

Title	Limulus Amebocyte Lysateのゲル化反応に関する研究
Author(s)	小林, 正義
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	https://hdl.handle.net/11094/32857
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

[6]

氏名・(本籍)	小 林 正 義
学位の種類	薬 学 博 士
学位記番号	第 5 0 1 2 号
学位授与の日付	昭 和 55 年 6 月 5 日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位論文題目	Limulus Amebocyte Lysateのゲル化反応に関する研究
論文審査委員	(主査) 教 授 青 沼 繁 (副査) 教 授 鎌 田 皎 教 授 岩 田 平 太 郎 教 授 三 浦 喜 温

論 文 内 容 の 要 旨

緒 論

1956年Bangにより、かぶとがに血液がグラム陰性菌により凝固することが見い出され¹⁾ つづいてLevinらにより、この凝固がグラム陰性菌細胞壁成分であるlipopolysaccharide (endotoxin) と、かぶとがに血球 (amebocyte) 内より溶出した血液凝固成分との反応によることが明らかにされた²⁾

Levinらは、かぶとがに血球抽出成分(limulus amebocyte lysate)を北米産かぶとがに(Limulus polyphemus) より調製し、このもののゲル化反応によりendotoxinを検出する方法 (Limulus Amebocyte Lysate (LAL) testまたはLimulus test) を考案した³⁾

以来、本方法は従来の致死毒性等の生体反応によるendotoxin assay法にくらべin vitroで簡便に、かつ高感度でendotoxinを検出しうるため急速にその応用範囲が広まり、注射剤製造工程中のピロジェン (endotoxin) 管理などに繁用されているが、信頼できる検定法として確立されるためには反応特異性をはじめ、さらに検討の必要な問題がいくつか残されている。著者はLAL test 実用化を目的とし、これら問題点のうち、もっとも重要と思われる四点、すなわち、

1) 再現性ある高感度LAL抽出法の確立 2) endotoxinに対する反応特異性 3) LALゲル化反応への影響因子 4) 血中反応阻害物質の分離精製およびその性状について検討を行なった。

本 論

1. 日本産かぶとがによりLimulus Amebocyte Lysateの抽出

Levinらの方法³⁾ で日本産かぶとがにから抽出したLALは低感度であり、実際応用には不向きであった⁴⁾ その原因として、かぶとがに血液の採血時に使用する血球抗凝集剤が有効でないことが

考えられた。本実験では有効な抗凝集剤を検索することを目的とし、これまでにかぶとがに血球に対し抗凝集剤として使用されたことのあるもの⁵⁾⁶⁾および、かぶとがに血球とその性状の類似性の指摘されている哺乳類血小板に対する抗凝集剤のなかから、いくつかを選び抗凝集剤として用いTable Iに示した方法でLALの抽出を行なった。その結果Table IIに示したようにテオフィリン、カフェイン、テオブロミンなどのメチルキサンチン類にもっとも優れた抗凝集能が認められ、これらを抗凝集剤として用い抽出することにより 10^{-3} $\mu\text{g}/\text{ml}$ のendotoxinを検出しうる、Levinらの得たものと同等の検出感度をもつLALを収率よく得ることができた。

Table I. Process for Preparing Limulus Amebocyte Lysate

Blood of horseshoe crab	(step 1)
centrifuged (1700g, 5min.)	
Blood cells (Amebocytes)	
1) washed with anti-aggregating agent	(step 2)
2) washed with artificial sea water	(step 3)
3) extracted with distilled water	(step 4)
4) centrifuged (1700g, 5min.)	
Supernatant	
(Limulus Amebocyte Lysate, LAL)	

Table II. Effect of Various Anti-aggregating Agents on the Inhibition of Aggregation and Sensitivities of LAL

Anti-aggregating agents	Concentration (M)	Inhibition ^{a)} of aggregatin	Sensitivity ^{b)} of LAL ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Yield of ^{c)} active LAL (%)
Adenosine	2×10^{-3}	±	1	30
Hydroxylamine	2×10^{-2}	±	10	35
cyclic AMP	2×10^{-2}	±	10	45
Prostaglandin E ₁	2×10^{-5}	±	1	40
Theophylline	2×10^{-2}	++	0.001	85
Caffeine	2×10^{-2}	++	0.001	75
Theobromine	2×10^{-2}	++	0.001	70
Acetylsalicylic acid	2×10^{-2}	±	10	55
Formaldehyde	2×10^{-2}	-	100	90
Neodymium chloride	3×10^{-1}	-	100	90
Lanthanum nitrate	3×10^{-1}	-	100	90
N-ethylmaleimide	2×10^{-2}	+	0.1	30

a) In the process for preparing LAL;

++: not aggregated at step 1 to 3 +: partially aggregated at step 3

±: partially aggregated at step 2 and wholly aggregated at step 3

-: wholly aggregated at step 2

b) The minimum concentration of Shigella endotoxin to produce the gelation of LAL

c) The percentage of active LAL which were prepared from Japanese horseshoe crab (*Tachypleus tridentatus*) used for this experiment

2. Limulus Amebocyte Lysateの反応特異性

i) ゲル化活性と発熱活性の比較 日本産

かぶとがににより得たLALを用い、各種endotoxinのLALゲル化反応 (Table III) による活性と局方発熱性物質試験による活性をそれぞれ最小検出感度 (end-point) でもとめ、これらの方法の相関性を検討した結果、Table IVに示したように、二方法で得た活性値 (end-point) は並行しており、LAL testの結果は生物活性 (発熱活性) をよく反映し、さらに2~10倍高い感度で測定できることを認めた。

Table III. Procedure of LAL Test

One tenth milliliter of testing sample was added to 0.1ml of LAL, and the mixture was incubated at 37°C for 1 hr.

The results were judged from the following view points.

- ++ : formation of immovables solid gel
- + : formation of movable gel in a mass
- ± : appearance of increased viscosity including formation of coarse granular gel
- : no formation of gel

Table IV. LAL and Pyrogen Tests Results on Endotoxins of Various Species

Endotoxins	Endotoxin concentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$)								End-point			
	$\times 10^{-1}$		$\times 10^{-2}$		$\times 10^{-3}$		$\times 10^{-4}$		Gelation ^{a)}	Pyrogenic ^{b)}		
	2.5	1	5	2.5	1	5	2.5	1	5	2.5	$\mu\text{g}/\text{ml}$	$\mu\text{g}/\text{ml}/\text{kg}$
E. coli 0128 : B 12	++	++	+	±	-	-	-	-	-	-	5.0×10^{-2}	1.0×10^{-1}
E. coli 026 : B 6	++	++	++	++	++	±	-	-	-	-	5.0×10^{-3}	3.0×10^{-2}
S. enteritidis	++	++	++	++	++	+	±	-	-	-	2.5×10^{-3}	1.0×10^{-2}
E. coli 0111 : B 4	++	++	++	++	++	++	+	±	-	-	1.0×10^{-3}	1.0×10^{-2}
E. coli 0127 : B 8	++	++	++	++	++	++	+	±	±	-	1.0×10^{-3}	3.0×10^{-3}
S. abotus equi	++	++	++	++	++	++	++	+	±	-	5.0×10^{-4}	3.0×10^{-3}
S. minnesota R595, PCP	++	++	++	++	++	++	++	+	±	-	5.0×10^{-4}	3.0×10^{-2}
Shigella K-3	++	++	++	++	++	++	++	+	±	±	5.0×10^{-4}	3.0×10^{-3}

a) the minimum dose of endotoxin to produce the gelation of LAL.

b) the minimum effective dose to be positive in pyrogen test

ただし、糖鎖を欠くRe型のS. minnesota R-595, PCP endotoxinのみがS型の他のendotoxinと異なり発熱活性にくらべゲル化活性が強く(60倍)、このものについては相関性が認められなかった。

しかしRe型のような特殊なendotoxinが検体中に混入することは通常おこりえないので、LAL応用に際し、この点とくに問題にならないと考えられる。

ii) Limulus Amebocyte Lysateの反応特異性 生体成分を主とする36種類の物質のLALゲル化作用について検討した結果、Table Vに示したようにアミノ酸、ペプチド、蛋白質、糖類、核酸、脂質のいずれのグループの物質にもLALゲル化作用は認められず、endotoxinに対するLALの反応特異性は維持された。すなわち生体部分を検体とするかぎり、かなりの広範囲にわたりLAL

を特異的なendotoxin検出試薬として応用できることが明らかとなった。

Table V. Reaction of LAL with Various Substances

Samples to be tested ^{a)}	Gelation of LAL ^{b)}
L-Glutamic acid, L-Leucine, L-Lysine	—
Bradykinin, Bovine serum albumin, Hemoglobin	—
Bovine submaxillary gland mucin, Histone	—
D-Glucose, D-Glucuronic acid, D-N-Acetyl glucosamine	—
Inositol, Lactose, Glycogen, Dextran, Hyaluronic acid, Chondroitin, Chondroitin sulfuric acid A, Heparin, Alginic acid	—
Myristic acid, ^{c)} Cholesterol, ^{c)} Sodium cholate, Lecithin, ^{c)} Ganglioside	—
Deoxyribonucleic acid, ^{d)} Ribonucleic acid, Adenosine-diphosphate, Adenosine-triphosphate, Inosine	—
Histamine, Adrenaline, Noradrenaline, Serotonin	—
Na-L-Ascorbate	—

- a) Two percent solutions dissolved in phosphate buffered saline (pH 7.2) were tested
 b) One tenth milliliter of the testing sample was added to each 0.1 milliliter of LAL, and the mixture was incubated at 37°C for 1 hour.
 c) emulsion in Tween 80-Span 80 system
 d) dissolved in 1.0 M sodium chloride

3. Limulus Amebocyte Lysate のゲル化反応に影響をおよぼす因子

i) 反応pHの影響 各濃度E. coli 0111:

B 4 endotoxin を試料とし, pH 4.75~pH 8.50の各反応pHで37°C, 1時間反応でLAL testを行った結果, Table VIに示したように最も高感度でendotoxinを検出できる反応至適pHはpH 6.75~pH 7.25に認められ, pH 5.0以下またはpH 8.25以上では, その1/10以下に感度は低下した。

ii) 反応温度の影響 E. coli 0111:B4 endotoxin 溶液を試料とし, pH 6.5, 1時間反応でLAL testを行なった結果, Table VIIに示したように反応至適温度は37°C~40°Cに認められ, 50°C以上または5°C以下では, その1/100以下に感度は低下した。

iii) 反応時間の影響 pH 6.5, 37°Cの反応

Table VI. Influence of pH on the Gelation Reaction of LAL

pH	E. coli 0111:B4 Endotoxin (ng/ml)					
	10	5	2.5	1.0	0.5	0.25
4.75	±	—	—	—	—	—
5.00	+	—	—	—	—	—
5.25	+	±	—	—	—	—
5.50	++	+	±	—	—	—
5.75	++	+	±	—	—	—
6.00	++	+	±	±	—	—
6.25	++	++	+	±	—	—
6.50	++	++	+	+	±	—
6.75	++	++	++	++	+	±
7.00	++	++	++	++	+	±
7.25	++	++	++	++	+	±
7.50	++	++	++	++	±	—
7.75	++	++	+	±	—	—
8.00	++	+	±	±	—	—
8.25	+	±	—	—	—	—
8.50	±	—	—	—	—	—

温度でLAL testを行なった結果、endotoxinの検出感度はTable VIIIに示したように反応時間4時間まで上昇するが、それ以降は反応時間延長による感度上昇は認められなかった。

iv) アルカリ土類金属およびキレート剤の影響 Levinらは $5 \times 10^{-2} \text{M}$ および 10^{-2}M 濃度の Mg^{2+} ; Ca^{2+} イオンを含むかぶとがに血漿に血球内成分を溶出させて得たLALを用い、LALにEDTA添加時に完全なゲル化反応阻害が認められ、またこれに Mg^{2+} ; Ca^{2+} イオンを添加してもゲル化活性の回復が認められないことから、 Mg^{2+} ; Ca^{2+} イオン以外の金属がLALのゲル化反応に必須であることを示唆した²⁾。しかしLevinらの検討においては、キレート結合反応の結果生ずるpH低下によるLALの反応至適pH逸脱が感度低下の原因となる可能性について検討が不充分である。そこで著者はpH、キレート剤、アルカリ土類金属の三要素を関連づけながら、これら因子のLALゲル化反応への影響を検討した。

その結果 $10^{-3} \sim 10^{-1} \text{M}$ の Mg^{2+} ; Ca^{2+} ; Sr^{2+} ; Ba^{2+} などのアルカリ土類金属イオンの反応系への添加により、Fig. 1に示したようにLALのゲル化反応が促進されることを認めた。たとえば、 Ca^{2+} イオンの 10^{-2}M 添加で10倍、 10^{-1}M 添加で200倍LALのendotoxinに対する感度が上昇することを認めた。

一方、EDTA、DTPAなどのキレート剤の影響を反応液pHを7.2に維持し検討した結果、Fig. 2に示したようにキレート剤 10^{-2}M 濃度以上の添加によりLALのendotoxinに対する感度は $\frac{1}{10}$ に低下した。これは通常のLAL中に $10^{-3} \sim 10^{-2} \text{M}$ 濃度含まれ、LALのゲル化に促進的に働く、 Mg^{2+} ; Ca^{2+} イオンなどがキレート結合し、その作用を失なったためと理解される。

$5 \times 10^{-2} \text{M}$ の高濃度の Mg^{2+} イオンを添加したLALに対し、特にpH維持をせず、EDTA (EDTA-2Naの中性溶液)を添加した場合Fig. 3に示したように 10^{-2}M 濃度以上のEDTA添加でキレート結合による著しい反応液のpH低下が生じ、LALのゲル化反応至適pHからの逸脱、ゲル化反応の完全阻害が認められた。

Table VII. Influence of Incubation Temperature on the Gelation Reaction of LAL

Temp. (°C)	E. coli 0111 :B4 Endotoxin (ng/ml)						
	100	10	5	2.5	1	0.5	0.25
5	-	-	-	-	-	-	-
25	++	++	+	±	-	-	-
30	++	++	++	+	±	-	-
35	++	++	++	++	±	-	-
37	++	++	++	++	+	±	-
40	++	++	++	++	+	±	-
45	++	++	++	±	-	-	-
50	+	-	-	-	-	-	-

Table VIII. Influence of Incubation Time on the Gelation Reaction of LAL

Incubation time (min.)	E. coli 0111 :B4 Endotoxin (ng/ml)						
	10	5	2.5	1	0.5	0.25	0.1
15	-	-	-	-	-	-	-
30	++	++	++	±	-	-	-
45	++	++	++	+	-	-	-
60	++	++	++	+	±	-	-
120	++	++	++	++	+	-	-
240	++	++	++	++	++	+	±
360	++	++	++	++	++	+	±
480	++	++	++	++	++	+	±

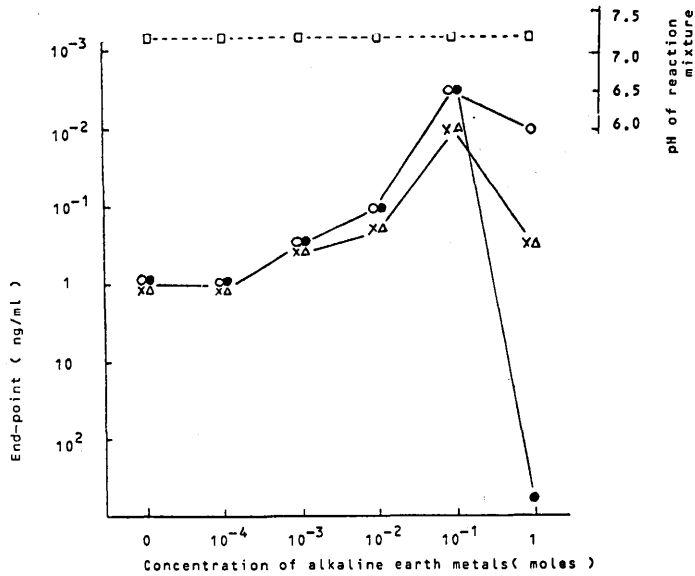


Fig. 1 Effect of Alkaline Earth Metals on the Gelatin Reaction of LAL

LAL tests were performed on the samples containing various concentrations of alkaline earth metals and endotoxin, and the end-point, that is the minimum concentration of endotoxin to be positive in LAL test, was determined at each concentration of alkaline earth metal.

○—Mg²⁺ ●—Ca²⁺ △—Ba²⁺ ×—Sr²⁺ ---□---pH

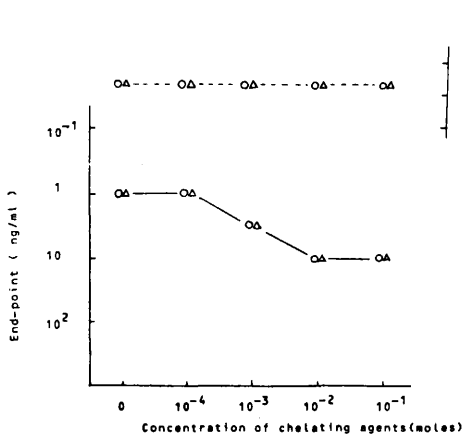


Fig. 2 Effect of Chelating Agents on the Gelation Reaction of LAL at pH 7.2

LAL tests were performed on the Samples containing various concentrations of chelating agents and endotoxin keeping the pH of the reaction mixtures at pH 7.2, and the end-point was determined at each concentration of chelating agent.

○—EDTA △—DTPA pH

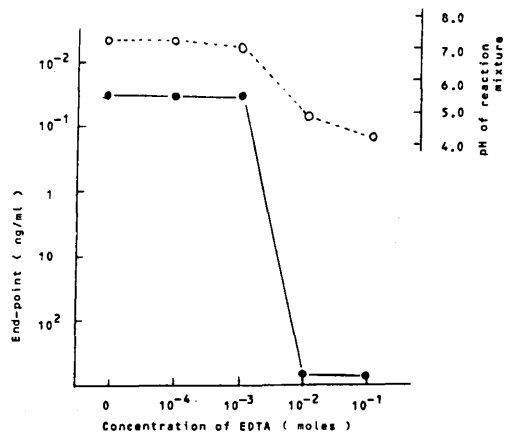


Fig. 3 Effect of EDTA on the Gelation Reaction of LAL Containing a High Concentration of Mg²⁺ Ion.

Effect of EDTA on the gelation reaction of LAL containing 0.05 M magnesium sulfate was examined by a method similar to that described in Fig. 1.

—●— End-point ---○--- pH

先に述べたLevinらの検討結果（ ページ）も同様の「キレート反応による反応至適pHの逸脱」によりすべて説明できると考えられる。

v) 各種化学物質の影響 その他の化学物質の影響を検討した結果、無機塩、糖類、アミノ酸などはTable IXに示したように、ほとんどのものがLALゲル化反応に影響をおよぼさなかったが、NaCl, glucose, ATP-2Naのように10~50%の高濃度では反応を阻害する例も認められた。高濃度検体のLAL testへの応用には注意を要する。またヒト血漿にはLevin,⁷⁾ Reinhold⁸⁾ らもすでに報告しているように反応阻害作用が認められた。Table Xに示したようにthiol基を有するある種の化合物にも反応阻害作用が認められた。酸化剤、還元剤にはTable XIに示したように、なんの影響も認められなかった。蛋白変性剤、殺菌剤等についてはTable XIIに示したように1%以上の濃度では、ほとんどのものに反応阻害作用を認めた。これらの物質の混入する検体のLAL test応用に際しては濃度によりfalse negativeの結果を示すこともあり、注意を要する。

Table IX. Influences of Various Substances on the Gelation Reaction of LAL

Substances	Conc. (%)	Endpoint ^{a)} (ng/ml)	Substances	Conc. (%)	End-point ^{a)} (ng/ml)
H ₂ O		1.0	Chondroitin sulfate	4.0	1.0
NaCl	0.9	1.0	Glutamic acid	10.0	1.0
	10.0	0.5	Lysine	10.0	1.0
	20.0	>10.0	Glycine	10.0	1.0
Glucose	25.0	1.0	Albumin	5.0	1.0
	50.0	2.5	ATP-2Na	10.0	5.0
Inositol	50.0	1.0		1.0	1.0
Mannit	20.0	1.0	Adenosine	1.0	1.0
Maltose	42.0	1.0	Plasma (human)		2.5×10 ⁴
Dextran 70	20.0	1.0			
Heparin	0.4 (500 U)	1.0			

a) the minimum concentration of E.coli 0111:B4 endotoxin to produce the grade (+) in the gelation reaction

Table X. Influences of -SH Substances on the Gelation Reaction of LAL.

Substances	Conc. (%)	End-point ^{a)} (ng/ml)
L-Cysteine	1.0	100
	0.1	5.0
	0.01	2.5
L-Cystine	1.0	1.0
2-Mercapto-ethanol	1.0	25.0
	0.1	1.0
L-Glutathione	1.0	1.0
Na-thioglycolate	1.0	1.0

a) the minimum concentration of E.coli 0111:B4 endotoxin to produce the grade(+) in the gelation reaction

Table XI. Influences of Reducing Agents and Oxidizing Agents on the Gelation of LAL

Substances	Conc. (%)	End-point ^{a)} (ng/ml)
NaHSO ₃	1.0	1.0
Na-L-Ascorbate	1.0	1.0
H ₂ O ₂	3.0	1.0
(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈	1.0	1.0

a) the minimum concentration of E.coli 0111:B4 endotoxin to produce the grade(+) in the gelation reaction

Table XIII. Influences of Protein Denaturing and Precipitating Reagents, and Antiseptics on the Gelation Reaction of LAL

Substances	Conc. (%)	End-point (ng/ml)	Substances	Conc. (%)	End-point (ng/ml)
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	10.0	>100	Ethanol	5.0	1.0
	5.0	10.0	Benzyl alcohol	2.0	100
	1.0	1.0		1.0	5.0
Sulfosalicylate	0.4	>100		0.5	1.0
			Benzalconium chloride	0.1	25
Na-TCA	1.0	2.5		0.01	1.0
	0.2	1.0	Phenol	1.0	10
Na-cholate	1.0	>100		0.5	1.0
	0.1	5.0	Formaldehyde	0.5	10
Urea	10.0	>100		0.1	1.0
	5.0	5.0	Cephalosporin	1.0	2.5
NaN_3	1.0	2.5	Ampicillin	1.0	2.5
	0.1	1.0			

a) the minimum concentration of *E. coli* 0111:B4 endotoxin to produce the grade (+) in the gelation reaction

4. 血漿中のLimulus Amebocyte Lysate ゲル化反応阻害物質の分離精製

菌血症、劇症肝炎患者のショック症状と血中に漏出したendotoxinとの関連が明らかにされ^{9)~12)}、この分野でのLAL testの応用が近年頻繁に行なわれるようになったが、血中endotoxin測定に際し血中のLALゲル化反応阻害物質の存在が重大な障害となっている。現在行なわれている測定に先立っての血中阻害物質の除去法は不完全なものであり、⁷⁾⁸⁾¹³⁾¹⁴⁾より優れた除去法の出現が望まれている。著者は新規除去法の開発に先立って阻害物質を分離精製し、本物質の性状を検討した。

i) 反応阻害物質の分離精製 ヒト血漿の硫酸分画により阻害活性は40~75%飽和硫酸沈澱分画 (fraction A-2) に認められた。fraction A-2をconcanavalin A-Sepharose 4B affinity,

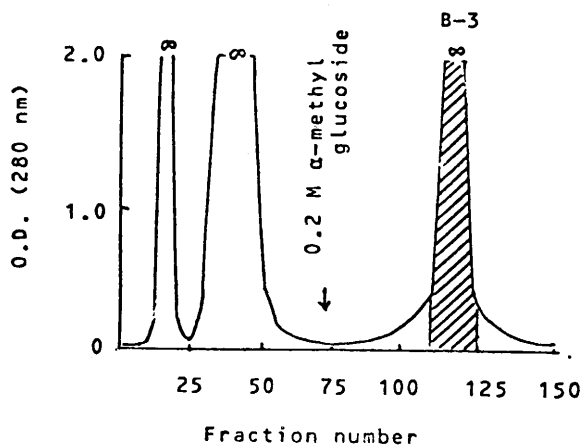


Fig. 4. Affinity Column Chromatography of the Inhibitor (A-2) on Concanavalin A-Sepharose 4B

Fraction A-2 was applied to a column of concanavalin A-Sepharose 4B (2.8×60cm) equilibrated with 0.05 M Na-phosphate buffer containing 0.05 M NaCl (pH 7.2). The column was washed with the same buffer. The absorbed inhibitor was eluted with 0.2 M α -methyl glucoside in the same buffer.

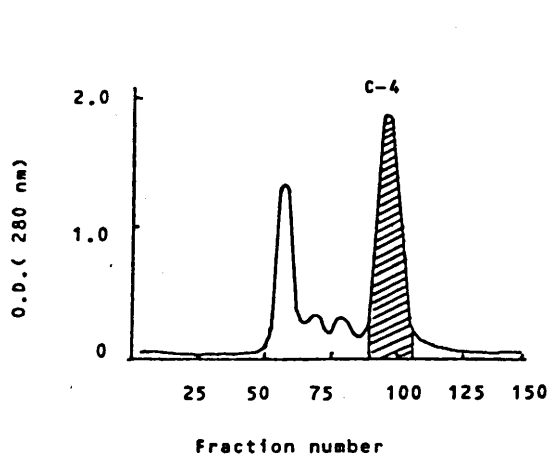


Fig. 5. Gel Filtration of the Inhibitor (B-3) on Sephadex G-200

Fraction B-3 was applied to a column of Sephadex G-200 (5.0×90cm) equilibrated with 0.05 M Tris-HCl buffer containing 0.9% NaCl (pH 8.0), and eluted with the same buffer. The inhibitory activity eluted in the shaded area.

Sephadex G-200ゲルろ過, DEAE-Sepharose CL 6B イオン交換, heparin-Sepharose 4B affinityの各カラムクロマトグラフィーの順でendotoxin freeの条件下精製を行なった。各カラムクロマトグラフィーによる精製段階でFig. 4~Fig. 7に示す溶出パターンを得た。阻害活性は斜線で示す分画に溶出し, 最終的にE-1, E-3の二つの活性分画を得た。

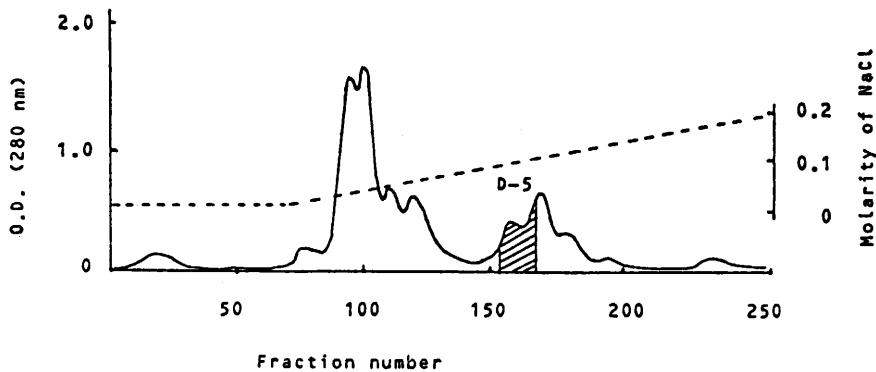


Fig. 6. Ion Exchange Column Chromatography of the Inhibitor (C-4) on DEAE-Sepharose CL6B

Fraction C-4 was applied to a column of DEAE-Sepharose CL 6B (2.6×40cm) equilibrated with 0.1M Tris-HCL buffer (pH 8.0). Elution was carried out with a linear NaCl gradient (0 to 0.2M) in the same buffer. The inhibitory activity eluted in the shaded area.

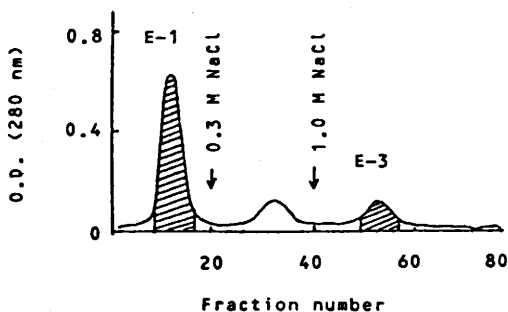


Fig. 7. Affinity Column Chromatography of the Inhibitor (D-5) on Heparin-Sepharose 4B

Fraction D-5 was applied to a column of heparin-Sepharose 4B (1.0×12cm) equilibrated with 0.01 M Tris-HCl buffer containing 0.05M NaCl (pH 7.6). The column was washed with the same buffer followed by 0.3M NaCl in 0.01 M Tris-HCl (pH 7.6). Finally the column was eluted with 1.0M NaCl in 0.01 M Tris-HCl (pH 7.6). The inhibitory activities eluted in the shaded areas.

2%であった。

- ii) 物理化学的, 化学的および免疫化学的性質 ディスク電気泳動および抗ヒト血漿抗血清に対する免疫電気泳動においてFig. 8, Fig. 9に示したように最精製品のうちE-3は単一成分と認め

Table X III. Yield and Recovery of Total Activity at Each Purification Step

Step	Fraction No.	Yield (mg/dl plasma)	Recovery of total activity (%)
Plasma		4830	100
1	A-2	950	83
2	B-3	400	70
3	C-4	20	65
4	D-5	12	20
5	E-1	2	8
	E-3	2	2

収率はTable X IIIに示したようにE-1が12 mg/dl plasma, E-3が2 mg/dl plasmaであった。また原料血漿中の阻害活性を100%とした場合の活性回収率はE-1が8%, E-3が

られたが、E-1には若干の不純物が認められ、電気泳動bandの濃度比から算出された純度は83%であった。

既知の各種血中proteinase inhibitorの抗血清とのOuchterlony法によるゲル内沈降反応では、Fig. 10に示したようにE-1は抗 α_1 -antitrypsin抗血清とのみ、E-3は抗antithrombin III抗血清とのみ沈降線を形成することが認められた。

また、糖含量、アミノ酸分析、SDS-ディスク電気泳動法による分子量測定のエ-1、E-3の各測定値はTable XIVおよびTable XVに示したように、それぞれこれまでに報告されている α_1 -antitrypsin¹⁵⁾およびantithrombin III¹⁵⁾の値と近似した値を示した。

以上の結果より血中のLALゲル化反応阻害物質の本体は α_1 -antitrypsinおよびantithrombin IIIであろうと推定され、また最終的に得られた活性回収比から主な作用は α_1 -antitrypsinによるものと考えられた。

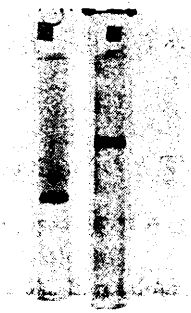


Fig. 8. Dise Gel Electrophoresis of E-1 and E-3
(A) E-1 (B) E-3



Fig. 9. Immunoelectrophoresis of E-1 and E-3
Wells 1. whole human plasma
2. E-1
3. E-3

Troughs a. rabbit anti-whole human plasma
b. rabbit anti-human α_1 -antitrypsin
c. rabbit anti-human anti-thrombin III

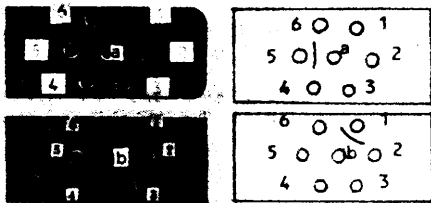


Fig. 10. Ouchterlony Immunodiffusion of E-1 and E-3 against Antisera of Various Proteinase Inhibitors
Wells 1. anti-antithrombin III
2. anti- α_2 -macroglobulin
3. anti-C1-inactivator
4. anti-antichymotrypsin
5. anti- α_1 -antitrypsin
6. anti- β -lipoprotein
Center wells
a. E-1 b. E-3

Table XIV. Analysis of E-1 and E-3 in Comparison with α_1 -Antitrypsin and Antithrombin III

	E-1	E-3	α_1 -Antitrypsin	Antithrombin III
Content of sugars (%)	11.7	13.3	12.2	13.4
Molecular weight	55000	62000	54000	65000

Table XV. Amino Acid Composition of E-1 and E-3 in Comparison with the Values of α_1 -Antitrypsin and Antithrombin III

Component	E-1	E-3	α_1 -anti- trypsin	anti- thrombin III
	(g/100 g protein)			
Lysine	7.78	6.42	8.41	6.65
Histidine	3.29	1.16	3.33	1.12
NH ₃	1.50	1.25	1.45	1.21
Arginine	2.22	4.38	2.33	4.70
Aspartic acid	9.69	8.60	9.75	8.60
Threonine	5.87	3.81	5.66	3.78
Serine	3.51	4.31	3.52	4.38
Glutamic acid	12.49	11.70	12.92	11.70
Proline	3.01	3.24	3.26	3.24
Glycine	2.53	1.80	2.38	1.75
Alanine	3.23	3.49	3.55	3.53
Cystine	0.2	0.62	0.00	0.93
Valine	4.74	4.31	4.74	4.32
Methionine	2.08	2.23	2.14	2.17
Isoleucine	3.92	3.59	3.89	3.57
Leucine	9.97	7.24	9.90	7.23
Tyrosine	2.23	3.10	2.14	3.13
Phenylalanine	7.39	5.71	7.63	5.72
Tryptophane	0.36	1.98	0.55	1.99

結 論

- 1) 高感度のLALを得る目的で、かぶとがに血球に対して有効な抗凝集剤を検索した結果、テオフィリン、カフェインおよびテオブロミンなどのmethylxanthine類が最も有効であることを認め、このものを用いて日本産かぶとがに (*tachypleus tridentatus*) から感度1ng/mlのLALを再現性よく抽出することに成功した。
- 2) 各種endotoxin標品についてウサギによる局方発熱性物質試験法とLAL testの相関性について検討し、LAL testが生物活性を反映することを認めた。
- 3) LAL testの反応特異性について検討し、アミノ酸、蛋白質、糖類、脂肪酸、核酸関連物質およびアミンなどの生体成分がLALのゲル化作用を示さないことを認め、LAL testの生体成分への応用における反応特異性を確認した。また反応至適温度は37°C~40°C、反応至適pHは6.75~7.25、反応時間は4時間でプラトーに達することを認め、さらにアルカリ土類金属がLAL testの感度をあげる作用のあることを認めた。
- 4) ヒト血漿よりLALゲル化反応阻害物質を精製し、 α_1 -antitrypsinおよびantithrombin III類似の2種の分画を得た。

参考文献

- 1) F. B. Bang, Bull. Johns. Hopkins Hosp., **98**, 325 (1956).
- 2) J. Levin and F. B. Bang, Bull. Johns. Hopkins Hosp., **115**, 265 (1964).
- 3) J. Levin and F. B. Bang, Thromb. Diath. Haemorr., **19**, 186 (1968).
- 4) 小林正義, 山元正昭, 薬誌, **94**, 293 (1974).
- 5) P. Morrison and W. H. Rotham, Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., **94**, 21 (1957).

- 6) A. L. Copley, *Federation Proc.*, **6**, 90 (1947).
- 7) J. Levin, P. A. Tomasulo and R. S. Oser, *J. Lab. Clin. Med.*, **75**, 903 (1970).
- 8) R. B. Reinhold and J. Fine, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **137**, 334 (1971).
- 9) S. Tamakuma, R. Rojas-Corna, P. Cuevas and J. Fine, *Ann. Surg.*, **173**, 219 (1971).
- 10) J. Levin, T. E. Poore, N. S. Young, S. Margolis, N. P. Zauber, A. S. Towns and W. R. Bell, *Ann. Internal Med.*, **76**, * 1 (1972).
- 11) S. P. Wilkinson, *Lancet* **1**, 521 (1974).
- 12) 多羅尾和郎, 遠藤修, 池内孝夫, 蘇鴻偉, 諸井球樹, 福島孝吉, *日消誌*, **73**, 1366 (1976).
- 13) M. S. Cooperstock, R. P. Tucker and J. B. Baublis, *Lancet* **1**, 1272 (1975).
- 14) 丹羽允, *日細誌*, **30**, 439 (1975).
- 15) N. Heimbürger, H. Haupt and H. G. Schwick, *Proceedings of the International Research Conference on Proteinase Inhibitors, P1-22* (H. Fitz and H. Tschesche eds.) Walter de Gruyter (1971).

論文の審査結果の要旨

日本産かぶとがにから *Limulus Amebocyte Lysate* (LAL) を抽出し, LAL test が局方発熱性物質試験法と相関性があることを見出した。さらにその特異性を検討し, これにより, 発熱性物質の試験法を確定し, 実用化の道を開いた。よって薬学博士として価値を認めた。