

ポリリジン固定化セルロース微粒子を用いた 特異的エンドトキシン測定システムの開発

○福間 百合子， 坂田 眞砂代， 國武 雅司（熊本大学大学院自然科学研究科）
戸所 正美（チッソ）

1. はじめに

エンドトキシンとは、大腸菌やサルモネラ菌の細胞壁構成成分の一つであり、その化学構造はリポ多糖(lipopolysaccharide; LPS) (図 1) である。LPS は水道水に普遍的に混在しており、注射用タンパク質やワクチン水溶液の最終バルク中にも微量混在している。LPS を微量でも含む医薬を体内に注射されると発熱やショック反応を起こすため、日本薬局方においても、注射用溶液の LPS 濃度を 10~100 pg/mL (0.1~1.0 EU/mL) 以下にすることが規定されている[1]。

現在、水溶液中の LPS 濃度は、リムルス試薬（カプトガニ血球抽出物）を用いたゲル化試験による検出がなされている。しかしながら、同試薬は、LPS と複雑なカスケード反応をするため、抗原タンパク、酵素、有

機溶媒などの共存物質により LPS とのゲル化反応の阻害を受けるため、試料溶液を LPS-free 水等で希釈処理をすることにより LPS 濃度検定が行われているのが現状である。

本研究では、非特異反応のないエンドトキシン測定システムの開発を試みた。我々によって既に開発された LPS 吸着剤（ポリε-リジン固定化セルロース粒子，商品名：Etclean-L，チッソ製）[2]に、試料中の LPS を特異的に吸着させ、吸着体-LPS 結合体として、リムルス試験を行なった。同法は、共存物質の影響を受けずに試料中の LPS の定量を可能とする。

2. 実験

試料溶液中の LPS は、バッチ法により、Etclean-L 吸着剤(粒径：53-125 μm，細孔径： $M_{lim} 4 \times 10^5$ ，チッソ製) (図 2) に吸着させた。吸着処理後の ETClean を遠心分離法により洗浄した。得られた ETClean-LPS 結合体を、蒸留水懸濁液としてリムルス試験を行ない、ETCclean との結合体として得られた LPS 濃度と、始めに添加した LPS 濃度を比較した。LPS 濃度は、トキシノメーターを用いた比濁法によるリムルステスト[3]により定量した。吸着処理前後の試料中のタンパク質の濃度は、UV 法を用いて定量した。

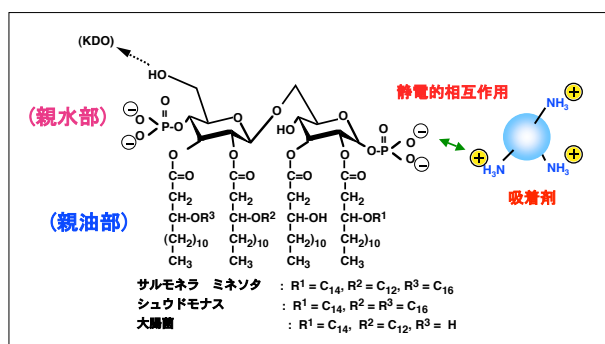


図 1 エンドトキシン (LPS) の化学構造

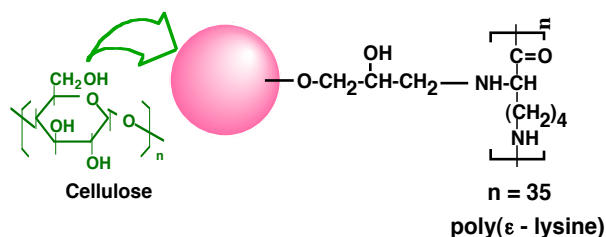


図 2 ETClean-L 粒子の化学構造

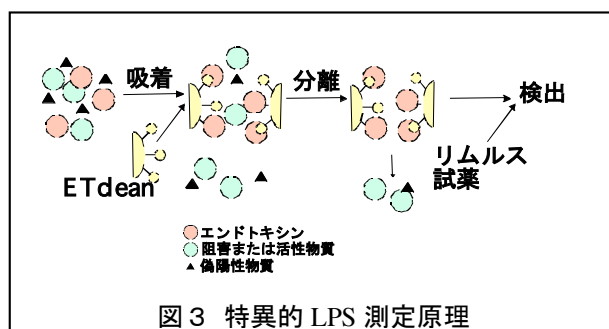


図 3 特異的 LPS 測定原理

3. 結果と考察

図4は、Etclean-LPS 結合体のリムルス反応（ゲル化時間）を、通常の LPS 水溶液中の LPS のゲル化時間と比較した結果である。並列比濁時間分析法を用い、添加した LPS 濃度とリムルス溶液のゲル化時間との検量関係を比較することにより評価した。結果として、両検量線は同様な曲線を示した。また LPS を Etclean に吸着させた後の Etclean 懸濁水溶液中の LPS 残存率は5%以下であり、試料中の LPS はほとんど Etclean に吸着されることがわかった。以上の結果より、同法を用いると、試料溶液中の LPS 濃度を吸着体-LPS 結合体として定量することが可能であることがわかった。

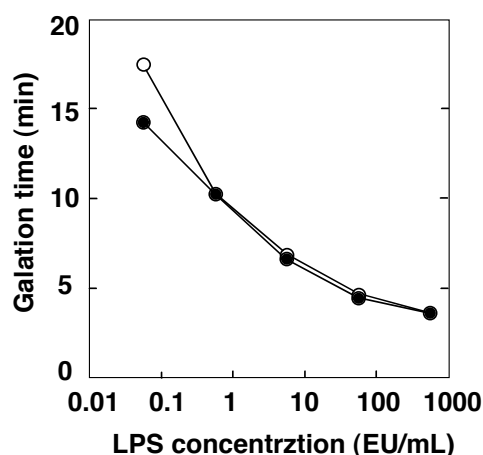


図4. LPS 水溶液 (○) および LPS-Etclean 結合体懸濁液 (●) 中の LPS 濃度とゲル化時間の関係

LPS 吸着条件 : LPS 水溶液 2 mL, Etclean 5 vol. %

つぎに、同法を用いて、タンパク質と LPS 混合溶液からの LPS 検定を試みた。リゾチームをリン酸緩衝液 (pH 7.2, イオン強度 $\mu = 0.2$) で溶解し、標準 LPS を添加後、図4と同様な方法で Etclean に LPS を吸着させた。その後、試料中のリゾチームを除去するため、吸着剤を遠心分離法により洗浄した。得られた吸着剤-LPS 結合体を、蒸留水懸濁液としてリムルス試験を行ない、添加した LPS の回収率を求めた。その結果、表1に示すように、リゾチーム水溶液中の LPS を LPS-Etclean 結合体として定量することによ

り、試料に始めに添加された LPS 濃度がほぼ回収され、リゾチームの影響を受けることなく、LPS 濃度の測定が可能であることがわかった。

表1. Etcleanを用いた特異的LPS測定法によるLPSの回収

サンプル			Etclean-LPS 吸着体
	タンパク質濃度	LPS濃度	LPS回収率
	$\mu\text{g/mL}$	ng/mL	%
リゾチーム + LPS(E. coli UKT-B)	1000	10	100
	1000	1	80

LPS吸着条件 : サンプル水溶液 2 mL, Etclean 5 vol. %

以上の結果より、トキシノメータによる比濁時間分析法に Etclean を応用することにより、通常のリムルス検定では不可能だった希釈処理せずにタンパク質水溶液中の LPS 濃度を正確に定量することが可能であることがわかった。今後は、同法を用いて、ビタミン D, E 等の脂溶性試料中の LPS 濃度の検定を試みる予定である。

4. 参考文献

- [1] USP XXIII, Official Monographs, US Pharmacopoeial Convention, Inc., Rockville, Md, USA (1995).
- [2] M. Todokoro, M. Sakata, S. Matama, M. Kunitake, K. Ohkuma, C. Hirayama, *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, **25** (2002) 601.
- [3] H. Ohishi, Y. Hatayama, H. Shraishi, K. Yanagisawa, Y. Sakata, *Yakugaku Zasshi*, **105** (1985) 300.

<謝辞>本研究は新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO)の平成 15 年度産業技術研究助成により実施された。

[問い合わせ先]

坂田 眞砂代

熊本大学大学院自然科学研究科

TEL 096-342-3674

E-mail msakata@gpo.kumamoto-u.ac.jp