Limulus Lysate (Pre-gel) のゲル化反応に関する研究 (第 3 報¹⁾)

各種物質のゲル化反応に及ぼす影響

小林正義, 森本武男, 山元正昭

帝国臓器製薬株式会社化学研究部²⁾

Studies on the Gelation Reaction of Limulus Lysate (Pre-gel). III.¹⁾ Influences of Various Substances on the Gelation Reaction of Limulus Lysate

MASAYOSHI KOBAYASHI, TAKEO MORIMOTO, and MASAOKI YAMAMOTO

Chemical Research Laboratory, Teikoku Hormone Mfg. Co., Ltd.²⁾

(Received December 2, 1974)

Effect of nucleic acid-related substances, amino acids, saccharides, protein-denaturing or -precipitating agents, SH reagents, reducing agents, biological products, urine, and saliva, on the gelation reaction of limulus lysate was examined. Most of them have no effect on the gelation reaction, but some inhibition was observed in benzyl alcohol, ATP of nucleic acid-related substances, cysteine, and mercaptoethanol among SH reagents. Protein-denaturing agents inhibited the gelation reaction at the concentration higher than a certain level. Saliva, urine, and biological products showed no inhibition of the gelation reaction. It was also found that the limulus test was applicable to the detection of endotoxin in products at various stages of manufacturing process.

Limulus lysate (pre-gel) は、カプトガニ血球 (amebocyte) から抽出した血球内成分で、とくにグラム陰性菌エンドトキシンにより、*in vitro* でゲル化反応を起こすことからエンドトキシンの鋭敏な検出法に用いられている。³⁾

現在、アメリカ産カプトガニ (*Limulus polyphemus*) および日本産カプトガニ (*Tachypleus tridentatus*) から活性の高い lysate (pre-gel) が抽出され、エンドトキシン検出試薬として市販に供され、⁴⁾ この検出反応は一般に limulus test (リムラステスト) とよばれている。

limulus test が支障なく実用に供されるためには、この反応の特異性、すなわち、反応がエンドトキシンのみによること、および被検物質中のエンドトキシンが、そのまま検出され得ることの二点が解明される必要がある。前者については、すでに多くの報告があり、⁵⁾ 著者らもすでに多くの生体内物質がゲル化反応に無関係なことを報告した。^{1b)}

エンドトキシンによる lysate (pre-gel) のゲル化機構は lysate に含まれる clottable タンパクが共存するトロンビン類似の酵素系や 2 価イオンとともに、clot タンパクを形成するためとされており、⁶⁾ この限りではエンドトキシンの関与する一種の化学反応と解釈することができる。したがって、ゲル化反応は pH をはじめとする反

1) a) 前々報 (1b) および前報 (1c) を第 1 報および第 2 報とする; b) 小林正義, 山元正昭, 薬誌, 94, 293 (1974); c) 小林正義, 山元正昭, 薬誌, 94, 298 (1974).

2) Location: Shimosakunobe, Takatsu-ku, Kawasaki.

3) J. Levin, F.B. Bang, *Thromb. Diath. Haemorr.*, 19, 186 (1968).

4) E-Toxate (Sigma 社), Pyrogent (Mallinckrodt 社), Pyrotest (Difco 社), プレゲル (帝国臓器—生化学工業).

5) a) R.B. Reinhold, J. Fine, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 137, 334 (1971); b) R.R. Rojas-Corona, R. Skarnes, S. Tamakuma, J. Fine., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 132, 599 (1969); c) J.Y. Jorgensen, R.F. Smith, *Appl. Microbiol.*, 26, 43 (1973); d) 丹羽 允, 平松 卓, 和栗 修, モダンメディア, 3, 137 (1974); e) 加納晴三郎, 川崎浩之進, 診断と治療, 62, 326 (1974).

6) a) N.O. Solum, *Thromb. Diath. Haemorr.*, 23, 170 (1970); b) N.S. Young, J. Levin, R.A. Prendergast, *J. Clin. Invest.*, 51, 1970 (1972); c) N.O. Solum, *Thromb. Res.*, 2, 55 (1973).

応条件、阻害、促進など反応系に対する影響物質などにより正常な反応を示さなくなり、エンドトキシンを定量的に、すなわち、そのまま検出することが不能になる場合もあることが容易に想像される。この意味から、とくに反応影響物質を詳細に検討することが limulus test の実用性を高めるのに必要と考えられる。

本報においては、タンパク、アミノ酸、核酸などの生体物質、タンパク変性剤、滅菌剤、および SH 剤、還元剤などのゲル化反応におよぼす影響を検討し、同時に生体抽出試料、唾液、尿などについても、その一部で発熱試験との比較を行ないながら検討を行なった。

実 験 の 部

1. 試 料 Lysate (pre-gel) は日本産カプトガニ血球から抽出された lysate の自社製剤を用いた。本品は lysate にリン酸塩と塩化ナトリウムを加えたアンプル凍結乾燥品で、そのエンドトキシンの最少検出感度 (end-point) は、*E. coli* 0111:B4 エンドトキシンを用いた場合 1×10^{-3} $\mu\text{g/ml}$ である。

エンドトキシンは *Shigella* K-3 株⁷⁾ および *E. coli* 0111 株⁸⁾ より調製された標品を用いた。糖類 (グルコース^{9a)} マルトース^{9a)} コンドロイチン硫酸^{9b)}、アミノ酸 (L-リジン^{9c)}、核酸関連物質 (ATP-2Na^{9d)} RNA^{9e)}、タンパク沈殿剤 (硫酸アンモニウム^{9d)} TCA^{9d)} スルホサリチル酸ナトリウム^{9d)}、滅菌剤 (エタノール^{9d)} チメロサル^{9f)} チッ化ナトリウム^{9d)} ベンジルアルコール^{9d)} ベンザルコニウムクロライド^{9f)}、タンパク変性剤 (コール酸ナトリウム^{9d)} 尿素^{9d)}、SH 剤 (L-システイン^{9d)} L-シスチン^{9d)} グルタチオン^{9g)} 2-メルカプトエタノール^{9h)} チオグリコール酸ナトリウム^{9d)}、還元剤 (ハイドロサルファイトナトリウム^{9h)} アスコルビン酸ナトリウム⁹ⁱ⁾ などの被検物質は一部を除き、全て市販品を用いた。これらはあらかじめ加熱処理により脱エンドトキシンを行なうか、それが不可能なものは、pre-gel でブランクテストを行なったうえ、ゲル化反応を起こさない濃度を上限として用いた。

また、生体抽出試料としてブタ小腸抽出タンパク、チトクローム c 製剤用原末、ヒト尿より抽出したタンパクおよびペプチド分画を用いた。これらはチトクローム c 原末を除き、すべて当研究所において調製された。ヒト唾液、ヒト尿は健康男女より可及的無菌下に採取した。これらは採取直後、または室温に放置後、経時的に実験に供した。

マルトース製造プロセスでの各試料は実際の test plant によって得られたものを、最終製品は局方発熱性試験陽性のものと陰性のものを特に選び実験に用いた。^{9j)}

2. 試料の溶解および pH 補正 各試料およびエンドトキシンは注射用生理食塩液、注射用蒸留水、または pH 7.0—8.0 の Tris-塩酸緩衝液に溶解した。これらの溶剤は、いずれもエンドトキシンを含まないことを確認のうえ用いた。また、被検液の pH が、ゲル化反応至適範囲 (pH 6.0—7.5) から著しく外れるものは、エンドトキシン free の水酸化ナトリウム液、塩酸または Tris 緩衝液を用い補正した。

3. ゲル化反応および判定 Lysate アンプル凍乾剤 (プレゲル) を注射用蒸留水 0.1 ml に溶解し、被検液 0.1 ml を加えて混和し、キャップで覆い、37°、1 時間静置してゲル化反応を行なった。結果は前報^{1c)}に記載したと同様、アンプルを 45° に傾け、ゲル化の程度に応じて (++)、(+), (±), (−) の 4 段階で判定した。この場合、判定 (+) を至適反応とし、その濃度をもって最少検出量 (end-point) とした。以上の操作は清浄な部屋で行ない、使用する器具はすべてエンドトキシン free のものを使用した。

4. 最少検出感度 (End-point) の変動 Lysate (pre-gel) のエンドトキシンに対する最少検出量 (濃度) を、その検出感度とし、これをゲル化感度または end-point とよぶが、実験毎のこれらの変動をみるために、エンドトキシンを毎回実験日ごとに生理食塩液に溶解したものおよび、あらかじめ調製したエンドトキシン溶液を 4° に保存したものについて同一ロットの pre-gel を用い、同一実験条件下にゲル化反応を行ない、end-point の変動の程度をしらべた。

5. ゲル化反応の阻害または促進 エンドトキシン free の被検液にエンドトキシンを各種濃度になるように加えて、ゲル化反応を行ない、被検液に含まれる物質による反応阻害または促進の程度をしらべた。

この場合、エンドトキシンのみを生理食塩液に溶解した対照液にくらべて被検液に添加の場合の end-point が変動するかどうかによって、反応の阻害または促進の有無を判定した。生体抽出試料や唾液、尿など、あらかじめ混入エンドトキシン除去の困難なものについては、そのまま、あるいは希釈液について直接ゲル化反応を行ない、同時に発熱性試験を行なって、両者の比較から反応の阻害、促進の有無を判定した。

6. ウサギ発熱性との比較 ウサギ発熱性試験は第 8 改正日本薬局方の試験法に準じて行ない、発熱性陽性となる最少有効量 ($\mu\text{g/ml/kg}$) を求めたうえ、pre-gel によるゲル化反応によって得られる end-point ($\mu\text{g/ml}$) と比較して、その比率を求めた。

7) 国立衛生試験所製。

8) Difco 社製。

9) a) 東京化成製; b) 生化学工業製; c) 日本理化学薬品製; d) 和光純薬製; e) Sigma 社製; f) 武田薬品製; g) 田辺製薬製; h) 半井化学製; i) 第一化学製; j) 林原化学研究所。

結 果

1. End-point の変動

End-point の日差変動を検討するために同一ロットの lysate について同一条件で、測定時に毎回調製したエンドトキシン液に対する end-point を日を変えて測定した結果は Table I に示すとおりである。

TABLE I. Variation of Minimum Detectable Amount (End-point) of *Shigella* Endotoxin in Gelation Reaction of Pre-gel

Exp. No.	Date	Gelation of pre-gel by <i>Shigella</i> endotoxin ^{a)}				
		5×10^{-3}	2.5×10^{-3}	10^{-3}	5×10^{-4}	2.5×10^{-4} ($\mu\text{g/ml}$) ^{b)}
1	3/4	+	+	±	—	—
2	3/5	+	+	±	—	—
3	3/6	++	+	+	—	—
4	3/7	+	+	±	—	—

a) One-tenth milliliter of 0.9% NaCl solution containing *Shigella* endotoxin in different concentrations was added to each 0.1 milliliter of the pre-gel, and the mixtures were incubated at 37° for 1 hour. The results were judged as 4 grades from the following view points:

++ : formation of immovable solid gel

± : formation of movable gel in a mass

± : appearance of increased viscosity including formation of coarse granular gel

— : not formation of gel

b) prepared daily with saline solution

TABLE II. Variation of End-point of *E. coli* Endotoxin in Gelation Reaction of Pre-gel

Exp. No.	Duration ^{a)} (days)	Gelation of pre-gel by <i>E. coli</i> 0111: B4 endotoxin ^{b)}				
		5×10^{-3}	2.5×10^{-3}	10^{-3}	5×10^{-4}	2.5×10^{-4} ($\mu\text{g/ml}$)
1	0	++	+	+	—	—
2	0	++	+	+	—	—
3	0	++	+	±	—	—
4	2	++	+	+	±	—
5	3	++	+	+	±	—
6	4	+	+	±	—	—
7	5	++	+	±	—	—
8	12	++	+	±	—	—
9	14	++	+	±	—	—

a) Saline solutions containing *E. coli* endotoxin in different concentrations were kept at 4° for 14 days. Gelation reactions were carried out at definite periods.

b) Mixtures of endotoxin in different concentrations and pre-gel were incubated at 37° for 1 hour, and the results were judged as listed in Table I.

Shigella エンドトキシンに対する end-point は 1×10^{-3} — 2.5×10^{-3} $\mu\text{g/ml}$ の範囲で判定 (+) が変動した。また 4° に保存した *E. coli* 0111 エンドトキシン溶液に対しても Table II に示すごとく、実験初日の 3 回の繰返し測定を含めて、14 日までの経時測定で、同様に 1×10^{-3} — 2.5×10^{-3} $\mu\text{g/ml}$ の範囲で判定 (+) が変動した。これらの結果は、Lysate の各試料に対する end-point が約 2 倍の範囲で変動することを示すものである。また、エンドトキシン溶液は 4°、14 日間保存しても活性の低下が認められないことも同時に明らかにされた。

2. 各種物質のゲル化反応阻害または促進

Table III に糖、タンパク、アミノ酸、核酸関連物質による影響を end-point の変動で示した。

グルコースは 25% まで、マルトースは 43.2% まで何らの変動も示さなかったが、グルコースの 50% で若干の感度低下傾向を認めた。コンドロイチン硫酸は 4% まで、ウシ血清アルブミンは 5% まで、L-リジンは 10% まで、それぞれなら変動を示さず、反応阻害を認めなかった。ATP-2Na は 1% で変動を示さなかった。

TABLE III. Influences of Various Substances on End-point in Gelation Reaction of Pre-gel

Substances	Conc. ^{a)} (%)	End-point ^{b)} ($\mu\text{g/ml}$)	Substances	Conc. ^{a)} (%)	End-point ^{b)} ($\mu\text{g/ml}$)
NaCl	0.9	$1.0(\times 10^{-3})$	Chondroitin sulfate	4.0	$1.0(\times 10^{-3})$
Glucose	50	2.5		1.0	1.0
	25	1.0		0.1	1.0
	10	1.0	Bovine serum albumin	5.0	1.0
	5	1.0		1.0	1.0
	2.5	1.0		0.1	1.0
Maltose	43.2	1.0	L-Lysine	10.0	0.5
	10.8	1.0		1.0	1.0
	2.7	1.0	ATP-2Na	10.0	5.0
	0.67	1.0		1.0	1.0
RNA (Yeast)	0.1	1.0		0.1	1.0

a) Each material was dissolved in 0.9% NaCl solution at various concentrations and pH was adjusted to optimal pH range.

b) minimum concentration of *E. coli* 0111: B4 endotoxin to produce the grade (+) in gelation reaction

TABLE IV. Influences of Various SH and Reducing Reagents on End-point in Gelation Reaction of Pre-gel

Substances	Conc. (%)	pH ^{a)}	End-point ^{b)} ($\mu\text{g/ml}$)
H ₂ O (control)		6.6	$1.0(\times 10^{-3})$
L-Cysteine-HCl	1.0	7.7	100
	0.1	7.7	5.0
	0.01	7.7	2.5
L-Cystine-HCl	0.01	7.4	0.5
L-Glutathione	1.0	7.6	0.5
	0.1	7.6	1.0
	0.01	7.6	1.0
2-Mercaptoethanol	1.0	7.3	25.0
	0.1	7.3	1.0
	0.01	7.3	1.0
Na-thioglycollate	1.0	5.8	0.5
Sodium hydrosulfite	1.0	7.4	1.0
	0.1	7.4	1.0
Na-L-Ascorbate	1.0	6.5	1.0

a) pH was adjusted with either NaOH solution or Tris-HCl buffer of various pH.

b) minimum concentration of *E. coli* 0111: B4 endotoxin to produce the grade (+) in gelation reaction

が 10% では明らかな反応阻害を示し, 1/5 の感度低下が認められた. RNA は 0.1% で変動を示さなかったが, より高濃度でエンドトキシン free の標品の入手が不能で, 阻害の有無を検討することはできなかった.

SH 剤, 還元剤による影響は Table IV に示すとおりである.

L-システイン, 2-メルカプトエタノールは 1% でも, かなり反応阻害があり, とくにシステインはすでに 0.1% でわずかながら阻害を示し, 1% では, ほぼ完全な阻害を示した. 他の SH 剤, 還元剤ではなんらの影響も認められず, SH 基または還元性による共通の阻害機構によるものとは考え難い.

タンパク沈殿剤, 滅菌剤などによる影響は Table V に示すとおりである.

硫酸アンモニウムは 1% ではほとんど阻害はなかったが, 5% 以上では反応液に沈殿を形成し, 反応は不能となった. エタノール, TCA ではほとんど阻害を認めなかったがスルホサリチル酸ナトリウム, コール酸ナトリ

TABLE V. Influences of Protein Denaturing and Precipitating Reagents, and Antiseptics on End-point in Gelation Reaction of Pre-gel

Substances	Conc. (%)	End-point ^{a)} (μg/ml)	Substances	Conc. (%)	End-point ^{a)} (μg/ml)
NaCl	0.9	0.5 (× 10 ³)	Urea	20.0	>100 (× 10 ³)
(NH ₄) ₂ SO ₄	20.0	>100 ^{b)}		10.0	100
	10.0	>100 ^{b)}		5.0	5.0
	5.0	10.0 ^{b)}		1.0	0.5
	1.0	1.0	Benzyl alcohol	2.0	>100 ^{b)}
Ethanol	5.0	1.0		1.0	5.0
Na-TCA	1.0	2.5		0.5	0.5
Sulfosalicylate	0.4	>100 ^{b)}	Benzalkonium chloride	0.1	25 ^{b)}
Thimerosal	0.01	0.5		0.01	1.0
NaN ₃	0.02	1.0			
Na-cholate	1.0	>100 ^{b)}			
	0.1	5.0			

a) Minimum concentration of *E. coli* 0111 endotoxin to produce the grade (+) in gelation reaction

b) Gelation reaction were disturbed with production of turbidity or precipitate in mixture of test solution and pre-gel.

ウムなどのタンパク変性剤には強い阻害作用が認められた。尿素の阻害作用は弱く、1% では阻害は認められなかった。滅菌剤は常用される濃度で試験したが、チメロサル、チッ化ナトリウムはほとんど阻害がなく、ベンジルアルコールは 1% 以上で阻害を示し、0.5% では阻害を認めなかった。ベンザルコニウムクロライドのようなイオン性界面活性剤はタンパクに対し強い沈殿反応を示すが、ゲル化反応でも 0.1% 以上で強い反応阻害が認められた。

TABLE VI. Comparison of End-point in Gelation with Pyrogenic Activity of Tissue and Urine Extracts

Substances	Gelation ^{a)} (A) (μg/ml)	Pyrogenic ^{b)} activity (B) (μg/ml/kg)	Ratio (B/A)
Intestine protein			
Lot 17	0.5	5.0	10
18	0.5	5.0	10
27	2.5	25.0	10
28	1.0	10.0	10
29	1.0	10.0	10
30	0.5	10.0	20
31	0.5	10.0	20
32	1.0	10.0	10
34	1.0	20.0	20
Cytochrome c			
Lot A	5.0 × 10 ³	25.0 × 10 ³	5
B	10.0 × 10 ³	250.0 × 10 ³	25
C	5.0 × 10 ³	100.0 × 10 ³	20
Urine fraction			
Frac. 1	1.0	5.0	5
2	0.25	5.0	20
3	0.25	5.0	20
4	0.1	2.5	25
5	0.5	5.0	10

a) Minimum concentration (end-point) of samples to produce the grade (+) in gelation reaction by pre-gel.

b) Minimum effective dose to be positive in pyrogen test.

3. 生体抽出試料による影響 プタ小腸抽出タンパク 9 ロット, チトクローム c 製剤用原末 3 ロット, 尿抽出タンパク, ペプチド 4 種についてゲル化反応を行なった結果は Table VI に示すとおりである. これらは, いずれも当初からエンドトキシン混入が強く, 除去困難であったため, そのままゲル化反応を行なって, end-point を測定すると同時に発熱性試験による最少有効量と比較した.

プタ小腸抽出タンパクでは, ゲル化反応による end-point は $0.5\text{--}2.5\text{ }\mu\text{g/ml}$ の範囲にあり, 発熱性最少有効量は $5.0\text{--}25.0\text{ }\mu\text{g/kg}$ で両活性の比率は $1:10\text{--}1:20$ の範囲であった. チトクローム c 製剤用原末でもゲル化反応の end-point と発熱性最少有効量の比率は $1:5\text{--}1:25$ の範囲にあり, また尿抽出試料でも $1:5\text{--}1:25$ の範囲にあった.

種々のエンドトキシンによる両活性の比率は大よそ $1:5\text{--}1:20$ の範囲にあることを, すでに前報¹⁾で認めており, エンドトキシンを含む生体抽出試料でもこの比率が, ほぼ一致することは, このような生体抽出試料によっても, ゲル化反応は全く影響を受けないことを示す.

4. 尿, 唾液による影響

新鮮唾液 3 例, および 10 名以上から採取した唾液を混合し, 室温で 10 日間保存した保存唾液 2 例についてゲル化反応を行ない, 同時に発熱性試験と比較した結果は Table VII に示すとおりである.

TABLE VII. Comparison of End-point in Gelation with Pyrogenic Activity of Fresh and Stored Saliva

Samples	Duration ^{a)} (days)	Saliva dilution ^{b)} for end-point (A)	Saliva dilution ^{c)} for pyrogenic activity (B)	Ratio (B/A)
A	0	4×10^3	2×10^2	1/20
B	0	4×10^3	2×10^2	1/20
C	0	4×10^3	4×10^2	1/10
D ^{d)}	10	4×10^6	2×10^5	1/20
E ^{d)}	10	4×10^6	4×10^5	1/10

a) Saliva samples were stored at 25° for 10 days.

b) Saliva samples were diluted with saline solution to produce the grade (+) in gelation reaction by pre-gel.

c) Saliva samples were diluted with saline solution to produce to be positive in pyrogen test.

d) mixed with numerous specimens

両唾液ともエンドトキシン含量は高く, 新鮮唾液で 4000 倍希釈, 保存唾液で 400 万倍希釈で end-point が得られた. 一方発熱性陽性となる最少有効量に対する希釈度は, それぞれ 200 倍—40 万倍で両者の比率は $1:10\text{--}1:20$ を示した. したがって, 唾液およびその希釈液による反応阻害はなんら認められないと考えることができる.

次に健康な男女 5 名から可及的無菌的に採取した直後および, その日までの保存尿について, エンドトキシン無添加, 添加に分けてゲル化反応を行なうと Table VIII に示す結果が得られる.

5 例中 4 例 (男子 3 例, 女子 1 例) は直後尿でゲル化反応全く陰性であり, 強い反応阻害を疑わせたが, これに $1 \times 10^{-3}\text{ }\mu\text{g/ml}$ のエンドトキシンを添加すると, 原尿で判定 (+) が得られた. 同時に経時的にゲル化反応陰性を示す期間は, いずれも添加したエンドトキシンは, そのままゲル化反応で対応量が, そのまま反応に検出されるので新鮮尿, 保存尿とも, 尿自身に反応阻害の全くないことが示された. なお, これらの尿のうち, 男子 1 例 (A), 女子 1 例 (D) は 7 日目, 3 日目で菌増殖によるとみられるゲル化反応陽性への転化がみられた.

原尿において採取直後, エンドトキシンが多量検出された女子 1 例 (E) (10 倍希釈で end-point) は, 経時的にエンドトキシンの増加が著しく, 7 日目で 10 万倍希釈の end-point に達した. この例でも採取直後にエンドトキシン $5 \times 10^{-3}\text{ }\mu\text{g/ml}$ を添加すると, 50 倍希釈で end-point が得られているので尿成分による反応促進ではなく, 尿に保有されるエンドトキシンが, そのまま反応に反映したものと考えることができる.

5. マルトース製造工程におけるゲル化反応

先に述べたように, マルトースはゲル化反応になんらの影響も及ぼさないことを認めたので製造工程の各マルトース分画によるゲル化反応への影響を検討した. 結果は Table IX に示すとおりである.

3 ロット (VIII, IX, X) の製造工程のそれぞれ 1—3 または 1—4 の工程で得られるマルトース分画液を Tris 緩衝液で pH 補正してゲル化反応と発熱性試験を行なうと VIII-1 を除き, すべての標品で 2 つの試験結果は良

TABLE VIII. Dilution to End-point in Gelation on Initial Urine and Endotoxin-added Urine

Samples	sex	Urine dilution to end-point ^{a)}				
		0	5	24 hr	3	7 days ^{b)}
A	male	— ^{c)}	—	—	—	1.0
	+Et ^{d)}	1.0	1.0	1.0	1.0	—
B	male	—	—	—	—	—
	+Et ^{d)}	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
C	male	—	—	—	—	—
	+Et ^{d)}	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
D	female	—	—	—	50	1 × 10 ³
	+Et ^{d)}	1.0	1.0	1.0	—	—
E	female	10	50	2 × 10 ²	5 × 10 ³	1 × 10 ⁵
	+Et ^{d)}	50	100	—	—	—

a) Urine samples were diluted with saline solution to produce the grade (+) in gelation reaction by pre-gel.

b) Urine samples were kept at 25° for 5 hrs to 7 days.

c) no gel formation (grade—) in gelation reaction

d) Endotoxin of *E. coli* 0111:B4 (Et) was added to original urine to concentration of 1 × 10⁻³ µg/ml.

e) In the same manner, added to concentration of 5 × 10⁻²

TABLE IX. Comparison of Gelation Reaction with Pyrogenic Activity of Each Manufacturing Products of Maltose

Lot	Stage ^{a)}	pH		Gelation ^{d)}			Pyrogenic activity			
		Preadjusted ^{b)}	Adjusted ^{c)}	1	2	4 hr ^{e)}	Fever degree ^{f)}	Judged ^{g)}		
VIII	1	4.38	6.67	—	—	—	1.1	0.3	0.7	+
	2	4.19	7.22	—	—	—	0.3	0.2	0.3	—
	3	3.96	7.14	—	—	—	0.4	0.3	0.2	—
IX	1	4.78	6.72	++	—	—	1.7	1.5	1.8	+
	2	4.77	7.18	+	—	—	0.7	1.5	0.5	+
	3	4.60	7.20	±	+	—	1.1	0.9	0.9	+
	4	4.67	7.19	—	—	—	0.1	0.4	0.5	—
X	1	4.56	6.83	++	—	—	1.1	1.0	1.8	+
	2	4.10	6.76	—	—	—	0.0	0.4	0.1	—
	3	4.32	7.18	—	—	—	0.1	0.2	0.3	—
	4	4.24	7.18	—	—	—	0.2	0.5	0.0	—
A	(Final)	6.16	7.14	++	—	—	1.0	2.0	1.4	+
B		4.95	7.17	++	—	—	0.7	0.7	1.0	+
C		4.83	7.18	+	—	—	0.9	0.6	0.7	+
D		5.20	7.18	—	—	—	0.1	0.1	0.0	—

a) Each stage of manufacturing process (stage 1—stage 4).

Products were obtained in form of solution. Product from final stage is dried powder.

b) Values for original product solution from each stage (contained 40—45% w/w of various purity of maltose). Final products were dissolved in water to 45% w/w.

c) Equal volume of 0.2M Tris-HCl buffer (pH 7.25) containing 10% NaCl was added to each product solution, and so pH was adjusted to optimum range for gelation reaction.

d) Results were judged as listed in Table I.

e) Reaction time was extended to 4 hrs.

f) Individual value of three rabbits

g) Judged according to criteria of JP VIII

く一致した。IX-3 のように 1 時間のゲル化反応で判定 (±) の場合でも、反応を 2 時間まで延ばすことによって判定 (+) が得られた。

VIII-1 の場合は工程の最初でもありなんらかの阻害が働いた可能性が考えられる。

またマルトース最終製品末 4 ロットについても同様に両活性は良く平行した。これらの結果は、マルトースの製造工程によるゲル化反応への影響は第一工程を除き、全く認められず、同時に limulus test の製造プロセスへの応用の可能性を明らかにしたものである。

考 察

Limulus test は Levin³⁾ により, はじめてカプトガニ (*Limulus polyphemus*) の血球から抽出されて以来, エンドトキシンによる, そのゲル化反応の機構が不明のまま, 临床上または薬剤などに応用が試みられ, 現在かなり広範囲に利用されるにいたっている. この反応のエンドトキシン, とくにグラム陰性菌エンドトキシンに対する特異性は, よくしらべられており,⁵⁾ 本邦でも加納,^{5e)} 下平,¹⁰⁾ 円羽,^{5d)} 著者^{1a)} らによって確認が得られているので, 本反応はエンドトキシンによる特異的なゲル化反応と考えてよい.

一方, この反応の定量性すなわち被検物質中のエンドトキシンが, そのまま正しく検出されるかの問題, 換言すれば被検物質または反応条件による反応への影響についてはきわめて実証性に乏しく, pH,^{1c, 11, 12)} キレート剤,^{3, 12, 13)} *p*-chloromercuribenzoic acid,^{6b)} *p*-chloromercuri-phenylsulfate,^{6b)} DFP,^{6b)} 血液,^{5a, 11)} トロンビン,^{5a)} γ -グロブリン,^{5a)} poly I-poly C¹⁴⁾ などきわめて部分的な報告があるにすぎない. Limulus test の確実な応用を望むためには, このような被検物質による影響を広範囲に検索する必要があることは当然であり, ゲル化機構の解明をまって, その阻害または促進物質の明らかにされるのを待つまゝに, 本 test の応用のうゑで現実に対象となる諸物質について順次検討することとした.

すでに前報^{1c)} において, pH, NaCl のゲル化反応に及ぼす影響について報告したが, 本報では, さらに広範囲な物質をとりあげた. その結果多くの物質は, その高濃度でもゲル化反応に, まったく影響を及ぼさないか, あるいは実用上支障のない軽度の影響しか与えないことが認められた. しかし, そのいくつかは部分的な, または完全な反応阻害を起こすことが明らかにされた. それらは ATP-2Na の高濃度, SH 剤のうちの L-システイン, 2-メルカプトエタノールであり, また多くのタンパク変性・沈殿剤であった. 滅菌剤は常用的濃度で無影響なものもあったが, 一部には強い阻害を示すものも認められた. このような反応阻害は lysate (pre-gel) に含まれるゲル化反応成分すなわち clottable タンパク, 酵素タンパク, 2価イオンなどに対する個別的直接作用のほか連鎖的な反応機構上での間接的な作用も含まれるものと解釈される.

ATP-2Na 高濃度による反応阻害は RNA 高濃度での未検討とあわせ, poly I-poly C に反応促進が認められるという Elin らの報告¹⁴⁾ を考慮するまでもなく, さらに広くヌクレオシド, ヌクレオチド系の検索を必要とすることを示唆するものであり, 今後早急に検討する予定である.

SH 剤のうち, とくに L-システインが強い阻害作用を示す理由は不明であるが, 他の SH 剤, 還元剤ではなんらの影響を示さない例の多いことを考慮すると, その構造上での特異性か, 他の要因との相乗作用としか考えられない. また, タンパク沈殿剤などは, もともとゲル化反応がタンパク質の直接関与する化学反応であることを考えると当然阻害的に作用する可能が強く, 結果もほぼ一致した. しかしながら, それらの種類, 濃度によっては実用上支障のないものもあり, たとえば強い阻害を示すベンジルアルコールも 0.5% 以下ではまったく阻害を示さないことなど, その例である.

生体抽出試料は, もともとエンドトキシンを含有するので発熱試験との比較で検討したが, いずれもエンドトキシン単独での動態をよく反映した結果が得られており, これらにタンパク, 核酸, 糖類などが共存することを考慮に入れても limulus test の応用は十分可能である. 同時に唾液, 尿でも反応阻害はまったく認められず, とくに尿の場合, 経時的な limulus test により, 細菌とくにグラム陰性菌の増殖とよく平行した結果が別に得られており, このことは, Jorgensen ら¹⁵⁾ の尿路感染症患者における本 test と菌培養の平行性をみた報告とあわせ, limulus test の尿の臨床診断への応用の可能性を示すものである.

謝辞 本研究にあたり御指導を賜った筑波大学 関口晃一教授, 大阪市大 丹羽 允講師, 御鞭撻をいただいた当社 岡部, 宮田両常務, 松島研究開発部門長に謹謝し, 実験に終始協力された石黒和恵嬢に感謝いたします.

10) 下平彰男, 都立衛生研究所年報, **24**, 97 (1972).

11) J. Levin, P.A. Tomasulo, R.S. Oser, *J. Lab. Clin. Med.*, **75**, 903 (1970).

12) 丹羽 允, 平松 卓, 和栗 修, 診断と治療, **62**, 300 (1974).

13) J. Levin, F.B. Bang, *Bull. Johns. Hopks. Hosp.*, **115**, 265 (1964).

14) R.J. Elin, S.M. Wolff, *J. Infec. Dis.*, **128**, 349 (1973).

15) J.H. Jorgensen, H.F. Carvajal, B.E. Chipps, R.F. Smith, *Appl. Microbiol.*, **26**, 38 (1973).