

なく、恐らくフィブリン溶解や炎症にとってより重要なものと考えられる。

TF/第VII因子複合体経路を介する凝固系活性化は、これが全てではないにしても、主要なものとして動物やヒトの敗血症モデルで発生していることは疑いのないことである。より重症の敗血症動物モデルでは、この活性化は最も悪化したDICに関係している。この後者のモデルでは、TF/FVIIaの阻害物質は、負荷後に投与しても死亡率を改善する。これまでの知見の全てが、このような阻害物質の有益効果が凝固に対するものではなく、炎症カスケードに及ぼす効果に関連する可能性を支持していることは驚くべきことである。

このような抗炎症効果の分子的経路を解明することは、それらが敗血症における死亡につながる事象においてキーププロセスであると考えられるた

め、非常に重要である。

敗血症患者における凝固時間の延長と血小板数減少に関する解釈には、それらが凝固系の活性化以外の過程に由来していると考えられるため、臨床的意味に関する研究がさらに必要である。

著明なフィブリノーゲン消費がないトロンビンの中程度の産生増加は、大多数の敗血症患者に見られることから、そのような産生がプロテインCの活性化により実際に有用であると考えられることから、その意味についても批判的評価が必要である。

患者における凝固阻害物質による研究により、ヒト敗血症病因論における凝固系活性化の重要性と生物学的因果関係が明らかにされるべきである。

#### 文 献

- 1) Hack, C.E., Aarden, L.A., Thijs, L.G.: Pole of cytokines in sepsis. *Adv Immunol* **66** : 101 - 195, 1997.
- 2) Vervloet, M.G., Thijs, L.G., Hack, C.E.: Derangements of coagulation and fibrinolysis in critically ill patients with sepsis and septic shock. *Semin Thromb Hemost* **24** : 33 - 44, 1998.
- 3) Griffin, J.H.: Blood coagulation. The thrombin paradox. *Nature* **378** : 337 - 338, 1995.
- 4) de Boer, J.P., Creasy, A.A., Chang, A. et al.: Activation patterns of coagulation and fibrinolysis in baboons following infusion with lethal or sublethal dose of *Escherichia coli* Circ Shock **39** : 59 - 67, 1993.
- 5) de Boer, J.P., Creasey, A.A., Chang, A. et al.: Alpha-2-macroglobulin functions as an inhibitor of fibrinolytic, clotting, and neutrophilic proteinases in sepsis: studies using a baboon model. *Infect Immun* **61** : 5035 - 5043, 1993.
- 6) Semeraro, N., Colucci, M.: Tissue factor in health and disease. *Thromb Haemost* **78** : 759 - 764, 1997.
- 7) Satta, N., Toti, F., Feugeas, O. et al.: Monocyte vesiculation is a possible mechanism for dissemination of membrane-associated procoagulant activities and adhesion molecules after stimulation by lipopolysaccharide. *J Immunol* **153** : 3245 - 3255, 1994.
- 8) Osterub, B.: Tissue factor expression by monocytes: regulation and pathophysiological roles. *Blood Coagul Fibrinolysis* **9** (Suppl 1) : S9 - S14, 1998.
- 9) Saasdi, S., Holzknicht, R.A., Patte, C.P. et al.: Complement-mediated regulation of tissue factor activity in endothelium. *J Exp Med* **182** : 1807 - 1814, 1995.
- 10) Bevilacqua, M.P., Pober, J.S., Majeau, G.R. et al.: Recombinant tumor necrosis factor induces procoagulant activity in cultured human vascular endothelium: characterization and comparison with the actions of interleukin 1. *Proc Natl Acad Sci USA* **83** : 4533 - 4537, 1986.
- 11) Nawroth, P.P., Handley, D.A., Esmon, C.T. et al.: Interleukin 1 induces endothelial cell procoagulant while suppressing cell-surface anticoagulant activity. *Proc Natl Acad Sci USA* **83** : 3460 - 3464, 1986.
- 12) Bevilacqua, M.P., Pober, J.S., Majeau, G.R. et al.: Interleukin 1 (IL-1) induces biosynthesis and cell surface expression of procoagulant activity in human vascular endothelial cells. *J Exp Med* **160** : 618 - 623, 1984.
- 13) Colucci, M., Balconi, G., Lorenzetti, R. et al.: Cultured human endothelial cells generate tissue factor in response to endotoxin. *J Clin Invest* **71** : 1893 - 1896, 1983.
- 14) Moore, K.L., Andreoli, S.P., Esmon, N.L. et al.: Endotoxin enhances tissue factor and suppresses thrombomodulin expression of human vascular endothelium in vitro. *J Clin Invest* **79** : 124 - 130, 1987.
- 15) Sandset, P.M.: Tissue factor pathway inhibitor (TFPI)-an update. *Haemostasis* **26** (Suppl 4) : 154 - 165, 1996.
- 16) Veer van't, C.V., Mann, K.G.: Regulation of tissue factor initiated thrombin generation by the stoichiometric inhibitors tissue factor pathway inhibitor, antithrombin-III, and heparin cofactor-II. *J*

- Biol Chem **272** : 4367 - 4377, 1997.
- 17) Gailani, D., Broze, G.J.J.: Factor XI activation in a revised model of blood coagulation. *Science* **253** : 909 - 912, 1991.
  - 18) Naito, K., Fujikawa, K.: Activation of human blood coagulation factor XI independent of factor XII. Factor XI is activated by thrombin and factor Xia in the presence of negatively charged surfaces. *J Biol Chem* **266** : 7353 - 7358, 1991.
  - 19) Minnema, M.C., Pajkrt, D., Willemin, W.A. et al.: Activation of clotting factor XI without detectable contact activation in experimental human endotoxemia. *Blood* **92** : 3294 - 3301, 1998.
  - 20) Minnema, M.C., ten Cate, H., Hack, C.E.: The role of factor XI in coagulation. A matter of revision. *Semin Thromb Hemost* **25** : 419 - 428, 1999.
  - 21) Bornne von dem, P., Bajzar, L., Meijers, J.C. et al.: Thrombin-mediated activation of factor XI results in a thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor-dependent inhibition of fibrinolysis. *J Clin Invest* **99** : 2323 - 2327, 1997.
  - 22) Borne von dem, P., Meijers, J.C., Bouma, B.N.: Feedback activation of factor XI by thrombin in plasma results in additional formation of thrombin that protects fibrin clots from fibrinolysis. *Blood* **86** : 3035 - 3042, 1995.
  - 23) Minnema, M.C., Friederich, P.W., Levi, M. et al.: Enhancement of rabbit jugular vein thrombolysis by neutralization of factor XI. In vivo evidence for a role of factor XI as an anti-fibrinolytic factor. *J Clin Invest* **101** : 10 - 14, 1998.
  - 24) Uchiba, M., Okajima, K., Murakami, K. et al.: Effects of plasma kallikrein specific inhibitor and active-site blocked factor VIIa on the pulmonary vascular injury induced by endotoxin in rats. *Thromb Haemost* **78** : 1209 - 1214, 1997.
  - 25) Uchiba, M., Okajima, K., Murakami, K. et al.: Effect of nafamostat mesilate on pulmonary vascular injury induced by lipopolysaccharide in rats. *Am J Respir Crit Care Med* **155** : 711 - 718, 1997.
  - 26) Butler, L.D., Layman, N.K., Cain, R.L. et al.: Interleukin 1-induced pathophysiology: induction of cytokines, development of histopathologic changes, and immunopharmacologic intervention. *Clin Immunol Immunopathol* **53** : 400 - 421, 1989.
  - 27) Remick, D.G., Strieter, R.M., Eskandari, M.K. et al.: Role of tumor necrosis factor-alpha in lipopolysaccharide-induced pathologic alterations. *Am J Pathol* **136** : 49 - 60, 1990.
  - 28) Movat, H.Z., Burrowes, C.E., Cybulsky, M.I. et al.: Acute inflammation and a Shwartzman-like reaction induced by interleukin-1 and tumor necrosis factor. Synergistic action of the cytokines in the induction of inflammation and microvascular injury. *Am J Pathol* **129** : 463 - 476, 1987.
  - 29) van der Poll, T., Buller, H.R., ten Cate, H. et al.: Activation of coagulation after administration of tumor necrosis factor to normal subjects. *N Engl J Med* **322** : 1622 - 1627, 1990.
  - 30) van der Poll, T., Levi, M., Buller, H.R. et al.: Fibrinolytic response to tumor necrosis factor in healthy subjects. *J Exp Med* **174** : 729 - 732, 1991.
  - 31) Taylor, F.B.J., He, S.E., Change, A.C. et al.: Infusion of phospholipid vesicles amplifies the local thrombotic response to TNF and anti-protein C into a consumptive response. *Thromb Haemost* **75** : 578 - 584, 1996.
  - 32) Jansen, P.M., Boermeester, M.A., Fischer, E. et al.: Contribution of interleukin-1 to activation of coagulation and fibrinolysis, neutrophil degranulation, and the release of secretory-type phospholipase A2 in sepsis: studies in nonhuman primates after interleukin-1 alpha administration and during lethal bacteremia. *Blood* **86** : 1027 - 1034, 1995.
  - 33) Stouthard, J.M., Levi, M., Hack, C.E. et al.: Interleukin-6 stimulates coagulation, not fibrinolysis, in humans. *Thromb Haemost* **76** : 738 - 742, 1996.
  - 34) Cermak, J., Key, N.S., Bach, R.R. et al.: C-reactive protein induces human peripheral blood monocytes to synthesize tissue factor. *Blood* **82** : 513 - 520, 1993.
  - 35) Baars, J.W., de Boer, J.P., Wagstaff, J. et al.: Interleukin-2 induces activation of coagulation and fibrinolysis: resemblance to the changes seen during experimental endotoxaemia. *Br J Haematol* **82** : 295 - 301, 1992.
  - 36) Lauw, F.N., Dekkers, P.E. Te, V.A. et al.: Interleukin-12 induces sustained activation of multiple host inflammatory mediator systems in chimpanzees. *J Infect Dis* **179** : 646 - 652, 1999.
  - 37) Hack, C.E., Wagstaff, J., Strackv, S.R. et al.: Studies on the contact system of coagulation during therapy with high doses of recombinant IL-2: implications for septic shock. *Thromb Haemost* **65** : 497 - 503, 1991.
  - 38) Biemond, B.J., Levi, M., ten Cate, H. et al.: Complete inhibition of endotoxin-induced coagulation activation in chimpanzees with a monoclonal Fab fragment against factor VII/VIIa. *Thromb Haemost* **73** : 223 - 230, 1995.
  - 39) Levi, M., ten Cate, H., Bauer, K.A. et al.: Inhibition of endotoxin-induced activation of coagulation and fibrinolysis by pentoxifyline or by a monoclonal anti-tissue factor antibody in chimpanzees. *J Clin Invest* **93** : 114 - 20, 1994.
  - 40) van der Poll, T., Levi, M., van Deventer, S.J. et al.: Differential effects of anti-tumor necrosis factor monoclonal antibodies on systemic inflammatory responses in experimental endotoxemia in chimpanzees.

- Blood **83** : 446 - 451, 1994.
- 41) van Deventer, S.J., Buller, H.R., ten Cate, J.W. et al.: Experimental endotoxemia in humans: analysis of cytokine release and coagulation, fibrinolytic, and complement pathways. *Blood* **76** : 2520 - 2526, 1990.
  - 42) Suffredini, A.F., Harpel, P.C., Parrillo, J.E.: Promotion and subsequent inhibition of plasminogen activation after administration of intravenous endotoxin to normal subjects. *N Engl J Med* **320** : 1165 - 1172, 1989.
  - 43) van der Poll, T., Levi, M., Hack, C.E. et al.: Elimination of interleukin 6 attenuates coagulation activation in experimental endotoxemia in chimpanzees. *J Exp Med* **179** : 1253 - 1259, 1994.
  - 44) van der Poll, T., Jansen, P.M., Van Zee, K.J. et al.: Pretreatment with a 55-kDa tumor necrosis factor receptor- immunoglobulin fusion protein attenuates activation of coagulation, but not of fibrinolysis, during lethal bacteremia in baboons. *J Infect Dis* **176** : 296 - 299, 1997.
  - 45) Higure, A., Okamoto, K., Hirata, K. et al.: Macrophages and neutrophils infiltrating into the liver are responsible for tissue factor expression in a rabbit model of acute obstructive cholangitis. *Thromb Haemost* **75** : 791 - 795, 1996.
  - 46) Todoroki, H., Higure, A., Okamoto, K. et al.: Possible role of platelet-activating factor in the in vivo expression of tissue factor in neutrophils. *J Surg Res* **80** : 149 - 155, 1998.
  - 47) Drake, T.A., Cheng, J., Chang, A. et al.: Expression of tissue factor, thrombomodulin, and E-selectin in baboon with lethal *Escherichia coli* sepsis. *Am J Pathol* **142** : 1458 - 1470, 1993.
  - 48) Semeraro, N., Triggiani, R., Montemurro, P. et al.: Enhanced endothelial tissue factor but normal thrombomodulin in endotoxin-treated rabbits. *Thromb Res* **71** : 479 - 486, 1993.
  - 49) Semeraro, N., Triggiani, R., Montemurro, P. et al.: Enhanced endothelial tissue factor but normal thrombomodulin in endotoxin-treated rabbits. *Thromb Res* **71** : 479 - 486, 1993.
  - 50) Mackman, N., Sawdey, M.S., Keeton, M.R. et al.: Murine tissue factor gene expression in vivo. Tissue and cell specificity and regulation by lipopolysaccharide. *Am J Pathol* **143** : 76 - 84, 1993.
  - 51) Erlich, J., Fearn, C., Mathison, J. et al.: Lipopolysaccharide induction of tissue factor expression in rabbits. *Infect Immun* **67** : 2540 - 2546, 1999.
  - 52) Hara, S., Asada, Y., Hatakeyama, K. et al.: Expression of tissue factor and tissue factor pathway inhibitor in rats lungs with lipopolysaccharide-induced disseminated intravascular coagulation. *Lab Invest* **77** : 581 - 589, 1997.
  - 53) Nieuwland, R., Berckmans, R.J., McGregor, S. et al.: Cellular origin and procoagulant properties of microparticles in meningococcal sepsis. *Blood* **95** : 930 - 935, 2000.
  - 54) Dackiw, A.P., McGilvray, I.D., Woodside, M. et al.: Prevention of endotoxin-induced mortality by antitissue factor immunization. *Arch Surg* **131** : 1273 - 1278, 1996.
  - 55) Toylor, F.B.J., Chang, A., Ruf, W. et al.: Lethal *E. coli* septic shock is prevented by blocking tissue factor with monoclonal antibody. *Crit Shock* **33** : 127 - 134, 1991.
  - 56) Taylor, F.B., Chang, A.C., Peer, G. et al.: Active site inhibited factor VIIa (DEGR VIIa) attenuates the coagulant and interleukin-6 and -8, but not tumor necrosis factor, responses of the baboon to LD100 *Escherichia coli*. *Blood* **91** : 1609 - 1615, 1998.
  - 57) Creasey, A.A., Chang, A.C., Feigen, L. et al.: Tissue factor pathway tissue factor pathway inhibitor reduces mortality from *Escherichia coli* septic shock. *J Clin Invest* **91** : 2850 - 2856, 1993.
  - 58) Carr, C., Bild, G.S., Chang, A.C. et al.: Recombinant *E. coli*-derived tissue factor pathway inhibitor reduces coagulopathic and lethal effects in the baboon gram-negative model of septic shock. *Crit Shock* **44** : 126 - 137, 1994.
  - 59) Randolph, M.M., White, G.L., Kosanke, S.D. et al.: Attenuation of tissue thrombosis and hemorrhage by ala-TFPI does not account for its protection against *E. coli* a comparative study of treated and untreated non-surviving baboons challenged with LD100 *E. coli*. *Thromb Haemost* **79** : 1048 - 1053, 1998.
  - 60) Bregengard, C., Nordfang, O., Wildgoose, P. et al.: The effect of two-domain tissue factor pathway inhibitor on endotoxin-induced disseminated intravascular coagulation in rabbits. *Blood Coagul Fibrinolysis* **4** : 499 - 706, 1993.
  - 61) Elsayed, Y.A., Nakagawa, K., Kamikubo, Y.I. et al.: Effects of recombinant human tissue factor pathway inhibitor on thrombus formation and its in vivo distribution in a rat DIC model. *Am J Clin Pathol* **106** : 574 - 583, 1996.
  - 62) Warr, T.A., Rao, L.V., Rapaport, S.I.: Disseminated intravascular coagulation in rabbits induced by administration of endotoxin or tissue factor: effect of anti-tissue factor antibodies and measurement of plasma extrinsic pathway inhibitor activity. *Blood* **75** : 1481 - 1489, 1990.
  - 63) Camerota, A.J., Creasey, A.A., Patha, V. et al.: Delayed treatment with recombinant human tissue factor pathway inhibitor improves survival in rabbits with gram-negative peritonitis. *J Infect Dis* **177** : 668 - 676, 1998.
  - 64) Taylor, F.B.J., Chang, A., Esmon, C.T. et al.: Antithro-

- mbin-III prevents the lethal effects of *Escherichia coli* infusion in baboons. *Circ Shock* **26** : 227 - 235, 1988.
- 65) Taylor, F.B.J., Emerson, T.E.J., Jordan, R. et al.: Antithrombin-III prevents the lethal effects of *Escherichia coli* infusion in baboons. *Circ Shock* **26** : 227 - 235, 1988.
  - 66) Bleeker, W.K., Teeling, J.L., Verhoeven, A.J. et al.: Vasoactive side effects of intravenous immunoglobulin preparations in a rat model and their treatment with recombinant platelet-activating factor acetylhydrolase. *Blood* **95** : 1856 - 1861, 2000.
  - 67) Camerer, E., Huang, W., Coughlin, S.R.: Tissue factor- and factor X-dependent activation of protease-activated receptor 2 by factor VIIa. *Proc Natl Acad Sci USA* **97** : 5255 - 5260, 2000.
  - 68) Petersen, L.C., Thastrup, O., Hagel, G. et al.: Exclusion of known protease-activated receptors in factor VIIa-induced signal transduction. *Thromb Haemost* **83** : 571 - 576, 2000.
  - 69) Cunningham, M.A., Romas, P., Hutchinson, P. et al.: Tissue factor and factor VIIa receptor / ligand interactions induce proinflammatory effects in macrophages. *Blood* **94** : 3413 - 3420, 1999.
  - 70) Taylor, F.B.J., Chang, A.C., Peer, G.T. et al.: DEGR-factor Xa blocks disseminated intravascular coagulation initiated by *Escherichia coli* without preventing shock or organ damage. *Blood* **78** : 364 - 368, 1991.
  - 71) Harada, N., Okajima, K., Kushimoto, S. et al.: Anti-thrombin reduces ischemia / reperfusion injury of rat liver by increasing the hepatic level of prostacyclin. *Blood* **93** : 157 - 164, 1999.
  - 72) Taylor, F.B.J., Stearns-Kurosawa, D.J., Kurosawa, S. et al.: The endothelial cell protein C receptor aids in host defense against *Escherichia coli* sepsis. *Blood* **95** : 1680 - 1686, 2000.
  - 73) Levi, M., Hack, C.E., de Boer, J.P. et al.: Reduction of contact activation related fibrinolytic activity in factor XII deficient patients. Further evidence for the role of the contact system in fibrinolysis in vivo. *J Clin Invest* **88** : 1155 - 1160, 1991.
  - 74) Ichinose, M., Barnes, P.J.: Bradykinin-induced airway microvascular leakage and bronchoconstriction are mediated via a bradykinin B2 receptor. *Am Rev Respir Dis* **142** : 1104 - 1107, 1990.
  - 75) Wachtfogel, Y.T., Pixley, R.A., Kucich, U. et al.: Purified plasma factor XIIa aggregates human neutrophils and causes degranulation. *Blood* **67** : 1731 - 1737, 1986.
  - 76) Wachtfogel, Y.T., Kucich, U., James, H.L. et al.: Human plasma kallikrein releases neutrophil elastase during blood coagulation. *J Clin Invest* **72** : 1672 - 1677, 1983.
  - 77) Schapira, M., Despland, E., Scott, C.F. et al.: Purified human plasma kallikrein aggregates human blood neutrophils. *J Clin Invest* **69** : 1199 - 1202, 1982.
  - 78) Nies, A.S., Forsyth, R.P., Williams, H.E. et al.: Contribution of kinins to endotoxin shock in unanesthetized Rhesus monkeys. *Circ Res* **22** : 155 - 164, 1968.
  - 79) Pixley, R.A., De La, C.R., Page, J.D. et al.: Activation of the contact system in lethal hypotensive bacteremia in a baboon model. *Am J Pathol* **140** : 897 - 906, 1992.
  - 80) Pixley, R.A., De La Cadena, R., Page, J.D. et al.: The contact system contributes to hypotension but not disseminated intravascular coagulation in lethal bacteremia. In vivo use of a monoclonal anti-factor XII antibody to block contact activation in baboons. *J Clin Invest* **91** : 61 - 68, 1993.
  - 81) Jansen, P.M., Pixley, R.A., Brouwer, M. et al.: Inhibition of factor XII in septic baboons attenuates the activation of complement and fibrinolytic systems and reduces the release of interleukin-6 and neutrophil elastase. *Blood* **87** : 2337 - 2344, 1996.
  - 82) Berg, T., Schlichting, E., Ishida, H. et al.: Kinin antagonist does not protect against the hypotensive response to endotoxin, anaphylaxis or acute pancreatitis. *J Pharmacol Exp Ther* **251** : 731 - 734, 1989.
  - 83) Colman, R.W., Flores, D.N., De La Cadena, R.A. et al.: Recombinant alpha 1-antitrypsin Pittsburgh attenuates experimental gram-negative septicemia. *Am J Pathol* **130** : 418 - 426, 1988.
  - 84) Harper, P.L., Taylor, F.B., De La, C.R. et al.: Recombinant antitrypsin Pittsburgh undergoes proteolytic cleavage during *E. coli* sepsis and fails to prevent the associated coagulopathy in a primate model. *Thromb Haemost* **80** : 816 - 821, 1998.
  - 85) Guerrero, R., Velasco, F., Rodriguez, M. et al.: Endotoxin-induced pulmonary dysfunction is prevented by C1-esterase inhibitor. *J Clin Invest* **91** : 2754 - 2760, 1993.
  - 86) Jansen, P.M., Eisele, B., de, J.I. et al.: Effect of C1 inhibitor on inflammatory and physiologic response patterns in primates suffering from lethal septic shock. *J Immunol* **160** : 475 - 484, 1998.
  - 87) Morrison, D.C., Cochrane, C.G.: Direct evidence for Hageman factor (factor XII) activation by bacterial lipopolysaccharides (endotoxins). *J Exp Med* **140** : 797 - 811, 1974.
  - 88) Herwald, H., Morgelin, M., Olsen, A. et al.: Activation of the contact-phase system on bacterial surfaces: a clue to serious complications in infectious diseases. *Nat Med* **4** : 298 - 302, 1998.
  - 89) De La, C.R., Suffredini, A.F., Page, J.D. et al.: Activation of the kallikrein-kinin system after endotoxin administration to normal human volunteers. *Blood* **81** : 3313 - 3317, 1993.

## 敗血症と生体反応(16)

遠藤 重厚\*  
Shigeatsu Endo

佐藤 信博\*  
Nobuhiro Sato

八重樫 泰法\*  
Yasunori Yaegashi

宮田 美智子\*  
Michiko Miyata

伊藤 頼子\*  
Yoriko Ito

北村 道彦\*\*  
Michihiko Kitamura

### 要 旨

敗血症のように生体に多大な侵襲が加わると様々な細胞が活性化され、全身性に炎症反応としてさまざまな液性因子が産生され、微小循環障害をもたらす、これが細胞、組織障害、さらには多臓器障害を引き起こす。多臓器不全は医療の進歩にも関わらず治療に難渋する病態である。本項では、敗血症性多臓器不全の病態とそれに関与する液性因子の働きについて述べる。

**Key words :** 多臓器不全, 液性因子, サイトカイン

## 16. 敗血症と多臓器不全

### 1. はじめに

現在、多臓器不全症候群 (multiple organ dysfunction syndrome; MODS) と呼ばれている多系統臓器不全の臨床的症候群は、重篤疾患患者の治療に関わる医師が直面する主要な治療的課題として過去数十年間にわたり浮上してきている。本症候群の発生率は集中治療室に入室した重篤疾患患者の15%に達する。複雑な免疫病態生理学的病態、本来であれば生存が期待される患者に及ぼす顕著にネガティブな影響、非常に大きな社会経済学的重要性については一般に同意が得られているものの、その正確な定義については実際の、概念的な面において見解に相違が認められている<sup>1)</sup>。

集中治療における漸進にも関わらず、MODSの死亡率は相変わらず50%を超えている。矛盾す

ることではあるが、MODSは医療の進歩による疾患とみなされている。MODSはTilneyら<sup>2)</sup>により1973年に初めて認識されたが、一つの疾患として受け入れられるまでには更に時間を要した。

しかしMODSの発症は、最大限の治療にも関わらず死までのプロセスが単に長引く以外のことも意味している。MODSは遺伝子的、細胞的、臓器特異的レベルでの急性炎症反応に対する不適切な宿主制御により、重篤または反復的な組織損傷が最大限に達することであるとみなされている。これには、特にMODSにおいて生じる敗血症に伴う全身性炎症反応症候群 (systemic inflammatory response syndrome; SIRS) において全般的内皮細胞損傷を伴う。しかし様々な非感染性障害 (外傷、膵炎、虚血-再灌流臓器損傷) もMODSを誘発し、敗血症関連臓器機能障害に関与する経路を活性化する。さらにMODSの死亡率は障害された臓器の数により直接的に異なる

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

が、これらの相互作用が炎症メディエータの動態を変化させることで炎症反応を調整する方法についてはあまりよく理解されていない<sup>3)</sup>。

## 2. 感染症に対する正常応答から敗血症性MODSのパターンまで

重度感染症に対する正常応答には、心拍数、心拍出量、酸素消費量の増加など一連の心血管系変化が含まれる<sup>4)</sup>。神経内分泌学的応答にはカテコールアミン、コルチゾール、抗利尿性ホルモン、成長ホルモン、グルカゴン、インシュリンの放出増加が挙げられる。凝固、補体カスケードおよび線溶系は活性化する。これらの変化による影響のピークは初回感染から2～5日以内に生じ、7～10日までにかけて低下する。輸液必要量の漸進的減少、脈拍と体温の下方傾向とそれに続く自発的利尿から、併発症を伴わずに臨床経過の改善が得られる。この最終的応答がみられない場合は併発症に注意すべきである。実際、数例の患者では初回感染後に頻脈、頻呼吸、発熱、全般的代謝亢進状態が維持される<sup>5)</sup>。

このパターンは広範囲な感染症または蘇生が遅延および／または不適切である場合にしばしば観察される。時にこの炎症反応は、24～72時間以内に発症する現象である急性肺傷害 (acute lung injury: ALI) に関連している。ALIの重症型であるacute respiratory distress syndrome (ARDS)の死亡率は50%以上であるともいわれている<sup>6)</sup>。低酸素血症による死亡は稀である。最も頻出な死亡原因は、通常院内肺炎に関連している進行性MODSである<sup>7)</sup>。ALI発症後には二つの一般的な臓器機能不全の臨床パターンがみられる。最初の臨床経過は最も頻出にみられるものである。肺は主要な機能障害臓器のままであるが、時に錯乱、血液学的異常、消化管出血を含む特徴的な重度敗血症に対するいくつかの臨床的、生体学的徴候を併発した敗血症の徴候を伴う臨床相が数週間続く。しかし、肝、腎機能の急激な増悪は死の直前まで生じない。死亡は初回感染後から14～21日以内に最も頻出する<sup>8)</sup>。

二番目の一般的な臨床パターンは遅延または不適切な蘇生および／または感染症の治療後にみられる。MODSの徴候は、ALI、腎・肝機能障害を

含む初回感染後すぐに認められる現象である。患者は死に至る多臓器機能が更に増悪する前に再び比較的安定した状態に入る。死亡率は高いものの、特に多臓器が関与している場合、患者はこれらの臨床的病態のいずれか一つから回復することができる<sup>9)</sup>。患者が回復するかどうかは、疾患の重篤度、基礎疾患、その後の損傷と併発症の数および重篤度に応じて異なる。

## 3. 生理的および代謝的反応

最初に敗血症に生じる主要な代謝的变化は酸素要求量と消費量の増加である。これは酸素供給量の増加により対処されるか、または嫌気性状態に陥ると思われる。心拍出量は増加し、同時に敗血症関連メディエータの放出により誘発される全身血管抵抗 (SVR) の低下が生じる。敗血症の初期段階では、酸素供給が維持されている場合、動脈と混合静脈の酸素含量の差は正常である。しかしMODSが生じると、SVRはさらに低下する。その後、細胞酸素利用度が低下すると思われる細胞レベルでの酸素要求量が増加することから、これは危険な状態である<sup>5)</sup>。

正常な状態では、血流は組織の代謝的必要性に応じて分布される。これは細動脈と毛細血管の両者により制御される。微小循環では、組織は赤血球血流の増加により利用可能以上の酸素の摂取が可能となる。敗血症誘発性の微小血管損傷は組織の酸素化の正常な代謝的制御を障害すると考えられている。敗血症において組織は限界まで酸素を摂取しようとするため、全身的酸素供給量が異常に高値で全身的酸素摂取量が低値な病理学的供給に依存した全身的酸素取込みが誘発される<sup>10)</sup>。や冠循環<sup>11)</sup> など、各臓器におけるこの酸素摂取障害を明らかにする実験が行われている。

敗血症においても存在する酸素摂取量低下に対する微小循環的相関性から、腸管、横隔膜、骨格筋における毛管作用は低下する。Lamら<sup>12)</sup> は血管内顕微鏡を用いて、ラット敗血症において筋肉と腸粘膜における血流停止に伴い、毛細血管血流と毛細血管数の空間的異質性がともに増加することを示した。

敗血症では組織の毛管作用が低下するというコンセンサスが増加してきているが、既存データで

は組織における酸素必要性の増加に対する毛細血管のリクルートメントの代謝的連結が同時に損失するかどうかについては一致が得られていない。これは早期敗血症では低下し、一方、後期敗血症では消失し反応性充血が生じると思われる。機能的毛細血管の損失に加えて、敗血症はまた広範囲な浮腫と臓器機能障害を誘発する内皮透過性の増加によっても特徴付けられる。

敗血症における微小循環血流異常に対する考えられる原因として、異常な白血球-内皮細胞相互作用が挙げられる。つまり、以下の理由から白血球は敗血症における組織損傷の原因として最有力候補である可能性がある。

- ・敗血症における低流量の毛細血管は、虚血-再灌流損傷を誘発する可能性のある白血球による間欠的閉塞により特徴付けられると思われる。
- ・敗血症併発時における白血球変形能の低下は毛細血管の施栓 (plugging) を誘発する可能性がある。
- ・白血球/内皮細胞相互作用の増加により誘発される好中球接着分子のアップレギュレーションは後毛細管細静脈損傷を誘発し、流出抵抗を増加させ毛細血管赤血球ずり速度の低下を誘発する可能性がある。

つまり、多数のメディエータと炎症細胞が内皮細胞、血管平滑筋細胞と相互に作用して血流に干渉し、最終的に微小血管機能障害を誘発する。微小血管の調節障害による灌流低下が敗血症の主要な原因か、単に敗血症誘発性MODSにおける関連する現象であるのかは、敗血症の原因における核心となる疑問である。細胞レベルでの酸素摂取の低下もまた重要な役割を果たしている可能性がある」と主張している報告も散見される<sup>13)</sup>。31P-NMRスペクトロスコピーを用いて、敗血症ラットにおける細胞生体エネルギーの評価を行った研究では、骨格筋、脳、心筋中に適切なレベルのATP (アデノシン三リン酸) とクレアチニンリン酸が認められた<sup>14)</sup>。グラム陰性菌血症と心筋抑制を有するイヌにおいて、NMRスペクトロスコピーにより推定した高エネ

ルギーリン酸の細胞内レベルは、カテコールアミンによる心筋仕事量が増加した期間においてさえ適切な値を示した<sup>15)</sup>。これらの研究から、細胞の低酸素状態とそれに関連した高エネルギーリン酸の蓄積量の低下は敗血症性ショックにおける病的異常に対する適切な説明ではないことが示唆された。

敗血症誘発性MODSでは、糖質代謝に顕著な変化が生じる。飢餓状態と比較して、エネルギー源としてのグルコース使用の減少を反映し、呼吸商は通常0.8~0.85を示す。これは糖新生 (Goriサイクル) を介したグルコース形成において非常に重要な二つの基質であるアラニン、乳酸への変換に利用されるピルビン酸の量を増加するピルビン酸デヒドロゲナーゼ活性の低下に関連している。末梢部から高負荷量のアミノ酸が肝臓に供給された場合にも糖新生は刺激される。一般的な最終的結末は、外因性インシュリンに比較的非反応性な高血糖症である。灌流障害がなければ、乳酸値はピルビン酸と直接比例して増加すると思われる<sup>5)</sup>。

蛋白質代謝もまた敗血症性MODSにおいて影響を受ける。骨格筋、結合組織、腸管腔臓器に由来するアミノ酸が重要なエネルギー源となり、オートカニバリズムと呼ばれる除脂肪体重の顕著な損失が生じる<sup>16)</sup>。アミノ酸の分解により尿素が増加する。肝蛋白合成の増加 (急性相反応) がみられるが、この生成量はアミノ酸の分解とは一致せず、1日当たり15~20gの窒素量に達すると思われる。蛋白質の体外投与は合成を改善することができるが、臓器機能障害が増悪している場合、肝合成は減少し有害なアウトカムに結びつく。

飢餓状態と比較して本状況下では、ケトン体の血中濃度は迅速に低下し低濃度で維持される。初めに脂肪分解が刺激され、脂肪生成は減少する。肝脂肪生成はMODSの進展において、トリグリセリドのクリアランスと超低密度リポ蛋白放出を伴い増加する<sup>5)</sup>。

#### 4. 炎症反応

MODSを誘発する臨床的、生理学的変化に関与する炎症反応については良く理解されてきて



いるが、この複雑なパズルのピースがすべて完全に配置されている訳ではない。敗血症を刺激する最初の障害は感染症であるが、これは外傷、熱傷、肺炎を含む他の各種原因からも生じる。微生物の種類により反応に差はみられない。残念なことに、感染の原因が分かった場合でも、治療による臨床的改善は確実ではない。刺激物質が何であれ、複数のメディエータ系とそれらの副生物の相互作用と影響が重要である場合、MODSの原因は制御不能な敗血症であると思われる。

生体の損傷に起因する炎症反応に関わるサイトカインは炎症の進展に併せて、一時的に産生量が増加し、シグナルを他の細胞に伝えたあとに、その産生量は低下する。サイトカインの産生は正および負の調節を受けており、通常は異常な産生は抑制されている。しかし、この調節が崩れ、異常量のサイトカインが産生されると、不可逆性の病態を惹起する。すなわちARDS, disseminated intravascular coagulation (DIC), 敗血症などで、そしてその最も重篤な病態が敗血症性ショックであり、たびたび多臓器不全症に進行し、死に至ることも度々みられる。この過程においてサイトカインの刺激によりphospholipase A<sub>2</sub>, エイコサノイド, 一酸化窒素 (NO), endothelin-1, thrombomodulin, 好中球エラスターゼ, 接着分子などが産生され、これらが間接的あるいは直接的に細胞, 組織障害をもたらす複雑な病態が形成される。サイトカインがSIRSにおいて重要な液性因子として作用していることについて我々はこれまで多くの報告をしてきた<sup>17~23)</sup>。endothelin-1には血管収縮作用, NOには血管弛緩作用という相反する作用があり、血管の緊張度を生理的に調節、しかもendothelin-1によりNO生成は促進され、NOはendothelin-1生成を抑制するともいわれている。このように相反する作用を有するendothelin-1とNOが敗血症性ショック時にはほぼ同時に高値となることは、非常に興味深いことである。

これらの産生刺激因子としては、サイトカイン、特にTNF- $\alpha$ の関与が強く示唆された。一方、TNFやIL-1は、多くの細胞でphospholipase A<sub>2</sub>の活性を亢進させ、エイコサノイドの遊離を増加させプロスタグランジンの産生を刺激する。血管内皮細胞では、PGF<sub>1 $\alpha$</sub> の産生が増加する。そして、

PGF<sub>1 $\alpha$</sub> は強力な血管拡張作用をもち、充血やさらには血圧低下の原因の一つと考えられている。TXA<sub>2</sub>には血管収縮作用を有している。

endothelin-1とNOとの関係と同様に、相反する作用を有する6-keto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub> とTXB<sub>2</sub>が敗血症性ショック時にはほぼ同時に上昇する。

6-keto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub> , TXB<sub>2</sub>もNO, endothelin-1と同様に、重症であるほど高値を示し、やはり血管障害の強さを示すものかもしれない。

炎症性サイトカインのなかでも、特にTNF- $\alpha$ が直接的あるいは様々な物質を介して間接的に血管内皮障害を惹起している可能性が示唆された。

最近、interleukin 18 (IL-18) が同定された<sup>24)</sup>。IL-18は肝不全、あるいはエンドトキシンショック時の肝機能障害に関与しているとも言われている。SIRSから多臓器不全にいたる過程でIL-18が上昇していることも確認されている<sup>25)</sup>。多臓器不全発症にはこのような新しいサイトカインの関与についてもよく検討する必要があるであろう。

Pinskyら<sup>26)</sup>は53例のショック患者(35例が敗血症性、18例が非敗血症性エピソード)における低血圧発症後48時間以内における炎症性サイトカインを測定している。死亡率は敗血症性患者(41%対17%)、MODS発症患者(29%対6%)でより高かった。さらに重要なことに、MODS患者または死亡患者では腫瘍壊死因子(TNF)とインターロイキン-6 (IL-6) 値は両方とも上昇しており、敗血症の有無に関わらず経時的減少がみられないことから、MODS患者における持続的な炎症反応が示唆された。

これらの系の継続的な刺激を誘発しMODSを生じさせるメカニズムについて、詳細な研究が引き続き行われている。最近、炎症反応を刺激する可能性のある発生源として腸管に注目が集まっており、これは“MODSの稼働源”とも呼ばれている。細菌はリンパ管および血流を介して胃腸壁を通過することが分かっており、この状態はトランスロケーションとして知られている。この状態がヒトにおいて臨床的に重要かどうかは明らかではないが、MODSにおける後期感染性併発症は耐性グラム陰性桿菌によるものであり、これらは全て重篤疾患患者の腸管に通常認められる細菌である。トランスロケーションにより血流およびリン



パ管内に細菌、抗原またはエンドトキシンが制御不能に持続的に放出され、患者は炎症メディエータの刺激に反応する。体内の固定マクロファージ群の70%に相当し、蛋白質合成など肝細胞機能の調節能を有するクッパー細胞を介して、肝臓はこの刺激に関与する。さらに腸管の免疫機能が低下すると、メディエータ放出源としてさらに作用する可能性がある。しかし、この現象がヒトにおいても起こりうるかについては不明である。

敗血症のハイパーダイナミック状態から臨床的に定義されるMODSへの移行は明瞭な形では生じない。これは、これら二つの存在が組織機能障害の漸進的変化および／または低酸素化の連続状態を示していることによると思われる。メディエータ反応と多数の臓器の内皮細胞または他の細胞構造に及ぼすその影響は敗血症の比較的初期に生じると思われるが、我々はこれら初期の変化を測定するための技能を有していない。臨床的に、この移行期には混合静脈酸素飽和度の上昇がしばしば認められる。この移行は臓器機能には有害であり、おそらく炎症反応自身により生じる細胞代謝

の調節不全を示しているという認識が高まってきている。この臓器機能の継続的増悪についての死亡統計では、死亡率は敗血症患者における40～60%から進行性MODS患者では90～100%まで増加している。

このような移行が生じていると一旦認識された場合、認識されていない灌流障害、制御不能な敗血症性病巣、炎症（肺炎）、損傷組織に対する持続的な病原を取り除く必要がある。

## 5. おわりに

敗血症誘発性多臓器不全は炎症メディエータの過剰な生成と、結果として代謝的無秩序な炎症反応の過剰活性化により特徴付けられると思われる。生体防御機序は対処不能となり、もはや炎症反応をコントロールすることができない。この非コントロール下での炎症反応の主要な結果が臓器傷害、循環性ショック、およびMODSの発症であり、初期の感染がコントロールされた場合であってさえ高い死亡率が誘発されるのである。

## 文 献

- 1) Matuschak, G.M., Lechner, A.J.: Hepatic regulation of systemic host defence and its derangement in multiple organ dysfunction and failure. In: Matuschak GM, ed. MSOF. New York: Marcel Dekker, 1993 : pp.1 - 33.
- 2) Tilney, N.L., Bailey, G.L., Morgan, A.P.: Sequential system failure after rupture of AAA: an unsolved problem in postoperative care. *Ann Surg* **178** : 117 - 122, 1973.
- 3) Bone, R.C.: Sepsis and multiple organ failure: consensus and controversy. In: Lamy M, Thijs LG, eds. *Mediators of Sepsis*. Berlin: Springer Verlag, 1992 : pp.3 - 12.
- 4) Cerra, F.B., Siegel, J.H., Border, J.R. et al.: Correlations between metabolic and cardiopulmonary measurements in patients after trauma, general surgery and sepsis. *J Trauma* **19** : 621 - 629, 1979.
- 5) Beal, A.L., Cerra, F.B.: Multiple organ failure syndrome in the 1990s. *JAMA* **271** : 226 - 233, 1994.
- 6) Petty, T.L.: ARDS, refinement of concepts and definition. *Am Rev Respir Dis* **138** : 724, 1979.
- 7) Meakins, J.L.: Etiology of multiple organ failure. *J Trauma* **30** : S165 - S168, 1990.
- 8) Barton, R., Cerra, F.B.: The hypermetabolism in multiple organ failure syndrome. *Chest* **96** : 1152 - 1160, 1989.
- 9) Knaus, W.A., Draper, E.A., Wanger, D.P. et al.: Prognosis in acute organ system failure. *Ann Surg* **202** : 685 - 693, 1985.
- 10) Nelson, D.P., King, C.E., Dodd, S.L.: Systemic and intestinal limits of oxygen extraction in a dog during endotoxemia. *J Appl Physiol* **63** : 387 - 394, 1987.
- 11) Bloos, F., Morisakli, H., Neal, A. et al.: Is the circulatory reserve supporting tissue oxygen availability depressed in normotensive hyperdynamic sepsis? *Crit Care Med* **20** : S55, 1992.
- 12) Lam, C., Tyml Martin, C.M.: The skeletal muscle microcirculation in sepsis. *Microvasc Res* **66** : 501,

- 1985.
- 13) Dong, Y.L., Sheng, C.Y., Herndon, D.N.: Metabolic abnormalities of mitochondrial function in postburn multiple organ failure. *Burns* **18** : 283 - 286, 1992.
  - 14) Hotchkiss, R.S., Karl, I.E.: Reevaluation of the role of cellular hypoxia and bioenergetic failure in sepsis. *JAMA* **267** : 1503 - 1510, 1992.
  - 15) Solomon, M.A., Alexander, H.R., Balaban, R.S.: Myocardial cytosolic phosphorylation potential in a canine sepsis model. *Clin Res* **39** : 164A, 1991.
  - 16) Cerra, F.B., Siegel, J.H., Coleman, B. et al.: Septic autocannibalism, a failure of exogenous nutritional support. *Ann Surg* **192** : 570 - 580, 1980.
  - 17) Endo, S., Inada, K., Inoue, Y. et al.: Endotoxin and cytokines in patients with gastrointestinal tract perforation. *Med Inflamm* **1** : 45 - 48, 1992.
  - 18) Endo, S., Inada, K., Inoue, Y. et al.: Two types of septic shock classified by the plasma levels of cytokines and endotoxin. *Circ Shock* **38** : 264 - 274, 1992.
  - 19) 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.
  - 20) Endo, S., Inada, K., Nakae, H. et al.: Blood levels of endothelin-1 and thrombomodulin in patients with disseminated intravascular coagulation and sepsis. *Res Commun Molec Pathol Pharmacol* **90** : 277 - 288, 1995.
  - 21) Endo, S., Inada, K., Ceska, M. et al.: Plasma interleukin 8 and polymorphonuclear leukocyte elastase concentrations in patients with septic shock. *J Inflamm* **45** : 136 - 142, 1995.
  - 22) Nakae, H., Endo, S., Inada, K. et al.: Nitrite/nitrate (NOx) and type II phospholipase A2, leukotriene B4, and platelet-activating factor levels in patients with septic shock. *Res Commun Molec Pathol Pharmacol* **92** : 131 - 139, 1996.
  - 23) Endo, S., Inada, K., Kasai, T. et al.: Levels of soluble adhesion molecules and cytokines in patients with septic multiple organ failure. *J Inflamm* **46** : 212 - 219, 1996.
  - 24) Okamura, K., Tsutsui, H., Komatsu, T. et al.: Cloning of a new cytokine that induces IFN- $\gamma$  production by T cells. *Nature* **378** : 8891, 1995.
  - 25) Endo, S., Inada, K., Yamada, Y. et al.: Interleukin 18 levels in patients with sepsis. *J Medicine* **31** : 15 - 20, 2000.
  - 26) Pinky, M.R., Vincent, J-L., Deviere, J. et al.: Serum cytokine levels in human septic shock. *Chest* **103** : 565 - 575, 1993.
-

## 症 例

### ヘルペス脳炎にエンドトキシンショックを合併した症例の プロカルチトニン値の検討

遠藤重厚<sup>1)</sup>, 寺山靖夫<sup>2)</sup>, 今井聡子<sup>1)</sup>, 伊藤頼子<sup>1)</sup>, 宮田美智子<sup>1)</sup>,  
高橋 学<sup>1)</sup>, 井上裕久<sup>1)</sup>, 森 潔史<sup>1)</sup>, 菅 康德<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 岩手医科大学医学部, 救急医学講座

<sup>2)</sup> 岩手医科大学医学部, 神経内科学講座

### Examination of procalcitonin levels in the patient with herpesencephalitis complicated with endotoxin shock

Shigeatsu ENDO<sup>1)</sup>, Yasuo TERAYAMA<sup>2)</sup>, Satoko IMAI<sup>1)</sup>, Yoriko ITO<sup>1)</sup>,  
Michiko MIYATA<sup>1)</sup>, Gaku TAKAHASHI<sup>1)</sup>, Hirohisa INOUE<sup>1)</sup>,  
Kiyoshi MORI<sup>1)</sup> and Yasunori SUGA<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> Department of Critical Care Medicine, School of Medicine,  
Iwate Medical University, Morioka, Japan

<sup>2)</sup> Department of Neurology, School of Medicine,  
Iwate Medical University, Morioka, Japan

(Received on November 24, 2004 & Accepted on December 2, 2004)

#### Abstract

The patient, a 26-year-old male, was brought in as a casualty due to a traffic accident. He had been treated for viral inflammation of the upper airways over the last 4 days. His consciousness level was JCS 3. Treatment was given with a diagnosis of herpes encephalitis. On the 7th day of illness, he was found to be febrile, at which time his leukocyte count and

CRP level were within the normal level but his procalcitonin and endotoxin levels exceeded the normal ranges. *Pseudomonas aeruginosa* was detected in the sputum. It was indicated that the procalcitonin level is useful in diagnosis of a bacterial infection, differentiating it from that of viral origin.

**Key words :** herpes encephalitis, procalcitonin, endotoxin shock, cytokine

#### I. はじめに

procalcitonin (以下PCTと略す) はカルチトニンの前駆体で, これまでとは全く異なる特性を持った新しいタイプの炎症のパラメーターとして報告された<sup>1)</sup>. PCTは細菌感染症のほか, 敗血症や敗血症性多臓器不全などで誘導されるが<sup>2-4)</sup>, ウイルス性の炎症や自己免疫疾患, 腫瘍, 周術期などでは殆ど誘導されないと報告されている<sup>5-7)</sup>.

今回, われわれはヘルペス脳炎の治療中にグラム陰性菌感染症を合併しエンドトキシン

ショックに陥った症例において, 血中の各種液性因子を測定しウイルス感染症と細菌感染症の鑑別にPCTを測定することが有用であった症例を経験したので報告する.

#### II. 症 例

患 者: 26歳の男性

既往歴: 特記すべきものなし

現病歴: 3月11日18時30分頃, 乗用車運転中に前の乗用車に追突して前頭部を打撲した. 近医に搬入されたが不穏状態が強くなり, 同

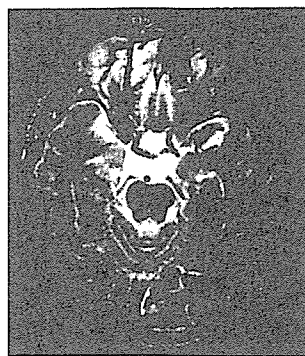


図1. 来院時の頭部MRI

日19時15分当センターに紹介となった。

初診時現症：来院時の血圧は136/84mmHg, 心拍数86/min, 呼吸数14回/minで, 意識レベルはJCS 3であった。前額部に軽度の擦過傷を認めた。

入院時検査所見：単純レントゲン写真, CT上では異常所見を認めなかったが, MRIにて両側側頭葉内面, 海馬近傍にT2WIで淡い陰影を認めた(図1)。血液生化学的検査は表1に示すが特に異常は認めなかった。

入院後経過：四肢をばたばた動かすような動作を繰り返し安静が保てないため, 鎮静目的で静脈麻酔剤の持続静脈投与を行うとともにベンチレーター管理とした。当センターに搬入された2時間後に4日前よりウイルス性上気道炎の診断で他医にて加療中との情報が入った。受傷前日(3月10日)の血液生化学的検査では特に異常を認めず, 白血球数 $3,500/\text{mm}^3$ , CRP $0.1\text{mg/dl}$ であり, 細菌感染症を示唆する所見も認められなかった。髄膜脳炎を疑い直ちに髄液を採取したところ, 初圧 $240\text{mmH}_2\text{O}$ , 髄液の色調はキサントクロミー, 細胞数 $589/\text{mm}^3$ (単核球565, 多核球24), 蛋白 $234\text{mg/dl}$ , 糖 $56\text{mg/dl}$ であり, ウイルス性脳炎が強く疑われた。ウイルス性脳炎による不穏状態と判断し抗ウイルス剤と細菌性肺炎防止目的で抗菌剤の投与を開始した。

7病院日目(3月17日)頃より $38$ 度台の発熱がみられたが, 3月17日の白血球数は $6,000/\text{mm}^3$ で, C-reactive protein(以下CRPと略す)は $1.9\text{mg/dl}$ と軽度上昇するのみであっ

表1. 入院時血液生化学的検査

Peripheral blood count		Blood chemistry	
WBC	$5,900/\text{mm}^3$	TP	$6.5\text{g/dl}$
RBC	$448 \times 10^4/\text{mm}^3$	Alb	$4.3\text{g/dl}$
Hb	$13.6\text{g/dl}$	BUN	$13.3\text{mg/dl}$
Ht	$40.4\%$	Na	$140.0\text{mEq/l}$
Pit	$21.7 \times 10^4/\text{mm}^3$	K	$4.0\text{mEq/l}$
		Cl	$100\text{mEq/l}$
Arterial blood gas (room air)		T-Bil	$0.5\text{mg/l}$
pH	7.422	D-Bil	$0.3\text{mg/l}$
PaCO <sub>2</sub>	$33.4\text{mmHg}$	GOT	$25\text{IU/l}$
PaO <sub>2</sub>	$98.7\text{mmHg}$	GPT	$20\text{IU/l}$
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	$21.7\text{mEq/l}$	LDH	$632\text{IU/l}$
BE	$-1.3\text{mEq/l}$	AMY	$167\text{IU/l}$
Sat	$98.4\%$	CRP	$0.1 > \text{mg/dl}$

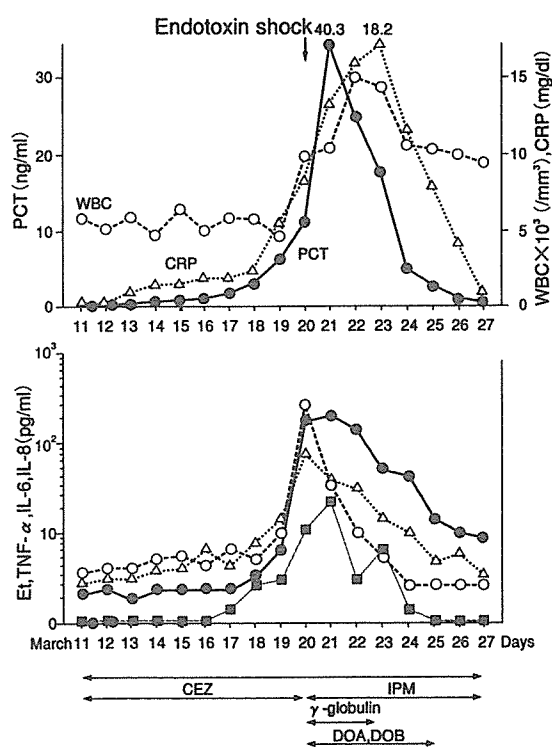


図2. 検査データの経日の推移

た(図2)。この時点でエンドトキシン(以下Etと略す)値は $1.6\text{pg/ml}$ , PCT値は $0.6\text{ng/ml}$ といずれも軽度上昇し陽性であった。3月18日には体温は $39.0$ 度まで上昇した。この時点でも白血球数は $5,800/\text{mm}^3$ であり, CRP値は $2.4\text{mg/dl}$ と軽度上昇するのみであった。一方, PCT値は $2.1\text{ng/ml}$ , Et値は $2.0\text{pg/ml}$ と前日より上昇していた。19日には白血球数は $4,500/\text{mm}^3$ であったが, CRP値は

5.8mg/dlまで上昇した。Et値は3.4pg/ml、PCT値は6.1ng/mlまで、また体温は40.0度まで上昇した。単純胸部レントゲン像では両側に軽度の透過性の低下を認める肺炎像が認められた。

第10病日（3月20日）の6時の体温は40.2度まで上昇し、血圧は78/32mmHgに低下しショック状態に陥った。この時点の白血球数は13,200/mm<sup>3</sup>、CRPは8.1mg/dl、Et値は10.2pg/ml、PCT値は11.8ng/mlであった。Etショックと診断し、抗菌剤を変更し、さらにγ-globulin製剤、ドーパミン、ドブタミンの投与を開始した。本症例は種々の治療に速やかに反応し、早急な血圧の上昇、解熱がみられた。サイトカイン値はEtショック時に漸増しその後直ちに低下した。PCT値とEt値は1日遅れて、CRP値と白血球数はさらに1日遅れて低下し始めた。Etショック発現5日目にはドーパミン、ドブタミンの投与は中止した。

3月18日、20日の喀痰から*Pseudomonas aeruginosa*が検出されたが、血液培養は陰性であった。3月25日には意識はほぼ清明となり、翌26日にはベンチレーターから離脱した。

今回測定したパラメーターの測定法については以下に示すとおりである。

PCTは化学発光免疫測定法（LUMI test PCTTM, B・R・A・H・M・S DIAGNOSTICA GmbH, Berlin Germany, Lumico Analyzer SA-300, マイクロテック, ニチオン, 東京）で測定した。PCTは健常者では0.5ng/ml未満で、敗血症では2.0ng/ml以上である（B・R・A・H・M・S DIAGNOSTICA GmbHとの私信）。tumor necrosis factor α（以下、TNF-αと略す）値は酵素免疫測定法（Medogenix, Fleurus, Belgium）で測定した。その測定限界は3 pg/mlであった。interleukin 6, interleukin 8（以下、IL-6, IL-8と略す）も酵素免疫測定法（TFB, 東京）で測定した。測定限界はいずれも10pg/mlであった。EtはEndotoxin-Single Wako（和光純薬㈱, 大阪）

を用いた高感度法で行った<sup>8,9)</sup>。正常値は1.1pg/ml未満であった。CRPは血清を分離後直ちにラテックス凝集比濁法（イムノテイクルスオート CRP, エイアンドティー, 東京）で測定した。正常値は0.3mg/dl未満であった。

### III. 考 察

サイトカインは、単球・マクロファージなど多くの細胞から産生されるが、PCTの産生細胞はいまだに不明であり、甲状腺全摘患者においても、感染を契機としてPCTが上昇するとの報告もある<sup>10)</sup>。

健常者にエンドトキシンを投与すると、悪寒、強直、筋肉痛、発熱など全身性炎症反応症候群の症状を呈し、1～2時間でTNF-αの産生がピークに達し、約6時間で前値に低下する。IL-6は3時間でピークに達し、約8時間で前値まで低下する。一方、PCT値はエンドトキシン投与後4時間頃から測定され、約6時間でプラトーに達し、この状態が約24時間持続するとの報告がある<sup>11)</sup>。

本症例において38度台の発熱がみられ3月17日の時点の白血球数が6,000/mm<sup>3</sup>と正常範囲で、CRP値は1.9mg/dlと軽度の上昇を認めたのに対して、PCT値は0.6pg/ml、Et値は2.0pg/mlと上昇していた。39.0度まで体温が上昇した3月18日においても白血球数は5,800/mm<sup>3</sup>であり、CRP値は2.4mg/dlとごく軽度の炎症反応を示しているのに対して、PCT値は2.1ng/ml、Et値は2.8pg/mlとさらに上昇した。PCT、Et値から判断すると3月18日の時点ですでに敗血症の状態にあったと考えられる。しかし、17日から19日までの3日間にわたり、IL-6、IL-8値は測定限界であった。CRP値は19日に11.8mg/dlまで上昇した。しかし、白血球数は5,000/mm<sup>3</sup>前後で推移していた。一般に感染症のマーカーとしてIL-6やCRPが有用であるといわれているが、Etショックの発現した3月20日以前の3日間のパラメーターの推移をみるとPCT、Et値

が感染に対して白血球数, CRP, サイトカインよりも早い炎症反応を示し, PCT, Et値の変動が大きく, PCT, Etが細菌感染症の診断には有用であることが示された。

本症例のようにウイルス感染症に細菌感染症を合併したような複雑な感染症の増悪時において鑑別診断法としてPCTを測定することは非常に有用であることが示唆された。

敗血症におけるPCT値のカットオフ値を2ng/mlとするとわれわれのこれまでの検討では, 感受性が75%, 特異性が83.3%であった<sup>4)</sup>。カットオフ値については今後さらに多くの症例を重ねて検討する必要があるであろう。

PCT値はマラリア<sup>2)</sup>, グラム陰性桿菌感染症であるメリオドーシス<sup>12)</sup>で上昇するとの報告がある。われわれのこれまでの検討では, グラム陰性桿菌とグラム陽性菌感染でのPCT

値に大きな違いはみられず, 両者共に重症であるほどPCT値が上昇した。

一方, 真菌感染症でPCT値が上昇するとの報告<sup>13)</sup>があるが, われわれのこれまでの症例の検討からは, 深在性真菌症あるいは真菌血症においては, PCT値の上昇することはほとんどみられず, 上昇した場合には混合感染が疑われる<sup>14)</sup>。この点に関しても今後さらに検討する必要がある。

本症例を通して, ウイルス感染症と細菌感染症の鑑別診断のツールとしてのPCT値測定の有用性が示された。

LUMI test PCTTMを供与して頂きましたB・R・A・H・M・S DIAGNOSTICA GmbHに深謝いたします。

また, 本研究の一部は, 文部科学省科学研究費および日本私立学校振興・共済事業団の助成によった。

## 文 献

- 1) Assicot M, Gendrel D, Carsin H, et al. : High serum procalcitonin concentrations in patients with sepsis and infection. *Lancet* **384**, 515-518, 1993.
- 2) Davis TM, Assicot M, Bohuon C, et al. : Serum procalcitonin concentrations in acute malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **88**, 670-671, 1994.
- 3) Zeni F, Viallon A, Assicot M, et al. : Procalcitonin serum concentrations and severity of sepsis. *Clin Intens Care* **5**, 89-98, 1994.
- 4) 遠藤重厚, 葛西 健, 稲田捷也 : 全身性炎症反応症候群における感染症及び重症度診断としてのプロカルチニン値測定の意義. *感染症誌* **73**, 197-204, 1999.
- 5) Gendrel D, Assicot M, Raymond J, et al. : Procalcitonin as a marker for the early diagnosis of neonatal infection. *Pediatr* **128**, 570-573, 1996.
- 6) Eberhard OK, Haubitz M, Brunkhorst FM, et al. : Usefulness of procalcitonin for differentiation between activity of systemic autoimmune disease (systemic lupus erythematosus/systemic antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis) and invasive bacterial infection. *Arthritis Rheum* **40**, 1250-1256, 1997.
- 7) Meisner M, Hutzler A, Tschakowsky K, et al. : Postoperative plasma concentrations of procalcitonin and C-reactive protein in patients undergoing cardiac and thoracic surgery with and without cardiopulmonary bypass. *Cardiovasc Engineering* **3**, 174-178, 1998.
- 8) Oishi H, Takaoka A, Hatayama Y, et al. : Automated limulus amebocyte lysate (LAL) test for endotoxin analysis using a new Toxinometer ET-201. *J Parenter Sci Technol* **39**, 194-199, 1985.
- 9) 八重樫泰法, 稲田捷也, 佐藤信博, 他 : 血漿高感度エンドトキシン測定法について. *エンドトキシン血症救命治療研会誌* **7**, 25-28, 2003.
- 10) Nylen ES, Snider RH Jr, Thompson KA, et al. : Pneumonitis-associated hyperprocalcitoninemia. *Am J Med Sci* **312**, 12-18, 1996.
- 11) de Werra I, Jaccard C, Corradin SB, et al. : Cytokines, nitrite/nitrate, soluble tumor necrosis factor receptors, and procalcitonin concentrations: comparisons in patients with septic shock, cardiogenic shock, and bacterial pneumonia. *Crit Care Med* **25**, 607-613, 1997.
- 12) Reith HB, Lehmkuhl R, Beier W, et al. : Procalcitonin-ein prognostischer Infektionsparameter bei der Peritonitis. *Chir Gastroentero* **7** (Suppl 2), 47-50, 1995.
- 13) Gerard Y, Hober D, Petitjean S, et al. : High serum procalcitonin level in a 4-year-old liver transplant recipient with a disseminated candidiasis. *Infection* **23**, 310-311, 1995.
- 14) 遠藤重厚, 稲田捷也, 岡本和美, 他 : 深在性真菌症では血中プロカルチニン値は上昇しない. *日外感染症研* **12**, 141-145, 2000.

## HEPATOLOGY

# Increased serum and hepatic tissue levels of interleukin-18 in patients with fulminant hepatic failure

Masahiro Shinoda,\* Go Wakabayashi,\* Motohide Shimazu,\* Hidetsugu Saito,<sup>†</sup> Ken Hoshino,\* Minoru Tanabe,\* Yasuhide Morikawa,\* Shigeatsu Endo,<sup>‡</sup> Hiromasa Ishii<sup>†</sup> and Masaki Kitajima\*

Departments of \*Surgery and †Internal Medicine, Keio University School of Medicine, Shinjuku, Tokyo and ‡Department of Critical Care Medicine, Iwate Medical University School of Medicine, Morioka, Iwate, Japan

## Key words

fulminant hepatic failure, inflammatory cytokines, interleukin-18, liver transplantation.

Accepted for publication 22 November 2005.

## Correspondence

Go Wakabayashi, Department of Surgery, Keio University School of Medicine, 35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan. Email: go@sc.itc.keio.ac.jp

## Abstract

**Background:** Fulminant hepatic failure is a serious clinical condition associated with a high mortality rate. Interleukin (IL)-18 is a pro-inflammatory cytokine that is associated with several inflammatory diseases. The purpose of the present paper was therefore to investigate whether IL-18 is elevated in patients with fulminant hepatic failure.

**Methods:** Serum levels of IL-18 were measured in patients with fulminant hepatic failure before and after liver transplantation. Native liver tissue samples were collected and the tissue levels of IL-18 were determined. Liver tissues were stained immunohistochemically with antihuman IL-18 antibody. The serum levels of IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12, interferon- $\gamma$ , and tumor necrosis factor- $\alpha$  were also determined in patients with fulminant hepatic failure before and after liver transplantation.

**Results:** Elevated levels of IL-18 in serum and hepatic tissue were observed in patients with fulminant hepatic failure. Native liver tissue samples were immunohistochemically positive for IL-18. Interleukin-18 levels were markedly reduced after liver replacement. No other inflammatory cytokines were substantially elevated in patients with fulminant hepatic failure.

**Conclusion:** The serum levels of IL-18 levels are elevated much more than those of other cytokines in patients with fulminant hepatic failure.

## Introduction

Despite recent therapeutic advances, fulminant hepatic failure (FHF) remains a serious clinical state that is associated with a high mortality rate in the absence of transplantation. Several cytokines have been reported as possible mediators of FHF pathophysiology, including interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra),<sup>1</sup> IL-6,<sup>1,2</sup> IL-10,<sup>3</sup> IL-12,<sup>4</sup> tumor necrosis factor (TNF),<sup>1,3</sup> soluble TNF receptor,<sup>5</sup> and interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ).<sup>6</sup>

In 1995, a gene coding for a novel cytokine that induced the production of IFN- $\gamma$  was cloned and the protein was designated as IL-18.<sup>7,8</sup> Subsequent investigations demonstrated that the fundamental function of IL-18 is to enhance Th1 cytokine production by CD4<sup>+</sup> T cells.<sup>9,10</sup> Through IFN- $\gamma$  production, IL-18 augments TNF- $\alpha$  and Fas ligand-mediated cytotoxicity.<sup>11</sup>

After these initial discoveries, several reports demonstrated increased serum levels of IL-18 in chronic liver diseases<sup>12–14</sup> and FHF.<sup>15</sup> However, no reports have compared the serum level of IL-18 to those of other inflammatory cytokines or determined the tissue level of IL-18 in FHF patients. In the present study we investigated whether serum and tissue levels of IL-18 are more

elevated in FHF patients than in other chronic liver diseases and whether serum level of IL-18 is more elevated than those of other inflammatory cytokines in FHF patients.

## Methods

### Patients

The subjects in the present study consisted of 16 patients with FHF, 13 patients with liver cirrhosis (LC), 20 patients with chronic hepatitis (CH), and eight controls. The 16 patients with FHF were diagnosed based on hepatic coma (>grade II) and prothrombin times (<40%).<sup>16</sup> Etiologies of FHF were as follows: unknown in 12 patients, viral hepatitis B in three patients, and acute progression of Wilson's disease in one patient. After admission we collected blood samples from all patients with FHF and decided to perform a series of plasma exchange (PE) for 11 patients using a membrane plasma separator. Then, we decided to perform living donor liver transplantation for 10 of these 11 patients. The 13 patients with LC consisted of eight patients with biliary atresia, three patients with primary biliary cirrhosis, one patient with primary sclerosing



cholangitis, and 1 patient with hepatitis B. These patients were divided into subgroups depending upon the severity of cirrhosis (Child–Pugh classification system<sup>17</sup>). There were seven patients with grade C-LC and six patients with grade B-LC. The 20 patients with CH included six patients with viral hepatitis B and 14 patients with viral hepatitis C. The eight control subjects were living donors for the patients with FHF or terminal liver diseases, and were in good health at the time of examination. Informed consent was obtained from each patient or family, and the study protocol conformed to the ethical guidelines of Keio University School of Medicine.

### Cytokine assays

We determined the serum levels of IL-18, IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12, and TNF- $\alpha$ , and the hepatic tissue levels of IL-18. Serum samples were collected from 16 patients with FHF, 13 patients with LC, 20 patients with CH, and eight donors. Hepatic tissue samples were collected from 10 patients with FHF, six patients with LC, and six donors. Cytokine levels in serum (pg/mL) were determined using commercial ELISA kits from R&D systems (Minneapolis, MN, USA) for IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$  (supersensitive type), IL-6, IL-8, IL-12, and TNF- $\alpha$ , and from Medical and Biological Laboratories (Nagoya, Japan) for IL-18. The hepatic tissue was homogenized in Dulbecco's phosphate-buffered saline (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA) containing 0.1 mmol/L phenylmethylsulfonylfluoride (Calbiochem, San Diego, CA, USA), and centrifuged at 100 000 *g* for 15 min at 4°C. The concentrations of cytokines (pg/mL) and protein (mg/mL, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) in supernatants were determined. The cytokine concentrations in hepatic tissues were determined using the following equation: [cytokine concentration in hepatic tissue (pg/mg protein tissue)] = [cytokine concentration in supernatant (pg/mL)]/[protein concentration in supernatant (mg/mL)].

### Immunohistochemistry

Hepatic tissue samples were obtained and snap-frozen in Tissue Tek OCT compound (Sakura Finetek, Tokyo, Japan). The sections were incubated with each primary antibody (1:100 dilution, mouse monoclonal antihuman IL-18, clone: 25–2G, Medical and Biological Laboratories) and biotinylated secondary antibody (1:500 dilution, Dako, Carpinteria, CA, USA), followed by incubation in peroxidase-conjugated streptavidin (1:500 dilution, Dako). The peroxidase reaction was carried out with diaminobenzidine-hydrogen peroxide (Aldrich Chemical, Milwaukee, WI, USA). Immunohistochemical staining was performed on three liver samples from patients with FHF, three liver samples from patients with LC and three normal liver samples from controls. Using the same specimens, control sections, which were processed in parallel except for the incubation with primary antibody, were prepared for each group.

### Sampling of serum and hepatic tissue

In patients with FHF, serum samples were collected at the time of admission to Keio University Hospital, at the beginning of surgery, and at 2 and 5 h after reperfusion. The level of IL-18 was determined in serum samples of FHF patients collected at the time of

admission, at the beginning of surgery, and at 2 h and 5 h after reperfusion. The levels of IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12, IFN- $\gamma$ , and TNF- $\alpha$  were determined in serum samples of FHF patients collected at the beginning of surgery, and at 2 h and 5 h after reperfusion. In patients with LC, serum samples were collected at the beginning of surgery for liver transplantation. In patients with CH, serum samples were collected during routine follow up. In healthy controls, serum samples were collected at the beginning of surgery for liver donation. The level of IL-18 was determined in serum samples of LC and CH patients and healthy control. The levels of IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12, IFN- $\gamma$ , and TNF- $\alpha$  were determined in serum samples of LC patients and healthy control. Hepatic tissues were collected from the native livers of the recipients with FHF or LC and from the intraoperative liver biopsies of the donors. Blood samples were centrifuged for 5 min at 1500 *g*, and all of the samples were stored at –80°C until assayed.

### Statistical analysis

The values are expressed as mean  $\pm$  SD. For parametric data, differences between groups were evaluated by Student's *t*-test for unpaired data. If the difference between the SD in the populations was significant, the Welch *t*-test was used instead. Differences were considered significant at  $P < 0.05$ .

## Results

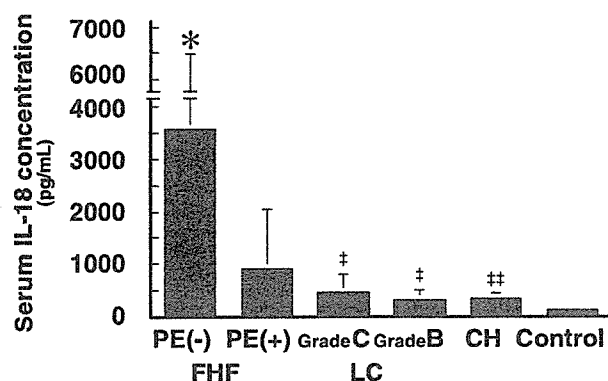
### Interleukin-18 levels in serum and hepatic tissue

Preoperative serum IL-18 levels in FHF patients were determined using the serum samples collected on admission. Because eight patients with FHF underwent PE in another hospital before their admission to Keio University Hospital, results for mean preoperative serum IL-18 level in FHF patients whose samples were collected before PE and in FHF patients whose samples were collected after PE are presented separately. The mean preoperative serum IL-18 levels were  $3590 \pm 2885$  pg/mL in FHF patients whose samples were collected before PE,  $923 \pm 1131$  pg/mL in FHF patients whose samples were collected after PE,  $487 \pm 315$  pg/mL in grade C-LC patients,  $345 \pm 152$  pg/mL in grade B-LC patients,  $354 \pm 107$  pg/mL in CH patients, and  $141 \pm 29$  pg/mL in control subjects (Fig. 1). The IL-18 level in FHF patients whose samples were collected before PE was significantly higher than that in patients whose samples were collected after PE, patients with grade C-LC, patients with grade B-LC, patients with CH, and control subjects ( $P < 0.05$  in each comparison).

The IL-18 levels in hepatic tissue were  $1764 \pm 967$  pg/mg protein in FHF,  $1393 \pm 1424$  pg/mg in LC, and  $29.5 \pm 17.7$  pg/mg in control subjects (Fig. 2). The hepatic tissue level of IL-18 according to the severity of cirrhosis in LC patients was  $246 \pm 347$  pg/mg in grade B-LC patients and  $1966 \pm 1423$  pg/mg in grade C-LC patients. The IL-18 level in liver differed significantly between FHF and control subjects ( $P < 0.01$ ).

### Immunohistochemistry for interleukin-18

Immunohistochemical staining for IL-18 showed diffuse or granular staining in the cytoplasm of hepatocytes in the native livers

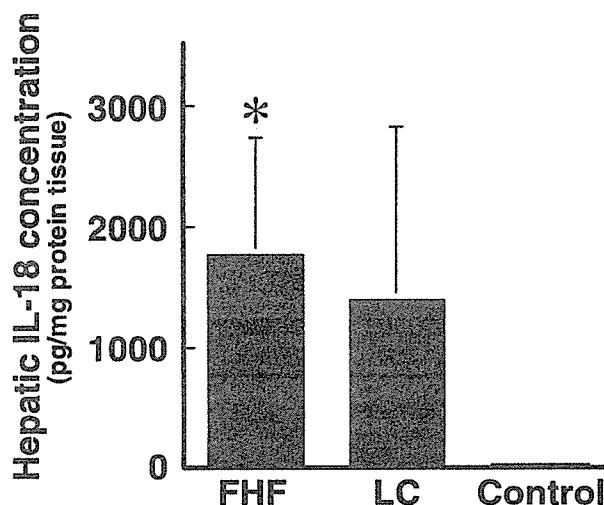


**Figure 1** Serum levels of interleukin (IL)-18 in patients with liver diseases. Because eight patients with fulminant hepatic failure (FHF) underwent plasma exchange (PE) before their admission to Keio University Hospital, mean preoperative serum IL-18 level in the eight FHF patients whose samples were collected before PE (PE-) and that in the other eight FHF patients whose samples were collected after PE (PE+) are presented separately. LC, liver cirrhosis; CH, chronic hepatitis; Control, healthy donors. Data represent mean  $\pm$  SD. \* $P < 0.05$  vs PE (+) FHF, grade C-LC, grade B-LC, CH, and control. † $P < 0.05$  vs control. ‡ $P < 0.01$  vs control.

from three FHF patients (Fig. 3a), while no staining was found in the normal livers from three donors (Fig. 3c). Some granular staining was seen in the livers from three LC patients, but the area of staining was apparently less compared to that of FHF patients (Fig. 3b). The control sections that were processed in parallel, except for the incubation with primary antibody, had no staining (not shown).

#### Serum levels of IL-18 and other cytokines before and after liver replacement in patients with FHF

Serum level of cytokines in FHF patients at the beginning of operation were as follows: IL-18,  $783 \pm 1017$  pg/mL; IL-8,  $43 \pm 1.4$  pg/mL; IFN- $\gamma$ ,  $13.7 \pm 21.5$  pg/mL; IL-6,  $9.1 \pm 11$  pg/mL; TNF- $\alpha$ ,  $3.0 \pm 2.6$  pg/mL; IL-1 $\beta$ ,  $0.77 \pm 0.83$  pg/mL; and IL-12, under the detectable limit (Fig. 4). Interleukin-18 levels were significantly higher than the levels of other cytokines ( $P < 0.05$  in each comparison). The level of IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12, IL-18, IFN- $\gamma$ , and TNF- $\alpha$  determined in serum samples of LC patients and healthy controls is presented as normalized to those of FHF patients (Fig. 5). There was no significant difference between any levels in FHF, LC, or healthy controls in each cytokine. Following liver replacement, the levels of IL-1 $\beta$  and IL-18 decreased, while those of IL-6, IL-8, IFN- $\gamma$ , and TNF- $\alpha$  increased after reperfusion (Fig. 6). Interleukin-18 levels normalized relative to that at the beginning of surgery were  $1.00 \pm 1.29$  at the beginning of surgery,  $0.31 \pm 0.24$  at 2 h after reperfusion, and  $0.29 \pm 0.20$  at 5 h after reperfusion. There was no significant difference between the normalized values of IL-18 at the beginning of surgery and at 2 h after reperfusion and between those at the beginning of surgery and at 5 h after reperfusion. There were significant differences between the normalized values of IL-18 and those of IL-6, IL-8,



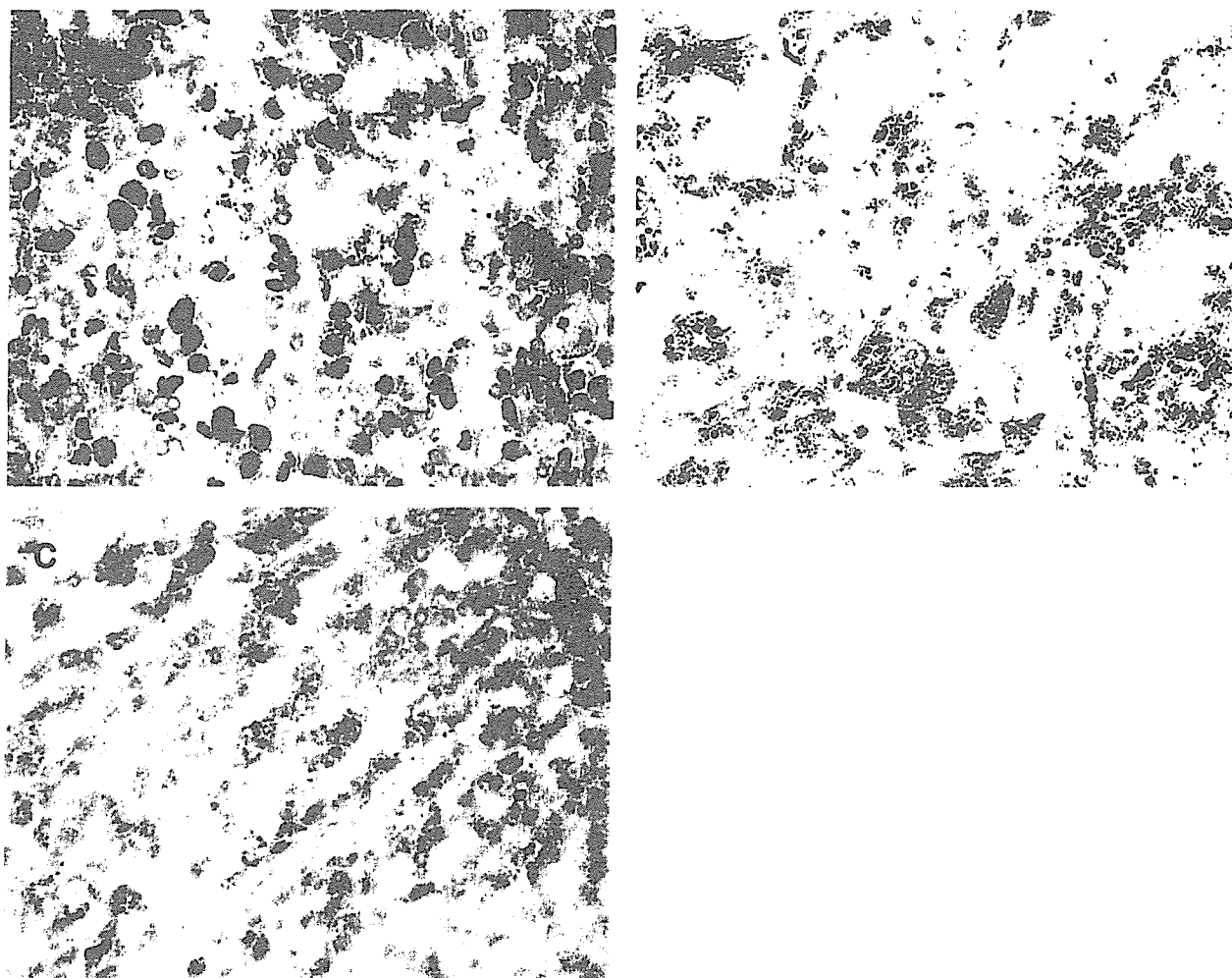
**Figure 2** Hepatic tissue levels of interleukin (IL)-18 in patients with liver diseases. FHF, patients with fulminant hepatic failure; LC, patients with liver cirrhosis; Control, healthy donors. Data represent mean  $\pm$  SD. \* $P < 0.01$  vs control.

IFN- $\gamma$ , or TNF- $\alpha$  at 2 and 5 h after reperfusion ( $P < 0.05$  in each comparison).

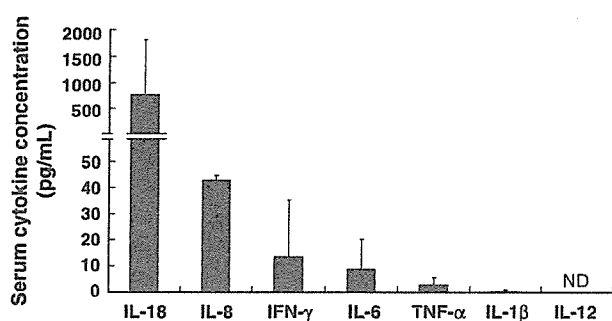
#### Discussion

The level of IL-18 in sera was determined in patients with liver diseases. Because PE removed a considerable amount of IL-18 and resulted in a marked reduction of serum IL-18 levels (data not shown), results for the FHF patients whose preoperative serum samples were not exposed to PE are shown separately in Fig. 1. The IL-18 levels in samples that did not undergo PE were significantly higher in FHF patients than in patients with grade C-LC, grade B-LC, CH, or healthy controls. Furthermore, the levels of IL-18 in patients with FHF in the present study were much higher than those reported for several other liver diseases: 508 pg/mL in severe primary biliary cirrhosis patients (Scheuer classification,<sup>18</sup> stage IV),<sup>12</sup> approximately 300 pg/mL in postoperative hepatic dysfunction patients,<sup>19</sup> and 349 pg/mL in biliary atresia patients.<sup>14</sup> Together, these results indicate that the serum level of IL-18 was much higher in patients with FHF than in either patients with other chronic liver diseases or healthy controls.

Elevation of serum IL-18 level in patients with FHF has been reported in a previous study,<sup>15</sup> but the hepatic tissue levels of IL-18 in FHF patients had not been reported. We determined hepatic tissue levels of IL-18 and immunohistochemical liver staining using samples that were collected at the time of liver transplantation. As in serum, the hepatic tissue levels of IL-18 were significantly higher in FHF patients than in healthy controls. Immunohistochemical staining was positive for IL-18. Liver tissues of FHF patients were collected after a series of treatments including PE, and it is possible that the hepatic tissue levels of IL-18 determined in the present study might be different from that of



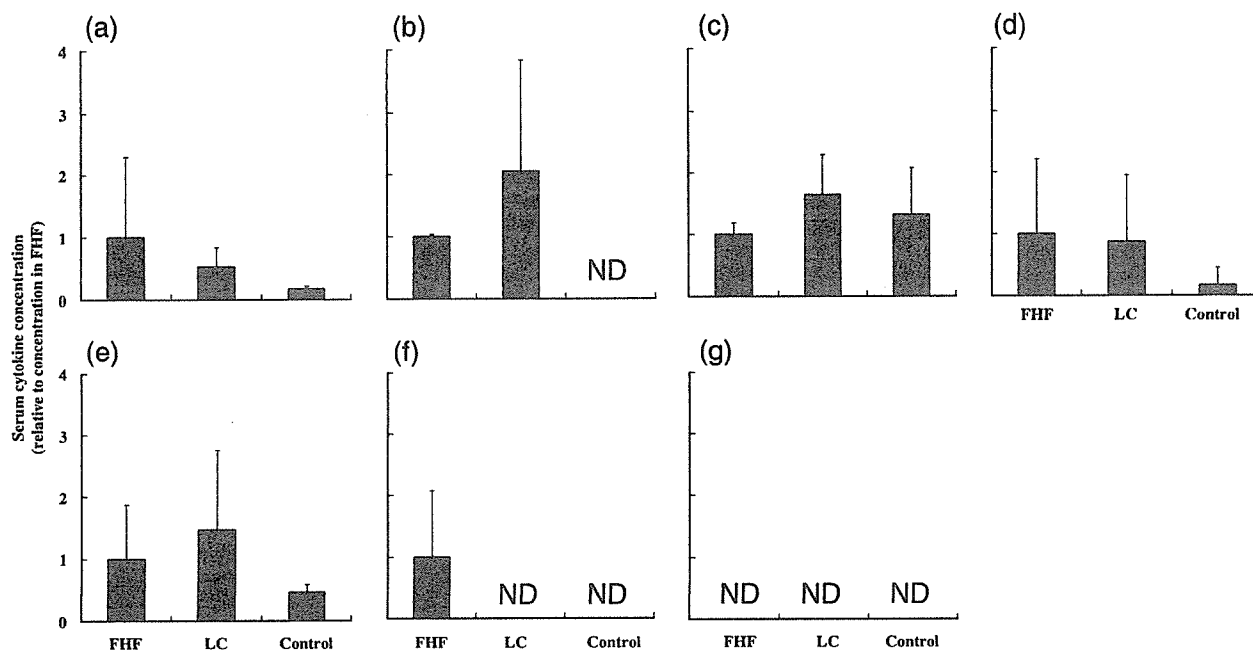
**Figure 3** Immunohistochemical staining for interleukin-18 in the liver. A representative sample is shown for each group (original magnification  $\times 400$ ). (a) Native liver from a patient with fulminant hepatic failure. (b) Liver from a patient with liver cirrhosis. (c) Liver biopsy from a healthy donor.



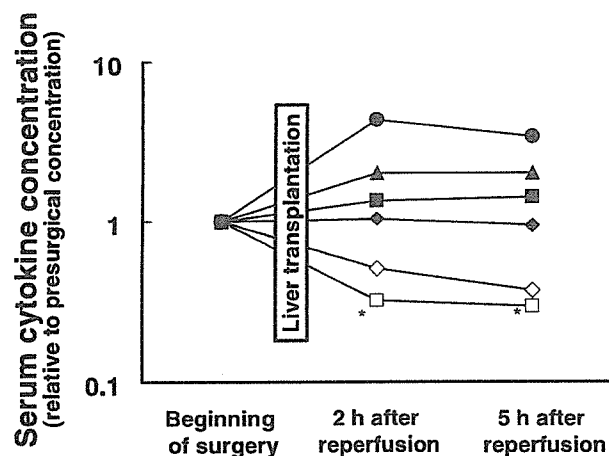
**Figure 4** Serum cytokine levels before liver replacement in patients with fulminant hepatic failure. IL, interleukin; IFN- $\gamma$ , interferon- $\gamma$ ; TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor- $\alpha$ ; ND, not detected. Data represent mean  $\pm$  SD.

FHF patients who had not received PE. However, it is very likely that the level of IL-18 in hepatic tissue is high in patients with FHF compared to those with LC or healthy controls. Furthermore, replacement of the liver resulted in a marked reduction of serum IL-18 levels. These findings strongly suggest that the liver produced IL-18 in patients with FHF.

The levels of IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12, TNF- $\alpha$ , and IFN- $\gamma$  in FHF patients, LC patients, and healthy control were also determined using serum samples collected at the beginning of surgery. Some of these cytokines have been reported to be elevated in patients with FHF, but their levels have not been compared with those of IL-18 using the same serum specimens.<sup>1-3,5,6</sup> Figure 4 shows that the serum level of IL-18 is much higher than those of IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12, TNF- $\alpha$ , or IFN- $\gamma$ . Based on the findings of Fig. 5, it is not likely that IL-8, TNF- $\alpha$ , and IFN- $\gamma$  are associated with FHF, because their levels in LC are higher than in FHF. Based on the findings of Fig. 6, it is not likely that IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , and IFN- $\gamma$  are associated with FHF, because their levels increased after



**Figure 5** Normalized cytokine levels in liver cirrhosis (LC) patients and healthy controls. Results are presented as normalized to fulminant hepatic failure (FHF) patients. There was no significant difference between any levels in FHF, LC, or healthy controls in each cytokine. (a) Interleukin (IL)-18; (b) IL-8; (c) interferon- $\gamma$ ; (d) IL-6; (e) tumor necrosis factor- $\alpha$ ; (f) IL-1 $\beta$ ; (g) IL-12. Control, healthy donors. ND, not detected. Data represent mean  $\pm$  SD.



**Figure 6** Serum cytokine levels after liver replacement in patients with fulminant hepatic failure. The levels of each cytokine are normalized relative to the levels at the beginning of surgery. The y-axis is a logarithmic scale. (●) Interleukin (IL)-6; (▲) IL-8; (■) interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ); (◆) tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ); (◇) IL-1 $\beta$ ; (□) IL-18. \* $P < 0.05$  vs IL-6, IL-8, IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  at the same time point.

liver replacement. Moreover, because the serum levels are very low. IL-1 $\beta$  ( $0.77 \pm 0.83$  pg/mL at the beginning of surgery) and IL-12 (under the detectable limit at the beginning of surgery) are also not likely to be involved in FHF pathophysiology. The present

study suggests that the serum level of IL-18 is more elevated than those of other major inflammatory cytokines in patients with FHF, and that IL-18 is involved in FHF pathophysiology. Effect of IL-18 on hepatic dysfunction has already been described. Finotto *et al.* reported that IL-18 plays a fundamental role in regulating hepatocyte apoptosis *in vivo*.<sup>20</sup> Kasahara *et al.* reported that apoptosis plays an important role in the pathophysiology of FHF in humans.<sup>21</sup> It is possible that IL-18 plays some role in the mechanism of FHF in humans, regulating hepatocyte apoptosis.

Although the levels were lower than that of IL-18 in FHF, serum levels of IL-18 in patients with LC and CH were also elevated, indicating that IL-18 elevation was not specific to FHF. Elevated serum level of IL-18 in other liver disorders has been previously reported.<sup>12–14,19,20</sup> Interleukin-18 could be produced in a wide spectrum of inflammatory liver diseases, and the level of IL-18 may be related to the severity of liver dysfunction or to the degree of inflammation and not necessarily to the type of liver disease.

In summary, increased preoperative levels of IL-18 were confirmed in the sera of patients with FHF. Elevated levels of IL-18 in hepatic tissue, positive staining of the liver for IL-18, and marked reduction of serum IL-18 levels after liver replacement were observed. These findings all suggest that the liver produces IL-18 in patients with FHF. None of the other inflammatory cytokines investigated in the present study were markedly elevated in the sera of patients with FHF. It is therefore likely that IL-18 plays a more important role than other cytokines in the pathophysiology of FHF. Future studies should include a mechanistic investigation to clarify whether IL-18 is actually involved in the pathophysiology of FHF and if it is an indicator of disease severity.

## Acknowledgments

This work was supported by a Grant-in-Aid for Scientific Research from the Mochida Pharmaceutical Company, Tokyo, Japan.

## References

- 1 Sekiyama KD, Yoshida M, Thomson AW. Circulating proinflammatory cytokines (IL-1 beta, TNF-alpha, and IL-6) and IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) in fulminant hepatic failure and acute hepatitis. *Clin. Exp. Immunol.* 1994; 98: 71–7.
- 2 Nakamura T, Ushiyama C, Suzuki S *et al.* Effect of plasma exchange on serum tissue inhibitor of metalloproteinase 1 and cytokine concentrations in patients with fulminant hepatitis. *Blood Purif.* 2000; 18: 50–4.
- 3 Nagaki M, Iwai H, Naiki T, Ohnishi H, Muto Y, Moriwaki H. High levels of serum interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha are associated with fatality in fulminant hepatitis. *J. Infect. Dis.* 2000; 182: 1103–8.
- 4 Leifeld L, Cheng S, Ramakers J *et al.* Imbalanced intrahepatic expression of interleukin 12, interferon gamma, and interleukin 10 in fulminant hepatitis B. *Hepatology* 2002; 36: 1001–8.
- 5 Tokushige K, Yamaguchi N, Ikeda I, Hashimoto E, Yamauchi K, Hayashi N. Significance of soluble TNF receptor-I in acute-type fulminant hepatitis. *Am. J. Gastroenterol.* 2000; 95: 2040–6.
- 6 Kimura K, Ando K, Tomita F *et al.* Elevated intracellular IFN-gamma levels in circulating CD8+ lymphocytes in patients with fulminant hepatitis. *J. Hepatol.* 1999; 31: 579–83.
- 7 Okamura H, Tsutsi H, Komatsu T *et al.* Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells. *Nature* 1995; 378: 88–91.
- 8 Ushio S, Namba M, Okura T *et al.* Cloning of the cDNA for human IFN-gamma-inducing factor, expression in *Escherichia coli*, and studies on the biologic activities of the protein. *J. Immunol.* 1996; 156: 4274–9.
- 9 Tomura M, Zhou XY, Maruo S *et al.* A critical role for IL-18 in the proliferation and activation of NK1.1+ CD3- cells. *J. Immunol.* 1998; 160: 4738–46.
- 10 Tomura M, Maruo S, Mu J *et al.* Differential capacities of CD4+, CD8+, and CD4-CD8- T cell subsets to express IL-18 receptor and produce IFN-gamma in response to IL-18. *J. Immunol.* 1998; 160: 3759–65.
- 11 Tsutsui H, Nakanishi K, Matsui K *et al.* IFN-gamma-inducing factor up-regulates Fas ligand-mediated cytotoxic activity of murine natural killer cell clones. *J. Immunol.* 1996; 157: 3967–73.
- 12 Urushihara N, Iwagaki H, Yagi T *et al.* Elevation of serum interleukin-18 levels and activation of Kupffer cells in biliary atresia. *J. Pediatr. Surg.* 2000; 35: 446–9.
- 13 Yamano T, Higashi T, Nouse K *et al.* Serum interferon-gamma-inducing factor/IL-18 levels in primary biliary cirrhosis. *Clin. Exp. Immunol.* 2000; 122: 227–31.
- 14 Ludwiczek O, Kaser A, Novick D *et al.* Plasma levels of interleukin-18 and interleukin-18 binding protein are elevated in patients with chronic liver disease. *J. Clin. Immunol.* 2002; 22: 331–7.
- 15 Yumoto E, Higashi T, Nouse K *et al.* Serum gamma-interferon-inducing factor (IL-18) and IL-10 levels in patients with acute hepatitis and fulminant hepatic failure. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2002; 17: 285–94.
- 16 Takahashi Y, Shimizu M. Aetiology and prognosis of fulminant viral hepatitis in Japan: a multicentre study. The Study Group of Fulminant Hepatitis. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 1991; 6: 159–64.
- 17 Pugh RN, Murray-Lyon IM, Dawson JL, Pietroni MC, Williams R. Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices. *Br. J. Surg.* 1973; 60: 646–9.
- 18 Scheuer P. Primary biliary cirrhosis. *Proc. R. Soc. Med.* 1967; 60: 1257–60.
- 19 Shibata M, Hirota M, Nozawa F, Okabe A, Kurimoto M, Ogawa M. Increased concentrations of plasma IL-18 in patients with hepatic dysfunction after hepatectomy. *Cytokine* 2000; 12: 1526–30.
- 20 Finotto S, Siebler J, Hausding M *et al.* Severe hepatic injury in interleukin 18 (IL-18) transgenic mice: a key role for IL-18 in regulating hepatocyte apoptosis in vivo. *Gut* 2004; 53: 392–400.
- 21 Kasahara I, Saitoh K, Nakamura K. Apoptosis in acute hepatic failure: histopathological study of human liver tissue using the tunel method and immunohistochemistry. *J. Med. Dent. Sci.* 2000; 47: 167–75.