

第2回 基礎・臨床融合の学内共同研究発表会

新しい高感度エンドトキシン測定法の開発—それで何がわかるのか—

- ◆ 日時 平成22年12月2日(木) 14時～16時
- ◆ 場所 基礎講義棟B講義室
- ◆ 研究責任者 谷 徹 (外科学講座)
- ◆ 司会 谷 徹

講演者と演題

小幡 徹 [(財)微生物化学研究会特定研究グループ]

新しい高感度エンドトキシン測定法の開発—それで何がわかるのか—

はじめに

安藤 朗 (大学院感染応答・免疫調節部門)

基礎医学講座と臨床医学講座が融合した学内共同研究プロジェクト(服部隆則 研究活動推進室会議室長)推進のための第2回学内講演会を開催したので報告する。

平成22年12月2日(木)14時より基礎講義棟B講義室で、外科学講座教授・谷徹先生の司会のもと「新しい高感度エンドトキシン測定法の開発—それで何がわかるのか—」というテーマで、(財)微生物化学研究会特定研究グループの小幡 徹先生に講演いただいた。講演の内容は、カプトガニ抽出液を用いた凝集法、比濁時間法による

従来のエンドトキシン測定法の問題点を呈示され、その発展・改良型として小幡先生らが開発されたレーザー散乱光で検出するエンドトキシン散乱測光法(Endotoxin Scattering Photometry; ESP法)を紹介された。検出範囲が0.001～100 pg/mlと広く、これまで測ることが出来なかった健常人レベルの血中エンドトキシン値の測定が可能になったことを示された。

馬場忠雄学長はじめ基礎・臨床あわせて25名の出席があり、柏木厚典附属病院長、産科学婦人科学講座教授の村上 節先生などから今後のさまざまな領域への応用の可能性が質疑され、新たな臨床研究への応用の手掛かりが得られた。

新しい高感度エンドトキシン測定法の開発 —それでなにが分かるのか?—

小幡 徹

財団法人微生物化学研究会特定研究推進グループ 客員研究員

Development of new and high sensitive endotoxin assay system. —What would we know in next?—

Toru OBATA

Microbial Chemistry Research Foundation, Specified Research Promoting Group,
Visiting Scientist

エンドトキシン (Lipopolysaccharide, LPS) の測定は、カブトガニ Amebocyte 抽出液中の凝集系が LPS 特異的に反応し、ゲル化することを利用して行われてきた。当初この抽出液 (Limulus Amebocyte Lysate, LAL 試薬) のゲル化を目視で観察し、ゲル化の有無を持って試料中のエンドトキシンを推定するという方法がとられてきた。そのため、その後の確立された測定法も全て、これを基礎とし、特に「静置して観察をすること」が“常識”となっていた。

我々は LAL 試薬の反応を、静置条件ではなく攪拌することで溶液全体のゲル化を阻害し、LAL 試薬のカスケード反応最終産物であるコアグリン分子を粒子として凝集させ、レーザー散乱光で検出するという測定方法を考案した。そしてさらに LAL カスケードを LPS の刺激が伝わる速度が、LPS の刺激 (濃度) 依存的である事を見いだした。

この原理によって従来法より 100 倍以上高感度でかつ迅速なエンドトキシン測定法 (Endotoxin Scattering Photometry (ESP) 法) が開発された。この ESP 法を用いると、従来法では検出率が悪かった臨床試料ばかりではなく、平均 0.107 pg/ml という健常人の血中エンドトキシンレベルも検出可能であった。

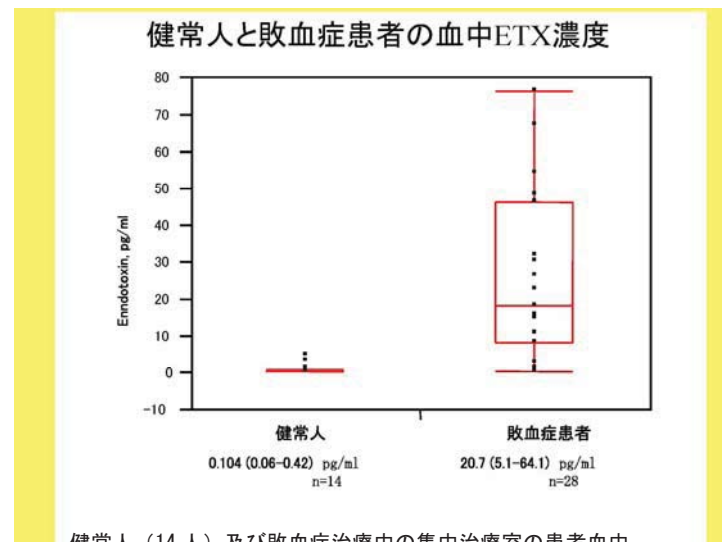
従来敗血症では、エンドトキシンが体内に入った場合に引き起こされると考えてきたが、敗血症患者の体内レベルは健常人平均値の約 200 倍であった。ではその症状を分ける閾値はどこに引かれるのだろうか?

また健常人の中にも、10 人中何人かの割合で高めの数値を持つヒトがいることがわかった。個別的には歯槽膿漏だったり、月経中であったという要因が認められるが、血液中のエンドトキシンが切っ掛けとなって起きる小さな炎症が原因となって発生するといわれている動脈硬化や塞栓症、心筋梗塞などにおいて、その検出が可能なのであるだろうか?

我々は新しい方法を見いだしたことで、新しい指標 (または従来の指標の再評価) を手に入れたのかもしれないと考えている。

“それでなにが分かるのか?”

我々は、この方法を用いて、ここから問いを始めなければならぬ。



健常人 (14 人) 及び敗血症治療中の集中治療室の患者血中のエンドトキシン濃度を ESP 法を用いて測った。

文献

- [1] Obata T, Nomura M, Kase Y, and Shirasawa Y. Early detection of the Limulus ameobocyte lysate reaction evoked by endotoxins. *Anal. Biochem.*, 373, 281-286, 2008.
- [2] 小幡 徹. 臨床試料における高感度エンドトキシン測定法. *日本血栓止血学会誌* 20,66-71, 2009.
- [3] Terawaki H, Yokoyama K, Yamada Y, Maruyama Y, Iida R, Hanaoka K, Yamamoto H, Obata T, Hosoya T. Low-grade endotoxemia is contributing to chronic inflammation in hemodialysis patients: Examination with the novel LPS detection method (ESP method). *Therapeutic Apheresis and Dialysis* in press. 2010.