

血液凝固制御因子プロテイン C の血液凝固カスケードを模した
新たな発色基質法による定量的活性測定に関する研究

長崎国際大学大学院薬学研究科
医療薬学専攻 予防薬学講座 臨床検査学研究室

松田 諒

2024

【略語一覧】

- APC: activated protein C (活性化プロテイン C)
- APTT: activated partial thromboplastin time (活性化部分トロンボプラスチン時間)
- BSA: bovine serum albumin (ウシ血清アルブミン)
- C4bBP: C4b binding protein (C4b 結合タンパク質)
- CI: confidence interval (信頼区間)
- CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute (臨床・検査標準協会)
- DIC: disseminated intravascular coagulation (播種性血管内凝固症候群)
- DOACs: direct oral anticoagulants (経口抗凝固薬)
- DTIs: direct thrombin inhibitors (直接トロンビン阻害薬)
- DVT: deep vein thrombosis (深部静脈血栓症)
- EGF: epidermal growth factor (上皮成長因子)
- EGFR: epidermal growth factor receptor (上皮成長因子受容体)
- EPCR: endothelial protein C receptor (血管内皮プロテイン C 受容体)
- FIXa: factor IXa (活性化血液凝固第 IX 因子)
- FVa: factor Va (活性化血液凝固第 V 因子)
- FVIIIa: factor VIIIa (活性化血液凝固第 VIII 因子)
- FX: factor X (血液凝固第 X 因子)
- FXa: factor Xa (活性化血液凝固第 X 因子)
- Gla domain: gamma-carboxyglutamic domain (Gla ドメイン)
- ISTH: International Society on Thrombosis and Haemostasis (国際血栓止血学会)
- JSTH: the Japanese Society on Thrombosis and Hemostasis (日本血栓止血学会)

LPIA: latex photometric immunoassay (ラテックス近赤外免疫比濁法)

n.c.: negative control (陰性コントロール)

OD: optical density (光学濃度)

PAR1: protease activator receptor 1 (プロテアーゼ活性化受容体 1/トロンビン受容体)

PBS: phosphate-buffered saline (リン酸緩衝生理食塩水)

pNA: *p*-nitroaniline (*p*-ニトロアニリン)

SCC: Scientific Standardization Committee (学術標準化委員会)

SNP: single nucleotide polymorphism (一塩基変異)

TAFI: thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (トロンビン活性化線溶阻止因子)

TFPI: tissue factor pathway inhibitor (組織因子経路インヒビター)

tPA: tissue plasminogen activator (組織プラスミノゲンアクティベーター)

WHO: World Health Organization (世界保健機関)

【目次】

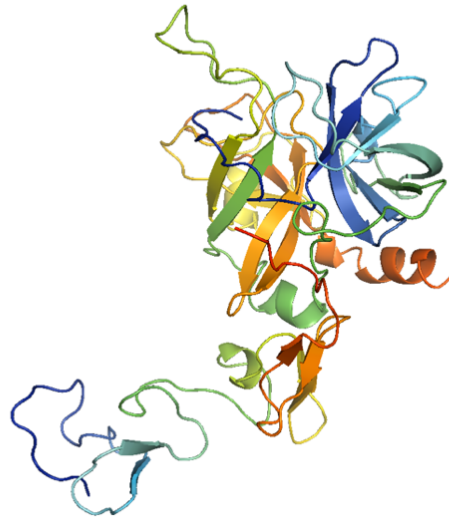
【第1節 序論】	5
【第2節 試薬及び測定機器】	16
【第3節 プロテインCコントロール血漿】	17
第1項 プロテインCコントロール血漿の調製	17
第2項 プロテインCコントロール血漿中のプロテインCの定量	18
【第4節 定量的新規プロテインC活性測定系の構築】	21
第1項 試薬用緩衝液・検体希釈用緩衝液、リポソーム溶液の調製	23
第2項 定量的プロテインC活性測定法の構築：各反応段階の検証	23
第3項 構築した測定法でのプロテインCコントロール血漿の活性測定	32
【第5節 定量的新規プロテインC活性測定系の最適化条件の探索と検討】	36
第1項 プロテインC活性化試薬の検討	36
第2項 定量的プロテインC活性測定、反応系の再検討	40
【第6節 測定条件の決定・既存法との比較検討】	57
第1項 測定条件の決定	57
第2項 既存法による検証	59
第3項 検量線の相関係数の比較	60
第4項 結果	61
第5項 考察	63
補遺	64
【第7節 結論】	66
【第8節 参考文献】	67
【謝辞】	73

【第 1 節 序論】

プロテイン C は 1975 年にウシ血漿からビタミン K 依存性血漿タンパク質の精製のための電気泳動法によって最初に単離された血漿タンパク質であり、その名称は泳動時に出現した 3 番目のピーク（ピーク C）に精製されたことに由来する¹。その後、ヒト血漿におけるプロテイン C は 1979 年に単離精製され、その構造は軽鎖分子量約 21,000, 重鎖分子量約 41,000 からなる全体分子量約 62,000 の肝臓で合成される 419 個のアミノ酸残基で構成されるタンパク質であること、 α -トロンビンにより Arg169 で切断されてセリンプロテアーゼとして抗凝固作用を有する活性化プロテイン C (APC) (Fig. 1A) へと変換されることが示された^{2,3}。プロテイン C の約 85–90%は Cys141 と Cys277 の間での 1 つのジスルフィド結合により架橋された 2 本鎖の状態で存在する。プロテイン C の構造中にはひとつの Gla ドメイン (1–37 残基) とふたつの上皮成長因子 (EGF) ドメイン (EGF-1: 46–92 残基、EGF-2: 93–136 残基) が存在している^{3–5} (Fig. 1B)。後述するが、APC の Gla ドメインは脂質との結合により抗凝固活性の発現に関与するだけでなく、血管内皮プロテイン C 受容体 (EPCR) と結合することで細胞保護活性を発現することにも関与すると報告されている^{6–9}。

ヒト血漿中において、プロテイン C と APC はそれぞれ約 70 nM (約 4 μ g/mL) と約 40 pM (約 2.5 ng/mL) の濃度で存在している¹⁰。生理的条件下における APC 生成反応はトロンビンとトロンボモジュリンの介在により生じており、この反応は血管内皮細胞上に存在する EPCR により約 20 倍促進されることが報告されている¹¹。自然界においては *Agkistrodon contortrix* というマムシの一種がもつ蛇毒にプロテイン C 活性化作用があることが知られており、検査試薬として利用されている^{12,13}。生体内において生じた APC は、同じくビタミン K 依存性タンパク質であるプロテイン S の遊離型を補因子として、負に帯電した膜表面において Ca^{2+} の存在下で活性化血液凝固第 V 因子 (FVa) 並びに活性化血液凝固第 VIII 因

A



B

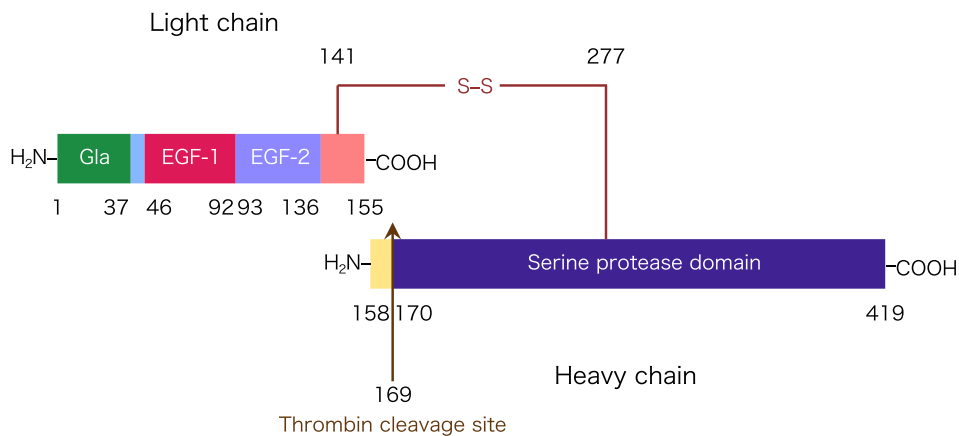


Fig. 1. Crystal structure of Gla-domainless human activated protein C and specific functional domain sequences of human protein C.

(A) X線結晶構造解析により得られた Gla-domainless APC の構造式¹⁴ (PDB ID: 1AUT)。データ中の水分子と固定化剤である H-D-Phe-Pro-Unk (PubChem CID: 446029) は削除している。(B) プロテイン C の一次構造における特徴的な構造。数字は該当するアミノ酸残基の N 末端からの位置を示す。軽鎖 N 末端の Gla ドメイン (1-37 残基)、芳香族スタック (38-45 残基)、2 つの EGF ドメイン (EGF-1: 46-92 残基、EGF-2: 93-136 残基) ならびに重鎖上の N 末端活性化ペプチド (158-169 残基)、セリンプロテアーゼドメイン (170-419 残基) が存在する。翻訳後 156-157 残基はフーリン様酵素により切断を受ける。重鎖には典型的なセリンプロテアーゼ活性部位 (His211, Asp257, Ser360) が含まれる。その他の翻訳後修飾としては Asp71 での β -ヒドロキシル化、97, 248, 313, 329 残基での N-グリコシル化、Gla ドメインの最初の 9 つの Glu 残基での γ -カルボキシル化が挙げられる。APC への活性化の際、トロンビンにより Arg169 にて切断される³。

子 (FVIIIa) のアルギニン残基を切断することで不活化を行う^{5,15,16}。FVIIIa は活性化血液凝固第 IX 因子 (FIXa) が血液凝固第 X 因子 (FX) を活性化血液凝固第 X 因子 (FXa) に変換する反応を、FVa は FXa がプロトロンビンをトロンビンに変換する反応を、それぞれ補因子として強力に増強することが知られている⁵。また、線溶機能を司るものとして組織プラスミノゲンアクティベーター (tPA) により誘導されるプラスミノゲンによってフィブリン分解を行う系が存在する。この系はプロテイン C と同じくトロンビン/トロンボモジュリン複合体によって活性化を受けるトロンビン活性化線溶阻止因子 (TAFI) により、その線溶機能が阻害される。したがって、プロテイン C の凝固制御によりトロンビンの生成量が低下することで TAFI の活性化が低下し線溶機能が維持される^{11,17}。このように、プロテイン C は生体内において過剰に生成されたトロンビンを起点として FVa と FVIIIa を分解することにより必要以上にトロンビンやフィブリンが生じないようにするだけでなく、線溶機能の調節にも関与する血液凝固制御因子として重要な役割を担っている^{11,17-19} (Fig. 2)。その他にも APC には遺伝子発現プロファイルの変化や抗炎症活性、抗アポトーシス活性、内皮バリア機能の保護といったような細胞保護作用を誘導することが示されている²⁰⁻²⁴。これらの細胞保護活性については上皮成長因子受容体 (EGFR) や G タンパク質共役型受容体であるプロテアーゼ活性化受容体 1/トロンビン受容体 (PAR1) を介しているものと考えられている^{11,25,26}。この様にプロテイン C は血液凝固制御のみならず細胞保護にも作用することで生体内における重要な役割を担っている。

1981 年に血漿中プロテイン C 濃度の低値を示す、遺伝的な欠乏症に起因する可能性がある家族性の静脈血栓症が初めて報告され²⁷、その後の研究でも遺伝的なプロテイン C 欠乏症が血栓症を引き起こす例が報告されてきた^{28,29}。臨床的に重要な重症のホモ接合体または複合ヘテロ接合体のプロテイン C 欠乏症の発症率は出生数に対して 0.00013-0.0002%程度と推定される一方で、プロテイン C 遺伝子異常保因率は 0.2-0.5%と遥かに高率であると報告されている³⁰。なお報告によると重度の遺伝的なプロテイン C 欠乏症の発症率が極端に少

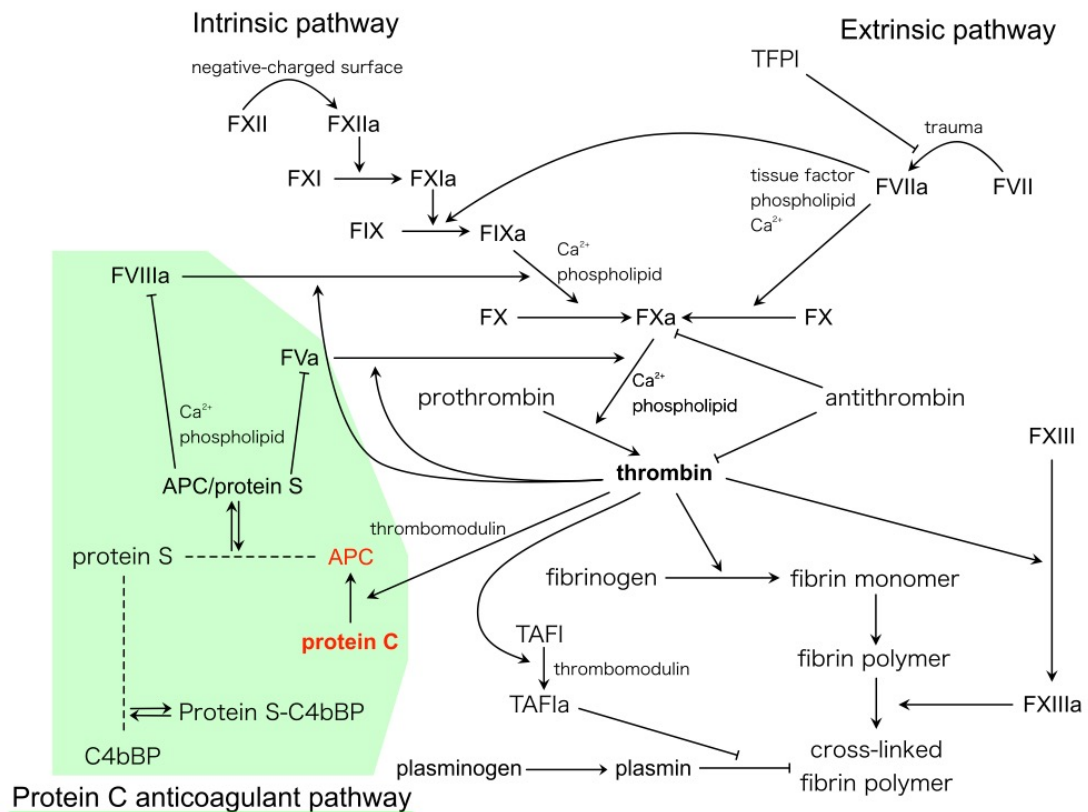


Fig. 2. The blood coagulation cascade and protein C anticoagulant pathway.

血液凝固反応はその起点により外因系 (Extrinsic pathway) と内因系 (Intrinsic pathway) に分類される。これらは FXa の生成が起こる段階で共通系に合流し、トロンビンを生成し最終的にフィブリンが生じる。トロンビンは種々の活性化反応を促進し、さらなる凝固反応の亢進に向かわせるが、プロテイン C を APC に変換する反応に関しては凝固反応を抑制に向かわせる。プロテイン C は活性化を受けた後、遊離型プロテイン S を補因子として FVIIIa と FVa を不活化する (protein C anticoagulant pathway)。なお図中の→は促進反応、|は抑制・分解反応を示す。

Abbreviations: TFPI, tissue factor pathway inhibitor; APC, activated protein C; C4bBP, C4b binding protein; TAFI, thrombin activatable fibrinolysis inhibitor; TAFIa, activated TAFI

ないのは診断前の胎児死亡や出生前死のためと考察されており³¹、実際に臨床症状を呈するプロテイン C 欠乏症の発症率は約 0.005%と推定されている³⁰。プロテイン C 欠乏症は深部静脈血栓症 (DVT) や肺血栓塞栓症のようなものから電撃性紫斑病や播種性血管内凝固症候群 (DIC) といった致命的な急性合併症まで、さまざまな臨床症状に関連することが報告されている^{29,32-35}。これを支持する報告として DVT 患者の約 30%にプロテイン C 活性の低

下を認めたという本邦における報告³⁶や、DVTを発症したプロテインC欠乏症患者においては最初の血栓症から10年間の累積再発率が38%にも及ぶことを示す海外の報告³⁷等がある。

プロテインC欠乏症はtype Iとtype IIの2種類に大別される。Type Iは血中プロテインC濃度が低いために活性が低下している場合で、type IIは血中プロテインC濃度が正常なものの、その機能の低下により活性が低下している状態と定義される^{30,38,39}。Type IIはさらにAPCのセリンプロテアーゼとしての機能が低下したtype IIaと、FVaやFVIIIa、リン脂質やプロテインSなどの生理的物質や補因子などとの相互作用が低下したtype IIbに細分化される場合もある⁴⁰。ほとんどのプロテインC欠乏症はtype Iであるが、type IIも症候性欠乏症の15%を占めるといふ報告がある^{30,39}。

プロテインCをコードするPROC遺伝子(2q13-q14)は9つのエクソンと8つのイントロンからなる^{41,42}。プロテインC欠乏症はPROC遺伝子の変異によって引き起こされ、その原因となる変異は160以上報告されている^{28,38,43,44}。本邦により報告された症候性プロテインC欠乏症もあり、type Iとしてコドン380Trp(TGG)-381Gly(GGT)の間に存在する4つのグアニンヌクレオチド連続区間から1つのグアニン(8857G)の欠失によりフレームシフト変異を引き起こし、細胞内輸送とタンパク質の成熟に支障を来たすことで血中プロテインC濃度並びに活性が低下するとされるprotein C Nagoyaが報告されている⁴⁵⁻⁴⁷。またtype IIbとしてコドン57Arg(CGG)におけるGly(GGG)のSNPによりCa²⁺ならびにリン脂質との結合能が低下し、活性が低下すると推測されるprotein C Yonago等が挙げられる^{48,49}。

Table 1–1. Protein C assays and classification according to assay results.

Assay type and characteristics		Type I deficiency	Type II deficiency		Risk from interference
			Subtype	Subtype	
			Ia	Ib	
Chromogenic					
Detects enzymatic cleavage of a small synthetic substrate	Venom	○	○	×	Activated samples, HIL
Clotting-based					
Detects cleavage of FVa and FVIIIa (Venom-APTT) or FVa (Venom-RVV); both require co-factors, including PL, Ca ²⁺ , PS	Venom-APTT	○	○	○	Activated samples, LA, high FVIIIa, APC-R, DOAC, high level of heparin/low molecular weight heparin, HIL
	Venom-RVV	○	○	○	Activated samples, LA, APC-R, DOAC, high level of heparin/low molecular heparin, HIL
Antigen	RID/IE	○	×	×	EDTA required in IE
Quantitative assay, dose not detect PC function	ELISA	○	×	×	Nonspecific binding, HIL
	ELFA	○	×	×	Nonspecific binding, HIL

○ Protein C deficiency can be detected by this assay.

× Protein C deficiency subtype is not detected by this assay.

Activated (and clotted) samples: contain coagulation enzymes that interfere with protein C assays, activation may be suspected when a sample is haemolysed or an unexpectedly shortened APTT.

HIL: hemolysis, icterus, or lipemia above the concentration allowable for the method, according to the manufacture's information for reagents and instrument.

Venom: protein C activation by Southern Copperhead viper venom (*Agkistrodon contortrix*) extant, Protac®.

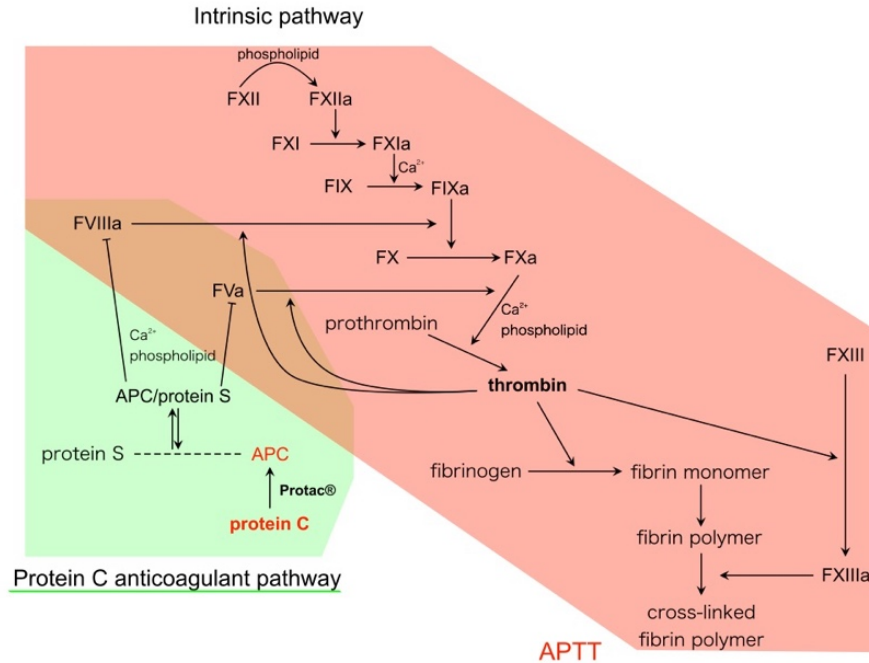
Abbreviations: APC-R, activated protein C resistance (most commonly due to factor V Leiden); APTT, activated partial thromboplastin time; Ca²⁺, calcium ions, DOAC, direct oral anticoagulant, EDTA; ethylenediaminetetraacetic acid (disodium or dipotassium salt); ELFA, enzyme-linked fluorescent assay; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; FVa, factor Va; FVIIIa, factor VIIIa; IE, immunoelectrophoresis; LA, lupus anticoagulant; PC, protein C; PL, phospholipid; PS, protein S; RID, radial immunodiffusion; RVV, Russell's viper venom

この表は Cooper, P. C., Pavlova, A., Moore, G. W., Hickey, K. P. & Marlal, R. A. Recommendations for clinical laboratory testing for protein C deficiency, for the subcommittee on plasma coagulation inhibitors of the ISTH. *J Thromb Haemost* 18, 271–277 (2020); 文献番号 40 より引用し、一部改変したものである。

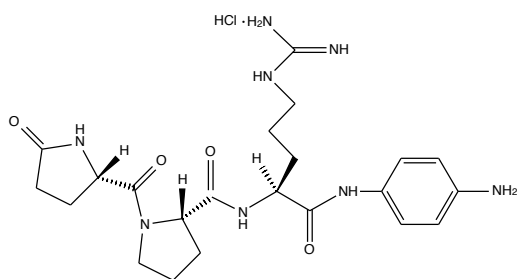
前述の欠乏症以外にも、ロングフライト血栓症（エコノミークラス症候群）として知られる血栓症や災害時に DVT の発症が多い⁵⁰⁻⁵²ことから、災害医療等においてもプロテイン C の重要性が注目されている。その他、重症敗血症における DIC や血栓塞栓症の発症にプロテイン C が大きく関与しており、本邦でもトロンボモデュリン アルファ（遺伝子組換え）や乾燥濃縮人活性化プロテイン C が治療薬として医薬品として承認され、利用されている（トロンボモデュリン アルファ（遺伝子組換え）は DIC に、乾燥濃縮人プロテイン C はプロテイン C 欠乏症に起因する電撃性紫斑病、急性肺血栓塞栓症、DVT に適応）^{47,53-55}。したがって、予防医学の観点からも今後プロテイン C 欠乏症のスクリーニングについては様々な領域でその重要性がさらに高まるものと予想される。

現在プロテイン C に関する検査法は血中存在量を測定するものと活性を測定するものとの 2 種類あり、その特徴を Table 1-1 に示す⁴⁰。なお、血中存在量の測定は免疫学的手法により行うため、プロテイン C 抗原量としてその結果を表現することが慣例となっている。プロテイン C 活性測定法については測定原理によりさらに凝固時間法と発色基質法（アミド活性法、合成基質法）に分類される。Table 1-1 に示す通り、その測定原理により検出できる欠乏症や検査結果に影響を及ぼす可能性がある因子がそれぞれ異なる^{38,40,56}。凝固時間法は血液凝固反応を利用した活性測定法であるが、その原理ゆえ血液凝固反応に影響を及ぼす諸因子により結果が左右されることが示されている (Fig. 3A)。一方発色基質法では、先述の蛇毒を利用したプロテイン C 活性化試薬である Protac®を用いてサンプル中のプロテイン C を APC へと変換し、APC 特異的な合成発色基質である S-2366 (Fig. 3B) を単位時間内に分解させ、遊離する *p*-nitroaniline (pNA) を吸光度測定により検出・定量することでプロテイン C 活性を測定することを原理としている (Fig. 3C)。凝固時間法とは異なり影響を受ける因子は少ないものの、測定系に生体内で APC が抗凝固活性を示すために必要なプロテイン S やリン脂質などの補因子が存在しない。このため、protein C Yonago の様な type IIb の欠乏症の検出ができないことが知られている^{40,57}。

A



B



C

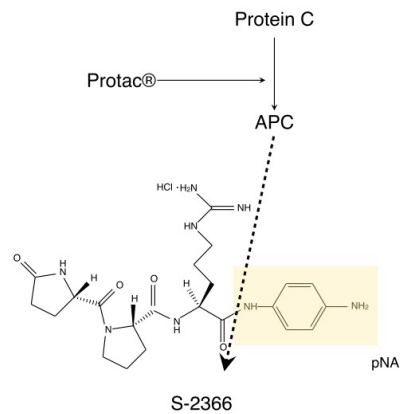


Fig. 3. Current methods for measuring protein C activity and the structure of chromogenic substrate.

(A) 凝固時間法の測定原理。APTT の測定系に Protac®によるサンプル中のプロテイン C を APC への変換反応を組み込んでいる。APC 生成反応とリン脂質による FXIa の生成反応を行なった後、Ca²⁺により駆動する FIXa の生成反応以降にかかる時間の延長度合いによりプロテイン C 活性を評価する。(B) APC 特異的発色基質である S-2366 の構造。一次構造は pyroGlu-Pro-Arg-pNA・HCl と表記される。厳密には APC だけでなくプロテイン C と FXIa によっても切断を受け pNA を遊離する。(C) 発色基質法の測定原理。測定系に各種補因子は含まれない。APC により破線矢印部分で切断され pNA を遊離、これを定量することでプロテイン C 活性を測定する。なお(A)における→は促進反応を、|は抑制・分解反応を示す。

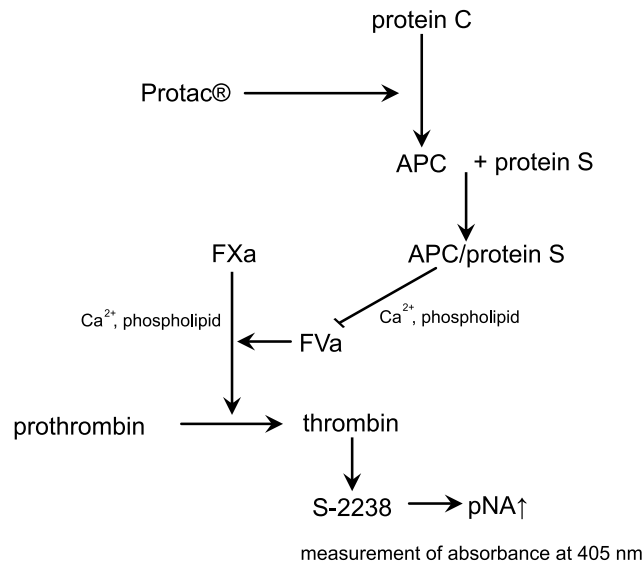
プロテイン C 活性の結果表示については臨床・検査標準協会 (CLSI) や国際血栓止血学会 (ISTH) では IU/mL など IU を用いた表現が好ましいとされている^{40,56,58}。ただしプロテイン C 活性の IU については WHO が規定する「国際標準血漿 1 mL 中に含まれるプロテイン C が示す活性」という定義⁵⁹での報告⁵⁷が確認できる一方、1967 年に国際生化学連合が定めた「至適条件下で、試料 1 L 中に、温度 30 °C (実情は 37 °C) で 1 分間に 1 μmol の基質を変化させることができる酵素量を 1 単位とする」という定義⁶⁰に則り検査結果を報告していると推測される事例もある^{29,40}。また APC についてはあるものの、1 IU と表示される標品の中に含まれる APC が 0.072 pM の濃度であったという研究報告⁶¹もある。しかしこれは先述した 1992 年の Gruber らの報告内容であるヒト血漿中濃度 40 pM¹⁰と一致せず、国際的に統一された表現が確定していないのが実情であると推察される。検査機関によっては標準血漿に対する百分率でその活性が表現されていることも国際的に報告されており⁵⁶、本邦においては承認されているプロテイン C 活性並びに抗原量試薬の結果表記については IU とはされておらず、その全てがパーセント表記となっている。またその基準範囲も検査機関や検査試薬により異なり、概ね 70–140%と幅広い (2016 年 JSTH 血栓性素因部会アンケート調査より)。パーセント表記については、海外にて健常成人のプール血漿を 100%または 4 μg/mL と定義すると 95%の割合で 70–140%の範囲内におさまるとの報告がある^{28,62}が、これは抗原量のものであり、国内の活性基準値はこれとも一致していない。検査において基準とされている血漿がどのようなプロファイルを持つものかが開示されておらず、また測定法や基準値が日本国内においても標準化されていない点は、2023 年時点においても改善すべき点であるとして指摘されている (第 17 回 日本血栓止血学会学術標準化委員会 SSC シンポジウム「血栓性素因部会・凝固線溶検査部会合同企画 3. PC 標準化の問題点と凝固制御因子標準化に関わる啓発活動について」家子正裕)。

そこで本研究では、凝固時間法に比してより特異度が高く、ISTH のレコメンデーションにて抗原量測定を含めた全ての検査法において第一選択とすることを推奨されている発色

基質法^{40,57}をベースとしてプロテイン S やリン脂質などの補因子を加え、血液凝固カスケードを模倣した新たな測定系 (Fig. 4A) を構築することで、前述した発色基質法にて type IIb の欠乏症が検出できないという点の改善を目指した。これに伴い発色基質を APC 特異的な S-2366 からトロンビン特異的な S-2238 (Fig. 4B) へと変更した。また検体中のプロテイン C 活性について、プロテイン C 欠乏血漿に試薬プロテイン C を定量的に添加することで調製した、コントロール血漿中のプロテイン C 濃度当量 (protein C activity $\mu\text{g/mL equivalent}$) として定量的に表現することを目指した。構築した測定系が検体中のプロテイン C 濃度依存的に機能するか、最終段階から 1 段階ずつ量的依存性を検証することとした。最終的な結果の評価については、コントロール血漿中のプロテイン C 濃度と pNA の単位時間あたりの吸光度増加量についての検量線を作成し、その近似曲線の相関係数を既存の発色基質法キットの結果と統計学的に比較することで非劣性を確認した。本手法による最大のメリットは type IIb の検出可能性を有し、かつプロテイン C の活性を従来のパーセント表記法ではなく質量濃度等量 ($\mu\text{g/mL equivalent}$) として表現できることである。

本章では「血液凝固制御因子プロテイン C の血液凝固カスケードを模した新たな発色基質法による定量的活性測定」について述べることとする。

A



B

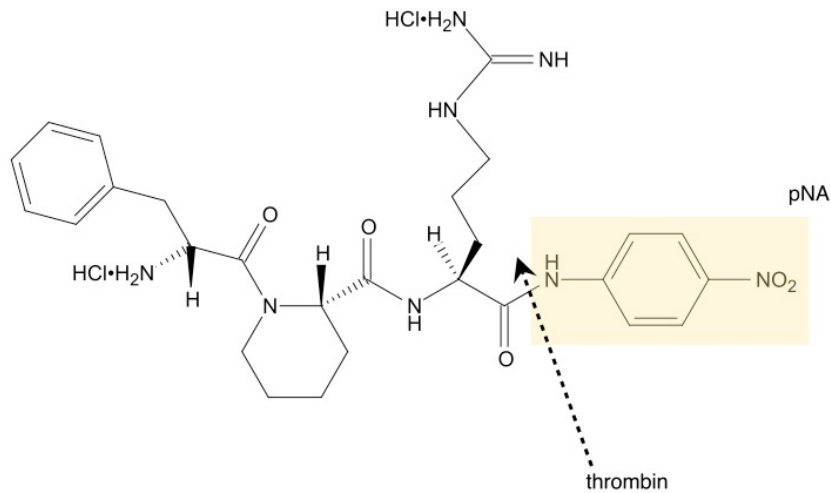


Fig. 4. Our new method for quantitative protein C activity measurement method and the structure of chromogenic substrate.

(A) 我々が新規に構築した定量的プロテインC活性測定法の原理。従来の発色基質法にはなかったプロテインSなどの補因子を組み込み、type IIb プロテインC 欠乏症の検出に対応できるように系を構築している。トロンビン特異的発色基質である S-2238 から遊離する pNA を定量的に評価することでプロテインC 活性を測定する。(B) トロンビン特異的発色基質である S-2238 の構造。一次構造は H-D-Phe-Pip-Arg-pNA \cdot 2HCl で表される。破線矢印で示した部分でトロンビンによる切断を受け、pNA を遊離する。なお (A) における \rightarrow は促進反応を、 $|$ は抑制・分解反応を示す。

【第2節 試薬及び測定機器】

Human FVa は Lifespan Biosciences Inc. (Seattle, WA, USA) から、human protein C 並びに human protein S, human FXa, human prothrombin, bovine thrombin は Haematologic Technologies (Essex Junction, VT, USA) から、それぞれ購入した。トロンビン特異的な合成発色基質である S-2238 は Chromogenix (Mölndal, Gothenburg, Sweden) より入手した。蛇毒由来のプロテイン C 活性化試薬である Protac®は BioMedica Diagnostics (Stanford, CT, USA) より購入した。Human protein C deficient plasma は HYPEN BioMed (Neuville-sur-Oize, France) から購入した。TritonX-100 は Nacalai Tesque (京都府中京区) より購入した。Bovine serum albumin (BSA) は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) より購入した。本邦で体外診断用医薬品として承認されているプロテイン C 抗原量測定法キットであるエルピアエース PC II は LSI Medience Co. (東京都港区) から、同じく本邦にてプロテイン C 活性測定の発色基質法試薬キットとして承認されているテストチーム S PC は SEKISUI MEDICAL Co., Ltd. (東京都中央区) から、それぞれ購入した。リン脂質である phosphatidylserine sodium salt (COATSOME DOPS-Na MS-8181LS) と phosphatidylcholine (COATSOME DSPC MC-8080) , phosphatidylethanolamine (COATSOME DSPE ME-8080) は Yuka Sangyo Co., Ltd. (東京都渋谷区) より購入した。

吸光度測定は Amersham Biosciences Ultrospec 3100 pro にて行った。

【第3節 プロテインCコントロール血漿】

プロテインC活性をコントロール血漿中のプロテインC濃度当量 (protein C activity $\mu\text{g/mL}$ equivalent) として検量線を作成して定量的に表現するために、血漿中に既知の濃度のプロテインCを含むプロテインCコントロール血漿が必要となる。そこで protein C deficient plasma に定量的に試薬プロテインCを添加することで規定濃度のコントロール血漿を調製した。調製したコントロール血漿のプロテインC含有量は、本邦においてプロテインC抗原量測定法キットとして体外診断用医薬品の承認を受けているエルピアエースPCIIを用いて定量的に評価した。調製したプロテインCコントロール血漿は必要に応じて各実験に用いた。

第1項 プロテインCコントロール血漿の調製

プロテインCコントロール血漿は購入した human protein C を PBS で 2.5, 5, 10, 20, 40 $\mu\text{g/mL}$ に希釈した上で、protein C deficient plasma に定量的に添加することで 0.5, 1, 2, 4, 6 $\mu\text{g/mL}$ の濃度になるよう調製した。なおブランク用の 0 $\mu\text{g/mL}$ のコントロール血漿は human protein C ではなく PBS を protein C deficient plasma に添加して調製した。

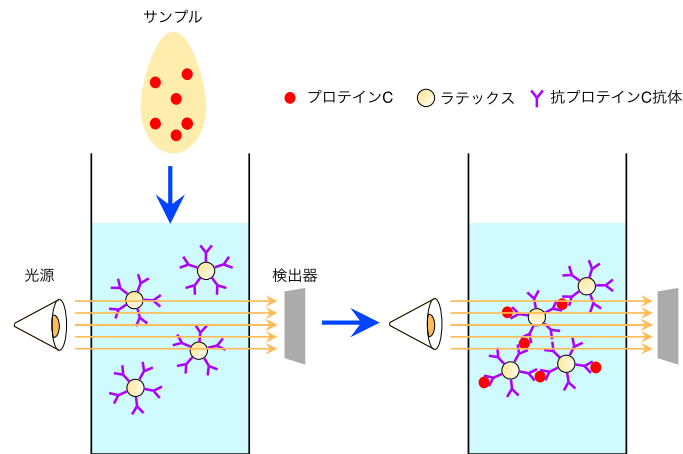
第2項 プロテイン C コントロール血漿中のプロテイン C の定量

得られたプロテイン C コントロール血漿中のプロテイン C を、ラテックス近赤外免疫比濁法 (LPIA 法) を測定原理とするエルピアエース PC II を用いてプロテイン C 抗原量として定量した (Fig. 5A)。調製したプロテイン C 濃度と光学濃度 (OD) の検量線を作成し、その直線性からコントロール血漿としての品質を検討した。

<方法>

測定手順はエルピアエース PC II の添付文書に準じたが、記載されている方法が自動分析器での測定を想定したものであったため、本検討では用手法で測定するために若干の変更を行った。測定手順は、まずプロテイン C コントロール血漿 (0–6 µg/mL) 2.1 µL を試薬キットの R-1 126 µL に添加し、37°C で 2 分間インキュベーションした。次に R-2 28 µL を得られた反応液に添加し 37°C で 5 分間インキュベーションした。5 分間の反応終了時点を対照として、さらに 2 分経過後の波長 800 nm における吸光度を測定し、その値から OD の変化量を算出した (Fig. 1–5B)。この操作を 10 回行い、 $n=10$ の平均値についてのプロテイン C 濃度に対する OD の変化量についての検量線を作成した。

A



B

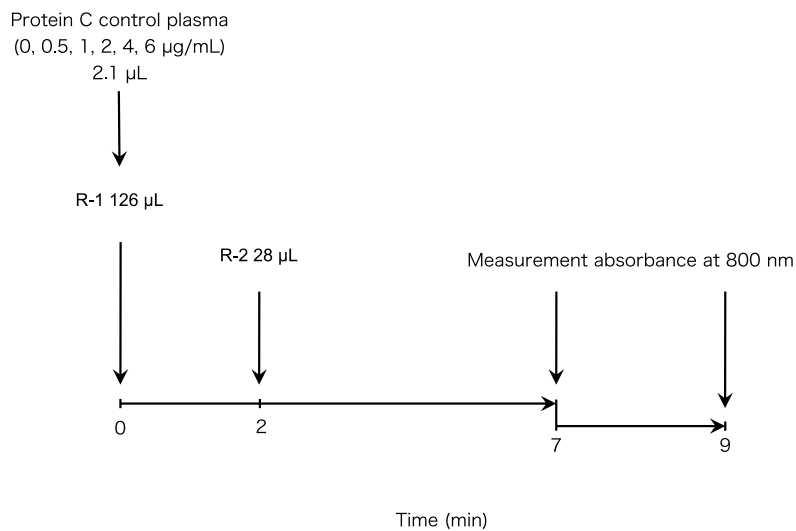


Fig. 5. Measurement principle and procedure for the protein C antigen assay of LPIA Ace PC II.

(A) エルピアエース PC II の測定原理であるラテックス近赤外免疫比濁法の概要。抗プロテイン C 抗体を有するラテックス試薬に対し、プロテイン C が添加されると抗原抗体反応によりラテックス凝集が起こる。これによる光学濃度の低下を透過光強度の増加から検出し、検体中のプロテイン C 濃度を測定する。(B) タイムラインと各時点で添加する試薬の体積について記している。0-7分では 37 °C でインキュベーションし、7-9分は室温にて反応をさせる。吸光度測定は 7分時点を対照として、9分時点の値を測定する。

<結果・考察>

調製したプロテイン C コントロール血漿中のプロテイン C 抗原量を、エルピアエース PC II によって用手法にて測定することができた (Fig. 6)。検量線の相関係数 r は 0.973 (95% CI: 0.9416–0.9969) であり、調製ならびに測定操作を用手法で行ったものの良好な直線性と相関が確認された。

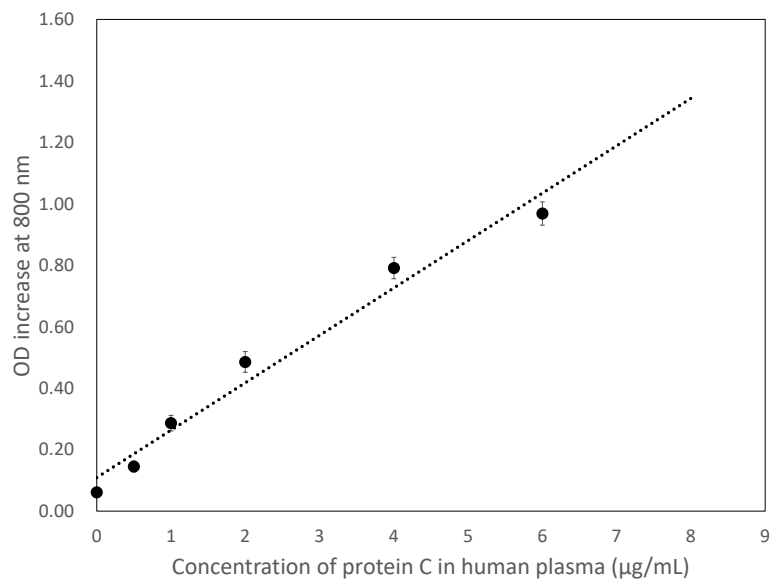


Fig. 6. Calibration curve of optical density and protein C concentration of the protein C control plasma. プロットは 7 分時点から 9 分までの 2 分間における光学濃度変化量における 10 回測定時の平均値であり、エラーバーは±標準誤差を示している。平均値のプロットに対する検量線の式は $y=0.1542x+0.1092$ であり、相関係数 $r=0.9864$ (95%CI: 0.9416–0.9969), 決定係数 $R^2=0.9731$ である。なお、0 µg/mL の測定を行なっているため検量線の原点補正は行なっていない。

【第4節 定量的新規プロテインC活性測定系の構築】

現在プロテインC活性測定法はTable 1に示した通り、凝固時間法と発色基質法によるものが実用化されている。両法ともサンプル中のプロテインCをAPCに変換する反応をProtac®により行うことは共通しているが、凝固時間法はAPCによるAPTTの延長度合いからプロテインCの活性を測定する一方、発色基質法はAPC特異的な発色基質であるS-2366を用いて単位時間あたりに遊離するpNAを吸光度測定により定量することでプロテインCの活性を測定する。凝固時間法はCaCl₂(Ca²⁺)により内因系凝固カスケードを駆動させることで生じるサンプル血漿自体の血液凝固反応を利用しているため、サンプル中に直接経口抗凝固薬(DOACs)や直接トロンビン阻害薬(DTIs)などの抗凝固成分が含まれる場合はその影響を強く受けてしまう。一方、*in vitro*にて*in vivo*でのAPCの抗凝固反応を再現しているためにtype IIbのようなAPCとその他の因子との相互作用が低下することが原因となる欠乏症の検出が可能であるという長所がある。他方、発色基質法は生じたAPCが直接発色基質を切断するため抗凝固剤等の影響をほとんど受け受けない上にその定量性の高さから、ISTHによるガイドラインにおいて第一選択となっているが、type IIbの欠乏症は検出できないというデメリットがある^{40,57}。

結果の表現についてもISTHではIUを用いたものが推奨されているが、一部の検査室、こと本邦においては半定量的なパーセント表示が共通の検査結果の単位となっている。パーセント表示では基準範囲が70-140%と非常に広いうえどのようなものを基準にしているのかが明確ではなく、第1節で述べた通りIUの定義も事実上標準化されていない。定量的なプロテインC活性測定の実現には、改善すべきことが多々あるのが現状である。

我々は上記の長所を維持した上でさらなる利点として、type IIbの欠乏症を検出できる新たな定量的プロテインC活性測定を実現するため、現状第一選択となっている発色基質法

をベースに血液凝固カスケードを模倣した新たな活性測定系の構築を試みた。血液凝固カスケードを模倣するにあたり発色試薬は APC 特異的な S-2366 試薬 (Fig. 3B,C) からトロンビン特異的な S-2238 試薬 (Fig. 4B) へと変更し、プロテイン C 活性依存的な単位時間あたりの吸光度増加速度を定量的に測定できるように系を構築した (Fig. 7)。各反応については Reaction 1 をプロテイン C 活性化反応、Reaction 2 は APC/プロテイン S 複合体形成反応、Reaction 3 を FVa 分解反応、Reaction 4 をトロンビン生成反応、Reaction 5 を呈色反応とした。

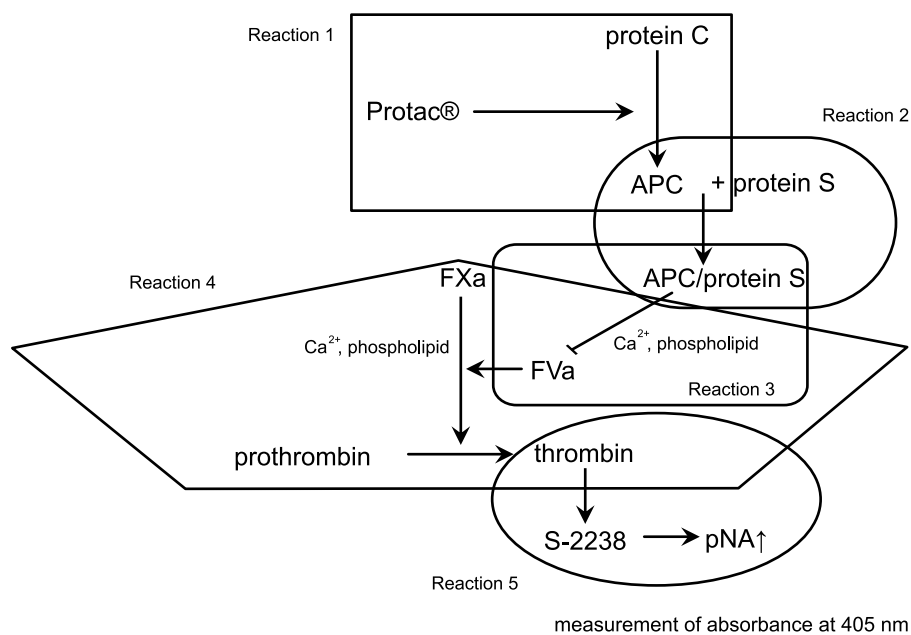


Fig. 7. Reaction map of early phase of consideration.

測定系は 5 つの反応段階によって構成される。Protac®によるプロテイン C の活性化 (Reaction 1) により生じた APC をプロテイン S との複合体に変換 (Reaction 2) し、APC の活性依存的に FVa の分解反応を行う (Reaction 3)。反応終了時点で残存する FVa が FXa によるトロンビン生成反応を促進 (Reaction 4) し、生じたトロンビンが特異的発色基質である S-2238 から pNA を遊離させる (Reaction 5)。なお図中の → は促進反応を、|は抑制・分解反応を示す。

第1項 試薬用緩衝液・検体希釈用緩衝液、リポソーム溶液の調製

検体希釈用緩衝液 (Dilution Buffer) ならびに試薬用緩衝液、リポソーム溶液 (Liposome A) はプロテイン S 比活性 (protein S-specific activity) 測定法における活性測定系⁶³を参考として、次のように調製した。

Dilution Buffer は 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) 中にくえん酸三ナトリウム・二水和物ならびに NaCl, BSA, Triton™ X-100 をそれぞれ 10.6 mM, 10 mM, 0.1 w/v%, 0.06 v/v%の濃度で含有するように調製した。試薬用緩衝液は 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) 中に CaCl₂ ならびに NaCl, Triton™ X-100 をそれぞれ 4 mM, 15 mM, 0.06 v/v%で含有するように調製した。

リポソーム溶液として phosphatidylcholine: phosphatidylserine sodium salt: phosphatidylethanolamine をモル比 1:1:1 で秤取し、クロロホルム:メタノールの 4:1 混液にて溶解させたのちにエバポレーションして多層小胞 (LMV) を作製し、この LMV を真空条件で一晩乾燥させた後に 50 mM Tris-HCl (pH 7.0) に懸濁させて水温 60 °C以上で 20 分間超音波破碎を行い小型単層小胞 (SUV) を得た⁶⁴。この SUV を 1.2 mg/mL となるように 50 mM Tris-HCl (pH 7.0) で調製したものを Liposome A とした⁶³。

第2項 定量的プロテイン C 活性測定法の構築：各反応段階の検証

トロンビン特異的な発色基質で S-2238 を用いた新たな測定系が実際に機能し、サンプル中のプロテイン C 活性依存的な定量性を有していることの検証を最終段階の Reaction 5 から順に行った。なお、APC が FVa を単位時間内に定量的に切断する Reaction 3 については既存の発色基質法の原理よりプロテイン C の活性依存性が認められているため、直接的な検証を省略した。

第2項-1 S-2238による呈色反応の検討

トロンビン量と、これによる S-2238 切断の結果遊離する pNA に量的相関があることは我々が構築する定量的プロテイン C 活性測定系の前提条件である。この量的関係を確認するために S-2238 による呈色反応 (Fig. 8A) の検討を行った。

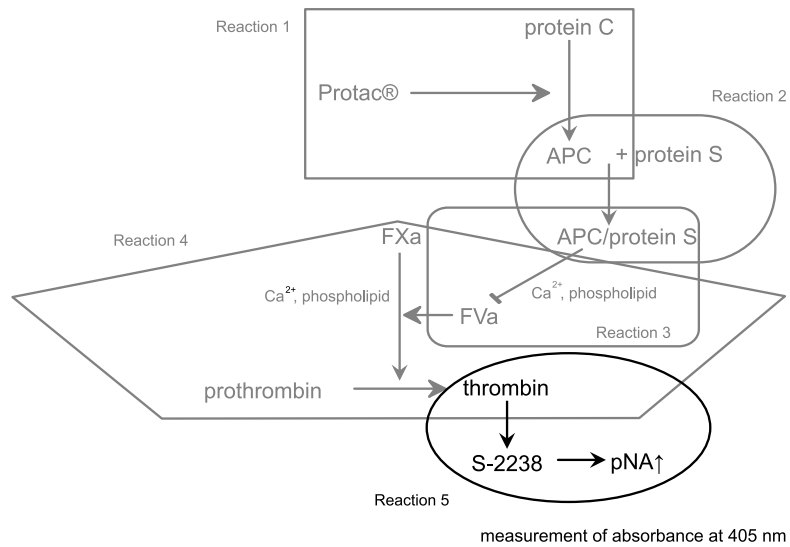
<方法>

100 μL の試薬 4 (S-2238 試薬) と Liposome A 2 μL の混液に 0.01 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ bovine thrombin を 1 μL ならびに 2 μL を、1.0 $\text{ng}/\mu\text{L}$ bovine thrombin を 1, 2.5, 5, 10 μL 添加した。全反応液量を 100 μL と近似した場合に、bovine thrombin 終濃度 1.0, 2.5, 5.0, 10, 20, 50 $\text{ng}/100 \mu\text{L}$ での pNA の遊離について波長 405 nm の吸光度を 300 秒間測定した (Fig. 8B)。0 $\text{ng}/100 \mu\text{L}$ は bovine thrombin を添加しない状態で測定した。なお、試薬 4 は試薬用緩衝液中に S-2238 を 750 μM 含有するよう調製し、測定は 2 回ずつ行った。1 分間あたりの吸光度変化量は、Ultrospec 3100 pro の Michaelis-Menten 式に従う酵素反応の反応初速部分の直線式の傾きを導く機能を利用し、これを記録した。

<結果・考察>

Bovine thrombin 濃度と 1 分間あたりの吸光度増加量は非常に良好な相関 ($r = 0.9967$, $R^2 = 0.9935$, $n = 2$) を示した (Fig 9)。したがって、S-2238 を用いたトロンビンの定量は可能であり、Reaction 4 にてプロテイン C 活性依存的に生成すると想定されるトロンビン量の差を検出するために使用することができるものと考えられた。

A



B

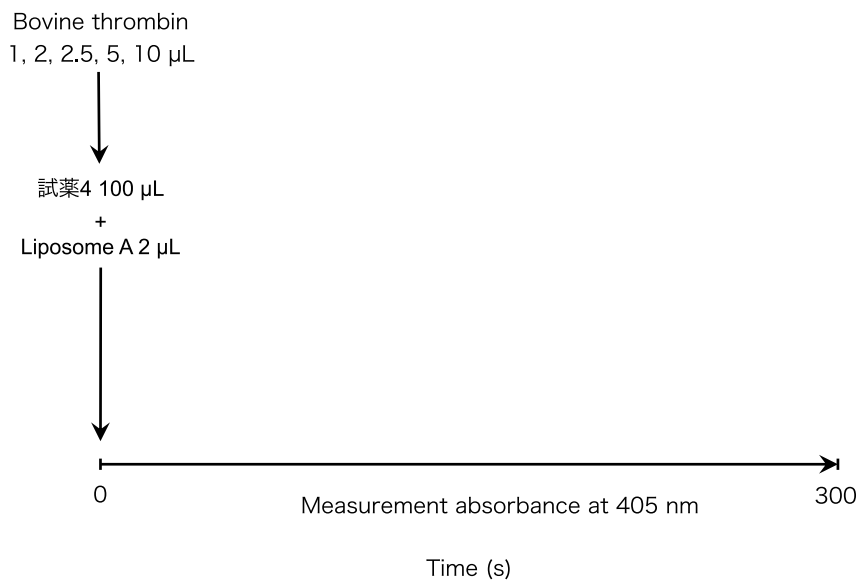


Fig. 8. Procedure of p-Nitroaniline-liberating reaction by thrombin.

(A) トロンビンがトロンビン特異的な発色基質である S-2238 に作用し、pNA を遊離する反応におけるトロンビンの量的依存性を確認する。反応系における本検討の位置付けを強調して示している。(B) タイムラインと添加する試薬とその体積を記載している。吸光度測定は 0 秒時点を対照として、300 秒間測定する。試薬 4 はトロンビン特異的な発色基質である S-2238 を含む。なお (A) における→は促進反応を、|は抑制・分解反応を示す。

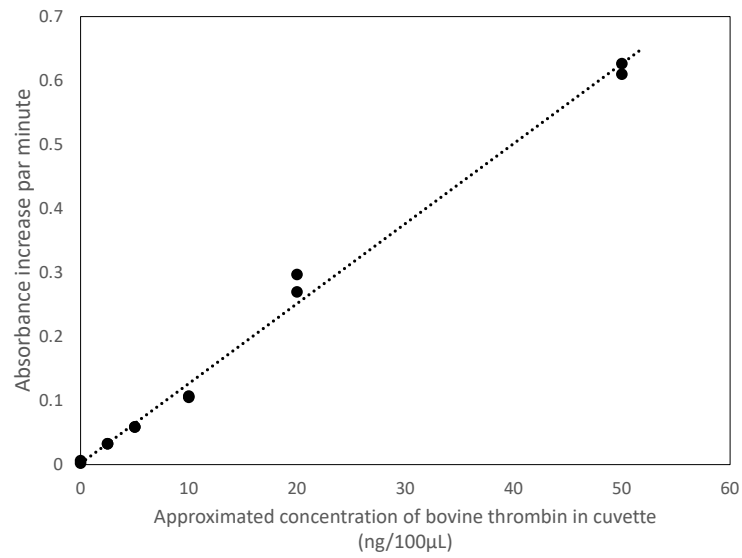


Fig. 9. S-2238 cleavage activity of bovine thrombin.

300 秒間の吸光度変化量を 1 分間あたりの変化速度に変換し、体積を 100 μL とした場合の bovine thrombin 濃度の近似値 (ng/100 μL) に対して実測値をプロットしている。近似曲線式は $y = 12.4919 \times 10^{-3}x + 1.7939 \times 10^{-3}$ であり、相関係数 $r = 0.9967$, 決定係数 $R^2 = 0.9935$ である ($n = 2$)。

第2項-2 FVa ならびに FXa の pNA 遊離反応における量的依存性の検討

構築した反応系の Reaction 3 では、試薬中の FVa が APC/プロテイン S 複合体によりプロテイン C の活性依存的に分解を受けることを想定している。そのため FVa と Reaction 4 以降の反応に量的相関が確認される必要がある。第2項-1 の検討においてトロンビンと生成する pNA の量的相関は確認されたため、Reaction 4-5 を組み合わせることで FVa ならびに FXa のトロンビン生成反応 (Fig. 10) における量的依存性の検証を行った。

2つの要素の量的依存性を検討するにあたり、構築した測定系の反応中で量的変化を受けない FXa の検討を先に行い、その後に FVa の検討を行った。

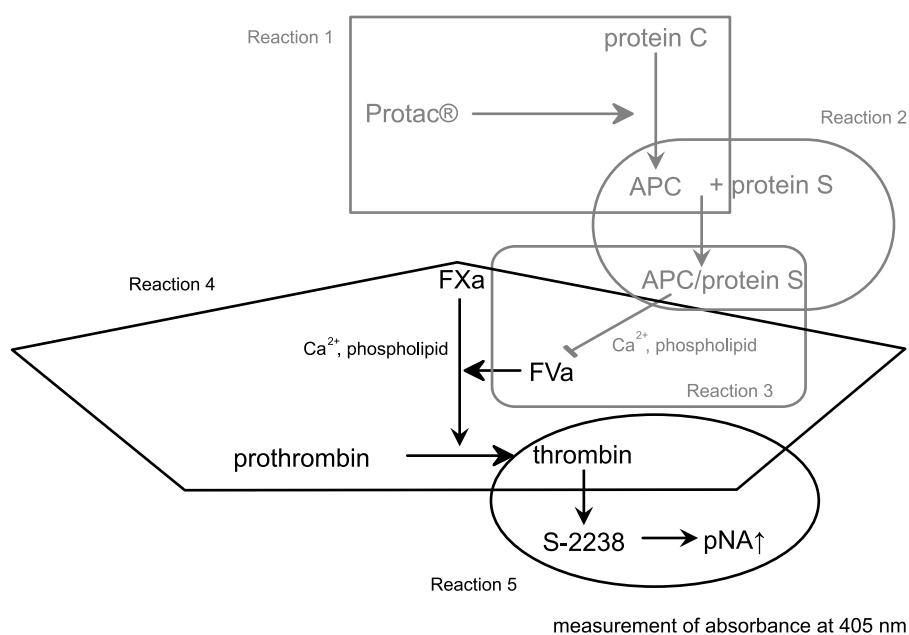


Fig. 10. Reaction map to confirm the concentration dependence of FXa and FVa on *p*-nitroaniline generation.

FXa ならびに FVa の濃度依存性を確認するため、連続する反応段階のうち Reaction 4-5 のみを強調して示す。FXa はプロトロンビンをトロンビンに変換するための直接の酵素として、FVa はその反応を増幅する補因子として機能する。FXa は FVa 非存在下であってもプロトロンビンの活性化作用を有する。なお図中の→は促進反応を、|は抑制・分解反応を示す。

第2項-2-1 FXa の pNA 生成における量的依存性の検証

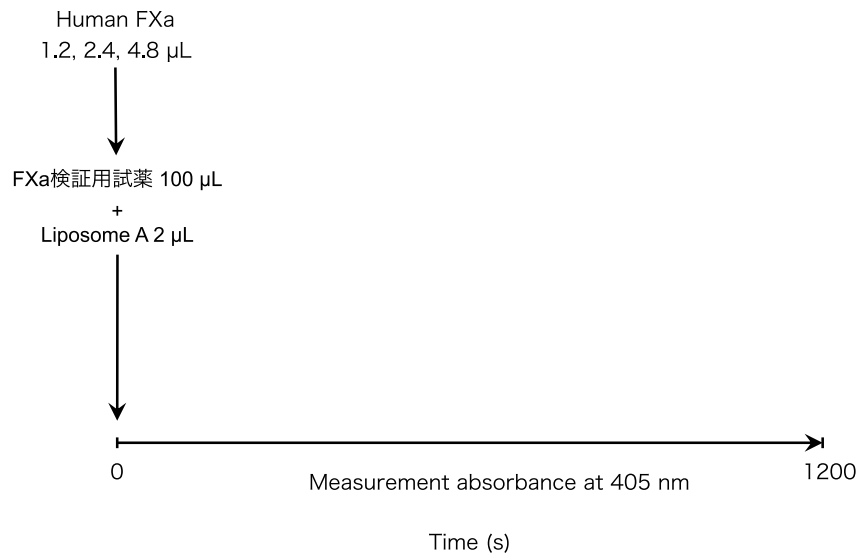
<方法>

試薬用緩衝液中に human prothrombin を 730 nM, S-2238 を 750 μ M 含むように FXa 検証用試薬を調製した。この FXa 検証用試薬 100 μ L に Liposome A を 2 μ L 添加したものをキュベット中に用意し、この混液に対して human FXa を定量的に添加することで FXa の pNA 生成における量的依存性を検証した。Human FXa は定量的プロテイン S 総活性測定法にて報告⁶³されている 50 pM を基準として、1/10 倍, 1/5 倍, 1/2 倍, 1 倍, 2 倍, 5 倍, 10 倍 (約 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 pM) となるように 7.5 ng/mL human FXa を 2.4 μ L または 4.8 μ L, 75 ng/mL human FXa を 1.2, 2.4, 4, 8 μ L, 750 ng/mL human FXa を 1.2 μ L または 2.4 μ L 添加した。本検討では補因子となる FVa を添加していないため反応時間は 1,200 秒とし、波長 405 nm における吸光度測定開始時点から 1,200 秒経過時点での室温における吸光度変化量を 1 分あたりの吸光度変化量に変換して評価した (Fig. 11A)。測定は 2 回行い、結果をキュベット内の体積を 100 μ L と近似した際の FXa 濃度 (pM) に対してプロットを行った。

<結果・考察>

FXa 添加量と 1 分あたりの pNA 遊離に由来する吸光度変化量に関して、良好な相関 ($r = 0.9891$, $R^2 = 0.9784$, $n = 2$) が示された (Fig. 11B)。構築した測定系において FXa は他の因子等において分解を受けたりはしないと考えられるが、以降の試薬濃度の最適化の際に FXa の量を調節することが有用となる可能性が示唆された。

A



B

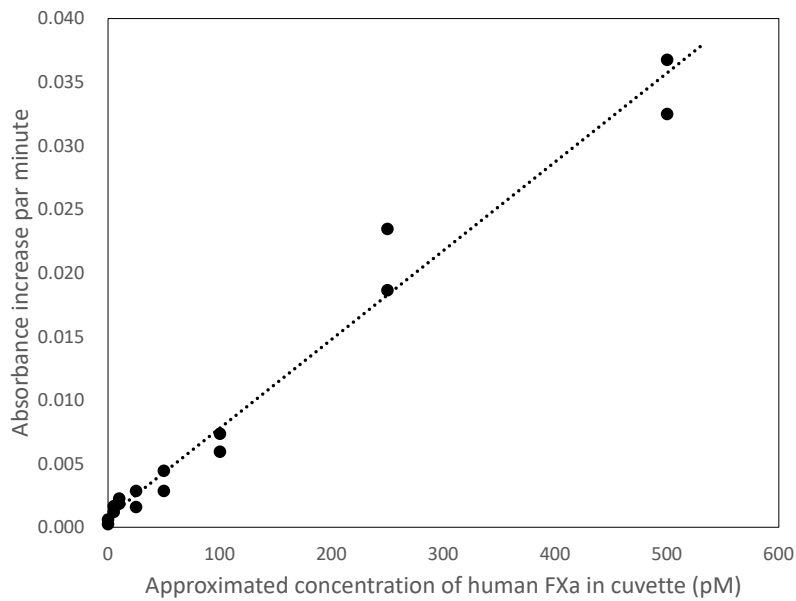


Fig. 11. Confirming FXa concentration dependence on S-2238 degradation.

(A) タイムラインと添加する試薬とその体積を記載している。吸光度測定は0秒時点を対照として、1,200秒間測定する。試薬4はトロンビン特異的な発色基質である S-2238 と、FXa により活性化を受けるプロトロンビンを含む。(B) 1,200 秒間の吸光度変化量を1分間あたりの変化速度に変換し、体積を 100 μL とした場合の FXa 濃度の近似値 (pM) に対して実測値をプロットしている。近似曲線式は $y = 6.9828 \times 10^{-5}x + 0.0008$ であり、相関係数 $r = 0.9891$, 決定係数 $R^2 = 0.9784$ である ($n = 2$)。

第2項-2-2 FXaのpNA遊離反応における量的依存性の検討

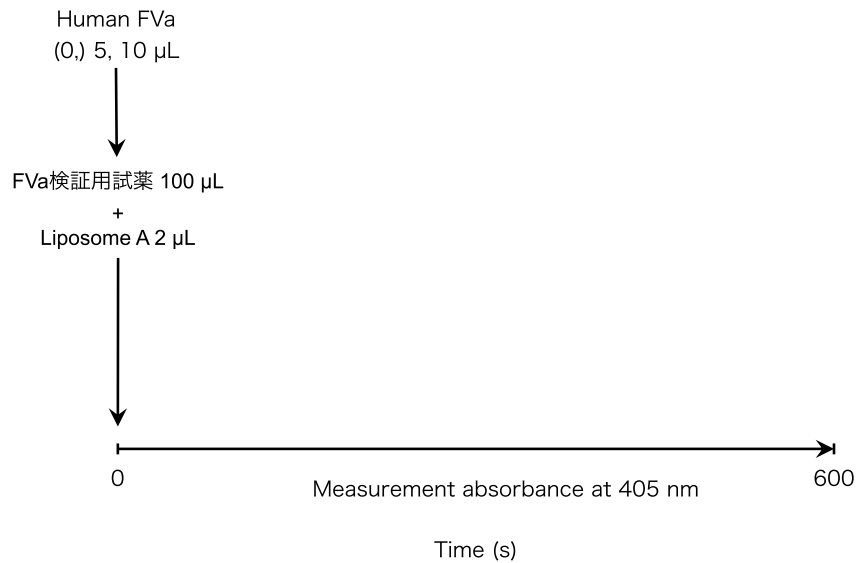
<方法>

試薬用緩衝液中に S-2238, human prothrombin, human FXa をそれぞれ 750 μ M, 730 nM, 50 pM 含むように FVa 検証用試薬を調製した。また、試薬用緩衝液中に human FVa を 357 nM 含有するよう FVa 試薬を調製した。発色試薬 100 μ L と Liposome A 2 μ L をキュベット中に用意し、そこに FVa 試薬を終濃度として 0 nM または 350 nM, 700 nM となるよう 5 μ L または 10 μ L 添加し、波長 405 nm における吸光度変化量を 600 秒間、2 回測定し、600 秒間の吸光度変化量を 1 分あたりの吸光度変化量へ変換して比較した。なお、本検討において 0 nM は FVa 試薬を添加せず測定を行い、Liposome A と FVa 試薬の添加による体積増加は相関の把握が目的のため無視し、いずれの条件においても最終的な体積は 100 μ L であるとして比較を行った (Fig. 12A)。

<結果・考察>

検討した FVa の濃度は 3 点であったが、今回の条件では FVa 濃度と pNA の単位時間あたりの生成量に関して良好な正の相関 ($r = 0.9892$, $R^2 = 0.9785$, $n = 2$) が示された (Fig. 12B)。これにより構築した測定系においてプロテイン C の活性依存的に APC/プロテイン S 複合体により FVa が切断される際に、単位時間の反応終了時点で残存する FVa 量を、pNA の生成量から推定できることが示唆された。これは本測定法における非常に重要な結果であり、プロテイン C 活性を定量的に評価できる可能性が示された。

A



B

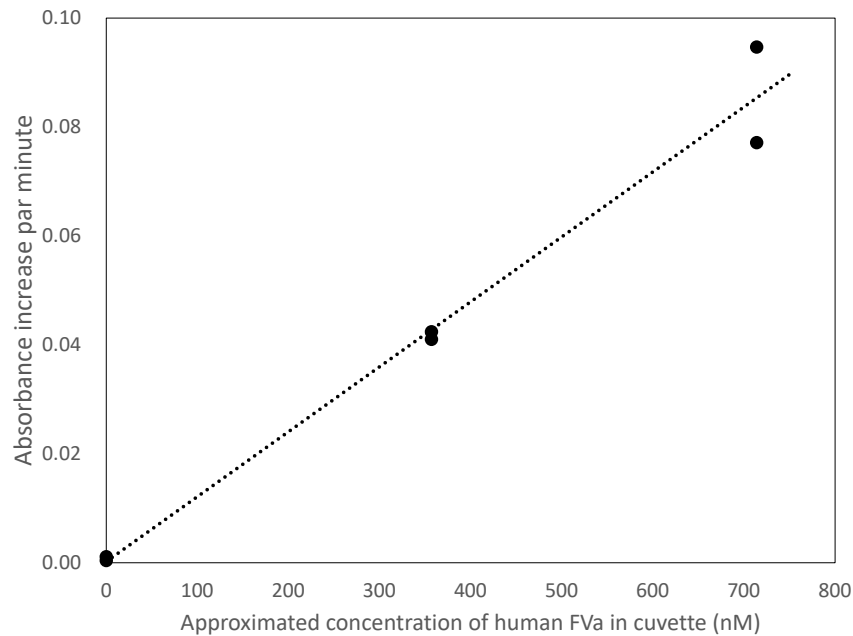


Fig. 12. Confirming FVa concentration dependence on S-2238 degradation.

(A) タイムラインと添加する試薬とその体積を記載している。吸光度測定は0秒時点に対照として、600秒間測定する。FVa検証用試薬はトロンビン特異的な発色基質であるS-2238とFXa、プロトロンビンを含む。Human FVa 0 μLは試薬を添加しないことを示す。(B) 600秒間の吸光度変化量を1分間あたりの変化速度に変換し、体積を100 μLとした場合に添加されるFXa濃度について、実測値をプロットしている。近似曲線式は $y = 0.0426x + 0.0002$ 、相関係数 $r = 0.9892$ 、決定係数 $R^2 = 0.9785$ である ($n = 2$)。

小括

本項にて構築した測定法の各段階の検証を行い、Reaction 4-5 (Fig. 10) の量的依存性が確認された。その他の反応を検討する上で、Reaction 1 についてはサンプル中のプロテイン C を完全に活性化すること、Reaction 2 についてはプロテイン C に対して大過剰のプロテイン S を添加してインキュベーションすることが、サンプル中のプロテイン C 濃度依存的に測定系が機能するために重要な点となると考える。また、Reaction 3 のプロテイン C 活性依存的な FVa の定量的分解反応は、type I 欠乏症ならびにプロテイン C 活性の定義より、同一の活性を示すプロテイン C ではその総量により活性が決定づけられることを利用し、単一の APC 試薬を種々の濃度でサンプル中に添加することで検証が可能であると考えられる。

次項では構築した測定系の Reaction 1-5 を通して実施し、実際にプロテイン C コントロール血漿の活性を測定できるか否かを検討する。

第3項 構築した測定法でのプロテイン C コントロール血漿の活性測定

前項にてサンプル中のプロテイン C 活性を単位時間あたりに遊離する pNA から定量的に評価できる可能性が示唆された。本項では protein C deficient plasma 中に定量的に human protein C を添加したプロテイン C コントロール血漿 (0, 2, 4, 8 $\mu\text{g/mL}$) 中のプロテイン C 活性を本法で評価できるかを検討した。なお 8 $\mu\text{g/mL}$ のプロテイン C コントロール血漿は第 3 節での結果 (Fig. 6) に外挿可能であるとして検討に用いた。

<方法>

Dilution Buffer ならびに試薬用緩衝液、Liposome A は本節第 1 項と同様に調製した。試薬 1 (プロテイン C 活性化試薬) は本邦において発色基質法キットとして体外診断用医薬品

の承認を取得しているテストチーム SPC の①液 (Protac®試薬) を流用した。試薬 2 (プロテイン S 試薬) は試薬用緩衝液中に human protein S を 64.5 nM (終濃度として約 2.3 nM) 含むように調製した。試薬 3 (FVa 試薬) は試薬用緩衝液中に human FVa を 715 pM (終濃度として約 50 nM) 含むように調製した。試薬 4 (呈色試薬) は試薬用緩衝液中に human prothrombin ならびに human FXa, S-2238 をそれぞれ 740 nM, 50 pM, 750 μM (終濃度としてそれぞれ約 630 nM, 43 pM, 650 μM) の濃度で調製した。

サンプルはプロテイン C コントロール血漿のうち、0, 2, 4, 8 μg/mL を検討に用いた。サンプルは Dilution Buffer にて 15 倍希釈し、その 2 μL を 6 μL の試薬 1 に加えて 37 °C, 5 分間インキュベーションした。反応液 8 μL に試薬 2 を 10 μL 添加し 37 °C で 5 分間インキュベーションしたのち、20 μL の試薬 3 を添加しさらに 37 °C, 10 分間インキュベーションした。その後、反応液 38 μL のうち 19 μL をキュベットに用意した 119 μL の試薬 4 と 2 μL の Liposome A との混液に加え、速やかに波長 405 nm にて 600 秒間吸光度を測定した (Fig. 13)。

上記操作を 3 回行って得られた吸光度測定結果は、反応開始時点から 600 秒経過時点の吸光度変化量を 1 分あたりの吸光度変化量へ変換し、コントロール血漿中のプロテイン C 濃度 (μg/mL) に対してプロットし、検量線を求めた。

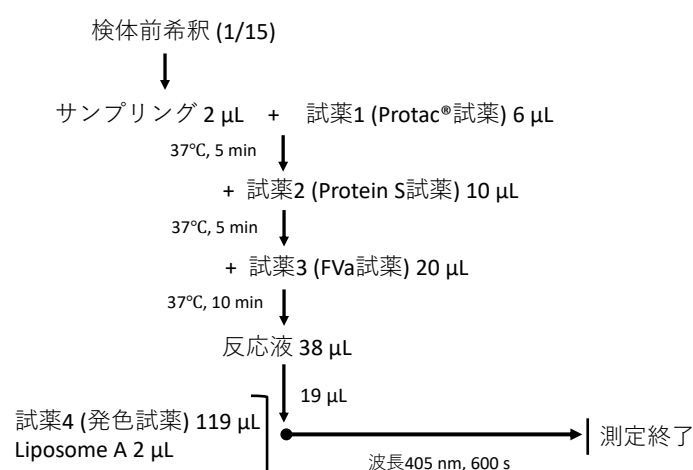


Fig. 13. Measurement procedure of the early phase for quantitative protein C activity measurement.

添加する試薬とその量、反応時間、反応条件について記載している。吸光度測定は試薬 4 と Liposome A との混液に反応液 19 μL を添加した時点をも 0 秒とし、2 秒間隔で 600 秒間測定する。

<結果・考察>

得られたプロットに対しての検量線は直線式にはあまり当てはまらず ($y = -0.0044x + 0.0369$, 相関係数 $r = -0.7186$, 決定係数 $R^2 = 0.5164$)、最も決定係数が高い近似曲線は多項式近似のものであった (Fig. 14A)。また、実際の吸光度測定結果は対数式のグラフのような変化を示した (Fig. 14B)。

得られた結果ではコントロール血漿中プロテイン C 濃度として 2-8 $\mu\text{g/mL}$ の範囲で差が無いように思われた (Fig. 14A)。検量線式が直線式ではなかったことから、実際のサンプルに含まれるプロテイン C 活性を定量的に検出する程の分解能は実現できていない事が示唆された。一方で、Reaction 1-5 を通して反応させた結果、少なくともプロテイン C 濃度 0 $\mu\text{g/mL}$ とその他の濃度では差が見られていることから、測定系自体はある程度機能しているものと考えられ、サンプル中に含まれるプロテイン C の活性を我々が構築した活性測定系により pNA の単位時間あたりの生成速度という形で定量的に表現できる可能性が示された。

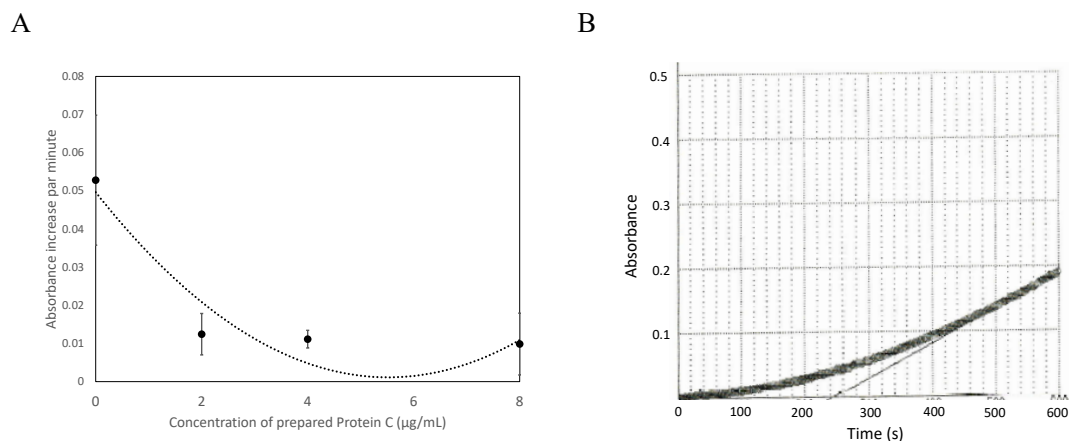


Fig. 14. Calibration curve and measurement result of early phase quantitative protein C measurement.

(A) プロテイン C コントロール血漿中のプロテイン C 濃度 (0, 2, 4, 8 $\mu\text{g/mL}$) に対して 600 秒間での吸光度の増分を 1 分間あたりに変換した値の平均値 ($n = 3$) をプロットしている。検量線は平均値に対して作成し、その式は $y = 0.0016x^2 - 0.0176x + 0.0496$ であり、決定係数 $R^2 = 0.9065$ である。エラーバーは標準誤差を示している。(B) Reaction 5 の際の波長 405 nm における吸光度変化を記録した一例 (プロテイン C 2 $\mu\text{g/mL}$) で、吸光度測定は 2 秒間隔である。

しかしながら、実際の吸光度測定結果が対数式グラフに似た形となっていたことから、吸

光度測定を行っている最中に多段階の酵素反応が同時に進行していたことが示唆された (Fig. 14B)。この点について反応系を改めて確認するとリン脂質を添加しておらず、APC/プロテイン S 複合体による FVa の不活化反応は負に帯電した膜上で Ca^{2+} の存在下で進行するという報告^{5,15,16}を反映していない事が判明した。したがって複数段階に分けてインキュベーションを行っていたが、実際に FVa 不活化反応が進行したのは試薬 4 ならびに Liposome A を添加した段階であったという可能性が考えられる。また、検体前希釈は 15 倍希釈としていたが、血漿中に存在し得る血液凝固系の阻害因子の影響を可能な限り排除するためには前希釈倍率をさらに上げ、測定系に加えられる阻害因子の絶対量を少なくする必要があるものとする。さらに、今回は Liposome A を添加していなかったことが大きな要因である可能性が高いが、プロテイン C 2–8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲で pNA 生成速度に差が生じなかった。これについては試薬として添加した FVa が少ないためにプロテイン C 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の段階で全て分解されてしまった可能性が考えられる。したがって、測定系全般の最適化についてのさらなる検討が必要であると考えられる。

また結果に現れない点として、調製後の試薬 4 にて S-2238 と思われる沈殿が観測されていた。この点についても pH や緩衝液の組成変更等を検討する必要があるものとする。

我々が構築した測定系はプロテイン C コントロール血漿中のプロテイン C を活性化させ、血液凝固カスケードを模した反応系を経由し、最終的にトロンビン特異的な発色基質である S-2238 の切断の結果生じる pNA を吸光度測定により検出する。今回の検討において、コントロール血漿中のプロテイン C の有無によって pNA 由来の吸光度変化速度に差が見られた。したがって、この pNA の生成速度の違いからサンプル中のプロテイン C の活性を推定できる可能性が示唆された。しかしながら、さらなる測定条件の最適化についての検討を重ねる必要があるものとする。

【第5節 定量的新規プロテインC活性測定系の最適化条件の探索と検討】

第4節にて各反応段階の量的依存性について検討し、さらなる条件検討が必要であることが示唆されたが、一方で Reaction 1-5 (Fig. 7) を経てプロテインCコントロール血漿中のプロテインCを検出することが可能であることが示唆された。本節では先の検討を基に実際にプロテインC活性測定法として成立しうる測定条件の探索と、最適化の検討について述べる。

第1項 プロテインC活性化試薬の検討

前節の検討では実績のあるテストチームS PCの①液 (Protac®試薬) を流用していたが、検査法として確立するためにはプロテインCの活性化法の検討が求められる。生体内においてはプロテインCの活性化は血管内皮細胞上のトロンボモジュリンとトロンビンの複合体とプロテインCが反応することで進行する。この際にEPCRが存在することでより強力な活性化が生じる¹¹⁾。可能な限り生体内の反応を再現することが正確なプロテインC欠乏症の検出により好ましいと考えられるが、トロンビンを活性化に用いる場合、Reaction 5におけるpNAの遊離反応に影響を及ぼすことが考えられる。したがってトロンボモジュリンによる検討は省略し、既存法通りにプロテインC活性化試薬であるProtac®を用いる方法について検討した。

平均血中濃度とされる4 µg/mLプロテインCコントロール血漿を用い、Protac®を種々の濃度、pHの条件で調製した上で、①液での活性化との比較を1,138秒間の反応にて行った。プロテインCの活性化の評価にはAPC特異的な発色基質であるテストチームS PCの②液 (S-2366 試薬) を用いた。なお、Protac®は凍結乾燥品のため水にて3 units/mLの濃度に調製し、各種検討に用いた。

第1項-1 pHの検討

<方法>

Protac®を 50 mM Tris-HCl (pH 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0) の種々の pH にて 0.5 units/mL に調製し、コントロール血漿 2 µL に対し 80 µL 添加し 37°C で 5 分間インキュベーションした。この時点で波長 405 nm での吸光度を測定間隔 2 秒で 60 秒間測定して S-2366 の沈殿等を疑わせるような吸光度の変動が無いことを確認した後、テストチーム SPC ②液を 40 µL 加えて 62 秒時点から 1,200 秒経過時点までの吸光度測定を継続した。Protac®の対照としてはテストチーム SPC ①液を用いた。なお、本検討における試薬組成、反応時間は同試薬キットの添付文書に記載の参考情報を基として設定した。結果は 62 秒時点から 1,200 秒経過時点までの吸光度の増分を 1 分間あたりの変化量に変換し、比較を行った。

<結果・考察>

得られた結果を Table 1-2 に示す。1 回の検討であるため統計学的な検討を行うことはできないが、pH 7.5 ならびに 8.0 の条件でテストチーム SPC の活性化試薬よりも大きな 1 分あたりの吸光度変化量が観測されたことから、これらの活性化条件が有用である可能性が示唆された。しかしながら、試薬用緩衝液の組成との相互作用による可能性も排除はできないものの、pH 8.0 においては S-2238 によるものと思われる沈殿が頻回に観測されていたことから、以降は 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) での検討を重ねることとした。

Table 1–2. Effect of buffer pH on the activity of Protac® and comparison with the activation reagent of Testzyme S PC.

Activator pH	Protac®: 0.5 units/mL, buffer: 50 mM Tris-HCl					テストチーム S PC
	7.0	7.5	8.0	8.5	9.0	活性化液
ΔAbs./min	0.0246	0.0319	0.0327	0.0257	0.0145	0.0294

ΔAbs./min: 62 秒から 1,200 秒までの 1,138 秒間の吸光度測定結果を、1 分間あたりの変化量に変換したものの。

プロテイン C コントロール血漿は 4 μg/mL を用いている。

第 1 項 – 2 濃度の検討

先の検討により、上市されているプロテイン C 活性化試薬と同等以上の活性化能を示す 50 mM Tris-HCl の pH 条件が絞り込まれた。そのうち pH 7.5 にて Protac® のプロテイン C 活性化に関する濃度依存性の検討を行った。なお、Protac® 添付文書には「1 mL の血漿中に含まれるプロテイン C を 37 °C において 5 分以内に活性化させる」ものとして、Protac® の 1 unit の定義が記載されている。

<方法>

3 units/mL Protac® 水溶液を 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) を用いて 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5(, 3.0) units/mL に希釈し活性化試薬を得た。キュベットに 4 μg/mL プロテイン C コントロール血漿 4 μL とテストチーム S PC の②液 (S-2366 試薬) を 80 μL 添加し、波長 405 nm ならびに 505 nm での吸光度差をブランクとして測定した。この後キュベットから 42 μL を抜き、キュベット内の反応液 42 μL に対し各濃度の活性化試薬 80 μL を添加し、10 秒間隔で 1,200 秒間吸光度を測定した。

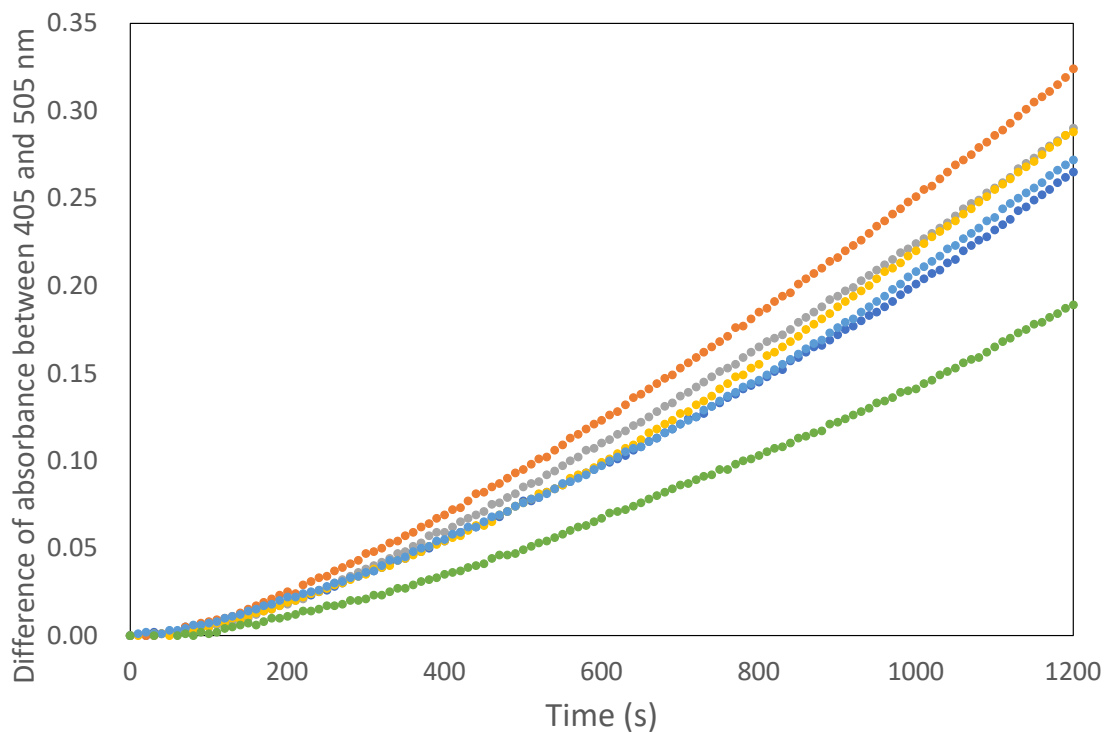
結果は波長 405 nm と 505 nm の吸光度の差を、経過時間に対してプロットした。

<結果・考察>

得られたプロットから、最もプロテイン C 活性化効率の良い Protac®濃度は 1.0 unit/mL であることが示された (Fig. 15)。今回の検討において各種濃度を得るために 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) にて 3 units/mL の Protac®原液を希釈しており、検討に用いた 3.0 units/mL の活性化試薬は Protac®原液そのものであった。濃度が高くなるに従い Tris-HCl の添加量は少なくなるため、今回の検討は厳密に 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) での Protac®の活性を検討する試験としては不適であったものと判断する。

今回の結果から、活性化試薬は添付文書通りに凍結乾燥状態の Protac®を超純水にて 3 units/mL の濃度に溶解した後、50 mM Tris-HCl (pH 7.5) を用いて 1 unit/mL の濃度として用いることが有用である事が示唆された。

なお、Protac®の 1 unit の定義より活性化時間を 5 分未満に短縮できる可能性も示唆されるが、検体前希釈倍率との関連もあるためこの検討は他項に譲ることとする。



● 0.5 units/mL ● 1.0 unit/mL ● 1.5 units/mL ● 2.0 units/mL ● 2.5 units/mL ● 3.0 units/mL

Fig. 15. Effect of Protac® concentration on protein C activation.

Tris-HCl (pH 7.5) 中の Protac® の濃度ごとに波長 405 nm と 505 nm の吸光度の差を、活性化試薬添加時点
を対照としてプロットしている。実際の吸光度測定は 10 秒間隔で 1,200 秒間測定している。

第 2 項 定量的プロテイン C 活性測定、反応系の再検討

前節での検討にて、Reaction 3 の APC/プロテイン S 複合体による FVa の不活化反応に Liposome を添加していなかったことや、プロテイン C コントロール血漿中プロテイン C 濃度 2-8 $\mu\text{g/mL}$ の範囲では 1 分間あたりの吸光度増加量にほとんど差がみられなかった等、反応系についてさらに検討すべき点があることが示唆されていた。本項目では、前項での結果を踏まえ Protac® を用いた活性化試薬を用いたプロテイン C 活性化反応時間の検討をはじめとし、プロテイン C 濃度依存的に最終的な pNA 遊離速度に違いが現れるよう各反応時

間の検討、試薬組成の検討等を行った。従来、試薬用緩衝液を 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) 中に CaCl₂ ならびに NaCl, Triton™ X-100 をそれぞれ 4 mM, 15 mM, 0.06 v/v% で含有するように調製していたが、S-2238 の沈殿が疑われた。したがって本検討では pH を変更し、反応用緩衝液 (Reaction Buffer) として 50 mM Tris-HCl (pH 7.0) 中に CaCl₂ ならびに NaCl, BSA, Triton™ X-100 をそれぞれ 4 mM, 15 mM, 0.1 w/v%, 0.06 v/v% で含有するように調製したものを使用することとした。Liposome は引き続き 50 mM Tris-HCl (pH 7.0) 中に phosphatidylcholine: phosphatidylserine sodium salt: phosphatidylethanolamine をモル比 1: 1: 1 で含有する 1.2 mg/mL Liposome A を用いた。Dilution Buffer についても変更はなく 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) 中にくえん酸三ナトリウム・二水和物ならびに NaCl, BSA, Triton™ X-100 をそれぞれ 10.6 mM, 10 mM, 0.1 w/v%, 0.06 v/v% の濃度で含有するように調製したものを用了。

第 2 項 - 1 プロテイン C 活性化反応時間の短縮と FVa 分解反応についての検討

プロテイン C 活性化時間の検討について、検体前希釈を 15 倍希釈から 50 倍希釈に、サンプリングを 2 μL から 5 μL へ変更したうえで、Reaction 1 (プロテイン C 活性化反応) についても Protac® を 1 unit/mL の濃度で 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) にて調製したプロテイン C 活性化試薬(R1) 5 μL と反応させることとした場合を検討した。この場合、実際の反応段階では血漿 10 μL と Protac® 1 unit の比率で存在することとなり、「血漿 1 mL 中のプロテイン C を 37 °C で 5 分以内に活性化する」という Protac® 1 unit の定義より、反応時間を 5 分よりも短縮できる可能性が考えられた。

また、2019 年に発表された M. Gierula らの報告にて、APC/プロテイン S の複合体はリン脂質表面にて形成されるものであり、この複合体形成反応は FVa が共存する場合でないと効率的に進行せず、実際には APC/プロテイン S/FVa 複合体をリン脂質表面にて形成すると

同時に FVa の不活化反応が起こることが示されていた⁶⁵。このことより、従来 Reaction 2 として Liposome A を添加せずにはまず APC/プロテイン S 複合体生成反応を行い、Reaction 3 として FVa を不活化させる構成であったところを、1 段階に統合できる可能性が示唆された。

これらを踏まえ、プロテイン C 活性化反応時間の短縮ならびに APC/プロテイン S 複合体形成と FVa 分解反応を 1 段階で行うこと (Fig. 16)、Reaction 2 と 3 の反応時間についての検討を行った。

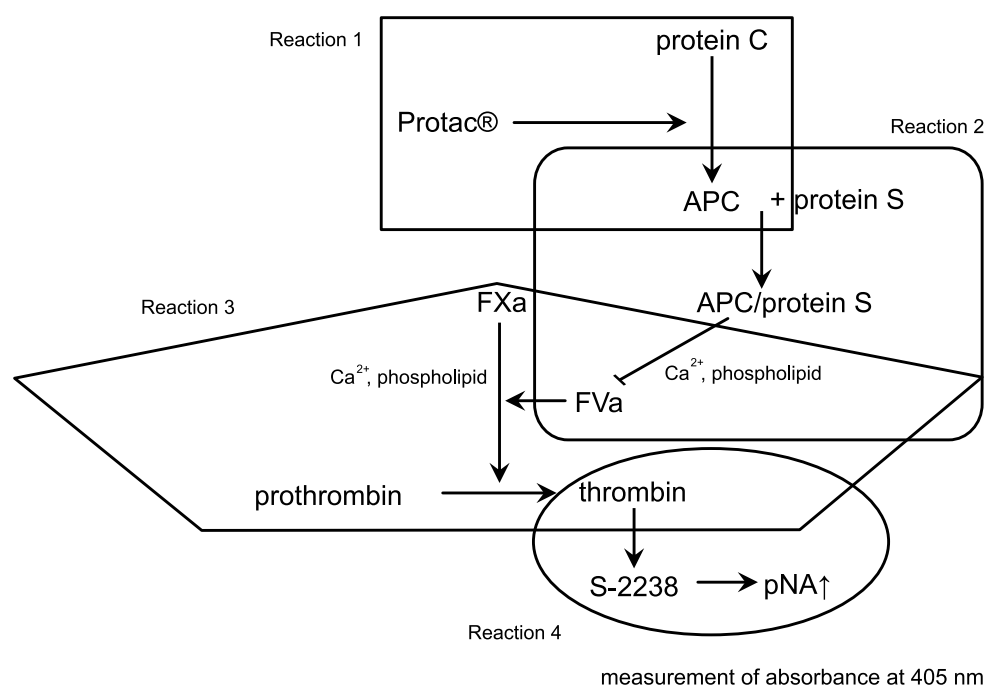


Fig. 16. Reaction map of the late-phase protein C activity assay.

M. Gierula らの報告⁶⁵に基づき、以前の測定系 (Fig. 7) における Reaction 2 と Reaction 3 を統合し、1 段階で行うように変更している。なお図中の→は促進反応を、|は抑制・分解反応を示す。

<方法>

試薬 1 (R1) は 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) 中に Protac®を 1 unit/mL の濃度で調製した。試薬 2 (R2) は Reaction Buffer 中に human protein S ならびに human FVa をそれぞれ 25 nM, 760 pM (終濃度としてそれぞれ約 3.5 nM, 100 pM) の濃度で調製した。試薬 3 (R3) は Reaction Buffer 中に human prothrombin ならびに human FXa をそれぞれ 2.0 μM, 430 pM (終濃度とし

てそれぞれ約 360 nM, 80 nM) の濃度で調製した。試薬 4 (R4) は Reaction Buffer 中に S-2238 を 750 μ M (終濃度として約 450 μ M) の濃度で調製した。

サンプルにはプロテイン C コントロール血漿 (0, 8 μ g/mL) を用い、前希釈として Dilution Buffer により 50 倍希釈を行った。Reaction 1 (プロテイン C 活性化反応) として、希釈検体と R1 を各 5 μ L 混和し、37 $^{\circ}$ C で 10 秒間インキュベーションした。次いで Reaction 2 (FVa 分解反応) としてこの混液に 20 μ L の R2 ならびに 2 μ L の Liposome A を添加し、37 $^{\circ}$ C で 10 秒または 1, 2, 5 分インキュベーションした。その後 Reaction 3 (トロンビン生成反応) として R3 を 27 μ L ならびに Liposome A を 2 μ L を添加し 37 $^{\circ}$ C で 1 分または 5 分間インキュベーションした。反応終了後、Reaction 4 (S-2238 分解・呈色反応) としてキュベットに用意した 90 μ L の R4 に反応液全量の 61 μ L を添加し、速やかに波長 405 nm における吸光度を 100 秒間測定した (Fig. 17)。

得られた結果は 0 秒時点から 10, 20, 30, 60, 100 秒経過時点の吸光度変化量を 1 分間あたりの値に変換し、pNA の生成速度として評価した。なお、今回検討した Reaction 2 と Reaction 3 の時間の組み合わせは (5 分, 5 分), (5 分, 1 分), (1 分, 5 分), (10 秒, 5 分), (2 分, 5 分) である。この結果から特に有用と思われる条件に関してはプロテイン C コントロール血漿 (0, 2, 4, 8 μ g/mL) についても検討を行い、プロテイン C 濃度と 0 秒時点から 100 秒経過時点における pNA 遊離速度のプロットから相関を確認した。

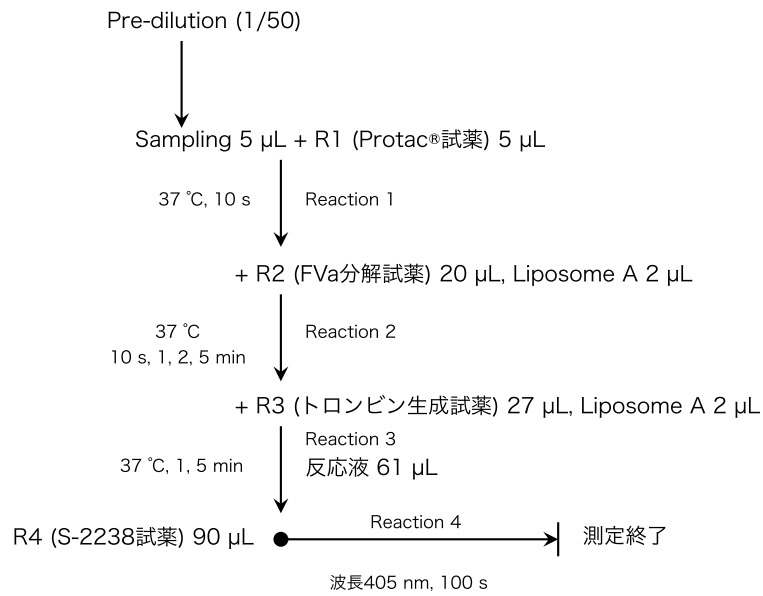


Fig. 17. Measurement procedure to consider reaction times for Reactions 1–3.

添加する試薬とその量、反応時間、反応条件について記載している。プロテインCコントロール血漿 (0, 2, 4, 8 μg/mL) を必要に応じて用いた。R1にはProtac®, R2はプロテインSとFVa, R3はFXaならびにプロトロンビンを含む。吸光度測定はS-2238を含む試薬4に反応液61 μLを添加した時点を0秒とし、2秒間隔で100秒間行う。

<結果・考察>

Table 1-3 に示すように、反応時間の組み合わせとして(Reaction 2, Reaction 3)=(1 分, 5 分), (2 分, 5 分)の条件においてプロテイン C 濃度 0 $\mu\text{g/mL}$ と 8 $\mu\text{g/mL}$ の pNA 遊離速度の差がそれぞれ 0.023, 0.053 /min と比較的大きくなった。本測定系はプロテイン C 活性が高いサンプルほど FVa の不活化がより進行し、生成するトロンビンならびに pNA がより少なくなることを想定して構築した系であり、これを支持するような結果を得られた (Fig. 18)。これら 2 条件について再現性を確認した結果を Table 1-4 に示すが、この際には Reaction 2 を 2 分、Reaction 3 を 5 分とした場合にのみ有用と思われる吸光度の増加 (0.007 /min, 0-100 s) が見られた。この時間条件についてのコントロール血漿中のプロテイン C 濃度と 100 秒間の観測における 1 分あたりの pNA 生成速度の相関は ($r = -0.7978$, $R^2 = 0.6365$) であることが示された (Fig. 18)。

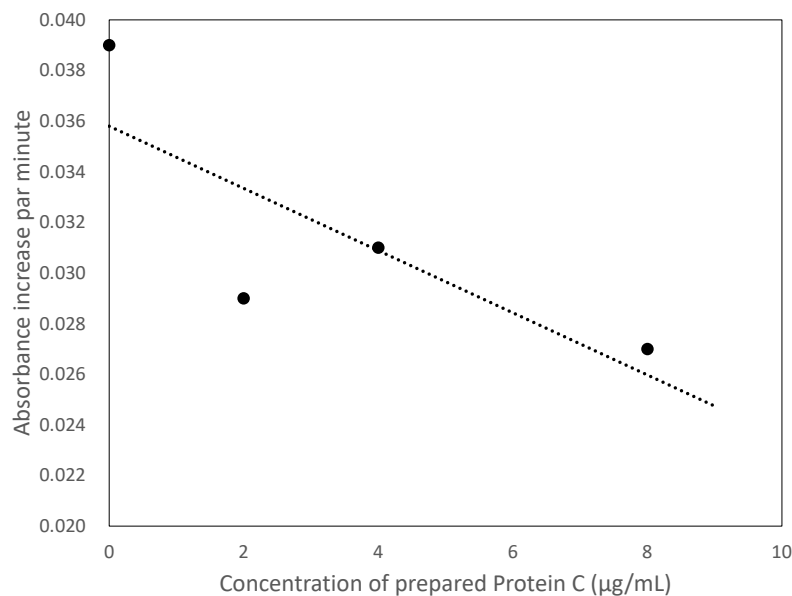


Fig. 18. Calibration curve of modified measurement system.

Reaction 2 を 2 分、Reaction 3 を 5 分とした際の 100 秒間の吸光度増分を 1 分間あたりに変換した実測値をプロテイン C コントロール血漿濃度 (0, 2, 4, 8 $\mu\text{g/mL}$) に対してプロットを示す。近似曲線式は $y = -0.0012x + 0.0358$ 、相関係数 $r = -0.7978$ 、決定係数 $R^2 = 0.6365$ である。

Table 1-3. Influence of the reaction time of Reactions 2 and 3.

Reaction 2, 3	PC conc. ($\mu\text{g/mL}$)	$\Delta\text{Abs./min}$					Difference 0-100 s
		0-10 s	0-20 s	0-30 s	0-60 s	0-100 s	
5 min, 5 min	0	0.042	0.030	0.026	0.026	0.027	-0.006
	8	0.054	0.051	0.038	0.036	0.033	
5 min, 1 min	0	0.030	0.027	0.024	0.021	0.021	0.002
	8	0.018	0.024	0.020	0.020	0.019	
1 min, 5 min	0	0.072	0.081	0.082	0.082	0.081	0.026
	8	0.072	0.063	0.056	0.056	0.055	
10 s, 5 min	0	0.210	0.150	0.150	0.147	0.145	0.014
	8	0.138	0.144	0.140	0.136	0.131	
2 min, 5 min	0	0.078	0.075	0.074	0.070	0.099	0.053
	8	0.042	0.048	0.046	0.045	0.046	

$\Delta\text{Abs./min}$: 各測定時間内における吸光度測定結果を、1分間あたりの変化量に変換したもの。0-10 s は 0 秒時点から 10 秒経過時点までの 10 秒間、0-20 s は同様に 20 秒間、0-30 s は 30 秒間、0-60 s は 60 秒間、0-100 s は 100 秒間の結果を用いて変化量を算出していることを示す。

Reaction 2, 3: Reaction 2 と Reaction 3 の時間の組み合わせを表現している。

PC conc.: プロテイン C コントロール血漿中のプロテイン C 濃度を記載している。

Difference 0-100 s: 各濃度の結果のうち 0-100 s の値について、プロテイン C 0 $\mu\text{g/mL}$ の値と 8 $\mu\text{g/mL}$ の値の差を示している。

$\Delta\text{Abs./min}$ は反応時間によりその値が変化したため、反応時間ごとにデータを記載している ($n = 1$)。

Table 1–4 Confirmation of the influence of the reaction time of Reactions 2 and 3 on the results.

Reaction 2, 3	PC conc. ($\mu\text{g/mL}$)	$\Delta\text{Abs./min}$					Difference 0–100 s
		0–10 s	0–20 s	0–30 s	0–60 s	0–100 s	
2 min, 5 min	0 (mean)	0.039	0.041	0.038	0.038	0.036	0.010
	8 (mean)	0.024	0.029	0.029	0.030	0.029	
1 min, 5 min	0	0.066	0.063	0.064	0.058	0.055	–0.044
	8	0.126	0.117	0.110	0.102	0.099	

$\Delta\text{Abs./min}$: 各測定時間内における吸光度測定結果を、1分間あたりの変化量に変換したもの。0–10 sは0秒時点から10秒経過時点までの10秒間、0–20 sは同様に20秒間、0–30 sは30秒間、0–60 sは60秒間、0–100 sは100秒間の結果を用いて変化量を算出していることを示す。

Reaction 2, 3: Reaction 2とReaction 3の時間の組み合わせを表現している。

PC conc.: プロテインCコントロール血漿中のプロテインC濃度を記載している。

Difference 0–100 s: 各濃度の結果のうち0–100 sの値について、プロテインC 0 $\mu\text{g/mL}$ の値と8 $\mu\text{g/mL}$ の値の差を示している。

$\Delta\text{Abs./min}$ は反応時間によりその値が変化したため、各反応時間ごとにデータを記載している。反応時間2分と5分の組み合わせは $n=2$ での検討であるため、その平均値を記載している。なお、1分と5分の組み合わせは $n=1$ である。

プロテインC濃度依存性が確認されたことから、Reaction 1は今回設定した10秒という従来の検討よりも大幅に短縮した条件においても十分進行していたことが示された (Fig. 18)。また、APC/プロテインS複合体形成反応とFVa分解反応を1段階の反応として統合し、試薬の組成を変更した測定系自体も実際に機能していることが示された。

しかしながら、プロテインC 4–8 $\mu\text{g/mL}$ では近似曲線に比較的近い部分に実測値があるのに対し、0 $\mu\text{g/mL}$ は大きく上に、2 $\mu\text{g/mL}$ は下に外れるように実測値がプロットされた (Fig. 18)。プロテインC 0 $\mu\text{g/mL}$ が上に外れた理由として、この濃度のコントロール血漿はhuman protein Cの代わりにPBSを添加して調製している一方で、試薬として用いているhuman protein Cは50 v/v% glycerol/H₂Oの不凍液に調製された状態で販売されているため、

この組成の違いが結果に影響を及ぼしている可能性が考えられる。また、大きく下に外れた 2 $\mu\text{g/mL}$ コントロール血漿においては、血漿中プロテイン C 濃度が低い領域では血漿成分の影響を受けている可能性が考えられる。

プロテイン C 0 $\mu\text{g/mL}$ コントロール血漿の組成が異なる問題については、代わりに 0.5, 1 $\mu\text{g/mL}$ といったより低濃度のコントロール血漿を用いることで改善できる可能性が考えられた。一方プロテイン C 2 $\mu\text{g/mL}$ コントロール血漿において pNA 遊離速度が低いことに関して、考察に基づく理由であれば検体前希釈倍率を上げることにより改善が図れるのではないかと考えた。また、プロテイン C 濃度間の pNA 生成速度の差を広げるために、FXa や FVa 濃度を変更することも有用であるのではないかと考える。

その他、前節第 3 項にて反応時間の経過とともに吸光度変化速度が上昇する結果が得られていた (Fig. 14B) が、Table 1-3 ならびに Table 1-4 に示すように本検討では反応の初期に吸光度変化速度が高い傾向が示された。このことより、各段階の反応は設定した反応時間内に概ね完了している可能性が考えられる。また、今後は反応の初速において吸光度変化速度を比較できる可能性が示唆され、全体的な測定時間の短縮も検討できるものとする。

第 2 項 - 2 検体前希釈倍率と FVa 濃度の検討

先の検討を基に検体前希釈倍率と試薬中の FVa 濃度を変化させ、血漿中プロテイン C 濃度と 1 分あたりの吸光度増加量についてプロットした際の更なる相関の向上と近似曲線式の傾きを大きくし、定量性の向上を図ることを目的としてさらに検討を重ねた。

第2項-2-1 条件検討

<方法>

試薬 1 (R1) は 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) 中に Protac® を 1 unit/mL の濃度で調製した。試薬 2 (R2) は Reaction Buffer 中に human protein S を 25 nM (終濃度として約 3.5 nM) ならびに human FVa を 505 pM または 760 pM (終濃度としてそれぞれ約 70 pM ならびに 100 pM) の濃度で調製した。試薬 3 (R3) は Reaction Buffer 中に human prothrombin ならびに human FXa をそれぞれ 2.0, 4.5 μ M (終濃度として約 360, 820 nM) の濃度で調製した。試薬 4 (R4) は Reaction Buffer 中に S-2238 を 750 μ M (終濃度として約 450 μ M) の濃度で調製した。

サンプルにはプロテイン C コントロール血漿 (1, 2, 4, 8 μ g/mL) を用い、前希釈として Dilution Buffer により 50 倍または 100 倍希釈を行った。Reaction 1 (プロテイン C 活性化反応) として、希釈検体と R1 を各 5 μ L 混和し 37 °C で 10 秒間インキュベーションした。次いで Reaction 2 (FVa 分解反応) としてこの混液に 20 μ L の R2 ならびに 2 μ L の Liposome A を添加し、37 °C で 2 分間インキュベーションした。この後 Reaction 3 (トロンビン生成反応) として R3 を 27 μ L 添加し 37 °C で 5 分間インキュベーションした。反応終了後、Reaction 4 (S-2238 分解・呈色反応) としてキュベットに用意した 90 μ L の R4 に反応液全量の 61 μ L を添加し、速やかに波長 405 nm における吸光度を 100 秒間測定した (Fig. 19)。

得られた結果は 0 秒時点から 100 秒経過時点の吸光度変化量を 1 分間あたりの値に変換し、pNA の生成速度として評価した。なお、今回検討した検体前希釈率と FVa 濃度の組み合わせは (1/100, 505 pM), (1/100, 760 pM), (1/50, 760 pM) であった。

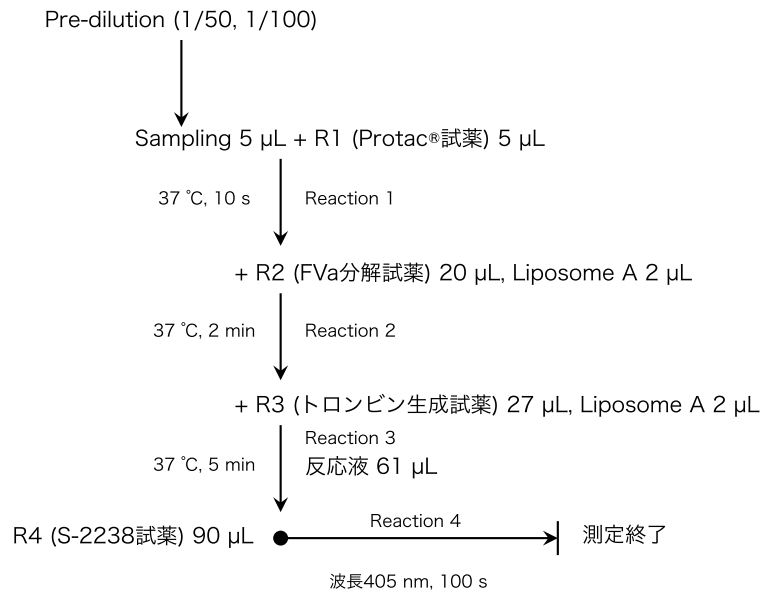


Fig. 19. Measurement procedure to determine the predilution and concentration of FVa.

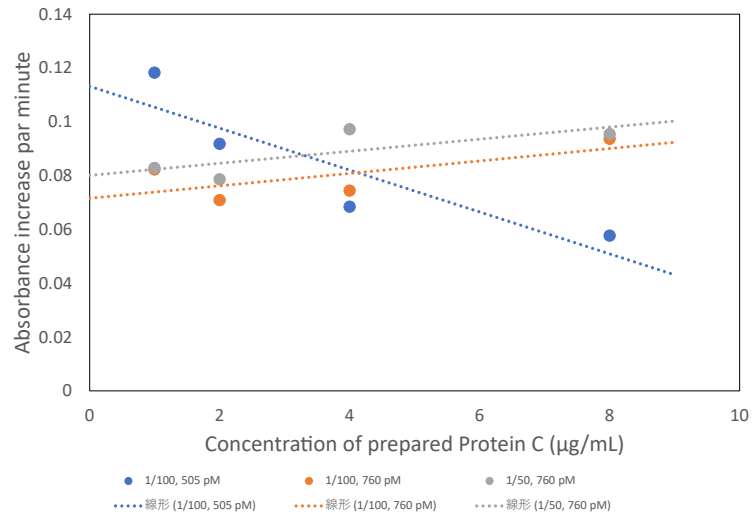
添加する試薬とその量、反応時間、反応条件について記載している。プロテインCコントロール血漿 (1, 2, 4, 8 μg/mL) についての検体前希釈を 1/50 または 1/100 として比較検討を行う。R1 には Protac®, R2 はプロテイン S と FVa, R3 は FXa ならびにプロトロンビンを含有する。なお R2 における FVa 濃度は 505 pM と 760 pM の 2 通り検討する。検討する検体前希釈率と R2 中 FVa 濃度の組み合わせは (1/100, 505 pM), (1/100, 760 pM), (1/50, 760 pM) である。吸光度測定は S-2238 を含む試薬 4 に反応液 61 μL を添加した時点を 0 秒とし、2 秒間隔で 100 秒間行う。

<結果・考察>

本測定系はサンプル中のプロテインC活性が高いほどFVaの不活化がより進行するため、生成するトロンビンならびにpNAがより少なくなる (Fig. 16)。したがって適切な条件では、吸光度変化速度とプロテインC濃度は負の相関を示すと考えられる。検討した条件のうち、最も良好な負の相関 ($r = -0.8958$, $R^2 = 0.8025$) を示したのは検体前希釈倍率 100 倍、R2 中 FVa 濃度 505 pM であった (Fig. 20A)。その他の条件は正の傾きを示しており、相関係数も 0.7 台と従来の検討で分解能が不足していると判断していた結果と類似していた。したがって、単回の検討ではあるものの今回の結果から検体前希釈倍率を上げること、FVa 濃度を下げることが血漿中プロテイン C 活性を定量的に測定するために有用である可能性が示唆さ

れた。しかしながら、最も有用らしいと考えた検体前希釈倍率 100 倍、R2 中 FVa 濃度 505 pM の結果も、実際には対数近似とした方が高い決定係数 ($R^2=0.9699$) であった (Fig. 20B)。対数近似でも検量線として問題はないが、本研究はプロテイン C 欠乏症の検出を主眼としており、対数近似ではプロテイン C 低濃度・低活性領域での誤差が大きくなる。測定の自動化が達成されれば誤差は小さくできるものと考えられるが、用手法にて検討を重ねている現段階では直線に近似できる方が好ましいと考える。プロテイン C 低濃度領域で吸光度変化速度の差が大きくなることから、検体前希釈倍率を高める、FXa ならびに FVa 濃度を調節する等の検討が必要となると考える。

A



B

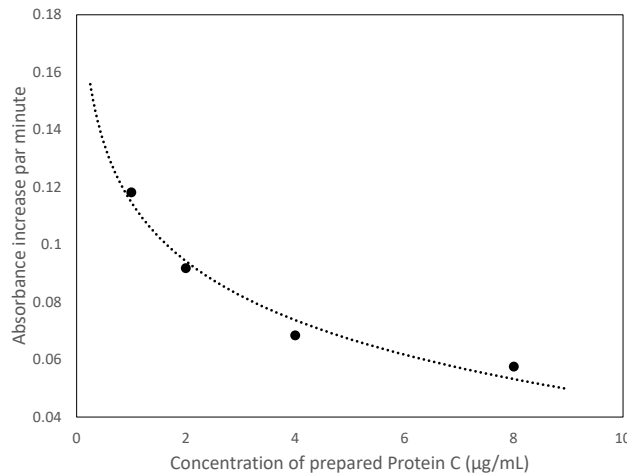


Fig. 20. Influence of sample predilution and FVa concentration on the result.

(A) 検体前希釈を 1/50 または 1/100、R2 中 FVa 濃度を 505 pM または 760 pM として検討した際の波長 405 nm における 100 秒間の吸光度増分を 1 分間あたりの値に変換したものを、プロテイン C コントロール血漿濃度 (1, 2, 4, 8 μg/mL) に対して実測値をプロットしている ($n=1$)。検討した組み合わせとプロット、近似曲線は凡例に示す通りである。検体前希釈 1/100、FVa 濃度 505 pM の近似曲線式は $y = -0.0078x + 0.1132$ 、相関係数 $r = -0.8958$ 、決定係数 $R^2 = 0.8025$ である。同様に検体前希釈 1/100、FVa 濃度 760 pM の近似曲線式は $y = 0.0023x + 0.0716$ 、相関係数 $r = 0.7089$ 、 $R^2 = 0.5027$ であり、検体前希釈 1/50、FVa 濃度 760 pM の近似曲線式は $y = 0.0022x + 0.0801$ 、相関係数 $r = 0.7551$ 、決定係数 $R^2 = 0.5702$ である。

(B) 検体前希釈 1/100、R2 中 FVa 濃度 505 pM の検討結果のみを単独でプロットしている。対数近似により求めた近似曲線式は $y = -0.03\ln(x) + 0.1148$ 、決定係数 $R^2 = 0.9699$ である。

第2項-2-2 サンプル数の取得

先の検討で最も良好な負の相関を示したものに近しい条件において、単回の検討ではなく $n = 5$ として問題点や改善策を見出すことを目的に検討を行った。なお、リン脂質依存性の反応を促進する目的で、リン脂質濃度を高めつつ、Reaction 3 においてトロンビン生成反応を阻害するホスファチジルコリン⁶⁶の割合を減らした Liposome B を添加することとした。また、先の検討における Table 1-3 ならびに Table 1-4 の結果を反映して Reaction 4 の反応時間を 20 秒とし、反応初速での評価を行った。

<方法>

試薬 1 (R1) は 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) 中に Protac® を 1 unit/mL の濃度で調製した。試薬 2 (R2) は Reaction Buffer 中に human protein S ならびに human FVa をそれぞれ 25 nM, 505 pM (終濃度としてそれぞれ約 3.5 nM, 70 pM) の濃度で調製した。試薬 3 (R3) は Reaction Buffer 中に human prothrombin ならびに human FXa をそれぞれ 2.0 μ M, 4.5 nM (終濃度としてそれぞれ約 360, 820 nM) の濃度で調製した。試薬 4 (R4) は Reaction Buffer 中に S-2238 を 750 μ M (終濃度として約 450 μ M) の濃度で調製した。Liposome B は 50 mM Tris-HCl (pH 7.0) 中に phosphatidylcholine: phosphatidylserine sodium salt: phosphatidylethanolamine をモル比 2: 3: 5 で含有するように Liposome A と同様の方法で作製し、2.0 mg/mL に調製したものをを用いた。

サンプルにはプロテイン C コントロール血漿 (0.5, 1, 2, 4, 6 μ g/mL) を用い、前希釈として Dilution Buffer により 100 倍希釈を行った。Reaction 1 (プロテイン C 活性化反応) として、希釈検体と R1 を各 5 μ L 混和し 37 °C で 30 秒間インキュベーションした。次いで Reaction 2 (FVa 分解反応) としてこの混液に 20 μ L の R2 ならびに 2 μ L の Liposome A を添加し、37 °C で 2 分間インキュベーションした。その後 Reaction 3 (トロンビン生成反応) として R3 を 27 μ L ならびに Liposome B を 2 μ L 添加し 37 °C で 5 分間インキュベーションした。反応

終了後、Reaction 4 (S-2238 分解・呈色反応) としてキュベットに用意した 90 μL の R4 に反応液全量の 61 μL を添加し、速やかに波長 405 nm における吸光度を 20 秒間測定した (Fig. 21)。なお検討は 5 回行った。

得られた結果は 0 秒時点から 20 秒経過時点の吸光度変化量を 1 分間あたりの値に変換し、コントロール血漿中プロテイン C 濃度に対して 1 分あたりの吸光度変化量の平均値をプロットして評価した。

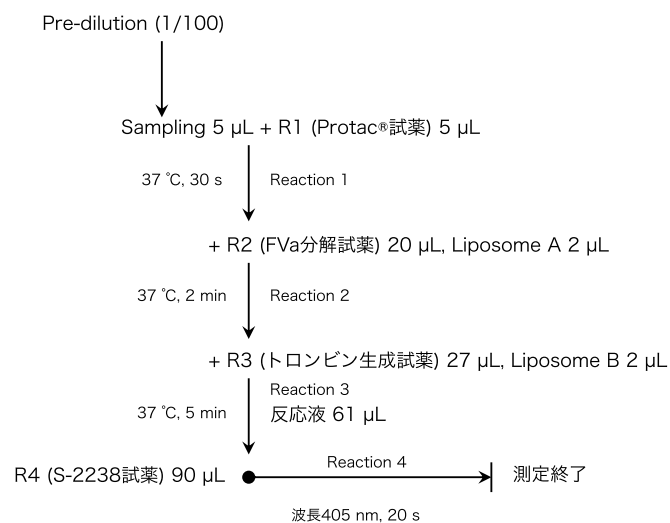


Fig. 21. Measurement procedure to confirm sample predilution and FVa concentration.

添加する試薬とその量、反応時間、反応条件について記載している。プロテイン C コントロール血漿 (0.5, 1, 2, 4, 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$) についての検体前希釈を 1/100 としている。R1 には Protac®, R2 はプロテイン S と FVa, R3 は FXa ならびにプロトロンビンを含有する。なお R2 における FVa 濃度は 505 pM とし、R3 と同時に添加するリン脂質を Liposome B へと変更している。吸光度測定は S-2238 を含む試薬 4 に反応液 61 μL を添加した時点を 0 秒とし、2 秒間隔で 20 秒間行う。

<結果・考察>

平均値のプロットは比較的良好な相関 ($r = -0.9668, R^2 = 0.9347$) を示したが、標準誤差が非常に大きい結果が得られた (Fig. 22A)。第 3 項での検討と比較して近似曲線の傾きは大きくなり、よりプロテイン C 活性の定量性は高まったと推察されるものの、用手法であるとは言え極めて再現性の低い結果となった。これは Reaction 3 にて添加するリン脂質を

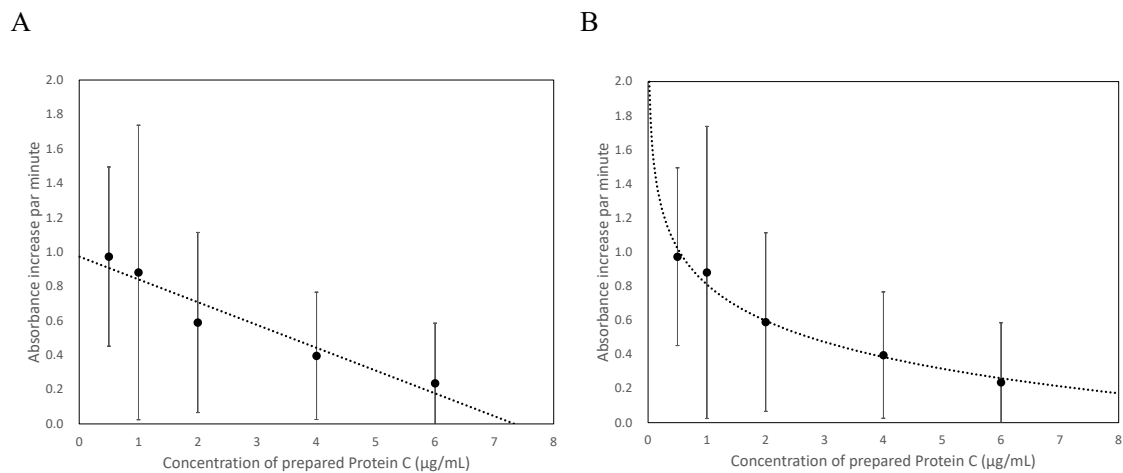


Fig. 22. Calibration curve of late-phase quantitative protein C measurement.

(A) プロテイン C コントロール血漿中のプロテイン C 濃度 (0.5, 1, 2, 4, 6 μg/mL) に対して 20 秒間での吸光度の増分を 1 分間あたりに変換した値の平均値 ($n = 5$) をプロットしている。検量線は平均値に対して作成し、その線形近似式は $y = -0.1326x + 0.9732$ であり、相関係数 $r = -0.9668$, 決定係数 $R^2 = 0.9347$ であり、横軸切片は 7.3394 μg/mL である。エラーバーは標準誤差を示している。(B) (A) のプロットに対して近似曲線を対数近似とした場合。近似曲線式は $y = -0.307\ln(x) + 0.8101$, 決定係数 $R^2 = 0.9789$ である。

Liposome B へと変更したことが一因となった可能性があると考え。しかし、本測定法はプロテイン C 欠乏症の検出を目的としているとはいえ、コントロール血漿中プロテイン C 濃度として約 7.3 μg/mL で測定限界を迎えてしまっており、さらなる改善が必要である事が示された。

標準誤差が大きくなったその他の要因としては様々考えられるが、1 分間あたりの吸光度変化量が全体的に従来の検討の 10 倍程度大きくなった事がそのひとつとして考えられるものの、試行回数を増やしていること、測定系に複数の酵素反応が組み込まれていることも無視できない要素であると推察する。検査法として確立するためには再現性を高めることは最重要であり、いかに用手法にて検討を行っているとは言え標準誤差を可能な限り低減することが求められると考える。

また、平均値のプロットにおける近似曲線の相関は比較的良好であったものの、依然とし

て線形近似よりも対数近似の決定係数が高い ($R^2 = 0.9347, 0.9789$) ことも認められた (Fig. 22B)。先の検討でも考察した通り検量線が対数近似であっても問題はなく、特にプロテイン C 欠乏症を評価する上では一定の優位性も考えられるが、再現性を高める上で併せて直線性を高めることができればあればより好ましいと考える。

小括

検体前希釈倍率を上げること、試薬中 FVa 濃度を下げること、すなわちプロテイン C と FVa に関してはより希薄な条件において血漿中プロテイン C 活性の定量性が高まることが示唆された。一方で試薬中 FXa 濃度を高めることで全体的な pNA 生成速度が上昇し検量線の傾きが数値として大きくなる一方で、測定間誤差が増大し再現性を低下させる可能性が示唆された。

【第6節 測定条件の決定・既存法との比較検討】

先の検討以降も様々な条件を設定し検討を重ねたが、添加する FVa をさらに減じて Protac®濃度を 0.5 units/mL とし、R2 を 10 μ L 添加する場合について検討を行なった。本検討ではプロテイン C コントロール血漿 (0.5, 1, 2, 4, 6 μ g/mL) について $n = 10$ としてデータを収集することとした。この結果に対してテストチーム SPC との定量性に関する統計学的な比較検討を z 検定にて行い、優位性または非劣性を検証した。

第1項 測定条件の決定

Protac®濃度を 0.5 units/mL に減じる一方でプロテイン C 活性化反応の反応時間を 10 秒から 60 秒に延長する検討を行なった。その他 FXa を増加させ、プロトロンビン濃度、S-2238 濃度については大過剰条件が失われたいと思われる程度に減じた。Liposome は前節の検討に引き続き Liposome A と Liposome B を併用することとした。

<方法>

Dilution Buffer は 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) 中にくえん酸三ナトリウム・二水和物ならびに NaCl, BSA, Triton™ X-100 をそれぞれ 10.6 mM, 10 mM, 0.1 w/v%, 0.06 v/v%の濃度で含有するように調製した。Reaction Buffer は 50 mM Tris-HCl (pH 7.0) 中に CaCl₂ならびに NaCl, BSA, Triton™ X-100 をそれぞれ 4 mM, 15 mM, 0.1 w/v%, 0.06 v/v%で含有するように調製した。また、Liposome は 50 mM Tris-HCl (pH 7.0) 中に phosphatidylcholine: phosphatidylserine sodium salt: phosphatidylethanolamine をモル比 1: 1: 1 で含有し 1.2 mg/mL に調製したものを Liposome A, 同様にモル比 2: 3: 5 で含有するように Liposome A と同様の方法で作製し、

2.0 mg/mL に調製したものを Liposome B とした。

試薬 1 (R1) は 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) 中に Protac® を 0.5 units/mL の濃度で調製した。試薬 2 (R2) は Reaction Buffer 中に human protein S ならびに human FVa をそれぞれ 25, 1.0 nM (終濃度としてそれぞれ約 1.5 nM, 60 pM) の濃度で調製した。試薬 3 (R3) は Reaction Buffer 中に human prothrombin ならびに human FXa をそれぞれ 1.2 μ M, 6.5 nM (終濃度としてそれぞれ約 200 nM, 1.0 nM) の濃度で調製した。試薬 4 (R4) は Reaction Buffer 中に S-2238 を 375 μ M (終濃度として約 240 μ M) の濃度で調製した。

サンプルは前希釈として Dilution Buffer により 100 倍希釈を行った。Reaction 1 (プロテイン C 活性化反応) として、希釈検体と R1 を各 5 μ L 混和し 37 °C で 1 分間インキュベーションした。次いで Reaction 2 (FVa 分解反応) としてこの混液に 10 μ L の R2 ならびに 2 μ L の Liposome A を添加し、37 °C で 2 分間インキュベーションした。この後 Reaction 3 (トロンビン生成反応) として R3 を 27 μ L ならびに Liposome B を 2 μ L 添加し 37 °C で 5 分間インキュベーションした。反応終了後、Reaction 4 (S-2238 分解・呈色反応) としてキュベットに用意した 90 μ L の R4 に反応液 51 μ L のうち 50 μ L を添加し、速やかに波長 405 nm における吸光度を 100 秒間測定した (Fig. 23)。なお検討は 10 回行った。

得られた結果は 0 秒時点から 10, 20, 30, 60, 100 秒経過時点の吸光度変化量を 1 分間あたりの値に変換し、コントロール血漿中プロテイン C 濃度に対する 1 分あたりの吸光度変化量として評価した。そのうち最も標準誤差が小さく、相関が高い条件については 1 分間あたりの吸光度変化量の平均値をコントロール血漿中プロテイン C 濃度に対してプロットして評価した。

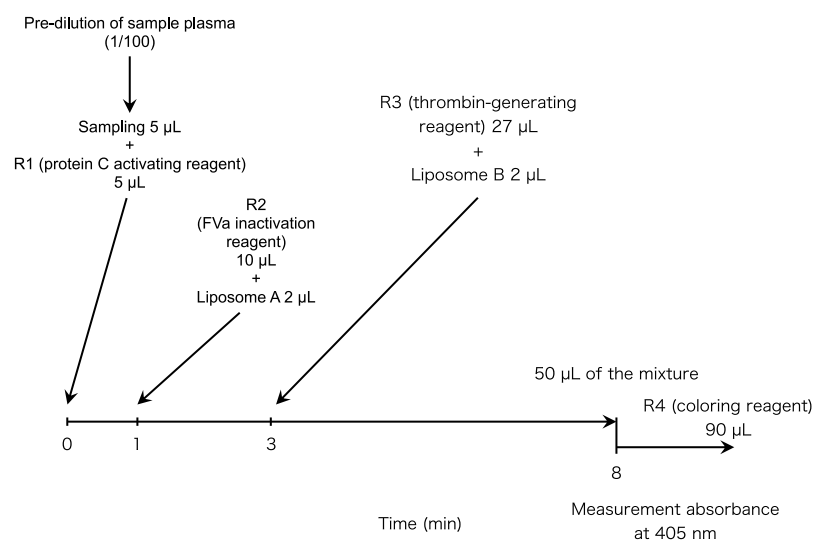


Fig. 23. The protocol for the quantitative measurement of protein C activity.

添加する試薬とその量、反応時間、反応条件について記載している。プロテイン C コントロール血漿 (0.5, 1, 2, 4, 6 µg/mL) についての検体前希釈を 1/100 倍とした。R1 には Protac®, R2 はプロテイン S と FVa, R3 は FXa ならびにプロトロンビンを含有する。R2 は 10 µL 添加することとし、吸光度測定は S-2238 を含む試薬 4 に反応液 50 µL を添加した時点を 0 秒として 2 秒間隔で 100 秒間行う ($n=10$)。

第 2 項 既存法による検証

本邦にて体外診断用医薬品として承認を受けている発色基質法によるプロテイン C 活性測定試薬キットであるテストチーム S PC を用いて、我々が開発した手法との比較検討を行うためのデータを収集した。なお、測定法はテストチーム S PC の添付文書に基づいて行なったが、試薬体積について比率を変更しない範囲で若干の変更を加えた。

<方法>

プロテイン C コントロール血漿 2 µL を①液 (Protac®試薬) 80 µL に加え、37 °Cにて 5 分間インキュベーションしたのち、②液 (S-2366 試薬) を 40 µL 加えてさらに 37 °Cにて 100 秒間インキュベーションした。反応終了後直ちに 122 µL の反応液のうち 120 µL をキューベッ

トに移し、波長 405 nm ならびに 505 nm の吸光度を測定した。吸光度測定はプロテイン C 0 μg/mL のコントロール血漿を対照として用い、得られた結果の 405 nm の値と 505 nm の値の差の平均値をコントロール血漿中プロテイン C 濃度に対してプロットし、検量線を作成した。

第3項 検量線の相関係数の比較

我々の定量的プロテイン C 活性測定法の既存法に対する非劣性または優位性を統計学的に検討するために、相関係数の差の検定 (z 検定) を行なった。検定する仮説は、帰無仮説 H_0 ; 「ふたつの相関係数 (Pearson's product-moment correlation coefficients) に差がない」、対立仮説 H_1 ; 「ふたつの相関係数に差がある」と設定し、有意水準 $\alpha=0.05$ とした。検定を行う上で r_1 と n_1 を我々の方法の相関係数とサンプル数、 r_2 と n_2 をテストチーム S PC での相関係数とサンプル数と定義した。相関係数 r_1, r_2 はフィッシャーの z 変換によって Z_1, Z_2 に標準化したうえで統計検定値 z (z-value) を計算し、Microsoft Excel の NORM.S.DIST 関数 (tanh 関数) を利用して算出された標準正規分布の累積分布関数値を用いて p 値を求めた。優位性の検証を考慮し検定は両側とし、 $2p < \alpha$ であれば H_0 が棄却され、 H_1 が支持されるものとした (Eq. 1-5)。

$$Z_1 = \frac{1}{2} \ln \left(\frac{1+r_1}{1-r_1} \right), \quad Z_2 = \frac{1}{2} \ln \left(\frac{1+r_2}{1-r_2} \right) \quad \text{Eq. 1}$$

$$z = \frac{Z_1 - Z_2}{\sqrt{\frac{1}{n_1-3} + \frac{1}{n_2-3}}} \quad \text{Eq. 2}$$

$$f(z) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \exp \left(-\frac{z^2}{2} \right) \quad \text{Eq. 3}$$

$$\tanh x = \frac{\exp(x) - \exp(-x)}{\exp(x) + \exp(-x)} \quad \text{Eq. 4}$$

$$p = 1 - \tanh f(z) = 1 - \tanh \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \exp \left(-\frac{z^2}{2} \right) \quad \text{Eq. 5}$$

第4項 結果

コントロール血漿 (0.5, 1, 2, 4, 6 µg/mL) を用い、我々の定量的プロテイン C 活性測定法とテストチーム S PC についてのプロテイン C 活性測定を 10 回ずつ行なった。我々の測定法の検量線の各種パラメータは Table 1-5 に示すとおり、Reaction 4 の時間が 20 秒間とした場合に最も高い相関と小さな標準誤差を示した (Fig. 24A)。一方、テストチームによる検量線も同じく作成した (Fig. 24B)。

検量線の相関係数についての差の検定も行われ、統計量は Table 1-6 に示す通りであった。検定では $2p=2$ が示され、ふたつの相関係数に差がないという帰無仮説 H_0 は棄却されなかった。

Table 1-5. Reference parameters for the calibration curve

	Concentration of protein C in human plasma (µg/mL)	Length of reaction time (s)				
		10	20	30	60	100
Mean ($n = 10$)	0.5	0.1362	0.1329	0.1626	0.1496	0.1290
	1	0.1308	0.1284	0.1570	0.1436	0.1183
	2	0.1152	0.1122	0.1420	0.1308	0.1065
	4	0.0750	0.0867	0.1234	0.1124	0.0846
	6	0.0630	0.0609	0.0992	0.0862	0.0588
Slope of the mean calibration curve		-0.0143	-0.0132	-0.0114	-0.0113	-0.0123
Intercept of the calibration curve		0.1426	0.1400	0.1675	0.1549	0.1326
r		-0.9823	-0.9993	-0.9980	-0.9980	-0.9978
R^2		0.9648	0.9987	0.9960	0.9961	0.9955

r , Person's product-moment correlation coefficients; R^2 , coefficient of determination

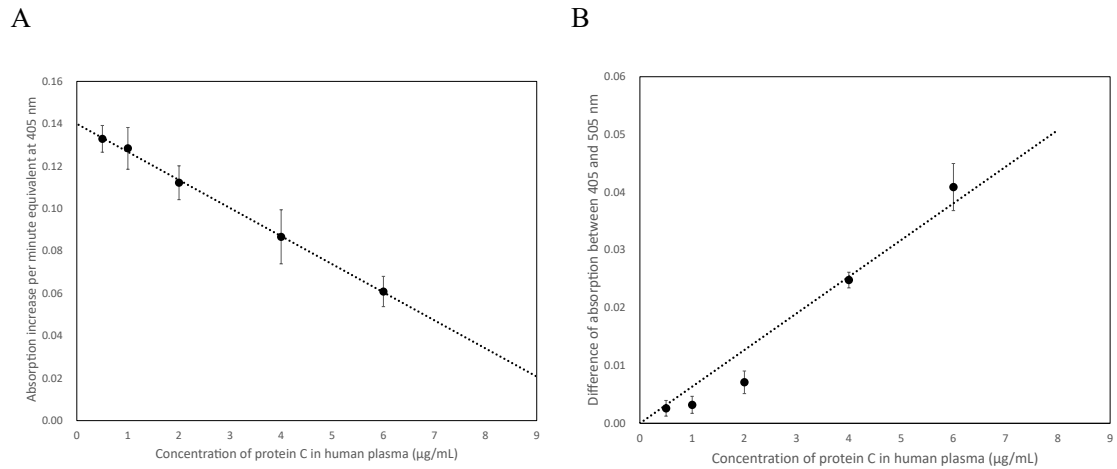


Fig. 24. Examination of protein C activity assay in vitro.

(A) 我々が構築した系において Reaction 4 を 20 秒とした際の吸光度変化量を 1 分間あたりの値に変換し、 $n=10$ の平均値をプロテイン C コントロール血漿 (0.5, 1, 2, 4, 6 $\mu\text{g/mL}$) に対してプロットしている。エラーバーは実際の測定値における標準誤差を示している。検量線は $y = -0.0132x + 0.1400$ 、相関係数 $r = -0.9993$ 、決定係数 $R^2 = 0.9987$ である。なお、横軸切片は 10.6061 $\mu\text{g/mL}$ である。(B) テストチーム S PC によるプロテイン C コントロール血漿 (0.5, 1, 2, 4, 6 $\mu\text{g/mL}$) の活性測定結果を示す。縦軸には波長 405 nm と 505 nm の吸光度の差の平均値 ($n=10$) をプロテイン C 濃度に対してプロットしている。検量線は $y = 0.0063x$ 、相関係数 $r = 0.9899$ 、決定係数 $R^2 = 0.9801$ である。なお、(B) はプロテイン C 0 $\mu\text{g/mL}$ のコントロール血漿を対照として測定したため、近似式が原点を通過するように補正をしている。

Table 1–6. Parameters of difference test among the Person's product-moment correlation coefficients.

	n	Statistic indicates	95% CI		
			Lower limit	Upper limit	
Our new method	10	r_1	-0.9993	-1	-0.9970
		Z_1	-4.0013		N/A
Current method	10	r_2	0.9899	0.9567	0.9977
		Z_2	2.6461		N/A
		z	-12.4362		N/A
		$2p$	2		N/A

r , Person's product-moment correlation coefficient; Z , Fisher's z-transformed r value; z , test statistics

95% CI, 95% confidence interval; N/A, not applicable

第5項 考察

今回我々が構築した測定系において、用手法にも関わらず Reaction 4 の反応・吸光度測定時間を 20 秒とした時に最も良好な結果 ($r = -0.9993$, $R^2 = 0.9987$) を得られた。我々の測定法とテストチーム SPC の測定より得られたコントロール血漿中のプロテイン C 活性を反映するプロテイン C 濃度に対する吸光度増加量における、10 回測定時の平均値の相関係数の差についての統計検定の結果より、ふたつの相関係数 ($r_1 = -0.9993$, $r_2 = 0.9899$) に差がないとする帰無仮説が棄却されず、本測定法の優位性は示されなかった。一方で本測定法は既存の発色基質法に対しその定量性において、少なくとも非劣性であるということが示されたものとする。

現状、プロテイン C 欠乏症のスクリーニングについてはその高い特異性と定量性から発色基質法を第一選択とすることが推奨されている⁴⁰。しかしながら発色基質法は測定系にプロテイン S やリン脂質等の生体内でプロテイン C が血液凝固制御作用を示す際に必須の補因子等を測定系に有さないため、type IIb のプロテイン C 欠乏症が検出できないという問題を抱えていた。我々の測定系は従来の発色基質法とは異なり血液凝固カスケードを模した反応系を有しているため、凝固時間法と同様に type IIb のプロテイン C 欠乏症を検出できる可能性を有している。その上で本測定系は発色基質法キットのプロテイン C 活性の定量性に対して非劣性であったことから、高い定量性をもって検体のプロテイン C 活性を標準血漿中プロテイン C 濃度に変換して定量的に表現する事ができる可能性を併せ持つ事が示唆された。このことは将来的な臨床検査の信頼性や有用性の向上につながるものとする。また、今回の結果から検体中のプロテイン C 活性をコントロール血漿の濃度当量 (protein C activity (PC $\mu\text{g/mL}$ equivalent)) として表現する場合、同じくサンプル中のプロテイン C 抗原量 ($\mu\text{g/mL}$) で活性を除することで無名数である「プロテイン C 比活性」を計算する事ができる。このプロテイン C 比活性は「プロテイン C 1 分子あたりの活性」を意味するため、確

定診断としての遺伝子検査実施前にプロテイン C の欠乏症を網羅的にスクリーニングする有用な方法となる可能性がある。既に本研究室が参画し実用化を達成しているプロテイン S 比活性測定法⁶³と合わせて評価することでプロテイン C 凝固制御系をさらに効率よく評価し、周術期等における血栓症リスク評価や、DVT 等の血栓症の病因の迅速かつ簡便なスクリーニングのための有用な検査法となることが期待される。しかしながらコントロールとして用いる試薬プロテイン C の品質や、測定系に用いる各種試薬のロットや品質により全体の結果が左右されることが想定される。この影響に関しては今後許容できる範囲のものとなるのかを検討する必要があると考える。

また、今回我々は条件検討を重ね、新規測定系を開発するために全ての手技を的手法により行っていた。一方でより測定間誤差を低減し結果の信頼性を向上させるためには、将来的に自動化についての検討が必要となるものとする。

一方、血液凝固カスケードを模した反応系を有するという事は、凝固時間法と同様に DOACs や DITs のような血液凝固カスケードに直接の作用点を持つ薬剤等の影響を受けることが想定される。この点に関しては我々が以前報告した通り、類似の測定系を有する定量的プロテイン S 総活性測定法を用いたプロテイン S 比活性測定系での DOACs の検討について、臨床利用で想定される血中濃度においてはその影響を受けない事が示されている⁶⁷。そのため今後検討は必要であるが、プロテイン S 総活性測定法と同様の結果をもたらすことが期待される。

補遺

我々が開発した手法によるプロテイン C 患者検体の測定結果は Supplemental Data 1 に示すとおりであった。

Supplemental Data 1. Protein C activity measurement of the international standard plasma and patient sample by our new and existing methods

	Unit	Sample type	
		International standard plasma	Patient with protein C deficiency
Our new method	µg/mL equivalent	4.13	2.10
(n = 2)	%	100	50.8
Existing method	%	(100)	51.0
(n = 1)			

【第7節 結論】

我々が新規に構築した、血液凝固制御因子であるプロテイン C の血液凝固カスケードを模した新たな発色基質法による定量的活性測定を用い、実際にプロテイン C 欠乏血漿中に定量的に調製したプロテイン C 活性を定量的に測定することに成功した。そのプロテイン C 濃度と活性を示す測定値の相関は非常に良好であり、既存の測定法に対する定量性についての非劣性が示唆された。これらより、検体中のプロテイン C 活性をコントロール血漿中プロテイン C 濃度当量として高い定量性をもって表現できる可能性が示唆され、同時にプロテイン C と種々の補因子との相互作用が低下することで引き起こされる type IIb プロテイン C 欠乏症を検出できる可能性も示唆された。

本法が実用化されることにより、周術期等における血栓症リスク評価や血栓症の病因のスクリーニングに貢献することが期待される。

【第 8 節 参考文献】

1. Stenflo, J. A new vitamin K-dependent protein. Purification from bovine plasma and preliminary characterization. *J. Biol. Chem.* **251**, 355–363 (1976).
2. Kisiel, W. Human Plasma Protein C. *J. Clin. Investig.* **64**, 761–769 (1979).
3. Mosnier, L. O. & Griffin, J. H. Protein C anticoagulant activity in relation to anti-inflammatory and anti-apoptotic activities. *Front. Biosci.* **11**, 2381 (2006).
4. Doolittle, R. F., Feng, D. F. & Johnson, M. S. Computer-based characterization of epidermal growth factor precursor. *Nature* **307**, 558–560 (1984).
5. Mann, K. G., Nesheim, M. E., Church, W. R., Haley, P. & Krishnaswamy, S. Surface-dependent reactions of the vitamin K-dependent enzyme complexes. *Blood* **76**, 1–16 (1990).
6. Jhingan, A., Zhang, L., Christiansen, W. T. & Castellino, F. J. The Activities of Recombinant γ -Carboxyglutamic-Acid-Deficient Mutants of Activated Human Protein C toward Human Coagulation Factor Va and Factor VIII in Purified Systems and in Plasma. *Biochemistry* **33**, 1869–1875 (1994).
7. Liaw, C. Y. P., Mather, T., Oganessian, N., Ferrell, G. L. & Esmon, C. T. Identification of the Protein C/Activated Protein C Binding Sites on the Endothelial Cell Protein C Receptor
IMPLICATIONS FOR A NOVEL MODE OF LIGAND RECOGNITION BY A MAJOR
HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX CLASS 1-TYPE RECEPTOR*. *J. Biol. Chem.* **276**, 8364–8370 (2001).
8. Regan, L. M., Mollica, J. S., Rezaie, A. R. & Esmon, C. T. The Interaction between the Endothelial Cell Protein C Receptor and Protein C Is Dictated by the γ -Carboxyglutamic Acid Domain of Protein C*. *J. Biol. Chem.* **272**, 26279–26284 (1997).
9. Zhang, L., Jhingan, A. & Castellino, F. J. Role of individual gamma-carboxyglutamic acid residues of activated human protein C in defining its in vitro anticoagulant activity. *Blood* **80**, 942–52 (1992).

10. Gruber, A. & Griffin, J. Direct detection of activated protein C in blood from human subjects. *Blood* **79**, 2340–2348 (1992).
11. Esmon, C. T. The Protein C Pathway. *Chest* **124**, 26S-32S (2003).
12. Exner, T. & Vaasjoki, R. Characterisation and some properties of the protein C activator from Agkistrodon Contortrix Contortrix venom. *Thromb Haemostasis* **59**, 40–4 (1988).
13. Gempeler-Messina, P. M., Volz, K., Bühler, B. & Müller, C. Protein C Activators from Snake Venoms and Their Diagnostic Use. *Pathophysiol Haemo T* **31**, 266–272 (2002).
14. Mather, T. *et al.* The 2.8 Å crystal structure of Gla-domainless activated protein C. *EMBO J.* **15**, 6822–6831 (1996).
15. Nesheim, M. E., Taswell, J. B. & Mann, K. G. The contribution of bovine Factor V and Factor Va to the activity of prothrombinase. *J Biological Chem* **254**, 10952–62 (1979).
16. Shen, L. & Dahlbäck, B. Factor V and protein S as synergistic cofactors to activated protein C in degradation of factor VIIIa. *J. Biol. Chem.* **269**, 18735–8 (1994).
17. Bajzar, L., Morser, J. & Nesheim, M. TAFI, or Plasma Procarboxypeptidase B, Couples the Coagulation and Fibrinolytic Cascades through the Thrombin-Thrombomodulin Complex*. *J. Biol. Chem.* **271**, 16603–16608 (1996).
18. Dahlbäck, B. Protein S and C4b-binding protein: components involved in the regulation of the protein C anticoagulant system. *Thromb Haemostasis* **66**, 49–61 (1991).
19. Castellino, F. J. Human protein C and activated protein C Components of the human anticoagulation system. *Trends Cardiovasc. Med.* **5**, 55–62 (1995).
20. Joyce, D. E., Gelbert, L., Ciaccia, A., DeHoff, B. & Grinnell, B. W. Gene Expression Profile of Antithrombotic Protein C Defines New Mechanisms Modulating Inflammation and Apoptosis*. *J. Biol. Chem.* **276**, 11199–11203 (2001).
21. Cheng, T. *et al.* Activated protein C blocks p53-mediated apoptosis in ischemic human brain endothelium and is neuroprotective. *Nat. Med.* **9**, 338–342 (2003).

22. Dömötör, E. *et al.* Activated protein C alters cytosolic calcium flux in human brain endothelium via binding to endothelial protein C receptor and activation of protease activated receptor-1. *Blood* **101**, 4797–4801 (2003).
23. MOSNIER, L. O. & GRIFFIN, J. H. Inhibition of staurosporine-induced apoptosis of endothelial cells by activated protein C requires protease-activated receptor-1 and endothelial cell protein C receptor. *Biochem. J.* **373**, 65–70 (2003).
24. Riewald, M., Petrovan, R. J., Donner, A., Mueller, B. M. & Ruf, W. Activation of Endothelial Cell Protease Activated Receptor 1 by the Protein C Pathway. *Science* **296**, 1880–1882 (2002).
25. Vu, T.-K. H., Hung, D. T., Wheaton, V. I. & Coughlin, S. R. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell* **64**, 1057–1068 (1991).
26. GRIFFIN, J. H., FERNÁNDEZ, J. A., GALE, A. J. & MOSNIER, L. O. Activated protein C. *J Thromb Haemost* **5**, 73–80 (2007).
27. Griffin, J. H., Evatt, B., Zimmerman, T. S., Kleiss, A. J. & Wideman, C. Deficiency of protein C in congenital thrombotic disease. *J. Clin. Investig.* **68**, 1370–1373 (1981).
28. Kottke-Marchant, K. & Comp, P. Laboratory issues in diagnosing abnormalities of protein C, thrombomodulin, and endothelial cell protein C receptor. *Arch Pathol Lab Med* **126**, 1337–48 (2002).
29. GOLDENBERG, N. A. & MANCO-JOHNSON, M. J. Protein C deficiency. *Haemophilia* **14**, 1214–1221 (2008).
30. Dahlbäck, B. The protein C anticoagulant system: Inherited defects as basis for venous thrombosis. *Thromb. Res.* **77**, 1–43 (1995).
31. Dinarvand, P. & Moser, K. A. . Protein C Deficiency. *Arch Pathol Lab Med* **143**, 1281–1285 (2019).
32. Baliga, V. *et al.* Homozygous protein C deficiency—management with protein C concentrate. *Eur J Pediatr* **154**, 534–538 (1995).
33. Estellés, A. *et al.* Severe inherited ‘homozygous’ protein C deficiency in a newborn infant. *Thromb. Haemost.* **52**, 53–6 (1984).

34. Sills, R. H., Marlar, R. A., Montgomery, R. R., Deshpande, G. N. & Humbert, J. R. Severe homozygous protein C deficiency. *J. Pediatr.* **105**, 409–413 (1984).
35. Branson, Herman E., Marble, R., Katz, J. & Griffin, John H. INHERITED PROTEIN C DEFICIENCY AND COUMARIN-RESPONSIVE CHRONIC RELAPSING PURPURA FULMINANS IN A NEWBORN INFANT. *Lancet* **322**, 1165–1168 (1983).
36. Kinoshita, S. *et al.* Protein S and protein C gene mutations in Japanese deep vein thrombosis patients. *Clin Biochem* **38**, 908–915 (2005).
37. Brouwer, J.-L. P. *et al.* High long-term absolute risk of recurrent venous thromboembolism in patients with hereditary deficiencies of protein S, protein C or antithrombin. *Thromb Haemostasis* **101**, 93–9 (2009).
38. Khor, B. & Cott, E. M. V. Laboratory tests for protein C deficiency. *Am J Hematol* **85**, 440–442 (2010).
39. Bertina, R. M. Protein C deficiency and venous thrombosis--the search for the second genetic defect. *Thromb Haemostasis* **83**, 360–1 (2000).
40. Cooper, P. C., Pavlova, A., Moore, G. W., Hickey, K. P. & Marlar, R. A. Recommendations for clinical laboratory testing for protein C deficiency, for the subcommittee on plasma coagulation inhibitors of the ISTH. *J Thromb Haemost* **18**, 271–277 (2020).
41. Foster, D. C., Yoshitake, S. & Davie, E. W. The nucleotide sequence of the gene for human protein C. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **82**, 4673–4677 (1985).
42. Patracchini, P., Aiello, V., Palazzi, P., Calzolari, E. & Bernardi, F. Sublocalization of the human protein C gene on chromosome 2q13–q14. *Hum. Genet.* **81**, 191–192 (1989).
43. D’Ursi, P. *et al.* ProCMD: a database and 3D web resource for protein C mutants. *BMC Bioinform.* **8**, S11 (2007).
44. Saunders, R. E. & Perkins, S. J. CoagMDB: a database analysis of missense mutations within four conserved domains in five vitamin K–dependent coagulation serine proteases using a text-mining tool. *Hum. Mutat.* **29**, 333–344 (2008).

45. Yamamoto, K. *et al.* Impaired secretion of the elongated mutant of protein C (protein C-Nagoya). Molecular and cellular basis for hereditary protein C deficiency. *J. Clin. Investig.* **90**, 2439–2446 (1992).
46. Katsumi, A. *et al.* Protein C Nagoya, an elongated mutant of protein C, is retained within the endoplasmic reticulum and is associated with GRP78 and GRP94. *Blood* **87**, 4164–4175 (1996).
47. Nakayama, T. *et al.* A case of purpura fulminans is caused by homozygous $\Delta 8857$ mutation (protein C-Nagoya) and successfully treated with activated protein C concentrate. *Br. J. Haematol.* **110**, 727–730 (2000).
48. Iijima, K. *et al.* A new hereditary abnormal protein C (protein C Yonago) with a dysfunctional Gla-domain. *Thromb. Res.* **63**, 249–257 (1991).
49. Mimuro, J. *et al.* An abnormal protein C (protein C Yonago) with an amino acid substitution of Gly for Arg-15 caused by a single base mutation of C to G in codon 57 (CGG-->GGG). Deteriorated calcium-dependent conformation of the gamma-carboxyglutamic acid domain relevant to a thrombotic tendency. *Int. J. Hematol.* **57**, 9–14 (1993).
50. Pietrzyk, W. S. Air travel-related symptomatic deep venous thrombosis in cruise ship passengers. *Int Marit Heal* **67**, 66–71 (2016).
51. Ueda, S., Hanzawa, K., Shibata, M. & Suzuki, S. High Prevalence of Deep Vein Thrombosis in Tsunami-Flooded Shelters Established after the Great East-Japan Earthquake. *Tohoku J Exp Medicine* **227**, 199–202 (2012).
52. Ueda, S., Hanzawa, K. & Shibata, M. One-Year Overview of Deep Vein Thrombosis Prevalence in the Ishinomaki Area Since the Great East Japan Earthquake. *Ann. Vasc. Dis.* **7**, 365–368 (2014).
53. Yan, S. B. & Dhainaut, J.-F. Activated protein C versus protein C in severe sepsis. *Crit Care Med* **29**, S69–S74 (2001).
54. Ikezoe, T. Thrombomodulin/activated protein C system in septic disseminated intravascular coagulation. *J Intensive Care* **3**, 1 (2015).
55. Ito, T., Thachil, J., Asakura, H., Levy, J. H. & Iba, T. Thrombomodulin in disseminated intravascular coagulation and other critical conditions—a multi-faceted anticoagulant protein with therapeutic potential. *Crit Care* **23**, 280 (2019).

56. Marlar, R. A. & Gausman, J. N. Laboratory testing issues for protein C, protein S, and antithrombin. *Int. J. Lab. Hematol.* **36**, 289–295 (2014).
57. Roshan, T. M., Stein, N. & Jiang, X. Y. Comparison of clot-based and chromogenic assay for the determination of protein c activity. *Blood Coagul Fibrin* **30**, 156–160 (2019).
58. Mackie, I. *et al.* Guidelines on the laboratory aspects of assays used in haemostasis and thrombosis. *Int J Lab Hematol* **35**, 1–13 (2013).
59. Raut, S. & Hubbard, A. R. International reference standards in coagulation. *Biologicals* **38**, 423–429 (2010).
60. Knight, S. G. Report of the Commission on Enzymes of the International Union of Biochemistry. *AIBS Bulletin* **12**, 39 (1962).
61. Conard, J. *et al.* Normalization of markers of coagulation activation with a purified protein C concentrate in adults with homozygous protein C deficiency. *Blood* **82**, 1159–64 (1993).
62. Miletich, J., Sherman, L. & Broze, G. Absence of Thrombosis in Subjects with Heterozygous Protein C Deficiency. *N. Engl. J. Med.* **317**, 991–996 (1987).
63. Tsuda, T. *et al.* New quantitative total protein S-assay system for diagnosing protein S type II deficiency. *Blood Coagulation & Fibrinolysis* **23**, 56–63 (2012).
64. Šturm, L. & Ulrih, N. P. Basic Methods for Preparation of Liposomes and Studying Their Interactions with Different Compounds, with the Emphasis on Polyphenols. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 6547 (2021).
65. Gierula, M. *et al.* The roles of factor Va and protein S in formation of the activated protein C/protein S/factor Va inactivation complex. *J Thromb Haemost* **17**, 2056–2068 (2019).
66. Tsuda, T., Yoshimura, H. & Hamasaki, N. Effect of phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine and lysophosphatidylcholine on the protein C/protein S anticoagulation system. *Blood Coagul Fibrin* **17**, 453–458 (2006).
67. Kuma, H. *et al.* Protein S-specific activity assay system is not affected by direct oral anticoagulants. *Thromb Res* **168**, 60–62 (2018).

【謝辞】

本研究を遂行するにあたり、担当される初の博士課程学生として、研究の着想段階から論文執筆、投稿に至るまで、厳しくも暖かく親身にご指導を賜りました長崎国際大学薬学部臨床検査学研究室 隈 博幸 教授、些細な疑問や会話の中から様々な知見を授けていただきました同研究室 波多江 日成子 助教に心より御礼申し上げます。

学位論文審査に際して主査として数多くのご指導を賜りました長崎国際大学薬学部分析化学研究室 大庭 義史 教授、副査として数々のご指摘、ご助言を賜りました同学部医療薬学研究室 大磯 茂 教授、同学部分子病態学研究室 太田 一寿 准教授に深く感謝を申し上げます。また、本研究の将来性について温かい励ましのお言葉を賜りました長崎国際大学大学院薬学研究科長 佐々木 茂貴 教授、学位論文審査を受ける上で数多くのご助力を賜りました同医療薬学専攻長 市川 和洋 教授、ならびに本研究に携わっていただきました全ての教職員に深謝申し上げます。本研究を遂行するにあたり、原著論文の共著者として多大なる貢献をいただいた染矢 留里 氏、小林 睦実 氏、中尾 英里 氏、濱崎 桃香 氏、重田 美鈴 氏に深く御礼申し上げますとともに、補遺の実験に貢献いただきました朝日 文渚 氏、羽田野 真菜 氏に深く感謝申し上げます。

加えて、大学院生として研究にあたりながらの勤務にご理解をいただき、多大なるご配慮とご助力を賜りました地方独立行政法人 北松中央病院 理事長兼院長 東山 康仁 博士ならびに名誉院長 福井 純 博士、副院長 高森 謙一 博士をはじめとした同院職員の皆様、同院でのご縁により折に触れ励ましのお言葉を賜りました長崎大学 河野 茂 名誉教授に深く感謝申し上げます。

最後に、大学卒業まで大切に育て上げていただき、さらに遠方での大学院進学の手手を許してくださいました両親、心の支えとなってくれた愛犬の海、愛鳥のいちご、だいふく、

きみ、ももには御礼の申し上げようもない程お世話になりました。末筆ながら今までの私の人生に関わってくださった全ての方に、改めまして衷心より御礼を申し上げます。

2024年 3月