

透析液細菌汚染の検出・測定法

田中重則

透析液が細菌に汚染されると菌由来の種々の物質が混入してくるが、なかでもごく微量で強力な発熱性ほか様々な生物活性を示すのが、グラム陰性菌細胞壁由来のエンドトキシンである。この検出法としてはリムルテストが最も優れており、その実際の測定法としては比色法と比濁法に大別される。筆者らは Wellreader を用いてカイネティック比色法により、水道水から臨床透析液まで透析全ラインのエンドトキシン濃度の管理に便利な広範囲のエンドトキシン (0.5~100,000 EU/l) が定量できる日常検査法を確立した。また、インラインにおいてリアルタイムでエンドトキシン濃度をモニタリングする 6 連バルブ型モニタリング装置も考案した。

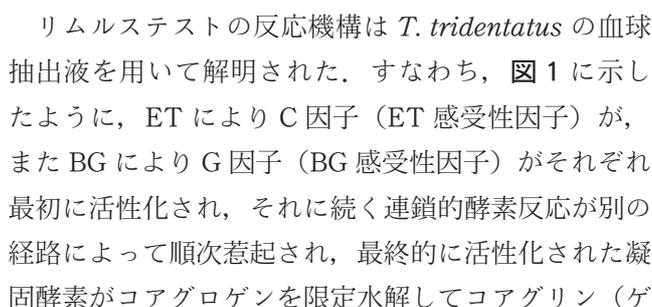
はじめに

透析液が細菌に汚染されると、グラム陰性菌の場合は、その細胞壁由来の内毒素 (endotoxin ; ET)、グラム陽性菌の場合は、それより産生される菌固有の外毒素、細胞壁由来のペプチドグリカン等の物質が透析液に混入することになる。なかでも ET は微量で最も強力な発熱性を示すほか、多彩な生物活性を持っているため¹⁾、早くから種々の ET 検出法が考案されてきた。ウサギ発熱試験、鶏胚致死試験などの *in vivo* 試験やリムルテスト、ラジオイムノアッセイ、エンザイムイムノアッセイ、ガスマススペクトル法などの *in vitro* 試験がその代表的なものであるが、感度、簡便性、経済性においてリムルテストが最も優れており、医薬品、水、透析液などの汚染試験、臨床検査など多方面で活用されている。

リムルテストは、カプトガニの血球抽出液

(amebocyte lysate) が ET により凝固 (ゲル化) する現象を肉眼的に判定する、いわゆるゲル化法に始まる。この反応機構が、日本産カプトガニ (*Tachypleus tridentatus*) を用いて解明され、発色合成基質を用いた比色法が考案された。また、ゲル化する過程で生じる濁度変化を測定する比濁法も考案された。さらにリムルテストは、ET だけでなく真菌細胞壁成分として知られる (1→3)- β -D-グルカン (BG) とも反応することが明らかにされ、それぞれに特異的なリムルテストが開発された。また、測定手技もエンドポイント法やカイネティック法が考案され、より高精度、簡便、迅速、経済的な方法へと改良・改善が試みられている¹⁾。一方、外毒素については、ET のようにすべての菌種由来のものを一括して測定する方法はなく、また、ペプチドグリカンについては、現在までのところ特異的な測定法が開発されていない。したがって、細菌汚染の指標として最も重要である ET に的をしぼり、その測定法として最もよく用いられているリムルテストの反応機構、特異性、日常検査用 ET 広範囲測定法、透析液監視用 ET 濃度インラインモニタリング法ならびに測定上の留意点について述べる。

1 リムルテストの反応機構

リムルテストの反応機構は *T. tridentatus* の血球抽出液を用いて解明された。すなわち、に示したように、ET により C 因子 (ET 感受性因子) が、また BG により G 因子 (BG 感受性因子) がそれぞれ最初に活性化され、それに続く連鎖的酵素反応が別の経路によって順次惹起され、最終的に活性化された凝固酵素がコアグロゲンを限定水解してコアグリニン (ゲル化) を形成する。

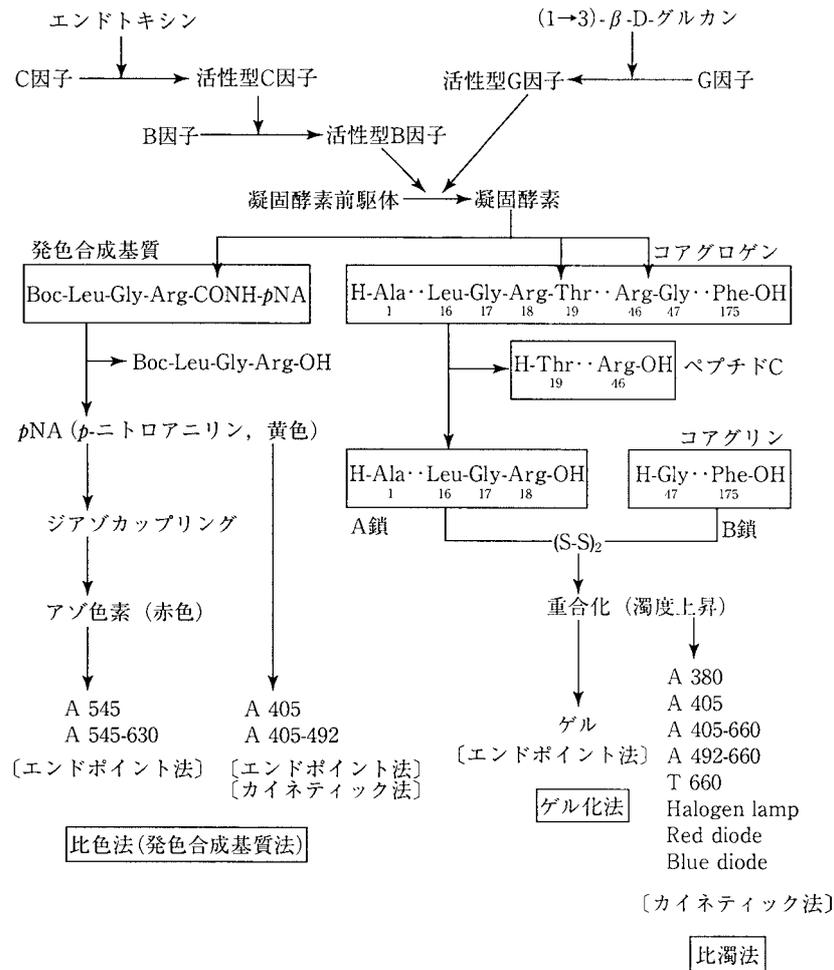


図1 リムルステストの測定原理

ル化蛋白質)に変換し、白濁するとともにゲルを形成するか、あるいは Boc-Leu-Gly-Arg-pNA 等の発色合成基質を加えておくと、それを水解して pNA (黄色)を遊離するという一連のセリンプロテアーゼ前駆体の活性化を介するカスケード機構を内蔵した反応である^{1,2)}。これらの反応に関与する個々の因子の諸性質ならびに各々の因子の活性化機序の詳細については文献3を参照されたい。

2 リムルステストの特異性

上述したように血球抽出液全体を用いて調製された通常のリムルス試薬は、C因子系、G因子系の両反応系が存在するため、ETとBGに反応する。このリムルス試薬の特異性を改善すべく種々検討がなされているが、ここでは筆者らの開発した比色法を紹介する。ETとBGとではその血球抽出液の活性化経路が図1に示したように異なるため、この両経路を分離することに成功し、C因子系反応因子またはG因子系反応

因子と Boc-Leu-Gly-Arg-pNA とを組み合わせて、それぞれに特異的な比色法リムルス試薬を開発した(前者(ESテスト):エンドスペー®シリーズ, エンドスペック®シリーズ(体外診断用医薬品);後者(Gテスト):ファンギテック®シリーズ(体外診断用医薬品), 生化学工業)^{2,4)}。ET特異的比色法リムルス試薬(ESテスト)は、ET(リポ多糖)のみにしか反応しない(ただし、リポドAならびに合成リポドAとも反応するが、その反応部位はこれらの共通部分のリポドA(ETの主要生物活性を担う本体物質)であり、広義ではすべてETとみなされている)。一方、BG特異的比色法リムルス試薬(Gテスト)は、直鎖のBGのほかに、BGを成分とするレンチナン、シゾフィラン、クレスチン、ザイモザン、そのほか、酵母やカビ、キノコ等の真菌細胞壁BGならびにセルロース系血液透析膜の洗浄液(BGが夾雑しており、それが溶出される)等、多くのBG類と反応する^{1,4,5)}。

3 日常検査としての ET 測定法

1) Wellreader 法

リムルステストの実際の測定手技としては、エンドポイント法とカイネティック法があり、それぞれ、より高感度、高精度、簡便、迅速、経済的な方法へと改良・改善が試みられている。特にカイネティック法は専用測定装置を必要とはするが、自動測定が行え、簡便、迅速な点で普及してきている。カイネティック法は、反応速度法と反応時間法とがあり、前者は短時間で低濃度の ET が測定でき、後者は測定時間は長いが広範囲の ET を測定できるという特徴を有している。最近、水道水から臨床透析液までの透析全ラインの ET 濃度の管理を行う透析施設が増え、1回の測定で短時間で広範囲の ET を定量する方法が望まれるようになった。

Wellreader SK603 (生化学工業) には、エンドポイント法と上記2種のカイネティック法の解析プログラムが標準装備されており、1回のカイネティック測定により種々の条件で再解析が行えるようになっている。そこで上記の課題を解決すべく、2種のカイネティック法の特徴を生かして、両法を組み合わせることを検討した。ET 標準液 100 と 500 EU/l の2濃度およびブランク液を用いて、エンドスペースでカイネティック法(反応速度法または反応時間法)により30分反応後、100 EU/l までを反応速度法で、100 EU/l を超えた検体を反応時間法で再解析することにより、0.5~100,000 EU/l という広範囲の ET を測定することができた⁶⁾。本法は、透析分野において、検体を希釈する必要がないため、操作時間の短縮とコストの低減となり、かつ希釈による ET の吸着・失活をも含めた誤差もなくなり、精度アップにつながる簡便、迅速な方法といえる。

なお、従来の Wellreader SK 601 でも Windows converter を接続することによって、SK603 と同様の結果が得られる⁷⁾。また、ET 標準液を 200 と 1,000 EU/l の2濃度ならびにブランク液を用いれば、反応速度法のみで同様に広範囲の ET が測定できる。

以上の3種の方法によって、実際に透析ラインの水道水、活性炭処理水、RO水および臨床透析液について測定したが、どの方法でもすべて希釈なしで1回で同時に定量することができた。

2) インラインモニタリング法

上記のような測定法では、どうしてもある時点での ET 濃度を定量したにすぎない。透析施行中の透析液の安全性管理としては、インラインにおいてリアルタイムで ET 濃度をモニタリングするのが最も望まれる。筆者らは、早稲田大学理工学部応用化学科酒井研究室とともにこの課題を解決するため、ET 濃度モニタリング装置の開発を行っているが、最近、エンドポイント比色法で反応を停止せずに、一定反応時間後に遊離したパラニトロアニリンの黄色を 405 nm で測定すれば、カイネティック法同様に自動測定が行えることに着目し、その解析法をインラインモニタリング装置に応用した。また、透析中のモニタリングを想定しているため、4時間以上安定なリムルス試薬溶液を用いなければならない。エンドスペースは通常、主剤を緩衝液で溶解して用いるが、調製後15分以上放置しておくでブランク値が高まり本研究には不適であると考えられてきた。この主剤を ET フリーの蒸留水で溶解したところ、長時間安定となり使用することができるようになった。以上のような改良を加えて6連バルブ型インラインモニタリング装置を開発した(図2)。この装置は、吸光度ピークの高さを測定するもので、

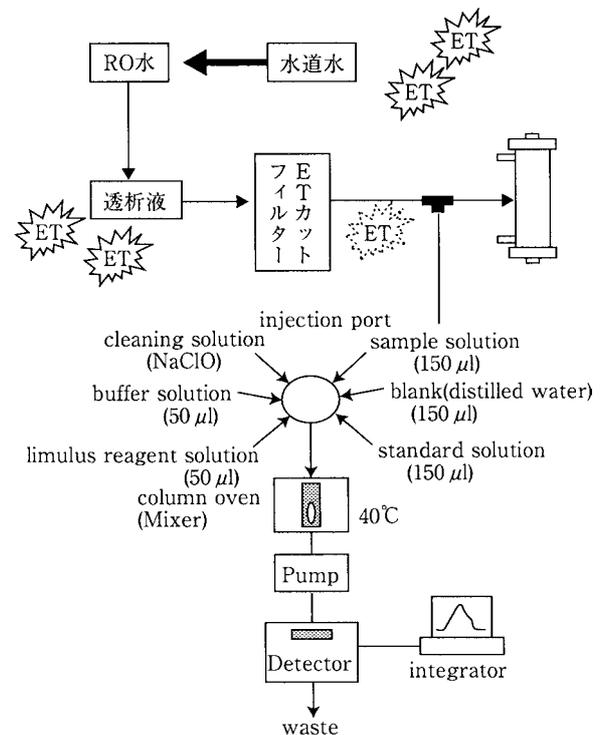


図2 6連バルブ型インラインモニタリング装置の透析ラインへの設置

1回の測定は液置換を含めて40分で終了する(反応時間は20分)。実際には以下の反応手順を繰り返す。

① ブランク液の測定

消毒液(洗浄液;たとえば、次亜塩素酸ナトリウム液)の注入→ブランク液の注入による洗浄→ブランク液の注入→緩衝液の注入→水溶解エンドスペー主剤溶液の注入→反応液を検出器に誘導して測定

② ET標準液の測定

標準液の注入および液置換→緩衝液の注入→水溶解エンドスペー主剤溶液の注入→反応液を検出器に誘導して測定

③ 検体の測定

検体の注入および液置換→緩衝液の注入→水溶解エンドスペー主剤溶液の注入→反応液を検出器に誘導して測定→消毒液の注入および液置換

この操作を以降も繰り返すことにより、リアルタイムのモニタリングを効率的に行うことができる。

本法により透析液で調製したET試料において0~30 EU/lの範囲で良好な直線関係が得られた(図3)⁸⁾。あらかじめ、ブランクとET標準液を測定しておけば、4時間の透析時間中に最大6回の測定が可能である。本装置は、吸引部の6連バルブを切り替えるだけで各溶液を装置へ導入でき、操作が簡便であり、透析ラインに設置(図2)すれば、透析液ET濃度が危険値に達したときに警告でき、さらに使用した透析液に含まれるET量の積算値が透析時間内に求められる。また、濾過型血液浄化法は今後さらに普及するこ

とが予想され、透析液ET濃度の管理に本装置は有用といえる。

4 測定上の留意点

1) 器具

ガラスや金属器具類は水でよく洗浄後、250°C以上で2時間以上乾熱したものを使用する。プラスチック製品を用いる場合は、ETおよびBGフリーの保証されたものを用いる。

2) リムルス試薬の性能・特異性

現在、リムルス試薬はゲル化法、比濁法、比色法の3種の方法のものが、その測定手技としてエンドポイント法とカイネティック法に大別されて市販されている。それらの測定原理は図1に示した通りであるが、ゲル化法と比濁法は最終的に生じた凝固酵素のプロテアーゼ活性を測定するものであり、比色法は凝固酵素のアミダーゼ活性を測定するものである。いずれにしても市販のリムルス試薬はメーカーならびに測定法の違いによって品質にかなり差がある^{9~14)}ため、標準物質による検量線の有効性(信頼性)を確認し、さらに反応干渉因子試験(添加回収試験)を行い、阻害または促進がないことをあらかじめ確認する¹⁾。透析液ETを測定する場合は、HDF研究会バリデーションを行い、各試験基準に適合するリムルス試薬ならびに測定方法により行うことが望ましい。なお、透析液を汚染なく採取するには部位によってそれぞれ工夫が必要だが、透析液ET活性は保存により低下するため、HDF研究会バリデーションに適合した安定化剤入り保存容器に分注する。詳細は文献9,10,12~18を参照されたい。また、リムルス試薬には3種の特異性を示すものが市販されているので、目的に応じて使い分ける^{1,8)}。

3) ET測定値の比較

カプトガニの血球抽出液全体を用いて調製された通常のリムルス試薬には、C因子系、G因子系の両反応系が存在し、ETだけでなくBGとも反応するため、これまでのリムルステストを用いたET測定に関する報告は見直す必要がある。特異性も含めて異なるリムルス試薬、異なる標準物質による測定値は比較することはできない^{1,11)}。

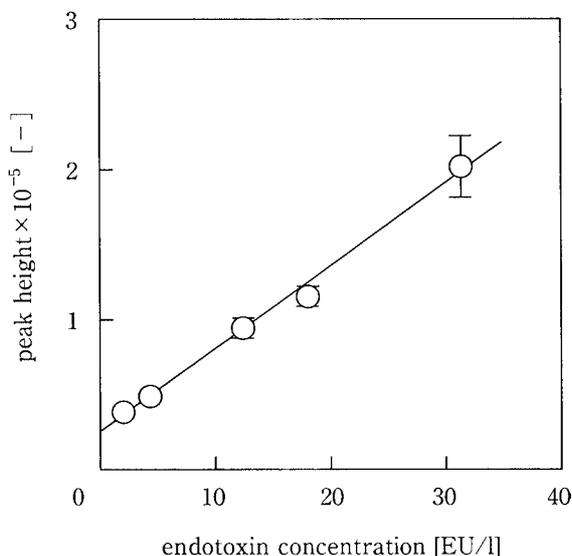


図3 透析液で調製したUSP ET標準品 Lot G-1の検量線

おわりに

近年、ポアサイズの大きなハイパフォーマンスメンブレンの普及に伴い、特にグラム陰性菌成分であるETの血中へのバックフィルトレーションが問題となり、透析液のET汚染の日常管理の必要性が高まっている。

ET測定法としてのリムルステストは数種の血液凝固因子（セリンプロテアーゼ）前駆体の活性化を介するカスケードを内蔵した増幅機構のゆえに、高感度に反応するゆえんでもあるが、逆に反応ステップが多いため、種々の物質によって影響を受ける原因ともなっている。そのため、測定原理、測定方法ならびに特異性などを異にした製品が市販され、それぞれ、より高感度、高精度、簡便、迅速、経済的な方法へと改良・改善が試みられているが、品質、性能には差があるのが現状である。あらかじめ添加回収試験やHDF研究会バリデーション等により、品質、性能について十分検討した上で、目的に応じて使い分けることが大切である。また測定の際には、検体の採取、調製、分注、保存ならびにリムルス反応時の分注等、全操作をすべてETおよびBGフリーの器具、容器を用いて行うことが必須である。

文 献

- 1) 田中重則：エンドトキシンとリムルステスト。透析液エンドトキシンがよくわかる本；竹沢真吾編，東京医学社，東京，p15, 1995.
- 2) Obayashi T, Tamura H, Tanaka S, et al.: A new chromogenic endotoxin-specific assay using recombinant limulus coagulation enzymes and its clinical applications. Clin Chim Acta, 149; 55, 1985.
- 3) 牟田達史, 岩永貞昭：生体防御としての体液凝固。無脊椎動物の生体防御；(財)水産無脊椎動物研究所編，学会出版センター，東京，p 81, 1992.
- 4) 明田川純, 田村弘志, 田中重則：カプトガニ血液凝固G因子系を利用した(1→3)-β-D-グルカン類の比色定量法。

- 防菌防黴, 23; 413, 1995.
- 5) Tanaka S, Aketagawa J, Takahashi S, et al.: Activation of a limulus coagulation factor G by (1→3)-β-D-glucans. Carbohydr Res, 218; 167, 1991.
- 6) 田中重則, 浦島泰子：ウェルリーダー SK 603 の2種のカイネティック比色法を用いた広範囲エンドトキシン測定法。腎と透析, 49 (別冊 2000) ; 156, 2000.
- 7) 浦島泰子, 田中重則：Wellreader SK601 を用いた広範囲エンドトキシン測定法。九州HDF検討会誌, 19, 2000.
- 8) 田中重則, 松田靖子, 宮坂武寛, 他：エンドトキシン濃度モニタリング装置の開発。日本血液浄化技術研究会誌, (印刷中).
- 9) 金 成泰編著：実践的アプローチ。透析液水質管理&オンラインHDF, メディカルレビュー社, 大阪, p 30, 1996.
- 10) Yamamoto C, Kim ST: Validation of limulus tests for endotoxin evaluation in dialysate. Nephrology, 2; 429, 1996.
- 11) 田村弘志, 田中重則, 大林民典, 他：カイネティック自動測定法によるエンドトキシンおよびβ-グルカンの二項目同時定量。エンドトキシン測定法の進歩；玉熊正悦監修, 嶋田 紘編, 第1回日本エンドトキシン研究会事務局, 横浜, p 12, 1996.
- 12) 安武由美, 長嶋淑子, 立山貴敏, 他：リムルステストによるエンドトキシン測定の問題点。臨牀透析, 13 ; 119, 1997.
- 13) 山本千恵子：透析液エンドトキシン測定法。透析会誌, 30 ; 911, 1997.
- 14) 山本千恵子：透析液エンドトキシン測定の3法の比較とオンライン置換液の安全性の評価。臨牀病理, 45 ; 1167, 1997.
- 15) 渡邊真紀, 小田俊男, 田村弘志, 他：透析液エンドトキシン安定化方法。臨牀透析, 12 (別冊) ; 149, 1996.
- 16) HDF研究会：HDF技術叢書(1)透析液水質管理の指針(平成8年12月); HDF研究会, 北九州, p 56, 1996.
- 17) 金 成泰：透析液調製過程におけるライン管理の実際。透析液エンドトキシンがよくわかる本；竹沢真吾編，東京医学社，東京，p55, 1995.
- 18) 浦野壽夫, 鈴木正司, 平澤由平：実例ライン管理。透析液エンドトキシンがよくわかる本；竹沢真吾編，東京医学社，東京，p 77, 1995.