

Title	Limulus Amebocyte Lysateのゲル化反応に関する研究
Author(s)	小林,正義
Citation	大阪大学, 1980, 博士論文
Version Type	
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、〈a href="https://www.library.osaka- u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について〈/a〉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 5012 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

(主查) 論文審查委員 教授青沼 繁

(副查) 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, つついて 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。 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

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。

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パイロジェン(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³¹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⁴゚その原因として、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 516 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 $10^{-3}\mu g/m \ell$ 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

(step 2)
(step 3)
(step 4)

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 (μg/mℓ)	Yieid of coactive LAL (%)
Adenosine	2×10^{-3}	±	1	30
Hydroxylamine	2×10^{-2}	±	10	35
cyclic AMP	2×10^{-2}	±	10	45
Prostaglandin E1	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 agregated 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

Table III. Procedure of LAL Test

One tenth milliliter of testing sample was added to $0.1m\ell$ of LAL, and the mixture was incubated at 37% for 1 hr.

The results were judged from the following view points.

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

に2~10倍高い感度で測定できることを認めた。

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

	Endotoxin concentration (μg/mℓ)								End-point			
Endotoxins	×10 ⁻¹		×10 ⁻²		×10 ⁻³			×10 ⁻⁴			Gelation a)	Pyrogenic b)
	2.5	1	5	2.5	1	5	2.5	1	5	2.5	μg/ml	μg/ml/kg
E. coli 0128: B 12	++	++	+	±	_	_	_	_	_	_	5.0×10 ⁻²	1. 0×10 ⁻¹
E. coli 026 : B6	++	++	++	++	++	±	_	_	_	_	5. 0×10 ⁻³	3.0×10^{-2}
S. enteritidis	++	++	++	++	++	+	±		_		2.5×10^{-3}	1.0×10^{-2}
E. coli 0111: B4	++	++	++	++	++	++	+	\pm	_		1.0×10^{-3}	1.0×10 ⁻²
E. coli 0127: B8	++	++	++	++	++	++	+	\pm	±		1.0×10^{-3}	3.0×10^{-3}
S. abotus equi	++	++	++	++	++	++	++	+	\pm	_	5.0×10 ⁻⁴	3.0×10^{-3}
S. minnesota R595, PCP	++	++	++	++	++	++	++	+	\pm	_	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) <u>Limulus Amebocyte Lysate の反応特異性</u> 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	<u> </u>
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, Cholesterol, Sodium cholate, Lecithin, Ganglioside	
Deoxyribonuleic acid, a Ribonucleic acid, Adenosine-diphosp Adenosine-triphosphate, Inosine	phate, —
Histamine, Adrenaline, Noradrenaline, Serotonin	. -
Na-L-Ascorbate	_

- a) Two percent solutions dissoved 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℃、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%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 WIに示したように反応至適温度は37℃~40℃に認められ,50℃以上または5℃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℃の反応

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

_U		E. coli	0111: B 4	Endoto	xin (ng/	′mℓ)
pН	10	5	2.5	1.0	0.5	0.25
4.75	±	_	_	_	_	_
5.00	+	_	_	_	_	_
5.25	+	±	_	_	_	_
5.50	++	+	\pm	_	_	
5.75	++	+	\pm		_	_
6.00	++	+	±	±	_	_
6.25	++	++	+	±	-	_
6.50	++	++	+	+	±	_
6.75	++	++	++	++	+	\pm
7.00	++	++	++	++	+ '	\pm
7.25	++	++	++	++	+	±
7.50	++	++	++	++	±	
7.75	++	++	+	+±	_	_
8.00	++	+	±	土	_	_
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5×10⁻²M および10⁻² M濃度のMg²⁺,Ca²⁺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Mg²⁺Ca²⁺イオンを添加してもデル 化活性の回復が認められないことから, Mg²+Ca²+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。 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。

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

Temp.		E. coli	0111 :	B4 End	otoxii	n (ng/	mℓ)
(L)	100	10	5	2.5	1	0.5	0.25
5	_	_	_	_	_	_	_
25	++	++	+	±	-	_	-
30	++	++	++	+	\pm	_	
35	++	++	++	++	\pm	_	_
37	++	++	++	++	+	±	_
40	++	++	++	++	+	±	_
45	++	++	++	±	_	_	_
50	+				_	_	_

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

Incubatio	n E	. coli	0111 :B4	1 Endo	toxin (n	${f g}/{f m}\ell)$	
time (min.)	10	5	2.5	1	0.5	0.25	0.1
15	_	_	-	_	_	_	_
30	++	++	++	±	_	_	_
45	++	++	++	+	_	_	_ '
60	++	++	++	+	±	_	_
120	++	++	++	++	+	_	_
240	++	++	++	++	++	+	±
360	++	++	++	++	++	+	±
480	++	++	++	++	++	+	±

その結果 $10^{-3}\sim10^{-1}$ 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 % に低下した。これは通常のLAL 中に $10^{-3} \sim 10^{-2}$ 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。

 5×10^{-2} 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(ED TA-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。

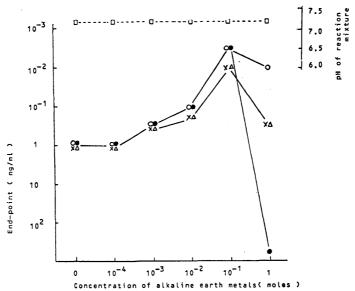


Fig. 1 Effect of Alkaline Earth Metals on the Gelatin Reaction of LAL LAL tests were performed on the samples containing various concentrations of alkaline earth metals and endotoxin, and the end-point, that is the minimum concentration of endotoxin to be positive in LAL test, was determined at each concentration of alkaline earth metal.

—— Mg²⁺ —— Ca²⁺ —— Ba²⁺ —— Sr²⁺ —— pH

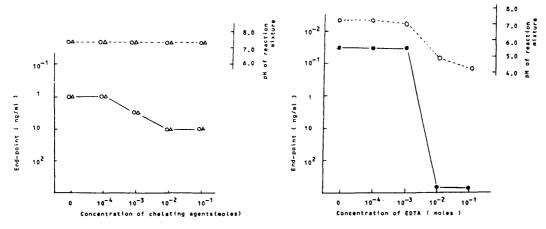


Fig. 2 Effect of Chelating Agents on the Gelation Reaction of LAL at pH 7.2

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 React 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 $10\sim50\%$ 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, Reinhold 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 X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 Xに示したようにX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	0.0	1.0	Condroitin sulfate	4.0	1.0
NaCl	0.9	1. 0	Glutamic acid	10.0	1.0
	10.0 20.0	0.5 >10.0	Lysine	10.0	1.0
Glucose	25. 0	1.0	Glycine	10.0	1.0
	50.0	2.5	Albumin	5.0	1.0
Inositol	50.0	1.0	ATP-2Na	10.0	5. 0
Mannit	20.0	1.0		1.0	1.0
Maltose	42.0	1.0	Adenosine	1.0	1.0
Dextran 70	20. 0	1.0	Plasma (human)		2.5 \times 10 ⁴
Heparin	0. 4 (500 U)	1.0	(numan)		

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 (ng/ml)
L-Cysteine	1.0	100
	0.1	5.0
	0.01	2.5
L-Cystine	1.0	1.0
2-Mercapto-	1.0	25.0
ethanol	0.1	1.0
L-Glutathione	1.0	1.0
Na-thioglycolate	1.0	1.0

a) the minimum concentration of E.coli 0111:84 endotoxin to produce the grace(+) 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\$208	1.0	1.0

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

Table	XII.	Influences of Protein Denaturing and Precipitating Reagents,
		and Anticentics on the Gelation Reaction of LAL

Substances	Conc.	End- a) point (ng/ml)	Substances	Conc.	End- a) point (ng/ml)
(NH ₄) ₂ 50 ₄	10.0	>100	Ethanol	5.0	1.0
4 2 4	5.0	10.0	Benzyl	2.0	100
	1.0	1.0	alcohol	1.0	5.0
Sulfosalicy late	0.4	> 100		0.5	1.0
Na-TCA	1.0	2.5	Benzalconium chloride	0.1	25
	0.2	1.0	CHIOFIGE	0.01	1.0
Na-cholate	1.0	>100	Phenol	1.0	10
Ha-chotate	0.1	5.0		0.5	1.0
Urea	10.0	>100	formaldehyde	0.5	10
0.00	5.0	5.0		0.1	1.0
Wall	1.0	2.5	Cephalosporin	1.0	2.5
NaNz	0.1	1.0	Ampicillin	1.0	2.5

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、「18)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 ヒト血漿の硫安分画により阻害活性は40~75%飽和硫安沈澱分画 (fraction A-2) に認められた。fraction A-2をconcanvalin A-Sepharose 4B affinity,

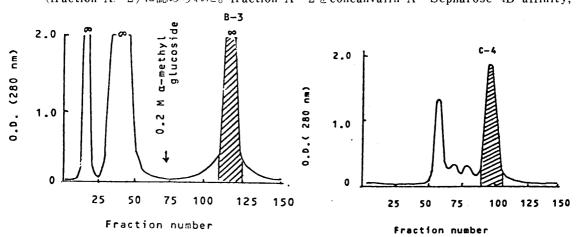


Fig. 4. Affinity Column Chromatography of the Inhibitor(A-2) on Concanavalin A-Sepharose 4B

Fraction A-2 was applied to a column of concanavalin A-Sepharose 4B $(2.8\times60\text{cm})$ equibrated with 0.05 M Na-phosphate buffer containing 0.05 M Na-Cl (pH 7.2). The column was washed with the same buffer. The absorbed innibitor 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 $(5.0\times90\text{cm})$ equibrated 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。

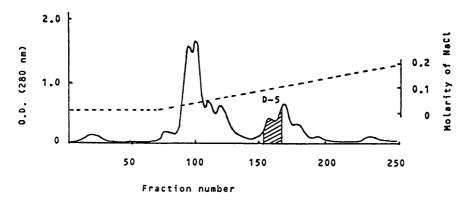


Fig. 6. Ion Exchange Column Chromatography of the Inhibitor (C-4) on DEAE-Sepharose CL6B

Fraction C-4 was applied to a column of DEAE-Sepharose CL 6B $(2.6\times40\text{cm})$ equibrated 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.

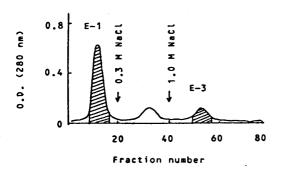


Fig. 7. Affinity Column Chromatography of the Inhibitor(D-5)on Heparin-Sepharose 4B

Fraction D-5 was applied to a column of heparin-Sepharose 4B $(1.0\times12\mathrm{cm})$ equibrated 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.

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

	c, as East I assistant a stop					
Step	Fraction No.	Yield (mg/dl plasma)	Recovery of total activity (%)			
Plasn	ıa	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 $X \coprod$ 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

2%であった。

ii) <u>物理化学的</u>, 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

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α₁-aniitrypsin 抗血清とのみ,E−3は抗antithrombin II 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E-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 -antitrypsin $^{15)}$ およびantithrombin $\coprod^{15)}$ 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 \blacksquare 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 o 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 α₁-antitrypsin
c.rabbit anti-human anti-thrombin III

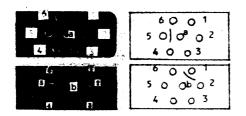


Fig. 10. Ouchterlony Immunodiffusion of E-1 and E-3 against Antisera of Various Proteinase Inhibitors

Wells 1. anti-antithrombin

- 2. anti-α₂-macroglobulin
- 3. anti-Cl-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		α ₁ -Anti- trypsin	Antithrom- bin ∐
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 α₁-Antitrypsin and Antithrombin II

Component	E-1	€-3	α ₁ -anti- trypsin	anti- thrombin III	
	(g/100 g protein)				
Lysine	7.78	6.42	8.41	6.65	
Nistidine	3.29	1.16	3.33	1.12	
NH ₂	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	
Elycine	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 1 ng/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℃~40℃、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. Heimburger, 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 Gruiter (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。