

氏 名・(本籍)	横 田 徹 (滋賀県)
学 位 の 種 類	博士 (医学)
学 位 記 番 号	博士第199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7年3月23日
学位論文題目	リムルテストによる血漿添加エンドトキシン濃度とヒト末梢血単核球からの TNF産生誘導能との相関
審 査 委 員	
	主査 教授 瀬 戸 昭
	副査 教授 馬 場 忠 雄
	副査 教授 小 玉 正 智

## 論 文 内 容 要 旨

### 〔研究の目的〕

血中のエンドトキシン測定法としてリムルテストが利用されている。しかしその測定値が血液中に存在する際のエンドトキシンの多様な生物活性を反映しているかどうかは明確にされていない。血液中に存在するエンドトキシンの腫瘍壊死因子 (TNF) 産生能を反映する測定法を検討した。

### 〔方 法〕

ヒト末梢血単核球をエンドトキシンフリーの条件下に採取し、10%FCS加RPMI1640に浮遊させ  $2 \times 10^6$ /mlに調整した後、300  $\mu$ lずつ48wellのculture plateで37°C 5%CO<sub>2</sub>下、2時間培養した。このヒト末梢血単核球に100ng/ml、10ng/ml、2.5ng/ml、1 ng/ml、250pg/ml、100pg/mlの各濃度で設定したエンドトキシン添加血漿を30  $\mu$ lずつ添加し、さらに37°C 5%CO<sub>2</sub>下で5時間培養した。培養後上清中のTNFをELISA法にて測定した。またエンドトキシン添加血漿を90分間37°Cでインキュベートした後、ヒト末梢血単核球に添加した検体についても同様の実験をおこなった。これらエンドトキシン添加血漿のエンドトキシン濃度を3種類の血漿前処理後、2種類の市販のリムルテストの組み合わせ、すなわちPCA処理後、エンドスペー法、newPCA処理後エンドスペー法、希釈加熱処理後 比濁時間分析法で測定した。各種設定濃度別にインキュベーション前後の血漿中のエンドトキシンの測定値とTNF産生能との相関性を測定法間で比較検討した。

### 〔結 果〕

血漿のエンドトキシン設定濃度が100ng/mlから250pg/mlの間で、エンドトキシン濃度とTNF産生量との間に高い相関が認められた。5回の実験結果からインキュベートした群のTNF産生量を基にインキュベート後のエンドトキシン濃度を算出すると設定濃度が1 ng/ml、10ng/ml、100ng/mlの場合、それぞれ前値の17.0 $\pm$ 6.1%、18.2 $\pm$ 17.7%、17.3 $\pm$ 6.8% (mean $\pm$ SD) まで低下しており、インキュベートによって血漿中のエンドトキシンの生物活性は低下したと考えられた。またこれらインキュベート後のエンドトキシン添加血漿をそれぞれの方法で測定するとPCA前処理後のエンドスペー法では1.1 $\pm$ 0.9%、0.5 $\pm$ 0.2%、0.6 $\pm$ 0.4%、newPCA前処理後のエンドスペー法では38.9 $\pm$ 1.0%、47.9 $\pm$ 7.9%、52.1 $\pm$ 9.9%、希釈加熱前処理後の比濁時間分析法では28.5 $\pm$ 3.3%、26.5 $\pm$ 4.5%、25.4 $\pm$ 4.4%と低下していた。これらの平均値を各濃度別に検定したところ、PCA前処理後エンドスペー法および

new PCA前処理後エンドスピーシー法による測定値の低下率は全ての濃度域でTNF産生量の低下率と5%の危険率で有意差を認めた。しかし、希釈加熱後比濁時間分析法による測定値の低下率は、各濃度でTNF産生量の低下率と有意差を認めなかった。よって比較検討した測定法のなかでは、比濁時間分析法による測定値が血中に存在するエンドトキシンによるTNF産生能をほぼ反映していると考えられた。

#### [考 察]

エンドトキシン血症の診断法として微量のエンドトキシンに反応するリムルステストが実用化されているが、測定値と臨床病態に相関を認めないことがしばしば報告されている。血中にはリムルス反応に影響する物質が存在し、添加されたエンドトキシンの回収に大きく影響していたが、回収率を良くするためいろいろな前処理法が考案されてきた。またエンドトキシン以外にも真菌由来のグルカンと反応することが判明し、エンドトキシンに特異的に反応するリムルステストが開発されている。しかし、測定された値が血液中のエンドトキシンによるゲル化以外の生物活性を反映しているか否かは、検討されていなかった。このため測定された血中エンドトキシンが実際に活性を持ち病態に関与しているのか判断できなかった。我々は以前から数種のリムルス法による血中エンドトキシン測定値と他の生物活性が相関していないことを報告し、臨床検査法としての血中エンドトキシン測定法は、充分な回収率を持ち、測定値が主要な生物活性と相関する必要があると主張してきた。今回、臨床上問題とされる微量なエンドトキシンに反応して産生されるTNFを生物活性として測定し、リムルス法による測定値が血漿中のエンドトキシン活性を反映しているか否かを検討した。この結果、比濁時間分析法は血漿中のエンドトキシンによるTNF産生能をほぼ評価でき、その測定値はエンドトキシンが原因となっている臨床病態を反映すると考えられた。一方、TNF産生量の低下が示す如く血漿によるエンドトキシン解毒能が再確認された。また回収率、特異性にすぐれる比濁時間分析法はこのエンドトキシン解毒能を良く反映していた。故に血漿の解毒能評価にも比濁時間分析法が有用である可能性が示唆された。

#### [結 論]

希釈加熱処理比濁時間分析法による血中エンドトキシン測定値は、血中に存在する際のエンドトキシンの生物活性（TNF産生能）を反映していた。

### 学位論文審査の結果の要旨

エンドトキシン血症の定量化診断には高感度のリムルステストが用いられるが、この検査方法にはいくつかの変法があり、その測定値は必ずしも一致せず、また臨床症状とも相関しないことがある。本研究では血漿エンドトキシンの生物活性を腫瘍壊死因子（TNF）誘導活性を指標として測定する方法を考案し、この方法とリムルステストを比較検討したものである。得られた結果は以下の通りである。

1. TNF誘導活性を指標とする新しいエンドトキシン測定方法として、ヒト末梢血単核球浮遊液にエンドトキシン添加血漿を加えて37℃で5時間培養し、その培養上清中に放出されるTNFをELISA法によって定量する方法を考案した。
2. この方法で測定されるエンドトキシンの生物活性は、エンドトキシンと血漿を混合して37℃に孵置すると時間とともに元の活性の約17%にまで低下し、この低下は血漿中のエンドトキシン解毒物質によると考えられた。
3. 血漿と混合されたエンドトキシンの一定時間後における活性低下率は、100ng/mlから250pg/mlの範囲で一定であり、比較検討した3つのリムルステスト変法の中では、希釈加熱・比濁時間分析法

の値とほぼ同じ値であった。

以上のように本研究は、血漿エンドトキシンの生物活性測定法を考案したこと及びエンドトキシン血症の定量化診断に用いられるリムルステストのうちで希釈加熱処理・比濁時間分析法がエンドトキシンの生物活性を最も正確に反映する測定方法であることを明らかに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。