

論文内容の要旨

Development of new endotoxin measurement assay using bioluminescence method
(生物発光法を用いた新しいエンドトキシン測定法の開発)

(野々口マリア, 高橋学, 菅重典, 秋丸理世, 児玉善之, 横藤壽, 下山賢, 森野豪太, 稲田捷也, 井上義博)

(Journal of Iwate Medical Association 72 巻, 4 号 2020 年 10 月掲載予定)

I. 研究目的

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る。臨床検体(血液)中のエンドトキシン濃度の測定は、エンドトキシンショックの診断や治療方針の決定に重要である。

現在用いられているエンドトキシン測定法に比濁時間分析法がある。これはリムルス反応を利用して少量の血球を含んだ血漿を対象としているが、測定精度が低いことが問題である。血液中の多くのエンドトキシンは白血球と結合した、あるいは白血球内に取り込まれた状態で存在する。我々はこの現象に着目し、多白血球血漿検体(leukocyte-rich plasma samples:LRP)を用いた比濁時間分析法によるエンドトキシン測定法を開発し、その有用性を報告した。

近年、黒田らによりリムルス反応を利用し高輝度ルシフェラーゼを用いたエンドトキシン測定法(生物発光法)が発表された。この測定法はさらに小野寺らにより改良され、最近では 20 分で結果が得られる全自動化されたエンドトキシン測定機器が開発され、臨床応用されている。

これまでヒトの血液を用いた全自動化生物発光法でのエンドトキシン測定の報告はない。本研究では、同一患者由来の LRP を対象として、比濁時間分析法と生物発光法でエンドトキシン濃度を測定し、比較検討を行った。

II. 研究対象ならび方法

岩手医科大学高度救急救命センターに搬送された細菌感染症疑いの患者から採取した血液 24 検体 (2018-2019 年) と健常者血液 8 検体を対象とした。

LRP は LRP37 法に従って調製した。滅菌済み 6%デキストラン 400 μ L にヘパリン加血液 800 μ L を加え、37°C で 5~6 分放置した。赤血球が凝集し沈降して生じた上澄みを LRP とした。

比濁時間分析法によるエンドトキシン値の測定は、和光純薬の toxinometer MT-5500 を用いた。生物発光法による測定は東亜 DKK の Luminitz-ET を使用した。MT-5500 で得られた測定値 (pg/mL) を EU (エンドトキシンユニット) へ換算し (1pg/mL=7mEU/mL), 両者を比較した。

細菌感染・敗血症・敗血症性ショックの診断基準は International Consensus Definition of Sepsis and Septic Shock, 3rd Edition(Sepsis-3)を用いた。患者重症度の指標として The Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II score(APACHE II score)と Sequential Organ Failure Assessment(SOFA) score を使用した。

比較には Mann-Whitney u 検定を、相関は Spearman の順位相関係数を用い、それぞれ JMP のソフトウェアを使用し解析した。カットオフ値の算出は Receiver operating characteristic 分析を用い、解析には SPSS のソフトウェアを使用した。P 値が 0.05 未満を有意差ありとした。

III. 研究結果

1. 比濁時間分析法での測定値は 10.61 ± 7.99 mEU/mL, 生物発光法での測定値は 18.80 ± 28.31 mEU/mL であり, 生物発光法で高値となる傾向にあった。また, それぞれの測定値の間には相関が認められた ($p=0.018$, $R^2=0.16$)。
2. 比濁時間分析法による測定時間は 138.01 ± 8.58 分であった。生物発光法の測定時間である 20 分は, これよりも有意に短いことが示された ($p<0.01$)。
3. 敗血症診断能を SPSS による解析で比較すると, 比濁時間分析法では感度 91%, 特異度 89%, 生物発光法では感度 95%, 特異度 100%であった。生物発光法でより高い値が得られた。
4. 患者の重症度(SOFA score と APACHE II score)と測定値を比較した。比濁時間分析法による測定値は SOFA ($p=0.009$, $R^2=0.23$) と APACHE II ($p=0.010$, $R^2=0.19$) の両者と相関した。生物発光法による測定値も SOFA ($p=0.007$, $R^2=0.46$) と APACHE II ($p=0.007$, $R^2=0.30$) の両者と相関したが, 生物発光法でより高い相関を示した。
5. 起因为菌別に測定値を比較した。それぞれの測定法において, グラム陰性菌が検出された症例の測定値は高い傾向にあることが確認された。

IV. 結 語

生物発光法は測定時間と測定精度において比濁時間分析法に比べて有意に優れていた。また, LRP を用いて測定したエンドトキシン値は患者の重症度と相関した。このように, 生物発光法により測定した LRP 中のエンドトキシン値は感染症の診断マーカーになりうることを示された。

論文審査の結果の要旨

論文審査担当者

主査 教授 村木 靖 (微生物学講座 感染症学・免疫学分野)

副査 教授 鈴木健二 (麻酔学講座)

副査 講師 高橋智弘 (救急・災害・総合医学講座 総合診療医学分野)

血中エンドトキシン濃度の測定は、エンドトキシンショックの診断や治療方針の決定に重要である。近年、高輝度ルシフェラーゼを用いた測定法(生物発光法)が開発され、全自動化された測定機器が臨床応用されている。しかしながら、ヒトの血液を用いた報告はなく、その精度や意義は不明である。本研究では、健常者および細菌感染症が疑われた患者由来の多白血球血漿検体 (LRP) を用いて、従来法 (比濁時間分析法) と全自動化生物発光法でエンドトキシン濃度を測定し、比較検討した。生物発光法は測定時間と測定精度において比濁時間分析法に比べて有意に優れていた。また、LRP を用いて測定したエンドトキシン値は患者の重症度と相関した。このように、生物発光法により測定した LRP 中のエンドトキシン値は感染症の診断マーカーになりうることを示された。

本論文は、LRP を用いたエンドトキシンの測定に関する有益な知見を示した研究といえる。学位に値する論文である。

試験・試問の結果の要旨

エンドトキシンの存在様式、LRP の調製法、統計学的処理法とその意義、細菌感染症の病態などについて試問を行い、適切な解答を得た。学位に値する学識を有していると考えられる。また、学位論文の作成にあたって、剽窃・盗作等の研究不正は無いことを確認した。

参考論文

- 1) 白血球減少を伴った敗血症性ショック症例に対する Polymyxin-B immobilized fiber-direct hemoperfusion 施行時の granulocyte colony stimulating factor の経時的推移 (横藤 壽 他 19 名と共著)
エンドトキシン血症救命治療研究会誌, 23 巻, 1 号 (2019) : p197-202.
- 2) 敗血症性 disseminated intravascular coagulation 症例に対する polymyxin-B immobilized fiber-direct hemoperfusion 施行時の high mobility group box 1 と トロンボモジュリンの検討 (野々口マリア 他 19 名と共著)
エンドトキシン血症救命治療研究会誌, 22 巻, 1 号 (2018) : p256-264.