

# Talking of LAL

## 第22話 添加回収試験の謎

エンドトキシン(ET)試験におけるバリデーションの中に「阻害または促進試験」があります。この試験では、いわゆる添加回収試験を行います。添加回収試験では、通常、既知量のETを添加した試料をリムルス試験によって測定し、添加量に対する測定値の割合を回収率として求めます。今回は、この添加回収試験の意味について考えてみたいと思います。

ETの添加回収試験とは何のために行うのでしょうか。まず考えられることは、「試料中のETの活性が正しく測定されていることを確かめるため」ということです。具体的には、「試料が共存することによる測定への影響が、許容される範囲内にあることを確かめる」と言い換えることもできるでしょう。ここで、ET以外の物質、例えば糖や無機物について添加回収試験を行う場合、測定対象物質は重さで表され、試料により対象物質が分解されてしまう場合以外は、対象物質の量が変化することはありません。この場合、「試料が共存することによる測定への影響」とは、「試料が反応系に与える影響」を意味していると思われます。ところが、ETの場合はその絶対的な活性が存在しないため、話は少し複雑になります。ETの分子量は数千から2万程度ですが、溶液中ではミセルを形成し、その見かけの分子量は数十万か

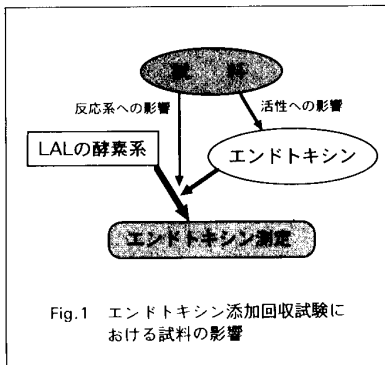


Fig.1 エンドトキシン添加回収試験における試料の影響

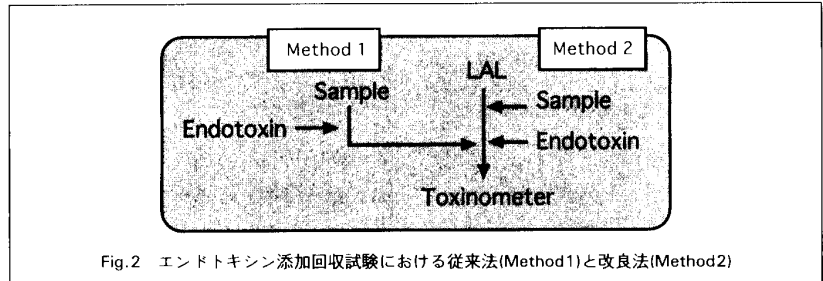


Fig.2 エンドトキシン添加回収試験における従来法(Method 1)と改良法(Method 2)

ら数百万になっているとされています。しかも、その生物活性はミセルの大きさによって変化し、リムルス試薬に対する反応性も例外ではありません。ETの測定とは、ETの活性の測定であって、ETの絶対量を測定しているのではないのです。しかも、ETの活性が可逆的に変化する場合もあります。従って、ETの添加回収試験における「試料が共存することによる測定への影響」では、「試料が反応系に与える影響」だけでなく、「試料がETの活性に与える影響」も考慮する必要があります( Fig. 1)。通常行われるET添加回収試験は、試料にETを添加した後リムルス試験を行います。この方法は「試料が反応系に与える影響」と、「試料がETの活性に与える影響」をあわせて測定する方法と言えるでしょう。多くの物質中のET測定は、この方法で問題なく測定条件が決められています。

しかし、中には試験結果が安定しないものもあります。例えば、第10話でお話したように、微量の塩化第2鉄はETの活性を低下させます<sup>2)</sup>。40 $\mu$ Mの塩化第2鉄について通常のET添加回収試験( Fig.2のMethod 1)を行うと、回収率は13.4%でしたから、さらに希釈しないとETの測定は行えないと判断されます。しかし、ETの添加方法を改良して、Fig.2のMethod 2のように実験を行うと、ET回収率は88.7%となりました。この結果は、

塩化第2鉄がリムルス試薬の酵素系にはほとんど影響を与えていないが、ETの活性を20%以下に低下させたことを示唆しています。

さらに、もう一つ問題点があります。それは、添加するETによって「試料がETの活性に与える影響」が異なることです。公的な標準品や市販のET対照標準品には、そのほとんどに添加物が含まれています。これらの添加物は、ETの活性を安定にするために添加されています。例えば、さきほどの塩化第2鉄の例で、ETにアルブミンが添加されている場合はET活性の低下が抑えられるのです。このことは、添加回収試験に使用するETによって、判定が異なる可能性があるということを示唆しています。

このように、添加回収試験を行う上で2つの謎が浮き上がってきました。すなわち、ET添加回収試験において(1)試料からの影響を分類し区別する必要はないか、(2)どのようなETを使用すべきかの2つです。次回は、添加回収試験で知りたいことについて考えてみたいと思います。

### 【参考文献】

- 1) 丹羽允: 「内毒素-その構造と活性-」(本間遜監修), p.124, (医歯薬出版)(1983).
- 2) 上谷正和: 和光純業時報, 61(1), 12(1993).

次回は「第23話 添加回収試験で知りたいこと」の予定です。