

機関番号：24601
 研究種目：基盤研究 C
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20591304
 研究課題名（和文） 新生児の血栓・DICの病因解明と治療法開発の基礎および臨床的研究
 研究課題名（英文） The clinical and experimental studies on the causes and the development of treatments of the neonatal thrombosis and DIC
 研究代表者
 高橋 幸博 (TAKAHASHI YUKIHIRO)
 奈良県立医科大学・医学科・教授
 研究者番号：60142379

研究成果の概要（和文）：

新生児血栓症および播種性血管内凝固（DIC）の全国調査を行った。新生児血栓症の多くは、中心静脈カテーテルに合併し、カテーテル管理法と抗血栓処理の開発が急務である。治療はtPA使用が増加した。新生児DICの病因は、新生児仮死と敗血症に大別され、両群の止血検査に有意な差異がみられた。しかし、D-dimerの標準化が必要である。新生児仮死に伴うDIC治療にトロンボモジュリン（TM）が有用で、中枢障害の改善も得られた。他の関連事項も合わせ検討した。凝固・線溶に関与するトロンビン活性化線溶抑制因子（TAFI）は新生児では極めて低値であった。

研究成果の概要（英文）：The national wide survey of neonatal thrombosis and disseminated intravascular coagulation (DIC) were performed.. In neonatal thrombosis, the complication of central catheter was one of the main causes of neonatal thrombosis. The management and the preventive antithrombotic procedures of neonatal central catheter were needed as soon as possible. The use of tissue plasminogen activator was increased in neonatal thrombosis, comparing with previous survey.. In neonatal DIC, two main causes of DIC were neonatal asphyxia and infection and the haemostatic parameters were significantly different between these groups. However, the standardization of D-dimer is needed for the diagnostic criteria, Thrombomodulin therapy was effective on DIC induced by neonatal asphyxia and also improved the neurological prognosis. The relative studies were also reported. As the important factor between thrombosis and fibrinolysis, the concentration of TAFI was measured. TAFI was very low in neonatal period. It seems to prevent neonatal thrombosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：新生児学、新生児血液学、新生児神経学
 科研費の分科・細目：内科系臨床医学・胎児新生児医学
 キーワード：新生児、血栓症、播種性血管内凝固

科学研究費補助金研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

新生児の血栓症ならびに播種性血管内凝固 (disseminated intravascular coagulation: DIC) は、新生児血液疾患の中で、共に予後不良な血液疾患である。本邦での新生児血栓症の実態は、2004年に我々が、全国の新生児医療機関の協力を得て実施した全国調査が最初で、それ以前は、病因や診断、治療の多くは知られていなかった。新生児血栓症は、先天性プロテイン C 欠乏症に発症する新生児電撃性紫斑病など、主に遺伝性血栓疾患が中心的な疾患として認識されていた。しかし、第 1 回の全国調査以来、本邦でも新生児血栓症への認識が高まり、学術集会での報告も散見されるようになった。一方、DIC は、様々な基礎疾患に合併する消耗性の凝固・線溶亢進症で、出血および血管内血栓による臓器障害を発症する重篤な病態であるが、成人領域では、日本血栓止血学会を中心に DIC に関する研究が行われ、特に、成人 DIC の診断基準は、従来の旧厚生省時代に作成された診断基準から、国際血栓止血学会 (ISTH: international thrombosis and haemostasis) の診断基準や、2005 年には、救急医学学会と日本血栓止血学会の DIC 合同委員会から新たな「急性期 DIC 診断基準」が示されるなど、時代の即した DIC 診断基準が提唱される状況下であった。しかし、新生児 DIC に関しては、急激な周産期医療の進歩や、新たな診断検査薬、治療薬が開発される中、実際の臨床との間に開きが生じてきている。また、血栓・止血に関する基礎研究が進み、凝固・線溶系の概念や、研究当初は、その機能が十分に解明されていなかった止血関連因子が、徐々にその機能が明らかとなってきたが、新生児領域での生理機能に果たす作用は不明であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、今日の新生児医療の進歩のもと、新生児血栓症ならびに新生児 DIC の実態を明らかにすることにある。特に、新生児血栓症では、第 1 回の全国調査から約 10 年が経過した。そこで、前回の調査成績を踏まえ、再度、全国の新生児医療機関の協力を得て、新生児血栓症の病因、診断、治療の変遷と、その問題点を明らかにし、今後の新生児血栓症に対する医療に繋げることを目的とする。

一方、新生児 DIC は、今日の DIC 概念の変遷や、診断検査薬や治療法の新たな開発が進み中、従来とは異なる実態が予想される。そこで、新生児血栓症と同様に全国の新生児医療機関の協力を得て、全国調査を行い、今日の新生児 DIC の発症要因や診断基準、治療法

について調査する。特に基礎疾患を基に新生児 DIC の特徴を明確にする。さらに、全国調査時にはなかった新たな DIC 治療薬のトロンボモジュリン (TM) 製剤の DIC 治療効果を、重症新生児仮死に伴う DIC 例を中心に検討する。

また、新生児 DIC の診断検査薬として混乱の生じている D-dimer 検査の検討、凝固・線溶系に関連する因子として注目されている TAFI (Thrombin activatable fibrinolytic inhibitor) の動態、血栓症を発症する ADAMTS-13 についても検討する。

その他、関連事項として、遺伝性疾患のダウン症候群に発症し、難治で重篤な出血症状を示す一過性骨髄異常増殖 (transient atypical myelopoiesis: TAM) に合併する肝線維症例の GATA-1 遺伝子解析と、新たな治療法の有効性を検討や、溶血性疾患では、血液型不適合抗体の IgG サブクラス解析、および新生児血小板減少症についても調査した。

3. 研究の方法

(1) 新生児血栓症の全国調査

新生児血栓症の全国調査は、本学の倫理委員会の承認を得たあと、日本周産期・新生児医学会ならびに日本産婦人科・新生児医学会、新生児医療の基幹施設等にアンケート調査用紙を送付し、得られた新生児血栓症の回答を得たデータを、2004年に実施して第 1 回調査と比較解析した。

(2) 新生児 DIC の全国調査

新生児 DIC の全国調査は、同じく本学の倫理委員会の承認を得たあと、日本周産期・新生児医学会ならびに日本産婦人科・新生児医学会、新生児医療の基幹施設等にアンケート調査用紙を送付し、回答の得たデータを解析した。

(3) 新生児仮死後の DIC に対する TM 製剤の効果

重症新生児仮死後の DIC に対し、脳低温療法に加えて抗炎症、抗アポトシス効果を有する DIC 治療薬の TM 製剤を使用し、DIC の止血機能の改善効果に加え、頭部 MRI での有用性を、過去に経験した脳低温療法のみでの症例との間で比較検討した。

(4) 新生児の止血機構の基礎的解析。

-D-dimer の検討-

新生児 DIC の白幡の DIC 診断基準の診断評価項目に採用されている簡易検査のラピディア D-dimer 測定法と現在広く使用されている高感度 D-dimer 測定法 (第一化学; ニッスイ) との関係性を、当院での高 FDP 症例の血漿を用いて比較検討した。

(5) TAFI 測定

トロンビンによる線溶抑制惹起する TAFI 抗原量を測定した。TAFI は TAFI (ProCPR) ELISA

KIT 蛋白科学研究所,名古屋)製の TAFI 抗原測定キットを用い、EDTA 末梢血からの血漿を分離し、その抗原量を同じく EDTA 成人血漿と比較した。

(6) 血漿 ADAMTS-13

血小板減少および黄疸例での ADAMTS-13 活性 (カイノス株式会社、東京)について用いて測定した。

(7) ダウン症候群の血液疾患合併症と GATA-1 遺伝子

ダウン症候群の末梢血液および臍帯組織の GATA-1 遺伝子解析を行った。また、重度肝線維症合併 2 症例に対して漢方薬の Inchin-ko-to の有効性を検証した。

(8) 血液型不適合妊娠での IgG サブクラス解析

血液型不適合合併妊娠例の抗血液型抗体の IgG サブクラス解析を行い、IgG サブクラスと予後との関連を検討した。

(9) 新生児血小板減少症

本院での過去 3 年間で血小板数 10 未満の症例の臨床的背景、経過、予後について検討した。

4. 研究成果

(1) 新生児血栓症の全国調査

全国の NICU 295 施設にアンケート調査をおこなった。発症率は全入院数 109,596 例中 69 例 (0.062%) と前回の 0.031% (全入院数 115298 例中 36 例) の 2 倍であった。発症部位は静脈血栓 47 例で下大静脈血栓が最も頻度が高かった。危険因子では、中心静脈カテーテルがもっとも多く、静脈血栓 47 例中 30 例 (64%) であり、前回調査とほぼ同様であった。今回の調査では支持療法のみ頻度は前回の 64% から 37% に減少し、t-PA の使用頻度が約 6 倍に増加した。第 1 回目の全国調査と比較し発症頻度や報告施設数 (19 施設から 31 施設) が増加したことから、新生児血栓症の発症の危険性につき認識が高まった結果と思われた。しかし施設により発症率や治療内容に偏りがあり、今後、根拠に基づく新生児血栓症の標準化治療を進めるうに、本邦における遺伝的背景や新生児管理の相違を考慮した診断法や診断基準をより明確化するとともに、本邦独自の臨床研究が必要であると思われた。

Table. The Results of Questionnaires-The Incidence of Neonatal of Thrombosis

Newborns	Year					Total
	1999	2000	2001	2002	2003	
Total admission number	21,432	22,124	22,750	24,125	24,867	115,298
Neonatal Thrombosis cases (Frequency %)	4 (0.019%)	5 (0.022%)	8 (0.035%)	3 (0.012%)	16 (0.064%)	36 (0.031%)
(total 19units)						
Newborns	Year					Total
	2005	2006	2007	2008	2009	
Total admission number	21,034	21,301	22,208	22,350	22,703	109,596
Neonatal Thrombosis cases (Frequency %)	12 (0.057%)	13 (0.061%)	9 (0.041%)	19 (0.085%)	16 (0.070%)	69 (0.062%)
(total 31units)						

(2) 新生児 DIC の全国調査

新生児 DIC は、全国の 257 か所の NICU 施設に調査を行った。調査項目は、現在使用している新生児 DIC の診断基準、DIC の診断で重要と考えられる検査項目、DIC 発症患児に対する治療内容に加えて、各施設から DIC 疑診症例と確診症例、3 症例ずつ選出を依頼し、その基礎疾患や検査所見などの詳細についても検討した。D-ダイマー値の使用測定キットについて追加調査を行った。その結果、回収率は 78 施設 (78/257 ; 30%) (総合周産期母子医療センター 28 病院、地域周産期医療センター 28 病院、一般小児科 22 病院) であったが、主な周産期施設から回答を得た。現在各施設で使用されている新生児 DIC の診断基準は、白幡の診断基準を採用している施設が、57 施設 (57/78 ; 77%) で、河井の基準を採用している施設が、11 施設 (11/78 ; 14%) であった。新生児 DIC の診断としての重要項目としていたのは、基礎疾患、出血症状、血小板減少の順に上位を占めた。新生児 DIC 確診例の治療は、基礎疾患に対する治療を行い、次いでメシル酸ナファモスタット (フサン®) が選択され、次いでアンチトロンビン (AT) が選ばれていた。ただし、新生児 DIC 疑診例では、基礎疾患のみの治療の割合が確診例よりも多かった。なお、本調査時、DIC の新規治療薬の TM は市販されていなかった。新生児 DIC 症例は、確診症例 127 例と疑診例 86 例の調査結果が得られた。両症例で、在胎週数、出生体重、発症日齢に有意差はなかった。血液凝固検査では、確診症例と疑診例では、フィブリノゲン、血小板数、PT および APTT に有意差を認めた。予後は、確診例が有意に悪かった。D-ダイマーは、37 施設から回答が得られたが、異なる 9 キットが使用されていた。その為、今回の症例比較には用いなかった。新生児 DIC 確診例 127 例の検討では、感染症 (37 症例)、新生児仮死 (35 症例)、消化管穿孔 (14 症例)、出血 (12 症例) の順に頻度が多かった。予後として生存率は、感染症 41%、新生児仮死 69%、消化管穿孔 57%、出血 67% で、後障害発症率は、感染症 27%、新生児仮死 46%、消化管穿孔 25%、出血 25% であった。出生体重別の予後の比較では、1,500g 未満の極低出生体重児 (VLBW) では感染症が最多で、次いで消化管穿孔であった。一方、2,500g 以上の新生児では、新生児仮死が最多で、次いで感染症であった。

(3) 新生児仮死後の DIC に対する TM 治療

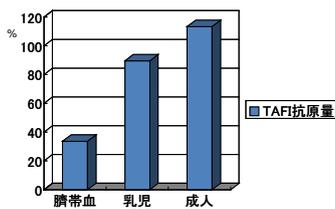
新生児 DIC の従来の治療法に加え TM が、当施設での使用経験ならびに、販売後の市販調査から有用であることがあきらかとなった。特に我々は重症新生児仮死後の DIC に、脳低温療法に抗 DIC、抗炎症、抗アポトシス効果を有する TM を併用することで、DIC の改善に加え中枢性障害の改善が得られることを見

結果

	例数	TAFI抗原量(%)*
臍帯血		
低出生体重児	20	24±12
正常産児	10	46±22
乳児	12	72±29
成人	20	92±34

*健康成人の
Pool血清に対して

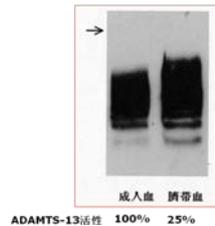
TAFIの出生後の推移



(6) 新生児と ADAMTS-13 (旧名: VWF cleaving protease; VWF:CPase)

ADAMTS-13 は、血小板の損傷血管内皮下組織への粘着に關与する von Willebrand Factor (VWF) の切断酵素で、VWF マルチマー構造は ADAMTS-13 により制御されている。血漿 VWF の高分子マルチマー構造を同定する電気泳動法で、マルチマー構造を形成する。新生児は、ADAMTS-13 の低下から、図右のごとく、さらに高分子マルチマーの VWF が存在する。

新生児の VWF マルチマーと ADAMTS-13



ホルマリン固定血小板を用いた実験でも、下図のごとく、新生児 VWF は、超高分子マルチマーを有する VWF が存在することから、リストセチン惹起血小板凝集の亢進を示す。低出生体重児では、ADAMTS-13 活性、抗原ともに低下し、超高分子マルチマーが存在した。新生児の VWF と ADAMTS-13 との関連は、生理的には、新生児の一次止血の維持に重要な働きをしていると考えられる。

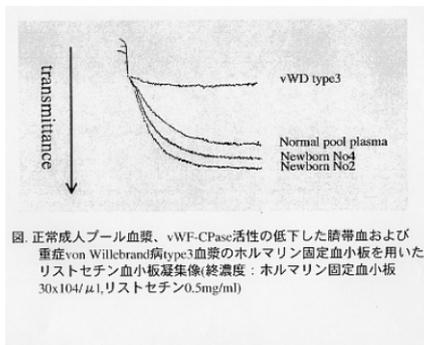


図 正常成人プール血漿、vWF-CPase活性の低下した臍帯血および重症 von Willebrand 病 type 3 血漿のホルマリン固定血小板を用いたリストセチン血小板凝集像(終濃度:ホルマリン固定血小板 30x10⁴/μl, リストセチン 0.5ng/ml)

VWF は高ずり応力下(血管径が細く、血流の速い部位)で、血小板凝集から血小板血栓を引き起こし臓器障害を招く。臨床的には ADAMTS-13 欠乏症では、過剰な超高分子マル

チマーによる VWF により、血小板血栓やそのため溶血性黄疸を引き起こす。先天性の ADAMTS-13 欠乏症は Upshaw-Schulman 症候群として知られ、血漿中の ADAMTS-13 因子補充で、血小板数の増加と溶血性黄疸が改善する。SGA 児で ADAMTS-13 活性の測定を、藤村らの開発した ADAMTS-13 活性測定法で測定したが、著しい低下例は見いだせなかった。さらに症例を増やし、SGA の重症度とを検討する必要がある。

(7) ダウン症候群の血液疾患合併症と GATA-1 遺伝子

ダウン症候群は、21 番目のトリソミーで、新生児遺伝性疾患で最も多い染色体異常症である。主に先天性心疾患や消化管閉鎖など、外科疾患で NICU に入院することが多いが、血液疾患では一過性骨髄異常増殖(transient atypical myelopoiesis:TAM)がある。多くは自然軽快するとされるが、重度の肝線維症を発症した例では、肝障害から DIC に陥り止血困難となる。現在、ダウン症候群と TAM との関連では、骨髄の異常増殖には、X 染色体 11.23 に存在する GATA-1 遺伝子の関与が推定されている。また、本症の特に肝線維症例に対する有効な治療法はない。我々は、ダウン症候群 3 例の GATA-1 遺伝子解析を、国立名古屋医療センターの国嶋博士と共同で解析し、同疾患で重度の肝線維症をきたした 2 児に、漢方薬の Inchin-ko-to を用いたところ、肝線維症が軽快し、予後の改善が得られた。しかし、症例数が少なく、今後症例を重ねる必要がある。

(8) 血液型不適合妊娠での IgG サブクラス解析

血液型不適合による溶血性黄疸、特に Rh 不適合では、胎児水腫を招き、出生後に重篤な貧血や黄疸、時に DIC を発症する。一方、母体抗体スクリーニング検査で、母体に抗力価の赤血球抗体が検出されても、何ら重篤な溶血や黄疸を生じない例もある。その差異は母体に産生される抗血液型 IgG 抗体のサブクラスの性状による。そこで、IgG サブクラス解析法を確立し、血液型不適合妊娠例の 23 例で、IgG サブクラス解析を行った。抗 IgE 抗体は 11 例(48%)、抗 IgE_c 抗体は 4 例(17%)、抗 IgD 抗体は 2 例(9%)、抗 IgD_C 抗体は 1 例(4%)、抗 IgA 抗体は 2 例(9%)、抗 IgB 抗体は 2 例(9%)、抗 IgM 抗体は 2 例(4%)であった。サブクラス解析は、16 例(69%)で検出ができた。検出不能は抗体力価が 4 倍未満では解析できず、4 倍で 4 例中 2 例(50%)で、それ以上では検出が可能であった。IgG サブクラスは IgG1 のみが 16 例中 8 例(50%)、IgG1,3 が 3 例、IgG3 のみが 2 例、IgG1,2,3 IgG1,2,4、IgG1,3,4 が各 1 例で、IgG1 は複合抗体を含めると 16 例中 14 例(87%)であった。抗 D 抗体では IgG3 が有意であった。

(9) 新生児血小板減少症

新生児の血小板症の頻度は 10 万未満が 0.7～0.9%、5 万未満が 0.12～0.14%、2 万未満が 0.01～0.08%と報告されている。当院での平成 19 年 4 月から平成 22 年 3 月 31 日までの血小板数 15 万未満の非免疫性血小板減少症を調査したところ、総入院数 515 名（出生体重 1000g 未満の超低出生体重児 53 名、1000g 以上 1500g 未満の極低出生体重児 56 名、1500g 以上 2500g 未満 229 名、229 名以上 117 名、死亡退院 22 名（4.3%））中、73 名（14%）で、10 万未満は 7 名に血小板減少症がみられた。出生体重別では出生体重 1000g 未満の超低出生体重児 53 名、1000g 以上 1500g 未満の極低出生体重児 56 名、1500g 以上 2500g 未満 229 名、229 名以上 117 名また、血小板減少のみみられた 73 名中 15 名（20%）が死亡退院で、全死亡退院の 7 割で、血小板減少症は重要なリスクファクターである。血小板数 10 万未満の 7 例の内訳は下図

血小板数が10万/μL未満の症例

頻度； 7例/515症例(1.4%)

No	在胎週数 (week)	出生体重 (g)	血小板数 (×10 ³ /μL)	臨床診断	予後
1	23	536	12	VLBW, 敗血症, DIC	生存
2	24	680	18	VLBW, 敗血症, DIC	死亡
3	26	308	25	VLBW, 新生児仮死, DIC	死亡
4	26	598	7	VLBW, 18トクソミー	死亡
5	33	1,540	19	LBW, 胎児水腫, DIC	死亡
6	37	2,440	17	NTED	生存
7	38	2,100	65	NTED	生存

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 3 件)

- 川口千晴、高橋幸博。本邦における新生児血栓症の最近の動向—2004 年度全国調査との比較—日本産婦人科・新生児学会誌 (印刷中)
- 西久保敏也、高橋幸博。新生児の DIC の診断と治療 日本産婦人科、新生児学会誌 (投稿中)
- Masahiro Takeyama, Yumiko Uchida, Ikuyo Arai, Tomoyuki Kamamoto, Toshiya Nishikubo, Hiromichi Kanehiro, Toshiyuki Sado, Shinji Kunishima, Yukihiko Takahashi. Neonatal case of transient abnormal myelopoiesis in Down's syndrome treated by Inchinkoto. Pediatr Internatinal (in press)

〔学会発表〕(計 2 件)

- Kawaguchi T, Takahashi Y. A recent national survey of Neonatal thrombosis in Japan Comparison with mailing questionnaires in 2004 XXIII congress of the International society on Thrombosis and Haemostasis, (Kyoto; July 23-28, 2011)
- 新居育世、内田優美子、林 環、釜本智之、阪口加那子、白 潤夏、橋本直樹、西久保敏也、高橋幸博 重症新生児仮死児へのトロンボモジュリン (TM) の臨床効果 第 114 回日本小児科学会学術集会 (東京: 8 月 12-14, 2011)

〔図書〕(計 2 件)

- 高橋幸博 血管力ニユレーション、周産期診療指針 周産期医学、2010
- 高橋幸博 新生児の輸血療法、周産期の免疫・生理・凝固・線溶系の生理わかりやすい周産期・新生児の輸血治療メジカルビュー社2009

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

なし

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

なし

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者 高橋幸博

奈良県立医科大学 医学部 教授

研究者番号: 60142379

(2) 研究分担者 なし

研究者番号:

(3) 連携研究者 なし

研究者番号: