

第57話 高感度エンドトキシン測定の実用

比濁時間分析法や比色法を用いると、かなり低濃度のエンドトキシンが測定できるようになっています。本シリーズでも、水中のエンドトキシンの測定の話を取り上げ、試料の添加量を調整することでトキシノメーター法による1EU/ℓのエンドトキシンの検出が90分程度で行えること、また、試料中のエンドトキシンを濃縮できるパイロセップ法では0.1EU/ℓ以下のエンドトキシンの検出が可能であることをご紹介しました(第21話¹⁾)。トキシノメーターの場合、試薬自体が自然に活性化を起こさない試薬、いわゆるブランクの安定な試薬を用いると、測定時間を延長すればするほど低濃度までエンドトキシンの測定が可能となります。今回は、この性質を利用した血中エンドトキシン測定の実用例をご紹介します。

血中エンドトキシンの測定は、グラム陰性菌感染症診断に有用であることが期待され、検討されてきました。1980年代から1990年代前半にかけて、主に合成基質法を用いた測定が検討され、迅速診断に期待が持たれましたが、β-グルカンにも反応するリムルス試薬を使用していたため、その結果に疑問が持たれるようになりました。その後、エンドトキシン特異的試薬を用いた測定が主流になると血中エンドトキシンの陽性率が低下しました。血中エンドトキシン測定には、血液中に存在する測定妨害物質を不活性化する必要があります。妨害物質の不活性化は、血液(血漿)の前処理によって行われ、種々の方法が開発されています。なかなか完全な前処理

法というものはないのですが、筆者らは、簡単な操作で処理が行え、ある程度良い回収率の得られる希釈加熱法を採用しています。操作が簡便であることは、エンドトキシン汚染を防ぐという面からも非常に重要です。筆者らが開発した界面活性剤を用いた希釈加熱法で血漿を前処理し、エンドトキシンに特異的なリムルス試薬とトキシノメーターを用いてエンドトキシンを測定する方法では、通常用いられている5pg/mℓをカットオフ値とすると、グラム陰性菌感染症を発見できる確率(診断感度)が56%、陰性の時にグラム陰性菌感染症でない確率(診断特異度)が99%との結果を得ており、グラム陰性菌感染症を発見するより、否定することに優れている方法と思われる²⁾。同じデータを用いて、カットオフ値を1pg/mℓまで下げると、診断感度は72%に上昇します²⁾。そのかわり、診断特異度は81%まで下がります。

血漿の前処理時の希釈倍率は10倍です。使用しているエンドトキシン1pgは約0.007EUですから、血漿中の1pg/mℓのエンドトキシンを測定するためには、その10分の1である0.0007EU/mℓを検出する必要があります。最近では、使用する器具も吟味され、測定技術も向上してきましたから、器具や操作からの汚染は少なくなりました。それに伴って、血中エンドトキシンの測定も正確に行えるようになってきたのですが、エンドトキシンの検出率も下がったように思えます。血中エンドトキシンの上昇が予想されるグラム陰性菌感染

症例でもエンドトキシン値が低いことがありますし、健康人血漿からエンドトキシンが検出されることはほとんどありません。それでは、どれくらい低い濃度を測定すると健康人における血中エンドトキシン濃度が見えてくるのでしょうか。筆者らは、トキシノメーターの測定時間を延長すれば低濃度まで検出できるという特徴を利用して、健康人血漿中のエンドトキシン測定を試みました²⁾。すなわち、前処理した健康人血漿を999分間測定してみたのです。74人の健康人の血漿を測定したところ、平均のゲル化時間は690.3分、最大999分以上、最小79.2分、標準偏差191.6分でした。690分のゲル化時間から検量線の外挿によってエンドトキシン濃度を求めると、0.06pg/mℓ(0.72EU/ℓ)となりました。

実際にこの方法を臨床研究に応用した例が報告されています³⁾。八重樫らは、健康人66名、感染症群31名、非感染症SIRS群40名について、測定時間を延長したエンドトキシン測定を行い、感染症群が他の群と比較して有意に高かったと報告しています。カットオフ値を1.1pg/mℓに設定すると、診断感度81.3%、診断特異度86.1%となっており、有用な検査になる可能性が示唆されています。問題は時間がかかることですが、この点も実際に測定すべき濃度が明らかになると、解決されていくことと思われます。

血液中にエンドトキシンが存在することは異常事態ですから、生体はこれに反応してエンドトキシンを抑えにかかると考えられます。このような状態は定常的でなく、常に変化していると思われるから、その測定も困難が予想されます。今後、エンドトキシン測定技術がさらに向上し、エンドトキシンの血中動態が明らかにされることを期待しています。

[参考文献]

- 1) 土谷正和:和光純薬時報, 63(4), 16(1995).
- 2) 土谷正和:「エンドトキシン研究5-研究と治療の進歩-」, p.17. (医学図書出版)(2002).
- 3) 八重樫泰法 他:エンドトキシン血症救命治療研究会誌, 7, 25(2003).

今回は、第58話「リムルス試験のバリデーション」の予定です。

