

# 혈액 투석 환자에서 Endotoxin의 임상적 의의

전북대학교 의과대학 내과학교실

강 성 귀

## 1. 내독소(Endotoxin)란?

박테리아 세포는 세포벽을 만드는데, 모든 박테리아 세포벽은 peptidoglycan(PDG)을 가지고 있다. 그람 음성 박테리아의 세포벽구조내의 외부층을 외부막이라고 하는데, 여기에 PDG층이 있다. 내독소는 이런 외부막의 구성 성분으로써 정제안된 내독소는 지질, 단백질, 탄수화물이 내포되어 있으나 고도로 정제된 내독소는 단백질을 가지고 있지 않다. 그런 까닭에 lipopolysaccharide(LPS)라고 한다. LPS는 물에 친

화력이 있는 다당질부와 물에 친화력이 없는 지질(lipid A)부의 2부분으로 구성되어 있는데, 다당질부는 o-specific 다당질부와 core oligosaccharide로 세분화 된다. O-specific다당질은 상이한 혈청형으로써 많은 차이가 있다. Core oligosaccharide는 그 구조와 구성이 더욱 보존되어 있으며, lipid A는 LPS분자중 가장 잘 보존되어 있는 부위이다. Lipid A는 phosphate와 lipid 사슬로 연결되고 대처하여 D-glucosamine의 2탄당으로 구성되어 있다(Fig. 1, 2)<sup>1, 2)</sup>.

## 2. 내독소의 생물학적 활성

내독소는 Table 1에서와 같이 체내의 세포 및 분자 수준에서 여러가지 생물학적 활성을 나타내고 있다.

## 3. 내독소의 열에 안정성

내독소는 일반적으로 열에 안정한 독소이다.

한실험에 의하면 내독소는 180-200°C로 전성 가열에 의해 완전히 불활성화 되지 않고 250°C에서 1시간 전성 가열시에 불활성화 된다(Fig. 3).

수용액내 저농도의 내독소는 안정하지 못하는데 37°C에서는 파괴가 많고(Fig. 4A), 70°C에서는 불활

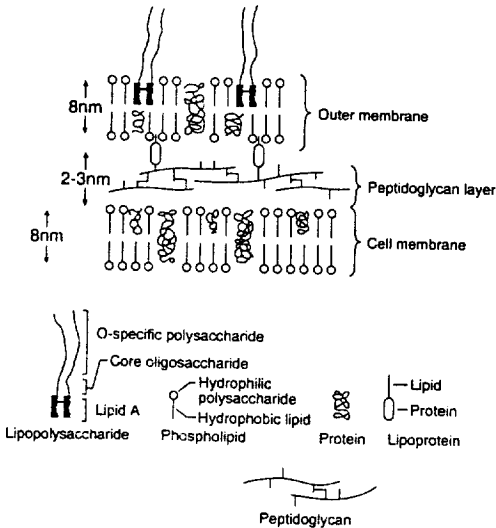


Fig. 1. Diagram of cell membrane and cell wall in Gram-negative bacteria.

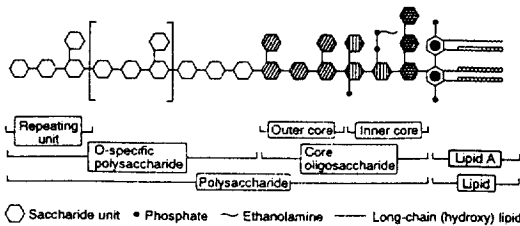


Fig. 2. Structure of lipopolysaccharide of enterobacteria.

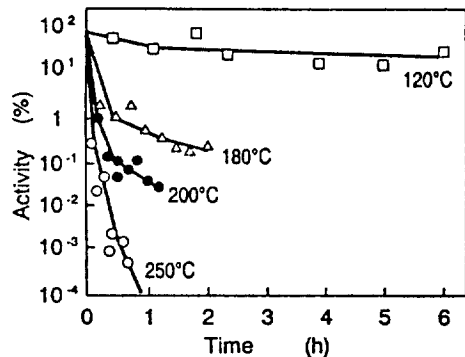


Fig. 3. Heat stability of endotoxin in dry form (endotoxin activity remaining after heating of 500ng of lyophilized LPS from Escherichia coli UKT-B).

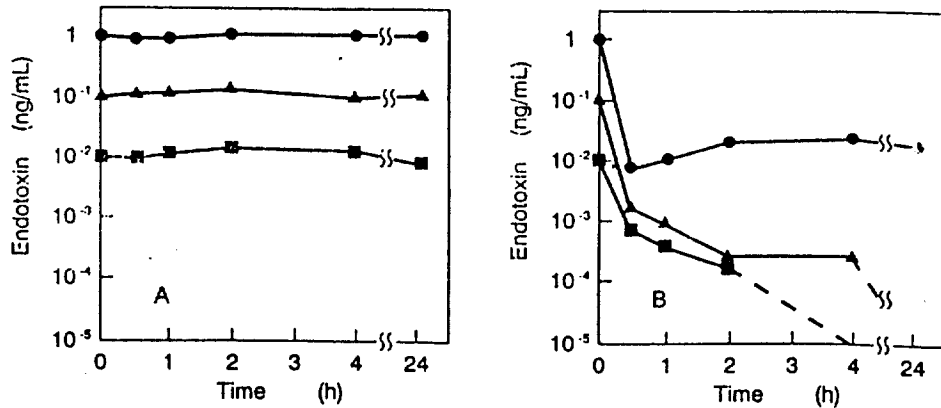


Fig. 4. Heat stability of endotoxin in solution(endotoxin activity remaining after heating of a solution of LPS from *Escherichia coli* UKT-B at 37°C(A) or 70°C(B)).  
●, 1ng/mL ▲, 0.1ng/mL ■, 0.01ng/mL

Table 1. Biological Activities and Effects of Endotoxin

**A. In the body**

- Pyrogenicity
- Lethal toxicity
- Schwartzman activity
- Endotoxin shock
- Leukopenia
- Platelet aggregation
- Depression of blood glucose
- Vasoconstriction and vasodilation
- Miscarriage
- Weight loss
- Induction of nonspecific resistance to infection
- Induction of interferon
- Tumor necrotic activity
- Adjuvant activity
- Induction of tolerancer to endotoxin

**B. In cells**

- Macrophage activation
- Maturation of T and B cell precursors
- Mitogenic activity for B lymphocytes
- Production of mediators
  - Interferon, tumor necrosis factor, prostaglandin, leukotriene, interleukan-1, colony-stimulating factor

**C. In molecules**

- Complement activation
- Hageman factor activation
- Plasminogen activation
- Limulus lysate gelation

성화 된다(Fig. 4B).

즉 내독소는 전성 가열했을때 수용액내에서 보다 안정하였고, 낮은 온도(Fig. 4B)에는 70°C에서 불활성화 할 수 있다.

**4. 내독소의 임상적 의의**

1) 그람 음성 패혈증과 간질환

혈장내 내독소의 측정은 여러가지 세균감염의 진단에 유용할 것이며 특히 패혈증, 위장 및 간질환시 내독소 검사의 진단적 의의는 지대할 것이다. 즉 건강한 사람의 순환 혈액 내에는 세균이 없다는 가정하에, 만일 대량의 세균 및 세균의 부산물이 혈액내에 순환한다면 발열과 저혈압이 나타날 것이다. 이때 세균학적 검출을 위해서 혈액 배양을 했을때, 배양하는데 오랜 시간이 요구되고, false-negative rate가 높기때문에 혈장 내독소 검사가 보다 더 확실한 방법이 될 것이다.

Pearson등<sup>3)</sup>은 그람 음성 세균성 패혈증 환자의 혈

Table 2. Summary of LAL Results for Diagnosis of Gram-negative Bacteremia

Culture results	LAL results	
	Negative	Positive
Negative	27	2
Gram-positive bacteremia	5	0
Gram-negative bacteremia	1	9

LAL : *Limulus ameobocyte lysate*

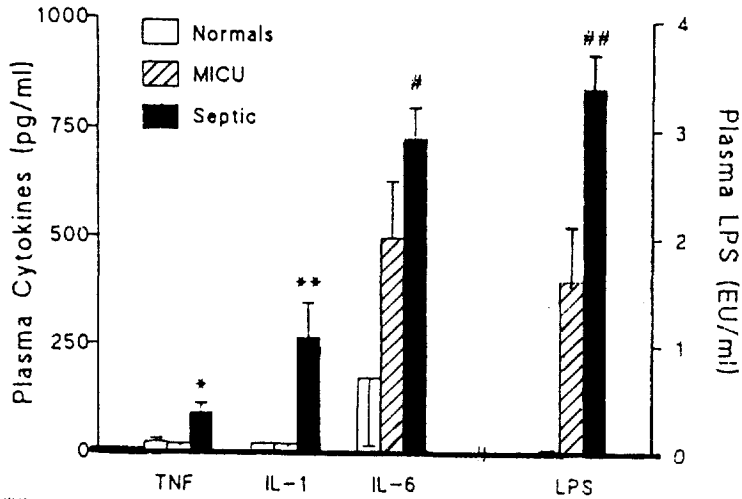


Fig. 5. Comparison of plasma lipopolysaccharide, tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-1 $\beta$ , and interleukin-6 levels in patients with the septic syndrome ( $n=97$ ), patients in medical intensive care who did not have sepsis ( $n=20$ ), and normal healthy controls ( $n=20$ ). Plasma samples were obtained immediately after the identification of patients with the sepsis syndrome and critically ill patients without sepsis who were in medical intensive care unit (MICU). The three groups differed regarding plasma levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleukin-6 (IL-6), and lipopolysaccharide (LPS) ( $P<0.001$  for all comparisons). Plasma TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6, and lipopolysaccharide levels were elevated in patients with sepsis as compared with both critically ill patients without ( $P<0.01$  for all comparisons) and normal controls ( $P<0.001$  for all comparisons).

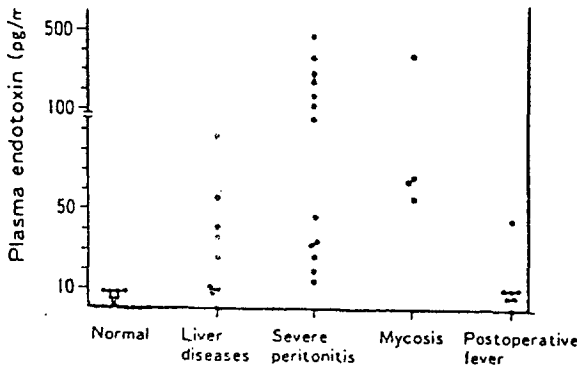


Fig. 6. Plasma endotoxin levels in normal subjects and patients.

장에서 내독소를 검출하였던 바 Table 2에서 보는 바와 같이 81.8%에서 내독소 양성이었다.

최근의 견해로는 LPS는 폐혈증에 직접 관여하는 것이 아니고, 대신 여러가지 체내 매개물질을 만들고, 유리시킴으로써 자극하며 이로 인하여 병태생리학적 변화를 유발시키는 것으로 알려졌다. 즉 폐혈증시 중요한 매개물질은 종양괴사인자(TNF- $\alpha$ ), 인터루킨-1(IL-1 $\beta$ )과 인터루킨-6(IL-6)등으로 알려져 있는데 LPS를 정맥내에 주입하면 상기 3가지 cytokines이 혈액내 증가한다. Casey 등<sup>4)</sup>의 보고에 의하면 폐혈증

증후군에서의 혈장 cytokines과 endotoxin 농도 사이에 상관관계가 있었다(Fig. 5).

한편 간장은 내독소를 해독하는 주장기로 간질환, 특히 간경변증은 내독소혈증의 원인이 되는데, 내독소는 정상적으로 존재하는 장내 세균총에서 유래되어 장벽을 통해 흡수되어 간장의 망상내피계에 탐식되어서 해독된다. 그러나 해독기전이 장애되면 흡수된 내독소는 순환 혈액내에 남게되어 여러가지 증상과 증후를 나타나게 된다.

Yokota<sup>5)</sup>은 15명 정상 지원자의 혈장내 내독소치를 측정하였던바 10pg/ml이하였는데, 간경변증 환자에서 66.7%, 심한 복막염 환자 100%, 진균증 환자 100% 그리고 수술후 발열 환자 14.3%에서 혈액내 내독소 농도가 증가되었다(Fig. 6).

## 2) 장기간 혈액투석환자

혈액투석의 가장 중요한 부분은 dialyzer로 여기에 10,000개의 hollow fiber가 있는데 hollow fiber의 내측 직경은 0.2mm이고, 벽두께는 0.02mm, 그리고 길이(전장)는 약 20cm이다. 혈액이 흐르는 것은 hollow fiber 내측이고, 투석액은 외측에서 흐른다. hollow fiber의 큰 pore을 가진 막을 high performance membrane (HPM)이라고 하는데, 보통 pore크기는

1970년대까진 20A°이었다. 그러나 1970년대 중반기 부터 mid-size molecular hypothesis(수천 분자량의 분자)가 제창된후 혈액에서 mid-size molecule를 제거하기 위해서 투석막의 pore를 키우는 것이 개발되었다.

장기간 혈액 투석을 받고 있는 환자에서 amyloidosis가 흔히 관찰되었는데, 이는 amyloidosis와 관련이 있는 분자량이 10,000인 단백질  $\beta$  2-microglobulin을 혈액에서 제거할 목적으로 보다 큰 pore가 있는 투석막을 개발하게 되었다. 이 투석막이 소위 HPM이고 세계적으로 많이 사용하고 있다.

HPM dialyzer가 투석의 performance가 보다 좋다(소분자량 단백질의 제거와 초여과에 의한 많은 양의 수분제거)는 것을 인정하고는 있지만 새로운 문제에 봉착하게 되었다. 즉 HPM은 환자 혈액에서 분자량이 약 10,000인 큰물질을 제거 할 수는 있으나, 투석액내의 같은 크기의 물질이 혈액내로 유입될 가능성을 생각하지 않을 수 없게 되었다.

실제로 혈액투석을 받고 있는 환자에서 원인불명의 고열이 발생하는 경우가 있는데, 이는 dialyzer막을 통해서 투석용액내의 pyrogen이 혈액내로 들어왔다고 가정할 수 있다. 이런 전형적인 pyrogen이 endotoxin으로서 endotoxin의 기본단위는 분자량이 2,000-10,000이상으로 추정하고 있다.

Endotoxin은 보통 수백만 분자량의 micelle형태로 존재한다. Micelle형태의 내독소는 분자량이 크기때문에 투석막을 통과하지 못하나, deoxycholate를 사용한 경우나, 청정제내  $Mg^{++}$ 나  $Ca^{++}$ 같은 이온들이 있으면 투석시 micelle은 소분자량의 subunit로 분해된다. 그리하여 high-flux시와 HPM투석막을 통해 혈액

내로 확산에 의해 유입된다<sup>6,7)</sup>.

Yamagami등<sup>8)</sup> 이 관찰한 바에 의하면 장기간 혈액 투석을 받고 있는 환자의 혈청내에서 endotoxin antibody(ELISA법)를 측정하였던바 유의하게 증가되어 있었다. 이는 투석액을 무균적으로 해야할 필요성을 강조하고 있다. 따라서 투석액내 endotoxin을 어떻게 제거할 것인가, 그리고 어떻게 청결하게 유지해야 할 것인가를 개발해야 한다.

### 3) 투석액내 내독소치를 최소화하는 방법

투석액내 endotoxin의 출처를 생각할 수 있는 것은, 투석원액은 보통 내독소가 없는 용액이고, 이 내독소 없는 용액은 역삼투물(reverse osmosis water)로 회석된다. 역삼투막의 pore크기는 아주 작기때문에, 비록 수도물에 내독소가 있다하더라도 내독소는 제거된다. 그래서 역삼투물은 내독소가 거의 없는 물이며 사용전 탱크에 저장된다(Fig. 7). 한편 탱크내에서 박테리아는 조건에 따라 번식할 수 있는데 이런 물 탱크가 내독소의 원천이 될 수 있다.

오늘날 투석용액은 acetate액 또는 bicarbonate액을 사용하고 있는데, 특히 bicarbonate 농축액에서 박테리아 오염의 가능성이 많다<sup>9)</sup>. 그리고 투석기와 연결부(connector)를 조심히 해야 하는데 이 부위에서 박테리아가 오염될 수 있기 때문이다(Fig. 8). 박테리아 및 내독소 오염으로부터 투석액을 보호하기 위하여 투석라인(dialysis system)에 pyrogen을 제거하는 filter를 부착하고, 또 자주 소독해야 한다. 이를 감시하기 위하여 endotoxin을 정확하고 빠른 시간내에 측정해야한다. 투석액내 endotoxin활성은 비교적 짧은 시간에 감소하기 때문에 endotoxin의 단시간내 측정이 중요하다.

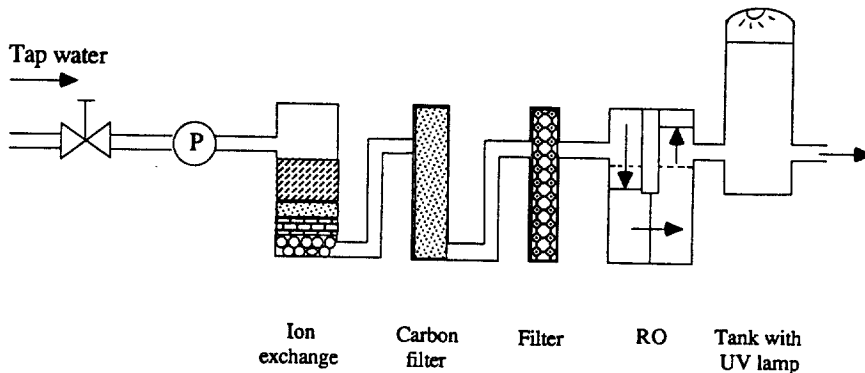


Fig. 7. Schema of water-supply system

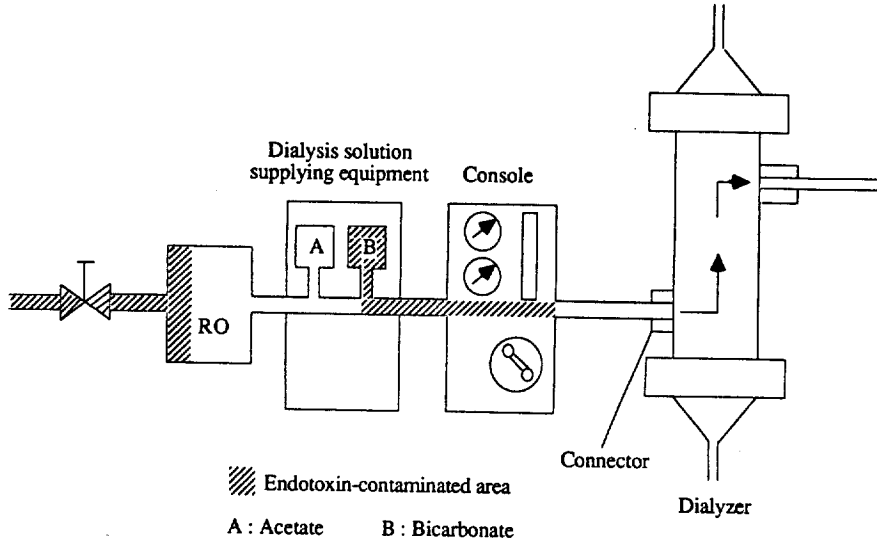


Fig. 8. Schema of water and dialysis solution delivery system.

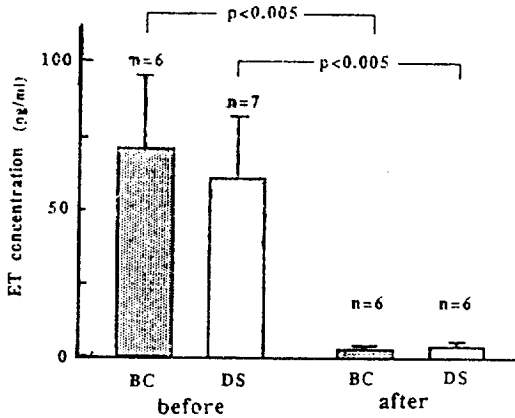


Fig. 9. Changes of ET concentration in bicarbonate concentrate and dialysis solution by intensive sanitization. BC=bicarbonate concentrate; DS=dialysis solution.

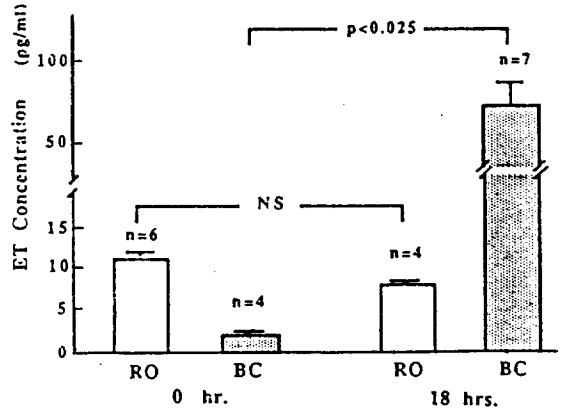


Fig. 10. Changes of ET concentration in water and bicarbonate concentrate dwelled for 0 and 18 hours. RO=water processed through reverse osmosis; BC=bicarbonate concentrate.

실제로 투석액내 endotoxin농도를 최소화 또는 제거시키는 방법은 다음과 같다.

1) Dialysate-delivery system을 철저히 청결하게 해야한다. 즉 투석기계내 proportioner로부터 투석기 inlet line까지 소독액(0.1% hypochlorous acid를 40분간)을 채워야 하고, 주 6회 정수된 물로 깨끗하게 씻어야 한다. 그리고 bicarbonate용액 통은 정수된 물로 매일 씻고, 건조하게 말리고, 1주에 1회 0.1% hypochlorous acid액으로 소독해야 한다. Kazuo<sup>9)</sup> 등의 성적에 의하면 이러한 철저한 청결로 bicarbonate 원액통에 endotoxin 농도가  $73.7 \pm 22.8$ pg/ml에서  $2.2$

$\pm 0.1$ pg/ml로 감소시킬 수 있었고 투석기 inlet의 투석액내 endotoxin이  $60.1 \pm 21.7$ pg/ml에서  $3.5 \pm 0.8$ pg/ml로 감소시켰다(Fig. 9). 특히 36시간이상 순환되지 않고 사용되는 월요일 아침의 투석은 주의를 요하는데, bicarbonate용액통에 18시간동안 살고 있던 박테리아(*P. aeruginosa*, *enterobacter*)가 있었던 경우 내독소는  $2.0 \pm 0.1$ pg/ml에서  $73.7 \pm 22.8$ pg/ml로 증가하였다<sup>9,10)</sup>(Fig. 10).

2) Kazuo등<sup>10)</sup> 투석액에서 endotoxin을 제거하기 위해서 투석기의 투석액 inlet부위에 microporous membrane filter(Sterapore-Mini, Mitsubishi Rayon

Engineering Co. Ltd, Tokyo, Japan)을 부착하였던 바, 내독소 농도는 filter를 사용전  $63.8 \pm 17.2 \text{ pg/ml}$ 이었던 것이 filter를 사용후  $2.0 \pm 0.8 \text{ pg/ml}$ 로 감소하였다.

3) 저자가 검사한 내독소 농도 : 우리나라 혈액투석 센터에서 채취한 시료에서 endotoxin농도를 kinetic turbidimetric method로 Toxinometer(Wako)를 이용하여 측정하였던 바 수도물에 endotoxin농도는  $33.4 \pm 9.3 \text{ ng/ml}$ 이었으나 RO system을 통과한 물에서 내독소 농도는  $2.69 \pm 0.9 \text{ ng/ml}$ 로 유의하게 감소하였다. 투석기 inlet의 투석액에서 내독소는  $2.9 \pm 1.0 \text{ ng/ml}$ 로 약간 증가하는 경향을 나타내었다.

## 결 론

투석액내 박테리아 오염으로 또는 high-flux membrane투석기를 통하여 endotoxin이 투석액에서 backdiffusion에 의해 혈액내로 유입되면 어떤 임상적 증상을 야기할 수 있기 때문에 투석액내 내독소를 최소화 하는 방법이 개발되어야 한다. 현재까지 수도물의 내독소는 역삼투압라인을 통하여 제거될 수 있었고, 투석액 delivery system은 철저한 소독을 해야하고, processed water의 내독소는 microporous polyethylene hollow filter막을 사용하여 내독소를 최소화 시킬 수 있다는 점으로 요약할 수 있다.

## REFERENCES

- 1) Rietschel ET, Ed: *Handbook of Endotoxin(Series Ed., Proctor RA) Vol I Chemistry of Endotoxin. Elsevier, Amsterdame, 1984*
- 2) Pearson FC, III. *Pyrogens: Endotoxins, LAL Testing, and Depyrogenation. Marcel Dekker, New York, 1985*
- 3) Pearson FC, Dubczak J, Weary M, Bruszer G, Donohue G: *Detection of endotoxin in the plasma of patients with Gram-negative bacterial sepsis by the limulus amoebocyte lysate assay. J Clin Microbiol 21 :865-868, 1985*
- 4) Casey LC, Balk RA, Bone RC: *Plasma cytokine and Endotoxin levels correlate with survival in patients with the sepsis syndrme. Annals Int Med 119 :771-778, 1993*
- 5) Yokota M, Kambayashi J, Tanaka J, Jsujinaka T, Sakon M, Mori T: *A simple turbidimetric time assay of the endotoxin in plasma. J. Biochem Biophys. Methods, 18 :97-104, 1989*
- 6) Stiller S, Man H, Brunner H: *Backfiltration in hemodialysis with highly permeable membranes. Contrib Nephrol 46 :23, 1985*
- 7) Bingel M, Lonnemann G, Shaldon S, Koch KM, Dinarello CA: *Human interleukin-1 production during hemodialysis. Nephron 43 :161-163, 1986*
- 8) Yamagami S, Adachi T, Sugimura T, Kishimoto T, Maekawa M, Niwa M, Shaldon S: *Detection of bacteria in dialysate and its antibody in long-term hemodialysis patients. Trans Am Soc Artif Intern Organs 35 :331-333, 1989*
- 9) Ebbem JP, Hirsch DN, Luehmann DA, et al: *Microbiologic contamination of liquid bicarbonate concentration for hemodialysis. Trans Am Soc Artif Intern Organs 33 :209, 1987*
- 10) Kazuo K, Shinju Y, Masato N, Tadasu S: *Methods of Minimizing Endotoxin level in dialysate. Dialy & Transpl 22 (3), 1993*