

単球による循環性エンドトキシンの排除機構の解明：

敗血症時に減少した membrane CD14 の役割を代償する soluble CD14 の意義

比 企 直 樹

単球による循環性エンドトキシンの排除機構の解明：

敗血症時に減少した membrane CD14 の役割を代償する soluble CD14 の意義

比 企 直 樹

目次

第Ⅰ章 緒言

I-1.	背景	
	I-1-1.	はじめに 4
	I-1-2.	血液中の endotoxin の排除 4
	I-1-3.	単球による endotoxin の排除 5
	I-1-4.	単球表面の endotoxin 結合リセプター 5
	I-1-5.	単球 mCD14 発現の減少と血清 sCD14 値の増加 6
I-2.	目的	7

第Ⅱ章 方法

II-1.	症例	
	II-1-1.	敗血症患者 8
	II-1-2.	発作性夜間血色素尿症 (PNH) 患者 8
	II-1-3.	コントロール (健常成人) 9
	II-1-4.	インフォームドコンセントと倫理委員会承諾 9
II-2.	血液採取とヒト末梢血単核球 (PBMCs) 分離	10
II-3.	PBMCs による endotoxin 排除能 (EEC) の評価	
	II-3-1.	健常人の EEC の測定 10
	II-3-2.	敗血症および PNH 患者の PBMCs による EEC 12
	II-3-3.	EEC における CD14 の役割の評価 12

II-4.	Endotoxin の単球表面への結合・取り込み能の評価	
II-4-1.	FACSscan による PBMCs, 特に単球 endotoxin 結合・ 取り込み能の評価	13
II-4-2.	単球表面への endotoxin の濃度依存性結合・取り込み	14
II-4-3.	健康成人, 敗血症患者, PNH 患者における endotoxin 結合・取り込み能の評価	16
II-4-4.	Endotoxin 結合・取り込み能における CD14 の評価	16
II-5.	サイトカイン分泌を指標とした endotoxin による PBMCs 刺激の評価	16
II-6.	単球表面の HLA-DR および mCD14 の発現の評価	17
II-7.	PBMCs 上清における sCD14 分泌の評価	18
II-8.	統計学的解析	18

第III章 結果

III-1.	PBMCs による EEC	
III-1-1.	10% FCS 細胞培養液自身の endotoxin 中和能力	19
III-1-2.	健康人の細胞性 EEC の時間経過および特異度	19
III-1-3.	敗血症患者単核球の EEC	22
III-1-4.	PNH 患者単核球の EEC	22
III-2.	Endotoxin の単球表面への結合・取り込み能	
III-2-1.	健康人および敗血症患者単球の FITC endotoxin 結合・取り込み能	22
III-2-2.	PNH 患者単球の FITC endotoxin 結合・取り込み能	27

III-3	PBMCs のサイトカイン分泌能	27
III-4	単球表面の HLA-DR および mCD14 の発現	27
III-5	PBMCs による sCD14 分泌能	28

第IV章 考察

IV-1.	循環血液中の endotoxin の中和について	33
IV-2.	PBMCs の EEC と単球の FITC endotoxin 結合・取り込み能の関係	33
IV-3.	Endotoxin による PBMCs 刺激における mCD14 の持つ意味	35
IV-4.	敗血症(単球 mCD14 発現が減少する病態)における EEC、 FITC endotoxin 結合・取り込み能, サイトカイン分泌能	36
IV-5.	抗 CD14 抗体による CD14 の重要性の確認	36
IV-6.	PNH 患者における EEC と FITC endotoxin 結合・取り込み能	37
IV-7.	Soluble CD14 の分泌増加とその意義	39
IV-8.	Soluble CD14 による endotoxin tolerance の解消	40

第V章 まとめ	42
---------	----

第VI章 臨床的展望	43
------------	----

参考文献	44
------	----

第 I 章 緒言

I-1. 背景

I-1-1. はじめに

グラム陰性菌の外膜構成成分である endotoxin は血液循環において、単球/macrophage, リンパ球, 好中球, 血管内皮細胞を刺激することで血液凝固系, 内分泌系, 免疫系において多彩な生物活性を示す。したがって生体における endotoxin の排除は重要である。Endotoxin 血症は外傷, 手術, 熱傷, 敗血症などの外科的侵襲によって誘導され^{1,3)}, このような外科的侵襲下における循環血液中の endotoxin 排除は外科的侵襲後の生体の恒常性維持に重要な機構である。

I-1-2. 血液中の endotoxin の排除

血中からの endotoxin は細胞性および液性因子により排除される。細胞性因子には Kupffer 細胞, 肺や脾臓などの網内系 macrophage, 肝細胞^{4,6)} および末梢血中の単球^{5,7,10)}や好中球¹¹⁾などがある。液性因子には high density lipoprotein (HDL)^{12,13)}, bactericidal/permeability-increasing protein (BPI)^{14,15)}, 抗 endotoxin 抗体¹⁶⁾, そして, transferrin¹⁷⁾ などがある。

I-1-3. 単球による endotoxin の排除

これらの細胞性因子のうち、単球は貪食能により細菌などの異物の除去をおこなうことで、生体防御にかかわる。同時に単球は endotoxin の刺激を受け炎症性および抗炎症性サイトカインの分泌をおこなうことで敗血症などの急性相反応における免疫系に関わる重要な血球である。しかし、この単球によって endotoxin がどのようにして取り込まれるか、endotoxin 刺激の情報がどのようにして単球細胞内に伝達されていくか、ということについてはまだ未解決の部分がある^{11, 18-24)}。In vitro では、endotoxin は好中球、単球、Kupffer 細胞内で dephosphorylation²⁴⁾や deacylation²⁵⁾により、また、そのほかの細胞内 endotoxin 変性²⁶⁾により中和される。しかし、この単球による endotoxin の取り込みや細胞内における中和が in vivo の循環血液中においても生じているかは現在のところ不明である。

I-1-4. 単球表面の endotoxin 結合 receptor

Endotoxin 刺激という情報が細胞内に伝わるためには、endotoxin の単球表面への付着という段階が必要である。Endotoxin は membrane CD14 (mCD14)²⁴⁾、CD11b/CD18 複合体²⁶⁾、80-kDa 膜蛋白²⁷⁾、acetylated low density lipoprotein (AcLDL)²⁸⁾といった膜型 endotoxin receptor と結合する。mCD14 は単球の endotoxin 細胞刺激伝達系に関与する重要な receptor である^{11, 18-23, 29)}。しかし、

mCD14 は glycosylphosphatidylinositol anchor を非貫通性に膜表面に降ろすことで細胞膜に付着するが、endotoxin 刺激を直接、細胞内に伝達することはできない²⁴⁾。Endotoxin の膜結合能と刺激伝達能に解離があるという事実から^{11,19)}、mCD14 以外の膜貫通性蛋白の関与²⁷⁾が疑われている。一方、CD14 receptor には、55-kDa の糖蛋白で好中球や単球/マクロファージなどの細胞膜上にある mCD14 のほかに血清中に存在する soluble CD14 (sCD14) がある。sCD14 は主に単球/macrophage より分泌され、健康成人の血清中に 2-6 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で存在し³⁰⁾、mCD14 を発現しない血管内皮細胞^{31,32)}や平滑筋細胞³³⁾、発作性夜間血色素尿症 (PNH) 患者の単球^{34,36)}における endotoxin 刺激の情報伝達に関与する^{34,36)}。また最近、mCD14 をもつ単球や好中球も sCD14 を介して endotoxin 刺激が細胞内に伝達されることが解明された^{35,37)}。endotoxin と mCD14 間および sCD14 間の反応は肝臓で産生される急性相蛋白の一つの endotoxin 結合性蛋白 (LBP) が触媒となっている^{36,38,39)}。

I-1-5. 単球 mCD14 発現の減少と血清 sCD14 値の増加

敗血症時には健康時に比べて単球表面の mCD14 の発現が低下する一方^{40,45)}、血清 sCD14 値は上昇する⁴⁶⁻⁵⁰⁾。そして、敗血症時における mCD14⁵¹⁾と sCD14^{46,48)}の変動は予後に相関する。PNH では種々の GPI anchor protein が単球表面になく、mCD14 receptor の発現もほとんどないが血清中に sCD14 を認める^{34,36)}。

〔一〕 目的

さらに, endotoxin が血液循環から単球により除去されるとすると, その前段階として, endotoxin の単球への付着, それと同時に発生するであろうサイトカイン分泌に代表される刺激伝達系の賦活, そして endotoxin 除去というステップが想像される. したがって, この研究の目的は,

- 1) 単球—endotoxin 結合に重要と考えられる mCD14 を単球に発現している健康成人, mCD14 の発現が減少していると推測される敗血症患者, そして, まったく発現のない PNH 患者の細胞性の endotoxin 排除を *ex vivo* にて明らかにすること;
- 2) endotoxin 排除と endotoxin の単球結合・取り込み能, サイトカイン分泌刺激能の関係をそれぞれフルオルセイン標識 endotoxin (FITC-binding-internalization LPS) と外因性 endotoxin 投与により評価し, 検討すること;
- 3) これらの endotoxin—単球反応における sCD14 の役割を明らかにすることである.

第Ⅱ章 材料と方法

Ⅱ-1. 症例

Ⅱ-1-1. 敗血症患者

アメリカ胸部外科学会の敗血症診断基準³²⁾を満たした13人(男性:8人, 女性:5人, 35歳から87歳)を対象とした。対象症例の診断は急性膵炎(n=7: 6名に手術を施行し, 5名は死亡), 汎発性腹膜炎(n=4: 全症例に手術を施行し, 全例とも生存), 肺炎(n=2: 2例とも死亡)で, 全症例に第二世代セフェム系抗生物質を投与した。敗血症の急性期(敗血症の診断より4日以内)および外科手術後7日以内の症例は除外した。採血は敗血症の診断より 8.2 ± 0.9 日目(mean \pm SE)におこなった。手術症例に関しては術後 9.8 ± 0.7 日目(mean \pm SE)に採血をおこなった。これらの症例のAPACHE II scoreは 17.3 ± 1 であった。

Ⅱ-1-2. 発作性夜間血色素尿症(PNH)患者

さらにこの研究ではPNH患者1人を対象とした。PNHは米国における発症率1:20000と希な疾患であり³³⁾, さらにPNHに敗血症を合併する症例は非常にまれである。本研究では1人のPNH患者の異なった病期を追跡することができ, 4つの異なる病期で採血した。この患者はドイツのウルム大学内科にてPNHの診断を受け, 腸閉塞および肺炎による敗血症の診断で外科に

緊急転科となった。

この患者の腸閉塞解除術前の敗血症と診断された時点で採血し、ヒト末梢血単核球 (PBMCs) の endotoxin 排除能 (endotoxin elimination capacity: EEC) を調べた。同患者はこの手術の3ヶ月後に回腸人工肛門を落とすために入院し、この術前に健康時の EEC を調べた。この手術の4週間後にこの患者は胆石胆嚢炎の診断にて再々手術を受け、4日後に採血をおこない、これを急性炎症緩解期として EEC を調べた。PNH が非常にまれな疾患であるうえ、このようなさまざまな病期における検体採取の機会はさらにまれである。したがって、この結果はすべて3回以上の解析をおこない、同様な結果を得ることで確認した。そのうえ、一つの病期において2回以上の採血をおこない、解析を再度繰り返し、結果の再現性を確認した。

II-1-3. コントロール (健康成人)

コントロールとして、15人の健康成人 (男性: 10人、女性: 5人、28歳から58歳、年齢、性別は対象症例と有意な差を認めなかった)を用いた。

II-1-4. インフォームドコンセントと倫理委員会承諾

本研究のプロトコールはドイツ、ウルム大学倫理委員会で承認されたのち、対象症例および健康成人ボランティアから十分なインフォームドコンセントを得た。

II-2. 血液採取とヒト末梢血単核球 (PBMCs) 分離

対象症例の末梢静脈より 15 ml の血液を採取し、endotoxin free の sodium heparinate (B/Braun, Melsungen, Germany) 10 IU/ml を加えた。赤血球分離用フィルター付きの 50 ml ポリスチレンチューブ (LeucoSep[®]; Geiner, Frickenhausen, Germany) にフィコール液 (Seromed, Berlin, Germany) を入れたのち、 $630 \times g$ にて 1 分間遠沈して、フィルターの下にフィコール液をセットした。このチューブに採取した全血を静かに加え、 $630 \times g$ で 20 分間にて遠心分離した。分離した PBMCs は PBS で 3 回洗浄後、10% FCS (GMN, Frankfurt, Germany), L-glutamine 2 mmol/l, HEPES 緩衝液添加 RPMI 1640 を 25 mmol/l (GIBCO, Eggenstein, Germany) で希釈して、最終濃度を 2×10^6 個/ml とした。培養液の endotoxin による汚染については定期的に検査し、endotoxin 値 0.05 EU/ml 以下のものを使用した。

II-3. PBMCs による endotoxin 排除能 (EEC) の評価

II-3-1. 健常人の EEC の測定

24 穴のポリスチレンプレート上で、一穴あたりそれぞれ 2×10^6 個、 2×10^5 個、 2×10^4 個の PBMCs に 1 ng/ml の endotoxin (*E. coli* 055 : B5, Bio

whittaker, Maryland, USA) を加え、37℃、5%CO₂環境下に30分、2時間、4時間、6時間にわたり incubation をおこなった。検体は速やかに 630 × g で10分間、遠沈し、細胞成分を分離したのち、上清を凍結した。上清の保存は-80℃にて4週間以内とした。上清中の endotoxin 値測定にはリムルステスト(後述)を用いた。対照として endotoxin を加えない群と PBMCs を加えない 10%FCS 溶液単独群を用いた。また、PBMCs の代わりに negative control として膵臓癌培養細胞 (SW1116:ATCC)、大腸癌培養細胞 (HT 29: ATCC)、肝芽腫培養細胞 (HepG 2:ATCC) を使用し、EEC の細胞特異性を検討した。

Incubation 前値に対する incubation 後の endotoxin 値の割合をもとめ、この値より endotoxin の消失率をもとめ、total EEC とした(次式)。

$$\text{Total EEC (\%)} = 100 (1 - \text{incubation 後値} / \text{incubation 前値})$$

各アッセイごとに細胞を含まない培養溶液の endotoxin 中和能力:% disappearance (10% FCS medium) も測定し、細胞性 EEC は次の式でもとめた。

$$\text{細胞性 EEC (\%)} = \text{total EEC} - \% \text{ disappearance (10\% FCS medium)}$$

上清中 endotoxin 値の測定:

endotoxin 値の測定は、従来のリムルステストを改良したエンドポイント法にて 96 穴 microtiter plate (Greiner Co., Nuertingen, Germany)を用いておこ

なった。測定法の実際については以前に報告した^{2,3)}、今回はこの方法からさらに改良を加えた。すなわち、血漿を蒸留水により希釈 (1:20) したのち、75℃にて15分間、加熱した。前処置の済んだ検体 50 μ l に lysate (Endosafe®, Charles River Endosafe, Sulzfeld, Germany) 50 μ l を microtiter plate 上で加え、37℃、30分間にわたり incubation した。Chromogenic substrate (pefachrome, LPS, Diezenbach, Germany) 10 μ mol を 6.6 ml 蒸留水に溶解した溶液 100 μ l を 0.005 mol/l RIS/HCl および 0.2 mol/l NaCl (pH 9.0) 200 μ l で希釈し、この希釈溶液を microtiter plate 上の検体に加え、37℃、3分間の incubation をおこなった。色素反応は 20% 酢酸 200 μ l を加えることで停止させた。吸光度は光学フォトメーター (405 nm) (SLT Co., Salzburg, Austria) を用いて測定した。検体の測定と同時に *E.coli* 055:B5 (Bio Whittaker, Maryland, USA) を 10% FCS Medium にて希釈し、標準曲線を作成して、endotoxin 値をもとめた。

II-3-2. 敗血症およびPNH患者のPBMCsによるEEC

健康成人同様に13人の敗血症患者および1人のPNH患者の末梢静脈より採取した15 mlの血液よりPBMCsを分離した。24穴のポリスチレンプレート上で、一穴あたり各々 2×10^6 個のPBMCsに1 ng/mlのendotoxinを加え、37℃、5%CO₂環境下に30分、2時間、4時間、6時間にわたり incubation をおこない、EECを評価した。

II-3-3. EEC における CD14 の役割の評価

Endotoxin 排除における CD14 receptor の役割を調べるために 15 $\mu\text{g/ml}$ の抗 CD14 抗体 (MEM18, IgG 1, Institute of Molecular Genetics, Prague, Czechoslovakia) を使用した。すなわち、各細胞へ endotoxin を添加する前に MEM18 を加えて、4°C、30 分間にわたり incubation し⁴⁰⁾、この後に endotoxin を加えた。

II-4. Endotoxin の PBMCs への結合・取り込み能の評価

II-4-1. FACSscan による PBMCs、特に単球 endotoxin 結合・取り込み能の評価

細胞が endotoxin を排除するのに endotoxin の細胞への付着が必須となると考え、PBMCs への endotoxin 結合・取り込み能の関係を調べた。

まず、PBMCs に対する endotoxin 結合・取り込み能を異なった濃度 (1, 10, 100 ng/ml および 1 $\mu\text{g/ml}$) の FITC-labeled endotoxin (*E. coli* 055: B5, trichloroacetic acid 抽出, Sigma, Delsenhofen, Germany) を使って調べた。2X10⁶ 個/ml の PBMCs にそれぞれの濃度の FITC-labeled endotoxin を添加し、37°C、5% CO₂ 環境下で 4 時間にわたり incubate した(予備実験で FITC-endotoxin の単球結合・取り込み能はいずれも 4 時間でプラトーに達したため、6 時間の incubation は

おこなわなかった)。PBMCsはPBS(1%ウシ血清アルブミンに0.1%酢酸を添加)にて2度の洗浄をおこなったのち、500 μ lのPBSにて再懸濁した。洗浄したPBMCs中の単球へのFITC endotoxin結合・取り込みをFACScan flow cytometer(Becton Dickinson, Heidelberg, Germany)によって解析した。コンピュータープログラム上でPBMCs中より単球の集団にのみゲートをかけて、forward light scatter および side scatter を利用して単球分画をもとめた。最低、 3×10^4 個の単球細胞をそれぞれの解析に用いた。単球へのFITC-endotoxin結合・取り込み能はFACS分析でゲートをかけた単球のFITC陽性率としてもとめられた。また、単球以外のPBMCsへのFITC endotoxin結合・取り込みはほとんど認められなかったため、endotoxin結合・取り込み能の解析対象は単球のみとした。

II-4-2. 単球表面へのEndotoxinの濃度依存性結合・取り込み

FITC endotoxinの単球への結合・取り込みはFITC endotoxin濃度1 ng/mlから濃度依存性に増加し、100 ng/mlで最高に達した(図1)。FITC endotoxin濃度100 ng/mlと1 μ g/mlでは結合・取り込み能に差は認められなかったが、データのばらつきが1 μ g/mlで最も少なかった。したがって本実験ではデータの再現性が重要と考え、1 μ g/mlの濃度を選択しendotoxin単球結合・取り込み試験をおこなった。

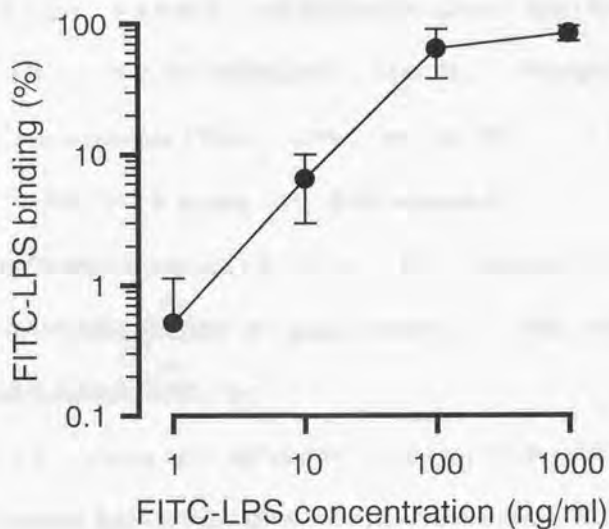


图 1 剂量动力学 FITC-LPS (E.coli O55: B5) 结合-内化作用的人健康单核细胞 4 小时后。健康志愿者的 2×10^6 PBMCs (n=7) 被不同浓度的 FITC 标记的平滑 LPS (E.coli, O55:B5) 孵育 4 小时。FITC LPS 的结合-内化作用由 FACS 分析确定。所有数据均为均值 \pm SE。

II-4-3. 健常成人, 敗血症患者, PNH 患者における endotoxin 結合・取り込み能の評価

健常成人, 敗血症患者, PNH 患者における endotoxin 結合・取り込み能を調べる目的で, それぞれの病態において, 2×10^6 個/ml の PBMCs に $1 \mu\text{g/ml}$ の FITC-labeled endotoxin を添加し, 37°C , $5\% \text{CO}_2$ 環境下で 30 分間, 2 時間, 4 時間にわたり incubate した. 単球-endotoxin 結合・取り込み能の測定, 解析は同様に FACSscan にておこなった. また, endotoxin の単球結合・取り込みの特異性を確認するために negative control として, 膀胱癌, 大腸癌, 肝芽腫の各培養細胞を用いた.

II-4-4. Endotoxin 結合・取り込み能における CD14 の役割の評価

Endotoxin 結合・取り込み能における CD14 の作用を知るために endotoxin を添加する前に PBMCs を MEM18 抗体 $15 \mu\text{g/ml}$ と 4°C で 30 分間にわたり preincubate した.

II-5. サイトカイン分泌を指標とした endotoxin による PBMCs 刺激の評価

EBC を評価すると同時に, 同じアッセイにおいて添加された 1ng/ml の endotoxin が PBMCs をどのように刺激するかをサイトカインを指標として評価した. 24 穴のポリスチレンプレート上で, 一穴あたり各々 2×10^6 個の PBMCs

に 1 ng/ml の endotoxin を加え、37°C、5%CO₂ 環境下に 30 分、2 時間、4 時間、6 時間にわたり incubation をおこなった。検体は速やかに 630 × g で 10 分間、遠沈し、細胞成分を分離したのち、上清を凍結した。上清の保存は -80°C にて 4 週間以内とした。上清中のサイトカイン (IL-6、TNF-α) 値は ELISA キット (Immunotech Co., Hamburg, Germany) を用いて測定した。測定値の下限は IL-6 で 50 pg/ml、TNF-α では 15.6 pg/ml であった。

II-6. 単球表面の HLA-DR および mCD14 の発現の評価

これまでにおこなったすべての単球-endotoxin 反応の評価 (EEC, endotoxin 結合・取り込み能、サイトカイン分泌能) と mCD14 リセプター発現の関係を調べる目的で、異なった病態 (健常人、敗血症、敗血症を伴った PNH) における単球の mCD14 receptor 発現を調べた。また、敗血症の重症度の指標として知られている単球外膜上 HLA-DR の発現を測定した^{44, 45, 51, 54)}。2X10⁶ 個/ml の PBMCs を 630 × g で 5 分間の遠沈をおこない、沈殿細胞を 100 μl の PBS (1% 牛血清アルブミン、0.1% 酢酸添加) にて再懸濁した。この懸濁液に 10 μl の RPE 標識の抗 CD14 モノクローナル抗体 (DACO, Hamburg, Germany) と FITC 標識の抗 HLA-DR 抗体 (DACO, Hamburg, Germany) を加え、暗所で室温、30 分間の incubation をおこなった。コントロールとして、

細胞を IgG2/RPE, IgG 1 /FITC 対照抗体(DACO, Hamburg, Germany)とも incubate した。この染色後、細胞は上記の PBS で2度の洗浄し、固定した。PBMCs 中の単球分画は forward light scatter および side scatter を利用してもとめた。細胞の receptor 発現は side scatter を利用し、ゲート中の単球より分析をおこなった。

II-7. PBMCs 上清における sCD14 分泌の評価

Endotoxin-PBMCs 反応に sCD14 が関与する可能性を考えて、EEC を評価すると同時に敗血症患者と健常人の PBMCs のアッセイにおいて sCD14 の分泌を評価した。24穴のポリスチレンプレート上で、一穴あたり各々 2×10^6 個の PBMCs に 1 ng/ml の endotoxin を加え、37°C、5% CO₂ 環境下に 30 分、2 時間、4 時間、6 時間にわたり incubation をおこなった。上清中の sCD14 は sCD14 測定キット(IBM, Hamburg, Germany) によって測定した。なお、測定値の下限は 1 ng/ml であった。

II-8. 統計学的解析

データは mean \pm SE にて表した。統計解析は Student's *t*-test にておこなった。 $p < 0.05$ をもって統計学的有意とした。

第Ⅲ章 結果

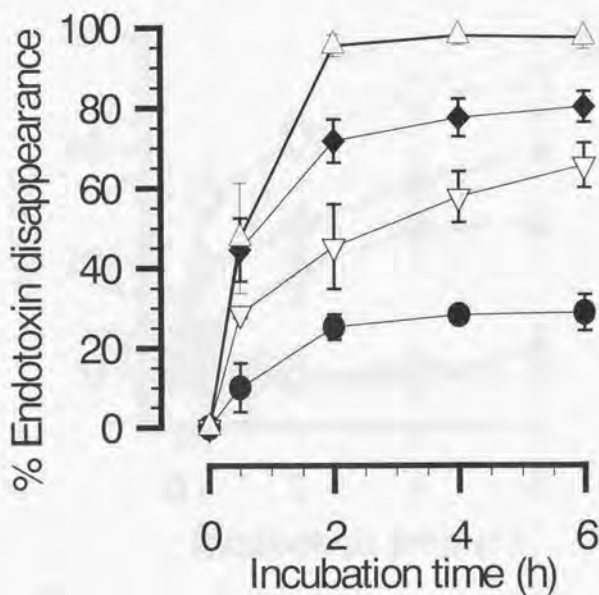
Ⅲ-1. PBMCs による EEC

Ⅲ-1-1. 10% FCS 細胞培養液自身の endotoxin 中和能力

10% FCS 溶液に endotoxin をそれぞれ 0.1, 0.3, 0.5, 1 ng/ml 加えて EEC を経時的に観察したところ, endotoxin 0.1 ng/ml は 10% FCS によって, ほぼ完全に中和され, 上清より消失した (図 2). Incubation 時に加えた endotoxin は 1 ng/ml 未満の濃度では 50%以上が 10% FCS 溶液により中和された, したがって, 細胞自身の EEC を評価するのに endotoxin の濃度として 1 ng/ml を妥当と考えた.

Ⅲ-1-2. 健康人の細胞性 EEC の時間経過および特異度

15 人の健康成人の血液より分離した異なった細胞数の PBMCs (2×10^6 個/ml, 2×10^5 個/ml, 2×10^4 個/ml) にそれぞれ 1 ng/ml の endotoxin を加えて incubate し, 細胞性 EEC の経時的な変化を調べた (図 3). PBMCs 2×10^6 個/ml, 2×10^5 個/ml, 2×10^4 個/ml の EEC の最高値はそれぞれ $49.7 \pm 4.5\%$, $38.8 \pm 4.7\%$, $26.0 \pm 6.1\%$ で, これらは incubation 後 4 時間から 6 時間で最高値に達した. 健康成人の PBMCs は時間および細胞数依存性に endotoxin を上清から排除した. Negative control として測定した膵臓癌, 大腸癌, 肝芽腫の培養細胞 (2×10^6 /ml) の EEC はほとんど認められなかった.



2 LPS neutralizing ability of cell free 10% FCS medium. The cell free 10 % FCS medium were incubated with the 1 ng/ml of smooth LPS and the changes of endotoxin disappearance determined by the LAL-test are expressed with % endotoxin disappearance on the ordinate whereas the abscissa represents the time scale in h. (●) 1ng/ml LPS, (▽) 0.5 ng/ml LPS, (◆) 0.3 ng/ml LPS, (△) 0.1 ng/ml LPS. All data are means \pm SE.

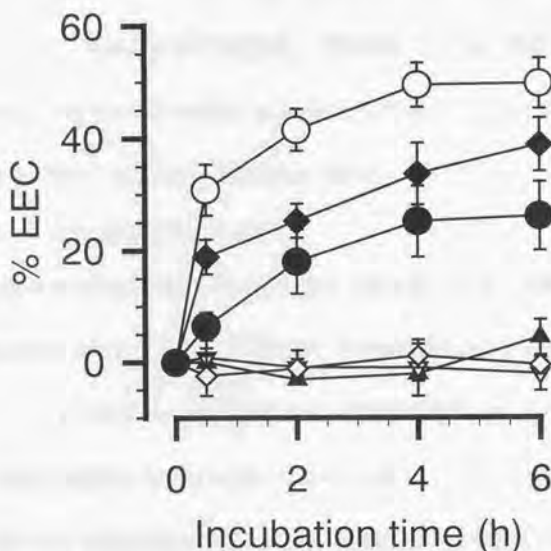


Fig. 3 Specificity and time scale of the endotoxin elimination capacity (EEC) of PBMCs from healthy volunteers. Different numbers of PBMCs were incubated with the 1 ng/ml of smooth LPS and the changes of EEC determined by the LAL-test are expressed with % EEC on the ordinate whereas the abscissa represents the time scale in h. (○) 2×10^6 of PBMCs from 15 healthy volunteers, (◆) 2×10^5 PBMCs from 10 healthy volunteers, (●) 2×10^4 PBMCs from 7 healthy volunteers, (▽) 2×10^6 of pancreatic cancer cell line: SW1116 (n=3), (▲) 2×10^6 of colorectal cancer cell line (n=3): HT29, (◇) 2×10^6 of hepatoblastoma cell line (n=3): Hep G2. All data are means \pm SE.

Ⅲ-1-3. 敗血症患者単核球の EEC

上記の結果をふまえ、以下の実験では、敗血症患者より得られた $2 \times 10^6/\text{ml}$ の PBMCs を用いて EEC を健康人と比較した。敗血症患者単核球の EEC は健康成人単核球のそれと最高値、時間経過ともに同じ程度であった。また、PBMCs をあらかじめ MEM18 と incubate しておく、EEC は健康者と敗血症患者の区別なくほぼ完全に抑制された (図4)。

Ⅲ-1-4. PNH 患者単核球の EEC

PNH 患者の敗血症時の6時間後の EEC の最高値は 47% で (図5)、健康者および敗血症患者のそれら (図4) と比較して時間経過およびその程度に変わりがなかった。これに反して、同じ PNH 患者の健康な時期の EEC はわずか 5.1% であり、胆嚢炎回復期のそれは 24.6% であった (図5)。このことにより、PNH 単球による EEC は臨床的重症度または炎症の程度によって決定される可能性が考えられた。

Ⅲ-2. Endotoxin の単球表面への結合・取り込み能

Ⅲ-2-1. 健康人および敗血症患者単球の FITC endotoxin 結合・取り込み能

敗血症患者と健康者の単球の endotoxin 結合・取り込み能に差はなかった (図6)。単球の endotoxin 結合・取り込み能の最高値は、敗血症患者で $85.4 \pm 3.4\%$ 、健康成人で $86.4 \pm 4.3\%$ であり、2つのグループは時間的にもほぼ同様な経過

をとった。MEM18の前処置によって単球の endotoxin 結合・取り込み能は敗血症患者では $13.2 \pm 1.0\%$ 、健康成人で $10.8 \pm 4.6\%$ に低下した。培養細胞の endotoxin 結合・取り込み能は膀胱癌で $1.8 \pm 0.2\%$ 大腸癌で $1.7 \pm 0.1\%$ 、肝芽腫で $3.4 \pm 0.3\%$ であった。

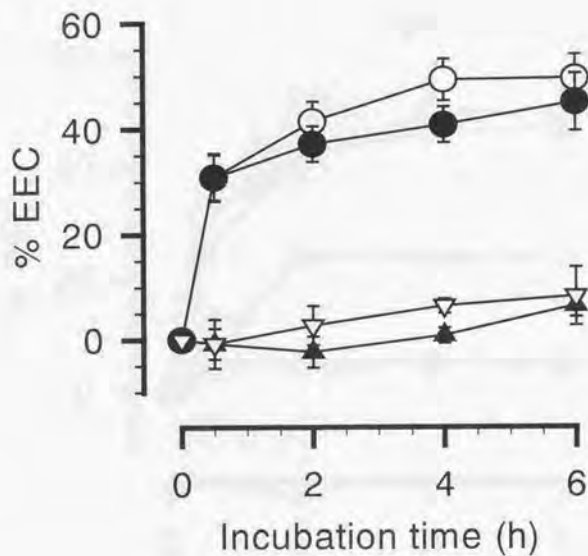


图 4 EEC of patients suffering from severe sepsis. 2×10^6 of PBMCs from 13 patients suffering from sepsis were incubated with the 1 ng/ml of smooth LPS (*E. coli*, O55:B5). The changes of EEC determined by the LAL-test are expressed with % EEC on the ordinate whereas the abscissa represents the time scale in h. (○) 2×10^6 of PBMCs from 15 healthy volunteers, (●) 2×10^6 of PBMCs from 13 patients with sepsis, (▽) 2×10^6 of PBMCs from 15 healthy volunteers + MEM18, (▲) 2×10^6 PBMCs from 13 patients with sepsis + MEM18. All data are means \pm SE.

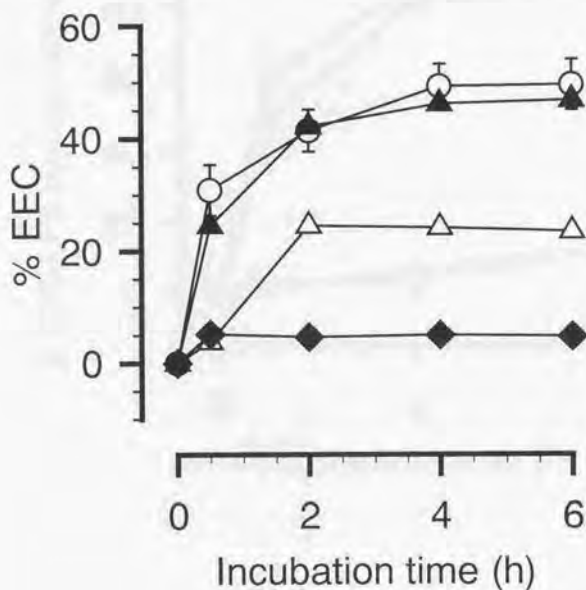


Fig. 5. EEC of a patient suffering from paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) with different clinical states. 2×10^6 of PBMCs from a patient suffering from PNH with different clinical status were incubated with the 1 ng/ml of smooth LPS (*E. coli*, O55:B5). The changes of EEC determined by the LAL-test are expressed with % EEC on the ordinate whereas the abscissa represents the time scale in h. (○) 2×10^6 of PBMCs from 15 healthy volunteers, (▲) 2×10^6 of PBMCs from PNH patient with septic state, (△) 2×10^6 of PBMCs from PNH patient with recovery state from acute cholecystitis, (◆) 2×10^6 of PBMCs from PNH patient with healthy state. All data are means \pm SE.

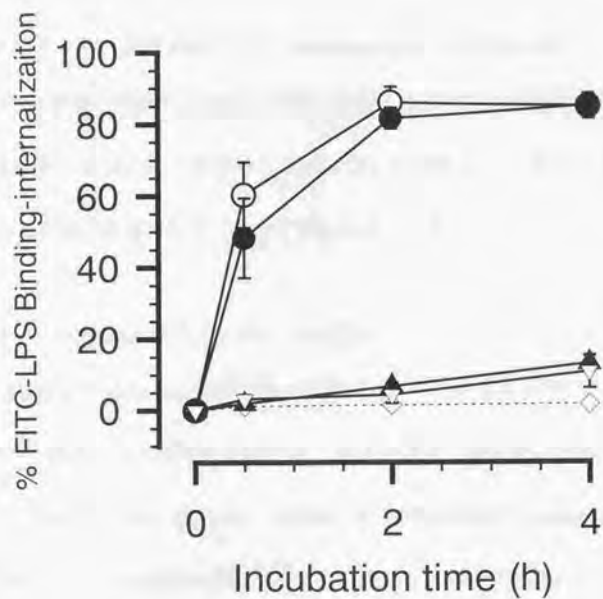


图 6 比较了败血症患者与健康志愿者的单核细胞对 FITC-LPS 的结合-内化作用。 (○) 2×10^6 个来自 8 名健康志愿者的 PBMCs, (●) 2×10^6 个来自 13 名败血症患者的 PBMCs, (▲) 2×10^6 个来自 13 名败血症患者 + MEM18 的 PBMCs, (▼) 2×10^6 个来自 15 名健康志愿者 + MEM18 的 PBMCs, (◇) 无 FITC-LPS 的对照。所有数据均为均值 \pm SE。

Ⅲ-2-2. PNH 患者単球の FITC endotoxin 結合・取り込み能

PNH 患者の単球の endotoxin 結合・取り込み能は敗血症緩解期では 55.5%、急性炎症期では 12.6%、健康時に 3.3%であった (図 7)。つまり、単球の endotoxin 付着は炎症の程度によって異なることが考えられた。

Ⅲ-3 PBMCs のサイトカイン分泌能

PBMCs は endotoxin 刺激によって TNF- α および IL-6 を時間依存性に分泌した。TNF- α の 4 時間値を除けば、敗血症患者と健常者の PBMCs のサイトカイン分泌能に差はなかった。PBMCs を MEM18 抗体で preincubate するとサイトカイン分泌は敗血症患者と健常者の 2 つのグループでほぼ完全に停止した (図 8)。

Ⅲ-4 単球表面の HLA-DR および mCD14 の発現 (図 9)

HLA-DR 陽性率は健常人では $93.0 \pm 1.0\%$ であったのに対して、敗血症患者では $26.6 \pm 5.0\%$ であった ($p < 0.01$)。PBMCs の mCD14 発現率は健常人の $93.6 \pm 6.5\%$ と有意に低下した ($p < 0.01$)。PNH 患者の敗血症時の HLA-DR と mCD14 の発現率はそれぞれ 3.7% と 0.3%であった。

III-5 PBMCs による sCD14 分泌能

健康成人 PBMCs の sCD14 分泌能は (図 10) 非常に低く (4.0 ± 0.4 ng/ml), endotoxin 刺激を加えても sCD14 の分泌に変化はなかった (4.5 ± 0.4 ng/ml). これとは対照的に, 敗血症患者 PBMCs の sCD14 分泌能 (12.5 ± 1.9 ng/ml) は健康成人に比べて高く ($p < 0.01$), endotoxin 刺激時にはさらに sCD14 分泌が増した (20.1 ± 1.8 ng/ml, $p < 0.02$). これらの *ex vivo* のデータは血漿 sCD14 値を反映している (表 1). すなわち, 健康成人の血漿 sCD14 値は 3.5 ± 0.3 μ g/ml に対して, 敗血症患者のそれは 6.8 ± 0.7 μ g/ml と明らかに上昇した ($p < 0.01$). さらに PNH 患者の血漿 sCD14 値も同様な傾向を示し, 敗血症時には 8.6 μ g/ml, 急性炎症期には 6.5 μ g/ml, そして健常時には 3.5 μ g/ml であった (表 1).

表 1. Plasma sCD14 levels from healthy subjects, patients with sepsis and a PNH patients with different clinical status

Clinical status	n	sCD14 Plasma (μ g/ml)
Healthy subjects	15	3.5 ± 0.3
Patients with sepsis	13	6.8 ± 0.7 *
PNH patient	1	
Health		3.5
Cholecystitis		6.5
Sepsis		8.6

All data are means \pm SE. n = numbers of subjects. PNH, Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria; sCD14, soluble CD14. * significantly different from the healthy subjects values, $P < 0.05$, student *t*-test.

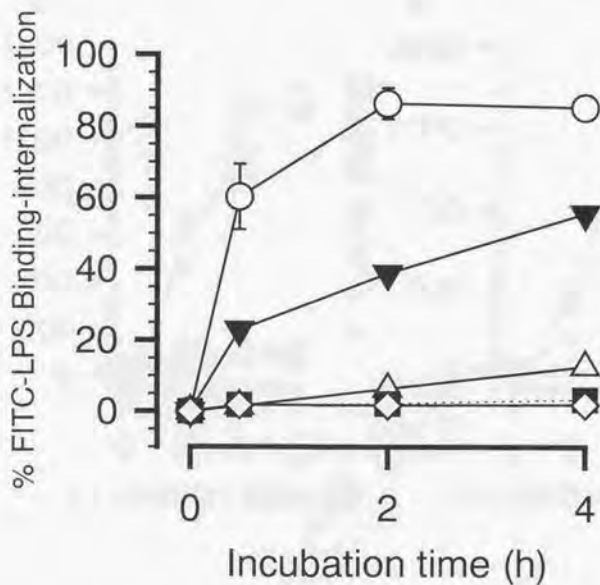


图 7 比较了 FITC-LPS 结合-内化作用由单核细胞从 PNH 患者在不同临床状态。(○) 2×10^6 个 PBMCs 来自 8 名健康志愿者, (▼) 2×10^6 个 PBMCs 来自 PNH 患者从败血症恢复状态 (△) 2×10^6 个 PBMCs 来自 PNH 患者从胆囊炎恢复状态 (■) 2×10^6 个 PBMCs 来自 PNH 患者健康状态, (◇) 控制没有 FITC-LPS。

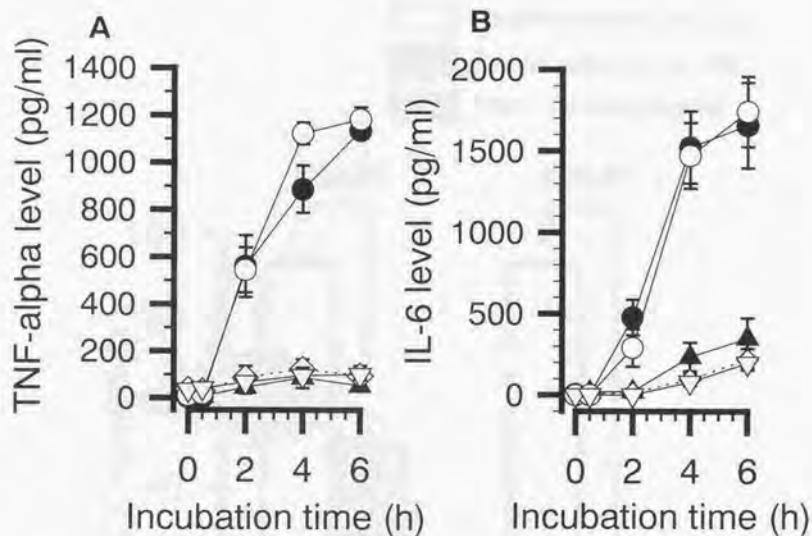


图 8 内毒素诱导 TNF- α (A: 左图) 和 IL-6 (B: 右图) 释放自 PBMCs。

刺激后 TNF- α 和 IL-6 的水平 (E.coli, O55:B5) 1 ng/ml 刺激后的 TNF- α 和 IL-6 水平 (pg/ml) 在纵轴上表示，而横轴表示时间 (h)。

(○) 2×10^6 健康志愿者的 PBMCs，(△) 与 MEM18，(●) 2×10^6 来自 13 名败血症患者的 PBMCs，

(▲) 与 MEM18，(◇) 无 LPS 刺激的控制。所有数据均为均值 \pm SE。

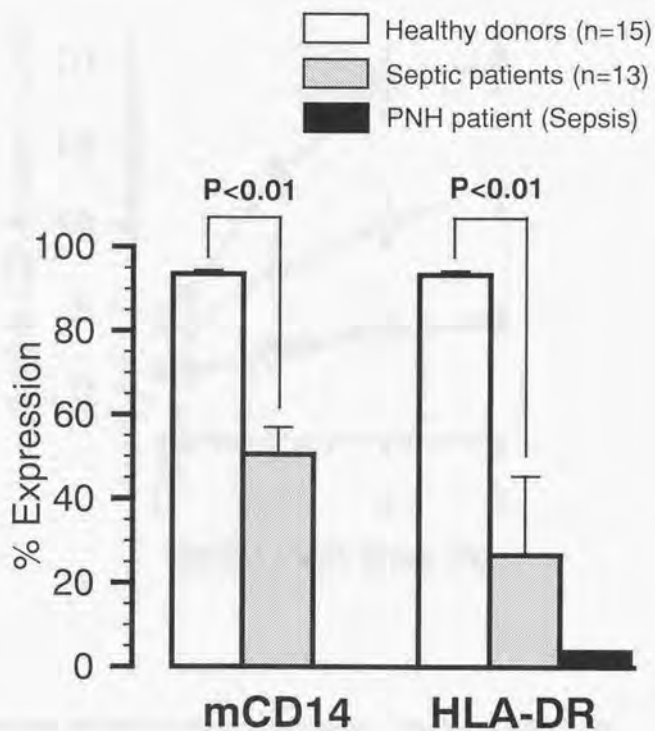


图 9 Expression of mCD14 and HLA-DR on gated monocytes. 10^6 of PBMCs harvested from healthy volunteers ($n=7$), septic patients ($n=13$) and a PNH patient with septic state were stained with RPE-anti-CD14 (Leu-M3) or FITC-anti-HLA-DR. Values are mean of percent positive monocytes. $P < 0.01$ as compared to healthy subjects. All data are means \pm SE.

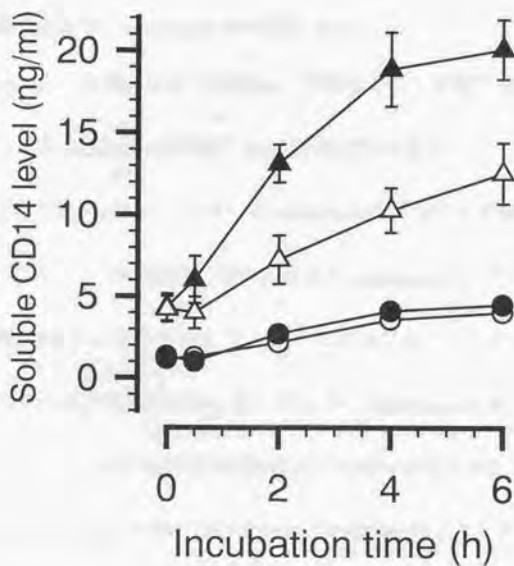


图 10 Spontaneous and endotoxin induced release of soluble CD14. The level of sCD14 after stimulation with 1 ng/ml of LPS (*E. coli*, O55:B5) is shown in ng/ml on the ordinate whereas the abscissa represents the time course in h. (●) 2×10^6 of PBMCs from 6 healthy volunteers with LPS stimulation, (○) without LPS stimulation, (▲) 2×10^6 PBMCs from 6 septic patients with LPS stimulation, (△) without LPS stimulation All data are means \pm SE.

第IV章 考察

IV-1. 循環血液中の endotoxin の中和について

Endotoxin は腸管内に多く存在し、門脈を介して循環性 endotoxin となる。血液に流入した endotoxin は肝臓で Kupffer 細胞や肝細胞によって中和、除去作用を受ける^{4,6)}。しかし、必ずしも endotoxin は肝でその生物活性を完全に失うわけではなく、肝細胞内に取り込まれた endotoxin は化学的変性を受けたのち、循環血液中に再放出され^{4,5,7,35)}、しかもリムルステストで陽性を示したり、マウスに強力な毒性を示したりする³⁶⁾。Endotoxin 中和に関しては、肝細胞系以外に血液中の液性物質や細胞性因子の関与が報告されており¹⁶⁾、循環血液による endotoxin 中和についても多くの研究が成されてきた^{12-15,17)}。細胞性因子による endotoxin 中和についてはほとんど知られていない。単球による endotoxin の取り込みを電子顕微鏡を用いて経時的に観察した実験^{9,10)}では、endotoxin は単球の特異的 receptor を介して単球内に取り込まれることが推測されており、さらに endotoxin は単球内で中和される^{9,7,8)}。これらは PBMCs が循環性 endotoxin の中和に重要な役割を果たすことを示唆している。

IV-2. PBMCs の EEC と単球の FITC endotoxin 結合・取り込み能の関係

本研究では、PBMCs に外因性に endotoxin を加え、上清中の endotoxin

を経時的に定量し、PBMCsのEECを評価した。EECは上清中に外因性に加えられたendotoxinのリムルス活性の経時的消失を評価している。健康人PBMCsのEECは、PBMCs 2×10^6 個の場合、最終的に約50%となった。患者を用いたアッセイにおけるEECは時間経過と細胞数とに依存性に増加し、PBMCsに特異的であることはnegative controlとして使用した膀胱癌、大腸癌、肝芽腫のそれぞれの培養細胞ではendotoxinを排除することができなかったことから明らかである。一方、FITC標識法によるendotoxin-単球結合・取り込み試験は細胞への単なるendotoxin結合・取り込み能を評価している。単球のFITC endotoxin結合・取り込み能の経時変化はPBMCsのEECのそれが同じパターンであった上、単球以外のPBMCsにFITC endotoxinはほとんど結合・取り込みがなかった。また、negative controlに対するendotoxin結合・取り込みも認められなかったことから、つぎの2つのことが推測される：1) PBMCsによるendotoxin排除の前段階としてendotoxinは単球に結合することが必要である；2) EndotoxinはPBMCs中でも単球内に特異的に取り込まれる。

EECとendotoxinの単球との結合・取り込みは、endotoxin毒性の不活化を直接評価しているわけではない。しかし、多くの光学顕微鏡¹⁸⁾や免疫染色^{9,10)}による単球の観察や、好中球を分解してpercol勾配遠沈をおこないendotoxinの存在部位を同定した実験¹¹⁾では、単球の細胞膜に接着した

endotoxin のほとんどは わずか 5-10 分で貪食細胞内に取り込まれることを明らかにしている。また、単球内の endotoxin 中和についてはすでに述べたように証明されている。したがって、本研究の EEC アッセイは endotoxin が単球細胞膜へ接着したことによる上澄みからの endotoxin 除去のみを表現しているのではなく、さらなる細胞内への取り込みと中和をも反映していることが推測できる。

IV-3. Endotoxin による PBMCs 刺激における mCD14 の持つ意味

Endotoxin による PBMCs 刺激については、通常臨床で経験しうるオーダーの endotoxin 量 (1 ng/ml 以下) では、mCD14 receptor が重要である。mCD14 の重要性は、抗 CD14 抗体がサイトカイン分泌に代表される endotoxin 刺激に対する単球の反応を阻害する^{19,23,29)}ことから明らかである。さらに、mCD14 が endotoxin receptor であることは本研究でも明らかにしたように PNH 患者で示されている^{34,35,57)}。すなわち、PNH 患者の単球は mCD14 をほとんど発現しないことがわかっており、これらの単球は通常、臨床上で問題となるような endotoxin 量 (1 ng/ml 以下) では刺激を受けない。また、*in vitro* の実験設定では、臨床上では診ることのない多量の endotoxin (100 ng/ml 以上) で PNH 患者単球は刺激されるが、抗 CD14 抗体はこの反応を阻害しない。つまり、PNH 患者単球は *in vitro* の実験設定にしか存在し得ない多量の endotoxin の存在下に

CD14 以外の receptor を介して刺激を受けていることになる。

IV-4. 敗血症(単球 mCD14 発現が減少する病態)における EEC, FITC endotoxin 結合・取り込み能, サイトカイン分泌能

敗血症患者の単球においては、敗血症の重症度に相関して mCD14 の発現が減少することが知られている⁴⁰⁻⁴³⁾。本研究における敗血症は HLA-DR receptor の低下と APACHE II score が示すように重症であり、これらの敗血症患者単球の mCD14 値は明らかに低下していた。また、敗血症を合併した PNH 患者は mCD14 を発現しない。ところが、これまでの結果を小括すると敗血症患者と健康成人とを比べて、1) 敗血症では mCD14 が減少しているにも関わらず、EEC と FITC endotoxin 結合・取り込み能に健常人と差がなかった；2) PBMCs 上清中の TNF- α と IL-6 値に差がなかった。；3) PNH 患者単球は mCD14 の発現がないにも関わらず、敗血症急性期に endotoxin を排除したという事実がある。以上から、敗血症時の EEC, 単球の endotoxin 結合・取り込み能およびサイトカイン分泌能には mCD14 以外の機構が関与することが推測された。

IV-5. 抗 CD14 抗体による CD14 の重要性の確認

本研究では m-および sCD14 の役割を明らかにするために抗 CD14 抗体

(MEM18)³⁰を用いて、EEC、単球の endotoxin 結合・取り込み能、およびサイトカイン分泌能について調べた。抗CD14抗体は健康人の場合と同様に敗血症患者においてもほぼ完全にこれらのすべての反応を阻害した。つまり、CD14は健常時のみならず敗血症時の endotoxin 細胞反応に重要であるということである。敗血症をともなったPNH患者を含む敗血症患者において、mCD14の減少にも関わらずEEC、単球の endotoxin 結合・取り込み能に変化がなかったというこれまでのデータから敗血症時のEEC、単球の endotoxin 結合・取り込み能にはmCD14以外の機構が関与していると考えられる。したがって、MEM18によって阻害されるmCD14以外の receptor の存在が不可欠となってくる。PBMCsの endotoxin との incubation により、敗血症患者のPBMCsは健康成人に比べて明らかに多量のsCD14を分泌することが判明した。MEM18は単球のmCD14のみならず、sCD14をもブロックする能力を持った抗体である³⁰ことから、敗血症時の急性炎症により分泌増加したsCD14がEEC、単球の endotoxin 結合・取り込み能、およびサイトカイン分泌能といった endotoxin 細胞反応に関与していると考えた。

IV-6. PNH患者におけるEECとFITC endotoxin 結合・取り込み能

以上のことはPNH患者の病態変化によって生じるEECと単球の endotoxin 結合・取り込み能の変化の関係からも裏付けられる。すなわち、PNH

患者の PBMCs は、1)健康な時期には endotoxin とほとんど結合せず、endotoxin のわずか 5.1%しか排除しなかった；2)胆嚢炎の回復期では endotoxin との結合・取り込みは増加し、endotoxin の 24.6%を排除した；3)敗血症の緩解期に endotoxin との結合・取り込みはさらに増加した；4)敗血症時には健常時と同等の EEC を示した。；5)PNH 患者における血清 sCD14 値が急性炎症の重症度に比例して上昇した。つまり、敗血症で分泌増加した sCD14 が元来 PNH 単球では発現しない mCD14 の役割を担ったと考えられる (表 2)。

表2. Relationship between monocytic mCD14 and plasma sCD14

	monocytic mCD14	plasma sCD14
Healthy subjects	↑	~
Patients with sepsis	↓	↑
PNH patient		
Health	-	~
Sepsis	-	↑

PNH 単球は sCD14 が血中に存在する場合、少量の endotoxin と反応する³⁴⁻³⁶⁾。また、PNH 単球における sCD14 依存性の endotoxin 反応は抗 sCD14 抗体によってブロックされる³⁵⁾。このように血中の sCD14 を介した PNH 単球刺激が証明されている。

IV-7. Soluble CD14 の分泌増加とその意義

本実験では、敗血症患者の PBMCs は健康成人に比べて 5 倍以上の sCD14 分泌を認めた。敗血症患者の PBMCs 上清中の sCD14 値は常に 10 ng/ml 以上で、2 時間の incubation で 20.1 ± 1.8 ng/ml に達している。Hailman らもこの sCD14 濃度は endotoxin の細胞刺激を増強させるのに適切な値であることを報告している^{35,36)}。sCD14 はその濃度の差によって、endotoxin に対して全く異なった二つの働きを持つ。大量の sCD14 ($>2 \mu\text{g/ml}$) は HDL と協調することで endotoxin を中和する⁵⁹⁾。この中和は単球の TNF- α 分泌を抑制したり^{59,60)}、マウスの敗血症モデルにおいて生存率を改善する⁶¹⁾ことで示されている。一方、少量の sCD14 量 (10 ng/ml - 1000 ng/ml) は逆に LPS 刺激を血管内皮細胞³³⁾、PNH 単球^{34,35)}、正常単球細胞^{35,36,36)}に伝え、サイトカインの分泌を増加させる。また、最近、臨床において高 sCD14 値がグラム陰性菌敗血症^{46,48)}や熱傷後の敗血症⁶²⁾で報告されており、予後と相関するといわれている。生体が感染を契機にどのような目的 (endotoxin 中和のためか、endotoxin 刺激伝達のためか) をで sCD14 の分泌を増加させるかは定かでない。sCD14 が循環血液中で endotoxin を中和物質 (細胞または HDL) への運搬を担う蛋白であるとすると、敗血症時の sCD14 分泌増加は血中に過剰に存在する endotoxin の排除という点で合目的な反応である。しかし、sCD14 が endotoxin を細胞に運搬し

た場合、細胞性に endotoxin を排除するのみではなく、同時に細胞を刺激する。敗血症における細胞刺激と endotoxin 排除、中和のバランスが何によって規定されるかは今後も重要な研究課題である。

本研究において分泌増加された sCD14 の origin は確かめていないが、Landmann らは、敗血症時に分泌される sCD14 や PNH 患者の単球から分泌される sCD14 は健常人のそれよりも分子量が大きいことを示した⁴⁰⁾。彼らは、この分子量の差より敗血症の患者や PNH 患者で上昇した sCD14 は mCD14 が shedding したのではなく、細胞内から分泌された蛋白であると考察している。Soluble IL-6 receptor のように⁶⁵⁾ differential mRNA splicing によって mCD14 の anchor 部がない蛋白が血中に産生されている可能性もある。

IV-8. Soluble CD14 による endotoxin tolerance の解消

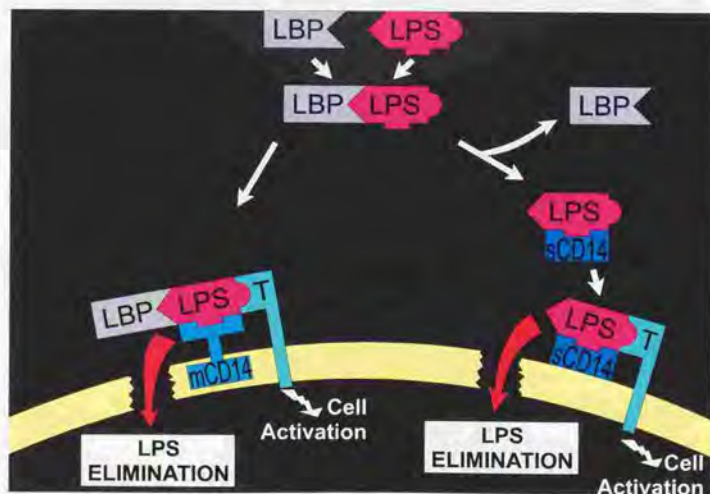
PBMCs を使用した *ex vivo* のアッセイにおいて、敗血症患者と健常人の endotoxin 刺激に対するサイトカイン分泌能に差はなかった。一般的に、敗血症患者から得られた単球は tolerance という endotoxin 刺激に対する低反応状態となり、健常人の単球に比べてサイトカイン分泌は低下する⁶⁴⁻⁶⁶⁾。本実験の PBMCs アッセイでは、この endotoxin tolerance はほとんど認められず、敗血症群と健常人群では endotoxin 刺激によるサイトカイン分泌能に差を認めなかった。このアッセイ中でトレランスを認めなかった原因の一つとして考えら

れるのは、sCD14がendotoxinを細胞に運搬し、endotoxinの取り込みのみならず、endotoxinによる細胞刺激をおこなったことである。



第V章 まとめ

以上をまとめると、1) 単核球、中でも単球が循環性endotoxinの排除能を持っており、この排除過程は単球のendotoxin結合に依存している；2) mCD14は健常時のendotoxin細胞反応（EEC，endotoxin結合・取り込み能，サイトカイン分泌能）において重要な役割を果たす；3) 敗血症時にはmCD14が減少するが、endotoxin排除，単球のendotoxin結合・取り込み能，サイトカイン分泌能といった機能はsCD14の分泌増加によって代償される。したがって、臨床で検出されるendotoxin量（1 ng/ml 以下）ではCD14（mもしくはs）は細胞刺激伝達とendotoxin排除における中心的なreceptorである。



Model for functional m/s CD14 receptor during different clinical status

第VI章 臨床的展望

Soluble CD14 は血中濃度のちがいでによって、まったく異なった作用を持つことはすでに述べたが、実際の臨床において、生体が感染や侵襲を受けた時に sCD14がどのような役割を担っているのかは定かではない。しかし、外科臨床において循環血液中出现するendotoxinに対して生体はこれを中和しようとして反応することが推測される。この中和機序の一つとして sCD14の分泌増加があり、細胞性および液性のendotoxin中和を助けているのではないと思われる。以上の考察より endotoxin血症の治療として、sCD14を大量に投与することによって、endotoxin中和を助けることも考えられる。Endotoxin血症では既に血清sCD14値は上昇しているため、少量のsCD14による細胞刺激ではなく、主に中和に働くことが推測される。この点はさらなる検討が必要である。本研究では、外科侵襲後には血清sCD14が循環血液中のendotoxin生物活性を調節していることを明らかにし、endotoxin中和物質としてのsCD14の臨床的意義を裏付けるものである。

参考文献

- 1) Berger, D., U.M. Schmidt, S. Ott, et al: Incidence and pathophysiological relevance of postoperative endotoxemia. FEMS Immunol.Med.Microbiol. **11**: 285-290 (1995).
- 2) Hiki, N., D. Berger, K. Buttenschoen, et al: Endotoxemia and specific antibody behavior against different endotoxins following multiple injuries. J.Trauma. **38**: 794-801 (1995).
- 3) Martinez Pellus, A.E., P. Merino, M. Bru, et al: Can selective digestive decontamination avoid the endotoxemia and cytokine activation promoted by cardiopulmonary bypass?. Crit.Care Med. **21**: 1684-1691 (1993).
- 4) Mimura, Y., S. Sakisaka, M. Harada, et al: Role of hepatocytes in direct clearance of lipopolysaccharide in rats. Gastroenterology **109**: 1969-1976 (1995).
- 5) Freudenberg, M.A., B. Kleine & C. Galanos: The fate of lipopolysaccharide in rats: evidence for chemical alteration in the molecule. Rev.Infect.Dis. **6**: 483-487 (1984).

- 6) Carey, F.J., A.I. Braude & M. Zalesky: Studies with radioactive endotoxin. III. the effect of tolerance on the distribution of radioactivity after intravenous injection of *Escherichia coli* endotoxin labeled with CR51 I. *J.Clin.Invest.* **37**: 441-457 (1958).
- 7) Fox, E.S., P. Thomas & S.A. Broitman: Clearance of gut-derived endotoxins by the liver. Release and modification of ³H, ¹⁴C-lipopolysaccharide by isolated rat Kupffer cells. *Gastroenterology* **96**: 456-461 (1989).
- 8) Peterson, A.A. & R.S. Munford: Dephosphorylation of the lipid A moiety of *Escherichia coli* lipopolysaccharide by mouse macrophages. *Infect.Immun.* **55**: 974-978 (1987).
- 9) Kang, Y.H., R.S. Dwivedi & C.H. Lee: Ultrastructural and immunocytochemical study of the uptake and distribution of bacterial lipopolysaccharide in human monocytes. *J.Leukoc.Biol.* **48**: 316-332 (1990).
- 10) Kang, Y.H., C.H. Lee, R.L. Monroy, et al: Uptake, distribution and fate of bacterial lipopolysaccharides in monocytes and macrophages: an ultrastructural and functional correlation. *Electron Microsc.Rev.* **5**: 381-419 (1992).

- 11) Luchi, M. & R.S. Munford: Binding, internalization, and deacylation of bacterial lipopolysaccharide by human neutrophils. *J.Immunol.* **151**: 959-969 (1993).
- 12) Levine, D.M., T.S. Parker, T.M. Donnelly, et al: In vivo protection against endotoxin by plasma high density lipoprotein. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **90**: 12040-12044 (1993).
- 13) Flegel, W.A., M.W. Baumstark, C. Weinstock, et al: Prevention of endotoxin-induced monokine release by human low- and high-density lipoproteins and by apolipoprotein A-I. *Infect.Immun.* **61**: 5140-5146 (1993).
- 14) Gray, P.W., G. Flaggs, S.R. Leong, et al: Cloning of the cDNA of a human neutrophil bactericidal protein. Structural and functional correlations. *J.Biol.Chem.* **264**: 9505-9509 (1989).
- 15) Heumann, D., P. Gallay, S. Betz-Corradin, et al: Competition between bactericidal/permeability-increasing protein and lipopolysaccharide-binding protein for lipopolysaccharide binding to monocytes. *J.Infect.Dis.* **167**: 1351-1357 (1993).

- 16) Baumgartner, J.D., T.X. O'Brien, T.N. Kirkland, et al: Demonstration of cross-reactive antibodies to smooth gram-negative bacteria in antiserum to *Escherichia coli* J5. *J.Infect Dis.* **156**: 136-143 (1987).
- 17) Berger, D., S. Schleich, M. Seidelmann, et al: Demonstration of an interaction between transferrin and lipopolysaccharide - an in vitro study. *Eur.Surg.Res.* **23**: 309-316 (1991).
- 18) Gally, P., C.V. Jongeneel, C. Barras, et al: Short time exposure to lipopolysaccharide is sufficient to activate human monocytes. *J.Immunol.* **150**: 5086-5093 (1993).
- 19) Gegner, J.A., R.J. Ulevitch & P.S. Tobias: Lipopolysaccharide (LPS) signal transduction and clearance. Dual roles for LPS binding protein and membrane CD14. *J.Biol.Chem.* **270**: 5320-5325 (1995).
- 20) Gessani, S., U. Testa, B. Varano, et al: Enhanced production of LPS-induced cytokines during differentiation of human monocytes to macrophages. Role of LPS receptors. *J.Immunol.* **151**: 3758-3766 (1993).

- 21) Heumann, D., P. Gallay, C. Barras, et al: Control of lipopolysaccharide (LPS) binding and LPS-induced tumor necrosis factor secretion in human peripheral blood monocytes. *J.Immunol.* **148**: 3505-3512 (1992).
- 22) Kitchens, R.L., R.J. Ulevitch & R.S. Munford: Lipopolysaccharide (LPS) partial structures inhibit responses to LPS in a human macrophage cell line without inhibiting LPS uptake by a CD14-mediated pathway. *J.Exp.Med.* **176**: 485-494 (1992).
- 23) Pollack, M., A.M. Espinoza, G. Guelde, et al: Lipopolysaccharide (LPS)-specific monoclonal antibodies regulate LPS uptake and LPS-induced tumor necrosis factor-alpha responses by human monocytes. *J.Infect.Dis.* **172**: 794-804 (1995).
- 24) Wright, S.D., R.A. Ramos, P.S. Tobias, et al: CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* **249**: 1431-1433 (1990).
- 25) Munford, R.S. & C.L. Hall: Purification of acyloxyacyl hydrolase, a leukocyte enzyme that removes secondary acyl chains from bacterial lipopolysaccharides. *J.Biol.Chem.* **264**: 15613-15619 (1989).

- 26) Lo, S.K., P.A. Detmers, S.M. Levin, et al: Transient adhesion of neutrophils to endothelium. *J.Exp.Med.* **169**: 1779-1793 (1989).
- 27) Schletter, J., H. Brade, L. Brade, et al: Binding of lipopolysaccharide (LPS) to an 80-kilodalton membrane protein of human cells is mediated by soluble CD14 and LPS- binding protein. *Infect.Immun.* **63**: 2576-2580 (1995).
- 28) Hampton, R.Y., D.T. Golenbock, M. Penman, et al: Recognition and plasma clearance of endotoxin by scavenger receptors. *Nature* **352**: 342-344 (1991).
- 29) Kirkland, T.N., F. Finley, D. Leturcq, et al: Analysis of lipopolysaccharide binding by CD14. *J.Biol.Chem.* **268**: 24818-24823 (1993).
- 30) Bazil, V., V. Horejsi, M. Baudys, et al: Biochemical characterization of a soluble form of the 53-kDa monocyte surface antigen. *Eur.J.Immunol.* **16**: 1583-1589 (1986).
- 31) Pugin, J., R.J. Ulevitch & P.S. Tobias: A critical role for monocytes and CD14 in endotoxin-induced endothelial cell activation. *J.Exp.Med.* **178**: 2193-2200 (1993).

- 32) Frey, E.A., D.S. Miller, T.G. Jahr, et al: Soluble CD14 participates in the response of cells to lipopolysaccharide. *J.Exp.Med.* **176**: 1665-1671 (1992).
- 33) Loppnow, H., F. Stelter, U. Schonbeck, et al: Endotoxin activates human vascular smooth muscle cells despite lack of expression of CD14 mRNA or endogenous membrane CD14. *Infect.Immun.* **63**: 1020-1026 (1995).
- 34) Duchow, J., A. Marchant, A. Crusiaux, et al: Impaired phagocyte responses to lipopolysaccharide in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Infect.Immun.* **61**: 4280-4285 (1993).
- 35) Golenbock, D.T., R.R. Bach, H. Lichenstein, et al: Soluble CD14 promotes LPS activation of CD14-deficient PNH monocytes and endothelial cells. *J.Lab.Clin.Med.* **125**: 662-671 (1995).
- 36) Hailman, E., T. Vasselon, M. Kelley, et al: Stimulation of macrophages and neutrophils by complexes of lipopolysaccharide and soluble CD14. *J.Immunol.* **156**: 4384-4390 (1996).

- 37) Vita, N., S. Lefort, P. Sozzani, et al: Detection and biochemical characteristics of the receptor for complexes of soluble CD14 and bacterial lipopolysaccharide. *J.Immunol.* **158**: 3457-3462 (1997).
- 38) Tobias, P.S., K. Soldau, J.A. Gegner, et al: Lipopolysaccharide binding protein-mediated complexation of lipopolysaccharide with soluble CD14. *J.Biol.Chem.* **270**: 10482-10488 (1995).
- 39) Yu, B. & S.D. Wright: Catalytic properties of lipopolysaccharide (LPS) binding protein. Transfer of LPS to soluble CD14. *J.Biol.Chem.* **271**: 4100-4105 (1996).
- 40) Bazil, V. & V. Horejsi: Shedding of the CD44 adhesion molecule from leukocytes induced by anti-CD44 monoclonal antibody simulating the effect of a natural receptor ligand. *J.Immunol.* **149**: 747-753 (1992).
- 41) Birkenmaier, C., Y.S. Hong & J.K. Horn: Modulation of the endotoxin receptor (CD14) in septic patients. *J.Trauma.* **32**: 473-478 (1992).
- 42) Ertel, W., F. Krombach, J.P. Kremer, et al: Mechanisms of cytokine cascade activation in patients with sepsis: normal cytokine transcription despite reduced CD14 receptor expression. *Surgery* **114**: 243-250 (1993).

- 43) Fingerle, G., A. Pforte, B. Passlick, et al: The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes is expanded in sepsis patients. *Blood* **82**: 3170-3176 (1993).
- 44) Lin, R.Y., M.E. Astiz, J.C. Saxon, et al: Altered leukocyte immunophenotypes in septic shock. Studies of HLA-DR, CD11b, CD14, and IL-2R expression. *Chest* **104**: 847-853 (1993).
- 45) Lin, R.Y., M.E. Astiz, J.C. Saxon, et al: Relationships between plasma cytokine concentrations and leukocyte functional antigen expression in patients with sepsis. *Crit.Care Med.* **22**: 1595-1602 (1994).
- 46) Landmann, R., W. Zimmerli, S. Sansano, et al: Increased circulating soluble CD14 is associated with high mortality in gram-negative septic shock. *J.Infect.Dis.* **171**: 639-644 (1995).
- 47) Durieux, J.J., N. Vita, O. Popescu, et al: The two soluble forms of the lipopolysaccharide receptor, CD14: characterization and release by normal human monocytes. *Eur.J.Immunol.* **24**: 2006-2012 (1994).

- 48) Landmann, R., A.M. Reber, S. Sansano, et al: Function of soluble CD14 in serum from patients with septic shock. *J.Infect.Dis.* **173**: 661-668 (1996).
- 49) Blanco, A., G. Solis, E. Arranz, et al: Serum levels of CD14 in neonatal sepsis by Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Acta Paediatr.* **85**: 728-732 (1996).
- 50) Burgmann, H., S. Winkler, G.J. Locker, et al: Increased serum concentration of soluble CD14 is a prognostic marker in gram-positive sepsis. *Clin.Immunol.Immunopathol.* **80**: 307-310 (1996).
- 51) Heinzelmann, M., M. Mercer Jones, W.G. Cheadle, et al: CD14 expression in injured patients correlates with outcome. *Ann.Surg.* **224**: 91-96 (1996).
- 52) American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine
Consensus Conference: 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.* **20**: 864-874 (1992).

- 53) Berger, D., E. Bolke, H. Huegel, et al: New aspects concerning the regulation of the post-operative acute phase reaction during cardiac surgery. *Clin.Chim.Acta* **239**: 121-130 (1995).
- 54) Wakefield, C.H., P.D. Carey, S. Foulds, et al: Changes in major histocompatibility complex class II expression in monocytes and T cells of patients developing infection after surgery. *Br.J.Surg.* **80**: 205-209 (1993).
- 55) Freudenberg, M.A., N. Freudenberg & C. Galanos: Time course of cellular distribution of endotoxin in liver, lungs and kidneys of rats. *Br.J.Exp.Pathol.* **63**: 56-65 (1982).
- 56) Duncan, R.L., Jr. & D.C. Morrison: The fate of E. coli lipopolysaccharide after the uptake of E. coli by murine macrophages in vitro. *J.Immunol.* **132**: 1416-1424 (1984).
- 57) Corrales, I., A.J. Weersink, J. Verhoef, et al: Serum-independent binding of lipopolysaccharide to human monocytes is trypsin sensitive and does not involve CD14. *Immunology* **80**: 84-89 (1993).

- 58) Wurfel, M.M., E. Hailman & S.D. Wright: Soluble CD14 acts as a shuttle in the neutralization of lipopolysaccharide (LPS) by LPS-binding protein and reconstituted high density lipoprotein. *J.Exp.Med.* **181**: 1743-1754 (1995).
- 59) Grunwald, U., C. Kruger & C. Schutt: Endotoxin-neutralizing capacity of soluble CD14 is a highly conserved specific function. *Circ.Shock* **39**: 220-225 (1993).
- 60) Haziot, A., G.W. Rong, V. Bazil, et al: Recombinant soluble CD14 inhibits LPS-induced tumor necrosis factor-alpha production by cells in whole blood. *J.Immunol.* **152**: 5868-5876 (1994).
- 61) Haziot, A., G.W. Rong, X.Y. Lin, et al: Recombinant soluble CD14 prevents mortality in mice treated with endotoxin (lipopolysaccharide). *J.Immunol.* **154**: 6529-6532 (1995).
- 62) Kruger, C., C. Schutt, U. Obertacke, et al: Serum CD14 levels in polytraumatized and severely burned patients. *Clin.Exp.Immunol.* **85**: 297-301 (1991).

- 63) Jones SA, Horiuchi S, Novick D, et al: Shedding of the soluble IL-6 receptor is triggered by Ca²⁺ mobilization, while basal release is predominantly the product of differential mRNA splicing in THP-1 cells. *Eur J Immunol* **21**: 3514-3522 (1998).
- 64) Bundschuh, D.S., J. Barsig, T. Hartung, et al: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and IFN-gamma restore the systemic TNF-alpha response to endotoxin in lipopolysaccharide-desensitized mice. *J.Immunol.* **158**: 2862-2871 (1997).
- 65) Astiz, M.E., E.C. Rackow, J.G. Still, et al: Pretreatment of normal humans with monophosphoryl lipid A induces tolerance to endotoxin: a prospective, double-blind, randomized, controlled trial. *Crit.Care Med.* **23**: 9-17 (1995).
- 66) Mengozzi, M. & P. Ghezzi: Cytokine down-regulation in endotoxin tolerance. *Eur.Cytokine.Netw.* **4**: 89-98 (1993).

inches
1 2 3 4 5 6 7 8
cm
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

Kodak Color Control Patches

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black



Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

