

を考慮すると、右房圧上昇を伴うそのような Qliver の回復は、実質的に ICG 等の物質代謝のための肝表面積を拡大させ、全体的な肝機能を改善すると思われる¹²⁾。注目すべきは、経腸栄養法が、腸血流を増加させることにより、肝血行動態上の PEEP 関連変化を有意に減衰させることである²⁷⁾。

肝灌流の特徴の変化は、肝による前炎症性液体因子の生合成と輸出、およびその流量依存性の胆汁排泄に関し、免疫調節的な結果をもたらす^{1, 2)}。しかし、PEEP を伴う PPV がこれらの危機的問題に及ぼす影響に関する詳細な研究は欠けている。

b. 肝微小循環

腺房構造と類洞の血流分布を変化させることにより、慢性肝疾患は、肝機能が正常なヒトよりも敗血症患者により一層、重篤な微小循環障害をきたしやすくする。レーザー Doppler 計測法やコロイド炭素注入、ICG クリアランス等の方法による研究が示すとおり^{10, 19)}、ベースラインの肝機能が正常でも、敗血症はクッパー細胞と肝細胞両者の機能と類洞灌流との間の典型的な関係を進行的に破壊させる²⁸⁾。このように、流量回復による敗血症誘導性 Q_{pv} 、 Q_{ha} または微小循環流量低下の回復は、必ずしも細胞性機能障害を予防または修正するものではない。敗血症関連の微小循環灌流低下または病的に増強された類洞流量の不均一性の回復能はほとんどの場合時間とともに低下する。ここでは 3 つの相互作用機序が重要である。

第 1 の機序は、多形核好中球 (PMN) β_2 インテグリンと ICAM-1 と ICAM-2 である内皮細胞リガンドのサイトカイン仲介性の上方制御による類洞毛細血管内の白血球凝集である^{10, 29)}。続いて、特にプロテアーゼと活性酸素種 (ROS) の産生増強やグラム陰性菌、グラム陽性菌 (リポタイコ酸)、サイトカイン、および phlogistic 補体分画 (C3a, C5a) の副産物の産生増強が起こる寸前の肝内循環 PMN 滞留の増加とともに、類洞血流抵抗の上昇と通過時間の散乱が生じる^{30, 31)}。出血性ショックおよび蘇生は中心周囲の類洞に著しい PMN 蓄積をもたらす、そこには小葉中心性壊死とともにキサンチンオキシダーゼが最大限に局在している³²⁾。従って、微生物による産物存在下のそのような循環不安定は肝炎において相加的であ

ると考えられる。

第 2 の機序は、外因性凝固経路の活性化に由来する凝血促進性内皮表現型の発現である。組織因子 (TF) への第 VIIa 因子の結合が続いて起こり、その後に第 VIIa 因子-TF 複合体による第 IX 因子と第 X 因子の活性化、トロンビン産生、フィブリン形成が生じ、閉塞をもたらす微小血栓形成につながる¹³⁾。

第 3 の機序は、原則的に NO およびプロスタサイクリン等のシクロオキシゲナーゼ由来エイコサノイドである類洞内皮由来の弛緩因子の産生における変化である。正常な場合、これらの化合物の血管拡張作用や PMN 抗凝集作用は、類洞の開通性や肝細胞の完全性を相乗的に維持している。それらの産生は敗血症により増強されるが³³⁾、同時に、エンドセリンやペプチドロイコトリエン¹⁰⁾を含む血管収縮性および前炎症性液体因子の合成も同様に増強される。NO 等の血管拡張物質の内因性産生が優勢であれば、類洞炎症と肝壊死は、門脈圧-流量関係に対する内毒素の有害作用と同様に改善する³⁴⁾。裏付け実験では、内毒素血症マウスモデルにおいて、PGI₂ 生合成を抑制する NO インヒビタ NG-モノメチル-L-アルギニンとアスピリンの併用投与後、最も多量の肝細胞性酵素の遊離と広範囲の梗塞と壊死を伴う血管内血栓症が発生した³³⁾。

敗血症誘導性微小循環障害の重要な結末は、代謝亢進を誘導する敗血症性液体因子により酸素需要が増大した場合でも、肝細胞性酸素供給が低下することである^{1, 10, 31)}。同時に発生する酸素消費 (V_{O_2}) の低下と、細胞内 P_{O_2} の危機的低下を伴う進行性ミトコンドリアシクロム減少と定義される肝の dysoxia (組織酸素代謝失調) は³⁵⁾、敗血症関連肝機能障害のカギとなる機序と仮定されている³⁶⁾。

肝の dysoxia は敗血症過程でどの程度まで肝機能障害に寄与しているのだろうか？段階的な出血性ショックにより肝への酸素供給を段階的に制限すると dysoxia の生化学的エビデンスがもたらされる³⁷⁾。しかし、流量が回復した臨床的敗血症性ショックの典型である血行動態が亢進した心血管状態にそれらのデータを補外することについては問題が多い。すべてを考慮すると、肝 dysoxia は

重篤な感染症患者の臨床経過において最も発生しやすい。多くの場合、ショックの早期における低循環血流量による低血圧相の回復期は、機能的に正常な可逆性dysoxiaに限られる。その規模も時間的経過も、正常血圧の臨床敗血症では明確に証明されず、肝機能検査では最小限の異常のみしかみられない。集中治療にもかかわらず着実に悪化する肝機能の有意な障害と多臓器不全のエビデンスがみられる敗血症患者では、細胞機能障害を伴うdysoxiaが推測される。この酸素障害が肝機能障害の原因であるのかまたは結果であるのか、類洞灌流と肝機能の免疫調節的側面における共変化との関係が体系的に評価されていないため未だ不明である。

c. 類洞の炎症と肝機能障害

敗血症発症中の肝血管の圧-流量関係および微小循環における病態生理学的変化は、類洞の接点において多くの自己持続的炎症性事象を伴う^{1,10)}。これらの事象およびこれらが多臓器不全発症中にいかにして敗血性肝機能障害に至るかを理解することは、複雑に相互作用する2つの機序が関与しているのではないかという認識とともにますます複雑化している。

第1の機序は、前炎症性サイトカインTNF- α とIL-1の肝による過剰発現に関連する。ヒト内毒素血症または実験的門脈内グラム陰性菌導入から60～90分以内に、肝による相当量の局所性TNF- α 産生が生じ、全身循環に輸出される³⁸⁾。クッパー細胞および他の肝細胞によるTNF- α および同時に誘導されるIL-1の発現増加は、類洞のPMN補充や白血球凝集、および血流妨害を起こしやすくする循環PMN上のL-セレクチンと β_2 インテグリン発現活性化とともに¹³⁾、トロンボモジュリンの下方制御により内皮表面に凝血促進性の表現型を発現させる²⁹⁾。シクロオキシゲナーゼ由来のエイコサノイド、エンドセリン、NO等の重要な二次伝達物質経路を調節する、サイトカイン仲介性の遺伝子活性化は炎症と微小血管調節管理の喪失を増幅する¹⁰⁾。サイトカイン遺伝子発現誘導に加え、内毒素は、主にこの初期相の産生を担うクッパー細胞とともに、肝におけるROS形成³⁰⁾を促進する^{31,39)}。結果的にROSとペルオキシ亜硝

酸により生じる微小血管血栓症と内皮の酸化損傷は虚血細胞腫脹を誘発する。

肝流出血流への類洞後逆圧上昇から肝浮腫が生じ、類洞間体液のディッセ血管外スペースへの移入を増強する。これらの事象から結果的に生じる細胞性酸素運搬減少は、内臓静脈貯留や肝動脈緩衝反応障害によりQ_{pv}および全体的な肝酸素供給低下をさらに促進する²¹⁾；TNF- α とIL-1関連の肺微小血管透過性亢進に関連する動脈低酸素血症も肝動脈による酸素運搬を危うくする。肝内事象とは無関係に、腸と肝の連続的配置は腸虚血-再灌流(I-R)損傷後の肝機能障害をさらに起こしやすくする。このように、ショックに関連する腸内毒素と細菌のための腸上皮バリア透過性の変化は、腸のリンパ系組織によるTNF- α 、IL-6等のメディエータ産生により門脈静脈のこれら物質の濃度が高まっても門脈内毒素血症および菌血症を亢進させ、肝炎症が増幅される⁴⁰⁾。

敗血症発症中の肝炎症と機能障害において2番目に重要な機序は、肝の低酸素-酸素再供給(H-R)とI-R損傷に関連する^{1,10)}。これらの損傷に関連する生化学的および免疫学的事象はほとんど非敗血症条件下で研究されている。しかし、アデノシン三リン酸(ATP)の関連する減少、キサンチン・デヒドロゲナーゼのキサンチン・オキシダーゼへの変換、およびミトコンドリア活性化はROSを産生し、敗血性刺激に加え、遺伝子の発現、TNF- α などのサイトカインの遊離、結合、細胞毒性¹⁾を調節する。このように虚血性ストレスと低酸素性ストレスおよび回復期においてROSが炎症を誘発する拡大的役割が提起されている。

酸素再供給-再灌流後の虚血性低酸素ストレス延長とPMNによる呼吸バースト期のROS産生は減少しているグルタチオン肝内貯蔵(GSH)を枯渇させ、そのインヒビタI κ B α の分解のためサイトカイン転写因子NF- κ Bを活性化する⁴¹⁾。非敗血症ラットにおける3つの肝葉血管茎閉塞による肝の限局性の無血流I-R後、補体活性化や虚血後および非閉塞肝葉の両者への24時間にわたるPMN流入亢進、循環中トランスアミナーゼの増加および肝細胞壊死のすべてが観察された³⁹⁾。注目すべきは、そのような損傷をきたしている肝が

肝静脈血に、上皮好中球活性化ペプチド-78等のTNF- α やその他の前炎症性物質を遊離し、直接的に肺炎症と微小血管透過性を亢進することである⁴²⁾。重篤敗血症はほとんど常に、ショックとその治療の血管収縮薬により肝の二次性虚血-低酸素ストレスを続発する。従って、炎症、心肺不安定、肝酸素アベイラビリティの低下、前炎症性メディエータ産生増加、および外因性化合物だけでなく内因性TNF- α やロイコトリエン²⁾の胆汁排泄の低下の自己増幅サイクルの舞台が整う。

非敗血症条件下における肝の限局性I-Rに続く実験的in vivoデータから裏付けられるこのシナリオは、菌血症敗血症後の全体的でしばしば一過性である肝酸素供給低下後の事象を説明するだろうか？そのような肝酸素運搬における30分以内の全体的低下は一見、低酸素後VO₂の回復や細菌クリアランス、胆汁の流れ、アスパラギン酸トランスアミナーゼの遊離、組織学的外観、受容体仲介性グリコーゲン分解により評価されるとおり、先行のグラム陰性菌血症とは無関係に十分受容されるように思われる。しかし、灌流ラット肝のそのような短時間の虚血性または一定流量の低酸素ストレスは、GSH不足も機能障害も誘発しないが、菌血症後のTNF- α およびIL-1発現を有意に下方制御する^{41, 43)}。*E.coli*菌血症とそれに続いて起こる二次性低酸素ストレス後のIL-1 β 遺伝子発現のそのような減衰は明らかで、これは免疫反応性IL-1 β 産生の並行的低下と関連していた⁴¹⁾。これらの変化はキサンチン・オキシダーゼインヒビタであるアロプリノール前投与、または菌血症後のカタラーゼ投与により十分予防可能で、肝のH-Rにより産生されるROSの新たな生物学的役割、すなわち転写後のIL-1 β 下方制御が確認される。IL-1 β とは異なりH-R仲介性菌血症後TNF- α 発現低下はアロプリノールでは回復せず、これらの遺伝子のプロモータ領域におけるオキシダント反応性分の感受性の差、またはリボ核酸溶解性分解に対するサイトカインmRNAの抵抗の差が推測される。この結果、様々なデータ⁴⁴⁾は、肝のオキシダントストレスによるサイトカインの上方制御は、全体的な酸素運搬における大幅な変動が比較的短時間であるかまたは微生物の産物への曝露が先行している場合には定型反応ではないことを示

している。要約すると、上記結果から、敗血症発症中in vivoのサイトカイン仲介性肝炎は複雑な酸素-およびメディエータ依存性に調節されると推測される。

d. 代謝の変化

敗血症は複合的な時間依存性代謝変化を誘発し、肝機能障害につながることもある。これらは上述の血行動態や微小血管、および炎症過程と密接に関連する。結末のひとつは、クッパー細胞と肝細胞の異常な相互作用である。In vitroにおいては内毒素および活性化したクッパー細胞からのサイトカインは、肝細胞における誘導イソ型NO発現を増強させ、NO産生増とその後の肝細胞によるタンパク質合成阻害に至る⁴⁵⁾。C反応性タンパクや α_1 酸性糖タンパク、フィブリノゲン、 α_2 マクログロブリン等の急性相タンパクに対しIL-1 β とIL-6による肝タンパク質合成の優先順位の見直しと同時に生じるため、上記機序の臨床的重要性は不明である¹⁾。アルブミンとプレアルブミンは重要な薬剤結合タンパクであるが、負の急性相反応物質であるためこれらの循環濃度低下は多数のアルブミン結合薬剤の遊離分との結合を変化させることにより治療効果を調節する。

薬剤誘導性毒性を起こしやすくする敗血症のもうひとつの作用は、TNF- α 、IL-1、インターフェロン- γ 、NOのパラクリン作用による肝細胞性混合機能オキシダーゼシトクロムP-450の妨害である⁴⁶⁾。酸化薬生体内変化のためのこの経路の抑制は特にテオフィリン、フェニトイン、ワルファリンに影響を及ぼすが、内因性炎症性メディエータの代謝動態変化の重要性はより大きい可能性もある。この後者の可能性についてはほとんど研究されていない。敗血症関連類洞灌流低下抑制を伴う低酸素症も、共役反応を行うためシトクロムP-450を阻害する。通常、これらの過程に関与する酵素の最大酸素濃度の半分 (K_{mO_2}) は10~15 μ mであるが、肝細胞における細胞内PO₂平均値は35 μ mである⁴⁷⁾。従って、敗血症関連類洞酸素運搬低下またはdysoxiaによる細胞の酸素供給低下においてほとんど余裕はない。

完全非経口栄養法 (TPN) は敗血症発症中の胆汁合併症に至るもうひとつの要因である。脂

肪症, PMN浸潤を伴う脂肪性肝炎, 胆汁うっ滞, 門脈三重炎, 細胞壊死を含むいくつかの特徴が報告されている⁴⁸⁾。この合併症はTPNから7~10日以内に発生する可能性があるが, 根底にある不顕性炎症性肝疾患やブドウ糖ベースのカロリー過剰投与, TPNの持続, 胆道内スラッジ形成等の要因と関連付けられている。TPN関連肝機能障害は通常, 短期のTPN中断後または代替カロリー補助源として脂肪乳剤を使用すると速やかに解消する。

敗血症誘導性の肝中間代謝における変化は, 進行性肝機能障害につながり得る様々な方法で, 代謝基質の臓器間流動とエネルギー源も変化させる。 α -から β -受容体への優勢な肝アドレナリン受容体表現型の変化⁴⁹⁾は, 細胞表面における神経ホルモンの信号伝達とGタンパク質結合信号変換の両者が影響されるため, 炭水化物, 脂肪, タンパク質の代謝を変化させることがある。エピネフリンやノルエピネフリン, コルチゾール, および成長ホルモンによる敗血症後早期のグリコーゲン分解亢進に, サイトカイン仲介性の筋タンパク分解による肝におけるグルコース新生の増加が続く, アラニンと乳酸前駆物質が遊離される。しかし, 内毒素は, グルコース新生経路の速度調節酵素であるホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼを下方制御することが報告されている⁵⁰⁾。この作用は, 肝および筋グリコーゲン不足によるグルコースアベイラビリティの進行性制約とともに, ある種の敗血症患者, 特に肝疾患を基礎疾患として有する患者にみられる, 生命に危険を及ぼす低血糖症を誘発する可能性がある。敗血症発症中の肝アミノ酸代謝変化のスペクトルも報告されている⁴⁾。オルニチン遊離亢進とともに, グルタミンおよびアルギニン等のグルコース新生アミノ酸の摂取が増加する。急性相のタンパク質合成と同様に, 敗血症動物では尿素産生も同様に増加し⁴⁾, この場合も敗血症発症中において肝によるアミノ酸利用に全体的な障害がないことが推測される。

4. 臨床における病態

敗血症および多臓器不全発症中の肝“機能”を判断するための検査室検査のほとんどは特異性に

欠ける⁸⁾。アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) とアラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) の上昇は細胞壊死というよりもむしろ細胞質ゾルの漏出を反映しているとも考えられる。高ビリルビン血症が意味するものには薬剤毒性, 輸血後溶血, または毛細胆管への抱合型ビリルビン流入を妨害する内毒素の脂質A部分により Na^+ , K^+ -ATPaseを阻害する肝外敗血症がある⁵¹⁾。低アルブミン血症は必ずしもタンパク質合成障害を意味するものではなく, プロトロンビン時間 (PT) 延長は播種性血管内凝固を表すことがある。組織病理学的所見を伴う上記検査における異常な結果の相関関係は不良であることが多い¹⁾。この意味において, 現在使用されている多臓器不全スコア評価系による肝機能障害定義は不明確である。血清ビリルビン ≥ 4 から 6 mg/dL への段階的上昇および全身性抗凝固性がみられない中でのPT > 4 秒延長など, ほとんどは肝胆汁排泄の指標と実質細胞合成機能のひとつを利用して¹³⁾。しかし, 敗血症のように思われる患者における高ビリルビン血症と黄疸の鑑別診断は大まかである。生化学的パラメータと無関係に悪化することがある肝非実質細胞機能が多様であることを考慮すると, いかなる検査も肝における免疫調節障害を十分に跡付けることはできず, 敗血症の予後において中心的課題になることが多い。

これらの限界を留意した上で, 敗血症における肝機能障害の疫学的特徴とは何であろうか? 発生率は次の4つの理由により判断が困難である: (a) 検査方法が異なる, (b) 敗血症の発症と重症度に関係する機能障害の時間的経過の特異化が欠如している場合が多い, (c) 手術と麻酔の使用率または集中治療室における潜在的肝毒性を持つ物質の投与が様々である, (d) 実験デザインが多様である (すなわちプロスペクティブ解析対レトロスペクティブ解析)。

肝機能異常を誘発する複合的条件をみると, 最も特徴的なパターンは, しばしば単独で, または同時にみられるアルカリホスファターゼ値より高く, トランスアミナーゼ値に対し不釣り合いに高い直接型高ビリルビン血症である。そのような直接型高ビリルビン血症は菌血症患者82例のプロスペクティブ解析における最も顕著な異常であり⁵²⁾,

54% (44名) にみられ、ASTまたはアルカリホスファターゼに比較してしばしば不釣り合いなほどであった。これらのビリルビン値上昇は、グラム陰性菌感染患者または肝胆汁疾患既往がある患者ではより深刻であった。Brooksら⁵³⁾ は、手術後患者43名に関するプロスペクティブ研究において、重症敗血症に伴いアルカリホスファターゼ濃度はほとんど変化せずに血清ビリルビン値が急速に上昇した (0.95mg/dL/日) ことを報告した。この研究において、アルカリホスファターゼ値は高ビリルビン血症のピークに続いて遅れて上昇するか、または重症度の低い敗血症ではより早期に発生した。これらの報告において、剖検では壊死のエビデンスはほとんどみられない肝内胆汁うっ滞が認められた。

腹腔内感染とグラム陰性敗血症は、肝細胞による輸送と抱合機序だけでなく細胞質ゾル、ミクロソーム、および合成機能を解析するため一連の定量検査を実施した特定患者9名の重症肝外感染症の黄疸において重大なリスクファクターであった⁵¹⁾。主な所見は、肝機能は肝疾患既往がない患者における敗血症発症中に様々な形で障害されるというものであった。特異的には、有機アニオン輸送は重度に障害された。一方、ガラクトース排泄能により反映される細胞質ゾル機能と、PTにより表される合成機能は十分維持された。これらのパターンとは対照的に、Kennyら⁵⁴⁾ によるプロスペクティブ研究は高齢の急性感染症患者36例

において、アルカリホスファターゼの肝アイソザイム上昇が優勢な異常であることを明らかにした。しかし、それぞれの値は非感染症患者の値と相当な重複を示している。

初期ショック状態の重症度により敗血症患者は、GibsonとDudley⁵⁵⁾ が初めて定義した虚血性肝炎 (shock liver) をきたすことがある。虚血性肝炎と敗血症の高ビリルビン血症および黄疸の鑑別はほぼ難しくないと考えられる。慢性的な右房高血圧による内臓静脈灌流への逆圧の有意な上昇を伴う心拍出量の急激な低下、従って Q_{pv} と Q_{ha} の低下は通常の状態である。右房圧の上昇は通常右室不全や肺高血圧、または心膜疾患から生じる。心拍出量における先行の低下は入院前または侵襲的血行動態モニタリング前にすでに発生しているため、臨床的には不顕性の場合もある。血清ASTとALTの正常値の40倍超または $>1,000U/L$ への顕著な上昇 ($>10,000U/L$ への上昇も珍しくない) が低血圧状態の24~48時間以内に生じることが特徴的である。低下はウイルス性肝炎より急速である。続いて血清ビリルビン、アルカリホスファターゼ、PTの緩徐で小幅な上昇が生じる。当然のことながら小葉中心帯の炎症を伴わない壊死は、この領域で通常低 PO_2 が優勢であることを考えると主要な組織病理学的所見である。Shock liverの予後は基礎疾患を反映し、肝機能障害自体を反映するものではない。

文 献

- 1) Matuschak, G.M.: Liver-lung interactions in critical illness. *N Horizons* **2**: 488 - 504, 1994.
- 2) Matuschak, G.M., Mattingly, M., Tredway, T.L. et al.: Liver-lung interactions during *E. coli* endotoxemia: TNF- α -leukotriene axis. *Am Rev Respir Dis* **149**: 41 - 49, 1994.
- 3) Gimson, A.E.S.: Hepatic dysfunction during bacterial sepsis. *Int Care Med* **13**: 162 - 166, 1987.
- 4) Pastor, C.M., Billar, R., Payen, D.M.: Liver injury during sepsis. *J Crit Care* **10**: 183 - 197, 1995.
- 5) Matuschak, G.M., Rinaldo, J.E., Pinsky, M.R. et al.: Effect of end-stage liver failure on the incidence and resolution of the adult respiratory distress syndrome. *J Crit Care* **2**: 162 - 173, 1987.
- 6) Pinsky, M.R., Vincent, J.L., Deviere, J. et al.: Serum cytokine levels in human septic shock: relation to multiple-system organ failure. *Chest* **103**: 565 - 575, 1993.
- 7) Doyle, R.L., Szaflarski, N., Modin, G.W. et al.: Identification of patients with acute lung injury. Predictors of mortality. *Am J Respir Crit Care Med* **152**: 1818 - 1824, 1995.
- 8) Helzberg, J.H.: "LFTs" test more than liver. *JAMA* **256**: 3006 - 3007, 1986.
- 9) Lautt, W.W.: Mechanism and role of intrinsic regulation of hepatic arterial blood flow: hepatic arterial

- buffer response. *Am J Physiol* **249** : G549 - G556, 1985.
- 10) Clemens, M.G., Bauer, M., Gingalewski, C. et al.: Hepatic intercellular communication in shock and inflammation. *Shock* **2** : 1 - 9, 1994.
 - 11) Greenway, C.V., Lautt, W.W.: Effect of hepatic venous pressure on transsinusoidal fluid transfer in the liver of the anesthetized cat. *Circ Res* **26** : 697 - 703, 1970.
 - 12) Matuschak, G.M., Pinsky, M.R., Rogers, R.M.: Effects of positive end-expiratory pressure on hepatic blood flow and performance. *J Appl Physiol* **62** : 1377 - 1383, 1987.
 - 13) Matuschak, G.M.: Progression to multiple organ system failure. In: Civerra, J.M., Taylor, R.W., Kirby, R.R. eds. *Critical care*. Philadelphia: Lippincott-Raven, 343-358, 1997.
 - 14) Pastor, C.M., Payen, D.M.: Effect of modifying nitric oxide pathway on liver circulation in a rabbit endotoxin shock model. *Shock* **2** : 196 - 202, 1994.
 - 15) Fink, M.P., Fiallo, V., Stein, K.L. et al.: Systemic and regional hemodynamic changes after intraperitoneal endotoxin in rabbits: development of a new model of the clinical syndrome of hyperdynamic sepsis. *Circ Shock* **22** : 73 - 81, 1987.
 - 16) Wang, P., Zheng, F.B.A., Chaudly, I.H.: Increase in hepatic blood flow during early sepsis is due to increased portal flow. *Am J Physiol* **261** : R1507 - R1512, 1991.
 - 17) Dahn, M.S., Lange, P., Lobdell, K. et al.: Splanchnic and total body oxygen consumption differences in septic and injured patients. *Surgery* **101** : 69 - 80, 1987.
 - 18) Dahn, M.S., Lange, P., Wilson, R.F. et al.: Hepatic blood flow and splanchnic oxygen consumption measurements in clinical sepsis. *Surgery* **107** : 295 - 301, 1990.
 - 19) Wang, P., Zheng, F.B.A., Chaudly, I.H.: Hepatocellular dysfunction occurs earlier than the onset of hyperdynamic circulation during sepsis. *Shock* **3** : 21 - 26, 1995.
 - 20) Brienza, N., Ayuse, T., Revelly, J-P. et al.: Effects on endotoxin on the isolated porcine liver: pressure-flow analysis. *J Appl Physiol* **78** : 784 - 792, 1995.
 - 21) Ayuse, T., Brienza, N., Revelly, J-P. et al.: Alterations in liver hemodynamics in an intact porcine model of endotoxin shock. *Am J Physiol* **268** : H1106 - H1114, 1995.
 - 22) Halvorsen, L., Roth, R., Gunther, R.A. et al.: Liver hemodynamics during portal venous endotoxemia in swine. *Circ Shock* **41** : 166 - 175, 1993.
 - 23) Greenway, C.V.: Role of splanchnic venous system in overall cardiovascular homeostasis. *Fed Proc* **42** : 1678 - 1684, 1984.
 - 24) Bersten, A.D., Hersch, M., Cheung, H. et al.: The effect of various sympathomimetics on the regional circulations in hyperdynamic sepsis. *Surgery* **112** : 549 - 561, 1992.
 - 25) Breslow, M.J., Miller, C.F., Parker, S.D. et al.: Effect of vasopressors on organ blood flow during endotoxic shock in pigs. *Am J Physiol* **252** : H291 - H300, 1987.
 - 26) Matuschak, G.M., Pinsky, M.R.: Effects of positive-pressure ventilatory frequency on hepatic blood flow and performance. *J Crit Care* **4** : 153 - 165, 1989.
 - 27) Purcell, P.N., Branson, R.D., Hurst, J.M. et al.: Gut feeding and hepatic hemodynamics during PEEP ventilation for acute lung injury. *J Surg Res* **53** : 225 - 341, 1992.
 - 28) Chun, K., Zhang, J., Biewer, J. et al.: Microcirculatory failure determines lethal hepatocyte injury in ischemic/reperfused rat livers. *Shock* **1** : 3 - 9, 1994.
 - 29) Zhang, P., Xie, M., Spitzer, J.A.: Hepatic neutrophil sequestration in early sepsis: enhanced expression of adhesion molecules and phagocytic activity. *Shock* **2** : 133 - 140, 1994.
 - 30) Bautista, A.P., Meszaros, K., Bojta, J. et al.: Superoxide anion generation in the liver during the early stage of endotoxemia in rats. *J Leukoc Biol* **48** : 123 - 128, 1990.
 - 31) Decker, K.: Biologically active products of stimulated liver macrophages (Kupffer cells). *Eur J Biochem* **192** : 245 - 261, 1990.
 - 32) Mayumi, T., Chan, C.K., Clemens, M.G. et al.: Zonal heterogeneity of hepatic injury following shock/resuscitation: relationship of xanthine oxidase activity to localization of neutrophil accumulation and central lobular necrosis. *Shock* **5** : 324 - 332, 1996.
 - 33) Harbrecht, B.G., Stadler, J., Demetris, A.J. et al.: Nitric oxide and prostaglandins interact to prevent hepatic damage during murine endotoxemia. *Am J Physiol* **266** : G1004 - G1010, 1994.
 - 34) Wright, C.E., Rees, D.D., Moncada, S.: Protective and pathological roles of nitric oxide in endotoxin shock. *Cardiovasc Res* **51** : 48 - 57, 1992.
 - 35) Connett, R.J., Honig, C.R., Gayeski, T.E.J. et al.: Defining hypoxia: a systems view of Vo_2 , glycolysis,

- energetics, and intracellular Po_2 . *J Appl Physiol* **68** : 833 - 842, 1990.
- 36) Schlichtig, R., Klions, H., Kramer, D. et al.: Liver dysoxia and its detection. In: Matuschak GM, ed. Multiple systems organ failure: hepatic regulation of systemic host defence. New York: Marcel Dekker, 193-213, 1993.
 - 37) Schlichtig, R., Klions, H., Kramer, D. et al.: Hepatic dysoxia commences during O_2 supply dependence. *J Appl Physiol* **72** : 1499 - 1505, 1992.
 - 38) Fong, Y., Marano, M.A., Moldawer, L.L. et al.: The acute splanchnic and peripheral tissue metabolic response to endotoxin in humans. *J Clin Invest* **85** : 1896 - 1904, 1990.
 - 39) Jaeschke, H., Farhood, A., Bautista, A.P. et al.: Complement activates Kupffer cells and neutrophils during reperfusion after hepatic ischemia. *Am J Physiol* **264** : G801 - G803, 1993.
 - 40) Deitch, E.A., Xu, D., Franko, L. et al.: Evidence favoring the role of the gut as a cytokine-generating organ in rats subjected to hemorrhagic shock. *Shock* **1** : 141 - 145, 1994.
 - 41) Matuschak, G.M., Johannis, C.A., Chen, Z. et al.: Brief hypoxic stress downregulates *E. coli*-induced IL-1a and IL-1b gene expression in perfused liver. *Am J Physiol* **271** : R1311 - R1318, 1996.
 - 42) Colletti, L.M., Remick, D.G., Burtch, S. et al.: Role of tumor necrosis factor α in the pathophysiologic alterations after hepatic ischemia/reperfusion injury in the rat. *J Clin Invest* **85** : 1936 - 1943, 1990.
 - 43) Wibbenmeyer, L.W., Lechner, A.J., Munoz, C.F. et al.: Downregulation of *E. coli*-induced TNF- α expression in perfused liver by hypoxia-reoxygenation. *Am J Physiol* **268** : G311 - G319, 1995.
 - 44) Epperly, N.A., Lechner, A.J., Webster, R.O. et al.: Bidirectional effects of hepatic ischemia/reperfusion on *E. coli*-induced TNF- α gene expression. *Am J Physiol* **270** : R289 - R297, 1996.
 - 45) Curran, R.D., Billiar, T.R., Stuehr, D.J. et al.: Hepatocytes produce nitrogen oxides from L-arginine in response to inflammatory products of Kupffer cells. *J Exp Med* **170** : 1769 - 1774, 1989.
 - 46) Abdel-Razzack, Z., Loyer, P., Frautrel, A. et al.: Cytokines down-regulate expression of major cytochrome P-450 enzymes in adult human hepatocytes in primary culture. *Mol Pharmacol* **44** : 707 - 715, 1993.
 - 47) Angus, P.W., Morgan, D.J., Smallwood, R.A.: Hypoxia and hepatic drug metabolism-clinical implications. *Aliment Pharmacol Ther* **4** : 213 - 225, 1990.
 - 48) Bashir, R., Lipman, T.O.: Hepatobiliary complications of total parenteral nutrition in adults. *Gastroenterol Clin North Am* **24** : 1003 - 1025, 1995.
 - 49) Pittner, R.A., Spitzer, J.A.: Shift from α - to β -type adrenergic receptor-mediated response in chronically endotoxemic rats. *Am J Physiol* **264** : E650 - E654, 1993.
 - 50) Hill, M., McCallum, R.: Altered transcription regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase in rats following endotoxin treatment. *J Clin Invest* **88** : 811 - 816, 1991.
 - 51) Pirovino, M., Meister, F., Rubli, E. et al.: Preserved cytosolic and synthetic liver function in jaundice of severe extrahepatic infection. *Gastroenterology* **96** : 1589 - 1595, 1989.
 - 52) Franson, T.R., Hierholzer, W.J. Jr., LaBreque, D.R.: Frequency and characteristics of hyperbilirubinemia associated with bacteremia. *Rev Infect Dis* **7** : 1 - 9, 1985.
 - 53) Brooks, G.S., Zimble, A.G., Bodenheimer, H.C. et al.: Patterns of liver test abnormalities in patients with surgical sepsis. *Am Surg* **57** : 656 - 661, 1991.
 - 54) Kenny, R.A.M., Hodgkinson, H.M., Hayes, M.C. et al.: Abnormalities of liver function and outcome of acutely ill elderly patients. *Age Aging* **13** : 224 - 229, 1984.
 - 55) Gibson, P.R., Dudley, F.J.: Ischemic hepatitis: clinical features, diagnosis, and prognosis. *Aust NZ J Med* **14** : 822 - 830, 1984.

Blood levels of type II phospholipase A2 and platelet-activating factor acetylhydrolase are elevated in acute lung injury/acute respiratory distress syndrome

Michiko Miyata*

Nobuhiro Sato*

Masahiro Kojika*

Masaki Hakozaiki*

Satoko Imai*

Gaku Takahashi*

Hideyuki Makabe*

Shigehiro Shibata*

Nobuki Shioya*

Yasushi Suzuki*

Go Wakabayashi**

Shigeatsu Endo*

Abstract : Blood levels of type II phospholipase A2 (type II PLA₂) and platelet-activating factor acetylhydrolase (PAF-AH) were investigated in septic acute lung injury (ALI)/acute respiratory distress syndrome (ARDS). Type II PLA₂ and PAF-AH levels were significantly higher in septic ALI/ARDS patients than in those without ALI/ARDS. There was a significant correlation between type II PLA₂ and PAF-AH. The levels of endotoxin, tumor necrosis factor α (TNF- α), and interleukin 8 (IL-8) were also high at the time of septic ALI/ARDS onset.

Correlations among these humeral mediators suggested endotoxin and cytokines to be involved in the production of type II PLA₂ and PAF-AH.

Key words : ALI, ARDS, type II PLA₂, PAF-AH

Introduction

Type II phospholipase A₂ (type II PLA₂) is detected at high concentrations in local sites of inflammation¹⁾. Vadas et al. reported a strong pyogenic action of type II PLA₂²⁾ and involvement of type II PLA₂ in the pathogenesis of sepsis and septic shock³⁻⁵⁾. Many recent reports have also shown type II PLA₂ in respiratory disorders^{6, 7)}, multiple injuries^{8, 9)}, multiple organ failure^{10, 11)} and surgical stress¹²⁾. On the other hand, tumor necrosis factor α (TNF- α) and interleukin 1 (IL-1) are produced by various cells, and play major roles in inflammatory

responses. These inflammatory cytokines enhance production of type II PLA₂ from target cells and type II PLA₂ promotes further production. This is considered to be one of the mechanisms underlying the actions of inflammatory responses of cytokines¹³⁾. Symptoms resembling those of acute respiratory distress syndrome (ARDS) reportedly appear in response to administration of type II PLA₂ to the guinea pig respiratory tract¹⁴⁾. Another report showed lung injury to be derived from injuries mediated by surfactants¹⁵⁾. The authors have also reported elevations of type II PLA₂ and surfactant-D (SP-D) in the

Michiko Miyata et al.: *Department of Critical Care Medicine, School of Medicine, Iwate Medical University, 19-1 Uchimaru, Morioka, Japan.

**Department of Surgery I, School of Medicine, Iwate Medical University, 19-1 Uchimaru, Morioka, Japan.

presence of acute lung injury (ALI/ARDS)^{16, 17}.

On the other hand, platelet-activating factor (PAF) is synthesized from lyso-PAF that is derived from PLA₂. PAF is produced by inflammation-related cells, such as neutrophils and macrophages, as well as hemangioendothelial cells. The neutrophil and macrophage-activating action of PAF is now clear, and PAF is currently regarded as an important mediator of inflammatory responses. PAF acts to increase neutrophilic production of active oxygen species and metabolites of arachidonic acid, as well as promote elastase release. PAF acts to induce tissue injuries via these actions in the presence of ALI/ARDS. TNF- α is known to increase neutrophilic production of PAF, in a concentration-dependent manner¹⁸. Some reports have also shown the PAF level in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) to be significantly elevated in ARDS patients^{19, 20}.

Platelet-activating factor acetylhydrolase (PAF-AH) is an enzyme that selectively hydrolyses the acetyl group of PAF and converts PAF to lyso-PAF for neutralization of PAF. PAF levels are regulated by PAF-AH²¹. The authors have also demonstrated correlations of type II PLA₂, PAF-AH and arachidonic acid metabolites with cytokines in septic patients^{22~25}.

The present study was designed to measure type II PLA₂ and PAF-AH levels in the presence of septic ALI/ARDS and to investigate roles of these enzymes in the pathogenesis of septic ALI/ARDS.

Subjects and Methods

Consent to participate in this study was obtained from the patients or members of their families. This study was approved by the Ethics Committee of Iwate Medical University.

The patients underwent surgery on an inpatient basis at the Critical Care and Emergency Center, Iwate Medical University Hospital during calendar year 2000.

The diagnosis of sepsis conformed to the criteria established by the ACCP/SCMCC Consensus Conference Committee²⁶. The diagnosis of ALI/ARDS conformed to the criteria reported by *Bernard et al.*²⁷.

There were 36 patients, 24 men and 12 women, ranging in age from 34 to 88 years (mean, 63.0 years). Thirteen patients (age 62 ± 17 years) had medical conditions associated with ALI/ARDS. There was no significant difference in age (63 ± 16 years) between the patients with and those without ALI/ARDS.

For measurement of PAF-AH activity, blood was collected with ethylene diamine tetra-acetic acid (EDTA), and then centrifuged at 3,000 rpm for 15 minutes. For measurement of type II PLA₂, endotoxin, TNF- α and interleukin 8 (IL-8), blood was drawn with heparinized endotoxin-free syringes and immediately centrifuged at 3,000 rpm for 40 seconds. The serum and plasma were stored at -80°C until assayed.

PAF-AH activity was measured using a radioimmunoassay (RIA) (NEN Research Products, Du Pont, Boston, MA, USA).

The normal level was 21.4 ± 7.6 nmol/mL. TNF- α was measured with an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Medogenix, Fleurus, Belgium), and IL-8 was measured with a different ELISA kit (TFB, Tokyo, Japan). The detection limits of the measurements were 3 pg/mL.

The blood level of type II PLA₂ was measured by immunoradiometric assay (IRMA) (Shionogi Research Institute, Osaka, Japan)²⁸. Normal was defined as a level below 3.7 pg/mL.

Endotoxin (Et) was measured with the highly sensitive endotoxin assay. A septic state was considered to be present if the level exceeded 1.1 pg/mL²⁹.

Statistical analyses were conducted using the unpaired Wilcoxon test. Pearson's coefficients were calculated for the determination of correlations between variables. A level of $p < 0.05$ was

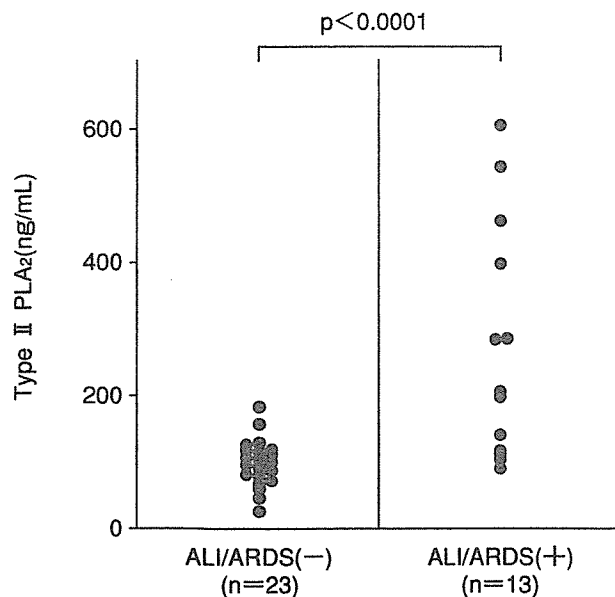


Fig. 1 Comparison of the blood level of type II PLA₂ between patients with and those without ALI/ARDS.

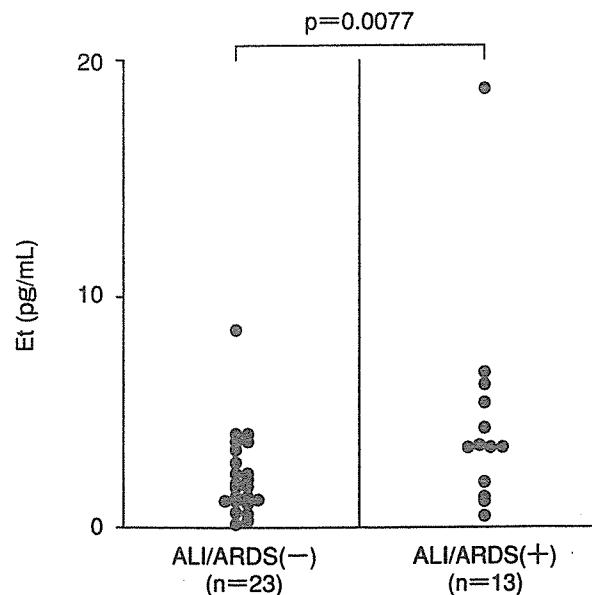


Fig. 3 Comparison of the blood level of Et between patients with and those without ALI/ARDS.

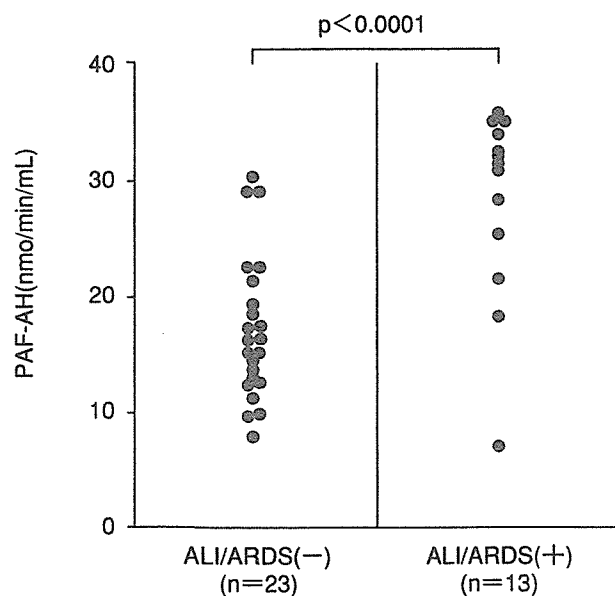


Fig. 2 Comparison of the blood level of PAF-AH between patients with and those without ALI/ARDS.

The blood level of PAF-AH was 30.6 ± 5.6 nmol/min/mL in the ALI/ARDS patients, also significantly higher than the 17.3 ± 6.7 nmol/min/mL in those without ALI/ARDS (Fig. 2).

The blood level of Et was 5.5 ± 5.4 pg/mL in the ALI/ARDS patients, again significantly higher than the 1.8 ± 1.3 pg/mL in those without ALI/ARDS (Fig. 3).

The blood level of TNF- α was 179.5 ± 71.7 pg/mL in the ALI/ARDS patients, significantly higher than the 44.6 ± 33.3 pg/mL in those without ALI/ARDS (Fig. 4).

The blood level of IL-8 was 126.9 ± 78.1 pg/mL in the ALI/ARDS patients, significantly higher than the 72.9 ± 38.0 pg/mL in those without ALI/ARDS (Fig. 5).

The correlations among these individual factors are presented in Table 1.

accepted as statistically significant.

Results

The blood level of type II PLA₂ was 301.8 ± 184.9 ng/mL in the ALI/ARDS patients, which was significantly higher than the 98.8 ± 37.7 ng/mL in those without ALI/ARDS (Fig. 1).

Discussion

Type II PLA₂ is an enzyme participating in hydrolysis of the 2-acetyl position of glycerophospholipid, which is a basic biomembrane structure, and in catalytic reactions to generate free fatty acids and lyso-phospholipid. Type II

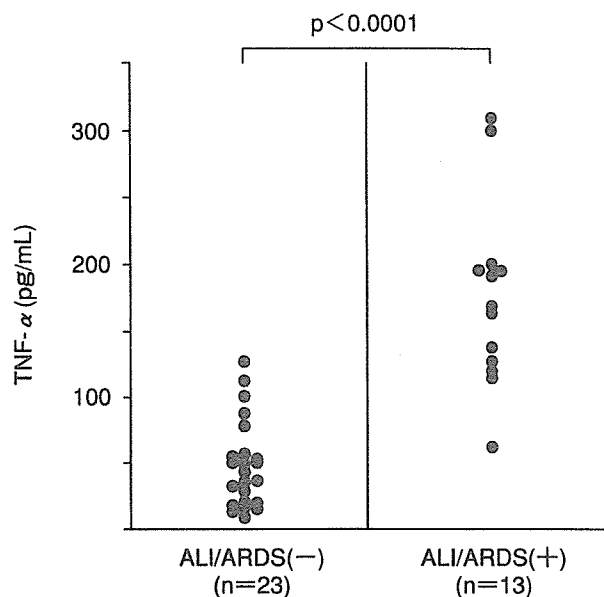


Fig. 4 Comparison of the blood level of TNF- α between patients with and those without ALI/ARDS.

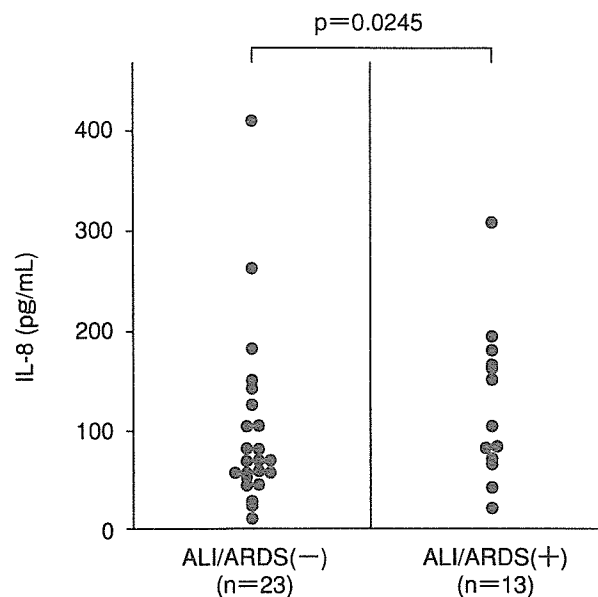


Fig. 5 Comparison of the blood level of IL-8 between patients with and those without ALI/ARDS.

Table 1 Correlations among individual factors

	PAF-AH	Et	TNF- α	IL-8
Type II PLA ₂	$\frac{0.4837}{0.0028}$	$\frac{0.4097}{0.0131}$	$\frac{0.7389}{<0.0001}$	$\frac{0.2418}{0.1555}$
PAF-AH		$\frac{0.3427}{0.0407}$	$\frac{0.5672}{0.0003}$	$\frac{0.4332}{0.0083}$
Et			$\frac{0.5364}{0.0007}$	$\frac{0.1136}{0.5471}$
TNF- α				$\frac{0.4437}{0.0067}$
($\frac{r \text{ value}}{P \text{ value}}$)				

PLA₂ is widely distributed in living organisms and plays important roles in tissue regeneration and the metabolism of biomembrane phospholipids. It is also a rate-limiting enzyme in the production of eicosanoid cascade metabolites and PAF.

It was previously reported that PLA₂ activity is detected in exudates from sites of inflammation³⁰. PLA₂ purified from peritoneal exudates of rabbits administered glycogen was demonstrated to be type II PLA₂³¹. Subsequently,

considerable attention focused on the possibility of type II PLA₂ functioning as a mediator of inflammation.

The blood level of type II PLA₂ was elevated in ALI/ARDS patients in the present study. Some recent reports have shown type II PLA₂ in respiratory disorders^{6, 7}. On the other hand, TNF- α and IL-1 are produced by various cells and play major roles in inflammatory reactions. These inflammatory cytokines enhance production of type II PLA₂ from target cells,

and type II PLA₂ in turn enhances production of eicosanoids. This has been regarded as one of the mechanisms underlying the inflammatory properties of cytokines^{13, 32}). In the present study as well, there was a significant correlation between blood levels of type II PLA₂ and TNF- α , suggesting TNF- α is to be intimately involved in type II PLA₂ production. Neutrophil-activating IL-8 was also recognized to be elevated in the presence of ALI/ARDS, though there was no significant correlation between IL-8 and type II PLA₂. These observations raise the possibility that inflammatory cytokines are also significantly involved in the onset and progression of the pathological changes characteristic of ALI/ARDS.

Et, a strong stimulator of cytokine production, showed a significant correlation with the blood level of TNF- α in this study as well, raising the possibility of Et being involved in TNF- α production.

On the other hand, surfactant reportedly suppresses PLA₂ secretion from guinea-pig alveolar macrophages³³). Other reports have shown that respiratory disorders appear in response to inactivation of surfactants by phospholipase A₂^{34~36}). The authors have also observed blood levels of type II PLA₂ and SP-D to be elevated in the presence of ALI/ARDS and that this elevation is highly involved in the pathogenesis of respiratory disorders^{16, 17}.

PAF is produced in large quantities by neutrophils, eosinophils and monocytes. The PAF thus produced is rapidly catabolized by PAF-AH. PAF, a phospholipid mediator, induces bronchial smooth muscle contraction, thereby stimulating production of cytokines, as well as neurotransmitter synthesis, and PAF is believed to be an important causative substance in the mechanism underlying the occurrence of bronchial asthma³⁷). Nakos et al. reported that the PAF level in BALF is significantly elevated in ARDS patients^{19, 20}).

The authors have reported blood levels of type II PLA₂ and PAF-AH to be increasingly elevated as sepsis worsens^{22~25}). Respiratory disorders are frequently associated with exacerbation of sepsis. Naturally, it is predicted that PAF would also be elevated in such pathological states. The blood level of PAF-AH was indeed elevated in the present study, suggesting that PAF-AH levels rise for the purpose of catabolizing PAF, the blood concentration of which is elevated in septic ALI/ARDS. In other words, these characteristics of PAF-AH support the observation that it apparently functions as a defensive factor against inflammatory reactions or oxygen stress. Furthermore, elevations in the blood concentrations of PAF-AH parallel the severity of pathological conditions.

The levels of eicosanoids, including leukotriene B₄, thromboxane B₂, and 6-keto-prostaglandin F_{1 α} , are elevated as blood levels of type II PLA₂ and PAF-AH rise along with an increasing severity of sepsis²⁵). These phenomena and observations suggest type II PLA₂ to be intimately involved in the production of these eicosanoids. Thus, numerous factors are involved in the onset and progression of pathological conditions associated with sepsis.

Blood concentrations of type II PLA₂ and PAF-AH were observed to be elevated in the presence of ALI/ARDS, suggesting that these enzymes play an important role in the onset and progression of pathological conditions.

Acknowledgement

This paper received the special research grants for development of characteristic education by the Promotion and Mutual Aid Corporation for Private Schools of Japan, and Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan.

References

- 1) Murakami, M.: Exacerbation of rat adjuvant arthritis by intradermal injection of purified mammalian 14-kDa group II phospholipase A₂. *FEBS Lett* **268** : 113 - 116, 1990.
- 2) Vadas, P. and Pruzanski, W.: Biology of disease. Role of secretory phospholipase A₂ in the pathobiology of disease. *Lab Invest* **55** : 391 - 404, 1986.
- 3) Vadas, P. and Hay, J.B.: Involvement of circulating phospholipase A₂ in the pathogenesis of hemodynamic changes in endotoxin shock. *Can J Physiol Pharmacol* **6** : 561 - 566, 1983.
- 4) Vadas, P., Pruzanski, W., Stefanski, E. et al.: Pathogenesis of hypotension in septic shock: correlation of circulating phospholipase A₂ levels with circulatory collapse. *Crit Care Med* **16** : 1 - 7, 1988.
- 5) Vadas, P., Pruzanski, W., Stefanski, E. et al.: Concordance of endogenous cortisol and phospholipase A₂ levels in gram-negative septic shock: A prospective study. *J Lab Clin Med* **111** : 584 - 590, 1988.
- 6) Tocker, J.E., Durham, S.K., Welton, A.F. et al.: Phospholipase A₂-induced pulmonary and hemodynamic response in the guinea pig. *Am Rev Respir Dis* **142** : 1193 - 1199, 1990.
- 7) Koike, K., Moore, E.E., Moore, F.A. et al.: Phospholipase A₂ inhibition decouples lung injury from gut ischemia-reperfusion. *Surgery* **112** : 173 - 180, 1992.
- 8) Uhl, W., Buchler, M., Nevalainen, T.J. et al.: Serum phospholipase A₂ in patients with multiple injuries. *J Trauma* **30** : 1285 - 1290, 1990.
- 9) Waydhas, C., Nast-Kolb, D., Duswald, K.-H. et al.: Prognostic value of serum phospholipase A₂ in the multitraumatized patients. *Klin Wochenschr* **67** : 203 - 206, 1989.
- 10) Baur, M., Schmid, Th.-O., Landauer, B.: Role of phospholipase A₂ in multiorgan failure with special reference to ARDS and acute renal failure (ARF). *Klin Wochenschr* **67** : 196 - 202, 1989.
- 11) Romaschin, A.D., DeMajo, W.C., Winton, T.: Systemic phospholipase A₂ and cachectin levels in adult respiratory distress syndrome and multi-organ failure. *J Clin Biochem* **25** : 55 - 60, 1992.
- 12) Ogawa, M., Arakawa, H., Yamashita, S. et al.: Postoperative elevations of serum interleukin 6 and group II phospholipase A₂: group II phospholipase A₂ in serum is an acute phase reactant. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* **74** : 241 - 244, 1991.
- 13) Pruzanski, W. and Vadas, P.: Phospholipase A₂ - a mediator between proximal and distal effectors of inflammation. *Immunol Today* **12** : 143 - 146, 1991.
- 14) Durhan, S.K., Selig, V.M.: Phospholipase A₂ induced pathophysiology changes in guinea pig lung. *Am J Pathol* **136** : 1283 - 1291, 2001.
- 15) Furue, S., Mikawa, K., Nashina, K. et al.: Therapeutic time-window of a group IIa phospholipase A₂ inhibitor in rabbit acute lung injury: Correlation with lung surfactant protection. *Crit Care Med* **29** : 719 - 727, 2001.
- 16) Imai, S., Sato, N., Kojika, M. et al.: Surfactant protein-D and type II phospholipase A₂ levels in patients with acute respiratory distress syndrome. *J Iwate Med Assoc* (in press).
- 17) Miyata, M., Sato, N., Suzuki, Y. et al.: Correlations of surfactant proteins with type II phospholipase A₂ in the presence of ALI/ARDS associated with diffuse peritonitis. *Med Postgraduates* (in press).
- 18) Matsumoto, K. et al.: Platelet-activating factor in bronchoalveolar lavage fluid of patients with adult respiratory distress syndrome. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **19** : 509 - , 1992.
- 19) Nakos, G. et al.: Proteins and phospholipids in BAL from patients with hydrostatic pulmonary edema. *Am J Respir Crit Care Med* **155** : 645 - , 1997.
- 20) Nakos, G. et al.: Bronchoalveolar lavage fluid characteristics of early intermediate and late phase of ARDS. Alterations in leukocytes, proteins, PAF and surfactant component. *Intensive Care Med* **24** : 296 - , 1998.
- 21) Jehle, R., Schlame, M., Buttner, C. et al.: Platelet-activating factor (PAF)-acetylhydrolase and PAF-like compounds in the lung: Effects of hyperoxia. *Biochim Biophys Acta* **1532** : 60 - 66, 2001.
- 22) Endo, S., Inada, K., Yamashita, H. et al.: Platelet-activating factor (PAF) acetylhydrolase activity, type II phospholipase A₂, and cytokine levels in patients with sepsis. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* **83** : 289 - 295, 1994.
- 23) Takakuwa, T., End, S., Nakae, H. et al.: Relationships between plasma levels of type II phospholipase A₂, PAF-acetylhydrolase, Leukotrienes B₄, complements, endothelin-1, and thrombomodulin in patients with sepsis. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* **84** : 271 - 281, 1994.

- 24) Takakuwa, T., Endo, S., Nakae, H. et al.: PAF-acetylhydrolase and arachidonic acid metabolite levels in patients with sepsis. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* **84** : 283 - 290, 1994.
- 25) Nakae, H., Endo, S., Inada, K. et al.: Plasma concentrations of type II phospholipase A₂, cytokines and eicosanoids in patients with burns. *Burns* **21** : 422 - 426, 1995.
- 26) Members of the American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference Committee: Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Chest* **101** : 1644 - 1655, 1992/
Crit Care Med **20** : 864 - 874, 1992.
- 27) Bernard, G.R., Artigas, A., Brigham, K.L. et al.: The American-European Consensus Conference on ARDS. Definition, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. *Am J Respir Crit Care Med* **149** : 818 - 924, 1994.
- 28) Matsuda, Y., Ogawa, M., Sakamoto, K. et al.: Development of a radioimmunoassay for human group-II phospholipase A₂ and demonstration of postoperative elevation. *Enzyme* **45** : 200 - 208, 1991.
- 29) Yaegashi, Y., Inada, K., Sato, N. et al.: Highly sensitive endotoxin assay for the diagnosis of sepsis. *Jpn J Crit care Endotoxemia* 2003 **7** : 25 - 28, 2003 (in Japanese).
- 30) Vadas, P., Pruzanski, W., Stefanski, E.: Extracellular phospholipase A₂: Causative agent in circulating collapse of septic shock. *Agents Actions* **24** : 320 - 325, 1988.
- 31) Chang, H.W., Kudo, I., Tomita, M. et al.: Purification and characterization of extracellular phospholipase A₂ from peritoneal cavity of caseinate-treated rat. *J Biochem* **102** : 147 - 154, 1987.
- 32) Crowl, R.M., Stoller, T.J., Conroy, R.R. et al.: Induction of phospholipase A₂ gene expression in human hepatoma cells by mediators of the acute phase response. *J Biol Chem* **266** : 2647 - 2651, 1991.
- 33) Hidi, R., Vidal, D., Navet, N. et al.: Inhibition by pulmonary surfactant curosurf of secretory phospholipase A₂ expression in guinea-pig alveolar macrophages. *Biochem Pharmacol* **54** : 1055 - 1058, 1997.
- 34) Arbibe, L., Vial, D., Rosinski-Chupin, I. et al.: Endotoxin induces expression of type-II phospholipase A₂ in macrophages during acute lung injury in guinea-pig. *J Immunol* 391 - 400, 1997.
- 35) Arbibe, L., Koumanov, K., Vial, D. et al.: Generation of Lyso-phospholipids from surfactant in acute lung injury is mediated by type-II phospholipase A₂ and inhibited by a direct protein A-phospholipase A₂ protein interaction. *J Clin Invest* **102** : 1152 - 1160.
- 36) Schrama, A.J., de Beaufort, A.J., Sukul, Y.R. et al.: Phospholipase A₂ is present in meconium and inhibits the activity of pulmonary surfactant: and in vitro study. *Acta Paediatrica* **90** : 412 - 416, 2001.
- 37) Ishii, S., Nagase, T. and Shimizu, T. et al.: Platelet-activating factor receptor.Prostaglandins Other Lipid Mediators **68-69** : 599 - 609, 2002.
-

敗血症と生体反応(15)

遠藤 重厚*	佐藤 信博*	八重樫泰法*
Shigeatsu Endo	Nobuhiro Sato	Yasunori Yaegashi
今井 聡子*	宮田美智子*	高橋 学*
Satoko Imai	Michiko Miyata	Gaku Takahashi
菅 康徳*	北村道彦**	
Yasunori Kan	Michihiko Kitamura	

要 旨

播種性血管内凝固 (disseminated intravascular coagulation: DIC) は過度の凝固亢進による播種性微小血栓形成の結果, 臓器障害および出血傾向をきたす病態である。敗血症はDICをきたす代表的疾患の一つである。DICを合併すると予後が不良となる場合が多く, 適切な治療が早期から求められる。本項では, 敗血症時の, 凝固, 線溶系に関する知識を整理するとともに, 本病態に係わる液性因子について述べる。

Key words : 敗血症, 凝固, 線溶, エンドトキシン, サイトカイン

15. 敗血症と血液凝固

1. はじめに

敗血症／敗血症性ショックは様々な炎症性メディエーターの過剰な活性化により発症する。細胞上の特異的受容体に相互作用する種々のサイトカインやホルモン様タンパク質の放出が敗血症のカギとなると考えられ, 多くの二次的, 三次的メディエーターの放出, 活性化を次々に誘発する¹⁾。敗血症の病因に関与する主なサイトカインは, TNF- α , IL-1や IL-1ra, IL-6, IL-8およびその他のケモカインであるIL-10, IL-12やIFN- γ である。サイトカインにより活性化される二次的メディエーターの中に凝固系があり, これはいわゆる血液凝

固カスケードに属するものである。この系には凝固系, 線溶系, プロテインC系, および補体系が含まれる。血液凝固カスケードの代表的な特徴は, これらのタンパク質が不活性な前駆体分子, セリンプロテイナーゼなどの活性分子にカスケードのような様式で活性化されることである。

敗血症の動物モデルでは, 大抵の場合に過剰な凝固系の活性化がしばしば起こり, これは敗血症患者においてもある程度同様である。敗血症における凝固異常を総合的に概括したものがあるが²⁾, 本項ではどちらかといえば, 敗血症における凝固系の役割に関する機構上の洞察を提供する研究に焦点を当てることになる。従って, 動物における実験的研究に重点を置くことになる。凝固の内因系経路として知られている接触相についても要約

Shigeatsu Endo et al.: Sepsis and pathophysiology.

*岩手医科大学医学部 救急医学 **岩手県立胆沢病院 外科

する。フィブリン溶解系およびプロテインC系という2つの抗凝固系についても考察する。まず、これらの系の生化学および生物学的側面について簡単に要約し、ヒト敗血症および敗血症動物モデルにおけるその役割について述べる。

2. 凝固系

a. 共通の経路

トロンビンは凝固系のカギとなる酵素である。この酵素はフィブリノーゲンのフィブリンへの変換を触媒するので、凝血促進作用を有している。注目すべきことに、本酵素はプロテインCとの相互作用により抗凝固作用も有しており、これはトロンビンパドックスとして知られている³⁾。従って、低濃度のトロンビンは必ずしもフィブリン形成を引き起こすものではなく、むしろプロテインC活性化により血栓塞栓イベントを防御する。

トロンビンは、種々の補因子、すなわち第V因子a (Fva)、リン脂質(凝固因子が集合する表面として働く)、カルシウムイオンの存在下において、活性化第X因子(Fxa)によりプロトロンビンから生成される。第X因子の活性化は、外因系経路(本経路の構成要素の一つである組織因子[TF]は血漿中には存在しない)あるいは内因系経路(全構成要素が血漿中に存在する)のいずれかにより引き起こされると考えられている。両経路の活性は主にセリンプロテアーゼ阻害物質であるアンチトロンビンIII(ATIII)により制御されており、多様な特異性を持つプロテアーゼ阻害剤 α_2 -マクログロブリン(α_2 M)によってもある程度制御されている。敗血症実験モデルではどちらの阻害物質もトロンビンを阻害することが認められている^{4,5)}。

b. 外因系経路

この経路は第VII因子と膜貫通タンパク質TFから構成される。正常な状態では、TFは末梢血液や内皮細胞に曝露されることはなく、血管外細胞に存在する⁶⁾。この経路の活性化は、これらの血管外細胞への血液の曝露を誘発することになる連続する内皮層の崩壊により引き起こされる。すなわち、内皮中または循環血中の好中球や単球がその膜上でTFに曝露されることに起因する。敗血

症における外因系凝固経路の活性化は、内皮の損傷よりもむしろ血液中単核細胞や内皮がTFへ曝露されることにより主に発生する。また細胞由来のリン脂質微粒子もTFを含有すると考えられる⁷⁾。敗血症時のTF発現作動物質には、エンドトキシン、サイトカイン(TNFあるいはIL-1)、活性化補体^{8~14)}などがある。TFは血液に曝露されると第VII因子と結合し、活性化し、これが第X因子を活性化する。次いでFXaはプロトロンビンを変換する。外因系経路の活性化は組織因子経路阻害因子(TFPI)により嚴重に制御されており¹⁵⁾、初期TF/FVIIa/FXa複合体活性を速やかに遮断する。低濃度TF/FVIIa/FXaにおけるTFPIの阻害活性を回避するためには¹⁶⁾、さらにトロンビンを生成するためにTF/FVIIaによる第IX因子の活性化が必要である(後述)。

c. 内因系経路

血液はガラスと接触すると速やかに凝血を形成する。この凝血形成は共通経路(トロンビンおよびFXa)に依存しているが、この場合はTF/FVIIaにより活性化されるのではなく、むしろ内因系経路と呼ばれる多くの凝固因子により活性化される。この経路の活性化は、ある活性化物質上に第XII因子(FXII、または以前のハーゲマン因子)が結合、活性化されることにより誘発される。生体内のこの活性化物質の表面の性質については未知である。FXIIaは、高分子量キニノゲン(HK)との複合体として当表面上に集合しているプレカリクレインを、カリクレインに変換する。次いでカリクレインは表面に結合したFXIIを活性化し、FXIIaを爆発的に活性化する。またFXIIaは、表面上でHKとの複合体として集合している第XI因子を活性化する。FXIaは次いで第IX因子を活性化しFIXaを産生する。そして、最終的にFVIIIa(トロンビンによりVIIIから生成された)存在下で、FIXaは第X因子をFXaに変換して共通経路を活性化する。第XII因子、プレカリクレイン、HK、第XI因子の活性化には、活性化表面とこれらのタンパク質の接触が必要なため、これらのタンパク質は接触相として知られている。この相の主な阻害物質はC1-阻害物質(C1-Inh)で、古典的補体活性化経路の活性化C1の主

な阻害物質である。

d. 外因系および内因系経路の統合

FX活性化への2種の経路の概念は*in vitro*研究に基づいている。しかし、先天性欠損症による臨床例においてはこの概念を必ず支持するものではなく、特に内因系経路に関するものはこれに對抗するものである。すなわち、第VIIIあるいは第IX因子欠損症患者は明確な出血傾向を示し、第XI因子欠損症では軽度の出血性疾患がみられるが、第XII欠損例ではむしろ血栓塞栓の問題が認められる。このように、同一経路に関与すると考えられるこれらの因子の欠損症が相反する止血問題に結びついているのである。その後の研究により、TF/第VIIa因子複合体は第X因子だけでなく、第IX因子をも活性化し、後者はFVIIIa存在下にFXaを生成することが確認された。第VII因子レベルにおけるこの増幅ループ回路は正常状態では適切な止血のために必要であり、このことは血友病の臨床像により劇的に示されている。より最近では、第XI因子が関係する第二のトロンビン生成増幅ループが認められている^{17~20)}。トロンビンにより生成されるFXIaは第IX因子を活性化し、第IX因子は第X因子を介してトロンビン生成をさらに誘発する。第XI因子によるトロンビンの爆発的增加によりTAFI（トロンビン活性化線溶抑制因子）が活性化され、フィブリンとプラスミノーゲンの結合部位を開裂させ、フィブリン溶解を阻害する^{21~23)}。このように、限られた量のTFにより誘発された場合でも、2種の増幅回路を介して血液凝固に充分な量のトロンビンが生成されると考えられる。

補因子FVIIIaやFVaの活性は特に活性化プロテインC（APC）により制御され、このタンパク質がこれらの補因子を不活性分子に分解する。これがAPCの主要な抗凝固機能である。APCは膜タンパク質トロンボモジュリン（TM）に結合したトロンビンによりプロテインCから生成される。正常状態では、TMは内皮細胞に発現しており、内皮の抗凝固性に寄与している。炎症時にはTNFやIL-1などのサイトカインがTMの合成をダウンレギュレートしており、炎症性プロテアーゼはこの膜タンパク質を内皮から解放させる。この

現象はTFの発現とともに、内皮表面を凝固促進的に変換させる^{9~12)}。局所感染においては、このことは微生物を局在させるうえで役立っているが、敗血症のような状態では広汎なフィブリン生成につながり、臓器機能障害の発生に寄与する可能性がある。

3. 敗血症の前臨床モデル

血液凝固はエンドトキシン（または他の細菌構成成分）あるいは細菌（生菌または死菌）を負荷した動物で研究されている。敗血症モデルは静脈内投与、あるいは腹腔内への感染フィブリン凝固塊の植え込み、盲腸穿刺および結紮といった局所投与で行われる。活性化凝固因子の高性能アクセシ系の大部分がヒト用として開発され、このアクセシ系に使用されている抗体は交叉反応性が低く動物では測定が困難であることから、動物モデルにおける血液凝固の研究は阻まれている。従って動物での凝固に関する詳細な研究は霊長類でのみ可能である。ヒトにおける実験的エンドトキシン血症モデルも開発されている。このモデルにおける負荷は非常に穏やかなもので、感冒様疾患を誘発する。このモデルでの凝固系活性化パターンは（亜）致死モデルのそれとは大きく異なると考えられる。従って、ヒトのエンドトキシン血症モデルで得られた結果は、相当注意深く実際の敗血症ショックに外挿するしかないであろう。

凝固系の機構とその臨床症状への影響を正確に認識するために、敗血症モデルにおいて凝固阻害物質が使用されている。共通経路には活性部位をブロックしたFxa（DEGR-Xa）やATIIIが使用されている。外因系経路にはTFPI、抗TFモノクローナル抗体（mAb）、抗FVII mAbや活性部位をブロックしたFVIIa（DEGR-FVIIa）が使用されている。またナファモスタットなどの低分子阻害剤も敗血症モデルで試験されている^{24, 25)}。内因系経路、特に接触相では、抗第XII因子mAbやC1-Inhが使用されている。APCを用いた多くの研究が敗血症モデルで行われている。

4. サイトカイン類による凝固活性化

敗血症での凝固異常に関して病因論的役割を持つと考えられるTF発現の作動物質には、エンド

トキシン, サイトカイン類であるTNFやIL-1, 活性化補体がある。TNFやIL-1を注射投与した動物における組織学的研究では, 投与部位での好中球の活性化やフィブリン沈着が示され^{26~28)}, これらのサイトカインの凝固促進性が支持されている。健常ボランティアにおけるTNFの全身注射投与によっても凝固とフィブリン溶解の活性化が誘発される。一般的に凝固はサイトカイン注入後数時間にわたって進行し, 一方, フィブリン溶解は短期間(約60分)しか活性化されず, その後は次第に阻害されるようになり, 最終的には凝固促進状態となる^{29, 30)}。

TNFやIL-1による凝固(およびフィブリン溶解)活性化は, ヒト以外の霊長類においても研究されている。体重1kgあたり100 μ gのTNFを負荷されたヒヒにおいて, プロテインCを阻害するモノクローナル抗体を併用投与しない場合には, トロンビン-抗トロンビンIII (TAT) 複合体は認められなかった³¹⁾。本モデルにおいて, TNF誘発性の凝固活性化がリン脂質微小小胞の注入により増強された。10 μ g/kgのIL-1 α によっても, ヒヒでのTAT複合体の増加が誘発され, これはプロテインC阻害がない場合でも同様であった³²⁾。IL-6もトロンビン産生を誘発することが認められている³³⁾。この産生機構は不明であるが, 急性期プロテインC反応性タンパク (CRP) が関与していると考えられる³⁴⁾。つまり, サイトカインであるIL-2やIL-12も霊長類でトロンビン産生を刺激し得る。すなわち, IL-2により誘発されるものは低用量TNFやエンドトキシン投与後に認められるものと非常に類似している³⁵⁾。一方, IL-12によるものはより多彩であり持続的で24時間にわたって継続する³⁶⁾。おそらく, これらいずれかのサイトカインによるトロンビン産生は, TNFおよびIL-1の放出を介するものであると考えられる。

特に, ある種のサイトカインが凝固促進状態を誘発するという主張は慎重に検討しなければならない。即ち, それらの研究で観察されている低用量トロンビンは, 単にプロテインC活性化を刺激して抗凝固状態という結果になっているにすぎないかもしれないからである。さらに, サイトカイン類によるトロンビン産生は主に外因系経路により起こると考えられる。またサイトカイン, 例え

ば高用量IL-2は接触相の顕著な活性化を誘発すると考えられる³⁷⁾。このことは, 産生されたトロンビン全てが外因系経路の活性化に由来するものではないという可能性も生じさせる。これらを考慮しても, 敗血症カスケードのカギとなるメディエーターであるサイトカインが凝固系の活性化を誘発し得るということを明確に示すものである。

5. 敗血症モデルにおける凝固系の活性化

a. 外因系および共通経路の活性化

動物にエンドトキシンや生菌を負荷すると, 凝固系の一過性の活性化だけではなくTNF, IL-1, IL-6およびその他のサイトカインの放出を誘発する。モデルによっては, 顕著なフィブリン形成を伴う。ヒトにおいては低用量のエンドトキシンでは顕著なフィブリン形成を誘発しない。抗第VII因子抗体や抗TF抗体を用いた研究で明らかにされているように^{38, 39)}, 凝固は外因系経路を介してのみ起こる。とりわけ, このような物質はサイトカインの反応に及ぼす影響は有さなかった。抗TNF抗体, 可溶性TNF受容体, IL-1raを用いた研究では, このようなヒト実験モデルでのトロンビン生成がサイトカインと無関係に起こり, エンドトキシンによる末梢血単核細胞や内皮細胞の直接的刺激に由来するらしいことが明らかにされている⁴⁰⁾。実験的エンドトキシン血症では, フィブリン溶解系の活性化を反映したプラスミン産生が既に遮断されており(プラスミノゲン活性化因子阻害因子1 [PAI-1] の濃度増大による), この時, 凝固系活性化は最大となり(負荷後約3~4時間)^{41, 42)}, この状況は凝固促進状態と呼ばれている。前述のように, 低濃度トロンビンはプロテインCを活性化して抗凝固活性を示すことから, この解釈は正確ではない可能性がある。チンパンジーの類似モデルで同様の知見が得られている³⁹⁾。意外にも, 抗IL-6 mAb添加実験では, その機構については不明であるが, 低用量エンドトキシンによる凝固系活性化におけるIL-6の役割が明らかにされている⁴³⁾。

致死量あるいは亜致死量のエンドトキシンまたは生菌を負荷後, 約1~2時間にTNF濃度は最大となり, 一方IL-1 β 濃度はやや遅れて最大となる。これらのモデルでは凝固系だけでなくフィブリン

溶解系も活性化されるが、負荷後数時間にはフィブリン溶解系は再び阻害され、凝固系はより長時間持続する⁴⁾。とりわけ、このような活性化は、緩やかで著しいフィブリノーゲンの消費とフィブリンの生成を伴う。軽度のエンドトキシン血症とは対照的に、より重篤な敗血症モデルではTNF阻害により凝固系の活性化が減少するが、フィブリン溶解系にはほとんど影響がない⁴⁴⁾。同様に、これらのモデルでIL-1raは凝固系の活性化を低下させ、プラスミン形成には影響しない³²⁾。このように重症の敗血症モデルでは、凝固系の活性化は炎症性サイトカインの放出に左右される。最終的にはこれらのモデルでの凝固系阻害物質がプラスミン形成を減少させる。このように、軽度の実験的エンドトキシン血症とは異なり、(重)致死の敗血症モデルではフィブリンによりプラスミン形成が強く促進される。

敗血症時のTF発現部位については、重症敗血症モデルによる研究がある。TFは末梢血中白血球、種々の臓器の浸潤白血球^{45, 46)}、脾臓や動脈由来の内皮細胞^{47~49)}、および肺や腎臓に見出されている^{47, 50~52)}。さらにTFは、エンドトキシン刺激単球に由来するリン脂質微小小胞に存在すると考えられる⁷⁾。実際、髄膜炎菌敗血症患者ではTF陽性のトロンビン産生性微小小胞が循環血中に存在すると考えられる⁵³⁾。

マウスの致死性エンドトキシンモデルにおいて、抗TF処置により死亡率と凝固因子消費が減少したが、一方でTNF放出には影響がみられなかった⁵⁴⁾。同様に、ヒトの致死性大腸菌モデルでは、抗TF mAbが凝固疾患性反応を減弱し、生存率が改善した⁵⁵⁾。また活性部位阻害化FVIIa (DEGR-第VII因子)により予後が改善され、凝固疾患性反応、特に炎症性の反応も減弱した⁵⁶⁾。多くの研究がTFPIに関して施行されている。Creaseyらにより、致死量の大腸菌を負荷したヒトにおいて、負荷後短時間に投与されたTFPIにより死亡を完全に防ぐことができることが示された⁵⁷⁾。この効果には凝固系の顕著な減弱と、IL-6反応の低下により示される炎症反応の減弱が伴っていた⁵⁷⁾。負荷4時間後のTFPI投与でも生存率は40%であった。初期の12時間において、臨床的および血行力学的パラメーターにTFPIが影響しな

かったことは注目すべきことである。同様の結果がその後の研究でも得られている^{58~62)}。TFPIはまたグラム陰性菌腹膜炎ウサギにおけるアウトカムも改善し、死亡を防御している⁶³⁾。

TFPI, DEGR-VIIaや抗TF mAbなどの凝固阻害物質は、敗血症モデルでアウトカムに良好な影響をもたらす。同様の有益な効果がAPC⁶⁴⁾、高用量ATIII^{65, 66)}でも認められている。これらの研究では全凝固系の顕著な阻害が認められるだけでなく、例えばIL-6, IL-8放出の減少により反映される、炎症性反応の減弱も見られた。トロンビン, FVIIa, Fxaなどの凝固プロテアーゼは、プロテアーゼ-活性化受容体⁶⁷⁾やおそらくその他の受容体^{68, 69)}と相互作用して細胞を誘発することが可能である。従って、凝固系の阻害により、その他の細胞反応、恐らく炎症性の反応(炎症への効果は凝固に関するものに対する二次的なものである)を減弱することで敗血症の死亡率を改善すると推測することが可能である。さらに、DEGR-Xaに関する研究で示されたように、凝固系そのものの阻害は敗血症での予後を改善するには充分ではない⁷⁰⁾。明らかに、ある種の凝固系阻害物質は凝固への効果に対して二次的ではない炎症反応に及ぼす独自の効果を有している。現在進められている研究において、凝固系阻害物質のこのような抗炎症効果に関する分子機構が明らかにされるに違いない。考えられる可能性としては、FVIIaの細胞シグナル伝達効果、凝固系阻害物質により誘発される内皮細胞によるプロスタサイクリン生成、および炎症反応を遮断する最近発見されたAPC受容体の刺激がある^{69, 71, 72)}。

b. 接触相の活性化

遺伝的欠損症の臨床的徴候と内因系経路凝固因子の考えられる役割との矛盾により、凝固系の概念を見直すことになり、第VIII, IX, XI因子の主な凝固機能は外因系経路の活性化の増幅であるとみなされている。従って*in vivo*での止血における第XII因子の正確な役割はそれほど明確なものではない。第XII因子の構造からはフィブリン溶解における役割が示唆される。実際、第XII因子欠損患者では多少フィブリン溶解反応が障害されており⁷³⁾、このことは第XII因子濃度の低下と

血栓塞栓性疾患の関係を説明するものと考えられる。これらの活性に加えて、接触相はHKからのブラジキニン産生能（カリクレインによる）でよく知られている。このノナペプチドは低濃度で血管拡張、血圧低下、血管透過性増大、気管支収縮を誘発する⁷⁴⁾。これらの効果の幾つかは一酸化窒素（NO）生成の誘発によるものである。さらに接触相の活性化生成物は好中球を誘引し、補体を活性化する^{75~77)}。このように接触相は強力な炎症系であり、敗血症の病因に寄与しているものと考えられる。

ブラジキニンなどの活性化生成物の循環血中濃度は敗血症実験モデルでは上昇しており、一方、第XII因子、プレカリクレインやHKの濃度は減少しており^{78, 79)}、接触相の活性化を示すものである。このような変化は致死敗血症では極めて著明であり、ヒビのモデルでは平均動脈圧の持続的な低下を伴っており、致死敗血症時の血行力学的变化にブラジキニンが関与していることが示唆される⁷⁹⁾。致死用量の大腸菌を静脈内負荷したヒビをmAbで前処置することにより、第XII因子活性化が阻害され、非可逆的血圧低下が減弱し、生存期間が延長した⁸⁰⁾。mAb処置はまた補体活性化、フィブリン溶解活性化、サイトカインや好中球エラスターゼの放出などを減弱させ、第XII因子の多様な炎症誘発性効果が示されている⁸¹⁾。このような事実は、ブラジキニン受容体拮抗剤がエンドトキシン血症に続く血圧低下に無効である⁸²⁾ことから、敗血症時の接触相の活性化による降圧効果が他の炎症系とのクロストークに影響されるという可能性をますます想起させる。接触相に関する他の特異性のより低い阻害物質の良好な効果についてもまた動物モデルで報告されている。すなわち致死量P. aeruginosa負荷ブタ（このモデルでは90%の動物が6時間以内に死亡する）において、 α 1-アンチトリプシン-Pittsburgh（反応中心部のいわゆるP1位が変異した α 1-アンチトリプシンで、強力な第XIIa因子／カリクレイン／トロンビン阻害性物質となったもの）は、接触相のタンパク質低下を遅延させ、最終死亡率には影響がみられなかったが、生存期間を延長させた⁸³⁾。しかし敗血症ヒビでの追跡研究では、“Pittsburgh”変異体は凝固障害を悪化させ、これはタンパク質

分解生成物の蓄積によるものと考えられた⁸⁴⁾。従ってこの阻害物質は臨床での敗血症で評価されることはおそくないであろう。

イヌにおける他の研究では、高用量C1-Inhは大腸菌エンドトキシン負荷後の早期肺機能障害を改善することが示され、これにはプレカリクレイン、第XI因子の消費の減弱を伴っていたが、第XII因子の減少は影響を受けなかった⁸⁵⁾。C1-Inhの好ましい効果は敗血症のヒビモデルでも認められており（動物は7日まで観察された）、接触相活性化の減弱のみならず補体活性化の減弱も伴っていた⁸⁶⁾。これらを合わせると、接触相活性化阻害物質の投与は、穏やかではあるが有益な効果を実験的敗血症において有する可能性があることが示されている。

エンドトキシンなどの細菌産生物は*in vitro*で接触相を活性化する^{87, 88)}。従って、接触相タンパク質の細菌およびその産生物との直接的な相互作用は、敗血症時の活性化の誘因になるとみなすことができる。しかし致死敗血症ヒビモデルにおいて接触相の活性化はその経過上、負荷後数時間のように後期ほど明白であった⁷⁹⁾。さらに健常ボランティアにおける低用量エンドトキシン負荷では、エンドトキシン静脈内投与後3～5時間まで接触相活性化は認められなかった⁸⁹⁾。この時間的経過により、観察された活性化は細菌や注入されたエンドトキシンによる直接的な相の活性化に起因するものではなく、他の機構を示すことが示唆される。ヒトにおける実験的エンドトキシン血症時の接触相活性化は常に見られるものではないことに注意すべきである⁴¹⁾。また*in vivo*でエンドトキシンが示す効果の大部分を生じさせるTNF- α の注射投与は、ヒトでは接触相の活性化を誘発しない²⁹⁾。このように、軽度の炎症性（エンドトキシン）刺激後、接触相の活性化が引き起こされるか否かはなお不明である。

6. 結語

凝固系の外因系および内因系経路はもはや個別の存在と考えるべきでなく、TF／第VII因子複合体を介して至適トロンビン産生を付与する統合系と考えるべきである。凝固系における第XII因子や他の接触相タンパク質の役割はあまり明確では