

令和 2 年 6 月 23 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11600

研究課題名(和文) 来院時心肺停止患者における赤血球表面上の補体沈着とその侵襲の評価

研究課題名(英文) Evaluation of C4d deposition on RBC surface in cardiac arrest

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) 3,000,000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72名(うち13名が院外心肺停止)、並びに対象となる健康成人の赤血球表面上の補体沈着量をフローサイトメトリーを用いて測定し、収集した臨床データ、血液データとの関係を検討した。72名の年齢の中央値は74歳で男性は39名(54%)であった。心停止においては健康成人に比べて有意に補体成分の沈着が見られる($p<0.05$)ことが確認された。検体全体で測定されたC4dの沈着量と各検査データ、臨床データとの比較検討を行い、補体沈着量とBase Excess、乳酸値、白血球数などと弱い相関関係がみられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

赤血球と補体を組み合わせた本研究の結果は本邦では初めての知見となる。心停止に対する一次救急処置は飛躍的に普及したが心停止から蘇生した患者は未だ治療が難しく、定型的な治療法は確立していない。その理由の一つに侵襲評価の難しさがある。今回心停止患者の赤血球には有意に補体成分が沈着していることが明らかとなり、既知の患者データとの関連が示され、心停止の侵襲を評価する一助になる。さらにそれを組み合わせることによる予後予測を検討するのに有用である可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We measured the volume of C4d deposition on the surface of erythrocyte of 72 patients (including 13 patients with out of hospital cardiac arrest) transferred to our critical care center, and that of healthy donors. We examined the association between the volume of C4d deposition and patients' clinical data. In patients' characteristics, median age was 74, and 39(54%) of 72 were male. C4d deposition in cardiac arrest was statistically higher than in healthy donor. C4d deposition of the surface of whole patients had weak association with Base Excess, lactate, and the numbers of white blood cell in patients' blood.

研究分野：救急医学

キーワード：心停止 赤血球 補体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

外傷、心肺停止、ショックなど生体に大きな侵襲が加わった場合、侵襲が加わった臓器だけでなく、様々な全身性の合併症を発症することがある。外傷であれば直接の組織、細胞の破壊、疾患であれば低灌流に陥った組織・細胞障害が起こり、自己細胞由来の組織構成物質 (DAMPs) が病原体 (PAMPs) のように生体に作用し、生体の免疫反応を刺激する。患者の発病や受傷等で補体をはじめとする自然免疫系が賦活化されることで生体に時として不利益となる反応がおこる事も重症患者によく認められ、急性呼吸窮迫症候群 (ARDS) などは代表例である。

このような生体反応の中で重要なものの一つに自然免疫があり、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。補体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、膠原病のひとつである全身性エリテマトーデス (SLE) の患者において補体が活性化している事は有名である。また SLE 患者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)。報告者らはこれまでに外傷患者の赤血球に補体成分 C4d が沈着している事を証明し、その変形能に影響を与えている可能性について報告した (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、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。赤血球の表面に沈着した補体成分 C4d は生体内に起こった自然免疫由来の炎症を反映している可能性がある。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。そこで本研究で生体に強い侵襲が起こる病態として虚血・再灌流に着目し、その明らかな病態として、心肺停止状態に注目した。心肺停止は文字通り心停止により循環が破たんした状態で体のあらゆる組織が虚血に陥る。また、治療により自己心拍が再開した場合は再灌流が起こり、先に述べたような免疫反応は一層活性化されると考えられている。これまで生体の侵襲が様々な形でスコア化されているが、全てが有用であるとは言えない。ここでは赤血球上の補体を評価することで虚血とそれに引き続く再灌流の侵襲を評価できると仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究の目的は心肺停止患者、並びに心肺停止後蘇生を得た患者の赤血球に沈着する補体成分の量を明らかにすることである。研究期間内に心肺停止患者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、心肺停止の原因や心拍再開の有無と補体沈着の量に相関関係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スコアを用いて数値化し、基礎疾患や心肺停止発症から採血までの時間、入院期間や検査データ、予後なども含め、補体沈着の度合いとそれぞれ関連があるかどうかを確認する。心拍再開に至った例では臨床的に行われる採血を用いて補体沈着量が増加するか検討する。重症度や検査データなどで補体沈着との相関が認められた場合は赤血球の補体沈着量が予後、臓器障害の程度の予測式が成立可能かどうか検討する。また、心停止症例が他の疾患に対して補体沈着量が多いことを確認するために他疾患での補体沈着量も測定を行い、比較検討する。

3. 研究の方法

対象は関西医科大学附属病院高度救命救急センターに搬送された患者で来院時心肺停止患者は 13 名。また、疾患ごとの比較も含めその他の疾患も含め総検体数は 72 検体であった。対象患者は治療上必要な血液検査が行われるが、そのうち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、冷蔵保存した。

採取された全血を転倒混和し、ピペットを用いて 50 μ l を 1000 μ l の HBSS++ と混合する。混合溶液を 5000rpm、1 分間で遠心分離し上澄みを取り除き、再び 1000 μ l の HBSS++ 溶液と混合し、遠心分離を行う。この操作で全血中の赤血球以外の血球成分を除去する事ができる。遠心分離した赤血球 1 μ l を、0.5% BSA を添加した 100 μ l の HBSS++ で溶解し赤血球溶液とする。100 μ l の赤血球溶液に補体成分 C4d の抗体を混和し抗体を結合させる。FITC で標識された 2 次抗体を用いて染色する。C4d と FITC で標識された赤血球をフローサイトメーターで計測を行う。約 1 万から 10 万の赤血球を測定し、蛍光度の平均をとり、その赤血球の C4d の沈着の値とする。フローサイトメーターの機種・出力は各測定で同一に設定する。(図 1 は申請者が以前に報告した外傷患者の赤血球表面上に補体成分 C4d が健康者に比較して沈着が増加していたことを示すフローサイトメーターの結果である。)

赤血球上の補体測定を行った患者の臨床的データを収集する。C4d を測定する採血を行った時点での心停止からの時間、心拍再開の有無、vital sign、血液検査データ、血液ガスデータを収集する。また、予後不良の場合は心拍再開から死亡までの時間を記録する。また、各実験日による誤差を補正する目的で参加に同意を得た健康成人の採血を行い、同様の手法で健康成人

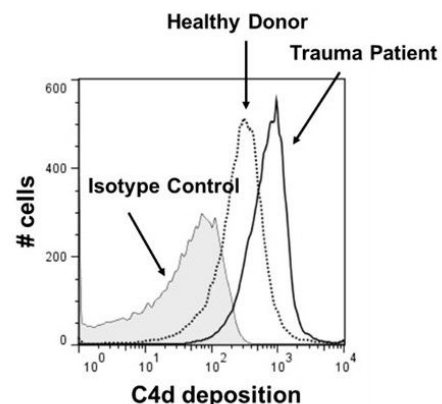


図1 赤血球表面のC4d沈着のヒストグラムの一例

赤血球上の C4d を測定した。

4. 研究成果

対象患者心停止全 13 名を表 1 に示す。平均年齢は 79 歳、男性は 5 名(38%)であった。全例心肺蘇生を行われている症例で、心停止から採血までの平均時間は 37 分であった。一時的にでも心拍再開の得られた症例は 8 例あったが心拍再開群の方が C4d の沈着量が多いという傾向は得られなかった。また、心停止の原因となった疾患は急性心不全（急性心筋梗塞、心不全）3 例、大動脈解離 2 例、呼吸不全（肺炎、低酸素血症）3 名などが認められたが、疾患別での C4d の沈着量の差は見られなかった。発症から受診（採血）までの時間が長い方が C4d の沈着が多いと予想されたが傾向は見られなかった。

予後に関しては 13 例中、1 例のみが長期生存例であったが、症例数が少ないこともあり比較はできなかった。

表 1 心停止全 13 例の背景

年齢 (歳)	性別	発症～採血 (分)	心拍 再開	採血タイミング	心停止の 原因	WBC(/m m)	CRP(mg/dl)	C4d MFI	28 日予 後
46	女	32	あり	再開前採血	急性心筋梗塞	17300	0.18	20.4	死亡
54	女	37	あり	再開後採血	低酸素血症	21900	1.243	120	生存
76	男	38	なし	-	不明	16000	9.157	64.4	死亡
77	男	46	なし	-	不明	4100	0.249	39.8	死亡
77	男	27	あり	再開前採血	クモ膜下出血	6000	0.123	13.7	死亡
83	男	20	あり	再開前採血	急性心不全	9600	4.568	39.3	死亡
85	女	49	あり	再開後採血	肺炎	22700	23.307	20.3	死亡
86	男	37	なし	-	溺水	6900	0.93	20.1	死亡
87	女	40	あり	再開前採血	低体温症	13700	3.346	86.3	死亡
87	女	34	なし	-	急性大動脈解離	8200	0.046	17.8	死亡
88	女	60	なし	-	急性大動脈解離	-	1.093	27.3	死亡
88	女	27	あり	再開前採血	肺炎	-	20.457	30.1	死亡
89	女	33	あり	再開後採血	急性心筋梗塞	4600	2.413	35.2	死亡

MFI : mean fluorescence index

次いで研究期間内に心肺停止と他疾患との比較を行った。

全 72 症例の背景を表 2 に示す。

年齢の中央値は 74 歳で男性は 39 名 (54%) であった。搬送された疾患としては OHCA(院外心停止)が最も多く 13 例、脳出血 12 例、感染症 (敗血症) 10 名、外傷 9 名などであった。平均の APACHE score は 19 で SOFA score は 4.5 であった。

表 2 研究期間内の測定全例の背景

n=72	
Age, median(±SE),y	73.5(±1.9)
Sex, male, n(%)	39(54)
Disease	
OHCA	13
intracerebral bleeding	12
infection	10
trauma	9
others	22

APACHEII score, mean(\pm SD)	19(\pm 18)
SOFA score, mean(\pm SD)	4.5(\pm 4.5)

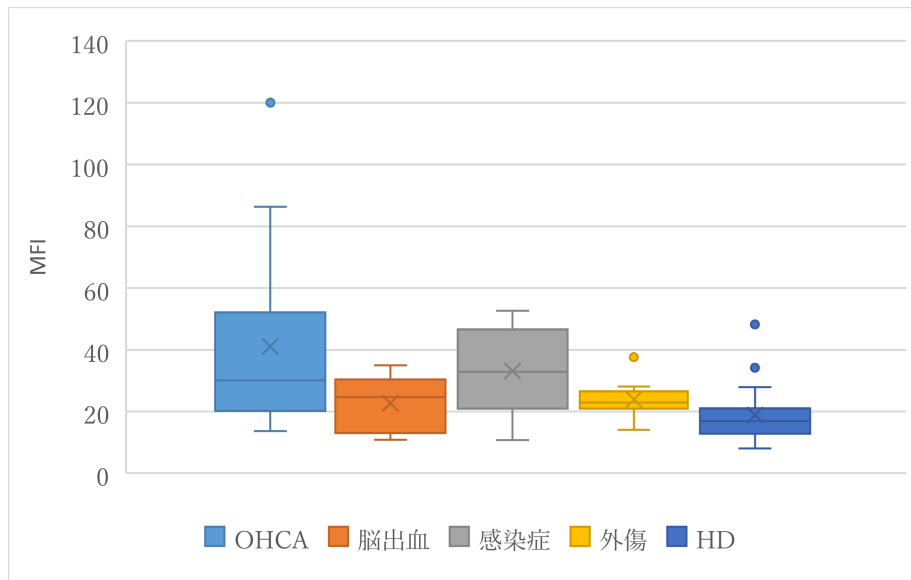
OHCA: out of hospital cardiac arrest

APACHEII: acute physiology and chronic health evaluation II

SOFA: sequential organ failure assessment

各研究の中でボランティアによる健康成人の赤血球を同様の研究方法で調べ、記録している。各疾患群と研究期間全体で測定した健康成人の補体沈着を比較検討した。結果を図2に示す。この中で心停止と感染症患者において健康成人に比べて有意に補体成分の沈着が見られる($p < 0.05$)ことが確認された。他の脳出血、外傷なども差がある傾向にあったが、多群比較検討では先に挙げた2者に統計学的に差が見られる結果となった。その他も統計学的に差は得られないものの中央値そのものは健康成人に比べて高い傾向がみられた。

図2 各疾患別の補体沈着量の比較



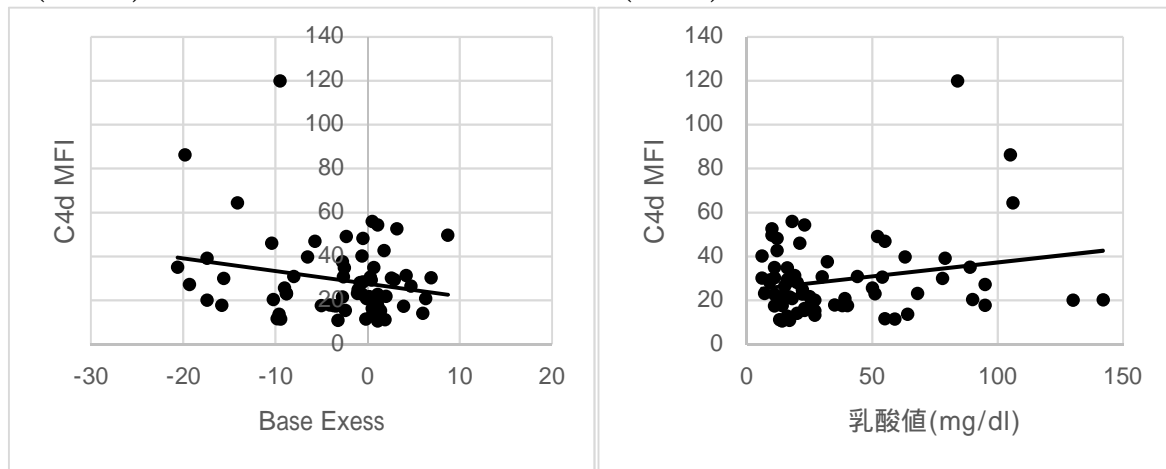
MFI : mean fluorescence index, OHCA : out hospital cardiac arrest, HD : healthy donor

続いて、検体全体で測定されたC4dの沈着量と各検査データ、臨床データとの比較検討を行った。図3は測定されたBase Excess、乳酸値との散布図を示す。その他、白血球数などと極めて弱い相関がみられる結果となった。一方、上昇に時間のかかるCRPにたいしては全く相関が得られなかった。

図3 補体沈着とBase Excess、乳酸値との関係

($r = -0.22$)

($r = 0.22$)



MFI : mean fluorescence index

考察

心停止は循環停止に伴う組織低酸素が生じる最も極端な病態であり、全身性に起こるため組

織障害の量は局所の障害に比べて飛びぬけて大きいと予想される。本研究では補体の活性化を見ることでその障害の大きさを定量化することを目的とし、心停止の症例群では健康成人に比べて赤血球上の補体沈着が多く、心停止により補体が活性化していることが明らかとなった。補体の活性化に着目して考えた場合、個々には異常高値の症例があり全体として他疾患に比べて補体の沈着が高度である傾向は認められたが、有意な差はあるものの他疾患に比べて突出して沈着量が多いという結果ではなかった。理由の一つは時間経過の問題が考えられる。発症から重症化まである程度時間が経過していることが予想される感染症などでは来院時に補体の活性化が十分に起きていることが予想される。心停止の場合、組織障害が進行し、低酸素状態が全身に発症するであろうが、発症からの時間経過は感染症に比べて短いことが予想される。組織障害の程度を反映するには時間経過が足りなかった可能性がある心停止は病院に到着する症例においては心停止発症から何時間もたっている状態で来院することはない。心停止発症から来院が補体の全身性活性化を十分に起こす前に測定されていることが考えられる。本研究の発症から採血までの平均時間は約 37 分であった。

さらに循環が停止している状況では補体の活性化が起きたとしてもそれを全身の活性化、全体の赤血球上の補体沈着とみるには十分な循環が得られていないということも考えられる。直接的、物理的な組織障害を伴う外傷や、他の内因性疾患は組織障害が発生してから循環が保たれている状態で来院となるが、心停止の場合、循環そのものが停止しているために全身の補体の活性化を採血の一部で測定することができなかった可能性がある。表 1 の中にも心拍再開後に検査用の採血を行った症例もあるが、残念ながらこの可能性を裏付ける結果は得られていない。また、心停止に至るまでの状態、すなわち低酸素、敗血症などから引き起こされた心停止であるかあるいは心疾患などで急激に循環が停止したからでそれまでの補体の活性化に影響を受ける可能性がある。

補体の沈着量と BE、乳酸値、白血球数などと弱いながらも相関の傾向があることは着目に値する。これらの検査値は急性期に大きく変化するもので補体の沈着が急性期の変化に関与している可能性を示すものである。逆に、発症時でなく、半日から翌日に上昇する CRP とは補体の沈着量と相関がみられないことも上記の可能性を裏付けるものと考えられる。本検討の疾患群に必ずしも発症時に来院していないと思われる症例も含まれるが今後の検討が望まれる。

本研究の Limitation として来院例の全症例を検討できていない。つまり赤血球は保存がきかないため、48 時間程度までの冷蔵保存で対応する必要がある。本研究は毎日行えるものではなかったため症例数に限りが出たことである。また、補体 C4d は C4b の一部であり C4b の活性化を見ていることになるが、赤血球上に沈着した場合、離開せず、赤血球の寿命まで残存するとされている。つまり、来院患者の C4d が過去数週に起こった炎症を見ている可能性がある。一部急性期の補体沈着のみを反映していないデータが混ざっている可能性が否定できない。

今後は本研究内容を他の疾患群の詳細なデータとともに検体数を増やし、急性期の重症度との関係を見ていく必要がある。

結語

心肺停止患者の赤血球表面上には健康成人に比して有意に補体が沈着していることから心停止時に補体の活性化が起きており、その沈着量は心停止の侵襲の一部を反映していることが推測される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 室谷 卓
2. 発表標題 救命センター来院患者の赤血球への補体沈着
3. 学会等名 第46回日本救急医学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 室谷 卓
2. 発表標題 赤血球補体成分と炎症の初期反応
3. 学会等名 第45回日本救急医学会総会・学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 室谷 卓
2. 発表標題 赤血球表面上の補体沈着
3. 学会等名 第47回日本救急医学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	鎌方 安行 (KUWAGATA Yasuyuki) (50273678)	関西医科大学・医学部・教授 (34417)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	池側 均 (IKEGAWA Hitoshi) (80379198)	関西医科大学・医学部・准教授 (34417)	