

# 血中エンドトキシン測定のための新しい血漿処理法の開発と その臨床的意義：肝疾患における検討

奈良県立医科大学第3内科学教室

松本宗輔

## DEVELOPMENT OF NEW TREATMENT OF PLASMA FOR QUANTITATION OF BLOOD ENDOTOXIN : ITS CLINICAL SIGNIFICANCE IN LIVER DISEASES

MUNESUKE MATSUMOTO

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

Received March 22, 1996

*Abstract* : Plasma endotoxin was measured in 31 patients with alcoholic liver diseases and in 90 patients with liver cirrhosis by the chromogenic substrate assay in which plasma was pretreated by an improved method. Pretreatment of plasma with perchloric acid yielded a soluble fraction (supernatant) and an insoluble fraction (precipitate) ; the supernatant was neutralized with 0.18 M sodium hydroxide and the precipitate was solubilized and neutralized by adding 10 % triethylamine. Endotoxin concentrations in these two fractions were measured by the use of S-2423 or endotoxin-specific Endospecky as a substrate. Irrespective of substrates, a greater part of plasma endotoxin was recovered from the precipitate in patients with liver cirrhosis. When total endotoxin concentration in plasma from cirrhotic patients was calculated by the new acid method, it correlated well to several parameters of liver function including total bilirubin, albumin, prothrombin time and cholinesterase. Endotoxin concentrations were notably elevated in patients with Child C cirrhosis. The elevation of plasma endotoxin was prominent in with poor prognosis, variceal bleeding or advanced hepatoma. Plasma endotoxin detected by this new method may become a useful clinical parameter to predict the outcome of liver diseases.

### Index Terms

endotoxin, chromogenic substrate assay, liver cirrhosis, perchloric acid, triethylamine

### 緒 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が<sup>1)</sup>、通常網内系での処理により無毒化されると考えられている<sup>2)</sup>。その後の運命の詳細はいまだ不明であるが、体外に排泄されなかったものの一部は肝産生蛋白と結合して不活性化された状態で、血中を循環していると想定されている<sup>3)</sup>。Etはカプトガニ血清抽出物の *Limulus lysate*<sup>4)</sup>をゲル化することから測定可能となったが、この *Limulus*

*lysate* のゲル化機構が解明され、合成基質を用いる定量法が開発される<sup>4)</sup>に及び、各種病態と Et 血症との関連を詳細に検討することが可能となった。しかし、血中 Et 測定上の最大の問題点は血漿処理法にある。すなわち、血中には種々の Et 反応阻害物質が存在しており<sup>5)</sup>、これらを除くために血漿処理法に工夫が加えられてきた<sup>5-7)</sup>が、いまだ理想的な方法がないのが現実で、血中 Et 濃度と患者の臨床像との間にはしばしば解離が認められる。現在、血漿前処理法としては希釈加熱法<sup>6)</sup>と過塩素酸(PCA)処理法<sup>7)</sup>が繁用されているが、いずれの方法を用

いても血中から 100% の Et 回収率が得られるとは限らない。われわれの検討では希釈加熱法では健康者、肝障害患者ともに 90% 以上の回収率が得られたが、PCA 処理法では回収率は 40~60% に過ぎず、残りの Et は通常の測定では廃棄される PCA 処理沈殿中から検出された<sup>8)</sup>。このような PCA 処理法の問題を克服するために、Inada ら<sup>9)</sup>は血漿をあらかじめ NaOH で処理する New PCA 法を開発した。この方法では PCA 処理後沈殿は生じず、処理血漿全体をサンプルとして血中総 Et 濃度を測定できる上に、回収率も良好であることから、PCA 法に代わる方法として一般の注目を集めている。一方、Fukui ら<sup>10)</sup>は PCA 処理後生ずる沈殿を廃棄せずにトリエチルアミンを用いて中和、可溶化する方法を案出した。本研究ではまず、従来の PCA 法<sup>7)</sup>、New PCA 法<sup>9)</sup>との対比のもとに Fukui らの PCA 処理法改良法の基礎的検討を行い、さらに多数の肝硬変患者を対象に血中 Et 濃度の測定を試み、本法による血中 Et 濃度測定の有用性について検討を加えた。

## 方 法

### 1. 非特異的合成基質 S-2423 による Et の測定

健康人 8 例、アルコール性肝疾患 31 例(脂肪肝 6 例、アルコール性肝炎 5 例、肝硬変 20 例)から採血を行った。検体は直ちに氷冷し、可及的速やかに 4℃ の条件下で 150 G・10 分間の遠心により、多血小板血漿 (PRP) を調整し、-80℃ に保存した。各検体を希釈加熱法あるいは PCA 処理法にて前処理した。希釈加熱法は Friberger らの方法<sup>9)</sup>に従い、血漿を内毒素フリー滅菌蒸留水で 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 (*E. coli* 0111 : B 4) を終濃度が 0 pg/ml, 12.5 pg/ml, 25 pg/ml, 37.5 pg/ml となるように各検体に加えておくことにより、各検体毎に検量線を準備した。

PCA 処理法は大林らの方法<sup>7)</sup>に準じたが、血漿の希釈は 2 種類の方法で行った。すなわち、第一の方法では原法の希釈率に従い、血漿 100 μl を 200 μl の 0.32 M PCA で処理し(反応時における最終希釈倍率 6 倍)、第二の方法では血漿 100 μl に滅菌蒸留水 100 μl を加え、0.32 M PCA 400 μl で処理(反応時における最終希釈倍率 12 倍)した。PCA 処理検体は 37℃、20 分間加熱した後、遠心分離(3000 rpm, 10 分間)し、上清は等量の 0.18 M NaOH で中和し、沈殿は 10% triethylamine (TEA) で中和した後、滅菌蒸留水に溶解し、総量を 1200 μl とした。

合成基質による Et の測定は、既報<sup>11)</sup>の如く Kabi 社のキットを用いて二段法(Limulus lysate 添加 20 分後、合成基質 S-2423 添加)で行い、microprocessor controlled

reader (EAR 400 AT, SLT Lab. Inst, Austria) による反応 kinetics の分析を加えた。すなわち、基質添加後の吸光度(405 nm) を 30 秒毎に記録し、各々の Et 濃度に対応する OD 増加率(Δ OD 405/分)を求め、これらに基づいて各検体の Et 濃度を計算した。Fig. 1 に 1 例として健康人の検量線を示すが、血中 Et 濃度は下記の計算式 (A) により求められる。

$$(A) ; Et(\text{pg/ml}) = (a-b) \times c / \tan \theta$$

a = 血漿の Δ OD 405/分

b = 滅菌蒸留水の Δ OD 405/分

c = 血漿希釈率

$\tan \theta$  = 検量線の勾配

なお、PCA 処理法では検体処理前に Et を添加した場合、上清中および沈殿中での Et 回収率は一定しなかったため、NaOH 処理あるいは TEA 処理後各分画に標準 Et を終濃度 0 pg/ml, 125 pg/ml, 250 pg/ml となるように加えて検量線を作成し、これに基づいて各分画の Et 濃度を計算した。

### 2. 特異的合成基質エンドスペースー<sup>®</sup> による Et の測定

対象は、健康人 8 例、肝硬変 90 例(アルコール性 11 例、B 型 26 例、C 型 53 例)である。このうち食道・胃静脈瘤、肝細胞癌の合併をそれぞれ 74 例、58 例に認めた。また、食道・胃静脈瘤合併例のうち 12 例は静脈瘤破裂のために消化管出血をきたした症例であり、これらについては回復期まで経過を追って採血した。

1. と同様に採血した多血小板血漿 (PRP) を検体とし、各検体を 0.32 M PCA, 0.18 M NaOH, 10% TEA で

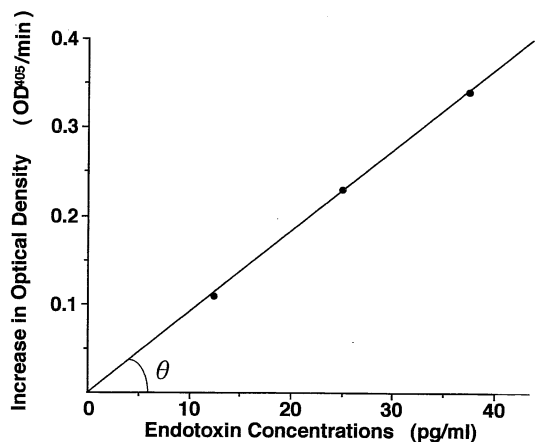


Fig. 1. Standard curve for quantitation of plasma endotoxin in healthy subjects.

処理した後、上清、沈殿中の Et をエンドスペース<sup>®</sup> (生化学工業, 東京) を用いて, Et 濃度を一段法で測定した. 基質添加後の吸光度(405 nm)を5分毎に micro-processor controlled reader(MTP-32, コロナ社製, 茨城)を用いて記録し, 各検体ごとに反応 kinetics の式(A)における各因子 a, b, c,  $\tan \theta$  を求め, Et 濃度を計算した.

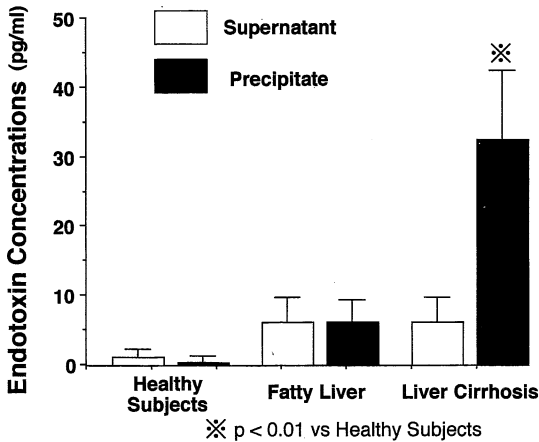


Fig. 2. Plasma endotoxin concentrations in normal subjects and chronic alcoholic liver diseases in the supernatants and precipitates resulting from PCA treatment. Endotoxin was measured with a synthetic substrate S-2423.

さらにこのうち 25 例については, Inada らの New PCA 処理法<sup>9)</sup>により血漿を処理した後, Et をエンドスペース<sup>®</sup>を用いて測定し, PCA 処理改良法による測定成績と対比した. すなわち, 血漿 100  $\mu$ l に 0.18 M NaOH 100  $\mu$ l を添加して 37 $^{\circ}$ C 5 分間インキュベートした後, 0.32 M PCA 100  $\mu$ l を加えさらに 10 分間インキュベートし, 最後に 0.18 M NaOH を 200  $\mu$ l 加えて激しく混和して測定検体とし, 標準曲線としては原法通り無処理の Et 水溶液を用いた. さらにこの 25 例中 11 例については, New PCA 処理に使用した容器をさらに 10% TEA を用いて洗浄した上, 滅菌蒸留水で総量 500  $\mu$ l とし, 溶液中の Et 濃度を測定した.

### 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. 過塩素酸処理改良法による血漿 Et 濃度

#### 1) 非特異的合成基質 S-2423 による成績

最終血液希釈倍率 6 倍で PCA 処理を行うと, 上清中に検出された Et 濃度は健常人と肝硬変の間で有意差がなかったが, 沈殿中の Et 濃度は肝硬変で著しい高値を示した(Fig. 2). 最終血漿希釈倍率を 12 倍とすると, Et の大部分は沈殿中にのみ検出されたが, 上清中, 沈殿中の濃度の合計を各血漿の Et 濃度とすると, 健常人, アルコール性脂肪肝, アルコール性肝炎, アルコール性肝硬変の Et 濃度はそれぞれ,  $1.8 \pm 0.7$  pg/ml,  $9.8 \pm 5.7$  pg

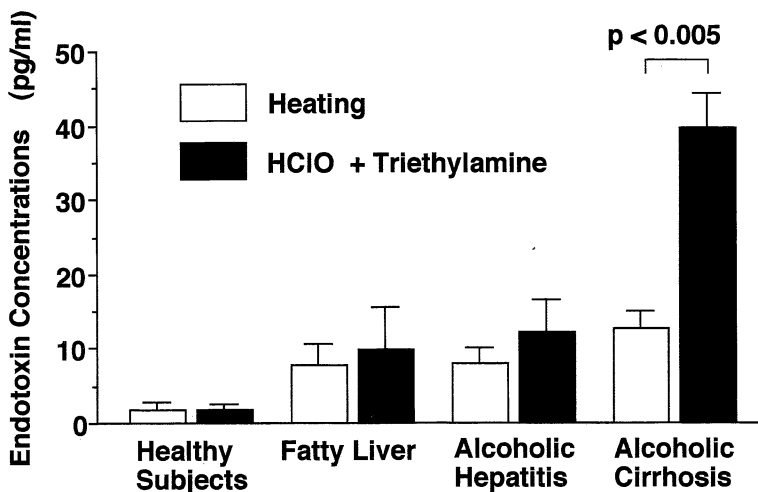


Fig. 3. Plasma endotoxin concentrations in healthy subjects and patients with alcoholic liver diseases.: Comparison between the heating method and the improved PCA method.

/ml,  $12.2 \pm 4.4$  pg/ml,  $39.7 \pm 4.6$  pg/ml であった(平均値  $\pm$  SE, Fig. 3). これらを同時に求めた希釈加熱法による成績と比較すると, アルコール性肝硬変において PCA 処理改良法による Et 値は希釈加熱法による Et 値より有意 ( $p < 0.005$ ) に高値であった (Fig. 3).

2) 特異的合成基質エンドスペース<sup>®</sup> による成績

上清中に検出された Et は健常人 ( $N=8$ )  $3.0 \pm 2.0$  pg/ml, 肝硬変 ( $N=90$ )  $32.4 \pm 43.4$  pg/ml, 沈殿中に検出された Et は健常人 ( $N=8$ )  $3.1 \pm 2.1$  pg/ml, 肝硬変 ( $N=90$ )  $50.2 \pm 67.1$  pg/ml であり, いずれの分画についても肝硬変では健常人より有意 ( $P < 0.001$ ,  $P < 0.001$ ) に高値を示した.

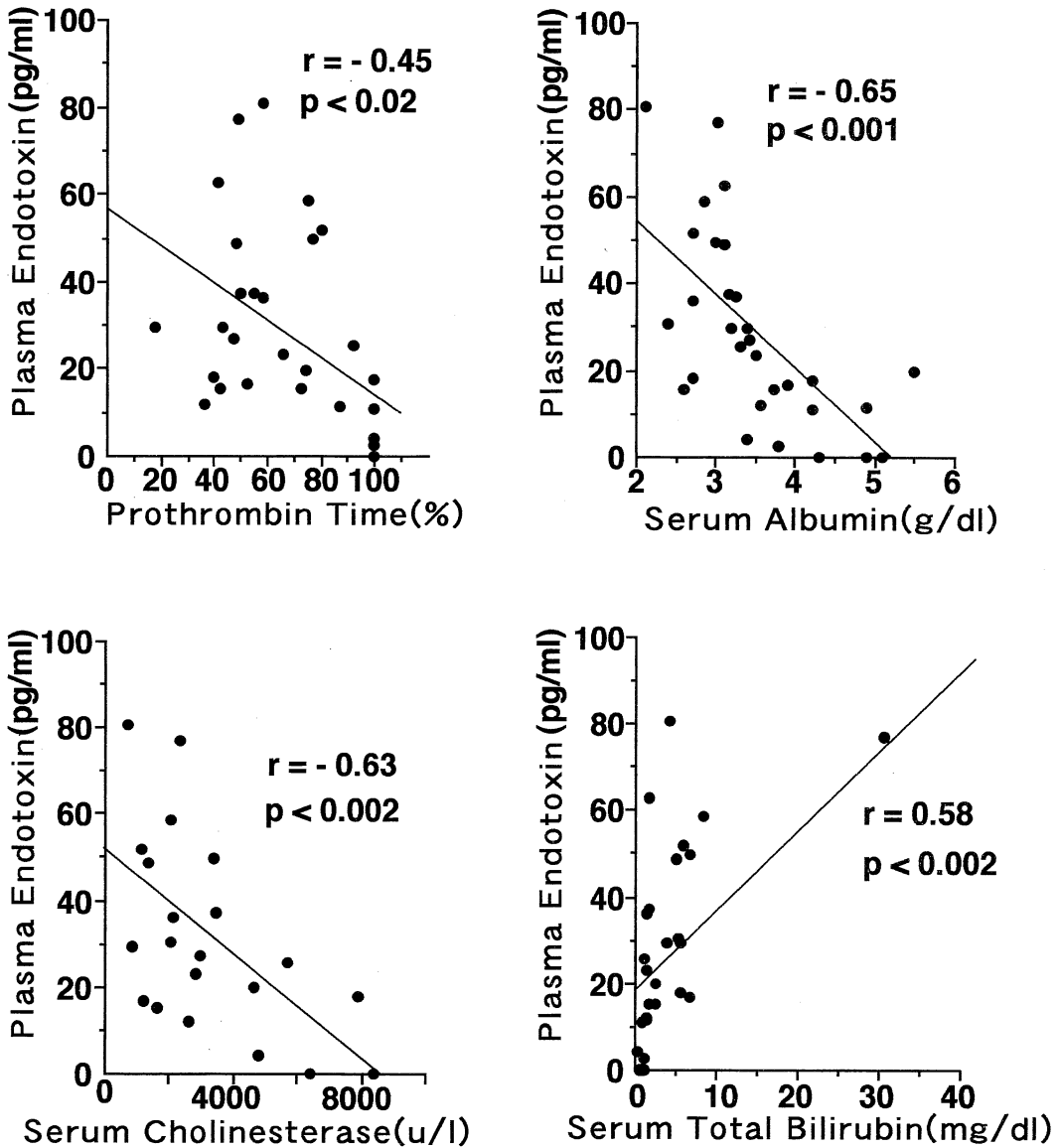


Fig. 4. Relationship of plasma endotoxin concentrations to prothrombin time, serum albumin, cholinesterase and total bilirubin. Endotoxin was measured with a synthetic substrate S-2423 after the improved PCA pretreatment.

2. New PCA 法による血中 Et 濃度との比較

New PCA 法により測定した血中 Et 濃度は健常人(N=8)2.8±2.0 pg/ml, 肝硬変(N=25)51.5±45.2 pg/ml となり, 肝硬変では健常人より有意(p<0.005)に高値を示した. この際, PCA 処理改良法による上清中 Et 濃度と New PCA 法による Et 濃度との間には相関関係はなかったが, 沈殿中 Et 濃度と New PCA 法による Et 濃度との間には弱い正の相関傾向(r=0.36, p=0.114)が認められた. また, このうち肝硬変 11 例において New PCA 法施行後に反応容器に付着した Et を測定して, New PCA 法による Et 濃度を合わせて血漿総 Et としたとこ

ろ, 平均 11.2±6.7% の Et が容器に付着していたと判定された.

3. 血中 Et 濃度と肝機能・臨床像との関係

1) 非特異的合成基質 S-2423 による成績

アルコール性肝障害において, 血中 Et 濃度はプロトロンビン時間, アルブミン, コリンエステラーゼと負の相関関係, 総ビリルビン値と正の相関関係にあった(Fig. 4). またこの方法による血中 Et 値は血清 HDL-コレステロール, トランスフェリンとも負の相関関係にあった(Fig. 5). さらに肝硬変例につき Child 分類<sup>12)</sup>別に血中総 Et 濃度をみると, Child A 19.3±5.5 pg/ml, Child B

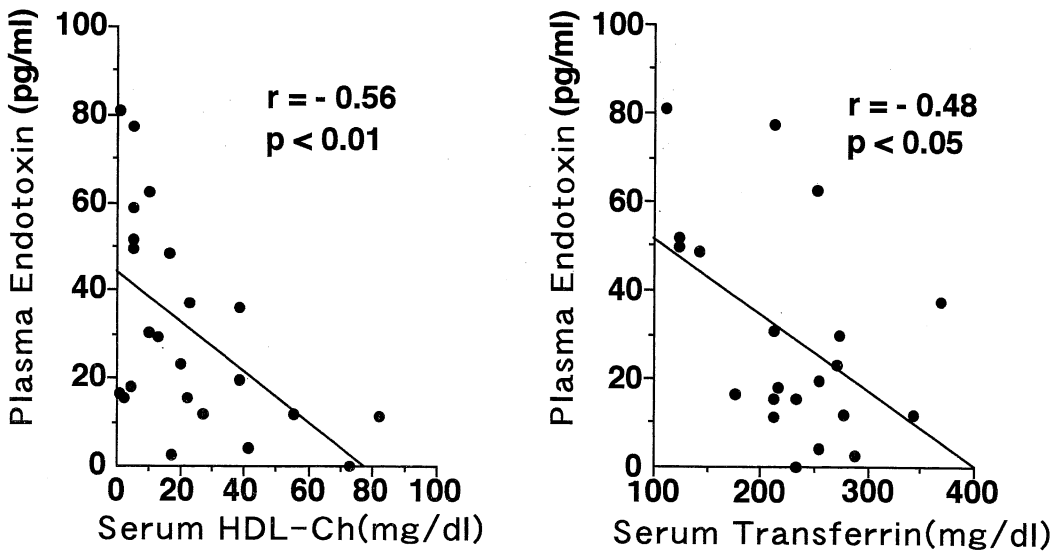


Fig. 5. Relationship of plasma endotoxin concentrations to serum high-density lipoprotein(HDL), cholesterol and transferrin. Endotoxin was measured with a synthetic substrate S-2423 after the improved PCA pretreatment.

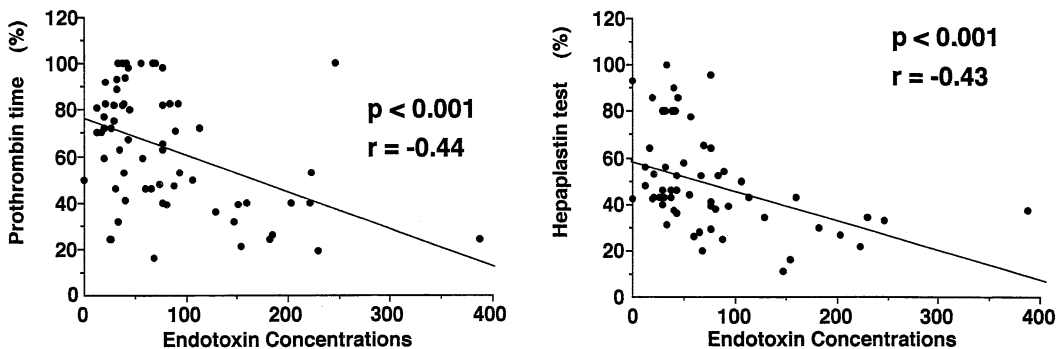


Fig. 6. Relationship of plasma endotoxin concentrations to prothrombin time and hepaplastin test in cirrhosis. Endotoxin was measured with commercially available substrate Endospecky<sup>®</sup> after the improved PCA pretreatment.

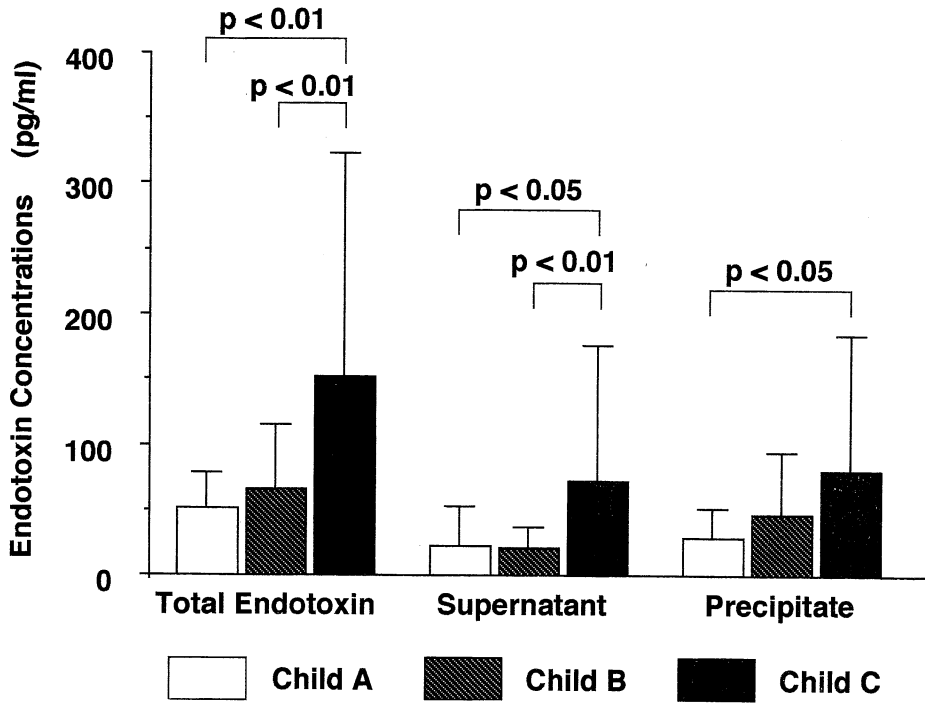


Fig. 7. Relationship between plasma endotoxin concentrations and Child-Pugh classification in cirrhosis. Endotoxin was measured with commercially available substrate Endospeccy® after the improved PCA pretreatment.

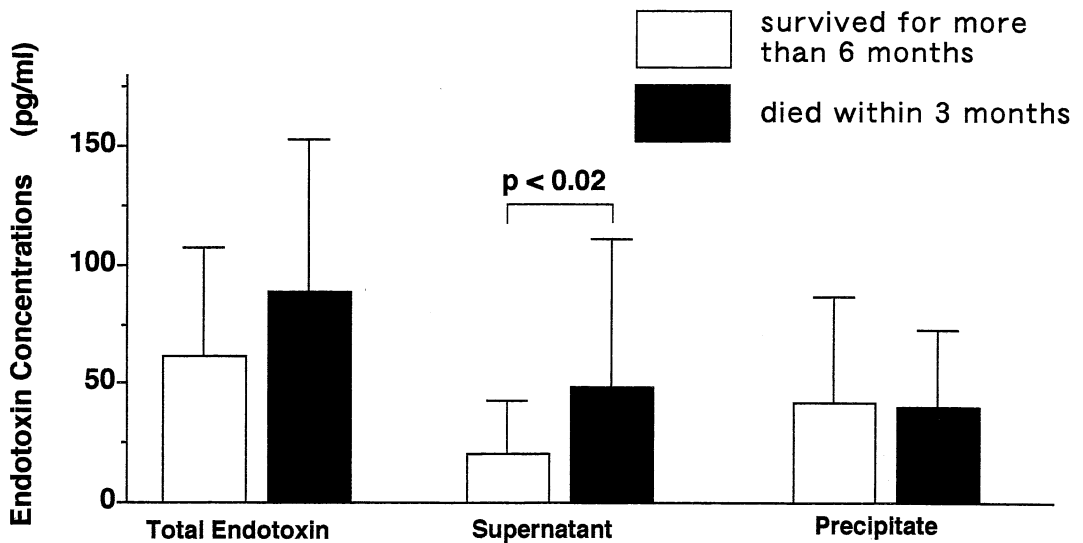


Fig. 8. Relationship between plasma endotoxin concentrations and prognosis of cirrhosis. Endotoxin was measured with commercially available substrate Endospeccy® after the improved PCA pretreatment.

32.6±22.9 pg/ml, Child C 44.5±23.8 pg/ml となり、  
進行例ほど血中総 Et 濃度が高値の傾向にあった。

2) 特異的合成基質エンドスペース<sup>®</sup>による成績

肝硬変において、血中 Et 濃度はプロトロンビン時間、  
ヘパラスチンテストと負の相関関係にあった (Fig. 6)。  
しかし S-2423 の場合とは異なり、アルブミン、コリンエ

ステラーゼ、総ビリルビン値などと血中 Et の間には有  
意の相関関係は認められなかった。Child 分類別では  
Child C 患者で Et 値が高かったが、肝硬変の進行に伴っ  
てまず沈殿中 Et が増加し、次いで上清中 Et が増加する  
傾向が認められた (Fig. 7)。また、3 ヶ月以内に死亡した  
例では 6 ヶ月以上生存した例より上清中 Et が有意に高

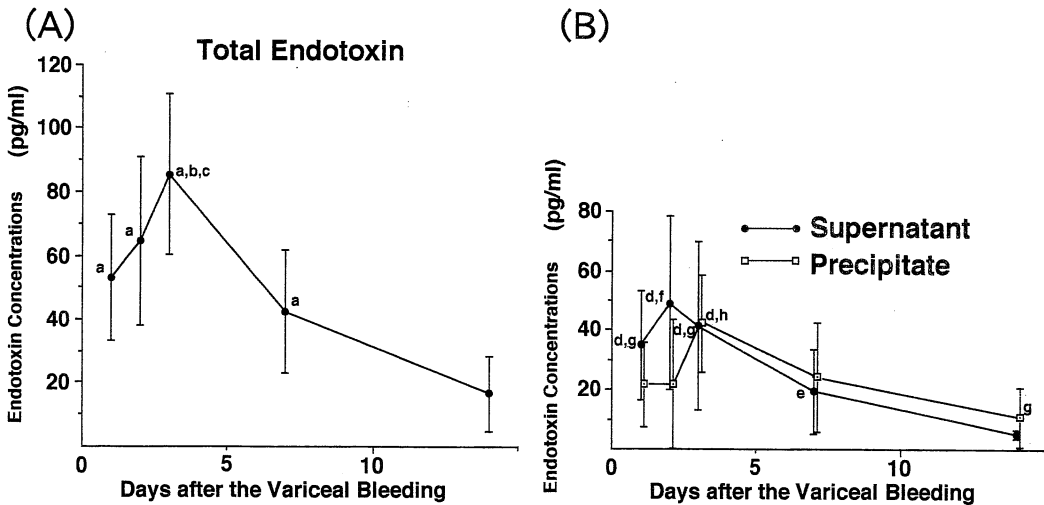


Fig. 9. Changes in plasma endotoxin concentrations after rupture of esophageal varices in patients with liver cirrhosis. (A) figure shows total endotoxin (●); a,  $p < 0.001$  vs day 14; b,  $p < 0.005$  vs day 1; c,  $p < 0.001$  vs day 7. (B) figure separately shows endotoxins in the supernatant fraction (●) and in the precipitate fraction (□). ; d,  $p < 0.001$  vs day 14; e,  $p < 0.005$  vs day 14; f,  $p < 0.005$  vs day 7; g,  $p < 0.05$  vs day 7; h,  $p < 0.02$  vs day 1.

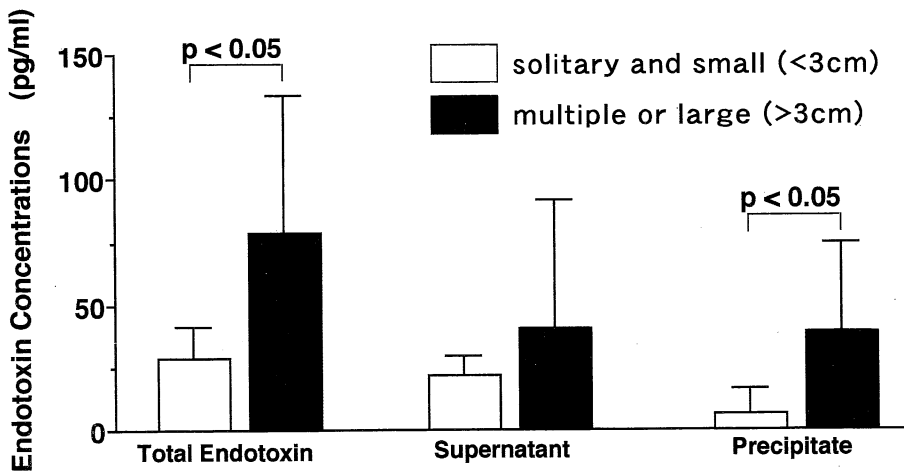


Fig. 10. Plasma endotoxin concentrations in cirrhotic patients with hepatocellular carcinoma. Endotoxin was measured with commercially available substrate Endospescey<sup>®</sup> after the improved PCA pretreatment.

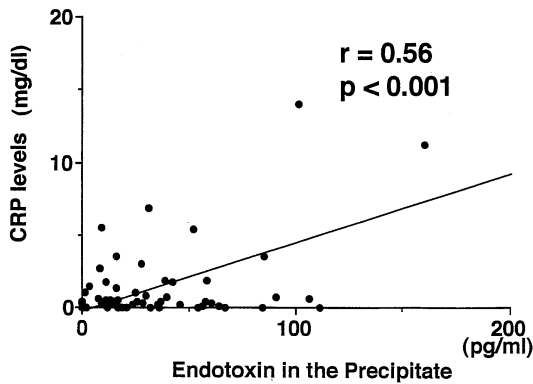


Fig. 11. Relationship between plasma endotoxin concentrations and serum C-reactive protein (CRP) levels in cirrhosis. Endotoxin was measured with commercially available substrate Endospecky® after the improved PCA pretreatment.

値を示した(Fig. 8).

食道静脈瘤破裂例において経過を追って血中 Et を測定すると、いずれの症例でも静脈瘤破裂後に Et が一過性の上昇を示したが、この際、まず上清中 Et が上昇し、続いて沈殿中 Et が上昇する傾向が認められた(Fig. 9)。さらに肝癌合併例のみについて血中 Et 濃度を検討すると、径 3 cm 未満の単発例に比し、3 cm 以上あるいは多発例では PCA 処理沈殿中 Et が高値を示した(Fig. 10)。

さらに、沈殿中 Et は血清 CRP と正の相関関係にあった(Fig. 11)。

## 考 察

Et は肝疾患<sup>13-16)</sup>、炎症性腸疾患<sup>17-19)</sup>、胆道感染症<sup>20,21)</sup>をはじめ種々の消化器疾患の病因、病態に深くかかわっていると考えられている。近年、合成基質法をはじめとする血中 Et の微量定量法の開発が進み<sup>4)</sup>、消化器疾患における Et 血症の意義を詳細に検討することが可能となった。しかし、現在の血中 Et 測定法にはいまだいくつかの未解決の問題点が残されており、血中 Et 値の解釈にあたり、こうした問題点を整理しておくことは重要である。Et を測定する上で問題となっている主要なもの 1) 血漿前処理法、2) 標準曲線の設定法、3) Limulus lysate の反応特異性の 3 点である。

血漿前処理法としては希釈加熱法<sup>9)</sup>と PCA 処理法<sup>7)</sup>が繁用されているが、いずれの方法を用いても血中から 100% の Et 回収率が得られるとは限らない。教室の Fukui ら<sup>8)</sup>は希釈加熱法では健常者、肝障害者ともに

90% 以上の回収率が得られたが、PCA 処理法では回収率は 40-60% に過ぎず、残りの Et は通常の測定では廃棄される PCA 処理沈殿中から検出されたとしている。このような PCA 処理法の問題を克服するために、2 つの方法が試みられている。1 つは Inada らが考案した New PCA 法<sup>9)</sup>で、まず血漿を NaOH で処理してから PCA 処理し、その後再び NaOH を追加するため沈殿が生じず、1 分画として血中 Et 総濃度を測定できる。いま 1 つは Fukui らが開発したもので、PCA 処理後生ずる沈殿を廃棄せず、TEA を用いてこれを可溶化してその Et 活性を測定する方法である<sup>10)</sup>。この場合、血中 Et 濃度は上清分画と沈殿分画の和として算出できる。Et は比較的親水性の polysaccharide 部分と疎水性の lipid A 部分からなっている<sup>22)23)</sup>が、元来水に溶けやすいものではなく、血中に存在する時は種々の結合蛋白の働きで一応水溶性になっていると想像されている。血漿を PCA 処理により酸性化するとかなりの部分が水に難溶性となり沈殿してしまう可能性があり、PCA 処理改良法ではそれをトリエチルアミン塩として、New PCA 法では Na 塩として可溶化しているわけである。本研究で著者はアルコール性肝障害、ウイルス性肝硬変患者の血中 Et をこの PCA 処理改良法で測定し、さらに一部の症例については Inada らの New PCA 法でも同時測定し、比較検討した。

次に問題となるのは標準曲線の設定法であるが、血中 Et 濃度を計算する際に水に Et を溶かしたものを標準曲線として用いることには大きな問題があると考えられる。すなわち、教室の Fukui ら<sup>8)</sup>は、一定量の Et を水に溶かした場合と血漿に溶かした場合では測定時の吸光度が異なっており、希釈加熱法では一般に血漿中の Et の方が水中の Et より高い値を示すこと、希釈加熱法、PCA 法のいずれを用いた場合でも血漿に添加した同一量の Et が与える吸光度は症例により異なることを報告している。さらに、PCA 処理を行う場合には上清、沈殿をいかにうまく中和したつもりでも最終 pH は検体ごとにまちまちになり、これが合成基質と Et の反応に影響を及ぼすことが明らかである。従って、ある生体試料中の Et 濃度を測定するにはその検体条件で標準 Et がいかなる吸光度を与えるかを基準にしなければならない。従来のほとんどの Et 測定法ではこの点が全く無視されてきているが、本研究ではすべての検体について internal standard を置くという原則に立って行った。

3 番目に問題となるのは Limulus lysate の反応特異性である。最初は Limulus lysate は Et に特異的に反応するものとされていたが<sup>3)</sup>、Kakinuma ら<sup>24)</sup>は抗腫瘍蛋白である (1 → 3)-β-D グルカンが 10 ng/ml の濃度でゲ



ル化するを明らかにした。(1→3)- $\beta$ -D グルカン  
は真菌類の菌体成分であるとともにセルロース系人工腎透  
析膜からも溶出する物質で<sup>25)26)</sup>あり、真菌血症や透析患  
者では従来の試薬では疑陽性反応を避けがたい。すなわ  
ち Limulus lysate には Et のリポド部分と反応する C  
因子と(1→3)- $\beta$ -D グルカンにより活性化される G  
因子<sup>27)</sup>があり、これらがともにゲル化カスケードの引き  
金となることから Et と(1→3)- $\beta$ -D グルカンを分別  
定量する必要が生じてきた。これは Limulus lysate を用  
いる定量法である合成基質法についても同様であり、反  
応系から G 因子を除く試みが重ねられた結果、まず  
lysate そのものから G 因子を除いた Endotoxin-  
specific test(エンドスペース<sup>®</sup>)が開発された<sup>28)</sup>。

以上のような経緯から血中 Et 濃度の解釈にあたって  
は用いた lysate の種類や G 因子除去操作の有無をは  
っきりさせる必要があり、理論的には非特異的な検出法  
だけでは Et 血症とは断定できない。

欧米では非特異的合成基質を用いる血中 Et 測定が一  
般的で、肝疾患の血中濃度についても既にいくつかの報  
告がなされている<sup>29)31)</sup>が、全て internal standard を置  
かない希釈加熱法によるものである。この方法に問題が  
あることは上述した通りであるが、これらの報告では Et  
濃度と Child 分類、血清総ビリルビン値、プロトロン  
ビン時間などの間には有意の相関関係が認められてい  
る<sup>29)30)</sup>。また、クレアチンクリアランスとも相関が認め  
られており<sup>30)</sup>、腹水貯留から肝腎症候群合併へと腎機能  
障害が進行したり、脳症を合併すると血中 Et 濃度が高  
値になる現象が観察されている<sup>29)31)</sup>。

教室の Fukui ら<sup>32)</sup>はより厳密な血中 Et の測定を目指  
し、まずアルコール性肝疾患患者の検体について、inter-  
nal standard を置くという条件下に希釈加熱法と合成  
基質 S-2423 を用いて血中 Et 濃度を測定した結果、健常  
人に対してアルコール性肝疾患患者では血中 Et 濃度が  
高値であり血中 Et は肝硬変のみならず、脂肪肝症例で  
も上昇していること、禁酒により血中 Et が低下するこ  
とを見いだした。肝硬変に限ってみると血中の  $\gamma$ -GTP  
活性値が高い例の方が正常値をとる例より血中 Et が高  
値を示したが、腹水の有無、食道静脈瘤の程度と血中 Et  
濃度との間には相関はみられなかった。また、肝予備能  
との関係ではアルコール性肝疾患全体でみて血清アル  
ブミン値が低い例の方が、正常値をとる例よりやや血中 Et  
濃度が高いという傾向を認めるにとどまった。

著者は、トリエチルアミンで PCA 処理沈殿中の Et を  
回収する方法で肝硬変患者の血中 Et 濃度を測定したと  
ころ、希釈加熱法の成績に比べて Et 濃度は著しく高値

を示すこと、こうして求めた血中 Et 濃度はプロトロン  
ビン時間、血清アルブミン、コリンエステラーゼ、HDL-  
コレステロール、トランスフェリンと負の相関関係、総  
ビリルビン値と正の相関関係にあることを明らかにした。  
このうち、アルブミン<sup>33)</sup>、HDL<sup>34)</sup>、トランスフェリン<sup>35)</sup>  
は Et 結合蛋白として重要な働きをなすと考えられて  
いるが、今回の PCA 処理改良法と非特異的合成基質を用  
いて測定できた Et 活性はこれら結合蛋白の減少にと  
も、血中に増加してくる Et 分画であるという推測も  
可能である。これが直ちに網内系機能を反映する spil-  
lover endotoxemia であるかどうかはさらに検討を要す  
るが、少なくとも肝機能評価の1つの指標になりうるこ  
とは事実であると考えられる。

以上のようにこの PCA 処理改良法による血中 Et 値  
が肝予備機能を反映する可能性があることから、次に特  
異的合成基質エンドスペース<sup>®</sup>を用いて同様の検討を  
行った。ただし、対象はウイルス性肝硬変が中心で肝癌  
合併例もあり、より多様な病態を含んでいる集団である。  
本法による肝硬変血中 Et 値も健常人の値より著しく高  
く、予備能との良好な相関が期待されたが、上記の検査  
項目のうち、有意の相関関係が認められたのはプロト  
ロンビン時間とヘパプラスチンテストのみであった。た  
だし、Child 分類でみると、Child C 患者で Et 値が高くな  
っており、PCA 処理後の上清、沈殿各々についてみると  
肝硬変の進行に伴ってまず沈殿中 Et が増加し、次いで  
上清中 Et も増加するという傾向が認められた。この傾  
向は予後との関係でも認められ、3ヶ月以内死亡例では6  
ヶ月以上生存例より上清中 Et が有意に高値を示してい  
た。一方で、本法による血漿 Et 値は食道静脈瘤破裂後に  
一過性の上昇を示した。また、肝癌合併例のみで検討す  
ると、径 3 cm 未満の単発例に比し、3 cm 以上あるいは  
多発例では PCA 処理沈殿中 Et が高値を示していた。以  
上のように本法による血漿 Et 値は肝機能以外の種々の  
要因により影響を受けることは明らかである。さらに上  
清、沈殿各分画ごとに臨床像との関係を検討すると、沈  
殿中 Et は血清 CRP と弱いながらも正の相関関係にあ  
ったことから、沈殿中 Et の一部は炎症に際し増加し、サ  
イトカインを介して急性相反応物質の産生にかかわる  
Et 分画を表している可能性もある。

PCA 処理改良法で上清中 Et、沈殿中 Et がそれぞれ何  
を意味しているかはなお不明である。Inada ら<sup>9)</sup>は、Et に  
は少なくとも2つの存在状態、すなわち遊離のものと蛋  
白に結合したものがあり、遊離の Et は PCA 処理にて上  
清中に認められ、HDL などと結合した Et は沈殿中に認  
められると考えている。しかし、著者は標準 Et を健常人

あるいは肝硬変血漿に混和したとき、Et量を多くすると、アルブミンに結合するEtの割合は減少したが、PCA処理後沈殿中に移行するEtの割合は添加したEt量に関係なく約70%であった。さらに、標識Etを各種濃度のアルブミン(1.5~6.0 g/dl)、トランスフェリン(150~300 mg/dl)、HDL(25~100 mg/dl)溶液に加えて、PCA処理を行ったところ、沈殿中に移行するEtの割合は蛋白の種類、濃度に関係なくほぼ60~70%であった(未発表データ)。これらの事実により、PCA処理においてEtの上清、沈殿への移行を規定するものは蛋白との結合状態ではないと考えている。

New PCA法は、上述したようにPCA処理改良法と並んで現在最も信頼できるEt測定法の一つであると考えられるが、成田<sup>36)</sup>はNew PCA法により肝硬変の血中Etを測定した結果、Et上昇はわずかではあるが、血清総ビリルビン、ICG 15分値と正の相関、プロトロンビン時間と負の相関関係を認めたとしている。著者は、今回25例の肝硬変患者血漿についてNew PCA法と著者らのPCA処理改良法によるEt測定を行ったが、New PCA法によるEt濃度はPCA処理改良法による上清中Et濃度とは相関せず、沈殿中Et濃度と弱い正の相関傾向にあることが確かめられた。いまだ少数例の検討ではあるが、現在までの解析ではNew PCA法によるEt濃度がプロトロンビン時間、ヘパラスチンテストと有意の相関関係を示すものの、Child分類別にみると必ずしも重症例でEtが高値を示さなかった(未発表データ)。さらに今回の検討において、New PCA法で処理すると沈殿は生じなかったが、使用した容器をさらにトリエチルアミン水溶液で洗浄すると11%程度のEtの残留が認められた。従って、現時点ではなおNew PCA法は血漿総Etを測定する上でPCA処理改良法に代わり得るものではないと考えている。

雑多な患者層を含むウイルス性肝硬変での成績と、Etの病態への密接な関与が想定されているアルコール性肝障害での成績は単純には比較できないとしても、非特異的合成基質を用いた方が肝予備能との相関が良かった点については基質自体の問題もあろうかと思われる。すなわち、腸管から吸収され網内系で処理される物質は、Etだけではないわけで、真菌菌体成分も同様の運命をたどると考えられる<sup>37)</sup>。その意味で真菌菌体成分とも反応する非特異的合成基質を用いた成績の方が、こうした機能を良く反映するという可能性が残っている。事実、従来のPCA処理法を用いた場合でも、非特異的合成基質では検出できた肝硬変のspillover endotoxemiaが特異的合成基質では測定できなくなるという現象<sup>38)</sup>があるが、

これには血漿処理法だけでなく、基質反応性の問題も関係しているとも考えられる。

## 結 語

血漿Et測定におけるPCA処理法の欠点を補うために、TEAを用いて沈殿を可溶化するPCA処理改良法(PCA・TEA処理法)を案出して、従来の希釈加熱法、PCA法、New PCA法と対比のもとに肝疾患患者の血中Et濃度を測定し、以下のごとき結果を得た。

1. PCA処理改良法で血漿処理の後、非特異的合成基質S-2423を用いてアルコール性肝障害患者の血中Et濃度を測定すると、肝硬変患者においてPCA処理沈殿中に多量のEtが証明された。この際、上清・沈殿両分画のEt濃度の和を総Et濃度とすると、アルコール性肝硬変において本改良法で求めたEt濃度は希釈加熱法に比較して有意に高値であった。また本法で測定したアルコール性肝疾患患者の血中Et濃度はプロトロンビン時間、血清アルブミン、コリンエステラーゼ、HDL-コレステロール、トランスフェリンと負の相関関係、総ビリルビン値と正の相関関係にあった。

2. PCA処理改良法で血漿処理の後、特異的合成基質エンドスペース<sup>®</sup>を用いて測定した肝硬変患者の血中Et濃度は、上清、沈殿中いずれの分画においても健常人より有意に高値であった。New PCA法を用いた場合でも同様の傾向は認められたが、両測定法による血中Et濃度は必ずしも相関せず、New PCA法では反応容器に付着するEtが問題となった。

3. PCA処理改良法とエンドスペース<sup>®</sup>を用いて測定した血中Et濃度はChild C肝硬変でとくに高値であったが、肝硬変の進行に伴ってまず沈殿中Etが増加し、次いで上清中Etが増加する傾向が認められた。さらに、予後不良例、進行癌例、食道静脈瘤破裂例で血中Etは高値をとる傾向にあった。

4. 以上より、PCA処理改良法を用いることにより、従来法では測定不可能であった血中Et活性が新たに測定できるようになり、臨床経過を反映する有用な指標となりうることが示唆された。

(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 博教授に深甚の謝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、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) Freudenberg, M. and Galanos, C. : *in* The metabolic fate of endotoxin (Levin, J., Buller, H. R., ten Cate, J. W., van Deventer, S. and Sturk, A., eds.). *Bacterial endotoxins : Pathophysiological effects, clinical significance, and pharmacological control.* Alan. R. Liss, New York, p63, 1988.
- 4) 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.
- 5) Levin, J., Tomasulo, P. and Oser, R. : Detection of endotoxin in human blood and demonstration of an inhibitor. *J. Lab. Clin. Med.* **75** : 903-911, 1970.
- 6) Friberger, P. : *in* The design of a reliable endotoxin test (ten Cate, J. W., Buller, H. R., Sturk, A. and Levin, J., eds.). : *Bacterial Endotoxins, Structure, Biochemical Significance and Detection with the Limulus Amebocyte Lysate Test.* Alan. R. Liss, New York, p139, 1985.
- 7) Obayashi, T. : Addition of perchloric acid to blood samples for colorimetric limulus test using chromogenic substrate : comparison with conventional procedures and clinical application. *J. Lab. Clin. Med.* **104** : 321-330, 1984.
- 8) 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.
- 9) Inada, K., Endo, S., Takahashi, K., Suzuki, M., Narita, T., Yoshida, T., Suda, H., Komuro, 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. Immunol.* **35**(4) : 303-314, 1991.
- 10) Fukui, H., Matsumoto, M., Tsujita, S., Takaya, A., Kojima, H., 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.
- 11) 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.
- 12) 金子義保 : 肝疾患の診断と治療 肝硬変. *医薬ジャーナル* **31**(8) : 2008-2011, 1995.
- 13) 多羅尾和郎 : 肝硬変とエンドトキシン. *最新医学* **35** : 518-521, 1980.
- 14) Nolan, J. P. and Ali, M. V. : Endotoxin and the liver. I. Toxicity in rats with choline deficient fatty livers. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **129** : 29-31, 1968.
- 15) Prytz, H., Holst, -Christensen, J., Korner, B. and Liehr, H. : Portal venous and systemic endotoxaemia in patients without liver disease and systemic endotoxaemia in patients with cirrhosis. *Scand. J. Gastroent.* **11** : 857-863, 1976.
- 16) Caridis, D. T., Fine, J., Reinhold, R. B. and Woodruff, P. W. H. : Endotoxemia in man. *Lancet* **24** : 1381-1385, 1972.
- 17) Kruis, W., Schusseler, P., Weinzierl, M., Galanos, C. and Eisenburg, J. : Circulating Lipid A antibodies despite absence of systemic endotoxemia in patient with Crohn's disease. *Di. Dis. Sci.* **29** : 502-507, 1984.
- 18) 鴨井三郎 : 炎症性腸疾患における血中 Lipid A 抗体の検討. *日消誌.* **85**(6) : 1245-1251, 1988.
- 19) Kondo, M., Yoshikawa, T., Takemura, S., Yokoe, N., Kawai, K. and Masuda, M. : Hemorrhagic necrosis of the intestinal mucosa associated with disseminated coagulation. *Digestion* **17** : 38-45, 1978.
- 20) 代田明郎, 森山雄吉, 足立憲治, 田代真一, 鄭 淳, 相原 薫 : エンドトキシン血症の発来について—とくに急性閉塞化膿性胆管炎における胆管由来の細菌

- 性因子と腸管由来の経門脈の細菌性因子に関する研究成績を中心として. 最新医学 35(3): 485-496, 1980.
- 21) 磯山 徹: 胆道感染症に伴うエンドトキシンショックに関する基礎的並びに臨床的研究. 日外会誌. 79: 315-331, 1978.
- 22) Westphal, O. and Luderitz, O.: Chemische Erforschung von Lipopolysacchariden gram-negativer bakterien. Angew. Chem. 66: 407-417, 1954.
- 23) Homma, J. Y., Matsuura, M., Kanegasaki, S., Kawakubo, Y., Kojima, Y., Shibukawa, N., Kumazawa, Y., Yamamoto, A., Tanamoto, K., Yasuda, T., Imoto, M., Yoshimura, H., Kusumoto, S. and Shiba, T.: Structural requirements of lipid A responsible for the functions: A study with chemically synthesized lipid A and its analogues. J. Biochem. 98: 395-406, 1985.
- 24) Kakinuma, A., Asano, T., Torii, H. and Sugino, Y.: Gelation of Limulus amoebocyte lysate by an antitumor(1-3)- $\beta$ -D-glucan. Biochem. Biophys. Res. Commun. 101: 434-439, 1981.
- 25) Corson, L.A. and Peterson, N. J.: *in* LAL-reactive material associated with hemodialysis membranes (Watson, S. W., ed.). Endotoxins and their detection with the limulus amoebocyte lysate test. Alan. R. Liss, New York, p217, 1982.
- 26) 坂下恵一郎, 筒井敏彦, 山崎親雄, 伊藤 晃, 増子 和郎, 磯崎 武: 未使用ダイアライザー由来リムルス陽性物質について. 人工臓器 13: 780-783, 1984.
- 27) Morita, T., Tanaka, S., Nakamura, T. and Iwanaga, S.: A new(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucan-mediated coagulation pathway found in Limulus amoebocytes. FEBS Lett. 129: 318-321, 1981.
- 28) Obayashi, T., Tamura, H., Tanaka, S., Ohki, M., Takahashi, S., Arai, M., Masuda, M. and Kawai, T.: A new chromogenic endotoxin-specific assay using recombinant limulus coagulation enzymes and its clinical application. Clin. Chim. Acta 149: 55-65, 1985.
- 29) Bigatello, L., Broitman, S. and Fattori, L.: Endotoxemia, encephalopathy, and mortality in cirrhotic patients. Am. J. Gastroenterol. 82: 11-15, 1987.
- 30) Lumsden, A., Henderson, J. and Kutner, M.: Endotoxin levels measured by a chromogenic assay in portal, hepatic and peripheral venous blood in patients with cirrhosis. Hepatology 8: 232-236, 1988.
- 31) Guarner, C., Soriano, G., Tomas, A., Bulbena, O., Novella, M. T., Balanzo, J., Vilardell, F., Mourelle, M. and Moncada, S.: Increased serum nitrite and nitrate levels in patients with cirrhosis: relationship to endotoxemia. Hepatology 18: 1139-1143, 1993.
- 32) Fukui, H., Brauner, B. and Bode, J. C.: Plasma endotoxin concentrations in patients with alcoholic and non-alcoholic liver disease: reevaluation with an improved chromogenic assay. J. Hepatol. 12: 162-169, 1991.
- 33) 北野浩行, 福井 博, 北方一成, 岡本康幸, 菊池英亮, 松本昌美, 菊川政次, 辻田重信, 長本一成, 辻井 正: エンドトキシン結合蛋白としてのアルブミンの意義について. 第7回エンドトキシン・シンポジウム講演記録集. 羊土社, 東京, p12-16, 1994.
- 34) 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.
- 35) Berger, D. and Beger, H. G.: Evidence for endotoxin binding capacity of human Gc-globulin and transferrin. Clin. Chim. Acta 163: 289-299, 1987.
- 36) 成田知史: 肝硬変症における血中エンドトキシン—新しい過塩素酸前処理法と特異的測定法を用いた検討. 日消誌. 89: 1252-1259, 1992.
- 37) 宮崎幸重, 光武耕太郎, 河野 繁, 原 耕平: 真菌由来 $\beta$ -グルカンの体内動態およびTNF産生能への関与. 第6回エンドトキシン・シンポジウム講演記録集. 羊土社, 東京, p13-21, 1993.
- 38) 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.