

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：17701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2016

課題番号：16K15764

研究課題名(和文)ヘパリン起因性血小板減少症(HIT)迅速診断のための病態シミュレーション技術構築

研究課題名(英文)Novel simulation technique for diagnosing heparin-induced thrombocytopenia (HIT)

研究代表者

伊藤 隆史(Ito, Takashi)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・講師

研究者番号：20381171

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：血栓症予防のためにしばしば用いられるヘパリンは、副作用としてヘパリン起因性血小板減少症(HIT)を起こす場合がある。HITに血栓症を合併すると、致死率は5-20%に及ぶため、早期診断・介入が重要だが、HIT診断のための検査は十分に整備されていない。本研究では、近年我々が開発したリアルタイム血栓モニタリングシステム(T-TAS)を用い、T-TAS上でヘパリン負荷試験を行うことによって、体外でHIT病態をシミュレーションできるかを検討した。その結果、HIT患者の血液にヘパリンを添加すると、血栓形成がむしろ亢進することが示され、本システムがHIT診断の補助判断材料として有用である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Heparin is frequently used for preventing thrombosis. Heparin-induced thrombocytopenia (HIT), an adverse effect of heparin, is potentially lethal. So, an early diagnosis is needed to avoid iatrogenic worsening. In this study, we examined potential usefulness of total thrombus-formation analysis system (T-TAS) in HIT diagnosis. Platelet-rich thrombus formation in T-TAS is impaired when heparin is mixed with whole blood from healthy volunteers. However, platelet-rich thrombus formation in T-TAS is paradoxically augmented if heparin is mixed with whole blood from HIT patients. These findings indicate that T-TAS may be potentially useful in distinguishing patients with HIT from those without HIT. Further studies are needed to evaluate its clinical usefulness.

研究分野：救急集中治療

キーワード：抗凝固薬 ヘパリン ヘパリン起因性血小板減少症 HIT 血栓症 ポイントオブケア

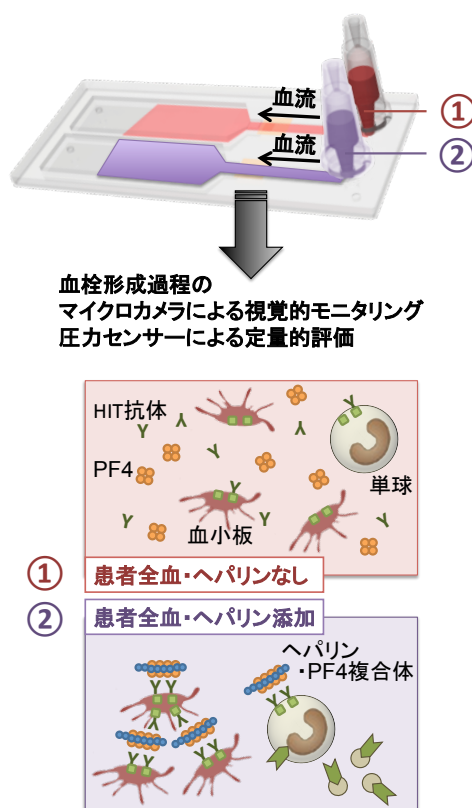
1. 研究開始当初の背景

救急・集中治療領域では、ヘパリンを投与されている患者が、何らかの理由で血小板減少をきたしていることも少なくないため、ヘパリン起因性血小板減少症（HIT）の鑑別が問題になる。血栓塞栓症を伴った HIT 患者の致死率は 5-20%に及び、早期診断・介入が重要だが、HIT 診断のための検査方法は十分に整っていない。HIT 診断のための検査は、(a) HIT 抗体そのものを調べる抗体検査、(b) HIT 抗体を含んだ患者検体にヘパリンを添加することによって血小板が活性化することを調べる血小板機能検査、に大別される。抗体検査、血小板機能検査は、HIT の診断に重要な役割を果たしているが、弱点もある。抗体検査の弱点としては、抗体陽性だとしても HIT とは限らない点、また、HIT 抗体検査を自施設で実施している病院は少なく、外注して結果が返ってくるまでの間、目の前の血栓症患者に対し、ヘパリンを増量すべきか、中止すべきか、判断に迷う点などが挙げられる。血小板機能検査は、より HIT の病態を反映した検査であり、HIT の確定診断に重要な検査だが、この検査を実施できる施設は日本国内で数施設程度であるため、HIT 診療の実状としては、臨床徴候と血小板数のみで判断しつつ、確定診断は後からつける形にならざるを得ない。このため、ヘパリン投与と患者の 1-3%に発症するとされる HIT が見過ごされたり、診断が遅れたりすることも少なくない。近年我々は JST の支援を受け、藤森工業株式会社と共同で「血栓傾向を科学的、定量的に診断する方法」の開発に取り組み、リアルタイム血栓モニタリングシステム（T-TAS®）を完成させた（JST プレスリリース 2012 年 2 月 29 日第 862 号）。本システムの特徴は、(1) 血栓形成過程および流路内圧をリアルタイムに表示できるため、迅速診断に適していること、(2) 血流下で血小板が活性化して血栓が形成されていく過程に、白血球や赤血球も関与していて、生体内での血栓形成過程に近いこと、(3) アスピリンなどの抗血小板薬服用患者の薬効を感度良く評価できること（*Thromb Haemost.* 2013;109:102-11）、などであり、T-TAS を応用展開することで、HIT 診断に役立てられる可能性が考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、T-TAS のマイクロ流路の 2 つのチャンネルのうち、片方でヘパリン非存在下での患者全血の血栓形成能を解析し、もう一方でヘパリンを添加した状態での患者全血の血栓形成能を解析することにより（図 1）、ヘパリンが患者血中に入った際の血小板機能の変化を T-TAS 上でシミュレーションし、HIT の迅速診断に応用することを目指す。

図1 T-TASを用いた
HIT病態のシミュレーション
およびその検出



3. 研究の方法

以下の 3 つのステップに従って検討した。
【ステップ 1】: HIT の診断が確定している患者の保存血漿と健常人の新鮮血小板とを用い、HIT 病態をシミュレーションするために最適な T-TAS マイクロチップの流路設計、血流速度の設定、ヘパリン添加濃度の検討を行った。

【ステップ 2】: 当院 ICU に入室し、ヘパリン使用中に血小板数が 10 万 / μ L 未満となって HIT の可能性が考えられた成人患者を対象として、HIT-IgG 抗体価（アイエルジャバ

ン社製試薬)を測定した。

【ステップ3】: 臨床徴候およびステップ2により HIT が疑われた患者の新鮮な全血を用い、ステップ1で決めた測定条件でヘパリン負荷を行い、HIT病態をT-TASマイクロ流路上で再現できるか検討した。

4. 研究成果

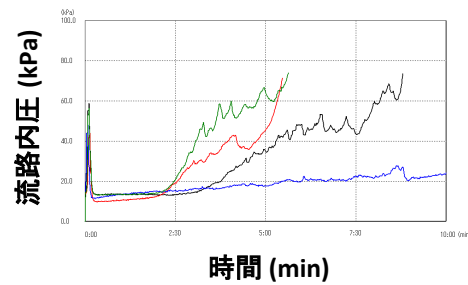
3つのステップに対し、以下のような結果を得た。

【ステップ1】: 血小板機能を評価するためのT-TASマイクロ流路は、通常、40 μm の櫛幅、深さのものを用いているが、血小板が減少している患者検体を用いた検討においては、30 μm の櫛幅、深さのものの方が、ヘパリン添加による差異を感度良く検出できた。流速については、1500 S^{-1} のずり速度を発生させる条件で、ヘパリン添加による差異を検出できた。ヘパリン添加濃度は、0.2 U/mL で、HIT患者と健常人の差を検出できた。100 U/mL の高用量では、HIT患者も健常人も流路内圧上昇が完全に抑制された。

【ステップ2】: 当院ICUには、一ヶ月におよそ90人の成人患者が入室する。そのうち、99%が何らかの形でヘパリン(Aラインへのヘパリン投与を含める)を投与されていて、血小板数が10万 μL 未満になる患者は、そのうち25%だった。そのうちHIT-IgG抗体が陽性になるケースは二ヶ月に一例ほどで、ICU入室成人患者におけるHIT-IgG陽性頻度は、0.5%程度と考えられた。

【ステップ3】: 臨床徴候およびステップ2により HIT が疑われた患者の新鮮な全血を用い、ステップ1で決めた測定条件でヘパリン負荷T-TASを実施したところ、図2のように、0.2 U/mL のヘパリンを添加することで、流路内圧の上昇が早いタイミングから観察されるようになり、ヘパリン添加によって血栓形成が高まっていることが判明した。一方、100 U/mL の高用量ヘパリン存在下では、流路内圧上昇が完全に抑制され、0.2 U/mL 前後のヘパリン臨床用量においてHIT患者の血栓形成が高まっていることが示唆された。

図2 HIT患者の血小板血栓形成に対するヘパリン添加の影響



全血+生食

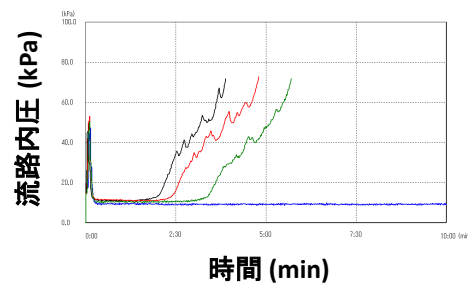
全血+Heparin 0.2U/mL (incubation-0min)

全血+Heparin 0.2U/mL (incubation-30min)

全血+Heparin 100U/mL(incubation-0min)

健常人の新鮮な全血を用いて同様の検討を実施した場合には、図3のように、0.2 U/mL のヘパリンを添加しても、流路内圧の上昇は遅延し、ヘパリン添加によって血小板血栓形成は抑制されることが判明した。一方、100 U/mL の高用量ヘパリン存在下では、HIT患者同様に流路内圧上昇が完全に抑制され、0.2 U/mL 前後のヘパリン臨床用量において、HIT患者と健常人でヘパリンに対する反応性が正反対であることが明らかになった。

図3 健常人の血小板血栓形成に対するヘパリン添加の影響



全血+生食

全血+Heparin 0.2U/mL (incubation-0min)

全血+Heparin 0.2U/mL (incubation-30min)

全血+Heparin 100U/mL(incubation-0min)

その後の検討で、HIT抗体が陽性であるにも関わらずT-TASで流路内圧の上昇が早まらない患者も認められた。特徴としては、当該患者が抗血小板薬を服用していたことが挙げられ、そのようなケースではT-TAS検査が偽陰性になる可能性が示唆された。当該患者の血漿と健常人の新鮮血小板とを用いることで、偽陰性を出すことなく診断できるかどうか、更なる検討が必要である。

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 0 件)

今後、論文化する予定である。

[学会発表] (計 3 件)

○伊藤隆史、上國料千夏、安田智嗣、垣花泰之 本邦 ICU における HIT 発症頻度の解析ならびに新規検査法の展望 第 44 回日本集中治療医学会学術集会 2017 年 3 月 10 日 ホテルさっぽろ芸文館 (北海道札幌市)

○中弁護、伊藤隆史、新門翠、久保祐輝、馬場敬太、政所祐太郎、宮本昇太郎、江口智洋、寺田晋作、垣花泰之 肺塞栓からショックを引き起こした遅発型ヘパリン起因性血小板減少症 (HIT) の一例 第 44 回日本集中治療医学会学術集会 2017 年 3 月 10 日 ロイトン札幌 (北海道札幌市)

○伊藤隆史 Clinical implication of visualizing platelet adhesion, aggregation, and activation in a microchip-based flow chamber system. 第 89 回日本生化学会大会 2016 年 9 月 25 日 東北大学川内北キャンパス (宮城県仙台市)

[図書] (計 1 件)

○伊藤隆史、垣花泰之 麻酔・手術後の患者管理 克誠堂出版 分担執筆 2016 年 総頁数 360 頁 (担当頁 123-127)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

特記事項なし。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 隆史 (ITO, Takashi)
鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 講師
研究者番号 : 20381171

(2) 研究分担者

丸山 征郎 (MARUYAMA, Ikuro)
鹿児島大学大学院医歯学総合研究科
特任教授
研究者番号 : 20082282

垣花 泰之 (KAKIHANA, Yasuyuki)
鹿児島大学医歯学域医学系
教授
研究者番号 : 20264426

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

細川 和也 (HOSOKAWA Kazuya)
藤森工業株式会社

永里 朋香 (NAGASATO Tomoka)
藤森工業株式会社