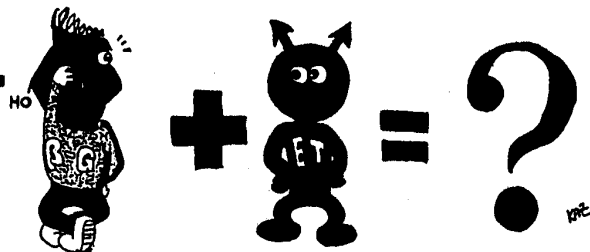


第17話 エンドトキシン特異的試薬



LALがエンドトキシンのみならず(1→3)-β-D-グルカン(β-グルカン)にも反応することは、本シリーズ第1話並びに第3話でお話した通りです。測定系にβ-グルカンが共存するとエンドトキシンを正確に測定できない場合があるため、エンドトキシン特異的LAL試薬の必要性が叫ばれていました。その答の一つがObayashiら¹⁾のエンドトキシン特異的試薬(エンドスピーとして生化学工業㈱から発売)の開発です。筆者らも、調製時の汚染リスクが少なく、ゲル化法やトキシノメーター法にも適用可能なエンドトキシン特異的試薬が必要と考え、彼らに続いて、異なった原理によるエンドトキシン特異的試薬(リムルスESテストワコー)を開発・発売しました。Obayashiらの方法については文献を参考にさせていただき、今回は、筆者らの試薬開発のエピソードをご紹介します。

リムルス試験によるエンドトキシン測定におけるβ-グルカンの影響は複雑です。その主な理由の一つは、本シリーズ第12話でお話したように、LALを活性化する過程がβ-グルカンとエンドトキシンで異なっているということです。トキシノメーターを用いたリムルス試験においても、エンドトキシンとβ-グルカンはその検量線の傾きが異なっており、両者の混合物では1+1=2といった単純な定量値は示しません。例えば、当社のHSタイプLAL(エンドトキシン及びβ-グルカンに反応)とESタイプLAL(エンドトキシンに特異的)の測定値の差は、必ずしもβ-グルカンの量を定量的に表しません。もちろん、HSタイプの測定値がESタイプのものより明らかに高い場

合は、試料中のβ-グルカンの存在が示唆されますが、この場合も定量は困難と考えられます。

1981年にKakinumaらはカルボキシメチル化したβ-グルカン(CMPS)とLALの反応に関する報告をしております²⁾。彼らは、CMPSがLAL活性化に対する至適濃度を持ち、高濃度ではCMPS自身によるLALの活性化を阻害すること、また、高濃度のCMPS存在下で大量のエンドトキシン(10ng/ml)がLALの活性化を起こすことも示しております。残念なことに、彼らは、β-グルカンのリムルス試験への影響を指摘しながら、β-グルカンの影響なしにエンドトキシンを測定するというは考えていなかったようです。

筆者がKakinumaらの文献から得たヒントは、大過剰のβ-グルカンによってそれ自身によるLALの活性化を完全に抑えた状態で、エンドトキシンの定量を行えないかという考えでした。これを実現するためには、Kakinumaらの実験をさらに進めて、以下のことについて確かめる必要がありました。

- (1)β-グルカンによるLALの活性化を、β-グルカン自身の添加によって完全に抑えることができるか。
- (2)大過剰のβ-グルカンの添加は、エンドトキシンの定量にどの程度の影響を与えるか。

もし、β-グルカンによるLALの活性化の抑制が完全でないと、エンドトキシンの定量性及び試薬の安定性が保証されないでしょうし、β-グルカンの添加

がエンドトキシンの測定に影響を与え、実際に測定したい濃度のエンドトキシンの検出ができない場合はこの方法を実用化することができません。そして、幸運にも、我々の検討の結果はすべて、エンドトキシン特異的試薬の調製が可能であることを示したのです³⁾。

この試薬の商品化には、もう一つ解決しなければならない点がありました。すなわち、添加するβ-グルカンをエンドトキシンフリーで調製することです。この点については、製造上のノウハウもあり、すべてをお話するわけにはいきませんが、β-グルカンをアルカリ下で修飾した水溶性の誘導体を使用することで達成しました。エンドトキシンの汚染とは関係ありませんが、使用するβ-グルカンが水溶性であることは、この原理の試薬を調製する上で非常に重要であると考えております。

さて、こうしてβ-グルカンを添加するだけでエンドトキシン特異的試薬が調製できることが判りました。この方法は、ゲル化法、比濁時間分析法、合成基質法のいずれにも応用が可能であり、調製方法も簡便で汚染の危険性が少ないという利点を持っています。

【参考文献】

- 1)Obayashi, T. et al. : *Clin.Chim. Acta*, 148, 55 (1985).
- 2)Kakinuma, A. et al. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 101, 434(1981).
- 3)土谷正和ら, 日細菌誌, 43, 903(1990).

次回は、「第18話 *Es-Eapp*プロット」の予定です。