

透析液エンドトキシン濃度の 超高感度測定法による検討

中澤了一

水戸中央クリニック腎臓内科

key words : エンドトキシン, 透析液, ESP

要 旨

透析液の微生物学的純度は、血液浄化療法の質を左右する重要な要因の一つである。従来の透析液エンドトキシン濃度測定に使われてきた比濁時間法は、感度の点で課題があることが指摘されてきた。

小幡らの開発した超高感度エンドトキシン測定法である ESP 法 (endotoxin scattering photometry) の有用性を検討するため、透析関連用水を測定した。この方法は、従来の測定法の感度とされてきた 1 EU/L (= 0.001 EU/mL) をしのぐ感度が得られ、2010 年 4 月以降に保険収載されたオンライン血液透析濾過 (OL-HDF) 療法実施上、透析液供給システムのバリデーションに有用であった。また「電解水透析」用の透析関連用水の管理にも有用性が示唆された。

1 目 的

慢性透析例における代表的合併症として、動脈硬化症と透析アミロイド症が知られている。この二大合併症の背景に、酸化ストレスの存在があることは周知の事実である。この酸化ストレス亢進の要因の一つとして、透析液の微生物学純度の問題が指摘されてきた。その検査項目の代表的なものとして、透析液エンドトキシンがあり、比濁時間法などで測定されてきた。日本透析医学会の透析液に関するガイドラインでは、望ましい最終透析液として 0.001 EU/mL (1 EU/L) 未満が提案されている。しかしながら、正常人血漿のエ

ンドトキシン濃度は < 1 pg/mL (= 7 EU/L) と推定されるも正確な値は測定困難で、敗血症症例でも < 1 pg/mL の血漿値を示すことも多く、測定法の改良が望まれていた。

2008 年、Obata らは、従来の Coagulin ポリマーを比濁法で測定する方法に代わり、その一步前の Coagulin 粒子をレーザー散乱測光で測定する方法 (endotoxin scattering photometry; ESP) を考案し、従来法に比べ 5,000 倍もの超高感度のエンドトキシン測定法を開発した¹⁾。これにより正常人の血漿エンドトキシン濃度は、0.104 pg/mL 程度であることが判明した。2010 年 4 月から保険収載された on-line HDF (OL-HDF)、特に predilution 法では大量の置換液を直接体内に送り込むため、置換液のエンドトキシン濃度管理には細心の注意を要する。その意味でも、この ESP 法を使用した透析液のバリデーションは臨床上重要な意味を持つ可能性があり、上記の合併症治療のうえでも貢献が期待される。

そこで、通常透析液と電解水透析 (electrolyzed water-hemodialysis; EW-HD) 用透析液、および置換液のエンドトキシン濃度を測定し、その現状と炎症マーカーとの関連を検討した。

2 方 法

対象は、2010 年 10 月から 1 年間観察しえた 40 例で、途中何らかの合併症を呈した症例は除外した。年齢は 60.5 ± 10.9 歳、男性 28 例、女性 12 例、透析歴は 12.5

±9.2年である。原疾患は慢性腎炎18例、糖尿病性腎症12例、腎硬化症3例、慢性腎盂腎炎2例、多発性嚢胞腎1例、急速進行性腎炎1例、不明3例であった。

2010年10月26日から新規に開設された透析室に移転し、PVDF配管を用いた透析液供給システム（日機装社製）を構築した。各種透析関連用水をサンプリングに供した。水のエンドトキシン濃度はObataらによって開発されたESP法に準拠した²⁾。細菌培養はR2A培地で、100 mLを採取して検査に供した。なお、移転前の旧設備（東レ社製）での透析液エンドトキシン濃度はトキシノメーターミニ（和光純薬製）で測定した。

電解水透析（EW-HD）は、電解透析水整水器 TRIM HD-24D（日本トリム社製）にて作成した透析液を使用して実施した³⁾。血清CRPは標準法で、血清8-OHdGは、Koideらによって開発された新しいHPLC-ECD with SPE法⁴⁾によった。透析液溶存水素濃度は、東亜DKK社製溶存水素計DH-35Aで測定した。血中水素濃度は、ガスクロマトグラフィー法でトライライザーmBA-3000（株式会社タイヨウ社製）を使用し、Ohsawa法⁵⁾を一部改変して測定した。呼気水素濃度はハイドライザー（株式会社タイヨウ社製：mBA-31）を使用して測定した。

3 結果と考察

新規開設の透析室で、透析液のcentral supply system下で、原水、RO水、供給装置後、ETRF 2本通過後の最終透析液などの透析関連用水のエンドトキシン濃度測定が行われ、最終透析液エンドトキシン濃度は0.015~0.116 mEU/mL (EU/L)で、生菌は観察されなかった。

新施設移転前の旧施設の透析関連用水（ETRF 1本装着コンソール）の微生物学的純度の検索では、最終末端では<1 EU/L（トキシノメーターミニ）で、生菌は検出されなかった。しかし、透析液供給装置後は9~32 EU/Lで、グラム陰性桿菌、*Rastonia pickettii* や *Sphingomonas paucimobilis* が検出された。

透析液溶存水素濃度は、通常透析液では0 ppb、EW-HD用透析液では37±4 ppbであった。EW-HDで透析器通過直後の静脈側血液中の血中水素濃度は38.2~80.9 ppbであった。EW-HD実施中の呼気水素濃度は17.3~110.7 ppmであった。

1年間の通常透析での経過観察では、血清CRPは0.191±0.43 mg/dLから0.117±0.151 mg/dLと有意な変動をみなかった。一方、血清8-OHdGは、健常人が25.5±13.8 pg/mLに対して、移転前245.8±136.9 pg/mLと有意に高値を示した。移転1年後には117.0±63.8 pg/mLと有意な低下を認めた (p<0.05)。8-OHdGにおける従来のELISA法での感度は130 pg/mL程度であり、Koide法は今後の評価法として有用と思われた。

透析液の清浄化による8-OHdGの低下は、単にエンドトキシン fragmentsのみならず、bacterial DNAなど他の炎症惹起物質の影響があるものと推定される⁶⁾。血漿エンドトキシン濃度は、透析治療中かなりのばらつきが見られた。また、0.01 EU/L程度の測定感度を得るためには、約60分を要した。

EW-HDでは、分子状水素 (H₂) を含有する電解透析水（電解陰極水）を得るため、原水から軟水化装置、活性炭フィルターを通してイオンを含んだ水を電気分解し、電解水タンクに貯蔵後、送液ポンプでROモジュール、RO水タンク、UFモジュールに送液している。しかも、現在使用中のEW-HDシステムはROモジュール、RO水タンクの消毒がきかない初期開発モデルであり、その意味でも電解水タンクやRO水タンクの消毒管理が実務上重要となり、各箇所でのエンドトキシン濃度の測定が望まれる。

実際、RO膜の目詰まり（FI値の上昇）とともに透析液溶存水素濃度が低下するを経験しており、RO膜の洗浄により回復がみられた。その意味でも各箇所でのエンドトキシン濃度のチェックは重要であり、特にROモジュール後の現sampling portには課題が多い。無菌アルコール液での封入効果を今後の課題としたい。血漿中のエンドトキシンの値のばらつきが大きかった理由は、治療中は血液回路のaccess portからしか採血できないため、そのportの消毒方法からはエンドトキシンフリーの保証が得られないため、contaminationの可能性が高い。

透析液の清浄化によって手根管症候群の発生頻度が減少するという有名な1991年発表のBaz論文⁷⁾以来、透析液清浄化による炎症反応の低下、貧血改善など様々な臨床効果が報告されてきた。1996年、筆者らも血清sCD 14が、ETRF使用による透析液清浄化、透析液エンドトキシン濃度の低下によって減少するこ

とを報告した⁸⁾。sCD 14 はエンドトキシン受容体の一つであり、血清 sCD 14 値の高い透析例では死亡リスクが高まることが、2009 年 Raj ら⁹⁾により証明された。

OL-HDF の HD に対する生存率・心血管系合併症比率を含めた優位性は、2011 年の EDTA で発表された 5 か国（イタリア、オランダ、トルコ、スペイン、フランス）での RCT の集計結果でも証明されようとしている。このような現下の状況を考える時、透析液エンドトキシンの厳重な管理は、通常の OL-HDF 補充液のさらなる清浄化に貢献しうる¹⁰⁾。

また、EW-HD を最初に行った Huang ら¹¹⁾の透析液エンドトキシン濃度は 61 ± 3 EU/L であったことより、その透析液供給システム上の課題は明らかである。この溶存水素を利用した EW-HD の利点をより引き出すためにも、さらには OL-HDF への応用を考えた場合にも、エンドトキシン低減化は必須となろう。このような対応策が、透析症例の生存率改善や合併症の軽減化につながれば患者へのメリットだけでなく、医療経済的なメリットにも貢献しうると思われる。また、MIA 症候群の病態生理の理解が深まることにより、さらなる新しい治療法の開発につながることを期待したい。

4 結 論

ESP 法を使用した透析液エンドトキシン濃度測定は、従来の測定感度 1 EU/L を上回る感度を示し、透析液供給システムのバリデーション上有益であった。測定時間の短縮や、簡便な手法の開発など一層の改良によって、臨床現場での活用に道が開けることを期待したい。

この研究は、日本透析医会平成 22 年度公募研究助成によるものである。

文 献

- 1) Obata T, Nomura M, Kase T, et al. : Early detection of the *Limulus* amoebocyte lysate reaction evoked by endotoxin. *Anal Biochem*, 373; 281-286, 2008.
- 2) 中澤了一, 本橋和子, 東 伸宣, 他 : 高感度測定法 (ESP 法) による透析液および血漿エンドトキシン濃度の測定. *人工臓器*, 37; S94, 2008.
- 3) Nakayama M, Nakano H, Hamada H, et al. : A novel bioactive haemodialysis system using dissolved dihydrogen (H_2) produced by water electrolysis : a clinical trial. *Nephrol Dial Transplant*, 25; 3026-3033, 2010.
- 4) Koide S, Kinoshita Y, Ito N, et al. : Determination of human serum 8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OHdG) by HPLC-ECD combined with solid phase extraction (SPE). *J Chromatogr B*, 878; 2163-2167, 2010.
- 5) Ohsawa I, Ishikawa M, Takahashi K, et al. : Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals. *Nat Med*, 13; 688-694, 2007.
- 6) 中澤了一 : 透析の生体適合性と心血管合併症. 透析患者の合併症とその対策, 15; 63-74, 2006.
- 7) Baz M, Durand C, Ragon A, et al. : Using ultrapure water in hemodialysis delays carpal tunnel syndrome. *Int J Artif Organs*, 14; 681-685, 1991.
- 8) Nakazawa R, Kaneko M, Hoshi H, et al. : Serum soluble CD14 levels and ultrafiltered dialysate in hemodialysis patients. *Nephron*, 73; 493-494, 1996.
- 9) Raj DS, Carrero JJ, Shah VO, et al. : Soluble CD14 levels, interleukin 6, and mortality among prevalent hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis*, 54; 1072-1080, 2009.
- 10) 小幡 徹, 鈴木 誠, 佐々木光司, 他 : 新しい高感度エンドトキシン測定法 (ESP 法) によるオンライン HDF 透析液の水質管理. *腎と透析*, 70(別冊); 159-161, 2011.
- 11) Huang KC, Yang CC, Hsu SP, et al. : Electrolyzed-reduced water reduced hemodialysis-induced erythrocyte impairment in end-stage renal disease patients. *Kidney Int*, 70; 391-398, 2006.