

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：32620

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670766

研究課題名(和文) 気道熱傷重症度評価の新たなバイオマーカーの開発

研究課題名(英文) Novel biomarker to reflect the severity of inhalation burn

研究代表者

井上 貴昭 (INOUE, YOSHIKI)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：60379196

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：気道熱傷は閉鎖空間における火災負傷時にしばしば受傷し、熱傷の予後を左右する重要病態である。従来気道熱傷の重症度評価は侵襲的検査である気管支ファイバーに依存するところが大きく、熱傷面積や組織における熱傷深度などの体表面の熱傷の重症度と比較して、重症度評価は困難であった。本研究では気道熱傷の重症度を評価する各種バイオマーカーに注目した。IL-6、白血球流動性、ATPは初期の気道熱傷の重症度と密接に関連し、その他酸化ストレス、Endotoxin Activity AssayやPresepsinなどは気道熱傷の亜急性期における敗血症を合併した際に遅発性に上昇した。

研究成果の概要(英文)：Inhalation burn is one of the major problem to influence the prognosis for the casualties of burn. Although bronchial fiberoscopy has been gold standard to evaluate the severity of the inhalation burn, this examination impose patients major invasion. Therefore novel biomarker to evaluate the severity of inhalation burn would be necessary. In this study, we measured and evaluated various biomarkers for the patients with inhalation burn. IL-6 and ATP had close correlation of the severity of early phase of inhalation burn, and oxidative stress and Endotoxin Activity Assay were elevated in late complicated with sepsis.

研究分野：救急医学

キーワード：気道熱傷 バイオマーカー IL-6 酸化ストレス 白血球レオロジー

1. 研究開始当初の背景

総務省消防庁の発表によると 2011 年の全国総出火件数は約5万件であり、年間1000人を超える死者が出ている。火災による死因の第1位は一酸化炭素中毒であり、続いて広範囲熱傷が位置づけられるが、気道熱傷は生命予後を左右する重要な熱傷である。気道熱傷は、特に火災現場などの閉鎖空間において、熱された粉塵やヒューム、高温の水蒸気や煙などを吸入することにより、声門から気道において気道粘膜に熱傷を来すものである。気道熱傷は、急性期は声門浮腫による進行性の上気道閉塞を来すほか、下気道型では気道粘膜の発赤、浮腫、硝子膜形成などにより進行性の酸素化障害を来す。一酸化炭素中毒では血中一酸化炭素ヘモグロビン値、広範囲熱傷では年齢、受傷面積、熱傷深度など、定量評価可能な指標により重症度評価が可能であるが、**気道熱傷の重症度に有効なのは気管支ファイバー所見のみであり、急性期より気管挿管を前提とする侵襲的検査にその重症度評価を委ねざるを得ないのが現状**である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、気道熱傷によって生じた PMN 機能発現の trigger となる ATP や adenosine、及び PMN 機能を反映する様々な臨床的バイオマーカーを測定し、低侵襲的に気道熱傷の重症度評価における有効性を明らかにすることである。今回の研究では特に、白血球レオロジー(白血球変形能及び粘着能)、oxidative stress(過剰酸素産生能)、また近年敗血症のバイオマーカーとして注目され、PMN 貪食能を反映する Endotoxin Activity Assay (EAA)を用いて評価することと、好中球遊走機能発現指標となる、ATP 及び adenosine について、気道熱傷の重症度評価を反映するバイオマーカーとしての有用性を明らかにすることである。

3. 研究の方法

気道熱傷症例を含む熱傷を受傷した症例を対象とした。(15歳未満小児例を除く。)対象症例について来院時に全血採血(EDTA加スプツ2mL+Heparin加スプツ5mL)を実施し、活性酸素・フリーラジカル自動分析装置(FRAS4^R; WismarII Inc., 東京)、EAA測定装置(東レ・メディカル、東京)、Presepsin測定装置(Path-FAST^R LCIメディアエンス、東京)、IL-6測定装置(RAY-FAST^R 東レ・メディカル、東京)、血球流動性測定装置(MCFAN^R; MC Healthcare Inc., 東京)、の各専用測定装置を用いて測定した。またELISAを用いた簡易キットにより、熱傷症例については、経日的に測定した。MCFANによる定量評価は既研究と同様にチャンネル通過時間を用いた(Inoue et al. J. Trauma 2006)。加えてフローサイトメトリーを用いて、ミトコンド

各種バイオマーカーの測定

◆ Free Radical Analytical System (FRAS4)



化学物質に対する酸化力、還元力を比色にて酸化ストレス (dROM*)、抗酸化能 (BAP**) として定量評価。

◆ Endotoxin Activity Assay (EAA)



Zymosanにて活性化された好中球による過剰酸素産生能から全血中のLPSを測定。

◆ Path-FAST



Presepsin; 好中球貪食能を反映する Soluble CD14 subtypeを測定。

◆ RAY-FAST



生体侵襲超急性期の侵襲評価としてのIL-6を測定。

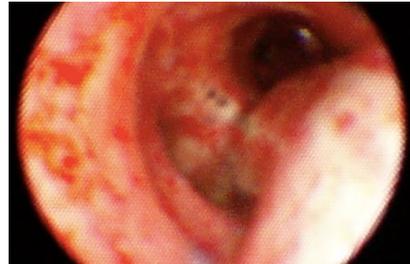
*dROM: Reactive Oxygen Metabolites
**BAP: Biological Anti-oxidant Potential

リアATPの専用特異抗体を用いて、熱傷患者におけるATP発現率を求め、fmip刺激に帯する反応性を健常ボランティア7名と比較した。

4. 研究成果

(1) 対象症例

研究期間中に、当院に搬送された重症熱傷は、10例であった。平均年齢67±7歳、Burn Index26±30であり、死亡例は4例(気道熱傷合併例3例、非合併例1例)であった。

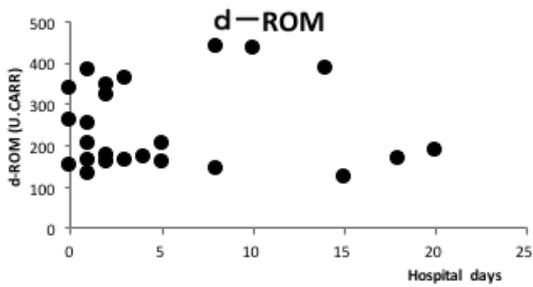
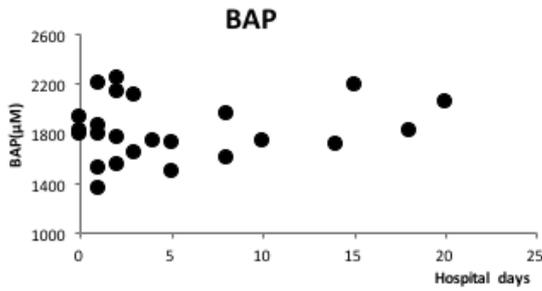


(2) 各種バイオマーカーの経日的変化

a. Oxidative stress

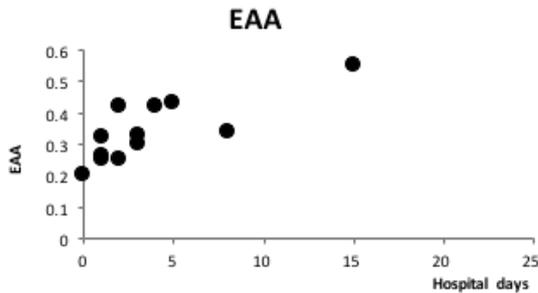
Oxidative stressを反映するdROM(reactive oxygen metabolite)及びBAP(biological anti-oxidant potential)について、全例の経日的変化を示す。

初期のばらつきが大きく、熱傷重症度との関連性を評価するには困難である。またこれまでの研究結果と同様、敗血症の合併によりBAPの上昇とdROMの低下をきたすことから、合併する感染の評価指標となる可能性がある。



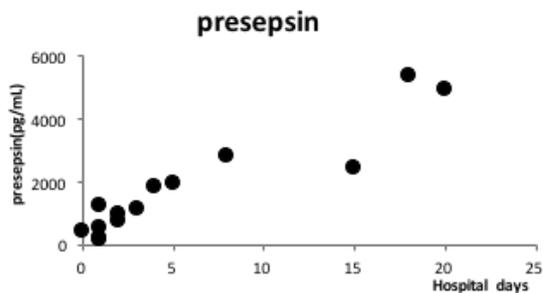
b. EAA

好中球の活性酸素産生能を反映する EAA は、初期は低値の症例がほとんどであり、経日的に増加する傾向を認める。従って初期の重症度評価よりも、病日の進行に伴う敗血症の病勢を示すものと考えられる。



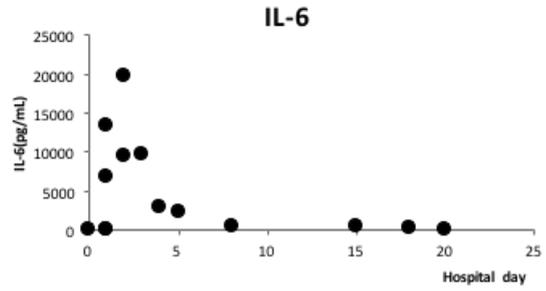
c. Presepsin

好中球の貪食能を反映する Presepsin は、初期は低値の症例がほとんどであり、経日的に増加した。合併する敗血症の病勢を示すと考えられる。



d. IL-6

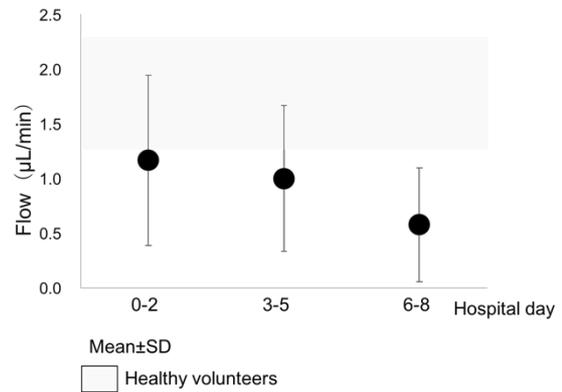
炎症性サイトカインの一つである IL-6 を示す。IL-6 は受傷直後が最大値を示し、以降は減衰している。受傷直後の initial impact を反映するものと考えられる。



e. 白血球変形能

100 μ L の全血を白血球流動性観察装置 (MCFAN) に流し、マイクロスリットの通過性を流速として評価し、白血球 Rheology として白血球変形能を定量評価した。

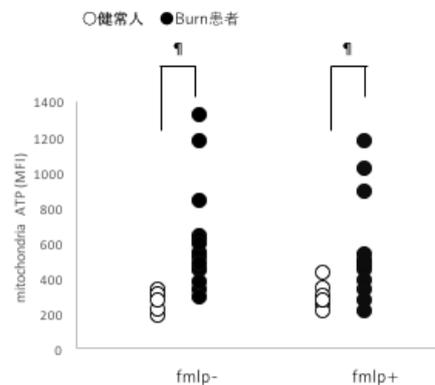
熱傷患者において第 0-2 病日、3-5 病日、6-8 病日として観察すると、経日的に流動性が増悪しており、受傷直後よりも数日~1 週間に低下していた。

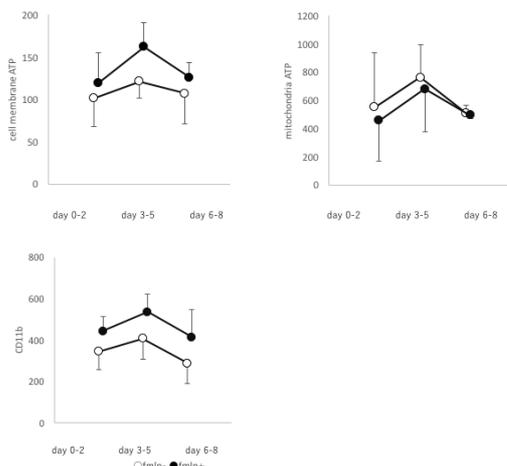
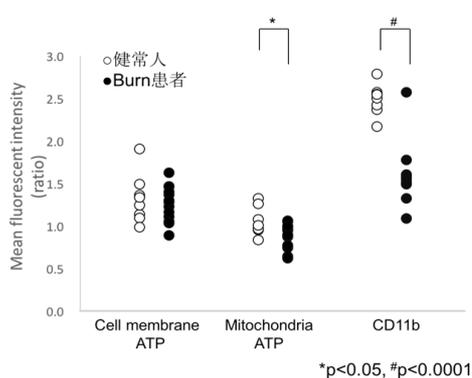


f. ATP 発現率

炎症反応発現においてその trigger であり、かつ組織侵襲の評価ともなる damage associated molecular patterns (DAMPs) の一種である ATP 活性について健常ボランティア 7 名と fmlp 刺激による反応性を評価した。fmlp 刺激前及び刺激後の状態では、ミトコンドリア ATP 活性は、健常人に比較して有意な上昇を認めた ($\dagger p < 0.01$)。

一方、fmlp に対する反応性は熱傷患者で有意に抑制されていた。経日的変化では、受傷日より 3-5 日目にピークを示した。





【考察】

熱傷は、初期は組織破壊に伴う生体侵襲が、また慢性期は創部感染に代表される敗血症に伴う生体侵襲が明らかとなる。従って受傷初期はいわゆる DAMPs が、慢性期は合併する敗血症に伴う PAMPs (pathogen associated molecular patterns) がその病勢を評価する biomarker と考えられる。特に気道熱傷以外に熱傷創を受傷していない症例においては、従来は侵襲的検査法である気管支ファイバースコープによって粘膜損傷程度を評価し、軽症～重症と評価していた。本研究では、救急領域のバイオマーカーとして、求められる特徴である、簡便性、迅速性、再現性、を満たす各種バイオマーカーを測定し、気道熱傷急性期に最も有効なバイオマーカーの開発を目標として実施された。単施設研究のため、重症気道熱傷症例数が十分ではないが、気道熱傷を合併する熱傷症例に対して、近年救急医学領域で注目される各種バイオマーカーの有用性を評価できたと考えられる。

用いたバイオマーカーは、酸化ストレス (BAP/ dROM)、EAA (活性酸素産生能)、Presepsin (好中球貪食能)、炎症性サイトカイン IL-6 産生能、白血球流動性 (白血球変形能～粘着能)、及び ATP を評価した。ATP については、DAMPs の一つとして、また炎症反応の trigger として測定した。

得られた結果として、酸化ストレス (dROM)・抗酸化物質 (BAP)、EAA、Presepsin、

は受傷直後より、亜急性期に上昇する傾向があり、むしろ敗血症の病態を反映した。IL-6 のみ初期に上昇しており、気道熱傷重症度の指標となる可能性が示唆された。また白血球レオロジーは、受傷直後から健常人と比較して、著明に流速が低下しているが、受傷直後よりも比較的急性期数日後に低下が著しく、熱傷侵襲に加えて循環・呼吸、及び血液凝固障害などの急性期侵襲を反映していると考えられた。また、ミトコンドリア内 ATP は、over roll で検討すると、熱傷患者では健常人と比較して、fmlp 刺激前も fmlp 刺激後も、有意な上昇が認められ、熱傷侵襲を反映すると思われる。しかしながら、ピーク値は day3-5 にあり、IL-6 の変化よりやや遅れることがわかった。

気道熱傷は、上気道型に代表される初期の気道狭窄が注目されがちではあるが、重症例では下気道に損傷が及び、体表面積の広い細気管支～肺胞レベルに広範なダメージを来たして、熱傷患者の予後を左右する。体表の熱傷と異なり、面積や熱傷深度で評価困難なこともあるため、本研究で明らかにされた IL-6 や白血球変形能、及び ATP 活性などを参考に、慎重な集中治療期間及び入院期間決定の指標とするべきである。特に低酸素血症が著しく、気管支ファイバーの実施が限定される症例においては、これら各種バイオマーカーの併用が望ましい。また Presepsin、酸化ストレス、EAA などは経時的な上昇、ないし再上昇を来す際は敗血症ととらえて早急な対応を要する。

本研究の limitation として、単一施設において重症熱傷、しかも重症熱傷は症例数が集まりづらく、症例が限定されることがまず挙げられる。今後多施設共同研究による解析を要する。加えて、本研究で用いた各種バイオマーカーは、現在救急医学領域では比較的普及しつつあるものではあるが、必ずしもどの施設でも計測可能ではなく、簡便性、迅速性、再現性に富む一方で、経済性については保険認可の観点からも問題を有する。更には、本研究でも気管支ファイバー所見との比較を十分検討し得なかったが、元々気管支ファイバースコープ所見が定性的であり、術者にも左右されることから定量的バイオマーカーとの関連性の解析には更なる検討を要すると思われる。

【結語】

気道熱傷の重症度を評価するバイオマーカーとして、初期には IL-6、白血球レオロジー、及び血清 ATP 活性が有用であった。Presepsin や酸化ストレス、EAA などは熱傷初期には低値を示し、上昇時は気道感染を含む敗血症の指標となる。

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)

[雑誌論文](計8件)

1. 井上 貴昭,石川 浩平,福本 祐一,滝
沢 聡,石原 唯史,杉中 宏司,末吉 孝
一郎,西山 和孝,大出 靖将,角 由佳,
松田 繁,岡本 健,田中 裕: ABLIS 20
10 輸液療法の変更点を見直す 熱傷 40:
26-35, 2014.
2. 井上 貴昭,中沢 武司,麻生 恭代,成
田 久美,秋田 美佳,中村 美子,石井
幸,佐々木 信一,田中 裕: 多職種 ICT
ラウンドがもたらす効果について. 日本臨
床救急医学会雑誌 17: 25-31, 2014.
3. 井上 貴昭,西山 和孝,末吉 孝一郎,
林 伸洋,大出 靖将,角 由佳,岡本 健,
田中 裕: 熱傷に関する教育カリキュラ
ムを見直す-現行の教育方針と実臨床の乖
離. 熱傷 40: 15-23, 2014.
4. Sumi Y, Woehrl T, Chen Y, Bao Y, Li X,
Yao Y, Inoue Y, Tanaka H, Junger WG:
Plasma ATP is required for neutrophil
activation in a mouse sepsis model.
Shock 42: 142-147, 2014.
5. Suginaka H, Okamoto K, Hirano Y,
Fukumoto Y, Morikawa M, Oode Y, Sumi Y,
Inoue Y, Matsuda S, Tanaka H: Hospital
disaster response using business impact
analysis. Prehospital and Disaster
Medicine 29: 561-568, 2014.
6. Morikawa M, Inoue Y, Sumi Y, Kuroda Y,
Tanaka H: Leukocyte deformability is a
novel biomarker to reflect
sepsis-induced disseminated
intravascular coagulation. Acute
Medicine and Surg 2: 13-20, 2015.
7. Ohara K, Inoue Y, Sumi Y, Morikawa M,
Matsuda M, Okamoto K, Tanaka H:
Oxidative stress and heart rate
variability in patients with vertigo.
Acute Medicine and Surg 2:163-168, 2015
8. Fukumoto Y, Inoue Y, Suginaka H, Hayashi
N, Sumi Y, Matsuda S, Okamoto K, Tanaka
H: Application to the triage of a blood
lactate level. Acute Medicine and
Surgery, 2015 (in press).

[学会発表](計6件)

1. Y.Inoue. Novel biomarker to reflect
oxidative stress for the patients with
sepsis. 第8回アジア救急医学会
(ACEM2015)
2. 井上 貴昭,西山 和孝,末吉 孝一郎,角
由佳,松田 繁,岡本 健,田中 裕: 敗
血症診療における oxidative stress と
biomarker. 第42回日本集中治療医学会,
東京, 2015.
3. 井上 貴昭,西山 和孝,角 由佳,岡本

健、田中 裕: 熱傷における DIC. 第 41
回日本熱傷学会総会, 愛知, 2015.

4. 井上 貴昭,森川 美樹,角 由佳,田中
裕: 敗血症性 DIC 症例に対する白血球レ
オロジンの有用性. 第1回血液流動学学会,
東京, 2014.
5. 井上貴昭,西山 和孝,末吉 孝一郎,角
由佳,田中 裕,林 伸洋,大出 靖将,
岡本 健: ABLIS2010 輸液療法ガイドライン
をふまえ,これまでの輸液療法を見直す.
第39回日本熱傷学会, 沖縄, 2013.
6. 井上 貴昭,福本 祐一,石川 浩平,杉
中 宏司,末吉 孝一郎,西山 和孝,角
由佳,竹内 悠二,林 伸洋,大出 靖将,
岡本 健,田中 裕: 外傷患者に対する生
体侵襲評価のための新たな biomarker の
開発. 第27回日本外傷学会,福岡,2013.

[図書](計3件)

1. 井上 貴昭: 広範囲熱傷の治療・熱傷治
療におけるチーム医療. 熱傷治療マニユ
アル改訂第2版(田中 裕編), 中外医学社,
p78-83, 2013.
2. 井上 貴昭: 熱傷の病態と全身管理・血
液凝固異常と血栓塞栓症. 熱傷治療ガイ
ド 2014(池田 弘人編), へるす出版,
p1219-1224, 2014.
3. 井上 貴昭,角 由佳,田中 裕: 高張
塩化ナトリウム輸液. 救急医学 37:
1685-1691, 2013.

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

井上 貴昭 (INOUE YOSHIKI)
筑波大学・医学部・教授
研究者番号: 60739

(2)角 由佳 (SUMI YUKA)

順天堂大学・医学部・教授
研究者番号: 40403084

(3)西山 和孝 (NISHIYAMA KAZUTAKA)

順天堂大学・医学部・助手
研究者番号: 80648296

(4)田中 裕 (TANAKA HIROAHI)

順天堂大学・医学部・教授
研究者番号: 01234567