

## 肝硬変における血中エンドトキシン不活性化機構に関する研究

—アルブミンの意義—

奈良県立医科大学第3内科学教室

辻田重信

ENDOTOXIN INACTIVATION IN THE BLOOD OF PATIENTS  
WITH LIVER CIRRHOSIS —ROLE OF ALBUMIN—

SHIGENOBU TSUJITA

*The Third Department of Internal Medicine, Nara Medical University*

Received December 13, 1996

*Abstract*: Endotoxin binding and inactivating abilities of albumin were evaluated in patients with liver cirrhosis. Endotoxin binding capacity of albumin was significantly lower in Child C cirrhotics than that in Child A cirrhotics. There was a significant negative correlation between endotoxin binding capacity of albumin and Child-Pugh score. Plasma endotoxin inactivating rate in Child C cirrhotics was significantly lower than that in Child A cirrhotics, although plasma endotoxin inactivating rate in cirrhotics was generally greater than that in healthy subjects. Plasma endotoxin inactivating rate was positively related to endotoxin binding capacity of albumin. Endotoxin binding capacity of albumin was positively related to serum albumin and high density lipoprotein (HDL)-cholesterol. The addition of human albumin to cirrhotic plasma resulted in a significant increase in endotoxin binding capacity of HDL. Plasma interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-6 and tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  were negatively related to serum albumin. Plasma samples with high amounts of IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  showed marked decrease in endotoxin binding capacity of albumin. Albumin at concentrations of 1.5 or 3.0 g/dl was proved to inactivate 80 to 90 % of 250 pg/ml endotoxin in the chromogenic assay system. Albumin (10-1000 mg/dl) inhibited endotoxin uptake and TNF production by Kupffer cells in a rat experimental model. These results suggest that albumin is an important endotoxin binding protein which inactivates endotoxin and suppresses cytokine secretion from the Kupffer cells in liver cirrhosis. Thus, administration of albumin is considered to be beneficial to endotoxin inactivation in patients with advanced liver cirrhosis.

## Index Terms

endotoxin, albumin, endotoxin binding capacity, endotoxin inactivation, liver cirrhosis

## 諸 言

エンドトキシン(Et)はグラム陰性桿菌の細胞壁成分であり、腸管から吸収されて体内に侵入する<sup>1)</sup>が、健常人ではKupffer細胞などの網内系細胞により不活性化さ

れるために生体に及ぼす影響は少ないと考えられている<sup>2)</sup>。しかし、重症肝障害なかでも肝硬変ではKupffer細胞機能の低下のために血中にEtが増加し<sup>3)</sup>、これが肝病態の進展や諸臓器合併症の発現に密接にかかわっていると想定されている。

近年, Et 測定に用いられる *Limulus lysate* のゲル化機構が解明され, これに基づいて合成基質を用いる定量法が開発された<sup>3)</sup>が, 血漿 Et の測定には血漿前処理法, 標準曲線の設定法などいくつかの問題点が残されていた。福井らはまずこれらに改良を加えて信頼できる Et 測定法(PCA 改良法)を確立し<sup>4,5)</sup>, この方法に基づいて肝炎患者血漿中の Et 測定を重ねてきた<sup>5,6)</sup>。その過程において, 肝硬変では血中に高濃度の Et がしばしば検出されるが, Et ショックのような重篤な症状を呈することは稀で, 測定された Et 濃度と患者の臨床像は必ずしも相関しないことが明らかとなった<sup>7)</sup>。このように血中に高濃度の Et が検出されるにもかかわらず, その毒性が顕在化しないということは, 視点を変えれば血中に Et 不活性化機構が存在することを示唆している。この Et 不活性化には種々の Et 結合蛋白の関与が考えられてきた<sup>8,9)</sup>が, 実際の患者血中において Et はどのような蛋白と結合して存在するのか, Et 結合蛋白と Et 活性との関係はどのようなものであるかという点は未だ解明されていない。

ところで, アルブミンは血中に最も高濃度に存在する蛋白質であり, 生体内で種々の内因性・外因性物質と結合してこれらの輸送蛋白として働くとともに, その結合によりこれら物質の生体に及ぼす作用を調整している可能性がある。アルブミンが Et と結合し得ることは古くから知られていた<sup>10)</sup>が, その病態生理学的意義は未だ明らかでない。そこで著者はこれまで余り注目されてこなかったアルブミンの Et 結合蛋白としての役割に注目して基礎的検討を行うとともに, 低アルブミン血症の原因疾患として重要な肝硬変患者を対象に, 血中 Et の蛋白結合状態と不活性化機構について検討を加えた。

## 方 法

### 1. 臨床的検討

#### 1) 対象

健常人 10 例, 肝硬変患者 56 例(アルコール性 5 例, B 型 14 例, C 型 37 例)の静脈血をヘパリン加採血し, 直ちに氷冷し, 可及的速やかに 4℃ の条件下で 800 rpm, 10 分間の遠心分離により得られた多血小板血漿を検体とした。

#### 2) 血中 Et の測定

血中 Et の測定は既報<sup>5,6)</sup>のごとく合成基質法で行い, 各検体を希釈加熱法あるいは過塩素酸(PCA)処理改良法で処理した後, Et 活性を合成基質エンドスペース<sup>®</sup>(生化学工業, 東京)を用いて測定した。希釈加熱法は Friberger らの方法<sup>11)</sup>に従い, 血漿を滅菌蒸留水で 10 倍

希釈した後, 75℃, 5 分間加熱した。なお, 加熱前から標準 Et(*Escherichia coli*(*E. coli*)0111:B4)を終濃度が 0, 12.5, 25.0, 37.5 pg/ml となるように各検体に加えておくことにより, 各検体毎の検量線を準備した。

一方, 過塩素酸処理法は Obayashi の方法<sup>12)</sup>に準じて, 血漿 100  $\mu$ l に滅菌蒸留水 100  $\mu$ l を加えた検体 200  $\mu$ l を 0.32 M 過塩素酸 400  $\mu$ l で前処理し, 37℃, 20 分間加熱した後, 遠心分離(3000 rpm, 10 分間, 4℃)し, 得られた上清は等量の 0.18 M NaOH で中和した(最終希釈倍率 12 倍)。沈殿は既報<sup>5,6)</sup>の如く, 10% triethylamine (TEA)で中和した後, 滅菌蒸留水に溶解し, 総量 800  $\mu$ l とした(上清と同様に最終希釈倍率 12 倍)。なお, NaOH 処理あるいは TEA 処理後各分画に標準 Et(*E. coli* 0111:B4)を終濃度 0, 12.5, 25.0 pg/ml となるように加えて各検体毎に検量線を作製し, これに基づいて各分画の Et 濃度を計算した。なお, 検体中の Et 活性は, 合成基質エンドスペース<sup>®</sup>を用いて一段法で測定した<sup>5,6)</sup>。基質添加後の吸光度(405 nm)を 5 分毎に microprocessor controlled reader(MTP-32, コロナ社, 茨城)を用いて記録し, 各検体ごとに反応 kinetics の直線部分の勾配( $\Delta$  OD405/分)を求め, Et 濃度を計算した。

### 3) 血漿の Et 不活性化能の検討

血漿に 250 pg/ml の Et を混和し, 37℃ 1 時間インキュベーションを加えるものと加えないものをそれぞれ Inadara の New PCA 法<sup>13)</sup>により処理して, Et 活性を測定し, インキュベーションにより失われた Et 活性(%)を求め, 血漿 Et 不活性化能の指標とした。

### 4) <sup>3</sup>H-標識 Et の作製

UDP galactose-4-epimerase 欠損 *Salmonella anatum* A1 epi を 1-broth で培養し, 培養液に 0.5  $\mu$ ci の <sup>3</sup>H-galactose(New England Nuclear 社, アメリカ)を加えて, 37℃, 15 分間反応させた。反応液を 1000 rpm, 10 分間, 4℃ で冷却遠沈し, 生理食塩水で懸濁した沈殿物から EDTA 抽出法により <sup>3</sup>H-標識 Et(<sup>3</sup>H-Et)を得た。得られた<sup>3</sup>H-Et 活性は合成基質エンドスペース<sup>®</sup>を用いて測定した。

### 5) 血漿蛋白の Et 結合能の検討

血漿蛋白の Et 結合能については, <sup>3</sup>H-Et を血漿に 3 ng/ml の濃度で混和し, 免疫沈降法により high-density lipoprotein(HDL), およびトランスフェリンに結合しうる<sup>3</sup>H-Et 量を, また, Blue Sepharose CL-6 B を用いた Affinity Chromatography によりアルブミンに結合しうる<sup>3</sup>H-Et 量を測定し, 血漿 1 ml あたりおよびそれぞれの 1 g 重量あたりの Et 最大結合量(pg)すなわち Et 結合予備能として表した<sup>7)</sup>。さらに, 21 例の肝硬変患

者の血漿に、ヒトアルブミン(ケミコン社, アメリカ)を終濃度が0.5 g/dl, 1.0 g/dl 上昇するように追加し, HDL, トランスフェリンの Et 結合予備能に及ぼす影響について検討した。また, 20 例の肝硬変患者の血漿にヒト HDL(ケミコン社, アメリカ), ヒトトランスフェリン(オルガノンテクニカ社, アメリカ)をそれぞれ終濃度が25 mg/dl, 50 mg/dl 上昇するように追加し, アルブミンの Et 結合予備能に及ぼす影響について検討した。

#### 6) 血漿サイトカインの測定法

血漿サイトカインについてはインターロイキン(IL)-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, 腫瘍壊死因子(tumor necrosis factor (TNF))- $\alpha$  のそれぞれについて Immunoenzyme metric assay により測定した。

#### 2. 実験的検討

血中 Et 測定系に及ぼすアルブミン添加の影響を以下のごとく検討した。まず *E. coli* 0111 : B 4 の Et 250 pg/ml 含有液に 25 % 精製ヒトアルブミン溶液(ローヌブランローラー社, アメリカ)を終濃度が0.75 g/dl, 1.5 g/

dl, 3.0 g/dl となるように添加した。この混合液を希釈加熱法<sup>11)</sup>あるいは PCA 改良法<sup>5,6)</sup>で処理した後, 溶液中の Et 活性をエンドスペースーにより測定してアルブミン無添加時の Et 活性と比較した。さらに, *E. coli* 0111 : B 4 の Et 25, 50 pg/ml 含有液にそれぞれ 25 % 精製ヒトアルブミン溶液を終濃度が1.25 g/dl, 2.5 g/dl, 5.0 g/dl となるように添加して無処理のまま検体として, 特異的合成基質とトキシノメーター(和光純薬社, 京都)を用いて Et 活性を測定し, アルブミン無添加時の Et 活性と比較した。

次に, 既報<sup>14)</sup>のごとく SD 系雌性ラットよりコラゲナーゼ灌流法, シャーレ付着法を用いて Kupffer 細胞を分離し, ヒトアルブミンの 0, 10, 100, 1000 mg/dl 含有培養液に [<sup>3</sup>H]-Et (500 ng/ml, 10<sup>5</sup>dpm) を加え, 細胞に取り込まれた [<sup>3</sup>H]-Et の radioactivity を scintillation counter (Beckman, アメリカ)を用いて測定した。さらに同濃度のアルブミン含有培養液に非標識 Et (500 ng/ml) を加え, Kupffer 細胞の TNF 産生量をマウス LM 細胞

Table 1. Serum albumin, high-density lipoprotein-cholesterol and transferrin levels in liver cirrhotic Child classification

	Albumin (g/dl)	HDL-cholesterol (mg/dl)	Transferrin (mg/dl)
Child A	3.58 $\pm$ 0.39	40.6 $\pm$ 13.9	282.7 $\pm$ 75.5
Child B	3.12 $\pm$ 0.47	31.9 $\pm$ 9.1	241.8 $\pm$ 67.0
Child C	2.93 $\pm$ 0.34	17.6 $\pm$ 15.2	180.2 $\pm$ 22.3

HDL (high-density lipoprotein)

\* p<0.001 \*\* p<0.005 \*\*\* p<0.01 \*\*\*\* p<0.05

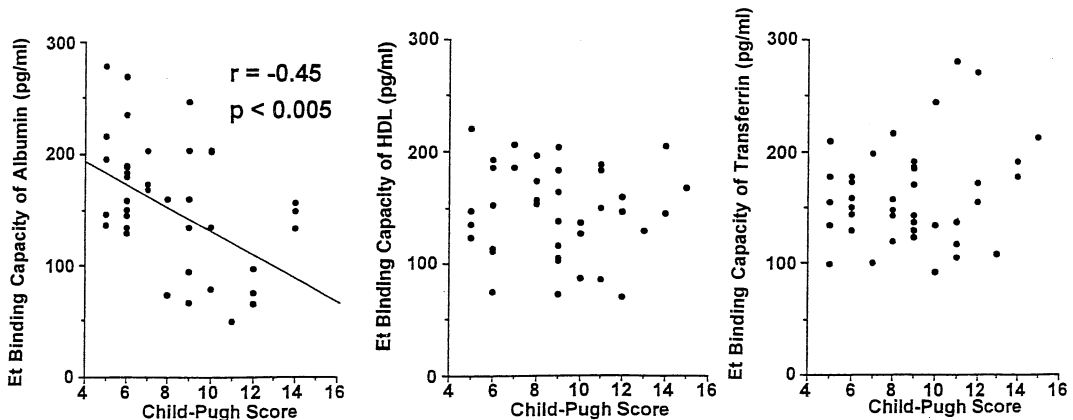


Fig. 1. Correlations between Child-Pugh score and endotoxin binding capacities of plasma albumin, high-density lipoprotein (HDL) and transferrin in cirrhotics.

を用いた bioassay にて測定した。

3. 統計学的検討

有意差検定は Student's *t*-test ならびに分散分析を用いて行った。危険率 5%以下を有意とした。

成 績

1. 臨床的検討

1) 健康人ならびに肝硬変患者における血中アルブミン, HDL, トランスフェリンの Et 結合予備能

健康人および肝硬変におけるアルブミンの Et 結合予備能はそれぞれ 138.8±60.6 pg/ml, 156.2±52.3 pg/ml, HDL の Et 結合予備能はそれぞれ 138.8±60.6 pg/ml, 156.2±52.3 pg/ml, トランスフェリンの Et 結合予備能はそれぞれ 142.9±27.8 pg/ml, 167.5±45.3 pg/ml であり, トランスフェリンの Et 結合予備能が肝硬変で有意( $P < 0.05$ )に高値を示した。さらに, Child 分類<sup>15)</sup>別にこれら蛋白の Et 結合予備能をみるとアルブミンの Et 結合予備能は Child A 178.1±46.1 pg/ml, Child B 151.4±53.2 pg/ml, Child C 128.8±51.8 pg/ml であり, Child A に比し, Child C で有意( $P < 0.02$ )に低値であった。一方, HDL の Et 結合予備能は Child A 146.9±38.9 pg/ml, Child B 158.7±42.6 pg/ml, Child C 156.9±39.7 pg/ml と肝硬変の重症度による差はなく, トランスフェリンの Et 結合予備能は Child A 158.2±38.2 pg/ml, Child B 158.9±37.3 pg/ml, Child C 182.7±57.4 pg/ml であり, Child C でやや高値の傾向にあった。この際, アルブミンの Et 結合予備能と Child-Pugh スコア<sup>16)</sup>の間には有意の負の相関( $r = -0.45, p < 0.005$ )が認められたが, HDL やトランスフェリンの Et 結合予備能と Child-Pugh スコアの間には有意の相関は認められなかった(Fig. 1)。血清アルブミン, HDL-コレステロール, トランスフェリン値は Child 分類が進行するに従ってそれぞれ有意に低下した(Table 1)。また, これら蛋白の Et 結合予備能をそれぞれの蛋白の単位 1 g あたりで求めるとアルブミンは 47.2±18.2 pg/g, HDL は

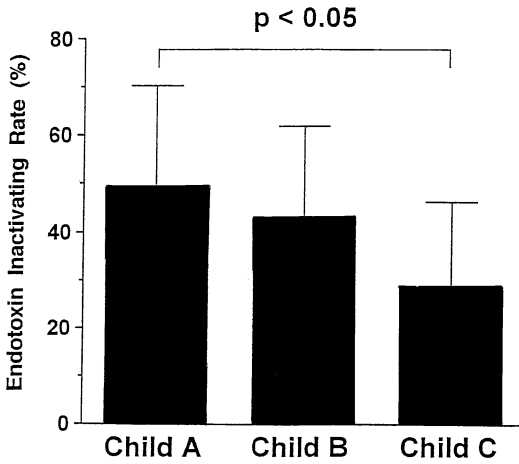


Fig. 2. Correlations between Child-Pugh grade and plasma endotoxin inactivating rate in cirrhotics.

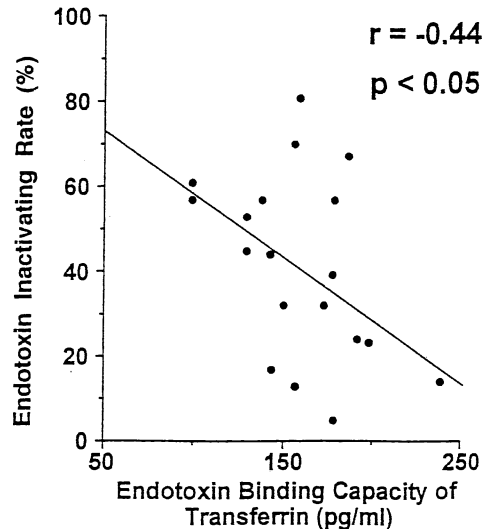
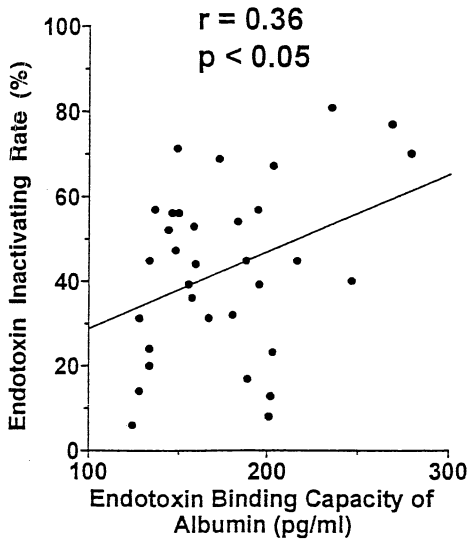


Fig. 3. Relationships of endotoxin binding capacities of plasma albumin and transferrin to plasma endotoxin inactivating rate in cirrhotics.

6966±7011 pg/g, トランスフェリンは717±227 pg/gとなり, アルブミン1 gあたりのEt結合予備能はHDL, トランスフェリン1 gあたりのEt結合予備能の約1/150, 1/15にとどまった。

2) 健康人ならびに肝硬変患者の血漿Et不活性化率

肝硬変症例における血漿Et不活性化率は健康人に対し有意に高率であった(肝硬変44.9±20.0% vs 健康人

31.8±11.2%,  $p < 0.001$ )が, Child分類別にみるとChild CではChild Aに比し, 有意( $p < 0.05$ )に低率であった(Fig. 2)。また, 肝硬変において血漿Et不活性化率はアルブミンのEt結合予備能と正の相関関係( $r = 0.36$ ,  $p < 0.05$ )(Fig. 3)に, トランスフェリンのEt結合予備能と負の相関関係( $r = -0.44$ ,  $p < 0.05$ )(Fig. 3)にあった。

3) 血清アルブミン, HDL, トランスフェリン値とこれ

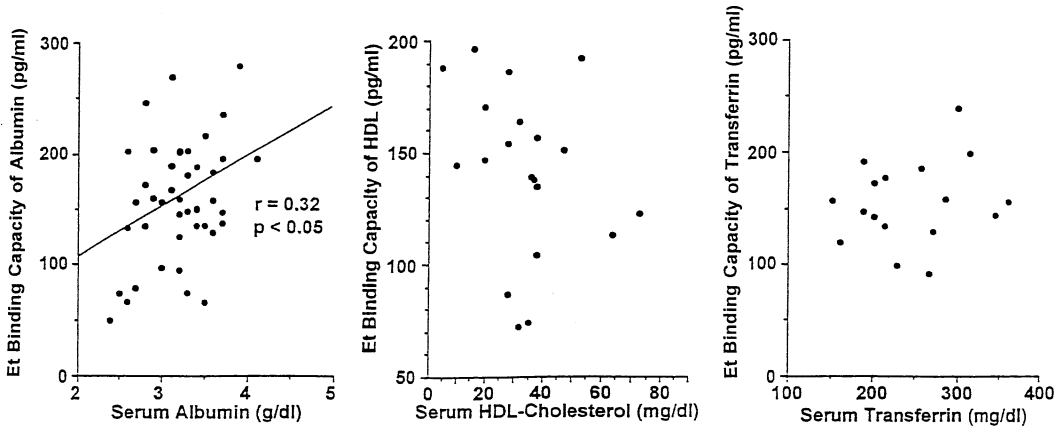


Fig. 4. Relationships of serum albumin, high-density lipoprotein (HDL) and transferrin levels to their endotoxin binding capacities in cirrhotics.

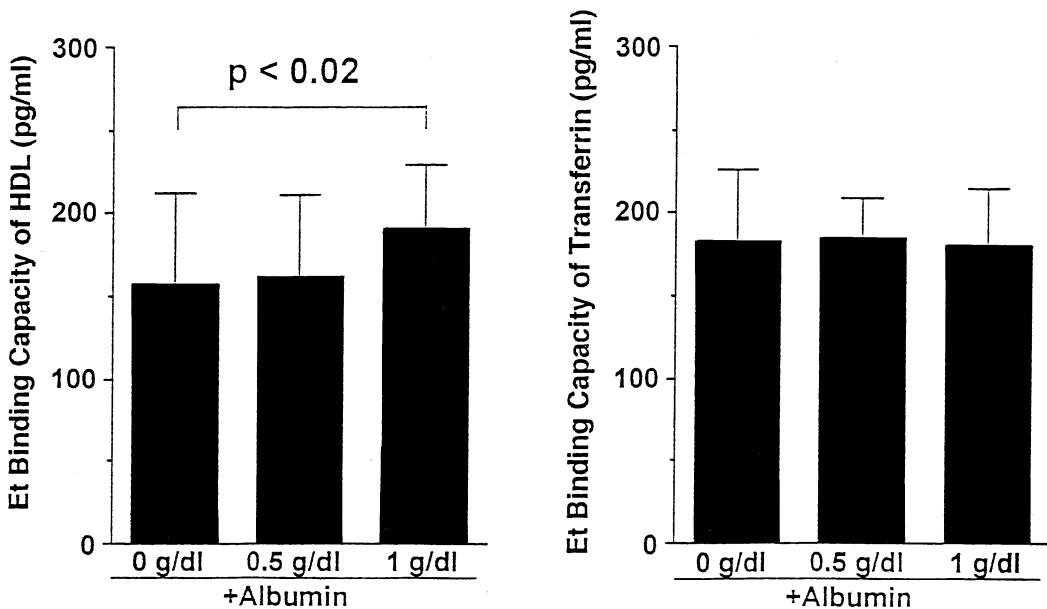


Fig. 5. Effect of an addition of albumin to plasma on endotoxin binding capacities of plasma high-density lipoprotein (HDL) and transferrin in cirrhotics.

ら蛋白の Et 結合予備能の関係

アルブミンの Et 結合予備能は血清アルブミン値と正の相関関係を示したが、HDL、トランスフェリンの Et 結合予備能はそれぞれの血中レベルとは相関しなかった (Fig. 4). また、アルブミンの Et 結合予備能は血清 HDL 値と正の相関関係 ( $r=0.41, p<0.05$ ) にあった. 21 例の肝硬変患者の血漿にヒトアルブミンを終濃度が 0.5 g/dl, 1.0 g/dl 上昇するように追加して HDL の Et 結合予備能を検討すると、HDL の Et 結合予備能はアルブミン無添加時  $157.5 \pm 54.5$  pg/ml, アルブミン 0.5 g/dl 追加時  $162.0 \pm 48.6$  pg/ml, アルブミン 1.0 g/dl 追加時  $190.4 \pm 38.9$  pg/ml とアルブミン 1.0 g/dl 追加により有意 ( $p<0.02$ ) に Et 結合予備能の増加をみた (Fig. 5). 一方、同

条件でトランスフェリンの Et 結合予備能を検討したところ、アルブミン無添加時  $182.5 \pm 42.5$  pg/ml, アルブミン 0.5 g/dl 追加時  $184.5 \pm 24.9$  pg/ml, アルブミン 1.0 g/dl 追加時  $180.2 \pm 34.6$  pg/ml とトランスフェリンの Et 結合予備能に変化は認められなかった (Fig. 5). また、肝硬変患者の血漿に HDL、トランスフェリンをそれぞれ終濃度が 25 mg/dl, 50 mg/dl 上昇するように追加してもアルブミンの Et 結合予備能に変化は認められなかった (HDL 無添加時  $371.5 \pm 71.1$  pg/ml, HDL 25 mg/dl 追加時  $380.2 \pm 76.5$  pg/m; トランスフェリン無添加時  $371.4 \pm 55.9$  pg/ml, トランスフェリン 50 mg/dl 追加時  $361.4 \pm 93.3$  pg/ml).

4) 血漿総 Et 濃度とサイトカインレベルとの関係

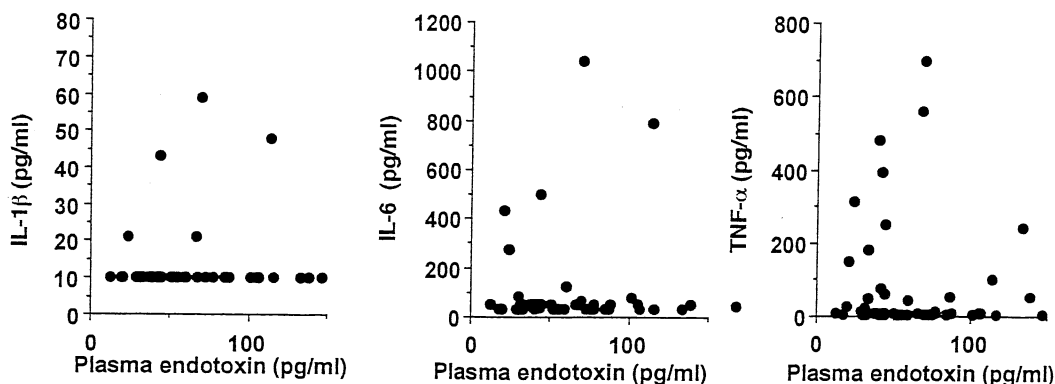


Fig. 6. Relationships of plasma endotoxin levels to plasma interleukin (IL)-1  $\beta$ , IL-6 and tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  levels in cirrhotics.

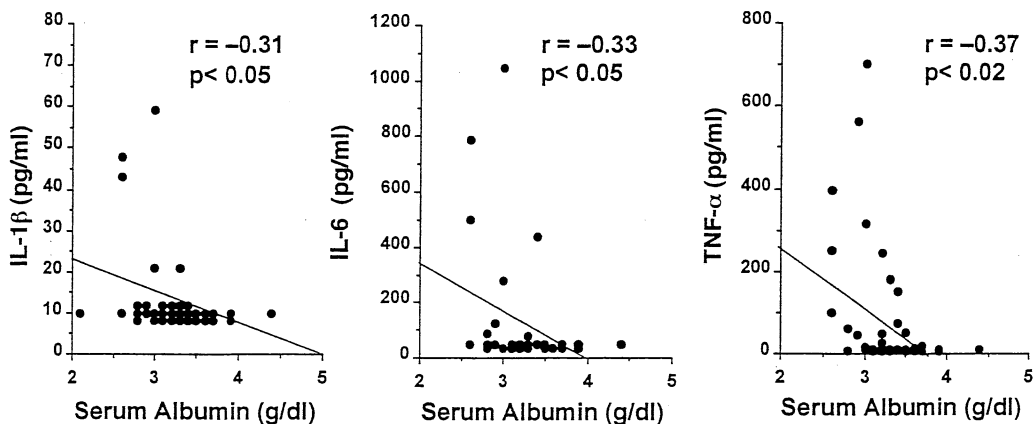


Fig. 7. Relationships of serum albumin levels to plasma interleukin (IL)-1  $\beta$ , IL-6 and tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  levels in cirrhotics.

健常人では血漿 IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  は全例測定感度以下(それぞれ 5.0 pg/ml, 10.0 pg/ml, 32.0 pg/ml, 5.0 pg/ml 未満)であったが, 肝硬変ではこれらはしばしば上昇し, とくに IL-6, TNF- $\alpha$  はそれぞれ  $148.6 \pm 15.4$  pg/ml,  $126.6 \pm 13.1$  pg/ml と有意 ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.01$ ) に高値を示した. また, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  のいずれについても著しい高値を示す例は血漿 Et も著増していたが, 一方で Et が高値であるにもかかわらず, サイトカインが上昇していない例も存在した (Fig. 6).

5) 血清アルブミンと血漿サイトカインレベル, CRP と

の関係

血漿 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  はともに血清アルブミン値と負の相関関係 (Fig. 7) にあった. さらに血漿アルブミンの Et 結合予備能と血漿サイトカインレベルとの関係を検討すると, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  の上昇例はすべてアルブミンの Et 結合予備能が 200 pg/ml 以下に低下していた (Fig. 8). また, アルブミンの Et 結合予備能と血清 CRP の間には有意の負の相関関係が存在した (Fig. 9).

2. 実験的検討

1) アルブミン添加の Et 活性に及ぼす影響

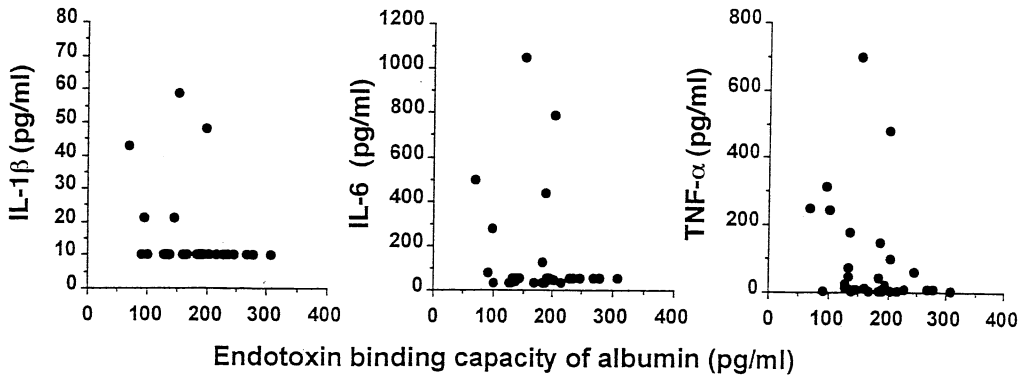


Fig. 8. Relationships of endotoxin binding capacity of serum albumin to plasma interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-6 and tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  levels in cirrhotics.

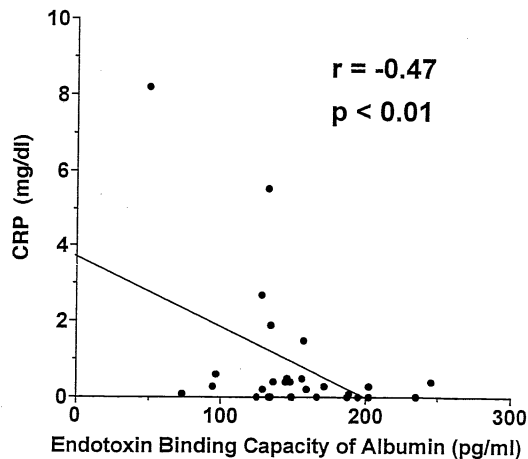


Fig. 9. Correlations between endotoxin binding capacity of serum albumin and serum C-reactive protein (CRP) levels in cirrhotics.

希釈加熱法, PCA 処理改良法のいずれの処理法を用いた場合でも, アルブミン水溶液は1.5~3.0 g/dl の濃度で 250 pg/ml の Et 活性を 80~90 %抑制した(Fig. 10). さらに同濃度のアルブミン添加 Et 水溶液を無処理のまま検体として, トキシノメーター法で Et 活性を測定した場合も, アルブミン水溶液は1.25~5.0 g/dl の濃度で 25, 50 pg/ml の Et 活性を 100 %抑制した.

2) ラット Kupffer 細胞の Et 取込み, TNF 産生に及ぼすアルブミン添加の影響

培養時間を 30 分から 60 分に延長すると Kupffer 細胞の Et 取り込みは一般に増加する傾向にあったが, いずれの培養条件下でもアルブミンは Kupffer 細胞の Et 取り込みを濃度依存性に有意に抑制した(Fig. 11). さらに, アルブミンは Kupffer 細胞の TNF 産生を濃度依存

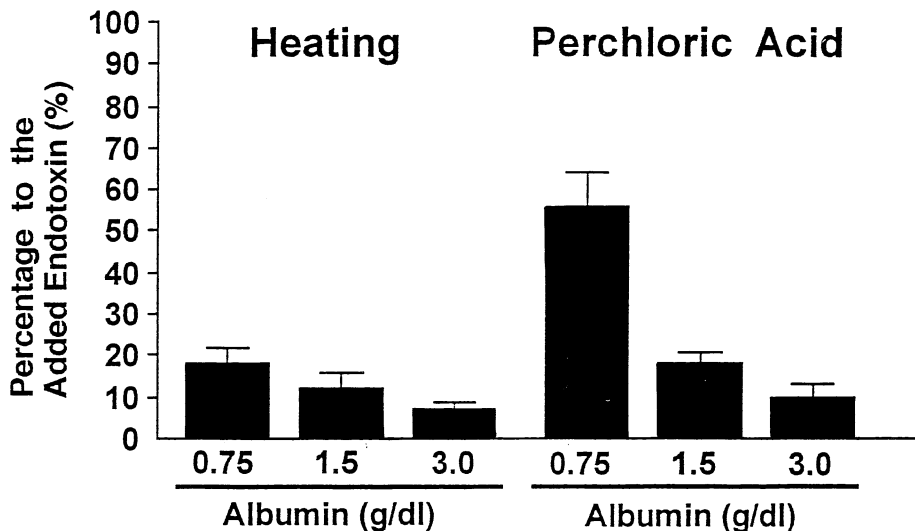


Fig. 10. Effect of albumin on endotoxin assay system.

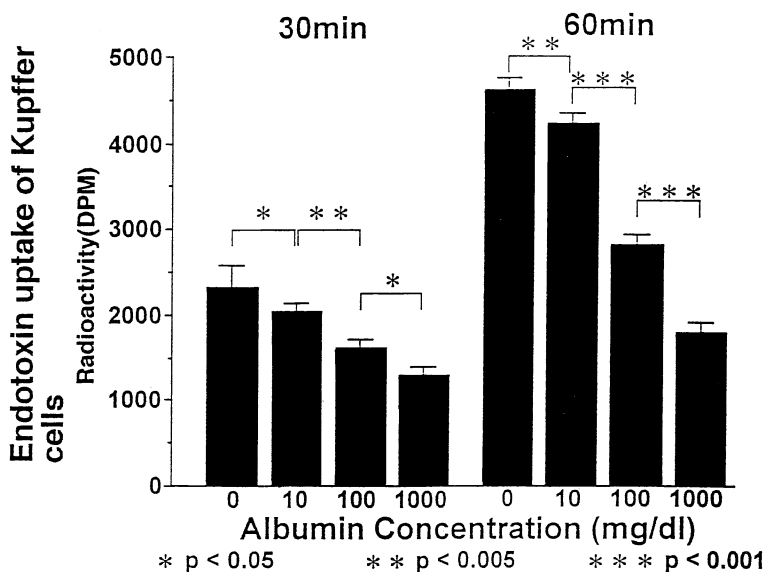


Fig. 11. Influence of albumin on endotoxin uptake of Kupffer cells.



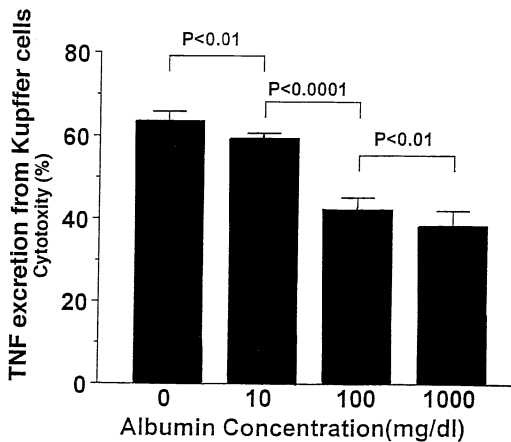


Fig. 12. Influence of albumin on tumor necrosis factor (TNF) production of Kupffer cells.

性に有意に抑制した(Fig. 12).

## 考 察

肝硬変では血中に高濃度の Et がしばしば検出されるが、血中 Et 濃度と肝硬変の重症度は必ずしも相関せず、Et 高値例でも Et ショックのような激的な症状を呈することはまれである<sup>7)</sup>。Et が網内系で解毒される<sup>2)</sup>ことは周知の事実であるが、血中に活性を持った Et が検出されるにもかかわらず、その毒性が顕在化しないことは、血中にも Et 不活性化機構が存在することを示唆している。現在まで、血中で Et と結合して不活性化にかかわる可能性がある蛋白質としては HDL<sup>8)</sup>、トランスフェリン<sup>9)</sup>、lipopolysaccharide binding protein(LBP)<sup>17)</sup>などが報告されてきたが、肝硬変病態におけるこれら結合蛋白の臨床的意義や Et 結合と Et 不活性化との関係ははまだ明らかでない。血中に微量に存在する内因性 Et の存在様式とりわけ蛋白との結合状態を知ることは現在手技的に容易でないため、今回著者は生合成した<sup>3</sup>H-Et を血液検体に混和し、外因性 Et の結合状態を検討して内因性 Et と Et 結合蛋白との関係を類推するという手法<sup>7)</sup>を用いた。

アルブミンの Et 結合能や Et 不活性化能は現在まで余り注目されてこなかったが、著者らは標準 Et の保存法について試行錯誤を重ねるうちに、たまたまアルブミン添加により Et 活性が著しく低下することを見だし、アルブミンと Et の関係に注目するに至った。今回の研究により、著者は、まず、肝硬変患者血中において Et がアルブミンにかなり結合し得ること、アルブミンには Et

不活性化能があることを初めて明らかにした。Fukui らは大量のアルブミン静注を継続した Child C の肝硬変において、Et が予想外に低値をとることがあることを既に報告している<sup>7)</sup>が、これは内因性 Et がアルブミンとの結合により失活し、検出不可能となった可能性を示唆している。

さらに著者はアルブミンの Et 結合蛋白としての意義をさらに明らかにする目的で、精製ヒトアルブミンを用いた実験を行い、アルブミンの Et 結合能を検討するとともに、Kupffer 細胞の Et 取り込みと TNF 産生能に及ぼすアルブミンの影響について検討を加えた。その結果、溶液中のアルブミン濃度が増加するほどアルブミンに結合する Et 量は増加すること、アルブミンは Kupffer 細胞の Et 取り込みと TNF 産生を濃度依存性に抑制することが明らかとなった。アルブミンは種々の生体内物質や薬物と結合してこれらの輸送蛋白として働いているが、肝不全例ではさらに肝性昏睡誘発物質と結合してこれらの血液脳関門通過を阻害する作用があることから、進行した肝硬変における低アルブミン血症には単に血液膠質浸透圧の低下にとどまらない重要な病態生理学的意義があると考えられる。ところで、アルブミンに Et 結合能があることは古くから知られていたが<sup>10)</sup>、その抗 Et 作用はむしろ弱いものとされてきており<sup>10)</sup>、Et 結合蛋白としてはむしろ HDL<sup>8)</sup>、トランスフェリン<sup>9)</sup>、LBP<sup>17)</sup>などが注目されてきている。事実、今回の解析においても単位重量あたりの血中アルブミンの Et 結合能は HDL、トランスフェリンの Et 結合能に比べるかに少なかったが、血中に存在する蛋白量を考える場合、圧倒的に大量に存在するアルブミンの意義は無視できないものがある。

最近、Et 結合蛋白と Kupffer 細胞における Et 処理の関係が注目されてきているが、HDL は Et 不活化作用を持つ<sup>8)</sup>ものの HDL に結合した Et は Kupffer 細胞で処理されにくくなる<sup>18)</sup>と報告されている。また、同様に Et を不活化する LBP は Kupffer 細胞における Et 処理、TNF 産生をともに促進するとされている<sup>15)</sup>。著者は、アルブミンが Kupffer 細胞の Et 取り込みと TNF 産生をともに抑制することを明らかにしたが、この事実は Kupffer 細胞の Et 処理においてアルブミンが HDL と協調して働き、Et 処理、TNF 産生両面において LBP とは拮抗することを意味している。さらに、今回肝硬変患者血漿にアルブミンを 1.0 g/dl 添加すると HDL の Et 結合予備能が増加したことから、アルブミンは HDL の Et 結合にも促進的に働き、血中 Et 不活性化にかかわっていることが推察された。既に著者は、Kupffer 細胞をエタノール存在下に培養し、その培養上清を肝実質細胞に添

加すると Et 結合蛋白産生が増加することを認め、この Et 結合蛋白が Kupffer 細胞の Et 処理を促進する一方で、TNF 放出を抑制することを明らかにした<sup>19)</sup>。さらに、アルブミンや HDL がエタノールにより誘導されたこの未知の Et 結合蛋白の重要な構成成分をなすことも確認している(未発表データ)。血中には以上のように複数の Et 結合蛋白が共存しており、これらの作用が複雑に絡み合っており、Kupffer 細胞機能にも影響を及ぼすと考えられる。

著者の今回の一連の研究結果は、肝硬変においてアルブミンが重要な Et 結合蛋白となっていること、肝硬変重症例ではアルブミンの低下やアルブミンとの結合において Et と競合する物質の増加にともない Et 結合予備能が減少し、不活性化能の低下を招く可能性があることを示唆している。Et が Kupffer 細胞を中心とするマクロファージで処理される際には種々のサイトカインが放出されるが、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ などは肝細胞障害性を有しており<sup>20)</sup>、これらサイトカインが血中に多量に存在することは肝硬変の病態悪化につながる可能性がある<sup>20)</sup>。福井らは、末期肝硬変において血中 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ が上昇することを報告した<sup>20)</sup>が、こうした症例では一般に血中 Et が上昇しており<sup>20)</sup>、Et 血症がサイトカイン上昇の一因をなす可能性がある。ただし、今回示したようになかには血漿 Et が高値にもかかわらず、サイトカインの上昇をみない例があり、この際、測定された Et は血液中の蛋白と結合して実際は不活性化されていたと推測される。今回の検討で、IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ が血清アルブミン値と負の相関関係にあったこと、さらに IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ の上昇例ではすべてアルブミンの Et 結合予備能が低下していたことから肝硬変ではアルブミンの低下に伴い Et の不活性化障害が起こり、その結果 Et の毒性が高まり、サイトカインの上昇を招いた可能性が示唆された。さらに一方で、アルブミンの Et 結合予備能は血清 CRP と負の相関関係を示したが、このことからアルブミンの Et 結合予備能の低下が炎症性サイトカインの産生亢進に伴う急性蛋白としての CRP の産生亢進を招いた可能性が考えられた。

以上、アルブミンと Et との関係については他の Et 結合蛋白との関連のもとにさらに詳細に検討を重ねなければならないが、今回の成績は、肝硬変重症例においてアルブミンが Et 解毒の意味において重要であり、血清アルブミン著減例に対するアルブミン補充が致死的な Et ショックを回避する意味からも有意義であることを示唆している。

## 結 語

アルブミンの Et 結合蛋白としての役割に注目して基礎的検討を行うとともに、低アルブミン血症の原因疾患として重要な肝硬変患者を対象に、血中 Et の蛋白結合状態と Et 不活性化機構について検討を重ね以下のごとき結果を得た。

1. アルブミンの Et 結合予備能は Child A 肝硬変に比し Child C 肝硬変で有意に低値であり、アルブミンの Et 結合予備能と Child-Pugh スコアの間には有意の負の相関関係が認められた。一方、HDL、トランスフェリンの Et 結合予備能と Child-Pugh スコアの間には相関関係は認められなかった。
  2. 肝硬変症例の血漿 Et 不活性化率は一般に健常人に比し高率であったが、Child C では逆に低下し、Child A に比し有意に低率であった。この際、血漿 Et 不活性化率はアルブミンの Et 結合予備能と正の相関関係にあった。
  3. 血清アルブミン、HDL、トランスフェリン値は Child 分類が進行するに従って有意に低下した。アルブミンの Et 結合予備能は血清アルブミン値、血清 HDL 値と正の相関関係を示した。肝硬変患者の血漿にヒトアルブミンを 1.0 g/dl 追加すると HDL の Et 結合予備能は有意に増加した。
  4. 肝硬変では血漿 IL-6、TNF- $\alpha$  が有意に高値を示し、IL-6、TNF- $\alpha$  著増例では血漿 Et 値も著増していた。血漿 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  は血清アルブミン値と負の相関関係にあり、IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  の上昇例はアルブミンの Et 結合予備能が著明に低下していた。また、アルブミンの Et 結合予備能と血清 CRP の間には有意の負の相関関係があった。
  5. 合成基質法による Et 測定系において、アルブミンは 1.5~3.0 g/dl の濃度で 250 pg/ml の Et 活性を 80~90 %不活性化し、トキシノメーター法による Et 測定系においては、アルブミンは 1.25~5.0 g/dl の濃度で 25、50 pg/ml の Et 活性を 100 %不活性化した。また、アルブミンは Kupffer 細胞の Et 取り込みならびに TNF 産生を濃度依存性に有意に抑制した。
- 以上の成績から、著者はアルブミンが肝硬変において重要な血中 Et 結合蛋白をなし、Et の不活性化、サイトカイン放出の抑制に働くという結論を得た。低アルブミン血症を呈する末期肝硬変症例へのアルブミン補充は Et 対策の観点からも有意義であると考えられる。

(稿を終えるに臨み、終始御懇篤なる御指導、御校閲を賜った恩師辻井 正学長ならびに福井 博教授に深甚の

誠意を捧げるとともに、御助言、御校閲を賜った病態検査学教室の中野 博教授ならびに細菌学教室の喜多英二教授に深く感謝いたします。また、 $[^3\text{H}]\text{-Et}$ の作成法を御教授くださった東京大学医科学研究所細菌感染研究部金ヶ崎士郎教授に深謝いたします。さらに、本研究の遂行にあたって常に御指導、御助力をいただいた教室の諸兄に感謝の意を表します。

## 文 献

- 1) Nolan, J. P. : The role of endotoxin in liver injury *Gastroenterology* **69** : 1346-1356, 1975.
- 2) Wolter, J., Liehr, H. and Grun, M. : Hepatic clearance of endotoxins : differences in arterial and portal perfusion. *J. Ret Soc.* **3** : 145-152, 1978.
- 3) Iwanaga, S., Morita, T. and Harada, T. : Chromogenic substances for horseshoe crab clotting enzyme, its application for the assay of bacterial endotoxin. *Hemostasis* **7** : 183-188, 1978.
- 4) Fukui, H., Brauner, B., Bode, J. C. and Bode, C. : Chromogenic endotoxin assay in plasma : Selection of plasma pretreatment and production of standard curves. *J Clin Chem Clin Biochem.* **27** : 941-946, 1989.
- 5) Fukui, H., Matsumoto, M., Tsujita, S., Takaya, A., Matsumura, M. and Tsujii, T. : Plasma endotoxin concentration and endotoxin binding capacity of plasma acute phase proteins in cirrhotics with variceal bleeding : an analysis by new methods. *J Gastroenterol Hepatol.* **9** (6) : 582-586, 1994.
- 6) 福井 博, 松本宗輔, 辻田重信, 松本元嗣, 高谷章, 菊池英亮, 植村正人, 森田倫史, 辻井 正 : 肝疾患におけるエンドトキシン血症—測定法の吟味と新しい血漿処理法による成績—。 *肝臓* **31** : 536-542, 1990.
- 7) Fukui, H., Tsujita, S., Matsumoto, M., Kitano, M., Kinoshita, K., Kikuchi, E., Okamoto, Y. and Tsujii, T. : Endotoxin inactivating action of plasma in patients with liver cirrhosis. *Liver* **15** : 104-109, 1995.
- 8) Ulevitch, R. J. Johnston, A. R. and Weinstein, D. B. : New function for high density lipoproteins : their participation in intravascular reactions of bacterial lipopolysaccharides. *J Clin Invest.* **64** : 1516-1524, 1979.
- 9) Berger, D. and Beger, H. G. : Evidence for endotoxin binding capacity of human Gc-globulin and transferrin. *Clin Chim Acta.* **163** : 289-299, 1987.
- 10) Tesh, V. L., Vukajlovich, S. W. and Morrison, D. C. : Endotoxin interactions with serum proteins relationship to biological activity. In : (Levin, J., Buller, H. R., ten Cate J. W., van Deventer, S. and Sturk, A.). *Bacterial endotoxins : Pathophysiological effects, clinical significance, and pharmacological control.* Alan. R. Liss, New York 47-62, 1988.
- 11) Friberger, P. : The design of a reliable endotoxin test. In : (ten Cate, J. W., Buller, H., Sturk, A. and Levin, J.). : *Bacterial Endotoxin, Structure, Biochemical Significance and Detection with the Limulus Amebocyte Lysate Test.* Alan. R. Liss, New York 139-149, 1985.
- 12) Obayashi, T. : Addition of perchloric acid to blood sample for colorimetric limulus test using chromogenic substrate : comparison with conventional procedures and clinical application. *J Lab Clin Med.* **104** : 321-330, 1984.
- 13) Inada, K., Endo, S., Takahashi, K., Suzuki, M., Narita, T., Yoshida, T., Suda, H., Komura, T. and Yoshida, M. : Establishment of a new perchloric acid treatment method to allow determination of the total endotoxin content in human plasma by the Limulus test and clinical application. *Microbiol Immunology* **35**(4) : 303-314, 1991.
- 14) Fukui, H., Kitano, H., Morimura, M., Kikuchi, E., Matsumoto, M., Kikukawa, M., Tsujita, S., Nagamoto, I., Nakatani, T., Okamoto, Y. and Tsujii, T. : Effect of alcohol on the functions of Kupffer cells and splenic macrophages in rats. *Alcohol Alcoholism* **28**(S1B) : 53-57, 1993.
- 15) 金子義保 : 肝疾患の診断と治療—肝硬変。 *最新医学* **31**(8) : 2008-2011, 1995.
- 16) Pugh, R. N. H., Murray-Lyon, I. M., Dawson, J. L., Pietroni, M. C. and Williams, R. : Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices. *Brit J Surg.* **60**(8) : 646-649, 1973.

- 17) Schumann, R. R., Leong, S. R., Flagg, G. W., Gray, P. W., Wright, S. D., Mathison, J. C., Tobias, P. S. and Ulevitch, R. J. : Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science* **249** : 1429-1431, 1990.
- 18) Freudenberg, M. and Galanos, C. : The metabolic fate of endotoxin. In : (Levin, J., Buller, H. R., ten Cate, J. W., van Deventer, S. and Sturk, A.). *Bacterial endotoxin: Pathophysiological effects, clinical significance, and pharmacological control*. Alan. R. Liss, New York 63-75, 1988.
- 19) Fukui, H., Kitano, H., Okamoto, Y., Kikuchi, E., Matsumoto, M., Kikukawa, M., Morimura, M., Tsujita, S., Nagamoto, I., Nakatani, T. and Tsujii, T. : Effect of alcohol on the endotoxin binding protein produced in the liver : *Alcohol Alcoholism* **29**(S1) : 87-91, 1994.
- 20) 福井 博, 辻田重信, 北野浩行, 森村昌史, 松本宗輔, 辻井 正 : 肝硬変における血中サイトカインとエンドトキシン. (西岡幹夫, 千葉満郎編). *消化器疾患とサイトカイン*. 日本医学館, 東京 67-71, 1993.