

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

－ 総合研究報告書 － 分担研究報告書

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

平成 24 年度 新生児期の遺伝性出血症と小児のワルファリン治療法に関する研究

研究協力者

川口 千晴	現東大寺福祉療育園	小児科
斎藤 能彦	第一内科学教室	
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

平成 25 年度 新生児期の遺伝性出血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24年度は血栓症治療でのワルファリン療法での安全な管理法を示した。平成25年度はプロテインC異常症を含めたPC/PS抗凝固制御系の評価に、プロトロンビン時間(PT)とHemosIL ThromboPathとを用いた効果的診断法を示した。

A. 研究目的

新生児は、それ以降の小児と比較し血栓症の発症リスクが高い。発症には新生児仮死や感染症、中心静脈カテーテル留置など新生児特有の要因がある。しかし、その病態には新生児から乳児への発達過程での抗凝固因子の産生低下が関与する。これら抗凝固因子の先天性欠乏症は、ホモ接合体やダブルヘテロ接合体では特異な電撃性紫

斑病を発症し早期発見に至るが、ヘテロ接合体異常や一過性の低下症では新生児期や乳児期での診断は容易でない。血栓症を発症する抗凝固因子にはアンチトロンビン(AT)、プロテイン C(PC)、プロテイン S(PS)、第 V 因子 Leiden 異常などがある。我が国の血栓症の主な病因は AT、PC、PS のいずれかの抗血栓因子の低下が主に関与する。AT 活性は一般施設でも測定が可能であり、

AT 欠乏症では単独の血液製剤も使用が可能である。しかし、PC、PS は、一般施設での測定が容易でなく血栓性素因としての認識も低く、また、PC 欠乏症での治療製剤も先天性 PC 欠乏症にのみ活性化 PC 製剤があるが、多くは治療には新鮮凍結血漿 (FFP) が利用されている。一方、FFP の血液製剤の使用指針に FFP の抗血栓療法として、明確な指針等はない。本研究ではこれらを踏まえ、平成 24 年度では小児血栓症治療法へのワルファリン療法に関する研究を、平成 25 年度は PC/PS 抗凝固系の評価に HemosIL ThromboPath (ILJapan) の有用性と新たな新生児・小児での抗凝固系異常の効果的診断法について検討した。

B. 研究方法

1. 平成 24 年度

新生児期の遺伝性出血症と小児のワルファリン治療法に関する研究では本院循環器内科に通院中でワルファリン服用者の残余血 (30 例) を使用した。各種ビタミン K 依存性凝固因子 (VKDF) 量は、SYSMEX 社製各種 VKDF 欠乏血漿を用い、自動血液凝固測定装置で凝固活性を測定した。PIVKA-II は、協和メディックス社の CL PIVCAL test で測定した。PC 活性は、コアプレスタ 2000 で、テストチームプロテイン C (積水メディカル株式会社) で測定した。

2. 平成 25 年度

新生児期の遺伝性出血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) 投与基準設定のための研究 では、ワルファリン血 (5 例)、肝疾患血 (5 例)、新生児・小児の止血検査後の残余血 (28 例) を使用した。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 凝固制御系は ACLTOP CTS (ILJAPAN 社) による HemosIL ThromboPath を用い測定した。

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
<hr/>	
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%) = $B - A / BX100$

(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

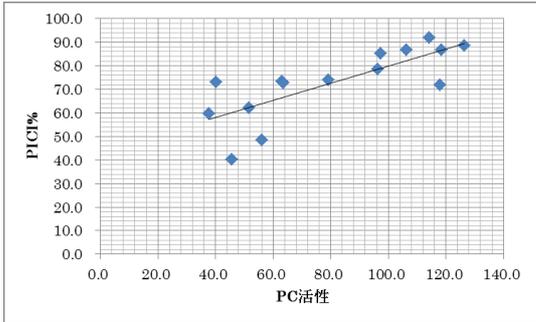
1. ワルファリン服用では従来の PT-INR に加え、PIVKA-II が出血予防の有用な指標となりうること、また、ワルファリン服用時の血栓発症予防に PC 測定が重要であることを示した (平成 24 年度報告集)。

2. ThromboPath PICU% 基準値

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

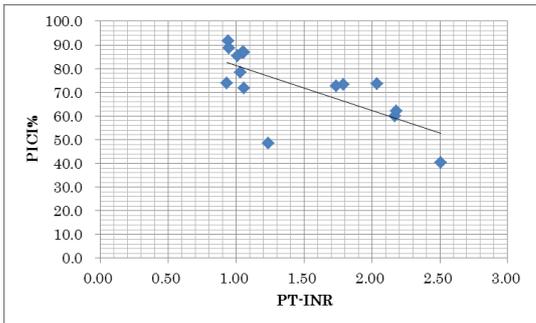
PICU% 値	%
健康成人 (n=5)	87.8 ± 0.1
ワルファリン血 (n=5)	64.3 ± 0.1
肝疾患 (n=5)	66.5 ± 0.1
<hr/>	
Protac 非存在下 Thrombin 産生量 (B)	
mOD/min	
健康成人 (n=5)	742.2 ± 23.0
ワルファリン血 (n=5)	402.2 ± 60.6
肝疾患 (n=5)	649.8 ± 138.3
<hr/>	
Protac 存在下 Thrombin 産生量 (A)	
mOD/min	
健康成人 (n=5)	90.5 ± 18.2
ワルファリン血 (n=5)	137.4 ± 29.5
肝疾患 (n=5)	213.3 ± 74.6

全例での PC 活性と PICI%との関連



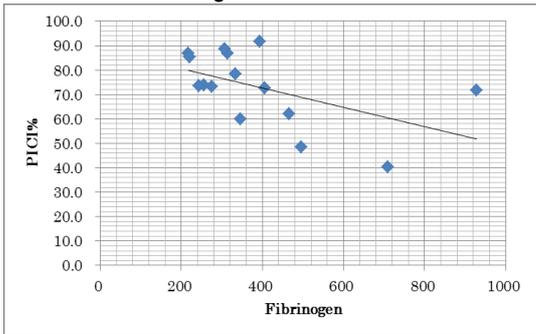
$r=0.7$ (± 0.7 ± 0.9 :強い相関)

全例での PT-INR と PICI%との関連



$r=-0.71$ (± 0.7 ± 0.9 :強い相関)

全例での Fibrinogen と PICI%との関連



$r=-0.65$ (± 0.4 ± 0.7 :相関あり)

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 ~ 98.3)

なお、凍結保存検体で、肝機能等の異常記載がない。

PC/PS 抗凝固系の異常例の内訳

A 施設 (n=147)	PCdef(14)、PSdef(11)、 FVLeiden(50)、Combuned(38)、LA(34)
B 施設 (n=103)	PCdef(19)、PSdef(32)、 FVLeiden(26)、Combuned(16)、LA(10)

C 施設 (n=32) PCdef(7)、PSdef(19)、
FVLeiden(5)、Combuned(1)、LA(0)
(例数) LA:lipus Anticoagulant.

PC/PS 抗凝固系の異常例の PICI%値 %

A 施設 (n=147)	59.0(11.8 83.3)
B 施設 (n=103)	70.2(19.9 95.3)
C 施設 (n=32)	72.9(48.9 89.1)

結果 2: 自験例での解析から 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。Fibrinogen とも弱い相関がみられたことから、本検査が FVIII の増加でも PICI%の低値がみられること(Toulon P et al Thromb Res 124:137-143,2009)

Fibrinogen が Acute Phase Reactant でもあることから、炎症を伴う DIC 等のマーカーとなることも示唆された。また、Protac 非存在下での Tissue Factor による Thrombin 産生も健康成人に比較し、ワルファリン血、肝疾患で有意に低値を示した。したがって、PICI%での血栓症評価には、VKDF の評価も考慮する必要がある。

2. 小児の ThromboPath の PICI%値

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

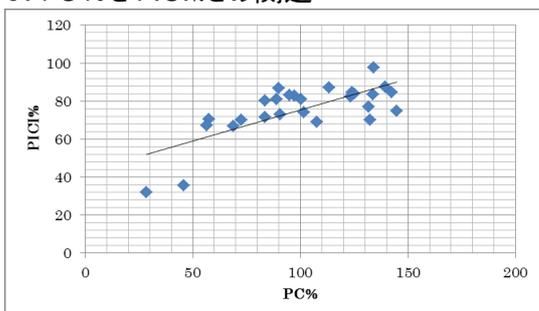
Protac 非存在下 Thrombin 産生量 (B)

	mOD/min
新生児 (n=3)	523.0 \pm 71.2
乳児 (n=6)	664.7 \pm 89.5
1 歳 (n=8)	824.0 \pm 73.8
2 歳 (n=5)	772.1 \pm 58.6
3 歳 (n=6)	766.0 \pm 34.5

Protac 存在下 Thrombin 産生量 (A)

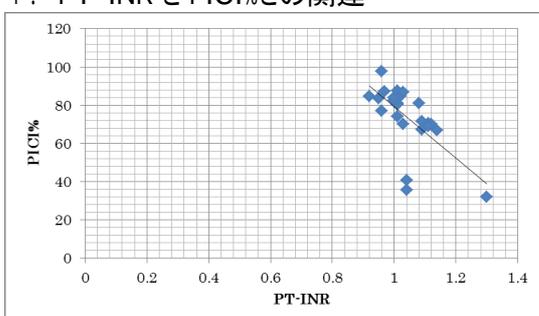
	mOD/min
新生児 (n=3)	333.6 \pm 44.8
乳児 (n=6)	185.4 \pm 26.9
1 歳 (n=8)	204.8 \pm 44.9
2 歳 (n=5)	136.7 \pm 36.9
3 歳 (n=6)	120.3 \pm 13.6

3. PC%とPICI%との関連



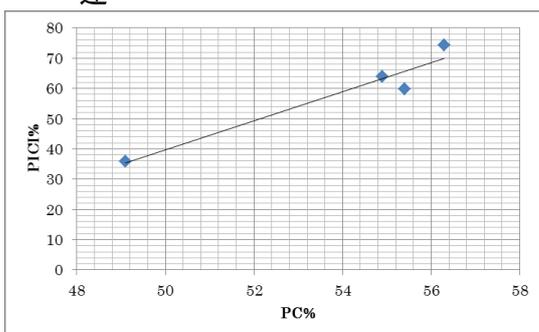
$r=0.73$ (± 0.7 ± 0.9 :強い相関)

4. PT-INRとPICI%との関連



$r = -0.65$ (± 0.4 ± 0.7 :強い相関)

5. ワルファリン服用時のPC%とPICI%との関連



$r = 0.96$ (± 0.9 ± 1.0 :強い相関)

D. 考察

新生児期は血液凝固系では肝由来のVKDFの産生低下やビタミンK欠乏に伴う異常蛋白(プロトロンピンではPIVKA-II)が出現することに加え、抗凝固系ではATおよびVKの依存性のPCおよびPSの産生低下とPIVKA-PC、PIVKA-PSが出現する。すなわち、血液凝固系、抗凝固系が発達過程であり、そのバランスが障害されると容易に出血症や血栓症を発症する。出血症ではVKDFではPTやヘパプラスチンテスト、PIVKA-II

などの診断検査法が確立しており、血栓症ではATのみ一般検査として測定が可能である。しかし、PC/PS凝固制御系はスクリーニングが容易でなく、新生児から乳児期ではPC、PSの効果的診断法は確立されていない。そのため、新生児・小児の血栓症発症の診断や治療法への対応は十分でない。平成24年は小児血栓症治療法の抗凝固療法であるワルファリン使用時の安全な使用方法を確立するためにワルファリン使用時のPT-INR、PIVKA-II、抗凝固因子のPCについて報告した。平成25年度は、新生児・小児の血栓症の効果的診断法の確立と治療法の一つである新鮮凍結血漿投与の基準を設定するために、新生児・乳幼児期でのPC活性と、PC/PS抗凝固系のグローバルな新たな検査法であるHemosIL ThromboPathの特性について検証した。その結果、以下の結果を得た。本検査は被検血漿内のPCを蛇毒成分のProtacで一旦活性化させ、被検血漿内のPC/PS抗凝固系のPC活性と相関を示したことから有用な検査法であるが、新生児・乳児期ではPTやワルファリン血でも相関とも相関し、凝固系、本検査がトロンピン形成での評価法であることから、とりわけVKDFの影響を受けることから、PC/PS抗凝固系のスクリーニングには、凝固系指標のPT等との組み合わせが重要であると考えられた。今回被検例数が少なく基準値として十分ではないが、およそ目安を示すことができた。今後さらに、PT等を組み合わせたCut-Off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。また、今回、被検検体が少ないが成人でも同様の結果を示したことから、本検査の成人での血栓症の診断時にも、その評価法の参考になると思われる。しかし、問題点として、測定量として被検検体が10 μ Lと微量での測定が可能であるが、その一方、測定時のDead spaceが大きく、新生児・小児への応用にはこの測定時のDead Spaceの改良が望まれる。また、今後の展望としてPT等ThromboPathを組み合わせることで、FFP等の使用指針を示すことも今後可能と思われる。

E. 結論

新生児・乳児期の血栓症は、成人領域と比較しても、その効果的診断法および治療法が依然確立されていない。本研究を通じ、効果的診断法ならびに治療法の方向性を示すことができた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 高橋幸博 今日の治療指針 (第7版) ビタミンK欠乏症 医学書院 (出版予定)
- 2) 高橋幸博 小児科診療増刊号(77巻増刊号) 特集:小児の治療指針 新生児メレナ 診断と治療社(出版予定)。

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4F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CL 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ピンIII欠乏症合併妊娠の1例
ビタミンKフォーラム:小児のワーフアリン治療
- 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34回日本血栓止血学会 (内山真一郎会長) 日時:平成24年6月7日 9日 場所:ハイアット・リーゲンシー 低酸素性虚血性脳症に伴うDICへのトロンボモジュリンの使用経験と血液凝固系についての検討
- 4) 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

- 5) 第57回日本未熟児新生児学会 (近藤裕一会長)

日時:平成24年11月25日 27日

場所:ホテル日航熊本、くまもと県民コウリュウパレア、鶴屋ホール
ワルファリン療法とPIVKA-

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特記すべきことはない