

## 正常血漿へのrTM製剤の添加におけるPC/PS凝固抑制系の評価

正常血漿へのrTM添加では濃度依存性にプロタック非添加および添加時のトロンビン産生量の低下がみられた。

### D. 考察

ThromboPathでのプロタック非添加のトロンビン産生(ODB値)は、被検血漿に組織因子とリン脂質により凝固を惹起した場合のトロンビン産生で、産生されたトロンビン量は、トロンビンに特異な発色性合成基質のOD値で表される。したがって、プロタック非添加では、外因系凝固でのトロンビン産生量を表す。新生児期および乳児期のODB値が成人と比較し低値であったことは、凝固過程で産生されるトロンビン産生量が成人よりは少ないことを表し、新生児および乳児は成人よりも凝固能が低いとするこれまでの報告を支持するものであった。

一方、ThromboPathでのプロタック添加では、被検血漿中のPCをプロタックで活性化し、活性化したPC(activated PC;APC)とPSで活性化V因子や、トロンビンやIX因子で活性化された活性化VIII因子を分解することで抗凝固能を示すもので、プロタック非添加時のトロンビン産生(ODB値)からプロタック添加時のトロンビン産生(ODA値)の差をODB値で除したもの(PiCi%)が、PC/PS制御機構での抗凝固能を表すと考えられる。今回の結果からもPC活性とPiCi%との相関は新生児期と乳児期を含む全体で関連がみられた。

新生児期および乳児期のプロタック添加時のトロンビン産生(ODA値)は成人よりも3倍近く高値であったことは、新生児期および乳児期ではPC/PS制御機構が成人と比較し未熟であることが示唆された。新生児期および乳児期の抗凝固能を構成する個々の抗凝固因子が、健康成人より低下していることは既に明らかにされており、全体の抗凝固能も結果として低下していると推定された。ThromboPathは凝固活性化に組織因子とリン脂質を添加している。すなわち、外因系を活性する系である。そこで、従来の凝固スクリーニング検査のPT-INRとPiCi%との関連性

を検討したところ、成人では関連を示すことができなかったが、新生児期と乳児期では関連性がみられた。PC活性とPiCi%との関連性では、新生児期は乳児期と比較し、その関連性が低いと考えられたことから、他の抗凝固因子の影響も考慮された。

次に抗凝固療法としてAT製剤たrTM製剤が使用されているが、抗凝固作用としてATやrTMの補充効果を客観的に評価が可能か、AT欠乏血漿へのAT添加実験および正常血症へのrTM添加実験をpreliminaryに行った。AT欠乏血漿へのAT製剤の添加実験からAT活性が50-100%の間で抗凝固能に急激変化がみられ、また、新生児期および乳児期の血漿へのAT製剤の補正試験でも、AT添加の抗凝固能の改善がみられたが、3例のみの成績で、今後さらに対象を増やして効果をみる必要がある。また、今回、PSの測定はできなかった。PCの機能にはPSも関与することから更なる追加研究を予定している。またrTM添加実験でも、抗凝固能がみられたが、ThromboPathを用いた被検血漿への抗凝固因子の添加試験は、今後、抗凝固療法を推定するうえに有用な検査法になると推定された。

### E. 結論

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選択に、ThromboPathを用いた検査法は有用と考えられた。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. Kashima A1, Higashiyama Y, Kubota M, Kawaguchi C, Takahashi Y, Nishikubo T. Children with Down's syndrome display high rates of hyperuricaemia. Acta Paediatr. 2014 Aug;103(8):e359-64. doi: 10.1111/apa.12664. Epub 2014 May 21.
2. Takahashi D1, Takahashi Y, Itoh S, Nishiguchi T, Matsuda Y, Shirahata A. Late vitamin K deficiency bleeding in an infant born at a maternity hospital. Pediatr Int. 2014 Jun;56(3):436. doi: 10.1111/

ped.12346.

3. Miyakawa Y, Kashiwagi H, Takafuta T, Fujimura K, Kurata Y, Kobayashi T, Kimura T, Adachi T, Watanabe T, Imaizumi M, Takahashi Y, Matsubara K, Terui K, Kuwana M, Kanagawa T, Murata M, Tomiyama Y; Committee for clinical practice guide of primary immune thrombocytopenia in pregnancy. [Consensus report for the management of pregnancy with primary immune thrombocytopenia].

Rinsho Ketsueki. 2014 Aug;55(8):934-47. [Article in Japanese]

## 2. 学会発表

1. 中川隆志、高橋幸博、内田優美子、釜本智之、新居育世、西久保敏也

Thrombopathによる新生児・小児の抗凝固能の評価

第50回日本周産期・新生児医学会学術集会  
シェラトン・グランデ・トーキョーベイ・グランドホテル

2014年7月13日-15日

2. 中川隆志、高橋幸博、武山雅博、嶋緑倫  
Thrombopath分析による小児血漿中の抗凝固能の評価

第56回日本小児血液・がん学会学術集会  
岡山コンベンションセンター、岡山シティミュージアム

2014年11月28日-30日

## 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

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 －

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

研究分担者

石黒 精

国立成育医療研究センター 教育研修部 部長

研究要旨

本研究班で診断した複合ヘテロ変異によるプロテインC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プロテインC値は、正常化して症状も消失し、プロテインC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。

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。ホモ変異や複合ヘテロ変異を持つプロテインC(PC)欠損症の患者は、新生児・乳児期から生命に危険な血栓症を起こすことが知られている。さらに、PC欠損症患者は新鮮凍結血漿の定期補充にもかかわらず、急速進行性の皮膚の出血性壊死である電撃性紫斑病を反復して苦しむ。本研究ではPC欠損症を根治しうる、新しい治療管理法について検討した。

B. 研究方法

対象は、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か月患児である。血中PC値は<5%であった。新生児・乳児期に頭蓋内および眼球内に出血性梗塞を起こしたために視力は消失し、精神運動発達遅滞、てんかんを来していた。また、新鮮凍結血漿の定期補充およびワルファリンまたはダビガトラン内服にもかかわらず、電撃性紫斑病を反復し、血漿由来活性化PC製剤(アナクトC®)を適時使用していた。

(倫理面への配慮)

プロテインC遺伝子の解析は、ヒトゲノム遺伝子解析研究に関する倫理指針に従って、

九州大学において実施された。今回のドミノ生体肝移植に先だって、日本肝移植学会、国立成育医療研究センターの倫理委員会において承認を受けた。

C. 研究結果

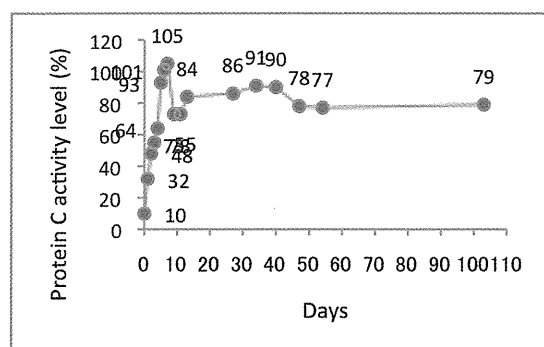
両親はPCのヘテロ変異であったので生体肝移植ドナーからは除外された。また、患児は死体臓器移植の待機リストでは低い順位であった。そのため、部分生体肝移植を受けるために摘出された、生後12か月のメープルシロップ尿症患者の肝を用いて生体肝移植を行うと決定した。移植手術直前から血漿由来活性化PC製剤を持続輸注し、術後4日まで継続した。生体肝移植後に血漿由来活性化PC製剤を中止後も血中PC値は70～91%と正常範囲に維持できた。周術期に血栓は起こらなかった。この結果、新鮮凍結血漿の定期補充は中止できた。さらに、心配されたメープルシロップ尿症患者の肝を用いたことから心配された血中分枝アミノ酸値の上昇は見られなかった。

D. 考察

メープルシロップ尿症患者から摘出した肝を用いて、PC患者を根治に導いた世界初の生体ドミノ肝移植である。新しい治療選択肢

を患者に提供可能にした点で本研究は意義がある。詳細は、研究発表業績1に記載した。

図1 生体ドミノ肝移植の周術期および術後における血中PC濃度(研究発表業績1から引用)



周術期には血漿由来活性化PC製剤を持續輸注した。

メープルシロップ尿症患者の肝を用いたことから、ロイシンを含む分枝アミノ酸の代謝異常が懸念された。しかし、本例では血中分枝アミノ酸値は上昇しなかった。分枝アミノ酸を代謝する分枝 $\alpha$ ケト酸デヒドロゲナーゼは活性の60%が骨格筋に存在するため、肝の分枝 $\alpha$ ケト酸デヒドロゲナーゼが消失しても、分枝アミノ酸代謝に明らかな問題は起きないことが確認された。

## E. 結論

メープルシロップ尿症患者から摘出した肝を用いて、PC患者を根治に導いた世界初の生体ドミノ肝移植である。新しい治療の選択肢を患者に提供可能になった点で意義深い。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. 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)

2. Wang R, Yoshida K, Toki T, Sawada T, Uechi T, Okuno Y, Sato-Otsubo A, Kudo K, Kamimaki I, Kanezaki R, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Terui K, Sato T, Iribe Y, Ohga S, Kuramitsu M, Hamaguchi I, Ohara, A, Hara J, Goi K, Matsubara K, Koike K, Ishiguro A, Okamoto Y, Watanabe K, Kanno H, Kojima S, Miyano S, Kenmochi N, Ogawa S, Ito E: Loss of function mutations in RPL27 and RPS27 identified by whole-exome sequencing in Diamond-Blackfan anemia. *Br J Haematol* 2014 Nov 25. doi: 10.1111/bjh.13229. [Epub ahead of print]

3. Fujimaru T, Ito S, Masuda H, Oana S, Kamei K, Ishiguro A, Kato H, Abe J: Decreased levels of inflammatory cytokines in immunoglobulin-resistant Kawasaki disease after plasma exchange. *Cytokine* 2014; 70(2):156-160.

4. Maekawa T, Oba M, Katsunuma T, Ishiguro A, Ohya Y, Nakamura H: Modified pulmonary index score was sufficiently reliable to assess the severity of acute asthma exacerbations in children. *Allergol Int* 2014; 63(4):603-607.

5. Yotani N, Ishiguro A, Sakai H, Ohfuji S, Fukushima W, Hirota Y: Factor-associated caregiver burden in medically complex patients with special health care needs. *Pediatr Int* 2014; 56(5): 742-747.

6. Minowa K, Arai K, Kasahara M, Sakamoto S, Shimizu H, Nakano N, Ito R, Obayashi N, Nakazawa A, Ishiguro A: Romiplostim treatment allows for platelet transfusion-free liver transplantation in pediatric thrombocytopenic patient with primary sclerosing cholangitis. *Pediatr Transplant* 2014; 18(6):E212-215.

7. 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* 2014; 173(3): 381-386.

8. 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- $\gamma$  in a patient with dominant partial interferon- $\gamma$  receptor 1 deficiency. Clin Immunol 2014; 151(1):25-28.
9. 鉄原健一、伊藤友理枝、内田桂子、辻聡、多田欣司、石黒 精：外傷が契機と考えられた小児副腎出血の2例. 日救急医学会関東誌 2014; 35(2):286-289
10. 野中航仁、松本正太郎、六車 崇、榎本有希、細川 透、石黒 精：自己免疫性溶血性貧血による心原性ショックに対し、extracorporeal membrane oxygenation導入により救命した乳児例. 日集中医誌 2014;21(5):497-500.
11. 松井 鋭、小林由典、伊藤友理枝、伊藤友弥、道端伸明、石黒 精、阪井裕一：循環不全徴候を示す細菌性髄膜炎急性期における急速輸液の影響. 日小児救急医学会誌 2014; 13(3): 377-381.
12. 上田理誉、前川貴伸、野村理、石黒 精、阪井裕一、中川聡：小児専門病院における乳幼児突発性危急事態 ALTE)112 例の臨床像解析. 日児誌 2014;118(8):1213-1218.
13. 飯尾美沙、竹中晃二、成田雅美、二村昌樹、濱口真奈、福島加奈子、山野織江、原口純、阪井 裕一、石黒 精、大矢幸弘：気管支喘息患児の保護者を対象としたテイラー化教育プログラムの開発および効果の検証. アレルギー 2014;63 (2):187-203.
14. 千葉剛史、伊藤友弥、山本しほ、佐々木隆司、植松悟子、辻 聡、武田憲子、石黒 精、阪井裕一：気管支喘息として治療されていた食道異物の1例. 日小児救急医学会誌 2014;13(1):34-38.
15. 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 2014; 37(1): 55-60.
16. 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：遺伝性血栓症：小児期における診断と治療の問題. 日小血がん誌 2014; 51(5):470-474.

17. 石黒 精：後天性血友病A、後天性von Willebrand病. 小児内科 2014; 46(2): 235-238.

#### 書籍

1. 石黒 精：好中球減少症. 今日の小児治療指針、水口 雅、市橋 光、崎山 弘（編）、16版、医学書院、東京(印刷中)
2. 石黒 精：出血傾向・凝固障害. 小児科研修ノート、五十嵐 隆など（編）、第2版、p497-499、診断と治療社、東京、2014.
3. 石黒 精：ITP/血友病での急性出血. 当直医のための小児救急ポケットマニュアル、辻 聡、小穴慎二、石黒 精など(編)、p257-261、中山書店、東京、2014.
4. 田中康子、石黒 精：貧血. 当直医のための小児救急ポケットマニュアル、辻 聡、小穴慎二、石黒 精など(編)、p124-126、中山書店、東京、2014.

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## IV. 診断ガイドライン および重症度分類の試案

## 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%

## 新生児・小児における遺伝性栓友病\*の重症度分類（案）

\*プロテインC, プロテインS, アンチトロンビン欠損症

### <重症度分類>

- |              |                          |
|--------------|--------------------------|
| Stage 1: 未発症 | 遺伝性栓友病と診断されたが、無症候である     |
| Stage 2: 軽症  | 発症早期に適切に治療され、補充療法を必要としない |
| 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である |
| 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である |

- 付1) 補充療法とは、新鮮凍結血漿かつ/または各因子濃縮製剤を示す。
- 2) 成人の遺伝性栓友病では発症後抗凝固療法は必須だが、小児では新生児期をこえると小学校低学年までは、生活指導のみで管理可能な場合もある。
- 3) 両アレル変異(異常)によるアンチトロンビン欠損症とプロテインS欠損症の報告は極めて稀であり胎生致死と考えられる。一方、両アレル変異(異常)プロテインC欠損症はほとんどが活性値が5%未満を呈する重症型となる。従って、プロテインC欠損症は下記のとおり活性値から重症度を分類する。
- 4) 3因子遺伝子の各ヘテロ変異を複数有する中等症あるいは重症型もある。

血漿プロテインC	濃度 (IU/ml)	活性 (%)
健常成人	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

## 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
石黒 精	好中球減少症	水口 雅、市橋 光、 崎山 弘	今日の小児治療指針	医学書院	東京	2015	印刷中
石黒 精	出血傾向・凝固障害	五十嵐 隆	小児科研修ノート	診断と治療社	東京	2014	497-499
石黒 精	ITP/血友病での急性出血	辻 聡、小穴慎二、 石黒 精	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	2014	257-261
田中康子、石黒 精	貧血	辻 聡、小穴慎二、 石黒 精	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	2014	124-126
落合正行、田中幸一 楠田 剛、井原健二	Pallister-Hall 症候群	水澤英洋	別冊日本臨床 新領域別 症候群シリーズ No.29 神 経症候群(第2版)	日本臨床社	大阪	2014	635-638

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
Yamamura K, Takada H, Uike K, Nakashima Y, Hirata Y, Nagata H, Takimoto T, Ishimura M, Morihana E, <u>Ohga S</u> , Hara T	Early progression of atherosclerosis in children with chronic infantile neurological cutaneous and articular syndrome.	Rheumatology	53(10)	1783-7	2014
Hoshina T, Nakashima Y, Sato D, Nanishi E, Nishio H, Nakgata H, Yamamura K, Doi T, Shiokawa Y, Kang D, <u>Ohga S</u> , Hara T	Staphylococcal endocarditis as the first manifestation of heritable protein C deficiency in childhood.	J Infect Chemother	20(2)	128-30	2014
Matsuoka W, Yamamura K, Uike K, Nagata H, <u>Ohga S</u> , Hara T	Tachyarrhythmia-induced cerebral sinovenous thrombosis in a neonate without cardiac malformation.	Pediatr Neonatal	55(5)	412-3	2014
Maeba S, Hasegawa S, Shimomura M, Ichimura T, Takahashi K, Motoyama M, Fukunaga S, Ito Y, Ichiyama I T, <u>Ohga S</u>	Successful treatment of corticosteroid with antiviral therapy for a neonatal liver failure with disseminated herpes simplex virus infection.	Am J Perinatol		in press	2015
Okada S, Hasegawa S, Suzuki Y, Matsubara T, Shimomura M, Okuda M, Ichiyama T, <u>Ohga S</u>	Acute pericardial effusion representing the TNF- $\alpha$ -mediated severe inflammation but not the coronary artery outcome of Kawasaki disease.	Scand J Rheumatol	Oct. 29	1-6	2014
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	44(5)	458-62	2014
Fujiwara A, Fukushima K, Inoue H, Takashima T, Nakahara H, Satoh S, <u>Ochiai M</u> , Hara T, Shimokawa M, Kato K.	Perinatal management of preterm premature ruptured membranes affects neonatal prognosis.	J Perinat Med	42(4)	499-505	2014
Matsui H, Takeda M, Soejima K, Matsunari Y, Kasuda S, Ono S, Nishio K, <u>Shima M</u> , Banno F, Miyata T, Sugimoto M	Contribution of ADAMTS13 to the better cell engraftment efficacy in mouse model of bone marrow transplantation.	Haematologica	99(10)	e211-213	2014
Matsui H, Fujimoto N, Sasakawa N, Ohinata Y, <u>Shima M</u> , Yamanaka S, Sugimoto M, Hotta A	Delivery of full-length factor VIII using a piggyBac transposon vector to correct a mouse model of hemophilia A.	PloS One	9(8)	e104957	2014
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, <u>Shima M</u> , Hattori K	Anti-factor IXa/X bispecific antibody ACE910 prevents joint bleeds in a long-term primate model of acquired hemophilia A.	Blood	124(20)	3165-3171	2014
Matsumoto T, Nogami K, <u>Shima M</u>	Coagulation function and mechanisms in various clinical phenotypes of patients with acquired factor V inhibitors.	Journal of Thrombosis and Haemostasis	12(9)	1503-1512	2014

Ogiwara K, Nogami K, Matsumoto T, <u>Shima M</u>	Tissue factor pathway inhibitor in activated prothrombin complex concentrates (aPCC) moderates the effectiveness of therapy in some severe hemophilia A patients with inhibitor.	International Journal of Hematology	99(5)	577-87	2014
Kashima AI, Higashiyama Y, Kubota M, Kawaguchi C, <u>Takahashi Y</u> , Nishikubo T	Children with Down's syndrome display high rates of hyperuricaemia.	Acta Paediatr	103(8)	e359-64	2014
<u>Takahashi D</u> 1, <u>Takahashi Y</u> , Itoh S, Nishiguchi T, Matsuda Y, Shirahata A	Late vitamin K deficiency bleeding in an infant born at a maternity hospital.	Pediatr Int	56(3)	436	2014
Miyakawa Y, Kashiwagi H, Takafuta T, Fujimura K, Kurata Y, Kobayashi T, Kimura T, Adachi T, Watanabe T, Imaizumi M, <u>Takahashi Y</u> , Matsubara K, Terui K, Kuwana M, Kanagawa T, Murata M, Tomiyama Y	Committee for clinical practice guide of primary immune thrombocytopenia in pregnancy. [Consensus report for the management of pregnancy with primary immune thrombocytopenia].	Rinsho Ketsueki.	55(8)	934-47	2014
Matsunami M, <u>Ishiguro A</u> , 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	2015
Fujimaru T, Ito S, Masuda H, Oana S, Kamei K, <u>Ishiguro A</u> , Kato H, Abe J	Decreased levels of inflammatory cytokines in immunoglobulin-resistant Kawasaki disease after plasma exchange.	Cytokine	70(2)	156-60	2014
Minowa K, Arai K, Kasahara M, Sakamoto S, Shimizu H, Nakano N, Ito R, Obayashi N, Nakazawa A, <u>Ishiguro A</u>	Romiplostim treatment allows for platelet transfusion-free liver transplantation in pediatric thrombocytopenic patient with primary sclerosing cholangitis.	Pediatr Transplant	18(6)	212-5	2014
<u>大賀正一</u> 、 <u>落合正行</u> 、 <u>石黒 精</u> 、 <u>高橋幸博</u> 、 <u>瀧 正志</u> 、 <u>嶋 緑倫</u> 、 <u>金子政時</u> 、 <u>福嶋恒太郎</u> 、 <u>康 東天</u>	遺伝性血栓症：小児期における診断と治療の問題。	日小血がん誌	51(5)	470-4	2014
<u>大賀正一</u>	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		印刷中	2015
<u>大賀正一</u>	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		印刷中	2015
野中航仁、松本正太郎、六車 崇、榎本有希、細川 透、 <u>石黒 精</u>	自己免疫性溶血性貧血による心原性ショックに対し、extracorporeal membrane oxygenation 導入により救命した乳児例。	日集中医誌	21(5)	497-500	2014
清水 武、 <u>石黒 精</u> 、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	37(1)	55-60	2014
<u>石黒 精</u>	後天性血友病 A, 後天性 von Willebrand 病。	小児内科	46(2)	235-8	2014

## VI. 研究成果の刊行物・別刷

## 遺伝性血栓症：小児期における診断と治療の問題点

大賀 正一<sup>1\*</sup>, 落合 正行<sup>2</sup>, 石黒 精<sup>3</sup>, 高橋 幸博<sup>4</sup>, 瀧 正志<sup>5</sup>, 嶋 緑倫<sup>6</sup>,  
金子 政時<sup>7</sup>, 福嶋恒太郎<sup>8</sup>, 康 東天<sup>9</sup> (小児新生児血栓症研究班)

<sup>1</sup> 山口大学大学院医学系研究科小児科学分野

<sup>2</sup> 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

<sup>3</sup> 国立成育医療センター血液内科

<sup>4</sup> 奈良県立医科大学病院総合周産期母子医療センター

<sup>5</sup> 聖マリアンナ医科大学横浜市西部病院小児科

<sup>6</sup> 奈良県立医科大学小児科学

<sup>7</sup> 宮崎大学医学部大学院看護学研究科周産期分野

<sup>8</sup> 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

<sup>9</sup> 九州大学大学院医学研究院臨床検査医学

## Heritable Thrombophilia: Clinical Problems in the Diagnosis and Management of Pediatric Patients

Shouichi Ohga<sup>1\*</sup>, Masayuki Ochiai<sup>2</sup>, Akira Ishiguro<sup>3</sup>, Yukihiro Takahashi<sup>4</sup>, Masashi Taki<sup>5</sup>, Midori Shima<sup>6</sup>,  
Masatoki Kaneko<sup>7</sup>, Kotaro Fukushima<sup>8</sup>, Dongchon Kang<sup>9</sup>  
(on behalf of the Japan Childhood Thrombophilia Study Group)

<sup>1</sup>Department of Pediatrics, Yamaguchi University Graduate School of Medicine

<sup>2</sup>Division of Neonatology, Comprehensive Maternity and Perinatal Care Center, Kyushu University

<sup>3</sup>Division of Hematology, National Center for Child Health and Development

<sup>4</sup>Departments of Perinatology, Nara Medical University

<sup>5</sup>Department of Pediatrics, St. Marianna University School of Medicine, Yokohama City Seibu Hospital

<sup>6</sup>Departments of Pediatrics, Nara Medical University

<sup>7</sup>Departments of Perinatology, Faculty of Medicine, University of Miyazaki

<sup>8</sup>Division of Maternity and Fetus, Comprehensive Maternity and Perinatal Care Center

<sup>9</sup>Department of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Kyushu University Hospital

### Abstract

Thromboembolic events rarely occur in children. However, pediatric patients with thromboembolism have been increasing in number during the decade of rapid progress in pediatric and perinatal medicine. The incidence of heritable thrombophilias depends on racial background. Factor V Leiden and the prothrombin variant are frequently found in Caucasians but not in Japanese. Nevertheless, the early diagnosis of the three major deficiencies of natural anticoagulants, namely, antithrombin (AT), protein C (PC) and protein S (PS), have gained attention even in Western countries, because affected children and their family members are at a higher risk of thrombosis than those carrying factor V Leiden or the prothrombin variant. Pediatric thrombosis is difficult to diagnose because of the physiological maturation of the coagulation system and incomplete imaging analyses. Thrombolytic therapy and prophylactic management in pediatric patients have not yet been established, although novel anticoagulants have now been used for adult patients. The diagnosis and management of adult patients cannot be applied to newborn infants. Our intensive genetic study has newly identified pediatric patients with PC deficiency, the number of whom corresponded to that of those registered in annual reports of coagulation disorders in Japan. Here, we review the clinical problems in the diagnosis and management of pediatric patients with heritable thrombophilias on the basis of our cumulative database.

**Key words:** thrombophilia, thrombotic predisposition, venous thromboembolism, purpura fulminans

### 要 旨

これまで小児に稀とされてきた血栓症は、小児および周産期医療の進歩とともに近年増加している。血友病と対比して栓

2014年5月29日受付, 2014年5月29日受理

\* 別刷請求先: 〒755-8505 宇部市南小串 1-1-1

山口大学大学院医学系研究科小児科学分野 大賀正一

E-mail: ohgas@yamaguchi-u.ac.jp

友病と呼ばれる遺伝性血栓症のうち, 3大抗凝固因子欠損症(プロテインC, プロテインSおよびアンチトロンビン)は, Factor V LeidenとProthrombin多型の多い海外においても, その高い血栓リスクから早期診断が強調されている. 一方, 小児期の血栓症診断は, 患児が止血血栓機構の成熟過程にあり, 必要な画像診断も実施しにくいいため, 容易ではない. 成人領域では血栓溶解療法も進歩し, 新しい抗凝固薬が使用されるようになったが, 小児領域ではその経験も少ない. 小児期の血栓症患者は新生児から乳児早期に多く, 成人における診断と治療法をそのまま適用することが難しい. 私たちは血栓症を発症した児の遺伝子診断を積極的に進めて, 血液凝固異常症全国調査登録数に相当するPC欠損症の新規家系を短期間に見出した. 症例集積から明らかとなった小児期の診断と治療における問題点を概説する.

キーワード: 栓友病, 血栓性素因, 静脈血栓塞栓症, 電撃性紫斑病

## I はじめに

止血は出血に対する原始的な生体防御反応であり, 免疫系と深く関わる. 凝固系と補体系を構成する蛋白の活性化と制御機構には類似点も多い. 好中球による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, 免疫と凝固を結ぶ主要なメディエーターである. 好中球は内因系(FXIIと結合して活性化)および外因系(TFとNETs)を介して血栓形成の初期反応に必須であり, 血栓止血機構と生体防御機構の機能的な関連が注目されている<sup>1,2)</sup>.

凝固線溶系は, 出血源となる血管の傷害局所において, 止血血栓を適切に形成し退縮させる. 凝固制御系は, 傷害部位以外の循環血中に不適切な血栓が形成されるのを阻止している. 血栓症は, 誘因, 素因および基礎疾患が複合的に作用して病的血栓が血管内で形成され, 組織・臓器の血液循環を障害する多元病である. 成人では加齢とともにその頻度が増加する. 一方, 小児期では新生児と思春期に血栓発症のピークがあり, 凝固線溶系の生理的発達に関与する. 新生児医療による中心静脈カテーテル, 心臓外科手術および画像診断法などの進歩に伴い, 近年小児血栓症は増加している<sup>3,4)</sup>. 寝たきり児の過凝固と血栓発症にも注意が必要である<sup>5)</sup>. こどもをとりまく環境の変化が, 遺伝性素因を際立たせるようになってきたのかもしれない.

凝固制御系および線溶系カスケードを構成する蛋白の機能異常が血栓性素因をもたらす. 抗凝固因子であるプロテインC [PC], プロテインS [PS] およびアンチトロンビン [AT] のそれぞれの遺伝的欠陥が, 高い血栓性素因を有する“いわゆる栓友病”である. とくにプロテインCは感染免疫系との関連が深く(図1)<sup>6)</sup>, その欠乏は小児期の血栓性素因として重要である.

## II 凝固因子・抗凝固因子異常による血栓性素因

自然抗凝固因子であるPC, PS, ATそして組織因子経路抑制因子(tissue factor pathway inhibitor: TFPI)が凝固制御系の主要な分子である. TFPIとATは標的酵素と高分子複合体を形成し, TFPIは血液凝固活性化第VII因子(FVIIa)

と同X因子(FXa)の活性を, ATはトロンビン(FIIa)とFXaの活性をそれぞれ阻害する. 活性化PC(APC)は補酵素であるPSとともにFVaとFVIIIaを分解し不活性化する. このほかこれらの経路に関わる分子として内皮PC受容体(endothelial protein C receptor: EPCR)<sup>7)</sup>, トロンボモジュリン(thrombomodulin: TM)<sup>8,9)</sup>, ヘパリンコファクターII(heparin cofactor II: HC II)などがある. それぞれの異常による血栓性素因への関与が示唆されているが, PC, PSおよびAT欠損症が重要である.

これに対して凝固因子側の異常分子により血栓性素因を示す主要なものとして, APC抵抗性を有するFV G1691A (Factor V Leiden: FVL)とFII G20210A (PT variant)がある. この2つは欧米人に最も頻度の高い遺伝性血栓性素因で, FVLヘテロ接合体の頻度はコーカサス人一般集団の5-8%に及ぶ. 一方, 日本など東アジア人にはこの2つはみつからない. 最近AT抵抗性を示す血栓症家系PT-Yukuhashiが報告された<sup>10)</sup>. 高FVIII血症も血栓性素因であるがその分子異常はまだ同定されていない.

PC, PSおよびAT欠損症は, 常染色体優性遺伝形式をとる疾患である. 日本人にはPS-Tokushimaが多いが, PCとATの血漿活性値から推定したヘテロ変異の保有者率は民族を問わず一般人口の1%未満と稀である. 一方, その血栓症発症のリスクは, 小児でもFVLとPT variant保有者に比して有意に高いと考えられている(表1A)<sup>3)</sup>. とくにPCとAT欠損症は, 他の異常と比べて脳血管と深部静脈血栓の初回発症リスクが高い. FVLとPT variantの頻度が高いため, 欧米では一般人の血栓症スクリーニング検査は行われない. しかし, 最近これら遺伝性血栓症の近親者(第一度および第二度近親者)における血栓塞栓症発症率がPC/PS/AT欠損症とFVL/PT variantで大きく異なることが明らかとなった(図2)<sup>11)</sup>. これを15歳以上でみるとPC/PS/AT欠損症近縁者における血栓の年間発症率は2.82%から4.89%に増加し, FVL/PT variantより上昇幅も大きい(表1B). しかし, この解析では新生児血栓症に触れていない. 私たちの日本における調査でもPC/PS/AT欠損症には*de novo*発症が稀であることから, 確定診断(遺伝子診断)を得た欠損家系の情報をえることがまず重要である.

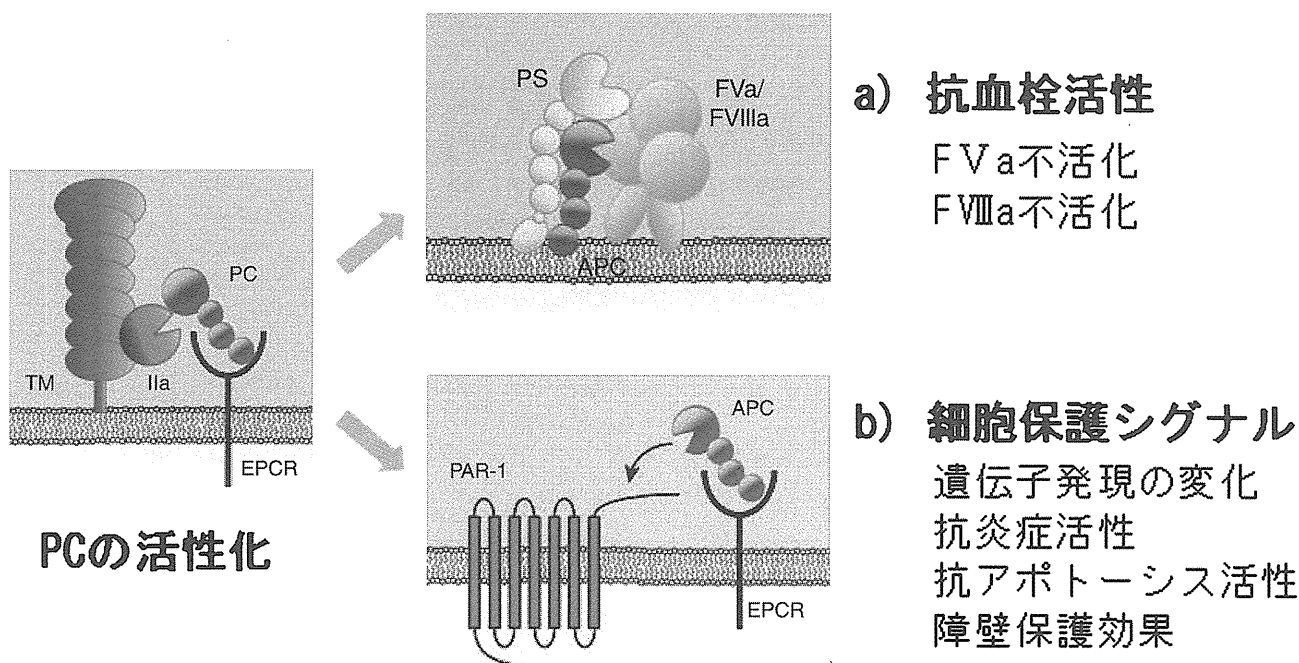


図1 プロテインC経路の構成分子とその反応。プロテインC (PC) は、血管内皮などの膜表面に存在する内皮PC受容体 (endothelial protein C receptor: EPCR) と結合し、活性化トロンピン (IIa)-トロンボモデュリン (TM) 複合体によって、その生理的活性化が促進される (左)。活性化したPC (APC) は、陰性荷電のリン脂質膜上でプロテインS (PS) の補酵素作用をうけ、活性化血液凝固第V因子 (FVa) と同第VIII因子 (FVIIIa) を蛋白分解して不活化することにより「抗血栓活性」を発揮する (a)。EPCRと結合したAPCは、プロテアーゼ活性化受容体 (protease-activated receptor 1: PAR1) を開裂することにより、さまざまな細胞保護効果をもたらす。また、標的細胞ごとに異なる受容体を介した直接効果も想定されている。文献6より改変。

### III 遺伝性血栓症の早期診断

日本人成人では深部静脈血栓症の成人患者の70%に3因子いずれかの低下があり、PS, PCおよびAT低下の割合は40%, 20%および10%で、それぞれその約半数の患者の片アレルに変異が確認される<sup>12,13)</sup>。小児については、これまでの国内報告例を検討し<sup>14)</sup>、石黒、瀧らの全国調査、高橋らの新生児の調査と合わせて、PS, PCおよびAT低下の割合は15%, 45%および10%と推定することができた<sup>15)</sup>。しかし、各因子低下にしめる変異保有者の割合は不明であった。

そこで私たちは、小児血栓症研究班を立ち上げ全国より依頼をうけ血栓性素因を疑う児の解析を積極的に進めた<sup>16)</sup>。過去5年間に小児血栓患者339人 (後天性:先天性4:1) を確認した。新生児は同時期に69人 (NICU入院当たり0.063%) で過去5年から倍増し、先天性の6例は全てPC欠損症であった。さらに2009年からの4年間にPC欠乏症23家系、PS欠乏症11家系およびAT欠乏症4家系の解析を終え、PROC変異11名 (全て発症 ホモ2, 複合ヘテロ5, ヘテロ4)、PROSI変異3名 (発症 ホモ1, ヘテロ2) およびSERPINC1変異4名 (全て未発症ヘテロ) の新規小児患者を同定した。10歳まで未発症、16歳で発症したPCおよびPS複合ヘテロ変異例を各々確認した。同時にPC

活性は低いがPROC変異のない患児を12名同定した。年齢による頻度と臨床像から、小児では新生児の頭蓋内出血/梗塞が先行する電撃性紫斑病が重要であることが明らかとなった。

さらに20歳未満の300名以上にこれまで行った血栓性素因解析の結果から、①血栓症は1歳未満が最も多いこと、②新生時期に頭蓋内病変によるPC異常症が多く、成人と異なる臨床像であること、③小学校高学年からの発症様式は成人型と同様であること、が明らかとなった。各因子活性基準値の下限を年齢群 (~日齢90, ~2歳, ~6歳, 7歳以上) の4群に分けると遺伝性血栓症診断のための3大抗凝固因子欠乏症の効率的なスクリーニングになる可能性を示した<sup>16)</sup>。

成人の活性低下の半数に遺伝子変異を認めないのは、血栓症診断時の消費の影響があると考えられる。このほか大欠失の見逃し、非翻訳領域あるいは他の調節遺伝子の影響なども否定できない。一方、小児では生理的に3因子とも生後しだいに活性が増加するため<sup>17)</sup>、活性下限値の設定は成人より困難である。新生児では3因子を同時測定した各因子の基準値がなく、PIVKAのPCとPSに対する影響も勘案しなくてはならない。今後出生早期の各因子活性の基準値を作成する必要がある。PC活性の生理的上昇の遅れる児が存在し<sup>18)</sup>、これが新生児期の血栓発症に関与してい

表1 遺伝性血栓症患者とその近親者における血栓症発症の危険率

A) 遺伝性血栓症			
遺伝性血栓症	オッズ比による危険率 (95% CI)		
	脳血管閉塞 (初回)	深部静脈血栓症 (初回, 再発)	
PC 欠損症	9.3 (4.8-18.0)	7.7 (4.4-13.4),	2.4 (1.2-4.4)
PS 欠損症	3.2 (1.2-8.4)	5.8 (3.0-11.0),	3.1 (1.5-6.5)
AT 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 (1.01-3.5)

B) 遺伝性血栓症患者の第一度および第二度近親者			
遺伝性血栓症	年間発生率 (%) (95% CI)	ハザード比 (95% CI)	p 値
PC/PS/AT 欠損症	2.82 (1.63-4.80) *	25.7 (12.2-54.2)	<.001
Factor V G1691A	0.25 (0.12-0.53)	1.7 (0.7-4.4)	.24
Factor II G20210A	0.42 (0.17-1.01)	2.6 (0.9-7.6)	.09
FVL+FII variants	2.33 (1.04-5.19)	19.6 (7.7-49.6)	<.01
なし	0.10 (0.06-0.17) 1 1		

PC : protein C, PS : protein S, AT : antithrombin, CI : 信頼区間 A は文献3, B は文献11 より改変。  
 \*15 歳以上では 4.89% (95% 信頼限界, 2.74-7.56, p<.001) と上昇幅も他群より大きい。

るかどうか, さらに症例の蓄積が必要である。

#### IV 三大抗凝固因子欠損症の補充療法

初回血栓症を発症した遺伝性 PC/PS/AT 欠損症の患者には, 抗凝固療法による再発予防を行う。成人では, 発症年齢からワーファリンを生体内服することが多い。深部静脈血栓症などの成人型発症様式をとる思春期の患者には, 成人に準じた治療管理が行われる。一方, 新生児・乳児では

血栓症の進行と再発の危険性が成人より低いため, とくに抗凝固療法の適応決定が難しい。新生児・乳児の PC 欠損症におけるワーファリン療法ではとくに奇異性血栓に注意する。最近の小児血栓症の治療管理ガイドラインでも, 新生児領域<sup>19)</sup>と小児領域<sup>20)</sup>は別扱いだいが, いずれも成人に匹敵する高いエビデンスレベルのものではない。

診断がついていない遺伝性 PC/PS/AT 欠損症患者の血栓発症急性期の補充療法には, 新鮮凍結血漿が用いられる。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

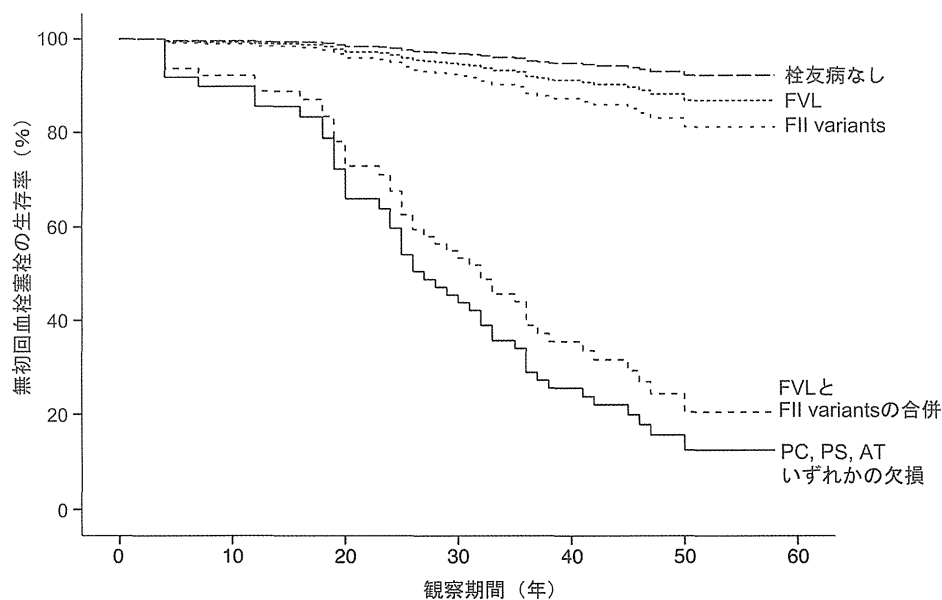


図2 遺伝性血栓症の近親者における血栓塞栓症なしの生存率。文献11より改変。

児では高いと考えられる。国内で使用できる各因子製剤はATとPCのみである。AT製剤の使用経験がある小児血液専門医は多い。一方、国内で唯一使用可能な血漿由来APC(アナクト®C; 化血研/帝人)は、先天性PC欠損症による血栓症に対してのみ保険適用で高価なため使用経験者が少ない。海外で敗血症治療時の有用性が否定された組み換えAPC製剤(rAPC)とは濃度も異なるが、頭蓋内出血を合併したPC欠損小児への使用には注意が必要である。ワーファリン過剰投与時に用いられるPPSB-HT®(日本製薬)にはPC濃度が極めて高いが、PC欠損症に対する保険適用はない。

新規抗血栓薬および線溶療法に関して新生児・乳児への使用方法に関する文献はあるがエビデンスが高いものではない。新生児・乳児の血栓症の診断には、小児血液および小児循環器専門医が新生児科医と連携して適切な検査と画像診断を行うことが必要である。

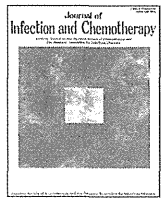
## V おわりに

血栓症を発症した児の血漿抗凝固因子活性から、遺伝性血栓症を早期診断することは難しい。両親が保因者であっても血栓症の未発症者であることが少なくないため、3世代にわたる注意深い問診が必要である。新生児のPROC変異保有者は血栓症のハイリスク集団と考え、低PC/PS活性が乖離した乳児新生児にはとくに注意が必要と思われる。遺伝性血栓症は生命を脅かし重篤な長期障害を残すため、家族の血栓性素因を早期に見出すことが大切である。

## 文 献

- von Brühl ML, Stark K, Steinhart A, et al: Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *J Exp Med*, 209: 819–835, 2012.
- Darbousset R, Thomas GM, Mezouar S, et al: Tissue factor-positive neutrophils bind to injured endothelial wall and initiate thrombus formation. *Blood*, 120: 2133–2143, 2012.
- Nowak-Göttl U, Janssen V, Manner D, et al: Venous thromboembolism in neonates and children — update 2013. *Thromb Res*, 131 (Suppl 1): S39–S41, 2013.
- 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, 21: 5–13, 2012.
- Ohmori H, Ochi F, Tanuma N, et al: Deep vein thrombosis in patients with severe motor and intellectual disabilities. *Ann Vasc Dis*, 6: 694–701, 2013.
- Bouwens EA, Stavenuiter F, Mosnier LO: Mechanisms of anticoagulant and cytoprotective actions of the protein C pathway. *J Thromb Haemost*, 11 (Suppl 1): 242–253, 2013.
- 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*, 119: 2392–2400, 2012.
- Navarro S, Medina P, Bonet E, et al: Association of the thrombomodulin gene c.1418C>T polymorphism with thrombomodulin levels and with venous thrombosis risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 33: 1435–1440, 2013.
- Tang L, Wang HF, Lu X, et al: Common genetic risk factors for venous thrombosis in the Chinese population. *Am J Hum Genet*, 92: 177–187, 2013.
- Miyawaki Y, Suzuki A, Fujita J, et al: Thrombosis from a prothrombin mutation conveying antithrombin resistance. *N Engl J Med*, 366: 2390–2396, 2012.
- Holzhauser S, Goldenberg NA, Junker R, et al: Inherited thrombophilia in children with venous thromboembolism and the familial risk of thromboembolism: an observational study. *Blood*, 120: 1510–1515, 2012.
- Kinoshita S, Iida H, Inoue S, et al: Protein S and protein C gene mutations in Japanese deep vein thrombosis patients. *Clin Biochem*, 38: 908–915, 2005.
- 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*, 124: 14–18, 2009.
- Ohga S, Kang D, Kinjo T, et al: Paediatric presentation and outcome of congenital protein C deficiency in Japan. *Haemophilia*, 19: 378–384, 2013.
- Ohga S, Ishiguro A, Takahashi Y, et al: Protein C deficiency as the major cause of thrombophilias in childhood. *Pediatr Int*, 55: 267–271, 2013.
- 大賀正一: 小児・新生時期における遺伝性血栓症(プロテインC異常症を含む)の効果的診断と治療予防法の確立に関する研究。厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業平成24–25年度総合研究報告書 2014年3月。
- Revel-Vilk S: The conundrum of neonatal coagulopathy. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2012: 450–454, 2012.
- Matsunaga Y, Ohga S, Kinjo T, et al: Neonatal asphyxia and renal failure as the presentation of non-inherited protein C deficiency. *J Perinatol*, 33: 239–241, 2013.
- Saxonhouse MA: Management of neonatal thrombosis. *Clin Perinatol*, 39: 191–208, 2012.
- Chalmers EI, Ganesen V, Liesner R, et al: Guideline on the investigation, management and prevention of venous thrombosis in children. *Br J Haematol*, 154: 196–207, 2011.





## Case report

## Staphylococcal endocarditis as the first manifestation of heritable protein S deficiency in childhood



Takayuki Hoshina, MD, PhD<sup>a,\*</sup>, Yasutaka Nakashima, MD<sup>a</sup>, Daisuke Sato, MD<sup>a</sup>, Etsuro Nanishi, MD<sup>a</sup>, Hisanori Nishio, MD, PhD<sup>a</sup>, Hazumu Nagata, MD<sup>a</sup>, Kenichiro Yamamura, MD<sup>a</sup>, Takehiko Doi, MD, PhD<sup>a</sup>, Yuichi Shiokawa, MD, PhD<sup>b</sup>, Yui Koga<sup>c</sup>, Dongchon Kang, MD, PhD<sup>c</sup>, Shouichi Ohga, MD, PhD<sup>a</sup>, Toshiro Hara, MD, PhD<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Pediatrics, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, Fukuoka, Japan

<sup>b</sup> Department of Cardiovascular Surgery, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, Fukuoka, Japan

<sup>c</sup> Department of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Kyushu University Hospital, Fukuoka, Japan

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 30 May 2013

Received in revised form

11 August 2013

Accepted 28 August 2013

## Keywords:

Protein S deficiency

Infective endocarditis

*Staphylococcus aureus*

Vegetation

Thromboembolism

## ABSTRACT

A 12-year-old Japanese girl developed infective endocarditis and central nervous system disease. The previously healthy girl showed altered consciousness and abnormal behaviors along with the classical signs of septic emboli. *Staphylococcus aureus* was isolated from peripheral blood, but not, the pleocytotic cerebrospinal fluid. Diagnostic imaging studies revealed a vegetative structure in the morphologically normal heart, and multiple thromboembolisms in the brain and spleen. Low plasma activity of protein S (12%) and thrombophilic family history allowed the genetic study, demonstrating that she carried a heterozygous mutation of *PROS1* (exon 13; 1689C > T, p.R474C). Surgical intervention of the thrombotic fibrous organization and subsequent anticoagulant therapy successfully managed the disease. There are no reports of infective endocarditis in childhood occurring as the first presentation of heritable thrombophilia. Protein S deficiency might be a risk factor for the development or exacerbation of infective endocarditis in children having no pre-existing heart disease.

© 2013, Japanese Society of Chemotherapy and The Japanese Association for Infectious Diseases. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Infective endocarditis (IE) is an infection of the mural endocardium caused by various bacteria or fungi. It rarely occurs in children presenting with vegetations, septic emboli, valve damages, and heart failure [1]. The majority of patients have underlying conditions such as rheumatic valvulopathy or congenital heart disease (CHD) [2]. Antibiotic managements controlled rheumatic heart diseases, and appreciably reduced the IE-risk in patients with unrepaired CHD. However, the incidence of pediatric IE is still increasing [2,3]. Advances in the cardiac surgery improved the survival rate of CHD patients, and might increase the number of IE-risk patients harboring bioprosthetic and synthetic devices. Recent reports delineated a continuing shift in the

epidemiology of pediatric IE toward a proportion of children without pre-existing heart disease [3,4]. The shift accounts for the growing numbers of preterm infants and children who need indwelling central venous catheters for the management. On the other hand, there is little information about the etiology of IE occurring in previously healthy children who have no structural heart disease.

Protein S (PS) deficiency is one of the genetic traits predisposing persons to hypercoagulability [5]. Homozygous *PROS1* mutation leads to fetal loss or, if any, neonatal purpura fulminans. Adult carriers of the heterozygous mutation are at high risk of stroke, pulmonary embolism, and deep vein thrombosis. PS deficiency can be acquired in vitamin K deficiency, warfarin or sex hormone therapy, pregnancy, liver disease, and infections. PS-deficient patients are prone to thromboembolic events during cardiac surgery. There are no reports of IE as the first manifestation of heritable thrombophilia.

We report herewith a pediatric case of PS-deficient heterozygote, beginning with an intractable IE and systemic thromboembolism in no pre-existing heart disease.

\* Corresponding author. Department of Pediatrics, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, 3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan. Tel.: +81 92 642 5421; fax: +81 92 642 5435.

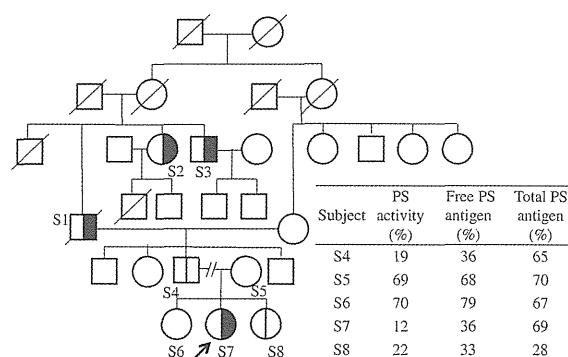
E-mail address: [hoshina@pediatr.med.kyushu-u.ac.jp](mailto:hoshina@pediatr.med.kyushu-u.ac.jp) (T. Hoshina).

## 2. Case report

A 12-year-old Japanese girl was transferred to our hospital for the treatment of IE and central nervous system (CNS) disease of unknown etiology. The patient with no previous illness developed headache and vomiting. The next day (the 2nd day of illness), she showed fever and disturbed consciousness. On the 3rd day of illness, the patient was admitted to our affiliated hospital because CNS infection was suspected. Peripheral blood studies showed a leukocyte count of  $16.09 \times 10^9/L$  and C-reactive protein (CRP) of 16.18 mg/dl. Cerebrospinal fluid (CSF) analysis revealed a cell count of 54/ $\mu l$  with 46% polymorphonuclear cells and 54% lymphocytes, glucose of 85 mg/dl, and protein of 32.2 mg/dl. Methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA) was isolated from the peripheral blood but not CSF cultures. Electroencephalogram revealed diffuse slow wave. Cefotaxime, panipenem/betamipron and acyclovir were intravenously started for the treatment of meningoencephalitis. Because of the thrombophilic family history and an abnormal structure in the left ventricle assessed by echocardiography, she was referred to our hospital at the 5th day of illness.

On admission, an afebrile well-nourished girl showed a pulse rate of 56 beats/min, a respiratory rate of 22 breaths/min and a blood pressure of 110/59 mmHg. The patient was listless but showed no meningeal signs. The Glasgow Coma Scale was E4V5M6. Auscultations revealed normal heart and respiratory sounds. There was no hepatosplenomegaly. Splinter hemorrhage and non-tender petechiae were found on the toes. Roth spots were determined on the retina. Complete blood cell counts showed a leukocyte count of  $10.59 \times 10^9/L$  with 83.5% segmented neutrophils, a hemoglobin concentration of 12.3 g/dl and a platelet count of  $185 \times 10^9/L$ . Liver and kidney functions were normal. CRP concentration was 7.45 mg/dl. Serum brain natriuretic peptide levels were elevated [51.3 pg/mL; reference range (rr): 0–18.4]. Coagulation studies revealed normal ranges of fibrinogen 321 mg/dl, prothrombin time (PT%) 78%, and activated partial thromboplastin time 32.5 s (rr: 26–41), and slightly increased levels of fibrinogen degradation products 5.4  $\mu g/ml$  (rr: <5.0), D-dimer 2.0  $\mu g/ml$  (rr: <0.5), thrombin-antithrombin complex 3.7 ng/ml (rr: <3.0), and plasmin  $\alpha$ -2-antiplasmin complex 1.2  $\mu g/ml$  (rr: <0.8). Plasma anticoagulant activities showed low PS of 12% (rr: 59–128), subnormal protein C (PC) of 66% (rr: 75–131), and normal antithrombin of 103% (rr: 80–120). Protein induced by vitamin K absence/antagonist-II was undetectable. Normal PS antigen levels (69%; rr: 65–135) and free-PS antigen levels (36%; rr: 60–150) favored the diagnosis of type III PS deficiency. Detailed family history disclosed that two siblings of the paternal grandfather were diagnosed as having PS deficiency because of mesenteric artery thrombosis and pulmonary infarction in their fifties. Asymptomatic father and younger sister of the patient had low PS activity (Fig. 1).

Venous blood cultures yielded MSSA. Sterile CSF showed a cell count of 98/ $\mu l$  with 88% polymorphonuclear leukocytes and 12% lymphocytes, glucose of 99 mg/dl, and protein of 21.0 mg/dl. Transesophageal echocardiography revealed a vegetative structure (13  $\times$  5 mm) in the left ventricular outflow tract. Head magnetic resonance imaging showed multiple white matter lesions with high signal intensity of T1-weighted fluid-attenuated inversion recovery and diffusion weighted image (DWI) on the splenium of corpus callosum and frontal and parietal lobes, indicating cerebral venous infarction. These determined the diagnosis of IE and cerebral infarctions associated with PS deficiency. Cefazolin (CEZ) and gentamicin (GM) therapy led to a partial resolution of symptoms but not vegetative mass. Because of the flare of fever and peripheral thrombotic lesions, the intraventricular lesion was removed by cardiac surgery on the 26th day of illness. The pedunculated structure located on the left ventricle wall adjacent to left coronary

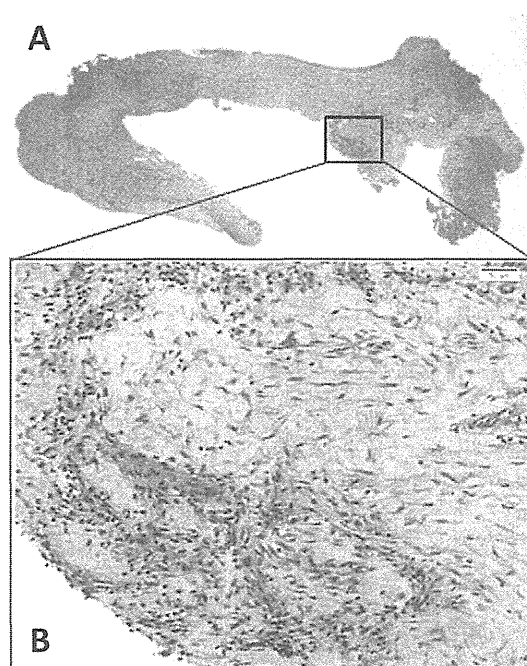


**Fig. 1.** Family pedigree of the present patient (arrow), and plasma protein S (PS) activity, free PS antigen, and total PS antigen in Subjects 4–8 (table). Subject 1 developed thromboembolisms in the leg at 49 years of age, cerebral infarction at 50 years, and mesenteric arterial thrombosis at 62 years. Subject 2 suffered from mesenteric arterial thrombosis at 59 years of age. Subject 3 had a history of pulmonary infarction. Subjects 4 (42 years old) and 8 (10 years old) had no history of thrombosis. Subjects 2 and 3 had been diagnosed as having PS deficiency. S: Subject.

cus, containing organizing thrombi with granulation tissue, but not mesenchymal cells or bacterial colonies (Fig. 2). Antimicrobial (CEZ + GM) and anticoagulant therapy (aspirin + warfarin following heparinization) was then started. After the stop of antimicrobial agents at the 50th day of illness, she is alive and well on warfarin therapy. The genetic study demonstrated that the patient was a heterozygous carrier of the reported mutation in exon 13 of *PROS1* (1689C > T, Arg474Cys) [6].

## 3. Discussion

Associated conditions in IE children without preexisting heart disease include neoplasms, prematurity, connective tissue disorders, and diabetes mellitus [3]. However, inherited thrombophilia



**Fig. 2.** Histological examination of a pedunculated structure on the left ventricle wall contained organizing thrombi with granulation tissue and fibrous tissue (Hematoxylin and eosin stain, original magnification A:  $\times$  40, B:  $\times$  400). There are edematous and myxoid changes, but no mesenchymal cells or bacterial colonies were observed.

had not been recognized a risk of IE. Lin et al. [4] characterized the feature of IE in non-CHD children; prevalent infection of *S. aureus* (MRSA and MSSA), vegetations in the right-sided heart, older age, and higher requirement of surgical intervention. Although the present patient later disclosed an episode of deciduous tooth loss two weeks prior to the onset of disease, the contribution remains unknown to the development of staphylococcal IE. The pathological findings of the intracardiac mass might be suggestive for nonbacterial thrombotic endocarditis (NBTE), arising in association with primary antiphospholipid syndrome, myeloproliferative disorders and malignancy [7]. On the other hand, granulation in the lesion, not usually observed in NBTE, indicated the presence of inflammation. Absent mesenchymal cells precluded the diagnosis of myxomatous tumor. The present case fulfilled the clinical criteria of IE, although *S. aureus* was identified from blood culture one time only. Furthermore, cerebral infarction, the most serious extracardiac complication of two different types of endocarditis, did not recur on anticoagulant therapy after the surgical intervention. These observations suggested that the predisposition of hypercoagulability could precipitate the formation of intra-ventricular clot with certain triggers such as occult bacteremia, and resulted in the intractable IE. Even if IE occurred in chance association with PS deficiency, it is not to say exaggerated that thrombophilia was one of the exacerbating factors of IE.

The major concern is the location of the vegetative lesion; why did it originate from the out-flow tract of left ventricle, but not, of right one in this patient? There are many reported cases of PS-deficient patients who developed arterial thromboembolism including stroke and mesenteric artery thrombosis. PS-deficient children might have a potential risk of arterial thrombosis [8]. Nevertheless, the association of heterozygous PS deficiency with venous but not arterial thrombosis is proven [9]. Girolami et al. [10] reported a 31-year-old man who developed both left and right atrial thrombosis, as presenting symptom of heritable PS deficiency. Jobic et al. [11] described a 77-year-old woman with unremarkable medical history who had native aortic valve thrombosis associated with PS deficiency. Maldjian et al. [12] reported that a previously healthy 39-year-old woman developed intracardiac thrombus due to PS-deficiency. On the other hand, no pediatric patient with isolated PS deficiency was reported to suffer from intracardiac thrombosis. Paç et al. [13] reported a case of biventricular cardiac thrombi in a 3-year old-girl with PC and PS deficiencies after the treatment of urinary tract infection and pneumonia. Mattiau et al. [14] described a 2-year-old girl with PC deficiency who presented with thrombus in the left ventricle and systemic emboli after the treatment of pneumonia. In these cases, intracardiac thrombi occurred in association with infection, but not limited to either-sided heart. To the best of our knowledge, there is only one case having a large vegetation of IE and PS deficiency [15]. The clinical course of the 81-year-old woman with no pre-existing heart disease was progressive. Taken together, surgical intervention must be inevitable for the treatment of thrombophilic IE patient, irrespective of the location of vegetative lesions.

The most prevalent form of heritable thrombophilia in Japan is PS deficiency, because of the polymorphism of PS-tokushima [16]. However, the mutation carriers are considerably found in the series of deep vein thrombosis [6,16]. The patient's pedigree disclosed the segregation of thrombophilic patient and PS deficiency. Secondary decrease of plasma PS activity in infection makes it difficult to diagnose heterozygous PS deficiency. The management of infection-

associated hypercoagulability in such mutant carriers should be individualized according to the types of thrombophilia. Further study is needed to determine whether heritable thrombophilia is a risk factor for the development of IE in previously healthy non-CHD children. However, we should pay more attention to heritable thrombophilia in the management of pediatric IE.

### Conflicts of interest

The authors state that they have no conflicts of interest.

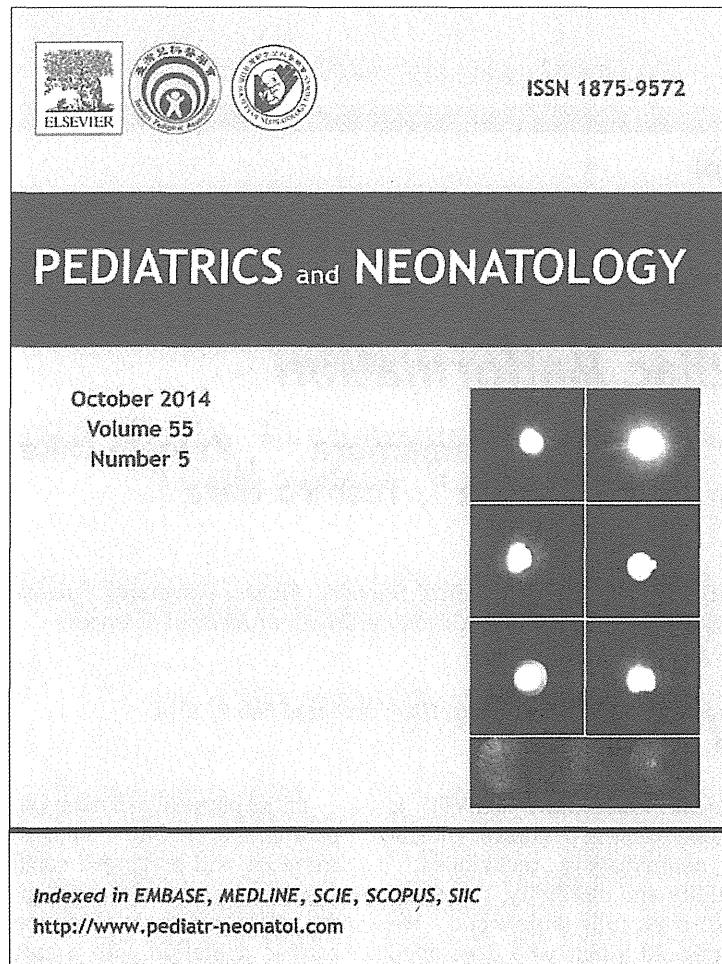
### Acknowledgments

We thank Prof. Yoshinao Oda and Dr. Kenichi Kohashi and Yuichi Yamada (Department of Pathology, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, Fukuoka, Japan) and Dr. Hatsue Ueda (Department of Pathology, National Cerebral and Cardiovascular Center, Osaka, Japan) for helpful discussion. This work was supported in part by a Grant-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan and by a grant from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan.

### References

- [1] Hoen B, Duval X. Clinical practice. Infective endocarditis. *N Engl J Med* 2013;368:1425–33.
- [2] Johnson JA, Boyce TG, Cetta F, Steckelberg JM, Johnson JN. Infective endocarditis in the pediatric patient: a 60-year single-institution review. *Mayo Clin Proc* 2012;87:629–35.
- [3] Day MD, Gauvreau K, Shulman S, Newburger JW. Characteristics of children hospitalized with infective endocarditis. *Circulation* 2009;119:865–70.
- [4] Lin YT, Hsieh KS, Chen YS, Huang IF, Cheng MF. Infective endocarditis in children without underlying heart disease. *J Microbiol Immunol Infect* 2013;46:121–8.
- [5] Ten Kate MK, van der Meer J. Protein S deficiency: a clinical perspective. *Haemophilia* 2008;14:1222–8.
- [6] Yamazaki T, Katsumi A, Kagami K, Okamoto Y, Sugiura I, Hamaguchi M, et al. Molecular basis of a hereditary type I protein S deficiency caused by a substitution of Cys for Arg474. *Blood* 1996;87:4643–50.
- [7] Mazokopakis EE, Syros PK, Starakis IK. Nonbacterial thrombotic endocarditis (marantic endocarditis) in cancer patients. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets* 2010;10:84–6.
- [8] Kenet G, Lüttkhoff LK, Albisetti M, Bernard T, Bonduel M, Brandao L, et al. Impact of thrombophilia on risk of arterial ischemic stroke or cerebral sinus-venous thrombosis in neonates and children: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Circulation* 2010;121:1838–47.
- [9] Anderson JA, Lim W, Weitz JI. Genetics of coagulation: what the cardiologist needs to know. *Can J Cardiol* 2013;29:75–88.
- [10] Girolami A, Simioni P, Sartori MT, Caenazzo A. Intra-cardial thrombosis with systemic and pulmonary embolism as main symptoms in a patient with protein S deficiency. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1992;3:485–8.
- [11] Jobic Y, Provost K, Larlet JM, Mondine P, Gilard M, Boschat J, et al. Intermittent left coronary occlusion caused by native aortic valve thrombosis in a patient with protein S deficiency. *J Am Soc Echocardiogr* 1999;12:1114–6.
- [12] Maldjian PD, Petsavage JM. Intracardiac thrombus and pulmonary embolism with cavitation and pneumomediastinum in a patient with protein S deficiency. *J Thorac Imaging* 2006;21:222–4.
- [13] Paç FA, Çağdaş DN. Treatment of massive cardiac thrombi in a patient with protein C and protein S deficiency. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2007;18:699–702.
- [14] Mattiau A, Tabachnik E, Sthoeger D, Birk E. Thrombus in the left ventricle of a child with systemic emboli: an unusual presentation of hereditary protein C deficiency. *Pediatrics* 2001;107:421–2.
- [15] Cheng HL, Lin WC, Shih PY, Huang CH, Hsu YC, Yie JC, et al. *Streptococcus agalactiae* infective endocarditis with large vegetation in a patient with underlying protein S deficiency. *Infection* 2013;41:247–50.
- [16] Miyata T, Sato Y, Ishikawa J, Okada H, Takeshita S, Sakata T, et al. Prevalence of genetic mutations in protein S, protein C and antithrombin genes in Japanese patients with deep vein thrombosis. *Thromb Res* 2009;124:14–8.

Provided for non-commercial research and education use.  
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/authorsrights>