

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 7 日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011 年 4 月 28 日 ～2013 年 3 月 31 日

課題番号：23792082

研究課題名（和文） 蛋白添加前処理法を用いた ESP による血漿エンドトキシン測定法の開発

研究課題名（英文） The development of the plasma endotoxin assay by ESP using the protein addition preparation

研究代表者 高橋 学（TAKAHASHI GAKU）

岩手医科大学・救急医学講座・助教

研究者番号：60453304

研究成果の概要（和文）：従来の比濁時間比濁時間分析法では 1.0pg/ml のエンドトキシンを測定するのに 119 分を要していたが、今回開発した検体の前処理にヒト血漿タンパクを添加した ESP による測定では 30 分以上の測定時間の短縮が可能であり、また測定感度も従来法に比べ上昇した。

研究成果の概要（英文）：Though The conventional automated turbidimetric-kinetic assay required 119 minutes to measure endotoxin of 1.0pg/ml, but measurement time was shortened more than 30 minutes by ESP using the protein addition preparation, the sensitivity of the measurement increased as compared with a traditional approach, too.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額 2011	1,600,000	480,000	2,080,000
交付決定額 2012	1,400,000	420,000	1,820,000

研究分野：救急医学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・救急医学

キーワード：エンドトキシン、ESP、アルブミン、比濁時間分析法

1. 研究開始当初の背景

国内で保険適応となっている血漿中エンドトキシン測定法は前処理に 0.02% TritonX-100 による 10 倍希釈加熱法を用いた比濁時間分析法によるもののみであるが、さまざまな施設から測定感度は 50% 以下と報告され測定の重要性が揺らいでいる。最近新たに 0.02% TritonX-100 による 100 倍希釈加熱法を用いた ESP 法による測定により飛躍的に測定時間が短縮するという報告があり、新たな保険適応にむけ当施設においてもこの方法を検討したが測定中に疑陽性反応が生じ臨床応用には問題があることが判明した。そこで我々は測定中の偽陽性反応の究明と新規の前処理法を用いた測定法の確立を目指し本研究を立案した。

2. 研究の目的

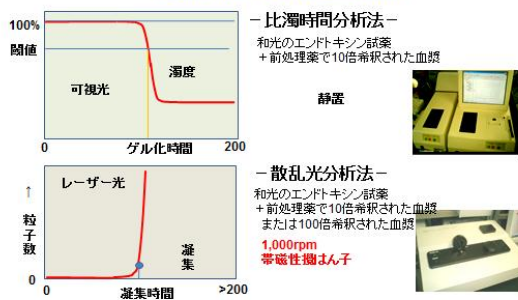
2008 年、他施設より ESP 法において現行の前処理法を改良しさらに希釈倍率を上げるにより血漿中のリムルス反応阻害物質の影響が減弱し測定感度、測定時間も飛躍的に向上すると報告がなされた。そこで当施設においてもこの前処理法を用いて検討すると、測定感度および測定時間も確かに格段に向上している結果が得られた。しかし、その中で临床上エンドトキシン血症とは考えにくい数々の症例からもエンドトキシンが陽性反応を呈してしまう現象を発見し、この方法では測定結果を臨床応用するには問題があることを報告した。一方でこの現象の原因を究明しこの反応を抑えることができればかなりエンドトキシンに特異性が上昇

し高精度な測定法が確立できるのではないかと考え、様々な前処理法を検討した。そして、前処理検体にある種の蛋白を添加えることにより先ほどの擬陽性反応を抑制できる手法を考案、エンドトキシン標準試薬を用いた検討では偽陽性反応を抑制することが可能であった。今回の研究ではこの方法を実際の臨床検体に用い、測定時間・精度の向上を目的とする。

3. 研究の方法

従来の10倍希釈による前処理法、100倍希釈による前処理法、偽陽性反応を抑制する目的でタンパク質を一定量加えた前処理液を用いた方法でそれぞれ比濁時間分析法、ESP法を用い臨床検体を測定する。また測定されたもの偽陽性反応ではなく真のエンドトキシンであることをリムルスカスケード抑制テストにて確認する。リムルスカスケード抑制テストとは①検体血漿にエンドトキシンの生理活性を抑制するポリミキシンBを大量に添加しエンドトキシン活性を完全に抑制した検体を用いてそれぞれの測定法にてエンドトキシン値を測定し偽陽性反応が出ないことを確認する。②検体血漿にリムルスカスケードの第一段階であるファクターCに対するモノクローナル抗体を添加しリムルスカスケードを完全に抑制後、それぞれの測定法にて偽陽性反応が出ないことを確認する。ものである。その後、前処理法を含め臨床検体の測定時間および精度を測定する。

比濁時間分析法との比較



比濁時間分析法と散乱光分析法の比較

	比濁時間分析法 (和光純薬工業)	散乱光分析法 (興和)
原理	可視光 濁度増加(透過度減少)	レーザー光 粒子数増加
反応条件	静置	1,000rpm 帯磁性攪はん子
前処理法 希釈率	0.02%トリトンX-100で 10倍希釈	0.02%トリトンX-100で10倍希釈、 さらに10倍希釈(最終100倍希釈)

4. 研究成果

従来の検体を10倍希釈する前処理法を用いた比濁時間分析法による測定法ではエンドトキシン標準試薬を用いて作成した1.0pg/mlの人工検体を測定するのに119分を要していた。他施設により報告された100倍希釈によるESP法では確かに40分前後でエンドトキシンの陽性反応を呈したがリムルスカスケード抑制テストを施行したところ、エンドトキシンの生理活性を完全に抑制した場合でも陽性反応を呈することが判明し、エンドトキシンとは全く関係のない擬陽性反応であることが明らかになった。そこで今回我々はこの偽陽性反応を抑制するためヒト献血アルブミン製剤を前処理液に添加する方法を開発した。この測定方法で人工検体を測定した場合1.0pg/mlの濃度の検体は約60分で測定が可能となった。実際に患者検体を測定した結果を以下に示す。症例①肺炎から敗血症を併発し集中治療管理を必要とした82歳の女性。比濁時間分析法ではどちらの前処理法を用いても濃度は変わらず測定

感度以下、ESP法では10倍希釈法では測定感度以下であったが、100倍希釈法で3.5pg/mlと陽性反応を呈した。

検体	測定法	10倍希釈	100倍希釈
検体3	ESP	<0.1 (<1228)	3.5 (120.67)
	比濁時間分析法	<0.3 (<<200)	<0.3 (<<200)

【検体に大量のポリミキシンBを添加しエンドトキシンの生理活性を完全に抑制するリムルスカスケード抑制テストを施行】

検体	+/-PXB	10倍希釈	100倍希釈
検体3		<0.1 (1442)	3.6 (120.2)
	+PXB	<<<0.3 (<<<200)	3.5 (122.5)

実際この検出されたものが真のエンドトキシンであることを検討するためリムルスカスケード抑制テストを施行した結果を上記に示す。10倍希釈検体ではポリミキシンにより反応は完全に抑制されたが100倍希釈検体で3.5pg/mlを検出し、測定されているものがエンドトキシンではなく偽陽性反応である可能性が高いことが判明した。この検体に前処理の段階において献血アルブミン製剤を添加し再度エンドトキシン値を測定すると測定結果は以下のように偽陽性反応は抑制することが可能であった。

検体	+/-PXB	10倍希釈	100倍希釈
検体3		<0.1 (1442)	<0.1 (1202)
	+PXB	<<<0.3 (<<<200)	<0.1 (1285)

症例②尿路感染症から敗血症性ショックを呈した 63 歳男性。尿および血液培養検査にて大腸菌が検出された。

検体	測定法	10倍希釈前処理法	100倍希釈前処理法
症例2	ESP	2.2 (42.6)	12.6 (83.3)
	比濁時間分析法	7.1 (44.4)	6.0 (134)

エンドトキシンの測定値を上記に示す。比濁時間分析法では測定したエンドトキシン値はいずれの前処理方法でも変化は認めなかったが、ESP 法では 100 倍希釈法を用いた場合測定濃度が約 6 倍高い値で検出された。この症例の検体においてもリムルスカスケード抑制テストを施行したところ 100 倍希釈法を用いた ESP ではポリミキシンで抑制されない偽陽性反応と考えられる測定値を検出した。

検体	測定法	10倍希釈前処理法	100倍希釈前処理法
症例2 ポリミキシンB添加後	ESP	0.1 (<1228)	3.5 (120.5)
	比濁時間分析法	<0.3 (<200)	<0.3 (<200)

この検体を今回開発したアルブミン添加全前処理法を用いて測定したところ 100 倍希釈法による ESP では偽陽性反応は抑制され、10 倍希釈とほぼ同一の値を呈した。

検体	測定法	10倍希釈前処理法	100倍希釈前処理法
症例2 アルブミン添加後	ESP	2.1 (42.0)	3.5 (90.5)
	比濁時間分析法	7.8 (44)	6.0 (134)

同様な方法で測定した臨床検体 26 例の検討では従来の測定感度は 58%であったもののアルブミン添加前処理法による ESP での測定感度は 79%に上昇した。

今回の検討では添加するタンパク質に患者検体血漿タンパクと血液製剤であるヒト

血清アルブミンを用いたが、この方法を臨床応用するには測定結果に一定の再現性が必要となるため添加する血漿を患者検体からではなく既に製品化された製剤を用いることが望ましいと考えている。しかし献血アルブミンは高額な製剤であり、このような測定系の使用に対する保険適応はないため臨床に用いるにはこの点についてさらに検討を重ねる必要があると考えられた。

希釈の濃度については一定のタンパク濃度が維持されていれば 10 倍希釈法においても 100 倍希釈法においても偽陽性反応は抑制できることが判明したが、10 倍希釈法では測定時間が短縮できるため今後は 10 倍希釈法に重点をおいて検討していく予定である。

また現在のエンドトキシン測定系では血漿に遊離しているフリーの状態のエンドトキシンのみを測定対象としているが、エンドトキシンは白血球に結合、もしくは貪食され存在している割合がかなり多いと考えられており白血球中のエンドトキシンを分離し比濁時間分析法で測定、測定精度が向上したことを 2012 年に報告した。現在この白血球分離検体においてアルブミン添加法による測定の検討を行っており近く報告予定である。

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 1 件)

① Shigenori Kan, Gaku Takahashi, et al Evaluation of an endotoxin-specific limulus amoebocyte lysate assay using leukocyte-rich plasma for the diagnosis of gram-negative bacterial infection. J Infect Chemother (2013) 19:299-304 査読有

[学会発表] (計 2 件)

① 高橋 学 ヒト血清アルブミン添加法を用いた ESP 法でのエンドトキシン測定法の検討 エンドトキシン血漿救命治療研究会 2012 年 1 月 27 日 東京
② 小野寺ちあき 高輝度ルシフェラーゼを用いた新しいエンドトキシン測定法の開発 エンドトキシン血漿救命治療研究会 2012 年 1 月 27 日 東京

○取得状況 (計 1 件)

名称: 生物由来の生理活性物質の測定方法および測定装置
発明者: 稲田捷也
権利者: 同上
種類: 特許

番号：2012-154815
取得年月日：2012. 8. 16
国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 学 (TAKAHASHI GAKU)
岩手医科大学 救急医学講座 助教
研究者番号：60453304

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

小鹿 雅博 (KOJIKI MASAHIRO)
岩手医科大学 救急医学講座 助教
研究者番号：40347878

鈴木 泰 (SUZUKI YASUSHI)
岩手医科大学 救急医学講座 助教
研究者番号：90306019

小野寺 ちあき (ONODERA CHIAKI)
岩手医科大学 救急医学講座 助教
研究者番号：30633078