

敗血症と生体反応(12)

遠藤 重厚*
Shigeatsu Endo

塩谷 信貴*
Nobutaka Shiotani

森 潔史*
Kiyofumi Mori

佐藤 信博*
Nobuhiro Sato

真壁 秀幸*
Hideyuki Makabe

北村 道彦**
Michihiko Kitamura

八重樫泰法*
Yasunori Yaegashi

高橋 学*
Gaku Takahashi

要 旨

敗血症は急性呼吸障害の最も一般的な原因である。感染により活性化された炎症細胞は、IL-8やplatelet activating factor (PAF) などの好中球活性化因子を放出し、これらにより活性化された好中球上のMac-1, LFA-1などの分子は質的機能的調節をうけ、それぞれのリガンドへの親和性を獲得することにより接着可能となる。接着浸潤した好中球は活性化され、顆粒球中のエラスターゼなどの蛋白分解酵素やフリーラジカルなどの放出を引き起こし、臓器障害が生じる。活性化された好中球はリソゾーム酵素やPAFなどの脂質を生成するが、これらは相互にその作用を増強し、肺障害などの組織障害をもたらす。本項では敗血症時の呼吸障害について概説する。

Key words : 敗血症, ALI, ARDS, 好中球, サイトカイン

12. 敗血症と呼吸障害

1. はじめに

敗血症時の急性呼吸器不全は、急性肺障害 (acute lung injury; ALI) や急性呼吸窮迫症候群 (acute respiratory distress syndrome; ARDS) の発生に先行して発症する。ARDSが局所的および全身的な様々な障害に対する非特異的反応である。敗血症は、ARDSに至る最もよく知られた前駆病状の1つであり、ARDS症例の1/3以上がこれに起因している¹⁾。ARDSに最もよく関連する敗血症の原因は、肺および腹腔内感染症である²⁾。

ARDSは、敗血症症候群患者の25~42%で発症し、ショック状態が持続する場合に増加する³⁾。敗血症に合併する急性呼吸不全はしばしば多臓器不全症に至る全身的な一過程であると認知されている。

敗血症によるARDSの発生率および死亡率を明らかにする試みは、この症候群を定義する一定の基準がないために困難であった。ほとんどの研究者は、両側性肺浸潤、ガス交換能不全、適切なリスク要因の確認、そして左心室機能障害が無いことを必要としている。しかし、これらの要素それぞれを定める基準が変動するものであり、このことがARDSに関する米欧コンセンサス会議

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

(American-European Consensus Conference on ARDS)において急性肺障害とARDSの定義を明らかにし、定める動機となった³⁾。ARDS患者は予期される予後が広範な不均一な集団である。米国におけるARDSの発生率は推定100,000人あたり5~71人と幅がある^{3,4)}。死亡率は30~70%の範囲で、これは30数年前に本疾患が最初に記述されたときと同様であるが^{3~5)}、いくつかの研究では生存率の改善が報告されている⁶⁾。死因は呼吸器不全ではなく、敗血症から離脱不能であるかあるいは多臓器不全症が最も多い⁷⁾。

年齢、疾患の重症度、病因、多臓器不全症の有無などいくつかの要因がARDSの死亡率に常に影響することが示されている。敗血症の存在はARDSの死亡率増加と関連している^{1,3,4)}。初期の低酸素血症の程度は、信頼し得る予後指標とは認められていないが^{1,5)}、最初の24~72時間の酸素化傾向は有効である^{3,4)}。肺障害の重症度をグレード化するための肺障害スコア (lung injury score; LIS) は有用なシステムであり⁸⁾、初期LISが死亡率と関連していることが示されている。LIS>3.5の患者の生存率は18%, LIS2.5~3.5で30%, LIS1.1~2.4で59%, LIS<1.1で66%であることが認められている⁵⁾。

2. 病因

a. 敗血症における急性肺障害モデル

敗血症患者に見られる急性肺障害の実験モデルは、主に二つのタイプに分けられる。一つは、動物に細菌を注入するか、または動物自身が持つ細菌を自家接種 (腸管穿孔や糞便汚染による腹膜炎モデルの作製) することにより、インタクトな動物における、ときに全身性の、実際の敗血症モデルを使用する。もう一方は、患者で特定され推定される個々の傷害原因あるいはメディエータを、細胞、単離肺、またはインタクトな動物で使用するものである。これらのモデルには、好中球や補体の活性化、アラキドン酸代謝物、リポ多糖 (LPS)、サイトカイン類の投与が含まれる。敗血症動物を用いたモデルは、関与する病態生理学的状況をより厳密に再現するという長所があるが、もう一つのモデルでは、ある特定のメディエータや特定の細胞タイプの役割をより正確に研究者が

検討することができ、障害サイズを制御できるという利点がある。ARDS患者や実験モデルにおいて高値を示す多くの液性因子は、敗血症に認められる肺機能不全を仲介すると言われている。

b. 好中球

ARDSの病因は複雑である。初期の見解では好中球および補体の活性化の役割が強調されていた。早期ARDSの患者における気管支肺胞洗浄液 (BALF) に関する研究では、好中球数増加と高濃度の好中球酵素が示され、両方が肺障害の重症度と関連していた⁹⁾。敗血症の患者では、BALF好中球濃度の持続的な上昇が死亡症例で見出された⁹⁾。BALF好中球濃度は、他の炎症性産生物の直接的な尺度ではないが、肺胞間隙への好中球の移動を促進または阻害するメディエータのバランスを反映するものであることが示唆されている⁹⁾。

かつては、肺内部における好中球の集積と活性化は同義とされていた。しかし、肺組織間隙での好中球集積は、その活性化とは別のプロセスであり、明確に異なるものであることが明らかにされた。肺内部における好中球集積は、敗血症性傷害後に数時間で発生する^{10,11)}。その集積は、肺胞マクロファージにより産生される走化性メディエータの同時に起こる増加と、肺血管内皮と好中球自体の接着分子のアップレギュレーションにより仲介されるようである¹²⁾。

肺内部での好中球活性化は微小血管の障害を惹起し、これは好中球プロテアーゼと活性酸素によるものである^{13,14)}。細胞膜脂質成分が酸化し、BALF中に脂質過酸化物の副産物が検出される場合には、細胞障害が発生している¹⁵⁾。H₂O₂の呼気中および尿中濃度もARDS患者では上昇しており^{16,17)}、特に敗血症患者ではその上昇程度が肺障害の重症度と関連していた。長時間にわたる持続性のレベル上昇は、死亡率の増加と関連した¹⁷⁾。好中球の粘着や活性化の予防、およびプロテアーゼ活性の減弱は、敗血症モデルや好中球活性化モデルにおける微小血管障害の緩和に有効であることが示されている^{13,18)}。

抗酸化作用を有するものには細胞内スーパーオキシドジスムターゼ、カタラーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼやサイトゾル漿液のアスコルビ

ン酸、還元型グルタチオン、および脂溶性ビタミンEがある。さらに、トランスフェリン、ラクトフェリン、フェリチンなどの鉄を結合する物質であり、血漿タンパク質も抗酸化物として作用すると考えられている¹⁵⁾。ARDS患者や発症リスクのある患者では、抗酸化物が欠乏しているという報告がある一方、N-アセチルシステインやプロシステイン過多についての研究では矛盾する結果が示されている^{15, 19)}。

好中球が早期肺障害において中心的な役割を果たしていることは明白であるが、好中球減少症患者でもARDSを発症する可能性があり、このことは肺胞マクロファージのような他のエフェクター細胞もまた重要であることを示唆している。肺胞マクロファージは、タンパク分解酵素、アラキドン酸代謝産物や他の炎症メディエータのみならず、活性酸素の産生、放出に関しても好中球と類似の能力を有している²⁰⁾。

c. サイトカイン

サイトカイン類は、種々の細胞から分泌される。サイトカインのうちtumor necrosis factor α (TNF- α) は、いくつかの実験モデルで、肺障害を惹起し、他のメディエータの効果を増強し、肺において微小血栓形成に関与する前凝固活性を有することが示されている^{21, 22)}。TNF- α とインターロイキン 1β (IL- 1β) は共に、好中球脱顆粒、ROS産生、ライソザイム放出を増加させるのみならず、内皮の粘着性分子や好中球、単球に対する走化性因子の合成も増大させる²¹⁾。

いくつかの研究により、早期および後期ARDS患者のBALF中TNF- α や他のサイトカインのレベルは上昇していることが示されている²³⁾。ARDS患者のうち、第1病日のTNF- α 血漿中レベルがより高く、長期に持続的な上昇を示す症例では、発症時レベルがより低く速やかに低下するような症例と比較すると、死亡率がより高い²⁴⁾。サイトカイン類は、早期ARDSでは内皮と表皮を障害して透過性を増大させ、後期では、線維化を促進する線維芽細胞と相互に作用すると思われる^{23, 24)}。

これらの炎症性メディエータの制御が、肺修復には重要であると考えられる。いくつかのモデル

において、TNF- α の効果に対抗するような作用物質が肺障害を軽減することが示されている²⁵⁾。敗血症患者における抗TNF- α モノクローナル抗体の多施設無作為化プラセボ対照試験では、敗血症ショック患者サブセット群で生存率の改善が示されている²⁶⁾。

d. エンドトキシン

敗血症において、エンドトキシンは好中球を肺に貯留し、補体と相乗的に作用し、好中球およびマクロファージの有毒物質産生を促進状態にする²⁰⁾。エンドトキシンの阻害により敗血症における死亡率が改善されるという初期の強い考えに反し、最近の多施設無作為化プラセボ対照試験では、抗エンドトキシンモノクローナル抗体HA-1AやE5投与患者で著明な効果は示されていない¹⁹⁾。

e. 脂質メディエータ

敗血症患者のBALF、血清の両方で高値のホスホリパーゼA₂ (PLA₂) が認められ、その濃度はARDSのリスク増加と肺障害の重症度と関連していた。PLA₂がARDSに関与するメカニズムにはいくつかあり、特にアラキドン酸およびその代謝物や血小板活性化因子の放出が関係する²⁷⁾。アラキドン酸産生物、特にトロンボキサンA₂ (TXA₂) やプロスタサイクリンは、敗血症およびエンドトキシン仲介肺障害の(シグナル伝達機構による)直接的または間接的メディエータであると言われている²⁸⁾。TXA₂は強力な平滑筋収縮物質および血小板凝集物質であり、一方、プロスタサイクリンは血管拡張物質、膜安定化作用物質、および血小板抗凝集物質である。TXA₂は炎症性細胞から、プロスタサイクリンは内皮細胞から放出される。急性肺障害の実験モデルでは、TXA₂の早期上昇は、早期障害と気管支収縮と関連している。これらのモデルにおいて、TXA₂阻害により肺高血圧の早期発症が軽減される²⁸⁾。

イブプロフェンによるシクロオキシゲナーゼの非特異的阻害は、全てではないが、いくつかのモデルにおける急性肺障害の軽減に有効であることが示されている²⁹⁾。イブプロフェンは、重症敗血症患者を対象とした2つの小規模無作為化プラセボ対照臨床試験で研究されたが、いずれも予後の

改善は認められなかった¹⁹⁾。敗血症患者におけるイブプロフェン静脈内投与の大規模多施設共同無作為化プラセボ対照試験の結果がまとめられつつある。

プロスタグランジンE₁ (PGE₁) に関する研究により、心拍出量の改善と血小板活性化の阻害とともに、肺および全身血管抵抗の低下が示されている³⁰⁾。初期の臨床試験では生存率の改善が認められたが、2つの対照試験（うち1試験は大規模多施設試験）では実証されなかった³⁰⁾。

3. 病理学的検討

ARDSの組織学所見は、びまん性肺胞損傷である³¹⁾。びまん性肺胞損傷の特徴は病因論的には非特異的であること、および高濃度酸素補給などのARDSのための治療や播種性血管内凝固症候群(DIC)などのARDSに関連した過程によっても、びまん性肺胞損傷の病理的变化を引き起こし得ることは理解しておくべきである³²⁾。これらの病理学的変化は、時間的に若干オーバーラップし、間質および肺胞の浮腫と出血が基本的特徴の滲出相、組織化と修復が起こっている増殖相、終末期病相を示す線維化相の3相に分けることができる^{31, 32)}。

a. 滲出相

組織学的によく知られた最も早期の変化は、肺胞表面の約95%を占める内皮細胞とタイプ1肺胞上皮細胞に対する損傷である。内皮細胞が腫大し、細胞間結合部が拡大し、飲細胞小胞が増加し、毛細血管基底膜が破壊され、これらにより毛細管漏出と浮腫形成に至っている^{31~33)}。内皮細胞の損傷は、その修復能のために比較的目立たないこともあり、従って、間質性浮腫の程度は、内皮における比較的軽度な変化に対して不釣り合いに認められることが多い^{32, 33)}。間質区画は伸展性で、大量の浮腫液を有することがある。しかし血管外液が正常容量の20%を超えると肺胞浮腫が起こる。血管内血栓と好中球集積が主に毛細血管内で認められる。タイプ1肺胞上皮細胞も腫大し、細胞質空胞化、囊胞形成、それらの結果として基底膜からの脱離が認められる^{31~33)}。タイプ2肺胞上皮細胞は損傷に対してより抵抗性である。肺胞崩壊、ヒ

アリン膜も存在する³¹⁾。

b. 増殖相

増殖相は障害後早くも第3日目より始まるが、第2, 3週目で極めて明確になり、タイプ2肺胞上皮細胞の再生で開始され、露出された基底膜内層を新しく覆う。これらタイプ2細胞は大型で、核異型性、膨隆核小体、層板状体異常を示す^{31~33)}。

増殖相では線維化が顕著となり、種々のメカニズムがその後に続く³⁴⁾。線維芽細胞と筋線維芽細胞が間質と肺胞滲出液に移動し、細胞性顆粒組織を形成する。コラーゲンが沈着し、無細胞性線維症となる。衰退しない線維増殖は末期肺胞線維症を招く。この進展は、初期の炎症反応の程度と炎症反応の遷延により決まるようである³³⁾。肺胞内組織は、タイプ2細胞による表層の新しい上皮形成にともなう結果として間質に取り込まれる。これは癒着による線維症として知られている過程であり、中隔あるいは壁在性線維症に帰着する^{31~34)}。この過程は、肺胞管、間隙および呼吸細気管支、終末細気管支に起こり、閉塞性細気管支炎に至る。

滲出相および早期増殖相では、炎症サイクルが中断されると肺の完全治癒の可能性がある。治癒にはアポトーシス過程が関与すると考えられる。アポトーシスは、プログラムされた細胞死であり、死滅細胞が食細胞作用を受けるまでの間、アポトーシス細胞毒がその死滅細胞により妨害され、その結果、さらなる炎症進展と損傷を避けることができる³⁵⁾。

肺修復時のARDS患者のBALFは、主に気腔顆粒化組織で見られる線維芽細胞および内皮細胞の両方に細胞死を誘発し得る。内皮細胞はアポトーシスにより致死する³⁶⁾。肺障害患者においてアポトーシス像を示す細胞の存在は、組織学的に確認されている³⁶⁾。動物モデルでのデータでは、タイプ2細胞による肺胞基底膜の新たな被覆が、線維芽細胞増殖と細胞外マトリクス沈着の抑制に必須であり、また線維芽細胞は肺胞タイプ2細胞の再生を刺激するマイトゲンを分泌するということが示唆されている。そしてまた、同じこれら線維芽細胞は、肺胞内皮細胞のアポトーシスを引き起こし、修復を阻害する因子も分泌する³⁷⁾。好中球のアポトーシスも同様に起こり、ラット急性肺障害

モデルにおいて、マクロファージがアポトーシスを起こしている好中球を貪食し、15～20分以内に分解したことが示されている³⁵⁾。

c. 線維化相

肺線維化は損傷発生後早くも36時間後に始まり³⁸⁾、呼吸器不全の第3または第4週までに広汎な肺再構築が起こる。組織学的には、肺胞中隔と気腔壁は無細胞性および膠原性結合組織で構

成されている。気腔は、小嚢腫様のもので拡張し、肺胞管線維症が認められる^{32, 33)}。時間とともにタイプ3弾性膠原線維がタイプ1固縮膠原線維に置き換わり、ARDS非生存者では、肺コラーゲン含量は2～3倍に増加する。生検における線維化の程度は、死亡率と相関する^{33, 39)}。ARDSのこのような後期ステージでは、15～40%の死亡が呼吸不全に直接的に起因するものである⁷⁾。

文 献

- 1) Knaus, W.A., Sun, X., Hakim, R.B. et al.: Evaluation of definition for adult respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* **150** : 311 - 317, 1994.
- 2) Seidenfeld, J.J., Pohl, D.F., Bell, R.C. et al.: Incidence, site, and outcome of infections in patients with the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis* **134** : 12 - 16, 1986.
- 3) Bernard, G.R., Artigas, A., Brigham, K.L. et al.: The American-European consensus conference on ARDS: definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. *Am J Respir Crit Care Med* **49** : 818 - 824, 1994.
- 4) Sloane, P.J., Gee, M.H., Gottlieb, J.E., et al.: A multi-center registry of patients with acute respiratory distress syndrome: physiology and outcome. *Am Rev Respir Dis* **146** : 419 - 426, 1992.
- 5) Vasilyev, S., Schaap, R.N., Mortensen, J.D.: Hospital survival rates of patients with acute respiratory failure in modern respiratory intensive care units: an international, multicenter, prospective survey. *Chest* **107** : 1083 - 1088, 1995.
- 6) Morris, A.H., Wallace, C.J., Menlove, R.L. et al.: Randomized clinical trial of pressure-controlled inverse ratio ventilation and extracorporeal CO₂ removal for adult respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* **149** : 295 - 305, 1994.
- 7) Montgomery, A.B., Stager, M.A., Carrico, C.J. et al.: Cause of mortality in patients with adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis* **132** : 485 - 489, 1985.
- 8) Murray, J.F., Matthay, M.A., Luce, J.M. et al.: An Expanded definition of the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis* **138** : 720 - 723, 1988.
- 9) Steinberg, K.P., Milberg, J.A., Martin, T.R. et al.: Evolution of broncoalveolar cell populations in the adult respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* **150** : 113 - 122, 1994.
- 10) Nahum, A., Chamberlin, W., Sznajder, J.I.: Differential activation of mixed venous and arterial neutrophils in patients with sepsis syndrome and acute lung injury. *Am Rev Respir Dis* **143** : 1083 - 1087, 1991.
- 11) Peralta, J.G., Barnard, M.L., Turrens, J.F.: Characteristics of neutrophil influx in rat lungs following fecal peritonitis. *Inflammation* **17** : 263 - 271, 1993.
- 12) Laurent, T., Markert, M., Von, Fliedner, V. et al.: CD11b/CD18 expression, adherence, and chemotaxis of granulocyte in adult respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* **149** : 1534 - 1538, 1994.
- 13) Okumura, Y., Inoue, H., Fujiyama, Y. et al.: Effects of serine protease inhibitors on accumulation of polymorphonuclear leukocytes in the lung induced by acute pancreatitis in rats. *J Gastroenterol* **30** : 379 - 386, 1995.
- 14) McCord, J.M., Gao, B., Leff, J. et al.: Neutrophil-generated free radicals: possible mechanisms of injury in adult respiratory distress syndrome. *Environ-Health Perspect* **10** : 57 - 60, 1994.
- 15) Gutteridge, J.M., Quinlan, G.J., Mumby, S. et al.: Primary plasma antioxidants in adult respiratory distress syndrome patients: changes in iron-oxidizing, iron-binding, and free radical-scavenging proteins. *J Lab Clin Med* **124** : 263 - 273, 1994.
- 16) Sznajder, J.I., Fraiman, A., Hall, J.B. et al.: Increased hydrogen peroxide in the expired breath of patients with acute hypoxemic respiratory failure. *Chest* **96** : 606 - 612, 1989.

- 17) Mathru, M., Rooney, M.W., Dries, D.J. et al.: Urine hydrogen peroxide during adult respiratory distress syndrome in patients with and without sepsis. *Chest* **105** : 232 - 236, 1994.
- 18) Wang, W., Suzuki, Y., Tanigaki, T. et al.: Effect of the NADPH oxidase inhibitor apocynin on septic lung injury in guinea pigs. *Am J Respir Crit Care Med* **150** : 1449 - 1452, 1994.
- 19) Hudson, L.: New therapies for ARDS. *Chest* **108** : 79S - 91S, 1995.
- 20) Rinaldo, J.E., Christman, J.W.: Mechanism and mediators of the adult respiratory distress syndrome. *Clin Chest Med* **11** : 621 - 632, 1990.
- 21) Marks, J.D., Marks, C.B., Luce, J.M. et al.: Plasma tumor necrosis factor in patients with septic shock: mortality rate, incidence of adult respiratory distress syndrome, and effects of methylprednisolone administration. *Am Rev Respir Dis* **141** : 94 - 97, 1990.
- 22) Chang, S.W.: Endotoxin-induced pulmonary leukostasis in the rat: role of platelet-activating factor and tumor necrosis factor. *J Lab Clin Med* **123** : 65 - 72, 1994.
- 23) Li, X.Y., Donaldson, K., Brown, D. et al.: The role of tumor necrosis factor in increased airspace epithelial permeability in acute lung inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol* **13** : 185 - 195, 1995.
- 24) Meduri, G.U., Headley, S., Kohler, G. et al.: Persistent elevation of inflammatory cytokines predicts a poor outcome in ARDS: plasma IL-1b and IL-6 levels are consistent and efficient predictors of outcome over time. *Chest* **107** : 1062 - 1073, 1995.
- 25) Windsor, A.C., Mullen Walsh, C.J. et al.: Delayed tumor necrosis factor blockade attenuates pulmonary dysfunction and metabolic acidosis associated with experimental Gram-negative sepsis. *Arch Surg* **129** : 80 - 89, 1994.
- 26) Abraham, E., Wunderink, R., Silverman, H. et al.: Efficacy and safety of monoclonal antibody to human tumor necrosis factor α in patients with sepsis syndrome. *JAMA* **273** : 934 - 941, 1995.
- 27) Kim, D.K., Fukuda, T., Thompson, B.T. et al.: Bronchoalveolar lavage fluid phospholipase A2 activities are increased in human adult respiratory distress syndrome. *Am J Physiol* **269** : L109 - L118, 1995.
- 28) Demling, R.H.: The modern version of adult respiratory distress syndrome. *Annu Rev Med* **46** : 193 - 202, 1995.
- 29) Li, J.X., Oliver, J.R., Lu, C.Y. et al.: Delayed thromboxane or tumor necrosis factor- α , but not leukotrienes inhibition, attenuates prolonged pulmonary hypertension in endotoxemia. *Am J Med Sci* **310** : 103 - 110, 1995.
- 30) Temmesfeld-Wollbruck, B., Walmrathe, D., Grimminger, F. et al.: Prevention and therapy of the adult respiratory distress syndrome. *Lung* **173** : 139 - 164, 1995.
- 31) Katzenstein, A.A., Bloor, C.M., Leibow, A.A.: Diffuse alveolar damage-the role of oxygen, shock, and related factors: a review. *Am J Pathol* **85** : 210 - 228, 1972.
- 32) Tomashefski, J.F. Jr.: Pulmonary pathology of the adult respiratory distress syndrome. *Clin Chest Med* **11** : 593 - 619, 1990.
- 33) Burkhardt, A.: Alveolitis and collapse in the pathogenesis of pulmonary fibrosis. *Am Rev Respir Dis* **140** : 513 - 524, 1989.
- 34) Fukuda, Y., Ishizaki, M., Masuda, Y.: The role of intra-alveolar fibrosis in the process of pulmonary structural remodeling in patients with diffuse alveolar damage. *Am J Pathol* **126** : 171 - 182, 1987.
- 35) Cox, G., Crossley, J., Xing, Z.: Macrophage engulfment of apoptotic neutrophils contributes to the resolution of acute pulmonary inflammation in vivo. *Am J Respir Cell Mol Biol* **12** : 232 - 237, 1995.
- 36) Polunovsky, V.A., Chen, B., Henke, C. et al.: Role of mesenchymal cell death in lung remodeling after injury. *J Clin Invest* **92** : 388 - 397, 1993.
- 37) Uhal, B.D., Joshi, I., True, A.L. et al.: Fibroblasts isolated after fibrotic lung injury induce apoptosis of alveolar epithelial cell in vitro. *Am J Physiol* **269** : L819 - L828, 1995.
- 38) Martin, C., Papazian, L., Payan, M.J. et al.: Pulmonary fibrosis correlates with outcome in adult respiratory distress syndrome: a study of mechanically ventilated patients. *Chest* **197** : 196 - 200, 1995.

Correlations of surfactant protein with type II phospholipase A₂ in the presence of ALI/ARDS associated with diffuse peritonitis

Michiko Miyata*	Nobuhiro Sato*	Yasushi Suzuki*
Masahiro Kojika*	Masanori Hakozaiki*	Gaku Takahashi*
Satoko Imai*	Kiyoshi Mori*	Hirohisa Inoue*
Yasunori Suga*	Shigehiro Shibata*	Nobuki Shioya*
Go Wakabayashi**	Shigeatsu Endo*	

Abstract : Blood levels of surfactant protein and type II phospholipase A₂ (type II PLA₂), in the presence of acute lung injury (ALI)/acute respiratory distress syndrome (ARDS) associated with diffuse peritonitis, were measured. Blood levels of surfactant protein-D (SP-D) and type II PLA₂ were elevated at the time ALI/ARDS manifested. There was a significant correlation between SP-D and type II PLA₂. The results suggest SP-D and type II PLA₂ to be involved in the manifestations of ALI/ARDS.

Key words : type II phospholipase A₂, SP-D, peritonitis, sepsis, ALI, ARDS

Introduction

Pulmonary surfactant is a physiologically active substance that is synthesized and secreted from alveolar type II epithelial cells, covers the inner surfaces of alveoli, and thereby prevents end-tidal alveolar collapse¹⁾.

Acute lung injury (ALI) and acute respiratory distress syndrome (ARDS) result in pulmonary microvascular hyper-permeability. It has long been accepted that the etiology of ALI/ARDS involves hemangioendothelial and alveolar epithelial cell injury, via activation of inflammatory cells such as neutrophils in response to cytokine generation²⁾, and the expression of adhesion factors³⁾.

It has recently been reported that the elevation of blood surfactant protein (SP) in the presence of ARDS is very likely to be a cause of ARDS or a defining prognostic factor^{4, 5)}. We have also reported the significance of SP in ARDS^{6~8)}.

The Type II phospholipase A₂ (type II PLA₂) concentration is high at local sites of inflammation⁹⁾. Vadas et al. have reported that type II PLA₂ has a strong pyogenic action¹⁰⁾ and that it plays a role in sepsis and septic shock¹¹⁾. We have also described the involvement of type II PLA₂ in sepsis^{12~14)}. Some reports have recently shown type II PLA₂ in respiratory disorders^{15, 16)}. On the other hand, tumor necrosis factor α

Michiko Miyata et al.: *Department of Critical Care Medicine, School of Medicine, Iwate Medical University, 19-1 Uchimaru, Morioka 020-8505, Japan.

**Department of Surgery I, School of Medicine, Iwate Medical University, 19-1 Uchimaru, Morioka 020-8505, Japan.

(TNF- α) and interleukin 1 (IL-1) are generated by a variety of cells, and play major roles in inflammatory reactions. These inflammatory cytokines enhance type II PLA₂ generation by target cells, and type II PLA₂ promotes eicosanoid generation. This process is considered to be one of the mechanisms underlying inflammatory reactions of cytokines^{17, 18}.

It has also been reported that type II PLA₂ suppresses the function of surfactant¹⁹.

In this study, we investigated blood levels of SP-A, SP-D and type II PLA₂, as well as those of inflammatory cytokines including TNF- α and interleukin 8 (IL-8), at the time of ALI/ARDS onset in sepsis patients.

Patients and Methods

Consent to participate in this study was obtained from the patients or their family members. 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 Committee²⁰. The diagnosis of ALI/ARDS conformed to the criteria reported by *Bernard et al.*²¹.

There were 20 patients, 14 men and 6 women, with diffuse peritonitis, with which sepsis was associated. Their ages ranged from 27 to 88 years (mean, 60.0 years). ALI/ARDS were associated with the condition in 12 patients (aged 58.6 ± 17.2 years). There was no significant difference in age (64.5 ± 11.0 years) between the ALI/ARDS patients and those without ALI/ARDS.

SP-A and SP-D levels were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Teijin Institute of Biomedicine, Tokyo, Japan). The method was based on that of Shimizu and

coworkers^{22~24}. Cut-off levels of SP-A and SP-D were 43.8 and 109.8 ng/mL, respectively.

The blood level of type II PLA₂ was measured by immunoradiometric assay (IRMA) (Shionogi Research Institute, Osaka, Japan)²⁵. The normal level was defined as being lower than 3.7 pg/mL.

The blood level of TNF- α was measured by ELISA (Medogenix, Fleurus, Belgium). The measurement limit is 3 pg/mL. The blood IL-8 level was also measured by ELISA (TFB, Tokyo, Japan). The measurement limit is 3 pg/mL.

All data were expressed as the mean \pm standard deviation (SD). The significance of differences was analyzed by the non-matched Wilcoxon test, and a difference at $p < 0.05$ was considered significant. Correlation coefficients were determined using Pearson's test, and correlations at $p < 0.05$ were considered significant.

Results

The SP-A level in the presence of ALI/ARDS with diffuse peritonitis was 37.6 ± 16.2 ng/mL. The maximum SP-A level during the course was 29.9 ± 8.2 ng/mL in the group without ALI/ARDS. Thus, there was no significant difference in SP-A level between the groups with and without ALI/ARDS (**Fig. 1**).

The SP-D level in the presence of ALI/ARDS was 476.3 ± 391.2 ng/mL while the maximum SP-D level during the course was 85.9 ± 35.0 ng/mL in the group without ALI/ARDS. Thus, the level was significantly higher in the group with ALI/ARDS (**Fig. 2**).

The Type II PLA₂ level in the presence of ALI/ARDS was 154.6 ± 102.3 ng/mL, while the maximum level during the course was 42.3 ± 30.9 ng/mL in the group without ALI/ARDS. Thus, the level was significantly higher in the group with ALI/ARDS (**Fig. 3**).

The TNF- α level in the presence of ALI/ARDS was 209.0 ± 284.5 pg/mL, while the maximum level during the course was $48.5 \pm$

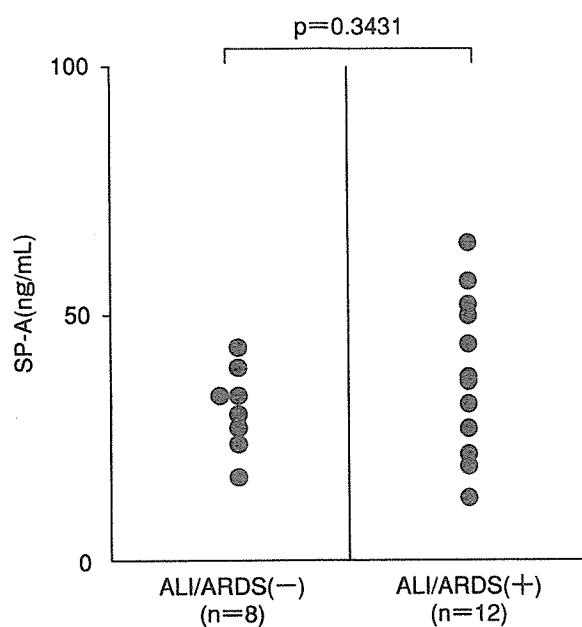


Fig. 1 The SP-A levels in patients with ARDS and without ARDS.

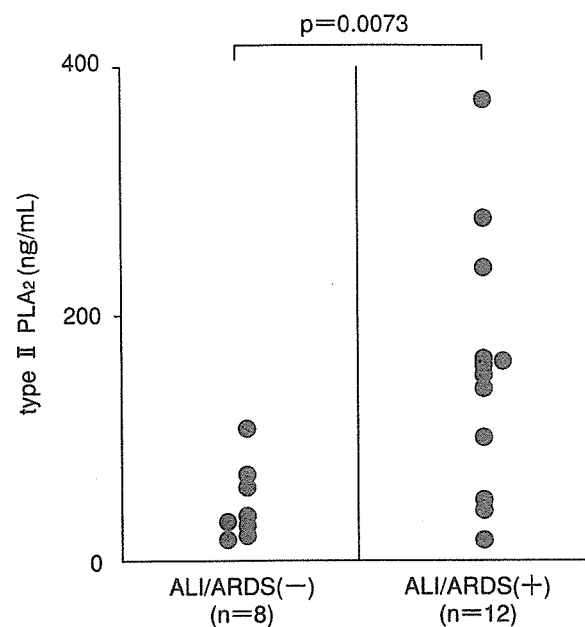


Fig. 3 The type II PLA₂ levels in patients with ARDS and without ARDS.

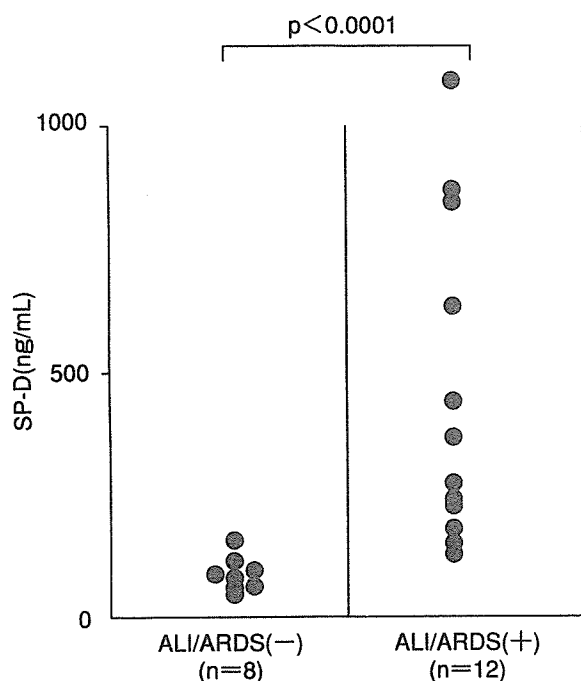


Fig. 2 The SP-D levels in patients with ARDS and without ARDS.

28.0 pg/mL in the group without ALI/ARDS. Thus, the level was significantly ($p = 0.0015$) higher in the group with the ALI/ARDS

The maximum blood IL-8 level during the

course was 58.5 ± 30.2 pg/mL in the group without ALI/ARDS. Thus, the maximum IL-8 level was significantly ($p = 0.0473$) higher in the group with ALI/ARDS.

There was no significant ($p = 0.1343$) correlation between SP-A and SP-D levels ($r = 0.3464$).

There was no significant correlation between SP-D and TNF- α , whereas there was a significant ($p = 0.0001$) correlation between SP-D and IL-8 levels ($r = 0.7967$).

There was also a significant correlation between SP-D and type II PLA₂ levels (Fig. 4).

Discussion

Sepsis is frequently associated with the rising severity of diffuse peritonitis. Furthermore, ARDS is associated with sepsis at a frequency of 38%, and the association of ARDS has been considered an important prognostic factor²⁶.

In this study, SP-D and type II PLA₂ were elevated in ALI/ARDS associated with diffuse peritonitis. Blood levels of inflammatory cytokines, i.e., TNF- α and IL-8, were also elevated at the time ARDS manifested. However, while

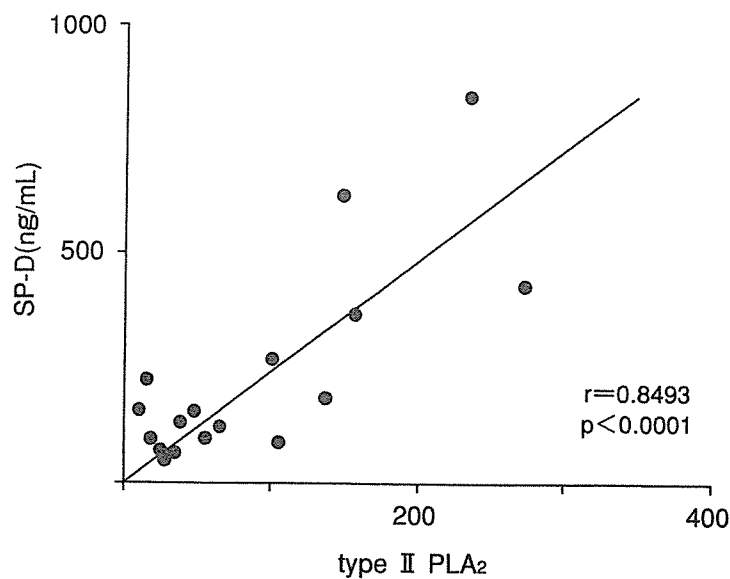


Fig. 4 The correlation between SP-D and type II PLA₂ levels.

SP-A showed a tendency toward elevation in ALI/ARDS, there was no significant elevation of SP-A in the group without ALI/ARDS. SP-A is involved in pulmonary surfactant homeostasis and is closely associated with alveolar immunity and inflammation including increased phagocytosis of alveolar macrophages and suppression of cytokine release. Many details regarding the function of SP-D remain unknown, but SP-D is considered to be involved in alveolar immunological control via macrophages in a manner similar to that of SP-A.

Many details regarding the mechanisms underlying manifestations of SP-A and SP-D in blood also remain unclear. The following are considered to be involved in these mechanisms: Increased generation of type II cells, alveolar epithelial lesions or alveolar basement membrane injury, capillary hyper-permeability, etc. In cardiogenic pulmonary edema, however, with which capillary hyper-permeability is associated, the blood SP-A level is not increased, while it is increased in experimentally radiation-induced pneumonitis leading to basement membrane injury. On the basis of these observations, we speculate that increases in the generation of

type II cells and alveolar epithelial lesions or alveolar basement membrane injury are the most likely mechanisms accounting for the elevations of SP-A and SP-D in blood.

A report has also shown that surfactant suppresses secretory PLA₂ expression from guinea-pig alveolar macrophages²⁷⁾. Other studies have shown that respiratory disorders occur in response to inactivation of surfactant by phospholipase A₂^{28, 29)}.

The type II PLA₂ elevation was consistent with the SP-D elevation, showing that SP-D was released into the bloodstream as a result of damage to pulmonary tissue by type II PLA₂. This suggests that inhibition of the activity of type II PLA₂ suppresses pulmonary tissue damage, thereby inhibiting the manifestations of ARDS.

The SP-D elevation in the bloodstream of an ARDS patient indicates an SP-D deficiency in pulmonary tissue, ultimately demonstrating that it would be reasonable to administer surfactant for the purpose of treating ARDS.

Elevations of TNF- α and IL-8 reflect inflammatory reactions, suggesting that both are significantly involved in type II PLA₂ genera-

tion.

The present observations suggest that SP-D and type II PLA₂ play major roles in the onset of ALI/ARDS in the presence of diffuse peritonitis.

References

- 1) King, R.J. and Clements, J.A.: Surfactant active materials from dog. II. Composition and physiological correlations. *Am J Physiol* **223** : 715 - 726, 1972.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) Doyle, I.R., Nicholas, T.E. and Bersten, A.D.: Serum surfactant protein-A levels in patients with acute cardiogenic pulmonary edema and adult respiratory distress syndrome. *Am Respir Crit Care Med* **152** : 307 - 317, 1995.
- 5) Greene, K.E., Wright, J.R., Steinberg, K.A., Ruzinski, J.T., Caldwell, E., Wong, W.B., Hull, W., Whitsett, J.A. et al.: Serial changes in surfactant-associated proteins in lung and serum before and after onset of ARDS. *Am J Respir Crit Care Med* **160** : 1843 - 1850, 1999.
- 6) Endo, S., Sato, N., Yamada, Y. et al.: Surfactant protein A and D (SP-A, SP-D) levels in patients with septic ARDS. *Res Commun Molecul Pathol Pharmacol* **111** : 245 - 251, 2002.
- 7) Kitamura, M., Endo, S., Sato, N. et al.: Study of surfactant D (SP-D) in septic ARDS: report of three cases. *Crit Care & Shock* **6** : 114 - 117, 2003.
- 8) Nakae, H., Endo, S., Sato, N. et al.: Surfactant protein-D and polymorphonuclear leukocyte elastase concentrations in patients with septic acute respiratory distress syndrome. *Crit Care & Shock* **7** : 159 - 163, 2004.
- 9) 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.
- 10) Vadas, P. and Pruzanski, W.: Biology of disease. Role of secretory phospholipase A₂ in the pathobiology of disease. *Lab Invest* **55** : 391 - 404, 1986.
- 11) 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.
- 12) Endo, S., Inada, K., Yamashita, H. et al.: Platelet-activating factor acetylhydrolase activity (PAF-AH), type II phospholipase A₂, and cytokine levels in patients with sepsis. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* **83** : 289 - 295, 1994.
- 13) Endo, S., Inada, K., Nakae, H. et al.: Plasma levels of type II phospholipase A₂ and cytokines in patients with sepsis. *Res Commun Molecul Pathol Pharmacol* **90** : 413 - 421, 1995.
- 14) Nakae, H., Endo, S., Inada, K. et al.: Nitrite/nitrate and type II phospholipase A₂, and platelet-activating factor levels in patients with septic shock. *Res Commun Molecul Pathol Pharmacol* **92** : 1331 - 1339, 1996.
- 15) 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.
- 16) 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.
- 17) Pruzanski, W. and Vadas, P.: Phospholipase A₂- α mediator between proximal and distal effectors of inflammation. *Immunol Today* **12** : 143 - 146, 1991.
- 18) 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.
- 20) Members of the American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus

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.

- 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.
- 21) 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.
- 22) Shimizu, H., Hosoda, Y., Mizumoto, M. et al.: Improved immunoassay for the determination of surfactant protein A (SP-A). *Tohoku J Exp Med* **157** : 269 - 278, 1989.
- 23) Honda, Y., Kuriki, Y., Matsuura, E. et al.: Pulmonary surfactant protein-D in sera and bronchoalveolar lavage fluids. *Am J Respir Crit Care Med* **152** : 1861 - 1866, 1995.
- 24) Nagae, H., Takahashi, Y., Kuriki, Y. et al.: Enzyme-linked immunosorbent assay using F(ab')₂ fragment for the detection of human pulmonary surfactant D in sera. *Clin Chim Acta* **266** : 157 - 171, 1997.
- 25) 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.
- 26) Hudson, L.D., Milberg, J.A., Anardi, D. et al.: Clinical risks for development of the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* **151** : 293 - 301, 1995.
- 27) 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.
- 28) 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* **159** : 391 - 400, 1997.
- 29) 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, 1998.
-

Tsukasa Wada · Kiyoshi Kuroda · Yuki Yoshida ·
Kuniaki Ogasawara · Akira Ogawa · Shigeatsu Endo

Local elevation of the anti-inflammatory interleukin-10 in the pathogenesis of chronic subdural hematoma

Received: 28 January 2005 / Revised: 24 October 2005 / Accepted: 28 December 2005 / Published online: 10 March 2006
© Springer-Verlag 2006

Abstract We investigated the relationship between inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of chronic subdural hematoma (CSDH) by measuring the plasma and subdural fluid levels of interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8), and interleukin-10 (IL-10). The levels of IL-6, IL-8 and IL-10 were measured in the subdural fluid obtained from 34 patients with CSDH, using the enzyme-linked immunosorbent assay. The patients were classified into a high IL-10 group and a low IL-10 group according to the level of IL-10 in their subdural fluid samples. The subdural fluid levels of IL-6 and IL-8 were significantly higher in the high IL-10 group than in the low IL-10 group ($P < 0.05$). A tendency for the patients in the low IL-10 group to show the separated or layer type of pattern on the CT scans was noted.

Keywords Chronic subdural hematoma ·
Anti-inflammatory cytokine · Interleukin-10 ·
Interleukin-8 · Interleukin-6

Introduction

Chronic subdural hematoma (CSDH) is well known to occur following even mild head trauma, especially in elderly patients [6, 7, 14]. Recently, local elevation of the levels of inflammatory cytokines, including those of the tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1- β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), and interleukin-8 (IL-8), has been shown in the subdural fluid in cases of CSDH and

inflammation has been proposed as playing a leading role in the pathogenesis of CSDH [2, 20].

Interleukin-10 (IL-10) is an anti-inflammatory cytokine released by monocytes and macrophages, and suppresses the production of inflammatory cytokines by the monocytes [1, 19]. If inflammation has been proposed as playing a leading role in the pathogenesis of CSDH, local change of the anti-inflammatory IL-10 may relate with pathological features of CSDH. To evaluate the role of IL-10 in the pathogenesis of CSDH, we measured the levels of IL-10, IL-6 and IL-8 of subdural fluid in CSDH. We discussed the relationship between local elevation of the inflammatory and anti-inflammatory cytokines and radiological features of CSDH.

Patients and methods

Thirty-four patients (29 males and five females; age range, 52–90 years; mean, 71.0 years) of CSDH were enrolled in the study. Patients with recurrent CSDH were excluded. In 29 of 34 patients, head trauma of various degrees of severity was the cause of CSDH. Nine of 34 patients received aspirin or ticlopidine as antiplatelet drugs and one patient received warfarin preoperatively. No patients presented any other risk factors for CSDH, such as chronic alcohol abuse and severe brain atrophy. CSDH was diagnosed based on computed tomography (CT), and none of the patients exhibited any signs of systemic inflammation. Blood examination was conducted in all patients on the day of the surgery, for a complete blood count and measurement of the serum level of C-reactive protein. All the patients were treated surgically by a small burr-hole craniotomy and irrigation, followed by external closed drainage, under local anesthesia. CT was performed 24 h, 7 days, 1 month, 3 months, and 6 months after the surgery, if there was no evidence of recurrent CSDH. Recurrence was considered to have occurred if there was evidence within 6 months of the surgery of increased thickness of the residual CSDH on CT images compared with that in the CT images obtained 7 days postoperatively.

T. Wada · K. Kuroda · Y. Yoshida · S. Endo
Department of Emergency Medicine, Iwate Medical University,
Uchimaru 19-1,
Morioka, 020-8505, Japan

T. Wada (✉) · K. Ogasawara · A. Ogawa
Department of Neurosurgery, Iwate Medical University,
Uchimaru 19-1,
Morioka, 020-8505, Japan
e-mail: twada@iwate-med.ac.jp
Tel.: +81-19-6515111
Fax: +81-19-6258799

We performed repeated CT at 2-week intervals for the patients who had recurrent CSDH. We considered surgical treatment when there was evidence of development of recurrent CSDH on repeated CT.

The levels of IL-6, IL-8 and IL-10 were determined by enzyme-linked immunosorbent assay. Samples of subdural fluid were collected directly from the CSDH at the time of the surgery. All the samples were centrifuged at 3,000 rpm for 10 min, and the supernatants were stored in sealed polypropylene tubes at -80°C until analysis. The all cytokines were assayed using enzyme-linked immunosorbent assay kits (R&D systems, Minneapolis, Minn.).

CSDH was classified into four types based on the pattern of the lesions on CT scans. Group 1: separated or layer type, consisting of two components of different densities, with a boundary in between; Group 2: laminar or mixed-density type, consisting of a homogenous density, with a high-density layer along the inner membrane; Group 3: trabecular type, consisting of a high-density septum between the inner and the outer membranes against a low-density to isodense background; Group 4: represented by a high-density, low-density, or isodense type of lesion, according to the classification suggested by Frati et al. [2].

For analysis of the relationship between the inflammatory cytokines IL-6 and IL-8, and the anti-inflammatory cytokine IL-10, we classified the patients into two groups: a high IL-10 group and a low IL-10 group. The differences in the levels of the inflammatory cytokines IL-6 and IL-8 between the high IL-10 group and low IL-10 group were tested by the Mann-Whitney test. The levels of these cytokines were also compared among the four groups divided according to the patterns on the CT scans, by Scheffé's *F* method.

Results

In all patients, blood cell count and serum level of C reactive protein were normal. Figure 1 shows the level of IL-10 in subdural fluid in all patients. Each patient was sorted into either a group with IL-10 under 60 pg/dl or a group with IL-10 over 200 pg/dl, as shown in the bar graph of Fig. 1. Consequently, we classified the patients into two groups: a high IL-10 group, in which the subdural fluid IL-10 level was over 200 pg/dl, and a low IL-10 group, in which the subdural fluid IL-10 level was under 60 pg/dl.

The subdural fluid levels of IL-6 and IL-8 were significantly higher in the high IL-10 group than in the low IL-10 group ($P<0.05$) (Table 1). The differences in the subdural fluid levels of IL-6, IL-8, and IL-10 among the four groups classified by the lesion pattern on CT were not significant, but a tendency for patients from Group 1 to show a low level of IL-10 was noted (Table 2).

Only one patient had a recurrence of CSDH in this study. This patient received aspirin pre- and postoperatively. In this patient who had CSDH classified as Group 2, the level of IL-10 in subdural fluid was 36.1 pg/dl.

Table 1 Subdural fluid levels of inflammatory cytokines in the high IL-10 vs low IL-10 group. Values represent means \pm standard deviation

	IL-6 (pg/dl)	IL (pg/dl)
IL-10 over 200 pg/dl ($n=5$)	1,477 \pm 36.13*	776 \pm 147.8**
IL-10 under 60 pg/dl ($n=29$)	1,053 \pm 506.4	545.4 \pm 307.6

*Significant difference in the level of IL-6 between two groups ($P=0.022$)

**Significant difference in the level of IL-8 between two groups ($P=0.044$)

Fig. 1 Bar graph showing the level of IL-10 in the subdural fluid in CSDH in all patients. Each patient was sorted into either a group with IL-10 under 60 pg/dl or a group with IL-10 over 200 pg/dl as shown in here

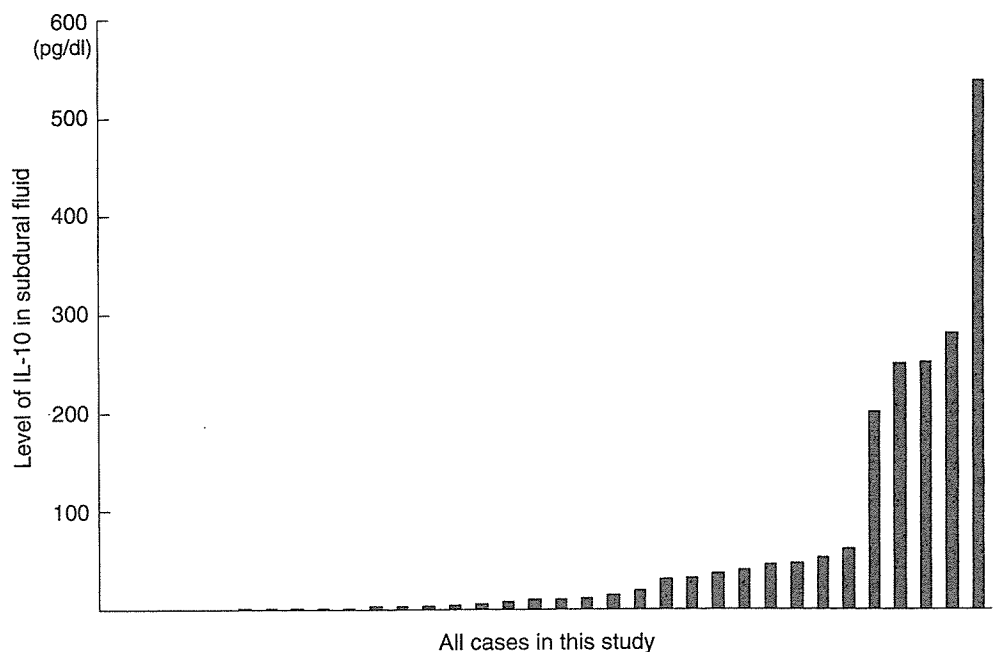


Table 2 The levels of cytokines in subdural fluid by classification of CT scanning pattern. Values represent means \pm standard deviation

Group ^a	IL-6 (pg/dl)	IL-8 (pg/dl)	IL-10 (pg/dl)
Group 1 (n=3)	1,138 \pm 523.2	663.0 \pm 179.4	15.5 \pm 26.1
Group 2 (n=4)	1,321 \pm 258.8	741.4 \pm 175.2	56.4 \pm 96.4
Group 3 (n=8)	1,374 \pm 197.6	575.7 \pm 308.8	57.7 \pm 80.8
Group 4 (n=19)	959.9 \pm 566.2	533.7 \pm 330.6	64.8 \pm 140.6

^aGroup 1 the separated or layering type; Group 2 the laminar or mixed-density type; Group 3 the trabecular type; Group 4 a high-density, low-density, or isodense type

Discussion

CSDH refers to a collection of blood in the space formed by cleavage of the inner dural layer (Haines and co-workers called this layer the dural border cell layer) after head trauma [8, 9, 13–15]. Recent studies have reported the local elevation of inflammatory cytokines in the cavity of the CSDH and support the hypothesis that local inflammation, angiogenesis, increased vascular permeability, and increased coagulative and fibrinolytic activity may be involved in the pathogenesis and progression of CSDH [3–5, 10–12, 16, 20, 21].

Inflammatory cytokines can stimulate the production of additional cytokines, which, together with the former, generate tissue pathology in human inflammatory diseases. A major deactivator of activated cytokine-producing cells is the anti-inflammatory cytokine IL-10 [1, 19]. We found the high IL-10 group showed significantly higher subdural fluid levels of IL-6 and IL-8 compared with the low IL-10 group. Our data on IL-10 suggest that the inflammatory process is activated during the formation of CSDH, while the balance of activation between inflammatory cytokines and anti-inflammatory cytokines is maintained. This phenomenon is similar to the inflammatory process in non-specific inflammation. Therefore, the elevation of IL-10 suggests that inflammation in the pathogenesis of CSDH may regulate it last.

Interestingly, the level of IL-10 in the subdural fluid tended to be lower in patients belonging to the Group 1 CT pattern (see Table 2). However, no significant differences in the levels of these cytokines were found among the groups divided on the basis of the lesion patterns on CT scans. Previous studies have reported that cases of CSDH showing the Group 1 CT pattern, which tend to rebleed easily, showed higher levels of inflammatory cytokines compared with other types of CSDH [2, 17, 18, 20]; therefore, elevation of the levels of inflammatory cytokines might be a risk factor for recurrence of CSDH [20]. However, our results did not support these considerations. We consider that it is difficult to explain the elevated levels of inflammatory cytokines simply by the effects of one kind of pathological event, such as bleeding into the subdural space. However, evaluation of only three patients showing the Group 1 pattern of CSDH on CT in our series may be statistically difficult. Similarly, it is difficult to evaluate the relationship between recurrence and level of IL-10, because

only one patient had recurrence of CSDH in this study. We will investigate more cases with Group 1 pattern of CSDH and/or recurrent CSDH in order to demonstrate the role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in pathogenesis of CSDH which tend to rebleed easily.

The level of IL-10 elevated in subdural fluid of CSDH locally like inflammatory cytokines such as IL-6 or IL-8. The local activation of IL-10 in CSDH was similar to that in other non-specific inflammation. We suggest that IL-10 acts as a deactivator of inflammation in the pathogenesis of CSDH.

References

1. Feldmann M, Brennan FM, Maini RN (1996) Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu Rev Immunol* 14:397–440
2. Frati A, Salvati M, Mainiero F, Ippolity F, Rocchi G, Raco A, Caroli E, Cantore G, Delfini R (2004) Inflammation markers and risk factors for recurrence in 35 patients with a post-traumatic chronic subdural hematoma: a prospective study. *J Neurosurg* 100:24–32
3. Fujisawa H, Ito H, Saito K, Ikeda K, Nitta H, Yamashita J (1991) Immunohistochemical localization of tissue-type plasminogen activator in the lining wall of chronic subdural hematoma. *Surg Neurol* 35:441–445
4. Fujisawa H, Ito H, Kashiwagi S, Nomura S, Toyosawa M (1995) Kallikrein-kinin system in chronic subdural haematoma: its roles in vascular permeability and regulation of fibrinolysis and coagulation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 59:388–394
5. Fujisawa H, Nomura S, Tsuchida E, Ito H (1998) Serum protein exudation in chronic subdural haematomas: a mechanism for haematoma enlargement? *Acta Neurochir* 140:161–166
6. Gardner WJ (1932) Traumatic subdural hematoma. With particular reference to the latent interval. *Arch Neurol Psychiatry* 27:847–858
7. Goodell CL, Mealey J Jr (1963) Pathogenesis of chronic subdural hematoma. Experimental studies. *Arch Neurol* 8:429–437
8. Haines DE (1991) On the question of a subdural space. *Anat Rec* 230:3–21
9. Haines DE, Harkey HL, al-Mefty O (1993) The “subdural” space: a new look at an outdated concept. *Neurosurgery* 32:111–120
10. Hirashima Y, Endo S, Hayashi N, Karasawa K, Nojima S, Takaku A (1995) Platelet-activating factor (PAF) and the formation of chronic subdural haematoma. Measurement of plasma PAF levels and anti-PAF immunoglobulin titers. *Acta Neurochir* 137:15–18
11. Hirashima Y, Endo S, Kato R, Ohmori T, Nagahori T, Nishijima M, Karasawa K, Nojima S, Takaku A (1994) Platelet-activating factor (PAF) and the development of chronic subdural haematoma. *Acta Neurochir* 129:20–25
12. Ito H, Saito K, Yamamoto S, Hasegawa T (1988) Tissue-type plasminogen activator in the chronic subdural hematoma. *Surg Neurol* 30:175–179
13. Markwalder TM (1981) Chronic subdural hematomas: a review. *J Neurosurg* 54:637–645
14. Markwalder TM, Steinsiepe KF, Rohner M, Reichenbach W, Markwalder H (1981) The course of chronic subdural haematoma after burr-hole craniostomy and closed-system drainage. *J Neurosurg* 55:390–396
15. Nakaguchi H, Tanishima T, Yoshimasu N (2000) Relationship between drainage catheter location and postoperative recurrence of chronic subdural hematoma after burr-hole irrigation and closed-system drainage. *J Neurosurg* 93:791–795
16. Nakamura S, Tsubokawa T (1989) Extraction of angiogenesis factor from chronic subdural haematomas. Significance in capsule formation and haematoma growth. *Brain Inj* 3:129–136

17. Nomura S, Kashiwagi S, Fujisawa H, Ito H, Nakamura K (1994) Characterization of local hyperfibrinolysis in chronic subdural hematoma by SDS-PAGE and immunoblot. *J Neurosurg* 81: 910–913
18. Ross SA, Halliday MI, Campbell GC, Byrness DP, Rowlands BJ (1994) The presence of tumor necrosis factor in CSF and plasma after severe head injury. *Br J Neurosurg* 8:419–425
19. Seymour RM, Henderson B (2001) Pro-inflammatory-anti-inflammatory cytokine dynamics mediated by cytokine-receptor dynamics in monocytes. *IMA J Math Appl Med* 18:159–192
20. Suzuki M, Endo S, Inada K, Kudo A, Kitakami A, Kuroda K, Ogawa A (1998) Inflammatory cytokines locally elevated in chronic subdural haematoma. *Acta Neurochir* 140:51–55
21. Suzuki M, Kudo A, Kitakami A, Doi M, Kubo N, Kuroda K, Ogawa A (1998) Local hypercoagulative activity precedes hyperfibrinolytic activity in the subdural space during development of chronic subdural haematoma from subdural effusion. *Acta Neurochir* 140:261–266

高エンドトキシン血症に対する
エンドトキシン吸着療法施行時の
High mobility group box 1 値と肺酸素化能の検討：症例報告

遠藤重厚, 佐藤信博, 小鹿雅博,
今井聡子, 高橋 学, 宮田美智子,
箱崎将規, 鈴木 泰, 八重樫泰法
岩手医科大学医学部, 救急医学講座

(Received on December 26, 2005 & Accepted on January 24, 2006)

要旨

高エンドトキシン血症患者に対してpolymyxin-B immobilized fiber (PMX) による2時間のエンドトキシン吸着療法 (PMX-direct hemoperfusion: PMX-DHP) を2回施行した. エンドトキシン値は速やかに低下し, High mobility group box 1 (HMGB1) 値も低下し, 呼吸状態は改善した. 肺酸素化能の指標である PaO_2/FIO_2 比と HMGB1 値間には有意な負の相

関関係がみられた ($r=-0.5243$, $p=0.0176$). また, エンドトキシン値と HMGB1 値間にも有意の相関関係がみられた ($r=0.5004$, $p=0.0246$). 呼吸障害発現における HMGB1 の関与の可能性, HMGB1 産生におけるエンドトキシンの関与の可能性, および高エンドトキシン血症に対する PMX-DHP の有用性が示された.

Key words : sepsis, endotoxin, PMX-DHP, HMGB1, ARDS

I. はじめに

グラム陰性桿菌の外膜に存在するエンドトキシンが種々の細胞を活性化してサイトカインを中心とする多くの液性因子を産生し, これらが複合して多彩な病態を惹起することを我々はこれまで報告をしてきた¹⁻³⁾. 一方, High mobility group box 1 (HMGB1) はエンドトキシンショックにおいて, 致死因子として作用すると報告され⁴⁾, その後多くの病態と HMGB1 について検討されてきた^{5,6)}. 最近, HMGB1 と急性呼吸障害との関わりについても報告されてきた^{7,8)}.

エンドトキシン血症の治療手段として polymyxin-B immobilized fiber (PMX) が開発され, 臨床において用いられてきた⁹⁾. 我々は, 高感度エンドトキシン測定法を用いてその有用性についてこれまで報告してきた^{10, 11)}.

今回, 高エンドトキシン血症から敗血症性多臓器不全症候群を合併した患者に対して PMX によるエンドトキシン吸着療法 (PMX-direct hemoperfusion: PMX-DHP) を施行した患者のエンドトキシン値, HMGB1 値, および肺酸素化能 (PaO_2/FIO_2 比: P/F 比) について検討したので報告する.

II. 症 例

症例: 58歳, 男性

既往歴: 特記すべきもの無し

現病歴: 4月4日午前7時30分頃交通事故で受傷し, 直ちに当科に搬入された.

来院時現症: 血圧76/40mmHg, 脈拍132/分, 体温36.8度とショック状態にあったが, 意識は清明であった.

来院時診断: 骨盤骨折, 両大腿骨開放骨折, 両下腿骨開放粉碎骨折, 出血性ショックであった.

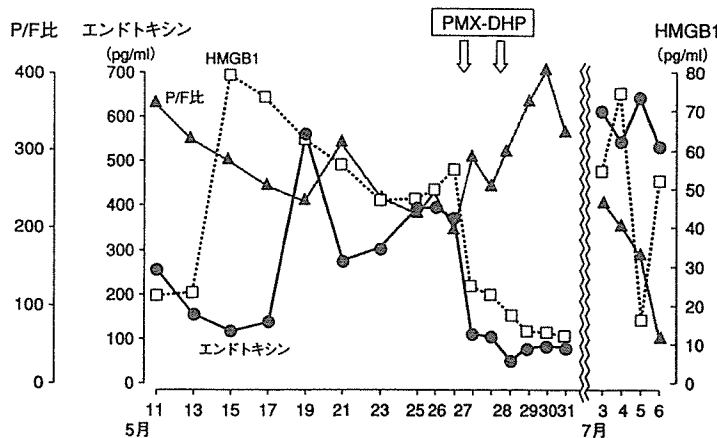


図1. エンドトキシン, HMGB1, およびP/F比の推移

臨床経過：出血性ショックに対して、輸液、輸血（濃厚赤血球、凍結人血漿）を行いながら同日午前9時より骨盤骨折に対して動脈塞栓術を施行し、バイタルサインは安定した。翌5日、両下腿の血流不良でチアノーゼが著明となったため両下腿の切断術を施行した。P/F比が186と急性呼吸促進症候群を合併し、人工呼吸器管理とした。4月下旬頃より下腿断端部に感染を合併し、創部および血液培養で*P. aeruginosa*が、創部からMRSAが検出された。BUN（30～90mg/dL）と腎機能傷害、総ビリルビン値（35～55mg/dL）と肝機能障害、汎発性血管内凝固症候群、意識障害と敗血症性多臓器不全症候群を合併した。それぞれの病態に対する治療を行うとともに血液透析、血漿交換を適宜施行した。5月初旬頃より熱発著明（39～41度）で、エンドトキシン値は高値で推移し、5月11日に血圧が低下し（82/36mmHg）、ショック状態となった。この時点でのエンドトキシン値は278pg/mlと高値を示した。敗血症性ショックに対する種々の治療を行いバイタルサインは安定したが、その後もエンドトキシン値は高値で推移した。高エンドトキシン血症に対して5月27、28日に2時間のPMX-DHPを2回施行し、エンドトキシン値の低下（374→107 pg/ml, 104→52 pg/ml）、およびHMGB1値の低下を認

めた（55.2→24.9 ng/ml, 22.7→17.6 ng/ml）（図1）。また、肺酸素化の改善もみられた（P/F比：198→288, 252→307）。本症例は、その後も、血液透析、血漿交換を含めた集学的治療を行い、一旦症状は改善したものの創部感染のコントロールが不能で7月6日に敗血症性多臓器不全症候群で死亡した。

III. 考 察

エンドトキシンは、単球やマクロファージなどの炎症細胞だけでなく、血管内皮細胞、気道上皮細胞、平滑筋細胞などの肺組織構成細胞の特異的受容体に直接作用して細胞を活性化させる。それによってtumor necrosis factor α (TNF- α), interleukin 1 (IL-1), IL-6, IL-8, migration inhibiting factor (MIF), chemokines, interferon, および活性酸素種などの各種メディエーター産生を誘導する¹²⁾。そして、これらが急性呼吸障害の発症に重要な役割を果たしていると考えられる。

HMGB1はエンドトキシンで活性化された単球やマクロファージから産生され、エンドトキシンを投与されたマウスの血中や敗血症患者の血中に存在する⁵⁾。HMGB1は分子量が約30Kダルトンで、DNAに結合し、ステロイドホルモン受容体やその他の転写因子がDNAに結合するときの調節をする¹³⁾。これが

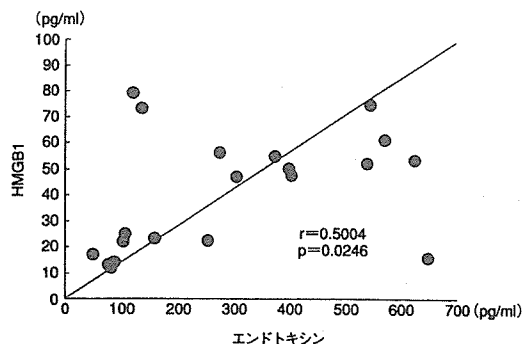


図2．経過中のエンドトキシン値とHMGB1値の相関関係 ($r=0.5004$, $p=0.0246$)

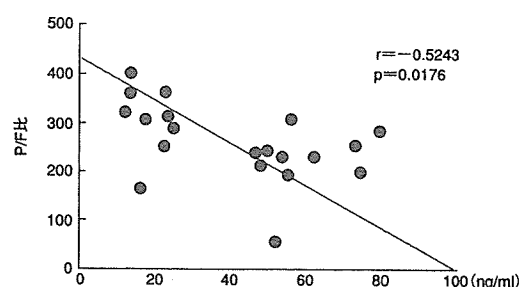


図3．経過中のHMGB1値とP/F比の相関関係 ($r=-0.5243$, $p=0.0176$)

多くの細胞の壊死に伴い細胞外に放出されると、receptor for advanced glycation end-products (RAGE) に作用してNF- κ Bを活性化し、炎症性サイトカインとして働く¹⁴⁾。また、樹状細胞、マクロファージもTNFなどで刺激されるとHMGB1を分泌する。HMGB1をC3H/HeJマウスの気道内に投与すると肺に炎症を惹起する⁷⁾。Uenoらは急性呼吸障害発現にHMGB1が重要な役割を担っていると報告している⁸⁾。

我々は多施設共同研究において、PMX-DHPにより血中のエンドトキシン値とともにサイトカイン値も低下することを報告した¹⁵⁾。しかし、PMX-DHPによりサイトカインが直接吸着されるのか、あるいはエンドトキシンが吸着されることによりエンドトキシンの刺激が軽減しサイトカインの産生が抑制されるのかは不明である。

今回の検討では、PMX-DHPにより血中のエンドトキシン値が低下し、エンドトキシン値とHMGB1値間には有意の相関関係がみられた ($r=0.5004$, $p=0.0246$) (図2)。経過中のHMGB1が高値であるほど肺酸素化能が

低下し、HMGB1値とP/F比には有意の負の相関関係がみられ ($r=-0.5243$, $p=0.0176$)、HMGB1の呼吸傷害に及ぼす影響を示唆するものと思われた (図3)。また、重症度の指標として用いられるSOFAスコア¹⁶⁾と有意ではないが相関傾向がみられ ($r=0.3940$, $p=0.0856$)、HMGB1が病態の重症度を反映している可能性も示唆された。1症例からの検討ではあるが、HMGB1が敗血症における病態形成と密接に関わっている可能性が窺われた。

我々は、これまでPMX-DHP施行後にエンドトキシン値が低下すると肺酸素化能が改善することを報告してきたが¹⁶⁾、肺酸素化能の改善は、PMX-DHPによるエンドトキシンを吸着する直接的な作用なのか、あるいはHMGB1を介した間接的な作用なのか今後症例数を重ねて検討する必要がある。

本研究の一部は、文部科学省の科学研究費、厚生科学研究費、および日本私立学校振興・共済事業団の共同研究助成費によった。

文 献

- 1) **Endo S, Inada K, Inoue Y, et al.** : Endotoxin and cytokines in patients with gastrointestinal tract perforation. *Mediators Inflamm* **1**, 45-48, 1992.
- 2) **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.
- 3) **Endo S, Inada K, Kikuchi M, et al.** : Are plasma endotoxin levels related to burn size and prognosis? *Burns* **18**, 486-955, 1992.
- 4) **Wang H, Bloom O, Zhang M, et al.** : HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science* **285**, 248-251, 1999.
- 5) **Wang H, Yang H, Czura CJ, et al.** : HMGB1 as a late mediator of lethal systemic inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* **164**, 1768-1773, 2001.
- 6) **Taniguchi N, Kawahara K, Yone K, et al.** : High mobility group box chromosomal protein 1 plays a role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis as a novel cytokine. *Arthritis Rheum* **48**, 971-981, 2003.
- 7) **Abraham E, Arcarolo J, Carmody A, et al.** : HMGB-1 as a mediator of acute lung inflammation. *J Immunol* **165**, 2950-2954, 2000.
- 8) **Ueno H, Matsuda T, Hashimoto S, et al.** : Concentrations of high mobility group box protein in experimental and clinical acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* **170**, 1310-1316, 2004.
- 9) **Hanasawa K, Tani T, Kodama M, et al.** : New approach to endotoxic and septic by means of polymyxin B immobilized fiber. *Surg Gynecol Obstet* **168**, 323-331, 1989.
- 10) **八重樫泰法, 稲田樓也, 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究会誌* **7**, 25-28, 2003.
- 11) **遠藤重厚, 八重樫泰法, 佐藤信博, 他** : PMX-DHP治療効果の検討ー高感度エンドトキシン測定法を用いた検討ー. *エンドトキシン血症救命治療研究会誌* **8**, 79-83, 2004.
- 12) **Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, et al.** : CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* **252**, 1321-1322, 1991.
- 13) **Melvin VS and Edwards DP** : Coregulatory proteins in steroid hormone receptor action : the role of chromatin high mobility group proteins HMG-1 and 2. *Steroids* **64**, 576-586, 1999.
- 14) **Anderson U, Wang H, Palmblad K, et al.** : High mobility protein (HMG-1) stimulates proinflammatory cytokine synthesis in human monocytes. *J Exp Med* **192**, 565-570, 2000.
- 15) **遠藤重厚, 佐藤信博, 八重樫泰法, 他** : 高感度エンドトキシン測定法によるPMX吸着治療法の効果判定について. *エンドトキシン血症救命治療研究会誌* **9**, 118-121, 2005.
- 16) **Vincent JL, Moreno R, Takala J, et al.** : The SOFA (sepsis-related organ failure assessment) score to describe organ dysfunction/failure. *Intensive Care Med* **22**, 707-710, 1996.