

令和元年6月12日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11400

研究課題名(和文)新しい敗血症診断システムの開発

研究課題名(英文)The investigation of new diagnosis system for sepsis

研究代表者

北村 直美 (Kitamura, Naomi)

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：30572474

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：従来のエンドトキシン測定法では、臨床的意義のあるエンドトキシンの測定は行われておらず、新しい測定法の普及が急務であった。本研究課題により、後方散乱法によるポータブルプロトタイプが完成した。この開発過程で『ゲル粒子測定方法及びその装置』に関する特許を取得することができた(特許第6373486号)。ポータブルプロトタイプの基本的性能が明らかになり、自動解析プログラムや前処理薬の条件など判明した。量産型機器の開発のための基本的データを本研究により蓄積できた。新しく開発されたポータブルプロトタイプにてさまざまな敗血症患者でのエンドトキシンを測定して臨床状態と評価を行うことも可能であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来のエンドトキシン測定法では、臨床的意義のあるエンドトキシンの測定は行われておらず、新しい測定法の普及が急務であった。本研究課題で完成した後方散乱法によるポータブルプロトタイプが完成臨床現場で利用できる新しい敗血症診断システムを実用化できる可能性が示唆された。後方散乱測光型ESP測定は、病原因子の評価を行う敗血症診断システムとして用いられるのみならず、微量のエンドトキシンを測定することができることから慢性疾患への応用も期待でき、臨床的価値も高いと考えられる臨床的に非常に意義のある研究であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We could not properly evaluate plasma endotoxin levels in septic patients using ordinal endotoxin measurement method. We have to establish new strategy to evaluate endotoxin for septic patients. The portable type prototype using posterior scattering photometry method, so called posterior Endotoxin Scattering Photometry (ESP), was completed in this investigation. We obtained Japanese patent for this development (Japanese patent number: 6373486). The basic performance was clarified in this study. We confirmed the basic program for automatic analysis and condition of reaction for pretreatment method in this study. These findings will provide basic data for development of production model. We were able to evaluate endotoxin levels in various clinical condition of patients with sepsis using the portable type prototype.

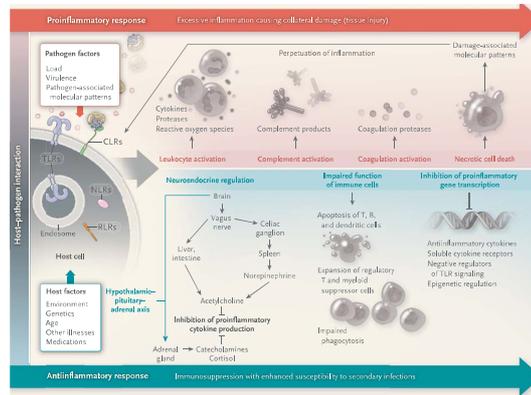
研究分野：外科・救急集中治療医学

キーワード：エンドトキシン 敗血症 敗血症性ショック Sepsis Septic shock 迅速診断

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

敗血症の病態は、感染が発生した際に病原因子と宿主因子が相互に作用しあうことにより生じている(右図、N Engl J Med 2013;369:840)。宿主の過剰な反応や炎症反応に伴う免疫抑制による多臓器障害や感染の遷延が生じると宿主の恒常性が保たれなくなり死に至ると考えられている。敗血症の診断・重症度評価のために様々なバイオマーカーが検討されてきた。この中で、本邦で保険適応であるバイオマーカーとしてはプロカルシトニン(PCT)、プレセプシン(sCD14)、C反応蛋白(CRP)などがあるがいずれも感染に対する生体反応を検出しており、病原因子を検出する何らかの検査を合わせて敗血症の評価を行う必要がある。



病原因子を検出する方法は培養検査が Gold standard であるが検出率は低いことが問題である。病原体関連分子パターン(Pathogen-associated molecular patterns PAMPs)を検出する検査の一つとしてリムルス検査がある。これは、グラム陰性菌の細胞壁成分であるエンドトキシンを検出する方法で 1970 年代より用いられてきた。エンドトキシンは敗血症性ショックおよび多臓器障害の病態形成に重要な役割を果たすと考えられている。しかし、現在国内で保険適応である臨床診断法は測定感度が低く、敗血症性ショックを呈する患者であっても測定できない場合にしばしば遭遇する。

従来用いられてきたリムルス試薬を応用した新しい測定法として Endotoxin Scattering Photometry (ESP)が開発された(Anal Biochem 2008;373:281)。ESPでは従来法より高感度で迅速に血中エンドトキシンの測定が可能となった。我々の研究では、敗血症患者の重症度に応じてエンドトキシン値が上昇することが観察された。(右上図)(Shock 2013;40:504)。

さらに、サブグループ解析では、培養陰性およびグラム陽性菌陽性であっても Septic shock を来すような症例では ESP で測定したエンドトキシンは有意に高値を示していた。これらの結果から、ESP は、これまで測定できていなかった微量エンドトキシンを測定でき、敗血症の重症度と関連していることが示唆された(基盤研究 C 23591863:平成 23~25 年度)。

以上より、ESP の測定原理は、現在臨床で用いられているエンドトキシン測定システムより非常に有用であるので、汎用機器の開発・普及が今後の急務と考えられる。

これまで研究で用いてきたレーザー散乱測光器は、市販の血小板凝集能測定装置を改変したものであった。血小板凝集能測定装置では側方散乱法が使用されている。その後、前方散乱法の器機を開発したが、溶媒内での多重散乱の影響により低糖度域の測定に問題があることが判明した。

我々の事前検討で、後方散乱法による ESP 測定は、溶媒への散乱光吸収が少なく、発生初期の粒子が検出し易いことから、前方散乱法より効率的かつ迅速に測定できることが判明している。

本研究では、後方散乱法を測定原理に用いたポータブルプロトタイプを開発し、その基本的性能の確認と最適なりムルス試薬の反応条件について探索し、量産型機器の開発の際の基本条件の検討を行う。

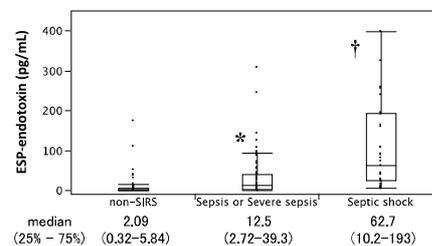
2. 研究の目的

敗血症の新しいエンドトキシン測定方法として ESP が開発され、従来法より高感度・迅速にエンドトキシンの測定が可能となり、敗血症患者の重症度評価を行える可能性が明らかとなった。本研究では、新しい敗血症診断システムとして ESP にさらに最適化された後方散乱法を用いたポータブルプロトタイプを開発し、その基本的性能の確認と最適なりムルス試薬の反応条件について探索し、量産型機器の開発の際の基本条件の検討を行う。さらに、ポータブルプロトタイプでさまざまな検体でエンドトキシン測定能を行い敗血症診断システムとしての性能を評価することを目的としている。

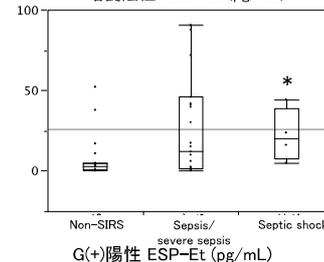
3. 研究の方法

【研究 1: 新しい後方散乱法を測定に用いた ESP のポータブルプロトタイプ開発と評価】

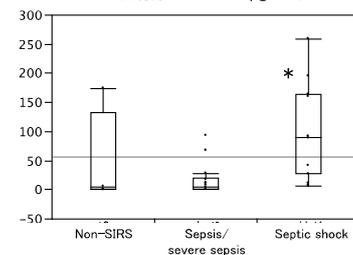
敗血症患者全体



培養陰性 ESP-Et (pg/mL)



G(+陽性) ESP-Et (pg/mL)



ポータブルプロトタイプでの ESP に最適化された反応条件を検討し、この機器の基本的性能を検証する。次の量産型機器の仕様を確定するために、エンドトキシン測定装置としての基本的な性能が満たされているか検討をする。

(方法)

- 1) 水系試料にてエンドトキシン測定を行い、ポータブルプロトタイプでの試薬の反応条件などを検討する。初期の ESP 測定機器の性能比較を行う。
- 2) 血漿系試料にてエンドトキシン測定を行い、ポータブルプロトタイプでの試薬の反応条件などを検討する。前項と同様に、初期の ESP 測定機器および現在臨床で使用可能な比濁時間分析法との性能比較を行う。

【研究 2：ポータブルプロトタイプにより臨床検体での評価】

新しく開発されたポータブルプロトタイプにてさまざまな敗血症患者でのエンドトキシンを測定して臨床状態と評価を行う。現在、宿主因子の評価法として本邦で保険適応として認められているプロカルシトニン (PCT) やプレセプシン (sCD14)、病原因子の評価方法として米国食品衛生局 (FDA) でエンドトキシン測定法として認められている Endotoxin Activity Assay (EEA) と比較検討することにより敗血症診断システムとしての可能性を評価する。

(方法)

外来・入院診療を行う患者で敗血症を呈する患者 (目標症例数：敗血症患者 100 名およびコントロールとしての健常者ボランティア 10 名) の臨床検体の収集を行い、凍結保存を行う。研究 1 でポータブルプロトタイプでの試薬の反応条件が整ってからエンドトキシンの測定を行う。

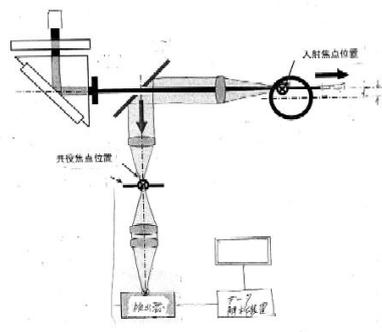
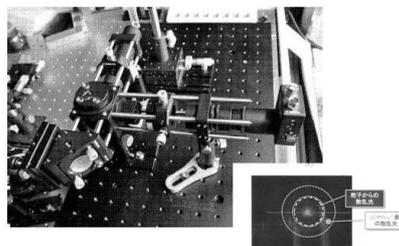
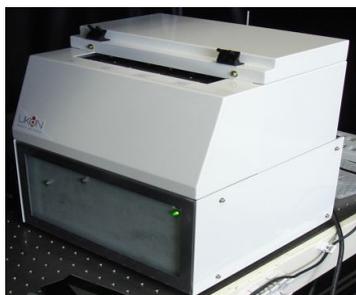
4. 研究成果

【研究 1：新しい後方散乱法を測定に用いた ESP のポータブルプロトタイプ開発と評価】

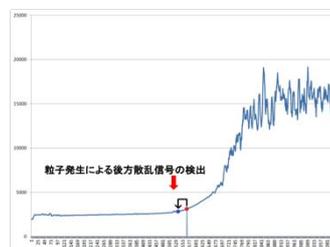
ポータブルプロトタイプでの ESP に最適化された反応条件を検討しこの機器の基本的性能を検証する。

平成 28 年前半に、基本となる原理確認用の基盤装置 (右図) を用いて後方散乱 ESP 法の反応性について確認した。その結果、後方散乱光検出型 ESP 法を前方散乱光検出型 ESP 法と比較して、迅速にエンドトキシンが検出できることを確認できた。後方散乱光の検出方法にも様々な工夫がされ (右下図)、分担研究者である小幡博士により特許出願が行われ、平成 30 年度には、『ゲル粒子測定方法及びその装置』に関する特許を取得した (特許 第 6373486 号)。

後方散乱 ESP 法のポータブルプロトタイプは、平成 28 年 12 月に完成した (下図)、4 チャンネル装備により 1 台で、2 試料二重同時測定的能力を持つ後方散乱光検出型 ESP 法測定装置である。

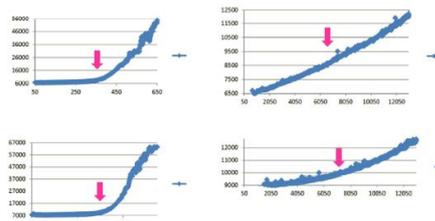


ESP法後方散乱信号の自動計測の測定例



既に、ポータブルプロトタイプの計測制御プログラムはほぼ完成しているが、エンドトキシン濃度を自動解析するプログラムの開発がまだであり、自動解析プログラムについても検討した。標準試料を反応させ、後方散乱光として検出した粒子の出現を検出した信号は、パソコンなどの記録装置に集積することを行っている。標準試料を反応させた際の粒子の出現状況は右図のようになる。

右のグラフの右上右下図は高濃度の場合であり変曲点が粒子の出現ポイントであることは、理解しやすい。しかし、左上下図のような低濃度での変曲点は、捕らえにくいのが現状である。解析プログラムの課題は、主として挟雑ノイズと微粒



子から得られる散乱光との区別を、いかに自動化で捉えられるかという点であった。

様々な濃度の極低濃度の標準エンドトキシンを用いた測定で、多数の粒子の出現曲線を検討して、典型的な検出パターンを検討し、反応時間を推定するプログラムを作成した。

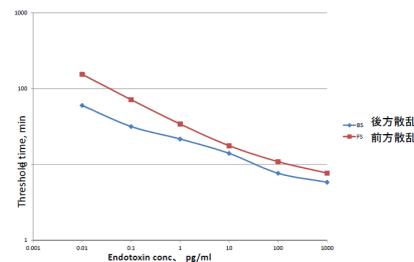
ポータブルプロトタイプで測定実験により得られたデータを対象に、人間の判定との違いを検証したところ、多くのデータで人間での判定に近い結果が得られた。今後、データを積み重ねて、プログラムのパラメーターをチューニングすることにより品質向上を図ることで、実用に耐えうるプログラムが開発できると結論された。量産化機器の開発の際には、今回の検討を応用する予定である。

1) 水系試料にてエンドトキシン測定

水系試料にてエンドトキシン測定を行い、既存の前方および側方散乱光を用いる ESP 法の測定装置より迅速にエンドトキシンを測定できることを確認した。

後方散乱 ESP 法に最適化された反応条件についても検討した。様々な物質について検討を行い、前処理薬の組成や反応系の濃度について検討を行い、水系の測定に最適化された前処理薬について一定の見解を得た。量産化機器の開発の際には、今回の検討を応用する予定である。

濃度 (pg/mL)	後方散乱 (分)	前方散乱 (分)	比濁時間分 析法(分)
1000	5.8	7.7	-
100	7.7	10.9	-
10	14.0	17.7	18.4
1	21.6	34.2	42.3
0.1	31.7	71.5	122.8
0.01	60.0	154.5	-



2) 血漿系での測定

血漿系の試料にてエンドトキシン測定を行い、ポータブルプロトタイプでの試薬の反応条件などの検討を行った。前項と同様に、様々な物質について前処理試薬の検討を行い、前処理薬の組成や反応系の濃度について検討を行い、血漿系での測定に最適化された前処理薬について一定の見解を得た。量産化機器の開発の際には、今回の検討を応用する予定である。

現在臨床で使用可能な比濁時間分析法では、エンドトキシンを測定出来ない臨床検体でも、ESP 法では、エンドトキシンが検出できることを確認した。

【研究 2：ポータブルプロトタイプにより臨床検体での評価】

新しく開発されたポータブルプロトタイプにてさまざまな敗血症患者でのエンドトキシンを測定して臨床状態と評価を行う。

国内の保険診療でこの敗血症診断試薬として測定可能なプロカルシトニン (PCT) やプレセプシン (sCD14)、病原因子の評価方法として米国食品衛生局 (FDA) でエンドトキシン測定法として認められている Endotoxin Activity Assay (EAA) と ESP の比較を行うこととした。

敗血症を示唆される臨床検体を 100 例集積して、ESP 法でエンドトキシンを測定し、ポータブルプロトタイプにて、側方散乱法や前方散乱法と同様に粒子の検出できることを確認している。同時に、PCT と sCD14、EAA についても評価を行った。今後、それらのデータの解析を行い、論文化を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

清水 智治, 三宅 亨, 北村 直美, 小幡 徹, 谷 眞至. 敗血症診断におけるエンドトキシンとプロカルシトニンの臨床的意義. 日本外科感染症学会雑誌 2017;42;101-110.

Shimizu T, Miyake T, Tani M. History and current status of polymyxin B-immobilized fiber column for treatment of severe sepsis and septic shock. Ann Gastroenterol Surg 2017;2;105-113.

Shimizu T, Miyake T, Kitamura N, Tani M, Endo Y. Endotoxin adsorption: Direct hemoperfusion with the polymyxin B-immobilized fiber column (PMX). Transfus Apher Sci. 2017;56:682-688.

清水 智治, 小幡 徹, 園田 寛道, 三宅 亨, 遠藤 善裕, 谷 徹, 谷 眞至. 潰瘍性大腸炎手術症例での ESP 法でのエンドトキシン推移の検討. エンドトキシン・自然免疫研究 第 20 巻 2017;20:22-24.

清水 智治, 小幡 徹, 園田 寛道, 三宅 亨, 植木 智之, 山口 剛, 飯田 洋也, 貝田 佐知子, 竹林 克士, 目片 英治, 遠藤 善裕, 谷 徹, 谷 眞至. 潰瘍性大腸炎における Endotoxin Activity Assay(EAA). エンドトキシン・自然免疫研究 第 21 巻 2018;21:26-29.

〔学会発表〕(計 12 件)

Tomoharu Shimizu, Hiromichi Sonoda, Hiroyuki Ohta, Tohru Miyake, Tomoyuki Ueki, Hiroshi Yamamoto, Hiroya Akabori, Eiji Mekata, Yoshihiro Endo, Masaji Tani. The clinical significance of procalcitonin and microbial factors following gastrointestinal

surgery. 第 71 回日本消化器外科学会総会, 2016
Tomoharu Shimizu, Toru Obata, Hiromichi Sonoda, Toru Miyake, Hiroya Akabori, Takahisa Tabata, Yutaka Eguchi, Yoshihiro Endo, Tohru Tani, Masaji Tani. Diagnostic potential of novel endotoxin detection method for sepsis and septic shock. The 8th Congress of the International Federation of Shock Societies (国際学会), 2016.
清水智治、園田寛道、三宅 亨、植木智之、吉岡豊一、北村直美、他. 大腸穿孔症例での急性血液浄化療法の役割. 第 27 回日本急性血液浄化学会学術集会 2016
清水智治、園田寛道、三宅 亨、植木智之、山口剛、貝田佐知子、他. 大腸穿孔の治療における SOFA スコアの意義と治療戦略. 第 29 回日本外科感染症学会総会学術集会, 2016
清水智治、園田寛道、三宅 亨、植木智之、生田大二、他. 潰瘍性大腸炎重症度の指標としての新しいエンドトキシン測定法の可能性. 第 71 回日本大腸肛門病学会学術集会, 2016
清水智治、園田寛道、三宅 亨、植木智之、北村直美、他. 大腸穿孔症例における予後予測因子の検討. 第 53 回日本腹部救急医学会総会, 2016
清水智治. 潰瘍性大腸炎における Endotoxin Activity Assay (EAA)の推移. 第 23 回 日本エンドトキシン・自然免疫研究会, 2017
清水 智治, 園田 寛道, 三宅 亨, 植木 智之, 森 治樹, 貝田 佐知子, 飯田 洋也, 北村 直美, 竹林 克士, 谷 眞至 .下部消化管穿孔による急性汎発性腹膜炎に対する予後指標と治療戦略 . 第 72 回 日本消化器外科学会総会 2017
清水 智治, 園田 寛道, 三宅 亨, 植木 智之, 山口 剛, 貝田 佐知子, 北村 直美, 飯田 洋也, 江口 豊, 遠藤 善裕, 谷 眞至 . 大腸穿孔症例での周術期血中 Lactate 値測定の意義 . 第 117 回 日本外科学会定期学術集会 . 2017
北村 直美, 飯田 洋也, 赤堀 浩也, 貝田 佐知子, 植木 智之, 三宅 亨, 園田 寛道, 山口 剛, 清水 智治, 仲 成幸, 谷 眞至, 田畑 貴久, 藤野 和典, 江口 豊 . 当院における急性胆嚢炎に対する治療の検討 . 日本外科学会定期学術集会 . 2017
北村直美, 谷 眞至, 清水 智治, 宮武 秀光, 藤井 恵美, 水野 隆芳, 今宿 康彦, 山根 哲信, 辻田 靖之, 江口 豊 . 癌患者に対する緊急手術の検討 , 日本救急医学会学術集会 2018 .
北村 直美, 前平 博充, 貝田 佐知子, 三宅 亨, 飯田 洋也, 山口 剛, 清水 智治, 田畑 貴久, 江口 豊, 谷 眞至 . 癌患者における緊急手術の特徴 . 第 55 回日本腹部救急医学会総会 2019 年 3 月

〔図書〕(計 1 件)

Tomoharu Shimizu, Masaji Tani, Yoshihiro Endo, Tohru Tani. Endotoxin adsorption: Direct hemoperfusion with a polymyxin B-immobilized fibers column (Toraymyxin). World Scientific.2017

〔産業財産権〕

○取得状況(計 1 件)

名称: ゲル粒子測定方法及びその装置
発明者: 小幡 徹、右近寿一郎
権利者: 株式会社プロジェクト K B F
種類: 特許
番号: 第 6373486 号
取得年: 2018
国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等 ; <http://www.shiga-med.ac.jp/~hqsurge1/pg216.html>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 江口 豊

ローマ字氏名: Eguchi Yutaka

所属研究機関名: 滋賀医科大学

部局名: 医学部

職名: 教授

研究者番号(8桁): 00263054

(2)研究分担者

研究分担者氏名: 谷 眞至

ローマ字氏名：Tani Masaji
所属研究機関名：滋賀医科大学
部局名：医学部
職名：教授
研究者番号(8桁)：60236677

(3)研究分担者
研究分担者氏名：清水 智治
ローマ字氏名：Shimizu Tomoharu
所属研究機関名：滋賀医科大学
部局名：医学部
職名：准教授
研究者番号(8桁)：70402708

(4) 研究分担者
研究協力者氏名：三宅 亨
ローマ字氏名：Miyake Toru
所属研究機関名：滋賀医科大学
部局名：医学部
職名：助教
研究者番号(8桁)：70581924

(5) 研究分担者
研究協力者氏名：小幡 徹
ローマ字氏名：Obata Toru
所属研究機関名：滋賀医科大学
部局名：医学部
職名：客員准教授
研究者番号(8桁)：80119776

(6) 研究分担者
研究協力者氏名：高橋 完
ローマ字氏名：Takahashi Kan
所属研究機関名：滋賀医科大学
部局名：医学部
職名：准教授
研究者番号(8桁)：80346014

(7) 研究分担者
研究協力者氏名：田畑 貴久
ローマ字氏名：Takahisa Tabata
所属研究機関名：滋賀医科大学
部局名：医学部
職名：講師
研究者番号(8桁)：90278200

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。