原 著

血液透析患者のエンドトキシン抗体の測定とその臨床的意義

安達 高久 山上 征二 岸本 武利 前川 正信

川村 正喜*

大阪市立大学泌尿器科 PL 病院泌尿器科*

key words : endotoxin antibody, hemodialysis, hemodialysis patient, ELISA, high-flux membrane

〈要旨〉

近年、透析液の細菌やエンドトキシンによる汚染の増強と high-flux 膜の使用により、エンドトキシンのサブユニットやフラグメントが患者血液内に侵入している危険性が指摘されている。そこで著者は、avidin-biotin の強い親和性と抗原抗体反応の特異性を利用した enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法を用いて、透析患者血液中のエンドトキシン抗体を測定した。まず最初に透析液中の細菌の分離・培養と同定、さらにこれより温フェノール法を用いてエンドトキシンの抽出を行った。さらにこの抽出したエンドトキシンと E. coli J-5 のエンドトキシンが、ELISA 法において交差反応を示すことを確認した。次に加熱処理した菌体で免疫した家兎より得た標準エンドトキシン抗体について、immuno-blotting を行い抗体価の確認を行った。さらにこの標準エンドトキシン抗体を用いて ELISA 法による検量線を作製し、抗体陽性の規準を設定した。以上の予備実験に基づいて、透析患者 101 名と健康対照者 21 名について E. coli J-5 のエンドトキシンを抗原として血液中のエンドトキシン抗体を測定した。

結果は、正常対照群では 21 名中 4 名 (19%)、従来の膜を使用した群では 54 名中 14 名 (26%) が抗体陽性であり、一方 high-flux 膜使用患者では 47 名中 28 名 (60%) が抗体陽性であり、 χ^2 (カイ自乗) 検定の結果、前 2 者に比較し有意に高値を示した。この結果は、特に high-flux 膜使用患者において、透析液中のエンドトキシンが血液内に侵入していることを強く示唆するものであった。

Detection of endotoxin antibody in the hemo-dialysis patient and its clinical significance

Takahisa Adachi, Seiji Yamagami, Taketoshi Kishimoto, Masanobu Maekawa, Masaki Kawamura*

Department of Urology, Osaka City University ; Department of Urology, PL Hospital*

Recently, with the frequent use of high-flux membranes, bacterial contamination and endotoxin pollution of the dialysate have become an important issue in hemodialysis (HD), and the hazards of subunits or small fragments of endotoxins passing through the membrane by back diffusion or back filtration from the dialysate into the blood of HD patients have been increasingly discussed. In this study, antibodies against endotoxins in the blood of HD patients were measured by means of the ELISA method, which is more sensitive and specific to endotoxins than conventional methods.

Initially, the bacteria in the dialysate were collected and identified. Endotoxins were subsequently extracted by Westphal's phenol method. Furthermore, cross reactivity between endotoxins from the dialysate bacteria and E. coli J-5 was confirmed by the ELISA method. The titers of the standard anti-endotoxin antibodies obtained from a rabbit immunized by heat-killed bacteria were measured by immunoblotting, and the criterion for antibody positivity was decided on the basis of this result. After these preliminary experiments, the antibodies were measured with E. coli J-5 endotoxins as antigens in 101 HD patients and 21 normal volunteers by means of the ELISA method. As a result, 19% of the healthy controls and 26% of the HD patients using conventional membranes were antibody positive, while 60% of the patients using high-flux membranes were antibody positive.

安達 高久 大阪市立大学泌尿器科 〒545 大阪市阿倍野区旭町 1-5-7 (06-645-2121)

〔受付：平成 2 年 11 月 16 日，受理：平成 3 年 2 月 8 日〕

This value was significantly higher than those of the other two groups. These results strongly suggest that endotoxins in the dialysate may pass through membranes, especially high-flux membranes.

緒言

近年、重曹透析液やブドウ糖含有透析液の普及により透析液の細菌およびエンドトキシンによる汚染の増強が観察され、問題となってきた。さらにエンドトキシンは、種々の条件下において分子量が1万程度のサブユニットに解離するため、これらの低分子エンドトキシンが患者の血液内に侵入している危険性が指摘されている。エンドトキシンは、通常リムルテストという鋭敏で特異性の高いアッセイによって測定される。しかしながら、ここで問題とするエンドトキシンの小さなフラグメントやサブユニットはこれらのアッセイに対し低感度と考えられ¹⁾、また血液中のエンドトキシンの測定には、アンチトロニンIIIや α_2 -プラスミンインヒビターなどのさまざまな反応阻害物質が存在し²⁾、なお多くの問題が残されている。また、TNFやIL-1の誘発によりエンドトキシンの存在を証明する方法もあるが^{3,4)}、これらの方法はエンドトキシンへの特異性に問題がある。そこで今回の実験においては、enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法を使用して、血液透析患者血液中のエンドトキシン抗体を測定し、これらの問題を検討した。

方法

1. 透析液中の細菌の採取、分離培養と同定およびエンドトキシンの抽出

まず直径 0.45 μm の pore size をもつアドバンテック社製採取用フィルターに約 200 l の透析液を濾過してフィルター表面に細菌を採取した。次に *Pseudomonas* agar (Difco) で分離培養を重ね、日水 ID テスト、NF プレートを使用し同定を行った。その結果、*Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas stutzeri* および *Enterobacter cloacae* が同定された。これらの菌をホームアルデヒド殺菌し、さらにアセトン乾燥菌とした。

続いて Westphal ら⁵⁾の温フェノール・水抽出法を用いてエンドトキシンの抽出を行った。最初にアセトン乾燥菌を蒸留水に浮かべ 67°C で加温し、同温同容量の 90% フェノールを激しく攪拌しながら菌液に加えた。次に抽出液を冷却後、低温で遠沈して水層部分とフェノール層に分離しエンドトキシンの抽出を行った。さらにフェノール層と不溶部分を水で再度加温抽出して回収率を高め、最後にエタノールで脱水、抽出を行った。

2. 標準エンドトキシン抗体と ELISA 法による標準曲線の作成

1) 標準エンドトキシン抗体の作成

2×10^8 cells/ml に調整した *Salmonella minnesota*

R595 (Re) 株を 2,500 g、および 2,000 g の雌雄 2 羽の成熟家兎の耳の静脈より投与して免疫を行った。方法は、heat killed cell 0.25 ml より始め、その後、0.25 ml ずつ増量し、週 2 回、計 6 回の投与を行い、また免疫前と最終免疫後 5 日目に全採血を行った。

2) 標準エンドトキシン抗体の精製

家兎より得られた血清は、硫酸塩析法により精製を行い、さらに Sephadex G25 カラムを使用し、2 度のゲルクロマトグラフィーにより脱塩を行って、標準エンドトキシン抗体とした。

3) 標準エンドトキシン抗体の Immunoblotting による抗体価の検討

まず PBS に浸したセルロース膜に *E. coli* J-5 のエンドトキシン 1 mg/ml のものを 1 滴のせ、次に 3% gelatin-PBS で blocking を行った。続いてセルロース膜を Tween 20 入り PBS で 5~5⁷ 倍に希釈した標準抗体およびコントロール血清中に入れ、さらに biotin 標識 protein A を、続いて alkaline phosphatase conjugated avidin (1,000 倍希釈) をセルロース膜に浸した。最後に para-nitrophenylphosphate acid disodium を添加し、10 分後反応を測定した。その結果、標準エンドトキシン抗体は 5⁶ 倍まで抗原抗体反応が見られ、一方、免疫前のコントロール血清では、各系列ですべて陰性であった(図 1)。

4) ELISA 法 (図 2)

① 10 $\mu\text{g/ml}$ の濃度に調整した抗原とするエンドトキシンを 100 μl well 内に入れ、エンドトキシンの coating を行う。② 1% bovine serum albumin (BSA) を含んだ PBS を各 well に 150 μl ずつ加え、非特異的部位の blocking を行う。③ 抗体を測定する試験血清を必要な倍数に希釈し、100 μl を well に添加し、incubate 後溶液を除去し、反応を停止させるため PBS-Tween 20 にて洗浄する。④ biotin 標識 anti-human Ig class 抗体を、100 μl を well に添加し、目的とする Ig class の特異抗体を標識する。⑤ biotin に非特異的かつ強力に結合する alkaline phosphatase conjugated streptavidin を 100 μl well に添加する。⑥ 酵素基質として para-nitrophenyl phosphate (PNPP) 100 μl を well に加え、室温にて 25 分間反応させ、その後反応停止のため 5N の NaOH を 50 μl ずつ加える。⑦ 96 well の plate を、ELISA auto-reader で吸光度を 405 nm において測定する。

図1 Immunoblotting for IgG antibody to endotoxin

1. COATING OF LIPOPOLYSACCHARIDE ON PLATES

96 well microtiter plates
100μl of LPS
overnight absorption

2. BLOCKING NON-SPECIFIC BINDING SITES.

150μl of BSA(1% w/v) D-PBS
incubate for 60 minutes at 37°C

3. APPLICATION OF HUMAN SERUM

add human serum diluted with
0.1% w/v BSA-PBS-Tween 20
incubate for 60 min at 37°C

4. APPLICATION OF BIOTINYLATED ANTI-HUMAN Ig CLASS SPECIFIC ANTIBODY

add 100μl of biotinylated antibody
incubate for 60 minutes at 37°C

5. APPLICATION OF ALKALINE PHOSPHATASE CONJUGATED STREPTAVIDIN

add 100μl alkaline phosphatase
conjugated streptavidin
incubate for 30 minutes at 37°C

6. APPLICATION OF P-NITROPHENYL PHOSPHATE

add 100μl of enzyme substrate
leave at room temperature for 60 minutes
stop reaction by adding 50μl of a 5N
NaOH solution

7. MEASUREMENT AND PLOTTING OF A SEMILOGARITHMIC GRAPH

the optical density is measured at 405nm
plot the value on a semilogarithmic graph

図2 ELISA technique for detection of antibody against endotoxin

5) 標準エンドトキシン抗体の検量線

以上のことより、家兎より得られた標準エンドトキシン抗体について、E. coli J-5 のエンドトキシンを抗原として ELISA 法による検量線を作製した。まず原液と 50 倍希釈液について縦軸に吸光度を、横軸に希釈倍率（濃度）をとり片対数グラフを作製した。これらのグラフは共に抗原抗体反応の結果として S 字状曲線を描いた。今回の実験では、すでに Immunoblotting 法により標準エンドトキシン抗体の 5^6 倍希釈 (15,625 倍希釈) 以上の濃

度において抗体の存在を確認している。そこで 50 倍希釈のグラフ上の 4^4 倍の点 (12,800 倍希釈) より高い濃度においては確実に抗体が存在するものと判断し、またこの点における吸光度の値が 0.051 であることより、より確実な 0.06 以上をもって抗体陽性の規準とした (図 3)。実際の患者の測定においては、患者血清を 4 の累乗倍数によって希釈していき、まずこれが S 字状のグラフになることを確認した上で、抗原抗体反応が確実に起こっていると考えられるグラフのほぼ中央での点 (実際には $4^3=64$ 倍希釈の点) における吸光度の値が 0.06 以上のものを抗体陽性者とした。

6) E. coli J-5 のエンドトキシンの交差反応性の確認

対象とした血液透析患者のうち後ほど示す抗体陽性者の中から 20 名を選び、E. coli J-5 のエンドトキシンと透析液より分離した細菌由来のエンドトキシンの両者を抗原として、ELISA 法における吸光度の関係を検討した。結果としては、両者は高い相関関係を示し ($Y=0.67X+0.12$, $r=0.67$, $p<0.01$)、E. coli J-5 のエンドトキシンが、透析液由来のエンドトキシンと ELISA 法において強い交差反応を示すことが証明された (図 4)。

対象

以上の予備実験に引き続いて、ELISA 法により、E. coli J-5 のエンドトキシンを抗原として長期透析患者血清中のエンドトキシン抗体を測定した。対象は、当院および関連病院において 2 年以上の血液透析を受けているいわゆる安定期透析患者 101 名で、過去 6 か月間に重症の感染症、重篤な肝機能障害および頻回の輸血歴を有さない者を選んだ。さらに使用ダイアライザー別に、cellulose 系の low-flux 膜使用者 54 名と合成高分子系の high-flux 膜使用者 47 名に分けて検討した。また正常対照者としてボランティア男女 21 名を選んだ。各患者群間には、年齢を除く各パラメータに有意差を認めなかった (表)。また、各群間の抗体陽性率を χ^2 (カイ自乗) 検定により危険率 5% 以下において有意差検定を行った。

結果

全透析患者においては、101 名中 42 名 (42%) が抗体陽性であり、一方正常対照者においては、21 名中 4 名 (19%) が抗体陽性であった。両群間には χ^2 検定において統計学的に有意差を認め ($p<0.05$)、透析患者には高率でエンドトキシン抗体が存在することが判明した (図 5)。さらに従来の low-flux 膜である Cuprophane 膜使用者では、26 名中 7 名 (27%) が、Cuproammonium rayon 膜使用者では 28 名中 7 名 (25%) が抗体陽性であり、low-flux 膜群全体では 54 名中 14 名 (26%) が抗体陽性であった。これらの値は正常対照群に比べ高値ではあったが、統計学的有意差は認められなかった (図 6)。

表 HD patients and normal controls subject to examination

Membrane group		Number of patients	Age (years)	Period of dialysis months	BUN (mg/dl)	S-creatinine (mg/dl)
Low flux group	Cuprophane	26 M : 16 F : 10	55.9±12.9	41.7±27.6	80.0±18.1	9.8±1.0
	Cuproammonium rayon	28 M : 16 F : 12	50.1±11.3	45.2±20.0	59.1±12.9	10.2±1.7
High flux group	PMMA	28 M : 17 F : 11	57.7± 9.5	48.3±33.9	56.9±12.9	9.9±2.1
	EVAL	19 M : 12 F : 7	48.2± 8.6	59.2±28.3	59.4±16.8	10.6±2.3
Normal control		21 M : 12 F : 9	31.7± 7.9	—	—	—

PMMA : Polymethyl methacrylate, EVAL : Polyvinyl alcohol

(Mean±SD)

図3 Standard curve of IgG antibody to endotoxin

図5 % endotoxin antibody positive in the healthy controls and all HD patients

図4 Cross reactivity between endotoxins from the dialysate bacteria and E. coli J-5 in the ELISA method

しかしながら合成高分子膜の high-flux 膜使用群においては、PMMA 膜使用者では 28 名中 15 名 (53%) が、EVAL 膜使用者では 19 名中 13 名 (68%) が抗体陽性であり、さらに high-flux 膜群全体では 47 名中 28 名

(60%) が抗体陽性であった。これらの値はいずれも正常対照群に比較し有意に高値であった ($p < 0.05$) (図 7)。

考察

1. ELISA 法によるエンドトキシン抗体の測定

透析患者にエンドトキシン抗体が存在することは、すでに 1969 年に Gazenfield ら⁶⁾が受動的赤血球凝集反応を用いて報告している。今回用いた ELISA 法は、avidin-biotin の強い親和性を利用し、さらに純度の高い anti-human IgG 抗体を利用することでより高感度で IgG 特異性の高い抗体価を測定することが可能である。また今回使用した E. coli J-5 (Re) という変異株は、コア部分とリポ A 部分を主体とする最も基本的な rough type の LPS 構造を持つ菌種である。これはエンドトキシン抗体を作製するのに最も頻回に使用される菌種であり、得られたエンドトキシン抗体は他の多くの LPS と交差反応を示すことが認められている⁷⁾。

図 6 % endotoxin antibody positive in the conventional low-flux membrane group

図 7 % endotoxin antibody positive in the high-flux membrane group

2. 透析患者のエンドトキシン抗体価と膜透過の可能性

一般にエンドトキシンの体内への侵入経路としては、細菌による感染症や外傷、手術および注射や検査などの医療行為、さらには腸管より腸内細菌のエンドトキシンが吸収されることなどが考えられる。今回の結果において特に注目すべき点は、正常対照者においても抗体陽性者を認め、さらには正常対照群と low-flux 膜使用群の間には抗体陽性率に有意差を認めず、一方 high-flux 膜使用群との間には有意差を認めたことである。しかしながら対象とした患者群は、以上のようなエンドトキシンに暴露される機会や頻度において特に偏りがあるとは考えられない。従ってこの抗体陽性率の差は、エンドトキシンに暴露される機会や頻度の問題ではなく、透析膜の性質の問題、ひいては膜のエンドトキシン透過性の差異に基づくものであると考えるのが最も妥当と思われる。近年、長期透析患者に高率にみられる手根管症候群 (CTS) や透析アミロイドーシスの原因物質として

β_2 -microglobulin (β_2 -MG) が注目されるようになり、これらの小分子蛋白の除去を目的に high-flux 膜が頻回に使用されるようになってきた。エンドトキシンは通常サブユニットが会合体を形成し、分子量が数十万～数百万の巨大分子を形成している。しかしながら、デオキシコール酸ナトリウム (DOC) による処理を加えたりキレート剤の存在など種々の条件下においてはサブユニットに解離し、分子量が S 型 LPS で 10,000～20,000, R 型 LPS で 5,000～6,000 程度にまで小さくなるといわれている。さらにはエンドトキシンを超音波処理した結果では、通常の活性を持つエンドトキシンの細小単位は直径が約 150 Å 程度の分子と推測されている (この場合分子量は数十万に相当すると考えられる)。従って直接活性を持った分子が膜を通過する可能性は極めて少ないと考えられる。しかしながら上記に示したような何らかの要因によって、あるいは自然に一部存在するより小さなエンドトキシンのフラグメントやサブユニットが、蛋白分子の通過性を有するこれらの high-flux 膜を逆拡散や逆濾過により通過することが十分に可能であると考えられる^{8,9)}。そして今回の実験は、患者血液中のエンドトキシン抗体を測定することにより、患者血液中に侵入したエンドトキシンが免疫担当細胞を感作し、抗体形成を促していることを示唆する結果を示すものと考えられた。さらに Lonnemann ら^{3,4)}はエンドトキシンを透析回路内に添加し血液回路内を循環させた単球より IL-1 や TNF が産生されることよりエンドトキシンの膜透過の可能性を主張している。

3. エンドトキシンの透析患者に及ぼす影響について
エンドトキシンが透析患者の血液内に侵入し、患者にどのような影響を及ぼしているかについてはほとんど明らかにされていない。しかしながら、重症の合併症を伴い血液透析だけではコントロールの困難な腎不全の場合やしばしば観察される明らかな感染を伴わない原因不明の発熱や、単純な循環動態の変化では説明のつかない血圧低下などにもエンドトキシンが関与している可能性が推測されている。さらに William は、エンドトキシンで感作したウサギの血清より得た免疫グロブリンのうち IgM 分画にはエンドトキシンの致死毒性を中和する能力が存在するが、一方 IgG 分画にはこの中和能力のないことを示し¹⁰⁾、抗体の存在が必ずしも十分な生体防衛能力を示すものではないことを示唆している。また in vitro において、エンドトキシン、TNF、IL-1 および IFN を添加してマクロファージを培養すると、マクロファージより β_2 -MG の産生が誘導されることが報告されている¹¹⁾。つまり本来は β_2 -MG を除去する目的で作製された high-flux 膜を使用することで、逆にエンドトキシン

の侵入をまねきこれが患者の慢性の炎症状態をつくり上げ、結果として β_2 -MG の産生を促しているという矛盾が生じる可能性が存在するわけである。いずれにせよ、エンドトキシンの急性の有害作用を回避する意味でも、また慢性のおそらくは患者にとって不利益になるであろうと予測される影響を避ける意味でも、血液透析におけるエンドトキシンの侵入を阻止する必要があると考えられる。そのためには透析液中のエンドトキシン濃度をできる限りゼロに近いものにするか、あるいは透析液がダイアライザーに入る直前においてエンドトキシンの侵入を遮断するため、cut off point が少なくとも 5,000 以下のフィルターを装着する方法が考えられている¹²⁾。以上、high-flux 膜使用透析患者におけるエンドトキシン侵入の可能性と生体への影響について考察を述べたが、エンドトキシンの透析患者に与える影響については、今後の問題として長期にわたる注意深い観察が必要であると考えられた。

結語

1. 長期透析患者 101 名と正常対照者 21 名において、E. coli J-5 のエンドトキシンを抗原とし、ELISA 法により血液中のエンドトキシン抗体を測定した。

2. このアッセイにおけるエンドトキシン抗体の陽性率は正常対照群 19%, low-flux 膜使用群 21%, high-flux 膜使用群 60% であり、high-flux 膜使用群の抗体陽性率は前 2 者に比較し有意に高値であった ($P < 0.05$)。

3. 以上の結果より、特に high-flux 膜使用透析患者においては、透析液中のエンドトキシンが患者血液内に侵入し、様々な影響を与えている可能性が示唆された。

文献

- 1) 本間遜, 岩永貞昭, 丹羽允, 吉田昌男: 内毒素. 医歯薬出版, 東京, 1983
- 2) Nakamura S, Morita T, Harada T, Iwanaga S, Takahashi K, Niwa M: A clotting enzyme associated with the hemolymph coagulation system of horseshoe crab. Its purification and characterization. *J Biochem* 92: 781-792, 1982
- 3) Lonnemann G, Bingel M, Floege J, Koch KM, Shaldon S, Dinarello CA: Detection of endotoxin-like interleukin-1-inducing activity during in vitro dialysis. *Kidney Int* 33: 29-35, 1988
- 4) Lonnemann G, Floege J, Schindler R, Behme T, Lenzner B, Shaldon S, Koch KM: Passage of cytokine-inducing E. coli fragments (CEF) through various hemodialysis (HD) membrane. Abstract, 21st Annual Meeting of Am Soc Nephrol, 1988
- 5) Westphal O, Jann K: Bacterial Lipopolysaccharides. *Methods Carbohydrate Chem* 5: 83-91, 1965
- 6) Gazenfield GE, Eliahou HE: Endotoxin antibodies in patients on maintenance hemodialysis. *Israel J Med Sci* 5: 1032-1036, 1969
- 7) Mutharia LM, Crockford G, Bogard WC, Hancock RW: Monoclonal antibodies specific for E. coli J-5 lipopolysaccharide: Cross reaction with other gram-negative bacterial species. *Infect Immun* 45: 631-636, 1984
- 8) Stiller S, Mann H, Brunner H: Backfiltration in hemodialysis with highly permeable membranes. *Contr Nephrol* 46: 23-32, 1985
- 9) Man NK, Ciancioni C, Faivre JM, Diab N, London G, Maret J, Wambergue FP: Dialysis-associated adverse reactions with high-flux membranes and microbial contamination of liquid bicarbonate concentrate. *Contr Nephrol* 62: 24-34, 1988
- 10) McCabe WR, DeMaria A, Berberich H, Johns MA: Immunization with rough mutant of *Salmonella minnesota*: Protective activity of IgM and IgG antibody to the R595 (Re Chemotype) mutant. *J Infect Dis* 158: 291-300, 1988
- 11) Knudsen P, Leon J, Ng A, Shaldon S, Floege J, Koch K: Hemodialysis related induction of β_2 -MG and IL-1 synthesis and release by mononuclear phagocytes. *Nephron* 53: 188-193, 1989
- 12) Tutunjian RS: Pyrogen removal by ultrafiltration. Endotoxins and their detection with the Limulus Amebocyte Lysate test. Alan R. Liss, Inc., New York, 150: 319-327, 1982