

論文要旨

Serum Derivative of Reactive Oxygen Metabolites (d-ROMs) in Pediatric Hemato-oncological Patients with Neutropenic Fever

小児血液腫瘍患児における好中球減少性発熱時の血清
Derivative of Reactive Oxygen Metabolites (d-ROMs) 値

西川 拓朗

【序論および目的】

血液腫瘍疾患では多くの患児が強力な化学療法によって好中球数の減少をきたし、好中球減少性発熱 (NF: neutropenic fever) を合併する。NF には血液培養陰性ではあるが細菌性敗血症と同様の重症例が存在する一方で、全身状態が良好に経過する軽症例も多くみられる。そして、早期に NF の重症度を予測する手段は確立されていない。

活性酸素種 (ROS: reactive oxygen species) は、好中球の微生物に対する殺菌作用や好中球細胞外トラップ形成において重要な役割をなす。本研究の目的は、その微生物に対する生体防御システムに関して欠かすことのできない ROS を NF 発症時に d-ROMs (Reactive oxygen metabolites) 値と BAP (Biological antioxidant potential) 値を用いて評価し、NF の重症度との関係を検討する。

【材料および方法】

27 人の小児血液腫瘍患児がこの試験に参加した。男子 11 名、女子 16 名で、平均年齢は 10 歳 (1-19 歳) であった。疾患は、急性リンパ性白血病 (ALL: Acute lymphoblastic leukemia) が 16 名、急性骨髄性白血病が 6 名、非ホジキン病が 3 名、ホジキン病が 2 名であった。NF 発症後、即座に血液採取を行い d-ROMs 値、BAP 値、CRP 値を測定した。また、新規診断 ALL 患児に関しては診断時から寛解導入療法期間中、d-ROMs 値、BAP 値を 1 週間毎に測定した。Wismerll 社の Free Radical Analytical System 4®を用い d-ROMs 値と BAP 値は測定した。NF の重症度は systemic inflammatory response syndrome (SIRS) 合併の有無で評価した。

【結果】

新規 ALL 発症時の d-ROMs 値は (698.5 ± 179 U.CARR; $n=11$) であり、治療開始 29 日目の d-ROMs 値 (155.6 ± 69.7 U.CARR; $n=10$, $p=0.0001$) と比して有意に増加を認めていた。また、治療経過と共に d-ROMs 値は低下し、末梢血液中から白血病細胞が消失した時の d-ROMs 平均値は正常域に改善していた (231.5 ± 96.4 U.CARR; $n=11$)。新規 ALL 発症時の BAP 値は (3103 ± 654 $\mu\text{mol/L}$; $n=11$) と正常域であり、治療が経過しても BAP 値の

論文審査の要旨

報告番号	総研第104号	学位申請者	西川 拓朗	
審査委員	主査	竹内 亨	学位	博士 (医学)
	副査	小田 紘	副査	松藤 凡
	副査	橋口 照人	副査	野村 裕一

Serum Derivative of Reactive Oxygen Metabolites (d-ROMs) in Pediatric Hemato-oncological Patients with Neutropenic Fever

(小児血液腫瘍患児における好中球減少性発熱時の血清 Derivative of Reactive Oxygen Metabolites (d-ROMs) 値)

血液腫瘍疾患では多くの患児が強力な化学療法により好中球数減少をきたし、好中球減少性発熱（以下NF）を合併する。NFには血液培養陰性ではあるが細菌性敗血症と同様の重症例が存在する一方で、全身状態が良好に経過する軽症例も多くみられる。発熱後早期にこれらを鑑別することは治療上重要であり血液培養やCRP値などが临床上用いられているが、早期にNFの重症度を予測する手段は確立されていない。活性酸素種（以下ROS）は、好中球の微生物に対する殺菌作用や好中球細胞外トラップ形成において必須とされる。そこで学位申請者らは、微生物に対する生体防御システムに関して欠かすことのできないROSを、27名の急性白血病/悪性リンパ腫患児において末梢血液から白血病細胞が消失した以降に生じた計36回のNF発症時の臨床血清検体でFree Radical Analytical System 4®を用い、Derivative-Reactive Oxygen Metabolites（以下d-ROMs）値とBiological Antioxidant Potential（以下BAP）値を測定し、NFの重症度との関係を検討した。

その結果、本研究で以下の知見が明らかにされた。

- 1) 新規急性リンパ性白血病（以下ALL）発症時（11例）のd-ROMs値は異常高値であるが、治療経過と共にd-ROMs値は低下し、全例寛解状態に入った治療開始29日目のd-ROMs値は正常化していた。また、末梢血液中から白血病細胞が消失した時点でも、d-ROMs値はすでに正常域に達していた。
- 2) 新規ALL発症時のBAP値は正常域であり、治療が経過してもBAP値の有意な変化はみられなかった。
- 3) 計36回のNFのうち7例にSystemic inflammatory response syndrome（以下SIRS）合併を認めた。血液培養陽性例は4例でいずれもSIRS合併NF群であり、うち1例が*Pseudomonas aeruginosa*で死亡した。SIRS合併NF群のd-ROMs値は、SIRS非合併NF群（n=29）に比して統計学的に有意に低下していた。一方、NF発症時のCRP値、BAP値、WBC数、好中球数に関してはSIRS合併/非合併NFの2群間に有意な差は認められなかった。

ALL初発時にはd-ROMs値の異常高値を認めたが、末梢血液中から白血病細胞が消失した時点のd-ROMs平均値は正常域に改善しており、腫瘍細胞が産生するROSの影響を除外するために末梢血液から白血病細胞が消失した以降のNFを対象とした点は妥当だと考えられた。

SIRSを伴うNF群（重症NF群）でd-ROMs値の低下が認められた。この結果は、重症敗血症でROSは上昇するという従来の報告には反しているようにみえるが、これはROSを主に産生する好中球数がNFでは圧倒的に少ないためであろう。好中球数減少時にはROS産生が元来減少していると考えられる。NFを発症した際に、微生物に対抗するためにROSを産生できる場合はより良い経過のNFになると考えられるが、ROS産生ができない場合は重症NFになる可能性があるかと推測された。

本研究は、NF発症時におけるd-ROMs値/BAP値とNF重症度の関連を検討したものであり、その結果d-ROMs値の低値が、重症のNFになり得えやすいことが示された点で非常に興味深い。d-ROMs検査は簡便、短時間、低コストで、かつベッドサイドでも検査ができるという点であり、将来的にNF重症度の早期予測マーカーとなり得る可能性があると考えられる。よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 104 号		学位申請者	西川 拓朗
審査委員	主査	竹内 亨	学位	博士 (医学)
	副査	小田 紘	副査	松藤 凡
	副査	橋口 照人	副査	野村 裕一

主査および副査の5名は、平成22年6月8日、学位申請者 西川 拓朗 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) NFの重症例とはどれを指すのか？SIRSを含まない例はあるのか？

(回答) NFの重症例は、本研究ではSIRS合併例と定義した。実際、血液培養陽性の4例、死亡例の1例、いずれもSIRS合併群であり、最大CRP値も著明にSIRS合併群で高く、この定義は妥当であると考えます。

質問2) NFで細菌感染ではないとき(血液培養が陰性)、発熱やSIRSが生じたりする機序は？

(回答) 血液培養は陽性率がかなり低い検査である。血液培養が陰性であってもその中には、多くの細菌感染症が含まれている。つまり血液培養陰性で熱がでたり、SIRSが生じたりする原因の多くは細菌感染と思われる。その他は、真菌、ウイルス感染などやはり感染症が占める。

質問3) day 0とは？day 0でd-ROMsが低値であったときにSIRSを合併するという事か？NF発症とSIRS発症のタイムラグについては？

(回答) day 0とは、NF発症日である。本研究の結果、day 0でd-ROMs値が低値であった時にSIRSが合併し易いということが判明した。NF発症時からSIRS発症までの経過時間は、SIRS合併7例のうち4例は、NF発症24時間以内である。それ以外の3例も数日内とタイムラグはあまりない。

質問4) ROSはどこで産生されるのか？好中球以外でROSを産生する場はあるのか？

(回答) ROSは、主に好中球などの食細胞の細胞内で産生され、 $\mu\text{M} \sim \text{mM}$ レベルまで増加する。一方、主要臓器の基幹細胞や血管内皮細胞や血管平滑筋細胞でもROSは産生されるが、正常ではnMレベル程度の極めて低濃度である。

質問5) BAPは還元で、d-ROMsは酸化ということか？d-ROMs値とBAP値は連動するのか？

(回答) d-ROMs値は酸化力で、BAP値は還元力を示す。ただし、d-ROMs値とBAP値は必ずしも連動はしない。全く別々の独立した評価法である。

質問6) 今回好中球数には両群間に差がないが、d-ROM値の差がでた原因は何と考えられるか？

(回答) d-ROMs値の差の原因は本研究では検討できていない。残された好中球のROS産生能の差や、血管内皮細胞などからのROS産生などが考えられるが、不明である。

質問7) d-ROMs測定するときNO由来のROSは入ってくるのか？

(回答) ヒドロペルオキシドはROSにより酸化を受けた脂質、蛋白質、核酸などの総称であるため、NO由来のROSもd-ROMs値としてどの程度反映されるかは不明ではあるが、影響は受けると推察される。

質問8) 白血球がある程度多いときにも、d-ROMs値による感染症の重症度予測は可能か？

(回答) 本研究では、NF症例でしかd-ROMs値を測っていないため、白血球が多い時の感染時のd-ROMs値の推移はわからない。また、感染時のd-ROMs値の動向を検討した文献もない。

質問9) 悪性腫瘍細胞ではROSの過剰産生があると述べているが、悪性腫瘍細胞ではATP産生経路がミトコドリアから解糖系にシフトしているという”ワールブルグ効果“とどのように整理して考えたらよいのか？

(回答) ワールブルグ効果によれば、ATP産生経路はROS産生の主な場であるミトコドリアから解糖系にシフトしてしまい、ROS産生は悪性腫瘍細胞で逆に減少するはずである。なぜ、悪性腫瘍細胞でROS産生が過剰になるかについては、腫瘍細胞ではROS産生遺伝子の発現が亢進する可能性を挙げることができる。通常は好中球など食細胞に存在してNADPHを基質としてROSを産生する膜酵素であるNADPH oxidase (NOX) familyの発現が多く、多くの癌細胞で確認されている。

質問10) Table2に関して、day0以降のd-ROMs値についてはどうであったか？

(回答) 本研究では、day0でしかd-ROMs値を測定していないため、day0以降のNF時のd-ROMs値の動向は全く不明である。今後の検討課題にしたい。

質問11) Figure2に関して、d-ROMsはフェントン反応の結果をみているので、生体内の反応とはタイムラグがあるのではないか、つまり数日前のROSを反映していることになるのか？

(回答) ご指摘の通り、数日前の生体内のROSを反映している。

質問12) NETsという現象はROSを必要とするということであるが、感染を必ず伴うのか？

(回答) NETs自体が、2004年に初めて報告された現象であるので、詳細な機能は解明されていないが、現時点ではNETs形成は、体外からか微生物侵入を防御する抗微生物機能のひとつとされている。何が刺激となって、NETsが放出されるのかは不明である。感染が必ず必要であるのかについても、現時点では不明である。

質問13) Table2に関して、SIRS合併/非合併両群の疾患構成に差がないか？例えばALLとAMLの患者にd-ROMs値の変化はなかったか？

(回答) 最多疾患であるALLがSIRS合併NF群では4名(57%)、SIRS合併なしNF群では17名(63%)なので疾患に偏りはない。また、ALLとAML患者のd-ROMs値も、疾患特異的な変化もない。

質問14) Figure2に関して、両群のd-ROMs値が低い集団は予後や発熱の持続期間など特徴の差はなかったか、また、他の重症度スコアでの比較を行ったか？

(回答) 両群のd-ROMs低値例で、予後や発熱の持続期間の差の検討はしていない。また、SOFA、スコアなど他の重症スコアでも検討していない。本研究はn数も小さいのでSIRS合併あり・なしの単純に2群にしか分けていない。今後症例数を増やしていき、検討したい。

質問15) d-ROMs値の低い患者への対応をどうするか？どのように臨床へ応用するのか？

(回答) NF発症時にd-ROMs値が低値の時はNFが重症化する可能性があるため、入念に経過を観察し治療のステップアップのタイミングを逃さないようにする、というように臨床応用ができる。

質問16) サンプルに関して溶血の影響を受けないか？

(回答) 溶血の影響はd-ROMs、BAP値共に受け、本来の値より高く値がでてしまう。ただし、本研究は全サンプル、中心静脈カテーテルからの逆血により採血を行っているため、溶血は起きてはいない。

質問17) 尿中のd-ROMs値は測定したか？

(回答) 今回は測定していない。理論上は、ヒドロペルオキシドがある程度あれば測定可能であろうが、論文報告はない。

質問18) NFは抗癌剤治療後どれくらいに発症するのか？投与中に発症した例はないか？

(回答) NFは抗癌剤治療のメニューにもよるが、大抵治療終了1週間程度してから、好中球減少期がおとずれ、NF発症の可能性が始まる。実際、本研究でも、抗癌剤投与中にNFを発症した例は36例中、4例と少ない。抗癌剤治療がd-ROMs値に影響を与えるのかどうかは、今後検討していきたい。

質問19) ROSの産生度が好中球の分化度により違うはずであるが、好中球の分化度を調べたか？

(回答) 本研究では、好中球の分化度は検討していない。今後の検討課題にしたい。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。