◆症 例◆

先天性プロテイン C ヘテロ欠乏症にプロテイン S 分子異常症の合併が疑われた一家系

阪 田 敏 幸*¹ 対 馬 信 子*² 畑 中 薫*³
森 下 孝*¹ 初 山 弘 幸*¹ 内 田 景 博*¹
片 山 善 章*¹ 松 山 辰 男*¹

Probable Dysfunctional Protein S in a Patient with Congenital Heterozygous Protein C Deficiency: A Family Study

Toshiyuki SAKATA*¹, Nobuko TSUSHIMA*¹, Kaoru HATANAKA*³
Takashi MORISHITA*¹, Hiroyuki HATSUYAMA*¹, Kageshiro UCHIDA*¹
Yoshiaki KATAYAMA*¹ and Tatsuo MATSUYAMA*¹

Key words: hereditary protein C deficiency, free and total protein S, dysfunctional protein S, C4b-binding protein, Bonzol®

We describe a previously unreported defect of protein S(PS) in proband(34-year-old, male) and his farther, characterized by low levels of cofactor activity for activated protein C(53~56%) contrasting with normal levels of total(101.0~108.7%) and free PS antigen(100.0~103.0%). The distribution of PS between the free form and the form complexed with the complement component C4b-binding protein(C4bp) was normal on crossed immunoelectrophoresis. The proband and his farther also have heterogeneous protein C(PC) deficiency, suffering from deep vein thrombosis (DVT) and pulmonary thromboembolism (PTE). His defects are transmitted in autosomal dominant fashion from his father. Other relatives carrying protein C deficiency (paternal aunt, paternal cousin, sister and nephew) were asymptomatic.

We administrated 400mg of Bonzol® for two weeks to his father and investigated serial changes of PC, total PS, free PS, PS activity and C4bp. Laboratory studies showed that PC, total PS, free PS were increased, but C4bp and the ratio (free PS/PS activity) were not changed. These findings suggest that this case is probably a new type defect of protein S and the recurrent thrombotic disease in this family is due to inherited deficiency of protein C and dysfunctional protein S.

*¹ 国立循環器病センター臨床検査部〔〒565 大阪府吹田市藤白台5丁目〕; Department of Clinical Laboratory, National Cardiovascular Center, Suita, 565.

*² 同センター血管内科 Department of Medicine, National Cardiovascular Center.

*³ 同センター病因部 Department of Etiology and Pathogenesis, National Cardiovascular Center.
受付: 1991. 4. 19. 受理: 1991. 9. 9.

はじめに

protein C(PC) および protein S(PS) の先天性異常症では, 深部静脈血栓症 (DVT) および肺塞栓症 (PTE) などの静脈血栓症を発症することが知られている。先天性 PS 欠乏症ではその明確な分類は困難であるが, Comp ら²⁾により以下の3 type に分類されている。

Type I ; total PS, free PS, PS activity とともに低下した type, TypeII a ; total PS が正常で, free PS, PS activity が低下した type, TypeII b ; total PS, free PS が正常で, PS activity が低下した type の3 type である。またそのうち約70% が Type I に属すると言われ, TypeII b の分子異常症はきわめてまれである。今回われわれは, PC ヘテロ欠乏症を有する深部静脈血栓症で, Type IIb PS 分子異常が疑われた二症例およびその家系員について報告する。

試薬及び方法

1. 検体: 全血を3.8% クエン酸ナトリウムで9:1の割合で抗凝固し, 4°C, 3,000回転で遠心分離して得られた血漿を検体とし, 測定まで-80°Cで保存した。Behringwerke の Standard-Human-Plasma (Lot. No 502520) を標準血漿として以下の測定に供した。

2. PC 活性: 活性化 PC(APC) のアミド分解活性と抗凝固活性を測定し, 前者はプロタック® (Pentapharm, Basle, Switzerland) と発色性合成基質 (S-2366; Kabi, Stockholm, Sweden) を用いたわれわれの方法³⁾⁴⁾で, 後者は STACLOT PROTEIN C (Diagnostica Stago, France) を用いて測定した。

3. PC 抗原量: プロテインCテスト「テイジン」(Teijin, Japan) を用いて one step sandwich EIA 法により測定した。

4. PS 活性: APC の補酵素活性として Suzuki & Nishioka の方法⁵⁾に準じて測定するとともに, PC 活性化剤であるプロタック® 溶液に精製 APC(Diagnostica Stago, France) 10 μ g を添加し, 同様の方法で PS 活性を測定した。

5. Total および free PS 抗原量: total は ELISA 法による Asserachrom PS(Diagnostica Stago, France), free PS は one step sandwich EIA 法によるプロテインSテスト「テイジン」(Teijin, Japan) をそれぞれ用いて測定した。

6. C4b-binding protein 抗原量: 抗ヒト C4bp 家兎血清 (Diagnostica Stago, France) を用いて免疫比濁法により測定した。測定は, Table. 1 に示したパラメーターにより, 遠心方

Table. 1 Measuring parameters of C4bp on COBAS FARA II

General		
Measurement mode: absorbance		
Wavelength: 340nm		
Temperature: 37°C		
Unit: %		
Analysis		
Sample: 15 μ l diluent (distilled water): 5 μ l		
Reagent (4% PEG, 10mM Tris-phosphate buffer): 80 μ l		
Incubation: 30sec		
Start reagent 1 (Rabbit anti-human C4bp serum): 8 μ l		
Diluent (distilled water): 15 μ l		
Readings	first: 5.0sec	number: 13
interval: 10sec		
Calculation		
Calc step: kinetic		
Readings	first: 1	last: 13
Calibration		
Calib interval: on request		
Standard nonlinear	1; 25%	2; 25%
3; 100%	4; 140%	5; 190%
Deviation: no		
Calc model: logit/log 5		
Replicate: single

Fig. 1 Standard curve for the determination of C4bp with use of COBAS FARA II

式自動分析装置である COBAS FARA II (Roche, Switzerland) で行った。本測定法では、クエン酸血漿を生理食塩水で 21 倍希釈した血漿をサンプルとし、正常血漿の 25% から 190% まで測定可能であった (Fig. 1)。同時再現性は平均 105.4% で CV 3.1% (n=10) と優れており、Laurell 法との相関は相関係数 $r = 0.964$, 回帰式 $y = 1.18x - 9.85$ (n=25) と良好であった。また健常人での平均±SD は $109.8 \pm 18.3\%$ (n=38) であった。

7. PS 交差免疫電気泳動

Comp らの方法⁶⁾に準じて行った。

□ ○ ;tested normal

■ ● ;Protein C deficiency, heterozygote

▨ ◎ ;Protein S abnormality, heterozygote

□ ○ ;not tested

* clinical manifestation of thrombotic disease
The arrow indicates the proband

Fig. 2 Pedigree of the family with protein C deficiency and dysfunctional protein S

結 果

1. Family report

発端者 (Fig 2, III-2) は 34 歳男性で 1981 年 5 月 (当時 25 歳), 背部から上腰部にかけ持続性激痛により他院に入院し, 急性虫垂炎として処置を受けるも完治せず, 右下肢腫張に気づき同年 9 月当センターを受診し, DVT および PTE と診断された。同年 12 月に当センターに入院し, ウロキナーゼ® (モチダ) 60 万単位を一週間継続投与された後, さらに 30 万単位を 10 日間投与された。退院後, 抗凝血薬および抗血小板薬による治療を継続中である。

父親 (II-3) は従兄弟結婚で, 発端者と同様 DVT, PTE を発症しており, 当センターにおいて線溶療法を受けた。また抗凝血薬療法を開始するにあたり, ボンゾール® (タナベ) 400 mg を 2 週間投与された。

発端者の父方の叔母 (II-6) と従兄弟 (III-6), さらに姉 (III-1) およびその子供 (IV-1) において PC のヘテロ欠乏がみられたが, 発症には至っていない。

2. 凝血的データ

発端者の止血検査データは, PT, APTT, Fbg, AT-III, Plg, α_2 -PI, FDP 等の検査項目全て正常であり, 肝障害あるいは DIC 等の所見も見られなかった。Table. 2 に発端者および家

Table. 2 Concentrations of protein C, protein S and C4bp in plasmas of the proband and its family members

Pedigree position	Sex	Age	Protein C			Protein S				C4bp antigen
			antigen	activity		antigen		activity		
				EIA	amio	APTT	total	free	Protac	
I-2	M	79	77.5	85.1	88	66.0	62.6	67	n.t.	88
II-1	F	50	92.5	100.0	90	63.7	61.5	59	n.t.	88
II-2	F	55	112.5	113.9	116	100.0	99.0	100	n.t.	109
II-3	M	60	57.5	47.2	47	103.0	108.7	53	56	118
II-4	M	62	87.5	86.7	84	104.0	86.9	88	85	86
II-6	F	52	45.0	53.3	49	62.0	76.0	62	60	103
III-1	F	37	32.5	33.3	30	99.4	71.2	100	86	90
III-2	M	34	40.0	47.0	50	100.0	101.0	55	55	110
III-4	M	35	122.5	123.1	114	116.1	99.1	100	n.t.	100
III-6	M	35	37.5	41.1	38	85.1	90.4	85	94	95
IV-1	M	14	32.5	30.7	29	66.6	65.4	70	76	88
normal	range	(n=27)	62-125	66-179	62-122	65-118	63-123	65-115	65-115	70-131

Data mean % of normal plasma, n.t.=not tested

Fig. 3 Crossed-immunoelectrophoresis of protein S in plasmas of the proband and its family members

Wells 1 and 8, pooled-normal plasma; well 2, proband (III-2); well 3, father (II-3); well 4, paternal aunt (II-6); well 5 paternal cousin (III-6); well 6, sister (III-1); well 7, nephew (IV-1).

系員の PC, PS および C4bp の値を示した。発端者の PC は、抗原量 40.0%, アミド活性 47.0%, 抗凝固活性 50% でヘテロ欠乏が認められ、同様の異常が父 (II-3), 父方叔母 (II-6), 父方従兄弟 (III-6), 姉 (III-1) および甥 (IV-1) においても認められた。

発端者および父親の PS 活性はそれぞれ 55% と 53% で, free PS 抗原量 (発端者: 101.0%, 父: 108.7%) との間に解離が見られた。さらにブロック® 溶液に過剰の APC を添加して PS 活性を測定しても同様の結果が得られた。この時の C 4 bp 濃度は正常範囲内であり, Fig. 3 に示した発端者ならびに家系員の交差免疫泳動像は多小高低があるものの, 正常血

Fig. 4 Serial changes in plasma levels of protein C antigen and activity during administration of bonzol and warfarin

Fig. 5 Serial changes in plasma levels of total protein S, free protein S, protein S activity and C4bp during administration of bonzol and warfarin

漿と同様二峰性の arc pattern を認めた。

3. ボンゾール® 療法

発端者と同様の異常を有する父親に対し、ボンゾール® (400 mg/day), およびワーファリン® (エーザイ) による治療を行い、その経過を観察した。その結果、ボンゾール® 投与開始後2週間でPCアミド活性は31%上昇し、PS抗原量はtotalで53%, freeで23%, PS活性では31%の上昇がみられたが、C4bp濃度の変動に一定の傾向は認められなかった (Fig. 4, 5)。

考 察

PC, PS はビタミンK依存性蛋白であり^{7,8)}, 後天的欠乏あるいは異常の原因として肝障害⁹⁾, ビタミンK不足, DICなどが考えられるが、発端者および家系員においてそれを疑う臨床的所見もみられなかった。さらにPS活性の低下する原因としてC4bpの増加が考えられ、免疫比濁法により血中C4bp濃度を測定した。血漿中には2種類のC4bpが存在し、全体の約80%は分子量570 kdの高分子C4bp(C4bp-high), 残りの20%は分子量510 kdの低分子C4bp(C4bp-low)であり、PSはC4bp-highにのみ結合すると言われている¹⁰⁾。今回の測定ではLaurell法と同様、遊離のC4bpとC4bあるいはPSの複合体等、血中の全てのC4bpを測定していると考えられる。このことは、Laurell法によって得られたC4bp値との間で良好な相関が得られたことから示唆された。本法によって得られたC4bp濃度は、PS活性の低下した発端者および父親においても正常であり、C4bp上昇によりPS活性が低下したとは考えにくく、本症例は先天性のPS欠乏症あるいは異常症であることが示唆された。

一方、発端者のPCヘテロ接合体は父親からの優性遺伝によるものと考えられ、ほかの家系員4名にも同様の欠乏が認められたことより、本症例は先天性PC欠乏症と思われた。

血液中のPSは遊離型(40%)およびC4bpとの結合型(60%)として存在し¹¹⁾, 前者のみがPCに対する補酵素活性を有するとされている¹²⁾。PS分子異常症ではこれらのPSが正常

に分布し、free PS抗原量とPS活性とが解離することが不可欠である。PSの分布は、交差免疫電気泳動法でほぼ正常 patternと同様に泳動され、free PSの存在が確認された。PS抗原量の測定には通常Laurell法が用いられるが、C4bpの増減によってロケットの高さに影響がみられ¹³⁾, functional assayによる活性値との間に解離を生じることが知られている。今回われわれは、C4bpの影響を受けないELISA法あるいはEIA法によりPS抗原量を測定した。特にfree PS抗原量の測定では、thrombin-sensitive regionを認識するモノクローナル抗体を使用したon step sandwich EIA法を用いたことにより、free PSをほぼ特異的¹⁴⁾に定量し得たと考える。

今回用いたPS活性測定法は、PS欠損血漿および被検血漿中のPCを蛇毒により活性化し、生成したAPCを用いてAPTTの延長により被検血漿中のPSの補助効果をみる方法であり、APCがPSに対して大過剰存在し、PSの量によってのみ規定されることが前提となる。本法では蛇毒により活性化されるPC量が少なく、被検血漿中のPC濃度が低いことから、PS活性測定に疑問が残る。そこで、大過剰のAPCを蛇毒とともに加えた方法でPS活性を測定したところ、やはり発端者と父親においてのみPS活性が約半分に低下しており、free PS抗原量との間に解離がみられ、分子異常が示唆された。

また発端者と同様のPC, PS異常を有する父親に対するボンゾール®による治療では新名主ら¹⁵⁾と同様の結果が得られ、PC, PSはボンゾール®服用により経日的に増加した。しかしPS活性とfree PS抗原量との解離傾向は解消されなかった。この結果からも本症例がPCヘテロ欠乏症およびPS分子異常症であることが強く示唆された。

Type IIbの分子異常症はMannucciら¹⁶⁾により既に報告されているが、PS活性とfree PS抗原量との解離が大きく、PS活性は10%以下である。PS活性が約50%存在する本症例とは恐らく異なるtypeと考えられる。

結 語

今回の症例は free PS 抗原量と PS 活性値との解離が比較的小さい new type の PS 分子異常症と思われた。しかしそれぞれの測定法が十分確立されていないことなどから、今後の検討が必要と思われた。

本論文の要旨は第 XIII 回日本血栓止血学会において報告した。

文 献

- 1) Bertina, R.M., Broekmans, A.W., Krommenhoe-kvan Es, C., van Wijngaarden, A.: The use of a functional and immunologic assay for plasma protein C in the study of heterogeneity of congenital protein C deficiency. *Thromb. Haemostas.*, **51**: 1~5, 1984.
- 2) Comp, P.C.: Laboratory evaluation of protein S status, *Seminers in Thrombosis and Hemostasis*, **16**: 177~181, 1990.
- 3) 阪田敏幸, 内田景博, 片山善章: 発色合成基質 (S-2366) によるプロテインC活性測定法の開発と遠心方式自動分析装置 COBAS FARA への適用. *日本臨床検査自動化学会誌*, **14**: 582~586, 1989.
- 4) 阪田敏幸ほか: プロテインC活性測定における合成基質の選択 Warfarin 服用患者について, *臨床病理*, **38**: 937~941, 1990.
- 5) Suzuki, K. and Nishioka, J.: Plasma protein S activity measured using PROTAC, a snake venom derived activation of protein C. *Thromb Res*, **49**: 241~251, 1988.
- 6) 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.
- 7) Stenflo, J.: New vitamin K-dependent protein. *J Biol. Chem.* **251**: 355~363, 1976.
- 8) Discipio, R.G., Hermodson, M.A., Yates, S.G., Davie, E.W.: A comparison of human prothrombin, factor IX (Christmas Factor), factor X (Stuart Factor), and protein S. *Biochemistry*, **16**: 698~706, 1977.
- 9) Yoshikawa, Y., Sakata, Y., Toda, G., Oka, H.: The acquired vitamin K-dependent γ -carboxylation deficiency in hepatocellular carcinoma involves not only prothrombin, but also protein C. *Hepatology*, **8**(3): 524~530, 1988.
- 10) 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.
- 11) Dahlbäck B. and Stenflo J: High molecular weight complex in human plasma between vitamin K-dependent protein S and component C4b-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**: 2512~2616, 1981.
- 12) Dahlbäck B.: Inhibition of protein Ca cofactor function of human and bovine protein S by C4b-binding protein. *J. Biol. Chem.*, **261**: 12022~12027, 1986.
- 13) Comp PC, GR Thurnau, J. Welsh, CT Esmon: Functional and immunologic protein S levels are decreased during pregnancy. *Blood*, **68**: 881~885, 1986.
- 14) Takahashi, H., Tatewaki, W., Wada, K. and Shibata, A.: Plasma protein S in disseminated intravascular coagulation, liver disease, collagen disease, diabetes mellitus, and under oral anticoagulant therapy. *Clinica Chimica Acta*, **182**: 195~208, 1989.
- 15) 新名主宏一, 丸山征郎, 納 光宏: Danazol の抗血栓作用機序. *日本血栓止血学会誌*, **1**: 235~246, 1990.
- 16) Mannucci P.M., Valsecchi, C., Krachmalnicoff, A., Faioni, E.M., and Tripodi, A.: Familial Dysfunction of protein S. *Thromb. Haemostas.*, **62**: 763~766, 1989.