

## 新生児期発症プロテイン C 欠乏症の臨床像と遺伝子解析の推奨基準

研究分担者	津田 博子	中村学園大学大学院栄養科学研究科 教授
研究協力者	大賀 正一	九州大学大学院医学研究院・成長発達医学 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 NICU 助教
	石村 匡崇	九州大学大学院医学研究院・成長発達医学 助教
	市山 正子	福岡市立こども病院 NICU
	堀田多恵子	九州大学病院・検査部 技師長
	康 東天	九州大学大学院医学研究院・臨床検査医学 教授

### 研究要旨

本邦における小児遺伝性血栓症の約 80%が、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 3 大血液凝固制御因子欠乏である。新生児期は最も血栓症の頻度が高く、電撃性紫斑病、頭蓋内出血・梗塞を発症する PC 欠乏症が多い。新生児期の凝固、抗凝固能は生理的にばらつきが多く、母体および付属物の影響を受けるため、その基準範囲や遺伝子検査の適応基準は定まっていない。本研究では、正期産児を対象に、新生児期の PC および PS 活性値を測定した。PC 活性は PS 活性に比べて低く、とりわけ生後 2 週までは活性値 30%未満の児も認められた。新生児発症の遺伝性プロテイン C 欠乏症を検索したところ、両アレル変異に加えて片アレル変異発症例も多く、遺伝子変異群 28 名 (両アレル変異 + 片アレル変異) は非変異群 10 名に比べて臨床症状数が多く、PC 活性値や PC/PS 活性比は低値であった。ROC 解析により求めた PC 活性値 10%未満での変異検出 Odd 比は 22.5 (95%CI 3.43-451.2,  $p < 0.01$ )、PC/PS 活性比 0.35 未満での変異検出 Odd 比は 12.3 (95%CI 1.56-165.2,  $p < 0.05$ ) であった。PC 活性値  $< 10\%$  と PC/PS 活性比  $< 0.35$  は、新生児 PC 欠乏症診断の遺伝子解析基準となる可能性が示唆された。

### A. 研究目的

新生児期は小児期の中で最も血栓症の発症頻度が高く、人口 10 万に対して小児全体では 0.07-0.14 名、入院中の小児は 5.3 名である。また、新生児集中治療室 (NICU) 入院中の患児は 24 名となる。新生児期における血栓発症の危険因子として、臍動静脈カテーテルを含めた中心静脈カテーテルや動脈カテーテル、感染、心疾患、新生児仮死、遺伝性血栓性疾患、外科手術などが挙げられる。

本邦においても周産期医療の進歩に伴い、新生児期の血栓症は増加傾向にあり、NICU での発症率は、1999 年から 2003 年までの 0.031% から、2005 年から 2009 年は 0.063% まで 2 倍に増加した。さらに私たちは、新生児期の遺伝性血栓症が頭蓋内病変と電撃性紫斑病で発症するプロテイン C (PC) 欠乏症が最も多いことを報告してきた。そこで今回は、遺伝子検査の適応基準を確立のために、新生児期の PC 活性の基準範囲を検討した。

## B. 研究方法

PC 活性基準範囲設定の対象は 2013 年 6 月から 2015 年 3 月に九州大学病院およびその関連病院にて、在胎 37 週から 40 週、2500g 以上で出生し、新生児仮死や先天異常などの合併症を認めない 52 名とした。PC 活性と PS 活性は Roche 社の STA Protein C/Protein S kit を用いて、九州大学病院・検査部にて測定した。各因子のプロモータを含むエクソンとその近傍の遺伝子解析もサンガー法にて同部で実施した。

遺伝子検査の適応基準設定の対象は、日本人新生児期発症 PC 欠乏症のうち、遺伝子解析を受けた 38 名とした。

(倫理面への配慮)

当研究は九州大学病院倫理委員会で承認され、保護者に紙面にて説明し同意書を得た。

## C. 研究結果

新生児期の PC 活性は、中央値が 31% で範囲は 5% から 68% までとばらつきが大きく、生後 2 週間までは PC 活性 30% 未満の症例も認めた。一方、新生児期の PS 活性は中央値が 49.5%、範囲は 24% から 76% であり、日齢に伴う変動は認めず、多くが PS 活性は 30% 以上であった(図 1)。

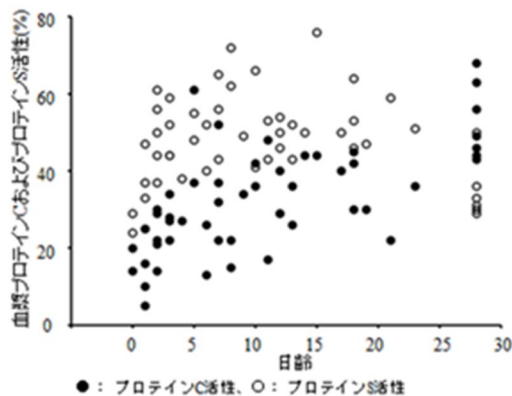


図 1 .正常新生児の日齢 28 までの PC、PS 活性値

遺伝子検査を受けた 38 名の結果は、両アレル変異は 19 名、片アレル変異は 9 名、非変異は 10 名であった。両アレル群は、片アレル群または非変異群に比べて、臨床症状が多く、電撃性紫斑病の発症率が高く、PC 活性値と PC/プロテイン S (PS) 活性比が低かった。

いずれかの変異群 28 名と非変異群 10 名を比較した時、臨床症状の数(中央値: 2 対 1)、電撃性紫斑病の発症率(0.57 対 0.10)、PC 活性値(中央値:10.0%対 19.5%) および PC/PS 活性比(中央値: 0.25 対 0.39)に、有意差を認めた(表 1)。

表 1 . 新生児期発症 PC 欠乏症の変異群と非変異群

	変異群	非変異群	単変量	多変量
性別(男:女:不明)	28 (13:12:3)	10 (3:6:1)	0.57	
在胎 37 週以上 (%)	18/20 (90.0)	3/7 (42.9)	<0.05	>.99
出生体重(範囲)	2815 (1854-3640)	2404 (818-3305)	0.18	
Apgar 5 分(範囲)	9 (6-10)	7 (4-9)	<0.05	>.99
発症日齢 (%)				
胎内	4/26 (15.4)	0/10 (0.0)	0.10	
0-6	18/26 (69.2)	10/10 (100)	0.08	
7-28	4/26 (15.3)	0/10 (0.0)	0.29	
臨床症状 (%)				
頭蓋内出血	24/28 (85.7)	8/10 (80)	>.99	
電撃性紫斑病	16/28 (57.1)	1/10 (10)	<0.05	>.99
硝子体出血	7/28 (25.0)	0/9 (0.0)	0.16	
症状 2 つ以上 (%)	15/28 (53.6)	0/10 (0.0)	<0.05	<0.05
PC 活性(範囲)	10 (1.5-31)	19 (6-45)	<0.01	<0.05
PS 活性(範囲)	57 (24-140)	45 (36-53)	>.99	
PC/PS 比(範囲)	0.25 (0.06-0.5)	0.39 (0.11-0.75)	<0.05	<0.05

ROC 解析により PC 活性値 10% 未満を Cut-off とした Logistic 解析を行うと、変異検出の Odds 比は 22.5 (95%CI:3.43-451.2,  $p<0.01$ )、PC/PS 活性比 0.35 未満を Cut-off とした場合は、変異検出の

Odds 比は 12.3 (95%CI : 1.56-165.2、 $<0.05$ ) であった。

#### D . 考察

新生児期の PC 活性は PS 活性に比べて低く、生後 2 週未満では PC 活性 30%未満の例も認められた。生後早期に PC 活性が低い新生児は、2 週以降に再検して、遺伝子解析の適応を検討することが望ましい。

新生児発症 PC 欠乏症は、両アレル変異に加え、片アレル変異保有者の発症も多い。遺伝子変異陽性例に遺伝子解析を行う基準としては、臨床像に加え、PC 活性値 $<10\%$ 、PC/PS 活性比 $<0.35$  が有用であった。血栓性素因を把握し、新生児・乳児に適切な治療と予防を行うためには、遺伝子解析を効率的に行う基準を確立する必要がある。

#### E . 結論

新生児期は PC 活性が低く、生後早期に PC 活性値が低い場合は、生後 2 週間以降の再検が望ましい。臨床症状数、PC 活性値、PC/PS 活性比を組み合わせれば、新生児期に効率的に遺伝子解析を行うことができる指標となる可能性が示された。

#### F . 健康危険情報

特になし。

#### G . 研究発表

##### 1 . 論文発表

1) Inoue H, Terachi SI, Uchiumi T, Sato T, Urata M, Ishimura M, Koga Y, Hotta T, Hara T, Kang D, Ohga S. The clinical presentation and genotype of protein C deficiency with double mutations of the

protein C gene. *Pediatr Blood Cancer*. 2017 Jan 23.(in press)

2) Ochiai M, Matsushita Y, Inoue H, Kusuda T, Kang D, Ichihara K, Nakashima N, Ihara K, Ohga S, Hara T; Kyushu University High-Risk Neonatal Clinical Research Network, Japan. Blood Reference Intervals for Preterm Low-Birth-Weight Infants: A Multicenter Cohort Study in Japan. *PLoS One*. 2016 Aug 23;11(8):e0161439.

3) 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.

4) 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.

5) 津田博子：先天性血栓性素因を有する静脈血栓塞栓症（特発性血栓症）.血液フロンティア,26 (3):51-57, 2016.

6) 津田博子：静脈血栓塞栓症の先天性要因の人種差.医学のあゆみ,25 (7):759-35, 2016.

7) 池田正孝、津田博子：難治性疾患としての特発性血栓症（先天性血栓性素因による）. 第10回日本血栓止血学会学術

標準化委員会シンポジウム報告. 日本血栓止血学会誌, 27 (4): 479-480, 2016.

## 2. 学会発表

- 1) Tsuda H: Update on Ongoing Project: Racial differences in Plasma Coagulation Inhibitors. “Plasma coagulation inhibitors”, 62nd Annual SSC Meeting of Int. Soc. Thromb. Haemost., Montpellier (Le Corum Conference Centre), France, May 26, 2016.
- 2) Tsuda H., Noguchi K., Nakazono E., Tsuda T., Jin, X.: Protein S specific activity analysis can accurately identify the carrier of Protein S Tokushima. 9th Congress of Asian-Pacific Soc. Thromb. Haemost., Taipei (Taipei International Convention Center), Taiwan, October 7, 2016.
- 3) 大賀正一. 新生児・小児期に発症する抗凝固因子欠損症の表現型と遺伝子型. 平成 28 年度厚生労働省科学研究費補助金 難治性疾患等政策研究事業“血液凝固異常症等に関する研究班(村田班)” 第 1 回班会議 特発性血栓症班研究報告 2016 年 8 月 26 日 東京都
- 4) 市山正子、井上普介、石村匡崇、楠田剛、金城唯宗、落合正行、高畑靖、堀田多恵子、山下博徳、佐藤和夫、康東天、大賀正一 新生児発症遺伝性プロテイン C 欠乏症スクリーニングのためのプロテイン C 活性基準 第 119 回日本小児科学会学術集会 2016 年 5 月 13-15 日 札幌市
- 5) 市山正子、井上普介、石村匡崇、楠田剛、金城唯宗、落合正行、高畑靖、堀田多恵子、山下博徳、佐藤和夫、康東天、原寿郎、大賀正一 新生児発症遺伝性プロテイン C 欠乏症スクリーニングのためのプロテイン C 活性基準 第 26 回日本産婦人科・新生児血液学会学術集会 2016 年 7 月 1-2 日 長崎市
- 6) 石黒 精、大賀正一、野上恵嗣、松本智子、末延総一、西村菜穂、中川聡、中舘尚也、福田晃也、笠原群生. 肝移植: プロテイン C 欠乏症の患児への新しい治療戦略. 第 58 回日本小児血液・がん学会学術集会 2016 年 12 月 15 日-17 日 東京都
- 7) 能口健太、古賀結、中園栄里、堀田多恵子、内海健、康東天、津田博子: 日本人健常者におけるプロテイン C 遺伝子多型の検討. 第 38 回日本血栓止血学会学術集会、奈良(奈良春日野国際フォーラム)、6 月 18 日 2016 年
- 8) 佐田志穂子、津田博子: Glucose 濃度低下による HepG2 細胞の脂質代謝関連因子と protein S 遺伝子発現の検討. 第 38 回日本血栓止血学会学術集会、奈良(奈良春日野国際フォーラム)、6 月 18 日 2016 年

## H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得  
なし。
2. 実用新案登録  
なし。
3. その他  
なし。