度と ET 濃度の関係から検量線を作成した．各検量線の測定値について直線回帰分析から決定係数 R^2 を求め，その正の平方根 $|r|$ を相関係数として 0.99 以上であることを確認した．

2) ブランク値の確認

試験者の手技，試薬，測定器具および容器などに起因する汚染がなく，測定に支障のない環境であることを確認した．各施設で作成した検量線を使用し，蒸留水を 8 重測定して得られた結果より，測定値の平均値 + 2 SD（standard deviation）が 0.001 EU/mL 未満であることを確認した．

2. 測定試薬のバリデーション

生物発光法の有効性を確認するため，保存検量線を使用し，以下の試験を実施した．

1) 反応干渉因子試験

試料が測定値に対し阻害または促進しないことを確認した．ET 標準品を蒸留水で 0.25 EU/mL, 0.5 EU/mL, 1.0 EU/mL の 3 濃度に希釈調製した試験溶液を作製した．各試験溶液を蒸留水または電解質溶液（サブラッド血液ろ過用補充液 BSG[®]：扶桑薬品工業（株），大阪）にて 0.025 EU/mL, 0.05 EU/mL, 0.1 EU/mL の 3 濃度に希釈し，各サンプルを 3 重測定した．試験は 5 回実施し，蒸留水および電解質溶液中の ET 濃度から y 切片を 0 として直線回帰を行い，回帰直線の傾きの 95% 信頼区間が 0.75～1.25 の範囲にあり，かつ相関係数が 0.99 以上であることを判定した．また，各サンプルにおける電解質溶液中の ET 回収率を以下の式を用いて算出し，電解質溶液による測定値への影響を検討した．

回収率(%) = 電解質溶液 ET 濃度 / 蒸留水 ET 濃度 × 100

2) 検出限界試験

ブランク試料から ET 濃度が検出可能な限界濃度を求め，測定値の精度を確認した．ブランク試料として蒸留水 7 バイアル（管）を用い，各バイアル（管）から 3 検体ずつ採取し，計 21 検体を測定した．測定値の標準偏差から以下の検出限界算出式で求めた検出限界が 0.001 EU/mL 未満であることを判定した．

表 1 装置製品番号および試薬 Lot

施設名	試薬 Lot	装置製品番号
施設 A	17DZ01	Z1225-16
施設 B	17CA02	Z1225-13
施設 C	17EA01	Z1225-19
施設 D	17EA01	Z1225-20
施設 E	17CA02	Z1225-15
施設 F	17DZ01	Z1225-18

検出限界 = $3.3 \times SD$

3) 透析液の定量限界試験

透析液中に含まれる ET を定量的に測定可能な検出限界濃度から，測定値の精度および真度を検討した．測定サンプルは，ET 濃度 0.02 EU/mL に希釈した試験溶液を透析液で 0.002 EU/mL に希釈調製し，5 重測定した．試験は 2 回実施し，測定値が 0.0015～0.0025 EU/mL の範囲であることを判定した．

3. 測定装置，試薬および測定方法の評価

ET 測定に使用する測定装置はエンドトキシン計（ルミニッツ[®]-ET：東亜ディーケーケー（株），東京）を用い，試薬は，LAL チューブと BL チューブの 2 種類から構成された装置専用のオールインワンの試薬キット（東亜ディーケーケー（株），東京）を使用した．表 1 に各施設で使用した測定装置の製品番号および試薬 Lot を示す．

測定は，測定サンプル 200 μ L を LAL チューブに分注し，攪拌器で約 5 秒間攪拌後，BL チューブをセットし，装置本体の装置テーブル（CH1～CH8）の指定された箇所に挿入しスタートキーを押すことにより行われる．装置テーブル内は 37℃ に恒温されており，サンプルは 19 分間の LAL 反応後，上下機構部のプランジャが押し下げられることにより BL チューブ内の試薬がサンプルに添加される．試薬とサンプルが混合・攪拌されると直ちに発光反応が始まり，40 秒経過後，反応によって生じた発光量は光電子増倍管（photomultiplier: PMT）によって検出され，発光量から ET 濃度が算出される．

III. 結 果

1. 低濃度検量線および高濃度検量線を図 2 に示す．各検量線の測定値について直線回帰分析から相関係数 (r) を算出した結果，低濃度検量線の ET 濃度値と発光量の相関関係は，A 施設 = 0.995, B 施設 = 0.999, C 施設 = 0.995, D 施設 = 0.999, E 施設 = 0.998, F 施設 = 0.999 であり，平均 $r = 0.997$ であった．高濃度検量線では A 施設 = 0.999, B 施設 = 0.999, C 施設 = 0.999,

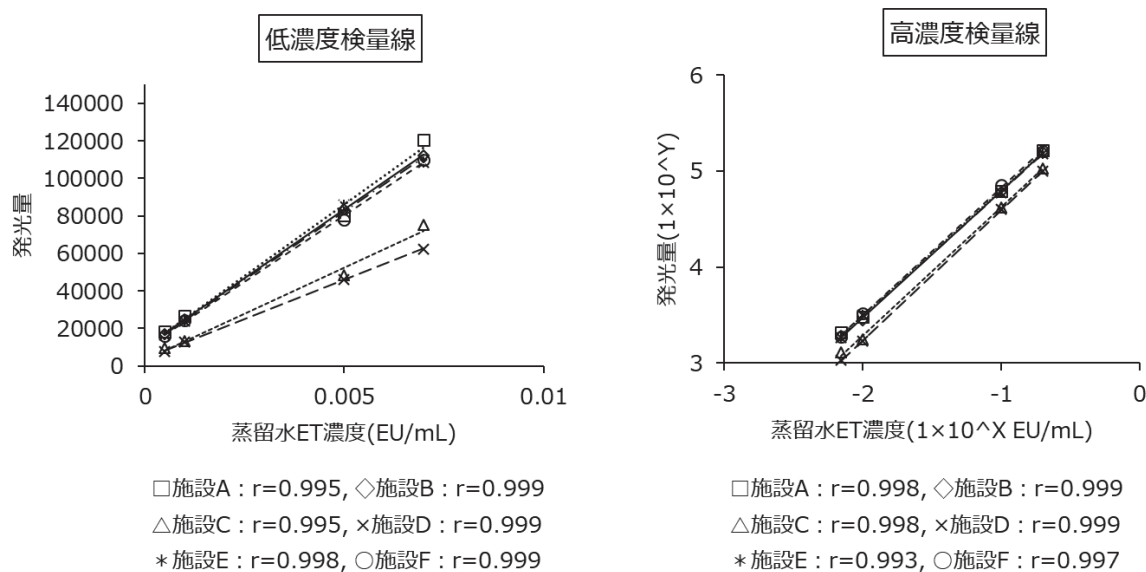


図2 検量線有効性の判定

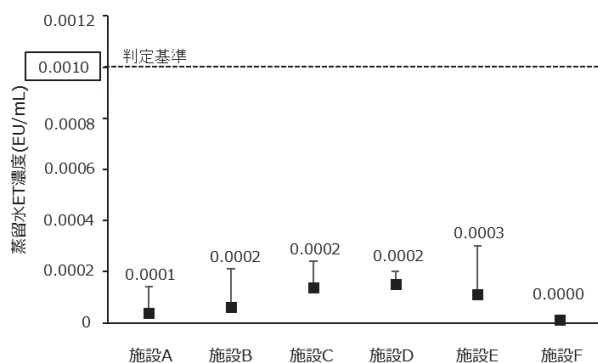


図3 ブランク値

判定基準: 平均値 + 2 SD < 0.001 EU/mL

D 施設 = 0.999, E 施設 = 0.999, F 施設 = 0.999, 平均 $r=0.999$ であり, 低濃度検量線, 高濃度検量線ともに全施設で $r=0.99$ 以上であった。

2. 各施設におけるブランク値の測定結果を図3に示す。蒸留水を8重測定した測定値の平均値 + 2 SD は A 施設 0.0001 EU/mL, B 施設 0.0002 EU/mL, C 施設 0.0002 EU/mL, D 施設 0.0002 EU/mL, E 施設 0.0003 EU/mL, F 施設 0.0000 EU/mL, 6 施設の平均は 0.0002 EU/mL であり, 全施設が 0.0010 EU/mL 未満であった。

3. 蒸留水および電解質溶液中の ET 濃度から直線回帰分析を行い, y 切片を 0 として算出した回帰式の傾きの分布範囲と相関係数を算出した(図4)。回帰直線の傾きの 95% 信頼区間は, A 施設 0.782~0.990, B 施設 0.809~0.952, C 施設 0.823~0.982, D 施設 0.853~0.929, E 施設 0.775~0.947, F 施設 0.787~0.943 であった。5 回の試験実施における相関係数は A 施設 0.993~

0.999, B 施設 0.995~0.999, C 施設 0.992~0.999, D 施設 0.995~0.999, E 施設 0.997~0.999, F 施設 0.997~0.998 であり, 全施設で回帰直線の傾きの 95% 信頼区間 (0.75~1.25) を満たし, 相関係数 0.99 以上であった。また, 各施設の平均値から蒸留水および電解質溶液の ET 濃度を比較した結果を図5に示す。蒸留水と電解質溶液との間には $r=0.99$ 以上の相関がみられた。各施設における電解質溶液 ET の平均回収率については, ET 濃度 0.025 EU/mL では, A 施設 87.9%, B 施設 89.1%, C 施設 92.6%, D 施設 90.5%, E 施設 86.3%, F 施設 84.4% で, 6 施設の平均回収率 88.5% であった。ET 濃度 0.05 EU/mL では, A 施設 80.7%, B 施設 86.9%, C 施設 83.8%, D 施設 86.8%, E 施設 82.3%, F 施設 82.2% で, 6 施設の平均回収率 83.8% であった。また, ET 濃度 0.1 EU/mL では, A 施設 90.5%, B 施設 88.4%, C 施設 91.6%, D 施設 89.6%, E 施設 86.9%, F 施設 87.6% で, 6 施設の平均回収率 89.1% の結果が得られた(図6)。

4. 蒸留水から採取した 21 検体を測定して得られた ET 活性値の標準偏差を算出した結果を図7に示す。検出限界算出式より ET 活性値の検出限界は A 施設 0.0004 EU/mL, B 施設 0.0005 EU/mL, C 施設 0.0002 EU/mL, D 施設 0.0001 EU/mL, E 施設 0.0003 EU/mL, F 施設 0.0002 EU/mL であり, 判定基準 (0.001 EU/mL 未満) を満たした。

5. 0.002 EU/mL に希釈調整した電解質溶液を 5 重測定し, 試験を 2 回実施した結果を図8に示す。電解質溶液中の ET 活性値は, A 施設 0.0018~0.0023 EU/mL, B 施設 0.0016~0.0022 EU/mL, C 施設 0.0020~

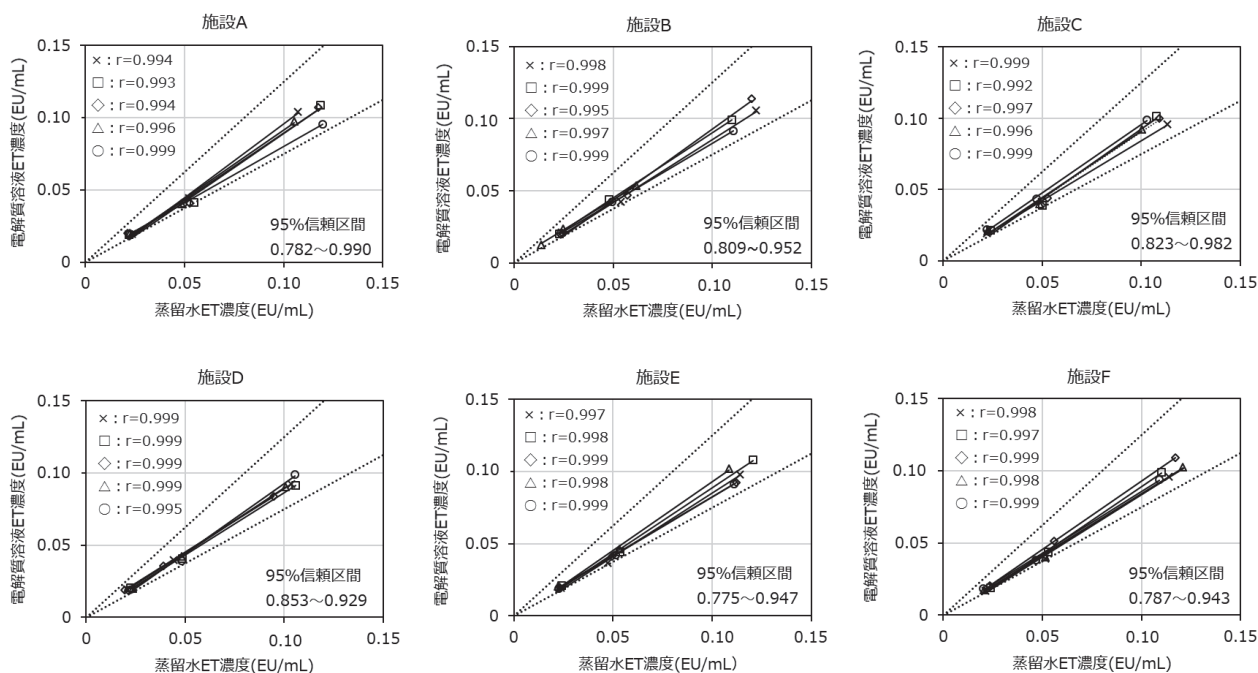


図 4 反応干渉因子試験

試験回数 ×: 1 回目, □: 2 回目, ◇: 3 回目, △: 4 回目, ○: 5 回目

判定基準: 95%信頼区間 = 0.75~1.25, かつ $r > 0.99$

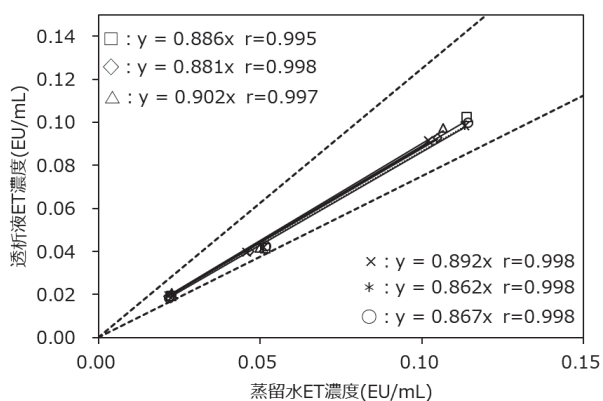


図 5 反応干渉因子試験

全施設平均値

0.0023 EU/mL, D 施設 0.0021~0.0024 EU/mL, E 施設 0.0009~0.0023 EU/mL, F 施設 0.0018~0.0024 EU/mL であり, 6 施設中 5 施設ですべての測定値が判定基準 (0.0015~0.0025 EU/mL) を満たした。

IV. 考 察

透析液の汚染は生体にさまざまな弊害をもたらし, 透析関連合併症を誘発する要因となることが知られている⁷⁾。また近年では, 逆濾過透析液を用いる全自動透析装置の導入や on-line HDF 治療を行う施設が増加しており¹⁾, 透析用水および透析液の清浄化管理は不可欠となった。

日本透析医学会が提示する透析液水質基準では, 透析液の生物学的汚染について生菌数測定と ET 測定が必須であり^{2,8,9)}, すべての透析治療に超純粋透析液の使用を推奨している。しかし, 生菌数測定では培養に 7 日間を要するため, 体内に入る透析液の安全性をリアルタイムに担保できない問題点が存在する。さらに, 透析液 ET 測定では結果が判明するまでに長時間要することや検出感度の問題が存在する。2008 年の透析液水質基準では, 透析液 ET 測定は比濁法や比色法で実施することが示されている⁸⁾。比濁法および比色法は, 濁度や吸光度の時間変化を観察し, 閾値に達するまでの時間から算出するカイネティック法であり, ET が低濃度であるほど長い反応時間が必要となり, 測定結果の判明と臨床現場における治療との間にタイムラグが生じる。また, ET 濃度の測定範囲の下限は 0.001 EU/mL であり, 透析液水質基準に示す基準値 0.001 EU/mL 未満^{2,8)}にはほぼ近い値である。臨床現場では正確な透析液清浄化管理のため, より高感度な測定結果が求められるが, 比濁法や比色法では感度と測定時間がトレードオフの関係にあるため, より低濃度の ET を測定するには原理的に長い反応時間が必要となる。これらの背景から, より迅速で高感度な測定可能な生物発光法が注目された。本研究では, 新たに開発された生物発光法による透析液 ET 測定の有効性について, 多施設で共通のプロトコルを用いて評価を行った。その結果, 手技確認試験, 反応干渉因子試験,

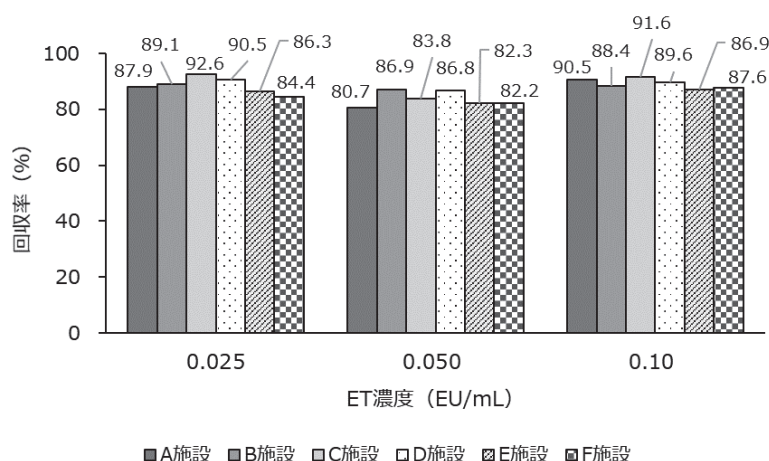


図 6 各施設における平均回収率

(回収率(%) = 電解質溶液 ET 濃度/蒸留水 ET 濃度 × 100)

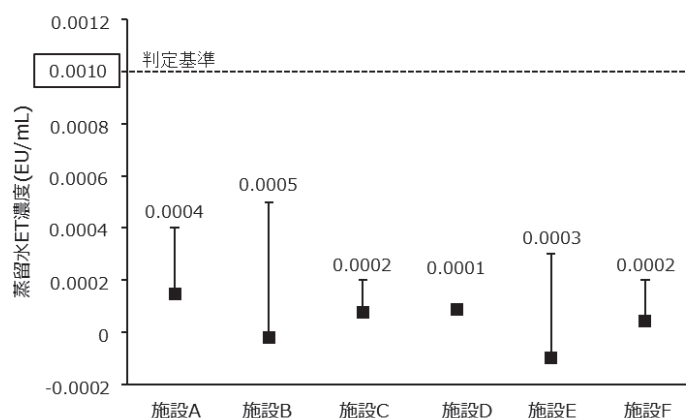


図 7 検出限界

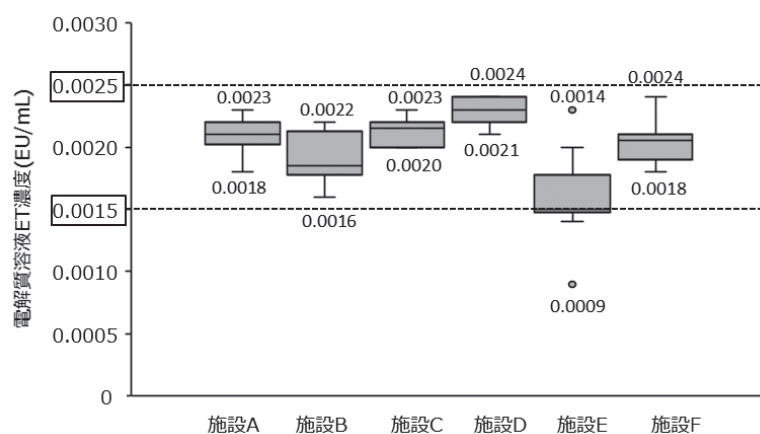
(検出限界値 = $3.3 \times SD \leq 0.001$ EU/mL)

図 8 透析液の定量限界

判断基準: 電解質溶液 ET 濃度 = 0.0015~0.0025 EU/mL

検出限界は6施設で判定基準を満たし、透析液の定量限界は1施設のみ判定基準がわずかに基準外であった。判定基準外となった原因として、当該施設でのET濃度が全体的に低値を示していることから、サンプル作製時の希釈誤差による可能性が推測できる。判

定基準を満たした各試験結果については、検量線有効性の判定、ブランク値の確認、反応干渉因子試験、検出限界、透析液の定量限界において、日本HDF研究会作成の透析液エンドトキシンに関するバリデーション指針⁵⁾に適合することが確認された。

一般に ET 測定において, ライセート試薬はサンプル中の組成によって阻害・促進などの影響を受けることが知られており, 透析液の水質管理を行ううえでライセート試薬が受ける干渉の程度を予め調べておく必要がある^{5,10)}。本研究においても, 反応干渉因子試験での電解質溶液 ET の回収率は 80~90%であったことから, 反応干渉因子の影響を受けることを認めた。この原因としてライセート試薬が透析液中に含まれるナトリウムや糖類などによる阻害を受けた可能性が考えられるが¹¹⁾, 透析液エンドトキシンに関するバリデーション指針の基準を満たしており, 良い再現性が確認されたことから, 反応干渉因子による影響は差し支えないと考える。しかし, 透析液 ET 測定の際には, 測定値が低値を示すということを前提に, 真の ET 濃度は 10~20%高値となることを考慮して, 水質管理を行うことが必要である。

蒸留水における 6 施設の検出限界値については平均 0.0003 EU/mL であり, 比濁法や比色法の測定範囲の下限值 0.001 EU/mL に比べて, より高感度の ET 測定が可能であること, また, 透析液では ET 濃度 0.002 EU/mL の測定で 5 施設の平均 ET 濃度は 0.0021 EU/mL であり, 高い真度および精度で測定可能なことが確認された。多施設評価により, 各施設における測定環境, 測定日時, 試験者の手技, 測定装置および試薬ロットなど, 異なる環境下でも同様の結果が得られた。すなわち室間再現精度が良好であることが認められた。

測定時間では, 比濁法において ET 濃度 0.001 EU/mL の測定に 81 分, 0.005 EU/mL では 42 分, 0.01 EU/mL では 33 分と, ET 濃度が低値であるほど測定に時間を要し, 生物発光法では ET 濃度にかかわらず測定は 20 分で完了したと報告されている¹²⁾。

測定時間の迅速化, および本研究により確認された良好な再現性, 高い真度と精度の理由としては, 生物発光法の優れた特徴が大きく関与している。まず BL 試薬では, ルシフェラーゼの遺伝子組み換えにより天然ホタルの発光強度に対し 10~15 倍以上の感度をもつ高輝度化変異型ルシフェラーゼ (高発光ルシフェラーゼ) が用いられており, ルシフェリンに対する親和性の向上から, 微量の ET を検出することが可能となった¹³⁾。また, ルシフェラーゼによる発光は, 迅速な化学反応により励起されて光を発生するため励起光を必要としない。したがって, ET 活性を検出するための高い S/N 比 (signal-noise ratio) を得られることから高感度で迅速な測定を可能としている³⁾。

一方, ET 活性と生菌数の関係について⁹⁾, RO 水お

よび透析液中にグラム陰性菌 86%, グラム陽性菌 14% の存在が確認されている。さらにグラム陰性菌では, 同一菌種においても菌株により ET 活性が異なる動態を示すことが, ET 濃度と生菌数の間に相関がない理由である。したがって, 透析液生物学的汚染では, 生菌と ET の両者から論じる必要があるが, ET 濃度 0.001 EU/mL 未満であっても生菌が検出される可能性は否定できず, 今後, 生物発光法による高感度かつ迅速測定から透析液中の ET 濃度と生菌数の関係について再度検討する必要がある。

結 論

生物発光法による ET 測定は, 高感度かつ迅速測定を可能とし, 透析液生物学的汚染管理に有用である。

利益相反: 投稿論文に関連し, 開示すべき COI 関係にある企業などはない。

文献

- 1) 日本透析医学会統計調査委員会. わが国の慢性透析療法の実況 (2015 年 12 月 31 日現在). 透析会誌 2017; 50: 1-62.
- 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. 2016 年版 透析液水質基準. 透析会誌 2016; 49: 697-725.
- 3) Noda K, Goto H, Murakami Y, Ahmed AB, Kuroda A. Endotoxin assay by bioluminescence using mutant firefly luciferase. *Analytical Biochemistry* 2010; 397: 152-5.
- 4) Fujii H, Noda K, Asami Y, Kuroda A, Sakata M, Tokida A. Increase in bioluminescence intensity of firefly luciferase using genetic modification. *Analytical Biochemistry* 2007; 366: 131-6.
- 5) エンドトキシン測定の標準化検討部会. 透析液エンドトキシン測定 (阻害・促進試験, 安定化剤, 外注検査) に関するバリデーション指針 (草案 96B). 臨牀透析 12 別冊 HDF 療法 '96: 1996: 142-8.
- 6) Noda K, Matsuno T, Fujii H, et al. Single bacteril cell detection using a mutant luciferase. *Biotechnol Lett* 2008; 30: 1051-4.
- 7) Henderson LW, Koch KM, Dinarello CA, Shaldon S. Hemodialysis hypotension: The Interleukin Hypothesis. *Blood Purif* 1983; 1: 3-8.
- 8) 秋葉隆, 川西秀樹, 峰島三千男, 他. 透析液水質基準と血液浄化器性能評価基準 2008. 透析会誌 2008; 41: 159-67.
- 9) 芝本隆, 信澤正美, 小野裕嗣. 透析液清浄化の現状と問題点. 日防塵防黴会誌 2002; 30: 13-20.
- 10) 山本千恵子. 透析液エンドトキシン測定法. 透析会誌

- 1997; 30: 911-5.
- 11) 大澤貞利, 久島貞一. エンドトキシンの測定法. 山下芳久, 峰島三千男編. 透析液の安全管理. 東京: 日本メディカルセンター, 2013: 40-4.
- 12) 芝本隆, 星野武俊. Limulus Amebocyte Lysate (LAL) 反応と Luciferase による生物発光法を用いたエンドトキシン (ET) 測定の高感度・迅速測定に関する研究. 日臨工技士会誌 2017; 61: 96-103.
- 13) 黒田章夫, 野田健一, 八幡悟史, 八谷宏光. 高輝度ルシフェラーゼを利用したエンドトキシンの迅速・高感度測定技術. 日血浄化技会誌 2015; 23: 365-7.