

表 題 敗血症性凝固障害の早期診断における凝固・線溶系マーカーの
有用性と幼弱血小板比率による血小板数の評価

論文の区分 博士課程

著 者 名 小 山 寛 介

担当指導教員氏名 布 宮 伸 教授

所 属 自治医科大学大学院医学研究科
地域医療学系専攻
麻酔・救急・集中治療医学分野
集中治療医学

2015年1月9日申請の学位論文

目次

1. 諸言	2
A. 研究① 重症敗血症性凝固障害の早期診断に有用なバイオマーカーの評価	5
2a. 対象と方法	5
3a. 結果	9
B. 研究② 敗血症性凝固障害における血小板減少と凝固・線溶系マーカーの関連	19
2b. 対象と方法	19
3b. 結果	21
C. 研究③ 幼弱血小板比率 (IPF) による敗血症患者における血小板減少の評価	23
2c. 対象と方法	23
3c. 結果	27
4. 考察	31
5. 結語	37
6. 謝辞	38
7. 参考文献	39

1. 緒言

敗血症は、世界で年間およそ 3,000 万人が罹患する疾患であり、重症例の死亡率は 30~40 %に上る[1,2]. 米国では敗血症の発症率が過去 10 年間で約 2 倍と、医療の発展に伴って逆説的に増大しており、治療成績の向上が急務である。しかし、敗血症の病態に関する知見は飛躍的に集積されているにも関わらず、現在の敗血症の標準的な管理は、早期の認知と早期の抗菌薬の投与、大量輸液による循環動態の安定であり[3], 敗血症の病態に対する根本的なアプローチは確立されていない。

病原微生物の感染において、止血凝固系は免疫系と直接または種々のメディエーターを介して相補的に関与し、生体防御機構として重要な役割を果たしている[4]. 病原微生物の感染が起きると、生体は Toll-like receptor (TLR) などの特異的受容体で病原微生物を認識し、signalosome pathway, inflammasome pathway を介して種々の炎症性サイトカインが産生され、炎症が惹起される[5]. IL-6 を主とする炎症性サイトカインは、単球系や血管内皮細胞などに組織因子を誘導し、凝固系の活性化が起こる。凝固カスケードにより生成されたトロンビンをはじめとする凝固因子は、血小板を活性化し、フィブリンを生成して血栓を形成すると同時に、血管内皮細胞、単球などに存在する PARs (protease activated receptors) を介して、サイトカイン産生や細胞接着因子 (P-selectin) を発現させ、NO を産生して血管拡張を引き起こし、炎症を増悪させる[6]. 血小板も単に凝固の場を提供し、止血に関わる細胞ではなく、TLR・purinergic

receptor を介して病原微生物を認識し，脱顆粒により多種の殺菌性のペプチドを放出し，生体防御に関わる免疫効果細胞として重要な役割を果たしている[7].

敗血症では，重篤な感染に対する過剰な炎症と凝固が相補的に関わり，多種のメディエーターによって繋がれた免疫系，止血凝固系，血管系など複数のシステムの異常により，虚血（低酸素症），細胞傷害，血管内皮障害，アポトーシスをきたし，多臓器機能不全に至る[8]. とくに凝固系の異常は，微小血管内の血栓形成とトロンビンを介した炎症の増悪によって組織傷害をきたす．すなわち，敗血症性凝固障害は，敗血症発症後の臓器合併症ではなく，敗血症発症初期から病態の形成に深く関与し，他の臓器障害の原因として重要である可能性が高い．重症の凝固障害である播種性血管内凝固（disseminated intravascular coagulation, DIC）の発症を早期に認知し，治療介入できれば敗血症患者の予後改善が期待できる．

しかし敗血症性凝固障害の早期診断，病勢や重症度の評価法は，未だ確立されていない[9]. 現在，敗血症性 DIC の診断は，世界的には国際血栓止血学会（International Society on Thrombosis and Haemostasis, ISTH）の overt DIC 診断基準が，我が国では旧厚生省（Japanese Ministry of Health and Welfare, JMHW）の DIC 診断基準が一般に広く使用されている[10]. ISTH overt DIC 基準, JMHW 基準はともに簡便で臨床における適用が容易であり，臓器障害や生命予後との関連が示されている一方，敗血症性 DIC の早期診断に用いるには限界があると指摘されている[11,12]. ISTH overt DIC 基準, JMHW 基準は血小板, prothrombin

time (PT) など一般の血液凝固検査を診断項目に用いており、それらが消費性に低下して初めて診断に至るため、確定診断には数日を要する[13,14]。わが国では日本救急医学会 (Japanese Association for Acute Medicine, JAAM) の主導で、より早期の DIC 診断を目的として急性期 DIC 診断基準が作成されたが[15]、診断の感度は高いものの特異度は低く、DIC の早期診断としての有用性は疑問視されている。

本研究では、敗血症性凝固障害の早期診断をテーマとして、凝固・線溶系マーカーと血小板の有用性を評価した。本研究の第一の目的は、重症の敗血症性凝固障害 (敗血症性 DIC) の早期診断に有用なマーカーを探ることである。我々は、凝固障害は敗血症初期より発症しており、重症例では血小板・凝固因子の消費の進行により、遅れて DIC が顕性化すると仮説を立て、敗血症初期の凝固・線溶系マーカーとその後の overt DIC 発症との関連を調査した (研究①)。

また本研究の第二の目的として、敗血症性凝固障害の診断項目としての血小板数の重要性を明らかにするため、敗血症初期の凝固・線溶系マーカーとその後の血小板減少との関連 (研究②) を調査し、血小板減少の病態に関して幼弱血小板比率による評価 (研究③) を行った。

A. 研究① 重症敗血症性凝固障害の早期診断に

有用なバイオマーカーの評価

2a. 対象と方法

2a. 1. 研究デザイン

2012年1月から2013年6月にかけて、自治医科大学附属病院ICU（12床）において前向き観察研究を行った[16]。本研究は自治医科大学倫理委員会の承認を受けており、患者家族よりインフォームドコンセントを得て実施した。

敗血症でICU入室となった18歳以上で、入室時にISTH基準のovert DICを合併していない患者を対象とした。敗血症は2001年のInternational Sepsis Definitions Conferenceの定義に準じて診断した[17]。除外基準は、肝硬変（Child-Pugh分類B以上）の合併、血液疾患の合併、維持透析患者と、ICU入室4週間前からの抗凝固療法、輸血療法の既往とした。

ICU入室時に、年齢、性差、合併症などの患者背景と、重症度スコアとしてAcute Physiology and Chronic Health Evaluation (APACHE) IIスコア[18]を記録した。臓器不全の指標であるSequential Organ Failure Assessment (SOFA)スコア[19]とISTH基準のovert DICスコアはICU入室後、連日算出した。またISTH基準non-overt DICスコアとJAAM基準DICスコアをDIC早期診断基準として連日計算した。

プライマリ・エンドポイントは、ICU入室後5日以内のovert DIC発症であ

る。ISTH 基準で 5 点以上獲得した場合に overt DIC と診断した。セカンダリ・エンドポイントは 28 日死亡率とした。対象とした患者から ICU 入室後 6 時間以内に血漿検体を採取し、その後 5 日間の overt DIC 発症と 28 日間の生命予後をフォローした。

2a. 2. バイオマーカーの測定

ICU 入室時を Day 0 とし、Day 1~3 まで、一般血液凝固検査である血小板数 (platelet count, PLT), PT-INR, APTT, fibrinogen, fibrinogen and fibrin degradation product (FDP), トロンビン生成の指標として thrombin-antithrombin complex (TAT), soluble fibrin (SF), 凝固抑制因子として protein C (PC), antithrombin (AT), 線溶系の指標として plasminogen, α_2 -plasmin inhibitor (PI), plasmin- α_2 -PI complex (PIC), plasminogen activator inhibitor (PAI)-1, そして血管内皮活性化の指標として可溶性 E-selectin の 14 のバイオマーカーを測定した。

検体はヘパリン・フリーで採取し、4°C・2,500 rpm で遠心処理した。一般血液凝固検査は CS-2100i 自動測定器 (Sysmex, 兵庫) で測定した。PC, AT, plasminogen, α_2 -PI 活性の測定は Berichrom 試薬 (Siemens, 東京) を、TAT, PIC の測定は Test F 酵素免疫法 (Sysmex) を用いた。SF, PAI-1, E-selectin は採取後-80°C で凍結した検体を用いて、それぞれ iatroSF test, tPAI test, sES latex photometric immunoassay 法 (三菱化学メディエンス, 東京) で測定した。

2a. 3. 患者管理

我々の施設は集中治療専門医が 24 時間専従して管理する closed ICU である。敗血症の管理は、Surviving Sepsis Campaign Guidelines に準じて標準的な治療を行った。深部静脈血栓（deep vein thrombosis, DVT）予防に関しては基本的にフットポンプを使用し、凝固障害、または出血のリスクがないことを確認した後に、低用量ヘパリン（10,000 単位/日）の投与を行った。アンチトロンビン製剤の投与は、入室時の AT 活性 < 50 % の患者に限って、集中治療専門医の判断で投与できることとした。濃厚血小板および新鮮凍結血漿の輸血は、出血性合併症の出現、または出血のリスクが高い場合に限って行った。

2a. 4. データ解析

対象患者を overt DIC 発症群と非発症群に分類した。2 群間の比較にはウィルコクソン順位和検定、 χ^2 検定またはフィッシャーの正確確率検定を用いた。バイオマーカーに関しては、我々の施設で用いている基準範囲を超えた場合、または下回った場合を異常値と定義した。

ICU 入室時 (Day 0) における 14 のバイオマーカーの overt DIC 発症の予測に関して ROC (Receiver operating characteristic curve) 分析を行い、AUROC (area under the ROC curve) を計算した。28 日死亡の予測に関しては、Day 0 と Day 2 のバイオマーカーについて ROC 分析を行った。DIC の早期診断に関しては、Day 0 の APACHE II スコアと pre-DIC スコア (ISTH non-overt DIC スコア, JAAM

スコア) の AUROC を算出し, Day 0 のバイオマーカーとの比較を行った. 診断のカットオフ値は感度と特異度の和が最大になる値として算出した. 陽性的中率 (positive predictive value, PPV) と陰性的中率 (negative predictive value, NPV) も併せて計算した.

各バイオマーカー間の 2 変数相関をみるため, スピアマン順位相関係数 (r 値) と p 値を計算し, $r < 0.5$ を共線性なしと判定した. またステップワイズ (変数増加法) による多重ロジスティック回帰モデルを用いて, ベイズ情報量基準を最適化する組合せとして, overt DIC 発症を予測する因子を抽出した. 生命予後に関しては, Kaplan-Meier 法を用いて 28 日間の生存曲線を作成し, ログランク検定を行った. 以上の統計計算は JMP version 10 (SAS, 東京) を用いて解析した.

3a. 結果

3a. 1. 患者背景と予後

111 例の敗血症患者が研究期間に ICU に入室した。34 例が研究プロトコールに従って除外され、77 例の患者が対象となった。ICU 入室時 (baseline) の患者背景と予後を Table 1 に示した。77 例の敗血症患者のうち、37 例 (48.1 %) が入室後 5 日以内に overt DIC を発症した (DIC 発症群)。DIC 発症群は APACHE II スコア、SOFA 最大値、28 日死亡率のいずれも非発症群と比較して高く、より重症であった。ICU 入室後 5 日間は、ヘパリンによる治療は行われなかった。DVT 予防の低用量ヘパリンは、DIC 発症群と比較して非発症群で多く投与された (10.8 vs. 50.0 %, $p = 0.0001$)。濃厚血小板、新鮮凍結血漿、アンチトロンビン製剤は DIC 発症群でより多く投与されていた (24.3 vs. 0 %, $p = 0.0001$; 29.7 vs. 7.5 %, $p = 0.012$, 56.8 vs. 5.0 %, $p < 0.0001$, respectively)。

3a. 2. Day 0 におけるバイオマーカーの異常と Day 0~3 における経時的推移

77 例のうち大部分の対象患者において、ICU 入室時から凝固・線溶系の異常が認められた：TAT 上昇 (98.7 %)、FDP 上昇 (97.4 %)、PC 活性低下 (88.3 %, Table 2)。一方、Day 0 における PLT 減少、PT 延長、fibrinogen 低下の頻度は低かった。また DIC 発症群では、非発症群と比較して、ICU 入室時の TAT、SF、PAI-1 の有意な上昇、PC、AT、plasminogen、 α_2 -PI の低下が認められた (Table 2)。

Table 1 Baseline Characteristics and Outcomes of the 77 Patients with Sepsis

	All Patients (n = 77)	Develop DIC (n = 37)	No DIC (n = 40)	p Value*
Demographics				
Age (years)	69.9 ± 12.9	70.7 ± 13.2	69.1 ± 12.7	0.58
Male	42 (54.5)	16 (43.2)	26 (65.0)	0.069
Source of Sepsis				
Pulmonary infection	15 (19.5)	7 (18.9)	8 (20.0)	1.00
Abdominal infection	43 (55.8)	22 (59.5)	21 (52.5)	0.65
Urinary tract infection	5 (6.5)	3 (8.1)	2 (5.0)	0.67
Soft tissue infection	11 (14.3)	3 (8.1)	8 (20.0)	0.19
Blood stream infection	2 (2.6)	2 (5.4)	0 (0.0)	0.23
Comorbidities				
IHD	7 (9.1)	2 (5.4)	5 (12.5)	0.43
CHF	2 (2.6)	0 (0.0)	2 (5.0)	0.49
Arrhythmia	3 (3.9)	3 (8.1)	0 (0.0)	0.11
COPD	6 (7.8)	1 (2.7)	5 (12.5)	0.21
CKD	10 (13.0)	6 (16.2)	4 (10.0)	0.51
CVD	3 (3.9)	2 (5.4)	1 (2.5)	0.61
Severity of illness				
APACHE II score	25.4 ± 7.9	28.8 ± 8.2	22.2 ± 6.1	0.0002
Organ dysfunction (days 0–5)				
max SOFA score**	9 (7–11)	10 (9–14)	7 (4–9)	0.0001
Prognosis				
ICU-free days	18 (10–21)	16 (0–19)	21 (17–23)	0.0001
28-day mortality	15 (19.5)	13 (35.1)	2 (5.0)	0.0011

Data are expressed as mean ± SD, median (interquartile range), or No. (%).

IHD, ischemic heart disease; CHF, chronic heart failure; COPD, chronic obstructive pulmonary disease; CKD, chronic kidney disease; CVD, cerebrovascular disease; APACHE, acute physiology and chronic health evaluation.

*Comparison of groups with and without subsequent development of overt DIC.

**maximum SOFA scores except for score of coagulation (platelet count) during the first 5 days.

Table 2 Plasma biomarkers at baseline (Day 0) in patients with sepsis

	Normal Range	All Patients		Develop DIC	No DIC	p Value*
		Median level	Abnormal patients (%)	Median level	Median level	
Global markers						
Platelet (x10 ⁹ /μL)	130–369	163 (118–205)	33.8 ^a	140 (108–184)	176 (136–228)	0.036
PT-INR	0.9–1.2	1.25 (1.15–1.37)	55.8 ^b	1.29 (1.17–1.38)	1.21 (1.13–1.31)	0.091
APTT (sec)	23.1–36.3	39.5 (32.2–48.9)	62.3 ^b	42.7 (35.4–49.5)	37.7 (31.3–42.7)	0.096
Fibrinogen (mg/dL)	129–371	395 (249–544)	25.9 ^a	299 (225–481)	419 (319–565)	0.041
FDP (μg/mL)	0–5.0	16.7 (10.4–28.9)	97.4 ^b	20.5 (11.7–44.1)	15.6 (8.4–22.1)	0.011
Thrombin generation						
TAT (ng/mL)	<2.4	12.5 (7.2–20.1)	98.7 ^b	19.5 (10.5–25.8)	8.4 (5.7–12.9)	<0.0001
SF (μg/mL)	<7.0	10.5 (5.3–24.2)	66.2 ^b	13.9 (7.9–29.3)	7.4 (3.2–17.3)	0.013
Anticoagulant activity						
PC (%)	67–129	46.2 (34.1–59.5)	88.3 ^a	36.6 (28.1–44.9)	59.1 (46.7–65.6)	<0.0001
AT (%)	75–125	51.8 (38.4–63.2)	88.3 ^a	42.8 (31.3–54.8)	58.2 (48.1–72.5)	0.0001
Fibrinolytic activity						
Plasminogen (%)	85–120	60.2 (43.6–73.7)	85.7 ^a	48.1 (30.3–66.1)	67.0 (57.1–84.6)	0.0001
α2-PI (%)	83–115	67.3 (52.1–82.8)	74.1 ^a	54.1 (40.5–67.6)	78.6 (67.1–88.7)	<0.0001
PAI-1 (ng/mL)	<50.0	154.7 (60.7–533.1)	81.8 ^b	531.6 (191.1–992.6)	77.6 (40.8–154.7)	<0.0001
PIC (μg/mL)	<0.9	1.0 (0.7–1.8)	54.5 ^b	1.0 (0.6–2.7)	1.1 (0.8–1.5)	0.99
Endothelial activation						
sES (ng/mL)	<29.7	55.2 (35.9–101.1)	83.1 ^b	65.3 (34.8–144.8)	49.5 (36.9–72.9)	0.17

DIC, disseminated intravascular coagulation; PT-INR, prothrombin time-international normalized ratio; APTT, activated partial thromboplastin time; FDP, fibrin degradation products; TAT, thrombin-antithrombin complex; SF, soluble fibrin; PC, protein C activity; AT, antithrombin activity; α2-PI, α2-plasmin inhibitor activity; PAI-1, plasminogen activator inhibitor-1; PIC, plasmin-α2-plasmin inhibitor complex; sES, soluble E-selectin

*Comparison of groups with and without subsequent development of overt DIC. ^aPercentage of patients with values lower than the lower limit of normal. ^bPercentage of patients with values higher than the upper limit of normal.

この傾向は、ヘパリンが投与された患者を除いたサブグループの解析でも同様の結果であった (DIC 発症群 33 例 vs. 非発症群 20 例, TAT 19.5 (10.5 - 25.8) vs. 8.5 (5.3 - 12.9), $p = 0.0002$; PAI-1 550.4 (191.1 - 1024.6) vs. 99.3 (54.6 - 184.1), $p < 0.0001$; PC 38.5 (29.1 - 45.5) vs. 53.1 (40.6 - 63.6), $p = 0.0006$; AT 43.1 (33.3 - 55.4) vs. 53.6 (47.2 - 72.3), $p = 0.007$).

PLT, PT-INR, FDP, TAT, PAI-1, PC の経時的推移 (Day 0 - 3) を DIC 発症群と非発症群にわけて Fig 1 に提示した. Day 0 において TAT, PAI-1 の著明な上昇と PC, plasminogen, α_2 -PI 活性の低下が認められ, これらは特に DIC 発症群で顕著であった. DIC 発症群では, TAT, PAI-1 は Day 0 を頂点として, その後徐々に基準値近くまで低下する傾向を示した (TAT on Day 0 vs. Day 2, $p = 0.013$; PAI-1, $p = 0.0035$). 一方, PLT, PT-INR に関しては, Day 0 の基準値近くから Day 2, Day 3 にかけて増悪する傾向を示した (PLT on Day 0 vs. Day 2, $p < 0.0001$; PT-INR, $p = 0.0043$).

3a. 3. Day 0 における各バイオマーカーの overt DIC 発症に関する予測能の評価

ROC 分析を用いて, Day 0 における各バイオマーカーの overt DIC 発症に関する予測能の評価を行った. AUROC, カットオフ値, PPV, NPV を Table 3 に示した. TAT, PC, AT, plasminogen, α_2 -PI, PAI-1 は, overt DIC 発症に関して高い AUROC, PPV を示した. 予測能の比較として, APACHE II スコア (AUROC

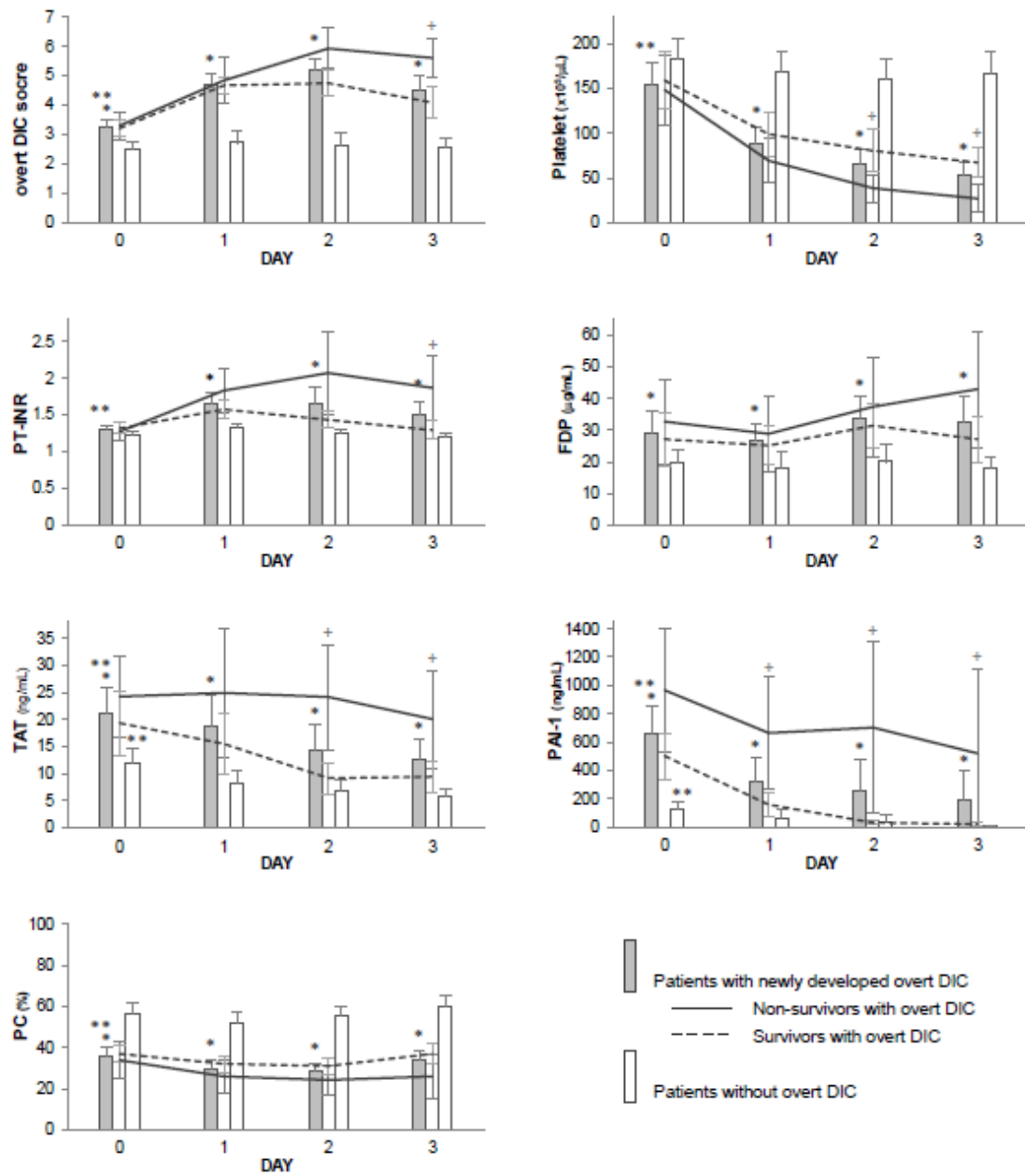


Fig 1 Time Course of Overt DIC Scores and Hemostatic Biomarkers from Admission (Day 0) to Day 3. Overt DIC scores, platelet count, PT-INR, FDP, TAT, PAI-1 and PC for patients with and without subsequent development of overt DIC (gray vs. white bars), and for survivors (dotted line) and non-survivors (solid line) among patients with overt DIC.

Data are expressed as mean and 95% CI. * $p < 0.05$ between patients with and without overt DIC on the same day. ** $p < 0.05$ between patients on Day 0 versus Day 2. + $p < 0.05$ between survivors and non-survivors with overt DIC on the same day.

Table 3 Area under the ROC curves of biomarkers at baseline for prediction of overt DIC

Biomarkers (Day 0)	AUC	(95%CI)	Cutoff values*	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV
Global markers							
Platelet	0.65	(0.51-0.76)	158 ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	0.62	0.65	0.62	0.65
PT-INR	0.61	(0.48-0.73)	1.3	0.62	0.63	0.61	0.64
APTT	0.61	(0.48-0.73)	42 (sec)	0.54	0.75	0.67	0.64
Fibrinogen	0.64	(0.51-0.76)	310 (mg/dL)	0.54	0.78	0.69	0.65
FDP	0.67	(0.54-0.78)	28 ($\mu\text{g/mL}$)	0.43	0.88	0.76	0.63
Thrombin generation							
TAT	0.77	(0.64-0.86)	15 (ng/mL)	0.67	0.85	0.81	0.72
SF	0.67	(0.54-0.78)	7.9 ($\mu\text{g/mL}$)	0.77	0.54	0.61	0.72
Anticoagulant activity							
PC	0.85	(0.76-0.91)	46 (%)	0.81	0.79	0.79	0.82
AT	0.76	(0.63-0.85)	46 (%)	0.60	0.85	0.78	0.69
Fibrinolytic activity							
Plasminogen	0.76	(0.63-0.85)	52 (%)	0.60	0.79	0.73	0.67
$\alpha 2$ -PI	0.79	(0.67-0.88)	70 (%)	0.81	0.67	0.70	0.79
PAI-1	0.87	(0.78-0.92)	269 (ng/mL)	0.72	0.92	0.89	0.78
PIC	0.49	(0.36-0.63)	1.9 ($\mu\text{g/mL}$)	0.35	0.89	0.76	0.59
Endothelial activation							
sES	0.59	(0.45-0.72)	67 (ng/mL)	0.51	0.72	0.62	0.61

ROC, receiver operating characteristic; AUC, area under the curve; CI, confidence interval; PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value; PT-INR, prothrombin time-international normalized ratio; APTT, activated partial thromboplastin time; FDP, fibrin degradation products; TAT, thrombin- antithrombin complex; SF, soluble fibrin; PC, protein C activity; AT, antithrombin activity; $\alpha 2$ -PI, $\alpha 2$ -plasmin inhibitor activity; PAI-1, plasminogen activator inhibitor-1; PIC, plasmin- $\alpha 2$ -plasmin inhibitor complex; sES, soluble E selectin. *Cutoff values were calculated to maximize the sum of sensitivity and specificity.

0.72 (95% confidence interval 0.61-0.82); PPV 0.62), ISTH non-overt DIC スコア (AUROC 0.71 (0.59-0.80); PPV 0.58), JAAM スコア (AUROC 0.68 (0.55-0.78); PPV 0.62) について同様の解析を行ったが、いずれもやや低い PPV を示した。

3a. 4. 相関分析と多重解析による DIC 発症予測に有用なバイオマーカーの同定

ROC 分析で $AUC > 0.7$ かつ $PPV > 0.7$ を示し, APACHE II スコア, pre-DIC スコアと比較して予測能に優れていたバイオマーカーについて更に解析を進めた. まずバイオマーカー間の 2 変数相関をみるため, TAT, PC, AT, plasminogen, α_2 -PI, PAI-1 に関してスピアマン順位相関分析を行った. PC と AT, plasminogen, α_2 -PI の各ペアにおいて $r > 0.5$ の有意で強い相関を認めた (Fig 2). しかし, PC, TAT, PAI-1 間の相関は弱く, 共線性はないと判定した. 次にステップワイズ法による多重ロジスティック回帰分析を行った結果, TAT, PAI-1, PC が overt DIC 発症を予測する組合せとして最適であることが分かった. これら 3 つのバイオマーカーは, APACHE II スコアによる補正を行った後も有意性を失わなかった (TAT, $p = 0.0002$, PAI-1, $p = 0.0001$, PC, $p < 0.0001$). 更に TAT, PAI-1, PC の組合せは, それぞれ単独の場合と比較して有意に DIC 発症の予測能が高かった (AUROC 0.95 (vs. TAT, $p = 0.0004$; vs. PAI-1, $p = 0.033$; vs. PC, $p = 0.025$, Fig 3)).

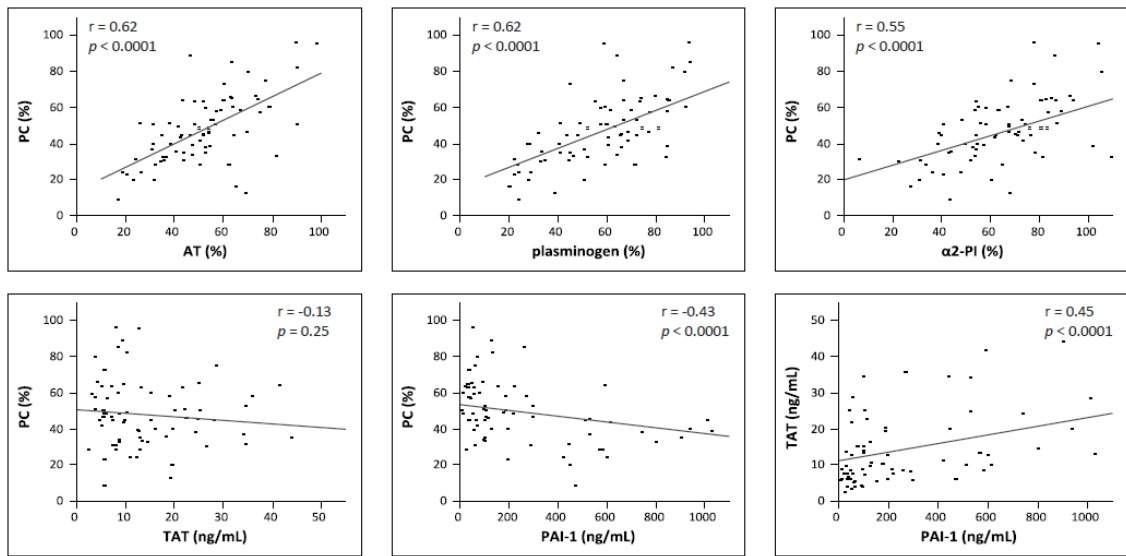


Fig 2 Correlation of Plasma Biomarkers at Baseline with Each Other. The correlation graphs and Spearman rank correlation coefficients (r value) are shown here.

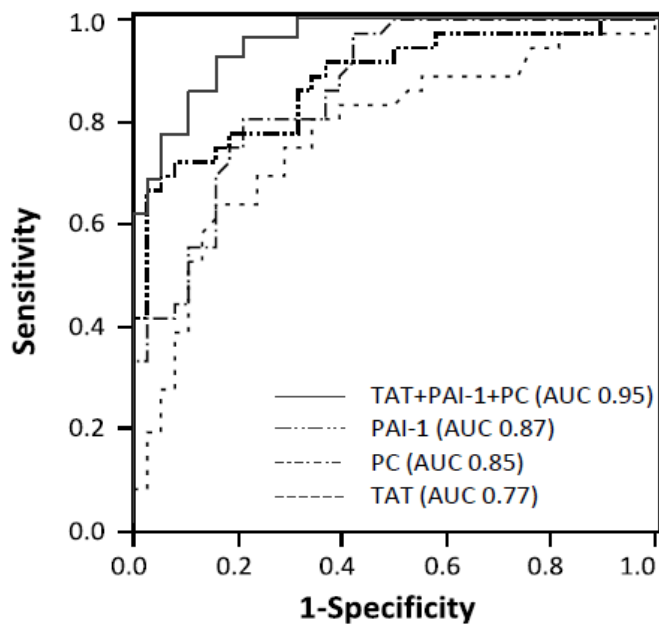


Fig 3 ROC Curves of TAT, PAI-1, and PC activity and Combination of these Biomarkers for Prediction of Overt DIC. AUROC for TAT, 0.77 (95% CI, 0.64–0.86), PAI-1, 0.87 (0.78–0.92), PC, 0.85 (0.76–0.91), and combination of these biomarkers are described. Combination of TAT, PAI-1, and PC was superior to each marker alone [AUROC, 0.95 (vs. TAT, $p = 0.0004$; vs. PAI-1, $p = 0.033$; vs. PC, $p = 0.025$)].

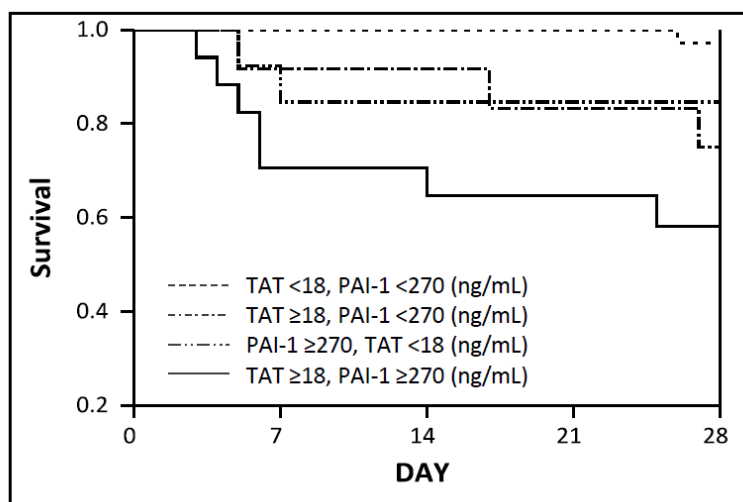


Fig 4 Kaplan–Meier Survival Curves for Patients Grouped by Cutoff Points of TAT and PAI-1 at Baseline. The cutoff points were set at 18 ng/mL for TAT and 270 ng/mL for PAI-1, based on the best calculated cutoff values that maximize the sum of sensitivity and specificity for 28-day mortality

3a. 5. Day 0, Day 2 におけるバイオマーカーの 28 日死亡に関する予測能

単変量解析では、Day 0 のバイオマーカーの中で TAT と PAI-1 のみが 28 日死亡率の予測因子として有意であった (Table 4)。感度、特異度を最大にするカットオフ値は、TAT が 18 ng/ mL, PAI-1 が 270 ng/ mL であった。対象となった敗血症患者において、Day 0 の TAT > 18 ng/ mL かつ、または PAI-1 > 270 ng/ mL のコホートを Kaplan-Meier 法で解析した結果、有意に 28 日死亡率との関連が認められた ($p = 0.0024$, Fig 4)。

Day 2 のバイオマーカーの大部分は、Day 0 と比較して 28 日死亡率に関する AUROC が高かった (Table 4)。とくに TAT, SF, PAI-1 は APACHE II スコアによる調整後も有意に 28 日死亡率との関連を認めた ($p = 0.0015$, $p < 0.0001$, $p < 0.0001$, respectively)。

Table 4 Area under ROC curves of Day-0 and Day-2 biomarkers for prediction of mortality

Biomarkers	ICU day	AUC (95%CI)	Cutoff values*	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV
Global markers							
Platelet	Day 0	0.58 (0.41-0.74)	117 (x10 ³ /μL)	0.41	0.79	0.32	0.84
	2	0.81 (0.64-0.91)	66 (x10 ³ /μL)	0.81	0.79	0.48	0.94
PT-INR	Day 0	0.53 (0.34-0.72)	1.2	0.53	0.71	0.31	0.86
	2	0.68 (0.47-0.84)	1.5	0.61	0.81	0.43	0.89
FDP	Day 0	0.61 (0.42-0.76)	21 (μg/mL)	0.61	0.65	0.29	0.87
	2	0.61 (0.41-0.77)	22 (μg/mL)	0.67	0.65	0.31	0.89
Thrombin generation							
TAT	Day 0	0.77 (0.62-0.87)	18 (ng/mL)	0.81	0.77	0.46	0.94
	2	0.83 (0.65-0.93)	16 (ng/mL)	0.67	0.92	0.67	0.92
Anticoagulant activity							
PC	Day 0	0.64 (0.45-0.79)	37 (%)	0.53	0.75	0.35	0.87
	2	0.76 (0.53-0.89)	22 (%)	0.61	0.97	0.82	0.91
Fibrinolytic activity							
Plasminogen	Day 0	0.64 (0.45-0.79)	61 (%)	0.81	0.52	0.29	0.91
	2	0.75 (0.57-0.87)	50 (%)	0.81	0.67	0.38	0.93
PAI-1	Day 0	0.81 (0.64-0.91)	269 (ng/mL)	0.85	0.71	0.38	0.96
	2	0.91 (0.79-0.96)	81.4 (ng/mL)	0.69	0.97	0.82	0.94

ROC, receiver operating characteristic; AUC, area under the curve; CI, confidence interval; PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value; PT-INR, prothrombin time-international normalized ratio; FDP, fibrin degradation products; TAT, thrombin-antithrombin complex; PC, protein C activity; PAI-1, plasminogen activator inhibitor-1.

*Cutoff values were calculated to maximize the sum of sensitivity and specificity.

B. 研究② 敗血症性凝固障害における血小板減少と 凝固・線溶系マーカーの関連

2b. 対象と方法

2b. 1. 研究デザイン

2010年9月から2011年11月の期間に自治医科大学附属病院ICUに入室した全患者を調査し、敗血症でICU入室となり、かつ入室時の $PLT > 80 \times 10^3/\mu L$ である患者を対象とした[20]。敗血症は2001年のInternational Sepsis Definitions Conferenceの定義に準じて診断した。除外基準は、18歳未満、肝硬変(Child-Pugh分類B以上)の合併、血液疾患の合併、維持透析患者と、ICU入室4週間前からの化学療法、抗凝固療法、輸血療法の既往とした。敗血症の管理、ICU入室後の輸血療法の適応に関しては研究①と同様に行った。

2b. 2. データ収集

電子カルテを参照して、対象患者の年齢、性別、診断名、感染部位、臨床データを抽出した。ICU入室時の重症度の判定のため、APACHE IIスコアとSimplified Acute Physiology (SAPS) IIスコアを計算した。ICU入室期間中のSOFAスコアとISTHのovert, non-overt DICスコアを計算した。患者予後としてICU-free dayと28日死亡率を調査した。

2b. 3. バイオマーカー測定

ICU入室時 (Day 1) と Day 2 から Day 5 まで PLT を抽出した。Day 1 における 10 の凝固・線溶系マーカー (PT-INR, APTT, fibrinogen, FDP, AT, PC, plasminogen, α_2 -PI, PIC, TAT) を研究①と同様の方法で測定した。

2b. 4. データ解析

本研究 (研究②) では、血小板数の低下を ICU 入室後 5 日以内における PLT 30 % 以上の減少と定義した。対象患者を血小板低下群と非低下群に分類し、比較を行った。2 群間の比較には、変数の分布によってステューデント t 検定、ウィルコクソン順位和検定を、名義尺度については χ^2 検定またはフィッシャーの正確確率検定を用いた。ROC 分析により、各バイオマーカーの血小板低下の出現に関する AUC を計算し、感度と特異度を最大にするカットオフ値を計算した。以上の統計解析は JMP version 10 (SAS, 東京) を用いて行った。

3b. 結果

3b. 1. 患者背景

対象とした期間に ICU に入室した 1,343 例の患者のうち、108 例が敗血症患者であり、そのうち 33 例が研究プロトコールに従って除外された。対象となった 75 例の敗血症患者のうち、42 例が ICU 入室後 5 日以内に血小板低下をきたした。

Table 5 に 75 例の患者背景を示した。敗血症の原因として最も多かったのは腹腔内感染であり、26 例 (34.7 %) が下部消化管穿孔、9 例 (12.0 %) が胆道系感染、5 例 (6.7 %) が腹腔内膿瘍、3 例 (4.0 %) が肝膿瘍であった。75 例のうち、50 例 (66.7 %) が外科系、25 例 (33.3 %) が内科系患者であった。

Day 1 から Day 5 における血小板低下群、非低下群の PLT の経時的推移を Fig 5 に示した。ICU 入室時において、血小板低下群と非低下群の PLT に有意差は認めなかったが、血小板低下群の PLT はその後 Day 4 まで減少する傾向を示した。臓器障害に関しては、循環不全、腎障害が血小板低下群で非低下群と比較して多く、28 日死亡率も高かった (Table 6)。

3b. 2. 敗血症患者における凝固・線溶系マーカーと血小板低下の出現との関連

ICU 入室時の凝固・線溶系バイオマーカーと、その後 5 日間における血小板低下の出現との関連を調査した。血小板低下群と非低下群の比較において、PT-NR ($p = 0.048$), fibrinogen ($p = 0.0014$), TAT ($p < 0.0001$), AT ($p = 0.0099$),

Table 5. Baseline characteristics of the 75 patients with sepsis

	All Patients (n = 75)	Subsequent decrease in platelet count (n=42)	No subsequent decrease in platelet count (n=33)	p value ^a
Age (years)	70.0±11.7	70.1±11.9	70.0±11.5	0.98
Male	41 (54.7%)	18 (42.9%)	23 (69.7%)	0.035
Sepsis				
pneumonia	15 (20.0%)	7 (16.7%)	8 (24.2%)	0.56
abdominal infection	46 (61.3%)	30 (71.4%)	16 (48.5%)	0.057
urinary tract infection	5 (6.7%)	3 (7.1%)	2 (6.1%)	1.00
soft tissue infection	9 (12.0%)	2 (4.8%)	7 (21.2%)	0.038
Comorbidity				
IHD	5 (6.7%)	2 (4.8%)	3 (9.1%)	0.65
CHF	5 (6.7%)	2 (4.8%)	3 (9.1%)	0.65
COPD	4 (5.3%)	2 (4.8%)	2 (6.1%)	1.00
CVD	2 (2.7%)	0 (0.0%)	2 (6.1%)	0.19
CKD	5 (6.7%)	4 (9.5%)	1 (3.0%)	0.38
Severity of illness				
APACHE II score	23.2±7.8	25.1±8.2	20.8±6.8	0.021
SAPS II score	49.8±15.5	55.5±16.1	42.9±11.8	0.0004
DIC score on admission				
ISTH overt	2.6±1.3	2.7±1.5	2.5±1.1	0.51
ISTH non-overt	5.0±1.8	5.2±1.9	4.8±1.5	0.33

Data are expressed as mean ± SD, or number (%).

IHD, ischemic heart disease; CHF, chronic heart failure; COPD, chronic obstructive pulmonary disease;

CVD, cerebrovascular disease; CKD, chronic kidney disease;

APACHE, acute physiology and chronic health evaluation; SAPS, simplified acute physiology score;

DIC, disseminated intravascular coagulation; ISTH, international society of thrombosis and hemostasis.

^aComparison of groups with and without a subsequent decrease in platelet count.

PC ($p = 0.0002$), plasminogen ($p = 0.0007$), α_2 -PI ($p = 0.0001$) は有意差を認め
たが, APTT, FDP, PIC では認めなかった (Table 7).

血小板低下出現の予測因子として評価するため, 各バイオマーカーについて
ROC 分析を行った. 各バイオマーカーの予測因子としての AUC とカットオフ
値を Table 8 に示した. ROC 分析の結果, TAT (AUC 0.846), PC (AUC 0.869),
plasminogen (AUC 0.846), α_2 -PI (AUC 0.885) が, 血小板低下出現の予測能に
優れていた.

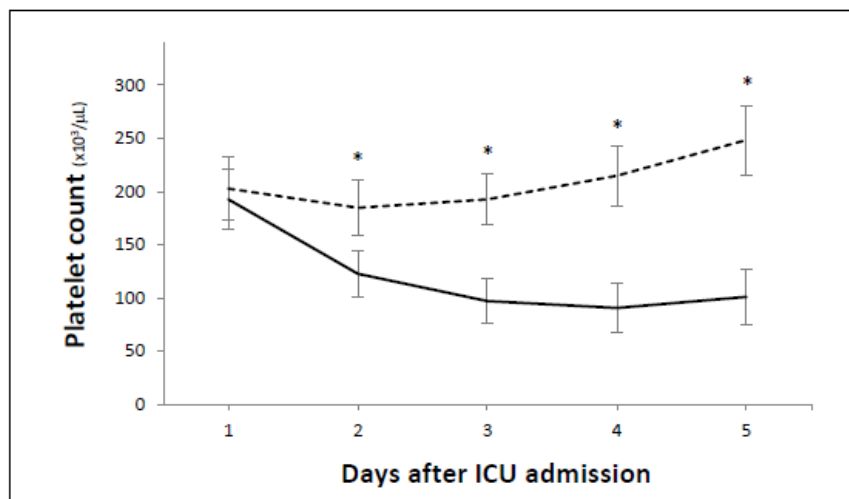


Fig 5 Time course of platelet counts during the first 5 days of ICU stay in patients with sepsis, showing patients with a subsequent decrease in platelet count (solid line) versus patients without a subsequent decrease in platelet count (dotted line). A subsequent decrease in platelet count was defined as a $\geq 30\%$ decrease within 5 days of ICU admission. Day 1 = the day of ICU admission. Data are expressed as mean and 95% confidence intervals; * $p < 0.05$.

Table 6. Interventions, organ dysfunction and prognosis in the 75 patients with sepsis

	All Patients (n = 75)	Subsequent decrease in platelet count (n=42)	No subsequent decrease in platelet count (n=33)	<i>p</i> value ^a
Transfusion (days 1-7)				
Red blood cell	18 (24.0%)	11 (26.2%)	7 (21.2%)	0.62
Platelet	9 (12.0%)	9 (21.4%)	0 (0.0%)	0.0039
Fresh frozen plasma	16 (21.3%)	15 (35.7%)	1 (3.0%)	0.0005
Treatment for DIC (days 1-7)				
Gabexate mesilate	29 (38.7%)	28 (66.7%)	1 (3.0%)	< 0.0001
Antithrombin	21 (28.0%)	21 (50.0%)	0 (0.0%)	< 0.0001
Organ dysfunction (days 1-7)				
CVS (SOFA ≥ 3)	39 (52.0%)	30 (71.4%)	9 (27.3%)	0.0002
Lung (SOFA ≥ 3)	26 (48.0%)	23 (54.8%)	13 (39.4%)	0.25
Renal (SOFA ≥ 2)	16 (21.3%)	14 (33.3%)	2 (6.1%)	0.0045
Liver (SOFA ≥ 2)	28 (37.3%)	18 (42.9%)	10 (30.3%)	0.34
DIC				
ISTH overt	23 (30.7%)	21 (50.0%)	2 (6.1%)	< 0.0001
ISTH non-overt	54 (72.0%)	38 (90.5%)	16 (48.5%)	< 0.0001
Prognosis				
ICU-free days	19 (11.5-23)	18 (7-21)	22 (15-23.5)	0.027
ICU mortality	6 (8.0%)	6 (14.6%)	0 (0.0%)	0.031
28-day mortality	6 (8.0%)	6 (14.6%)	0 (0.0%)	0.031

Data are expressed as median (interquartile range), or number (%).

DIC, disseminated intravascular coagulation; SOFA, Sequential Organ Failure Assessment;

CVS, cardiovascular system; ISTH, international society of thrombosis and hemostasis.

^aComparison of groups with and without a subsequent decrease in platelet count.

Table 7. Comparison of coagulation and fibrinolytic markers on the day of ICU admission

	Normal range	Subsequent decrease in platelet count (n = 42)	No subsequent decrease in platelet count (n = 33)	P value
Platelet count (x 10 ³ /mL)	130-369	181 (123-245)	197 (162-234)	.52
PT-INR	0.9-1.2	1.33 (1.14-1.53)	1.17 (1.11-1.34)	.048
APTT (sec)	23.1-36.3	44.2 (32.9-59.3)	40.6 (36.1-48.3)	.71
Fibrinogen (mg/dL)	129-271	322 (212-493)	526 (380-649)	.0014
FDP (mg/mL)	0-5.0	20.4 (12.3-30.5)	16.8 (11.2-24.3)	.21
TAT (ng/mL)	<2.4	13.8 (9.9-22.1)	7.2 (5.4-9.3)	<.0001
PIC (mg/mL)	<0.9	0.9 (0.7-1.9)	1.4 (0.8-1.8)	.19
AT (%)	88-116	51.1 (36.9-62.5)	62.7 (47.8-74.1)	.0099
PC (%)	67-129	35.1 (28.1-55.8)	64.2 (56.5-79.8)	.0002
Plasminogen (%)	85-120	50.7 (40.4-68.3)	85.3 (73.9-91.9)	.0007
α2-PI (%)	83-115	56.5 (48.3-67.6)	83.9 (75.2-94.7)	.0001

PT-INR, prothrombin time – international normalized ratio; APTT, activated partial thromboplastin time; FDP, fibrin degradation products; TAT, thrombin-antithrombin complex; PIC, plasmin-α2-plasmin inhibitor complex; AT, antithrombin activity; PC, protein C activity; α2-PI, α2-plasmin inhibitor activity.

Table 8. Receiver operating characteristics curve analyses showing areas under the curve (AUC) for prediction of a subsequent decrease in platelet count, and cutoff values maximizing the sum of sensitivity and specificity

	AUC	P value	Cutoff value	Sensitivity	Specificity
Platelet count	0.544	.79	157 (x10 ³ /mL)	0.36	0.82
PT-INR	0.639	.012	1.37	0.48	0.79
APTT	0.526	.26	48.9 (sec)	0.45	0.76
Fibrinogen	0.666	.0019	462 (mg/dL)	0.71	0.66
FDP	0.587	.045	29.4 (mg/mL)	0.33	0.88
TAT	0.846	<.0001	13 (ng/mL)	0.59	1.0
PIC	0.399	.57	2.7 (mg/mL)	0.24	0.88
AT	0.734	.0071	55.8 (%)	0.67	0.66
PC	0.869	<.0001	41.4 (%)	0.67	0.94
Plasminogen	0.846	.0012	72.8 (%)	0.91	0.77
α2-PI	0.885	<.0001	73.3 (%)	0.92	0.75

PT-INR indicates prothrombin time – international normalized ratio; APTT, activated partial thromboplastin time; FDP, fibrin degradation products; TAT, thrombin-antithrombin complex; PIC, plasmin-α2-plasmin inhibitor complex; AT, antithrombin activity; PC, protein C activity; α2-PI, α2-plasmin inhibitor activity.

C. 研究③ 幼弱血小板比率 (IPF) による

敗血症患者における血小板減少の評価

2c. 対象と方法

2c. 1. 研究デザイン

2013年10月から2014年11月にかけて敗血症でICU入室となり、入室時の $PLT > 80 \times 10^3/\mu L$ である患者を対象とした。敗血症は2001年のInternational Sepsis Definitions Conferenceの定義に準じて診断した。除外基準は、18歳未満、肝硬変（Child-Pugh分類B以上）の合併、血液疾患の合併、維持透析患者と、ICU入室4週間前からの化学療法、抗凝固療法、輸血療法の既往とした。敗血症の管理、ICU入室後の輸血療法の適応に関しては研究①と同様に行った。

2c. 2. データ収集, IPFの測定とAIPCの算定

ICU入室時に、年齢、性差、合併症の患者背景とAPACHE IIスコアを記録した。ICU入室時 (Day 0) と Day 1~Day 2 まで PLT と幼弱血小板比率 (immature platelet fraction, IPF) を測定した。

IPFはXE2100自動測定器 (Sysmex) で測定した。XE2100は、ポリメチン系およびオキサジン系色素を核酸染色蛍光色素として使用し、フローサイトメトリ法で全血小板数とIP粒子を測定し、IPFの自動計算を行う[21]。IPFの測定時間は1検体あたり1分と迅速に結果が得られ、これまでの網血小板は測定に時

間がかかり，施設間でばらつきがあるという欠点を補う測定方法である．健常人では IPF 平均値が約 3% になるように，ゲーティングが予め設定されている．

幼弱血小板絶対数（absolute immature platelet count, AIPC）は，単位血液当たりの幼弱血小板数として，PLT に IPF を乗じて算出した（ $PLT \times \%IPF/\mu L$ ）．

2c. 3. データ解析

対象患者を ICU 入室後 5 日間フォローし，血小板減少の重症度によって，正常～軽度減少群（ $PLT: 80 \times 10^3/\mu L$ 以上），中等度減少群（ $50 \times 10^3/\mu L$ 以上 $80 \times 10^3/\mu L$ 未満），重度減少群（ $50 \times 10^3/\mu L$ 未満）の 3 群に分類した．3 群間の比較には，一元配置分散分析（one-way Analysis of Variance; ANOVA）を行い，各々 2 群間の比較には Tukey-Kramer 法による多重比較検定を行った．統計解析は JMP version 11（SAS，東京）を用いて行った．

3c. 結果

3c. 1. 患者背景

112 例の敗血症患者が研究期間に ICU に入室した。31 例が研究プロトコールに従って除外され、81 例の患者が対象となった。81 例中、正常～軽度血小板減少群は 51 例(62.9 %), 中等度減少群が 13 例(16.1 %), 重度減少群が 17 例(21.0 %)であった。正常～軽度血小板減少群の平均年齢は 64.7 ± 16.2 歳, 中等度減少群は 70.1 ± 10.6 歳, 重度減少群は 63.6 ± 24.3 歳であり, 男性の割合はそれぞれ 68.4, 66.7, 71.4 % と 3 群間に有意差を認めなかった。ICU 入室時の重症度に関しては, 正常～軽度血小板減少群の APACHE II スコアは 21.8 ± 8.9 , 中等度減少群は 28.8 ± 10.3 , 重度減少群は 29.3 ± 7.6 と有意差が認められた ($p = 0.0221$)。

3c. 2. ICU 入室後の敗血症患者における PLT, IPF, AIPC の経時的推移

ICU 入室後 5 日間の正常～軽度血小板減少群, 中等度減少群, 重度減少群における PLT, IPF, AIPC の経時的推移を Fig 6 に示した。ICU 入室時 (Day 0) の PLT に関しては, 正常～軽度減少群が, 中等度減少群, 重度減少群と比較して有意に高かった ($p = 0.0031, p = 0.0008$, respectively, Table 9)。中等度・重度減少群の PLT は, その後 Day 4 まで低下する傾向を示した。入室時の IPF に関しては, 中等度減少群, 重度減少群それぞれが, 正常～軽度減少群と比較して有意に上昇していたが ($p < 0.0001, p = 0.0012$, respectively), AIPC は 3 群に有意差はなく, 消費性の血小板減少を示唆する結果であった。

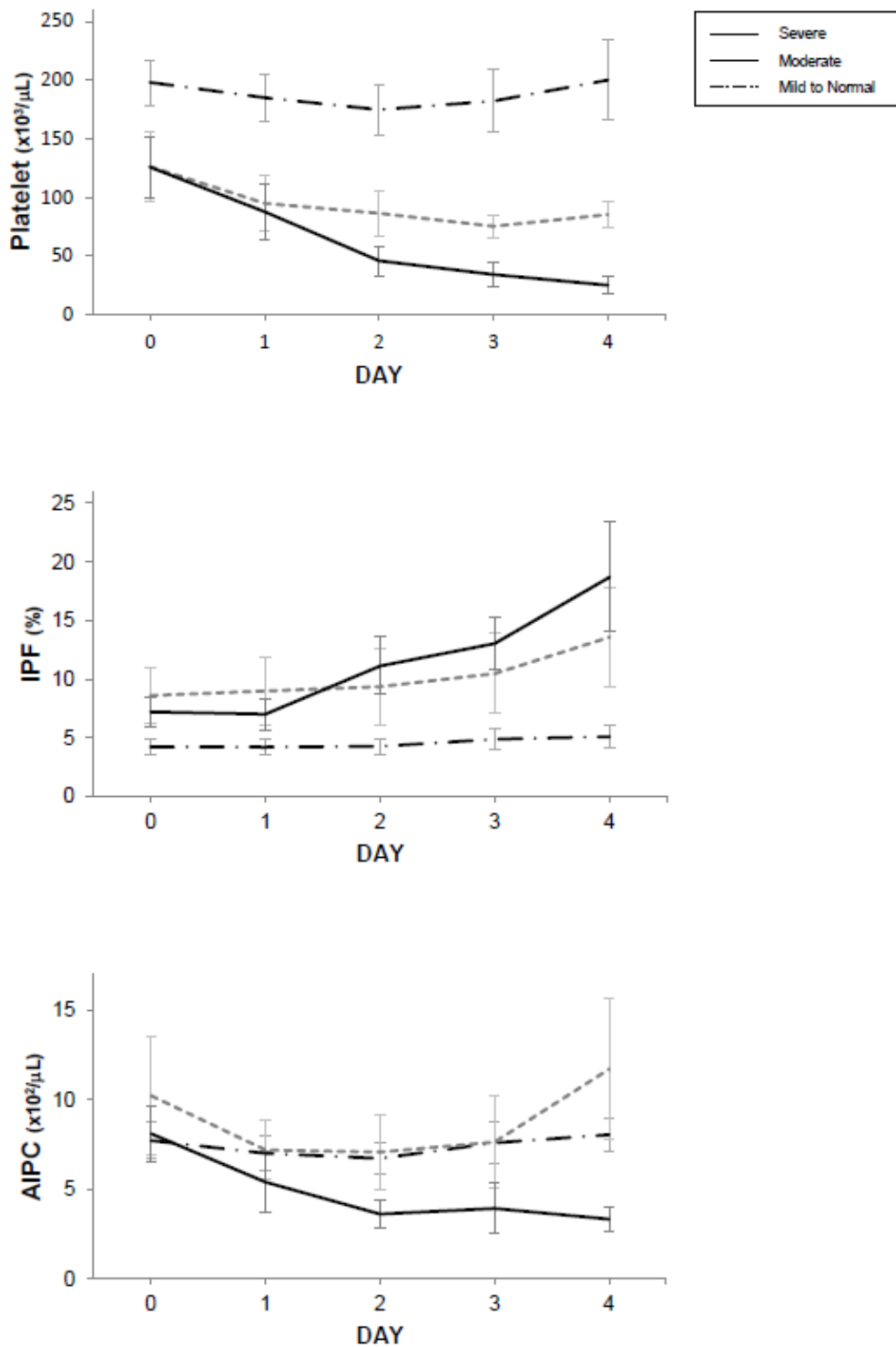


Fig 6 Time course of PLT, IPF, AIPC during the first 5 days of ICU stay in patients with sepsis. Patients were grouped according to the development of Severe (Min PLT < 50 × 10³/μL), Moderate (50 - 80 × 10³/μL), and Mild to Normal (≥ 50 × 10³/μL) thrombocytopenia. PLT, platelet count; IPF, immature platelet fraction, AIPC, absolute immature platelet count; Min, minimum. Data are expressed as mean and 95% confidence intervals.

中等度減少群，重度減少群の IPF が入室後上昇する傾向を示すのに対し，正常～軽度減少群では横這いで推移し，入室後 5 日間における IPF の最大値は，正常～軽度減少群と比較して中等度減少群，重度減少群で有意に高かった ($p < 0.0001$, $p < 0.0001$, respectively).

一方 AIPC に関しては，中等度減少群では入室後 Day 2 まで正常～軽度減少群近くまで低下し，その後上昇する傾向を示した．中等度減少群の AIPC 最大値は，正常～軽度減少群，重度減少群と比較して有意に高く ($p = 0.0049$, $p = 0.0132$, respectively)，消費性の血小板低下に対する造血の亢進を示唆する結果であった．しかし重度減少群の AIPC は，Day 0 から Day 4 まで低下する傾向を示し，重度減少群の AIPC 最小値は，正常～軽度減少群，中等度減少群と比較して有意に低く ($p = 0.0008$, $p = 0.0002$, respectively)，骨髄における血小板産生低下の存在を示す結果であった．

Table 9 PLT, IPF, AIPC in Patients with Severe, Moderate, Mild to Normal thrombocytopenia

Thrombocytopenia	Severe (n = 17)	Moderate (n = 13)	Mild - Normal (n = 51)	p Value [†]
On admission (Day 0)				
PLT ($\times 10^9/\mu\text{L}$)	126.7 \pm 53.3*	126.8 \pm 53.5*	198.1 \pm 76.2	< 0.0001
IPF (%)	7.1 \pm 2.8*	8.6 \pm 4.4*	4.2 \pm 2.3	< 0.0001
AIPC ($\times 10^2/\mu\text{L}$)	8.1 \pm 3.3	10.2 \pm 5.9	7.7 \pm 4.1	0.1594
Max values during 5 d				
IPF (%)	18.3 \pm 7.5***	13.6 \pm 6.2*	5.4 \pm 2.7	< 0.0001
AIPC ($\times 10^2/\mu\text{L}$)	8.5 \pm 3.2**	13.4 \pm 6.7*	8.9 \pm 4.4	0.005
Min values during 5 d				
AIPC ($\times 10^2/\mu\text{L}$)	2.7 \pm 1.6***	7.3 \pm 5.1	5.7 \pm 2.6	< 0.0001

Data are expressed as mean \pm SD.

PLT, platelet count; IPF, immature platelet fraction; AIPC, absolute immature platelet count; Max, maximum; Min, minimum.

[†] Comparison of groups with severe, moderate, mild to normal thrombocytopenia

* $p < 0.005$ vs. Patients with mild to normal thrombocytopenia.

** $p < 0.05$ vs. Patients with moderate thrombocytopenia.

4. 考察

本研究により、敗血症患者は初期より凝固障害を合併しており、ICU入室時の凝固・線溶系マーカーの異常は、その後の overt DIC 発症と強く関連することが明らかになった。測定した凝固・線溶系マーカーの中では TAT, PAI-1, PC の3つが独立して overt DIC 発症の予測因子として有用であり、更に TAT, PAI-1 の2つは生命予後とも有意に関連していた(研究①)。同様に、ICU入室時の凝固・線溶系マーカーの異常は、その後の血小板減少とも強く関連しており、血小板減少の原因として敗血症初期より合併する凝固障害があることが示唆された(研究②)。また ICU入室時の IPF は中等度・重度の血小板減少群で上昇しており、消費性の血小板減少の病態が示唆された。更に重度減少群では、その後有意な AIPC の低下が認められ、重症血小板減少には産生低下の病態が加わる可能性が示された(研究③)。

炎症と凝固は、感染に対する生体防御機構として相補的に働く[22]。感染に対する生体の過剰な炎症反応である敗血症においても、凝固異常を合併することが多く、臓器障害の一因であると考えられている。本研究においても、敗血症患者の大部分が ICU入室時から凝固・線溶系の異常を呈していた。これは敗血症患者を対象とした多施設大規模研究である PROWESS study のデータと一致する[23]。更に、入室時の凝固・線溶系マーカーは、その後5日間における overt DIC 診断基準の確定と有意に関連していた。これらの結果は、敗血症は病初期から凝固障害を伴うという我々の仮説を裏付けるものである。従って敗血

症性 DIC の早期診断には、DIC の前段階である、いわゆる pre-DIC からの進行を捉えるという概念ではなく、急性の重篤な凝固・線溶異常を早期に検出するという戦略が望ましいと考えられる。

DIC は凝固の亢進に伴うトロンビンの過剰生成を病態の基礎とする[24]。敗血症性 DIC では、凝固の亢進に加えて、凝固抑制の低下と線溶系の抑制の機序が病態を形成する。AT や PC などの凝固抑制因子は、消費の増大、合成の低下、血管外への漏出や好中球エラスターゼなどのタンパク分解酵素による分解等によって低下する[25,26]。線溶系は、炎症により血管内皮に誘導された PAI-1 によって抑制される[27,28]。本研究では、敗血症患者において ICU 入室時に TAT、PAI-1 の上昇、PC 活性の低下が確認され、TAT、PAI-1、PC がそれぞれ独立して overt DIC 発症と関連していた。この結果から、凝固の活性化、凝固抑制の低下、線溶系の抑制の 3 つの機序は敗血症発症初期より病態形成に関与しており、敗血症性 DIC の診断にはこれら 3 つの機序を分けて評価する必要があると考えられる。

本研究において、DIC 発症群では TAT、PAI-1 は Day 0 を頂点として、その後低下し、ISTH 基準での overt DIC の確定診断に至るときにはすでに改善を認めた。この傾向は、DIC 発症群の中でも生存例に顕著であり、死亡例では TAT、PAI-1 の上昇が遷延する傾向が認められた。このような TAT、PAI-1 の経時的推移は、動物実験における敗血症モデルや他の臨床研究でも指摘されている[29,30]。TAT、PAI-1 は半減期が短く、敗血症性凝固障害の初期から生成、誘導

されるタンパクであるのに対し、PLT、PTやPCは消費されて異常を呈するマーカーである。本研究での生存例、死亡例の経時的推移の違いから、TAT、PAI-1は敗血症性凝固障害の病勢を適切に反映することが示唆される。

現在、いくつかのDIC早期診断基準が提唱されているが、いずれも敗血症性DICに対して応用するには限界がある。多くのDIC早期診断基準は、臨床応用を重視し、一般に使用される血液凝固検査を診断項目にしている。しかし、PLT、PTなどの一般凝固検査は、消費性低下や産生低下を示すものであり、DICの病勢を遅れて反映する。またFDPは、DICが重症化するとPAI-1の著増により産生が抑制され、上昇が軽度に留まることがあり、fibrinogenは炎症性タンパクとして敗血症では上昇を示すことが多い。Kinasewitzら[31]やDhainautら[32]は簡便な敗血症性凝固障害急性期の診断スコアリング・システムを構築したが、いずれも一般凝固検査の増悪傾向を捉えるものであり、確定診断には最低2日が必要となる。本研究の結果は、TAT、PAI-1、PCをICU入室時に単回測定することで重症凝固障害を診断できる可能性を示しており、これによって敗血症性DICに対する早期治療介入の実現が期待できる。

これまで敗血症患者を対象として、AT、PC、TAT、PIC、PAI-1などの凝固・線溶系マーカーを評価した研究は複数存在するが、一致した見解は得られていない[23,28,29,32-34]。過去の研究結果の相違を説明する理由として、以下のことが考えられる。第一にバイオマーカーの異常値を解釈する場合、測定時期を考慮する必要がある。本研究や過去の研究[23,29]においても、敗血症の急性期

にはバイオマーカーは数日の間に大きく変動しており，測定時期によって有用性が変化する可能性がある．第二にバイオマーカーの診断能の評価には，カットオフ・レベルを考慮する必要がある．Oh ら[9]と Egi ら[35]は，AT を評価する際に，基準値下限（70 %）をカットオフ値として用いており，ISTH non-overt DIC 基準に AT を加えても診断能は上がらないと結論した．しかし，我々の研究では，AT 活性に関して DIC 非発症群においても大部分が基準値下限である 70 % 以下を示しており，overt DIC 発症の予測には更に低いカットオフ値（46.1 %）を用いる必要性を示す結果であった．第三に凝固・線溶系マーカーを評価した多くの研究は，敗血症患者の予後をエンドポイントとしている．本研究では，Day 0 におけるバイオマーカーの多くは，over DIC 発症の予測には有用であったが，28 日死亡に関する予測能は低かった．生命予後予測に関しては，Day 2 のバイオマーカーの方が Day 0 と比較して優れており，これは overt DIC の発症だけではなく，重篤な凝固障害の遷延が，敗血症患者の予後に大きく影響することを示唆すると考えられる．

我が国では敗血症性 DIC に対する治療が一般的に行われているが，敗血症に対する抗凝固療法や凝固抑制因子製剤の有効性に関して，質の高いエビデンスは示されていない．敗血症患者に対してアンチトロンビン製剤の大量投与が行われた大規模 RCT である KyberSept 試験[36]では，生存率の改善を認めなかった．しかしサブグループ解析では，ヘパリンの併用がなかった群[37]や DIC 合併群[38]で予後が良好である結果が示されている．PROWESS-SHOCK 試験[39]

において有効性が示せず、市場から撤退した活性化プロテイン C 製剤に関しても、メタアナリシス[40]や、敗血症発症 24 時間以内に投与された群を調査した研究[41]では生存率の改善を認めている。本研究で示された敗血症が発症初期から凝固障害を合併することも、早期治療介入の必要性の根拠となる。また凝固の亢進、凝固抑制の低下、線溶系の抑制の 3 つの機序が独立して敗血症性 DIC の病態形成に寄与する可能性を示したことは、凝固亢進に伴う血栓形成傾向が強いものや、血管内皮障害が前面にでるものなど、病態においてもサブタイプが存在することを示唆する。敗血症性凝固障害に対する治療は、凝固障害の重症度、治療介入の時期、病態に応じた薬剤の選択など複数の要因を考慮した戦略が必要である可能性が高く、今後の検討課題である。

近年、血小板が止血だけではなく、自然免疫においても重要な役割を果たしていることが明らかになってきた[7]。血小板にも Toll-like receptor が存在し、病原微生物を認識すると、活性化して凝集する。また感染による凝固の亢進に伴って生成されるトロンビンも血小板の活性化を促す。活性化した血小板は、P-selectin や GPIIb/IIIa を介して好中球と結合し、好中球の病原微生物に対する認識や貪食、NETs (neutrophil extracellular traps) 産生を促進する。また血小板の放出する PMPs (platelet microbicidal proteins) や kinocidins によって好中球の殺菌能が強化される。一方で、生体の過剰な免疫応答が起こる敗血症では、血小板は血栓形成による血管障害と、白血球の遊走を促進することにより、臓器障害の原因となっている可能性がある[42]。

敗血症における血小板減少は、凝固の亢進による血栓形成や網内系での捕捉に伴う消費性低下が原因とされる[43]。本研究でも ICU 入室時の凝固・線溶系異常とその後の血小板低下の出現に関連が認められた。しかし临床上、炎症の改善に伴って、凝固障害の改善が得られたのにも関わらず、血小板減少が進行、遷延する症例を認めることがあり、血小板減少の機序は未だ完全に解明されていない。血小板減少は重症患者において予後と関連することが指摘されており[44]、また敗血症性凝固障害の重症度の判定にも使用されるため、その病態の理解は治療方針や輸血の適応を決定する上で重要である。今回、我々は幼弱血小板数を血小板造血能の指標として用い、敗血症患者における血小板減少を評価した。一般に IPF は骨髄における血小板産生を表すとされ、IPF の上昇は化学療法後の骨髄機能の回復や、ITP や DIC における血小板消費に対する造血反応を示唆する[45,46]。しかし、厳密に血小板造血能を表すのは絶対数である AIPC であり、骨髄での産生が変化しない場合における相対的な IPF の上昇が血小板の破壊を示唆する[47,48]。本研究では、中等度減少群において PLT の低下と AIPC の低下を伴わない IPF の上昇が認められた。一方で高度減少群における PLT の低下傾向は、AIPC の低下を伴っていた。すなわち、敗血症における中等度までの血小板減少は主に凝固障害に伴う消費性低下が原因であるが、重度の血小板減少には血小板産生が低下する病態が加わるという二段階の機序が存在する可能性が示唆された。これは临床上みられる、敗血症性 DIC において TAT, PAI-1, PC などの凝固・線溶系マーカーの改善し、PLT の消費が減少し

た後にも血小板減少が遷延する現象を説明する。敗血症性凝固障害において、PLT は予後と関連し、重症度を反映する重要なマーカーであるが、早期診断や病勢の評価として用いるには適当ではない可能性があり、敗血症性凝固障害の診断項目として今後更に検討する必要がある。

5. 結語

敗血症患者は早期から凝固障害を合併しており，ICU 入室時の凝固・線溶異常は overt DIC 発症と強く関連していた．特に TAT，PAI-1，PC の overt DIC 発症に関する予測能は高く，これら 3 つのバイオマーカーを入室時に単回測定することで，重篤な凝固障害を簡便かつ迅速に診断できる可能性が示された．また敗血症における血小板減少は凝固障害と関連しており，更に重度の血小板減少では消費性の低下に加えて，血小板産生が低下する病態の存在が示唆された．

6. 謝辞

本研究を進めるにあたり，指導教員の布宮伸教授，坂田洋一先生，そして窓岩清治先生より適切なお助言と様々なお指導を賜りました．ここに深く感謝の意を表します．また，分子病態研究部の研究スタッフ，集中治療部のスタッフには本研究に際して多大なるご支援を頂き，感謝しております．そして最後に私の臨床，研究生活を様々な面で支えてくれた友人，家族に対し心より感謝の意を表し，謝辞と致します．

7. 参考文献

1. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med* 2003;348:1546-1554.
2. Dombrovskiy VY, Martin AA, Sunderram J, Paz HL. Rapid increase in hospitalization and mortality rates for severe sepsis in the United States: a trend analysis from 1993 to 2003. *Crit Care Med* 2007;35:1244-1250.
3. Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, Annane D, Gerlach H, Opal SM, Sevransky JE, Sprung CL, Douglas IS, Jaeschke R, Osborn TM, Nunnally ME, Townsend SR, Reinhart K, Kleinpell RM, Angus DC, Deutschman CS, Machado FR, Rubenfeld GD, Webb SA, Beale RJ, Vincent JL, Moreno R, Surviving Sepsis Campaign Guidelines Committee including the Pediatric S. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012. *Crit Care Med* 2013;41:580-637.
4. Levi M, van der Poll T. Inflammation and coagulation. *Crit Care Med* 2010;38:S26-34.
5. Cinel I, Opal SM. Molecular biology of inflammation and sepsis: a primer. *Crit Care Med* 2009;37:291-304.
6. Coughlin SR. Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature* 2000;407:258-264.
7. Yeaman MR. Bacterial-platelet interactions: virulence meets host defense. *Future Microbiol* 2010;5:471-506.
8. Abraham E, Singer M. Mechanisms of sepsis-induced organ dysfunction. *Crit Care Med* 2007;35:2408-2416.
9. Oh D, Jang MJ, Lee SJ, Chong SY, Kang MS, Wada H. Evaluation of modified non-overt DIC criteria on the prediction of poor outcome in patients with sepsis. *Thromb Res* 2010;126:18-23.
10. Taylor FB, Jr., Toh CH, Hoots WK, Wada H, Levi M, Scientific Subcommittee on Disseminated Intravascular Coagulation of the International Society on T, Haemostasis. Towards definition, clinical and laboratory criteria, and a scoring system for disseminated intravascular coagulation. *Thromb Haemost* 2001;86:1327-1330.
11. Angstwurm MW, Dempfle CE, Spannagl M. New disseminated intravascular coagulation score: A useful tool to predict mortality in comparison with Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II and Logistic Organ Dysfunction scores. *Crit Care Med* 2006;34:314-320; quiz 328.
12. Voves C, Wuillemin WA, Zeerleder S. International Society on Thrombosis and Haemostasis score for overt disseminated intravascular coagulation predicts

- organ dysfunction and fatality in sepsis patients. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2006;17:445-451.
13. Ten Cate H. Thrombocytopenia: one of the markers of disseminated intravascular coagulation. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2003;33:413-416.
 14. Song J, Hu D, He C, Wang T, Liu X, Ma L, Lin Z, Chen Z. Novel biomarkers for early prediction of sepsis-induced disseminated intravascular coagulation in a mouse cecal ligation and puncture model. *J Inflamm (Lond)* 2013;10:7.
 15. Gando S, Iba T, Eguchi Y, Ohtomo Y, Okamoto K, Koseki K, Mayumi T, Murata A, Ikeda T, Ishikura H, Ueyama M, Ogura H, Kushimoto S, Saitoh D, Endo S, Shimazaki S, Japanese Association for Acute Medicine Disseminated Intravascular Coagulation Study G. A multicenter, prospective validation of disseminated intravascular coagulation diagnostic criteria for critically ill patients: comparing current criteria. *Crit Care Med* 2006;34:625-631.
 16. Koyama K, Madoiwa S, Nunomiya S, Koinuma T, Wada M, Sakata A, Ohmori T, Mimuro J, Sakata Y. Combination of thrombin-antithrombin complex, plasminogen activator inhibitor-1, and protein C activity for early identification of severe coagulopathy in initial phase of sepsis: a prospective observational study. *Crit Care* 2014;18:R13.
 17. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G, International Sepsis Definitions C. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intensive Care Med* 2003;29:530-538.
 18. Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, Zimmerman JE. APACHE II: a severity of disease classification system. *Crit Care Med* 1985;13:818-829.
 19. Vincent JL, Moreno R, Takala J, Willatts S, De Mendonca A, Bruining H, Reinhart CK, Suter PM, Thijs LG. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Med* 1996;22:707-710.
 20. Koyama K, Madoiwa S, Tanaka S, Koinuma T, Wada M, Sakata A, Ohmori T, Mimuro J, Nunomiya S, Sakata Y. Evaluation of hemostatic biomarker abnormalities that precede platelet count decline in critically ill patients with sepsis. *J Crit Care* 2013;28:556-563.
 21. Pons I, Monteagudo M, Lucchetti G, Munoz L, Perea G, Colomina I, Guiu J, Obiols J. Correlation between immature platelet fraction and reticulated platelets. Usefulness in the etiology diagnosis of thrombocytopenia. *Eur J Haematol* 2010;85:158-163.
 22. O'Brien M. The reciprocal relationship between inflammation and coagulation. *Top Companion Anim Med* 2012;27:46-52.
 23. Kinasewitz GT, Yan SB, Basson B, Comp P, Russell JA, Cariou A, Um SL,

- Utterback B, Laterre PF, Dhainaut JF, Group PSS. Universal changes in biomarkers of coagulation and inflammation occur in patients with severe sepsis, regardless of causative micro-organism [ISRCTN74215569]. *Crit Care* 2004;8:R82-90.
24. Amaral A, Opal SM, Vincent JL. Coagulation in sepsis. *Intensive Care Med* 2004;30:1032-1040.
 25. Faust SN, Levin M, Harrison OB, Goldin RD, Lockhart MS, Kondaveeti S, Laszik Z, Esmon CT, Heyderman RS. Dysfunction of endothelial protein C activation in severe meningococcal sepsis. *N Engl J Med* 2001;345:408-416.
 26. Levi M, van der Poll T. The role of natural anticoagulants in the pathogenesis and management of systemic activation of coagulation and inflammation in critically ill patients. *Semin Thromb Hemost* 2008;34:459-468.
 27. Bergmann S, Hammerschmidt S. Fibrinolysis and host response in bacterial infections. *Thromb Haemost* 2007;98:512-520.
 28. Madoiwa S, Nunomiya S, Ono T, Shintani Y, Ohmori T, Mimuro J, Sakata Y. Plasminogen activator inhibitor 1 promotes a poor prognosis in sepsis-induced disseminated intravascular coagulation. *Int J Hematol* 2006;84:398-405.
 29. Lorente JA, Garcia-Frade LJ, Landin L, de Pablo R, Torrado C, Renes E, Garcia-Avello A. Time course of hemostatic abnormalities in sepsis and its relation to outcome. *Chest* 1993;103:1536-1542.
 30. Saetre T, Lindgaard AK, Lyberg T. Systemic activation of coagulation and fibrynolysis in a porcine model of serogroup A streptococcal shock. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2000;11:433-438.
 31. Kinasewitz GT, Zein JG, Lee GL, Nazir SA, Taylor FB, Jr. Prognostic value of a simple evolving disseminated intravascular coagulation score in patients with severe sepsis. *Crit Care Med* 2005;33:2214-2221.
 32. Dhainaut JF, Shorr AF, Macias WL, Kollef MJ, Levi M, Reinhart K, Nelson DR. Dynamic evolution of coagulopathy in the first day of severe sepsis: relationship with mortality and organ failure. *Crit Care Med* 2005;33:341-348.
 33. Iba T, Gando S, Murata A, Kushimoto S, Saitoh D, Eguchi Y, Ohtomo Y, Okamoto K, Koseki K, Mayumi T, Ikeda T, Ishhikura H, Ueyama M, Ogura Y, Endo S, Shimazaki S, Japanese Association for Acute Medicine Disseminated Intravascular Coagulation Study G. Predicting the severity of systemic inflammatory response syndrome (SIRS)-associated coagulopathy with hemostatic molecular markers and vascular endothelial injury markers. *J Trauma* 2007;63:1093-1098.
 34. Iba T, Kidokoro A, Fukunaga M, Sugiyama K, Sawada T, Kato H. Association between the severity of sepsis and the changes in hemostatic molecular markers and vascular endothelial damage markers. *Shock* 2005;23:25-29.
 35. Egi M, Morimatsu H, Wiedermann CJ, Tani M, Kanazawa T, Suzuki S,

- Matsusaki T, Shimizu K, Toda Y, Iwasaki T, Morita K. Non-overt disseminated intravascular coagulation scoring for critically ill patients: the impact of antithrombin levels. *Thromb Haemost* 2009;101:696-705.
36. Warren BL, Eid A, Singer P, Pillay SS, Carl P, Novak I, Chalupa P, Atherstone A, Penzes I, Kubler A, Knaub S, Keinecke HO, Heinrichs H, Schindel F, Juers M, Bone RC, Opal SM, KyberSept Trial Study G. Caring for the critically ill patient. High-dose antithrombin III in severe sepsis: a randomized controlled trial. *JAMA* 2001;286:1869-1878.
 37. Hoffmann JN, Wiedermann CJ, Juers M, Ostermann H, Kienast J, Briegel J, Strauss R, Warren BL, Opal SM, KyberSept i. Benefit/risk profile of high-dose antithrombin in patients with severe sepsis treated with and without concomitant heparin. *Thromb Haemost* 2006;95:850-856.
 38. Kienast J, Juers M, Wiedermann CJ, Hoffmann JN, Ostermann H, Strauss R, Keinecke HO, Warren BL, Opal SM, KyberSept i. Treatment effects of high-dose antithrombin without concomitant heparin in patients with severe sepsis with or without disseminated intravascular coagulation. *J Thromb Haemost* 2006;4:90-97.
 39. Ranieri VM, Thompson BT, Barie PS, Dhainaut JF, Douglas IS, Finfer S, Gardlund B, Marshall JC, Rhodes A, Artigas A, Payen D, Tenhunen J, Al-Khalidi HR, Thompson V, Janes J, Macias WL, Vangerow B, Williams MD, Group P-SS. Drotrecogin alfa (activated) in adults with septic shock. *N Engl J Med* 2012;366:2055-2064.
 40. Kalil AC, LaRosa SP. Effectiveness and safety of drotrecogin alfa (activated) for severe sepsis: a meta-analysis and metaregression. *Lancet Infect Dis* 2012;12:678-686.
 41. Casserly B, Gerlach H, Phillips GS, Marshall JC, Lemeshow S, Levy MM. Evaluating the use of recombinant human activated protein C in adult severe sepsis: results of the Surviving Sepsis Campaign. *Crit Care Med* 2012;40:1417-1426.
 42. Katz JN, Kolappa KP, Becker RC. Beyond thrombosis: the versatile platelet in critical illness. *Chest* 2011;139:658-668.
 43. Levi M, Schultz M. Coagulopathy and platelet disorders in critically ill patients. *Minerva Anestesiol* 2010;76:851-859.
 44. Moreau D, Timsit JF, Vesin A, Garrouste-Orgeas M, de Lassence A, Zahar JR, Adrie C, Vincent F, Cohen Y, Schlemmer B, Azoulay E. Platelet count decline: an early prognostic marker in critically ill patients with prolonged ICU stays. *Chest* 2007;131:1735-1741.
 45. Takami A, Shibayama M, Orito M, Omote M, Okumura H, Yamashita T, Shimadoi S, Yoshida T, Nakao S, Asakura H. Immature platelet fraction for prediction of platelet engraftment after allogeneic stem cell transplantation.

Bone Marrow Transplant 2007;39:501-507.

46. Koike Y, Miyazaki K, Higashihara M, Kimura E, Jona M, Uchihashi K, Masuda A, Kandabashi K, Kurokawa M, Yatomi Y. Clinical significance of detection of immature platelets: comparison between percentage of reticulated platelets as detected by flow cytometry and immature platelet fraction as detected by automated measurement. *Eur J Haematol* 2010;84:183-184.
47. Bat T, Leitman SF, Calvo KR, Chauvet D, Dunbar CE. Measurement of the absolute immature platelet number reflects marrow production and is not impacted by platelet transfusion. *Transfusion* 2013;53:1201-1204.
48. Barsam SJ, Psaila B, Forestier M, Page LK, Sloane PA, Geyer JT, Villarica GO, Ruisi MM, Gernsheimer TB, Beer JH, Bussel JB. Platelet production and platelet destruction: assessing mechanisms of treatment effect in immune thrombocytopenia. *Blood* 2011;117:5723-5732.