

ブタ肝移植における血中エンドトキシン値の変動

東北大学小児外科

安 藤 正

同 第2外科

大河内信宏 加藤 博孝 小泉 雅典

藤盛 啓成 桜田 正寿 里見 進

佐々木 崇 田口 喜雄 森 昌造

同 第3内科

矢 島 義 昭

THE BLOOD LEVEL OF ENDOTOXIN AFTER LIVER TRANSPLANTATION IN THE PIG

Tadashi ANDOH

Division of Pediatric Surgery, Tohoku University School of Medicine
Nobuhiro OHKOUCHI, Hirotaka KATOH, Masanori KOIZUMI,
Keisei FUJIMORI, Masatoshi SAKURADA, Susumu SATOMI,
Takashi SASAKI, Yosio TAGUCHI and Shozo MORI

Second Department of Surgery, Tohoku University School of Medicine

Yoshiaki YAJIMA

Third Department of Internal Medicine, Tohoku University School of Medicine

ブタ肝移植において移植後のエンドトキシン (Et) の変動について検討した。3時間 (n=5) および12時間保存 (n=2) の移植モデルで全例において血中 Et が検出され、移植後24時間の間に8~380 pg/ml のピーク値を示し以後漸減した。この Et は従来の合成基質法では陽性に検出されたが β -glucan 感受性因子を選択的に除去したエンドトキシン特異テストでは全く検出されなかった。また移植前後での血液培養は全例が陰性であった。この現象はヒトの肝不全時にみられる、矢島らのいうところの non-septic endotoxemia と同一のものであると考えられた。移植肝の状態が悪く、数時間で死亡した例では血中 Et が低値を示す傾向が認められ、この意味で生着予後の1つの指標となりうると思われたが、この現象は従来の spill-over 学説では説明困難であった。

索引用語：肝移植，エンドトキシン，Limulus colorimetric test，エンドトキシン特異テスト，non-septic endotoxin

I. 緒 言

劇症肝炎や肝硬変などの肝不全時に、disseminated intravascular coagulation (DIC) や腎不全の合併に伴って高率にかつ高度の Endotoxin (以下 Et) 血症が出現することが知られている^{1)~4)}。また、近年では手術

侵襲の大きな食道癌の根治手術時や肝硬変を合併した肝切除術時にも高率に Et 血症が出現することが明らかにされている⁵⁾⁶⁾。これらの症例で特徴的なことは、臨床上グラム陰性菌敗血症を伴わないにもかかわらず Et 血症をきたすことであり、従来その成立機株より内因性 Et 血症とよばれてきた。これは、肝不全状態や過大な手術侵襲の加わった場合においては肝の Kupffer 細胞の貪食能が障害される結果、生理的に門脈血中に

<1989年6月7日受理> 別刷請求先：安藤 正
〒980 仙台市青葉区星陵町1-1 東北大学医学部
第2外科

吸収される腸内細菌由来の Et が肝を spill-over して末血中に出現するというものである⁷⁾。しかし矢島らは、過塩素酸法を前処理法とした Limulus Colorimetric Test (いわゆる従来の合成基質法)を用いて検出されるこの内因性 Et 血症が、 β -glucan 感受性因子を除去して構成されたエンドトキシン特異テスト (エンドトキシンに特異的な合成基質法)を用いると全く検出されないことを示した。そして、単なる成立機転の違いにとどまらず、物質としても区別する意味で non-septic endotoxemia とよび、グラム陰性菌敗血症の際に出現する septic endotoxemia と区別して用いている⁸⁾。

今回、われわれはブタ肝移植モデルを用いて肝の Kupffer 細胞の貪食能が障害されると予想される肝移植時に、血中 Et がどのように変動するのか、また、Et が肝移植において生着予後の指標となりうるかどうかを検討した。

II. 対象と方法

体重15~20kg のブタを用い、4℃の Collins 液にて3時間単純浸漬保存の後に同所性に移植した (n=5)。なお、移植に際して門脈のクランプ中には門脈と大腿静脈から外頸静脈へのバイパスを置いている。移植中に門脈血流再開前、再開後1~24時間および2~30日にわたり経時的に中心静脈より採血をして以下の測定を行った。さらに、12時間の保存肝移植系 (n=2) においても同じ項目を測定した。

1. 血中 Et の測定

heparin の入った disposable syringe を用いて中心静脈より3ml の採血を行った。検体を3,000rpm, 15分間、遠心して platelet-poor plasma とし、perchloric acid (PCA) にて前処理を行った。従来の合成基質法 (以下 T 法) としては Toxicolor® (生化学工業製) を、エンドトキシン特異テスト (以下 ES 法) としては Endospecy® (生化学工業製) を用いた。なお、両測定法による測定は PCA 処理後の同一の上清を用いて行い、測定感度はともに5pg/ml であった。

また、バイパスチューブ内はあらかじめ Et free の滅菌蒸留水30l にて洗浄し、Et free としたものを用いており、移植の前にはアルブミンやプラズマネートなどの血漿製剤は全く使用していない。術中の補液は Lactate Ringer Solution を用い、単純浸漬保存に用いた灌流保存液 (Euro-Collins 液®, ミドリ十字社製) には Et 活性は T 法, ES 法でともに全く検出されなかった。

2. 血液培養および肝胆道系酵素

血流再開の前および24時間後に中心静脈より採血を行い、血液培養および肝機能評価として transaminase (GOT, GPT), Alp, LDH および血清ビリルビン値を測定した。なお、血液培養はカルチャーボトル® (栄研化学製) を用いてグラム陽性菌, グラム陰性菌および真菌を分離培養した。また transaminase の測定は紫外部測定法により単位として Karmen 単位を、Al-p は King-Armstrong 法により K-A 単位を用いた。LDH は紫外部測定法により Wröblewski 単位を用いた。なお、各酵素の正常値には、われわれの施設で行ったブタ肝移植実験時の移植前値を用いており、GOT: 51.2±18.3Karmen 単位, GPT: 30.2±9.3Karmen 単位, Al-p: 19.9±6.9K-A 単位, LDH: 1,222±362 Wröblewski 単位, (平均値±S.D. n=19) を正常値とした。

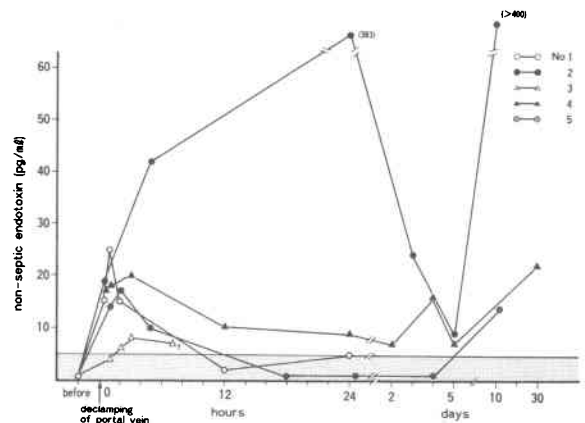
III. 結果

1. 肝移植時のエンドトキシン値の推移

3時間保存の肝移植モデル (No. 1~5) での Et の変化は T 法で測定すると血流再開前には検出されなかったものが、いずれの例も血流再開後30分~24時間の間に最高8~380pg/ml の濃度で検出された。No. 2を除いては血流再開後、30分~3時間の早期にピーク値をとった後、Et 値は速やかに下降した。しかし ES 法で測定するといずれの症例も血流再開前はおろか、再開後も Et は全く検出されなかった (図1)。

しかし、7日以上長期生存が得られた4頭のうち No. 2, 4および5の3例では T 法で一時的に下がった後、10~30日後に再び上昇し、しかも T 法ばかりでなく

図1 3時間保存例における Et の変動



ES法でも陽性に検出された。この3例ではT法でES法より高値を示した(表1)。この3例はT法の再上昇した時期に一致して発熱、黄疸、出血傾向などの理学所見を示し、敗血症によるDICが疑われた。実際に、No. 5ではEtの再上昇時の静脈血培養にてE. coliおよびEnterococcus faecalisが同定され、屠殺時には3例とも肝膿瘍が認められた。またNo. 3は移植肝の状態が悪く、7時間後に死亡したがEt値は最高8pg/mlにとどまった。

12時間保存の移植モデルNo. 6での血中Etの変化は、T法で測定すると血流再開前には検出されなかったものが、血流再開後数時間のあいだ30~50pg/mlの濃度で検出された。No. 7は血流再開1時間後に高カリウム血症によるおもわれる心停止にて死亡した。移植肝の状態が悪かったと考えられたが、Et血症はむしろ軽度であり、6~9pg/mlの上昇にとどまった。ES法で測定すると2例とも血流再開の前後に全く検出されなかった(図2)。

2. 門脈血中のエンドトキシン

12時間保存のNo. 6では門脈血流再開直後数分の門脈採血で38pg/mlのEt値がT法で既に検出され、かつ、この値は末梢での検出値と一致した。同じ12時間保存のNo. 7でも血流再開直後の採血で門脈血中と末

梢血中のEt値が一致した。そしてこれらの門脈血検体も末梢血中と同様にES法ではEt活性はまったく検出されなかった。

3. 血液培養

血流再開前および24時間後での中心静脈からの採血による血液培養の結果は3時間保存および12時間保存のいずれの症例もグラム陽性菌、陰性菌および真菌は陰性であった。

4. 肝胆道系酵素の推移

GOTは3時間保存の5例では血流再開後24時間後に170~540Karmen単位のピーク値をとり、その後速やかに下降した。しかし、肝膿瘍を形成したNo. 4は29病日に161単位に再上昇していた。12時間保存のNo. 6, 7では血流再開後直ちにGOTは上昇しているが術後短時間で死亡しているため6時間以後の変化を検討できなかった(図3)。

また、GPTは3時間保存の5例では門脈血流再開後の変動はほとんどみられず、20~50Karmen単位の間で動くに過ぎなかった。Al-pの変動は血流再開後24時間以内に28~50K-A単位に上昇する例もあれば、7~23K-A単位と上昇のみられない例もあり、明らかな傾向を示さなかった。

LDHは4例で測定しえたが3例では24時間でピーク値をとるものの明らかな傾向は示さなかった。Total bilirubinは5例で測定したが24時間以内の変動はみられず24時間以後もほとんど動かなかった。しかし、術後29病日に肝膿瘍を呈したNo. 4, 5の2例ではそれぞれ3.3および3.9mg/dlに上昇していた。

IV. 考案

これまでエンドトキシンを測定する方法としては、一般にはリムルスゲル化法が行われてきた⁹⁾。この方法はゲル化の有無によりエンドトキシンを定性的に評

表1 術後DIC発症時におけるEt値の乖離

Case	Toxicolor ^a (pg/ml)	Endoscopy ^a (pg/ml)	Culture	Outcome
No 2	scale out (>400)	368	N. D.	Died at 18P.O.D. Liver abscess, DIC
No 4	22	8	N. D.	Sacrificed at 29P.O.D. Liver abscess, DIC
No 5	14	7	E. coli, Enterococcus faecalis	Sacrificed at 30P.O.D. Liver abscess, DIC

P.O.D.: postoperative days N.D.: not detected

図2 12時間保存例におけるEt値の変動

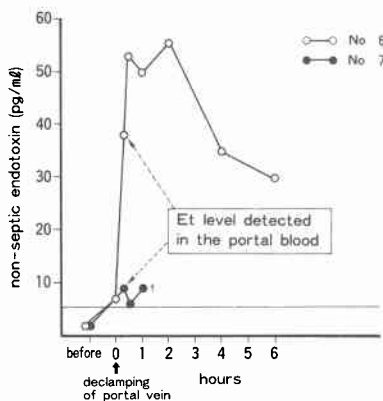
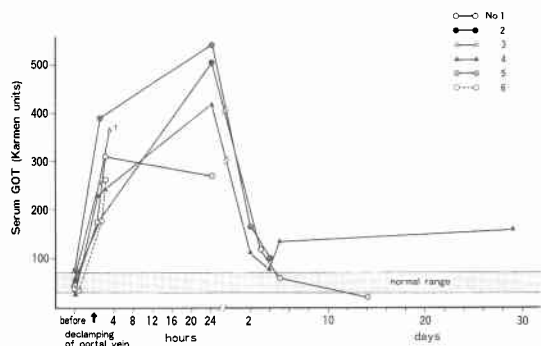


図3 肝移植後のGOTの変動



価する検査法であり、その客観性には問題があるもののエンドトキシンに特異的であると信じられていたので従来のエンドトキシン血症に関する報告のほとんどはゲル法により行われてきた¹⁰⁾。しかし、近年、岩永らはエンドトキシン活性を比色定量する *Limulus Colorimetric Test* (合成基質法: T法)を開発し¹¹⁾、田村らは合成基質法のための前処理法として過塩素酸(PCA)法を提唱した¹²⁾。これにより血中エンドトキシンを pg/ml の単位まで定量することが可能となった。現在では岩永ら、田村らの方法に準拠した測定キットが市販されている。さらに岩永らはリムルス法には植物由来の多糖である β -glucan による偽陽性反応が存在することを明らかにし、 β -glucan 感受性因子を反応系より選択的に除去して構成されるエンドトキシン特異テスト(ES法)が開発された¹³⁾。

臨床において DIC や腎不全を合併した肝不全時や肝硬変を合併した肝切除術時に血中 Et 値を測定すると、ES 法では検出されず T 法でのみ検出されるエンドトキシン血症が出現する。著者のりとりである矢島らはこのエンドトキシンを non-septic endotoxin とよび、sepsis の際に ES 法と T 法の両測定法で検出される septic endotoxin とは区別して用いている。手術侵襲の大きな食道再建術時や肝硬変を合併した肝切除術時にはこの non-septic endotoxin が出現しながらも、DIC や shock を伴わないことから、septic endotoxin と同様な生物活性を有しているとは考えにくい。かといって植物由来の多糖である β -glucan が生体内で産生されたとは考えられる。この non-septic endotoxin の本体は目下のところ不明である。

肝の網内系機能の低下が予測されるブタ肝移植時においても、移植後24時間の間に血中 Et 値が T 法で検出されたが ES 法では全く検出されないという結果が得られた。ブタでみられたこの測定法の乖離は、臨床でみられる non-septic endotoxemia と全く同様の反応である。移植の前後での血液培養は陰性であり、グラム陰性菌および真菌による sepsis は検査上も理学所見からも否定的であった。このことはヒトだけでなくブタにおいても、T 法と ES 法が乖離する non-septic endotoxemia という状態が明らかに存在することを意味するものである。

長期生存がえられた4例中3例では、10~30日後に sepsis や DIC 症状を呈した際に血中エンドトキシン値の再上昇がみられた。一般にグラム陰性菌敗血症の際に認められる Et 血症では T 法と ES 法での Et 値

が一致するはずであるが¹⁴⁾、この時のエンドトキシンは T 法と ES 法の両測定法で陽性に検出され、かつ、T 法での活性値がより高値を示した。今回の結果は矢島のいう non-septic endotoxemia に septic endotoxemia が重なったことによる可能性が示唆された。

Non-septic endotoxemia の本体については現在のところ明らかではないが、1つの可能性として腸管からの吸収過程で何らかの修飾をうけ、ES 法に反応しなくなった Et が肝を spill-over して末血に流入することが考えられる。しかし、移植肝の状態が悪い症例では Et 値がむしろ低値を示したこと(移植肝の状態が悪ければ肝の網内系機能はより低下しており、spill-over による Et はより高値を示すはず)、および門脈血中の Et 値と末梢のそれとが一致したこと(spill-over 学説に従うならば門脈血中の Et 値が末梢の Et 値よりもむしろ高値を示すはず)より、spill-over で説明することは困難である。むしろ、ブタの生体反応の結果出現している内因性物質である可能性を示唆する成績ではないかと考えている。

また、移植肝の生着予後を評価する指標となるものを肝胆道系酵素で検討したが、いずれの酵素も明らかな傾向は示さず生着予後の指標としては不適當と思われる。これに対し、移植肝の状態が悪い症例では Et 値が低値を示したことより、術直後の non-septic endotoxin の測定は移植肝の生着予後の1つの指標となりうる可能性が示唆された。

さらに、摘出肝の保存時間と移植後の non-septic endotoxin 値とを検討すると、移植肝の状態が悪くない例では3時間保存例も12時間保存例もともに門脈血流再開後30分ないし3時間の間に20ないし60pg/ml のピーク値をとり、以後漸減しているが、移植肝の状態が悪い例(No. 3および7)では保存時間によらず Et 値が低値にとどまった。しかし、12時間保存の例数が少なく、3時間保存例との比較検討は困難であった。

今後、症例を重ねてゆき、non-septic endotoxin の臨床的意義を検討するとともにその本体を解明してゆくことが急務であると考えている。

文 献

- 1) Wilkinson SP, Moodie H, Stamatakis JD et al: Endo toxemia and renal failure in cirrhosis and obstructive jaundice. *Br Med J* 2: 1415-1418, 1976
- 2) Clemente C, Bosch J, Rodés J et al: Functional renal failure and haemorrhagic gastritis associated with endotoxemia in cirrhosis. *Gut*

- 18 : 556—560, 1977
- 3) 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
 - 4) Yajima Y, Otsuki M, Fukuda I et al : A case of liver cirrhosis complicated with endotoxemia and disseminated intravascular-coagulation : A case report. Tohoku J Exp Med 151 : 269—274, 1987
 - 5) Nakagawa K, Matsubara S, Ouchi K et al : Endotoxemia after abdominal surgery. Tohoku J Exp Med 150 : 273—280, 1986
 - 6) 北村道彦, 西平哲郎, 平山 克ほか : 食道癌術後のエンドトキシン血症。日消外会誌 20 : 1648—1653, 1987
 - 7) Bradfield JWB : Control of spill-over. The importance of Kupffer cell function in clinical medicine. Lancet 2 : 883—885, 1974
 - 8) 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
 - 9) Levin J, Tomasulo PA, Oser RS et al : Detection of endotoxin in human blood and demonstration of an inhibitor. J Lab Clin Med 75 : 903—911, 1970
 - 10) Rojas-Corona RR, Scarnes R, Tamakuma S et al : The limulus coagulation test for endotoxin : A comparison with other assay methods. Proc Soc Exp Biol Med 132 : 599—601, 1969
 - 11) Iwanaga S, Morita T, Harada T et al : Chromogenic substrates for horseshoe crab clotting enzyme : Its application for the assay of bacterial endotoxins. Haemostasis 7 : 183—188, 1978
 - 12) Tamura H, Obayashi T, Takagi K et al : Perchloric acid treatment of human blood for quantitative endotoxin assay using synthetic chromogenic substrate for horseshoe crab clotting enzyme. Thromb Res 27 : 51—57, 1982
 - 13) Obayashi T, Tamura H, Tanaka S et al : A chromogenic endotoxin-specific assay using recombinant limulus coagulation enzymes and its clinical applications. Clin Chim Acta 149 : 55—65, 1985
 - 14) 矢島義昭, 福田一郎, 大槻昌夫ほか : グラム陰性菌血症における血中エンドトキシン定量の意義。現代医療 19 : 161—165, 1987