

黒毛和種牛における内因系血液凝固異常と胎子死の関連性

緒方良彦^{1)†} 斯琴図雅⁵⁾ 森友靖生²⁾ 大場恵典³⁾
 国枝哲夫⁴⁾ 北川 均³⁾

- 1) 宮崎県北部農業共済組合西臼杵センター (〒882-1101 西臼杵郡高千穂町大字三田井3214-3)
 2) 東海大学農学部 (〒869-1404 阿蘇郡南阿蘇村河陽)
 3) 岐阜大学応用生物科学部 (〒501-1193 岐阜市柳戸1-1)
 4) 岡山大学大学院環境生命科学研究科 (〒700-8530 岡山市北区津島中1-1-1)
 5) 岡山大学大学院自然科学研究科 (〒700-8530 岡山市北区津島中1-1-1)

(2012年11月12日受付・2013年10月4日受理)

要 約

黒毛和種繁殖牛において、XI因子欠乏症を含む内因系血液凝固異常と原因不明の流死産（いわゆる胎子死）の関連性について調査した。繁殖牛群129頭を調査したところ、XI因子欠乏症の既知変異遺伝子の遺伝子頻度は26.4%であった。変異アレルのホモ接合体（変異ホモ）群とヘテロ接合体（ヘテロ）群、変異アレルを持たない正常ホモ接合体（正常ホモ）群間で、プロトロンビン時間（PT）に有意差はなく、活性化部分トロンボプラスチン時間（APTT）では、変異ホモ群、ヘテロ群、正常ホモ群の順に有意に延長していた。各群間の胎子死頻度比較は、変異ホモ群がヘテロ群、正常ホモ群に対して有意に高く、正常ホモ群と変異ホモ群の胎子死頻度のオッズ比は2.72（95%信頼区間：1.08～6.84）であった。XI因子以外の内因系因子と胎子死の関連を調査する目的で、正常ホモ群71頭をAPTTの中央値から20秒以上延長している個体（延長）群と非延長群の2群に分け、PT及び胎子死頻度を比較した。2群間でAPTTには有意差が存在するがPTに有意差はなく、胎子死頻度で有意な差があった。延長群と非延長群との胎子死頻度のオッズ比は3.49（95%信頼区間：1.29～9.40）であった。また、非延長群と変異ホモ群との胎子死頻度のオッズ比は3.77（95%信頼区間：1.39～10.18）であった。これらの結果は、XI因子欠乏症を含む内因系血液凝固因子異常が胎子死の発生に関連している可能性を示した。

——キーワード：活性化部分トロンボプラスチン時間（APTT）、XI因子、胎子死。

----- 日獣会誌 67, 54～58 (2014)

近年、黒毛和種繁殖牛での調査から、流死産や生後死の発生頻度は血液凝固因子の一つである第XI因子欠乏症の変異アレルのホモ接合体（変異ホモ）群で高いことが示唆されている（小川博之：黒毛和種牛における第XI因子欠乏症，平成16年度—平成18年度農水省家畜衛生対策事業実績報告書—慢性疾患低減飼養管理技術の開発，30，日本獣医学会（2007））。人では抗リン脂質自己抗体による高分子キニノーゲンや第XII因子の活性低下など，血液凝固内因系接触因子障害が子宮内発育不全（IUGR）や習慣性流産（いわゆる不育症）の要因であることを示唆する報告 [1, 2] もあるが，牛では内因系凝固因子の異常と

胎子死との関連については明らかにされていない。そこで，宮崎県下の黒毛和種繁殖牛群を対象に，胎子死とXI因子を含む内因系凝固因子異常との関連性を調査した。

材料及び方法

宮崎県下で繁殖母牛として飼育されている黒毛和種牛129頭を用いた。3.13%クエン酸加真空採血管にて静脈血を採血し遠心分離後，血球部分はPCRによる黒毛和種牛XI因子欠乏症 [3] の原因遺伝子異常の解析を実施し，変異遺伝子頻度を求めた。血漿部分で既報 [4] に従い活性化部分トロンボプラスチン時間（APTT）及び

† 連絡責任者：緒方良彦（宮崎県北部農業共済組合西臼杵センター）

〒882-1101 西臼杵郡高千穂町大字三田井3214-3

☎0982-72-4105 FAX 0982-72-6032

E-mail : nhnic-shinryousho@mh-nosai.jp

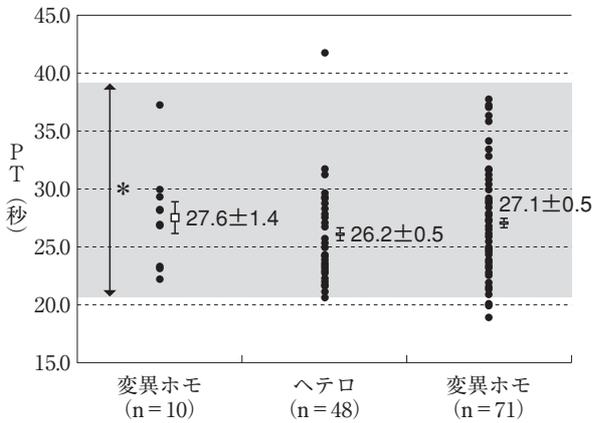


図1 XI因子遺伝子型別PT比較

* : は参考基準値範囲

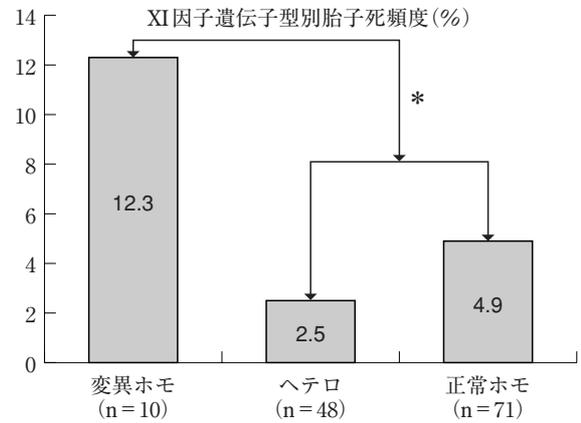


図3 XI因子遺伝子型別胎死頻度

* : 変異ホモとヘテロ, 正常ホモ間に有意差 ($P < 0.01$) あり

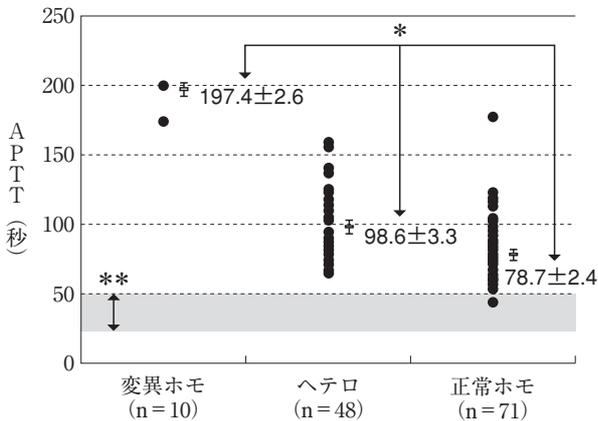


図2 XI因子遺伝子型別APTT比較

* : 各群間で有意差 ($P < 0.01$) あり

** : は参考基準値範囲

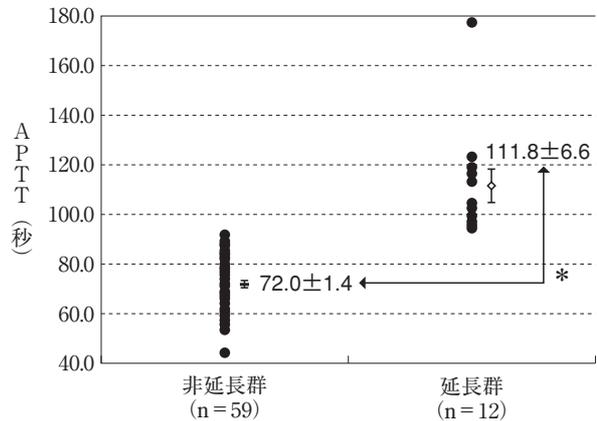


図4 非延長群と延長群のAPTTの分布

* : 非延長群に対し延長群はAPTTが有意 ($P < 0.01$) に延長

プロトロンビン時間 (PT) を測定し, XI 因子の遺伝子型別に比較した. 対象個体 129 頭の分娩歴から胎死頻度 (胎死数/総分娩回数) を調べ, XI 因子の遺伝子型別に比較した. 内因系凝固異常は, 部分トロンボプラスチン時間 (PPT) が正常値より 20 秒以上延長するといわれている [5]. XI 因子以外の内因系凝固因子と胎死の関連性を検討するために, XI 因子欠乏症正常ホモ接合体個体群 71 頭で, APTT の中央値 (74.3 秒) を仮の正常値とし, その値より 20 秒以上 APTT が延長している個体群を延長群, 20 秒以内の個体群を非延長群として, 延長群と非延長群間で, PT 及び胎死頻度を比較した. なお今回の調査では, APTT 及び PT の基準値を, 正常牛血漿を用いて測定していないので, 参考基準値として著者ら [6] の報告の値を用いた. 統計処理は Welch- t 検定, χ^2 検定, オッズ比検定を行い, $P < 0.05$ を有意差ありとした.

成 績

図 1 に XI 因子遺伝子型別 PT の比較を示す. 今回対象とした個体 129 頭の XI 因子変異遺伝子頻度は 26.4 % であった. PT は, 参考基準値より 1 個体で延長, 3 個体で短縮が認められたが, 各群値 (平均値 \pm 標準誤差) には有意差は認められず参考基準値内であった. 図 2 に XI 因子遺伝子型別 APTT の比較を示す. APTT は, 1 個体が参考基準値範囲内であり, その他の個体はすべて参考基準値より延長していた. 各群値 (平均値 \pm 標準誤差) では, XI 因子変異ホモ群, ヘテロ接合体個体 (ヘテロ) 群, 正常ホモ群の順に有意 ($P < 0.01$) に延長していた. 図 3 に XI 因子遺伝子型別胎死頻度を示す. 胎死頻度は変異ホモ群がヘテロ群及び正常ホモ群に比べ有意 ($P < 0.01$) に高く, 変異ホモ群と正常ホモ群間ではオッズ比が 2.72 (95 % 信頼区間: 1.08 ~ 6.84) であった.

正常ホモ群内にも明らかに APTT が延長している個体

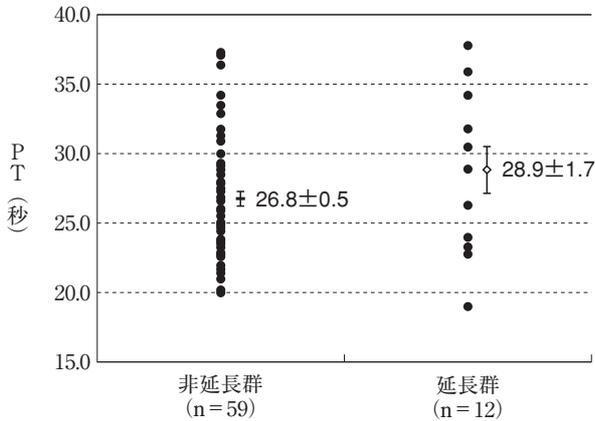


図5 非延長群と延長群のPT比較

が認められたため、延長群と非延長群に分けてAPTT値(平均値±標準誤差)を比較してみると有意差($P < 0.01$)がみられた(図4)。このことから延長群にはXI因子以外の内因系凝固因子の異常が存在する可能性が示された。延長群と非延長群のPT値(平均値±標準誤差)は2群間で有意差は認められなかった(図5)。図6で、延長群と非延長群との胎子死頻度比較及び、それらとXI因子変異ホモ群、ヘテロ群との胎子死頻度比較を示す。延長群と非延長群との胎子死頻度には有意差($P < 0.01$)があり、そのオッズ比は3.49(95%信頼区間: 1.29~9.40)であった。非延長群とXI因子変異ホモ群との胎子死頻度のオッズ比は3.77(95%信頼区間: 1.39~10.18)であった。

考 察

今回対象とした個体集団のPTは、どの比較においても有意差が存在せず、異常出血等の臨床症状を示していないことより、外因系及び共通系は正常であると考えた。

XI因子欠乏症は常染色体劣性の遺伝性血液凝固不全である。牛ではホルスタイン種での報告[7]が最初であり、APTT延長、血液混入乳及び貧血などの臨床症状を示した[8]。黒毛和種牛のXI因子欠乏症では、軽度の止血異常や発育不良を伴った症例報告があるものの[9]、無症状に経過する症例が多いとされ、あまり重要視されていない。Ohbaら[10]の報告では、黒毛和種牛におけるXI因子の変異遺伝子頻度は26.4%であり、今回の変異遺伝子頻度と同じであった。また、その始祖牛は現在供用されている種雄牛より少なくとも6代前の種雄牛YMDであり、著者ら[6]の報告の始祖牛と同じであった。これらは、国内の黒毛和種牛においてXI因子の変異遺伝子が広く蔓延していること示すものと考えられる。本研究では、XI因子変異ホモ群の胎子死頻度が正常ホモ群及びヘテロ群のそれより有意に高いことから、XI因子欠乏症原因遺伝子をホモ接合で持つことが胎子

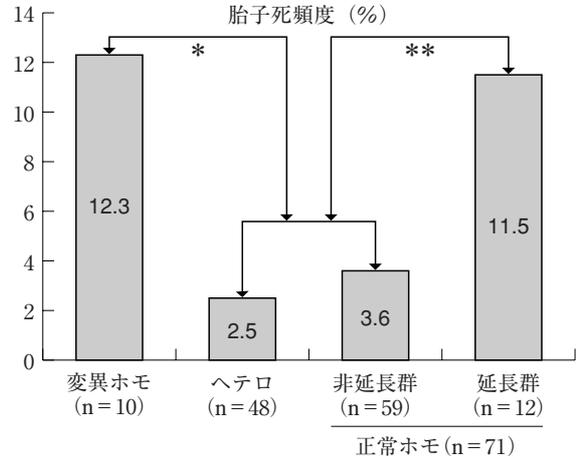


図6 変異ホモ、ヘテロ、非延長群、延長群の胎子死頻度比較

*, **: ヘテロ、非延長群と変異ホモ、延長群間に有意差($P < 0.01$)あり

死に影響を与えている可能性が示された。

APTTの延長は内因系凝固因子のXII因子、XI因子、VIII因子、IX因子、高分子キニノーゲン及びプレカリクレインの異常が疑われる。VIII因子の異常は血友病A[11]、IX因子の異常は血友病B[12]として知られている。牛の血友病についてはMoritomoら[13]の報告があるが、保因母牛のAPTTに重度延長は認めていない。また、血友病は家族病歴がその診断に重要であるが、延長群の家族に血友病の症状を示した例はない。これらより、今回の延長群のAPTT延長が血友病による可能性は低いと考えられる。一方、XII因子、XI因子、高分子キニノーゲン及びプレカリクレインは接触因子とよばれ、XI因子と高分子キニノーゲンは1:1の高分子複合体を形成して血液中に存在する。XII因子及び高分子キニノーゲンは内因系血液凝固の開始因子であると同時に線溶系の開始因子でもある[14]。これらの因子に異常が生じた場合、生体内では出血傾向がみられず、胎盤血管において線溶系の低下を引き起こし、血栓症や流産の原因となりうる事が報告されている[15]。Bauerら[16]の報告では、胎盤への血流を人工的に塞栓することでIUGRが起きている。Yamadaら[17]は、胎盤機能障害による虚弱子牛症候群の発症の可能性を報告している。これらのことより、延長群において、XI因子以外の接触因子の異常が、胎子死に影響している可能性が推測される。

最新の知見によると、XI因子は凝固因子であるとともに抗線溶効果を有しており、XI因子欠乏症では血栓症発現抑制作用が指摘されている[18]。このように、人ではXI因子を含む接触因子と線溶系及び生殖系との関連が明らかにされつつあるが、牛については不明である。今後、XI因子を含む接触因子の異常による血栓症、胎盤

機能障害について更なる検討が必要である。

引用文献

- [1] 杉 俊隆：自己抗体を介したカリクレイン-キニン系の破綻と不育症，*医学のあゆみ*，204，1031-1035 (2003)
- [2] 杉 俊隆：不育症と自己免疫性thrombophilia (抗リン脂質抗体，抗第XII因子抗体，抗キニノーゲン抗体)，*血栓止血誌*，20，510-518 (2009)
- [3] Kunieda M, Tsuji M, Abdol RA, Khalaj M, Ikeda M, Miyadera K, Ogawa H, Kunieda T : An insertion mutation of the bovine F11 gene is responsible for factor XI deficiency in Japanese black cattle, *Mammalian Genome*, 16, 383-389 (2005)
- [4] 島津千里：プロトロンビン時間 (PT)，活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT)，部分トロンボプラスチン時間 (PTT)，*日本臨床*，58，645-648 (2010)
- [5] 松下博治：血液凝固と出血性疾患の検査，*家畜の臨床検査*，高橋 貢，板垣 博編，第1版，78-79，医歯薬出版株式会社，東京 (1973)
- [6] 緒方良彦，桐木保明，藤寺 易，有藤純一，佐藤伸介，森友靖生，小川博之：出血症状を示した第XI因子欠乏症の黒毛和種子牛の2症例，*家畜診療*，53，347-351 (2006)
- [7] Kociba GJ, Rantnoff OD, Loeb WF, Wall RL, Heider LE : Bovine plasma thromboplastin antecedent (factor XI) deficiency, *J Lab Clin Med*, 74, 37-41 (1969)
- [8] Brush PJ, Anderson PH, Gunning RF : Identification of factor XI deficiency in Holstein-Friesian cattle in Britain, *Vet Rec*, 121, 14-17 (1987)
- [9] 高須正規，武田枝理，西飯直仁，大場恵典，前田貞俊，宮澤清志，小川博之，北川 均：活性化部分トロンボプラスチン時間の延長を認めた発育不良の黒毛和種子牛の1例，*日獣会誌*，58，820-822 (2005)
- [10] Ohba Y, Takasu M, Nishii N, Takeda E, Maeda S, Kunieda T, Kitagawa H : Pedigree analysis of factor XI deficiency in Japanese black cattle, *J Vet Med Sci*, 70, 297-299 (2008)
- [11] 田中一郎，嶋 緑倫：血友病A，*血栓止血誌*，11，397-405 (2000)
- [12] 中 宏之，嶋 緑倫：血友病B，*血栓止血誌*，11，405-410 (2000)
- [13] Moritomo Y, Shimojo K, Miyadera K, Khalaj M, Asano Y, Kunieda T, Ogawa H : Clinical and pathological aspects of hemophilia A in Japanese Brown cattle, *J Vet Med Sci*, 293-296 (2008)
- [14] 高田明和，高田由美子：血液凝固線溶系のメカニズムとくに凝固と線溶の相関について，*生物物理化学*，28，7-15 (1984)
- [15] Colman RW, Schmaier AH : Contact system: a vascular biology modulator with anticoagulant, profibrinolytic, antiadhesive, and proinflammatory attributes, *Blood*, 90, 3819-3843 (1997)
- [16] Bauer MK, Breier BB, Bloomfield FH, Jensen EC, Gluckman PD, Harding JE : Chronic pulsatile infusion of growth hormone to growth-restricted fetal sheep increases circulating fetal insulin-like growth factor-1 levels but not fetal growth, *J Endocrinol*, 177, 83-92 (2003)
- [17] Yamada A, Kawana M, Tamura Y, Miyamoto A, Fukui Y : Effect of Single or Multiple Injection of Follicle Stimulating Hormone Combined with Pregnant Mare Serum Gonadotropin on Superovulatory Response, and Normal and Freezable Embryos in Ewes, *J Reprod Dev*, 42, j81-j87 (1996)
- [18] He R, Chen D, He S : Factor XI: hemostasis, thrombosis, and antithrombosis, *Thromb Res*, 129, 541-550 (2012)

Relationship between Fetal Losses and Intrinsic Coagulation Disorder
in Japanese Black cattle

Yoshihiko OGATA^{1)†}, SIQINTUYA⁵⁾, Yasuo MORITOMO²⁾, Yasunori OHBA³⁾,
Tetsuo KUNIEDA⁴⁾ and Hitoshi KITAGAWA³⁾

- 1) *Nishiusuki Livestock Clinic Center, North Branch of Miyazaki A.M.A.A., 3214-3 Mitai, Takachiho-cho, Nishiusuki-gun, 882-1101, Japan*
- 2) *School of Agriculture, Tokai University, Minamiaso-mura, Kawayo, Aso-gun, 869-1404, Japan*
- 3) *Veterinary Internal Medicine, Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu University, 1-1 Yanagido, Gifu, 501-1193, Japan*
- 4) *Graduate School of Environmental and Life Science, Okayama University, 1-1-1 Tsushima-naka, Kita-ku, Okayama, 700-8530, Japan*
- 5) *Graduate School of Natural Science and Technology, Okayama University, 1-1-1 Tsushima-naka, Kita-ku, Okayama, 700-8530, Japan*

SUMMARY

The relationship between intrinsic coagulation disorders, including factor XI deficiency, and stillbirths of unknown cause (aka fetal losses) was studied in breeding Japanese Black cattle. Among the 129 breeding cattle investigated, the frequency of the factor XI deficiency mutant gene was 26.4%. There were no significant differences in prothrombin time (PT) among the mutant allele homozygous (mutant homologous) group, the mutant allele heterozygous (heterologous) group and the normal homozygous (normal homologous) group; however, there were significant differences in activated partial thromboplastin time (APTT) among these groups. The frequency of fetal losses was significantly higher in the mutant homologous group than the mutant heterologous group and the normal homologous group, and the odds ratio of fetal loss frequency between the normal homologous group and the mutant homologous group was 2.72 (95% confidence interval: 1.08-6.84). To investigate the relationship between intrinsic coagulation factors other than factor XI and fetal losses, 71 cattle in the normal homologous group were divided into two groups — one in which APTT was extended for 20 seconds or longer than the median value (the extension group) and a non-extension group — and PT and fetal loss frequency were compared between the two groups. A significant difference was not found in PT, but was found in APTT and fetal-loss frequency between the groups. The odds ratio of fetal-loss frequency between the extension group and the non-extension group was 3.49 (95% confidence interval: 1.29-9.40). Also, the odds ratio of fetal-loss frequency between the non-extension group and the mutant homologous group was 3.77 (95% confidence interval: 1.39-10.18). These results indicate that intrinsic coagulation factor disorders including XI factor deficiency may be involved in fetal losses in Japanese Black cattle.

— Key words : Activated partial thromboplastin time (APTT), factor XI deficiency, fetal loss.

† Correspondence to : Yoshihiko OGATA (*Nishiusuki Livestock Clinic Center, North Branch of Miyazaki A.M.A.A., 3214-3 Mitai, Takachiho-cho, Nishiusuki-gun, 882-1101, Japan*
TEL 0982-72-4105 FAX 0982-72-6032 E-mail : nhnic-shinryousho@mh-nosai.jp

— *J. Jpn. Vet. Med. Assoc.*, 67, 54 ~ 58 (2014)