

侵襲と臓器障害発症のあいだをつなぐものとその対策

—Endotoxin—

札幌医科大学第1外科 江端俊彰 * , 早坂 淩 *

I. はじめに

外科的手術侵襲に伴い、臓器障害を呈することは、日常診療において、しばしば経験することである。臓器障害は、敗血症、出血、ショックなどにより、種々のmediatorが放出されることに関連して惹起される。術後の臓器障害は感染を伴うことが多く、とくにendotoxinの関与が重要と考えられている。Endotoxinは、補体系、カリクレイン・キニン系、凝固線溶系の諸因子を活性化してショックを引き起こす。Endotoxin Shockでは、chemical mediatorが放出され、cellular hypoxiaの細胞内では代謝障害を呈し、臓器障害を誘発する。Endotoxinに関連した臓器障害症例、endotoxinの定量法、肝の臓器障害に関する実験的研究につき検討したので報告する。

II. 研究対象と方法

1. 臓器障害症例の検討

昭和50年1月より昭和62年8月までの13年間に当科での手術後にendotoxin血症より臓器障害を呈した症例は54例である。この54症例を対象にendotoxinと臓器障害につき検討した。

2. Endotoxin定量法の検討

Endotoxinの検出法としてのLimulus gelatin test (LGT)とmethyl coumarin (MCA)合成基質による定量法を比較検討した。

3. 肝の臓器障害に関する実験

ラットを使用し、24時間絶食後、エーテル麻酔下に開腹し、盲腸を約1cm切開することにより汎発性腹膜炎を作成した。汎発性腹膜炎後、endotoxin血症を併発し、

肝臓器障害を呈する実験モデルである。実験群は、対照群：単開腹し、3、5時間後に再開腹して肝を摘出した。腹膜炎3時間群：腹膜炎作成3時間後に再開腹して肝を摘出した。腹膜炎5時間群：腹膜炎作成5時間後に開腹して肝を摘出した。腹膜炎+デキサメサゾン (Dex)群：腹膜炎作成と同時に尼静脈よりDex. 1mg/100g投与し、5時間後に再開腹して肝を摘出した。

肝の酵素活性の測定は、肝を約1.0g切除し、buffer solutionを加え、ホモジナイズした。遠心分離(18000 rpm 30分)後、上清を抽出物として使用した。解糖系の酵素としてphospho fructokinase (PFKase), pyruvate kinase (PKase), 糖新生系の酵素としてglucose-6-phosphatase (G6Pase), fructose-1,6-diphosphatase (FDPase), phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) の活性を340 nmにてspectrophotometryで測定した。また、酵素蛋白量を決定するためにBiuret法にて測定した。

腹膜炎作成3、5時間後に、再開腹して肝を摘出、生理的食塩水で洗浄したのち、スライサーにて肝を0.4mm厚にスライスした。スライス肝約200mgを三角フラスコに入れ、 $1\mu\text{ci U}^{-14}\text{C}-\text{glucose}$, $1\mu\text{ci l}^{-14}\text{C}-\text{glutamate}$, $1\mu\text{ci U}^{-14}\text{C}-\text{pyruvate}$ を含むmedium 5mlの反応液を注入した。95%O₂+5%CO₂気相にて37℃, 70spm, 2時間反応させたのちに5N-H₂SO₄ a₂ mlにて反応を停止させた。反応停止後、over nightにてCO₂補足を行い、toluene scintillator 15 mlを加え、放射能活性を測定した(図1)。

結果は肝湿重量 100mgあたり2時間に取り込まれた放射能活性を、加えた核種の放射能活性に対する百分比I-

*Toshiaki Ebata

**Hiroshi Hayasaka

Incorporation Rate (I.R.) で表現した。

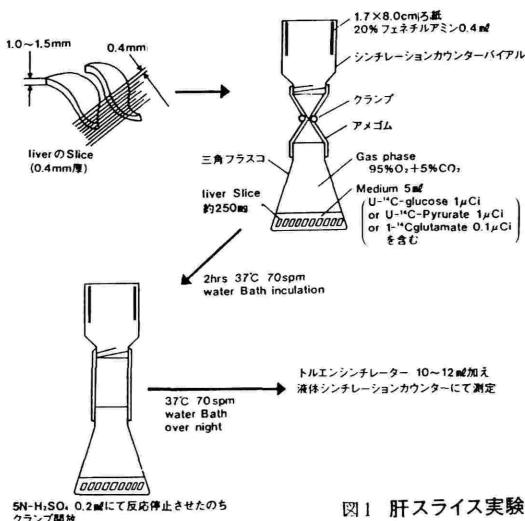


図1 肝スライス実験

5N-H₂SO₄ 0.2 ml にて反応停止させたのち
クランプ開放

$$I.R (\%) = \frac{^{14}CO_2 \text{ dpm} / 100\text{mg slice} / 2\text{hrs}}{\text{dpm}}$$

dpm: medium 中に含まれるcount 値

III. 成績

1. 臓器障害症例の検討

1975年1月より1987年8月までの13年間における臓器障害症例は54例である。年齢別では、39歳以下4例、40～49歳9例、50～59歳7例、60～69歳19例、70歳以上15例と、60歳以上の比較的高齢者に34例、63%と多くみられている。臓器障害数では平均2.5であるが、50～59歳では3.6と多くなっている。四臓器障害以上のMORでは全例死亡している（表1）。肺不全26例、肝不全26例、腎不全35例、DIC28例、消化管出血15例、免疫不全3例であり、エンドトキシンの関与しているものでは、他と比較して DICが高率に認められる。

表1 年齢別臓器障害症例と臓器障害数

年齢	症例数	臓器障害数
39歳以下	4	9 (2.3)
40～49歳	9	18 (2.0)
50～59歳	7	25 (3.6)
60～69歳	19	48 (2.5)
70歳以上	15	33 (2.2)
計	54	133 (2.5)

札幌医科大学第1外科 1975.1～1987.8

2. エンドトキシン血症と基礎疾患

エンドトキシン血症は、感染症に伴って発生する場合、腸内細菌由来の内因性エンドトキシンが血中に発現する場合、免疫不全に伴って発現する場合が考えられる。表2はエンドトキシン血症を呈した症例の基礎疾患である。腹腔内感染、胆道感染などの感染症が、81.5%と非常に高率であった。内因性エンドトキシンに関連して、上腸間膜動脈血栓症、絞扼性腸閉塞症もみられる。すべての症例に血中エンドトキシンが陽性で、定量できたものは35 pg/mlから400 μg/mlの濃度で検出された。細菌の同定では、Pseudomonas, E.coli, Klebsiellaなどのグラム陰性桿菌が多く検出されている。

表2 エンドトキシン血症を呈した症例の基礎疾患

	基礎疾患	症例数	Limulus test
腹腔内感染	胃癌	11	34.5 pg/ml ~ 2 mg/ml
	悪性リンパ腫	3	0.25 μg/ml ~ 0.5 μg/ml
	胃・十二指腸潰瘍	2	0.25 μg/ml
	憩室穿孔	2	(+)
	胃穿孔	1	0.375 μg/ml
	空腸穿孔	1	(+)
	直腸癌	1	(+)
胆道感染	粗管癌	6	32 ng/ml ~ 400 ng/ml
	鶏癌	6	0.125 μg/ml ~ 0.5 μg/ml
	粗管炎・肝炎	3	(+)
	粗管結石	3	(+)
	急性粗管炎	2	(+)
	粗管癌	1	(+)
尿路感染	乳頭癌	1	(+)
	直腸癌	2	10 μg/ml
	上腸間膜動脈血栓症	4	1.0 ng/ml
	絞扼性腸閉塞	3	(+)
腸閉塞症	結核癌	1	(+)
	悪性リンパ腫	1	(+)

3. Limulus testの検討

Endotoxin の検出法としてLGT はよく知られている。1975年より、当教室では北九州産のTachyplems tridentatus よりlpssteを抽出し、LGT を行ってきた。LGT は定性的であるが、品質向上に伴い 0.01ng/mlの感度まで検出できるようになってきた。血漿阻害除去法としては、以前より加熱法を行っている¹⁾。

合成基質法はendotoxin により、濃度依存性に活性化される凝固酵素の活性を、coagulogenのアミノ酸配列をもとに作られた合成基質PNA や MCAの水解活性により数値化することにより定量化したものである。当教室ではこのMCA 合成基質を使用し、6.25pg/mlの感度まで検出可能であった。血漿阻害除去法としては、過塩素酸法が合成基質法ではもっとも有効である²⁾。

消化器外科術後のエンドトキシン血症を疑われ症例に

つきLGTとMCA合成基質法とを比較検討した。LGTで陰性の症例でもMCA法では陽性のこともあり、MCA法は鋭敏性、客観性に関して優れた方法である(表3)。しかし、合成基質法は操作がやや繁雑である欠点があり、緊急を用する時はLGTで十分である。

表3 臨床例検体における Limulus test と新定量法の比較

症例 No.	Limulus test	新定量法	Sample dilution					Lysozyme endpoint ng/ml	Endotoxin 濃度 ng/ml
			2'	2 ²	2 ⁴	2 ⁶	2 ⁸		
1	+	+	+	±	±	-	-	5	4.4
	+	+	#	+	-	-	-	1.25	10
	+	+	#	±	±	-	-	5	6.9
2	+	+	+	+	±	-	-	0.625	5
3	-	+	-	-	-	-	-	1.25	0
4	-	+	-	-	-	-	-	0.625	0
5	-	+	-	-	-	-	-	0.625	0
									2.8

4. 肝の臓器障害時の糖代謝

腹膜炎作成5時間後の血漿 endotoxin濃度は、117.86

ng/mlと高値であった。白血球数4200、血小板数90×10⁴、血糖値 129mg/dlと減少を認めた。また、GOT 115 IU、GPT 18.3 IUと有意な上昇もみられ、肝不全状態であった。

腹膜炎作成3時間後の肝の糖調節酵素活性の変動であるが、解糖系の PFKase は腹膜炎群で19%の有意な増加を認めた。PKase も36%の有意な増加を呈した。糖新生系の酵素である G6Pase は有意差を示さなかったが、FDPase は35%の増加を呈した。腹膜炎作成5時間後では PFKase、PKase が13%、14%の増加を示したが、G6Pase、FDPase は有意差を認めなかった。また糖新生系の PEPCK は、3時間後では16%の減少、5時間後には65%の減少を呈したが有意差はなかった。デキサメサン投与により、PFKase、PKase はともに有意に増加した。糖新生の律速酵素である G6Pase、PEPCK活性は有意に増加した。しかし、FDPase活性には変化がなかった(表4)。

表4 Glucoregulatory enzymes in livers of rats with peritonitis.

	Enzyme activity (Unit/g protein/min)			
	Sham operated	Peritonitis 3 hrs	Peritonitis 5 hrs	Peritonitis + dexamethasone
Phosphofructokinase (PFKase)	11.76 ± 3.90 (n = 7)	20.86 ± 3.27 ^a (n = 7)	13.93 ± 4.34 (n = 13)	20.03 ± 6.78 ^d (n = 9)
Pyruvate kinase (PKase)	104.17 ± 21.55 (n = 8)	322.62 ± 85.80 ^a (n = 7)	45.93 ± 16.79 ^a (n = 10)	427.06 ± 150.29 ^c (n = 9)
Glucose 6-phosphatase (G6Pase)	2.60 ± 0.89 (n = 9)	2.59 ± 0.92 (n = 7)	0.92 ± 0.71 ^a (n = 9)	7.70 ± 3.32 ^c (n = 9)
Fructose 1,6-diphosphatase (FDPase)	15.02 ± 4.05 (n = 8)	26.87 ± 9.87 ^b (n = 7)	22.43 ± 4.63 ^b (n = 13)	26.44 ± 7.97 (n = 10)
Phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK)	19.71 ± 9.70 (n = 5)	16.54 ± 6.09 (n = 7)	13.32 ± 3.92 (n = 5)	24.33 ± 3.38 ^c (n = 8)

Values are mean ± S.D.

a : significant compared to sham operated control. p < 0.005

b : significant compared to sham operated control. p < 0.01

c : significant compared to peritonitis 5 hrs. p < 0.005

d : significant compared to peritonitis 5 hrs. p < 0.01

肝スライス実験において、U-¹⁴C-glucoseよりCO₂への¹⁴CのI.R.は、対照群のI.R.を100%活性とした時に、腹膜炎3時間、5時間群において経時的に活性低下

を示した。デキサメサン投与群では、5時間群と比較して有意に増加した(図3)。U-¹⁴C-pyruvateよりCO₂への¹⁴CのI.R.は、対照群と比較して腹膜炎3時間、5

時間で有意の減少を示した。しかし、デキサメサン投与群では、I.R.は有意に増加した(図4)。

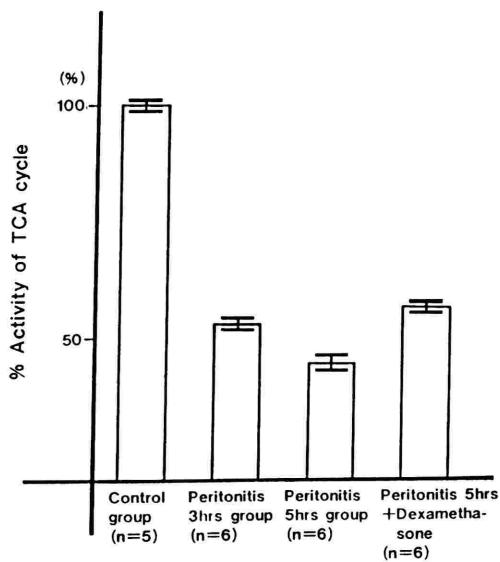
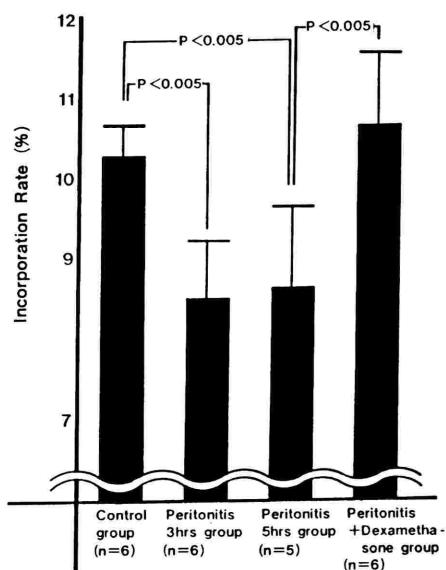


図3 TCA Cycle Activity of the liver slice in Peritonitis Rats with and without Dexamethasone

図4 U-¹⁴C PyruvateよりCOへの¹⁴CのIncorporation



IV. 考 案

エンドトキシン血症では、補体系、キニン・カソクリン系、凝固線溶系の緒因子が活性化され、chemical mediatorを放出するといわれている³⁾。これらのchemical mediatorは血管透過性を亢進させ、末梢循環不全により、循環血液量の減少を呈し、cellular hypoxiaを示す。Cellular hypoxiaとなった細胞においては、種々の代謝障害より、臓器障害を呈するようになる。また、endotoxinは細胞に直接作用することにより、臓器障害を示すことも考えられている。臓器障害は、出血、endotoxin、不適切な補液・栄養管理などに伴って発生することが多い。とくに消化器外科手術の術後においては、感染症に併発することが多く、われわれの症例でも83%は感染に関与している。これら感染症では、すべての症例に血中endotoxin陽性であった⁴⁾。感染症とは別に、内因性endotoxinの関与により、endotoxin血症から臓器障害を呈する場合もある。上腸間膜動脈血栓症、絞扼性腸閉塞症などの腸閉塞に伴う場合が多い。これらの疾患では、内因性endotoxinが、門脈系、リンパ系、腸管より漏出して腹膜より吸収される経路により、endotoxin血症を呈するとされている⁵⁾。消化器外科手術後の臓器障害を発生する比率は、1%前後と考えられている⁶⁾。肝硬変症を合併した患者では臓器障害の発生が多く、とくに肝不全は重篤であり、endotoxinの関与が考えられている⁷⁾。

Endotoxinの検出法として Levin, Bangが Limulus polyphemusのlysateとendotoxinのゲル化反応を発見してから20年が経過した⁸⁾。われわれは、1975年、北九州産 Tachypleus tridentatusより lysateを抽出し、LGTによりendotoxinの検出を行ってきた¹⁰⁾。LGTは品質向上により、感度0.01ng/mlまで、検出できるようになってきたが、臨床応用で問題となっているのは、血漿阻害除去法である。血漿中にはアンチスルロビンⅢ、 α_2 プラズミンインヒビター、 α_1 アンチトリプシンなどの阻害物質があり、加熱法、クロロフォルム法で行っている。また、岩永らの研究によりカブトガニ凝固のメカニズムが解明され、合成基質によるendotoxinの定量が可能となった⁹⁾。われわれも MCA合成基質により6.25

pg/mlの微量定量を行ってきた²⁾。合成基質法でもスロンビンや X_a 因子などの阻害物質があり、過塩素酸法を使用している。最近の研究によると、カブトガニの lysate 中に endotoxinで活性化される経路とは別の B-D-グルカンによって活性化される factor G を介する経路が発見されている¹⁰⁾。この factor G を除き、endotoxin に特異的に反応する endotoxin specific(BS) テストが開発され、臨床反応がなされつつある¹¹⁾。このように endotoxinの検出法も進歩し、非常に早期に正確な endotoxinの検出が可能となり、臨床的に広く利用されるようになってきた。

Endotoxin 血症では代謝障害より臓器障害を呈するが、その主要臓器は肝である。Endotoxin血症では糖代謝の著しい障害が発生する。すなわち、glycolysisは亢進しており、糖消費亢進状態にある。Glucoseは主要なエネルギー源ではなく glutamateがその役割を担い、ATP 產生に重要に関係している。TCA cycle活性は低下しており、ミトコンドリアにおける ATP 產生を低下させ、cytosolにおける glycysis を亢進させる。一方、糖新生系では、pyruvate のミトコンドリア内膜の通過障害が示唆される。肝における糖中間代謝産物では、glucose-6-phosphate, fructose-6-phosphate の減少と fructose-1,6-diphosphate の増加、pyruvate, lactate の増加を認める報告が多い¹²⁾。Cytosolにおける糖新生系酵素とされる FDPase 活性について Williamson¹³⁾は、糖中間代謝産物の変動が、fructose-6-phosphate と fructose-1,6-diphosphate の間の酵素活性の変動の結果生ずるとしている。今回の実験においても、腹膜炎 3 時間群では、PFKase, FDPase の有意な増加を認めるが、腹膜炎 5 時間群では PFKase, PKase, G6Pase の減少、FDPase の増加を認めている。

Endotoxin shock の治療に glucocorticoid の大量投与が有効性を示すことは知られている。Glucocorticoidは、肝においては糖新生の亢進、糖利用を行う組織においては糖利用の抑制を引き起こす¹⁴⁾。Glucocorticoid の投与により、FDPaseを除くすべての律速酵素活性の増加を呈する。これは中間代謝産物を正常化し、基質サイクルの回転が増加するためである。肝スライス実験

では、TCAcycle活性が増加し、ATP 產生の効率を改善させ、糖消費抑制に働く。さらに糖新生における pyruvate のミトコンドリア内膜通過は、glucocorticoidで改善される。

V. おわりに

臓器障害は今日の治療技術でも救命困難な部分が残されており、これをいかに防止し、治療するかは、きわめて重要な問題である。臓器障害は感染症、とくに endotoxin の関与により発生する場合が多く、83%と高率に認めている。Endotoxin 血症より代謝障害を呈し、臓器障害を示すことが非常に多くみられる。臓器障害の治療法であるが、endotoxin 血症よりの早期離脱を図り、臓器不全を予防し、臓器不全に陥った時は早期に治療を行い、多臓器不全に発展する前に適切な治療を行うことが大切であると考えられる。

文 献

- 1) 西村亘：カブトガニ血球成分によるエンドトキシンの検出、札幌医誌、46:89-104, 1977.
- 2) 小林謙二：4-Methylcoumarin Amide合成基質を用いた新しいエンドトキシン定量法の実験的応用、札幌医誌、50:173-186, 1981.
- 3) Ebata T. and Hayasaka H: Effects of aldosterone and dexamethasone on blood chemical mediators in endotoxin shock. Jap. J. Surg. 9: 79-85, 1979.
- 4) 早坂滉、江端俊彰：ショックとその対策、一とくに敗血症性ショックについてー、外科 MOOK. 消化器外科合併症とその処置、金原出版、東京、1985. P86-93
- 5) Azuma K: Experimental study of endogenous endotoxin absorption Sapporo Med. J. 52:559-575, 1983.
- 6) 江端俊彰、戸塚守夫、伝野隆一、長谷川格、東薫、南田英俊、平池則雄、早坂 滉：消化器外科手術によるエンドトキシン血症と多臓器機能不全、

- 日消外会誌19:694-697. 1986.
- よりの検討一. 麻酔, 33: 1366-1370, 1984.
- 7) 江端俊彰, 南田英俊, 後藤幸夫, 東 薫, 平池則雄, 山本雄治, 鳥本勝司, 戸塚守夫, 早坂 混: 多臓器障害(肝不全)の病態と治療法の検討, 日消外会誌, 20:2460-2463. 1987.
- 8) Levin J: The history of the development of the Limulus Amoebocyte Lysate test in Bacterial Endotoxin: Structure, Biomedical Significans and detection with the Limulus Amoebocyte Lysate test. Alan R. Liss, Inc. New York, 1985. P3-28.
- 9) 岩永貞昭, 大橋邦啓, 丹羽 允: 抗リボ多糖因子の生物学的意義, 蛋白質核酸酵素 31:374-385, 1986.
- 10) Morita T., Tanaka S., Nakamura T and Iwanaga S: A new (1→3)-B-D-glucan-mediated coagulation pathway tound in Limulus Amebocytes. FEBSLett 129:318-321, 1981.
- 11) 大林民典, 田村弘志, 田中重則, 大木 誠, 高橋昭治, 荒井幹雄, 増田美保子, 河合 忠: エンドトキシンに特異的な新しい比色定量法の開発. 臨床病理33:639-644, 1985.
- 12) Ebata T., Kuttner R.E., Apantaku F.O. and Schumerw : Effect of a new synthetic complement inhibitor on hepatic glycyltic intermediates in septic rats, Adv Shock Res 9: 275-282, 1983.
- 13) Williamson J.R, Refino C. and LaNcae K: Effects of E. coli lipopolysaccharide B treatment of rats on gluconeogenesis. A Ciba symposium J&A Churchill, London, 1970. P145-154.
- 14) 江端俊彰, 伝野隆一, 後藤幸夫, 東 薫, 長谷川格, 南田英俊, 早坂 混: エンドトキシンショックにおける糖質コルチコイドの効果—肝糖代謝面