[薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
110 (5) 332-340 (1990)]

エンドトキシン特異的リムルス試薬による血液製剤中のエンドトキシン量の測定とウサギ発熱曲線との関連性

藤原 博,^{*,a} 石田説而,^a 島崎義男,^a 内藤誠之郎,^a
土谷正和,^b 松浦脩治^b

国立予防衛生研究所,^a 和光純薬工業株式会社大阪研究所^b

Measurement of Endotoxin in Blood Products Using an Endotoxin-Specific *Limulus* Test Reagent and Its Relation to Pyrogenic Activities in Rabbit

Hiroshi FUJIWARA,^{*,a} Setsuji ISHIDA,^a Yoshio SHIMAZAKI,^a
Seishiro NAITO,^a Masakazu TSUCHIYA^b
and Shuji MATSUURA^b

National Institute of Health,^a 2 Kamiosaki, Shinagawa-ku, Tokyo 141, Japan
and Osaka Research Laboratory, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.,^b 6-1
Takada-cho, Amagasaki, Hyogo 661, Japan

(Received January 11, 1990)

The amounts of endotoxin in commercial blood products were measured by the turbidimetric kinetic *Limulus* test with an ordinary reagent (LAL-HS) and a new endotoxin-specific reagent (LAL-ES). LAL-ES contains a sufficient amount of a water-soluble (1→3)- β -D-glucan derivative as a blocker of the (1→3)- β -D-glucan-mediated coagulation pathway in the reaction of the *Limulus* amoebocyte lysate. The amounts of endotoxin in albumin and globulin products measured with LAL-ES agreed with pyrogenic activities in rabbits, but those measured with LAL-HS did not. Added endotoxin in the blood products was well recovered with LAL-ES, but that in some products was excessively recovered with LAL-HS. The amounts of endotoxin in diphtheria-pertussis-tetanus combined vaccines measured with LAL-HS and LAL-ES agreed with the pyrogenic activities in rabbits. The results suggested the existence of a false-positive substance like β -glucan in the blood products but not in the vaccine. LAL-ES is more suitable for the detection of endotoxin in blood products than LAL-HS.

Keywords—*Limulus* test; endotoxin; β -glucan-like-substance; blood product; *Limulus* amoebocyte lysate (LAL)

緒言

エンドトキシン¹⁾は、致死性、発熱性、アジュバント作用等、多彩な生物活性を示す他、グラム陰性菌感染時のショックや、敗血症等、重篤な症状を引き起こす物質として知られている。また、いわゆる発熱物質 (pyrogen) としては最も強力なものであり、これの医薬品、血液製剤、ワクチン等への混入は重大な副作用の原因となり、大きな問題となる。

わが国における医薬品等の発熱物質試験は日本薬局方²⁾、生物学的製剤基準³⁾、日本抗生物質医薬品基準⁴⁾のいずれにおいても、ウサギによる発熱試験法が規定されている。この試験法は実験動物を用いた *in vivo* の方法なので、手間、費用はもとより、精度や再現性の点で多くの問題を含んでいる。しかし、pyrogen はエンドトキシンだけではないこともあり、現在のところこれに代わる方法は無いようである。

私達は、ウサギ発熱試験に代わり得る *in vitro* の試験法の開発研究を続けているが、その1つとして、リムルス試験法⁵⁾を検討している。カプトガニ血球抽出液 (*Limulus* amoebocyte lysate: LAL) を用いたリムルス試験法によるエンドトキシンの検出は、現在、基礎及び臨床医学⁶⁾、薬学等を初めとして、水や医薬品、化学薬品の品質管理等、広い分野で用いられており、米国薬局方⁷⁾にも採用されている。日本でも最近、エンドトキシン試験法と

して日本薬局方の一般試験法に加えられ、注射用水の試験に用いられるようになった。²⁾ また最近では国内及び海外で、病気の臨床診断にこの試験法の利用が試みられており、尿路感染症、髄膜炎、肝疾患、敗血症等の診断に成果を上げている。^{8,9)} しかし、血液や尿等の体液、また血液製剤やワクチンについては、阻害物質や偽陽性物質の問題があり、正確な測定が困難な場合が多かった。^{10,11)} この偽陽性物質の1つとして(1→3)-β-D-グルカンがある。^{12,13)} この物質はカプトガニ凝固反応系の factor G と反応して LAL のゲル化を起こす物質で、血液を始めとする体液中にも含まれるが、¹⁴⁾ 高濃度では(1→3)-β-D-グルカン自身による LAL 活性化を阻害することが報告されている。¹²⁾ また、かつて腎臓透析患者に多く見られたエンドトキシン血症の原因も、セルロース系透析膜に由来する factor G 活性化物質によることが明らかになった。^{15,16)}

今回は、最近開発された、β-グルカンによる偽陽性反応を抑えエンドトキシンに特異的に反応するリムルス測定試薬¹⁷⁾を用いて、国家検定として発熱試験が実施された市販の血液製剤についてリムルス試験を試み、その発熱活性とリムルス活性との関連性を統計学的に比較分析して、この試験法がウサギ発熱試験に代わり得る可能性があるかどうかを検討した。すなわち、アルブミン製剤及びグロブリン製剤、更に精製沈降百日咳ジフテリア破傷風混合ワクチンについて、従来の試薬と比較し、ウサギ発熱活性との関連性を検討した。

材料及び方法

試薬 リムルス試薬はカードラン ((1→3)-β-D-グルカン) をカルボキシメチル化し (CM カードラン), 1 mg/ml の濃度で LAL 溶液 (ゲル化感度: 0.03 EU/ml) に加えたリムルスES-テストワコー (LAL-ES, 和光純薬工業, 大阪) 及び CM カードランを加えないリムルスHS-テストワコー (LAL-HS, 和光) を使用した。LAL-ES は試薬中に高濃度の(1→3)-β-D-グルカンを存在させることにより、これ自身による偽陽性の発生を抑え、エンドトキシンを特異的に測定しようとするものである。標準エンドトキシンとして日本薬局方エンドトキシン標準品 (*Escherichia coli* UKT-B 株由来) を蒸留水で溶解して使用した。血液製剤及び精製沈降百日咳ジフテリア破傷風混合ワクチンは国立予防衛生研究所生物製剤管理部に国家検定用に提出されたものを使用した。今回使用した血液製剤は各メーカーのアルブミン製剤 39 検体、グロブリン製剤 44 検体で、すべて発熱試験に合格したものである。

エンドトキシン活性 定法¹⁷⁾によって処理後、トキシノメーター (和光) により比濁時間を測定、これによる平行線検定法によって標準エンドトキシンに対する相対値として算出し、endotoxin unit (EU) 値で表した。

発熱活性 ウサギの体温が注射前体温に比べ 0.6°C 以上上昇するものを発熱活性陽性の目安とした。この実験で用いた標準エンドトキシンは 20 EU で 0.6°C の体温上昇を示すとされている。

発熱活性の測定 生物製剤基準に準じたウサギによる発熱試験法により測定、検体の体重 1 kg 当たり 3 ml を耳静脈に注射し、2 分間隔で直腸体温をコンピューターによって合計 3 時間自動測定して、注射前体温に対する体温上昇度及びそれによる発熱曲線で表した。

結果と考察

1. 無処理血液製剤の LAL-HS 及び LAL-ES による測定値の比較

無処理の各血液製剤につき LAL-HS 及び LAL-ES で EU 値を測定し、ウサギ発熱試験による体温の上昇度との関連性を検討した。Table I にそのうち各 10 検体について、それぞれの EU 値 (HS 値, ES 値) とその比、及びウサギ発熱試験による体温上昇度値を示した。() の中はウサギの匹数を示す。この結果、EU 値はいずれも HS 値の方が大きく、ばらついていて、その多くが発熱 (0.6°C 以上の上昇) を起こす EU 値を示した。それに対し、ES 値は小さく、ほとんどが発熱を起こさない EU 値であり、ほぼ値が揃っていた。これらの検体の発熱活性が弱く、いずれも国家検定における合格の範囲内を示していることを考慮すると ES 値の方が良く発熱活性と関連していた。また、HS 値/ES 値は同じ製剤でも製品によって大きく異なり、β-グルカン様物質等の偽陽性物質の含有量に差異があることが示唆された。

2. EU 値の度数分布

LAL-HS と LAL-ES で測定し、得られた EU 値の度数分布をアルブミン製剤、グロブリン製剤のそれぞれについて算出しグラフに示した (Fig. 1)。ここで EU 値は対数をとってある。全体としていずれの分布図もほぼ正規分布を示している。またいずれの製剤でも ES 値のピークが小さい方へ寄っているが、これは Table I で分

TABLE I. Comparison of EU Titers of Blood Products by LAL-HS and LAL-ES

Products (Maker)	LAL-HS (EU/ml)	LAL-ES (EU/ml)	HS/ES	Rise of temperature (m±E)
Albumin (A)	35.25	3.54	10.0	0.50±0.05 (2)
Albumin (B)	14.25	3.58	4.0	0.30±0.12 (6)
Albumin (C)	4.64	2.81	1.7	0.28±0.25 (6)
Albumin (D)	23.46	0.54	43.4	0.33±0.28 (3)
Albumin (E)	8.49	6.06	1.4	0.33±0.10 (2)
Albumin (F)	13.50	3.32	4.1	0.30±0.10 (2)
Albumin (G)	17.01	0.25	68.0	0.27±0.19 (6)
Albumin (H)	26.63	3.32	8.0	0.15±0.05 (2)
Albumin (I)	0.74	0.50	1.5	0.35±0.05 (2)
Albumin (J)	11.48	6.30	1.8	0.15±0.15 (2)
Globulin (A)	21.89	0.03	729.7	0.30±0.21 (3)
Globulin (B)	0.38	0.31	1.2	0.25±0.12 (6)
Globulin (C)	667.29	1.72	388.0	0.33±0.15 (6)
Globulin (D)	45.25	1.27	35.6	0.30±0.15 (3)
Globulin (E)	110.94	0.48	231.1	0.20±0.00 (2)
Globulin (F)	47.80	0.05	956.0	0.05±0.05 (2)
Globulin (G)	16.67	0.20	83.4	0.10±0.10 (2)
Globulin (H)	3.43	0.27	12.7	0.10±0.00 (2)
Globulin (I)	0.96	0.02	48.0	0.05±0.05 (2)
Globulin (J)	0.87	0.06	14.5	0.15±0.05 (2)

Fig. 1. Frequency Distribution of EU Titer in Blood Products
 Albumin and globulin products were assayed with both LAL-HS and LAL-ES.

かるように, 全体に HS 値より ES 値の方が小さいことを示す. すなわち, LAL-ES では偽陽性物質による偽反応が抑えられていると考えられる.

3. 試薬の違いによるリムルス活性の比較

LAL-HS と LAL-ES で測定した EU 値を比較した. Fig. 2 は各製剤につき 2 つの EU 値を線で結んだもの

Fig. 2. Comparison of HS Titrers and ES Titrers in Blood Products

□, HS titer; ■, ES titer. The horizontal lines in the figures indicate 20 EU of endotoxin which raise 0.6°C of rectal temperature of rabbits at the pyrogen test.

Fig. 3. Frequency Distribution of HS/ES Ratio of Blood Products

HS/ES ratio was calculated by division of HS titer by ES titer.

Fig. 4. Comparison of EU Titers in Blood Products from Various Makers

Each square indicates the mean EU titer of the product. The vertical bars in the figures indicate 95% confidence interval of the mean.

Fig. 5. Time-Courses of Temperature Rise Response in Rabbits by Blood Products

Each curve shows the mean of samples used in this experiments. Rabbits were injected intravenously with a dose of 3 ml per kg body weight, followed by measurements of the rectal temperature at 2 min intervals for 3 h. Each horizontal line represents 0.6°C which is regarded as temperature rise in general.

である。これにより、グロブリン製剤では線の長いものが多く、全体として HS 値と ES 値の差が大きいことが分かる。また HS 値は 20 EU を示す線より上に位置しているものもあったが、ES 値はほぼ線より下に位置した。使用した検体がすべて発熱試験に合格し、発熱活性が弱いものであることから、HS 値の多くは発熱活性と矛盾していた。

4. HS 値及び ES 値の比の分布

製剤別の HS 値/ES 値の度数分布を調べ、Fig. 3 に示した。これによると、アルブミン製剤の、ピークはほぼ

Fig. 6. Correlation between EU Titer and Rectal Temperature Rise

Each square represents an individual rabbit. The dotted lines represent 0.6°C rectal temperature rise (horizontal) and 20 EU of standard endotoxin (vertical).

1 つであるが、グロブリン製剤ではピークが 2 つ認められ、このことからグロブリン製剤中には偽陽性物質の含有量の異なる 2 種類の製剤が存在することが推測された。

5. メーカー別による EU 値の比較

メーカー別、製剤別に HS 値及び ES 値のそれぞれの平均を求め、Fig. 4 にプロットした。この結果、いずれの製剤も、またいずれの EU 値も全体としてメーカーによる差が否定されず異なる製剤は勿論のこと、同じ製剤でもメーカーによって性状等に差異のあるものが存在することが示唆された。

6. 血液製剤のウサギ発熱曲線

上記のように、この実験で使用した血液製剤はすべて生物学的製剤基準に基づく発熱試験に合格したものである。したがって発熱活性は非常に弱いと考えられるが、実験に用いたそれぞれの製剤の平均の発熱曲線を Fig. 5 に示す。縦軸に製剤注射時の体温を 0 としたときの体温上昇度を、横軸に 2 分間隔の測定度数（合計 3 時間）をとっている。いずれの製剤も 0.6°C （図中横線で示す）以下の上昇で推移しており発熱活性を示さなかった。

Fig. 7. EU Titer and Time-Courses of Rectal Temperature Rise in Rabbit by Precipitated Purified Diphtheria-Pertussis-Tetanus Combined Vaccine

See captions of Figs. 2 and 5.

7. リムルス活性とウサギ体温上昇度との関係

各試薬で測定した EU 値とウサギ体温上昇度との関連性を検討した。EU 値の対数と体温上昇度の関連をプロットしたのが Fig. 6 である。点線で囲んだ範囲は 0.6°C の体温上昇とそれを示す EU 値 (20 EU) を結んだものである。ES 値を示す右側の図ではいずれの製剤もほとんどが点線内に位置しているが、HS 値による左側の図ではかなりの製剤が点線外に位置していた。この事実は、ES 値は良く発熱活性と関連しているが、HS 値は発熱活性との間にずれがあることを示している。

8. 無処理血液製剤に添加したエンドトキシンの回収

無処理の血液製剤に一定量のエンドトキシンを添加し、各リムルス試薬で測定してその回収性を調べた。Table II はその成績で、各添加量に対する HS 値及び ES 値を EU 値で示した。その結果、ES 値は、もともと製剤に含まれているエンドトキシン量を考慮すると良く添加量と一致しており、ほぼ正確に回収されたと考えられる。それに反し、HS 値はかなり大きく添加量とずれているものがあり、血液製剤中の偽反応物質の影響を受けたと考えられる。

9. 沈降精製百日咳ジフテリア破傷風混合ワクチンの EU 値の比較及びウサギ発熱曲線

最後に沈降精製百日咳ジフテリア破傷風混合ワクチンについて、LAL-HS、LAL-ES によって EU 値を測定し、ウサギ発熱曲線と比較した。Fig. 7 の上図は 2 つの測定法による EU 値を線で結んだもので、上記 Fig. 2 と同じ表示法である。Fig. 2 における各製剤と比べいずれも線が短く、HS 値と ES 値の間が小さいことが知られた。すなわち、血液成分を含まないこのワクチンは β -グルカン様物質をほとんど含まないと考えられるため、いずれのリムルス試薬を用いても測定値に差が見られなかった。Fig. 7 の下図はこのワクチンのうち、上は lot 4、下は lot 1 のウサギ発熱曲線の例であるが、この発熱活性はいずれもそれぞれの EU 値と平行していた。

結 語

以上に述べた実験結果から、従来の LAL-HS による EU 値が、発熱活性から期待される値よりかなり大きい値を示すこと、また添加したエンドトキシンの回収性も良くないことが示されたが、LAL-ES は得られた EU 値が発熱活性と良く関連し、添加エンドトキシンも良く回収することが認められた。これは、血液製剤の中にはある程度の量の β -グルカン様物質が含まれており、これが LAL-HS に反応して EU 値が高く測定されることが考えられる。これに対し、LAL-ES には製剤中の β -グルカン様物質は反応せず、偽陽性の発現が抑えられているものと考えられる。しかし、血液製剤中の β -グルカン様物質の量は製剤によって、また同じ製剤でもメーカーによって大きく異なるものがあることが、今回の実験から示唆された (Table I, Fig. 2, 4)。また、3 種混合ワクチンでは、LAL-HS と LAL-ES の差は認められず、これは β -グルカン様物質の含有がほとんど無いことによると考えられた (Fig. 7)。以上のことから、LAL-ES によって、従来難しいとされた、無処理血液製剤中のエンドトキシン量をほぼ正確に測定することが可能であると考えられ、測定値は発熱活性とも良く関連した。

引 用 文 献

- 1) 岩永貞明, 丹羽 允, 吉田昌男 (編), “内毒素—その構造と活性—,” 医歯薬出版, 東京, 1983.
- 2) 第十一改正日本薬局方, 厚生省, 1986.
- 3) 生物学的製剤基準, 厚生省, 1985.

TABLE II. Recovery of Endotoxin Added in Blood Products

Products (Maker)	Methods	Endotoxin dose added (EU/ml)		
		0	1.25	20.0
Albumin (A)	LAL-HS	6.56	8.58	24.94
	LAL-ES	0.35	1.62	17.69
Albumin (B)	LAL-HS	6.41	18.71	29.54
	LAL-ES	0.14	1.65	19.00
Albumin (C)	LAL-HS	3.60	5.58	27.59
	LAL-ES	0.74	1.65	19.00
Albumin (D)	LAL-HS	13.14	19.91	36.55
	LAL-ES	1.44	3.84	24.61
Globulin (A)	LAL-HS	47.80	38.40	101.48
	LAL-ES	0.05	1.05	12.30
Globulin (B)	LAL-HS	91.44	88.77	106.21
	LAL-ES	1.81	5.39	18.48
Globulin (C)	LAL-HS	14.31	24.14	28.54
	LAL-ES	0.01	0.88	13.91
Globulin (D)	LAL-HS	0.54	1.46	9.54
	LAL-ES	0.08	1.10	17.44

- 4) 日本抗生物質医薬品基準, 厚生省, 1982.
- 5) J. Levin, F. B. Bang, *Thromb. Diath. Haemorrh.*, **19**, 186 (1968).
- 6) 織田敏次, 山本祐夫 (監修), “第 1 回—第 4 回エンドトキシン臨床研究会記録,” 羊土社, 東京, 1979—1983.
- 7) U. S. Pharmacopeia XX, 1980, p. 888.
- 8) 大林民典, 化学療法領域, **5**, 61 (1989).
- 9) J. H. Jorgensen, *Microbiology*, **1985**, 27.
- 10) K. Takagi, A. Moriya, H. Tamura, C. Nakahara, S. Takano, Y. Fujita, T. Kawai, *Thromb. Res.*, **23**, 51 (1981).
- 11) 大林民典, 河合 忠, 臨床検査, **26**, 635 (1982).
- 12) J. Kakinuma, T. Asano, H. Torii, Y. Sugino, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **101**, 434 (1981).
- 13) T. Morita, S. Tanaka, T. Nakamura, S. Iwanaga, *FFBS Lett.*, **124**, 318 (1981).
- 14) 中村隆範, 森田隆司, 平永万寿代, 宮田敏行, 岩永貞昭, 日細菌, **38**, 781 (1983).
- 15) T. Obayashi, H. Tamura, S. Tanaka, M. Ohki, S. Takahashi, T. Kawai, *Infect. Immun.*, **53**, 294 (1986).
- 16) 青木悦子, 野沢章夫, 山田誠一, 金沢 司, 大和田 滋, 石田尚志, 中村正夫, 山本光祥, 臨床検査, **31**, 321 (1987).
- 17) 土谷正和, 松浦脩治, 日細菌, **44**, 389 (1989).