

各種肝疾患における血中エンドトキシン測定 of 臨床的意義

大元 謙治, 山本晋一郎, 井手口清治, 山本 亮輔, 高取 敬子, 和田あゆみ, 齋藤 逸郎, 大海 庸世, 日野 一成, 平野 寛

各種肝疾患 166 例について血中エンドトキシンを合成発色基質を用いた定量的リムルステストにて測定し, その臨床的意義について検討した. 急性肝炎では全例血中エンドトキシンは陰性であったが, 劇症肝炎では高率かつ高度のエンドトキシン血症を認めた. 慢性肝疾患においては非代償性肝硬変および肝細胞癌に有意の血中エンドトキシンの上昇を認め予後を左右する因子であろうと思われた. また血中エンドトキシンと細網内皮系機能および一般肝機能との関係を検討した結果, 肝疾患でのエンドトキシン血症の成因には細網内皮系機能の低下や肝血流量の低下のほか, 肝実質細胞のエンドトキシン処理能の低下も関与していると考えられた. 以上より, 血中エンドトキシンの測定により肝疾患の進展度や予後予測が可能であろうと思われた. (昭和63年9月22日採用)

Clinical Significance of Plasma Endotoxin in Various Liver Diseases

Kenji Ohmoto, Shinichiro Yamamoto, Seiji Ideguchi, Ryosuke Yamamoto, Keiko Takatori, Ayumi Wada, Itsuro Saito, Tsuneyo Ohumi, Kazunari Hino and Yutaka Hirano

Plasma endotoxin concentration was examined in 166 cases of various liver diseases. Plasma endotoxin was determined by a quantitative Limulus test using chromogenic substrate with perchloric acid pretreatment. The plasma endotoxin level was significantly elevated in decompensated liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma as well as in fulminant hepatitis. It correlated well with the lipid emulsion test, ICG R₁₅ and the hepaplastin test, which suggested that the plasma endotoxin level might reflect reticuloendothelial function, blood flow of the liver and parenchymal liver cell function. From these results, measurement of endotoxin in plasma is considered to be useful in the evaluation of liver function and prognosis of liver diseases. (Accepted on September 22, 1988) *Kawasaki Igakkaishi* 14(4): 617-623, 1988

Key Words ① Endotoxin ② Lipid emulsion test ③ Liver function
④ Liver diseases

I. はじめに

腸内細菌由来のエンドトキシン(Endotoxin: Et)は腸内から吸収され門脈血中に存在するが、正常人では肝内の Kupffer 細胞をはじめとする細網内皮系(Reticuloendothelial System: RES)により処理され体循環には出現しないとされている。¹⁾しかし高度肝障害例では spill over した Et が体循環に出現することがあり、肝障害の成因や進展との関連が注目されている。²⁾

一方、Et の測定法としてリムルステストが Levin ら³⁾により創案されて以来、広く用いられているが、ゲル化反応を指標としたリムルステストは定性的検出法であるため subclinical な Et 血症を確認するのは困難であった。1978年岩永ら⁴⁾や1982年田村ら⁵⁾によって開発された合成発色基質を用いた Perchloric acid-Limulus colorimetric test (PCA-LCT) は定量的検出法であるため、微量の血中 Et も検出可能と考えられている。

今回われわれは各種肝疾患 166 例について PCA-LCT により血中 Et を測定した。また血中 Et と RES 機能および一般肝機能との関係も合わせて検討し興味ある結果を得たので報告する。

II. 対象と方法

血中 Et の測定は各種肝疾患 166 名を対象とした。内訳は急性肝炎 8 例、劇症肝炎 5 例、慢性非活動性肝炎 8 例、慢性活動性肝炎 10 例、代償性肝硬変 21 例、非代償性肝硬変 25 例、肝細胞癌 70 例、胆管細胞癌 7 例、転移性肝癌 6 例、閉塞性黄疸 6 例(臍癌 3 例、総胆管癌 1 例、総胆管結石 2 例)で、健常者 20 名を対照とした。

血中 Et の測定は前処理として過塩素酸(PCA)を用い、合成発色基質による定量的リムルステスト(Toxicolor test®: 生化学工業)を施行した。Et の測定に使用したガラス器具は 250°C 以上で 2 時間以上の乾熱処理を行った。患者の皮膚を 90% エタノールで消毒し、ヘパリン加採血を行い、遠心分離により多血小板血漿を調

製し、-80°C で冷凍保存して 1 か月以内に測定した。測定手順は血漿検体 0.1 ml を 0.32M PCA 液 0.2 ml に加え、37°C で 20 分間加温し、1,000×g で 15 分間遠心して得られた上清を 0.05 ml 取り出し、0.18N NaOH 0.05 ml で中和した。この処理検体 0.1 ml に、pH 8.0、0.2M Tris-HCl 緩衝液に溶解したカプトガン血球抽出物と合成基質よりなる反応液 0.1 ml を添加し、37°C で 30 分間加温した。その後 0.45N 塩酸に溶解した 0.04% 亜硝酸ナトリウム 0.5 ml、0.3% スルファミン酸アンモニウム 0.5 ml、0.07% N-(1-ナフチル)エチレンジアミン二塩酸塩 0.5 ml を順次添加し、遊離した p-ニトロアニリンをジアゾ化して 545 nm の波長での吸光度を測定した。標準 Et (E. coli 0111 B4: Difco 社)により作成した検量線から Et 濃度を求めた。

RES 機能検査は Kim ら⁶⁾や平澤ら⁷⁾により臨床応用された lipid emulsion test (LET) を基に簡略化した方法⁸⁾にて行った。すなわち 10% lipid emulsion (Intralipos®) を 2 ml/kg 静脈内投与し、3 分後、6 分後、9 分後に採血し、分光光度計にて 580 nm の波長での血漿の混濁度を測定した。各時間の測定値を片対数方眼紙にプロットし、投与した lipid emulsion の血中半減期を求めた。Biozzi ら⁹⁾の phagocytic index (=K 値)の計算式

$$K = (\log C_1 - \log C_2) / (T_2 - T_1)$$

($C_1 = T_1$ 時血漿混濁度 - 注射前血漿混濁度)

($C_2 = T_2$ 時血漿混濁度 - 注射前血漿混濁度)

より貪食指数 (KLET) = $\log 2 /$ 半減期(分)を算出した。

なお 2 群間の有意差は Wilcoxon 検定を用いて危険率 5% 以下を有意差ありとした。

III. 結果

Figure 1 に示すように、健常者 20 名の平均血中 Et 濃度は 2.06 ± 1.06 pg/ml で、5 pg/ml 以下が正常域と考えられた。急性肝炎では全例が正常値であったのに対して、劇症肝炎では 5 例中 4 例 (80%) が高値を示した。慢性非活

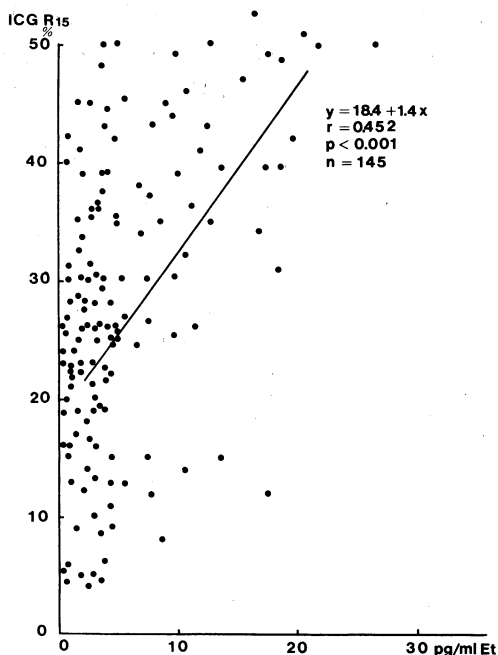


Fig. 4. Plasma endotoxin level correlated well with ICG R₁₅

γ -globulin および hepaplastin test (HPT) であった。血中 Et と KLET (Fig. 2) および HPT (Fig. 3) とは負の相関を示し、ICG 15 分値 (Fig. 4) および γ -globulin (Fig. 5) とは正の相関を示した。

IV. 考 察

1972年 Caridis ら¹⁰⁾ は劇症肝炎 2 例と肝硬変 2 例において敗血症を伴わない Et 血症を認め内因性 Et 血症と名付けた。Nolan²⁾ は inverted gut sac の実験から Et が腸粘膜から吸収されることを証明し、肝障害の成因や進展と腸内細菌由来の内因性 Et 血症との関連を指摘している。多羅尾ら¹¹⁾ は肝硬変のうち有腹水例の 76%、無腹水例の 24% に Et 血症を認め、腹水が肝硬変例の Et 血症の成因に関与していると報告している。しかし Fulenwider ら¹²⁾ は肝硬変の有腹水例の 11 例と無腹水例 27 例の血中および腹水中の Et を測定し、すべての検体で Et は陰性であったと報告している。このように報告者により結果が一致しない

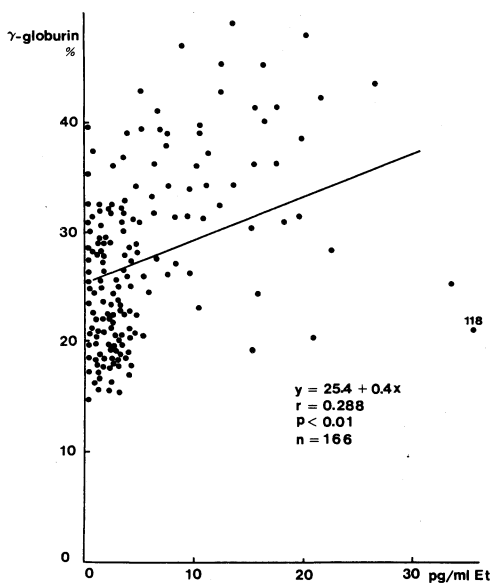


Fig. 5. Plasma endotoxin level correlated well with γ -globulin

原因として、Et の検出法として従来のリムルステストを用いているためであろうとの報告がある。¹³⁾ つまり、ゲル化反応を指標としたリムルステストは定性的検出法であるため 5~10 pg/ml の微量の Et を確認判定することが困難であることや、検体の前処理として用いられている希釈加熱法いわゆる Cooperstock 法¹⁴⁾ での偽陽性偽陰性等の問題が指摘されている。

1978年 岩永ら⁴⁾ は、Et とカプトガニ血球抽出液との反応過程は 3 種のセリンプロテアーゼ前駆体が順次活性化され、さらに活性化された clotting enzyme が coagulogen を coagulin に変えてゲル化反応が起こるカスケードを発見し、さらに coagulogen が clotting enzyme により限定分解を受ける部分と同じアミノ酸配列をもつ合成発色基質をカプトガニ血球抽出液に組み込み、Et を比色定量する合成基質法を考案し、リムルステストを客観性のある感度の高い定量法に改良した。また血中には clotting enzyme と同じアミダーゼ活性をもつ物質 (thrombin, trypsin, Xa 因子等) や、逆に反応を阻害する物質 (α 2-plasmin inhibitor, anti-thrombin III 等) があり、これらが偽陽性や

偽陰性の原因となっている。田村ら⁵⁾は過塩素酸 (PCA) による前処理にてこれら偽陽性物質や偽陰性物質が完全に除去でき、Et 添加回収試験でもほぼ 100% の回収率を示したと報告している。

今回われわれはこれらを組み合わせた PCA-LCT により各種肝疾患例の血中 Et を測定した。急性肝炎では全例が正常域であったが、劇症肝炎では高率に、かつ高度の Et 血症を来していた。Wilkinson ら¹⁵⁾は劇症肝炎例での腎不全や播種性血管内凝固症候群 (DIC) の合併と Et 血症との関連を指摘している。また志賀ら¹⁶⁾は家兎の総胆管内に Et を逆流させ、さらに 24 時間後に耳静脈から Et を注入すると肝臓に出血性の広汎な壊死を来すと報告し、劇症肝炎の成因として Shwartzman 反応¹⁷⁾ の関与を指摘している。また Freudenberg ら¹⁸⁾はラットに Et を投与すると初期には Kupffer 細胞に取り込まれ、投与 3 日後には肝実質細胞に移行し、一部は脱アシル化により解毒され胆汁中より腸管に排泄されると報告しており、劇症肝炎の Et 血症は肝組織の広汎な壊死により Et の処理機構が破綻した結果であるとも考えられ、これらの因果関係についてはなお明らかでない。

慢性肝疾患においては、慢性肝炎および代償性肝硬変例ではほとんどが正常域を示していたが、非代償性肝硬変および肝細胞癌例では有意な血中 Et の上昇を認めた。胆管細胞癌では 7 例中 2 例に Et 血症を認めたが、この 2 例は共に高度の肝硬変合併例で非代償期の状態であった。10 pg/ml 以上の Et 血症例では発熱や腎障害や前 DIC 状態等の Et によると思われる臨床所見がみられたが、5~10 pg/ml 程度の軽度の Et 血症ではほとんどが無症状であった。矢島¹⁹⁾も PCA-LCT にて肝疾患での血中 Et を測定し、内因性 Et 血症例では必ずしも shock や DIC を伴わないと述べ、これらを septic endotoxemia に対して non-septic endotoxemia として区別し、外因性 Et と内因性 Et との異同の問題も指摘している。すでにわれわれが報告した肝動脈塞栓術後の ET 血症例でも、

10 pg/ml 以下の症例ではほとんどが無症状であった。^{20), 21)} Beeson²²⁾は Et に対して biological tolerance が成立することを指摘しており、慢性肝疾患において内因性 Et による生体への影響が出現する臨床上有意な血中 Et 濃度は 10 pg/ml 以上と考えられ、血中 Et が 10 pg/ml 以下では Et に対する tolerance が成立しているものと思われた。

非代償性肝硬変における Et 血症の成因として、中野ら²³⁾は肝 RES 機能の低下と側副血行路の発達とが大きく関与しており、腹水中 Et の腹膜からの吸収やリンパ行性の経路も指摘している。また肝硬変例の腸内胆汁酸量の低下に伴う腸内細菌叢の変化や腸粘膜からの Et 吸収の促進等も関係しているとの報告もある。²⁴⁾さらに Et の処理機構として血漿中に Et 不活化因子 (endotoxin inactivating factor: EIF) の存在も指摘されており、^{21), 25)}内因性 Et 血症の成因について今後も多角的に検討されなければならないと思われた。一方、多羅尾²⁶⁾は肝硬変症に対して非吸収性抗生剤を長期間投与し、血中 Et の低下と肝機能の回復をみたと報告し、Et 血症が肝硬変の進展に関与していると述べている。われわれも²⁷⁾非代償性肝硬変に非吸収性抗生剤である硫酸ポリミキシン B を経口投与し、血中 Et の低下に伴い肝不全の改善を認めたと報告した。さらにラットの四塩化炭素²⁸⁾やガラクトサミン肝障害²⁹⁾では、Et が肝細胞障害の要因になっていると指摘されている。以上のように、慢性肝疾患の場合も Et 血症が肝疾患の進展の結果であるか、成因の一つであるかはいまだ明らかではないが、非代償性肝硬変と肝細胞癌例に高頻度に Et 血症を認めたことより、Et の測定は慢性肝疾患の進展度や予後を予測する指標に成り得るであろうと考えられた。

血中 Et と RES 機能および一般肝機能との関係を検討した結果、血中 Et は KLET と ICG 15 分値とに高い相関を認め、肝疾患における内因性 Et 血症の成因として RES 機能低下や肝血流の減少が関与していることが示唆された。また γ -globulin および HPT とも有意な相関

を認めた。中野ら²³⁾は γ -globulin の増加の機序として、内因性 Et 血症を来すような非代償性肝硬変では、門脈血中の Et や細菌性および食事性抗原の増加により抗体産生が促されている可能性があるとして述べている。また HPT との関連については、HPT の著明に低下している劇症肝炎や非代償性肝硬変での高 Et 血症の要因は RES 機能低下のほかに、Freudenberg ら¹⁸⁾ が指摘しているように肝実質細胞による Et の処理能の低下の関与を示唆する結果と考えられた。

以上より、肝疾患と内因性 Et 血症とは密接に関連していることが示され、PCA-LCT により新しい観点から肝疾患の病態の把握が可能となった。さらに肝障害の進展の予防や治療への試みがなされるべきであろうと思われた。

V. ま と め

各種肝疾患 166 例について PCA-LCT により血中 Et を測定し、以下の結果を得た。

1) PCA-LCT による血中 Et の正常域は 5 pg/ml 以下であるが、肝疾患において臨床上有意味な Et 血症は 10 pg/ml 以上と考えられた。

2) 劇症肝炎では高率にかつ高度の Et 血症を認めた。

3) 慢性肝疾患では非代償性肝硬変および肝細胞癌に有意な血中 Et の上昇を認めた。

4) 肝疾患における内因性 Et 血症の成因として RES 機能低下や肝血流の減少のほかに、肝実質細胞の Et 処理能の低下も関与していることが示唆された。

5) 肝疾患において PCA-LCT による血中 Et の測定により、新しい観点から肝疾患の病態が把握され、肝障害の進展度や予後予測が可能であろうと思われた。

文 献

- 1) Jacob, A. I., Goldberg, P. K., Bloom, N., Degenshein, G. A. and Kozinn, P. J.: Endotoxin and bacteria in portal blood. *Gastroenterology* 72: 1268—1270, 1977
- 2) Nolan, J. P.: The role of endotoxin in liver injury. *Gastroenterology* 69: 1346—1356, 1975
- 3) Levin, J., Tomasulo, P. A. and Oser, R. S.: Detection of endotoxin in human blood and demonstration of an inhibitor. *J. Lab. clin. Med.* 75: 903—911, 1970
- 4) Iwanaga, S., Morita, T., Harada, T., Nakamura, S., Niwa, M., Takada, K., Mimura, T. and Sakakibara, S.: Chromogenic substrates for horseshoe crab clotting enzyme. Its application for the assay of bacterial endotoxins. *Haemostasis* 7: 183—188, 1978
- 5) Tamura, H., Obayashi, T., Takagi, K., Tanaka, S., Nakahara, C. and Kawai, T.: Perchloric acid treatment of human blood for quantitative endotoxin assay using chromogenic substrate for horseshoe crab clotting enzyme. *Thromb. Res.* 27: 51—57, 1982
- 6) Kim, D. K. and Pfeifer, J.: Measurement of phagocytic activity of reticuloendothelial system (RES) by intralipid: Effect of C Parvum treatment. *Surg. Forum.* 28: 85—87, 1977
- 7) 平澤博之, 菅井桂雄, 林 春幸, 添田耕司, 小林弘忠, 大竹喜雄, 田畑陽一郎, 小高通夫, 佐藤 博: 術後感染症に対する自己防御機構の検討—II. 細網内皮系機能の検討とその抑制に対する対策. *外科* 43: 47—52, 1981
- 8) 大元謙治, 山本晋一郎, 福嶋啓祐, 井手口清治, 山本亮輔, 日野一成, 大海庸世, 古城研二, 平野 寛: 肝動脈塞栓術 (TAE) 前後の lipid emulsion test の意義. *肝臓* 27: 837, 1986
- 9) Biozzi, G., Benacerraf, B. and Halpern, B. N.: Quantitative study of the granulopoietic activity of the reticulo-endothelial system. II: A study of the kinetics of the granulopoietic activity of the R. E. S. in relation to the dose of carbon injected. Relationship between the weight of the organs and their activity. *Br. J. exp. Path.* 34: 441—457, 1953
- 10) Caridis, D. T., Reinhold, R. B., Woodruff, P. W. H. and Fine, J.: Endotoxaemia in man. *Lancet* 1: 1381—1386, 1972

- 11) Tarao, K., So, K., Moroi, T., Ikeuchi, T., Suyama, T., Endo, O. and Fukushima, K.: Detection of endotoxin in plasma and ascitic fluid of patients with cirrhosis: Its clinical significance. *Gastroenterology* 73: 539—542, 1977
- 12) Fulenwider, J. T., Sibley, C., Stein, S. F., Evatt, B., Nordlinger, B. M. and Ivey, G. L.: Endotoxemia of cirrhosis: An observation not substantiated. *Gastroenterology* 78: 1001—1004, 1980
- 13) 矢島義昭：合成発色基質を用いた血中エンドトキシン測定法の臨床応用と肝疾患におけるエンドトキシン血症の臨床的意義について。肝臓 27: 934—944, 1986
- 14) Cooperstock, M. S., Tucker, R. P. and Baublis, J. V.: Possible pathogenic role of endotoxin in Reye's syndrome. *Lancet* 1: 1272—1274, 1975
- 15) Wilkinson, S. P., Arroyo, V., Gazzard, B. G., Moodie, H. and Williams, R.: Relation of renal impairment and haemorrhagic diathesis to endotoxaemia in fulminant hepatic failure. *Lancet* 1: 521—524, 1974
- 16) 志賀淳治, 加藤綾子, 森 亘: シュワルツマン反応による家兎肝臓の急性出血性壊死。肝臓 17: 580—588, 1976
- 17) Shwartzman, G.: A new phenomenon of local skin reactivity to *B. typhosus* culture filtrate. *Proc. Soc. Biol. Exp.* 25: 560—561, 1928
- 18) Freudenberg, M. A., Kleine, B. and Galanos, C.: The fate of lipopolysaccharide in rats: Evidence for chemical alteration in the molecule. *Rev. infect. Dis.* 6: 483—487, 1984
- 19) 矢島義昭：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
- 20) 大元謙治, 山本晋一郎, 井手口清治, 山本亮輔, 日野一成, 大海庸世, 古城研二, 斎藤逸郎, 平野 寛: 肝疾患における血中エンドトキシンの臨床的意義。消化器科 9: 203—210, 1988
- 21) 大元謙治: 肝動脈塞栓術後の血中エンドトキシンの動態。肝臓 29: 1087—1094, 1988
- 22) Beeson, P. B.: Tolerance to bacterial pyrogens. I. Factors influencing its development. *J. exp. Med.* 86: 29—38, 1947
- 23) 中野 均, 矢野洋一, 鈴木 宏, 江口 敏, 永田一良, 有高雄樹, 村山俊二, 平井賢治, 佐田通夫, 安倍弘彦, 谷川久一: 網内系機能とエンドトキシン血症。織田敏次監修, 本間 遜, 玉熊正悦編: エンドトキシン研究の新しい展開。東京, 羊土社。1986, pp. 193—204
- 24) Kocsar, L. T., Bertok, L. and Varteresz, V.: Effect of bile acids on the intestinal absorption of endotoxin in rats. *J. Bacteriol.* 100: 220—223, 1969
- 25) Skarnes, R. C., Rosen, F. S., Shear, M. J. and Landy, M.: Interaction of endotoxin by a humoral component. II. Interaction of endotoxin with serum and plasma. *J. exp. Med.* 108: 685—699, 1958
- 26) Tarao, K., Moroi, T., Hirabayashi, Y., Ikeuchi, T., Endo, O. and Takamura, Y.: Effect of paromomycin sulfate on endotoxemia in patients with cirrhosis. *J. clin. Gastroenterol.* 4: 263—267, 1982
- 27) 大元謙治, 山本晋一郎, 井手口清治, 山本亮輔, 古城研二, 斎藤逸郎, 和田あゆみ, 山本真理子, 大海庸世, 日野一成, 平野 寛, 福嶋啓祐, 有田清三郎: 非代償性肝硬変患者に対する硫酸ポリミキシンBの効果。肝胆膵 16: 1039—1046, 1988
- 28) Nolan, J. P. and Leibowitz, A. I.: Endotoxin and the liver. III. Modification of acute carbon tetrachloride injury by polymyxin B-an antiendotoxin. *Gastroenterology* 75: 445—449, 1978
- 29) Grün, M., Liehr, H. and Rasenack, U.: Significance of endotoxaemia in experimental "galactosamine hepatitis" in the rat. *Acta Hepato-Gastroenterol.* 24: 64—81, 1977