

28P-pm02

リムルス反応-ルシフェラーゼ発光反応を用いるエンドトキシンの高感度・迅速測定

○八幡 悟史¹, 荒川 智¹, 野田 健一¹, 黒田 章夫², 八谷 宏光¹(¹東亜ディーケーケー,²広島大院)

【目的】エンドトキシンはグラム陰性菌が持つ強毒性の物質である。体内に入ると発熱や強いショック症状を引き起こすため、製薬・医療の分野では非常に厳しく管理されている(日本薬局方等)。現在、エンドトキシンの測定は、カプトガニの血球成分(以後リムルス試薬)とのリムルス反応を用いるゲル化転倒法と光学的測定法(比濁法・比色法)で行われている。しかし、高感度な測定法である光学的測定法では、①低活性領域ほど測定時間が長い、②検出限界が0.001 EU/mLで高感度化にはさらなる反応時間が必要、などの問題点が存在している。これらを鑑み、本研究では、従来法と同じリムルス反応をルシフェラーゼによる発光反応で検出する、高感度かつ迅速なエンドトキシン測定法を開発した。

【方法】サンプルまたは標準エンドトキシンを所定の値に希釈した溶液に、リムルス試薬を加えて37℃で一定時間反応後、ルシフェリンを含む発光基質を加えて37℃で一定時間反応させ、ルシフェラーゼとATPを加えて発光量を測定した。

【結果と考察】本法では、サンプル(0.001 EU/mL)の測定時間が25分以内であり、ブランクシグナルの 3σ と定義した検出限界は0.0002 EU/mLであった。反応条件の最適化検討において、リムルス試薬が発光反応へ影響を及ぼすことを確認した。リムルス試薬使用量を、最大の発光量となる、比濁法の約50%とした。サンプルと各試薬の反応は、反応時間の増加に比例して発光量が大きくなるため、それぞれの反応時間を正確に制御する必要があった。比濁時間分析法との良好な相関を確認出来たことから、本法によって、製薬用水中のエンドトキシンを従来法よりも高感度かつ迅速に測定できる可能性が高いと考える。