

氏名・(本籍)	小林 知 恵 (滋賀県)
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	博士 第242号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成9年3月24日
学位論文題目	Silkworm larvae plasmaによるヒト血中ペプチドグリカン検出法の検討
	審査委員 主査 教授 大久保 岩 男
	副査 教授 馬 場 忠 雄
	副査 教授 小 玉 正 智

論文内容の要旨

【目 的】

Silkworm larvae plasma (SLP)を用いてグラム陽性菌及び陰性菌の菌体成分であるペプチドグリカン(PG)の検出をヒト血漿にて施行し、その意義を検討する。

【はじめに】

近年、従来のグラム陰性菌による重症感染症(いわゆる敗血症)に加えて、グラム陽性菌による感染症が増加し全体の30~40%を占めるという報告が多い。現在本邦では、グラム陰性菌や真菌が引き起こす感染症の迅速な血中診断として、カプトガニ由来のリムルス試薬による血中エンドトキシン及び β -グルカンの検出が行なわれているが、グラム陽性菌感染症については、これまで簡便な血中診断方法がなかった。今回我々は、グラム陽性菌及び陰性菌の菌体成分であるペプチドグリカン(PG)の検出をヒト血漿にて初めて施行し、グラム陽性菌感染の血中診断の可能性について検討した。

【材料と方法】

Silkworm larvae plasma (SLP)試薬は、カイコ体液中に存在するprophenoloxidase cascadeが、PG及び真菌成分の(1-3) β -グルカンによって活性化される現象を利用した試薬である。PG又は β -グルカンが存在すると、最終的にphenoloxidaseが活性化され、基質のL-DOPAからメラニン色素を産生させて溶液を黒変させる。この色調の変化をトキシノメーターMT251で経時的に測定、透過光量比が90%となった時点を反応時間(Ta)とし、標準PG水溶液の反応時間から作成した標準曲線からPG濃度を算出した。血漿の前処理は加熱希釈法を用いた。

【結 果】

標準PG水溶液及びPG添加血漿による標準曲線は直線回帰性を有し、臨床検体を用いた同時再現性も良好であった。健常人55名の血中PG濃度は全て0.1ng/ml未満であった。SLP法における測定限界濃度のペプチドグリカンの生物活性は、ヒト末梢血単核球に対するTNF- α 産生誘導能において単独でもエンドトキシンとの混合においても認めなかった。

重症感染症の55/67名(82.1%)、菌血症患者の16/19名(84.2%)で0.1ng/ml以上のPGが検出された。MRSA菌血症患者の5/5名(100%)、緑膿菌血症の6/7名(85.7%)で同じくPGが検出された。

細菌培養法と比較したSLP法の感度は、グラム陽性菌単独感染例では75.0%、グラム陰性菌単独感染例では85.2%、混合感染例では94.7%であった。上記の症例を総合して検討すると、感度86.2%、特異性は90.6%、陽性正診率は89.3%、診断効率は88.5%であった。

【考 察】

重症感染症におけるグラム陽性菌の血中診断としては、従来の血液培養法の他にstaphylococcus aureusの外毒素であるtoxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1)の検出が施行されているが、TSST-1非産生株やS.aureus以外の菌では迅速な診断法がなかった。本稿では、グラム陽性菌の細胞壁成分であるPGに着目し、患者血液を用いた重症感染症の新しい診断法について検討した。これまでPGの測定は、その特異成分であるムラミン酸などをラジオイムノアッセイや高分子クロマ

トグラフィーで検出する方法によって行なわれてきた。しかしこれらの方法は、操作が複雑で実用的でなかった。また、各種の細菌ごとにPGの微細構造が異なるため、上記の方法ではその高い特異性ゆえにさまざまな細菌由来のPGを一括して測定できない弱点があった。SLP法は、リムルス法と同様に原始生物の酵素系を利用する測定法で、操作は簡便で迅速な測定が可能であり、グラム陽性及び陰性の各種細菌のPGに反応した。

PG添加ヒト血漿による標準曲線は直線回帰性を示し、測定の同時再現性も良好であった。SLP法での検出限界値0.01ng/ml周辺におけるPGの生物活性は、ヒト末梢血単核球に及ぼすTNF- α 産生誘導能による検討において、単独でもエンドトキシンとの混合でも認められなかった。この結果は諸家の報告とも一致しており、これらの結果から、健常成人の測定値から得た正常血中濃度0.1ng/mlは、PGの生物活性発現の最下限値を十分に下回っていると考えられた。臨床症例の血中PG濃度は、健常成人と比較して菌血症症例で特に高い値を示す傾向を認め、血液中のPG量を反映していると考えられた。細菌培養法と比較検討したSLP法の感度、特異性、陽性正診率、診断効率は、いずれも85%以上で良好であった。

【結 語】

本法はグラム陽性菌及び陰性菌感染の診断に有効であり、これまで簡便迅速な方法がなかったグラム陽性菌感染症においては特に有用な方法となる可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

近年、グラム陽性菌による感染症が増加し起炎菌の30~40%を占めている。グラム陰性菌や真菌が引き起こす感染症の迅速な血中診断法としては、リムルステストがあるが、グラム陽性菌感染症については、これまで簡便な血中診断方法がなかった。本研究は、silkworm larvae plasma (SLP)を用いて、グラム陽性菌及び陰性菌に共通する菌体成分であるペプチドグリカン(PG)の検出をヒト血漿にて施行し、その意義を検討したもので、以下の結果を得た。

- 1) カイコ体液中に存在するprophenoloxidase cascadeが、PG及び β -グルカンによって活性化される現象を利用したSLP試薬を用いて、基質のDOPAからメラニンが産生されて溶液が黒変する現象を、透過光量比として経時的に測定する方法をヒト血漿で初めて施行した。
- 2) 標準PG水溶液及びPG添加血漿による標準曲線は直線回帰性を有し、ヒト敗血症検体を用いた同時再現性試験でも、良好な結果を得た。
- 3) SLP法における測定限界濃度は、ヒト末梢血単核球に対するTNF- α 産生誘導能で検討したPGの生物活性発現の最下限値をはるかに下回り、感受性が高かった。
- 4) 健常人55例の血中PG濃度は全て測定限界値以下であった。重症感染症67例中55例(82.1%)でPGが検出された。また、MRSA菌血症5例では100%、緑膿菌血症7例では85.7%のPG検出率であった。
- 5) 重症感染症例67例と健常人55例の計122例で検討したSLP法の感度は86.2%、特異性90.6%、陽性正診率89.3%、診断効率88.5%で、いずれも85%以上を示し、良好な結果を得た。

以上のように本研究は、SLP法がグラム陽性菌を含めた全ての細菌感染の簡便迅速な診断に有効であることを示唆した点が重要であり、博士(医学)の学位に値すると考えられる。