

内視鏡消毒剤中オルトフタルアルデヒドの高感度蛍光定量法の開発

Development of a highly sensitive fluorescence assay for orthophthalaldehyde in endoscopic disinfectants

青木 萌恵¹⁾ 星野 智哉¹⁾ 古庄 仰¹⁾ 杉山 栄二¹⁾
水野 初²⁾ 伊藤 忍³⁾ 轟木 堅一郎¹⁾

1) 静岡県立大学薬学部 2) 名城大学薬学部 3) 株式会社アmano医療機器事業部

抄 録 内視鏡は、結核菌等による細菌感染を防ぐため使用前に 0.55%のオルトフタルアルデヒド (OPA) を主成分とする高水準消毒剤を用いた専用装置で自動洗浄される。この際、消毒剤は繰り返し使用により徐々に薄まるため、洗浄装置内の消毒剤濃度が有効濃度域内かを随時モニターする必要がある。吸光度法を原理とした現行の OPA 濃度計は精度や感度が十分とはいえず、消毒剤中色素が定量結果に影響しうる問題もあった。本論文では消毒剤中 OPA の感度、精度、特異性に優れた蛍光定量法の開発を報告する。開発した定量法により消毒剤中 OPA は、0.20–0.55%の範囲で良好な定量性を示し、OPA の洗浄能力の下限付近である 0.27–0.33%においても 0.01%刻みの濃度で良好な定量性を与えた。本法は現行の濃度計よりも精度や感度が優れ、かつ試薬と消毒剤の混合だけで誰でも簡単に再現性の高い定量を可能とすることから実利用が期待できる。

キーワード: 内視鏡消毒剤、蛍光定量法、オルトフタルアルデヒド

Abstract Endoscopes are automatically rinsed with a disinfectant containing 0.55% ortho-phthalaldehyde (OPA) prior to use in a dedicated machine to prevent bacterial infection. Because the disinfectant is gradually diluted with repeated use, it is necessary to monitor the concentration of disinfectant in the cleaning machine as needed to ensure that it is within the effective concentration range. In this paper, we report the development of a fluorescence assay for OPA in disinfectants with excellent sensitivity, accuracy, and specificity. The developed method showed good quantification of OPA in disinfectants in the range of 0.20–0.55%, and also gave good quantification at concentrations of 0.01% in increments of 0.27–0.33%, which is near the lower limit of the cleaning power of it. This method is expected to be used because it is more accurate and sensitive than current OPA monitors, and anyone can easily perform highly reproducible assay by simply mixing reagents and disinfectant.

Key words: endoscopic disinfectants, fluorescence assay, orthophthalaldehyde

1. 緒言

内視鏡は、結核菌等による細菌感染を防ぐため使用前に高水準消毒剤により洗浄することがガイドラインにより定められている¹⁾。広い抗微生物スペクトルや

強い殺微生物力がある内視鏡洗浄用の高水準消毒剤として、グルタルアルデヒド (GA) や過酢酸、オルトフタルアルデヒド (OPA) が市販されている。このうち、GA については、皮膚および呼吸器への刺激性やアレルギー性があり、消毒従事者が喘息に罹患するなど健康影響が問題となっている^{2,3)}。過酢酸と OPA は

受理日：2023年10月30日
採択日：2023年11月29日
オンライン公開日：2024年3月31日

抗酸菌（結核菌、非結核性抗酸菌）に対する殺菌力が GA に比べ有意に高いが、過酢酸は金属腐食性が高いため、洗浄適合性のある内視鏡や専用装置を使用することが求められる。これに対し OPA は、高水準消毒剤として優れた洗浄効果を示し、内視鏡に付着していた細菌グラム陽性菌（ブドウ球菌、レンサ球菌）、グラム陰性菌（大腸菌、緑膿菌等）、真菌（カンジダ属）などに対して 5 分で殺菌効果を示すとされている。また、抗菌や真菌に対する殺菌作用、芽胞に対する殺芽胞効果、ウイルスに対する不活化作用なども有している。一方で消毒後のすすぎが不十分な場合、残留した OPA による有害事象が報告されており^{4,5)}、専用の洗浄消毒器⁶⁾による適切な洗浄と完全なすすぎが行われる。この際、0.55% OPA を含む消毒剤（ディスオーパ⁷⁾等）は繰り返し使用により徐々に薄まるため、洗浄装置内の OPA 濃度が有効濃度域内（0.30–0.55%）であるかを随時モニターする必要がある。現行の OPA 濃度計（ディスオーパモニター⁸⁾等）は OPA 由来の紫外吸光度から簡易定量を行うが、精度や

感度が十分とはいえず、誤飲や識別のための添加色素である緑色 201 号が吸収極大波長の 640 nm 付近のみならず、200–500 nm の広い領域に吸収を持つため⁹⁾、定量結果に影響しうる問題もあった。

そこで本研究では、消毒剤中 OPA の感度、精度、特異性に優れた蛍光定量法の開発を行い、医療現場や高齢者施設で従事者が誰でも簡便かつ正確に OPA 濃度を分析できる方法を構築した。本法では、OPA がアミノ酸の発蛍光誘導体化試薬としても利用されている¹⁰⁾ことに着想を得た。消毒剤中の OPA は弱塩基性条件下でアミノ酸およびチオールからなる蛍光誘導体化試薬と混合し、強い蛍光を発するイソインドール誘導体へと変換される（図 1）。この蛍光強度から OPA 濃度を共存物質の影響を受けずに高感度かつ選択的、簡便に定量できる。誘導体化反応の最適化や、共存する着色料である緑色 201 号濃度が本分析に及ぼす影響の評価、分析バリデーションなどの評価を行い構築した分析法の有用性について実証した結果を以下に述べる。

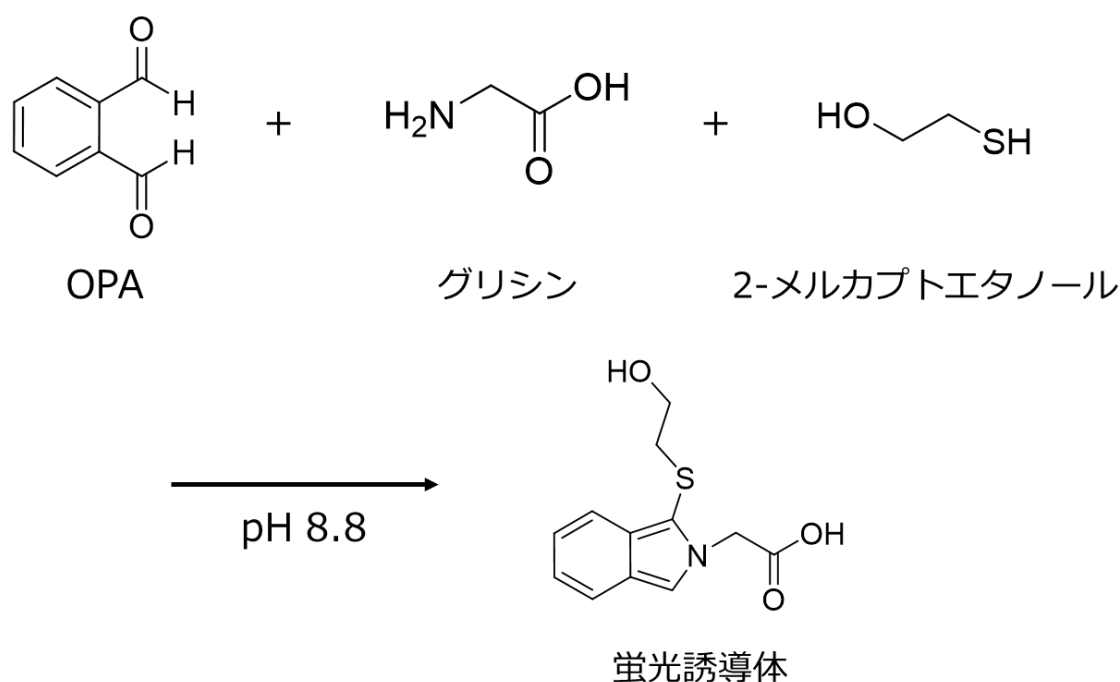


図 1 消毒剤中 OPA の蛍光誘導体化反応式

2. 実験

2.1 試薬および溶液

全ての実験用水は、水道水を ELGA Purelab Flex system (Veolia Water 製) により精製して使用した。OPA、グ

リシン、2-メルカプトエタノール、2-ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリン (HP-β-CD)、ホウ酸緩衝液 (100 mmol/L、pH 8.8、APDS タグワコー用) および緑色 201 号 (アリザリングリーン G) は富士フィルム和

光純薬社製のものを使用した。ディスオーパ消毒液 0.55%は ASP Japan 合同会社から入手した。特記しない限り試薬は市販の特級品をそのまま使用した。OPA 標準液には、ディスオーパモニター (ASP Japan 合同会社製) において校正用に使用される 0.20–0.55%の 8 溶液 (0.20、0.25、0.30、0.35、0.40、0.45、0.50、0.55%) を株式会社アマノより提供を受けた。HPLC 用アセトニトリルおよびメタノールはそれぞれ Fisher Scientific、キシダ化学製のものを使用した。その他の試薬はすべて特級品以上のものを使用した。

2.2 分析装置

HPLC およびフローインジェクション分析には、RF-20A XS 蛍光検出器および SPD-M20A フォトダイオードアレイ検出器を接続した LC-40B XR (島津製作所製) を使用した。蛍光スペクトル測定には FP-6500 蛍光分光光度計 (日本分光製) を使用した。

2.3 消毒液中 OPA の蛍光誘導体化分析

ディスオーパ消毒液または OPA 標準液 20 μ L に蛍光誘導体化試薬 (50 mmol/L 2-メルカプトエタノール、100 mmol/L グリシン、50 mmol/L HP- β -CD を含む pH 8.8 のホウ酸緩衝液) 7,980 μ L を加えたものを蛍光分光光度計またはフローインジェクション蛍光分析システムにて分析した。蛍光分光光度計による測定では、反応溶液の 1 mL を 1 cm 角の石英ガラスセル (容量 3.5 mL、ジーエルサイエンス製) に入れ、励起波長 340 nm における蛍光スペクトルおよび蛍光強度を測定した。フローインジェクションシステムでの測定では、反応溶液の 10 μ L を前項で示した HPLC 装置に導入し、溶離液としてホウ酸緩衝液を流速 0.4 mL/min で送液した。蛍光検出は励起波長 340 nm、蛍光波長 440 nm にて行った。

2.4 ディスオーパ中緑色 201 号濃度の HPLC 分析

HPLC 分析装置は 2.2 項に記載のとおりである。分析カラムには ACQUITY UPLC BEH C18 (2.1 \times 150 mm、1.7 μ m、Waters 製) を用いカラム温度を 50°C に設定した。移動相には、メタノール–20 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 7.0) (55 : 45, v/v) を用い、流速 0.08 mL/min で送液した。カラムからの溶出液はフォトダイオードア

レイ検出器を用い検出波長 260 nm で分析した。緑色 201 号標準品の水溶液 (0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 μ g/mL) の分析により得られたピーク面積値から作成した検量線を用い、ディスオーパを水で 10 倍希釈した試料のピーク面積を検量線に当てはめることで濃度を算出した。

2.5 分析バリデーション

OPA 濃度 0.20–0.55%の 8 溶液 (0.20、0.25、0.30、0.35、0.40、0.45、0.50、0.55%) の標準液を 2.3 項に記載の手順で各濃度 9 回ずつ誘導体化を行い、フローインジェクション法により蛍光強度を測定した。さらに、OPA の有効洗浄の下限である 0.30%の \pm 10%の濃度 (0.27、0.28、0.29、0.30、0.31、0.32、0.33%) の標準液を各濃度 3 回ずつ測定した。

3. 結果と考察

3.1 OPA の蛍光誘導体化反応の確認と最適化

ディスオーパの誘導体化反応液を、反応直後から 20 分後まで励起波長 340 nm で測定した蛍光スペクトルおよび蛍光強度変化のグラフを図 2 に示す。蛍光誘導体化試薬溶液中に HP- β -CD を含まない場合、反応直後から 20 分間で蛍光極大 450 nm における蛍光強度は約 50%程度にまで低下した (図 2a)。OPA とグリシン、2-メルカプトエタノールから形成されるイソインドール誘導体は容易に加水分解され、蛍光性を持たなくなることが報告されており¹¹⁾、その報告と違わない結果となった。内視鏡洗浄は、医療現場だけでなく介護老人ホームなど様々な現場で行われており、誰でも簡単に再現性の高い OPA の定量を実現させる必要がある。誘導体化反応させた溶液を蛍光光度計にセットする時間、測定開始する時間などは実施者や測定回ごとに大きくばらつくことから、ある程度の時間において安定に蛍光強度が一定となることが望ましい。Wagner らは、水溶液中に疎水的な環境を持つ HP- β -CD の空洞内にイソインドール誘導体を包接させることにより、誘導体の加水分解反応を大きく遅延させ蛍光強度を一定時間保つことができることを報告している¹²⁾。そこで誘導体化試薬溶液中に 50 mmol/L HP- β -CD を加え、蛍光強度変化を追跡した (図 2b、2c)。その結果、反応開始後 10 分までは蛍光強度がほぼ一定に保たれていた。また、蛍

光極大波長は HP- β -CD 未添加時の 450 nm に対し 440 nm と短波長側にシフトし蛍光強度自体も約 1.4 倍程度増強した。これらの結果はいずれもイソインドール誘

導体が HP- β -CD の疎水的空洞内に包接されることを裏付けていた。

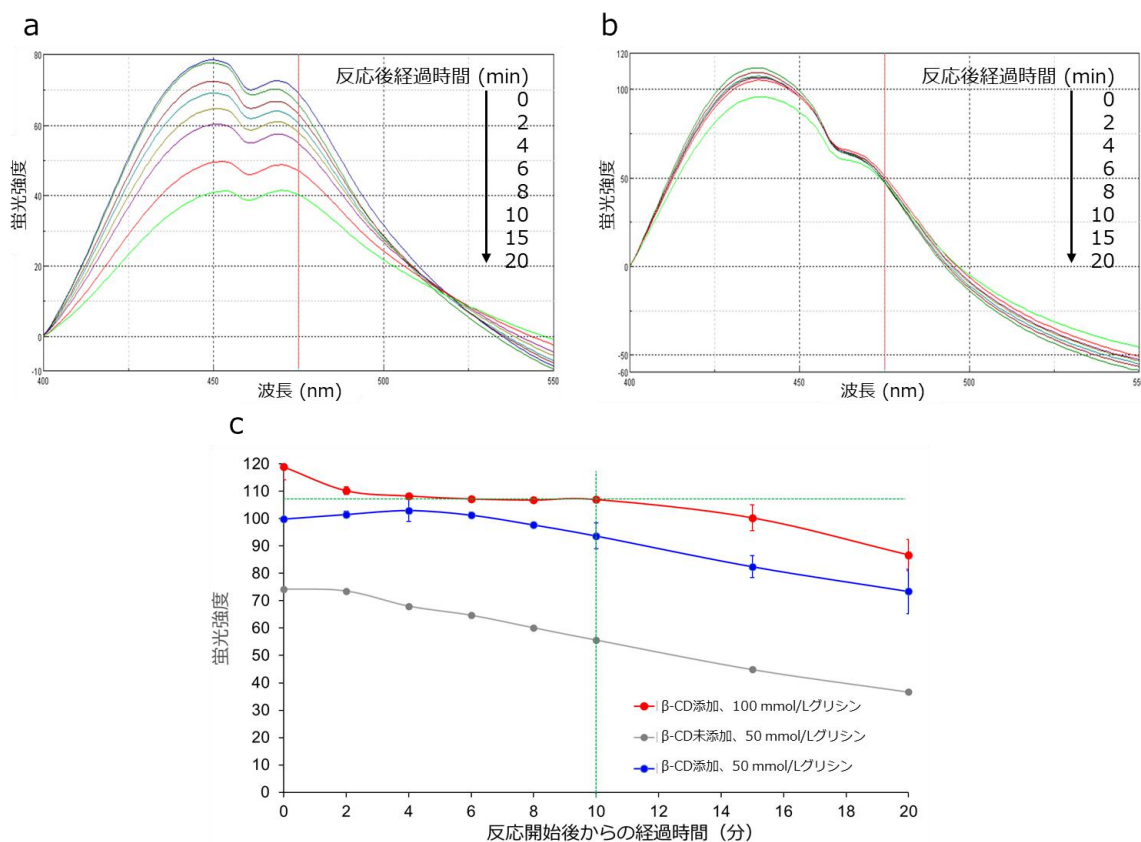


図2 (a) 50 mmol/L HP- β -CD の未添加および添加時の蛍光誘導体化反応液の蛍光スペクトルおよび (b) 蛍光強度変化推移

3.2 ディスオーパ中緑色 201 号濃度の HPLC 測定と OPA の蛍光誘導体化に及ぼす影響の評価

消毒剤ディスオーパにはアントラキノン系酸性染料である緑色 201 号 (アリザリングリーン G) が着色料として添加されており、その添加濃度は非開示となっている。可視領域における吸収極大は約 610 nm および 640 nm 付近であるが、紫外領域にも 254 nm および 280 nm に強い吸収が認められる^{9,13)}ことから、従来法の紫外吸光度法では OPA の定量に影響を与える可能性があった。また、蛍光光度法においても高い吸光物質の共存は励起光や蛍光発光の減弱に繋がることからその影響を把握しておく必要があった。検量線作成に用いた緑色 201 号標準品水溶液 (0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 μ g/mL) のクロマトグラムを図 3a に、検量線を図 3b に示す。構造異性体に基づくと思われる①と②の 2 本の

ピークが 10.8 min と 12.8 min 付近に検出された。いずれのピーク面積を用いても緑色 201 濃度に対して良好な定量性 ($R^2 > 0.999$) を示したことから、この結果を元に作成した検量線を用いて、10 倍希釈したディスオーパ溶液中の緑色 201 濃度を算出した。その結果、ピーク 1 より算出した濃度は 2.0 μ g/mL、ピーク 2 より算出した濃度は 2.2 μ g/mL となった。そこで、OPA 0.55% 水溶液に緑色 201 号を 2.0-3.0 μ g/mL となるように添加後、2.3 項に記載の手順で誘導体化を行い、フローインジェクション法により蛍光強度を測定した。その結果、緑色 201 号の共存は OPA の蛍光強度に -6.53~3.16% の誤差を与えたが、濃度依存的な変動は認められず、OPA の蛍光定量において実用上殆ど影響を及ぼさないことが示された (図 4)。

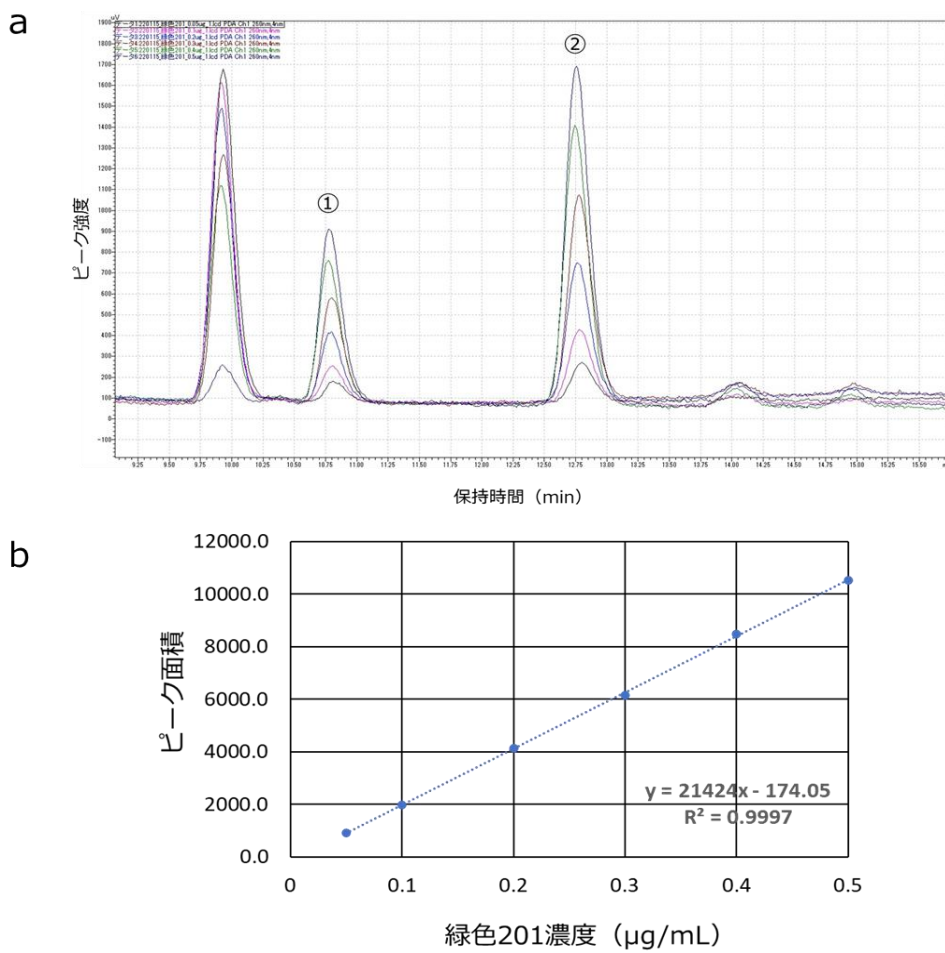


図3 緑色 201 号標準品水溶液 (0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 μg/mL) の (a) クロマトグラムおよび (b) ピーク②より算出した検量線

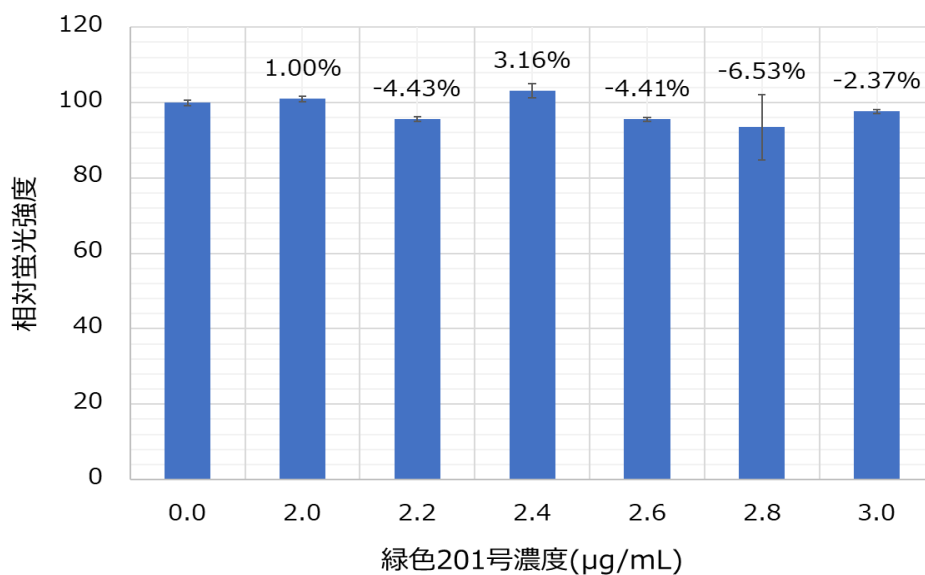


図4 緑色 201 号濃度が 0.55% の OPA の蛍光強度に及ぼす影響

3.3 分析バリデーション

開発した分析法の妥当性を検証するため、2.5 項の条

件で分析バリデーションを行った。OPA の定量範囲は、有効洗浄濃度の下限である 0.30% より低い濃度での定

量を可能とする 0.20–0.55%で設定し、良好な定量性 ($R^2=0.997$) を示した (図 5a)。また、0.55%の標準液を 9 回分析したときの相対標準偏差は 0.85%、すべての濃度範囲における相対標準偏差は 1.85%未満であり良好

な再現性も有していた。さらに、洗浄能力の下限付近である 0.27–0.33%の範囲においても 0.01%刻みの濃度で十分な定量性 ($R^2=0.991$) を示した (図 5b)。

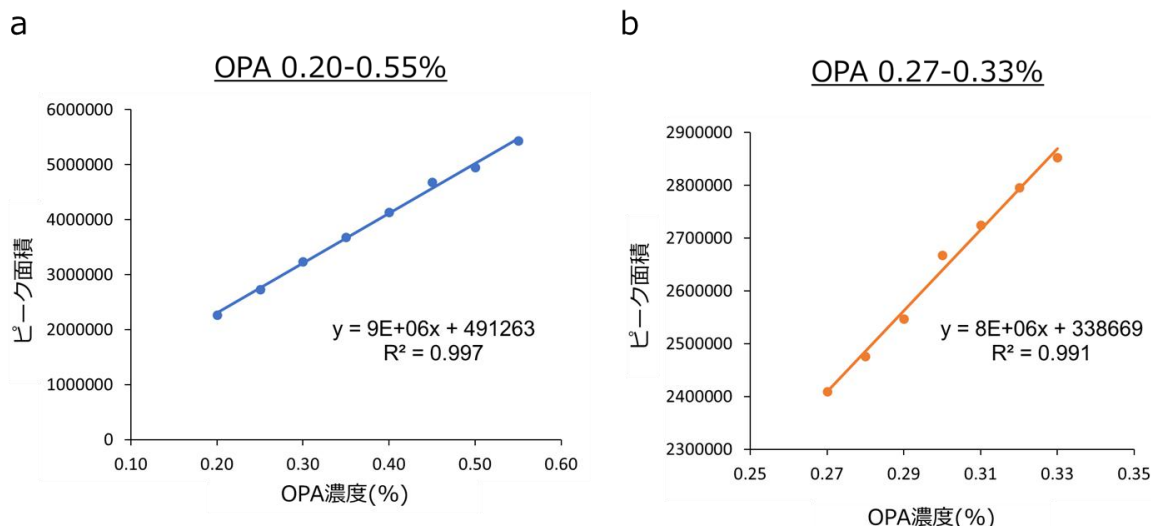


図5 OPA濃度 (a) 0.20–0.55%および (b) 0.27–0.33%における検量線

4. 結言

本論文では、消毒剤中 OPA の新たな蛍光分析法の開発研究の成果を纏めた。開発した分析法により消毒液中の OPA は、0.20–0.55%の範囲で良好な定量性と精度で定量でき、洗浄能力の下限付近においても 0.01%刻みの濃度で十分に定量可能であった。また、OPA の定量には、共存色素である緑色 201 号の濃度の影響を殆ど受けないことも示すことができた。本分析法は消毒剤と蛍光誘導体化試薬を混合するだけで定量が可能であり、かつ反応開始後 10 分までは蛍光強度がほぼ一定に保たれることから、測定者の技量によらず誰でも簡単に再現性の高い OPA の定量が実現する。現在、複数のメーカーから可搬型蛍光光度計が市販されており、今後、これらと組み合わせることで医療機関や介護施設等でのオンサイト分析に適用され、内視鏡検査の安全維持に貢献することが期待できる。

謝辞

本研究は公益財団法人浜松地域イノベーション推進機構フォトンバレーセンター「A-SAP 産学官金連携イノベーション推進事業」の支援により行われました。事

業の関係者および本学地域・産学連携推進室の皆様にご感謝申し上げます。

参考文献

- 1) 岩切龍一、田中聖人、後藤田卓志、岡 志郎、大塚隆生、坂田資尚、千葉俊美、樋口和秀、増山仁徳、野崎良一、松田浩二、下野信行、藤本一眞、田尻久雄 (2018) 「消化器内視鏡の洗浄・消毒標準化にむけたガイドライン」、『日本消化器内視鏡学会雑誌』 60 (7) , pp 1370-1396.
- 2) A. B. West, S.F. Kuan, Bennick M, S. Lagarde (1995), Glutaraldehyde colitis following endoscopy: clinical and pathological features and investigation of an outbreak, *Gastroenterology*, 108, 1250–1255.
- 3) T. Takigawa, Y. Endo (2006), Effects of Glutaraldehyde Exposure on Human Health, *Journal of Occupational Health*, 48, 75–87.
- 4) S. G. Venticinqu, V. S. Kashyap, R. J. O'Connell (2003), Chemical burn injury secondary to

- intraoperative transesophageal
echocardiography, *Journal of Occupational Health*, 97, 1260–1261.
- 5) W. N. Sokol (2004), Nine episodes of anaphylaxis following cystoscopy caused by Cidex OPA (ortho-phthalaldehyde) high-level disinfectant in 4 patients after cystoscopy, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 114, 392–397.
- 6) 内視鏡洗浄消毒器エンドクレンズNeo 添付文書 (2020年2月改訂),
https://www.pmda.go.jp/PmdaSearch/kikiDetail/ResultDataSetPDF/100171_228AHBZX00022000_A_01_05 (Accessed:2023年8月20日).
- 7) デイスオーパ消毒液 0.55%添付文書 (2020年11月改訂)
https://www.pmda.go.jp/PmdaSearch/iyakuDetail/ResultDataSetPDF/172133_732170DQ1020_3_01 (Accessed:2023年8月20日).
- 8) デイスオーパモニター, ASP Japan,
<https://www.asp.co.jp/products/disinfection/disopa-monitor> (Accessed:2023年8月20日).
- 9) K. Agrawal, P. Verma (2019), Biodegradation of synthetic dye Alizarin Cyanine Green by yellow laccase producing strain *Stropharia sp.* ITCC-8422, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 21, 101291.
- 10) M. Yamaguchi, J. Ishida, T. Toyo'oka ed. (1999), Reagent for FL Detection in “*Modern derivatization methods for separation sciences*”, pp 99-165, Wiley.
- 11) M. C. García Álvarez-Coque, M. J. Medina Hernández, R. M. Villanueva Camañas, C. Mongay Fernández (1989), Formation and instability of *o*-phthalaldehyde derivatives of amino acids, *Analytical Biochemistry*, 178, 1–7.
- 12) Brian D. Wagner, Gregory J. McManus (2003), Enhancement of the fluorescence and stability of *o*-phthalaldehyde-derived isoindoles of amino acids using hydroxypropyl- β -cyclodextrin, *Analytical Biochemistry*, 317, 233–239.
- 13) AAT Bioquest 社 HP Absorption [Alizarin Cyanin Green G],
https://www.aatbio.com/absorbance-uv-visible-spectrum-graph-viewer/alizarin_cyanin_green_g
(Accessed:2023年9月9日).