

令和 2 年 6 月 28 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K10102

研究課題名(和文)Thrombopasを用いた新生児PC制御機構の解明と新たな治療法の開発

研究課題名(英文)Elucidation of newborn PC control mechanism and development of new treatment method using Thrombopas

研究代表者

中川 隆志(Nakagawa, Takashi)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：30571004

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)：新生児から乳児のPICI%、トロンビン生成、プロタック使用後のトロンビン生成と正常成人との比較を行った。新生児ではPC/PS制御系の未熟性と凝固因子の生理的産生低下により、抗凝固と凝固がうまくバランスをとっている。感染や仮死などで抗凝固能が低下すると、容易にDICになるためPC、PSやFFP投与の必要性を検討する余地があると考えられた。

PC活性が50%になるとPICI%はほぼ80%に近づき、PC活性が70%になるとPICI%は正常レベルまで上昇し、FFP投与後も大きな変化は見られない。そのためPC活性が50%以上であれば抗凝固能は保たれることが予想された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新生児や乳児では、仮死や重症感染症となったときに、血液凝固能と血液抗凝固能のバランスが崩れやすく、播種性血管内凝固症候群を容易に引き起こしてしまう。そのため、新生児や乳児では、病初期からプロテインCやプロテインS、新鮮凍結血漿の投与が有効である。

研究成果の概要(英文)：We compared the PICI% of newborns to infants, thrombin generation, thrombin generation after using Protac, and normal adults. In the newborn, anticoagulation and coagulation are well balanced due to immaturity of the PC/PS control system and decreased physiological production of coagulation factors. If the anticoagulant ability declines due to infection or asphyxia, DIC can easily occur, so it may be necessary to consider the necessity of PC, PS or FFP administration.

When the PC activity reaches 50%, the PICI% approaches 80%, and when the PC activity reaches 70%, the PICI% rises to the normal level, and there is no significant change after FFP administration. Therefore, it was expected that the anticoagulant ability would be maintained if the PC activity was 50% or more.

研究分野：小児

キーワード：Thrombopas

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

新生児 DIC は周産期に関連する様々な基礎疾患に合併し、その発症は新生児予後に大きく影響する。新生児 DIC の治療は、基礎疾患の治療に加え、破綻した止血機構の制御による。これまで新生児 DIC の治療は、基礎疾患により過剰に産生されたトロンピン (Th) や活性化 X 因子等を制御することで、ヘパリン療法やアンチトロンピン (AT) 補充療法が行われてきた。さらに膵炎治療薬として開発された蛋白分解酵素阻害薬の FOY や Futhan など新生児 DIC の治療に用いてきた。これら治療法は、その有用性を示すエビデンスが少なく未だ新生児 DIC 治療ガイドラインとして確立されたものではない。しかし、近年、わが国で開発された新規 DIC の治療薬のトロンボモジュリン (TM) 製剤は、成人はもとより新生児 DIC でも、その有用性が蓄積されてきている (Shirahata A et al Eur J Pediatr 2013. E Pub)。同製剤は、トロンボモジュリンとトロンピンが複合体を形成することで、トロンピンの凝固活性や血小板活性化作用を不活化し、TM・Th 複合体がプロテイン C (PC) 制御機構 [PC とその補因子の遊離型プロテイン S (free PS) による凝固制御機構] を活性化することで、Th で活性化された V 因子および 因子を選択的に分解し、過剰の Th による凝固活性化の悪循環を制御するものである。また、TM はアミノ末端にレクチン結合ドメインが存在し、同ドメインには抗炎症効果も期待されている。しかし、TM 薬剤の活性化 V 因子、 因子の不活化には PC 制御機構が、十分に機能が果たせることが前提であるが、PC 制御機構を構成する PC や PS はともに肝由来のビタミン K 依存性抗凝固因子で、肝の未熟な新生児では成人量の 1/4-1/5 量に低下しており、特に新生児血栓症で発症する中に一過性の PC 活性が 10%以下にまで低下している例が存在する (川口千晴、高橋幸博 小児血液・がん学会誌、Ohga S, Takahashi Y et al, Pediatr Int 2013;55:267-271)。したがって、新生児の PC 活性に加え、PC 制御機構全体での評価は極めて重要である。また、PC の補充は、先天性 PC 欠乏症では活性化 PC 製剤の適応があるが、通常は新鮮凍結血漿の補充しかなく、その適応や、TM 補充効果の評価、非活性型 PC 製剤を含めた新たな治療薬の開発に繋がると考える。

2. 研究の目的

新生児は、小児期を通じて容易に播種性血管内凝固 (DIC) や血栓症を発症する。新生児の止血機構に關与する凝固・線溶因子、およびその抗凝固因子の中で、フィブリノゲンと凝固促進作用を有する第 V 因子 (V 因子)、第 因子 (因子) は出生時既に成人量に達している。一方、他の肝由来の凝固・線溶因子やその抗凝固因子は新生児肝の未熟性からその産生量は成人量の約 1/2 であり、新生児は成人とは異なる止血バランスを維持しつつ成長する。われわれは新生児 DIC や血栓症の発症と病態に活性化 V 因子と活性化 因子を不活化するプロテイン C 制御機構が重要と考えている。特に低出生体重児や病的新生児の PC 制御機構全体の予備能を Hemosil™Thrombopas を用い測定することで PC 制御機構の低下例を予知し、新鮮凍結血漿の他に治療法の開発や TM 製剤の治療効果を in vitro で検証する。

3. 研究の方法

新生児の PC 制御機構を中心に、臨床検体を使用し研究する。従来 PC 制御機構は、PC 活性、

Total PS, freePS 活性、補体制御因子 C4b-BP の測定等が中心であった(生体内では PS は、C4b-BP 結合 PS と free PS が存在し、抗凝固活性は freePS にある)。Hemosil™ Thrombopath は、被検検体中の PC および PS 存在下での PC 活性化を蛇毒成分のプロタックで活性化させ、最終的に検体を組織因子で活性化させた際のトロンビン活性の抑制効果で PC 制御機構の総合的な制御能力を判定するもので、成人でも血栓素因者や各種疾患での有用性は期待できるが、新生児では、さらに生理的な産生減少や、PC、PS、C4BP なので乳児期での生理的な産生量の違いも考慮が必要である。また、母体から PC 制御機構に影響する移行 PC 制御抗体の影響も考慮されることから、主として被検血漿を用いた研究に、新たに現在使用されている新生児 DIC の治療法の有効性を投与前で検証が可能かを研究期間内に明らかにしたい。

ThromboPath

血漿中の PC/PS 凝固制御機能を評価する方法として開発された。測定原理は、被検血漿中のプロテイン C に蛇毒成分であるプロタックを添加することで活性化プロテイン C に変換させ、さらに同血漿中の凝固因子を組織因子とリン脂質を添加することで活性化させ、凝固過程で活性化された活性化第 V 因子、第 VIII 因子を活性化プロテイン C/プロテイン S で不活化されるトロンビン量をトロンビンに特異的な合成発色基質で測定するもので、プロタック非添加時のトロンビン生成量との割合 (PiCi%) からプロテイン C/プロテイン S 制御機構を評価するものである。

$$PiCi\% = \frac{OD_{ActivatorB} - OD_{ActivatorA}}{OD_{ActivatorB}} \times 100$$

| |
|--|
| <p>PiCi% : Protac-Induced Coagulation Inhibition percentage OD : optical density ActivatorA : presence of a snake venom extract(protac) ActivatorB : absence of a snake venom extract(protac)</p> |
|--|

4. 研究成果

新生児および乳児のプロタック非添加時の血漿中トロンビン産生量は、健康成人血漿と比較し有意に低下していた。また、プロタック添加時では新生児および乳児の血漿トロンビン生成量は健康成人血漿でのトロンビン生成量と比較し、有意に増加していた。すなわち、新生児および乳児では凝固能および抗凝固能ともに健康成人と比較して低下していた。したがって、新生児および乳児の凝固因子、抗凝固因子は成人とは異なる止血バランスを維持しつつ成人での止血バランスに発達することが示唆された。

新生児・乳児においてプロタック非添加時のトロンビン生成量と PT-INR との関連では R=-0.7 と負の相関を示していた。プロタック非添加時のトロンビン生成量は、血漿に組織因子とリン脂質を添加し血漿でのフィブリン塊が形成されるまでの時間である。ThromboPath でのプロタック非添加時のトロンビン生成量は、血液凝固での第 VII 因子・組織因子を介する外因系による第 X 因子凝固活性化と第 VII 因子・組織因子から第 IX 因子を介した内因系による第 X 因子凝固活性化において血漿中の抗凝固因子のバランスから産生された prothrombinase によるプロトロンビンのトロンビン産生能を示すが、一方、PT は十数秒と短時間で第 VII 因子を介する主に外因系の凝固活性化を示し、さらに血漿中のフィブリノゲン形成の至る時間で、両者の関連

が示唆された。特に、両者での解離例では、トロンビン生成過程での凝固および抗凝固過程のバランスやフィブリノゲン形成の異常を考慮する必要があると推察された。

一方、ThromboPath のプロタック添加時のトロンビン生成は、血漿に組織因子とリン脂質を添加し凝固活性化を起こす前に、血漿中にプロタックを添加することで血漿中プロテイン C を活性化プロテイン C に変換し、血漿中のプロテイン S とともに、組織因子とリン脂質の添加で活性化される第 V 因子および VIII 因子を選択的に分解することで抗凝固を示すプロテイン C/プロテイン S 制御機構により抑制されたトロンビン生成量を表すと考えられる。ThromboPath での評価指標である PiCi%は、プロタック添加時のトロンビン産生量 (ODA) をプロタック非添加時のトロンビン産生量 (ODB) からを差し引いたものを、プロタック非添加時のトロンビン産生量 (ODB) で除したものを 100 倍した値で、健康成人の PiCi%のカット・オフ値は 85% と報告されている。この検査法は PC/PS 制御機構のグローバルな評価を行う測定装置として開発された。本検討でも健康成人 20 例の PiCi%カット・オフ値は 84%であった。すなわち、凝固制御機構でのプロテイン C/プロテイン S 制御機構は重要な働きを示していることが推定された。今回測定に用いたプロテイン C 活性は、原理的には ThromboPath と同様に、血漿に血漿にプロタックを添加し、抑制されたトロンビン生成を発色性合成基質で検出されるもので、トロンビン抑制率を示す PiCi%は プロテイン C 活性と相関すると推察され、両者との間には $r=0.8$ と正の相関がみられた。

一方、抗凝固作用を持つ血漿因子は、アンチトロンビン (AT)、プロテイン C (PC)、プロテイン S (PS) のほか、 α_2 -マクログロブリン (α_2 -M) 等などが知られている。新生児および乳児期では肝の未熟性や PC、PS がビタミン K 依存性抗凝固因子でもあることからその産生量も低下しており、各因子は、生後半年の間で成人値に達するが、 α_2 -M は生後、逆に出生時は健康成人より増加しており、その後徐々に成人値となる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|---|---|----|
| 研究分担者 | 高橋 幸博 (Takahashi Yukihiro) (60142379) | 奈良県立医科大学・医学部・研究員 (24601) | |