

審査の結果の要旨

氏名 西田 正人

本研究では、臨床的に重篤な結果をもたらすエンドトキシン血症の診断において、従来には確立されていなかった臨床的重症度を反映するアッセイ法を開発するため、培養細胞においてエンドトキシン (Lipopolysaccharide, LPS) の特異的レセプターである Toll-like receptor (TLR) 4 の特異的刺激量を測定するアッセイ系の構築を試みた。得られた結果の概要は

- (1) ヒト単球系細胞 THP-1 細胞の TNF- α 産生を測定する系において、抗TLR4抗体によるその減少量がTLR4刺激特異的な刺激量と想定したが、ヒト血漿存在下では、血漿がELISAによるTNF- α 測定に影響し、TLR4特異的刺激量のアッセイには適さないと考えられた。
- (2) HEK293細胞にTLR4/MD-2/CD14、およびNF- κ B依存性レポーター遺伝子を強制発現させ、その細胞におけるNF- κ B活性値を測定する系を構築した。*in vitro*の実験にてLPS濃度に依存してNF- κ B活性を測定できることを確認した。また、この細胞におけるNF- κ B活性上昇は、TLR4刺激に特異的であることを確認した。
- (3) TLR4/MD-2/CD14を定常発現する細胞を用いて、LPSを静脈内投与するエンドトキシン血症動物モデルの血液検体を採取し、そのサンプル中に含まれるLPSの生物活性をアッセイしたところ、定量的にそのエンドトキシン血症を評価でき、さらに生体の炎症反応の指標と考えられる、TNF- α 濃度と強く相関を認めた。対照的に、リムルテストはTNF- α 濃度の変化とは大きく乖離した。これより、TLR4/MD-2/CD14定常発現細胞を用いたアッセイが、LPSの生理活性を生体内と同じ状況で評価することが示唆された。
- (4) 大腸菌を腹腔内に投与する腹膜炎による敗血症動物モデルにおいて血液検体を同様にアッセイしたところ、同様に定量的にエンドトキシン血症を評価できた。リムルテストも同様の変化を示し、このモデルにおいて評価能は同等と考えられた。両者はTNF- α 濃度と平行の変化を示した。一方致死の予測に関してはTNF- α 濃度が有用な指標と考えられたが、TLR4/MD-2/CD14定常発現細胞によるアッセイはTLR4刺激に特異的な点が臨床において有用であると考えられた。

以上、本論分は、LPSの特異的受容体であるTLR4を介した刺激伝達に注目し、その刺激量を特異的に定量することで、血液検体中に含まれるLPSの生理活性を、生体に対する影響とその反応を反映して評価できる可能性を示した。臨床における、エンドトキシン血症の診断や治療の向上に貢献するものと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。