日消外会誌　27（3）：753～758，1994年

原　著

食道静脈瘤手術症例における硫酸ポリミキシンBとチニダゾール投与の効果

岩手医科大学高次救急センター，同　第1外科[1]，同　細菌学[2]
菊地　充　渡辺　正敏[1]　小川　將[1]　中村　隆二[1]
斉藤　和好[1]　稲田　捷也[2]　吉田　昌男[2]

32例の食道静脈瘤直達手術術後に，血中エンドトキシン（Et）をNew perchloric acid（New PCA）処理後エンドスペシー（生化学工業）を用いて測定し，polymyxin B sulfate（PL-B），tinidazol（TDZ）投与の直腸内細菌，血中Etに及ぼす効果を調べた．症例を非投与（A）群13例と，PL-B 300万単位（B）群9例，PL-B 600万単位（C）群5例，PL-B 300万単位，TDZ 1,000mg（D）群5例に分け，術前に3日間投与した．投与前（手術3日前），術後1，3，5病日と，投与群では術前日（投与後）にも末梢血を採取しEtを測定した．A群は術前5.8（平均，pg/ml）から第1病日に7.4に増加し，その後漸減した．B群では投与後に16％の減少がみられ，術後も同じレベルで推移した．一方，C，D群は投与後に30％以上減少したが術後はB群に比し高値であった．PL-B投与は，術後血中Etの増加を抑制したが，PL-B増量やTDZ併用は必ずしもEt濃度の減少を来さず，細菌叢の変化あるいは死滅した細菌が放出したEtの増大が考えられた．

Key words：Endogenous endotoxemia, polymyxin B sulfate, tinidazol, chemical preparation

はじめに

Levinら[1]によるカブトガニ血液を用いたエンドトキシン（以下，Etと略記）の測定法（リムルス法）は，臨床検体測定の積み重ねによりグラム陰性桿菌感染症における重要な指標としての地位が確立されてきた．しかしその測定法はいまだに完全とはいい難いのが現状である．従来本邦ではリムルス法に続いて微量定量が可能な合成基質法[2]（トキシカラー，生化学工業）が主に用いられてきたが，これはEtに反応するBおよびC因子系のほかに，Etではない糖類によって反応するG因子偽陽性反応を包含していることが明らかとなり[3]，この偽陽性反応を除去した合成基質法[4]（エンドスペシー，生化学工業）が新たに開発された．さらに，Etの測定に際して血漿の前処理が必要であるが，本邦で広く用いられている過塩素酸法[5]（Perchloric acid以下，PCA法と略記）による前処理では，測定に供されない沈殿中にもEtがみられることが見いだされ[6]，これも含めて測定する新過塩素酸法[7]（new perchloric acid以下，New PCA法と略記）が考案された．われわれはこれまでに多くの臨床検体を用いてNew PCA法とエンドスペシーを組み合わせることにより，感度と信頼性が格段に高くなったことを報告してきた[8]．

腸管内に大量に存在するグラム陰性菌から生成されるEtは，通常でも生体に取り込まれているとする概念が一般的である．このような感染巣の見られない状態でかつ腸管由来と考えられるEt血症を内因性Et血症[9)~12)]と称している．腸管から生体に取り込まれたEtは肝臓に入り網内系により解毒される．網内系の機能不全がみられる肝疾患特に肝硬変，肝不全では吸収されたEtが肝臓で処理しきれずに大循環に現れるとされている．このように肝硬変をともなう場合が多い食道静脈瘤は術前後を通し高頻度に内因性Et血症の出現が予想される．しかし，矢島ら[13]は新しい測定法であるエンドスペシーを用いて肝疾患における内因性Et血症の検討を行ったが，この方法ではEtレベルは低く，その存在は証明できなかったと報告している．

今回，われわれは食道静脈瘤手術症例において以下の点に関して検討を行った．第1は手術前後の血中Et

＜1993年11月1日受理＞別刷請求先：菊地　充
〒020　盛岡市内丸19－1　岩手医科大学高次救急センター

をエンドスペシーで測定し，内因性Et血症の検討を行った．さらに，腸内細菌由来の血中Etを低下させる目的で，好気性グラム陰性菌，嫌気性菌にそれぞれ有効とされているpolymyxin B sulfate（以下，PL-Bと略記），チニダゾール（以下，TDZと略記）を術前投与し，その効果について検討を行った．

対象と方法

1．PL-BのEt不活化能に関する基礎的検討

精製されたEt（*E. coli* 0111：B4, Difco社製）を滅菌した蒸留水で1ng/ml，100pg/mlとなるように調整し，それぞれ4分割した．この溶液中にPL-Bを1cc当り0.1mg，1mg，10mgの濃度となるように添加し，残りの1検体は対照とした．すべての検体を37度の恒温槽に入れ，加温後10，60，120分に0.1ccづつ採取し，エンドスペシーを用いて吸光度（OD値）を測定した．

2．臨床的検討

対象：1985年から1988年に本学第1外科で食道静脈瘤に対し直達手術を行った32例（食道離断術27例，Hassab手術5例）を対象とした（**Table 1**）．全例で術中肝生検を行い組織学的診断を行った．

手術3日前より絶食とし，経中心静脈栄養を行った．PL-BおよびTDZの術前投与法から以下の4群に分類した．A群：無処置（絶食のみ），B群：手術3日前より手術前日までPL-B 300万単位/日を経口投与，C群：PL-B 600万単位/日を経口投与，D群：PL-B 300万単位/日に加えてTDZ 1,000mg/日を3日間経口投与した．

i）直腸内細菌採取および細菌培養

B，C，D群各症例で薬剤投与前および手術前日に直腸内に生理食塩水約100mlを注入し，可及的に回収した溶液を細菌培養に用いた．

回収した腸液10mlを8種類の分離培養，血液寒天，チョコレート寒天，マッコンキー，ブドウ球菌選択培地No. 110，NAC（nalidixic acid cetrimide）寒天，1.5%寒天加SF（Streptococcus faecalis），グアノフラシン添加サブロー寒天培地およびGAM（Gifu anaerobic medium）寒天培地に摂取し，37℃で一晩放置後，分離菌の同定を行った．ただし，GAM寒天は嫌気ジャー（BBL Gas Pak System）による嫌気培養を行った．

同定法：グラム陰性桿菌はチトクロームオキシダーゼ試験（チトクロームオキシダーゼディスク'栄研'）の後に，13種類の確認培地を用いて同定した．嫌気性菌はRap ID ANA II system（Innovative Diagnostic System, Inc. 社製）のキットを用いて同定した．

ii）血中Etの測定

検体採取：A群では手術3日前（投与群では投与前），術後第1，3，5病日に，B，C，D群では，A群と同時期に加えて術前日にも採血し，血中Et濃度を測定した．

Et測定方法：ヘパリンを加えたEt freeのディスポーザブルシリンジ（テルモ社製）を用いて末梢静脈から無菌的に採血し3,000rpm，40秒間遠心分離し，得た血漿を検体とし測定まで−80℃で凍結保存した．前処理法はNew PCA法[6]を用い，検体に水酸化ナトリウムを添加，加温後過塩素酸にて蛋白を沈殿させた．その後水酸化ナトリウムを加えて沈殿を溶解し，緩衝液にてpHを調節し，処理検体にエンドスペシーを加え反応させた．次いで，ジアゾカップリング試薬にてアゾ色素に変え，分光度計にてOD値を測定した．このOD値から血中Etを算出した（正常値は9.8pg/ml以下）．各群の測定値の変動をWilcoxon検定にて有意差検定を行った．

結　果

1．PL-BのEt不活化能に関する検討

既知量のEt溶液にPL-Bを添加した際の回収実験では，Et 1ng/ml添加時の対照のOD値は10，60，120分でそれぞれ1.22，1.26，1.23であった．一方，PL-B 0.1mgにより，10分では，0.58，120分は0.14と経過とともにOD値は減少する傾向がみられた．さらにPL-B 10mgでは10分は0.06，120分0.04と用量依存性にEtのリムルス活性が抑制された．また，Et 100pg/mlでも同様に活性の抑制作用が証明された（**Fig. 1**）．

2．臨床的検討

対象症例の大多数は肝硬変症例でその他はいずれも

Fig. 1　Effect of PL-B concentration on the Et inactivation.

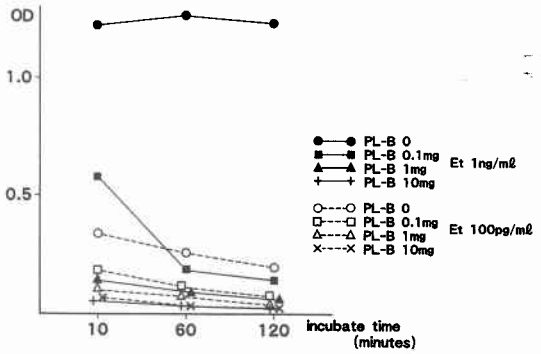


Table 1 Characteristics of patients with esophageal varices

	Group A	Group B	Group C	Group D
No. of the cases	13	9	5	5
Sex Male	8	5	3	1
Female	5	4	2	4
Age (mean)	52.6	52.8	54.6	56.2
Liver disease LC	10	8	5	3
IPH		1	0	2
Child classification				
A	7	4	1	3
B	5	5	4	1
C	1	0	0	1

LC : liver cirrhosis.
IPH : idiopathic portal hypertension.
Group A : control.
Group B : oral administration of PL-B (300 million units/day),
Group C : oral administration of PL-B (600 million units/day),
Group D : oral administration of PL-B (300 million units/day), +TDZ (1,000 mg/day).

Table 2 Changes of bacterial flora in the rectum in the administration groups

No.	E. coli		Bacteroides	
	Before	After	Before	After
Group B				
14	++	+	+	+++
15	++	++	+	++
16	+++	−	−	++
17	++	++	++	++
18	++	+	++	++
19	++	−	−	+++
20	+++	+	+++	++
21	++	−	−	++
22	++	+	+++	++
Group C				
23	++	+	++	++
24	+	−	++	+++
25	+++	+	++	++
Group D				
28	+++	+++	+++	−
29	+++	++	++	−
30	++	+++	+	−

− : Negative + : ~10^3 ++ : 10^4~10^6 +++ : 10^7~
Before : Before administration.
After : After administration.

Table 3 Effects of PL-B, TDZ administration on the serum Et level

	Before	After	Inhibition rate
Group B	6.6±2.8 pg/ml	5.5±3.5	16.7%
Group C	7.9±1.6	5.1±1.5*	35.4
Group D	7.1±3.2	4.7±1.4	33.8

Data showes mean±S.D.
Before :Before administration.
After : After administration.
* : Shows $p<0.05$ as compared with before administration in group C.

特発性門脈圧亢進症患者であった（**Table 1**）．いずれの症例においても観察期間中明らかな感染を含む重篤な合併症なく，生存退院した．

i）投与前後の直腸細菌叢の変化

採取が可能であったB群9例，C群3例，D群3例について検討を行った．直腸灌流液1mlあたりの細菌数を，陰性は−，10^3までを+，10^4～10^6までを++，10^7以上を+++とした．

その結果，B群は，好気性グラム陰性菌の *E. coli* の減少が7例にみられたが，嫌気性菌である *Bacteroides* に関しては逆に5例に増加が認められた．C群では *E. coli* は著明に減少を示したが，B群と同様に *Bacteroides* が増加する傾向が認められた．嫌気性菌に効果のあるTDZ併用のD群は，*Bacteroides* において全例が陰性化し，TDZの嫌気性菌に対する効果が認められたが，*E. coli* は減少しなかった（**Table 2**）．

ii）PL-B, TDZ投与前後の血中Et濃度の変化

術前投与を行ったB, C, D群において，投与前後すなわち手術3日前と術前日のEt値を比較検討したところ以下のごとくいずれの群においてもその平均値は減少した．

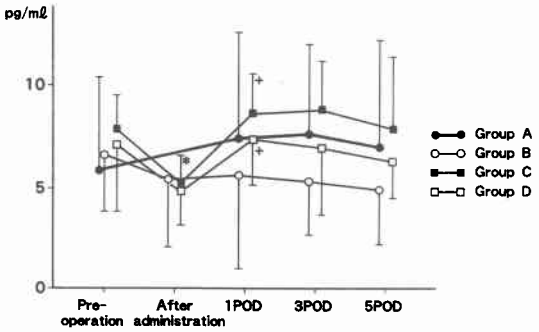
B群：6.6±2.8pg/ml（前）→5.5±3.5pg/ml（後），減少率16.7%．C群：7.9±1.6pg/ml（前）→5.1±1.5pg/ml（後），減少率35.4%（$p<0.05$）．D群：7.1±3.2pg/ml（前）→4.7±1.4pg/ml（後），減少率33.8%で，減少率はC群で顕著だった（**Table 3**）．

iii）術後の血中Etの推移

各群の平均値はいずれも正常範囲内で推移した．しかし，それぞれの増減を詳細に検討すると以下のようであった．

A群における血中Et値は術前5.8±4.6pg/mlで，第1病日には7.4±5.3pg/mlとなった．その後同様の

Fig. 2 Changes of serum Et level in perioperative period.



＊: Shows $p<0.05$ as compared with before administration in group C. ＋: Shows $p<0.05$ as compared with after administration with group C and D.

値で推移し，第5病日は7.0±5.1pg/ml であった．これに対して B 群では，術後第1病日も5.5±4.5pg/ml と増加はみられず，その後漸減する傾向がみられた．C, D 群は，投与後に比べて術後第1病日には増加を示しその後も B 群と比べて高い値で推移した（**Fig. 2**）．

考　察

リムルス法を用いた Et の測定により確立された内因性 Et 血症の概念[9)~12)]は，Et 測定法の変遷にともないその存在に疑問が生じた[14)]．また，術後エンドトキシン血症として注目されていた現象は，血管内に存在する G 因子系を活性化させる物質によるものである可能性がうかがわれた[15)]．

著者らの Et 特異性の高いエンドスペシーを用いた検討において，術後に血中 Et が低レベルで推移するもののやや増加する傾向がみられた．これは手術侵襲によって何らかの機序で腸管内の Et が通常よりも多く血中に入り込む可能性を示唆した．しかし，高値を示すことはなく，術後において時間の経過とともに正常化する傾向がみられた．

肝硬変は，内因性 Et 血症を呈する代表的疾患[16)]として注目されてきたが，今回の検討では観察期間中臨床的に明らかな Et 血症を示唆する症状はみられず，術後における腸管由来の Et の上昇は，生体に悪影響を及ぼさない範囲にとどまるものと考えられた．

PL-B は直接 Et を不活化する薬剤であることが今回実験的に証明された．PL-B に合わせて Et 生成能のある嫌気性菌も減少させる目的で TDZ を併用投与し，その効果を細菌学的，また血中 Et 濃度の変化から比較検討した．術前後での直腸内細菌の検討では，PL-B 投与では嫌気性菌が増加し，TDZ との併用ではグラム陰性菌が逆に増加する傾向がみられ，PL-B の投与量増加や TDZ 併用などによっても必ずしも Et 産生菌の確実な総量減少が得られなかった．

多羅尾[17)]によると嫌気性菌の Et 活性は，好気性グラム陰性菌と比較して1/100位であるが，肝硬変患者の糞便中には健常人と比べて100～1,000倍の菌数が存在するため，内因性 Et 血症の原因として重要であると述べている．また肝疾患の Et 血症に対して，カナマイシン[18)]あるいは硫酸ジベカシン[19)]を投与後，Et の一過性の上昇がみられ，Et を生成する細菌が死滅する際に放出される Et が一時的に増加することが観察されている．一方，大元ら[20)]は，PL-B は殺菌作用と Et 不活化能を保有しているためこのような現象はみられないとしている．このように，抗菌剤による細菌死滅効果と血中 Et 濃度変化との相関は複雑である．

今回の検討では，投与前後においては PL-B 300万単位投与群は投与前を基準として16%の減少率であった．同様に PL-B 600万単位投与群は35%，PL-B, TDZ 両者併用群33%と，PL-B 600万投与および併用群で Et の下降が多く効果的であると考えられた．しかし，術後の血中 Et 濃度を比較してみると，PL-B 600万単位投与および併用群で投与を中止した術後より Et 値の上昇がみられた．このことは，PL-B, TDZ により相対的に大量に死滅したグラム陰性菌あるいは嫌気性菌から放出された Et の影響が最も考えられた．

文　献

1) Levin J, Bang FB: Clottable protein in Limulus: Its localization and kinetics of its coagulation by endotoxin. Thromb Diath Haemorrh 19: 186—197, 1968
2) Iwanaga S, Morita T, Harada T et al: Chromogenic substrates for horseshoecrab clotting enzyme. Haemostasis 7: 183—188, 1978
3) Morita T, Tanaka S, Nakamura T et al: A new (1→3)-β-D-glucan-mediated coagulation pathway found in Limulus amebocyte lysate. FEBS Lett 129: 318—321, 1981
4) Obayashi T, Tamura H, Tanaka S et al: A new chromogenic endotoxin-specific assay using recombined Limulus coagulation enzyme and its clinical applications. Clin Chim Acta 149: 55—65, 1985
5) Iwanaga S, Morita T, Harada T, et al: Chromogenic substrates for horseshoecrab clotting enzyme. Haemostasis 7: 183—188, 1978

6) 高橋和彦：発色合成基質を用いたヒト血中内毒素微量定量法に関する研究．岩手医誌 40：67—80, 1988
7) 吉田昌男，高橋和彦，平田陸正ほか：合成基質を用いた血中エンドトキシンの微量定量法について—トキシカラーテストおよびエンドスペシーテストについての2, 3の知見．織田敏次 監修．エンドトキシン研究の新しい展開．羊土社，東京，1985, p35—44
8) Inada K, Endo S, Takahashi K et al: 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 35：303—314, 1991
9) Triger DR, Boyer TD, Levin J: Portal and systemic bacteraemia and endotoxemia in liver disease. Gut 19：935—939, 1978
10) van Deventer SJH, Ten Cate JW, Tytgat GNJ: Intestinal endotoxemia. Gastroenterology 94：825—831, 1988
11) Jacob AI, Goldberg PK, Bloom N, et al: Endotoxin and bacteria in portal blood. Gastroenterology 72：1268—1270, 1977
12) Prirz H, Holst-Christensen J, Korner S: Portal venous and systemic endotoxaemia in patient without liver disease and systemic endotoxaemia in patient with cirrhosis. Scand J Gastroenterol 11：857—863, 1976
13) 矢島義昭，福田一郎，大槻昌夫ほか：Endotoxin-specific (ES) test を用いた肝疾患におけるエンドトキシン血症の再検討．織田敏次 監修．エンドトキシン研究の新しい展開．羊土社，東京，1987, p47—53
14) 北村道彦，阿保七三郎，橋本正治ほか：術中の門脈分析による食道癌手術におけるエンドトキシン血症の検討．医のあゆみ 158：769—770, 1991
15) 菊地 充，渡辺正敏，佐々木章ほか：ラット臓器，特に血管ホモジネートのカブトガニ血液凝固G因子活性化能—トキシカラーテストによる術後一過性エンドトキシン血症の原因について．日外会誌 90：2052, 1989
16) Yajima M, Fukuda I, Otsuki K et al: Non-septic endotoxemia in cirrhotic patients. Gastroenterol Jpn 24：262—269, 1989
17) 多羅尾和郎：腸内細菌とエンドトキシン．肝・胆・膵 12：587—593, 1986
18) 岩崎正高，上代龍吉，和田達郎ほか：Endotoxin に対する Polymyxin B の作用について—その臨床的検討—．日消病会誌 79：241—248, 1982
19) 足立幸彦，榎本雅一，山本俊夫：非代償期肝硬変例のエンドトキシン血症に及ぼす非吸収性抗生物質，ポリミキシンBと硫酸ジベカシンの効果について．森 亘，志賀淳治 編．肝疾患あすの話題．中外医学社，東京，1985, p105—109
20) 大元謙治，山本晋一郎，井出口清治ほか：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

The Effects of Oral Administration of Polymyxin B Sulfate and Tinidazol in Patients with Esophageal Varices

Mitsuru Kikuchi, Masatoshi Watanabe[1], Masaru Ogawa[1], Ryuji Nakamura[1], Kazuyoshi Saito[1], Katsuya Inada[2] and Masao Yoshida[2]
Critical Care and Emergency Center, [1]The First Department of Surgery and [2]Department of Bacteriology, School of Medicine, Iwate Medical University

The recent discovery of a non-endotoxic reactive pathway in the conventional Limulus test has indicated that serum endotoxin (Et), being derived from the intestinal bacterial flora, may become pathogenic (endogenous entotoxemia) under some conditions. Revaluation of postoperative endogenous entotoxemia was done by an endotoxin-specific chromogenic assay (Endospecy, Seikagaku Kogyo, Tokyo, Japan) using 32 patients with esophageal varices and liver disease (cirrhosis; 26, idiopathic portal hypertension: 6). In addition, the effects of oral polymxin-B sulfate (PL-B) and/or tindiazol (TDZ) administration prior to surgery (esophageal transcetion: 27, Hassab's operation: 5) were estimated on the basis of changes in bacterial flora in the rectum after administration and the postoperative serum Et level. Et was increased on the 1st postoperative day (POD) (7.4 ± 5.3 pg/ml) compared with the preoperative period (5.8 ± 4.6 pg/ml). Thereafter, it was decreased on the 3rd and 5th POD. PL-B administration (300 million units/day) reduced the increase in Et level. However, administration of a large quantity of PL-B (600 million units/day) or adding TDZ (1000 mg/day) to PL-B failed to cause a further reduction in the Et level. Based on the change in the bacterial flora of the rectum, an increase in anaerobic bacteria (in PL-B administration) or E. coli (in PL-B + TDZ administration) may be the cause of the failure. No apparent septic

manifestion occurred during the postoperative course. Surgical stress on patients with liver impairment caused the serum Et level to increase up to within the normal limit. If additional postoperative morbidity occurred, the endogenous endotoxin level would probably increase enough to be pathogenic. Oral PL-B administration was effective in reducting the Et level.

Reprint requests: Mitsuru Kikuchi Critical Care and Emergency Center, School of Medicine, Iwate Medical University
19-1 Uchimaru, Morioka, 020 JAPAN