

V. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
石村匡崇、大賀正一	血友病性偽腫瘍		血液症候群Ⅱ	日本臨牀社	東京	2013	555-6
土居岳彦、大賀正一	Glanzmann型血小板無力症(タイプⅠ)		血液症候群Ⅱ	日本臨牀社	東京	2013	420-3
瀧本智仁、大賀正一	タイプⅡ血小板無力症		日本臨床別冊「血液症候群Ⅱ」	日本臨牀社	東京	2013	424-428
大賀正一	小児科特集 3. 感染症と血液疾患		感染症Today		東京	2013	5-6
石黒 精	ITP/血友病での急性出血	辻 聡, 小穴慎二, 石黒 精など	当直医のための小児救急ポケットマニュアル	中山書店	東京		印刷中
石黒 精	出血傾向・凝固障害	五十嵐 隆など	小児科研修ノート 第2版	診断と治療社	東京		印刷中
田中康子 石黒 精	貧血	辻 聡, 小穴慎二, 石黒 精など	当直医のための小児救急ポケットマニュアル	中山書店	東京		印刷中
石黒 精	出血傾向	松井 陽, 横谷 進, 石黒 精, 奥山虎之など	小児検査実践マニュアル	診断と治療社	東京	2013	62-64
生田泰久 石黒 精	血小板減少症	松井 陽, 横谷 進, 石黒 精, 奥山虎之など	小児検査実践マニュアル	診断と治療社	東京	2013	269-272
千葉 剛 石黒 精	血栓症	松井 陽, 横谷 進, 石黒 精, 奥山虎之など	小児検査実践マニュアル	診断と治療社	東京	2013	277-281
高橋幸博	ビタミンK	高橋尚人	小児科学レクチャー	総合医学社	東京	2013	
高橋幸博	Hageman trait (第XII因子欠乏症)		血液症候群Ⅲ—その他の血液疾患を含めて— 第2版	日本臨床社	東京	2013	

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ohga S, Ishiguro A, Takahashi Y, Shima M, Taki M, Kaneko M, Fukushima K, Kang D, Hara T, on behalf of the Japan Childhood Thrombophilia Study Group	Protein C deficiency as the major cause of thrombophilias in childhood.	Pediatr Int	55(3)	267-71	2013
Ohga S, Kang D, Kinjo T, Ochiai M, Doi T, Ishimura M, Kayamori Y, Urata M, Yamamoto J, Suenobu S, Kanegane H, Ikenoue T, Shirahata A, Hara T	Pediatric presentation and treatment of congenital protein C deficiency in Japan.	Haemophilia	19(3)	378-84	2013
Doi T, Ohga S, Ito N, Ishimura M, Suga N, Nomura A, Takada H, Matsumoto M, Fujimura Y, Hara T	Limited renal prophylaxis in regular plasmatherapy for heritable ADAMTS13 deficiency.	Pediatr Blood Cancer	60(9)	1557-8	2013

Yamamura K, Joo K, Ohga S, Nagata H, Ikeda K, Muneuchi J, Watanabe M, Hara T	Thrombocytosis in asplenia syndrome with congenital heart disease: a previously unrecognized risk factor for thromboembolism.	Int J Cardiol	167 (5)	2259-63	2013
Hoshina T, Nakashima Y, Sato D, Nanishi E, Nishio H, Nakagata H, Yamamura K, Doi T, Shiokawa Y, Kang D, Ohga S, Hara T	Staphylococcal endocarditis as the first manifestation of heritable protein C deficiency in childhood.	J Infect Chemother		in press	2013
Narazaki R, Makimura M, Sanefuji M, Fukumachi S, Akiyoshi H, So H, Yamamura K, Doizaki S, Kojima S, Ihara K, Hara T, Ohga S	Bilateral stenosis of carotid siphon in Hutchinson-Gilford progeria syndrome.	Brain Dev	35(7)	690-3	2013
Matsunaga Y, Ohga S, Kinjo T, Ochiai M, Fukumoto Y, Ito N, Doi T, Kang D, Hara T	Neonatal asphyxia and renal failure as the presentation of severe protein C deficiency.	J Perinatol	33(3)	239-41	2013
Ochiai M, Kinjo T, Takahata Y, Iwayama M, Kenji I, Ohga S, Kotaro F, Wake N, Taguchi T, Hara T	Clinical outcome of extremely low birth weight infants born at GW22-26: a report from a single institution in Japan.	Neonatology	105(2)	79-84	2014
Nomura O, Hashimoto N, Ishiguro A, Miyasaka M, Nosaka S, Oana S, Sakai H, Takayama JI	Comparison of patients with Kawasaki disease with retropharyngeal edema and patients with retropharyngeal abscess.	Eur J Pediatr		in press	
Takeda K, Kawai T, Nakazawa Y, Komuro H, Shoji K, Morita K, Katsuta T, Yamamoto M, Miyairi I, Ohya Y, Ishiguro A, Onodera M	Augmentation of antitubercular therapy with interferon- γ in a patient with dominant partial interferon- γ receptor 1 deficiency.	Clin Immunol		in press	
Mamemoto K, Kubota M, Nahai A, Takahashi Y, Kamamoto T, Minowa H, Yasuhara H	Factors associated with exclusive breastfeeding in low birth weight infants at NICU discharge and the start of complementary feeding.	Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition		in press	2013
Matsumoto T, Nogami K, Shima M	Simultaneous measurement of thrombin and plasmin generation to assess the interplay between coagulation and fibrinolysis.	Thromb Haemost	110(4)	761-8	2013
Shima M	Hemophilia world.	Rinsho Ketsueki.	54(8)	736-43	2013
Shima M, Thachil J, Nair SC, Srivastava A	Towards standardization of clot waveform analysis and recommendations for its clinical applications.	J Thromb Haemost	11(7)	1417-20	2013
Doi M, Sugimoto M, Matsui H, Matsunari Y, Shima M	Coagulation potential of immobilised factor VIII in flow-dependent fibrin generation on platelet surfaces.	Thromb Haemost	110(2)	316-22	2013
Sugita C, Yamashita A, Matsuura Y, Iwakiri T, Okuyama N, Matsuda S, Matsumoto T, Inoue O, Harada A, Kitazawa T, Hattori K, Shima M, Asada Y	Elevated plasma factor VIII enhances venous thrombus formation in rabbits: contribution of factor XI, von Willebrand factor and tissue factor.	Thromb Haemost	110(1)	62-75	2013

Yada K, Nogami K, Ogiwara K, Shima M	Activated prothrombin complex concentrate (APCC)-mediated activation of factor (F)VIII in mixtures of FVIII and APCC enhances hemostatic effectiveness.	J Thromb Haemost	11(5)	902-10	2013
大賀正一	エキスパートのための産婦人科・新生児領域の血液疾患診療の手引き「新生児血栓症」	日本産婦人科 新生児 血液学会			印刷中
大賀正一	小児期に発症する遺伝性血栓症 ～プロテインCの重要性～	日本小児科 学会雑誌	117(10)	1538-44	2013
市山正子、大賀正一、松永友佳、金城唯宗、落合正行、堀田多恵子、浦田美秩代、古賀結、西村美香、康東天、原寿郎	小児遺伝性血栓症スクリーニングのための protein C, protein S 及び antithrombin 活性値	日本産婦人科・ 新生児 血液学会誌	23(1)	25-2	2013
清水 武, 石黒 精, 高柳隆章, 松井猛彦, 利根川尚也, 前川貴伸, 板橋家頭夫	アデノウイルス胃腸炎とマイコプラズマ肺炎に続発したループスアンチコアグラント陽性・低プロトロンビン血症	日臨免誌			印刷中
一宮優子, 石黒 精, 中館尚也, 前川貴伸, 藤田秀樹, 國島伸治, 阪井裕一	ロミプロスチムが慢性自己免疫性血小板減少症に奏功して開心術を施行し得た小児例	日小血・がん誌			印刷中
藤井輝久, 天野景裕, 渥美達也, 石黒 精, 大平勝美, 岡本好司, 勝沼俊雄, 嶋 緑倫, 高橋芳右, 松下 正, 松本剛史, 森下英理子	日本血栓止血学会, インヒビターのない血友病患者に対する止血治療ガイドライン: 2013年度版	日本血栓止血誌	24	619-639	2013
小川千登世, 真部 淳, 小原 明, 石黒 精	急性リンパ性白血病L-アスパラギナーゼ療法関連凝固異常に対する国内外の支持療法の現状	臨床血液	54	316-318	2013
山本真梨子, 中館尚也, 井口梅文, 益田博司, 阪井裕一, 石黒 精	遺伝子組み換え第IX因子製剤の持続輸注による小児期血友病Bの開頭術周術期管理	臨床血液	54	300-304	2013
曾山奉教, 吉田秀人, 下村大樹, 高橋幸博	体外循環中のアルカレミア環境下の血球凝集塊に血小板凝集、血栓形成は関与するのか？	体外循環学会誌	40(1)	1-6	2013

VI. 研究成果の刊行物・別刷

I. 新生児血栓症

II. 大賀正一 九州大学大学院医学研究院周産期小児医療学

III. 特に伝えたいこと、知って欲しいこと(簡潔に)

1. 小児の血栓症は成人よりまれだが、新生児に最も多く、近年診断される例が増加している。
2. 遺伝性・非遺伝性因子により、頭蓋内病変、電撃性紫斑病などの特徴的な発症様式となる。
3. 凝固線溶能の評価が難しく、血栓の部位を証明する画像検査も施行しにくい。
4. 母体情報と家族歴を把握し、必要に応じて遺伝子解析とカウンセリングを行う。
5. 抗凝固療法に用いる薬剤の使用に関する EBM が少なく、確立された治療法はない。
6. 生命予後のみならず、神経学的予後の不良な例が多い。

IV. 最新と思われる知見またはトピックス(簡潔に)

1. 日本人小児の分子疫学から、Protein C (PC) 欠損症が注目され、先天性のみならず PC 活性の上昇が遅れる後天性 PC 欠損症も確認された。
2. 後天性因子として、早期産児における長期の中心静脈カテーテルの関与は大きい。
3. トロンボモジュリン製剤の有用性に関する情報が蓄積されつつあり、新鮮凍結血漿、活性化 PC 製剤など補充療法の再評価が必要である。

- 1) 定義・病態生理 生後 1 か月までに、止血機構が過剰に作動して血栓を形成し臓器障害をきたす疾患である。新生児では特に狭い血管腔と高いヘマトクリットによる血流の変化、および凝固制御因子の成熟と内因性線溶活性の低下が、その病態に関与する。誘因・後天性因子として、抗リン脂質抗体症候群 (APS) 母体、感染症、脱水、多血症、中心静脈ルート、および先天性心疾患術後の血栓性血小板減少性紫斑病などがある。
- 2) 疫学 欧米での頻度は NICU 入院の 0.15-0.24% と日本より高いが、日本でも近年 0.063% と倍増している。遺伝性血栓症は約 5% と少ないが、全て PC 欠損症である。小児先天性血栓症の約半数は PC 欠損症で、その半数がホモか複合ヘテロ変異、25% がヘテロ変異である。
- 3) 診断 部位(脳静脈洞と腎静脈)と病型(胎児水頭症、脳出血性梗塞、電撃性紫斑病)が特徴的である。電撃性紫斑病は末端壊死の出現前に、臀部や足底の紫斑からはじまるものも少なくない。半数以上に先行する頭蓋内病変を合併する。血小板数著減、Fibrinogen 値減少と D-dimer 増加があり、臓器障害を起こす。血栓の画像診断には超音波検査を活用する。PC 欠損症の診断は難しいが、PIVKA II 陰性でかつ PC と PS 活性の乖離があり、PC 活性が 30% 未満の新生児に疑う。家族歴があれば、両親の因子活性を確認し、必要な遺伝子解析を行う。
- 4) 治療 抗凝固療法と血栓溶解療法からなる。APS には、交換輸血と低用量アスピリンを用いる。新生児の深部静脈血栓症の回復は成人より早く再発率も低いが、遺伝性血栓症では進行と再発のリスクが高い。抗凝固療法を継続し、凍結血漿、活性化 PC、AT 製剤などを補充して、トロンボモジュリン製剤も検討する。TPA や新規抗血栓薬の適応が今後の課題である。

文献

1. Kenet G, Nowak-Göttl U. Best Pract Res Clin Haematol 2012; 25: 333-4.
2. 川口千晴、高橋幸博.産婦人科新生児血液学会雑誌 2012; 21: 5-13.
3. Ohga S, Ishiguro A, Takahashi Y, *et al.* Pediatr Int 2013 (in press)



Review Article

Protein C deficiency as the major cause of thrombophilias
in childhood

Shouichi Ohga,^{1,2} Akira Ishiguro,⁵ Yukihiro Takahashi,⁶ Midori Shima,⁷ Masashi Taki,⁸ Masatoki Kaneko,⁹ Kotaro Fukushima,³ Dongchon Kang⁴ and Toshiro Hara² on behalf of the Japan Childhood Thrombophilia Study Group
Departments of ¹Perinatal and Pediatric Medicine, ²Pediatrics and ³Obstetrics and Gynecology, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, ⁴Department of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Kyushu University Hospital, Fukuoka, ⁵Division of Hematology, National Center for Child Health and Development, Tokyo, Departments of ⁶Pediatrics and ⁷Perinatology, Nara Medical University, Kashihara, ⁸Department of Pediatrics, St. Marianna University School of Medicine, Yokohama City Seibu Hospital, Yokohama, ⁹Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, University of Miyazaki, Miyazaki, Japan

Abstract Genetic predisposition of thromboembolism depends on the racial background. Factor V Leiden (G1691A) and factor II mutation (G20210A) are the leading causes of inherited thrombophilias in Caucasians, but are not found in Asian ancestries. Protein S (PS), protein C (PC) and antithrombin (AT) activity are reportedly low in 65% of adult Japanese patients with deep vein thrombosis. Approximately half of the patients with each deficiency carry the heterozygous mutation of PS (*PROS1*; 20%), PC (*PROC*; 10%), and AT genes (*SERPINC1*; 5%). Recently, several studies have revealed an outline of inherited thrombophilias in Japanese children. Congenital thrombophilias in 48 patients less than age 20 years consisted of 45% PC deficiency, 15% PS deficiency and 10% AT deficiency, along with other causes. All PS- and AT-deficient patients had a heterozygous mutation of the respective gene. On the other hand, PC-deficient patients were considered to carry the homozygous or compound heterozygous mutation in 50%, the heterozygous mutation in 25%, and unknown causes in the remaining 25% of patients. Half of unrelated patients with homozygous or compound heterozygous *PROC* mutations carried PC-nagoya (1362delG), while their parents with its heterozygous mutation were asymptomatic. Most of the PC-deficient patients developed intracranial lesion and/or purpura fulminans within 2 weeks after birth. Non-inherited PC deficiency also conveyed thromboembolic events in early infancy. The molecular epidemiology of thrombosis in Asian children would provide a clue to establish the early intervention and optimal anticoagulant therapy in pediatric PC deficiency.

Key words intracranial thrombosis, intracranial hemorrhage, purpura fulminans, protein C deficiency.

Introduction

Thromboembolic events less commonly occur in children than in adults. The life-threatening conditions are driven by a wide range of triggers, including infection, trauma and surgery, on a background of individual predispositions. Pediatric thrombosis is being recognized with increasing frequency, although the cause remains elusive. The national registry data from North America, Europe and Australia revealed an incidence of 5–8 venous thromboembolic events (VTE)/10 000 hospital admissions, or 0.05–14/10 000 children.¹ Under 20 years of age, VTE occurs at the highest incidence in neonates and infants, and then at the second peak of incidence during puberty and adolescence. Both peak

occurrences are considered to be associated with decreased intrinsic fibrinolytic activity of the blood during these periods. The higher prevalence of adult thromboses in the West than that seen in the East might result from the difference in dietary habits and races. The modern lifestyle is being globally Westernized, but genetic backgrounds are hard-wired to change among races. Factor (F) V Leiden (G1691A) and FII mutation (G20210A) are the major thrombophilic predispositions in Caucasians but not in Asian ancestries.² In Japan, two major studies revealed that 65% of adult VTE patients had a low activity of protein S (PS), protein C (PC) or antithrombin (AT), and half of them carried the heterozygous mutation of the respective genes.^{3,4} On the other hand, the clinical features and genetic backgrounds of pediatric thrombosis have not been clarified in Japan.

In this review, we first draw an outline of inherited thrombophilias in Japanese children, based on the recent independent studies. Then, we discuss the problems in the diagnosis and treatment of pediatric thromboembolism focusing on PC deficiency.

Correspondence: Shouichi Ohga, MD PhD, Department of Perinatal and Pediatric Medicine, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, 3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan. Email: ohgas@pediatr.med.kyushu-u.ac.jp

Received 21 December 2012; revised 7 March 2013; accepted 18 March 2013.

Table 1 Definition of the severity of PC deficiency

Subjects	Plasma PC activity	
	IU/mL	%
Healthy adults	0.65–1.35 [‡]	64–135 [‡] , 146 [§]
PC deficiency		
Mild	>0.2	>20
Moderately severe	0.01–0.2	1–20
Severe	<0.01	<1

Standard values of PC activity were obtained from [‡]the reference,⁶ [‡]Medical and Biological Laboratories, Tokyo, Japan; and [§]Special Reference Laboratories, Tokyo, Japan. The levels are determined by clot-based assays. PC, protein C.

PC and PC levels in children

PC is a vitamin-K-dependent serine protease, which is synthesized in the liver and circulates at a low concentration in plasma. The anti-coagulant zymogen is activated by the complex formation with thrombin on the endothelial cell receptor thrombomodulin, and more effectively by binding to the endothelial PC receptor. Activated PC cleaves critical sites in the activated procoagulant factor V (FV) and FVIII, and inactivates the two factors.⁵ This process is augmented by protein S (PS), FV and lipid cofactors of lipoproteins and phospholipids. PC-deficient individuals have a decreased capacity to control the propagation of thrombin generation by FVa and FVIIIa after the activation of coagulation cascade, according to the circulating amounts of functional PC molecules regardless of the decreased production or increased consumption.

Inherited PC deficiency is an autosomal recessive thrombophilia. Biallelic (homozygous or compound heterozygous) PC gene (*PROC*) mutants incite purpura fulminans (PF) as a consequence of “severe” PC deficiency in the newborn.⁶ Heterozygous *PROC* mutants are at risk of venous thromboembolism as “moderately severe” or “mild” PC deficiency in young adults. The severity of PC deficiency is defined according to the levels of activity assessed by chromogenic (amidolytic) or coagulometric (clotting) assay (Table 1).⁷ The plasma PC activity in healthy adults ranges from 0.65 to 1.35 IU/mL, corresponding to the % interval of references used in Japan. “Mild,” “moderately severe” and “severe” PC deficiencies are defined as the range of >20% (>0.2 IU/mL), 1–20% (0.01–0.2 IU/mL), and <1% (<0.01 IU/mL), respectively. However, the distinction of inherited (heritable) or non-inherited (acquired) PC deficiency is challenging in children who developed acute thrombosis for the following reasons. First, plasma PC activity is physiologically low until adolescence. Second, two major conditions affecting plasma PC levels, vitamin K deficiency and infection, are not rarely found in early infancy. Third, young parents with heterozygous *PROC* mutation are healthy, and the history of the grandparents may be less informative. Fourth, in critically ill children with thrombotic events, the genetic tests are time-consuming in guiding the management, and the constitutional hypercoagulability is hard to assess by functional assays during the treatment course.

Neonatal PC and PS levels are much lower than the adult reference levels. The mean plasma activities of PC and PS in healthy term infants are approximately 35%.^{6–8} Preterm infants

show much lower levels than term infants because of immaturity of the liver. Both PC and PS levels increase after birth, and reach the lower limit of adult references (~50 IU/dL) during 6 months to 1 year of age (Fig. 1).^{8–10} As PC activity often remains below the adult reference ranges until puberty, PC levels in childhood are hard to screen for inherited thrombophilias.¹¹

Several factors affect the physiological levels of PC and PS throughout childhood.¹² Both activities are low in the presence of vitamin K antagonist. Vitamin K deficiency precipitates bleeding (i.e. hemorrhagic diseases of the newborn, vitamin K deficiency bleeding in infancy), and also thrombosis (i.e. warfarin-induced skin necrosis/ paradoxical thrombosis). Infection lowers the plasma concentration of PC and PS. The mechanisms of “infectious PF” are involved in antibody-mediated consumption (i.e. post-varicella PF) or toxic effects (i.e. meningococemia PF).¹³ PC/PS deficiency arises from the loss or consumption in patients with nephrotic syndrome, sepsis and/or disseminated intravascular coagulation, and from the impaired synthesis in those with liver dysfunction. The half-life of plasma PC (6–8 h) is shorter than that of PS and other procoagulant vitamin K dependent factors. The true enzymatic activity of PS depends on free PS concentration. However, the interpretation of PS activity in newborns is not complicated because the binding C4b is at very low levels at birth. Acute inflammation reduces PS activity due to binding with C4b. For the diagnosis of PC deficiency in infants,

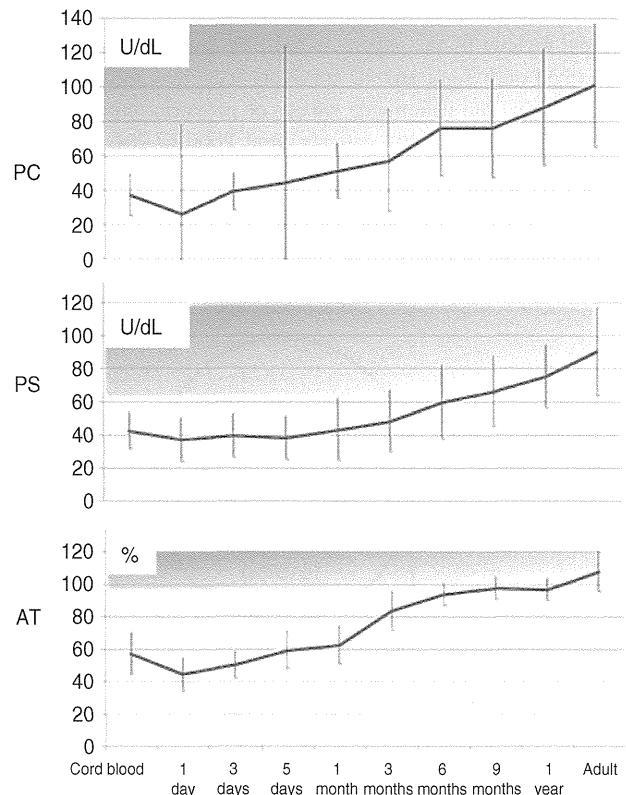


Fig. 1 Changes in the plasma activity of protein C (PC), protein S (PS) and antithrombin (AT) of healthy full-term Japanese infants from birth to 1 year of age. Each bar represents the mean \pm SD revised from the data of reference 8.

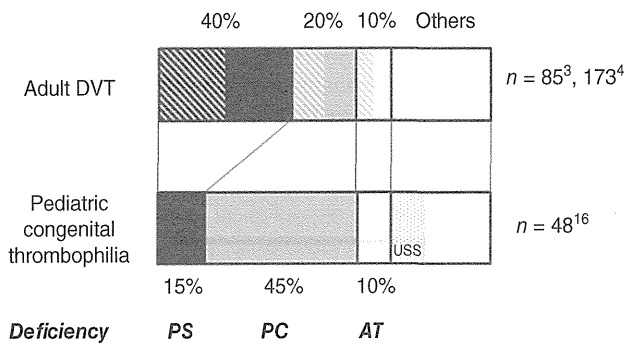


Fig. 2 Proportion of protein S (PS) (black), protein C (PC) (gray) and antithrombin (AT) deficiency (light gray) in adult patients with deep vein thrombosis (DVT) and pediatric patients diagnosed as having congenital thrombophilia in Japan. The hatched column represents patients who carry the heterozygous mutation of the PS, PS or AT gene. Upper columns are based on the data from references 3 and 4, and the lower ones are revised from the data of reference 16. USS (dotted column), Upshaw–Schulman syndrome. Each superscript in the figure refers to the number of reference.

plasma PC activity should be monitored concurrently with PS activity, protein induced by vitamin K absence or antagonists, D-dimer, anti-phospholipid antibodies, and FVII activity. Unexplained dissociation between PC and PS activity may portend a diagnosis of inherited PC deficiency.

Genetic backgrounds of PC deficiency in Japan

Recent reviews by the experts in the UK¹⁴ and North America¹⁵ described only eight and 12 survivors with long-term therapy, respectively. The nationwide survey of pediatric thrombosis in Japan first collected 301 patients from 2006 to 2010.¹⁶ Forty-eight patients (15%) were diagnosed as having congenital thrombophilia due to PC (n = 22; 46%), PS (n = 7, 15%), AT (n = 5;

10%), or ADAMTS13 (n = 5; 10%) deficiency and other causes (n = 9; 19%). This proportion differed from that of adult Japanese deep vein thrombosis cases (Fig. 2). There were no homozygous or compound heterozygous mutations of *PROS1*, *PROC* or *SERPINC1* in adult patients. PS deficiency was the most frequent genetic predisposition of adult thrombosis in Japan. It may reflect the higher frequency of heterozygous *PROS1* mutants in Japanese (1.12–1.8%) than in Caucasians (0.03–0.13%), accounting for the founder effects of PS-tokushima.¹⁷ On the other hand, approximately half of pediatric patients with congenital thrombophilia had PC deficiency. Half of them carried homozygous or compound heterozygous *PROC* mutations, in contrast to no PS or AT-deficient patients with biallelic mutations. Homozygous PS or AT-deficient mice result in fetal loss. Only a few patients with homozygous or compound heterozygous mutations of *PROS1* or *SERPINC1* have ever been reported. The true frequency of Japanese carriers of heterozygous *PROC* mutation may be higher than the prevalence of PC deficiency of 1/700 screened by amidolytic activity.¹⁸ These studies corroborated that *PROC* mutants are the leading cause of inherited thrombophilia in Japanese children.

Another study has recently reported the presentation and genotype of pediatric PC deficiency in Japan, based on the combined data with genetic study, post-marketing survey of plasma-derived activated PC concentrate (AnactC, Kaketsuken & Teijin, Kumamoto, Japan), and literature review.¹⁹ Between 1985 and 2010, this study determined 27 Japanese patients with congenital PC deficiency in Japan. These included one pair of twins, and a pair of cousins. Two patients had died. These patients might appreciably cover the 22 patients reported in the aforementioned nationwide survey.¹⁶ Twenty-four (89%) patients presented within 14 days after birth, including three prenatal hydrocephalies. Of the 27 patients, the first presentation was intracranial lesions (thrombosis, hemorrhage, and/or fetal hydrocephaly) in 19, PF in 16, and both in 10 patients (Fig. 3). Intracranial

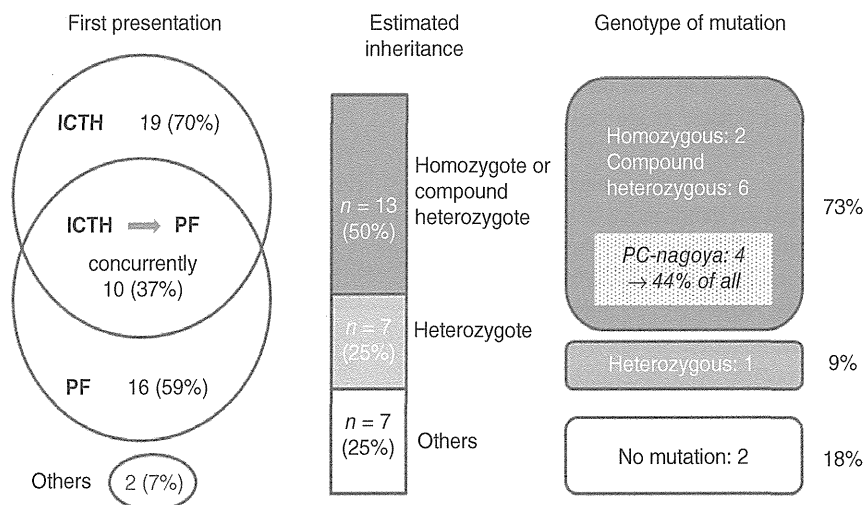


Fig. 3 First presentation at diagnosis, estimated inheritance, and genotype of pediatric patients with protein C (PC) deficiency in Japan. The major form of the disease onset is intracranial thrombosis and hemorrhage (ICTH) and/or purpura fulminans (PF) until 2 weeks of age. Three-quarters of patients were born to healthy parent(s) having low PC activity. Four unrelated patients carried PC-nagoya among 11 patients who received genetic study.

thrombosis/infarction and hemorrhage (ICTH) preceded or concurrently occurred with PF in both affected patients. Low PC activities of 18 mothers and/or 12 fathers indicated 20 heritable PC-deficiencies (two homozygotes, 11 compound heterozygotes, and seven heterozygotes) and seven unidentified causes of PC deficiency. Nine of 11 patients had *PROC* mutations, and four unrelated patients carried PC-nagoya (1362delG). No PC-deficient parents experienced VTE. Of the 18 patients treated with activated PC concentrate, two died and eight evaluable survivors had neurological sequelae. According to a different survey on neonatal thrombosis in Japan between 1999 and 2009,²⁰ six newborn infants were diagnosed with inherited thrombophilia (all PC deficiency) of 105 patients with neonatal thrombosis. These studies outlined the features of inherited thrombophilia in Japanese children: (i) PC deficiency is the leading cause of inherited thrombophilia; (ii) the first presentation is preceding ICTH and/or PF within the first 2 weeks of life; (iii) PC-nagoya may be prevalent in pediatric but not adult patients with PC deficiency; and (iv) many survivors with PC deficiency have neurological sequelae, visual impairments and amputated extremities.

Neonatal non-inherited PC deficiency

The important observation was that 25% of patients diagnosed with congenital PC deficiency were born to healthy parents with normal PC activity. Their presentations were indistinguishable from those of patients with *PROC* mutations. However, the low PC activity gradually increased and attained the normal range, but did not convey any recurrent VTE by the age of 1 year. In this setting, such patients could be diagnosed as having “neonatal non-inherited PC deficiency.”

Manco-Johnson *et al.*^{21,22} first reported 11 newborn infants with undetectable PC activity and/or antigen, which proved on subsequent follow up to be acquired. Five of them developed renal, aortic and cerebral thrombosis. Severe to moderately severe PC activity (<0.1 U/mL or <10%) could occur and often led to thrombosis in the stressed newborns as non-inherited PC deficiency. Matsunaga *et al.*²³ recently described a case of neonatal asphyxia and acute renal failure associated with isolated PC deficiency. The term infant had 6% of PC activity, 61% of PS activity, but no mutations in the promoter and coding regions of *PROC*. The hypercoagulability and dissociated PC and PS levels were unexplained by high D-dimer levels, normal FVII activity and absent vitamin K deficiency. During the early neonatal period, plasma PC activity shows prominent wide range compared with PS or AT activity (Fig. 1). The “transient PC deficiency in infancy” should be noticed as a critical thrombophilia showing a mimicking feature of inherited PC deficiency. Further studies are needed to clarify the mechanisms of delayed PC maturation, focusing on the genetic and epigenetic factors regulating PC concentrations.^{24,25}

Future directions

Severe or moderately severe PC deficiency occurs in newborn infants, and results in serious conditions. Activated PC products may be limitedly used for the treatment of inherited PC deficiency but not sepsis.²⁶ However, the clinical dilemma resides in

the difficulty in discerning “inherited” from “acquired” PC deficiency at the first presentation. The phenotype and genotype of PC deficiency in Asian children should be clarified more to establish the screening methods, diagnostic guidelines, and optimal managements using PC agents.

Acknowledgments

We thank the staffs of the Comprehensive Maternity and Perinatal Care Center, and the Department of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Kyushu University Hospital, Fukuoka, Japan. This work was supported in part by a grant from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan. The authors have no conflicts of interest to declare.

References

- Parker RI. Thrombosis in the pediatric population. *Crit. Care Med.* 2010; **38** (Suppl): S71–5.
- Young G, Albisetti M, Bonduel M *et al.* Impact of inherited thrombophilia on venous thromboembolism in children: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Circulation* 2008; **118**: 1373–82.
- Kinoshita S, Iida H, Inoue S *et al.* Protein S and protein C gene mutations in Japanese deep vein thrombosis patients. *Clin. Biochem.* 2005; **38**: 908–15.
- Miyata T, Sato Y, Ishikawa J *et al.* Prevalence of genetic mutations in protein S, protein C and antithrombin genes in Japanese patients with deep vein thrombosis. *Thromb. Res.* 2009; **124**: 14–18.
- Sarangi PP, Lee HW, Kim M. Activated protein C action in inflammation. *Br. J. Haematol.* 2010; **148**: 817–33.
- Goldenberg NA, Manco-Johnson MJ. Protein C deficiency. *Hemophilia* 2008; **14**: 1214–21.
- Price VE, Ledingham DL, Krümpel A, Chan AK. Diagnosis and management of neonatal purpura fulminans. *Semin. Fetal Neonatal Med.* 2011; **16**: 318–22.
- Takahashi Y, Yoshioka A. Hemostasis and its regulation system in childhood. *Jpn. J. Pediatr. Hematol.* 1994; **8**: 389–97.
- Flanders MM, Phansalkar AR, Crist RA, Roberts WL, Rodgers GM. Pediatric reference intervals for uncommon bleeding and thrombotic disorders. *J. Pediatr.* 2006; **149**: 275–7.
- van Teunenbroek A, Peters M, Sturk A, Borm JJ, Breederveld C. Protein C activity and antigen levels in childhood. *Eur. J. Pediatr.* 1990; **149**: 774–8.
- Tientadukul P, Chinthamittr Y, Sanpakit K, Wongwanit C, Nilanont Y. Inappropriate use of protein C, protein S, and antithrombin testing for hereditary thrombophilia screening: an experience from a large university hospital. *Int. J. Lab. Hematol.* 2011; **33**: 593–600.
- Bereczky Z, Kovács KB, Muszbek L. Protein C and protein S deficiencies: similarities and differences between two brothers playing in the same game. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2010; **48**: S53–66.
- Faust SN, Levin M, Harrison OB *et al.* Dysfunction of endothelial protein C activation in severe meningococcal sepsis. *N. Engl. J. Med.* 2001; **345**: 408–16.
- Chalmers E, Cooper P, Forman K *et al.* Purpura fulminans: recognition, diagnosis and management. *Arch. Dis. Child.* 2011; **96**: 1066–71.
- Davis MD, Dy KM, Nelson S. Presentation and outcome of purpura fulminans associated with peripheral gangrene in 12 patients at Mayo Clinic. *J. Am. Acad. Dermatol.* 2007; **57**: 944–56.
- Ishiguro A, Taki M, Manabe A, Ogawa C, Nakadate H, Shima M. The first national survey of thrombotic disorders in Japanese children (OS-3-116). *Jpn. J. Clin. Hematol.* 2011; **52**: 1139.

- 17 Hayakawa T, Morimoto A, Nozaki Y *et al.* Mesenteric venous thrombosis in a child with type 2 protein S deficiency. *J. Pediatr. Hematol. Oncol* 2011; **33**: 141–3.
- 18 Sakata T, Okamoto A, Mannami T, Tomoike H, Miyata T. Prevalence of protein S deficiency in the Japanese general population: the Suita Study. *J. Thromb. Haemost.* 2004; **2**: 1012–13.
- 19 Ohga S, Kang D, Kinjo T *et al.* Pediatric presentation and treatment of congenital protein C deficiency in Japan. *Haemophilia* 2013; doi: 10.1111/hae.12097.
- 20 Kawaguchi C, Takahashi Y. A recent national survey of neonatal thrombosis in Japan. Comparison with mailing Questionnaires in 2004 in Japan. (P-TH-389). *XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis* 2011:381.
- 21 Manco-Johnson MJ, Marlar RA, Jacobson LJ, Hays T, Warady BA. Severe protein C deficiency in newborn infants. *J. Pediatr.* 1988; **113**: 359–63.
- 22 Manco-Johnson MJ, Abshire TC, Jacobson LJ, Marlar RA. Severe neonatal protein C deficiency: prevalence and thrombotic risk. *J. Pediatr.* 1991; **119**: 793–8.
- 23 Matsunaga Y, Ohga S, Kinjo T *et al.* Neonatal asphyxia and renal failure as the presentation of severe protein C deficiency. *J. Perinatol.* 2013; **33**: 239–41.
- 24 Tang W, Basu S, Kong X *et al.* Genome-wide association study identifies novel loci for plasma levels of protein C: the ARIC study. *Blood* 2010; **116**: 5032–6.
- 25 Oudot-Mellakh T, Cohen W, Germain M *et al.* Genome wide association study for plasma levels of natural anticoagulant inhibitors and protein C anticoagulant pathway: the MARTHA project. *Br. J. Haematol.* 2012; **157**: 230–9.
- 26 Ranieri VM, Thompson BT, Barie PS *et al.* Drotrecogin alfa (activated) in adults with septic shock. *N. Engl. J. Med.* 2012; **366**: 2055–64.

日本小児血液・がん学会推薦総説

小児期に発症する遺伝性血栓症～プロテインCの重要性～

九州大学大学院医学研究院周産期・小児医療学

大賀正一

キーワード：血栓性素因，栓友病，電撃性紫斑病，脳静脈洞血栓症，深部静脈血栓症，肺動脈血栓塞栓症

はじめに

止血はすべての動物が備える出血に対する生体反応である。この機序は、感染に対する基本的な生体防御機構である免疫系と深く関わる。凝固系と補体系を司る因子には構造や機能に類似点が多い。好中球の細胞外トラップ (neutrophil extracellular traps: NETs) や感染早期に産生されるフィブリノゲンやサイトカインは、炎症と凝固を結ぶ機構である。血栓には、傷害部位の出血を阻止する生理的血栓と、何らかの病態により血管内で形成され、組織・臓器の循環を障害する病的血栓がある。傷害局所における止血血栓の形成と退縮には凝固線溶系の働きが不可欠だが、それ以外の部位では凝固制御系が全身の不適切な血栓形成を阻止している。

プロテインC (PC) は、プロテインS (PS) およびアンチトロンビン (AT) とともに3大自然抗凝固因子である¹⁾。PCの先天性欠損あるいは後天的欠乏から、新生児や重症感染症患者は電撃性紫斑病を発症する²⁾。PCはトロンボモデュリン (TM) とトロンビン (Factor IIa: FIIa) の複合体によって活性化される。近年、活性化PC (APC) は抗凝固作用のほかに、その直接的な細胞保護作用が、TMの多彩な炎症作用とともに注目されるようになった³⁾。抗凝固因子関連製剤 (AT, APC, TM など) の敗血症性ショックなどに対する臨床的有用性の評価は難しいが、小児・新生児領域での使用経験も集積されつつある。

小児の血栓症は成人よりまれであるが、新生児と思

春期に頻度が高くなる。近年、国内外でその増加が認識されてきた⁴⁾。血栓症は多元病であり、動脈硬化や糖尿病などのいわゆる成人病 (non-communicable disease) と深く関連する。栓友病 (thrombophilia) という病名は、1965年にEgebergがAT欠損症の家系に、はじめて用いた概念である。現在では、特発性あるいは家族性血栓症と診断されていた患者に遺伝子変異が同定され、遺伝性血栓症の確定診断に至る例が増加している。成人における血栓症の遺伝的背景は、「栓友病」という単一遺伝子病ではなく、寄与の大きさに幅のある「血栓性素因」である。一方、小児では、致死的にかつ重度の障害を残す稀な遺伝病としての「栓友病」を見逃すことはできない。

本稿では、小児血栓症の遺伝的背景について、感染、炎症と免疫とのかかわりから、とくに新生児・乳児におけるPC欠乏の重要性について解説する。

血栓症と血栓性素因

血栓症とは、「止血機構が過剰に作動して形成された病的血栓による臓器障害」と定義される。まだ血栓を形成していないが、これを生じやすい過凝固の身体的要因が血栓性素因である。血栓傾向の複合的要因が絡み合っ、血栓症を発症する。血栓形成には、古典的なVirchowの3徴、①血管壁、②血流の変化、および③凝固能が相互に作用する。動脈血栓の形成には血管壁と血流の変化が、また静脈血栓の形成には凝固能が深く関与する。どこに血栓を起こしやすいか (例えば頭蓋内と外) は、血管壁の構造と走行の特性が関与する。局所ではなく、病的血栓を全身性に形成しやすい要因 (誘因、関連する病態および基礎疾患) について遺伝と環境を軸に図1にまとめた。

血友病と対比させ、血栓症のみが唯一の表現型であ

連絡先住所：(〒812-8582) 福岡市東区馬出3丁目1番1号
九州大学大学院医学研究院周産期・小児医療学
大賀正一

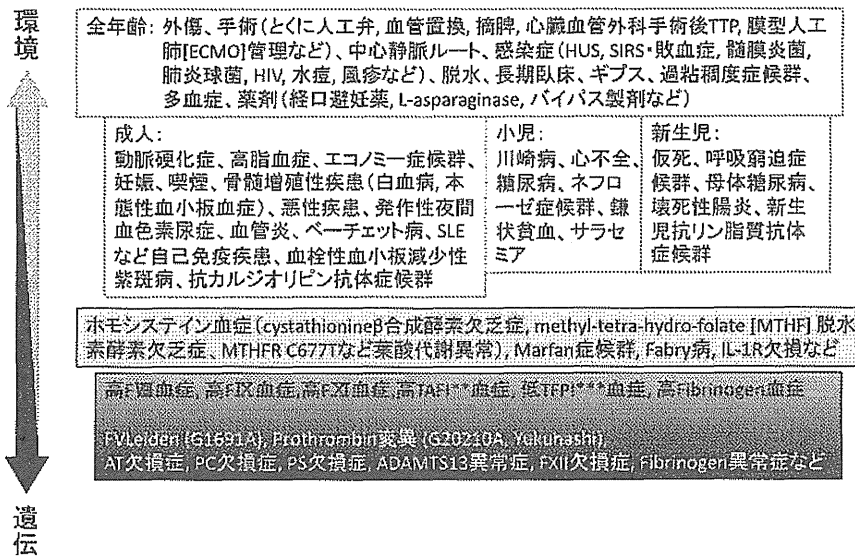


図1 血栓性血小板減少症をおこす素因(病態)

TTP: thrombotic thrombocytopenic purpura, ECMO: extracorporeal membrane oxygenation, TAFI: thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor, TFPI: tissue factor pathway inhibitor

る単一遺伝子病を「栓友病」とすれば、PC、PSおよびAT遺伝子異常による抗凝固因子欠損症(機能喪失)がこれに相当する。両アレル変異や欠失による重症型として電撃性紫斑病が有名である。軽症・中等症の活性低下を示すヘテロ変異保有者は、若年成人になって下肢の深部静脈血栓症(deep vein thrombosis: DVT)や肺血栓性血小板減少症などの静脈血栓性血小板減少症(venous thromboembolism: VTE)を発症しやすい「血栓性素因」を有する。両アレル異常によるATとPS欠損は胎生致死とされ、患児の報告は極めて例外的である⁹⁾。外因系関連の組織因子(tissue factor: TF)/FVIIa、プロトロンビンとその受容体 protease activated receptor (PAR)-1は胎児の育成に必須である。抗凝固因子も妊娠維持に不可欠で、PC、PS及びAT欠損症の母はしばしば不妊症/不育症の病歴を持つ。新生児電撃性紫斑病の報告はほぼすべて両アレル異常の重症PC欠損症だが、その理由は明らかでない。

凝固因子の異常による栓友病(機能獲得)には、APCに抵抗性をもつFactor V Leiden (FVL)がある。FVLは欧米人に最も頻度の高い遺伝性血栓性素因で、静脈血栓性血小板減少症の20~60%をしめる⁷⁾。このヘテロ接合体の頻度はコーカサス人一般集団の5~8%に及び、VTEの発症リスクは4~7倍高い。FVLホモは0.18%とまれだが、VTEリスクは80倍となる。欧米で次に頻度の高い遺伝性血栓性素因はプロトロンビン(PT)非翻訳領域の変異G20210Aで、このヘテロ変異の保有者はVTEリスクが2~3倍高く、ホモではさらに上昇す

る。一方、日本など東アジア人にはFVLとPTG20210Aはみつからず⁸⁾、中国でもPC異常が主要な血栓性素因である⁹⁾。日本から最近AT抵抗性を示す血栓症家系PT-Yukuhashiが報告された¹⁰⁾。今後、全ゲノム解析はさらに新規変異/多型を同定するであろう。血栓症のリスクについては、初発と再発の何れにおいても、PC及びAT欠損者のほうがFVLやPT多型を有する者よりも高い(表1)。このような背景から、血栓症の多い欧米における栓友病 thrombophilia という病名は、日本では一般に遺伝性血栓症と訳されるのであろう。

日本人と欧米人のPS、PCおよびATのヘテロ変異保有者頻度を比較すると、PCとATについては、一般集団と成人DVT患者、いずれにも民族間で差はない。一方、日本人にはPS-Tokushimaが多いため、PS異常の頻度は、一般集団、成人DVTのいずれにおいても欧米人より高い。日本人の成人DVT患者85名について3因子活性をスクリーニングすると65%にいずれかの低下があり、各因子欠乏症例の約半分にヘテロ変異が確認され、全体の33%が遺伝性血栓症の保因者となる¹¹⁾。ヘテロ変異保有者の活性値は判別困難なこともあるが、成人DVT173名の3因子を直接遺伝子解析しても変異率は32%と変わらない¹²⁾。

他にも血栓性素因を有する遺伝性疾患がある。高FVIII血症は10%の活性上昇がVTEの発症リスクを10%上昇させるようであるが、遺伝子異常はまだ同定されていない。フィブリノゲン異常症は出血と血栓の

表1 遺伝性血栓性素因を有する小児における血栓塞栓症発症の危険率

遺伝性血栓性素因	危険率(オッズ比) [95% 信頼区間]	
	脳血管閉塞(初回)	深部静脈血栓症(初回,再発)
Protein C 欠損症	9.3 [4.8-18.0]	7.7 [4.4-13.4], 2.4 [1.2-4.4]
Protein S 欠損症	3.2 [1.2-8.4]	5.8 [3.0-11.0], 3.1 [1.5-6.5]
Antithrombin 欠損症	7.1 [2.4-22.4]	9.4 [3.3-26.7], 3.0 [1.4-6.3]
Factor V G1691A	3.3 [2.6-4.1]	3.6 [3.8-4.8], 1.4 [0.4-1.2]
Factor II G20210A	2.4 [1.7-3.5]	2.6 [1.6-4.4], 2.1 [1.0-3.5]
Lipoprotein (a)	6.5 [4.5-8.7]	4.5 [3.3-6.2], 0.8 [0.5-1.4]
LA/aPL	6.6 [3.5-12.4]	4.9 [2.2-10.9]
3つ以上の遺伝性素因	11.9 [5.9-23.7]	9.5 [4.9-18.4], 4.5 [4.5-6.9]

LA/aPL : lupus anticoagulants/antiphospholipid antibodies (文献4より抜粋)

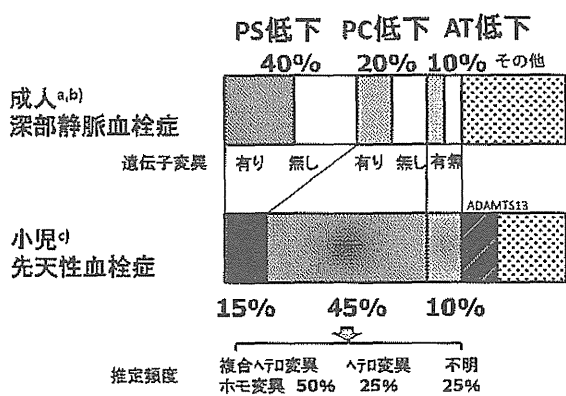


図2 日本人の成人と小児における血栓性素因 (文献11, 12, 17より改変)

両方をおこす。プラスミノゲン異常症 (Tochigi など) は血栓性素因として否定されたが、FXII 欠損症、TM 異常症についてはまだ素因として確立していない。ADAMTS13 欠損症は慢性再発性 TTP として、通常新生児期に重度の溶血と黄疸で発症するが、血栓症の発症は遅れる。凝固・抗凝固・線溶因子の異常以外に、血栓症が特徴的の症候となる先天性代謝異常症がある。高ホモシスチン血症は活性酸素による内皮傷害が動脈血栓を誘導する。メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素遺伝子多型 (MTHFR C677T) の頻度は日本人に高く、ホモシスチン血症をきたし脳梗塞との関連が示唆されている。先天性ネフローゼも血栓症を合併する。IL-1Ra を含む領域の染色体欠失による新生児自己炎症性疾患にも血栓症が報告された¹³⁾。発作性夜間血色素尿症は小児には極めて稀で血栓症も通常みられない。小児悪性腫瘍治療中の中心静脈ラインの血栓リスクに及ぼす遺伝的素因の寄与は少ないようである¹⁴⁾。

小児血栓症の分子疫学と臨床像

日本人小児に発症する遺伝性血栓症の全体像はこれ

まで明らかではなかった。石黒らは本邦で初めて小児血栓症に関する全国調査を行い、2006~10年の5年間に20歳未満に発症した先天性血栓症48例を集積した。その約70%は成人DVTと同様に3大抗凝固因子異常であった(図2)。しかし、その内訳は異なり、半数以上はPC異常症で、PS異常15%、AT異常10%と続いた。これは瀧らの凝固異常症全国調査および高橋らの新生児血栓症の全国調査¹⁵⁾の結果を反映している。先天性PC欠損症と診断された小児に関して、活性化PC製剤(アナクト®C, 化血研/帝人)の市販後調査、九州大学病院で約20年継続してきた血栓性素因解析の小児例、さらに会議録などの文献を網羅的に解析し、国内に23家系25例のPC異常症を確認することができた¹⁶⁾。11例に遺伝子解析が行われ7例がPC遺伝子(PROC)のホモ(1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、変異のない例も確認された。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に血栓症を起こしていないPC活性低下例であった。以上より、先天性PC欠損症と診断された小児の半数がPROCホモか複合ヘテロ変異、25%がヘテロ変異、残りが原因不明と推定される(図2)。両アレル変異を有する患者の半数はPC-Nagoya (1362delG)を保有していたが、これは興味深いことに成人DVT例にはほとんど見つからない¹⁷⁾。このことは成人血栓症ではPC-Nagoyaの寄与は大きくないが、小児血栓症においてはこれが重症PC欠損症をおこす重要な変異であることが示唆される。

小児PC欠損症の臨床像として、ほとんどが生後1か月以内に頭蓋内出血/梗塞(在胎33週~生後15日)か電撃性紫斑病で発症すること、60%は両者を合併し、頭蓋内病変が先行すること、眼病変でたまたま見つかる例があること、妊娠後期に先天性水頭症を指摘されている例があること、子宮内発育遅延はまれでほ

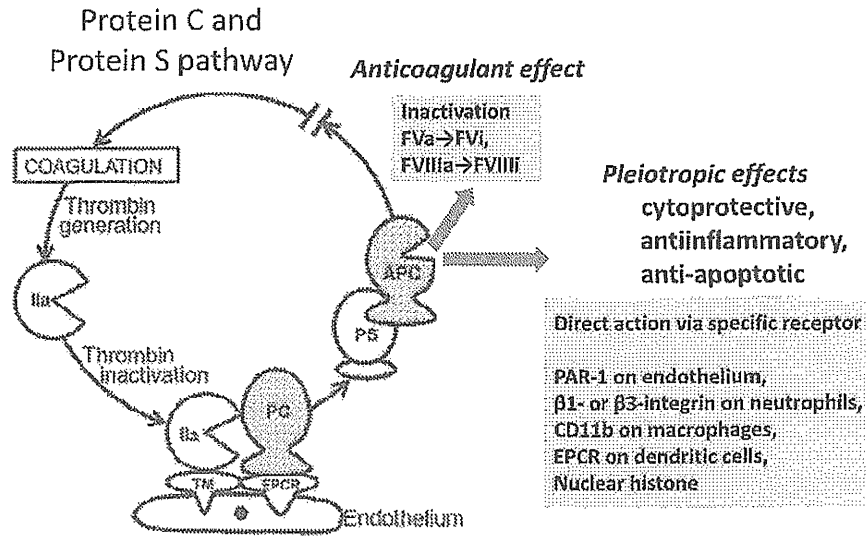


図3 プロテインCの活性化経路とその機能
(文献3及び Anderson JA et al. Can J Cardiol. 2013 ; 29 : 75-88 より改変)

とんどが満期産成熟児であること、などが明らかとなった¹⁷⁾。さらに、PC活性の単独低値にもかかわらず、変異のない新生児腎不全の症例も確認された¹⁸⁾。PC欠損症には Direct sequencing のみでは同定できない大欠失も報告されている。しかし、私たちはこの変異が確認されなかった複数例に、PC活性のゆるやかな上昇と正常化を確認している。FXIとPAI-1の加齢による血中濃度の増加は、age-related stability element (ASE)とage-related increase element (AIE)の発現から説明され、PC濃度の安定化にもASEが関与する¹⁹⁾。最近、ゲノムワイド解析から血漿PC濃度に影響する内皮PC受容体(EPCR)多型などが明らかになった²⁰⁾。新生児早期にPC活性が異常低値を示す「新生児一過性PC欠乏症」がどの程度血栓発症に関与するのか、遺伝要因か環境要因か、そしてどのような治療管理が適切かを今後明らかにする必要がある。

胎児水頭症、新生児頭蓋内出血・梗塞、脳静脈洞血栓症、硝子体出血、腎不全は、電撃性紫斑病以外に遺伝性PC欠損症を疑う症候である。乳児では感染に伴う電撃性紫斑病に遺伝性PC欠損症が隠れている可能性がある²¹⁾。新生児から乳児期早期にはPC欠損症を、それ以降はPS欠損症とAT欠損症を考慮して血栓性素因をスクリーニングするのが妥当であろう。

プロテインC(PC)の機能と活性化機構

PCは肝臓で合成されるセリンプロテアーゼ (serpin)の酵素前駆体で、ビタミンK依存性抗凝固因子である(図3左)。凝固の活性化がトロンビン(IIa)産生

を誘導すると、過剰なトロンピンが内皮細胞上に発現したTMに結合する。TMに結合したトロンピンは基質特異性が変化して、凝固促進作用を失いPCを強力に活性化する。EPCRはPCと結合して、TM結合IIaとともに活性化PC(APC)へと変化させる。APCは活性化した血小板に結合し、PSを補酵素として、FVaとFVIIIaを選択的に不活化することによりトロンピン産生を抑制して抗凝固作用を発揮する。また、血中APCはPAI-1を不活化して抗凝固作用をもたらす。このようにAPCはトロンピン生成に応じて産生されるので、凝固活性に反応してPC/PS制御系が活性化される。従って、PCとPS濃度の選択的低下はいずれも過凝固となる。可溶性EPCRは逆にAPC産生と機能を障害して過凝固を誘導する。この遺伝子PROCR variant (Ser219Gly)がPC経路の活性化を抑制し、血栓性素因であることが最近報告された²²⁾。

PCをコードする遺伝子PROCは染色体2q13-q14に局在する9つのexonからなる。遺伝性PC欠損症はPC抗原量・活性ともに低下するType Iと抗原量は正常で活性のみ低下するType IIに分類される。250以上の血栓発症に関与する変異が同定されその部位は分散している²³⁾。FVLは、APCの限定分解部位の置換Arg506Glnにより不活化されなくなる。APCとPCはEPCRに同等の親和性を有するので、APCはEPCRから一部解離して作用する。EPCRと結合したAPCはPAR-1を介して、内皮に直接細胞保護作用(抗炎症と抗アポトーシス)をもたらす。APCは好中球、マクロファージ、樹状細胞などの免疫担当細胞に、また神経細胞にも特異的受容体(LRP8, S1P1など)を介して

表2 プロテインCおよびプロテインS活性に影響する要因

要因	プロテインC	プロテインS
生理的		
妊娠	妊娠 22 週まで著明に上昇	減少
経口避妊薬・ホルモン療法	—	低値
年齢	年齢とともに上昇 (PCはPSとATより成人レベルへの到達が遅れる)	
性別	—	女性は低値
後天的欠乏		
抗ビタミンK療法	低値	低値
ビタミンK欠乏	低値	低値
未熟児	低値	低値
肝疾患	低値	低値
消費 (DIC, 重症感染症, 敗血症, VTE)	低値	低値
抗体出現 (SLE, 水痘, 悪性新生物)	低値	低値

*サラセミア, 鎌状貧血, もやもや病などでも Protein C および Protein S がいずれも低下することが報告されている。

*Lupus anticoagulant の存在下では, いずれも Clotting assay の結果に影響が出る。(文献 23, 24 より改変)

抗炎症作用を発揮する (図 3 右)³¹。TM も HMGB-1 を介した抗炎症作用が明らかとなり, 臨床における有用性が期待されている。可溶性 TM は髄液に移行しないが, APC は EPCR 依存的に正常な BBB も通過し中枢神経に作用する。APC には PAR-1, EPCR 及び PAR-3 を介した急性神経障害に対する保護作用があると考えられている。

成人までの VTE の発症率は, 新生児から乳児早期に最も高く, 学童期に低くなり, 思春期に再び上昇する。この新生児と思春期の血栓傾向には, 凝固制御因子の成熟と内因性線溶活性の低下が関与する。止血機構の成熟に従って, 3 大抗凝固因子濃度も年齢とともに上昇する²⁹。AT 濃度は学童期まで, PC および heparin cofactor (HC)-II 濃度は成人までに上昇する。PS は C4BP と結合しない free PS が活性を示すが, 新生児期は C4BP 値が低く free-PS 濃度が相対的に高い。PC, PS 及び AT のうち最も成人域への到達が遅れるのが PC である。生後 2 週間までの PC 活性値には, とくに個人差が大きいのかも知れない。本邦では高橋ら²⁹の基準値が主に使用されているが, 測定法の統一 (標準血漿, amidolytic/clotting 法など), ビタミン K 欠乏の確認, さらに 3 大因子の同時測定での検討が必要であろう。新生児期に PC と PS 活性を乖離させる後天的要因は明らかではない (表 2)²⁹。本邦成人では, PS 多型が多いため, PS/AT 比が遺伝性 PS 欠損症のスクリーニングに利用される。小児では PC/PS 比による単独 PC 低下の同定が遺伝性 PC 欠損症の診断に有用かもしれない。

小児 PC 欠乏症に対する治療と予防

血栓症の治療は, 抗凝固療法と血栓溶解療法からなる²⁶。初回の場合は素因を明らかにし, これに応じて抗凝固療法による再発予防を行う。遺伝性血栓症 (栓友病) でなければ新生児血栓症の進行と再発の危険性は低い。PC, PS 及び AT 欠損症の血栓症リスクは高いため, FVL や PTG20210A と異なり, この家族歴を有する小児にはこの 3 因子のスクリーニングが海外でも推奨されている²⁷。

小児 PC 欠乏症による血栓性疾患の治療管理を表 3 に示す²⁸。濃厚血小板と新鮮凍結血漿による補充療法の必要性はとくに新生児・乳児では高い²⁹。小児の PC 欠乏に対する補充療法は, 成人より強調されるべきであろう。生理的な止血効果を期待する凝固因子の最少血中活性値は 20~30% 程度である。新生児の血漿 PC 活性もこれ以上に保ちたい。TM 製剤 (リコモジュリン[®], 旭化成ファーマ) が有効性を発揮するには, 十分な PC 濃度が望ましいと考えられる³⁰。

現在国内で唯一の PC 製剤は血漿由来 APC で, 先天性 PC 欠損症による血栓症のみが保険適応となっている。海外における重症敗血症に対する組み換え APC 製剤 (rAPC) による大規模な無作為化臨床試験 (PROWESS 試験, レベル 1b) では, APC 群の有意な生存率の改善が報告された。しかし, 最近成人の重症敗血症と敗血症性ショックに対する rAPC の効果は否定された³¹。小児では頭蓋内出血が問題となるため³², 新生児 PC 欠損症例への使用には注意が必要である。APC や TM 製剤は, 小児 (とくに新生児) には病態を考慮して, 製剤の特性を生かした投与量と方法

表3 遺伝性プロテインC欠乏症による血栓症(DIC, 電撃性紫斑病, 急性静脈血栓塞栓症など)の治療管理

疾患	治療製剤	投与量	投与の指標
DIC, PF, 急性 VTE	PC 製剤 ^{a)}	100 U/kg を初回ボース後に 50 U/kg を 6-12 h 毎 (急性期は 6 h 毎)	PC 活性 50 IU/dL ; D-dimer の減少と正常化まで
	FFP	10-15 mL/kg, 8-12 h 毎 ; 但し, PC 製剤の使用まで	PC 活性 >10 IU/dL ; PC 製剤の使用まで, D-dimer の 低下と正常化まで
侵襲的処置の 際の予防	非分画ヘパリン ^{b)} 低分子ヘパリン ^{b)}	15-20 U/kg/h を PC 補充とともに 1.0-1.5 mg/kg 12 h 毎を PC 補充とともに	抗 Xa 活性 0.3-0.7 U/mL 抗 Xa 活性 0.5-1.0 U/mL
	PC 製剤 ^{a)}	100 U/kg 初回ボース後に 30-50 U/kg を 12-24 h 毎	PC 活性 20-50 IU/dL ; 術後に D-dimer が陰性化または 急速に低下するまで
維持	PC 製剤 ^{a)} 通常は Warfarin 療法と 併用	30-50 IU/kg を 1-3 日毎 0.1-0.2 mg/kg 経口を毎日 (PC 製剤の補充なしの場合) 0.05-0.1 mg/kg 経口を毎日 (PC 製剤の補充ありの場合)	D-dimer 陰性化 INR 2.5-3.5, 思春期は一般により高い INR が 要求される PC 製剤補充の場合は, INR 1.5-2.5

^{a)} 日本では活性化 PC のみが適応製剤である。小児・新生児では年齢と病態に応じて、注意深くモニターしながら、過剰投与に注意して使用する。

^{b)} ヘパリンの使用は血小板減少を伴う DIC の場合に出血のリスクをあげるため注意する。DIC: disseminated intravascular coagulation, INR: international normalized ratio, PF: purpura fulminans, VTE: venous thromboembolism. (文献 28 より改変)

を確立することが必要であろう。

小児血栓症のうち特発性の再発例及び遺伝性栓友病患者にはワーファリンの長期投与が必要となる。PC 欠乏の場合はとくに奇異性血栓症に注意して少量から開始し、細やかに INR をモニターする。Sick day の管理のみならず、長期的な骨、成長に対する晩期効果にも注意する。新生児乳児期発症の PC 欠損症は、発症時に重症型であっても年齢とともに活性もある程度上昇し、比較的血栓症を起こすことが少なくなるようである。Warfarin 過剰のカウンターに用いられる PPSB-HT[®] (日本製薬) の PC 濃度は極めて高い。海外でも重症 PC 欠損患者の長期管理に関する情報は少ない。PC 欠損症に対する補充療法の確立が必要である。PC 欠損症には血友病と同様に肝移植後の治療例が報告されている³⁹⁾。今後新たな細胞移植療法や遺伝子修復療法の開発が期待される。

おわりに

小児血栓症は稀であるが、新生児の PROC 変異保有者はハイリスク集団として注意すべきであろう。非遺伝性 PC 欠乏症の鑑別は困難である。胎児水頭症や感染性電撃性紫斑病と診断された小児に PC 欠乏症が隠れている可能性がある。遺伝性 PC 欠損症による小児血栓症は生命を脅かし重篤な障害を残す。妊産褥婦では PS 欠損症と AT 欠損症とが管理上問題となることが多い。新生児血栓症の予後を改善するには、周産期における産科との細やかな連携が必須である。周産期

死亡率の低い日本でこそ、新生児血栓症に対する適切な抗凝固療法を確立し、家族を守る包括的医療を実践する意義は大きい。

日本小児科学会の定める利益相反に関する開示事項はありません。

文 献

- 1) Lipe B, Ornstein DL. Deficiencies of natural anticoagulants, protein C, protein S, and antithrombin. *Circulation* 2011 ; 124 : e365-368.
- 2) Chalmers E, Cooper P, Forman K, et al. Purpura fulminans : recognition, diagnosis and management. *Arch Dis Child* 2011 ; 96 : 1066-1071.
- 3) Griffin JH, Zlokovic BV, Mosnier LO. Protein C anticoagulant and cytoprotective pathways. *Int J Hematol* 2012 ; 95 : 333-345.
- 4) Nowak-Göttl U, Janssen V, Manner D, et al. Venous thromboembolism in neonates and children—update 2013. *Thromb Res* 2013 ; 131 (Suppl 1) : S39-41.
- 5) Mahasandana C, Suvatte V, Chuansumrit A, et al. Homozygous protein S deficiency in an infant with purpura fulminans. *J Pediatr* 1990 ; 117 : 750-753.
- 6) Olivieri M, Bidlingmaier C, Schetzel S, et al. Arterial thrombosis in homozygous antithrombin deficiency. *Hamostaseologie* 2012 ; 32 (Suppl 1) : S79-82.
- 7) Sveinsdottir SV, Saemundsson Y, Isma N, et al. Evaluation of recurrent venous thromboembolism in patients with Factor V Leiden mutation in heterozygous form. *Thromb Res* 2012 ;

- 130 : 467—471.
- 8) Hamasaki N, Kuma H, Tsuda H. Activated protein C anticoagulant system dysfunction and thrombophilia in Asia. *Ann Lab Med* 2013 ; 33 : 8—13.
 - 9) Tang L, Guo T, Yang R, et al. Genetic background analysis of protein C deficiency demonstrates a recurrent mutation associated with venous thrombosis in Chinese population. *PLoS One* 2012 ; 7 : e35773.
 - 10) Miyawaki Y, Suzuki A, Fujita J, et al. Thrombosis from a prothrombin mutation conveying antithrombin resistance. *N Engl J Med* 2012 ; 366 : 2390—2396.
 - 11) Kinoshita S, Iida H, Inoue S, et al. Protein S and protein C gene mutations in Japanese deep vein thrombosis patients. *Clin Biochem* 2005 ; 38 : 908—915.
 - 12) Miyata T, Sato Y, Ishikawa J, et al. Prevalence of genetic mutations in protein S, protein C and antithrombin genes in Japanese patients with deep vein thrombosis. *Thromb Res* 2009 ; 124 : 14—18.
 - 13) Reddy S, Jia S, Geoffrey R, et al. An autoinflammatory disease due to homozygous deletion of the IL1RN locus. *N Engl J Med* 2009 ; 360 : 2438—2444.
 - 14) Chung BH, Ma ES, Khong PL, et al. Inherited thrombophilic factors do not increase central venous catheter blockage in children with malignancy. *Pediatr Blood Cancer* 2008 ; 51 : 509—512.
 - 15) 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—. *産婦人科新生児血液学会雑誌* 2012 ; 21 : 5—13.
 - 16) Ohga S, Kang D, Kinjo T, et al. Paediatric presentation and outcome of congenital protein C deficiency in Japan. *Haemophilia* 2013 ; 19 : 378—384.
 - 17) Ohga S, Ishiguro A, Takahashi Y, et al. Protein C deficiency as the major cause of thrombophilias in childhood. *Pediatr Int* 2013 (in press).
 - 18) Matsunaga Y, Ohga S, Kinjo T, et al. Neonatal asphyxia and renal failure as the presentation of non-inherited protein C deficiency. *J Perinatol* 2013 ; 33 : 239—241.
 - 19) Zhang K, Kurachi S, Kurachi K. Genetic mechanisms of age regulation of protein C and blood coagulation. *J Biol Chem* 2002 ; 277 : 4532—4540.
 - 20) Oudot-Mellakh T, Cohen W, Germain M, et al. Genome wide association study for plasma levels of natural anticoagulant inhibitors and protein C anticoagulant pathway : the MARTHA project. *Br J Haematol* 2012 ; 157 : 230—239.
 - 21) Ishimura M, Saito M, Ohga S, et al. Fulminant sepsis/meningitis due to *Haemophilus influenzae* in a protein C-deficient heterozygote treated with activated protein C therapy. *Eur J Pediatr* 2009 ; 168 : 673—677.
 - 22) Dennis J, Johnson CY, Adediran AS, et al. The endothelial protein C receptor (PROCR) Ser219Gly variant and risk of common thrombotic disorders : a HuGE review and meta-analysis of evidence from observational studies. *Blood* 2012 ; 119 : 2392—2400.
 - 23) Bereczky Z, Kovács KB, Muszbek L. Protein C and protein S deficiencies : similarities and differences between two brothers playing in the same game. *Clin Chem Lab Med* 2010 ; 48 (Suppl 1) : S53—66.
 - 24) Revel-Vilk S. The conundrum of neonatal coagulopathy. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2012 ; 2012 : 450—454.
 - 25) 高橋幸博, 吉岡 章, 他. 小児期の凝固・線溶およびその調節・阻止機構. *日本小児血液学会雑誌* 1994 ; 8 : 389—397.
 - 26) Manco-Johnson MJ. Controversies in neonatal thrombotic disorders. In : Ohls R, Yoder MC, eds. *Hematology, immunology and infectious disease : neonatology questions and controversies*. vol. 2. Philadelphia : Saunders Elsevier, 2012 : 89—95.
 - 27) Holzhauer S, Goldenberg NA, Junker R, et al. Inherited thrombophilia in children with venous thromboembolism and the familial risk of thromboembolism : an observational study. *Blood* 2012 ; 120 : 1510—1515.
 - 28) Goldenberg NA, Manco-Johnson MJ. Protein C deficiency. *Haemophilia* 2008 ; 14 : 1214—1221.
 - 29) Motta M, Del Vecchio A, Radicioni M. Clinical use of fresh-frozen plasma and cryoprecipitate in neonatal intensive care unit. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2011 ; 24 (Suppl 1) : 129—131.
 - 30) Mimuro J, Takahashi H, Kitajima I, et al. Impact of recombinant soluble thrombomodulin (thrombomodulin alfa) on disseminated intravascular coagulation. *Thromb Res* 2013 ; 131 : 436—443.
 - 31) Ranieri VM, Thompson BT, Barie PS, et al. Drotrecogin alfa (activated) in adults with septic shock. *N Engl J Med* 2012 ; 366 : 2055—2064.
 - 32) El Beshlawy A, Alaraby I, Abou Hussein H, et al. Study of protein C, protein S, and antithrombin III in newborns with sepsis. *Pediatr Crit Care Med* 2010 ; 11 : 52—59.
 - 33) Lee MJ, Kim KM, Kim JS, et al. Long-term survival of a child with homozygous protein C deficiency successfully treated with living donor liver transplantation. *Pediatr Transplant* 2009 ; 13 : 251—254.

OFFICIAL COMMUNICATION OF THE SSC

Towards standardization of clot waveform analysis and recommendations for its clinical applications

M. SHIMA,* J. THACHIL,† S. C. NAIR‡ and A. SRIVASTAVA§

*Department of Pediatrics, Nara Medical University, Kashihara, Nara, Japan; †Department of Haematology, Manchester Royal Infirmary, Manchester, UK; ‡Department of Transfusion Medicine and Immunohaematology, Christian Medical College; and §Department of Haematology, Christian Medical College, Vellore, India

To cite this article: Shima M, Thachil J, Nair SC, Srivastava A. Towards standardization of clot waveform analysis and recommendations for its clinical applications. *J Thromb Haemost* 2013; 11: 1417–20.

Introduction

Automated coagulation analyzers can provide a wealth of information in addition to that provided by conventional clotting tests such as the prothrombin time (PT) and the activated partial thromboplastin time (APTT), which are often considered of limited use for clinical purposes [1]. One particular type of analysis, the clot waveform, which was originally described using the Multichannel Discrete Analyzer (MDA series; Organon, Technika, Durham, NC, USA), defines changes in light transmittance that occur during the process of clot formation. A number of recent reports have described the use of this type of automated clotting instrument for clot waveform analysis (CWA), and there appears to be significant advantages in using this assay for the assessment of global coagulation function. In this communication, we propose standardization of methods for the CWA using currently available clotting analyzers and overview the potential clinical applications.

Principles of clot waveform analysis

Visualization of clot waveforms

Changes in light transmittance or absorbance are determined by continuous measurements during the APTT

Correspondence: Midori Shima, Department of Pediatrics, Nara Medical University, 840 Shijo-cho, Kashihara City, Nara, Japan.
Tel.: +81 744 29 8881; fax: +81 744 24 9222.
E-mail: mshima@naramed-u.ac.jp

Report on clot waveform analysis from the working group of the FVIII and IX Subcommittee of the SSC

Received 30 October 2012

Manuscript handled by: S. Eichinger

Final decision: F. Rosendaal, 26 April 2013

and are designated the clot waveform (CW) (Fig. 1). This clotting process is categorized into three parts: the pre-coagulation, coagulation and post-coagulation phases. Pre-coagulation is described as the first segment of the trace, from the beginning of the signal to the onset of coagulation. After the onset of coagulation, light transmittance is decreased or absorbance is increased by the formation of fibrin, and this is defined by a slope in the waveform. At the end of coagulation, light transmittance or absorbance tends to stabilize and is characterized again by a linear segment. If fibrinolysis is enhanced due to acquired or congenital abnormalities of hemostasis, light transmittance may increase or absorbance may decrease again in the post-coagulation phase.

Coagulation analyzer

There are two types of clotting machines for CWA. One utilizes a system to detect transmittance during the APTT clotting reaction, and is represented by the MDA-II or CS series. In this type, transmittance is decreased after initiation of clotting (Fig. 1A). The other type monitors the absorbance, and is represented by the ACL series. In this type, 0% absorbance defines the pre-coagulation phase, and the absorbance increases after the initiation of clotting (Fig. 1B). Other analyzers having similar features should also be able to provide CWA data easily, particularly if manufacturers incorporate the relevant software. Even if an automated CWA is not available, there are several analyzers that are able to provide adequate raw data (Table S1). CWA is possible using such analyzers by statistical evaluation of this raw data of transmittance or absorbance (Fig. S1).

Recommended method for standardization of CWA

APTT assay

Plasma should be prepared from fresh citrated whole blood as for the standard APTT assay. Pooled plasma from nor-

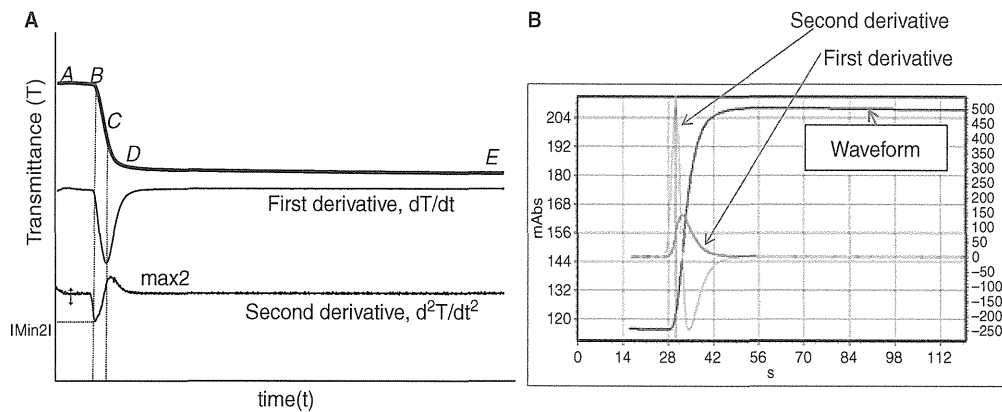


Fig. 1. APTT clot waveforms (A) Clot waveform of normal plasma by monitoring of transmittance (CS2000i). The upper trace shows the changes in light transmittance observed during the performance of APTT with normal reference plasma by CS200i (Sysmex Kobe, Japan). Point 'A' marks the beginning of the recording by the instrument, which occurs 8 s after the addition of CaCl₂. Point 'B' indicates the initiation of coagulation, namely fibrin formation. The clot waveform is separated into the pre-coagulation phase (A–B), the coagulation phase (B–D) and the post-coagulation phase (D–E). (B) Clot waveform of normal plasma by monitoring of absorbance (ACL-Top). The upper blue colored trace shows the changes in absorbance observed during the performance of APTT with normal reference plasma by ACL-Top (Instrumentation Laboratory). The red colored curve is the first derivative of the absorbance corresponding to the coagulation velocity. The light blue colored biphasic curve is the second derivative of the absorbance corresponding to the coagulation acceleration.

mal individuals or commercial normal plasma is available as reference plasma. Colorless APTT reagents, without opacity, are recommended to detect sensitive changes in transmittance or absorbance, and for subsequent precise measurements of the various parameters. Although any APTT reagent that fulfills this criteria should be usable for CWA, among the reagents tested so far (Table S1), Thrombocheck APTT-SLA/0.02M CaCl₂ is suitable for MDA-II and CS series and HemosIL SynthASil for ACL-Top series. Other instrument and reagent combinations should also be possible to use but these need to be tested. APTT reagents used for the detection of anti-phospholipid antibodies are not recommended for the CWA because their sensitivity for assessing low clotting function is not sufficiently high. The APTT for CWA is performed in a similar manner to that for the standard APTT assay.

CWA parameters

The first derivative of the transmittance reflects coagulation velocity, and the second derivative reflects coagulation acceleration. Clotting time (CT), maximum coagulation velocity (Min1), maximum coagulation acceleration (Min2) and maximum coagulation deceleration (Max2) are common basic parameters. Among these measurements, Min2 has been reported to be correlated with clotting function in hemophilia [2].

Clinical applications of CWA

Clotting function of various bleeding disorders

Initial evaluation of clotting function by CWA is undertaken by qualitative assessment of the CW pattern. In

particular, two characteristic CW patterns are observed in various coagulation abnormalities compared with normal reference plasma (Fig. S2). In normal plasma, the pre-coagulation phase is short and the slope, reflecting the coagulation phase, is steep. In factor (F) XII, X, IX, VIII, V and II deficiencies, the pre-coagulation phase is prolonged but the changes in slope are different [1]. Changes in slope are more evident in FVIII and FIX deficiencies than in other deficiencies. Thus, qualitative analysis of CW may have diagnostic value in various clinical settings of impaired clotting function.

Evaluation of clotting function in hemophilia A and B

While assays of FVIII:C and FIX:C are most important for the clinical management of hemostasis in patients with hemophilia, CWA provides a potentially widely available platform for assessment of global hemostasis in these patients [3] (Figs S3 and S4). This assay could then also provide a novel method not only for diagnosis and correlations with the bleeding phenotype but also for monitoring of hemostasis in cases of replacement therapy for serious hemorrhage or surgery.

Furthermore, the aPTT CWA is also useful for assessing very low levels of FVIII or FIX, for example less than 1 IU dL⁻¹. Studies in a number of patients with severe HA diagnosed by conventional clotting assays, demonstrated that CWA patterns differed from patient to patient. The APTT clotting time was prolonged in all patients with severe HA, but there was variation in the slope [2]. Using mixtures of severe HA plasma and exogenous FVIII ranging from zero to 1.0 IU dL⁻¹, the slope and the APTT clot time and the min2 appeared to change in a dose-dependent manner. Similarly, in further studies