

図4. 抗生物質の投与日数 (IVIG使用群) (n=38)

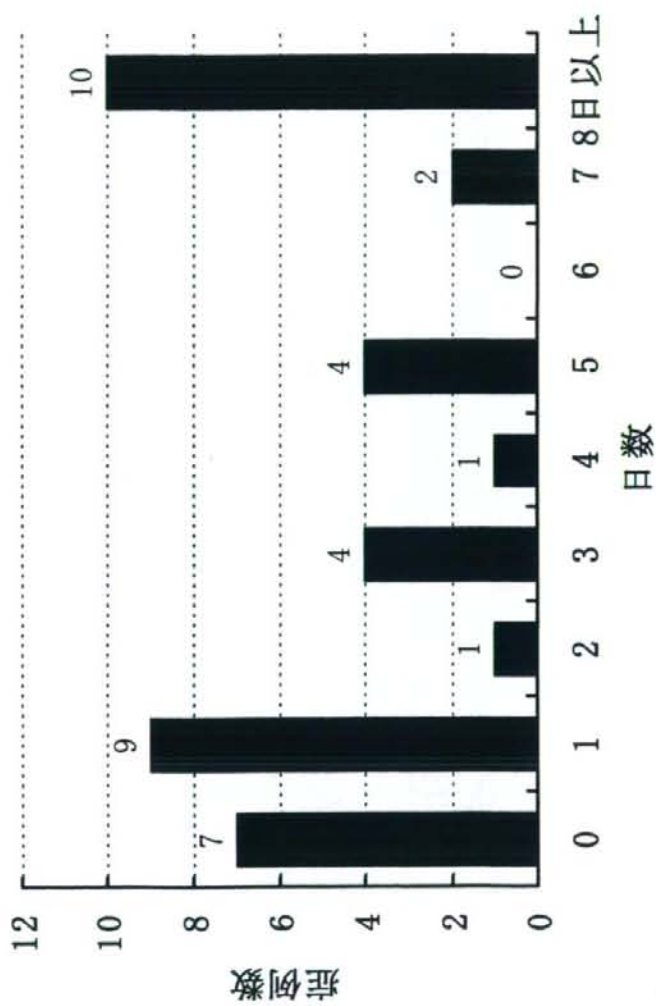


表3. 各群での基準値適合率

項目*	IVIG使用群 (n=38)	IVIG非使用群 (n=206)
7項目	4 (10.5%)**	4 (1.9%)
6項目	4 (10.5%)	15 (7.3%)
5項目	7 (18.4%)	31 (15.0%)

* : 7項目 ; 発熱、発熱期間、CRP値、白血球数、細菌培養、抗生物質の投与期間、
抗生物質の反応性、

6項目 ; 発熱、発熱期間、CRP値、白血球数、細菌培養、抗生物質の投与期間

5項目 ; 発熱、発熱期間、CRP値、白血球数、抗生物質の投与期間

** : 値は症例数、カッコ内は頻度

表4. 各群におけるSeptic score別の症例数 (平成20年度調査)

Septic score (点数)	感染症群		非感染症群 (n=751)	死亡例 (感染症死)
	IVIG使用群 (n=7)	IVIG非使用群 (n=131)		
0~4	0 (0.0%)*	58 (44.2%)	741 (98.7%)	0
5~9	2 (28.6%)	50 (38.2%)	10 (1.3%)	2 (0)**
10~14	2 (28.6%)	12 (9.2%)	0 (0.0%)	1 (1)
15~19	1 (14.2%)	8 (6.1%)	0 (0.0%)	3 (2)
20以上	2 (28.6%)	3 (2.3%)	0 (0.0%)	2 (2)

*: 値は症例数、カッコ内は頻度

**: 値は症例数、カッコ内は感染症が原因死亡例

表5. 各群での基準値適合率とSeptic score (平成20年度調査)

項目*	IVIG使用群 (n=7)		IVIG非使用群 (n=131)	
	症例数	Septic score	症例数	Septic score
7項目	2 (28.6%)**	21.0†	1 (0.8%)	18.0
6項目	2 (28.6%)	21.0	5 (3.8%)	13.8
5項目	3 (42.8%)	18.3	11 (8.4%)	9.9

* : 7項目 ; 発熱、発熱期間、CRP値、白血球数、白血球数、細菌培養、抗生物質の投与期間、
抗生物質の反応性、

6項目 ; 発熱、発熱期間、CRP値、白血球数、細菌培養、抗生物質の投与期間

5項目 ; 発熱、発熱期間、CRP値、白血球数、抗生物質の投与期間

** : 値は症例数、カッコ内は頻度

† : 適合症例におけるSeptic Scoreの平均値

厚生労働科学研究費補助金
医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業
総合研究報告書

「大量出血時の止血能の評価と輸血療法に関する研究」

研究分担者：西脇 公俊 名古屋大学医学部附属病院 麻酔科教授

研究要旨

手術関連死亡の最大原因は大量出血であるが、その治療の鍵は如何に止血凝固能を改善させて止血を図るかである。しかしそのための適切な血液製剤の使用指針は確立されていない。

そこでまず、過去3年間の大量出血症例について、術式、頻度、出血量、輸血量、術中止血能検査結果について検討した。あわせて、術中血小板アフェレーシスの効果について検討した。

次に、術中大量出血時に適宜、血液凝固検査を行って止血能を評価し、良好な止血を得るための輸血治療について検討を行った。術中に出血量が増加すると、その量に応じて血小板数、フィブリノーゲン値が著明に低下し、希釈性凝固障害に陥って止血が困難となる。それに対しては、従来の治療法である血小板製剤と新鮮凍結血漿の投与だけでは不十分であり、クリオプレシピテート製剤やフィブリノーゲン製剤を投与して速やかに低フィブリノーゲン血症を改善させることで良好な止血を達成でき、出血量を減少させうると期待された。

さらに、しばしば止血に難渋し、大量出血となる得る人工心肺を使用する心臓大血管手術を対象に、人工心肺中に血小板・フィブリノーゲンがどのように変動するか検討した。冠動脈バイパス術や弁置換術では、人工心肺が始まった直後に回路内容量による希釈に相当する血小板・フィブリノーゲンの低下が見られたが、その後はほぼ一定の値を保った。しかし、大血管手術症例では、血小板・フィブリノーゲンが人工心肺開始時に希釈による低下を見たあと、ほぼ一定の値を保つ場合と、経時的に低下する場合が見られた。人工心肺離脱時に使用する血液製剤の準備のためには、冠動脈バイパス術や弁置換術では、人工心肺中に一度血小板・フィブリノーゲンを測定し、それを目安に準備すればよいが、大血管手術の場合は人工心肺中に経時的に低下する場合があるので、人工心肺離脱直前に測定し、それを元に準備する必要があると考えられた。

A. 研究目的

手術関連死亡の最大の原因は大量出血であり、その対応については、日本麻酔科学会と日本輸血・細胞治療学会合同により作成された「危機的出血への対応ガイドライン」が平成19年度に発表された。それによると、血小板は $5 \text{ 万}/\text{mm}^3$ 以上を、フィブリノーゲンは $100 \text{ mg}/\text{dl}$ 以上をキープするとされている。また、出血が外科的に制御可能になるまでは凝固因子の投与は無効とされている。一般の手術に比べてヘパリン化し、人工心肺を使用する胸腹部大動脈瘤患者の手術においては、しばしば止血に難渋する。そこで、このような手術においても、有効な輸血治療の確立が急務である。

本研究はまず、術中大量出血時の止血・凝固能を詳細に評価し、凝固能低下と出血量の相関関係を明らかにして希釈性凝固障害の本態を解明することを目的とした。

その上で、新鮮凍結血漿投与に替わる新たな治療として、フィブリノーゲンや接着性凝固蛋白を豊富に含むクリオプレシピテート製剤もしくはフィブリノーゲン製剤の投与による止血改善効果を検討する。合わせて人工心肺前の自己血小板フェレーシスの有用性を検討した。

さらに、人工心肺中はヘパリンの十分量投与による抗凝固作用により、血栓形成は抑制されるため、血小板・凝固因子は温存されると考えられている。しかし、実際に人工心肺中に血小板・凝固因子がどのように変動するかを調べた報告はない。そこで、人工心肺を使用する心臓大血管手術において、血小板・フィブリノーゲンがどのよう

に変動するか検討し、有効な輸血治療を行うための指標をどのように得れば良いのか検討した。

B. 研究方法

平成16年1月1日から18年12月31日の3年間に名古屋大学医学部附属病院で行われた全手術症例のうち、循環血液量を超える出血か、もしくは4L以上の出血をきたした症例、MAP20単位以上の輸血を行った症例をピックアップし、その発生頻度ならびにその状況と予後を調査した。その中で、止血能検査が術中繰り返し行われた症例について、出血量の推移と血液凝固能との相関について検討した。あわせて、術中血小板アフェレーシスを行った症例について、出血量と血小板数との関係、輸血量について検討した。

次に名古屋大学病院において予定された胸腹部大動脈瘤手術症例において、人工心肺中および、人工心肺後一定の時間間隔でヘモグロビン値および血小板数測定と血液凝固検査（PT、APTT、フィブリノーゲン値の測定）を行った。出血量の増加にともなって血小板 $5 \text{ 万}/\text{mm}^3$ 以下、フィブリノーゲンは $150 \text{ mg}/\text{dl}$ 以下となった時に血小板、FFPの投与で対応する群と、血小板 $10 \text{ 万}/\text{mm}^3$ 以下、フィブリノーゲンは $150 \text{ mg}/\text{dl}$ 以下となった時に血小板、クリオプレシピテート製剤にて対応する2群に分けて前向きに検討した。

フィブリノーゲン補充効果の高いこれらの製剤を投与することで、希釈性凝固障害による大量出血を防げるかどうか、検査値の評価も含めて新鮮凍結血漿投与の場合と

の比較検討を行った。

さらに、人工心肺を使用する心臓大血管手術において、血小板・フィブリノーゲンがどのように変動するか検討した。血小板数・フィブリノーゲン、PT、APTTを麻酔導入後、ヘパリン化後、人工心肺開始10分後、以後1時間ごとに人工心肺終了まで、人工心肺終了後でプロタミン投与時に測定した。あわせて人工心肺回路内容量、輸血量を測定した。大血管手術の一部ではD-ダイマー、FDPも測定した。

(倫理面への配慮)

研究に対するインフォームド・コンセントを取得して行った。

C. 研究結果

大量出血を来した症例は、83例で内訳は以下であった。胸腹部大動脈瘤手術24例、肝切除術18例、肝移植術13例、心臓手術8例、骨盤内蔵全摘術3例、腎癌手術2例、腹部大動脈瘤手術2例、腓頭十二指腸切除術2例、食道手術、胃切除術、大腸穿孔手術、大網充填術、仙骨部腫瘍切除術、脊椎悪性腫瘍手術、神経芽種手術、前置胎盤帝王切開術、卵巣腫瘍手術、右肺全摘術、脳動静脈奇形手術、各1例。また、大量出血を起こしやすい手術の3年間症例数は、胸腹部大動脈瘤手術90例、肝切除術481例、肝移植術60例、腎癌手術107例、腹部大動脈瘤手術94例、全症例数は13,409例であった。従って、発生率でみると、胸腹部大動脈瘤手術26.7%、肝移植術21.7%、肝切除術3.7%、腹部大動脈瘤手術2.1%、腎癌手術1.

9%、全症例数に対する全大量出血症例は0.6%であった。

47,200ml以上出血し、MAP184単位、FFP225単位、血小板95単位、フィブリノーゲン23g輸血したが、完全に止血し得た肝切除術の一例において、大量出血初期においてフィブリノーゲン値が50mg/dl、血小板数5万/ μ l以下であったが、輸血によりフィブリノーゲン値を100mg/dl以上、血小板数5万/ μ l以上に維持され止血が得られた症例を確認した。

胸腹部大動脈瘤手術において平成18年4月1日から平成19年3月31日までの1年間に血小板アフェレーシスを行った27例とその直前1年間にアフェレーシスなしで行った36例を比較検討し、アフェレーシス症例で出血量、輸血したMAP、血小板、FFPいずれにおいても有意に減少した。

術中に大量出血をきたしやすい基礎疾患である胸部大動脈瘤症例において、人工心肺離脱1時間前から1時間ごとに血小板数の測定および血液凝固検査を行った。出血量が2000ccを越えてくると血小板数は5~10万に減少し、PTは40%程度に、フィブリノーゲン値は150mg/dl以下に低下した。赤血球製剤と血小板製剤、新鮮凍結血漿の輸血を行ったが、ヘモグロビン値の改善は認められたものの、血小板数やPT、フィブリノーゲン値の改善は認めず、良好な止血が得られず出血量は増加した。そしてPTやフィブリノーゲン値はさらに低下し、新鮮凍結血漿の投与を続けても止血は困難を極めた。そこで、出血量の増加によりフィブリ

ノーゲン値の低下 (150 mg/dl 以下) を認めた場合に、クリオプレシピテート製剤 3~6 パック (新鮮凍結血漿 15~30 単位分) を投与して血液凝固能の改善を図った (名古屋大学医学部附属病院、国立循環器病センター)。クリオプレシピテート製剤の投与によってフィブリノーゲン値は少なくとも 100 mg/dl 近く上昇し、それとともに止血が得られ、更なる出血量の増加を防げた。

一方、生体肝移植術においては、術中の血液凝固検査でフィブリノーゲン値が 100 mg/dl 以下に低下した場合にフィブリノーゲン製剤 3~6 g の投与を行って、出血傾向の改善を図った (名古屋大学医学部附属病院)。この場合もフィブリノーゲン値は 150 mg/dl 以上にまで上昇し、それとともに出血傾向の改善を認め、総出血量も従来の新鮮凍結血漿投与による治療時と比較して約 3 分の 2 に減少した。

さらに、人工心肺を使用する心臓大血管手術 30 例において経時的に血小板、フィブリノーゲンを測定した。術式としては冠動脈バイパス術、弁置換術、大血管置換術の各 10 例に分けられた。すべての症例において、血小板・フィブリノーゲン値は、ヘパリン投与後の人工心肺直前値に比べて、人工心肺術開始直後には、循環血液量が人工心肺回路内容量により希釈されたのに相当する低下を示した。その後の経時変化としては、冠動脈バイパス術や弁置換術では、人工心肺時間が長くなったとしても血小板数・フィブリノーゲンはほぼ保たれていた。一方大血管置換術においては血小板数・フィブリノーゲンが保たれる症例と、経時的に減少していく症例が見られた。D-ダイマー、FDP を測ることのできた 4 症例におい

て、いずれも D-ダイマー、FDP は経時的に増加したが、それとフィブリノーゲンの減少との関係は見いだせなかった。

D. 考察

大量出血となる頻度の高い術式として、胸腹部大動脈瘤手術、肝移植術、肝切除術があり、それらだけで大量出血症例の 2/3 を占める。血小板フェレーシスは同種血小板輸血量を減らすのみならず、同種赤血球輸血、同種 FFP の輸血量を減らし、総出血量も減らすことがわかった。

術中に大量出血をきたした症例では、出血量に応じて血小板数やフィブリノーゲン値が著明に低下し、止血凝固能が低下して良好な止血が得られず、さらなる出血量の増加をまねいていると考えられた。数値的な指標としては、血小板数は 5 万、フィブリノーゲン値は 150 mg/dl を下回ってくると止血不良がひどくなると考えられた。このような希釈性凝固障害に対する治療として、従来の新鮮凍結血漿投与では止血凝固能の十分な改善が得られない場合が多く、血小板製剤だけでなくクリオプレシピテート製剤やフィブリノーゲン製剤を短時間に投与する治療法の有効性が示唆された。今後は、術中大量出血時にどのタイミングでどれだけの量の製剤を投与するのがもっとも適切であるのか、具体的な検討を行う必要があると考えられた。

人工心肺を使用する手術においては、冠動脈バイパス術、弁置換術では、血小板数・フィブリノーゲン値がほぼ維持されたが、大血管置換術では、それが維持されない症例が見られた。その理由は、大血管置換術

では術野が広範囲にわたり、組織を切り開いてきた術野にたくさんの血液が漏出し、それを人工心肺回路に回収して送血しているため、いくらヘパリンを投与していても、そこで凝固系が活性化されてしまい、フィブリノーゲン・血小板が消費されてしまう可能性が考えられた。

E. 結論

過去の大量出血症例において、術中に止血能の検査が充分に行われていない症例もあった。超大量出血となっても輸血により完全な止血が得られる場合もあることがわかった。大量出血とならなかった症例も含めて前向き検討が重要と考えられ、大量出血となる可能性の高い、胸腹部大動脈瘤手術、肝移植術、肝切除術などにおいて、止血能を検査しながら、輸血療法を前向きに検討することが有用と考えられた。

術中の大量出血時には出血量に応じて血小板数やフィブリノーゲン値が低下し、止血凝固能が低下する。それに対しては血小板製剤と新鮮凍結血漿の輸血だけでは不十分で、クリオプレシピテート製剤やフィブリノーゲン製剤の投与で止血凝固能を改善させることによって良好な止血を達成でき、総出血量を減少させることが期待される。

冠動脈バイパス術や弁置換術では、人工心肺が始まった直後に回路内容量による希釈に相当する血小板・フィブリノーゲンの低下が見られたが、その後はほぼ一定の値を保った。しかし、大血管手術症例では、血小板・フィブリノーゲンが人工心肺開始時に希釈による低下を見たあと、ほぼ一定の値を保つ場合と、経時的に低下する場合

が見られた。

人工心肺離脱時に使用する血液製剤の準備のためには、冠動脈バイパス術や弁置換術では、人工心肺中に一度血小板・フィブリノーゲンを測定し、それを目安に準備すればよいが、大血管手術の場合は人工心肺中に経時的に低下する場合があるので、人工心肺離脱直前に測定し、それを元に準備する必要があることがわかった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 池山明子、金 壁年、高尾のぞみ、角洲浩央、小林 信、富田彰、鈴木章吾、橋本篤、浅野市子、梅田亜希子、市川崇、梶田博史、中澤朋子、辻 里花、矢野 隆、須藤悠介、滝 和美、西脇公俊、島田康弘：大量出血-大量出血時の凝固障害について- 臨床麻酔、2007;31(4):753-758
- 2) 花井慶子、山本晃士、菊地良介、成田友美、加藤千秋、柴山修司、梶田博史、西脇公俊、碓氷章彦、上田裕一、高松純樹。胸部大動脈瘤手術における自己血小板輸血の止血効果。日本輸血細胞治療学会誌、2008;54(5):592-597

2. 学会発表

- 1) 梶田博史、西脇公俊。胸部大血管手術における血小板アフェレーシスの有用性について。日本心臓血管麻酔学会、長崎、2006
- 2) A. Umeda, K. Nishiwaki, Y Shimada. The efficacy of bicarbonated Ringer's solution during living-donor liver transplantations. アメリカ麻酔学会、シカゴ、2006

- 3) 梶田博史、西脇公俊、島田康弘. 胸部大血管手術における血小板アフェレーシスの有用性について、日本麻酔科学会第54回学術集会、札幌、2007.
- 4) 中村匡男、西脇公俊、人工心肺装置を使用した心臓大血管手術における凝固系因子の変動の検討、第56回日本麻酔科学会学術集会、神戸、2009

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
宮田茂樹	外科周術期輸血トリガー値に関する考察	山口一成	別冊・医学のあゆみ 輸血医療・医学の新展開	医歯薬出版		2006	585-592
中谷武嗣、 宮田茂樹	人工弁・補助循環における抗血小板療法	内山真一郎、堀正二	抗血小板療法の新しい使い方	医薬ジャーナル		2006	153-158
稲田英一	緊急輸血と大量輸血	認定輸血検査技師制度協議会カリキュラム委員会	スタンダード輸血検査テキスト第2版	医歯薬出版	東京	2007	211-218
稲田英一	現在の輸血療法：適正な輸血療法の実施に向けて	稲葉頌一	周術期輸血の現状と問題点	真興交易医学出版部	東京	2008	254-264
稲田英一	わかりやすい周産期・新生児の輸血治療-研修医から専門医まで必修の輸血療法と安全対策-	大戸斉、大久保光夫	危機的出血と周産期医療	メジカルビュー社	東京	2009	16-27

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yamamoto K, Honda T, Matsushita T, Kojima T, Takamatsu J	Anti-HCV agent, ribavirin, elevates the activity of clotting factor VII in hemophilia patients: a possible mechanism of decreased events of bleeding in hemophiliacs by ribavirin	Journal of Thrombosis and Haemostasis	4	469-470	2006

Yamakage N, Ikejiri M, Okumura K, Takagi A, Murate T, Matsushita T, Naoe T, Yamamoto K, <u>Takamatsu J</u> , Yamazaki T, Hamaguchi M, Kojima T	A case of coagulation factor V deficiency caused by compound heterozygous mutations in the factor V gene	Haemophilia	12	172-178	2006
Miyamoto K, Nishigami K, Nagaya N, Akutsu K, Chiku M, Kamei M, Soma T, <u>Miyata S</u> , Higashi M, Tanaka R, Nakatani T, Nonogi H, Takeshita S	Unblinded pilot study of autologous transplantation of bone marrow mononuclear cells in patients with thromboangiitis obliterans	Circulation	114	2679-2684	2006
Banno F, Kokame K, Okuda T, Honda S, <u>Miyata S</u> , Kato H, Tomiyama Y, Miyata T	Complete deficiency in ADAMTS13 is prothrombotic, but it alone is not sufficient to cause thrombotic thrombocytopenic purpura	Blood	107	3161-3166	2006
Kato H., Kashiwagi H., Shiraga M., Tadokoro S, Kamae T., Ujiie H., Honda S., <u>Miyata S.</u> , Ijiri Y., Yamamoto J., Maeda N., Funahashi T., Kurata Y., Shimomura I., Tomiyama Y., Kanakura Y	Adiponectin acts as an endogenous antithrombotic factor	Thromb Vasc Biol	26	224-230	2006
<u>稲田英一</u>	麻酔科領域における輸血-輸血原理と危機的出血への対応	医学のあゆみ	218	599-655	2006
加藤栄史、高本滋、宇留間元昭、安藤高宣、丹羽玲子、池田久實、比留間潔、浅井隆善、星順隆、倉田義之、清水勝	静注用免疫グロブリン使用の現状 —全国調査結果より—	日本輸血学会雑誌	52	422-430	2006
Yamamoto K, Kojima T, Takeshita K, Matsushita T, <u>Takamatsu J</u>	Pitavastatin attenuates the upregulation of tissue factor in restraint-stressed mice	Thrombosis Research	120	143-144	2007
Yamamoto K, <u>Takamatsu J</u> , Saito H	Intravenous immunoglobulin therapy for acquired coagulation inhibitors: a review	International Journal of Hematology	85	287-293	2007

Kajiguchi M, Kondo T, Izawa H, Kobayashi M, Yamamoto K, Shintani S, Numaguchi Y, Naoe T, <u>Takamatsu J</u> , Komori K, Murohara T	Safety and efficacy of autologous progenitor cell transplantation for therapeutic angiogenesis in patients with critical limb ischemia	Circulation Journal	71	196-201	2007
稲田英一	麻酔科領域における輸血:輸血原理と危機的出血への対応	医学のあゆみ	219	45-51	2007
稲田英一	血液製剤の適正使用について:2005年ガイドラインを踏まえて	人工血液	15	36-41	2007
Yamamoto K, Kojima T, Takeshita K, Matsushita T, <u>Takamatsu J</u>	Pitavastatin attenuates The upregulation of tissue factor in restraint-stressed mice	Thrombosis Research	120	143-144	2007
Yamamoto K, <u>Takamatsu J</u> , Saito H	Intravenous immunoglobulin therapy for acquired coagulation inhibitors: a review	International Journal of Hematology	85	287-293	2007
Kajiguchi M, Kondo T, Izawa H, Kobayashi M, Yamamoto K, Shintani S, Numaguchi Y, Naoe T, <u>Takamatsu J</u> , Komori K, Murohara T	Safety and efficacy of autologous progenitor cell transplantation for therapeutic angiogenesis in patients with critical limb ischemia	Circulation Journal	71	196-201	2007
池山明子、金 壁年、高尾のぞみ、角淵浩央、小林 信、富田彰、鈴木章吾、橋本 篤、浅野市子、梅田亜希子、市川崇、梶田博史、中澤朋子、辻 里花、矢野 隆、須藤悠介、滝 和美、西脇公俊、島田康弘	大量出血ー大量出血時の凝固障害についてー	臨床麻酔	31	753-758	2007
Honda T, Katano Y, Toyoda H, Hayashi K, Ishigami M, Nakano I, Goto H, Yamamoto K, <u>Takamatsu J</u>	Effect of ribavirin, combination with interferon in patients with hepatitis C, on the bleeding risk associated with selective serotonin reuptake inhibitors	Journal of Clinical Psychiatry	69	679-680	2008

Kashiwagi T, Matsushita T, Ito Y, Hirashima K, Sanda N, Fujimori Y, Yamada T, Okumura K, Takagi A, Murate T, Katsumi A, <u>Takamatsu J</u> , Yamamoto K, Naoe T, Kojima T	L1503R is a member of group I mutation and has dominant-negative effect on secretion of full-length VWF multimers – An analysis of two Patients with type 2A von Willebrand disease	Haemophilia	14	556-563	2008
Koike K, Kikuchi Y, Kato M, <u>Takamatsu J</u> , Shintani Y, Tsutsumi T, Fujie H, Miyoshi H, Moriya K, Yotsuyanagi H	Prevalence of hepatitis B virus infection in Japanese patients with HIV.	Hepatology Research	38	310-314	2008
Toyoda H, Honda T, Hayashi K, Katano Y, Goto H, Kumada T, Takahashi K, Abe N, Mishiro S, <u>Takamatsu J</u>	Prevalence of hepatitis E virus IgG antibody in Japanese patients with hemophilia.	Intervirology	51	21-25	2008
<u>高松純樹</u>	「周術期における輸血療法:総論」周術期輸血療法UPDATE	週間医学の歩み	224	183-189	2008
<u>高松純樹</u>	輸血部門における安全管理	臨床検査	52	145-150	2008
山本晃士、菊地良介、花井慶子、成田友美、加藤千秋、柴山修司、中村太郎、藤本康弘、木内哲也、 <u>高松純樹</u>	肝臓移植手術における輸血量減少に貢献した凝固学的治療	日本輸血・細胞治療学会誌	54	619-624	2008
花井慶子、山本晃士、菊地良介、成田友美、加藤千秋、柴山修司、梶田博史、西脇公俊、碓氷章彦、上田裕一、 <u>高松純樹</u>	胸部大動脈瘤手術における自己血小板輸血の止血効果	日本輸血・細胞治療学会誌	54 (5)	592-597	2008
<u>宮田茂樹</u> 、佐々木啓明、荻野均	心臓血管外科領域の輸血・止血管理。「周術期輸血療法update」	週間医学の歩み	224	210-216	2008
<u>宮田茂樹</u>	輸血におけるInformation Technology「輸血の安全管理」	臨床検査	52	195-200	2008
Banno K, Chauhan AK, Kokame K, Yang J, <u>Miyata S</u> , Wagner DD, Miyata T	The distal carboxy-terminal domains of ADAMTS13 are Required for regulation of in vivo thrombus formation	Blood		In press	

宮田茂樹、阪田敏幸	特殊な輸血 凝固因子欠乏症. 現在の輸血療法 適正な輸血療法の実施に 向けて	医学出版部		104- 116	2008
稲田英一	心臓麻酔におけるリスクマ ネジメント	胸部外科	61	393- 397	2008
市川眞紀子、宮田茂樹	輸血にまつわるテクニック 「輸血をめぐるノウハウ」	臨床研修プラ クティス	6	48-57	2009

IV. 研究成果の刊行物・別刷

LETTERS TO THE EDITOR

Anti-HCV agent, ribavirin, elevates the activity of clotting factor VII in patients with hemophilia: a possible mechanism of decreased events of bleeding in patients with hemophilia by ribavirin

K. YAMAMOTO,* T. HONDA,† T. MATSUSHITA,‡ T. KOJIMA§ and J. TAKAMATSU*

*Department of Transfusion Medicine, Nagoya University Hospital, Nagoya; †Department of Gastroenterology, Nagoya Graduate School of Medicine, Nagoya; ‡Department of Hematology, Nagoya Graduate School of Medicine, Nagoya; and §Department of Medical Technology, Nagoya University School of Medicine, Nagoya, Japan

To cite this article: Yamamoto K, Honda T, Matsushita T, Kojima T, Takamatsu J. Anti-HCV agent, ribavirin, elevates the activity of clotting factor VII in patients with hemophilia: a possible mechanism of decreased events of bleeding in patients with hemophilia by ribavirin. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 469–70.

The combination therapy with ribavirin and interferon- α (IFN- α) has been reported to be more effective than IFN- α monotherapy for eradicating hepatitis C virus (HCV) [1,2], including patients with concomitant hemophilia [3]. We observed significant decreases in doses of clotting factors used for hemostatic therapy in hemophiliacs during ribavirin administration (e.g. 3780 units per month before ribavirin treatment and 1600 units per month during ribavirin on the average) [4]. In our hospital, 47 hemophilic patients who had been treated for chronic hepatitis C with IFN- α alone demonstrated no significant reduction in the use of clotting factor. This observation strongly suggests that the addition of ribavirin leads to the reduction of clotting factors used for bleeding in hemophiliacs. One suggestion comes from a case report that described an increase in warfarin dose requirement in a patient with heart valve prosthesis after starting this anti-HCV combination therapy [5].

These observations led us to investigate the ribavirin-induced change in vitamin K-dependent coagulation factors. To this purpose, we have measured the clotting activity of factor (F)VII, X, and prothrombin in hemophilic patients who were receiving the anti-HCV combination therapy. The protocol of therapy and analysis was approved by the Nagoya University institutional review board and written informed consent was obtained from each patient before treatment. Nine hemophilic patients, including seven hemophilia A and two hemophilia B (mean age \pm SD: 42.5 \pm 10.4 years old), whose characteristics were previously described [4], were entered in this study.

Correspondence: Koji Yamamoto, Department of Transfusion Medicine, Nagoya University Hospital, 65 Tsurumai, Showa, Nagoya 466-8550, Japan.
Tel.: +81 52 744 2576; fax: +81 52 744 2610; e-mail: kojy@med.nagoya-u.ac.jp

Received 17 July 2005, accepted 18 October 2005

The liver biopsy performed before starting the combination therapy did not show cirrhosis but chronic hepatitis in all patients analyzed. During this study, all patients were treated with the same 24-week regimen of IFN- α 2b (Intron A[®], Schering Plough, K.K., Osaka, Japan) and oral ribavirin (600–800 mg day⁻¹ of Rebetol; Schering-Plough, Kenilworth, NJ, USA). All statistical analyses were performed with STATA ver.7 software (STATA Corp., College Station, TX, USA) and the *P*-value < 0.05 was considered statistically significant.

The procoagulant activity of FVII in plasma has been elevated in all of nine ribavirin-treated hemophilic patients in comparison with that before ribavirin administration (Fig. 1A). The average and standard deviation for the elevation of FVII activity was 15.7% \pm 8.8% (*P* < 0.04 in before vs. during ribavirin treatment; max. 28%; min. 5%). This elevation of FVII activity was independent of improvement of liver function (i.e. albumin, total bilirubin, cholinesterase) in the patients (not shown). Only two patients, one has HIV infection and the other has hepatitis B virus concomitant with HCV, did not show a substantial elevation of FVII activity (i.e. 5% and 8%, respectively). We then measured activated FVII (FVIIa) levels in patients' plasma before and during ribavirin treatment using STACLOT[®] VIIa-rTF (Diagnostica Stago, Asnieres, France) [6] and observed substantial increases in FVIIa (e.g. 25.3 \pm 14.8 mU mL⁻¹), which were almost compatible with elevation of FVII clotting activity. The plasma levels of FX and prothrombin were unchanged by ribavirin treatment in all of nine hemophilic patients (not shown). The elevation of FVII clotting activity by ribavirin is consistent with the previous observation of warfarin resistance in a ribavirin-treated patient [5].

To investigate the mechanism of ribavirin-induced elevation of FVII activity, we analyzed the gene expression of FVII in cultured normal human hepatocytes (Cambrex Bio Science Walkersville, Inc., Walkersville, MD, USA) or human hepatoma cell line, HepG2 cells (ATCC, Manassas, VA, USA),

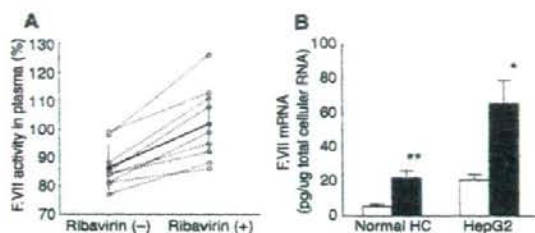


Fig. 1. Clotting activity of FVII in plasma of hemophilic patients and the mRNA expression of FVII in cultured human hepatocytes with or without ribavirin. (A) Each clotting activity of FVII in plasma of nine hemophilic patients before and at 4 weeks after starting ribavirin therapy was shown as open circle and dashed line, respectively. The average and SD of all patients was expressed as closed circle and error bar (without ribavirin: $86.3\% \pm 7.6\%$; with ribavirin: $102.0\% \pm 10.3\%$; $P < 0.04$). (B) Normal human hepatocytes or HepG2 cells had been cultured with (■) or without (□) ribavirin for 48 h. The mRNA expression of FVII was quantitated by real-time RT-PCR assay. Each value is expressed as the mean and SD from three sets of experiments. All of real-time RT-PCR assays were performed in duplicate. * $P < 0.02$; ** $P < 0.01$.

which were cultured in medium with ribavirin at clinically therapeutic concentration ($150 \mu\text{g mL}^{-1}$) in the presence of IFN- α 2b ($0.75 \mu\text{g mL}^{-1}$; kindly provided by Schering Plough, K.K.). The expression level of mRNA for FVII, FX, and prothrombin, was determined by real-time quantitative RT-PCR with the ABI Prism 7700 Sequence Detection (Perkin-Elmer Biosystems, Foster City, CA, USA) and SYBR Green PCR Kit (Perkin-Elmer Biosystems), according to the manufacturer's recommendations. The sequences of primer pairs used to quantify mRNA of the above genes were described in the NCBI Sequence Viewer. Variations in sample loading were assessed by measuring β -actin mRNA. Comparison of quantitative RT-PCR results between two groups was performed with the two-sample t -test. Welch's method was applied when variance between two groups was unequal (statistical significance: $P < 0.05$).

Significant induction of FVII mRNA was demonstrated in cultured normal hepatocytes (fourfold; $P < 0.01$) or HepG2 cells (threefold; $P < 0.02$) at 48 h after ribavirin treatment (Fig. 1B). No significant induction of mRNAs for FX and prothrombin was detected in ribavirin-treated cultured hepatocytes or HepG2 cells (not shown). In hepatocytes, ribavirin may stimulate to synthesize FVII by binding specifically to the promoter region of FVII gene (under current investigation).

It is possible that not only the induction of FVII but also changes in other coagulation factors during ribavirin therapy may be responsible for the decreased events of bleeding in hemophiliacs. However, the elevation of FVII activity in plasma could contribute most to the increased hemostatic potential in hemophilic patients because the cell-based tissue factor-activated FVII would play a central role in initiating coagulation and in activating platelets followed by large scale thrombin generation [7]. Clinically, recombinant activated FVII has been widely used as an antidote to control and prevent excessive hemorrhage in hemophilic patients with inhibitors [8]. Meanwhile, it was

reported that even 10–20% of increase in plasma FVII/FVIIa would be an independent risk factor for coronary heart disease in healthy individuals [9,10], suggesting that a substantial elevation of endogenous FVII levels could result in an increased thrombotic potential. In general, the occurrence of spontaneous bleeding events in hemophiliacs is dependent on the critical hemostatic balance. In these conditions, 15–20% elevation of intrinsic FVII activity in plasma (Fig. 1A), because of the continuous induction of endogenous FVII by ribavirin (Fig. 1B), would contribute to the prevention from spontaneous bleeding in hemophiliacs. As a half-life of FVII in plasma is the shortest in all of coagulation factors, the continuous induction of FVII can maintain or increase the hemostatic value *in vivo*. If the prophylaxis to bleeding in hemophilic patients by ribavirin treatment were executable, it would result in much improvement of quality of their life and in large reduction of medical expenses in the country.

Acknowledgements

We thank Satoshi Suzuki, Tomomi Narita and Tomoko Nashida for their excellent technical assistance.

References

- McHutchison JG, Gordon SC, Schiff ER, Shiffman ML, Lee WM, Rustgi VK, Goodman ZD, Ling MH, Cort S, Albrecht JK. Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. Hepatitis Interventional Therapy Group. *N Engl J Med* 1998; **339**: 1485–92.
- Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC, Rustgi VK, Shiffman M, Reindollar R, Goodman ZD, Koury K, Ling M, Albrecht JK. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet* 2001; **358**: 958–65.
- Santagostino E, Rumi MG, Rivi M, Colombo M, Mannucci PM. Sustained suppression of hepatitis C virus by interferon and ribavirin in hemophilic patients not responding to interferon monotherapy. *Blood* 2002; **99**: 1089–91.
- Honda T, Toyoda H, Hayashi K, Katano Y, Yano M, Nakano I, Yoshioka K, Goto H, Yamamoto K, Takamatsu J. Ribavirin and the use of clotting factors in patients with hemophilia and chronic hepatitis C. *JAMA* 2005; **293**: 1190–2.
- Schulman S. Inhibition of warfarin activity by ribavirin. *Ann Pharmacother* 2002; **36**: 72–4.
- Morrissey JH, Macik BG, Neuenschwander PF, Comp PC. Quantitation of activated factor VII in plasma using a tissue factor mutant selectively deficient in promoting factor VII activation. *Blood* 1993; **81**: 734–44.
- Roberts HR, Monroe DM, Oliver JA, Chang JY, Hoffman M. Newer concepts of blood coagulation. *Haemophilia* 1998; **4**: 331–4.
- Roberts HR, Monroe DM, White GC. The use of recombinant factor VIIa in the treatment of bleeding disorders. *Blood* 2004; **104**: 3858–64.
- Junker R, Heinrich J, Schulte H, van de Loo J, Assmann G. Coagulation factor VII and the risk of coronary heart disease in healthy men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; **17**: 1539–44.
- Lowe GD, Rumley A, McMahon AD, Ford I, O'Reilly DS, Packard CJ for the West of Scotland Coronary Prevention Study Group. Interleukin-6, fibrin D-dimer, and coagulation factors VII and XIIa in prediction of coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; **24**: 1529–34.

CASE REPORT

A case of coagulation factor V deficiency caused by compound heterozygous mutations in the factor V gene

N. YAMAKAGE,* M. IKEJIRI,* K. OKUMURA,* A. TAKAGI,*† T. MURATE,*† T. MATUSHITA,‡
T. NAOE,‡ K. YAMAMOTO,§ J. TAKAMATSU,§ T. YAMAZAKI,¶ M. HAMAGUCHI¶ and T. KOJIMA*†

*Department of Pathophysiological Laboratory Sciences, Nagoya University Graduate School of Medicine; †Department of Medical Technology, Nagoya University School of Health Sciences; ‡Department of Hematology, Nagoya University Graduate School of Medicine; §Division of Transfusion Medicine, Nagoya University Hospital; and ¶Department of Hemostasis and Thrombosis Clinical Research Center, National Hospital Organisation, Nagoya Medical Center, Nagoya, Japan

Summary. We investigated the molecular basis of a severe factor V (FV) deficiency in a Japanese female, and identified two distinct mutations in the FV gene, a novel cytosine insertion (1943insC) and a previously reported point mutation (A5279G). We expected the patient to be a compound heterozygote for those mutations, as a 1943insC, but not an A5279G, was found in the mother and a sibling. The 1943insC will cause a frame-shift after ⁵⁹⁰Gln, resulting in amino acid substitutions with two abnormal residues followed by a stop codon in the FV A2 domain (FS592X). The A5279G will cause an amino acid alteration in the FV A3 domain (Y1702C), which has been observed in several ethnic groups. We found that both mutant mRNAs were detected by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) in the patient's platelets, whereas no FV antigen and activity were detected in plasma. On the one hand, the RT-PCR signal from the FS592X-FV mutant mRNA

was markedly reduced, suggesting that the RNA surveillance system would eliminate most of the abnormal FS592X-FV transcripts with a premature termination. On the other hand, expression analyses revealed that only small amounts of Y1702C-FV with a low specific activity were secreted, and that the FS592X-FV was not detected in cultured media. These data indicated that both mutant FV molecules would be impaired, at least in part, during the post-transcriptional process of protein synthesis and/or in secretion. Taken together, it seems to suggest that each gene mutation could be separately responsible for severe FV deficiency, while this phenotype is due to the in-trans combination of the two defects.

Keywords: compound heterozygote, expression study, factor V deficiency, gene mutation, parahemophilia, reverse transcriptase polymerase chain reaction

Introduction

Human coagulation factor V (FV) is a large (molecular weight of 330 kDa) single-chain glycoprotein that circulates in blood as an inactive procoagulant cofactor and plays an important role in the blood coagulation cascade [1,2]. The cDNA clones encoding

human FV have been isolated [3], and the human FV gene has been mapped to chromosome 1q23 and spans approximately 80 kb of DNA [4]. The human FV gene consists of 25 exons and 24 introns, and the mRNA encodes 2224-amino acid protein containing a leader peptide of 28 amino acids [5]. It is comprised of three homologous A-type domains, two homologous C-type domains, and a heavily glycosylated B domain and shows a linear domain structure (A1-A2-B-A3-C1-C2) homologous to factor VIII (FVIII) with 35–40% homology existing in both the A-type and C-type domains [1,2]. Thrombin activates FV by the proteolytic release of the B domain, resulting in the formation of a non-covalently bound heterodimeric molecule of the heavy chain (residues 1–709, A1-A2 domains) and

Correspondence: Tetsuhito Kojima, MD, PhD, Professor, Department of Pathophysiological Laboratory Sciences, Nagoya University Graduate School of Medicine, 1-1-20 Daiko-Minami, Higashi-ku, Nagoya 461-8673, Japan.
Tel.: 81 52 719 3153; fax: 81 52 719 3153;
e-mail: kojima@met.nagoya-u.ac.jp

Accepted after revision 7 December 2005