

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

新生児期の遺伝性血栓症と小児のワルファリン治療法に関する研究
効果的診断法の確立と抗血栓因子補充のための新生児への
新鮮凍結血漿（FFP）投与基準設定

研究分担者

高橋 幸博 奈良県立医科大学附属病院 新生児集中治療部門 教授

研究協力者

中川 隆志	奈良県立医科大学附属病院	新生児集中治療部
斎藤 能彦	第一内科学教室	
山口 直子	奈良県立医科大学附属病院	中央臨床検査部
谷口 恵理	奈良県立医科大学附属病院	中央臨床検査部
豆田 清美	奈良県立医科大学附属病院	中央臨床検査部
片岡 美香	奈良県立医科大学附属病院	中央臨床検査部
倉本 智津子	奈良県立医科大学附属病院	中央臨床検査部
内池 敬男	奈良県立医科大学附属病院	中央臨床検査部

研究要旨

新生児・小児の血栓症の診断と治療に関し、平成25年度はプロテインC異常症を含めたPC/PS抗凝固制御系の効果的な診断法として、HemosIL ThromboPathを用い、その特性と臨床応用を検討した。

A. 研究目的

新生児は、小児期の中でも血栓症の発症頻度は高く、発症には遺伝性も含め新生児特有な基礎疾患や病態、管理が関与する。血栓症の発症には抗凝固因子のアンチトロンピン(AT)、プロテイン C(PC)、プロテイン S(PS)が重要な因子である。このうち AT は播種性血管内凝固 (disseminated intravascular coagulation; DIC)の診断や成分製剤の入手も可能であることから、AT 測定は日常診療でも実施されている。一方、PC や PS は、一部の測定機器で検査は可能ではあるが、日常検査でないこともあり、新生児電撃性紫斑病の診断時に測定されることはあっても通常の血栓症で測定されること

は少ない。

特に、PS は、PC の補因子として抗凝固作用を示すが、PS の抗凝固作用は補体制御因子の C4-binding protein (C4BP) に結合していない free PS である。PS と C4BP とは、血漿中では平衡関係にあり、C4BP は炎症反応で増加することから、炎症時には free PS は低下する。したがって、PC/PS 抗凝固系の欠乏症の診断は容易でない。また、PC/PS 抗凝固系異常の治療は、先天性 PC 欠乏症のみ活性化 PC 製剤が使用されるが、PS 欠乏症は成分製剤はなく新鮮凍結血漿 (FFP) での補充療法しかない。

一方、血液製剤の FFP の使用指針には

抗凝固療法としての明確な指針はない。

本研究ではこれらを踏まえ、PC/PS 抗凝固系のグローバルな評価法に HemosIL ThromboPath (ILJapan)を用い、新生児・小児での PC/PS 系抗凝固異常の効果的診断法を確立するために ThromboPath の特性を検討した。

B. 研究方法

ワルファリン血(5例)、肝疾患血(5例)、新生児・小児の止血検査血の残余血(28例)と止血異常のない健常成人血(5例)を用いた。なお、新生児・小児の止血検査血は、臨床での異常ない残余血を用いた。

PC 活性はテストチームプロテイン C で測定した。第 VIII 因子活性は Sysmex トロンボチェック FACTOR VIII を用いた。PC/PS 抗凝固系は ACLTOP CTS (ILJAPN 社)を用い HemosIL ThromboPath で測定した。

ThromboPath の測定原理

クエン酸血漿	10 μL
希釈液	40 μL
Protac (PC 活性蛇毒)あり(A)	45 μL
あるいは Protac なし(B)	
加温反応	120 秒
Tissue factor +合成リン脂質	50 μL
加温反応	90 秒

Thrombin 特異発色合成基質 50 μL
45 秒後 OD405nm で比色測定
The Protac-Induced Coagulation Inhibition percentage (PICU%) = B-A/BX100
Protac ありと Protac なしの測定値の意義

Protac 作用機序

Protac は蛇(Agkistrodon contortix contortix) 毒由来の分子量 37,000 の糖蛋白で、PC と結合し PC の立体異常を惹起させ、PC を活性化させる。血漿内に Protac を添加し、APC に変化させること、FV を活性化させる作用があるが、APC により FV、FVIII は分解され、凝固抑制を示す。

トロンピン産生

最終評価はトロンピン産生を合成発色基質

(S2708, Z-D-Arg-Ser-Arg-pNA,2HCl) で検出する。単位は mOD/min で表示され、高値はトロンピン産生が多いことを示す。

(倫理面への配慮)

両測定に関して本学倫理委員会の承認を得て実施した。

C. 研究結果

1. ThromboPath PICI% 基準値

健康成人、ワルファリン血、肝疾患血の ThromboPath の PICI%値

PICI%	値%
健康成人 (n=5)	87.8 ± 0.1
ワルファリン血 (n=5)	64.3 ± 0.1
肝疾患 (n=5)	66.5 ± 0.1

Protac 非存在下 Thrombin 産生量 (B)

	mOD/min
健康成人 (n=5)	742.2 ± 23.0
ワルファリン血 (n=5)	402.2 ± 60.6
肝疾患 (n=5)	649.8 ± 138.3

Protac 存在下 Thrombin 産生量 (A)

	mOD/min
健康成人 (n=5)	90.5 ± 18.2
ワルファリン血 (n=5)	137.4 ± 29.5
肝疾患 (n=5)	213.3 ± 74.6

c.f. (Toulon P et al Thromb Res 124:137-143,2009)

PC/PS 抗凝固系の異常のない PICI%値

A 施設 (n=126)	86.7(66.0 ~ 97.7)
B 施設 (n=40)	90.5(73.4 ~ 98.4)
C 施設 (n=106)	91.9(58.1 ~ 8.3)

なお、凍結保存検体で、肝機能等の詳細に関する記載がない。

自験例での成人での解析から PICI%は、健康成人に比較し、ワルファリン血、肝疾患で有意に低値を示した。すでに、Protac を使用した PC 活性評価でのワルファリン血での検討から、Protac による PC の活性化では Acarboxy form の PC は同時に評価ができないことが報告 (Martinoli JL et al. Thromb Res 43(3)-253-264,1986)されており、自験例でもワルファリン血と一部の肝障害者で PICI% の低値がみられた。したがって、PICI%での血栓症評価には、VKDF の産生低下とその

カルボキシ化の評価も考慮する必要がある。

	トロンボテスト (%)
健康成人(n=5)	103.7 ± 11.1(93.5 ~ 150)
ワルファリン血(n=5)	19.1 ± 11.3(9.6 ~ 38.1)
肝疾患(n=5)	74.6 ± 36.1(19.8 ~ 150)

2. 検体希釈と感度

TromboPath は測定に、測定量は 10 µL ではあるが、Dead Space も含め 300 µL が必要である。新生児への応用は容易でない。健康成人での付属希釈液での希釈による影響を検索したが、肝障害血での希釈で、検量線の傾きに差異の見られるものがあった(結果、略)したがって、新生児への使用は制限を受ける。

3. 新生児・小児の ThromboPath の PIC1%値

PIC1%	値%
新生児(n=3)	36.1 ± 3.5
乳児(n=6)	75.5 ± 10.9
1歳(n=8)	75.2 ± 4.5
2歳(n=5)	82.0 ± 5.9
3歳(n=6)	84.3 ± 1.3

Protac 非存在下 Thrombin 産生量(B)	mOD/min
新生児(n=3)	523.0 ± 71.2
乳児(n=6)	664.7 ± 89.5
1歳(n=8)	824.0 ± 73.8
2歳(n=5)	772.1 ± 58.6
3歳(n=6)	766.0 ± 34.5

Protac 存在下 Thrombin 産生量(A)	mOD/min
新生児(n=3)	333.6 ± 44.8
乳児(n=6)	185.4 ± 26.9
1歳(n=8)	204.8 ± 44.9
2歳(n=5)	136.7 ± 36.9
3歳(n=6)	120.3 ± 13.6

PC%と PIC1%との関連(r=0.73)、PT-INR と PIC1%との関連(r = -0.65)で相関関係がみられた。

4. Protac 非存在下と存在下での Thromb 産生量の比較

Protac 非存在下での Thrombin 産生量は健

康成人で 742.2 ± 23.0 mOD/min であるが、新生児は 523.0 ± 71.2 mOD/min、乳児期は 664.7 ± 89.5 mOD/min と低値である。その一方で、Protac 存在下では健康成人で 90.5 ± 18.2 mOD/min であるが、新生児は 333.6 ± 44.8 mOD/min、乳児期は 185.4 ± 26.9 mOD/min と成人と比較し高値である。すなわち、新生児・乳児は Protac での被検血漿内の PC は活性化による FV や FVIII を凝固抑制能力が十分でないことが想定される。

5. 新生児・乳児の AT 量、PC 活性の比較

新生児(n=3)	%
AT	51.7 ± 14.0
PC	41.7 ± 9.7
乳児(n=6)	%
AT*(n=5)	85.8 ± 16.9
PC	79.7 ± 26.6
健康成人(n=5)	%
AT	94.1 ± 8.5
PC	112.6 ± 10.0
ヘパリン血(n=5)	%
AT	90.5 ± 16.8
PC	52.8 ± 9.8
肝疾患(n=5)	%
AT	86.9 ± 12.2
PC	77.4 ± 28.4

AT 乳児*: 1名検体不足から未検査

6. PC%あたりのトロンピン産生量の比較

Protac 非存在下トロンピン産生量(mOD/min) Protac 存在下トロンピン産生量(mOD/min)および、Protac 非存在下トロンピン産生量(mOD/min) Protac 存在下トロンピン産生量(mOD/min)/PC (%)

新生児 (n=3)	
Protac (-) -Protac(+)	mOD/min 189.4 ± 34.6
Protac (-) -Protac(+)/PC	mOD/min/% 4.6 ± 0.4
乳児(n=6)	
Protac (-) -Protac(+)	mOD/min 479.3 ± 88.4
Protac (-) -Protac(+)/PC	mOD/min/% 6.3 ± 1.1

健康成人

Protac(-)-Protac(+)	mOD/min
	651.7 ± 16.3
Protac(-)-Protac(+)/PC	mOD/min/%
	6.4 ± 1.5

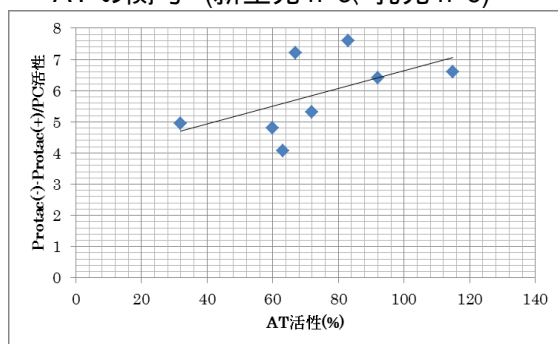
ヘパリン血

Protac(-)-Protac(+)	mOD/min
	264.8 ± 81.5
Protac(-)-Protac(+)/PC	mOD/min/%
	5.7 ± 2.0

肝疾患

Protac(-)-Protac(+)	mOD/min
	436.4 ± 132.5
Protac(-)-Protac(+)/PC	mOD/min/%
	5.8 ± T

7. ThromboPath での PC 抑制効果に対する AT の関与 (新生児 n=3、乳児 n=5)



r = 0.57

結果

Protac 非存在下トロンビン産生量 (mOD/min) Protac 存在下トロンビン産生量(mOD/min)は、Protac で活性化し PC/PS 抗凝固系のトロンビン産生抑制の実測値とし、Protac 非存在下トロンビン産生(mOD/min)

Protac 存在下トロンビン産生量 (mOD/min)/PC%は、PC 単独でのトロンビン産生抑制度とした場合、新生児・乳児では PC/PS 抗凝固系でのトロンビン産生抑制は十分なものでなく、とりわけ新生児は、PC に対するトロンビン産生抑制は成人でのヘパリン血に相当するほど低値であった。また、新生児・乳児での PC/PS 系でのトロンビン産生凝固抑制効果の不十分な要因には AT 低下も関与していることが示唆された。

D. 考察

血液凝固制御機構には、大きく二つ存在する。一つはセリンプロテアーゼである活性化凝固因子を特異的にあるいは蛋白分解酵素阻害作用として凝固抑制をする機構と、凝固過程の律速因子として作用する活性化 FV や FVIII を制御する機構である。前者は AT のようなセリンプロテアーゼインヒビターと非特異的に凝固抑制を起こす 2 マクログロブリンがあり、後者は凝固最終産物のトロンビンが血管内皮細胞上に発現するトロンボモジュリンと結合することで、トロンビンの凝固活性作用や血小板活性作用を消失させ、新たに抗凝固因子であるプロテイン C を活性化し、PS の補因子とともに活性化した FV や FVIII を抑制する機構(PC/PS 抗凝固系)である。

本研究では後者による抗凝固作用の効果的診断法の確立と FFP での使用指針について検討した。そのため、PC/PS 抗凝固系のグローバルな検査で新たな検査法である ThromboPath について検討した。

ThromboPath は、生体内での PC 活性機構であるトロンビン・トロンボモジュリン複合体形成による PC 活性化ではなく、被検血漿内に蛇毒成分試薬である Protac を用い直接 PC を活性化した後に、一気に組織因子で凝固を惹起させ、産生されるトロンビン産生の抑制量で PC/PS 抗凝固能をグローバルに検査する方法である。

今回、例数は少ないが、新生児は、その後の小児や成人と比較し、明らかに Protac 非添加でのトロンビン産生量も少なく、その一方で Protac 添加でもトロンビン産生抑制は低く、PC/PS 系での凝固抑制能の低下がみられた。しかも、新生児の PC/PS 系での凝固抑制能は、今回のような組織因子での急激な血液凝固を制御するには十分でないことも判明した。

これまで、PC、PS の単独での活性測定は一般検査ではないが測定が可能であったが、PC/PS 凝固制御系は全体でのスクリーニング法がなく、そのため、新生児から乳児での PC、PS 欠乏の効果的診断法は確立されていないこともあり、新生児・小児の血栓症発

症の診断や治療法への対応の遅れが危惧されたが、ThromboPath は、そのスクリーニング検査法として有用であった。

ThromboPath の問題点は肝障害やワルファリン血での検討からも VKDF の産生量やビタミン K 代謝の影響を受けることが示唆される。特に新生児・乳児では本検査ではその評価には注意が必要であるが、凝固系指標の PT 等との組み合わせることで、より有用な検査法であることが示唆された。しかし、今回、被検例数が少なく基準値を示すには、今後さらに検討を行う必要がある。Cut-Off 値を設定することができれば、新生児・乳児の PC/PS 抗凝固系のグローバルなスクリーニング法として効果的な検査法となり得ると考えられる。測定での問題点は Protac の添加、非添加での被検検体は各 10 μ L と微量であるが、その一方、測定時の Dead space が大きく、新生児、小児への応用には Dead Space の改良が望まれる。また、今後の展望は、in vitro での正常血漿での補正試験や実際の FFP 投与での補正効果を調べることで FFP 等の使用指針を示すことが今後可能と思われた。

E. 結論

ThromboPath は、新生児・乳児期の遺伝性血栓症の PC/PS 系でのグローバルな診断に有用と考えられた。さらに FFP の抗凝固作用の評価にも役立つと考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

本研究成果を論文として投稿予定

2. 学会発表

1) 第 22 回日本産婦人科・新生児血液学会 (会長佐川典正)

日時：平成 25 年 6 月 29-30 日

場所：アスト津 4 F アストホール

発表：

ビタミン K 欠乏性出血症の新規 PIVKA-
検査法 ピブカルテストからデタミ
ナー C L ピブカルテストに

前回妊娠時に深部静脈血栓症の既往がある先天性アンチトロンビン III 欠乏症合併妊娠の 1 例

ビタミン K フォーラム：小児のワルファリン治療

2) 第 23 回日本産婦人科新生児血液学会 (会長小林 浩)

日時：平成 25 年 6 月 7-8 日

場所：東大寺総合文化センター

新生児の交換輸血時の血液製剤の検討

3) 第 35 回日本血栓止血学会 (一瀬白帝会長)

日時：平成 25 年 5 月 30 日 6 月 1 日

場所：山形国際ホテル

新生児の消化管関連疾患に伴う DIC へのトロンボモジュリン製剤の効果

Determiner CL PIVCAL- 測定のワルファリン止血管理への臨床応用の可能性について

G. 知的財産権の出願・登録状況

特許取得

なし

実用新案登録

なし

その他

特記すべきことはない