様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

# 科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　５ 年　 ５ 月 ２４ 日現在

機関番号：１４５０１
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2020～2022
課題番号：２０Ｋ０９６１９

研究課題名（和文）妊娠初期のプロテインS、プロテインC抗凝固因子の変動と産科異常との関連解析

研究課題名（英文）Analysis of the association between Protein S and Protein C anticoagulant factor levels in early pregnancy and obstetric abnormality.

研究代表者
出口　雅士（Deguchi, Masashi）
神戸大学・医学研究科・特命教授
研究者番号：５０４０３２９１

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,300,000円

研究成果の概要（和文）：各種プロテインS（PS）、プロテインC anticoagulant system活性の低下と各種妊娠合併症（流死産、34，35，36，37週未満の早産、胎児発育不全、妊娠高血圧症候群、胎児機能不全、羊水過少、常位胎盤早期早剥、血栓塞栓発症）との関連は認めなかったが。抗凝固療法のない例で総PS比活性低下は妊娠高血圧腎症のリスク因子であった。
流死産歴のある対象患者では抗凝固療法が行われている例が多く、流産歴、死産歴との関連を解析したところ、12週以降22週未満の流産歴と遊離プロテインS活性低下、22週以降の死産歴と総プロテインS活性低下および総プロテインS比活性低下が関連することが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義
総プロテインS（PS）比活性低下は非凝固療法女性で妊娠高血圧腎症の、総PS活性ないし比活性低下は 22週以降の死産の、遊離PS活性低下は12週以降22週未満の流産のリスク因子であることが判明した。海外での報告と異なり、本邦ではPSの低下は主に初期流産に関連するとの報告が多かったが、日本人においてもPS低下のある例では妊娠12週以降の流産、死産、妊娠高血圧腎症にも注意が必要であることが分かった。この結果は不育症女性の妊娠分娩管理において、初期流産だけでなく妊娠中期以降の産科異常にも注意して管理する必要があることを示したもので、不育症女性の生児獲得の向上に寄与する結果である。

研究成果の概要（英文）：There was no association between decreased activity of various protein S (PS) and protein C anticoagulant system activities and various pregnancy complications (miscarriage, preterm delivery at <34, 35, 36, or 37 weeks, fetal growth failure, gestational hypertension, fetal dysfunction, amniotic fluid deprivation, premature abruption of the normal placenta, and thromboembolism). However, there was association between low total PS activity/antigen ratio and preeclampsia in patients without anticoagulation therapy.
In the analysis of the association with history of miscarriage or stillbirth, we found that a history of miscarriage after 12 weeks was associated with lower free protein S activity, and a history of stillbirth after 22 weeks was associated with lower total protein S activity and lower total PS activity/antigen ratio.

研究分野：不育症

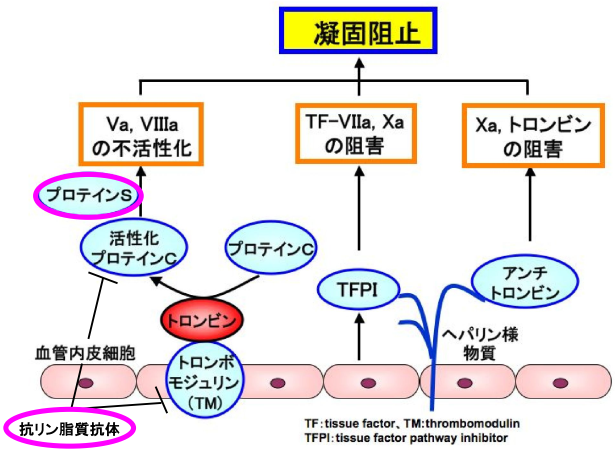
キーワード：プロテインS　不育症　産科異常

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９（共通）

## １．研究開始当初の背景

これまで抗リン脂質抗体が不育や胎児発育障害、妊娠高血圧などの産科合併症や流早産の原因となることが多々報告されている。近年、PS や第 XII 因子といった凝固阻止活性低下が不育症の原因となると報告され、凝固異常と産科合併症、不育症との関連が注目されるようになってきている。これまでは不育症患者に対して、遊離型 PS 抗原量または活性、PC 活性や、抗リン脂質抗体を個々に測定して評価を行ってきた。ところが実際にはこれらの抗凝固因子は右図のように相互に作用しあっており、個々の評価では病態を十分反映できず、実際の臨床の場では臨床像と合致しない場合も多々ある。




産科領域では PS 欠乏と妊娠中の血栓症発症や不育症との関連が注目されつつあるが、日本人では先天性 PS 欠乏症の頻度が 1.12%程度と高いことが知られている。ところが現在の遊離型 PS 抗原量または活性の測定系では日本人にみられる PS 欠損徳島型 (ヘテロ接合体で 16%の活性低下とされる) の同定は困難である。その原因として、遊離 PS だけでなく、C4b 結合蛋白と結合した PS も PC の補酵素活性を有することが知られてきたことが挙げられる。近年、C4b 結合蛋白と結合した PS を遊離型に変えた後に総 PS 活性を測定して PS 総抗原量との比 (総 PS 比活性) を測定する方法が開発されてきており、この方法により、より生理的な PS 活性を測定できる可能性がある。

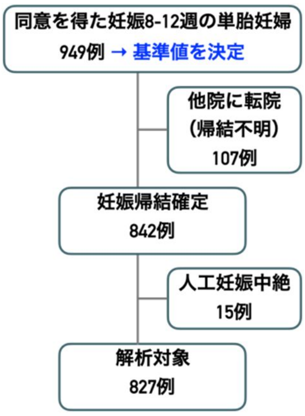
また、生理的に重要な血液凝固制御機構である PC 凝固制御系全体としての活性 (PC anticoagulant system 活性 : Thrombopas) を測定するキットも近年開発された。活性化 PC (APC) が抗凝固作用を発現するためには補酵素である PS が必須であり、この測定キットを用いることにより、PC のみならず、PS の異常も包括してより生理的にとらえ得る。さらに、抗リン脂質抗体による血栓形成機構は大きく分けて、血小板、血管内皮細胞、単球、血漿蛋白に対する作用、およびβ2GP-I（凝固第 X 因子抑制ファクター）活性の抑制などがあげられるが、抗リン脂質抗体には APC を抑制する作用があることも知られており、Thrombopas を調べることにより、今は実施が困難である抗リン脂質抗体の生理活性の定量的評価も合わせて行える可能性がある。

1) Sato Y et al. Res Pract Thromb Haemost. 2018; 2: 357-365.

## ２．研究の目的

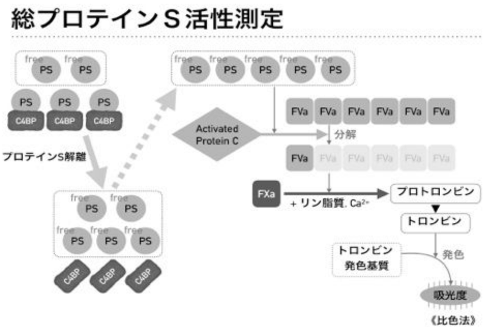
本研究の目的は、妊婦および不育症患者を対象とし、遊離 PS 抗原量と活性、D ダイマー、可溶性フィブリン（SF)、総 PS 抗原量、活性と比活性、Thrombopath を測定して血栓・産科合併症リスク評価を行い、新たな検査系である総 PS 比活性・PC 抗凝固活性が血栓・産科合併症リスク評価方法として従来の検査法より優れているかを明らかにし、臨床応用の道を開く。ただ、妊娠中の凝固制御は非妊時と大きく異なる恒常性となっているため、従来の遊離 PS 抗原量と活性も測定することで、多面的に妊娠中の抗凝固機構の低下の実態とその意義を把握し、それらの変化の異常が産科異常のリスク因子となるかどうかを解明し、抗凝固機構の異常を持つ妊婦に帯する新たな治療法を開発する上での基礎的な調査を行うことである。

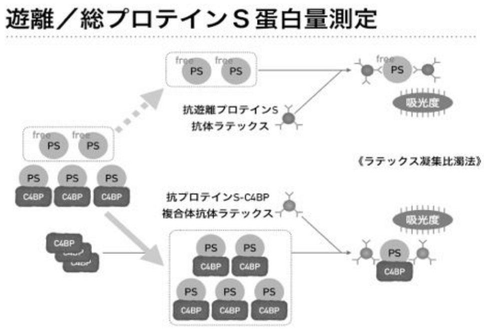
実際には。1.全妊婦対象の前向きコホート研究により、妊娠中の抗凝固機構の低下の実態ならびに妊娠初期の抗凝固機構異常と産科異常の発生の関連を調べ、妊娠初期の抗凝固機構の異常の臨床的意義を明らかにすること、および 2. 総 PS 抗原量・活性・比活性、Thrombopath といった（抗）凝固因子の検査値が妊娠中にどのように変化するかを明らかにすることを目的とした。

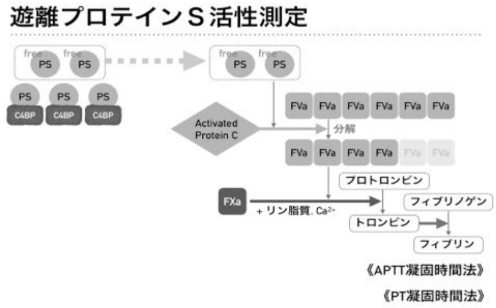



３．研究の方法

前向きコホート研究として、妊娠 8～12 週に 949 人の単胎妊婦から採血と測定を行なった（右図）。単胎妊婦全体の測定値から 1,5,10 パーセンタイルの基準値を決定した。研究での測定値に基づく介入を行わず（不妊、不育症でプロテイン S 低値やその他の凝固異常を指摘されたことがあれば、今回の採血結果にかかわらず、過去の結果に基づいて必要と考えられる介入は実施した）、他院転院等により妊娠帰結が不明であった 107 例を除外し妊娠期血斑命令は 842 例、人工妊娠中絶 15 例を除いた 827 例で、妊娠初期に測定した遊離プロテイン S 活性・蛋白量、近年開発された総プロテイン S 活性・蛋白量・比活性、Thrombopath の測定値と産科異常との関連を調べた。統計解析は、今回の素集団から求めた検査結果の基準値（1,5,10 パーセンタイル）未満と基準値以上で各産科合併症の発生に差があるかを Fisher ’s exact test で検定し、$p<0.05$ を有意とした。各種プロテイン S 測定の原理を下図に示す。




遊離プロテイン S 活性、遊離プロテイン S 蛋白量、Thrombopath は IL ジャパン社の試薬 HemosIL® Protein S Activity、free Protein S、Thrombopath を使用し、ACL-TOP 自動測定器（IL ジャパン）を用いて測定した。
総プロテイン S 活性，総プロテイン S 蛋白量，　総プロテイン S 比活性 = 総プロテイン S 活性/総プロテイン S 蛋白量についてはシノテスト、プロテイン S 比活性測定法によりシノテスト社に依頼して測定した。

４．研究成果

　今回の妊婦の測定結果から得られた妊娠初期の各計測値の基準値は下表の通りとなり、総 PS 活性、遊離 PS 抗原量・活性が妊娠初期から低下し、それに伴って総 PS 比活性も低下することが分かった。

| | 非妊時<br>基準値 | 中央値（範囲） | 10%ile | 5%ile | 1%ile |
|---|---|---|---|---|---|
| 遊離 PS | | | | | |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 活性 (%) | 63.5 | 47 (4.6-145) | 28 | 25 | 18 |
| 抗原 (%) | 54.7 | 40 (2.3-127) | 25 | 20 | 12 |
| 総 PS | | | | | |
| 活性 (%) | 74 | 71 (28-136) | 52 | 45 | 39 |
| 抗原 (%) | 74 | 71 (34-133) | 58 | 53 | 48 |
| 比活性 | 0.78 | 1.0 (0.48-1.8) | 0.81 | 0.77 | 0.59 |
| ThromboPath (%) | 81 | 82 (49-94) | 72 | 69 | 62 |

妊娠帰結確定 827 例の背景と帰結は以下に示すとおりで、妊娠合併症の発生頻度については大きく一般集団と異なるものはなかった

対象者の背景

年齢 34（16-45）歳

妊娠歴

妊娠* 2（1-10）回

出産 0（0-4）回

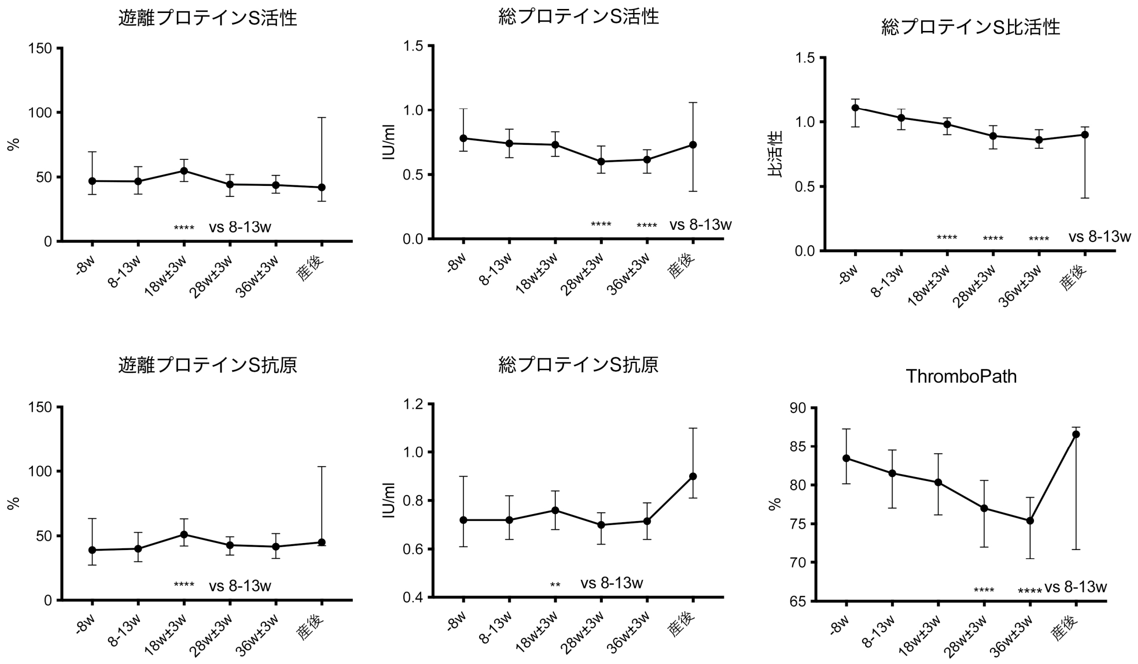
流産 0（0-8）回

死産 0（0-2）回

* 現在の妊娠を含む

| 帰結 | 例数 | | 合併症 | 例数 | |
|---|---|---|---|---|---|
| 生児獲得 | 798 | 96.5% | 34w未満早産 | 23 | 2.9% |
| | | | 37w未満早産 | 99 | 12.4% |
| | | | 胎児発育不全 | 80 | 10.0% |
| | | | 妊娠高血圧症候群 | 52 | 6.5% |
| | | | 妊娠高血圧腎症 | 25 | 3.1% |
| | | | 羊水過少 | 32 | 4.0% |
| | | | 胎児機能不全 | 90 | 11.3% |
| | | | UmApH < 7.2 | 33 | 4.1% |
| | | | 常位胎盤早期剥離 | 6 | 0.8% |
| | | | 血栓 | 2 | 0.3% |
| 初期流産 | 13 | 1.6% | | | |
| 中期流産 | 14 | 1.7% | | | |
| 死産 | 2 | 0.2% | | | |

妊娠初期、18，28，36 週の 4 回測定した 50 名の妊婦の検査値推移（中央値±25%ile，産後 1 ヶ月の測定は 3 例のみ）を下に示す。遊離プロテイン S は活性、抗原とも妊娠初期に既に 40%前後まで低下、18 週前後で少し増加しますが 28 週以降再び 40%前後に戻って経過し、原則として妊娠初期から大幅に低下し、以後低値が持続し、産後 1 ヶ月でも低値が続くことが分かります。総プロテイン S 活性は妊娠による減少は小さく、妊娠末期に向かって徐々に減少するのに対し、総プロテイン S 抗原量の妊娠中の変化は少ないため、総プロテイン S 比活性は妊娠末期に徐々に低下していくものの、大きく非妊時の基準値を下回ることはないことが分かります。プロテイン C 凝固制御系全体の活性（ThromboPath）は妊娠初期は基準値を下回ることは少ないものの、妊娠末期に向かって基準値以下まで低下していくものの、産後 1 ヶ月では妊娠前の値に回復することがうかがえます。ThromboPath の変化は出産に伴う止血機構の亢進という点では生理的変化を捉えているものと考えられます。妊娠に伴ってプロテイン C の活性は変化しないとされており、この変化には総プロテイン S 比活性の低下なども関与している可能性がある。




各種プロテイン S, ThromboPath (プロテイン C anticoagulant system 活性値)の 1,5,10%ile 未満と妊娠合併症

・12 週未満の流産
・12 週以降の流死産
・34, 35, 36, 37 週未満早産
・胎児発育不全（FGR）
・妊娠高血圧症候群（HDP)、妊娠高血圧腎症、早発型 HDP
・胎児機能不全（NRFS）
UmA pH<7.20
羊水過少
常位胎盤早期早剥
血栓塞栓発症

について検討を行ったが、各種プロテイン S, ThromboPath 値の低下はいずれの項目とも関連は認めなかった。827 例中 164 例で採血までに低用量アスピリンないしヘパリンの抗凝固療法が行われていたことから、抗凝固療法のない分娩例 640 例で検討すると総プロテイン S 比活性 10%ile 未満は妊娠高血圧腎症のリスク因子 [OR 3.7]（p<0.05）であることが判明した。

本研究では採血を実施するまでの流産例は対象とならないため、前向きの解析では妊娠初期の流産については十分に評価できないこと、過去に反復流産歴のある例や死産歴のある例では抗凝固療法が行われている例が多いため、流産歴、死産歴との関連についても解析を行った。12 週未満の流産歴と各種プロテイン S, ThromboPath 値の低下の関連は認めなかったが、12 週以降 22 週未満の流産歴と遊離プロテイン S 活性 10%ile 未満 [OR 2.5]（p<0.05)、22 週以降の死産歴と総プロテイン S 活性 5, 10%ile 未満 [OR 6.4, 3.5]（p<0.05）および総プロテイン S 比活性 5, 10%ile 未満 [OR 6.9, 4.9]（p<0.01）と関連することが判明した。また、妊娠歴のある女性では 遊離プロテイン S 蛋白量、総プロテイン S 蛋白量 5, 10%ile 未満が少なかった（p<0.05)。

以上より、
・総プロテイン S 比活性低下は非凝固療法例で、妊娠高血圧腎症
・総プロテイン S 活性 ないし比活性低下は 22 週以降の死産
・遊離プロテイン S 活性低下は 12 週以降 22 週未満の流産
のリスク因子であることが判明した。
また、ThromboPath (プロテイン C anticoagulant system 活性値)は妊娠合併症や流死産歴と関係しなかったことから、妊娠合併症との関連ではプロテイン C 凝固制御系全体の活性ではなく、プロテイン S の活性の変化の方が妊娠に与える影響が大きいことが判明した。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計4件（うち査読付論文　3件／うち国際共著　0件／うちオープンアクセス　2件）

| | |
|---|---|
| １．著者名<br>出口雅士 | ４．巻<br>73 |
| ２．論文標題<br>不育症と血栓性素因 | ５．発行年<br>2021年 |
| ３．雑誌名<br>産婦人科の進歩 | ６．最初と最後の頁<br>85-89 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>なし | 査読の有無<br>有 |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著<br>－ |

| | |
|---|---|
| １．著者名<br>Tanimura Kenji、Sasagawa Yuki、Deguchi Masashi、Arase Noriko、Arase Hisashi、Yamada Hideto | ４．巻<br>97511 |
| ２．論文標題<br>A Novel Autoantibody against β2-Glycoprotein I/HLA Class II Complexes in Antiphospholipid Syndrome | ５．発行年<br>2021年 |
| ３．雑誌名<br>IntechOpen | ６．最初と最後の頁<br>1-10 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.5772/intechopen.97511 | 査読の有無<br>有 |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著<br>－ |

| | |
|---|---|
| １．著者名<br>出口雅士 | ４．巻<br>74 |
| ２．論文標題<br>（臨床の広場）不育症と凝固検査 | ５．発行年<br>2021年 |
| ３．雑誌名<br>産婦人科の進歩 | ６．最初と最後の頁<br>85-89 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>なし | 査読の有無<br>有 |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著<br>－ |

| | |
|---|---|
| １．著者名<br>出口雅士、谷村憲司、蝦名康彦、山田秀人 | ４．巻<br>70 |
| ２．論文標題<br>不妊・不育症女性の合併症・併存疾患をどう扱う - 血栓性素因 | ５．発行年<br>2021年 |
| ３．雑誌名<br>産婦人科の実際 | ６．最初と最後の頁<br>in press |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>なし | 査読の有無<br>無 |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著<br>－ |

〔学会発表〕　計10件（うち招待講演　6件／うち国際学会　0件）

| |
|---|
| 1．発表者名<br>出口雅士 |
| 2．発表標題<br>不育症の管理 ー 最近の話題 |
| 3．学会等名<br>第6回新潟生殖医療研究会（招待講演） |
| 4．発表年<br>2023年 |

| |
|---|
| 1．発表者名<br>出口雅士 |
| 2．発表標題<br>不妊症と不育症 |
| 3．学会等名<br>2022年度神戸大学エキスパートメディカルスタッフ育成プログラム周産期医療コースフォーラム（招待講演） |
| 4．発表年<br>2023年 |

| |
|---|
| 1．発表者名<br>出口雅士 |
| 2．発表標題<br>助産師に求められるウィメンズヘルス - 不育症を理解する |
| 3．学会等名<br>神戸大学エキスパートメディカルスタッフ育成プログラム周産期医療コースフォーラム　神戸（WEB（招待講演） |
| 4．発表年<br>2021年 |

| |
|---|
| 1．発表者名<br>出口雅士 |
| 2．発表標題<br>プロテインS 低下と不育症、産科異常 |
| 3．学会等名<br>第73回日本産科婦人科学会学術講演会（招待講演） |
| 4．発表年<br>2021年 |

１．発表者名
Shi Y, Tanimura K, Sasagawa Y, Uchida A, Shirakawa T, Imafuku H, Deguchi M, Yamada

２．発表標題
Uterine endometrial microbiota in women with recurrent pregnancy loss

３．学会等名
第73回日本産科婦人科学会学術講演会

４．発表年
2021年

１．発表者名
Tanimura K, Sasagawa Y, Deguchi M, Saito S, Tsuda S, Nagamatsu T, Fujii T, Arase H, Yamada H

２．発表標題
Autoantibody against β2-glycoprotein I/HLA-DR complexes in women with adverse obstetric events

３．学会等名
第73回日本産科婦人科学会学術講演会

４．発表年
2021年

１．発表者名
施　　裕徳、谷村　憲司、内田　明子、白川　得朗、今福　仁美、出口　雅士、山田　秀人

２．発表標題
切迫流早産と不育症のマイクロビオータ解析のコホート研究

３．学会等名
第36回日本生殖免疫学会学術集会

４．発表年
2021年

１．発表者名
出口雅士

２．発表標題
プロテインS 低下と 不育症、産科異常

３．学会等名
第73回日本産科婦人科学会学術講演会（招待講演）

４．発表年
2021年

| |
|---|
| 1．発表者名<br>出口雅士 |
| 2．発表標題<br>プロテインS 低下と 不育症、産科異常 |
| 3．学会等名<br>第65回日本生殖医学会学術講演会（招待講演） |
| 4．発表年<br>2020年 |

| |
|---|
| 1．発表者名<br>安積麻帆、出口雅士、清水真帆、笹川勇樹、森實真由美、谷村憲司、山田秀人 |
| 2．発表標題<br>妊娠初期のプロテインS低値と産科異常との関連 |
| 3．学会等名<br>第142回近畿産科婦人科学会学術集会 |
| 4．発表年<br>2020年 |

〔図書〕　計5件

| | |
|---|---|
| 1．著者名<br>山田　秀人、出口　雅士 | 4．発行年<br>2020年 |
| 2．出版社<br>メジカルビュー社 | 5．総ページ数<br>7 |
| 3．書名<br>不育症 - 産科的抗リン脂質抗体症候群の診断,治療 | |

| | |
|---|---|
| 1．著者名<br>出口　雅士、山田　秀人 | 4．発行年<br>2020年 |
| 2．出版社<br>メジカルビュー社 | 5．総ページ数<br>5 |
| 3．書名<br>不育症 - 抗PS/PT抗体と不育症 | |

| 1．著者名<br>山田　秀人、出口　雅士 | 4．発行年<br>2020年 |
|---|---|
| 2．出版社<br>メジカルビュー社 | 5．総ページ数<br>5 |
| 3．書名<br>不育症 - 血栓性素因による不育症：総論 | |

| 1．著者名<br>出口　雅士、山田　秀人 | 4．発行年<br>2020年 |
|---|---|
| 2．出版社<br>メジカルビュー社 | 5．総ページ数<br>9 |
| 3．書名<br>不育症 - プロテインS低下症 | |

| 1．著者名<br>出口　雅士、山田　秀人 | 4．発行年<br>2020年 |
|---|---|
| 2．出版社<br>メジカルビュー社 | 5．総ページ数<br>4 |
| 3．書名<br>不育症 - プロテインC低下症 | |

〔産業財産権〕

〔その他〕

－

6．研究組織

| | 氏名<br>（ローマ字氏名）<br>（研究者番号） | 所属研究機関・部局・職<br>（機関番号） | 備考 |
|---|---|---|---|
| 研究分担者 | 山田　秀人<br>(Yamada Hideto)<br>(40220397) | 神戸大学・医学研究科・非常勤講師<br>(14501) | |
| 研究分担者 | 谷村　憲司<br>(Tanimura Kenji)<br>(80593988) | 神戸大学・医学部附属病院・准教授<br>(14501) | |

６．研究組織（つづき）

| | 氏名<br>（ローマ字氏名）<br>（研究者番号） | 所属研究機関・部局・職<br>（機関番号） | 備考 |
|---|---|---|---|
| 研究分担者 | 笹川　勇樹<br><br>(Sasagawa Yuki)<br><br>(40815304) | 神戸大学・医学部附属病院・助教<br><br>(14501) | |

７．科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕　計0件

８．本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---|---|