

Limulus amebocyte lysate (LAL) 凝固因子を利用する 敗血症の補助診断マーカーの特徴と展望

田村 弘志¹⁾, Johannes Reich²⁾, 長岡 功³⁾

¹⁾LPS コンサルティング事務所, ²⁾Microcoat Biotechnologie GmbH, ³⁾順天堂大学医学部生体防御学

Characteristics and future prospects of sepsis biomarkers using limulus clotting enzymes

Hiroshi Tamura¹⁾, Johannes Reich²⁾, Isao Nagaoka³⁾

¹⁾LPS Consulting Office

²⁾Microcoat Biotechnologie GmbH

³⁾Department of Host Defense and Biochemical Research, Juntendo University School of Medicine

Abstract

It is widely recognized that an early detection of life-threatening sepsis or septic shock using biomarkers is of great importance for successful treatment of diseases. Bacterial endotoxins in human blood are one of the target analytes to identify sepsis patients. It has been half a century since endotoxin determination techniques with Limulus Amebocyte Lysate (LAL) were applied to human plasma using the gel-clot method. Thereafter, chromogenic and turbidimetric techniques with high specificity to endotoxin or β -D-glucan were successfully developed, and these technologies enable detection of trace amounts of the analytes in blood. With reference to FDA-approved β -D-glucan detection, it became a global standard to aim for early diagnosis of invasive fungal diseases. A number of questions and problems with endotoxin detection, however, still remain unsolved from the standpoint of clinical significance.

In this review, firstly we focus on development history, recent advances and limitations of LAL techniques coupled with extraction methodologies from blood, and secondly, we suggest a new approach to the solution of the above for biomarker-guided therapy and clinical investigations.

Endotoxin and Innate Immunity 23 : 64~72, 2020

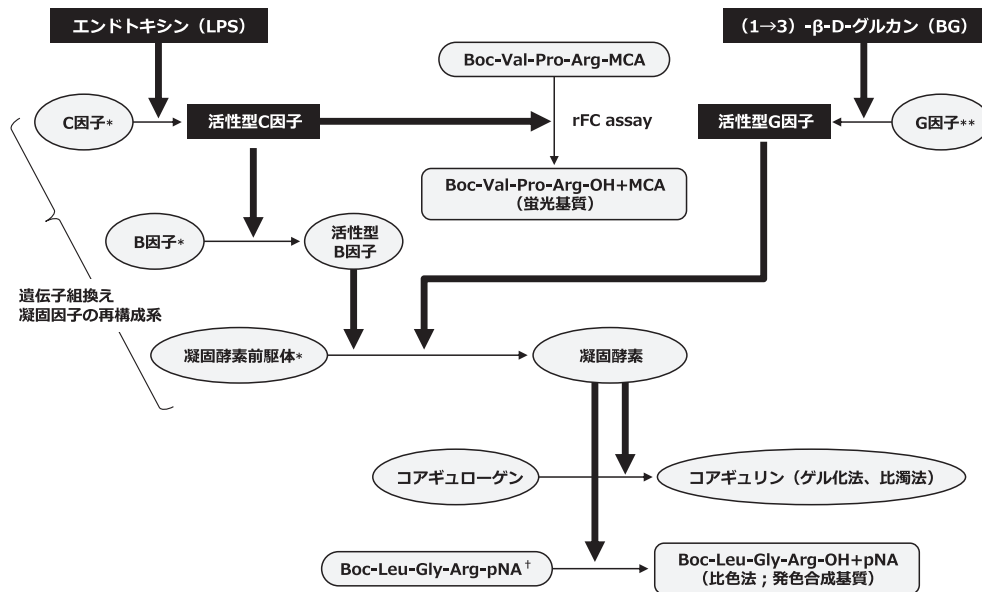
Key words : エンドトキシン (1 \rightarrow 3)- β -D-グルカン, LAL, 敗血症, バイオマーカー

はじめに

感染症は、病原微生物が生体内に侵入・増殖して発症する疾患であり、病原微生物により、主たる感染巣や症状が異なり、宿主の全身状態や基礎疾患および生体防御能によっても予後が異なる。臨床現場では、多種多様な病原微生物をいかに迅速に検出し、早期に適切な治療を施すかが、感染症に起因する敗血症の病態を制御するうえで極めて重要である。近年、病原体に特徴的な遺伝子領域を増幅する迅速診断技術、検査機器の進歩に伴い、分離培養された菌株を迅速かつ正確に同定しつつ、固有の毒素や薬剤感受性遺伝子の高感度検出が可能となっている。一方、感染症の非侵襲的なスクリーニングや補助診断、重症度や予後予測、ならびに治療効果判定の指標

として種々のバイオマーカーが開発されてきた。感染症領域におけるバイオマーカーには以下に示すように幅広い活用が期待されている。これらは、菌体の構成成分、代謝物質、炎症性サイトカイン、特徴的な遺伝子領域などに基づいているが、いずれも単独で診断に寄与できるほど信頼性の高いものはなく、その特性と限界を理解しつつ総合的な感染症診断と治療介入、予後・効果の予測を行うことが重要である。本稿においては、グラム陰性菌および真菌の構成成分である lipopolysaccharide (LPS : エンドトキシン) および (1 \rightarrow 3)- β -D-グルカン (β -グルカン) を指標とする迅速診断法 (補助診断法) の特徴と進歩にフォーカスし、あわせて今後の課題と展望を述べたい。

【感染症領域におけるバイオマーカーに期待するもの】



* 遺伝子組換え凝固因子 (3因子) が利用可能
 ** 遺伝子組換えG因子は開発段階
 † Ac-Ile-Glu-Ala-Arg-pNA, Boc-Thr-Gly-Arg-pNAも利用可能

図 1 カプトガニ凝固因子を用いたエンドトキシンおよび (1→3)-β-D-グルカンの測定原理

1. 全身性炎症反応症候群 (systemic inflammatory response syndrome : SIRS)における感染と非感染性の早期鑑別
2. 感染起因菌・薬剤耐性菌の早期検出・同定 (proven diagnosis)
3. 菌体成分の早期検出・菌血症の補助診断(エンドトキシン/β-グルカン, probable or possible diagnosis)
4. 炎症反応のトリガー・メディエーターを標的とする補助診断
5. 早期治療介入・病態のモニタリング・投与中止のタイミング
6. 予後・治療効果・副作用の予測 (prognostic/predictive marker)
7. 治療転帰・重症化リスクの判別(ゲノム・エピゲノム解析)
8. 臨床試験におけるクリニカルエンドポイントの代替 (surrogate marker)

* 本稿と関連する部分を太字・アンダーラインで示す。

1. カプトガニ凝固因子を用いたエンドトキシンおよびβ-グルカン測定法の進歩

エンドトキシン (グラム陰性菌内毒素) は、グラム陰性菌の細胞壁外膜を構成する成分であるリポ多糖 (LPS) であり、発熱作用、致死毒性、炎症反応など生体内において多彩な生物活性を示す。1964年、LevinとBangにより、カプトガニの血球抽出液 (Limulus ameocyte lysate : LAL) を用いたエンドトキシン検出法 (リムル

ステスト : LAL test) が創案された¹⁾。その後、1983年に岩永らにより解明されたLALの詳細な反応機構(図1)を基に、エンドトキシンにより最終的に活性化された凝固酵素 (clotting enzyme : CE) のアミダーゼ活性を利用する高感度比色法LAL試薬 (トキシカラー、生化学工業) が開発された^{2,3)}。一方、LALは、酵母・カビ・キノコなどの真菌、一部の藻類、高等植物の細胞壁を構成する主要成分β-グルカンにも極微量で反応することが明らかとなり、通常のLAL試薬は必ずしもエンドトキシンに特異的ではないことが判明した⁴⁾。そこで、われわれは、LALに共存するβ-グルカン感受性因子 (G因子) の除去または不活化を試み、1986年に、C因子、B因子、凝固酵素前駆体 (proCE) の再構成系による高感度エンドトキシン特異的比色法LAL試薬 (エンドスペシー、生化学工業)、さらにはG因子とproCEから成るβ-グルカン測定試薬G-test (グルスペシー、生化学工業) を世界に先駆けて開発した⁵⁾。一方、エンドトキシンとβ-グルカンに特異的な比濁法LAL試薬 (リムルスES-Jテストワコー/βグルカンテストワコー、富士フィルム和光純薬) が比色法の後に市場に投入され、これらはいずれも日本で誕生し、その後半世紀を超えた今日まで、局方一般試験法による注射薬・医療機器などの製造・品質管理、免疫学・細胞生化学・分子生物学領域の基礎および応用研究、種々の臨床応用ならびに深在性真菌症の新たな診断・治療アルゴリズムの確立 (ファンギテックGテスト、生化学工業) などグローバル市場を牽引する原動力になっている⁶⁾。

表 1 血中エンドトキシンおよび関連バイオマーカーの測定法

手法/分析対象	原理	方法	試料	文献 筆頭著者	出版年
LAL	Activation of pro-clotting enzyme in Limulus amoebocyte lysate	Gel-clot	Plasma	Levin J ⁷⁾	1970
GC/MS	β -Hydroxymyristic acid content of lipid A	Gas chromatograph-Mass spectrometer	Serum (Rabbit)	Maitra SK ⁸⁾	1978
Anti-endotoxin antibody	Anti-bacteroides lipopolysaccharide IgG	Inhibition ELISA	Serum	Allan E ⁹⁾	1995
LBP (LPS Binding Protein)	Endotoxin-LBP-sCD14 complexes	ELISA	Serum	Opal SM ¹⁰⁾	1999
EAA (Endotoxin Activity Assay)	Human neutrophil-Complement opsonized LPS-IgM complexes	Chemiluminescent emission	Whole blood	Marshall JC ¹¹⁾	2002
MAT (Monocyte Activation Test)	In vitro activation of human monocytoïd cells in response to pyrogens	ELISA	NA*	Hoffmann S ¹²⁾	2005
NF- κ B activation	Toll-like receptor 4/MD-2/CD14	NF κ B-dependent luciferase reporter assay	Plasma (Rat)	Nishida M ¹³⁾	2007

*NA : not applicable

2. LAL test の臨床応用

2-1. 血中エンドトキシン測定法の進歩と課題

敗血症とは重症感染症に伴い種々の病態を呈する症候群であり、その定義に関しては複数の学会により幾度も論議がなされてきた。現在敗血症は「感染に対する制御不十分な生体反応に起因する生命に危機を及ぼす臓器障害」と定義されており、エンドトキシンは、敗血症、とくにグラム陰性菌敗血症の病態形成に強く関与していることが明らかにされている。エンドトキシンの血中濃度の推移を把握するには、生物材料を用いてエンドトキシン活性を *in vitro* で測定する方法に加え、エンドトキシン分子を構成する 3-O- β -ヒドロキシミリリスチン酸などを機器分析により直接定量するか、あるいは LPS-binding protein (LBP) や抗エンドトキシン抗体など関連分子を測定するかなどの方法が知られている。表 1 にこれまで開発された血中エンドトキシン測定法をまとめて示す⁷⁻¹³⁾。ウサギ発熱性物質試験の *in vitro* 代替法 (monocyte activation test : MAT) はエンドトキシン以外のパイロジェンにも反応するが、医薬品・医療機器の品質管理にはむしろ適した方法といえる。表中の種々測定法のなかで、検出感度、測定精度、再現性、経済性などの観点から LAL test が最も優れていることは論をまたず、国際調和エンドトキシン試験法としてすでに三極薬局方に収載されている。しかし、臨床的意義については評価が定まらず、測定法の信頼性に加え、血中エンドトキシンの存在様式やクリアランスも含め議論すべき点が多く残されている¹⁴⁾。これまで FDA 認可 (510k, Endotoxin Activity Assay Device) を取得した血中エンドトキシン測定法は EAA だけであり、本邦では主にポリミキシン B を固定化したエンドトキシン吸着カラム (polymyxin B-immobilized fiber column-direct hemoperfusion :

PMX-DHP) の適応基準など、治療効果の検討に用いられている。しかし、LAL test と EAA は測定原理が全く異なるため、両者の測定値を単純に比較することはできない。また、敗血症の領域に留まらず、動脈硬化性疾患、肥満症、メタボリックシンドロームのような慢性疾患との関連も指摘されており、技術的要因も含め更なる検討を要すると思われる。

LAL test を臨床に応用する試みは古くから続けられ、1960 年代より、Levin や Fine, Cooperstock らにより血中エンドトキシンの測定と臨床的意義に関する検討が開始された。最初に解決しなければならない問題は、LAL の酵素反応を妨害するさまざまな干渉因子をあらかじめ不活化することであり、有機溶媒、酸処理、希釈加熱法などの種々の前処理法ならびに測定法 (ゲル化、定量法) が開発された^{1,15)}。わが国においては、1985 年に LAL test (合成基質法) と過塩素酸 (PCA) 前処理による血中エンドトキシンの高感度測定がはじめて保険適用され、望月らは重症感染症の重篤さや病態を把握するうえで極めて意義の大きなものであると指摘している^{3,23)}。その後、エンドトキシン特異的 LAL test を用いた合成基質法および比濁法によるカイネティック法が本邦で開発され、より簡便で迅速な検査システム (いずれも体外診断用医薬品) へと発展を遂げた。現在では、比濁時間分析法のみが利用可能 (検査実施は本邦のみ) であるが、臨床的感度が低く、保険請求上同一区分であるプロカルシトニンのほうが有用とされる。表 2 にこれまで開発された血中エンドトキシン測定法をまとめて示すが¹⁵⁻¹⁹⁾ グラム陰性菌敗血症の早期診断・治療に貢献するには、解決すべき課題は少なくない。その後、Shimizu らにより LAL をベースとする超高感度エンドトキシン測定法 (endotoxin scattering photometry : ESP 法) が考案され、従来まで検出できないレベルの測定が可能となった

表 2 LAL test による血中エンドトキシン測定法

原材料	反応系に 関与する成分	天然/遺伝子 組み換え	エンドトキシン に対する特異性	方法	試料	抽出法/前処理法	文献	出版年		
LAL (Limulus ame- boocyte lysate)	Extracts of blood cells (amoebocyte) Purified fractions		Non-specific	Gel-clot	Plasma	Chloroform	Levin J ⁽⁵⁾	1970		
			Non-specific	Gel-clot	Plasma	Acetic acid	Reinhold RB ⁽¹⁵⁾	1971		
			Non-specific	Gel-clot	Plasma	Dilution-heating	Cooperstock MS ⁽⁵⁾	1975		
			Non-specific	Turbidimetric	Plasma (PRP*)	Dilution-heating	Fink PC ⁽⁵⁾	1981		
			Non-specific	Chromogenic	Plasma (PRP)	PCA	Tamura H ⁽⁶⁾	1982		
			Non-specific	Nephelometric/ Chromogenic	Plasma (PRP)	Dilution-heating	Pearson FC ⁽⁵⁾	1985		
			Non-specific	Chromogenic	Plasma (PRP)	Chloroform/Dilution-heating/PCA	Obayashi T ⁽⁷⁾	1984		
			Specific	Chromogenic	Plasma (PRP)	PCA	Obayashi T ⁽⁵⁾	1985		
			Non-specific	Chromogenic	Plasma (PRP)	Dilution-heating	Dolan SA ⁽⁵⁾	1987		
			Non-specific	Chromogenic	Plasma (PRP)	Dilution-heating	van Deventer SJH ⁽⁵⁾	1987		
			Non-specific	Chromogenic	Plasma (PRP)	Dilution-heating/Trifluoroacetic acid/Chloroform	Roth RI ⁽⁵⁾	1990		
			Specific	Chromogenic	Whole blood	Nitrate-detergent	Tamura H ⁽⁵⁾	1991		
			Specific	Chromogenic	Plasma (PRP)	New PCA	Inada K ⁽⁸⁾	1991		
			Specific	Turbidimetric	Plasma (PRP)	Dilution-heating/detergent	Kabayashi J ⁽⁹⁾	1991		
			Specific	Chromogenic	Plasma (PRP)	KOH-detergent	Tamura H ⁽⁵⁾	1992		
			Specific	Turbidimetric/ ESP**	Plasma (PRP)	Dilution-heating	Shimizu T ⁽²⁰⁾	2013		
			Coagulation enzymes (LAL)	Factor C	Recombinant	Specific (Fluorometric)	Chromogenic	No published paper	Ding JL ⁽²¹⁾	2001
				Factor C & B, pro-CE		Specific	Chromogenic		Mizunuma H ⁽²²⁾	2017

*PRP : Platelet Rich Plasma, **ESP : Endotoxin Scattering Photometry

が、未承認、保険適用外のため、大規模なコホート研究や臨床試験が望まれる²⁰⁾。また、遺伝子組換え LAL 試薬については、Ding らに続き、筆者らも 2000 年代中頃から検討を重ねてきたが、現在リコンビナント C 因子のみを用いるシンプルな測定系とすべてのリコンビナント凝固因子 (C 因子, B 因子, proCE) の再構成系の 2 種類が開発・市販されている^{21,22)}。いずれも LAL test の代替法 (公定法) としての位置づけにあるが、臨床応用に関しては今後の検討が待たれるところである。

2-2. 血中エンドトキシン測定の際に考慮すべき重要な要因

LAL を用いるエンドトキシン定量法は、LAL 凝固系の活性化能を指標としたエンドトキシン分子の生物活性に基づく間接的測定法であり、前述したように、lipid A を構成する脂肪酸を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で分離後に物理化学的に検出する直接的測定法とは明確に区別する必要がある。両者の感度は LAL test のほうが格段に優れており、血中に存在する pg オーダーの極微量のエンドトキシン測定には物理化学的測定法では太刀打ちできない。一方、試料にエンドトキシンを添加して回収率を検証する際に、回収率に影響を与える要因が多々存在するので注意を払う必要がある。作用機序別に以下の 3 種に分けられる。

1. アナライトであるエンドトキシンの分子構造が変化するか、もしくは修飾を受け、反応性に影響を与える場合 (A)
2. LAL の反応系 (セリンプロテアーゼ前駆体か活性化型セリンプロテアーゼ) に直接作用する場合 (B)
3. 生成したプロダクト (ゲル化および比濁法: 不溶性コアギュリングまたはコアギュリン粒子; 比色法: 遊離のパラニトロアニリンまたは蛍光の 4-メチルクマリンなど) の安定性やシグナル強度に影響する場合 (C)

リムルス反応は、ヒトの血液凝固系活性化機序と類似した一連の酵素反応であり、反応温度, pH, イオン強度などに加え、被検試料またはそれに共存するタンパク質分解酵素やインヒビター, 金属イオン, タンパク質変性剤などがしばしばリムルス反応を阻害あるいは促進する (B)。また、蛍光基質の場合、キノリン誘導体のような薬物により蛍光強度の低下が生じる場合があり (C)、このようなクエンチングと薬物の構造要因についても事前に検証するのが望ましい。反応干渉因子を除去または不活化する際に、最も厄介なのが (A) であり、被検試料または共存物質がエンドトキシンの物性を変化させ、リムルス反応の活性化に影響を及ぼす場合あるいは被検試料または共存物質がエンドトキシンの存在様式を変化させ、リムルス反応の活性化に影響を及ぼす場合 (塩基性タンパク質, 塩基性ペプチド, 両親媒性ペプチドなど)、

acyloxyacyl hydrolase (AOAH) による lipid A アシル鎖の加水分解などがあげられる^{24,25)}。また、会合体 (高分子ミセル) を形成したエンドトキシン分子は高い LAL 活性化能を有し、界面活性剤などで乖離したエンドトキシン分子は LAL 活性化能が失われるため、しばしば偽陰性の原因となる。なかでも胆汁酸のような界面活性作用を有する生体成分の影響によるエンドトキシン分子の乖離やエンドトキシン結合タンパク質との結合が引き起こすマスキング (偽陰性) など、LAL test のデータ解釈には注意すべき点が少なくない²⁶⁾。

さらに、測定結果に及ぼす影響として、異なる操作段階における以下の 3 つの要因があげられ、いずれも偽陰性または偽陽性の原因になり得る。

1. 試料採取と保存法 (血漿・血清/保存温度・時間)
2. 前処理法 (分離/非分離, 加熱/非加熱, 希釈/酸・アルカリ)
3. 測定試薬・測定法 (ゲル化/比色法, エンドトキシン特異的/非特異的, エンドポイント/カイネティクス, 天然/遺伝子組み換え)

その他に、使用器具類, 測定環境, 手技などがもたらすエンドトキシン汚染も異常値や偽陽性の原因となるが、上記要因のなかでは、3 の測定試薬 (LAL の特異性; β -グルカンに対する反応性) ならびに測定法 (反応時に生じる濁りや着色) が原因でしばしば偽陽性が生じるため注意が必要である。

3. 敗血症とエンドトキシン血症 (endotoxemia)

LAL test は、培養法に代わる迅速検査法として、緊急度や重症度の高い敗血症の早期診断や効果的な治療法の選択に役立てることが期待されている。1970 年代後半より、玉熊らを中心に、微量のエンドトキシンの生体作用、バクテリアルトランスロケーションの解明とあわせ、LAL test 陽性 (エンドトキシン血症, endotoxemia) の臨床的意義に関する議論が積み重ねられてきた。Yoshida らは、重篤な血液疾患を対象に菌血症とエンドトキシン血症の相関および予後との関連性についてエンドトキシン特異的 LAL 試薬を用いて検討した。その結果、菌血症の 70% がエンドトキシン血症であり、エンドトキシン血症の 40% は血培陰性であることが判明し、両者とも高いショック合併率と死亡率 (>40%) を示した²⁷⁾。一方、菌血症とエンドトキシン血症に関する臨床研究のメタアナリシスが、Hurley らにより 2015 年に報告された。2009 年の横断的レビューに続く臨床的に貴重な解析結果であるが、グラム陰性菌感染例以外のエンドトキシン血症 (両者間の不一致例) が顕著である。さまざまな要因があげられるが、使用した LAL 試薬がエンドトキシンと同様に β -グルカンにも反応することが主たる原因と考えられる。本レビューでは LAL 試薬の感度と測定法 (ゲル化法/合成基質法) に言及しているもの

表 3 血中 (1→3)- β -D-グルカン測定法の臨床的有用性

臨床論文	感度	特異度	エビデンス		β グルカン 定量キット	文献
Obayashi, et al.(Lancet, 1995)	90%	100%	多施設臨床試験	日本	Fungitec G-test	31
Ostrosky, et al.(CID, 2005)	70%	87%	多施設臨床試験	米国	Fungitell	32
Lu, et al.(Intern Med, 2011)	76%	85%	抽出 論文数 メタ解析 (meta-analysis)*		13 Fungitell (9/13)	6
Karageorgopoulos, et al.(CID, 2011)	77%	85%			23 Fungitell (10/23)	6
Onishi, et al.(J Clin Microbiol, 2012)	80%	82%			36 Fungitec G-test (7/23)	6
					WAKO (2/13)	
					WAKO (5/23)	
					GKT-5M (China) (1/23)	
					Fungitell (17/36)	
					Fungitec G-test (9/36)	
					WAKO (6/36)	
					GKT-5M (China) (3/36)	

*Multicenter cohort study, Multicenter case-control study, Prospective cohort study, Prospective case-control study, Retrospective cohort study, Retrospective case-control study, etc.

の、反応特異性や血液前処理法に関しては考慮に入れない²⁸⁾。とくに欧米においては、LAL test で検出されるエンドトキシン血症の評価は、エンドトキシンに対する特異性が担保されていない報告が多数を占め、今後とも注意が必要である。さらに、循環血中の極微量のエンドトキシンは、フリーの状態と白血球・血小板に吸着した状態で混在しており、現行のLAL test では、検出感度、診断精度が不足しており、臨床的重要性を欠く場合が多い。今後はエンドトキシンの選択的吸着剤（不溶性担体、ビーズ）にエンドトキシンを結合させた後、干渉因子を洗浄除去、LAL 試薬で測定する analyte trapping により、極微量のエンドトキシンを濃縮して測定する改良法など更なる検討および臨床研究が望まれる。

一方、近年、ごく微量のエンドトキシンの長期的な暴露が、動脈硬化、2型糖尿病など種々の生活習慣病を発症増悪するリスク要因と考えられ、慢性炎症 (chronic low grade inflammation) との関連が注目されるようになった。これと関連し、metabolic endotoxemia (ME) という概念が提唱されてきた²⁹⁾、肥満、非アルコール性脂肪肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis : NASH)、慢性炎症と ME との関連については明確な科学的根拠に乏しい。Ramendra らは、腸管のバリア機能の破壊 (leaky gut syndrome : LGS) が、バクテリアトランスロケーションに起因する慢性炎症や多様な疾患の引き金になると考え、そのリスク評価に LAL test を用いた新たなアプローチ、バイオマーカーの創出に向けた検討を進めている³⁰⁾。このように、エンドトキシンは、感染に伴う重篤な臓器障害を引き起こされる敗血症だけでなく、感染を伴わない慢性炎症 (生活習慣病、がん) においても、重要な役割を果たしていると考えられ、LAL をベースと

したより高感度かつ高精度のエンドトキシン測定プラットフォームの再構築と新たな臨床展開が期待される。

4. わが国で開発された血中 β -グルカン測定法と国際化

これまで述べたように、LAL を用いたエンドトキシン測定法は1980年以降大きな進歩を遂げたが、臨床応用では、開発から半世紀経った今も臨床現場で求められるニーズを満たしていると言えなく、とくに欧米においては日常の補助診断や臨床試験に用いられることはまれである。これに対して、同じLAL凝固因子を利用する血中 β -グルカン測定法は、世界に先駆けわが国で開発された深在性真菌症の体外診断薬で、多施設共同臨床研究の成績がObayashi らにより Lancet 誌に掲載されると、いち早く欧米の臨床家の注目を集めることとなった³¹⁾。1995年には本邦における保険適用が開始され、米国マサチューセッツ州 Associates of Cape Cod 社に技術移管された後に、北米における多施設共同臨床研究の成果をもとに、2004年にFDA認可を取得した。その後、米欧の各種診療ガイドラインに掲載されるとともに、深在性真菌症 (カリニ肺炎含む) の早期診断と治療、抗真菌薬の臨床開発ならびにそれらのグローバル展開に大きく貢献している³²⁾。表3は、ファンギテック G テスト (日本) と Fungitell (米国) の臨床的感度と特異度、さらには、これらの診断薬を用いて実施された臨床成績のメタ解析 (3報) の結果であるが、感度76%から特異度85.3%と良好な診断精度を示している⁶⁾。また、陰性予測率 (NPV) の高さも本法の大きな特徴であり、不適切な抗菌薬投与を控えることで医療費の抑制が期待できる。このように、血中 β -グルカンは深在性真菌症の早期診

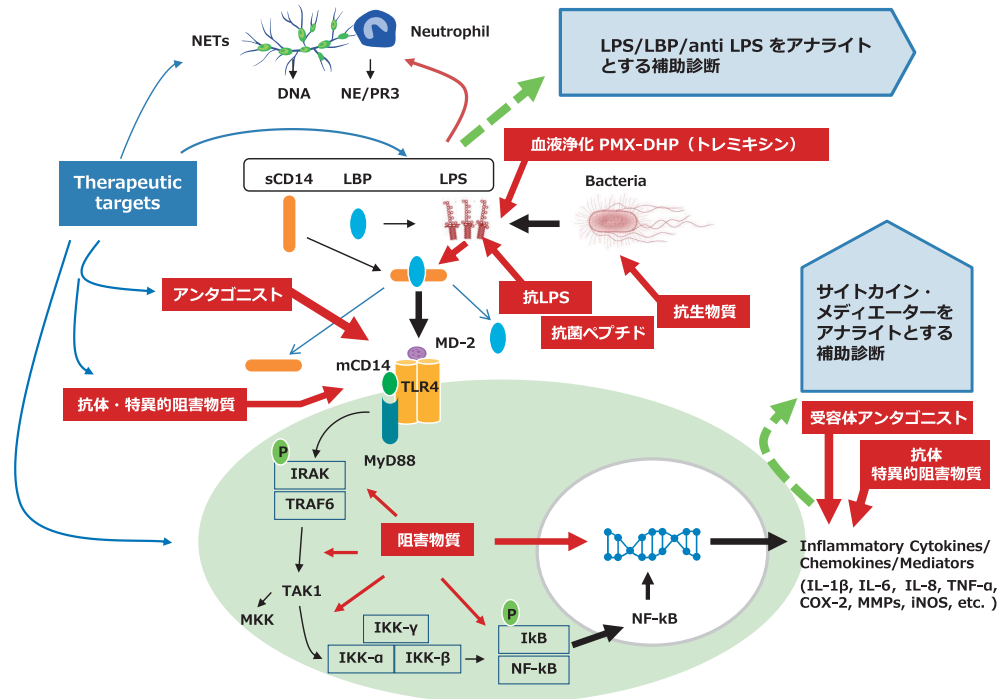


図 2 抗エンドトキシンおよび抗サイトカインに基づく敗血症の治療戦略とバイオマーカー

断と治療効果の判定に加え、抗菌薬の適正使用、スチュワードシッププログラムの推進に寄与している。

5. 敗血症治療薬開発へのバイオマーカーの活用

敗血症の制御には、感染の開始から炎症の引き金となる菌体の増殖を抑えつつエンドトキシンなどの菌体成分をいかに効率よく中和または吸着（体外循環）するか、エンドトキシン受容体である TLR4 との結合をいかに抑制し（アンタゴニスト）、細胞内の情報伝達機構をいかに制御するか、毒性の発現を抑えつつどのように安全性を担保するか、治療有効濃度をいかに維持するかなどがポイントになる。エンドトキシンをターゲットとする創薬研究と臨床試験は、SIRS という概念が提唱された 1990 年代の初めに米国で試みられた。抗 LPS 抗体 (XOMA, Centocor) の開発に始まり、TLR4 アンタゴニスト (Eritoran (E5564), Eisai), 細胞内情報伝達阻害薬 TAK-242 (Takeda), 抗血栓作用を有する組換え型ヒト活性化プロテイン C 製剤 (recombinant activated protein C : rAPC (Xigris), Eli Lilly) などの大型新薬候補が次から次へと登場したが、いずれも開発を断念したり、大規模無作為比較試験 (randomized controlled trial : RCT) の結果を受け市場から撤退した。適切なバイオマーカーを有効に活用できなかったことも要因の一つであり、重症敗血症および敗血症性ショックの治療戦略ならびに補助診断に役立つと期待されるバイオマーカー (アナライト) を図 2 に示す。

バイオマーカーのバリデーションとその情報に基づく適切な患者の確保 (accrual) が新薬開発の成否を左右する重要な要素であるが、上記の抗 LPS 抗体においては、LAL test (エンドトキシン非特異的) を用いて選定された治療群にエンドトキシン血症の偽陽性例 (β -グルカン高値の深在性真菌症) が含まれていたことも治療薬が奏功しなかった原因のひとつと推定される。莫大な費用を要する新薬開発において、バイオマーカーが重要な役割を果たすことは広く認識されており、的確なデザインのもと、臨床開発のスピードアップ、コスト削減に寄与することが可能となる。既知のバイオマーカーの有用性に加え、新たな視点でのバイオマーカー開発 (がんゲノム医療におけるコンパニオン診断の観点)、敗血症病態のイメージング手法など革新的技術を活用した診断薬の臨床試験を治療介入とともに展開していくことが、ブレイクスルーにつながる大きなポイントと考えられる。

おわりに

内科、外科、救命救急・集中治療領域だけでなく、今般の新型コロナウイルス感染症においても、血管障害と血栓形成の抑制など敗血症対策は極めて重要な課題である。敗血症は、院内死亡率が 30~60%にも達するため、バイオマーカーを用いる早期の補助診断と治療開始の時期が生死に影響する。敗血症に対するこれまでの創薬研究戦略の行き詰まりを打破するためには、図 2 を考慮しつつ新しい視点での開発戦略、治療の最適化のためのバイオマーカー探索が求められる。たとえば、長岡らの研

究グループによる抗菌ペプチドの多様性に関する最新の知見 (pyroptosis, neutrophil extracellular traps (NETs), ectosome)³³⁾やゲノム情報とバイオインフォマティクスならびに人工知能 (artificial intelligence : AI) を融合したイノベティブかつチャレンジングなアプローチと実践が待たれるところである。

文 献

- 1) Levin J, Bang FB : The role of endotoxin in the extracellular coagulation of Limulus blood. *Bull Johns Hopkins Hosp* 115 : 265-274, 1964
- 2) Harada T, Morita T, Iwanaga S, et al. : A new chromogenic substrate method for assay of bacterial endotoxins using Limulus hemocyte lysate. *Prog Clin Biol Res* 29 : 209-220, 1979
- 3) 大林民典, 田村弘志, 田中重則, 他 : 血中エンドトキシン測定のための新しい血液前処理法 (過塩素酸法) とその臨床的応用. *臨床病理* 31 : 285-288, 1983
- 4) Morita T, Tanaka S, Nakamura T, et al. : A new (1→3)- β -D-glucan-mediated coagulation pathway found in Limulus amoebocytes. *FEBS Lett* 129 : 318-321, 1981
- 5) Obayashi, T, Tamura H, Tanaka S, et al. : A new chromogenic endotoxin-specific assay using recombinant limulus coagulation enzymes and its clinical applications. *Clin Chim Acta* 149 : 55-65, 1985
- 6) 田村弘志 : (1→3)- β -D-グルカン測定法の進歩と将来展望. “ β グルカンの基礎研究と応用・利用の動向”大野尚仁 監修, シーエムシー出版, 2018, pp113-128
- 7) Levin J, Poore TE, Zauber NP, et al. : Detection of endotoxin in the blood of patients with sepsis due to gram-negative bacteria. *N Engl J Med* 283 : 1313-1316, 1970
- 8) Maitra SK, Schotz MC, Yoshikawa TT, et al. : Determination of lipid A and endotoxin in serum by mass spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75 : 3993-3997, 1978
- 9) Allan E, Poxton IR, Barclay GR : Anti-bacteroides lipopolysaccharide IgG levels in healthy adults and sepsis patients. *FEMS Immunol Med Microbiol* 11 : 5-12, 1995
- 10) Opal SM, Scannon PJ, Vincent JL, et al. : Relationship between plasma levels of lipopolysaccharide (LPS) and LPS-binding protein in patients with severe sepsis and septic shock. *J Infect Dis* 180 : 1584-1589, 1999
- 11) Marshall JC, Walker PM, Foster DM, et al. : Measurement of endotoxin activity in critically ill patients using whole blood neutrophil dependent chemiluminescence. *Crit Care* 6 : 342-348, 2002
- 12) Hoffmann S, Peterbauer A, Schindler S, et al. : International validation of novel pyrogen tests based on human monocytoid cells. *J Immunol Methods* 298 : 161-173, 2005
- 13) 西田正人, 畑尾忠彦, 比企直樹, 他 : TLR4 強制発現細胞による血中エンドトキシン生物活性測定を試み (Lipopolysaccharide Biological Activity Assay (LBA)). *エンドトキシン研* 10 : 126-132, 2007
- 14) Munford RS : Endotoxemia—Menace, Marker, or Mistake? *J Leukoc Biol* 100 : 687-698, 2016
- 15) Novitsky TJ : Limulus amoebocyte lysate (LAL) detection of endotoxin in human blood. *J Endotoxin Res* 1 : 253-263, 1994
- 16) Tamura H, Obayashi T, Takagi K, et al. : Perchloric acid treatment of human blood for quantitative endotoxin assay using synthetic chromogenic substrate for horseshoe crab clotting enzyme. *Thromb Res* 27 : 51-57, 1982
- 17) Obayashi T : Addition of perchloric acid to blood samples for colorimetric limulus test using chromogenic substrate : comparison with conventional procedures and clinical applications. *J Lab Clin Med* 104 : 321-330, 1984
- 18) Inada K, Endo S, Takahashi K, et al. : Establishment of a new perchloric acid treatment method to allow determination of the total endotoxin content in human plasma by the limulus test and clinical application. *Microbiol Immunol* 35 : 303-314, 1991
- 19) Kambayashi J, Yokota M, Sakon M, et al. : A novel endotoxin-specific assay by turbidimetry with limulus amoebocyte lysate containing beta-glucan. *J Biochem Biophys Methods* 22 : 93-100, 1991
- 20) Shimizu T, Obata T, Sonoda H, et al. : Diagnostic potential of endotoxin scattering photometry for sepsis and septic shock. *Shock* 40 : 504-511, 2013
- 21) Ding JL, Ho B : A new era in pyrogen testing. *Trends Biotechnol* 19 : 277-281, 2001
- 22) Mizumura H, Ogura N, Aketagawa J, et al. : Genetic engineering approach to develop next-generation reagents for endotoxin quantification. *Innate Immun* 23 : 136-146, 2017
- 23) 望月英隆, 小野聡, 青笹季文, 他 : エンドトキシンの測定法をめぐる問題点と測定の意義. *救急医* 14 : 1421-1426, 1990
- 24) Tamura H, Reich J, Nagaoka I : Bacterial endotoxin assays relevant to host defense peptides. *Juntendo Med J* 62 : 132-140, 2016
- 25) 田村弘志 : バイオ医薬品, とくに抗体医薬におけるエンドトキシン試験. *Pharm Stage* 19 : 32-39, 2020
- 26) Reich J, Tamura H, Nagaoka I, et al. : Investigation of the kinetics and mechanism of low endotoxin recovery in a matrix for biopharmaceutical drug products. *Biologicals* 53 : 1-9, 2018
- 27) Yoshida M, Obayashi T, Tamura H, et al. : Diagnostic and prognostic significance of plasma endotoxin determination in febrile patients with haematological malignancy.

- nancies. *Eur J Cancer* 30 : 145-147, 1994
- 28) Hurley JC, Nowak P, Öhrmalm L, et al. : Endotoxemia as a diagnostic tool for patients with suspected bacteremia caused by gram-negative organisms : a meta-analysis of 4 decades of studies. *J Clin Microbiol* 53 : 1183-1191, 2015
- 29) Boutagy NE, McMillan RP, Frisard MI, et al. : Metabolic endotoxemia with obesity : is it real and is it relevant? *Biochimie* 124 : 11-20, 2016
- 30) Ramendra R, Isnard S, Mehraj V, et al. : Circulating LPS and (1→3)-β-D-Glucan : a folie à deux contributing to HIV-associated immune activation. *Front Immunol* 10 : 465, 2019 (doi : 10.3389/fimmu.2019.00465)
- 31) Obayashi T, Yoshida M, Mori T, et al. : Plasma (1→3)-beta-D-glucan measurement in diagnosis of invasive deep mycosis and fungal febrile episodes. *Lancet* 345 : 17-20, 1995
- 32) Ostrosky-Zeher, L, Alexander BD, Kett DH, et al. : Multicenter clinical evaluation of the (1→3) beta-D-glucan assay as an aid to diagnosis of fungal infections in humans. *Clin Infect Dis* 41 : 654-659, 2005
- 33) Kumagai Y, Murakami T, Kuwahara-Arai, et al. : Antimicrobial peptide LL-37 ameliorates a murine sepsis model via the induction of microvesicle release from neutrophils. *Innate Immun* 1753425920936754, 2020