

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 6 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22390339

研究課題名（和文） 血漿および白血球内エンドトキシン値同時測定法の開発

研究課題名（英文） Technological development of endotoxin assay with leukocyte-rich plasma and plasma in sepsis

研究代表者

遠藤 重厚 (ENDO SHIGEATSU)

岩手医科大学・医学部救急医学講座・教授

研究者番号：30160394

研究成果の概要（和文）：血漿エンドトキシン測定法として保険適用されている比濁時間分析法では、被験者から遠心分離によって得る血漿として我々は多血小板血漿 (Platelet-Rich Plasma 以下 PRP) を用いてエンドトキシンを測定している。しかし、この方法の診断法としての感度、特異度は 58.6%、97.0%と、感度が良いとは言い難い。敗血症において、血漿以外にも、白血球表面には白血球が認識して結合した細菌の菌体成分としてのエンドトキシンや、白血球細胞膜表面の CD14 Receptor、Toll Like Receptor4 などに結合した細菌から遊離したエンドトキシンが存在し、さらに細胞内に取り込まれているエンドトキシンも存在していると考えられる。ヒドロキシエチルデンプン（以下 HES）の赤血球除去剤としての特性を活かし、多白血球血漿 (Leukocyte-Rich Plasma 以下 LRP) を作成し、新規のエンドトキシン測定用試料の作成法を考案し、検証した。さらに従来 PRP を用いる方法と比濁時間分析法を用いて比較検討した。その結果、敗血症患者での LRP におけるエンドトキシン値は、従来 PRP におけるエンドトキシン値より有意に高く、また感度においても有意に高かった。今後の敗血症における診断率の向上に寄与すると考えられた。

研究成果の概要（英文）：For the National Health Insurance-covered endotoxin assay method for the determination of plasma endotoxin, namely, turbidimetry-gelation time assay, platelet-rich plasma (PRP) prepared by centrifugation of the patient's blood is used, as a rule. However, the diagnostic sensitivity of this assay can hardly be considered to be satisfactory (sensitivity, 58.6%; specificity, 97.0%). In sepsis, endotoxin recognized by leukocytes and bound to the surface of leukocytes as a bacterial cell constituent and endotoxin liberated from bacteria and bound to the CD14 receptor, toll-like receptor (TLR) 4, etc., on the leukocyte membrane surface are known; in addition endotoxin is also considered to be taken up by the cells besides being present in the circulating plasma. Endotoxin thereby activates leukocytes, which in turn, is associated with activation of humoral factors, such as cytokines. We focused our attention on the endotoxin occurring within and on the surface of white blood cells, and have reported the possibility of the sensitivity of the test being improved by simultaneously using both white blood cells and plasma as assay samples.

This study was undertaken to devise and examine a new method of sample preparation for endotoxin assay in leukocyte-rich plasma (LRP), prepared taking advantage of the property of hydroxyethyl starch (HES) as an erythrocyte aggregating agent. Furthermore, we comparatively assessed the assay results obtained by the conventional method using PRP and the turbidimetry-gelation time method using LRP. The results showed significantly higher endotoxin levels in LRP, as compared to the endotoxin levels in PRP determined by the conventional method, in patients with sepsis, and a significantly higher sensitivity of the former method. We consider that our newly devised assay method may contribute to improvement of the diagnosis rate of sepsis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
2011年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2012年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・救急医学

キーワード：集中治療医学・敗血症

1. 研究開始当初の背景

(1) エンドトキシンは、グラム陰性菌の細胞壁の構成成分であり、その活性本体はリポ多糖（リポポリサッカライド（以下、LPS と略す））である。エンドトキシンは多様な生物活性を示し、敗血症や敗血症性ショックなどを引き起こす。グラム陰性菌より遊離したLPSは、LPS結合蛋白質LBPに結合した後、マクロファージや好中球などのトール様受容体4（TLR4）に結合し、活性化させる。その結果、過剰の炎症性サイトカイン等が産生されると上記の症状が引き起こされる。

(2) グラム陰性桿菌の細胞外壁の構成成分であるエンドトキシン（内毒素、Endotoxin）はリポ多糖（lipopolysaccharide；LPS）そのものであり、非常に多くの生物活性を示す。敗血症におけるエンドトキシンの役割について古くから議論され、リムルテストにより血中のエンドトキシン量を測定することが行われてきた。

(3) 本邦で唯一保険適用されているエンドトキシン測定法としては比濁時間分析法がある。この方法で血液エンドトキシンを測定する場合、被験血液から遠心によって得られた多血小板血漿（Platelet-Rich Plasma 以下PRP）や乏血小板血漿（Platelet-Poor Plasma）などが用いられている。エンドトキシンは、血漿内だけでなく、白血球内に貪食された細菌や、白血球細胞膜表面のLPS結合物質であるLPS Binding Protein（以下LBP）、CD14Receptor、Toll Like Receptor（以下TLR）にも多く結合しており、サイトカインなどの液性因子を活性化に関与している。我々は以前から血漿内だけでなく、白血球内に貪食されたエンドトキシン及びに白血球

表面に結合しているエンドトキシンに注目してきた。

2. 研究の目的

エンドトキシンを血漿と白血球分画とで各々測定すると、白血球分画のみで高値となるポイントや、逆に血漿のみ高値となるポイント、両方高値となる場合が存在していることが分かり、血漿と白血球を同時測定することで、血中エンドトキシン濃度をより正確に測定できる可能性がある。しかし、この方法での白血球分画は血漿と白血球層（パフューコート）を個別に採取する必要があり、操作上煩雑であり実用性に欠けていた。そこで、赤血球凝集剤であるヒドロキシエチルデンプン（以下HES）を血液に加えて静置することにより、ヘモグロビンが測定系に阻害的に影響する赤血球を除去し、赤血球を殆ど含まない白血球及び血漿の分画が同一検体試料として採取できる。

この研究では、HESを用いて赤血球を除去した血漿と白血球を含む分画（Leukocyto-Rich Plasma 以下LRP）を作製し、LRPの検証とLRPを用いたエンドトキシンを測定し、敗血症の診断率の向上が可能であるかを従来のPRPを用いた成績と比較検討する。

3. 研究の方法

(1) 敗血症患の血中エンドトキシンを血漿と白血球分画とで各々測定すると、白血球分画のみで高値となるポイントや、逆に血漿のみ高値となるポイント、両方高値となる場合が存在していることが分かり、血漿と白血球を同時測定することで、血中エンドトキシ

ン濃度をより正確に測定できる可能性が示唆された。しかし、この方法での白血球分画は血漿と白血球層（バフィーコート）を個別に採取する必要があり、操作上煩雑であり実用性に欠けていた。そこで、赤血球凝集剤であるヒドロキシエチルデンプン（以下 HES）を血液に加えて静置することにより、ヘモグロビンが測定系に阻害的に影響する赤血球を除去し、赤血球を殆ど含まない白血球及び血漿の分画が同一検体試料として採取した。

(2) この研究では、HES を用いて赤血球を除去した血漿と白血球を含む分画（Leukocyte-Rich Plasma 以下 LRP）を作製し、LRP の検証と LRP を用いたエンドトキシンを測定し、敗血症の診断率の向上が可能であるかを従来の PRP を用いた成績と比較検討した。

(3) 健常者血液にリン酸緩衝食塩液（PBS (-)）または最終濃度 10, 100 および 1000pg/ml の LPS を加えて 37°C で 3 時間加温した。最初に lysing solution (BD 社) で溶血させた後、PBS (-) で 3 回遠心洗浄後に抗 LPS コアマウス抗体 (IgG2a, Hycal1 Biotechnolog 社) またはアイソタイプコントロールとしてマウス抗体 IgG2a (BD 社) を加え暗所で 20 分反応させた。PBS (-) で 3 回遠心洗浄後に抗 CD33 抗体-TITC (BD 社) と抗マウス抗体 IgG2a+抗体-PE (ラット, BD 社) を同時に加えて暗所で 20 分間染色した。PBS (-) で 3 回遠心洗浄後にパラフォルムアルデヒドで固定してから FACSCALibur (BD 社) を用いたフローサイトメトリーにより CD33 強陽性細胞を単球、弱陽性細胞を顆粒球として解析した。

4. 研究成果

(1) 白血球上 LPS のフローサイトメトリーによる解析

LPS を健常者血液に添加し加温した場合の白血球上への LPS の結合を確認した。3 時間加温すると LPS の量依存性には顆粒球及び単球に結合していることが確認された。

(2) HES 加血液の静置後の上澄の赤血球及び白血球数の推移

HES 加血液の静置後の上澄の赤血球及び白血球数の推移を検討した。赤血球は次第に沈降していき、赤血球数が最初に沈降したのは 15 分値で、その後も変化なく低値であった。白血球数は 15 分で最高値を示し、その後漸減していった。このことより上澄を得る時間を 15 分とした。

(3) 全血と PRP、LRP の血球数及び白血球分画の変化

	全血	LRP	PRP
白血球数	6.3±1.4 ×10 ⁹ /μl	4.3±0.95 ×10 ⁹ /μl	0.07±0.06 ×10 ⁹ /μl
赤血球数	4.8±0.04 ×10 ⁶ /μl	0.048±0.015 ×10 ⁶ /μl	0.014±0.015 ×10 ⁶ /μl
血小板数	26.9±6.6 ×10 ³ /μl	19.1±3.4 ×10 ³ /μl	19.8±10.1 ×10 ³ /μl

全血と LRP と PRP の平均血球数と白血球分画比率を比較し、さらに LRP の白血球回収率及び赤血球除去率を求めた。血球数の比較を表 1 に示す。白血球数では、全血-LRP 間で有意差をもって LRP で低値であった (n=7, p=0.013, Anova 及び TukeyTest)、全血-PRP 間においても有意差をもって PRP が低値を示し、(n=7 p<0.01 Anova 及び TukeyTest)。LRP-PRP 間でも有意差をもって PRP が低値を示した (n=7 p<0.01 Anova 及び TukeyTest)。赤血球数では、全血に比し LRP、PRP 共に有意に低値を示し (n=7 p<0.01 Anova 及び TukeyTest)、LRP と PRP で有意差は認められなかった (n=7 p=0.9761 Anova 及び TukeyTest)。血小板数では 3 群間で有意差は認めなかった (n=7 p=0.166 Anova 及び TukeyTest)。白血球回収率は 68.3%であった。赤血球除去率 99.9%であった。

(4) P LPS 添加健常者血液における PRP 法と LRP 法の比較

健常者血液に LPS を 50pg/ml 添加し、経時的に血液をくみ取り、PRP 法と LRP 法で LPS の回収量の推移を調べた。LRP 法のエンドトキシン値は、PRP 法のエンドトキシン値より常に高値を推移した。また個体により、60 分値、120 分値で PRP 法と LRP 法のエンドトキシン値に解離するポイントが認められた。

(5) PRP 法と LRP 法におけるエンドトキシンの検出感度

	sensitivity	specificity	positive predictive value	positive predictive value
PRP法	52.6%	98.6%	94.7%	75.2%
LRP法	89.5%	81.4%	73.3%	88.0%

PRP 法ではカットオフ値 1.2pg/ml と設定し、感度 52.6%、特異度 98.6%、陽性的中率 94.7%、陰性的中率 75.2%であった。LRP 法ではカットオフ値 1.232pg/ml と設定し、感度 89.5%、特異度 81.4%、陽性的中率 73.3%、陰性的中率 88.0%はあった。感度において LRP 法は PRP 法に比し高値となった。AUC においても LRP 法で高値を示した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計6件)

- ① Matsumoto N, Takahashi G, Kojika M, Suzuki Y, Inoue Y, Inada K, Endo S: Interleukin-8 induces an elevation in the endotoxin activity assay (EAA) level: dose the EAA truly measure the endotoxin level? J Infect Chemother (in press) (査読有)
- ② Endo S, Suzuki Y, Takahashi G, Shozushima T, Ishikura H, Murai A, Shishida T, Irie Y, Miura M, Iguchi H: Usefulness of presepsin in the diagnosis of sepsis in a multicenter prospective study. J Infect Chemother, 18; 891-897, 2012 (査読有)
- ③ Onodera C, Takahashi G, Kan S, Shozushima T, Matsumoto N, Inada K, Endo S: Experimental application of a synthetic luminescent substrate assay using endotoxin-specific limulus amoebocyte lysate to human blood, J infect Chemother, 18;370-377, 2012 (査読有)
- ④ Ishibe Y, Takahashi G, Kojika M, Matsumoto N, Sato H, Masuda T, Suzuki Y, Endo S: Evaluation of presepsin with the point-of-care test in a case of severe sepsis, J Iwate Med Assoc, 64;57-61, 2012 (査読有)
- ⑤ Endo S, Takahashi G, Shozushima T, Matsumoto N, Kojika M, Suzuki Y, Inoue Y: Usefulness of Presepsin (Soluble CD14 Subtype) as a Diagnostic Marker for Sepsis, JJAAM, 23;27-38, 2012 (査読有)
- ⑥ Shozushima T, Takahashi G, Matsumoto N, Kojika M, Okamura Y, Endo S: Usefulness of presepsin (sCD14-ST) measurements as a marker for the diagnosis and severity of sepsis that satisfied diagnostic criteria of systemic inflammatory response syndrome, J Infect Chemother, 17:764-769, 2011 (査読有)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

遠藤重厚 (ENDO SHIGEATSU)
岩手医科大学・医学部救急医学・教授
研究者番号：30160394

(3) 連携研究者

鈴木泰 (SUZUKI YASUSHI)

岩手医科大学・医学部救急医学・講師
研究者番号：90306019

小鹿雅博 (KOJIKI MASAHIRO)
岩手医科大学・医学部救急医学・助教
研究者番号：40347878

吉川智弘 (KIKKAWA TOMOHIRO)
岩手医科大学・医学部救急医学・助教
研究者番号：90468314
(H22)

高橋学 (TAKAHASHI GAKU)
岩手医科大学・医学部救急医学・助教
研究者番号：60453304

柴田繁啓 (SHIBATA SHIGEHIRO)
岩手医科大学・医学部救急医学・助教
研究者番号：10326671
(H22)