

201415048A

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・小児における特発性血栓症の診断、予防および治療法の
確立に関する研究

平成26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 大賀 正一

平成27(2015)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・小児における特発性血栓症の診断、予防および治療法の

確立に関する研究

平成 26 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 大賀 正一

平成 27 (2015) 年 3 月

目次

| | | |
|------|-----------------------------------------------------------------------|----|
| I. | 班員・研究協力者名簿 | 1 |
| II. | 総括研究報告書 | |
| | 新生児・小児における特発性血栓症の診断、予防および 治療法の確立に関する研究 | 5 |
| | 大賀 正一 | |
| III. | 分担研究報告書 | |
| 1. | 小児遺伝性栓友病のスクリーニングに関する研究 ～ 小児・周産期領域における3大抗凝固因子の遺伝子解析 ～ | 19 |
| | 康 東天, 落合 正行, 福嶋 恒太郎, 大賀 正一, 堀田 多恵子, 浦田 美秩代, 古賀 結, 市山 正子 | |
| 2. | 早産・低出生体重児の出生時血液検査基準範囲の作成 | 25 |
| | 落合 正行, 石村 匡崇, 福嶋 恒太郎, 康 東天, 原 寿郎 | |
| 3. | 母体の血栓性素因スクリーニングによる新生児血栓症の早期診断 | 28 |
| | 金子 政時 | |
| 4. | 血栓症の診断における包括的凝固機能検査の臨床的応用の基礎検討 | 31 |
| | 嶋 緑倫 | |
| 5. | 抗 Xa 阻害薬使用時の有効な凝血学的モニタリングの検討 | 33 |
| | 瀧 正志, 山下 敦己, 森 美佳, 長江 千愛, 足利 朋子 | |
| 6. | 凝固検査標準化および診断法の開発 (新生児) | 38 |
| | 高橋 幸博, 中川 隆志, 野上 恵嗣, 嶋 緑倫, 豆田 清美, 谷口 恵理, 山口 直子, 山崎 正晴, 福井 博, 斎藤 能彦 | |
| 7. | プロテイン C 欠損症に生体ドミノ肝移植が成功した世界最初の例 | 42 |
| | 石黒 精 | |

| | |
|-------------------------|----|
| IV. 診断ガイドラインおよび重症度分類の試案 | 47 |
| V. 研究成果の刊行に関する一覧表 | 51 |
| VI. 研究成果の刊行物・別刷 | 55 |

I. 班員・研究協力者名簿

新生児・小児における特発性血栓症の診断、予防および治療法の確立に関する研究班

班員・研究協力者

| 区 分 | 氏 名 | 所 属 等 | 職 名 |
|-------|--------|-----------------------------|------|
| 研究代表者 | 大賀 正一 | 山口大学大学院医学系研究科 小児科学分野 | 教 授 |
| 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 | 宮崎大学医学部・大学院看護学研究科周産期分野 | 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 |
| 研究協力者 | 吉良 龍太郎 | 福岡市立こども病院・感染症センター 小児神経科 | 科 長 |
| | 本荘 哲 | 独立行政法人国立病院機構福岡病院・小児科 | 医 長 |
| | 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 |
| | 大森 啓充 | 独立行政法人国立病院機構柳井医療センター・小児科 | 診療部長 |
| | 井上 裕文 | 山口大学大学院医学系研究科 小児科学分野 | 助 教 |

Ⅱ. 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・小児における特発性血栓症の診断、予防および
治療法の確立に関する研究

研究代表者 大賀 正一 山口大学大学院医学系研究科・小児科学 教授

研究要旨

新生児と小児の血栓症は近年増加している。血栓発症リスクの最も高い遺伝性素因である Protein C (PC)、Protein S (PS) 及び Antithrombin (AT) 欠損症の早期診断法が注目されている。小児の血栓症診断と素因解析は難しく治療管理法と予防法も確立していない。周産期の特異な発症様式を明らかにして、早期診断の指針作成をめざし本研究を開始した。

1) 新規発症例の集積

2014 年は新規 28 家系から 21 検体を解析し、PC 遺伝子変異 3 名（複合ヘテロ1、ヘテロ2）の児、PS 複合ヘテロ変異 1 名の母を同定した。3 年間に集積した PC 欠乏児 37 名から 16 名（43%）の変異保有者を確定したが、小児では活性値と臨床像からの予測が難しい。

2) 小児期発症者における血栓性素因の効果的診断法

年齢別に設定した各因子活性下限値の有用性を 20 歳までの血栓症例の解析から検討した。2 歳未満と中学生では低 PC 活性児が約 45%と他 2 因子活性低下児の割合より高いこと、小学生では低 PC 活性児と低 PS 活性児の割合（各 19%）も高いこと、が明らかになった。PC 欠損症による血栓症は 2 歳未満が最多（44%）でこの年齢群に PROC 変異を 6 名同定した。PS 欠損症は小学生に多く（33%）、この年齢群に PROSI 変異を 4 名同定した。この年齢別下限値の成人基準値に相当する有用性が示された。一方、2 歳未満とくに新生児における PC 異常症診断のための活性下限値の設定の難しさが明らかとなった。早期産児は凝固検査の評価が難しいため、多施設共同で基準値設定の標準化を行った。新規活性測定法、新生児の基準値と過凝固の評価について検討を継続している。

3) 診療ガイドラインの作成

年齢別抗凝固因子活性下限値と発症様式を考慮した成人と異なる「新生児・小児における遺伝性栓友病の診断基準案」および「重症度分類案」を作成した。また治療に関しては新生児 DIC の新しい診療ガイドラインと組み合わせる早期の効率的な遺伝子診断につなげる方法を提案した。新生児領域を中心に全国ネットを確立してこの案の有用性を継続して検討中である。本研究班での確定診断例に根治療法としてのドミノ移植が成功した。予後不良な新生児発症例の保存的治療と予防法を確立することが重要である。

研究班の症例集積から成人とは明らかに異なる小児血栓症の遺伝的背景と臨床像が明らかになり、早期診断案が今回具体化した。重篤な後遺症を残すこの稀少疾患を小児期に早期診断する体制を整え、治療と予防の診療指針確立をめざして本臨床研究を継続する。

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 | 宮崎大学医学部大学院看護学研究科周産期分野 | 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

小児の血栓症は稀とされてきたが、新生児医療や心臓外科手術の進歩などを背景に、近年先進国で増加している。海外では、リスクの高いAntithrombin(AT)、Protein C(PC)及びProtein S(PS)欠損症を小児期に診断する意義が強調され始めた(Blood 2012;120:1510)。わが国でも成人の解析が進み治療法も進歩した。一方、新生児・小児の血栓症診断は難しく治療管理法も確立していない。

私たちは重症感染に伴うPCヘテロ変異の血栓小児例(Eur J Pediatr 2009;168:673)を見出し、日本人小児血栓症の分子疫学と臨床像を明らかにした(Haemophilia 2013;19:378, 日児誌 2013;117:1538)。①患者は新生児とAYA(adolescent and young adult)世代に多い、②特発性と診断された新生児・乳児にはPC欠乏症が、AYA世代にはPS/AT欠乏症が多い、③水頭症、頭蓋内出血、新生児仮死、腎不全など成人と異なる発症様式を呈する、ことを国内外に発信した(Pediatr Int 2013;55:267, 5th EAHF 2013)。一方、新生児特有の後天性因子も示唆され、多彩な臨床像から早期診断法を確立するにはさらに症例集積が必要であることも明らかとなった。ヘテロ変異を有する両親の多くは未発症であり、妊娠は母の血栓発症の契機となる。新規治療薬(t-PAなど)は小児の使用経験も少ない。世界一低い周産期死亡率を誇り、人口減少時代を迎えた日本で「家族を守る血栓症診療」を確立する意義は大きい。

本研究の目的は新生児・小児例を集積し、「早期診断、治療管理と予防法を確立」することである。平成23年度から私たちは全国の診療ネットの基盤を確立し、産婦人科新生児血液学会と小児血液がん学会を通じて、症例集積を急速に進めた。3因子活性比のスクリーニングによる効率的遺伝子診断法の試案も作成中である。診療情報を共有し抗凝固療法と補充療法の評価を行うネットワークも確立した。今回、小児血栓症の全貌解明と質の高い診療指針の作成をめざして、新規症例の集積を継続し、現在の登録を小児血栓症の継続的な国内登録システムに発展させる。

B. 研究方法

新生児・小児における特発性血栓症の全貌を明らかにし、診療ガイドラインを作成する。①3年間で集積した国内の症例登録基本データをもとに、3大抗凝固因子欠損症を中心とした診療指針を作成する。②診断としては、新生児と学童における発症様式の相違から、効率的遺伝子診断のための活性値を決定し指針に組み込む。③治療としては、診療経験の主治医ネットワークを全国周産母子センターからほぼ確立したので、指針案を作成しコンセンサスを得る。④家族解析から小児の発症例・未発症例を集積し、発症の誘因・後天的要因を解析し、小児発症の予防策を含む包括的指針をめざす。

本症は稀少性が高いとされたが、発症様式が多彩で予想外に見つかりだしたことから、全国レベルで経験のある主治医と血栓止血領域の専門医の密な連携が必須である。新生児領域は九州大学病院総合周産期母子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」の施設群から全国の総合周産期母子医療センターへネットを広げたので、日本産婦人科新生児血液学会(研究協力:池ノ上理事長、白幡名誉会員)を基盤に活動する。小児領域は成育医療センターと九州大学を中心に全国の小児医療センターにネットを拡充し、日本小児血液がん学会(研究協力:理事長、瀧血栓止血委員長)を基盤に活動していく。

以下に具体的方法を記す。

1) 症例集積と血栓性素因の臨床的評価(大賀、石黒、高橋、瀧ほか)

罹患者系の遺伝子解析とカウンセリングを遂行する。主治医と連携をとり家系内の血栓発症予防を行う。新規例ごとにスクリーニングと遺伝子解析を実施する。月1家系以上の同定が見込まれる。

2) 血栓性素因スクリーニング、遺伝子解析(康、嶋、落合[児]、福嶋、金子[母]他)

PT、APTT、Fibrinogen、PIC、TAT、D-dimer、VIII:C、抗Cardiolipin抗体、lupus-anticoagulant、PC・PS活性/抗原、活

性、PIVKA、FVII・FVIII活性、vWF活性、血清脂質などをスクリーニングする。*PROSI* (15 exons), *PROC* (9 exons), *SERPINC1* (13 exons) の翻訳とプロモーター領域を解析する。MLPA法やCGHアレイによる欠失の確認、エクソーム解析を行う。臨床遺伝医療部で遺伝カウンセリングを行う。

3) 治療薬の適応と有効な適正使用に関する検討(嶋、高橋、瀧、大賀、白幡、池ノ上他)

新生児・小児に対するトロンボモジュリン製剤、活性化PC製剤、AT製剤および凍結血漿による補充療法への指針作成のための、基礎的及び臨床的エビデンスを集積する。

4) 新生児領域の診断と治療指針の作成(落合、大賀、高橋、及び参加施設) 初年度

周産母子センター(母性、新生児)を中心に活用できる診療の手引きを作成する。

5) 小児領域の診断と治療指針の作成(石黒、瀧、大賀及び参加施設) 次年度

小児医療センターを中心に活用できる診療の手引きを作成する。小児神経および循環器領域には未診断例あるいは後天性として治療されている例のあることが予想される。専門医(研究協力: 吉良、本荘、山村ほか)のネットワークを拡大して、継続性のある質の高い全国レベルの診療システム基盤を構築する。

(倫理面への配慮)

血栓症責任遺伝子の解析について、ヒト遺伝子研究に該当する場合は、ヒトゲノム遺伝子解析研究に関する倫理指針に従う。申請者の血栓性素因に関する遺伝子解析研究は所属施設の倫理委員会で承認済みであるが、当該研究の参加については、主治医が所属するそれぞれの施設の倫理委員会の承認を得る。疾患登録については小児血液がん学会が学会倫理審査委員会ですで行っている疾患登録事業の疫学研究倫理指針に準拠した臨床研究として行う。患者登録システムの確立には、遺伝子検査を含む研究であること、発症前の家族を診断する可

能性のあることから、主治医から患者本人もしくは保護者への説明が十分になされ同意が取得された上で、申請者が遺伝子解析を行う。さらに遺伝カウンセリングを行い、可能な治療と予防に関する指導や助言も必要に応じて行う。調査にあたっては、個人情報の守秘を厳守し、データの取り扱いに注意する。本研究においては、九州大学において患者検体の匿名化を図り、検体の採取にあたっては、患者および家族から事前に十分な説明をおこない、文書による同意を得る。山口大学病院と九州大学病院では臨床遺伝医療部にて遺伝カウンセリングを行っており、すでに血栓性素因の遺伝子診断が確定した家系にカウンセリングを実施している。

C. 研究結果

・研究班全体としての研究成果

新生児・小児血栓症とその素因を診断し治療管理・予防法を確立するため、以下の研究結果に基づき診療指針案を作成した。

1) 新規発症例の集積

2014年は新規28家系以上の小児例の診断と治療に関する相談を受け、自然抗凝固因子活性低下症を疑う家系から21検体を解析した。*PROC*変異3名(複合ヘテロ1、ヘテロ2)の児、*PROSI*複合ヘテロ変異1名の母を新規に同定したが、*SERPINC1*変異はなかった。これにより、2011年以降の班員のグループが同定してきた本邦小児PC欠乏症患者は約3年間で37名(うち16名が変異確定)となった(表1)。

表1. 研究班開始後の小児Protein C欠乏症

| 患者数 | 2011以前 27名 | 2011以降 37名 |
|---------|---------------|---------------|
| ホモ変異 | 2 | 3 |
| 複合ヘテロ変異 | 11 | 6 |
| ヘテロ変異 | 7 | 7 |
| | ⇒35% | ⇒44% |
| 変異なし | 2 | 21 |
| その他不明 | 5 | 0 |
| | }26% | }57% |

a) 2011年以前は両親の活性からの推定

b) 2011年以降は全例遺伝子解析による確定

これは2011年以前の30年間の27名(うち変異確定20名)の報告から急増しており、近年本研究班が稀少例の正確な診断に寄与したことを示唆している。この遺伝性PC欠損症の中にヘテロ変異の割合が44%とだいに増加していることは予想通りである。また非血縁者にホモ変異が予想外に同定されている。積極的な遺伝子解析を継続しているため、臨床像と活性値からは遺伝性PC欠損症との鑑別が困難な変異なし例が増加した。さらにその後の観察から、ほとんどはPC活性が年齢相当に上昇することも確認された。

2) 小児期発症者における血栓性素因の効果的診断法

出生から20歳までの血栓症発症者とその疑い患者に行った血栓性素因遺伝子解析の症例集積集団に対して、年齢別に設定した各因子活性下限値の有用性を検討した(表2下)。2歳未満と中学生(13-15歳)の2群では低PC活性児が約45%と他2因子活性低

下児の割合より有意に高く、小学生(7-12歳)では低PC活性児と低PS活性児の割合(各19%)が有意に高かった。特発性血栓症と診断されPC欠乏が関与したと考えられる児は2歳未満が最多(44%)でこの年齢群にPROC変異を6名同定した。PS欠損症は小学生群に多く(33%)この群にPROS1変異を4名同定した。このことから、今回設定した年齢別活性下限は、日本人成人基準値(Kinoshita S et al. Clin Biochem. 2005; 38: 908-15, Miyata T et al. Throm Res. 2009; 124: 14-8)に相当する有用性があったと考えられた。一方、2歳未満とくに新生児と3か月までの児におけるPC異常症診断のための活性下限値の設定は難しいことが明らかとなった。早期産児は凝固検査の評価が難しく、多施設共同で基準値設定の標準化を行った。新規活性測定法、新生児の基準値と過凝固の評価について検討を現在も継続している。

表2. 新生児・小児における遺伝性栓友病*の診断基準(案)
*プロテインC, プロテインS, アンチトロンビン欠損症

<診断基準>

- 1) 各抗凝固因子活性が、常に年齢基準値の下限*である
- 2) 年齢に応じて下記の特徴的な発症様式をとる
 - 新生児・乳児早期: 胎児脳室拡大(水頭症)、新生児脳出血・梗塞、脳静脈洞血栓、電撃性紫斑病、硝子体出血
 - 幼児・学童期: 脳出血・梗塞、脳静脈洞血栓、上腸管膜動脈血栓
 - 思春期以降: 深部静脈血栓症、肺塞栓・梗塞、脳梗塞
- 3) 各遺伝子変異が確認されるか、家族集積性から遺伝性と判断できる

上記1)-3)を全て満たすものを、遺伝性栓友病発症者、1)と3)を満たすが年齢的にまだ発症していないものを、遺伝性栓友病未発症者とよぶ。

*年齢別各活性値の下限(単位%)

| | PC | PS | AT |
|----------|-----------|-----------|-----------|
| 0日 - 89日 | 45 (<60%) | 42 (<60%) | 52 (<65%) |
| 90日 - 2歳 | 64 (<85%) | 51 (<85%) | 52 (<65%) |
| 3歳 - 6歳 | 64 (<85%) | 51 (<85%) | 68 (<85%) |
| 7歳 - 20歳 | 75 (100%) | 60 (100%) | 80 (100%) |
| 成人 | 75 | 60 | 80 |

但し括弧内は成人基準の%

3) 診療ガイドラインの作成

年齢別抗凝固因子活性下限値と発症様式を考慮した成人と異なる「新生児・小児における遺伝性栓友病の診断基準案」(表2)および「重症度分類案」(表3)を作成した。また治療に関しては新生児DICの新しい診療ガイドラインと組み合わせて早期の効率的な遺伝子診断につなげる方法を提案した。新生児領域を中心に小児科診療施設の全国ネットを確立し、この案の有用性を継続して検討中である。本研究班で確定診断した例に根治療法としてのドミノ移植が成功した(石黒分担員)。今後予後不良な新生児発症例の保存的治療と予防法を確立するには、新たに班員のコアメンバーで作成した新生児DICの診療ガイドラインを参考に管理予防から根治療法までを含めた包括的診療ガイドラインを確立する必要がある。

表3. 新生児・小児遺伝性栓友病の重症度分類 (案)

| ＜重症度分類＞ | |
|--------------|-----------------------|
| Stage 1: 未発症 | 遺伝性栓友病と診断されたが、無症候 |
| Stage 2: 軽症 | 発症早期に適切に治療され、補充療法は不要 |
| Stage 3: 中等症 | 発症後補充しながら、独立して日常生活が可能 |
| Stage 4: 重症 | 発症後補充と支持がなくては日常生活が不可能 |

| 血液プロテインC | 濃度 (IU/ml) | 活性 (%) |
|-----------------------|------------|--------|
| 健康成人 | 0.65~1.35 | 64~146 |
| プロテインC欠損症 | | |
| 軽症 mild | >0.2 | >20 |
| 中等症 moderately severe | 0.01~0.2 | 1~20 |
| 重症 severe | <0.01 | <1 |

・各分担研究項目の成果

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

《小児遺伝性栓友病のスクリーニング～小児・周産期領域における3大抗凝固因子の遺伝子解析》に関する研究

日本人小児における遺伝性血栓性素因(栓友病)の効果的スクリーニング法を確立するため、小児期発症のPS、PC及びAT欠乏症患者の表現型(活性値と臨床症状)と遺伝子型を解析した。2014年はPC欠乏22家系、PS欠乏4家系およびAT欠乏2家系に遺伝子解析を行った。PROC変異は複合ヘテロ1名、ヘテロ2名と変異なし8名、PROS1変異は複合ヘテロ1名と変異なし2名、

SERPINC1変異はなし1名を確認した。PROC複合ヘテロ変異は新生児電撃性紫斑病と頭蓋内出血梗塞、ヘテロ変異の2名(日齢16, 4歳)は感染に伴って発症した脳静脈洞血栓であった。PC欠乏として解析した70%以上は新生児(胎児期も含む)発症の頭蓋内病変であった。2011年秋より集積した研究班のPC欠乏症の遺伝子診断例は37名に、うち変異確定者は13名(44%)になった。年齢別3因子活性の下限基準値を定義し、20歳以下の栓友病疑い306例を年齢層別に検討した。0-2歳と13-15歳における低PC活性児の割合(各45%、44%)は他の2因子活性の低下した児の割合(5-17%)より有意に高かった。7-12歳の低PC活性児は低PS活性児の数と同じ割合(19%)で低AT活性児のそれ(1%)より有意に高かった。特発性血栓症と診断した62名における年齢層別患者割合は3因子間で異なり、PC欠損症では0-2歳が44%と最多をしめこの群にPROC変異を6名同定し、PS欠損症では7-12歳が33%と多くこの群にPROS1変異を4名同定した。3因子が低活性であった各年齢層に同定された変異患児の割合には差がなかったため、この各年齢層に定義した下限基準値の有用性が示された。今後、さらに新生児における低PC活性の下限値について、同時測定によるPS活性比から検討する必要がある。

落合 正行, 石村 匡崇, 福嶋 恒太郎, 康 東天, 原 寿郎

《早産・低出生体重児の出生時血液検査基準範囲の作成》に関する研究

新生児・小児血栓症の診断と治療の基礎となる、早産児・低出生体重児の入院時の血液検査基準値を設定した。既存のネットワークをもとに多施設共同臨床研究を行うインフラを整備し、11の関連施設から年間1000例程度のハイリスク新生児をデータベースに登録した。対象は関連施設に入院した全ての新生児であり、死亡退院と先天異常例は除外した。測定項目は標準化サーベイランス27項目のうち入院時ルーティン項目を選択した。入院時(日齢0-1)の血液検査所見を性別、在胎週数、出生体重別に層別化し

て、ノンパラメトリック法にて基準値と基準範囲(95%信頼区間)を設定した。ほとんどの項目で性差はなく、在胎週数や出生体重に比例して増加する項目(総蛋白、アルブミン、クレアチニン等)と変化しない項目(尿素窒素、カルシウム、カリウム等)を認めた。肝臓で合成される凝固線溶因子においては、出生時の基準範囲は在胎週数と出生体重に依存すると推測される。

金子 政時 宮崎大学医学部大学院看護学研究科周産期分野 教授

《母体の血栓性素因スクリーニングによる新生児血栓症の早期診断》に関する研究

母体の血栓性疾患のリスク因子から特発性小児血栓症児およびその家系のスクリーニングが可能かを明らかにすることを目的とした。平成26年に総合周産期母子医療センターで管理された妊婦を対象とした。妊娠合併症として、重症妊娠高血圧症候群、子宮内胎児発育遅延児、母体合併症・既往として、深部静脈血栓症、脳梗塞、その他血栓性疾患、家族歴として、2親等以内の脳梗塞等の血栓性疾患を有する妊婦をハイリスク妊婦として捉え、必要に応じてPC、PSの活性および抗原量、AT活性を測定した。さらに、ハイリスク母体から出産した児の出生時の所見収集と血栓性疾患の発症に関して経過を追跡した。その結果、リスク因子を有する妊婦35名(13.6%)が抽出されたが、その中から特発性小児血栓症児およびその家系の特定には至らなかった。さらに症例を集積していくと同時に、今後は、胎盤組織所見でFetalvessel thrombosisのみられた児の予後も追跡していく予定である。

嶋 緑倫 奈良県立医科大学小児科学教授

《血栓症の診断における包括的凝固機能検査の臨床的応用の基礎検討》に関する研究

出血性素因や血栓性素因の凝血的評価は診断のみならず治療管理にもきわめて重要である。従来は、凝固因子、抗凝固因

子、線溶因子や抗線溶因子などが個々に評価されてきたが、in vivoを反映していない。最近我々はトロンビン生成とプラスミン生成を同時に評価できる測定法を確立した。本同時測定法は出血性素因のみならず血栓性素因の包括的評価にきわめて有用であることが期待される。今回、本生成試験を用いた栓友病診断の臨床的応用について、抗凝固因子添加における本生成試験へ与える影響を検討した。抗凝固因子(活性型PC、AT、トロンボモジュリン)の過剰量の添加はいずれも凝固能ならびに線溶能を抑制することがわかった。今後、血栓症を呈する各欠乏血漿検体を用いて、抗凝固因子過剰存在下での本法で検討する予定である。

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

《凝固検査標準化および診断法の開発(新生児)》に関する研究

プロテインC(PC)は肝で合成されるビタミンK依存性抗凝固因子で、血漿中で最も重要な抗凝固因子である。新生児や小児は肝

の未熟性やビタミンK欠乏に陥りやすく、先天性や後天性PC欠乏症では血栓症を発症する。特に先天性PC欠乏症では新生児期に電撃性紫斑病を生じる。本研究は、新たに抗凝固検査法として開発されたThromboPathを用い、新生児・小児における抗凝固機構の特性と治療について検討した。

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

《抗Xa阻害薬使用時の有効な凝血的モニタリングの検討》に関する研究

血栓症の治療および予防薬として抗Xa阻害薬を使用する際の有効な凝血的モニタリング法は未だ確立されていないが、Rivaroxabanにおいては凝固波形解析による凝血的モニタリングが有用である可能性が示唆された。今後、モニタリングの精度を高めるため凝固波形解析に用いる最適な試薬について検討を進める必要がある。

石黒 精 独立行政法人国立成育医療研究センター・教育研究部総合診療部血液内科 部長

《プロテインC欠損症に生体ドミノ肝移植が成功した世界最初の例》に関する研究

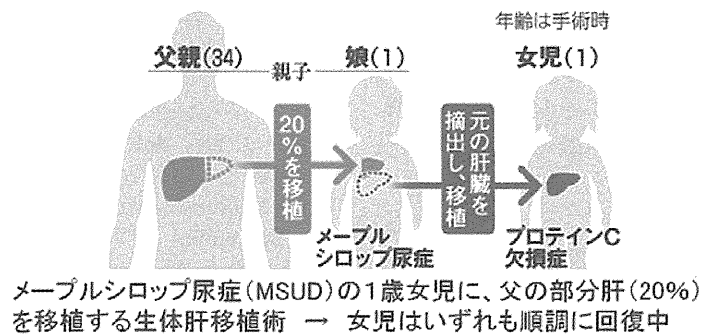
本研究班で診断した複合ヘテロ変異によるPC欠損症の23か月患児に、メープルシロップ尿症患者から摘出した肝を用いて世界初の生体ドミノ肝移植を実施した。新鮮凍結血漿の定期補充にもかかわらず電撃性紫斑を反復していた患者の血中PC値は正常値は正常化して症状も消失し、PC欠損症の根治療法が成功した。新しい治療選択肢を患者に提供可能にした点で意義深い。

D. 考察

私たちは小児の血栓性素因は、①PC欠乏症が最も多いこと、②これが新生児の電撃性紫斑病に先行する頭蓋内出血・梗塞として発症すること、を後方視的研究から明らかにし、遺伝子解析を積極的に行うことにより、③予想外に未診断例がいることを本研究班の活動により実証してきた。本年も1家系以上のペースで新規変異患者を同定し症例を集積した。新生児では胎児発症のperinatal stroke症例に、また乳児では重症感染や外科手術などによる後天的血栓症と考えられていた症例に、PROCヘテロ変異が確認された。患児の両親は、予想通り血

栓の既往がなく変異を保有していた。成人とは発症様式が異なる小児PC欠損症に焦点を絞って遺伝子解析を行うことにより、遺伝性血栓性素因家系を早期に効率よく診断できることが、研究班の実績から明らかになってきた。

今回、集積例のデータから年齢層別に設定した3つの抗凝固因子活性の下限値は、成人と異なる多様な発症様式をとる新生児（PC異常優位）、そして成人型深部静脈血栓症を早期発症するAYA世代（PC異常と日本人に多いPS異常優位）という日本の小児血栓症の特徴をよく表した。成人は診断時に3因子活性低下例の半数に変異が確認されない。今回設定した小児の下限値は低活性の半数弱に変異を確認することができ、成人の基準とほぼ同等の有用性を示した。一方、新生児の基準値設定は困難であった。胎児脳室拡大と多発性脳梗塞を来したPC変異例は、PC活性の低下が判別しにくいアジアに多い血栓性素因であることが最近海外から報告されている。成人でも活性値から遺伝子解析に進めることに躊躇する例がある。新生児特有のstroke（動脈性血栓）で発症した例を診断し得たことは、活性値から想定される変異保有者のアレル頻度が想定よりも高いことを示唆する。中心静脈栄養あるいは心臓外科手術などの新生児医療の進歩



MSUD児： 移植肝で α -ケト酸脱水素酵素複合体活性を補充
PC欠損児： 肝外(腎・筋肉など)で α -ケト酸脱水素酵素活性あり
国内ドミノ肝移植39例のうち、小児では初
2014年8月25日 笠原群生先生 成育医療センター/自治医大
<http://apital.asahi.com/article/news/2014082600003.html>

図1. 根治療法としての肝ドミノ移植 (成育医療センター 石黒ら文献8)

による後天性因子の変化が、水面下にあったヘテロ変異の血栓性素因リスクをあげつつあるのかもしれない。

研究班では、新生児例の早期診断のため、母からのスクリーニング(金子、福嶋ら)、活性測定法の検討(嶋、高橋ら)の検討を行った。落合と康らは、新生児の検査値の標準化を行い、凝固検査の基準値設定を行った。最近PC活性とPS活性が0.5未満の小児例に積極的に遺伝子解析を行うようになり、変異なし例が増加した。これらの多くは継続観察により、PC活性が上昇し、PS活性との乖離もみられなくなる。PC活性の上昇が遅れる、もしくは変動しやすい原因は不明であるが、このような例のPC成熟遅延乳児に感染などの後天性要因が加わり血栓発症に至る例があると想定される。新生児における症例を継続しこのようなslow starterと思われる血栓リスクについてさらに明らかにする必要がある。

今回、このような背景から、診断基準試案(表2)と重症度分類試案(表3)を作成し、班員内でのコンセンサスを得た。これを小児・新生児診療施設において検証して次年度の診断ガイドラインの基礎資料としたい。

一方、治療についても症例が集積されてきたが、前向き研究を開始するほどの情報が十分でない。班員の瀧らは実際に抗凝固療法を小児に行う場合の、治療中モニタリングについて研究を続けている。石黒らは、本研究班で診断したPC複合ヘテロ変異の児に、同ヘテロ変異を有する父からの肝移植が困難なため、ドミノ移植を成功させた。国内ドミノ移植で小児では初めてとなったこの肝移植がPC欠損症に行われた意義は大きい。補充療法を行う製剤を適正に使用し、患児に根治療法を行う方法を今後確立していくことが必要であろう。日本人小児を対象とした本研究の意義を実感させるものであった。

E. 結論

研究班では、これまで注目されなかった日本人小児の血栓症を細やかに解析する

ことにより、PC欠乏症の臨床的意義を明らかにしてきた。本年は、これらの成果をもとに初めて、成人とは独立した診断基準案と重症度分類案を提示することができた。さらにドミノ肝移植による根治療法の成功は診療ガイドラインのエビデンスとなった。試案の有用性を全国レベルで検討するとともに、症例をさらに集積して治療管理そして予防に関する試案作りのための情報収集を行う。

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. Ochiai M, Kinjo T, Takahata Y, Iwayama M, Kenji I, Ohga S, Kotaro F, Wake N, Tagichi T, Hara T: Survival and neurodevelopmental outcome of preterm infants born at 22-24 weeks of gestational age. *Neonatology* 105(2):79-84, 2014
2. Yamamura K, Takada H, Uike K, Nakashima Y, Hirata Y, Nagata H, Takimoto T, Ishimura M, Morihana E, Ohga S, Hara T: Early progression of atherosclerosis in children with chronic infantile neurological cutaneous and articular syndrome. *Rheumatology* 53(10):1783-7, 2014
3. Hoshina T, Nakashima Y, Sato D, Nishio 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* 20(2):128-30, 2014
4. Matsuoka W, Yamamura K, Uike K, Nagata H, Ohga S, Hara T: Tachyarrhythmia-induced cerebral sinovenous thrombosis in a neonate without cardiac malformation. *Pediatr Neonatol* 55(5):412-3, 2014
5. Maeba S, Hasegawa S, Shimomura M, Ichimura T, Takahashi K, Motoyama M, Fukunaga S, Ito Y, Ichiyama T, Ohga S: Successful treatment of corticosteroid with antiviral therapy for a neonatal liver failure with disseminated herpes

s simplex virus infection. Am J Perinatol 2014 (in press)

6. Okada S, Hasegawa S, Suzuki Y, Matsubara T, Shimomura M, Okuda M, Ichiyama T, Ohga S: Acute pericardial effusion representing the TNF- α -mediated severe inflammation but not the coronary artery outcome of Kawasaki disease. Scand J Rheumatol Oct. 29:1-6, 2014

7. Nogami K, Shinozawa K, Ogiwara K, Matsumoto T, Amano K, Fukutake K, Shima M. Novel FV mutation (W1920R, FVNara) associated with serious deep vein thrombosis and more potent APC resistance relative to FVLeiden. Blood. 2014 123(15): 2420-2428.

8. Matsunami M, Ishiguro A, Fukuda A, Sasaki K, Uchida H, Shigeta T, Kanazawa H, Sakamoto S, Ohta, Nakadate H, Horikawa R, Nakazawa A, Ishige M, Mizuta K, Kasahara M: Successful living domino liver transplantation in a child with protein C deficiency. Pediatr Transplant (in press)

9. 大賀正一、落合正行、石黒精、高橋幸博、瀧正志、嶋緑倫、金子政時、福嶋恒太郎、康東天 小児新生児血栓症研究班: 「遺伝性血栓症: 小児期における診断と治療の問題点」. 日本小児血液がん学会雑誌 51(5): 470-4, 2014

10. 大賀正一: 新生児の血栓止血異常症: 血友病と栓友病. 日本未熟児新生児学会雑誌 2015 (印刷中)

11. 大賀正一: 第15章「血液・腫瘍性疾患」播種性血管内凝固症候群 disseminated intravascular coagulation (DIC). 今日の小児治療指針第16版 2015 (印刷中)

2. 学会発表

1. Ochiai M, Matsushita Y, Kusuda T, Ichiyama M, Kitajima J, Inoue H, Tanaka K, Ihara K, Ohga S, Hara T: Blood chemistry and hematology reference intervals in preterm or low birth weight infants at birth. PAS and ASPR Joint Meeting 2014 May 3-6, 2014, Vancouver, Canada

2. Ichiyama M, Ohga S, Ochiai M, Tanaka K, Matsunaga Y, Kusuda T, Inoue H, Ichimura M, Takimoto T, Koga Y, Hotta T, Kang D, Hara T: Genetic screening of

protein C, protein S and antithrombin deficiency in pediatric thromboembolism. Pediatric Academic Societies (PAS) and Asian Society for Pediatric Research (ASPR) 2014 Joint Meeting, May 3 - 6, 2014. Vancouver, British Columbia, USA

3. Shimomura M, Ichimura T, Kittaka S, Mizutani M, Hasegawa S, Ohga S: Siblings with atypical HUS experienced in our hospital. Pediatric aHUS forum in Yamaguchi 2014, December 3, 2014, Ube, Yamaguchi, Japan

4. 大賀正一: プロテインC欠損症~早期診断と治療~第62回 日本輸血・細胞治療学会総会 共催セミナー5 奈良市、2014年5月15日

5. 大賀正一: 新生児の血栓症と血栓性素因 第24回日本産婦人科・新生児血液学会 ランチョンセミナー 横浜市、2014年6月13日

6. 大賀正一, 茨聡, 樺山知佳, 河井昌彦, 川口千晴, 沢田健, 高橋大二郎, 高橋幸博, 瀧正志, 長江千愛, 西久保敏也, 水上尚典, 白幡聡, 日本産婦人科・新生児血液学会新生児DIC診断・治療指針作成ワーキンググループ. 新生児DICの診断と治療-新しい指針の提案 補充療法の適応 第24回日本産婦人科・新生児血液学会 シンポジウム 横浜市、2014年6月13日

7. 長江千愛, 茨聡, 大賀正一, 樺山知佳, 河井昌彦, 川口千晴, 沢田健, 高橋大二郎, 高橋幸博, 瀧正志, 西久保敏也, 水上尚典, 白幡聡, 日本産婦人科・新生児血液学会新生児DIC診断・治療指針作成ワーキンググループ. 新生児DICの診断と治療-新しい指針の提案 新生児DICに対する遺伝子組換えトロンボモジュリン製剤の使用指針. 第24回日本産婦人科・新生児血液学会 シンポジウム 横浜市、2014年6月13日

8. 高橋大二郎, 茨聡, 大賀正一, 樺山知佳, 河井昌彦, 川口千晴, 沢田健, 高橋幸博, 瀧正志, 長江千愛, 西久保敏也, 水上尚典, 白幡聡, 日本産婦人科・新生児血液学会新生児DIC診断・治療指針作成ワーキンググループ. 新生児DICの診断と治療-新しい指針の提案 アンチトロンビン製剤の再評価. 第24回日本産婦人科・新生児血液学会 シンポジウム 横浜市、2014年6月13日

9. 川口千晴, 高橋幸博, 茨聡, 大賀正一, 樺山知佳, 河井昌彦, 沢田健, 高橋大二郎, 瀧正志, 長江千愛, 西久保敏也, 水上尚典, 白幡聡, 日本産婦人科・新生児血液

学会新生児DIC診断・治療指針作成ワーキンググループ. 新生児DICの診断と治療-新しい指針の提案 新生児DICの診断基準(案) 第24回日本産婦人科・新生児血液学会 シンポジウム 横浜市、2014年6月13日

10. 大賀正一: 小児の血栓症と血栓性素因～感染と止血のかかわり～. 第194回倉敷小児科専門医会 特別講演. 倉敷市、2014年7月23日

11. 大賀正一: 血友病と栓友病 ～診断と治療の問題点～. 第76回日本小児科学会宮崎地方会 特別講演. 宮崎市、2014年9月14日

12. 大賀正一: こどもの血栓症 ～血栓性素因を考える～. 宇部市小児科医会セミナー 宇部市 2014年9月16日

13. 大賀正一: 止血異常 小児診療のピットフォール. 第34回山口県小児外科研究会 特別講演 山口市 2014年9月25日

14. 大賀正一: 新生児の血栓止血異常症 第59回日本未熟児新生児学会・学術集会 教育講演 松山市 2014年11月11日

15. 大賀正一: 血栓症とその遺伝性素因 ～栓友病の早期診断をめざして～. 第25回山口血液疾患研究会 特別講演 山口市 2014年11月17日

16. 大賀正一: 小児の血栓性素因 ～感染と免疫の関わりから～. 第66回中国四国小児学会 教育講演 高知市、2014年11月22日

17. 大賀正一: 遺伝性血栓性素因 ～こどもと家族を守る～. 第14回和歌山Hemophilia Network 特別講演 和歌山市、2014年12月6日

18. 松岡若利、鶴池清、永田弾、山村健一郎、平田悠一郎、李守永、賀来典之、馬場晴久、中山秀樹、大賀正一、原寿郎: 発作性上室性頻拍による心原性ショックの後に発見された新生児脳静脈洞血栓症の1例 第24回日本産婦人科・新生児血液学会 横浜市、2014年6月13日

19. 市山正子、中村有香里、落合正行、石村匡崇、楠田剛、浦田美秩代、堀田多恵子、康東天、大賀正一、原寿郎: 胎児水頭症から診断された先天性プロテインCヘテロ接合体欠損症の新生児例. 第24回日本産婦人科新生児血液学会 横浜市、2014年6月13日

20. Nishimura A, Miyamoto S, Takada K, Satomi R, Matsumura Y, Terauchi M, Kajiwara M, Ohga S, Enomoto K, Ohta M. A congenital protein C deficiency boy who developed cerebral venous thrombosis after steroid therapy. 第76回日本血液学会学術集会 大阪市、2014年10月31日

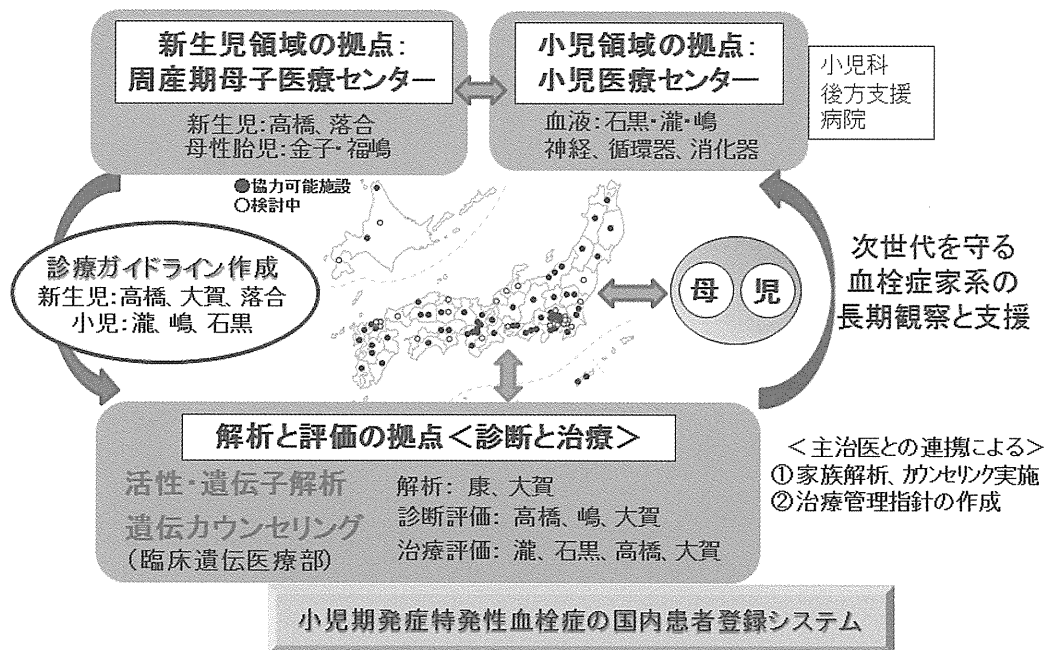
21. Sekiya Y, Okuno Y, Muramatsu H, Olfat I, Kawashima N, Narita A, Wang X, Xu Y, Hama A, Fujisaki H, Toshihiko I, Hasegawa D, Kosaka Y, Sunami S, Ohtsuka Y, Ohga S, Takahashi Y, Kojima S, Shimada A. JAK2, MPL, and CALR mutations in children with essential thrombocytopenia. 第76回日本血液学会学術集会 大阪市、2014年10月31日

22. 落合正行、金城唯宗、高畑 靖、岩山真理子、安部 猛、井原健二、大賀正一、福嶋恒太郎、加藤聖子、田口智章、原寿郎: 在胎週数22-24週で出生した早産児の死亡率、罹患率と予後～2000年から2010年までの単施設での比較～. 第67回九州小児科学会 大分市、2014年11月22-23日

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

付) 研究の流れ図

新生児・小児の特発性血栓症家系情報を集積し、
診断、予防と治療に関する診療指針による包括医療を行う



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

Ⅲ. 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）
「新生児・小児における特発性血栓症の診断、予防および治療法の確立に関する研究」
－ 分担研究報告書 －

小児遺伝性栓友病のスクリーニングに関する研究
～ 小児・周産期領域における3大抗凝固因子の遺伝子解析 ～

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

| | |
|--------|---------------------|
| 堀田 多恵子 | 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 |
| 古賀 結 | 九州大学病院検査部 技師 |
| 市山 正子 | 国立病院機構 九州医療センター 小児科 |

研究要旨

日本人小児における遺伝性血栓性素因(栓友病)の効果的スクリーニング法を確立するため、小児期発症のプロテイン S (PS)、プロテイン C (PC) 及びアンチトロンビン (AT) 欠乏症患者の表現型(活性値と臨床症状)と遺伝子型を解析した。2014 年は PC 欠乏 22 家系、PS 欠乏 4 家系および AT 欠乏 2 家系に遺伝子解析を行った。PROC 変異は複合ヘテロ 1 名、ヘテロ 2 名と変異なし 8 名、PROSI 変異は複合ヘテロ 1 名と変異なし 2 名、SERPINCI 変異はなし 1 名を確認した。PROC 複合ヘテロ変異は新生児電撃性紫斑病と頭蓋内出血梗塞、ヘテロ変異の 2 名(日齢 16, 4 歳)は感染に伴って発症した脳静脈洞血栓であった。PC 欠乏として解析した 70%以上は新生児(胎児期も含む)発症の頭蓋内病変であった。2011 年秋より集積した研究班の PC 欠乏症の遺伝子診断例は 37 名に、うち変異確定者は 13 名(44%)になった。年齢別 3 因子活性の下限基準値を定義し、20 歳以下の栓友病疑い 306 例を年齢層別に検討した。0-2 歳と 13-15 歳における低 PC 活性児の割合(各 45%、44%)は他の 2 因子活性の低下した児の割合(5-17%)より有意に高かった。7-12 歳の低 PC 活性児は低 PS 活性児の数と同じ割合(19%)で低 AT 活性児のそれ(1%)より有意に高かった。特発性血栓症と診断した 62 名における年齢層別患者割合は 3 因子間で異なり、PC 欠損症では 0-2 歳が 44%と最多をしめこの群に PROC 変異を 6 名同定し、PS 欠損症では 7-12 歳が 33%と多くこの群に PROSI 変異を 4 名同定した。3 因子が低活性であった各年齢層に同定された変異患児の割合には差がなかったため、この各年齢層に定義した下限基準値の有用性が示された。今後、さらに新生児における低 PC 活性の下限値について、同時測定による PS 活性比から検討する必要がある。

A. 研究目的

自然抗凝固因子であるプロテイン S (PS)、プロテイン C (PC) 及びアンチトロンビン (AT) の欠損症は遺伝性血栓性素因のうち、最も血栓塞栓症を発症するリスクが高い。日本人には、海外で高頻度だが当該リスクはより低い血液凝固第 V 因子ライデン (FVL) とプ

ロトロンビン多型 (PTvariant) がない。そのため日本人成人では PS 欠乏症が最も頻度の高い遺伝性血栓性素因である。これまで日本人小児では PC 欠乏症の頻度が高いことを示し、この発症様式が成人と異なることを示してきたが、稀少疾患であるため分子及び臨床疫学情報に乏しい。家族解析を進め、