

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791113

研究課題名(和文) 母児免疫性血小板減少症および早発黄疸の予測因子の検索

研究課題名(英文) Predictors of feto-maternal alloimmune thrombocytopenia and hemolytic jaundice

研究代表者

落合 正行(OCHIAI, MASAYUKI)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：90507782

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：血小板減少性紫斑病ITPや血液型不適合を合併した母体から出生した新生児では、しばしば血小板減少や溶血性黄疸を来し、頭蓋内出血や核黄疸など重篤な合併症の危険性がある。しかしながら病勢を予測する因子は特定されていない。今回の研究では、血球貪食機能を有する単球やマクロファージのFcレセプターの促進的Fc R2A・抑制的機能Fc R2Bのバランスに着目した。ITPと血液型不適合いずれの症例においても、正常コントロールと比較してFc R2A/2Bのバランスが高かった。今後は血小板減少や溶血性黄疸を来した例において、バランスの相違と治療経過による変化を観察する必要がある。

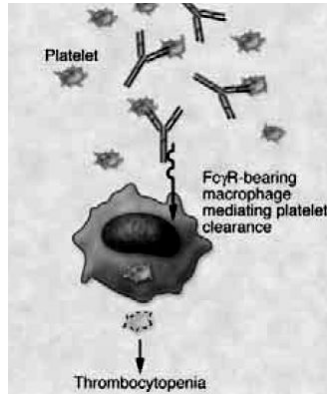
研究成果の概要(英文)：Newborn who were born from the mother complicated with thrombocytopenic purpura (ITP) and blood type incompatibility often presents thrombocytopenia and hemolytic jaundice. In these infants, there is a risk of serious complications such as intracranial hemorrhage and nuclear jaundice. However, factors that predict the disease have not been identified. In this research, we focused on the balance of facilitative (Fc R2A) and suppressive (Fc R2B) function of Fc receptors on monocytes and macrophages. In any cases of ITP and blood type incompatibility, the balance of Fc R2A/2B was higher as compared to normal controls. In the cases of thrombocytopenia and hemolytic jaundice, it is needed to investigate the differences and changes of these balances.

研究分野：小児科学

キーワード：臨床 免疫学 発現制御

1. 研究開始当初の背景

血小板減少性紫斑病 ITP とは、妊娠可能な若年女性に比較的多く見られる自己免疫疾患の一つである。自己の血小板に対する自己抗体 PA-IgG で感作された血小板が、貪食機能を有する単球やマクロファージなどで破壊されて血小板低下を来す疾患である(図1)。

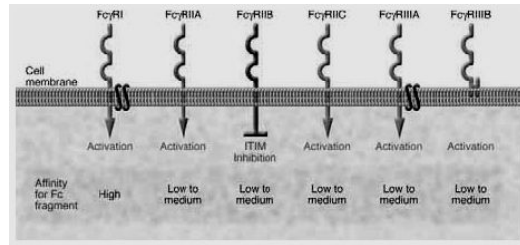


(図1) ITP の病態

ITP 罹患母体から出生した児の 15-45% に血小板減少を来す。うち 5-15% に治療を要する血小板減少を呈する(うち 3% に頭蓋内出血の報告もある)。PA-IgG を主体とする抗血小板自己抗体が経胎盤的に胎児に移行すると考えられるが、母体の血小板数、PA-IgG と、児の血小板の推移とは多くの報告で関連しないと考えられている。母体へのステロイド治療、免疫グロブリン大量療法も児の血小板減少に対して効果は認められていない。母体摘脾後も同様に注意が必要である。出生時の血小板が正常であっても、3-5 生日に低下することもあるため、1 週間くらいまで血小板の推移を追う必要がある。治療方針について一定の見解なく、1-3 万/ml 以下で IVIG、PSL などを、出血傾向があれば血小板輸血を考慮される(Avery's Disease of the Newborn より)。血液型不適合妊娠とは、母体にはない血液型抗原が胎児にあるものをいう。ABO 型、Rh 型をはじめ様々な不規則抗原が考えられており、母体は妊娠中に胎児の血液が母体へ移行することで感作される。産生された抗体が経胎盤的に胎児に移行すれば、同様の機序で赤血球の破壊が起こり、新生児の早発黄疸を来す危険性が高い。早発黄疸とは出生 24 時間以内に見られる重症黄疸であり、直ちに光線療法、免疫グロブリン大量療法や交換輸血などを行わなければ核黄疸による脳性まひを残すことがある。

近年、貪食細胞機能に関わる Fc レセプターのうち、促進的機能 Fc R2A と抑制的機能 Fc R2B を有するサブタイプが見出された(図2)(Samuelsson A ら、Science 2001)。ITP 成人例では抑制的サブタイプの発現が低く、治療により発現が上昇することが確認された(Asahi A ら、J Clin Invest 2008)。母

児間の免疫グロブリンの移行に伴う血小板減少症や赤血球溶血性黄疸・貧血の予測因子として、Fc レセプターの抑制的機能に着目した。



(図2) Fc レセプターのサブタイプ

2. 研究の目的

ITP 合併母体あるいは血液型不適合妊娠における、新生児期早期の血小板減少あるいは溶血性貧血の病勢予測マーカーとして Fc レセプターの有用性を解析する。

3. 研究の方法

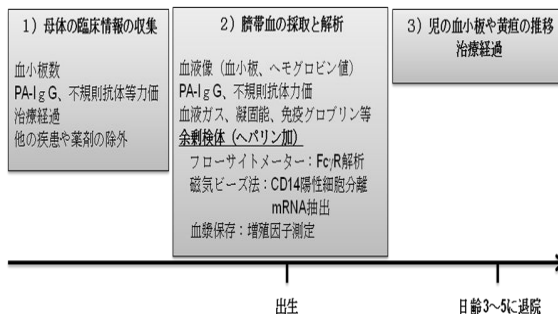
(1) 対象

研究対象となる病的新生児は、九州大学病院総合周産期母子医療センターをはじめとした関連施設に血小板減少性紫斑病もしくは不規則抗体陽性や Rh 陰性で血液型不適合妊娠で周産期管理をうけて出生した新生児とした。

除外対象は、血小板減少症を来す疾患(妊娠高血圧症候群、全身性エリテマトーデス、バセドウ病など)や薬剤内服歴(非ステロイド性抗炎症薬、サイアザイド系利尿薬、バルプロ酸、カルバマゼピンなど)のある母体から出生した新生児とした。

研究対象の正常コントロールは、九州大学病院総合周産期母子医療センターに入院した母体から出生した、在胎週数 37 週以上、出生体重 2500 g 以上の正常新生児とした。

(2) 前向き研究(図3)



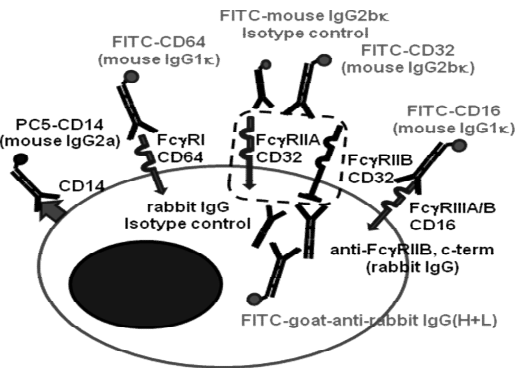
(図3) 前向き研究図

研究対象の可否について 1) 母体の周産期情報の収集を行い、文書による説明と同意を得る。出生時に 2) 臍帯血を採取した。診療に必要な検体を除いた余剰分を、直ちにフローサイトメーターによる Fc レセプターのサ

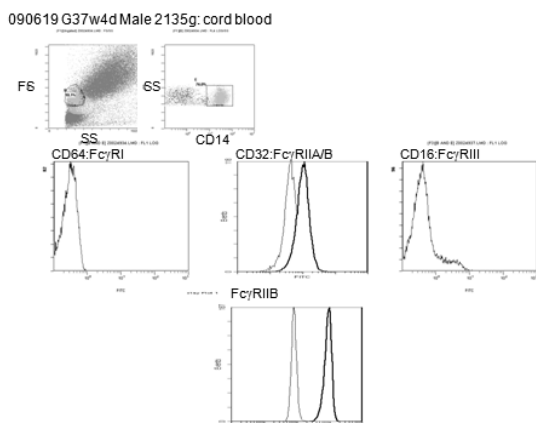
ブタイプ解析と磁気ビーズ法による CD14 陽性単球の分離と mRNA 抽出を行った。余剰血漿があれば冷凍保存した。研究対象児の血小板減少や黄疸の検査および加療については、保険診療内の通常の診療を行った。これらの症例に前向きに追跡し、3)血小板数や黄疸の経緯を調査した。解析結果と臨床情報との関連を統計学的に解析して、予測因子を検索した。

(3) フローサイトメーターでの Fc R 発現解析 (図4)

使用する抗体および細胞内染色については Asahi ら (Asahi A ら、J Clin Invest 2008) に従った。平均照度から発現強度を測定した。PC5-CD14 抗体にて単球成分をソーティングして、FITC-CD32 細胞外染色で Fc R2A/2B 共通ドメインの発現を測定した。Fc R2B の細胞内ドメインを Fc R2B 抗体を細胞内 FITC 発現で測定した。平均照度の差分を求めて Fc R2A と Fc R2B の発現バランスを解析した (図5)



(図4) Fc R 発現解析における細胞染色



(図5) フローサイトメーター発現解析

4. 研究成果

(1) 対象症例

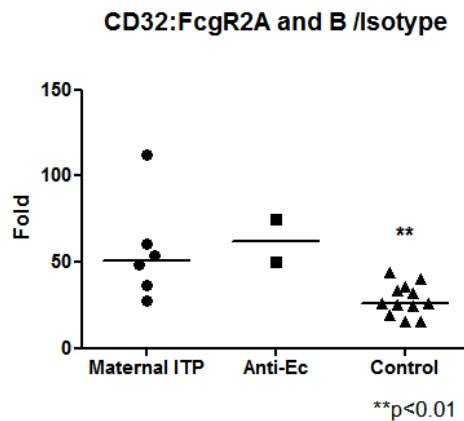
研究期間内に ITP6 例、血液型不適合 2 例、対象 12 例が集積された。疾患例の周産期情報を表 1 に示す。いずれの症例においても、出生後の新生児では、血小板減少や溶血性貧血は来たさなかった。

表 1. 対象症例の背景

	週日	出生体重	性別	分娩方式	1分	5分	pH
Maternal ITP	37	3 2905	M	VD	8	8	7.314
Maternal ITP	39	5 3105	F	VD	9	10	7.301
Maternal ITP	37	2 2700	M	VD	5	8	7.042
Maternal ITP	36	3 2172	F	CS	6	9	7.27
Maternal ITP	36	3 1772	F	CS	5	8	7.27
Maternal ITP	38	4 3020	M	VD	8	9	7.216
Anti-Ec	39	1 2655	F	CS	8	9	7.29
Anti-Ec	40	4 3335	F	VD	9	9	7.312

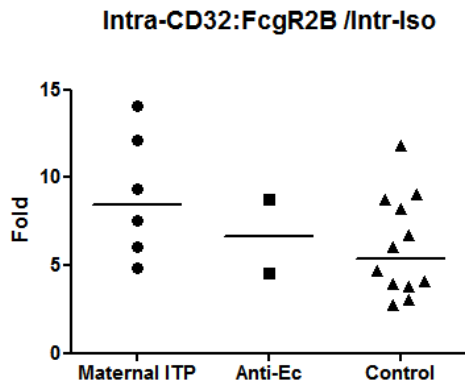
(2) Fc レセプター発現解析

細胞外 CD32 ; Fc R2A/2B 発現 ITP、血液型不適合いずれにおいても正常群と比較して CD32 の発現は高かった (p<0.01) (図6)



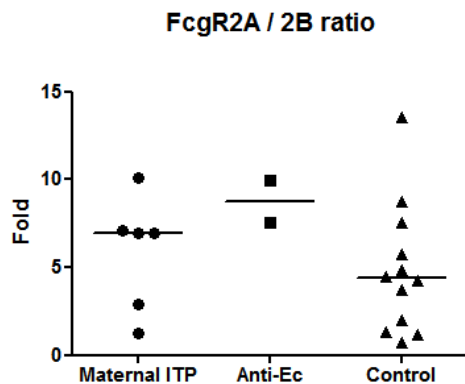
(図6) CD32 細胞外染色

細胞内 CD32 ; Fc R2B 発現 抑制性 Fc R2B は ITP、血液型不適合、正常群いずれも発現量に有意差は認めなかった (図7)



(図7) CD32 細胞内染色

Fc R2A/2B バランス
いずれの群においてもバランスに有意差は認めなかった (図8)

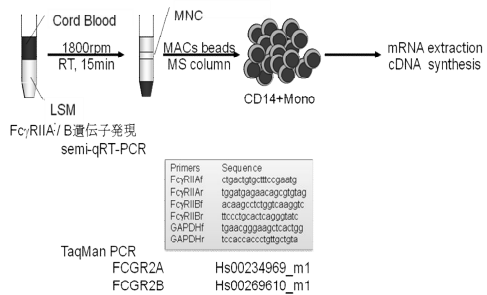


(図8) Fc 2A/2B バランス

しかしながら、今回の ITP、血液型不適合群はいずれも新生児期に症候化していない。疾患未発症で、FcgR2A/B が有意に高く、2B も高い傾向があり、2B 発現上昇により発症を抑制している可能性が考えられた。これは成人例の報告 (Asahi A ら、J Clin Invest 2008) の結果と合致している。今後も継続して症例を集積して血小板減少例や早発黄疸例とのバランスの相違、治療経過による変化を観察する必要がある。同時に CD14 細胞を磁気ビーズ法により分離しており、mRNA から RT-PCR 法やマイクロアレイ法での網羅的な発現解析に備えている (図9)

《臍帯血CD14陽性細胞分離およびFcγR発現解析》

CD14+ Monocyte purification and cDNA synthesis



(図9) 磁気ビーズ法による CD14 陽性細胞分離と Fc R 遺伝子発現

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)

Ochiai M, Kinjo T, Takahata Y, Iwayama M, Abe T, Ihara K, Ohga S, Fukushima K, Kato K, Taguchi T, Hara T.

Survival and neurodevelopmental outcome of preterm infants born at 22-24 weeks of gestational age

Neonatology 2014;105:79-84. 査読有

DOI: 10.1159/000355818

Inoue H, Ohga S, Kusuda T, Kitajima J, Kinjo T, Ochiai M, Takahata Y, Honjo S, Hara T.

Serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a predictor of the development of bronchopulmonary dysplasia in preterm infants.

Early Hum Dev. 2013 Jun;89(6):425-9. 査読有

DOI: 10.1016/j.earlhumdev.2012.12.011.

Hikino S, Ohga S, Kinjo T, Kusuda T, Ochiai M, Inoue H, Honjo S, Ihara K, Ohshima K, Hara T.

Tracheal aspirate gene expression in preterm newborns and development of bronchopulmonary dysplasia.

Pediatr Int. 2012 Apr;54(2):208-14. 査読有

DOI: 10.1111/j.1442-200X.2011.03510.x.

[学会発表](計7件)

Ochiai M, Matsushita Y, Kusuda T, Ichiyama M, Kitajima J, Inoue H, Tanaka K, Ihara K, Ohga S, Hara T.

Blood chemistry and hematology reference intervals in preterm or low birth weight infants at birth

PAS and ASPR Joint Meeting 2014 May 3-6,

2014 Vancouver

Ochiai M

Survival and neurodevelopmental outcome of preterm infants born at 22-24 weeks of gestational age

The 25th FISP/M August 30, 2014 Fukuoka

Ochiai M, Kinjo T, Ichiyama M, Takahata Y, Abe T, Ihara K, Ohga S, Kato K, Taguchi T, Hara T

Survival and neurodevelopmental outcome of preterm infants born at 22-24 weeks of gestational age

ASPR-PSM 2013, 9-12th May, 2013, Kuching, Sarawak, Malaysia

Ichiyama M, Ochiai M, Kinjo T, Iwayama M, Abe T, Torisu H, Yamashita H, Ihara H, Ohga S, Yoshida K, Hara T.

Correlation of ADHD or ASD symptoms and WISC-3rd in VLBWI at school age

ASPR-PSM 2013, 9-12th May, 2013, Kuching, Sarawak, Malaysia

Inoue H, Ohga S, Kusuda T, Kitajima J, Kinjo T, Ochiai M, Takahata Y, Honjo S, Hara T.

Serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a predictor of the development of bronchopulmonary dysplasia in preterm infants

The 24th Fukuoka International Symposium on Pediatric/Maternal-Child Health Research (FISP/M) Aug. 31, 2013 Centennial Hall Kyushu University of Medicine

Inoue H, Iwayoshi T, Kinjo T, Ochiai M, Takahata Y, Ihara K, Hara T

Congenital Multiple Pituitary Hormone Deficiency Associated with Hyperammonemia the 8th Congress of Asian Society for Pediatric Research

May 17 to 19, 2012, Seoul, Korea

Inoue H, Ohga S, Kusuda T, Kitajima J, Kinjo T, Ochiai M, Takahata T, Honjo S, Hara T

Serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) levels in preterm infants with CLD

the 8th Congress of Asian Society for Pediatric Research

May 17 to 19, 2012, Seoul, Korea

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

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)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.med.kyushu-u.ac.jp/pediatr/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

落合 正行 (OCHIAI, Masayuki)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号: 9 0 5 0 7 7 8 2

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: