原 著

播種性血管内凝固症候群 (DIC) および
血栓性血小板減少性紫斑病 (TTP) に
おける protein C の変動

高橋 芳右* 花野 政晴* 滝沢 慎一郎*
長山 礼三* 柴田 昭*

Plasma protein C levels in disseminated intravascular coagulation
(DIC) and thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP)

Hoyu TAKAHASHI*, Masaharu HANANO*, Shin-ichiro TAKIZAWA*,
Reizo NAGAYAMA* and Akira SHIBATA*

Key words: protein C, disseminated intravascular coagulation
(DIC), thrombotic thrombocytopenic purpura
(TTP), von Willebrand factor antigen

Protein C was measured by means of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in plasmas from 46 normal subjects, 34 patients with disseminated intravascular coagulation (DIC) and 4 patients with thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP). Normal range in the assay was 73.5-155.0% (95% confidence limits) of a normal pooled plasma. In patients with DIC, plasma protein C concentrations were significantly decreased, with a geometric mean value of 43.1%. The protein C concentration was positively correlated with plasma prothrombin, antithrombin III and serum pseudocholinesterase, and was negatively correlated with von Willebrand factor antigen (vWF:Ag) and vWF:Ag/factor VIII ratio. These findings suggest that low protein C concentrations in DIC mean a consumption of protein C probably due to its activation by thrombin and/or impaired liver synthetic function. In patients with TTP, plasma protein C levels were normal with a geometric mean value of 125.3%, indicating that the pathophysiology of TTP is quite different from that of DIC.

* 新潟大学医学部第一内科 [〒951 新潟市旭町通1番町754], The First Department of Internal Medicine, Niigata University School of Medicine, Niigata, Japan.

緒 言

近年注目されている protein C は肝で産生される vitamin K 依存性血漿蛋白で, thrombomodulin の存在下で thrombin により活性化される¹⁻³⁾. 活性化 protein C は第Vおよび第VIII因子を選択的に不活化し抗凝固物質として作用する⁴⁾とともに, 線溶促進作用もあるとされている⁵⁾. 先天性 protein C 欠乏症では繰り返し静脈血栓症を合併し易く^{6,7)}, protein C が止血・血栓に重要な役割を演じていることがうかがわれる. Protein C は播種性血管内凝固症候群(DIC)などの後天性凝固異常症においても低下することが一部報告されている^{8,9)}. Protein C の臨床的意義を更に明らかにするため, 今回DIC および血栓性血小板減少性紫斑病(TTP)症例において血漿 protein C 量を感度が高く正確な ELISA 法にて測定し, また protein C 値と他の凝固線溶系指標および肝機能との関係を分析した.

I. 対象および方法

対象は健常人46名, DIC 症例34例, TTP 症例4例である. DIC 症例の基礎疾患の内訳は固形癌8例, 急性白血病11例(うち急性前骨髄球性白血病9例, 急性骨髄芽球性白血病1例, 急性単球性白血病1例), 悪性リンパ腫1例, 敗血症4例, 血管性疾患9例(うち Kasabach-Merritt 症候群5例, 大動脈瘤2例, 心腔内血栓2例), 産科的疾患(羊水塞栓症)1例である.

Protein C は ELISA protein C (Boehringer Mannheim GmbH, ベーリンガー・マンハイム山之内取扱い)を用い, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) sandwich 法にて測定した. 各試料は 500 μ l ずつ用い, 以下の反応は室温にて行った. Maxisorp tube (Nunc) に抗 protein C F(ab')₂ fragments を加え一晚放置し coating を行い, 洗浄後稀釈血漿(通常100倍稀釈)を添加して2時間 incubate し, さらに洗浄後 peroxidase と結合させた抗 protein C ユ

Fig. 1 Representative reference curve for protein C by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

Fig. 2 Plasma protein C concentrations in normal subjects and in patients with disseminated intravascular coagulation (DIC) and with thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP). The bars for each group indicate the geometric means and the limits of 1 standard deviation.

サギ IgG を加え 2 時間 incubate した. 洗浄後過酸化水素とともに基質の ortho-phenylenediamine を添加し, 3 分後 $150 \mu\text{l}$ の 3 M 硫酸にて反応を止めた. 各 tube の吸光度は日立分光光度計 220A を行い, 492 nm にて測定した. 両対数グラフ用紙上で血漿稀釈度を横軸に, 吸光度を縦軸にとり結果をプロットした.

Prothrombin 時間 (PT), prothrombin, 第 V 因子, 第 VIII 因子活性 (VIII) は一段法にて, fibrinogen は thrombin 時間法またはクロジゲン法にて, FDP は latex 凝集法にて測定した. von Willebrand factor antigen (vWF:Ag) は Laurell 免疫電気泳動法にて定量した. Antithrombin III (AT III) は chromogenic substrate Chromozym TH (Pentapharm AG) または S-2238 (Kabi) を用い heparin cofactor として, また α_2 -plasmin inhibitor (α_2 PI) および plasminogen は S-2251 (Kabi) を用い測定した.

II. 成 績

図 1 に protein C の検量線の 1 例を示したが, 正常プール血漿の 100 倍稀釈から 12,800 倍稀釈までが直線となり, 本法での測定可能域は

Fig. 3 Basic coagulation and fibrinolysis parameters in patients with DIC. PT denotes prothrombin time; II, prothrombin activity; V, factor V activity; VIII, factor VIII activity; vWF: Ag, von Willebrand factor antigen; Fbg, fibrinogen; and FDP, fibrin/fibrinogen degradation products. Normal ranges are shown by the shaded areas.

Fig. 4 Antithrombin III (ATIII), α_2 -plasmin inhibitor (α_2 PI) and plasminogen (Plg) activities in patients with DIC. Normal ranges are shown by the shaded areas.

0.01%までと極めて低かった。Protein C は健常人では平均値 (geometric mean) 104.4%で、95%信頼限界は73.5~155.0%であった。

DIC 症例では protein C は平均 43.1%と著減し、正常範囲内にとどまる例は34例中6例 (17.6%) のみであった (図2)。基礎疾患別にみると、固形癌が平均34.3%と最も低く、血管性疾患が44.0%、敗血症が47.7%であり、白血病患者が50.5%と最も高値の傾向を示した。

DIC症例における他の凝固線溶系因子および阻止因子を検討すると、PT は平均56.9%で85%の症例で延長していたが、prothrombin 活性および第V因子活性はそれぞれ平均値は86.7%および75.5%で約1/3の症例でのみ低下を認めた。第Ⅷ因子活性は平均92.3%でわずか23%の症例で低下を認めたに過ぎなかった。一方vWF:Ag は平均274.5%と上昇し、68%の症例が異常高値を示した。vWF:Ag/Ⅷ比は平均3.59と上昇し、80%の症例が異常高値を示した。Fibrinogen は平均144.9 mg/dl で76%の症例で低下し、FDP は全例増加していた (図

Fig. 5 Correlation of protein C with antithrombin III in patients with DIC.

Fig. 6 Correlation of protein C with α_2 -plasmin inhibitor in patients with DIC.

3)。AT III は平均値 74.8%で、64%の症例が低値を示した。 α_2 PI は平均 40.0%と著減し、88%の症例が低値を示し、plasminogen は平均 61.1%と低下し、84%の症例が異常低値を示した (図4)。

次に DIC 症例において protein C とこれらの凝固線溶系指標および肝機能との関係を検討した。まず同じく肝で生成される vitamin K 依存性凝固因子の prothrombin とは相関係数 (r) = 0.417 ($p < 0.05$) の正相関を示した。AT III と $r = 0.634$ ($p < 0.001$) の正相関を示した (図5) が、 α_2 PI とは相関がみられず (図6)、また plasminogen, PT, 第V因子活性, fibrinogen 量, FDP 値とも有意の相関は認められなかった。Protein C は第Ⅷ因子活性とは有意の相関を示さなかったが、vWF:Ag とは $r = -$

Fig. 7 Correlation of protein C with vWF:Ag (upper panel) and with vWF:Ag/VIII ratio (lower panel) in patients with DIC.

Fig. 8 Correlation of protein C with pseudocholinesterase in patients with DIC.

Fig. 9 Correlation of protein C with GPT in patients with DIC.

0.595 ($p<0.001$), また vWF:Ag/VIII 比とは $r=-0.476$ ($p<0.01$) の負の相関を示した (図 7). 一方血清 pseudocholinesterase と $r=0.555$ ($P<0.005$) の正相関が認められた (図 8) が, 血清 albumin 濃度とは有意の相関は得られなかった ($r=0.221$, $p=0.25$). また血清 GPT 値とも全体としては $r=-0.426$ ($p<0.02$) の負の相関を示した (図 9) が, その値が 200 IU/L 以上の 3 症例を除くと有意の相関は認められなくなった.

DICの経過に伴う protein Cの変動を検討した急性前骨髓球性白血病の一例を図10に示した. 本例は骨髓では白血病細胞が有核細胞の81.8%を占めていたが, 末梢血には白血病細胞は出現せず, また何ら出血症状を認めず, 汎血球減少症の時期に発見され, 抗白血病剤投与後 DIC が顕性化した例である. 初診時(4月3日)の凝

固検査成績では fibrinogen 185 mg/dL, FDP 5 μ g/mL 以下, PT 88%, vWF:Ag/VIII 比 1.7, α_2 PI 60%, plasminogen 74%, AT III 92%, protein C 113%と, α_2 PI および plasminogen の軽度低下を認めるのみであった. 4月6日には fibrinogen 160 mg/dL, FDP 5 μ g/mL, vWF:Ag/VIII 比 3.3, α_2 PI 41%と徐々に悪化傾向を示したが, この時 protein C は 43%と著減を来した. 抗白血病剤投与に伴い 4月10日には fibrinogen 50 mg/dL, FDP 40 μ g/mL, PT 40%, vWF:Ag/VIII 比 3.7, α_2 PI 10%, plasminogen 17%と, DIC の典型的所見を呈していたが, この時 protein C は 74%とすでに回復傾向を示した. その後白血病細胞の消失と FOY 投与により, protein C より遅れて fibrinogen, FDP, α_2 PI, plasminogen が正常化した. Protein C は 4月20日から再び低下傾向を示したが, この

Fig. 10 Changes in protein C and other coagulation parameters in a patient with acute promyelocytic leukemia complicated by DIC. BHAC-DMP indicates the combination chemotherapy with behenoyl Ara-C, Daunorubicin, 6MP-R and prednisolone.

時点では pseudocholinesterase および albumin も正常であった。その後 DIC の再発はみられなかったが、5月に入り pseudocholinesterase および albumin が低下してきた。なお AT III はこの間まったく低下を認めなかった。

TTP においては、protein C は平均125.3%とまったく低下を認めず(図2), また AT III 98%(平均値), α_2 PI 103.8%, plasminogen 92.8%, PT 83.8%, prothrombin 93.5%, 第V因子活性91.5%, 第VIII因子活性88.5%と著変なかったが、vWF:Ag は平均 239.3%, vWF:Ag/VIII比は平均2.92と上昇していた(図11). Fibrinogen は平均248.5 mg/dl であったが、1例において低下を認め、FDP は5以下, 10, 20, 80 μ g/ml 各1例ずつであった。

III. 考 按

DIC や慢性肝疾患などにおいて protein C が減少することが、これまで Laurell 法にて測定することにより報告されているが^{8,9)}, 今回より感度が高く正確な ELISA 法にて測定した。図1に示した検量線から明らかなように、本法では極めて低濃度まで測定可能であった。DIC 症例では protein C の著明な低下を認め(図2), 82%の症例が異常低値を示した。このことから protein C は DIC の診断の一指標にな

Fig. 11 Coagulation and fibrinolysis parameters in patients with TTP. Normal ranges are shown by the shaded areas.

るものと考えられる。Epstein ら¹⁰⁾ は radio-immunoassay にて 4 例の DIC 症例で protein C を測定し、うち 2 例の急性型 DIC では protein C の低下を認めたが、慢性型代償性 DIC の 2 例（胃癌および Kasabach-Merritt 症候群）では protein C はそれぞれ 78%、75% と低下しておらず、protein C の低下は血管内 thrombin 生成の良い指標ではないとしている。今回検討した自験例においては、Kasabach-Merritt 症候群の 5 例では protein C は 19~82% に分布し、大動脈瘤の 2 例では 72%、77% とほぼ正常であり、確かに protein C の低下を認めない慢性型 DIC 症例も存在するが、fibrinogen 100 mg/dl 以上の Kasabach-Merritt 症候群でも protein C の低下例があり、また DIC 全体としてみると protein C は fibrinogen 量とは相関しなかった ($r=0.097$, $P=0.59$)。今後さらに多数例の解析から多様な DIC の病態により protein C 量がどのように規定されるのか、検討する必要があるであろう。

DIC の基礎疾患別にみると、白血病群が他の群に比し高値傾向があり、AT III が同様に白血病群ではあまり低下しない所見^{11,12)}とともに興味深い。DIC ないし凝固異常の発症機転が、顆粒球の elastase-like protease や chymotrypsin-like protease の作用^{13,14)}を含め、他の DIC と異なるためなのかどうかは今後の検索にゆだねられているが、DIC の診断および治療にあたっては念頭に置くべき所見と考えられる。

DIC における protein C 値は prothrombin, AT III と正相関し、vWF:Ag および血管内凝固または過凝固状態の指標とされる vWF:Ag/VIII 比¹⁵⁾ と負の相関を示した（図 5 および 7）。これらの所見は、DIC における protein C の低値は生体内での thrombin 生成の結果の消費によることを示唆する。また protein C 値は血清 pseudocholinesterase と正相関し（図 8）、肝の蛋白合成能を反映している可能性もある。Rodeghiero ら¹²⁾ は、急性白血病における protein C および AT III の低下は DIC より肝機能障害によると推定しており、Galloway ら¹⁶⁾ も AT III のみの検討ではあるが、急性白血病での変動は肝の蛋白合成能に起因するとし

ている。しかし今回の解析では、同様に肝で産生される線溶系の重要な指標である α_2 PI や plasminogen とは相関しないことより、血液凝固に伴う消費の亢進をより強く反映しているものと推測された。また肝の蛋白合成能も影響するにしても、それが DIC の臓器障害の現れである可能性もある。さらに protein C は血中半減期が比較的短い¹⁷⁾ので、DIC の治療効果の予測ないし判定に良い指標となる可能性もある。事実図 10 に示した症例では FDP の上昇前に protein C が低下し、また FDP, fibrinogen, α_2 PI, plasminogen より早く回復した。しかし、 α_2 PI の回復に遅れて protein C が正常化する例なども経験しており、症例により反応態度が異なることが考えられ、今後症例の集積が必要であろう。

TTP は DIC 同様重篤な経過をとるが、その病因については prostacyclin 刺激因子や安定化因子の欠乏、血小板凝集因子の出現あるいはそれを中和する IgG の欠如、また異常に大きな vWF multimer などがあげられている^{18~20)}が、今のところ不明な面が多い。TTP においては一般に凝固異常は少ないとされている^{21,22)}が、今回の検討でも同様であった。しかし vWF:Ag および vWF:Ag/VIII 比は上昇しており、これは血管内皮細胞傷害を反映しているものと思われる。TTP 症例においては protein C は全例正常であり、AT III や α_2 PI の低下もみられないこととも合わせ、TTP は DIC とは発症機転の異なる病態であると考えられた。

今回の検討では、protein C は ELISA 法にて抗原量として測定した。血中には活性化 protein C の生理的阻害因子として protein C inhibitor が存在する²³⁾。生体内で凝固系の活性化が起こり血栓症を生ずるような臨床病態、特に DIC においては、活性化 protein C と protein C inhibitor の複合体²⁴⁾が流血中に存在するものと考えられる。本 ELISA 法においてはこういった複合体も protein C と同様に測定しているものと思われる。今後この複合体、protein C の生物活性、protein C activation peptide²⁵⁾ や protein C の turnover を測定することにより、DIC および TTP における protein C の意義

がさらに解明されるものと思われる。

結 語

Protein C を ELISA 法にて健常人46名, DIC 34症例, TTP 4 症例で測定した。正常範囲は 73.5~155.0%であった。DIC 症例では protein C 値の著明な低下(平均値 43.1%)を認め, DIC 診断の一指標になるものと考えられた。Protein C は prothrombin, AT III, pseudo-cholinesterase と正相関し, vWF:Ag および vWF:Ag/VIII 比と負の相関を示し, DIC における protein C の低下は thrombin により活性化され消費されるとともに, 肝の蛋白合成能も反映しているものと考えられた。一方, TTP においては protein C はまったく正常であり, TTP は DIC とは異なる病態と考えられた。

謝辞; 今回検討した症例のうち4症例を検索させて頂いた長岡赤十字病院黒川和泉先生, 佐渡総合病院本間義章先生, 燕労災病院榎本悟先生に深謝する。本研究の一部は文部省科学研究費(No. 59770855)および厚生省特定疾患血液凝固異常症調査研究班(班長, 青木延雄教授)の助成金により行われた。

文 献

- 1) Stenflo, J.: A new vitamin K-dependent protein. Purification from bovine plasma and preliminary characterization. *J. Biol. Chem.*, **251**; 355~365, 1976.
- 2) Kisiel, W.: Human plasma protein C. Isolation, characterization, and mechanism of activation by α -thrombin. *J. Clin. Invest.*, **64**; 761~769, 1979.
- 3) Esmon, C.T. and Owen, W.G.: Identification of an endothelial cell cofactor for thrombin-catalyzed activation of protein C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **78**; 2249~2252, 1981.
- 4) Marlar, R.A., Kleiss, A.J. and Griffin, J.H.: Mechanism of action of human activated protein C, a thrombin-dependent anticoagulant enzyme. *Blood*, **59**; 1067~1072, 1982.
- 5) Comp, P.C. and Esmon, C.T.: Generation of fibrinolytic activity by infusion of activated protein C into dogs. *J. Clin. Invest.*, **68**; 1221~1228, 1981.
- 6) Griffin, J.H., Evatt, B., Zimmerman, T.S., Kleiss, A.J. and Wideman, C.: Deficiency of protein C in congenital thrombotic disease. *J. Clin. Invest.*, **68**; 1370~1373, 1981.
- 7) Bertina, R.M., Broekmans, A.W., Krommenhoek-van Es, C. and van Wijngaarden, A.: The use of a functional and immunologic assay for plasma protein C in the study of the heterogeneity of congenital protein C deficiency. *Thromb. Haemostas.*, **51**; 1~5, 1984.
- 8) Griffin, J.H., Mosher, D.F., Zimmerman, T.S. and Kleiss, A.J.: Protein C, an antithrombotic protein, is reduced in hospitalized patients with intravascular coagulation. *Blood*, **60**; 261~264, 1982.
- 9) Mannucci, P.M. and Vigano, S.: Deficiencies of protein C, an inhibitor of blood coagulation. *Lancet*, **2**; 463~467, 1982.
- 10) Epstein, D.J., Bergum, P.W., Bajaj, S.P. and Rapaport, S.I.: Radioimmunoassays for protein C and factor X. Plasma antigen levels in abnormal hemostatic states. *Am. J. Clin. Pathol.*, **82**; 573~581, 1984.
- 11) Vellenga, E. and Mulder, N.H.: Normal levels of antithrombin III in acute leukemia complicated by coagulopathy. *Acta Haematol.*, **63**; 336~338, 1980.
- 12) Rodeghiero, F., Mannucci, P.M., Vigano, S., Barbui, T., Gugliotta, L., Cortellaro, M. and Dini, E.: Liver dysfunction rather than intravascular coagulation as the main cause of low protein C and antithrombin III in acute leukemia. *Blood*, **63**; 965~969, 1984.
- 13) Egbring, R., Schmidt, W., Fuchs, G. and Havemann, K.: Demonstration of granulocytic proteases in plasma of patients with acute leukemia and septicemia with coagulation defects. *Blood*, **49**; 219~231, 1977.
- 14) Brower, M.S. and Harpel, P.C.: Proteolytic cleavage and inactivation of α_2 -plasmin inhibitor and C_i inactivator by human polymorphonuclear leukocyte elastase. *J. Biol. Chem.*, **257**; 9849~9854, 1982.
- 15) Denson, K.W.E.: The ratio of factor VIII-related antigen and factor VIII biological act-

- ivity as an index of hypercoagulability and intravascular clotting. *Thromb. Res.*, **10**; 107~119, 1977.
- 16) Galloway, M.J., Mackie, M.J. and McVerry, B.A.: Antithrombin III levels in acute leukemia. *Blood*, **65**; 505, 1985.
- 17) Vigano, S., Mannucci, P.M., Solinas, S., Bottasso, B. and Mariani, G.: Decrease in protein C antigen and formation of an abnormal protein soon after starting oral anticoagulant therapy. *Br. J. Haematol.*, **57**; 213~220, 1984.
- 18) Machin, S.J.: Thrombotic thrombocytopenic purpura. *Br. J. Haematol.*, **56**; 191~197, 1984.
- 19) Bukowski, R.M.: Thrombotic thrombocytopenic purpura: A review. *Prog. Hemostas. Thromb.*, **6**; 287~337, 1982.
- 20) Moake, J.L., Rudy, C.K., Trall, J.H., Weinstein, M.J., Colannino, N.M., Azocare, J., Seder, R.H., Hong, S.L. and Deykin, D.: Unusually large plasma factor VIII: von Willebrand factor multimers in chronic relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura. *N. Engl. J. Med.*, **307**; 1432~1435, 1982.
- 21) Jaffe, E.A., Nachman, R.L. and Merskey, C.: Thrombotic thrombocytopenic purpura — a coagulation parameter in twelve patients. *Blood*, **42**; 499~507, 1973.
- 22) Ridolfi, R.L. and Bell, W.R.: Thrombotic thrombocytopenic purpura. Report of 25 cases and review of the literature. *Medicine*, **60**; 413~428, 1981.
- 23) Suzuki, K., Nishioka, J. and Hashimoto, S.: Protein C inhibitor: Purification from human plasma and characterization. *J. Biol. Chem.*, **258**; 163~168, 1983.
- 24) Suzuki, K., Nishioka, J., Kusumoto, H. and Hashimoto, S.: Mechanism of inhibition of activated protein C by protein C inhibitor. *J. Biochem.*, **95**; 187~195, 1984.
- 25) Bauer, K.A., Kass, B.L., Beeler, D.L. and Rosenberg, R.D.: Detection of protein C activation in humans. *J. Clin. Invest.*, **74**; 2033~2041, 1984.

●新しい知識の導入と方法の実際！

臨床免疫検査法

月刊「臨床免疫」第13巻秋季特別増刊号

編集 臨床免疫編集委員会 専門医66氏分担執筆

B 5 判 443頁 定価7,500円(〒300円)

〒101 東京都千代田区神田多町2-11

科学評論社

振替口座東京 7-102026
電話 03-252-7768