

新生児、乳幼児期のビタミンK依存性蛋白 Protein C とその測定上の問題点

聖マリアンナ医科大学小児科

山田 兼雄

常泉 いづみ, 目黒 嵩

Protein C は近年、新たに見出されたビタミンK依存性蛋白の1つである。Protein Cは、血液凝固第V、第Ⅷ因子を特異的に失活させる作用が第一にあげられる。第二に血管内皮内皮下組織から、プラスミノゲンアクチベーターの遊離を促進させる作用が存在することが認められている。すなわち、トロンビンが生成され、生体の中で血栓形成傾向が発生すると、そのトロンビンによって、Protein C が活性化されて活性型のProtein Cとなり、血栓形成傾向を抑制するという働きが見られるようになる。

ビタミンK依存性凝固蛋白であるProtein Cを研究することにより、ビタミンK欠乏状態を今までよりもさらに解明できると考え、Protein Cの測定法、Protein Cの正常値(新生児から年長児、成人まで)、さらにビタミンK欠乏状態のProtein Cのレベル、異常Protein Cならびに、ビタミンKに対する反応について研究を行ってきている。

今年度は、1)ビタミンK欠乏症、DIC、コントロールの、ELISA法によって測定したProtein Cの抗原量、2)ビタミンK欠乏症のProtein CレベルのビタミンK投与前後の変化、3)Protein C活性の測定法に対する一考察などについて報告する。

測定法

- 1) Protein C抗原量: Behringer-Manheim社製の、抗Protein C抗体を用いた Peroxydase法によるELISAを用いて測定した。
- 2) Protein C活性: DEAE-Sepharose CL-6B, 10mMPB, pH7.6のミニカラムを用いて、50-100, 100-150, 200-300mM NaCl, 10mM PB pH7.6でそれぞれ100, 150, 300分画を溶

出した。この溶出分画あるいは、アルミニウム処理溶出分画を用いて、トロンビンで活性化し、AT-Ⅲ、ヘパリンで反応及び残存トロンビンをとめた後、合成基質S-2238のamidolytic activityとして測定した。活性値は、合成基質の分解速度 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ で表わした。

成績

図2に、ELISA法で測定したProtein Cの抗原量を示す。成人に比べて、小児期のProtein Cの値は低く、新生児、乳児、幼児と年齢につれてその値は高くなるが、幼児期でもまだ 73.3 ± 13.7 と成人と比べると低値であった(図1)。また、ビタミンK欠乏症、DICでは同年齢の児に比べてもさらに低い値をとった。図2は、ビタミンK欠乏症について、Kの投与前と投与後の値を分けて示したもので、Kの投与により、程度は様々であるが、増加傾向にあった。これらのビタミンK欠乏症の患児については、表1に示す通りである。(表1)

図3に示すように、蛋白をDEAE-Sepharose, CL-6B, 10mMPB, pH7.6, 50~300mM NaCl分画で溶出させると、大きな5つの山ができる。このうち、Protein Cは、300mM分画に含まれるが、100, 150分画にも、Protein Cと同様の抗凝固活性が存在した。このうち、aPTTの延長、ビタミンK依存症について検討すると、150mM NaCl分画が、Protein C類似の性質を持つことがわかった。この2つの分画は、図4に示すように、どちらもビタミンK欠乏症、ワーファリン投与例では低値を示していた。

考察

Protein Cの抗原量については、年齢的な変

化を、さらに検体をふやして検討したい。ビタミンK欠乏症では、Protein Cは低値を示したが、ビタミンKを投与すると、増加していることは興味がある。本成績はあくまでも、ELISA法を用いたImmunological assayであり、ビタミンK欠乏症では、abnormal protein C(PIVKA-Protein C)が存在し、ビタミンKを投与する

ことにより、これがnormal Protein Cになることによって、抗原性が変化したことを表わしているものと考えている。また、amidolytic assayを用いた生物活性の測定に関しては、まだ検討が必要であるが、Protein C類似の蛋白についても、さらに考えて行きたい。

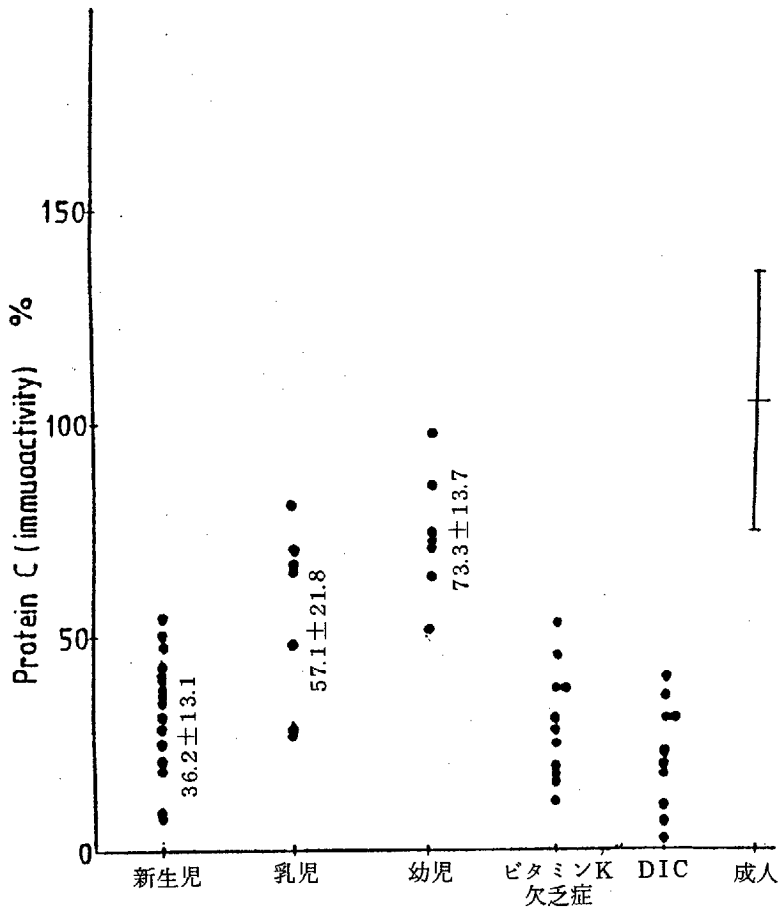


図1. ELISA法によるProtein C抗原量

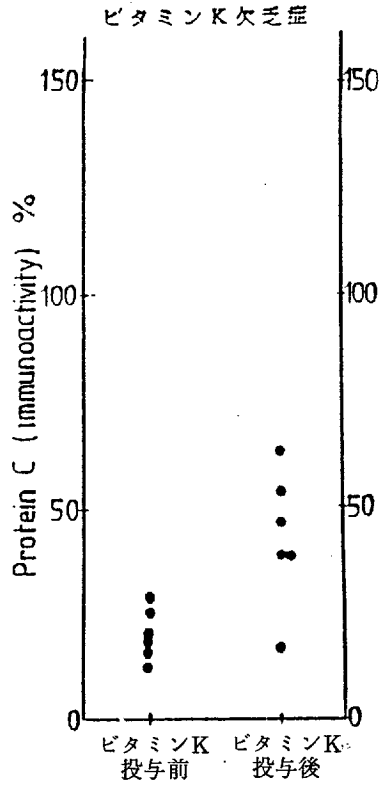


図2. ビタミンK欠乏症のProtein C抗原量

表1. Vit. K欠乏症

		発見時		HPT%	PIVKaII	Protein C
1	I. baby	1日	新生児メレナ	28	+	30
2	T. "	1日	"	—	4 $\mu\text{g}/\text{ml}$	% of normal 25
3	K. "	4日	"	5↓	4 "	18
4	R. F.	1ヶ月	頭蓋内出血	28	1 "	28
5	K. K.	12日	メレナ	20	0	15
6	Y. T.	6ヶ月	頭蓋内出血	5↓	8 $\mu\text{g}/\text{ml}$	14

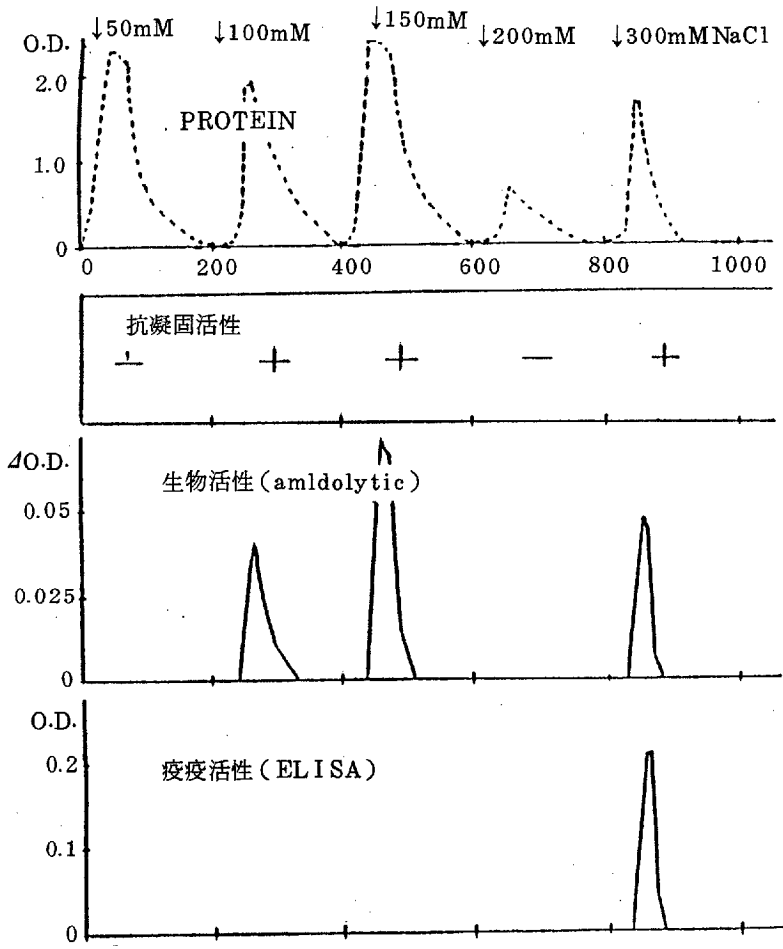


图3. Protein C の amidolytic activity

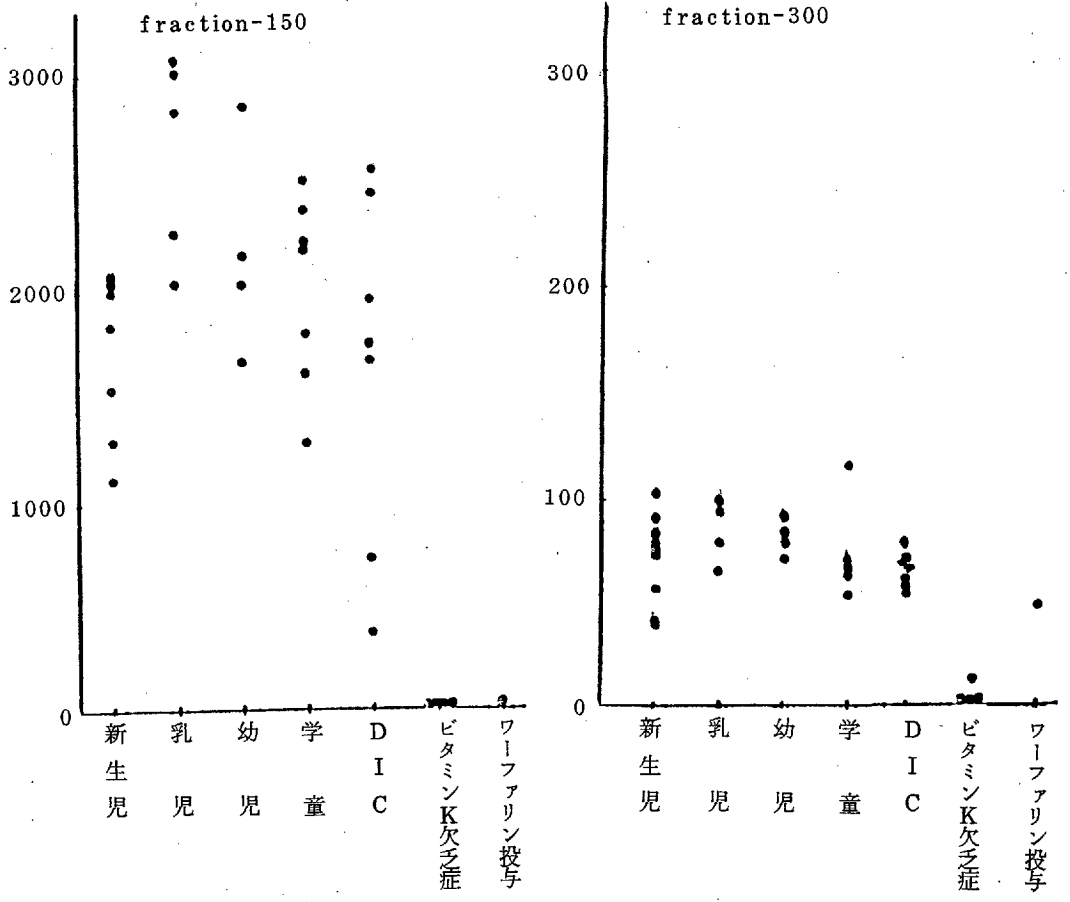




図4. 150, 300mM NaCl 分画でのProtein Cのamidolytic activity

 **検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用** 
論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります

ProteinC は近年、新たに見出されたビタミン K 依存性蛋白の 1 つである。ProteinC は、血液凝固第 Ⅲ 因子を特異的に失活させる作用が第一にあげられる。第二に血管内皮内皮下組織から、プラスミノゲンアクチベーターの遊離を促進させる作用が存在することが認められている。すなわち、トロンピンが生成され、生体の中で血栓形成傾向が発生すると、そのトロンピンによって、ProteinC が活性化されて活性型の Pro-teinC となり、血栓形成傾向を抑制するという働きが見られるようになる。

ビタミン K 依存性凝固蛋白である ProteinC を研究することにより、ビタミン K 欠乏状態を今までよりもさらに解明できると考え、ProteinC の測定法、ProteinC の正常値(新生児から年長児、成人まで)、さらにビタミン K 欠乏状態の ProteinC のレベル、異常 ProteinC ならびに、ビタミン K に対する反応について研究を行ってきている。

今年度は、1) ビタミン K 欠乏症、DIC、コントロールの、ELISA 法によって測定した Pro-teinC の抗原量、2) ビタミン K 欠乏症の Prote-inC レベルのビタミン K 投与前後の変化、3) Pr-oteinC 活性の測定法に対する一考察などについて報告する。