#### 原 著

## 食道静脈瘤術後におけるリムルステストを用いた エンドトキシン血症の検討

### 一発色合成基質の相違による乖離現象について一

岩手医科大学高次救急センター,同 第1外科学\*,同 細菌学\*\* 菊地 充 渡辺 正敏\* 中村 隆二\* 斉藤 和好\* 遠藤 重厚 稲田 捷也\*\* 吉田 昌男\*\*

食道静脈瘤術後にみられたトキシカラーとエンドスペシー(ともに生化学工業,東京)のエンドトキシン(以下,Et)値の相違に関して検討を加えた。症例(13例)において手術前後に New PCA(過塩素酸)法前処理で測定したトキシカラーとエンドスペシーとの値の差(G 因子活性化因子値,以下 G 値)は,術後46.3(平均,pg/ml)より術後第 1 病日140.6に有意に上昇した(p<0.05)。G 値は,Et が失活する希釈加熱処理変法(n=5)を用いた測定でも大きな変化を見せなかった。 5 例について PCA 法の上澄と沈殿の G 値を測定すると,術後第 1 病日では沈殿(74.8)に比べて上澄(115.5)でより高値を示した。

以上の実験結果から、術後第1病日のトキシカラーによる測定値の上昇はEtと異なることが示唆された。この原因はトキシカラーに含まれるG因子活性化因子による可能性がうかがわれた。

**Key words**: limulus test, factor G, endotoxin, esophageal varices

#### はじめに

エンドトキシン(以下,Et)によりカプトガニ血球抽出液の凝固反応が活性化されることを応用した Et の測定法(Limulus test)が Levin ら $^{11}$ により開発された。そして Limulus test と同じ血球抽出液を用いた定量法(発色合成基質法)が開発され,臨床的に利用されるようになった。その後,カプトガニの凝固系の検討がなされ,Et によって活性化された C 因子系以外に ( $1\rightarrow 3$ )- $\beta$ -D-グルカン(以下, $\beta$ -グルカンと略記)によって活性化される G 因子系が存在することが明らかにされた $^{21}$ . 現在,発色合成基質法としては両経路に反応するトキシカラーテスト $^{31}$ (生化学工業,東京,以下トキシカラーと略記)と,G 因子を含まずに Et に特異的に反応するエンドスペシーテスト $^{41}$ (生化学工業,東京,以下,エンドスペシーと略記)が利用できる。

Et 血症はグラム陰性菌感染症においてみられるが, このほかに, 高度肝障害患者にみられる感染を伴わな い Et 血症の存在5)や,門脈血中の Et 高値6)7などから 内因性 Et 血症という概念5)~7)が提唱されている。また 術後にも一過性の Et 血症が見られるとの報告8)もあ り,内因性 Et 血症発生の機序としては消化管からの Et の吸収や,肝臓での処理能が関係していると考えら れてきた。

ところが、消化器手術術後 Et 血症の検討では、トキシカラーではほぼ全例が陽性になるのに対し、エンドスペシーでは測定を行った結果、Et が検出された症例はわずかであった $^{91}$ . トキシカラーとエンドスペシーの間での値の相違、すなわち乖離現象がエンドスペシーで測定不能な形態に変化した Et なのかあるいは植物多糖である  $\beta$ -グルカンを含めた Et 以外の物質(以下、G 因子活性化因子)であるか現在も意見が分かれている。

本研究では、食道静脈瘤手術術後で一過性にトキシカラーのみが高値になる現象について着目し、この原因について種々検討したので報告する.

<1994年9月14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

Table 1 Diagnosis and clinical data

Diagnosis		
Esophageal varices	13	cases
Liver cirrhosis	11	
Idiopathic portal hypertension	2	
Sex		
Male	10	
Female	3	
Age	53.7	(mean
Child classification		
A	4	cases
В	8	
С	1	
Operative data		
Time	$9.5 \pm 1.2$	hours
Bleeding volume	$798.8 \pm 729.9$	ml

#### 対象と方法

#### I. 臨床的検討

#### 1. 対象

1988年 4 月から1990年12月にかけて当科で手術を行い真菌を含めた術後感染症および合併症がなく経過した食道静脈瘤患者13例(男性10例,女性 3 例)を対象とした(Table 1)。原疾患の内訳は肝硬変11例,特発性門脈圧亢進症 2 例で,術前の Child 分類では A 4 例,B 8 例,C 1 例であった。術前処置として手術 3 日前より中心静脈栄養下に絶食とした。手術は,開胸経横隔膜開腹下に食道離断,脾摘および食道,胃血行郭清を行った。

なお、この研究は岩手医科大学倫理委員会の承認を 得て行われた。

#### 2. 血液の採取および前処理法

術前, 術後1,3,5 病日に肘静脈から無菌的に4ml 採血後,遠心分離(3,000rpm,40秒)して得た多血小板血漿を検体とした。血漿の前処理法としては New PCA 法100を用いた。すなわち血漿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る。その後水酸化ナトリウムを加えて沈殿を溶解させ,緩衝液にて pH を調節し,前処理を終了した。

#### 3. Et および G 因子活性化因子定量法

処理検体 $100\mu$ l にエンドスペシーまたはトキシカラー試薬 $100\mu$ l を加え、 $37^{\circ}$ C、30分加温後、ジアゾ化試薬にて発色させた。吸光度545nm で測定し比色定量した。Et はエンドスペシー(正常値;9.8pg/ml 以下)で、 $\beta$ -グルカンを含めた G 因子活性化因子の値はトキシ

カラーの値からンエンドスペシーの値を差し引いた値 (正常値;60.0pg/ml以下)で示した。なお、G 因子活 性化因子の値は Et の値と同様に、標準 Et との吸光度 の差から計算した

#### II. G 因子活性化因子に関する検討

前記の食道静脈瘤手術症例13例の中から無作為抽出 した5例の術前,術後第1,3,5病日に採血した血 液を対象とし,以下の操作を加え,G因子活性化因子 を検討した

- 1) Et および G 因子活性化因子の値と蛋白との関係を検討するために以下の測定を行った。除蛋白法の一つである従来の PCA 法 $^{11}$ を用いて前処理した検体,すなわち血漿 $100\mu$ l に PCA を $300\mu$ l 加え, $37^{\circ}$ Cで30分間加温後,遠心分離(3,000rpm,15分)し,除蛋白されたその上澄を検体とした。また沈渣を NaOHで可溶化し,酸で中和後それぞれに含まれる G 因子活性化因子を測定した。
- 2) Et およびG因子活性化因子の値の加熱による 影響を検討した。すなわち血漿を10倍希釈後。100°C。 120分加熱前処理によるβ-グルカンの定量法12)を応用 して血漿を希釈加熱前処理後トキシカラーとエンドス ペシーを用いて Et と G 因子活性化因子の値を検討し た、この検討に先立ち、この加熱処理法をトキシカラー で行いうるか否かを検討する目的で Et と β-グルカン (カードラン,生化学工業,東京)による添加回収実験 を行った。0.8ml の生理食塩水と健常人血漿0.1ml に 精製した LPS (E. coli 0111: B4, Difco 社, Detroit, USA) 0.1ml を加え、最終濃度が100pg/ml、1ng/ml、 10ng/ml となるように調整した。カードランは同様の 方法により50pg/ml, 500pg/mm, 5ng/ml となるよう に調整し, 100°Cで加温後10, 60, 90, 120分に0.1ml ず つをそれぞれ採取しトキシカラーにて測定し, 回収率 を求めた。
- 3) ブタノールジイソプロピルエーテルで検体を脱脂 $^{13)}$ し、Et および G 因子活性化因子の値との関連を調べた。すなわち、血漿0.5ml にエチレンジアミンテトラアセテート0.05mg を溶解した後1ml のブタノールジイソプロピルエーテルを加え遠心分離 (2,000rpm、2分)し、その上澄を0.1ml 採取した。この脱脂検体をNew PCA 法 $^{10}$ で前処理し G 因子活性化因子を測定した。

III. 測定値は平均または平均±標準偏差で表し、Wilcoxon 検定または t 検定により平均値を比較し、p<0.05を有意差とした。

**Fig. 1** Changes of serum Et and factor G pathway activating factor (G PAF) level in perioperative period

\*: p<0.05 as compared with preoperation.

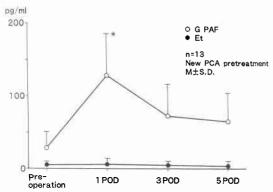
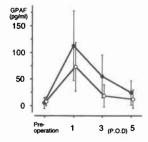


Fig. 2 Comparison of factor G pathway activating factor (G PAF) between supernatant (closed circles) and precipitation (open circles) in 5 cases with esophageal varices patients. Data shows values of Toxicolor minus values of Endospecy (mean±SD).



#### 結 果

#### I. 周術期の血中 Et および G 因子活性化因子

食道静脈瘤手術症例13例でのエンドスペシーによる血中 Et 値は、術前 $6.0\pm4.3$ pg/ml で、術後1, 3, 5 病日はそれぞれ $6.8\pm6.1$ ,  $6.6\pm4.7$ ,  $5.5\pm5.5$ pg/ml とほぼ一定の値で推移した。一方、血中 G 因子活性化因子値は術前 $29.0\pm20.4$ pg/ml で、第 1 病日には $129.7\pm59.2$ pg/ml と有意に増加し(p<0.05)、その後、術後 3, 5 病日にはそれぞれ $71.4\pm59.2$ ,  $65.7\pm42.0$ と術後 1 病日と比べ減少した(**Fig. 1**)

- II. 術後に増加する血中のG因子活性化因子について
- 1) PCA 処理上澄と沈殿の中の Et および G 因子活性化因子値: 食道静脈瘤手術 5 例での G 因子活性化

Fig. 3 Effects of heating (100°C, 120mins) on Et (LPS, left) and β-D-glucan (Cardlan, right).

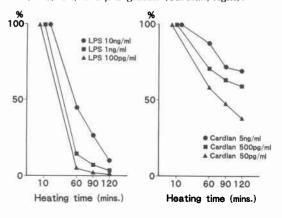
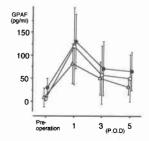


Fig. 4 Differences in between factor G pathway activating factor (G PAF) pretreatment of New PCA (closed circles), modified pretreatment of dilution and heationg (open circles), and remonal of lipid (open triangles) in 5 cases with esophageal varices patients. Data shows values of Toxicolor minus values of Endospecy (mean±D).



因子値は,上澄が術前 $7.9\pm10.1$ pg/ml から第1病日 $115.5\pm65.5$ pg/ml と増加したのに対し,沈殿では術前 $9.3\pm8.1$ pg/ml から第1 病日 $74.8\pm46.0$ pg/ml の上昇であり,上澄の増加と比較すると軽度であった(Fig. 2)。

- 2)横田ら $^{11}$ による希釈加熱処理の変法 (10倍希釈, $100^{\circ}$ C,120分加熱)の検討:添加回収実験では,加熱120分後では Et 活性はほぼ失活するのに対し, $\beta$ -グルカンのリムルス活性は減少が軽度にとどまった(**Fig. 3**).
- 3) 希釈加熱処理変法による G 因子活性化因子値: 食道静脈瘤手術 5 例での G 因子活性化因子値は術前 6.0±5.2pg/ml で、術後第 1 病日120.2±83,5pg/ml

と経過中最高値をとり、New PCA 法前処理後や PCA 前処理後の上澄の G 因子活性化因子の値と相似であった。また、その後の術後第3、5 病日の値はそれぞれ57.7 $\pm$ 63.8、50.8 $\pm$ 52.1で術前に比べ高値であった(Fig. 4)。

4) 脱脂後の血漿の G 因子活性化因子:食道静脈瘤 手術 5 例での G 因子活性化因子の値は第 1 病日には 81.5±43.4pg/ml と増加し,第 3,5 病日はそれぞれ 49.8±36.1pg/ml,31.1±16.6pg/ml と減少する傾向 がみられた (**Fig. 4**).

#### 考 察

腸管内には常在菌より産生される Et が多量に存在しい,通常の環境下でも腸管から吸収されると考えられている。吸収された Et は門脈を経て肝臓で貪食されるいが,炎症による腸管粘膜の透過性亢進いや肝臓の網内系機能の低下いを生じるような病態下では Et 血症が惹起され内因性 Et 血症<sup>18)</sup>としてさまざまな症状発現の原因となるとされている。

今回, 食道静脈瘤症例の手術前後における検討を 行った結果,以下の事柄が明らかとなった。 G 因子を 含んだ測定法(トキシカラー)を用いた場合は、術後 早期に高値となり、以後漸減する経過を示した。しか し, 同じ検体を用いた Et 特異性のエンドスペシーで は、われわれの設定した正常範囲にとどまった。この ように術後早期にはトキシカラーによる測定値とエン ドスペシーによる測定値との間で乖離現象が顕著で あった。値の相違がエンドスペシーでは測定不可能な Et なのかあるいは β-グルカンを含んだ G 因子活性化 因子によるものなのかはこれまで明らかにされていな かった。臨床例における結果から、5例の検体を用い て食道静脈瘤術後に認められるトキシカラーの値の上 昇に関して検討した。まずわれわれは、EtとG因子活 性化因子の性状の相違に着目した。すなわち、Et は加 熱により活性が低下することが考えられた12)。 さらに 検討を加えた結果、食道静脈瘤術後に認められるトキ シカラーで測定した値が術後早期に上昇するのは,耐 熱性で、かつ PCA 法前処理で除蛋白を行った上清と 沈殿の比較では非蛋白成分である上澄に有意に多く認 められ19, Et とは明らかに異なる性質を示した。さら に血漿を化学的に脱脂したあとの測定では, G 因子活 性化因子は軽度の減少が認められたものの術後第1病 日の上昇が同様に認められた。 脱脂による値の減少の 理由は明らかではないが、クロロホルムエーテル法に よる脱脂実験ではG因子活性化因子はほぼ失活した

ことから (未発表),脱脂操作により Et や G 因子活性 化因子が化学的に変化した可能性が推察された。これ らの結果から,トキシカラーによる術後の上昇は,Et ではなく  $\beta$ -グルカンを含めた G 因子系を活性化させ る比較的耐熱性の物質,おそらく糖類であると考えられた。

G因子系を介する物質としては、 $\beta$ -グルカンが判明している。この多糖体は、植物性であり、真菌の菌体、茸類、セルロース系血液透析膜 $^{20}$ や、植物多糖を主成分とする BRM(biological response modifier)に含まれていること $^{21}$ が知られている。また、薬剤などにもグルカン様物質が含有されていることが報告されている $^{22}$ .  $\beta$ -グルカンの生体内における影響を丹羽ら $^{23}$ が検討しているが、発熱、白血球増多はみられなかったと報告している。一方、後藤ら $^{24}$ は、 $\beta$ -グルカンによりマクロスファージの活性化が起こり、炎症反応が引き起こされるとしている。

トキシカラーによる測定値のみ上昇するこのような物質を矢島ら $^{25)}$ はグルカン様活性( $\beta$ -glucan like activity)と表現している。北村ら $^{9)}$ は,食道癌術後に一過性のG因子活性化因子の上昇があると報告しており,また須田ら $^{26)}$ も正常妊婦から経腹的に採取した羊水や,臍帯血血液中にG因子活性化因子を認めている

トキシカラーによる測定値の上昇が薬剤などによる 外因性と考えられる報告<sup>22)</sup>があるが、われわれが行っ たラットによる実験<sup>27)</sup>から生体内由来である可能性が あると考えている。血中に出現する機序として、今回 の消化器術後以外にも術中門脈血<sup>28)</sup>や肝疾患、特に DIC<sup>25)</sup>でトキシカラーが陽性を示していることから、 手術操作に伴う血管の損傷や侵襲から血管内皮の傷害 が起き、G因子活性化因子が溶出する可能性が考えら れた。

G 因子活性化因子の生体における意義は不明であるが, 今後さらにこの物質の同定や生体への影響について究明が必要である。

#### 文 献

- Levin J, Bang FB: Clottable protein in Limulus: Its localization and kinetics of its coagulation by endotoxin. Thromb Diath Haemorrh 19: 186-197, 1968
- 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

- 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, 1987
- 4) Obayshi 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) 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
- Nolan JP, Camara DS: The importance of intestinal endotoxins in liver disease. Prog Clin Biol Res 189: 347-364, 1985
- Triger DR, Boyer TD, Levin J: Portal and systemic bacteraemia and endotoxemia in liver disease. Gut 19: 935—939, 1978
- 8) 黒沢 努:外科手術における血中エンドトキシンの変動. 織田敏次 監修,エンドトキシン臨床研究の現状と展望,羊土社,東京,1986,p73-81
- 9) 北村道彦, 西平哲郎, 森 昌造ほか: 食道癌術後の エンドトキシン血症. 日外会誌 **90**:626, 1989
- 10) 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 40:67-81, 1988
- 11) Obayashi T: Addition of perchloric acid to blood samples for colorimetric limulus test using chromogenic substrate: comparison with conventional procedures and clinical applications. J Lab Clin Med 104: 321-330, 1984
- 12) 横田雅之,上林純一,田中利一:リムルス・ゲル化 反応比濁時間分析法による血中エンドトキシン, β-グルカン分別定量法の検討. 織田敏次 監修,エンドトキシン臨床研究の現状と展望,羊土社,東京,1989,p47—52
- 13) Bill E, Brain R: A solvent system for delipidation of plasma or serum without protein precipitation. J Lipid Res 17: 176—181, 1976
- 14) 多羅尾和郎:腸内細菌とエンドトキシン。肝・胆・ 膵 12:587-593, 1986
- 15) Tachibana G, Sakon M, Kambayashi J: Endogenous endotoxin in patients with liver cirrhosis—A quantitative analysis of endotoxin in portal and peripheral blood. Jpn J Surg 18: 403—408, 1988

- 16) Jacob JI, Goldberg PK, Bloom N et al: Endotoxin and bacteria in portal blood. Gastroenterology 72: 1268—1270, 1977
- 17) Nolan JP: Endotoxin reticuloendothelial function, and liver injury. Hepatology 1: 458-465, 1991
- 18) van Deventer SJH, Knepper A, Lawson J et al: Endotoxins in portal blood. Hepatogastroenterology 35: 223—225, 1988
- 19) 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ートキシカラーテストおよび ES テストについての2,3の知見。織田敏次監修,エンドトキシン臨床研究の現状と展望,羊土社,東京,1986,p73-81
- 20) Yamagami S, Yoshihara H, Iritani S et al: Is LAL reactive substance contained in the washing solution of unused dialyzer endotoxin? Jpn J Artif Organs 14: 30-33, 1985
- 21) Kakinuma A, Asano T, Torii H et al: Gelation of Limulus amoebocyte lysate by an antitumor (1-3) β-D-glucan. Biochem Biophys Res Commun 101: 434—439, 1981
- 22) 塚田勝比古,東 克謙,片桐健二ほか:肝硬変症の エンドトキシン測定における血液製剤の影響. 織 田敏次 監修,エンドトキシン臨床研究の現状と展 望,羊土社,東京,1989,p53—58
- 23) 丹波 允: リムルステスト最近の進歩。織田敏次 監修, エンドトキシン臨床研究の現状と展望, 羊土 社, 東京, 1986, p23-33
- 24)後藤 元,湯浅和美,島田 肇ほか:β1-3 グルカンおよびエンドトキシンの呼吸器に対する生物活性.島田 馨編.第2回エンドトキシンシンポジウム講演記録集,1989,p61-65
- 25) 矢島義昭,福田一郎,大槻昌夫ほか:肝硬変における non-septic endotoxemia. 織田敏次, エンドトキシン臨床研究の現状と展望, 羊土社, 東京, 1989p247-256
- 26) 須田秀利, 臼木 豊, 松田 勲: 臍帯血中エンドトキシン定量の問題点。新生児誌 25:829-833,1989
- 27) 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プトガニ血液凝固 G 活性化能ー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
- 28) 北村道彦,阿保七三郎,泉 啓一ほか:衛中の門脈血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

# A Study of Endotoxemia of Post Operative Period in Esophageal Varices Patients by Using Limulus Test —Discrepancy between Toxicolor and Endospecy—

Mitsuru Kikuchi, Masatoshi Watanabe\*, Ryuji Nakamura\*, Kazuyoshi Saito\*,
Shigeatsu Endo, Katsuya Inada\*\* and Masao Yoshida\*\*
Critical Care and Emergency Center, The First Department of Surgery\* and Department of Bacteriology\*\*, School of Medicine, Iwate Medical University

Recent advances in Limulus coloremetric testing have made it possible to quantitatively differentiate serum endotoxin specific activity (Endospecy: ES) from non-specific activity (Toxicolor: TOX) including the quantity via the other action pathway (factor G activating factors: G PAF) in addition to ES. We studied postoperative canges in the values of ES and G PAF in 13 patients with esophageal varices. Blood was takenbefore the operation and on postoperative days (POD) 1, 3 and 5, and treated before measurement by a new perchloric acid (PCA) method that we recently developed. G PAF increased on the first POD (130.6 pg/ml) from the preoperative value (46.3 pg/ml) (p<0.05), and decreased thereafter. Heating (100°C 120 min) the samples (n=5) and removing lipid from them decreased their G PAF value only slightly. The new PCA pretreatment and the conventional PCA method showed the same degree of increase in G PAF in the supernatant on POD 1. As the above experiment results show, postoperative transient endotoxemia is seemed to cause by non-endotoxic Limulus reactive substances by surgical injury.

**Reprint requests:** Mitsuru Kikuchi Critical Care and Emergency Center 19-1 Uchimaru, Morioka, 020 JAPAN