

新生児期, 乳児期におけるプロテイン S の推移

奈良県立医科大学小児科学教室

橋 本 憲 治

CHRONOLOGICAL CHANGES OF PROTEIN S IN NEWBORN AND INFANTILE PERIODS

KENJI HASHIMOTO

Department of Pediatrics, Nara Medical University

Received May 31, 1989

Summary: Chronological changes of levels and plasma distribution of vitamin K-dependent protein S (PS) were studied in infants throughout the first 12 months of life. Total PS antigen (T-PS: Ag), C₄b-binding protein (C₄bp: Ag), free PS antigen (F-PS: Ag), PS: Ag complexed with C₄b-binding protein (C₄bp-S: Ag) and PS activity (PS: Act) were measured in 450 full term infants with no bleeding and thrombotic episodes. T-PS: Ag assayed by ELISA were 22.4 ± 9.4 U/dl (mean \pm SD) on 0 day after birth (cord plasma), 22.3 ± 9.4 U/dl on 1 day and rose gradually, reaching 72.0 ± 16.8 U/dl at 12 months of age. PS: Act assayed by modified A-PTT using PS-immunodepleted plasma showed no increase but considerably higher levels in contrast with T-PS: Ag during the first 1 month of age, and then started to rise in parallel with T-PS: Ag, reaching 75.2 ± 19.3 U/dl at 12 months of age. Although 54~57% (same as the normal adult value) of PS were found to be bound to C₄bp in infants after 3 months of age, only 11.9%~34.0% of PS were bound in infants before 1 month of age because of relatively lower levels of C₄bp.

Index Terms

protein S (PS), C₄b-binding protein (C₄bp), C₄b-binding protein S antigen (C₄bp-S: Ag), free protein S antigen (F-PS: Ag)

緒 言

プロテイン S (Protein S; PS) は, DiScipio¹⁾ら(1977)によってヒト血漿より純化された分子量 69,000, N末端に 10 個の γ -carboxyglutamin 酸 (Gla) 残基を有するビタミン K 依存性血漿蛋白である²⁾。当初, 本因子の生物学的活性, 機能については不明であったが, その後本因子はプロトロンビン, 第七, 第九, 第十因子などのビタミン K 依存性凝固因子が示すプロテアーゼ作用はなく, 活性化プロテイン C (Activated protein C; APC) の非酵素性補助因子として, 第五因子及び第八因子を失活して凝固抑制的に働くことが明らかにされた³⁾⁴⁾⁵⁾。

更に, PS はヒト成人血漿中では 50~60% が補体系の

重要な調節蛋白である C₄b-binding protein (C₄bp) と結合しており, 残りの 40~50% は遊離型 PS として存在し, APC の補助因子として抗凝固能を示すことが知られるようになった⁶⁾⁷⁾。

従来, 凝固因子の欠乏が出血傾向を発現せしめることはよく知られてきたが, 近年血栓を反復する患者のなかにはフィブリノゲン, アンチトロンビン III (AT-III), プロテイン C (PC), プラスミノゲンの先天性欠乏ないし異常に基因するものが存在することが相次いで報告されるようになり, Comp⁸⁾ら(1984) は PS の先天性欠乏により血栓を反復する 1 家系を報告した。以来, 著者らの観察例⁹⁾を含め現在までに 10 数家系の先天性 PS 欠乏症が報告されている^{10)~12)}。後天的には, PS は妊娠, 紅斑性

狼瘡、経口避妊薬摂取など血栓傾向のリスクの高い状態では低下し、又 PS が肝で合成されることより肝疾患でも低下することが報告されている。従って、肝の未熟とビタミンKの不足状態の新生児期には PS の生理的低下が推察されるが、新生児期および乳児期の PS の存在形成およびその推移の詳細については明らかでない。

教室では既に、PS 及び C₄bp を血漿より純化し、家兎、マウスに免疫した各異種抗体を得、これを用いた Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) による、遊離型 PS と C₄bp 結合型 PS の PS 抗原測定法を確立した¹³⁾¹⁴⁾。本稿では新生児期、乳児期における PS 動態を明らかにする目的で、正期産児臍帯血及び生後 1 日目より 12 ヶ月に至る健康児について、PS 抗原、活性、及び PS の C₄bp との結合様式の推移を検索した。

検索対象及び方法

1. 検索対象

a) 臍帯血：満期正常分娩における臍帯結紮直後の臍帯血 (30 例) を採取し、直ちに 1/9 容の 3.8% クエン酸ナトリウムと混和し 10 分間遠心分離した。尚、母体へのビタミンK投与はされていない症例を対象とした。

b) 新生児、乳児：周産期にビタミンK投与の既往がなく出血症状及び血栓症状を呈していない正期産正常新生児生後 1 日 30 例、生後 2 日 30 例、生後 3～4 日 30 例、生後 5～7 日 30 例、及び、1 ヶ月、3 ヶ月、6 ヶ月、9 ヶ月、12 ヶ月の健康乳児 (各 60 例) より採血、上記同様の方法にて血漿を得た。尚、各血漿サンプルは測定に使用する直前まで -80℃ にて凍結保存した。

2. 人工的 PS 欠乏血漿：著者らの作成した抗 PS 家兎血清よりの IgG 分画をゲルに吸着、不溶化せしめて抗 PS-セファローズ 4 B カラムを作製し、これに正常プール血漿を通過させ、PS 欠乏血漿を得た¹⁴⁾。

3. プロテイン S 活性測定法：PS 欠乏血漿に対する被検血漿の活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT) 延長効果で測定した¹⁴⁾。125 μl の人工的プロテイン S 欠乏血漿と 25 μl の被検血漿の混合物に Actin (Dade, USA) を 100 μl 添加し、37℃、1 分間反応させ、10 μl の純化 APC (50 μg/μl) を添加した。1 分後 50 μl の 50 mM CaCl₂ を再加し、凝固時間を測定した。標準曲線は、PS 欠乏血漿にて種々の濃度に希釈した正常プール血漿を用いて作成した。

4. 全プロテイン S 抗原量 (T-PS: Ag)：著者らの開発した酵素免疫測定法 (ELISA) に拠った。抗 PS マウス血清を 0.05 M 炭酸塩緩衝液 (PH 9.6) にて 2000 倍希釈し、ELISA 用 microtitre-plate (NUNC, Denmark)

に 200 μl ずつ分注後 4℃ にて 24 時間放置した。吸引除去後 4% bovine serum albumin (BSA) を含む 0.05 M 炭酸塩緩衝液 200 μl を各々添し 37℃ 2 時間反応させブロッキングを行った (step 1)。ブロッキング液を 0.05% Tween 20 を含む 0.02 M リン酸緩衝化生食水 (pH 7.2) (A 液) にて十分洗浄後、被検血漿を 4% BSA を含む 0.02 M リン酸緩衝化生食水 (B 液) にて希釈し、抗原として各々 100 μl ずつ添加し 4℃、24 時間反応させた (Step 2)。Step 2 での反応液を A 液で十分に洗浄し、B 液にて 1000 倍に希釈した自家製抗 PS 家兎血清 100 μl を添加し、37℃ 2 時間反応させた (Step 3)。

A 液にて洗浄後 B 液にて 2000 倍に希釈したペルオキシダーゼ標識抗家兎 IgG ヤギ抗体 (Miles Lab Ltd., USA) 100 μl を添加し 37℃ で 60 分間反応させた。A 液で十分な洗浄後、0-phenyldiamine を基質として添加、発色させ 5～10 分後に 2.5 M 硫酸で反応を停止させ 492 nm での吸光度を測定した (step 4)。

既報の如く、本 ELISA は、遊離型及び C₄bp 結合型 PS 共に補促し、全 PS 抗原量を反映した¹⁴⁾。

5. C₄bp 結合型 PS 抗原量 (C₄bp-S: Ag)：Step 2 の過程までは T-PS: Ag と全く同様に行い、Step 3 において、抗 PS 家兎血清にかえて抗 C₄bp 家兎血清を 2000 倍希釈したものをを用いた。以下 Step 4 も T-PS: Ag と全く同一の方法で行った。4、5 の ELISA 法ともに、純化 PS、純化 C₄bp-PS complex を対象として用い標準曲線を作成し ELISA によって得られた値を蛋白量に換算した。C₄bp-PS complex は、モル比 1:1 の非共有結合とされているので、得られた C₄bp-PS complex の蛋白量のうち、各々の分子量より PS 部分の蛋白量を算定した¹⁴⁾。

6. 遊離型 PS 抗原量 (Free-PS: Ag)：4 で得た T-PS: Ag 蛋白量から、5 で算定した C₄bp 結合型 PS: Ag 蛋白量を引いて遊離型 PS 抗原蛋白量を算定した。尚、4、5、6 の成績は健康成人 20 名よりのプール血漿を標準 100% として、U/dl で表現した。

7. プロテイン S 抗原の二次元交差免疫電気泳動法 (PS: CIE)：1 mM EDTA 加、0.075 M ベロナール緩衝液 (pH 8.6) で溶解した 1% アガロース平板を作成し、被検血漿 8 μl を添加後 Bromophenol blue をマーカーとしたアルブミンピークが 3.7 cm 移動するまで 2.5 mA/cm で一次元泳動を行った。泳動後、孔より 2 mm 上方で泳動方向に平行にゲルを切りとり、その上部に 1% 抗 PS 家兎血清加 1% アガロースゲルを作成し、一次元泳動と直角方向に 0.7 mA/cm、16 時間泳動した。泳動後ゲルを乾燥させ Coomassie brilliant blue-R250

で染色した⁹⁾。C₄bp の二次元交差免疫電気泳動は抗 PS 家兎血清を抗 C₄bp 家兎血清に換えて上記と同様の方法で行った。

8. 全 C₄b-binding protein 抗原量 (C₄bp: Ag) 測定法: 自家製抗 C₄bp 家兎血清を用いた Laurell 法によるロケット免疫電気泳動法に拠った¹³⁾¹⁴⁾。0.075 M ペロナール緩衝液 (pH 8.6) で溶解した 1% アガロース (Sigma, USA) に 1% になるべく抗 C₄bp 家兎血清を混和し、ゲル平板を作成した。ペロナール緩衝液で 10 倍希釈した被検血漿 5 μl を添加後 0.6 mA/cm の定電流で 16 時間泳動した。

成 績

1. 成熟新生児、乳児期に於ける血漿中プロテインS

抗原の二次元交差免疫電気泳動像 (PS: CIE): 成熟新生児の血漿中 PS の存在形式について、自家製抗ヒト PS 家兎血清を用いた二次元交差免疫電気泳動法により、PS 抗原の泳動像を観察した。正常成人血漿サンプルでは、起点に近い位置に peak の高い slow moving な部分と、これに連なって陽極側に中等度の peak 高を示す fast moving な部分の二峰性の arc pattern が観察された。成熟新生児の臍帯血漿サンプルでは陰極側の slow moving arc は欠如していたが、陽極側には成人に比して若干 peak 高の低い fast moving arc が認められた。生後 1 日のサンプルでは slow moving arc は殆ど欠如していたが、経日的に漸次出現し始め、生後 5 日のサンプルでは明らかな二峰性を呈した (Fig. 1)。一方、抗ヒト C₄b-binding protein (C₄bp) 家兎血清を用いた二次元交差

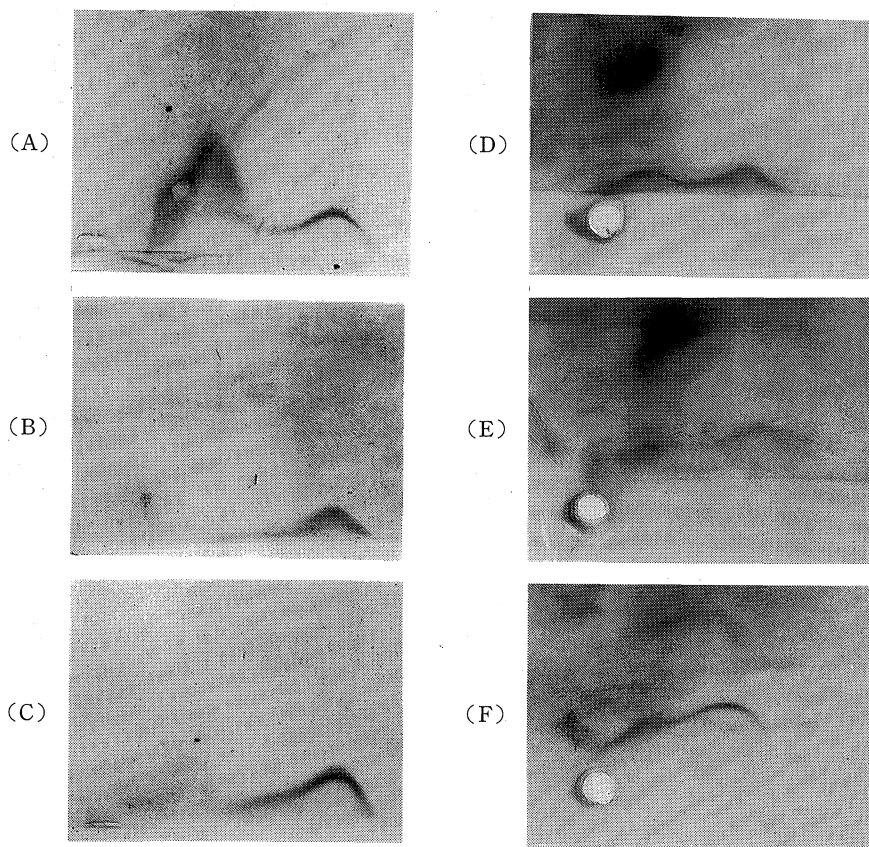


Fig. 1. Crossed immunoelectrophoresis of PS: Ag.

- (A) Healthy adult (Normal Control)
- (B) Cord plasma
- (C) 1 day after birth
- (D) 5~7 days after birth
- (E) 1 month after birth
- (F) 3 months after birth

免疫電気泳動にて、正常成人血漿サンプルは起点に近い陰極側に一峰性の arc が観察された。臍帯血では arc は欠如していたが生後 5 日のサンプルで arc が少量出現し始め、生後 1 ヶ月のサンプルでは成人の 2/3 peak 高を示す arc が観察された。従って PS: CIE に於いて、二峰性を呈した PS 抗原 arc の slow moving part は C_4 bp と結合した C_4 bp-S であり、fast moving part は Free-PS によるものと判定した (Fig. 2)。

2. 新生児期及び乳児期の血漿中の全 PS 抗原量 (T-PS: Ag), C_4 bp 結合型 PS 抗原量 (C_4 bp-S: Ag), 遊離型 PS 抗原 (Free-PS: Ag) 及び C_4 bp 抗原量 (C_4 bp: Ag) の推移: 成熟新生児の出生直後より生後 1 年まで経時的に T-PS: Ag, C_4 bp-S: Ag, Free-PS: Ag 及び C_4 bp: Ag の推移を追跡した。ELISA 法で測定した T-PS:

Ag は、臍帯血 30 サンプルでは 2~45 U/dl (平均±標準偏差 22.4 ± 9.9 U/dl) で成人値の約 1/4 の値であった。

生後 1 日 7~48 U/dl (22.3 ± 9.4 U/dl) と同様に低値であったが、生後 2 日 7~49 U/dl (25.4 ± 10.2 U/dl), 3~4 日 12~41 U/dl (26.5 ± 8.4 U/dl) と軽度に増加しはじめ、生後 5~7 日では 16~59 U/dl (33.5 ± 10.3 U/dl) と成人値の約 1/3 となり、1 ヶ月で 19~61 U/dl (36.6 ± 9.2 U/dl), 3 ヶ月 12~97 U/dl (45.9 ± 13.7 U/dl) と成人値の約 1/2 に到達した。6 ヶ月で 19~127 U/dl (59.7 ± 20.1 U/dl), 9 ヶ月 22~123 U/dl (66.6 ± 20.8 U/dl) と漸次増加し、12 ヶ月では 42~121 U/dl (72.0 ± 16.8 U/dl) と成人の下限値内に到達した (Table 1, Fig. 3)。

同様の ELISA 法で測定した C_4 bp-S: Ag は、臍帯血

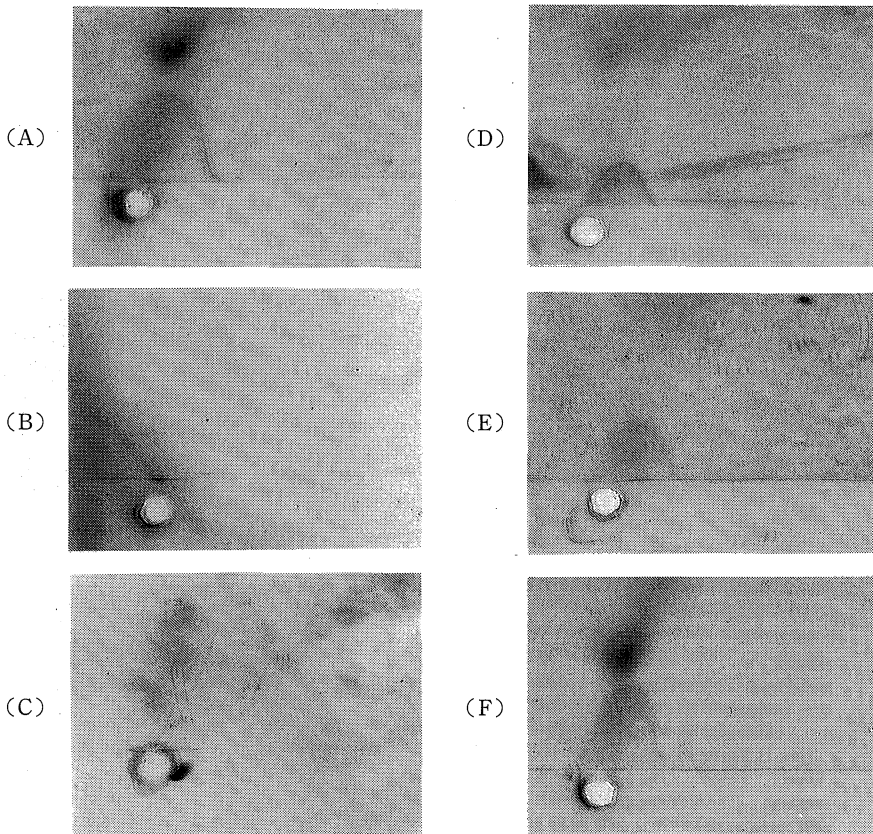


Fig. 2. Crossed immunoelectrophoresis of C_4 bp: Ag.

- (A) Healthy adult (Normal Control)
- (B) Cord plasma
- (C) 1 day after birth
- (D) 5~7 days after birth
- (E) 1 month after birth
- (F) 3 months after birth

Table 1. Mean±SD (U/dl) of PS: Ag, PS: Act and C₄bp: Ag in each age group

	0 D (Cord)	1 D	2 Ds	3-4 Ds	5-7 Ds
Total PS: Ag	22.4± 9.9	22.3± 9.4	25.4±10.2	26.5± 8.4	33.5±10.3
PS: Ag complexed with C ₄ bp	10.7±10.6	12.8± 9.8	16.3±10.7	15.5± 8.1	22.2±10.2
Free PS: Ag	40.9±16.6	37.2±12.7	37.0±14.5	37.6±12.0	36.9±10.2
C ₄ bp: Ag	3.9± 5.2	6.3± 7.4	8.2± 8.5	13.0± 8.1	23.4±12.3
PS: Act	42.6±11.5	38.4±11.6	37.1±13.6	39.6±13.4	38.1±13.5

	1 M	3 Ms	6 Ms	9 Ms	12 Ms	Adults
Total PS: Ag	36.6± 9.2	45.9±13.7	59.7±20.1	66.6±20.8	72.0±16.8	96.1±18.5
PS: Ag complexed with C ₄ bp	30.6± 9.4	48.2±19.2	56.6±20.2	65.8±17.8	69.4±18.1	93.7±15.8
Free PS: Ag	43.0±12.8	48.0±17.2	59.0±20.4	68.3±22.3	75.9±30.4	98.4±26.1
C ₄ bp: Ag	43.0±16.0	67.1±19.8	77.3±13.3	83.4±16.7	89.1±12.1	95.1±16.2
PS: Act	43.1±19.1	48.1±18.7	59.5±22.6	66.3±21.3	75.2±19.3	90.4±26.8

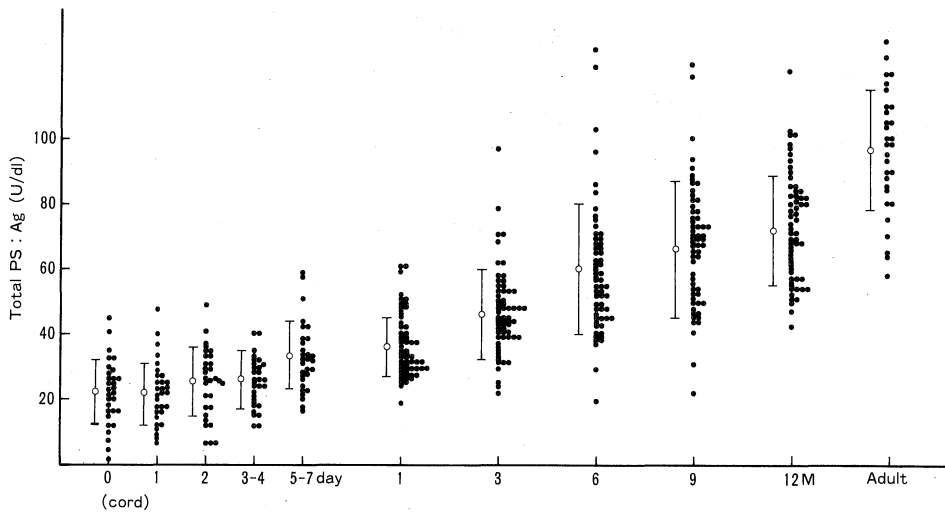


Fig. 3. Chronological changes of total-protein S antigen.

30 サンプルでは0~47 U/dl (10.7±10.6 U/dl) であり, 生後1日で0~31 U/dl (12.8±9.8 U/dl), 2日0~46 U/dl (16.3±10.7 U/dl), 3~4日3~40 U/dl (15.5±8.1 U/dl) と著しく低下していた。

生後5~7日で7~43 U/dl (22.2±10.2 U/dl) と増加しはじめ, 1ヶ月7~60 U/dl (30.6±9.4 U/dl), 3ヶ月では10~108 U/dl (48.2±19.2 U/dl) と成人値の約1/2に達した。6ヶ月21~114 U/dl (56.6±20.2 U/dl), 9ヶ月21~108 U/dl (65.8±17.8 U/dl) と漸次増加し, 12

ヶ月では42~107 U/dl (69.4±18.1 U/dl) と成人の下限値に達した (Table 1, Fig. 4)。

Free-PS: Ag は, 臍帯血 30 サンプルでは8~78 U/dl (40.9±16.6 U/dl) であったが, 生後1日で10~70 U/dl (37.2±12.7 U/dl), 2日10~76 U/dl (37.0±14.5 U/dl), 3~4日13~61 U/dl (37.6±12.0 U/dl), 5~7日14~64 U/dl (36.9±10.2 U/dl) と臍帯血の値より軽度に低下していた。生後1ヶ月で19~88 U/dl (43.0±12.8 U/dl) と増加しはじめ, 3ヶ月では20~89 U/dl (48.0

±17.2 U/dl)と成人値の約1/2に達した。6ヶ月で17~134 U/dl(59.0±20.4 U/dl), 9ヶ月22~123 U/dl(68.3±22.3 U/dl)と漸次増加し, 12ヶ月では41~142 U/dl(75.9±30.4 U/dl)と成人の下限値内に到達した (Table 1, Fig. 5).

Laurell法で測定したC₄bp:Agは, 臍帯血30サンプルでは0~15 U/dl(3.9±5.2 U/dl), 生後1日0~23 U/dl(6.3±7.4 U/dl), 2日0~24 U/dl(8.2±8.5 U/dl), 3~4日0~32(13.0±8.1 U/dl)と極めて低値で

推移していた。生後5~7日では8~51 U/dl(23.4±12.3 U/dl), 1ヶ月12~79 U/dl(43.0±16.0 U/dl)と著増し, 3ヶ月では26~108 U/dl(67.1±19.8 U/dl)と成人値の約2/3値に達した。その後6ヶ月で41~117 U/dl(77.3±13.3 U/dl), 9ヶ月37~113 U/dl(83.4±16.7 U/dl)と緩徐に漸増し, 12ヶ月では49~117 U/dl(89.1±12.1 U/dl)と成人の下限値内に達した (Table 1, Fig. 6).

T-PS:AgとC₄bp-S:Agの比は, 臍帯血では0.12

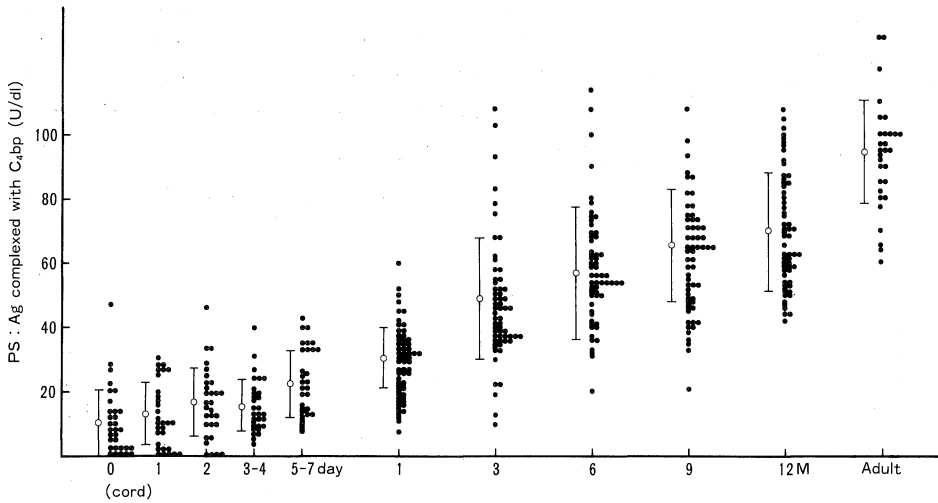


Fig. 4. Chronological changes of protein S antigen complexed with C₄b-binding protein.

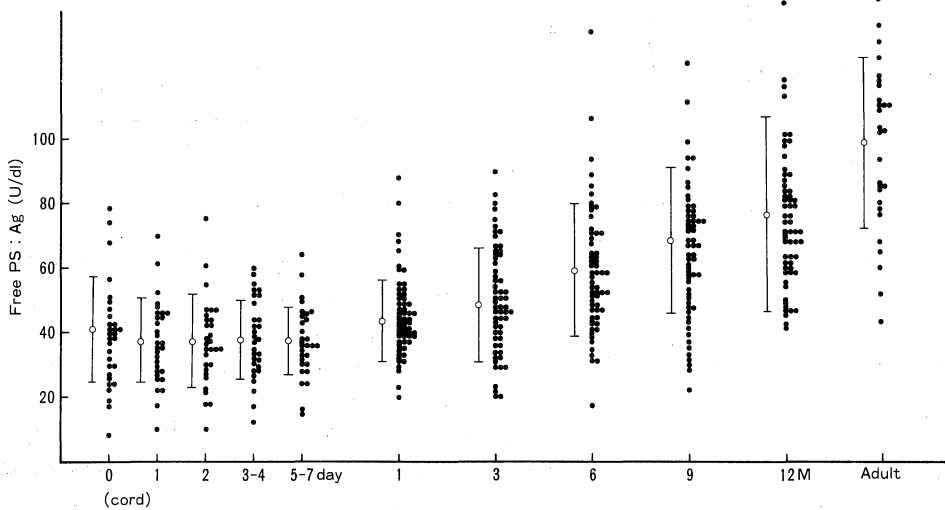


Fig. 5. Chronological changes of free-protein S antigen.

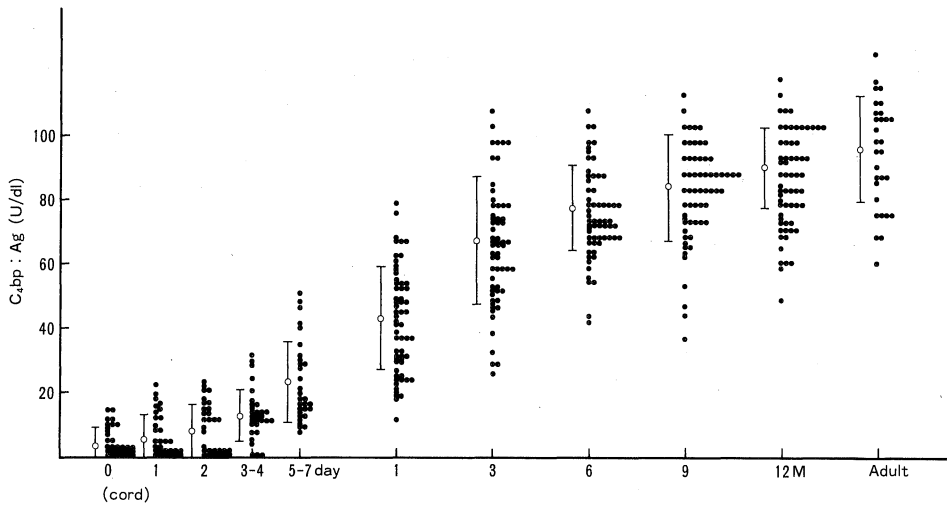
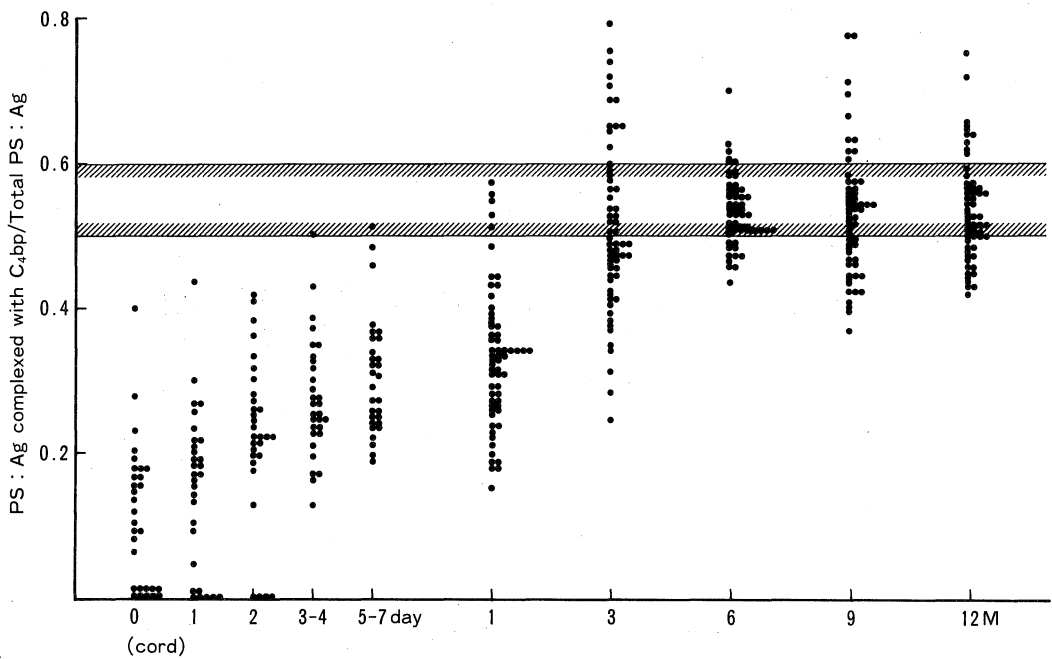


Fig. 6. Chronological changes of C₄b-binding protein antigen.

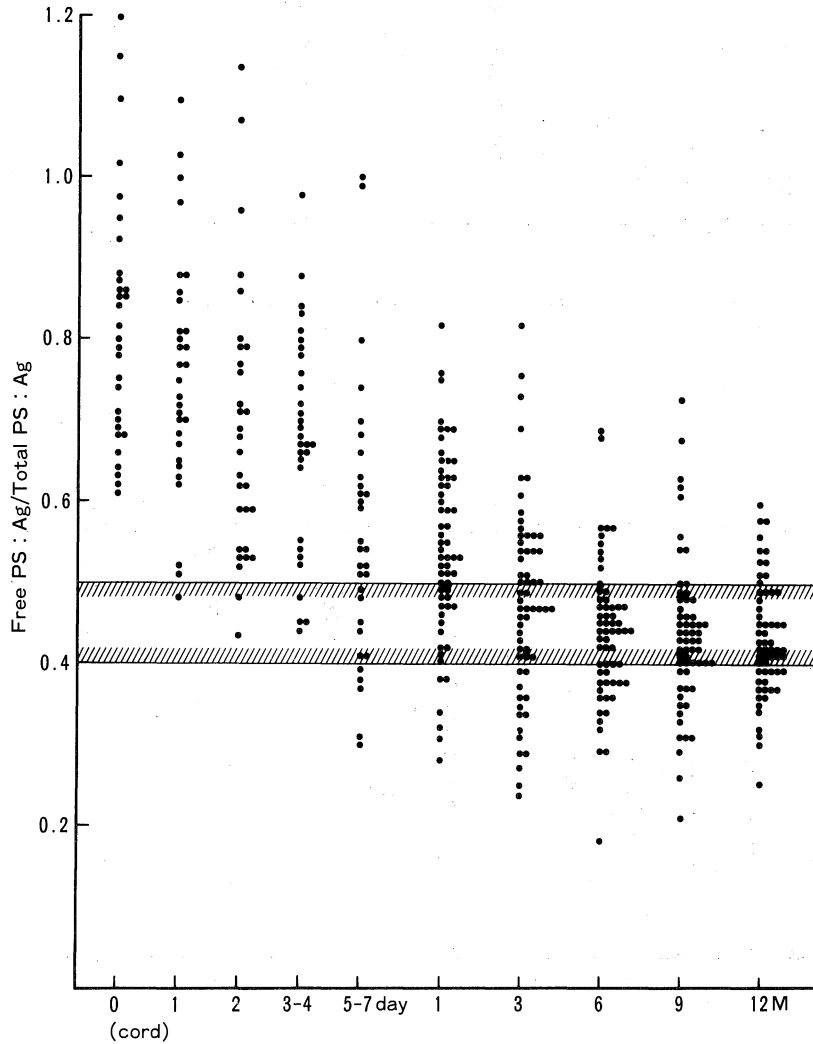


	0 D (Cord)	1 D	2 Ds	3-4 Ds	5-7 Ds	1 M	3 Ms	6 Ms	9 Ms	12 Ms
Mean	0.12	0.16	0.23	0.28	0.31	0.34	0.55	0.54	0.57	0.56
S. D.	± 0.10	± 0.11	± 0.11	± 0.08	± 0.09	± 0.10	± 0.17	± 0.05	± 0.12	± 0.11

Fig. 7. Chronological changes of the ratio of protein S antigen complexed with C₄b-binding protein to total-protein S antigen. The area surrounded by diagonal lines indicates healthy adults values.

±0.10, 生後1日 0.16±0.11 と極めて低値であった。生後2日で 0.23±0.11, 3~4日 0.28±0.08, 5~7日 0.31±0.09, 1ヶ月では 0.34±0.10 と漸次増大し, 3ヶ月では 0.55±0.17 とほぼ成人レベルの比率 (0.50~0.60) に達した。以後6ヶ月で 0.54±0.05, 9ヶ月 0.57±0.12, 12ヶ月では 0.56±0.11 であり同様の比率で推移した (Fig. 7)。

T-PS: Ag と Free-PS: Ag の比は, 臍帯血では 0.82±0.18, 生後1日 0.76±0.19 と極めて高値であった。生後2日で 0.70±0.21, 3~4日 0.68±0.13, 5~7日 0.52±0.14, 1ヶ月では 0.54±0.12 と漸次低下し, 3ヶ月で 0.48±0.12 とほぼ成人レベルの比率 (0.40~0.50) に達した。6ヶ月で 0.44±0.07, 9ヶ月 0.42±0.08, 12ヶ月では 0.45±0.06 と同様の比率であった (Fig. 8)。



	0 D (Cord)	1 D	2 Ds	3-4 Ds	5-7 Ds	1 M	3 Ms	6 Ms	9 Ms	12 Ms
Mean	0.82	0.76	0.70	0.68	0.52	0.54	0.48	0.44	0.42	0.45
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
S. D.	0.18	0.19	0.21	0.13	0.14	0.12	0.12	0.07	0.08	0.06

Fig. 8. Chronological changes of the ratio of free-protein S antigen to total-protein S antigen. The area surrounded by diagonal lines indicates healthy adults values.

3. 新生児期及び乳児期の血漿中の PS 活性値 (PS : Act) の推移 : 臍帯血 30 サンプルでは 20~73 U/dl(42.6 ±11.5 U/dl) であった。生後 1 日で 11~68 U/dl (38.4 ±11.6 U/dl), 2 日 5~64 U/dl (37.1±13.6 U/dl), 3~4 日 7~65 U/dl(39.6±13.4 U/dl), 5~7 日 5~68 U/dl (38.1±13.5 U/dl) と臍帯血の値より低値を示したが、生後 1 ヶ月で 7~97 U/dl(43.1±19.1 U/dl) と軽度増加し始め、3 ヶ月では 12~97 U/dl (48.1±18.7 U/dl) と成人値の約 1/2 に達した。6 ヶ月で 19~119 U/dl (59.5±22.6 U/dl), 9 ヶ月 25~123 U/dl (66.3±21.3 U/dl) と漸次増加し、12 ヶ月では 33~128 U/dl (75.2±19.3 U/dl) と成人値下限に到達した (Table 1, Fig. 9).

この PS : Act が T-PS : Ag, C₄bp-S : Ag, Free-PS : Ag のいずれと平行して推移するか、各々についての相関を求めた。

PS : Act と T-PS : Ag の相関係数は、臍帯血では $\gamma = 0.91$, 生後 1 日 $\gamma = 0.92$, 2 日 $\gamma = 0.89$, 3~4 日 $\gamma = 0.88$ と良好であった。生後 5~7 日では $\gamma = 0.75$, 1 ヶ月 $\gamma = 0.67$, 3 ヶ月 $\gamma = 0.60$ とかなり係数は低下し相関は不良であったが、6 ヶ月で $\gamma = 0.88$, 9 ヶ月 $\gamma = 0.88$, 12 ヶ月では $\gamma = 0.82$ と再び良好な相関を示した (Fig. 10).

PS : Act と C₄bp-S : Ag の相関係数は、臍帯血では $\gamma = 0.81$, 生後 1 日 $\gamma = 0.83$, 2 日 $\gamma = 0.87$, 3~4 日 $\gamma = 0.76$ と相互の相関は良好であった。生後 5~7 日では $\gamma = 0.63$, 1 ヶ月 $\gamma = 0.60$, 3 ヶ月 $\gamma = 0.60$ とこの時期の相

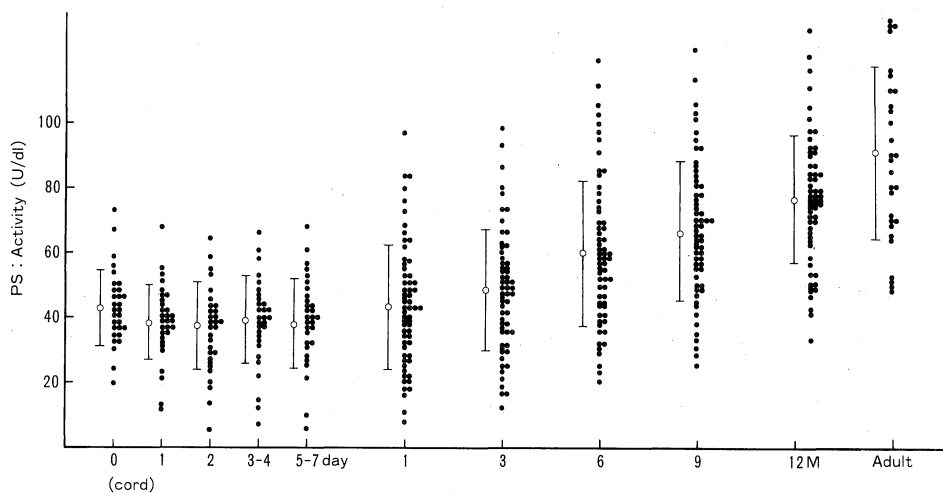


Fig. 9. Chronological changes of protein S activity.

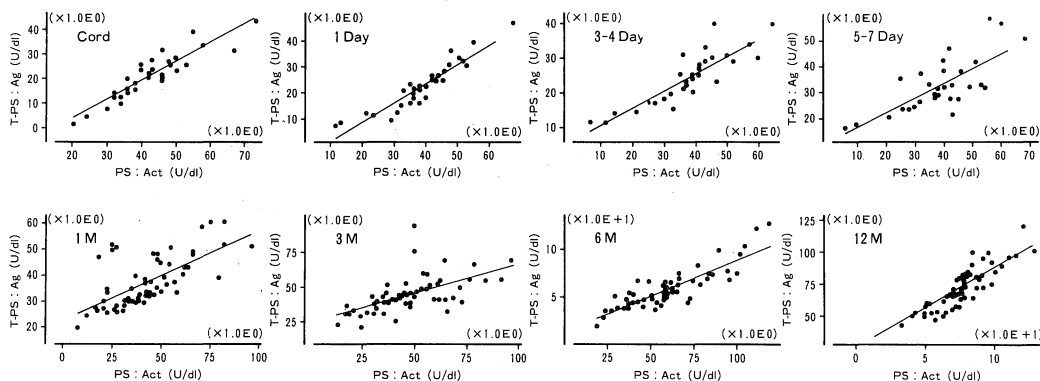


Fig. 10 Correlation between total-protein S antigen and protein S activity.

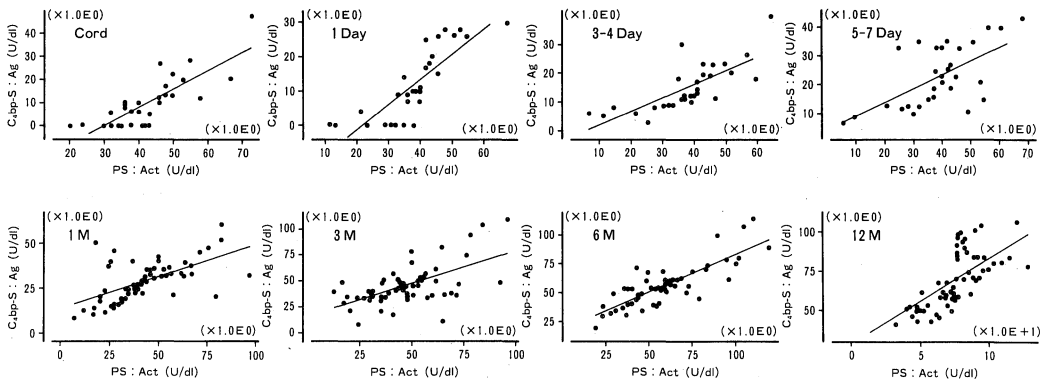


Fig. 11. Correlation between protein S antigen complexed with C₄b-binding protein and protein S activity.

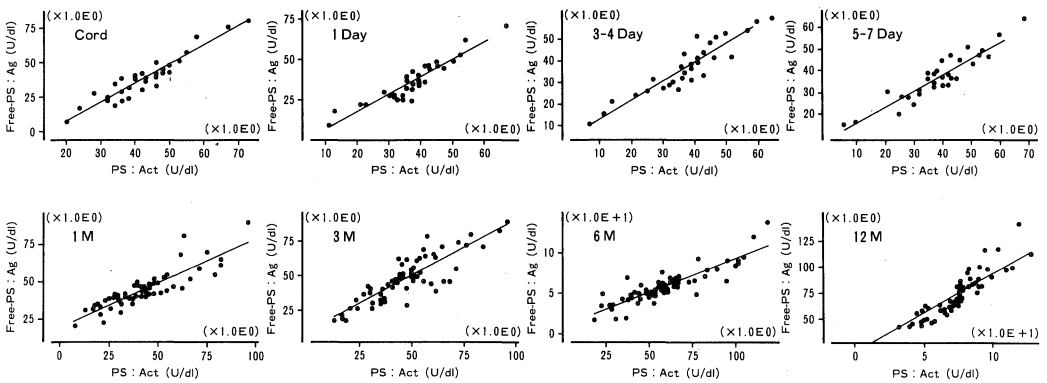


Fig. 12. Correlation between free-protein S antigen and protein S activity.

関はかなり低下したが、その後6ヶ月では $\gamma=0.83$ 、9ヶ月 $\gamma=0.76$ 、12ヶ月 $\gamma=0.70$ であり健常成人と同様の相関値を示した (Fig. 11).

PS : Act と Free-PS : Ag の相関係数は、臍帯血では $\gamma=0.93$ 、生後1日 $\gamma=0.92$ 、2日 $\gamma=0.91$ 、3~4日 $\gamma=0.91$ であった。生後5~7日では $\gamma=0.90$ 、1ヶ月 $\gamma=0.88$ 、3ヶ月 $\gamma=0.86$ 、6ヶ月 $\gamma=0.91$ 、9ヶ月 $\gamma=0.89$ 、12ヶ月 $\gamma=0.82$ といずれの時期も良好な相関を示した (Fig. 12).

考 察

新生児期には肝の未熟性ならびにビタミンK欠乏によりプロトロンビン(第II因子)、第VII因子、第IX因子及び第X因子などの凝固因子の活性が低下し、これら各因子の低下度は新生児出血症の発現とも関連することは従来より良く知られてきたところである。これら4因子はそ

れぞれ分子内に活性中心のセリン残基を有し、セリンプロテアーゼの前駆体として血漿中に存在している。一方PSは上記因子と同じくビタミンK依存因子であり肝で合成されるが、血漿中ではプロテインC(PC)の活性化型である Activated PC (APC) の作用の補助因子として、凝固制御的に働くことが明確にされるようになった²⁾³⁾⁴⁾。臨床的にPC及びPSの欠乏ないし低下は、凝固制御機構の破綻による血栓形成を招来せしめることが知られているが、新生児期及び乳児期のPCならびにPSの動態については殆ど知られていない。PSはヒト血漿中に於いて補体系蛋白C₄bpと結合しているPS(C₄bp-S)と、結合せず遊離しているPS(Free-PS)の二様式で存在している⁶⁾⁷⁾。著者は成熟新生児の生直後より生後1年まで、全PS抗原量、C₄bp結合PS抗原量、遊離PS抗原量及びPS活性の推移を検索した。

自家製抗ヒトPS家兔抗血清を用いて血漿中のPSの

二次元交差免疫電気泳動を行うと、正常成人血漿サンプルでは、泳動原点近くに高 peak の C₄bp 結合型 PS 抗原の arc と、それに連なって陽極側に peak 高のやや低い遊離型 PS 抗原の arc との二峰性の泳動 pattern が観察された。成熟新生児の臍帯血サンプルでは、C₄bp 結合型 PS 抗原の arc は欠如し、かつ遊離型 PS 抗原のやや低い arc のみが観察された。C₄bp 結合型 PS 抗原の arc は生後 2 日より出現しはじめ生後 5～7 日では成人像より低い、明らかな二峰性 arc が認められた。

自家製抗ヒト C₄bp 家兔抗血清を用いた二次元交差免疫電気泳動では臍帯血、生後 1 日のサンプルでは、泳動 arc が欠如していたが、経時的に出現しはじめ 1 ヶ月では成人の約 2/3 の arc 高を呈した。遊離型 PS 抗原は臍帯血サンプルでは成人の約 1/2 高の arc を呈し、1 ヶ月以後漸次増高し 3 ヶ月では成人の約 2/3 の arc 高を呈することが観察された。新生児期には C₄bp 抗原が極めて低値のため PS は結合し得ず、殆ど遊離型 PS の型で存在しているものと考えられた。このような PS 抗原の定性所見に基づいて、新生児、乳児期に於ける血中の PS 複合体の推移について、全 PS 抗原、C₄bp 結合型 PS 抗原、遊離型 PS 抗原を定量的に検索した。全 PS 抗原量は臍帯血 22.4±9.9 U/dl、生後 1 日 22.3±9.4 U/dl と成人値の約 1/4 の値を示し、その後漸次増高し、生後 1 ヶ月で 36.6±9.2 U/dl となり、12 ヶ月で 72.0±16.8 U/dl と成人下限値内に到達した。C₄bp 自体の抗原量は新生児期では極めて低値であり、第 5～7 日より 3 ヶ月にかけて著しい増加を認めたが、その後漸次増高し 12 ヶ月で 89.1±12.1 U/dl と成人下限値内に達した。C₄bp 抗原量と C₄bp 結合型 PS 抗原量の推移とは平行していた。これに対し、遊離型 PS 抗原量は臍帯血 40.9±16.6 U/dl と成人値の約 2/5 であり、生後 5～7 日 36.9±10.2 U/dl、1 ヶ月 43.0±12.8 U/dl と優位の増加を認めなかったが、同時期の全 PS 抗原量に比し有意の高値を示した。その後漸次増高し 12 ヶ月では 75.9±30.4 U/dl と成人下限値内に到達していた。

PS の活性は凝固法により測定したが、臍帯血では 42.6±11.5 U/dl であった。生後 1～7 日の間更に低下したが、1 ヶ月で 43.1±19.1 U/dl となり、その後 3 ヶ月より 12 ヶ月に至る期間は漸増傾向を認めた。PS 活性と全 PS 抗原量または C₄bp 結合型 PS 抗原量との相関は、生下時より生後 3～4 日までは良好であったが、生後 5～7 日より 3 ヶ月にかけて相互の相関は優位な低下を認めた。6 ヶ月以降 12 ヶ月までは再び良好な相関を示した。一方 PS 活性と遊離型 PS 抗原量との相関は、臍帯血より 12 ヶ月に至る全期間に於いて良好な相関を示

した。

以上の成績から下記のことが推論される。即ち、新生児期には C₄bp 抗原量が極めて低値であり、PS 抗原側から見た場合 C₄bp が相対的に不足し、C₄bp 結合型 PS の占める割合が有意に低下している。従って遊離型 PS の占める比率が高くなる。Comp¹⁵⁾らによって報告されている如く、この C₄bp 結合型 PS 抗原は PS 活性を持たないため、C₄bp 結合型比率の低い新生児期に於いては、相対的な活性高値として反映されるものと考えられる。又、1 ヶ月まで、PS 活性が殆ど増加しないのは、全 PS 抗原量がゆるやかに漸増するものの、C₄bp 抗原の漸増傾向により、活性を有さない C₄bp 結合型 PS 抗原の存在比率の増加によって相殺されたものと考えられた。

6 ヶ月以降、PS 活性値と全 PS 抗原量は、ほぼ平行した漸増傾向を示し良好な相関で推移した。PS 活性を持たない C₄bp 結合型 PS の全 PS 抗原量に占める比率は、新生児期より 1 ヶ月にかけては (0.12～0.34) と有意に低値であり、遊離型 PS 優位の状態であった。3 ヶ月 (0.55±0.17)、6 ヶ月 (0.54±0.05)、9 ヶ月 (0.57±0.12)、12 ヶ月 (0.56±0.11) と健常成人レベルの比率 (0.50～0.60) と同様であり、生後 1 ヶ月から 3 ヶ月の間に PS と C₄bp との結合関係が成人レベルに樹立されていくものと推察された。成人では遊離型 PS、遊離型 C₄bp と C₄bp-PS complex は平衡関係にあり、KD=0.7×10⁻⁷M であることが知られている¹⁶⁾。Laurell 法で C₄bp が測定限界以下の症例が含まれる生後 3～4 日までは KD を求めることは出来ないが、PS 及び C₄bp が共に減少している生後 5～7 日、1 ヶ月、3 ヶ月での KD を求めると各々 0.5×10⁻⁷M、0.8×10⁻⁷M、0.8×10⁻⁷M となり平衡関係はほぼ一定した値を示している。このことは全 PS 抗原量が成人の約 1/3、全 C₄bp 抗原量が成人の 1/4 である生後 5～7 日では、C₄bp-PS complex が成人の約 1/9～1/12 であることを示しており、僅かに血中に出現した C₄bp のうち PS と複合体を作成する割合は PS 量の減少を伴うが故に成人より更に低いことが示唆された。

著者の成績について学会発表とはほぼ同時期に、独立した 4 ヶ所の研究 Group¹⁷⁻²⁰⁾から、胎児血又は臍帯血における PS、C₄bp を検索した成績が発表された。彼らはそれぞれ胎児血又は臍帯血を 20 例から 30 例検索し、これらに於いて C₄bp 抗原が欠如～著減している事、並びにこの時期の遊離型 PS 優位を指摘している。著者の成績はこれらとはほぼ一致していた。それに加えて PS 抗原の存在様式の推移を、臍帯血、新生児期 1 日目より 12 ヶ月まで詳細に追跡した結果、生後 1 カ月までの遊離型 PS

抗原の優位、及び3ヶ月以降はPS抗原が一定した成人レベルでの存在様式を維持すること、即ちPSとC₄bpが生後1ヶ月から3ヶ月の間に成人レベルでの平衡に達するという新知見を得た。又、ごく最近正常新生児、乳児のPSの推移を6ヶ月まで検索した成績が報告された²¹⁾。彼らは著者の成績と同様、新生児期の低値より6ヶ月期までの漸増傾向を報告しているが、著者の成績に比して全経過を通じ若干高値である。この差については、彼らはロケット免疫電気泳動で全PS抗原量を測定しており、本稿で用いたELISA法との方法論の差によるものか、もしくは人種差によるものかは現時点では明らかでない。又、彼らの成績は全PS抗原量の測定のみであり、C₄bpとの関連については全く言及していない。

ビタミンK依存性凝固因子の場合、ビタミンK欠乏状態において、生物学的活性を持たないGlaを欠く異常蛋白(Protein induced by vitamin K absence or antagonist; PIVKA)が出現し、新生児メレナ及び乳児特発性ビタミンK欠乏症と密接に関連することが知られている^{22)~29)}。PSもビタミンK依存性因子であり、新生児期、乳児期に於けるPIVKA-PSの存非の検索は重要である。しかしながら、一般にPIVKA出現時は、活性が抗原量に比して有意に低下しており、今回の新生児期のPSの成績とは全く逆のdiscrepancyを示すことになる。このための場合、活性、抗原値からPIVKA-PSの存在を推定することは不可能である。又、PIVKA存在時、他のビタミンK依存性因子の場合、二次元交差免疫電気泳動法(CIE)にて二峰性patternを確認できることがあるが、前述の如くPSのCIE像は、正常人において二峰性patternを呈するため、現時点ではCIEによるPIVKA-PS検索法も確立されていない。PIVKA-PS測定にはPIVKA-PSを認識するモノクローナル抗体の作成等の方法なども含めて今後の課題と思われる。

結 語

成熟新生児の生直後より12ヶ月の乳児期まで、血漿中プロテインSの抗原および活性の推移を検索した。

1. 全PS抗原量は臍帯血30サンプルでは22.4±9.9 U/dl, 生後1日22.3±9.4 U/dl, 生後1ヶ月36.6±9.2 U/dl, 3ヶ月45.9±13.7 U/dl, 12ヶ月72.0±16.8 U/dlと健常成人下限値に達した。

2. PS活性は臍帯血42.6±11.5 U/dl, 生後1日38.4±11.6 U/dl, 1ヶ月43.1±19.1 U/dlでありこの間有意な増加はなかった。又全PS抗原量に比して活性値は有意に高かった。3ヶ月以降は12ヶ月に至るまで、全PS抗原量にはほぼ平行して漸増した。

3. PS抗原は、生直後より1ヶ月に至るまで遊離型の占める割合が82~54%と健康常成人の40~50%に比して有意に高く、C₄b-binding protein (C₄bp) 抗原量の増加に平行してC₄bp結合型の占める比率が増加した。3ヶ月以降、遊離型、C₄bp結合型の存在比率は健康常成人と同様であり一定していた。

4. 遊離型PS、遊離型C₄bpとC₄bp-PS complexにおけるKDは、生後5~7日、1ヶ月、3ヶ月で各々 $0.5 \times 10^{-7} M$, $0.8 \times 10^{-7} M$, 0.8×10^{-7} とほぼ一定した値を示した。

本論文の要旨は、第29回日本臨床血液学会(1987年10月、千葉)及び第10回国際血栓学会(1988年5月、アテネ)に於いて発表した。

尚、本研究費の一部は昭和62年度文部省科学研究費(No. 62770681)の援助を受けた。

文 献

- 1) DiScipio, R., Hermodson, M. A., Yates, S. G. and Davie, E. W.: A Comparison of Human Prothrombin, Factor IX (Christmas Factor), Factor X (Stuart Factor), and Protein S. *Biochemistry* **16**: 698-706, 1977.
- 2) Lundwall, A., Dackowski, W., Cohen, E., Shaffer, M., Mahr, A., Dahlbäck, B., Stenflo, J. and Wydro, R.: Isolation and sequence of the cDNA for human protein S, a regulation of blood coagulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**: 6716-6720, 1986.
- 3) Walker, F. J.: Regulation of activated protein C by a new protein. *J. Biol. Chem.* **255**: 5521-5524, 1980.
- 4) Walker, F. J.: Protein S and the regulation of activated protein C. *Semin. Thromb. Hemostas.* **10**: 131-138, 1984.
- 5) Suzuki, K., Nishioka, J., Matsuda, M., Murayama, H. and Hashimoto, S.: Protein S is essential for the activated protein C-catalyzed inactivation of platelet-associated factor V. *J. Biochem.* **96**: 455-460, 1984.
- 6) Dahlbäck, B. and Stenflo, J.: High molecular weight complex in human plasma between vitamin K-dependent protein S and complement component C₄b-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **78**: 2512-2516, 1981.

- 7) Suzuki, K., Nisioka, J. and Hashimoto, S.: Regulation of activated protein C by thrombin-modified protein S. *J. Biochem.* **94**: 699-705, 1983.
- 8) Comp, P. C., Nixon, R. R., Cooper, M. R. and Esmon, C. T.: Familial protein S deficiency is associated with recurrent thrombosis. *J. Clin. Invest.* **74**: 2082-2088, 1984.
- 9) 杉本充彦, 今井俊介, 螺良義彦, 橋本憲治, 今中康文, 奥香世, 松岡宏明, 新家興, 三上貞昭, 福井弘, 星田徹, 塚本政志, 岡崎孜雄: 脳梗塞症を呈した先天性プロテインS欠乏症の1家系3症例. *臨床血液* **29**: 855-861, 1988.
- 10) Schwarz, H. P., Fisher, M., Hopmeier, P., Batard, M. A. and Griffin, J. H.: Plasma protein S deficiency in familial thrombotic disease. *Blood* **64**: 1297-1300, 1984.
- 11) Broekmans, A. W., Bertina, R. M., ReinaldaPoot, J., Engesser, L., Muller, H. P., Leeuw, J. A., Michiels, J. J., Brommer, E. J. P. and Briet, E.: Hereditary protein S deficiency and venous thrombo-embolism —A study in three dutch families. *Thromb. Haemostas.* **53**: 273-277, 1985.
- 12) Kamiya, T., Sugihara, T., Ogata, K., Saito, H., Suzuki, K., Nishioka, J., Hashimoto, S. and Yamagata, K.: Inherited deficiency of protein S in a Japanese family with recurrent venous thrombosis —A study of three generation. *Blood* **67**: 406-410, 1986.
- 13) 杉本充彦, 橋本憲治, 奥香世, 金広昭美, 今中康文, 三上貞昭: ヒト Protein S および C₄b binding protein—Protein S complex の純化. *奈医誌.* **37**: 295~300, 1986.
- 14) Sugimoto, M., Mikami, S., Hashimoto, K., Kanehiro, T., Oku, K., Imanaka, Y., Imai, S., Tsubura, Y. and Fukui, H.: Enzyme-linked immunosorbent assay for total protein S antigen and for protein S antigen complexed with C₄ b-binding protein—Determination of free protein S antigen in plasma. *J. Nara Med. Ass.* **38**: 593-599, 1987.
- 15) Comp, P. C., Doray, D., Patton, D. and Esmon, C. T.: An abnormal plasma distribution of protein S occurs in functional protein S deficiency. *Blood* **67**: 504-508, 1986.
- 16) Dahlbäck, B.: Purification of human C₄b-binding protein and formation of its complex with Vitamin K-dependent protein S. *Biochem. J.* **209**: 847-856, 1983.
- 17) Malm, J., Bennhagen, R., Holmberg, L. and Dahlbäck, B.: Low plasma concentrations of C₄ b-binding protein and vitamin K dependent protein S in preterm infants with decreased formation of protein S C₄b-binding protein complexes. *Thromb. Haemost.* **58**: 1466, 1987. (abstr)
- 18) Moalic, P., Gruel, Y., Foleppe, P., Delahousse, B., Body, G. and Leroy, J.: Levels and plasma distribution of free and C₄b-BP-bound protein S in human fetuses and full term newborns. *Thromb. Haemost.* **58**: 1467, 1987. (abstr)
- 19) Melissari, E., Scully, M. F., Parker, C., Nicolaidis, K. H. and Kakkar, V. V.: Protein C/protein S in the foetal blood. Absence of bound protein S and C₄b-binding protein. *Thromb. Haemost.* **58**: 1491, 1987. (abstr)
- 20) Schwarz, H. P., Muntean, W., Watzke, H., Richter, B. and Griffin, J. H.: Low total protein S antigen but high protein S activity due to decreased C₄b-binding protein in neonates. *Blood* **71**: 562-565, 1988.
- 21) Andrew, M., Paes, B., Milner, R., Johnston, M., Mitchell, L., Tollefsen, D. M. and Powers, P.: Development of the human coagulation system in the full-term infant. *Blood* **70**: 165-172, 1987.
- 22) Hemker, H. C. and Muller, A. D.: Kinetic aspects of the interaction of blood-clotting enzymes. VI. Localization of the site of blood-coagulation inhibition by the protein induced by vitamin K absence (PIVKA). *Thrombos. Diathes. haemorrh.* **20**: 78-87, 1968.
- 23) Hemer, H. C., Veltkamp, J. J. and Loeliger, E. A.: Kinetic aspects of the interaction of blood clotting enzymes. III. Demonstration of an inhibitor of prothrombin conversion in vitamin K deficiency. *Thrombos. Diathes. haemorrh.* **19**: 346-363, 1968.
- 24) Veltkamp, J. J., Muis, H., Muller, A. D., Hemker, H. C. and Loeliger, E. A.: Additional evi-

- dence for the existence of a precursor molecule of the prothrombin complex in oral anticoagulation. *Thrombos. Diathes. haemorrh.* **25** : 312-315, 1971.
- 25) **Lindhout, M. J.** and **Kop-Klaassen, B. H. M.:** Protein induced by vitamin K antagonists (PIV-KAs) *in* Prothrombin and related coagulation factors (Hemker, H. C. and Veltkamp, J. J., eds.). Leiden University Press, p274-288, 1975.
- 26) **Shah, D. V.** and **Suttie, J. W.:** The vitamin K dependent, *in vitro* production of prothrombin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **60** : 1397-1402, 1974.
- 27) **Nelsestuen, G. L.** and **Suttie, J. W.:** The purification and properties of an abnormal prothrombin protein produced by dicumarol treated cows. A comparison to normal prothrombin. *J. Biol. Chem.* **247** : 8176-8182, 1972.
- 28) **Stenflo, J., Fernlund, P., Egan, W.** and **Roe-pstorff, P.:** Vitamin K dependent modifications of glutamic acid residues in prothrombin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **71** : 2730-2733, 1974.
- 29) **Hemker, H. C., Veltkamp, J. J., Hensen, A.** and **Loeliger, E. A.:** Nature of prothrombin. *Nature* **200** : 589-590, 1963.