

表題 敗血症における血小板減少に対する幼若血小板比率を用いた評価

論文の区分 博士課程

著 者 名 室野井 智博

担当指導教員氏名 鈴川 正之 教授

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

2017 年 1 月 10 日申請の学位論文

目次

1. 諸言	4
A, 研究① 敗血症における血小板減少に対する幼若血小板比率を用いた評価 および予後との関連.....	7
2a. 対象と方法.....	7
2a.1. 対象症例	7
2a.2. 診断および治療	8
2a.3. データ収集.....	8
2a.4. バイオマーカーの測定	9
2a.4.1. 幼若血小板比率の測定と幼若血小板絶対数の算出	9
2a.4.2. 炎症および凝固系バイオマーカーの測定	9
2a.5. データ解析.....	11
3a. 結果.....	12
3a.1. 患者背景と予後	12
3a.2. ICU 入室後の敗血症患者における IPF, 血小板数の経時的推移	15
3a.3. ICU 入室時の血小板減少群と血小板非減少群, 対照群における IPF, AIPC, 血小板数の比較.....	15
3a.4. 敗血症患者における血小板減少と凝固系バイオマーカーの関連	17
3a.5. 敗血症患者における ICU 入室時の IPF と 28 日死亡率の関係.....	18
3a.6. 敗血症患者における抗凝固薬投与, 非投与における血小板数の推移の比較...	21
B, 研究② 敗血症早期における血小板減少時の血小板産生能の 評価	22
2b. 対象と方法	22
2b.1. 対象症例	22
2b.2. データ収集	23
2b.3. バイオマーカーの測定	23
2b.4. データ解析	23
3b. 結果	24
3b.1. 患者背景と予後	24

3b.2. ICU 入室時の血小板減少群および血小板非減少群における IPF, AIPC, TNF- α , TPO, IL-6 の比較	26
3b.3. ICU 入室後 3 日間の敗血症患者における IPF, AIPC, 血小板数, TNF- α , TPO, IL-6 の経時的推移	27
3b.4. ICU 入室時の敗血症患者における IPF, IL-6, TNF- α , TPO と 28 日死亡率の関係	29
4. 考察	30
5. 結語	36
6. 謝辞	37
7. 参考文献	38

1. 諸言

敗血症とは、細菌による感染症が進展し、重篤な全身症状を示す病態とされ、感染を原因とする SIRS (systemic inflammatory response syndrome: SIRS) と定義された [1](#). さらに、臓器障害を伴う敗血症は severe sepsis, ショックを伴う敗血症は septic shock と定義され [1](#), これらの共通な定義を用いることにより、敗血症に関する病態解析は発展し、多くの知見の集積を得た.

しかし、高齢化に伴い敗血症の発症率は増加し [2](#), さらに臓器障害合併率も増加しており [3](#), 敗血症による死亡率は依然高いままである [4](#). 近年の報告においても、死亡率は、severe sepsis では 25%~30%に達し、septic shock では 40%以上に上る [2,5](#). 敗血症に伴う臓器障害に対する根本的な治療方法は確立されておらず、救命率の向上には、さらなる病態の解明および臓器障害が合併する可能性のある患者に対する早期診断および早期治療介入が重要である.

敗血症において、血小板は凝固因子および好中球と協働して、自然免疫を担っており、早期から病態形成に寄与している [6-8](#). 生体内に病原微生物が侵入すると、自然免疫担当細胞である血小板や好中球、単球はその病原微生物に由来する炎症を惹起する分子パターンである pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) や 障害を受けた細胞から炎症を惹起する Alarmins を Toll-like receptor (TLR)を介して認識し、活性化する [6,9](#). 活性化した血小板や好中球は複合体を形成し、病原体の認識やその貪食を担う [6,9,10](#). さらに、活性化した単球は、Interleukin-6 (IL-6), Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α)などの炎症性サイトカインを産生し、単球や血管内皮細胞などに組織因子を誘導し、凝固系を活性化す

る [11](#). さらに，産生された IL-6 や TNF- α は血小板産生を制御する Thrombopoietin (TPO) の産生を亢進し，血小板の産生および動員を促すとされる [12,13](#). しかし，敗血症に至る重症感染症においては，炎症ならびに凝固の活性化による過剰な血栓形成に伴い，血小板の消費が亢進した結果，血小板が減少する [14-19](#). 敗血症において，血小板減少は臓器障害の一つの指標であり，死亡率の上昇，ICU (Intensive Care Unit) 滞在期間の延長，入院期間の延長と強く関連すると報告されている [20-23](#). さらに，血小板減少は，重度の凝固障害である播種性血管内凝固 (Disseminated Intravascular Coagulation, DIC) の重症度を反映する指標とされ，敗血症において DIC の合併は，死亡率と関連すると報告されている [24,25](#).

敗血症性凝固障害に対する早期診断および重症度診断の評価法は，国際血栓止血学会 (International Society on Thrombosis and Haemostasis, ISTH) overt DIC 診断基準 [17](#) や，日本救急医学会急性期 DIC スコア [26](#)，旧厚生省 Japanese Ministry of Health and Welfare (JMHW) DIC スコア [17](#) が広く用いられている. しかし，いずれの診断基準もすでに臓器障害の一つの指標である血小板数が診断項目に用いられており，さらに，その低下率が診断項目に含まれるため，確定診断に数日を要し早期診断には限界があるとされ [24,27](#)，敗血症性凝固障害および血小板減少に対する早期診断に有用なマーカーが求められている.

近年，幼若血小板比率 (Immature platelet fraction, IPF) は，網血小板に代わる血小板の産生を反映する信頼性の高いマーカーとして測定されるようになった [28](#). 網血小板は骨髓から放出されて間もない幼若血小板であり，末梢血中出现した幼若血小板は骨髓における血小板産生能を反映する. 網血小板の測定は，

特殊技術が必要とされ、標準化が困難であったが、IPF が自動測定可能となり、簡便かつ迅速に測定可能となった²⁹. IPF は、幼若血小板が成熟血小板と比較して、RNA が多く含まれることを利用し、全血小板数のうちの幼若血小板数を測定し、全血小板数を母数とした百分率で示される。実際の幼若血小板数である幼若血小板絶対数（Absolute Immature platelet count, AIPC）は、血小板数に IPF を乗じて算出される^{28,30}. AIPC の上昇は血小板産生亢進を反映し、さらに血小板産生に差が無ければ IPF の上昇は血小板の消費亢進を反映する^{31,32}. IPF および AIPC の測定は、末梢における血小板消費が主病態である自己免疫性血小板減少性紫斑病および血栓性血小板減少性紫斑病の診断やその治療効果判定に有用とされている^{31,32}. さらに、IPF が、感染および敗血症の発症の予測に有用なマーカーとして報告され³³⁻³⁵、敗血症との関連が示唆されている。

我々は、敗血症早期において IPF は、凝固障害に伴う血小板の消費亢進を反映して上昇すると仮説を立て、IPF による血小板減少の早期予測をテーマに研究を行った。本研究の第 1 の目的は IPF の上昇が凝固障害に伴う血小板減少を早期に予測し、敗血症患者の予後と関連することを示すことである（研究①）。また、第 2 の目的として、敗血症早期における血小板減少時の血小板産生能を、AIPC ならびに血小板産生の制御の中心を担う TPO, IL-6, TNF- α にて評価し明らかにすることである（研究②）。

A, 研究① 敗血症における血小板減少に対する幼若血小板比率を用いた評価および予後との関連

2a. 対象と方法

2a.1. 対象症例

2013 年 10 月から 2015 年 2 月にかけて，自治医科大学附属病院集中治療室（Intensive Care Unit, ICU）に入室した敗血症患者を対象とし，単施設前向き観察研究を行った．本研究は自治医科大学倫理委員会の承認を受けて実施した．除外基準は

- ① 18 歳未満
- ② ICU 入室時の血小板数が $80 \times 10^3/\mu\text{L}$ より少ない患者
- ③ 血液疾患の合併
- ④ Child-Pugh 分類 B 以上の肝硬変
- ⑤ 癌に対する化学療法の既往
- ⑥ ICU 入室 4 週間前からの輸血療法

とした．

対照群は非感染性疾患で，予定手術後に自治医科大学附属病院 ICU に入室した患者を対象とし，上記除外基準に加え，ICU 入室 4 週間前からの感染がない患者とした．

2a.2. 診断および治療

自治医科大学附属病院 ICU は 24 時間、集中治療医が専従して治療する closed ICU である。敗血症の診断は、2001 年の International Sepsis Definitions Conference に沿って、臨床所見や炎症のパラメーター、循環動態を評価し、感染に伴う全身症候を呈した症例を敗血症と診断した³⁶。敗血症の管理は、Surviving Sepsis Campaign Guideline に準じて標準的な治療を行った³⁷。深部静脈血栓症 (deep vein thrombosis, DVT) 予防は、フットポンプおよび弾性ストッキングを使用し、活動性の出血がある場合ならびに出血のリスクが高いと判断した場合を除き、抗凝固薬（低分子ヘパリンならびに未分画ヘパリン、メシル酸ナファモスタット）を使用した。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と判断した場合に限って行った。

2a.3. データ収集

ICU 入室時に、年齢、性差、合併症などの患者背景及び、重症患者における予後予測スコアである Acute Physiology and Chronic Health Evaluation (APACHE) II スコアを記録した。また、重症患者における臓器障害の程度を示す指標である Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) スコアを凝固障害の指標である血小板数を除き、ICU 入室後から連日算出した。DIC の診断基準である ISTH の overt DIC スコアを連日算出した。臨床的アウトカムとして、ICU 入室後の 28 日間において、ICU に在室していない日数である ICU-free days と 28 日死亡率を評価した。

2a.4. バイオマーカーの測定

2a.4.1. 幼若血小板比率の測定と幼若血小板絶対数の算出

幼若血小板比率は、多項目自動血球分析装置 XE-5000 (Sysmex, Kobe, Japan)³⁸を用いて、当院検査室において測定した。ICU 入室時を Day 1 とし、Day 1 から Day 5 まで測定した。XE-5000 は成熟血小板と比較して幼若血小板は、RNA が多いことを利用して、核酸染色蛍光色素である、ポリメチン系色素およびオキサジン系色素を用い、フローサイトメトリー法にて全血小板数のうちの幼若血小板数を測定し、全血小板数を母数とした百分率で示される。さらに、幼若血小板絶対数 (absolute immature platelet count, AIPC) は、単位血液あたりの幼若血小板数として、血小板数に IPF を乗じて算出した。

2a.4.2. 炎症および凝固系バイオマーカーの測定

当院の検査室において、ICU 入室時を Day 1 として Day 3 まで、炎症を示すバイオマーカーとして、C-reactive protein (CRP) と procalcitonin を測定した。凝固系バイオマーカーとして、prothrombin time international normalized ratio (PT-INR), fibrinogen, fibrin degradation products (FDP), antithrombin (AT), plasminogen, thrombin-antithrombin complex (TAT) を測定した。

検体はヘパリン・フリーで採取し、CRP は、LABOSPECT 008 自動測定器 (日立, 東京), procalcitonin は cobas 8000 自動測定器 (Roche diagnostics, 東京) で測定した。一般血液凝固検査は CS-2100i 自動測定器 (Sysmex, 兵庫) で測定した。AT, plasminogen の測定は、Berichrom 試薬 (Siemens, 東京) を、TAT の測

定は, Test F 酵素免疫法 (Sysmex) を用いた.

2a.5. データ解析

対象患者を ICU 入室後 5 日間で、血小板数が $80 \times 10^3/\mu\text{L}$ 未満に減少した、もしくは初日の血小板数の 30% 以下に減少した患者を血小板減少群と定義し、血小板減少群と非減少群の 2 群に分類した。2 群間の比較には、Student の t 検定、Wilcoxon 順位和検定、 χ^2 検定、Fisher の正確検定を用いた。3 群間の比較には、一元配置 (one-way Analysis of Variance, ANOVA) , Kruscal-Wallis 検定を行い、各々 2 群間の比較には Tukey-kramer , Steel-Dwass の多重比較検定を用いた。28 日死亡率の予測には、Cox の比例ハザードモデルによる生存時間分析にて単変量解析ならびに多変量解析を行った。さらに、28 日死亡率の予測の正確性には、Receiver operating characteristic curve (ROC) 分析を行い、area under the curve (AUC) を用いて分析を行った。検定は両側検定を行い、 $P < 0.05$ を有意とした。統計解析は JMP version 12 (SAS institute, Tokyo, Japan) を使用した。

3a. 結果

3a.1. 患者背景と予後

観察期間中に 184 例の敗血症患者が ICU に入室した. 83 例が除外基準を 1 項目以上満たしたため除外され, 101 例の敗血症患者が解析対象となった. 対照群は, 非感染性疾患の予定手術術後 48 症例が対象となった.

敗血症患者 101 例の ICU 入室時の患者背景と予後を Table 1 に示し, 対照群の患者背景を Table 2 に示した. 101 例の敗血症患者 (敗血症群) のうち, 47 例 (46.5%) が ICU 入室後 5 日以内に血小板数が減少した (血小板減少群). 血小板減少群は, 血小板非減少群と比較して, APACHE II スコア, SOFA スコアが ICU 入室時点で高かった. 濃厚血小板は, 血小板減少群でより多く使用されていた (7.9% vs. 0.0%; $P=0.0016$). 濃厚赤血球, 新鮮凍結血漿は 2 群間で差を認めなかった (12.9% vs. 8.9%, $P=0.23$; 5.9% vs. 3.0%, $P=0.30$ respectively) .

Table 1: Baseline characteristics and outcomes of patients with sepsis

	All patients with sepsis (n = 101)	No decrease in platelet count (n = 54)	Subsequent decrease in platelet count (n = 47)	<i>P</i> -value*
Demographics				
Age (years, range)	67 (59-78)	65 (58-78)	69 (62-80)	0.14
Male sex (n, %)	64 (63.4%)	34 (63.0%)	30 (63.8%)	1.00
Source of sepsis				
Pulmonary infection (n, %)	21 (20.8%)	8 (14.8%)	13 (27.7%)	0.14
Abdominal infection (n, %)	56 (55.5%)	33 (61.1%)	23 (48.9%)	0.23
Urinary tract infection (n, %)	4 (4.0%)	2 (3.7%)	2 (4.3%)	1.00
Soft tissue infection (n, %)	19 (18.8%)	11 (20.3%)	8 (17.0%)	0.80
Central nervous system infection (n, %)	1 (1.0%)	0 (0%)	1 (2.1%)	0.47
Comorbidities				
Hypertension (n, %)	23 (22.8%)	16 (29.6%)	7 (14.9%)	0.09
Chronic Heart Failure (n, %)	7 (6.9%)	4 (7.4%)	3 (6.4%)	1.00
Diabetes Mellitus (n, %)	22 (21.8%)	13 (24.1%)	9 (19.2%)	0.63
Chronic Kidney Disease (n, %)	14 (13.9%)	5 (9.3%)	9 (19.2%)	0.25
Severity of illness				
APACHE II (median, range)	21.0 (16.0-27.0)	17.5 (14.0-24.3)	25.0 (18.0-30.0)	0.0006
Organ dysfunction				
SOFA score** (median, range)	6 (4-8)	4 (2-6)	8 (6-10)	<0.0001
Prognosis				
ICU-free days (median, range)	21 (16-24)	23 (20-25)	19 (13-21)	<0.0001
28-day mortality (n, %)	8 (7.9%)	1 (1.9%)	7 (14.9%)	0.024

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

Abbreviations: APACHE, Acute Physiology and Chronic Health Evaluation; SOFA, Sepsis-related Organ Failure Assessment; ICU, intensive care unit.

*Comparison of groups with and without subsequent decrease in platelet count.

**SOFA scores do not include coagulation parameter (platelet count).

Table 2: Baseline characteristics of control group patients

	Control Group (n = 48)
Demographics	
Age (years, range)	63 (49-72)
Male sex (n, %)	33 (68.7%)
Surgical procedure	
Gastrointestinal (n, %)	18 (37.5%)
Thoracic (n, %)	22 (45.8%)
Urologic (n, %)	4 (8.3%)
Other general surgery (n, %)	2 (4.1%)
Gynecologic (n, %)	1 (2.0%)
Orthopedic (n, %)	1 (2.0%)
Severity of illness	
APACHE II (median, range)	12.0 (8.0-16.3)
Prognosis	
ICU-free days (median, range)	26 (26-26)
28-day mortality (n, %)	0 (0%)

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

Abbreviations: APACHE, Acute Physiology and Chronic Health

Evaluation; ICU, intensive care unit.

3a.2. ICU 入室後の敗血症患者における IPF, 血小板数の経時的推移

ICU 入室後 5 日間の血小板減少群と非減少群における血小板数および IPF の経時的推移を Figure 1 に示した. 血小板減少群では, 血小板が経時的に減少するにつれて, IPF は経時的に上昇を認めた (Figure 1a). 対照的に血小板非減少群では, 血小板の推移と並行してほぼ変化を認めなかった (Figure 1b).

3a.3. ICU 入室時の血小板減少群と血小板非減少群, 対照群における IPF, AIPC, 血小板数の比較

ICU 入室時の IPF と AIPC を, 血小板減少群, 血小板非減少群, 対照群の 3 群でそれぞれ比較した. ICU 入室時の血小板数は 3 群間で差を認めなかった (median, 148.0 [94.8-218.0] vs. 170.0 [142.0-249.0] vs. 181.5 [157.5-208.8] $\times 10^3/\mu\text{L}$; $P=0.24$ respectively). 入室時の IPF は, 血小板減少群で最も上昇し, 血小板非減少群においても, 対照群と比較して, 上昇していた (median 4.3% [range 3.1-8.1%], 3.7% [2.6-4.6%], 2.1% [1.6-3.5%]; $P<0.0001$; Figure 2a). AIPC は, 対照群 (4.2 [3.0-6.4] $\times 10^3/\mu\text{L}$) と比較して, 敗血症群で有意に上昇していたが, 血小板減少群と血小板非減少群で比較すると, 有意差を認めなかった (median, 7.6 [4.2-10.0] vs. 5.9 [4.2-8.7] $\times 10^3/\mu\text{L}$; $P=0.32$; Figure 2b). さらに, ICU 入室時の網状赤血球を血小板減少群と非減少群で比較すると, 差を認めなかった (1.3% [1.0-1.8] vs. 1.2% [0.9-1.5], $P=0.19$).

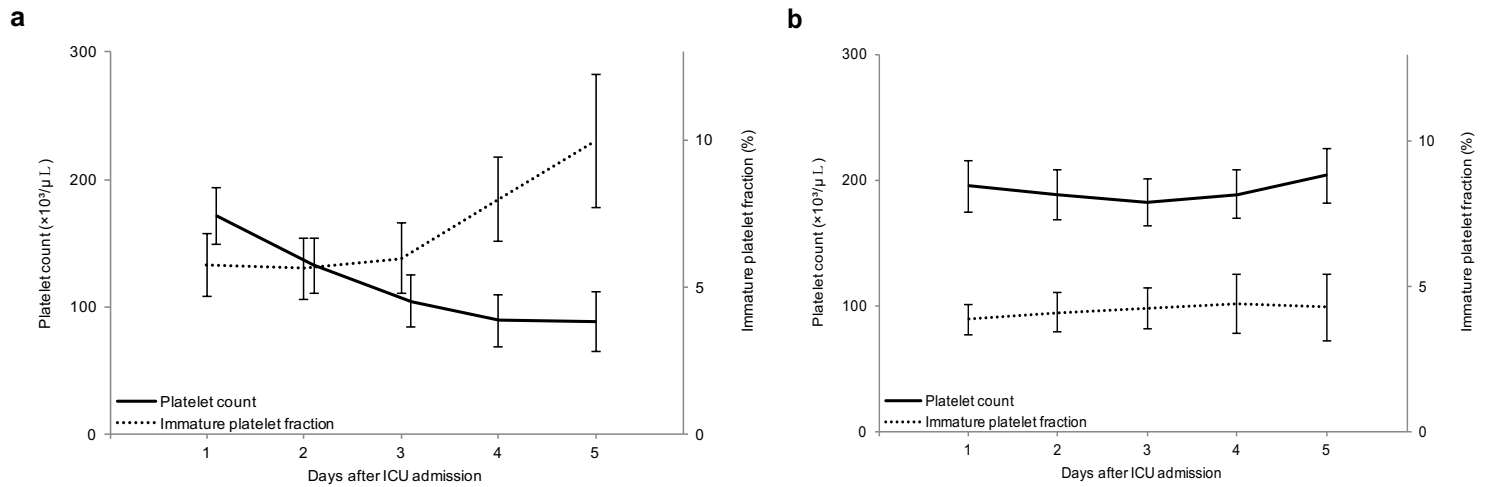


Figure 1. Changes in immature platelet fraction and platelet count over days 1 to 5 of intensive care unit (ICU) admission in septic patients (a) with and (b) without a subsequent decrease in platelet count. Data are expressed as the mean with the 95% confidence interval shown by the error bars.

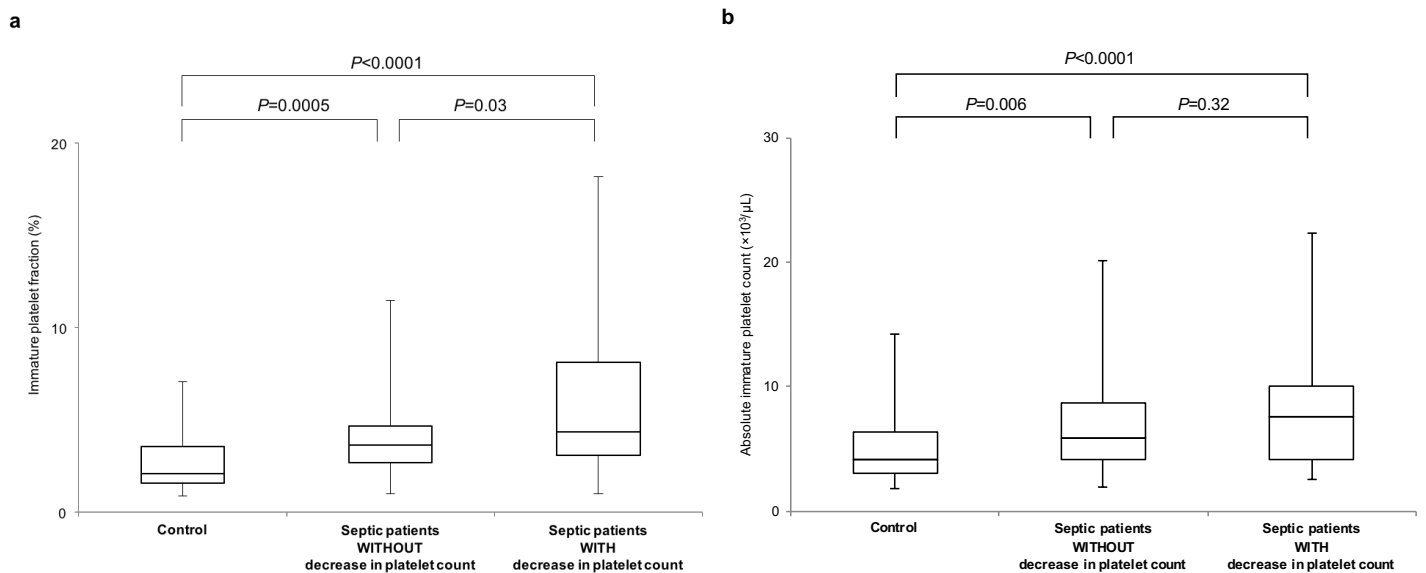


Figure 2. Box plot showing (a) immature platelet fraction and (b) absolute immature platelet count on the day of intensive care unit admission in septic patients with a subsequent decrease in platelet count, septic patients without a subsequent decrease in platelet count, and controls with elective surgery.

3a.4. 敗血症患者における血小板減少と凝固系バイオマーカーの関連

血小板減少と凝固障害の関係を評価するために、血小板減少群と非減少群で Day 1 から Day 3 までの凝固系バイオマーカーを比較した。

一般血液凝固検査である PT-INR とトロンビン生成の指標である TAT は、血小板非減少群と比較して、血小板減少群で、Day 1 から有意に上昇しており、Day 3 まで有意に上昇していた (Figure 3a, Figure 3c). 凝固抑制因子である AT は血小板減少群で血小板非減少群と比較して Day 1 から有意に低下しており、Day 2 まで有意に低下していた (Figure 3d). さらに、線溶系の指標である plasminogen は、Day 1 から Day 3 まで有意に低下していた (Figure 3e).

血小板非低下群においても、Day 1 から Day 3 まで PT-INR, TAT, FDP は基準値よりも上昇し、AT, plasminogen は低下していた。

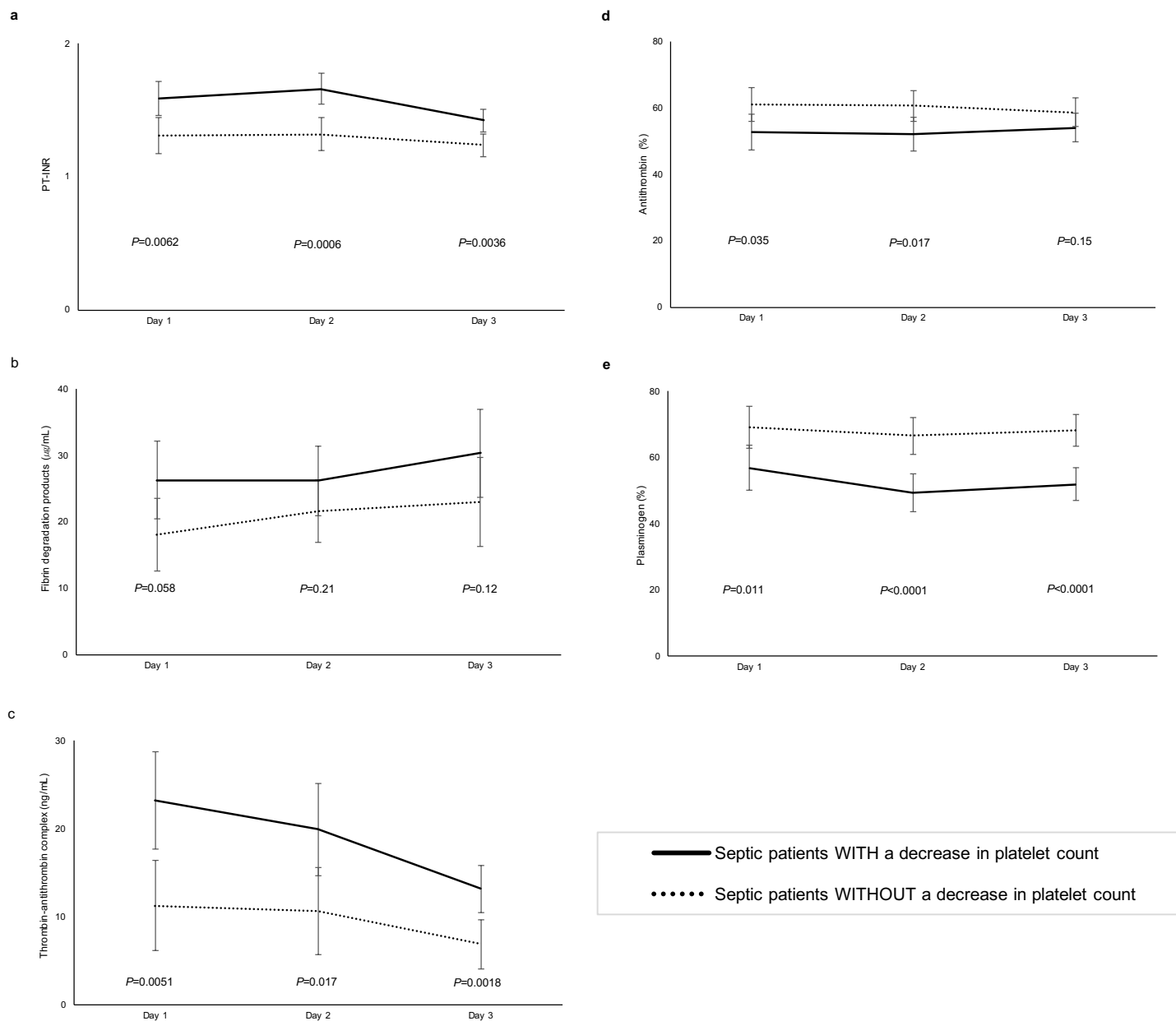


Figure 3. Changes in hemostatic biomarkers over days 1 to 3 of intensive care unit admission.

(a) Prothrombin time-international normalized ratio (PT-INR), (b) fibrin degradation products, (c) thrombin-antithrombin complex, (d) antithrombin, and (e) plasminogen in patients with and without a subsequent decrease in platelet count. Data are expressed as mean with 95% confidence intervals.

3a.5. 敗血症患者における ICU 入室時の IPF と 28 日死亡率の関係

敗血症患者において、ICU 入室時の IPF と 28 日死亡率の関係を調べるために生存群と非生存群と 2 群に分けて、ICU 入室時の IPF と APACHE II スコアを検討した。

非生存群において、IPF, APACHE II とともに、生存群と比較して有意に上昇していた(8.2% [5.6-10.9%] vs. 3.8% [2.7-5.7%]; $P=0.0003$, 30.5 [27.3-34.0] vs. 19.0 [16.0-26.0]; $P=0.0008$, respectively)。

さらに、IPF が 28 日死亡率を予測するかを調べるために、比例ハザードモデルを用いた。IPF は単変量解析では、有意に 28 日死亡率と関連することを示し、さらに APACHE II で調整した多変量解析においても IPF は独立して有意に 28 日死亡率と関連することを示した(Table 3)。

次に、28 日死亡率の予測能を検討するために ROC 分析を行った。IPF は APACHE II と同等の高い予測能を示した(IPF, AUC 0.886 [95% confidence interval 0.754-0.952], $P=0.0002$, APACHE II score, 0.857 [0.748-0.924], $P=0.0017$)。さらに、IPF と APACHE II を組み合わせは、高い予測能を示した(0.912 [0.790-0.966], $P<0.0001$)。また、炎症バイオマーカーおよび凝固系バイオマーカーも ROC 分析を行ったが、CRP (0.523 [0.320-0.718], $P=0.74$), procalcitonin (0.455 [0.285-0.636], $P=0.87$) , PT-INR (0.614 [0.323-0.841], $P=0.035$), FDP, (0.723 [0.546-0.850], $P=0.36$) , AT (0.549 [0.304-0.773], $P=0.56$), plasminogen (0.581 [0.289-0.825], $P=0.36$), TAT (0.589 [0.313-0.819], $P=0.092$) といずれも AUC が低く、また有意ではなかった。

Table 3: Cox regression analysis for IPF and APACHE II score at ICU admission to predict 28-day mortality

	Univariate analysis			Multivariate analysis		
	Hazard Ratio	95% CI	<i>P</i> -value	Hazard Ratio	95% CI	<i>P</i> -value
IPF	1.38	1.18-1.61	0.0002	1.33	1.11-1.58	0.0007
APACHE II	1.10	1.04-1.18	0.0023	1.09	1.01-1.16	0.014

Abbreviations: APACHE, Acute Physiology and Chronic Health Evaluation; CI, confidence intervals;

IPF, Immature Platelet Fraction

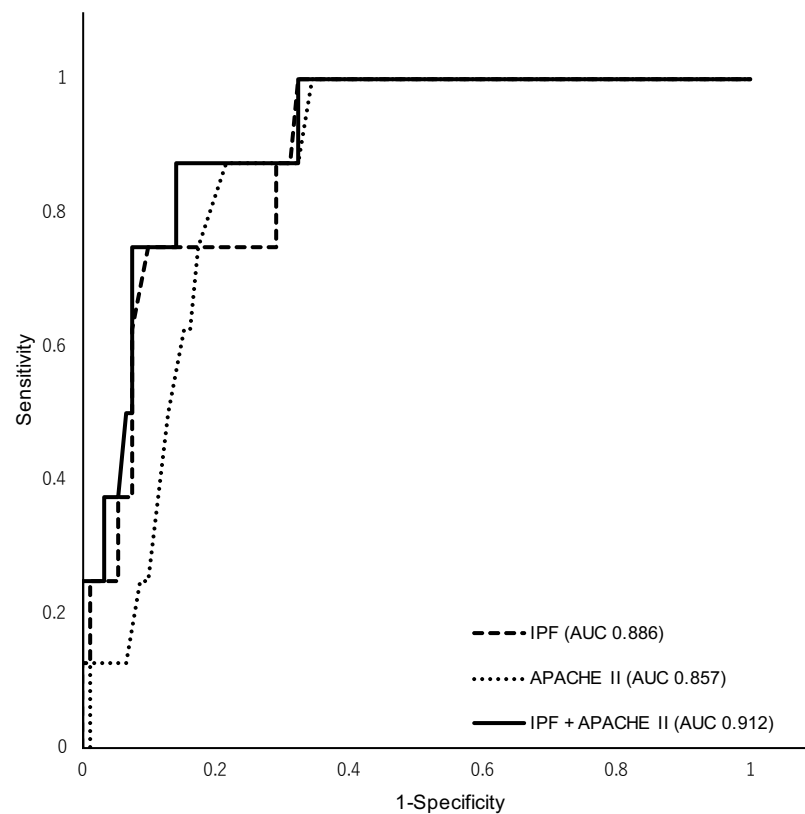


Figure 4. Receiver operator characteristic curve analysis comparing the prognostic value of immature platelet fraction on intensive care unit admission for 28-day mortality with that of the Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II (APACHE II) score. The figure shows the area under the receiver operating characteristic curve (AUC) for immature platelet fraction (0.886 [95% CI, 0.754-0.952]) and APACHE II score (0.857 [95% CI, 0.748-0.924]).

3a.6. 敗血症患者における抗凝固薬投与、非投与における血小板数の推移の比較

敗血症に伴う血小板減少に対する抗凝固薬による血小板数への影響を検討するために、敗血症群において、抗凝固薬投与群と抗凝固薬非投与群の2群にわけて、Day 1 から Day 5 までの血小板数の推移を比較した。

抗凝固薬投与群において、血小板数が低い結果であった (Figure 5) 。

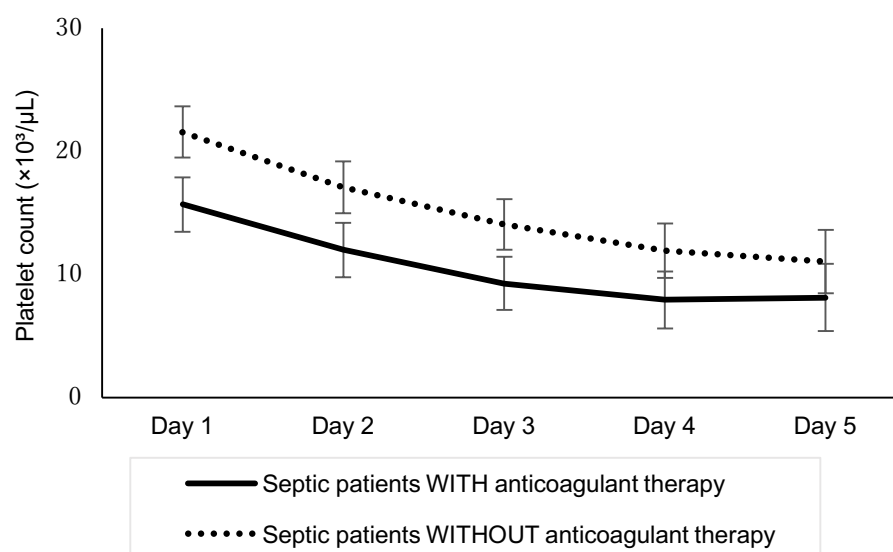


Figure 5. Changes in platelet count over days 1 to 5 of intensive care unit admission. Platelets count in patients with septic patients with and without anticoagulant. Data are expressed as mean with 95% confidence intervals.

B, 研究② 敗血症早期における血小板減少時の血小板産生能の

評価

2b. 対象と方法

2b.1. 対象症例

2014 年 1 月から 2015 年 6 月にかけて、自治医科大学附属病院 ICU に入室した敗血症患者を対象とし、単施設前向き観察研究を行った。本研究は自治医科大学倫理委員会の承認を受けて実施した。

除外基準は

- ① 18 歳未満
- ② ICU 入室時の血小板数が $80 \times 10^3/\mu\text{L}$ より少ない患者
- ③ 血液疾患の合併
- ④ Child-Pugh 分類 B 以上の肝硬変
- ⑤ 癌に対する化学療法の既往
- ⑥ ICU 入室 4 週間前からの輸血療法

とした。

敗血症の診断および治療は研究①と同様に行った。

研究①で示した対照群の IPF ならびに AIPC の中央値をそれぞれの基準値と定義した。

2b.2. データ収集

ICU 入室時に、年齢、性差、合併症などの患者背景及び, APACHE II スコア, SOFA スコアを凝固系の指標である血小板数を除いたスコアで ICU 入室後から連日算出した. 臨床的アウトカムとして, 28 日間の ICU-free days, 28 日死亡率を評価した.

2b.3. バイオマーカーの測定

ICU 入室時を Day 1 として, Day 3 まで, 血小板産生制御因子として, IL-6, TNF- α , TPO を測定した.

検体はヘパリン・フリーで採取し, 4 °C・2500 rpm で遠心処理した後に, -80°C で凍結した検体を用いて, IL-6, TNF- α , TPO はそれぞれ, Chemiluminescent immunoassay 法(富士レビオ, 東京), Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay 法 (R & D Systems, 米国), 生物発光酵素免疫測定法(富士レビオ, 東京)で測定した.

2b.4. データ解析

対象患者を ICU 入室後 5 日間で, 血小板数が $80 \times 10^3/\mu\text{L}$ 未満に減少した, もしくは初日の血小板数の 30%以下に減少した患者を血小板減少群と定義し, 血小板減少群と非減少群の 2 群に分類した. 2 群間の比較には, Student の t 検定, Wilcoxon 順位和検定, χ^2 検定, Fisher の正確検定を用いた. 検定は両側検定を行い, $P < 0.05$ を有意とした. 統計解析は JMP version 12 (SAS institute, Tokyo, Japan)を使用した.

3b. 結果

3b.1. 患者背景と予後

観察期間中に TPO, IL-6, TNF- α を測定した 50 例の敗血症患者を対象とした。6 例が除外基準を 1 項目以上満たしたため除外され、44 例の敗血症患者が解析対象となった。

敗血症患者 44 例の ICU 入室時の患者背景と予後を Table 4 に示した。44 例の敗血症患者（敗血症群）のうち、20 例（45.4%）が ICU 入室後 5 日以内に血小板数が減少した（血小板減少群）。血小板減少群は、血小板非減少群と比較して、APACHE II スコア, SOFA スコアが ICU 入室時点で高かった。

また、皮膚軟部感染患者 7 例中 7 例にドレナージ術が施行され、腹部感染症患者 27 例中 24 例（87.5%）に手術が行われていた。

Table 4: Baseline characteristics and outcomes of patients with sepsis

	All patients with sepsis (n = 44)	No decrease in platelet count (n = 24)	Subsequent decrease in platelet count (n = 20)	<i>P</i> -value*
Demographics				
Age (years, range)	70 (59-81)	65 (55-71)	77 (71-85)	0.0030
Male gender (n, %)	29 (65.9%)	18 (62.1%)	11 (37.9%)	0.16
Source of sepsis				
Pulmonary infection (n, %)	10 (22.7%)	6 (25.0%)	4 (20.0%)	0.76
Abdominal infection (n, %)	27 (61.4%)	14 (58.3%)	13 (65.0%)	0.73
Soft tissue infection (n, %)	7 (15.9%)	4 (16.7%)	3 (15.0%)	1.00
Comorbidities				
Hypertension (n, %)	13 (29.6%)	8 (33.3%)	5 (25.0%)	0.74
Chronic Heart Failure (n, %)	3 (6.8%)	2 (8.3%)	1 (5.0%)	1.00
Diabetes Mellitus (n, %)	10 (22.7%)	8 (33.3%)	2 (10.0%)	0.083
Chronic Kidney Disease (n, %)	6 (13.5%)	3 (12.5%)	3 (15.0%)	1.00
Severity of illness				
APACHE II (median, range)	22.0 (16.0-30.0)	19.0 (15.0-25.0)	26.0 (18.0-31.0)	0.050
Organ dysfunction				
SOFA score** (median, range)	7 (4-8)	5 (4-7)	8 (6-11)	0.0015
Prognosis				
ICU-free days (median, range)	19 (15-24)	22 (16-25)	17 (11-21)	0.020
28-day mortality (n, %)	5 (11.4%)	2 (8.3%)	3 (15.0%)	0.64

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

Abbreviations: APACHE, Acute Physiology and Chronic Health Evaluation; SOFA, Sepsis-related Organ Failure Assessment; ICU, intensive care unit.

*Comparison of groups with and without subsequent decrease in platelet count.

**SOFA scores do not include coagulation parameter (platelet count).

3b.2. ICU 入室時の血小板減少群および血小板非減少群における IPF, AIPC, TNF- α , TPO, IL-6 の比較

ICU 入室時における TNF- α , TPO, IL-6, IPF, AIPC の 2 群間の比較を Table 5 に示した. 両群において, TNF- α , TPO, IL-6, IPF, AIPC で基準値より高値であった. ICU 入室時において, 血小板減少群では, 血小板非減少群と比較して, IPF, IL-6, TNF- α は有意に上昇していた. TPO と AIPC は 2 群間で差がなかった.

Table 5 Cytokines at baseline (day 1) in patients with sepsis

	Normal range	All patients (n = 44)	No decrease in platelet count (n = 24)	Subsequent decrease in platelet count (n = 20)	P-value*
Tumor Necrosis Factor α (pg/mL)	0.6-2.8	8.45 (4.2-15.8)	4.2 (2.8-7.8)	16.2 (12.3-22.0)	<0.0001
Thrombopoietin (fmol/mL)	0.12-0.68	4.3 (2.7-5.7)	4.4 (2.7-7.1)	4.0 (2.7-5.5)	0.62
Interleukin-6 (pg/mL)	0-4.0	858.5 (231.3-3337.5)	278.5 (118.5-1262.5)	3420.0 (845.3-26025.0)	<0.0001
Absolute immature platelet count ($\times 10^3$)	4.2 (3.0-6.4) **	7.7 (5.3-10.4)	6.9 (4.2-9.2)	8.7 (5.7-10.8)	0.22
Immature platelet fraction (%)	2.1 (1.6-3.5) **	4.2 (3.5-7.9)	4.0 (3.5-5.5)	7.5 (3.5-8.5)	0.040

Data are expressed as median (interquartile range).

*Comparison of groups with and without subsequent decrease in platelet count.

** This reference value is quoted from the control group of study 1.

3b.3. ICU 入室後 3 日間の敗血症患者における IPF, AIPC, 血小板数, TNF- α , TPO, IL-6 の経時的推移

ICU 入室後 3 日間の血小板減少群と非減少群における IPF, AIPC, 血小板数, TNF- α , TPO, IL-6 の経時的推移を Figure 6 に示した.

血小板数は、血小板減少群では経時的に減少し、Day 2 から有意に減少を認めた(Figure 6a). IPF は、Day 1 から Day 3 まで、血小板減少群で有意を持って上昇していたが(Figure 6c), AIPC は経過中に有意差を認めなかった(Figure 6b). IL-6 と TNF- α は Day 1 から血小板非減少群と比較して、血小板減少群で、有意をもって上昇しており、Day 3 まで同様に高値であった(Figure 6d, Figure 6e). TPO は 2 群間で、Day 1, Day 2 において差を認めず、Day 3 となり初めて、血小板減少群で有意に上昇していた(Figure 6f).

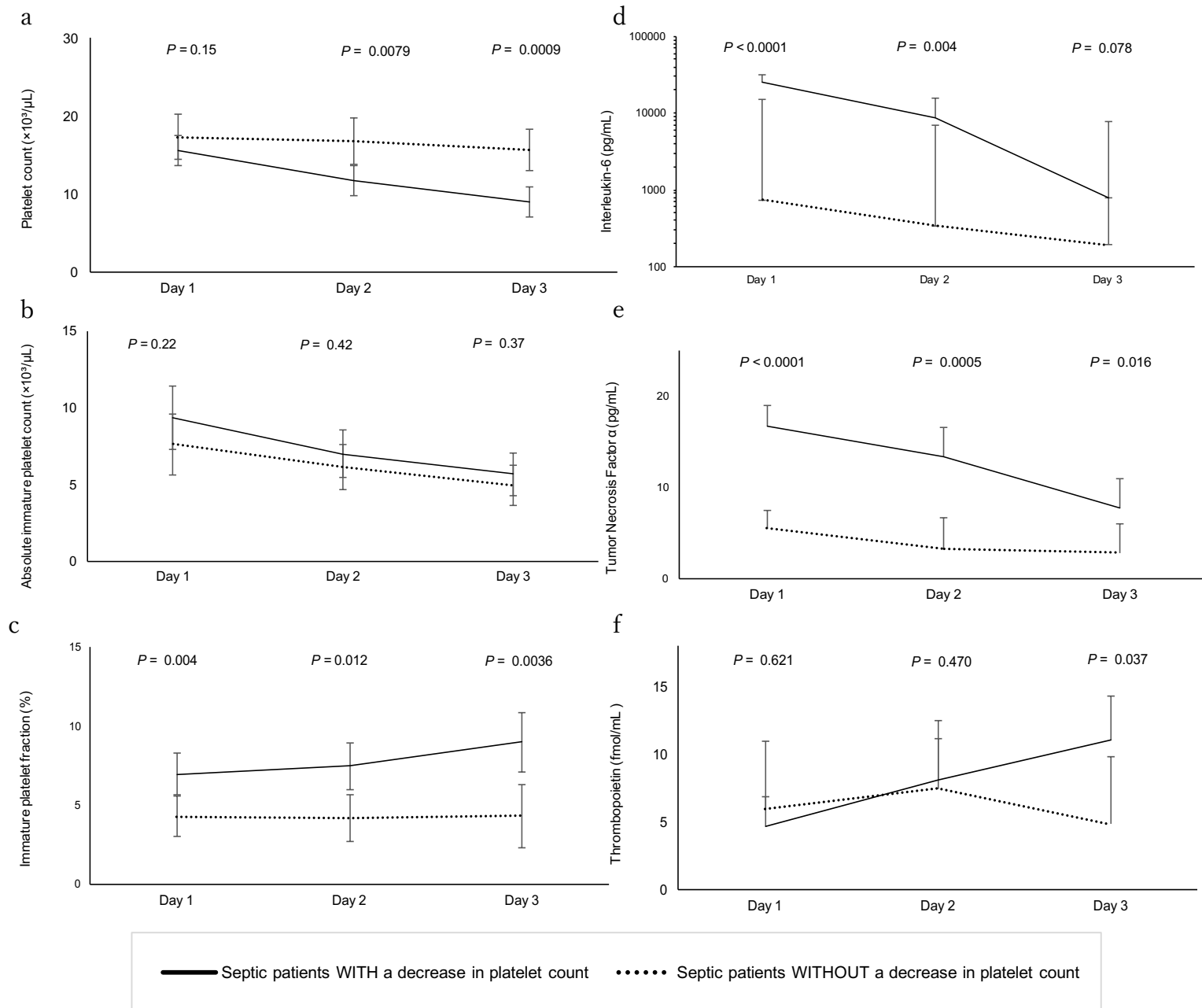


Figure 6. Changes in hemostatic biomarkers over days 1 to 3 of intensive care unit admission. (a) platelet count, (b) immature platelet fraction, (c) absolute immature platelet count, (d) interleukin-6, (e) tumor necrosis factor α , and (f) thrombopoietin in patients with and without a subsequent decrease in platelet count. Data are expressed as mean with 95% confidence intervals.

3b.4. ICU 入室時の敗血症患者における IPF, IL-6, TNF- α , TPO と 28 日死亡率の関係

敗血症患者において、ICU 入室時の IPF および炎症性サイトカインと 28 日死亡率の関係を調べるために生存群と非生存群と 2 群に分けて、ICU 入室時の IPF と IL-6, TNF- α , TPO を検討した。いずれのサイトカインも生存群、非生存群で有意差を認めず、IPF のみが非生存群で有意に上昇していた (Table 6)。

Table 6: Cytokines and IPF at baseline (day 1) between survivors and nonsurvivors

	Nonsurvivors (n = 5)	Survivors (n = 39)	<i>P</i> -value*
Tumor Necrosis Factor α (pg/mL)	8.0 (4.4-20.2)	8.9 (4.2-15.9)	0.87
Thrombopoietin (fmol/mL)	8.0 (4.0-10.2)	3.9 (2.7-5.5)	0.073
Interleukin-6 (pg/mL)	1410.0 (160.4-16400.0)	657 (250.0-3350.0)	0.95
Immature platelet fraction (%)	8.1 (6.4-10.0)	4.1 (3.4-6.5)	0.021

Data are expressed as median (interquartile range).

*Comparison of survivors and nonsurvivors

4. 考察

本研究により, IPF の上昇は, 敗血症における凝固障害を伴う血小板減少を予測することを明らかにした. また, 血小板減少群で血小板非減少群と比較して, IPF はさらに上昇し, 血小板産生を反映する AIPC に差が無かった. これらの結果から, 敗血症早期におけるさらなる IPF の上昇は, 血小板産生の亢進ではなく, 血小板消費の亢進を反映していることが示唆された. また, IPF は血小板減少に先行して上昇を示すことから, 敗血症性凝固障害の早期予測マーカーとなり得る可能性が示唆された. さらに, IPF の上昇は 28 日死亡率の独立した予測因子であり, APACHE II スコアと同等の予測率を示した. また, 敗血症に伴う血小板減少早期において, TPO, IL-6, TNF- α は上昇を示し, 血小板の産生は低下していないことを明らかにした.

IPF および AIPC は血小板減少性疾患の診断において, 有用性が報告されている. Barsam らは, 特発性血小板減少性紫斑病患者において, 末梢における血小板の破壊を反映し IPF が上昇し, さらに, AIPC は血小板産生を反映し, 治療効果判定に有用であることを報告した³¹. また, Bat らは, AIPC は血小板輸血に影響されず, 血小板産生を反映するマーカーであることを報告した³².

本研究において, IPF の上昇は, その後の敗血症性凝固障害を伴う血小板減少と関連し (研究①), さらに, 血小板減少早期には, 血小板産生が低下していないことを示した (研究①,②). この結果から, 敗血症性凝固障害に伴う血小板減少は, 血小板産生抑制ではなく, 血小板の消費亢進の結果であることを明らかにした. 敗血症における血小板減少の主な原因が凝固障害に伴う血小板の消費

であるとする定説を支持する結果であった [7,14-19,39](#).

さらに、敗血症早期における IPF の上昇は、ICU 入室時点における血小板数に差が無いことから、それまでの血小板消費亢進および血小板減少傾向を反映しており、その後の血小板減少を予測すると考えられる。

また、ICU 入室時において、血小板非減少群では、TPO、IL-6、TNF- α の上昇を伴い、対照群と比較して、AIPC が上昇を示した（研究①,②）。De Blasi らは、IPF は、敗血症が臨床的に明らかとなる前に上昇し、その後の敗血症発症を予測し、プロカルシトニンや CRP、白血球は予測し得なかったと報告した [33](#)。Di mario らは、IPF の上昇が細菌感染や敗血症の重症度を予測すると報告した [34,35](#)。また、TPO は血小板産生において、もっとも主要な制御因子であり [40](#)、感染早期においては、活性化した単球から TNF- α 、IL-6 が放出され、TPO の産生が亢進する機序が報告されている [12,41,42](#)。本研究で示した、血小板非減少群における ICU 入室時の IPF および AIPC の上昇は、感染による炎症を背景とした血小板産生亢進を反映している可能性が推定される。

つぎに、IPF の上昇が 28 日死亡率を予測することを明らかにした（研究①）。これは、IPF が敗血症性凝固障害に伴う血小板減少を反映し、生命予後と関連している可能性が考えられる。敗血症において、血小板減少は臓器障害の一つの指標であり、血小板数の低下および低下率が死亡率の上昇と強く関連すると報告されている [20-23](#)。さらに、血小板減少は重症凝固障害である DIC においても重症度を反映する指標とされ、敗血症において、DIC の合併は、臓器障害および死亡率と関連する [24,25](#)。DIC は、凝固の亢進に加え、凝固抑制の低下および線溶抑制が伴い、微小血管内の過剰なトロンビン生成およびフィブリン沈着による

広範な血栓症をもたらし、臓器障害に至るとされる [17,24,25,43-45](#). DIC の発症や重症度を早期に認知し、治療介入できれば、敗血症患者の予後改善が期待できる可能性が示唆される.

しかし、敗血症性凝固障害に対する既存の早期診断基準は、いずれの診断基準も臓器障害の一つの指標である血小板数を診断項目に用いており、さらに、その低下率が診断項目に含まれるため確定診断に数日を要し [24,27](#), 敗血症性凝固障害の早期診断において限界がある. 本研究において、IPF は血小板減少に先行して上昇することを明らかにしており (研究①), ICU 入室時に IPF を単回測定することで、DIC の重症度を反映する血小板減少に対する早期診断ならびに早期治療が可能となり、救命率の改善の可能性がある.

また、2016 年 2 月に敗血症の定義が大きく改訂され、Sepsis-3 が報告された. 敗血症は、“感染症に対する制御不能な宿主反応に起因した生命を脅かす臓器障害”と定義され [46](#), 集中治療室においては、臓器障害度を示す SOFA スコアが用いられ、より臓器障害に主眼が置かれるようになった. SOFA スコアは、各臓器障害の指標を各々 4 段階に評価する. Sepsis-3 において、臓器障害とは“感染症によって SOFA スコアが 2 点以上増加した状態”と定義され [46](#), SOFA スコアと院内死亡率は有意な相関があり、スコアが上昇する毎に死亡率が上昇し、SOFA スコア 2 点以上は院内死亡率 10%に相当する [47](#). しかし、すでに進行した臓器障害の合併を敗血症の必須条件とした Sepsis-3 による診断は初期には臓器障害を伴わない重症感染症に対して診断および治療が遅れるリスクを包含しており、ますます、精度の高い各臓器障害に対する早期診断、および重症度、予後の評価方法が求められている. 本研究においては、血小板減少を血小板数の 30%以上

の減少および $80 \times 10^3/\mu\text{L}$ 未満と定義しているが、これは、SOFA スコアの血小板の項目における 2 点以上の上昇および 2 点に相当しており、IPF は、新定義における敗血症早期診断においても有用である可能性が示唆される。

本研究では、28 日死亡率において、IPF は APACHE II と同等の予測率を示し、さらに、APACHE II と IPF を併せて評価することで、既存の重症度スコア以上の予測率を示すことを明らかにした（研究①）。敗血症に伴う血小板減少に対する治療に関して、質の高いエビデンスは示されていないが、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⁴⁸では、生存率の改善を認めなかったが、DIC 合併群を対象としたサブグループ解析⁴⁹や重症例を対象としたサブグループ解析⁵⁰では、有効性が示されている。さらに、遺伝子組み換えトロンボモジュリン製剤は多国籍間で行われた第 II 相試験⁵¹において、凝固障害の強い症例における有効性が示唆され、その結果から、凝固障害の強い症例を対象に、多国籍間第 III 相試験が進行中である。いずれの治療も、重症度の高い症例に対する有効性が示唆されており、重症度に応じた治療戦略が必要であると考えられる。IPF の測定が、リスクの層別化に寄与し、治療選択の一助となる可能性が示唆される。また、さらに IPF によるリスクの層別化が、治療薬の有用性を示す研究の一助となる可能性があり、今後の研究課題である。

ICU 入室後 3 日間において、いずれの群も IL-6, TNF- α , TPO, AIPC は上昇を示した。さらに、血小板減少群においても、AIPC に差を認めず、血小板産生の低下がないことを明らかにした（研究②）。これは、敗血症早期におけるさらなる IPF の上昇は、血小板産生の亢進ではなく、血小板消費の亢進を反映すると

した仮説を支持する結果である。また、血小板減少群においては、TPO は、IL-6 および TNF- α に遅れて上昇することを示した。感染を初めとする侵襲下において、IL-6 および TNF- α は、極めて早期に上昇するマーカーとして知られ⁵²、敗血症においては、TPO を介して、血小板産生亢進に寄与することが報告されている^{12,41,42}。Kaser らは、マウスにおいて、IL-6 による TPO 産生の時間的推移を報告し、IL-6 投与から 3 日目に TPO が有意に上昇し、そのピークは 9 日目であったことを報告した⁵³。本研究において、いずれの群も、IL-6 および TNF- α は ICU 入室時から漸減傾向を示しており、本来のピークは ICU 入室以前であった可能性や TPO のピークはさらに数日後である可能性が考えられ、IL-6 および TNF- α と TPO のピークの違いを観察していることが示唆されるが、さらに検討が必要である。

また、TPO は血小板減少群では、血小板非減少群と比較して、Day 3 に有意な上昇を示したが、観察された 3 日間においては、2 群間で血小板産生に差を認めなかった（研究②）。Cerutti らは、整形外科術後の TPO と血小板の推移について報告しており、TPO は術後 3 日目にピークを示し、血小板数は術後 14 日目にピークを示したことを報告し、TPO 濃度と血小板数のピークには、時間差があることを報告した⁵⁴。また、TPO は、肝臓において恒常的に産生され、血小板・巨核球上の Mpl receptor に吸着されることによって、血中 TPO 濃度が制御されるスポンジ理論が提唱され、血小板が減少すると、Mpl に吸着する TPO が減少し、血中 TPO が増加し、血小板産生を亢進するメカニズムが想定されており⁵⁵、本研究においても、血小板の減少に従い、TPO が上昇している傾向が観察された。

また、研究②において、非生存群において、生存群と比較して、IPF は有意な上昇を示し、研究①を支持する結果であった。IL-6 および TNF- α は有意な上昇を示さなかった。IL-6 および TNF- α は、敗血症において、重症度および死亡率と関連するサイトカインであると報告されているが⁵⁶、一方で、手術侵襲や術式⁵⁷、外傷^{58 59} など、さまざまな生体侵襲によって上昇することが報告されている。本研究で対象となった腹腔内感染症患者および軟部組織感染症患者の多くが開腹手術を含めたドレナージ術が行われており、IL-6 および TNF- α の上昇は、敗血症の重症度だけではなく、さまざまな生体侵襲を反映している可能性がある。本研究においては、手術症例を除いた検討は、症例数が少ないため、困難であり、さらなる症例の集積が必要である。

本研究は、単施設における観察研究であり、症例数、観察期間に限界があるが、IPF および AIPC を用いて敗血症における血小板消費亢進ならびに血小板産生を評価した最初の研究であり、敗血症早期において、IPF は血小板消費亢進を反映して上昇し、凝固障害に伴う血小板減少の予測因子として有用であることを明らかにした。IPF を指標とすることで、血小板減少が明らかとなる前に、敗血症に至る可能性のある重症感染症患者を早期にとらえて治療を開始することで、救命率の改善の可能性が見込まれる。IPF は敗血症性凝固障害に伴う血小板減少の早期診断において、新しい診断ツールの一つとなる可能性が示唆され、生命予後を反映する有用なマーカーであることが示唆された。

5. 結語

敗血症早期において IPF は、血小板消費亢進を反映して上昇し、凝固障害に伴う血小板減少と 28 日死亡率の予測因子として有用である。

また、敗血症早期において、TPO は上昇しており、血小板減少の原因として、明らかな血小板産生の低下は認めなかった。

6. 謝辞

本研究の機会を下さった救急医学の鈴木正之教授，集中治療医学の布宮伸教授に感謝の意を表します．本研究を進めるにあたり小山寛介先生に多大なるご指導およびご助言を賜りました．深く感謝の意を表します．また，集中治療部，救急医学のスタッフの皆様には，本研究に際し多大なるご支援を頂き，感謝しております．最後に，臨床および研究生活を支えてくれた家族に心より感謝の意を表し，謝辞と致します．

7. 参考文献

1. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RMH, Sibbald WJ. Definitions for Sepsis and Organ Failure and Guidelines for the Use of Innovative Therapies in Sepsis. *Chest*. 101(6):1644-1655. 1992.
2. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med*. 29(7):1303-1310. 2001.
3. 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*. 35(5):1244-1250. 2007.
4. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med*. 348(16):1546-1554. 2003.
5. Fleischmann C, Scherag A, Adhikari NK, Hartog CS, Tsaganos T, Schlattmann P, Angus DC, Reinhart K, International Forum of Acute Care T. Assessment of Global Incidence and Mortality of Hospital-treated Sepsis. Current Estimates and Limitations. *Am J Respir Crit Care Med*. 193(3):259-272. 2016.
6. Engelmann B, Massberg S. Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 13(1):34-45. 2013.
7. 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*. 18(1):R13. 2014.
8. van der Poll T, Herwald H. The coagulation system and its function in early immune defense. *Thromb Haemost*. 112(4):640-648. 2014.
9. Oppenheim JJ, Yang D. Alarmins: chemotactic activators of immune responses. *Curr Opin Immunol*. 17(4):359-365. 2005.

10. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 303(5663):1532-1535. 2004.
11. Levi M, van der Poll T. Inflammation and coagulation. *Crit Care Med*. 38(2 Suppl):S26-34. 2010.
12. Kaushansky K. The molecular mechanisms that control thrombopoiesis. *J Clin Invest*. 115(12):3339-3347. 2005.
13. Kaushansky K. Thrombopoietin. *N Engl J Med*. 339(11):746-754. 1998.
14. Katz JN, Kolappa KP, Becker RC. Beyond thrombosis: the versatile platelet in critical illness. *Chest*. 139(3):658-668. 2011.
15. Levi M, Schultz M. Coagulopathy and platelet disorders in critically ill patients. *Minerva Anestesiol*. 76(10):851-859. 2010.
16. Li Z, Yang F, Dunn S, Gross AK, Smyth SS. Platelets as immune mediators: their role in host defense responses and sepsis. *Thromb Res*. 127(3):184-188. 2011.
17. Taylor FB, Jr., Toh CH, Hoots WK, Wada H, Levi M, Scientific Subcommittee on Disseminated Intravascular Coagulation of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. Towards definition, clinical and laboratory criteria, and a scoring system for disseminated intravascular coagulation. *Thromb Haemost*. 86(5):1327-1330. 2001.
18. Liaw PC, Ito T, Iba T, Thachil J, Zeerleder S. DAMP and DIC: The role of extracellular DNA and DNA-binding proteins in the pathogenesis of DIC. *Blood Rev*. 30(4):257-261. 2016.
19. Meng W, Paunel-Gorgulu A, Flohe S, Hoffmann A, Witte I, MacKenzie C, Baldus SE, Windolf J, Logters TT. Depletion of neutrophil extracellular traps in vivo results in hypersusceptibility to polymicrobial sepsis in mice. *Crit Care*. 16(4):R137. 2012.
20. Akca S, Haji-Michael P, de Mendonca A, Suter P, Levi M, Vincent JL. Time course of platelet counts in critically ill patients. *Crit Care Med*. 30(4):753-756. 2002.
21. Baughman RP, Lower EE, Flessa HC, Tollerud DJ. Thrombocytopenia in the intensive care unit. *Chest*. 104(4):1243-1247. 1993.

22. Stephan F, Hollande J, Richard O, Cheffi A, Maier-Redelsperger M, Flahault A. Thrombocytopenia in a surgical ICU. *Chest*. 115(5):1363-1370. 1999.
23. Vanderschueren S, De Weerd A, Malbrain M, Vankersschaever D, Frans E, Wilmer A, Bobbaers H. Thrombocytopenia and prognosis in intensive care. *Crit Care Med*. 28(6):1871-1876. 2000.
24. Ten Cate H. Trombocytopenia: one of the markers of disseminated intravascular coagulation. *Pathophysiol Haemost Thromb*. 33(5-6):413-416. 2003.
25. Zeerleder S, Hack CE, Willemin WA. Disseminated intravascular coagulation in sepsis. *Chest*. 128(4):2864-2875. 2005.
26. 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*. 34(3):625-631. 2006.
27. 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)*. 10(1):7. 2013.
28. Briggs C, Kunka S, Hart D, Oguni S, Machin SJ. Assessment of an immature platelet fraction (IPF) in peripheral thrombocytopenia. *Br J Haematol*. 126(1):93-99. 2004.
29. Abe Y, Wada H, Tomatsu H, Sakaguchi A, Nishioka J, Yabu Y, Onishi K, Nakatani K, Morishita Y, Oguni S, Nobori T. A simple technique to determine thrombopoiesis level using immature platelet fraction (IPF). *Thromb Res*. 118(4):463-469. 2006.
30. 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*. 84(2):183-184. 2010.
31. 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*. 117(21):5723-5732. 2011.
 32. 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*. 53(6):1201-1204. 2013.
 33. De Blasi RA, Cardelli P, Costante A, Sandri M, Mercieri M, Arcioni R. Immature platelet fraction in predicting sepsis in critically ill patients. *Intensive Care Med*. 39(4):636-643. 2013.
 34. Enz Hubert RM, Rodrigues MV, Andreguetto BD, Santos TM, de Fátima Pereira Gilberti M, de Castro V, Annichino-Bizzacchi JM, Dragosavac D, Carvalho-Filho MA, De Paula EV. Association of the immature platelet fraction with sepsis diagnosis and severity. *Sci Rep*. 5:8019. 2015.
 35. Di Mario A, Garzia M, Leone F, Arcangeli A, Pagano L, Zini G. Immature platelet fraction (IPF) in hospitalized patients with neutrophilia and suspected bacterial infection. *J Infect*. 59(3):201-206. 2009.
 36. 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*. 29(4):530-538. 2003.
 37. 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.* 41(2):580-637. 2013.
38. Briggs C, Longair I, Kumar P, Singh D, Machin SJ. Performance evaluation of the Sysmex haematology XN modular system. *J Clin Pathol.* 65(11):1024-1030. 2012.
 39. 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.* 28(5):556-563. 2013.
 40. Grozovsky R, Giannini S, Falet H, Hoffmeister KM. Regulating billions of blood platelets: glycans and beyond. *Blood.* 126(16):1877-1884. 2015.
 41. Ishiguro A, Suzuki Y, Mito M, Shimbo T, Matsubara K, Kato T, Miyazaki H. Elevation of serum thrombopoietin precedes thrombocytosis in acute infections. *Br J Haematol.* 116(3):612-618. 2002.
 42. Gainsford T, Nandurkar H, Metcalf D, Robb L, Begley CG, Alexander WS. The residual megakaryocyte and platelet production in c-mpl-deficient mice is not dependent on the actions of interleukin-6, interleukin-11, or leukemia inhibitory factor. *Blood.* 95(2):528-534. 2000.
 43. Dhainaut J-F, 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*. *Critical Care Medicine.* 33(2):341-348. 2005.
 44. Amaral A, Opal SM, Vincent JL. Coagulation in sepsis. *Intensive Care Med.* 30(6):1032-1040. 2004.
 45. Abraham E, Singer M. Mechanisms of sepsis-induced organ dysfunction. *Crit Care Med.* 35(10):2408-2416. 2007.
 46. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, Bellomo R, Bernard GR, Chiche JD, Coopersmith CM, Hotchkiss RS, Levy MM, Marshall JC, Martin GS, Opal SM, Rubenfeld GD, van der Poll T, Vincent JL, Angus DC. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA.* 315(8):801-810. 2016.

47. Ferreira FL, Bota DP, Bross A, Melot C, Vincent JL. Serial evaluation of the SOFA score to predict outcome in critically ill patients. *JAMA*. 286(14):1754-1758. 2001.
48. 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*. 286(15):1869-1878. 2001.
49. 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*. 4(1):90-97. 2006.
50. Wiedermann CJ, Hoffmann JN, Juers M, Ostermann H, Kienast J, Briegel J, Strauss R, Keinecke HO, Warren BL, Opal SM, KyberSept I. High-dose antithrombin III in the treatment of severe sepsis in patients with a high risk of death: efficacy and safety. *Crit Care Med*. 34(2):285-292. 2006.
51. Vincent JL, Ramesh MK, Ernest D, LaRosa SP, Pacht J, Aikawa N, Hoste E, Levy H, Hirman J, Levi M, Daga M, Kutsogiannis DJ, Crowther M, Bernard GR, Devriendt J, Puigserver JV, Blanzaco DU, Esmon CT, Parrillo JE, Guzzi L, Henderson SJ, Pothirat C, Mehta P, Fareed J, Talwar D, Tsuruta K, Gorelick KJ, Osawa Y, Kaul I. A randomized, double-blind, placebo-controlled, Phase 2b study to evaluate the safety and efficacy of recombinant human soluble thrombomodulin, ART-123, in patients with sepsis and suspected disseminated intravascular coagulation. *Crit Care Med*. 41(9):2069-2079. 2013.
52. Pfafflin A, Schleicher E. Inflammation markers in point-of-care testing (POCT). *Anal Bioanal Chem*. 393(5):1473-1480. 2009.
53. Kaser A, Brandacher G, Steurer W, Kaser S, Offner FA, Zoller H, Theurl I, Widder W, Molnar C, Ludwiczek O, Atkins MB, Mier JW, Tilg H. Interleukin-6 stimulates thrombopoiesis through thrombopoietin: role in inflammatory thrombocytosis. *Blood*. 98(9):2720-2725. 2001.

54. Cerutti A, Custodi P, Mduranti, Cazzola M, Balduini CL. Circulating thrombopoietin in reactive conditions behaves like an acute phase reactant. *Clin Lab Haematol.* 21(4):271-275. 1999.
55. Italiano JE, Jr., Lecine P, Shivdasani RA, Hartwig JH. Blood platelets are assembled principally at the ends of proplatelet processes produced by differentiated megakaryocytes. *J Cell Biol.* 147(6):1299-1312. 1999.
56. Oda S, Hirasawa H, Shiga H, Nakanishi K, Matsuda K, Nakamua M. Sequential measurement of IL-6 blood levels in patients with systemic inflammatory response syndrome (SIRS)/sepsis. *Cytokine.* 29(4):169-175. 2005.
57. Maruszynski M, Pojda Z. Interleukin 6 (IL-6) levels in the monitoring of surgical trauma. A comparison of serum IL-6 concentrations in patients treated by cholecystectomy via laparotomy or laparoscopy. *Surg Endosc.* 9(8):882-885. 1995.
58. Pellegrin K, Peterson VM, Vadgama J, Wu Y, Fleming AW. TNF-alpha in trauma patients: a touch is just enough. *Curr Surg.* 57(6):638. 2000.
59. Ozturk H, Yagmur Y, Ozturk H. The prognostic importance of serum IL-1beta, IL-6, IL-8 and TNF-alpha levels compared to trauma scoring systems for early mortality in children with blunt trauma. *Pediatr Surg Int.* 24(2):235-239. 2008.