

# 生物発光を利用した透析液および透析用水中のエンドトキシン測定

小田 侑, 八幡 悟史, 野田 健一, 荒川 智

東亜ディーケーケー株式会社

## Detecting endotoxin in dialysis fluid using bioluminescence

Atsumu Oda, Satoshi Yawata, Kenichi Noda, Satoshi Arakawa

DKK-TOA corp.

### Abstract

We released the Bioluminescence Endotoxin Analyzer (Luminutes-ET) for hemodialysis facilities in April 2017, which uses a new detection method combining LAL reaction and bioluminescence. The bioluminescence method has superior Signal/Noise ratio, allowing fast and highly sensitive measurements of up to 0.0003 EU/mL in under 20 minutes.

This detection method applies the mutant firefly luciferase discovered by Kuroda laboratory at Hiroshima University which is 10 times higher in luminescence intensity compared to the wild-type. We designed the analyzer and reagent kit to significantly reduce measurement errors and lyophilized the reagent for long-term stability.

The luciferase developed by Kuroda laboratory was not suitable for detecting endotoxin in dialysis fluid as its luminescence reaction was affected by the  $\text{Na}^+$  in dialysate solutions. We improved on this luciferase to prevent the effect of  $\text{Na}^+$  on its reaction. As a result, endotoxin detection in deionized water, i.e. dialysis water, and dialysis fluid now uses the same calibration curve.

Endotoxin measurement using this bioluminescence method was evaluated; its accuracy and measurement validated at six hemodialysis facilities based on the common guidelines set forth by Japanese Society for Hemodiafiltration. The validity of its calibration curve, blank tests, reaction interfering factor tests, detection limits, and quantitation limit of dialysate measurement were assessed. In conclusion, the bioluminescence method's fast and highly sensitive measurements were verified, and was confirmed that it is fit for biological contamination control in dialysis fluid.

Endotoxin and Innate Immunity 22 : 17~20, 2019

**Key words** : 生物発光法, 高発光ルシフェラーゼ, 耐塩性ルシフェラーゼ, 透析

### はじめに

透析治療は透析患者の血液と大量の透析液が接触するため、エンドトキシン (ET) の徹底した管理が求められ、超純粋透析液においては水質基準が0.001 EU/mLという厳しい規制が設けられている<sup>1)</sup>。これまでETの定量法は、比濁法または比色法を用いて行うのが主流であった。しかし、これらの方法は0.001 EU/mL測定時に30~90分程度の時間を必要とする。そのため透析開始前にET測定結果が得られないなど、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。この問題を解決する手法として、高発光ルシフェラーゼを用いた生物発光

法によるET測定システム<sup>2)</sup>に着目し、透析分野向けに生物発光式ET計Luminutes-ETをリリースした。今回、Luminutes-ETの製品化にあたり、①測定誤差を可能な限り小さくするための装置設計と試薬のキット化、②ルシフェラーゼをはじめとした試薬の長期保存を可能とするための凍結乾燥、③透析液に対する阻害をなくするためのルシフェラーゼの改良を行った。透析分野への参入に伴い、生物発光法によるET測定法の多施設間バリデーション試験を実施したので、その結果についても報告する。

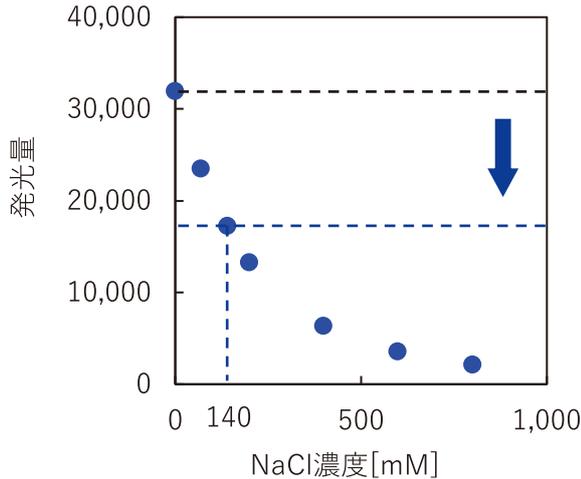


図1 NaCl添加時のルシフェリンの測定 (LAL反応を介さない測定)

## 1. 高発光ルシフェラーゼを用いた生物発光式 ET 測定システム

ホタルルシフェラーゼの反応はATPに対して鋭敏に反応し、広い範囲で直線性が得られることから、食品などの清浄度管理に利用されている<sup>3)</sup>。黒田らは、遺伝子組み換え技術を用いて、野生型の10~15倍の発光強度を持つルシフェラーゼ (高発光ルシフェラーゼ) を開発した<sup>4)</sup>。また高発光ルシフェラーゼの特徴を活かした測定として、ETの迅速・高感度測定を可能とする測定手法を開発した<sup>2)</sup>。生物発光法、比濁法、比色法はいずれもカプトガニの血球から抽出されたリムルス試薬を用いる測定方法である。生物発光法では、ルシフェリンを含む発光基質と高発光ルシフェラーゼ、ATPを添加するとETとリムルス試薬の反応によって生成されたクロッキングエンザイムと反応してサンプルが自家発光するため、その発光強度から測定を行う手法である。同法はET濃度の増加に伴って発光強度が増大する測定法であり、透過光量の減衰を観察する他法と比べてS/N (Signal/Noise) に優れている。リムルス試薬のカスケード反応は長い時間をかけて進行するが、生物発光法の優れたS/Nによって他法より短時間での測定が可能となる。

## 2. 生物発光式 ET 測定システムの製品化

### 2-1. 装置設計と試薬のキット化および凍結乾燥

生物発光法ではリムルス試薬が特定の時間反応した時点でBL試薬 (発光基質、高発光ルシフェラーゼ、ATP) を添加する必要があるが、添加のタイミングが変わると発光量も変動する。そこでBL試薬を凍結乾燥してチューブに封入し、特定のタイミングで装置がチューブを押し出すことで試薬がサンプルに自動で添加されるシステムを構築した。これによって試薬添加のタイミングなどによる測定誤差を小さくし、さらに測定が簡便になった。

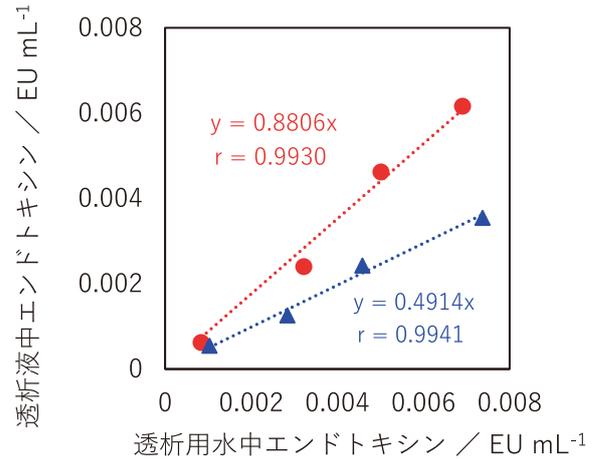


図2 耐塩性 (●)/高発光 (▲) ルシフェラーゼを用いた際の透析液/水のET測定

また、不安定であった高発光ルシフェラーゼも凍結乾燥によって冷蔵で1年以上の保管が可能となった。

### 2-2. ルシフェラーゼの耐塩化

透析液の主成分は一般的に塩化ナトリウムをはじめとした電解質とブドウ糖、重炭酸ナトリウムからなり、ナトリウムイオンはおよそ140 mM含まれている<sup>5)</sup>。従来の高発光ルシフェラーゼはナトリウムイオン濃度の増大とともに顕著に反応阻害を受け、透析液と同等である140 mMの塩化ナトリウム存在下では発光強度が約50%減少することがわかった (図1)。そこで、高発光ルシフェラーゼにさらに変異を入れて、高い発光強度を維持しつつナトリウムイオンによって阻害を受けにくい耐塩性ルシフェラーゼを開発した。耐塩性ルシフェラーゼを用いて透析用水および透析液に標準エンドトキシンを添加し測定したところ、これまで透析液で希釈したETサンプルに対する発光強度が、透析用水で希釈したETサンプルと比較して80~90%程度まで改善した (図2)。日本HDF研究会にて作成された「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)<sup>6)</sup>」より、同結果は基準 (75~125%) を満たしており、反応干渉は認められなくなった。そのため透析用水、透析液いずれのサンプルについても同一の検量線で測定することが可能となった。

## 3. 透析施設での多施設間バリデーション試験

### 3-1. 透析施設での多施設間バリデーション試験

透析液水質基準におけるET測定方法は、「リムルス試験法。同等の感度を有すると証明されたものについて使用可能である。」とされている<sup>1)</sup>。近土らは、生物発光法によるET測定システムのバリデーション試験として透析液ET測定に関するバリデーション指針に準じて多施設間で共通のプロトコールを作成し、手技確認試験とし

表 1 6施設における試験方法および基準

		試験方法	基準
手技確認試験	検量線有効性の判定	低濃度 ET サンプル 4 濃度 (0.0005, 0.001, 0.005, 0.007 EU/mL), 高濃度 ET サンプル 4 濃度 (0.007, 0.01, 0.1, 0.2 EU/mL) を調製し, 各 3 重測定	低濃度, 高濃度で検量線を作成し, 相関係数 $r > 0.99$ を満たす
	ブランク値の確認	蒸留水を 8 重測定	平均値 + 2 SD < 0.001 EU/mL を満たす
測定試薬のバリデーション	反応干渉因子試験	透析液または蒸留水で調製した ET サンプル 3 濃度 (0.025, 0.05, 0.1 EU/mL) を各 3 重測定を 5 回行う	X 軸を蒸留水希釈, Y 軸に透析液希釈の結果をプロットし, 原点を通る近似直線を引く。相関係数 $r > 0.99$ かつ $0.75 < \text{傾き}$ の平均 $\pm 2 \text{ SD} < 1.25$ を満たす
	検出限界試験	蒸留水を 7 サンプル用意し, 各 3 重測定	3.3 SD < 0.001 EU/mL を満たす
	透析液の定量限界	透析液で調製した ET サンプル (0.002 EU/mL) を用意し, 10 重測定	10 点すべての結果が 0.0015~0.0025 EU/mL の範囲内である

表 2 6施設におけるバリデーション試験結果

	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
A 施設	低濃度 $r : 0.995$ 高濃度 $r : 0.999$	平均値 + 2 SD : 0.0001	相関係数 $r : 0.992 \sim 0.999$ 傾きの平均 $\pm 2 \text{ SD} : 0.78 \sim 0.99$	3.3 SD : 0.0004	0.0018~0.0023
B 施設	低濃度 $r : 0.999$ 高濃度 $r : 0.999$	平均値 + 2 SD : 0.0002	相関係数 $r : 0.995 \sim 0.999$ 傾きの平均 $\pm 2 \text{ SD} : 0.80 \sim 0.95$	3.3 SD : 0.0005	0.0016~0.0022
C 施設	低濃度 $r : 0.995$ 高濃度 $r : 0.999$	平均値 + 2 SD : 0.0002	相関係数 $r : 0.990 \sim 0.998$ 傾きの平均 $\pm 2 \text{ SD} : 0.76 \sim 0.85$	3.3 SD : 0.0002	0.002~0.0023
D 施設	低濃度 $r : 0.999$ 高濃度 $r : 0.999$	平均値 + 2 SD : 0.0002	相関係数 $r : 0.992 \sim 0.998$ 傾きの平均 $\pm 2 \text{ SD} : 0.76 \sim 0.99$	3.3 SD : 0.0001	0.0021~0.0024
E 施設	低濃度 $r : 0.998$ 高濃度 $r : 0.999$	平均値 + 2 SD : 0.0003	相関係数 $r : 0.997 \sim 0.999$ 傾きの平均 $\pm 2 \text{ SD} : 0.77 \sim 0.94$	3.3 SD : 0.0003	0.0009~0.0023
F 施設	低濃度 $r : 0.999$ 高濃度 $r : 0.999$	平均値 + 2 SD : 0	相関係数 $r : 0.997 \sim 0.999$ 傾きの平均 $\pm 2 \text{ SD} : 0.78 \sim 0.94$	3.3 SD : 0.0002	0.0018~0.0024

て検量線有効性の判定, ブランク値の確認を行った上で, 測定試薬のバリデーションとして反応干渉因子試験, 検出限界試験, 透析液の定量限界試験について評価を行った<sup>7)</sup>。

### 3-2. 結果

表 1 に試験方法と基準, 表 2 に試験結果を示す。表 1, 2 より, 6 施設中 5 施設ですべての項目で基準を満たした。また, 残り 1 施設については透析液の定量限界試験を満たさなかったものの, それ以外のすべての項目で基準を満たした。以上の結果から, 生物発光法は従来法と比較して短時間かつ高感度な測定を可能としており, 透析液および透析用水の ET 測定に有用であるということが示唆された。

### おわりに

生物発光式 ET 計 Luminutes-ET は測定時間 20 分未

満で 0.0003 EU/mL と, 迅速かつ高感度な測定を可能としており, サンプルの ET 濃度は低いですがすぐに結果が求められるような場合や, 検査業務の効率化をしたい場合には非常に有用な装置である。

### 文 献

- 1) 峰島三千男, 川西秀樹, 阿瀬智暢, 他 : 2016 年版 透析液水質基準. 透析会誌 49 : 697-725, 2016
- 2) Noda K, Goto H, Murakami Y, et al : Endotoxin assay by bioluminescence using mutant firefly luciferase. Analytical Biochemistry 397 : 152-155, 2010
- 3) 厚生労働省 : 食品衛生検査指針 微生物編 2004. 日本食品衛生協会, 2004, pp71-73
- 4) Fujii H, Noda K, Asami Y, et al : Increase in bioluminescence intensity of firefly luciferase using genetic modification. Analytical Biochemistry 366 : 131-136, 2007
- 5) 扶桑薬品工業株式会社 : キングリー透析剤 AF2 号 添付

- 文書, 2009, p1
- 6) 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）. 臨床透析 12 別冊 HDF 療法 '96：142-148, 1996
  - 7) 近土真由美, 内野順司, 村上淳, 他：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<sup>®</sup>-ET）の多施設評価. 透析会誌 51：591-598, 2018