

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5048838号
(P5048838)

(45) 発行日 平成24年10月17日(2012.10.17)

(24) 登録日 平成24年7月27日(2012.7.27)

(51) Int.Cl. F I
GO 1 N 33/53 (2006.01) GO 1 N 33/53 D

請求項の数 7 (全 13 頁)

(21) 出願番号	特願2010-523316 (P2010-523316)	(73) 特許権者	503148096 ユニヴェルズイテート・ツューリヒ
(86) (22) 出願日	平成20年9月2日(2008.9.2)		スイス国ツェーハー-8006 ツューリヒ, レミシュトラーセ 71
(65) 公表番号	特表2010-538282 (P2010-538282A)	(74) 代理人	100068755 弁理士 恩田 博宣
(43) 公表日	平成22年12月9日(2010.12.9)		
(86) 国際出願番号	PCT/EP2008/007158	(74) 代理人	100105957 弁理士 恩田 誠
(87) 国際公開番号	W02009/030456		
(87) 国際公開日	平成21年3月12日(2009.3.12)	(74) 代理人	100142907 弁理士 本田 淳
審査請求日	平成23年8月31日(2011.8.31)	(72) 発明者	グラーフ、ロルフ スイス国 CH-8051 チューリッヒ プロプシュタイシュトラーセ 148
(31) 優先権主張番号	07017539.3		
(32) 優先日	平成19年9月7日(2007.9.7)		
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒト敗血症を測定する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

腓石タンパク質 / 再生タンパク質 (PSP / reg) を全身性感染症のマーカーとして使用する方法であって、PSP / reg の濃度を体液試料中で測定し、高濃度であることを敗血症の発症の指標とする方法。

【請求項 2】

PSP / reg 濃度を血清中で測定する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

外傷後敗血症の発症の指標となる前記高濃度が 60 ng / mL である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

敗血症の発症の指標となる前記高濃度が、外傷から 3 日目、4 日目または 5 日目において 80 ng / mL である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 5】

E L I S A、R I A、E I A、質量分析またはマイクロアレイ分析により PSP / reg の濃度を測定する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

サンドイッチ E L I S A により PSP / reg の濃度を測定し、マイクロタイタープレートを PSP / reg に対する一種類の抗体で被覆した後、該プレートをブロックし、試料または標準を入れ、PSP / reg に対する第 2 の種類の抗体を与えた後、適当な標識と

結合した特定の種類の第2の抗体を検出する第3の抗体を加え、前記標識はPSP/regの量を定量するのに用いられる、請求項1に記載の方法。

【請求項7】

前記サンドイッチELISAにおける標識は発色検出用の酵素である、請求項6に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、体液中の腓石タンパク質/再生タンパク質(PSP/reg)の濃度に基づいてヒトにおける全身性感染症の予測および/または診断、特に敗血症の発症の予測のための方法、および測定キットに関する。

10

【背景技術】

【0002】

発明の背景

重症外傷に対する全身性の応答には、先天性免疫、炎症反応および細胞活動に影響する多くのパラメータが含まれる。重症外傷患者には、感染症のない良性的結果を示す者もいれば、感染症または敗血症に苦しむ者もいる。敗血症は複数の臓器不全を伴い、死亡率が高い。敗血症の診断のために最も広く用いられているマーカーとしては、白血球数、C反応性タンパク質およびプロカルシトニンがある。後の2つは、外傷後に多く誘導されるが、機能はまだ知られていないタンパク質である。また、IL-6、IL-8およびIL-18などのサイトカインも患者の観察に利用されている。しかしながら、上記のマーカーのいずれも、敗血症を含む感染症について予測する指標としては働かず、治療は敗血症が発症してからと遅れる。

20

【0003】

動物パイロット実験において、腓臓組織の損傷がない場合であっても、取り扱いのストレスで腓タンパク質が誘導されることがわかっている(非特許文献1)。このタンパク質、腓石タンパク質/再生タンパク質(PSP/reg)は、レクチン結合タンパク質のファミリーに属する。急性または慢性の腓炎の状態において、このタンパク質は高度にアップレギュレートされて血清中に現れることもある。このタンパク質の調節は他の酵素前駆体のように単に食誘導性分泌には限定されないため、他の状態、たとえば腓炎の間に上昇が見られることもある。したがって、現在までこのタンパク質の研究は主に腓臓内について行われてきた。このタンパク質は小腸のパネート(PANETH)細胞および胃底細胞中でも合成されている。PSP/regの機能については、いまだに論争が盛んに行われているが、一般には再生過程における細胞増殖の促進に関与していると見られている(非特許文献2)。

30

【0004】

PSP/regを疾病マーカーとして確立するための努力が行われてきている。血清濃度は様々な胃腸疾患において上昇するために、血清値と特定の疾病の存在との相関性を確立することはこれまでのところできていない(非特許文献3)。

40

【0005】

発明の概要

本発明は、ヒトにおける全身性感染症の予測および/または診断、特に敗血症の発症の予測のための方法に関し、腓石タンパク質/再生タンパク質(PSP/reg)の濃度を体液試料中で測定し、高濃度であることを敗血症の発症についての当該疾患の初期における指標とする。また、本発明は、体液中のPSP/reg濃度を測定する方法、およびそのような方法のための部品からなるキットに関する。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0006】

50

【非特許文献1】アール グラフ (R. Graf) ら、J SurgRes、2002年、195巻、136～144頁

【非特許文献2】ワイ キノシタ (Y. Kinoshita) ら、J. Gastroenterol、2004年、39巻、507～513頁

【非特許文献3】ワイ サトムラ (Y. Satomura) ら、J Gastroenterol、1995年、30巻、643～650頁

【図面の簡単な説明】

【0007】

【図1】重症外傷を負った患者の入院後の血清中のC反応性タンパク質 (CRP) 値の測定。次のように遡及的 (retrospectively) に患者を分類した。感染症なし (白抜きボックス、 $n = 14$)、感染症を伴った患者 (斜線ボックス、 $n = 22$)、敗血症を伴った患者 (黒ボックス、 $n = 27$)。3つの群のCRP値 ($\log_{10} \text{ng/mL}$) を平均および95%信頼区間とともにボックスプロットとしてプロットしている。d = 外傷後の日数。統計分析は、多変量解析を用いて行った。p = 有意性、* = 非感染に対する敗血症のp値。

10

【図2】重症外傷を負った患者の入院後の血清中のIL-6値の測定。患者の分類と、ボックスプロットにおけるIL-6値 ($\log_{10} \text{pg/mL}$) の表示は、図1のCRP値についてと同様である。

【図3】重症外傷を負った患者の入院後の血清中のプロカルシトニン (PCT) 値の測定。患者の分類と、ボックスプロットにおけるPCT値 ($\log_{10} \text{ng/mL}$) の表示は、図1のCRP値についてと同様である。

20

【図4】腓石タンパク質 / 再生タンパク質 (PSP) の測定。0日における外傷後のPSP / regの時間的プロファイル。すべての値は各時点で合わせたものである。C (= 対照) は、健全な被験者についての値を示し、dは外傷後の日数である。

【図5A】重症外傷を負った患者の入院後の血清中のPSP / reg値の測定。患者の分類と、白抜きボックス、斜線ボックスおよび黒ボックスの意味は、図1のCRP値についてと同様である。3つの群のPSP / reg値 (ng/mL) を平均 \pm SEMとしてプロットしている。d = 外傷後の日数。

【図5B】重症外傷を負った患者の入院後の血清中のPSP / reg値の測定。患者の分類と、ボックスプロットにおけるPSP / reg値 (ng/mL) の表示は、図1のCRP値についてと同様である。p = 有意性、* = 非感染に対する敗血症のp値。

30

【発明を実施するための形態】

【0008】

発明の詳細な説明

本発明は、ヒトにおける全身性感染症の予測および / または診断、特に敗血症の発症の予測のための方法に関し、腓石タンパク質 / 再生タンパク質 (PSP / reg) の濃度を体液試料、たとえば血清中で測定し、高濃度であることを敗血症の発症についての当該患者の初期における指標とする。

【0009】

PSP / reg濃度を測定するのに有用な血清以外の体液は、たとえば、全血、尿、唾液、脳脊髄液、涙液、汗、乳、または固体組織または糞便からの抽出物である。ついでに指標となるPSP / reg濃度は、測定のために選ばれた体液に依存する。血清に関して、この濃度は3日目、4日目または5日目において60～80 ng/mL である。したがって、より詳細には本発明は、敗血症の発症の予測および / または診断の方法に関し、腓石タンパク質 / 再生タンパク質 (PSP / reg) の濃度を血清中で測定し、3日目、4日目または5日目に60 ng/mL 以上の濃度、特に80 ng/mL 以上の濃度であることを敗血症の発症の指標とする。

40

【0010】

体液中のPSP / regの濃度を測定するためには任意の既知の方法を用いることができる。考えられる方法としては、たとえば、ELISA、RIA、EIA、質量分析、ま

50

たはマイクロアレイ分析がある。こうした方法は、たとえば敗血症などの全身性感染症の診断に用いられる場合、本発明のさらなる目的である。

【0011】

ヒト体液、たとえば血清中のPSP/regの測定のための好ましい方法は、ELISAである。本発明の一実施形態において、PSP/reg ELISAは、サンドイッチアレイからなる。従来のマイクロタイタープレートをPSP/regに対する一種類の抗体（「第1」の抗体）、たとえばモルモットポリクローナル抗体で被覆する。その後、このプレートをブロックし（block）、試料または標準を入れる。インキュベーションの後、PSP/regに対する異なる種類の抗体（「第2」の抗体）、たとえばポリクローナルウサギ抗体を与える。その後、特定の種類の「第2」の抗体を検出する第3の抗体、たとえば、発色検出用の酵素などの適当な標識と結合した抗ウサギ抗体を加える。最後に、PSP/regの有無および量の尺度となる標識の検出および定量のために、このプレートを標識についての基質で展開（develop）する。標識が発色検出用の酵素の場合、基質は共役酵素の発色性基質である。そしてこの色反応をマイクロプレートリーダにおいて検出し、標準と比較する。

当な抗体のペア（「第1」および「第2」の抗体）は、モルモット、ラット、マウス、ウサギ、ヤギ、ニワトリ、ロバ、またはウマの組み合わせである。ポリクローナル抗体が好ましいが、モノクローナル抗体または抗体断片を用いることもできる。適当な標識は、発色標識、すなわち検出可能な着色または蛍光化合物に基質を変化させるのに用いる酵素、分光学的標識、たとえば蛍光標識または可視色を呈する標識、標識に特異的なさらなる化合物によって形成可能であって容易な検出および定量を可能にするアフィニティ標識、または標準的なELISAにおいて使用される他の標識である。

【0012】

PSP/reg検出の他の好ましい方法は、単一の抗体を用いた放射免疫測定または競合免疫測定、および市販の自動分析ロボットでの化学発光検出である。微粒子増強蛍光、蛍光偏光法、または質量分析を用いてもよい。検出装置、たとえばマイクロアレイは、PSP/regの読み取り装置として有用な部品である。

【0013】

本発明はさらに、全身性感染症の診断/予測用にPSP/regを測定するための部品からなるキットに関し、たとえば、装置と、試薬と、PSP/regの標準溶液とを含む。考えられる装置としては、たとえば、ELISA用マイクロタイタープレート、プレコートされたELISAプレート、およびプレートカバーが挙げられる。試薬は、PSP/regの検出のために特別に開発および設計された試薬である。PSP/regの標準溶液は、好ましくは、以下の説明に従って合成されるPSP/regを含む。部品からなるキットは、ピペットなどのさらなるハードウェア、バッファやブロッキング溶液などの溶液、フィルタ、カラーテーブル、および使用説明書を含んでもよい。

臓mRNAからクローニングし、酵母発現ベクターにサブクローニングすることができる。タンパク質はADHの制御下で発現させることができる。適当な発現培地は、PSP/regの分泌を誘導および維持するためにメタノールを含んでもよい。PSP/regは好ましくは、pHおよび塩勾配によりSP-セファロース-セルロースを用いて精製される。このような精製PSP/regは、体液中のPSP/reg濃度と比較するための標準溶液を調製するのに用いられる。このタンパク質に対するポリクローナル抗体は、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ニワトリ、ロバ、ウマおよびモルモットまたは他の適当な動物から標準的な方法を用いて得ることができる。

【0014】

敗血症の発症初期の段階において血清中のPSP/regが増加する理由は、完全には分かっていない。ラットのパイロット実験において、脾臓の損傷がない場合にPSP/reg合成の増加が観察され、他の臓器への有意な外傷性損傷がPSP/regの血中濃度の増加に繋がることが明白となった。さらなる研究のために、重症外傷を負っているが明らかな脾臓損傷の無いヒト患者の組を選んだ（実施例を参照）。血清中へのPSP/reg

10

20

30

40

50

g の出現は、腭液からのタンパク質を血液中へそらす経路変更を意味するものであろう。また、レクチン結合ファミリー（たとえば、腭炎関連タンパク質）の一部がサイトカインによって誘導可能であることも分かっている。外傷後にはサイトカインが強力にかつ協調して作用する。多くの異なるサイトカインが放出されるサイトカイン応答の複雑性は理解されていない。したがって、PSP/reg は、全身性のストレスまたは外傷の状況下で上昇するサイトカインに対して反応すると思われる。これに対し、たとえばアミラーゼやリパーゼなどの他の腭酵素はサイトカインによって調節されないうまく、それらの血液中への出現は迂回のみによるものである。血清中の PSP/reg 濃度は、敗血症の信頼できる指標であることがここで示されている。血中の PSP/reg の増加は、特異的なストレス応答を意味するのであろう。

10

【0015】

炎症の他の指標とは違って PSP/reg の濃度は、敗血症の臨床徴候が明白となる間または前に患者において高度に増加することが分かっている。血清 PSP/reg の検出および定量は、たとえば、100 pg/mL 未満の検出限界を有するサンドイッチ ELISA によって行われる。正常な血清値は 5 ~ 15 ng/mL である。重症外傷を負った患者は、その外傷の原因となった事故の 7 ~ 10 日後に敗血症を発症する。血清値は、敗血症の重症度と相関する。それは 200 ng/mL を超えることもある。PSP/reg 値は、敗血症の臨床徴候が得られる以前に 3 日目から 5 日目に増加し始め、60 ~ 80 ng/mL を超える値に達する。これらの値は、患者が敗血症を発症するかどうか、したがって高額な抗生物質による治療や集中治療室に滞在することを含む集中治療の必要性の予測を可能にする。市販の診断的測定と比べて、PSP/reg ELISA は、推定敗血症患者をモニタするのに著しく優れている。

20

【0016】

実施例

PSP/reg の単離とサブクローニング

PSP/reg に特異的な抗体の生産のための cDNA を得るべく、最先端の実験手法を用いて、腭臓 mRNA の逆転写によりそのような cDNA を調製する。PSP/reg をコードする配列に特異的なプライマーを用いて、PSP/reg の cDNA を選択的に増幅させる PCR 反応を行う。伸長プライマーを用いてこの PCR 反応を繰り返し、ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) トランスフェクションベクターへの挿入に特異的な配列を付加する。プライマーは、アルファ接合因子のシグナルペプチドのコーディング領域を、KEX2 部位および成熟ヒト PSP/reg のコーディング領域に融合させるように設計される。ピキア・パストリスベクターへのサブクローニングは 2 段階法である。まず、PCR 産物を pCR2.1 ベクター (インビトロジェン (Invitrogen)、TAK クローニング) にライゲーションし、配列を確認する。次に、この PCR 産物を XhoI/NotI の制限消化により切断し、トランスファーベクター pPIC9 (インビトロジェン) にライゲーションする。ピキア・パストリス KM71 株 (インビトロジェン) を形質転換し、組み換えタンパク質の拡張および生産のために最も生産的なクローンを選択する。

30

【0017】

PCR 増幅およびサブクローニングに用いたプライマー

ヒト PSP/reg/reg1 アルファ

順方向プライマー

5' GAAAAGACAAGAGGGCCAGACAGAGTT 3' (配列番号 1)5' GTA TCTCTCGAGAAAAGACAAGAGGGCCAG 3' (伸長)

(配列番号 2)

逆方向

5' CTAGTTTTTGAAC TTGCATAC 3' (配列番号 3)

ヒト PSP/reg/reg1 ベータ

順方向プライマー

5' GAAAAGACAAGGAGTCCAGACAGAGCTG 3' (配列番号 4)

40

50

5' GTATCTCTCGAGAAAAGACAGGAGTCCCAGAC 3' (伸長)
(配列番号5)

逆方向プライマー

5' ATCTG CAGTCTAGAAATTCTGCAGGACCAGTTCTAGAC
3' (配列番号6)

タンパク質の大量発現

単一のコロニーを用い、250 mLのバッフル付きフラスコ中の25 mLのBMG (緩衝化最小グリセロール、100 mMリン酸カリウム pH 6.0、1.34%酵母窒素塩基、 4×10^{-5} %ピオチン、1%グリセロール) に植え付け、29⁺の振盪培養器 (300 rpm) 中で一晩培養する。この培養液の10 mLを、3リットルバッフル付きフラスコ中の1リットルのBMGに接種し、29⁺にて一晩培養 (300 rpm) する。室温で5分間、1500 ~ 3000 x gの遠心分離により細胞を回収する。同じバッフル付きフラスコ中の1/5容積 (200 mL) のBMM (緩衝化最小メタノール、グリセロールが0.5%メタノールに置換されたBMG) に細胞を再懸濁することにより、発現を誘導する。誘導の最適時間に達するまでの24時間毎に100%メタノールを加え、0.5% (1 mL) の濃度を得る。室温で1500 ~ 3000 x gの遠心分離により細胞を回収する。培地の上清を回収し、ペプチドの精製まで冷凍しておく。

【0018】

ポリペプチドを培地の上清から精製する。培地の上清を蒸留水で1:3に希釈する。pHはHClを用いてpH 3.5に調整する。培地の上清をSP-セファロースカラムにアプライし、塩およびpH勾配 (10 mM LiCl、50 mM MES、pH 5.3開始バッファ、2 M LiCl、50 mM MES、pH 6.3終了バッファ) によって溶出する。画分を回収し、SDSゲル電気泳動によって分析する。最も高く純度も大きいタンパク質含量を有する画分を合わせ、10 mM HEPES、pH 7.5に対して透析する。ポリペプチドの配列をN末端配列決定法により確認し、アミノ酸分析によって濃度を判定する。

【0019】

PSP/reg ELISA

トータルのPSP/regの測定には、組み換えヒトPSP/regに対して産生されたモルモット抗血清および同じタンパク質に対するウサギ抗血清に基づいたサンドイッチELISAを用いてもよい。ウサギ抗体の特異性および感受性を高めるために、プロテインAビーズ (ハイトラップ (HiTrap) (登録商標)、ファルマシア (Pharmacia)) のカラム上への吸着によってIgGを精製する。ハイトラップ (登録商標) カラムは、pH 7の200 mM NaH₂PO₄ / Na₂HPO₄ によって平衡化する。同じバッファ溶液 (最終濃度20 mM) を用いてウサギ抗血清をpH調整してから、それをカラムに入れ、その後、100 mMおよび10 mMのTris/HCl pH 8で連続して洗浄する。IgG画分を0.1 Mのクエン酸 pH 3で溶出する。溶出画分は、1 MのTris/HCl pH 8.9ですぐに中和させる。

【0020】

TBS (100 μL/ウェル) に1:500で希釈したモルモット抗ラットPSP/reg IgG画分で、96ウェルのマイクロタイタープレート (コスター (Costar) EIAプレート、平底、高結合性) を一晩の間、4⁺で被覆する。洗浄工程の後、プレートを150 μLの1% BSA/TBSで1時間ブロックし、その後、異なる標準濃度の組み換えヒトPSP/reg (0、0.1、0.5、1.0、1.5、2.5、3.5または5.0 ng/mL) 100 μLまたは希釈した試料100 μLで置き換える。試料および標準を2サンプルずつ充填し、室温で1時間インキュベートする。繰り返し洗浄した後、1:500に希釈した100 μLのウサギ抗ラットPSP/reg IgGでプレートを1時間インキュベートする。もう一度洗浄してから、100 μLの市販のマウスモノクローナル抗ウサギIgG抗体による30分間のインキュベートを開始する (マウス抗ウサギアルカリホスファターゼ共役のIgG画分、1:1000希釈、シグマ (Sigma) より購入

10

20

30

40

50

)。次にプレートをもう一度洗浄し、アルカリホスファターゼバッファ(100 mM Tris / HCl、pH 9.5、100 mM NaCl、0.8 mM MgCl₂)に加えた可溶性ホスファターゼ基質、p-ニトロフェニルリン酸二ナトリウム(シグマ104(登録商標)錠剤)を加える。約20分間のインキュベーションの後、405 nmにおける光学密度(OD)をMRXマイクロプレートリーダー(ダイナテックラボラトリーズ(Dynatech Laboratories))において測定する。

【0021】

すべての希釈物(コーティング抗体以外)は1%のBSA/TBS中で調製する。室温でのすべてのインキュベーションは、回転式ELISAプレート振盪機(タイトラマックス(Titramax)100、ハイドルフ(Heidolph)、バイオブロックサイエンティフィック(Bioblock Scientific))上で行う。すべての洗浄工程は、自動マイクロタイタープレート洗浄機(MRW、ダイナテックラボラトリーズ)を用いてTBS/Tween 20(0.05%、v/v)によって行う。健全なボランティアに由来する希釈した血清への組み換えPSP/regの収率は以下の通りである。1:10の希釈では71%、1:20の希釈では18%、1:40の希釈では95%。プレート内およびプレート間での差異は、標準の範囲内の濃度(0.1~3.5 ng/mL)でそれぞれ5%未満および10%未満である。

10

【0022】

試験は、組み換えヒトPSP/reg1アルファを用いて行う。同じ技術を用いて、第2のアイソフォームである組み換えPSP/reg1ベータを作製した。PSP/reg1ベータは、ELISAによって同様によく認識される。したがって、ELISAは、既知のPSP/regファミリーのタンパク質に対して特異的である。

20

【0023】

原理を証明するための試験患者

調査する集団には、2002年1月から2003年9月の期間にチューリッヒ大学病院の外傷外科(レベルI外傷センター)に入院してきた63人の負傷患者が含まれる。包含する基準は、外傷重症度スコア(ISS)が16点を超えること、患者年齢が15歳を超えること、事故から入院までが4時間未満であること、集中治療室(ICU)での監視下で5日を超えて生存したこととした。臍臓の損傷を有する患者は除外した。外傷二次救命処置(ATLS)ガイドラインおよび標準外傷プロトコールに従ってすべての患者を治療した。簡単に説明すると、気道の確保、通気、および心血管機能のモニタリングの後、体腔の減圧、出血および汚染の管理を含む救命処置を行った。続いて、根治的創面切除、コンパートメントの減圧、および殆どは外固定(「初日手術」)による大きな骨折の一次安定化を行った。その後、臓器機能の回復のために患者をICUに移した。注目すべきは、正常な腸内細菌叢および腸粘膜を維持するために、すべての患者が外傷後24時間以内に経腸栄養摂取を受けたことである。陽性の細菌培養物によって感染病巣が確認された場合には、抗生物質を用いた。さらに、開放骨折に対しては、標準的な抗生物質を5日間与え、骨折の骨接合術に対する予防としてセファロスポリンを単発で与えた。

30

【0024】

表1は、入院日における人口学的データおよび外傷スコアをまとめたものである。外傷の重症度と性別分布は非常に類似していた。

40

【0025】

【表 1】

対象患者の人口学的データ

パラメータ	非感染	感染症	敗血症
数	14	22	27
年齢(歳)	38.6±16.9	36.6±15.5	37.3±16.0
男性	11(78.6%)	15(68.2%)	22(81.5%)
ISS ^a (点)	34.6±9.3	32.2±13.9	38.7±15.6
GCS ^b (点)	8.9±5.2	9.2±4.9	8.8±5.1
APACHE II ^c (点)	15.0±6.2	13.6±6.6	17.0±6.8
ICU ^d (日)	9.1±5.9	16.3±8.2	26.6±9.9

平均±標準偏差。括弧内の数値は百分率。

^aISS: 外傷重症度スコア^bGCS: グラスゴー昏睡スケール^cAPACHE II: 急性生理学および慢性健康評価II^dICU: 集中治療室

10

外傷患者の血液状態

20

a) 非感染、b) 感染症、および c) 敗血症のスコアに基づいて適切的に患者を3つの群に割り振る(表2)。炎症および外傷の程度を判定するために用いたいくつかのパラメータの経過を明らかにするために、血液白血球数およびC反応性タンパク質を測定した。重症度の群に関係なく、すべての患者が入院1日目に血液白血球の強い減少を示した。白血球は、10日目で $1.8 \times 10^6 / L$ という有意に高い白血球数に達する敗血症患者を除いては、徐々に正常にまで増加する。C反応性タンパク質(CRP)の同時測定によって、すべての群において、入院時の低い濃度から3日目の約 150 ng/mL にまで徐々に増加することがわかった(図1)。非感染群は他の群に比べて一貫して低い濃度を有するが、3つの患者群を区別する明白なパターンはない。このように5日目と7日目の間、および14日目と21日目の間で、敗血症の患者は敗血症でない患者と比べて高いCRPを示すが、その違いは2倍未満である。

30

【0026】

【表 2】

対象患者の外傷パターンおよび外傷後の経過

パラメータ	非感染 (n=14)	感染症 (n=22)	敗血症 (n=27)
頭部(AIS ^a 、点)	85.7%(3.4)	86.4%(3.7)	70.4%(4.1)
胸部(AIS ^a 、点)	78.6%(3.0)	36.4%(3.3)	63.0%(3.5)
腹部(AIS ^a 、点)	50.0%(3.7)	36.4%(3.8)	44.4%(4.1)
四肢(AIS ^a 、点)	57.1%(3.0)	68.2%(2.3)	63.0%(2.5)
骨盤(AIS ^a 、点)	21.4%(3.0)	22.7%(2.6)	18.5%(2.8)
脊椎(AIS ^a 、点)	42.9%(2.8)	36.4%(2.5)	25.9%(2.9)
SIRS ^b なし	2(14.3%)	—	—
SIRS ^{2b}	5(35.7%)	2(9.1%)	—
SIRS ^{3/4b}	7(50.0%)	20(90.9%)	—
敗血症	—	—	27(100%)
死亡率	2(14.3%)	2(9.1%)	5(18.5%)

^aAIS:簡易傷害スケール^bSIRS:全身性炎症反応症候群

外傷患者における炎症の標準指標の測定

一般的に用いられる炎症の指標、たとえばIL-6(図2)やプロカルシトニン(PCT、図3)が3つの重症度の群の間を区別することができるかどうかを調べるために、入院中の全期間にわたってこれらのタンパク質の血中濃度を測定した。IL-6は、外傷後すぐに増加して1日目に最高濃度に達した。最初の2日間は、敗血症群(1200pg/mL)および感染症群(600pg/mL)において非感染群よりも高く、3つの重症度の群で違いがみられた。5~10日目において差異があるが、データのばらつきが大きいため統計値は有意性を示さない。敗血症(350pg/mL)の期間中にわずかな増加が見られるが、これらの濃度は入院1日目と比べて低い。

【0027】

PCTは、敗血症の以前および最中の敗血症患者で20倍にまで明らかに増加したが、他の群では0.5~2ng/mL前後の濃度に留まっている(図3)。PCTの最大の増加は健常者の25倍であった。試料中の大きなばらつきのために統計値は有意差を示さない。

【0028】

PSP/regは外傷後にアップレギュレートされる

PSP/regは、大部分は脾臓および腸内で合成される。局所的な組織損傷にตอบสนองして、それは高度にアップレギュレートされる。脾臓組織の損傷がない場合には、PSP/regがアップレギュレートされることはないと予想される。しかしながら、PSP/regの発現および分泌に影響しうるサイトカインの放出が多発性外傷により起こる。したがって、脾臓の損傷はないが重症外傷を負っている患者においてこれらのタンパク質が増加しているかどうかを調べた。多発性外傷後のすべての患者のいずれのデータも、0日目ならびに健常者に比べて、1日目に増加を示し、それが3日目に有意となっている(図4)。

【0029】

このように、脾石タンパク質は、多発性外傷後にわずかに増加する。非感染の患者、感染症を伴った患者および敗血症を伴った患者に割り振った層別化を用いてデータを解析した。非感染の患者におけるPSP/reg値は、7~10日目がピークとなるようにわずかに増加した(図5A、図5B)。感染症を示した多発性外傷の患者においては、さらな

10

20

30

40

50

る増加が見られる。最後に、敗血症を示した多発性外傷の患者は、血清PSP / regの大きな増加を示す。

【0030】

増加は、敗血症の臨床基準が満たされる数日前に始まる。PSP / regは敗血症に高度に相関している。患者がまだ敗血症でない3日目において、血中のPSPの平均濃度は有意に増加して100 ng / mLを超え、敗血症の期間中には約20倍に達する(図5A、図5B、5~10日目)。

【0031】

したがって、敗血症を伴った患者におけるPSP / regの初期の増加は、敗血症を予測するための血清マーカーとして用いることができる。したがって、特異性、正および負の予測値は、3日目および5日目における3つの潜在的なカットオフ値、たとえば30 ng / mL、60 ng / mLおよび80 ng / mLに集約される。特異性は、60 ng / mLおよび80 ng / mLのカットオフ値の80%前後である。上記正および負の値もまた60~80%であり、本方法によって早い時期に患者の識別を行うことができることが示される。

【0032】

【表3】

敗血症を伴った患者のPSP血清濃度の3つのカットオフ点についての感受性、特異性ならびに正および負の予測値を、感染性合併症または局所感染症を伴わない患者と比較したもの。非感染の2つの群を敗血症群と比較した。感染症群は含んでいない。

3日目	30ng/mL	60ng/mL	80ng/mL
感受性(%)	70.4	55.5	40.7
特異性(%)	72.2	83.3	83.3
正の予測値(%)	65.5	71.4	64.7
負の予測値(%)	76.5	71.4	65.2
5日目	30ng/mL	60ng/mL	80ng/mL
感受性(%)	74.1	63.0	51.9
特異性(%)	66.7	75.0	77.7
正の予測値(%)	62.5	65.4	63.6
負の予測値(%)	77.4	73.0	68.3

分析は、外傷後3日目または5日目に得られたPSP血清値に基づく。

10

20

30

【 1 】

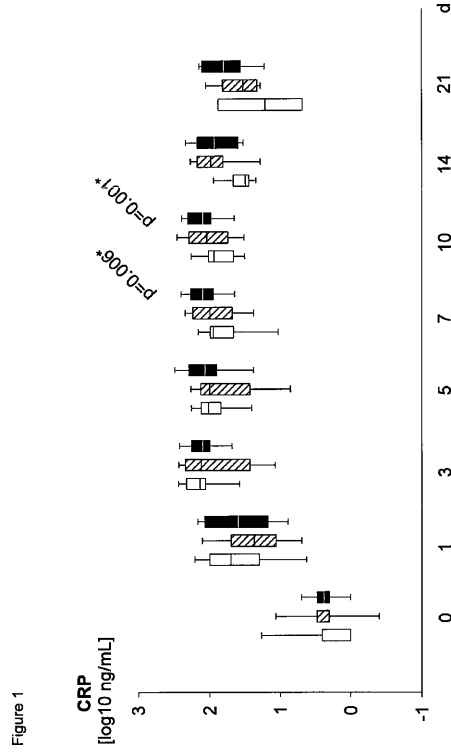


Figure 1

【 2 】

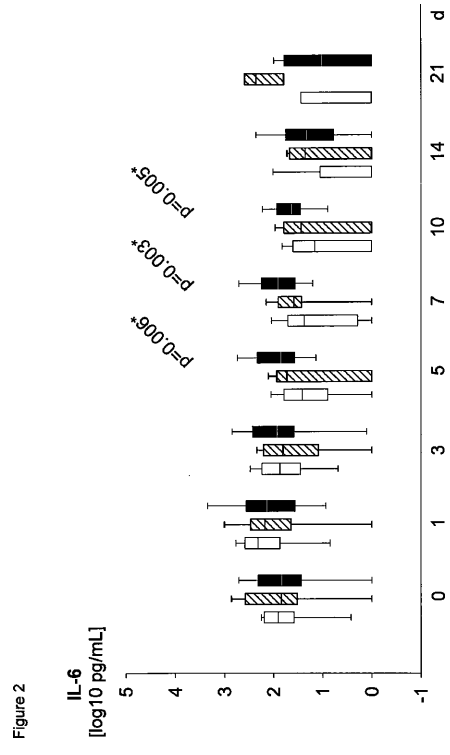


Figure 2

【 3 】

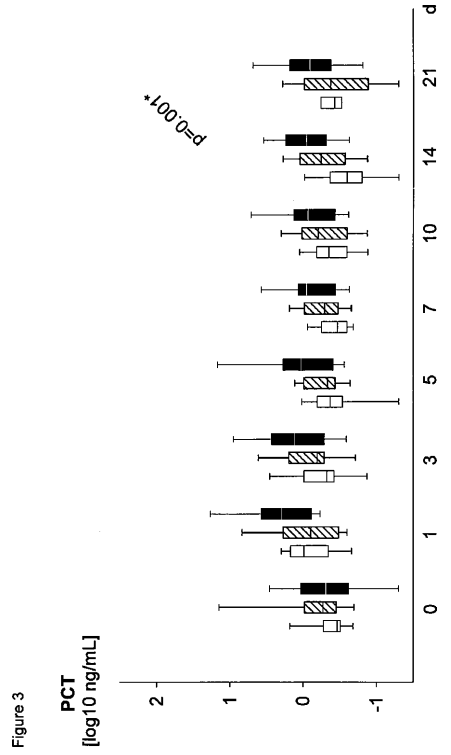


Figure 3

【 4 】

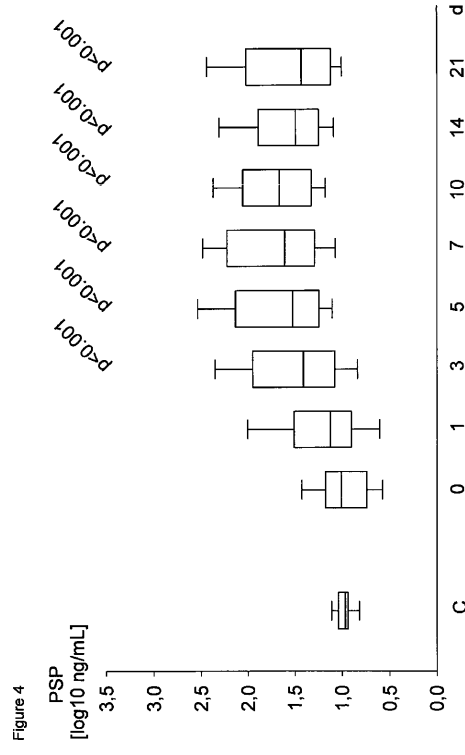
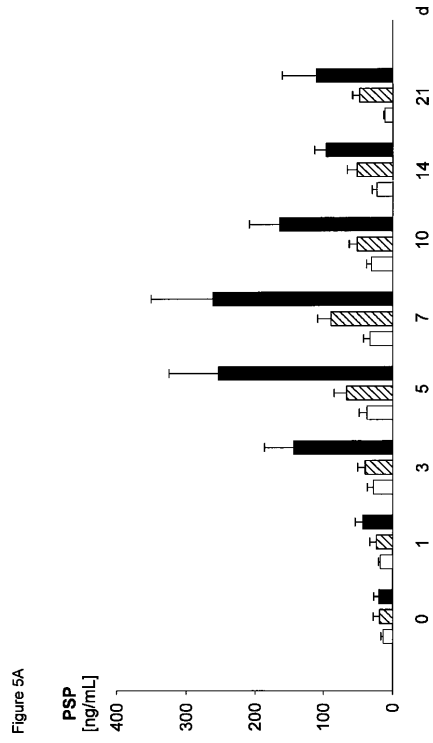
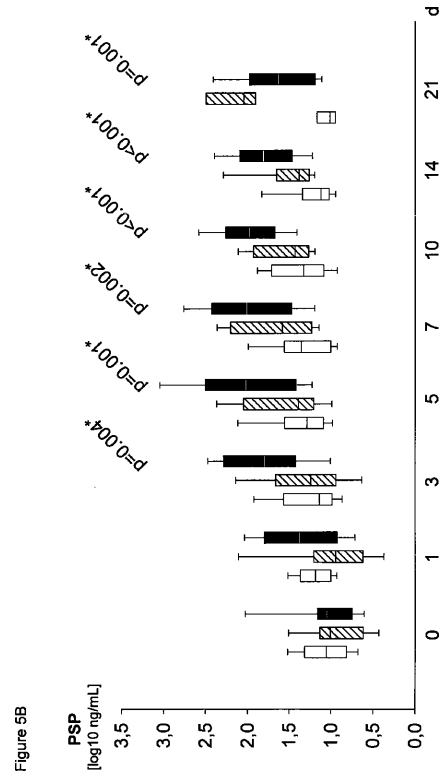


Figure 4

【 5 A 】



【 5 B 】



【 配列表 】

0005048838000001.app

フロントページの続き

- (72)発明者 ビムラー、ダニエル
スイス国 CH - 8700 キュスナハト チュルヒャーシュトラーセ 119
- (72)発明者 キール、マリウス
スイス国 CH - 8032 チューリッヒ ホフシュトラーセ 14

審査官 加々美 一恵

- (56)参考文献 特開2004-194534(JP, A)
Journal of Gastroenterology, 1995年, Vol.30, p643-650

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G01N 33/48-33/98
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

专利名称(译)	测量人败血症的方法		
公开(公告)号	JP5048838B2	公开(公告)日	2012-10-17
申请号	JP2010523316	申请日	2008-09-02
[标]申请(专利权)人(译)	苏黎世大学		
申请(专利权)人(译)	海胆威赛罗卡泰特Tsuyurihi		
当前申请(专利权)人(译)	海胆威赛罗卡泰特Tsuyurihi		
[标]发明人	グラフロルフ ビムラーダニエル キールマリウス		
发明人	グラフ、ロルフ ビムラー、ダニエル キール、マリウス		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/6893 G01N2333/474 G01N2800/26		
FI分类号	G01N33/53.D		
代理人(译)	昂达诚 本田 淳		
优先权	2007017539 2007-09-07 EP		
其他公开文献	JP2010538282A5 JP2010538282A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及一种预测创伤后人类脓毒症的可靠方法，其中胰腺结石蛋白/再生蛋白 (PSP / reg) 的水平在血清中测定，并且高水平指示脓毒症的发展。疾病的早期阶段。此外，描述了测定血清中PSP / reg水平的方法。

パラメータ	非感染	感染症	敗血症
数	14	22	27
年齢(歳)	38.6±16.9	36.6±15.5	37.3±16.0
男性	11(78.6%)	15(68.2%)	22(81.5%)
ISS*(点)	34.6±9.3	32.2±13.9	38.7±15.6
GCS*(点)	8.9±5.2	9.2±4.9	8.8±5.1
APACHE II*(点)	15.0±6.2	13.6±6.6	17.0±6.8
ICU*(日)	9.1±5.9	16.3±8.2	26.6±9.9