

肝硬変および脳血管障害時の protein C の変動

富山医科薬科大学検査部

風間 嘉晶・丹羽 正弘・近藤 信一・高橋 薫・櫻川 信男

桑名病院脳外科

宮川 照夫・新井 弘之

Protein C levels in liver cirrhosis and cerebrovascular diseases

Yosiaki KAZAMA, Masahiro NIWA, Shin-ich KONDO,
Kaoru TAKAHASHI and Nobuo SAKURAGAWA

Central Clinical Laboratory, Toyama Medical and Pharmaceutical University

Teruo MIYAKAWA and Hiroyuki ARAI

Department of Neurosurgery, Kuwana Hospital

Protein C, a vitamin K-dependent serine protease zymogen, is one of serine proteases which works in the regulatory systems of blood coagulation. Activation of protein C by thrombin is markedly enhanced by the thrombomodulin in the endothelial cell. Activated protein C exerts an anticoagulant by inhibiting F. Va and F. VIIa selectively. Protein C levels were measured by the amidolytic activity of the activated protein C against the chromogenic substrate (S-2266) in the patients with the cerebrovascular diseases, the patients with liver cirrhosis, and the patients receiving warfarin therapy. Protein C levels in the patients with cerebrovascular diseases were normal, whereas its levels in the patients with liver cirrhosis and patients receiving warfarin therapy were significantly low, $33.2 \pm 23\%$ and $65 \pm 21\%$, respectively.

Key words: protein C, cerebrovascular diseases, liver cirrhosis, warfarin therapy

プロテイン C, 脳血管障害, 肝硬変, ワーファリン治療

本格的な高令化社会を迎え、疾患分類上、悪性腫瘍や各種血栓症が上位を占め、また、最近の豊かな食生活から飲酒量も増加し、肝硬変をみることが多い。

肝は凝固・線溶系因子の産生場所として重要であるが、重症肝障害をもたらす肝硬変症では重症の凝血系障害から出血がもたらされることが多い。

一方、脳血管障害の原因としては、もちろん、血友病

やビタミン K 欠乏症のように出血性素因が挙げられるが¹⁾、不明のことが多い。他方、脳出血や脳血栓が出現すれば、凝固・線溶系が変動することが知られている²⁾。

ところで、近年の凝血系研究の進展につれて、凝血系制御機構上重要な抗第 Xa 因子や抗トロンピン作用を示す antithrombin III とは別に、第 Va や第 VIIa 因子を阻害する protein C の存在が明白となった。protein C は

Reprint requests to: Nobuo Sakuragawa,
Central Clinical Laboratory, Toyama
Medical and Pharmaceutical University.

別刷請求先: 〒930-01 富山市杉谷2630番地
富山医科大学検査部 櫻川 信男

もとより Seegers ら³⁾により, autoprothrombin II A として発見されたものであり, 抗凝固作用, 線溶亢進作用および血小板凝集障害作用が指摘されたものである。その後 Stenflo⁴⁾によりビタミン K 依存性蛋白として牛血より精製され, protein C と命名されたが, Seegers はこれを前述の autoprothrombin II A⁵⁾ と同一物とし, その後, Kiesel⁶⁾により人血より精製された。これはビタミン K 依存性凝固因子であることから, ワーファリン投与で減少することは明白で, 26~92U/dl まで減少する⁷⁾。正常者では, 70~140U/dl(100U/dl でプール血漿で測定して設定する)であり, 肝疾患, 手術後や血管内凝固症候群などで減少し⁸⁾⁹⁾, 先天性には heterozygote で 14~62U/dl を示す血栓傾向を持つ患者¹⁰⁾¹¹⁾や, 完全に欠乏する homozygote も存在し, protein C の半減期は 6~8 時間である¹²⁾。

Protein C の分子量は 62,000 であり, heavy chain (4,100) と light chain (2,100) より成り, 人血で 4 μ g/ml 存在する¹³⁾。この protein C は血管内皮細胞表面の thrombomodulin と thrombin との複合体により活性化される。これは protein S, Ca²⁺ phospholipid と共に強力に作用する¹⁴⁾¹⁵⁾。更に活性化 protein C は線溶系を亢進させるが, 線溶系阻害因子を阻止するのか, 血管内皮細胞より activator を放出するのか不明であり¹⁶⁾¹⁷⁾, 活性化 protein C は protein C inhibitor により制御されている¹⁸⁾。

本稿では, protein C の変動を産生障害を伴う肝障害として肝硬変, および凝血系の急激な変動を来す脳血管障害において検索し, その病態生理学的意義を解明した。

方法と材料

1. 方法

患者血漿を 3.8% クエン酸 1 容に血液 9 容の割合で採血し, 3,000rpm 10 分間遠心して, 血漿を得た。

2. 対象

対象患者として, 脳血管障害者 (51 例), 肝硬変者 (9 例), ワーファリン服用者 (8 例) とした。脳血管障害者は, 桑名病院脳神経外科に入院した未治療者で, 臨床症状および頭部 CT, 脳血管撮影により, 脳梗塞, 脳出血, クモ膜下出血 (SAH) に分類した。発症から 2 日以内を急性期, 1 週間以後 2 ヶ月以内を慢性期とした。各病期の人数, 平均年齢は急性脳梗塞 (12 例, 平均年齢 66.7 才), 慢性脳梗塞 (10 例, 平均年齢 61.3 才), 急性脳

出血 (10 例, 平均年齢 58.8 才), 急性 SAH (4 例, 平均年齢 60.8 才), 慢性クモ膜下出血 (4 例, 平均年齢 55.3 才) であった。対照として, 健康者 10 名とした。血漿は測定まで -30°C 以下で保存した。

3. プロテイン C 測定法

プロテイン C は生物活性を測定した。

(1) バリウム沈澱溶出血漿の作成

クエン酸加血漿 1ml 容 1M BaCl₂, 0.5M Tris-HCl (pH 8.0) 0.08ml を添加して, 4°C, 10,000g 15 分間遠心して, プロテイン C の吸着沈澱を得た。この沈澱を 0.15M BaCl₂-0.02M Tris-HCl (pH 8.0) 1ml で洗浄し, 4°C, 10,000g, 15 分間遠心後, その沈澱に, 0.1M Na-EDTA (pH 6.0) 0.5ml を加え溶解する。この溶解液に 40% PEG-6,000 0.5ml を加え, 分画を採取して, 0.05M Tris-HCl (pH 8.0), 0.1% Bovine serum albumin, 0.1M NaCl 0.5ml (A 溶液) を加え, バリウム沈澱溶出血漿とした。

(2) プロテイン C 活性の測定

バリウム沈澱溶出血漿 0.1ml, A 溶液 0.1ml, トロンビン (三共, 50U/ml) 0.1ml 混和後, 37°C, 60 分間 incubation し, プロテイン C を活性化した。さらに antithrombin III (75U/ml)-ヘパリン 100U/ml) 混液 0.1ml 加え, 37°C, 10 分間 incubation し, トロンビンを失活後, 発色合成基質 S-2266 (1.25mg/ml) 0.1ml 加え, 37°C, 10 分間反応後, 50% 酢酸 1ml で反応を停止して, 吸光度 (405nm) を測定した。

プロテイン C 活性値は, 健康人プール血漿より作製した検量線により, その値を算出した。

結 果

1. 肝硬変およびワーファリン投与時における protein C の変動

肝硬変での protein C は Fig. 1 のごとく 33.3 \pm 23% と低値を示した。ワーファリン投与時のそれも同様であり, 65 \pm 21% と低値を示した。前者はビタミン K 依存性凝固因子の産生場所の機能障害を示し, 後者のそれはビタミン K 不足を示す。

2. 脳血管障害時の protein C の変動

急性期および慢性期における脳血栓で, やや増加傾向を示すが, 統計的には, 有意ではなく, クモ膜下出血例でも低下傾向をみとめるが統計的には有意ではなかった (Fig. 2)

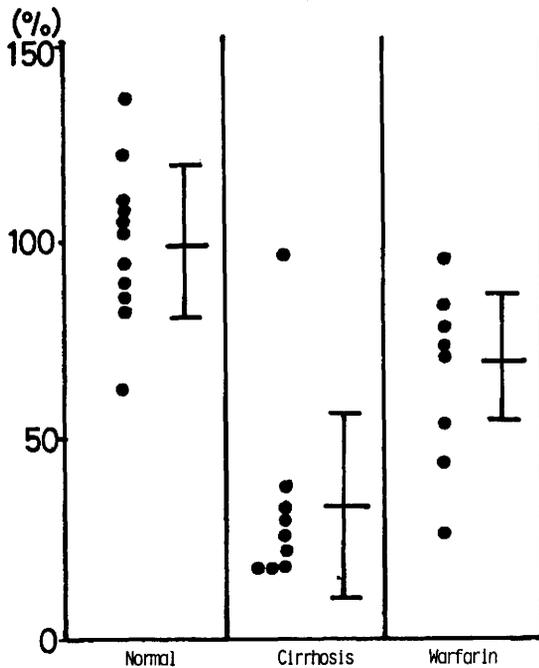


Fig. 1 Functional protein C levels in normal individuals, patients with liver cirrhosis, and patients receiving warfarin therapy

考 按

Protein C の変動は凝血学的意味が大きく、その欠乏症では血栓症が発生する¹⁰⁾¹¹⁾¹²⁾。

ビタミン K 欠乏症では第 II, VII, IX, X 因子の全てが欠乏するが、ワーファリン投与の導入時では第 VII 因子と protein C のみ、急速に減少し、他の凝固因子の減少の程度が緩徐であることから凝固系の亢進が指摘され¹⁵⁾、以前より皮膚壊死として指摘されていた warfarin induced skin necrosis が注目されている¹⁶⁾。

血中プロテイン C レベルが40~50% 以下を示す先天性プロテイン C 欠乏症は、2,000~5,000 人に 1 人の割合で出現する先天性 antithrombin III 欠乏症と同様、その臨床的意義は大きい¹⁷⁾¹⁸⁾。機能異常症も存在し、heterozygote は protein C が 40~50% であり、血栓症は下肢深部静脈血栓症や肺塞栓などであって、先天性 protein C 欠乏症の患者の約50%は15~30才で症状が発現する。その治療法としては、最初にヘパリンを用いて warfarin necrosis を防禦しつつ、長期間のワーファリン治療を施行する。Homozygote は皮下血腫(purpura fulmi-

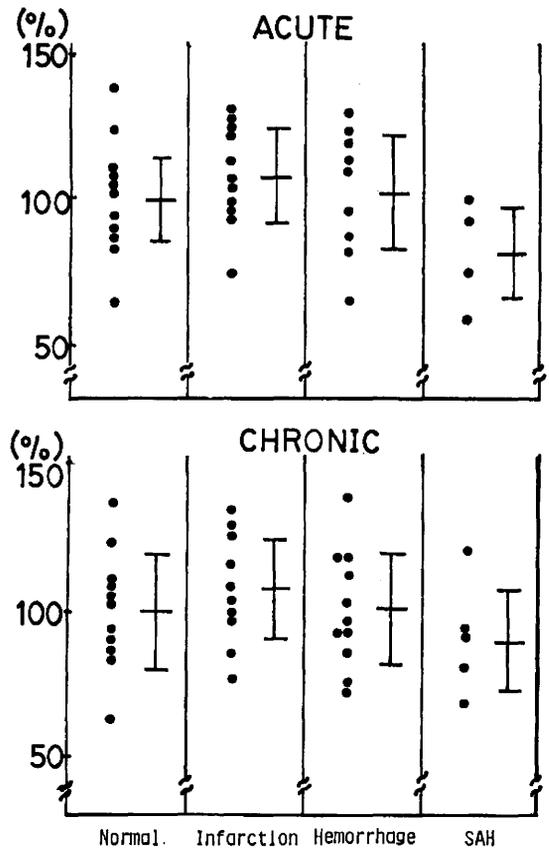


Fig. 2 Functional protein C levels in normal individuals, and cerebrovascular diseases

nans) であり、生後まもなく出現する。Homozygote の治療はヘパリンや抗血小板剤は無効であり、protein C の補充のみが有効となる。Factor IX 濃縮製剤 (1,000U/kg/48hr) や新鮮凍結血漿 (10mg/kg/12hr) を用いて 20~30U/dl に上昇させる¹¹⁾。

さて、この protein C が肝硬変で減少したことは、その産生場所が肝であることに起因している。また、ワーファリン投与での減少はビタミン K 依存性を明示している。

一方、脳血管障害例、脳出血時では fibrinogen の増加がみとめられ、血小板の形態や機能も変化するが¹⁹⁾、antithrombin III や α_2 -plasmin inhibitor などの凝固・線溶系の阻害物質には著明な変動はみとめられず、heparin cofactor II のみが急性期および慢性期脳血管障害例で減少を示しており²⁰⁾、antithrombin III が減少しない時期でも heparin cofactor II が抗トロンビ

ン作用を示して凝固系阻止につとめていることが考えられる。この場合の protein C も統計的には有意の変動をみとめられないが、これは血栓形成がごく一部の局所であり、全身性には影響を及ぼさないことが考えられる。

ま と め

肝障害とワーファリン投与時および脳血管障害において protein C の変動を検索した。

肝硬変のごとく産生場所の障害では protein C の減少は当然であり、ワーファリン投与によるビタミン K 欠乏状態も同様、減少をもたらす。脳血管障害では protein C の変動をみないが、別に検査した heparin cofactor II の減少から antithrombin III が減少する以前に減少した。

参 考 文 献

- 1) 櫻川信男：乳児の頭蓋内出血について，新潟医学会雑誌，98：421～424，1984。
- 2) 宮川照夫，新井弘之，櫻川信男：出血性脳梗塞の凝血学的検討，臨床血液，24：284，1983。
- 3) Seegers, W.H., McCoy, L.H., Groben, H. and Sakuragawa, N.: Purification and some properties of autoprothrombin II A: An anticoagulant perhaps also related to fibrinolysis, *Thromb. Res.*, 1: 443～460, 1972.
- 4) Stenflo, J.: A new vitamin K dependent protein. Purification from bovine plasma and preliminary characterization. *J. Biol. Chem.*, 251: 355～363, 1976.
- 5) Seegers, W.H., Novoa, E., Henry, R.L. and Hassouna, H.I.: Relationship of "new" vitamin K-dependent protein C and "old" auto-prothrombin II A. *Thromb. Res.*, 8: 543～552, 1976.
- 6) Kiesiel, W.: Human protein C. Isolation, Characterization and mechanism of activation by α -thrombin. *J. Clin. Invest.*, 64: 761～719, 1979.
- 8) Marlar, R.A., Endres-Brooks, J. and Miller, C.: Serial studies of protein C and its plasma inhibitor in patients with disseminated intravascular coagulation. *Blood.*, 66: 59～63, 1985.
- 9) Rodeghiero, F., Mannucci, P.M., Vagano, S., et al.: Liver dysfunction rather than intravascular coagulation as the main course of low protein C and antithrombin III in acute leukemia. *Blood.*, 63: 965～969, 1984.
- 10) Marciniak, E., Wilson, H.P., Marlar, R.A., et al.: Neonatal purpura fulminans: A genetic disorder related to the absence of protein C in blood. *Blood.*, 65: 15～20, 1985.
- 11) Sills, R.H., Marlar, R.A., Montgomery, R.A., et al.: Severe homozygous protein C deficiency. *J. Pediatr.*, 105: 409～413, 1984.
- 12) Griffin, J.M., Mosher, D.T., Zimmerman, T.S.: Protein C, an antithrombotic protein, is related in hospitalized patients with intravascular coagulation. *Blood.*, 60: 261～264, 1982.
- 13) Marlar, R.A., Kleis, A.T., Griffin, J.H.: Mechanism of action of human activated protein C, a thrombin-dependent anticoagulant enzyme. *Blood.*, 59: 1064～1072, 1982.
- 14) Stenflo, J.: Structure and function of protein C. *Seminars in Thromb. Haemost.*, 10: 109～121, 1980.
- 15) 櫻川信男，前田美雪，丹羽知登世：Protein C 測定法の検討並びにワーファリン服用時の protein C を含むビタミン K 依存性凝固因子の変動，臨床病理，34：464～468，1986。
- 16) Faraci, P.A., Deterling, R.A., Stein, A.M., et al.: Warfarin induced necrosis of the skin. *Surg. Gynecol. Obstet.*, 146: 695～700, 1978.
- 17) Bertina, R.M., Broekmans, A.W., von Wijnngaarden, A., et al.: Hereditary protein C deficiency and thromboembolic disease. In: Jespersen J. et al Ed. "Clinical aspects of fibrinolysis and thrombosis" South Jutl and Univ.Press. Esbjerg, 1983, pp. 151～162.
- 18) Thaler, E. and Lechner, K.: Antithrombin III deficiency and thrombolism. *Clin. Haemast.*, 10: 369～390, 1981.
- 19) 新井弘之，宮川照夫，櫻川信男：脳血管障害にみられる血小板の変化，最新医学，41：357～360，1986。
- 20) 櫻川信男：凝固制御機構異常もその調節因子第83回日本内科学会総会（東京）シンポジウムに発表（1986. 4.）

（昭和61年3月10日受付）