

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2008-522604  
(P2008-522604A)

(43) 公表日 平成20年7月3日(2008.7.3)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C12Q 1/68 (2006.01)</b>	C12Q 1/68 A	2G054
<b>GO1N 33/53 (2006.01)</b>	GO1N 33/53 D	4B029
<b>GO1N 33/543 (2006.01)</b>	GO1N 33/543 597	4B063
<b>GO1N 21/78 (2006.01)</b>	GO1N 21/78 C	
<b>C12Q 1/02 (2006.01)</b>	C12Q 1/02	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 59 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2007-544987 (P2007-544987)  
 (86) (22) 出願日 平成17年12月9日 (2005.12.9)  
 (85) 翻訳文提出日 平成19年6月11日 (2007.6.11)  
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2005/004755  
 (87) 国際公開番号 W02006/061644  
 (87) 国際公開日 平成18年6月15日 (2006.6.15)  
 (31) 優先権主張番号 0426982.5  
 (32) 優先日 平成16年12月9日 (2004.12.9)  
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

(71) 出願人 390040604  
 イギリス国  
 THE SECRETARY OF STATE FOR DEFENCE IN HER BRITANNIC MAJESTY'S GOVERNMENT OF THE UNITED KINGDOM OF GREAT BRITAIN AND NORTHERN IRELAND  
 イギリス国 ウィルシャー エスピー4  
 オージェイキュー ソールズベリー ポート  
 ンダウン ディーエステーエル  
 (74) 代理人 100082005  
 弁理士 熊倉 禎男

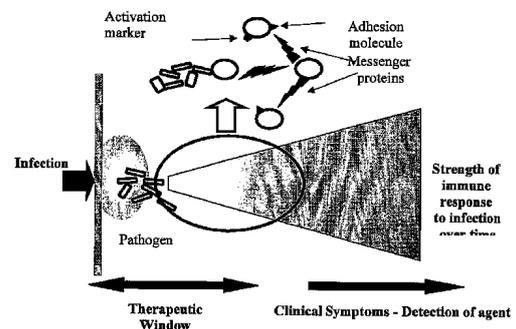
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 敗血症の早期検出

(57) 【要約】

本発明は、初期段階の感染を検出するための、特に、敗血症を最も発生し易い患者を同定するためのシステム及び方法を記述する。任意に予測アルゴリズムの使用と組み合わせた、サイトカイン及び/又は細胞活性化マーカーの特定の組合せにおける発現レベルの測定が、高精度の予測を可能にする。この方法は、民間の及び軍事的な事情において適用可能である。

【選択図】 図1



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

感染、S I R S 又は敗血症の初期段階を検出するために生物学的サンプルをスクリーニングする方法であって、

a) R T - P C R によって一組の情動的に有益なバイオマーカの発現を検出し、及び / 又はフローサイトメトリーにより一組の情動的に有用な細胞表面バイオマーカの発現を検出し、及び / 又は一組の標準の臨床測定値をモニターする工程、

b) 前記検出の結果を、ニューラルネットワーク又は多変量統計解析により解析する工程、

c) 明白な感染の発症の可能性及びタイミングに従って、前記サンプルを分類する工程、  
を含むことを特徴とする方法。 10

## 【請求項 2】

前記結果の解析により、臨床的 S I R S 又は敗血症の発症の可能性を予測する請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

前記結果の解析により、臨床的 S I R S 又は敗血症の発症のイエス / ノーの二値予測を行う請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 4】

臨床的 S I R S 又は敗血症の発症が予測されたら、前記結果は、前記臨床的疾患の可能異性のあるタイミング及び / 又は重篤度を決定するために二次解析にかけられる請求項 2 又は 3 に記載の方法。 20

## 【請求項 5】

発現が R P - P C R によって検出される前記一組の情動的に有益なバイオマーカが、F a s L、M C P - 1、T N F、I L - 1、I L - 6、I L - 8、I L - 10、I N F、及び I N F からなる群から選択される少なくとも 6 種類からなる請求項 1 ~ 4 の何れか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 6】

少なくとも 7 種のバイオマーカの発現が検出される請求項 5 に記載の方法。

## 【請求項 7】

フローサイトメトリーによって発現が検出される前記一組の情動的に有益な細胞表面バイオマーカが、C D 3 1、H L A - D R、C D 5 4、C D 1 1 b、C D 6 2 L、C D 2 5、C D 6 9、C D 8 0 及び C D 9 7 からなる群から選択される少なくとも 2 種からなる請求項 1 ~ 4 の何れか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 8】

解析される前記標準の臨床的測定値が、温度、心拍速度、白血球細胞野合計数及び区別された数 ( 単球、リンパ球、顆粒球、好中球 )、血小板数、血清クレアチニン、尿素、乳酸塩、塩基過剰、 $p O_2$ 、 $H C O_3^-$ 、及び C - 反応性タンパク質からなる群から選択される請求項 1 ~ 4 の何れか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 9】

主成分解析及び / 又は判別関数解析を含む多変量統計解析により、前記解析が行われる請求項 1 ~ 8 の何れか 1 項に記載の方法。 40

## 【請求項 10】

前記多変量統計解析が、判別関数解析を含む請求項 9 に記載の方法。

## 【請求項 11】

前記解析が、ニューラルネットワークにより行われる請求項 1 ~ 8 の何れか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 12】

前記ニューラルネットワークが、多層パーセプトロン・ニューラルネットワークである請求項 11 に記載の方法。 50

## 【請求項 13】

前記解析が、80%超の症例において臨床的なSIRS又は敗血症を正確に予測できる請求項9～11の何れか1項に記載の方法。

## 【請求項 14】

初期段階の感染、SIRS又は敗血症を検出するために生物学的サンプルをスクリーニングするためのシステムであって、

前記サンプルにおける細胞からRNAを抽出及び精製する手段と、

選択されたRNA配列を逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)により増幅するためのサーマルサイクラー又は他の手段と、

前記RT-PCRの結果を検出及び定量するための手段と、

このような結果を解析できるようにトレーニングされたコンピュータに基づくニューラルネットワークと、

前記ニューラルネットワーク解析の結果がオペレータに伝達され得るディスプレイ手段と、

を含むことを特徴とするシステム。

10

## 【請求項 15】

初期段階のSIRS又は敗血症を検出するために生物学的サンプルをスクリーニングするためのシステムであって、

特定の細胞表面マーカーを標識して該マーカーの発現を定量する手段と、

前記標識及び定量の結果を検出及び定量する手段と、

このような結果を解析できるようにトレーニングされたコンピュータに基づくニューラルネットワークと、

前記ニューラルネットワーク解析の結果がオペレータに伝達され得るディスプレイ手段と、

を含み、好ましくは、前記標識が、標識された抗体又は抗体断片によるものであり、前記定量は蛍光活性化された細胞ソーティング(FACS)又は他の形態のフローサイトメトリーによるものであることを特徴とするシステム。

20

## 【請求項 16】

RT-PCR及びFACS解析の両方を行う手段を含む請求項13又は14の何れかに記載の方法。

30

## 【請求項 17】

更に、標準的な臨床測定値からデータを取得して解析する手段を含む請求項13～15の何れか1項に記載の方法。

## 【請求項 18】

感染、SIRS又は敗血症の診断のための診断手段を調製するための、請求項1～12の何れか1項に記載の方法に従う解析又は請求項13～16の何れか1項のシステムを使用する解析。

## 【請求項 19】

感染、SIRS又は敗血症の診断のための診断手段を調製するための、請求項1～12の何れか1項に記載の方法又は請求項13～16の何れか1項のシステムの使用。

40

## 【発明の詳細な説明】

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

(発明の背景)

大幅に改善された診断、治療及び支援にも拘わらず、重篤な感染及び敗血症は未だ重要な死亡原因のままであり、また急性の発症における生存患者においても、慢性の不健康状態又は能力障害をもたらすことが多い。健康な成人の間では突然の抗し難い感染は比較的稀であるが、免疫無防備状態の個体、集中治療を受けている重篤な疾患の患者、火傷の患者及び幼児の場合には、それは増大したリスクを構成する。一部の症例では、明らかに治療可能な感染が敗血症の発症を導く；敗血症とは、腎不全及び呼吸器不全、血液凝固異常

50

、重大で且つ無応答性の低血圧、並びに約30%の症例での死亡を導く進行性の循環器崩壊を特徴とした、感染に対する制御不能な不適切な応答である。北アメリカの人口における敗血症の発生は、年間で人口の約0.3%（約450,000症例）であり、死亡率は高齢者で40%、最も重篤な形態である敗血症ショックの症例では50%に昇る（Angus et al, 2001, Crit Care Med 29: 1303-1310）。

#### 【0002】

感染性微生物での感染の後、身体は、最初は先天的な非特異的免疫応答、その後は特異的な後天的免疫応答といった、古典的な炎症反応及び活性化を伴って反応する。細菌感染において、菌血症は迅速な（30～90分以内）発熱、並びに敗血症性抗原に誘導された免疫応答の発生よりもかなり前に、細菌毒素の検出にトリガーされたインターロイキン1（IL-1）及び腫瘍壊死因子（TNF- $\alpha$ ）等の炎症性サイトカインの放出を導く。

10

#### 【0003】

*Escherichia coli*、*Klebsiella*、*Proteus*又は*Pseudomonas*のようなグラム陰性腸内細菌に由来する腸チフス、疫病、野兔病及びブルセラ症、又は腹膜炎のような感染に起因するグラム陰性菌血症において、これは、殆どが細菌の細胞壁に由来するリポ多糖（LPS）及び他の成分に対する反応である。循環するLPS、特にその成分であるリポドAは、広範囲な全身的反応を誘発する。それは、おそらくは肝臓内において星細胞と接触し、最初にIL-1放出及び発熱を導く。循環する単球及びマクロファージの活性化は、IL-6、IL-12、IL-15、IL-18、TNF- $\alpha$ 、マクロファージ遊走阻害因子（MIF）のようなサイトカイン、並びに高移動度群B1（HMGB1）のようなサイトカイン様分子の放出を導き、ついでこれらが好中球、リンパ球及び血管内皮を活性化し、細胞接着分子をアップレギュレートし、プロスタグランジン、一酸化窒素シンターゼ及び急性期タンパク質を誘導する。血小板活性化因子（PAF）、プロスタグランジン、ロイコトリエン及びトロンボキサンの放出は、血管内皮を活性化し、血管緊張を調節し、外因性凝固カスケードを活性化させる。これら応答の調節不全は、敗血症の合併症及び低血圧を導く末梢血管拡張に関する敗血症ショック、並びに血栓症及び血管内凝血を生じる異常凝固及び繊維素溶解をもたらす（Cohen, 2002, Nature 420: 885-891）。

20

#### 【0004】

LPSは、血清LPS結合性タンパク質（LBP）、並びに単球及びマクロファージに発現したCD14に結合することによって、主として細胞に作用する。LPS及びLPSの複合体を結合する際、CD14は、共受容体であるToll様受容体4（TLR-4）及び更なる成分であるMD-2と共に作用して、シグナリング複合体を形成し、マクロファージの活性化及びサイトカインの放出を開始させる

30

(Pålsson-McDermott & O'Neill,

2004, Immunology 113: 153-162)。Toll様受容体ファミリーは、先天的な免疫システムのためのトリガーとして作用するある範囲の細菌及び真菌のリガンドに関与する一群の細胞表面受容体であり、該リガンドにはグラム陽性細胞壁構造、フラゲリン、及びバクテリアDNAに特徴的なCpG反復が含まれる。

40

#### 【0005】

グラム陽性病原体での感染の場合、敗血症ショックは、外毒素の産生に関連している。例えば、そうでなければ健康である固体を屢々冒す毒素ショック症候群、特に、急性形態の敗血症ショックは、毒性ショック症候群トキシン-1（TSST-1）として知られる外毒素を産生する、特定の*Staphylococcus aureus*株によるものである。同様の症状は、一定の群A・*Streptococcus pyogenes*株での侵襲的感染によって惹起され、連鎖球菌発熱性エンテロトキシンA（SPE-A）に関連することが多い。幾つかのグラム陽性外毒素（TSST-1を含む）は、それらの超抗原特性の結果として、それらの影響を支配的に及ぼすと考えられる。超抗原は、抗原提示細胞上のMHCクラスII分子を一定のクラスのT細胞受容体に架橋することによって、

50

Tリンパ球を非特異的に刺激することができる。通常は、T細胞受容体(TCR) - 主要組織適合性複合体(MHC)の相互作用が高度に特異的であり、MHCにより提示される短い抗原由来のペプチドを特異的に認識するTCRを担持したT細胞だけが結合及び活性化されることができ、抗原特異的なT細胞応答を保証する。超抗原はこの機構をバイパスして、T細胞の大量かつ不適切な活性化を生じる。しかし、SPE-Aは効率的な超抗原ではなく、何等かの更なる機構が関係しているに違いない。なお、臨床的な敗血症はまた、幾つかのウイルス(例えば、ベネズエラウマ脳炎ウイルス)及び真菌での感染からも生じ得ること、及びこのような場合に他の機構が関与する可能性があることに留意すべきである。

#### 【0006】

潜在的に重篤な感染をできるだけ早期に検出する能力、特に、疑わしき個体において敗血症の発症を予測する能力は、明らかに有利である。ショック、敗血症、敗血症ショック、毒素ショック、全身性炎症応答症候群(SIRS)のような臨床的実体を定義する明瞭な基準を確立するための試みにおいて、長年に亘ってかなりの努力が費やされてきた。同様に、ある範囲の臨床的、化学的、生化学的、免疫学的、及び細胞計数的なパラメータを測定すること、及び変化する予後の成功及び洗練の多くの評価システムに基づいて、頑丈な予測モデルを設計するために多くの試みがなされてきた。

#### 【0007】

1991年のアメリカ胸部医師大学(ACCP)及び集中治療医学学会(SCCM)の合意会議に従えば、患者が下記の1以上を有するときに「SIRS」が存在するとみなされる: 即ち、38 超又は36 未満の体温、90/分より大きい心拍速度、20/分を越える呼吸速度又は32mgHg未満のPaCO<sub>2</sub>を含む過呼吸、12000細胞/μL超又は4000細胞/μL未満の白血球数(Bone et al, 1992, Crit Care Med 20: 864-874)。

#### 【0008】

「敗血症」は、感染により生じるSIRSとして定義されてきた。SIRSは、例えば火傷、肺炎、及び他の疾患状態においては、感染の不存在下でも生じ得ることが承認されている。「感染」は、病原性又は潜在的に病原性の微生物が、正常な無菌の組織、体液又は体腔に侵入することにより生じる病理学的プロセスとして定義された。

#### 【0009】

「重篤敗血症」は、臓器不全の合併症を生じた敗血症として定義され、それ自身はMarshall等(1995, Crit Care Med 23: 1638-1652)によって、又は臓器不全後遺症評価(SOFA)スコア(Ferreira et al, 2002, JAMA 286: 1754-1758)によって定義された。

#### 【0010】

「敗血症ショック」とは、他の原因によって説明されない持続的な動脈低血圧を特徴とする、(成人における)敗血症+急性循環不全の状態を言う。

#### 【0011】

集中治療を受けている患者の敗血症の重篤度を評価し、合理的な治療計画を可能にするために、敗血症のための多数の臨床的重篤度モデルが開発され、或いはより一般的なモデルから適合されてきた。最初の一般的に許容されたシステムは、急性病理学及び慢性健康評価スコア(APACHE、並びにその改良型のAPACHE II及びIII)(Knaus et al, 1985, Crit Care Med 13: 818-829; Knaus et al, 1991, Chest 100: 1619-1636)であったが、死亡率予測モデル(MPM)(Lemeshow et al, 1993, JAMA 270: 2957-2963)及び単純化された急性病理学スコア(SAPS)(Le Gall et al, 1984, Crit Care Med 12: 975-977)もまた、広く使用されている一般的な予測モデルである。敗血症を含むより重篤な症状のために、多臓器機能障害スコア(MODS)(Marshall et al, 1995, Crit Care Med 23: 1638-1652)、臓器不全後遺症評価スコア(SOFA)(Ferreira et al, 2002, JAMA 286: 1754-1758)、及び論理的臓器機能不全スコア(LODS)(Le Gall et al, 1996, JAMA 276: 802-810)のような、更に専門的なモデルが開発された

10

20

30

40

50

。更に最近になって、特殊なモデルである P I R O (Levy et al, 2003, Intensive Care Med 29: 530-538) が提案された。これら全てのモデルは、患者の状態の重篤度及び生じ得る結果を反映する有用なスコアを誘導するように試みるために、広範囲の一般的及び特異的な臨床測定値を使用する。

【 0 0 1 2 】

上記で述べた標準の予測方法に加えて、特異的な診断及び予後試験を開発する観点から、敗血症と多くの特殊な血清マーカーとの間の相関が広範に研究されてきた。その中には下記のもが含まれる。

【 0 0 1 3 】

C - 反応性タンパク質 ( C R P ) は、炎症の非特異的マーカーとして周知の、肝臓由来の血清急性期タンパク質である。もっと最近になって (Toh et al, 2003, Intensive Care Med 29: 55-61)、リポタンパク質複合 C - 反応性タンパク質 ( L C C R P ) として知られるカルシウム依存性の C R P 及び超低密度リポタンパク質 ( V L D L ) の複合体が、敗血症の際の凝集機構への影響に参与することが示されている。特に、活性化された部分的なトロンボプラスチン時間として知られる共通試験は、敗血症の場合の特別なプロファイルを発生させ、これは迅速な診断試験のための基礎として提案されている。

10

【 0 0 1 4 】

T N F - 及び I L - 1 は、敗血症において上昇することが長年に亘って知られていた典型的な急性炎症性サイトカインであり (Damas et al, 1989, Critical Care Med 17: 975-978)、敗血症の重篤な合併症である成人呼吸困難症候群における臓器不全の有用な予測因子であることが報告されてきた (Meduni et al, 1995, Chest 107: 1062-1073)。

20

【 0 0 1 5 】

活性化された補体生成物 C 3 ( C 3 a ) 及び I L - 6 は、微生物侵入に対する宿主反応の有用な予測因子であり、発熱及び白血球カウントよりも優れていることが提案されてきた。分泌生ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> は、同じ研究において、信頼性のより低いマーカーであることが分かった。

【 0 0 1 6 】

プロカルシトニン は、カルシトニンのプロペプチド前駆体であり、その血清濃度は L P S に応答して上昇し、また I L - 6 及び T N F - のレベルと相関することが知られている。敗血症の予測因子としてのその使用が評価されてきた (Al-Nawas et al, 1996, Eur J Med Res 1: 331-333)。0.1 ng / mL の閾値を使用することにより、それは敗血症患者の 39% を正しく識別した。しかし、他の報告は、それが I L - 6 又は I L - 8 よりも優れているものの (Harbarth et al, Am J Resp Crit Care Med 164: 396-402)、一連の C R P 測定の使用よりも信頼性が低いことを示唆している (Neely et al, 2004, J Burn Care Rehab 25: 76-80)。

30

【 0 0 1 7 】

白血球活性化マーカー (例えば C D 1 1 b、C D 3 1、C D 3 5、L - セレクチン、C D 1 6) の好中球表面での発現の変化は、S I R S のマーカーとして使用されており、I L - 6 及びその後の臓器不全の発症と相関することが分かっている。同様に、C D 6 3、C D 6 2 P、C D 3 6 及び C D 3 1 のような血小板表面抗原の発現が調べられたが、信頼性のある予測モデルは構築されていない。

40

【 0 0 1 8 】

最後に、単球 H L A - D R 発現のダウンレギュレーションは、敗血症における劣悪な結果の予測因子であり、T N F - の産生を損なう単球不活性化の指標であり得ることが示されている。I F N - での治療が、このような場合には有益であることが示されている (Docke et al, 1997, Nature Med 3: 678-681)。

【 0 0 1 9 】

しかし、これらマーカーの多くが敗血症に関連しており、幾つかは状態の重篤さの指標を与えるが、未だ一つのマーカー又はマーカーの組合せが信頼性のある診断試験であること、ましてや敗血症発症の予測因子であることは示されていない。2001年国債敗血症

50

定義会議は、「敗血症を診断するためのバイオマーカーの使用は時期尚早である」と結論した (Levy et al, 2003, *Intensive Care Med* 29: 530-538)。

#### 【0020】

伝統的な臨床所見、臨床化学、生化学、免疫及び細胞数測定 of データを含む複雑な変数の組における経時的な変化から、信頼性のある診断パターン及び頑丈な予後の指標を抽出することは、洗練された分析方法を必要とする。医療診断用途のための、ニューラルネットワークを含む専門的システム及び人工知能の使用が以前に開発されている (Place et al, 1995, *Clinical Biochemistry* 28: 373-389; Lisboa, 2002, *Neural Networks* 15: 11-39)。上記で述べた APACHE スコア及び 1991 年の ACCP / SCCM・SIR S 基準 (Bone et al, 1992, *Crit Care Med* 20: 864-874) を用いた多変量ロジスティック回帰及びニューラルネットワークモデルを使用することによって、敗血症患者の生存を予測する試みにおいて特定のシステムが開発されている (Flanagan et al, 1996, *Clinical Performance & Quality Health Care* 4: 96-103)。このような研究は、両アプローチが共に良好な予測結果を与えることができるが、ニューラルネットワークシステムは、予め選択された閾値に対する感度がより低いことを示唆している (Rosenberg, 2002, *Curr Opin Crit Care* 8:321-330 によって論評された多くの研究の結果)。Brause et al (2004, *Journal fur Anaesthesie und Intensivbehandlung* 11: 40-43) は、敗血症の予測のために使用されるニューラルネットワークモデルの一例を提供している。このモデル (MEDAN) は、ある範囲の標準の臨床手段を分析し、その結果を APACHE II、SOF A、SAPS II、及び MODS モデルを使用することによって得たものと比較した。この研究は、利用可能なマーカーのうちで、最も情報価値があるのは収縮期血圧及び拡張期血圧、並びに血小板カウントであると結論付けた。

10

20

#### 【0021】

ニューラルネットワークは、複雑なデータシステムにおけるパターンを同定できる非線型関数である。これは、ネットワークがノイズデータ組内の構造を識別することを可能にする多くの数学的関数を使用することによって達成される。これは、システムからのデータが、該データ内の変数間の関係に基づいてパターンを作製し得るからである。ニューラルネットワークが、「トレーニング」として知られる期間にこのようなデータ点の十分な例を認識すれば、それはこの構造を「学習」することができ、次いで、更なるデータ点又は試験データにおいてこれらパターンを識別することができる。この方法において、ニューラルネットワークは、それが認識しているデータ内に存在するパターンをモデル化することによって、将来の例を予測又は分類することができる。次いで、該ネットワークが前記データ内の新しいパターンを首尾よく識別したことを示す高い精度スコアで試験データを正しく予測又は分類するその能力によって、該ネットワークの性能が評価される。ニューラルネットワークの並列処理能力は、そのプロセッシング素子のアーキテクチャに依存し、これら素子は生物学的ニューロンのモデルに従って相互作用するように構成される。プロセッシング素子内での刺激レベルを変化させるために、1 以上の入力接続重み (connection weight) によって調節される。前記プロセッシング素子の出力はその活性化レベルに関連しており、該出力は非線型であってもよく、又は不連続であってもよい。従って、ニューラルネットワークのトレーニングは、前記素子の移送機能、該相互接続構造の詳細、及び当該システムが従う学習の規則に依存した、相互接続重みの調節を含んでいる (Place et al, 1995, *Clinical Biochemistry* 28: 373-389)。このようなシステムは、外傷患者の健康結果モデルを含む多くの臨床状況に適用されてきた (Marble & Healy (1999) *Art Intell Med* 15: 299-307)。

30

40

#### 【0022】

Warner et al (1996, *Ann Clin Lab Sci* 26: 471-479) は、多層フィードフォワードニューラルネットワークモデルの四つの入力の成分として、「敗血症ショック因子」(患者が本人の認めるところにより敗血症ショックの徴候を有するかどうか)、IL-6、可溶性 IL-6 受容体 (酵素結合免疫吸着試験による測定として)、及び APACHE II スコアの測定値を使用して、敗血症の結果を予測するための多重パラメータ方法を記載し

50

ている。しかし、このシステムは、未だ臨床的徴候を有していない個体については予測性がなく、また議論の余地はあるが、IL-6のようなサイトカインの血清レベルが上昇するときまでには、診断（結果でないにしても）は臨床的に明らかである。

【0023】

Dybowski et al (1996, Lancet 347: 1146-1150) は、分類及び回帰ツリー (CART) を使用して、157の可能な敗血症予測基準からの入力を選択し、次いで、遺伝子アルゴリズムを実行するニューラルネットワークを使用して、予測的なマーカーの最良の組合せを選択する。これらは、血清又は細胞表面バイオマーカーよりも、むしろ多くのルーチンの臨床値及び代理指標を含んでいる。しかし、取扱われている問題は、既に敗血症の明瞭な診断を有し、且つ既に決定的に病気である患者の予後である。

10

【0024】

遺伝子アルゴリズムのアプローチの更なる改良は、人工免疫系の使用を含んでおり、その一つのバージョンは人工免疫認識系 (AIRS) であり (Timmis et al, An overview of Artificial Immune Systems. In: Paton, Bolouri, Holcombe, Parish and Tateson (eds.) "Computation in Cells and Tissues: Perspectives and Tools for Thought", Natural Computation Series, pp51-86, Springer, 2004; Timmis (L.N. De Castro and J, Timmis. Artificial Immune Systems: A New Computational Intelligence Approach. Springer-Verlag, 2002)、これは人工知能に適用される生物学的免疫系のクローン選別及び親和性成熟処理によって触発された順応系である。

20

【0025】

免疫学的に言えば、AIRSは、免疫系のクローン選別理論によって触発される (F. Burnett. The Clonal Selection Theory of Acquired Immunity. Cambridge University Press, 1959)。このクローン選別理論は、適合、クローニング、変異及び選別のプロセスを通して、如何にして感染物質を認識できる抗体が作製されるかを説明しようと試みている。AIRSは、このプロセスを利用して、適合、クローニング及び変異のプロセスを通して、未経験のデータ項目のための分類子として使用できる一組の記憶検出体を発生させる。陰性選別のような免疫に触発される他のアプローチとは異なり、AIRSは、分類において、より詳細にはワンショット管理された学習に使用するために特別に設計される。

30

【0026】

米国特許出願2002/0052557は、患者の心拍速度の変動に基づいて、多くの破滅的な病気の発症を予測する方法を記載している。ここでも、ニューラルネットワークが、データをモデル化及び分析する可能な方法の一つである。

【0027】

国際特許出願WO00/52472は、CD11b又は「CD11b複合体」(Mac-1、CR3)の血清もしくは好中球表面レベルに基づいて、幼児において使用するための迅速なアッセイ方法を記載している。この方法は、単一のマーカーだけを使用し、その一つは、議論の余地は残るが、炎症への応答における好中球活性化の周知のマーカーである。

40

【0028】

このような複雑なデータ組（ここでのデータは、定量的かつ連続的であるよりも、定性的かつ不連続であることが多い）を分析するための別のアプローチは、ロジスティック回帰法のような、洗練された統計的解析技術を使用することである。定性的な二元従属変数を使用するロジスティック回帰が、有意な変数を選択することに関して不十分に差別的であるときは、多変量技術が使用されてよい。多変量ロジスティック回帰モデル及びニューラルネットワークの両方からの出力は連続的な変動量であるが、ニューラルネットワークモデルによって計算される見込みは、通常は一方の極端又は他方の極端にあり、僅か数個の値だけが中間領域に入る。臨床的な状態において、これは屢々有用であり、より明瞭な決定を与えることができる (Flanagan et al, 1996, Clinical Performance & Quality Health Care 4: 96-103)。

50

## 【 0 0 2 9 】

感染及び / 又は敗血症の最も初期の徴候を検出する能力は、できるだけ早期の治療を可能にする点で明らかな利益を有している。状態の重篤度及び治療しなかったときの起こりうる結果の指標は、治療オプションに関する決定を知らせる。これは、集中治療を受けている人、又は火傷を負ったもしくは免疫障害のある人のような無防備な入院集団、又は深刻な感染及びその後の敗血症の増大したリスクが存在する他のグループの両方に関連している。戦場及び市民環境の両方における生物兵器の使用又は疑われる使用は、露出されたこ他における感染の初期徴候について試験するための迅速且つ信頼性のある手段が有利である場合の一例である。

## 【 0 0 3 0 】

( 発明の説明 )

感染の後、免疫系の細胞は、活性化に至ることにより病原体を認識し応答する。これは異なるメッセンジャータンパク質 ( 例えばサイトカイン及びケモカイン ) の産生、及び細胞表面の活性化マーカー及び接着分子の発現をもたらす ( 図 1 )。これらの産生は、細胞間の情報交換を促進し、特定の物質に対する調和された免疫応答をもたらす。この炎症性免疫応答は、感染に対する応答において比較的一定であり、疾患プロセスの極めて早期の段階に生じるので、このようなマーカー発現の変化をモニターすることにより、敗血症発症の初期の段階が予測される。本発明の目的は、初期の段階、好ましくは介入の治療窓の間、臨床症状及び疾患の発生の前に、重篤な感染を検出する手段を提供することである ( 図 1 )。

## 【 0 0 3 1 】

第一の側面において、本発明は、臨床的徴候が現れる数日前に、感染、SIRS又は敗血症の初期徴候を検出するシステム及び方法を記述する。また、該状態の臨床的経路のタイミングを予測できる方法を提供する。当該システムは、生物学的サンプル、好ましくは血液サンプルに基づいて、1以上の組の試験結果を分析することを含んでなるものである。任意に、ルーチンの他の臨床的測定値を分析に含めてもよい。

## 【 0 0 3 2 】

第一の組の試験は、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 ( RT - PCR ) によりサイトカイン mRNAを増幅することによって、血液中の白血球におけるケモカイン及びサイトカインのパネルの発現レベルを決定することを含むものである。この群には、CD178 ( FAS - L )、MCP - 1 ( 単球ケモスタティックタンパク質 - 1 )、TNF -  $\alpha$ 、IL - 1 $\beta$ 、IL - 6、IL - 8、IL - 10、INF -  $\gamma$  及び INF -  $\gamma$  が含まれる。CD178は、II型膜タンパク質としてコード化及び発現されるが、メタロプロテアーゼにより開裂されて可溶性ホモトリマー、可溶性の FasL又は sFasLを放出するので、サイトカインと看做されてよい。

## 【 0 0 3 3 】

第二の組の試験は、HLA - DR、CD54、CD11b、CD31、CD69、CD80、CD62L ( L - セレクチン )、CD25及びCD97を含んでなる表面マーカー群の細胞表面発現を決定することを含んでいる。これは標準の方法、好ましくは、細胞を特異的な標識を付した抗体又はその断片でラベルし、フローサイトメトリーにより分析することによって行われてよい。

## 【 0 0 3 4 】

当該分析に含めてよい第三の組の試験には、温度、心拍速度、白血球細胞の合計数及び区別された数 ( 単球、リンパ球、顆粒球、好中球 )、血小板数、血清クレアチニン、尿素、乳酸塩、塩基過剰、 $pO_2$ 、 $HCO_3^-$ 、及びC - 反応性タンパク質を含んだルーチンの臨床データが含まれる。

## 【 0 0 3 5 】

好ましくは、サンプルを収集した患者が敗血症を発症することについての、イエス / ノー予測を計算することを可能にするニューラルネットワークプログラムによって、1以上の組の試験結果が分析される。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 3 6 】

陽性の予測の場合、好ましくは、次に顕性の臨床的徴候及び症候群の発症までの時間に関する評価を行うことを可能にするように、更なる分析が行われる。或いは、両方の分析を多変量ロジスティック回帰によって行ってよい。

## 【 0 0 3 7 】

試験群の分析は、個別に又は同時に行うことができる。好ましくは、PCRデータに対する補充データとして、臨床データがニューラルネットに入力される。同時に、フローサイトメトリーのデータを、該ニューラルネットワークによって処理することができる。該ニューラルネットを介した処理のためには一組のデータだけが必要とされるが、これら追加の例のような三つのデータ組の一つ、二つ、又は全てを入力することには、当該ニューラルネットワークを「トレーニングし」、該プログラムからの出力における信頼性を改善する利点が存在する。

10

## 【 0 0 3 8 】

更なる側面において、当該ニューラルネットワークは、予め記録された臨床データを処理するために使用され、或いは、このようなデータのデータベースは、当該ニューラルネットワークをトレーニングしてその予測能力を改善するために使用されてもよい。

## 【 0 0 3 9 】

当該方法は、集中治療患者のルーチンモニタリングの一部として使用されてよく、ここでは正規の血液サンプルが他の目的のために採取される。感染及び/又は敗血症の素因を与えられる他の入院患者も、モニターされてよい。このような素因を与える条件には、遺伝的又は後天的免疫不全(HIV/AIDSを含む)、又は免疫抑制剤(例えば一般の手術患者、移植のレシピエント又はステロイド治療を受けている患者)、糖尿病、リンパ腫、白血病、又は他の悪性疾患、貫通性もしくは汚染された外傷、火傷又は腹膜炎が含まれる。もう一つの側面において、本発明の方法は、感染症の大発生の際に個体をスクリーニングするために、或いは、バイオテロ又は武力衝突の際の生物兵器使用の結果として、偶発的であっても故意であっても、感染性病原体に露出されたか、又は露出されたことが疑われる個体をスクリーニングするために使用されてよい。

20

## 【 0 0 4 0 】

従って、本発明は、感染、SIRS又は敗血症の初期段階を検出するために生物学的サンプルをスクリーニングするための方法であって：RT-PCRにより一組の情動的に有用なバイオマーカーの発現を検出し、及び/又はフローサイトメトリーにより一組の情動的に有用な(informative)細胞表面バイオマーカーを検出し、及び/又は一組の標準の臨床測定値をモニターする工程と；ニューラルネットワーク又は多変量統計解析により前記検出の結果を分析する工程と；明白な感染の発症の可能性及びタイミングに従って、サンプルを前記サンプルを分類する工程とを含んでなる方法を提供する。

30

## 【 0 0 4 1 】

好ましくは、前記生物学的サンプルは血液サンプルである。更に好ましくは、前記RT-PCR及び/又はフローサイトメトリー及び/又は標準の臨床測定の結果が、第一の分析にかけられて、SIRS又は感染症の発症に関する予測を生じる。一つの別の実施形態において、これは確率として表現される。別の実施形態において、それはイエス/ノーの二者択一の結果として表現される。

40

## 【 0 0 4 2 】

必要に応じ、第一の分析によりSIRSもしくは敗血症の可能性があることが示唆されるときは(予め定められた任意の閾値確率を越えるとき、又は「イエス」の予測として定義される)、前記結果は第二の分析にかけられて、明白な臨床的徴候の発症までの可能な時間、又は臨床的疾患のあり得る重篤度の徴候を与えるまでの可能な時間が決定される。

## 【 0 0 4 3 】

好ましくは、情動的に価値のある一組のバイオマーカー(その発現はRT-PCRによって検出される)は、CD178(FasL)、MCP-1(或いはCCL-2として知られる)、TNF、IL-1、IL-6、IL-8、IL-10、INF-及びINF

50

- からなる群から選択される少なくとも四つ、好ましくは少なくとも六つ、更に好ましくは少なくとも七つ、最も好ましくはその全部からなる。

【0044】

或いは、その発現がフローサイトメトリーによって検出される前記一組の情動的に有用な細胞表面バイオマーカーは、CD31、HLA-DR、CD54、CD11b、CD62L、CD25、CD69、CD80及びCD97からなる群から選択される少なくとも一つ、好ましくは少なくとも二つ、もっとも好ましくは少なくとも三つからなる。

【0045】

標準の臨床的測定が分析されるときは、これらは温度、心拍速度、白血球細胞の合計数及び区別された数(単球、リンパ球、顆粒球、好中球)、血小板数、血清クレアチニン、尿素、乳酸塩、塩基過剰、 $pO_2$ 、 $HCO_3^-$ 、及びC-反応性タンパク質からなる群から選択される少なくとも一つ、好ましくは三つ、最も好ましくは少なくとも五つからなっている。

10

【0046】

一つの極めて好ましい実施形態において、前記分析は、ニューラルネットワークによるものである。最も好ましくは、それは多層パーセプトロン・ニューラルネットワークである。

【0047】

好ましくは、このようなニューラルネットワークは、症例の70%超、より好ましくは症例の少なくとも80%、更に好ましくは症例の少なくとも85%、最も好ましくは症例の少なくとも95%で、SIRS又は敗血症を正確に予測することができる(コントロール群でのこのような発症が予防的治療により予防されない場合の試験において決定される)。SIRS又は敗血症は、明らかな臨床的徴候の少なくとも1日前、より好ましくは少なくとも2日前、更に好ましくは少なくとも3日前、最も好ましくはSIRS又は敗血症が診断される4日以上前に予測できることが好ましい。

20

【0048】

もう一つの好ましい実施形態では、分析は、多変量の統計的解析、好ましくは主成分解析及び/又は判別関数解析によるものである。多変量の統計的解析は、判別関数解析を含んでなることが更に好ましい。

【0049】

更なる側面において、本発明は、初期段階の感染、SIRS又は敗血症を検出するために生物学的サンプルをスクリーニングするためのシステムであって：前記サンプルから得た細胞からRNAを抽出及び精製する手段と、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)により選択されたRNA配列を増幅するためのサーマルサイクラー又は他の手段と、前記RT-PCRの結果を検出及び定量する手段と、このような結果を分析できるようにトレーニングされたコンピュータに基づくニューラルネットワークと、それによってニューラルネットワーク解析の結果がオペレータに伝達され得るディスプレイ手段とを具備してなるシステムを提供する。

30

なお、この側面において、RT-PCRの結果は判別関数解析を使用して解析されてもよいが、ニューラルネットワークが好ましい実施形態である。

40

【0050】

或いは、システムは、生物学的サンプルから得られた細胞上の特定の細胞表面マーカーを標識し、且つ前記マーカーの発現を定量する手段と、前記標識及び定量の結果を検出及び定量する手段と、このような結果を解析できるようにトレーニングされたコンピュータに基づくニューラルネットワークと、それによってニューラルネットワーク解析の結果がオペレータに伝達され得るディスプレイ手段とを具備する。好ましくは、前記標識することは、標識された抗体又は抗体断片によるものであり、また前記定量は蛍光で活性化された細胞ソーティング(FACS)又は他の形態のフローサイトメトリーによるものである。

【0051】

50

好ましくは、前記システムは、RT-PCR及びFACS分析の両方のための手段を具備し、より好ましくは、他のルーチンの臨床試験結果も解析でき、これら全ての結果をその解析に組み込むことができる。

【0052】

更なる側面において、本発明は、SIRS、敗血症もしくは感染を診断するための診断手段を調製するための、上記で述べた方法の何れかの実施形態に従う解析、又は感染を診断するための診断手段を調製するための上記で述べたシステムの使用を提供する。

【0053】

また、上記で述べた方法に従って、SIRS、感染又は敗血症を早期診断する方法も提供される。

【0054】

(発明の詳細な説明)

以下、図面及び実施例を参照して、本発明を更に詳細に説明する。

実施例1： サイトカイン発現、細胞表面マーカー及び臨床測定値のニューラルネットワーク解析による敗血症の予測

<研究設計及び患者>

クイーンアレクサンドラ病院ICU部門からの敗血症の発症についての研究は、91人の患者集団をもたらした(Dstl/CR08631)。血液サンプルは、ICUに滞在している全期間に亘ってこれら患者から毎日採取され、合計で24人の患者が敗血症を発症していると診断された。臨床的敗血症が診断された当日に採取されたサンプル(0日)は、敗血症診断の6日前(-6日)まで遡って、RT-PCR及びフローサイトメトリーにより、活性化マーカー及びサイトカインmRNAの発現について分析された。加えて、標準の病院データ及び臨床所見が記録された。伝統的な統計分析のためのデータを提供するために、対照患者からのサンプルもまた同じ方法で処理された。

【0055】

RT-PCRは、通常使用される実験室技術に従って行った。簡単に言えば、血液サンプルの場合、全血を採取し、次いでRNA安定化剤の存在下で細胞を溶解する。RNAは、ビーズの親和性結合によって分離され、該ビーズは遠心分離(又は適切なきときは磁氣的に)により単離され、汚染物のDNAはDNase消化により除去され、RNAはRT-PCRにかけられる。

【0056】

蛍光活性化された細胞ソーティング(FACS)フローサイトメトリーは、当該技術において極めて周知であり、また如何なる標準技術を使用してもよい。

【0057】

<データ解析>

生物学的システムの複雑さ、及びこの研究に使用されるマーカー間の複雑な関係は、データ解析の標準の線型技術に不確かな結果を生じさせる。結局、当該データの中に如何なるパターンが存在するかが不明瞭であり、データ組の複雑さに対処するために、非線型モデリングが可能な更に強力な技術が探究された。

【0058】

解析のために、患者からのデータは敗血症の発生の1~4日前に照合され、敗血症を発症しなかったICU患者からなる年齢/性別の合致する対照群と比較された。個別のサンプルは、56以下の異なるパラメータを測定するデータを提供し、選択された変数の組合せが、多層パーセプトロンニューラルネットワーク(Proforma, Hanon Solutions, Glasgow, Scotland)に供給された。

【0059】

各ネットワークは、逆行性伝播アルゴリズムを使用して、バランスされた敗血症及び対照データのランダムな70%選別でトレーニングされ、次いでデータの残りの30%を用いて試験した。このネットワーク内のデータをモデリングすることを狙って5回の試みが行われたが、各モデルは当該データに対して一般化する能力において相違した。最も成功

10

20

30

40

50

したモデルは、敗血症群又は非敗血症対照群の何れかである以前に会ったことのない患者を、最も正確に分類できるものであった。

【 0 0 6 0 】

< 結果 >

表 2 は、試験患者を正確に分類し、又は 2 9 / 3 5 ( 又は 8 2 . 9 % ) と評価された成功モデルの一例を示している。

【表 1】

表 2 : サイトカイン m R N A 変数を使用した分類読取り値 ( 1 ~ 4 日 )

	スコア	正確に予測された サンプルの%
合計患者	29/35	82.9%
対照患者	16/20	80.0 %
敗血症患者	13/15	86.7%

10

このモデルにおける信頼性を増大させるために、これは、各回において当該ネットワークをトレーニング及び試験するためのデータのランダムな異なる選択を使用して 5 回行われた。完了したら、患者を正確な敗血症群又は非敗血症の対照群に分類するネットワーク能力の全体の指標を与えるために、個々のモデルについてのスコアを平均した。

20

【 0 0 6 1 】

下記の表 3 に示すように、一連の 5 つのデータベースは、約 8 0 % の予測平均精度を与える。

30

【 0 0 6 2 】

## 【表 2】

表 3 : RT-PCRデータだけを使用して敗血症を予測するニューラルネットワーク  
(5プロジェクトの分類特性解析)

	ヒット/発生	%	ヒット/予測	%	チャンス %	改善 %	比率
モデル 1							
状態	23/27	85.2	N/A	N/A	50.0	35.2	1.7:1
敗血症	9/13	69.2	9/9	100.0	48.1	51.9	2.1:1
対照	14/14	100.0	14/18	77.8	51.9	25.9	1.5:1
モデル 2							
状態	29/35	82.9	N/A	N/A	50.0	32.9	1.7:1
敗血症	13/15	86.7	13/17	76.5	42.9	33.6	1.8:1
対照	16/20	80.0	16/18	88.9	57.1	31.7	1.6:1
モデル 3							
状態	32/40	80.0	N/A	N/A	50.0	30.0	1.6:1
敗血症	20/22	90.9	20/26	76.9	55.0	21.9	1.4:1
対照	12/18	66.7	12/14	85.7	45.0	40.7	1.9:1
モデル 4							
状態	21/26	80.8	N/A	N/A	50.0	30.8	1.6:1
敗血症	9/12	75.0	9/11	81.8	46.2	35.7	1.8:1
対照	12/14	85.7	12/15	80.0	53.8	26.2	1.5:1
モデル 5							
状態	23/29	79.3	N/A	N/A	50.0	29.3	1.6:1
敗血症	12/15	80.0	12/15	80.0	51.7	28.3	1.5:1
対照	11/14	78.6	11/14	78.6	48.3	30.3	1.6:1

$$128 / 157 = 81.5\%$$

$$79.3 + 85.2 + 80 + 82.9 + 80.8 = 408.2 / 5 = 81.64\%$$

## 【 0 0 6 3 】

表 4 は、異なる変数の組み合わせを使用して構築された、ある範囲のネットワークについての平均された予測精度値を列記している。

最も成功したモデルは、フローサイトメトリーデータからの CD 3 1 発現 % と組み合わせてサイトカイン mRNA 発現を使用して構築され ( 8 1 . 0 % 精度、表 3 のモデル 1 )、臨床データもまた高いスコアになった ( 8 0 . 4 %、表 3 のモデル 2 )。

## 【 0 0 6 4 】

10

20

30

40

50

## 【表 3】

表 4：ニューラルネットワーク解析からの結果

モデル	マーカー	予測精度 (%)
1	FasL, MCP-1, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10	81.6
2	クレアチニン, 単球, CRP, リンパ球, 温度, 好中球, 白血球数	80.4
3	FasL, MCP-1, IL-8, 白血球数, 温度, クレアチニン	79.0
4	FasL, MCP-1, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 & IL-10, %CD31 & クレアチニン	78.7
5	FasL, TNF- $\alpha$ , IL-1?, IL-6, IL-8 & IL-10	78.1
6	FasL, MCP-1, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, クレアチニン, 単球, CRP, リンパ球, 温度, 好中球, 白血球数	76.0
7	MCP-1, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10	76.0
8	血小板, HCO <sub>3</sub> , PO <sub>2</sub> , 尿素, クレアチニン, 心拍速度	70.7

10

## 【0065】

我々の予測モデルを更に試験するために、我々は、当該ネットワークを臨床症状の開始の1～4日前に得られたサイトカインデータの100%までについて、該ネットワークをトレーニングした。次いで、我々は「0日」敗血症患者、-5日及び6日からの敗血症患者を含む試験データを選択した。0日、5日及び6日からの敗血症患者を含む試験データを選択し、また別のボランティア研究からの14人の対照患者も選択し、そのうちの7人がサンプリングの9日以内に上部気道感染（URTI）の症状を発症した（Dst1/CR08631）。その結果を下記の表5に示す。

20

## 【0066】

## 【表 4】

表 5：他の群の予測におけるサイトカイン mR NAモデル（-4日～-1日）の特性

試験セット	スコア	正しく予測されたサンプルの%
0日敗血症	8/9	89%
-5日敗血症	7/9	78%
-6日敗血症	5/6	83%

30

この表は、臨床的敗血症の発症の4日前までの敗血症患者によって発現されたパターンから構築された我々のモデルが、0日の敗血症患者の89%、-5日の敗血症患者の78%、-6日の敗血症患者の83%を正しく同定又は「スコアリング」したこと示している。ニューラルネットワークを使用した全体の分析は、敗血症についての多くの予測モデルの作製を導いた。サイトカインデータのみを使用して構築されたモデルは、敗血症を発症するであろう個体とそうでない個体とを、一貫して成功裏に識別できることを立証した。

40

## 【0067】

実施例 2：ニューラルネットワークモデルを使用すると、非敗血症ボランティアからの擬陽性結果は存在しない

表 6 は、サイトカイン RT-PCR によってボランティア群を試験した結果を示しており、SIRS 又は敗血症の兆候を発症した者はいなかった。

## 【0068】

50

## 【表 5】

表 6

名称	ヒット/発生	%	ヒット/予測	%	チャンス	改善	比率
合計	13/13	100.0	N/A	N/A	50.0%	50.0%	2.0:1
対照	13/13	100.0	13/13	100.0	100.0%	0.0%	1.0:1
敗血症	0/0	N/A	0/0	0.0	0.0%	0.0%	N/A

## 【0069】

10

実施例 3： 臨床データを使用した、90%超の精度でのニューラルネットワーク敗血症予測

ニューラルネットワークモデルは、表 4 のモデル 2 に定義された臨床データ組を使用し、下記の表 7 に記載され且つ図 3 に更に示されたパラメータを使用して試験された。

## 【0070】

## 【表 6】

表 7： 臨床データを解析するためのニューラルネットワークパラメータ

入力から隠蔽へのウエイト					
入力	ユニット 1	ユニット 2	ユニット 3	ユニット 4	ユニット 5
1	-3.04389	0.783085	-8.14579	-5.31918	-11.699
2	-2.40492	-3.28341	6.81119	-2.22889	10.3357
3	2 0.0835039	-2.25136	15.2575	-3.38677	11.4842
4	-16.2918	3.45666	-5.86258	8.93773	-1.57967
5	12.7828	4 5.2618	6.36791	7.45053	17.1156
6	34.3201	7.31471	-18.392	16.806	10.2057
7	-3.31337	-1.41443	-10.2639	-3.68324	1.4483
バイアスから隠蔽へのウエイト					
1	-0.407035	-9.38879	4.06257	-12.6877	-10.7582
隠蔽から出力へのウエイト					
1	-8.79483	8.82026			
2	8.79794	-8.38064			
3	3.60783	-3.62177			
4	3.00073	-3.83778			
5	4.85609	-4.85559			
バイアスから出力へのウエイト					
1	-2.64015	2.65373			

20

30

## 【0071】

40

## 【表 7】

表 8

名称	ヒット/発生	%	ヒット/予測	%	チャンス	改善	比率
状態	14/15	93.3	N/A	N/A	50.0%	43.3%	1.9:1
敗血症	8/8	100.0	8/9	88.9	53.3%	35.6%	1.7:1
対照	6/7	85.7	6/6	100.0	46.7%	53.3%	2.1:1

## 【0072】

実施例 4： 人工免疫認識系の使用

50

## &lt; 描写 &gt;

初期のAIRS (A. Watkins. An Artificial Immune Recognition System. Mississippi State University: MSc Thesis., 2001) は、単純な実数値形状空間を使用した。最近になって、他の人々は、該表現をハミング形状空間 (J. Hanamaker and L. Boggess. The effect of distance metrics on AIRS. In Proc. Of Congress on Evolutionary Computation (CEC). IEEE, 2004) 及び自然言語 (D. Goodman, L. Boggess and A. Watkins. "An investigation into the source of power for AIRS, an artificial immune classification system". In Proc. Int Joint Conference on Neural Networks, pp1678-1683. IEEE, 2003) へと拡張した。AIRSは、学習されるデータのベクトル、刺激レベル及び資源の数を含む一組の人工認識ボール (ARBS) を維持している。トレーニングに際しては、ARBにおけるデータベクトルのトレーニング項目に対する親和性を評価することにより刺激レベルが計算され、一致が強いほど刺激は大きい。この刺激レベルを使用して、ARBがどれだけ多くのクローンを産生するかが指示され、またARBの生存に影響を与える。

10

## 【0073】

## &lt; 親和性の尺度 &gt;

これは、用いられる表現に依存する。ハミング距離、ユークリッド距離等を含む、AIRSに使用するための多くの親和性尺度が提案されてきた。この研究では、ユークリッド距離及びハミング距離の両方の尺度を使用した。ユークリッド距離が最良の結果を与えた。

20

## 【0074】

## &lt; 免疫アルゴリズム &gt;

本質的に、AIRSは二つのポピュレーション、即ち、記憶プール及びARBプールCを発生させる。それは別々のトレーニング段階及び試験段階を有しており、試験段階はk-最近接分類子に類似している。トレーニング段階の際に、トレーニングデータ項目がMに提示される。この組はランダムに播種することができ、実験的証拠は、AIRSが初期の開始点に対して非感受性であることを示唆するであろう。トレーニング項目は、組Mにおける全ての記憶細胞に対して適合され、高適合M Cmatchとして一つの細胞が同定される。次いで、このM Cmatchはクローニングされ、突然変異される。クローニングは刺激に比例して行われ (刺激が高いほどクローン率が高い)、突然変異は反比例する (刺激が高いほど突然変異率は低い)。これらのクローンは、ARBプールCに挿入される。次いで、トレーニング項目がARBプールのメンバーに提示され、ここでは、新しい候補記憶細胞のクローニング及び突然変異を許容する反復法が採用される。ARBが請求できる多くの資源によって生存が指令されるポピュレーション制御のプロセスを通して、新たな候補記憶細胞が作製される。この機構は、J. Timmis and M. Neal. A Resource Limited Artificial Immune System. Knowledge Based Systems 14(3/4): 121-130, 2001に提案された資源割当てアルゴリズムに基づいている。この新たな候補は、トレーニング項目を用いてM Cmatchに対して比較される。該候補細胞とM Cmatchとの間の親和性が高ければ、該記憶細胞は該候補細胞で置換えられる。

30

## 【0075】

このプロセスは各トレーニング項目について行われ、その際に、記憶組は分類のために使用できる多くの細胞を含むであろう。未知のデータ項目の分類は、k-最近接法で行われる。

40

## 【0076】

## &lt; 実験設定 &gt;

このデータ組へのニューラルネットワークの適用に匹敵する実験手順を使用するための試みがなされた。全ての研究において、マーク: a s L、M C P - 1、T N F - 、I L - 、I L - 6、I L - 8及びI L - 10が使用された。しかし、ニューラルネットワーク研究の際のデータの予備処理に関する不完全な情報に起因して、データ組を完全に正確に再現することは不可能であった。

50

## 【 0 0 7 7 】

## 実験 1

最初の組の実験では、敗血症の発症の1日～4日前に患者から収集したデータを、対照組の患者からのデータと共に、トレーニングデータとして使用した。詳細に言えば、敗血症の兆候を示した患者についての、1日、2日、3日及び4日からの組み合わせられたデータを使用し、またAIRSをトレーニングするために、対照患者のランダムな集合を使用した。合計で59のトレーニングデータ項目を使用した。AIRSを試験するために、対照群からの患者のランダムな集合及び全ての日からの組み合わせられたデータ(トレーニングプロセスに使用したデータは排除した)が使用された。合計で34の試験データ点を使用した。AIRSのための設定が表9に示されている。

10

## 【 0 0 7 8 】

## 【表 8】

表9：AIRSのためのパラメータ設定

パラメータ	設定
エポック	
クローン率	10
突然変異率	0.8
母集団の初期サイズ	5
親和性閾値	0.2
刺激閾値	0.8
資源の数	200

20

## 【 0 0 7 9 】

## 実験 2

我々の第二の組の実験のために、患者は、0日、5日及び6日についてのデータを使用して敗血症の兆候を示した患者、及び対象患者に分類された。AIRSシステムは、実験1について使用したのと同じデータを使用する一方、同じパラメータを使用してトレーニングされた。

30

## 【 0 0 8 0 】

## &lt; 結果 &gt;

結果は、当初の報告からは、データが如何にして数日の期間に亘って最初に組み合わせられ、次いでトレーニング及び試験の組に分割されたかを正確に確認するのが困難であったので、ニューラルネットワーク解析から得られた結果と直接比較可能なものではない。従って、得られた結果は、これを念頭において考慮されるべきである。

## 【 0 0 8 1 】

## 実験 1

AIRSアルゴリズムの10回の独立した実行を行い、次いで平均及び標準偏差を計算する。AIRSは、平均で73(2.93)%の分類精度を達成できることが分かった。これは、(同じマーカーを用いた)ニューラルネットワーク解析よりも約10%低い。しかし、直接比較での配慮がとられるべきである。

40

## 【 0 0 8 2 】

## 実験 2

ここでも再度、AIRSアルゴリズムの10回の独立した実行が行われ、平均及び標準偏差がとられた。このときは、敗血症の発症前の先行日(0、5及び6)、及び対照群が解析された。ここでも、AIRSは、1日～4日からとられたデータ及び対照群に対してトレーニングされた。これらの結果が表10に提示される。

50

【 0 0 8 3 】

【 表 9 】

表 1 0 : 他 の 群 に お け る 予 測  
(括弧内は標準偏差)

試験組	精度
0日敗血症	83 (7.6) %
5日敗血症	93 (6.1) %
6日敗血症	91 (8.2) %
対照	70 (12.8) %

10

【 0 0 8 4 】

表 1 0 から分かるように、A I R S は高パーセンテージで敗血症の症例を同定する（5日及び6日におけるニューラルネットワークの性能を凌ぐことができるが、この場合も比較警告を伴う）。対照群も同様に明瞭ではなく、予測された結果よりも低く、ニューラルネットワークアプローチよりも顕著に低い。これは、トレーニングのために利用可能なデータの量が非敗血症の場合よりも大きいことに起因して、A I R S が敗血症患者の方にバイアスされた事実による可能性がある。

【 0 0 8 5 】

&lt; 結論 &gt;

20

A I R S は、敗血症の潜在的な症例を予め識別でき、また一定のレベルにおいてニューラルネットワークアプローチに匹敵するように思える。

【 0 0 8 6 】

実施例 5 : 敗血症を予測するための C D 3 1 発現の使用

&lt; 研究設計及び患者 &gt;

実施例 1 参照

&lt; フローサイトメトリー &gt;

血液をヘパリンナトリウム容器 (HM&S, Chessington, Surrey) の中に採取し、室温で実験室に輸送した。100 µL アリコート of 血液と免疫蛍光染料とを、製造業者 (Beckman Coulter limited, High Wycombe, Buckinghamshire, and Becton Dickinson UK Limited, Cowley, Oxford) が推奨する容積を使用して混合した。C D 3 及び C D 4 についての同時染色により T ヘルパー細胞を識別し、また C D 3 及び C D 8 の両方について染色することにより T 細胞毒性細胞を同定した。これらの細胞集団は、H L A - D R、C D 2 5、C D 5 4 及び C D 6 9 について染色された。B 細胞は、C D 1 9 について染色することにより同定され、C D 8 0、C D 8 6、C D 2 5、C D 5 4 で調査された。ナチュラルキラー細胞は、C D 5 6 を染色することによって識別され、C D 1 1 b、C D 2 5、C D 5 4 及び C D 6 9 と共にインターロゲートされた。単球集団は、C D 1 4 についての染色により選択され、これらの細胞は C D 1 1 b、C D 5 4、C D 8 0、C D 8 6 及び H L A - D R 染色を用いてプローブされた。顆粒球集団を同定するためにはゲーティングが使用され、これは C D 1 1 b、C D 6 9、C D 3 1、C D 5 4 及び C D 6 2 L について染色された。この染料は、室温で 2 0 分間インキュベートされた。500 µL のオプティライズ (Optilyse) C (Beckman Coulter limited) を各々の管に添加し、直ちに渦混合した。このサンプルを、室温で 1 0 分間インキュベートして赤血球を溶解し、次いで染色を固定するために 500 ミクロンのイソトン (Isoton; Beckman Coulter limited) を添加した。この管を直ちに渦混合し、室温で 1 0 分間インキュベートした。次いで、フローサイトメータ (Beckman Coulter Epics XL System 2) 上で細胞を計数した。

30

40

【 0 0 8 7 】

&lt; 統計学 &gt;

データは、S P S S ソフトウェアパッケージ 1 1 . 0 版上での二変量ロジスティック回帰モデルを使用して分析された。この分析は、免疫モジュレータ発現についての対照群の

50

平均を、7つの時点（診断の6、5、4、3、2、及び1日前、及び診断の当日である0日）で敗血症患者から得た平均と比較した。データ点が失われた場合は、許容可能なn値を維持するために、当該群についての平均値で置換された。当該モデルからの結果は、置換されたデータ点が、可能な予測子として当該モデルにより強調されたマーカーを含まなかったときにのみ報告された。

#### 【0088】

##### <結果>

該データの分析により、予測子効果 = 0.114の弱い証拠が存在することが分かった。CD31の減少した発現は、診断3日前の敗血症の可能な予測子であることが示された  $p = 0.037$  ( $n = 6$ )。診断の6日前について得られた結果は、この日のサンプルサイズが小さいため ( $n = 4$ )、確定的ではなかった。診断の5、4、2又は1日前、又は診断の当日については、統計的に有意な予測子は見つからなかった。

10

#### 【0089】

##### <結論>

敗血症の発症前の患者、及びこの疾患を発症しなかった患者から得られたフローサイトメトリーデータが照合された。敗血症の診断以前の日における患者からの結果を使用して群が構築され、対照群は敗血症を発症しなかった年齢の一致する患者から得た測定値からなるものであった。中間値ならびに第90及び第10百分位棒を表示するグラフの調査は、データの広がりのために解釈が困難であり、従って統計的解析が行われた。

20

#### 【0090】

このための生データをプロットすると（図2参照）、6人の敗血症患者のうち4人（66.6%）が対照群よりも低いCD31発現を有していた。対照群（非敗血症）のデータ点は11.8%～100%に分布する一方、診断の3日前の6データ点のうち4データ点は9%未満であったことが見て取れる。従って、CD31は、臨床的徴候及び症状の出現に先立つ3日前に敗血症の発症を予測するために使用してよい。このことは、CD31が、特に他の有益な敗血症バイオマーカーと組み合わせたときに、有用な予測マーカーであり得ることを示唆している。

#### 【0091】

##### 実施例6： 敗血症を予測するための多変量統計解析

##### <序文>

敗血症の症状の発生前1～6日に患者から収集されたデータに対して、多変量データ解析法が適用された。測定値にはフローサイトメトリー、PCR及び古典的臨床所見が含まれた。三つの分類の所見の各々を個別に、また完全なデータ組として組み合わせて考慮することにより、このデータマトリックスに対して主成分解析（PCA）が適用された。判別関数解析（DFA）を使用して、複数の群が変数の平均に関して異なるかどうかを決定し、次いで群のメンバーシップ（例えば新規症例）を予測するために当該変数を使用した。これは、PCAからの結果に対して、また三つの分類の所見に対して、各々を個別にまた完全なデータ組として組み合わせて行われた。

30

#### 【0092】

##### <データの記述、操作及び多変量技術>

PCA及びDFAに先立って分布の正規性が必要とされるので、PCAに先立って確率密度関数を生じさせることによりデータが要約され、非正規データはジョンソン変形アルゴリズムを使用して変形された。

40

#### 【0093】

PCAは、次元減少技術であり、多変量データマトリックスを、変数の線型組み合わせで構成された幾つかの潜在変数に分解するように努力し、これは元のマトリックスの変数の大きさを説明する。この方法では、データ組内でのパラメータの相関（正又は負の）を確立することができる。

#### 【0094】

本質的に、DFAは変数の解析（ANOVA）に対するアプローチにおいて類似してい

50

る。DFA問題は、一方向解析ANOVA問題と言い換えることができる。即ち、特定の変数の平均に関して、二つの群が相互に有意に異なっているかどうかを問合せることができる。しかし、一つの変数についての平均が異なるグループにおいて有意に異なれば、この変数は、これら群の間を識別すると結論してよいことは明瞭であろう。

【0095】

単一変数の場合、ある変数が群の間を識別するかどうかの最終的な有意差検定は、F検定である。Fは、本質的に、プールされた（平均）群内分散に対する、当該データにおける群間分散の比率として計算される。群間分散が優位に大きければ、平均値間には有意差が存在するはずである。

【0096】

多変量を考慮するときには、幾つの変数のどれが群間の判別に寄与するかを確立することが可能である。このことは、全ての分散及び共分散のマトリックス；同様に、プールされた群内の分散及び共分散のマトリックスを生じる。これらのマトリックスは、次いで、群の間に何等かの有意差（全ての変数に関して）が存在するか否かを決定するために、多変量F検定を介して比較される。この方法は、多変量解析又はMANOVAと同一である。MANOVAにおけると同様に多変量検定が行われ、統計的に有意であれば、何れの変数が群に亘って有意に異なる平均を有しているのかが調査される。こうして、複数の変数を用いたコンピュータ処理が更に複雑であっても、主要な理論はそのまま適用される。即ち、観察された平均の差において明らかな、群の間を識別する変数が探索される。

【0097】

DFAは、完全なデータマトリックス（置換された平均値を含む）を使用し、また1以上のパラメータがそのために置換された平均値を含むデータ点を排除することにより、臨床的フローサイトメトリー及びRT-PCRデータに対して行われる。モデル1で開発されたモジュールからPCAスコアの解析を可能にする類似のモジュールが開発された。後者の目的は、所見を分類するために、変形されたデータマトリックス（PCA）が使用できるかどうかを確立することであった。

【0098】

モデル1 所見データの主成分解析（PCA）

i) 臨床データに基づくPCAモデル

所定のモデルにおいて誘導及び使用されるPCの数は、通常は1を越える固有値を有するものとして定義される。6PCは、臨床データのためのこの基準に合致し、合計で74.3%のデータ組の変動を説明する。PCの各々は他のPCに関して直交（非相関）しているので、特定のPCとの臨床パラメータの関連は、該PCを定義し、且つ該パラメータが如何にしてデータ組の分散に影響するかを説明する。

【0099】

表12は、臨床データからの六つの誘導されたPCを伴った各パラメータの読み込みを要約している。0.5を越える読み込み値は、所定のPCに対する特定のパラメータの強い寄与を示している。当該データ組から誘導されたPCは、次のように解釈されてよい。

【0100】

PC1 これは、WCC、単球、好中球及び血小板の強い相関によって支配される。クレアチニンと乳酸塩（lactate）との間に強い相関が存在する。これらの群の両者は負の関係（PC1スケールの反対端）を有しており、従って負に相関している。BXS及びHCO<sub>3</sub><sup>-</sup>は高度に相関しており、PC1及びPC2に等しく寄与する。後者のパラメータは、PC1におけるクレアチニン及び乳酸塩によって対比される。これらの相関は、表2及び図2に要約されている。

【0101】

PC2 WCC、単球、好中球及び血小板で構成される群と、BXS及びHCO<sub>3</sub><sup>-</sup>で構成される群との間の負の相関を示している。

【0102】

PC3 このPCは、図3に示すように、温度、HR及びCRPの間の強い相関によ

10

20

30

40

50

って特徴付けられる。

【0103】

PC4 多くのパラメータがこのPCについての優位性に接近するが、図5によって示されるように、CRPのみが決定的にこのPCと関連している。

【0104】

PC5  $pO_2$ は、この成分における尿素及びMAPの両方と対比される。

【0105】

PC6 この入PCは、専ら、リンパ球によって当該データセットの中に導入された分散を説明する。

【0106】

PCローディングを解釈する際に、関連した臨床パラメータは、これら種/生理的パラメータのレベルが、PC1、2等に属するとして特徴付けられた患者において上昇又は減少するであろうことを示唆する。これは、判別解析の節において行われるであろう。

【0107】

ii) フローサイトメトリーデータに基づくPCAモデル

パラメータは明瞭化のために略語化されており、略語は表13に列記されている。9個のPCが、表14における固有値マトリックスに示されたデータ組の分散の80.5%を説明しており、関連のローディングが表15に纏められている。測定されたパラメータ間の相関が表16に示されており、下記の間で誘導されたPC内では強い相関を有する：

fc1及びfc3

fc5及びfc6

fc7及びfc8

fc9と、fc10及びfc11，

fc12及びfc13

fc11及びfc14

fc17と、fc20及びfc23

fc21と、fc17、20及び22

fc23と、fc20及びfc22

fc28及びfc29

【0108】

PC構造は次のように解釈されてよい：

PC1： CD3 CD4におけるCD3 CD4 CD25、CD3 CD4におけるCD3 CD4 HLA-DR、CD3 CD8におけるCD3 CD8 CD25、CD19におけるCD19 CD80、CD19におけるCD19 CD86、CD14におけるCD14 CD80、CD14におけるCD14 CD86、CD19におけるCD19 CD54を、CD19におけるCD19 CD25、及びCD56におけるCD56 CD54を相関させる。

PC2： CD19におけるCD19 CD86を、CD14におけるCD14 HLA-DR、CD14におけるCD14 HLA-DR CD11B、CD14におけるCD14 HLA-DR CD11B CD54と対比する。

PC3： CD3 CD4におけるCD3 CD4 CD54、CD3 CD4におけるCD3 CD4 CD69、CD3 CD8におけるCD3 CD8 CD54、CD3 CD8におけるCD3 CD8 CD69。

PC4： CD56、CD69(%)、CD11B CD69(%)におけるCD56 CD69。

PC5： CD3 CD8、CD62L(%)におけるCD3 CD8 CD54

。

PC6： CD31(%)

PC7： EV > 0.5の有意な成分はなし。

PC8： CD54(%)

10

20

30

40

50

PC9 : CD14におけるCD14 CD11B

【0109】

対又は群の一つのパラメータだけを考慮することにより、9個のパラメータを除去して、データマトリックスのy成分を増大させることが可能であろう。しかし、CD31(%)、CD54(%)、CD62L(%)、CD11B(%)、CD69(%)及びCD11B CD69(%)だけを統計的解析にかけることが決定された(f c 2 4 ~ f c 2 9)。

【0110】

選択されたフローサイトメトリー変数の固有値マトリックスが表17に示されており、構築されたPCAモデルのローディングが表18に纏められている。3PCの使用は、データ組の76.6%の変動を説明する。このPCモデルは下記を示している：

PC1 : CD69(%)及びCD11B CD69(%)を相関させる。

PC2 : CD31(%)、CD62L(%)及びCD11B(%)を相関させる。

PC3 : CD54(%)に関連した分散で構成される。

【0111】

i i i) RT-PCRデータに基づくPCAモデル

表19は、RT-PCRデータの72.9%の分散が3つのPCだけによって説明されることを示している。このモデルについての読み取りは表20に示されている。変数の各PCとの相関が図23及び24に示されており、以下のことを明らかにしている。

PC1 : Fas-L、MCP-1、TNF-alpha、IL-6及びIL-8を相関させる。

PC2 : IL-1及びIL-10を相関させる。

PC3 : IL-1及びIL-10を対比する。

【0112】

PC2におけるIL-1及びIL-10の相関、及びPC3におけるこれら変数のその後の対比は興味深いものである。幾人かの患者において、これらの変数は高度に相関又は対比されてよく、患者を識別する強力な手段を提供する可能性がある。

【0113】

i v) 臨床、フローサイトメトリー及びRT-PCRの組み合わせられたデータに基づくPCAモデル

表21は、この最終モデルに含められるパラメータ、及び相関マトリックスのための関連の固有値を要約している。表21は、9個のPCが1よりも大きい固有値を有することを示しており、これは68.7%のデータ分散を説明する。解析は、PCAモデルの以下の解釈を可能にする：

PC1 : WCC、好中球、単球、APTR、 $\text{HCO}_3^-$ 、BXS、血小板、CD69(%)及びCD11B CD69(%)の間の正の相関を示す。このPCはまた、上記を、相関している乳酸塩及びクレアチニンと対比する。

PC2 : CD69(%)、CD11B CD69(%)、WCC、好中球、単球及びINRを相関させる。これらのパラメータは、TNF- と対比される。

PC3 : PCRパラメータであるFas-L、MCP-1、TNF-、IL-6及びIL-8を強く相関させる。

PC4 : CRP及びIL-10を対比する。

PC5 : フローサイトメトリーのパラメータであるCD31(%)、CD54(%)、CD62L(%)及びCD69(%)を相関させる。

PC6 : CD62L(%)及びHRを相関させる。

PC7 : 温度と関連付けられる。

PC8 : IL-1と関連付けられる。

PC9 :  $\text{PO}_2$ と関連付けられる。

【0114】

10

20

30

40

50

モデル 2 : 所見及び P C A スコアのデータに基づく判別関数解析 ( D F A )

開発された D F A モデルにおける全てのモデル定義に共通の用語が以下で説明され、また数値は表 2 3 に示される。

【 0 1 1 5 】

モデル :

この解析の目的は、ある症例が何れの群に属するかを最良に予測する「モデル」を構築することである。以下の議論において、「該モデルにおいて」の用語は、群のメンバーシップの予測に含められる変数を言うために使用され、またそれらが含まれなければ「該モデルの中にはない」。

【 0 1 1 6 】

・ 順方向の段階的解析

段階的判別関数解析において、判別のモデルは徐々に構築される。即ち、各工程において、全ての変数が検討及び評価されて、群間の識別に何れが最も寄与するかが確立される。次いで、該変数は当該モデルに含められるであろう。

【 0 1 1 7 】

・ 逆方向の段階的解析

逆向きに進めることが可能である；その場合、当該プログラムは最初に全ての変数を当該モデルに含め、次いで、各工程において、群のメンバーシップの予測に最も小さく寄与する変数を除外する。従って、成功裏の判別関数解析の結果として、「重要な」変数、即ち、群の間の識別に最も寄与する変数のみが当該モデルにおいて維持されるであろう。

【 0 1 1 8 】

・ 導入するための F、除去するための F

段階的手順は、導入するための F 及び除去するための F によって「案内」される。変数についての F 値は、群間の識別におけるその統計的有意性を示す。即ち、それは変数が群のメンバーシップの予測に対して独特の寄与をする程度の尺度である。一般に、プログラムは、これら変数についてのそれぞれの F 値がユーザにより特定された導入のための F よりも大きい限り、当該モデルに含められるべき変数を選択し続け；またそれらの優位性がユーザにより特定された除去するための F よりも小さければ、変数を当該モデルから排除（除去）する。

【 0 1 1 9 】

・ 許容度

変数の許容値は、当該モデルにおける他の全ての変数を用いて、それぞれの変数の  $1 - R^2$  として計算される。従って、許容度は、それぞれの変数の冗長性の尺度である。例えば、0.10 の許容度値は、該変数が当該モデルにおける他の変数と 90% の冗長をもつことを意味する。

【 0 1 2 0 】

・ W i l k s の

このパラメータは、当該モデルの識別能力の尺度を与え、0（完全な識別）～ 1（識別なし）の範囲の値を取ることができる。

【 0 1 2 1 】

・ 部分的

これは、当該モデルの識別力に対するそれぞれの変数の独特の寄与（直交的に測定される）に関連した W i l k s の である

【 0 1 2 2 】

注意点としては、段階的な判別解析の結果の共通の誤解釈は、額面上の統計的優位性レベルを取ることである。解析の次の工程において何れの変数を含め、又は排除するかをプログラムが決定するとき、それは考慮している各変数の寄与の優位性を実際に計算する。従って、この段階的手順は、最大の識別力を生じるように当該モデルに含めるべき変数を「念入りに選ぶ」ので、本来的に確率を利用するであろう。従って、段階的アプローチを使用するとき、その優位性レベルが真のアルファ誤差率を反映しないことの認識、即ち

10

20

30

40

50

、 $H_0$ （群間の識別が存在しないゼロ仮定）を誤って拒絶する可能性の認識が維持されなければならない。

【0123】

・正準相関解析（CCA）

これは、変数間の関係を評価するための追加の手順である。即ち、この操作は、二組の変数の間の関係を説明することを可能にする。この解析を特徴付けるパラメータを以下に詳述する。

【0124】

・ルートの有意性（ $F^2$ 検定）

ルートの用語は、個別の判別関数（DF）を記述するために使用される。誘導されたDFの統計的有意性は、連続するDFの $F^2$ 検定によって試験される。全正準ルートの段階的低下試験の報告が得られ、この報告には全DFの有意性及びこれに続く第二行が含まれ、該第二行は、第一のルートを除いた後の残りのルートの有意性を報告する。従って、解釈するDFの数を得られる。

10

【0125】

・判別関数係数

二つの出力が発生される。一つは生の係数のためのものであり、一つは標準化された係数のためのものである。ここで、生のとは、該係数が（生の）判別関数スコアを計算するために観察されたデータと共に使用され得ることを意味する。標準化された係数は、それが標準化された変数に関し、従って比較可能な尺度を意味するので、解釈のために慣習的に使用される係数である。

20

【0126】

・固有値

各DFの固有値、及び各関数によって占められる説明された分散の累積比率が得られる。この値は、PCA及びDFAにおいて同一の方法で定義される。この値が大きいほど、DFによって説明される分散の量が大きい。

【0127】

・因子構造係数

これらの係数は、変数とDFの間の相関を表すものであり、判別関数の「意味するもの」を解釈するために普通に使用される。PCAに類似の方法において、因子の解釈は、因子構造係数に基づくべきである。

30

【0128】

・正準変数の平均

変数が如何にして異なる群の間での識別に関与するかの知識が得られたら、次の論理工程は、各DFの性質及び区別を決定することである。この質問に答える最初の工程は、正準変数平均を調べることである。所定のDFの正準平均及び所見群が大きいほど、当該DFの識別力は大きい。

【0129】

i) 臨床データのPCAスコアに基づくDFAモデル

a) 置換された平均値を含む

40

表19は、この解析の結果を要約している。0.4のWilksの値は、比較的非効率的な分類モデルを示している。三つの誘導されたDFは、データ組の合計89.9%の分散を説明し、またDFは主にPC1、3及び4で構成される。因子構造係数は次のことを示している：

- ・DF1は、PC1及びより低い程度でPC4により説明される変動で構成される。
- ・DF2は、専ら、PC3により説明される変動で構成される。
- ・DF3は、PC4によって説明される変動で構成される。

【0130】

これらの相関は、標準化された係数によって確認される。正準変数の平均は次のことを示す。

50

- ・ D F 1 は、1日、2日及び3日を、5日及び6日に対して負に相関させる。
- ・ D F 2 は、対照群所見を定義する。
- ・ D F 3 は、2日のための所見を定義する。

## 【0131】

このモデル及びその P C に対する識別性質の分類の要約が、表 2 5 に示されている。該モデルの分類マトリックスが、表 2 6 に示されている。表 2 6 は、対照及び6日のデータについて良好な分類が得られ、それぞれ 8 0 % 及び 8 3 % の所見が正しく分類されることを示唆している。しかし、当該モデルの全体の分類能力は乏しく、全ての所見の 4 8 % だけが正しく分類されるに過ぎない。

## 【0132】

## b) 置換された平均値を排除する

表 2 4 は、この解析の結果を要約している。0.45 の W i l k s の 値は、比較的非効率的な分類モデルを示している。三つの誘導された D F は、データ組の合計 9 5 % の分散を説明し、また D F は主に P C 1、3 及び 5 で構成される。因子構造係数は次のことを示している：

- ・ D F 1 は、P C 1 と P C 5 の間の負の相関によって説明される分散で構成。
- ・ D F 2 は、P C 3 により説明される分散で構成される。
- ・ D F 3 は、D F 2 よりは程度が低いが、P C 3 により説明される分散で構成される。

## 【0133】

これらの相関は、標準化された係数によって確認される。正準変数の平均は下記のことを示す：

- ・ D F 1 は、1日、2日及び3日を、5日及び6日に対して負に相関させる。
- ・ D F 2 は、1日及び6日を対照群に対して負に相関させる。
- ・ D F 3 は、6日についての所見を定義する。

## 【0134】

この方法の分類及びその P C に対する識別特性が、表 2 5 に示されている。当該モデルの分類マトリックスが表 2 6 に示されている。表 2 6 は、対照群及び6日のデータについて良好な分類を得ることができ、それぞれ 8 3 % 及び 6 7 % の所見が正しく分類されることを示唆している。しかし、該モデルの全体の分類能力は乏しく、全所見の 4 4 % だけが正しく分類されるに過ぎず、平均置換された変数を使用する場合よりも低い。

## 【0135】

平均置換された値を用いた、及びこの値を用いないで行った同様の予測効率は、これらの値を含めて D F A を行うために、その後のアプローチを確証した。

## 【0136】

## i i) 臨床データの変換された値に基づく D F A モデル

所見の分類を改良するための努力において、元のデータマトリックスから変換された変数値が D F A にかげられた。この命題は、P C A が次元を減少させる技術であるから、恐らくは或るデータの品質は失われ、また P C A スコアに対して D F A を実行することは予測能力の低いモデルを導くということである。

## 【0137】

表 2 7 はこの解析の結果を要約している。0.22 の W i l k s の 値は、P C A スコア分類モデルに対する改善である。五つの誘導された D F は、該データ組の合計 9 9 % の分散を説明し、該 D F は、B X S、C R P、乳酸塩、尿素、温度、クレアチニン、好中球、 $p O_2$  及び  $H C O_3^-$  で構成され、他の臨床的変数は所見の分類に対する影響をもたない。因子構造係数は下記のことを示す：

- ・ D F 1 は、乳酸塩に対して負に相関する B X S と  $H C O_3^-$  の間の相関を分類する。
- ・ D F 2 は、B X S、C R P 及び  $H C O_3^-$  の間で高度の相関を示す所見を分類する。
- ・ D F 3 は、温度とクレアチニンの間の負の相関を用いてサンプルを分類する。
- ・ D F 4 は、温度と  $p O_2$  の間の負の相関を用いてサンプルを分類する。
- ・ D F 5 は、尿素と好中球の間の負の相関を用いてサンプルを分類する。

10

20

30

40

50

## 【 0 1 3 8 】

このモデルの分類及び臨床的変数に対するその識別特性が、表 3 1 に示されている。該モデルの分類マトリックスが表 3 2 に示されている。表 3 2 は、対照及び 6 日のデータについて良好な分類を得ることができ、それぞれ 8 0 % 及び 8 3 % の所見が正しく分類されることを示唆している。1 日、2 日及び 5 日は P C A スコアモジュールに比較して大きく改善されるが、該モデルの全体の分類能力は乏しく、全所見の 5 5 % が正しく分類される。

## 【 0 1 3 9 】

i i i ) フローサイトメトリーの P C A スコアに基づく D F A モデル

表 3 3 は、この解析の結果を要約している。0 . 3 9 の W i l k s の 値は、比較的非効率的な分類モデルを示している。二つの誘導された D F は、データ組の合計 7 1 % の分散を説明し、また該 D F は主に P C 1、5 及び 8 で構成される。因子構造係数は次のことを示す。

- ・ D F 1 は、P C 1 及び P C 8 によって説明される分散で構成される。
- ・ D F 2 は、専ら P C 5 によって説明される分散で構成される。

10

## 【 0 1 4 0 】

このモデルの分類及び P C に対するその識別特性の要約が、表 3 4 に示されている。該モデルについての分類マトリックスが表 3 5 に示されている。表 3 5 は、対照データ及び 6 日データについて合理的な分類が得られ、6 6 % の所見が両群に正しく分類されることを示唆している。しかし、該モデルの全体の分類能力は乏しく、全所見の 4 4 % だけが正しく分類されるに過ぎない。

20

## 【 0 1 4 1 】

i v ) フローサイトメトリーデータに基づく D F A モデル

このモデルの分類及び変数に関するその識別特性が表 3 6 に示されている。0 . 0 3 4 の W i l k s の 値は、優れた分類モデルを示している。三つの誘導された D F は、データ組の合計 7 4 % の分散を説明し、また該 D F は主に f c 7 - 8、f c 1 1、f c 1 6、f c 2 5、f c 2 8、f c 2 9 で構成される。因子構造係数は次のことを示す：

- ・ D F 1 は、f c 7、1 6、2 8 及び 2 9 を相関させ、またこれらを f c 8 及び 2 5 と対比させる。
- ・ D F 2 は、f c 7、8、1 6 及び 2 5 を相関させ、またこれらを f c 1 2 と対比させる。
- ・ D F 3 は、f c 1 1 と相関される。

30

表 3 7 はこの情報を要約している。

## 【 0 1 4 2 】

これらの相関は、標準化された係数によって確認される。正準変数の平均は以下のことを示す：

- ・ D F 1 は、1 日を、5 日及び 6 日と対比させる。
- ・ D F 2 は、対照群を 3 日、4 日及び 5 日と対比させ、また対照を 6 日と相関させる。
- ・ D F 3 は、2 日及び 3 日を 4 日と対比させる。

40

## 【 0 1 4 3 】

表 3 8 は、全ての群について良好な分類が得られることを示唆する。該モデルの全体の分類能力は印象的であり、全所見の 7 6 . 6 % が正しく分類される。

## 【 0 1 4 4 】

R T - P C R についての D F A モデルは P C A スコア及び変形されたデータの両方にとって乏しく、W i l k s の 値 > 0 . 8 であり、それらは捨象されて更に考慮されることはないであろう。

## 【 0 1 4 5 】

v ) 臨床、フローサイトメトリー及び R T - P C R の組み合されたデータに基づく D F A モデル

このモデルの分類及び変数に関するその識別特性が表 3 9 に示されている。0 . 0 0 8

50

7のWilksの値は、優れた分類モデルを示している。四つの誘導されたDFは、データ組の合計89.2%の分散を説明し、また該DF因子構造は、BXS、fc25、fc22、fc11、温度、CRP、fc18、fc6、IL-6、INR、APTR、fc16、尿素、乳酸塩、Fas-L、fc13、fc24、fc1、fc3、MCP-1、fc28、IL-10、fc27、fc26、好中球、fc14、WCC、fc29、血小板、 $pO_2$ が該モデルに含められることを示している。全ての他のパラメータは、段階的基準に合致せず、従って当該モデルから排除された。

#### 【0146】

正準変数の平均は次のことを示している。

- ・DF1は、1日を5日及び6日と相関させる。
- ・DF2は、対照群を6日と相関させ、またこれらを3、4及び5日と対比させる。
- ・DF3は、対照群を5日と相関させ、またこれらを2、3及び6日と対比させる。
- ・DF4は、4日及び5日と対比させる。

表37はこの情報を要約している。

#### 【0147】

表40は、76%の最小適性割当て率で、全ての群について優れた分類が得られることを示している。該モデルの全体の分類能力は印象的であり、全ての所見の86.9%が正しく分類される。各DFがこのモデルを使用してデータに適用されるときには、患者の群がクラスターを形成し、また他の群から空間的に分離されることを明瞭に見て取ることができる。

#### 【0148】

< 結論 >

PCAは、全てのクラスの患者についての測定された変数の間の相関を強調した。分子生物学の観点から多くの相関が予測される。PCAモデルの幾つかは、データ組の次元を大きく減少させたが、得られたスコアは患者の群を空間的に分離させなかった。

#### 【0149】

PCAから得られたスコア上のDFAは、失望させる結果を示した。PCAスコアが使用されたとき、該モデルの識別能力は44~56%の範囲に亘った。これらモデルの低い識別能力は、顕著な詳細を備えたPCAが失われる際の、データ組の次元減少の結果であるかもしれない。臨床及びフローサイトメトリーモデルの識別能力は、それぞれ55%及び76%であった。DFAが完全なデータ組（臨床、フローサイトメトリー及びRT-PCRの変数）上で実施されたとき、86.9%の予測効率が得られた。従って、この後者のモデルに含められる変数（表36）は、敗血症に罹り易いことが疑われる新たな患者を分類するために、測定及び使用されることが推奨される。

#### 【0150】

当該モデルの最も印象的な特徴は、症状の発症の正確に6日前に、患者に正確に割当てるためのその能力である。従って、重要な識別変数をモニターでき、又はそのレベルで医療的治療が与えられなければならない閾値レベルを確率できるであろう。表34に示したパラメータを使用すれば、患者からデータを取得し、また変換アルゴリズムを使用してデータをDFAモデルに入力することが可能である。次いで、これは90%に近い効率で、患者を適切な群に分類することができる。これは、臨床実験室で使用するとき大きな価値をもち得るであろう。

10

20

30

40

50

【 0 1 5 1 】

【 表 1 0 】

表 1 1 臨床所見についての相関マトリックスの固有値、及び関連の統計量

PC	固有値	全分散%	累積固有値	累積分散%
1	3.73	24.87	3.73	24.87
2	2.50	16.70	6.23	41.58
3	1.53	10.23	7.77	51.81
4	1.22	8.14	8.99	59.95
5	1.10	7.39	10.10	67.35
6	1.04	6.96	11.14	74.31
7	0.87	5.80	12.01	80.11
8	0.77	5.19	12.79	85.31
9	0.66	4.42	13.46	89.73
10	0.54	3.62	14.00	93.36
11	0.44	2.99	14.45	96.35
12	0.29	1.95	14.74	98.30
13	0.210	1.40	14.95	99.70
14	0.02	0.16	14.98	99.87
15	0.01	0.12	15.00	100.00

10

20

【 0 1 5 2 】

【 表 1 1 】

表 1 2 各PCについての臨床測定値のローディング

(95%CLについて示された固有値との関係 $>0.5$ )

臨床測定値	PC1	PC 2	PC 3	PC 4	PC 5	PC 6
温度	0.14	0.08	0.60	-0.36	0.14	0.40
HR	0.15	-0.06	0.58	-0.48	0.11	-0.37
MAP	0.22	0.21	-0.29	-0.48	-0.54	-0.14
WCC	0.63	-0.74	0.00	0.05	0.02	-0.01
好中球	0.58	-0.75	0.01	0.17	0.00	0.05
リンパ球	0.35	0.00	-0.14	-0.16	-0.19	-0.62
単球	0.62	-0.66	0.08	-0.05	0.01	-0.01
血小板	0.53	-0.09	-0.37	0.05	0.22	0.04
CRP	-0.15	0.11	0.62	0.50	0.08	-0.36
PO2	-0.26	0.07	-0.36	0.12	0.53	-0.39
HCO3-	0.76	0.47	0.16	0.23	-0.13	-0.07
BXS	0.78	0.49	0.15	0.20	-0.11	-0.05
乳酸塩	-0.55	-0.46	0.16	-0.12	-0.08	-0.22
尿素	-0.30	-0.17	0.09	0.44	-0.58	0.04
クレアチニン	-0.69	-0.44	0.05	0.02	-0.19	-0.06

30

40

50

【 0 1 5 3 】

【 表 1 2 】

表 1 3 フローサイトメトリーデータの解析に使用した略語

略語	フローサイトメトリーのパラメータ
fc 1	CD3 CD4におけるCD3 CD4 CD25
fc 2	CD3 CD4におけるCD3 CD4 HLA-DR
fc 3	CD3 CD8におけるCD3 CD8 CD25
fc 4	CD3 CD8におけるCD3 CD8 HLA-DR
fc 5	CD3 CD4におけるCD3 CD4 CD54
fc 6	CD3 CD4におけるCD3 CD4 CD69
fc 7	CD3 CD8におけるCD3 CD8 CD54
fc 8	CD3 CD8におけるCD3 CD8 CD69
fc 9	CD19におけるCD19 CD80
fc 10	CD19におけるCD19 CD86
fc 11	CD14におけるCD14 CD80
fc 12	CD14におけるCD14 CD86
fc 13	CD19におけるCD19 CD54
fc 14	CD19におけるCD19 CD25
fc 15	CD56におけるCD56 CD54
fc 16	CD56におけるCD56 CD69
fc 17	CD14におけるCD14 CD54
fc 18	CD14におけるCD14 HLA-DR
fc 19	CD14におけるCD14 CD11B
fc 20	CD14におけるCD14 CD54 HLA-DR
fc 21	CD14におけるCD14 HLA-DR CD11B
fc 22	CD14におけるCD14 HLA-DR CD11B CD54
fc 23	CD14におけるCD14 CD11B CD54
fc 24	CD31 (%)
fc 25	CD54 (%)
fc 26	CD62L (%)
fc 27	CD11B (%)
fc 28	CD69 (%)
fc 29	CD11B CD69 (%)

10

20

30

40

50

【 0 1 5 4 】

【 表 1 3 】

表 1 4 フローサイトメトリーデータについての相関マトリックスの固有値、  
及び関連統計値

PC	固有値	全分散%	累積固有値	累積分散%
1	7.16	24.68	7.16	24.68
2	3.81	13.12	10.96	37.80
3	2.63	9.07	13.59	46.88
4	2.43	8.39	16.03	55.27
5	1.90	6.54	17.93	61.81
6	1.62	5.59	19.55	67.41
7	1.46	5.05	21.01	72.45
8	1.21	4.19	22.23	76.64
9	1.10	3.78	23.32	80.42
10	0.87	3.00	24.19	83.42
11	0.85	2.93	25.04	86.36
12	0.71	2.44	25.75	88.80
13	0.63	2.17	26.38	90.97
14	0.53	1.82	26.91	92.78
15	0.39	1.36	27.30	94.14
16	0.35	1.21	27.65	95.35
17	0.34	1.16	27.99	96.51
18	0.31	1.07	28.30	97.58
19	0.20	0.68	28.50	98.26
20	0.12	0.42	28.62	98.68
21	0.10	0.34	28.72	99.02
22	0.08	0.27	28.79	99.29
23	0.07	0.23	28.86	99.52
24	0.05	0.18	28.91	99.70
25	0.04	0.13	28.95	99.83
26	0.02	0.08	28.98	99.91
27	0.01	0.05	28.99	99.96
28	0.01	0.03	29.00	99.99
29	0.00	0.01	29.00	100.00

10

20

30

40

50

【 0 1 5 5 】

【 表 1 4 】

表 1 5 各 P C についての全てのフローサイトメトリーのローディング  
( 9 5 % C L について示された固有値との関係 > 0 . 5 )

	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7	PC8	PC9
fc 1	0.59	-0.36	0.19	0.06	-0.13	-0.28	0.28	-0.11	-0.33
fc 2	0.61	-0.07	-0.20	-0.21	0.11	0.41	0.34	-0.01	-0.17
fc 3	0.62	-0.31	-0.07	0.14	0.14	-0.11	0.21	0.05	-0.31
fc 4	0.24	-0.03	-0.26	-0.19	0.11	0.44	0.46	-0.24	-0.03
fc 5	-0.06	-0.01	0.89	-0.24	-0.10	0.07	0.20	0.07	-0.10
fc 6	-0.11	-0.11	0.62	-0.02	-0.45	0.06	0.42	0.15	-0.07
fc 7	0.08	0.18	0.64	-0.39	0.50	0.05	-0.25	-0.09	-0.06
fc 8	0.14	0.29	0.63	-0.41	0.43	0.03	-0.24	-0.12	-0.07
fc 9	0.70	-0.52	0.17	0.05	-0.15	-0.01	-0.05	-0.03	0.18
fc 10	0.58	-0.57	0.05	0.14	-0.01	-0.06	-0.25	-0.35	0.11
fc 11	0.79	-0.35	-0.06	-0.09	0.02	0.30	0.04	0.03	0.14
fc 12	0.53	-0.36	0.06	0.15	-0.22	-0.09	-0.33	-0.44	0.02

10

20

【 0 1 5 6 】

表 1 5 続き

fc 13	0.57	-0.27	0.23	-0.09	0.17	-0.06	0.01	-0.15	0.24
fc 14	0.74	-0.44	-0.01	0.03	0.09	0.13	0.00	0.22	0.16
fc 15	0.54	-0.19	0.11	0.18	0.08	0.13	-0.30	0.46	0.14
fc 16	0.31	-0.09	-0.21	-0.63	-0.07	0.45	-0.07	-0.03	-0.10
fc 17	0.73	0.26	0.02	0.26	0.03	-0.15	-0.13	0.19	-0.28
fc 18	0.49	0.64	-0.02	-0.10	-0.39	0.23	-0.15	-0.06	-0.07
fc 19	0.28	0.28	0.00	-0.27	-0.01	-0.32	0.40	0.01	0.60
fc 20	0.64	0.64	-0.05	0.09	-0.18	0.07	-0.16	0.01	-0.19
fc 21	0.52	0.65	0.01	-0.15	-0.38	0.08	-0.02	-0.07	0.16
fc 22	0.66	0.66	-0.02	0.01	-0.19	-0.07	-0.03	-0.01	0.06
fc 23	0.79	0.31	0.05	0.16	0.01	-0.29	0.02	0.15	0.05
fc 24	0.45	0.19	-0.05	-0.21	0.23	-0.53	0.33	-0.02	-0.04
fc 25	0.29	-0.15	-0.12	0.00	0.29	0.03	-0.01	0.54	-0.12
fc 26	0.10	0.35	-0.24	-0.03	0.55	0.12	0.02	0.04	0.24
fc 27	0.25	0.16	-0.37	-0.17	0.35	-0.29	0.03	-0.29	-0.27
fc 28	-0.08	-0.30	-0.25	-0.77	-0.27	-0.26	-0.19	0.16	-0.05
fc 29	-0.03	-0.29	-0.26	-0.77	-0.26	-0.29	-0.17	0.17	-0.04

30

40

50

【 0 1 5 7 】

【 表 1 5 】

表 1 6 フローサイトメトリー変数を使用したPCAモデルの相関マトリックス

	fc 1	fc 2	fc 3	fc 4	fc 5	fc 6	fc 7	fc 8	fc 9	fc 10	fc 11	fc 12	fc 13	fc 14	fc 15
fc 1	1.00	0.34	0.69	0.09	0.13	0.16	-0.02	0.00	0.59	0.47	0.43	0.38	0.46	0.42	0.19
fc 2	0.34	1.00	0.43	0.53	-0.06	-0.08	0.02	0.03	0.33	0.26	0.57	0.17	0.22	0.54	0.24
fc 3	0.69	0.43	1.00	0.14	-0.11	-0.12	-0.03	-0.05	0.46	0.41	0.54	0.29	0.31	0.58	0.36
fc 4	0.09	0.53	0.14	1.00	-0.12	-0.07	-0.06	-0.02	0.10	0.06	0.32	0.06	0.10	0.13	0.00
fc 5	0.13	-0.06	-0.11	-0.12	1.00	0.80	0.53	0.51	0.09	-0.07	-0.05	-0.04	0.10	-0.04	-0.01
fc 6	0.16	-0.08	-0.12	-0.07	0.80	1.00	-0.02	-0.02	0.10	-0.07	-0.06	-0.03	0.03	-0.05	-0.09
fc 7	-0.02	0.02	-0.03	-0.06	0.53	-0.02	1.00	0.92	0.00	-0.04	0.00	-0.03	0.16	0.01	0.10
fc 8	0.00	0.03	-0.05	-0.02	0.51	-0.02	0.92	1.00	-0.02	-0.04	-0.01	-0.02	0.23	-0.04	0.07
fc 9	0.59	0.33	0.46	0.10	0.09	0.10	0.00	-0.02	1.00	0.73	0.76	0.61	0.52	0.76	0.46
fc 10	0.47	0.26	0.41	0.06	-0.07	-0.07	-0.04	-0.04	0.73	1.00	0.57	0.82	0.55	0.60	0.35
fc 11	0.43	0.57	0.54	0.32	-0.05	-0.06	0.00	-0.01	0.76	0.57	1.00	0.45	0.51	0.82	0.49
fc 12	0.38	0.17	0.29	0.06	-0.04	-0.03	-0.03	-0.02	0.61	0.82	0.45	1.00	0.30	0.41	0.30
fc 13	0.46	0.22	0.31	0.10	0.10	0.03	0.16	0.23	0.52	0.55	0.51	0.30	1.00	0.50	0.28
fc 14	0.42	0.54	0.58	0.13	-0.04	-0.05	0.01	-0.04	0.76	0.60	0.82	0.41	0.50	1.00	0.58
fc 15	0.19	0.24	0.36	0.00	-0.01	-0.09	0.10	0.07	0.46	0.35	0.49	0.30	0.28	0.58	1.00
fc 16	0.06	0.47	0.12	0.27	-0.01	-0.07	0.11	0.10	0.15	0.11	0.52	0.07	0.20	0.23	0.07
fc 17	0.41	0.31	0.38	0.00	-0.06	-0.09	0.03	0.09	0.34	0.26	0.37	0.28	0.32	0.38	0.44
fc 18	0.04	0.27	0.04	0.06	-0.02	-0.02	0.03	0.16	0.06	-0.06	0.21	0.13	0.08	0.07	0.12
fc 19	0.06	0.13	0.04	0.08	0.04	0.01	0.07	0.09	0.10	-0.06	0.15	-0.07	0.19	0.11	-0.01
fc 20	0.16	0.32	0.18	0.07	-0.10	-0.12	0.03	0.17	0.12	0.04	0.25	0.17	0.14	0.16	0.24
fc 21	0.06	0.25	0.05	0.12	0.00	-0.02	0.05	0.20	0.11	-0.05	0.22	0.14	0.10	0.10	0.09
fc 22	0.16	0.29	0.19	0.13	-0.07	-0.11	0.07	0.22	0.17	0.04	0.27	0.19	0.12	0.20	0.20
fc 23	0.40	0.29	0.40	0.05	-0.03	-0.08	0.06	0.14	0.41	0.28	0.44	0.31	0.33	0.44	0.44
fc 24	0.36	0.26	0.30	0.12	-0.01	-0.08	0.12	0.17	0.15	0.09	0.17	0.09	0.24	0.18	0.07
fc 25	0.07	0.23	0.22	0.08	-0.09	-0.09	0.00	0.03	0.20	0.12	0.28	0.04	0.14	0.37	0.26
fc 26	-0.24	0.15	-0.05	0.09	-0.20	-0.29	0.10	0.12	-0.17	-0.10	0.03	-0.23	0.09	0.01	0.01
fc 27	0.02	0.20	0.18	0.10	-0.25	-0.32	0.05	0.03	-0.04	0.09	0.11	0.11	0.07	0.07	-0.16
fc 28	0.03	0.00	-0.07	-0.01	-0.05	-0.04	-0.02	-0.02	0.07	0.01	0.01	0.01	-0.02	0.02	-0.07
fc 29	0.06	0.03	-0.04	-0.01	-0.05	-0.04	-0.04	-0.03	0.09	0.04	0.04	0.03	0.02	0.04	-0.04

10

20

30

40

50

【 0 1 5 8 】

表 1 6 続 き

	fc 16	fc 17	fc 18	fc 19	fc 20	fc 21	fc 22	fc 23	fc 24	fc 25	fc 26	fc 27	fc 28	fc 29
fc 1	0.06	0.41	0.04	0.06	0.16	0.06	0.16	0.40	0.36	0.07	-0.24	0.02	0.03	0.06
fc 2	0.47	0.31	0.27	0.13	0.32	0.25	0.29	0.29	0.26	0.23	0.15	0.20	0.00	0.03
fc 3	0.12	0.38	0.04	0.04	0.18	0.05	0.19	0.40	0.30	0.22	-0.05	0.18	-0.07	-0.04
fc 4	0.27	0.00	0.06	0.08	0.07	0.12	0.13	0.05	0.12	0.08	0.09	0.10	-0.01	-0.01
fc 5	-0.01	-0.06	-0.02	0.04	-0.10	0.00	-0.07	-0.03	-0.01	-0.09	-0.20	-0.25	-0.05	-0.05
fc 6	-0.07	-0.09	-0.02	0.01	-0.12	-0.02	-0.11	-0.08	-0.08	-0.09	-0.29	-0.32	-0.04	-0.04
fc 7	0.11	0.03	0.03	0.07	0.03	0.05	0.07	0.06	0.12	0.00	0.10	0.05	-0.02	-0.04
fc 8	0.10	0.09	0.16	0.09	0.17	0.20	0.22	0.14	0.17	0.03	0.12	0.03	-0.02	-0.03
fc 9	0.15	0.34	0.06	0.10	0.12	0.11	0.17	0.41	0.15	0.20	-0.17	-0.04	0.07	0.09
fc 10	0.11	0.26	-0.06	-0.06	0.04	-0.05	0.04	0.28	0.09	0.12	-0.10	0.09	0.01	0.04
fc 11	0.52	0.37	0.21	0.15	0.25	0.22	0.27	0.44	0.17	0.28	0.03	0.11	0.01	0.04
fc 12	0.07	0.28	0.13	-0.07	0.17	0.14	0.19	0.31	0.09	0.04	-0.23	0.11	0.01	0.03
fc 13	0.20	0.32	0.08	0.19	0.14	0.10	0.12	0.33	0.24	0.14	0.09	0.07	-0.02	0.02
fc 14	0.23	0.38	0.07	0.11	0.16	0.10	0.20	0.44	0.18	0.37	0.01	0.07	0.02	0.04
fc 15	0.07	0.44	0.12	-0.01	0.24	0.09	0.20	0.44	0.07	0.26	0.01	-0.16	-0.07	-0.04
fc 16	1.00	0.06	0.30	0.05	0.18	0.19	0.08	-0.01	-0.02	0.06	0.11	0.16	0.39	0.41
fc 17	0.06	1.00	0.43	0.04	0.77	0.33	0.60	0.84	0.34	0.24	0.15	0.24	-0.22	-0.18
fc 18	0.30	0.43	1.00	0.16	0.82	0.90	0.74	0.40	0.13	-0.01	0.07	0.11	-0.10	-0.09
fc 19	0.05	0.04	0.16	1.00	0.11	0.42	0.39	0.42	0.41	-0.02	0.12	0.15	0.05	0.08
fc 20	0.18	0.77	0.82	0.11	1.00	0.72	0.87	0.67	0.28	0.03	0.22	0.20	-0.21	-0.18
fc 21	0.19	0.33	0.90	0.42	0.72	1.00	0.86	0.50	0.25	0.01	0.06	0.09	-0.06	-0.05
fc 22	0.08	0.60	0.74	0.39	0.87	0.86	1.00	0.77	0.38	0.05	0.19	0.18	-0.16	-0.13
fc 23	-0.01	0.84	0.40	0.42	0.67	0.50	0.77	1.00	0.46	0.20	0.14	0.24	-0.18	-0.14
fc 24	-0.02	0.34	0.13	0.41	0.28	0.25	0.38	0.46	1.00	0.15	0.22	0.37	0.08	0.13
fc 25	0.06	0.24	-0.01	-0.02	0.03	0.01	0.05	0.20	0.15	1.00	0.05	0.16	0.03	0.03
fc 26	0.11	0.15	0.07	0.12	0.22	0.06	0.19	0.14	0.22	0.05	1.00	0.20	-0.17	-0.14
fc 27	0.16	0.24	0.11	0.15	0.20	0.09	0.18	0.24	0.37	0.16	0.20	1.00	0.05	0.09
fc 28	0.39	-0.22	-0.10	0.05	-0.21	-0.06	-0.16	-0.18	0.08	0.03	-0.17	0.05	1.00	0.98
fc 29	0.41	-0.18	-0.09	0.08	-0.18	-0.05	-0.13	-0.14	0.13	0.03	-0.14	0.09	0.98	1.00

10

20

30

【 0 1 5 9 】

## 【表 1 6】

表 1 7 選択されたフローサイトメトリー変数についての相関マトリックスの固有値、及び関連統計値

PC	固有値	全分散%	累積固有値	累積分散%
1	2.06	34.26	2.06	34.26
2	1.60	26.64	3.65	60.90
3	0.94	15.71	4.60	76.60
4	0.76	12.70	5.36	89.31
5	0.63	10.45	5.99	99.76
6	0.01	0.24	6.00	100.00

10

## 【0 1 6 0】

## 【表 1 7】

表 1 8 各 PC についての選択されたフローサイトメトリーのローディング  
(95% CL について示された固有値との関係 > 0.5)

	PC1	PC2	PC3
fc 24	-0.23	-0.72	-0.13
fc 25	-0.10	-0.40	0.87
fc 26	0.20	-0.60	-0.39
fc 27	-0.19	-0.72	-0.06
fc 28	-0.98	0.14	-0.05
fc 29	-0.98	0.09	-0.08

20

## 【0 1 6 1】

## 【表 1 8】

表 1 9 RT-PCR データについての相関マトリックスの固有値、及び関連統計値

PC	固有値	全分散%	累積固有値	累積分散%
1	2.9	41.0	2.9	41.0
2	1.2	17.6	4.1	58.6
3	1.0	14.4	5.1	73.0
4	0.6	8.3	5.7	81.3
5	0.6	7.9	6.2	89.2
6	0.4	6.2	6.7	95.4
7	0.3	4.6	7.0	100.0

40

## 【0 1 6 2】

## 【表 19】

表 20 各 PC についての RT-PCR ためのローディング  
(95% CI について示された固有値との関係 > 0.5)

	PC1	PC2	PC3
Fas-L	0.68	-0.01	0.340
MCP-1	0.71	-0.38	-0.27
TNF- $\alpha$	0.77	0.21	-0.25
IL-1	0.37	0.64	0.56
IL-6	0.72	-0.22	-0.20
I1-8	0.70	-0.28	0.389
I1-10	0.34	0.698	-0.48*

10

\* 95% CI に有意性境界線

20

## 【0163】

## 【表 20】

表 21 臨床、RP-PCR 及びフローサイトメトリーの組合された  
変数についての相関マトリックスの固有値、及び関連統計値

	固有値	全分散%	累積固有値	累積%
1	4.550	15.167	4.550	15.167
2	3.861	12.870	8.411	28.037
3	3.295	10.982	11.706	39.019
4	2.028	6.760	13.734	45.779
5	1.816	6.052	15.549	51.831
6	1.520	5.065	17.069	56.896
7	1.234	4.113	18.303	61.010
8	1.153	3.844	19.456	64.854
9	1.139	3.797	20.595	68.650
10	0.958	3.192	21.553	71.842
11	0.931	3.104	22.484	74.946
12	0.906	3.021	23.390	77.968
13	0.825	2.748	24.215	80.716
14	0.740	2.466	24.955	83.182
15	0.685	2.284	25.640	85.466
16	0.611	2.036	26.251	87.502
17	0.559	1.863	26.810	89.365
18	0.542	1.808	27.352	91.173
19	0.480	1.601	27.832	92.774

30

40

50

## 【 0 1 6 4 】

表 2 1 続 き

20	0.441	1.469	28.273	94.244
21	0.371	1.235	28.644	95.479
22	0.333	1.108	28.976	96.588
23	0.299	0.998	29.276	97.586
24	0.250	0.833	29.526	98.419
25	0.175	0.585	29.701	99.003
26	0.139	0.462	29.840	99.465
27	0.114	0.381	29.954	99.846
28	0.020	0.068	29.974	99.914
29	0.018	0.059	29.992	99.973
30	0.008	0.027	30.000	100.000

10

20

## 【 0 1 6 5 】

## 【表 2 1】

表 2 2 各PCについての臨床、RP-PCR及びフローサイトメトリーの組合されたデータのローディング (95%CLについて示された固有値との関係  $> 0.5$ )

パラメータ	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7	PC8	PC9
CD31 (%)	-0.02	-0.03	0.42	0.18	0.52	-0.07	-0.40	-0.17	0.03
CD54 (%)	-0.16	0.04	0.20	-0.09	0.48	0.48	0.06	0.18	-0.19
CD62L (%)	-0.41	-0.09	0.20	0.28	0.16	-0.21	0.01	-0.01	0.39
CD11B (%)	-0.13	-0.16	0.22	0.19	0.54	-0.13	-0.09	-0.19	0.05
CD69 (%)	0.49	-0.55	0.23	-0.27	0.13	-0.16	0.00	0.40	-0.25
CD11B CD69 (%)	0.48	-0.53	0.29	-0.27	0.14	-0.16	-0.03	0.40	-0.22
温度	0.20	0.06	0.30	-0.35	-0.02	0.37	0.47	0.17	0.30
HR	0.15	-0.12	0.13	-0.35	0.20	0.65	-0.03	-0.32	0.00
MAP	0.19	0.19	-0.15	0.10	-0.44	0.31	-0.30	0.04	-0.35
WCC	0.57	-0.64	0.14	0.38	0.01	0.06	0.02	-0.08	0.08
好中球	0.53	-0.64	0.21	0.38	-0.01	-0.05	0.00	-0.06	0.12
リンパ球	0.31	-0.10	-0.32	0.01	-0.02	0.09	-0.06	-0.30	-0.28
単球	0.56	-0.61	0.04	0.25	-0.04	0.19	0.06	-0.04	0.09
血小板	0.49	-0.02	-0.31	0.29	0.01	-0.15	0.26	0.04	-0.01
INR	-0.21	-0.71	0.09	0.10	-0.25	0.21	-0.24	-0.12	-0.04
APTR	-0.50	-0.49	-0.04	0.07	-0.33	0.11	-0.22	-0.08	-0.08
CRP	-0.07	-0.09	0.26	-0.63	0.14	-0.32	-0.23	-0.18	0.02
PO2	-0.23	0.13	-0.10	0.18	0.45	-0.10	0.14	-0.12	-0.49
HCO3-	0.79	0.32	-0.07	-0.25	-0.03	-0.12	-0.21	-0.06	0.01
BXS	0.80	0.33	-0.07	-0.24	-0.04	-0.11	-0.22	-0.08	0.03
乳酸塩	-0.50	-0.41	-0.02	-0.15	0.03	0.06	0.22	0.08	-0.08
尿素	-0.25	-0.15	0.21	-0.12	-0.24	-0.32	0.16	-0.08	-0.19
クレアチニン	-0.68	-0.45	0.16	-0.06	-0.15	-0.04	-0.03	0.10	-0.18
Fas-L	-0.05	0.12	0.77	-0.08	0.01	0.11	-0.16	-0.05	-0.05
MCP-1	0.12	0.19	0.61	0.07	-0.36	-0.09	0.20	-0.32	-0.13
TNF- $\alpha$	0.14	0.49	0.57	0.32	0.01	0.24	0.13	0.05	-0.12
IL-1	-0.22	0.28	0.20	0.20	-0.12	0.11	-0.45	0.49	0.16
IL-6	0.07	0.19	0.66	0.15	-0.15	-0.20	0.20	-0.05	-0.25
IL-8	0.02	0.16	0.73	-0.05	-0.27	-0.04	-0.03	-0.01	0.16
IL-10	0.14	0.44	0.02	0.51	0.09	0.03	-0.05	0.21	-0.19

10

20

30

40

50

## 【表 2 2】

表 2 3 全ての D F A モデルに使用される  
モデル定義

パラメータ	値
変数導入	順方向、段階的
許容差	0.010
モデルに含められる用語	誘導に従う
入力するためのF	1.00
除去するためのF	0.00
工程の数	有意性に従う

10

## 【 0 1 6 7】

## 【表 2 3】

表 2 4 置換された平均値を含む臨床データの P C A スコアに基づく  
D F A モデルの要約

パラメータ	値/用語			
W i l k s の $\lambda$	< 0.40			
モデルに含められた変数	PC1, PC3, PC4			
$\chi^2$	3 sig. DFs			
累積比率	DF1	DF2	DF3	
	56.7%	79.3%	89.9%	
固有値	0.60	0.24	0.11	
因子構造	PC1	0.63	0.02	0.15
	PC3	0.09	-0.87	0.39
	PC4	0.44	0.03	-0.51
標準化された係数	PC1	0.78	0.02	0.13
	PC3	0.12	-0.89	0.35
	PC4	0.61	0.04	-0.48
	対照	-0.15	0.63	0.04
	日 1	0.51	-0.39	0.02
	日 2	0.57	-0.17	-0.64
	日 3	0.72	0.02	0.35
	日 4	0.21	0.02	0.43
	日 5	-1.80	-0.01	-0.28
	日 6	-1.33	-1.14	0.37

20

30

## 【 0 1 6 8】

## 【表 2 4】

表 2 5 置換された平均値を含む臨床データの P C A スコアに基づく判別 D F  
A モデルにおける変数アソシエーションの要約

DF	PC	各 P C の成分
1	1	WCC, 単球, 好中球及び血小板, BXS及びHCO <sub>3</sub> -ve クレアチニン及び乳酸塩と相関
	4	CRP
2	3	HR and CRP
3	4	CRP

40

50

【 0 1 6 9 】

【 表 2 5 】

表 2 6 置換された平均値を含む臨床データの P C A スコアに基づく D F A モデルの分類マトリックス

群	% 正確さ	対照	1 日	2 日	3 日	4 日	5 日	6 日
		p=. 28	p=. 23	p=. 14	p=. 08	p=. 11	p=. 09	p=. 05
対照	80	24	4	0	1	0	0	1
1 日	36	12	9	3	0	0	0	1
2 日	40	5	2	6	0	1	0	1
3 日	11	1	5	1	1	1	0	0
4 日	8	7	3	0	0	1	1	0
5 日	50	2	2	0	0	0	5	1
6 日	83	1	0	0	0	0	0	5
合計	48	52	25	10	2	3	6	9

10

【 0 1 7 0 】

【 表 2 6 】

表 2 7 置換された平均値を含まない臨床データの P C A スコアに基づく D F A モデルの要約

パラメータ		値/用語			
W i l k s の $\lambda$		< 0. 45			
モデルに含められた変数		PC1, PC3, PC5			
$X^2$		3 sig. DFs			
累積比率		DF1	DF2	DF3	
		52%	89%	95%	
固有値		0. 49	0. 35	0. 05	
因子構造		PC1	0. 65	0. 09	0. 08
		PC3	-0. 13	0. 80	0. 45
		PC5	-0. 61	-0. 32	-0. 07
標準化された係数		PC1	0. 79	0. 10	0. 06
		PC3	-0. 15	0. 87	0. 38
		PC5	-0. 73	-0. 34	-0. 06
正準変数の平均		対照	-0. 18	0. 56	-0. 10
		日 1	0. 54	-0. 59	0. 07
		日 2	0. 45	-0. 14	0. 36
		日 3	0. 81	0. 40	-0. 19
		日 4	0. 22	-0. 05	-0. 27
		日 5	-1. 61	-0. 00	0. 33
		日 6	-1. 40	-1. 90	-0. 59

20

30

40

【 0 1 7 1 】

50

## 【表 2 7】

表 2 8 置換された平均値を含まない臨床データの P C A スコアに基づく判別  
D F A モデルにおける変数アソシエーションの要約

DF	PC	各 P C の成分
1	1	WCC, 単球, 好中球及び血小板, BXS及びHCO <sub>3</sub> -ve クレアチニン及び乳酸塩と相関
	5	PO2は、尿素及びMAPの両方と対比される
2	3	HR 及び CRP
3	3	HR 及び CRP

10

## 【 0 1 7 2】

## 【表 2 8】

表 2 9 置換された平均値を含まない臨床データの P C A スコアに基づく D F A  
モデルの分類マトリックス

群	% 正確さ	対照	1 日	2 日	3 日	4 日	5 日	6 日
		p=. 34	p=. 21	p=. 13	p=. 06	p=. 10	p=. 09	p=. 03
対照	83	25	2	1	1	0	1	0
1 日	47	9	9	1	0	0	0	0
2 日	0	6	6	0	0	0	0	0
3 日	0	3	3	0	0	0	0	0
4 日	0	5	3	0	0	0	1	0
5 日	25	4	2	0	0	0	2	0
6 日	67	0	0	0	0	0	1	2
合計	44	52	25	2	1	0	5	2

20

30

40

## 【 0 1 7 3】

50

## 【表 29】

表 30 置換された平均値を用いて変換された臨床データに基づく D F A モデルの要約

パラメータ		値/用語				
W i l k s の $\lambda$		0.25				
モデルに含められた変数		BXS, CRP, 乳酸塩, 尿素, 温度, クレアチニン, 好中球, PO2, HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>				
$X^2$		5 sig. DFs				
累積比率		DF1	DF2	DF3	DF4	DF5
		46%	74%	85%	94%	99%
固有値		0.78	0.47	0.18	0.15	0.09
因子構造	BXS	-0.62	0.58	-0.09	0.21	0.22
	CRP	0.12	0.63	0.16	-0.03	-0.31
	温度	0.17	0.03	-0.56	0.62	0.11
	乳酸塩	0.65	0.03	0.05	0.05	0.01
	尿素	-0.19	-0.18	-0.19	0.17	-0.57
	クレアチニン	0.42	-0.26	0.51	0.20	-0.19
	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	-0.54	0.67	-0.13	0.19	0.16
	PO2	0.16	-0.05	-0.04	-0.67	-0.31
	好中球	-0.14	0.05	-0.24	-0.18	0.70
標準化された係数	BXS	-1.45	-0.78	0.84	0.09	1.00
	CRP	0.13	0.65	0.07	-0.20	-0.20
	温度	0.41	-0.02	-0.64	0.53	0.02
	乳酸塩	0.56	0.34	-0.22	-0.01	0.21
	尿素	-0.52	-0.22	-0.51	0.09	-0.60
	クレアチニン	0.13	-0.11	0.93	0.57	0.10
	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	1.02	1.45	-0.53	0.32	-0.88
	PO2	0.19	0.07	-0.28	-0.61	-0.21
	好中球	-0.10	0.01	-0.30	-0.32	0.67
正準変数の平均	対照	-0.54	-0.90	-0.10	-0.14	-0.07
	日 1	-0.22	0.53	-0.35	-0.03	0.40
	日 2	-0.19	0.84	0.20	-0.58	-0.36
	日 3	-0.42	0.64	0.41	0.62	-0.28
	日 4	-0.34	-0.09	0.43	0.61	0.06
	日 5	2.05	-0.37	0.61	-0.23	0.27
	日 6	1.95	0.03	-1.05	0.47	-0.54

10

20

30

40

## 【表 3 0】

表 3 1 置換された平均値を含む臨床データに基づく D F A モデルにおける変数アソシエーションの要約

DF	DFを定義する臨床的変数
1	乳酸塩と負に相関するBXS及びHCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
2	BXS, CRP及びHCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> の間の相関
3	温度及びクレアチニンの間の負の相関
4	温度及びPO2の間の負の相関
5	尿素及び好中球の間の負の相関

10

## 【 0 1 7 5】

## 【表 3 1】

表 3 2 置換された平均値を含む臨床データに基づく D F A モデルの分類マトリックス

群	% 正確さ	対照	1 日	2 日	3 日	4 日	5 日	6 日
		p=. 28	p=. 23	p=. 14	p=. 08	p=. 11	p=. 09	p=. 05
対照	80	24	5	1	0	0	0	0
1 日	56	4	14	5	0	1	0	1
2 日	60	2	2	9	1	0	0	1
3 日	11	1	4	2	1	1	0	0
4 日	8	7	4	0	0	1	0	0
5 日	50	1	2	1	0	0	5	1
6 日	83	0	0	0	0	0	1	5
合計	55	39	31	18	2	3	6	8

20

30

40

50

【 0 1 7 6 】

【 表 3 2 】

表 3 3 置換された平均値を含むフローサイトメトリーデータのPCAスコアに基づくDFAモデルの要約

パラメータ		値/用語	
Wilksの $\lambda$		< 0.39	
モデルに含められた変数		PC1, PC5, PC8	
$X^2$		2 sig. DFs	
累積比率		DF1	DF2
		46 %	71 %
固有値		0.49	0.26
因子構造	PC1	0.30	-0.04
	PC5	-0.19-	-0.59
	PC8	0.419	-0.14
標準化された係数	PC1	0.40	-0.04
	PC5	-0.25	-0.67
	PC8	0.56	-0.16
正準変数の平均	対照	-0.21	-0.35
	日 1	-0.71	-0.12
	日 2	-0.24	0.16
	日 3	0.14	1.44
	日 4	0.48	0.32
	日 5	0.88	-0.28
	日 6	1.99	-0.43

10

20

【 0 1 7 7 】

【 表 3 3 】

表 3 4 置換された平均値を含むフローサイトメトリーデータのPCAスコアに基づくDFAモデルにおける変数アソシエーションの要約

DF	PC	各DFの成分
1	1	fc 1-3, 9-15, 17, 20-23
	8	fc 19
2	5	fc 7 + 26

30

40

50

【 0 1 7 8 】

【 表 3 4 】

表 3 5 置換された平均値を含むフローサイトメトリーデータの P C A スコア  
に基づく D F A モデルの分類マトリックス

群	% 正確さ	対照	1 日	2 日	3 日	4 日	5 日	6 日
		p=. 28	p=. 23	p=. 14	p=. 08	p=. 11	p=. 09	p=. 05
対照	66. 6	20	7	0	1	0	1	1
1 日	36. 0	12	9	2	0	0	2	0
2 日	13. 3	4	8	2	1	0	0	0
3 日	44. 4	2	2	0	4	0	1	0
4 日	33. 3	3	2	1	0	4	1	1
5 日	40. 0	4	1	0	0	0	4	1
6 日	66. 6	1	1	0	0	0	0	4
合計	43. 9	46	30	5	6	4	9	7

10

20

30

40

50

【 0 1 7 9 】

【 表 3 5 】

表 3 6 置換された平均値を含むフローサイトメトリーデータに基づく D F A  
モデルの要約

パラメータ		値/用語		
W i l k s の $\lambda$		< 0.034		
モデルに含められた変数		fc7-8, fc11, fc16, fc25, fc28, fc29		
$X^2$		3 sig. DFs		
累積比率		DF1	DF2	DF3
		46%	62%	74%
固有値		2.17	0.94	0.63
因子構造	fc7	0.06	-0.16	-0.10
	fc8	-0.06	-0.19	-0.07
	fc11	0.02	0.13	-0.24
	fc16	0.05	-0.14	0.14
	fc25	-0.34	-0.23	-0.08
	fc28	0.04	-0.02	0.02
	fc29	0.06	-0.03	0.01
標準化された係数	fc7	1.84	0.20	-1.03
	fc8	-1.66	-1.00	0.32
	fc11	0.87	1.89	-1.16
	fc16	-0.73	-1.33	0.80
	fc25	-0.86	-0.29	0.02
	fc28	-2.34	0.65	0.29
	fc29	2.64	0.12	-0.66
正準変数の平均	対照	0.50	-0.92	-0.40
	日 1	1.07	-0.32	0.12
	日 2	0.22	0.07	1.10
	日 3	0.20	1.75	1.26
	日 4	-0.39	1.49	-1.34
	日 5	-1.05	0.73	-0.55
	日 6	-5.27	-1.06	0.48

10

20

30

【 0 1 8 0 】

【 表 3 6 】

表 3 7 置換された平均値を含むフローサイトメトリーデータに基づく D F A  
モデルにおける変数アソシエーションの要約

DF	DFを定義する臨床的変数
1	fc7, 16, 28及び29を相関させ、またこれらをfc8及び25に対比させる
2	fc7, 16, 28及び25を相関させ、またこれらをfc12に対比させる
3	fc11と相関させる

40

50

【 0 1 8 1 】

【 表 3 7 】

表 3 8 置換された平均値を含む臨床データに基づく D F A モデルの分類マトリックス

群	% 正確さ	対照	1 日	2 日	3 日	4 日	5 日	6 日
		p=. 28	p=. 23	p=. 14	p=. 08	p=. 11	p=. 09	p=. 05
対照	80.0	24.0	2.0	0.0	1.0	2.0	1.0	0.0
1 日	68.0	6.0	17.0	1.0	0.0	1.0	0.0	0.0
2 日	73.3	3.0	1.0	11.0	0.0	0.0	0.0	0.0
3 日	66.7	2.0	0.0	0.0	6.0	1.0	0.0	0.0
4 日	91.7	1.0	0.0	0.0	0.0	11.0	0.0	0.0
5 日	80.0	0.0	1.0	1.0	0.0	0.0	8.0	0.0
6 日	83.3	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0	5.0
合計	76.6	36.0	21.0	13.0	7.0	16.0	9.0	5.0

10

【 0 1 8 2 】

## 【表 3 8】

表 3 9 臨床的変数、RT-PCR変数及びフローサイトメトリー変数の組合せに基づくDFAモデルの要約

パラメータ		値/用語			
Wilksの $\lambda$		< 0.0087			
モデルに含められた変数		fc7-8, fc11, fc16, fc25, fc28, fc29			
$X^2$		3 sig. DFs			
累積比率		DF1	DF2	DF3	DF4
		44%	63%	79%	89%
固有値		3.79	1.60	1.34	0.86
因子構造	BXS	-0.30	0.08	-0.26	0.17
	fc 25	0.22	-0.23	-0.08	0.13
	fc 22	0.22	-0.03	0.08	0.28
	fc 11	-0.02	0.12	0.05	0.23
	温度	0.09	-0.11	-0.13	0.20
	CRP	0.01	0.16	-0.33	-0.16
	fc 18	0.15	0.01	-0.12	0.06
	fc 6	-0.03	0.01	-0.02	0.12
	IL-6	-0.11	-0.06	0.11	-0.07
	INR	0.00	0.06	0.03	0.12
	APTR	0.15	0.12	0.30	-0.03
	fc 16	-0.07	-0.09	-0.11	-0.07
	尿素	-0.02	-0.10	0.01	0.17
	乳酸塩	0.25	0.04	-0.05	-0.22
	Fas-L	0.00	0.15	-0.03	0.04
	fc 13	-0.04	-0.01	-0.07	0.11
	fc 24	0.00	-0.15	0.11	0.15
	fc 1	-0.01	0.12	-0.12	0.22
	fc 3	-0.02	0.04	-0.02	0.15
	MCP-1	-0.06	0.04	0.02	-0.02
fc 28	-0.05	-0.03	-0.08	-0.01	
Il-10	0.01	-0.10	0.09	-0.07	

10

20

30

## 【0183】

表 3 9 続き 臨床的変数、RT-PCR変数及びフローサイトメトリー変数の組合せに基づくDFAモデルの要約

	fc 27	0.01	-0.12	0.08	-0.02
	fc 26	0.04	-0.10	0.19	-0.06
	好中球	-0.11	-0.07	0.03	-0.04
	fc 14	0.00	0.09	0.08	0.19
	WCC	-0.10	-0.08	0.03	-0.01
	fc 29	-0.07	-0.04	-0.08	0.03
	血小板	-0.11	0.04	0.12	-0.03
	P02	0.05	-0.07	0.03	-0.27
パラメータ		値/用語			
累積比率		DF1	DF2	DF3	DF4
		44%	63%	79%	89%
固有値		3.79	1.60	1.34	0.86
標準化された係数	BXS	-0.80	0.33	-0.21	-0.09
	fc 25	0.81	-0.52	-0.29	0.22
	fc 22	0.46	-0.58	0.05	0.68
	fc 11	0.04	2.00	0.53	0.96
	温度	0.51	-0.41	-0.07	0.23
	CRP	0.07	0.14	-0.58	-0.13
	fc 18	0.64	0.72	-0.53	-0.11
	fc 6	0.02	-0.29	0.17	0.08
	IL-6	-0.69	-0.36	0.28	-0.12
	INR	-0.90	0.03	-0.99	0.94
	APTR	0.82	0.62	1.28	-0.44
	fc 16	-0.63	-1.23	-0.54	-0.69
	尿素	-0.13	-0.38	0.06	0.58
	乳酸塩	0.14	0.12	-0.06	-0.68
	Fas-L	0.20	0.92	-0.04	0.05
	fc 13	-0.27	-0.82	-0.33	-0.07
	fc 24	-0.46	-0.72	0.11	0.15
	fc 1	1.04	0.84	0.09	0.12
	fc 3	-0.67	-0.46	-0.41	0.06
	MCP-1	0.33	0.01	-0.21	-0.05
	fc 28	3.20	0.89	-2.48	-0.21
	Il-10	0.22	-0.03	0.26	-0.16
	fc 27	0.12	0.14	0.23	-0.13
	fc 26	0.15	0.26	0.27	-0.01
	好中球	0.83	0.74	0.27	-1.34
	fc 14	-0.43	-0.73	0.32	-0.88
	WCC	-0.70	-1.06	0.05	0.77
	fc 29	-2.73	-0.34	2.71	0.56
	血小板	-0.47	-0.06	0.33	0.27
	P02	-0.17	-0.12	0.20	-0.45

10

20

30

40

## 【 0 1 8 4 】

表 3 9 続き 臨床的変数、R T - P C R 変数及びフローサイトメトリ変数の組合せに基づく D F A モデルの要約

50

正準変数の平均	対照	-0.39	-1.04	1.24	0.23
	日 1	-1.80	-0.51	-0.50	-0.19
	日 2	-0.65	0.70	-1.16	-1.17
	日 3	-0.40	1.12	-1.19	0.45
	日 4	0.38	2.02	0.20	1.77
	日 5	3.33	1.36	1.41	-1.45
	日 6	5.37	-2.44	-2.21	0.76

【 0 1 8 5 】

【 表 3 9 】

10

表 4 0 臨床的変数、R T - P C R 変数及びフローサイトメトリー変数の組合せに基づく D F A モデルの分類マトリックス

群	%	対照	1 日	2 日	3 日	4 日	5 日	6 日
		p=. 28	p=. 23	p=. 14	p=. 08	p=. 11	p=. 09	p=. 05
対照	90.0	27.0	0.0	1.0	1.0	1.0	0.0	0.0
1 日	76.0	3.0	19.0	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0
2 日	93.3	0.0	1.0	14.0	0.0	0.0	0.0	0.0
3 日	77.8	1.0	0.0	1.0	7.0	0.0	0.0	0.0
4 日	91.7	0.0	0.0	1.0	0.0	11.0	0.0	0.0
5 日	90.0	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	9.0	0.0
6 日	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	6.0
合計	86.9	31.0	20.0	21.0	8.0	12.0	9.0	6.0

20

【 0 1 8 6 】

実施例 7 : 敗血症を予測するための二変量ロジスティック回帰分析

二変量ロジスティック回帰モデルを使用して、敗血症を発症し且つ陽性の微生物学的結果を呈した I C U 患者からの R T - P C R、フローサイトメトリーの結果及び臨床データを別々に解析した。このモデルは、対照群と年齢の一致し且つ敗血症と診断されなかった I C U 患者群から得た結果を使用した。該モデルは多くの可能な予測因子を同定したが、発症前の敗血症患者について得られた値が非感染症患者について得られた範囲内なので、幾つかは使用が制限されるように見える。非感染症データとは異なる幾つかの前敗血症データ点を生じる潜在的な予測マーカーが、表 3 6 に列記されている。しかし、組合されたときには、これら予測マーカーは 2 4 人の前敗血症患者のうちの 8 人だけを同定できたに過ぎない。

30

40

【 0 1 8 7 】

## 【表 4 0】

表 4 1 二値ロジスティック回帰分析により同定された潜在的予測マーカーの要約

時点	全体の予測子効果	予測子	確率スコア
5 日前診断	p=0.10	base excess	p=0.047
4 日前診断	p=0.042	IL-10	p=0.058
3 日前診断	p=0.095	血中重炭酸塩	p=0.021
	p=0.114	CD 31	p = 0.037
	p=0.055	IL-10	p=0.052
2 日前診断	p=0.10	血中重炭酸塩	p=0.017
		C反応性タンパク質	p=0.038
	P=0.085	TNF- $\alpha$	p=0.022

10

## 【 0 1 8 8】

後で S I R S を発症して感染が確認された 24 人のうちの 8 人において、敗血症を予測できたマーカーの組合せの発見は、診断試験を構成しない。顆粒球上の C D 3 1 の予測能力は有望であるように見えるが (66%)、このマーカーは臨床症状の出現の 3 日前に有効であるに過ぎない。C D 3 1 単独に基づく試験は、有効であるためには大きな診断窓の存在が必要であるから、診断試験を構成しないかもしれない。これは、より多くのマーカーの発見によって達成できるであろう。しかし、この研究は将来の診断試験の一部を形成し得るマーカーを見付けるかもしれないが、注意払わなければならない。1980 年代の半ばに、H L A - D R は感染症及び敗血症の発症についての予後徴候であると信じられた (Spittler, A. & Roth, E. 2003, Intensive Care Med, vol. 29, pp. 1211-121)。しかし、より多くの最近の研究によって、このマーカーの術後レベルは S I R S、敗血症又は感染合併症を予測しないことが示された (Oczenski, W. et al 2003, Intensive Care Med, vol. 29, pp. 1253-1257 and Perry, S. et al. 2003, Intensive Care Med, vol. 29, pp. 1245-1252)。H L A - D R の場合におけるこれらの矛盾する報告は、本研究結果に対して注意が払われなければならない理由を示している。これらの発見は、抗生物質ポリシー、診断基準、臨床実務、外科的手術、治療方針、環境因子、及び患者の罹患素因のような地理的因子に起因するかもしれない (Angus, D. & Wax, R. 2001, Critical Care Medicine, vol. 29, no. 7 (suppl), pp. 109-116)。同定されたマーカーの有用性を更に評価するためには、幾つかの異なる病院 (好ましくは異なる健康オーソリティーに亘る) からの更に多くの患者を含んだ大規模の研究を行う必要がある。

20

30

## 【 0 1 8 9】

実施例 8 : 生物兵器に対する対応のモデルとしての敗血症

< 背景及び方法 >

特許請求の範囲に記載された発明の一つの応用は、生物兵器に対する露出から生じる故意の感染の早期検出であるから、このような感染のモデルとしての敗血症の適用可能性が試験された。Burkholderia pseudomallei、及び Francisella tularensis のような推定される生物兵器病原体は、明らかな理由のためにモデル化が困難な重篤な敗血症を生じることが予測される (表 4 2 参照)。

40

## 【 0 1 9 0】

しかし、全血のインピトコ感染はモデルとして使用されてよく、また活性化マーカー発現及びサイトカイン応答が測定されてよい。これをインピトコ感染モデルと比較するために、インピボでの後天的院内感染データと直接比較可能なモデル感染物質として、Staphylococcus aureus 感染が選択された。

## 【 0 1 9 1】

50

## 【表 4 1】

表 4 2

感染	「否定的な」結果の形態
炭疽	敗血症、敗血症ショック
ブルセラ症	敗血症、敗血症ショック又は慢性形態
鼻疽及び類鼻疽	敗血症、敗血症ショック又は持続形態
ペスト	敗血症、敗血症ショック
野兔病	敗血症、敗血症ショック
発疹チフス	敗血症
Q熱	敗血症

10

## 【0192】

表 4 2 続き

エボラ及びマルブルグ出血熱	敗血症、敗血症（毒素感染、血液量減少）ショック
日本脳炎	敗血症、敗血症ショック
天然痘	敗血症、敗血症ショック
黄熱病	敗血症

20

## 【0193】

25人の健康なボランティアからの血液を、インビトロで *Staphylococcus aureus* に感染させ、先に述べたように、感染後24時間及び48時間においてマーカー及びサイトカインレベルを測定した。

## 【0194】

## FACS

樹状細胞： CD54、CD97、CCR6、CCR7

NK細胞： CD25、CD44、CD62L、CD69、CD97

単球： CD44、CD54、CD62L、CD69、CD97、CD107a

好中球： CD44、CD62L、CD69、CD107a

## リアルタイムRT-PCR

IL-1、IL-6、IL-8、IL-10、MCP-1、TNF- $\alpha$ 、sFasL

30

## 【0195】

これらの組の入力パラメータ（即ち、樹状細胞マーカー、NK細胞マーカー、単球マーカー、好中球マーカー、24時間でのRT-PCRデータ、及び48時間でのRT-PCRデータ）を使用して、それ自身のニューラルネットワークモデルをトレーニングした。トレーニング（70%）及びその後の試験（30%）のために、感染した血液サンプル又は非感染血液サンプルのランダムな選択を使用した。ニューラルネットワークの試験段階は、入力されたパラメータの試験組が感染サンプル又は非感染サンプルの何れに由来するかを正確に予測する回数%に基づいて、予測精度を与えた。各組の入力パラメータの試験が5回繰返された。試験が行われる毎に、新たにランダム化された70%の感染サンプル及び非感染サンプルを使用して、新しいニューラルネットワークが構築された。5個のランダム化された入力データ組に関して構築された5個のニューラルネットワークから計算された5個の予測精度を平均することにより、各組の入力パラメータについて、平均予測精度が誘導された。この方法論は、敗血症患者の研究に使用したものと類似していた。

40

## 【0196】

## &lt; 結果 &gt;

最も一貫した結果は、RT-PCRの結果から得られた。図4は、三人の患者から得ら

50

れたデータを示しており、これはプロファイルにおける変化のパターンの幾分不均一なパターンを例証している。しかし、上記で述べたニューラルネットワーク解析にかけたときに、該アルゴリズムは、非感染対照に対する感染サンプルの良好なレベルの同定を達成した(図5)。

【図面の簡単な説明】

【0197】

【図1】図1：感染の後、免疫系の細胞は活性化されることにより病原体を認識し、これに応答する。これにより、異なるメッセンジャータンパク質(例えばサイトカイン及びケモカイン)の産生、及び細胞表面上での活性化マーカー及び接着分子の発現がもたらされる。これらの産生は、細胞間の情報伝達を促進し、特定の物質に対する調整された免疫応答を生じる。この炎症性免疫応答は、感染に対する応答において比較的一定であり、且つ疾患プロセスの非常に初期の段階で生じるので、このようなマーカーの発現における変化をモニターすることは、敗血症発症の初期段階を予測するために使用することができる。理想的に言えば、これは臨床症状及び疾患の開始前の、介入の治療窓の間に行われる。

10

【図2】図2：フローサイトメトリーにより、顆粒球上で測定されたCD31発現のプロット。敗血症の患者(n=6)及び敗血症発症には至らなかったICU患者(n=24)の診断の3日前に、患者から採取した血液サンプルからのもの。各符号は、一人の患者からの測定値を表す。

20

【図3】図3：表4、モデル2に従って臨床データを解析するニューラルネットワークの設計。WCC = 白血球数、CRP = C反応性タンパク質

【図4】図4：S. Aureusによるインピトロでの血液感染後に得られた、サイトカインプロファイルの変化。実施例8に詳述した三人のボランティアから採取された血液からのデータ。

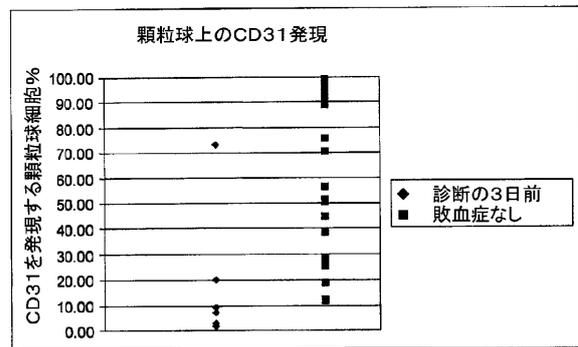
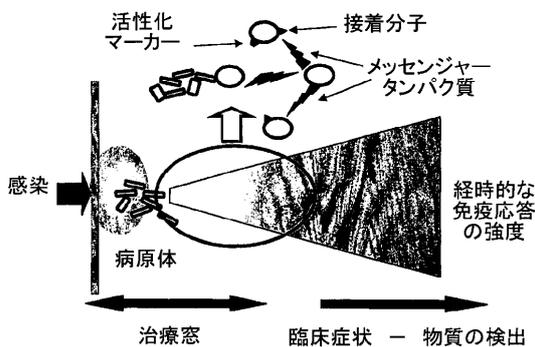
【図5】図5：S, Aureusによるインピボ敗血症モデルにおけるニューラルネットワーク解析の結果。

【図1】

【図2】

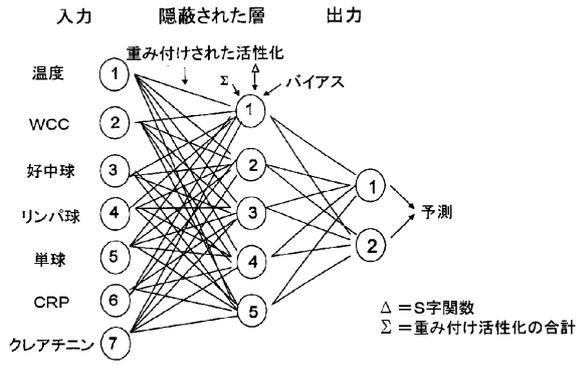
Figure 1

Figure 2



【 図 3 】

Figure 3



【 図 4 】

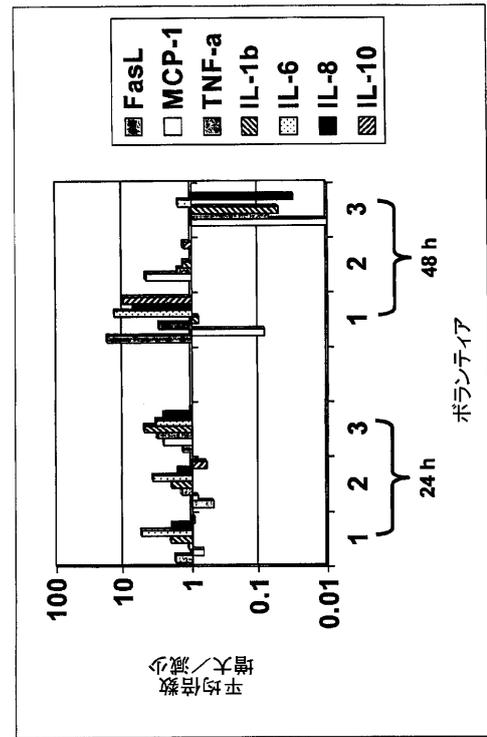


Figure 4

【 図 5 】

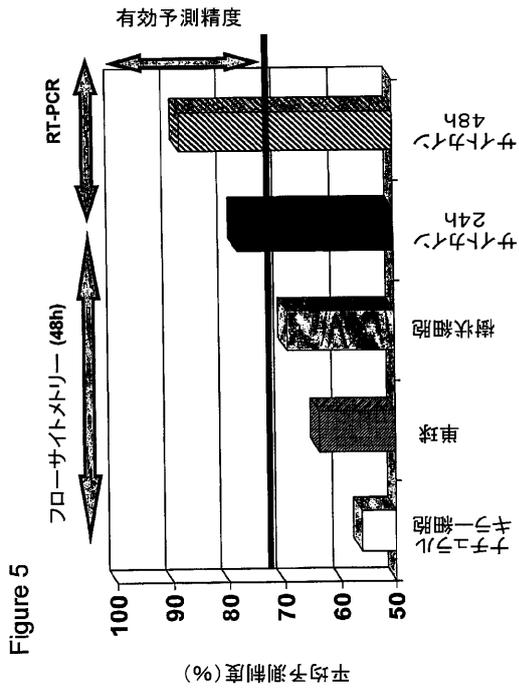


Figure 5

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

application No

/GB2005/004755

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G06F 19/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G06F C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, INSPEC, BIOSIS, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2003/207278 A1 (KHAN JAVED ET AL) 6 November 2003 (2003-11-06) abstract figures 1-3,5 paragraphs [0005], [0007], [0015], [0017], [0037], [0060], [0070]	1-19
X	WO 2004/043236 A (BECTON, DICKINSON AND COMPANY; IVEY, RICHARD; GENTLE, THOMAS; MOORE, R) 27 May 2004 (2004-05-27) the whole document ----- -/--	1-13,18, 19
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents :		
*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
*E* earlier document but published on or after the international filing date		*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
*L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)		*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		*A* document member of the same patent family
*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 24 March 2006	Date of mailing of the international search report 07/04/2006	
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3018	Authorized officer Godzina, P	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

application No

GB2005/004755

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BRAUSE R ET AL: "Neural Networks for sepsis prediction - The MEDAN-Project" JOURNAL FUR ANASTHESIE UND INTENSIVBEHANDLUNG 2004 GERMANY, vol. 11, no. 1, 18 February 2004 (2004-02-18), pages 40-43, XP002373875 ISSN: 0941-4223 cited in the application the whole document -----	1-13,18, 19
X	US 6 658 287 B1 (LITT BRIAN ET AL) 2 December 2003 (2003-12-02) figures 4,6-9 column 1, line 53 - column 2, line 48 -----	1-4,11, 13,18,19
A	COBB J P ET AL: "SEPSIS GENE EXPRESSION PROFILING: MURINE SPLENIC COMPARED WITH HEPATIC RESPONSES DETERMINED BY USING COMPLEMENTARY DNA MICROARRAYS" CRITICAL CARE MEDICINE, WILLIAMS AND WILKINGS COMPANY, BALTIMORE, MA, US, vol. 30, no. 12, December 2002 (2002-12), pages 2711-2721, XP008037048 ISSN: 0090-3493 page 2712, right-hand column, line 44 - page 2713, middle column, line 33 page 2717, right-hand column, lines 16-22 -----	1-19
A	WO 00/52472 A (THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY; RABIN,) 8 September 2000 (2000-09-08) abstract -----	1-19
A	DYBOWSKI R ET AL: "Artificial neural networks in pathology and medical laboratories." LANCET. 4 NOV 1995, vol. 346, no. 8984, 4 November 1995 (1995-11-04), pages 1203-1207, XP002373876 ISSN: 0140-6736 page 1203, left-hand column, lines 7-10 page 1203, right-hand column, lines 1-4 page 1203, right-hand column, lines 47-54 page 1204, left-hand column, lines 13-22 page 1206, left-hand column, lines 1-12 page 1206, right-hand column, lines 1-3 figure 2 ----- -/--	1-19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

application No  
GB2005/004755

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BEATTY P C W: "Neural networks" CURRENT ANAESTHESIA AND CRITICAL CARE, CHURCHILL LIVINGSTONE, LONDON, GB, vol. 9, no. 4, August 1998 (1998-08), pages 168-173, XP004937546 ISSN: 0953-7112 the whole document	1-19

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

application No

'GB2005/004755

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2003207278	A1	06-11-2003	US 2004009154 A1 15-01-2004
WO 2004043236	A	27-05-2004	AU 2003291484 A1 03-06-2004
			AU 2003291488 A1 03-06-2004
			BR 0316197 A 27-09-2005
			BR 0316223 A 04-10-2005
			CA 2505785 A1 27-05-2004
			CA 2505843 A1 27-05-2004
			EP 1590469 A2 02-11-2005
			EP 1575978 A2 21-09-2005
			JP 2006506069 T 23-02-2006
			JP 2006506070 T 23-02-2006
			WO 2004044556 A2 27-05-2004
US 6658287	B1	02-12-2003	NONE
WO 0052472	A	08-09-2000	AU 3862200 A 21-09-2000

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
<b>C 1 2 M 1/34 (2006.01)</b>		C 1 2 M 1/34		A
<b>C 1 2 M 1/00 (2006.01)</b>		C 1 2 M 1/00		A

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(74) 代理人 100084009

弁理士 小川 信夫

(74) 代理人 100084663

弁理士 箱田 篤

(74) 代理人 100093300

弁理士 浅井 賢治

(74) 代理人 100114007

弁理士 平山 孝二

(72) 発明者 ジャクソン マシュー クリストファー

イギリス国 ウィルシャー エスピー 4 0 ジェイキュー ソールズベリー ポートン ダウン  
ディーエステーエル内

(72) 発明者 ルカソウスキー ローマン アントニー

イギリス国 ウィルシャー エスピー 4 0 ジェイキュー ソールズベリー ポートン ダウン  
ディーエステーエル内

(72) 発明者 イェイツ アマンダ マリー

イギリス国 ウィルシャー エスピー 4 0 ジェイキュー ソールズベリー ポートン ダウン  
ディーエステーエル内

(72) 発明者 ピアス マーティン ジュリアン

イギリス国 ウィルシャー エスピー 4 0 ジェイキュー ソールズベリー ポートン ダウン  
ディーエステーエル内

(72) 発明者 ブルックス ティモシー ジョン ギルビー

イギリス国 ウィルシャー エスピー 4 0 ジェイキュー ソールズベリー ポートン ダウン  
ディーエステーエル内

F ターム(参考) 2G054 AB05 EA03

4B029 AA07 AA23 BB11 BB16 BB20 FA04 FA12

4B063 QA18 QA19 QQ02 QQ08 QQ42 QQ53 QR08 QR32 QR36 QR42

QR50 QR55 QR62 QR72 QR77 QS25 QS28 QS34 QS36 QS39

QX01