

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09278

研究課題名(和文)敗血症における赤血球表面上の補体沈着と侵襲度の評価

研究課題名(英文)The evaluation of relationship between severity of sepsis and the deposition of complement on erythrocyte in sepsis 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) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：救命救急センターに来院した敗血症患者、21名を解析し健常人と比較し赤血球表面上の補体成分C4d沈着が有意であり、SOFAスコアにおいてはC4dの沈着にやや相関が見られており敗血症患者における補体沈着が患者の重症度を予測できる可能性を指摘しうる結果となった。また、他の疾患と合わせると計86例の測定を行った。他疾患を合わせると疾患別の補体沈着の量に差は見られなかったが、患者の来院時のバイオマーカーである血清乳酸値などには相関関係が見られ、患者の重症度を示すAPACHE IIスコアやSOFAスコアにおいてもやや相関が見られ、赤血球上のC4dの沈着は患者の重症度を反映していることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

補体成分C4dが自己の細胞である赤血球表面上に沈着していることは、補体がいちど活性化したことの足跡であると考えられる。それはまさに補体の活性化の証である。敗血症やその他の重症患者で補体が沈着していることを測定することにより、免疫の活性化の程度を定量することにつながる意義深い発見である。C4dの沈着は腎臓内の組織などの報告は多くあるが、赤血球表面上の沈着に対する報告は本邦にはごく少なく革新的であると考えられる。また、検体の採取という意味においても組織採取ではなく血液検査で検体が得られ、低侵襲であり患者への負担も小さく社会的に意義深いものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Twenty-one patients suffered from sepsis who were transferred to critical care center were analyzed. Their erythrocytes had more C4d deposition compared to the erythrocytes from healthy donors. The volume of C4d deposition and SOFA score, showed a loose correlation, and the results suggest that C4d deposition may predict patients' severity. In addition, total 86 patients that included other diseases who were transferred to critical care center were analyzed. Although no statistical differences were observed in the amount of complement deposition by disease, correlations were observed with biomarkers such as serum lactate levels on admission. A slight correlation was also observed in the APACHE II score and SOFA score, which indicate the severity of the patient. Deposition of C4d on erythrocytes was shown to reflect patient severity.

研究分野：救急医学

キーワード：補体 重症度 赤血球

1. 研究開始当初の背景

ヒトの侵襲に対する防御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) の患者は補体が活性化していることは有名である。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。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)。我々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)。また、現在までのところ救命救急センター来院患者の赤血球上には補体反応の残存の証明である C4d が健康成人に比較して多く沈着していることを明らかにした。また、来院患者の傷病には心停止、感染症、外傷などが含まれ、他疾患に比較して多いことが明らかとなっており、その沈着量は患者来院時の乳酸値や血液ガス分析における Base Excess、白血球数などと相関していることがわかった。したがって補体の活性化は救命センターに来院するような重症度の高い患者に関して起こっており、補体の沈着には一定の特徴がみられる傾向がある。赤血球に沈着した補体はこれまであまり注目されてこず、いったん不活化した補体であるため役割はないものと考えられていた。しかしながらこれらの沈着した補体は重症度に相関し生体に加えられた侵襲を推測することができるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は救命救急センターに来院する患者の赤血球表面上に補体沈着が起こっていることを確認するとともに敗血症をはじめとした重症病態の傷病別の補体沈着に差があるかどうかを確認すること、また、敗血症を含む重症病態での補体の沈着と重症度、あるいはバイタルサインなどを含めた患者データとの相関の有無を確認すること、さらに同一敗血症患者から得た赤血球表面上の補体沈着の程度が来院後からどのように変化するかを確認することである。

3. 研究の方法

・対象

対象は2020年4月から2023年3月まで関西医科大学附属病院救命救急センターに搬送・受診された患者で、あらかじめ計画された研究日の当日あるいは前日に搬送になる患者が対象になり患者群は不連続であった。除外基準として担癌状態、膠原病などの慢性炎症性疾患に現に罹患しているもの、その他、研究医が除外相当と考えた者であった。研究を行うにあたっては関西医科大学倫理委員会の承認を受け、患者本人あるいは患者家族より同意を取得した。

・赤血球表面上の補体成分 C4d の測定

来院後、診療上必要な血液ガス分析用に採取されたヘパリン化血液検体の残余を研究用として使用した。採取されたヘパリン化全血を転倒混和し、ピペットを用いて50 μ lのヘパリン化全血と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取り除く。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C4d抗体(anti-C4d monoclonal antibody (A213; Quidel, San Diego, CA))を混和し抗体を結合させる。その後二次抗体(Alexa Fluor 488-conjugated rabbit anti-mouse IgG (A11059; Life technologies, Grand Island, NY))を用いて染色する。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。C4d抗体のアイソタイプコントロールとしてIgG1k-isotype control (401402; Bio Legend, San Diego, CA)を用いて同一検体で同じ方法でアイソタイプコントロールの検体を作成した。約1万から10万個の赤血球を測定し、蛍光度の平均値(MFI: mean fluorescence index)を算出し、その患者の赤血球表面上の補体C4dの沈着値とする。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がフローサイトメーターの出力によって変化する値となるため各実験日による誤差を補正する目的で実験日ごとに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赤血球上のC4dを測定し対応する患者の赤血球上のC4dとの比(補体沈着度)を計算する。

・臨床データの収集

赤血球上の補体測定を行った患者の臨床データを収集する。C4dを測定する採血を行った時点でのvital sign、血液検査データ、血液ガスデータを診療録から収集する。得られたデータからSOFA score (sequential organ failure assessment score)、APACHEII score (APACHEII score: acute physiology and chronic health evaluation score)を算出する。

・検討方法

実験で得られた患者の赤血球表面上の補体の沈着値を絶対値として対応する健康成人のそれと比較した。また、患者のデータとの比較検討に関しては補体の沈着値と健康成人のその比を患者の補体沈着度とし、患者補体の沈着度と患者の血液検査の結果、既存の重症度(SOFA score、APACHEII score)との比較を行った。2群間の差の検定に関しては Wilcoxon signed-ranks test の関連ある 2 群比較、2 群間の相関関係については Spearman の順位相関係数の検定を行った。また、来院後同一の患者で時間経過とともに補体の沈着が増加するかどうかが補体沈着値を経時的に評価した。

4. 研究成果

対象期間中の患者群で感染症(敗血症)は 21 例であり概要を表 1 に示す。平均年齢は 72±13 歳で男性は 13 例(62%)であった。SOFA score は 6.4±3.7 で APACHEII score は 20±10 という重症度であった。感染症は呼吸器が 6 例、消化器 6 例、尿路感染症が 3 例、皮膚軟部組織 3 例、原因不明が 3 例であった。

年齢	性別	主病名	WBC	CRP	Base Excess	Lactate	PCT	Pt MFI	HD MFI	沈着度	APACHEII score	SOFA score
70	男	肺炎	5200	15.91	5.6	35		22.6	19.9	1.14	27	6
88	男	肺炎	3100	0.52	-10.6	89	0.06	22.1	14.5	1.52	28	8
79	男	肺炎	13900	18.60	-6.5	25	0.27	50.8	21.6	2.35	26	6
86	男	肺炎	3600	3.86	-2	29		38.5	10.6	3.63	20	7
75	男	肺炎	4200	6.12	-2.5	30	0.17	15.3	14.4	1.06	17	6
57	女	膿胸	13800	26.60	-2.9	26	2.19	14.5	8.55	1.70	29	8
74	女	非閉塞性腸間膜虚血	15200	0.27	-17.1	144		18	14.5	1.24	40	12
58	男	非閉塞性腸間膜虚血	5200	38.10	-4	41	46.81	32.3	15.6	2.07	6	4
70	女	消化管穿孔	17600	26.62	-0.1	7	4.21	23.9	12.6	1.90	11	3
70	女	消化管穿孔	7800	35.39	-5.2	38	36.93	22.3	12.5	1.78	14	6
73	男	腸閉塞	10400	38.90	-3.6	30	33.96	84	16.1	5.22	27	12
89	女	急性胆嚢炎	12200	17.90	0.7	14	1.49	11.6	8.82	1.32	11	6
57	男	壊死性筋膜炎	15600	26.00	-2.1	24		10.8	9.87	1.09	12	3
59	男	壊死性筋膜炎	14700	10.61	1.4	22	0.75	73.3	29.2	2.51	8	0
69	男	下肢蜂窩織炎	9900	9.50	-1	18		27.8	24	1.16	9	0
98	男	尿路感染症	5500	2.23	-0.1	17	0.53	20.5	14.5	1.41	12	2
65	女	尿路感染症	12700	5.89	-13.3	26	2.65	38.8	29.2	1.33	23	6
72	女	腎盂腎炎	29100	11.77	-29.3	138	6.88	18.7	8.42	2.22	42	13
46	男	敗血症	16500	30.49	-10.5	85	39.86	29.9	16.6	1.80	20	9
86	女	敗血症	9700	31.20	-1.5	32	22.8	25.9	21.1	1.23	17	6
71	男	敗血症	16000	40.99	-9.6	20	100	38.5	9.15	4.21	15	12

表 1 感染症 21 症例の補体沈着と重症度スコア

WBC: White blood cell (/ μ l), CRP: C reactive protein (mg/dl), PCT: procalcitonin (ng/ml), Pt: patient, HD: healthy donor, MFI: mean fluorescence index, APACHEII score: acute physiology and chronic health evaluation score, SOFA score: sequential organ failure assessment score

敗血症患者 C4d 沈着値の平均は 1.99±1.10 で、沈着度はすべて 1.0 以上となり健康成人のそれと比較して有意に沈着していた ($p<0.05$)

また、患者データとの比較では白血球数(相関係数 0.25; $p=0.26$) CRP 値(0.37;0.10)、プロカルシトニン値(0.40;0.11)、APACHEII Score(0.047;0.83)、SOFA score(0.34;0.13)であり、緩い相関関係が見られた項目が認められた(図 1)

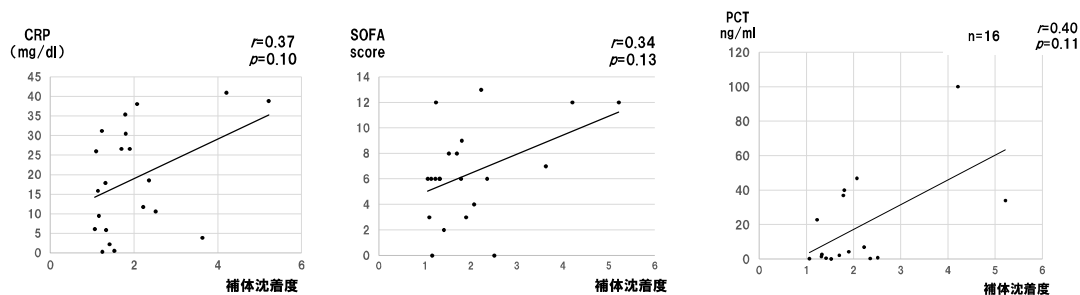


図 1 来院時の補体沈着度と血液データ、重症度との関係

また、同一患者の来院後の補体沈着を経時的に評価可能であった 1 例の経過(図 2)を示す。本例は凝固障害まできた敗血症症例であるが、来院から 6 時間後までは大きな変化はなく、9 時間後から沈着の増加が見られた。

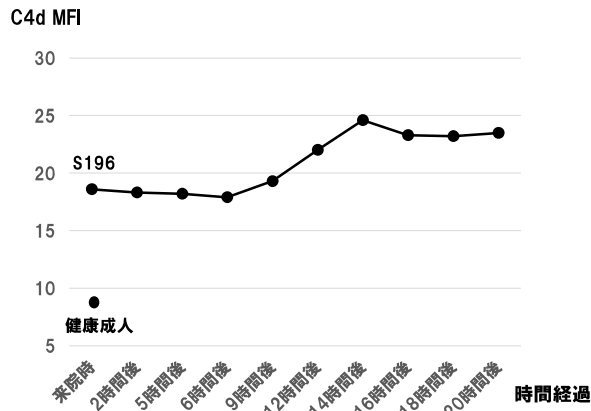


図2 同一の患者の補体沈着値の経時的変化と健康成人の補体沈着値の比較

	n=86
Age, mean(±SD),y	66(±19)
Sex, male, n(%)	54(63)
Disease	
Trauma	26
Infection	21
Cardiac Arrest	13
Intracranial bleeding	4
Others	22
APACHEII, mean(±SD)	17(±12)
SOFA, mean(±SD)	4.7(±4.6)

表2 全86例の患者背景

敗血症以外の他の疾患も含め研究期間内で計86名の重症患者の補体沈着の測定を行った。86例の内訳を表2に示す。

平均年齢は66±19歳で男性は54名(63%)であった。疾患別では外傷26例、感染症21名、心停止13名、脳出血4名、その他22名であった。平均のAPACHEII scoreは17±12でSOFA scoreは4.7±4.6であった。健康成人と比較した関連2群の比較検定では有意差(p<0.01)が認められ、患者群では赤血球表面上に補体沈着が有意に認められる結果となった(図3)。疾患別の補体沈着度に関してはその他を除いた疾患群では有意な差は見られなかった。(図は省略)

患者データとの比較検討においては補体沈着度と血清乳酸値(相関係数0.23;p<0.05)、CRP(0.31;p<0.05)で緩やかな相関がみられ、患者重症度ではAPACHEII score(相関係数0.24;p<0.05)、SOFA score(0.30;p<0.01)と同様に緩やかな相関がみられた(図4)。

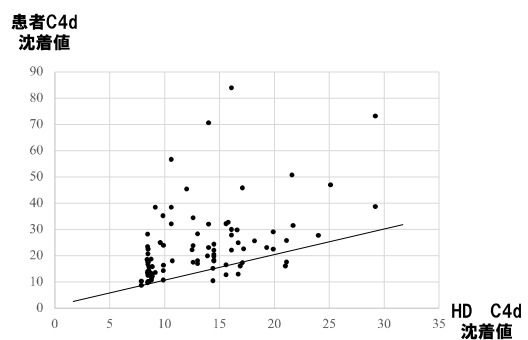


図3 来院患者と健康成人の補体沈着値の関係
図中の線は沈着度1を示す。

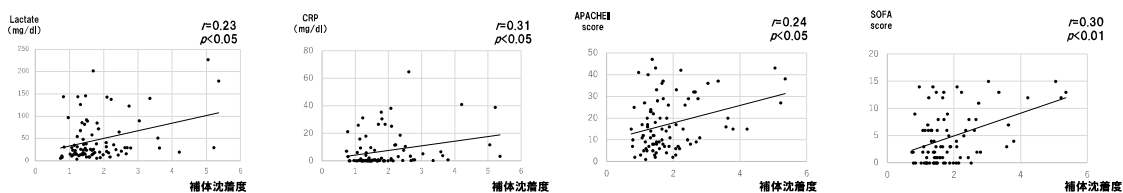


図4 補体沈着度と患者臨床データとの関係

・考察

敗血症は感染症によって臓器障害の出現した状態と定義されている。生体は感染が起きると反応として局所に炎症が生じる。感染が局所で制御できない場合、感染症は全身に広がりをもたせ炎症性サイトカインの分泌とともに全身性の炎症反応として様々な反応が起こる。そのうちの凝固障害は末梢循環不全と関連し、臓器障害を引き起こす。その際に用いられている臓器障害の評価がSOFA scoreであり感染症によるSOFA scoreの悪化が2点以上となると敗血症と定義されている。今回、敗血症症例のみに焦点を絞った検討により、敗血症時に補体が活性化しその結果として補体が赤血球表面上に沈着していることが示された。(厳密には敗血症と診断に至らない症例が2例含まれているが、来院時には正確な評価に至らない場合もあったため感染症症例として含めた。)

敗血症の患者データとの比較では白血球数(相関係数0.25;p=0.26)、CRP値(同0.37;0.10)、プロカルシトニン(PCT)値(0.40;p=0.11)、APACHEII Score(0.047;0.83)、SOFA score(0.34;0.13)であり、いずれも強い相関関係とは言えないものの緩やかな相関が見られる項目が認められた。敗血症は感染が生じた直後に起こるわけではなく、一定の時間が経過してから来院するものが多くまた、重症病態になってから治療が始まるものもあり、補体の活性化が起こるのに十分な時間が経過していたともいえる。CRPやPCTの上昇は感染症発症から重症化とともに高値になる

ため、一定の相関関係が認められたものと考えられる。APACHEII score と SOFA score で大きな違いが出ているが、敗血症の診断方法が SOFA score を使用していることに関係があり、より SOFA score に強く影響されたものと考えられる。結果として敗血症が重症である方が補体の沈着は増えているものと考えられる。

補体の活性化は治療開始後も起こっており、補体の沈着は経時的に増加していくものと予想していたが、検討可能な 1 例に関してはほぼ変化なく経過し、治療開始後に補体の沈着が大きく増加しない可能性が示された。この 1 例は敗血症として昇圧剤を使用し播種性血管内凝固症候群を発症するほどの重症例であったにも関わらず補体の沈着量そのものが増加しなかった。経過中の 6 時間後から 9 時間後の間に集中治療室での観血的処置の目的から凝固能改善のため新鮮凍結血漿（輸血）が投与されていた。本研究は来院時の採血のデータを使用することがほとんどであることから輸血による補体の活性化については検討されておらず、本例は新鮮凍結血漿の投与により赤血球表面上の補体沈着が増加した可能性は否定できない。

同時に検討した敗血症以外の重症病態の患者での同様の検討に関しては外傷と敗血症以外の症例数が多くなく、単純に比較は困難なこともあり、敗血症が他の疾患群に比べて補体の沈着量が多いといった傾向は認められなかった。敗血症の発症が外傷と比べて時間経過が長いことから、補体の沈着する時間が十分にあるように思えるが、外傷と敗血症のみでの比較ではないこと、症例数が十分でないことなども考慮する必要がある。血清乳酸値に関しては相関係数 0.32 ($p=0.03$) であり、補体の沈着は来院時の循環障害を反映している可能性がある。Base Excess 値は相関係数-0.20、 $p=0.06$ で強い相関があるとはいえなかった。CRP では相関係数 0.30、 $p=0.004$ と緩い相関が得られた。外傷や心停止では CRP の上昇は来院時には起こっていないが、感染症では発症から時間が経過していることで CRP の上昇が認められることが多いことなどが影響を与えたと考えられ、CRP にも緩い相関があるといえる結果となった。全体の重症度は APACHEII score は相関係数 0.24、 $p=0.02$ 、SOFA score は相関係数 0.29、 $p<0.01$ の結果となり、緩い相関関係があった。補体の沈着は緩やかではあるものの重症度を反映しているものと言える。

・ 結論

敗血症をはじめとする重症病態のために救命救急センターに搬送される患者の赤血球表面上に補体沈着が起こっており、既存の重症度や状態との緩やかな相関関係は成立し、補体沈着が重症度を反映する可能性が示された。

・ limitation

本検討の limitation として敗血症は外傷とは違い発症時が断定困難であるから症例ごとの時間経過に関しては検討ができず、時間経過が結果に影響を与えている可能性が検討できなかった。測定方法においてフローサイトメーターは同一機器、同一設定で測定を行っているが、フローサイトメーターのコンディションによってレーザーの強さが変わる可能性がある、あるいは実験日ごとの実験コンディションによって蛍光染色の強さが変化するという可能性がある。その補正にため健康成人のボランティアの測定とその比を作成した。補体の沈着の絶対量を検討できないことが結果に影響を及ぼしている可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1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 赤血球表面の補体沈着と病態との関係
3. 学会等名 第50回日本救急医学会総会・学術集会
4. 発表年 2022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)	
研究分担者	池側 均 (IKEGAWA Hitoshi) (80379198)	関西医科大学・医学部・准教授 (34417)	
研究分担者	中村 文子 (NAKAMURA Fumiko) (80701721)	関西医科大学・医学部・助教 (34417)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------