

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：34417

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15672

研究課題名(和文) 補体沈着による赤血球の機能低下が重症病態に与える影響についての研究

研究課題名(英文) C4d deposition on the surface of RBCs may interfere with their function in severe patients

研究代表者

室谷 卓 (MUROYA, Takashi)

関西医科大学・医学部・講師

研究者番号：20528434

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：救命救急センターに搬送された患者について赤血球表面上の補体成分をフローサイトメトリーで測定し、来院時の重症度の指標として用いられているAPACHEIIスコア、SOFAスコアとの検討を行った。患者群(n=25)の補体沈着は健康成人群(n=10)のそれと比較してより多く沈着していることが明らかになった(n=25 vs 10;p<0.01)各スコアと赤血球補体成分との相関関係は見られなかった。救命センターに搬送される患者は補体の活性化が起きており既存の重症度とは相関しないものの患者の免疫反応を赤血球表面上の補体成分を測定することにより推測できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We measured C4d (one of the factor of compliment) deposition on the surface of RBCs (Red Blood Cells) with flow cytometry in the patients who were transferred to Trauma and Critical Care Center and assessed the relation in the severity of the patients and the amount of the deposition. We used the APACHEII score and SOFA score as the patients' severity. There is the significant deference in the patients group and normal healthy donors (n=25 vs 10;p<0.01). There is no correlation in C4d deposition on the surface of RBCs and the severity sores. Severe patients have more C4d deposition of their RBCs surface, but no correlation in C4d deposition and severity score in existence. We may assess the immune reaction of the severe patients by the measurement of the complement deposition of patients' RBCs surface.

研究分野：救急医学

キーワード：赤血球 補体 重症患者

1. 研究開始当初の背景

自然免疫が患者の重症化に寄与している事は明らかにされており、自然免疫の中で最も迅速に活性化するのは補体系である。膠原病のひとつである全身性エリテマトーデス (SLE) の患者は補体が活性化している事が知られているが、彼らの赤血球上に補体成分 C4d が沈着している事が証明されている (Kao AH et al Arthritis Rheum. 2010 Mar;62(3):837-44) また、外傷患者の赤血球に補体成分 C4d が沈着している事も証明されておりその変形能に影響を与えている可能性について報告されている (Muroya T et al Crit Care Med. 2014 May;42(5):e364-72)。補体の活性化は全身における炎症の初期反応として起こり、赤血球機能に影響を与え、SLE では持続する炎症の指標として診断に用いられている。赤血球に沈着した補体成分 C4d は生体内に起こった炎症を反映している可能性がある。炎症の初期反応はそのメカニズムから内因性も含めた救急患者にも同様の傾向があることが予想される。

C4d は赤血球に一度沈着すれば赤血球の寿命まで沈着し続ける特徴を有しており、赤血球に沈着した補体を測定する事により、患者の補体の活性化を推測できると考えられる。赤血球上の補体沈着は赤血球機能の変化にも影響を与えている可能性があるため、この点についても議論が可能になることが期待できる。

2. 研究の目的

本研究の目的は重症患者の赤血球に沈着する補体成分と多発外傷、敗血症、ショックなどの重症患者の重症度との関連性を明らかにすることである。救命センターに搬送される患者群において赤血球上に補体の沈着が有意に認められること、また、どのような疾患で補体沈着が認められるかを確認する。補体沈着を測定する患者の重症度をスコアを用いて数値化し、検査データなども含め、補体沈着の量とそれぞれ関連があるかどうかを確認する。

3. 研究の方法

関西医科大学附属病院倫理審査委員会 (整理番号 2016643) 承認。

対象は関西医科大学高度救命救急センターに搬送された患者をランダムに選出し 25 名で登録を行った。年齢、性別、主病名などの内訳を Table 1 に示す。来院時の血液検査データ及びバイタルサインで来院時の重症度の指標として用いられている APACHEII スコア、SOFA スコアを算出した。診療上、対象患者はほぼ全例に対し治療上必要な血液検査が行われるが、そのうち動脈血液ガス測定用のヘパリン化採血された約 2ml の全血のうち余剰分を回収し、4 の冷蔵庫で保存した。4 では 24 時間程度保存が可能であり、当日あるいは翌日に以下の測定を行った。

保存血の洗浄赤血球を一次抗体であるヒト C4d 抗体と二次抗体である FITC の蛍光抗体で標識しフローサイトメトリーで計測を行い、蛍光度の平均 (MFI; Mean Fluorescence Index) をその検体の C4d の沈着の値とした。フローサイトメトリーは BD 社の FACS Calibur を用い、出力は各測定で同一に設定した。同様の過程をボランティアの健康成人よりの献血を用いて行い、健康成人の値として測定された患者のそれと比較した。健康成人は合計 10 名で、各測定にあわせて募集された。

症例	年齢	性別	主病名
1	69	男	弓部大動脈破裂
2	53	男	劇症型肺炎球菌感染症
3	41	女	SAH
4	85	女	Sepsis(UTI)
5	77	男	Sepsis(UTI)
6	69	男	CPA
7	80	女	ヘルペス脳炎
8	82	男	脳室内出血
9	41	男	会陰部壊死性筋膜炎
10	31	男	左手 2-4 挫滅開放性骨折
11	49	男	墜落胸部外傷
12	30	女	CO 中毒
13	59	男	熱中症
14	76	女	肺塞栓・DVT
15	48	男	SAH
16	72	男	血気胸 外傷性 SAH
17	72	女	CPA
18	46	女	CPA with SLE
19	63	男	肺炎 with MDS
20	66	男	肺炎 with AS
21	42	男	症候性てんかん
22	77	女	Sepsis (UTI)
23	62	男	血気胸 足関節骨折
24	72	男	出血性胃潰瘍
25	77	男	間質性肺炎
平均	62		

Table 1 患者背景

4. 研究成果

Figure 1 は患者赤血球検体とその際に比較された健康成人の赤血球との測定結果の一例である。それぞれの検体の C4d の蛍光度を MFI として算出集計し、患者群と健康成人群で平均値の比較をおこなった。

救命センターに搬送される患者群 (n=25) の平均 MFI は健康成人群 (n=10) のそれと比較して赤血球表面に補体成分 C4d が沈着している傾向にあることが明らかになった (n=25 vs 10; p < 0.01) (Table 2, Figure 2)。

また、測定日の違いによる抗体の標識などのコンディションの違いを考慮し、ヒト C4d 抗体のアイソタイプコントロールを用いて実際のヒト C4d 抗体とそのアイソタイプコ

ントロールの沈着の比 (C4d/Iso) を算出し患者群と健康成人群とを比較したところ同様の結果が得られた。(Figure 3)

これらの結果から救命センターに搬送される患者群では赤血球上の補体成分が健康成人に比べて有意に沈着していることが明らかになった。これは先に外傷患者の初期採血における赤血球上の C4d の沈着が有意であったことと一致する結果である。今回の検討には外傷患者が数名含まれているものの、多くは内因性疾患による急病 (Table 1) であり外傷のみならず急病状態における患者では補体の活性化が起きているものと推測される。ただし、患者群は救命センターに搬送されるという一定程度の重症度の高さをあることを考慮に入れる必要がある。

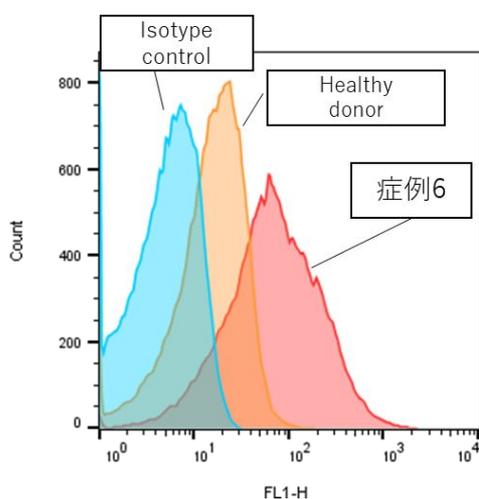


Figure 1 赤血球上に沈着した C4d

横軸に蛍光度を示すヒストグラムであり、右方変位が C4d の多量沈着を意味する。検体ごとに平均値 (MFI) を算出し、C4d の沈着量とした。

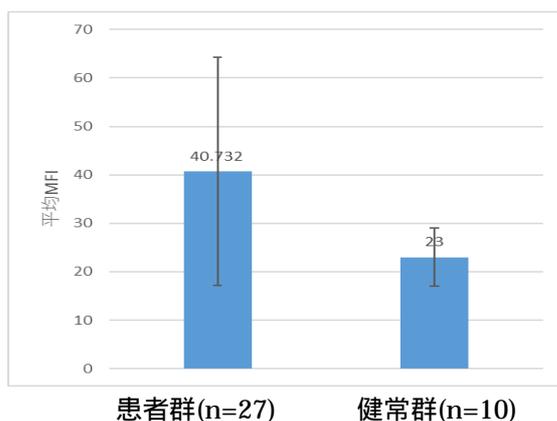


Figure 2 各検体の MFI の平均を縦軸にとり患者群と健康成人群の MFI を比較した。平均の比較では患者群のほうが有意に赤血球上の C4d の沈着が増加していることが明らかとなった。(p<0.05)

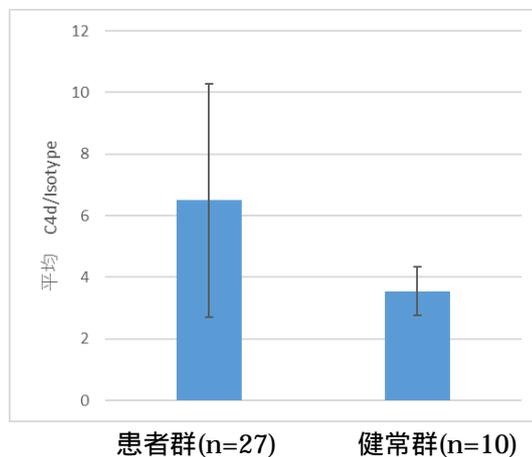


Figure 3 各検体のヒト C4d 抗体の MFI と同じ検体におけるアイソタイプコントロールの比を縦軸にとり患者群と健康成人群で比較した。Figure2 と同様に患者群のほうが有意に赤血球上の C4d の沈着が増加していることが明らかとなった。(p<0.05)

急病状態における患者群には補体の活性化が起きていることが推測される結果となったが、補体の活性化はどのような疾患あるいはどのような病態で有意に増加するのか追加検討を行った。一般に救急集中治療領域で使用されている重症度の指標は APACHEII スコアと SOFA スコアである。詳細は割愛するがどちらも患者の多臓器機能を評価しスコアリングし、各臓器障害の数値を合計することで重症度のスコアとしている。

各患者におけるスコアと赤血球表面上の C4d の量 (MFI) は Table 2 に示されており、MFI と各スコアの関係を検討した (Figure 4)。

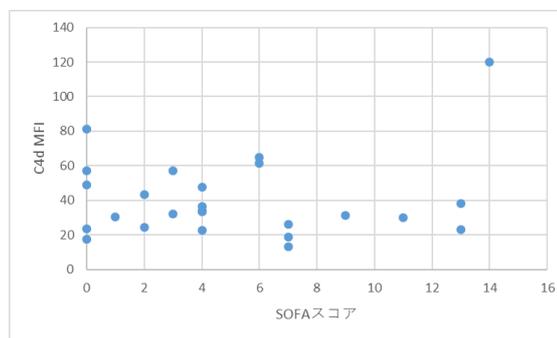
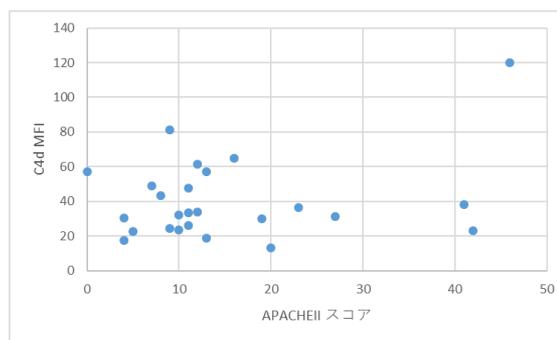


Figure 4 C4d MFI と各スコアの散布図  
赤血球表面上の C4d と各スコアとの関係を  
散布図で示した。各スコアと C4d とに相関関  
係は見られなかった。

番号	主病名	APACHEII	SOFA	C4d MFI	Isotype MFI
1	弓部大動脈破裂	9	0	81.3	6.02
2	劇症型肺炎球菌感染症	19	11	29.8	8.65
3	SAH	12	6	61.6	5.84
4	Sepsis(UTI)	13	7	18.8	5.82
5	Sepsis(UTI)	11	4	47.8	6.55
6	CPA	46	14	120	6.63
7	ヘルペス脳炎	20	7	13.3	5.57
8	脳室内出血	23	4	36.6	6.6
9	会陰部壊死性筋膜炎	7	0	49.1	5.39
10	左手 2-4 挫滅開放性骨折	0	0	57	6
11	墜落胸部外傷	4	1	30.6	5.85
12	CO 中毒	12	4	34	6.86
13	熱中症	9	2	24.6	7.3
14	肺塞栓・DVT	16	6	65	6.74
15	SAH	4	0	17.6	5.9
16	血気胸 外傷性 SAH	10	3	32.1	5.93
17	CPA	42	13	23.1	6.6
18	CPA with SLE	41	13	38.2	5.93
19	肺炎 with MDS	27	9	31.4	6.47
20	肺炎 with AS	13	3	57.2	5.62
21	症候性てんかん	8	2	43.3	6.44
22	Sepsis (UTI)	11	7	26.1	6.77
23	血気胸 足関節骨折	5	4	22.6	6.42
24	出血性胃潰瘍	10	0	23.6	6.06
25	間質性肺炎	11	4	33.6	6.61
		15.32	4.96	40.732	6.3428

Table 2 各疾患における APACHEII スコア、SOFA スコア、赤血球表面上に沈着する C4d 量 (MFI) とその Isotype control (MFI)

疾患別では症例 6 CPA (心肺停止) の場合に補体の沈着が他に比して多いが、症例 17、18 の CPA に関しては異常高値とは言えなかった。CPA といえど、発症からの経過時間なども補体の活性化に影響を与えている可能

性がある。

一般に炎症は病原体や障害された組織が起こすといわれているため、組織の障害が大きければ大きいほど補体の活性化も大きくなっていると考えられるが、組織の障害はこれまで具体的な数値で測定不可能であったが、本研究を用い、補体の活性化を見ることで測定可能になる可能性がある。赤血球表面上の C4d の測定には時間の制約など、障壁もあるものの、今後、予後や他の血液データなどと経時的な変化も含めて比較することで新たな見地を得る可能性は残されている。

結語として救命センターに搬送される患者は補体の活性化が起きていると解釈され、既存の重症度とは相関しないものの患者の免疫反応を赤血球表面上の補体成分を測定することにより推測できる可能性がある。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計 1 件)  
第 44 回日本救急医学会・学術集会  
2016 年 11 月 18 日 グランドプリンスホテル新高輪 (東京都港区高輪)  
生体侵襲を評価する赤血球表面マーカー測定を試み 室谷卓

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

室谷 卓 (MUROYA Takashi) 関西医科大学 医学部 講師

研究者番号：20528434

### (2) 研究分担者

鎌方 安行 (KUWAGATA Yasuyuki) 関西医科大学 医学部 教授

研究者番号：50273678

櫻本 和人 (SAKURAMOTO Kazuhito) 関西医科大学 医学部 助教

研究者番号：00460808