

# Endotoxin Activity Assay 異常値症例の検討

田中 智基

滋賀医科大学医学部附属病院救急集中治療部

## The abnormally high levels of endotoxin activity assay in septic patients

Tomoki Tanaka

Shiga University of Medical Science Hospital

### Abstract

Rates of mortality due to sepsis remains high. Endotoxin is the cell wall of gram negative bacteria and it is one of the most major mediators of inflammation in sepsis. Therefore, the measurement of endotoxin in blood is important to select clinical treatment for sepsis/septic shock patients. The standard assay for determination of endotoxin has been the limulus amoebocyte lysate assay. However, some reports founded that the usefulness of this assay was limited. Endotoxin activity assay (EAA) is another method for measurement of endotoxin levels in blood. Some studies reported that EAA had a significant correlation with mortality, severity and other biomarkers. Moreover, the EUPHRATES trial showed the possibility that EAA had an usefulness for selecting responsive patient population to PMX-DHP. However, it remains unclear whether EAA is useful for septic patients and we need more research to evaluate its potential. This report serves to present the available knowledge concerning EAA while referencing to previous reports and data from our intensive care units.

Endotoxin and Innate Immunity 23 : 22~27, 2020

**Key words** : EAA, PMX-DHP, DIC, 敗血症

### はじめに

敗血症の病態は「感染に対する制御不能な宿主応答により、生命を脅かすような臓器障害を引き起こした状態」と定義されている。この反応を引き起こす物質として病原微生物由来の Pathogen-associated molecular pattern があり、そのひとつとしてグラム陰性菌の細胞壁成分であるエンドトキシン Lipopolysaccharide (LPS) がある。臨床現場で病態把握やエンドトキシン吸着療法 polymyxin B-immobilized fiber column direct hemoperfusion (PMX-DHP) などの治療方法の選択にエンドトキシンの測定は重要である。その測定法としてはカプトガニの血液を用いたリムルス試験 Limulus amoebocyte lysate (LAL) が本邦では最も普及している。しかし、この方法には測定時間や感度などの問題点があり現在もその臨床的有用性は確立されていない。他の測定方法として Endotoxin Activity Assay (EAA)<sup>1)</sup>がある。EAA は患者血液中の好中球の CR1, CR3 レセプターを介した活性酸素の産生反応を利用した血中エンドトキシン測定

法で、0 から 1 の相対的反応値として結果を得る。簡便かつ迅速に測定でき、早期介入が必要とされる重症患者で利便性が高く、そのような重症患者において、重症度との相関、死亡率との相関などの EAA 値の有用性が報告されている。また米国・カナダで行われていた、EUPHRATES trial<sup>2)</sup>では、 $0.6 < EAA < 0.9$  かつ Multiple Organ Dysfunction Score (MODS)  $> 9$  の患者において PMX-DHP による予後改善が認められ、PMX-DHP の施行基準として EAA 値が再度注目されている。しかしながら、日本では EAA の測定は保険収載で認められていない。また LAL 法との解離や EAA 値が 1 以上となる異常高値例も散見され、好中球の反応でエンドトキシン値を正確に反映してよいか疑問が残る。この Mini Review では当施設での EAA 測定結果を含め、これまでの EAA に関する研究を報告する。

### 1. EAA とは

EAA は Romaschin ら<sup>1)</sup>により 1998 年に発表された測定方法であり 3 段階の反応系から成る。まず患者血中

LPSと抗LPSモノクローナル抗体により免疫複合体を形成させ、これらが補体と結合しオプソニン化される。オプソニン化により貪食されやすくなった免疫複合体を好中球が取り込み活性酸素が産生され、同時に試薬に含まれるザイモザンも好中球に取り込まれ活性酸素産生を増強させる。その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する。この化学発光を3つの条件で行い (Tube1:ルミノール, ザイモザン; Tube2:ルミノール, ザイモザン, 抗LPS抗体; Tube3:ルミノール, ザイモザン, 抗LPS抗体, 過剰LPS (*E. coli* 055:B5, 4,600 pg/mL)), それらの結果から (Tube2発光量 - Tube1発光量) / (Tube3発光量 - Tube1発光量) = EAA値として算出する。原理上, EAA値は0~1.0までの値となる。

EAAを用いた最初の大規模研究であるMEDIC study<sup>3)</sup>では, 857名の集中治療入室Intensive Care Unit (ICU)患者(入室24時間以内)と97名の健常人のEAA値に関する報告がなされた。健常人のうち93%が0.4未満で0.6以上は存在しなかったことから, EAA値の0~0.39を低値, 0.4~0.59を中等値, 0.6以上を高値と分類すると提唱された。857名のICU患者のEAA値は, 0.4未満が42.8%, 0.4以上0.6未満が26.6%, 0.6以上が30.6%であった。グラム陰性菌 gram negative bacteria (GN)感染症に対して感度85.3%, 特異度44.0%と報告され, 特異度は低い結果であった。しかしGNに対する陰性適中率は98.6% (95% CI, 97.5%~99.8%), また全感染症に対する陰性適中率は94.8% (95% CI, 92.6%~97.1%)と感染症の有無の予測としてEAA値は有用な可能性が示唆された。その他にICU入室後24時間以内の重症敗血症発症リスク, APACHE II, MODS, SOFAなどの重症度とEAA値が有意に相関すること, そしてICU死亡率は3群でそれぞれ低値:10.9%, 中等値:13.2%, 高値:16.8%とEAA値に伴って上昇することが示された。これらの結果よりEAA値が重症患者管理において有用な指標となると報告された。

## 2. EAAの検討

それ以降, EAAに関する多くの報告がある。安宅らの報告ではICUに入室した64例ではEAAとLAL法の結果に相関は認めず, Satoらの報告<sup>4)</sup>でも98例の胆道系感染症例で同様の結果であった。またSanadaらは小児肝移植例の門脈血と末梢静脈血を用いてEAAとLAL法を測定し, 2つの結果に関連性はなく, EAA値の方が低濃度のエンドトキシンを反映していると報告している<sup>5)</sup>。つまり, EAAとLAL法はともにエンドトキシンの反応を測定した検査であるが, 異なった指標として考える必要がある。

2014年にIkedaらが314名のICU入室患者のEAA値に関して報告した<sup>6)</sup>。この報告においてEAA値はICU

入室患者で $0.39 \pm 0.25$  (平均 $\pm$ SD), 61名の健常人で $0.10 \pm 0.09$ であった。MEDIC studyでは健常人のEAA中央値が0.26とIkedaらの報告より約4倍高値を示しており, 理由としては人種差や環境要因があると考察されている。また28日死亡率, APACHE II, 重症敗血症と敗血症性ショックの割合が, EAA値が高い群で有意に高値であった。重症度の予測能ではAUCがProcalcitonin (PCT), APACHE II, EAA, CRPにおいてそれぞれ0.871, 0.811, 0.764, 0.706とEAA値が他のマーカーと同等の高い予測能を有していた。またEAA値とPCTが弱く相関し ( $r=0.35$ ), 重症度予測にPCTとEAA値の組み合わせが有用とも報告している。その後, 2019年にもIkedaらは敗血症もしくは敗血症疑いでICUに入室した142名のEAA値について報告しており<sup>7)</sup>, EAA値とAPACHE II, 28日死亡率が有意に相関していたと報告している。またPCTに加え, プレセプシン, 乳酸値, IL-6とEAA値が相関し, この内EAA値が最も培養結果と相関していたことも報告されている。

また感染症だけでなく, 外傷や術後症例などでもEAAの有用性の報告があり, Charbonneyら<sup>8)</sup>は48例の多発外傷患者でEAAを測定し, 死亡例で有意にEAAが高値を示し(死亡群 vs 生存群:  $0.48$  vs  $0.28$ ;  $p=0.048$ ), 入院時にショック状態であった患者でも有意にEAAが高値であったと報告している(ショックあり群 vs ショックなし群:  $0.34 \pm 0.19$  vs  $0.24 \pm 0.13$ ;  $p=0.049$ )。Yarostovskyら<sup>9)</sup>は開心術後の敗血症81例のEAA値がPCT, APACHE IIと相関していた ( $r=0.27$ ,  $r=0.33$ )と報告し, Ricciら<sup>10)</sup>は25例の先天性心疾患児の心臓血管術後ではEAA値が術後有意に上昇し, 術後1日目のEAA値は乳酸値, 昇圧薬投与量などとも相関していたと報告している。

これらの報告より, 敗血症だけではなく多岐にわたる重症患者においてEAAはリスク評価や感染症の指標として有用であると考えられている。

## 3. EAA異常値

先も述べたように, 原理上, EAA値は0~1.0までの値をとるといわれているが, 実臨床では1.0以上の異常高値症例であったり, リムルス法で高値で重症度が高い症例でもEAA値は0.1以下となるような相対的異常低値も散見される。原因としてはEAAの測定過程にあると考えられている。EAA値の測定には複数の過程が必要で, さまざまな要素に影響を受ける可能性がある。患者と検査キットのLPSの株の違い, 好中球や補体の活性化, LPS結合蛋白によるLPSとIgMと結合能への影響などが考えられる。例えば, EAA値はステロイド使用患者において低値を示すという報告がある<sup>11)</sup>。その報告では健常人の血液を用いて, メチルプレドニゾロン添加前後でのEAA値とLAL法でのエンドトキシン値を測定

したところ、LAL法では変化を認めなかったが、EAA値は前後で有意に低下したと報告している。このことから、ステロイドにより好中球の活性が抑制されたことがEAA値に影響を与えたと考えられる。ステロイドに限らず免疫抑制状態にある患者の場合には同様にEAA値に影響を受けている可能性も考えられる。一方で、異常高値に関してはTube3には過剰LPSが添加されているため、EAA値は1.0以下になるといわれているが、実際には1.0を超える異常高値例も存在する。1.0以上を示す症例では好中球や補体の異常活性化、LPSの株の違いが影響し異常値となっている可能性があるが、エンドトキシンに対する宿主反応が過剰である可能性は高いと考え加療にあたる必要がある。

#### 4. 異常値に関する滋賀医科大学の検討

われわれの施設では2016年7月よりEAAの測定を前向き観察研究として実施している。2016年7月から2018年10月までに当院救急外来受診、もしくは集中治療室入室患者を対象として100名の患者でEAA値を測定し、そのうち敗血症(Sepsis3)でかつPMX-DHPを施行する前に測定できた症例が80例あった。80例の患者背景、EAA値の分布を表1に示した。EAA値(中央値(Q<sub>1</sub>~Q<sub>3</sub>))は0.42(0.28~0.60)であり、Ikedaらの報告<sup>6)</sup>と同様の分布であった。Marshallらの報告<sup>3)</sup>と比較すると分布としては0.2から0.4の症例が多く、欧米人より日本人は低い傾向にあるのかもしれない。また80例中23例がEAA測定前にステロイドや免疫抑制剤を使用しており、使用群と非使用群のEAA値はそれぞれ0.35(0.28~0.61)、0.44(0.28~0.61)(中央値(Q<sub>1</sub>~Q<sub>3</sub>))であった。2群間で有意差は認めない(p=0.602)が、使用群で低値を示しており、ステロイドや免疫抑制剤を使用している症例ではEAA値の判断に注意が必要である。またそのような薬剤を使用していない症例で、明らかにエンドトキシン血症が疑わしいがEAA値が低値の場合には免疫機能異常の可能性があるとわれわれは考えている。

また80例中にEAA値が1.0以上の異常高値が6例含まれていた。この異常高値例について表2にまとめた。EAA異常高値例がすべて重症度が高いというわけではないが、ここで示すSOFAやAPACHEはICU入室時の値であり、生存日数としては6例中3例が28日以内に死亡している。つまりSOFAやAPACHEよりもEAAが早期に重症度を反映する症例もあると考えられる。また起因菌として*Streptococcus*や*Enterococcus*などのグラム陽性菌(gram positive bacteria: GP)でもEAA高値例があることも分かる。この6例だけではEAA値異常高値となる要因は明らかにはできないが、EAA異常高値を示す患者に対しては、今後重症化する可能性や培養陰性でも重度のエンドトキシン血症の可能性を十分考慮して治療にあたる必要があると考えられる。

表1 患者背景(80例)・EAA値分布

症例数	80
年齢(歳)	73.0(66.5~78.0)
性別、男性(%)	54(67.5)
身長(cm)	160.7(155.4~167.0)
体重(kg)	56.5(48.4~64.3)
SOFA score	9(5~12)
EAA値*	0.42(0.28~0.60)
EAA分布(n)	
<0.2	9
0.2~0.39	26
0.4~0.59	25
0.6~0.79	14
0.8~0.99	0
≥1.0	6
28日死亡、n(%)	22(27.5)
感染部位(n)	
腹部	36
肺	22
軟部組織	8
血液	8
不明	6

中央値(Q<sub>1</sub>~Q<sub>3</sub>)

SOFA: sequential organ failure assessment

EAA値の測定機序が複数の過程が必要であり、上述したさまざまな要素に影響を受けてしまう可能性が高いことから、実臨床においてわれわれは血中のLPS量によって治療適応を判断するのではなく、個々の患者のLPSに対する反応が過剰な場合に適切な治療を行うことが必要であると考えている。同量のLPSでも各患者で反応は異なり、それが過剰な患者では臓器障害を呈する敗血症に進展する可能性がある。EUPHRATESの結果は、エンドトキシンに対する全身反応がEAAとして0.6から0.9の患者においてPMX-DHPが有意に死亡率を低下させたとも捉えられる。この視点から、リムルス法よりもEAA値の方が臨床での治療方法の選択には有用なのかもしれない。EAA値がより臨床的に正確かつ有用に用いられるよう今後も症例を重ね検討していく必要がある。

#### 5. 他マーカーとの相関に関する滋賀医科大学の検討

EAAの測定は2回の操作で約30分程で結果を得られるため、簡便、迅速という点から臨床現場において有用である。しかし、日本ではEAAの測定は保険適応がないため現在使用することはできない。また、上述したようにEAAの測定はいくつかの過程を経ておりエンドトキシン以外の病態を反映している可能性もある。そこで一般的な血液検査と病態との関連を調査した。表1に示した80例のうち、集中治療室に入室し、EAA測定を入

表 2 EAA 異常値症例 (EAA&gt;1.0)

	原疾患	EAA	年齢	SOFA	APACHE	起因菌	CKD (KDIGO)	免疫抑制剤	生存日数
No. 1	頸部膿瘍・壊死性降下性縦隔炎	1.83	85	6	16	<i>Streptococcus pyogenes</i>	stage 3	なし	35 日
No. 2	サイトメガロ腸炎(C7-HRP 陽性, 下部内視鏡検査で潰瘍多発あり) 重症筋無力症	1.45	61	10	19	不明	Stage 3	なし	90 日以上
No. 3	脳内悪性リンパ腫 (化学療法中) NOMI (小腸結腸切除術)	1.36	67	10	33	<i>Citrobacter freundii</i> ( <i>metallo β lactamase</i> 産生菌)	なし	MTX リンデロン 0.5 mg	90 日以上
No. 4	脳梗塞・脳出血 壊死性胆嚢炎 (胆嚢摘出術) 肝壊死肝 (区域切除) 上腸間膜動脈血栓症・小腸壊死 (小腸大量切除術)	1.13	73	20	31	<i>Enterococcus faecium</i>	stage 1	なし	6 日
No. 5	上部胆管癌術後 誤嚥性肺炎	1.11	84	15	20	<i>Serratia</i>	stage 3	なし	14 日
No. 6	胆管癌 (膵頭十二指腸切除術) 創部壊死性筋膜炎	1.03	74	14	20	<i>Aeromonas hydrophila</i>	stage 3	なし	2 日

室から 24 時間以内に施行し、さらに EAA 測定から 3 時間以内に一般血液検査も施行できていた 68 例を対象とした。関連項目は WBC, CRP, PCT, Platelet, PT-INR, Antithrombin (AT), SOFA, APACHE II とした。これらの検査結果とスコアは入室前後 3 時間以内で直近のものを用いた。また 28 日, 90 日死亡率を集計し、予後との関係を検討した。

表 3 に 68 例の患者背景を示す。EAA 値の中央値 ( $Q_1 \sim Q_3$ ) は 0.42 (0.27~0.625) で、感染部位は腹腔内が多かった ( $n=31, 45.6\%$ )、次いで肺 ( $n=17, 25\%$ ) であった。起因菌は GN が 23 例 (33.8%), GP が 19 例 (27.9%), 真菌が 1 例 (1.5%), 不明が 25 例 (36.8%) であった。GN 群と GP 群のそれぞれの EAA 値は GN vs GP : 0.43 (0.23~0.67) vs 0.42 (0.24~0.59) であり有意差は認めなかった ( $p=0.799$ )。EAA 値と 28 日死亡のリスクに関して、単変量解析で EAA は有意にリスクであり (odds ratio 1.226 ; 95% CI 1.015~1.482 ;  $p=0.035$ )、多変量解析では共変数を年齢, APACHE II, PMX-DHP の有無として強制投入法で検討した結果, EAA 値は有意なリスクであった (odds ratio 1.227 ; 95% CI 1.013~1.487 ;  $p=0.037$ )。次に各種血液検査との相関関係について、EAA 値は Plt, WBC, AT と負の相関を示し ( $r=-0.412, r=-0.246, r=-0.277$ )、Lac, PT-INR とは正の相関を示した ( $r=0.266, r=0.243$ )。また CRP, PCT, SOFA, APACHE II とは相関を示さなかった ( $r=0.046, r=0.073, r=0.002, r=0.021$ )。

APACHE II, SOFA, CRP が EAA 値と相関するという報告<sup>3,6,7)</sup>はあるが、今回は異なる結果となった。本検

表 3 患者背景 (68 例)

症例数	68
年齢 (歳)	73.5 (67.2~78)
性別, 男性, n (%)	50 (73.5)
身長 (cm)	160.75 (155.6~167.0)
体重 (kg)	56.0 (48.2~64.3)
APACHE II score	23 (17~29)
SOFA score	9 (6~12)
PaO <sub>2</sub> /F <sub>i</sub> O <sub>2</sub>	251.4 (146~326)
乳酸値 (mg/dL)	20 (12~38.7)
WBC ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	9.5 (4.2~16.6)
Platelet ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	112.5 (60.5~163.5)
CRP (mg/dL)	14.4 (7.7~22.6)
Procalcitonin (ng/dL)	12.27 (2.0~51.6)
PT-INR	1.29 (1.16~1.51)
Antithrombin (%)	55 (47~67)
EAA 値 : 全例	0.42 (0.27~0.625)
EAA 値 : グラム陽性菌感染症例	0.42 (0.24~0.59)
EAA 値 : グラム陰性菌感染症例	0.43 (0.23~0.67)
28 days mortality, n (%)	19 (27.9)
感染部位	
腹部	31
肺	17
軟部組織	7
血液	8
不明	5

中央値 ( $Q_1 \sim Q_3$ )

SOFA : sequential organ failure assessment, APACHE II : Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II

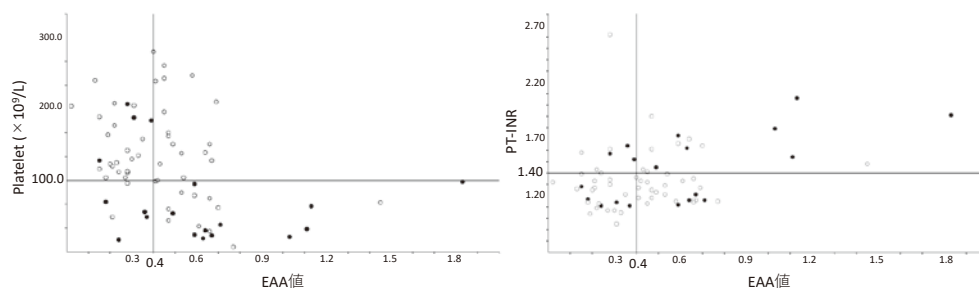


図 1 EAA 値と Platelet, PT-INR の相関  
(● : 28 日以内死亡, ○ : 28 日生存)

討は対象が Sepsis3 で敗血症と診断された患者という点で他検討と異なっているため、臓器障害を伴う感染症という群では相関関係に何らかの影響があるものと考えられている。その他に、Plt, AT, PT-INR の凝固マーカーと相関する傾向がある。凝固系と EAA 値の関係を検討した報告はいくつかあり、Koch ら<sup>12)</sup>は 49 名の SIRS もしくは敗血症患者の EAA 値を測定し、EAA 値が血小板、PT-INR, APTT, フィブリノーゲン、AT と相関はしなかったが、ROTEM の各パラメーターとの関係性を比較したところ、Clot formation time, Clotting Time, maximum clot firmness と相関し ( $r = -0.38$ ,  $r = -0.29$ ,  $r = 0.27$ )、EAA 高値であれば血栓形成もより加速し強固となる可能性を報告している。次に、図 1 に EAA 値と Plt, PT-INR の相関図を示した。白色丸が生存、黒色丸が死亡を示している。EAA > 0.4 の患者において血小板が 10 万/ $\mu\text{L}$  で 2 群に分けた時、血小板高値群の方が 28 日死亡率は有意に低い結果となった (Plt High vs Plt Low = 0% vs 50.0%,  $p = 0.001$ )。また同様に EAA > 0.4 の患者において PT-INR が 1.4 で 2 群に分けた時、PT-INR 低値群の方が 28 日死亡率は低い結果となったが、有意差は認めなかった (PT-INR High vs PT-INR Low = 40.0% vs 17.3%,  $p = 0.052$ )。

これらの結果より、EAA 値は凝固異常の病態を反映している可能性があり、また EAA 値が高値でもまだ凝固異常を発症していない症例は死亡リスクが低いと考えられる。つまり、感染と凝固のクロストークといわれるように、エンドトキシン血症だけでなく、それによる凝固異常、臓器障害を引き起こす DIC 状態になった時に死亡につながると考えられる。そのため、EAA 値は単独で用いるのではなく、凝固異常と合わせて病態を判断することで敗血症予後改善に対し適切な治療を選択する因子になり得るのではないかと考えている。

## おわりに

EAA 値は EUPHRATES trial で示されたように PMX-DHP の適応判断の指標として有用な可能性が高いものとする。われわれは EAA 値が凝固亢進時に敗

血症の予後を反映していることを見出した。このことから EAA 値はより臨床に即したマーカーの可能性はある。しかし EAA 値にはいまだ不明な点が多く、その値を的確に臨床に用いる判断はいまだ試行錯誤の状態である。適切な患者に適切なタイミングで PMX-DHP を施行する判断を含め、敗血症の予後を改善するためには、臨床研究に加えて基礎研究を含めた更なる検討が必要である。

## 文 献

- 1) Romaschin AD, Harris DM, Ribeiro MB, et al. : A rapid assay of endotoxin in whole blood using autologous neutrophil dependent chemiluminescence. *J Immunol Methods* 212 : 169-185, 1998
- 2) Klein DJ, Foster D, Walker PM, et al. : Polymyxin B hemoperfusion in endotoxemic septic shock patients without extreme endotoxemia : a post hoc analysis of the EUPHRATES trial. *Intensive Care Med* 44 : 2205-2212, 2018
- 3) Marshall JC, Foster D, Vincent JL, et al. : Diagnostic and prognostic implications of endotoxemia in critical illness : results of the MEDIC study. *J Infect Dis* 190 : 527-534, 2004
- 4) Sato M, Matsuyama R, Kadokura T, et al. : Severity and prognostic assessment of the endotoxin activity assay in biliary tract infection. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 21 : 120-127, 2014
- 5) Sanada Y, Mizuta K, Urahashi T, et al. : Impact of hepatic clearance of endotoxin using endotoxin activity assay. *Hepatology Int* 6 : 778-782, 2012
- 6) Ikeda T, Ikeda K, Suda S, et al. : Usefulness of the endotoxin activity assay as a biomarker to assess the severity of endotoxemia in critically ill patients. *Innate Immun* 20 : 881-887, 2014
- 7) Ikeda T, Kamohara H, Suda S, et al. : Comparative Evaluation of Endotoxin Activity Level and Various Biomarkers for Infection and Outcome of ICU-Admitted Patients. *Biomedicines* 7 : 47, 2019

- 8) Charbonney E, Tsang JY, Li Y, et al. : Endotoxemia Following Multiple Trauma : Risk Factors and Prognostic Implications. *Crit Care Med* 44 : 335-341, 2016
- 9) Yaroustovsky M, Plyushch M, Popov D, et al. : Prognostic value of endotoxin activity assay in patients with severe sepsis after cardiac surgery. *J Inflamm (Lond)* 10 : 8, 2013
- 10) Ricci Z, Haiberger R, Pezzella C, et al. : Evaluation of Endotoxemia After Pediatric Cardiac Surgery With the Endotoxin Activity Assay : An Exploratory Prospective Cohort Study. *Pediatr Crit Care Med* 17 : e76-80, 2016
- 11) Matsumoto N, Takahashi G, Kojika M, et al. : Interleukin-8 induces an elevation in the endotoxin activity assay (EAA) level : does the EAA truly measure the endotoxin level? *J Infect Chemother* 19 : 825-832, 2013
- 12) Koch A, Meesters MI, Scheller B, et al. : Systemic endotoxin activity correlates with clot formation : an observational study in patients with early systemic inflammation and sepsis. *Crit Care* 17 : R198, 2013