

エンドトキシンによって誘発された播種性血管内凝固症 に対するアルコール摂飲の影響

堀 江 登

(武庫川女子大学生活環境学部食物栄養学科)

Effects of alcohol-drinking on endotoxin-induced disseminated intravascular coagulation

Noboru Horie

*Department of Food Science and Nutrition,
School of Human Environmental Science,
Mukogawa Women's University, Nishinomiya 663, Japan.*

This study was conducted to evaluate effects of alcohol-drinking in blood coagulation, fibrinolysis, platelet and organ failure on endotoxin (LPS)-induced disseminated intravascular coagulation (DIC) in rats.

Fibrinogen level, PT and APTT as the parameter of blood coagulation, α_2 PI activity and FDP level as the fibrinolysis, AST(GOT) activity and BUN level as organ failure and platelet count were assayed. The increased AST(GOT) activity, shortened APTT, lowered fibrinogen level and decreased α_2 PI activity was observed on the alcohol-drinking alone in comparison with non-drinking group. The parameters of DIC in blood coagulation, fibrinolysis, platelet and organ failure apparently grew worse more in LPS-induced DIC of alcohol-drinking group than in that of non-drinking group.

These results indicate that LPS-induced DIC in rat may play a change for the worse with alcohol-drinking.

緒 言

播種性血管内凝固症(DIC)とは、凝固能を亢進させる物質が血管内で発生するか、大腸菌のエンドトキシン(LPS)などの物質が血管内に侵入し、これにより血液の凝固能が亢進し、続いて線維素溶解系が活性化され、その結果として凝固異常をはじめとする種々の病態、臨床症状を示す疾患群の総称である¹⁾。

一方、アルコール飲料には嗜好品としてだけでなく、社会生活の媒体としての効用があり、私たちは様々な機会に接し、親しんでいる。このアルコール

は胃または小腸上部で吸収され、血中に取り込まれる。その後、肝臓のアルコール脱水素酵素によってアセトアルデヒドに処理され、続いてミトコンドリアのアルデヒド脱水素酵素によって酸化されて酢酸を経て代謝される。このようなアルコールには強い薬理作用や生化学的性質があり、臓器ならびに血液成分に種々の影響を与え、そのために多飲により種々のアルコール性肝疾患が引き起こされる。また、アルコールの摂飲によって、線維素溶解系酵素のウロキナーゼ様のプラスミノゲン・アクチベーターが血中に増加することが報告され²⁾、血液凝固・線維素溶解系との関係が注目される。

本実験は、エタノールを長期間にわたって摂飲させたラットに LPS で DIC を誘発する実験モデルを作製し、DIC に対するアルコール摂飲の影響を血液凝固・線維素溶解系の動態から検討したものである。

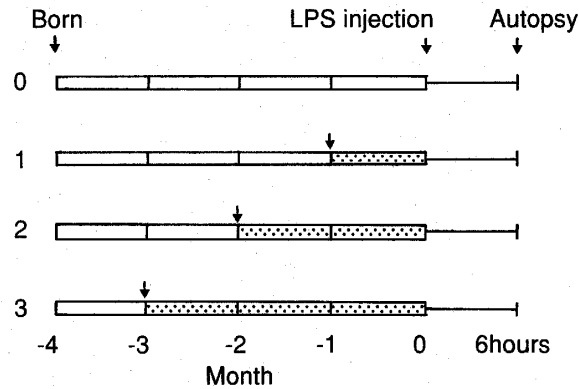


Fig.1. The experimental protocol for examination of the effects of alcohol-drinking on LPS-induced DIC.

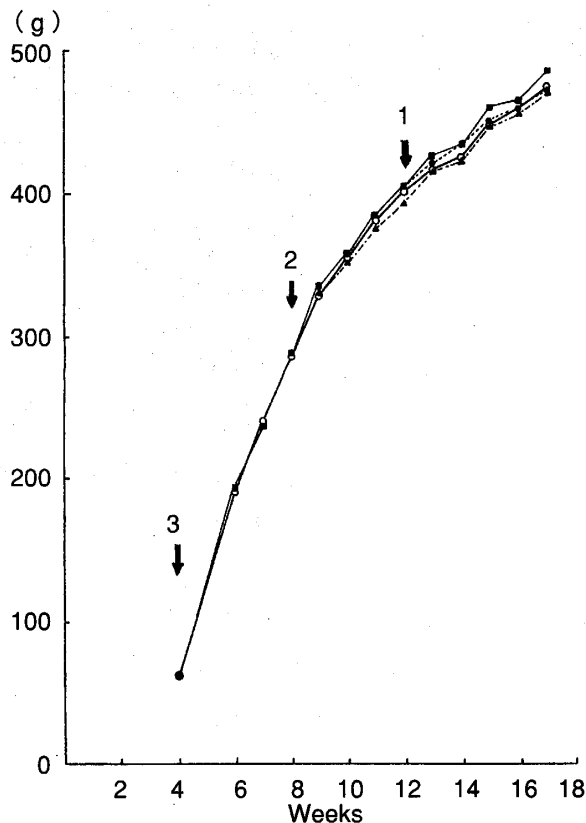


Fig.2. Effects of alcohol-drinking on growth curve of body weight. 1(●.....●):1 month drinking of 10% alcohol, 2(▲.....▲):2 months drinking, 3(■.....■):3 months drinking, ○——○:tapwater alone.

実験材料および方法

実験動物として、4週齢の雄性ラット(Crj-Wistar)を使用した。ラットは、Fig.1に示すように水道水を飲み続けたもの(非摂飲群)および生後1, 2, 3ヶ月目より10%(V/V)エタノールを摂飲させた4つの群に分けた。また、これらのアルコール摂飲群の体重の平均値の変動をFig.2に示す。LPSによるDICは、大腸菌より得られたLPS(lipopolysaccharide B, *E.coli* 0127:B8;DIFCO社, Detroit)を生理食塩水に溶解後、生後4ヶ月目に尾静脈より5mg/体重Kgを注入して誘発した。LPSを注入して6時間後にエーテル麻酔下で腹部後大静脈より採血した。全血を使用して血小板数をFonio法で赤血球数との割合から求めた後、クエン酸加血漿と血清を作製した。クエン酸加血漿について、トロンビン時間法³⁾でフィブリノゲン(FG)量、トロンボプラスチンC(Dade社, Aguada)を用いてプロトロンビン時間(PT)⁴⁾、アクチン(Dade社)を用いて活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)⁵⁾を測定した。 α_2 プラスミンインヒビター(α_2 PI)活性は発色性合成基質S-2251(Chromogenix, Mölndal)を使用して測定した⁶⁾。また、血清を用いて、フィブリン・フィブリノゲン分解産物(FDP)量はStaphylococcal(Newman D₂C, Sigma社, St. Louis)を使用したブドウ球菌凝集試験法(SCT)⁷⁾で、アスパラギンアミノトランスフェラーゼ(AST:GOT)活性は和光純薬工業社(大阪)のGOT UV-テストワコー(UV法)で、血中尿素窒素(BUN)量は和光純薬工業社の尿素窒素-テストワコー(ジアセチルモノオキシム法)で測定した。

統計的な検定はstudent t-testにより、 $p < 0.05$ を有意な差とした。

結果

1. 血液凝固系に対する影響

大腸菌のエンドトキシンであるLPSをラットの尾静脈から静注(5mg/体重Kg)した本実験系のアルコール非摂飲群において、血液中のFGレベルの有意な低下(Fig.3)、PTの有意な延長(Fig.4)ならびにAPTTの有意な延長(Fig.5)が観察された。また、アルコールを摂飲する期間が長期間になるとFGレベルのわずかな低下(Fig.3)とPTのわずかな延長(Fig.4)、さらにAPTTの短縮(Fig.5)が認められた。しかし、LPSを静注した後に、FGレベルの

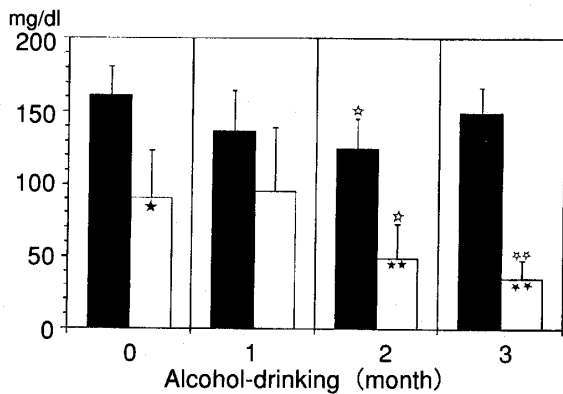


Fig.3. Variations of fibrinogen levels in plasma after LPS injection(I.P.). Closed column: without LPS, opened column: with LPS. Values are mean±SD of 4 rats. ☆:p<0.05 and ☆☆:p<0.01 versus 0 month group, ★:p<0.05 and ★★:p<0.01 versus without LPS.

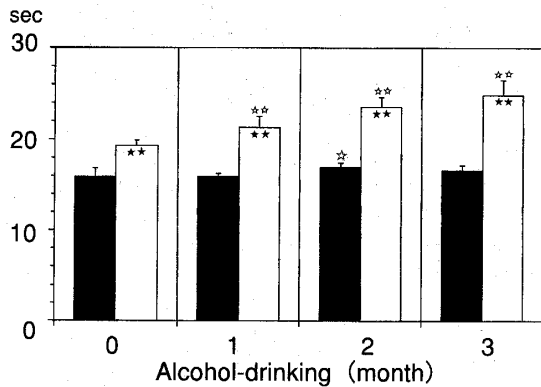


Fig.4. Variations of prothrombin time(PT) of plasma after LPS injection(I.P.). Closed column: without LPS, opened column: with LPS. Values are mean±SD of 4 rats. ☆:p<0.05 and ☆☆:p<0.01 versus 0 month group, ★★:p<0.01 versus without LPS.

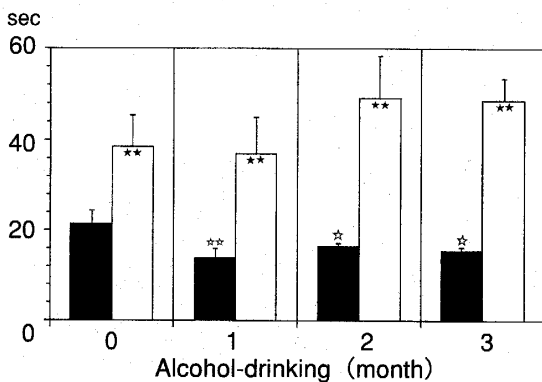


Fig.5. Variations of activated partial thromboplastin time(APTT) of plasma after LPS injection(I.P.). Closed column: without LPS, opened column: with LPS. Values are mean±SD of 4 rats. ☆:p<0.05 and ☆☆:p<0.01 versus 0 month group, ★★:p<0.01 versus without LPS.

低下(Fig.3), PTの延長(Fig.4)ならびに APTTの延長(Fig.5)がいずれもアルコール摂取の期間が長くなるにつれてより顕著になった。

2. 線維素溶解系に対する影響

LPSを静注したアルコール非摂取群において、血液中の FDP レベルの有意な上昇(Fig.6)と、 α_2 PI 活性の減少傾向(Fig.7)が観察された。また、アルコールの摂取が長期間になるに伴う FDP レベルの変動はなかったが、 α_2 PI 活性はわずかに減弱した。さらに、アルコールを長期間摂取した LPS 静注群では、 α_2 PI 活性にはそれ以上の変動が認められた(Fig.7)が、LPS 静注後の FDP レベルはさらに有意に上昇した(Fig.6)。

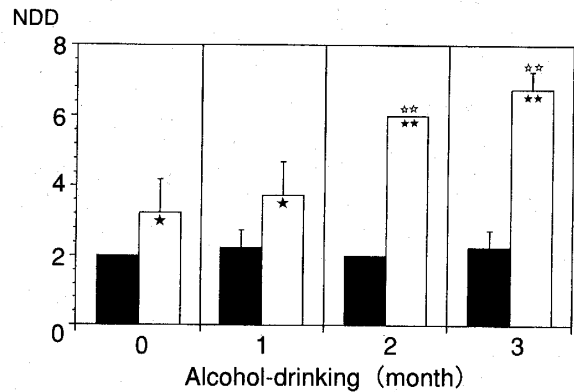


Fig.6. Variations of fibrinogen-fibrin degradation products(FDP) levels in serum after LPS injection(I.P.). Closed column: without LPS, opened column: with LPS. Values are mean±SD of 4 rats. ☆☆:p<0.01 versus 0 month group, ★:p<0.05 and ★★:p<0.01 versus without LPS. NDD: number of double dilution.

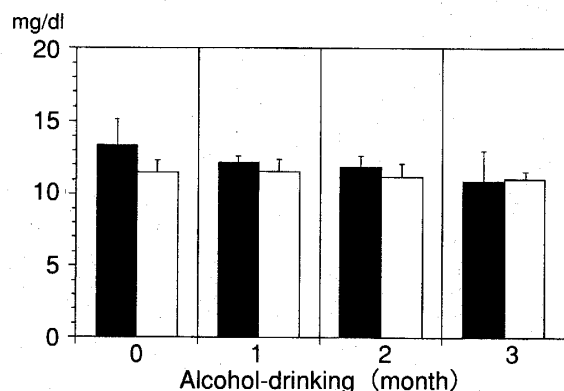


Fig.7. Variations of α_2 plasmin inhibitor activity in plasma after LPS injection(I.P.). Closed column: without LPS, opened column: with LPS. Values are mean±SD of 4 rats.

3. 血小板に対する影響

LPS を静注したアルコール非摂飲群において血小板数の減少傾向が認められた(Fig.8). 一方, 2ヶ月間のアルコール摂飲群でのみ血小板数はわずかに減少したが, LPS を静注した後に血小板数がいずれも有意に減少した(Fig.8).

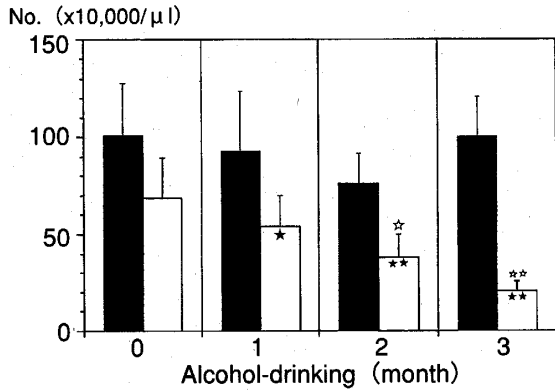


Fig.8. Variations of platelet count after LPS injection(I.P.). Values are mean±SD of 4 rats. Closed column: without LPS, opened column: with LPS. ☆:p<0.05 and ☆☆:p<0.01 versus 0 month group, ★:p<0.05 and ★★:p<0.01 versus without LPS.

4. 腎機能と肝機能に対する影響

LPS を静注したアルコール摂飲群において, 腎機能の指標となる BUN レベルが有意に上昇(Fig.9)した. このことはアルコールを摂飲する期間が長くなるに伴って, LPS 静注後の BUN レベルがさらに著しく上昇した(Fig.9). これらの変動はいずれもアルコールの長期摂飲のみでは観察されなかった.



Fig.9. Variations of blood urea nitrogen levels(BUN) in plasma after LPS injection(I.P.). Closed column: without LPS, opened column: with LPS. Values are mean±SD of 4 rats. ☆:p<0.05 and ☆☆☆:p<0.01 versus without LPS.

また, 肝機能をあらわす血中の AST(GOT)活性はアルコールの摂飲期間が長くなるに伴って増加傾向を示した. しかし, LPS の静注により, AST(GOT)活性は増加したが, アルコール摂飲期間に伴う漸増は認められなかった(Fig.10).

さらに, 肉眼的には肺において, アルコール摂飲の期間が長期になるにつれて, より顕著な出血痕が観察された.

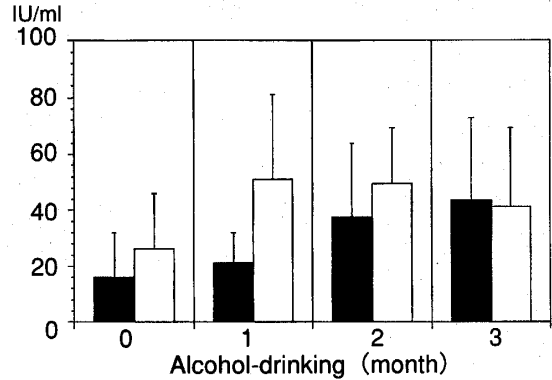


Fig.10. Variation of activity of asparagine amino transferase(ASAT:GOT) in plasma after LPS injection(I.P.). Closed column: without LPS, opened column: with LPS. Values are mean±SD of 4 rats.

考 察

本研究では, エンドトキシンで誘発した播種性血管内凝固症に対するアルコール摂飲の影響を観察するために, 10% エタノールを自由摂飲させたラットを実験動物として使用した. この条件は, 成人ひとり当たり 1日平均 1.1 リットルを飲用するとされ, これを換算すると 1日に 4.5 合の日本酒を飲んでいることになる.

アルコールの摂飲後にエンドトキシン血症を引き起こすことがある⁸⁾. このことはアルコール摂飲により, 肝臓の細網内皮系機能が抑制され⁹⁾, 血中に侵入したエンドトキシンの処理がなされなかったことによると考えられている¹⁰⁾. 本実験では, アルコールの摂飲期間に伴って, 血中の AST(GOT)活性の上昇傾向, さらに肝臓で生合成される FG レベルの低下傾向や α_2 PI の活性の減弱傾向が生じ, これらのことは肝障害を引き起こした状態であったことを暗示する. しかし, 成長に伴う体重の変化にはほとんど差はなく, 肝障害が体重にまで影響を及ぼすに至らなかったものと考えられる. また, アルコールの摂飲だけでは, 肝機能の指標となる BUN レベルに

変化はなく、腎臓に対してほとんど影響していなかったと考える。

一方、DICは消耗性止血障害に伴う出血傾向と多臓器障害をあらわす疾患である¹⁾¹¹⁾。本実験では、DICを作製するモデル実験をLPSをラットの尾静脈に注入することによって作製した。LPSの静注によって、血管内皮細胞から組織因子が血中に放出される¹²⁾ために、血液凝固系、さらに線維素溶解系と血小板凝集の亢進が認められる。本実験においても、LPSの静注により、血漿中のFGレベルの低下、PTの有意な延長ならびにAPTTの有意な延長が認められ、これらの血液凝固系のマーカーの変動から血液凝固系の亢進状態が作製されていたと推察される。また、線維素溶解系においても、アルコールの摂飲のみで、 α_2 PI活性はわずかに低下したが、FDPレベルに影響はなかった。アルコールの摂飲によって血中のプラスミノゲン・アクチベーターのレベルが上昇したことの報告がある²⁾が、FDPレベルの上昇にまで影響するものではなかったものと推察する。しかし、LPS静注により α_2 PI活性にはほとんど変動が認められなかったが、線維素溶解系の亢進によるFDPレベルの有意な上昇が認められた。さらに、LPSの静注によって、アルコール摂飲群において止血機構が著しい亢進状態に陥ったことは、血小板凝集に伴う血小板数の減少によって裏付けられている。また、BUNレベルの有意な上昇が認められ、本実験で作製したDICモデルが多臓器障害を伴うものであったことを示唆する。

アルコール摂飲の期間が1, 2, 3ヶ月間群および非摂飲群に、LPSを静注することによってDICを誘発した。非摂飲群に比べてアルコール摂飲群では、血液凝固系の指標となるFGレベル、APTTならびにPTがいずれもより有意に変動し、著しい血液凝固系の亢進状態が生じた。また、線維素溶解系の指標となるFDP量が有意に増加したが、 α_2 PI活性にアルコール摂飲の影響がほとんど認められないことから、線維素溶解系の亢進のためだけで生じたことに疑問が残る。エンドトキシン静注¹³⁾、カラゲニン誘発炎症¹⁴⁾¹⁵⁾ならびにザルコーマ180細胞の腹腔内注入¹⁶⁾で誘発された脾臓や肺のエラスターゼ活性やカテプシンG活性も本実験のLPS静注ラットにおいても上昇が確かめられ、さらにアルコール摂飲群でこれらの活性が増強された。これらのことは脾臓や肺の細網内皮系細胞に由来するもの

とされている。このことはアルコール摂飲による肝臓の細網内皮系の機能低下と矛盾するものである。しかし、肝機能の指標となる血中AST(GOT)活性の上昇がみられ、多量のアルコール処理に伴う肝機能の低下が生じていたことから、肝臓の実質細胞との関係も無視できないと考える。

本実験において、アルコールの摂飲期間がより長期間になるに伴って、LPSで誘発したDICはより増悪化することを認めた。しかし、この機構には多くの疑問が残る、これらを解決するためには食作用を有する血管内皮細胞やマクロフェージ等に対するアルコールの影響を生化学的・組織学的に検討し、さらに静注したLPSの血中消失速度などの検討も必要であろう。

結 論

エタノールの10%溶液を3ヶ月間(長期)摂飲させたラットにおいて、対照に比べて、AST(GOT)活性の上昇、わずかにAPTTの短縮、FGレベルの低下ならびに α_2 PI活性の減弱が認められた。しかし、これらの長期間アルコールを摂飲させたラットにLPSでDICを誘発させたものでは、非摂飲群に比べて、血液凝固系の亢進、線維素溶解系の亢進ならびに血小板数の減少がより著しく認められた。

アルコールの長期摂飲はLPSで誘発したDICを有意に増悪化するものであった。

文 献

- 1) McKay, D.J., Disseminated intravascular coagulation. An intermediary mechanism of disease., Horper & Row(1965)
- 2) Sumi, H., Hamada, H., Tsushima, H. and Mihara, H., Alcohol Alcoholism., **23**, 33-43(1988)
- 3) Quick, A.J., in "Hemorrhagic disease", pp.436-439, Lea and Febiger, Philadelphia(1957)
- 4) Quick, A.J., Stanly, B.M., Bancroft, F.W., Am. J. Med. Sci., **190**, 501-511(1935)
- 5) Hattersley, P.G. and Hayse, D., Am. J. Clin. Pathol., **66**, 295-310(1976)
- 6) Teger-Nilsson, A.C., Friberger, P. and Gyzander, E., Scand. J. Lab. Invest., **37**, 403-409(1977)
- 7) Hawinger, J., Niewiarowski, S., Gurewick,

- V. and Thomas, D.P., *J. Lab. Clin. Med.*,
75, 93-108(1970)
- 8) Utili, R., Abernathy, C.O. and Zimmerman, H.J., *Life Sci.*, **20**, 553-568(1977)
- 9) Ali, M.V. and Nolan, J.P., *J. Lab. Clin. Med.*, **70**, 295-301(1967)
- 10) 荒井正夫, 小林利次, 平野芳昭, 奥野府夫, 竹川節男, 伊藤大輔, 高木俊和, 石井裕正, 土屋雅春, エンドトキシン臨床研究の新しい展開, 羊土社, pp.243-248(1987)
- 11) Katsuura, Y., Okamoto, S., Ohno, N. and Wanaka, K., *Thromb. Res.*, **82**, 361-368(1996)
- 12) Moldow, F., Bach, R.R. Staskus, K. and Rick, D., *Thromb. Haemostas.*, **70**, 702-706(1993)
- 13) 岡本歌子, 佐々木邦子, 長尾直樹, 内木位節子, 永松陽子, *日本生理誌*, **44**, 633-641(1982)
- 14) 木下明美, 堀江登, 藤中砂織, 斎藤朋子, 笹岡祐香, 清原利文, *医学のあゆみ*, **169**, 831-832(1994)
- 15) 堀江登, 岡本歌子, 清水はじめ, *医学のあゆみ*, **135**, 997-998(1985)
- 16) Horie, N., Kinoshita, A., Iemoto, A., Okamoto, U. and Okada, Y., *Bull. Mukogawa Women's Univ. Nat. Sci.*, **41**, 27-34(1993)