

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

小児・新生児期における遺伝性血栓症（プロテインC異常症を含む）の
効果的診断と治療予防法の確立に関する研究

平成 24-25 年度 総合研究報告書

研究代表者 大賀 正一

平成 26 (2014) 年 3 月

目次

・ 班員・研究協力者名簿・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	1
・ 総括研究報告書	
小児・新生児期における遺伝性血栓症（プロテインC異常症を含む）の 効果的診断法と治療管理法の確立に関する研究・・・・・・・・	
大賀 正一	
・ 分担研究報告書	
1. 血栓塞栓症家系の遺伝的素因に関する研究 ～小児における抗凝固因子欠乏症のスクリーニングと遺伝子解析～ ・・・・・・・・・・・・・・・・	
康 東天，落合 正行，福嶋 恒太郎，堀田 多恵子，浦田 美秩代， 古賀 結，西村 美香，大賀 正一	
2. 妊娠時のプロテインS活性低下時の遺伝子検査の意義に関する検討・・・・・・・・	
福嶋 恒太郎	
3. 周産期における遺伝性血栓症の診断と治療に関する研究・・・・・・・・	
金子 政時	
4. 周産期領域の栓友病診断と治療管理ガイドラインの 作成に関する研究・・・・・・・・	
嶋 緑倫	
5. 血栓症患者の遺伝子異常および、 抗Xa阻害薬使用時の有効な凝血学的モニタリングの検討・・・・・・・・	
瀧 正志	
6. 新生児期の遺伝性出血症と小児のワルファリン治療法に関する研究 効果的診断法の確立と抗血栓因子補充のための新生児への 新鮮凍結血漿（FFP）投与基準設定研究・・・・・・・・	
高橋 幸博，中川 隆志，山口 直子，谷口 恵理，豆田 清美，片岡 美香 倉本 智津子，内池 敬男	
7. 新生児血栓症の疫学に関する研究・・・・・・・・	
石黒 精	
・ 班会議・・・・・・・・	
・ 研究成果の刊行に関する一覧表・・・・・・・・	
・ 研究成果の刊行物・別刷・・・・・・・・	

小児・新生児期における遺伝性血栓症(プロテイン C 異常含む)の効果的診断と治療予防法の確立に関する研究班
 班員・研究協力者名簿

区 分	氏 名	所 属 等	職 名
研究代表者	大賀 正一	九州大学大学院医学研究院 周産期・小児医療学	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	九州大学病院・総合周産期母子医療センター-母性胎児部門	講 師
	金子 政時	宮崎大学医学部・生殖発達医学講座産婦人科学分野	准 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	院 長
	池ノ上 克	宮崎大学医学部附属病院	院 長

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

小児・新生児期における遺伝性血栓症（プロテインC異常症を含む）の
効果的診断と治療予防法の確立に関する研究

研究代表者 大賀 正一 九州大学大学院医学研究院周産期・小児医療学 教授

研究要旨

本邦では極めて稀とされる小児血栓症は、小児周産期医療の進歩とともに増加中である。遺伝性血栓性素因のうち、とくに抗凝固因子欠乏症（Antithrombin [AT]、Protein C [PC]及びProtein S [PS]）は、その高い血栓リスクから小児期の早期診断が強調されるようになった。一方、新生児・小児例の診断は難しく治療管理法も未確立である。母子と家族を守るために周産期の母子と小児に発症する血栓症の診療指針の作成をめざして本研究を開始した。

1) 新規発症例の集積

研究班発足後、全国より依頼を受け小児血栓性素因の解析を行い、PC 欠乏症 23 家系、PS 欠乏症 11 家系および AT 欠乏症 4 家系の解析を終了した。小児例は PROC 変異 11 名（全て発症 ホモ2、複合ヘテロ5、ヘテロ4）、PROS1 変異3名（発症 ホモ1 ヘテロ2）およびSERPINC1 変異 4 名（全て未発症ヘテロ）を新規に同定した。10 歳まで未発症、16 歳で発症した PC および PS 複合ヘテロ変異例を各々確認した。PC 活性が低く、PROC 変異のない患児を 12 名同定した。年齢による頻度と臨床像から、小児 PC 欠乏症の重要性を示した。

2) 日本人小児における血栓性素因の遺伝的背景

5 年間に小児血栓患者 339 人（後天性:先天性 4:1）を確認した。新生児は同時期に 69 人（NICU 入院当たり 0.063%）で過去 5 年から倍増し、先天性の 6 例は全て PC 欠損症であった。PC 欠損を伴う小児血栓症は、過去 25 年間に 27 人（遺伝子診断は 1/3）で、遺伝子変異のない一過性活性低下も存在した。以上より、小児先天性血栓症の約 70% は、三大因子欠乏（PC 45%、PS 15%、AT 10%）だが、成人血栓症の遺伝的背景（PC 20%、PS 40%、AT 10%）と異なることを明らかにした。総合周産期センター集積漏れは極めて少ないことを確認した。

3) 小児期における遺伝性血栓症の効果的診断法

新生児から 20 歳までの 307 人に血栓性素因解析を行い、血栓症は 1 歳未満が最も多いこと、新生児時に頭蓋内病変による PC 異常症が多く、成人と異なる臨床像であること、各因子活性基準値の下限を年齢群（～日齢 90、～2 歳、～6 歳、7 歳以上）の 4 群に分けると遺伝性 3 大抗凝固因子欠乏症の効率的なスクリーニングが可能であることを示した。活性測定基準値の標準化、新生児の基準値設定、過凝固の評価方法について検討を継続している。

4) 診療ガイドラインの作成

新生児血栓症の診療指針骨子を作成して公聴会にて報告し、全国ネットを確立した。臨床像の違いから、新生児期の PC 欠損症（主に頭蓋内病変）と思春期の PS および AT 欠損症（成人型静脈血栓塞栓症の早期発症病型）にわけて診断と治療の指針を作成する必要性が高いことが明らかとなった。

小児期に発症する血栓症の遺伝的背景と臨床像を報告した。短期間に新規症例を遺伝子診断し、考えられていたよりも頻度の高い疾患であることを明らかにした。さらに、診療情報からエビデンスを確立するための全国ネットを新生児領域で立ち上げ、新規発症例を早期診断する体制を整えた。今後後天性を含めたスクリーニングから、基盤データを充実させて、実践的な小児新生児の血栓症の診療ガイドラインの確立をめざす。

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	九州大学病院・総合周産期母子医療センター母性胎児部門	講師
金子 政時	宮崎大学病院・総合周産期母子医療センター	准教授
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

Protein S (PS)、Protein C (PC) 及び Antithrombin (AT) 欠損症は日本人の三大血栓性素因で、FVLeidenが主因の欧米とは異なる。ヘテロ変異の成人は深部静脈血栓塞栓症を発症し、ホモ/複合ヘテロ変異の新生児は電撃性紫斑病を起こす。日本人の各変異保有率は成人の活性値からPS 1.8%、PC 0.16%およびAT 0.18%とされる。一方、小児周産期領域における遺伝性素因については明らかでない。

乳児は生理的に抗凝固因子活性が低い。活性化PCは抗凝固以外に細胞保護・抗炎症作用を有し、PC欠乏が敗血症の重症化因子となる。感染性電撃性紫斑病や脳性麻痺の小児にFVLeiden やPC欠損症が見つかり、同様な小児例 (Eur J Pediatr 2009;168:673, Clin Neurophysiol 2010;121:800) を我々も報告してきた。感染後に後遺症を残した児に栓友病が隠れている可能性がある。

産科的塞栓症 (羊水塞栓を含む) は日本でも増加し、2008年度は妊産婦死亡の1位となった。三大素因の女性は、分娩が初発血栓の誘因となる。妊婦スクリーニングは児の早期診断と自らの予防に繋がる。三大素因に対する現在の抗凝固療法は不十分で、より安全な周産期管理が妊婦に必要である。遺伝性血栓症母子の包括的診療指針はない。

本研究の目的は、母子の血栓性素因を正確に診断し、遺伝性血栓症母子の診断と治療のガイドラインを確立することである。遺伝子診断と遺伝カウンセリングから家族を支援し、トータルケアの基盤形成をめざす。さらに血栓性素因に関する新規遺伝子の発見に備える。

B. 研究方法

小児・周産期領域における遺伝性血栓症の臨床的意義を明らかにし、診療ガイドラインを作成する。周産母子と小児医療センターを拠点に詳細な調査と凝固線溶スクリーニングを母子に行い、遺伝子解析を行う。周産期医療の支援病院を中心に血栓症による神経眼病変患児のスクリーニングと遺伝子解析を行う。罹患家系の遺伝カウンセリングを行う。血栓性素因のある母を適切に管理し、児には出生後速やかに診断と治療を行う。九州大学病院総合周産期母子・小児医療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」施設群から開始し、日本産婦人科新生児血液学会を活動基盤に全国へ対象施設を広げる。

2年間にこれまでの国内調査結果を統合し、基盤データを確立する。小児期に発症する3大遺伝性血栓症の遺伝子解析を行い、各施設と連携して臨床情報の解析と遺伝カウンセリングをすすめる。新生児および小児期発症の特発性血栓症のうちPC/PS/AT異常症の罹患家系を集積し解析を遂行した。治療経過から、分子疫学に基づく効率的な診断と治療ガイドラインを作成するための基盤データベースを作成する。長期入院中の周産期頭蓋内出血・梗塞例の診療画像記録も解析し疑い例をスクリーニングして、母子と家族に適切に対応する。

以下に具体的方法を記す。

1) 小児周産期領域の遺伝子解析情報 (大賀、康、高橋、石黒ほか)

全国の総合・地域周産期母子医療センターの情報と3調査の結果から、遺伝子解析を積極的に継続しデータを充実させる。同時

に罹患家系の遺伝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。新規症例発生ごとにこれを順次実施する。

2) 新生児と母体の診療管理(落合、福嶋、金子、高橋および参加施設)

周産母子センター(母性、新生児)に入院した血栓性素因を疑う妊婦と児に、順次スクリーニングと遺伝子診断を行い適切に診療する。同素因を疑う児には家族解析を行う。

3) 小児科における解析(石黒、嶋、吉良、本荘ほか)

新生児医療後方支援病院小児科の記録から、後方視的に血栓性素因疑い例を選定する。血栓性素因スクリーニングと遺伝子診断を行い必要な家族解析を行う。北部九州の基幹10施設にはTV会議による診療連携を築く。新生児医療の支援施設である国立病院機構の協力を得る。

4) 血栓性素因スクリーニング、遺伝子解析およびカウンセリング(大賀、康他)

PT, APTT, Fibrinogen, PIC, TAT, D-dimer, VIII:C, 抗 Cardiolipin 抗体, lupus-anticoagulant, PC・PS 活性 / 抗原, AT 活性, PIVKA, F₁₊₂ 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 (7 exons)の翻訳とプロモーター領域を解析する。欠失を検討する。臨床遺伝医療部で遺伝カウンセリングを行う。

5) 周産期領域の栓友病診療ガイドラインの作成(高橋、嶋、瀧、大賀、白幡、池ノ上他)

母子に効果的なスクリーニング項目を決定する。活性化PC・AT 製剤補充の有用性を検討し、治療ガイドラインを作成する。

平成25年度までに拡充した全国からの小児血栓症に関する解析を継続し、臨床及び分子疫学情報の基盤データを充実させる。この結果を反映させた診療ガイドラインを作成して、基盤データを継続診療のための遺

伝性血栓症登録へ発展させる。原因不明の若年発症血栓や活性低下例の新規遺伝子解析を始める。分子疫学研究には本荘哲(国立病院機構福岡病院小児科医長・元栃木県立がんセンター疫学研究室長)の協力をえる。

(倫理面への配慮)

全国調査(新生児、小児)は、対象数把握と研究参加に関するもので遺伝子検査を含まない診療情報のみの観察研究であった。しかし、患者登録システムの確立に当たっては遺伝子検査を含む研究であるため、主治医から患者本人もしくは保護者への説明・同意の取得がなされた上で、申請者が遺伝子解析を行う。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(2011年3月30日継続)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疾患登録事業の疫学研究倫理指針に準拠して臨床研究として行う。調査にあたっては、個人情報を守秘を厳守し、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、事前に患者および家族へ十分に説明し、文書による同意を得る。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、関連施設のカウンセリングも協力して行う。

C. 研究結果

・研究班全体としての研究成果

新生児・小児血栓症の診断と治療を確立するため、その遺伝的背景と診療指針の作成に関して、以下の4つを明らかにした。

1) 新規発症例の特徴

研究班発足後、全国より依頼を受け小児血栓性素因の解析を行い、PC 欠乏症 23 家系、PS 欠乏症 11 家系および AT 欠乏症 4 家系の解析を終了した。小児例は PROC 変

異 11 名(全て発症 ホモ2、複合ヘテロ5、ヘテロ4)、*PROS1*変異3名(発症 ホモ1 ヘテロ2)および *SERPINC1* 変異 4 名(全て未発症ヘテロ)を新規に同定した。10 歳まで未発症、16 歳で発症した PC および PS 複合ヘテロ変異例を各々確認した。PC 活性が低い *PROC* 変異のない患児を 12 名同定した。

石黒、瀧らの小児の全国調査と高橋らの新生児血栓症の調査から、図 1 のように小児血栓症の 70%には PC, PS, AT 欠乏症がみられ、PC 欠乏症がその約半分を占めることが明らかとなり、成人と比較して小児 PC 欠乏症の重要性を明らかにした(Pediatr Int 55: 267-71,2013)。

研究班では新規診断例既報告例、疫学データを多面的に可能な限り照合し基盤データを整備した。そしてこの 2 年の前方視的解析から、小児 PC 欠損症では新生児の頭蓋内病変(梗塞、出血、静脈洞血栓、水頭症などが)が主たる病型であることを確認した。さらに、小児期発症の PS および AT 欠損症は、10 歳以上で成人型静脈血栓塞栓症(VTE)をきたす病型が主体であることが明らかとなった(図1)。

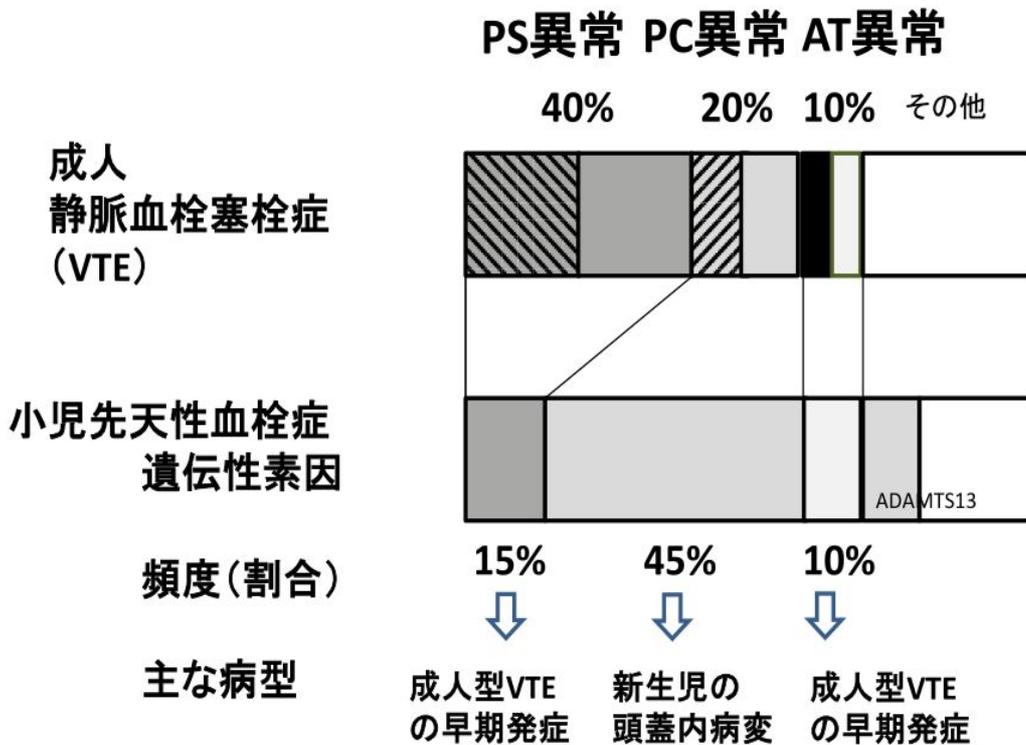


図 1 . 本邦における抗凝固因子欠損症の遺伝的背景と臨床病型

小児PC欠乏症の発症年齢を研究班発足時の2011年までのデータ (Haemophilia 19:378-84,2013)とそれ以降のものとを表1に比較する。

表1. 小児 Protein C 欠乏症の発症年齢

	2011以前	2011以降
患者数	26名	23名
出生前	3	2
日齢0-7	17 } 77%	11 } 57%
日齢8-30	4	2
1か月-2歳	2	3
2歳以降	0(0%)	5(22%)

予想されたとおり、胎児期の水頭症を含め早期新生児例が過半数を占めていた。従来の後方視的解析では、2歳以降のPC欠乏症小児の発症例が検索できていなかったが、新たに5例を診断した。ほぼ1/10の短期間に同数の小児PC欠乏症を診断し、2歳以降の小児を診断し得た事実は、未診断小児発症PC欠乏症が少なくないことを示唆する。

小児PC欠乏症の遺伝形式を2011年までのデータとそれ以降について表2に比較する。

表2. 小児 Protein C 欠乏症の遺伝形式

	2011以前	2011以降
患者数	27名	23名
ホモ変異	2	2
複合ヘテロ変異	11 } 44%	5 } 30%
ヘテロ変異	7	4
変異なし	2	12
その他不明	5 } 26%	0 } 52%

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

新規診断例についてもホモ変異および複合ヘテロ変異の両アレル以上が30%を占め、ヘテロ変異の患児も発症していた。今回の解析で同定された変異は、これまで200以上の既報告PROC変異であった。また、図2に示すとおり、hot spotはなく、また明らかな遺伝子型と表現型の相関を認めることはできなかった。

新規診断例はすべて遺伝子解析を行ったので、変異がdirect sequencingで証明で

きない例が半数に昇った。このことは、スクリーニングのための活性値の限界であること、新生児の診断が活性値からは困難であること、また稀ながら欠失や二次的な活性低下が病的意義を有すること、などが予想された。

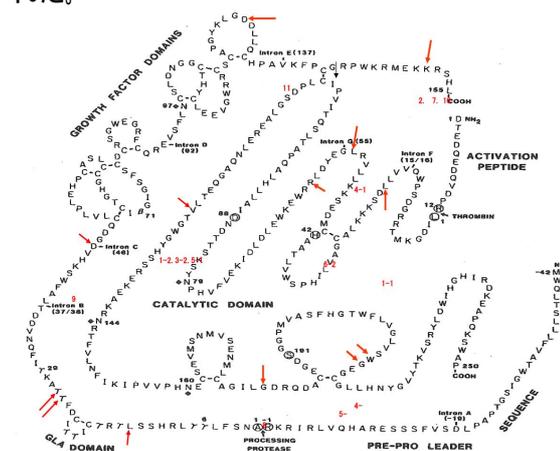


図2. 同定されたPROC変異の部位

2) 日本人小児における血栓性素因の遺伝的背景

全国調査から、5年間に小児血栓339人(後天性:先天性 4:1)を確認した。新生児は同時期に69人(NICU入院当たり0.063%)で過去5年から倍増し、先天性の6例は全てPC欠損症であった。PC欠損を伴う小児血栓症は、過去25年間に27人(遺伝子診断は1/3)で、遺伝子変異のない遅れて正常化する例を確認した。以上より、小児先天性血栓症の約70%は、3因子欠乏(PC 45%, PS 15%, AT 10%)であるが、成人血栓症の遺伝性素因(PC 20%, PS 40%, AT 10%)とは異なることを明らかにした (Pediatr Int 55:267-71, 2013)(図1)。全国の総合周産期センターに調査漏れが極めて少ないことを確認した。

3) 小児発症遺伝性血栓症の効果的診断

新生児から20歳までの307例に血栓性素因解析を行い、血栓症は1歳未満が最も多いこと、新生時期には頭蓋内病変によるPC異常症が多く、成人と異なる臨床像であること、各因子活性基準値の下限を年齢群(新生児、~2歳、~6歳、7歳以上)の4

群に分けると遺伝性3大抗凝固因子欠乏症の効率的スクリーニングが可能なことを示した。

4) 診療ガイドラインの作成

新生児血栓症の診療ガイドライン作成の基本骨子を作成し、診療指針作成に関する公聴会にて報告した。これを評価する全国ネットも確立した。新生児PC欠損症の病型である電撃性紫斑病を想定した補充療法の治療指針を作成した。一方、臨床像と治療管理法の違いなどから、血栓症の多い新生児期と思春期にわけたガイドライン作成の必要性が明らかとなった。

以上より、新生児・小児期に発症する血栓症の遺伝的素因に関して、日本の分子疫学と臨床像を初めて明らかにした。さらに、診療情報から診断と治療のエビデンスを確立するための全国ネットを新生児領域でほぼ立ち上げ、新規発症例を早期に診断できる体制になった。

・各分担研究項目の成果

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

血栓塞栓症家系の遺伝的素因～周産期領域における効率的スクリーニングに関する研究

全国から解析依頼をうけ、PC変異12人、PS変異2人及びAT変異6人を同定し、10歳と16歳のPCおよびPS複合ヘテロ変異例を各々見出した。PC活性が従来の基準値では下限域内とされた新生児例(脳梗塞と胎児水頭症)から各2家系を同定した。遺伝性PC欠損症家系の診断には活性基準値を再設定し、新生児ではPC異常が重要で、遺伝子解析を進める効果的スクリーニング法(各因子活性比など)を提唱した。新規診断例と報告例のデータを照合し基盤データを整備した。

新生児は非典型例も含め広く3因子活性と遺伝子解析を継続し、発症時の過凝固状

態を評価した。同時期の健常児の基準値を作成して活性比、ビタミンKの影響などから、効率的診断法を検討中である。生理的PC活性上昇が遅延するPC欠乏症の診断意義が明らかになるであろう。

20歳までの307例に血栓性素因解析を行った。各因子活性下限を新たに定義すれば、遺伝性血栓症を効率的に診断できる可能性を示した。新生児期は頭蓋内病変で発症するPC欠損症が、7歳以降は成人型深部静脈血栓塞栓症を発症するPS欠損症が主体であった。生後3か月までのPS活性と解離した低PC活性から遺伝子診断を進めていく。

嶋 緑倫 奈良県立医科大学小児科学教授

凝固検査標準化、治療管理ガイドライン作成(小児)に関する研究

本邦遺伝性血栓症3大素因のうち2つはPC経路に関与する。PC経路機能検査(Thrombopath)はトロンビン生成量からPiCi%(PC-induced coagulation inhibition %)を算出し、PS、PC、FV、FVIIIなどの異常を高感度でスクリーニングできる。我々は反復流産既往妊婦(先天性PS欠損症疑い)のPiCi%と関連因子の経時変化を報告し、さらに不育症妊婦の解析を進めた。妊産婦・新生児の生理的変動もふまえ、本法のような包括的凝固/抗凝固検査が遺伝的血栓症のスクリーニングに有用かを検討している。

国内で汎用されている凝固測定機器を用いて凝固波形解析法における測定試薬や定量的パラメーターの評価を行い凝固波形解析の標準化を試みた(J Thromb Haemost 11:1417-20, 2013)。さらに、凝固系と線溶系のバランスを評価するために従来のトロンビン生成測定法系にプラスミン生成を同時に評価できる測定系を確立した(Thromb Haemost 110:761-8, 2013)。

福嶋 恒太郎 九州大学病院・総合周産期母子医療センター母性胎児部門 講師

血栓性素因を有する母体管理と児の早期診断に関する研究

PSの生理的な低下と胎児発育遅延との関

連について検討し、血栓性素因を認めない胎児発育遅延におけるPS活性は正常妊娠例と比して有意に低下していることを示した。不育症、習慣流産等の疾患でも微小血栓形成による胎盤機能障害が病態に關与していることが明らかとなっており、深部静脈血栓症などの明らかな凝固障害を来した症例のみならず、FGRや不育症についても血栓性素因解析の蓄積と検討を進めた。

抗リン脂質抗体症候群患者の妊娠ではヘパリン及びバイアスピリンを用いた抗凝固療法が提案されているが、PS低下症では妊娠成立後は妊娠の影響と病的低下の鑑別が従来の血液検査法では不可能であり、現状適切な治療の提案が困難となっている。不育症習慣流産等で妊娠後に血栓性素因が明らかとなる症例に注目し、妊娠中にPS遺伝子解析をおこなうことによって、抗凝固療法適否決定に資することが可能かどうか検討中である。

金子 政時 宮崎大学医学部・生殖発達医学講座産婦人科学分野 准教授

血栓性素因を有する母体管理と児の早期診断 に関する研究

小児新生児期における遺伝性血栓症の新生児を発症前に抽出することは、新生児予後の改善に繋がる。そこで、血栓性疾患の素因を持つ妊婦から出生した新生児を、ハイリスク新生児として疾患の検索を行った。初年度は当院で管理した母体261名中、脳梗塞の既往を持つ妊婦と深部静脈血栓症の既往を持つ妊婦合計2名をcandidateとした。脳梗塞既往のある妊婦は、血栓症に関する検索では異常を示さず、帝王切開にて3114gの男児を出産した。次年度は当院で管理した母体278名中、脳梗塞の既往を持つ妊婦と血小板増多症合併妊婦の2名の児について遺伝性血栓症素因について検索を行ったが異常はなかった。

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

新生児の血栓症の病因・病態 に関する研究

PC欠乏例の遺伝子診断を実施した。新生児血栓症(5年毎に実施)サーベイランスと本研究班のデータベースを照らし基盤データの向上を図った。PC診断体制(SEKIUI コアプレスタ2000、テストチーム RS PC)を整備し、新生児・乳児のビタミンK欠乏症の診断検査試薬ピブカルテストの後発診断薬、PIVKA-II検査法(デタミナーCLピブカルテスト)の検査薬を確立した(平成24年11月から検査可能)。同検査法の確立のため、ワルファリン血のPC活性を測定したところ、その投与量、PT-INRに比較し、極度にPC活性低下例を認めた。ワルファリン・コントロールが良好にも関わらず血栓症を反復する例があることから、原因不明の血栓症例ではPC異常症も考慮する必要性が示唆された。原因不明の血栓症や脳梗塞例にPC検査を行いその意義を検討している。

新生児の各種病態での止血検査にSEKISUIコアプレスタ2000を用いたテストチームS RPCでのPC活性とACL TOP 300CTSによる総PC・PS制御能のスクリーニング検査法であるThrombopathとを同時に測定することで、新生児各種疾患でのPCの動態とPC・PS制御能を測定し、PC・PS制御系の補充療法としての新鮮凍結製剤(FFP)の適応を検討している。

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

小児凝固異常症の疫学と診療ガイドライン作成 に関する研究

2013年3月より診療中の遺伝性血栓症患者の遺伝子解析を開始した。現在まで6家系10名の遺伝子解析を九州大学に依頼し、その内5家系8名分について解析が終了した。

血栓症の治療および予防薬の抗凝固効果には大きな個人差が存在する。血栓症治療薬として使用する場合、投与量の増加に伴い出血性合併症の頻度が増加する危険性がトロンビン生成試験の成績より示唆される。抗Xa阻害薬を使用する際の有効な凝血学的モニタリングは未だ確立されていないが、一部の抗Xa阻害薬においては凝固波形解析による凝血学的モニタリングが有用である

可能性が示唆された。現在、モニタリングの精度を高めるため凝固波形解析に用いる最適な試薬の検討を進めて、診療ガイドラインへ適切に反映させる予定である。

石黒 精 独立行政法人国立成育医療研究センター・教育研究部総合診療部血液内科 部長

小児血栓症の疫学 に関する研究

わが国で初めて小児血栓性疾患の疫学調査を実施した。5年間の症例を対象とした一次アンケートによって625例の小児血栓症患者が報告された。以後二次調査の返送率を向上させた。二次アンケート調査によって得られた383例について詳細なデータを解析した。その結果、基準に適合しなかった例を除いて、63例の先天性血栓素因および276例の後天性疾患が明らかになった。

国立成育医療研究センターの電子カルテを用いて後方視的に開院以来10年間の小児血栓性疾患を調べた。その結果、全国疫学調査で判明していた以上の124例の症例が明らかになり、日本小児科学会や日本血栓止血学会で成果を発表した。

D . 考察

本研究班を組織した時点で、想定できたことと予想外であった点を考察する。三大抗凝固因子欠損症が血栓症の遺伝的素因として、臨床的に最も重要である。この3疾患は稀少疾患ながらも日本ではFVLとPT多型がない。成人では後天性因子による影響が大きい。以上から、日本人小児を対象とすれば血栓症の遺伝的背景がより明確になると想定した。積極的な遺伝子解析から、二年間で予想以上に症例が集積された。小児患者から未発症の親が診断され、複数の新規家系が発見された。症例数が少なくても小児発症例を細やかに解析すれば素因家系を成人よりも高い確率で診断できることを実証した。

一方、変異がなく活性上昇の成熟機転が遅れる児が確認されたことは、新たな多元的要因(平時は基準値内だがある状況下では急激な活性低下がおこるなど)が推定され、とくに新生児基準値の見直しが必要と

なった。

全国調査以降診療ネットを確立してから、治療に関する情報にはコンセンサスさえ得られていないものが多いことが明らかになった。海外でも小児と新生児の血栓症診療ガイドラインが最近出始めたが、成人のエビデンスレベルには到底及ばない。本研究班の設立後に日本では使用不可能な組換PC製剤の敗血症に関する効果が否定され、またAT抵抗性による新規栓友病家系が日本から報告された。このことは、日本人小児を対象とした本研究の意義を実感させるものであった。

E . 結論

新生児・小児期に発症する血栓症の遺伝的素因に関して、日本の分子疫学と臨床像を初めて明らかにした。診療情報から診断と治療のエビデンスを確立するための全国ネットを新生児小児領域で新規発症例を早期に診断できる体制をほぼ確立した。これにより、後天性因子の解析と対策の必要性、治療における確かな情報が極めて少ないことが明らかとなった。新生児と小児の効率的スクリーニング法を開発し、遺伝子診断を家系単位で進め新規診断例基盤データを集積し、さらに実践的で質の高い小児・新生児血栓症の診療指針策定をめざす。

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) Ohga S, Ishiguro A, Takahashi Y, Shima M, Taki M, Kaneko M, Fukushima K, Kang D, Hara T, on behalf of the Japan Childhood Thrombophilia Study Group. Protein C deficiency as the major cause of thrombophilias in childhood. *Pediatr Int* 55(3): 267-71, 2013
- 2) Ohga S, Kang D, Kinjo T, Ochiai M, Doi T, Ishimura M, Kayamori Y, Urata

- M, Yamamoto J, Suenobu S, Kanegane H, Ikenoue T, Shirahata A, Hara T: Pediatric presentation and treatment of congenital protein C deficiency in Japan. *Haemophilia* 19(3):378-84, 2013
- 3) Ochiai M, Kinjo T, Takahata Y, Iwayama M, Kenji I, Ohga S, Kotaro F, Wake N, Taguchi T, Hara T: Clinical outcome of extremely low birth weight infants born at GW22-26: a report from a single institution in Japan. *Neonatology* 105(2):79-84, 2014
 - 4) Doi T, Ohga S, Ito N, Ishimura M, Suga N, Nomura A, Takada H, Matsumoto M, Fujimura Y, Hara T: Limited renal prophylaxis in regular plasmotherapy for heritable ADAMTS13 deficiency. *Pediatr Blood Cancer* 60(9):1557-8, 2013
 - 5) Yamamura K, Joo K, Ohga S, Nagata H, Ikeda K, Muneuchi J, Watanabe M, Hara T: Thrombocytosis in asplenia syndrome with congenital heart disease: a previously unrecognized risk factor for thromboembolism. *Int J Cardiol* 167(5):2259-63, 2013
 - 6) 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* 2013 (in press)
 - 7) Narazaki R, Makimura M, Sanefuji M, Fukamachi S, Akiyoshi H, So H, Yamamura K, Doizaki S, Kojima S, Ihara K, Hara T, Ohga S: Bilateral stenosis of carotid siphon in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Brain Dev* 35(7): 690-3, 2013
 - 8) Matsunaga Y, Ohga S, Kinjo T, Ochiai M, Fukumoto Y, Ito N, Doi T, Kang D, Hara T: Neonatal asphyxia and renal failure as the presentation of severe protein C deficiency. *J Perinatol* 33(3): 239-41, 2013
 - 9) Nanishi E, Ohga S, Doi T, Ishimura M, Ihara K, Takada H, Shima M, Hara T: Complete immunotolerance induction after FEIBA prophylaxis in a hemophilia A patient with high-titer inhibitor. *Haemophilia* 18(3):e75-7, 2012
 - 10) Kitajima J, Inoue H, Ohga S, Kinjo T, Ochiai M, Yoshida T, Kusahara K, Hara T: Differential transmission and postnatal outcome in triplets with congenital cytomegalovirus infection. *Pediatr Development Pathol* 15(2):151-155, 2012
 - 11) Shiraishi A, Hoshina T, Ihara K, Doi T, Ohga S, Hara T: Acute liver failure as the initial manifestation of Wilson disease triggered by human parvovirus B19 infection. *Pediatr Infect Dis J* 31(1):103-4, 2012
 - 12) Unal S, Gumruk F, Yigi S, Tuncer M, Tavi B, Cil O, Takci S, Urata M, Hotta T, Kang D, Cetin M: A novel mutation in protein C gene (PROC) causing severe phenotype in neonatal period. *Pediatr Blood Cancer* 61(4):763-4, 2014
 - 13) Uchiumi T, Tanamachi H, Kuchiwaki K, Kajita M, Matsumoto S, Yagi M, Kanaki T, Kang D: Mutation and functional analysis of ABCC2/multidrug resistance protein 2 in a Japanese patient with Dubin-Johnson syndrome. *Hepatol Res* 43(5):569-75, 2013
 - 14) Matsumoto T, Nogami K, Shima M: Simultaneous measurement of thrombin and plasmin generation to assess the interplay between coagulation and fibrinolysis. *Thromb Haemost* 110(4):761-8, 2013
 - 15) Shima M, Thachil J, Nair SC, Srivastava A: Towards standardization of clot waveform analysis and recommendations for its clinical applications. *J Thromb Haemost* 11(7):1417-20, 2013
 - 16) Fujita Y, Satoh S, Sugitani M, Yumoto Y, Fukushima K, Wake N: Clinical utility of augmentation index as a new parameter of peripheral circulation in human fetuses. *Early Hum Dev* 89(8):601-5, 2013
 - 17) Anami A, Fukushima K, Takasaki Y, Sumida T, Waguri M, Wake N, Murashima A: The predictive value of anti-SS-A antibodies titration in pregnant women with fetal congenital heart block. *Mod Rheumatol* 23(4):653-8, 2013
 - 18) Kaneko M, Sameshima H, Minematsu T, Kusumoto K, Yamauchi A, Ikenoue T: Maternal IgG avidity, IgM and ultrasound abnormalities: combined method to detect congenital cytomegalovirus infection with sequelae. *J Perinatol* 33(11):831-5, 2013
 - 19) Mamemoto K, Kubota M, Nagai A, Tak

- ahashi Y, Kamamoto T, Minowa H, Yasuhara H: Factors associated with exclusive breastfeeding in low birth weight infants in NICU discharge and the start of complementary feeding *Asia Pac J Clin Nutr* 22:270-5, 2013
- 20) Takahashi D, Takahashi Y, Matsui M, Araki S, Kubo K, Sato H, Shirahata A: Evaluation of hypercoagulability using soluble fibrin monomer complex in such newborns *Pediatr Int* 155:151-6, 2013
- 21) Imamura H, Akioka Y, Taki M, Terawawa F, Okumura N, Hattori M: Successful living-related kidney transplantation in a boy with inherited dysfibrinogenemia. *Pediatr Nephrol* 17(7): E161-E164, 2013
- 22) Kawata H, Uesugi Y, Soeda T, Takemoto Y, Sung JH, Umaki K, Kato K, Ogiwara K, Nogami K, Ishigami K, Horii M, Uemura S, Shima M, Tabata Y, Saito Y. A new drug delivery system for intravenous coronary thrombolysis with thrombus targeting and stealth activity recoverable by ultrasound. *J Am Coll Cardiol* 60(24):2550-7, 2012
- 23) Doi M, Matsui H, Takeda Y, Saito Y, Takeda M, Matsunari Y, Nishio K, Shima M, Banno F, Akiyama M, Kokame K, Miyata T, Sugimoto M. ADAMTS13 safeguards the myocardium in a mouse model of acute myocardial infarction. *Thromb Haemost* 108:1236-8, 2012
- 24) Tatsumi K, Ohashi K, Tateno C, Yoshizato K, Yoshioka A, Shima M, Okano T. Human hepatocyte propagation system in the mouse livers: functional maintenance of the production of coagulation and anticoagulation factors. *Cell Transplant* 21:437-45, 2012
- 25) Dargaud Y, Sorensen B, Shima M, Hayward C, Srivastava A, Negrier C. Global haemostasis and point of care testing. *Haemophilia* 4:81-8, 2012
- 26) Fukushima K, Yumoto Y, Kondo Y, Fujita Y, Morokuma S, Tsukimori K, Wake N: A retrospective chart review of the perinatal period in 22 pregnancies of 16 women with Moyamoya disease. *J Clin Neurosci* 19:1358-62, 2012
- 27) Hidaka N, Yamanaka Y, Fujita Y, Fukushima K, Wake N: Clinical manifestations of pregnancy in patients with Takayasu arteritis: experience from a single tertiary center. *Arch Gynecol Obstet* 285:377-85, 2012
- 28) Kaneko M, Sameshima H, Kai K, Urabe H, Kodama Y, Ikenoue T. Mortality rates for extremely low-birth weight infants: A regional, population-based study in Japan during 2005-2009. *J Obstet Gynecol Res* 38: 1-7, 2012
- 29) Kaneko M, Kawagoe Y, Oonishi J, Yamada N, Sameshima H, Ikenoue T. Case report and review of delayed-interval delivery for dichorionic, diamniotic twins with normal development. *J Obstet Gynecol Res* 38: 741-4, 2012
- 30) Tanabe S, Yaki H, Kimura T, Isonishi A, Kato S, Yoshida Y, Hayakawa M, Matsumoto M, Ohtaki S, Takahashi Y, Fujimura Y: Two newborn-onset patients of Upshaw-Schulman syndrome with distinct subsequent clinical courses. *Int J Haematol* 96: 789-97, 2012
- 31) Nanishi E, Ohga S, Doi T, Ishimura M, Ihara K, Takada H, Shima M, Hara T. Complete immunotolerance induction after FEIBA prophylaxis in a hemophilia A patient with high-titer inhibitor. *Haemophilia* 2012;18:e75-7
- 32) Shiraishi A, Hoshina T, Ihara K, Doi T, Ohga S, Hara T. Acute liver failure as the initial manifestation of Wilson disease triggered by human parvovirus B19 infection. *Paediatr Infect Dis J* 2012; 31:103-4
- 33) Kitajima J, Inoue H, Ohga S, Kinjo T, Ochiai M, Yoshida T, Kusuhara K, Hara T: Differential transmission and postnatal outcome in triplets with congenital CMV infection. *Pediatr Development Pathol* 2012; 15:151-5
- 34) Doi M, Matsui H, Takeda Y, Saito Y, Takeda M, Matsunari Y, Nishio K, Shima M, Banno F, Akiyama M, Kokame K, Miyata T, Sugimoto M. ADAMTS13 safeguards the myocardium in a mouse model of acute myocardial infarction. *Thromb Haemost* 2012; 108:1236-8
- 35) Dargaud Y, Sorensen B, Shima M, Hayward C, Srivastava A, Negrier C. Global haemostasis and point of care tes

- ting. Haemophilia 2012; 4:81-8
- 36) Fukushima K, Yumoto Y, Kondo Y, Fujita Y, Morokuma S, Tsukimori K, Wake N. A retrospective chart review of the perinatal period in 22 pregnancies of 16 women with Moyamoya disease. J Clin Neurosci 2012;19:1358-62
- 37) Fukushima K, Morokuma S, Tsukimori K, Murata M, Wake N. Blood pressure measurements within the JNC7 pre-hypertensive range after 32 weeks of gestation are a risk factor for decreased fetal growth. Hypertens Res 2012; 35: 128-30
- 38) Hidaka N, Yamanaka Y, Fujita Y, Fukushima K, Wake N. Clinical manifestations of pregnancy in patients with Takayasu arteritis: experience from a single tertiary center Arch Gynecol Obstet. 2012 ; 285(2): 377-85
- 39) Kaneko M, Sameshima H, Kai K, Urabe H, Kodama Y, Ikenoue T. Mortality rates for extremely low-birthweight infants: A regional, population-based study in Japan during 2005-2009. J Obstet Gynecol Res 2012; 38: 1-7
- 40) Oba T, Yasukawa H, Hoshijima M, Sasaki K, Futamata N, Fukui D, Mawatari K, Nagata T, Kyogoku S, Ohshima H, Minami T, Nakamura K, Kang D, Yajima T, Knowlton KU, Imaizumi T: Cardiac-specific deletion of SOCS-3 prevents development of left ventricular remodeling after acute myocardial infarction. J Am Coll Cardiol 28: 59(9):838-52, 2012
- 41) 大賀正一：エキスパートのための産婦人科・新生児領域の血液疾患診療の手引き「新生児血栓症」pp. 印刷中，日本産婦人科新生児血液学会編集 2013
- 42) 大賀正一：小児期に発症する遺伝性血栓症～プロテインCの重要性～日本小児血液・がん学会推薦総説 日本小児科学会雑誌117巻10号 1538-44, 2013
- 43) 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2013; 23(1):25-2
- 44) 松永友佳, 山本順子, 大賀正一, 横田千恵, 高橋保彦, 末延聡一, 浦田美秩代, 栢森裕三, 康東天, 原寿郎: 臀部血管腫に伴うKasabach-Merritt症候群を疑われた新生児プロテインC欠損症の1例. 日本小児皮膚科学会雑誌 31(1): 19-23, 2012
- 45) 鈴木真波、笹本優佳、攪上詩織、新谷亮、升森智香子、大野秀子、瀧正志：臍帯のPCRで最終的に先天性CMV 感染症と診断した血小板減少性紫斑病の1例. 日産婦新生児血学誌2012; 22:S91-2
- 46) 高橋幸博、楠田聡、瀧正志、澤田健、酒井道生、西口富三、遠藤文夫、白幡聡：ビタミンK欠乏性出血症の新PIVKA-II検査法 ピブカルテストからデタミナーCLピブカルテストに . 日産婦新生児血学誌2012;22:S57-8
- 47) 一宮優子, 石黒 精, 中館尚也, 前川貴伸, 藤田秀樹, 國島伸治, 阪井裕一: ロミプロスチムが慢性自己免疫性血小板減少症に奏功して開心術を施行し得た小児例. 日小血がん誌 2013 (印刷中)
- 48) 清水 武, 石黒 精, 高柳隆章, 松井猛彦, 利根川尚也, 前川貴伸, 板橋家頭夫: アデノウイルス胃腸炎とマイコプラズマ肺炎に続発したループスアンチコアグラント陽性・低プロトロンビン血症. 日臨免誌2013 (印刷中)
- 49) 小川千登世, 真部 淳, 小原 明, 石黒 精: 急性リンパ性白血病L-アスパラギナーゼ療法関連凝固異常に対する国内外の支持療法の現状. 臨床血液 2013; 54(3): 316-8
- 50) 山本真梨子, 中館尚也, 井口梅文, 益田博司, 阪井裕一, 石黒 精: 遺伝子組み換え第IX因子製剤の持続輸注による小児期血友病Bの開頭術周術期管理. 臨床血液 2013; 54(3): 300-4
- 51) 野村 理, 荒木 尚, 堤 義之, 石黒 精, 阪井裕一: 軽微な受傷機転によるretroclival epidural hematomaの幼児例. 日救急医会誌 2012; 23(6):242-6
- 52) 余谷暢之, 石黒 精, 森 鉄也, 熊谷昌明, 師田信人, 宮坂実木子, 阪井裕一: ビタミンK欠乏に伴う乳児頭蓋内出血症例の検討. 日児誌 2012; 116(7):1102-7
- 53) 石村匡崇、大賀正一：血友病性偽腫瘍「血液症候群」pp. 555-56, 日本臨牀社 2013
- 54) 土居岳彦、大賀正一：Glanzmann型血小板無力症(タイプ) 「血液症候群」 pp. 420-423, 日本臨牀社 2013

- 55) 瀧本智仁、大賀正一：タイプ 血小板無力症 日本臨床別冊「血液症候群」pp. 424-428, 日本臨床社 2013
- 56) 大賀正一：小児科特集 3. 感染症と血液疾患 感染症Today Journal vol.3. pp. 5-6, 2013
- 57) 石黒 精：出血傾向 . 小児検査実践マニュアル, 松井 陽, 横谷 進, 石黒 精, 奥山虎之など(編), 診断と治療社, 2013(印刷中)
- 58) 大賀正一：新生児血栓症(プロテインC、プロテインS及びアンチトロンビン異常症)の効果的診断法と治療管理法の確立に関する研究 厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究研究事業)新生児血栓症(プロテインC、プロテインS及びアンチトロンビン異常症)の効果的診断法と治療管理法の確立に関する研究 代表研究報告書 平成23年度 総括分担研究報告書 1-8, 2012
- 59) 康 東天、落合正行、福嶋恒太郎、浦田美秩代、栢森裕三、大賀正一：血栓塞栓消化系の遺伝的素因に関する研究～周産期領域におけるスクリーニングと遺伝子解析～厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究研究事業) 新生児血栓症(プロテインC、プロテインS及びアンチトロンビン異常症)の効果的診断法と治療管理法の確立に関する研究 分担研究報告書 平成23年度 総括分担研究報告書 11-13, 2012
- 60) 長江千愛、瀧 正志：小児科領域のDIC、臨床に直結する血栓止血学、朝倉英策(編著) p227-234、中外医学社(発行)2013
- 61) 山下敦己、瀧正志：日常生活における管理・指導 凝固異常症(血友病、先天性血栓性疾患)、小児科臨床2012; 65: 808-12
- 62) 松永友佳、山本順子、大賀正一、横田千恵、高橋保彦、末延聡一、浦田美秩代、栢森裕三、康東天、原寿郎. 臀部血管腫に伴うKasabach-Merritt症候群を疑われた新生児プロテインC欠損症の1例. 日本小児皮膚科学会雑誌 2012; 31: 19-23
- 63) 山下敦己、瀧正志：日常生活における管理・指導 凝固異常症(血友病、先天性血栓性疾患). 小児科臨床 2012; 65: 808-12
- 64) 長江千愛、瀧正志：播種性血管内凝固症候群(DIC)の治療. 小児内科 2012; 53:1067-5
2. 学会発表
- 1) Ohga S. Salvage treatment of refractory LCH and HLH. The 54th Meeting of Korean Society of Hematology, Korea Histiocytosis Working Party Symposium, Changwon, Korea, November 8-9, 2013. (invited speaker)
- 2) Ohga S. Heritable thrombophilias in Japanese children. The 5th Congress of East Asia, Hemophilia Forum (EAHF), Seoul, Korea, September 7-8, 2013. (Invited speaker)
- 3) Yamamura K, Uike K, Nakashima Y, Hirata Y, Nagata H, Takimoto T, Ishimura M, Takada H, Ohga S, Hara T. Early progression of atherosclerosis in children with cryopyrin-associated periodic syndrome. The 9th Asian Society for Pediatric Research & 20th Perinatal Society of Malaysia Annual Congress. Sarawak, Malaysia, 2013.
- 4) Yamamura K, Joo K, Ohga S, Nagata H, Ikeda K, Muneuchi J, Watanabe M, Hara T. Thrombocytosis in asplenia syndrome: a previously unrecognized risk factor for thromboembolism. The 8th Asian Society for Pediatric Research. Seoul, Korea 2012
- 5) Yamamura K, Nagata H, Joo K, Ohga S, Ikeda K, Muneuchi J, Watanabe M, Hara T. Thrombocytosis in asplenia syndrome: a previously unrecognized risk factor for thromboembolism. The 4th Congress of Asia-Pacific Pediatric Cardiac Society. Taipei, Taiwan 2012
- 6) 大賀正一 小児の血栓症～感染症と止血機構のかかわり～セミナー3 基礎から臨床へ 日常診療を深める最新知見 第23回日本外来小児科学会 福岡市, 2013年8月31日
- 7) 大賀正一 診断指針作成のためのパブリックオピニオンを聴く会 新生児血栓症 第23回日本産婦人科・新生児血液学会 奈良市, 2013年6月8日 2012.
- 8) 康東天 「臨床検査医/検査部長の立場から望むこと:臨床検査学サイエンティストの養成」第60回日本臨床検査医学会学術集会,(招待講演)2013年11月1日, 神戸市.
8. 康東天「項目コード(JLAC10)を用いた多施設間検査情報のための取り組みと問題点」 第60回日本臨床検査医学会学術集会,(招待講演)2013年11月1日, 神戸市.

- 9) 井藤奈央子、大賀正一、土居岳彦、石村匡崇、野村明彦、高田英俊、菅尚浩、郭義胤、波多江健、松本雅則、藤村吉博、原寿郎：新鮮凍結血漿定期投与を行ったUpshaw-Schulman症候群の長期予後についての検討。第48回日本小児腎臓病学会，徳島市，2013年6月28-29日
- 10) 市山正子、大賀正一：胎児水頭症から診断された症例。平成25年度 第1回厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業「小児新生児期における遺伝性血栓症の効果的診断と治療予防法の確立に関する研究」班会議 奈良市，2013年6月8日
- 11) 大賀正一 新生児血栓症研究～現在までの解析結果とスクリーニング法について～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 平成25年度 第1回厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業「小児新生児期における遺伝性血栓症の効果的診断と治療予防法の確立に関する研究」班会議 奈良市，2013年6月8日
- 12) 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。第23回日本産婦人科・新生児血液学会 奈良市，2013年6月8日
- 13) 土居岳彦、大賀正一、井藤奈央子、石村匡崇、菅尚浩、野村明彦、松本雅則、藤村吉博、高田英俊、原寿郎：定期凍結血漿投与を行ったUpshaw-Schulman症候群3例の長期予後。第116回日本小児科学会学術集会，広島市，2013。
- 14) 石渡久子、西口康介、玉木久光、大森多恵、伊藤昌弘、三澤正弘、大塚正弘、長澤正之、大賀正一：胎生期に脳梗塞を発症した先天性プロテインC欠乏症ヘテロ接合体の一例。第116回日本小児科学会学術集会，広島市，2013。
- 15) 土居岳彦、大賀正一、井藤奈央子、石村匡崇、菅尚浩、野村明彦、松本雅則、藤村吉博、高田英俊、原寿郎。定期凍結血漿投与を行ったUpshaw-Schulman症候群3例の長期予後。第116回日本小児科学会学術集会 広島 2013
- 16) 石渡久子、西口康介、玉木久光、大森多恵、伊藤昌弘、三澤正弘、大塚正弘、長澤正之、大賀正一。胎生期に脳梗塞を発症した先天性プロテインC欠乏症ヘテロ接合体の一例。第116回日本小児科学会学術集会。広島 2013
- 17) 大賀正一 血友病と栓友病 第7回 北陸ヘモフィリアセミナー 特別講演，金沢市，2012。
- 18) 大賀正一 小児の血栓性素因 ～ Protein C欠乏症を中心に ～第399回日本小児科学会福岡地方会，特別講演，福岡市，2012。
- 19) 大賀正一 小児の血栓症 ～Protein Cを中心に～ 第8回 阪神ヘモフィリア研究会，特別講演2，神戸市，2012。
- 20) 大賀正一 分野別シンポジウム5 小児凝固障害症の新たな治療戦略小児血栓性疾患の診断と治療戦略。第115回日本小児科学会，福岡市，
- 21) 土居岳彦、菅尚浩、石村匡崇、野村明彦、高田英俊、松本雅則、藤村吉博、大賀正一、原寿郎：定期凍結血漿投与を行ったUpshaw-Schulman症候群3例の長期予後。第54回日本小児血液・がん学会，横浜市，2012。
- 22) 澤野 徹、土居岳彦、石村匡崇、菅尚浩、瀧本智仁、高田英俊、原寿郎、大賀正一：吸引分娩後の頭血腫から診断した中等症および重症血友病Aの新生児2例 第54回日本小児血液・がん学会，横浜市，2012。
- 23) 中島康貴、佐藤大祐、名西悦郎、永田 弾、山村健一郎、西尾壽乗、保科隆之、土居岳彦、大賀正一、原寿郎：左室流出路の異常構造物を伴う感染性心内膜炎を発症したプロテインS欠乏症の1例。第44回日本小児感染症学会，北九州市，2012。
- 24) 澤野 徹、菅尚浩、深町 滋、赤峰 哲、慶田裕美、落合正行、石村匡崇、瀧本智仁、原寿郎、大賀正一：吸引分娩後の頭血腫から診断された中等症および重症新生児血友病Aの2例。第471回日本小児科学会福岡地方会，福岡市，2012。
- 25) 土居岳彦、大賀正一、石村匡崇、瀧本智仁、高田英俊、原寿郎：インヒビター高力価血友病A児に対する長期止血管理のケース Advate PUPS closed Meeting，東京，2012。
- 26) 中島康貴、佐藤大祐、名西悦郎、永田 弾、山村健一郎、西尾壽乗、保科隆之、土居岳彦、大賀正一、原寿郎：左室流出路の異常構造物を伴う感染性心内膜炎を発症したプロテインS欠乏症の1例。第14回福岡小児感染免疫・血液カンファレンス，福岡市，2012。
- 27) 松永友佳、金城唯宗、井藤奈央子、土居岳彦、落合正行、浦田美秩代、康東天、大賀正一、原寿郎：仮死と急性腎不全で

- 発症した新生児プロテインC欠乏症の1例。第22回日本産婦人科・新生児血液学会，津市，2012。
- 28) 大賀正一，落合正行，金城唯宗，土居岳彦，石村匡崇，山本順子，末延聡一，金兼弘和，浦田美秩代，栢森裕三，池ノ上克，白幡 聡，康 東天，原 寿郎：日本人の新生児・小児における症候性Protein C欠乏症の発症様式。第22回日本産婦人科・新生児血液学会，津市，2012。
- 29) 大賀正一。第115回日本小児科学会分野別シンポジウム5 小児凝固障害症の新たな治療戦略「小児血栓性疾患の診断と治療戦略」，2012年4月20日，福岡
- 30) 高橋幸博。日本産婦人科・新生児血液学会「産婦人科・新生児領域の血液疾患診療の手引き」 「新生児血栓症」2012年6月29 - 30日 三重
- 31) 大賀正一。第399回日本小児科学会福岡地方会 特別講演 小児の血栓性素因 P rotein C欠乏症を中心に，2012年10月13日，福岡
- 32) 大賀正一。第8回阪神ヘモフィリア研究会 特別講演2 小児の血栓症 Protei n C欠乏症，2012年7月28日，神戸
- 33) 大賀正一。第7回北陸ヘモフィリアセミナー 特別講演 血友病と栓友病 小児診療の問題点，2012年11月17日，富山
- 34) 土居岳彦，菅 尚浩，石村匡崇，野村明彦，高田英俊，松本雅則，藤村吉博，大賀正一，原 寿郎。定期凍結血漿投与を行ったUpshaw-Schulman症候群3例の長期予後。第54回日本小児血液・がん学会学術集会。横浜2012
- 35) 澤野 徹，土居岳彦，石村匡崇，菅 尚浩，瀧本智仁，高田英俊，原 寿郎，大賀正一。吸引分娩後の頭血腫から診断した中等症および重症血友病Aの新生児2例。第54回日本小児血液・がん学会学術集会。横浜2012
- 36) 中島康貴，佐藤大祐，名西悦郎，永田 弾，山村健一郎，西尾壽乗，保科隆之，土居岳彦，大賀正一，原 寿郎。左室流出路の異常構造物を伴う感染性心内膜炎を発症したプロテインS欠乏症の1例。第44回日本小児感染症学会。小倉 2012
- 37) 澤野 徹，菅 尚浩，深町 滋，赤峰 哲，慶田裕美，落合正行，石村匡崇，瀧本智仁，原 寿郎，大賀正一。吸引分娩後の頭血腫から診断された中等症および重症新生児血友病Aの2例。第471回日本小児科学会福岡地方会。福岡 2012
- 38) 土居岳彦，大賀正一，石村匡崇，瀧本智仁，高田英俊，原 寿郎。インヒビター高力価血友病A児に対する長期止血管理のケース。Advate PUPS closed Meeting。東京 2012
- 39) 中島康貴，佐藤大祐，名西悦郎，永田 弾，山村健一郎，西尾壽乗，保科隆之，土居岳彦，大賀正一，原 寿郎。左室流出路の異常構造物を伴う感染性心内膜炎を発症したプロテインS欠乏症の1例。第14回福岡小児感染免疫・血液カンファレンス。福岡 2012
- 40) 松永友佳，金城唯宗，井藤奈央子，土居岳彦，落合正行，浦田美秩代，康 東天，大賀正一，原 寿郎。仮死と急性腎不全で発症した新生児プロテインC欠乏症の1例。第22回日本産婦人科・新生児血液学会。津 2012
- 41) 大賀正一，落合正行，金城唯宗，土居岳彦，石村匡崇，山本順子，末延聡一，金兼弘和，浦田美秩代，栢森裕三，池ノ上克，白幡 聡，康 東天，原 寿郎。日本人の新生児・小児における症候性Protein C欠乏症の発症様式。第22回日本産婦人科・新生児血液学会。津 2012
- 42) 山村健一郎，永田 禅，池田和幸，大賀正一，原 寿郎，倉岡彩子，宗内 淳，渡辺まみ江，弓削哲二，城尾邦隆。無脾症候群における血小板数増多と血栓塞栓症- 認識されていなかった危険因子。115 回日本小児科学会。福岡 2012
- 43) 中島康貴，佐藤大祐，永田 弾，山村健一郎，西尾壽乗，保科隆之，土居岳彦，池田和幸，大賀正一，原寿郎。左室流出路の異常構造物を伴う感染性心内膜炎を発症したプロテインS欠乏症の1例。第468回日本小児科学会福岡地方会。福岡 2012

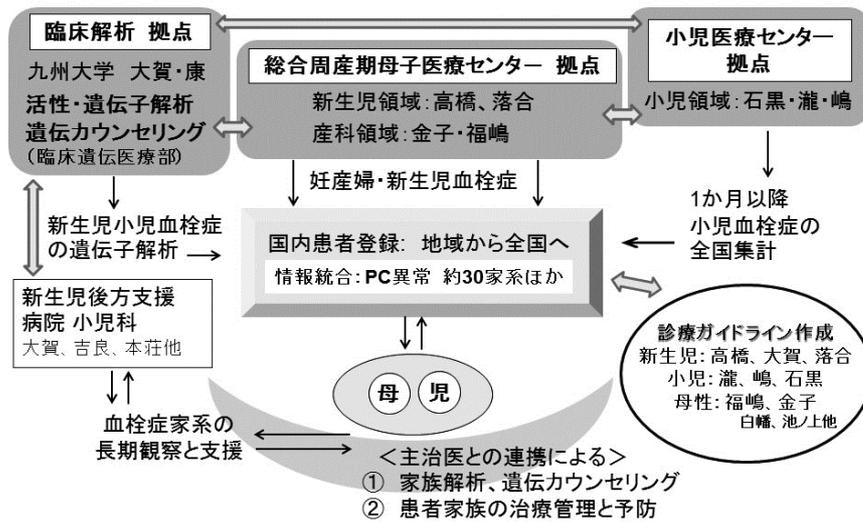
H . 知的財産権の出願・登録状況

特許取得（嶋 緑倫分担研究者）

特許4671823 血液凝固因子の不活性化及び血液凝固因子

付) 研究の流れ図

日本における小児、新生児と妊産婦の血栓症家系を同定し、
 予防と治療管理に関する包括的指導を行う



研究協力: 白幡 聡 北九州八幡東病院長 池ノ上 克 宮崎大学医学部附属病院長

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

- 総合研究報告書 -

分担研究報告書

血栓塞栓症家系の遺伝的素因に関する研究

～ 小児における抗凝固因子欠乏症のスクリーニングと遺伝子解析 ～

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 九州大学病院総合周産期母子医療センター母性胎児部門 講師
大賀 正一 九州大学大学院医学研究院・周産期小児医療学 教授

研究協力者

堀田 多恵子 九州大学病院検査部 技師長
浦田 美秩代 九州大学病院検査部 副技師長
古賀 結 九州大学病院検査部 技師
西村 美香 九州大学先端医療イノベーションセンター 技師

研究要旨

日本人小児血栓症の遺伝的素因を明らかにするため、小児期発症のプロテイン S (PS)、プロテイン C(PC)及びアンチトロンピン(AT)欠乏症患者の遺伝子解析を行った。研究班発足後、全国より小児血栓症および疑い(家系内に血栓症あり)例の解析を行い、PC 欠乏症 23 家系、PS 欠乏症 11 家系および AT 欠乏症 4 家系の解析を終了した。小児例は *PROC* 変異 11 名(全て発症 ホモ2、複合ヘテロ5、ヘテロ4)、*PROS1* 変異3名(発症 ホモ1 ヘテロ2) および *SERPINC1* 変異 4 名(全て未発症ヘテロ)を同定した。PC 活性が低い *PROC* 変異のない患児を 12 名同定した。PC 欠乏症患児 15 名(65%)は新生児であり、PS 欠乏症患児はすべて 10 歳以上であった。これまでに集積された国内小児遺伝性 PC 欠損症患者 25 名(遺伝性 18 名、他 7 名)に相当する症例数を 2 年間に診断した。小児期に発症する遺伝性血栓症を効率的に診断するため、上記 3 因子活性と遺伝子解析結果を検討し、0-日齢 90、日齢 91-2 歳、3-6 歳および 7 歳以上の 4 群の年齢区分で活性値を設定すると、効率的なスクリーニングが行える可能性を示した。新生児の PC 欠損症、学童以降の PS および AT 欠損症が小児期発症の主要な遺伝性血栓症であることが示された。発症年齢と臨床像の特徴から、小児血栓症の診療ガイドラインを作成することが必要である。

A. 研究目的

3大遺伝性血栓症であるPS、PC及びAT欠乏症の小児における疫学は明らかでない。日本人成人ではPS欠乏症が最も頻度の高い遺伝性血栓性素因である。日本人小児では私たちの後方視的研究から、PC欠乏症の頻度が重要であることを示唆したが、極めて稀なためその全体像が把握できていない。新規診断小児例の家族解析を進め、各因

子活性と遺伝子解析の結果から、小児期における遺伝性血栓症の頻度と臨床的特徴を検討した。

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・AT（シスメックス）を用いた。

PROCのexon1-9をPCRで増幅し、ABI PRISM3100 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、遺伝カウンセリングを行った。

統計解析は、JMP ver8.0 (SAS Institute)を使用して行った。

2. 新規診断例の家系解析

本研究班設立後の2年間に全国より依頼された、小児PC欠乏症による血栓症を疑われた非血縁27家系の20歳未満の27患者(2未発症者を含む)の相談を受け血栓性素因スクリーニング(APSなど後天性も含む)とともに遺伝子解析を行った。またPS欠乏10家系とAT欠乏4家系の小児とその両親を対象に、この血栓性素因解析を行った。

3. スクリーニングのための3因子活性値

1993年6月 - 2012年3月の19年間に血栓症を発症または疑われ、診断と治療管理のため遺伝性および後天性血栓性素因の解析を行った21歳未満の307名を対象とした。

C. 研究結果

1. 3因子活性値によるスクリーニング

小児の3因子活性スクリーニングの方法について、各活性下限値を検討した。血栓性素因解析を行った1868名のうち307名(16.4%)が21歳未満で、1歳までの患児は他の各年齢群のほぼ2倍であった。成人の解析結果から小児の各因子活性低下を年齢別に定義したが、その後症例の集積とともに、3か月までの新生児から乳児早期におけるPC

およびPS活性値が重要であり、再定義の必要性があると考えられた。よって、表1のようにスクリーニング下限値を設定した。発症時の消費性凝固障害とビタミンK欠乏によるPCおよびPS活性への影響から、とくにPC/PS活性比を考慮して、今後2012年4月以降の新規診断例には遺伝子解析を広く行う方針とした。

表1. 年齢別各因子活性の下限値の定義

年齢	PC	PS	AT
0-3か月	<45% (a)	<42% (a)	<52% (b)
3か月-2歳	<64% (c)	<51% (c)	<52% (b)
3-6歳	<64% (c)	<51% (c)	<68% (c)
7-20歳	<75% (d)	<60% (d)	<80% (d)

成人下限活性値(PC 75%, PS 60%, AT80%)のa:60%, b:65%, c:85%およびd:100%未満に相当する活性値

解析対象は、1歳未満が20%と最多であった。307名中、126名に3因子いずれかの活性低下があり、このうち明らかな後天性血栓症を除外し、62名を3因子の低下した特発性血栓症として遺伝子解析を行った。44名には低下因子の変異は無く、18名に各因子の変異(PC異常8名、PS異常8名、AT異常2名)を同定した。この年齢別の活性下限で定義すると、血栓症児に占める各低因子活性児の割合はPC 32%、PS 17%、AT 7%で、この低因子活性児の各変異保有率はPC 21%、PS 30%およびAT 40%であった(図1)。

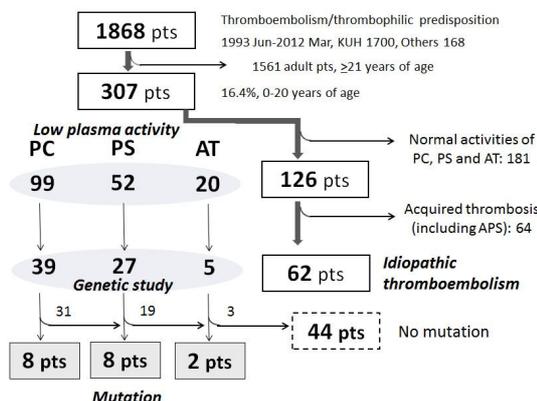


図1. 2011年度までの小児血栓性素因解析

PROC変異患児の75%は2歳未満、PROS1変異の75%は7歳以上で、SERPINC1変異

は2名とも3歳以上であった。PC異常は4名が複合ヘテロ接合で、4名はヘテロ接合であった。4名は同時にPS活性も低下していた。PROS1変異は2名が複合ヘテロ(PS徳島)で、6名はヘテロ(2名PS徳島)であった。7名は同時にPC活性も低下していた。AT異常は2名ともヘテロであった。PC異常例は2歳未満に頭蓋内病変、PSかAT異常例の多くは、7歳以上に頭蓋外静脈血栓症で発症していた。

2. PC欠損症例(2012年以降)

解析の終了した23名の臨床的背景とPC活性、PS活性、PROC変異の有無および両親の解析結果を表2に示す。PROC変異を11名に同定した。うち1名(14歳)を除く10名は全て発症例であった。変異はホモ接合体2、複合ヘテロ接合体5およびヘテロ接合体4で近親婚は唯一の外国人家系(トルコ人)のみであった。新規変異はなかった。PC欠損症23家系のうち13名は日齢7までの早期新生児発症、2名は新生児発症であった。低PC活性だがPROC変異のない患児を12名同定した。変異を有する患児の家族解析の結果、患児の*de novo*発症はなく、両親のどちらかに変異が確認された。電撃性紫斑病は3名のみでいずれも頭蓋内病変を発症していた。残りはそのほとんどが出血梗塞などの頭蓋内病変であった。変異の部位にhot spotはなかった。電撃性紫斑病に特異的な遺伝子型はなく、明らかな遺伝子型と表現型の相関は視られなかった。末端壊死を来した例にも低PC活性ながら変異のない例を確認した。

10歳まで明らかな血栓を呈していないPROC複合ヘテロ変異の男児は、母(16歳発症の深部静脈血栓症)とともに変異を同定した。この患児は症候性てんかんを有していた。父は推定ヘテロ変異と考えられ現在解析中である。このPROC複合ヘテロ変異の男児はPC活性が27%と比較的保たれていたが、母が16歳で深部静脈血栓症(DVT)を発症していた。今後思春期にかけて血栓発症のリスクを予想しカウンセリングを行った。

3. PS欠損症例(2012年以降)

PS欠損例は活性値低下から10家系の母

子を中心に解析した(表3)。20歳未満は5例であった。PROS1変異は3名を同定し、いずれも10歳以上に発症していた。17歳で深部静脈血栓症を発症した男児はPROS1ホモ変異接合体であった。血縁のない両親は血栓症は未発症でPROS1ヘテロ変異を有していた。23歳で肺梗塞を発症したPROS1ヘテロ変異の男性を診断した。この母はこのヘテロ変異を有する未発症者で、健常弟にもこの変異はなかった。PROS1遺伝子解析を行った不育症の母に変異例はなかった。確認された変異は全て既報告であった。PROS1変異のなかった1名にPlasminogen Tochigiを同定した。

表3. 小児・周産期PS欠乏症の解析例(2012-13)

家系	発症年齢(歳)	性	症状および家族歴	PROS1 変異
1	1	男	未発症 父がPS 変異による血栓症	なし
2	1.4	男	不育症 PS 活性低下の母の児	なし
	43	母	不育症	なし
3	12	女	IEを契機に見えられた PS 家系	ヘテロ
4	17	男	DVT両親未発症ヘテロ	ホモ
5	23	男	肺梗塞 母が未発症ヘテロ変異と判明	ヘテロ
6	25	女	不育症	なし
7	31	女	分娩後左下肢静脈血栓症	なし(PLG 栃木)
8	33	女	妊娠中のPSPC 活性の異常乖離	なし
9	35	女	不育症	なし
10	40	女	不育症 母方祖父系家族性	なし

4. AT欠損症例(2012年以降)

AT欠損例は6家系11名の遺伝子解析を行った。10名はSERPINC1変異のヘテロ接合体者であった。小児は6名のうち5名は血栓未発症児、もう一名は肝移植後の児であったが末梢血由来DNAには、父に同定したSERPINC1変異は認められなかった。父は肝移植のドナーとなった後に血栓症を発症していた。成人は5名で1名の未発症以外は、静脈欠損塞栓症(VTE)を発症していた。

表4. 小児・周産期AT欠乏症の解析例(2012-13)

家系	発症年齢	性	症状および家族歴	SERPINC1 変異
1	3 歳	女(娘)	父より肝移植後	なし
	34 歳	男(父)	DVT	ヘテロ
2	3 歳	女(娘)	未発症 AT 活性低下	ヘテロ
	42 歳	女(母)	未発症 AT 活性低下	ヘテロ
3	4 歳	女	川崎病	ヘテロ
4	10 歳	男	未発症血栓家系	ヘテロ
5	27 歳	女	初産 DVT	ヘテロ
6	母	女	DVT	ヘテロ
	双生児	姉	未発症	ヘテロ
		弟	未発症	ヘテロ
	母の父	男	DVT	ヘテロ

表2. 新規診断小児PC欠乏症23例(2012-13)

年齢	性	周産期情報	初発症状	PC 活性	PS	PROC 変異	両親の解析
日齢0	男	37 週 3038g Ap 6/8	大脳白質に広範囲	<10%	34%	複合ヘテロ	両親各ヘテロ
日齢0	男	39 週 2978g Ap 5/7	臍帯血栓、肺高血圧、多嚢胞脳軟化	46%(8か月)	94%	なし	
日齢0	女	34 週 1296g Ap8/9	脳実質内出血	17%	43%	なし	
日齢0	男	36 週 2810g Ap3/5	新生児仮死 哺乳不良	11%	43%	なし	
日齢2	男	38 週 2750g Ap 8/9	先天性水頭症、多発性脳梗塞	21%	42%	ヘテロ	父ヘテロ
日齢2	男*	詳細不明	電撃性紫斑、頭蓋内、硝子体出血	4%	freePS 74%	ホモ	両親ヘテロ
日齢2	男	38 週 2938g 仮死なし	頭蓋内出血、両網膜下出血	<10%	未検	複合ヘテロ	両親ヘテロ
日齢2	女	38 週 3225g Ap6/9	無呼吸、左 MCA 梗塞	23%	46%	なし	
日齢4	女	37 週 2048g Ap 8/9	脳実質内多発出血、左下肢血栓症	17%	67%	複合ヘテロ	両親各ヘテロ
日齢6	女	25 週 818g、Ap2/5	脳室内出血→右下肢末端壊死	45%	67%(抗原)	なし	母正常 PC 活性
日齢6	男	正期産 仮死なし	視床出血(低体温けいれん)	29%	45%	なし	
日齢6	男	38 週	在胎 34 週頃に水頭症			なし(PS変異なし)	
日齢7	男	37 週 2502g Ap7/9	無呼吸遷延、脳梗塞	27%	52%(抗原)	なし	両親活性正常
新生児	男	新生児	電撃性紫斑、頭蓋内	11歳	Warfarin 中	ホモ	両親推定ヘテロ
新生児	男	詳細不明	新生児脳室内出血	<10%		複合ヘテロ	
7か月	男	胎児期脳梗塞	脳梗塞後右不全麻痺	44%	異常なし	ヘテロ	父ヘテロ
7か月	男	なし	右上肢麻痺 陳旧性脳梗塞	50%	未検	なし	
1歳	男	なし	脳梗塞	43%	58%	ヘテロ(PS変異なし)	父ヘテロ
2歳	女	なし	乳児 ALL 治療中肺小動脈多発血栓	37%	51%	なし(AT変異なし)	
7歳	女	不明	血栓症	63%	46%	なし(PS変異なし)	
10歳	女	なし	胆道閉鎖,PDA,VitK 投与後低 PCPS	36%	57%	なし(PLG 栃木)	
10歳	男	39 週 3752g 異常なし	症候性てんかん	27%	73%	複合ヘテロ	母 DVT ヘテロ
14歳	男	なし	未発症	39%	90%	ヘテロ	家族歴有り

* 日本人以外

D. 考察

本研究班設立後2年間に、私たちが設立までにほぼ10倍以上の期間に網羅的に検索した国内報告小児遺伝性PC欠損症患者18名(遺伝子解析による変異同定は9名: Hae mophilia 2013)に相当する23名を見出し、11名にPROC変異を同定した。さらに12名は変異がないことを確認した。

PC欠損症は新生児例が65%をしめた。両親の解析からこの変異例には、解析した範囲内でde novo発症はなかった。PC欠乏症は新生児例を発端として、血栓リスクのあるPC欠損症両親の発見に繋がった。小児PC欠乏症の臨床像としては電撃性紫斑病よりも頭蓋内出血・梗塞が多いことも明らかになった。これは、今回の前向き研究が私たちの研究班設立までの後ろ向き研究を立証したことになる。一方、PC-Nagoyaなどの特定の遺伝子型が増えず、非血縁者家系にもホモ変異が確認された点は予想外の結果であった。

これまでの結果から全体の25%に変異のないPC活性単独低下例があることが想定されていたが、今回はこれがほぼ半数に達した。このことから、PROC変異のない単独PC欠乏症の存在がより明確となり、想定された頻度よりも高いことが示唆された。これは、今回3か月未満の活性値によるスクリーニングを厳しく再設定しながらも、遺伝子解析を広

く行ったためであろう。

一方、PS欠乏症とAT欠乏症の小児期発症血栓患者は極めて少なく、発症例の臨床像は、成人DVTの早期発症型であった。変異例はほぼ全例に家族歴を有していた。PS活性の低い不育症の母にPROC変異が認められる頻度は、日本人一般集団の推定変異保有率から高くないことが伺われた。

E. 結論

小児遺伝性血栓症は、新生児頭蓋内病変発症型であるPC欠乏症と小児発症型成人病型のPSおよびAT欠乏症に分けることができる。この臨床的特徴から、遺伝性血栓症スクリーニングを小児期から行い、診断指針を作成することが必要であると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Ohga S, Ishiguro A, Takahashi Y, Shima M, Taki M, Kaneko M, Fukushima K, Kang D, Hara T, on behalf of the Japan Childhood Thrombophilia Study Group. Protein C deficiency as the major cause of thrombophilias in childhood. *Pediatr Int* 55(3): 267-71, 2013
- Ohga S, Kang D, Kinjo T, Ochiai M, Doi T, Ishimura M, Kayamori Y, Urata M, Yamamoto J, Suenobu S, Kanegane H,

- Ikenoue T, Shirahata A, Hara T: Pediatric presentation and treatment of congenital protein C deficiency in Japan. *Haemophilia* 19(3):378-84, 2013
- 3) Ochiai M, Kinjo T, Takahata Y, Iwayama M, Kenji I, Ohga S, Kotaro F, Wake N, Taguchi T, Hara T: Clinical outcome of extremely low birth weight infants born at GW22-26: a report from a single institution in Japan. *Neonatology* 105(2):79-84, 2014
- 4) Doi T, Ohga S, Ito N, Ishimura M, Suga N, Nomura A, Takada H, Matsumoto M, Fujimura Y, Hara T: Limited renal prophylaxis in regular plasmotherapy for heritable ADAMTS13 deficiency. *Pediatr Blood Cancer* 60(9):1557-8, 2013
- 5) 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* 2013 (in press)
- 6) Matsunaga Y, Ohga S, Kinjo T, Ochiai M, Fukumoto Y, Ito N, Doi T, Kang D, Hara T: Neonatal asphyxia and renal failure as the presentation of severe protein C deficiency. *J Perinatol* 33(3): 239-41, 2013
- 7) Nanishi E, Ohga S, Doi T, Ishimura M, Ihara K, Takada H, Shima M, Hara T: Complete immunotolerance induction after FEIBA prophylaxis in a hemophilia A patient with high-titer inhibitor. *Haemophilia* 18(3):e75-7, 2012
- 8) Kitajima J, Inoue H, Ohga S, Kinjo T, Ochiai M, Yoshida T, Kusahara K, Hara T: Differential transmission and postnatal outcome in triplets with congenital cytomegalovirus infection. *Pediatr Development Pathol* 15(2):151-155, 2012
- 9) Unal S, Gumruk F, Yigi S, Tuncer M, Tavi B, Cil O, Takci S, Urata M, Hotta T, Kang D, Cetin M: A novel mutation in protein C gene (PROC) causing severe phenotype in neonatal period. *Pediatr Blood Cancer* 61(4):763-4, 2014
- 10) Uchiumi T, Tanamachi H, Kuchiwaki K, Kajita M, Matsumoto S, Yagi M, Kanaki T, Kang D: Mutation and functional analysis of ABCC2/multidrug resistance protein 2 in a Japanese patient with Dubin-Johnson syndrome. *Hepatol Res* 43(5):569-75, 2013
- 11) Fujita Y, Satoh S, Sugitani M, Yumoto Y, Fukushima K, Wake N: Clinical utility of augmentation index as a new parameter of peripheral circulation in human fetuses. *Early Hum Dev* 89(8):601-5, 2013
- 12) Anami A, Fukushima K, Takasaki Y, Sumida T, Waguri M, Wake N, Murashima A: The predictive value of anti-SS-A antibodies titration in pregnant women with fetal congenital heart block. *Mod Rheumatol* 23(4):653-8, 2013
- 13) Fukushima K, Yumoto Y, Kondo Y, Fujita Y, Morokuma S, Tsukimori K, Wake N: A retrospective chart review of the perinatal period in 22 pregnancies of 16 women with Moyamoya disease. *J Clin Neurosci* 19:1358-62, 2012
- 14) Hidaka N, Yamanaka Y, Fujita Y, Fukushima K, Wake N: Clinical manifestations of pregnancy in patients with Takayasu arteritis: experience from a single tertiary center. *Arch Gynecol Obstet* 285:377-85, 2012
- 15) Fukushima K, Morokuma S, Tsukimori K, Murata M, Wake N. Blood pressure measurements within the JNC7 pre-hypertensive range after 32 weeks of gestation are a risk factor for decreased fetal growth. *Hypertens Res* 2012; 35: 128-30
- 16) Oba T, Yasukawa H, Hoshijima M, Sasaki K, Futamata N, Fukui D, Mawatari K, Nagata T, Kyogoku S, Ohshima H, Minami T, Nakamura K, Kang D, Yajima T, Knowlton KU, Imaizumi T: Cardiac-specific deletion of SOCS-3 prevents development of left ventricular remodeling after acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 28: 59(9):838-52, 2012
- 17) 大賀正一：エキスパートのための産婦人科・新生児領域の血液疾患診療の手引き「新生児血栓症」pp. 印刷中, 日本産婦人科新生児血液学会編集 2013
- 18) 大賀正一：小児期に発症する遺伝性血栓症～プロテインCの重要性～日本小児血液・がん学会推薦総説 日本小児科学会雑誌117巻10号 1538-44, 2013
- 19) 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2013; 23(1):25-2
- 20) 松永友佳、山本順子、大賀正一、横田千恵、高橋保彦、末延聡一、浦田美秩代、栢森裕三、康東天、原寿郎：臀部血管腫に伴うKasabach-Merritt症候群を疑われた新生児プロテインC欠損症の1例。日本小児皮膚科学会雑誌 31(1): 19-23, 2012
- 21) 鈴木真波、笹本優佳、攪上詩織、新谷亮、升森智香子、大野秀子、瀧正志：臍帯のPCRで最終的に先天性CMV 感染症と診断した血小板減少性紫斑病の1例。日産婦新生児血学誌2012; 22:S91-2
- 22) 石村匡崇、大賀正一：血友病性偽腫瘍「血液症候群」pp. 555-56, 日本臨牀社 2013
- 23) 土居岳彦、大賀正一：Glanzmann型血小板無力症(タイプ)「血液症候群」 pp. 420-423, 日本臨牀社 2013
- 24) 瀧本智仁、大賀正一：タイプ 血小板無力症 日本臨牀別冊「血液症候群」 pp. 424-428, 日本臨牀社 2013
- 25) 大賀正一：新生児血栓症(プロテインC、プロテインS及びアンチトロンビン異常症)の効果的診断法と治療管理法の確立に関する研究 厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究研究事業)新生児血栓症(プロテインC、プロテインS及びアンチトロンビン異常症)の効果的診断法と治療管理法の確立に関する研究 代表研究報告書 平成23年度 総括分担研究報告書 1-8, 2012
- 26) 康東天、落合正行、福嶋恒太郎、浦田美秩代、栢森裕三、大賀正一：血栓塞栓消化系の遺传的素因に関する研究～周産期領域におけるスクリーニングと遺伝子解析～厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究研究事業) 新生児血栓症(プロテインC、プロテインS及びアンチトロンビン異常症)の効果的診断法と治療管理法の確立に関する研究 分担研究報告書 平成23年度 総括分担研究報告書 11-13, 2012
- 27) 松永友佳、山本順子、大賀正一、横田千恵、高橋保彦、末延聡一、浦田美秩代、栢森裕三、康東天、原寿郎。臀部血管腫に伴うKasabach-Merritt症候群を疑われた新生児プロテインC欠損症の1例。日本小児皮膚科学会雑誌 2012; 31: 19-23
2. 学会発表
- 1) Ohga S. Salvage treatment of refractory LCH and HLH. The 54th Meeting of Korean Society of Hematology, Korea Histiocytosis Working Party Symposium, Changwon, Korea, November 8-9, 2013. (invited speaker)
- 2) Ohga S. Heritable thrombophilias in Japanese children. The 5th Congress of East Asia, Hemophilia Forum (EAHF), Seoul, Korea, September 7-8, 2013. (invited speaker)
- 3) 大賀正一 小児の血栓症～感染症と止血機構のかかわり～セミナー3 基礎から臨床へ 日常診療を深める最新知見 第23回日本外来小児科学会 福岡市, 2013年8月31日
- 4) 康東天「臨床検査医/検査部長の立場から望むこと:臨床検査学サイエンティストの養成」第60回日本臨床検査医学会学術集会,(招待講演)2013年11月1日, 神戸市.
8. 康東天「項目コード(JLAC10)を用いた多施設間検査情報のための取り組みと問題点」 第60回日本臨床検査医学会学術集会,(招待講演)2013年11月1日, 神戸市.
- 5) 市山正子、大賀正一：胎児水頭症から診断された症例。平成25年度 第1回 厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業「小児新生児期における遺伝性血栓症の効果的診断と治療予防法の確立に関する研究」班会議 奈良市, 2013年6月8日
- 6) 大賀正一 新生児血栓症研究～現在までの解析結果とスクリーニング法について～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 平成25年度 第1回 厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業「小児新生児期における遺伝性血栓症の効果的診断と治療予防法の確立に関する研究」班会議 奈良市, 2013年6月8日
- 7) 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. 第23回日本産婦人科・新生児血液学会 奈良市, 2013年6月8日
- 8) 土居岳彦、大賀正一、井藤奈央子、石村匡崇、菅尚浩、野村明彦、松本雅則、藤村吉博、高田英俊、原寿郎：定期凍結血

- 漿投与を行ったUpshaw-Schulman症候群3例の長期予後. 第116回日本小児科学会学術集会, 広島市, 2013.
- 9) 石渡久子、西口康介、玉木久光、大森多恵、伊藤昌弘、三澤正弘、大塚正弘、長澤正之、大賀正一: 胎生期に脳梗塞を発症した先天性プロテインC欠乏症ヘテロ接合体の一例. 第116回日本小児科学会学術集会, 広島市, 2013.
- 10) 土居岳彦、大賀正一、井藤奈央子、石村匡崇、菅尚浩、野村明彦、松本雅則、藤村吉博、高田英俊、原寿郎: 定期凍結血漿投与を行ったUpshaw-Schulman症候群3例の長期予後. 第116回日本小児科学会学術集会 広島 2013
- 11) 石渡久子、西口康介、玉木久光、大森多恵、伊藤昌弘、三澤正弘、大塚正弘、長澤正之、大賀正一: 胎生期に脳梗塞を発症した先天性プロテインC欠乏症ヘテロ接合体の一例. 第116回日本小児科学会学術集会. 広島 2013
- 12) 大賀正一 診断指針作成のためのパブリックオピニオンを聴く会 新生児血栓症. 第23回日本産婦人科・新生児血液学会 奈良市, 2013年6月8日 2012.
- 13) 大賀正一 小児の血栓性素因 ~ Protein C欠乏症を中心に ~ 第399回日本小児科学会福岡地方会, 特別講演, 福岡市, 2012.
- 14) 大賀正一 小児の血栓症 ~ Protein Cを中心に ~ 第8回 阪神ヘモフィリア研究会, 特別講演2, 神戸市, 2012.
- 15) 大賀正一 分野別シンポジウム5 小児凝固障害症の新たな治療戦略小児血栓性疾患の診断と治療戦略. 第115回日本小児科学会, 福岡市, 2012
- 16) 土居岳彦、菅尚浩、石村匡崇、野村明彦、高田英俊、松本雅則、藤村吉博、大賀正一、原寿郎: 定期凍結血漿投与を行ったUpshaw-Schulman症候群3例の長期予後. 第54回日本小児血液・がん学会, 横浜市, 2012.
- 17) 澤野徹、土居岳彦、石村匡崇、菅尚浩、瀧本智仁、高田英俊、原寿郎、大賀正一: 吸引分娩後の頭血腫から診断した中等症および重症血友病Aの新生児2例 第54回日本小児血液・がん学会, 横浜市, 2012.
- 18) 中島康貴、佐藤大祐、名西悦郎、永田弾、山村健一郎、西尾壽乗、保科隆之、土居岳彦、大賀正一、原寿郎: 左室流出路の異常構造物を伴う感染性心内膜炎を発症したプロテインS欠乏症の1例. 第44回日本小児感染症学会, 北九州市, 2012.
- 19) 澤野徹、菅尚浩、深町滋、赤峰哲、慶田裕美、落合正行、石村匡崇、瀧本智仁、原寿郎、大賀正一: 吸引分娩後の頭血腫から診断された中等症および重症新生児血友病Aの2例. 第471回日本小児科学会福岡地方会, 福岡市, 2012.
- 20) 土居岳彦、大賀正一、石村匡崇、瀧本智仁、高田英俊、原寿郎: インヒビター高力価血友病A児に対する長期止血管理のケース Advate PUPS closed Meeting, 東京, 2012.
- 21) 中島康貴、佐藤大祐、名西悦郎、永田弾、山村健一郎、西尾壽乗、保科隆之、土居岳彦、大賀正一、原寿郎: 左室流出路の異常構造物を伴う感染性心内膜炎を発症したプロテインS欠乏症の1例. 第14回福岡小児感染免疫・血液カンファレンス, 福岡市, 2012.
- 22) 松永友佳、金城唯宗、井藤奈央子、土居岳彦、落合正行、浦田美秩代、康東天、大賀正一、原寿郎: 仮死と急性腎不全で発症した新生児プロテインC欠乏症の1例. 第22回日本産婦人科・新生児血液学会, 津市, 2012.
- 23) 大賀正一、落合正行、金城唯宗、土居岳彦、石村匡崇、山本順子、末延聡一、金兼弘和、浦田美秩代、栢森裕三、池ノ上克、白幡聡、康東天、原寿郎: 日本人の新生児・小児における症候性Protein C欠乏症の発症様式. 第22回日本産婦人科・新生児血液学会, 津市, 2012.
- 24) 山村健一郎、永田禅、池田和幸、大賀正一、原寿郎、倉岡彩子、宗内淳、渡辺まみ江、弓削哲二、城尾邦隆: 無脾症候群における血小板数増多と血栓塞栓症- 認識されていなかった危険因子. 115 回日本小児科学会. 福岡 2012
- 25) 中島康貴、佐藤大祐、永田弾、山村健一郎、西尾壽乗、保科隆之、土居岳彦、池田和幸、大賀正一、原寿郎: 左室流出路の異常構造物を伴う感染性心内膜炎を発症したプロテインS欠乏症の1例. 第468回日本小児科学会福岡地方会. 福岡 2012

G. 知的財産権の出願・登録状況

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）

－ 総合研究報告書 － 分担研究報告書

妊娠時のプロテイン S 活性低下時の遺伝子検査の意義に関する検討

研究分担者 福嶋恒太郎 九州大学病院総合周産期母子医療センター 講師

研究要旨

プロテインS(PS)活性は妊娠成立後には病的低下の診断が困難である。妊娠時にPS遺伝子検査を行うことの意義を明らかにするために、当院で妊娠中に血栓性素因検査を行った20妊娠(18例)の臨床経過を検討した。16例が妊娠中PS活性低値であったが、産褥期低下例は測定した6例中1例のみであった。妊娠中に測定したPS値で治療選択を行うことは適切ではなく、遺伝子検査は治療介入の要否決定に有用と考えられた。

A. 研究目的

われわれはこれまでにプロテイン S の生理的な低下と胎児発育遅延との関連について検討し、血栓性素因を認めない胎児発育遅延におけるプロテイン S(PS)活性は正常妊娠例と比して有意に低下していることを示した。

PS 低下症では妊娠成立後は妊娠の影響と病的低下の鑑別が従来の血液検査法では不可能であり、現状適切な治療の提案が困難となっている。また不育症、習慣流産等の疾患でも微小血栓形成による胎盤機能障害が病態に関与していることが明らかとなっているものの、妊娠前に十分な検索が行われていないあるいは、明確な診断なく抗凝固療法が行われている場合も多い。

本院は周産期センターとして Pregnancy Loss の病歴を有する患者が集積している。そこで、妊娠中に PS 遺伝子異常の診断を行うことの意義を明らかにすることを目的として、当院における妊娠中に血栓性素因を行った症例について検討をおこなった。

B. 研究方法

対象は 2012 年 1 月 1 日から 12 月 31 日までの間に当院で妊娠分娩管理を行った症

例の内、妊娠中あるいは妊娠前に PS 活性を検査されていた 20 妊娠(18 母体)である。研究班ならびに当院の倫理規定に沿い後方視的に診療録から情報を抽出し検討した。

(倫理面への配慮)

遺伝子解析は、当研究班の規定に沿い、患者からの書面による同意取得が行われた。

C. 研究結果

流産や常位胎盤早期剥離、子宮内胎児死亡等の既往で検査をおこなったあるいは検査を行われていた症例は 14 妊娠(14 母体)あった(表)。

妊娠前に血栓性素因検査をおこなわれていたのは 14 例中 9 例で、うち 1 例が抗リン脂質抗体症候群(APS)、非妊娠時の PS 活性低下を指摘されていた。妊娠中に測定した PS 活性は APS の 1 例を除く 13 例ですべて低下していた。

妊娠中におこなわれた介入としては妊娠 11 週で深部静脈血栓症を起こした症例でヘパリン療法が、APS ならびに非妊娠時 PS 活性症例で低用量アスピリン療法(LDA)およびヘパリン療法がおこなわれていた。抗核抗

体陽性のみで LDA およびヘパリン療法が 1 例、また病歴のみを理由に 7 例に LDA がおこなわれていたが、患者の強い希望のあった 1 例をのぞいては、当院での血栓性素因検査結果がえられた時点ないし妊娠第 2 三半期で投与を中止した。母児罹病としては、妊娠高血圧症候群を 4 例が発症していた。他に 3 例が妊娠高血圧症候群を 32 週、34 週、38 週で発症、1 例が 10 週で流産となっていた。治療の有無と予後には明確な関連は見いだせなかった。

産褥に PS 活性を測定できた症例は 3 例のうち 1 例は産褥期も PS 活性低値であったため当研究班で遺伝子検査を行ったが PS 遺

伝子の変異は認められなかった。なお、対象期間とは別に習慣流産、妊娠初期の PS 活性低下を認めた 1 例に遺伝子検査を行ったが、異常なく妊娠中の低下と判断し現在経過観察中である。

今回妊娠中の児罹病のため当院受診した症例は 4 例(15、16、17、19)で第 2 三半期の重症の子宮内発育制限ないし子宮内胎児死亡のため当院紹介となっていた。4 例とも妊娠中に PS 活性低下を認めた以外には異常なく、産褥検査前に妊娠成立した 1 例を除く 3 例で PS 活性は正常化しており、妊娠成立した 2 例の次回妊娠(18、20)では特に母児罹病を認めなかった。

表. 血栓素因を解析した妊婦例のまとめ

番号	病歴	妊娠前の血栓性素因検査	妊娠中PS活性	妊娠中治療(中止週数)	転帰	産褥期PS活性	
1	初期流産2回	異常なし	54	LDA(14)	正期産経膈分娩		
2	初期流産3回	異常なし	50	LDA(18)	38週緊急帝王切、PIH		
3	初期流産5回	APS	108	LDA+ヘパリン	35週緊急帝王切、PIH		
4	中期子宮内胎児死亡	異常なし	42	LDA(34)	正期産経膈分娩	95	
5	後期早剥・子宮内胎児死亡		46	LDA(26)	正期産予定帝王切(既往帝王切)	73	
6	初期流産2回		68	LDA(13)	正期産経膈分娩		
7	初期流産1回、早剥1回 子宮内胎児死亡1回	異常なし	47	なし	正期産予定帝王切(既往帝王切)		
8	深部静脈血栓症(今回妊娠)		22	ヘパリン	正期産経膈分娩	転居	
9	後期子宮内胎児死亡1回		42	なし	34週帝王切、PIH	37	遺伝子検査異常なし
10	初期流産3回	PS活性低下(他院)	-	LDA+ヘパリン	正期産経膈分娩		
11	初期流産3回	XII因子低下のみ	50	LDA(28)	正期産経膈分娩		
12	初期流産5回	抗核抗体陽性のみ	46	LDA+ヘパリン	正期産予定帝王切(既往帝王切)		
13	早剥・子宮内胎児死亡2回	異常なし	40	LDA(21)	32週帝王切(低置胎盤)・PIH		
14	初期流産2回		24	なし	10週稽留流産	転居	
15*			19	なし	23週子宮内発育制限 24週子宮内胎児死亡	87	
16*			-	なし	26週子宮内胎児死亡	75	
17*			24	なし	30週子宮内胎児死亡	73	
18	30週子宮内胎児死亡		-	なし	正期産経膈分娩		
19*			18	なし	17週子宮内胎児死亡		検査前に次回妊娠成立
20	17週子宮内胎児死亡		-	なし	正期産予定帝王切(骨盤歪)		

APS: 抗リン脂質抗体症候群、PS: プロテインS、LDA: 低用量アスピリン療法、PIH: 妊娠高血圧症候群
17/18および19/20は同一母体

D. 考察

抗リン脂質抗体症候群患者の妊娠ではヘパリン及びバイアスピリンを用いた抗凝固療法が提案されている。一方で、PS 活性低下症例でも同等の治療を希望する患者は多く、不妊治療施設の中での安易な使用例が多いことも問題となっており、適切な使用を推奨するためには、正確な診断や症例の抽出を行うことを可能とする必要がある。今回の18 症例についても、明確な適応なく8 例に薬物投与が行われており、そのうち産褥期にPS 低下が認められていたものは1 例のみであった。これらの症例ではPS 遺伝子解析をおこなうことによって、抗凝固療法の要否の再検討が可能であったと思われる。一方で遺伝子異常がなくても産褥期に病的活性低下を示す症例もあることから、他の検査法の開発も急務であると考えられた。

E. 結論

妊娠中にPS 活性低下例に対する遺伝子検査をおこなうことは、妊娠前に十分な検査が行われていない症例では、妊娠中の治療介入の要否決定における一つの選択肢となりうると思われる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ohga S, Ishiguro A, Takahashi Y, Shima M, Taki M, Kaneko M, Fukushima K, Kang D, Hara T; Japan Childhood Thrombophilia Study Group. *Pediatr Int.* 2013 Jun;55(3):267-71

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

現在のところなし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

－ 総合研究報告書 － 分担研究報告書

周産期における遺伝性血栓症の診断と治療に関する研究

研究分担者

金子 政時 宮崎大学医学部生殖発達医学講座産婦人科分野 准教授

研究要旨

小児新生児期における遺伝性血栓症の新生児を発症前に抽出することは、新生児予後の改善に繋がる。そこで、母体の血栓性疾患の既往というリスク因子からそのような児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。重症妊娠高血圧症候群、子宮内胎児発育遅延児の母体、先天性アンチトロンビン 欠損症、妊娠初期に脳梗塞の既往のある妊婦、血小板増多症合併妊婦をハイリスク妊娠として設定して、妊娠・分娩経過および新生児経過を厳重にフォローした。その結果、1080 名中 8 妊婦(0.7%)が、遺伝性血栓症の新生児を出産するハイリスクとして抽出された。これら妊婦の内、5 名の妊婦に対してプロテイン S 抗原、プロテイン S 活性、プロテイン C 抗原、プロテイン C 活性値を測定した。重症 IUGR を合併した妊婦以外では、プロテイン S 活性と抗原量の低下を認めた。これらの児を含む全ての児の全てにおいて、頭蓋内出血等のエピソードはみられなかった。血栓性さらなる検討症例の集積が必要である。母体の血栓性疾患と新生児の遺伝性血栓症との関係を明らかにするためには、大規模なコホート調査を行う必要があるものと考えられる。

A. 研究目的

小児新生児期における遺伝性血栓症の新生児を発症前に抽出することは、新生児予後の改善に繋がる。そこで、母体の血栓性疾患の既往というリスク因子からそのような児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 22 年から平成 25 年までに宮崎大学で管理した重症妊娠高血圧症候群、子宮内胎児発育遅延児の母体、先天性アンチトロンビン 低下症、深部静脈血栓症および脳梗塞の既往のある妊婦、血小板増多症合併妊婦を対象に、凝固線溶系検査値の変動を調べた。また、一部の妊婦のプロテイン C、プロテイン S 活性測定した。ハイリスク妊婦から出産した児については、出生時の所見集め、血栓症の発症の有無について

経過を追った。

(倫理面への配慮)

本研究は、後方視的研究であり、医学的な見地から測定の意義を考え、妊婦への説明後に採血した。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

同期間に、1080 例の妊婦を当大学で管理した。その内、本研究の対象となる妊婦は、先天性 AT 低下症 (n=1)、重症 PIH (n=1)、重症 IUGR 母体 (n=1)、脳梗塞の既往もしくは妊娠初期の脳梗塞発症の既往をもつ妊婦 (n=3)、分娩直前に D-ダイマー 8.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ と高値を示し、下肢エコーで膝静脈に下肢の静脈血栓が疑われた妊婦と血小板増多症合併妊婦の合計 8 名であっ

た。これらの妊婦の内 6 名に対して、プロテイン C およびプロテイン S の活性値と抗原量を測定した。脳梗塞の既往のある妊婦 1 名、深部静脈血栓が疑われた妊婦、血小板増多症合併妊婦については、プロテイン C およびプロテイン S の活性値と抗原量を測定しなかったが、児の予後を厳重にフォローした。

プロテイン C およびプロテイン S の活性値と抗原量の結果を、表 1 に示す。先天性 AT 低下症 (No.1)、重症 PIH (No.2) および妊娠初期に脳梗塞を発症した妊婦 (No.4) にお

いて、プロテイン S の活性および抗原量の低下を認めた。一方、重症 IUGR 母体においては、プロテイン C およびプロテイン S の活性および抗原量の低下を認めなかった。これらの児を含む全ての児の全てにおいて、頭蓋内出血等のエピソードはみられなかった。

妊娠初期に脳梗塞を発症した妊婦においては、特に遺伝性血栓症のハイリスクと考えられるため、遺伝子解析を行ったが異常を認めなかった。

表 1

No	合併疾患	測定週数 (週)	PC 活性 (%)	PC 抗原量 (%)	PS 活性 (%)	PS 抗原量 (%)
1	AT 低下症	29	88	102	29	61
2	重症 PIH	27	81	74	34	38
3	重症 IUGR	21	70	81	96	86
4	脳梗塞 (妊娠初期)	29	137	130	32	50
5	脳梗塞 (妊娠前)	9	NA	93	104	84
6	深部静脈血栓症	38	D-ダイマー 8.25 μ g/ml		NA	NA

NA;未測定

D. 考察

我々の施設で管理した 1080 名中 8 妊婦 (0.7%) が、遺伝性血栓症の新生児を出産するハイリスクとして抽出された。これら妊婦の内、5 名の妊婦に対してプロテイン S 抗原、プロテイン S 活性、プロテイン C 抗原、プロテイン C 活性値を測定した。重症 IUGR を合併した妊婦以外では、プロテイン S 活性と抗原量の低下を認めた。しかしながら、妊娠中はこれらの値が低下することが知られていることから生理的な変化とも考えられる。

遺伝性血栓症を新生児期に効果的に診断し、治療を効果的に行うために、血栓性素因をもつ母体の効率的なスクリーニング法を確立することは臨床上有意義である。プロテイン S 抗原、プロテイン S 活性、プロテイン C 抗原、プロテイン C 活性値は、妊娠中の生理的変動が知られている。この事実を

考慮に入れながら、ハイリスクとする対象を、血栓症の家族歴等を有する妊婦にまで広げて、母体のプロテイン S 抗原、プロテイン S 活性、プロテイン C 抗原、プロテイン C 活性値と新生児の遺伝性血栓症との関係を大規模なコホート調査を行う必要があるものと考えられる。

E. 結論

重症妊娠高血圧症、AT 低下症、妊娠初期脳梗塞発症妊婦においては、妊娠中のプロテイン S 活性および抗原量の低下を認めた。母体の血栓性疾患と新生児の遺伝性血栓症との関係を明らかにするためには、大規模なコホート調査を行う必要があるものと考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的所有権の取得状況

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）

－ 総合研究報告書 － 分担研究報告書

周産期領域の栓友病診断と治療管理ガイドラインの作成に関する研究

研究分担者 嶋 緑倫 奈良県立医科大学 小児科 教授

研究要旨

血栓性素因を有する疾患の診断治療管理において *in vivo* を反映する凝固機能評価はきわめて重要である。本研究ではまず、栓友病の原因としても代表的なプロテイン C およびプロテイン S 欠乏の包括的評価を目的としてプロテイン C (PC) / プロテイン S (PS) 経路異常スクリーニング検査を用いて反復流産既往妊婦を経時的に評価し、各凝固因子欠乏血漿を用いた添加実験も実施した。本症例の PC/PS 経路異常には PS 低値に加えて第 VIII 因子 (FVIII) 高値も関与していた。 *In vitro* 添加実験から FV と FVIII が本経路へ大きく関与することが判明した。栓友病スクリーニング検査として PC、PS、FV、FVIII 等の異常を包括的に評価可能な本法の有用性が期待される。次に、トロンピ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。さらに、両反応系におけるそれぞれの因子の関与について検討した結果、プロトロンビナーゼ複合体必須因子である第 V 因子および第 X 因子が最も大きく関与していた。さらにフィブリノゲンおよびプラスミノゲンはプラスミン生成に大きく関与した。トロンピン生成・プラスミン生成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と考えられた。

A. 研究目的

本邦遺伝性血栓症 3 大素因 (プロテイン C: PC、プロテイン S: PS、アンチトロンピン: AT) のうち、PC、PS の 2 つは共同して抗凝固機能を発揮する。本経路にはさらに第 V 因子 (FV)、FVIII などの凝固因子や抗リン脂質抗体、トロンボモジュリンなど多数の因子が関与している。

我々は本邦初の APC 抵抗性 FV 分子異常症 (FV W1920R) 患者の解析を通じて、PC 経路機能の凝血的評価手法を確立してきた。本分担研究では、母子に効果的な栓友病スクリーニング項目として、PC/PS 経路機能検査が有用であるかどうかの基礎的検討を実施した。栓友病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。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。トロンピ

ン生成測定法は代表的な包括的凝固機能測定法であるが、*in vivo* では凝固系と線溶系が連動していることから、これら両反応系を評価できることが望ましい。そこで、本年度の分担研究では、栓友病の凝固機能を包括的に評価するためにトロンピ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することを目的とした。

B. 研究方法

PC 活性測定は STA 試薬シリーズプロテイン C (クロット) を用いた。PS 活性測定は STA ライアテスト フリー・プロテイン S を用いた遊離抗原測定で代用した (いずれもロシュ・ダイアグノスティックス)。PC 経路機能検査である Thrombopath® (Instrumentation Laboratory) は被検血漿に Ca と組織トロンボプラスチン添加後、合成基質を用いてトロンピン生成能を評価する。その際、PC 活性化

剤である Protac 添加の有無によって比較し、PiCi% (Protac-induced coagulation inhibition %)を算出する。つまり、PC 経路が Protac で活性化された場合にトロンビン生成能がどの程度抑制されるかを評価した。これによりPS、PC、FV、FVIII、抗リン脂質抗体等の異常を効率的に(感度 95%、特異度 86%)スクリーニングできるとされる(Toulon, 2009)。本法は市販キット化されており、血液凝固自動分析装置(ACL TOP、三菱化学メディエンス)で測定できることから汎用性が高い。本法を用い、反復流産既往妊婦(先天性 PS 欠損症疑い)の PC 経路機能と関連する諸因子を経時的に評価した。

また、市販各凝固因子欠乏血漿に純化 FII、FV、FVII、FVIII、FIX、FX をそれぞれ添加して PiCi% の変動を in vitro で評価した。

トロンビン・プラスミン生成同時測定試験ではトリガー試薬(TF, PL, tPA)を 20mM HEPES, pH 7.2, 150mM NaCl, 0.01% Tween 20 と混合した。血漿中の最終濃度は TF: 1pM, PL: 4uM, tPA 3.3nM に調整した。生成されたトロンビンおよびプラスミンの測定のために2種類の蛍光発色基質(トロンビン基質: Z-Gly-Gly-Arg-AMC, Bachem, Switzerland; プラスミン基質: Boc-Glu-Lys-Lys-MCA, Peptide Institute Inc.)を用いた。血漿検体(80ul)を 96 穴ポリスチレンプレートに添加し、20ul のトリガー試薬(TF/PL/tPA)を添加した。37 10 分加温後蛍光発色基質を添加した。次に、CaCl₂ を添加して蛍光シグナルを 2 時間、45 秒間隔で 390nm および 460nm で測定した。生成トロンビンおよびプラスミン測定のために段階希釈した純化 トロンビンおよびプラスミンを用いて標準曲線を作成した。データ解析には excel のソフトウェアを用いた。

C. 研究結果

1. プロテインC/プロテインS経路異常スクリーニング

まず健常成人 30 例の血漿で実施した Thrombopath[®] のパラメータ(平均 ± SD)は、Protac(+) 96.4 ± 31.4mOD/min、

Protac(-) 823.3 ± 40.2 mOD/min、PiCi% 88.2 ± 4.1%であった。

文献(Toulon, 2009)に従い、PiCi%で 84.1%以下(-1SD)を異常低値とした。これにより、前述したスクリーニング感度を得られるとされる。

症例は 44 歳女性。2 度の流産既往があり、3 度目の妊娠前に PS 活性(45%)、FXII:C(46%)低値を認めた。PS 欠損症として、妊娠 5 か月からヘパリン投与が開始された。妊娠中も PS は 38-42%を推移し妊娠前と変化は無く(図 1 上段)、PC、AT、FV:C は正常範囲内であった。しかし、妊娠前は正常範囲にあった PiCi%(86%、cut off 値 84%)は妊娠経過とともに徐々に低下し(60%)、トロンビン生成能も亢進した(730 910mOD/min)(図 1 下段)。妊娠経過中に FVII:C、FVIII:C、FXII:C は増加を認めた(図 2)。出産直前には PiCi%が 52%とさらに低下し、トロンビン生成能 1000mOD/min、FVII:C 204%、FVIII:C 416%、FXII:C 144%と凝固機能が著明に亢進した(図 1)が、無事正期産に至った。本例の PS 活性は出産 7 か月後には 60%に回復した。PS 遺伝子異常について現在解析中である。尚、出生児の生後 7 か月時の PS 活性は 85%と正常であった。

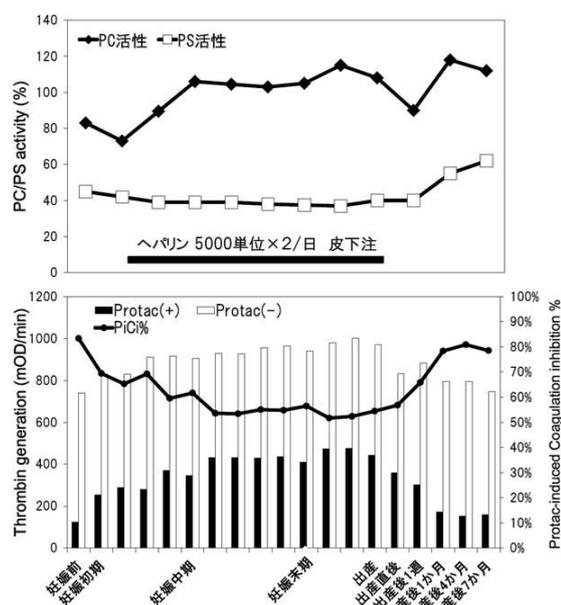


図 1. 習慣流産既往妊婦の PC/PS 活性(上段)および Thrombopath[®] パラメータ(下段)の推移

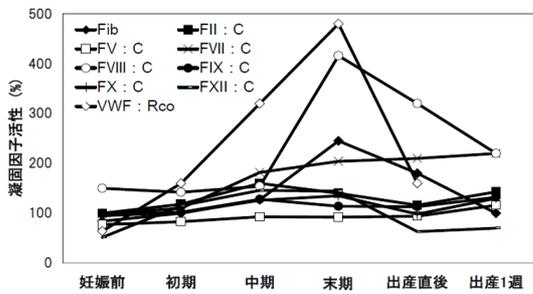


図 2. 習慣流産既往妊婦の各凝固因子活性と VWF:RCo の推移

本例で PS 値が不変でありながら PiCi% が低下した機序解明のため、各凝固因子欠乏血漿 (Geroge King) に各欠乏因子を 50 ~ 200% で in vitro で添加したところ、PiCi% は各凝固因子濃度依存性の変化を示し、FV 添加で増加、FII、FVII、FIX、FX 添加によって軽度低下、FVIII 添加によって著明な低下を示した (図 3)。つまり、PC 経路の機能発現には FV、FVIII の関与が大きく、本例の妊娠経過中の PiCi% の低下には FVIII 増加が関与していることが示唆された。

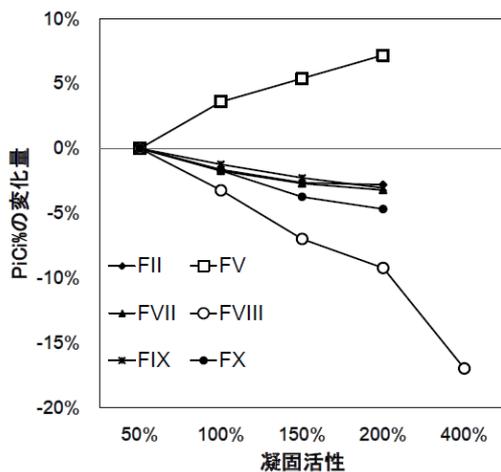


図 3. 各凝固因子欠乏血漿に欠乏因子を in vitro で添加した場合の PiCi% の変化量

II. トロンビン・プラスミン生成同時測定

まず、正常血漿についてトロンビン生成およびプラスミン生成反応における蛍光シグナルを測定した (図 4)。

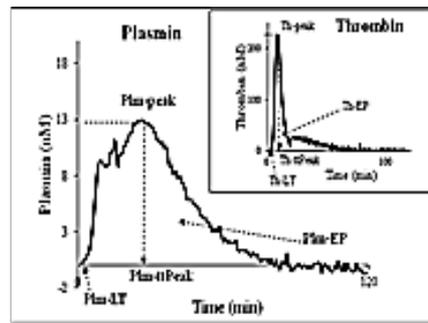


図 4. 正常血漿におけるトロンビン・プラスミン同時測定

さらに、これらの raw data の 1 次微分からトロンピンおよびプラスミン生成曲線が得られた (図 5)。

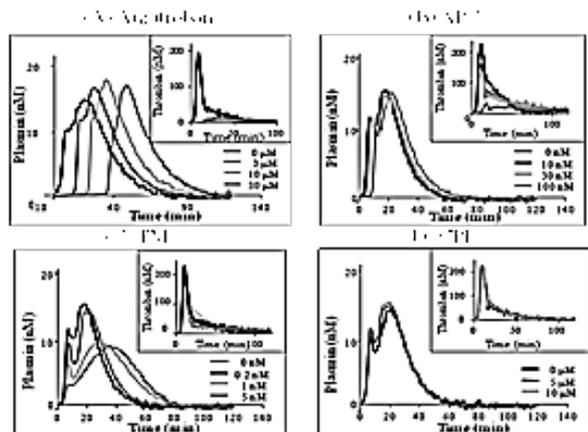


図 5. 各種凝固因子添加時の T/P-G

トロンピン生成ではトロンピン生成が開始するまでの時間 (lag time: LT)、トロンピンピーク値 (peak thrombin: Peak)、peak に至るまでの時間 (time to peak; ttPeak)、トロンピン総生成量 (endogenous potential: EP) の定量的パラメーターを算定した。プラスミン生成でも、同様にプラスミン生成開始までの時間 (LT)、プラスミンピーク値 (Peak)、peak に至るまでの時間 (ttPeak)、総プラスミン生成量 (EP) のパラメーターを算定した。

このトロンピン / プラスミン生成試験 (T/P-G 測定) が凝固反応系と線溶反応系間の協働的バランスを反映するものかについてトロンピン特異性のインヒビター (アルガトロバン) や抗凝固因子である APC やトロンボモジュリン (TM) を添加して検討した。アルガトロバンは濃度依存性に TG に抑制した。本抑制効果は著明で、アルガトロバン治療

濃度 10uM で > 90%抑制した。一方、プラスミン生成においてLTを濃度依存性に延長したが、Peakはむしろ増加した。APCやTMの抑制パターンは異なっていた。すなわち、両因子はアルガトロバンと同様にトロンピン生成を濃度依存性に抑制したが、TMはプラスミン生成を抑制したが、APCは抑制しなかった。APCのプラスミン生成抑制効果はみられなかった。以上より、T/P-G測定はトロンピン依存性の抗線溶因子である thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI)に感受性が高いことも示唆された。

次に、本研究では、様々な凝固因子や抗凝固因子の凝固・線溶系における役割を検討するためにそれぞれの因子欠乏血漿を用いてT/P-G測定を行った。トロンピン生成では第II, V, VIII, IX, X, XIII, フィブリノゲン欠乏血漿で低下した。プラスミン生成では第V, X因子、フィブリノゲン、プラスミノゲン欠乏で著明に低下した。 α_2 PI欠乏症のpeakは亢進した。以上よりフィブリン形成はプラスミン生成を惹起する上できわめて重要であることが確認された。さらに、共通経路の凝固因子である第V, 第X因子もプラスミン生成に影響することが判明した。これらの因子の重要性を確認するために、様々な濃度の純化FV, FX, プラスミノゲン、フィブリノゲンをそれぞれの欠乏血漿に添加したところ、いずれの欠乏血漿においても濃度依存性にトロンピン生成さらに、およびプラスミン生成を改善した。さらにプラスミン生成には微量のフィブリノゲンでも惹起されやすいことも判明した。

D. 考察

I. プロテインC/プロテインS経路異常スクリーニング

本症例は妊娠前からPS活性が低く、妊娠経過中の変動は乏しかったにもかかわらずPiCi%が徐々に低下した(図1)。凝固因子添加実験(図3)の結果をふまえるとFVIIIの上昇が本症例のPiCi%低下に最も影響したと考えられた。また、近年我々がAPC抵抗性のFV分子異常症患者(FV_{Nara})を報告するまでは日本人のAPC抵抗性FV例はなく、FVとの関連は本邦ではまだ十分に検討されてお

らず興味深い。

本法のスクリーニング検査としての有用性を評価するためには、正常妊婦や血栓症(流産)既往妊婦を対象にした多数の症例蓄積が必要である。また、新生児・乳児における評価も重要である。妊産婦・新生児の生理的変動を考慮した上で、本法のような包括的凝固/抗凝固検査が遺伝的血栓症のスクリーニングに有用かどうか、引き続き検討する。

II. トロンピン・プラスミン生成同時測定

凝固系と線溶系の協働作用を評価する目的でトロンピン/プラスミン生成測定系を確立した。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。したがって、本測定系は、出血性素因のみならず血栓性素因を包括的に評価する上にきわめて有用な評価法を考えられた。さらに本研究において、1)トロンピン生成はプラスミン生成の開始にきわめて重要であり、たとえ微量なトロンピン生成量でもプラスミン生成反応を惹起する、2)プラスミン生成はフィブリノゲン濃度に大きく依存している、3)プロトロンビナーゼ複合体の必須因子であるFVとFXはトロンピン生成のみならずプラスミン生成にも必須であること、4)抗線溶因子である α_2 PIはプラスミン生成を増強するがトロンピン生成には影響をあたえないこと、などが判明した。

E. 結論

PC/PS経路依存性抗凝固機能の包括的測定を用いて反復流産既往妊婦の経時的評価を実施した。本法ではPC、PSに加えて、FV、FVIIIが大きく影響した。栓友病スクリーニング検査として本法の有用性が期待されるが、十分な検討を要する。

In vivoでの出血や血栓症は凝固反応系と線溶反応系とのきわめて繊細なバランスを基盤に発症する。したがって、出血性疾患や血栓性疾患の診断や治療管理において、両反応系を同時に測定する必要がある。本研究では凝固反応系をトロンピン生成、線溶反応系をプラスミン生成にて両者を同時

に評価する測定法を確立した。本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と考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Matsumoto T, Nogami K, Shima M. Simultaneous measurement of thrombin and plasmin generation to assess the interplay between coagulation and fibrinolysis. *Thromb Haemost.* 2013 110(4):761-8.
- 2) Shima M. [Hemophilia world] *Rinsho Ketsueki.* 2013 54(8):736-43.
- 3) Shima M, Thachil J, Nair SC, Srivastava A. Towards standardization of clot waveform analysis and recommendations for its clinical applications. *J Thromb Haemost.* 2013 11(7):1417-20.
- 4) Doi M, Sugimoto M, Matsui H, Matsunari Y, Shima M. Coagulation potential of immobilised factor VIII in flow-dependent fibrin generation on platelet surfaces. *Thromb Haemost.* 2013 110(2):316-22.
- 5) Sugita C, Yamashita A, Matsuura Y, Iwakiri T, Okuyama N, Matsuda S, Matsumoto T, Inoue O, Harada A, Kitazawa T, Hattori K, Shima M, Asada Y. Elevated plasma factor VIII enhances venous thrombus formation in rabbits: contribution of factor XI, von Willebrand factor and tissue factor. *Thromb Haemost.* 2013 110(1):62-75.
- 6) Ohga S, Ishiguro A, Takahashi Y, Shima M, Taki M, Kaneko M, Fukushima K, Kang D, Hara T; Japan Childhood Thrombophilia Study Group. Protein C deficiency as the major cause of thrombophilias in childhood. *Pediatr Int.* 2013 55(3):267-71.
- 7) Yada K, Nogami K, Ogiwara K, Shima M. Activated prothrombin complex concentrate (APCC)-mediated activation of factor (F)VIII in mixtures of FVIII and APCC enhances hemostatic effectiveness. *J Thromb Haemost.* 2013 11(5):902-10.

- 8) Shima M. [Hemophilia]. *Rinsho Ketsueki.* 2013 54(2):189-97.
- 9) Dargaud Y, Sorensen B, Shima M, Hayward C, Srivastava A, Negrier C. Global haemostasis and point of care testing. *Haemophilia.* 2012 Suppl 4:81-8.

2. 学会発表

- 1) Matsumoto T, Nogami K, Shima M: Usefulness of thrombin generation assay (TGA) for diagnosis of prolonged aPTT with positive LA. 第75回日本血液学会 札幌市 2013.10.12
- 2) 松本智子、野上恵嗣、嶋緑倫 Thrombin /Plasmin 生成同時測定による新規包括的凝固線溶検査 第60回日本臨床検査医学会学会 神戸市 2013.11.2
- 3) 中川隆志、荻原建一、佐道俊幸、野上恵嗣、松本智子、矢田弘史、嶋緑倫: 反復流産の既往を持つ妊婦の PC/PS 経路依存性抗凝固能評価. 第34回日本血栓止血学会東京都 2012.6.8.
- 4) 荻原建一、野上恵嗣、篠澤圭子、松本智子、古川晶子、西屋克己、矢田弘史、福武勝幸、嶋緑倫: 第V因子変異 R506Q (FV_{Leiden})より強い APC レジスタンスを示した FV 変異 W1920R (FV_{Nara}) 第34回日本血栓止血学会 東京都 2012.6.9

H. 知的財産権の出願・登録状況

参考文献

特許取得

特許 4671823 血液凝固因子の不活性化及び血液凝固因子

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

－ 総合研究報告書 －

分担研究報告書

研究テーマ： 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学的モニタリングの検討

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
足利 朋子 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

研究要旨：

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を対象として先天性血栓性素因の3大疾患であるアンチトロンビン異常症、プロテインC異常症、プロテインS異常症の遺伝子解析を行った。解析した6家系の内4家系において先天性血栓性素因の遺伝子異常を認めた。凝固制御因子の活性値測定のみによる診断は正確性に欠け、先天性血栓性素因の診断に遺伝子解析は極めて有用であった。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) 血栓症の治療および予防薬として抗 Xa 阻害薬を使用する際の有効な凝血学的モニタリングは未だ確立されていないが、Danaparoid においては凝固波形解析による凝血学的モニタリングが有用である可能性が示唆された。今後、モニタリングの精度を高めるため凝固波形解析に用いる最適な試薬について検討を進める必要がある。

A. 研究目的

1) 血栓症患者の遺伝子異常についての検討

日本人における先天性血栓性素因は、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)異常症が多く、これまでに多くの原因遺伝子変異が同定されている。しかし本邦における先天性血栓性素因の遺伝子異常に関するデータは決して十分とは言えず、特に血栓症患者における各遺伝子異常の発現頻度、各遺伝子異常と血栓症発症リスクとの関連性については未だ不明な点が多い。

また先天性血栓性素因の診断は主として各凝固制御因子の活性値および抗原量の測定により行われている。しかし生理的要因や治療の影響からこれらの活性値測定のみによる診断は容易ではないこともあり、確定診断のためには遺伝子検査が有用であるが、その検査体制が整っていないのが現状である。

本研究は血栓症患者を対象とし、先天性血栓性素因の3大疾患であるAT異常症、PC異常症、PS異常症の遺伝子検査を行い、遺伝子異常と血栓症発症との関連性について解析することを目的としている。

2) 抗 Xa 阻害薬使用時の有効な凝血学的モニタリングの検討

近年血栓症の治療および予防薬として抗 Xa 阻害薬が広く使用されるようになった。抗 Xa 阻害薬はトロンビンに対する直接的な阻害作用が少ないため出血の危険性が低いとされているが、出血性合併症は決して皆無とは言えない。しかしながら、従来の凝固時間法による薬効モニタリングは困難とされ、現時点で有効な凝血学的モニタリング法は確立されていない。そこで我々は、抗 Xa 阻害薬使用時の適切な凝血学的モニタリング法について検討するため、トロンビン生成能、凝固波形解析を用いて抗 Xa 阻害薬添加時の凝固能の変化について検討した。

B. 研究方法

1) 血栓症患者の遺伝子異常についての検討

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 AT、PC、PS 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)。

2) 抗 Xa 阻害薬使用時の有効な凝血学的モニタリングの検討

健常成人 5 名から得られた乏血小板血漿(2 回遠心、1800g、15 分間)に各濃度の Danaparoid、Fondaparinux を添加し、APTT、トロンビン生成能、凝固波形解析より得られる最大凝固加速度を測定した。トロンビン生成能は、トロンビンの総生成量を表す ETP(Endogenous thrombin potential)で評価した。各薬剤添加時の凝固時間および ETP の変化率(投与後/投与前)を求め、それぞ

れの変動係数(CV)を比較した。次に各薬剤添加による ETP の変化と最大凝固加速度との相関関係について検討した。

(倫理面への配慮)

本研究の実施に関しては、聖マリアンナ医科大学の生命倫理委員会で承認された(承認番号 第 1210 号)。

C. 研究結果

1) 血栓症患者の遺伝子異常についての検討

6 家系 10 名の遺伝子解析を行い、その内 4 家系 7 名において先天性血栓性素因の遺伝子異常を認めた。その内訳は、AT 異常症が 3 家系、PC 異常症が 1 家系であった。一方、2 家系においては遺伝子異常を認めなかった。遺伝子異常を認めなかった 2 家系の内、1 家系は PS 欠損症を疑われた母子である。母親は他院で PS 活性値の低下から PS 欠損症と診断された。不育症のためアスピリン内服とヘパリン皮下注射を行い、妊娠が継続し分娩となった。児も PS 活性値 69%と軽度の低下を認めたが、母子とも PS 遺伝子解析で異常を認めず後天性の PS 低下症の可能性が高いと考えられた。もう 1 家系は脳梗塞を発症した乳児で、PC 活性値の低下を認めたが、遺伝子解析で異常を認めず、今後 PC 活性の経時的な追跡を行う予定である。

2) 抗 Xa 阻害薬使用時の有効な凝血学的モニタリングの検討

Danaparoid 添加により、APTT は濃度依存性に延長し、ETP は濃度依存性に低下した。両者の CV 値を比較すると、ETP の CV 値は APTT の CV 値に比べ大きい傾向が認められた。

Fondaparinux 添加による APTT の延長効果は極めて僅かであったが、ETP は濃度依存性に低下した。両者の CV 値を比較すると、ETP の CV 値は APTT の CV 値に比べ大きい傾向が認められた。

各薬剤添加時の ETP の変化率と最大凝固加速度の変化率の相関関係について検

討したところ、Danaparoid 添加時においては両者の間に有意な正の相関関係が認められた($r=0.86$, $p<0.01$)。Fondaparinux においては、両者の間に有意な相関関係は認められなかった($r=0.50$, $p=0.06$)。

D. 考察

1) 血栓症患者の遺伝子異常についての検討

遺伝子解析を行った6家系の内4家系に先天性血栓性素因の遺伝子異常が認められた。これらの家族に対して、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。一方、2家系においては凝固制御因子の低下を認めたものの、ダイレクトシーケンス法による遺伝子解析においてはその凝固制御因子の塩基配列に異常を認めなかった。凝固制御因子の活性値を経時的に測定し、凝固制御因子の一過性の活性値低下か否かを追跡する予定である。

凝固制御因子の活性値測定のみによる診断は正確性に欠け、先天性血栓性素因の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。

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

ETP 変化率の CV 値はいずれの薬剤においても大きく、これは各薬剤のトロンビン生成能抑制効果には個人差が存在することを示唆する成績と考えられ、この個人差は出血性合併症の一因である可能性が考えられた。

Danaparoid 添加による最大凝固加速度の変化率は ETP 変化率と正の相関関係にあり、最大凝固加速度は Danaparoid 添加時の個々に異なるトロンビン生成能抑制効果を鋭敏に捉えうる検査法である可能性が示唆された。しかし、Fondaparinux においては同様の結果は得られず、今後凝固波形解析に用いる最適な試薬について検討を進めたいと考えている。

F. 結論

先天性血栓性素因の正確な診断に遺伝子解析は非常に有用であった。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は今後症例を増やして検討したい。

抗 Xa 阻害薬使用時の有効な凝血的モニタリングの検討に関して、Danaparoid においては凝固波形解析による凝血的モニタリングが有用である可能性が示唆された。今後、モニタリングの精度を高めるため凝固波形解析に用いる最適な試薬について検討したい。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 山下敦己、瀧 正志：日常生活における管理・指導 凝固異常症（血友病、先天性血栓性疾患）小児科臨床、65:808-812, 2012
- 2) 長江千愛、瀧 正志：播種性血管内凝固症候群（DIC）の治療、小児内科、53:1067-1075, 2012
- 3) 足利朋子、山下敦己、武藤真二、長江千愛、秋田美恵子、鈴木典子、山崎哲、高山成伸、立浪忍、瀧 正志：ステロイドパルス治療家兎モデル実験における顕著なトロンビン生成能の上昇、血栓止血誌、23:571-579, 2012
- 4) 長江千愛、瀧 正志：小児科領域の DIC、臨床に直結する血栓止血学、朝倉英策（編著）p227-234、中外医学社（発行）2013
- 5) Hideaki Imamura, Yuko Akioka, Masashi Taki, Fumiko Terasawa, Nobuo Okumura, Motoshi Hattori: Successful living-related kidney transplantation in a boy with inherited dysfibrinogenemia. Pediatric Nephrology, 17: E161-E164, 2013
- 6) Ohga S, Ishiguro A, Takahashi Y, Shima M, Taki M, Kaneko M, Fukushima K, Kang D, Hara T, Japan Childhood Thrombophilia Study Group: Protein C deficiency as the major cause of thrombophilias in childhood. Pediatr Int. 55:267-71, 2013

- 7) 瀧 正志：出血性疾患に対する臨床的ならびに検査からのアプローチ、日本小児血液・がん学会雑誌、50(3)：450-456、2013
2. 学会発表
- 1) 瀧 正志：小児 DIC の新たな治療戦略、第 115 回日本小児科学会、2012.4
- 2) 足利朋子、山下敦己、武藤真二、長江千愛、瀧 正志：ステロイドパルス療法はトロンビン生成能を増加させる、第 115 回日本小児科学会、2012.4
- 3) Shinji Muto, Tomoko Ashikaga, Atsuki Yamashita, Chiaï Nagae, Masashi Taki: Clinical experience with the medication of recombinant thrombomodulin to children with DIC in Japan. 25th Annual ASPHO (American Society of Pediatric Hematology Oncology) Meeting, 2012.5
- 4) Atsuki Yamashita, Chiaï Nagae, Tomoko Ashikaga, Shinji Muto, Mieko Akita, Satoshi Yamazaki, Shigenobu Takayama, Masashi Taki: Analysis of anticoagulant effect of factor Xa inhibitors using thrombin generation assay in vitro. The 74th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology, 2012.10
- 5) 山下敦己、長江千愛、足利朋子、武藤真二、秋田美恵子、山崎哲、高山成伸、瀧正志：L-asparaginase による凝固障害の発症機序、第 54 回日本小児血液・がん学会、2012.11
- 6) 武藤真二、長江千愛、足利朋子、山下敦己、瀧正志：小児 DIC に対する遺伝子組み換えトロンボモジュリン製剤の有用性、第 54 回日本小児血液・がん学会、2012.11
- 7) 足利朋子、長江千愛、山下敦己、秋田美恵子、武藤真二、瀧 正志：小児の各種疾患に対するステロイドパルス療法のトロンビン生成能に及ぼす影響、第 54 回日本小児血液・がん学会、2012.11
- 8) 富田 知世子、山下 敦己、足利 朋子、武藤 真二、長江 千愛、瀧 正志：急性壊死性脳症に合併した DIC に対し遺伝子組み換えトロンボモジュリン製剤が著効した幼児例、第 54 回日本小児血液・がん学会、2012.11
- 9) Satoshi Yamazaki, Shigenobu Takayama, Noriko Suzuki, Noriko Yamazaki, Masashi Taki, Masahiro Ieko, Yoko Kawai, Standardization Subcommittee of Laboratory test for Thrombosis and Hemostasis: Reevaluation of activated partial thromboplastin time (APTT) reagents in Japan, XXVth International Symposium on Technological Innovations in Laboratory Hematology, 2013.5
- 10) Atsuki Yamashita, Chiaï Nagae, Tomoko Ashikaga, Shinji Muto, Mieko Akita, Satoshi Yamazaki, Shigenobu Takayama, Shinobu Tatsunami, Masashi Taki: Pathogenesis of hemostatic abnormalities by L-asparaginase in children with acute leukemia. XXIVth ISTH, 2013.6
- 11) Tomoko Ashikaga, Atsuki Yamashita, Shinji Muto, Chiaï Nagae, Mieko Akita, Noriko Suzuki, Satoshi Yamazaki, Shigenobu Takayama, Shinobu Tatsunami, Masashi Taki: Pulsed methylprednisolone therapy markedly increases thrombin generation potential in a rabbit experiment. XXIVth ISTH, 2013.6

H. 知的財産権の出願・登録状況 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）

－ 総合研究報告書 － 分担研究報告書

研究分担者

高橋幸博 奈良県立医科大学附属病院 新生児集中治療部門 教授

平成 24 年度 新生児期の遺伝性出血症と小児のワルファリン治療法に関する研究

研究協力者

川口 千晴	現東大寺福祉療育園	小児科
斎藤 能彦	第一内科学教室	
片岡 美香	奈良県立医科大学附属病院	中央臨床検査部
倉本 智津子	奈良県立医科大学附属病院	中央臨床検査部

平成 25 年度 新生児期の遺伝性出血症と小児のワルファリン治療法に関する研究

効果的診断法の確立と抗血栓因子補充のための新生児への
新鮮凍結血漿（FFP）投与基準設定

研究協力者

中川 隆志	奈良県立医科大学附属病院	新生児集中治療部
斎藤 能彦	第一内科学教室	
山口 直子	奈良県立医科大学附属病院	中央臨床検査部
谷口 恵理	奈良県立医科大学附属病院	中央臨床検査部
豆田 清美	奈良県立医科大学附属病院	中央臨床検査部
片岡 美香	奈良県立医科大学附属病院	中央臨床検査部
倉本智津子	奈良県立医科大学附属病院	中央臨床検査部
内池 敬男	奈良県立医科大学附属病院	中央臨床検査部

研究要旨

新生児・小児の血栓症の診断と治療に関し、平成24年度は血栓症治療でのワルファリン療法での安全な管理法を示した。平成25年度はプロテインC異常症を含めたPC/PS抗凝固制御系の評価に、プロトロンビン時間(PT)とHemosIL ThromboPathとを用いた効果的診断法を示した。

A. 研究目的

新生児は、それ以降の小児と比較し血栓症の発症リスクが高い。発症には新生児仮死や感染症、中心静脈カテーテル留置など新生児特有の要因がある。しかし、その病態には新生児から乳児への発達過程での抗凝固因子の産生低下が関与する。これら抗凝固因子の先天性欠乏症は、ホモ接合体やダブルヘテロ接合体では特異な電撃性紫

斑病を発症し早期発見に至るが、ヘテロ接合体異常や一過性の低下症では新生児期や乳児期での診断は容易でない。血栓症を発症する抗凝固因子にはアンチトロンビン(AT)、プロテイン C(PC)、プロテイン S(PS)、第 V 因子 Leiden 異常などがある。我が国の血栓症の主な病因は AT、PC、PS のいずれかの抗血栓因子の低下が主に関与する。AT 活性は一般施設でも測定が可能であり、

AT 欠乏症では単独の血液製剤も使用が可能である。しかし、PC、PS は、一般施設での測定が容易でなく血栓性素因としての認識も低く、また、PC 欠乏症での治療製剤も先天性 PC 欠乏症にのみ活性化 PC 製剤があるが、多くは治療には新鮮凍結血漿 (FFP) が利用されている。一方、FFP の血液製剤の使用指針に FFP の抗血栓療法として、明確な指針等はない。本研究ではこれらを踏まえ、平成 24 年度では小児血栓症治療法へのワルファリン療法に関する研究を、平成 25 年度は PC/PS 抗凝固系の評価に HemosIL ThromboPath (ILJapan) の有用性と新たな新生児・小児での抗凝固系異常の効果的診断法について検討した。

B. 研究方法

1. 平成 24 年度

新生児期の遺伝性出血症と小児のワルファリン治療法に関する研究では本院循環器内科に通院中でワルファリン服用者の残余血 (30 例) を使用した。各種ビタミン K 依存性凝固因子 (VKDF) 量は、SYSMEX 社製各種 VKDF 欠乏血漿を用い、自動血液凝固測定装置で凝固活性を測定した。PIVKA-II は、協和メディックス社の CL PIVCAL test で測定した。PC 活性は、コアプレスタ 2000 で、テストチームプロテイン C (積水メディカル株式会社) で測定した。

2. 平成 25 年度

新生児期の遺伝性出血症と小児のワルファリン治療法に関する研究 効果的診断法の確立と抗血栓因子補充のための新生児への新鮮凍結血漿 (FFP) 投与基準設定のための研究 では、ワルファリン血 (5 例)、肝疾患血 (5 例)、新生児・小児の止血検査後の残余血 (28 例) を使用した。PC 活性はテストチームプロテイン C で測定した。第 VIII 因子活性は Sysmex トロンボチェック FACTOR VIII を用いた。PC/PS 凝固制御系は ACLTOP CTS (ILJAPAN 社) による HemosIL ThromboPath を用い測定した。

ThromboPath の測定原理

クエン酸血漿	10 μ L
希釈液	40 μ L
Protac (PC 活性蛇毒) あり (A)	45 μ L
あるいは Protac なし (B)	
加温反応	120 秒
<hr/>	
Tissue factor + 合成リン脂質	50 μ L
加温反応	90 秒

Thrombin 特異発色合成基質 50 μ L
 45 秒後 OD405nm で比色測定
 The Protac-Induced Coagulation Inhibition percentage (PICU%) = B - A / BX100

(倫理面への配慮)

両測定に関して本学倫理委員会の承認を得て実施した。

C. 研究結果

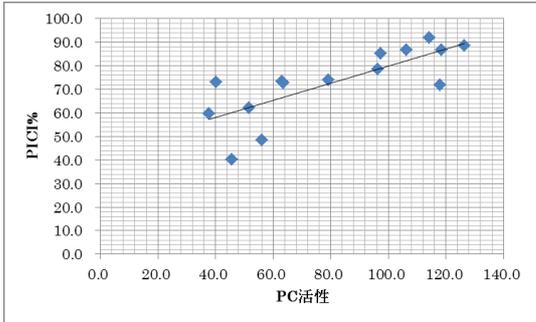
1. ワルファリン服用では従来の PT-INR に加え、PIVKA-II が出血予防の有用な指標となりうること、また、ワルファリン服用時の血栓発症予防に PC 測定が重要であることを示した (平成 24 年度報告集)。

2. ThromboPath PICI% 基準値

健康成人、ワルファリン血、肝疾患血の ThromboPath の PICI% 値

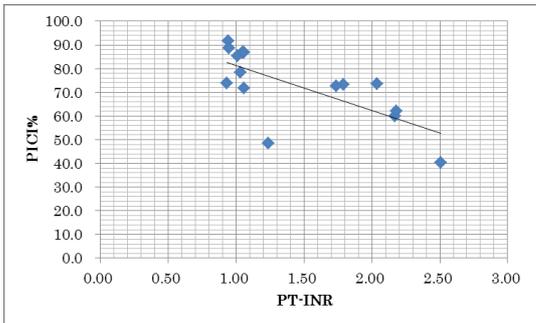
PICI% 値	%
健康成人 (n=5)	87.8 \pm 0.1
ワルファリン血 (n=5)	64.3 \pm 0.1
肝疾患 (n=5)	66.5 \pm 0.1
<hr/>	
Protac 非存在下 Thrombin 産生量 (B)	
mOD/min	
健康成人 (n=5)	742.2 \pm 23.0
ワルファリン血 (n=5)	402.2 \pm 60.6
肝疾患 (n=5)	649.8 \pm 138.3
<hr/>	
Protac 存在下 Thrombin 産生量 (A)	
mOD/min	
健康成人 (n=5)	90.5 \pm 18.2
ワルファリン血 (n=5)	137.4 \pm 29.5
肝疾患 (n=5)	213.3 \pm 74.6

全例での PC 活性と PICI%との関連



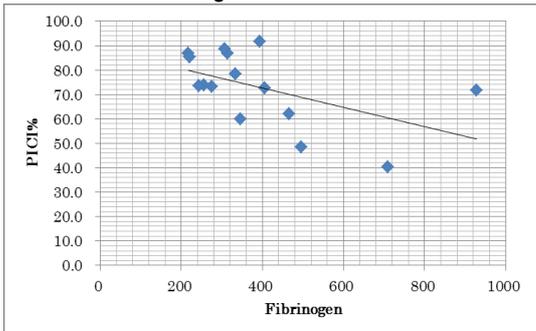
$r=0.7$ (± 0.7 ± 0.9 :強い相関)

全例での PT-INR と PICI%との関連



$r=-0.71$ (± 0.7 ± 0.9 :強い相関)

全例での Fibrinogen と PICI%との関連



$r=-0.65$ (± 0.4 ± 0.7 :相関あり)

c.f. (Toulon P et al Thromb Res 124:137-143,2009)

PC/PS 抗凝固系の異常のない PICI%値 %

A 施設 (n=126)	86.7(66.0 ~ 97.7)
B 施設 (n=40)	90.5(73.4 ~ 98.4)
C 施設 (n=106)	91.9(58.1 ~ 98.3)

なお、凍結保存検体で、肝機能等の異常記載がない。

PC/PS 抗凝固系の異常例の内訳

A 施設 (n=147)	PCdef(14)、PSdef(11)、 FVLeiden(50)、Combuned(38)、LA(34)
B 施設 (n=103)	PCdef(19)、PSdef(32)、 FVLeiden(26)、Combuned(16)、LA(10)

C 施設 (n=32) PCdef(7)、PSdef(19)、
FVLeiden(5)、Combuned(1)、LA(0)
(例数) LA:lipus Anticoagulant.

PC/PS 抗凝固系の異常例の PICI%値 %

A 施設 (n=147)	59.0(11.8 83.3)
B 施設 (n=103)	70.2(19.9 95.3)
C 施設 (n=32)	72.9(48.9 89.1)

結果 2: 自験例での解析から PICI%は、健康成人に比較し、ワルファリン血、肝疾患で有意に低値を示した。Fibrinogen とも弱い相関がみられたことから、本検査が FVIII の増加でも PICI%の低値がみられること(Toulon P et al Thromb Res 124:137-143,2009)

Fibrinogen が Acute Phase Reactant でもあることから、炎症を伴う DIC 等のマーカーとなることも示唆された。また、Protac 非存在下での Tissue Factor による Thrombin 産生も健康成人に比較し、ワルファリン血、肝疾患で有意に低値を示した。したがって、PICI%での血栓症評価には、VKDF の評価も考慮する必要がある。

2. 小児の ThromboPath の PICI%値

PICI%値	%
新生児 (n=3)	36.1 \pm 3.5
乳児 (n=6)	75.5 \pm 10.9
1 歳 (n=8)	75.2 \pm 4.5
2 歳 (n=5)	82.0 \pm 5.9
3 歳 (n=6)	84.3 \pm 1.3

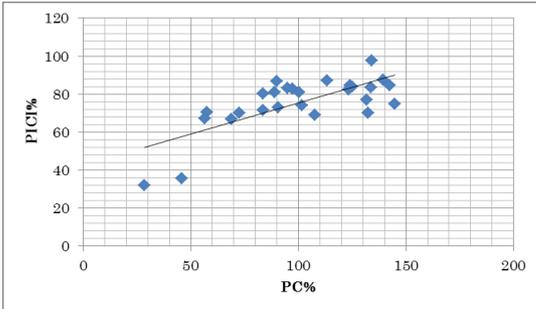
Protac 非存在下 Thrombin 産生量 (B)

	mOD/min
新生児 (n=3)	523.0 \pm 71.2
乳児 (n=6)	664.7 \pm 89.5
1 歳 (n=8)	824.0 \pm 73.8
2 歳 (n=5)	772.1 \pm 58.6
3 歳 (n=6)	766.0 \pm 34.5

Protac 存在下 Thrombin 産生量 (A)

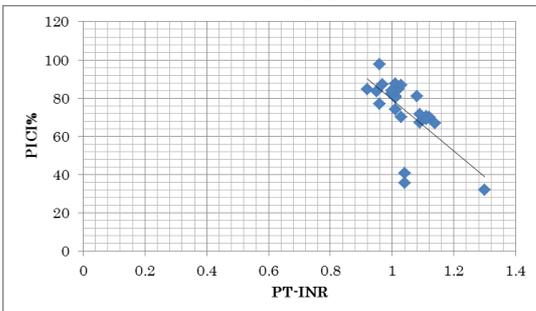
	mOD/min
新生児 (n=3)	333.6 \pm 44.8
乳児 (n=6)	185.4 \pm 26.9
1 歳 (n=8)	204.8 \pm 44.9
2 歳 (n=5)	136.7 \pm 36.9
3 歳 (n=6)	120.3 \pm 13.6

3. PC%とPICI%との関連



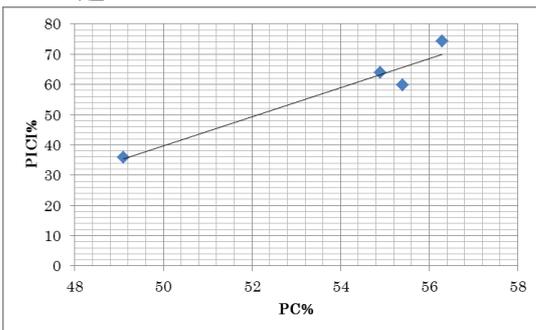
$r=0.73$ (± 0.7 ± 0.9 :強い相関)

4. PT-INRとPICI%との関連



$r = -0.65$ (± 0.4 ± 0.7 :強い相関)

5. ワルファリン服用時のPC%とPICI%との関連



$r = 0.96$ (± 0.9 ± 1.0 :強い相関)

D. 考察

新生児期は血液凝固系では肝由来のVKDFの産生低下やビタミンK欠乏に伴う異常蛋白(プロトロンピンではPIVKA-II)が出現することに加え、抗凝固系ではATおよびVKの依存性のPCおよびPSの産生低下とPIVKA-PC、PIVKA-PSが出現する。すなわち、血液凝固系、抗凝固系が発達過程であり、そのバランスが障害されると容易に出血症や血栓症を発症する。出血症ではVKDFではPTやヘパプラスチンテスト、PIVKA-II

などの診断検査法が確立しており、血栓症ではATのみ一般検査として測定が可能である。しかし、PC/PS凝固制御系はスクリーニングが容易でなく、新生児から乳児期ではPC、PSの効果的診断法は確立されていない。そのため、新生児・小児の血栓症発症の診断や治療法への対応は十分でない。平成24年は小児血栓症治療法の抗凝固療法であるワルファリン使用時の安全な使用方法を確立するためにワルファリン使用時のPT-INR、PIVKA-II、抗凝固因子のPCについて報告した。平成25年度は、新生児・小児の血栓症の効果的診断法の確立と治療法の一つである新鮮凍結血漿投与の基準を設定するために、新生児・乳幼児期でのPC活性と、PC/PS抗凝固系のグローバルな新たな検査法であるHemosIL ThromboPathの特性について検証した。その結果、以下の結果を得た。本検査は被検血漿内のPCを蛇毒成分のProtacで一旦活性化させ、被検血漿内のPC/PS抗凝固系のPC活性と相関を示したことから有用な検査法であるが、新生児・乳児期ではPTやワルファリン血でも相関とも相関し、凝固系、本検査がトロンピン形成での評価法であることから、とりわけVKDFの影響を受けることから、PC/PS抗凝固系のスクリーニングには、凝固系指標のPT等との組み合わせが重要であると考えられた。今回被検例数が少なく基準値として十分ではないが、およそ目安を示すことができた。今後さらに、PT等を組み合わせたCut-Offを設定することができれば、新生児・乳児のPC/PS抗凝固系のグローバルなスクリーニング法として効果的な検査法となり得ると考えられる。また、今回、被検検体が少ないが成人でも同様の結果を示したことから、本検査の成人での血栓症の診断時にも、その評価法の参考になると思われる。しかし、問題点として、測定量として被検検体が10 μ Lと微量での測定が可能であるが、その一方、測定時のDead spaceが大きく、新生児・小児への応用にはこの測定時のDead Spaceの改良が望まれる。また、今後の展望としてPT等ThromboPathを組み合わせることで、FFP等の使用指針を示すことも今後可能と思われる。

E. 結論

新生児・乳児期の血栓症は、成人領域と比較しても、その効果的診断法および治療法が依然確立されていない。本研究を通じ、効果的診断法ならびに治療法の方向性を示すことができた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 高橋幸博 今日の治療指針 (第7版) ビタミンK欠乏症 医学書院 (出版予定)
- 2) 高橋幸博 小児科診療増刊号(77巻増刊号) 特集:小児の治療指針 新生児メレナ 診断と治療社(出版予定)。

2. 学会発表

- 1) 第22回日本産婦人科・新生児血液学会 (会長佐川典正) 日時:平成25年6月29-30日 場所;アスト津4Fアストホール 発表:
ビタミンK欠乏性出血症の新規PIVKA-検査法 ピブカルテストからデタミナーCL ピブカルテストに 前回妊娠時に深部静脈血栓症の既往がある先天性アンチトロンビンIII欠乏症合併妊娠の1例
ビタミンKフォーラム:小児のワーフアリン治療
- 2) 第23回日本産婦人科新生児血液学会 (会長小林 浩) 日時:平成25年6月7-8日 場所:東大寺総合文化センター 新生児の交換輸血時の血液製剤の検討
- 3) 第34回日本血栓止血学会 (内山真一郎会長) 日時:平成24年6月7日 9日 場所:ハイアット・リーゲンシー 低酸素性虚血性脳症に伴うDICへのトロンボモジュリンの使用経験と血液凝固系についての検討
- 4) 第35回日本血栓止血学会 (一瀬白帝会長) 日時:平成25年5月30日 6月1日

場所:山形国際ホテル

新生児の消化管関連疾患に伴うDICへのトロンボモジュリン製剤の効果 Determiner CL PIVCAL- 測定のワルファリン止血管理への臨床応用の可能性について

- 5) 第57回日本未熟児新生児学会 (近藤裕一会長)

日時:平成24年11月25日 27日

場所:ホテル日航熊本、くまもと県民コウリュウパレア、鶴屋ホール
ワルファリン療法とPIVKA-

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

特記すべきことはない

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

－ 総合研究報告書 －

分担研究報告書

新生児血栓症の疫学に関する研究

研究分担者

石黒 精 独立行政法人国立成育医療研究センター 教育研修部長
研究所 臨床研究教育部 部長
総合診療部小児期診療科医長 血液内科医長

研究要旨

新生児血栓症(プロテイン C、プロテイン S およびアンチトロンビン異常症)を含む小児血栓症の全国調査成績を報告する。また、成育医療研究センターにおける 10 年間の小児血栓症の推移についても報告する。

A. 研究目的

小児において血栓症は少ないといわれ、その実態は長らく不明であった。近年、新生児や小児の集中治療の分野を中心に報告例が散見されるようになってきた。カナダ、オランダ、ドイツからはまとまった調査結果が報告されている。血栓症やその基礎となる栓友病の有病率は、FV Leiden が東アジアでは見られないように、人種によって異なっているとされている。わが国の新生児を含む小児全体の血栓症に関する診療体制の構築は、急務といえるが、実態はほとんど明らかになっていない。小児の血栓症に関する診療状況を把握して基礎資料を作成することを目的とする。

B. 研究方法

アンケート調査は 2006 年から 2010 年の 5 年間に発症した血栓症を対象にした。小児科学会研修指定病院の責任者 520 人、および小児血液学会、小児循環器学会、小児腎臓学会、小児リウマチ学会・小児神経学会の評議員 629 人に、アンケートを発送した。その結果、717 通が返送され、625 人と予想以上多くの小児血栓性疾患の患者の存在

が判明した。詳細な情報を得るためにさらに 198 通の二次アンケート調査を送付した。167 通が返送され、383 人が解析対象となった。

さらに、当院における 2002 年 3 月～2012 年 7 月の電子診療録から後方視的に検討した。

(倫理面への配慮)

当施設の倫理委員会の審査を経た上で、「疫学研究に関する倫理指針」を遵守して行った。調査に際し、対象施設の管理者宛に調査協力に関する説明書を送付して理解を図り、同意を得た。個人情報の保護のために、アンケートは匿名かつ連結不可能にした。結果は研究の目的に限定し、対象者の個人情報は一切公表しない。調査用紙は研究報告書が完成したら破棄する。

C. 研究結果

383 例の内訳は、先天性栓友病が 90 人、後天性の基礎疾患を持つ者が 293 人であった。このうち、成人例、誤診例、家族歴から診断されたものの血栓症がない者を除外した結果、339 人が最終的に解析対象となった。その内訳は、先天性栓友病が 63 人、後

天性の基礎疾患を持つ者が 276 人であった。男女比は 1.1:1 であった。年齢分布を図に示す。1 歳未満が 29% ともっとも多く見られた。血栓症が直接の死因であったのは 15 人であった。また、先天性栓友病の詳細を表に示す。また、後天性の基礎疾患としては、溶血性尿毒症症候群・血栓性血小板減少性紫斑病、先天性心疾患、中心静脈カテーテルが多く認められた。再発例は先天性栓友病では 63 人中 30 人、後天性の基礎疾患を持つ者では 276 人中 34 人と、先天性栓友病で有意に多く見られた ($p < 0.0001$)。

表. Congenital thrombophilia

	Total numbers (%)	M/F	Recurrent TE
Protein C	27 (43)	11/16	13
Protein S	9 (14)	4/5	6
ADAMTS13	9 (14)	4/5	3
Antithrombin	7 (11)	3/4	2
Others	11 (17)	4/7	6

当院単独の調査結果では、症例は 124 例 (男 61 例、女 63 例) であった。当院入院で診断されたのは観察期間中 40747 例の小児入院に対し 102 例であった。年齢は 0~19 歳 (中央値 3 歳) で 1 歳未満が最多で 28 例 (新生児 9 例) であった。図に示すように経年的に増加傾向であった ($p < 0.05$)。先天性血栓素因は 8 例で、プロテイン C 欠損症 3 例、プロテイン S 欠損症 3 例、先天性 HUS 1 例、鎌状赤血球症 1 例であった。後天性血栓症は、HUS/TTP 45 例、門脈血栓症 14 例、中心静脈カテーテル関連血栓症 14 例、脳梗塞 11 例、肺塞栓 7 例、四肢深部血栓症 7 例であった。

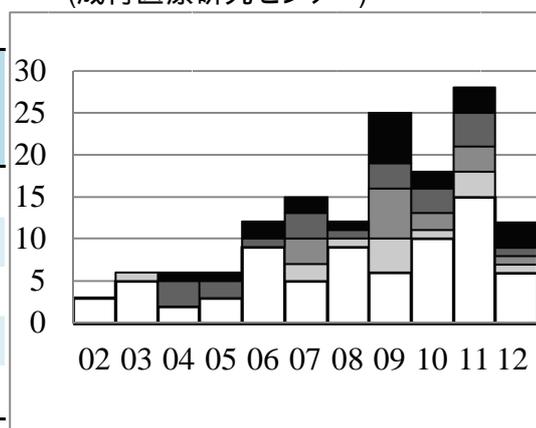
D. 考察

本研究はアジア人を対象にした初めての小児血栓症の包括的調査である。その結果、339 人の血栓症を発症した小児の存在が明らかになった。このうち新生児、乳児は 29%

を占めて最多であった。再発例は先天性栓友病では後天性の基礎疾患を持つ者に比較して有意に多く見られた。

新生児を含む小児の血栓症は、当初の予想以上に多く存在していることが明確に示された。死亡率や再発率が高いことから、今後、最適な予防法や治療法を開発する必要があると考えられる。他施設共同研究によって明らかにしてゆく必要がある。

図. Yearly change in patients diagnosed with thromboembolism (成育医療研究センター)



E. 結論

新生児を含む小児血栓症の全国調査成績に加えて成育医療研究センターにおける 10 年間の小児血栓症の推移について報告した。

F. 研究発表

- 論文発表
 - Takeda K, Kawai T, Nakazawa Y, Komuro H, Shoji K, Morita K, Katsuta T, Yamamoto M, Miyairi I, Ohya Y, Ishiguro A, Onodera M: Augmentation of antitubercular therapy with interferon- in a patient with dominant partial interferon-receptor 1 deficiency. Clin Immunol, (in press 2014)
 - 清水 武, 石黒 精, 高柳隆章, 松井猛彦, 利根川尚也, 前川貴伸, 板橋家頭夫: アデノウイルス胃腸炎とマイコプラズマ肺

- 炎に続発したループスアンチコアグラーント陽性・低プロトロンビン血症．日臨免誌（印刷中）
- 3) 一宮優子, 石黒 精, 中舘尚也, 前川貴伸, 藤田秀樹, 國島伸治, 阪井裕一: ロミプロスチムが慢性自己免疫性血小板減少症に奏功して開心術を施行し得た小児例．日小血がん誌（印刷中）
- 4) 石黒 精: 出血傾向・凝固障害．小児科研修ノート第2版, 診断と治療社, 東京（印刷中）
- 5) 石黒 精: ITP/血友病での急性出血．当直医のための小児救急ポケットマニュアル, 辻 聡, 小穴慎二, 石黒 精など(編), 中山書店, 東京（印刷中）
- 6) Nomura O, Hashimoto N, Ishiguro A, Miyasaka M, Nosaka S, Oana S, Sakai H, Takayama JI: Comparison of patients with retropharyngeal edema and patients with retropharyngeal abscess. Eur J Pediatr, Epub ahead of print DOI 10.1007/s00431-013-2179-0.
- 7) 藤井輝久, 天野景裕, 渥美達也, 石黒 精, 大平勝美, 岡本好司, 勝沼俊雄, 嶋 緑倫, 高橋芳右, 松下 正, 松本剛史, 森下英理子: 日本血栓止血学会, インヒビターのない血友病患者に対する止血治療ガイドライン: 2013年度版. 日本血栓止血誌 24(6): 619-639, 2013.
- 8) Ohga S, Ishiguro A, Takahashi Y, Shima M, Taki M, Kaneko M, Fukushima K, Kang D, Hara T, Japan Childhood Thrombophilia Study Group: Protein C deficiency as the major cause of thrombophilias in childhood. Pediatr Intern, 55(3): 267-271, 2013.
- 9) 小川千登世, 真部 淳, 小原 明, 石黒 精: 急性リンパ性白血病L-アスパラギナーゼ療法関連凝固異常に対する国内外の支持療法の現状．臨床血液, 54(3): 316-318, 2013.
- 10) 山本真梨子, 中舘尚也, 井口梅文, 益田博司, 阪井裕一, 石黒 精: 遺伝子組み換え第IX因子製剤の持続輸注による小児期血友病Bの開頭術周術期管理．臨床血液, 54(3): 300-304, 2013.
- 11) 石黒 精: 出血傾向．小児検査実践マニュアル, 松井 陽, 横谷 進, 石黒 精, 奥山虎之など(編), p62-64, 診断と治療社, 東京, 2013.
- 12) 生田泰久, 石黒 精: 血小板減少症．小児検査実践マニュアル, 松井 陽, 横谷 進, 石黒 精, 奥山虎之など(編), p269-272, 診断と治療社, 東京, 2013.
- 13) 千葉 剛, 石黒 精: 血栓症．小児検査実践マニュアル, 松井 陽, 横谷 進, 石黒 精, 奥山虎之など(編), p277-281, 診断と治療社, 東京, 2013.
- 14) Nomura O, Ishiguro A, Maekawa T, Nagai A, Kuroda T, Sakai H: Antibiotic administration can be an independent risk factor for therapeutic delay of pediatric acute appendicitis. Pediatr Emerg Care, 28(8): 792-795, 2012.
- 15) 余谷暢之, 石黒 精, 森 鉄也, 熊谷昌明, 師田信人, 宮坂実木子, 阪井裕一: ビタミン K 欠乏に伴う乳児頭蓋内出血症例の検討．日児誌, 116(7): 1102-1107, 2012.
- 16) Kemmotsu Y, Saji T, Kusunoki N, Tanaka N, Nishimura C, Ishiguro A, Kawai S: Serum adipocytokine profiles in Kawasaki disease. Mod Rheumatol, 22(1): 66-72, 2012.
- 17) 石黒 精: 免疫学からみた血友病におけるインヒビター発生と免疫寛容成立の機序．日小血・がん誌, 49(4): 489-494, 2012.
- 18) 石黒 精: 血友病かもしれない? - あなたならどうする．石黒 精, 嶋 緑倫, 瀧 正志, 中舘尚也, 真部 淳(編), はじめての血友病診療実践マニュアル, p7-13, 診断と治療社, 東京, 2012.

G . 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
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
「小児新生児期における遺伝性血栓症（プロテインC異常症を含む）
の効果的診断と治療予防法の確立に関する研究」
（課題番号 H24 - 難治等（難） - 一般 - 050）
研究代表者 大賀 正一

平成 24 年 6 月 12 日

関係各位

平成 24 年度 第 1 回 新生児血栓症研究班 班会議開催のご案内

標記について、下記のとおり会議を開催いたしますので、ご出席賜りますようお願いいたします。

記

日 時： 平成 24 年 6 月 30 日（土）13：30～

場 所： アスト津 4F 会議室 1

〒514-0009 三重県津市羽所町 700 TEL：059-222-4122
（津駅東口から徒歩 1 分）

<http://www.ust-tsu.jp/access/index.html>

プログラム： 1．新生児血栓症研究 ～経過と今後の計画～ 大賀正一
2．新生児 DIC の診断基準について 高橋幸博先生
3．その他

日本産婦人科・新生児血液学会に参加されない方は旅費を支給いたします。
ご不明な点がございましたら、下記事務局までお問い合わせ願います。

以上

ご出席予定（敬称略）： 石黒精 金子政時 白幡聡 高橋幸博 瀧正志
大賀正一 松永友佳（落合代）

【事務局】

〒812-8582 福岡市東区馬出 3-1-1
九州大学大学院周産期・小児医療学
担 当：古賀 章子
TEL：092-642-5421 FAX：092-642-5435
E-mail：a-koga@pediatr.med.kyushu-u.ac.jp

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業
「小児新生児期における遺伝性血栓症（プロテインC異常症を含む）
の効果的診断と治療予防法の確立に関する研究」
（課題番号 H24 - 難治等（難） - 一般 - 050）
研究代表者 大賀 正一

平成 25 年 6 月 4 日

関 係 各 位

平成 25 年度 第 1 回 小児新生児血栓症研究班（略称）

班会議プログラムのご案内

日 時： 平成 25 年 6 月 8 日（土）12：45～13：50

場 所： ホテル日航奈良 5 階「百合」の間

〒630-8122 奈良県奈良市三条本町 8-1 TEL 0742-35-8831

（JR 奈良駅西口直結）

<http://www.nikkonara.jp/>

- 内 容：
- 1．現在までの解析結果とスクリーニング法について
 - 2．症例呈示：胎児水頭症から診断された症例
 - 3．新生児 DIC と血栓症～その考え方～
 - 4．その他 今後の展開など

日本産婦人科・新生児血液学会終了直後（12:30）に、学会場東大寺総合文化センター1F
エントランスホール前にお集まり下さい。皆様で会場までご案内致します。
ご不明な点がございましたら、下記事務局までお問い合わせ願います。

ご出席予定（敬称略、順不同）：高橋幸博、嶋緑倫、白幡聡、西久保敏也、高橋大二郎、
大賀正一、市山正子（落合・福嶋代）

【事務局】

〒812-8582 福岡市東区馬出 3-1-1

九州大学大学院周産期・小児医療学

担 当：有川 美穂

TEL: 092-642-5421 FAX: 092-642-5435

E-mail: ari-miho @pediatr.med.kyushu-u.ac.jp

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業

「小児新生児期における遺伝性血栓症（プロテイン C 異常症を含む）
の効果的診断と治療予防法の確立に関する研究」
（課題番号 H24・難治等（難）・一般・050）

平成 25 年度 第 1 回 新生児血栓症研究班 班会議 議事録

・日時：平成 25 年 6 月 8 日（土） 12:45 - 13:50

・場所：ホテル日航奈良 5F「百合」の間 T630-8122 奈良市三条本町 8-1

・出席者（50 音順、敬称略、*分担協力・オブザーバー）

嶋緑倫、白幡聡*、高橋大二郎*、高橋幸博、西久保敏也*、市山正子、大賀正一

・報告および議事内容

1．新生児血栓症研究～現在までの解析結果とスクリーニング法について～大賀

本研究班は平成 25 年度の継続研究が認められ、診療ガイドラインの作成が求められている。小児期の年齢別 3 大因子活性の基準値と遺伝子解析結果を検討し、新生児乳児のプロテイン C 欠損症に頭蓋内病変が多いことを示した。プロテイン C 欠損症をスクリーニングするため、活性基準値の設定や PC/PS 活性比の有用性について検討中である。全国登録データベース拡充のため、主治医とのネットワークを構築する計画が承認された。さらなる症例集積とともに、各分担の先生に研究継続のご協力をお願いした。

2．胎児水頭症から診断された症例～市山

胎児水頭症で発症し、出生後脳静脈洞血栓症と診断された男児で、プロテイン C 活性低下、PC/PS 活性比の乖離より PROC 遺伝子のヘテロ接合と判明した症例を提示した。

3．新生児 DIC と血栓症について～高橋大二郎先生

高橋先生より新生児期 DIC の診断基準作成について提示された。基礎疾患の重要性を血栓傾向との関係から解説された。凝固検査値は他因子の影響も受けるため、体重別の診断基準の必要性が提唱された。過剰治療を避けるためにも、新生児の DIC スコアリングの確立と臨床への応用の必要性について再認識された。また DIC スコアリングは治療効果の指標にはなるが予後の指標にはならず、臓器障害のスコアリングなど予後の指標となる新しいスコアリングの必要性についても言及された。

文責 大賀、市山

2013 年 6 月 10 日作成

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
高橋幸博、 西久保敏也	新生児緊急搬送 ハンドブック	藤村正哲	新生児緊急搬送 ハンドブック	メディカ出版	大阪	2012	10
西久保敏也、 高橋幸博	輸血 (交換輸血を含む)	日本周産期・ 新生児医学界 教育・研修委 員会	周産期診療 ワークブック	Medical View	東京	2012	318-21
高橋幸博	播種性血管内凝固 症候群(DIC)	日本周産期・ 新生児医学界 教育・研修委 員会	周産期診療 ワークブック	Medical View	東京	2012	311-7
千葉 剛、石 黒 精	血栓症	松井 陽, 横谷 進, 石黒 精, 奥山虎之など (編)	小児検査実践 マニュアル	診断と治療社	東京	2012	印刷中
大賀正一	2. 「新生児血栓症」 エキスパートのため の産婦人科・新生児 領域の血液疾患診 療の手引き	板倉敦夫、細 野茂春、金井 誠		日本産婦人科 新生児 血液学会		2013	印刷中
石村匡崇、 大賀正一	血友病性偽腫瘍		血液症候群	日本臨牀社	東京	2013	555-6
土居岳彦、 大賀正一	Glanzmann 型 血小板無力症(タイ プ)		血液症候群	日本臨牀社	東京	2013	420-3
瀧本智仁、 大賀正一	タイプ 血小板無 力症		日本臨床別冊 「血液症候群」	日本臨牀社	東京	2013	424-8
大賀正一	小児科特集 3. 感染症と血液疾 患		感染症 Today		東京	2013	5-6
石黒 精	ITP/血友病での 急性出血	辻 聡, 小穴慎 二, 石黒 精な ど	当直医のための 小児救急ポケット マニュアル	中山書店	東京		印刷中
石黒 精	出血傾向・凝固障害	五十嵐 隆など	小児科研修ノー ト第2版	診断と治療社	東京		印刷中

田中康子 石黒 精	貧血	辻 聡,小穴慎 二,石黒 精な ど	当直医のための 小児救急ポケット マニュアル	中山書店	東京		印刷中
石黒 精	出血傾向	松井 陽,横谷 進,石黒 精, 奥山虎之など	小児検査実践 マニュアル	診断と治療社	東京	2013	Apr.62
生田泰久 石黒 精	血小板減少症	松井 陽,横谷 進,石黒 精, 奥山虎之など	小児検査実践 マニュアル	診断と治療社	東京	2013	269-72
千葉 剛 石黒 精	血栓症	松井 陽,横谷 進,石黒 精, 奥山虎之など	小児検査実践 マニュアル	診断と治療社	東京	2013	277-81
高橋幸博	ビタミン K	高橋尚人	小児科学 レクチャー	総合医学社	東京	2013	
高橋幸博	Hageman trait (第 XII 因子欠乏症)		血液症候群 その他の血液疾 患を含めて 第 2 版	日本臨床社	東京	2013	

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nanishi E, Ohga S, Doi T, Ishimura M, Ihara K, Takada H, Shima M, Hara T	Complete immunotolerance induction after FEIBA prophylaxis in a hemophilia A patient with high-titer inhibitor.	Haemophilia	18(3)	e75-7	2012
Shiraishi A, Hoshina T, Ihara K, Doi T, Ohga S, Hara T	Acute liver failure as the initial manifestation of Wilson disease triggered by human parvovirus B19 infection.	Pediatr Infect Dis J	31(1)	103-4	2012
Kitajima J, Inoue H, Ohga S, Kinjo T, Ochiai M, Yoshida T, Kusuhara K, Hara T	Differential transmission and postnatal outcome in triplets with congenital cytomegalovirus infection.	Pediatr Development Pathol	15(2)	151-5	2012
Doi M, Matsui H, Takeda Y, Saito Y, Takeda M, Matsunari Y, Nishio K, Shima M, Banno F, Akiyama M, Kokame K, Miyata T, Sugimoto M	ADAMTS13 safeguards the myocardium in a mouse model of acute myocardial infarction.	Thromb Haemost	108(6)	1236-8	2012

Dargaud Y, Sorensen B, Shima M, Hayward C, Srivastava A, Negrier C	Global haemostasis and point of care testing.	Haemophilia	Suppl 4	81-8	2012
Tanabe S, Yagi H, Kimura T, Isonishi A, Kato S, Yoshida Y, Hayakawa M, Matsumoto M, Ohtaki S, Takahashi Y, Fujimura Y	Two newborn-onset patients of Upshaw–Schulman syndrome with distinct subsequent clinical courses.	Int J Hematol	96(6)	789-97	2012
Fukushima K, Yumoto Y, Kondo Y, Fujita Y, Tsukimori K, Wake N	Moyamoya disease in the perinatal period: experience in 22 cases.	J Clin Neurosci	19(10)	1358-62	2012
Hidaka N, Yamanaka Y, Fujita Y, Fukushima K, Wake N	Clinical manifestations of pregnancy in patients with Takayasu arteritis: experience from a single tertiary center.	Arch Gynecol Obstet.	285(2)	377-85	2012
Fukushima K, Fujiwara A, Anami A, Fujita Y, Yumoto Y, Morokuma S, Wake N	Cervical length predicts placental adherence and massive hemorrhage in placenta previa.	J Obstet Gynaecol Res	38(1)	192-7	2012
Kaneko M, Sameshima H, Kai Katsuhide, Urabe H, Kodama Y, Ikenoue T	Mortality rates for extremely low-birthweight infants: A regional, population-based study in Japan during 2005-2009.	J Obstet Gynecol Res	38 (9)	1145-51	2012
Ohga S, Kang D, Kinjo T, Ochiai M, Doi T, Ishimura M, Kayamori Y, Urata M, Yamamoto J, Suenobu S, Kanegane H, Ikenoue T, Shirahata A, Hara T	Pediatric presentation and treatment of congenital protein C deficiency in Japan.	Haemophilia		in press	2013
Matsunaga Y, Ohga S, Kinjo T, Ochiai M, Fukumoto Y, Ito N, Doi T, Kang D, Hara T	Neonatal asphyxia and renal failure as the presentation of severe protein C deficiency.	J Perinatol		in press	2013
Takahashi D, Takahashi Y, Matsui M, Araki S, Kubo K, Sato H, Shirahata A	The evaluation of hypercoagulability using soluble fibrin monomer complex in sick newborns.	Pediatr Int		in press	2013
Yamamura K, Joo K, Ohga S, Nagata H, Ikeda K, Muneuchi J, Watanabe M, Hara T	Thrombocytosis in asplenia syndrome with congenital heart disease: a previously unrecognized risk factor for thromboembolism.	Int J Cardiol		in press	2013

Narazaki R, Makimura M, Sanefuji M, Fukamachi S, Akiyoshi H, So H, Yamamura K, Doizaki S, Kojima S, Ihara K, Hara T, Ohga S	Bilateral stenosis of carotid siphon in Hutchinson-Gilford progeria syndrome.	Brain Dev		in press	2013
Tsukimori K, Morokuma S, Hori T, Takahashi K, Hirata T, Otera Y, Fukushima K, Kawamoto T, Wake N	Characterization of placental transfer of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans and polychlorinated biphenyls in normal pregnancy.	J Obstet Gynaecol Res	39(1)	83-90	2013
Anami A, Fukushima K, Takasaki Y, Sumida T, Waguri M, Wake N, Murashima A	The predictive value of anti-SS-A antibodies titration in pregnant women with fetal congenital heart block.	Mod Rheumatol		in press	2013
Ohga S, Ishiguro A, Takahashi Y, Shima M, Taki M, Kaneko M, Fukushima K, Kang D, Hara T, on behalf of the Japan Childhood Thrombophilia Study Group.	Protein C deficiency as the major cause of thrombophilias in childhood.	Pediatr Int	55(3)	267-71	2013
Doi T, Ohga S, Ito N, Ishimura M, Suga N, Nomura A, Takada H, Matsumoto M, Fujimura Y, Hara T	Limited renal prophylaxis in regular plasmatherapy for heritable ADAMTS13 deficiency.	Pediatr Blood Cancer	60(9)	1557-8	2013
Hoshina T, Nakashima Y, Sato D, Nanishi E, Nishio H, Nakagata 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		in press	2013
Ochiai M, Kinjo T, Takahata Y, Iwayama M, Kenji I, Ohga S, Kotaro F, Wake N, Taguchi T, Hara T	Clinical outcome of extremely low birth weight infants born at GW22-26: a report from a single institution in Japan.	Neonatology	105(2)	79-84	2014
Nomura O, Hashimoto N, Ishiguro A, Miyasaka M, Nosaka S, Oana S, Sakai H, Takayama JI	Comparison of patients with Kawasaki disease with retropharyngeal edema and patients with retropharyngeal abscess.	Eur J Pediatr		in press	
Takeda K, Kawai T, Nakazawa Y, Komuro H, Shoji K, Morita K, Katsuta T, Yamamoto M, Miyairi I, Ohya Y, Ishiguro A, Onodera M	Augmentation of antitubercular therapy with interferon- γ in a patient with dominant partial interferon- γ receptor 1 deficiency.	Clin Immunol		in press	

Mamemoto K, Kubota M, Nahai A, Takahashi Y, Kamamoto T, Minowa H, Yasuhara H	Factors associated with exclusive breastfeeding in low birth weight infants at NICU discharge and the start of complementary feeding.	Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition		in press	2013
Matsumoto T, Nogami K, Shima M	Simultaneous measurement of thrombin and plasmin generation to assess the interplay between coagulation and fibrinolysis	Thromb Haemost	110(4)	761-8	2013
Shima M	Hemophilia world	Rinsho Ketsueki	54(8)	736-43	2013
Shima M, Thachil J, Nair SC, Srivastava A	Towards standardization of clot waveform analysis and recommendations for its clinical applications.	J Thromb Haemost	11(7)	1417-20	2013
Doi M, Sugimoto M, Matsui H, Matsunari Y, Shima M	Coagulation potential of immobilised factor VIII in flow-dependent fibrin generation on platelet surfaces.	Thromb Haemost	110(2)	316-22	2013
Sugita C, Yamashita A, Matsuura Y, Iwakiri T, Okuyama N, Matsuda S, Matsumoto T, Inoue O, Harada A, Kitazawa T, Hattori K, Shima M, Asada Y	Elevated plasma factor VIII enhances venous thrombus formation in rabbits:contribution of factor XI, von Willebrand factor and tissue factor.	Thromb Haemost	110(1)	62-75	2013
Yada K, Nogami K, Ogiwara K, Shima M	Activated prothrombin complex concentrate (APCC)-mediated activation of factor (F)VIII in mixtures of FVIII and APCC enhances hemostatic effectiveness.	J Thromb Haemost	11(5)	902-10	2013
Shima M	Hemophilia	Rinsho Ketsueki	54(2)	189-97	2013
大賀正一	エキスパートのための産婦人科・新生児領域の血液疾患診療の手引き「新生児血栓症」	日本産婦人科新生児血液学会			印刷中
大賀正一	小児期に発症する遺伝性血栓症～プロテインCの重要性～	日本小児科学会雑誌	117(10)	1538-44	2013

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)	25-2	2013
清水 武, 石黒 精, 高柳隆章, 松井猛彦, 利根川尚也, 前川貴伸, 板橋家頭夫	アデノウイルス胃腸炎とマイコプラズマ肺炎に続発したループスアンチコアグulant陽性・低プロトロンビン血症	日臨免誌			印刷中
一宮優子, 石黒 精, 中舘尚也, 前川貴伸, 藤田秀樹, 國島伸治, 阪井裕一	ロミプロスチムが慢性自己免疫性血小板減少症に奏功して開心術を施行し得た小児例	日小血・がん誌			印刷中
藤井輝久, 天野景裕, 渥美達也, 石黒 精, 大平勝美, 岡本好司, 勝沼俊雄, 嶋 緑倫, 高橋芳右, 松下 正, 松本剛史, 森下英理子	日本血栓止血学会, インヒビターのない血友病患者に対する止血治療ガイドライン:2013 年度版	日本血栓止血誌	24	619-39	2013
小川千登世, 真部 淳, 小原 明, 石黒精	急性リンパ性白血病 L-アスパラギナーゼ療法関連凝固異常に対する国内外の支持療法の現状	臨床血液	54	316-8	2013
山本真梨子, 中舘尚也, 井口梅文, 益田博司, 阪井裕一, 石黒 精	遺伝子組み換え第 IX 因子製剤の持続輸注による小児期血友病 B の開頭術周術期管理	臨床血液	54	300-4	2013
曾山奉教, 吉田秀人, 下村大樹, 高橋幸博	体外循環中のアルカレミア環境下の血球凝集塊に血小板凝集、血栓形成は関与するのか？	体外循環学会誌	40(1)	1-6	2013
松永 友佳, 山本 順子, 大賀 正一, 横田 千恵, 高橋 保彦, 末延 聡一, 浦田 美秩代, 栢森 裕三, 康 東天, 原 寿郎	臀部血管腫に伴う Kasabach-Merritt 症候群を疑われた新生児プロテイン C 欠損症の 1 例	日本小児皮膚科学会雑誌	31(1)	19-23	2012
高橋幸博, 楠田聡, 瀧 正志, 澤田健, 酒井道生, 西口富三, 遠藤文夫, 白幡聡	ビタミン K 欠乏性出血症の新規 PIVKA-II 検査法 ピブカルテストからデタミナー CL ピブカルテストに	日産婦新生児血学誌	22(1)	57-8	2012
高橋幸博	29. 血液凝固・線溶検査	Neonatal Care	秋季増刊	2439-53	2012
山下敦己, 瀧 正志	日常生活における管理・指導 凝固異常症(血友病、先天性血栓性疾患)	小児科臨床	65(4)	808-12	2012

曾山奉教,吉田秀人,下村大樹,高橋幸博	体外循環中のアルカレミア環境下の血球凝集塊に血小板凝集、血栓形成は関与するのか？	体外循環学会誌	40(1)	1-6	2013
余谷暢之,石黒 精,森 鉄也, 熊谷昌明,師田信人,宮坂実木子,阪井裕一	ビタミン K 欠乏に伴う乳児頭蓋内出血症例の検討	日児誌	116(7)	1102-7	2012
長江千愛,瀧 正志	播種性血管内凝固症候群(DIC)の治療	小児内科	53(8)	1067-75	2012