

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5801895号
(P5801895)

(45) 発行日 平成27年10月28日(2015.10.28)

(24) 登録日 平成27年9月4日(2015.9.4)

(51) Int.Cl. F I
 GO 1 N 33/68 (2006.01) GO 1 N 33/68
 GO 1 N 33/53 (2006.01) GO 1 N 33/53 D

請求項の数 3 (全 10 頁)

(21) 出願番号	特願2013-529000 (P2013-529000)	(73) 特許権者	591122956
(86) (22) 出願日	平成24年8月10日 (2012.8.10)		株式会社 L S I メディエンス
(86) 国際出願番号	PCT/JP2012/070428		東京都千代田区内神田一丁目13番4号
(87) 国際公開番号	W02013/024798	(74) 代理人	100090251
(87) 国際公開日	平成25年2月21日 (2013.2.21)		弁理士 森田 憲一
審査請求日	平成26年2月19日 (2014.2.19)	(74) 代理人	100139594
(31) 優先権主張番号	特願2011-176549 (P2011-176549)		弁理士 山口 健次郎
(32) 優先日	平成23年8月12日 (2011.8.12)	(72) 発明者	遠藤 重厚
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		岩手県盛岡市三ツ割4-2-55
		(72) 発明者	福井 康雄
			高知県高知市池2125-1 高知医療センター内
		審査官	海野 佳子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 全身性炎症反応症候群を伴わない術後感染症の検出方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

試料中の s C D 1 4 - S T を測定することを特徴とする、全身性炎症反応症候群を伴わない術後感染症の検出方法。

【請求項2】

該 s C D 1 4 - S T を免疫学的測定方法で測定する、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

全身性炎症反応症候群を伴わない術後感染症を検出するキットであって、

(a) s C D 1 4 - S T に特異的な抗体、

(b) 試料中の s C D 1 4 - S T の量と 全身性炎症反応症候群を伴わない術後感染症との 10
 相関を示す標準データ、

(c) 取扱説明書

を含む、該キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、術後感染症を診断する方法と、該方法を実施するキットに関する。

【背景技術】

【0002】

手術は、医療技術発達に伴い外科をはじめとするさまざまな分野で行われているが、術 20

後感染症はそのリスクとして注目されている。

外科領域の感染症は術前/術後の周術期で発生する。具体的に、術前の場合には腹膜炎（腹腔内膿瘍）、重症膵炎、腸管虚血の重篤化が知られている。また、術後の場合には腹腔内膿瘍、カテーテル感染、肺炎、尿路感染が知られている。術後感染症は、重篤度が高く、治療法の早期決定のために、迅速且つ精度良く診断する必要がある。

【0003】

術後感染の診断には、現在、血液培養、白血球数、体温、画像診断、全身性炎症反応症候群（SIRS）の持続期間、C反応性タンパク質（CRP）値などの血液生化学所見等を指標とされている。このうち、血液培養は感染症に対し陽性率が低く、検査結果も判明するまでに3～7日を要するため、治療に反映しにくいのが現状である（非特許文献1）
 10
 。また、手術直後に発熱、白血球数、CRP値の上昇を認めるのは当然の結果であり、これらも特異的な指標ではない（非特許文献2）。SIRS陽性項目数は、項目増により多臓器不全移行リスクが増加することも知られているが、手術侵襲で持続期間が変動（約1～3日間）するなど、感染に対し特異的なマーカーではない。その他、最近では細菌性感染症マーカーとしてプロカルシトニン（PCT）が広く使われつつあるが、このマーカーは、感染を伴わない侵襲度の高い外傷でも血中濃度が上昇し、感染症診断において偽陽性を示す事が知られている（非特許文献3）。

以上のように、未だ、術後感染症の診断に有効なマーカーの報告はなく、医師は術後感染症の診断に苦慮しているのが実情であり、そのようなマーカーの発見が切望されている。
 20

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0004】

【非特許文献1】JAMA. 1995; 273(2): 117-123

【非特許文献2】診断と治療. 2008; 96(1): 61-66

【非特許文献3】Swiss Med Wkly. 2005; 135(31-32): 451-460

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

術後感染症が疑われた後、それに対する適切な治療方針を迅速に決定することが求められている。本発明の課題は、術後感染症の診断に有効なマーカーを提供することにある。
 30

【課題を解決するための手段】

【0006】

前記課題の解決手段を鋭意探求する中で、本発明者は、術後感染症が疑われた際に、試料中のsCD14-STを測定することにより、手術（外傷）の影響を受けることなく感染に対し反応する特異的なマーカーであり、その測定値あるいは程度から、術後感染症を検出できることを発見し、本発明を完成した。

【0007】

本発明は、
 40

(1) 試料中のsCD14-STを測定することを特徴とする、術後感染症の検出方法、
 (2) 術後感染症が疑われる患者又は術後感染症患者から採取した試料中のsCD14-STを測定する工程、及びsCD14-ST値が非感染者と比較して高値である場合に術後感染症であると判断する工程を含む、術後感染症の検出方法、

(3) 前記判断工程において、sCD14-ST値と予め決定した閾値とを比較する、請求項2に記載の方法、

(4) 該sCD14-STを免疫学的測定方法で測定する、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法、

(5) 術後感染症を検出するキットであって、(a) sCD14-STに特異的な抗体、
 (b) 試料中のsCD14-STの量と術後感染症との相関を示す標準データ、(c) 取
 50

【 0 0 1 3 】

本明細書における「敗血症」とは、細菌感染によって引き起こされた全身性炎症反応症候群（SIRS）である。すなわち、細菌感染症が全身に波及したもので非常に重篤な状態であり、無治療ではショック、DIC、多臓器不全などから死に至ることもある。「敗血症」の診断は上記感染の存在に加え、例えば、全身性炎症反応症候群（SIRS）診断項目である以下4項目のうち2項目以上を満たす状態の事を言う（Chest 1992;101(6):1644-1655）。

- 1) 体温 > 38 または < 36
- 2) 心拍数 > 90 回/分
- 3) 呼吸数 > 20 回/分または $PaCO_2 > 32 \text{ torr}$
- 4) 白血球数 > 12000、< 4000 / m^3 または未熟型白血球 > 10 %

10

【 0 0 1 4 】

本明細書における「敗血症」は、敗血症の最終段階と関連する敗血症、「重症敗血症」、「敗血症性ショック」及び「敗血症の合併症」（例えば、多臓器機能不全症候群（MODS）、播種性血管内凝固症候群（DIC）、急性呼吸促進症候群（ARDS）、急性腎不全（AKI））の発病を含むが、限定されない敗血症の全ての段階を含む。

【 0 0 1 5 】

敗血症は、抗生物質および支持療法が可能であるにも関わらず、死亡症例の重大な原因となっている。最近の研究における推定では、米国において毎年751,000症例の重症敗血症が発生しており、その死亡率は30 - 50%である。2002年にアメリカ集中治療医学会（SCCM）とヨーロッパ集中治療医学会（ESICM）、およびISF（International Sepsis Forum）に所属する集中治療や感染症の専門家が、重症敗血症の死亡率を向こう5年間で25%低下させることを目的に、“Surviving Sepsis Campaign（SSC）”と称する国際的なプログラムを立上げ、その取組みの一環としてSurviving Sepsis Campaign guidelines（SSCG）が作成されている。このガイドラインは2004年にはじめてエビデンスに基づいた重症敗血症の診断・治療のガイドラインとして発表され、2008年にはその改訂版が発表されている（Crit Care Med. 2008;36:296-327）。これらのガイドラインは、重症敗血症に対する初期輸液療法（early-goal directed therapy）などを基盤とするものである（New Engl. J. Med. 2001;345:1368-1377）。

20

30

【 0 0 1 6 】

本ガイドラインに記載された敗血症の治療には、例えば抗菌薬、輸液療法、血管収縮薬、強心薬、ステロイド療法、血液製剤、血糖コントロール、血液浄化法〔持続的血液ろ過（CHF）、持続的血液ろ過透析（CHDF）、血液透析（HD）〕、外科手術（膿瘍ドレナージ、感染性壊死組織除去）などが挙げられているが、その他にエンドトキシン吸着療法（PMX）や グロブリン製剤も挙げられる（Crit Care Med. 2008;36:296-327）。敗血症治療剤は上記に例示した薬剤に限定されるものではないが、例えば、水島裕編集、「今日の治療薬 解説と便覧 2006」、南江堂（2006年）等が参考にできる。

【 発明の効果 】

【 0 0 1 7 】

本発明方法によれば、術後感染症の発症を迅速に精度良く検出することができることから、適切な治療方針を策定することができる。例えば、従来指標（プロカルシトニン）は、手術操作の影響によりその値が上昇してしまい、手術後の感染と手術操作の影響を見分けることができないが、本発明に使用する指標（sCD14-ST）は、手術の影響を受けず、手術後の感染を特異的に検出することができる。

40

また、本発明のキットは、本発明方法に用いることができる。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 1 8 】

【 図 1 】 術後感染を起していない症例における各指標（sCD14-ST、PCT、体温、WBC）の推移を示すグラフである。

50

【図2】術後感染を起した症例における各指標（sCD14-ST、PCT、体温、WBC）の推移を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0019】

本発明の検出方法（以下、本発明方法と称する）では、被検対象者、特に、術後感染症が疑われる患者又は術後感染症患者から採取した試料中のsCD14-STを測定する。このような被検対象者には、術後に生じる感染症であれば特に限定は無いが、例えば、術後に生じる抗菌剤治療を必要とする感染症、あるいは、術後に生じる悪化した感染症（特に敗血症）の患者も含まれる。

sCD14-STの測定方法それ自体は公知であり、タンパク質の各種の公知分析方法、例えば、抗体を用いる免疫学的分析方法、電気泳動等の生化学的分析方法により実施することができ、臨床検査用の自動分析機を使用することもできる。RNAアプタマーなど、抗体と類似の性質を有する物質を利用する分析方法も本発明の一部である。

【0020】

例えば、特許第4040666号明細書には、ヒトsCD14-STの測定方法、より具体的には、配列番号2に記載の16アミノ酸残基からなるペプチド（特許第4040666号明細書に記載のS68ペプチド）を抗原として作製したポリクローナル抗体（S68抗体）、モノクローナル抗体（F1146-17-2抗体）と、抗CD14抗原モノクローナル抗体（例えば、F1031-8-3抗体、F1106-13-3抗体等）との組合せを用いたサンドイッチEIA系〔特許第4040666号明細書の実施例7-(1)〕が開示されており、本発明方法に適用することができる。

また、後述する実施例に示すように、sCD14-STの測定試薬は、磁性粒子を使用した化学発光酵素免疫測定法により、自動化学発光免疫測定装置（PATHFAST；三菱化学メディエンス社）を使用することもできる。

【0021】

本発明方法で用いる試料としては、sCD14-STの測定が可能である限り、特に限定されるものではなく、例えば、血液試料（例えば、全血、血漿、血清）を用いることができる。

【0022】

本発明方法では、試料中のsCD14-ST濃度の上昇を、術後感染症の指標とする。例えば、後述する実施例2に示すように、術後に感染があった場合には、sCD14-ST値が高くなる。培養にて感染が確認された術後7日目には、sCD14-ST値は978pg/mLを示し、それは術後5日目も同程度であった。このように、本発明方法では、術後にsCD14-ST値が高値を示す場合には、感染症を起しているとは判定でき、更に、従来の培養法よりも簡便に早期に判定することができる。一方、sCD14-ST値が低値を示す場合には、感染症を起していないと判定することができる。例えば、試料中のsCD14-ST濃度が健常人の分位数（例えば、中央値）より高ければ高値であり、感染症を起しているとは判定できる。一方、試料中のsCD14-ST濃度が健常人の分位数（例えば、中央値）と同じか低ければ低値であり、感染症を起していないと判定できる。また、Cox回帰やロジスティック回帰などの統計学的手法によって行うことができる。判定のための基準は、事前に用意しておいた「閾値」を使用することができる。

【0023】

本発明方法において、術後感染症を検出するためのsCD14-ST濃度の閾値は、種々条件、例えば、性別、年齢などにより変化することが予想されるが、当業者であれば、被験者に対応する適当な母集団を適宜選択して、その集団から得られたデータを統計学的処理を行うことにより、判定用閾値を決定することができる。前記母集団としては、健常人群、非感染症群、感染症群、敗血症群、敗血症の各病態の程度群、敗血症の各病態の種類群などが選択できる。後述する実施例2では、感染を起していない時点のsCD14-ST濃度の平均値+2×SD値より、891pg/mLの最適カットオフ値を決定して

10

20

30

40

50

いる。本発明方法では、判定用閾値を決定し、試料中のsCD14-S T濃度の測定値と判定用閾値を比較することにより、医師の判断を必要とすることなく、自動的に、術後感染症の検出を行うことができる。

【0024】

術後感染症を検出するためのカットオフ値としては、好ましくは200~5000pg/mLで、より好ましくは300~3000pg/mL、より好ましくは500~1000pg/mLが挙げられる。

【0025】

本発明方法において、検体の採取時期は、術後感染症の疑いが生じた段階、治療を行った後などが好ましいが、手術を行った後、経時的に採取しても良い。例えば、手術を行った後から7日間から10日間程度などが挙げられる。

10

【0026】

本発明のキットは、本発明方法を実施するのに用いることができ、

(a) sCD14-S Tに特異的な抗体、

(b) 試料中のsCD14-S Tの量と術後感染症との相関を示す標準データ、

(c) 取扱説明書

を含む。

【0027】

本発明のキットに用いる前記抗体は、モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体のいずれであることもできる。また、sCD14-S Tへの特異的結合能を保持する抗体断片、例えば、Fab、Fab'、F(ab')₂、又はFvとして、キットに用いることもできる。

20

【0028】

更に、前記抗体は、そのままの状態でもキットに用いることもできるし、利用する免疫学的手法に基づいて、それに適した形態、例えば、ラテックス凝集免疫測定法を利用するのであれば、ラテックス担体に固定した状態で、磁性粒子などを利用した高感度測定法を利用するのであれば、磁性粒子に固定した状態で、イムノクロマトグラフ法などの基板を利用する方法であれば、基板に固定した状態で、標識物質(例えば、酵素、蛍光物質、化学発光物質、放射性同位体、ビオチン、アビジン)による標識の必要があれば、標識化した状態で、キットに用いることもできる。

30

【0029】

本発明のキットに含まれる前記標準データは、試料中のsCD14-S Tの量と術後感染症との相関を示すものである限り、特に限定されるものではないが、例えば、判定用閾値、あるいは、判定用閾値を算出するためのオリジナルデータ又は統計処理データなどを挙げることができる。該標準データは、前記取扱説明書中に記載されても良いし、別にデータシートとして添付しても良い。また、添付される文書の形態は、紙、CD-ROM等の電子媒体、ホームページ等からのダウンロードも含まれる。

【0030】

また、本発明のキットに含まれる前記取扱説明書は、少なくとも、試料中のsCD14-S Tの量と術後感染症との関係に言及するものであれば、特に限定するものではなく、前記言及に加え、例えば、本発明のキットを使用する免疫学的測定の実施手順に関する説明、得られた測定値に基づいて予後を予測する手順に関する説明、キット自体の保存・取り扱いなどに関する注意事項などを含むことができる。

40

【実施例】

【0031】

以下、実施例によって本発明を具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

【0032】

実施例1：sCD14-S T及びプロカルシトニンの測定方法

sCD14-S Tの測定は、特許第4040666号明細書の実施例7-(1)を改変

50

して行った。すなわち、アルカリフォスファターゼ（ALP）標識したポリクローナル抗体（S68抗体）と、磁性粒子（JSR社製）に固定化したモノクローナル抗体（F1031-8-3抗体）を使用し、自動化学発光酵素免疫測定装置であるPATHFAST（三菱化学メディエンス社製）で測定した。アルカリフォスファターゼ（ALP）標識したポリクローナル抗体（S68抗体）は、該ポリクローナル抗体（S68抗体）のFab'画分を調製し、マレイミド法によりALPと結合させて作製した。発光基質は、CDP-star（アブライドバイオシステム社製）を使用した。

測定は以下の手順に従って行った。まず、検体を磁性粒子固定化抗体とALP標識抗体を反応させ、検体中のsCD14-STと前記2つの抗体で複合体を形成させた後、この複合体を磁力体で収集し、結合しなかったALP標識抗体を除いた。発光基質を加え、発光量をsCD14-ST量として検出した。

10

【0033】

プロカルシトニン（PCT）測定は、エクルーシス（ロシュ社製）にて、専用測定試薬であるエクルーシスブラームスPCT（ロシュ社製）を用いた。

【0034】

実施例2：術後感染の有無と各指標の経時推移

食道癌手術後に術後感染を起していない1症例（58歳、男性）と術後感染を起こした1症例（71歳、男性）について、術後の感染の有無あるいは時期と各指標の関係を解析した。具体的には、術後0、1、3、5、7日後にEDTA全血またはEDTA血漿を経時的に採取し、sCD14-STはEDTA全血、PCTはEDTA血漿を試料として測定を行った。また、各ポイントの体温、白血球数（WBC）、SIRS陽性項目数についても、公知の方法に従って確認を行った。例えば、SIRS陽性項目数は、

20

- 1) 体温 > 38 または < 36
- 2) 心拍数 > 90 回/分
- 3) 呼吸数 > 20 回/分または $PaCO_2 > 4.3 kPa$
- 4) 白血球数 > 12000、< 4000 / m^3 または未熟型白血球 > 10%

の何項目に該当するかを評価し、2項目以上に相当する場合はSIRSと診断した。

なお、術後感染を起した症例については、術後7日目に喀痰培養検査からStenotrophomonas maltophiliaが検出され、感染を起していたことが確認された。

【0035】

30

術後感染を起していない症例に関する各指標の推移を表1および図1に、術後感染を起こした症例に関する各指標の推移を表2および図2に、それぞれ示す。

sCD14-STは術後感染を起した症例において、術後5日目に測定値の上昇が認められ、術後0日に比べて約2.5倍も高値となり、上記事象と一致し、更に、早期に感染を検出できることがわかった。一方、他の指標であるPCT、体温、WBC、SIRS診断は、いずれの症例も顕著な変化を示さず、感染との関連性が認められないことから、これらの指標を基に術後感染を検出するのは困難であることがわかった。よって、本発明の術後感染の検出方法として、sCD14-STは有効であることが示された。

また、感染を起していない時点のsCD14-ST濃度の平均値 + 2 × SD値は891 pg/mLとなり、sCD14-ST濃度が約900 pg/mL以上であれば、術後感染症であると判定できることが示唆された。

40

【0036】

【表 1】

項目	sCD14-ST (pg/mL)	PCT (ng/mL)	体温 (°C)	WBC (個/mm ³)	SIRS診断 (陽性項目数)
術後直後	549	0.073	36.3	3600	非SIRS (1)
術後1日目	658	0.430	37.5	3880	非SIRS (1)
術後3日目	753	0.250	36.8	6830	非SIRS (0)
術後5日目	738	0.147	36.2	6210	非SIRS (0)
術後7日目	694	0.336	36.5	7380	非SIRS (0)

10

【0037】

【表 2】

項目	sCD14-ST (pg/mL)	PCT (ng/mL)	体温 (°C)	WBC (個/mm ³)	SIRS診断 (陽性項目数)
術後直後	410	0.084	36.0	3810	非SIRS (0)
術後1日目	684	0.504	38.5	5920	非SIRS (1)
術後3日目	407	0.524	37.6	6980	非SIRS (1)
術後5日目	970	0.427	36.7	9090	非SIRS (1)
術後7日目	978	0.306	36.9	8340	非SIRS (1)

20

【産業上の利用可能性】

【0038】

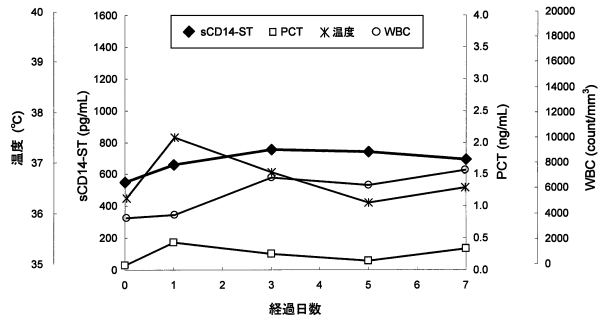
敗血症の指標として知られていたsCD14-STが、敗血症のような重篤な全身性の感染症だけでなく、SIRSを伴わない感染症も特異的に検出できることは驚くべき結果であった。更に、手術操作の影響を受けずに、術後感染症を特異的に検出するための指標はこれまで知られていなかったため、本発明で、これらの事象の判別・検出にsCD14-STを指標とできることは非常に効果が高いと言える。

30

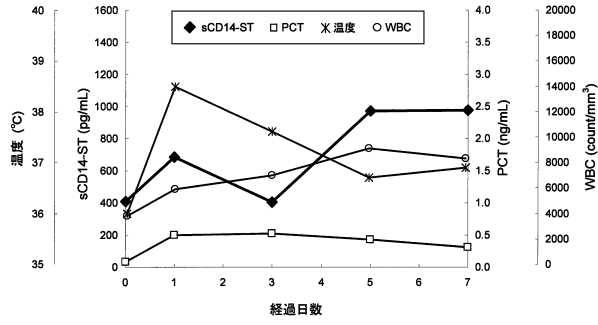
本発明は、術後感染症が疑われる患者あるいは術後感染症患者を、容易に且つ精度良く検出することで、早期の治療法の決定に役立てることができる。

以上、本発明を特定の態様に沿って説明したが、当業者に自明の変形や改良は本発明の範囲に含まれる。

【 ① 】



【 ② 】



【 配列表 】

0005801895000001.app

フロントページの続き

(56)参考文献 特許第4040666(JP, B2)

特表2004-515860(JP, A)

C. Dupont et al., The value of C-reactive protein for postoperative monitoring of lower limb arthroplasty, *Annales de readaptation et de medecine physique*, 2008年 6月 1日, Vol.51, No5, P.348-357

Heinz Burgmann et al., Increased Serum Concentration of Soluble CD14 Is a Prognostic Marker in Gram-Positive Sepsis, *Clinical Immunology and Immunopathology*, 1996年, Vol.80, No3, P.307-310

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48 - 33/98

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAPLUS/MEDLINE/BIOSIS(STN)

专利名称(译)	检测没有全身炎症反应综合征的术后感染的方法		
公开(公告)号	JP5801895B2	公开(公告)日	2015-10-28
申请号	JP2013529000	申请日	2012-08-10
[标]申请(专利权)人(译)	三菱化学美迪恩斯株式会社		
申请(专利权)人(译)	有限公司的LSI Medience		
当前申请(专利权)人(译)	有限公司的LSI Medience		
[标]发明人	遠藤重厚 福井康雄		
发明人	遠藤 重厚 福井 康雄		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/56966 G01N33/6893 G01N2333/70596 G01N2800/26		
FI分类号	G01N33/68 G01N33/53.D		
代理人(译)	森田健一 山口健次郎		
优先权	2011176549 2011-08-12 JP		
其他公开文献	JPWO2013024798A1		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供了用于诊断手术部位感染的标记物。在用于检测手术部位感染的本发明方法中，测量样品中的sCD14-ST。

(21) 出願番号	特願2013-529000 (P2013-529000)	(73) 特許権者	591122956 株式会社 L S I メディエンス
(86) (22) 出願日	平成24年8月10日 (2012. 8. 10)		東京都千代田区内神田一丁目13番4号
(86) 国際出願番号	PCT/JP2012/070428	(74) 代理人	100090251 弁理士 森田 憲一
(87) 国際公開番号	W02013/024798	(74) 代理人	100139594 弁理士 山口 健次郎
(87) 国際公開日	平成25年2月21日 (2013. 2. 21)	(72) 発明者	遠藤 重厚 岩手県盛岡市三ツ割4-2-55
審査請求日	平成26年2月19日 (2014. 2. 19)	(72) 発明者	福井 康雄 高知県高知市池2125-1 高知医療センター内
(31) 優先権主張番号	特願2011-176549 (P2011-176549)	審査官	海野 佳子
(32) 優先日	平成23年8月12日 (2011. 8. 12)		
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		