

造血器悪性疾患に合併した感染症における endotoxin specific assay (endospecky) の臨床的意義

吉村 輝夫・上田 孝典・岩崎 博道・神谷 健一
津谷 寛・内田 千彦・中村 徹
福井医科大学第一内科*

(平成2年5月7日受付・平成2年6月20日受理)

当科に入院した19名の造血器悪性疾患に伴った21例の感染症につき、endotoxin (Et) に特異性の高い endotoxin specific assay (endospecky) を行い、Et 値を経時的に測定した。造血器感染症の52%の症例が Et 値陽性 (>3 pg/ml) を示した。経時的測定では、Et 値は抗生剤投与前、すでに高値を示し、投与後4時間で最高値に達し、以後漸減した。また、Et 値10 pg/ml 以上の強陽性例ではグラム陰性菌感染症が強く示唆された。したがって、Et 値の測定は、グラム陰性菌感染症の診断および、使用抗生剤の有効性を判定する上で有用な方法であり、経時的測定には抗生剤投与前、4時間後と解熱後の3回測定が適当であると考えられた。

Key words : endotoxin, endotoxin specific assay, endospecky, 造血器腫瘍, 感染症

Endotoxin (Et) はグラム陰性桿菌の細胞壁外膜に存在するリポ多糖類で、グラム陰性菌感染症において経過中に、あるいは感受性抗生剤が細菌に作用して溶菌する際に血中に放出され、発熱、ショック、播種性血管内凝固症候群(DIC)、成人呼吸窮迫症候群(ARDS)、多臓器不全(MOF)などの生物活性を生ずることが知られている^{1,2)}。その測定法には、Et がカプトガニ血球を凝集させることから、従来カプトガニ血球抽出液 (lysate) を用いたリムステストが汎用されてきた³⁻⁵⁾。しかし、このテストは、ゲル化法・合成基質法とも lysate 全体を用いるために、凝固因子の1つである factor G を介して^{6,7)}、真菌多糖・レンチナン・クレステンヤ、セルロース系透析膜灌流液に含まれる(1→3)-β-D-グルカンおよびその類似物質とも反応を起こすため陽性所見が見られ、その特異性が問題となっていた^{8,9)}。近年、偽陽性の原因となっている factor G を lysate から分離除去し、Et によって活性化される経路のみを再構成し、これに発色合成基質 (Boc-Leu-Gly-Arg-pNA) を加えた Et に特異的な比色定量法 (endotoxin specific assay) が開発された^{10,11)}。一方、造血器悪性疾患においては、特に化学療法後の汎血球減少時には宿主の抵抗力の低下により容易に感染に罹患し、septic shock などの重篤な病態を引き起こすことが考えられ¹²⁾。感染症の早期診断、治療効果の確実な判定が重要である。我々は、新しく開発された本 Et 測定法を用い、血液悪性疾患に合併した感染症において Et 定量を行い、その診断、治療効果判定に対する意義について若干の検

討を行った。

I. 対象と方法

(1) 対象

昭和63年3月より、同年11月までの9か月間に造血器悪性疾患にて当科入院した急性非リンパ性白血病12名、急性リンパ性白血病2名、悪性リンパ腫4名、多発性骨髄腫1名の計19名のべ21症例である。加えて、正常対象者6名についても検討した。

(2) Et 測定法

対象疾患患者が原疾患の化学療法後において感染を疑わせる38℃以上の発熱を生じた場合に抗生剤投与を開始した。抗生剤の種類は、主治医の判断による。投与前、投与直後、以後投与後72時間まで経時的に Et-free シリンジでヘパリン加採血し、ただちに3,000 rpm 40秒遠沈にて多血小板血漿を分離、凍結保存して Et 測定に供じた。測定には、生化学工業社の endotoxin 測定キット、endotoxin specific assay (endospecky) を用いた。抗生剤有効性の判定は、高久の判定基準¹³⁾に準じた。

II. 結果

(1) 感染症の内訳

21症例における発熱の原因としては、胸部X線、理学所見より肺炎と診断した者4例。血液培養より菌が検出され敗血症とした者2例で、その他15例は起炎菌、focusとも明らかにし得なかったが、そのうち臨床

症状より sepsis の疑われた者 6 例, さらに 2 例は, 原疾患による発熱が示唆された。

起炎菌に関しては, 菌が同定された者はグラム陽性菌 (表皮ブ菌), グラム陰性菌 (大腸菌) それぞれ 1 例ずつの 2 例にすぎなかった。

(2) 抗生剤の有効性

assay 期間中に使用した抗生剤有効例は 8 例 (内訳は急性非リンパ性白血病 7 例, 急性リンパ性白血病 1 例), 無効例は 13 例 (内訳は急性非リンパ性白血病 6 例, 急性リンパ性白血病 2 例, 悪性リンパ腫 4 例, 多発性骨髄腫 1 例) であった。

(3) Et 値の測定結果

正常対象 6 名の Et 値は, 0.88 ± 0.33 pg/ml (mean \pm SD) であり, 全例本 assay で正常値とされている 3 pg

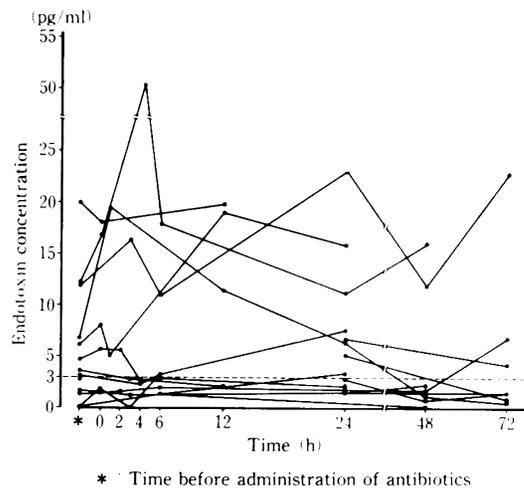


Fig. 1. Time course of plasma endotoxin levels in 21 cases

/ml¹¹以下を満足した。全症例の Et 測定値の推移を Fig. 1 に示す。抗生剤投与前の Et 高値のものは, 抗生剤投与後も高値が持続する傾向がみられた。

経過中陽性値を示した症例の各採血時間での平均値をみると (Fig. 2), 抗生剤投与前値は, 8.1 pg/ml とすでに異常値を示し, 投与後漸増し, 4 時間にてピーク値 20 pg/ml に達したが, 以後は減少傾向が認められた。

全症例中, Et 値が 3 pg/ml より高値を示す陽性群は 11 例 (52%) 存在し, 3 pg/ml 以下の陰性群は 10 例 (48%) であった。さらに Et 値陽性群のうち, 抗生剤有効例は 4 例 (36%), 無効例は 7 例 (64%), 陰性群では, 抗生剤有効例 4 例 (40%), 無効例は 6 例 (60%) であった (Table 1)。

(4) 症例

Sepsis が疑われ Et 値を follow しつつ抗生剤を使用し, 解熱をみた 2 例を呈示する。

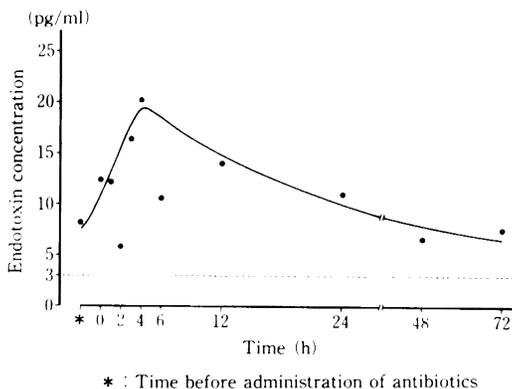
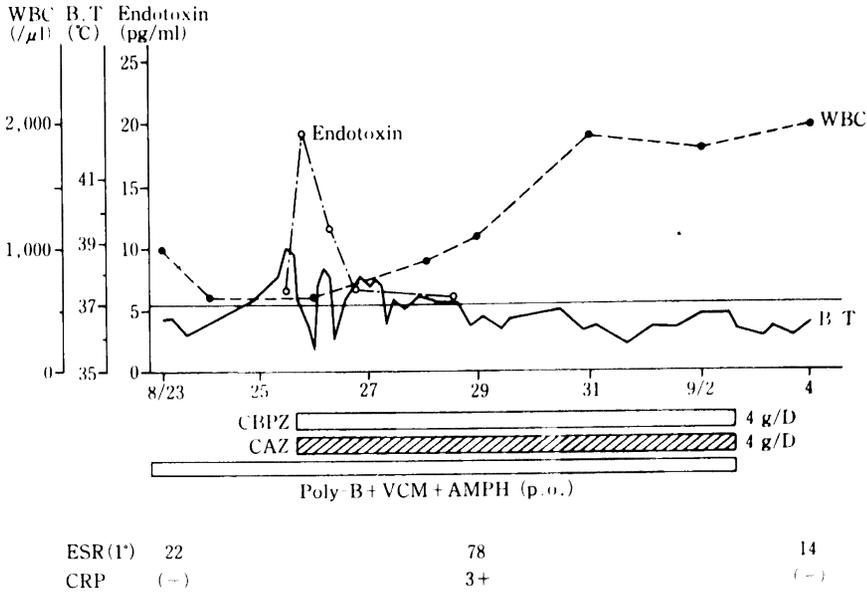


Fig. 2. Time course of mean plasma endotoxin levels in the endotoxin positive patient group

Table 1. Comparison of the chemotherapeutic effect between endotoxin-positive and -negative groups

	Total (%)	Response to chemotherapy	
		Effective (%)	Ineffective (%)
*Et-positive (>3 pg/ml)	11 (100)	4 (36)	7 (64)
*Et-negative (\leq 3 pg/ml)	10 (100)	4 (40)	6 (60)
Total	21 (100)	8 (38)	13 (62)

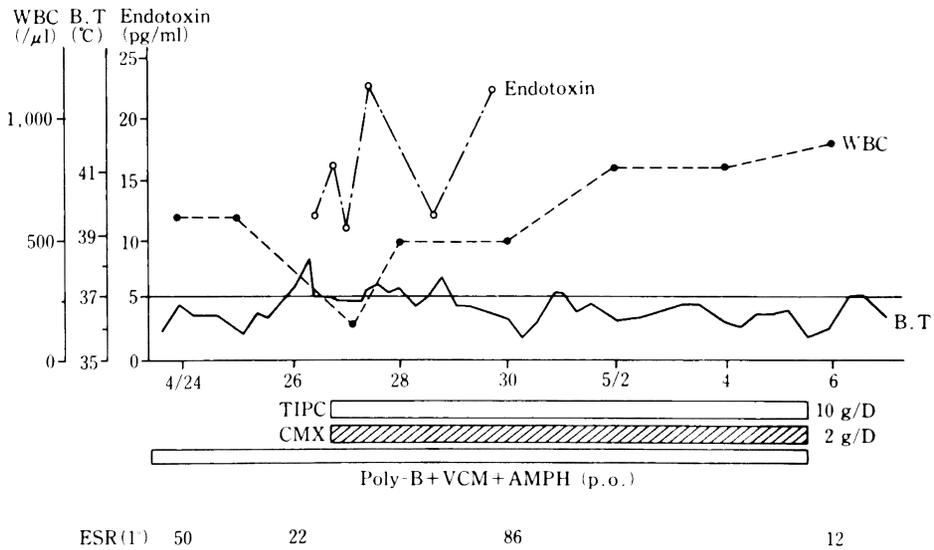
*Et=endotoxin



K Y 55 F AML (M3)

CBPZ: cefbuparazone, CAZ: ceftazidime, VCM: vancomycin, AMPH: amphotericin

Fig. 3. Case 1, 55 y.o. female, APL, clinical diagnosis: sepsis. In this case plasma endotoxin levels correlated with the therapeutic effect



M.K. 55 F ALL (L1)

TIPC: ticarcillin, CMX: cefmenoxime, VCM: vancomycin, AMPH: amphotericin

Fig. 4. Case 2, 55 y.o. female, ALL, clinical diagnosis: sepsis. In this case fever decreased after administration of antibiotics, but plasma endotoxin levels remained persistently high

第1例 (Fig. 3) は、急性前骨髄球性白血病, 55歳女性。化学療法後、汎血球減少が認められ、抗生剤経口投与による腸内殺菌を開始した。化学療法終了後9日目に血小板数 $2 \times 10^4/\mu\text{l}$ と減少し、その2日後に白血球数 $600/\mu\text{l}$ と nadir に達し、翌日より悪寒、戦慄を伴う最高 38.9°C の発熱が認められた。ただちに、抗生剤 (cefbuperazone 4 g/日・ceftazidime 4 g/日) を開始したが、その時の Et 値は、抗生剤投与前値が 6.8 pg/ml 、投与後1時間で 19.2 pg/ml と最高値を示し、以後解熱とともに Et 値は減少を示した。なお、肝機能障害は認められず、喀痰中細菌は常在菌のみ、尿・血液からは菌は検出されず、X線像や理学所見より発熱の focus を見出し得なかったが、強い悪寒、戦慄を伴う spike fever を繰り返す症状よりグラム陰性菌感染による sepsis が示唆された症例である。

第2例 (Fig. 4) は、急性リンパ性白血病, 55歳女性。第1例と同様に化学療法後の汎血球減少時に 38°C 台の発熱をきたし、抗生剤投与 (ticarcillin 10 g/日, cefmenoxime 2 g/日) を開始し、治療に反応したが解熱後も Et 値は高値を示し、このように治療効果と Et 値との間に有意な相関の認められない例も存在した。なお、本例も肝機能は正常であった。

III. 考 察

正常対象に対し行った endospecy では、その値は $0.88 \pm 0.33 \text{ pg/ml}$ (mean \pm SD) であり、全例従来正常範囲とされている 3 pg/ml 以下に含まれ、この意味では特異性の高い検査法であると考えられる。

感染症発症後、Et 値は、52% の症例において陽性値を示した。抗生剤投与との相関をみると、Et 値は投与前においては陽性値ながら投与後に比較すると低値を示し、以後漸増し、投与後4時間にて最高値に達し、以後は減少傾向が認められた。これは、抗生剤が血中に投与された後、感染病巣に移行して溶菌が起り、Et が血中に放出される推移と相関するものと考えられる。しかし一方では、症例によって抗生剤投与前でもすでに著高を示す例もみられ、また、抗生剤投与後 Et 値のピークが遅延したり、長時間 Et 値が高値を持続する例も存在するなど多様性が認められた。このことは、網内系の機能を含む宿主の条件の差、抗生剤間の組織移行性の差や、菌によっては抗生剤と接触後、溶菌するまでの時間に差があるなど、Et 値の推移に関係する因子の多様性を反映しているものと考えられる。これらの所見を考慮して Et 値の測定を行わなければならないが、今回の結果より Et 血症の有無および使用抗生剤の有効性を推測するためには、Et 値の測定を少なくとも抗生剤投与前、投与後4時間と解熱後の3

点で行い、その値を比較することが適当と考えられた。

原因菌種別における、Et 値陽性率および使用抗生剤による効果は、菌検出率が低いため明らかにし得なかった。したがって、現状では、陽性例全体についてみると対象が血液悪性疾患治療後の immunocompromized host であるため重複感染の可能性も考えられ、さらに起炎菌の同定を厳密に試みるなど検討を重ね、その意義を明らかにする必要があるものと考えられた。ただし、Et 値が 10 pg/ml 以上の強陽性例5例においては、そのうち4例が、症状、薬剤感受性より、グラム陰性菌が主体の感染と考えられ、Et 値の著高例は、グラム陰性菌感染として、これに対する積極的加療を行うことが必要と考えられた。

以上、当科に入院した血液悪性疾患に合併した感染症に抗菌療法を行い、Et 値の推移を検討した。52% の例で Et 値陽性が認められた。その推移は、抗生剤投与前にも高値を認めるも、投与後4時間にて最高値に達し、Et 値 10 pg/ml 以上の強陽性例では、グラム陰性菌感染症としての積極的加療の必要性が強く示唆された。

本論文の要旨は、第36回日本化学療法学会、西日本支部総会において発表した。厚生省がん研究助成菌の援助、endotoxin 測定に援助をいただいた武田薬品工業 K.K. に感謝する。

文 献

- 1) 加納晴三郎, 川崎浩之進, 小川善之, 伊丹孝文: 血中エンドトキシン (エンドトキセミア)。ファルマシア 24: 251~256, 1988
- 2) 中野昌康: エンドトキシン研究の進歩。感染・炎症・免疫 18: 239~249, 1988
- 3) Levin J, Tomasulo P A, Oser R S: Detection of endotoxin in human blood and determination of an inhibitor. J Lab Clin Med 75: 903~911, 1970
- 4) Iwanaga S, Morita T, Harada T, Nakamura S, Niwa M, Takada K, Kimura T, Sakakibara S: Chromogenic substrates for horseshoe crab clotting enzyme. Its application for the assay of bacterial endotoxins. Haemostasis 7: 183~188, 1978
- 5) 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
- 6) 田中重則, 中村隆範, 森田隆司, 岩永貞昭: "Limulus test" の反応機構: 多糖体で活性化される新しい alternative pathway について。第28回毒素シンポジウム予稿集 7~12, 1981
- 7) Morita T, Tanaka S, Nakamura T, Iwanaga S: A new (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan-mediated coagula-

- tion pathway found in *Limulus* amoebocytes. FEBS LETTERS 129: 318-321, 1981
- 8) 久島義昭: エンドトキシンの生物活性とエンドトキシン血症の臨床的意義. Prog Med 7: 1085-1094, 1987
- 9) Yamagami S, Yoshiwara H, Iritani S, Umeda M, Senju M, Kisimoto M, Niwa M, Iwanaga S, Tanaka S: Is an LAL reactive substance contained in the washing solution of unused dialyzer endotoxin? Jpn J Artif Organs 14: 30-33, 1985
- 10) Obayashi T, Tamura H, Tanaka S, Ohki M, Takahashi S, Arai M, Masuda M, Kawai T: A new chromogenic endotoxin specific assay using recombinant limulus coagulation enzymes and its clinical applications. Clinica Chimica Acta 149: 55-65, 1985
- 11) 田中重則: リムルス反応(エンドトキシン検出)の新しい展開. Prog Med 7: 1075-1083, 1987
- 12) 上田孝典, 中村 徹: 感染症の重症度と難治度, 血液内科. 化学療法の領域 4: 13-18, 1988
- 13) 高久史磨, 永井清保, 前川 正, 正岡 徹: 顆粒球減少に伴う感染症に対する抗菌薬の効果判定基準. 臨床血液 25: 588-592, 1984

CLINICAL SIGNIFICANCE OF AN ENDOTOXIN-SPECIFIC ASSAY (ENDOSPECY) FOR DIAGNOSING INFECTIONS IN PATIENTS WITH HEMATOLOGICAL MALIGNANCIES

Teruo Yoshimura, Takanori Ueda, Hiromichi Iwasaki, Ken-ichi Kamiya,
Hiroshi Tsutani, Michihiko Uchida, and Toru Nakamura

First Department of Internal Medicine, Fukui Medical School,
23-3 Shimoaizuki, Matsuoka, Yoshida-gun, Fukui, Japan

Plasma endotoxin levels were determined by means of a newly developed endotoxin-specific assay (endospeccy) in 21 cases of infectious disease in 19 patients with hematological malignancies. Fifty-two percent of the patients proved endotoxin positive (>3 pg/ml). In these patients the plasma endotoxin level, already high before the administration of antibiotics, peaked at 4 after treatment, and gradually decreased thereafter. The high endotoxin levels (more than 10 pg/ml) suggested that Gram-negative bacteria were the main cause of infection. Serial determination of the endotoxin level appears to be useful for establishing a diagnosis of Gram-negative bacterial infection and for evaluating the therapeutic efficacy of the antibiotics administered.