

201128275A

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患克服研究事業

新生児血栓症(プロテインC、プロテインS及びアンチトロンビン異常症)の
効果的診断法と治療管理法の確立に関する研究

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 大賀 正一

平成24(2012)年3月

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

新生児血栓症（プロテインC、プロテインS及びアンチトロンビン異常症）

の効果的診断法と治療管理法の確立に関する研究

平成 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 大賀 正一

平成 24（2012）年 3 月

目次

I. 総括研究報告書	
新生児血栓症（プロテインC, プロテインS及びアンチトロンビン異常症）の効果的診断法と治療管理法の確立に関する研究	1
大賀 正一	
II. 分担研究報告書	
1. 血栓塞栓症家系の遺伝的素因に関する研究 ～周産期領域におけるスクリーニングと遺伝子解析～	11
康 東天, 落合 正行, 福島 恒太郎, 浦田 美秩代, 栢森 裕三, 大賀 正一	
2. 凝固検査標準化、治療管理ガイドライン作成（小児）に関する研究	14
嶋 緑倫	
3. 栓友病の新生児期からの効果的診断法と治療管理法の確立に関する研究	18
金子 政時	
4. 新生児の血栓症の病因・病態に関する研究	20
高橋 幸博, 川口 千晴	
5. 小児血栓症の疫学に関する研究	22
石黒 精, 瀧 正志	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	27
IV. 研究成果の刊行物・別刷	33

I. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
総括研究報告書

新生児血栓症（プロテインC,プロテインS及びアンチトロンビン異常症）
の効果的診断法と治療管理の確立に関する研究

研究代表者 大賀 正一 九州大学大学院医学研究院周産期・小児医療学 教授

研究要旨

血栓症は遺伝と環境による複合的要因によって発症する多元病である。近年、先天性・後天性血栓性素因（栓友病）の解明が進んでいる。海外では、Factor V Leiden (FVL: R506Q) が先天性血栓性素因として最も頻度が高い。一方、東アジアでは FVL はみられず、日本では深部静脈血栓症成人の 65% にプロテイン S (PS)、プロテイン C (PC) およびアンチトロンビン (AT) の活性低下がみられ、その 2 割から 4 割に遺伝子変異が半数に同定されることが明らかとなった。一方、周産期の母子における血栓性素因とその臨床像は明らかでない。PC 欠損症は新生児電撃性紫斑病をおこす稀な疾患として知られるが、この PC ヘテロ変異保有者は日本人 620 人に一人と予想外に多いと推定されている。小児は血栓症をおこしにくいとされるが、新生児はむしろ血栓傾向が強い。この 3 大血栓性素因 (PS, PC および AT) のヘテロ変異を有する母が、初回妊娠年齢までに発症する可能性は低いが、妊娠分娩そのものが血栓発症の契機となる。

本研究では、母子の血栓性素因を効率よくスクリーニングし、遺伝子診断を確定して、「周産期における血栓塞栓症の全貌」を明らかにし、「診断と治療法の確立」をめざす。①母子の 3 大因子の活性測定と遺伝子解析、②治療剤の全例調査解析、および③国内症例の網羅的解析を行った。その結果、国内に 23 家系 25 例の PC 異常症を確認した。小児期の遺伝性栓友病のほとんどは、生後 1 か月以内に頭蓋内出血/梗塞（主に在胎 33 週～生後 15 日）か電撃性紫斑病で発症する PC 欠損症であることが明らかとなった。60% の患児は両者を合併し、頭蓋内病変が先行していた。出生時に血栓症の家族歴が明らかであったものは 25% にすぎず、75% の患児の母は分娩まで血栓症を起こしていない PC 活性低下例であった。11 例に遺伝子解析が行われ 7 例が PC 遺伝子 (*PROC*) のホモ (2 例) または複合ヘテロ変異 (6 例) であった。両親の PC 活性から、患児の 20% は *PROC* ヘテロ変異による PC 欠乏と推定されたが、変異なしも 2 例に確認された。死亡例は 2 例のみであったが、活性化 PC 製剤を使用した生存例も、末端肢切断や神経学的後遺症を残していた。

同時に 2006 年から 2010 年の 5 年間に発症した血栓症を対象にした初めての小児血栓症の全国調査を行った。301 人が集計され、遺伝性栓友病が 48 人、基礎疾患などを有する後天性が 253 人であった。遺伝性の内訳は、PC 異常 22 (46%)、PS 異常 7 (15%)、AT 異常 5 (10%)、ADAMT13 異常 5 (10%) およびその他 9 (19%) であった。この全国調査は新生児を対象としていないが、これまでの新生児の調査結果も考慮すると、小児期の血栓症の半数は PC 異常であり、これが新生児期に発症し、救命し得ても頭蓋内出血/梗塞などによる後遺症を残していると推測された。この周産期・新生児・小児領域の調査結果を包括的に検討すれば、成人までに発症する遺伝性血栓症の全体像を明らかにすることが可能である。母のスクリーニングから母児の遺伝性血栓症を診断し、早期に対応できる AT/PC 製剤の適正使用を含む治療ガイドラインを策定することが必要である。

研究分担者

康 東天	九州大学大学院医学研究院・臨床検査医学	教授
嶋 緑倫	奈良県立医科大学小児科学	教授
落合 正行	九州大学病院・総合周産期母子医療センター新生児内科部門	助教
福嶋恒太郎	九州大学病院・総合周産期母子医療センター母性胎児部門	講師
金子 政時	宮崎大学病院・総合周産期母子医療センター	准教授
高橋 幸博	奈良県立医科大学病院・総合周産期母子医療センター	教授
瀧 正志	聖マリアンナ医科大学横浜市西部病院・小児科	教授
石黒 精	独立行政法人国立成育医療研究センター・教育研修部血液内科	部長

A. 研究目的

血栓症は遺伝因子と環境因子によって発症する多元病である。プロテインS(PS)、プロテインC(PC)およびアンチトロンビン(AT)欠損症は、日本人における3大遺伝性血栓性素因(栓友病)である。この遺伝的背景は民族により異なり、欧米ではFactor V Leiden (FVL: R506Q)やプロトロンビン変異(FII: G20210A)の頻度が高いが、これらは日本人には見られない。各ヘテロ変異の若年成人は深部静脈血栓症を発症し、ホモおよび複合ヘテロ変異の新生児は電撃性紫斑病をおこすことが知られている。これまでに成人を対象とした解析から、日本人のヘテロ変異保有率はPS 1.8%、PC 0.16%およびAT 0.18%と推定され、これらを保有する成人に静脈血栓の発症危険度が高いことが明らかにされた(Kinoshita S, et al. Clin Biochem 2005;38: 908, Miyata T, et al. Thromb Res 2009;124: 14.他)。また、活性化PCは抗凝固以外に細胞保護・抗炎症作用を有しており、PC欠乏症が敗血症の重症化因子になることが近年注目されている。日本の成人における3大素因の分子疫学が解明されてきたが、小児周産期領域の血栓症の全貌は明らかではない。

乳児は生理的に抗凝固因子活性が低く、各因子の先天性欠乏症の診断は難しい。妊産婦も抗凝固因子活性は生理的に変動し、先天性欠乏症の診断は困難である。感染や自己抗体などによる影響も、小児および妊産婦には見逃すことのできない後天性因子である。電撃性紫斑病や脳性麻痺の小児に

FVLやPC欠損症が海外で見つかり、同様な小児例(Ishimura M, Ohga S, et al. Eur J Pediatr 2009; 168: 673, Sekiguchi K, Kang D, et al. Clin Neurophysiol 2010; 121: 800)を私たちも報告した。重症感染症で後遺症を残した児に素因がある可能性がある。

羊水塞栓症を含む産科的塞栓症は日本でも増加し、2008年度は妊産婦死亡率の第1位となった。上記3大素因の女性には血栓症の既往がなくても、初回分娩において血栓症をおこす可能性がある。しかし、妊婦の血栓性スクリーニングは難しい。母子両者への影響が大きく重篤度が高い疾患である割には一般に行われていない。3大素因に対する現在の抗凝固療法の予防効果は不十分とされ、とくに妊婦には安全な周産期管理が必要である。新生児の遺伝性栓友病に対する診断と治療管理のガイドラインはない。

本研究の目的は、小児周産期領域の血栓症の全貌を明らかにして、母子の血栓性素因に正確かつ効率的に対応できる「小児血栓症の診療と治療のガイドライン」を作成することである。さらに、小児周産期領域の血栓症の分子疫学を解明して、遺伝子診断と遺伝カウンセリングから罹患母子を長期に観察・支援する疾患登録システムを確立する。これは血友病と同様に血栓止血領域の稀少疾患の患者に対して、将来のトータルケアの基盤を形成するものである。

B. 研究方法

日本における小児周産期の血栓症について、その臨床的特徴と分子疫学、診断お

よび治療を前方視・後方視研究から明らかにする。

1) 前方視的には、総合周産母子医療センターを拠点に全国規模にて、血栓性素因のある母子の詳細な病歴調査と凝固線溶スクリーニングを行い、遺伝子解析を開始する(大賀、金子、福嶋ほか)。新規診断例の小児と両親を中心に、その患者家族の疑い例に対して検討を行う。

2) 後方視的には、①九州大学にて診断した周産期遺伝性血栓症の症例解析(大賀、康、落合、福嶋:研究協力 栢森裕三、浦田美秩代)、②活性化PC製剤の国内全例調査の小児例の解析(大賀、落合ほか)、③国内症例の網羅的集計と解析(大賀、康:研究協力 日本産婦人科新生児血液学会 池ノ上克、白幡聡、高橋)、④小児血栓症の全国調査(石黒、瀧、嶋、高橋ほか)、⑤新生児血栓症の全国集計(高橋ほか)を行った。また、⑥新生児後方支援病院を中心に神経学的後遺症を有する児の家族の病歴と家族歴から遺伝性栓友病について検索する。

これらの解析結果を照合検討して、「小児・周産期血栓症の診断と治療における包括的ガイドライン」を作成する。血栓性素因の遺伝子解析については、九州大学倫理委員会で承認をうけ、対象者より同意書を取得して行う。必要があれば、その結果をもとに遺伝カウンセリングを行う。全国疫学調査についても成育医療センターの倫理委員会で承認済みである。

1) 前方視的解析

新規発生例の対象施設は、九州大学病院総合周産期母子・小児医療センターが構成する「ハイリスク新生児臨床研究ネットワーク」の施設群から開始し全国へ広げる。このネットワークには既に基幹10施設にTV会議による密な診療連携基盤が築かれている。後方視的研究は新生児医療に関与する国立病院機構から開始する。また、産科領域については状況を把握しやすい宮崎県(金子、池ノ上ほか)と福岡県(福嶋ほか)から産科領域の遺伝性血栓症の疫学調査を計画

する。

2) 後方視的解析

①周産期遺伝性血栓症の症例解析

〈凝固線溶因子活性および自己抗体の同定〉

血栓性素因解析は以下の凝固関連因子18項目のスクリーニングから行う。PT、APTT、Fibrinogen、FDP、トロンボテスト、ヘパプラスチンテスト、プラスミノゲン活性、 α_2 プラスミンインヒビター活性、PIC、TAT、D-dimer、トロンボモジュリン、tPAI-C、lupus-anticoagulant、抗Cardiolipin抗体、PC活性、PS活性、AT活性。PCおよびPSの活性測定にはSTA試薬シリーズ プロテインC(クロット)、プロテインS(クロット)(Stago/ロシュ・ダイアグノスティクス)を、AT活性測定にはエルシステム・AT III(シスメックス)を用いた。正常プール血漿を標準に用いて、2SD以内を参照域とし3SD以下を活性低下とした。

〈PS, PS, AT遺伝子解析〉

PS遺伝子 *PROS1* (15 exons)、PC遺伝子 *PROC* (9 exons)、AT遺伝子 *SERPINC1* (7 exons) の翻訳およびプロモーター領域を解析した。患児家族の同意を得て、末梢血白血球よりDNAを抽出した。活性低下と判断した因子の各遺伝子プライマーで、DNAをポリメラーゼ鎖反応(PCR)により増幅し、当該PCR産物の塩基配列を直接法にて決定した。塩基配列の決定にはABI PRISM3100 Genetic Analyzer(ライフテクノロジーズジャパン)を用いた。変異が同定されない場合、活性および臨床像からMLPA法にて欠失を検討した。臨床遺伝医療部にて遺伝カウンセリングを行った。

②活性化PC製剤の国内全例調査の解析

国内で唯一、先天性PC欠乏症患者の血栓症に適応である乾燥濃縮人活性化プロテインC(Anact®C, 帝人/化血研)について、2000年12月から2011年3月までの全例使用成績を検討した。先天性PC欠乏症の定義は、(1) PC活性が60%以下であり、かつ、血液凝固第VII因子との活性比又は抗原比が、0.7未満である場合、(2) PC活性が60%以下であり、かつ、血栓症の既往歴がある場合、

(3) PC活性が60%以下であり、かつ、同一家系内に先天性PC欠乏症患者がいる場合、(4) PC活性が60%を超え80%以下の場合は、血液凝固第VII因子との活性比又は抗原比が0.7未満で、かつ、血栓症の既往歴があるか、同一家系内に先天性PC欠乏症患者がいる場合、(5) 遺伝子解析により、PC欠乏症の診断がなされている場合、とした。主治医の承諾を書面で取得し、匿名化した小児例のみ限定して解析した。調査項目は、性、年齢(診断時と治療時)、家族歴、PC抗原および活性値、FVII因子活性、遺伝子診断、予後と合併症、本剤の有用性、有効性、有害事象とした。

③国内症例の網羅的集計と解析

1981年から2011年3月までに医中誌、PubMed, およびGoogle Scholarにて検索した。国内国外文献、学会抄録と全ての会議録を網羅して、小児血栓症、栓友病、遺伝性/先天性のPS/PC/AT欠乏症、血栓塞栓症および紫斑病を検索語とした。

④小児血栓症の全国調査

2006年から2010年の5年間に発症した新生児発症を除く小児血栓症を調査対象とした。小児科学会研修指定病院の責任者520人、および小児血液学会、小児循環器学会、小児腎臓学会、小児リウマチ学会・小児神経学会の評議員771人にアンケート調査を発送した。その結果、720通が返送され、660人と予想以上多くの小児血栓性疾患の患者の存在が判明した。詳細な情報を得るためにさらに203通の二次アンケート調査票を送付した。144通が返送され、338人が解析対象となった。

⑤新生児血栓症の全国集計

全国の新生児医療機関にアンケート調査用紙を送付し、新生児期に発症した血栓症の考えられる誘因、発症部位、診断法、治療および予後について回答を求めた。調査機関は2005年1月から2009年5月までの5年間で、過去に実施した1991年1月から2003年12月までの調査と比較した。

(倫理面への配慮)

厚生労働省の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」と「疫学研究に関する倫理指針」を遵守し、倫理委員会の承認を得て行った。対象施設の管理者宛に調査協力に関する説明書を送付して理解を図り、同意を得た。個人情報の保護のために、全国調査は匿名かつ連結不可能にした。結果は研究の目的に限定し、対象者の個人情報は一切公表しない。

C. 研究結果

1) 前方視的解析

新規発生例は、全国から依頼を受け順次九州大学病院にて解析を行った。2011年度は小児例と妊産婦例で10例以上の遺伝子診断の依頼があり解析した。深部静脈血栓症を起こした父をPC異常のヘテロ変異と診断し、家族解析と遺伝カウンセリングを行った。児と母の変異は否定された。血栓症を発症したPS異常症および予防できたAT異常症の患児がそれぞれヘテロ変異と診断された。PS活性が29%の低下した脳梗塞の妊婦例を現在解析中である。分子疫学的検討にあたっては、解析母集団の特徴とサイズが重要であり、妊婦と新生児を含めさらに前方視的に調査方法を計画中である。

2) 後方視的解析

①周産期遺伝性血栓症の症例解析

2008年から2011年までに7人6家系のPC欠乏症の小児を活性から診断し、遺伝子解析を行った。後に述べる国内網羅的調査の25人のうち11人の小児PC欠乏症に遺伝子解析が行われていた。このうちの7人6家系(Pt5, 9, 12-t1, 12-t2, 14, 15および22)に相当する。頭蓋内出血/梗塞(Pt9)と腎不全(Pt22)の新生児2例にPROC変異はなかった。Pt15はPROCヘテロ変異を有した13か月の女児で、化膿性髄膜炎罹患時に電撃性紫斑病を起こした。残りのPt5、Pt12の双生児およびPt14にPROC複合ヘテロ接合変異を同定した。それぞれの母はPROCヘテロ変異接合体者で、PC活性低下も確認されたが、血栓症や習慣性流産の罹患歴は明らかで

はなかった。

②活性化PC製剤の国内全例調査の解析

活性化PC製剤の調査は、各主治医からの同意により、2001年以降の10年間に国内で使用した例の66%をカバーすることができた。99回の投与歴を有する75人のうち、34人は先天性PC欠乏症の臨床診断基準を満たしていなかったため除外した。活性化PC製剤は20歳未満の先天性PC欠乏症と診断された29人に投与された。初発症状としての電撃性紫斑病は9人の小児に見られたが、成人(12人)にはなかった。この9人の電撃性紫斑病患児のうち、5人は頭蓋内出血/梗塞を同時に発症していた。別の6人の小児は電撃性紫斑病を合併しない頭蓋内出血/梗塞を初発症状とした。電撃性紫斑病か頭蓋

内出血/梗塞の発症は、全例発症日齢の中央値である77生日以内であった(表1)。その他の臓器病変が初発であった14人の半数は悪性疾患の治療中におこった静脈血栓塞栓症であった。臨床像については、電撃性紫斑病と頭蓋内出血/梗塞の患者群で前者に感染を併発する例が多かったこと以外に差はなかった(p=0.044, 表1)。また、頭蓋内出血/梗塞の患者群に血栓発症の誘因は認めなかった。その他の14例は遺伝子解析が行われておらず、PC活性も電撃性紫斑病と頭蓋内出血/梗塞の患者群より高く、両親の活性低下を含めて家族歴が明らかでなかった。この群は、後天性PC欠乏症の可能性が高いと考えられる。

表1 活性化プロテイン C (APC) 製剤による治療を受けた患児の主な初発病変

	電撃性紫斑病 ^a	頭蓋内出血/出血/梗塞 ^b	他の血栓塞栓症 ^c	P value	
				a vs. b	a+b vs. c
患者数, 男児 : 女児	9, 3 : 6	6, 1 : 5	14, 7 : 7	0.604	0.264
年齢*, 中央値 (範囲)	15 日 (3-422 日)	14 日 (7-317 日)	4.4 歳 (58 日-16 歳)	0.768	<.0001
PC 活性, 中央値 (範囲) %	0 (0-31)	18 (0-40)	28 (0-57)	0.195	0.006
家族歴 陽性率, %	78	83	0	>.999	<.0001
併存症					
なし	4	6	0	0.044	0.0002
あり 感染	5	0	1		
悪性腫瘍	0	0	12		
先天性心臓病	1	0	1		
有効性: あり/なし/不明	5 / 4 / 0	1 / 1 / 3	7 / 4 / 1	>.999	>.999
有用性: あり/なし/不明	3 / 1 / 5	3 / 0 / 3	7 / 0 / 7	>.999	>.999
生存率 (%)	7 (78)	6 (100)	7 (50)	0.486	0.050

表2 先天性プロテイン C 欠乏症と診断された日本の小児 25 例

患児 (Pt)	出生 在胎体重 器数 (g)	発症年齢 (日齢)			眼出血	PC 活性 (%)	患児 PROC 変異 (%)	両親の PC 活性低下	APC 療法	予後
		頭蓋内 出血/梗塞	電撃性 紫斑病	頭蓋内 出血						
1	34 1854	在胎 33w	3	無	<10	ex9:1235G>A	ホモ	母 父	有	6 か月で感染死
2-1	34 2054	在胎 34w	26	46	<10		複合ヘテロ	母 父	有	切開, 発達遅滞
3	36 3048	在胎 36w	無	37			不明	母 父	有	発達遅滞
2-2	38 3126	0	無	12	<10		ヘテロ	母	有	発達遅滞
4	37 2430	0	2	有	3	ex9:1362delG	ホモ	母 父	有	切開, DQ 下限
5	40 3456	0	0		<10	ex9:1190G>A/ex9:1362delG*	複合ヘテロ	母 父	有	発達遅滞, VP 梗塞
6	37 2700	0	7	有	<10		ヘテロ	母	有	発達遅滞
7	39 3165	1	1		5	ex3:296G>A/ex9:1362delG	複合ヘテロ	母 父	有	発達遅滞, VP 梗塞
8	38 2782	2	2	有	<10		複合ヘテロ	母 父	有	2 か月
9	38 3305	3	無		24	変異なし*	不明	正常域	有	67 生日, 発達遅滞
10		>3	3		1.5		複合ヘテロ	母 父	有	発達遅滞
11	40 3556	5	頭蓋内 出血	34			不明	母 父	有	18 生日
12-1	38 2242	6	無	6	<10	ex8:887C>T/ex9:1360G>C*	複合ヘテロ	母 父	有	発達遅滞
12-2	38 2280	6	無		<10	ex8:887C>T/ex9:1360G>C*	複合ヘテロ	母 父	有	発達遅滞
13	40 3052	7	無		19		ヘテロ	母	有	
14	40 2848	13	16		8	ex4:258delT 18Stop/ex9:905C>T*	複合ヘテロ	母 父	有	てんかん, DQ 下限
15	39 2518	13 か月	13 か月	無	8	ex4:356G>T*	ヘテロ	母	有	重度発達遅滞
16	39 3640	0			<5	ex7:725C>T/ex9:1362delG	複合ヘテロ	母 父	無	正常発達
17		0			23		不明	正常域	有	死亡
18	正常域	1	有		20		ヘテロ	母	有	正常発達, HIV 死
19	36 2566	無	1		30		不明	正常域	有	
20	39 3502	無	2	有	24		複合ヘテロ	母 父	有	
21	38 2560	無	10	有	<10		複合ヘテロ	母 父	有	
22	41 2404	有	紫斑	無	6	変異なし*	不明	正常域	有	腎不全, 正常発達
23	37 2996	無	無	11	28		不明	正常域	有	正常発達, 盲

空間は未記載, Pt: patient, PC: プロテイン C, DQ: 発達指数 Pts 2-1 と 2-2 はいとこ, Pts 12-1 と 12-2 は双生児, ex9:1362delG は PC-nagoya * 遺伝子解析を施行した 11 人のうち, 7 人は (Pts 5, 9, 12-1, 12-2, 14, 15 および 22) 九州大学にて変異を同定した。

③国内症例の網羅的集計と解析

1980年以降の30年間に先天性PS欠乏症およびAT欠乏症の症例報告は各々数例であった。一方、20歳未満の先天性PC欠乏症を、双胎(Pt12-t1, Pt12-t2)といとこ(Pt2-1, Pt2-2)の各1組を含む23家系25人に確認した。全例を発症年齢順に並べ、頭蓋内出血/梗塞を初発とした例(上段)、それ以外の症候を初発とした例(下段)に分けて示す(表2)。頭蓋内出血/梗塞で発症した17人うち、10人は電撃性紫斑病を発症したが、頭蓋内出血/梗塞に先行することはなかった。頭蓋内病変は胎児期に発症した水頭症が3人であった(Pt1, Pt2-1およびPt3)。

初発が頭蓋内病変でなかった8人のうち、電撃性紫斑病での発症は6人であった。感染症は電撃性紫斑病の3人に併発したが、頭蓋内病変のみの患児にはみられなかった。Pt22は仮死と急性腎不全、Pt23は眼科検診で硝子体出血が確認された。PC欠乏症は1例を除き週数相当体重児であった。

家族歴、両親のPC活性および抗原量および遺伝子解析の結果から、PROCホモ変異が2人、複合ヘテロ変異11人、ヘテロ変異5人、そして遺伝形式不明が7人であった。遺伝性血栓症を示唆する家族歴が陽性であったのは5人(25%)にすぎなかった。22人のうち17人(77%)において、両親(母)が低PC活性を示した。PROC変異は解析した11人のうち、2人に同定できなかった。16人(64%)が初発時に活性化PC製剤を投与され、2人(Pt1とPt17)が感染関連血栓塞栓症で死亡した。予後の記載がある生存10人のうち、8人は何らかの神経学的後遺症を残していた。

④小児血栓症の全国調査

新生児を除く338人から成人、最終診断が異なる者、家族歴から診断されたが血栓症がない者を除外し、301人を最終解析対象とした。遺伝性栓友病48人、後天性血栓症253人であった。男女比は1:1で、発症は1歳未満が29%と最も多かった。血栓症が直接の死因であったのは10人であった。遺伝

性栓友病はPC欠乏22(46%)、PS欠乏7(15%)、AT欠乏5(10%)、ADAMTS13異常5(10%)、その他9(19%)であった。後天性の基礎疾患には、溶血性尿毒症症候群・血栓性血小板減少性紫斑病、先天性心疾患、中心静脈カテーテルが多かった。再発は遺伝性栓友病では48人中22人、後天性の基礎疾患を持つ者では253人中29人と前者に有意に多かった($p<0.0001$)。

⑤新生児血栓症の全国集計

最近5年間と過去の全国調査と比較した。発症頻度は、今回109,596例中69例、0.063%で過去に実施した調査での115,298例中36例、0.031%と比較すると、発症例は2倍に増加したが、遺伝性栓友病の発症数に変化がなかった。中心静脈カテーテルや新生児仮死による二次性血栓症が増加していた。

⑥神経学的後遺症を有する児と家族の検討

新生児後方支援病院(研究協力:吉良龍太郎、本荘哲 国立病院機構福岡病院小児科医長および元栃木県立がんセンター疫学研究室長)を定点として、血栓症によることが疑われる神経・眼病変の患児の抽出を計画中である。

D. 考察

今回3つの独立した周産期、小児および新生児領域を対象とした調査を、班会議および日本血液学会、日本小児血液がん学会、および血栓止血委員会にて検討した。その結果、1)小児においても日本人(東洋人)の血栓症の頻度が西洋人よりも低いこと、2)3大血栓症のうち、小児期発症の約半数は新生児発症のPC欠乏症であること、3)PC欠乏症の初発は、頭蓋内出血/梗塞と電撃性紫斑病がそれぞれ3分の2を占め、半分以上は両者を合併すること、4)PC欠乏症の頭蓋内出血/梗塞は電撃性紫斑病に先行し、胎児期に発症する例があること、5)PC欠乏症に子宮内発育遅延はまれであること、6)PC欠乏症の母の77%にPC活性低下が見られたが患児の妊娠時まで健康であったこと、7)

活性化PC製剤投与例においても生存例の後遺症が高率であることが示された。PC異常症については、さらにPROCヘテロ変異が20%ほどあること、さらに後天性新生児PC欠乏症が存在するなど重要な知見であった。

小児血栓症のうちとくに新生児PC欠乏症の臨床的意義は大きい。この早期診断と治療介入のために、母のスクリーニングから、母子の遺伝子診断につなげることが重要と考えられる。

E. 結論

遺伝性栓友病の母を見出し適切に管理し、児に速やかな素因の診断治療を行うための「診断と治療のガイドライン」の作成が急務である。このような稀少重症疾患には患者登録を立ち上げ長期管理が必要である。今回の難治班は、二次公募の採択であったため実質活動が半年と短かったが、有用なデータが蓄積された。本研究班の活動を継続したい。

謝辞: 今回の小児血栓症全国調査および活性化PC製剤調査には、震災に見舞われた北関東および東北の多くの先生がたからも多大なご協力を賜りました。心より御礼申し上げますとともに、一日も早い復興と皆様の健康をお祈り申し上げます。

F. 健康危険情報

治療介入を行う研究でないため特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kinjo T, Ohga S, Ochiai M, Honjo S, Tanaka T, Takahata Y, Ihara K, Hara T: Serum chemokine levels and developmental outcome in preterm infants. *Early Hum Dev.* 2011 6:439-43.
- 2) Kusuda T, Hikino S, Ohga S, Kinjo T, Ochiai M, Takahata Y, Tokunaga S, Ihara K, Hata Y, Hara T: Genetic variation of vascular endothelial growth factor pathway does not correlate with the severity of retinopathy of prematurity. *J Perinatol.* 2011 31:246-50.
- 3) Hamada M, Sugimoto M, Matsui H, Mizuno T,

Shida Y, Doi M, Fukushima H, Nishio K, Yoshioka A, Shima M: Antithrombotic properties of pravastatin reducing intra-thrombus fibrin deposition under high shear blood flow conditions. *Thromb Haemost.* 2011 105:313-20.

- 4) Fukushima K, Morokuma S, Tsukimori K, Murata M, Wake N: Blood pressure measurements within the JNC7 pre-hypertensive range after 32 weeks of gestation are a risk factor for decreased fetal growth. *Hypertens Res.* 2011 (in press).
- 5) Doi K, Sameshima H, Kodama Y, Furukawa S, Kaneko M, Ikenoue T: Perinatal death and neurological damage as a sequential chain of poor outcome. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2011 (in press).
- 6) Takahashi D, Shirahata A, Itoh S, Takahashi Y, Nishiguchi T, Matsuda Y: Vitamin K prophylaxis and late vitamin K deficiency bleeding in infants: The 5th nation-wide survey in Japan. *Pediatr Int.* 2011 (in press).
- 7) 松永友佳, 山本順子, 大賀正一, 横田千恵, 高橋保彦, 末延聡一, 浦田美秩代, 栢森裕三, 康 東天, 原 寿郎: 臀部血管腫に伴う Kasabach-Merritt 症候群を疑われた新生児プロテインC欠損症の1例. *日本小児皮膚科学会雑誌.* 2011 (印刷中)
- 8) 石黒 精: 血友病における抗第VIII因子同種抗体の出現と消失の免疫学的機序. *日臨免誌.* 2011 (印刷中)

2. 学会発表

- 1) Ohga S: Congenital protein C deficiency in the Japanese experience. The 7th Congress of ASPR, Hematology Session "Thrombosis in Children in the West and East" Pediatric Academic Societies (PAS) and Asian Society for Pediatric Research (ASPR) 2011 Joint Meeting, Denver, Colorado, 2011.4.30-5.3. (invited)
- 2) Ohga S: Prophylaxis in Hemophilia ~ Experience in Japan ~ The 4th Congress of East Asia, Hemophilia Forum (EAHF). Tianjin, Mainland China, 2011.6.10-12. (invited)
- 3) Ishiguro A, Taki M, Manabe A, Ogawa C, Shima M: The first national survey of pediatric thrombosis in Japan. XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. Kyoto, 2011.7.23-28.
- 4) Ogawa C, Manabe A, Ohara A, Ishiguro A: The survey of supportive therapy for coagulation disorder during L-asparaginase (L-asp) therapy in Japan. XXIII Congress of the

International Society on Thrombosis and Haemostasis. Kyoto, 2011.7.25.

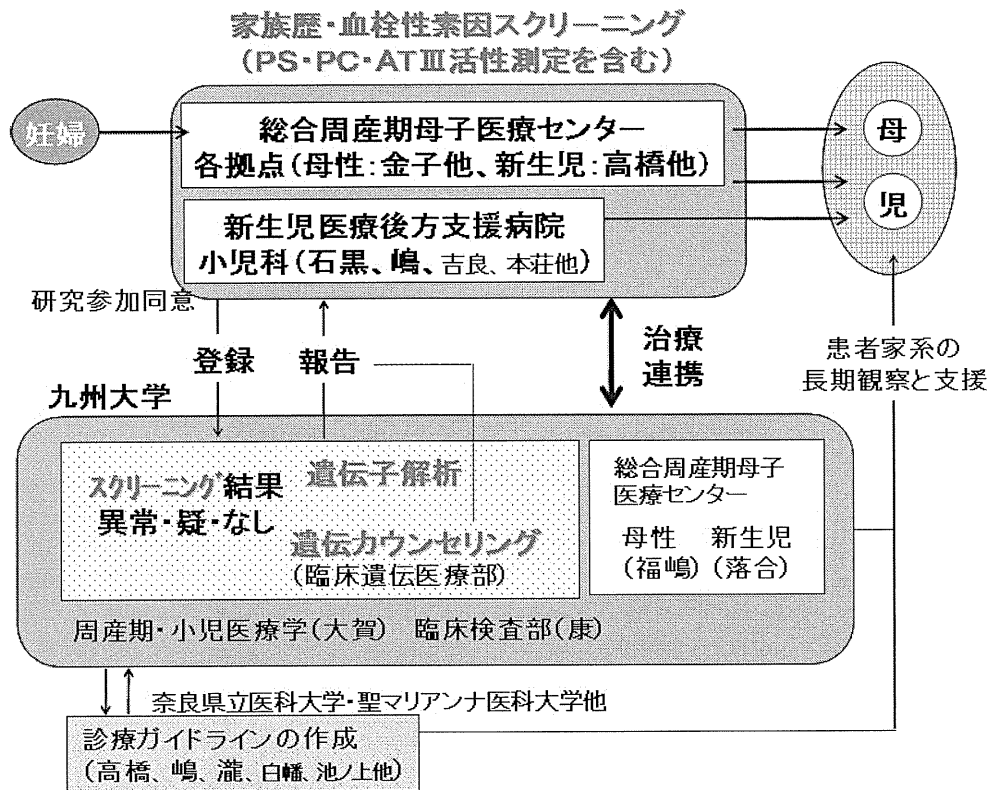
- 5) Nakadate H, Ishiguro A, Sakai H: Teaching simulation software of blood coagulation factor VIII activity for hemophilia patients. 第73回日本血液学会総会. 名古屋, 2011.10.14.
- 6) 大賀正一, 金城唯宗, 落合正行, 松永友佳, 石村匡崇, 土居岳彦, 井藤奈央子, 山本順子, 康 東天, 原 寿郎: 小児先天性Protein C欠乏症の発症様式. 第1回日本血液学会九州地方会 教育セミナー. 福岡, 2011.9.3.
- 7) 大賀正一, 工藤寿子, 足立壮一, 菊地 陽: 小児血液疾患の基礎. 第4回研修医(初期・後期)のための血液学セミナー. 大津, 2011.7.8-10.
- 8) 松永友佳, 金城唯宗, 福本有里, 二宮崇仁, 井藤奈央子, 土居岳彦, 落合正行, 原寿郎, 大賀正一, 浦田美秩代, 康 東天: 急性腎不全で発症した新生児プロテインC (PC) 欠乏症の1例. 第464回日本小児科学会 福岡地方会. 福岡, 2011.4.9.
- 9) Ohga S, Kinjo T, Matsunaga Y, Ochiai M, Doi T, Ishimura M, Yamamoto J, Suenobu S, Shirahata A, Urata M, Kayamori Y, Kang D,

Hara T: Characteristic presentation of congenital protein C (PC) deficiency in childhood. 第73回日本血液学. 名古屋, 2011.10.14-16.

- 10) Ishiguro A, Taki M, Manabe A, Ogawa C, Nakadate H, Shima M: The first national survey of thrombotic disorders in Japanese children. 第73回日本血液学会学術集会. 名古屋, 2011.10.14-16.
- 11) 余谷暢之, 石黒 精, 永井 章, 小穴慎二, 阪井浩一: 当院で8年間にみられたビタミンK欠乏に伴う乳児頭蓋内出血症例の検討. 第114回日本小児科学会学術集会総会. 東京, 2011.8.12.
- 12) 大賀正一, 金城唯宗, 松永友佳, 落合正行, 土居岳彦, 石村匡崇, 山本順子, 末延聡一, 白幡 聡, 康 東天, 原 寿郎: 先天性Protein C欠乏症の小児期における発症様式. 第53回日本小児血液・がん学会学術集会. 前橋, 2011.11.25-27.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

付) 研究の流れ図



研究協力: 白幡 聡 北九州八幡東病院 院長
池ノ上 克 宮崎大学医学部附属病院 院長

Ⅱ. 分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

血栓塞栓症家系の遺伝的素因に関する研究
～ 周産期領域におけるスクリーニングと遺伝子解析 ～

研究分担者

康 東天 九州大学大学院医学研究院・臨床検査医学 教授
落合 正行 九州大学病院総合周産期母子医療センター新生児内科部門 助教
福嶋恒太郎 九州大学病院総合周産期母子医療センター母性胎児部門 講師
大賀 正一 九州大学大学院医学研究院・周産期小児医療学 教授
研究協力者
栢森 裕三 九州大学病院検査部 技師長
浦田美秩代 九州大学病院検査部 副技師長

研究要旨

日本人における血栓症の遺伝的素因は海外と異なり、プロテイン S (PS)、プロテイン C (PC) 及びアンチトロンビン(AT) 欠乏症の3つが主体であることを成人で明らかにしてきた。一方、新生児と妊婦は 3 大遺伝的素因を各因子の活性と抗原量のみから診断することは難しい。新生児における電撃性紫斑病などの血栓塞栓症に対する早期治療を可能にするため、3 因子の活性と遺伝子に関して家族解析を継続し、適切なスクリーニング法を検討している。

A. 研究目的

PS、PC及びAT欠乏症は、常染色体優性遺伝形式をとる日本人の3大血栓性素因である。深部静脈血栓症の成人の65%にいずれかの活性低下が、さらにその2割から4割に各遺伝子のヘテロ変異を有することを明らかにしてきた。新生児は電撃性紫斑病が血栓症の代表的な発症様式である。PC変異のある患者の家系解析から、新生児と成人の差を明らかにし、周産期における素因のスクリーニング法確立をめざす。

B. 研究方法

1. PS, PC, AT活性測定と各遺伝子解析

血漿PCおよびPS活性はSTA試薬シリーズプロテインC(クロット)、プロテインS(クロット)(Stago/ロシュ・ダイアグノスティックス)を用いて各々測定した。AT活性はエルシシステム・ATⅢ(シスメックス)を用いた。

PROCのexon1-9をPCRにて増幅し、ABI PRISM3100 Genetic Analyzer(ライフテクノロ

ジーズジャパン)にて直接法により塩基配列を決定した。PSおよびAT活性の低かった患者には、PROS1 (exon 1-15) とSERPINC1 (exon 1-7) 解析も行った。

2. 活性化ヒトPC製剤の市販後調査

アナクト®C(帝人/化血研)が先天性PC欠乏症患者の深部静脈血栓症、肺血栓塞栓症および電撃性紫斑病に唯一使用可能なPC製剤である。2000年12月から2011年3月までの市販後全例調査のうち主治医の同意を得た匿名化症例を解析した。先天性PC欠乏症の診断は本剤の使用基準とした。調査項目は性、年齢、家族歴、既往歴、PC抗原値と活性、FVII活性、遺伝子診断、治療および予後とした。

(倫理面への配慮)

遺伝子解析は倫理委員会で承認をうけた同意書を取得し、末梢血白血球由来DNAを用いて行った。

C. 研究結果

九州大学病院にて2008年から2011年までにPC活性と*PROC*解析から7人のPC欠乏症患児を診断した。新生児症例にPS及びAT欠損症はなかった。本邦小児例の報告を網羅的に検索したところ、11人に遺伝子解析が行われ、2名に変異は同定できなかった。この2名はそれぞれ頭蓋内出血・梗塞症例と急性腎不全で発症し、その後生後半年でPC活性が次第に上昇した。*PROC*変異が同定された患者8名のうち4例がPC-nagoya (Stop420→462)を片アレルに保有していた。電撃性紫斑病で発症した新生児の父がPC-nagoyaのヘテロ接合体者であったが、血栓症の既往歴と家族歴はなくPC活性も80%以上と正常であった。一方、同じPC-nagoyaのヘテロ接合体の成人が深部静脈血栓症を発症し、糖尿病も指摘されていた。この成人は血栓症の家族歴も有していた。九大での過去15年にわたる血栓性素因の解析では、成人深部静脈血栓症患者のPC-nagoya保有者はこの1名のみであった。

活性化PC製剤を使用した66%の患者の初回使用例を解析した。本剤治療歴を有する75人から、診断基準を満たさない34人を除外した。活性化PC製剤は20歳未満の29人に使用されていた。電撃性紫斑病は9人の初発症状で、うち5人は頭蓋内出血/梗塞を併発していた。頭蓋内病変を初発としたのは6人であった。残り14人のうち半数は悪性疾患などの治療中に血栓塞栓症を発症していた。この14人に、有意な家族歴も遺伝子診断例もなく、後天性欠乏症が示唆された。

D. 考察

日本における新生児血栓症(電撃性紫斑病と頭蓋内出血/梗塞)のほとんどは、生後2週間以内に発症したPC欠乏症であった。この中には*PROC*変異を両アレルにもつもののほか、ヘテロ接合体と後天性欠乏例も確認された。PC-nagoyaは成人血栓症での頻度は高くないが、新生児患者の半数がこの変異を有していたことは、この変異の頻度と分子特性に起因するのかもしれない。

E. 結論

両親と患児の臨床像とPC活性のみから、遺伝性PC欠乏症を診断することは難しい。周産期領域における血栓症に対して活性化PC製剤を用いた治療法を確立するためには、3因子活性測定とともに遺伝子解析を組み込んだ効率的スクリーニング法を確立することが必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kinjo T, Ohga S, Ochiai M, Honjo S, Tanaka T, Takahata Y, Ihara K, Hara T: Serum chemokine levels and developmental outcome in preterm infants. *Early Human Development*. 2011 87(6):439-43.
- 2) Kitajima J, Inoue H, Ohga S, Kinjo T, Ochiai M, Yoshida T, Kusahara K, Hara T: Differential transmission & postnatal outcome in triplets with congenital cytomegalovirus infection. *Pediatr Development Pathol*. (in press).
- 3) Eljaafari FM, Takada H, Tanaka T, Doi T, Ohga S, Hara T: Potent induction of IFN- γ production from cord blood NK cells by the stimulation with single-strand RNA. *J Clin Immunol*. 2011 (in press).
- 4) Kitajima J, Ohga S, Kinjo T, Ochiai M, Takahata Y, Honjo S, Hara T: Serum prohepcidin concentrations at birth and 1 month after birth in premature infants. *Pediatr Blood Cancer*. 2011 56(2): 267-72.
- 5) Asanoma K, Kubota K, Chakraborty D, Renaud SJ, Wake N, Fukushima K, Soares MJ, Rumi MA: SATB homeobox proteins regulate trophoblast stem cell renewal and differentiation. *J Biol Chem*. 2012 287(3):2257-68.
- 6) Fukushima K, Tsukimori K, Li D, Takao T, Morokuma S, Kato K, Seki H, Takeda S, Matsumura S, Wake N: Effect of transient TCDD exposure on immortalized human trophoblast-derived cell lines. *Hum Exp Toxicol*. 2011 (Epub ahead of print).
- 7) Fukushima K, Fujiwara A, Anami A, Fujita Y, Yumoto Y, Sakai A, Morokuma S, Wake N: Cervical length predicts placental adherence and massive hemorrhage in placenta previa. *J Obstet Gynaecol Res*. 2012 38(1):192-7.
- 8) Tsukimori K, Uchi H, Mitoma C, Yasukawa F, Chiba T, Todaka T, Kajiwaru J, Yoshimura T, Hirata T, Fukushima K, Wake N, Furue M: Maternal exposure to high levels of dioxins in relation to birth weight in women affected by

- Yusho disease. *Environ Int.* 2012 38(1):79-86.
- 9) Fukushima K, Morokuma S, Tsukimori K, Murata M, Wake N: Blood pressure measurements within the JNC7 pre-hypertensive range after 32 weeks of gestation are a risk factor for decreased fetal growth. *Hypertens Res.* 2012 35(1):128-30.
- 10) Hidaka N, Yamanaka Y, Fujita Y, Fukushima K, Wake N: Clinical manifestations of pregnancy in patients with Takayasu arteritis: experience from a single tertiary center. *Arch Gynecol Obstet.* 2012 285(2):377-85.
- 11) Takao T, Asanoma K, Kato K, Fukushima K, Tsunematsu R, Hirakawa T, Matsumura S, Seki H, Takeda S, Wake N: Isolation and characterization of human trophoblast side-population (SP) cells in primary villous cytotrophoblasts and HTR-8/SVneo cell line. *PLoS One.* 2011 6(7):e21990.
- 12) Tsukimori K, Uchi H, Mitoma C, Yasukawa F, Fukushima K, Todaka T, Kajiwara J, Yoshimura T, Hirata T, Wake N, Furue M: Comparison of the concentrations of polychlorinated biphenyls and dioxins in mothers affected by the Yusho incident and their children. *Chemosphere.* 2011 84(7):928-35.
- 13) Fukushima K, Morokuma S, Fujita Y, Tsukimori K, Satoh S, Ochiai M, Hara T, Taguchi T, Wake N: Short-term and long-term outcomes of 214 cases of non-immune hydrops fetalis. *Early Hum Dev.* 2011 87(8):571-5.
- 14) Li X, Morokuma S, Fukushima K, Otera Y, Yumoto Y, Tsukimori K, Ochiai M, Hara T, Wake N: Prognosis and long-term neurodevelopmental outcome in conservatively treated twin-to-twin transfusion syndrome. *BMC Pregnancy Childbirth.* 2011 11:32.
- 15) Fukushima K, Murata M, Tsukimori K, Eisuke K, Wake N: 8-Hydroxy-2-deoxyguanosine staining in placenta is associated with maternal serum uric acid levels and gestational age at diagnosis in pre-eclampsia. *Am J Hypertens.* 2011 24(7):829-34.
- 16) Nanishi E, Ohga S, Doi T, Ishimura M, Ihara K, Takada H, Shima M, Hara T: Complete immunotolerance induction after FEIBA prophylaxis in a hemophilia A patient with high-titer inhibitor. *Haemophilia* 2011 (in press).
- 17) 北島順子, 金城唯宗, 大賀正一, 落合正行, 井上普介, 楠田 剛, 井原健二, 原 寿郎: 新生児における鉄恒常性とヘプシジン. *産婦人科新生児血液学会雑誌.* 2011 20巻 103-11.
- 18) 松永友佳, 山本順子, 大賀正一, 横田千恵, 高橋保彦, 末延聡一, 浦田美秩代, 栢森裕三, 康 東天, 原 寿郎: 臀部血管腫に伴う Kasabach-Merritt 症候群を疑われた新生児プロテインC欠損症の1例. *日本小児皮膚科学会雑誌.* 2011 (印刷中)

2. 学会発表

- 1) Ohga S: Congenital protein C deficiency in the Japanese experience. The 7th Congress of ASPR, Hematology Session "Thrombosis in Children in the West and East" Pediatric Academic Societies (PAS) and Asian Society for Pediatric Research (ASPR) 2011 Joint Meeting. Denver, Colorado, 2011.4.30-5.3. (invited speaker)
- 2) Ohga S: Prophylaxis in Hemophilia ~ Experience in Japan ~ The 4th Congress of East Asia, Hemophilia Forum (EAHF). Tianjin, Mainland China, 2011.6.10-12. (invited speaker)
- 3) 大賀正一: 小児先天性Protein C欠乏症の発症様式. 第1回日本血液学会九州地方会教育セミナー. 福岡, 2011.9.3.

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

凝固検査標準化、治療管理ガイドライン作成（小児）に関する研究

嶋 緑倫 奈良県立医科大学小児科 教授

研究要旨

血栓傾向を凝血的に評価する測定法について検討を行った。方法は、凝固波形解析、トロンビン生成試験、トロンボエラストグラフィなどの包括的凝固機能検査とプロテイン C 経路の活性を評価した。広汎位の血栓症を発症した第 V 因子異常症の小児例の解析を行った。

A. 研究目的

小児科領域の血栓症はプロテイン C 欠乏症など先天性の血栓素因を背景に発症する場合と感染症などの基礎疾患を背景に後天性に発症する場合がある。プロテイン C やプロテイン S などの血栓性因子の測定や遺伝子解析は診断には有用であるが血栓傾向の重度や臨床的重症度とは相関しない。したがって、凝血的な評価法の確立が望まれる。本分担研究では包括的凝固機能検査を実施して血栓傾向の凝固機能評価を行うとともに全身性の血栓症を発症した第 V 因子異常症の血栓機序について解析した。

B. 研究方法

1. 凝固波形解析

aPTT における透過度をリアルタイムにモニタリングして凝固波形を描出するとともに、凝固速度や凝固加速度などの定量的パラメータを算出する。

2. トロンビン生成法

血漿あるいは PRP 検体に組織因子、リン脂質、塩化カルシウムで凝固を惹起し生成されるトロンビン生成速度をモニタリングする。さらにピークトロンビン、総トロンビン生成量などのパラメータを算出する。

C. 研究結果

1. 包括的凝固機能検査

過凝固状態は、凝固波形やトロンビン生成のパラメータ解析で評価可能であった。また、トロンビン生成を用いた活性化プロテイン C 活性の測定は血栓傾向の評価に有用であった。血栓症を発症した第 V 因子異常症は APC 経路活性が低下し、APC 抵抗性を示した。HEK293 細胞を用いて野生型 (WT)、R506Q 変異、W1920R 変異の 3 種の FV を発現、精製した。トロンビンや FXa により FV を活性化後、リン脂質 (PL) と Ca^{2+} 存在下に APC/PS 添加後の FVa 活性、FVa 開裂を凝固 1 段法、SDS-PAGE/WesternBlot 法で評価した。また FV の APC cofactor 作用も合成基質法を用いた FVIIIa 活性測定にて検討した。【結果】トロンビンや FXa による FV 活性化反応では FV-WT と -W1920R 間で明らかな差異は認めなかった。次に APC (25 pM), PS (30 nM), PL (20 μ M) と FVa (2 nM) を 5 分間反応させると、FV-WT、-R506Q、-W1920R それぞれの FVa 活性は初期値の 2.6%、16.7%、62.8% に低下した。この時の FVa 重鎖の Gln⁵⁰⁶ は FVa-R506Q では全く開裂せず、-W1920R の Arg³⁰⁶ 開裂は遅延した。また FV-W1920R では Arg³⁰⁶ が全く開裂しなかった。さらに、APC (0.5 nM)、PS (5 nM)、PL (20 μ M)、FV (0.5 nM) と FVIIIa (10 nM) を 20 分間反応させたところ、FV-WT、-R506Q、-W1920R 存在下の残存 FVIIIa 活性は、FV

非添加時の 18%、53%、95%であり、FV-W1920R における APC cofactor 作用はほとんどみられなかった。

D. 考察

小児の血栓症における凝血学的評価は包括的凝固機能検査を実施することで評価が可能であった。さらにプロテイン C 経路の包括的評価はきわめて有用であった。また、FV 異常症の解析から我が国にも APC 抵抗性の患者が存在することが初めて明らかになった。今後新生児小児領域の血栓症について凝血学的評価を実施することは小児の血栓症の診断および治療に大きく貢献するものと考えられた。

E. 結論

血栓症における凝固亢進状態を凝血学的に評価した。APC 経路の包括的評価はきわめて重要であった。我が国でも APC 抵抗性の患者が存在することが判明した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Matsumoto T, Nogami K, Ogiwara K, Shima M: A putative inhibitory mechanism in the tenase complex responsible for loss of coagulation function in acquired hemophilia A patients with anti-C2 autoantibodies. *Thrombosis and Haemostasis*. 2012 (Epub ahead of print).
- 2) Soeda T, Nogami K, Ogiwara K, Shima M: Interactions between residues 2228-2240 within factor VIIIa C2 domain and factor IXa Gla domain contribute to propagation of clot formation. *Thromb Haemost*. 2011 106(5):893-900.
- 3) Ogiwara K, Nogami K, Shima M: Factor VIII activation by factor VIIa analog (V158D/E296V/M298Q) in tissue factor-independent mechanisms. *Thromb Haemost*. 2011 106(4):665-74.
- 4) Nogami K, Ogiwara K, Matsumoto T, Nishiya K, Takeyama M, Shima M: Mechanisms of human neutrophil elastase-catalysed inactivation of factor VIII(a). *Thrombosis and Haemostasis*. 2011 105(6):968-80.

- 5) Yada K, Nogami K, Ogiwara K, Shibata M, Shima M: Effects of anti-factor VIII inhibitor antibodies on factor VIIa/tissue factor-catalysed activation and inactivation of factor VIII. *Thrombosis and Haemostasis*. 2011 105(6):989-98.
- 6) Kasuda S, Tatsumi K, Sakurai Y, Kato J, Taminishi S, Takeda T, Ohashi K, Okano T, Hatake K, Shima M: Expression of coagulation factors from murine induced pluripotent stem cell-derived liver cells. *Blood Coagulation and Fibrinolysis*. 2011 22(4):271-9.
- 7) Hayashi T, Sakurai Y, Fukuda K, Yada K, Ogiwara K, Matsumoto T, Yoshizawa H, Takahashi Y, Yoshikawa Y, Hayata Y, Taniguchi S, Shima M: Correlations between global clotting function tests, duration of operation, and postoperative chest tube drainage in pediatric cardiac surgery. *Paediatric Anaesthesia*. 2011 21(8):865-71.

2. 学会発表

- 1) Shima M: Basis and clinical practice for hemophilia with inhibitor. 52nd spring meeting of the Korean society of hematology. Seoul, Korea, 2011.5.23.
- 2) Doi M, Sugimoto M, Matsui H, Matsumoto T, Shima M: Functional characterization of immobilized factor VIII in intrathrombus fibrin network formation under whole blood flow conditions with high shear rates. XXII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. Kyoto, 2011.7.25.
- 3) Hori Y, Isonishi A, Soejima K, Matsumoto M, Shima M, Fujimura Y: Isoelectric focusing analysis with a large-pore agarose-acrylamide composite gel identified two forms of adamts13, unbound and bound to von willebrand factor, in plasma milieu. XXII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. Kyoto, 2011.7.25.
- 4) Higasa S, Amano K, Hanabusa H, Muto S, Matsushita T, Shima M, Fujii T, Sakai M: Fine (feiba inhibitor entry) post-authorization safety surveillance (pass) : capturing long-term experience in Japanese inhibitor subjects under routine clinical management. XXII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. Kyoto, 2011.7.25.
- 5) Sugimoto M, Hamada M, Matsui H, Doi M, Matsunami Y, Fukushima H, Nishino K,

- Yoshioka A, Shima M: Antithrombotic properties of pravastatin reducing intra-thrombus fibrin deposition under high shear blood flow conditions. XXII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. Kyoto, 2011.7.25.
- 6) Fukutake K, Hanabusa H, Taki M, Matsushita T, Shima M, Shirahata A: The post-authorization safety Surveillance program confirmed actual clinical safety and efficacy of recombinant plasma/albumin-free method factor VII in Japan. XXII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. Kyoto, 2011.7.26.
- 7) Matsumoto T, Nogami K, Ogiwara K, Tsujii N, Shima M: Coagulation velocity and acceleration correlate with clinical phenotype of patients with acquired factor V inhibitors. XXII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. Kyoto, 2011.7.26.
- 8) Erich de Paula, Kaan Kavakli, Johnny Mahlangu, Yasmin Ayob, Steven R Lentz, Massimo Morfini, Laszlo Nemes, Silva Zupancic Salek, Midori Shima, Jerzy Windyga, Silke Ehrenforth, Henning Friis Andersen, Ampaiwan Chuansumrit: Clinical and laboratory results from adepttm 1,a phase 2 trial investigating the use of recombinant activated FVII analogue in congenital haemophilia patients with inhibitors. XXII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. Kyoto, 2011.7.27.
- 9) Matsushita T, Shirahata A, Fukutake K, Mimaya J, Takamatsu J, Shima M, Hanabusa H, Takedani H, Takashima Y, Tawa A, Higasa S, Takata N, Sakai M, Kawakami K, Ohashi Y: Clinical pharmacological study of a plasma-derived factor VIIa and factor X mixture (MC710) in haemophilia patients with inhibitors-phase 1 trial. XXII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. Kyoto, 2011.7.27.
- 10) Sugita C, Yamashita A, Matsuda S, Goto Moriguchi S, , Matsumoto T, inoue O, Iwakiri T, Matsuura Y, Shima M, Asada Y: Elevated plasma levels of factor VII enhance thrombus formation though excess thrombin generation in rabbit jugular vein. XXII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. Kyoto, 2011.7.27.
- 11) Ishiguro A, Taki M, Manabe A, Ogawa C, Shima M: The first national survey of pediatric thromboembolism in Japan XXII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. Kyoto, 2011.7.27.
- 12) Ogiwara K, Nogami K, Hosokawa K, Matsumoto T, Shima M: Procoagulant effect of tranexamic acid with minimal urokinase on exvivo human hemophilia model under blood flow. XXII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. Kyoto, 2011.7.27.
- 13) Yada K, Nogami K, Ogiwara K, Shibata M, Shima M: Mild clinical phenotype in a severe hemophilia a with age178his substitution associated with increased factor Xa generation. XXII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. Kyoto, 2011.7.28.
- 14) Shinozawa K, Nogami K, Ogiwara K, Matsumoto T, Amano K, Shima M, Fukutake K: A novel missense mutation of factor V (factor V nara:W1920R) manifested thrombosis and demonstrated a positive result of activavated protein C resistance assay. XXII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. Kyoto, 2011.7.28.
- 15) 荻原建一, 野上恵嗣, 篠澤圭子, 松本 智子, 古川晶子, 西屋克己, 福武勝幸, 嶋 緑倫: 活性化プロテイン C 抵抗性の新規凝固第 V 因子分子異常症(W1920R)の凝血学的特性と抗凝固療法の確立. 第 73 回日本血液学会. 名古屋, 2011.10.16.
- 16) Ishiguro A, Taki M, Manabe A, Ogawa C , Nakadate H, Shima M: The first national survey of thrombotic disorders in Japanese children. Division of Hematology, National Center for Child Health and Development. 第 73 回日本血液学会. 名古屋, 2011.10.16.
- 17) Matsumoto T, Nogami K, Ogiwara K, Yada K, Shima M: Evaluation of coagulation function on the clinical phenotype with acquired FV inhibitor patients. 第 73 回日本血液学会. 名古屋, 2011.10.16.
- 18) Yada K, Nogami K, Ogiwara K, Shima M: Effects of anti-FVIII inhibitors on the FVIII neutralization for hemophilia A with inhibitor. 第 73 回日本血液学会. 名古屋, 2011.10.14.
- 19) 古川晶子, 荻原建一, 野上恵嗣, 細川 和也, 松本智子, 西屋克己, 嶋 緑倫: 第Ⅷ因子欠乏型出血症状であると凝血学的に診断できた type 3 von Willebrand 病の1例. 第 53 回日本小児血液・がん学会 第 9 回日本小児がん看護学会. 前橋, 2011.11.25.
- 20) Yada K, Nogami K, Ogiwara K, Shima M: A novel mechanism of Enhancing the

- Haemostatic Effect in the Combination with Recombinant Factor VIII and Activated Prothrombin Complex Concentrate (APCC) in Hemophilia A Patients with Inhibitor. American Society of Hematology. San Diego, 2011.12.10.
- 21) Yada K, Nogami K, Ogiwara K, Shima M: A novel mechanism of Enhancing the Haemostatic Effect in the Combination with Recombinant Factor VIII and Activated Prothrombin Complex Concentrate(APCC) in Hemophilia A Patients with Inhibitor. American Society of Hematology. San Diego, 2011.12.10.
- 22) Ogiwara K, Hosokawa K, Nogami K, Matsumoto T, Shima M, Nishiya K, Tanaka I, Nogami K, Ogiwara K, Yada K, Matsumoto T: "Evaluation of Comprehensive Hemostatic Function of Patients with Von Willebrand Disease (VWD) Under Flow Using a New Microchip Flow Chamber System. American Society of Hematology. San Diego, 2011.12.10.
- 23) Ogiwara K, Shinozawa K, Nogami K, Matsumoto T, Nishiya K, Tsujii N, Yada K, Fukutake K, Shima M: Mechanism of the Potent Activated Protein C Resistance of Novel Factor V Mutation with W1920R (FV Nara) Relative to R506Q (FV Leiden). American Society of Hematology. San Diego, 2011.12.12.
- 24) Ogiwara K, Hosokawa K, Nogami K, Matsumoto T, Shima M: Evaluation of Comprehensive Hemostatic Function of Patients with Von Willebrand Disease (VWD) Under Flow Using a New Microchip Flow Chamber System. American Society of Hematology. San Diego, 2011.12.13.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

特許 4671823 血液凝固因子の不活性化及び血液凝固因子