

オプレシビテート、濃縮フィブリノゲン製剤等を適切に使用することで、早期に止血を行い、赤血球製剤を含め全体の輸血量を減少させることが、患者の予後改善につながるとの報告が増加している。しかしながら、これらの報告はほとんどすべてが海外からの報告なので、本邦においても科学的根拠に基づいた患者予後改善を目的とした周術期輸血管理、止血管理の指針の策定が望まれる。

(宮田 茂樹)

謝辞：この論文の成果の一部は、平成22年度厚生労働科学研究費補助金「医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業」による。

文献

- 1) British Committee for Standards in Haematology, Blood Transfusion Task Force : Guidelines for the use of platelet transfusions. *Br J Haematol* 122 : 10-23, 2003
- 2) Ferraris VA, Ferraris SP, Saha SP, et al : Perioperative blood transfusion and blood conservation in cardiac surgery : the Society of Thoracic Surgeons and The Society of Cardiovascular Anesthesiologists clinical practice guideline. *Ann Thorac Surg* 83 : S27-86, 2007
- 3) Fang WC, Helm RE, Krieger KH, et al : Impact of minimum hematocrit during cardiopulmonary bypass on mortality in patients undergoing coronary artery surgery. *Circulation* 96 : II-194-199, 1997
- 4) DeFoe GR, Ross CS, Olmstead EM, et al : Lowest hematocrit on bypass and adverse outcomes associated with coronary artery bypass grafting. Northern New England Cardiovascular Disease Study Group. *Ann Thorac Surg* 71 : 769-776, 2001
- 5) Habib RH, Zacharias A, Schwann TA, Riordan CJ, Durham SJ, Shah A : Adverse effects of low hematocrit during cardiopulmonary bypass in the adult : should current practice be changed? *J Thorac Cardiovasc Surg* 125 : 1438-1450, 2003
- 6) Karkouti K, Wijeyesundera DN, Yau TM, McCluskey SA, van Rensburg A, Beattie WS : The influence of baseline hemoglobin concentration on tolerance of anemia in cardiac surgery. *Transfusion* 48 : 666-672, 2008
- 7) van Straten AH, Hamad MA, van Zundert AJ, Martens EJ, Schonberger JP, de Wolf AM : Preoperative hemoglobin level as a predictor of survival after coronary artery bypass grafting : a comparison with the matched general population. *Circulation* 120 : 118-125, 2009
- 8) Habib RH, Zacharias A, Schwann TA, et al : Role of hemodilutional anemia and transfusion during cardiopulmonary bypass in renal injury after coronary revascularization : implications on operative outcome. *Crit Care Med* 33 : 1749-1756, 2005
- 9) Engoren MC, Habib RH, Zacharias A, Schwann TA, Riordan CJ, Durham SJ : Effect of blood transfusion on long-term survival after cardiac operation. *Ann Thorac Surg* 74 : 1180-1186, 2002
- 10) Koch CG, Li L, Duncan AL, et al : Transfusion in coronary artery bypass grafting is associated with reduced long-term survival. *Ann Thorac Surg* 81 : 1650-1657, 2006
- 11) Murphy GJ, Reeves BC, Rogers CA, Rizvi SI, Culliford L, Angelini GD : Increased mortality, postoperative morbidity, and cost after red blood cell transfusion in patients having cardiac surgery. *Circulation* 116 : 2544-2552, 2007
- 12) Surgenor SD, Kramer RS, Olmstead EM, et al : The association of perioperative red blood cell transfusions and decreased long-term survival after cardiac surgery. *Anesth Analg* 108 : 1741-1746, 2009
- 13) Ho J, Sibbald WJ, Chin-Yee IH : Effects of storage on efficacy of red cell transfusion : when is it not safe? *Crit Care Med* 31 : S687-697, 2003
- 14) Koch CG, Li L, Sessler DI, et al : Duration of red-cell storage and complications after cardiac surgery. *N Engl J Med* 358 : 1229-1239, 2008
- 15) Weightman WM, Gibbs NM, Sheminant MR, Newman MA, Grey DE : Moderate exposure to

- allogeneic blood products is not associated with reduced long-term survival after surgery for coronary artery disease. *Anesthesiology* 111 : 327-333, 2009
- 16) Lelubre C, Piagnerelli M, Vincent JL : Association between duration of storage of transfused red blood cells and morbidity and mortality in adult patients: myth or reality? *Transfusion* 49 : 1384-1394, 2009
 - 17) Bracey AW, Radovancevic R, Riggs SA, et al : Lowering the hemoglobin threshold for transfusion in coronary artery bypass procedures : effect on patient outcome. *Transfusion* 39 : 1070-1077, 1999
 - 18) Spiess BD, Ley C, Body SC, et al : Hematocrit value on intensive care unit entry influences the frequency of Q-wave myocardial infarction after coronary artery bypass grafting. The Institutions of the Multicenter Study of Perioperative Ischemia (McSPI) Research Group. *J Thorac Cardiovasc Surg* 116 : 460-467, 1998
 - 19) Hardy JF, Martineau R, Couturier A, Belisle S, Cartier R, Carrier M : Influence of haemoglobin concentration after extracorporeal circulation on mortality and morbidity in patients undergoing cardiac surgery. *Br J Anaesth* 81 Suppl 1 : 38-45, 1998
 - 20) Despotis G, Eby C, Lublin DM : A review of transfusion risks and optimal management of perioperative bleeding with cardiac surgery. *Transfusion* 48 : 2S-30S, 2008
 - 21) Segal JB, Dzik WH : Paucity of studies to support that abnormal coagulation test results predict bleeding in the setting of invasive procedures : an evidence-based review. *Transfusion* 45 : 1413-1425, 2005
 - 22) Stanworth SJ, Brunskill SJ, Hyde CJ, McClelland DB, Murphy MF : Is fresh frozen plasma clinically effective? A systematic review of randomized controlled trials. *Br J Haematol* 126 : 139-152, 2004
 - 23) Casbard AC, Williamson LM, Murphy MF, Rege K, Johnson T : The role of prophylactic fresh frozen plasma in decreasing blood loss and correcting coagulopathy in cardiac surgery. A systematic review. *Anaesthesia* 59 : 550-558, 2004
 - 24) Solomon C, Pichlmaier U, Schoechl H, et al : Recovery of fibrinogen after administration of fibrinogen concentrate to patients with severe bleeding after cardiopulmonary bypass surgery. *Br J Anaesth* 104 : 555-562, 2010
 - 25) Sihler KC, Napolitano LM : Massive transfusion: new insights. *Chest* 136 : 1654-1667, 2009
 - 26) Ho AM, Karmakar MK, Dion PW : Are we giving enough coagulation factors during major trauma resuscitation? *Am J Surg* 190 : 479-484, 2005
 - 27) Ho AM, Dion PW, Cheng CA, et al : A mathematical model for fresh frozen plasma transfusion strategies during major trauma resuscitation with ongoing hemorrhage. *Can J Surg* 48 : 470-478, 2005
 - 28) Maegele M, Lefering R, Paffrath T, Tjardes T, Simanski C, Bouillon B : Red-blood-cell to plasma ratios transfused during massive transfusion are associated with mortality in severe multiple injury : a retrospective analysis from the Trauma Registry of the Deutsche Gesellschaft für Unfallchirurgie. *Vox Sang* 95 : 112-119, 2008
 - 29) Sperry JL, Ochoa JB, Gunn SR, et al : An FFP : PRBC transfusion ratio $\geq 1 : 1.5$ is associated with a lower risk of mortality after massive transfusion. *J Trauma* 65 : 986-993, 2008
 - 30) Johansson PI, Hansen MB, Sorensen H : Transfusion practice in massively bleeding patients : time for a change? *Vox Sang* 89 : 92-96, 2005
 - 31) Johansson PI, Stensballe J, Rosenberg I, Hilslov TL, Jorgensen L, Secher NH : Proactive administration of platelets and plasma for patients with a ruptured abdominal aortic aneurysm : evaluating a change in transfusion practice. *Transfusion* 47 : 593-598, 2007
 - 32) Warren O, Mandal K, Hadjianastassiou V, et al : Recombinant activated factor VII in cardiac surgery : a systematic review. *Ann Thorac Surg* 83 : 707-714, 2007
 - 33) Tritapepe L, De Santis V, Vitale D, et al : Recombinant activated factor VII for refractory bleeding after acute aortic dissection surgery : a propensity score analysis. *Crit Care Med* 35 : 1685-1690, 2007
 - 34) Zangrillo A, Mizzi A, Biondi-Zoccai G, et al : Recombinant activated factor VII in cardiac surgery : a meta-analysis. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 23 : 34-40, 2009
 - 35) Gill R, Herbertson M, Vuylsteke A, et al : Safety and efficacy of recombinant activated factor VII : a randomized placebo-controlled trial in the setting of bleeding after cardiac surgery. *Circulation* 120 : 21-27, 2009
 - 36) O'Connell KA, Wood JJ, Wise RP, Lozier JN, Braun MM : Thromboembolic adverse events after use of recombinant human coagulation factor VIIa. *JAMA* 295 : 293-298, 2006

Severe hemophilia A in a Japanese female caused by an *F8*-intron 22 inversion associated with skewed X chromosome inactivation

Yuhri Miyawaki · Atsuo Suzuki · Yuhta Fujimori · Akira Takagi ·
Takashi Murate · Nobuaki Suzuki · Akira Katsumi · Tomoki Naoe ·
Koji Yamamoto · Tadashi Matsushita · Junki Takamatsu · Tetsuhito Kojima

Received: 19 May 2010 / Revised: 12 July 2010 / Accepted: 28 July 2010 / Published online: 11 August 2010
© The Japanese Society of Hematology 2010

Hemophilia A is an X-linked recessive bleeding disorder with a worldwide prevalence of approximately 1 in 5,000 males. Hemophilia A is caused by a deficiency or functional defect in coagulation factor VIII (FVIII), and its clinical severity is inversely related to residual FVIII activity (FVIII:C). Patients with less than 1, 1–5, and 5–30% FVIII:C are classified as having severe, moderate, and mild hemophilia A, respectively [1]. The gene encoding FVIII (*F8*) is located in the most distal region of the long arm of the X chromosome (Xq28) and spans 186 kb [2]. The molecular basis underlying hemophilia A is well characterized, and various causative defects, such as point mutations, insertions, deletions and other genetic abnormalities, have been found in the *F8* gene of hemophilia A patients. Among them, a large genomic inversion

disrupting *F8* at intron 22 (*F8-int22* inversion) is found in about half of severe hemophilia A cases including Japanese [3–5], and an inversion at intron 1 (*F8-int1* inversion) is found in 1–5% of cases [6, 7].

Hemophilia A affects males, and is transmitted by heterozygous females who are denoted as carriers. They are usually asymptomatic, because their proportion of somatic cells with an inactivated normal X chromosome is approximately equal to the proportion with an inactivated mutated X chromosome [8]. However, there are several potential genetic mechanisms leading to the phenotypic expression of very low FVIII:C in female carriers as hemophiliacs. Thus, in rare cases, severe hemophilia A can occur in females homozygous (e.g., consanguinity) or compound heterozygous for mutations in *F8* [9, 10], through X chromosome abnormalities such as monosomy X (45 X, Turner syndrome), and due to skewed X inactivation in a heterozygous female carrier [11, 12]. In this study, we investigated the genetic mechanisms of *F8* defects to elucidate the molecular pathogenesis responsible for severe hemophilia A in a Japanese female. The study was approved by the Ethics Committee of the Nagoya University School of Medicine, and genomic DNA samples from all participants were isolated from peripheral leukocytes by phenol extraction as described previously [13], after informed consents were obtained.

The patient was a 21-year-old female and suffered from bleeding symptoms, such as easy bruising and joint swelling, since she was 2 years old. She was diagnosed as a severe hemophilia A (FVIII:C < 1% and FVIII:Ag < 5%), and received FVIII concentrates as replacement therapy. However, she had developed hemophilic arthropathy in her left elbow joint. Her elder brother suffered from similar bleeding symptoms and had also been diagnosed as a severe hemophilia A (FVIII:C < 1% and FVIII:Ag < 5%).

Y. Miyawaki · A. Suzuki · Y. Fujimori · A. Takagi ·
T. Murate · T. Kojima
Department of Pathophysiological Laboratory Sciences,
Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya, Japan

A. Takagi · T. Murate · T. Kojima (✉)
Department of Medical Technology,
Nagoya University School of Health Sciences,
1-1-20 Daiko-Minami, Higashi-ku,
Nagoya 461-8673, Japan
e-mail: kojima@met.nagoya-u.ac.jp

N. Suzuki · A. Katsumi · T. Naoe
Department of Hematology-Oncology,
Nagoya University Graduate School of Medicine,
Nagoya, Japan

K. Yamamoto · T. Matsushita
Division of Transfusion Medicine,
Nagoya University Hospital, Nagoya, Japan

J. Takamatsu
Aichi Red Cross Blood Center, Seto, Japan

The mother was a hemophiliac carrier (FVIII:C = 48% and FVIII:Ag = 61%). The levels of von Willebrand factor antigen and ristocetin cofactor activity in all family members tested including the patients were within the normal range. A DNA sample from the father was not available. Chromosomal analysis of the patient revealed a normal female 46, XX karyotype with no structural abnormalities (data not shown).

The pedigree of the patient's family is shown in Fig. 1. First, we analyzed inversions of *F8-int22* and *F8-int1* by the inverse shifting-polymerase chain reaction (IS-PCR) approach [14], and found that the patient was heterozygous for *F8-int22* inversion type I mutation (data not shown). We detected the same *F8-int22* inversion in her brother monozygously and in her mother heterozygously. These results indicated the *F8-int22* inversion found in the patient to be inherited from her mother. We also tested for the *F8-int22* inversion in their DNA by Southern blotting [15] as well as by single-tube long-distance PCR (LD-PCR) [6, 16], and obtained consistent results with the IS-PCR data (data not shown).

Female carriers with a heterozygous abnormal *F8* gene show generally about 50% of FVIII:C due to random inactivation of the X chromosomes with a rate equivalence. The patient was diagnosed as a hemophilia A carrier with the *F8-int22* inversion in terms of genotype, but with a severe hemophilia A phenotype. Because the skewed X chromosome inactivation in a heterozygous carrier is known to be a cause of X-linked recessive disorders in females [8], we

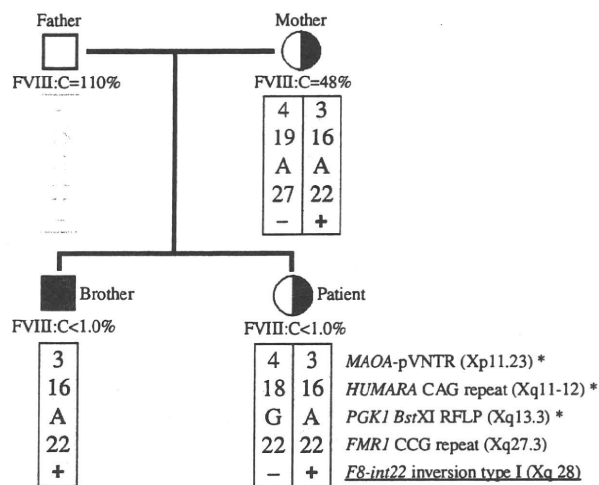


Fig. 1 Pedigree and X chromosome haplotypes of the family members. FVIII:C levels (%) were represented below the symbols. Haplotypes of the X chromosomes were shown in boxes, and represented the number of repeats, individual nucleotides, or presence/absence (+/-) of the mutation at each locus. A predicted haplotype of the father, for whom data were unavailable, was shown in bright gray. *Informative markers for the assessment of the X chromosome inactivation pattern of the patient

tried to examine the DNA methylation pattern at the heterozygous X-linked gene loci. First, we determined the chromosome haplotype of the family members, and found that three markers, the monoamine oxidase A gene (*MAOA*, Xp11.23) promoter VNTR (*MAOA-pVNTR*) [17], the human androgen receptor gene (*HUMARA*, Xq11-12) CAG repeat [18] and the phosphoglycerate kinase 1 gene (*PGK1*, Xq13.3) *Bst*XI polymorphism [19], were informative, but the fragile X mental retardation gene 1 (*FMR1*, Xq27.3) CGG repeat [20] was not (Fig. 1).

Among them, we assessed the DNA methylation pattern at *MAOA-pVNTR* as shown in Fig. 2. Since *Hpa*II cleaves non-methylated DNA in the active X chromosome, PCR amplification of the gene in DNA treated with *Hpa*II will fail. In the sample of the patient's brother having a single active X chromosome, PCR-amplified fragments appeared as a 210-bp band (3-repeats allele, lane 5), but disappeared on digestion of the template DNA with *Hpa*II (lane 6). The analysis of PCR-amplified fragments from the mother's DNA samples with or without digestion by *Hpa*II showed two distinct bands, a 4-repeats allele (240-bp) and a 3-repeats allele (210-bp) (lanes 3 and 4), suggesting that random X inactivation occurred in her somatic cells. In contrast, the DNA of the patient not digested with *Hpa*II gave two distinct bands (lane 1), a 4-repeats allele from the father (240-bp) and a 3-repeats allele from the mother (210-bp), but only the 240-bp band was observed on PCR amplification of the *Hpa*II-digested DNA sample (lane 2). Analysis of this pattern with NIH image version 1.62 revealed an extremely skewed inactivation of the paternally derived X chromosome containing a normal *F8* (ratio 99.5:0.5), fully consistent with the patient's severe hemophilia A phenotype. We also analyzed X chromosome inactivation patterns at the other two gene markers, the *HUMARA* CAG repeat and the *PGK1 Bst*XI polymorphism, and obtained similar findings with skewed inactivation rates (data not shown). Meanwhile, we analyzed the *F8* genomic sequence of the patient by PCR-mediated direct sequencing, and found no abnormality causing a FVIII deficiency (data not shown). Taken together, it was suggested that an extremely skewed inactivation toward the paternally derived X chromosome carrying a normal *F8* gene could occur in this female hemophilia A patient.

X chromosome inactivation is a process in mammals by which one of the two X chromosomes in female somatic cells is inactivated to eliminate differences between males and females in levels of expression of the genes on the X chromosome [21]. The determination of whether the maternally or paternally derived X chromosome is to be inactivated is random, and the inactive X chromosome is silenced by CpG hyper-methylation. X chromosome inactivation is regulated by the expression of the X-inactive-specific transcript gene (*XIST*) [22]. The *XIST* antisense

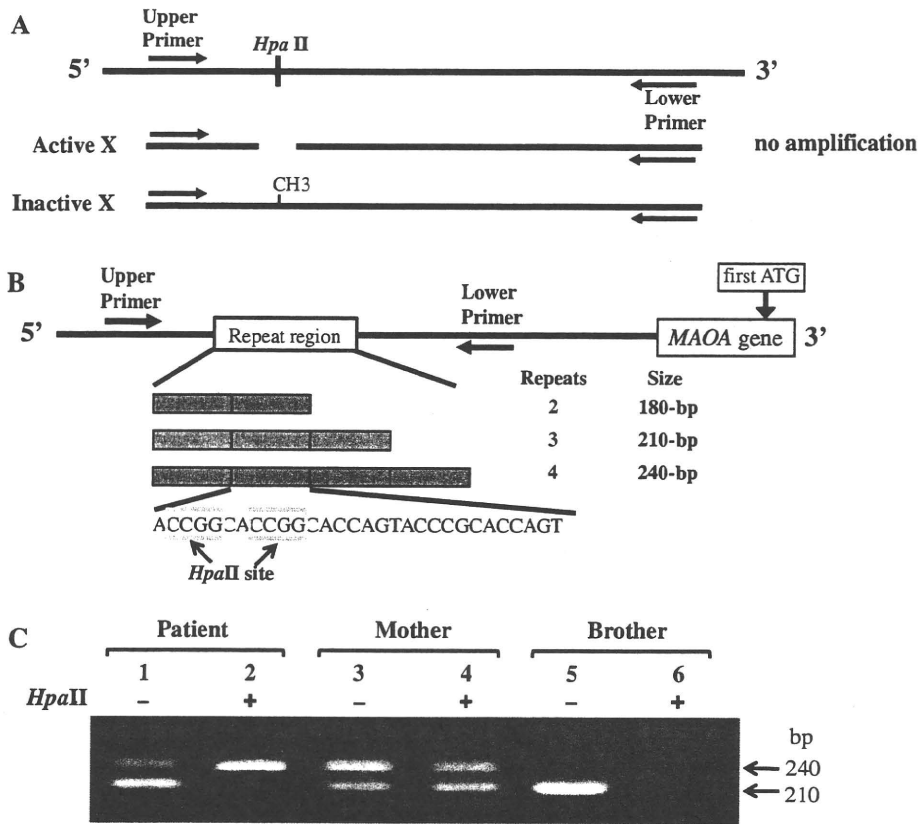


Fig. 2 Assessment of X chromosome inactivation at MAOA-pVNTR. **a** Scheme of methylation-sensitive HpaII-PCR amplification at MAOA-pVNTR. The symbol (≡) indicated a methylation site in the HpaII cleavage site of the gene. Since HpaII cleaves non-methylated DNA in the active X chromosome, PCR amplification of the HpaII-treated gene on the active X chromosome will fail. **b** Scheme of the MAOA gene and MAOA-pVNTR repeat sequence. Repeat structure, sequence of the repeat region, allele (repeat) numbers, and PCR

product sizes were shown. Solid arrows indicate a PCR primer set. **c** Methylation-sensitive HpaII-PCR patterns at MAOA-pVNTR. After digestion of the DNA with HpaII, PCR-mediated MAOA-pVNTR for the patient showed an extremely unbalanced amplification toward the paternal 4-repeats allele. Comparatively, that for the mother showed nearly equal levels of amplification for both alleles. +: HpaII-pre-digested DNA, -: undigested DNA

RNA (*TSIX*), which is an RNA gene and a negative regulator of *XIST*, is also related to this process [23]. A skewed X chromosome can occur as a result of chance, abnormalities in these factors, or selection that eliminates the normal X chromosome after X inactivation [8]. We did not elucidate the precise mechanisms responsible for the skewed X inactivation in this patient; however, it might be possible due to an aberration of these factors.

In conclusion, the maternally transmitted F8-int22 inversion and the extremely skewed inactivation of the paternally derived X chromosome carrying a normal F8 would cause the severe hemophilia A phenotype in this female patient, although the presence of other mutation cannot be excluded completely.

Acknowledgments The authors thank C. Wakamatsu for her expert technical assistance, and the members of the Kojima laboratory and Dr. H. Saito for helpful discussions. This study was supported in part by Grants-in-Aid from the Kitamura Memorial Foundation, the

Baxter Hemophilia Scientific Research & Education Fund (BHF) and the Japanese Ministry of Health, Labour and Welfare (Research on Measures for Intractable Diseases).

References

- White GC II, Rosendaal F, Aledort LM, Lusher JM, Rothschild C, Ingerslev J, et al. Definitions in hemophilia. Recommendation of the scientific subcommittee on factor VIII and factor IX of the scientific and standardization committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *Thromb Haemost.* 2001;85:560.
- Gitschier J, Wood WI, Goralka TM, Wion KL, Chen EY, Eaton DH, et al. Characterization of the human factor VIII gene. *Nature.* 1984;312:326–30.
- Lakich D, Kazazian HH, Antonarakis SE, Gitschier J. Inversions disrupting the factor VIII gene are a common cause of severe haemophilia A. *Nat Genet.* 1993;5:236–41.
- Naylor J, Brinke A, Hassock S, Green PM, Giannelli F. Characteristic mRNA abnormality found in half the patients with

- severe haemophilia A is due to large DNA inversions. *Hum Mol Genet.* 1993;2:1773–8.
5. Fukuda K, Naka H, Morichika S, Shibata M, Tanaka I, Shima M, et al. Inversions of the factor VIII gene in Japanese patients with severe hemophilia A. *Int J Hematol.* 2004;79:303–6.
 6. Bagnall RD, Waseem N, Green PM, Giannelli F. Recurrent inversion breaking intron 1 of the factor VIII gene is a frequent cause of severe hemophilia A. *Blood.* 2002;99:168–74.
 7. Cumming AM. The factor VIII gene intron 1 inversion mutation: prevalence in severe hemophilia A patients in the UK. *J Thromb Haemost.* 2004;2:205–6.
 8. Puck JM, Willard HF. X inactivation in females with X-linked disease. *N Engl J Med.* 1998;338:325–8.
 9. Cai X, Wang X, Dai J, Fang Y, Ding Q, Xie F, et al. Female hemophilia A heterozygous for a de novo frameshift and a novel missense mutation of factor VIII. *J Thromb Haemost.* 2006;4:1969–74.
 10. Windsor S, Lyng A, Taylor S, Ewenstein B, Neufeld E, Lillicrap D. Severe haemophilia A in a female resulting from two de novo factor VIII mutations. *Br J Haematol.* 1995;90:906–9.
 11. Favier R, Lavergne J-M, Costa J-M, Caron C, Mazurier C, Viemont M, et al. Unbalanced X-chromosome inactivation with a novel FVIII gene mutation resulting in severe hemophilia A in a female. *Blood.* 2000;96:4373–5.
 12. Valleix S, Vinciguerra C, Lavergne J-M, Leuer M, Delpéch M, Negrier C. Skewed X-chromosome inactivation in monozygotic diamniotic twin sisters results in severe and mild hemophilia A. *Blood.* 2002;100:3034–6.
 13. Kojima T, Tanimoto M, Kamiya T, Obata Y, Takahashi T, Ohno R, et al. Possible absence of common polymorphisms in coagulation factor IX gene in Japanese subjects. *Blood.* 1987;69:349–52.
 14. Rossetti L, Radic C, Larripa I, De Brasi C. Developing a new generation of tests for genotyping hemophilia-causative rearrangements involving *int22h* and *int1h* hotspots in the factor VIII gene. *J Thromb Haemost.* 2008;6:830–6.
 15. Sugihara T, Takahashi I, Kojima T, Okamoto Y, Yamamoto K, Kamiya T, et al. Identification of plasma antibody epitopes and gene abnormalities in Japanese hemophilia A patients with factor VIII inhibitor. *Nagoya J Med Sci.* 2000;63:25–39.
 16. Liu Q, Nozari G, Sommer SS. Single-tube polymerase chain reaction for rapid diagnosis of the inversion hotspot of mutation in hemophilia A. *Blood.* 1998;92:1458–9.
 17. Sabol SZ, Hu S, Hamer D. A functional polymorphism in the monoamine oxidase A gene promoter. *Hum Genet.* 1998;103:273–9.
 18. Allen RC, Zoghbi HY, Moseley AB, Rosenblatt HM, Belmont JW. Methylation of *HpaII* and *HhaI* sites near the polymorphic CAG repeat in the human androgen-receptor gene correlates with X chromosome inactivation. *Am J Hum Genet.* 1992;51:1229–39.
 19. Okumura K, Fujimori Y, Takagi A, Murate T, Ozeki M, Yamamoto K, et al. Skewed X chromosome inactivation in fraternal female twins results in moderately severe and mild haemophilia B. *Haemophilia.* 2008;14:1088–93.
 20. Lee S-T, McGlennen RC, Litz CE. Clonal determination by the fragile X (FMR1) and phosphoglycerate kinase (PGK) genes in hematological malignancies. *Cancer Res.* 1994;54:5212–6.
 21. Lyon M. Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). *Nature.* 1961;190:372–3.
 22. Hoki Y, Kimura N, Kanbayashi M, Amakawa Y, Ohhata T, Sasaki H, et al. A proximal conserved repeat in the Xist gene is essential as a genomic element for X-inactivation in mouse. *Development.* 2009;136:139–46.
 23. Lee J, Davidow LS, Warshawsky D. Tsix, a gene antisense to Xist at the X-inactivation centre. *Nat Genet.* 1999;21:400–4.



Regular Article

A novel splice site mutation in intron C of *PROS1* leads to markedly reduced mutant mRNA level, absence of thrombin-sensitive region, and impaired secretion and cofactor activity of mutant protein S[☆]

Hiromi Okada^{a,b,*}, Shinji Kunishima^a, Motohiro Hamaguchi^a, Akira Takagi^c, Koji Yamamoto^d, Junki Takamatsu^d, Tadashi Matsushita^e, Hidehiko Saito^f, Tetsuhito Kojima^c, Tomio Yamazaki^a

^a Department of Hemostasis and Thrombosis, Clinical Research Center, National Hospital Organization Nagoya Medical Center, 4-1-1 San-nomaru, Naka-ku, Nagoya 460-0001, Japan

^b Department of Educational Research Center for Clinical Pharmacy, Nagoya City University Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya, Japan

^c Department of Medical Technology, Nagoya University School of Health Sciences, Nagoya, Japan

^d Department of Transfusion Medicine, Nagoya University Hospital, Nagoya, Japan

^e Department of Hematology, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya Japan

^f Nagoya Central Hospital, Nagoya, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 August 2009

Received in revised form 21 October 2009

Accepted 26 November 2009

Available online 21 December 2009

Keywords:

PROS1
protein S
splice site mutation
thrombosis
secretion
APC cofactor activity

ABSTRACT

Protein S (PS) is a member of the vitamin K-dependent protein family containing similar γ -carboxyglutamic acid (Gla) domains, although only PS has a thrombin-sensitive region (TSR), which is located between the Gla domain and the first epidermal growth factor-like domain. In this study, a novel *PROS1* mutation was identified at the last nucleotide in intron C (c.260-1G>A) in a patient suffering from recurrent deep vein thrombosis associated with PS deficiency. To investigate the molecular mechanisms of PS deficiency caused by the novel *PROS1* mutation, we characterized the mutant mRNA, and the secretion and function of the mutant PS molecule associated with the mutation. RT-PCR was used to detect the aberrant mRNA in the patient's platelets, the amount of which was markedly reduced and lacked the region corresponding to exon 4 coding the TSR of the PS molecule. The recombinant mutant PS lacking the TSR (TSR-lack PS) showed a markedly reduced transient expression/secretion level, 37.9% of that of wild-type (WT) PS. Activated protein C (APC) cofactor activity assay showed that TSR-lack PS had no cofactor activity. Moreover, binding assays of monoclonal antibodies recognizing the PS Gla domain and the Gla residues indicated that the bindings of TSR-lack PS to both of these antibodies were clearly weaker than those of WT PS. These findings suggest that the novel mutation leading to the absence of the TSR not only affected the secretion of mutant PS, but was also responsible for impairment of the Gla domain conformation required for the γ -carboxylation to express APC cofactor activity.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

Protein S (PS) is one of the most important natural anticoagulants, as demonstrated by the fact that individuals with PS deficiency have

Abbreviations: PS, protein S; Gla, γ -carboxyglutamic acid; TSR, thrombin-sensitive region; WT, wild-type; APC, activated protein C; EGF, epidermal growth factor; DVT, deep vein thrombosis; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; moAb, monoclonal antibody.

[☆] A part of the data in this manuscript was presented at the 29th Congress of the Japanese Society on Thrombosis and Hemostasis, Utsunomiya, Japan, 18 November 2006, and the XX1st Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Geneva, Switzerland, 9 July 2007.

* Corresponding author. Present address: Department of Educational Research Center for Clinical Pharmacy, Nagoya City University Graduate School of Pharmaceutical Sciences, 3-1 Tanabe-dori, Mizuho-ku, Nagoya 467-8603, Japan. Tel.: +81 52 836 3624; fax: +81 52 836 3621.

E-mail address: okada@phar.nagoya-cu.ac.jp (H. Okada).

an increased risk of venous thrombosis [1]. PS enhances the activated protein C (APC)-dependent proteolytic inactivation of coagulation factor Va and factor VIIIa [2]. PS also exhibits APC-independent anticoagulant functions, probably through direct inhibition of both the prothrombinase and tenase complexes [3,4], and functions as a nonenzymatic cofactor for tissue factor pathway inhibitor in the inhibition of factor Xa [5–7]. Recently, model mice heterozygous for PS deficiency were generated and showed reduced PS plasma levels and APC cofactor activity in assays of plasma coagulation and thrombin generation [8]. It has also been reported that mice homozygous for PS deficiency were not obtained through mating and that the homozygous-recessive embryos died in utero, indicating the physiological importance of PS [8].

PS is a single-chain 635-amino-acid glycoprotein with a γ -carboxyglutamic acid (Gla) domain, a thrombin-sensitive region (TSR), four consecutive epidermal growth factor (EGF)-like domains, and a large domain homologous to the sex-hormone-binding

globulins. The Gla domain of PS is highly homologous to the Gla domains of other vitamin K-dependent coagulation factors and required to bind to the surface of negatively charged phospholipid membranes [9]. However, in contrast to other vitamin K-dependent factors, only PS has a unique module consisting of 29 residues, namely, the TSR, between the Gla domain and the EGF1 domain. The TSR is cleaved by thrombin at two sites (Arg-49 and Arg-70) and by factor Xa at Arg-60, resulting in functional inactivation of PS [10,11]. Although the physiological functions of the TSR are not yet fully understood, some studies have shown that the TSR is required for the PS Gla domain to bind to phospholipids [12]. These studies have also indicated that the TSR is not involved in direct interactions with phospholipids, but modulates phospholipid binding and the Gla domain conformation in a non-specific manner [13,14].

The PS gene, *PROS1* (GeneID: 5627), spans 101 kb of genomic DNA containing 15 exons and is transcribed into about 3.3 kb of mRNA. *PROS1* is located near the centromere of chromosome 3q11.1–11.2. To date, more than 200 mutations associated with PS deficiency in humans have been reported; however, only a few studies have investigated the molecular basis of the *PROS1* mutations responsible for PS deficiency. In the present study, we describe a novel splice site mutation in intron C of *PROS1* identified in a patient suffering from severe thrombotic complications associated with PS deficiency, and characterize the molecular effects of the mutation focusing on mutant mRNA levels, secretion of the mutant PS molecule, and the functional role of the TSR.

Materials and methods

Patient and blood samples

Patient

The patient is a Japanese man who had experienced episodes of recurrent deep vein thrombosis (DVT) in his legs since 45 years of age. Following pain in his left leg due to DVT at the age of 69, he was diagnosed with PS deficiency and has subsequently undergone continuous warfarin treatment. The PS levels in the patient's plasma showed total PS antigen, 30%; free PS antigen, 19%; and PS activity, <10% under warfarin therapy.

Blood samples

This study was approved by the ethics committee of the Nagoya University School of Medicine. Following the provision of informed consent, venous blood samples from the patient with PS deficiency as well as normal individuals were collected. No blood samples were available from members of the patient's family. Genomic DNA and total platelet RNA containing PS mRNA were isolated as previously described [15].

Analysis of PS DNA and mRNA in platelets

PCR amplification and sequencing of *PROS1* and PS mRNA was done essentially as described previously elsewhere [15,16].

Mutagenesis and construction of expression vectors

The expression vector pcDNA3 (Invitrogen, San Diego, CA, USA) carrying a full-length WT PS cDNA was generously provided by Dr B. Dahlbäck. Mutant PS cDNA lacking exon 4 was generated by recombinant PCR [17]. The mutant PS molecule was designated as TSR-lack PS in this study.

Quantification of PS expression/secretion by ELISA and pulse-chase analysis

Transient expression of recombinant PS molecules in COS-1 cells and measurement of PS antigen concentration in conditioned media

by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) were performed essentially following a previously described method [18,19]. Pulse-chase analysis of recombinant PS by radioactive labeling, immunoprecipitation, and electrophoresis were carried out as previously described [20].

Determination of APC cofactor activity of recombinant PS

In order to measure APC cofactor activity, we needed a large amount of recombinant PS. Thus, instead of transient transformants, we established stable transformants expressing recombinant PS molecules in HEK 293 cells as described previously [20]. The APC cofactor activity of recombinant PS was determined by a clotting-based assay as previously described [21].

Binding of the recombinant PS to monoclonal antibodies (moAbs)

Briefly, a microtiter plate was coated with two moAbs: moAb MK21 recognizing the PS Gla domain and moAb M3B recognizing the Gla residues (kindly provided by Dr B. Dahlbäck and Dr J. Stenflo, respectively) [22,23]. We also prepared a microtiter plate coated with anti-PS polyclonal antibody (DAKO, Glostrup, Denmark). For the binding assay, we prepared conditioned media containing recombinant PS molecules transiently expressed in COS-1 cells. Various concentrations of the recombinant PS were incubated in the coated plates with various antibodies overnight at 4 °C and bound proteins were detected by peroxidase-conjugated anti-PS polyclonal antibody (DAKO).

Results

Gene abnormalities in the patient

The DNA-PCR products of all 15 exons, including exon-intron boundaries, of *PROS1* in the patient were directly sequenced. A G-to-A substitution at the last nucleotide of intron C was identified in exon 4 of the DNA-PCR products. This novel mutation (c.260-1G>A) was found to be heterozygous in the patient. The same mutation was not found in the DNA samples of 114 healthy subjects (data not shown).

The total platelet RNA in the patient was tested for the presence of mutant PS mRNA. Using the primers shown in the legend to Fig. 1, the region including exon 4 was amplified by RT-PCR. An aberrant, small RT-PCR product was detected in addition to a band associated with the normal-sized product (404 bp) for the patient, but not for the controls (Fig. 1). Furthermore, the abnormal band showed a significantly lower intensity compared with the normal band. Each product was purified by gel electrophoresis and directly sequenced. The normal sized product showed only the WT sequence of *PROS1*; however, the sequence of the aberrant fragment completely lacked exon 4 (c.260_346del: p.Val87_Asn115del).

The expression/secretion of recombinant PS in COS-1 cells

The failure to transcribe exon 4 causes an in-frame deletion of 29 amino acids that constitute the TSR of the PS molecule. To address the effect of the absence of TSR in the mutant PS on its expression/secretion from cells, transient expression studies with COS-1 cells were performed and the culture media were analyzed for recombinant PS content. To accurately quantify these recombinant PS expression/secretion levels, the concentrations of recombinant PS in the culture media were measured by ELISA (Fig. 2A). The quantity of TSR-lack PS in the culture media was markedly reduced to 37.9% of that of WT PS.

Pulse-chase analysis was carried out to compare the secretion profile of TSR-lack PS with that of WT PS (Fig. 2B). The level of radiolabeled WT PS rapidly decreased in the cells with a half-life of 2

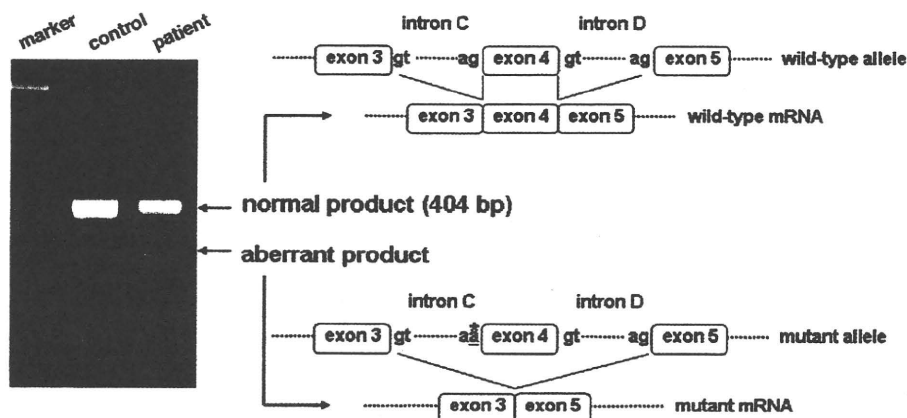


Fig. 1. Analysis of the PS mRNA of the patient with PS deficiency. Left: RT-PCR products amplified with the primer set (5'-AGGCTTCACAAGTCTGGTTAGGAAGCG-3' and 5'-CTTTGATTGAGATTATATCTGTAGCC-3') were subjected to electrophoresis on a 2% agarose gel and stained with ethidium bromide. Right: Schematic diagram indicates the mechanism causing the absence of exon 4 in the aberrant RT-PCR product of the patient induced by the G-to-A transition (*) at the splice site at -1 of exon 4 (c.260-1G>A). Raw sequencing data of the normal RT-PCR product and the aberrant RT-PCR product are not shown.

hours and immediately appeared in the culture media. In contrast, radiolabeled TSR-lack PS slowly disappeared from the cells, with a half-life of approximately 8 hours, and its rate of secretion into the culture media was lower than that of WT PS. Furthermore, the secretion efficiency, measured as the level of PS in the media at 8 hours, was significantly reduced for TSR-lack PS (40% of the initial value) compared with WT PS (70%). Taken together, these findings show not only that the secretion rate of TSR-lack PS is lower than that of WT PS, but also that the secretion efficiency of TSR-lack PS is lower.

APC cofactor activity

The APC cofactor activities of WT PS and TSR-lack PS were examined by a clotting-based assay using the serum-free culture media of the stable transformants. WT PS dose-dependently prolonged the clotting time (10–100 ng/ml), while TSR-lack PS showed no APC cofactor activity (Fig. 3).

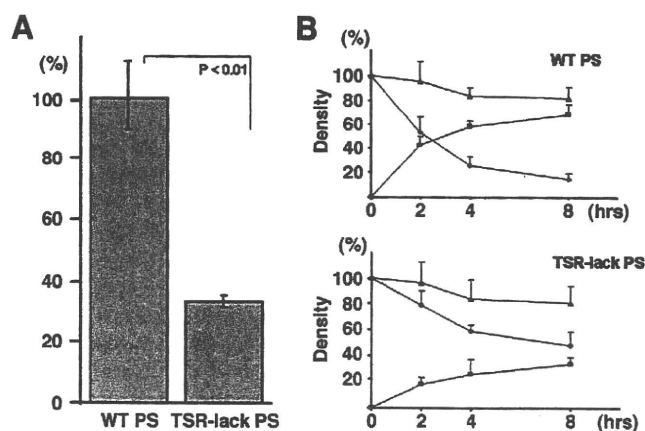


Fig. 2. Transient expression/secretion of WT PS and TSR-lack PS in COS-1 cells. (A) ELISA results of concentration of WT PS and TSR-lack PS. Mean value of WT PS is assigned as 100%. Values represent mean \pm SD of 6 transfection experiments for both WT PS and TSR-lack PS. Comparison between TSR-lack PS and WT PS expression levels was performed using unpaired t-test. (B) Pulse-chase analysis using transient expression in COS-1 cells. Radiolabeled media and cell lysates were immunoprecipitated and subjected to SDS-PAGE. The radioactivity of the PS bands on the dried gels was measured using an image analyzer. The amount of radioactive PS in the cell lysates at the beginning of the experiment is assigned a value of 100%. Graphs represent radioactivity recovered from cell lysates (\blacklozenge), media (\blacksquare), or the total (\blacktriangle) at each time point. Total radioactivity was calculated as the sum of radioactivities recovered from media and lysates. Values represent mean \pm SD of 3 (WT PS) or 4 (TSR-lack PS) independent experiments.

Binding of recombinant PS to moAbs recognizing the PS Gla domain and the Gla residues

Next, to identify the effect of the absence of the TSR in the PS molecule on its Gla domain conformation and γ -carboxylation, we performed moAbs binding assays using the serum-free culture media of transient transformants (Fig. 4). WT PS and TSR-lack PS showed similar binding to the anti-PS polyclonal antibody. In contrast, in the Ca^{2+} -dependent and conformation-dependent moAb MK21 (recognizing the PS Gla domain) binding assay, the binding of TSR-lack PS was weaker than that of WT PS, as described in previous reports [14]. In addition, the binding of TSR-lack PS to the moAb M3B (recognizing the Gla residues) was also clearly weaker than that of WT PS, suggesting that TSR-lack PS has impaired γ -carboxylation.

Discussion

In the present study, the DNA analysis of a patient with PS deficiency revealed a G-to-A transition at the last nucleotide of intron C of *PROS1* (c.260-1G>A). This novel point mutation abolishes the invariant AG dinucleotide in the acceptor splice site of intron C and

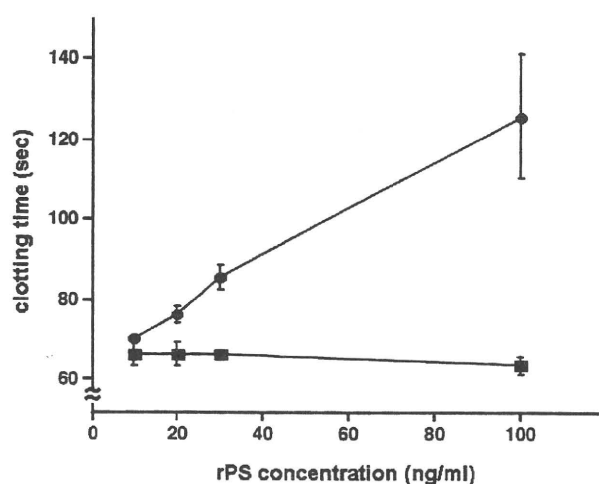


Fig. 3. APC cofactor activity of WT PS and TSR-lack PS. WT PS and TSR-lack PS at a range of concentrations (0–100 ng/mL) in serum-free media of stable transformants were incubated with PS-depleted plasma, factor Va, and APC for 2 min. Clotting was initiated by addition of CaCl_2 , and clotting time was measured using ST art4. Values represent mean \pm SD of 6 independent experiments. (\bullet) indicates WT PS; (\blacksquare), TSR-lack PS.

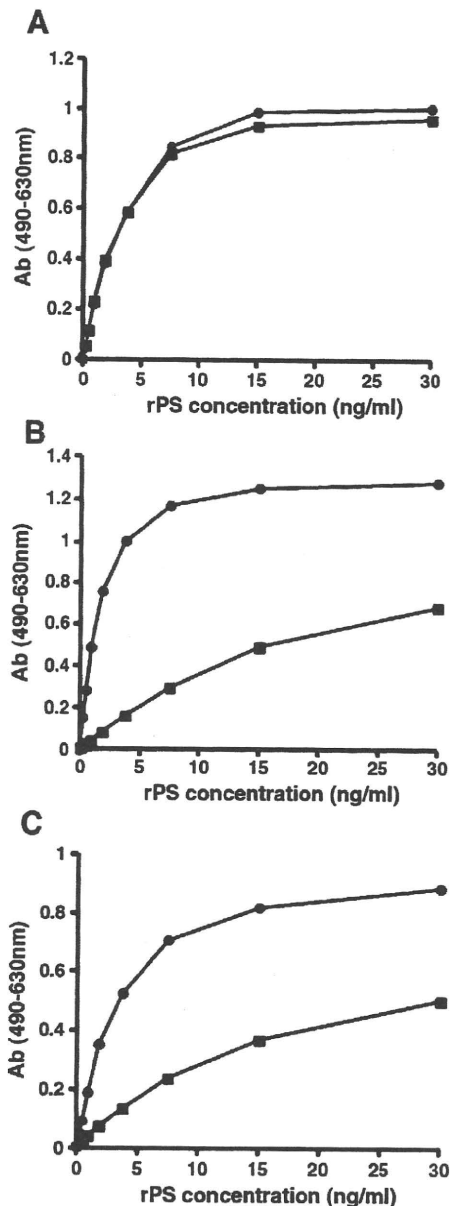


Fig. 4. Characterization of the Gla domain conformation and the γ -carboxylation of recombinant PS. The binding of WT PS (\bullet), and TSR-lack PS (\blacksquare) to polyclonal anti-PS antibody (A), moAb MK21 recognizing the PS Gla domain that is Ca^{2+} - and conformation-dependent (B), and the moAb M3B recognizing the Gla residues (C) in the culture media were measured by microtiter plate assay. The bound recombinant PS molecules were detected using peroxidase-conjugated anti-PS polyclonal antibody.

may subsequently induce cryptic splicing of the mutated mRNA [24]. Okamoto et al. reported that the region corresponding to exon 4 of *PROS1* containing a nonsense mutation (c.308C>G: p.Ser103X) was absent in mutant mRNA, and that the amount of the abnormal PS transcript was markedly reduced in a patient with a quantitative PS deficiency [25]. In fact, our RT-PCR analysis also revealed the presence of aberrant mRNA lacking a section corresponding to exon 4, the amount of which was markedly reduced in our patient. It was supposed that this splice site mutation affected the splicing of the aberrant pre-mRNA and impaired the mRNA processing efficiency, and possibly also the *in vivo* stability of the aberrant mRNA which could be lower than that of WT mRNA, resulting in the low mutant mRNA level [26]. It is apparent that the reduced mRNA level associated with the failed transcription of an exon caused by the splice site mutation is mainly responsible for the quantitative PS deficiency in our patient.

The failed transcription of exon 4 causes an in-frame deletion of 29 amino acids that constitute the TSR of the PS molecule (c.260_346del: p.Val87_Asn115del). The complete deletion of a domain as important as the TSR is expected to affect protein structure and function. To demonstrate the effect of the absence of the TSR in the PS molecule on its expression/secretion from cells, we carried out transient expression analysis using COS-1 cells. Measurement of the amount of protein secreted into the culture media by ELISA is useful for assessing the overall efficiency of the protein expression/secretion pathway because an ELISA result depends on the efficiency of every step of the expression/secretion pathway, including transcription, mRNA stability, translation, secretion, and protein stability in the culture medium. In addition, we performed pulse-chase analysis to focus on the steps from primary protein synthesis to secretion in the protein expression/secretion pathway. Our ELISA result showed that the amount of TSR-lack PS secreted into the culture medium was markedly reduced to 37.9% of that of WT PS, indicating that some steps in the protein expression/secretion pathway were impaired. Moreover, the data from pulse-chase analysis also showed that the secretion efficiency of TSR-lack PS was significantly lower than that of WT PS. Thus, it is considered that the absence of the TSR in the PS molecule leads to its impaired secretion, resulting in the quantitative PS deficiency similar to the missense mutations associated with quantitative PS deficiency reported previously [27]. The present study indicates that not only the decrease in the level of mutant mRNA, but also the impairment of mutant PS secretion, is responsible for the quantitative PS deficiency in the patient.

In some reports, the TSR of PS is described as being essential for APC cofactor activity, because the TSR is necessary to maintain the correct conformation of the PS Gla domain for its binding to membranes [12,13]. Our data clearly show that TSR-lack PS has no APC cofactor activity, in contrast to WT PS, in the clotting-based assay (Fig. 3). In addition, the binding assay of moAb MK21 recognizing the PS Gla domain showed that TSR-lack PS bound to MK21 with significantly lower affinity than WT PS, indicating that the Gla domain might be incorrectly folded in TSR-lack PS (Fig. 4B). Furie et al reported that the vitamin K-dependent proteins lack biological activity if γ -carboxylation is impaired [28]. We also demonstrated that the binding affinity of TSR-lack PS to the moAb M3B, which recognizes the Gla residues, was much lower than that of WT PS (Fig. 4C), indicating that the γ -carboxylation of TSR-lack PS was at least partially impaired. Therefore, it was speculated that the absence of the TSR affected the conformation of the γ -carboxylase-recognizing region near the Gla domain of the PS molecule, leading to partial impairment of the γ -carboxylation of TSR-lack PS. Our findings suggest that the TSR of PS might have an important role in maintaining the conformation of the Gla domain of PS required for its proper γ -carboxylation, and that the absence of the TSR might result in the loss of APC cofactor activity.

Unfortunately, we were unable to measure the levels of plasma PS before the patient started warfarin therapy, which makes it difficult to discuss the genotype-phenotype relationship in detail. However, our observations suggest that in our patient, the plasma antigen concentration of TSR-lack PS is very low because of the reduced mutant mRNA level and the impaired secretion of TSR-lack PS. Furthermore, even though a small amount of TSR-lack PS was identified in the plasma, it is expected to be inactive as an APC cofactor. Thus, we consider that the patient would have low plasma PS antigen and activity levels even if he had not undergone the warfarin treatment. In this study, we identified a novel splice site mutation in *PROS1* leading to a reduced mutant mRNA level and the absence of the TSR in the mutant PS molecule. We also characterized the mutant TSR-lack PS molecule to investigate the molecular effects of the mutation. These molecular approaches could contribute to a greater understanding of the relationship between the genetic mutation and clinical phenotypes.

Conflict of interest statement

The authors declare that they do not have conflict of interest with respect to this manuscript.

Acknowledgements

We wish to thank C. Wakamatsu for her expert technical assistance. This study was supported in part by Grants-in-Aid from the Japanese Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology (17590490) and the Japanese Ministry of Health, Labor and Welfare (Research on Measures for Intractable Diseases).

References

- [1] Makris M, Leach M, Beauchamp NJ, Daly ME, Cooper PC, Hampton KK, Bayliss P, Peake IR, Miller GJ, Preston FE. Genetic analysis, phenotypic diagnosis, and risk of venous thrombosis in families with inherited deficiencies of protein S. *Blood* 2000;95:1935–41.
- [2] Dahlbäck B. Protein S and C4b-binding protein: components involved in the regulation of the protein C anticoagulant system. *Thromb Haemost* 1991;66:49–61.
- [3] Hackeng TM, van 't Veer C, Meijers JC, Bouma BN. Human protein S inhibits prothrombinase complex activity on endothelial cells and platelets via direct interactions with factors Va and Xa. *J Biol Chem* 1994;269:21051–8.
- [4] Koppelman SJ, Hackeng TM, Sixma JJ, Bouma BN. Inhibition of the intrinsic factor X activating complex by protein S: evidence for a specific binding of protein S to factor VIII. *Blood* 1995;86:1062–71.
- [5] Hackeng TM, Sere KM, Tans G, Rosing J. Protein S stimulates inhibition of the tissue factor pathway by tissue factor pathway inhibitor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:3106–11.
- [6] Rosing J, Maurissen LF Tchaikovski SN, Tans G, Hackeng TM. Protein S is a cofactor for tissue factor pathway inhibitor. *Thromb Res* 2008(SV):60–3.
- [7] Ndonwi M, Broze Jr G. Protein S enhances the tissue factor pathway inhibitor inhibition of factor Xa but not its inhibition of factor VIIa-tissue factor. *J Thromb Haemost* 2008;6:1044–6.
- [8] Saller F, Brisset AC, Tchaikovski SN, Azevedo M, Chrast R, Fernandez JA, Schapira M, Hackeng TM, Griffin JH and Angelillo-Scherrer A. Generation and phenotypic analysis of protein S-deficient mice. *Blood*. In Press 2009.
- [9] Walker FJ. Regulation of activated protein C by protein S. The role of phospholipid in factor Va inactivation. *J Biol Chem* 1981;256:11128–31.
- [10] Lu D, Xie RL, Rydzewski A, Long GL. The effect of N-linked glycosylation on molecular weight, thrombin cleavage, and functional activity of human protein S. *Thromb Haemost* 1997;77:1156–63.
- [11] Long GL, Lu D, Xie RL, Kalafatis M. Human protein S cleavage and inactivation by coagulation factor Xa. *J Biol Chem* 1998;273:11521–6.
- [12] Borgel D, Gaussem P, Garbay C, Bachelot-Loza C, Kaabache T, Liu WQ, Brohard-Bohn B, Le Bonniec B, Aiach M, Gandrille S. Implication of protein S thrombin-sensitive region with membrane binding via conformational changes in the gamma-carboxyglutamic acid-rich domain. *Biochem J* 2001;360:499–506.
- [13] Saller F, Villoutreix BO, Amelot A, Kaabache T, Le Bonniec BF, Aiach M, Gandrille S, Borgel D. The gamma-carboxyglutamic acid domain of anticoagulant protein S is involved in activated protein C cofactor activity, independently of phospholipid binding. *Blood* 2005;105:122–30.
- [14] Saller F, Kaabache T, Aiach M, Gandrille S, Borgel D. The protein S thrombin-sensitive region modulates phospholipid binding and the gamma-carboxyglutamic acid-rich (Gla) domain conformation in a non-specific manner. *J Thromb Haemost* 2006;4:704–6.
- [15] Yamazaki T, Hamaguchi M, Katsumi A, Kagami K, Kojima T, Takamatsu J, Saito H. A quantitative protein S deficiency associated with a novel nonsense mutation and markedly reduced levels of mutated mRNA. *Thromb Haemost* 1995;74:590–5.
- [16] Iwaki T, Mastushita T, Kobayashi T, Yamamoto Y, Nomura Y, Kagami K, Nakayama T, Sugiura I, Kojima T, Takamatsu J, Kanayama N, Saito H. DNA sequence analysis of protein S deficiency identification of four point mutations in twelve Japanese subjects. *Semin Thromb Hemost* 2001;27:155–60.
- [17] Higuchi R. Recombinant PCR. In: innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, editors. *PCR Protocols*. San Diego, CA: Academic Press; 1990. p. 177–83.
- [18] Whitt M, Buonocore L, Rose JK. Liposome-mediated transfection. *Curr Protoc Immunol* 2001 Chapter 10:Unit 10 6.
- [19] Espinosa-Parrilla Y, Yamazaki T, Sala N, Dahlbäck B, Garcia de Frutos P. Protein S secretion differences of missense mutants account for phenotypic heterogeneity. *Blood* 2000;95:173–9.
- [20] Giri TK, Garcia de Frutos P, Yamazaki T, Villoutreix BO, Dahlbäck B. In vitro characterization of two naturally occurring mutations in the thrombin-sensitive region of anticoagulant protein S. *Thromb Haemost* 1999;82:1627–33.
- [21] Okada H, Yamazaki T, Takagi A, Murate T, Yamamoto K, Takamatsu J, Matsushita T, Naoe T, Kunishima S, Hamaguchi M, Saito H, Kojima T. In vitro characterization of missense mutations associated with quantitative protein S deficiency. *J Thromb Haemost* 2006;4:2003–9.
- [22] Brown MA, Stenberg LM, Persson U, Stenflo J. Identification and purification of vitamin K-dependent proteins and peptides with monoclonal antibodies specific for gamma-carboxyglutamyl (Gla) residues. *J Biol Chem* 2000;275:19795–802.
- [23] Dahlbäck B, Hildebrand B, Malm J. Characterization of functionally important domains in human vitamin K-dependent protein S using monoclonal antibodies. *J Biol Chem* 1990;265:8127–35.
- [24] Cooper DN. Human gene mutations affecting RNA processing and translation. *Ann Med* 1993;25:11–7.
- [25] Okamoto Y, Yamazaki T, Katsumi A, Kojima T, Takamatsu J, Nishida M, Saito H. A novel nonsense mutation associated with an exon skipping in a patient with hereditary protein S deficiency type I. *Thromb Haemost* 1996;75:877–82.
- [26] Wang GS, Cooper TA. Splicing in disease: disruption of the splicing code and the decoding machinery. *Nature Rev Genet* 2007;8:749–61.
- [27] Okada H, Takagi A, Murate T, Adachi T, Yamamoto K, Matsushita T, Takamatsu J, Sugita K, Sugimoto M, Yoshioka A, Yamazaki T, Saito H, Kojima T. Identification of protein S alpha gene mutations including four novel mutations in eight unrelated patients with protein S deficiency. *Br J Haematol* 2004;126:219–25.
- [28] Furie B, Bouchard BA, Furie BC. Vitamin K-dependent biosynthesis of gamma-carboxyglutamic acid. *Blood* 1999;93:1798–808.

大量出血時の病態と輸血療法

—フィブリノゲン濃縮製剤投与の有用性

Pathomechanisms of coagulopathy in massive bleeding and fibrinogen concentrate substitution therapy



高松純樹

Junki TAKAMATSU

愛知県赤十字血液センター

◎生体で認められる出血には、主として血管の破綻による物理的出血(局所出血)と、止血に関する血液成分の異常のために起こる全身性出血傾向による。したがってそれに対する対応としては、物理的出血では局所処置(局所止血)が第一義的であり、いくら血小板や血漿製剤に投与を行っても止血はできない。一方、その出血の原因が止血に関する血小板、凝固因子およびその制御因子などの欠乏または機能異常による場合には、適切な検査を参考にして欠乏あるいは機能異常を呈している成分(ときには複数)の十分な補充が必要である。とくに術中の大量出血時では凝固因子、血小板の漏出、消費、枯渇が惹起され、さらに大量出血という悪循環に陥る。なかでもフィブリノゲンは凝固系の最終的な基質でありながら、もっとも早期に止血レベル以下に減少することから、もっとも早期でかつ十分な補充療法が求められる。



大量出血、凝固障害、フィブリノゲン製剤、フィブリノゲン欠乏症、輸血療法

24 時間以内に循環血液量あるいはそれを超える出血を大量出血と定義しているが、これらの原因となるのは外傷、消化管出血、心臓血管外科手術(とくに胸部大血管手術)、悪性腫瘍(とくに肝胆道系腫瘍)、さらには産科的疾患が含まれている。医療施設によってはこれらに加えて肝移植術がその原因としてあげられ、名古屋大学では 2005～2006 年には平均 50 単位の赤血球輸血が行われていた。本稿では、このような大量出血時の輸血療法について述べる。

大量出血の病態生理

大量出血時においては、血小板数の減少、機能異常や凝固異常がしばしば認められ、その発症については以下に述べるいくつかの要因が考えられている。

その第 1 は、大量出血時には多くの凝固因子が喪失・消費され、その結果として止血に必要な凝固因子や、ときには血小板までが枯渇する状態となる。それに対して輸血される全血製剤あるいは

サイドメモ 1

止血系におけるフィブリノゲンの役割とその病態

フィブリノゲンは肝で産生される分子量約 34 万の血漿糖蛋白質で、止血系における最終基質である。さらに、フィブリノゲンは血小板凝集に必須の蛋白であり、さらに妊娠、とくに着床および胎児生育にとって必須である。病的状態では先天性無・低フィブリノゲン血症患者は終生の出血傾向を有する。一方、後天性低フィブリノゲン血症は本稿でのべる大量出血時以外にも肝障害患者のような産生障害あるいは線溶亢進によって起こる。線溶亢進状態には、全身性の凝固反応なしで起こる一次線溶と、血管内凝固症候群(DIC)のような二次線溶がある。前者では血栓溶解療法、あるいはある種の悪性腫瘍や肝障害でみられる。いかなる原因であれ、DIC では二次線溶を惹起するが、頭部外傷、前置胎盤、大動脈瘤破裂あるいは急性前骨髄性白血病などではさらに線溶亢進状態がみられる。このようにフィブリノゲンは種々の生理的役割を担うとともに、欠乏状態では不断の出血の原因となる。

赤血球濃厚液では血小板や凝固因子が十分含有されていないために、赤血球の補充のみで結果的に血小板、凝固因子あるいはその両方が欠乏し、希釈性の凝固障害が引き起こされることとなる。血小板についていえば、24時間以上冷蔵保存された全血製剤、濃厚赤血球製剤中には機能を有した血小板は存在していない。全血製剤では多くの凝固因子は比較的よく保たれているが、第Ⅷ、第Ⅴ因子は4°Cで21日保存されるとすると、活性はそれぞれ5%、35%と、著しい低下がみられる。赤血球濃厚液においては血漿成分の含有はほとんどない。

ブタを用いた動物実験モデルにおいても、出血自体は中等度であっても、増加しているフィブリノゲン産生は分解あるいは消費されるフィブリノゲンを補うことはできず、ついには著しい出血という悪循環となることが明らかにされている¹⁾。

第2は、血管内凝固症候群(DIC)による凝固因子の消費による凝固異常が考えられる。広範な組織障害が起これば、循環血液量の減少や酸素運搬能が適切に補正されなければ組織は虚血あるいは壊死状態となり、その結果、大量の組織因子の放出

によりDICが惹起されることとなる。凝固異常の程度と血圧の低下時間の間には密接な関係があるという報告からも、この病態が大量輸血時の凝固異常の原因として重要な役割を担っていることは明らかである。

第3は、大量に投与される晶質液、あるいは膠質液による希釈の影響や、低体温による血小板機能低下あるいは凝固反応の低下も考えられる。とくに膠質液はフィブリノゲンがフィブリンへ転換する過程であるfibrin monomerの重合反応に阻害的に作用し、結果としてフィブリノゲン値を低下させることにもなる²⁾。

1. 血小板減少

大量輸血時(通常は循環血液量を超える輸血量)に対して全血製剤の投与のみでは血小板数は5万~10万程度に低下することもまれではない。しかし、輸血量と血小板減少が一定ではないことは、大量輸血患者に対して一定の割合での血小板予防投与はかならずしも有効とは限らないことを示唆する。すなわち、血小板減少即細血管性出血を意味するわけではなく、また減少程度が出血の程度の予測になるとも限らないからである。

2. 凝固因子欠乏

前述したように全血輸血では第Ⅷ、第Ⅴ因子以外は比較的保たれているために大量輸血時には全血輸血が適応となることもあるが、赤血球濃厚液のみの補充では凝固異常は必発である。しかし、凝固に関する検査異常が即出血を示すわけではないことは血小板数と出血の関係と同様である。プロトロンビン時間、あるいは活性化部分トロンボプラスチン時間がコントロールに比べて1.5倍以上延長、あるいはフィブリノゲン値が75 mg/dl以下では出血の可能性がある。なかでもフィブリノゲンは、減少する凝固因子になかでもっと早く止血レベル以下になることが報告されている³⁾。

図1に大量出血時の凝固異常のメカニズムを示す。もともと出血傾向のある場合であっても出血傾向のない場合であっても出血量が2~3lに達すると、軽度ではあるが凝固異常が起これば始める。その結果、血小板・凝固因子の漏出が生じる。生体での血小板、凝固因子の数・量の変動(この場合は減少となる)があってもただちに凝固異常に陥

サイド メモ 2

大量出血に対する活性化リコンビナント第Ⅶ因子(rVIIa)の意義

凝固因子に対するインヒビターを生じた血友病患者にみられる急性期の出血に対する治療製剤として開発された活性化リコンビナント第Ⅶ因子(rVIIa)が、重症外傷患者や産科出血を含む大量出血に対する治療に有用であるという報告がある。rVIIaは生理的濃度で、活性化された血小板に結合し、トロンビン産生を爆発的に起こすことにより安定化フィブリンを形成する。rVIIaが有効に作用するためには、フィブリノゲン値が少なくとも100 mg/dl以上、血小板数は50,000以上が必要である。言い換えれば、rVIIaはトロンビン生成を亢進させるのであって、すべての出血を止めるわけではなく、フィブリノゲン、血小板なくしてはその機能を発揮することはできない。さらに、現時点ではどのような出血患者にどのような量をどのような間隔で投与すべきかという成績はきわめて少なく、今後の課題である。とくに大量投与では血栓症のおそれがあるところから、安易な使用は厳に慎むべきである。

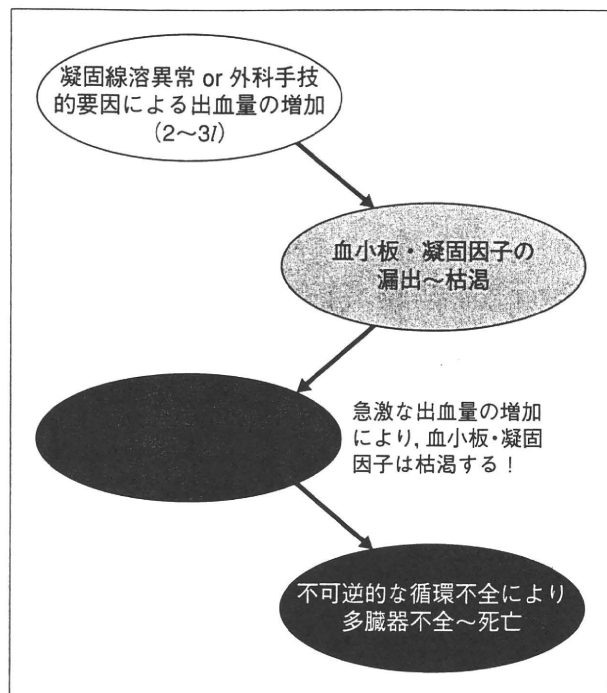


図 1 大量出血による凝固異常

るわけではなく、血小板ではプールされていた分が動員されたり、凝固因子では肝での産生が亢進することになる。しかし、このような代償もできなくなるとこれらは枯渇し、一気に大量出血となる。このような状態はさらに出血を増強させ、ついには多臓器不全、果てには死亡となる。また、外傷性の大量出血にあつてはショック、挫滅組織からの組織因子の流入による凝固活性化、さらには抗凝固系や線溶系経路の活性化などが複合的に加わること、治療・病態の推移などによるアシドーシス、低体温、血液の希釈、あるいは心機能低下による拍出障害、凝固因子の消費など、手術時にはみられない要因も考えられる⁴⁾。

いずれにせよ、大量出血により急速な凝固異常を生じることその基礎疾患・病態によらないことに留意し、適切かつ迅速な対応が求められる。

大量出血に対する輸血療法

出血に対する治療の大原則は局所止血であることは自明の理であり、また出血の結果として生じるショックに対する治療、組織における虚血、低体温に対する対応などが求められる。それらは救命救急処置としては重要であるが、ここでは主として輸血による治療について詳しく述べることに

する。

大量輸血時における凝固異常に際してはまず止血検査を行い、以後止血が完了するまで適宜行うことが必要である。プロトロンビン時間あるいは INR、活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT)、フィブリノゲン値、血小板数は必須の検査項目であり、なかでもフィブリノゲン値と血小板数の変動はきわめて重要であることに留意すべきである。

しかし、止血検査に異常があるからといって予防的な血小板・血漿輸血の適応はないことから、輸血をする判断には実際の出血状況、バイタルサインなど総合的にモニタリングをすることが重要である。

輸血療法の実際

1. 赤血球

赤血球それ自体は止血に直接的に関与してはいないが、血小板の遊走に対する流体力学的効果により活性化血小板の機能を亢進し、またトロンビン産生にも寄与している。急速にヘマトクリット値が低下すると出血時間が延長することは知られているが、これは赤血球膜表面に存在するエラスターゼが第Ⅸ因子を活性化し、止血に関与していることと関係しているものと推定されている。しかし、現時点でも大量出血患者でこのような効果をもたらすためには、どの程度のヘマトクリット値やヘモグロビン値が適切であるかははっきりしていない。

一方、外傷患者での大量出血例への赤血球輸血は死亡率を高めているとか、肺障害をもたらすとか、感染症に陥りやすいとか、あるいは腎不全を惹起しやすいという報告もあり、とくに採血後 2 週間以上たった製剤では高率との報告がある⁵⁻⁷⁾。

2. フィブリノゲン

フィブリノゲンは大量出血時においてもっとも早期に止血レベルを下まわる因子であり、大量出血時の鍵となる止血に関する要因といてよいことはすでに述べた。また、産科的出血時においてはフィブリノゲン値は大出血を予知する唯一因子であり、患者のフィブリノゲン値が 200 mg/dl 以下であれば(妊婦であるから本来ならば 400~500

mg/dl 程度であり、この値は明らかに低い)100%の予知率である⁸⁾。

このように、大量出血に際してフィブリノゲンを十分補充する必要性・有効性は、臨床例のみならず、ブタを用いた検討によっても確認されている⁹⁾。フィブリノゲンを補うには、①新鮮凍結血漿(FFP)、②クリオプレチピテート(クリオ)、③フィブリノゲン濃縮製剤が、選択肢としてある。

① FFP……FFP はすべての凝固因子を含んでおり、わが国においては各種凝固因子の補充に加えてフィブリノゲンの補充に唯一保険適応となっている。しかし、フィブリノゲン濃度を FFP にて止血の最低値から止血レベルに上昇させることは、FFP に含まれるフィブリノゲン値は正常血漿と同値あるいは抗凝固剤の影響で正常血漿以下であることから 10~20 ml/kg と大量投与が必要となる。さらに、輸血関連肺障害(TRALI)、アナフィラキシー反応、場合によっては溶血反応も起こりうる。

② クリオ……もうひとつの選択肢としてのクリオは、以下のようにして作製される。新鮮凍結血漿(FFP)を 4°C の冷蔵庫内にて 1~2 日間かけてゆっくりと解凍して遠心操作すると、クリオプレチピテートと称される沈殿物とクリオスーパーネータントと称される上清が得られる。この沈殿物には、第Ⅷ因子や第Ⅹ因子など分子量の大きな凝固蛋白やフィブリノゲン、フォンビレブランド因子、フィブロンectin などの接着性蛋白が含まれている。上製分画を除去後、沈殿物であるクリオ分画を再度 37°C に加温すると速やかに溶解するので、これを再凍結しておけば 1 年間は有効である。5 単位の FFP からは容量として約 10 倍以上濃縮され、1g 前後のフィブリノゲンが得られる。かつては血友病治療に用いられていたが、現在ではもっぱらフィブリノゲンの補充療法用にアメリカを中心に用いられているが、ヨーロッパでは安全な濃縮フィブリノゲン製剤が入手されるようになり使用は激減している。作製には数日かかるので、緊急用にはあらかじめ ABO 型別あるいは万人用に AB 型のクリオを作成しておかねばならないこと、ドナーのフィブリノゲン濃度に依存するので、濃度が一定しないこととウイルスの不

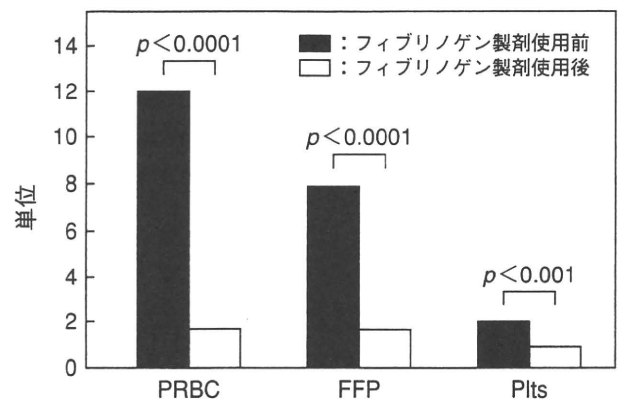


図 2 血液製剤の使用量の変化¹⁰⁾

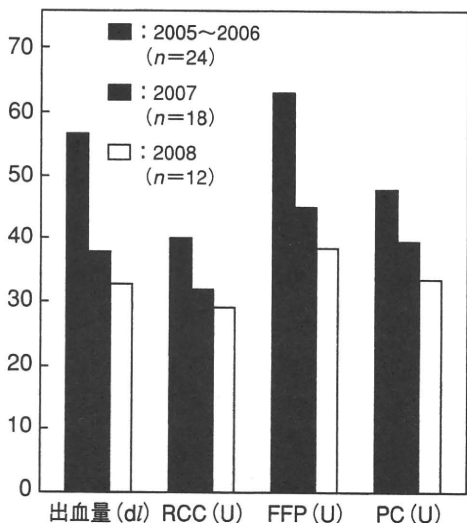
活化がされていない点は濃縮製剤に比べて大きなマイナス点である。

③ フィブリノゲン濃縮製剤……フィブリノゲン濃縮製剤はわが国では先天性無あるいは低フィブリノゲン血漿患者の補充療法のみが保険適応で、後天性低フィブリノゲン血症には保険適応となっていない。欧米、とくにヨーロッパでは先天性のみならず、後天性低フィブリノゲン血症にも使用されており、多くの報告例がある¹⁰⁾。図 2 に、大量出血後の低フィブリノゲンに対するフィブリノゲン製剤の補充成績の一部を示す。患者は、参加出血患者、小児科、胸部大動脈血管瘤、腹部大動脈瘤、外傷患者など 43 名の低フィブリノゲンに対して濃縮フィブリノゲン製剤を投与し、その前後の製剤の輸血量を比較した。成人では平均 4,000 ml の輸血が 50 ml へと著減したが、小児例でも輸血必要量は減少したが、統計学的には有意差はなかった。同様に、種々の低フィブリノゲン血症に対する濃縮フィブリノゲン製剤の有効性についての報告がなされている^{11,12)}

名古屋大学病院においても、大出血をきたす疾患の手術に際しては濃縮フィブリノゲン製剤を使用しているが、2つのその代表的疾患の経時的な平均出血量と平均輸血量を示す(図 3)。2005~2006 年はほとんど濃縮フィブリノゲン、クリオを使用していない時期であり、2008 年は積極的に使用している時期で、2007 年はその中間にあたる。図 3 でも明らかのように、胸部外科手術(ほとんどが胸部大動脈瘤)、肝移植手術において出血量、輸血量ともに半減している。

さて、実際のフィブリノゲンの投与については、

(A) 胸部外科手術



(B) 肝臓移植術

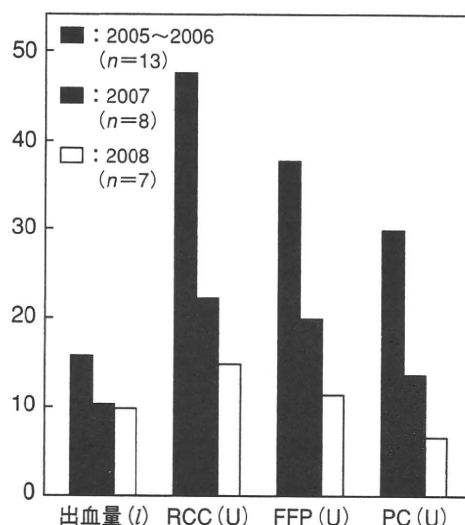


図3 大量出血(74,000 ml)または大量輸血(RCC720U)症例における出血量・輸血量 (2006~2008)

以下のデータを参考に投与量と時期を考慮する。体重 50 kg の患者では 3 g の投与で理論上 100~120 mg/dl 上昇するが、大出血時では当然のことながら回収率は低下するので、増量する必要がある。フィブリノゲン値が 50 mg/dl 以下では止血不能であり、止血栓形成能ゼロであるのでただちに濃縮フィブリノゲン製剤の投与が必要となる。50~100 mg/dl では出血傾向著明であり、基礎疾患、出血の状況によるが、早期の補充が望まれる。一方、150 mg/dl 前後では止血不良であってただちに大出血となることはないが、出血が持続していれば、容易に 100 mg/dl、50 mg/dl となり大出血に陥るので、フィブリノゲンの補充が望ましい。

3. 血小板

従来は、大量出血時における全身性の細血管性出血がみられたならば、止血検査を行うとともに血小板輸血を考慮することが第一義的と考えられてきた。しかし、すでに述べているように、大量出血時の血小板、凝固因子の変動ではフィブリノゲンがもっとも早期に止血レベル以下に低下すること、生理的な血小板凝集にフィブリノゲンは必須であること、さらにはブタを用いた実験では出血の速度を減少させたり生存期間の延長には、血小板製剤よりもフィブリノゲン製剤のほうが有効であるという報告や¹⁰⁾、そして 904 例の血小板減少患者の血栓形成能に対するフィブリノゲンの有

効性から¹¹⁾、血小板は第一義的に考慮すべきではないと思われる。とくに血小板数が 10 万前後であるにもかかわらず出血が持続した場合には、血小板減少による出血ではなく、フィブリノゲンを含む凝固因子の減少、血小板機能異常あるいは DIC のような凝固異常も考慮する。一方、頭部外傷、動脈瘤破裂、ショック状態が持続し長時間虚血状態が持続した場合などでは、とくに DIC による血小板・凝固因子の消費に基づいた出血が顕著にみられることから、どのような製剤が必要か十分に考慮すべきである。

4. FFP

FFP もわが国の産科出血時または大量出血時の際のガイドライン、あるいは PT, APTT がコントロールの 1.5 倍以上に延長した凝固異常で用いられる。その投与量は 10~15 ml/kg の範囲での使用することが推奨されている。しかし、FFP は前述したように、凝固因子の濃度は正常ヒト血漿と同じか低いために、とくにフィブリノゲンの補充という観点では循環負荷に陥る量が必要であること、一気に止血濃度までに上げることができないこと、さらには大量使用ではときに血液型の不適合の心配があること、感染症の伝播のおそれがあること、さらには急性輸血関連肺障害 (TRALI) の合併が否定できないことなど、大量出血時のフィブリノゲン補充にはかならずしも適切とはいえない

い。

大量出血時の輸血療法にあたっての 考慮すべき点

1. フィブリノゲンの定量

大量出血時には止血に関する因子のうち、フィブリノゲン値がもっとも早期に止血レベルを割り込み、大量出血の悪循環に陥ることはすでに述べ、フィブリノゲン値の測定は重要であると思われる。であるがゆえに、フィブリノゲン値の測定は大出血に陥ってから慌てて行うのではなく、可能性があれば早め早めに行うことが肝心である。

現在、フィブリノゲンの定量はほとんどの医療機関では凝固機器を用いて PT, APTT と同時に測定していると思われる。その原理は、一定のトロンビン濃度(かなりの高濃度)を用いた血漿トロンビン時間はフィブリノゲン値の関数であることに基づいている。すなわち、フィブリノゲン値が高値であれば、トロンビン時間は短く、濃度が低ければ延長するというものである。しかし、大量出血時に投与される代用血漿(とくに膠質液)が以上の測定系に影響し、みかけ上高値となると報告されており^{13,14)}、これは出血があるにもかかわらず、検査上フィブリノゲン値は高い値が得られるとされ、代用血漿が大量に使用される大量出血時には注意すべき点である。

2. 凝固検査

前項においても述べたように、大量出血時には凝固能のモニターが重要であるが、検査それ自体の問題についても十分配慮する必要がある。大量出血時には血圧の低下などにより末梢血から直接採血することは困難であっても、カテーテルからの採血は検査に影響することが多く、極力さける

べきである。

さらに、迅速な対応ができるようになったとはいえ、凝固検査には一定の時間がかかることは避けられず、得られた結果も 30~40 分前のものである。したがって、早め早めの検査をすること、フィブリノゲン製剤を含む輸血の判断も早め早めに対応することが重要である。

PT, APTT は FFP の投与にあたって目安になっているが、本来この検査は単独の因子欠損ではそれなりの意義を見出すことができるが、大量出血時のような複雑な凝固異常ではかならずしも適切な指標とはなりえないことに十分留意すべきであり、医療者は臨床的に出血の状況、バイタルサインなども十分考慮して判断すべきである。

文献

- 1) Martini, W.Z. et al.: *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **289**: E930-E934, 2005.
- 2) Fenger-Eriksen, C. et al.: *J. Thromb. Haemost.*, **7**: 1099-1105, 2009.
- 3) Hippala, S. T. et al.: *Anesth. Analg.*, **81**: 360-365, 1995.
- 4) Maegele, M. et al.: *Injury*, **38**: 298-304, 2007.
- 5) Malone, D. L. et al.: *J. Trauma*, **54**: 898-905, 2003.
- 6) Weinberg, J. A. et al.: *J. Trauma*, **65**: 794-798, 2008.
- 7) Claridge, J. A. et al.: *Am. Surg.*, **68**: 566-572, 2002.
- 8) Charbit, B. et al.: *J. Thromb. Haemost.*, **5**: 266-273, 2007.
- 9) Fries, D. et al.: *Br. J. Anaesth.*, **95**: 172-177, 2005.
- 10) Fenger-Eriksen, C. et al.: *Br. J. Anaesth.*, **101**: 769-773, 2008.
- 11) Weinkove, R. et al.: *Transfus. Med.*, **18**: 151-157, 2008.
- 12) Dane, A. F. et al.: *Vox Sang.*, **94**: 221-226, 2008.
- 13) Weinstock, N. et al.: *J. Thromb. Haemost.*, **4**: 1825-1827, 2006.
- 14) Hippala, S. T. et al.: *Blood Coagul. Fibrinolysis*, **6**: 743-746, 1995.

* * *

特 集

危機的出血に対する
輸血療法最前線

緒言とまとめ

稲田 英一

キーワード▶▶ 危機的出血, 危機的出血への対応ガイドライン, 産科危機的出血への対応ガイドライン, 異型適合血輸血

手術の基本は組織の切除であり, そのために起こる出血の予防と止血である。手術は出血との戦いであるといってもよい。出血に対し, 生体は交感神経系緊張を介した心拍数増加や血管収縮, 体液シフトといった代償反応により, 血管内容量や心拍出量の維持, 臓器灌流の維持を図る。医療においては, 輸液や輸血による血管内容量の確保や, 心血管作動薬による血行動態維持が行われる。しかし, 太い動静脈や静脈叢の損傷や, 骨盤や大腿骨など骨からの出血, 子宮や熱傷部切除面などの広い領域からの出血, さらに凝固異常や血小板減少症による出血傾向の出現による急速な出血では, 前述の代償反応や, 止血操作, 輸液・輸血ではもはや血行動態を維持できなくなることがある。低心拍出量, 低血圧, 心臓, 肝臓, 腎臓などの重要臓器の低灌流による臓器機能不全による低心拍出量の進行, 出血傾向による出血量の増加といった悪循環が発生するために, 心停止が起こりうる。このような, 出血に関連して心停止や心停止を覚悟するような病態を危機的出血と考えることができる。

◀危機的出血の実態▶

危機的出血が注目されたのは, 日本麻酔科学会偶発症例調査 2002 年の報告¹⁾である。解析対象症例は 3,855,384 症例である。心停止 2,443 症例 (発生率 6.34%), 死亡 2,638 症例 (死亡率 6.85%) であった。死亡に至った偶発症としては, 心停止が

48.9%, 高度低血圧が 42.1%, 高度低酸素血症が 3.9%を占めていた。心停止, 死亡の原因とも出血性ショックが圧倒的多数を占めていた。出血性ショックによる偶発症は死亡転帰率が高く, 心停止では 89.3%, 心停止以外の偶発症でも 52.6%に達した。さらに, 手術中の大出血を合わせると, 心停止の 33.6%, 死亡の 49.9%を占めていた。その後に行われた麻酔関連偶発症例調査に関する追加調査 2003 においても, 術前からの出血性ショックや術中の大出血による術中心停止は多く, しかも術後の予後が不良であることが示された²⁾。体重 60 kg に換算した場合に, 12l 以上の大量出血となった症例は“術前合併症としての出血性ショック”による偶発症例で 30.5%, “手術が原因の大出血”による偶発症例で 38.7%を占めた。体重相当以上の出血症例も, おのおの 9.1%, 13.9%を占めた。体重 60 kg に換算した場合の術中最大出血速度を見ると, 240 g・min⁻¹以上の速度での出血が“術前合併症としての出血性ショック”による偶発症例で 42.6%, “手術が原因の大出血”による偶発症例で 46.7%を占めた。きわめて急速な出血が多く症例で起きていることが分かる。“手術が原因の大出血”の偶発症例の 58.0%において麻酔科医は大量出血を予想し, 平均して赤血球濃厚液 11.8 単位, 新鮮凍結血漿 14.4 単位が準備されていた。一方, 赤血球濃厚液ならびに新鮮凍結血漿の平均使用量は, “術前合併症としての出血性ショック”による偶発症例ではおのおの

* 順天堂大学医学部麻酔科学・ペインクリニック講座

19.4 単位, 17.4 単位, “手術が原因の大出血”による偶発症例ではおのおの 27.4 単位, 30.8 単位であった。交差適合試験を省略して輸血が行われた割合は“術前合併症としての出血性ショック”による偶発症例で 16.4%, “手術が原因の大出血”による偶発症例で 10.9%であった。また, O 型以外の症例へ O 型赤血球製剤が輸血された割合は“術前合併症としての出血性ショック”による偶発症例で 2.1%, “手術が原因の大出血”による偶発症例で 0.6%であった。これらのデータから, 危機的出血時に交差適合試験の省略や, O 型緊急輸血の実施頻度が低いことが示唆された。

最近ではわれわれ³⁾が行った厚生労働班研究でも, 5,000 ml 以上の術中出血症例で最低ヘモグロビン値が $5 \text{ g} \cdot \text{dl}^{-1}$ 未満に低下した症例の 43%, 心マッサージが必要であった症例の 76%では, 死亡あるいは後遺症が残存するなど予後が不良であることが示された。これらの症例においても, 未交差同型血の使用頻度は 20%未満であり, 異型適合赤血球輸血の頻度は 10%未満であった。

《“危機的出血への対応ガイドライン”と“産科危機的出血への対応ガイドライン”》

このような危機的出血を的確, 迅速に治療するために, 2007 年に日本麻酔科学会と日本輸血・細胞治療学会⁴⁾が“危機的出血への対応ガイドライン”を合同で作成した。

“危機的出血への対応ガイドライン”の大きな特徴は, 輸血原理に基づいた輸血を行うものの, 危機的出血においては救命を最優先することである。時間的に切迫し交差適合血が間に合わない場合は, 患者の血液型とは異なるが適合する血液型の輸血用血液(異型適合血)の使用を明文化したことである。もう一つの特徴は, 出血が起きている手術室や救急室といった現場, 輸血部や検査部, 血液センターが一体となったチームとして機能することである。そのチームを統率するのがコマンダーであり, 手術室においては, 麻酔科医がコマンダーとなることが多いと考えられる。したがって, 麻酔科医は“危機的出血への対応ガイドライン”をよく理解し, チームを引っ張っていくようにしなければならない。そのためにも, 厚生労働省の輸血指針や, 上記ガイドラインに基づき, そ

の施設の実情に合った院内ガイドラインを作成し, 院内コンセンサスを得ておくことは重要である。“危機的出血への対応ガイドライン”については, 紀野論文で詳細に解説する。

さらに, 産科出血においては, 出血量が多くなる頻度が 250-300 分毎に 1 症例と高いことや, 前置胎盤や低置胎盤, 多胎など出血量を多くする因子が分かっていること, そのような要因がなくとも弛緩出血のためにときに 10 l を超すような大出血が起こること, 2 l 程度の出血であっても産科 DIC を起こすことなどから, “危機的出血への対応ガイドライン”だけでは対応しきれないとの声がある, 産科医から上がった。そこで, 日本輸血・細胞治療学会, 日本麻酔科学会, 日本産科婦人科学会, 日本産婦人科医会, 日本周産期・新生児学会⁵⁾が合同で, 2010 年に“産科危機的出血への対応ガイドライン”を作成した。“産科危機的出血への対応ガイドライン”では, 大出血を起こす可能性の高い妊婦の同定と高次分娩施設における分娩の推奨, 自己血輸血などについても触れ, 分娩時の出血に対しては凝固因子補充を早期から開始することなどが盛り込まれている。産科出血では, 子宮破裂や常位胎盤早期剥離など外出血がほとんどなく内出血が多い場合がある。そのような症例における大出血を見逃さないために, ショックインデックスの使用を推奨している。“産科危機的出血への対応ガイドライン”については, 入田論文で詳細に解説する。

《緊急輸血と血液製剤》

血液製剤や輸液剤, アルブミン製剤, 人工膠質液について, その性質や, 適応, 副作用などについてもよく理解しておくことが必要である。交差適合試験や不規則抗体検査, 核酸増幅試験(NAT)などの諸検査や, 放射線照射, 貯血前白血球除去などが輸血の安全にそのように寄与しているかについての理解も必要である。急速輸血では, 通常は起こりにくい高カリウム血症や低カルシウム血症などの電解質異常が起こりうる。アルブミン製剤の使用に関しては, その有用性について議論が行われている。人工膠質液は, 腎機能障害や凝固障害などに関する懸念がもたれているが, 理論的なりリスクと実際のなりリスクについての議論が活発

に行われている。人工膠質液も新しい製剤が開発され、日本に導入されようとしている。それぞれの製剤については、稲葉論文と飯島論文で解説する。

大量出血に備え、予定手術ではしばしば自己血貯血が行われる。大血管損傷などにおいては、術中自己血回収が行われることが多い。自己血貯血や等容積性血液希釈、自己血回収などの自己血輸血の意義や方法、注意点についても知っておく必要がある。自己血輸血については吉場論文で解説する。

輸血用血液は以上のような検査や、コンピュータクロスマッチを含めた輸血用血液の確認などにより、以前に比べはるかに安全性は向上している。しかし、それでも、人為的なミスにより不適合輸血を行う可能性がある。危機的出血時の異型適合血使用をした場合に、後追い交差適合試験により不規則抗体などが検出された事例もある。輸血副作用として起こる溶血反応への対処法について理解しておく必要がある。不適合輸血については藤井論文で解説する。

《最後に》

“危機的出血への対応ガイドライン”の周知度は、まだ高いとはいえない。各施設における輸血ガイドライン作成と、それに基づく実地訓練の実施度は低い。“産科危機的出血への対応ガイドライン”は公表されて日が浅く、その有用性や評価についてはまだ明らかになっていない。今後、これらのガイドラインが普及し、危機的出血が回避されたり、危機的出血患者の予後が改善することを期待している。

引用文献

- 1) 入田和男, 川島康男, 巖 康秀, 瀬尾憲正, 津崎晃一, 森田 潔ほか「麻酔関連偶発症例調査 2002」および「麻酔関連偶発症例調査 1999-2002」について: 総論一 (社) 日本麻酔科学会安全委員会偶発症例調査専門部会報告一. 麻酔 2004 : 53 : 320-35.
- 2) 入田和男, 川島康男, 森田 潔, 瀬尾憲正, 巖 康秀, 讃岐美智義ほか. 「術前合併症としての出血性ショック」ならびに「手術が原因の大出血」に起因する麻酔関連偶発症に関する追加調査 2003 の集計結果一 (社) 日本麻酔科学会安全委員会偶発症例調査専門部会報告一. 麻酔 2005 ; 54 : 77-86.
- 3) 入田和男, 稲田英一, 吉村 速, 巖 謙吾, 津崎晃一, 稲葉頌一ほか. 麻酔科認定病院の手術室で発生している大量出血とその対応に関する実態調査. 麻酔 2009 ; 58 : 109-23.
- 4) <http://www.anesth.or.jp/safety/guideline.html>
<http://www.jstmct.or.jp/jstmct/Guideline/Reference.aspx?ID=4>
- 5) <http://www.jstmct.or.jp/jstmct/Guideline/Reference.aspx?ID=5>

ABSTRACT

The Frontiers of Blood Transfusion for Critical Bleeding : Preface and Comments

Eiichi INADA

*Department of Anesthesiology and Pain Medicine,
Juntendo University School of Medicine, Tokyo 113-8421*

The annual surveys of critical incidents in Japanese Society of Anesthesiologists (JSA)-certified hospitals in 1999-2002 demonstrated that massive and critical bleeding was the major cause of intraoperative cardiac arrest leading to poor prognosis including death and permanent brain damage. The surveys also suggested that type-specific blood transfusion and emergent O-type blood transfusions were underutilized. Therefore, the JSA and the Japan Society of Transfusion Medicine and Cell Therapy publicized the guidelines for treatment of critical bleeding in 2007. Five academic societies publicized the guidelines for management of critical bleeding in obstetrics in 2010. Each hospital is expected to make institutional emergency blood transfusion guidelines on the basis of the above guidelines in order to decrease the incidence of critical bleeding and to improve the prognosis of the patients with critical bleeding.

key words : critical bleeding, guidelines for treatment of critical bleeding, type-specific blood transfusion