

# どう捉える敗血症，いかに対処するエンドトキシン

久志本成樹 横田 裕行 宮内 雅人 川井 真  
辻井 厚子 金 史英

**要旨** 敗血症における臓器不全の発現には，侵入病原微生物に対する過剰炎症反応が重要である。しかし，この理論的根拠は，高用量のエンドトキシン（ET）や細菌によるサイトカインストームモデルでの基礎研究結果であり，臨床病態を必ずしも反映しない。過剰炎症反応では説明できない臓器不全の遷延が予後を規定している。敗血症の病態は以下のような視点からの捉えることができる。(1) 過剰炎症反応は，従来考えられていたほど長期間に及ばず，早期からの免疫抑制状態の存在が示唆される。剖検で共通してみられる細胞死は，リンパ球と腸上皮細胞のapoptosisであり，免疫担当細胞のapoptosisは急性期からの免疫抑制に関与しうる。(2) 組織学的変化では説明のできない臓器機能障害には，ミトコンドリア機能障害が注目されている。細胞死がわずかであるにもかかわらず，臓器機能障害が認められることを支持するものであり，cytopathic hypoxiaとして捉えうる。ETは詳細に研究されている毒素であり，生理的状态の消化管内に約25gが貯蔵されるが，生体への少量の投与により敗血症病態が再現される。従来のETを標的とした抗体による臨床研究では転帰の改善を証明しえたものはない。EUPHAS trialは，腹腔内感染によるsevere sepsis/septic shockを対象として，ポリミキシンB固定化ファイバーによる血液吸着療法(PMX-DHP)による，①循環動態，②呼吸機能，SOFA (sequential organ failure assessment) score, 28日死亡率などを検討したものである。PMX-DHPは循環動態の改善のみでなく，28日死亡率の改善を示し，中間解析にて中止基準を満たしたため64例にて中止された。本治験に関わる疑問点は，①ETレベルが測定されていないが，ET除去により効果が得られたものか？ ②治療対象として重要な白血球減少，血小板減少症例が含まれていない，③標準療法群では循環動態の改善がないのか？ ④標準療法群の28日死亡率53%は高すぎないか？ ⑤ETの完全な除去が重要か？ PMX-DHPは免疫抑制状態を改善するか？ ⑥64例エントリーでの中止は尚早，などが挙げられる。本治験結果は，わが国の診療を再認識するとともに，世界に影響を与える可能性がある。

(日救急医学会誌. 2010; 21: 101-17)

キーワード：重症敗血症，免疫麻痺，ミトコンドリア，エンドトキシン吸着療法

## はじめに

日本における敗血症の疫学に関する正確な報告はない。しかし，いわゆる先進国では，coronary care unitを除く集中治療室における第2の死亡原因であ

り，全人口における死亡原因としても第10位に位置付けられることが報告されている<sup>1,2)</sup>。米国においても，過去20年間にその発生率は増加し，その増加率は1.5-8%/年，2000年には人口10万人あたり240人，年間70万人が敗血症となり，約21万人が死に至るとされる<sup>2,3)</sup>。更に敗血症は全入院症例の2%，ICU入院症例の75%までを占め，その死亡率は20-50%と高率である<sup>3-7)</sup>。わが国においても，その重要性は同様に捉えることができよう。

How to comprehend the pathophysiology of sepsis and treat the patients with endotoxemia?

日本医科大学救急医学

著者連絡先：〒113-8603 東京都文京区千駄木1-1-5

1992年に発表されたThe American College of Chest PhysiciansとSociety of Critical Care Medicineによる敗血症の定義は、発表された当初と比較して広く定着し、そして、現在もっとも広く用いられているものであろう<sup>8,9)</sup>。この定義において背景となった病態概念は、「敗血症の病態は、生体に侵入した病原微生物そのものによってではなく、病原微生物に対する生体の過剰炎症反応-uncontrolled hyperinflammation-(主として過剰なサイトカインによって誘導される)によって形成される」とするものである。しかしながら、この敗血症から死に至る病態のコンセプトは、近年、変化しつつあり、新たな病態の捉え方を認識する必要がある<sup>10)</sup>。

エンドトキシンは、敗血症、とくにグラム陰性菌敗血症の病態形成に強く関与していることは、多くの基礎的、臨床的研究が明らかにするところである<sup>11,12)</sup>。しかし、これまでエンドトキシンを標的とした多くの敗血症に関するclinical trialにおいて、有効性を証明することのできた治療法はなかった。最近、血液中からのエンドトキシン除去を目的としたポリミキシン固定化ファイバーによる血液吸着法(PMX-DHP)が、腹腔内感染症による敗血症性ショックの循環動態を改善するだけでなく、28日死亡率を早期治験中止とするまで有意に改善したことが報告された<sup>13)</sup>。敗血症の病態に関わるメディエーターとして、多くの研究が行われているエンドトキシンであるが、今また、治療の標的として注目されている。

本総説においては、過剰炎症反応のみでは理解・把握することが困難な敗血症の病態に関して、最近の知見をまとめるとともに、敗血症におけるメディエーターとしてのエンドトキシンと、これをターゲットとした治療をレビューする。ただし、敗血症病態、治療標的としてのエンドトキシンともに、その一面を述べるにとどまるものであり、現在までの知見を網羅するものではないことをあらかじめ断っておきたい。

## 敗血症は全身性炎症反応症候群であるが、必ずしもサイトカインストームではない

SIRS (systemic inflammatory response syndrome) / sepsisの定義の背景には、1980年代のサイトカインを中心とする侵襲時の生体反応に重要なメディエーターに関する研究は急速に展開があるものの、全く新たな考え方というわけではない。1972年にThomasら<sup>14)</sup>は“the microorganisms that seem to have it in for us ... turn out ... to be rather more like bystanders ... It is our response to their presence that makes the disease. Our arsenals for fighting off bacteria are so powerful ... that we are more in danger from them than the invaders.”というコメントをNew England Journal of Medicine誌に記載し、生体が細菌と戦うために有している“武器”はきわめて強力であり、これこそが感染症患者を危険な状態に陥らせていると述べている。

新たな定義に基づく臨床試験により、有効性を証明するに至ることが期待された敗血症に対する抗メディエーター療法であるが、ことごとく有効性を示すに至らず<sup>15)</sup>、わずかに活性化プロテインCが対照群の死亡率30.8%を24.6%へと、有意ではあるものの6%の改善を示したに過ぎない<sup>16)</sup>。生体の過剰炎症反応が重要であるとする理論的根拠のひとつは、高用量のエンドトキシンや細菌投与によるサイトカインストームモデルでの基礎研究の結果であり、臨床病態を必ずしも反映しない。急性期に敗血症性ショックに至る病態は過剰炎症反応であるが、過剰炎症では説明できない臓器不全の遷延が敗血症の予後を規定している<sup>17-19)</sup>。

臨床においても、髄膜炎菌による重症敗血症の急性期などにおいては、著しいtumor necrosis factor (TNF) - $\alpha$ などの上昇を伴う高サイトカイン血症を認める<sup>20,21)</sup>。しかしながら、重症敗血症を対象とした臨床研究をみると、多くの多施設共同研究のエントリー症例におけるサイトカインレベルは決して異常高値は示しておらず、急性期においてもTNF- $\alpha$

やinterleukin (IL) -1が測定感度に達していたものは10-25%程度であり、基礎研究でみられるサイトカインストームとは異なるものである<sup>22-25</sup>)。抗炎症薬による敗血症治療のメタアナリシスでは、高用量の使用では有害ですらあり、転帰の改善が期待できるサブグループは約10%にとどまると報告されており、敗血症は従来考えられていた病態とは異なる可能性があるとの認識が必要である<sup>26</sup>)。

### 敗血症では初期反応として免疫抑制が生じている可能性がある

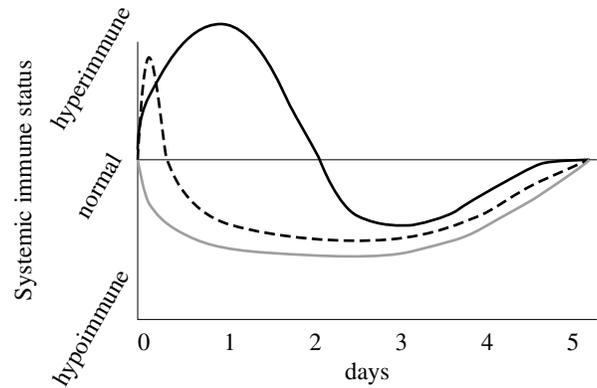
これまで、敗血症においては病初期に高サイトカイン血症を伴う過剰炎症反応状態が惹起され、この病態が一定期間持続した後に、免疫抑制状態が生じるものと考えられており、この過剰炎症反応によって生じる病態、臓器機能不全を如何に制御するかとの視点から、抗メディエーター療法が臨床において試みられてきた<sup>1, 15, 27</sup>) (Fig. 1)。

しかし、この数年において、短時間の全身性炎症反応後に抗炎症反応(免疫抑制状態)が持続する、あるいは、全身性抗炎症反応はsepsisにおける初期反応であるとする捉え方が、多くの研究者により示唆されている<sup>25, 28-30</sup>)。侵襲に対する正常な生体反応として全身性炎症反応の抑制が生じ、この抗炎症反応は代償性反応ではなく、むしろ非感染部位では病初期から優位なものであるとの新たな認識が必要であろう。更に後述する免疫担当細胞のapoptosisがこの免疫抑制に重要な関与をしている可能性が指摘されている。

重症敗血症症例に対して、一律に炎症性メディエーター抑制療法を施行しても臨床的な効果が得られない背景には、このような病態が存在することが考えられる。

### 重症敗血症死亡例の剖検から何を学ぶか

ICUに入院加療して死亡した剖検例を対象とし

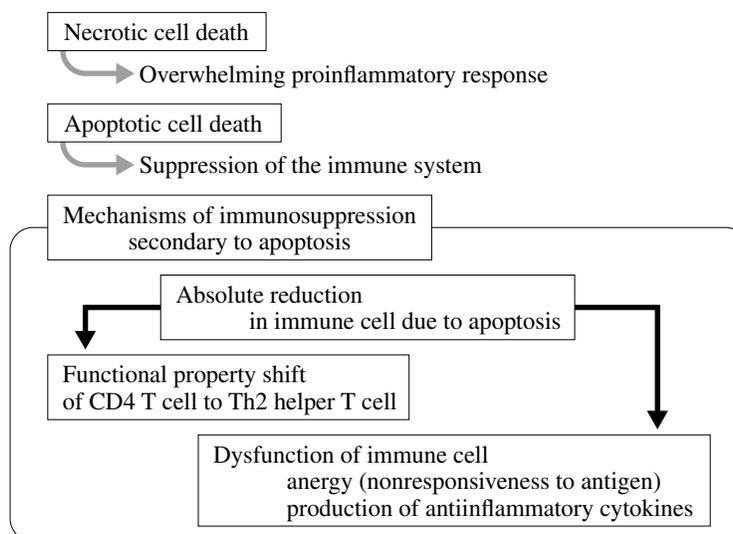


**Fig. 1.** Immunologic responses in sepsis.

The duration of overstimulated inflammatory response to infection is short-lasting than it was originally thought to be (solid line and dotted line). Immunosuppression may occur earlier phase of sepsis (dotted line), and it may be primary immunologic response to sepsis rather than a compensatory reaction (gray line).

て、臨床診断と剖検所見による診断、更に実際に行われた治療と剖検所見から考えられる治療法に乖離が存在したか否かを検討した報告がある<sup>31, 32</sup>)。Mortら<sup>31</sup>)によるsurgical ICUに入院した149例の成人剖検例の解析では、61例(41%)に臨床診断と剖検所見に乖離があり、34例(23%)では剖検所見からは治療内容、予後が異なる可能性があるとして分類され、うち85%は感染症が診断しえなかったものである。また、Blosserら<sup>32</sup>)によるmedical ICUに入院した41例の成人剖検例の解析では、14例(34%)で死亡原因に関する臨床診断と剖検所見に乖離があり、11例(27%)では剖検により認められた病態により治療内容、予後が異なる可能性があったことが報告されている。しかしながら、敗血症死亡例に関して、その直接の死亡原因を明確にしえたものはない<sup>33</sup>)。

重症敗血症死亡例の剖検から、どのような所見が認められるのであろうか。Hotchkissら<sup>33, 34</sup>)は、敗血症による多臓器不全で死亡し剖検を行った20例を対象として、細胞死としてのapoptosisに注目して検討している。Autolysisによる影響を排除するために、心停止から組織サンプルを得るまでの時間は、15分から90分：12例、90分から180分：7例、1例のみで6時間後と短時間である。免疫組織学的検索



**Fig. 2.** Role and mechanisms of apoptosis in immunologic response of sepsis.

Necrotic cell death induces overwhelming proinflammatory response, and apoptotic cell death promotes suppression of immune system by several mechanisms.

により確認される細胞死は全身の臓器に認められる apoptosis であり, とくにリンパ球と消化管上皮細胞という免疫担当細胞の apoptosis を共通の特徴的な所見として挙げており, 基礎的研究結果と一致するものである<sup>35, 36)</sup>。

Apoptosis に陥った細胞は迅速に貪食され, これは 2 時間以内にも終了しうるプロセスである。ランダムな組織切片はこのプロセスの一部を捉え得たものであり, また, 敗血症の臨床経過では apoptosis は絶えず存在している可能性のある所見と考えられる。

一方, 臨床的には多臓器不全で死亡に至っているが, その原因を組織学的検索は明確にしえたのであろうか。小葉中心性巣状肝細胞壊死 7 例, 脳梗塞, 心筋壊死をそれぞれ 3 例に認めているものの, いずれも小範囲であり, 臓器不全を説明しうる細胞壊死は確認されていない。他の報告をみても, 心, 腎, 肝, 肺などに軽度の壊死は存在しても, 臓器機能障害の程度に合致するものでなく<sup>34)</sup>, また, 腎不全などの臓器不全を合併した敗血症生存例では, 臓器機能はベースラインに回復している<sup>1)</sup>。このような臓器機能障害に対して, 細胞死がごく軽度である病態

は, 心筋虚血後にみられる “Cell hibernation (細胞の冬眠)” あるいは “Cell stunning (細胞の気絶・失神)” と同様に考えることができるのではないかとされる<sup>33)</sup>。

### 剖検で認められた敗血症における apoptotic cell death は免疫系にどのような影響を与えるか?

前項で述べた剖検研究で共通して認められる細胞死はリンパ球と腸上皮細胞の apoptosis であるが, これは免疫系および敗血症の病態にどのような影響を与えているのであろうか。細胞の壊死は炎症反応を賦活し, 一方, apoptosis は免疫反応の抑制につながると捉えることができる<sup>37)</sup> (Fig. 2)。その apoptosis が免疫系抑制を来すメカニズムとして, ①アポトーシスによる免疫担当細胞数の減少のみならず<sup>34, 38)</sup>, ② apoptosis により惹起される活性化 CD4 T 細胞の抗炎症性特性へのシフト (抗炎症性サイトカインを産生する Th2 ヘルパー T 細胞)<sup>39, 40)</sup>, 更に③anergy などの免疫担当細胞の機能低下を惹起することが報告されている<sup>41, 42)</sup>。また, マクロファージによる apoptotic

cellの貪食により、抗炎症性メディエーター産生増加、炎症性サイトカイン産生抑制が生じることも明らかにされている<sup>43)</sup>。

これら多くの機序により、免疫担当細胞のapoptosisは免疫抑制状態を来し、敗血症急性期からの病態に関与している可能性がある。

### 敗血症由来のミトコンドリア機能障害

敗血症に伴う臓器障害の発現には、①組織灌流不全、②炎症性メディエーターが重要であるが、組織学的変化では説明のできない臓器機能障害においては、ミトコンドリア機能障害が広く注目されている。

敗血症では末梢組織における微小循環障害の存在に関わらず、局所における酸素飽和度は上昇している。ミトコンドリアにおけるATP産生は全身の酸素消費の90%以上を占め、敗血症における局所酸素飽和度の上昇は、ミトコンドリアにおける酸素利用障害が存在する可能性を示唆し、ミトコンドリアの機能障害が臓器不全の発現に重要であると考えられる<sup>34, 44)</sup>。Brealeyら<sup>45)</sup>は、敗血症患者28例を対象として、入院後24時間以内に横紋筋のbiopsyを施行したところ、健常者や生存した敗血症症例と比較して、死亡例では横紋筋内ATP濃度が有意に低下していることを報告し、予後不良症例におけるミトコンドリア機能障害を直接的に証明している。また、そのメカニズムとしてnitric oxide (NO)が重要であり、グルタチオンで示される抗酸化活性の低下、NADH dehydrogenaseで示されるミトコンドリア電子伝達系機能障害はNOの過剰産生と関連し、更にこれは横紋筋内ATP濃度の低下と関連する。そして、組織におけるATP濃度が低い症例では、ショックの合併、臓器不全の発現頻度が高いことが明らかにされており、過剰に産生されるNOがミトコンドリアの機能不全に関与することが臨床例において示されている。

敗血症に伴う臓器障害の病態メカニズムは、ミトコンドリアのエネルギー代謝失調であるcytopathic

hypoxiaから臓器機能障害となり、細胞の気絶あるいは冬眠として捉えることができる。敗血症由来のミトコンドリア機能障害の発現機序に関しては、末梢循環不全による血流分布異常（ミトコンドリアへの酸素供給不全）、TNF  $\alpha$ 、活性酸素種、NOなどの関与、autophagyによるミトコンドリアの減少、ミトコンドリア内DNAの枯渇などが挙げられているものの明確ではない<sup>37, 45)</sup>。

細胞死として、necrosis, apoptosisとともにautophagyが注目されている。生体の適応反応として重要と考えられるが、敗血症における意義は今後明らかにされるものであろう<sup>46)</sup>。

### Sepsisに対する supra-normal resuscitation はなぜ有効でない

輸液療法、循環管理におけるhyper-あるいは supra-normal resuscitationの考え方があることはよく知られている。健常者においては酸素供給を増加させても、酸素消費は一定レベルで頭打ちになるのに対して、敗血症症例ではこのプラトーが存在せず、酸素供給を増やせば、それに応じて酸素消費が増えることが示されたことに基づくものである。

Septic shockに対する循環・酸素代謝管理の有用性に関する前向き研究の結果から、以下のレベルへ到達しえた症例の予後が良好であったことが示されている。

- Cardiac Index > 4.5L/min/m<sup>2</sup>
- O<sub>2</sub> delivery (酸素運搬量) > 600 ml/min/m<sup>2</sup>
- O<sub>2</sub> consumption (酸素消費量) > 170 ml/min/m<sup>2</sup>

本結果をもとに、これらの指標を管理目標として治療を行うべく多くの臨床検討が行われたが、いずれの研究においても有効性を証明するには至っていない<sup>47-51)</sup>。これらの指標への到達の可否は転帰予測の有用なパラメータであるが、心拍出量と酸素運搬量を高いレベルに維持することを基本的な治療戦略とすることは奨められない<sup>52)</sup>。

単純に酸素運搬量を増加させても、臨床的に臓器

機能, 転帰の改善が得ることができない背景には, 前項で述べた敗血症由来のミトコンドリア機能障害 (cytopathic hypoxia) による酸素利用障害が背景に存在する可能性がある。

### もっとも研究されている毒素—エンドトキシン

グラム陰性菌細胞壁全重量の10%, 外膜の75%までが, リピドAと呼ばれる脂質部分に糖鎖が結合した構造を有する lipopolysaccharide (LPS) により構成される<sup>53)</sup>。LPSは細胞壁外膜の構成成分であり, 細胞壁から容易には遊離することはない。細菌が死滅, 分解されたときなどに遊離するが, 積極的に分泌されない毒素であることからエンドトキシン (内毒素) と呼ばれる。一方, エクソトキシン (外毒素) は, 細菌が菌体外へ放出する毒素の総称である。内毒素は菌種間で毒性が非特異的であるのに対して, 外毒素の毒性は特異的である。

エンドトキシンはグラム陰性菌感染においてもっとも重要な生体反応惹起物質であり, E coli whole cellにより466遺伝子がup/down-regulateされるが, うち88%がLPSのみにより再現可能である<sup>54)</sup>。そして, 血管内皮細胞における遺伝子発現の変化にはNF- $\kappa$ Bが, 好中球ではp38 MAPKが重要であるとされる<sup>55,56)</sup>。

正常な消化管内細菌叢にはグラム陰性菌が多く存在し, 消化管は重要な endotoxin reservoir であり, 生理的状态においても約25gが貯蔵されている<sup>57)</sup>。明確にはされていないものの, エンドトキシンには生理的意義が存在することが考えられ, 事実, 基礎的研究により, エンドトキシンを完全にブロックする, あるいは反応性が著しく低下することは, 病態を悪化させる可能性があることが指摘されている<sup>33,58-60)</sup>。

エンドトキシンの投与により敗血症の病態が再現されるのか。Suffrediniら<sup>61)</sup>は, 健常成人9人に対して endotoxin 4ng/kg を静脈内投与し, 肺動脈カテーテルによる検査を含む血行動態の評価を行い,

対照健常人と比較している。投与後, インフルエンザ様の症状が出現し, 悪寒, 発熱, 関節痛, 筋肉痛, 頭痛, 嘔気などが2~3時間後にもっとも強く認められるモデルである。エンドトキシン投与によるショックでは, 直後より末梢血管抵抗の著しい減少が生じ, 心拍出量の増加にかかわらず血圧の低下が確認されており, 敗血症病態に一致するものである。更にエンドトキシン投与3時間以降, 輸液負荷に関わらず, 心拍出量は低下し, 同時に左室一回仕事量で示される心収縮力の低下が生じており, 現在考えられている敗血症ショックの病態に一致するものである。本報告においても, TNF- $\alpha$  レベルを測定しているが, 投与1時間後9例中7例で測定感度以上に上昇し, 測定しえたものでは $109 \pm 20\text{ng/l}$ であったが, 3時間後にはわずかに2例のみで測定可能であり, 5時間後にはすべて測定感度以下であったことも記載しておきたい。他にも健常成人ボランティアによるエンドトキシン投与モデルでの報告があり, 同様の症状が出現する<sup>62)</sup>。

Taveira da Silvaら<sup>63)</sup>は, 自殺企図にて大量のエンドトキシンを自己注射した検査技師が, 全身倦怠, 頭痛, 嘔気・嘔吐にて搬送され, 蘇生および経時的モニタリングを施行し, その経過を詳細に報告している。本例では, 1mgのエンドトキシンが静脈内に自己注射され, 15000ng/kgに相当し, 前述のボランティアモデルの3750倍の量である。そして, エンドトキシンのみによっても高心拍出量を伴うショック, DIC, 肝および腎機能障害, 非心原性肺水腫などの重症敗血症病態が再現されることが述べられている。

このように, エンドトキシン単独によっても, 敗血症, 重症敗血症からショックの病態が再現されるものである。

### エンドトキシンを標的とした治療と従来の抗エンドトキシン療法の結果

敗血症治療における標的としてのエンドトキシン

**Table 1.** Potential targets for antiendotoxin therapeutic approaches.

Inhibition of LPS synthesis or immuneclearance	Lipid A synthesis inhibitors LPS vaccines Anti-LPS-antibodies
Removal of LPS constituents from the blood or other body fluids	Removal of LPS or other microbial by filtration or absorption (columns, polymyxin B)
Inhibition of LPS/CD14 interactions Inhibition of cell signal transduction	LPS-binding proteins (BPI) Anti-CD14 antibodies Anti-TLR4 antibodies TLR receptor blockade NF- $\kappa$ B inhibition

LPS: lipopolysaccharide, BPI: bactericidal permeability increasing protein, TLR: toll-like receptors, NF: nuclear factor

は、以下のような視点から捉えることができる<sup>64)</sup>。

- ①グラム陰性菌感染症に対する抗菌薬治療は細菌細胞壁の破壊により、エンドトキシンの菌体外遊離を惹起するため、エンドトキシン放出量の少ない抗菌薬療法を選択する。
- ②グラム陰性菌感染に限らず、敗血症においては高エンドトキシン血症が認められることから、腸管内に大量に貯蔵されたエンドトキシン由来である gut endotoxin translocation に対する gut barrier function を改善する。
- ③選択的な抗エンドトキシン療法により体内のエンドトキシンレベルを低下させ、その影響を排除する。

抗菌薬によるエンドトキシン遊離量への影響に関しては、Simpsonら<sup>65)</sup>による報告が挙げられる。B pseudomallei による敗血症を合併した severe meloidosis 68例を対象として、non-filament inducing antibiotics である IPM と filament inducing antibiotics である CAZ を投与してエンドトキシンレベルを比較している。投与前のエンドトキシンレベルは同等であるが、投与後のエンドトキシンは CAZ で有意に高く、とくにピークを示す投与3時間後では、725.8pg/ml (231.8-2477.2) vs. 146pg/ml (54.2-895.0) と大きな差を認めている ( $p=0.008$ )。TNF- $\alpha$  や IL-6 などのサイトカイン

レベルには有意な影響は認められていないが、non-filament inducing antibiotics あるいは高用量の filament inducing antibiotics を使用することにより、エンドトキシン遊離を減少させることができる。

腸管内に貯蔵されたエンドトキシン由来の gut endotoxin translocation が生じること、更にこれを防ぐべく、腸管のバリアー機能を回復・維持することを明確に証明し得た手段はない。現時点では、グルタミンの投与による粘膜萎縮防止、更に容易に血流が低下して低灌流となりうる腸管循環の適正化が対策として考えられる。

可能性を有する選択的な抗エンドトキシン療法のターゲットとして、1) LPS 合成阻害あるいは免疫学的阻害、2) 濾過あるいは吸着によるエンドトキシンの除去、3) LPS/CD14 相互作用阻害あるいは細胞内シグナル伝達阻害などが挙げられる<sup>66)</sup> (Table 1)。臨床的有効性に関する評価は、これらの治療法のうち抗エンドトキシン抗体療法がもっとも多く試みられている。加熱処理 E. coli を用いたワクチンである polyclonal sera: J5 による無作為化比較試験の結果がまず報告された<sup>67)</sup>。グラム陰性菌による菌血症が疑われる患者を対象とし、J5 投与例では死亡率 22% (23/103 例) であり、対照例の死亡率 39% (42/109 例) と比較して有意な改善効果を示した ( $p=0.011$ )。

更に敗血症性ショック症例のみに注目すると, 44% (18/41) vs. 77% (30/39) ( $p=0.003$ ) であることから, 更なる臨床検討が行われたが, 一貫した結果を認めることはできなかった<sup>68-70</sup>。

その後, エンドトキシンに対するモノクローナル抗体であるHA-1A (human monoclonal IgM antibody) とE5 (murine monoclonal IgM antibody) を用いた多施設共同前向き検討が行われた<sup>71,72</sup>。HA-1Aは543例の敗血症症例を対象として28日死亡率を検討しているが, 全体では対照群43%, HA-1A群39%と有意差は認められていない ( $p=0.24$ )。しかしながら, 血液培養によりグラム陰性菌の証明されなかった343例では死亡率の減少はみられていないが, グラム陰性菌血液培養陽性196症例では, 対照群49%, HA-1A群30%と有意な生命予後の改善効果が認められている ( $p=0.014$ )。E5はグラム陰性菌によると判断された468例の敗血症症例を対象として30日死亡率を検討している。全体では対照群41%, E5群40%と有意差は認められていないが, 血液培養によりグラム陰性菌が証明され, かつショックを伴わない137症例では, 対照群43%, E5群30%と有意な改善効果が認められ ( $p=0.01$ ), 臓器不全からの離脱率も高いことが示された。

HA-1A, E5ともに敗血症全体を対象としての有効性は証明しえなかったものの, それぞれ有効性の示唆された, 血液培養陽性グラム陰性菌敗血症, ショックを伴わない血液培養陽性グラム陰性菌敗血症に関しての再評価が行われたが, 有効性の証明には至らなかった。HA-1Aでは非グラム陰性菌感染症で転帰を有意に悪化させることが示され<sup>73-76</sup>, 開発が中止となっている。のちにHA-1A, E5のいずれもLPSに対する抗体としてのLipid A binding capacityが不十分であることが報告されている<sup>77,78</sup>。

現在, 最も広く展開されているエンドトキシンをターゲットとした臨床治験は, エンドトキシンによる細胞内シグナル伝達に重要な受容体であるToll-like receptor 4に対する抗体であるeritoran tetrasodium (E5564) であろう。Phase 2 trialの結果が報告さ

れ<sup>79</sup>, phase 3が日米欧で進行中である。

## エンドトキシン定量と定量評価に求めるものは?

血液中から検出されるエンドトキシンは, グラム陰性菌感染によるもの (bacteremia and endotoxemia) だけでなく, 術後, 外傷, 肝不全などに伴う腸管機能低下時に, 腸管から血液中への侵入に由来するもの (non-bacteremia but endotoxemia) があると考えられている<sup>80</sup>。

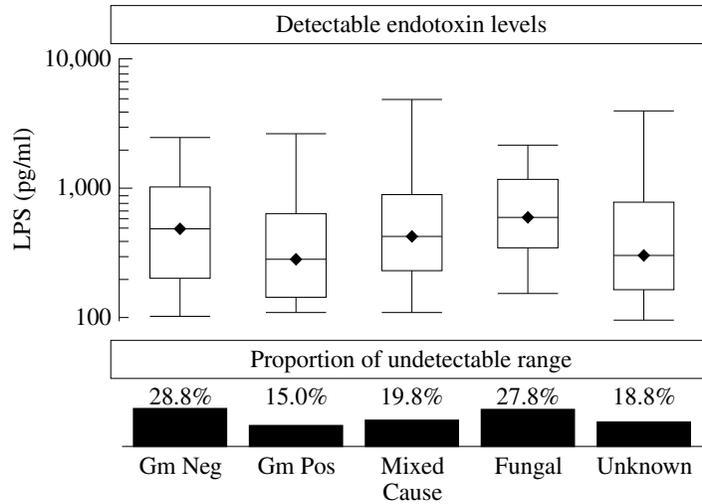
### 1. 従来のエンドトキシン測定法とその問題点

現在, 本邦において広く行われているエンドトキシン定量法はカプトガニ血球抽出成分 (limulus amoebocyte lysate: LAL) を用いた方法である。その精度を向上するために種々の血漿の前処理法が応用されているが, 正確な定量が容易でない, エンドトキシンレベルが病態を反映しない, などの問題点が指摘され, 必ずしも満足できるレベルには至っていない。

LALにはエンドトキシンと特異的に結合し活性化されるC因子と,  $\beta$ -Dグルカンで活性化されるG因子が存在するが, わが国では, G因子系反応を抑制して測定を行っている。一方, 欧米では, エンドトキシンに特異的でないリムルステストが用いられている。このため, エンドトキシン血症を呈する比率が, 本邦の報告と比較して高く, 病態の解釈に注意が必要である。欧米からの報告をみると, エンドトキシン血症が培養により証明されたグラム陰性菌感染症より高率に認められている<sup>81-83</sup> (Fig. 3)。

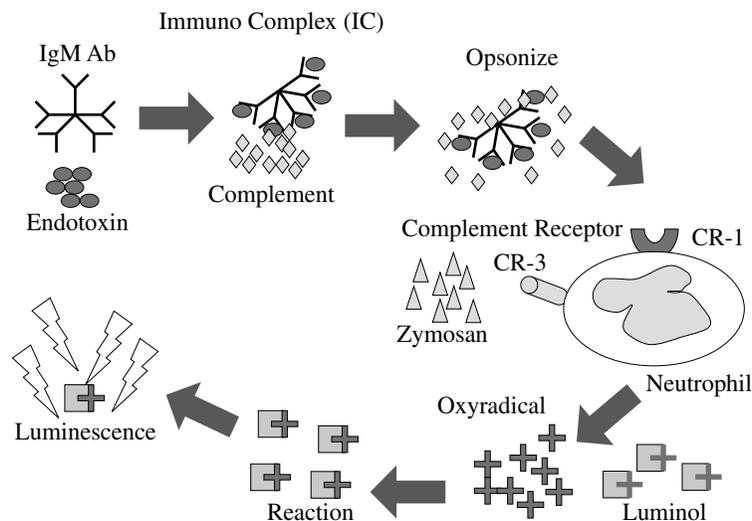
### 2. Endotoxin Activity Assay とは?

Endotoxin Activity Assay (EAA) はLAL assayとは異なるアプローチによるエンドトキシン測定法である。エンドトキシンに対するIgMモノクローナル抗体と患者血液中のエンドトキシンが補体によるopsonizationを介して好中球を活性化し, この活性化好中球により産生される活性酸素種を化学発光法に



**Fig. 3.** Detectable endotoxin levels measured by limulus amoebocyte lysate assay at onset of sepsis.

There was no significant association between the type of microorganisms that caused sepsis. Gm neg, gram-negative sepsis; Gm pos, gram-positive sepsis; Mixed cause, polymicrobial sepsis with gram-negative or gram-positive bacteria with or without fungal pathogens. (Modified from reference 83.)



**Fig. 4.** Principles of the endotoxin activity assay.

The Endotoxin Activity Assay (EAA) measures the endotoxin activity in whole blood by the priming of host neutrophil respiratory burst activity via complement opsonized LPS-IgM immune complexes. The luminol reaction in the presence of immune complexes emits light energy. This light energy is measured and recorded by a luminometer. The Relative Light Units (RLU) measured by the instrument is converted by a calculation into an Endotoxin Activity (EA) value which is reported as a percentage of the total possible activity (0 to 100%).

より測定，定量化することを利用した方法である (Fig. 4)。サンプル血液中の好中球が産生する oxyradicals を，a：エンドトキシンが全く存在しないと

き，b：大過剰のエンドトキシンが存在するとき，c：対象血によるものの3点で測定し， $c-a/b-a$  で表す。EAAは0～1の値をとる<sup>53, 84, 85</sup>。

**Table 2.** Reference range of endotoxin activity assay.

EA Range	EA Description	EA Result Interpretation
0.00 - 0.39	low	low risk of severe sepsis absence of gram neg. infection
0.40 - 0.59	intermediate	elevated risk for severe sepsis
$\geq 0.60$	high	high risk for severe sepsis

EA: endotoxin activity.

### 3. Endotoxin Activity Assay による細菌感染症とその重症度診断

健康成人97人での分布をみると, endotoxin activity (EA) level <0.40が93%を占め, 残る7%が0.4-0.6であり, 0.6をこえるものは一人も認められていない。この結果をもとに, EA levelは大きく3つに分類されている (Table 2)<sup>53)</sup>。更にICU入院患者857例の分布をみると, low level (<0.40): 367例 (42.8%), intermediate level (0.4-0.6): 228例 (26.6%), high level: 262例 (30.6%)であった。EA activity <0.4の症例の内訳をみると, 何らかの感染症を有するものは5.2%のみであり, とくにグラム陰性菌感染症合併例は1.2%であった。0.4をカットオフ値とすると, グラム陰性菌感染症診断の感度は85.3%, 特異度44.0%, 更に陰性適中率は98.6%であり, 0.4以下でのグラム陰性菌感染症の可能性は非常に低いものと考えられる。

一方, スタンダードとされるLAL assayによるエンドトキシン血症は重症であることを意味するのであろうか。Marshallら<sup>84)</sup>は, ICU入院患者74例を検討し, EAAによる評価では他の病態と比較して敗血症例でのエンドトキシンレベルが高いものの, LAL assayでは, 予定手術, 移植症例, 各種臓器不全症例などより敗血症例のエンドトキシンは低値であった。また, severe sepsisあるいはseptic shock 116例を対象としてエンドトキシン高値例 (>0.1 IU/ml)と低値例 (<0.1 IU/ml)を比較し, ショックや臓器不全の合併, 転帰にはなんら有意差がないことも報告され<sup>86)</sup>, LAL assayによる評価は, 病態や重症度を反映し得ない可能性がある。

エンドトキシンの定量的評価に何を期待するので

あろうか<sup>11, 80)</sup>。下記4つのポイントが挙げられる。

- ①グラム陰性菌の血液中への存在を反映することにより, グラム陰性菌に照準を合わせた抗菌薬の選択を可能とすること
- ②腸管低灌流状態からの消化管粘膜バリアー機能低下が存在することにより, グラム陰性菌あるいはエンドトキシントランスロケーションが存在する可能性を示唆し, 腸管低灌流状態からの離脱をはかるべく蘇生を行う指標となること
- ③Critical careにおける重症度判定と予後予測を可能とすること
- ④選択的な抗エンドトキシン療法の適応決定と効果判定を可能とすること

Bacterial translocationに関しては, 腸管内細菌が腸管粘膜バリアーを超えて体循環へ侵入するとの考え方から, エンドトキシントランスロケーション, 更に全身性炎症反応を惹起しうる炎症性メディエーターの消化管壁内における産生へと, そのコンセプトは変わってきている<sup>87, 88)</sup>。腸管低灌流によるbacterial translocationの存在を示唆する基礎的および臨床的検討は少なくないが<sup>89-91)</sup>, 臨床例における明確な証明はない。

### EUPHAS studyの結果を どのように捉えるか

2009年, JAMAに発表されたEUPHAS (Early Use of Polymyxin B Hemoperfusion in Abdominal Sepsis) trialは, 緊急手術を要する腹腔内感染症により severe sepsis/septic shockを呈する症例を対象として, PMX-DHPによる循環動態改善効果とともに, 呼吸機能,

SOFA (sequential organ failure assessment) score, 28日死亡率などの改善を示したものである<sup>13)</sup>。28日死亡率の改善が中間解析による治験中止基準を満たしたため、64例のエントリーにより中止された。概要を記述するとともに、本治験に関わる疑問点を考えてみたい。

### 1) EUPHAS studyの概要

イタリアの10施設のICUにおいて、2004年12月から2007年12月に行われ、緊急手術を要する腹腔内感染症により severe sepsisあるいはseptic shockを呈する症例を対象とした前向き多施設共同無作為化割付試験である。

開腹手術後6時間以内にランダム化され、①通常療法群 (n=30)、②PMX-DHP群 (n=34) に割り付けられた。PMX-DHP群では、手術後24時間以内に第1回PMX-DHP、終了24時間後に第2回PMX-DHP (各2時間ずつ) を施行した。その結果、72時間後、PMX-DHP群では平均動脈圧が有意に上昇し、VDI (vasopressor dependency index) も減少しているが、これらの改善は通常療法群では認められなかった。更にPaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> ratio, SOFA scoreも有意に改善し、28日死亡率は通常療法群 16/30 (53%)、PMX-DHP群 11/34 (32%) であり、SOFA scoreで補正するとPMX-DHP群で有意な低下が認められた。また、院内死亡も通常療法群 20/30 (67%)、PMX-DHP群 14/34 (41%) であり、同様の補正にてPMX-DHP群で有意な低下が認められた。

### 2) EUPHAS study および発表論文に関する指摘

本研究および発表論文内容に関して、いくつかの疑問点、確認を要するポイントが指摘されうる。

- (1) エンドトキシンレベルが測定されていないが、エンドトキシン除去により臨床効果が得られたものか？

本論文のintroductionにおいて、“グラム陰性菌感染症ではエンドトキシンレベルが上昇し、予後不良につながる”と記載されている。EAAは、low, intermediate, high level別に解析すると、グラム陰性菌感染症および重症敗血症の比率が段階的に増加

し、high levelではICU死亡率も高いことが示されている<sup>53)</sup>。しかし、エンドトキシン定量のスタンダードとされるLAL assayでは、予定手術、移植症例、臓器不全症例などより敗血症症例のエンドトキシンは低値であり<sup>84)</sup>。また、エンドトキシンレベルによりショックや臓器不全の合併、転帰には差が認められていない<sup>86)</sup>。“グラム陰性菌感染症ではエンドトキシンレベルが上昇し、予後不良につながる”ものであろうが、信頼しうるエンドトキシン測定法がない現状においては必ずしも明確な根拠のある記述とはいえないのではないだろうか。

- (2) Polymyxin B hemoperfusionは血中エンドトキシンを吸着し、予後および病態の改善の可能性はある

Introductionにおいて、“Polymyxin B hemoperfusionにより血中エンドトキシンを吸着し、予後および病態の改善の可能性はある”との記述がなされており、その背景の主要部分は2007年に発表されたPMX-DHPに関するsystematic reviewである<sup>92)</sup>。対象となった全28論文の内訳は9 randomized controlled trials, 7 non-randomized parallel studies, 12 pre-post design studiesであり、26論文はわが国からの発表論文である。PMX-DHP 978例、通常療法447例、グラム陰性菌感染の証明は71%であった。PMX-DHPにより、平均動脈圧19 mmHg上昇 (95%CI: 15-22mmHg; p<0.001)、dopamine/dobutamine投与量1.8μg/kg/min減少 (95%CI: 0.4-3.3; p=0.01)、PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> ratio 32 units 上昇 (95%CI: 23-41; p<0.001) が認められるが、通常療法群との比較ではなく、pre-post PMX-DHP比較である。死亡率の比較では、通常療法群61.5%、PMX-DHP群 33.5% (risk ratio 0.53, 95% CI: 0.43-0.65, P<0.001) と有意な改善効果が認められている。更にエンドトキシンレベルは、Endospey法によって測定した日本からの17論文455例では21.2pg/mlの低下を認めているものの (95%CI: 17.5-24.9; p<0.001)、pre-post PMX-DHP比較であり、modified LALによるヨーロッパ報告では低下は認められない。死亡率低下以外は、対照群の存在しないpre-postデータの分析である本論文を

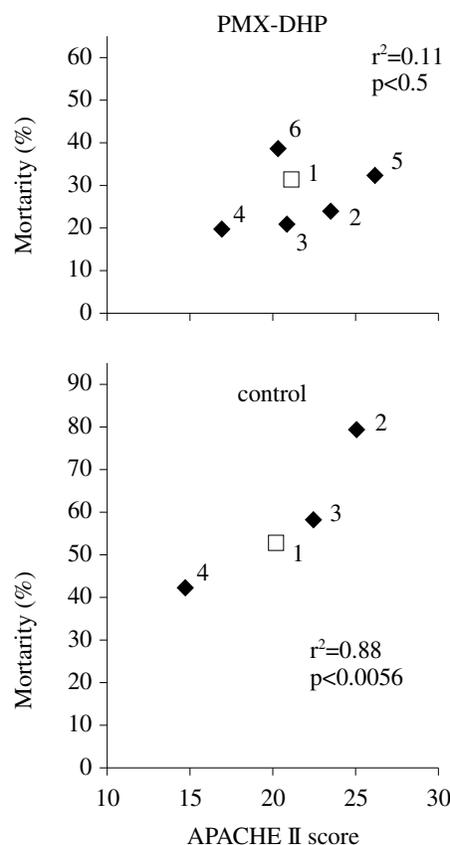
中心としてEUPHAS studyの理論的背景としているが、より多くのcase-control studyが望まれたものである。

(3) 最大の治療ターゲットとなりうる白血球減少、血小板減少症例 (DIC症例) が含まれていない本研究における除外基準に、重篤な顆粒球減少症 (白血球数 $<500/\mu\text{l}$ ) と血小板減少症 ( $<30000/\mu\text{l}$ ) が含まれている。大腸穿孔などにより一定時間を経過した場合には、しばしば認められる所見であり、われわれの治療対象として重要な症例群である。重篤な好中球減少や血小板減少症のabdominal sepsisにおける合併頻度は明らかにされていないものの、本研究エントリー症例における白血球数をみると、PMX-DHP群では平均 $13,700/\mu\text{l}$  (11,400-16,000)、通常療法群  $11,400/\mu\text{l}$  (9,000-13,800) である。白血球増多症例のみを対象とした検討であるとの認識は明確にしておく必要がある。

(4) 通常療法群では循環動態の改善がないのか？

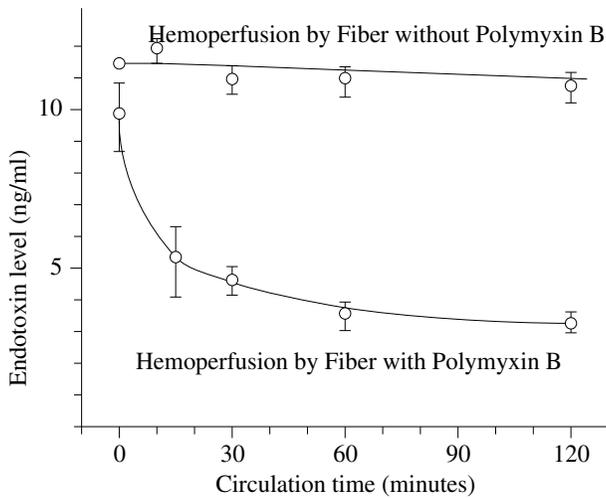
本研究の主要評価項目は、①平均動脈圧の変化、②昇圧薬必要量の変化である。PMX-DHP群では平均動脈圧は $76\text{mmHg}$  (72-80) から $84\text{mmHg}$  (80-88) へ有意に上昇し ( $p=0.001$ )、Inotropic scoreは低下した ( $p<0.001$ )。副次的項目ではあるが $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$  ratioは235から264へ有意な改善を示している ( $p=0.049$ )。しかしながら、通常療法群では72時間後に、これらの改善が認められていない。通常療法を施行しても初期72時間以内に呼吸状態が悪化することはしばしば経験するところであるが、循環動態の改善は多くの症例で認められるのではないか。2008年に敗血症性ショックに対するステロイドの有効性の報告を行ったCORTICS studyにおいても、ステロイド投与症例のみでなく対照症例においても3日目にはprobability of shockは低下している<sup>93)</sup>。通常療法群での治療内容と病態の変化に関しても検証が必要と考える。

(5) 通常療法群の28日死亡率53%、院内死亡率67%が高すぎるために有意差を認めたのではないか？



**Fig. 5.** The relationship between physiological severity and mortality in patients with abdominal sepsis requiring emergency surgery. The result of EUPHAS trial is shown as open square (1). Other closed squares represent the results of Japanese studies (2-6). The mortality of both PMX-DHP treated group (upper) and conventional treatment group (lower) in EUPHAS trial is equivalent to that of Japanese studies. Physiologic severity was evaluated by APACHEII score. (references 94-98)

Abdominal sepsisの重症例での28日死亡率53%という数字からは非常に高い印象をうける。しかしながら、上記、systematic reviewにおいても28論文中26論文が本邦からの発表であるが、28日死亡率は通常療法群61.5%、PMX-DHP群33.5%と、本研究と大差はない。また、日本国内で発表された腹部救急疾患術後敗血症症例の重症度と死亡率との関係にEUPHAS studyの結果を重ねても、その成績は国内報告と同等とみることができ (Fig. 5)<sup>94-98)</sup>、通常療法群での死亡率が高すぎるために有効性が認められたものであるとの指摘はしえない。



**Fig. 6.** Endotoxin absorption ability by polymyxin B hemoperfusion was evaluated in vitro using bovine plasma containing endotoxin. Endotoxin level of bovine plasma decreased significantly, thereafter the level reached plateau after 2 hours of perfusion. (modified from reference 100.)

#### (6) エンドトキシンの完全な除去が重要か？

本研究において、エンドトキシンレベルの測定に関しては記載がなされていない。エンドトキシンは少量でも敗血症病態が再現されうるとはすでに述べたが、完全に除去することが重要であるのか。そして、PMX-DHPにより完全な除去が可能であろうか。エンドトキシンを完全にブロックする、あるいは、反応性が著しく低下することは、病態を悪化させる可能性があることが報告されている<sup>33, 59, 60, 99</sup>。そして、PMX-DHPに関する基礎的検討において、エンドトキシンを完全に除去しうるものではないことが述べられている<sup>100</sup> (Fig. 6)。腸管は大量のエンドトキシンリザーバーとなっていることは、何らかの生理的意義を有する可能性があり、エンドトキシンを完全に除去しないPMX-DHPは、完全に阻害する治療法より有効である可能性がある。

#### (7) PMX-DHPは敗血症急性期から生じうる免疫抑制状態を改善するか？

エンドトキシンは pro-apoptotic factor の活性化を促進する<sup>34</sup>。そして、apoptotic cell death は種々のメカニズムにより免疫抑制を惹起することが明らかにされており<sup>34, 37-43</sup>、PMX-DHPによるエンドトキシン吸

着は apoptosis を抑制することにより、免疫抑制状態を改善する可能性がある。エンドトキシン除去は、炎症反応を抑制するだけでなく、敗血症の病態背景として重要と考えられる免疫抑制状態に対しても改善効果を有するという側面を持つ可能性がある。

#### (8) 64例エンタリーでの早期中止は尚早である

第1回中間解析において、PMX-DHP群で治験中止基準としての  $p < 0.029$  の要件を満たし死亡率の低下が認められた。死亡率が高い本治験対象患者に潜在的に有益である治療を受けさせないことは非倫理的であり、64例で中止となったものである。

本研究は、主要評価項目である循環動態の改善効果は有意ではあるものの、著しいものではなく、一方、副次評価項目の28日死亡率改善が中止基準に至るものであった。JAMA の editorial において、少数症例で有意差が認められたときにはその解釈に注意が必要であり、著者らも本治験の結果を確認するためには、より大きな規模でのが必要であることを認めている<sup>101</sup>。他にも統計解析方法や患者背景などに関するコメントが出されている<sup>102-104</sup>。

ショックなどを伴う abdominal sepsis に対する治療として、わが国ではPMX-DHPは標準的治療となりつつあり、本治験結果は国内での診療に変革を与えるまでのインパクトを有するかは疑問である。しかし、ショックを伴う abdominal sepsis に対する標準的な治療としての効果を再認識するものである。更なる展開には、信頼しうるエンドトキシン測定法の確立が期待される。また、より大きな規模での無作為化比較試験が必要であろう。現在の surviving sepsis campaign における sepsis management bundle には4つの elements しかない。血糖管理の有効性、ショックに対するステロイド投与のいずれも、最近の報告では肯定的なものではなく<sup>93, 105</sup>、活性化プロテインCの適応も限定的となり、かつ、推奨度も高いものではない。PMX-DHPが日本発の治療法として sepsis management bundle の element の一員に加わることを期待したい。

## 文 献

- 1) Wheeler AP, Bernard GR: Treating patients with severe sepsis. *N Engl J Med.* 1999; 340: 207-14.
- 2) Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, et al: Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med.* 2001; 29: 1303-10.
- 3) Martin GS, Mannino DM, Eaton S, et al: The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med.* 2003; 348: 1546-54.
- 4) Dombrovskiy VY, Martin AA, Sunderram J, et al: Rapid increase in hospitalization and mortality rates for severe sepsis in the United States: a trend analysis from 1993 to 2003. *Crit Care Med.* 2007; 35: 1244-50.
- 5) Padkin A, Goldfrad C, Brady AR, et al: Epidemiology of severe sepsis occurring in the first 24 hrs in intensive care units in England, Wales, and Northern Ireland. *Crit Care Med.* 2003; 31: 2332-8.
- 6) Vincent JL, Sakr Y, Sprung CL, et al: Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. *Crit Care Med.* 2006; 34: 344-53.
- 7) Dombrovskiy VY, Martin AA, Sunderram J, et al: Facing the challenge: decreasing case fatality rates in severe sepsis despite increasing hospitalizations. *Crit Care Med.* 2005; 33: 2555-62.
- 8) American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. Consensus Conference: Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med.* 1992; 20: 864-74.
- 9) Levy MM, Fink MP, Marshall JC, et al: 2001 SCCM/ES-ICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med.* 2003; 31: 1250-6.
- 10) van der Poll T, Opal SM: Host-pathogen interaction in sepsis. *Lancet Infect Dis.* 2008; 8: 32-43
- 11) Cohen J: The detection and interpretation of endotoxaemia. *Intensive Care Med.* 2000; 26: S51-6.
- 12) Nahra R, Dellinger RP: Targeting the lipopolysaccharides: still a matter of debate? *Curr Opin Anesthesiol.* 2008; 21: 98-104.
- 13) Cruz DN, Antonelli M, Fumagalli R, et al: Early use of polymyxin B hemoperfusion in abdominal septic shock: the EUPHAS randomized controlled trial. *JAMA.* 2009; 301: 2445-52.
- 14) Thomas L: Germs. *N Engl J Med.* 1972; 287: 553-5.
- 15) Riedemann NC, Guo RF, Ward PA: Novel strategies for the treatment of sepsis. *Nat Med.* 2003; 9: 517-24.
- 16) Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, et al: Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med.* 2001; 344: 699-709.
- 17) Fink MP, Heard SO: Laboratory models of sepsis and septic shock. *J Surg Res.* 1990; 49: 186-96.
- 18) Deitch EA: Animal models of sepsis and shock: a review and lessons learned. *Shock.* 1998; 9: 1-11.
- 19) O'Reilly M, Newcomb DE, Remick D: Endotoxin, sepsis, and the primrose path. *Shock.* 1999; 12: 411-20.
- 20) Girardin E, Grau GE, Dayer JM, et al: Tumor necrosis factor and interleukin-1 in the serum of children with severe infectious purpura. *N Engl J Med.* 1988; 319: 397-400.
- 21) Hatherill M, Tibby SM, Turner C, et al: Procalcitonin and cytokine levels: relationship to organ failure and mortality in pediatric septic shock. *Crit Care Med.* 2000; 28: 2591-4.
- 22) Debets JM, Kampmeijer R, van der Linden MP, et al: Plasma tumor necrosis factor and mortality in critically ill septic patients. *Crit Care Med.* 1989; 17: 489-94.
- 23) Oberholzer A, Oberholzer C, Moldawer LL: Cytokine signaling-- regulation of the immune response in normal and critically ill states. *Crit Care Med.* 2000; 28: Suppl: N3-12.
- 24) Pruitt JH, Welborn MB, Edwards PD, et al: Increased soluble interleukin-1 type II receptor concentrations in postoperative patients and in patients with sepsis syndrome. *Blood.* 1996; 87: 3282-8.
- 25) Hotchkiss RS, Nicholson DW: Apoptosis and caspases regulate death and inflammation in sepsis. *Nat Rev Immunol.* 2006; 6: 813-22.
- 26) Zeni F, Freeman B, Natanson C: Antiinflammatory therapies to treat sepsis and septic shock: a reassessment. *Crit Care Med.* 1997; 25: 1095-100.
- 27) Dinarello CA: Proinflammatory cytokines. *Chest.* 2000; 118: 503-8.
- 28) Volk HD, Reinke P, Döcke WD: Clinical aspects: from systemic inflammation to 'immunoparalysis'. *Chem Immunol.* 2000; 74: 162-77.
- 29) Munford RS, Pugin J: Normal responses to injury prevent systemic inflammation and can be immunosuppressive. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001; 163: 316-21.
- 30) Reddy RC, Chen GH, Tekchandani PK: Sepsis-induced immunosuppression: from bad to worse. *Immunol Res.* 2001; 24: 273-87.
- 31) Mort TC, Yeston NS: The relationship of pre mortem diagnoses and post mortem findings in a surgical intensive care unit. *Crit Care Med.* 1999; 27: 299-303.
- 32) Blosser SA, Zimmerman HE, Stauffer JL: Do autopsies of critically ill patients reveal important findings that were clinically undetected? *Crit Care Med.* 1998; 26: 1332-6.
- 33) Hotchkiss RS, Karl IE: The pathophysiology and treatment of Sepsis. *N Engl J Med.* 2003; 348: 138-50.
- 34) Hotchkiss RS, Swanson PE, Freeman BD, et al: Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. *Crit Care Med.* 1999; 27: 1230-51.
- 35) Ayala A, Herdon CD, Lehman DL, et al: The induction of accelerated thymic programmed cell death during polymicrobial sepsis: control by corticosteroids but not tumor necrosis factor. *Shock.* 1995; 3: 259-67.

- 36) Hotchkiss RS, Swanson PE, Cobb JP, et al: Apoptosis in lymphoid and parenchymal cells during sepsis: findings in normal and T- and B-cell-deficient mice. *Crit Care Med.* 1997; 25: 1298-307.
- 37) Exline MC, Crouser ED: Mitochondrial mechanisms of sepsis-induced organ failure. *Front Biosci.* 2008; 13: 5030-41.
- 38) Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, et al: Depletion of dendritic cells, but not macrophages, in patients with sepsis. *J Immunol.* 2002; 168: 2493-500.
- 39) Abbas AK, Murphy KM, Sher A, et al: Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature.* 1996; 383: 787-93.
- 40) Opal SM: Anti-inflammatory cytokines. *Chest.* 2000; 117: 1162-72.
- 41) Voll RE, Herrmann M, Roth EA, et al: Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature.* 1997; 390: 350-1.
- 42) Heidecke CD, Hensler T, Weighardt H, et al: Selective defects of T lymphocyte function in patients with lethal intraabdominal infection. *Am J Surg.* 1999; 178: 288-92.
- 43) Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, et al: Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest.* 1998; 101: 890-8.
- 44) Kreymann G, Grosser S, Buggisch P, et al: Oxygen consumption and resting metabolic rate in sepsis, sepsis syndrome, and septic shock. *Crit Care Med.* 1993; 21: 1012-9.
- 45) Brealey D, Brand M, Hargreaves I, et al: Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock. *Lancet.* 2002; 360: 219-23.
- 46) Hotchkiss RS, Strasser A, McDunn JE, et al: Cell death. *N Engl J Med.* 2009; 361: 1570-83.
- 47) Hayes MA, Timmins AC, Yau EH, et al: Elevation of systemic oxygen delivery in the treatment of critically ill patients. *N Engl J Med.* 1994; 330: 1717-22.
- 48) Gattinoni L, Brazzi L, Pelosi P, et al: A trial of goal-oriented hemodynamic therapy in critically ill patients. SvO2 Collaborative Group. *N Engl J Med.* 1995; 333: 1025-32.
- 49) Ronco JJ, Fenwick JC, Tweeddale MG, et al: Identification of the critical oxygen delivery for anaerobic metabolism in critically ill septic and nonseptic humans. *JAMA.* 1993; 270: 1724-30.
- 50) Boyd O, Grounds RM, Bennett ED: A randomized clinical trial of the effect of deliberate perioperative increase of oxygen delivery on mortality in high-risk surgical patients. *JAMA.* 1993; 270: 2699-707.
- 51) Sandham JD, Hull RD, Brant RF, et al: A randomized, controlled trial of the use of pulmonary-artery catheters in high-risk surgical patients. *N Engl J Med.* 2003; 348: 5-14.
- 52) Hollenberg SM, Ahrens TS, Annane D, et al: Practice parameters for hemodynamic support of sepsis in adult patients: 2004 update. *Crit Care Med.* 2004; 32: 1928-48.
- 53) Marshall JC, Foster D, Vincent JL, et al: Diagnostic and prognostic implications of endotoxemia in critical illness: results of the MEDIC study. *J Infect Dis.* 2004; 190: 527-34.
- 54) Huang Q, Liu D, Majewski P, et al: The plasticity of dendritic cell responses to pathogens and their components. *Science.* 2001; 294: 870-5.
- 55) Zhao B, Bowden RA, Stavchansky SA: Human endothelial cell response to gram-negative lipopolysaccharide assessed with cDNA microarrays. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2001; 281: C1587-95.
- 56) Fessler MB, Malcolm KC, Duncan MW, et al: A genomic and proteomic analysis of activation of the human neutrophil by lipopolysaccharide and its mediation by p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem.* 2002; 277: 31291-302.
- 57) van Deventer SJ, ten Cate JW, Tytgat GN: Intestinal endotoxemia. Clinical significance. *Gastroenterology.* 1988; 94: 825-31.
- 58) Hagberg L, Briles DE, Edén CS: Evidence for separate genetic defects in C3H/HeJ and C3HeB/FeJ mice, that affect susceptibility to gram-negative infections. *J Immunol.* 1985; 134: 4118-22.
- 59) Hotchkiss RS, Swanson PE, Knudson CM, et al: Overexpression of Bcl-2 in transgenic mice decreases apoptosis and improves survival in sepsis. *J Immunol.* 1999; 162: 4148-56.
- 60) Arbour NC, Lorenz E, Schutte BC, et al: TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat Genet.* 2000; 25: 187-91.
- 61) Suffredini AF, Fromm RE, Parker MM, et al: The cardiovascular response of normal humans to the administration of endotoxin. *N Engl J Med.* 1989; 321: 280-7.
- 62) Dandona P, Nix D, Wilson MF, et al: Procalcitonin increase after endotoxin injection in normal subjects. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994; 79: 1605-8.
- 63) Taveira da Silva AM, Kaulbach HC, Chuidian FS, et al: Shock and multiple-organ dysfunction after self-administration of Salmonella endotoxin. *N Engl J Med.* 1993; 328: 1457-60.
- 64) Kellum J: A targeted extracorporeal therapy for endotoxemia: the time has come. *Crit Care.* 2007; 11: 137.
- 65) Simpson AJ, Opal SM, Angus BJ, et al: Antibiotic-induced endotoxin release in the treatment of acute septicemic melioidosis. *J Infect Dis.* 2000; 181: 1014-9.
- 66) Opal SM, Glück T: Endotoxin as drug target. *Crit Care Med.* 2003; 31: S57-S64.
- 67) Ziegler EJ, McCutchan JA, Fierer J, et al: Treatment of gram-negative bacteremia and shock with human antiserum to a mutant Escherichia coli. *N Engl J Med.* 1982; 307: 1225-30.
- 68) Girardin E and the J5 Study Group: Treatment of severe infectious purpura in children with human plasma from donors immunized with Escherichia coli J5: a prospective double-blind study. *J Infect Dis.* 1992; 165: 695-701.
- 69) Calandra T, Glauser MP, Schellekens J, et al: Treatment of gram-negative septic shock with human IgG antibody to Es-

- cherichia coli J5: a prospective, double-blind, randomized trial. *J Infect Dis.* 1988; 158: 312-9.
- 70) Cornetta A, Baumgartner JD, Lee ML, et al: Prophylactic intravenous administration of standard immune globulin as compared with core-lipopolysaccharide immune globulin in patients at high risk of postsurgical infection. *N Engl J Med.* 1992; 327: 234-40.
- 71) Ziegler EJ, Fisher CJ, Sprung CL, et al: Treatment of gram-negative bacteremia and septic shock with HA-1A human monoclonal antibody against endotoxin. *N Engl J Med.* 1991; 324: 429-36.
- 72) Greenman RL, Schein RMH, Martin MA, et al: A controlled clinical trial of E5 murine monoclonal IgM antibody to endotoxin in the treatment of gram-negative sepsis. *JAMA.* 1991; 266: 1097-102.
- 73) French National Registry of HA-1A: The French national registry of HA-1A (Centoxin) in septic shock. A cohort study of 600 patients. The national committee for the evaluation of Centoxin. *Arch Intern Med.* 1994; 154: 2484-91.
- 74) Bone RC, Balk RA, Fein AM, et al: A second large controlled clinical study of E5, a monoclonal antibody to endotoxin: results of a prospective, multicenter, randomized, controlled trial. The E5 sepsis study group. *Crit Care Med.* 1995; 23: 994-1006.
- 75) Angus DC, Birmingham MC, Balk RA, et al: E5 murine monoclonal antiendotoxin antibody in Gram-negative sepsis: A randomized controlled trial. E5 Study Investigators. *JAMA.* 2000; 283: 1723-30.
- 76) Daifuku R, Haenftling K, Young J, et al: Phase I study of antilipopolysaccharide human monoclonal antibody MAB-T88. *Antimicrob Agents Chemother.* 1992; 10: 2349-51.
- 77) Baumgartner JD: Immunotherapy with antibodies to core lipopolysaccharide: a critical appraisal. *Infect Dis Clin North Am.* 1991; 5: 915-27.
- 78) Marra MN, Thornton MB, Snable JL, et al: Endotoxin-binding and -neutralizing properties of recombinant bactericidal/permeability-increasing protein and monoclonal antibodies HA-1A and E5. *Crit Care Med.* 1994; 22: 559-65.
- 79) Tidswell M, Tillis W, Larosa SP, et al: Eritoran Sepsis Study Group. Phase 2 trial of eritoran tetrasodium (E5564), a Toll-like receptor 4 antagonist, in patients with severe sepsis. *Crit Care Med.* 2010; 38: 72-83.
- 80) Balk RA: Endotoxemia in critically ill patients: why a reliable test could be beneficial. *Crit Care.* 2002; 6: 289-90.
- 81) Danner RL, Elin RJ, Hosseini JM, et al: Endotoxemia in human septic shock. *Chest.* 1991; 99: 169-75.
- 82) Bates DW, Parsonnet J, Ketchum PA, et al: Limulus amoebocyte lysate assay for detection of endotoxin in patients with sepsis syndrome. *Clin Infect Dis.* 1998; 27: 582-91.
- 83) Opal SM, Scannon PJ, Vincent JL, et al: Relationship between plasma levels of lipopolysaccharide (LPS) and LPS-binding protein in patients with severe sepsis and septic shock. *J Infect Dis.* 1999; 180: 1584-9.
- 84) Marshall JC, Walker PM, Foster DM, et al: Measurement of endotoxin activity in critically ill patients using whole blood neutrophil dependent chemiluminescence. *Crit Care.* 2002; 6: 342-8.
- 85) <http://www.spectraldx.com/endotoxin.htm>
- 86) Venet C, Zeni F, Viallon A, et al: Endotoxemia in patients with severe sepsis or septic shock. *Intensive Care Med.* 2000; 26: 538-44.
- 87) Steinberg SM: Bacterial translocation: what it is and what it is not. *Am J Surg.* 2003; 186: 301-5.
- 88) Balzan S, de Almeida Quadros C, de Cleva R, et al: Bacterial translocation: overview of mechanisms and clinical impact. *J Gastroenterol Hepatol.* 2007; 22: 464-71.
- 89) Diebel LN, Dulchavsky SA, Brown WJ: Splanchnic ischemia and bacterial translocation in the abdominal compartment syndrome. *J Trauma.* 1997; 43: 852-5.
- 90) Rahman SH, Ammori BJ, Holmfeld J, et al: Intestinal hypoperfusion contributes to gut barrier failure in severe acute pancreatitis. *J Gastrointest Surg.* 2003; 7: 26-35.
- 91) Holland J, Carey M, Hughes N, et al: Intraoperative splanchnic hypoperfusion, increased intestinal permeability, down-regulation of monocyte class II major histocompatibility complex expression, exaggerated acute phase response, and sepsis. *Am J Surg.* 2005; 190: 393-400.
- 92) Cruz DN, Perazella MA, Bellomo R, et al: Effectiveness of polymyxin B-immobilized fiber column in sepsis: a systematic review. *Crit Care.* 2007; 11: R47.
- 93) Sprung CL, Annane D, Keh D, et al: Hydrocortisone therapy for patients with septic shock. *N Engl J Med.* 2008; 358: 111-24.
- 94) 斎藤人志, 黒田雅利, 松澤研, 他: 大腸穿孔に起因したSIRS症例に対するPMX-DHPの有用性と限界. *日外感染症会誌.* 2006; 3: 93-100.
- 95) 堀口徹, 鹿瀬陽一, 斉藤洋一, 他: 当院にてエンドトキシン吸着カラムを用いた血液浄化法 (PMX) を施行した糞便汚染を伴う下部消化管穿孔性腹膜炎19例の検討. *エンドトキシン血症治療研究会誌.* 2000; 4: 31-7.
- 96) 木多秀彰, 木暮洋暉: エンドトキシン吸着療法導入による消化器外科腹部感染症治療の改善効果. *日外感染症研.* 1999; 11: 131-5.
- 97) 池田寿昭, 池田一美, 谷内仁, 他: 腹腔内感染による重症敗血症・敗血症性ショック症例に対するPMX-DHPの治療効果. *日腹救急医学会誌.* 2008; 28: 765-76.
- 98) 曾我幸弘, 石川雅健, 雨森明, 他: 腹部重症感染症に対するエンドトキシン吸着療法の適応について. *日腹救急医学会誌.* 1998; 18: 399-404.
- 99) Hagberg L, Briles DE, Edén CS: Evidence for separate genetic defects in C3H/HeJ and C3HeB/FeJ mice, that affect susceptibility to gram-negative infections. *J Immunol.* 1985; 134: 4118-22.
- 100) 小玉正智, 谷徹, 花沢一芳, 他: エンドトキシン除去用ポ

リミキシンB固定化繊維充填カラム (PMX) の設計, 性能評価および臨床における有用性評価. 基礎と臨床. 1994; 28: 1421-32.

- 101) Kellum JA, Uchino S: International differences in the treatment of sepsis: are they justified? JAMA. 2009; 301: 2496-7.  
102) Kida Y: JAMA. 2009; 302: 1969; author reply 1969-70.

- 103) Amaral AC: JAMA. 2009; 302: 1968-9; author reply 1969-70.  
104) Vincent JL: JAMA. 2009; 302: 1968; author reply 1969-70.  
105) NICE-SUGAR Study Investigators, Finfer S, Chittock DR: Intensive versus conventional glucose control in critically ill patients. N Engl J Med. 2009; 360: 1283-97.

## ABSTRACT

### How to comprehend the pathophysiology of sepsis and treat the patients with endotoxemia?

Shigeki Kushimoto, Hiroyuki Yokota, Masato Miyauchi, Makoto Kawai  
Atsuko Tsujii, Shiei Kim

*Department of Emergency and Critical Care Medicine, Nippon Medical School*

In the pathophysiology of sepsis leading to multiple organ dysfunction syndrome (MODS), uncontrolled hyper-inflammatory responses to infected microorganism play a pivotal role. However, the concept that MODS and death from sepsis was attributable to overstimulated immune response, which based on basic studies in which large doses of endotoxin or bacteria were administered and the animal died from “cytokine storm”, and does not reflect the clinical pictures of sepsis. The outcome of sepsis depends mainly on delayed organ failure, which cannot be explained by the concept. We can discuss the pathophysiology of sepsis as mentioned below to comprehend this condition.

- 1) The duration of overstimulated inflammatory response to infection is short-lasting than it was originally thought to be. Immunosuppression may occur earlier phase of sepsis. Characteristic finding from autopsy of septic patients is apoptotic immune cell death, such as lymphocytes and intestinal epithelial cells, which may contribute to the impaired immune response of sepsis.
- 2) Organ dysfunction of sepsis cannot be explained by histological evidence of cell death. The concept of sepsis-induced mitochondrial dysfunction is supported as cytopathic hypoxia to understand the pathogenesis of organ dysfunction.

A considerable body of evidence has accumulated the implication of endotoxin in pathophysiology of sepsis. Although 25g of endotoxin is reserved in gut of healthy humans, full clinical manifestations of sepsis can be developed by administration small dose of endotoxin. However, antiendotoxin strategy, such as monoclonal antibody, have not provided survival benefits in clinical trials. EUPHAS trial is a trial to determine whether polymyxin B hemoperfusion (PMX-DHP) added to conventional therapy improves outcome, 1) hemodynamic parameters, 2) respiratory parameters, SOFA score, and 28-day mortality compared with conventional therapy. PMX-DHP improved significantly those parameters and mortality. The analysis triggered the stopping rule based on a statistically significant reduction in mortality. We reviewed several points regarding this study.

- 1) Although circulating endotoxin levels was not determined, does the clinical efficacy of PMX-DHP depend on removal of endotoxin?
- 2) Severe leukocytopenic/thrombocytopenic patients, those are important target of this treatment, have been excluded.
- 3) Why did not improve hemodynamic parameters in conventional therapy?
- 4) Is the 28-day mortality 53% in conventional therapy group too high?
- 5) Is it important full removal of endotoxin? Does PMX-DHP improve immunosuppressive state of sepsis?
- 6) Is early termination of the study justified?

This trial realized the importance of PMX-DHP in the management of abdominal sepsis in our country again, and also may provide the influence to the world.

(JJAAM. 2010; 21: 101-17)

Keywords: severe sepsis, immunoparalysis, mitochondria, polymyxin B hemoperfusion