

「敗血症性 DIC のデータ駆動型研究」

東京大学大学院理学系研究科・教授

合田 圭介

要旨

本研究は、敗血症性 DIC（播種性血管内凝固症候群）において、血小板凝集塊（platelet aggregates, PA）および血小板-白血球凝集塊（platelet-leukocyte aggregates, PLA）の出現頻度、形態、臨床指標との関係を多角的に評価し、新たな診断バイオマーカーの確立を目指したものである。COVID-19 を契機とした微小血栓研究を基盤に、高速流体イメージング技術と AI 画像解析（iPAC および SHIGI）を用いて、敗血症性 DIC 患者の血液中に存在する微小血栓の特徴を抽出・解析した。3 年間で 184 名 747 検体のデータを解析し、疾患進行とともに PA/PLA 濃度が変動すること、PA の形態変化が臨床指標と相関することが示された。さらに CAD（冠動脈疾患）への応用も進め、抗血小板療法の薬効評価としての有用性を示した。

背景・目的

播種性血管内凝固症候群（Disseminated Intravascular Coagulation : DIC）は、敗血症や悪性腫瘍、外傷などの重篤な基礎疾患により誘発される全身性の凝固異常であり、微小血管内での血栓形成が全身的に進行する疾患である[1]。DIC が重症化すると、血栓による微小循環障害が多臓器に波及し、多臓器不全を引き起こすため、極めて致死的な病態である。これまでの診断法や治療法では、DIC の発症や進行をリアルタイムに把握することが困難であり、より精密かつ迅速な診断ツールの開発が求められていた。本研究では、血小板、白血球、血管内皮といった細胞系因子と、凝固因子や線溶因子といった液性因子を統合的に評価する「cell-based process of hemostasis」の概念に基づいて、敗血症性 DIC の病態を包括的に理解し、早期診断や治療戦略の最適化に資する革新的診断ツールの開発を目的とした。

本研究の主たる目的は、敗血症性 DIC の早期診断および重症化リスクの評価を可能とする新規画像解析型血液診断ツールの開発である。そのために、微小血栓の形成や血小板-白血球相互作用を定量的かつ形態学的に評価し、それらの指標が臨床的な重症度指標や治療反応性とどのように関係するかを明らかにする必要がある。また、抗菌薬や抗血栓療法の選択に資する治療モニタリング技術の確立を視野に入れ、リアルタイムかつ非侵襲的な観察手法として、画像ベースの血栓解析技術を用いることにした。これにより、患者ごとの病態進行に応じた個別化医療の実現を目指す。

方法

本研究では、血小板および血小板凝集塊の解析のために、全血から密度勾配遠心法（Lymphoprep）を用いて単一血小板および凝集塊を濃縮した。500 μ L の全血を生理食塩水で希釈後、Lymphoprep 上で 800 g・20 分間遠心し、単核細胞層から 500 μ L を回収した。CD61-PE および CD45-PC7 で蛍光標識した後、2%パ

ラホルムアルデヒドで固定を行った（血小板凝集塊の崩壊防止のため、採血後4時間以内に固定）。

イメージングには、光周波数分割多重（FDM）顕微鏡を用いた。これは、空間的に分布した光周波数コムと単一ピクセル検出器（APD）を用いた高速・ブレのない明視野イメージングシステムである。励起光は連続波レーザー（491 nm）をAODで周波数変調し、対物レンズ（20X, NA 0.75）でマイクロ流路上の細胞に集光。透過光はAPDで検出し、LabVIEWプログラムでフーリエ変換を通じて画像再構成を行った。画像サイズは67×67ピクセル、分解能は0.8 μmで、1秒あたり100～300イベントのスループットを達成した[2, 3]。

画像データはMATLABとPythonを用いて解析された。Canny法による輪郭検出と形態演算によりオブジェクトを分割し、面積に基づいて48 μm²以上の構造を凝集塊と定義した。蛍光強度に基づき、CD61/CD45のダブルポジティブをPLA、CD61のみポジティブで閾値以上の強度を持つものをPAと分類した。凝集塊の濃度は、得られた25,000画像中のPAまたはPLAを含む画像の比率として算出した[4]。

統計解析は、Kruskal-Wallis検定、Mann-Whitney U検定、Spearmanの順位相関などを用いて実施し、D-dimerやFDP等の臨床指標との相関を評価した。また、画像分類にはAIDeveloperを用いた畳み込みニューラルネットワーク（CNN）を構築し、ノイズ、血小板、血小板凝集塊、白血球を識別。分類結果は疾患分類モデルの入力としても活用された[4]。

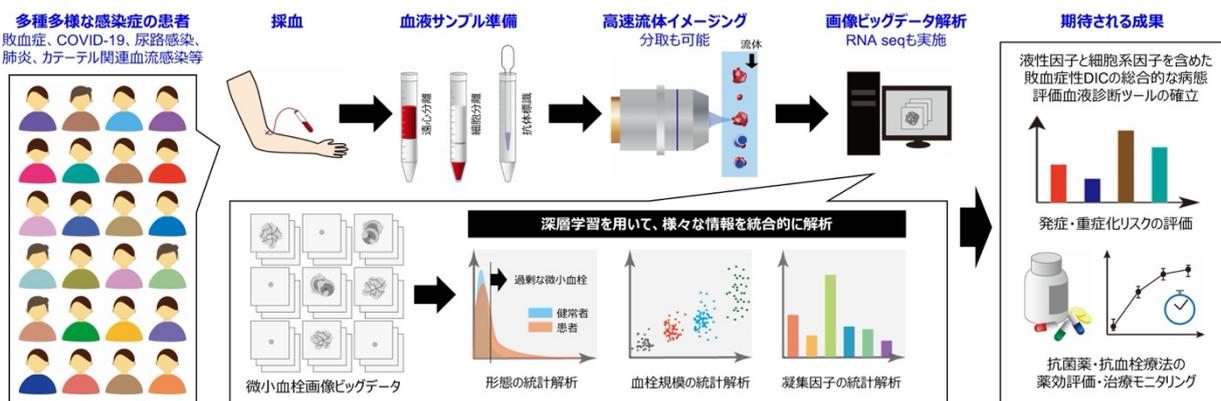


図1. 敗血症性DICのデータ駆動型研究の概要



図2: iPAC実用機とSHIGIの解析システム。

結果

4.1 微小血栓濃度の群間差異

図 3A は、健常者群、感染症群、敗血症群、DIC 群における血小板-白血球凝集塊 (PLA) の濃度分布を示している。明らかに、敗血症群および DIC 群では PLA の濃度が健常者群に比べて有意に高く、統計的にも p 値 < 0.01 の有意差が確認された。この結果は、敗血症や DIC において炎症反応や血液凝固系の過活性化が進行しており、白血球と血小板の相互作用が活発になっていることを示唆している。この現象は、感染症や敗血症時に好中球細胞外トラップ (NETs) が形成されることによって、血小板が活性化され、白血球と結合しやすくなることに由来する可能性がある。NETs は抗菌防御機構である一方で、凝固カスケードを強く刺激し、血栓形成を促進することが知られている。さらに、DIC の病態では内皮細胞の障害やサイトカインストームにより、血小板の異常活性化が誘発され、血小板と白血球の凝集が促進される可能性がある [5]。

図 3B では、血小板-血小板凝集塊 (PA) の形態的特徴を群間で比較した。DIC 群の PA は、他の群と比較して明らかに固体性 (solidity) が低く、偏心率 (eccentricity) が高いという特徴があった。これは、DIC の病態が単なる凝集塊の増加だけでなく、凝集塊の構造的な不安定性や異常な形態変化を伴っていることを示している。

PA の形態異常は、血小板活性化の程度や刺激経路の違いにより誘導される。例えば、DIC のような重度の凝固異常状態では、トロンビンの過剰産生やフィブリン形成の異常が生じ、それに応答して形成される PA が不規則な構造をとることがある。また、血流中のせん断応力の異常や、血小板内の細胞骨格変化も、凝集塊の形態変化に寄与することが考えられる。これらの直接的な結果から、敗血症および DIC 患者では血小板-白血球や血小板同士の異常な相互作用が顕著であることが示された。特に PLA の上昇は、免疫系と凝固系のクロストークが病態の中心にあることを示し、炎症と血栓形成の連関を反映していると考えられる。また、PA の形態異常は、凝固反応が制御不能な状態に陥っていることを示唆し、出血と血栓の両側面を併せ持つ DIC の本質を捉えている [1, 6]。

4.2 臨床指標との相関

本研究では、各検体の PA および PLA 濃度と、D-dimer、FDP、LD などの臨床検査データとの相関解析を行った。その結果、PA および PLA 濃度はいずれも D-dimer および FDP と正の相関を示し (Spearman 相関係数 > 0.5)、統計的にも有意な関係が得られた。これにより、画像から得られた凝集塊の情報が、既存の血栓マーカーと整合的であることが示された。

D-dimer および FDP はフィブリン分解産物であり、血栓形成と線溶活性のバランス指標とされる。これらとの相関は、PA および PLA の形成が実際の血液内凝固状態を反映していることを裏付ける。血小板凝集塊の形成はトロンビン刺激や内皮障害、サイトカインによる活性化によって引き起こされ、これが二次的にフィブリン形成および分解に繋がる。また、LD (乳酸脱水素酵素) の高値を示す患者群では、PA 濃度が上昇する傾向があった。LD は細胞傷害や組織壊死の指標であり、感染症や DIC においては細胞壊死に伴う炎症反応が血小板活性化を引き起こす可能性がある。細胞内の DAMPs (damage-associated molecular patterns) が放出されることで、血小板の TLR (Toll 様受容体) が刺激され、凝集能が増強される経路が考えられる [7]。

一方で、白血球数や血小板数との明確な相関は確認されなかった。これは、PA や PLA の形成が単に細胞数に依存するものではなく、細胞の機能的な活性化状態や相互作用に依存していることを意味しており、従来の血算では評価困難な病態の一端を画像解析が可視化できることを示している。

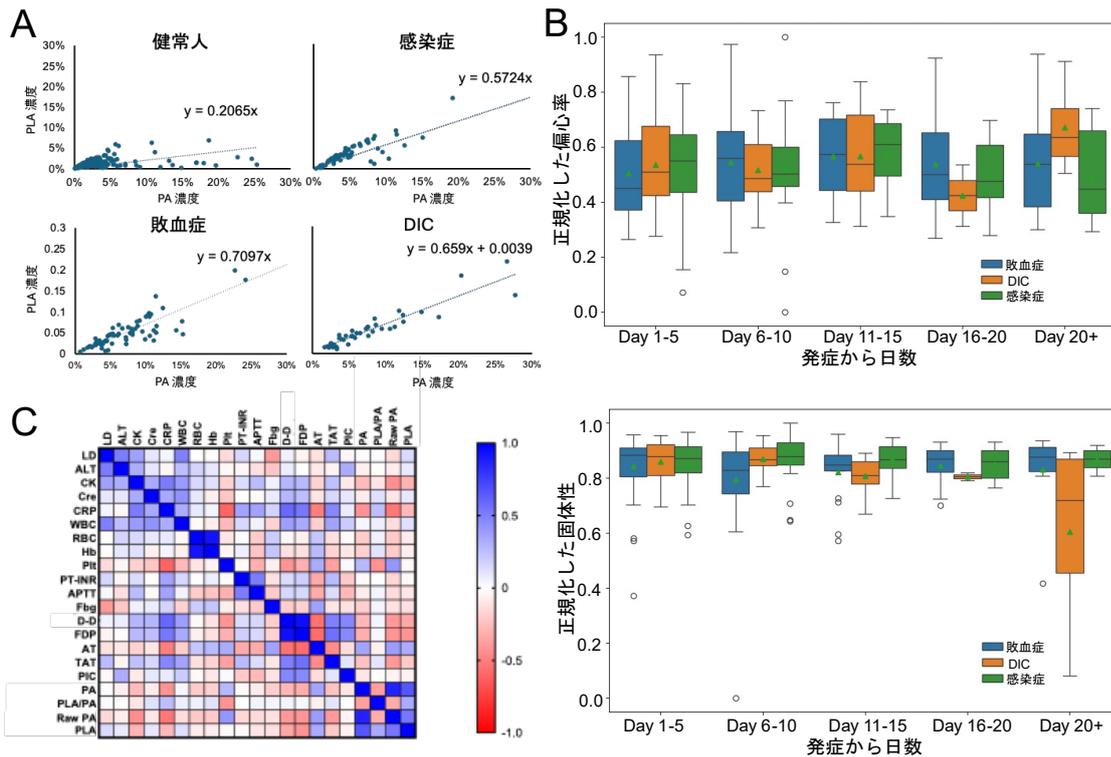


図 3：血小板凝集塊の解析。(A) PA および PLA の解析結果 (B) 臨床データと P A/PLA のスピアマン相関行列。青色は正の相関、赤色は負の相関を示す。(C) 血小板凝集塊の形態解析 (偏心率・固体性)。偏心率 (eccentricity)：値が 1 に近いほど細長い形状を示し、0 に近いほど円に近い形状を示す。DIC 群では偏心率が高い傾向が見られ、凝集塊がより不規則な形状である可能性がある。固体性 (solidity)：凝集塊の実際の面積と凸包面積 (物体を囲む最小の凸多角形) との比率を示し、1 に近いほど滑らかな形状であることを意味する。DIC 群では固体性が低く、凝集塊がより不規則で複雑な形状を持つことが示唆される。

4.3 時系列解析による新発見

図 4 は、感染症発症初期から数日にわたる時系列データにおける PA 濃度の変動を示している。多くの症例において、感染症の初期段階で PA の比率が急激に上昇しており、これは血液凝固系の迅速な活性化を反映している。このような動態は、症状が出現する前から血栓形成が始まっていることを示しており、病態進行の先行指標として活用可能である。

感染初期には、炎症性サイトカイン (IL-6, TNF- α など) の分泌が急増し、それにより血小板が活性化されやすい状態となる。また、感染源から放出された細菌性成分や LPS (リポ多糖) なども血小板を直接刺激し、凝集を促進することが知られている。したがって、PA の上昇は炎症性刺激に対する迅速な血小板応答を反映していると考えられる [8]。

また、DIC が進行するにつれて PLA の濃度が一時的に減少する傾向も観察された。これは、DIC に特徴的な出血傾向の影響によって白血球数や血小板数が減少し、結果として凝集塊の形成能が低下したことを反映している可能性がある。また、DIC においては血小板と凝固因子の消費が進み、凝固と線溶のアンバランスがより深刻となる。さらに、慢性炎症環境では白血球のアポトーシスや脱顆粒により、PLA の形成機構そのものが障害される可能性も考えられる。

こうした時間的変化を捉えることで、患者の状態変化をよりの確にモニタリングし、治療戦略の調整に

活用することが期待される。特に早期の PA 上昇は感染症重症化の前兆であり、臨床現場での先制医療を可能にするバイオマーカーとなる可能性がある。

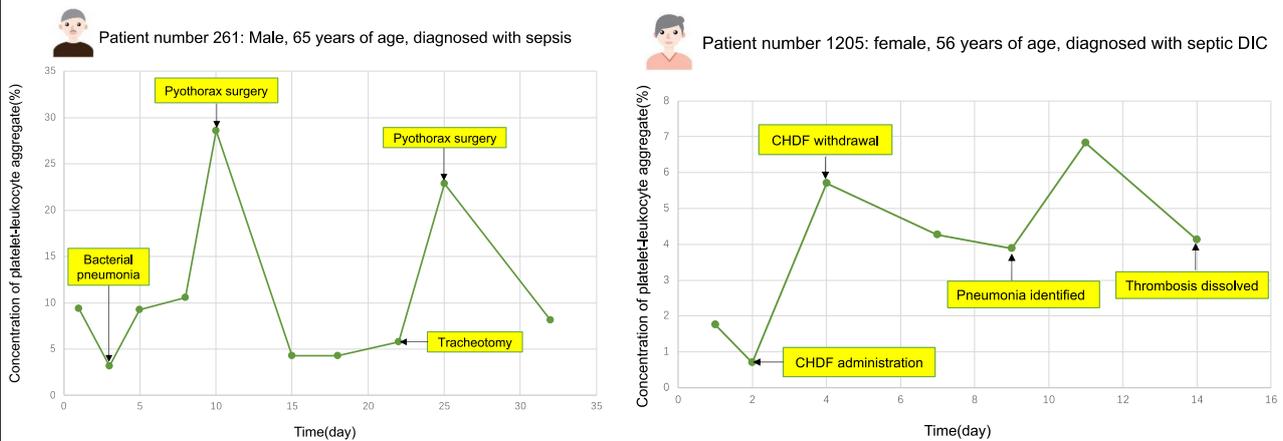


図 4. 時系列モニタリング結果

4.4 血小板凝集の形態解析と AI による疾患分類への展開

DIC 患者は基礎疾患が多様であり、感染症、悪性腫瘍、外傷など複数の因子が複雑に絡み合う病態であるため、病態分類や治療選択が極めて難しい。こうした背景から、本研究では、DIC の構成要素でもある感染症および血栓症における血小板凝集塊の形態差異と治療反応性の評価を通じて、今後の DIC 分類・管理への応用可能性を探った。

COVID-19 と典型的血栓症（深部静脈血栓症、ACS など）の血小板凝集塊を比較した結果、明確な形態的違いが確認された。COVID-19 では、大小不均一で形態の複雑な凝集塊が多数存在し、白血球を含む大型の循環血小板凝集塊（PLA）の頻度が高かった。これに対し、血栓症ではより均質かつコンパクトな形態の PA が多く観察された。これは、COVID-19 が免疫性血栓形成（immunothrombosis）を特徴とし、NETs 形成やサイトカインストームに伴う強力な血小板活性化を介して血栓を形成していることを反映している [4]。

さらに、冠動脈疾患（CAD）患者を対象とした解析では、抗血小板療法が PA の出現頻度を抑制する一方、PLA の頻度には大きな影響を与えていないことが判明した。これは、PLA の形成が単なる血小板活性ではなく、炎症経路や白血球とのクロストークに強く依存していることを示唆する。これらの結果は、血小板凝集塊の形態情報が病態分類の鍵となり得ること、また、PA と PLA のバランスや性質を観察することで、抗血栓療法の有効性や疾患の進行状態をより精密に評価できる可能性を示している [9]。

現在進行中の研究では、得られた大量の画像データを深層学習により分類し、疾患の状態や進行度に応じた予測モデルの構築を目指している。特に、DIC のように多様な原因と病態が混在する疾患においては、

AI による血小板凝集塊の形態分類とその時系列解析に基づいたパターン認識が、今後の病態層別化や治療個別化の鍵となると期待される。

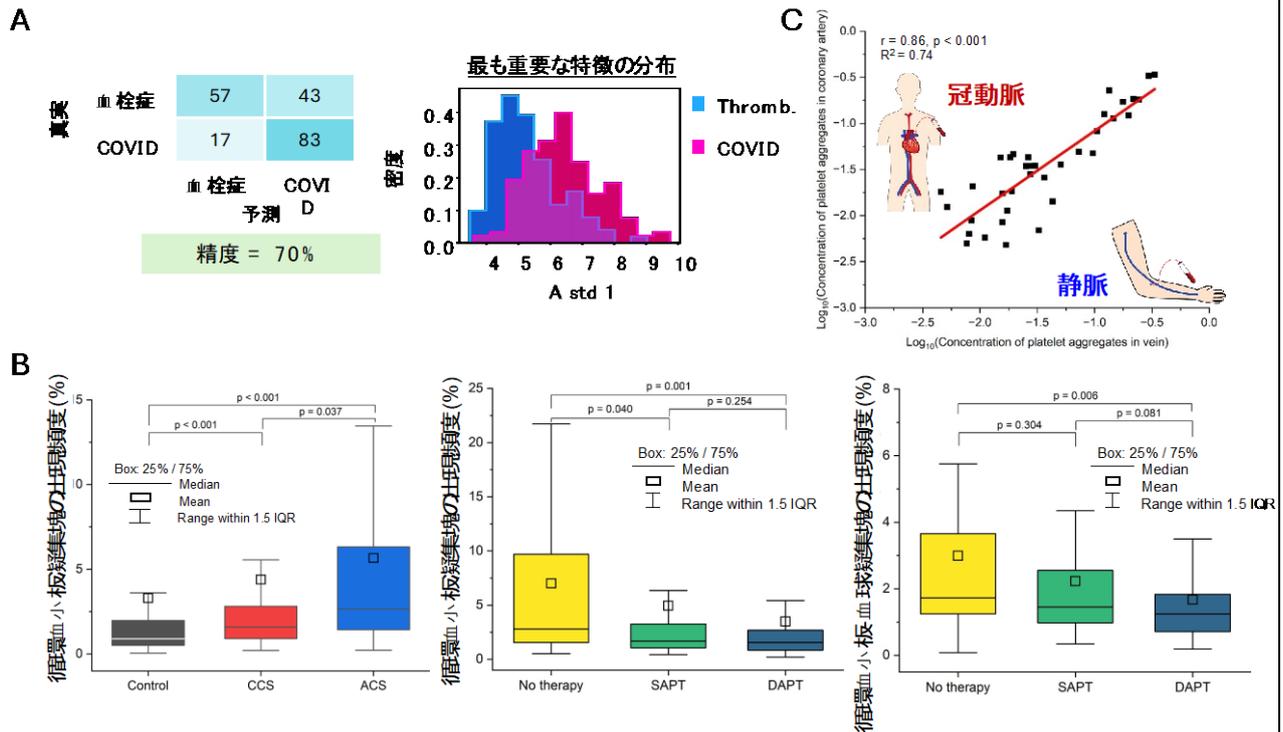


図 5. AI による循環血小板凝集塊の解析 (A) COVID-19 患者と血栓症患者データの分類結果と特徴。(B) CAD 患者における循環血小板凝集塊 (PA) と白血球を含む血小板凝集塊 (PLA) の出現頻度。抗血小板療法においても PLA の出現頻度は大きく抑制されておらず、PLA が炎症性経路に依存する可能性が示される。(C) 冠動脈および静脈で測定された循環血小板凝集塊濃度の相関解析。両部位で有意な正の相関が確認され ($r = 0.86, p < 0.001$)、静脈血でも冠動脈内の血小板凝集状態を反映可能であることを示唆。

考察

本研究では、敗血症性 DIC 患者を対象に、血小板凝集塊の濃度と形態に関する画像解析を行い、病態の異常な凝固・炎症反応を定量的に捉える新たな知見を得た。まず、PA および PLA の出現頻度は、健常者と比較して感染症・敗血症・DIC 群で有意に上昇しており、特に PLA の増加は、免疫系と凝固系の相互作用が病態の中心であることを示唆している。これは、NETs の形成やサイトカインの放出による血小板活性化、さらには内皮障害により、血小板と白血球が異常に結合しやすくなっていることに起因すると考えられる。

加えて、DIC 群では PA の形態に著しい変化が見られ、固体性の低下や偏心率の上昇といった構造的な不安定性が観察された。これらの形態異常は、トロンビンの過剰産生、フィブリン形成異常、血流の乱れ、血小板内の細胞骨格構造の変化など、DIC 特有の凝固・線溶異常により誘発されると考えられる。したがって、PA や PLA の濃度だけでなく形態指標も、病態の理解や重症度の評価に有効である。臨床検査データとの比較からも、PA および PLA の濃度は D-dimer、FDP などの血栓関連マーカーと正の相関を示しており、画像から得られる情報が実際の凝固状態と整合していることが明らかになった。特に LD との

相関は、細胞障害による DAMPs 放出とそれに伴う血小板活性化が、感染や DIC における血栓形成の一因である可能性を示唆している。また、白血球数や血小板数とは相関が見られなかったことから、従来の血算では捉えられない機能的な活性化状態や細胞間相互作用を、画像解析が補完できることも重要な意義である。さらに、感染初期における PA の急上昇や、DIC 進行に伴う PLA の一過性減少といった時系列的変動は、血栓形成が病態進行と密接に連動していることを示すものであり、今後の先制医療におけるバイオマーカーとしての可能性を強く示唆するものである。特に PLA は、免疫系の状態を反映しやすいため、治療反応性や予後予測にも応用が期待される。

また、DIC は基礎疾患が多様であるため、単一の診断指標では病態の全貌を捉えるのが難しい。本研究で示したように、感染症（例：COVID-19）と血栓症における PA/PLA の形態的差異は、DIC を構成する病態の背景を明らかにする鍵となる可能性がある。加えて、冠動脈疾患患者における抗血小板療法の効果を検証した結果、PA の抑制には効果がある一方、PLA の抑制効果は限定的であった。これは、PLA が血小板活性のみならず、炎症や免疫細胞とのクロストークにより形成されることを示しており、PLA の観察は、より広範な病態評価に有効である。現在進行中の研究では、血小板凝集塊の画像を深層学習によって分類し、疾患の状態や進行度を推定する AI モデルの構築が進められている。特に、PA/PLA の形態情報や時系列的変化を取り入れたモデルは、DIC の病態層別化や個別化治療の選択に有用であると期待される。今後は、血液画像情報とゲノム・プロテオームなど他のオミクス情報を統合し、より高精度な病態予測システムを構築することで、敗血症性 DIC の診断と治療を一層進展させることが可能となるであろう。

共同研究者

矢富裕 国際医療福祉大学 教授・大学院長 東京大学名誉教授
西川真子 東京大学医学部附属病院検査部・助教

引用論文

1. Levi M, Cate H. Disseminated intravascular coagulation. *N Engl J Med*. 1999. 341:586–592.
2. Nishikawa M, Kanno H, Zhou Y, et al. Massive image-based single-cell profiling reveals high levels of circulating platelet aggregates in patients with COVID-19. *Nat Commun*. 2021. 12:7135.
3. Kanno H, Mikami H, Goda K. High-speed single-pixel imaging by frequency-time-division multiplexing. *Opt Lett*. 2020. 45:2339–2342
4. Zhang C, Herbig M, Zhou Y, et al. Real-time intelligent classification of COVID-19 and thrombosis via massive image-based analysis of platelet aggregates. *Cytometry A*. 2023. 103:492-499.
5. Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D, et al. Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010. 107(36):15880–15885.
6. Gasecka A, Borovac JA, Guerreiro RA, et al. Thrombotic complications in patients with COVID-19: pathophysiological mechanisms, diagnosis, and treatment. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2021. 35:215–219.
7. Maouia A, Rebetz J, Kapur R, et al. The immune nature of platelets revisited. *Transfus Med Rev*. 2020. 34:209–220.
8. Unal S, Gumruk F, Aytac S, et al. Interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha)

levels and IL-6, TNF-polymorphisms in children with thrombosis. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2008. 30:26–31.

9. Hirose K, Kodera S, Nishikawa M, et al. Direct evaluation of antiplatelet therapy in coronary artery disease by comprehensive image-based profiling of circulating platelets. *Nat Commun.* 2025. In press.

助成研究に関連した発表論文

1. Y. Deng, H. M. Tay, Y. Zhou, X. Fei, X. Tang, M. Nishikawa, Y. Yatomi, H. W. Hou, T. Xiao, and K. Goda, “Studying the efficacy of antiplatelet drugs on atherosclerosis by optofluidic imaging on a chip”, *Lab on a Chip* 23, 410 (2022)
2. Y. Zhou, M. Nishikawa, H. Kanno, R. Yang, Y. Ibayashi, T.-H. Xiao, W. Peterson, M. Herbig, N. Nitta, S. Miyata, Y. Kanthi, G. K Rohde, K. Moriya, Y. Yatomi, K. Goda, “Long-term effects of Pfizer-BioNTech COVID-19 vaccinations on platelets”, *Cytometry Part A* 103, 162 (2023)
3. C. Zhang, M. Herbig, Y. Zhou, M. Nishikawa, M. Shifat-E-Rabbi, H. Kanno, R. Yang, Y. Ibayashi, T. Xiao, G. K. Rohde, M. Sato, S. Kodera, M. Daimon, Y. Yatomi, and K. Goda, “Real-time intelligent classification of COVID-19 and thrombosis via massive image-based analysis of platelet aggregates”, *Cytometry Part A* 103, 492 (2023)
4. K. Hirose, S. Kodera, M. Nishikawa, M. Sato, Y. Zhou, H. Zhang, S. Minatsuki, J. Ishida, N. Takeda, H. Wang, C. Kong, Y. Deng, J. Chen, C. Zhang, J. Akita, Y. Ibayashi, R. Yang, H. Kanno, N. Nitta, T. Sugimura, N. Takeda, M. Kurano, Y. Yatomi, K. Goda, “Direct evaluation of antiplatelet therapy in coronary artery disease by comprehensive image-based profiling of circulating platelets”, *Nature Communications*, in press (2025)