透析液エンドトキシン測定法

山本 千恵子

芳野病院透析センター

key words : エンドトキシン, リムルス試薬, 透析液, 安定化剤, 標準化

〈要旨〉

全国の透析施設でエンドトキシン (ET) 測定が行われているが, 透析液安全基準に則った水質評価を行うためには測定法の標準化が必要と考えられる。本邦で入手可能な3種のリムルス試薬 (エンドスペー法=生化学工業, ET シングルテスト-ES 法=和光純薬, Kinetic QCL 法=第一化学) と世界的な基準 ET として認められているアメリカ薬局方 reference standard endotoxin (USP RSE) を使用し, 測定干渉を解消する希釈倍数について検討した。

透析液, A 原液, B 原液の希釈系列を作製し, USP RSE/蒸留水溶液を最終濃度が 50 EU/L となるように添加回収試験を行った。測定干渉を受けることなく透析液・A 原液・B 原液を測定するにはエンドスペー法で {1 倍, 40 倍, 20 倍}, ET シングルテスト-ES 法で {4 倍, 40 倍, 40 倍} の希釈が必要であった。Kinetic QCL 法は未希釈透析液では測定干渉を認めなかったが, 2 から 16 倍希釈で促進傾向が認められ, B 原液では 40 倍希釈により阻害が解消されたが, 80 倍希釈で促進傾向が認められた。A 原液は Kinetic QCL 法では 80 倍希釈を行っても阻害を解消できなかった。キット間において臨床検体の同時測定値を比較した結果, ET シングルテスト-ES 法は 4 倍希釈を行ってもエンドスペー法に比べ有意に低値を示した ($p < 0.05$)。

また, 保存による透析液 ET の失活・吸着を防ぐ目的で開発された安定化剤入り採取管を使用すると冷蔵保存 7 日後も透析液 ET の回収率は $91 \pm 12\%$ と良好な安定化効果が認められた。

Methods for accurate endotoxin measurement in the dialysates

Chieko Yamamoto

Yoshino Hospital

Endotoxin (ET) levels in the dialysate must be determined by an accurate and precise assay. For validation, three commercial kits, Endospecy (Seikagaku, Tokyo), ET single test-ES (Wako, Osaka) and Kinetic QCL (BioWhittaker, Maryland) were tested for interference. The dilution series of the dialysate, bicarbonate and acid concentrate were made between 1- and 80-fold, which were spiked with U.S. Pharmacopoeia reference standard ET (USP RSE). The recovered activity for ET in each series was evaluated versus the theoretical value of 50 EU/L. The dilutions which overcame interference with Endospecy were 1, 40 and 20 in the dialysate, acid concentrate and bicarbonate, respectively. Likewise, 1 : 4, 1 : 40 and 1 : 40 dilutions were necessary to overcome inhibition with ET single test-ES. With Kinetic QCL, there was no interference in the undiluted dialysate ; however, enhancement was observed between 2- and 16-fold dilution. The dilution which overcame interference in the bicarbonate was 40-fold with Kinetic QCL. Even the 80-fold dilution of the acid concentrate failed to overcome inhibition with Kinetic QCL. Clinical dialysate samples were also measured for ET activity by Endospecy and ET single test-ES kit in parallel. The ET single test-ES kit gave significantly lower values (44%) than the Endospecy kit ($p < 0.05$). In addition, the stabilizing agent for preventing ET in the dialysate from loss of activity through inactivation and adsorption was shown to be effective, as the recovered ET activity in the dialysate was kept within the range of $100 \pm 25\%$ of the initial value as long as 7 days.

緒 言

日本透析医学会から透析液安全基準が提示され¹⁾透析液 ET 測定値に基づく水質管理が全国的に実施されていくものと予想される。今日、ET の検出にはカプトガニの血液凝固反応を利用したリムルステストが使用されている。しかし、リムルス試薬の反応性は試料中に含まれる様々な成分の影響を受けやすいことが指摘されている²⁾。また、ET 自身も透析液という電解質溶液中では容器への吸着や失活が懸念されている。今回、これらの問題点を整理し、キット間の比較を目的として検討を行った。

I. 対象および方法

1. ET 測定

1) エンドスペシー-ES-200 (エンドスペシー法, 生化学工業)

サンプル 50 μ l とリムルス試薬 50 μ l をワンステップで反応させるカイネティック比色レート法にて測定した。分析機器はウェルリーダー-SK601 を使用した。

2) エンドトキシシンシングルテスト-ES ワコー (ES-シングル法, 和光純薬)

リムルス試薬を反応管の中に凍結乾燥させたものにサンプル 200 μ l を加えて反応を開始させた。トキシノメーター-MT258 を使用し、比濁時間分析法にて測定した。

3) Kinetic QCL (QCL 法, 第一化学)

操作手順書に従い、サンプル 100 μ l を 37°C、10 分間インキュベーション後、リムルス試薬 100 μ l を加え直ちに Kinetic QCL リーダーにセットし、カイネティック比色法にて測定した。

2. ET 標準品

E. coli O113:H10:K陰性株から分離精製されたアメリカ薬局方参照標準 ET (USP RSE, Lot F) を検討に用いた。標準 ET 溶液を ET 試験用水 (大塚製薬注射用水) で希釈し 500 EU/L の添加用 ET 試験溶液を調整した。

3. 透析液・A 原液・B 原液の希釈回収試験

ET フリー透析液を ET 試験用水で 1:1 から 1:32 までの 2 倍希釈系列を作製した。同様に A 原液および B 原液を ET 試験用水で希釈し、1:10 から 1:80 までの 2 倍希釈系列を作製した。各希釈系列の 9 容に 500 EU/L の ET 試験溶液 1 容を添加後直ちにリムルステストを行い、回収率を求めた。透析液はキンダリー

図 1 各種溶液希釈系列の添加回収試験。A: 透析液, B: A 原液, C: B 原液, Mean $\pm$ 2SD. (■-■) エンドスペシー法, (●-●) QCL 法, (▲-▲) ES-シングル法。

液 AF-2 号 (扶桑薬品) を使用し、ET 除去フィルター (polyethersulfone/polyarylate polymer alloy 膜) で濾過し ET フリー透析液とした³⁾。

4. 臨床透析液検体の測定

臨床で使用している調製透析液を供給回路の数箇所から採取してエンドスペシー法および ES-シングル法で ET 活性を同時測定した (n=15)。また、ES-シ

シングル法はET 試験用水で4 倍希釈した検体も測定した。有意差検定はpaired *t*-test で行い、 $P<0.05$ を有意差ありと判断した。

5. 保存による影響

臨床用透析液・逆浸透水を500 ml の滅菌ビーカーに大量に採取し、各種材質（ガラス、polypropylene, polyethylene, polystyrene, acrylic resin）の市販試験管に分注した。分注前の滅菌ビーカー内の透析液あるいは逆浸透水のET 活性を100%として分注直後および透析液では冷蔵保存1 日後のET 活性を測定し回収率を求めた。また、臨床用透析液を生化学工業社製の安定化剤入り透析液採取管（EG チューブHD）とコントロール用採取管に分注し、冷蔵保存した。採取2 時間後、1 日後、3 日後、5 日後、7 日後にエンドスペシー法でET 活性を測定した。採取管に分注する前の透析液ET 活性値を100%として回収率の推移を見た。

II. 結 果

1. 希釈溶液添加回収試験（図1）

透析液・A 原液・B 原液を阻害なく（ $100\pm25\%$ ）測定するにはエンドスペシー法で{1 倍・40 倍・20 倍}、ES-シングル法では{4 倍・40 倍・40 倍} 希釈が必要であった。ES-シングル法における未希釈透析液の回収率 $75\pm9\%$ と4 倍希釈での回収率 $96\pm14\%$ には有

意差を認めた（ $P<0.05$ ）。QCL 法は未希釈透析液で測定干渉を認めなかったが2 から16 倍希釈を行うと促進作用が認められた。また、B 原液では40 倍希釈で測定阻害は解消されたが80 倍希釈では促進作用が認められた。QCL 法においてはA 原液は80 倍希釈を行っても $77\pm24\%$ と完全には測定阻害を解消できなかった。

2. 臨床検体の測定値の比較

臨床透析液検体を測定した結果、エンドスペシー法とES-シングル法の測定値には正の相関が認められ

図2 臨床透析液検体ET 測定値の相関
（□）未希釈、（●）4 倍希釈

図3 各種容器保存時のET 比活性の経時変化

図4 透析液保存時のET比活性の推移
(■) 安定化剤入り, (●) コントロール

た(図2, $y=0.44x$, $r=0.92$, $P<0.01$). 4倍希釈を行うと回帰式は $y=0.81x$ ($r=0.97$, $P<0.01$)であった. しかし, 4倍希釈を行ってもES-シングル法での測定値はエンドスペー法での測定値に比較すると有意に低値であった ($P<0.01$).

3. 保存による測定値の変化

いずれの材質の試験管においても分注・保存により, 逆浸透水・透析液ともET測定値の減少傾向が認められた(図3). 保存によるET活性の推移を調べたところコントロール用採取管で保存した透析液の7日後のET活性は $23\pm6\%$ にまで減少したのに対して安定化剤入り透析液採取管で保存した透析液検体のET活性は冷蔵保存7日後でも $91\pm12\%$ と良好な安定化効果が認められた(図4).

III. 考 察

透析液ETの測定は水質管理上不可欠なものであるが, 透析液がET測定キットに及ぼす干渉の程度を予め調べておかなければならない⁴⁾. ES-シングル法は測定阻害が認められると報告されている^{5,6)}. 今回の検討でも, ES-シングル法には透析液による測定阻害が認められたが, ET試験用水で4倍希釈すれば阻害は許容範囲($\pm 25\%$)に解消された. ES-シングル法では測定干渉の影響を排除するために, 透析液により溶解したエンドトキシン溶液を用いて検量線を引く方法も提案されているが^{5,7)}, 透析液中のエンドトキシンは容器へ吸着しやすい(図3)ために安定した検量線が得られず, 理論的にも測定値が高値に変異してしまうことが予想される. 最近, ES-シングル法ではET標準品

(control standard endotoxin, CSE)を*E. coli* B4株からUSP RSEに変更して検量線の範囲を広げ, 検体量を200 μ lから300 μ lに増量し, さらに検量線に2次式を導入する変法がメーカー自らにより提示されている⁸⁾. 検体量の増量によりリムルス反応の2次式の検量線では1次式の場合に比し, 測定範囲(1~1000 EU/L)の両端で相対的に高い測定値が得られることが予想される. また機序は不明であるが100 EU/L近傍の測定値も従来の検量線を使用した場合よりも高値となっている. 以上のように, ES-シングル法では阻害の解消方法に混乱が見られるので早期に測定方法が統一されていくことが期待される. 一方, エンドスペー法およびQCL法では透析液による阻害は認められなかった. 透析液を希釈した場合もエンドスペー法では希釈による回収率の変化はほとんど認められなかったが, QCL法では希釈倍数によっては促進傾向が認められた. 促進傾向はB液の80倍希釈でも認められ, QCL法はETが溶存する溶液のpHや電解質濃度の影響を受けやすいものと考えられる.

臨床透析液検体のET測定値をエンドスペー法とES-シングル法(4倍希釈法)で同時測定し比較したところ, ES-シングル法で相対的に低値を示した(81%). USP RSEを用いた透析液の阻害試験で, エンドスペー法における未希釈時の回収率が $94\pm6\%$, ES-シングル法における4倍希釈での回収率が $96\pm14\%$ という結果と比較すると両者の臨床検体の測定値のギャップは大きすぎるように思われる. 原因の一つとしてリムルスキット間でETの種類に対する反応性に差があるのかもしれない. 検体測定用の検量線に使用しているのは*E. coli*由来のCSEだが, 実際に透析液中に含まれる水棲菌由来のETとは構造的に若干異なっている. 透析用水や透析液からは*Acinetobacter*属や*Pseudomonas*属などが検出される⁹⁾ことが多く, これら水棲菌由来のETは親水基である糖鎖部分が短いという特徴がある¹⁰⁾. また, ライセートには抗LPS因子が含まれておりこれは糖鎖の短いETと結合しやすいとされている¹¹⁾. ライセートの精製方法によっては試薬中に抗LPS因子が残存し, 試薬中の抗LPS因子が水棲菌由来のETと結合して反応を抑制している可能性も否定できない. 臨床検体のエンドスペー法とQCL法の同時測定ではほぼ同等の値が得られており⁶⁾, ES-シングル法(4倍希釈法)のみが相対的に低値を示し, 臨床透析液の検討においては3者のキット間での相関はなお一部課題を残す結果となった.

透析液検体の不適切な保存によってもET測定値が真の値よりも低値を示すことがある^{12,13)}. 透析液の水

質管理を目的に ET を測定するには、採取後直ちに測定すべきだが、検査設備や業務の都合上、直後に測定できない場合も多い。保存中の ET 活性の低下は容器への吸着および失活が関与しており、容器の材質により程度の差はあるが一様に ET 活性の低下が認められ(図 3)、どの材質の試験管を使用しても安定化剤の併用は必要と考えられた。

現在国内で市販されているリムルスキットの CSE は、今回の検討で使用した USP RSE Lot. F をもとに標準化されているが、今年 USP RSE が Lot. F から Lot. G に変更になり今後は各メーカーの CSE の力価が変更される方向で検討が進んでいる。アメリカで実施されているゲル化法では Lot. F と Lot. G の力価は同等とされているが、国内のリムルスキットで測定すると Lot. G の力価が 1.35 倍高いと報告されている¹⁴⁾。今後、Lot. G に対して標準化された CSE を採用したキットにより同じ活性をもつ検体を測定すると、現行よりも見かけ上低値(74%程度)を示すことになるので水質管理上注意が必要であろう。

今後透析液 ET 測定の標準化のためには、透析液に含まれる水棲菌由来の ET の標品化とこれに基づくキットのバリデーションが必要と考えられる。

IV. 結 論

透析液 ET 測定に関してキット間の標準化を目的に測定時の希釈条件と保存の影響を検討した。

1. 透析液 ET を阻害/促進作用なく測定するには Kinetic QCL 法は未希釈での測定、ET シングルテスト-ES 法では蒸留水による 4 倍希釈が必要であった。エンドスピーシー法は希釈倍率に関係なく安定した結果が得られた。

2. 透析液 ET 測定の標準化のためには、水棲菌由来の ET 標品化とこれに基づくキットのバリデーションが必要と考えられる。

3. 安定化剤入り採取管を使用すれば、透析液エンドトキシン活性は冷蔵で 7 日間安定であった。

文献

- 1) 山上征二：透析液安全基準策定報告。透析会誌 28：1487-1493, 1995
- 2) Twohy CW, Duran AP, Munson TE: Endotoxin contamination of parental drugs and radiopharmaceuticals as determined by the limulus amoebocyte lysate method. J Parent Science Technol 35: 190-201, 1984
- 3) Yamamoto C, Kim ST: Endotoxin rejection by ultrafiltration through high-flux, hollow fiber filters. J Biomed Mater Res 32: 467-472, 1996
- 4) 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 96 B)。臨牀透析 12 別冊 HDF 療法'96: 142-148, 1996
- 5) 重松恭一, 西江和夫, 平松英樹, 鹿島伸康, 中島弘二, 田嶋俊郎, 筒井敏彦, 坂下恵一郎：透析液中のエンドトキシン測定上の問題点。腎と透析別冊 1995 ハイパフォーマンスマンブレン'95: 25-27, 1995
- 6) Yamamoto C, Kim ST: Validation of limulus tests for endotoxin evaluation in dialysate. Nephrology 2: 429-434, 1996
- 7) 及川一彦, 三谷 盛, 千田 宏, 石崎 允：エンドトキシン測定における検量線の検討。臨牀透析 12 別冊 HDF 療法'96: 82-86, 1996
- 8) 土谷正和, 高岡 文, 井尻晴久, 西野たまき, 松浦脩治, 村上尚子, 森田麻生, 神田千春：エンドトキシン-シングルテストワークを用いた透析液エンドトキシン測定。第二回 HDF 研究会抄録集: p 22, 1996
- 9) Klein E, Pass T, Harding GB, Wright R, Million C: Microbial and endotoxin contamination in water and dialysate in the central United States. Artif Organs 14: 85-94, 1990
- 10) Rietschel ET, Kirikae T, Schade FU, Ulmer AJ, Holst O, Brade H, Schmidt G, Mamat U, Grimm-ecke HD, Kusumoto S: The chemical structure of bacterial endotoxin in relation to bioactivity. Immunobiology 187: 169-190, 1993
- 11) 徳永文稔, 岩永貞昭：抗リポ多糖因子：その構造と生物活性。代謝 26: 429-439, 1989
- 12) 竹沢真吾, 菊池伸樹, 日台英雄, 中村陽子, 戸田規子, 菅野正彦：透析液エンドトキシン測定の基礎検討。腎と透析別冊 1993 ハイパフォーマンスマンブレン'93: 64-66, 1993
- 13) 渡邊真紀, 小田俊男, 田村弘志, 田中重則, 鈴木 仁：透析液エンドトキシン安定化方法。臨牀透析 12 別冊 HDF 療法'96: 149-152, 1996
- 14) 竹沢真吾：エンドトキシン分析時における標準エンドトキシンの問題点。第二回 HDF 研究会抄録集: p 23, 1996