

第10話 薬剤の影響 (3)

第8話及び第9話では、実際に薬剤のエンドトキシン試験を行う場合を考えてきました。今回は、試料がリムルテストに与える影響について、少し深く考えてみたいと思います。第6話で述べたとおり、試料の測定への影響の様式は以下の3種類に分けることができると考えられます。

- ① リムル試薬 (LAL) の活性化に影響を与えるもの
- ② 試料がエンドトキシンの物性に影響を与えるもの
- ③ 主反応以外の測定系に影響を与えるもの

薬剤で認められる多くの影響は、薬剤がLALの酵素系に影響を与える①と思われる。しかし、一部の薬剤は明らかにエンドトキシンの物性に影響を与えており、測定の変動等問題になることがあります。たとえば、薬剤のLALの酵素系への影響が考えられないにもかかわらず、エンドトキシンの添加回収率がよくないという場合です。今回は、このような②の影響について考えてみましょう。

筆者らは、鉄・アルミニウム等の金属イオンで、試料がエンドトキシンの活性にのみ影響を与える例を経験しております¹⁾。すなわち、これらの金属塩溶液は数十μM程度の濃度でエンドトキシンの活性を低下させるが、LALの酵素系への影響はないと考えられる結果を得たのです。その実験方法について説明しましょう。

通常のエンドトキシン添加回収試験では、試料にエンドトキシンを添加した後、LALと混合して測定を行います。この方法で、40μMの鉄塩及び20μMのアルミニウム塩の、エンドトキシン添加回収試験を行ったところ、いずれの回収率も30%以下となりました(表1)。μMオーダーという低い濃度の金属イオンがLALの酵素を阻害するとは考えにくかったため、次の実験を行いました。すなわち、金属塩溶液をまずLALに添加し、その後エンドトキシン溶液を加えて測定を行ったのです。もし、エンドトキシンがLALの酵素系に影響を与えるのであれば、どちらの試料調製方法でも影響が現れるはずですが、ところが、この時のエンドトキシン回収率は88~114%となり、測定への影響は認められませんでした(表1)。これらの実験の違いは、エン

ドトキシンが試料と先に接触するか、LALと先に接触するかです。もちろん、試料をLALと混合することによって試料濃度が低くなり、エンドトキシンへの影響がなくなったとも考えられます。しかし、実際は数μMの金属塩溶液でもエンドトキシン活性の低下が認められ、この考え方は支持されませんでした。結局、「試料は、エンドトキシンに何らかの影響を与えて活性を変化させるが、LALの酵素系には影響を与えない」と考えると、この現象がうまく説明できるように思われます。この場合、エンドトキシンは金属イオンよりLALと反応しやすい必要があります。このことから、金属イオンのエンドトキシンに対する影響が蛋白によって緩和されることや、LAL中のFactor C (エンドトキシン感受性物質) とエンドトキシンの親和力が非常に強いことなどが想像されます。この実験方法で、試料がエンドトキシンに影響を与える物質をすべて検出できるわけではありません。しかし、試料を先にエンドトキシンと混合したときのみ影響が認められた場合は、試料が少なくともエンドトキシン自身に、何らかの影響を及ぼしていると考えられます。

エンドトキシン標準品を扱う場合には、エンドトキシンに影響を与える物質の混入に注意が必要です。エンドトキシン標準品の活性が変わってしまえば、測定そのものが成り立ちません。筆者らも、軟質ガラスからの溶出物によると思われるエンドトキシン標準品の活性低下を経験しております。また、金属製の器具を長時間エンドトキシン溶液に漬けると、エンドトキシンの活性が低下することがあります。

一方、エンドトキシンの活性に影響を

与える試料に混入した天然のエンドトキシンは、すでに影響を受けた状態で存在していると考えられます。この活性が環境の変化によって変わらなければよいのですが、精製したエンドトキシンの活性が超音波処理や凍結乾燥などの処理で容易に変わることが考えれば、条件によっては活性の変化が起こる可能性があります。それでは、どの状態の活性を標準とするべきでしょうか。この問題は難しく、おそらく回答は得られないと思われま。とりあえず、測定の目的によって個々の基準を設定し、標準化を行う必要があるのではないのでしょうか。

試料の影響の種類を知ることは、試料の測定条件のバリデーションに必須というわけではありません。試料の影響は希釈等によって除けるので、その影響がどのような種類であっても、規定された条件を満たせば、測定可能と判断されます。しかし、影響の種類を知ることで、試料の適切な測定条件の設定が容易になると考えられます。

【参考文献】

- 1) 土谷正和:防菌防微, 18, 287-294 (1990).

今回は、第11話「β-グルカン(1)」の予定です。



表1. 各種金属塩のエンドトキシン回収率に及ぼす影響

Sample	Concentration (mM)	Recovery of endotoxin (%) ¹⁾	
		Method 1 ²⁾	Method 2 ³⁾
FeSO ₄	0.04	26.4	90.5
FeCl ₃	0.04	13.4	88.7
AlK(SO ₄) ₃	0.02	27.6	113.5
CaCl ₂	0.01	104.7	ND ⁴⁾
	0.10	113.3	ND
MgSO ₄	0.01	91.3	ND
	0.10	97.0	ND

1) Lipopolysaccharide from *E. coli* UKT-B was used for this experiment at the concentration of 0.1ng/ml.
 2) Method 1 : Endotoxin was added to samples before being mixed with LAL.
 3) Method 2 : Samples were mixed with LAL before endotoxin was added.
 4) ND : not done.