

新規診断例を集積し、各因子活性から小児期においても、効果的なスクリーニングができる方法を検討した。

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で増幅し、ABI 3500xL Genetic Analyzer(ライフテクノロジー 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、*PROSI* (exon 1-15) と*SERPINC1*(exon 1-7) 解析も行った。健常成人保存血漿の±2SDを成人の基準範囲とし、<3SDを低下とした(Clin Biochem 2005;38:908-15)。

(倫理面への配慮)

遺伝子解析は倫理委員会承認(#232-02, #448-00)の同意書を取得し、末梢血白血球由来DNAを用いて行った。遺伝性血栓症と診断した患者家族も同意を得て家系内の解析を行い、必要に応じて遺伝カウンセリングを行った。

2. 新規診断例の家系解析

全国より研究班に診療に関する相談を受けた小児期発症栓友病疑い患者とその家系について、抗リン脂質抗体症候群などの続発性血栓症・凝固障害を除外し、PC, PS及びATの活性測定と遺伝子解析を行った。これまでの解析から、生後3か月までのとくにPCおよびPS活性値は再定義の必要性があると考えられたため、遺伝子解析の対象については、発症時の消費性凝固障害とビタミンK欠乏によるPCおよびPS活性への影響も考慮し、とくにPC/PS活性比(0.5)を目安として積極的に解析を行った。

2011年秋に本研究班の前身から行ってきた症例の集積を行った。また、2011年までに行ってきた後方視的症例を再検討し活性値からのスクリーニング案を提示した。

C. 研究結果

1. PC, PS及びAT欠損症例

2014年は、PC欠乏の診療に関して22家系、PS欠乏およびAT欠乏に関してそれぞれ4家系と2家系の相談を受けた。このうち3因子低下から、遺伝子解析に至った数はそれぞれ17、3および1検体であった。PC欠乏患児のうち、*PROC*変異を3名(複合ヘテロ変異1、ヘテロ変異2)に同定し、8名にエクソンとその近傍に変異のないことを確認した。PS欠乏家系に1名の*PROSI*変異を同定し、2名には変異のないことを確認した。*SERPINC1*変異家系には、1名に変異なしを確認した。

この*PROSI*変異は36歳の母で、3回目の妊娠を契機にPS活性低下と臨床診断され、今回の確定診断後に脳静脈洞血栓症が疑われて精査加療を要することになった。彼女の児3名は今後解析を予定している。この母は非妊娠時の血漿PS活性が10%と低く、複合ヘテロ接合変異(ex6.927A>G p.K196Q [PS-Tokushima], int14.2212-1G>A[splicing acceptor site])が同定された。このintron 14のsplicing acceptor site異常は新規変異であった。不妊症もなく今回発症までの妊娠分娩歴はG3P3で、不育症も明らかな血栓塞栓症も経験していなかった。

2. PC欠損症例

2014年に診療相談を受けたPC欠損家系において現在まで解析中を含む20歳未満23名の発症様式、PC及びPS活性、*PROC*変異の解析結果を表1に示す。17名(74%)は1生月までに起こった頭蓋内病変により本症を疑われた。この新生児例のうち5名(29%)は胎児期発症が示唆された。この新生児発症例のうちPC/PS活性比が<0.5を呈した3名と<0.5の2名いずれにも変異なしを確認した。変異を認めた3名のうち2名のPC/PS活性比は<0.5であったが、1名は0.85と高かった。電撃性紫斑病で発症した1名は複合ヘテロ接合変異を有し頭蓋内出血・梗塞が先行していた。ヘテロ変異の2名(16生日と4歳)は、それぞれ術後、重症RSV肺炎後に脳静脈洞血栓症を発症していた。

表1. 新生児及び小児PC欠乏症解析例 (2014)

年齢	性	周産期情報	初発の状況	PC・PS 活性(年齢)	PROC 変異	両親の解析
11日 新生児		胎児発症	側脳室拡大、脳梗塞、下垂体出血	42% 64%		
		胎児発症	左脳室拡大(34週)と新生児梗塞	24→85% 53→104%(1歳)		父母(PC77,89%,PS97,PS)
1月 男		胎児発症	胎児期脳梗塞(左MCA領域)	41% 85%(2月)	なし	
3歳 女		胎児発症	出血性梗塞(孔脳症)と新生児DIC	27% 36%(1日)	なし	
4歳 女		胎児発症	出血性梗塞によるWest症候群	16% 69%(9月)	なし	
3歳 男			出生時臍帯内血液凝固	34% 82%		
1歳 1日 女		29週,1096g	日齢0 左出血性梗塞	17% 34%		
1歳 1日 女		29週,874g	新生児DIC(重症), MD-twin1	13% 48%	なし	
25日 男			新生児DIC, MD-twin2	25% 39%	なし	
5日 男			日齢3のくも膜下・脳室内出血	19%	なし	
7日 女			新生児Poland症候群	30% 70%		
2月 女		38週,2640g	日齢7 左脳室内出血	24% 83%(27日)		
5月 男			日齢7 左脳室内出血(Ⅲ度)	24% 83%(27日)		父母(PC77,97%,PS89,71%)
16日 新生児 男			日齢10 脳炎と静脈洞血栓症	36% 56%(28日)		
26日 1歳 男		30週,1086g	脊髄髄膜瘤術後に静脈洞血栓症	14% 51%	ヘテロ変異	
			電撃性紫斑病,頭蓋内出血	<5% 86%	複合ヘテロ	父母兄ヘテロ(PC54,65,51%)
1歳 1歳 男			晩期循環不全	22% 41%	未	
			紫斑あり(一過性抗リン脂質抗体)	42%		
			敗血症に伴う電撃性紫斑病		なし	
1歳 4歳 男		異常なし	母PC欠損症疑いで未発症	32%(2月)→84%		
9歳 女			RSV肺炎後の上矢状静脈洞血栓	62% 73%	ヘテロ変異	父ヘテロPC83%PS112%
13歳 男			DVT(総腸骨大腿静脈)と肺血栓塞栓	139% 116%		
			TIA 右不全麻痺	46% 76%	なし	

3. 年齢別3因子活性値によるスクリーニング

これまでの症例集積をもとに20歳未満の各年齢別に設定した3因子活性下限値(表2)の有用性について検討した。

表1. 年齢別各因子活性の下限値の定義

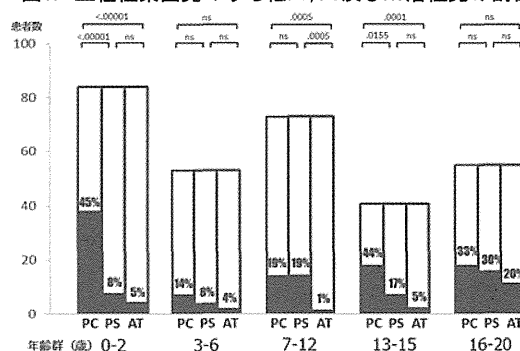
年齢	PC	PS	AT
0-3か月	<45% (a)	<42% (a)	<52% (b)
3か月-2歳	<64% (c)	<51% (c)	<52% (b)
3-6歳	<64% (c)	<51% (c)	<68% (c)
7-20歳	<75% (d)	<60% (d)	<80% (d)

成人下限活性値(PC 75%, PS 60%, AT80%)の
a:60%, b:65%, c:85%およびd:100%未満に相当する活性値

血栓性素因解析をうけた20歳までの306名のうちPC, PS及びAT活性低下を122名に確認した。このうち二次性要因を除外して“特発性血栓症”と診断された62名にそれぞれ遺伝子解析を行い18名に変異を同定した。

この血栓性素因解析対象者の各年齢群における血漿3因子活性低下者の割合を図1に示す。0-2歳が84名と最も多く、7-12歳が73名とこれに続いた。0-2歳と13-15歳ではPC活性低下者の割合が、他の2因子低下者の割合に比し高かった(図1)。7-12歳におけるPC活性低下者はPS活性低下者と同じ19%で、AT活性低下者(1%)より高かった。

図1. 血栓性素因児のうち低PC, PS及びAT活性児の割合

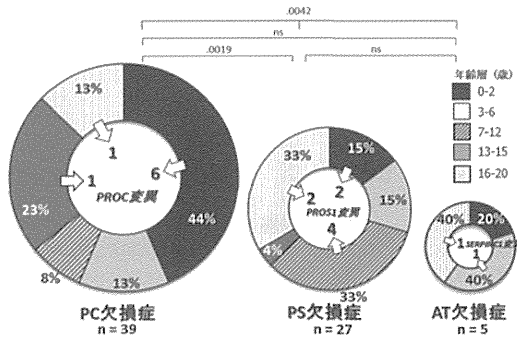


次に3因子解析を行った特発性血栓症(62名)のPC, PS及びAT欠損症患者の年齢層の分布を図2に示す。患者数はPC(39), PS(27), AT欠損症(5)の順に多かった。年齢層の割合は、PC欠損症では0-2歳(44%)が最も高く、7-12歳(23%)がこれに続いた。PS欠損症では7-12歳と16-20歳が各33%とが最も高かった。AT欠損症では13-15歳と16-20歳が各40%と最も高かった。年齢層の割合の分布は、PC欠損症とPS欠損症では異なり、また3欠損症間でも異なっていた。

変異同定者は、PC欠損症では0-2歳が6名と最も多く、PS欠損症では7-12歳が4名と最も多かった。この年齢層別の変異者数の分布は統計学的に有意な差に至らなかった。

また、各年齢層に同定された変異者の割合の分布はPC欠損症とPS欠損症の間で有意差はなかった。AT欠損患者は少なく、他の2因子との適切な比較解析は行えなかった。

図2. 特発性血栓症児の年齢分布と遺伝子変異者数



D. 考察

今回私たちが2014年に検討した小児遺伝性血栓症疑い例を発端とした解析は28家系であった。その約80%はPC欠損症で、さらにその3/4は新生児発症であった。これには、胎児発症例が約30%をしめ、現在も遺伝子解析を継続中である。

この1年間の解析でも、①小児遺伝性血栓症は新生児PC欠損症患者が大多数を占める、②発症様式は頭蓋内出血・梗塞、脳静脈洞血栓症による頭蓋内病変でこれが電撃性紫斑病に先行する、③胎児発症が一定数ある、④ヘテロ変異者は手術侵襲、感染などの誘因を契機に新生児期をこえて、ischemic stroke (脳静脈洞血栓症を含む)などの血栓塞栓症を起こす、ことが示された。この成人と明確に異なる臨床像は、“小児・新生児PC欠損症”を血栓性素因ではなく“栓友病”の疾患概念で捉える臨床的重要性を提示するものである。

本研究班では積極的な遺伝子解析を実施し、効率的な遺伝子スクリーニングを行うために設定した活性下限値の有用性を評価した。年齢を層別化して行った検討では、2歳までの乳児期と中学生におけるPC低下患者の割合が有意に高く、それがいずれの年齢層でも約半数弱にみられること、そして小学生の患児にはPCとPS低下がATより多く、

いずれも約20%にみられること、が明らかとなった。さらに、この基準値を用いたとき、変異患者数の活性低下患者数に占める割合(変異同定率)のばらつきが年齢層間で確認されなかった。このことは、この活性値で判断した低下患者数に応じて、変異者が確認されることを示す。つまり、活性下限値のスクリーニング効率の有用性を示唆することになる。

変異者の絶対数は、PROC変異では0-2歳が6名と最多、PROSI変異では7-12歳が4名と最多で、当該年齢層の活性低下者にしめる変異保有者の割合は35%と44%であった。血栓塞栓症の成人に現在の基準値でスクリーニングするとPS活性低下の約半数に変異が確認される。このことは7-12歳のPS低下患者を今回のように成人の活性値でスクリーニングしてもよいことが示唆される。0-2歳児に設定したPC活性下限値は35%と有る程度の有用性が証明されたが、成人(あるいは7歳以上のPS活性下限値)と同程度の約50%のスクリーニング効率を持たせるにはさらに工夫が必要であることを示す結果であろう。

0-2歳群のPC活性の基準値設定には、表1に示すとおり、新生児の生理的活性上昇率を考慮しなくてはならない。新生児特有の発症誘因(仮死など)、また1歳までの活性上昇速度のばらつき(成熟のslow starter)などを明らかにする必要がある。また、表1の結果から、変異検出率を高めるPC/PS活性比の設定にはとくに2週未満の健常検体との十分数の比較検討が必要であることが伺われた。

E. 結論

小児遺伝性血栓症は、①頭蓋内病変で発症する新生児PC欠乏症と②7歳以降の若年発症成人型PS欠損症あるいはAT欠損症に分けた疾患概念として捉える必要がある。新生児発症PC欠乏症のperinatal strokeにおける重要性を明らかにするため、今後も症例集積を重ね、本症の効率的診断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. 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, Nishii 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 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. 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
8. 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)
8. 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 2014 (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, Ishimura 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、鵜池清、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

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）
「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 －

早産・低出生体重児の出生時血液検査基準範囲の作成

研究分担者

落合 正行	九州大学病院総合周産期母子医療センター 助教講師
石村 匡崇	九州大学大学院医学研究院・成長発達医学 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
康 東天	九州大学大学院医学研究院・臨床検査医学 教授

研究協力者

原 寿郎	九州大学大学院医学研究院・成長発達医学 教授
------	------------------------

研究要旨

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。

A. 研究目的

本邦の周産期医療は世界トップレベルの救命率を誇るが、体が小さく未熟な新生児の特殊性ゆえに臨床研究が進みにくい。そこで、新生児・小児の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。

B. 研究方法

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、10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。

(倫理面への配慮)

本研究は当院(22-131)および関連施設のIRBの承認を受けており、UMIN-CTR(000083)臨床試験に登録している。

C. 研究結果

2010年4月から2013年3月までの研究期間で3189例のハイリスク新生児が登録され、2709例で基準範囲を求めた。

ほとんどの項目で性差は認めなかった。在胎週数や出生体重に比例して増加する項目(総蛋白；図1、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、クロール；図2等)を認めた。

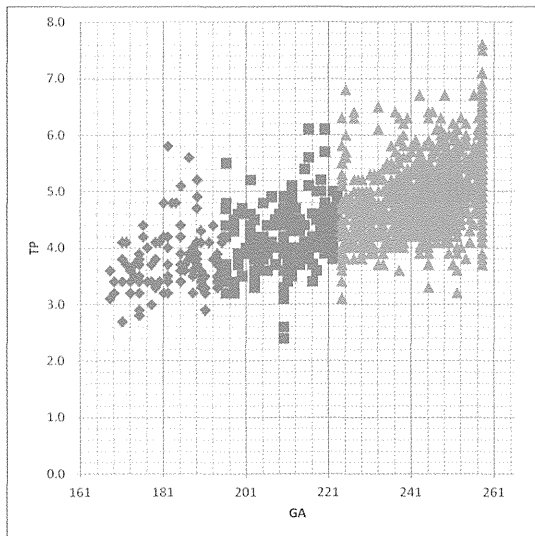


図1；出生時の総蛋白値(縦軸)と在胎週数(横軸)の散布図

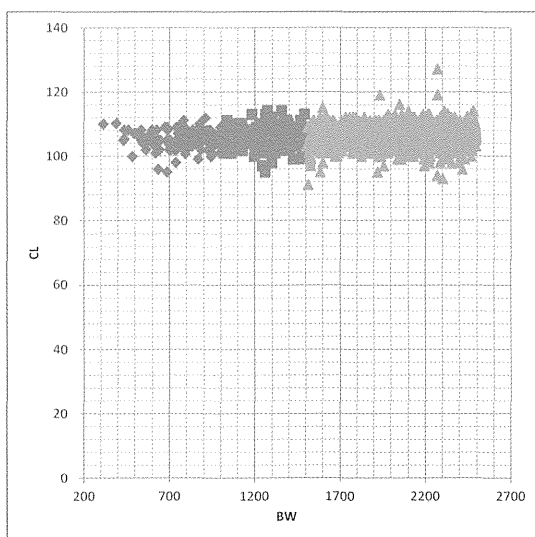


図2；出生時の血清クロール値(縦軸)と出生体重(横軸)の散布図

D. 考察

凝固線溶因子の測定法は施設間で標準化されていないため、本研究では基準範囲を求めることができなかった。しかしながら、肝臓で合成される総蛋白やアルブミン値では、性差はなく、在胎週数と出生体重に依存していた。凝固線溶因子においても同様の傾向が推測される。散布図において外れ値が散見されている。これらの症例の臨床背景を解析することで、肝臓における合成や代謝が亢進、あるいは低下する因子が求められ

る。特発性(二次性)血栓症の病態解明の一助となる可能性がある。

E. 結論

早産児・低出生体重児の診療や臨床研究の基礎となる出生時の血液検査基準範囲を設定した。

F. 研究発表

1. 論文発表

本研究の成果は投稿準備中である。

1. Ochiai M, Kinjo T, Takahata Y, Iwayama M, Abe T, Ihara K, Ohga S, Fukushima K, Kato K, Taguchi T, Hara T. Survival and neurodevelopmental outcome of preterm infants born at 22–24 weeks of gestational age. *Neonatology* 2014;105:79–84.

2. Yamada T, Kubota T, Nakamura M, Ochiai M, Yonezawa M, Yano T, Kawashiri T, Egashira N, Hara T, Masuda S. Evaluation of teicoplanin concentrations and safety analysis in neonates. *Int J Antimicrob Agents*. 2014 Aug 20.S0924–8579(14)00239–8.

3. Fujiwara A, Fukushima K, Inoue H, Takashima T, Nakahara H, Satoh S, Ochiai M, Hara T, Shimokawa M, Kato K. Perinatal management of preterm premature ruptured membranes affects neonatal prognosis. *J Perinat Med*. 2014 Jul;42(4):499–505.

4. 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): 25–26, 2013

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

2. Ichiyama M, Ohga S, Ochiai M, Tanaka K, Matsunaga Y, Kusuda T, Inoue H, Ishimura M, Takimoto T, Kusuda T, Koga Y, Hotta T, Kang D, Hara T: Genetic Screening of Protein C, Protein S and Antithrombin Defficiency in Pediatric Thromboembolism. PAS and ASPR Joint Meeting 2014 May 3-6, 2014 Vancouver

3. Ochiai M; Survival and neurodevelopmental outcome of preterm infants born at 22-24 weeks of gestational age. The 25th FISP/M August 30, 2014 Fukuoka

4. 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・新生児血液学会学術集会 2014年6月13～14日 横浜市

5. 市山正子、田中幸一、中村有香里、楠田剛、落合正行、湯元康夫、福嶋恒太郎、原寿郎. 胎児水頭症で発症した先天性プロテインC欠損症のヘテロ変異例. 第50回日本周産期・新生児医学会 2014年7月13～15日 浦安市

6. 市山正子、落合正行、檜崎亮、井上普介、楠田剛、高野由紀子、曳野俊治、佐藤和夫. 新生児期に発症した日本児先天性プロテインC欠損症の臨床像. 第59回日本未熟児新生児学会 2014年11月10-12日 松山市

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

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）
「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 －

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

研究分担者

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

研究要旨

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、必要に応じてプロテインC、プロテインSの活性および抗原量、アンチトロンビンⅢ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Fetal vessel thrombosisのみられた児の予後も追跡していく予定である。

A. 研究目的

ヘテロ変異を有する両親の多くは未発症であるが、妊娠を契機に血栓症を引き起こすことも考えられる。そこで、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。

（倫理面への配慮）

本研究は、後方視的研究であり、医学的な見地から測定の意義を考え、必要性がある場合は妊婦への説明後に採血した。結果の公表については、匿名とし、本人同定ができないように配慮することで、妊婦の同意を得た。

B. 研究方法

平成26年に宮崎大学附属病院産婦人科で管理し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の母体、母体合併症および既往として、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、必要に応じてプロテインC、プロテインSの活性および抗原量、アンチトロンビンⅢ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を収集し、血栓性疾患の発症に関して経過を追跡した。

C. 研究結果

同期間に、257例の妊婦を当大学病院で管理した。この内、双胎19組（二絨毛膜二羊膜性双胎7組、一絨毛膜二羊膜性双胎11組、一絨毛膜一羊膜性双胎1組）、品胎1組を含んでいる。妊婦および新生児の臨床背景を表1に示す。

表1. 母体・新生児の背景

年齢 (歳)	32 (18-46)
分娩週数 (週)	38 (22-41)
初産婦数	125
経膣：帝切	122：135
出生体重 (g)	2702(480-4172)

注：数値：中央値(最小値-最大値)

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の母体、母体合併症および既往として、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リスク因子として、母集団から抽出した。

表2. リスク因子

リスク因子	対象数
妊娠合併症	8
重症妊娠高血圧腎症	5
胎盤早期剥離	3
母体既往・合併症	4
脳梗塞	2
抗SS-A抗体陽性	1
AVM	1
2親等以内の家族歴	5
脳梗塞	4
心筋梗塞	1 (兄)
胎児・新生児	24
子宮内胎児発育遅延	24

注：複数のリスク因子保有例あり。

表2に示すようなリスク因子を持つ妊婦35名(13.6%)を抽出した。

次に妊娠中のプロテインC、プロテインSの活性および抗原量、アンチトロンビンⅢ活性について検討した。

表3. 妊娠中の検査値

	ATⅢ	PS 抗原量	PS 活性	PC 抗原量	PC 活性
1	94	42	28	133	105
2	NA	46	28	107	79
3	NA	47	41	111	82
4	NA	51	14	128	104
5	96	52	38	97	80
6	NA	63	45	136	107
7	NA	64	15	113	91
8	NA	69	45	96	84
9	NA	69	56	143	122
10	NA	80	48	128	102
11	91	83	NA	96	NA
12	102	95	97	87	82
13	81	NA	NA	NA	NA
14	82	NA	NA	NA	NA
15	85	NA	NA	NA	NA
16	102	NA	NA	NA	NA
17	85	NA	NA	NA	NA
18	86	NA	NA	NA	NA
19	102	NA	NA	NA	NA
20	78	NA	NA	NA	NA
21	104	NA	NA	NA	NA
22	93	NA	NA	NA	NA
23	104	NA	NA	NA	NA
24	75	NA	NA	NA	NA

35名中24名に、妊娠中のプロテインC、プロテインSの活性および抗原量、アンチトロンビンⅢ活性のいずれかの検査が施行されていた。妊娠中に異常値を示した妊婦においても、妊娠後には正常値を示した。

35名の妊婦の児の予後を1ヶ月健診まで厳重にフォローした結果、頭蓋内出血等のエピソードはみられなかった。

D. 考察

我々の施設は、宮崎県の総合周産期医療センターであり、県内のハイリスク妊婦・ハイリスク新生児の管理を行っている。そのような施設において特発性小児血栓症児およびその家系のスクリーニングを母体に係る複数のリスク因子から試みた。リスク因子を有する妊婦は全体の約14%であった。今回の検討では、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。この原因として、本疾患の希少性、児のフォロー期間の短さがあるものと思われる。

宮崎県においては、県内の2次・3次周産期施設の母体および新生児を担当する医師からなる死亡・神経学的予後不良症例に関する症例検討会を年に2回開催している。この中でも、特発性小児血栓症児およびその家系が疑われる症例はなかった。

全ての母体および新生児を対象としたスクリーニングは非効率的であると考えられるが、我々の方法の妥当性も今回の検討では、明らかにはできなかった。

今後の方針として、継続してハイリスク母体をリストアップしていく予定である。また、ハイリスク母体の胎盤の組織学的所見で、fetal vessel thrombosisの所見を得られることがある。この所見のみられる児の中に予後不良症例がある。この点にも注目して、今後検討症例を増やしていく予定である。

E. 結論

特発性小児血栓症児およびその家系のスクリーニングを母体に係る複数のリスク因子から試みた。リスク因子を有する妊婦は全体の約14%であった。今回の検討では、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。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
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）
「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 －

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

研究分担者

嶋 緑倫

奈良県立医科大学小児科 教授

研究要旨

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について検討した。抗凝固因子（活性型プロテインC、アンチトロンビン、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。

A. 研究目的

栓友病は先天性の遺伝性血栓症で、プロテインC(PC)、プロテインS(PS)、アンチトロンビン(AT)の欠乏が主な病因である。これらの疾患の診断はそれぞれの抗凝固因子の測定や遺伝子解析による。しかしながら、それぞれの測定値は臨床的重症度を必ずしも反映しない。また、診断まで時間を費やすことも多い。したがって、栓友病の治療管理上、血栓傾向を評価する凝固機能測定法の確立が望まれる。トロンビン生成測定法は代表的な包括的凝固機能測定法であるが、*in vivo*では凝固系と線溶系が連動していることから、これら両反応系を評価できることが望ましい。昨年度は、栓友病の凝固機能を包括的に評価するためにトロンビンおよびプラスミンを同時に定量的に評価できる測定系の確立を報告した。今年度の分担研究は、トロンビン・プラスミン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について検討した。

B. 研究方法

トロンビン・プラスミン生成試験：本法は、

組織因子(TF)、合成リン脂質(PL)、組織プラスミノゲンアクチベータ(tPA)をトリガー試薬とし、血漿とCaCl₂を添加してトロンビンとプラスミンが同時に生成する。トリガー試薬の血漿中の最終濃度はTF 1 pM, PL 4 uM, tPA 3.3nMに調整した。生成された両者を蛍光発色基質法で測定する。得られた波形を一次微分して、波形からはLag time、Peak height、Time to peak、EP(総生成量)の各パラメータが得られる。この反応の際、抗凝固因子である活性型PC(APC)、アンチトロンビン(AT)、トロンボモジュリン(TM)をそれぞれCaCl₂添加前に添加して、トロンビン生成およびプラスミン生成への影響について検討した。今回は正常プール血漿における抗凝固因子の影響について、添加濃度の条件設定を行い検討した。

(倫理面への配慮)

被験者の血液採取にあたり、informed consentについて厳格に行い同意を得て、得られる個人情報については各種法令等遵守し、個人情報等保護に十分配慮し実験を行った。

C. 研究結果

正常血漿でのトロンビン・プラスミン生成は従来、Matsumotoらがすでに報告している同様の生成パラメータを示した。さらに、抗凝固因子のAPC、AT、およびrTMをそれぞれ添加し、その影響を本法にて施行した。いずれの抗凝固因子の過剰な存在も、トロンビン生成および引き続くプラスミン生成を濃度依存性に抑制した。これら濃度依存性反応から検討した本法の至適濃度はAPC 20 nM、AT 2.0 U/ml、rTM 400 nM(最終濃度)であった。

D. 考察 E. 結論

従来 of 凝血学的評価は凝固反応系、線溶反応系を別々に評価していたが、実際の*in vivo*ではこれら両反応系は協働して進行しているとされる。凝固系と線溶系の協働作用を評価する目的でトロンビン・プラスミン生成測定系を我々はすでに確立している。本法は出血性素因を包括的に評価する上に極めて有用な評価法であり、本研究では、血栓症の診断への本法の臨床的応用としての基礎実験である。今回の検討から、抗凝固因子(APC、AT、rTM)の過剰な存在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。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Matsui H, Takeda M, Soejima K, Matsunari Y, Kasuda S, Ono S, Nishio K, Shima M, Banno F, Miyata T, Sugimoto M. Contribution of ADAMTS13 to the better cell engraftment efficacy in mouse model of bone marrow transplantation. *Haematologica*. 2014 99(10): e211-213.
2. Matsui H, Fujimoto N, Sasakawa N, Ohinata Y, Shima M, Yamanaka S, Sugimoto M, Hotta A. Delivery of full-length factor VIII using a piggyBack transposon vector to correct a mouse model of hemophilia A. *PloS One*. 2014 9(8): e104957.

3. Muto A, Yoshihashi K, Takeda M, Kitazawa T, Soeda T, Igawa T, Sampei Z, Kuramochi T, Sakamoto A, Haraya K, Adachi K, Kawabe Y, Nogami K, Shima M, Hattori K. Anti-factor IXa/X bispecific antibody ACE910 prevents joint bleeds in a long-term primate model of acquired hemophilia A. *Blood*. 2014 124(20):3165-3171.

4. Matsumoto T, Nogami K, Shima M. Coagulation function and mechanisms in various clinical phenotypes of patients with acquired factor V inhibitors. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2014 12(9): 1503-1512.

5. Ogiwara K, Nogami K, Matsumoto T, Shima M. Tissue factor pathway inhibitor in activated prothrombin complex concentrates (sPCC) moderate the effectiveness of therapy in some severe hemophilia A patients with inhibitor. *International Journal of Hematology*. 2014 99(5):577-587.

6. 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.

G. 知的財産権の出願・登録状況、参考文献

研究協力者

奈良県立医科大学小児科学教室：
野上恵嗣、橋本直樹、松本智子

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 －

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

分担研究者

瀧 正志 聖マリアンナ医科大学小児科学 教授、
 聖マリアンナ医科大学横浜市西部病院小児科 部長

研究協力者

山下 敦己 聖マリアンナ医科大学小児科
森 美佳 聖マリアンナ医科大学小児科
長江 千愛 聖マリアンナ医科大学小児科
足利 朋子 聖マリアンナ医科大学横浜市西部病院小児科

研究要旨
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学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学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。

A. 研究目的

近年血栓症の治療および予防薬として抗 Xa 阻害薬が広く使用されるようになった。抗 Xa 阻害薬はトロンビンに対する直接的な阻害作用が少ないため出血の危険性が低いとされているが、出血性合併症は決して皆無とは言えない。しかしながら、従来の凝固時間法による薬効モニタリングは困難とされ、現時点で有効な凝血学的モニタリング法は確立されていない。そこで我々は、抗 Xa 阻害薬使用時の適切な凝血学的モニタリング法について検討するため、トロンビン生成能、凝固波形解析を用いて抗 Xa 阻害薬添加時の凝固能の変化について検討した。

B. 研究方法

健常成人9名から得られた乏血小板血漿（2回遠心、1800g、15分間）に各濃度のRivaroxaban、Apixabanを添加し、APTT、トロンビン生成能、凝固波形解析より得られる最大凝固加速度を測定した。トロンビン生成能は、トロンビンの総生成量を表すETP(Endogenous thrombin potential)で評価した。各薬剤添加時の凝固時間およびETP

の変化率(投与後/投与前)を求め、それぞれの変動係数(CV)を比較した。次に各薬剤添加によるETPの変化と最大凝固加速度との相関関係について検討した。ETPの変化は、添加後のETP値を添加前のETP値で除して100を掛けた値であるResidual ETPで表した。

(倫理面への配慮)

本研究の実施に関しては、聖マリアンナ医科大学の生命倫理委員会で承認された(承認番号 第1210号)。

C. 研究結果

Rivaroxaban添加により、APTTは濃度依存性に延長し、ETPは濃度依存性に低下した。両者のCV値を比較すると、ETPのCV値はAPTTのCV値に比べ大きい傾向が認められた(表1)。

表1. Rivaroxaban添加時のAPTTおよびETPの変化率

	Rivaroxaban							
	62.5 μg/L		125 μg/L		250 μg/L		500 μg/L	
	Mean±SD	CV(%)	Mean±SD	CV(%)	Mean±SD	CV(%)	Mean±SD	CV(%)
APTT	1.16±0.01	1.2	1.25±0.03	2.3	1.41±0.05	3.9	1.83±0.14	7.5
ETP	0.67±0.10	14	0.52±0.14	27	0.32±0.12	37	0.15±0.09	62

※変化率=添加後値/添加前値

(n=9)

Apixaban添加によるAPTTの延長効果は極めて僅かであったが、ETPは濃度依存性に低下した。両者のCV値を比較すると、ETPのCV値はAPTTのCV値に比べ大きい傾向が認められた(表2)。

表2. Apixaban添加時のAPTTおよびETPの変化率

	Apixaban							
	50ng/ml		100ng/ml		200ng/ml		400ng/ml	
	Mean±SD	CV(%)	Mean±SD	CV(%)	Mean±SD	CV(%)	Mean±SD	CV(%)
APTT	1.16±0.01	1.3	1.10±0.02	1.4	1.15±0.02	1.6	1.21±0.03	2.2
ETP	0.72±0.08	11	0.60±0.10	17	0.47±0.10	20	0.36±0.08	24

※変化率=添加後値/添加前値

(n=9)

各薬剤添加時のETPの変化率と最大凝固加速度の変化率の相関関係について検討したところ、Rivaroxaban添加時においては両者の間に有意な正の相関関係が認められた(図1、 $r=0.81$ 、 $p<0.01$)。

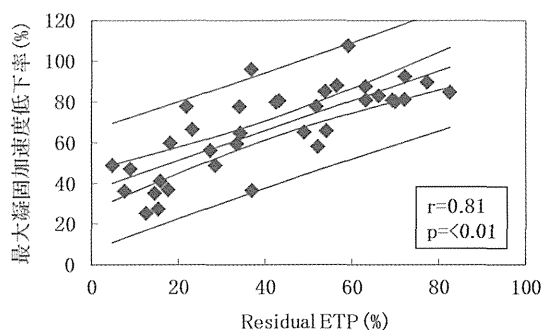


図1. Rivaroxaban添加時の最大凝固加速度低下率とResidual ETPとの相関関係

Apixaban添加時においては両者の間に有意な正の相関関係が認められたが、最大凝固加速度の変化が乏しく、その相関係数は低値であった(図2、 $r=0.43$ 、 $p=0.01$)。

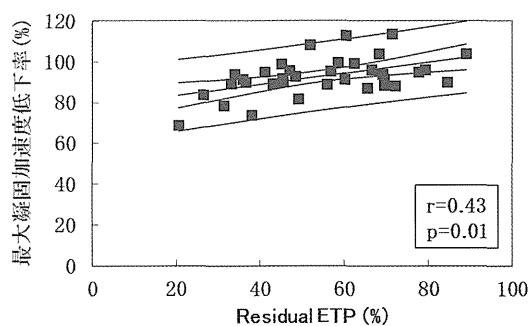


図2. Apixaban添加時の最大凝固加速度低下率とResidual ETPとの相関関係

D. 考察

薬剤添加時のETP変化率のCV値はいずれの薬剤においても大きく、これは両薬剤のトロンビン生成能抑制効果には大きな個人差が存在することを示唆する成績と考えられた。

Rivaroxaban添加による最大凝固加速度の変化率はETP変化率と正の相関関係にあり、最大凝固加速度はRivaroxaban添加時の個々に異なるトロンビン生成能抑制効果を鋭敏に捉えうる検査法である可能性が示唆された。しかし、Apixabanにおいては薬剤添加による最大凝固加速度の変化率が乏しく、凝固波形解析をApixabanの凝固モニタリング法として応用することは困難と考えられた。

今回我々は凝固波形解析としてAPTT系の最大凝固加速度について検討したが、今後PT系の凝固波形解析の有用性についても検討したいと考えている。

E. 結論

抗Xa阻害薬が凝固機能検査に与える影響は薬剤毎に異なるため、凝固モニタリング法を確立するためには各薬剤の特徴を明らかにし、その特徴を活かした最適な方法を応用していく必要がある。今回検討した2薬剤については、APTT系の凝固波形解析はRivaroxabanについては凝固モニタリング法として応用できる可能性があるが、Apixabanについて応用することは困難である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 鈴木典子、山崎 哲、辻村浩司、高山成伸、瀧 正志：自動分析によるフォン・ヴィレブランドファクターリストセチンコファクター活性(VWF:RCo)測定およびフォン・ヴィレブランドファクター抗原(VWF:Ag)測定の評価、日本検査血液学会雑誌、15(3):311-318, 2014
- 山下敦己、瀧 正志：von Willebrand病、内科、114(2):259-261, 2014
- 瀧 正志：新生児・小児の血液学的検査—凝固・線溶検査、検査と技術、42(12):

1308-1311、2014

4. 瀧 正志：血友病、小児科、55(11)：1681-1686、2014

2. 学会発表

国内学会

1. 足利朋子、長江千愛、森美佳、山下敦己、瀧 正志：青年期に定期補充療法を中断した重症血友病患者の臨床経過、第117回日本小児科学会、2014.4

2. 長江千愛、足利朋子、山下敦己、森美佳、吉川喜美枝、山本仁、瀧 正志：血友病患者における新生児期の出血に関する検討、第117回日本小児科学会、2014.4

3. 足利朋子、長江千愛、森美佳、山下敦己、瀧 正志：軽症および中等症血友病患者における止血管理の問題点、第36回日本血栓止血学会、2014.5

4. 山下敦己、長江千愛、森美佳、足利朋子、秋田美恵子、熱海千尋、山田浩史、長谷川泰弘、瀧 正志：脳梗塞を発症したvon Willebrand病type 2Aの一例、第36回日本血栓止血学会、2014.5

5. 瀧 正志：QOL調査結果から考える血友病治療の方向性、第7回血友病理学療法研究会 2014.6

6. 竹内 淳、吉岡範人、山下敦己、田村みどり、鈴木 直、瀧 正志：von Willebrand病を合併した妊婦の1例、第24回日本産婦人科・新生児血液学会、2014.6

7. 長江千愛、茨聡、大賀正一、横山知佳、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：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、2014.6

8. 川口千晴、高橋幸博、茨聡、大賀正一、横山知佳、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：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、2014.6

9. 高橋大二郎、茨聡、大賀正一、横山知佳、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：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、2014.6

10. 大賀正一、茨聡、横山知佳、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：補充療法の適応、第24回日本産婦人科・新生児血液学会、2014.6

11. 山下敦己、長江千愛、森美佳、足利朋子、秋田美恵子、山崎哲、高山成伸、瀧 正志：トロンビン生成試験および凝固波形解析を用いた抗Xa阻害薬の抗凝固効果の解析、第15回第日本検査血液学会、2014.7

12. 山崎哲、鈴木典子、山崎法子、高山成伸、山下敦己、瀧 正志：APTT試薬評価の統一に向けたパネル血漿の利用とリーダーチャートによる評価、第15回第日本検査血液学会、2014.7

13. 森 美佳、長江千愛、足利朋子、山下敦己、慶野 大、大山 亮、森本瑞穂、森 鉄也、木下明俊、瀧 正志：緊急時に凝固因子製剤の添加試験にて診断・治療した重症血友病Bの1例、第70回神奈川血液研究会、2014.9.6

14. 吉田賢弘、濱崎祐子、原田涼子、濱田陸、石倉健司、幡谷浩史、長江千愛、瀧正志、本田雅敬：後天性第XI因子インヒビターを認めたSLEの1例、第44回日本腎臓病学会東部学術集会、2014.10.25

15. 瀧 正志：我が国の血友病患者におけるQOLの現状と今後の治療の方向性、76th annual meeting of the Japanese Society of Hematology, 2014.10.31

16. 瀧 正志：わが国の血友病臨床研究の進捗状況、第56回日本小児血液・がん学会学術集会、2014.11.28

17. 長江千愛、村上由則、大平勝美、小野織江、小島賢一、白幡聡、竹谷英之、立浪忍、牧野健一郎、松本剛史、森戸克則、吉川喜美枝、和田育子、瀧 正志：わが国の血液凝固異常症の小児患者におけるQOL、第56回日本小児血液・がん学会学術集会、2014.11.29

18. 足利朋子、長江千愛、森美佳、慶野大、

山下敦己、森鉄也、木下明俊、瀧正志FVIII/VWF製剤を用い救済免疫寛容導入療法を行ったインヒビター保有血友病Aの2症例の経験、第56回日本小児血液・がん学会学術集会、2014.11.29

19. 立浪 忍、三間屋 純一、白幡 聡、大平勝美、花井十伍、桑原理恵、秋田美恵子、瀧正志：HIV感染血友病における抗HIV薬の未使用例について、第28回日本エイズ学会、2014.12.3

国際学会

1. M. Taki, S. Tatsunami, J. Mimaya, M. Akita, Y. Nishina, J. Hanai, K. Ohira, A. Shirahata: Multivariate analysis of the occurrence of intracranial hemorrhage among adult hemophiliacs in Japan, XXXI International Congress of the WFH, 2014.5
2. M.Taki, H. Hanabusa, K. Fukutake, T. Matsushita, K. Nogami, A. Shirahata: Real-life clinical experience of 117 previously untreated patients (PUPs) treated with antihemophilic factor (recombinant), plasma/albumin free method in Japanese post authorization safety surveillance, XXXI International Congress of the WFH, 2014.5
3. K. Fukutake, Hideji Hanabusa, Masashi Taki, Tadashi Matsushita, Keiji Nogami, Akira Shirahata, Mutsumi Shiraishi and ADVATE J-PASS Study group: What we learn from data of a prospective post-authorization safety surveillance study in 384 hemophilia A patients with antihemophilic factor (recombinant) plasma / albumin free method demonstrates safety and efficacy in Japan, XXXI International Congress of the WFH, 2014.5
4. K. Amano, K. Fukutake, H. Hanabusa, M. Taki, T. Matsushita, M. Shima, M. Sakai, H. Yamaguchi, T. Karumori: Evaluation of the safety and efficacy of recombinant factor IX (nonacog alfa) in Japanese patients with hemophilia B - The second interim analysis of 304 patients in post marketing surveillance study -, XXXI International

Congress of the WFH, 2014.5

5. A. Yamashita, C. Nagae, T. Ashikaga, M. Akita, S. Yamazaki, S. Takayama, S. Tatsunami, M. Taki: Challenges to establishment of monitoring method for anticoagulant effect of anti factor Xa inhibitor, XXXI International Congress of the WFH, 2014.5

6. T. Ashikaga, M. Mori, A. Yamashita, C. Nagae, M. Taki: Prevalence of arthropathy in patients with mild and moderate hemophilia, XXXI International Congress of the WFH, 2014.5

7. M. Mori, C. Nagae, T. Ashikaga, A. Yamashita, D. Keino, R. Oyama, A. Kinoshita, M. Taki: Acute coronary syndrome in a patient with haemophilia A, XXXI International Congress of the WFH, 2014.5

8. Tatsunami S, Shirahata A, Mimaya J, Kuwabara R, Nishina Y, Hanai J, Ohira K, Taki M: Long-term observation of hemophiliacs with HIV infection in Japan: Follow-up of survival and status of HCV infection, XXXI International Congress of the WFH, 2014.5

9. Tatsunami S, Shirahata A, Mimaya J, Kuwabara R, Nishina Y, Hanai J, Ohira K, Taki M: Prevalence and status of HCV infection among Japanese hemophiliacs, XXXI International Congress of the WFH, 2014.5

10. Hiroaki Mizukami, Jun Mimuro, Tsukasa Ohmori, Midori Shima, Tadashi Matsushita, Masashi Taki, Shinji Muto, Satoshi Higasa, Michio Sakai, Ryosuke Uchibori, Tomonori Tsukahara, Masashi Urabe, Akihiro Kume, Seiji Madoiwa, Yoichi Sakata, Keiya Ozawa: Age-related eligibility of hemophilia gene therapy using AAV vectors. 76th annual meeting of the Japanese Society of Hematology, 2014.10.31

11. Shinobu Tatsunami, Jyunichi Mimaya, Akira Shirahata, Masashi Taki: Prevalence of chronic kidney disease and osteoporosis

among Japanese hemophiliacs. 76th annual meeting of the Japanese Society of Hematology, 2014.11.1

12. Hideji Hanabusa, Midori Shima, Keiji Nogami, Tadashi Matsushita, Katsuyuki Fukutake, Masashi Taki, Michio Sakai, Baisong Mei, Yingwen Dong, Srividya Neelakantan, Wildon Farwell, Glenn F Pierce: Recombinant factor VIII Fc fusion protein in Japanese subjects from the A-LONG study with severe hemophilia A, 76th annual meeting of the Japanese Society of Hematology, 2014.11.2

13. Midori Shima, Hideji Hanabusa, Masashi Taki, Tadashi Matsushita, Tetsuji Sato, Katsuyuki Fukutake, Koichiro Yoneyama, Naoki Fukazawa, Takehiko Kawanishi, Keiji Nogami: Safety and prophylactic efficacy profiles of ACE910, a humanized bispecific antibody mimicking the FVIII cofactor function, in Japanese patients with hemophilia A: First-in-patient phase 1 study. ASH, 2014.12.8

G. 知的財産権の出願・登録状況

本研究とは関係がない。

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 －

凝固検査標準化および診断法の開発（新生児）

研究分担者

高橋 幸博 奈良県立医科大学附属病院 総合周産期母子医療センター
新生児集中治療部門 教授

研究協力者

中川 隆志 奈良県立医科大学附属病院新生児集中治療部門
野上 恵嗣 奈良県立医科大学附属病院小児科
嶋 緑倫 奈良県立医科大学附属病院小児科
豆田 清美 奈良県立医科大学附属病院中央臨床検査部
谷口 恵理 奈良県立医科大学附属病院中央臨床検査部
山口 直子 奈良県立医科大学附属病院中央臨床検査部
山崎 正晴 奈良県立医科大学附属病院中央臨床検査部
福井 博 奈良県立医科大学附属病院消化器内科
斎藤 能彦 奈良県立医科大学附属病院循環器内科

研究要旨

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。

A. 研究方法

新生児期は母体内の胎内生活から胎外生活への適応期でもあり、肝の未熟性やビタミンK欠乏などに加え、呼吸・循環系の急激な変化もあり、血液凝固・線溶能は大きく変化する。その際、血液凝固・線溶能に関しては、血液凝固・線溶能の全体像を把握できる検査法や個々の凝固・線溶因子の動態について既に数多くの報告がなされている。しかし、抗凝固能に関しては、アンチトロンビン（AT）、プロテインC（PC）/プロテインS（PS）、TFPI、 $\alpha 2$ -マクログロブリン（ $\alpha 2$ -MG）、 $\alpha 1$ アンチトリプシン（ $\alpha 1$ -AT）など抗凝固作用を有する種々の因子の生後の動態は既に報告されてはいるが、全体での抗凝固能を示す検査法はほとんどない。そこで、本研究では、新生

児・小児の抗凝固能、特に新生児・乳児の全体での抗凝固能を評価する方法を確立することにあり、そのために、既にPC/PS制御機構の検査法として開発されたThromboPath検査法を応用して、新生児・乳児の抗凝固能の全体での検査法として役立つか、また、抗凝固療法として新鮮凍結血漿や血液分画製剤（AT製剤や活性化PC製剤、トロンボモジュリン）の投与基準や投与前の有効性を示す検査法として応用が可能かについて検討した。

B. 研究方法

対象は新生児7例、乳児20名及び健康に異常ない成人20名の3.2%クエン酸ナトリウム（Na9）血漿で、新生児・乳児は通常診療後

の残余3.2%クエン酸Na血漿を用いた。また、対象とした被検血漿は、血小板数を含めた末梢血血球数、炎症反応、血液生化学検査に異常はなかった。

検査項目は、PTおよびAPTT、フィブリノゲンに加え、AT、PC等を行った。また、ThromboPathはACL TOP CTS300 -CTS (アイ・エル・ジャパン株式会社、東京)で測定した。その他、AT欠乏血漿 (Affinitybiologicals、AT活性 $<0.01\text{U/ml}$)。およびAT製剤 (AT: ノイアートR)、リコンビナント・トロンボモジュリン (rTM: 旭化成ファーマ、日本)を購入し添加実験に使用した。

ThromboPathの測定原理と測定項目

被検血漿にPC活性化蛇毒成分のプロタックを添加(A)あるいは対照として非添加(B)したものに、組織因子およびリン脂質を加え血液凝固を惹起し産生されるトロンビン量をトロンビン特性の発色性合成基質の光学密度(光学濃度;OD)の変化で計測する。同検査法での測定項目は、プロタック添加時のOD値(ODA)、非添加時のOD値(ODB)、PiCi% $= (ODB-ODA)/ODB \times 100$ である。(倫理面への配慮)

本研究は当院倫理委員会の承認のもとに実施した。

平成25年度の研究成果:

新生児および乳児を含む小児血漿と肝障害者、循環器弛緩でワルファリン投与者と対照として健康成人血漿で検討した成績を報告した。

平成26年度の研究成果:

C. 研究結果

平成25年度の成果を踏まえ、平成26年度に新生児期を7名、乳児期を20名、対照として健康成人を20名に被検血漿を増やし、各時期のThromboPathの各測定項目について検討した。新生児期7例のプロタック非添加時のOD値(ODB)は 0.470 ± 0.071 で健康成人のOD値(ODB)は 0.791 ± 0.062 と比較し、約1/2に低下していた。また、新生児期のプロタック添加時のOD値(ODAの平均 \pm SD)は 0.305 ± 0.035 で、健康成人のOD値(ODA)は

0.102 ± 0.029 で、約3倍の残存トロンビン値を示した。乳児期20例ではプロタック非添加時のOD値(ODB)の平均 \pm SDは 0.696 ± 0.099 で健康成人のOD値(ODB)の 0.791 ± 0.062 と比較し約2/3に増加し、プロタック添加時のOD値は 0.198 ± 0.049 と健康成人のOD値(ODA)の 0.102 ± 0.029 と比較しやや高値であった。また、乳児期のODB値は年齢が増すごとに増加し、ODA値は低下した。PiCi%は、新生児期は $36.4 \pm 3.3\%$ で、乳児期は $71.2 \pm 10.1\%$ であった。健康成人では $86.9 \pm 3.4\%$ であった。

ThromboPathとPT-INRのPiCi%との関連性

新生児・乳児および成人全体でのPT-INRとPiCi%との間に $r = -0.7$ の負の相関がみられた。しかし、成人のみではその関連がなく $r = -0.01$ 、新生児・乳児で $r = -0.69$ の負の相関がみられた。

ThromboPathのPiCi%とPC活性あるいはAT活性との関連性

PiCi%とPC活性あるいはAT活性の間でそれぞれ $r = 0.86$ 、 $r = 0.61$ と正の関連が見られた。

新生児期および乳児期でのプロタック添加時の残存トロンビン値(ODA)値が、健康成人より高値であったことから、PC/PS凝固抑制系以外の凝固抑制因子の低下が推察された。そこで、AT欠乏血漿にAT製剤によるAT添加実験、および正常血症へのr-TM製剤添加実験を行った。

AT欠乏血漿へのAT(ノイアート[®])添加におけるPC/PS凝固抑制系の評価

一定量のAT欠乏血漿 AT活性 $<0.01\text{U/ml}$ に各種濃度のATを添加した場合のトロンビン産生量を比較した。AT欠乏血漿にAT製剤で終濃度のAT活性を 1U/ml (AT活性100%)に補正することで、PiCi%値は5.7%低下、プロタック添加時のOD値は、0.0374低下したのに対して、プロタック非添加でのOD値は0.165低下した。また、AT活性が50%-100%で顕著に低下した。