

Ⅲ. 分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
「新生児・小児における特発性血栓症の診断、予防および治療法の確立に関する研究」
－ 分担研究報告書 －

小児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 ～

研究分担者

康 東天 九州大学大学院医学研究院・臨床検査医学 教授
落合 正行 九州大学病院総合周産期母子医療センター新生児内科部門 助教
福嶋 恒太郎 福岡市立こども病院産科 医長
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

研究協力者

内海 健 九州大学大学院医学研究院・臨床検査医学 准教授
堀田 多恵子 九州大学病院検査部 技師長
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
市山 正子 福岡市立こども病院 NICU

研究要旨

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。

A. 研究目的

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) 欠損症は、血栓塞栓発症のリスクが最も高い遺伝性血栓性素因である。妊娠中は PS 活性が低下し、小児期にはこの自然抗凝固因子は年齢とともに上昇するため、周産期の母と児における本症の診断は容易でない。日本人には血液凝固第 V 因子ライデン (F

VL) とプロトロンビン多型 (PT variant) がなく、PS-Tokushima 多型が多いため、PC と PS 欠損症を周産期の母子にスクリーニングすることは重要である。この 2 年間に年齢に応じた 3 各因子の下限値を設定し、有用性を検討した。

B. 研究方法

1. PS、PC、AT 活性測定と各遺伝子解析

血漿PCおよびPS活性はSTA試薬シリーズプロテインC (クロット)、プロテインS (クロット) (Stago/ロシュ・ダイアグノスティックス) を用いて各々測定した。AT活性はエルシステム・ATⅢ (シスメックス) を用いた。

*PROC*のexon1-9をPCRで増幅し、ABI 3500xL Genetic Analyzer (ライフテクノロジー・ジャパン) にて直接法により塩基配列を決定した。PSおよびAT活性の低かった患者には、*PROSI* (exon 1-15) と*SERPINC1* (exon 1-7) 解析も行った。健常成人保存血漿の±2SDを成人の基準範囲とし、<3SDを低下とした (Clin Biochem 2005;38:908-15)。

(倫理面への配慮)

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

2. 新規診断例の家系解析

全国より相談を受けた遺伝性栓友病疑いの小児・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、PIVKA、及び抗カルジオリピン抗体の測定も可能な限り行った。

C. 研究結果

1. PC、PS及びAT欠損症例

2014年1月から2016年2月までの2年1か月に全国より54家系以上の母子の血栓性素因診療に関する相談を受けた。年齢別活性によるスクリーニングを実施し、同意取得を得た36家系49検体について遺伝子解

析を行った。家族の解析も含めて*PROC*変異の複合ヘテロ2名、ヘテロ11名、変異なし19名、*PROSI*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名を同定することができた。

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変異保有者は7名 (30%)、PS変異保有者は1名 (13%)、AT変異保有者は1名 (50%) であった。16歳から20歳までに発症した小児例は今回なかった。

2. PC欠損症の臨床像と遺伝子型

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例は複合ヘテロ変異、3例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ていた。

遺伝子解析を完了した小児期に発症患者22家系の23名を表1に示す。小児期発症*PROC*変異保有者の7名のうち、4名は1歳未満3名は1歳以降の発症であった。新生児発症が1歳未満発症のほとんどを占めたものの、PC活性が20%未満でPC/PS活性の乖離を示しても変異のないものが目立った。家系4の児は母が妊娠中に心内血栓症を発症して緊急分娩となった新生児脳室内出血の例であった。母はPS活性が14%で低く、PC活性も51%と低かったため両遺伝子型の解析を行い、*PROC*に複合ヘテロ変異を同定した。

家系19の4歳男児は、RSV重症肺炎でメチルプレドニゾロンパルス療法のと後に長期が症も加わったためか発症した。家系20の男児は、母のPC活性低下と児の出生時の臍帯血内血管凝固から、PC欠損が疑われていたが遺伝子検査を希望していなかった。5歳のとき、EBウイルス血球貪食症候群 (EBV-HLH) を発症してその管理中に血栓症の合併を来した。EBV-HLHの治療反応性はよかったものの、中心静脈管理に伴って発症した血栓合併症の管理は非常に困難となり外科的処置を必要とした。

表1. 新生児小児PC欠乏症の遺伝子解析症例 H26-27 (2014-2015)

家系発症年齢	性	周産期情報	初発の状況	PC活性	PS活性	変異
1 34週左脳室拡大?			胎児脳室拡大 新生児期に反復する急性梗塞	24%→85%(1歳)	53%→104%(1歳)	なし
2 胎児(現在3歳)女			胎児期発症の出血性梗塞(乳脳症)と新生児DIC	27%(日齢1)	36%(日齢1)	なし
3 胎児(現在4歳)女			症候性てんかんWest、胎児期発症の出血性梗塞による	16%(月齢9)	69%(月齢9)	なし
4 日齢0	男	25w6d 789g	新生児IH		53%	66% ヘテロ
	母27歳女		妊娠25週6日意識消失 心内血栓→開胸血栓除去		51%	14% 複合ヘテロ
5 日齢0	女		出生後脊髄髄膜瘤(術後)に静脈洞血栓症を来した16生		14%	51% ヘテロ
6 日齢0(現在5か)女		羊水寡少 胎盤機能不全で	日齢0の新生児脳梗塞	46%(日齢19)→36%(日齢90)→54%	88%(日齢19)→96%(日齢130日)→	なし
7 日齢0(現在1歳?)			日齢0の左頭頂部内側の出血性梗塞	17%(日齢0)→60%(1歳5か月)	34%(日齢0)→99%(1歳5か月)	ヘテロ
8 日齢1	女		新生児DIC twin-1、18生日死		13%	48% なし
	日齢1 女		新生児DIC twin-2		25%	39% なし
9 日齢1(現在1か)男		36w5d, 2216g Ap:2/4/7/8	日齢1の頭蓋内出血	12%(日齢7)→20%(1か月)	43%(日齢7)→42%(1か月)	なし
10 日齢2(現在7か)女		Sotos(5q35欠失)XII因子欠損	脳梗塞・多発静脈血栓症(日齢2)	56%(7か月)	88%(7か月)	なし
11 日齢3(現在3か)女		38w0d, 2394g 帝切	3生日左股関節部筋肉内血腫	PC/PS 17/45→22/68→51/106	(日齢5→日齢27→ほぼ3生月時)	なし
12 早期新生児	男	?	早期新生児脳出血		48%	61% なし
13 日齢25	男	日齢3のSAH IH		19%(日齢5)		なし
14 1か月	男	2か月のとき凝固検査	胎児期脳梗塞(左MCA領域)	41%(2か月2日)		85% なし
15 新生児	男		PF+ICH	<5%		86% 複合ヘテロ
	父34歳健康男				54%	85% ヘテロ
	母34歳健康女		PROS1解析中→変異なし		65%	55% ヘテロ
	4歳健康女		PROS1解析中→変異なし		141%	65% なし
	2歳健康男		PROS1解析中→変異なし		51%	49% ヘテロ
16 2か月	女	第1子。在胎38週2日、3080g	急性心不全、拡張型心筋症、視床出血 右横静脈洞 22→6%		79→58%	なし
17 6か月	男	なし	心奇形のない感染性心内膜炎に伴う多発性梗塞		41%	85% なし
18 3歳	?		敗血症性ショック 電撃性紫斑病			なし FV exon10多型
19 4歳	男	異常なし 家族歴なし	RSV肺炎(mPSL)後のふらつき、頭痛でOSVT	62%(抗原量117%)		73% ヘテロ
	父					ヘテロ
	母					なし
20 5歳	男	出生時臍帯内血液凝固	EBV-HLH治療中、脳静脈洞血栓と右房巨大血栓	34%(3歳)	82%(3歳)	ヘテロ
	父35歳男		無症状		92%	64% なし
	母35歳女		無症状 活性低下を内科にて指摘	50%→74%(再検)		89% ヘテロ
21 13歳	男		TIA右不全麻痺 r/o部分発作	46%→49%(4か月後再検)		76% なし
22 14歳	男	Down、高尿酸血症、難聴甲	起床時にふらつき左中脳部の脳梗塞	39%→64%(発症3か月)→39%(発		74% ヘテロ

家系発症年齢	性	周産期情報	初発の状況	PC活性	PS活性	変異
1 新生児(現在13歳)	女		脳性麻痺(新生児期脳梗塞疑い)		103%	60% なし
2 新生児(現在41歳)	男		脳性麻痺(新生児期脳梗塞疑い)	64%(warfarin中)	23%(warfarin中)	なし
3 新生児(現在43歳)	女		脳性麻痺(新生児期脳梗塞疑い)		147%	58% なし
4 9か月(現在2歳)	男児		9か月の時の右片麻痺 脳梗塞		91%	48% なし
	父31歳					なし
5 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% なし
6 12歳	女	脳性麻痺?	感染症契機?の下肢DVT		89%	57% なし
7 14歳	男	なし	下肢DVT		93% 35%(Ag 68%)	複合ヘテロ
8 15歳	男	なし	T-ALL治療中の多発性脳梗塞		138%	71% なし
9 36歳	女	PS活性10%				複合ヘテロ
10 40歳	女		習慣性流産 甲状腺疾患 溶血性貧血と胆石摘脾後DV		93%	29% ヘテロ

家系発症年齢	性	周産期情報	初発の状況	PC活性	PS活性	変異
1 日齢10(現在5か)	男	生後10日発症	パレコウイルス脳炎に合併した右横静脈洞血栓症	36%(日齢28)	56.2%(日齢28)	なし
2 日齢21	女?男	在胎39週2639g 仮死なし。胎けいれん。新生児脳静脈洞血栓症、脳出血、脳室内出血	横静脈血栓による出血性脳梗塞	32%(日齢23)→36%(日齢56)	56%(日齢23)→61%(日齢56)	ヘテロ
	母出産10日					ヘテロ
	2歳				107%	なし
	63歳		下肢静脈血栓症(50歳台で胸水のため入院し、長期臥床)	25%ワーファリン中?	39%ワーファリン中?	ヘテロ
3 30歳	女	第一子妊娠時のDVT AT30%現在35歳	第一子AT活性正常			なし

3. PS欠損症の臨床像と遺伝子型

PS変異保有者の10家系8名の小児と2名の不育症母の解析結果を表2に示す。家系7の14歳男児は、誘因なく下肢の深部静脈血栓症(DVT)を発症した。片アレルはPS-Tokushimaであった。これを契機に未発症両親のヘテロ変異が診断された。患児の血栓症管理は困難で初発治療中に再燃をみる難治例であった。

4. PS欠損症の臨床像と遺伝子型

AT変異は3家系のうち1家系3名にヘテロ変異を同定した。この母はこれまで未発症であったが、満期産新生児を出産10日目に往生脈血栓を発症し出血性脳梗塞となった。この新生児も日齢21に静脈洞血栓症、脳室内出血、脳出血を起こした。母子ともにAT遺伝子のヘテロ変異を有していた。発症時の児のPC活性及びPS活性は32%と56%であった。一方、日齢10に脳炎に静脈洞血栓症を合併した児に変異は同定されなかった。

5. 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活性比を検討し、日齢10日未満では正常新生児でも活性比<0.5になることが多く、とくに診断が困難であることが明らかとなった。

D. 考察

2014-15年の2年間に蓄積した周産期に発症する母子例を、策定した年齢別活性スクリーニング基準を用いることにより、PC活性の低下とともに発症する新生児血栓症患者の約30%にPROC変異を同定できるようになった。全体の半分以上がPC活性低下例であることを考慮すると、小児血栓症の遺伝的素因にPC欠損症が大きく関与することを前向き研究から明らかにすることができた。

成人の解析では、妊娠中の母に発症するPS低下に伴う血栓の発症について遺伝的素因をAT活性との比から鑑別する方法が用いられるが、この2年で妊娠まで発症し

ていなかった母がPS異常症のみならず、PCおよびAT異常症にも確認された。さらに母子の解析をこれまでの成人の解析と比較して目立った点は、両アレル変異がPCおよびPSいずれにも同定できたことである。PS-Tokushimaの頻度から、PS両アレル変異の片方に多く診られることは想定したとおりであった。PC両アレル変異も新生児の解析を進めたことから同定できる確率は高くなったと思われる。一方、新生児患者にはPC活性低下からPCヘテロ変異がより多く見つかると考えられたが、上昇が遅く血栓発症に関与が考えられる例について今後のさらなる検討が必要である。3因子異常がなく新生児仮死、10日以内に発症した不整脈例、脳炎例のstrokeなどから、早期新生児血栓症例のリスクについては多方面からの遺伝的素因と環境因子の解析が必要と思われた。

周産期の母子の発症に関する特徴のほか、1歳をこえる小児の特徴も明らかとなった。幼児期から10歳頃までは、血栓発症のリスクは低いとされ、3因子欠損症を含めた遺伝的素因の関与は明らかではなかった。しかし、幼児から10歳頃までに発症する例には、感染が誘因となるPC欠損症、10歳以上には誘因なく発症するPS欠損症が主な小児期発症栓友病であることも特徴づけられた。後者は、発症様式が成人型と同様でありPS両アレル変異が思春期や妊婦に見つかったことから、重症血栓性素因、すなわち遺伝性栓友病としての疾患概念として再考すべきであろう。これらの早期治療介入のために、産科、小児科・新生児科、循環器内科、血管外科、血液内科医との連携の必要である。

E. 結論

周産期の母子に発症する遺伝性血栓症は、①新生児PC欠乏症と妊婦PS欠乏症、②10歳以降の若年発症重症成人型3因子欠損症に分類できる。これを統合し連続性のある栓友病としての疾患概念から、発症前診断とその予防管理をめざした質の高い診療指針の作成が必要である。新生児のスク

リーニング法を確立するにはさらなる情報集積を継続していくことが必須である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ochiai M, Kinjo T, Takahata Y, Iwayama M, Kenji I, Ohga S, Kotaro F, Wake N, Tagichi T, Hara T: Survival and neurodevelopmental outcome of preterm infants born at 22-24 weeks of gestational age. *Neonatology* 105(2):79-84, 2014
- 2) Yamamura K, Takada H, Uike K, Nakashima Y, Hirata Y, Nagata H, Takimoto T, Ishimura M, Morihana E, Ohga S, Hara T: Early progression of atherosclerosis in children with chronic infantile neurological cutaneous and articular syndrome. *Rheumatology* 53(10):1783-7, 2014
- 3) Hoshina T, Nakashima Y, Sato D, 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
- 4) Matsuoka W, Yamamura K, Uike K, Nagata H, Ohga S, Hara T: Tachyarrhythmia-induced cerebral sinovenous thrombosis in a neonate without cardiac malformation. *Pediatr Neonatol* 55(5):412-3, 2014
- 5) Maeba S, Hasegawa S, Shimomura M, Ichimura T, Takahashi K, Motoyama M, Fukunaga S, Ito Y, Ichiyama T, Ohga S: Successful treatment of corticosteroid with antiviral therapy for a neonatal liver failure with disseminated herpes simplex virus infection. *Am J Perinatol* 2014 (in press)
- 6) Okada S, Hasegawa S, Suzuki Y, Matsubara T, Shimomura M, Okuda M, Ichiyama T, Ohga S: Acute pericardial effusion representing the TNF- α -mediated severe inflammation but not the coronary artery outcome of Kawasaki disease. *Scand J Rheumatol* 29:1-6, 2014
- 7) 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
- 8) 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
- 9) 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
- 10) 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
- 11) 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)
- 12) 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

13) 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

14) 大賀正一、落合正行、石黒精、高橋幸博、瀧正志、嶋緑倫、金子政時、福嶋恒太郎、康東天 小児新生児血栓症研究班：「遺伝性血栓症：小児期における診断と治療の問題点」. *日本小児血液がん学会雑誌* ;51(5)、470-474、2014

15) 大賀正一：新生児の血栓止血異常症：血友病と栓友病. *日本未熟児新生児学会雑誌* 27(1):25-29、2015

16) 大賀正一：第15章「血液・腫瘍性疾患」播種性血管内凝固症候群 disseminated intravascular coagulation (DIC). *今日の小児治療指針* 第16版 557-559、2015

17) 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

18) 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 459-461、2015:

2. 学会発表

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

2) Ichiyama M, Ohga S, Ochiai M, Tanaka K, Matsunaga Y, Kusuda T, Inoue H, Ishimura M, Takimoto T, Koga Y, Hotta T, Kang D, Hara T: Genetic screening of protein C, protein S and antithrombin deficiency in pediatric thromboembolism. Pediatric Academic Societies (PAS) and Asian Society for Pediatric Research (ASPR) 2014 Joint Meeting, May 3 - 6, 2014. Vancouver, British Columbia, USA

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

4) 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

5) 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.

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

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

8) 大賀正一、茨聡、樺山知佳、河井昌彦、川口千晴、沢田健、高橋大二郎、高橋幸

博、瀧正志、長江千愛、西久保敏也、水上尚典、白幡聡、日本産婦人科・新生児血液学会新生児DIC診断・治療指針作成ワーキンググループ：新生児DICの診断と治療 新しい指針の提案 補充療法の適応 第24回日本産婦人科・新生児血液学会シンポジウム 横浜市、2014年6月13日

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

第24回日本産婦人科・新生児血液学会シンポジウム 横浜市、2014年6月13日

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

11) 川口千晴、高橋幸博、茨聡、大賀正一、樺山知佳、河井昌彦、沢田健、高橋大二郎、瀧正志、長江千愛、西久保敏也、水上尚典、白幡聡、日本産婦人科・新生児血液学会新生児DIC診断・治療指針作成ワーキンググループ：新生児DICの診断と治療-新しい指針の提案 新生児DICの診断基準(案)

第24回日本産婦人科・新生児血液学会シンポジウム 横浜市、2014年6月13日

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

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

月14日

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

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

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

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

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

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

20) 松岡若利、鶴池清、永田弾、山村健一郎、平田悠一郎、李守永、賀来典之、馬場晴久、中山秀樹、大賀正一、原寿郎：発作性上室性頻拍による心原性ショックの後に発見された新生児脳静脈洞血栓症の1例

第24回日本産婦人科・新生児血液学会横浜市、2014年6月13日

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

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

2014年10月31日

23) 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 大阪市、2014年10月31日

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

25) 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. 東京 2016年2月20日

26) 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

27) 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.

28) 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

29) 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

30) 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、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

31) 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

32) 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.

33) 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

34) 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

35) 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

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・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。POC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

本邦の周産期医療は世界トップレベルの救命率を誇るが、体が小さく未熟な新生児の特殊性ゆえに臨床研究が進みにくい。そこで、新生児・小児の血栓症の診断と治療の基礎となる、

1) 早産児・低出生体重児の入院時の血液検査基準範囲を設定する。

さらに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。そこで、健常新生児の 2) PC と PS 活性値基準範囲を設定し、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) 早産児・低出生体重児の入院時の血液検査基準範囲

既存のネットワークをもとに多施設共同臨床研究を行うインフラを整備し、10 の関連施設から年間 1000 例程度のハイリスク新生児をデータベースに登録した。対象は関連施設に入院した全ての新生児であり、死亡退院と先天異常例は除外した。測定項目は標準化サーベイランス 27 項目のうち入院時ルーティン項目を選択した。入院時(日齢 0 - 1)の血液検査所見を性別、在胎週数、出生体重別に層別化して、ノンパラメトリック法にて基準値と基準範囲(95%

信頼区間)を設定した。

(倫理面への配慮)

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

2) 新生児のプロテインC活性基準範囲

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、2500g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。

②PC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。

上記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) 早産児・低出生体重児の血液基準範囲

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

ほとんどの項目で性差は認めなかった。在胎週数や出生体重に比例して増加する項目(総蛋白; 図1、アルブミン、クレアチニン等)と変化しない項目(尿素窒素、カルシウム、クロール; 図2等)を認めた。

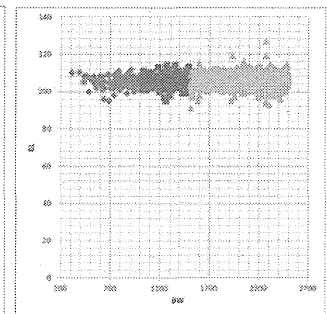
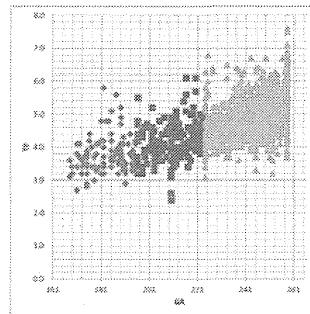


図1; 総蛋白値

図2; 血清クロール値

2) プロテインC活性基準範囲

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%)。

②PC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	0.64	<0.05
	(0.03-0.91)	(0.27-0.75)	

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

1) 早産児・低出生体重児の血液基準範囲

肝臓で合成される総蛋白やアルブミン値では、性差はなく、在胎週数と出生体重に依存していた。散布図において外れ値が散見されている。これらの症例の臨床背景を解析することで、肝臓における合成や代謝が亢進、あるいは低下する因子が求められる。特発性 (二次性) 血栓症の病態解明の一助となる可能性がある。

2) プロテイン C 活性基準範囲

新生児期の PC 活性値はばらつきが大きく、日齢 14 以降には上昇していた。生後 2 週間以降の評価が望ましい。PC 欠乏症では、PC/PS 活性比 < 0.3 が遺伝子検査の指標である。

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、PC 活性低値に加え、新生児仮死、低血圧、低酸素、感染、炎症など影響が推測される。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。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

早産児・低出生体重児の診療や臨床研究の基

礎となる出生時の血液検査基準範囲を設定した。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) Ochiai M, Kinjo T, Takahata Y, Iwayama M, Abe T, Ihara K, Ohga S, Fukushima K, Kato K, Taguchi T, Hara T. Survival and neurodevelopmental outcome of preterm infants born at 22-24 weeks of gestational age. *Neonatology* 2014;105:79-84.

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

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

4) 市山正子、大賀正一、松永友佳、金城唯宗、落合正行、堀田多恵子、浦田美秩代、古賀結、西村美香、康東天、原寿郎. 小児遺伝性血栓症スクリーニングのための protein C, protein S 及び antithrombin 活性値. *日本産婦人科・新生児血液学会誌* 23(1): 25-26, 2013

5) 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.

6) 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.

7) 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.

8) 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.

9) 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.

10) 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.

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

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

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

4) 市山正子、中村有香里、落合正行、石村匡崇、楠田剛、浦田美秩代、堀田多恵子、康東天、大賀正一、原寿郎. 胎児水頭症から診断された先天性プロテイン C ヘテロ接合体欠損症の新生児例. 第 24 回日本産婦人科・新生児血液学会学術集会 2014 年 6 月 13~14 日 横浜市

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

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

7) 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

8) 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

9) 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 年 7 月 10-12 日 福岡市

10) 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 年 7 月 10-12 日 福岡市

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

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、本人同定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。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Thrombopath法が有用であった。

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。本研究では凝固波形解析やトロンビン生成測定法、さらに、PC/PS機能を評価できるThrombopath法の有用性について検討した。また、トロンビンおよびプラスミンを同時に定量的に評価できる測定系を確立した。

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の評価することができる。

Thrombopath法：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。

トロンビン・プラスミン生成試験：本法は、組織因子(TF)、合成リン脂質(PL)、組織プラスミノゲンアクチベータ(tPA)をトリガー試薬とし、血漿とCaCl₂を添加してトロンビンとプラスミンが同時に生成する。

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

2-1. 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。

2-2. 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

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

礎実験である。今回の検討から、抗凝固因子 (APC、AT、rTM) の過剰な存在はいずれも凝固能ならびに線溶能を抑制することがわかった。さらに、血栓症の凝血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Thrombopath法で検討し、両方法が血栓症の凝血的評価法として有用であることを明らかにした。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Matsui H, Takeda M, Soejima K, Matsunari Y, Kasuda S, Ono S, Nishio K, Shima M, Banno F, Miyata T, Sugimoto M. Contribution of ADAMTS13 to the better cell engraftment efficacy in mouse model of bone marrow transplantation. *Haematologica*. 2014 99(10): e211-213.
- 2) Matsui H, Fujimoto N, Sasakawa N, Ohinata Y, Shima M, Yamanaka S, Sugimoto M, Hotta A. Delivery of full-length factor VIII using a piggyBack transposon vector to correct a mouse model of hemophilia A. *PloS One*. 2014 9(8): e104957.
- 3) Muto A, Yoshihashi K, Takeda M, Kitazawa T, Soeda T, Igawa T, Sampei Z, Kuramochi T, Sakamoto A, Haraya K, Adachi K, Kawabe Y, Nogami K, Shima M, Hattori K. Anti-factor IXa/X bispecific antibody ACE910 prevents joint bleeds in a long-term primate model of acquired hemophilia A. *Blood*. 2014 124(20):3165-3171.
- 4) Matsumoto T, Nogami K, Shima M. Coagulation function and mechanisms in various clinical phenotypes of patients with acquired factor V inhibitors. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2014 12(9): 1503-1512.
- 5) Ogiwara K, Nogami K, Matsumoto T, Shima M. Tissue factor pathway inhibitor in activated prothrombin complex concentrates (sPCC) moderate the effectiveness of therapy in some severe hemophilia A patients with inhibitor. *International Journal of Hematology*. 2014 99(5):577-587.
- 6) Nogami K, Shinozawa K, Ogiwara K, Matsumoto T, Amano K, Fukutake K, Shima M. Novel FV mutation (W1920R, FV_{Nara}) associated with serious deep vein thrombosis and more potent APC resistance relative to FV_{Leiden}. *Blood*. 2014; 123(15): 2420-2428.
- 7) Matsumoto T, Nogami K, Okuda M, Shima M. Optimization of the automated, CS-2000i™ method for measuring low levels of von Willebrand