

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 25 日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861730

研究課題名(和文)多白血球血漿におけるエンドトキシン測定

研究課題名(英文)Leukocyte-rich plasma as a specimen for the measurement of endotoxin

研究代表者

菅 重典(KAN, SHIGENORI)

岩手医科大学・医学部・助教

研究者番号：80633081

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は現在、エンドトキシン測定の保険適応となっている比濁時間分析法を応用し、新たに考案した多白血球血漿を測定することで、従来の測定法の問題点を補い、Sepsisにおけるエンドトキシン血症の診断率を向上させ、しいては救命率向上に直結する事を最終目的とした。

研究の結果、基礎的実験において試薬として適切であり、試験管内実験および臨床実験において有意に高値を示し、感度・特異度は改善し、診断率の向上を認めた。臨床に应用した結果、早期にエンドトキシン血症を診断し、エンドトキシン吸着療法を施行した結果救命できた症例を経験した。これらの成果は、論文に掲載していただき、各学会および研究会で報告している。

研究成果の概要(英文)：We focused our attention on the endotoxin present within and on the surface of white blood cells and attempted to establish a new sample preparation method for endotoxin assays in leukocyte-rich plasma (LRP), taking advantage of the erythrocyte-aggregating property of hydroxyethyl starch (HES). We used an endotoxin-specific turbidimetric kinetic assay, which is the conventional method used to assay endotoxin levels in platelet-rich plasma (PRP). Then, we comparatively assessed the assay results obtained with the endotoxin assay using PRP and LRP. It was found that the sensitivity of endotoxin assay in the diagnosis of infections caused by Gram-negative bacteria. These results suggest that our newly developed leukocyte-rich plasma endotoxin assay may contribute to an improvement in the rate of sepsis diagnosis.

研究分野：救急医学

キーワード：感染症 敗血症 エンドトキシン 多白血球血漿

## 1. 研究開始当初の背景

グラム陰性菌細胞壁を構成するエンドトキシンの化学的本体はリポ多糖(LPS)であり、きわめて多彩な生物活性を有する。エンドトキシンは白血球を活性化しサイトカインなどの液性因子産生などを介して病態の発現、進行に関与していることはよく知られた事実である[1-3]。多臓器不全、敗血症性ショックに陥った場合死亡率は50%に達する。また、エンドトキシン血症の特別な治療としては緊急透析であるPMX DHPによるエンドトキシン吸着療法があり、Septic shockの際は救命に直結する。このことから、エンドトキシン血症の証明は、非常に重要である。

現在、本邦では唯一保険適応されているリムルテストとして比濁時間分析法がある。この方法で血液エンドトキシンを測定する場合、試料として血液から遠心分離によって得られた多血小板血漿(Platelet-Rich Plasma 以下 PRP)や乏血小板血漿(Platelet-Poor Plasma)などが用いられている。しかし、グラム陰性菌感染症では、エンドトキシンは血漿中に存在するばかりでなく、白血球細胞膜表面のLPS受容体であるCD14・Toll Like Receptor 4を介して結合して存在することが考えられる。また、エンドトキシンはその後細胞内に取り込まれることが報告されている。さらにエンドトキシンを持つグラム陰性菌が貪食されると細胞内にエンドトキシンが取り込まれることになる。よって、現在のPRPによる比濁時間分析法は感度が低いことが問題点であった。

そこで、我々は白血球表面や細胞内のエンドトキシンに着目し、それらがリムルテストの測定に供することが出来ると考え、自験データとして、これまで敗血症患者の血中エンドトキシンを血漿と白血球画分とで各々測定し、白血球画分のみで高値とな

る時期や、逆に血漿のみ高値となる時期、両方高値となる時期が存在していることを明らかにしている[4]。しかし、この方法では、血漿と白血球層(バフィーコート)を個別に採取する必要があり、操作上煩雑となり、白血球を十分に回収できないことや赤血球の混入などの問題点があり実用性に欠けていた。(比濁時間分析法では赤血球を含む試料を用いると前処理段階で溶血し、ヘモグロビンが透過光量を減少させ測定系に不具合を生じるため赤血球を遠心分離し除去する必要がある。)

そこで、赤血球の凝集剤であるヒドロキシエチルデンプン(HES)を用い白血球採取法[5-6]に着目し、赤血球を含まず、エンドトキシンと結合した白血球及び血漿を同一検体試料(多白血球血漿 Leucocyte Rich Plasma 以下 LRP)としてエンドトキシンを測定する方法を考案するに至った。

## 2. 研究の目的

現在、エンドトキシンの定量法には広く臨床応用されているPRPによる比濁時間分析法の他に、ESP法(Endotoxin Scattering Photometry)、EAA(Endotoxin Activity Assay)などがあるが、それぞれ問題点が指摘されている。比濁時間分析法における感度・特異度は56.8%、97.0%と感度が良いとは言い難い。ESP法は小幡らによって開発され一部で臨床応用されているが、感度・特異度75.9%、97.0%と感度が比濁法に比し高いが、原法ではエンドトキシン以外の要因で偽陽性反応を示すことを明らかにし、我々は最近改良法を提示してきた[7-8]。またEAA法はFDAにより認可されており欧米で使用されているが、特異度は44.0%と低く、エンドトキシンそのものの直接的な定量法ではないことから、病態により偽陽性が多く、我々も偽陽性を確認し報告してきた[9]。

この研究では LRP による比濁時間分析法では、白血球結合エンドトキシン原理からエンドトキシンそのものを測ることができ、上記の問題点を補い診断率の上昇が見込まれる。よってグラム陰性桿菌敗血症を含むエンドトキシン血症の診断および治療効果マーカーとなりえ、診断率の改善、しいては救命率の向上を目的とする。

また、この方法は他では考案されておらず、我々独自のアイデアであり、さらにこの LRP は同様のリムルステストである真菌感染症マーカーの  $\beta$ -D グルカンでも同様の効果を期待でき、エンドトキシン以外にも発展が見込まれる。

### 3. 研究の方法

#### (1)LPS と白血球の結合を確認する

LPS が白血球に結合している事、または内部にも存在するという大前提を確認実験する。白血球への LPS 結合を、白血球抗体、LPS 抗体を用い、フローサイトメトリーによる解析を行う。これは確認実験であり資料、方法や材料は【10】【11】を参照したものである。

#### (2)LRP 試料の作成

ここでの、試料として適切であること条件として、A:HES 製剤混注後の赤血球が沈降し分離されるまでの適切な静置時間が短く実用的な時間であること。B:この研究の鍵である白血球を十分かつ安定した回収ができる事。C:比濁時間分析法では赤血球を含む試料を用いると前処理段階で溶血し、ヘモグロビンが透過光量を減少させ測定系に不具合を生じるため赤血球を遠心分離し除去する必要がある、赤血球が十分に除去されていること。D:主な免疫細胞である顆粒球および単球の分画比率に変化がない事である。測定はフローサイトメトリーを用い検討する。

#### (3)健常者および疑似エンドトキシン検体でのエンドトキシン値の比較検討

複数の健常者検体における PRP、LRP

エンドトキシン値の比較検討を行う。さらに、健常者全血にエンドトキシンを混注し、37℃ で2時間混和後した疑似エンドトキシン血症における PRP、LRP エンドトキシン値を比較検討する。この検討により、偽陽性、偽陰性の有無を確認する。また臨床研究への予備実験となる。

#### (4)SIRS 患者におけるエンドトキシン値測の比較検討、統計解析

施設へ搬入となった患者で SIRS (全身性炎症症候群) より検体を採取し、PRP、LRP エンドトキシン値を比較検討する。統計解析 (SPSS を使用) を行い、ROC 曲線を作成し cut-off 値、感度、特異度および陽性的中率、陰性的中率を求め、従来の測定法と比較検討する。

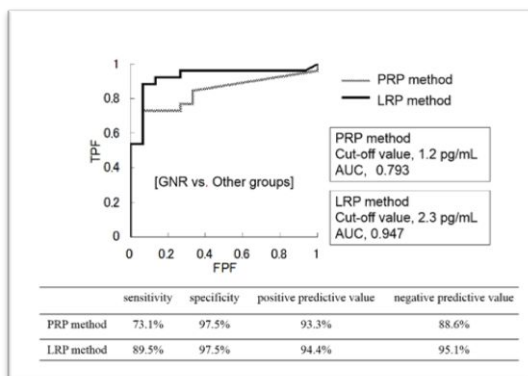
#### (5)エンドトキシン血症患者における症例検討

エンドトキシン血症を呈した数名の患者を定期的に検体採取し、PRP、LRP エンドトキシン値と共に CRP(急性炎症反応タンパク)、白血球、使用抗生剤、ICU チャートをもとに、症例検討を重ね、LRP の有用性について検討する。

### 4. 研究成果

赤血球凝集剤ヒドロキシエチルデンプン (HES) を用いて多白血球血漿 (LRP) を得て、リムルステストの比濁時間分析法を用いたエンドトキシン測定法の試料とする方法を考案し、多血小板血漿 (PRP) 法と比較検証した。その結果、血液に等量の6% HES を加えて15分室温放置することにより LRP を得ることが出来た。LRP には全血の白血球を殆ど回収でき、測定系への悪影響を及ぼさず赤血球は除去できた。さらに LPS を健常血液に添加しフローサイトメトリーで検討したところ LPS が白血球に結合していることが示された。健常血液に LPS を添加加温して LRP 法と PRP 法を比較したところ、ヘマトクリット値で補正した LRP 法のエンドトキシン値は、PRP 法のエンドトキシン値より高く白血球エンドトキシンも測定していることが示された。試料

に含まれる HES はエンドトキシン測定に影響することはなく LRP 法はリムルステストの試料として適切であると考えられ、今後の敗血症における診断率の向上の可能性が示唆された。これらは下記 1) で論文掲載し、さらに学会でも発表している。



さらに、臨床研究として検体を敗血症患者より採取し、統計処理を行ったところ、下記の表の結果が得られ、従来の PRP より LRP が優れていることが示唆された。

臨床応用したところ、患者の救命に寄与した症例を報告し、論文に掲載していただいた。

また、同様に -D グルカンでも LRP の有用性が認められ、我々は現在、基礎研究を行っており学会発表、論文掲載の予定である。

#### 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 3 件)

1) 菅重典, 高橋学, 小野寺ちあき 他, 多白血球血漿を用いたエンドトキシン測定法の基礎的研究 臨床病理 : 日本臨床検査医学会誌 60(11), 1045-1052, 2012-11. 査読あり

2) KAN shigenori, TAKAHASHI Gaku, ONODERA Chiaki et al. Evaluation of an endotoxin-specific limulus amoebocyte lysate assay using leukocyte-rich plasma for the diagnosis of gram-negative bacterial infection .Journal of infection

and chemotherapy : 19(2), 299-304, 2013-04-01 . 査読あり

3) 菅重典, 高橋学, 佐藤諒, 他 16 名. インフルエンザを契機に発症した敗血症性ショックの 1 例. エンドトキシン血症救命治療研究会誌:19 巻 1 号:2014. 査読あり

〔学会発表〕(計 3 件)

2013 年度 日本救急医学会総会

2014 年度 日本救急医学会総会

2014 年度 エンドトキシン救命治療研究会

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

菅重典 (KAN Shigenori)

岩手医科大学 助教

研究者番号 : 80633081

(3) 連携研究者

稲田健也 (INADA Katuya)

岩手医科大学救急医学講座 助教

研究者番号 : 80048446

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

丹保亜希仁 (TANPO Akihito)

岩手医科大学救急医学講座 助教

研究者番号 : 80531524

小鹿雅博 (KOJIKI Masahiro)

手医科大学救急医学講座 助教

研究者番号 : 40347878