

第 39 話 非特異反応の観察方法

前回ご紹介したように、正常な反応タイムコースは非特異的な濁りとは区別ができ、非特異的濁りを生ずる試料にエンドトキシンが入っている場合は非特異的濁りにエンドトキシンの反応が加わった反応タイムコースとなります。しかし、エンドトキシンや β -グルカンの混入量が非常に多い場合や非特異的濁りが非常に大きい場合には、非特異的濁りの程度を正確に把握することが困難になる場合があります。今回は、リムルス試験における非特異反応のみを観察する方法について考えてみましょう。

エンドトキシン及び β -グルカン測定における非特異反応の判別方法については、稲田らが報告しています¹⁾。その方法は、エンドトキシン活性の阻害剤としてポリミキシン B を、 β -グルカン活性の阻害剤として過剰のカルボキシメチル化カードラン (CM-カードラン) を使用し、本来の LAL 活性化物質の活性を抑制した状態で測定を行うというものです。すなわち、0.01% のポリミキシン B を試料に添加してエンドトキシンに特異的な測定を行ったり、0.2 mg/ml の CM-カードランを試料に添加して β -グルカンに特異的な

測定を行うと LAL の活性化以外の反応が観察できるというわけです²⁾。

エンドトキシンの活性がポリミキシン B によって阻害されることは広く知られています²⁾。筆者らも、トキシノメーターを用いたタイムコースの観察実験で、ポリミキシン B の添加によるエンドトキシン活性の抑制を行った経験があります³⁾。このとき、ポリミキシン B を入れすぎると反応液が濁り、測定が困難になりました。0.02% で濁りは観察されませんでしたので測定は可能でしたが、エンドトキシン量が多いと活性が完全に抑制されませんでした。稲田らの報告¹⁾でも、エンドトキシン活性が完全に抑制されない場合もあるようです。しかし、ポリミキシン B によりエンドトキシン活性は大きく抑制されるため、ほとんどの検体で非特異反応の観察が可能です。

稲田らは、 β -グルカンの活性を抑制した条件で β -グルカンを測定することにより、非特異反応が観察できると報告しています¹⁾。この方法は、大過剰の CM-カードランの添加で β -グルカンによる LAL の活性化を抑制してエンドトキシンに特異的な測定を行うリムルス ES-II テストワコーの原理⁴⁾と同じですが、本来測定しようとする物質の活性を抑えてしまうという、おもしろい発想だと思います。リムルス ES テストワコーシリーズが発売されて 10 年になりますが、その特異性で大きな問題は起こっていないことを考えると、この方法でほとんど完全に β -グルカン活性の抑制が可能と考えられます。

エンドトキシンや β -グルカンの測定においては「より高い値の出る測定法の方が、試料からの影響の少ない優れた方法」と捉えられる傾向があるように思われます。リムルス試験における

試料の影響として阻害が多いために、高い値の方が阻害の受け方が少ないと受け取られるのでしょうか。実際、阻害の影響を及ぼす物質は数多く存在しますし、試験結果が予想より低い値になることをよく経験します。しかし、測定への影響は、阻害のみではなく、促進や非特異反応もあるということを忘れてはなりません。また、測定法や試薬の違いによる測定値の差を評価する場合、試料から受ける影響の程度、エンドトキシンの種類による反応性、非特異反応の出方などの違いについても調べた上で結論を出す必要があります。稲田らの報告¹⁾は、測定法の違いによる測定値の乖離の原因を実験的に明らかにし、非特異反応を簡単に観察できる方法を提供した点で、高く評価できると思います。

トキシノメーターによるリムルス試験のバリデーションには、検量線の直線性と反応干渉因子試験を行います。より良いリムルス試験を行うためには、これらバリデーション項目に加え、稲田らの方法による非特異反応の観察、反応タイムコースの観察等の方法を駆使して、測定が受ける影響を把握しておく必要があると思います。

〔参考文献〕

- 1) 稲田捷也, 遠藤重厚: 医学と薬学, 42, 885 (1999)
- 2) Morrison, D. C., Macobes, D. M.: *Immunochem.*, 13, 813 (1976)
- 3) Tsuchiya, M., Oishi, H., Takaoka, A., Fusamoto, M. and Matsuura, S.: *Chem. Pharm. Bull.*, 38, 2523 (1990)
- 4) 土谷正和, 高岡 文, 時岡伸之, 松浦脩治: 日本細菌学雑誌, 45, 903-911 (1990)
- 5) Kakinuma, J., Asano, T., Torii, H. and Sugino, Y.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 101, 434 (1981)

今回は「第 40 話 エンドトキシンと Toll-like receptor」の予定です。

