

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 3 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22791748

研究課題名（和文）救命救急センターにおける重症度、生存率と血漿遊離核酸濃度の関連性の検討

研究課題名（英文）The relationship between plasma free DNA and the mortality and morbidity of ICU patients.

研究代表者

青山 倫子（AOYAMA MICHIKO）

神戸大学・大学院保健学研究科・保健学研究員

研究者番号：40566121

研究成果の概要（和文）：本研究では救命救急センター搬入患者血漿中の遊離 DNA が新規の重症度判定マーカーとして、救急領域での利用が可能かを模索するものである。本研究の結果、敗血症患者において、搬入後 3 日間の平均血漿遊離 DNA 濃度が高いほど予後が悪い傾向が見られた。また、非敗血症患者における搬入後 5 日間の血漿遊離 DNA 濃度は生存例よりも死亡例で高く推移する傾向が見られた。したがって、血漿遊離 DNA は救急領域での患者病態を反映する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The plasma DNA concentration has been known to increase in the circulation of patients after trauma and may have prognostic potential. We examined the relevance of the plasma DNA concentration in ICU patients and their mortality. The average of plasma DNA concentrations for 3 days was higher, the mortality tended to be high in sepsis ($p=0.08$). In the non-septic patients, the plasma DNA concentrations of non-survived patients were higher than that of survived patients ($p<0.05$) for 5 consecutive days. Plasma DNA concentration may be a useful prognostic marker of mortality in ICU patients.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・救急医学

キーワード：外傷外科学

1. 研究開始当初の背景

血漿遊離 DNA は悪性腫瘍患者で高値となることから、癌の診断への有用性が検討されているが、それ以外にも、外傷患者において血漿遊離 DNA 濃度が高いほど、急性呼吸障害の急性呼吸窮迫症候群と急性肺障害の発症率及び死亡率が高く、予後を判断する有用な

因子であるとの報告もある。血漿遊離 DNA は採血時の血液検体から容易に得られるため、患者に特別な侵襲を加えることなく、また測定にも特別な技術が必要ないことから、比較的簡便に検査を行うことが可能である。敗血症患者における血漿遊離 DNA の由来は明らかではないが、細胞死が主な原因と考えられる

ことから、臓器障害の指標である SOFA スコアとの関連は臨床的に有用であると考えられる。救急救命センターに運ばれる患者の病態は様々であり、予後の予測は非常に難しいことから、簡便かつ迅速な検査で臓器障害の程度が予測できるようなマーカーがあれば、患者の病態を速やかに把握することが出来るため、その後の治療方針も立て易い。

2. 研究の目的

本研究では救命救急センターに搬入された患者の血漿遊離 DNA と SOFA スコア、死亡率との関連について検討し、血漿遊離 DNA が救急患者の病態を把握するための新しいマーカーとなり得るかを検討するものである。

3. 研究の方法

兵庫医科大学救命救急センター搬入患者の中で、インフォームドコンセントを行い、研究協力が賛同が得られた患者の血液から血漿を分離し、血漿中の遊離 DNA をキットを用いて抽出した。抽出後の DNA をリアルタイム PCR を用いて b-globin の定量を行い、標準ヒト DNA で検量線を引いて濃度を測定した。単位は、ヒト標準ゲノム DNA 定量により、1 k genome equivalents (GE) は 6.6 pg DNA として、kGE/mL を用いて評価した。得られたデータは臓器障害スコアである SOFA スコアや APACHEII スコア、及び救急救命センターにおける生存率との関係性を統計学的に解析し、検討した。

4. 研究成果

研究期間中に 140 名の参加登録を得た。血漿遊離 DNA 濃度は国内外での研究が進み、現在では敗血症における血漿遊離 DNA の起源として、好中球が重要であると考えられている。

表 1. 疾患別 APACHEII スコアと性別

	男/女 (人)	APACHEII
敗血症	7/14	18.9±7.8
敗血症性 ショック	13/11	24.1±9.3
非 SIRS	2/3	18.2±11.8
出血性 ショック	6/5	17.7±11.4
熱傷	2/1	16.0±11.1
急性膵炎	15/2	15.1±9.1

好中球は感染に際し、自らの DNA を放出し、網目状構造を作って外来抗原を捕捉する neutrophil extracellular traps (NETs) が明らかとなったため、敗血症で増加する血漿遊離 DNA は好中球由来ではないかと考えられている。それを踏まえ、いくつかの除外項目を設けて解析を行った (例: 外傷などでは損傷組織の DNA によって高値となるため除外)。結果、140 名のうち 81 名について搬入後 5 日間の血漿遊離 DNA 濃度を測定することができた。81 名の疾患別 APACHEII スコアについては表 1 に記載の通りである。敗血症性ショックでは搬入時 APACHEII スコアが他に比べ高い傾向にあった。

表 2. 疾患別血漿遊離 DNA 濃度 (kGE/mL)

	生存例 (人数)	死亡例 (人数)
敗血症	14.2±5.9(18)	13.9±8.3(3)
敗血症性 ショック	18.5±7.3(11)	15.7±15.9(13)
非 SIRS	9.8±3.1(5)	-(0)
出血性 ショック	11.2±6.2(10)	115.8±47.4(1)
熱傷	2.6±1.9(1)	18.9±33.9(2)
急性膵炎	8.3±2.0(13)	47.5±44.7(4)

生存例と死亡例の搬入後 3 日間の平均血漿遊離 DNA 濃度を比較すると、生存例では約 20 kGE/mL であるのに対し、死亡例では約 40 kGE/mL と、高い傾向を示した ($p=0.08$)。搬入後 5 日間の濃度変化を確認すると、搬入後 3 日目のみが死亡例では濃度が上昇していることが明らかとなった。現時点では理由は不明であるが、好中球機能との関連についてもさらに詳しく検討する必要があると考えている。疾患別の血漿遊離 DNA 濃度は表 2 の通りである。敗血症性、敗血症性ショック、出血性ショックでは生存例でも他に比べ高い値を示した。死亡例では全体的に生存例よりも高い傾向が見られたが、敗血症、敗血症性ショックでは生存例と死亡例でほぼ同じ値となっていた。

生存率との ROC 曲線を作成したところ、16 kGE/mL がカットオフ値となった (図 1)。各疾患における 5 日間の血漿遊離 DNA 濃度の推移を生存例 (図 2)、死亡例 (図 3) ごとにまとめると、生存例では 16 kGE/mL 付近で推移していたが、死亡例では出血性ショックでは連続して高値であり、急性膵炎、熱傷などでも高値が見られた。敗血症性ショックでは、生存例、死亡例とも 16 kGE/mL よりも高くなるのは 3 日目のみであった。

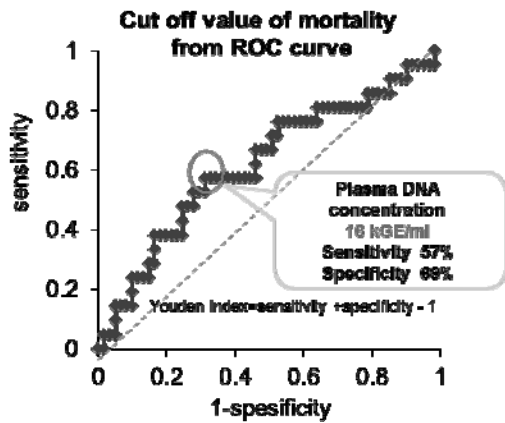


図 1. ROC 曲線

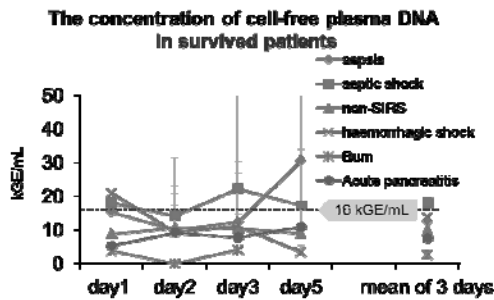


図 2. 生存例の 5 日間の濃度変化

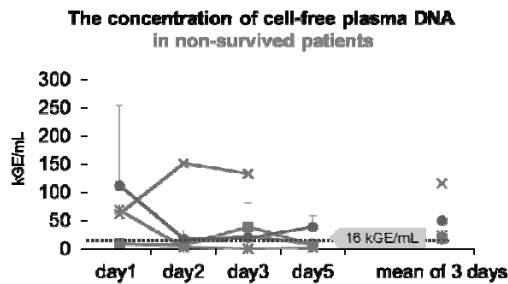


図 3. 死亡例の 5 日間の濃度変化

また、搬入時の緊急手術の有無と、血漿遊離 DNA 濃度についても検討したところ、緊急手術患者については血漿遊離 DNA 濃度が低く ($p < 0.05$) 推移することが明らかとなった (図 4) が、生存例では緊急手術患者で有意に低く推移する (図 5, $p < 0.01$) もの、死亡例では緊急手術の有無に関係なく、全く同じ推移を示した (図 6)。

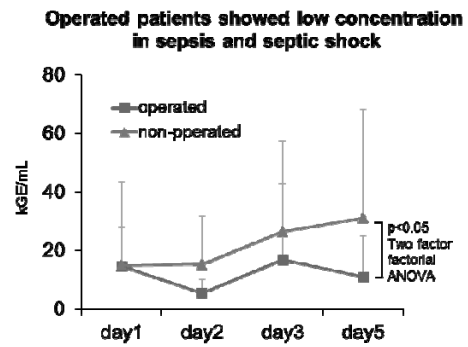


図 4. 緊急手術の有無別でみた 5 日間の血漿遊離 DNA 濃度の変化

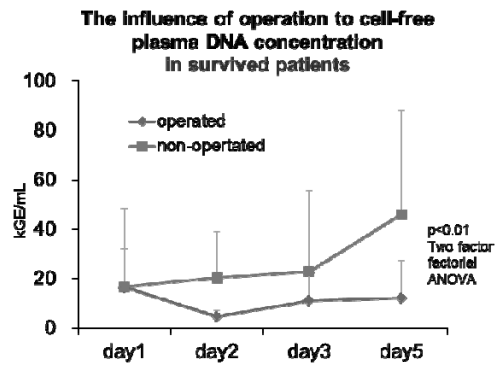


図 5. 生存例における緊急手術の有無での血漿遊離 DNA 濃度の変化

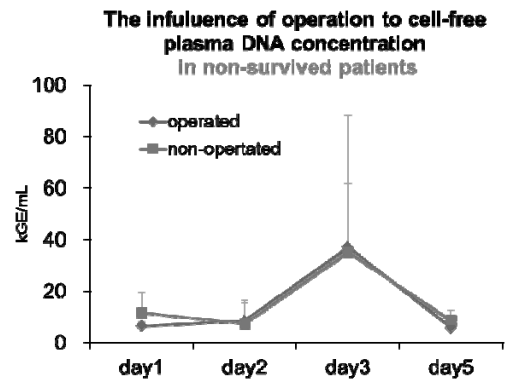


図 6. 死亡例における緊急手術の有無での血漿遊離 DNA 濃度の変化

また、搬入時 APACHE II スコアとの相関では非常に弱い正の相関がみられた ($R = 0.228$, $p = 0.05$) が、SOFA スコアとは相関は見られなかった。

以上より、血漿遊離 DNA は救命救急センター搬入患者の病態に関連していると考えられたが、詳細な機序は不明であった。好中球との関連やが重要視されているため、好中球数との推移なども検討すべきと考えている。また、症例数を増やし、さらに大規模な症例数での検討が必要と考えられた。

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 2 件)

- ① Michiko Aoyama, Joji Kotani, Takahiro Ueda, Noriaki Maeshige, Makoto Miyoshi, Nobuki Oka, Taketo Inoue, Makoto Usami
The relationship between cell-free plasma DNA concentration and mortality of ICU patients
2012 年 06 月 09 日～2012 年 06 月 13 日
7th International Shock Congress 35th Annual Conference on Shock
America, Miami
- ② 青山 倫子、高原 美樹、山内 千里、岡伸樹、山下 勇人、上田 敬博、宇佐美 眞、小谷 穰治
敗血症における好中球の性差について
2012 年 11 月 13 日～2012 年 11 月 15 日
第 40 回日本救急医学会

6. 研究組織

(1) 研究代表者

青山 倫子 (AOYAMA MICHIKO)
神戸大学・大学院保健学研究科
保健学研究員
研究者番号：40566121