

然抗凝固因子の下限值を設定し、これが遺伝子変異保有者の診断に有効であるかを全国から症例を集積して検討した。

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、*PROS1*(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遺伝性血栓友病疑いの小児・新生児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。生後3か月までのPC・PS活性については同時測定による再定義が必要であると考え、既報告を含めた症例集積から、遺伝子解析対象選定に有用なPC/PS活性比(0.5)を検討した。新生児には発症時の消費性凝固障害とビタミンK欠乏によるPC・PS活性値への影響を考慮して血液凝固第Ⅶ因子とPIVKAの測定、さらに抗カルジオリピン抗体の評価も同時に行った。新生児発症が想定され神経学的後遺症を有する原因不明の脳梗塞児にも年齢による各因子活性下限スクリーニング法を用いて遺伝子解析を実施した。

C. 研究結果

1. PC、PS及びAT欠損症例

2015年2月から2015年2月までの1年間には全国より30家系41名の診療相談を受け、20家系25検体の血栓性素因遺伝子解析を行った。PC欠乏症疑いは16家系21名(表1)、PS欠乏症疑いは12家系14名、AT欠乏症疑いは1家系4名、それ以外の血栓症1名であった(表2)。本研究班で作成した基準を用いて、3か月以内の児には再検による経過観察を行い、15名にPC遺伝子解析を、9名にPS遺伝子解析を、4名にAT遺伝子解析を行った(表3)。

*PROC*変異は複合ヘテロ1名、ヘテロ4名、変異なし9名、*PROS1*変異は複合ヘテロ1名、ヘテロ1名、変異なし7名であった。*SERPINC1*変異はヘテロ変異の1家系を同定した。PC異常16家系のうち10名(63%)、PS異常12家系のうち2名(17%)であった。AT異常の1名は21生日のまれな新生児発症例であった。

2. PC、PS及びAT欠損症の遺伝子型

同定した患者の各遺伝子型を表3に示す。PC欠損症複合ヘテロ変異は、exon 7とexon 9のいずれもミスセンスであったが、この27歳が血栓症初発となった妊婦のPC活性は51%であった。Exon 7の同変異を有する児の出生時のPC活性は53%であった。解析した14名中、複合ヘテロ変異1名(7%)、ヘテロ変異4名(29%)、変異なし9名(64%)であった。PS欠損症複合ヘテロ変異は、exon 6のミスセンス変異(PS-Tokushima)とexon 9のナンセンス変異で、この患者は14歳で初めて下肢の深部静脈血栓症(Deep vein thrombosis:VT)で発症し、PS活性は34%であった。解析した9名中、複合ヘテロ変異1名(11%)、ヘテロ変異1名(11%)、変異なし7名(78%)であった。AT欠損症の1家系はヘテロミスセンス変異であった。

3. PC、PS及びAT欠損症の活性値と診断、臨床像

PC変異保有者の5名のうち、PC/PS活性値が、<0.5は1名のみであった。一方、PC変異保有のない10名のうち<0.5が3名いたが何

れも6か月までの乳児であった。PS変異保有者の2名は何れも、PS/PC活性比が、<0.5であった。一方、PS変異保有のない7名のうち、PS/PC活性比<0.5が4名いたがこれは何れも10歳以上であった。

周産期に母子ともに血栓症で発症した2家系はそれぞれPC異常症とAT異常症であった。出生時に臍帯内血液凝固を呈し、PC欠損症を疑われたものの無症状であったPRO Cヘテロ変異の児は、5歳のときEBウイルス関連血球貪食症候群の治療中に脳静脈洞血栓と右房巨大血栓を発症し、開胸血栓除

去をうけた。他方、PROSI複合ヘテロ変異(片アレルはPS-Tokushima)の男児は14歳のときに、下肢の深部静脈血栓症が初発となったが誘因は明らかでなかった。

4. PC/PS活性比による遺伝子異常予測

3か月未満児のPC変異保有者診断が困難であるため、新生児期のPC/PS活性比を検査の日齢によって図1に示した。日齢10日未満では正常新生児でも活性比<0.5による分離が不良であることが明らかとなった。

表1. 新生児・小児プロテインC異常症(疑い児を含む)の集積症例(2015年2月-2016年2月)

病系	発症年齢	性	発症時情報	初発の状況	PC活性	PS活性	AT活性	変異
1	現在4か月	男	痙攣発作後呼吸不全	腸管出血性大腸炎	17% (日齢7) → 48% (10か月)	69%		
2	現在11か月	女		心臓内出血	17% (日齢4)	30% (日齢4)		
2-1	27歳	女		脳梗塞 脳出血 脳動脈瘤 心臓内出血 → 脳出血	21%	14%		有
2-2	日齢7	男	23w 4d 787g	肺出血VH	22%	66%	93%	有
4	現在6か月	女	羊水減少 胎動減少(不全期) 41w1d 2252g Ag 8/9	日齢10の脳内出血	48% (日齢12) → 36% (日齢20) → 54% (日齢13)	82% (日齢19) → 95% (日齢13)	88% (日齢12) → 96% (日齢13)	無
5	現在11か月	男	38w 5d 2215g Ag 2/4/7/8 脳出血 呼吸不全	日齢1の脳内出血	12% (日齢7) → 20% (10か月)	43% (日齢7) → 42% (10か月)	42% (日齢7) → 24% (10か月)	無
6	現在7か月	女	50w 5 (50.5w) 2100g 胎動不安	脳出血、多発性脳出血(日齢2)	26% (7か月)	88% (7か月)		無
7	現在7か月	女	38w 0d, 2274g 胎動不安	3日目の脳出血	PC/PS 117/45 → 12/68 → 51/106 (日齢5 → 10 → 20か月)			無
8	現在7か月	男	?	多発性脳出血	48%	61%	79%	無
9	現在41歳	男	?	脳性麻痺(新生児期脳梗塞疑い)	84% (warfarin中)	23% (warfarin中)	97%	有
10	現在3歳	男	22w 2270g (産後死亡)	1ヶ月後肺動脈血栓症	48% (産後) Ag 70%	13%	FVII 80%	
11	24歳	女	21w 38w 2080g 胎動減少	全身性出血、脳出血、消化管出血、血尿	22 → 48%	79 → 58%	58% FVII 12%	無
12	6歳	男	なし	心臓の病、呼吸器の病に併発する多発性出血	41%	85%		無
13	1歳3か月	男	初産児 38w 35w 脳出血 2500g AP 10/10	3か月後脳出血 5か月後多発性脳出血	47%	81%	85%	
14-1	5歳	男	出生時肺動脈血栓症	28w 4d 胎動不安、胎動減少 胎内出血	34% (3歳)	82% (3歳)	150% (3歳)	有
14-2	3歳	男		脳出血	92%	64%		無
14-3	3歳	女		脳出血、消化管出血	39% → 74% (再発)	89%		有
14-4	3歳	男		脳出血	22%	102%		
15	14歳	男	Down症 呼吸不全 脳出血	呼吸不全による多発性出血	39% → 64% (産後2か月) → 39% (産後5か月)	74%	92%, aPL 26 > 10U/ml	有
16-1	38歳	女		第一子産後下腔DVT	52%	111%	102%	
16-2	8歳	?		脳出血				
16-3	2歳	?		脳出血				

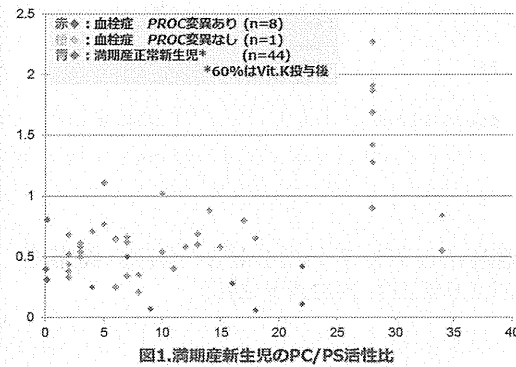
表2. 新生児・小児プロテインS (PS) 異常症およびアンチトロンピン (AT) 異常症(疑い児を含む)の集積症例(2015年2月-2016年2月)

病系	発症年齢	性	発症時情報	初発の状況	PC活性	PS活性	AT活性	変異
PS異常症								
1	日齢6	男	40w 37.85g 経産分娩異常なし	小腸壊死	41% (日齢10)	21% (日齢10)		
2-1	母	女		不妊症 G4PO	84%	58% (Ag 64%)	aCL 3+	
2-2	日齢20	?	36w 23.62g AP 8/9 前置胎盤 胎動不安	日齢4-5 高心拍数 呼吸器障害の疑い		26% (Ag 29%)		
3	現在13歳	女		脳性麻痺(新生児期脳梗塞疑い)	103%	60%	114%	無
4	現在43歳	女		脳性麻痺(新生児期脳梗塞疑い)	147%	58%	119%, 高 aCL 26 > 10U/ml	無
5	3歳	男	Down症	血栓症は明らかでない	49% → 38% (再発)	104% → 91% (再発)	freePS64 PSAg 46%	
6	10歳	男		頭部外傷時、頭部左側硬膜下血腫	47%			
7	12歳	女	先天性CMV感染症, Ep	Flu後DVT (下大～左大腿～左膝窩静脈)	72%	37%		無
8	12歳	女	脳性麻痺?	感染性発熱? の下腔DVT	89%	57%	vWF 39%	
9	14歳	男	なし	下腔DVT	93%	35% (Ag 68%)	warfarin中 PCSS PS11	有
10	15歳	女	なし (11歳 一過性網下障害)	DVT PTE	92%	34%	AT抵抗性無し	無
11	15歳	男	なし	T-ALL治療中の多発性脳梗塞	138%	71%	101%	無
12-1	40歳	女		腎臓性出血 甲状腺炎 溶血性貧血 脳後DVT	93%	29%	103%	有
12-2	6歳	女		無症状		40% (Ag 18%)		
AT異常症								
1-1	日齢21	?	39w 26.39g 仮死 胎動不安	新生児期脳内出血、脳出血、脳室内出血	32% (日齢23) → 36% (56% (日齢23) → 61% (43% (日齢23)			有
1-2	本児出産	女		脳静脈血栓による出血性脳梗塞				有
1-3	2歳	男			107%	96%	112%	無
1-4	63歳	女		下腔静脈血栓症 (50歳頃長期入院臥床)	25% warfarin中	39% warfarin中	50%	有
2	14歳	男		サッカー中に2度脳梗塞	129%	123%		

表3. 新生児・小児PC異常症例の遺伝子型 (2015年2月-2016年2月)

家系	発症年齢	性	PC活性	PS活性	AT活性	変異	遺伝子型
3-1	27歳	女	51%	14%		複合ヘテロ	ex7: c.565 C>T, p.Arg 189 Trp (CGG>TGG)/ ex9: c.1234 G>A, p.Gly 412 Ser
3-2	日齢0?	男	53%	66%	93%	ヘテロ	ex7: c.565 C>T, p.Arg 189 Trp (CGG>TGG)
4	現在5か月	女	46%	88%	88%	なし	no
5	現在1か月	男	12%	43%	42%	なし	no
6	現在7か月	女	56%	88%		なし	no
7	現在3か月	女	17%			なし	no
8	新生児?	男	48%	61%	79%	PROC	なし
9	現在41歳	男	64%	23%	97%	なし、PROS1変異なし	no (PROC, PROS1)
11	2か月	女	22%	79%	58%	なし	no
12	6か月	男	41%	85%		なし	no
14-1	5歳	男	34%	82%	150%	ヘテロ	ex9: c.1015 G>A, p.Val 339 Met (CTG>ATG)
14-2	35歳	男	92%	64%		なし	no
14-3	35歳	女	50%	89%		ヘテロ	ex9: c.1015 G>A, p.Val 339 Met (CTG>ATG)
15	14歳	男	39%	74%	90%	ヘテロ	ex9: c.988 C>A, p.Leu 330 Ile (CTC>ATC)
3	現在13歳	女	103%	60%	90%	なし	no
4	現在43歳	女	147%	58%	90%	なし	no
7	12歳	女	72%	37%		なし	no
8	12歳	女	89%	57%		なし	no
9	14歳	男	93%	35%		複合ヘテロ	ex6: c.586 A>G, p.Lys 196 Glu (AAG>GAG)* / ex8: c.760 C>T, p.Gln
10	15歳	女	92%	34%		なし	no
11	15歳	男	138%	71%	101%	なし	no
12-1	40歳	女	93%	29%	103%	ヘテロ	ex15: c.2000 C>T, p.Pro 667 Leu
1-1	日齢21	男女	32%	56%	43%	ヘテロ、PROC変異なし	ex5: c.813 C>G, p.Phe 271 Leu (TTC>TTG)
1-2	出産後10日	女				ヘテロ	ex5: c.813 C>G, p.Phe 271 Leu (TTC>TTG)
1-3	2歳	男	107%	96%	112%	なし	no
1-4	63歳	女	25%?	39%	50%	ヘテロ	ex5: c.813 C>G, p.Phe 271 Leu (TTC>TTG)

*: PS-Tokushima



D. 考察

今回私たちが2015年に解析を修了した小児・新生児遺伝性血栓症疑い20家系27名のうち、60%はPC欠損症でその半数が新生児発症であった。これには、胎児発症と思われる例も含まれる。一方、35%を占めるPS欠損症の発症者は10歳以上で、新生児発症と考えられる変異保有例はなかった。この研究班が発足した前向き研究で初めてAT血栓症の新生児発症例を同定した。

我々が設定した年齢に応じた各因子の活

性下限値を用いたスクリーニングは有用であったが、感度と特異度は十分とは言えなかった。3か月未満のうち、PC欠損症の発症がとくに集中する新生児の活性下限値の設定は難しく、日齢10以内の新生児に対しては健常児でもかなり低い例が存在するため分離が不良である。妊婦と新生児はPC/PS活性比による診断はワンポイントでは難しく、とくに新生児乳児における遺伝性PC欠損症の診断は比の動態を追うことが必要であろう。

この1年間の解析でも、小児遺伝性血栓症の特徴である、①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が多い、③胎児発症がある、④ヘテロ変異保有の小児は感染などの誘因を契機に、思春期ではPS欠損症を中心に誘因が明らかでなくても成人型DVTを発症することが明らかとなった。成人と明確に異なる病型は、“小児・新生児PC欠損症”を血栓性素因ではなく“栓友病”の疾患概念で捉えた診療ガイドラインが必要であることを示す。

本年度の解析の特徴は、周産期に母子と

もに発症した2家系が同定されたことである。いずれも妊娠中が初発となり、緊急分娩となった2児ともに新生児も重篤な頭蓋内出血・梗塞による病変を発症したヘテロ変異保有者であった。PC複合ヘテロの母は活性が比較的保たれ、妊娠まで血栓は起こしていない。この妊娠中にはPS活性値のほうに二次的に低下し、鑑別が極めて困難であった。もう一家系は極めてまれな新生児発症のAT欠損症であった。この変異を保有する母が周産期にいずれも発症するリスクのあることはこの研究班を立ち上げるときに予測していたことであるがこれを単年度に見いだすこととなった。

新生児発症の変異保有例を正しく診断し早期に治療介入できるようにするためには、母体の正確な診断が必須である。さらに、変異検出率を高めるPC/PS活性比の設定には、とくに早期新生児に対するPC/PS活性比の判別式を確立することが必要であると考えられる。

さらに日本人小児に発症するPCおよびPS異常症には両アレル変異を有して新生児に発症する例の他に、片アレルがTS-TokushimaでPS活性が比較的保たれ、思春期に誘因なく発症する例が予想外に多くいるため、これらの早期治療介入のために循環器内科、血管外科、血液内科医ほかとの連携がますます必要になるであろう。

E. 結論

小児期に発症する遺伝性血栓症は、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、そしてまれなAT欠損症に分けた疾患概念として診療指針を作成する必要がある。3か月未満の年齢に応じた新しいスクリーニング法を確立するために、今後も継続して遺伝子型、活性と発症様式の情報集積を継続していくことが必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Ichiyama M, Ohga S, Ochiai M, Fukushima K, Ishimura M, Torio M, Urata M, Hotta T, Kang D, Hara T. Fetal

hydrocephalus and neonatal stroke as the first presentation of protein C

deficiency. *Brain Dev* 38, 253-256. 2016
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. Age-specific onset and distribution of the natural anticoagulant deficiency in pediatric thromboembolism, *J Pediatr Res* 79, 81-86, 2016

3) Amamoto R, Uchiyama T, Yagi M, Monji K, Song Y, Oda Y, Shiota M, Yokomizo A, Naito S, Kang D. The Expression of Ubiquitous Mitochondrial Creatine Kinase Is Downregulated as Prostate Cancer Progression, *J Cancer* 7, 50-59, 2016

4) Arakawa T, Kobayashi-Yurugi T, Alguet Y, Iwanari H, Hatae H, Iwata M, Abe Y, Hino T, Ikeda-Suno C, Kuma H, Kang D, Murata T, Hamakubo T, Cameron AD, Kobayashi T, Hamasaki N, Iwata S. Crystal structure of the anion exchanger domain of human erythrocyte band 3, *Science* 350, 680-684, 2015

5) Ichihara K, Yomamoto Y, Hotta T, Hosogaya S, Miyachi H, Itoh Y, Ishibashi M, Kang D. Collaborative derivation of reference intervals for major clinical laboratory tests in Japan. *Ann Clin Biochem* 2016 (in press)

6) Mukai N, Ninomiya T, Hata J, Hirakawa Y, Ikeda F, Fukuhara M, Hotta T, Koga M, Nakamura U, Kang D, Kitazono T, Kiyohara Y. Association of hemoglobin Alc and glycated albumin with carotid atherosclerosis in community-dwelling Japanese subjects: the Hisayama Study. *Cardiovasc Diabetol* 14, 84. 2015

7) Wang L, Ishihara T, Ibayashi Y, Tatsushima K, Setoyama D, Hanada Y, Takeichi Y, Sakamoto S, Yokota S, Mihara K, Kang D, Ishihara N, Takayanagi R, Nomura M. Disruption of mitochondrial fission in the liver protects mice from diet-induced obesity and metabolic deterioration, *Diabetologia* 58, 2371-2380. 2015

8) 大賀正一: 播種性血管内凝固症候群. 今日の小児治療指針第16版 医学書院 2015. 557-9.

9) 大賀正一: 第II部各論(疾患)第1章 血液・造血器疾患. D 血小板と止血・血栓の異常 2 血栓症と血栓性素因 a 遺伝性血栓症(栓友病) 小児血液・腫瘍学 診断と治療社 2015: 459-61.

2. 学会発表

1) Ohga S, Ichiyama M, Ochiai M, Urata M, Hotta T, Kang D, Hara T: Symposium 10 Advance and issues on thrombotic and hemorrhagic diseases in childhood.

Clinical and molecular aspects of pediatric natural anticoagulant deficiency in Japan. The 11th Asian Society for Pediatric Research (ASPR 2015) Apr. 17, Osaka/第118回日本小児科学会学術集会、2015年4月17-19日、大阪.

2) Ohga S: Symposium 24-3: Stroke in Children. The Role of Coagulopathy in Children with Ischemic Stroke. The 13th Asian and Oceanian Congress of Child Neurology (2015 AOCCN) May 17, 2015, Taipei, Taiwan.

3) 大賀正一、康東天、嶋緑倫、落合正行、福嶋恒太郎、金子政時、高橋幸博、瀧正志、石黒精)「新生児・小児血栓班」4. 新生児と小児に発症する特発性血栓症. 血栓素因部会・静脈血栓症/肺塞栓症部会. 第10回日本血栓止血学会SSCシンポジウム. 2016年2月20日、東京

4) 大賀正一: 小児・新生児領域の血栓症. 第22回小児血液フォーラム in OKAYAMA. 2015年 2月7日、岡山

5) 大賀正一: 新生児異常の早期発見と根治療法への挑戦. 第32回山口県母性衛生学会学術講演会 特別講演. 2015年7月5日、山口大学医学部総合研究棟S、宇部

6) 大賀正一: 感染症と凝固異常～先天性・後天性血栓性素因から～. 第18回神奈川小児血液・感染症フォーラム. 2015年9月25日、キャメロットジャパン、横浜

7) 奥園清香、石村匡崇、二宮崇仁、神野俊介、西尾壽乗、李守永、賀来典久、高田英俊、大賀正一、原寿郎: 当院で経験したPROC遺伝子の遺伝的背景が異なる電撃性紫斑病

(purpura fluminans PF) の3例. 第57回日本小児血液・がん学会学術集会、2015年11月27-29日、甲府

8) 坂田恭史、古田貴士、平野玲史、福永真之介、石川雄一、岩井崇、中村好貴、梶本まどか、長谷川俊史、石村匡崇、高田英俊、大賀正一: 新生児多発性脳梗塞で発症した色素失調症の1例. 第6回中国四国PID研究会、2015. 7. 25、岡山

9) 坂田恭史、古田貴士、平野玲史、福永真之介、石川雄一、岩井崇、中村好貴、梶本まどか、長谷川俊史、石村匡崇、高田英俊、大賀正一: 多発性脳梗塞で発症し、新規のIKBKG遺伝子変異を認めた色素失調症の1例. 第67回中国四国小児科学会、2015. 11. 7-8、宇部

10) 向野文貴、井上裕文、山田紘子、岡桃子、梶本まどか、松重武志、大賀正一: 単純ヘルペス脳炎に脳出血を合併した女児の一例. 第26回日本小児神経学会中国・四国地方会 2015. 7. 18、岡山

11) 小林光、井上裕文、岡桃子、梶本まどか、東良紘、松重武志、野村貞宏、大賀正一: 頭痛と複視で発症した脳幹梗塞の12歳女児例. 第67回中国四国小児科学会 2015. 11. 7-8、宇部

12) 坂田恭史、古田貴士、平野玲史、福永真之介、石川雄一、岩井崇、中村好貴、梶本まどか、長谷川俊史、石村匡崇、高田英俊、大賀正一: 多発性脳梗塞で発症し、新規のIKBKG遺伝子変異を認めた色素失調症の1例. 第67回中国四国小児科学会 2015. 11. 7-8、宇部

13) 東良紘、橘高節明、水谷誠、大賀正一: ビタミンK欠乏症を認めた進行性家族性肝内胆汁鬱滞(PFIC)が疑われる2症例. 第127回日本小児科学会山口地方会. 2015. 11. 8、宇部

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

新生児のプロテイン C 活性基準範囲の作成

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

研究協力者

市山 正子 福岡市立こども病院 NICU

石村 匡崇 九州大学大学院医学研究院成長発達医学分野 助教

研究要旨

新生児期発症の遺伝性血栓症では、プロテインC(PC)欠乏症が最も多く、頭蓋内病変や電撃性紫斑病を発症する。新生児期は凝固・抗凝固因子活性が生理的に低くばらつきも大きいため、PCやプロテインS(PS)活性の基準範囲の設定は難しく、遺伝子解析の適応が確立されていない。今回、健常新生児のPCとPS活性値を測定し、新生児血栓症発症群の遺伝子解析に基づき遺伝性PC欠乏症の遺伝子検査の適応指標について検討した。健常新生児例において、PC活性値は新生児期にばらつきが大きく(中央値31%、範囲5~68%)、日齢を経て上昇した。PS活性値は日齢に伴う変動は認めなかった(49.5%、24~76%)。発症例において、PC/PS活性比は遺伝子変異群が非変異群に比べて低値であった(中央値0.24と0.64、 $p<0.05$)。ROC解析で求められたPC/PS活性比 <0.3 で、変異検出のOdds比は13.3 (95%CI 1.35-324.4、 $p<0.05$)であり、遺伝子検査の適応基準として有用となる可能性が示された。

A. 研究目的

日本人成人の深部静脈血栓症はプロテイン C (PC)、プロテイン S (PS) とアンチトロンビン (AT) の抗凝固因子の活性低下例が多い。近年、日本人小児の遺伝性血栓症においても、約 70%がこの 3 大因子の先天性欠乏症であることが明らかにされている。日齢 28 以内の新生児期は、成人に達するまでに血栓症の発症頻度が最も高い。これまで私たちは、新生児期に頭蓋内病変と電撃性紫斑病で発症する PC 欠乏症が多く、また PC と PS 活性の乖離が発症の指標になる可能性を報告した。

新生児期は凝固・抗凝固因子活性が生理的に低くばらつきも大きいため、PC や PS 活性の基準範囲の設定は難しく、遺伝子解析の適応が確立されていない。今回、健常新生児の PC と PS 活

性を測定し、新生児血栓症発症群の遺伝子解析に基づき遺伝性 PC 欠乏症の遺伝子検査の適応指標について検討した。

B. 研究方法

1) 健常児群 2013 年 6 月~2015 年 3 月に九州大学病院およびその関連病院で、在胎 37 週~40 週、2500 g 以上で新生児仮死などの合併症なく出生した健常新生児 52 例を対象に、PC および PS 活性値を測定した。

2) PC 欠乏症群 論文または学会報告された日本人新生児発症 PC 欠乏症 50 例のうち、遺伝子検査を施行された 34 例を対象とした。既知の変異を認めた群 (変異群 25 例) と認めない群 (非変異群 9 例) に分けて、PC 活性値、発症日齢および臨床症状を記録した。さらに、PC と PS 活

性値が記録されている 18 例 (変異群 13 例、非変異群 5 例) では PC/PS 活性比を算出した。

1) 2) のデータを基に遺伝子検査の適応について、ノンパラメトリック検定と Logistic 回帰分析で統計解析を行った。

C. 研究結果

1) 健常児群 PC 活性値は新生児期にばらつきが大きく (中央値 31%、範囲 5~68%)、日齢を経て上昇した (相関係数 $r:0.66$, $p<0.01$)。PS 活性値は日齢に伴う変動は認めなかった (49.5%、24~76%)。

2) PC 欠乏症群 変異群 25 例の内訳はホモ変異 2 例、複合ヘテロ 16 例、ヘテロ 7 例であった。発症日齢は、非変異群は全例が胎児期もしくは日齢 6 までの新生児期早期であった。変異群は日齢 7 以降の発症例も認めた (胎児期~日齢 6: 17 例、日齢 7~13: 4 例、日齢 14~28: 2 例)。臨床症状は、非変異群が電撃性紫斑病 (1 例)、頭蓋内病変 (8 例) であった。変異群は頭蓋内病変 (8 例)、電撃性紫斑病 (5 例)、頭蓋内病変と電撃性紫斑病 (8 例)、頭蓋内病変と硝子体出血 (2 例) と複数の症状を呈した症例も多く認めた。18 例 (変異群 13 例、非変異群 5 例) の PC/PS 活性比は、変異群は非変異群に比べて低値であった (中央値 0.24 と 0.64, $p<0.05$) (表 1)。

表 1 変異群、非変異群の PC/PS 活性比

	変異群	非変異群	p 値
PC/PS	0.24 (0.03-0.91)	0.64 (0.27-0.75)	<0.05

ROC 解析にて活性比<0.3 を cut-off と設定して Logistic 解析を行った。変異検出の Odds 比は 13.3 (95%CI 1.35-324.4, $p<0.05$) であり、新生児期は PC/PS 活性比<0.3 が遺伝子検査の適応基準として有用となる可能性が示された (表 2)。

表 2 活性比<0.3 を cut-off とした Logistic 解析

	オッズ比	95%信頼区間	p 値
変異検出	13.3	1.35-324.4	$p<0.05$

D. 考察

新生児期の PC 活性値はばらつきが大きく、健常児群にも低値を示す症例を認めた。健常児群では日齢 14 以降に PC 活性値は上昇していた。出生後早期に PC 活性値が低い症例は、生後 2 週間以降に再検することが望ましい。

PC 欠乏症では、PC/PS 活性比<0.3 で有意な変異検出比を認めた。PC/PS<0.3 が遺伝子検査の指標であることが示唆された。

非変異群は新生児期早期までに全例発症していた。これは、早期に PC 活性値が低いことに加え、新生児仮死、低血圧、低酸素、感染、炎症などの血栓症の危険因子による影響が推測される。変異群は非変異群に比べて複数の症状を呈し、より重症である傾向を認めた。発症日齢や臨床症状も遺伝子検査適応の指標になる可能性が考えられた。血栓性素因や危険因子の的確な把握、発症や再発予防が予後改善に必要であり、今後は診断、遺伝子検査の適応基準と予防法の更なる確立が求められる。

E. 結論

新生児発症 PC 欠乏症の遺伝子検査の適応は、発症日齢と臨床症状に加えて、出生 30 日までの PC/PS 活性比<0.3 という指標が有用である。

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) 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. Age-specific onset and distribution of the natural anticoagulant deficiency in pediatric

thromboembolism. *Pediatr Res.* 2016 Jan;79(1-1):81-6.

2) Ochiai M, Ichiyama M, Iwayama M, Sakai Y, Yoshida K, Hara T. Longitudinal study of very low birth weight infants until 9 years of age; attention deficit hyperactivity and autistic features are correlated with their cognitive functions. *Early Hum Dev.* 2015 Dec;91(12):783-6.

3) Yamamoto H, Ishimura M, Ochiai M, Takada H, Kusuhara K, Nakatsu Y, Tsuzuki T, Mitani K, Hara T. BTK gene targeting by homologous recombination using a helper - dependent adenovirus / adeno - associated virus hybrid vector. *Gene Ther.* 2016 Feb;23(2):205-13.

4) Hashiguchi K, Morioka T, Murakami N, Yamashita K, Hiwatashi A, Ochiai M, Morokuma S, Iihara K. Clinical Significance of Prenatal and Postnatal Heavily T2-Weighted Magnetic Resonance Images in Patients with Myelomeningocele. *Pediatr Neurosurg.* 2015 Nov;50(6):310-20.

5) Otera Y, Morokuma S, Fukushima K, Anami A, Yumoto Y, Ito Y, Ochiai M, Hashiguchi K, Wake N, Sago H, Kato K. Neurological outcomes in Chiari type II malformations and their correlation to morphological findings and fetal heart rate patterns: a retrospective study. *BMC Res Notes.* 2015 Feb 27;8:57.

6) Ichiyama M, Ohga S, Ochiai M, Fukushima K, Ishimura M, Torio M, Urata M, Hotta T, Kang D, Hara T. Fetal hydrocephalus and neonatal stroke as the first presentation of protein C deficiency. *Brain Dev.* 2016 Feb;38(2):253-6.

7) 井上普介、西尾寿乗、高田英俊、酒井康成、名西悦郎、落合正行、原寿郎 自然免疫受容体 Nod1

のリガンドは母仔の血管病変を介して IUGR および IUFD をおこす *日本産婦人科・新生児血液学会誌* 25(1): 5091-5092、2015.

2. 学会発表

1) Inoue H, Kusuda T, Fujiyoshi J, Matsushita Y, Ochiai M, Nishio H, Takada H, Hara T. Nod1 signaling induces intrauterine fetal growth restriction and fetal death in mice. The 11th Asian Society for Pediatric Research. April 14th to 18th, 2015, Osaka, Japan

2) 安岡和昭、澤野徹、酒見好弘、山下博徳、落合正行：胎児期に頭蓋内出血を認めた先天性プロテイン C 欠損症の 1 例. 第 51 回日本周産期・新生児医学会、2015.7.10-12、福岡

3) 倉田浩昭、落合正行、田中幸一、中村有香里、楠田剛、井上普介、藤吉順子、松下悠紀、原寿郎：極低出生体重児における高フェリチン血症の危険因子. 第 51 回日本周産期・新生児医学会、2015.7.10-12、福岡

4) 倉田浩昭、落合正行、田中幸一、中村有香里、楠田剛、井上普介、藤吉順子、松下悠紀、原寿郎：気管支肺異形成症の重症化に関連する周産期因子とサイトカインプロファイルの解析. 第 51 回日本周産期・新生児医学会、2015.7.10-12、福岡

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

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 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pilot studyを行った。平成26~27年の2年間に総合周産期母子医療センターで管理された妊婦520例を対象とした。重症妊娠高血圧症候群、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、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60名（11.5%）を抽出し、その内1名の母体にProtein Cのエクソン7とエクソン9に1塩基置換によるミスセンス変異をヘテロ接合体で認めた。その児においては、エクソン7に1塩基置換によるミスセンス変異を認めた。本研究は、母体リスクからの新生児血栓症のスクリーニングの可能性を示唆したが、母体発症前の遺伝子変異の診断に関しては課題が残った。

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。

B. 研究方法

平成26年1月～27年12月の期間に宮崎大学附属病院産婦人科で管理した妊婦を対象に後方視的に研究を行った。ハイリスク妊婦は、以下のような要件を有する妊婦と定義した。妊娠合併症；重症妊娠高血圧症候群、母体合併症・既往歴；深部静脈血栓症、脳梗塞、その他血栓性疾患、家族歴；2親等以内の脳梗塞等の血栓性疾患。これらのリスクを持つ妊婦に対して、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。

（倫理面への配慮）

本研究は、後方視的研究である。採血は、医学的な見地から測定の必要性がある場合のみ施行された。結果の公表については、匿名とし、本人同意ができないように配慮することで、妊婦の同意を得た。

C. 研究結果

平成26年1月～平成27年12月の期間に、当大学病院で管理した520例の臨床背景を表1に示す。

表 1. 母体・新生児の背景

年齢 (歳)	33 (18-46)
分娩週数(週)	38 (22-41)
初産婦数	241 (46.3%)
経膣：帝切	242：278

注：数値：中央値（最小値－最大値）
ハイリスク妊婦として 60 名を抽出した。詳細を表 2 に示す。

表 2. リスク因子

リスク因子	対象数
妊娠合併症	18
重症妊娠高血圧腎症	13
胎盤早期剥離	5
母体既往・合併症	12
脳梗塞	3
抗 SS-A 抗体陽性	4
AVM	2
深部静脈血栓症	1
孔脳症	1
心房内血栓症	1
2 親等以内の家族歴	12
脳梗塞	8
心筋梗塞	4

注：複数のリスク因子保有例あり。

60 例中 1 例に Protein C の遺伝子解析の結果、異常を認めた。本症例の経過を以下に示す。

（母体経過）妊娠 25 週 6 日に意識消失発作のため当院へ搬送となった。両心房内に血栓を認めた。同日に緊急帝王切開後に開胸後血栓を除去した。その後、抗凝固療法を施行した。術後 5 日目の造影 CT 検査では、大腿静脈から骨盤内の静脈に多数の血栓を認め、一時的に下大静脈フィルターを挿入した。その後は、ワルファリン内服で、特に合併症なく経過している。

（新生児経過）1 生日に脳室内出血を発症した。その後に脳室拡大の進行のため 134 生日に VP シ

ヤントを留置した。現在、外来管理中である。

本症例の Protein C および S の抗原量と活性の推移を表 3 に示した。

（遺伝子解析）

Protein S 遺伝子解析；イントロン・エクソン境界領域を含む全エクソン 1 から 15 までを検索し、エクソン内に変異を認めなかった。

Protein C 遺伝子解析；母体において、イントロン・エクソン境界領域を含む全エクソン 1 から 9 までを検索し、エクソン 7 とエクソン 9 に 1 塩基置換によるミスセンス変異をヘテロ接合体で認めた。児においては、母に変異が見つかったエクソン 7 と 9 を検索し、エクソン 7 に母と同じ 1 塩基置換によるミスセンス変異を認めた。

表 3. Protein C および S の抗原量、活性の推移

検査項目	分娩当日	分娩後 7 日	分娩後 35 日	分娩後 54 日
PC 抗原量	61	15	23	21
PC 活性	51	10	10	10
PS 抗原量	50	52	40	47
PS 活性	14	10	13	19

（遺伝子解析は、九州大学病院検査部 堀田多恵子氏に依頼した。）

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母体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の可能性について pilot study を行った。

その結果、リスク因子を有する妊婦は全体の約 11.5%であった。今回の検討では、その中から 1 例 (1.7%) の母体の Protein C の遺伝子解析において、エクソン 7 とエクソン 9 に 1 塩基置換による

ミスセンス変異をヘテロ接合体で認めた。その児においては、エクソン7に母と同じ1塩基置換によるミスセンス変異を認めた。本症例において、母体では、遺伝子異常に「妊娠」という因子が加わり深部静脈血栓症を発症した事が推察された。一方、児においては、遺伝子異常に「未熟性」という因子が加わり血栓後の脳室内出血を来したと推察した。

今回の症例においては、次回の妊娠時に母児に対する血栓予防対策を立てる事が可能となった。しかしながら、日本人において、Protein S および Protein C の遺伝子変異は、白人と比較してそれぞれ5~10倍、3倍多いとされている【1】。このような遺伝子変異を発症前に如何にして見つけるかについては課題が残った。

E. 結論

心房内血栓（深部静脈血栓症）を契機に、母児の protein C の遺伝子変異を見つけることができた。これにより、次回妊娠時における血栓症予防対策を立てる事が可能になった。しかしながら、リスク因子発症前に如何にして遺伝子変異を見

つけるかについては、今後の課題である。

F. 研究危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況、参考文献

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. 参考文献

【1】 Kinoshita S, Iida H, Inoue S, et al.

Protein S and Protein C gene mutations in Japanese deep vein thrombosis patients. *Clinical Biochemistry* 38 (2005), 908-915.

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

分担研究者

嶋 緑倫 奈良県立医科大学小児科 教授

研究協力者

野上 恵嗣 奈良県立医科大学小児科学教室

橋本 直樹 奈良県立医科大学小児科学教室

松本 智子 奈良県立医科大学小児科学教室

荻原 健一 奈良県立医科大学小児科学教室

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を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。凝固波形解析法は包括的凝固機能を定量的に解析できる。また、Thrombopath 法は内因性 PC/PS 機能を評価することができる。今年度は脳梗塞を発症した2小児における包括的凝固機能および PC/PS 系の関与について検索した。

B. 研究方法

凝固波形解析：凝固波形解析(CWA)は PT および APTT でフィブリン形成過程をリアルタイムに凝固波形として描出し、各種パラメータの解析によって凝固機能を評価することができる。

Thrombopath 法は、蛇毒(Protac)の有無におけるトロンビン生成の比(PiCi)を用いて血漿中の抗凝固機能を反映でき、内因性 PC/PS 機能を評価することができる。

(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

1. 水痘後脳梗塞を発症した症例

Thrombopath を用いた評価では、患児は PiCi が 85.4%(NP; 80-90%)と正常レベルであった。CWA による凝固機能評価では、PT の Clot time ; 11.5(NP; 10.9)sec、最大凝固速度(|min 1|) ; 9.36(NP; 8.05)および最大凝固加速度(|min 2|) ; 4.45(NP; 3.99)また APTT では、Clot time ; 28.1(NP; 27.8)sec、最大凝固速度(|min 1|) ; 6.49(NP; 5.20)および最大凝固加速度(|min 2|) ; 0.50(NP; 0.39)であった。PT および APTT で Clot time は正常と同等レベルを示す一方、PT、APTT 共に|min 1|と|min 2|が正常より高値を示した。この症例は PC/PS 系の異常は認めないが凝固機能が亢進しており、血栓症の原因のひとつではないかと考えられる。

2. 無熱性痙攣出現後脳梗塞が診断された症例

凝固検査では PT;11.8s、APTT; 40.9s、Fib 206, FDP; 0.6、D-dimer; 0.2、ATIII; 88%、PC 抗原;59%、PC 活性; 68%、PS 抗原 69%、PS; 60%。本例の Thrombopath による PiCi%が 69.9%と低下(NP; 80-90%)したので、内因性の PC/PS 経路の減弱あるいは抑制を確認した。症例要約より、PC および PS の低下を反映する結果であった。PT の Clot time ; 10.5(NP; 10.9)sec、最大凝固速度(|min 1|) ; 1.65(NP;1.09)および最大凝固加速度(|min 2|) ; 0.22(NP; 0.19)また APTT では、Clot time ; 31.8(NP; 32.7)sec、最大凝固速度(|min 1|) ; 4.17(NP; 3.02)および最大凝固加速度(|min 2|) ; 0.64(NP; 0.46)であった。PT および APTT で Clot time は正常と同等レベルを示す一方、PT、APTT 共に|min 1|と|min 2|が正常より高値を示した。この症例は PC/PS 系の異常を認め、凝固機能が亢進することで血栓傾向を示す可能性があると考えられた。

D. 考察・結論

血栓症の凝血学的異常を評価するために本研究では、血栓症発症小児例2例について包括的凝固機能解析法である凝固波形解析とPC/PS異常を検索できるThrombp

ath法で検討し、両方法が血栓症の凝血学的評価法として有用であることを明らかにした。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) Matsumoto T, Nogami K, Okuda M, Shima M: Optimization of the automated, CS-200 0i™ method for measuring low levels of von Willebrand factor ristocetin cofactor activity (VWF:RCo). International Journal of Hematology. 2015; 101(2): 126-132
- 2) Yoshioka A, Ishii E, Ueno T, Usami I, Kobayashi M, Kobayashi R, Sotomatsu M, Shirahata A, Suzuki T, Taki M, Ishida Y, Matsushita T, Shima M, Nogami K, Sakai M, Kigasawa H, Fukutake K: The International Immune Tolerance Induction Study and its follow-up study on Japanese hemophilia A patients with inhibitors. International Journal of Hematology. 2015; 101 (4) : 362-368
- 3) Yada K, Nogami K, Takeyama M, Ogiwara K, Wakabayashi H, Shima M: Mild hemophilia A patient with novel Pro1809Leu mutation develops an anti-C2 antibody inhibiting allogeneic but not autologous factor VIII activity. J Thromb Haemost. 2015; 13(10): 1843-53
- 4) Furukawa S, Nogami K, Ogiwara K, Yada K, Minami H, Shima M: Systematic monitoring of hemostatic management in hemophilia A patients with inhibitor in the perioperative period using rotational thromboelastometry. J Thromb Haemost. 2015; 13(7): 1279-84
- 5) Nogami K, Shima M: Phenotypic Heterogeneity of Hemostasis in Severe Hemophilia. Semin Thromb Hemost. 2015; 41(8): 826-31
- 6) Chitlur M, Rivard GE, Lillicrap D, Mann K, Shima M, Young G: Recommendations

for performing thromboelastography/
thromboelastometry in hemophilia:
communication from the SSC of the ISTH.
Journal of Thrombosis and Haemostasis.
2015; 12(1):103-6

7) Shima M, Hermans C, de Moerloose P:
Novel products for haemostasis.
Haemophilia. 2014; 20(4); 29-35

8) Muto A, Yoshihashi K, Takeda M,
Kitazawa T, Soeda T, Igawa T, Sakamoto Y,
Haraya K, Kawabe Y, Shima M, Yoshioka A,
Hattori K: Anti-factor IXa/X bispecific
antibody (ACE910): hemostatic potency
against ongoing bleeds in a hemophilia A
model and the possibility of routine
supplementation. J Thromb Haemost. 2014;
12(2): 206-213.

9) Yada K, Nogami K, Kawamura T, Minami
H, Shima M: The first case of
intlh-related inversion in Japanese
haemophilia A patients. Haemophilia.
2014; 20(6): 408-410

10) Haku J, Nogami K, Matsumoto T,
Ogiwara K, Shima M: Optimal monitoring of
bypass therapy in hemophilia A patients
with inhibitors by the use of clot
waveform analysis. Journal of Thrombosis
and Haemostasis. 2014; 12(3): 355-362.

2. 学会発表

野上恵嗣：最近明らかにされた遺伝子血栓
症. 第25回日本産婦人科・新生児血液学会,
2015. 6. 5-6

G. 知的財産権の出願・登録状況、参考
文献

なし

研究テーマ：血栓症患者の遺伝子異常についての検討

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

本邦の血栓症患者における先天性血栓性素因の遺伝子異常の発現頻度、各遺伝子異常の血栓症発症リスクについて検討するため、血栓症を発症した患者のアンチトロンビン、プロテインC、プロテインSの遺伝子解析を行った。解析した2家系において、各々プロテインSの遺伝子異常、プロテインCの遺伝子異常を認めた。遺伝子解析により先天性血栓性素因を正確に診断でき、更に家族への適切な遺伝カウンセリングから血栓予防教育が可能となり、遺伝子解析の臨床的有用性は極めて高いことが示唆された。

A. 研究目的

日本人における先天性血栓性素因の多くは、アンチトロンビン(AT)異常症、プロテインC(PC)異常症、プロテインS(PS)異常症の3つであることが知られている。そこで先天性血栓性素因の遺伝子異常の発現頻度、各遺伝子異常の血栓症発症リスクについて検討するため、血栓症を発症した患者のAT、PC、PSの遺伝子解析を行った。

B. 研究方法

対象は、血栓塞栓症を発症し先天性血栓性素因の存在が疑われ、遺伝子検査のための検体採取に対して同意が得られた患者である。患者の静脈血を採取し、九州大学病院臨床検査部でアンチトロンビン、プロテインC、プロテインSの遺伝子検査を行った。この遺伝子検査のために必

要な採血量は1回2mlであり、採血は1回のみである。

(倫理面への配慮)

聖マリアンナ医科大学の生命倫理委員会へ本研究の実施申請を行い、2013年3月に「血栓症患者の遺伝子解析」の実施が承認された(承認番号 第2365号)。

C. 研究結果

2家系2名の遺伝子解析を行った。1例目は14歳の男性。深部静脈血栓症(DVT)を発症し、PS活性が35%と低値であった。PSの遺伝子解析において、PS徳島変異とエクソン8の一塩基置換によるナンセンス変異を認めた。2例目は38歳女性。妊娠中にDVTを発症し、PC活性が52%と低値であった。PCの遺伝子解析において、エクソン9の一塩基欠失によるナンセン

ス変異を認めた。両症例共、遺伝子解析により診断を確定することができた。両症例とも家系内で初めて診断された症例であり、今後家族の検査についても検討している。

D. 考察

遺伝子異常が認められた2家系の患者家族に対して、正確な先天性血栓性素因の診断、正しい情報提供を行うことができた。

今後希望に応じて家族の検査を行う予定である。遺伝子検査の結果に基づいた適切な血栓症の予防教育は、血栓症の一次予防において極めて重要と考えられる。

E. 結論

先天性血栓性素因の正確な診断に遺伝子解析は極めて有用であることが示唆された。更に家族への適切な遺伝カウンセリングから血栓予防教育が可能となり、遺伝子解析の臨床的有用性は極めて高いことが示唆された。今後症例を増やして血栓症患者における遺伝子異常の頻度や各遺伝子異常の血栓症発症リスクについて検討したい。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 瀧 正志：播種性血管内凝固、小児血液・腫瘍学、日本小児血液・がん学会編集、診断と治療社、東京、p453-456、2015
- 2) 足利朋子、瀧 正志：止血・血栓に関連する血漿とその成分、小児血液・腫瘍学、日本小児血液・がん学会編集、診断と治療社、東京、p25-27、2015
- 3) 瀧 正志：特発性血栓症、難病辞典、尾崎承一編集、学研、東京 p289-291、2015

4) Atsuki Yamashita, Chiai Nagae, Mika Mori, Tomoko Ashikaga, Mieko Akita, Noriko Suzuki, Satoshi Yamazaki, Shinobu Tatsunami, Shigenobu Takayama, Masashi Taki: Analysis of anticoagulant effect of unfractionated heparin by using thrombin generation assay in vitro. J. St. Marianna. Univ. 6(1):15-21, 2015

5) 瀧 正志：DICの病態解明の進歩と新しい診断基準、小児科診療 78(12):1747-1752、2015

2. 学会発表

国内学会

- 1) 辻村浩司、井本清美、鈴木典子、山崎哲、高山成伸、瀧 正志：凝固検査用検体の遠心条件に関する検討～残存血小板数について～、第16回日本検査血液学会、名古屋、2015.7.11-12
- 2) 大賀正一、康東天、嶋緑倫、落合正行、福嶋恒太郎、金子政時、高橋幸博、瀧 正志、石黒精：新生児と小児に発症する特発性血栓症、第10回日本血栓止血学会SSCシンポジウム、2016.2.20

国際学会

- 1) Shouichi Ohga, Masashi Taki, Dongchon Kang, Masayuki Ochiai, Akira Ishiguro, Yukihiro Takahashi, Midori Shima, Masatoki Kaneko, Kotaro Fukushima, Toshiro Hara: The role of coagulopathy in children with ischemic stroke. AOCCN2015, Taipei, 2015.5.14-17

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・小児の血漿中抗凝固能の測定法の開発

研究分担者

高橋 幸博 奈良県立医科大学 総合周産期母子医療センター 教授

研究協力者

中川 隆志 奈良県立医科大学 総合周産期センター 助教

研究要旨

血栓症は、凝固能の亢進と抗凝固能の低下から発症する。抗凝固能は、プロテインC/プロテインSによるプロテインC凝固制御機構、アンチトロンビン制御機構、組織因子制御機構などが関与する。これら抗凝固機構のうち、プロテインC、プロテインS、アンチトロンビンは肝臓で産生され、肝臓の未熟な新生児は、生理的に抗凝固能の低下がある。

ThromboPath[®] (Hemosll) を用い、プロテインC、アンチトロンビン制御能を評価した。

A. 研究目的

特発性血栓症の発症には、主に肝臓で産生される抗凝固因子のプロテインC、プロテインS、アンチトロンビンが関与する。特に先天性血栓症では、プロテインCおよびアンチトロンビンが重要である。

そこで、ThromboPath[®] (Hemosll) を用い、血漿中のプロテインC、あるいはアンチトロンビンの抗凝固能を評価した。

ThromboPath[®] (Hemosll) は、プロテインCを特異的に活性化する蛇毒成分のプロタックを被検血漿に添加し、血漿中のプロテインCを活性化プロテインCに変換させ、組織因子とリン脂質で凝固惹起を起こし、被検血漿中のプロテインC凝固制御機構を評価する測定法である。したがって、すべての抗凝固因子の発達が完成した成人ではプロテインC凝固制御機構を反映する。しかし、新生児・乳児は、肝臓の

未熟性からプロテインC、プロテインS、アンチトロンビンともに産生低下があり、プロテインC、プロテインSはビタミンK依存性の抗凝固因子であることから、ビタミンK欠乏状態ではさらに抗凝固能の低下が生じる。

我々は、血漿中の個々の抗凝固因子の定量に加え、血漿中の種々の抗凝固因子全体での抗凝固能を測定するため、ThromboPath[®] (Hemosll) を用いて、抗凝固能の評価と血栓症の発症予防や治療の評価に役立つかを検討した。

B. 研究方法

ThromboPath[®] (Hemosll : アイ・エル・ジャパン社) は ACLTOPCTS300 を用いて測定した。解析はプロタック添加あるいは非添加でのトロンビン産生量と、両測定値から得られるPiCi%で検討した。

プロテイン C 欠乏血漿、あるいはアンチトロンビン欠乏血漿は、ともに免疫吸着法で作成された市販欠乏血漿を用いた。プロテイン C は純化標品、を純化アンチトロンビンは市販アンチトロンビン III 製剤および純化標品を用いた。

新生児クエン酸 Na 血漿へのプロテイン C、アンチトロンビン、新鮮凍結血漿添加補正実験も行った。

対象は新生児 14 例、乳児 20 例、健常成人 20 例で、被検血漿は、止血検査終了後に廃棄となる残余血漿で、止血異常のない血漿を用いた。

(倫理面への配慮)

本研究は本学の倫理委員会の承認を得て実施した (本学受付番号 807-2)。

C. 研究結果

1. ThromboPath[®]のプロテイン C 凝固制御指標の PiCi%とアンチトロンビンとの相関

PiCi%は、プロタック非添加時のトロンビン産生量からプロタック添加時のトロンビン産生量を引き、その値をプロタック非添加時のトロンビン産生量で除して、100 倍したものである。すなわち、プロタックで被検血漿中のプロテイン C をすべて活性化プロテイン C にすることで、活性化 V 因子、活性化 VIII 因子を不活化する。基準値は 90%前後となる。乳児、幼児では低値である。

PiCi%はプロテイン C 凝固制御能を反映するが、新生児・乳児では、プロテイン C 以外にもアンチトロンビンも低値で、PiCi%とアンチトロンビン活性との間で、新生児では $r=0.42$ で中位の相関、幼児では同じく $r=0.3$ と正の弱い相関が、成人では $r=0.36$ と負の弱い相関を示した。

2. アンチトロンビン欠乏血漿へのアンチトロン

ビン添加試験

アンチトロンビン添加により、プロタック非添加でのトロンビン産生は、アンチトロンビン添加にともない低下した。

プロタック添加でのトロンビン産生はアンチトロンビンが 70%で急激に低下した。

また、PiCi%もアンチトロンビン 70%で急激に上昇した。

アンチトロンビン 70%以上と 70%未満の 2 群間で有意な差がみられた。

3. 新生児クエン酸 Na 血漿 (n=7) にアンチトロンビンを負荷し、100%にした場合のプロタック非添加、添加および PiCi%の比較

プロタック非添加ではアンチトロンビンを 100%に補正した際、有意にトロンビン産生が低下した。

プロタック添加ではアンチトロンビン添加で、わずかに低下したが有意差がなかった。

PiCi%でも同様にアンチトロンビン添加では有意な上昇はなかった。

D. 考察

ThromboPath[®]は被検血漿に組織因子とリン脂質を加えることで凝固を惹起する。凝固反応経路は主に外因系経路ではあるが、同時に活性化 VII 因子とともに IX 因子を活性化し内因系経路にも影響する。また、凝固過程で生じるトロンビンは V 因子や VIII 因子を活性化し、加速度的にトロンビンが律速増加させる。ThromboPath[®]は時間当たりのトロンビン産生を、トロンビン特異合成発色基質の OD 値の変化量で測定するものである。その際、反応開始前に被検血漿中のプロテイン C をプロタックであらかじめ活性化し、凝固速度を抑制することでプロテイン C 凝固制御能を評価する。しかし、血漿中にはプロテイン S やアンチトロン

ビンのほか、新生児では α 2-マクログロブリンなどもトロンビンを抑制する。アンチトロンビン欠乏血漿は、アンチトロンビンのみ吸着除去した成人血漿に相当し、プロタック添加、非添加、PiCi%すべてにおいてアンチトロンビン70%を境にトロンビン産生が抑制された。新生児・乳児ではPiCi%とアンチトロンビン活性との間に関連がみられ、プロタック非添加で有意なトロンビン産生低下がみられたことから、新生児・乳児では、主たる抗凝固因子はプロテインC凝固制御機構ではあるが、プロテインC以外の抗凝固因子の凝固抑制系も重要であることが判明した。

E. 結論

新生児・乳児では、主な凝固制御機構はプロテインC凝固制御機構ではあるが、プロテインC以外の抗凝固因子の凝固抑制系も考慮し、治療にあたる必要がある。

F. 研究発表

学会発表

1. 中川隆志、西久保敏也、高橋幸博、武山雅博、野上恵嗣、豆田清美、山口直子、嶋緑倫：新生児の止血機能での antithrombin の意義についての検討。

第37回日本血栓止血学会 甲府市総合市民会館、2015.5.21-23、山梨

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 －

プロテイン C 欠乏症に脳死肝移植が成功したわが国最初の例

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

昨年度、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欠乏症に肝移植療法がプロテインC欠乏症の根治療法として成功した。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23か月児に実施した。本年度はさらに、小児ドナーから提供を受け、わが国初の脳死肝移植を7歳児に実施した。従来は対症療法しか選択肢のなかったプロテインC欠乏症患者に対して、新しい治療選択肢を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）欠乏症の患者は、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欠乏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。昨年度、本研究班で診断した複合ヘテロ変異によるPC欠乏症の23か月児に、メープルシロップ尿症患者から摘出した肝を用いて成功した、世界初の生体ドミノ肝移植について報告した。本年度はさらにPC欠乏症を根治しうる、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欠乏症の7歳女児である。出生直後に、電撃性紫斑、頭蓋内出血、右眼球出血を来し、血中PC活性が16%であり、PC欠乏症と診断された。さらに、日齢52に左足が壊死し切断術を受けた。右の視力は消失したので摘

出し義眼を装用していた。また、左不全片麻痺、てんかん、発達遅滞を来していた。ワルファリン（5.4 mg/日）を内服し、PT-INR 3～4に調節されていた。電撃性紫斑の既往が4回あり、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。移植手術直前から血漿由来活性化PC製剤を持続輸注し、国立成育医療研究センターにおいて脳死肝移植を実施した。移植肝は当初、機能不全であり、高アンモニア血症となり持続的血液濾過透析を5日間行った。凝固因子が欠乏したので、新鮮凍結血漿も補充した。PC製剤はPC活性が25%以上になる術後12日まで継続した。患者の血