

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591863

研究課題名(和文)新しいエンドトキシン測定法による敗血症の評価

研究課題名(英文)The evaluation of sepsis by new endotoxin detection methods

研究代表者

清水 智治 (Shimizu, Tomoharu)

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：70402708

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円、(間接経費) 1,140,000円

研究成果の概要(和文)：Endotoxin Laser Scattering Photometry (ESP) が比濁時間分析法(従来法)より高感度にエンドトキシン(Et)を測定できる可能性が示唆された。ESPが従来法より有意にSeptic shockおよびSepsisの診断能が高く、細菌感染診断として一般的に使用される試薬の一つであるプロカルシトニンテストと同等での予測能力であった。Septic shockにてEt吸着療法を行った患者では、ESP測定値の低下にともなって臨床症状が改善した。また、Et吸着筒前後で、Et低下も確認された。PMX施行患者でのEAAよりESPが患者状態を良く反映する可能性が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Endotoxin Laser Scattering Photometry (ESP) method may more sensitively detect endotoxins than the ordinary turbidimetric method. ESP significantly discriminated between patients with or without septic shock and sepsis compared to the ordinary method. There was no significant difference in predictive power between ESP and procalcitonin test that is one of common tools for the diagnosis of bacterial infection. The patients clinical conditions of septic shock due to intra-abdominal infection were improved by endotoxin adsorption therapy (PMX), reducing plasma endotoxins measured by ESP method. We also observed the reduction in the endotoxin after passing through column by ESP method even after the longer duration of PMX.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：エンドトキシン 敗血症性ショック 敗血症 高感度測定

1. 研究開始当初の背景

エンドトキシンは、グラム陰性菌が産生する強い毒素であり、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(1)。血中エンドトキシンはリムルスアッセイを用いて測定できる。国内では臨床診断試薬として保険適応である。しかし、現在の国内で用いられているエンドトキシン特異的リムルスアッセイは感度が低く、敗血症性ショックを呈しエンドトキシン吸着カラムによる治療効果を認める患者であっても中エンドトキシンが測定できない場面にはしばしば遭遇する。

新しいエンドトキシン測定方法として、小幡博士によりリムルスアッセイ応用した Endotoxin Laser Scattering Photometry (ESP) が開発された。従来法ではリムルス試薬がエンドトキシンと反応した際に生じるゲルを濁度により評価(比濁時間分析法)していたが、レーザー散乱測光法によりゲルが生じる前の微粒子を測定することにより感度と測定時間短縮を可能とした。従来法のリムルスアッセイでは 5pg/mL が測定限界であったが、ESP では 0.0214pg/mL まで測定可能であり、約 200 倍の感度を持つ。ESP によって、今まで測定できていなかった血中の微量のエンドトキシンを迅速に測定することができるようになり、正確に患者の病態を評価し的確な治療を行うことが可能となった。右図のように、直腸穿孔により敗血症を示した患者において従来法(比濁時間分析法)ではエンドトキシンを検出できなかったが、ESP では評価可能であったことを既に報告している。また、少数例での検討では、non-SIRS、sepsis、septic shock といった患者状態を区別できる可能性がある。

一方、米国では、リムルスアッセイによるエンドトキシン測定の臨床診断薬としては認められておらず、好中球の活性化比を利用して測定する Endotoxin Activity Assay (EAA) が、臨床診断薬として認められている。米国では敗血症性ショックの患者に対して EAA を指標としてエンドトキシン吸着療法の臨床試験が行われる予定となっている。国内では、2008 年より研究用機器として EAA の測定が可能となっているが、評価まだ定まっていない。

以上の背景より、本研究課題では、敗血症患者での血中エンドトキシン値を ESP および EAA により測定し、その臨床的意義を解明することを目的としている。

2. 研究の目的

臨床研究 1: 腹膜炎、肺炎、尿路感染症、胆嚢炎、カテーテル感染症など様々な敗血症 (Sepsis) を呈する患者において ESP の評価を行う。血液・喀痰・尿など各種培養検査および患者の重症度スコアと対比して、ESP にて患者病態を正確に評価できているかどうか確認を行う。

臨床研究 2: 敗血症性ショックを来した症例では経時的に ESP と EAA を測定しエンドトキシン吸着療法を必要とした患者と必要でなかった患者のエンドトキシン濃度を比較する。これまで明らかではなかったエンドトキシン吸着療法を必要とする患者でのエンドトキシンレベルを推定することができる。

3. 研究の方法

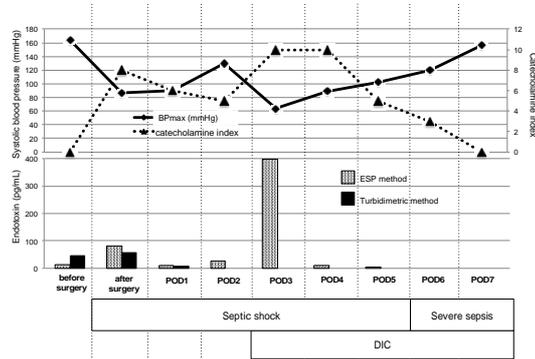
臨床研究 1: 腹膜炎、肺炎、尿路感染症、胆嚢炎、カテーテル感染症など様々な敗血症 (Sepsis) を呈する患者において ESP の評価を行う。血液・喀痰・尿など各種培養検査および患者の重症度スコアと対比して、ESP にて患者病態を正確に評価できているかどうか確認を行う。細菌感染マーカーであるプロカルシトニンテスト (PCT) と対比し ESP の正確性を検討する。

臨床研究 2: 敗血症性ショックを来した症例では経時的に ESP と EAA を測定しエンドトキシン吸着療法を必要とした患者と必要でなかった患者のエンドトキシン濃度を比較する。これまで明らかではなかったエンドトキシン吸着療法を必要とする患者でのエンドトキシンレベルを推定することができる。

4. 研究成果

臨床研究 1: 敗血症症例における ESP 法の敗血症診断能に関する研究

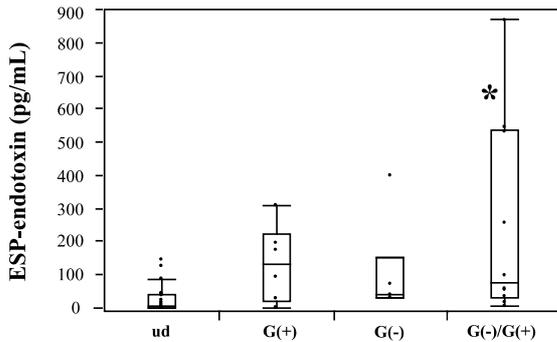
- (1) 敗血症性ショックを来した患者での ESP によるエンドトキシン値と循環動態の変化についての評価(雑誌論文)
突然の腹痛にて当院に救急搬送された症例。大腸穿孔により敗血症性ショックに陥った。循環動態・全身状態の改善と伴に ESP によるエンドトキシン値は低下していったが、従来法によるエンドトキシン値は術前術後に検出されたのみで、経過中ほとんど検出されなかった。ESP による評価が患者状態を反映する可能性を見いだした症例報告である。



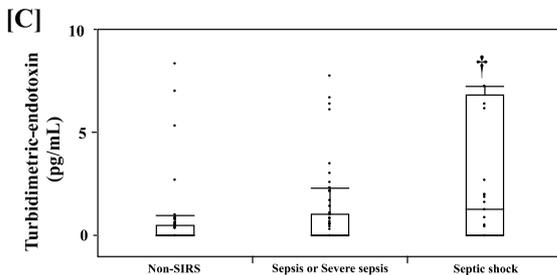
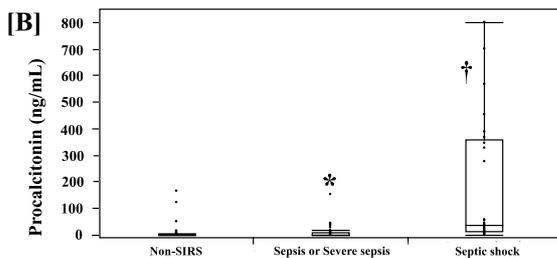
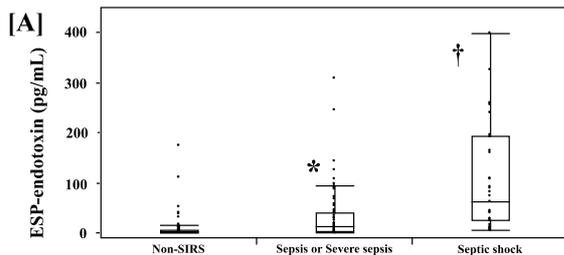
- (2) 腹腔内感染が示唆される緊急手術を必要とする患者 40 例で検討を行った。術前、術直後、術後一日目に(敗血症性ショックを来

した症例ではショックを脱するまで)採血を行い、検出菌、敗血症重症度との関係について、検討を行った。従来法のエンドトキシン値と PCT 値との比較検討を行った。(雑誌論文)

グラム陰性菌の感染を合併する症例で ESP 法では高値を示した。

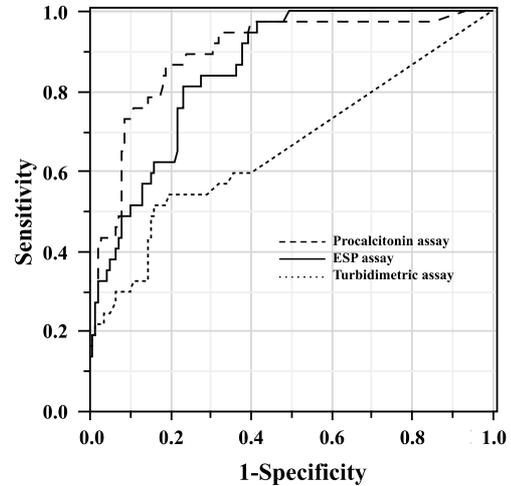


患者の敗血症重症度 (non-SIRS, Sepsis & severe sepsis, Septic shock) により ESP、従来法、PCT を比較したところ、ESP と PCT は患者の重症度が上昇するにつれ、高値となった。



敗血症性ショックに対する診断能は従来法は有意差を認めなかったが、ESP と PCT はほ

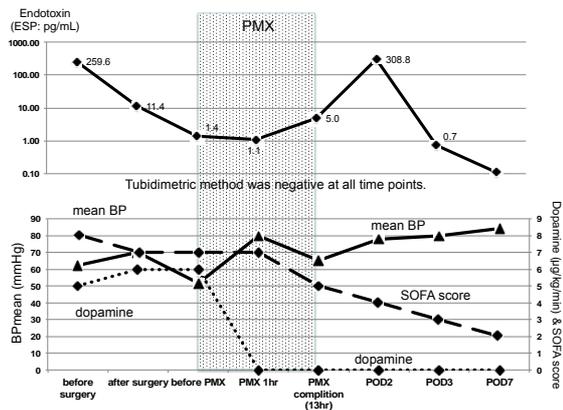
ぼ同等の診断能がある事が判明した。



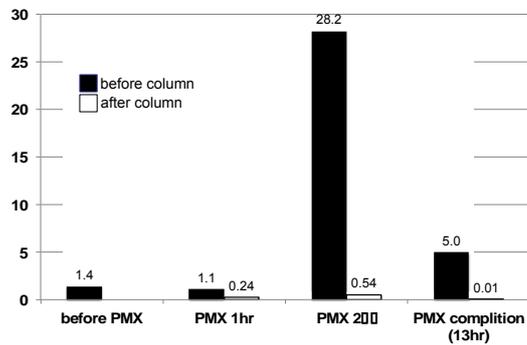
以上より、ESP が患者敗血症の重症度を反映し、その診断能は現在、敗血症診断に用いられている PCT と同等である可能性が示唆された。

臨床研究 2: 敗血症性ショックを来した症例では経時的に ESP と EAA を測定しエンドトキシン吸着療法 (PMX 治療) を必要とした患者での検討

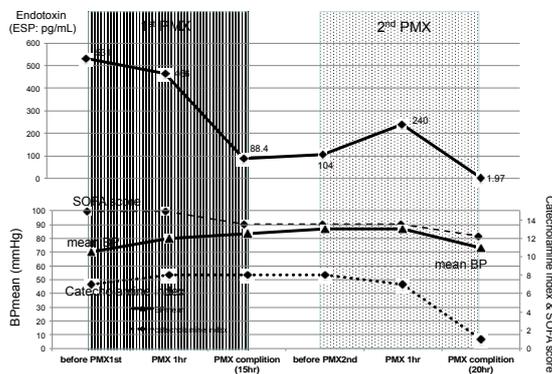
- (1) 敗血症性ショックを来した患者での長時間 PMX 治療での ESP によるエンドトキシン値の評価 (雑誌論文)
外傷性大腸穿孔による汎発性腹膜炎により敗血症性ショックに陥った症例で、PMX 治療を行った結果、循環動態の改善に伴い、ESP によるエンドトキシン値は低下を認めたと、従来法は経過中検出限界以下であった。



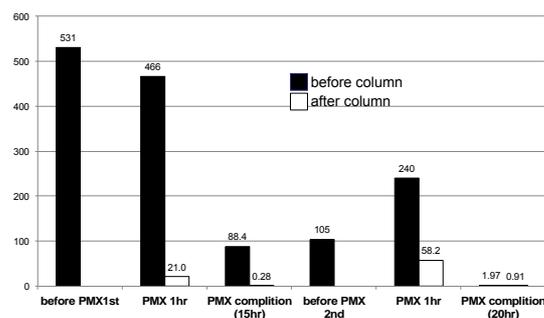
また、長時間の PMX 治療を行ったにもかかわらず、PMX カラムのエンドトキシン吸着能が保たれていることが確認された。



感染性壊死性膵炎にてドレナージ術を施行した患者で敗血症性ショックに陥った症例でも、循環動態の改善にともない、ESP によるエンドトキシン値は低下を認めたが、従来法は経過中検出限界以下であった。



PMX カラムのエンドトキシン吸着能が保たれていることが確認された。



(2) 敗血症性ショック患者での ESP と EEA の比較 (雑誌論文)

潰瘍性大腸炎に合併した大腸穿孔症例において、敗血症性ショックを来した患者で PMX 治療を施行した。ESP と EEA を測定してエンドトキシンの検討を行ったが、ESP は概ね、患者の状態に併行して減少していったが、EAA 値は敗血症性ショックの状態にあるにもかかわらず、低い値を示した。ステロイドが全身投与されている様な症例では、EAA 法の評価には注意する必要がある、

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9件)

山口剛、清水智治、小幡 徹、園田寛道、赤堀浩也、三宅 亨、田畑貴久、江口豊、谷 徹: ステロイド治療中に敗血症性ショックに陥った患者での Endotoxin Activity Assay と Endotoxin Scattering Photometry の評価、腹部救急医学会雑誌、査読有、印刷中 2014.

Shimizu T, Obata T, Sonoda H, Akabori H, Miyake T, Yamamoto H, Tabata T, Eguchi Y, Tani T: Diagnostic potential of endotoxin scattering photometry for sepsis and septic shock. Shock, 査読有, 38(6), 2013, 504-511.

Shimizu T, Obata T, Sonoda H, Akabori H, Tabata T, Eguchi Y, Endo Y, Tani T: The ability of endotoxin adsorption during a longer duration of direct hemoperfusion with a polymyxin B- immobilized fiber column in patients with septic shock. Transfus Apher Sci, 査読有, 49(3), 2013, 499- 503.

大園 英一, 小幡 徹, 井上 有紀, 本田和美, 熊谷 拓也, 根岸 秀樹, 市村 恭子, 岡松 健太郎, 滝澤 英明, 野呂瀬 嘉彦, 高橋 めぐみ, 清水 智治, 谷 徹, 富岡敏一, 坂元 仁, 土戸 哲明: 岡松 健太郎, 滝澤 英明, 野呂瀬 嘉彦, 高橋 めぐみ: ETRF/UF の多段化で透析液の微生物学的清浄度は向上するか?, 腎と透析, 査読有, 75 巻別冊, 2013, 139- 141.

小幡 徹, 清水 智治, 谷 徹, 上村 優介, 清水 洋一, 中澤 了一, 柏原 英彦, 森戸勝, 佐藤 寿加, 井上 均, 木次谷 隆公, 市川 正人, 竹内 一郎, 吉岡 豊一, 吉田和彦: 高感度エンドトキシン測定 ESP 法を用いた透析液のエンドトキシン測定と培養検査の多施設比較, 腎と透析, 査読有, 75 巻別冊, 2013, 122- 124.

Tomoharu Shimizu, Toru Obata, Hiroichi Sonoda, Hiroya Akabori, Tohru Miyake, Tsuyoshi Yamaguchi, Tsuyoshi Mori, Shigeyuki Naka, Satoshi Murata and Tohru Tani: Alteration in plasma endotoxin level measured by endotoxin scattering photometry method in two patients with septic shock. 日本外科系連合学会誌, 査読有, 38 巻 2013, 75-79.

清水 智治, 小幡 徹, 赤堀 浩也, 遠藤 善裕, 江口豊, 田畑 貴久, 谷 徹: Endotoxin scattering photometry(ESP)法による敗血症患者での血中エンドトキシンの評価, 査読有, 16 巻 2012, 26-31.

赤堀 浩也, 清水 智治, 三宅 亨, 山口剛, 園田 寛道, 塩見 尚礼, 仲 成幸, 村田 聡, 山本 寛, 小幡 徹, 遠藤 善裕, 谷

徹: 消化器外科手術での Endotoxin activity assay(EAA)の変動に関する検討, 査読有, 16 巻 2012, 93-102.

清水 智治, 小幡 徹, 園田 寛道, 谷 徹: ESP 法(Endotoxin scattering photometry)による血中エンドトキシン測定, 日本外科感染症学会雑誌, 査読有, 9 巻 2012, 327-334.

[学会発表](計 23 件)

山口剛、清水智治、小幡 徹、園田寛道、太田裕之、赤堀浩也、遠藤善裕、仲成幸、田畑貴久、江口 豊、谷 徹: 潰瘍性大腸炎大腸穿孔症例での Endotoxin Activity Assay に関する検討, 第 50 回日本腹部救急医学会総会, 2014 年 03 月 06 日~2014 年 03 月 07 日(東京)

清水智治、小幡 徹、園田寛道、太田裕之、山口剛、赤堀浩也、遠藤善裕、仲成幸、田畑貴久、江口 豊、谷 徹: 腹部救急疾患での新しいエンドトキシン測定法 (Endotoxin Scattering photometry; ESP 法) による重症度評価の可能性, 2014 年 03 月 06 日~2014 年 03 月 07 日(東京)

清水 智治、小幡 徹、園田 寛道、太田 裕之、山口 剛、赤堀 浩也、遠藤 善裕、田畑 貴久、江口 豊、谷 徹: Endotoxin Scattering Photometry (ESP 法) での敗血症診断の可能性, 第 19 回日本エンドトキシン・自然免疫研究会, 2013 年 12 月 06 日~2013 年 12 月 07 日(大津)

清水智治、小幡 徹、赤堀浩也、吉岡豊一、森 毅、遠藤善裕、田畑貴久、江口 豊、谷 徹: Endotoxin Scattering Photometry (ESP) 法の敗血症診断能と PMX 治療での変動, 第 34 回 日本アフェリシス学会学術大会(招待講演), 2013 年 11 月 01 日~2013 年 11 月 03 日(軽井沢)

清水智治、小幡 徹、赤堀浩也、園田寛道、森 毅、山本 寛、遠藤善裕、仲成幸、江口 豊、田畑貴久、谷 徹: 敗血症性ショック症例での EAA と ESP 法の比較, 第 28 回 日本 Shock 学会総会, 2013 年 05 月 17 日(東京)

清水智治: 腹部救急疾患でのエンドトキシン吸着療法の評価としての Endotoxin Scattering Photometry (ESP)法の可能性, 第 49 回 日本腹部救急医学会総会(招待講演), 2013 年 03 月 13 日~2013 年 03 月 14 日(福岡)

清水智治: 緊急手術症例における Endotoxin Scattering photometry (ESP) 法によるエンドトキシンの評価, 第 19 回 外科侵襲とサイトカイン研究会, 2012 年 12 月 07 日~2012 年 12 月 08 日(神戸市)

清水智治: 長時間 PMX 治療での Endotoxin Scattering photometry (ESP) 法による血中エンドトキシン値の評価, 第

25 回 日本外科感染症学会総会学術集会, 2012 年 11 月 21 日~2012 年 11 月 22 日(千葉)

法による Endotoxin Scattering photometry の変動, 第 33 回 日本アフェリシス学会学術大会, 2012 年 11 月 09 日~2012 年 11 月 10 日(佐世保市)

Tomoharu Shimizu: The ability of endotoxin adsorption during a longer duration of direct hemoperfusion with a polymyxin B-immobilized fiber column in patients with septic shock. 2012 Meeting of International Endotoxin and Innate Immunity Society. 2012 年 10 月 23 日~2012 年 10 月 26 日(Tokyo)

Tomoharu Shimizu, The Clinical Efficacy of Direct-Hemoperfusion with Polymyxin B Immobilized Fiber Column (Toraymyxin), 2012 Annual Meeting in Taiwan Society of Critical Care Medicine (招待講演), 2012 年 10 月 06 日~2012 年 10 月 07 日(台北, 台湾)

Tohru Tani, Tomoharu Shimizu: Direct-hemoperfusion with polymyxinB immobilized fiber reduces plasma and endotoxin and inflammatory mediators in septic patients. World Association for Apheresis 2012(招待講演), 2012 年 09 月 14 日~2012 年 09 月 16 日(Istanbul, Turkey)

Tomoharu Shimizu: Alteration in plasma endotoxin level during a longer duration of direct hemoperfusion with a polymyxin B-immobilized fiber column in a patient with septic shock. World Association for Apheresis 2012, 2012 年 09 月 14 日~2012 年 09 月 16 日(Istanbul, Turkey)

Tomoharu Shimizu, Plasma endotoxin level measured by endotoxin scattering photometry during direct hemoperfusion with a polymyxin B-immobilized fiber column in a patient with septic shock, 35th Annual Conference on Shock, 2012 年 06 月 09 日~2012 年 06 月 13 日(Florida, USA)

清水智治: PMX 施行症例での ESP 法による評価, 第 27 回 日本 Shock 学会(招待講演), 2012 年 05 月 10 日~2012 年 05 月 11 日(東京)

清水智治: Endotoxin Scattering photometry による外科周術期患者の評価, 第 112 回 日本外科学会定期学術集会, 2012 年 04 月 12 日~2012 年 04 月 14 日(千葉)

清水智治: 腹部緊急手術症例での ESP により血中エンドトキシン値の評価, 第 24 回日本外科感染症学会学術集会 シンポジウム, 2011 年 12 月 2 日(三重県)

清水智治: 重症感染症 外科的マネジメントと血液浄化療法のタイミング, 第 24 回日本外科感染症学会学術集会 ICD 講習会(招待講演), 2011 年 12 月 1 日(三

重県)

清水智治: 新しいエンドトキシン測定法による術後敗血症症例の評価, 第73回日本臨床外科学会総会, 2011年11月19日(東京都)

清水智治: 腹部救急疾患におけるESP法による血中エンドトキシンの評価, 第47回日本腹部救急医学会総会, 2011年8月12日(福岡県)

- ⑳ 清水智治: 腹膜炎症例でのESP法によるエンドトキシン値の評価, 第26回日本Shock学会総会, 2011年5月21日(浜松市)
- ㉑ 清水智治: ESP法による腹部緊急手術周術期の血中エンドトキシン値の評価, 第48回日本腹部救急医学会総会, 2012年3月15日,(金沢市)
- ㉒ 清水智治: Septic shock症例でのESP法による血中エンドトキシン値の変動の検討, 第48回日本腹部救急医学会総会, 2012年3月15日(金沢市)

〔図書〕(計2件)

清水智治, 他 医学図書出版社 エンドトキシン・自然免疫研究15巻, Endotoxin scattering photometry(ESP)法による血中ET測定の現状と課題, 2012, 68

清水智治, 他 医学図書出版社 エンドトキシン・自然免疫研究14巻, 血中エンドトキシン測定の見通し Endotoxin scattering photometry(ESP)による血中エンドトキシン評価, 2011, 88

〔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

清水智治 (SHIMIZU Tomoharu)

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号: 70402708

(2)研究分担者

山本 寛 (YAMAMOTO Hiroshi)

滋賀医科大学・医学部・講師

研究者番号: 00283557

谷 徹 (TANI Tohru)

滋賀医科大学・医学部・教授

研究者番号: 20179823

小幡 徹 (OBATA Toru)

滋賀医科大学・医学部・特任准教授

研究者番号: 80119776

江口 豊 (EGUCHI Yutaka)

滋賀医科大学・医学部・教授

研究者番号: 00263054

田畑 貴久 (TABATA Takahisa)

滋賀医科大学・医学部・講師

研究者番号: 90278200

赤堀 浩也 (AKABORI Hiroya)

滋賀医科大学・医学部・特任助教

研究者番号: 10340069

三宅 亨 (MIYAKE Tohru)

滋賀医科大学・医学部・客員助教

研究者番号: 70581924