異常プロトロンビン (PIVKA-II) の検出の 簡易法の試みと臨床応用での検討

目黒 嵩* 宮地 良和* 山田 兼雄*

A simple and rapid method for the assay of PIVKA-II and its practical use for the clinical cases

Takashi MEGURO*, Yoshikazu MIYAJI* and Kaneo YAMADA*

Key words : PIVKA, prothrombin, vitamin K, dicumarol,
Latex-agglutination

When vitamin K deficiency occurs, precursor forms of vitamin K dependent coagulation factors which are termed protein induced by vitamin K absence (PIVKAs) appears in the circulating blood.

Crossed immunoelectrophoresis has usually been employed to demonstrate the presence of PIVKAs, but the procedure is time consuming for clinical use.

In the present test method developed by the authors, the abnormal form of prothrombin (PIVKA-II) in the plasma can readily be determined within a period of 30 min. This test method is a simple and rapid assay for the detection PIVKA-II.

The principle of this assay is based on the agglutination of antihuman prothrombin rabbit IgG coated latex (AP-Latex) with absorbed plasma which is treated with barium carbonate.

After mixing with 25 μ l of the plasma and 200 μ l of the 0.2 % bovine albumin saline, in which 100mg/ml of barium carbonate was suspended, incubation at 37°C or room temperature for 10 min was carried out with shaking every 2 min. After the incubation, 275 μ l of the bovine albumin saline solution was added and the mixture was centrifuged at 3000 rpm for 5 min. Then 100 μ l of the supernatant placed on a glass slide (2×3 cm), one drop of Ap-Latex was added. After the mixture was shaken for 2 min, the latex agglutination was checked in daylight against a flat dark background.

The level of PIVKA-II was expressed by the maximum dilution level being agglutinated in the specimen.

This assay is expected to be useful as a screening test to differentiate whether or not vitamin K deficiency is present in various clinical cases.

---

* 聖マリアンナ医科大学小児科〔〒213 川崎市宮前区菅生2095〕, Department of Pediatrics, St. Marianna University School of Medicine, Kawasaki, Japan.

はじめに

新生児，乳児特発性ビタミンK欠乏症およびビタミンK拮抗剤による抗凝固療法中にビタミンK依存性凝固因子第II，第VII，第IX，第X因子であるが，カルボキシル化されないでグルタミン残基(Glu)の形で血中に出現してくる¹⁻³⁾。すなわち，Protein Induced by Vitamin K Absence (PIVKA)である。現在，このPIVKAのスクリーニングテストとしてはトロンボテスト(TT)，ヘパプラスチンテスト(HPT)が用いられ，間接的な証明がなされている。また，直接的に証明するためには二次元免疫電気泳動法⁴⁾が用いられている。しかし，この方法は測定がかなり難しく，時間を要し，スクリーニング法として適当ではない。今回われわれは，プロトロンビンのPIVKA(PIVKA-II)を直接，かつ迅速に測定する方法を開発したので報告する。

I. 原 理 (図1)

正常プロトロンビンのグルタミン残基は2個のカルボキシル基を持っており， Ca^{++} ，さらにリン脂質との結合をうながし，凝固活性を示す。しかし，PIVKA-IIのグルタミン残基は1個のカルボキシル基しか持っておらず， Ca^{++} との結合が低く，凝固活性を示さない。さらに，バリウム塩(Ba塩)に対する吸着性も正常プロトロンビンとPIVKA-IIとで異なり，PIVKA-IIは吸着され難い性質を持っている。しかし，抗プロトロンビン抗体に対する抗原性は共通であり，両者とも同様の抗原抗体反応を示す。以上の両者の性質から血漿中の正常プロトロンビンとPIVKA-IIをBa塩処理により分離し，非吸着のPIVKA-IIを抗ヒトプロトロンビン感作ラテックスを用いて抗原-抗体反応のラテックス凝集として検出する⁵⁾。

II. 実験ならびに成績

1. 基礎的検討

1) 感作ラテックス凝集反応の反応の検討：抗ヒトプロトロンビン家兎血清より硫酸分画で

I) 吸着処理

II) ラテックス凝集反応

Fig. 1 The principle of the method

IgG分画を分離し，このIgG分画をポリエチレン粒子(ラテックス)と混合し，感作ラテックスを作製した。このラテックスの凝集反応の条件について検討した。試料希釈液[0.24 Mグリシン緩衝液 pH 9.6 (GB)，生食アルブミン溶液(SA)，生食(S)の3者]を用いて，正常血漿を希釈した場合の凝集価はGBで×200，SAで×1,600，Sで×800あった。以下，今回は最も感度の高い生食アルブミン溶液を用いた。

2) バリウム塩の吸着処理の検討：Ba塩(BaCO_3 と BaSO_4 の2者)で正常血漿およびPIVKA-II陽性血漿を用いて検討した。図2-aに示すごとく，正常血漿では両者ともBa塩25 mg/ml以上ではほぼ完全に吸着された。一方，PIVKA陽性血漿でもBa塩25 mg/ml以上で正常プロトロンビンは吸着され，PIVKA-IIのみが残存する結果が常に得られた。しかし， BaSO_4 の場合に濃度が増加するにつれて，抗原性が低下することからPIVKA-IIも若干吸着

Fig. 2 Studies of treatment with barium salts

されるものと考えられた。また、図2-bに示すごとく、 $BaCO_3$ の吸着処理時間は2分以上で正常血漿中のプロトロンビンは全て吸着され、PIVKA陽性血漿でも2分から30分の吸着処理時間で一定の値を示した。

2. 測定法

前述の基礎的検討に基づいて、血中 PIVKA-II の測定法を設定した。方法は 100mg/ml $BaCO_3$ -0.2% 牛アルブミン生食 200 μ l に血漿 25 μ l を添加し、37°Cあるいは室温で2分毎に混和し、10~15分吸着処理し、次いで希釈液 275 μ l を加え、3,000rpm、5分間遠心分離後、上清100 μ l と抗プロトロンビン感作ラテックス試薬1滴を2 $\times$ 3cm の平板上で2分間混和し、凝集の有無を観察する。凝集(+)が PIVKA-II 陽性と判定する。さらに、定量には吸着上清を希釈し

て同様に観察し、凝集(+)を示す最大希釈で表現する。

3. 臨床被検体での検討 (図3)

新生児出血症および乳児特発性ビタミンK欠乏症、ビタミンK拮抗剤投与中の患者、正常成熟新生児について、PIVKA-IIを本法で測定し、合わせて、二次元免疫電気泳動、TT、HPTと比較した。新生児のTT、HPTは35%以下であったが、24例中20例は本法でPIVKA-IIは陰性であった。また、電気泳動法でPIVKA-IIが確認された4例では本法でも陽性であった。一方、新生児出血症、乳児特発性ビタミンK欠乏症では本法で全例陽性であり、泳動法でも確認された。ビタミンK拮抗剤投与中患者では7例中6例が本法で陽性であり、泳動法でもPIVKA-IIを認めた。しかし、残りの1例はTT35%、

● : 二次元免疫電気泳動法にて PIVKA-II (+)
○ : 二次元免疫電気泳動法にて PIVKA-II (-)

Fig. 3 Differentiation of crossed immunoelectrophoresis, Ap-Latex, Thrombotest (TT) and Hepaplastintest (HPT) among normal infants, infants with a vitamin K deficiency and patients under the effects of vitamin K antagonist

HPT 55%と低い値であったが、本法および泳動法でも PIVKA-II を認めることができなかった。

III. 考 案

PIVKA-II の直接証明は二次元免疫電気泳動法が用いられており、操作は必ずしも単純ではない。しかし、本法は測定に要する時間が30分と極めて迅速であり、また、特に器機を必要としない点から、PIVKA-II 有無の判定が容易である。本法はビタミンK欠乏症、あるいはビタミンK欠乏以外による出血性疾患の診断、鑑別に有用な方法となり得ると考えられた。

文 献

- 1) Hemker, H. C., Velkamp, J. I., Hensen, A., Loeiger, E. A. : Nature of prothrombin biosynthesis : Preprothrombinaemia in vitamin K deficiency. *Nature*, **200** ; 589~590, 1963.
- 2) Ganrot, P. O., Nilehn, J.-E. : Prothrombin during treatment with dicoumarol. II. Demonstration of abnormal prothrombin fraction. *Scan. J. Clin. Lab. Invest.*, **22** ; 23~28, 1968.
- 3) Stenelo, J., Fernsund, P., Egan, W., Ropst-rff, P. : Vitamin K dependent modifications glutamic acid residue in prothrombin. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **71** ; 2730~2731, 1974.
- 4) Ressler, N. : Two dimensional electrophoresis of serum protein antigens in an antibody containing buffer. *Clin. Chem. Acta*, **5** ; 795~800, 1960.
- 5) Meguro, T. and Yamada, K. : Simple and rapid test for PIVKA-II in plasma. *Thombs. Res.*, **25** ; 109~114, 1982.