

# ビタミンK欠乏症における Protein C の検討

聖マリアンナ医大小児科 山田 兼雄  
共同研究者

宮地 良和, 目黒 高  
常 泉 いづみ

ビタミンK依存性凝固因子には、第II、第VII、第IXならびに第X因子が存在することが知られているが、近年になり、Protein CならびにProtein Sなどが注目をあびるようになった。第II、VII、IXならびにX因子のPIVKA-II、VII、IX、Xについては多く研究され、PIVKA-IIについては、われわれも、その簡易測定法を開発し、報告してきた。

Protein Cの解明とともにPIVKA-Protein Cの存在の可能性は多く述べられてきたが、実際にその研究法または報告は少ない。今回、近年開発されたProtein Cの凝固法による成績と従来の免疫法(EIA法)を利用した成績とのdyscrepancyから、PIVKA-Protein Cの存在を認め、PIVKA-Protein CのProtein Cに対する阻害効果ならびにPIVKA-Protein Cの泳動による観察を行なった。

## 対象および方法

1. 対象：正常成人、学童、乳児、新生児、未熟児、臍帯血ならびにビタミンK欠乏症、ワーファリン投与例について検討した。
2. 方法：免疫法は、抗Protein CのF(ab')<sub>2</sub>をマイクロプレートにコーティングし、被験血漿と反応させた後、ペルオキシダーゼ標識抗Protein Cとさらに反応させ、Protein Cに比して結合した酵素活性を測定するEIA法で行なった。凝固法は、基質血漿として、Protein C欠乏血漿に被験血漿を加え、トロンボモジュリンの存在下でのKPTTの凝固時間の延長効果として測定した。両測定に用いる被験血漿は3.8%クエン酸ナトリウム1/10

容加血液を採取し、3000 rpm, 15分間、10℃で分離した。PIVKA-Protein Cの鑑別は、Protein CとPIVKA-Protein Cの共通抗原を持ち、電気泳動的に移動度が異なることを利用した。2%アガローゲル( $\mu=0.02$ , ベロナール緩衝液, pH 8.6)の平板を作製し、被験血漿10 $\mu$ lをサンプリングし、300 V, 3時間の条件で、一次元電気泳動を行なう。次いで、アガロース平板を泳動した方向に切り出し、新たな平板上に移し、抗Protein C血清(自家製)を添加した抗体アガロース平板を作製する。300 V, 4時間の条件で二次元泳動を行なった。

Protein Cの抗凝固作用に対するPIVKA-Protein Cの影響(阻害率)は、正常プール血漿にバリウム吸着患者血漿を混合し、対照として用いた生食と比較して、プール血漿中のProtein C活性の阻害率を求めた。

## 成 績

1. PIVKA-Protein Cの確認：ビタミンK欠乏患者-症例の検査結果は、PIVKA-II 8  $\mu$ g/ml, PT 20.4秒, aPTT 54.4秒, トロンボテスト5%以下であった。このときのProtein C抗原量は23.5%, 抗凝固活性は1.0%であり、抗凝固活性に比して、抗原量が高値を示した。この成績より、PIVKA-Protein Cが考えられ、二次元免疫電気泳動法では、二峰性の沈降線が観察された。
2. Protein Cの抗原量と抗凝固活性の相関  
PIVKA-II陰性例として、正常成人、学童、乳児、新生児、臍帯血を用いたときの相関は  $r = 0.779$ ,  $y$  (抗凝固活性) =  $0.72x + 6.9$ であった。

これに対して、PIVKA-II陽性を示したワーファリン投与例、ビタミン欠乏症での相関は、 $r=0.798$ 、 $y=0.57x-9.4$ であった。すなわち、PIVKA-II陽性群では、傾きが小さく、抗原量に比して、抗凝固活性は極めて低値であった。

### 3. ビタミンK投与前後のProtein Cの変動(図1)

ビタミンK投与前後でのProtein Cの抗原量と抗凝固活性の変動について検討した。Protein C活性は、ビタミンK投与後には、確実に上昇しているのに対し、抗原量は、活性程、ビタミンK投与による影響は認められなかった。

### 4. Protein C抗凝固活性におよぼすPIVKA-Protein Cの影響(図2)

PIVKA-Protein Cの観察された血漿において、Protein Cの阻害はビタミンK欠乏症5例中4例に認められ、最高80%の阻害率であった。これに対して、ワーファリン投与では、5例中1例にも認

められなかった。

## 考 察

ビタミンK欠乏症でのProtein Cは、免疫法、凝固法とも、正常成人に比して低値であるが、免疫法では、乳児、新生児においては、あまり差が見られなかった。しかし、凝固法では極めて低値を示し、本症に対しては有用な測定法であった。また、抗原量と凝固法の両者を測定することにより、PIVKA-Protein Cを観察することが可能となった。Protein C活性に与えるPIVKA-Protein Cの影響は、現在、必ずしも明らかではないが、Protein C活性を競合的に阻害するために影響するものと考えられた。また、阻害効果がビタミンK欠乏症例で多く観察されたことは興味ある成績であった。

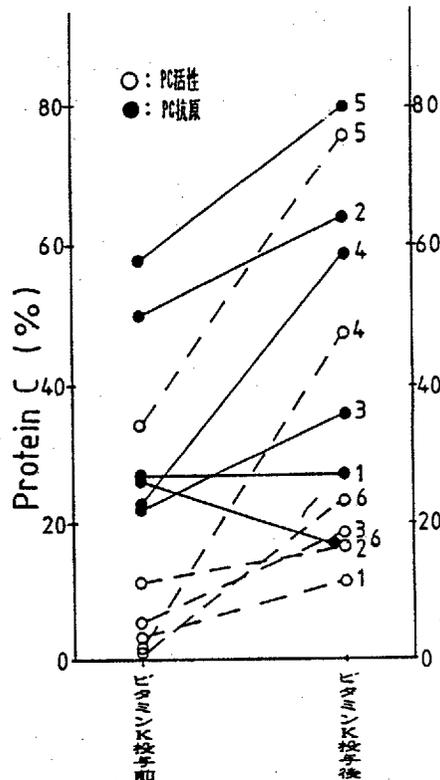


図1.

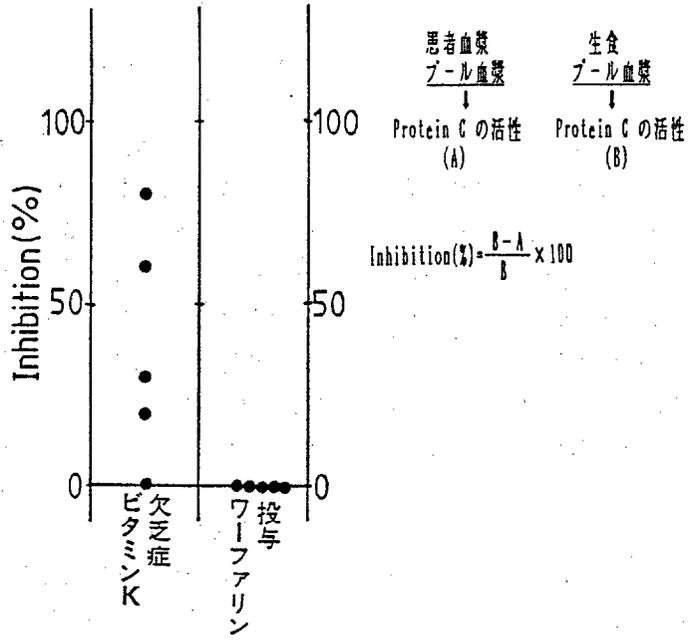
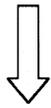


図 2.



**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



ビタミン K 依存性凝固因子には, 第 , 第 , 第 IX ならびに第 X 因子が存在することが知られているが, 近年になり, Protein C ならびに Protein S などが注目をあびるようになった。第 , , IX ならびに X 因子の PIVKA- , , IX, X については多く研究され, PIVKA- については, われわれも, その簡易測定法を開発し, 報告してきた。

Protein C の解明とともに PIVKA-Protein C の存在の可能性は多く述べられてきたが, 実際にその研究法または報告は少ない。今回, 近年開発された Protein C の凝固法による成績と従来の免疫法(EIA 法)を利用した成績との discrepancy から, PIVKA-Protein C の存在を認め, PIVKA-Protein C の Protein C に対する阻害効果ならびに PIVKA-Protein C の泳動による観察を行なった。