

腹膜炎に対する緊急手術後の合併症予測における Endotoxin Activity Assay (EAA) の有用性

細 井 愛

新潟大学大学院医歯学総合研究科
消化器・一般外科学分野（第一外科）
（主任：若井俊文教授）

Usefulness of the Endotoxin Activity Assay to Predict Postoperative Complications after Emergency Surgery for Peritonitis

Mana Hosoi

*Division of Digestive and General Surgery,
Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences
(Director: Prof. Toshifumi WAKAI)*

要 旨

【緒言】消化管由来の腹膜炎は診断や治療が遅れると容易に敗血症に移行する緊急度の高い病態であり、重症度や適切な治療法を早期に判断することは非常に重要である。腹膜炎重症化の一因としてグラム陰性桿菌から放出されるエンドトキシンの関与が知られている。近年、エンドトキシンの新しい測定法として全血で測定可能な化学発光法による Endotoxin Activity Assay (EAA) が臨床応用されている。腹膜炎に対する緊急手術後の合併症予測における急性期の EAA による血中エンドトキシン測定の有用性を検証した。

【方法】2014 年 6 月から 2015 年 5 月までに腹膜炎の診断で当科に入院し緊急手術が施行された 46 例を対象とした。入院後 24 時間以内に採取した血液検体を用いて EAA によって得られる Endotoxin Activity Level (EA 値) を測定した。対象を Low-EA 値群 (EA 値 < 0.4) と High-EA 値群 (EA 値 ≥ 0.4) に分け、2 群間における臨床因子を比較検討した。同時に入院時の WBC, CRP, プロカルシトニンなどの炎症マーカー、Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II score, Sequential Organ Failure Assessment score などの重症度判定スコアを測定し、EA 値との関連を検討した。2 群間における臨床因子の比較は、Fisher の直接確率検定を用いて検討した。単変量解析で有意であった因子について、Logistic 回帰分析を用いて多変量解析を行った。2 種類の因子の相関は Spearman の順位相関係数を用いて検討した。

【結果】腹膜炎の原因疾患の内訳は、下部消化管穿孔が 18 例 (39 %) と最も多かった。EA 値の中央値は 0.34 (範囲: 0.01 - 0.83) であり、Low-EA 値群は 27 例 (59 %), High-EA 値群は 19 例 (41 %) であった。術後合併症は 46 症例中 22 例 (48 %) で認められた。合併症なし群では High-EA 値症例が 24 例中 6 例 (25 %) であったのに対し、合併症あり群では High-EA 値

Reprint requests to: Mana Hosoi
Division of Digestive and General Surgery,
Niigata University Graduate School of Medical and
Dental Sciences,
1-757 Asahimachi - dori, Chuo - ku,
Niigata 951 - 8510, Japan.

別刷請求先: 〒951 - 8510 新潟市中央区旭町 1 - 757
新潟大学大学院医歯学総合研究科
消化器・一般外科学分野（第一外科） 細 井 愛

症例が22例中13例(59%)であり、合併症あり群では合併症なし群と比較してHigh-EA値症例の占める割合が有意に高かった($P=0.02$)。また、合併症なし群ではlactate(LAC)高値症例が24例中7例(29%)であったのに対し、合併症あり群ではLAC高値症例が22例中13例(59%)であり、合併症あり群では合併症なし群と比較してLAC高値症例の占める割合が有意に高かった($P=0.04$)。多変量解析では、EA値(≥ 0.4)が独立した合併症発生予測因子であった(オッズ比4.04, 95%CI 1.10-14.9, $P=0.036$)。EA値とWBC, CRPなど既存の炎症マーカーや重症度判定スコアとの相関は認めなかった。

【結語】エンドトキシンの新しい測定法であるEAAは、独立した新規バイオマーカーとして腹膜炎に対する緊急手術後の合併症発生予測に有用である。

キーワード：エンドトキシン, 腹膜炎, 敗血症, EAA (Endotoxin Activity Assay), 緊急手術

緒 言

腹膜炎は救急診療において高頻度に遭遇する疾患のひとつである。腹膜炎の原因疾患は数多くあるが、急性腹症として緊急手術を必要とする場合があり、術後に多くの合併症を引き起こして重症化することがある。

エンドトキシンは腸内常在菌であるグラム陰性桿菌細胞壁のリポ多糖(lipopolysaccharide: LPS)で、血中に放出されると、サイトカインの誘導を介して敗血症性ショック、播種性血管内凝固症候群(disseminated intravascular coagulation: DIC)、多臓器不全などの重篤な病態を引き起こす¹⁾²⁾。血中のエンドトキシンを正確に測定することは、腹膜炎重症化の予防、早期診断、適切な治療を行う上で重要であるが、従来のエンドトキシン測定法は、操作が煩雑であり、精度に限界があるといった問題点も指摘されてきた³⁾⁻⁵⁾。

Endotoxin Activity Assay (EAA)は、血液中のエンドトキシン濃度に応じて免疫複合体を形成させ、それに反応した患者の好中球から産生される活性酸素を測定することで、Endotoxin Activity Level (EA値)を算出する⁴⁾⁶⁾。近年、この新規バイオアッセイを用いて敗血症を中心とした様々な病態の評価が行われている。

本研究の目的は、腹膜炎に対する緊急手術後の合併症発生予測における急性期のEAAによる血中エンドトキシン測定の有用性を明らかにすることである。

材料と方法

1. 検討対象

2014年6月から2015年5月までに腹膜炎の診断で当科に入院し緊急手術を施行された46例を対象とした。男性23例、女性23例であり、年齢の中央値は69歳(範囲: 26-98歳)であった。

2. EA値測定方法

EA値の測定は腹膜炎の診断で当科に入院後24時間以内に行った。本法の測定原理は、試薬の抗LPSモノクローナル抗体を検体に加えてエンドトキシン-抗エンドトキシン抗体-補体免疫複合体を形成させ、その免疫複合体と患者由来の好中球が反応することで生じる活性酸素を試薬に含まれるルミノールとの化学発光として検出し、血中エンドトキシンレベルを求めるものである。試薬に含まれるザイモザンも好中球にとりこまれ、活性酸素の産生を増強する。チューブ1は、ネガティブコントロールでルミノール、ザイモザンのみ、チューブ2は、検体、チューブ3はポジティブコントロールであり、チューブ2, 3は、各々抗エンドトキシン抗体、ルミノール、ザイモザンを含む。チューブ1, 2には全血を加え、チューブ3には過剰のLPS(濃度4,600 pg/mL)を添加した血液を加え反応を行う。各々のチューブにおける活性酸素量をSmart Line TL (Berthold Detection Systems, Germany)を用いて化学発光量を自動計測することにより測定した。EA値は好中球が

産生する活性酸素量（チューブ2）を、活性酸素産生能の最大値（チューブ3）に対する比として計算し、それぞれの値はコントロール（チューブ1）のベースライン値で補正される。EA値はチューブ2の化学発光量－チューブ1の化学発光量/チューブ3の化学発光量－チューブ1の化学発光量として計算した²⁾⁴⁾⁶⁾⁷⁾。

3. 臨床因子の検討

入院時に、一般的な血液検査に加えてWBC、CRP、プロカルシトニン（procalcitonin：PCT）などの炎症マーカーを採取した。これらを用いてAcute Physiology and Chronic Health Evaluation II（APACHE II）score、Sequential Organ Failure Assessment（SOFA）scoreなどの重症度判定スコアを計算し、EAA測定結果との関連を検討した。外科手術はいずれも当科に入院後ただちに施行された。EA値測定結果は、Low-EA値群（EA値<0.4）とHigh-EA値群（EA値≥0.4）の2群に分類した⁸⁾。DICの診断は急性期DIC診断基準を用いて行いスコア4点以上をDICありとした⁹⁾。使用カテコラミンはドーパミン、ドブタミン、ノルアドレナリンであり、輸血製剤は濃厚赤血球液、新鮮凍結血漿、濃厚血小板液であった。合併症はJapan Clinical Oncology Group 術後合併

症基準（Clavien-Dindo分類）ver 2.0に準拠して診断し、grade II以上を合併症ありと定義した¹⁰⁾¹¹⁾。

4. 統計学的解析

各項目のカットオフ値はそれぞれのデータの中央値および当院での血液検査の正常値を元に設定した。2群間における臨床因子の比較には、カテゴリー変数値に対してはFisherの直接確率検定、連続変数値に対してはMann-Whitney U検定を用いて検討した。単変量解析で有意であった因子について、Logistic回帰分析を用いて多変量解析を行った。2種類の因子の相関はSpearmanの順位相関係数を用いて検定した。統計学的検討はSPSS statistics 22（IBM Japan, Tokyo, Japan）を使用し、片側P値<0.05を有意差ありと定義した。

結 果

1. 対象疾患と術式の内訳

対象疾患の内訳を図1に示す。下部消化管穿孔が18例（39%）と最も多かった。上部消化管穿孔が9例（20%）、絞扼性イレウスが8例（17%）、急性虫垂炎が6例（13%）、上腸間膜動脈血栓症が4例（7%）、胆汁性腹膜炎が4例（4%）であった。

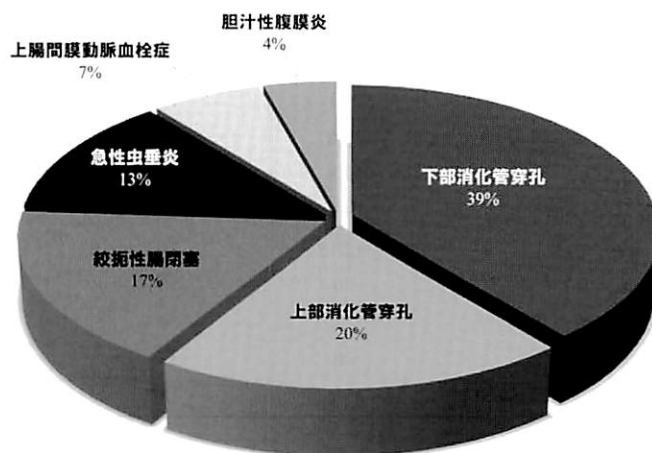


図1 腹膜炎緊急手術疾患の内訳
術後診断による内訳を示した。下部消化管穿孔が最も多かった。

が3例(7%),胆汁性腹膜炎が2例(4%)であった(図1).

術式の内訳は結腸切除術14例,小腸切除術12例,虫垂切除術4例,大網充填術4例,Hartmann手術3例,胃切除術2例,胆嚢摘出術2例,洗浄ドレナージ術,食道縫合術,癒着剥離術,十二指腸部分切除術,十二指腸縫合閉鎖術,臍頭十二指腸切除術が各々1例ずつ(複数術式は主たる方をカウントした)であった.

2. Low - EA 値群と High - EA 値群の比較

全症例のEA値の中央値は0.34(範囲:0.01-0.83)であった.Low-EA値群は27例(59%),High-EA値群は19例(41%)であった.Low-EA値群とHigh-EA値群で術後因子との関連性を比較したところ,術後の合併症発生率はLow-EA値群が27例中9例(33%)であったのに対し,High-EA値群は19例中13例(68%)であり,High-EA値群で有意に高かった($P=0.02$).過去の報告で有意差があるとされている術後28日以内の死亡では両群で有意差を認めな

った(表1)¹²⁾.

3. 合併症と関連する因子の検討

術後合併症は46症例中22例(48%)で認められた.合併症の内訳は腹腔内膿瘍を含む surgical site infection (SSI)が14例と最も多く,ついでイレウス・腸炎などの消化器系合併症が12例,胸水4例,尿路感染4例などであった(表2).

合併症なし群ではHigh-EA値症例が24例中6例(25%)であったのに対し,合併症あり群ではHigh-EA値症例が22例中13例(59%)であり,合併症あり群では合併症なし群と比較してHigh-EA値症例の占める割合が有意に高かった($P=0.02$).また,合併症なし群ではlactate (LAC)高値症例が24例中7例(29%)であったのに対し,合併症あり群ではLAC高値症例が22例中13例(59%)であり,合併症あり群では合併症なし群と比較してLAC高値症例の占める割合が有意に高かった($P=0.04$)(表3A).

重症度スコアであるAPACHE II score, SOFA score, 炎症マーカーであるWBC, CRP, PCTで

表1 腹膜炎緊急手術症例におけるEA値と術後因子

項目	EA 値		P 値
	Low (<0.4) (n = 27)	High (≥0.4) (n = 19)	
術後合併症 (なし/あり)	18/9	6/13	0.02
PMX-DHP (なし/あり)	26/1	16/3	0.18
CHDF (なし/あり)	26/1	18/1	0.66
カテコラミン使用 (なし/あり)	21/6	11/8	0.13
輸血 (なし/あり)	19/8	11/8	0.29
アルブミン投与 (なし/あり)	19/8	10/9	0.18
腹水培養陽性 (なし/あり)	12/15	8/11	0.56
挿管期間 (中央値, 日)	0	0	0.18
ICU 入室期間 (中央値, 日)	1	4	0.07
在院期間 (中央値, 日)	20	38	0.17
術後 28 日以内の死亡 (なし/あり)	25/2	18/1	0.63

PMX-DHP : direct hemoperfusion using polymyxin B immobilized column.
CHDF : continuous hemodiafiltration.
ICU : intensive care unit.

表2 術後合併症の内訳

合併症の種類	症例数
Surgical site infection (腹腔内膿瘍を含む)	14
消化器系合併症 (イレウス, 腸炎など)	12
胸水	4
尿路感染	4
呼吸器合併症 (ARDS, 肺動脈血栓症など)	3
DIC	2
敗血症	2
循環器系合併症 (心房細動, 心不全など)	2
脳血管系合併症	2
縫合不全および膿液瘻	2
その他	2

Japan Clinical Oncology Group (JCOG) 術後合併症基準 (Clavien-Dindo 分類) ver 2.0 の grade II 以上. 重複を含む.

ARDS : acute respiratory distress syndrome.

DIC : disseminated intravascular coagulation.

は合併症の有無で有意差を認めなかった. また消化管穿孔の有無においても有意差を認めなかった.

多変量解析では, EA 値 (≥ 0.4) が独立した合併症予測因子であった (オッズ比 4.04, 95 % CI 1.10 - 14.9, $P = 0.036$) (表 3B).

4. EA 値と炎症マーカー・重症度スコアとの相関

既存の炎症マーカーである, WBC, CRP, PCT, LAC との検討ではいずれも EA 値との相関を認

めなかった (図 2A). また, 重症度スコアの APACHE II score, SOFA score との検討においても相関を認めなかった (図 2B).

考 察

血中のエンドトキシン測定は従来, カプトガニ血液抽出液由来のリムルス試薬を用いたリムルステスト (limulus amebocyte lysate : LAL) が使用されてきた¹³⁾. これはカプトガニ血液の細菌

図2A EA値と炎症マーカー

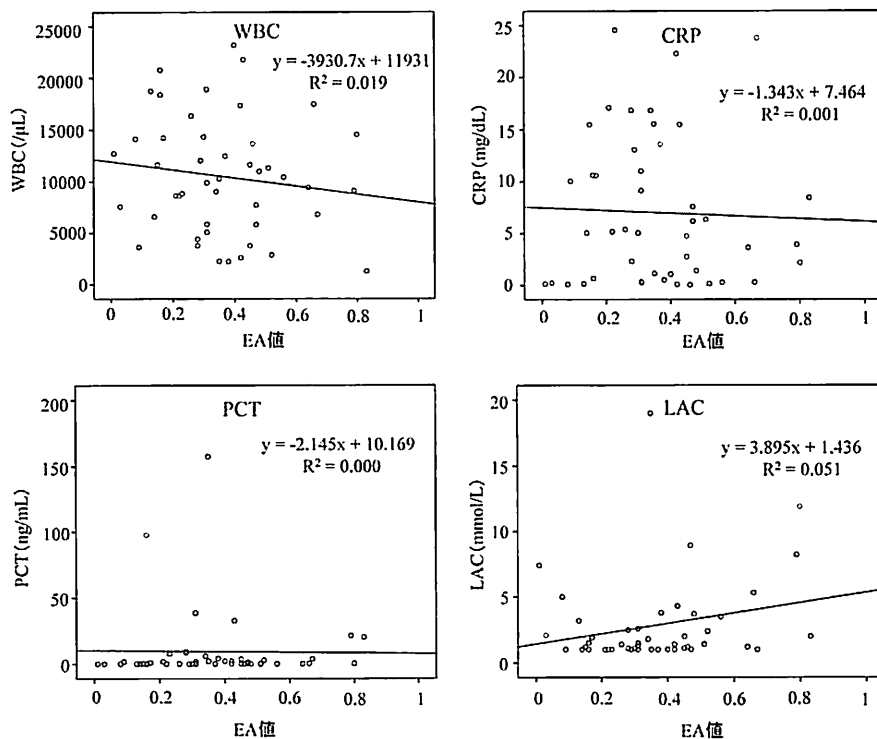


図2B EA値と重症度スコア

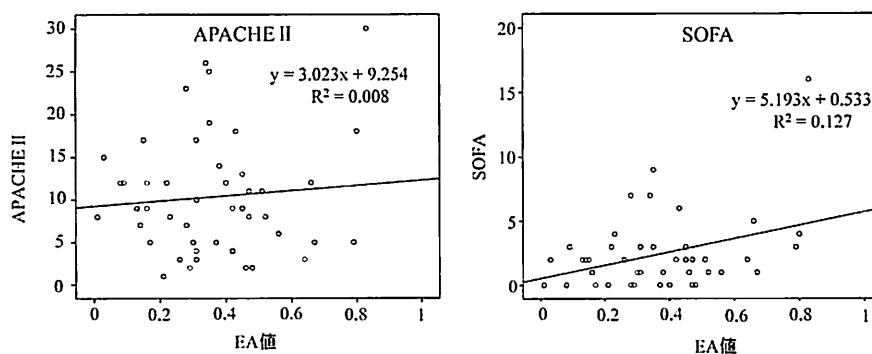


図2 EA値と既存の炎症マーカー、重症度スコアとの比較

(A) EA値とWBC, CRP, PCT, LACに相関は認めなかった。

(B) EA値とAPACHE II score, SOFA scoreに相関は認めなかった。

表 3A 術後合併症と臨床因子の単変量解析

項目	合併症		P 値
	なし (n = 24)	あり (n = 22)	
性別 (男/女)	9/15	14/8	0.07
年齢 (<65/≥65)	11/13	10/12	0.61
既往症 (なし/あり)	4/20	3/19	0.55
抗凝固薬・血小板薬内服 (なし/あり)	20/4	15/7	0.20
ステロイド内服 (なし/あり)	22/2	21/1	0.53
発症からの時間 (<10 時間/≥10 時間)	5/19	7/15	0.31
APACHE II score (<9/≥9)	13/11	8/14	0.18
SOFA score (<2/≥2)	10/14	10/12	0.52
EA 値 (<0.4/≥0.4)	18/6	9/13	0.02
WBC (/μL) (4000-12000/<4000 あるいは>12000)	13/11	8/14	0.18
CRP (mg/dL) (<2/≥2)	9/15	7/15	0.46
PCT (ng/mL) (<0.5/≥0.5)	13/11	11/11	0.51
LAC (mmol/L) (<1.6/≥1.6)	17/7	9/13	0.04
血小板 (15-35 万/<15 万 あるいは≥35 万)	17/7	15/7	0.55
PT (%) (≥80%/<80%)	16/8	12/10	0.30
FBG (mg/dL) (<400/≥400)	17/7	19/3	0.18
FDP (μg/dL) (<5/≥5)	13/11	9/13	0.27
SIRS (なし/あり)	12/12	10/12	0.50
DIC (なし/あり)	23/1	17/5	0.08

APACHE II score : Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II score.

SOFA score : Sequential Organ Failure Assessment score.

LAC : lactate.

PT : prothrombin time.

FBG : fibrinogen.

FDP : fibrin/fibrinogen degradation products.

SIRS : systemic inflammatory response syndrome.

DIC : disseminated intravascular coagulation.

表 3B 術後合併症と臨床因子の多変量解析

項目	オッズ比	95%信頼区間	P 値
EA 値 (≥ 0.4)	4.04	1.10 - 14.9	0.036
LAC (≥ 1.6)	3.23	0.89 - 11.7	0.075

LAC : lactate (mmol/L).

に対する凝集反応を元に開発されたものであるが、血中にはエンドトキシン阻害物質が多数存在すること、多段階の生物学的カスケードを経由した測定値であること、このカスケードは β -D-グルカンによっても惹起されることなどから、精度に限界があった。また、結果を得るまでに時間を要することも指摘されてきた³⁾⁻⁵⁾¹⁴⁾。そこで Romaschin らによって全血でエンドトキシンを検出する EAA が開発された⁴⁾。

EAA で用いる主な試薬は LPS を構成する 3 種類の構造物のうちのリピド A に対するモノクローナル抗体であり、エンドトキシンに特化した測定ができることが特徴である。リピド A は多様性を持ったグラム陰性菌の LPS 中でも構造共通性の高い活性部位である¹⁾。EAA の測定時間は約 30 分で操作も簡便であり、リアルタイムの評価が可能であることから有用な測定法と言われている⁵⁾。

EAA の測定精度は北米および欧州の 10 施設 857 例の検討 (multi-center endotoxin detection in critical illness study: MEDIC study) などで証明されており、これらの国では EA 値は敗血症性ショック患者へのエンドトキシン吸着療法 (direct hemoperfusion using polymyxin B immobilized column: PMX-DHP) 導入の基準にもなっている²⁾⁷⁾¹⁵⁾¹⁶⁾。また、EA 値の基準は健常者 97 例の検査、術後敗血症患者の検査結果から低値 (< 0.4)、中等値 ($0.4 - 0.6$)、高値 (> 0.6) に統合されている²⁾⁵⁾。本邦における EAA 使用経験では、健常者群で EA 値が 0.6 を超える報告はなかったこと⁵⁾⁶⁾、ICU 入室症例や急性胆道感染症患者

において EA 値が 0.4 未満と 0.4 以上とで重症度に差があるという複数の報告があることから⁷⁾⁸⁾¹⁷⁾、今回は EA 値 0.4 をカットオフ値として解析した。

EAA は化学発光によるエンドトキシン測定法であるため、従来の LAL のようにエンドトキシン量の絶対値を求めることはできない。また患者自身的好中球に対する免疫複合体の結合を利用しているため、好中球が極めて少ない状態や機能が失われているような状態では十分な反応が得られない可能性もあり、サンプルの保存は好中球の活性が失われる 3 時間以降は不可能である、といった問題点がある²⁾⁴⁾。EAA、LAL のどちらが血中エンドトキシンの測定法として妥当かは一定の見解が得られておらず、今後、さらなる検討が必要である。これまでの報告では、急性期の EA 値は、APACHE II score や SOFA score などの重症度スコアや、CRP、PCT などの既存の炎症マーカーと相関関係を持つとされてきた¹²⁾¹⁴⁾¹⁷⁾。しかしながら、本研究では、いずれのスコア、マーカーとも有意な相関関係は認めなかった。過去の多くの研究が、すでに敗血症を呈した重症患者において EA 値を測定しているのに対し、今回対象とした腹膜炎症例は早期の段階での測定であったことが一因と考えられる。

一方で、術後の合併症の有無において EA 値は有意な因子であった。入院時 EA 値が高い症例は、術後合併症の発生に対して、特に注意した管理が必要である。術後合併症の 33 % を SSI が占めており、EA 値は SSI 対策強化の指標として利用できる可能性がある。また、EA 値を指標として術

後の集中治療の必要性を早期に判断することが可能になると考えられる。

今回の対象症例において、既存の炎症マーカーや重症度スコアとの相関を検討したが、いずれもEA値との相関を認めなかった。これはEA値が既存のいずれのスコア、マーカーからも独立した新たなバイオマーカーとしての可能性をもつことを示唆している。EAAと既存の炎症マーカーを組み合わせることで、より精度の高い診断につなげられることが期待される。

結 論

エンドトキシンの新しい測定法であるEAAは、独立した新規バイオマーカーとして腹膜炎に対する緊急手術後の合併症発生予測に有用である。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導を賜りました新潟大学大学院医歯学総合研究科消化器・一般外科学分野、若井俊文教授、日本歯科大学新潟生命歯学部医科病院外科、大竹雅広教授に深謝いたします。

文 献

- 1) Hoffman WD and Natanson C: Endotoxin in septic shock. *Anesth Analg* 77: 613-624, 1993.
- 2) Marshall JC, Foster D, Vincent JL, Cook DJ, Cohen J, Dellinger RP, Opal S, Abraham E, Brett SJ, Smith T, Mehta S and Derzko A: Diagnostic and prognostic implications of endotoxemia in critical illness: Results of the MEDIC study. *J Infect Dis* 190: 527-534, 2004.
- 3) Imai T, Shiga T, Saruki N, Nishikawa K, Fujita T and Morishita Y: Change in plasma endotoxin titres and endotoxin neutralizing activity in the perioperative period. *Can J Anaesth* 43: 812-819, 1996.
- 4) Romaschin AD, Harris DM, Ribeiro MB, Paice J, Foster DM, Walker PM and Marshall JC: A rapid assay of endotoxin in whole blood using autologous neutrophil dependent chemiluminescence. *J Immunol Methods* 212: 169-185, 1998.
- 5) 遠藤重厚, 佐藤信博, 鈴木 泰, 小鹿雅博, 高橋学, 八重樫泰法: 新しいエンドトキシン測定法 (Endotoxin Activity assay) の有用性と問題点. *ICUとCCU* 31: 407-410, 2007.
- 6) 安宅一寛, 嶋岡英輝, 西 信一: 化学発光法を用いた Endotoxin Activity Assay (EAA) の検討. *ICUとCCU* 31: 445-452, 2007.
- 7) 松原全宏, 井口竜太, 比留間孝広, 中村謙介, 中島 勉, 片桐大輔, 上井研人, 野入英世: Endotoxin activity assayの急性腎障害および持続的腎代替療法における評価. *日集中医誌* 20: 235-242, 2013.
- 8) Sato M, Matsuyama R, Kadokura T, Mori R, Kumamoto T, Nojiri K, Taniguchi K, Takeda K, Kubota K, Tanaka K and Endo I: Severity and prognostic assessment of the endotoxin activity assay in biliary tract infection. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 21: 120-127, 2014.
- 9) 丸藤 哲, 齋藤大蔵, 石倉宏恭, 上山昌史, 大友康裕, 織田成人, 久志本茂樹, 丹正勝久, 真弓俊彦, 池田寿昭, 射場敏明, 江口 豊, 岡本好司, 小倉裕司, 小関 一英, 阪本雄一郎, 高山泰広, 遠藤重厚: 急性期DIC診断基準で診断された敗血症性DICに対するアンチトロンビンの効果. *日救急医学会誌* 24: 105-115, 2013.
- 10) Dindo D, Demartines N and Clavien PA: Classification of surgical complications: a new proposal with evaluation in a cohort of 6336 patients and results of a survey. *Ann Surg* 240: 205-213, 2004.
- 11) Japan Clinical Oncology Group: JCOG術後合併症基準 (Clavien-Dindo分類) ver 2.0 (CTCAE対比表). < http://www.Jcog.jp/doctor/tool/Clavien_Dindo.html >
- 12) Yaroustovsky M, Plyushch M, Samsonova N, Abramyan M, Popok Z and Krotenko N: Prognostic value of endotoxin activity assay in patients with severe sepsis after cardiac surgery. *J Inflamm* 10: 8-12, 2013.
- 13) 土谷正和: 比濁時間分析による血中エンドトキシン測定の実状. *エンドトキシン研* 5: 25-30, 2002.
- 14) 諏訪雄亮, 松山隆生, 門倉俊明, 佐藤真理, 森隆

- 太郎, 遠藤 格: 急性胆管炎の重症度判定: Endotoxin Activity Assay. 肝胆臓 70: 735 - 742, 2015.
- 15) Novelli G, Ferretti G, Poli L, Pretagostini R, Ruberto F, Perrella SM, Levi S, Morabito V and Berloco PB: Clinical results of treatment of post - surgical endotoxin - mediated sepsis with polymyxin - B direct hemoperfusion. Transplant Proc 41: 1021 - 1024, 2010.
- 16) Novelli G, Ferretti G, Ruberto F, Morabito V and Pugliese F: Early management of endotoxemia using the endotoxin activity assay and polymyxin B - based hemoperfusion. Contrib Nephrol 16: 91 - 101, 2010.
- 17) Ikeda T, Ikeda K, Suda S and Ueno T: Usefulness of the endotoxin activity assay as a biomarker to assess the severity of endotoxemia in critically ill patients. Innate Immunity 20: 881 - 887, 2014.

(平成28年1月5日受付)
