

敗血症性ショックモデルとしてのエンドトキシンの病態生理
—酸化ストレスからのアプローチ—

坂口 修平

Metabolic Aspects of Endotoxin as a Model of Septic Shock
—Approached from Oxidative Stress—

Shuhei SAKAGUCHI

*First Department of Hygienic Chemistry, Tohoku Pharmaceutical University,
4-4-1 Komatsushima, Aoba-ku, Sendai 981-8558, Japan*

(Received October 1, 2003; Accepted November 29, 2003)

Despite the remarkable progress in intensive care medicine, sepsis and shock continue to be major clinical problems in intensive care units. Septic shock may be associated with a toxic state initiated by the stimulation of monocytes by bacterial toxins such as endotoxin, which is released into the bloodstream. This study describes the role of oxidative stress in endotoxin-induced metabolic disorders. We demonstrate that endotoxin injection results in lipid peroxide formation and membrane injury in experimental animals, causing decreased levels of free radical scavengers or quenchers. Interestingly, it was also suggested that tumor necrosis factor (TNF)-induced oxidative stress occurs as a result of bacterial or endotoxin translocation under conditions of reduced reticuloendothelial system function in various disease states. In addition, we suggest that intracellular Ca^{2+} , Zn^{2+} , or selenium levels may participate, at least in part, in the oxidative stress during endotoxemia. On the other hand, it is also suggested that the extent of endotoxin-induced nitric oxide (NO) formation may be due, at least in part, to a change in heme metabolic regulation during endotoxemia. However, in our experimental model, NO is not crucial for lipid peroxide formation during endotoxemia. Sho-saiko-to is one of the most frequently prescribed Kampo medicines and has primarily been used to treat chronic hepatitis. We report that Sho-saiko-to decreases the rh TNF-induced lethality in galactosamine-hypersensitized mice and protects mice against oxygen toxicity and Ca^{2+} overload in the cytoplasm or mitochondria during endotoxemia. We further suggest that Sho-saiko-to shows a suppressive effect on NO generation in macrophages stimulated with endotoxin and that it may be useful in improving endotoxin shock symptoms.

Key words—septic shock; endotoxin; oxidative stress; free radical formation; Sho-saiko-to

はじめに

ショックとは生活機能が極端に低下したときの状態で、原因はなんであれ生体に強い衝撃が加わって生じる非生理的な生命を脅かす状態を総称する言葉で、“死の前兆”を意味する1つの症候群である。ショックは慢性的に進行する状態や1つの疾病及び単一の病態ではなく、原因のいかに問わず、共通するショックの病態は相対的あるいは絶対的な循環血液量の減少による末梢循環不全であり、ほぼ共通の終末像を呈する。直接の原因、ショックを誘発する因子は極めて多く、病態生理学的にも広範囲にま

たがっている。¹⁾最近の生化学、免疫学の進歩がショックを理解する上で重要な示唆を与え、研究者にとって興味のつきない多くの問題を提供してくれている。病態生理学的には心拍出量の低下、急な低血圧、有効微小循環血量の欠乏、播種性血管内凝固 (disseminated intravascular coagulation, DIC) とそれに基づく全身組織と重要臓器組織の酸素欠乏 (anoxia)、毛細血管透過性の亢進、網内系 (reticuloendothelial system, RES) の機能低下及びそれらの結果としての代謝的失調と細胞代謝不全、代謝性アシドーシスの発生を伴う。ショックは原因から心原性 (cardiogenic shock)、出血性 (血液量減少性, hypovolemic shock)、敗血症性 (septic shock) などに分類されるが、いずれも組織循環障

東北薬科大学第一衛生化学教室 (〒981-8558 仙台市青葉区小松島4-4-1)
e-mail: shuhei@tohoku-pharm.ac.jp

害から臓器障害, 多臓器不全症候群 (multiple organ dysfunction syndrome, MODS) に至り, 末期には不可逆性ショック状態になるものと考えられている.^{2,3)}

筆者らは長年, ショックモデルとしてのエンドトキシン血症の病態生理学の研究に興味を持っていた. この間, 生化学の進歩を基にしたエンドトキシン及びショック研究は目覚しく, また, 筆者らもエンドトキシン血症の病態機構を明らかにするためにフリーラジカル産生,⁴⁻⁹⁾ RES 機能,^{10,11)} リポ蛋白質代謝,¹²⁻¹⁴⁾ グリコーゲン枯渇機構,^{15,16)} 細胞内 Ca^{2+} 動態,¹⁷⁻¹⁹⁾ サイトカイン,^{20,21)} 一酸化窒素 (nitric oxide, NO),²²⁻²⁴⁾ 必須微量元素^{25,26)} そして漢方薬剤小柴胡湯のショック防止効果²⁷⁻³¹⁾ に関心を持ち研究を進めてきた. 敗血症性ショック (本総説ではグラム陰性桿菌から生じるエンドトキシンショックを示す) の複雑な病態機構を論じるために, 筆者らの研究成績を基にエンドトキシンで惹起される酸化ストレス (oxidative stress) からアプローチしていき, さらにその病態論から小柴胡湯の敗血症性ショックの防御機構についても述べていきたい.

1. ショックとエンドトキシン

感染, 非感染侵襲による多臓器障害, 多臓器不全 (multiple organ failure, MOF) への発症の原因として種々の humoral mediators の関与が報告され, その対策が医療の現場で行われている. 中でもグラム陰性菌感染症によるショック, すなわち敗血症性ショックはその診断と治療の進歩にも関わらず死亡率が高く, 米国では年間の死亡者が 21 万にも及んでいると推定され, 重要疾患の 1 つでもある.³²⁾ 敗血症性ショックが持続すれば hyperdynamic state は hypodynamic state となる. この状態では低酸素症が顕著になり, 代謝アシドーシスが進行し, やがて多臓器不全に陥り予後は極めて悪い. ショック学は戦争とともに発展し, 特に米国などでは国家プロジェクトとして研究が行われ, ショックの病態研究とその治療法開発が飛躍的に進歩してきた. 1970 年代後半より高齢者などいわゆる compromised host の増加, 手術の拡大化とともに, ショック研究の対象は敗血症性ショックが主体となってきた.¹⁾

グラム陰性菌敗血症性ショックの原因物質として重要なエンドトキシンは多様な生物活性を持っており, 現在基礎医学, 臨床医学の連携をはかりながら

研究が進められている. 臨床的にはエンドトキシンを簡単に検出するカプトガニ血球由来の limulus test が開発されて以来, 各種疾患の各種病態とエンドトキシンとの関係が明らかにされつつある. 例えば, ショックの原因が出血性やその他の要因であっても, RES 機能が低下したとき, 腸内起因菌の内因性エンドトキシンが肝 Kupffer 細胞内で解毒されず, bacterial translocation (BT) により末梢血中にエンドトキシンが認められ, エンドトキシン血症の状態になること,³³⁾ また, 腹部手術などの高度な外科侵襲, あるいは肝, 胆, 膵疾患などに内因性エンドトキシンの解毒不全が関与し, 一見相互に何の関連もないような疾患が敗血症性ショック, すなわちエンドトキシンショックの終末代謝像と近似していることが知られるようになってきた. 最近では臨床的に外科領域のショックばかりではなく, 内科領域でもエンドトキシンが注目されてきている.

2. エンドトキシと SIRS

生体に対するエンドトキシンの多彩な作用はエンドトキシンによる直接的な作用によるものでなく, エンドトキシンの刺激を受けた種々の細胞から産生される humoral mediators を介して引き起こされることが明らかになってきた.³⁴⁾ エンドトキシンによって刺激を受けた単球-マクロファージ, 血管内皮細胞, 好中球などから産生されるサイトカイン, エイコサイド, 血小板活性化因子 (PAF), 活性酸素, エラスターゼ, NO などの作用により全身的な過剰炎症反応が惹起され, 血圧低下, 微小循環障害から細胞障害, さらに臓器障害が引き起こされる.³⁵⁾

敗血症とは血液中に細菌が存在すること, あるいはエンドトキシンに代表される細菌毒素が存在することが必要条件であり, 細菌感染症の過程で高熱, 白血球の増加や減少, 呼吸促拍, 頻脈などの一連の臨床症状を示す病態として捉えられてきたが, 同様な症状は外傷, 熱症, 膵炎, 出血性ショックなどの非感染性疾患, ウイルス, 真菌感染など細菌感染症でも認められる. その原因のいかに関わらず, 共通する臨床症状は刺激に対する全身の炎症反応である. 敗血症性ショックなどは「かならずしも感染によらない, 生体の過剰な侵襲に対する全身性炎症反応症候群 systemic inflammatory response syndrome (SIRS) として理解されつつあり,³⁶⁾ humoral medi-

ators の炎症性サイトカインが initial mediator として作用し、最終的に組織、臓器障害を引き起こす酸化ストレスがこの多臓器不全に関与していることが示唆されている。³⁵⁾ 従来、敗血症の概念が不明確であったが、1992年にアメリカ胸部内科医協会と集中治療医学会のコンセンサス委員会で SIRS の概念が導入され、³⁷⁾ 敗血症の位置づけが明確になり、この概念が各国で受け入れられつつある。すなわち SIRS は感染がなくても急性肺炎、炎症、外傷、その他の疾患で発熱、頻脈、呼吸回数の促進、白血球増加などの症状を呈する場合を総称し、さらに、感染が証明されて同様の症状を呈する場合を敗血症とすることが提唱されている (Fig. 1)。³⁷⁾ この概念の導入により、SIRS の段階で敗血症の前段階として治療を開始し、敗血症から敗血症性ショック、それに引き続いて発症する可能性の高い多臓器不全を防止しようとしている。この SIRS の段階ではサイトカインが大きな要因となっており、humoral mediators に対する対策が考えられている。³³⁾

3. エンドトキシンのシグナル伝達機構

現在までに知られているエンドトキシンによる細胞活性化の分子機構は次のように考えられている。³⁸⁾ エンドトキシンの細胞上の受容体に関しては単球-マクロファージの分化抗原である分子量 53 kDa の糖タンパク CD14 が知られている。エンドトキシン (lipopolysaccharide, LPS) は血清中の

LPS 結合タンパク質 (LPS binding protein, LBP) などに結合し、複合体となって CD14 と結合して細胞を活性化する。これまで CD14 がエンドトキシンの受容体と考えられていたが、CD14 は glycosyl-phosphatidylinositol (GPI) アンカーを介して細胞膜表面に結合している膜型分子、あるいは GPI アンカーが欠損した遊離分子であるため、細胞ドメインを持たないことからエンドトキシンのシグナル伝達に関わるもう 1 つの受容体の存在が示唆されてきた。³⁹⁾ 実際、CD14 欠損マウスはエンドトキシンに対する反応性は低下するが反応はする。最近、細胞内へのシグナル伝達を行う LPS レセプターとして Toll-like receptor 4 (TLR4) が見出された。TLR4 ノックアウトマウスは LPS に低応答性である。また、TLR4 が LPS 低応答性マウス C3H/HeJ の LPS 低応答性の原因遺伝子であり、C3H/HeJ マウスでは TLR4 の細胞質内ドメインに点変異性が存在するため機能的 TLR4 が発現していない。TLR4 はアダプタ分子である MD-2 と会合しており、複合体として LPS を認識することで細胞内へシグナルを伝達する。⁴⁰⁾ 以上のことから今日では少なくともマウスにおいては TLR4 が LPS の受容体であると考えられている。

4. エンドトキシンと酸化ストレス

一般に脂質過酸化はオゾンや高酸素状態などのときに生成するが、低酸素状態でも起こり、活性酸素

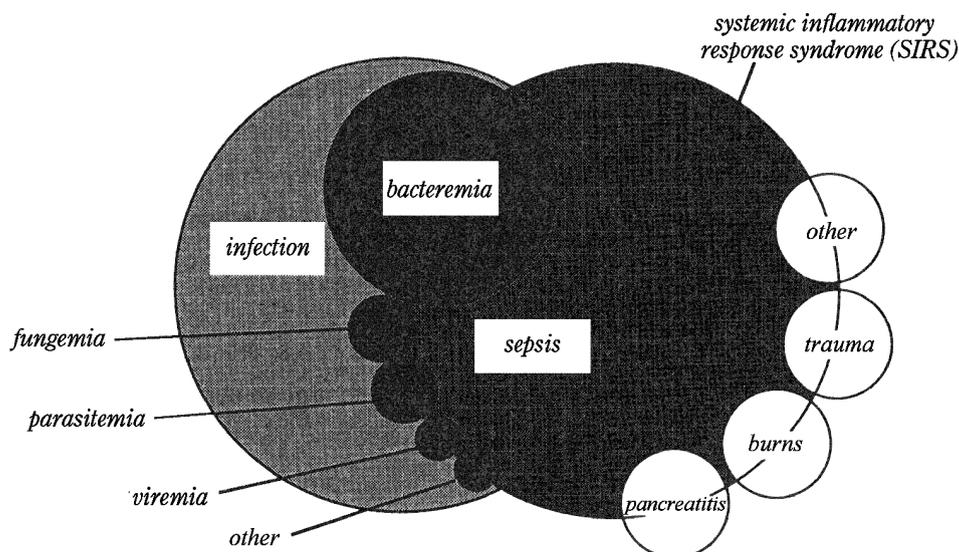


Fig. 1. Concept of Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) (ACCP/SCMCC, 1992)

を発生することが1970年代の後半から知られるようになってきた。活性酸素種は従来から研究されてきた毒性に加え、生体のレドックス制御の観点から細胞内情報伝達シグナルとしての役割が注目されてきている。酸化ストレスとは活性酸素生成亢進・抗酸化防御システムの破綻であり、酸化促進物質が優勢になった状態と定義されており、種々の疾病の発生と進展に関与する。エンドトキシンによる臓器障害を考える場合フリーラジカルの関与も重要である。一般にショックではDICを生起する。エンドトキシン血症ではこのDICのモデルともなる。DICは血管凝固に続く末梢循環での血栓形成から、末梢組織の酸素供給が障害されて酸素欠乏となり、フリーラジカルの生成によりリソゾーム膜やミトコンドリア膜の脂質過酸化が起こり、組織障害や代謝障害となって不可逆性ショック状態に移行するものと考えられている。³⁵⁾ ショックの本態は組織還流の低下であり、細胞は低酸素状態に置かれる。エンドトキシン血症時に著しい高乳酸血症を呈することは筆者らも⁴⁾観察しており、これは組織 anoxia, ischemia からくる嫌氣的状態の指標であり重症状態を示す。そこで筆者らはいち早く、1980年代の初頭からエンドトキシン血症での脂質過酸化生成とその消去機構の障害についての実験を開始した。⁴⁻⁹⁾

4-1. フリーラジカルの生成と生体膜障害 エンドトキシン血症は腎、肺、肝など主要な臓器に障害を引き起こす多臓器不全が、その中でも肝が最も早期に高頻度に障害が生じる。このようなことから主として基礎的な動物実験は肝を中心に行われてきた。現在、エンドトキシンが容易に検出され、臨床家にとってもエンドトキシンは興味ある対象になっており、Nolan と Leibowitz⁴²⁾ が腸管由来のエンドトキシンが肝疾患の成因、進展に関与することを指摘以来、肝疾患とエンドトキシンとの関連が一段と注目を集めている。Shibayama⁴³⁾ は肝を含む臓器障害の主原因は臓器内の微小血管内に形成されたフィブリン血栓による循環障害であると述べているが、肝障害の成因を考える場合、フリーラジカルの関与も重要である。筆者らはこの考えに基づいて研究を進めてきた。

ショックモデルでの活性酸素の消長は極めて短時間であり、把握は困難である。そこで筆者らは肝臓中の過酸化脂質 (thiobarbituric acid, TBA) を定量

することで推定した。⁴⁾ 当時、このTBA法はフリーラジカル生成を推定するのに大変有益な方法であった。⁴⁴⁾ マウスにエンドトキシン (200 μg , *i.p.*) を投与すると18h後に肝内の過酸化脂質、スーパーオキシド産生系の xanthine oxidase (XOD) 活性が顕著な増大を示した。過酸化脂質の増大はTBA値であるが、肝 plasma membrane (細胞膜) に変化が予想された。そこで、superoxide dismutase (SOD), glutathione reductase (GSSG-R), glutathione peroxidase (GSH-Px) 活性を観察すると活性の低下が見られ、フリーラジカル消去機構の障害が観察された。⁴⁾ このGSH-Px-GSSG-R系は膜脂質をフリーラジカル攻撃から防御するのみでなく、oxidation-reduction系やSH酵素及び膜SHの酸化を防御するものと考えられていた。このことは筆者らの検討により、エンドトキシンによる血清LDHの逸脱が還元型グルタチオン (GSH) の投与により防御できたことから理解できた。⁴⁵⁾ さらにエンドトキシン投与による肝細胞膜の損傷をSDS-ポリアクリルアミド電気泳動パターンで検討した (Fig. 2).⁴⁾ 予想通り分子量65 kDa付近のバンドの消失が観察され、140 kDa付近の数カ所のタンパク画分に顕著な変化が認められ、フリーラジカル産生による肝細胞膜の損傷が示唆できた。このエンドトキシンによる肝細胞膜の損傷は α -トコフェロールの投与により完全に、GSHではほとんど膜が修復された。一方、コーチゾンではやや異なった修復パターンを示した。 α -トコフェロール、GSHは肝の脂質過酸化を抑制するが、コーチゾンはエンドトキシンによる脂質過酸化は抑制しない。 α -トコフェロール、コーチゾンは同じく膜を修復しても、過酸化脂質の抑制と言う点では作用機構が異なるものと考えられた。このことについて、ビタミンE (Vit. E) 欠乏、過剰食飼育マウスでの肝脂質過酸化を検討すると、エンドトキシンを投与したVit. E過剰食マウスは脂質過酸化は見られず、Vit. E欠乏食マウスでは普通食による脂質過酸化を上回る顕著な増大を示した (Fig. 3).⁵⁾ 一方、臓器障害の指標であるLDH isozymeパターンを比較すると、エンドトキシン投与ではLDH-3, 5の各臓器からの逸脱が、Vit. E欠乏マウスでは特に顕著に見られ、膜電気泳動パターンと一致した。Vit. Eは膜を安定させ、リソゾーム酵素の放出を防止し、エンドトキシンによ

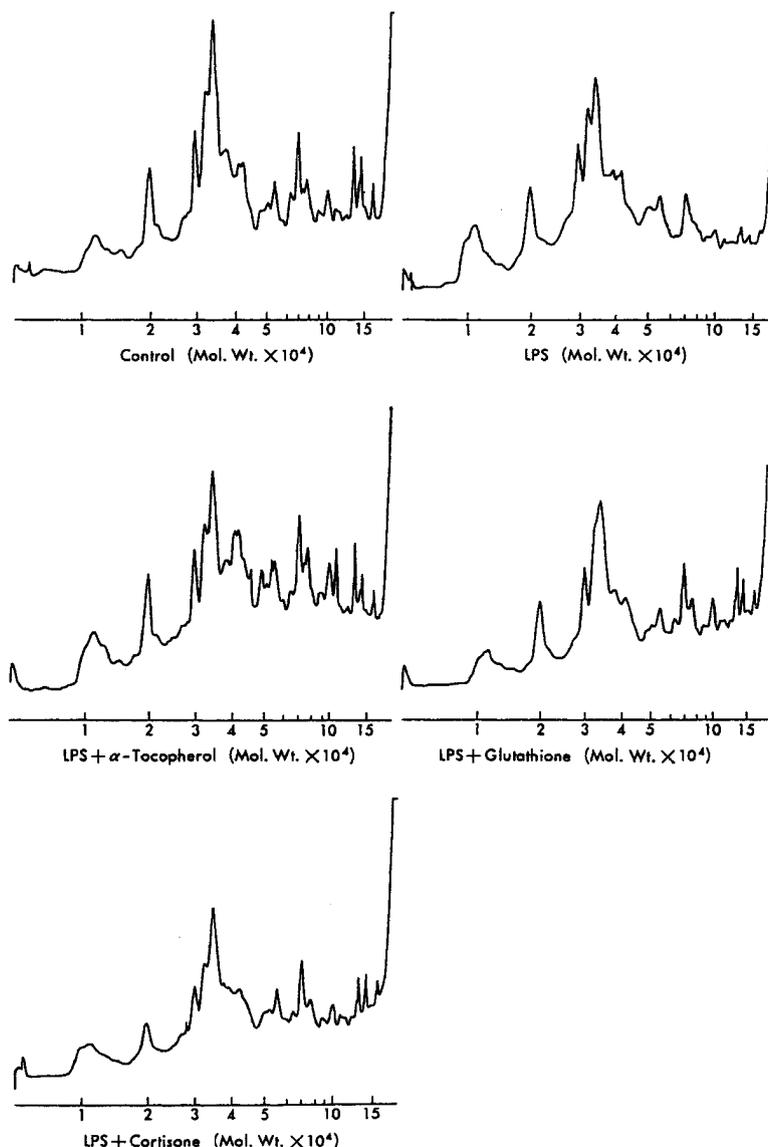


Fig. 2. Scanograms of SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoregrams of Plasma Membrane Protein
The gel patterns were scanographed by a Shimadzu CS-910 from scanner.

る組織障害の防御に役立っていることが示唆された。⁵⁾

リソゾーム膜の障害がフリーラジカルで容易に起こることは衆知の事実である。エンドトキシン血症時には高乳酸血症を伴うが、組織内の pH の低下はリソゾーム膜の不安定化を引き起こし、膜リン脂質の高度不飽和脂肪酸の過酸化はリソゾーム膜からの水解酵素の放出を促し、組織障害の増大をもたらすものと考えられる。

RES とマクロファージを同一視して扱うことには議論もあるかもしれないが、RES は主として肝 Kupffer 細胞などの sessile マクロファージと好中球

や単球などの wandering マクロファージに大別され、生体自己防衛機能の一端として phagocytic system を形成している。ショック時の RES 機能の低下は病態生理上重要な意味を持ち、その予後に重大な影響を及ぼす。エンドトキシンなどが Kupffer 細胞で食食消化、解毒されず長時間血流中に滞留するようになり、臓器組織の障害を招く。筆者らは代表的な RES 機能抑制剤である酢酸鉛によるエンドトキシンの感受性増大の一因にフリーラジカル scavenger 系の活性低下が起因するものと推定した。⁴⁶⁾ 肝はショックによる細胞障害を受け易く、ショックによる多臓器不全への中心的役割を担ってい

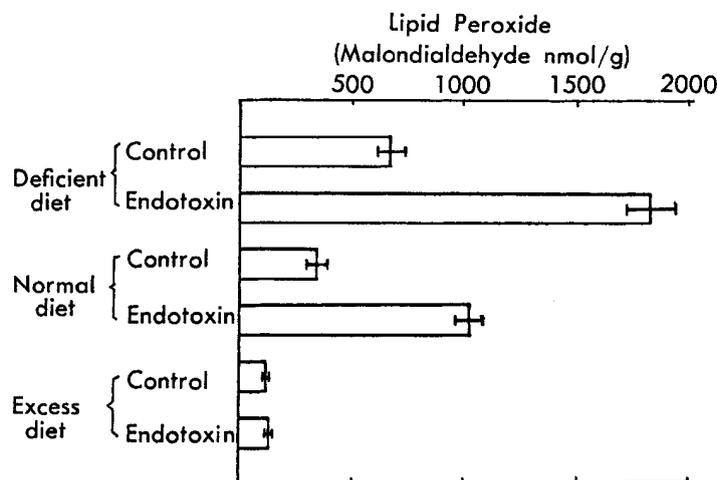


Fig. 3. Effect of α -Tocopherol-Deficient or -Excess Diet on Lipid Peroxide Level in Liver or Endotoxin-Poisoned Mice

Mice were fed the diets for 40 days, and then injected with endotoxin (5 mg/kg *i.p.*) Control mice were injected with saline alone. Each result represents the mean \pm S.E. from 16 mice. Deficient diet: *dl*- α -tocopherol acetate below 5 I.U./kg. Normal diet: *dl*- α -tocopherol acetate 20 I.U./kg. Excess diet: *dl*- α -tocopherol nicotinate 200 I.U./kg.

るとされ、フリーラジカルがその成因に関与しており、敗血症性ショックの病態解明にエンドトキシンによるフリーラジカル産生機構が重要な示唆を与える。⁴⁻⁹⁾

4-2. エンドトキシンによる細胞内 Ca^{2+} の増大と細胞障害 Ca^{2+} 濃度の変化は細胞内外の Ca^{2+} プールにより調節されている。細胞外 Ca^{2+} 濃度は 1–2 mM であるのに対し細胞質の濃度は約 100 nM にすぎず、細胞外には著しく高濃度の Ca^{2+} が存在するが、通常は細胞膜がバリアーの役割を果たしている。細胞内では小胞体、ミトコンドリア内に Ca^{2+} が比較的高濃度に存在し、必要により膜を通過して細胞内へ流入する。それゆえ、何らかの障害により細胞内に大量の Ca^{2+} が流入すると細胞障害が発現する。エンドトキシン血症は単にホルモンの不均衡などでは clear-cut に理解できない複雑な病態代謝を示しており、1つの代謝応答がまた1つの代謝応答につながり複雑多岐に及んでいる。この複雑な応答を考える場合、細胞内 Ca^{2+} は非常に魅力的な示唆に富んでおり、筆者らは一連の研究の流れの中でエンドトキシン血症の代謝異常を解く鍵として細胞内 Ca^{2+} の動態からアプローチしてきた。¹⁷⁻¹⁹⁾

現在、肝細胞障害と細胞内、特に細胞質中の Ca^{2+} との関係が次第に明らかになってきている。最も重要な Ca^{2+} 源は小胞体、ミトコンドリアなどより、むしろ細胞外液よりの Ca^{2+} の流入であり、

肝細胞障害の出現は持続的な Ca^{2+} 濃度上昇が細胞質に認められることが重要である。このようなことから、筆者らは肝の単一細胞の cytosolic-free Ca^{2+} 濃度 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を画像解析システム ARGUS-100CA を使用して検討した。¹⁸⁾ エンドトキシン投与 18 h 後にマウスの $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の増大を認めた (Fig. 4(A))。さらに肝細胞膜 Ca^{2+} -ATPase 活性が対照に比較して 28% 低下した。Kessler⁴⁷⁾ らは肝細胞膜の Ca^{2+} -ATPase の分子量は 140 kDa であることを示しており、この細胞膜 Ca^{2+} -ATPase は活性酸素による脂質過酸化によって阻害されることが認められている。⁴⁸⁾ 筆者らの検討によりエンドトキシンによる肝細胞膜 Ca^{2+} -ATPase 活性の低下はフリーラジカルによる脂質過酸化が肝細胞膜 (60–150 kDa)、特に 140 kDa を損傷させることにより起こることが示唆された (Fig. 4(B))。¹⁸⁾ したがって、エンドトキシンで起こるフリーラジカル産生による肝細胞膜 Ca^{2+} ポンプ機能障害が細胞外から細胞内へ $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の流入を導くと考えられる。

一方、筆者らの検討においても肝ミトコンドリアではエンドトキシンは Ca^{2+} を増大させ、脂質過酸化を惹起させ、 Ca^{2+} -ATPase 活性を高めることを認めた (Table 1)。¹⁷⁾ これらの事実は肝ミトコンドリアへの Ca^{2+} の蓄積をもたらし、活性酸素の発生により、ミトコンドリア膜が損傷を受けることは明白であり、ミトコンドリアの膜過酸化は Ca^{2+} の膜透過性に大きな影響を持つことになる。ミトコンド

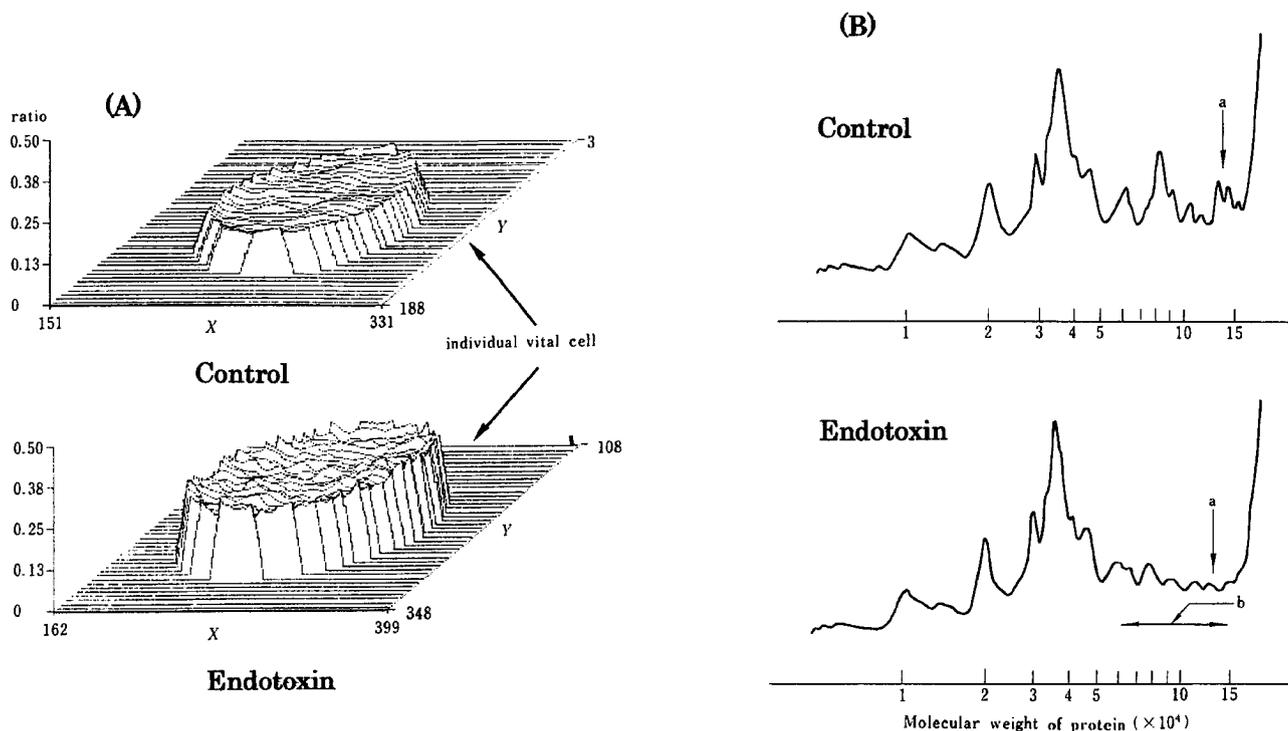


Fig. 4. Changes in Cytosolic-Free Ca^{2+} Concentration $[Ca^{2+}]_i$ in Individual Vital Cells (A) and Scangrams of SDS-Polyacrylamide Gel Electropherograms (B) in Liver Plasma Membrane Protein of Mice 18 h after Endotoxin Administration

A: $[Ca^{2+}]_i$ in an individual vital cell was shown by computer graphics using the ARGUS-100CA system. B: a: molecular weight of protein (140 kDa) of Ca^{2+} -ATPase⁴⁰ in liver plasma membrane, b: region of endotoxin-induced membrane damage.

Table 1. Changes in ATPase Activity in Liver Mitochondria of Endotoxin-Poisoned Mice at 18 h

Treatment	Mitochondria fraction		
	Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase	Mg^{2+} -ATPase (nmol/mg of protein)	Ca^{2+} -ATPase
None	467 ± 4 (100%)	429 ± 6 (100%)	38 ± 2 (100%)
Endotoxin	447 ± 4 (96%)	390 ± 2 (91%)	57 ± 5* (150%)

Each value represents the mean ± S.E. of 12 mice. Asterisk (*) indicates a significant difference from the control value at $p < 0.05$.

リアは酸化的リン酸化により細胞内のエネルギーを生成しているため、その障害は細胞死に直結する。このことはエンドトキシンはミトコンドリア損傷の指標である state 3, respiratory control index (RCI) の低下を導くことから明らかである。⁸⁾

エンドトキシンによるショック機構の1つとして、フリーラジカル生成機構を述べてきたが、ここでアラキドン酸の遊離を考えた場合細胞内 Ca^{2+} もまた関与する。すなわち細胞内 Ca^{2+} の増大 → ホスホリパーゼ A_2 (PLA₂) の活性化 → アラキドン酸生成の一連の反応が起こるものと考えられた。このことは筆者らの実験から、^{8,19)} vitamin D₃ 及び Ca^{2+} 欠

乏マウスにエンドトキシンを投与しても肝の脂質過酸化が起こらず、 Ca^{2+} 拮抗剤のベラパミルや PLA₂ 阻害剤のデキサメタゾンの投与も脂質過酸化を抑制することからも間接的に示唆できる。現在までに哺乳動物から3種の PLA₂、すなわち分泌性 (sPLA₂) で分子量 14 kDa の I 型 (膵臓型)、II 型 (非膵臓型、炎症型) と分子量 85 kDa の細胞質 PLA₂ (cPLA₂) が単離されている。sPLA₂ と cPLA₂ の示す酵素学的性質の違いとして、sPLA₂ は活性発現に mM オーダーの Ca^{2+} が必要であるのに対し、cPLA₂ は細胞内で起こる nM 単位の Ca^{2+} 濃度変化に呼応して活性化される。cPLA₂ はアラ

キドン酸を選択的に遊離するが、sPLA₂には脂肪酸選択性は認められないなどの点から、細胞活性化の初期過程における膜リン脂質からのアラキドン酸の選択的遊離はcPLA₂により制御されていると考えられている。⁴⁹⁾ このことはcPLA₂ ノックアウトマウスの解析によりcPLA₂が種々の刺激に応じて誘導される脂質 mediator の産生において中心的な役割を担っていることが確認されている。⁵⁰⁾ また、炎症サイトカインによるプライミングの際に、cPLA₂の活性化が必須であることがcPLA₂をノックアウトした細胞で証明されている。したがって、アラキドン酸はその代謝経路で脂質 mediator を産生するだけでなく、起炎物質として炎症にも関与する。⁵¹⁾

筆者らは実験的エンドトキシン血症では酸化ストレスが生じ、顕著な脂質過酸化が細胞・組織障害をきたすことを証明しており、その一因として細胞内Ca²⁺の増大を示唆してきた。¹⁷⁻¹⁹⁾ これはcPLA₂活性発現に必要なnM単位の[Ca²⁺]_i増大により、アラキドン酸カスケードが亢進され、DICに関与するPAFやロイコトリエンD₄、MDAを含めた脂質 mediator が産生されると考えられ、エンドトキシンで起こるショックに細胞内Ca²⁺が深く関与していることは間違いのないものと思われた。

5. 腫瘍壊死因子 (TNF) と酸化ストレス

5-1. TNF とエンドトキシンの相乗作用

Tumor necrosis factor (TNF) は腫瘍部位に出血壊死を誘導する因子として見出されたが、現在では炎症を通した生体防御機構に広く関わる炎症サイトカインとして理解されている。敗血症性ショックにおいては炎症反応を惹起するサイトカインとして中心的

な役割を演じ、前述したSIRSがその病態の本質である考え方がなされてきている。³⁷⁾ 本来、TNFはエンドトキシンなどの刺激により単球-マクロファージを始めとする多種類の細胞で生産され、炎症反応や免疫機構に広く関わり、生体の恒常性の維持に重要な役割を果たしている。⁵²⁾ しかしながら、過剰に産生されるとショックを誘発することから、TNFはエンドトキシンショックの重要な mediator の1つであると考えられており、BeutlerとCerami⁵³⁾はTNFは致死活性を持ち、エンドトキシン致死活性の mediator であると述べている。しかし、エンドトキシンの混入のない recombinant human TNF (rhTNF) はそれ自身致死活性はない。このことはHsuehら⁵⁴⁾によるエンドトキシンとTNFの強い相乗作用は、組織障害や致死に重要な役割を担うとの報告からもうなずけ得る。

そこで、エンドトキシン血症でのTNFの酸化ストレスの影響をエンドトキシンとの相乗作用から検討した。⁹⁾ rhTNFとエンドトキシンの併用投与によりマウスの致死作用の増大と肝SOD、GSH-Px活性の低下の相乗作用が見られ、rhTNF投与では見られない酸化ストレスが誘導されてきた (Table 2)。このことはRES機能抑制剤である酢酸鉛処理マウスにポリミキシンBを前投与すると、酢酸鉛で誘導されてくるrhTNFの脂質過酸化が抑制されたことから理解できる。このポリミキシンBはエンドトキシン(LPS)のlipid A部分と結合して、エンドトキシンの活性を中和することが知られており、rhTNFで誘導されてくる酸化ストレスはrhTNFとエンドトキシンが相乗的に作用することが間接的に証明された。⁹⁾ TNFは本来、生体防御機

Table 2. Changes in Superoxide Dismutase (SOD) and Glutathione Peroxide (GSH-Px) Activities and Non-Protein Sulfhydryl (Np-SH) Level in Liver of Endotoxin-Pretreated Mice 3 h after Recombinant Human Tumor Necrosis Factor (rhTNF) Administration

Treatment	SOD	GSH-Px	Np-SH
	(Units/mg of protein)		(μ g/g of wet liver)
Control	2.52 \pm 0.39 ^{a)}	0.68 \pm 0.03	1.34 \pm 0.16
LPS	2.96 \pm 0.41	0.65 \pm 0.05	1.25 \pm 0.07
rhTNF	3.11 \pm 0.34	0.76 \pm 0.02	1.29 \pm 0.06
LPS+rhTNF	2.16 \pm 0.36*	0.51 \pm 0.04*	0.98 \pm 0.07*

a) Mean value \pm S.E. of 10 mice. * significant difference from the value of endotoxin or rhTNF-injected mice ($p < 0.05$). Control: saline, lipopolysaccharide (LPS): endotoxin (0.5 mg/kg, *i.p.*), rhTNF (1×10^4 units/mouse, *i.v.*).

構に関わるサイトカインであり、エンドトキシンの存在下では過剰にフリーラジカルを産生し、ショックに導くことが示唆された。

5-2. TNF と D-ガラクトサミン エンドトキシン血症モデルとして用いられる D-ガラクトサミン (D-GalN) は動物に投与するとエンドトキシンと同様に TNF の感受性を顕著に増強する。Freudenberg らは⁵⁵⁾ C3H/HeJ 系エンドトキシン耐性マウスでは D-GalN とエンドトキシンを投与してやると、肝の uridine triphosphate (UTP) は激減するが死に至らない。しかし、感受性マウスの C3H/HeN 系のマクロファージを移入してやると D-GalN 処理 C3H/HeJ 系マウスはエンドトキシンに対して感受性になり死に至ることを観察した。このことからエンドトキシンと D-GalN の併用による致死活性はマクロファージが重要であることが示された。筆者ら¹⁹⁾は zymosan でマクロファージを活性化させてやると、一般的に D-GalN のマウス腹腔内投与量は 700 mg/kg であるが、400 mg/kg の投与量でエンドトキシン感受性になることを見出した。エンドトキシン (1 mg/kg, *i.p.*) の低用量の投与で肝細胞膜 Ca^{2+} -ATPase 活性は顕著に低下を示し、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を増大させ、顕著な脂質過酸化に導いた (Table 3)。¹⁹⁾ しかし、エンドトキシン刺激による TNF 産生が D-GalN の投与でも増強が見られず、⁵⁶⁾ また肝 Kupffer 細胞の TNF の mRNA レベルも変化しないと言われている。このことから D-GalN 負荷による動物の TNF の感受性増大は、TNF の産生亢進による作用増強よりはむしろ他の機構により感受性を高めて

いるかもしれない。それではその作用機構は何であろうか？ 筆者らはその機構を説明するために前述の TNF とエンドトキシンの相乗作用からアプローチした。

5-3. D-GalN 負荷による TNF 感受性増大機構と内因性エンドトキシンの関与 現在までに知られている D-GalN 負荷による TNF の感受性増大機構を上記したが、その機構を抗エンドトキシン作用を持つポリミキシン B を使用した筆者ら^{20,21)} の実験から内因性エンドトキシンの関与を考察していく。ポリミキシン B の前投与は D-GalN 負荷マウスによる rhTNF の顕著な致死と LDH isozyme の逸脱を防御する。²¹⁾ このことは糖脂質代謝でも観察された。²⁰⁾ また、D-GalN 負荷マウスに影響を及ぼさない rhTNF ($5 \times 10^3 \text{U/mouse}$, *i.v.*) 量にエンドトキシン (0.1 mg/kg, *i.p.*) の低用量を併用投与すると直腸体温の顕著な低下が見られ、致死作用を示し、8 h で全例死亡した (Table 4)。²⁰⁾ これらの知見から D-GalN による TNF 感受性増大機構に腸管由来の内因性のエンドトキシンが関与することが示唆された。BT が存在することは実験的にも臨床的にも確認されている。しかし、BT と死亡率や MODS への進展など、ヒトにおけるその正確な役割はまだまだ明らかにされていない。³³⁾ Deitch ら⁵⁷⁾ はショック状態では BT が起こることを観察しており、彼らは侵襲下での腸管のバリアの破綻を強調している。また、D-GalN 投与時の実験肝障害でも起こることが報告されており、重要な示唆を与えている。

敗血症性ショックモデルとして D-GalN を負荷し

Table 3. Effect of Galactosamine on Changes of Cytosolic-Free Ca^{2+} Concentration in Single Cells and Plasma Membrane Ca^{2+} -ATPase Activity in Liver of Zymosan-Pretreated Mice 18 h after Endotoxin Administration

Treatment	Plasma membrane Ca^{2+} -ATPase	Single cells $[\text{Ca}^{2+}]_i^a$
	(nmol/mg of protein)	(nmol/cell)
Control	157.2 ± 2.3 ^{b)}	127.3 ± 10.6 ^{c)}
LPS	120.2 ± 3.8	145.7 ± 3.1
LPS+GalN	87.6 ± 4.5*	171.9 ± 4.3*
GalN	148.7 ± 6.4	132.5 ± 2.6

a) $[\text{Ca}^{2+}]_i$; Cytosolic-free Ca^{2+} concentration. b) Mean value ± S.E. of 10 mice. c) Mean value ± S.E. of 6 experiments. * significant difference from the value of endotoxin-injected mice ($p < 0.05$). Control: saline, LPS: endotoxin (1 mg/kg, *i.p.*), GalN: galactosamine (400 mg/kg, *i.p.*).

Table 4. Effects of Endotoxin on Rectal Temperature in rhTNF/GalN-Treated Mice

Treatment	Rectal temperature (°C)	
	4 h	18 h
Control	37.3 ± 0.09 ^{a)}	37.1 ± 0.07
LPS 0.1 mg/kg (<i>i.p.</i>)	37.0 ± 0.11	36.8 ± 0.15
rhTNF 5×10^3 units/mouse (<i>i.v.</i>)	37.2 ± 0.13	37.3 ± 0.17
rhTNF/GalN 700 mg/kg (<i>i.p.</i>)	36.8 ± 0.14	36.4 ± 0.24
LPS/GalN	37.1 ± 0.16	36.5 ± 0.27
LPS/rhTNF	36.7 ± 0.12	36.8 ± 0.21
LPS/rhTNF/GalN	32.2 ± 0.12*	No survival

a) Mean value ± S.E. of 5 mice. *, $p < 0.05$, significantly different from rhTNF/GalN-treated group. Mice with a body temperature of 37–38°C were employed in this experiment after selection by measuring twice at 15 min intervals.

た実験モデルが使用されており、このモデルによるエンドトキシンの感受性はサイトカイン、特にTNFのメディエート作用によると述べられている。⁵⁵⁾ その感受性機構に内因性的エンドトキシンの関与が示唆され、^{20,21)} SIRSの病態での酸化ストレス産生機構の一端が伺われる。本モデルは急性肝障害モデルとしても使用され、肝障害の発症・進展にエンドトキシンの関与を考察する場合に有益な情報を与える。

6. 酸化ストレスに対する必須微量元素のセレン及び亜鉛の役割

エンドトキシン血症時に血中亜鉛の急速な消失がしばしば観察されている。⁵⁸⁾ エンドトキシンの主要なターゲット臓器は肝であるが、急性、慢性を問わず肝疾患において低亜鉛血症が知られており、肝疾患と亜鉛との関連は興味深い。この亜鉛は必須微量元素として免疫や細胞機能調節に関与するとともに、酸化ストレスによって生じる細胞障害を防御しメタロチオネインを誘導する。⁵⁹⁾ また、必須微量元素のセレン (Se) はGSH-Pxの構成成分であり、脂質過酸化抑制を示す。このような観点から本稿ではエンドトキシン血症時に惹起される酸化ストレスの要因の1つとしての必須微量元素の関与を述べていく。メタロチオネイン (MT)⁶⁰⁾ はその構成アミノ酸の約1/3をシステインが占め、芳香族アミノ酸やヒスチジンを含まない分子量7000の水銀、カドミウムなどの重金属の毒性軽減に関与する熱安定性低分子タンパク質である。MTは金属結合能が高く、生体内で亜鉛や銅などの必須金属と結合し、その代謝調節作用の働きを有する生体防御タンパク質と考えられている。さらに、最近ではスーパーオキシドラジカル (O_2^-) や過酸化脂質 ($LOO\cdot$) などのフリーラジカルを消去するいわゆるラジカルscavengerとしての機能が注目されている。MTは様々な物理的、化学的条件による酸化ストレスによっても誘導合成される。また、エンドトキシンは肝臓のMTの誘導剤でもある。エンドトキシンの誘導される酸化ストレスにMTがどのような役割を果たすのかを観察するために、筆者らは亜鉛欠乏食で飼育したラットを使用して酸化ストレスに対するMTの防御作用を検討した。²⁶⁾

亜鉛欠乏食飼育ラットは普通食飼育に比べ、顕著に肝脂質過酸化は誘導される (Fig. 5(A))。このと

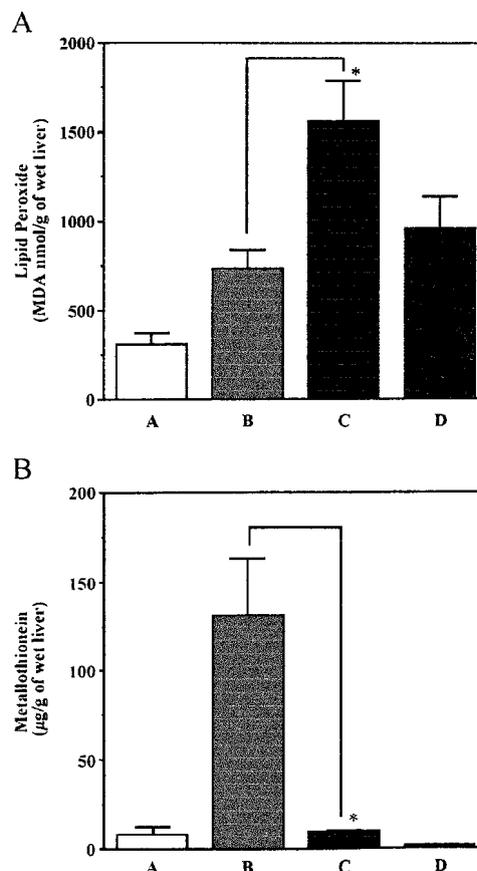


Fig. 5. Effects of Zn^{2+} -Deficient Diet on Lipid Peroxide (A) and Metallothionein (B) Levels in Liver of Rats 18 h after Endotoxin Challenge

Rats were fed the Zn^{2+} -deficient diet for 8 weeks, and were then injected with endotoxin (6 mg/kg *i.p.*). Lipid peroxide and metallothionein levels were determined as described in Materials and Methods. A: Zn^{2+} -adequate diet (Control), B: endotoxin/ Zn^{2+} -adequate diet, C: endotoxin/ Zn^{2+} -deficient diet, D: Zn^{2+} -deficient diet. Data are results from five experiments and each value represents the mean \pm S.E. for five rats per group. * $p < 0.05$, compared to endotoxin/ Zn^{2+} -adequate diet group.

き、亜鉛欠乏飼育ラットでは普通食で誘導されるエンドトキシンによる肝内MT合成の誘導が顕著に低下した (Fig. 5(B)).²⁶⁾ 最近、遺伝子工学的な手法を用いたMTを過剰発現したトランスジェニックマウスや、ジーンターゲット法によるMT遺伝子ノックアウトマウスが作成され、酸化ストレスに対する生体防御因子としてのMTの重要性が明らかにされている。⁶¹⁾ このことは筆者らの上記の検討でも、亜鉛欠乏食飼育ではエンドトキシンによる顕著な肝MTの誘導が見られないが、脂質過酸化は顕著に増大する逆相関関係を示し、エンドトキシンの誘導される酸化ストレスに対するMTの防御効果が示された。²⁶⁾ 亜鉛はそれ自体抗酸化作用があるとされ、活性酸素消去酵素であるSODにおい

でも共役的な役割を果たしており、MTを誘導する。血中亜鉛は敗血症で低下することが知られており、⁵⁸⁾ エンドトキシンによる致死作用は亜鉛投与によって改善されることが報告されている。エンドトキシン血症での亜鉛濃度と脂質過酸化との密接な関係が示唆され、生体内亜鉛濃度がエンドトキシンで誘導される酸化ストレスに関与すると思われる。また、ZnSO₄ (100 μM) の添加はエンドトキシンで誘導される細胞内 Ca²⁺ の増大を明らかに抑制したが、亜鉛拮抗剤の TPEN (1 μM) は細胞内 Ca²⁺ の増大には関与しなかった (Fig. 6)。²⁶⁾ この事実は、亜鉛が細胞内 Ca²⁺ の増大を抑制することによりフリーラジカル産生を含むエンドトキシン血症の代謝を制御することを示唆する。エンドトキシンによる亜鉛欠乏状態では、生体の多数の亜鉛含有酵素活性の低下によりタンパク質、糖、脂質代謝に障害を引き起こすことが推定され、エンドトキシン血症の病態の進展過程での亜鉛の病態生理学的意義はかならずしも明確ではないが、生体亜鉛濃度は酸化ストレスと密接な関係を有することは間違いない。したがって、敗血症では亜鉛の低下はエンドトキシンによる酸化ストレスの要因を考える上で興味ある示唆を

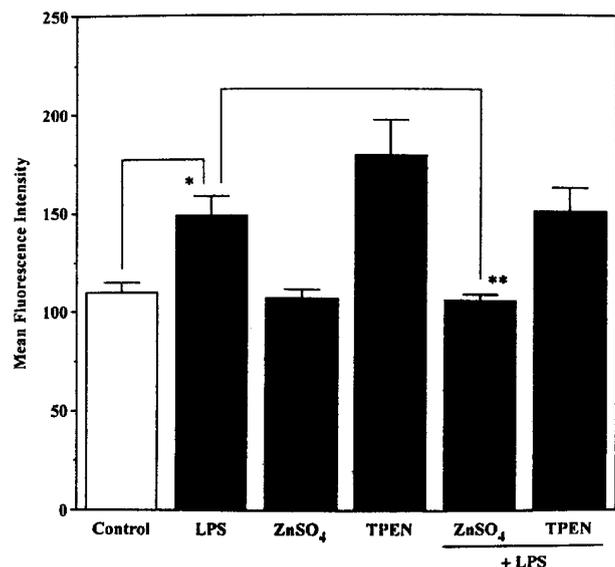


Fig. 6. Effects of ZnSO₄ and TPEN on Enhancement of Intracellular Ca²⁺ in J774A.1 Cells Stimulated with Endotoxin
J774A.1 cells (1×10⁶/ml) were loaded with 1 μM fluo 3 for 30 min. Cells were incubated with endotoxin (10 μg/ml) in the presence or absence of 100 μM ZnSO₄ and 1 μM TPEN for 1 h and the mean fluorescence intensity of fluo 3 of 10⁴ cells was measured with FACScan. Data represent the means ± S.E. from three independent experiments performed in triplicate. **p* < 0.05, compared to untreated cells. ***p* < 0.05, compared to cells treated with endotoxin alone.

与えてくれる。

一方、セレン (Se) 含有 GSH-Px はこれまでに細胞質型、消化管型、血漿型、リン脂質型の 4 種類が知られており、いずれも活性中心に微量元素である Se を含有するセレノシステインを持つ活性酸素消去酵素である。この Se の脂質過酸化抑制作用は GSH-Px を介した作用である。⁶²⁾ 筆者らはエンドトキシンによる肝の脂質過酸化生成の一因として Se の影響を観察した。²⁵⁾ Se 欠乏食で 10 週間飼育したラットの肝 Se 濃度は普通食飼育に比べ 43% 低下し、このときの肝 GSH-Px 活性は 47% の低下を示した。この条件下でエンドトキシンを投与すると、普通食飼育ラットにエンドトキシンを投与した場合よりも酸化ストレスが増大し (Fig. 7)、細胞障害の指標である LDH 活性、及びその isozyme の逸脱も顕著に見られた。Se は GSH-Px 活性中心を構成し、抗酸化的役割を持った必須微量元素であるが、一方ではその化学形によっては酸素分子と反応し活性酸素を生成する二面性を持っている。⁶³⁾ 筆者ら⁴⁾ はエンドトキシンで誘導される肝の脂質過酸化生成時に肝 GSH-Px 活性の低下を見ている。エンドトキシン血症での Se の役割は GSH-Px を介した作用であり、必須微量元素 Se の生体濃度がエンドトキシンで惹起される酸化ストレスに影響を及ぼしている。²⁵⁾

7. エンドトキシンと一酸化窒素

NO はガス状ラジカル物質であり、血管由来弛緩因子 (EDRF) の本体が NO と同定されて以来、その産生、生理的役割に関する研究が加速され、血管系ばかりでなく、種々な疾病の病態生理において細胞機能の媒介伝達、調節、免疫に関することが明らかにされつつある。⁶⁴⁾ NO 合成酵素 (NOS) は 3 種類のアイソフォームから構成されており、神経型 (n) NOS (NOS-1)、誘導型 (i) NOS (NOS-2)、内皮型 (e) NOS (NOS-3) に分類されている。nNOS と eNOS はそれぞれニューロン及び内皮細胞に構成的 (constitutive) に発現し、Ca²⁺ 依存性であることから cNOS と呼ばれる。一方、iNOS は炎症性サイトカインやエンドトキシンによって誘導 (inducible) され、Ca²⁺ 非依存性である。敗血症性ショックではエンドトキシンの刺激により種々なサイトカインが産生され、これらサイトカインにより iNOS 由来の NO の過剰産生が持続すると顕著な末

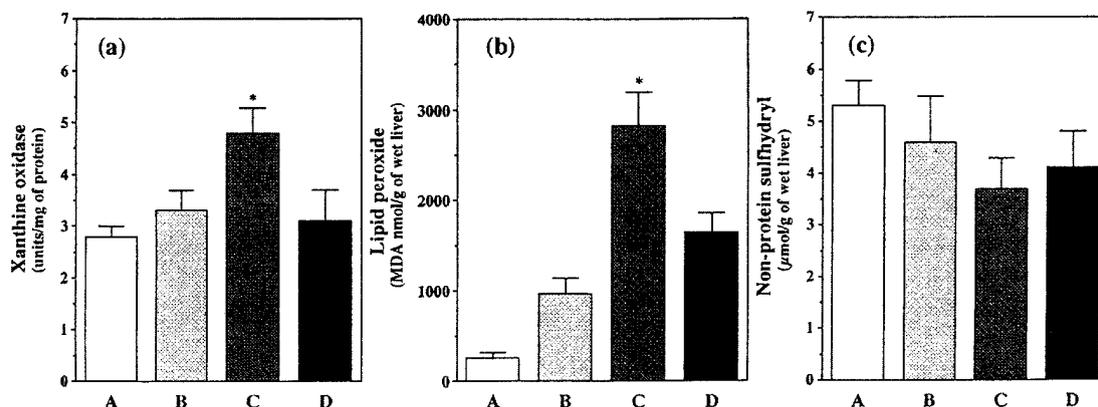


Fig. 7. Changes in Xanthine Oxidase Activity (a) Lipid Peroxide (b) and Non-Protein Sulfhydryl (c) Levels in the Liver of Rats Given the Se-Deficient Diet 18 h after Endotoxin Administration

Rats were fed the diets for 10 weeks, and then injected with endotoxin (4 mg kg⁻¹i.p.). A: Se-adequate diet (control), B: endotoxin/Se-adequate diet, C: endotoxin/Se-deficient diet, D: Se-deficient diet. MDA: malondialdehyde. Each value represents the mean \pm S.E. of five rats. *: Significantly different from the value of endotoxin/Se-adequate diet group ($p < 0.05$).

梢血管抵抗の低下がもたらされ、敗血症性ショックが引き起こされると考えられている。⁶⁵⁾ このことは次のように解釈されている。ショックの初期には血管内 cNOS 活性化による NO は血行動態の変化に関与しているが、後期には持続性の iNOS が誘導され、難治性の低血圧、内皮細胞障害、心筋収縮抑制などが惹起され多臓器不全に陥る。NO が敗血症性ショックにおいてどのような病態生理を有するか、現在でも議論の分かれるところである。

NO のエンドトキシンに対する研究の多くは NOS 阻害剤を用いた実験結果を基に、NO の生体に及ぼす功罪を論議している。⁶⁴⁾ 例えば、NOS 阻害剤がエンドトキシンや TNF による血圧の低下を制御し、見かけ上はショックを改善する。しかし、血圧の改善と臓器血流や生命予後にはかならずしも結びつかず病態は悪化する。また、NOS 阻害剤がエンドトキシンに対する致死性を上昇させ、臓器障害を悪化させることが報告されており、⁶⁶⁾ NO の防御側面も強調されている。しかしながら、これらの実験に使用する NOS 阻害剤は iNOS による過剰に生成される NO とともに、臓器血流を制御する cNOS 由来の NO も阻害することから、NOS 阻害剤の障害の悪化作用は循環病態を介した二次的な作用の現象とも考えられなくはない。これらの NOS 阻害剤として cNOS を保護し iNOS を制御する iNOS に特異的な阻害剤が求められているが、現在のところ満足すべきものはない。

筆者らはエンドトキシンに対する酸化ストレスの

NO の影響を cNOS の比較的選択的阻害剤 L-アルギニン類似化合物 (L-NMMA, L-NAME, L-NA), 及び iNOS の比較的選択的阻害剤アミノグアニジン (AG) を投与して比較検討した。^{22,23)} L-アルギニン類似化合物、AG の投与はエンドトキシンによる肝の脂質過酸化生成に対してはほとんど影響を及ぼさない。²²⁾ また、致死率、細胞障害の指標となる LDH 活性とその isozyme,²³⁾ 及びマウスマクロファジー様培養細胞 (J774A.1) の cytotoxicity に対しても AG の影響はほとんど認められなかった (Fig. 8).²²⁾ 事実、MacMicking ら⁶⁷⁾ の報告によれば、iNOS ノックアウトマウスではエンドトキシンによる血圧低下は見られず、また感染抵抗性や抗腫瘍性といった防御機能は低下している。しかし、iNOS ノックアウトマウスでは敗血症による臓器障害の発生や死亡率は野生型との間に有意差がなかった。これらの報告⁶⁷⁾ と筆者らの結果^{22,23)} から考察すると、過剰生成された NO はショックで誘導される末梢血管抵抗性の低下には重要な役割を担うが、酸化ストレスによる臓器障害にはむしろ防御的に作用し、エンドトキシンによる臓器障害には NO 以外の因子が関与していることが示唆された。NO は eNOS 由来の細胞保護作用と iNOS 由来の細胞障害作用の二面性を持っている。例えば、NO は O₂ と反応し、細胞毒性の強いラジカルである peroxynitrite (ONOO⁻) を産生し細胞障害を引き起こす。⁶⁸⁾ 一方、NO が O₂ と結合するためにアンチオキシダントとして働いている可能性も指摘されており、これ

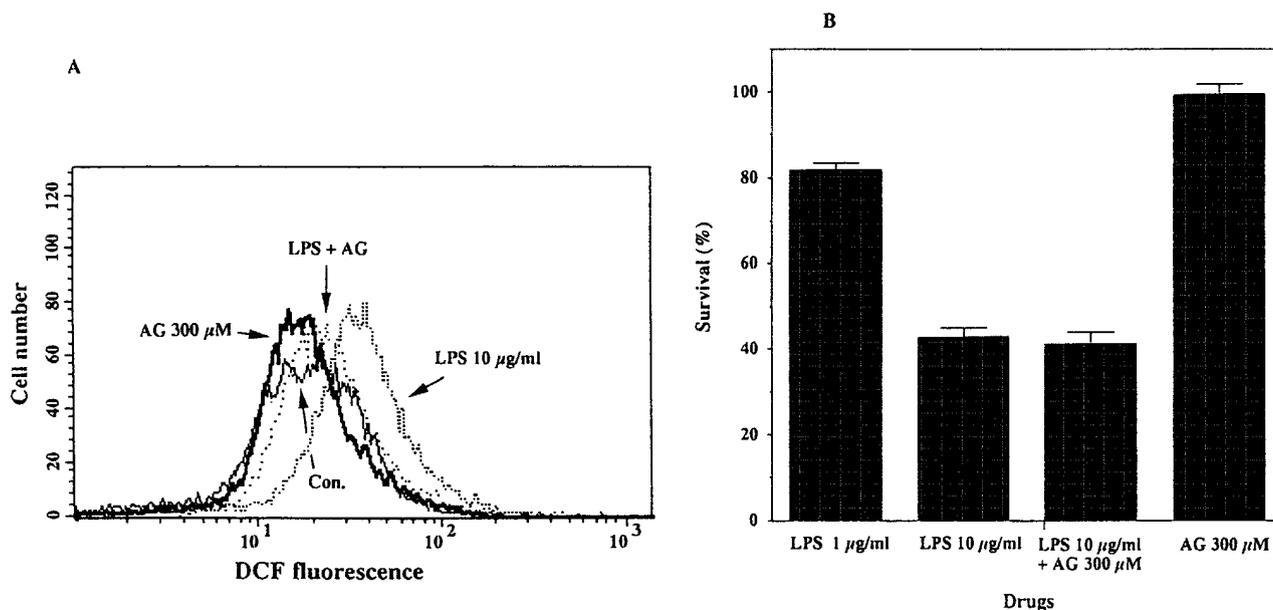


Fig. 8. Effects of Aminoguanidine on Endotoxin-Induced Intracellular Peroxide Production (A) and Cell Growth Inhibition (B) in J774A.1 Cells

A: After DCFH-DA loading, cells were incubated with or without 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ endotoxin for 5 min. Aminoguanidine (AG, 300 μM) was added to the cells 10 min before endotoxin treatment. Then, the fluorescence of intracellular DCF was determined by flow cytometry. B: Cells were incubated with endotoxin (1 and 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in the presence or absence of 300 μM aminoguanidine for 48 h. Cell survival was measured by the MTT assay. Each point represents the mean \pm S.E. of 8 determinations.

は O_2 を消去することにより Haber-Weiss 反応や Fenton 反応が進行するのを防止すると考えられる。そこで、筆者らは鉄及びヘム代謝の観点からエンドトキシン血症での NO 産生を検討した。²⁴⁾

エンドトキシン血症では hypoferremia を呈する。^{24,69)} このとき、血清セルロプラスミンは増大する。これは血清中の Fe^{2+} はセルロプラスミンによって Fe^{3+} に酸化されてフェリチンに取り込まれることを意味する。ヘム代謝は鉄と密接な関係にあり、ヘム分解の律速酵素であるヘムオキシゲナーゼ (HO) の誘導型 isozyme である HO-1 はエンドトキシンで誘導され、酸化ストレスの防御作用を有し、NO によっても誘導される。⁷⁰⁾ また、cytochrome P450 (cyt P450) にはヘム鉄が含まれており、NO はこの活性中心に位置するヘム鉄に結合し錯体を形成することにより不可逆的に cyt P450 を低下させる。筆者らはエンドトキシン血症で HO 活性の誘導と cyt P450 の低下を確認している。²⁴⁾ ヘム合成阻害薬 CoCl_2 (100 μM) 及び鉄の阻害薬 deferoxamine (100 μM) を使用して、J774A.1 細胞でエンドトキシン (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) により誘導される NO 産生を観察した。 CoCl_2 の添加はエンドトキシン誘導による NO の産生を増大させたが、deferoxamine の添

加は NO の産生を抑制しなかった (Fig. 9).²⁴⁾ このことはエンドトキシンで誘導される NO 産生は少なくとも一部はヘム代謝の調節を受けることを示唆している。一方、筆者らの結果²⁴⁾ からエンドトキシンで誘導される脂質過酸化には hypoferremia が関与するが、この脂質過酸化生成時の Fenton 反応には NO の関与が少なく、エンドトキシンで惹起される酸化ストレス⁴⁻⁹⁾ に対して、前述したように NO は影響を及ぼさないこと^{22,23)} が裏付けられた。

上述したように亜鉛はエンドトキシンによる酸化ストレスを防御する。一方、敗血症性ショックでは NO ラジカルによる顕著な末梢血管抵抗の低下がもたらされ、ショックが引き起こされる。⁶⁵⁾

そこで、エンドトキシン (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 処理 J774A.1 細胞での亜鉛による NO 産生の影響を観察した。²⁶⁾ ZnSO_4 (50 μM) の添加は J774A.1 細胞でのエンドトキシンによる NO 産生の誘導を抑制した。この結果から亜鉛が NO の産生を抑制することにより、エンドトキシンで誘導される末梢血管抵抗性の低下に起因するショックを防御することが示唆された。同様な NO 産生の抑制は Se の添加によっても観察された。²⁵⁾ これは Se-GSH-Px により脂肪酸の hydroperoxide の還元作用などにより内因性

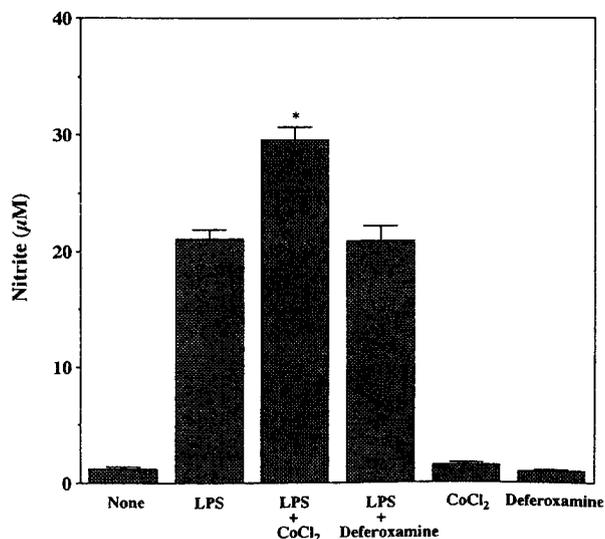


Fig. 9. Effects of Cobalt Chloride and Deferoxamine on Production of Nitric Oxide by Cells Stimulated with Endotoxin

J774A.1 cells were incubated in 12-well plates and treated with endotoxin (1 µg/ml) and interferon-γ (IFN, 100 U/ml) for 48 h in the presence or absence of cobalt chloride (100 µM) or deferoxamine (100 µM). Nitric oxide production by J774A.1 cells was assayed by measuring the accumulation of nitrite in culture media using Griess reaction. LPS: endotoxin, CoCl₂: cobalt chloride. Each bar represent the mean ± S.E. of three experiments. *Significant difference from the value of cells treated with endotoxin/IFN ($p < 0.05$).

NO を酸化ストレスから保護しているものと考えられる。このことは Asahi ら⁷¹⁾により GSH-Px は内因性の NO によって不活性されることが報告されており、エンドトキシン血症時での酸化ストレスの際の GSH-Px 活性低下¹⁾は NO 産生からも説明できる。

8. 敗血症性ショックと漢方方剤小柴胡湯

小柴胡湯はサイコ、ハンゲ、オウゴン、タイソウ、ショウキョウ、ニンジン、カンゾウの7種類の生薬から構成されており、わが国では従来から胸脇苦満を伴う各種の急性及び慢性の肝疾患や炎症性疾患に応用されている漢方方剤である。この小柴胡湯の薬理作用は免疫調節作用、肝保護作用、抗炎症作用、抗アレルギー作用など多岐にわたっている。⁷²⁾敗血症性ショックの治療は困難な症例が多く、多臓器不全に陥れば予後は極めて不良である。このショックの治療に副腎皮質ステロイドの持つ生体の“防御効果増強”の根拠により、臨床では敗血症性ショックにおいても副腎皮質ステロイド初期大量投与が行われてきたが、ステロイドの副作用の発現の面で問題を残している。筆者らは小柴胡湯の多彩な薬理

作用、特に“グルココルチコイド増強作用”に着目して小柴胡湯による敗血症の防御効果を検討してきた。²⁷⁻³¹⁾

敗血症性ショックは SIRS という概念で包括する試みがなされている。³⁷⁾このような病態の背景には高サイトカイン血症が存在する。D-GalN で感作されたマウスに TNF を投与すれば致死活性が 3000 倍に高まる。⁷³⁾そこで、筆者らはこのモデルを用いて小柴胡湯のショック防御効果を観察するために、最初に rhTNF に対する致死率を観察した。²⁷⁾小柴胡湯は GalN 負荷マウスでの rhTNF の致死作用を防御し、また、rhTNF 投与による直腸体温の低下が抑制され、小柴胡湯の rhTNF に対する致死防御効果が示された。ショック患者の重篤な合併症の1つに DIC があり、合併した場合には病態が複雑になり治療はより困難となる。炎症と凝固は互いにリンクしており、敗血症重症化の本態である微小循環障害発生に、根源的な役割を果たしていると考えられている。そこで、筆者ら³¹⁾は DIC の診断に使用される fibrinogen の変化を観察した。rhTNF の投与では顕著な fibrinogen の低下が見られるが、小柴胡湯の前投与はその著しい低下を防御することが認められたこのことは Kubo ら⁷⁴⁾がエンドトキシンで誘発されるラットの DIC での血小板、fibrinogen の消費が小柴胡湯の構成成分でもある baicalin, baicalin により防御できることを示唆しており、筆者らの結果を裏付けるものである。

小柴胡湯を前投与することによりエンドトキシンによる肝の脂質過酸化、活性酸素産生系の XOD 活性の亢進が抑制され、SOD 及び GSH-Px の低下が軽減された。一方、フリーラジカル scavenger の肝内 GSH 及び O₂⁻, OH[·] の scavenger である α-トコフェロールはエンドトキシンにより顕著な減少が見られるが、小柴胡湯はそれらの減少を抑えた。したがって、小柴胡湯はエンドトキシンによるフリーラジカル産生亢進及びフリーラジカル消去機構低下の両者を抑制し、エンドトキシンによって惹起されるフリーラジカルの毒性から生体を防御するものと考えられた。²⁸⁾このことはオウゴンエキス及びそのフラボノイド成分の baicalin, baicalin が強い抗酸化作用を示し、*in vivo* においても α-トコフェロールと同程度の抗酸化作用を示すこと、⁷⁵⁾また、小柴胡湯による脂質過酸化反応の抑制は主に baicalin,

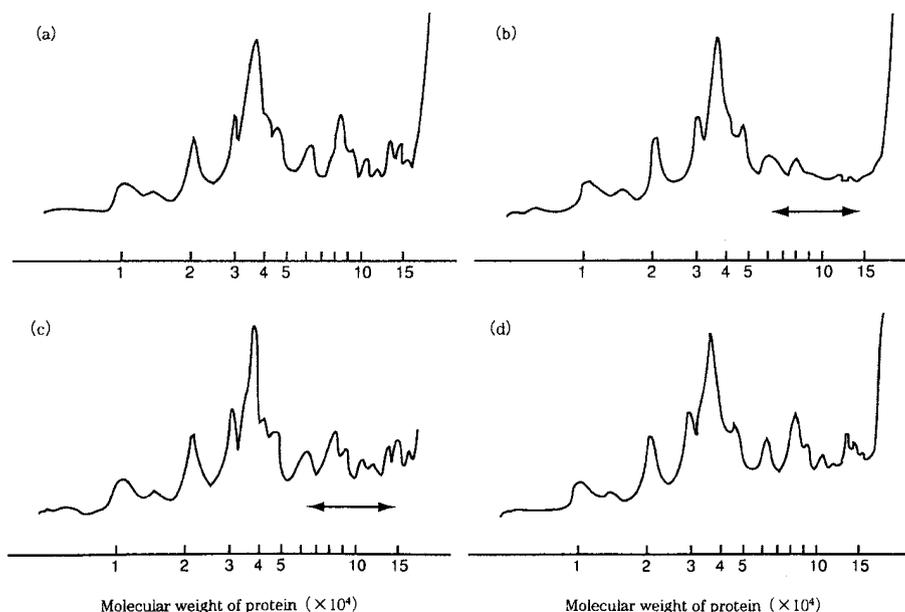


Fig. 10. Scanograms of SDS-Polyacrylamide Gel Electropherograms of Liver Plasma Membrane Protein

(a): control, (b): endotoxin, (c): endotoxin+TJ-9 (Sho-saiko-to), (d): TJ-9. Endotoxin (6 mg/kg) was administered *i.p.* into TJ-9 (500 mg/kg/d, *p.o.*) - pretreated mice. After treatment, the mice were sacrificed at 18 h postintoxication. Each sample (10–20 μ g of protein) was subjected to SDS-gel electrophoresis. Gels were stained for protein with 0.1% Coomassie blue and decolorized. Each plasma membrane preparation was from 10 mice. \leftrightarrow : endotoxin-induced membrane protein damage.

ginsenoside Rf が関与していることが示唆されている。⁷⁶⁾ さらに、筆者らは小柴胡湯の肝細胞膜の障害に対する効果を SDS-ポリアクリルアミド電気泳動で検討した。²⁸⁾ 小柴胡湯の前投与はエンドトキシンで見られる 65 kDa, 140 kDa 付近のタンパクの損傷を修復し、肝細胞膜を保護する作用が示唆された (Fig. 10)。一方、臓器障害指標の LDH isozyme パターンを比較すると、エンドトキシンによる LDH-3,5 isozyme で見られる逸脱を小柴胡湯は防御した。このことは小柴胡湯が膜を安定させ、リゾゾーム酵素の放出を防止し、組織障害の防御に役立っていることが示され、膜泳動パターンと一致した。²⁸⁾ 肝はショックによる細胞障害を受け易く、ショックによる多臓器不全への進展の中心的役割を担っているとされ、フリーラジカルがその成因に関与しており、小柴胡湯のフリーラジカルに対する抑制は抗ショック作用として重要な機序を与える。

敗血症性ショックでの末梢血管抵抗の低下は主として iNOS による NO 産生が深く関わっていることが示されており、⁶⁵⁾ 筆者らは小柴胡湯の防御効果を NO 産生からアプローチした。^{30,31)} rhTNF のみでは NO は産生しないが、エンドトキシンと rhTNF の併用により相乗的に NO が産生される。そこで、

エンドトキシン/rhTNF で刺激した J774A.1 細胞を使用して小柴胡湯に対する NO 産生作用を検討した。³¹⁾ 小柴胡湯の構成成分であり柴胡の活性成分の 1 つであるサイコサポニン a は、経口投与により腸内細菌叢で 9 種類の化合物に変化する。このことは直接小柴胡湯を培養細胞に添加しても意味をなさない。そこで、筆者らは *in vitro* での血清薬理学的手法を使用して解析した。あらかじめ、小柴胡湯を経口投与したマウスの血清添加は、エンドトキシン/rhTNF で刺激した J774A.1 細胞からの NO 産生を抑制した (Fig. 11)。³¹⁾ したがって、小柴胡湯は NO の産生を抑制することにより、エンドトキシンで誘導される血圧の低下を防御することが示唆された。従来より末梢血管抵抗性の低下を示している敗血症性ショック患者では、組織還流維持の目的で還流圧を保つため、血圧上昇を目的としてノルエピネフリンなどの血管収縮剤の使用が行われてきたが、小柴胡湯の有効性が NO の抑制の面からも理解できる。⁶⁵⁾

さらに、筆者らは小柴胡湯の防御効果を細胞内の Ca^{2+} 動態からも観察した。小柴胡湯の前投与²⁹⁾ はエンドトキシンによる O_2^- 産生に起因する肝細胞膜 Ca^{2+} ポンプ機能障害を回復させ、細胞外から細胞

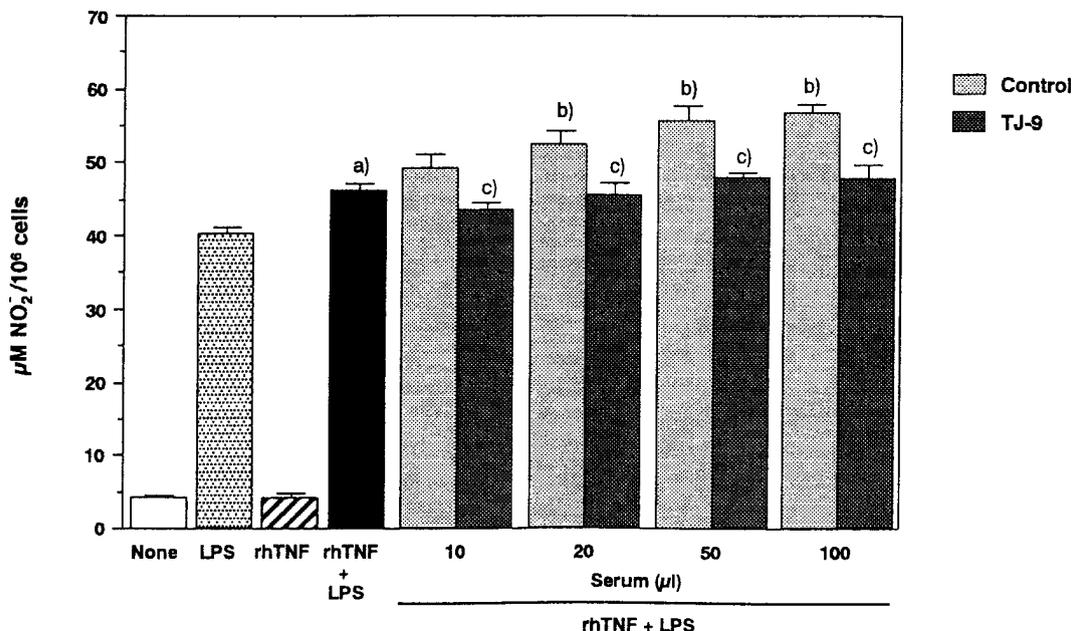


Fig. 11. Effect of TJ-9-Pretreated Serum on Production of NO in J774A.1 Cells Stimulated with Endotoxin/rhTNF

Mice were pretreated with TJ-9 (500 mg/kg/d, *p.o.*). The pooled serum was obtained from 10 mice pretreated, with TJ-9. Control serum was obtained from TJ-9-non-treated 10 mice. Cells (1×10^6 cells/well) were incubated with combinations of endotoxin/rhTNF and TJ-9-pretreated serum (10–100 μ l). Nitrite accumulation in the culture medium was determined as described in Materials and Methods. Each bar represents the mean \pm S.E. of 3 experiments. None: unstimulated. J774A.1 cells, LPS: endotoxin (1 μ g/ml). rhTNF: recombinant human tumor necrosis factor (1×10^4 units/ml), Control: TJ-9-non-treated serum. TJ-9: Sho-saiko-to (500 mg/kg/d, *p.o.*)-pretreated serum. a) $p < 0.05$, compared with LPS alone-treated group. b) $p < 0.05$, compared with rhTNF/LPS-treated group. c) $p < 0.05$, compared with group treated with rhTNF/LPS plus control serum.

内への流入を防ぎ、 $[Ca^{2+}]_i$ の増大を抑制させた (Fig. 12). 一方、小柴胡湯はエンドトキシンによるミトコンドリア Ca^{2+} -ATPase 活性の増大を抑制し、ミトコンドリア損傷の指標である state 3, RCI の低下を改善した。小柴胡湯はミトコンドリア内 Ca^{2+} の蓄積を抑えることによりミトコンドリア機能障害を軽減させる。²⁹⁾ Ca^{2+} は生体の諸機能の発現にとって不可欠な因子であり、組織で細胞内情報伝達物質として働き、細胞内 Ca^{2+} 濃度は細胞活性やホメオスタシスにおいて重要な役割を担っている。したがって、小柴胡湯のエンドトキシンによるショックの防御機構に細胞内 Ca^{2+} が深く関与していることは間違いない。

おわりに

ショックの病態は侵襲に対する生体反応の集大成であり、その終末像は原因の違いに関わらず、全身性の過剰な炎症反応とこれに伴う微小循環不全による臓器不全として理解できる。敗血症性ショックの病態は、主としてエンドトキシン血症に基づくものである。ショックの病態の究明や治療の進歩によって、ショック患者ではショックそのものによる死亡は減少しているが、ショックから離脱後の多臓器不

全が問題になってきている。したがって、ショック治療では虚血・低還流、低酸素や humoral mediators の過剰産生状態から引き起こされる細胞・組織・臓器障害を防止することが究極の目的になる。現在、敗血症性ショックの治療は感染症あるいは感染源に対する原因療法と強力な全身管理が必要で、中心となるのは輸液による体液管理であるが、最近の SIRS の考えから抗サイトカイン療法や薬物による mediator のコントロールも行われている。しかし、サイトカインを始めとする種々のメディエーターが関係する生体反応は侵襲に対する生存や生体防御に必須の反応であるので、これを無制限に制御することはかならずしもよい結果を招くとは限らない。米国では年間約 75 万人が敗血症に陥り、21 万人もの患者がそのために死亡している現実がある。³²⁾ 敗血症に対して、これまで数多くの治療法の開発が試みられたが、満足のいく治療法は見出されていない。その点、小柴胡湯はサイトカイン、NO を含めたフリーラジカル、細胞内 Ca^{2+} を制御することにより細胞・組織障害を防止することが考えられる。⁷⁷⁾ 漢方方剤は数種類の生薬が組み合わされた複合体で、個々の薬理作用は単一剤ほど強くない

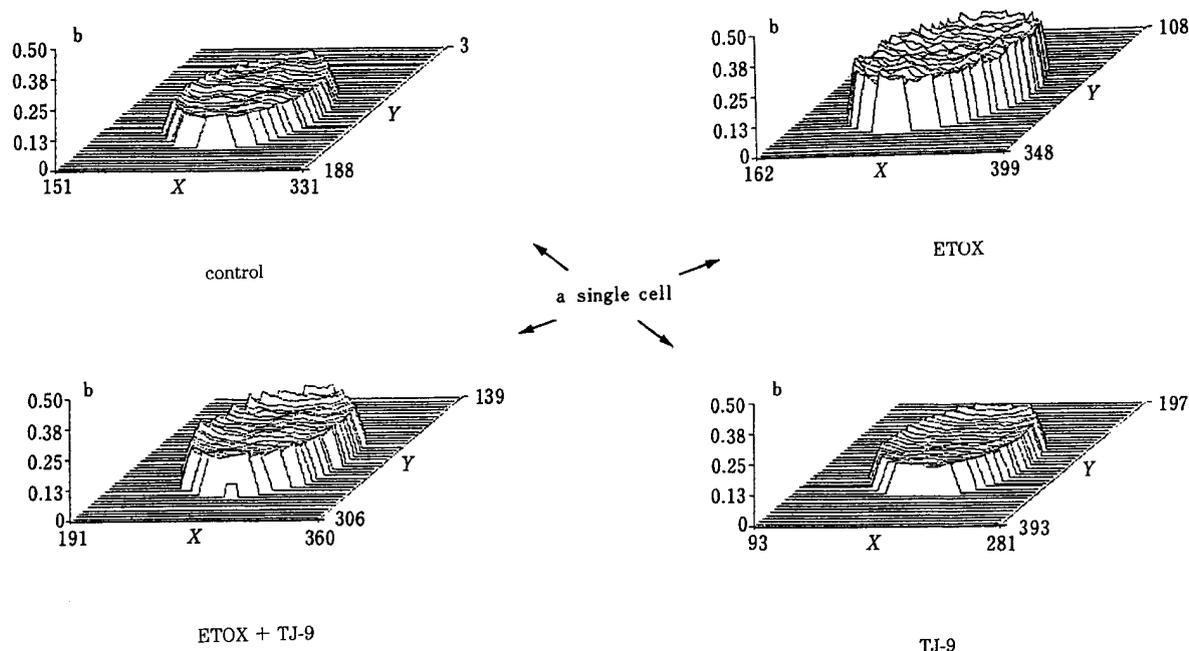


Fig. 12. Changes in Cytosolic-Free Ca^{2+} Concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), in a Single Liver Cell in TJ-9 Pretreated Mouse 18 h after Endotoxin Administration

$[\text{Ca}^{2+}]_i$ in a single liver cell was measured by microfluorometric analysis using a Hamamatsu Photonics ARGUS-100CA image processor fitted with computer apparatus and a video camera. Control: saline, ETOX: endotoxin (6 mg/kg *i.p.*), TJ-9: Sho-saiko-to (500 mg/kg/d, *p.o.*).

が、促進と抑制のような相反する薬理作用を有し、病態が複雑な症例に適している。このようなことから漢方方剤ではあるが、小柴胡湯は術前投与によるショック予防効果を発揮する可能性が期待できる。以上、本総説では酸化ストレスから見た敗血症の病態論について述べてきたが、エンドトキシンは自然免疫系を動かす代表的な因子であり、広汎な生体反応を有する極めて活性の高い物質であることが多くの医学・生物の研究者を魅了している。今後、内外のエンドトキシン研究の発展が敗血症性ショックの治療面での飛躍的な進歩につながることに期待したい。

REFERENCES

- 1) Tamakuma S., "Shock 1995-96," ed. by Tamakuma S., Nakayama-Shoten, Tokyo, 1995, pp. 8-14.
- 2) Okada K., "Shock," ed. by Okada K., Iyaku Journal Co., Ltd., Osaka, 1996, pp. 45-50.
- 3) Hirota M., Ogawa M., *Nippon Geka Gakkai Zasshi*, **100**, 667-673 (1999).
- 4) Sakaguchi S., Kanda N., Hsu C. C., Sakaguchi O., *Microbiol. Immunol.*, **25**, 229-244 (1981).
- 5) Sakaguchi O., Kanda N., Sakaguchi S., Hsu C. C., Abe H., *Microbiol. Immunol.*, **25**, 787-799 (1981).
- 6) Sakaguchi S., Kanda N., Hsu C. C., Sakaguchi O., *Jpn. J. Med. Sci. Biol.*, **34**, 53-54 (1981).
- 7) Sakaguchi O., Sakaguchi S., *Jpn. J. Med. Sci. Biol.*, **35**, 115-116 (1982).
- 8) Sakaguchi S., Ibata H., Yokota K., *Microbiol. Immunol.*, **33**, 99-110 (1989).
- 9) Sakaguchi S., Furusawa S., Yokota K., Sasaki K., Takayanagi M., Takayanagi Y., *Pharmacol. Toxicol.*, **79**, 259-265 (1996).
- 10) Abe H., Sakaguchi S., Sakaguchi O., *Microbiol. Immunol.*, **27**, 973-978 (1983).
- 11) Sakaguchi S., Abe H., *Microbiol. Immunol.*, **30**, 389-394 (1986).
- 12) Sakaguchi O., Sakaguchi S., *Microbiol. Immunol.*, **23**, 71-85 (1979).
- 13) Sakaguchi S., *Microbiol. Immunol.*, **26**, 1017-1034 (1982).
- 14) Sakaguchi S., Iizuka Y., Furusawa S., Takayanagi M., Satoh S., *Int. Immunopharmacol.*, **2**, 867-873 (2002).
- 15) Sakaguchi S., Yokota K., *Microbiol. Immunol.*, **31**, 509-520 (1987).

- 16) Sakaguchi S., Ibata H., Yokota K., *Microbiol. Immunol.*, **34**, 985–994 (1990).
- 17) Sakaguchi S., Abe H., Sakaguchi O., *Microbiol. Immunol.*, **28**, 517–527 (1984).
- 18) Sakaguchi S., Tsutsumi E., Yokota K., *Biol. Pharm. Bull.*, **16**, 808–810 (1993).
- 19) Sakaguchi S., Yokota K., *Pharmacol. Toxicol.*, **77**, 81–86 (1995).
- 20) Sakaguchi S., Furusawa S., Yokota K., Sasaki K., Takayanagi M., Takayanagi Y., *Biol. Pharm. Bull.*, **23**, 116–118 (2000).
- 21) Sakaguchi S., Furusawa S., Yokota K., Takayanagi M., Takayanagi Y., *Int. J. Immunopharmacol.*, **22**, 935–942 (2000).
- 22) Sakaguchi S., Furusawa S., Sasaki K., Takayanagi M., Takayanagi Y., *Pharmacol. Toxicol.*, **86**, 162–168 (2000).
- 23) Sakaguchi S., Furusawa S., Takayanagi M., Takayanagi Y., *FEMS Microbiol. Lett.*, **196**, 39–43 (2001).
- 24) Sakaguchi S., Iizuka Y., Furusawa S., Takayanagi M., Satoh S., *Pharmacol. Toxicol.*, **89**, 273–276 (2001).
- 25) Sakaguchi S., Iizuka Y., Furusawa S., Tanaka Y., Takayanagi M., Takayanagi Y., *Toxicol. Lett.*, **118**, 69–77 (2000).
- 26) Sakaguchi S., Iizuka Y., Furusawa S., Ishikawa M., Satoh S., Takayanagi M., *Eur. J. Pharmacol.*, **451**, 309–316 (2002).
- 27) Sakaguchi S., Tsutsumi E., Yokota K., Furusawa S., Sasaki K., Takayanagi Y., *Microbiol. Immunol.*, **35**, 389–394 (1991).
- 28) Sakaguchi S., Tsutsumi E., Yokota K., *Biol. Pharm. Bull.*, **16**, 782–786 (1993).
- 29) Sakaguchi S., Tsutsumi E., Yokota K., *Biol. Pharm. Bull.*, **17**, 232–236 (1994).
- 30) Sakaguchi S., Furusawa S., Yokota K., Sasaki K., Takayanagi Y., *Biol. Pharm. Bull.*, **18**, 621–623 (1995).
- 31) Sakaguchi S., Furusawa S., Yokota K., Sasaki K., Takayanagi M., Takayanagi Y., *Biol. Pharm. Bull.*, **19**, 1474–1478 (1996).
- 32) Hotchkiss R. S., Karl I. E., *N. Eng. J. Med.*, **348**, 138–150 (2003).
- 33) Takesue Y., Yokoyama T., *Igaku No Ayumi*, **181**, 47–51 (1997).
- 34) Wakabayashi G., Kitajima M., “Shock 1995–96,” ed. by Tamakuma S., Nakayama-Shoten, Tokyo, 1995, pp. 16–27.
- 35) Takano H., Yoshikawa T., Kondo M., “Shock 1995–96,” ed. by Tamakuma S., Nakayama-Shoten, Tokyo, 1995, pp. 34–39.
- 36) Hirasawa H., *Igaku No Ayumi*, **181**, 3–7 (1997).
- 37) ACCP/SCMCC Consensus Committee, *Crit. Care Med.*, **20**, 864–874 (1992).
- 38) Aderem A., Ulevitch R. J., *Nature*, **406**, 782–787 (2000).
- 39) Medzhitov R., Preston-Hurlburt P., Janeway C. A., *Nature*, **388**, 394–397 (1997).
- 40) Hoffmann J. A., Kafatos F. C., Janeway C. A., Ezekowitz R.A.B., *Science*, **284**, 1313–1318 (1999).
- 41) Sakaguchi O., Sakaguchi S., Tsunoda N., *Microbiol. Immunol.*, **23**, 605–616 (1979).
- 42) Nolan J. P., Leibowitz A. I., *Gastroenterology*, **75**, 445–449 (1978).
- 43) Shibayama Y., *J. Pathol.*, **151**, 315–321 (1987).
- 44) Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K., *Anal. Biochem.*, **95**, 351–358 (1979).
- 45) Sakaguchi S., Hsu C. C., Kanda N., Sakaguchi O., *Jpn. J. Anesth.*, **30**, 478–485 (1981).
- 46) Sakaguchi O., Abe H., Sakaguchi S., Hsu C. C., *Microbiol. Immunol.*, **26**, 767–778 (1982).
- 47) Kessler F., Bennardini F., Bachs O., Serratoso J., James P., Caride A., Gazzotti P., Peniston T., Carafoli E., *J. Biol. Chem.*, **265**, 16012–16019 (1990).
- 48) Kaneko M., Beamish R. E., Dhalla N. S., *Am. J. Physiol.*, **256**, H368–H374 (1989).
- 49) Leslie C. C., *J. Biol. Chem.*, **272**, 16709–16712 (1997).
- 50) Uozumi N., Kume K., Nagase T., Nakatani N., Ishii S., Tashiro F., Komagata Y., Maki K., Ikuta K., Ouchi Y., Miyazaki J., Shimizu T., *Nature*, **390**, 618–622 (1997).
- 51) Sato E. F., Inoue M., “Oxidative Stress,” ed. by Yoshikawa T., *Igaku No Ayumi*, Ishiyaku Publishers Inc., 2001, pp. 100–103.
- 52) Fiers W., *FEBS Lett.*, **285**, 199–212 (1991).
- 53) Beutler B., Cerami A., *Nature*, **320**, 584–588 (1986).
- 54) Hsueh W., Sun X., Rioja Gonzalez-Crussi F., *Immunol.*, **70**, 309–314 (1990).
- 55) Freudenberg M. A., Keppler D., Galanos C., *Infect. Immun.*, **51**, 891–895 (1986).

- 56) Bahrami S., Redl H., Leichfried G., Yu Y., Schlag G., *Infect. Immun.*, **62**, 99–105 (1994).
- 57) Deitch E. A., Ma W. J., Ma L., Berg R., Specian R. D., *Surgery*, **106**, 292–300 (1989).
- 58) Gaetke L. M., McClain C. J., Talwalkar R. T., Shedlosky S. I., *Am. J. Physiol.*, **272**, E952–E956 (1997).
- 59) Nath R., Kumar D., Li T., Singal P.K., *Toxicol.*, **155**, 17–26 (2000).
- 60) Bremmer I., Beattie J. H., *Annu. Rev. Nutr.*, **10**, 63–83 (1990).
- 61) Satoh M., “Oxidative stress,” ed. by Yoshikawa T., *Igaku No Ayumi*, Ishiyaku Publisher Inc., Tokyo, 2001, pp. 315–318.
- 62) Barceloux D. G., *J. Clin. Toxicol.*, **37**, 145–172 (1999).
- 63) Sakurai H., Satoh H., Hatanaka A., Sawada T., Kawano K., Hagino T., Nakajima K., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **199**, 313–318 (1994).
- 64) Moncada S., Palmer R. M. J., Higgs E. A., *Pharmacol. Rev.*, **43**, 109–142 (1991).
- 65) Titheradge M. A., *Biochim. Biophys. Acta*, **1411**, 437–455 (1999).
- 66) Billiar T. R., Curran R. D., Harbrecht B. G., Stuehr D. J., Demetris A. J., Simmons R. L., *J. Leukocyte Biol.*, **48**, 565–569 (1990).
- 67) MacMicking J. D., Nathan C., Hom G., Chartrain N., Fletcher D. S., Trumbauer M., Stevens K., Xie Q. W., Sokol K., Hutchinson N., Chen H., Mudgett J. S., *Cell*, **81**, 641–650 (1995).
- 68) Radi R., Beckman J. S., Bush K. M., Freeman B. A., *Arch. Biochem. Biophys.*, **288**, 481–487 (1991).
- 69) Sakaguchi S., Furukawa R., Hsu C. C., Sakaguchi O., *Jpn. J. Bacteriol.*, **35**, 529–537 (1980).
- 70) Poss K. D., Tonegawa S., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **94**, 10919–10924 (1997).
- 71) Asahi M., Fujii J., Suzuki K., Seo H.G., Kuzuya T., Hori M., Tada M., Fujii S., Taniguchi N., *J. Biol. Chem.*, **270**, 21035–21039 (1995).
- 72) Oda T., Oka H., “Recent Advances in the Pharmacology of Kampo (Japanese Herbal) Medicines,” eds. by Hosoya E., Yamamura Y., Excerpta Medica, Tokyo, 1998, pp. 367–377.
- 73) Lehmann V., Freudenberg M. A., Galanos C., *J. Exp. Med.*, **165**, 657–663 (1987).
- 74) Kubo M., Matsuda H., Tani T., Arichi S., Kimura Y., Okuda H., *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 2411–2415 (1985).
- 75) Kimura Y., Kubo M., Tani T., Arichi S., Okuda H., *Chem. Pharm. Bull.*, **29**, 2610–2617 (1981).
- 76) Miyahara M., Tatsumi Y., *Yakugaku Zasshi*, **110**, 407–413 (1990).
- 77) Sakaguchi S., *Kanpou Igaku*, **19**, 179–181 (1995).