

발열성 물질시험과 세균 내독소 시험의 비교 연구

이유경 · 강윤숙* · 백선영 · 김용관 · 신광훈** · 민홍기#

식품의약품안전청 생물학평가부 세균제제과

*식품의약품안전청 식품평가부 식품미생물과

**식품의약품안전청 생물학평가부 혈액제제과

(Received June 28, 1999)

Comparison of LAL Test with Pyrogen Test

Yoo Kyoung Lee, Yoon Sook Kang*, Sun Young Baek, Yong Kwan Kim,
Kwang Hoon Shin** and Hong Ki Min#

Bacterial products Division, Biologics evaluation Department, KFDA

**Food Microbiology Division, Food evaluation Department, KFDA*

***Blood products Division, Biologics evaluation Department, KFDA*

Abstract — To survey the possibility of replacing the pyrogen test with *Limulus Amebocyte Lysate* (LAL) test and to find out a standard methods suitable to our blood products made in Korea, 100 samples of 20% human serum albumin were tested by commercial LAL test kits and results of those were compared with rabbit pyrogen test. The LAL test is used both kinetic-chromogenically and kinetic-turbidimetrically. Both methods equally showed broad detection range (5.0~0.005 EU/ml), excellent sensitivity (≥ 0.005 EU/ml) and predominant recovery rate within valid dilution range, but kinetic-turbidimetric method seemed to be more reproducible than kinetic-chromogenic method(kinetic-chromogenic method : S.D.=15.88, kinetic-turbidimetric method : S.D.=8.12). After heating the sample at 75°C for 15 min, the results showed a little elevated recovery rate with both methods. After performing the test on 100 albumin samples with both kits, the results were analysed using the USP standard (1.33 EU/ml). 7% of samples in kinetic-chromogenic methods and 1% of samples in kinetic-turbidimetric method exceeded the limit of endotoxin levels regulated for blood products in USA. Because this phenomenon was not observed in both methods at the same time and both methods have high sensitivity (≥ 0.005 EU/ml), these results seemed to depend on non-specific reaction. Considering its sensitivity and reproducibility, we could assure that LAL test is proper to detecting pyrogenic with good sensitivity.

Keywords □ *Limulus Amebocyte Lysate*(LAL) test, rabbit pyrogen test, kinetic-chromogenic method, kinetic-turbidimetric method.

주사제나 비경구용 의약품에 의한 발열은 주로 자연계에 존재하는 내독소(endotoxin)에 의한 것으로서 내독소란 그람음성균의 outer membrane의 한 구성성분인 lipopolysaccharide(LPS)로 구성되어 있으며 LPS는 친수성(hydrophilic)인 O-specific polysaccharide와 core oligosaccharide 부분과 소수성(hydrophobic)

인 lipid A의 3부분으로 세분화되어 있다. 내독소는 체내의 가장 중요한 발열물질로서 LPS가 혈류를 타고 체내에 들어오게 되면 체내에서 단핵구나 대식세포에 의해 내인성 발열물질이 유리되며 이 내인성 발열물질은 직접 또는 입과구를 통하여 혈액으로 유리되어 시상하부의 체온조절중추를 자극하여 발열반응을 유도한다.¹⁾ 내독소의 체내침투는 발열반응 이외에 치사성 쇼크, 체중감소, 혈중 글루코스 감소, macrophage 활성화 등 다양한 생리현상을 초래하기도 한다.^{2,3)} 내독소

본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 02-380-1745 (팩스) 02-383-8322

는 열에 매우 안정하여 180~200°C의 dry heat에서도 완전하게 불활성화되지 않으며 멸균용 여과를 통과하는 반면 알칼리 용액에서는 쉽게 불활성화되는 특성이 있다.⁴⁾

1912년 토끼를 이용한 발열성시험이 처음 실시된 이후 현재 의약품의 내독소의 검출 방법으로는 가장 널리 사용되어 왔으나 1963년 Levin과 Bang 등에 의하여 투구게의 혈구 내에 있는 *Limulus amoebocyte lysate*(LAL)가 내독소에 특이적으로 반응하는 특성이 있음이 밝혀진 이래 LAL test는 경제성이 높으며 감도가 우수하고 신속하다는 등의 여러 장점이 보고되고 있어 LAL을 이용한 내독소의 검출방법으로 점차 발열성시험을 대체할 수 있는 추세이다.⁵⁻⁸⁾ 반응원리는 세균의 내독소가 LAL과 접촉하게 되면 적어도 3개의 serine protease zymogens인 factor C, factor B, proclotting enzyme이 포함된 효소반응이 개시된다(Fig. 1). Endotoxin pathway는 단계적으로 amoebocyte coagulogen을 변화시켜 coagulin gel을 생성한다. LAL에 있는 또 다른 단백질으로는 anti-LPS factor가 있으며 limulus clotting enzyme의 LPS-mediated activation을 조절한다.⁹⁾ 그 동안 LAL은 세균의 내독소하고만 특이적으로 반응하는 것으로 알려져 왔으나 최근 세균의 내독소 이외에 carboxymethylated(CM) β -D-glucan 등이 비특이 반응을 유도할 수 있다는 사실이 보고된 바 있다.⁹⁻¹¹⁾ LAL과 반응하는 glucan에는 세균의 curdlan, yeast의 zymosan, 조류(algae)의 laminarin, fungus의 lentinan 등이 포함된다. 이외에 hemodialyzer의 hollowfiber cellulose membrane에서 나온 extracts 또한 LAL과 반응하지만 토끼의 발열성시험에서는 발열을 유도하지 못하는 물질로 알려져 있다.⁹⁾

현재 개발되어 시판되고 있는 LAL시약으로는 LAL의 gel 형성 여부에 따라 단지 내독소의 존재유무만 확인하는 정성시험 분석법인 Gel clot 방법, gel 형성이 탁도의 변화를 측정하는 방법인 비탁법(turbidimetric method)이 있으며 여기에는 일정 시간 내에 도달하는 최종 탁도를 측정하는 종말점 비탁법(end-point turbidimetric)과 일정 탁도에 도달하는데 소요되는 시간을 측정하는 키네틱 비탁법(kinetic turbidimetric)이 있다. 또한 응고효소에 의해 합성기질로부터 유리되는 발색기의 양을 측정하는 비색법(chromogenic method)이 있으며 이 방법은 측정방법에 따라 종말점 비색법(end-point chromogenic)과 키

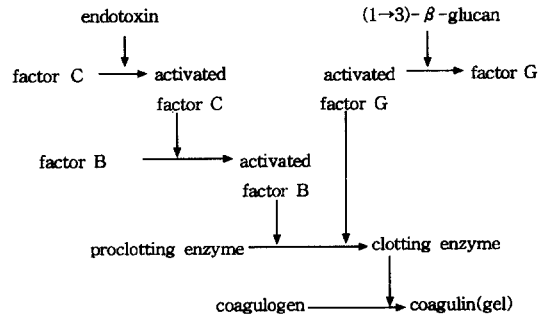


Fig. 1 - Cascade reaction in the endotoxin test.

네틱 비색법 (kinetic chromogenic)으로 나뉘어 진다. 본 실험에서는 국내에서 제조된 알부민의 LAL시험에 가장 적합한 시험방법 및 조건을 설정하고, 기존의 발열성시험과 LAL test 결과를 비교하여 알부민의 발열성 물질 측정법으로 사용 가능한지 검토하고 국내 알부민에 적합한 기준을 설정하기 위하여 생물학평가부에 검정 의뢰된 20% 알부민 100건을 수집하여 발열성시험과 LAL test를 수행하였으며 현재 시판 중인 여러 종류의 LAL kit를 구매하여 비교검토함으로써 알부민 분석에 적합한 시험방법과 실험조건을 설정하였다.

재료 및 방법

실험재료

시료 - 혈액제제인 사람혈청알부민(20%) 중 국검시 발열성 물질시험을 통해 발열성 물질이 검출되지 않은 제품 100개를 검체로 사용하였다.

시약 -

(1) LAL 시약(Limulus amoebocyte Lysate) : 미국 Bio Whittaker사의 QCL-1000(No. 50-647U), 미국 Charles River Endosafe 사의 키네틱-비색법 시약인 endochrome-K와 키네틱-비탁법 시약인 KTA2를 사용하였다.

(2) 내독소 표준품 : 미국 FDA의 reference standard endotoxin (10,000 EU/ml)에 표준화한 charles river endosafe사의 control standard endotoxin(10 ng/vial)을 사용하였으며 각각 사용한 LAL 시약과의 역가는 Charles River Endosafe 사에서 제공한 certificate of analysis를 이용하였다.

(3) LAL 시험용 물(LAL reagent water) : 영국 Charles River Endosafe Limited사의 제품을 이용하

여 보증된 엔도톡신 함량은 0.001 EU/ml 이하이다.

사용기구

시료의 준비에 사용된 튜브는 폴리스티렌 재질로 엔도톡신이 없는 일회용 튜브(Falcon 2057)를 사용하였으며 시험에 사용된 모든 플라스틱 피펫 팁도 엔도톡신 free한 팁(ependorf, biopur)을 사용하되 이를 습열멸균(121°C, 15분)한 후 80°C dry oven에서 건조시켜 사용하였다. 분석에 사용된 microplate는 역시 폴리스티렌 재질의 내독소가 없는 96 well plate (Falcon 3072)를 사용하였다. 내독소 표준품 희석에 사용된 튜브는 borosilicate 재질의 유리튜브를 주사용 증류수로 세척한 후 250°C Dry Oven에서 4시간 건조 열멸균하여 사용하였다.

시험방법

<키네틱-비색법과 키네틱-비탁법>

표준액의 제조 - 본 시험에서 사용된 LAL kit는 endochrome-K(Endosafe, R1710K), KTA2(Endosafe, R1900)였으며, 표준액으로 사용한 내독소는 *E. coli* 055:B5로부터 추출한 lipopolysaccharide(Endosafe E120)이었으며, 시험용액 제조를 위한 완충액으로는 non-pyrogenic 멸균증류수(Endosafe W120)를 사용하였다.

E. coli 055:B5를 제조사에서 지시한 용량의 non-pyrogenic 멸균증류수에 녹여 50 EU/ml 농도의 stock solution을 만든 후, 10배 희석법을 이용해 5 EU/ml, 0.5 EU/ml, 0.05 EU/ml, 0.005 EU/ml의 표준농도를 만들어 표준곡선을 만드는데 사용하였다. 최초 저장액은 5분간 vortex mixer를 이용해 혼합하며 연속적인 희석계열의 작성 시에는 borosilicate 튜브를 사용해 1분간 vortexing 하였다. 또한 사용직전 30초간 잘 혼합하여 사용하였다.

시료조제 - 각각의 시료에서 200 µl를 취해 LAL 시험용수 1,400 µl에 혼합해 1:8 희석액을 만든 후 연속적으로 희석해 1:80, 1:160, 1:240, 1:360, 1:480의 시료를 만들었다.

시료의 열처리 - 각각의 시료에서 200 µl를 취해 LAL 시험용수 1,400 µl에 혼합해 1:8 희석을 만든 후 75°C로 설정한 수욕에서 15분간 중탕으로 가열하였다. 처리 후 LAL 시험용수로 희석해 1:80, 1:160, 1:240의 시료를 만들었다.

제품양성대조(positive product control) - 각각의 희석시료에 0.5 EU/ml의 농도로 endotoxin을 첨가하였다. 조제 방법은 희석시료와 엔도톡신의 반응을 최소화하기 위해 well plate에 시료 100 µl를 넣은 후 LAL 시약을 분주하기 직전 5 EU/ml 농도의 엔도톡신을 10 µl 넣는 방법인 in-plate spiking 기법을 이용하였다. 따라서 엔도톡신 스파이크의 농도를 0.45 EU/ml로 계산하였다.

음성대조(negative control) - 음성대조로서 LAL reagent water를 사용하였다.

엔도톡신 측정 및 분석 - 96 well plate에 음성 대조액, 표준엔도톡신, 시료, 제품양성대조액의 순으로 각 해당되는 well에 각각 100 µl씩 담은 후, 일부 well에는 5 EU/ml의 표준액을 10 µl씩 분주하여 회수율을 검사할 수 있도록 한다. LAL시약은 사용 전 상온에 꺼내놓거나 37°C에서 30분 가량 놓아두어 반응 온도에 손쉽게 이를 수 있도록 한 후 사용직전에 LAL water에 녹여서 각 well에 100 µl씩 분주한다. 반응시간은 자동적으로 1시간 각 reading의 간격은 15초로 총 241 reading하였다. Onset O.D.는 키네틱-비색법의 경우는 0.1, 키네틱-비탁법은 0.05로 설정하였다. 시간의 경과에 따른 탁도의 변화의 측정은 미국 Bio-Tek Instrument 사의 ELx808IU를 사용하였으며 데이터 획득 및 분석에는 KC-3를 사용하였다.

농도 및 회수율의 계산 - 단계적으로 희석된 표준품들의 onset O.D.에 도달하는데 걸리는 시간에 대한 double log를 취한 그래프를 이용하여 농도를 계산한 후 희석배수를 곱한다. 결과들은 regression factor가 0.98이상이고 회수율이 50~150% 범위에 들어갈 때 의미를 가지게 된다. 회수율은 샘플내의 물질이나 어떤 요인들로 인해 LAL에 대한 활성도가 증가 또는 억제되는 정도를 파악하기 위한 방법으로 in-plate spiking 기법을 이용하여 첨가한 엔도톡신의 농도는 0.45 EU/ml로 계산하되 그 식은 아래와 같다.

회수율(%)=

$$\frac{\text{spike한 well의 농도} - \text{spike안 한 well의 농도}}{0.45} \times 100$$

<종말점-비색법>

표준액의 제조 - 본 시험에서 사용된 LAL kit는 QCL-100(Biowhittaker)이었으며, 표준액으로 사용한

내독소는 *E. coli* O111:B4로부터 추출한 lipopolysaccharide(Biowhittaker)이었으며, 시험용액 제조를 위한 완충액으로는 내독소 제거 처리한 LAL 시약용 증류수를 사용하였다.

E. coli O111:B4를 제조사에서 지시한 용량의 LAL 시약용 증류수에 녹여 저장액(22 EU/ml)을 만든 후, 1.0 EU/ml, 0.5 EU/ml, 0.25 EU/ml, 0.125 EU/ml 순으로 희석하여 표준농도를 만들어 표준곡선을 만드는 데 사용하였다. 저장액은 15분간 vortex mixer를 이용해 혼합하며 연속적인 희석액의 작성시 1분간 잘 혼합하였다. 또한 사용직전 30초간 vortexing하여 사용하였다.

시료조제 - 각각의 시료에서 200 µl를 취해 LAL시약용 증류수 1,400 µl에 혼합해 1:8 희석액을 만든 후 연속적으로 희석해 1:80, 1:160, 1:240, 1:360, 1:480의 시료를 만들었다.

시약의 조제 - 발색기질시약(Biowhittaker)에 LAL 시약용 증류수 6.5 ml를 첨가하여 2 mM 농도로 만든 후, LAL 시약에는 LAL 시약용 증류수 1.4 ml를 가하여 조심스럽게 흔들어 완전히 녹여서 사용하였다. 반응정지액은 25v/v% 아세트산과 10% sodium dodecylsulfate로 제조하였다.

내독소 측정 - Microplate(Falcon 3072)에 시료, 표준품, 음성 대조군을 각각 50 µl씩 분주하고, LAL 시약을 50 µl씩 첨가한 뒤, 37°C에서 10분간 배양한 후, 미리 37°C로 가온해 둔 발색기질 시약을 100 µl를 첨가하였다. Microplate를 37°C에서 6분 동안 배양한 다음 각 well에 반응정지액 50 µl를 첨가한 다음 microplate reader를 이용하여 405 nm에서 측정하였다.

<발열성물질시험>

발열성물질시험은 생물학적제제 기준 및 시험방법에 의해 실시하였으며 그과정을 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 한 검체 당 체중 1.5 Kg이상의 토끼 3마리를 사용하였으며 주사기와 주사바늘은 미리 250°C에서 30분 이상 가열 멸균하여 사용하였다. 10시간 전부터 시험이 끝날 때까지 물 이외의 사료는 공급하지 않았다. 온도계는 일정한 깊이로 직장에 삽입하고 일정 시간 안정시킨 다음 측정하되 검체 주사전의 체온을 대조체온으로 하였다. 대조체온 측정 후 약 15분 이내에 미리 약 37°C로 가온한 검체를 Kg당 3 ml씩 이정맥내에 주사하고 주사 후 3시간, 적어도 1시간마다 체온을 측정하였다. 토끼 3마리의 대조체온과의 체

온차의 최대치의 합이 1.3°C이하일 때 발열성물질 시험 음성, 또는 2.5°C이상일 때는 발열성물질 시험 양성으로 하였고, 체온의 차가 그 중간 또는 발열반응이 이상하다고 인정될 때는 시험을 반복하여 두 번의 결과의 합이 3.0°C 이하이면 음성으로, 4.2°C 이상이면 양성으로 판정하되 체온의 차가 그 중간 또는 발열반응이 이상하다고 인정될 때는 다시 한번 마지막으로 시험을 반복하여 세 번에 걸친 체온의 차가 5.0°C 미만이면 음성으로, 5.0°C 이상일 때 양성으로 판정한다.

실험 결과 및 고찰

LAL 시험의 혈액제제 중 사람 혈청 일부민에의 적용 가능성을 확인하여 효과적인 수행방법을 모색하기 위해 먼저 LAL 시험을 이용한 몇 가지 시험법 중 먼저 다른 의약품 등에 광범위하게 사용중인 종말점비색법을 이용한 kit의 사용을 시도하여 보았다. 일반적으로 샘플 내의 저해작용인 배제를 위해 우선적으로 희석법을 사용하는데 이때 최대 희석배수(MVD, Maximum Valid Dilution)가 중요한 지표가 된다. 최대 희석배수는 희석 LAL 시약의 감도를 최대한의 희석배율을 결정해주는 지표로 종말점비색법의 경우는 다음과 같이 계산할 수 있다.

$$\begin{aligned} \text{최대희석배수(MVD)} &= \frac{\text{endotoxin limit} \times \text{potency of product}}{\lambda} \\ &= \frac{1.33 \times 1}{0.1} = 13.3 \end{aligned}$$

- potency of product : volume-per-kilogram 투여 약물의 경우 1.0
- λ : LAL시약의 최저 검출농도

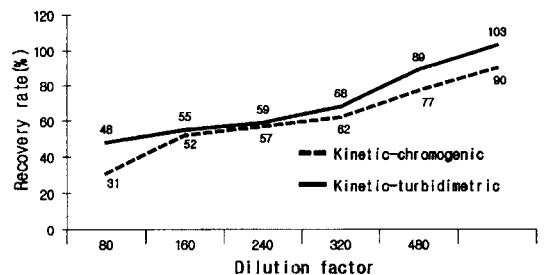


Fig. 2 - Changes on recovery rate with dilution factor.

Table I – Changes of recovery rate after heating at 75, 15 min

Method/Treatment	No. of sample	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Kineticchromogenic	none(%)	53.99	39.03	34.16	32.77	61.33	53.89	53.79	58.06	56.41	55.54
	done(%)	58.06	40.65	36.89	34.07	61.07	57.55	55.30	58.36	57.87	54.89
Kinetic-turbidimetric	none(%)	60.15	54.28	67.26	66.93	62.85	67.50	62.99	70.50	67.5	71.09
	done(%)	104.2	94.19	89.31	86.98	79.41	75.71	99.65	70.45	78.55	85.41

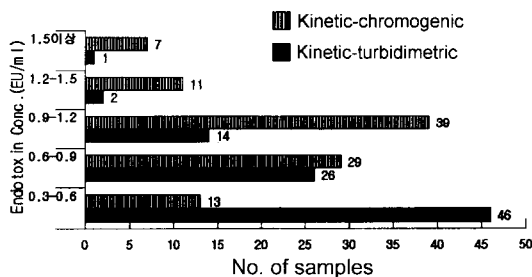


Fig. 3 – Comparison of endotoxin concentration detected with kinetic-chromogenic and kinetic-turbidimetric method in albumin samples.

이 시약을 이용하여 샘플에 대한 시험을 수행해 본 결과 10배까지는 회수율이 50%를 넘지 못했으므로 저해작용은 제거되지 않았음을 확인할 수 있었다. 키네틱법을 이용한 kit에 대한 시험 결과, 희석을 통해서 저해작용이 제거되었으며(Fig. 2), 열처리를 하였을 때 회수율이 유의하게 상승됨을 확인하였다(Table I). 발열성물질 시험을 통과한 검체 100개를 시료로 선정하여 키네틱-비색법과 키네틱-비탁법을 이용하여 LAL test를 실시하여 각각에 대한 시험을 실시하여 검체 내 내독소의 농도와 회수율을 검사하고(Fig. 4-5) 이를 바탕으로 두 방법에 대한 생물학적제제 특히 알부민의 내독소 시험법으로의 이용가능성과 적합성을 비교하여 보았다.

희석을 이용한 저해작용제거효과

키네틱법을 이용하는 경우 MVD는 다음과 같은 방법으로 산출할 수 있다.

$$\text{최대희석배수(MVD)} = \frac{1.33 \times 1}{0.005} = 266$$

본 실험에서는 희석을 통해 저해작용을 제거하기 위한 적정 희석비율을 얻기 위해 시료를 80배, 160배, 240배, 그리고 최대 희석배수 값에는 벗어나지만 480배, 720배까지 희석하여 시험을 수행하였을 때, 160배 이상부터는 비색법과 비탁법에서 공히 50%이상의 회

수율을 보였다(Fig. 4). USFDA GUIDELINE(1987) and GUIDANCE(1991)에서 지정한 바에 따르면 생물학적제제에 대한 LAL test의 유효성을 검증하기 위해 50-150%의 회수율을 요구하고 있으므로 160배 희석했을 경우 저해작용이 제거되었다고 판단된다.

열처리를 이용한 저해작용의 극복

일반적으로 LAL test에 있어서의 저해작용은 제제의 생산 및 공정 중에 재료로 사용되거나 정상적으로 접촉할 수 있는 물질들, 특히 액상의 thimerosal, sodium bisulfite, benzyl alcohol, benzalkonium chloride, urea, rose bengal 등이 LAL 시약 내의 단백질을 변성시키거나 효소활성을 억제하여 유도되며, 따라서 소량 첨가된 내독소의 회수가 억제 또는 증가하게 된다. 그 중 benzyl alcohol 등과 같은 저해제는 희석을 통해 손쉽게 극복이 가능하지만 보다 적극적으로 detergent를 사용하거나 일정시간 가온하여 저해작용을 제거할 수 있는데 본 시험에서는 후자의 방법을 선택하여 75°C에서 15분간 가온하여 회수율의 변화를 확인하였다(Table I).

시험 방법에 따른 열처리 효과의 차이를 비교하기 위해 시험의 유의성의 척도인 시료의 내독소 회수율을 기준으로 통계적 처리를 수행하였다. 각 방법간 및 처리간의 분산 분석을 수행하여 F 검정을 수행하였으며 처리간의 차이의 유무를 각 방법간의 결과를 paired-comparison을 수행한 결과 키네틱-비색법과 비탁법의 경우 모두 열처리에 의해 회수율이 유의하게 증가되었음을 확인할 수 있었고, 특히 키네틱-비탁법에 있어 비색법에 비해 현저한 회수율의 상승효과를 보였다(키네틱-비색법 : S.D.-1.33, 키네틱-비탁법 : S.D.-14.39). 결국, 본 시험에서의 최적 LAL test 조건은 160배 희석에 75°C, 30분 열처리를 한 경우인 것으로 확인되었다.

키네틱-비색법과 키네틱-비탁법의 비교

생물학적제제, 특히 알부민에 대한 LAL test의 적

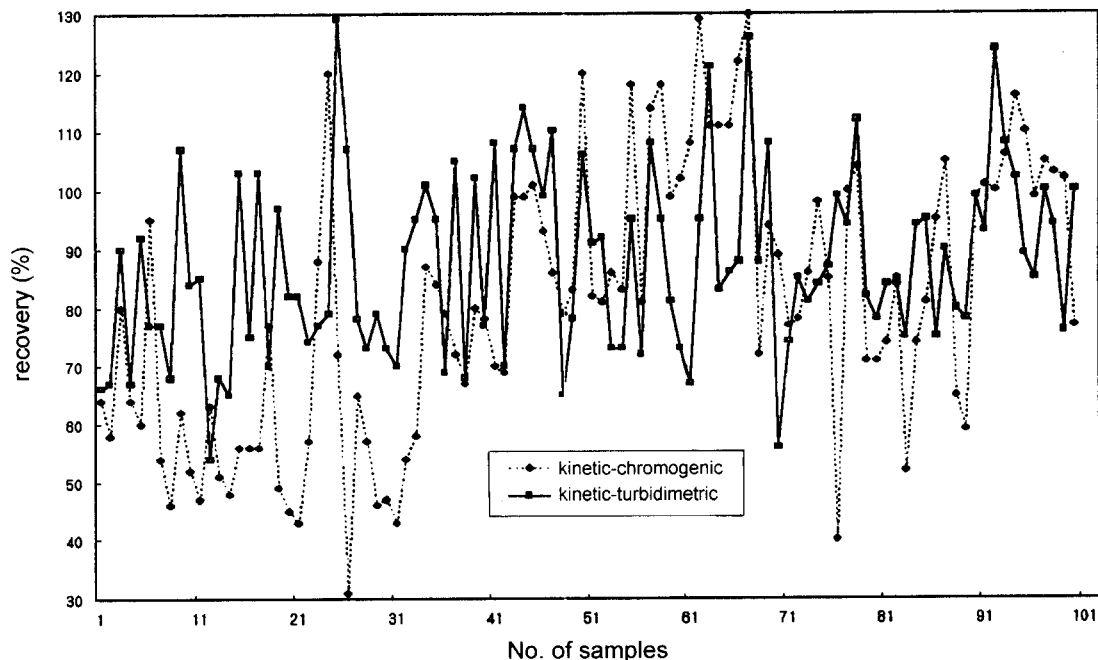


Fig. 4 - Comparison of recovery rate in albumin samples after test in kinetic-chromogenic and kinetic-turbidimetric methods.

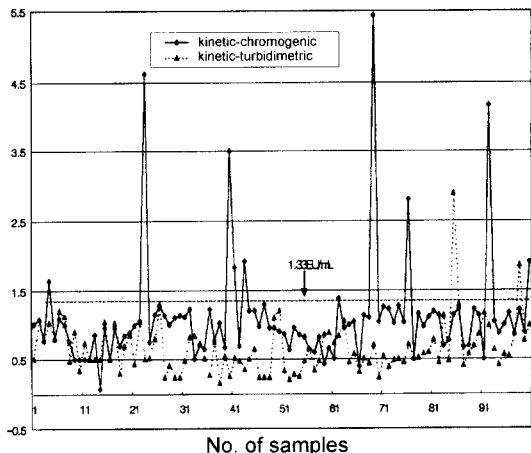


Fig. 5 - Concentration of endotoxin in albumin.

합성을 확인하고 시판중인 kit중 보다 용도에 부합하는 방법을 선정하기 위해 rabbit pyrogen test에서 합격한 20% 사람 혈청 알부민 100건을 선정하여 각각 키네틱-비색법과 키네틱-비탁법을 이용한 LAL test를 수행하였다(Table II, Fig. 3-5). 본 시험에서와 같이 *E. coli* O55:B5를 표준품으로 사용하고 있는 미국의 기준인 1.33 EU/ml를 결과에 적용해 보았을 때, 키네틱-비색법에서는 7%, 키네틱-비탁법에서는 1%가

기준 이상의 결과를 보였다. 이는 일종의 증진작용 (enhancement)에 의한 것으로 사료된다. 보통 증진작용은 LAL을 활성화시키는 포도당 중합체인 glucans이 존재할 때 발생하는 것으로 보이는데, glucan 간섭에 대해 위험한 수준에 있는 물질은 셀룰로오스의 hollow fiber, 세척되지 않은 셀룰로오스 아세테이트 필터, carboxymethyl cellulose 또는 세균의 증식에 의한 curdlan, 효모증식에 의한 zymosan, 조류(algae)의 laminarin, 곰팡이의 lentinan 등으로 볼 수 있다. 이들 물질들은 LAL과 반응하지만 발열성물질 시험에서는 발열을 유도하지 못하는 물질로 알려져 있으므로 본 실험에서의 나타난 증진 작용들은 본 제제의 제조 공정 중에 노출된 물질들에 의한 것으로 보인다.⁹⁾

재현성 조사

본 시험에서는 각 LAL 시약들을 이용한 시험을 국가검정시에 적용할 경우 가장 문제가 될 수 있는 재현성의 안정화를 위해 각각의 kit에 대해 시료 중에서 임의로 선정된 10건의 알부민에 대해 재현성을 검사하였다(Table II). 10건의 시료에 대해 각 kit를 이용하여 동일한 시험을 연속적으로 실시한 결과를 역시 미국의 기준인 1.33 EU/ml를 적용했을 때, 키네틱-비

Table II – Comparison on reproducibility of LAL test between kinetic-chromogenic and kinetic-turbidimetric method

Method/Treatment	No. of sample	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	S.D.
Kineticchromogenic	Concentration (Eu/ml)	0.78	0.77	1.33	0.51	0.9	1.03	0.87	1.1	1.5	0.8	0.23
	Recovery (%)	54	72	63	97	53	101	111	78	76	80	15.0
Kinetic-turbidimetric	Concentration(Eu/ml)	0.36	0.49	0.85	0.54	0.44	0.29	0.35	0.32	0.8	0.32	0.15
	Recovery (%)	95	83	85	91	95	99	94	91	121	112	8.44

색법의 경우 8회는 적합, 2회는 기준 초과인 것으로 확인되었고 표준편차는 내독소 농도에 대해서는 0.23으로 나타났으며, 키네틱-비탁법의 경우 10회 모두 적합한 것으로 확인되었고 표준편차도 8.44로 나타나 키네틱-비색법에 비해 오차가 현저히 적은 것으로 결론 지을 수 있었다.

이러한 오차의 발생은 알부민내의 저해물질들에 의한 간섭현상 이외에도 내독소의 물리적 성상이 관여하는 것으로 보인다. 내독소는 검출과 제거에 있어 문제를 야기하는 독특한 화학적, 물리적 성질을 가지고 있다. 내독소분자의 탄수화물 부분은 물과 같은 극성 용매에서의 분산을 용이하게 하고, 비극성 용매에서는 분산되지 않도록 한다. 유기 용매 내에서는 용매가 지질 A의 배치를 변화시키고 활성을 없애기 때문에 LPS를 회수하는 것은 불가능하다고 할 수 있겠다. 정제되지 않은 내독소는 지질, 탄수화물, 그리고 단백질을 포함하고 있어 물에서 안정하고 손쉽게 분산되므로, 시료에 대한 잘 혼합하는 것이 필요하지 않은 반면, 정제된 내독소는 안정화 단백질 group이 없어 물에서 분산할 만큼 안정하지 못하므로 조제와 유지를 위해 잘 혼합한 것이 필요하고 특히, 1 EU/ml 이하의 저농도인 내독소 희석액은 유효한 상태로 유지하기가 어렵다. 하지만 정제되지 않은 내독소와는 달리 정제된 내독소는 약물 시료와 혼합되면서 배열상에 변화를 일으켜 간섭현상을 나타내는 경우가 많으므로 실제적으로 문제가 되는 것은 안정한 상태인 정제되지 않은 내독소라고 할 수 있겠다. 그러므로 오차를 방지하기 위해서는 최대한 내독소에 노출되는 가능성을 줄이고 표준품 조제 시나 내독소 스파이크액 조제 시에 사용 직전에 조제하여 바로 사용되도록 정해진 시간만큼 철저히 잘 혼합할 것이 권장된다. FDA에서 LAL 시험을 승인하기 이전의 문제들 중 하나는 내독소가 아닌 발열성물질의 문제였다. LAL 시험에 대한 모든 연구는 이 시험이 의약품 품질관리 시험에 있어 어떠한 발열성물질도 놓치지 않는다는 것을 보여주고 있으며, 특히 1979년

Baxter사에서 정맥 주사제와 의학적 기구에 대해 수행된 143,194건의 LAL 시험과 28,410건의 토끼 발열성 물질 시험 결과를 보고하였다. 이 결과에 따르면 용액과 기구내의 발열성물질은 자연 상태의 내독소이므로 LAL 시험과 토끼시험 모두에서 양성반응을 나타내며, 설명되지 않는 음성 LAL 시험 결과와 양성 토끼시험 결과는 없었고, LAL 시험에 의해 검출될 수 있는 대부분의 내독소 유래의 발열성물질이 토끼 실험에서는 검출되지 않는 경우가 확인되었으며, LAL 시험시 보다 높은 재현성을 얻을 수 있음이 확인되었다.¹²⁾ 결국, FAD에서 1987년에 발열성시험을 LAL 시험으로 대체할 것을 승인한 후, 현재 대부분의 약전은 LAL 분석을 기본적인 내독소 시험방법으로 받아들여지고 있는데 이는 LAL 시험의 감도, 특이도, 정확도, 경제성 등을 고려한 것으로 본 시험 결과와 일치한다고 볼 수 있다.

결 론

본 연구에서는 사람 혈청 알부민내의 내독소 검출을 위해 LAL 시험을 현재 사용되고 있는 발열성물질 시험의 대체 또는 병행 시험으로의 시행 가능성을 타진하고 시판중인 LAL 시험 키트들에 대한 시험을 수행하여 가장 신속하고 손쉽게 정확한 결과를 얻을 수 있는 시험법을 선정하고 현 실정에 적합한 기준 설정을 위해 수행되었다.

1. LAL 시험을 이용하여 사람 혈청 알부민내의 내독소 분석시, 160배 희석, 75°C로 15분간 열처리할 때 최적의 회수율을 얻을 수 있었다.

2. 국내에서 제조한 20% 알부민 100건에 대한 발열성시험시 모두 적합하였으나, LAL 시험결과 키네틱-비탁법에서 1%, 키네틱-비색법에서 7%가 1.33 EU/ml를 초과한 것으로 관찰되었으나 음성 LAL 시험 결과와 양성 토끼시험 결과는 없었고, 키네틱-비탁법과 키네틱-비색법이 모두 매우 높은 감도를 나타냄을 고려할

때, 비특이 반응에 의한 결과인 것으로 추측되었다.

3. 재현성 시험에 있어서는 키네틱-비색법에 비해 키네틱-비탁법이 우수한 결과를 나타내었다.

4. 본 실험결과를 종합하여 볼 때 LAL시험을 발열성물질 시험의 대체시험 또는 병행시험이 가능할 것으로 생각된다.

문 헌

- 1) Lanisng, M. P, John, P. H. and Donald, A. K. : *Microbiology*. 2nd ed. An. C. Brown Publishers, p55, (1993).
- 2) Lillehei, R. C., Longerbeam, J. K. and Bloch, J. H. : Physiology and therapy of bacteremic shock, Experimental and clinical observation. *Am. J. Cardiol.* **13**, 599 (1963).
- 3) Clas, F and Loos, M. : Killing of the S and R forms of *Salmonella minnesota* via the classical pathway complement activation in guinea pig and human sera. *J. Immunology.* **40**, 547 (1980).
- 4) Kanoh, S., Mochida, K. and Ogawa Y. : Studies on heat-inactivation of pyrogen from *E. coli*. *Biken. J.* **13**, 233 (1970).
- 5) Cooper, J. F., Levin, J., Wagner, H. N. : Quantitative comparison of *in vitro* and *in vivo* methods for the detection of endotoxin. *J. Lab. Clin. Med.* **78**(1), 138 (1971).
- 6) Wachtel, R. E., Tsuji, K. : Comparison of limulus amebocyte lysate and correlation with the United States pharmacopeial pyrogen test. *Appl. Environ. Microbiol.* **33**(6), 1265 (1977).
- 7) Poole, S., Dawson, P., Gaines, Das, R. E. : Second international standare for endotoxin : Calibration in an international collaborative study. *J. Endotoxin. Reserch.* **4**(3), 221 (1997).
- 8) Steere, A. C., Rifaat, M. K., Seligmann, E.B., Hochstein, Jr. H. D., Frieland G., Dasse P., Wustrack K. O., Axnick K. J., Barker L. F. : Pyrogen reactions associated with the infusion of 25% normal serum albumin(human). *Transfusion* **18**(1), 102 (1978).
- 9) Cooper, J. F., Weary, M. E., Jordan, F. T. : The impact of non-enxotoxin LAL-reactive materials on limulus amebocyte lysate analyses. *PDA. J. Pharma. Sci. Tech.* **51**(1), 2 (1997).
- 10) Roslansky, P. F., Novitsky, T. J. : Sensitivity of Limulus Amebocyte Lysate(LAL) to LAL-reactive glucans. *J. Clin. Microbiol* **29**(11), 2477 (1990).
- 11) Ikemura, K., Ikegami, K., Shimazu, T., Yoshioka, T., Sugimoto T. : False positive result in limulus test caused by limulus amebocyte lysate-reactive material in immunoglobulin products. *J. Clin. Microbiol* **27**(9), 1965 (1989).
- 12) Muscoli, C., Weary, M. K. : Application of the Limulus Amebocyte Lysate(LAL) pyrogen test for parenteral injectable products. Biomedical applications of the horseshoe crab(Limulidae), Elias Cohen Ed, AR Liss, (1979).