

201510010B

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患克服研究事業

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

平成 26-27 年度 総合研究報告書

研究代表者 大賀 正一

平成28(2016)年3月

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

新生児・小児における特発性血栓症の診断、予防および治療法の

確立に関する研究

平成 26－27 年度 総合研究報告書

研究代表者 大賀 正一

平成 28 (2016) 年 3 月

目次

I.	班員・研究協力者名簿	1
II.	総括研究報告書	
	新生児・小児における特発性血栓症の診断、予防および 治療法の確立に関する研究	5
III.	分担研究報告書	
1.	小児期発症遺伝性栓友病のスクリーニングに関する研究 ～ 小児・周産期領域における3大抗凝固因子の遺伝子解析 ～	21
	康 東天、落合 正行、福嶋 恒太郎、大賀 正一、内海 健、堀田 多恵子、 井上 裕文、市山 正子	
2.	新生児の出生時血液検査およびプロテインC活性基準範囲の作成	30
	落合 正行、市山 正子、石村 匡崇	
3.	母体の血栓性素因スクリーニングによる新生児血栓症の早期診断	35
	金子 政時、	
4.	血栓症の診断における包括的凝固機能検査の臨床的応用の基礎検討	38
	嶋 緑倫、野上 恵嗣、橋本 直樹、松本 智子、荻原 健一	
5.	血栓症患者の遺伝子異常についての検討、 抗Xa阻害薬使用時の有効な凝血的モニタリングの検討	41
	瀧 正志、山下 敦己、森 美佳、長江 千愛、足利 朋子	
6.	凝固検査標準化および診断法の開発、 新生児・小児の血漿中抗凝固能の測定法の開発	47
	高橋 幸博、中川 隆志	
7.	プロテインC欠乏症に肝移植という新しい治療選択肢の提示	50
	石黒 精	

IV. 診断ガイドラインおよび重症度分類（新生児・小児）	57
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・小児血栓症研究班」	
V. 指定難病診断ガイドライン案（新生児から成人まで）	61
森下 英理子、大賀 正一、津田 博子ほか	
VI. 新生児 DIC に対する補充療法	69
VII. 研究成果の刊行に関する一覧表	75
VIII. 研究成果の刊行物・別刷	83

I. 班員・研究協力者名簿

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

区 分	氏 名	所 属 等	職 名
研 究 代 表 者	大賀 正一	山口大学大学院医学系研究科 小児科学分野	教 授
研 究 分 担 者	康 東天	九州大学大学院医学研究院・臨床検査医学	教 授
	嶋 緑倫	奈良県立医科大学小児科学	教 授
	落合 正行	九州大学病院・総合周産期母子医療センター 新生児内科部門	助 教
	福嶋恒太郎	福岡市立こども病院 産科	科 長
	金子 政時	宮崎大学医学部・大学院看護学研究科周産期分野	教 授
	高橋 幸博	奈良県立医科大学病院・総合周産期母子医療センター	教 授
	瀧 正志	聖マリアンナ医科大学横浜市西部病院・小児科	教 授
	石黒 精	独立行政法人国立成育医療研究センター 教育研修部血液内科	部 長
研 究 協 力 者	吉良龍太郎	福岡市立こども病院・感染症センター 小児神経科	科 長
	本荘 哲	独立行政法人国立病院機構福岡病院・小児科	医 長
	白幡 聡	北九州八幡東病院	
	池ノ上 克	宮崎大学	学 長
	大森 啓充	独立行政法人国立病院機構柳井医療センター・小児科	診療部長
	井上 裕文	山口大学大学院医学系研究科 小児科学分野	助 教

Ⅱ. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
総括研究報告書

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

研究代表者 大賀 正一 山口大学大学院医学系研究科・小児科学 教授

研究要旨

新生児・小児に発症する遺伝性血栓症を効率よく診断し、的確な治療管理法を確立するため、血栓発症リスクが最も高いとされる先天性 Protein C (PC)、Protein S (PS) 及び Antithrombin (AT) 欠損症を中心に、全国から症例集積を継続して解析した。

1) これまでの症例集積

2014-15年に新規48家系の46検体を解析し、PROC変異13名(複合ヘテロ2、ヘテロ11)、PROSI変異3名(複合ヘテロ2、ヘテロ1)、SERPINC1変異3名(ヘテロ3)を同定した。PCとAT異常には妊娠中に発症し、児も変異を有して血栓を発症した母児をそれぞれ診断した。PS異常にも脳虚血疑いでこのリスクの高い複合ヘテロ変異の母を診断した。さらに、この2年間に、周産期症例に加えて、乳幼児期に感染を契機に発症したPC異常症を4例、思春期に誘因なく発症したPCおよびPS異常症を2例、また未発症複合ヘテロ変異も同定した。周産期からリスクを抱える血栓予備軍の母児の存在を確認した。

2) 小児期発症遺伝性血栓症の効果的診断法

研究班で策定した年齢別の各因子活性下限値(0-3月, 3月-3歳, 3歳-6歳, それ以上)を設定し、これに同時測定したPC/PS活性比を考慮して積極的に遺伝子解析を行ったところ、小児でも3因子遺伝子変異を約30%に同定することができるようになった。一方、症例の多い新生児PC遺伝子変異例の検出率が十分とはいええず、とくに10日までの判別法を開発する必要がある。Perinatal Strokeを発症しやすい早期産児の凝固機能評価は難しく、多施設共同で基準値設定の標準化を行い、新規活性測定法、新生児の基準値と過凝固の評価法についてさらなる検討が必要である。血栓発症リスクのある長期療養児のスクリーニングも必要である。

3) 診断基準と重症度分類と治療管理に関して

成人とは異なる「新生児・小児における遺伝性栓友病の診断基準」と「重症度分類」を作成することができた。治療管理に関しては、新生児DICに対する補充療法を策定したが、異常症患児の特異的治療を提言するには至らなかった。PC欠損症の根治療法として本研究班の診断例から肝移植療法が続いて行われ、経過良好である。

新生児・小児期発症における栓友病診断の指針をわが国のエビデンスとして策定することができた。一方、治療管理法のガイドライン作成のための質の高いエビデンスづくりが今後の課題である。根治療法のある予後不良なこの稀少疾患の診療体制を整える必要がある。

研究分担者

康 東天	九州大学大学院医学研究院・臨床検査医学	教授
嶋 緑倫	奈良県立医科大学小児科学	教授
落合 正行	九州大学病院・総合周産期母子医療センター新生児内科部門	助教講師
福嶋恒太郎	福岡市立こども病院産科	科長
金子 政時	宮崎大学医学部大学院看護学研究科周産期分野	教授
高橋 幸博	奈良県立医科大学病院・総合周産期母子医療センター	教授
瀧 正志	聖マリアンナ医科大学横浜市西部病院・小児科	教授
石黒 精	独立行政法人国立成育医療研究センター・教育研修部血液内科	部長

A. 研究目的

小児の血栓症は稀とされてきたが、新生児医療や心臓外科手術の進歩などを背景に、近年先進国で増加している。海外では、リスクの高いAntithrombin (AT)、Protein C (PC) 及びProtein S (PS) 欠損症を小児期に診断する意義が強調され始めた (Blood 2012;120:1510)。わが国でも成人の解析が進み治療法も進歩した。一方、新生児・小児の血栓症診断は難しく治療管理法も確立していない。私たちは重症感染に伴うPCヘテロ変異の血栓小児例 (Eur J Pediatr 2009;168:673) を見出し、日本人小児血栓症の分子疫学と臨床像を明らかにした (Haemophilia 2013;19:378, 日児誌 2013;117:1538)。①患者は新生児とAYA (adolescent and young adult) 世代に多い、②特発性と診断された新生児・乳児にはPC欠乏症が、AYA世代にはPS/AT欠乏症が多い、③水頭症、頭蓋内出血、新生児仮死、腎不全など成人と異なる発症様式を呈する、ことを国内外に発信した (Pediatr Int 2013;55:267, 5th EAHF 2013)。一方、新生児特有の後天性因子も示唆され、多彩な臨床像から早期診断法を確立するにはさらに症例集積が必要であることも明らかとなった。ヘテロ変異を有する両親の多くは未発症であり、妊娠は母の血栓発症の契機となる。新規治療薬 (t-PAなど) は小児の使用経験も少ない。世界一低い周産期死亡率を誇り、人口減少時代を迎えた日本で「家族を守る血栓症診療」を確立する意義は大きい。

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

登録を小児血栓症の継続的な国内登録システムに発展させる。

B. 研究方法

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

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

以下に具体的方法を記す。

1) 症例集積と血栓性素因の臨床的評価 (大賀、石黒、高橋、瀧ほか)

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

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

PT、APTT、Fibrinogen、PIC、TAT、D-dimer、VIII:C、抗 Cardiolipin 抗体、lupus-anticoagulant、PC・PS活性/抗原、活性、PIVKA、FVII・FVIII活性、vWF活性、血清脂質などをスクリーニングする。*PROS1* (15 exons)、*PROC* (9 exons)、*SERPINC1* (13 exons) の翻訳とプロモーター領域を解析する。MLPA法やCGHアレイによる欠失の確認、エクソーム解析を行う。臨床遺伝医療部で遺伝カウンセリングを行う。

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

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

4) 新生児領域の診断と治療指針の作成 (落合、大賀、高橋、及び参加施設) 初年度 周産母子センター (母性、新生児) を中心に活用できる診療の手引きを作成する。

5) 小児領域の診断と治療指針の作成 (石黒、瀧、大賀及び参加施設) 次年度

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

(倫理面への配慮)

血栓症責任遺伝子の解析について、ヒト遺伝子研究に該当する場合は、ヒトゲノム遺伝子解析研究に関する倫理指針に従う。申請者の血栓性素因に関する遺伝子解析研究は所属施設の倫理委員会で承認済み

であるが、当該研究の参加については、主治医が所属するそれぞれの施設の倫理委員会の承認を得る。疾患登録については小児血液がん学会が学会倫理審査委員会ですで行っている疾患登録事業の疫学研究倫理指針に準拠した臨床研究として行う。患者登録システムの確立には、遺伝子検査を含む研究であること、発症前の家族を診断する可能性のあることから、主治医から患者本人もしくは保護者への説明が十分になされ同意が取得された上で、申請者が遺伝子解析を行う。さらに遺伝カウンセリングを行い、可能な治療と予防に関する指導や助言も必要に応じて行う。調査にあたっては、個人情報 の 守 秘 を 厳 守 し、デ ー タ の 取 り 扱 い に 注 意 す る。本 研 究 に お い て は、九 州 大 学 に お い て 患 者 検 体 の 匿 名 化 を 図 り、検 体 の 採 取 に あ た っ て は、患 者 お よ び 家 族 か ら 事 前 に 十 分 な 説 明 を お こ な い、文 書 に よ る 同 意 を 得 る。山 口 大 学 病 院 と 九 州 大 学 病 院 で は 臨 床 遺 伝 医 療 部 に て 遺 伝 カ ウ ン セ リ ン グ を 行 っ て お り、す で に 血 栓 性 素 因 の 遺 伝 子 診 断 が 確 定 し た 家 系 に カ ウ ン セ リ ン グ を 実 施 し て い る。

C. 研究結果

・研究班全体としての2年間の研究成果

新生児・小児血栓症とその素因を診断し治療管理・予防法を確立するため、成人とは異なる診断指針と重症度分類を作成し、これにより小児期発症例の約30%に変異を同定することができるようになった。本基準のエビデンス論文と症例報告群が受理され、新生児の診断法に関してさらに検討し、治療に関する情報収集を継続中である。

1) 症例集積

2014-15年に新規48家系の46検体を解析し、*PROC*変異13名 (複合ヘテロ2、ヘテロ11)、*PROS1*変異3名 (複合ヘテロ2、ヘテロ1)、*SERPINC1*変異3名 (ヘテロ3) を同定した。PCとAT異常には妊娠中に発症し、児も変異を有して血栓を発症した母児をそれぞれ診断した。PS異常にも脳

虚血疑いでこのリスクの高い複合ヘテロ変異の母を診断した。さらに、この2年間に、周産期症例に加えて、乳幼児期に感染を契機に発症したPC異常症を4例、思春期に誘因なく発症したPCおよびPS異常症を2例、また未発症複合ヘテロ変異も同定した。このように周産期からリスクを抱える血栓予備軍の母児の存在を確認することができた。

2011年以降に本研究班が解析した結果から、小児期発症PC異常症は19名となりその半分はPROCヘテロ変異を有することを明らかにし、ヘテロ変異者の小児での素因が異常者の半数以上であると示した(表1)。

表1. 研究班開始後の小児期発症PC欠乏症

患者数	2011以前 27名	2011以降 47名
ホモ変異	2	2
複合ヘテロ変異	11	7
ヘテロ変異	7	10
変異なし	2	28
その他不明	5	0
	26%	59%

a) 2011年以前は両親の活性からの推定
b) 2011年以降は全例遺伝子解析による確定

2016年2月11日現在

2) 小児期発症例の効果的診断法

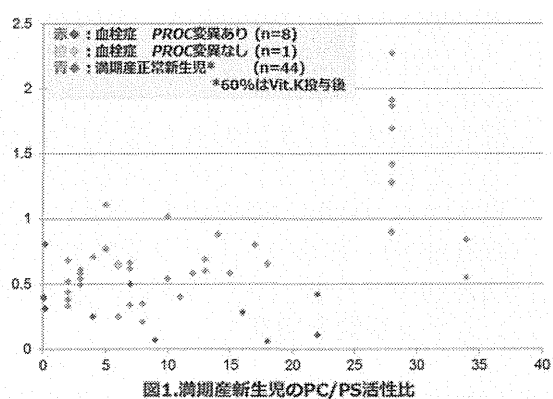
研究班で策定した年齢別の各因子活性下限値(0-3月, 3月-3歳, 3歳-6歳, それ以上)を設定し、これに同時測定のPC/PS活性比を考慮して積極的に遺伝子解析を行ったところ、小児でも3因子遺伝子変異を約30%に同定することができるようになった。一方、症例の多い新生児PC遺伝子変異例の検出率が十分とはいえ、とくに10日までの判別法を開発する必要がある。Perinatal Strokeを発症しやすい早期産児の凝固機能評価は難しく、多施設共同で基準値設定の標準化を行い、新

規活性測定法、新生児の基準値と過凝固の評価法についてさらなる検討が必要である(図1)。血栓発症リスクのある長期療養児のスクリーニングが必要と考え、新生児以降に血栓症を発症した4名(うち重症心身障害児・者が3名)にPS活性の低下を認め、画像診断とその後の臨床経過から新生児期に発症した頭蓋内虚血性病変あるいは血栓症を疑った。4例に遺伝子解析を行ったがPROSI変異はなかった。

3) 診断基準と重症度分類と治療管理

成人とは異なる「新生児・小児における遺伝性栓友病の診断基準」と「重症度分類」を作成することができた。治療管理に関しては、新生児DICに対する補充療法を策定したが、異常症患児の特異的治療を提言するには至らなかった。PC欠損症の根治療法として本研究班の診断例から肝移植療法が続いて行われ、経過良好である。

新生児・小児期発症における栓友病診断の指針をわが国のエビデンスとして策定することができた。一方、治療管理法のガイドライン作成のための質の高いエビデンスづくりが今後の課題である。根治療法のある予後不良なこの稀少疾患の診療体制を整える必要がある。



・各分担研究項目の成果

1) 康 東天, 落合 正行, 福嶋 恒太郎, 大賀 正一, 内海 健, 堀田 多恵子, 井上 裕文, 市山 正子

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

日本人母児の周産期に発症する血栓性素因の遺伝子解析を効率的に行うため、当施設で設定した基準値を用いて小児期発症のプロテインS (PS)、プロテインC (PC) 及びアンチトロンビン (AT) 欠乏症患者および家系について検討した。2014-15年は全国より母子の血栓性素因に関する相談を受け、36家系49検体の遺伝子解析を行った。家族解析を含めて*PROC*変異の複合ヘテロ2名、ヘテロ11名、変異なし19名、*PROS1*変異の複合ヘテロ2名、ヘテロ1名、変異なし9名、*SERPINC1*ヘテロ変異の3名を同定した。遺伝子解析を行った20歳未満の小児期発症患者は、PC欠乏23名 (70%)、PS欠乏8名 (24%)、AT欠乏2名 (6%)であった。その中でPC変異有りは7名 (30%)、PS変異有りは1名 (13%)、AT変異有りは1名 (50%)であった。PC遺伝子解析23名のうち、16名 (70%)は新生児期発症のうち1名は複合ヘテロ変異、3名はヘテロ変異であった。1歳を超えて発症したPC遺伝子変異の3名はヘテロ変異であり、うち2名は感染症に伴って血栓を発症した。小児期発症PS変異は1例のみであったが、14歳で誘因なく発症した複合ヘテロ変異保有者で未発症の両親はそれぞれヘテロ変異を有していた。AT欠乏2名はいずれも新生児発症であった。日齢21に脳静脈洞血栓を発症したAT遺伝子ヘテロ変異保有児の母は分娩10日後出血性脳梗塞を発症した。研究班で策定したスクリーニング基準により、小児に発症する遺伝性PC、PS、AT欠損症から、未発症の母 (家族) を早期に診断できるようになった。小児期発症にはヘテロ変異のみならず予想外に両アレル異常が同定されている。新生児発症例および妊婦におけるより効率的なスクリーニング法の開発

が必要である。

2) 落合 正行, 市山 正子, 石村 匡崇
《新生児のプロテインC活性基準範囲の作成》

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およびプロテインC (PC) とプロテインS (PS) 活性の基準範囲を設定した。対象は当院および関連施設から生存退院した新生児であり、先天異常例は除外した。測定項目は入院時ルーティン項目およびPCとPS活性を選択した。ルーティン項目は入院時データを性別、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範囲を設定した。PCとPS活性値は正期産児を対象に新生児期の推移を測定した。ルーティン項目には性差はなく、在胎週数や出生体重に比例して増加する項目 (総蛋白等) と変化しない項目 (クロール等) を認めた。PC活性値は新生児期にばらつきが大きく、日齢を経て上昇した。遺伝性PC欠乏発症例において、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。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。

3) 金子 政時

《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》

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。

4) 嶋 緑倫

《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》

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PC、AT、トロンボモジュリン)の過剰量の添加はいずれも凝固能ならびに線溶能を抑制することがわかった。さらに、小児血栓症における包括的凝固機能の評価において凝固波形解析やPC/PS異常を包括的に評価できるThrombpath法が有用であった。

5) 瀧 正志, 山下 敦己, 森 美佳, 長江 千愛

《1) 血栓症患者の遺伝子異常についての検討、2) 抗Xa阻害薬使用時の有効な凝血的モニタリングの検討》

1) 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5家系の内、3家系において先天性血栓性素因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。血栓症患者における遺伝子異常の発現頻度や各遺伝子異常の血栓症発症リスクについては今後症例を増やして検討したい。

2) 抗Xa阻害薬の凝血的モニタリング法として凝固波形解析(CWA)の有用性について検討するため、薬剤添加時のトロンビン生成能、凝固波形解析の変化について検討した。Rivaroxabanにおいては、APTT系のCWAから得られる最大凝固加速度の変化がトロンビン生成能の変化と相関性が高く、凝血的モニタリングとして有用である可能性が示された。一方ApixabanにおいてはPT系のCWAから得られる最大凝固加速度の変化がトロンビン生成能の変化と相関性が高く、凝血的モニタリングとして有用である可能性が示唆された。

6) 高橋 幸博, 中川 隆志

《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～》

新生児の血栓症の病因・病態解析は、その診断、予防および治療に重要である。従来、血栓症の診断には、個々の抗凝固因子量の測定や、欠乏抗凝固因子の遺伝子解析によった。しかし、病態には凝固過程における凝固・抗凝固のバランス下での血漿中のトロンビン形成を知ることが重要と考え、我々は、プロテインC制御系の評価法として開発されたThromboPath®(Hemos11)を用い、新生児の新たな抗凝固能の評価法を確立した。

7) 石黒 精

《プロテインC欠乏症に肝移植という新し

い治療選択肢の提示》

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。

D. 考察

2011年までに後方視的検討から明らかにした小児期発症遺伝性血栓症の特徴である①PC欠乏症が最も多く、②主に新生児に集中して電撃性紫斑病に先行する頭蓋内出血・梗塞として発症すること、は本研究班の前向き研究から実証した。さらに年齢に応じた活性下限値を設定して、小児期発症血栓症の診断基準と重症度分類を提唱することができた。これを用いた積極的な遺伝子解析から、①PC欠損症は胎児発症から早期新生児の発症が主体であること、②新生児発症PC変異保有者の半分はヘテロ変異であること、③PSおよびAT欠損症でも母が妊娠を契機に発症し、早期産となった児も母と同じ変異遺伝子をもって頭蓋内出血・梗塞を発症することを明らかにした。また、新生児以降では④感染を誘因として発症する乳児のPCまたはPS欠損症と⑤誘因なく10歳以降で発症するPS欠損症が、小児発症のうちひとつの特徴であることが確認できた。

さらに、新生児発症例だけでなく、乳児・小児例、さらに母にもPCおよびPS遺伝子の複合ヘテロ変異が同定された。この両アレル変異の遺伝子型はPS異常症では日本に多いPS-Tokushima多型などが片方に有ることが多く、PS低活性者が日本人若年発症血栓症の予備軍であることを裏付ける結果となった。PC遺伝子の複合ヘテロ変異は重症例が多く新生児発症例に主に同定され、日本人の5大変異を片ア

レルにもつものが多かったが、家族歴で血族婚が確認できないものがほとんどであった。

周産期母子例と小児期発症例の遺伝子診断率の向上は、分担研究者の金子、福嶋、落合、瀧、高橋各先生による全国規模の産科・新生児科・小児科の周産期連携による成果である。一方、診断に関する問題点としては、早期産児および成熟児でも早期新生児期の各因子活性値によるスクリーニングが困難である。嶋、高橋両先生による新規診断また適切なモニタリング法、さらに早期産児に関する落合、市山両先生らの解析を継続する。また井上先生らの神経後遺症例からの検索は今後も継続が必要であろう。

治療に関しては、新生児DICの補充療法を作成することができたが、栓友病患児の治療管理法のエビデンスがなくガイドラインを作成できる段階ではない。診断基準と同様に研究班が治療指針のエビデンスを造る必要がある。石黒らが昨年につき先天性PC欠損症に対する根治療法として行った生体肝移植の2例は経過良好で高額な活性化PC製剤から離脱できている。神経学的発達についてもよい情報が得られつつある。

本研究班は、新生児・小児遺伝性血栓症の診断基準のエビデンス論文を発信し、稀少疾患の症例報告を積み重ねて、成人とは異なる重症度分類を作成した。また、成人血栓班（村田班）の森下先生、小嶋先生、津田先生のご支援を頂き成人重症度分類との整合性をはかった。しかし、新規抗凝固療法については小児・新生児診療施設の情報十分でなく質の高い診療ガイドライン確率のために、今後も研究継続が必要である。

E. 結論

日本人の小児期に発症する血栓症を全国レベルで解析し、早期治療介入に必要な、成人とは独立した診断基準と重症度分類を提示した。研究班におけるPC異常診断例の肝移植後の経過は根治療法への

新たな挑戦である。症例をさらに集積して治療管理と予防に関する研究を継続する。

F. 健康危険情報

治療介入を行う研究でないため特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 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, *Pediatr Res* 79:81-86, 2016
3) 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.* 91(12):783-786, 2015
4) 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.* 23(2):205-213, 2016
5) Hashiguchi K, Morioka T, Murakami N, Yamashita K, Hiwataashi 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.* 50(6):310-320, 2015

6) 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.* 27;8:57. 2015 Feb

7) Amamoto R, Uchiumi 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

8) Arakawa T, Kobayashi-Yurugi T, Alguel 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

9) 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)

10) 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 A1c and glycated albumin with carotid atherosclerosis in community-dwelling Japanese subjects: the Hisayama Study. *Cardiovasc Diabetol* 14:84. 2015

11) 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
- 12) Matsumoto T, Nogami K, Okuda M, Shima M. Optimization of the automated, CS-2000i™ method for measuring low levels of von Willebrand factor ristocetin cofactor activity (VWF:RCO). *Int J Hematol.* 101(2): 126-132, 2015
- 13) 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.* 101 (4) : 362-368, 2015
- 14) 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.* 13(10): 1843-1853, 2015
- 15) 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.* 13(7): 1279-1284, 2015
- 16) Nogami K, Shima M. Phenotypic Heterogeneity of Hemostasis in Severe Hemophilia. *Semin Thromb Hemost.* 41(8): 826-831, 2015
- 17) 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.* 12(1):103-106, 2015
- 18) Matsunami M, Ishiguro A, Fukuda A, Sasaki K, Uchida H, Shigeta T, Kanazawa H, Sakamoto S, Ohta M, 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.* 19(3):E70-74, 2015
- 19) Yamashita A, Nagae C, Mori M, Ashikaga T, Akita M, Suzuki N, Yamazaki S, Tatsunami S, Takayama S, Taki M: Analysis of anticoagulant effect of unfractionated heparin by using thrombin generation assay in vitro. *J. St. Marianna. Univ.* 6(1):15-21, 2015
- 20) 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
- 21) Hoshina T, Nakashima Y, Sato D, Nanishi E, Nishio H, Nakgata 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
- 22) 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
- 23) 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 29:1-6, 2014

24) 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 557-9. 2015

25) 大賀正一: 第II部各論(疾患)第1章 血液・造血管器疾患. 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 459-61, 2015

26) 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

27) 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

28) 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

29) 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

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) 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

4) 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

5) 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

6) 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

7) 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

8) 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、宇部市

9) 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年7月10-12日 福岡市

10) 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、横浜市

11) 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 fulminans 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、甲府市

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：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年7月25日、岡山市

13) 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年11月7-8日、宇部市

14) 向野文貴、井上裕文、山田絃子、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年7月18日、岡山

15) 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年11月7-8日、宇部市

16) 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年11月7-8日、宇部市

17) 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年11月8日、宇部市

18) 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、2015年5月21-23日、甲府市総合市民会館(山梨県)

19) 井上裕文、岡桃子、梶本まどか、松重武志、長谷川俊史、野瀬善夫、門屋亮、大賀正一：反復性の静脈還流障害を起こした静脈性血管腫の2歳男児. 第57回日本小児神経学会学術集会、2015年5月28日、大阪市

20) 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、2014年5月15日、奈良市

21) 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、2014年6月13日、横浜市

22) 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、2014年6月13日、横浜市

23) 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、2014年6月13日、横浜市

24) 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、2014年6月13日、横浜市

25) 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、2014年6月13日、横浜市

26) 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、2014年7月23日、倉敷市

27) 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、2014年9月14日、宮崎市

28) 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、2014年9月16日、宇部市

29) 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、2014年9月25日、山口市

30) 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、2014年11月11日、松山市

31) 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、2014年11月17日、山口市

32) 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、2014年11月22日、高知市

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

34) 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、2014年6月13日、横浜市

35) 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、2014年6月13日、横浜市

36) Nishimura A, Miyamoto S, Takada K, Satomi R, Matsumura Y, Terauchi M, Kajiwara M, Ohga S, Enomoto K, Ohta M.

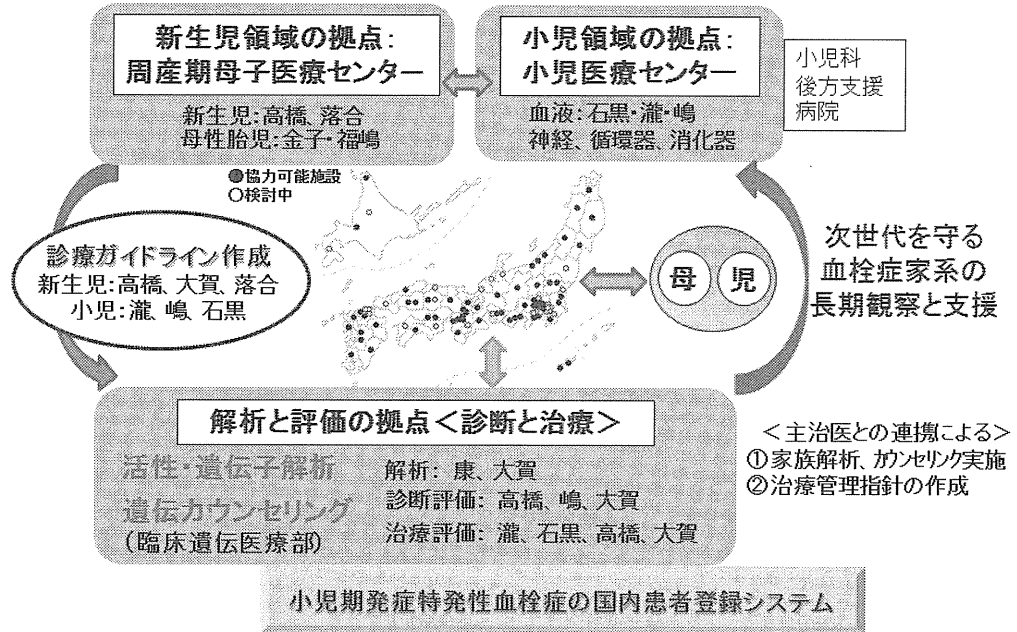
A congenital protein C deficiency boy who developed cerebral venous thrombosis after steroid therapy. 第76回日本血液学会学術集会、2014年10月31日、大阪市

37) 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 thrombocythemia. 第76回日本血液学会学術集会、2014年10月31日、大阪市

38) 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、2014年11月22-23日、大分市

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

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



研究協力: 白幡 聡 先生 池ノ上 克 宮崎大学学長