

Evaluation of New Japanese Diagnostic Criteria for Disseminated Intravascular Coagulation in Critically Ill Patients

Satoshi Gando, MD, PhD,* Hideo Wada, MD, PhD,[†] Hidesaku Asakura, MD, PhD,[‡]
Toshiaki Iba, MD, PhD,[§] Yutaka Eguchi, MD, PhD,** Kohji Okamoto, MD, PhD,^{††}
Yasuhiro Ohtomo, MD, PhD,^{‡‡} Kazuo Kawasaki, MD, PhD,^{§§} Shin Koga, MD, PhD,^{***}
Kazuhide Koseki, MD, PhD,^{†††} Hajime Tsuji, MD, PhD,^{†††} Toshihiko Mayumi, MD, PhD,^{§§§}
Atsuo Murata, MD, PhD,^{****} Masao Nakagawa, MD, PhD,^{†††}
and Shigeatsu Endo, MD, PhD^{††††}

*Department of Anesthesiology and Critical Care Medicine, Hokkaido University, Graduate School of Medicine, Sapporo-city;

[†]Department of Laboratory Medicine, Mie University School of Medicine, Tsu-city; [‡]Third Department of Internal Medicine, Kanazawa University, Graduate School of Medical Science, Kanazawa-city; [§]Department of Surgery, Juntendo University Urayasu Hospital, Urayasu-city; **Intensive Care Unit, Shiga University of Medical Science, Ohtsu-city; ^{††}First Department of Surgery, University of Occupational and Environmental Health School of Medicine, KitaKyushu-city; ^{‡‡}Department of Critical Care and Traumatology, National Tokyo Disaster Medical Center, Tachikawa-ku; ^{§§}Department of Internal Medicine, Teikyo University, School of Medicine, Itabashi-ku; ^{***}Department of Hematology/Oncology, Wakayama Medical University, Wakayama City; ^{†††}Department of Emergency and Critical Care Medicine, Kawaguti Municipal Medical Center, Kawaguchi-city; ^{†††}Second Department of Internal Medicine, Kyoto Prefectural University of Medicine, Kyoto-city; ^{§§§}Department of Emergency Medicine and Intensive Care Unit, Nagoya University, Graduate School of Medicine, Nagoya-city; ^{****}Department of Trauma and Critical Care Medicine, Kyorin University School of Medicine, Mitaka-city; ^{††††}Department of Critical Care Medicine, Iwate Medical University, School of Medicine, Morioka-city, Japan

Summary: New Japanese diagnostic criteria were prepared for disseminated intravascular coagulation (DIC) in critically ill patients and their usefulness was compared with the criteria of the International Society of Thrombosis and Haemostasis (ISTH) and those of the Japan Ministry of Health and Welfare (JMHW). In a retrospective study of patients with platelet counts of less than $150 \times 10^3/\text{mL}$, 52 cases (33.3%), 66 cases (42.3%), and 101 cases (64.7%) were diagnosed as DIC by the ISTH, JMHW, and new Japanese DIC criteria, respectively. The DIC state as diagnosed by the new Japanese DIC criteria included both DIC states as diagnosed by ISTH or JMHW criteria. Some DIC states diagnosed by the JMHW criteria included those diagnosed by ISTH criteria but this was not universal. The mor-

tality of DIC as diagnosed by the ISTH or JMHW criteria was markedly high, compared to that for DIC diagnosed by the new Japanese criteria. The mortality of patients without DIC by ISTH was also high when they were diagnosed as DIC by the new Japanese criteria. The frequency of DIC by each set of diagnostic criteria was significantly higher in patients with infection than in those without infection. The mortality of DIC by each set of diagnostic criteria was significantly higher in patients with infection than in those without infection, and the mortality of overt-DIC by ISTH diagnostic criteria was also high in patients without infection.

Key Words: DIC—ISTH—New Japanese diagnostic criteria—Japan Ministry of Health and Welfare.

New disease entities have recently emerged, such as systemic inflammatory response syn-

drome (SIRS) (1)/sepsis in the emergency department (ED) and intensive care unit (ICU), which is frequently associated with disseminated intravascular coagulation (DIC) (2,3). In a phase III trial of activated protein C (APC) (4) and high-dose antithrombin (AT) (5) for severe sepsis, APC was shown to improve outcome in patients with severe sepsis, whereas AT did not. It was also reported that DIC was frequently associated with severe sepsis in this trial and that APC was significantly effective in patients with

This study was partly supported by The Japanese Association for Acute Medicine and The Japanese Society for Thrombosis and Hemostasis.

Address correspondence and reprint requests to Hideo Wada, MD, Department of Laboratory Medicine, Mie University School of Medicine, 2-174 Edobashi, Tsu-city, Mie 514-8507, Japan; e-mail: wadahide@clin.medic.mie-u.ac.jp.

DIC. Clinical trials of APC and thrombomodulin (TM) for DIC have been reported in Japan (6,7). The International Society of Thrombosis and Haemostasis (ISTH) proposed overt-DIC diagnostic criteria in 2001 (8). The frequency and mortality of DIC in leukemia have both diminished in recent times, reflecting advances in therapy for leukemia, such as all-trans retinoic acid (ATRA) (9), blood transfusions, and anti-infection strategies. Since the establishment of DIC diagnostic criteria by the Japan Ministry of Health and Welfare (JMHW) (10), early diagnosis and treatment of this entity are enacted in patients with leukemia. However, the frequency and mortality of DIC remain high in the emergency department (ED) and intensive care unit (ICU), reflecting the difference between leukemia and sepsis as underlying diseases in DIC. Furthermore, the sensitivity of the diagnostic criteria of the JMHW or ISTH is low for DIC in sepsis compared to DIC in leukemia, although a phase III trial of APC showed that early diagnosis and treatment of DIC was necessary in patients with DIC in the ER and ICU.

We have, therefore, prepared new Japanese DIC diagnostic criteria for critically ill patients and compared their usefulness with the ISTH or JMHW criteria.

MATERIALS AND METHODS

We retrospectively examined 156 patients with thrombocytopenia (platelets < 150,000/mL) who were diagnosed with the condition between June 1, 2002 and August 31, 2002, at the following institutions: Hokkaido University, Graduate School of Medicine, Mie University School of Medicine, Kanazawa University, Graduate School of Medical Science, Urayasu Hospital of Juntendo University, Shiga University of Medical Science, University of Occupational and Environmental Health School of Medicine, KitaKyushu-city, National Tokyo Disaster Medical Center, Teikyo University, School of Medicine, Kawaguti Municipal Medical Center, Nagoya University, Graduate School of Medicine, and Kyorin University School of Medicine.

They consisted of 53 females and 103 males. Underlying diseases included infection (n=62), trauma (n=30), post-surgery (n=10), aneurysm (n=9), cardiac disease (n=6), and other diseases (n=39) (Table 1). DIC was diagnosed using the ISTH overt-DIC diagnostic criteria, JMHW DIC diagnostic criteria or new Japanese DIC diagnostic criteria (Table 2). The new Japanese diagnostic criteria of DIC were created to focus on in-

TABLE 1. Subjects

	Total	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
Cases	156	20	25	20	8	28	10	7	8	6	15	9
Male	103	13	13	16	6	20	8	7	6	2	7	5
Female	53	7	12	4	2	8	2	0	2	4	8	4
Infection	62	6	4	17	2	5	4	7	3	4	2	8
Trauma	30	4	1	0	4	17	0	0	1	0	3	0
Surgery	10	1	6	0	0	0	1	0	0	0	2	0
Aneurysm	9	3	2	0	0	0	1	0	—	0	2	0
Cardiac diseases	6	0	4	0	0	0	0	0	1	0	1	0
Others	39	6	8	3	2	6	4	0	2	2	5	1

TABLE 2. New Japanese DIC Diagnostic Criteria for Critically Ill Patients

Score	SIRS	Platelet Count (PC) or Reduction Rate of PC	FDP	PT Ratio	Fibrinogen
1	3 items (+)	120×10 ³ /μL, or 30% reduction (during 24 hours)	10 μg/mL	1.2	3.5 g/L
2					
3		80×10 ³ /μL, or 50% reduction (during 24 hours)	25 μg/mL		

More than 5 points is considered DIC.

fectious diseases, especially SIRS. DIC was diagnosed by SIRS-positivity, prothrombin time (PT), fibrinogen, platelet count, fibrin and fibrinogen degradation products (FDP) based on numerous previous reports (11–14). One point in the DIC score represents the essential value for diagnosis of DIC, and 3 points represents the value for significance of mortality or organ failure. This discriminant characteristic of the new Japanese diagnostic criteria system was examined using 378 usable cases from the data of one facility (Table 3). A DIC score of 5 points was sufficient for the diagnosis of DIC. Positivity for more than three items of the SIRS criteria was considered as 1 point. PT, fibrinogen, FDP, and platelet counts were measured in each institution. A score of more than 2 points on the sepsis-related organ dysfunction assessment (SOFA) (15) score was considered as organ failure.

Statistical analysis was assessed by the Chi-square test and Spearman's rank correlation coefficient to evaluate relationships.

RESULTS

In this retrospective study, 52 cases (33.3%), 66 cases (42.3%), and 101 cases (64.7%) of patients with thrombocytopenia were diagnosed

with DIC by the ISTH, JMHW, or new Japanese DIC diagnostic criteria, respectively (Table 4). Fifty-five patients were not diagnosed by the new Japanese DIC diagnostic criteria during their clinical course. Many patients were positive for SIRS and the rate of platelet count reduction per 24 hours was not effective for diagnosis of DIC in those patients. Platelet counts were sufficiently low to fit the criteria for DIC before the rate of reduction had increased enough to establish the diagnosis. The relationship among the three DIC diagnostic criteria is shown in Fig. 1. DIC, as diagnosed by the new Japanese DIC criteria, included both DIC states as diagnosed by ISTH or JMHW. Some, but not all, DIC states diagnosed by the JMHW criteria included those diagnosed by the ISTH criteria. Among 52 patients with DIC according to both the JMHW criteria and new Japanese DIC criteria, more than 28.0% were diagnosed by the new Japanese DIC criteria before diagnosis by the JMHW criteria. The mortality of patients with DIC by the ISTH (46.2%) or JMHW (42.4%) criteria was markedly high, compared to that of patients diagnosed by the new Japanese DIC criteria. The mortality of patients without DIC by the ISTH criteria was also high when they were diagnosed as DIC by the new Japanese DIC criteria (Table 5). The frequency of DIC by each set of diagnostic criteria was sig-

TABLE 3. Test Property of the Scores for DIC Diagnosis by the New Japanese Diagnostic Criteria

Property	4 Points	5 Points	6 Points
Sensitivity	93%	88%	73%
Specificity	87%	95%	98%
Positive predictive value	45%	66%	84%
Negative predictive value	99%	99%	97%
Odds ratio	86	136	168
Likelihood ratio	7.3	17.3	46

TABLE 4. Frequency of Diagnosis of DIC Based on ISTH, JMHW or New Japanese DIC Criteria

	ISTH Overt DIC	JMHW DIC	New Japanese DIC Criteria
Cases	52	66	101
Percent	33.3%	42.3%	64.7%

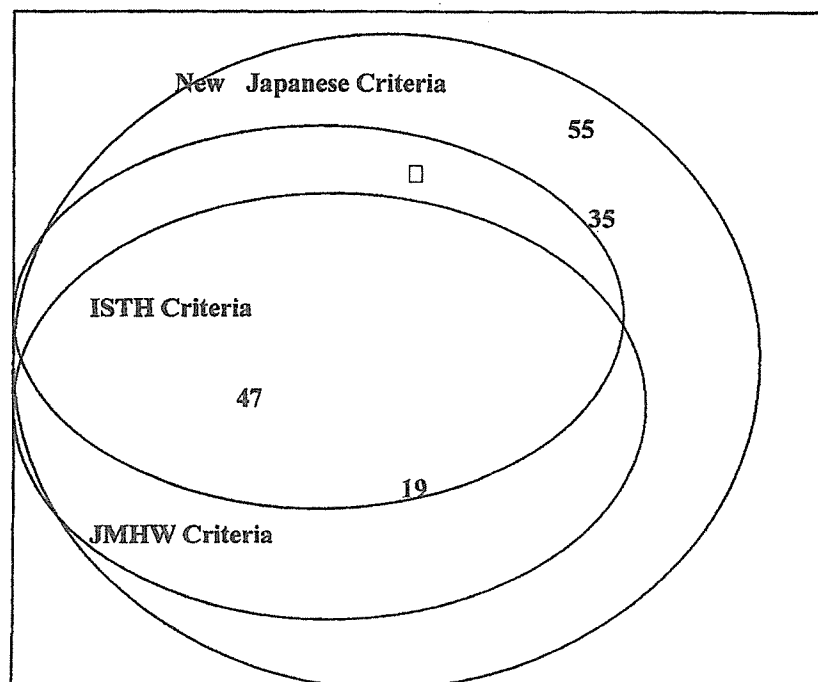


FIG. 1. Frequency of diagnosis of DIC based on ISTH, JMW, and New Japanese DIC criteria.

TABLE 5. Mortality and Diagnosis of DIC

New Japanese Criteria	ISTH DIC	JMW DIC	ISTH DIC (-)	JMW DIC (-)	Total
(-)	—	—	17.3%	15.5%	10.9%
(+)	46.2%	42.4%	24.5%	22.9%	35.6%

nificantly higher in patients with infection than in those without (Table 6). The mortality of DIC according to each set of diagnostic criteria was significantly higher in patients with infection than in those without, and the mortality of overt-DIC by the ISTH diagnostic criteria was also high in patients without infection (Table 7). The DIC score in New Japanese DIC criteria was significantly correlated with SOFA score.

DISCUSSION

In this study, 33.3%, 42.3%, and 64.7% of patients with thrombocytopenia were diagnosed as

having DIC by the ISTH, JMW, and new Japanese DIC criteria, respectively, suggesting that the new Japanese DIC diagnostic criteria are the most sensitive among the three sets of diagnostic criteria. Although the new Japanese DIC criteria have a high sensitivity, the specificity may be low. In a previous study, the survival rate of DIC patients treated with anticoagulants before diagnosis of DIC by the JMW criteria was significantly increased (12). However, the ISTH or JMW criteria have low sensitivity for DIC in patients with sepsis, because patients with sepsis have low FDP and high fibrinogen levels compared to patients with leukemia (16). Both the ISTH and JMW criteria for DIC depend on FDP

TABLE 6. Relationship Between Infection and DIC

	ISTH	JMHW	New Japanese Criteria
Infection (+)	45.2%*	54.8%*	77.4%*
Infection (-)	25.5%	34.0%	56.4%

*p < 0.01.

TABLE 7. Relationship Between Infection and Mortality

	DIC by ISTH Criteria	DIC by JMHW Criteria	DIC by New Japanese Criteria
Infection (+)	51.9%	50%*	43.8%*
Infection (-)	37.5%	12%	15.0%

*p < 0.01.

and fibrinogen levels. The DIC state, as diagnosed by the new Japanese DIC criteria, included the states diagnosed by both the ISTH or JMHW criteria. Some but not all states diagnosed by the JMHW criteria included those diagnosed by the ISTH criteria. These findings were similar to those previously reported (13). The cut-off values of global coagulation tests were determined by discussion between all researchers. The cut-off value for platelet counts according to previous reports (11) and our data would be $120 \times 10^3/\text{mL}$ and $80 \times 10^3/\text{mL}$. The value for PT would be 1.2, from previous reports (13), and that of FDP would be $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ or $25 \mu\text{g}/\text{mL}$. FDP and D-dimer levels are not sufficiently increased in patients with sepsis, and secondary fibrinolysis is suppressed by the inflammatory response, such as high PAI-1 levels (17).

The mortality of DIC by the ISTH or JMHW criteria was markedly high compared to that by the new Japanese criteria, suggesting that DIC patients with critical illness need to be treated with anticoagulant before diagnosis of DIC by the ISTH or JMHW diagnostic criteria. Indeed, it was reported that SIRS caused an increase in the association with DIC and organ failure with subsequent poor outcome (11,18). In an animal model of sepsis, DIC was frequently associated with sepsis and the outcome was poor (19,20). The frequency of DIC by each diagnostic criteria was significantly elevated in patients with infections,

suggesting that infection, particularly SIRS, causes high cytokine levels (21), which elevate TF or PAI-1 production. The mortality associated with DIC by each set of diagnostic criteria was significantly elevated in patients with infection, suggesting that patients with infections frequently have organ failure due to high plasma cytokine levels or hypofibrinolysis.

In conclusion, DIC patients with critical illness should be treated with anticoagulant before diagnosis of DIC by the ISTH or JMHW diagnostic criteria.

REFERENCES

1. Bone RC. Toward an epidemiology and natural history of SIRS (systemic inflammatory response syndrome). *JAMA* 1992;268:3452.
2. Müller-Berghaus G, ten Cate H, Levi M. Disseminated intravascular coagulation: Clinical spectrum and established as well as new diagnostic approaches. *Thromb Haemost* 2001;86:1327.
3. Levi M, de Jonge E, van der Poll T, et al. Disseminated intravascular coagulation. *Thromb Haemost* 1999;82:695.
4. Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, et al. Efficacy and safety of recombinant human protein C for severe sepsis. *N Engl J Med* 2001;8:699.
5. Warren BL, Eid A, Singer P, et al. High-dose antithrombin in severe sepsis. A randomized controlled trial. *JAMA* 2001;286:1869.
6. Maruyama I. Recombinant thrombomodulin and activated protein C in the treatment of disseminated intravascular coagulation. *Thromb Haemost* 1999;82:718.

7. Aoki N, Matsuda T, Saito H, et al. A comparative double-blind randomized trial of activated protein C and unfractionated heparin in the treatment of disseminated intravascular coagulation. *Int J Hematol* 2002;75:540.
8. Taylor Jr FB, Toh CH, Hoots WK, et al. Towards definition, clinical and laboratory criteria, and a scoring system for disseminated intravascular coagulation: On behalf of the Scientific Subcommittee on Disseminated Intravascular Coagulation (DIC) of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH). *Thromb Haemost* 2001;86:1327.
9. Huang ME, Ye YC, Chen SR, et al. Use of all-trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Blood* 1988;72:567.
10. Kobayashi N, Maegawa T, Takada M, et al. Criteria for diagnosis of DIC based on the analysis of clinical and laboratory findings in 345 DIC patients collected by the Research Committee on DIC in Japan. *Bibl Haematol* 1983;49:265.
11. Gando S, Kameue T, Nanzaki S, et al. Disseminated intravascular coagulation is a frequent complication of systemic inflammatory response syndrome. *Thromb Haemost* 1996;75:224.
12. Wada H, Wakita Y, Nakase T, et al. Outcome of disseminated intravascular coagulation in relation to the score when treatment was begun. *Thromb Haemost* 1995;74:848.
13. Wada H, Gabazza EC, Asakura H, et al. Comparison between diagnostic criteria for disseminated intravascular coagulation (DIC): The diagnostic criteria for overt-DIC of the International Society of Thrombosis and Haemostasis (ISTH) and those of the Japanese Ministry of Health and Welfare. *Am J Hematol* 2003;74:17.
14. Asakura H, Ontachi Y, Mizutani T, et al. Decreased plasma activity of antithrombin or protein C is not due to consumption coagulopathy in septic patients with disseminated intravascular coagulation. *Eur J Haematol* 2001;67:170.
15. Vincent JL, Moreno R, Takahara J. The SOFA (sepsis-related organ failure assessment) score to describe organ dysfunction/failure. *Intensive Care Med* 1996;22:707.
16. Wada H, Mori Y, Okabayashi K, et al. High plasma fibrinogen level is associated with poor clinical outcome in DIC patients. *Am J Hematol* 2003;72:1.
17. Pralong G, Calandra T, Glauser MP, et al. Plasminogen activator inhibitor I: A new prognostic marker in septic shock. *Thromb Haemost* 1989;61:459.
18. Rangel-Frausto MS, Pittet D, Costigan M, et al. The natural history of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). A prospective study. *JAMA* 1995;273:117.
19. Taylor Jr FB, Chang A, Edgington TS, et al. Lethal E coli septic shock is prevented by blocking tissue factor with monoclonal antibody. *Circ Shock* 1991;33:127.
20. Asakura H, Suga Y, Nakao S, et al. Marked difference in pathophysiology between tissue factor and lipopolysaccharide-induced DIC models in rats. *Crit Care Med* 2002;30:161.
21. Wada H, Tamaki S, Tanigawa M, et al. Plasma levels of IL-1 β in disseminated intravascular coagulation. *Thromb Haemost* 1991;65:364.

敗血症性多臓器不全症候群発現における炎症性液性因子

岩手医科大学医学部救急医学
遠藤 重厚 佐藤 信博

Key Words : 敗血症, 多臓器不全症候群, メディエーター, サイトカイン

1. はじめに

多臓器不全症候群 (multiple organ dysfunction syndrome; MODS) は, 過去数十年に渡り重篤疾患患者の治療に関わる医師が直面してきた主要な課題である。本症候群の発生率は集中治療室に入室した重篤疾患患者の15%に達する。その正確な定義については実際の, 概念的な面において見解に相違が認められている¹⁾。

集中治療における治療の進歩にも関わらず, MODSの死亡率は相変わらず50%を超えている。矛盾することではあるが, MODSの概念は医療の進歩による疾患とみなされている。MODSは1991年に新たな概念が構築されている²⁾。

しかしMODSの発症は, 最大限の治療にも関わらず死までのプロセスが単に長引く以外のことも意味している。MODSは種々のレベルでの急性炎症に対する不適切な宿主制御により, 重篤または反復的な組織損傷が最大限に達することであるとみなされている。

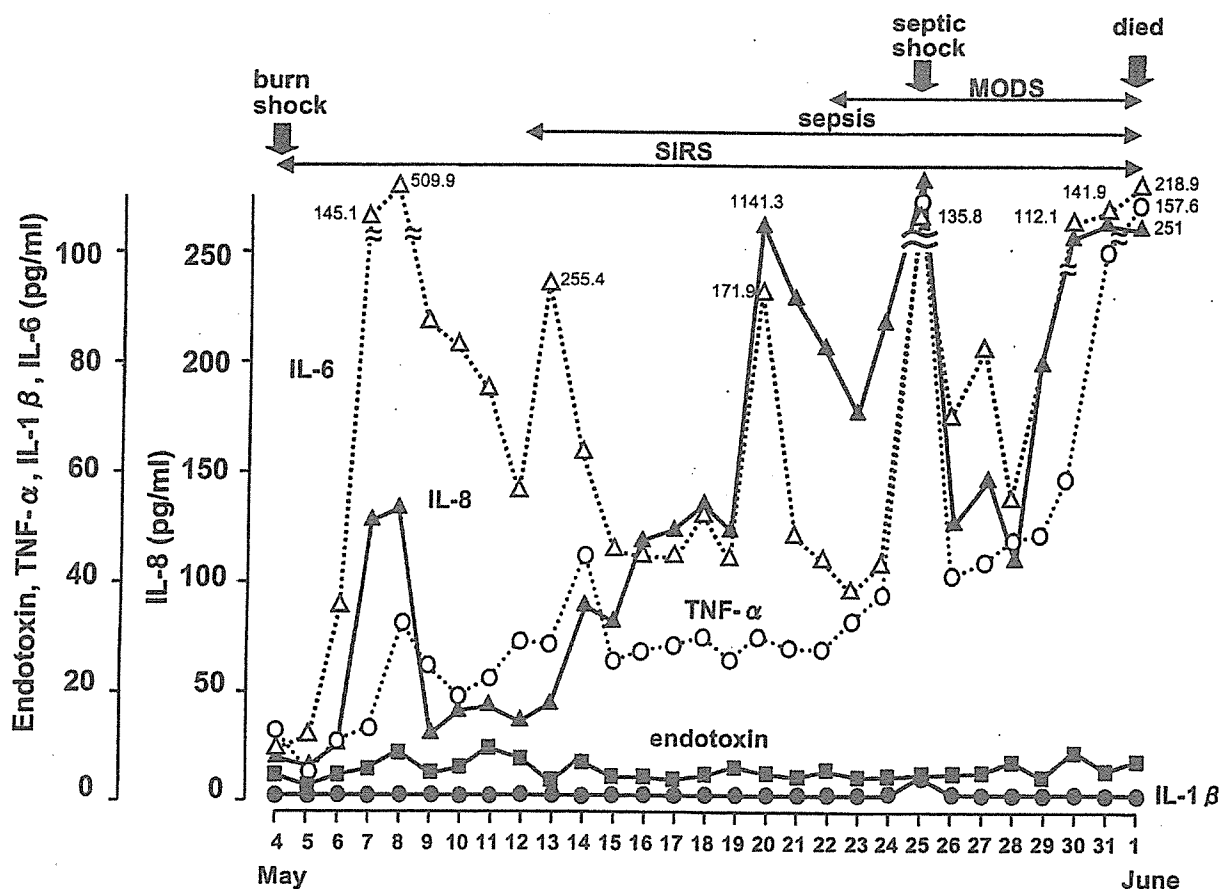
特に敗血症に伴う全身性炎症反応症候群 (sys-

temic inflammatory response syndrome; SIRS) においては全般的内皮細胞損傷を伴う。しかし様々な非感染性の反応 (外傷, 肺炎, 虚血-再灌流臓器損傷) もMODSを誘発し, 敗血症関連臓器機能障害に関与する経路を活性化する。さらにMODSの死亡率は障害された臓器数が増すのに伴い増加する。MODSにおいて炎症性液性因子の動態を変化させることで炎症反応を調整する方法についてはあまりよく理解されていない³⁾。

2. 感染症に対する正常応答から敗血症性MODSのパターンまで

重症感染症に対する生体の正常応答には, 心拍数, 心拍出量, 酸素消費量の増加など一連の心血管系変化が含まれる⁴⁾。神経内分泌学的応答にはカテコールアミン, コルチゾール, 抗利尿ホルモン, 成長ホルモン, グルカゴン, インシュリンの放出増加が挙げられる。凝固, 補体カスケードおよび線溶系は活性化する。これらの変化による影響のピークは初回感染から2~5日以内に生じ, 7~10日までにかけて低下する。輸液必要量の減少, 脈拍と体温の下方傾

図1 体表面積98%の患者の受傷直後から死亡するまでの経過



40歳. 女性 (TBSA 98%. BI 89)

向とそれに続く自発的利尿から、併発症を伴わずに臨床経過の改善が得られる。この最終的応答がみられない場合は併発症に注意すべきである。実際、一般的に感染後に頻脈、頻呼吸、発熱、全般的代謝亢進状態が維持される⁵⁾。

このパターンは広範囲な感染症または蘇生が遅延および／または不適切である場合にしばしば観察される。時にこの炎症反応は、24～72時間以内に発症する現象である急性肺傷害 (acute lung injury: ALI)に関連している。ALIの重症型であるacute respiratory distress syndrome (ARDS)の死亡率は50%以上であるともいわれている⁶⁾。最も多い死亡原因は、通常院内肺炎に関連している進行性MODSである⁷⁾。ALI発症後には二つの一般的な臓器機能不全のパタ

ーンがみられる。一番目の臨床経過は最も頻出にみられるものである：肺は主要な機能障害臓器のままで、時に、重度敗血症に特徴的な臨床相が数週間続く。しかし、肝、腎機能の急激な増悪は死の直前まで生じない。死亡は初回感染後から14～21日以内に最も頻出する⁸⁾。

二番目の一般的な臨床パターンは適切な治療が速やかに行われないうちにみられる。MODSの徴候は、ALI、腎・肝機能障害を含む初回感染後すぐに認められる現象である。患者は死に至る多臓器機能が更に増悪する前に再び比較的安定した状態に入る。死亡率は高いものの、特に多臓器が関与している場合、患者はこれらの臨床的病態のいずれか一つから回復することができる⁹⁾。患者が回復するかどうかは、

疾患の重篤度、基礎疾患、その後の損傷と併発症の数および重篤度に応じて異なる。

3. 炎症反応

MODSを誘発する臨床的、生理学的変化に関与する炎症反応については良く理解されてきているが、この複雑なパズルのピースがすべて完全に配置されている訳ではない。敗血症を刺激する最初の障害は感染症であるが、これは外傷、熱傷、肺炎を含む他の各種原因からも生じる。微生物の種類により反応に差はみられない。残念なことに、感染の原因が分かった場合でも、治療による臨床的改善は確実ではない。刺激物質が何であれ、複数のトリガーとなる液性因子とそれらによって生じる液性因子との相互作用と影響が重要である場合、MODSの原因は制御不能な敗血症であると思われる。

生体の損傷に起因する炎症反応に関わるサイトカインは炎症の進展に併せて、一時的に産生量が増加し、シグナルを他の細胞に伝えたあとに、その産生量は低下する。サイトカインの産生は正および負の調節を受けており、通常は異常な産生は抑制されている。しかし、この調節が崩れ、異常量のサイトカインが産生されると、不可逆性の病態を惹起する。すなわちARDS、DIC、敗血症などで、そしてその最も重篤な病態が敗血症性ショックであり、たびたびMODSに進行し、死に至ることも度々みられる(図1)。この過程においてサイトカインの刺激によりphospholipase A₂、エイコサノイド、一酸化窒素(NO)、endothelin-1、thrombomodulin、好中球エラストラーゼ、接着分子などが産生され、これらが間接的あるいは直接的に細胞、組織障害をもたらし複雑な病態が形成される。サイトカインがSIRSにおいて重要な液性因子として作用していることについて我々はこれまで多くの報告をしてきた^{10)~16)}。endothelin-1には血管収縮作用、NOには血管弛緩作用という相反する作用があり、血管の緊張度を生理的に調節、しかもendothelin-1によりNO生成は促進され、NOはendothelin-1生成を抑制するともいわれている。このように相反する作用を有するendothe-

lin-1とNOが敗血症性ショック時にほぼ同時に高値となることは、非常に興味深いことである。

これらの産生刺激因子としては、サイトカイン、特にTNF- α の関与が強く示唆された。一方、TNF- α やIL-1は、多くの細胞でphospholipase A₂の活性を亢進させ、エイコサノイドの遊離を増加させプロスタグランジンの産生を刺激する。血管内皮細胞では、PGF_{1 α} の産生が増加する。そして、PGF_{1 α} は強力な血管拡張作用をもち、充血やさらには血圧低下の原因の一つと考えられている。TxA₂も血管収縮作用を有している。

endothelin-1とNOとの関係と同様に、相反する作用を有する6-keto-PGF_{1 α} とTxB₂が敗血症性ショック時にはほぼ同時に上昇する。

6-keto-PGF_{1 α} 、TxB₂もNO、endothelin-1と同様に、重症であるほど高値を示し、やはり血管障害の強さを示すものかもしれない。

炎症性サイトカインのなかでも、特にTNF- α が直接的あるいは様々な物質を介して間接的に血管内皮障害を惹起している可能性が示唆された。

最近、interleukin 18(IL-18)が同定された¹⁷⁾。IL-18は肝不全、あるいはエンドトキシンショック時の肝機能障害に関与しているとも言われている。SIRSから多臓器不全にいたる過程でIL-18が上昇していることも確認されている¹⁸⁾。多臓器不全発症にはこのような新しいサイトカインの関与についてもよく検討する必要があるであろう。

Pinskyら¹⁹⁾は53例のショック患者(35例が敗血症性、18例が非敗血症性エピソード)における低血圧発症後48時間以内における炎症性サイトカインを測定している。死亡率は敗血症性患者(41%対17%)、MODS発症患者(29%対6%)でより高かった。さらに重要なことに、MODS患者または死亡患者ではTNF- α とIL-6値は両方とも上昇しており、敗血症の有無に関わらず経時的減少がみられないことから、MODS患者における持続的な炎症反応が示唆された。

これらの系の継続的な刺激を誘発しMODSを生じさせるメカニズムについて、詳細な研究が引き続き行

われている。最近、炎症反応を刺激する可能性のある発生源として腸管に注目が集まっており、これは“MODSの稼働源”とも呼ばれている。細菌はリンパ管および血流を介して胃腸壁を通過することが分かっており、この状態はトランスロケーションとして知られている。この状態がヒトにおいて臨床的に重要かどうかは明らかではないが、MODSにおける後期感染性併発症は耐性グラム陰性桿菌によるものであり、これらは全て重篤疾患患者の腸管に通常認められる細菌である。トランスロケーションにより血流およびリンパ管内に細菌、抗原またはエンドトキシンが制御不能に持続的に放出され、患者は炎症メディエータの刺激に反応する。体内の固定マクロファージ群の70%に相当し、蛋白質合成など肝細胞機能の調節能を有するクッパー細胞を介して、肝臓はこの刺激に反応する。さらに腸管の免疫機能が低下すると、メディエータ放出源としてさらに作用する可能性がある。しかし、この現象がヒトにおいても起こりうるかについては不明である。

敗血症のハイパーダイナミック状態から臨床的に定義されるMODSへの移行は明瞭な形では生じない。これは、これら二つの存在が組織機能障害の漸進的変化および／または低酸素化の連続状態を示していることによると思われる。液性因子と多数の臓器の内皮細胞または他の細胞構造に及ぼすその影響は敗血症の比較的初期に生じるとされるが、我々はこれら初期の変化を測定するための技法を有していない。臨床的に、この移行期には混合静脈酸素飽和度の上昇がしばしば認められる。この移行は臓器機能には有害であり、おそらく炎症反応自身により生じる細胞代謝の調節不全を示しているという認識が高まってきている。この臓器機能の継続的増悪についての死亡統計では、死亡率は敗血症患者における40～60%から重篤なMODS患者では90～100%まで増加している。

このような移行が生じていると一旦認識された場合、認識されていない灌流障害、制御不能な敗血症性病巣、炎症、損傷組織にする病原を取り除く必要がある。

4. おわりに

敗血症誘発性多臓器不全症候群は炎症性液性因子の過剰な生成と、結果として無秩序な炎症反応の過剰活性化により特徴付けられると思われる。生体防御機序は対処不能となり、もはや炎症反応をコントロールすることができない。この非コントロール下での炎症反応の主要な結果が臓器傷害、ショック、およびMODSの発症であり、初期の感染がコントロールされた場合であってさえ高い死亡率が誘発されるのである。

文献

- 1) Matuschak GM, Lechner AJ. Hepatic regulation of systemic host defence and its derangement in multiple organ dysfunction and gfailure. In: Matuschak GM, ed. MSOF. New York: Marcel Dekker, 1993 : pp.1-33.
- 2) ACCP/SCMCC Consensus Conference Committee: Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. Chest 1992 ; 101 : 1644-1655 / Crit Care Med, 1992 ; 20 : 864-874.
- 3) Bone RC. Sepsis and multiple organ failure: consensus and controversy. In: Lam, M, Thijs LG, eds. Mediators of Sepsis. Berlin: Springer Verlag, 1992 : pp.3-12.
- 4) Cerra FB, Siegel JH, Border JR, et al. Correlations between metabolic and cardiopulmonary measurements in patients after trauma, general surgery and sepsis. J Trauma 1979 ; 19 : 621-629.
- 5) Beal AL, Cerra FB. Multiple organ failure syndrome in the 1990s. JAMA 1994 ; 271 : 226-233.
- 6) Petty TL. ARDS, refinement of concepts and definition. Am Rev Respir Dis 1979 ; 138 : 724.
- 7) Meakins JL. Etiology of multiple organ failure. J Trauma 1990 ; 30 : S165-S168.
- 8) Barton R, Cerra FB. The hypermetabolism in multiple organ failure syndrome. Chest 1989 ; 96 : 1152-1160.
- 9) Knaus WA, Draper EA, Wanger DP, et al. Prognosis in acute organ system failure. Ann Surg 1985 ; 202 : 685-693.
- 10) Endo S, Inada K, Inoue Y, et al. Endotoxin and cytokines in patients with gastrointestinal tract perforation. Med Inflamm 1992 ; 1 : 45-48.
- 11) Endo S, Inada K, Inoue Y, et al. Two types of septic shock classified by the plasma levels of cytokines and

- endotoxin. *Circ Shock* 1992 ; **38** : 264-274
- 12) Endo S, Inada K, Yamashita H, et al. Platelet-activating factor (PAF) acetylhydrolase activity, type II phospholipase A₂, and cytokine levels in patients with sepsis. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1994 ; **83** : 289-295
- 13) Endo S, Inada K, Nakae H, et al. Blood levels of endothelin-1 and thrombomodulin in patients with disseminated intravascular coagulation and sepsis. *Res Commun Molecul Pathol Pharmacol* 1995 ; **90** : 277-288
- 14) Endo S, Inada K, Ceska M, et al. Plasma interleukin 8 and polymorphonuclear leukocyte elastase concentrations in patients with septic shock. *J Inflamm* 1995 ; **45** : 136-142
- 15) Nakae H, Endo S, Inada K, et al. Nitrite/nitrate (NOx) and type II phospholipase A₂, leukotriene B₄, and platelet-activating factor levels in patients with septic shock. *Res Commun Molecul Pathol Pharmacol* 1996 ; **92** : 131-139
- 16) Endo S, Inada K, Kasai T, et al. Levels of soluble adhesion molecules and cytokines in patients with septic multiple organ failure. *J Inflamm* 1996 ; **46** : 212-219.
- 17) Okamura K, Tsutsui H, Komatsu T, et al. Cloning of a new cytokine that induces IFN- γ production by T cells. *Nature* 1995 : 378, 88-91.
- 18) Endo S, Inada K, Yamada Y, et al. Interleukin 18 levels in patients with sepsis. *J Medicine* 2000 ; **31** : 15-20.
- 19) Pinky MR, Vincent J-L, Deviere J, et al. Serum cytokine levels in human septic shock. *Chest* 1993 ; **103** : 565-575.

エンドトキシン測定法の評価



岩手医科大学医学部救急医学

教授 遠藤重厚

八重櫻泰法

講師 佐藤信博／小鹿雅博

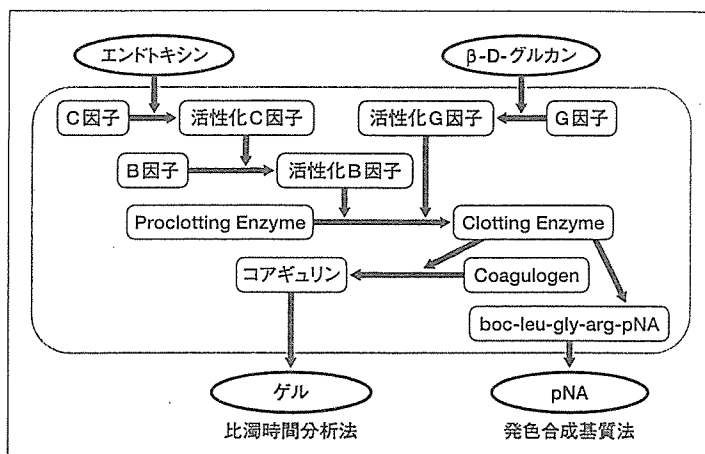
リムロイドサイエンス株式会社

稻田捷也

リムルステストの原理について

エンドトキシン定量法として知られるリムルステストの名はアメリカ産カブトガニの学名 *Limulus polyphemus* から由来している。このテストは、カブトガニ血球が微量のエンドトキシンで凝固する現象が契機となり開発された¹⁾。カブトガニ血球の抽出液(ライセート)に存在するC因子がエンドトキシン(lipopolysaccharide: LPS)の受容体であり、これは哺乳動物の補体のC1sやC1qとの構造類似性が明らかにされている。その後、岩永らにより詳細に研究され、LPSによって活性化される系(C因子系)と、真菌の細胞壁成分である β -D-グルカンなどによって活性化される系(G因子系)が存在することがわかった²⁾。その結果、エンドトキシン、 β -D-グルカンそれぞれ特異的に反応するキットが開発された。さらに定量方法においても、合成基質法^{3,4)}や比濁時間分析法⁵⁾が開発された(図1)。現在0.1pg/mL単位のエンドトキシンを検出できる可能性がある。しかし、欧

図1 2つのリムルステスト



米で市販されているキットは今でも古典的な方法(エンドキシシとグルカンに反応する)であることは注意が必要である(欧米のエンドキシシのデータは信用性に疑問が残る)。

リムルステストの種類

a. 発色合成基質法

発色合成基質法は、凝固酵素の基質として合成発色基質を用い、吸光度測定する方法である。日本産カブトガニ *Tachypleus tridentatus* のライセート内に、発色基質 *p*-ニトロアニリン (pNA) を結合した合成発色基質 boc-leu-gly-arg-pNA を加える。リムス反応で生じた酵素活性により切断されて生じた pNA を、最大吸収を示す 405nm (黄色) の吸光度を測定するか、pNA をジアゾカップリングして 450nm (赤色) の吸光度を測定するエンドポイント法を当初採用していた (生化学工業)³⁾。そして、マイクロプレートを用いたカインेटック法 (微量の血漿をウエル内に添加し、処理から主反応までウエル内で行う) もある⁴⁾。この方法は、ジアゾカップリング・エンドポイント法の欠点である、pNA 類似構造物 (サルファ剤など) を含む血漿に対して偽陽性を示すという問題を改良したものである⁶⁾。

b. 比濁時間分析法

これは、ゲル化に伴う濁度を透視光量値の変化として捉えて定量化している。市販のものには比濁時間分析法キット(和光純薬工業)がある⁵⁾。なお、このキットでは過剰量のグルカンを加えてG因子の活性化を抑制することでエンドトキシン特異的にしてある⁷⁾。

測定上の注意および問題点(濁度発生による偽陽性に注意する)

リムルテストの反応は前述したようにC因子へのLPSの結合、C因子の活性化、B因子の活性化、凝固酵素の活性化、コアグュリン(またはpNA)の生成と、数段階の活性化を経てゲル化(濁度変化)や黄色色素生成が起こる。したがって、最終反応までにはラグタイムが必ずみられる。発色合成基質法や比濁時間分析法のいずれでも、反応を肉眼

図2 健康者検体の発色合成基質法と比濁時間分析法の比較

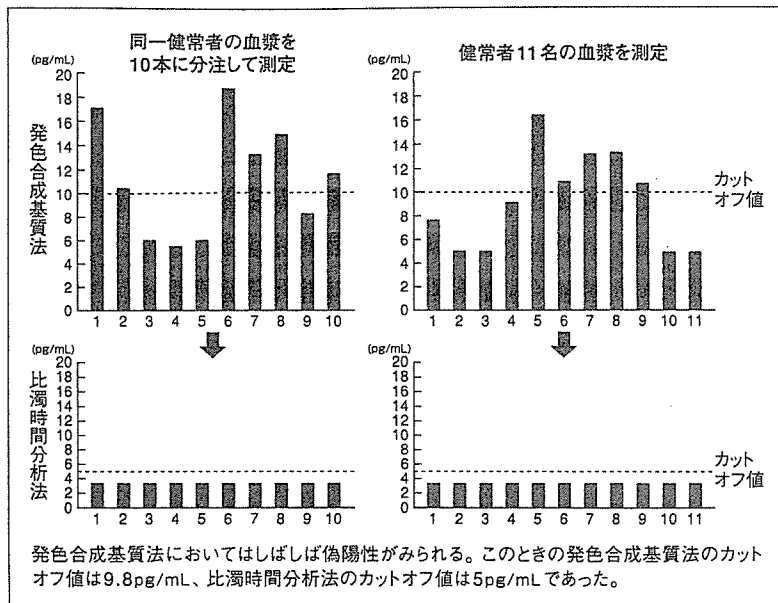
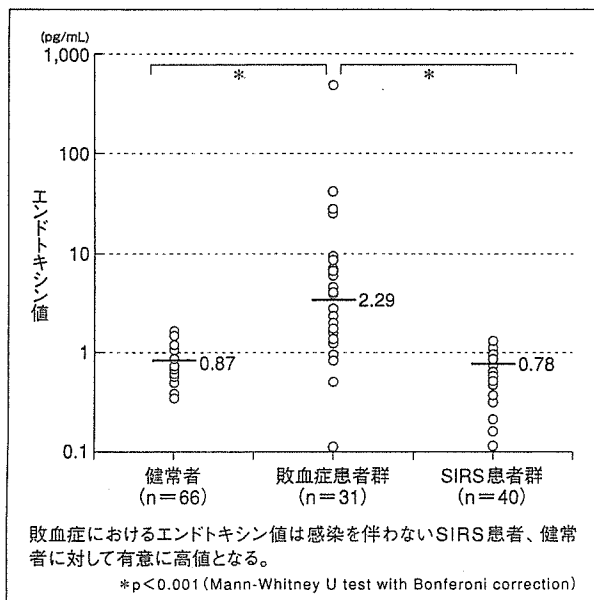


図3 敗血症におけるエンドトキシン値



的に観察できる。もし、反応早期から濁度変化や405nm吸光度の上昇がみられる場合には非特異的な濁度が発生している可能性が高く、測定値は評価に留保すべきである。アルカリ処理法の場合、血漿などでは偽陽性を発生することがあり⁸⁾、実用には不都合があった(図2)。

高感度エンドトキシン測定法

比濁時間分析法はトキシノメーターを用いて、検体とカプトガニ血球から調整されたリムルス試薬を混和させ

た溶液のゲル化時間(リムルス反応)を測定する方法である。これには、リムルス反応を利用しているため特異度は非常に高い一方で、感度に関しては測定時間が短いと低下することや、試薬によりばらつきがでるという弱点があった。これまでのエンドトキシンのカットオフ値は、特異度と測定時間の短縮を重視し、3.5~5pg/mLに設定されることが多く、感度が低いという問題があった。

そこで測定時間を200分とすることにより、0.1pg/mLまで測定することができた。本法により、敗血症診断におけるエンドトキシン値の最適カットオフ値は1.1pg/mLとした。これによると敗血症診断における感度は81.3%、特異度は86.1%となり、従前のカットオフ値を5.0pg/mLに想定した場合に比べてその感度は3倍以上になった(図3)⁹⁾。

これまでマスクされていた1.1~5pg/mLのエンドトキシン血症症例に対して、エンドトキシンをターゲットとして治療を行うことにより、著明な臨床効果が得られることは、エンドトキシン高感度測定法の位置づけにおいて臨床に非常に重要であることを支持するものである¹⁰⁾。

本法は、エンドトキシン測定法としては現時点においてはゴールデンスタンダードであると思われる。

文献

- 1) Levin J and Bang FB : *Bull Johns Hopkins Hosp* 115 : 265-274, 1964
- 2) Iwanaga S, Morita T, Harada T et al : *Haemostasis* 7 : 183-188, 1978
- 3) Obayashi T, Tamura H, Tanaka S et al : *Clin Chim Acta* 149 : 55-65, 1985
- 4) Tamura H, Arimoto Y, Tanaka S et al : *Clin Chim Acta* 226 : 109-112, 1994
- 5) Oishi H, Takaoka A, Hatayama Y et al : *J Parenter Sci Technol* 39 : 194-199, 1985
- 6) 稲田捷也、遠藤重厚、吉田昌男 : *病態生理* 12 : 381-389, 1993
- 7) Kakinuma A, Asano T, Torii H et al : *Biochem Biophys Res Commun* 101 : 434-439, 1981
- 8) 稲田捷也、遠藤重厚 : *医学と薬学* 42 : 885-897, 1999
- 9) 八重樫泰法、稲田捷也、佐藤信博ほか : *エンドトキシン血症救命治療研究会誌* 7 : 25-28, 2003
- 10) 遠藤重厚、八重樫泰法、佐藤信博ほか : *PMX治療効果の検討ー高感度エンドトキシン測定法を用いた検討ー*、*エンドトキシン血症救命治療研究会誌* 8 : 79-83, 2004

敗血症の迅速診断法

遠藤 重厚 佐藤 信博 八重樫泰法

要約：日常的な臨床実践における重症全身性炎症反応の鑑別診断は難しく，多大な費用と時間が必要である。感染部位から遠い臓器の機能障害の発生（重症敗血症）は敗血症という診断を遅らせ，併発疾患によっては35～70％という高死亡率や長期入院につながる。高感度で特異的な生化学的および免疫学的マーカーによる早期診断が行われれば，この高い罹患率と死亡率の低下に貢献することができることと考えられる。体温や白血球増加，およびCRPのような臨床徴候は免疫状態や炎症に対する宿主反応を反映することはできない。現在，多くの生化学的/免疫学的マーカーをモニタリングし，早期に適切な治療を行う努力がなされている。ここではそれらを概説する。

はじめに

敗血症に併発する種々の病態は救急領域において治療が長引く要因の一つで，保健医療の大きな負担となっている。したがって，生化学的/免疫学的マーカーをモニタリングし，早期に適切な治療を行う必要がある。従来，感染症の診断としては，発熱，白血球数，CRP，細菌培養などが用いられてきた。しかし，循環血液中に微生物が検出されない炎症性反応が頻繁に発生していることから，敗血症に関して新たな理解と定義が導入されてきた。主に，そのものとしては検出されない場合が多い微生物学的または非微生物学的過程に対する全身性宿主反応であり，証明された感染の存在とは無関係に検出可能なレベルのサイトカインを伴っている¹⁾。初期は高炎症段階がみられ，この段階はすみやかに低炎症相に移行するがかなり重複することも多く，その後，回復に至らなければ免疫不全状態になることもある。

生化学的/免疫学的モニタリングには基本的に

以下の二つのアプローチがある。

- 1) 敗血症反応は高度にコンパートメント化されるため，主に血漿である体液の検査を行う。状態によっては気管支肺胞洗浄検査（BAL）が適切な場合もある。
- 2) 通常は末梢細胞由来の血液を使用して細胞の検査を行うが，場合によっては肺マクロファージのような局所細胞の方が適切な場合がある。

体液（血液）マーカー

血液で測定するマーカーは

1. リポ多糖（LPS）や関連分子のような敗血症誘発物質
2. 反応細胞の産物
3. 体液性活性化カスケードの産物を含む。

1. 誘発物質

- 1) エンドトキシン

エンドトキシン（LPS）はグラム陰性細菌性敗血症の病態生理学における一次性誘発物質であ

Rapid Diagnostic Method for Sepsis

岩手医科大学医学部救急医学（〒020-8505 盛岡市内丸19-1）

ICUとCCU 29(1):21～26, 2005

る。したがって、エンドトキシンは重要なモニタリング指標とみなされる。しかし、エンドトキシン測定にはいくつかの障害があった。内毒素のみの測定では誤りにつながることもあり、循環血液中では細菌/エンドトキシンの一過性発現が多いため、症例における発現を証明することが困難になり、このことが矛盾する臨床結果を招く原因とも考えられていた²⁾。しかし、この誤解はエンドトキシン特異的な測定法を用いることのない欧米での結果であり、本邦においてはエンドトキシン特異的な測定法に加えて、さらに高感度法も開発され、エンドトキシン測定に関しては本邦が世界をリードしている³⁾。

グラム陽性細胞成分にルーチンに適用できる分析ツールはない。

2. 反応細胞の産物

感染症における病態生理学的な理解に重要なマーカーの一つは、サイトカインの検出である。これは、サイトカインの産生と作用が局所的であることや、低濃度、半減期が短いことにより困難な作業である⁴⁾。血漿中半減期が短いことの一因として、循環する可溶性サイトカイン受容体を含む受容体との結合がある。これらの可溶性受容体はサイトカインを中和するだけでなく、それ自体が診断法となりうるツールでもある⁵⁾。

サイトカインによるモニタリングで不十分な点をマーカーとしていくつかあるが、このうちマクロファージ活性化マーカーであるネオプテリン⁶⁾とプロカルシトニン⁷⁾が最もよく知られている。

1) 血漿サイトカイン

多種多様なサイトカインの中から、動態反応が迅速であること、ほとんどのアッセイにおいて可溶性受容体結合と無関係であること、腎機能と比較的無関係であるなどの好都合な特徴により IL-6 が最も広く使用されている。IL-6 濃度の上昇は予後と関連することが分かったが、TNF 濃度は予後を示す指標であるとは証明されず、したがって IL-6 は信頼性の高い感染症のマーカーであると考えられる⁸⁾。しかし、IL-6 は感染を伴わない侵襲の強い SIRS 状態でも上昇することが欠点でもある。さらに、血漿中の IL-8、IL-10、IL-18、および IL-1ra や可溶性 TNF 受容体のよう

な天然の拮抗物質は、感染症症例においてモニタリング目的で繰り返し使用されている⁵⁾。

サイトカインとして作用する物質で最も新しく同定された物質の一つは HMG-1⁹⁾ で、現時点では限定的なデータしかないが、感染症が重症化した敗血症患者では血清中 HMG-1 濃度が上昇していることから、HMG-1 は将来マーカーになる可能性を有している。

2) ネオプテリン

遍在する非抱合プテリジンの一種であるネオプテリンはグアノシン三リン酸 (GTP) 由来で¹⁰⁾、IFN- γ と LPS の刺激により単球/マクロファージから放出される。集中治療を行った症例においてネオプテリン濃度と敗血症において強い相関が有ることが報告されている⁶⁾。21 例の症例において生存者と非生存者の差は第一病日からすでにみられた。ネオプテリンを測定することにより敗血症の診断は 83% という総合的な精度が得られた。またネオプテリンは、Goris の多臓器不全 (MOF) スコア (>5 の場合) も予測した。この研究においてネオプテリンは敗血症および非敗血症生存者と非生存者を常に同様に鑑別可能としている。Strohmaier ら¹¹⁾ は、ネオプテリンの血中濃度は、ICU で抗生剤の使用を決定するための信頼性の高い基盤を提供できることを明らかにした。最終的に、感染が疑われる場合は血清ネオプテリン濃度が 40 nmol/L を超える場合にのみ抗生剤を投与した。40 nmol/L というカットオフ値は、未治療のままであるコロニー形成と全身性感染とを識別する因子として利用される。この戦略の主な成果は、治療費の低減だけではなく、感染エピソードや分離される微生物の減少、特に *Pseudomonas* 属とブドウ球菌の著明な減少である。

3) プロカルシトニン

プロカルシトニンは 116-アミノ酸プロペプチドで、タンパク質が分解されてホルモンのカルシトニンになる。PCT は症例における細菌性敗血症 (ウイルス性感染レベルが低い) のきわめて早期の識別マーカーではないかと考えられている¹²⁾¹³⁾。市販のアッセイが利用できるようになったため、ますます多くの臨床研究が実施されてい

る。カルシトニンの産出源は一般に甲状腺細胞（およびその他の神経内分泌細胞）とみなされているが、この細胞は、甲状腺摘出敗血症症例でも感染によるプロカルチニン増加がみられるため、おそらくプロカルチニン供給源ではないと思われる⁷⁾。内毒素や *E. coli* などのプロカルチニン誘発物質がいくつか知られている。病巣除去に成功した腹膜炎症例における血漿中 PCT 濃度の有意な低下を報告、手術による肺血症の病巣除去に失敗し症例が死亡した場合、平均プロカルチニン濃度は高いままであったり、プロカルチニン濃度を利用して急性呼吸窮迫症候群（ARDS）の病因が感染性であるか非感染性であるかを明確に識別した報告がみられる。Murray スコアがきわめて類似する症例において、プロカルチニンにより ARDS の原因が敗血症によるものかあるいは敗血症以外によるものかが識別された。この研究で TNF とネオプテリンによる結果は同等であったが、IL-6 と CRP は不十分であった。敗血症誘発動物にプロカルチニンに反応を示す抗血清を投与すると死亡率が低下するという所見は、プロカルチニンが細菌性感染症のマーカー以上のものであることを示し、実際、炎症過程における活性物質であるとみなし得るものである¹²⁾。近々、本邦においても使用可能となるものと思われる。

4) 内皮マーカー

数少ない循環内皮細胞を採取することは困難なため、血漿中の濃度を測定することになる。感染症、特に敗血症における他の多くの病態において、P-セレクトリン、E-セレクトリン、(ICAM-1) などの細胞表面接着分子の上昇を伴う内皮細胞の活性化がある。これらが上昇することは白血球の接着性を高める。これらの接着分子は少量が血漿に流入しており、血漿分析により知ることができる。

内皮マーカーの活性化だけではなく内皮障害のモニタリングにもなりうるものであろう。その一つはトロンボモジュリンである。可溶性トロンボモジュリンは内皮表面に存在する以外に、血漿や健康被験者の尿中に発見されている。家兎における実験から、可溶性トロンボモジュリンは内皮表

面から流入するのではなく、細胞障害の結果であることが推測される。血漿中のトロンボモジュリン濃度は、ARDS や敗血症のように、通常脈管内皮の不安定を伴う疾患状態において上昇することがいくつかの研究から報告されている。実験結果は、*E. coli* 量と関連し TNF 依存性である敗血症ヒト血漿へのトロンボモジュリン放出に関するエビデンスを提供し、内皮保護において抗 TNF が果たす可能性がある役割を示している¹⁴⁾。

トロンボモジュリンとは別に、敗血症症例では可溶性内皮細胞プロテイン C 受容体の血漿濃度が上昇している。しかし、トロンボモジュリンとの相関性は弱く、別の因子の関与が示される¹⁵⁾。

3. 液性因子

体液のカスケードは、敗血症症例の血漿で一部が敗血症誘発物質と直接反応して活性化するが（オプソニン作用時など）、大部分は活性化細胞（単球や組織因子など）との反応により活性化する。これらの反応は凝固、線溶、補体カスケードの誘導につながる。抗トロンビン [AT] III、組織因子経路抑制因子 [TFPI]、活性化プロテイン C (APC) などである。これらのマーカーについては今後データの集積が必要であろう。

本邦で開発された可溶性 CD 14 サブタイプを測定することが感染症の診断マーカーとして注目されている¹⁶⁾。現時点では敗血症のマーカーとして最もすぐれたツールになる可能性がある。簡便な定性法も開発中である。

細胞関連マーカー

感染症において様々な細胞型の細胞表面分子がいくつか研究され、刺激後の免疫競合細胞の *ex vivo* 反応性を解明するため機能アッセイが行われている。実施が容易で高度に標準化された方法（フローサイトメトリ、ELISA など）により短時間で結果が得られる。今日、免疫学的介入や治療戦略は、症例が展開する免疫学的な相にしたがって適用する必要がある。

1. 予後および予測パラメータとしての HLA-DR の発現

感染症、特に敗血症において最も特徴が解明さ

れている細胞表面抗原はクラスター DR を伴うヒト白血球抗原 (HLA) である。HLA-DR は主に単球やマクロファージのような抗原提示細胞により発現する主要組織適合性クラス II 抗原複合体であるが、活性化した T および B 細胞によっても発現する。この背景において、単球は、細菌、ウイルス、真菌感染に対する特異的免疫や非特異的免疫でも中心的役割を果たすため集中的に研究されている。Polk らはすでに 1986 年に感染発現に伴い単球を発現する HLA-DR の割合を相関付けた¹⁷⁾。彼らは、重症症例を検討し、第 7~8 病日および第 10~12 病日において単球 HLA-DR 発現が少ないことと、重症感染症の展開または存在との陽性相関を明らかにした。数年後、彼らのグループは外傷症例 60 例を検討して 3 群に分類した。これら症例中、合併症もなく回復がみられた症例における単球 HLA-DR 発現は 1 週間後に正常範囲に回復したが、重症敗血症をきたして回復した症例では正常値に達したのは 3 週間後であった。死亡した症例では、HLA-DR 発現は一度も正常値に回復しなかった。Döcke らは 5 日以上にわたる単球上の MHC クラス II 抗原発現減少 (<30% HLA-DR+) は、敗血症後の予後と強く相関することを証明した¹⁸⁾。彼らが実施した心移植レシピエントにおける免疫モニタリングによると、移植 5~7 日後に単球上の HLA-DR 密度が低下していると感染性合併症を展開するリスクが高かった。術前の HLA-DR 密度に比して HLA-DR 発現が増加した症例では拒絶リスクが高かった。

しかし、単球上の HLA-DR 密度の低下は手術中に常に生じること、手術介入前でも麻酔導入直後に有意な低下が生じることも注意しておく必要がある。すなわち感染がなくてもこのような現象が生じることである。

単球とマクロファージ上の HLA-DR 発現に対するメディエータの調節能は、MHC クラス II 分子の減少により抗原提示能が決定されるか否かという疑問を生じさせる。実際、以前の研究で、MHC クラス II 分子の全てが 0.1% という少量でも休止状態の T 細胞刺激には十分であることが示された¹⁹⁾。したがって、これらのデータから、

循環する単球が抗原を提示し T 細胞を増殖させる能力は、細胞表面 HLA-DR プロテインの有意な喪失にも関わらず、大手術後の無事象の回復期に抑制されることはないと推測される。このように、HLA-DR 低下と臨床的予後の相関性は他の機序に基づいている。しかし、感染性合併症、予後、および循環単球上の HLA-DR 発現の間に十分に証明された相関性があることから、この抗原は敗血症の経過における信頼性の高いマーカーであるように思われる。

単球上の HLA-DR 発現の特徴はよく解明されているが、他の細胞型におけるその発現はほんの一部しか証明されていない。単球とは対照的に T 細胞 HLA-DR 発現度は非敗血症症例では術後初日に、感染を展開する症例以上に上昇するとの報告もある。

2. 敗血症におけるその他の細胞関連マーカー

単球は敗血症の発症と経過に決定的な役割を果たし、細胞表面抗原の発現はこれら細胞の機能特性に相関するため、その他の莫大な数のマーカーが研究されている。その中の一つ、CD 14 抗原は自然免疫応答において中心的役割を果たす。CD 14 は単球上に高度に発現し、細菌の LPS と LBP に結合し、CD 14 に LPS を提示するオプソニンとして機能する。さらに、循環血液中で可溶性 CD 14 (sCD 14) の形態も発見されており、血漿濃度は敗血症を含むいくつかの感染性疾患で上昇することが知られている。この可溶性 CD 14 のサブタイプが感染症の診断として有用な可能性がある¹⁶⁾。膜結合 CD 14 は敗血症により低下し、発現の減少はおそらく予後不良を示すのではないかと推測されている²⁰⁾。最近、複合体である LPS-LBP-CD 14 のシグナル経路は TLR 4 およびその補因子 MD 2 との結合が引き金になって生じることが明らかにされた。これまでのところ単球上 TLR 4 の調節に関しては限定的データしかなく、今後の研究により、免疫モニタリング系における適切な感染症の診断マーカーとしての役割が明らかにされよう。

SIRS 状態の特徴を解明するため、他の様々な細胞と同様に単球上のその他のマーカーが取り上げられている。CD 11 b/CD 18 複合体は細胞相互

作用の促進において接着分子として機能し、iC3b-被覆分子の結合を仲介し、その取り込みと破壊を導く。CD 11b/CD 18 の発現は全身性炎症反応症候群 (SIRS) および敗血症の重症度とともに増加する。

おわりに

技術の進歩、感染症および敗血症マーカーは luminometric (輝度測定) 手技 (サイトカイン分析~20 分; 例, DPC Bierman, ドイツ) または迅速な臨床測定法—IL-6 ストリップ (Knill, ドイツ), PCT カセット (Brahms, ドイツ) 半定量法, ネオプテリン半定量法などを用いる自動計測機器の使用により, より簡便な利用が可能になっている。

最新の研究成果から, 感染症および敗血症マーカーは多形性の影響に関する知見の増加と組み合わせると, 感染性合併症をきたすリスクが高い症例を特定することが可能ではないかという期待が抱かれる。これらの症例は, 各症例に合わせて免疫系および体液系をサポートすることが射程範囲内であることから, 免疫/生化学的モニタリングの恩恵を最も多く受ける症例ではないかと思われる。

文 献

- Casey LC, Balk RA, Bone RC: Plasma cytokine and endotoxin levels correlates with survival in patients with the sepsis syndrome. *Ann Intern Med* 119: 77-778, 1993
- Moore F, Poggetti R, McAnena O, et al: gut bacterial translocation via the portal vein: a clinical perspective with major torso trauma 31: 629-638, 1991
- 八重樫泰法, 稲田捷也, 佐藤信博, 他: 血漿高感度エンドトキシン測定法について. エンドトキシン血症救命治療研究会誌 7: 25-28, 2003
- cavaillon JM: Possibilities and problems of cytokine measurements/In: Redl H, Schlag g (eds) *Cytokines in Severe Sepsis and Septic Shock*. Birkhauser, Basel, 1999, p 95-119
- Goldie AS, Fearon KC, Ross JA, et al: Natural cytokine antagonists and endogenous antiendotoxin core antibodies in sepsis syndrome. The Sepsis Intervention group. *JAMA* 274: 172-177, 1995
- Strohmaier W, Redl H, Schlag G, et al: D-erythro-neopterin plasma levels in intensive care patients with and without septic complications. *Crit care Med* 15: 757-760, 1987
- Assicot M, Gendrel D, Carsin H, et al: High serum procalcitonin concentration in patients with sepsis and infection. *Lancet* 341: 515-518, 1993
- Patel RT, Deen KI, Youngs D, et al: Interleukin 6 is a prognostic indicator of outcome in patients with severe intra-abdominal sepsis. *Br J Surg* 81: 1306-1308, 1993
- Wang H, Bloom O, Zhang M, et al: HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science* 285: 248-251, 1999
- Brown GM: The biosynthesis of pteridines. *Adv Enzymol* 35: 5-77, 1971
- Strohmaier W, Poigenfurst J, Mauritz W: Neopterin blood levels: a basis for deciding to use antibiotics in intensive care unit (ICU) patients. *Pteridines* 7: 1-4, 1996
- Gendrel D, Boyun C: Procalcitonin, a marker of bacterial infection. *Infectipon* 25: 133-134, 1997
- 遠藤重厚, 葛西健, 稲田捷也: 全身性炎症反応症候群における感染症および重症度診断としてのプロカルチニン値測定の意義. *感染症誌* 73: 197-203, 1999
- Redl H, Schlag G, Schiesser A, et al: Thrombomodulin release in baboon sepsis: its dependence on the dose of *Escherichia coli* and the presence of tumor necrosis factor. *J Infect Dis* 171: 1522-1527, 1995
- Kurosawa S, Stearns-Kurosawa DL, Carson CW, et al: Plasma levels of endothelial cell protein C receptor are elevated in patients with sepsis and systemic lupus erythematosus: lack of correlation with thrombomodulin suggests involvement of different pathological processes. *Blood* 91: 725-727, 1998
- 遠藤重厚, 八重樫泰法, 佐藤信博, 他: 新しい

- 敗血症の診断マーカーである可溶性 CD 14 サブタイプの有用性について. 日救急医学会誌 14 : 602, 2003
- 17) Polk HC, Jr, George CD, Welljausen SR, et al : A systematic study of host defences in badly injured patients. Ann Surg 204, 282-299, 1986
- 18) Docke WD, Randow F, Syrbe Y, et al : Monocyte deactivation in septic patients : restoration by IFN-gamma treatment. Nature Med 3 : 678-681, 1997
- 19) Demotz S, Grey HM, Sette A : The minimal-number of class II MHC-antigen complexes needed for T cell activation. Science 249 : 37-42, 2001
- 20) Weighardt H, Heidecke CD, Emmanuilidis K, et al : Sepsis after major visceral surgery is associated with sustained and interferon gamma resistant defects of monocyte cytokine production. Surgery 27 : 309-315, 2000

Abstract

Rapid Diagnostic Method for Sepsis

Shigeatsu Endo, Nobuhiro Sato and Yasunori Yaegashi

Department of Critical Care Medicine, Iwate Medical University
19-1 Uchimaru, Morioka, Iwate 020-8505, Japan

Sepsis poses a formidable and increasingly common challenge to the clinician. If unsuspected and left unchecked, it can progress to severe sepsis and on to septic shock with alarming rapidity. Although innovative therapies are being tested and novel management strategies are evolving, early diagnosis of this lethal disease still offers the patient the best chance of survival. The clinician should, therefore, have a high index of suspicion for this disease and should treat early and aggressively, even before complete laboratory and diagnostic results are available to confirm the diagnosis.

ICU & CCU 29 (1) : 21~26, 2005

高感度エンドトキシン測定法の評価

1) 岩手医科大学医学部救急医学 2) リムロイドサイエンス (株)

遠藤 重厚¹⁾, 八重樫 泰法¹⁾, 佐藤 信博¹⁾, 鈴木 泰¹⁾, 小鹿 雅博¹⁾, 稲田 棲也²⁾

1. リムルステストの原理について

エンドトキシン定量法として知られるリムルステストの名はアメリカ産カブトガニの学名 *Limulus polyphemus* から由来している。このテストは、カブトガニ血球が微量のエンドトキシンで凝固する現象が契機となり開発された¹⁾。カブトガニ血球の抽出液 (ライセート) に存在するC因子がエンドトキシン (lipopolysaccharide; LPS) の受容体であり、これは哺乳動物の補体のC1sやC1qとの構造類似性が明らかにされている。エンドトキシンと結合するC因子は活性化C因子となる。活性化C因子はB因子を活性化し、活性化B因子は凝固酵素前駆体に作用して凝固酵素に変換する。これが、コアグロゲン (哺乳類のフィブリノーゲンに相当) に作用し、不溶性のコアグリン (フィブリンに相当) を形成する。これがリムルステストのゲル化法と呼ばれるもので、開発当初から敗血症患者血中エンドトキシンの定量法として用いられるようになった。その後、岩永らにより詳細に研究され、LPSによって活性化される系 (C因子系) と、真菌の細胞壁成分である β -D-グルカンなどによって活性化される系 (G因子系) が存在することがわかった (図1)²⁾。その結果、エンドトキシン、 β -D-グルカンそれぞれ特異的に反応するキットが開発された。さらに定量方法においても、合成基質法^{3),4)}や比濁時間分析法⁵⁾が開発された。現在0.1pg/ml単位のエンドトキシンを検出できる可能性がある。しかし、欧米で市販されているキットは今でも古典的な方法 (エンドトキシンとグルカンに反応する) であることは注意が必要である (欧米のエンドトキシンのデータは信用性に疑問が残る)。

2. リムルステストの種類

a. ゲル化法

定性的方法である。ライセートは市販されている。45度傾けるか、転倒させて判定する。既に臨床では用いられていない。

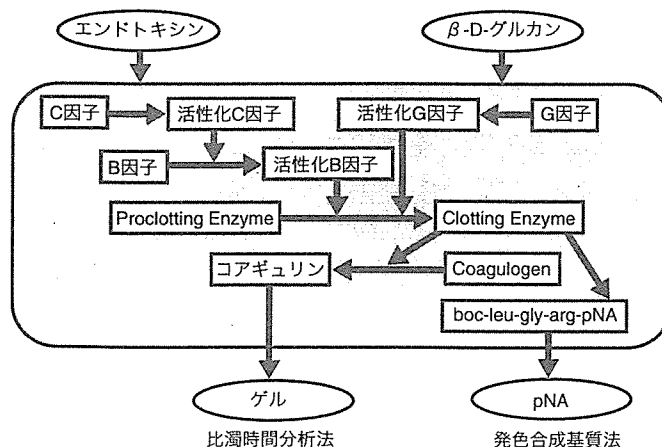


図1 2つのリムルステスト