

受賞論文題名：生物発光式エンドトキシン検出法の開発及び 透析液測定への応用

所載ページ：「分析化学」第 72 巻第 7・8 号，289-298 ページ



八幡 悟史¹，野田 健一¹，下村 亜依¹，小田 侑¹，荒川 智¹，八谷 宏光¹，黒田 章夫²
(¹東亜ディーケーケー株式会社，²広島大学大学院統合生命科学研究科)

「分析化学」編集委員会では、「分析化学」誌に掲載された論文の中から、独創性があり、実用的にも優れた分析技術や測定機器、並びに科学技術や産業の発展に貢献すると認められる論文の著者全員に、編集委員長名で「分析化学」産業技術論文賞を授与することにしています。本年度は多くの優れた論文の中から受賞論文として、上記の論文が選定されましたので、お知らせいたします。

【選定理由】

エンドトキシン（以下 ET）はグラム陰性菌の細胞壁に存在し、菌が死んだ際に溶液中に放出される。血中に入ると発熱やショック症状を引き起こすことがあるため、日本薬局方をはじめとする国内外の薬局方や透析液水質基準などで管理基準値が定められている。特に、透析治療に用いる透析液の管理基準値は 0.001 EU mL⁻¹（EU：endotoxin unit）未満であり、低濃度で管理されている。従来から、カプトガニの血液製剤であるライセート試薬を使用するゲル化法、比濁法、比色法の 3 法が検出法として用いられているが、これらでは分析時間が非常に長いという問題が存在していた。加えて、近年ではオンライン HDF 治療が普及してきており、透析液中 ET 濃度をより低濃度で管理することの必要性が高まっている。このため、迅速で高感度な新たな検出法が望まれていた。

著者らは、エラーブローン PCR 法を用いて、天然ルシフェラーゼにランダムに変異を導入することで、ルシフェラーゼの改良に成功した。従来の 12 倍以上の発光量を呈する、423、436、530 部位を変異させた 3 重変異体を開発した。この高輝度ルシフェラーゼと従来法でも使用しているライセート試薬を組み合わせ、生物発光式エンドトキシン検出法を開発し、迅速かつ高感度測定を可能とした。透析液中の塩化物イオンによる阻害を受けにくくする必要もあり、塩耐性を示す二つの変異（288 部位と 488 部位）を発見した。それらを組み合わせた 2 重変異体を調製し、より高い耐性を示すことを見出すことで、耐塩性ルシフェラーゼ CR を開発した。このルシフェラーゼ CR を用いることで、透析液中の成分の影響を受けずにエンドトキシンを測定することが可能となった。

この生物発光を用いたエンドトキシン測定法において、耐塩性ルシフェラーゼ CR を含む発光試薬とライセート試薬を別々に凍結乾燥した試薬キットと、透析用 ET 検出装置を開発した。ライセート試薬を含む試薬チューブに試料液を注入し、装置へセットすることで自動的に測定する装置である。比濁法や比色法などの従来法よりも短い測定時間：20 分間で検出限界 0.0003 EU mL⁻¹ を実現しており、透析液測定における管理基準値：0.001 EU mL⁻¹ 未満にも十分対応可能な性能である。医療関連 6 機関が実施した評価試験でも良好な結果を確認している。

より小型でシンプルな装置を目指し、37℃でも活性を維持できる耐熱性ルシフェラーゼを開発し、ライセート試薬、ルシフェラーゼを含むすべての試薬を 1 つの試薬チューブに入れた試薬キットとしての装置化も行った。測定時間：10 分間で検出限界 0.001 EU mL⁻¹ と良好な性能を実現している。

エンドトキシン測定にルシフェラーゼの発光反応を応用して迅速で高感度な ET 検出を可能にした、透析液の水質管理などで広く利用されている新技術に関する論文である。

本論文を 2023 年「分析化学」産業技術論文賞受賞論文に値するものと認め、選定した。

〔「分析化学」産業技術論文賞選考委員会〕

【代表著者のコメント】

この度は「分析化学」産業技術論文賞に選定いただき、誠にありがとうございます。編集委員会の先生方をはじめとする関係各位に対し、著者一同、厚く御礼申し上げます。

エンドトキシンは医療の分野で測定が必須の項目です。従来法では低濃度ほど長い測定時間が必要であり、長年にわたって迅速で高感度な測定法が求められていました。本論文では、エンドトキシンを迅速かつ高感度に測定することを目指して行った、ルシフェラーゼの改良と装置開発に関する成果を報告しました。変異型ルシフェラーゼは、エンドトキシン測定に限らず、様々な分析対象物の迅速測定や高感度測定へ応用することができます。今後も医療の安全や分析化学の発展に少しでも貢献できればと考えております。