

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
「新生児・小児における特発性血栓症の診断、予防および治療法の確立に関する研究」
－分担研究報告書－

凝固検査標準化および診断法の開発（新生児）

研究分担者 高橋幸博（奈良県立医科大学附属病院 総合周産期母子医療センター 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門
野上恵嗣 奈良県立医科大学附属病院小児科
嶋 緑倫 奈良県立医科大学附属病院小児科
豆田清美 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
山口直子 奈良県立医科大学附属病院中央臨床検査部
山崎正晴 奈良県立医科大学附属病院中央臨床検査部
福井 博 奈良県立医科大学附属病院消化器内科
斎藤能彦 奈良県立医科大学附属病院循環器内科

研究要旨： プロテインC（PC）は肝で合成されるビタミンK依存性抗凝固因子で、血漿中で最も重要な抗凝固因子である。新生児や小児は肝の未熟性やビタミンK欠乏に陥りやすく、先天性や後天性PC欠乏症では血栓症を発症する。特に先天性PC欠乏症では新生児期に電撃性紫斑病を生じる。本研究は、新たに抗凝固検査法として開発されたThromboPathを用い、新生児・小児における抗凝固機構の特性と治療について検討した。

A. 研究目的

新生児期は母体内の胎内生活から胎外生活への適応期でもあり、肝の未熟性やビタミンK欠乏などに加え、呼吸・循環系の急激な変化もあり、血液凝固・線溶能は大きく変化する。その際、血液凝固・線溶能に関しては、血液凝固・線溶能の全体像を把握できる検査法や個々の凝固・線溶因子の動態について既に数多くの報告がなされている。しかし、抗凝固能に関しては、アンチトロンピン（AT）、プロテインC（PC）/プロテインS（PS）、TFPI、2-マクログロブリン（2-MG）、1アンチトリプシン（1-AT）など抗凝固作用を有する種々の因子の生後の動態は既に報告されているが、全体での抗凝固能を示す検査法はほとんどない。そこで、本研究では、新生児・小児の抗凝固能、特に新生児・乳児の全体での抗凝固能を評価する方法を確立することになり、そのために、既にPC/PS制御機構の検査法として開発されたThromboPath検査法を応用して、新生児・乳児の抗凝固能の全体での検査法

として役立つか、また、抗凝固療法として新鮮凍結血漿や血液分画製剤（AT製剤や活性化PC製剤、トロンボモジュリン）の投与基準や投与前の有効性を示す検査法として応用が可能かについて検討した。

B. 研究方法

対象は新生児7例、乳児20名及び健康に異常な成人20名の3.2%クエン酸ナトリウム（Na9）血漿で、新生児・乳児は通常診療後の残余3.2%クエン酸Na血漿を用いた。また、対象とした被検血漿は、血小板数を含めた末梢血血球数、炎症反応、血液生化学検査に異常はなかった。検査項目は、PTおよびAPTT、フィブリノゲンに加え、AT、PC等を行った。また、ThromboPathはACL TOP^{CTS}300-CTS（アイ・エル・ジャパン株式会社、東京）で測定した。その他、AT欠乏血漿（Affinitybiologicals、AT活性<0.01U/ml）、およびAT製剤（AT：ノイアート[®]）、リコンビナント・トロンボモジュリン（rTM：旭化成ファーマ、日本）を購入し

添加実験に使用した。

ThromboPath の測定原理と測定項目

被検血漿に PC 活性化蛇毒成分のプロタックを添加 (A) あるいは対照として非添加 (B) したものに、組織因子およびリン脂質を加え血液凝固を惹起し産生されるトロンビン量をトロンビン特性の発色性合成基質の光学密度 (光学濃度; OD) の変化で計測する。同検査法での測定項目は、プロタック添加時の OD 値 (ODA)、非添加時の OD 値 (ODB)、 $PiCi\% = (ODB - ODA) / ODB \times 100$ である。

(倫理面への配慮)

本研究は当院倫理委員会の承認のもとに実施した。

平成 25 年度の研究成果:

新生児および乳児を含む小児血漿と肝障害者、循環器弛緩でワルファリン投与者と対照として健康成人血漿で検討した成績を報告した。

平成 26 年度の研究成果:

C. 研究結果

平成 25 年度の成果を踏まえ、平成 26 年度に新生児期を 7 名、乳児期を 20 名、対照として健康成人を 20 名に被検血漿を増やし、各時期の ThromboPath の各測定項目について検討した。新生児期 7 例のプロタック非添加時での OD 値 (ODB) は 0.470 ± 0.071 で健康成人の OD 値 (ODB) は 0.791 ± 0.062 と比較し、約 1/2 に低下していた。また、新生児期のプロタック添加時の OD 値 (ODA の平均 \pm SD) は 0.305 ± 0.035 で、健康成人の OD 値 (ODA) は 0.102 ± 0.029 で、約 3 倍の残存トロンビン値を示した。乳児期 20 例ではプロタック非添加時での OD 値 (ODB) の平均 \pm SD は 0.696 ± 0.099 で健康成人の OD 値 (ODB) の 0.791 ± 0.062 と比較し約 2/3 に増加し、プロタック添加時の OD 値は 0.198 ± 0.049 と健康成人の OD 値 (ODA) の 0.102 ± 0.029 と比較しやや高値であっ

た。また、乳児期の ODB 値は年齢が増すごとに増加し、ODA 値は低下した。PiCi%は、新生児期は $36.4 \pm 3.3\%$ で、乳児期は $71.2 \pm 10.1\%$ であった。健康成人では $86.9 \pm 3.4\%$ であった。

ThromboPath と PT-INR の PiCi%との関連性

新生児・乳児および成人全体での PT-INR と PiCi%との間に $r = -0.7$ の負の相関がみられた。しかし、成人のみではその関連がなく $r = -0.01$ 、新生児・乳児で $r = -0.69$ の負の相関がみられた。

ThromboPath の PiCi%と PC 活性あるいは AT 活性との関連性

PiCi%と PC 活性あるいは AT 活性の間でそれぞれ $r = 0.86$ 、 $r = 0.61$ と正の関連が見られた。

新生児期および乳児期でのプロタック添加時の残存トロンビン値 (ODA) 値が、健康成人より高値であったことから、PC/PS 凝固抑制系以外の凝固抑制因子の低下が推察された。そこで、AT 欠乏血漿に AT 製剤による AT 添加実験、および正常血症への r-TM 製剤添加実験を行った。

AT 欠乏血漿への AT (ノイアート^R) 添加における PC/PS 凝固抑制系の評価

一定量の AT 欠乏血漿 (AT 活性 < 0.01 U/ml) に各種濃度の AT を添加した場合のトロンビン産生量を比較した。AT 欠乏血漿に AT 製剤で終濃度の AT 活性を 1U/ml (AT 活性 100%) に補正することで、PiCi%値は 5.7%低下、プロタック添加時の OD 値は、0.0374 低下したのに対して、プロタック非添加での OD 値は 0.165 低下した。また、AT 活性が 50%-100% で顕著に低下した。

正常血漿への rTM 製剤の添加における PC/PS 凝固抑制系の評価

正常血漿への rTM 添加では濃度依存性にプロ

タック非添加および添加時のトロンビン産生量の低下がみられた。

D. 考察

ThromboPath でのプロタック非添加のトロンビン産生(ODB 値)は、被検血漿に組織因子とリン脂質により凝固を惹起した場合のトロンビン産生で、産生されたトロンビン量は、トロンビンに特異な発色性合成基質の OD 値で表される。したがって、プロタック非添加では、外因系凝固でのトロンビン産生を表す。新生児期および乳児期の ODB 値が成人と比較し低値であったことは、凝固過程で産生されるトロンビン産生量が成人よりは少ないことを表し、新生児および乳児は成人よりも凝固能が低いとするこれまでの報告を支持するものであった。

一方、ThromboPath でのプロタック添加では、被検血漿中の PC をプロタックで活性化し、活性化した PC(activated PC; APC)と PS で活性化 V 因子や、トロンビンや IX 因子で活性化された活性化 VIII 因子を分解することで抗凝固能を示すもので、プロタック非添加時のトロンビン産生(ODB 値)からプロタック添加時のトロンビン産生(ODA 値)の差を ODB 値で除したもの(PiCi%)が、PC/PS 制御機構での抗凝固能を表すと考えられる。今回の結果からも PC 活性と PiCi%との相関は新生児期と乳児期を含む全体で関連がみられた。

新生児期および乳児期のプロタック添加時のトロンビン産生(ODA 値)は成人よりも3倍近く高値であったことは、新生児期および乳児期では PC/PS 制御機構が成人と比較し未熟であることが示唆された。新生児期および乳児期の抗凝固能を構成する個々の抗凝固因子が、健康成人より低下していることは既に明らかにされており、全体の抗凝固能も結果として低下していると推定された。ThromboPath は凝固活性化に組織因子とリン脂質を添加している。すなわち、外因系を活性する系

である。そこで、従来の凝固スクリーニング検査の PT-INR と PiCi%との関連性を検討したところ、成人では関連を示すことができなかったが、新生児期と乳児期では関連性がみられた。PC 活性と PiCi%との関連性では、新生児期は乳児期と比較し、その関連性が低いと考えられたことから、他の抗凝固因子の影響も考慮された。

次に抗凝固療法として AT 製剤た rTM 製剤が使用されているが、抗凝固作用として AT や rTM の補充効果を客観的に評価が可能か、AT 欠乏血漿への AT 添加実験および正常血症への rTM 添加実験を preliminary に行った。AT 欠乏血漿への AT 製剤の添加実験から AT 活性が 50-100%の間で抗凝固能に急激変化がみられ、また、新生児期および乳児期の血漿への AT 製剤の補正試験でも、AT 添加の抗凝固能の改善がみられたが、3 例のみの成績で、今後さらに対象を増やして効果を見る必要がある。また、今回、PS の測定はできなかった。PC の機能には PS も関与することから更なる追加研究を予定している。また rTM 添加実験でも、抗凝固能がみられたが、ThromboPath を用いた被検血漿への抗凝固因子の添加試験は、今後、抗凝固療法を推定するうえに有用な検査法になると推定された。

E. 結論

新生児・小児における特発性血栓症の診断、予防および治療法の選択に、ThromboPath を用いた検査法は有用と考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Kashima A¹, Higashiyama Y, Kubota M, Kawaguchi C, Takahashi Y, Nishikubo T. Children with Down's syndrome display high rates of hyperuricaemia. Acta Paediatr. 2014

Aug;103(8):e359-64. doi: 10.1111/apa.12664.
Epub 2014 May 21.

2. 実用新案登録

2) Takahashi D¹, Takahashi Y, Itoh S,
Nishiguchi T, Matsuda Y, Shirahata A. Late
vitamin K deficiency bleeding in an infant
born at a maternity hospital. *Pediatr Int.*
2014 Jun;56(3):436. doi: 10.1111/ped.12346.

3) Miyakawa Y, Kashiwagi H, Takafuta T,
Fujimura K, Kurata Y, Kobayashi T, Kimura T,
Adachi T, Watanabe T, Imaizumi M, Takahashi
Y, Matsubara K, Terui K, Kuwana M, Kanagawa
T, Murata M, Tomiyama Y; Committee for
clinical practice guide of primary immune
thrombocytopenia in pregnancy. [Consensus
report for the management of pregnancy with
primary immune thrombocytopenia].

Rinsho Ketsueki. 2014 Aug;55(8):934-47.
[Article in Japanese]

2. 学会発表

第50回日本周産期・新生児医学会学術集会
2014年7月13日-15日 シェラトン・グランデ・トー
キョーベイ・グランドホテル
Thrombopath による新生児・小児の抗凝固能の
評価
中川隆志、高橋幸博、内田優美子、釜本智之、新
居育世、西久保敏也

第56回日本小児血液・がん学会学術集会
2014年11月28日-30日 岡山コンベンションセン
ター、岡山シチーミュウジウム
Thrombopath 分析による小児血漿中の抗凝固能
の評価
中川隆志、高橋幸博、武山雅博、嶋緑倫

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

