

昭和62・63年度科学研究費補助金一般研究(C)

肝細胞癌における異常プロトロンビン
PIVKA-IIの産生に関する臨床的, 実験的研究

研究成果報告書

(研究課題番号 62570337)



1989年2月

研究代表者 奥田博明

(東京女子医科大学・消化器内科・助手)

昭和 62・63 年度科学研究費補助金一般研究(C)
研究成果報告書

(1) 「研究課題名」

肝細胞癌における異常プロトロンビン PIVKA-Ⅱ の産生に関する臨床的、実験的研究

「課題番号」

6 2 5 7 0 3 3 7

(2) 「標 題」

昭和 63 年度
一般研究(C)

(3) 「研究代表者」

奥田博明 (東京女子医科大学・消化器内科・助手)

(4) 「研究分担者」

なし

(5) 「研究経費」

昭和 62 年度	1,200 千円
昭和 63 年度	900 千円
計	2,100 千円

(6) 「研究発表」

ア. 学会誌等

1) 奥田博明, 中西敏己, 古川隆二, 橋本悦子, 小幡 裕: 肝細胞癌における異常プロトロンビン PIVKA-Ⅱ の産生に関する臨床的および実験的研究。肝臓: 1697-1702, 1986.(12月)

2) H. Okuda, H. Obata, T. Nakanishi, R. Furukawa and E. Hashimoto: Production of abnormal prothrombin (des- γ -carboxy prothrombin) by hepatocellular carcinoma-A clinical and experimental study. J Hepatol 4: 357-363, 1987. (5-6月, 別添)

3) 奥田博明, 中西敏己, 古川隆二, 橋本悦子, 古川みどり, 小幡 裕: 肝細胞癌と異常プロトロンビン PIVKA-Ⅱ。肝胆膵: 759-766, 1987. (5月)

4) H. Okuda, T. Nakanishi, R. Furukawa, M. Furukawa and H. Obata: Production of des- γ -carboxy prothrombin by human hepatoma cells in culture. Hepatology 7: 1128, 1987. (9-10月)

5) 富松昌彦, 吉田錦吾, 中西敏己, 古川隆二, 古川みどり, 奥田博明, 小幡 裕, 肝癌組織におけるプロトロンビン関連抗原の産生について。肝臓28: 1667, 1987.(12月)

6) 奥田博明, 中西敏己, 古川隆二, 古川みどり, 小幡 裕: 肝癌細胞における異常プロトロンビン PIVKA-II の産生に関する検討。肝臓29: 47-51, 1988. (1月)

7) H. Okuda, T. Nakanishi, M. Furukawa and H. Obata: Clinical significance of abnormal prothrombin in the follow-up of patients with hepatocellular carcinoma. J Gastroenterol Hepatol 3: 676, 1988. (11-12月)

8) 古川みどり, 中西敏己, 奥田博明, 小幡 裕: 肝細胞癌における PIVKA-II の vitamin K 感受性に関する検討。日消誌85: 2583-2589, 1988. (12月)

9) M. Furukawa, T. Nakanishi, H. Okuda and H. Obata: Studies of vitamin K sensitivity of des- γ -carboxy prothrombin in patients with hepatocellular carcinoma. (発表予定)

イ. 口頭発表

1) 奥田博明, 橋本悦子, 中島弥生, 長谷川潔, 邱 世賢, 山内克己, 久満董樹, 中西敏己, 古川隆二, 小幡 裕: 肝細胞癌における血漿 PIVKA-II 測定の臨床的意義。第72回日本消化器病学会総会。1986年3月29日。

2) 奥田博明, 橋本悦子, 中西敏己, 古川隆二, 吉田錦吾, 山内克己, 中島弥生, 長谷川潔, 邱 世賢, 久満董樹, 小幡 裕: ヒト肝癌培養細胞における PIVKA-II 産生に関する検討。第22回日本肝臓学会総会。1986年6月13日。

3) 奥田博明, 中西敏己, 小幡 裕: 肝細胞癌における異常プロトロンビン (PIVKA-II) 産生の臨床的意義と基礎的知見。厚生省がん研究助成金“肝細胞がんの特性の解明と診断治療体系の確立に関する研究”班々会議。1986年7月29日。

4) H. Okuda, T. Nakanishi, E. Hashimoto and H. Obata: Clinical significance of plasma abnormal prothrombin (PIVKA-II) in patients with hepatocellular carcinoma. 8th World Congress of Gastroenterology. 1986年9月12日。

5) H. Okuda, T. Nakanishi, R. Furukawa E. Hashimoto and H. Obata: Production of abnormal prothrombin (PIVKA-II) by human hepatoma cells in culture. International Association for the Study of the Liver. 1986年9月17日。

6) 奥田博明, 小幡 裕: 肝細胞癌における異常プロトロンビン (PIVKA-II) 産生の臨床的意義と基礎的知見。第28回日本消化器病学会大会シンポジウム。1986年10月1日。

7) 中西敏己, 古川隆二, 吉田錦吾, 奥田博明, 小幡 裕: ヒト肝細胞癌における PIVKA-II 産生機序。第33回日本臨床病理学会総会。1986年10月4日。

8) 奥田博明, 中西敏己, 橋本悦子, 小幡 裕: 肝細胞癌における異常プロトロンビン (PIVKA-II) 産生の臨床的意義と基礎的知見。第45回日本癌学会総会。1986年10月22日。

9) 中西敏己, 古川隆二, 奥田博明, 小幡 裕: 肝癌細胞におけるプロトロンビン異常代謝に関する検討。第21回日本肝臓学会東部会。1986年11月28日。

10) 奥田博明, 中西敏己, 小幡 裕: 肝細胞癌における異常プロトロンビン PIVKA-II の産生

に関する検討。厚生省がん研究助成金“肝細胞がんの特性の解明と診断治療体系の確立に関する研究”班々会議。1986年12月16日。

11) 奥田博明, 中西敏己, 古川隆二, 小幡 裕: 諸種肝癌細胞及びその他の細胞における異常プロトロンビンPIVKA-IIの産生に関する検討。第73回日本消化器病学会総会。1987年4月8日。

12) 奥田博明, 中西敏己, 古川隆二, 古川みどり, 小幡 裕: 肝癌細胞における異常プロトロンビンPIVKA-IIの産生に関する検討。第46回日本癌学会総会。1987年9月8日。

13) 中西敏己, 古川隆二, 奥田博明, 古川みどり, 小幡 裕: 肝細胞癌における血中PIVKA-IIとその出現機序。第34回日本臨床病理学会総会。1987年10月2日。

14) 吉田錦吾, 中西敏己, 古川隆二, 富松昌彦, 古川みどり, 奥田博明, 小幡 裕: 肝癌組織内のプロトロンビン関連抗原の検討。第34回日本臨床病理学会総会。1987年10月4日。

15) 富松昌彦, 吉田錦吾, 奥田博明, 中西敏己, 古川みどり, 小幡 裕: 肝癌組織におけるプロトロンビン関連抗原の産生について。厚生省がん研究助成金“肝細胞がんの特性の解明と診断治療体系の確立に関する研究”班々会議。1987年10月13日。

16) 富松昌彦, 吉田錦吾, 中西敏己, 古川隆二, 古川みどり, 奥田博明, 小幡 裕: 肝癌組織におけるプロトロンビン関連抗原の産生について。第22回日本肝臓学会東部会。1987年10月23日。

17) H. Okuda, T. Nakanishi, R. Furukawa, M. Furukawa and H. Obata: Production of des- γ -carboxy prothrombin by human hepatoma cells in culture. 38th American Association for the Study of Liver Diseases. 1987年10月28日。

18) 古川みどり, 奥田博明, 中西敏己, 小幡 裕: 肝細胞癌における血漿PIVKA-IIの臨床的意義 — 主として経過観察例について —。第29回日本消化器病学会大会。1987年11月6日。

19) H. Okuda, T. Nakanishi, M. Furukawa and H. Obata: Clinical significance of abnormal prothrombin in the follow-up of patients with hepatocellular carcinoma. 6th Biennial Asian Pacific Association for the Study of the Liver. 1988年2月15日。

20) 古川みどり, 中西敏己, 奥田博明, 小幡 裕: 肝細胞癌におけるPIVKA-II産生機序に関する検討。第74回日本消化器病学会総会。1988年3月26日。

21) 古川隆二, 中西敏己, 奥田博明, 古川みどり, 小幡 裕: 肝細胞癌におけるPIVKA-IIの産生機序。第35回日本臨床病理学会総会。1988年10月21日。

22) 中西敏己, 吉田錦吾, 古川隆二, 奥田博明, 古川みどり, 小幡 裕: 肝細胞癌産生PIVKA-IIのVitamin K感受性。第35回日本臨床病理学会総会。1988年10月21日。

ウ. 出版物

1) 奥田博明: 肝細胞癌と異常プロトロンビンPIVKA-II。図説臨床 [癌] シリーズNo.25腫瘍マーカー。pp. 75-80。メジカルビュー社。1988年8月。

2) 小幡 裕, 奥田博明: PIVKA-II。医科学大事典, Supp 1. 6へ診断・検査法の進歩1989。

(7) 「研究成果」

I はじめに

肝細胞癌(HCC)の腫瘍マーカーには種々のものが知られており、肝癌細胞が産生する胎児性蛋白 α -fetoprotein (AFP)が有用とされているが、特異性の面でまだ問題があるため、さらに実用的でかつ特異性の高いHCCの腫瘍マーカーの導入が望まれていた。

血液凝固第II因子であるプロトロンビンは肝でvit. K依存性凝固因子とも呼ばれている。肝細胞におけるプロトロンビンの生成はプロトロンビン前駆体のグルタミン酸残基(Glu)の γ 位の炭素がカルボキシル化を受けてGla(γ -carboxyglutamic acid residue)に転換されてプロトロンビンとなる。このカルボキシル化反応にはvit. Kが必要であり、プロトロンビンはそのN末端に10個のGla残基を保有し、それらのGla残基を介して Ca^{2+} との強い結合能を有するに至り、凝固蛋白としての機能を発揮する。従ってvit. K欠乏状態などではGlaに転換され難く、Glaを欠くかGlaの含量が少ない状態で血中に出てくる。このような異常プロトロンビン(abnormal prothrombin)はprotein induced by vitamin K absence or antagonist-II (PIVKA-II)¹⁾またはdes- γ -carboxy prothrombinと呼ばれている(Fig.1)。このPIVKA-IIはN末端の10個のGlaのすべて、または一部がGluのままであるという以外は正常プロトロンビンと変わらないが、 Ca^{2+} と結合しないために凝固活性を有さない。

1984年にLiebmanらはポリクローナル抗体によるcompetition RIA法²⁾によりHCC 76例における血清中異常プロトロンビンdes- γ -carboxy prothrombinまたはPIVKA-IIを測定し、69例(91%)に検出され、さらに51例(67%)で300 ng/ml以上の有意の高値を示した事よりPIVKA-IIがHCCの新しい腫瘍マーカーとなり得ると述べ、またPIVKA-IIが腫瘍切除や化学療法により減少する事から、HCC細胞から産生されていると推測した。³⁾その後、本原らはプロトロンビンとは反応せずPIVKA-IIの一部に対して特異的に反応するモノクローナル抗体を作成し、ELISA法を確立した。⁴⁾

今回、我々は本原の方法に準じたEIA法⁵⁾を用いてHCCを含む諸種肝疾患及びその他の腫瘍性疾患例について血漿PIVKA-IIを測定し、またヒト肝癌培養細胞を用いてPIVKA-IIの産生に関する実験的研究を行なった。⁶⁻¹⁰⁾

Production of Normal Prothrombin or PIVKA-II

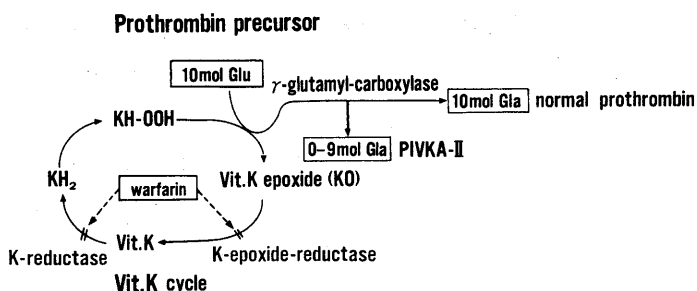


Fig. 1 正常プロトロンビンまたはPIVKA-IIの産生

II 各種疾患患者における血漿 PIVKA-II 測定とその臨床的検討

対象は諸種肝疾患すなわち急性肝炎17（劇症肝炎4例を含む）、慢性肝炎30（慢性持続性肝炎8、慢性活動性肝炎22）、肝硬変67、HCC 138例及び消化器系の他臓器癌45例（胃癌15、膵癌11、胆嚢癌8、大腸癌6、胆管細胞癌4、胃肉腫1）で、このうち肝転移例は20例（膵癌5、胃癌、胆嚢癌各4、大腸癌、胆管細胞癌各3、胃肉腫1）である。なお健常者50例及び正常妊婦13例（20～28週7、29～36週6）についても測定した。

早朝空腹時に採取した血液4.5 mlに3.8%クエン酸ナトリウム0.5 mlを加えて混和し、1時間以内に3000 rpm10分の遠心分離を行い、得られた血漿を本原らの原法⁴⁾に準じたEIA法⁵⁾によりPIVKA-II濃度を測定した。PIVKA-II値の単位としてはarbitrary unit (AU)を使用した⁴⁾が、この測定系における1AUは実質的には約10 ngのプロトロンビン量に相当する⁴⁾、⁵⁾なお同一検体にて血清AFP値をEIA法にて測定した。

血漿PIVKA-II値の測定結果をFig. 2に示す。健常者50名のPIVKA-II値の平均値と最高値は、それぞれ0.06及び0.08 AU/mlであり、全員が0.1 AU/ml未満であったために0.1 AU/ml未満を正常とした⁶⁾、⁸⁾正常妊婦例もすべてPIVKA-II値は正常であった。HCC以外の肝疾患例において0.1 AU/ml以上の値を示したのは慢性肝炎の3例のみでいずれも上昇度は低く0.2 AU/ml以下であり、肝硬変67例は全例正常域であった。

HCCは138例中81例（58.7%）が高値を示し、そのうち58例（42.0%）は0.4 AU/ml以上の高値を示した。腫瘍占拠部位が肝の20%以上を占めた進行例では70例中64例（91.4%）が高値を示したが、そのうち50%以上を占めた高度進行例では18例中全例が、20～50%を占めた中等度進行例では52例中46例（88.4%）が高値を示した。これに反し、腫瘍占拠部位が肝の20%以下の例では68例中17例（25.0%）で上昇を示したにすぎず、HCC例では腫瘍の大きさとPIVKA-II値との間に相関傾向が認められた。一方、消化器系の他臓器癌における上昇は45例中7例（15.6%）であるが、いずれも0.3 AU/ml以下の軽度上昇例であった。なお肝転移を伴った例では20例中3例（15.0%）、肝転移を伴わない例では25例中4例（16.0%）にPIVKA-IIが高値であり、両者間に差は認められなかった。

同時に測定した血清AFP値ではHCC 138例中92例（66.7%）が20 ng/ml以上であり、45例（32.6%）が300 ng/ml以上であった。しかしながら肝硬変では67例中20例（29.9%）、慢性肝炎では30例中11例（36.7%）また急性肝炎では17例中6例（35.3%）においてAFPが20 ng/ml以上であり、PIVKA-IIはAFPに比べHCCに対する特異性がより高い結果が得られた。なお妊婦13例では全部軽度～中等度のAFPの上昇がみられ、PIVKA-IIとの解離が認められた。

PLASMA PIVKA-II LEVELS IN NORMAL SUBJECTS,
PREGNANT WOMEN AND IN PATIENTS WITH VARIOUS
DISEASES

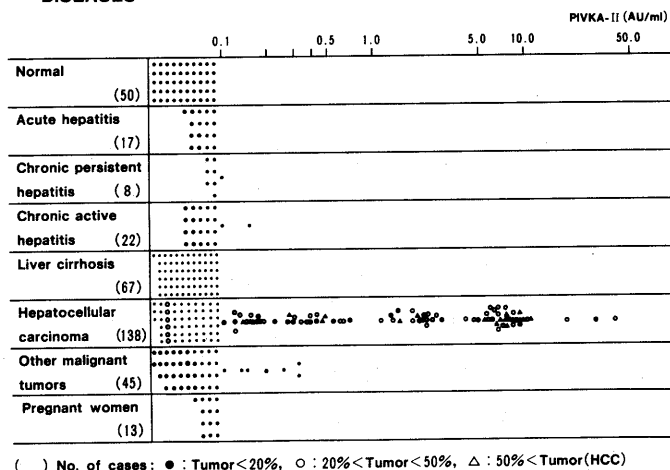


Fig. 2 健常者, 妊婦および諸種疾患における血漿PIVKA-II値の分布

RELATIONSHIP BETWEEN PIVKA-II AND AFP LEVELS
IN PATIENTS WITH HEPATOCELLULAR CARCINOMA

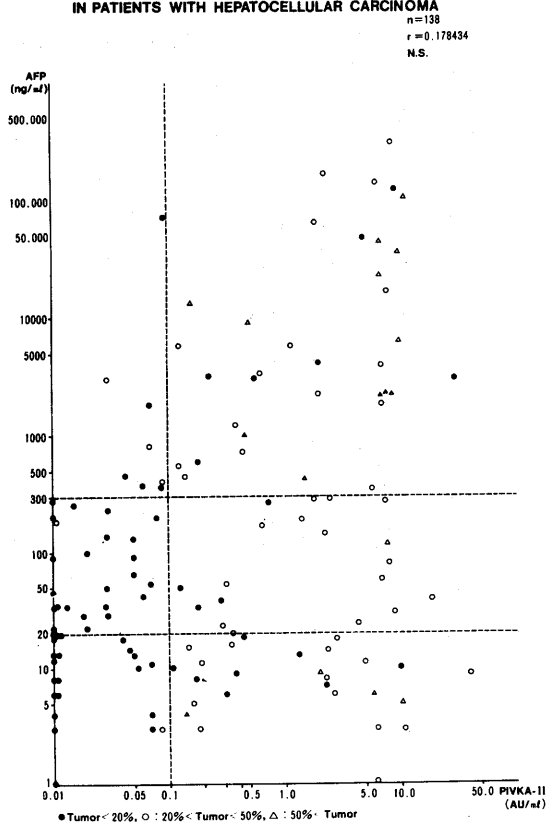


Fig. 3 肝細胞癌におけるPIVKA-II値とAFP値との関係 (n = 138)

HCC例におけるPIVKA-IIとAFPとの相関をみるとFig. 3に示すように明らかな相関は認められなかった。AFPが300 ng/ml以下の93例中46例(49.5%)でPIVKA-IIは陽性であり、そのうち29例(31.2%)は0.4 AU/ml以上の高値を示した。なおAFP非産生例(20 ng/ml以下)の51例中28例(54.9%)でPIVKA-IIは陽性であり、うち16例(31.4%)が0.4 AU/ml以上を示した。

以上よりAFP低値のHCC例の多くでPIVKA-IIが高値を示すため、AFPとPIVKA-IIの両者を組み合わせる事により、HCCの診断に有用であると思われる。

III ヒト肝癌培養細胞におけるPIVKA-IIの産生に関する検討

前記の臨床的事実を裏付けHCCにおけるPIVKA-IIの上昇機序を解明するために諸種ヒト肝癌細胞株及びその他の細胞株を用い、肝癌細胞におけるPIVKA-IIの産生に関する検討を行った。

1. ヒト肝癌培養細胞株 huH-2

実験に使用したヒト肝細胞癌由来の細胞株は許らによって確立されたhuH-2株である。¹¹⁾このhuH-2に10% fetal calf serum (FCS), DM 160液(極東製薬)を加え、24well culture plate (Corning)にて5% CO₂, 37℃の条件下で培養を行い、培養上清中のPIVKA-II及びAFPの測定を行った。諸種の細胞数3×10⁴, 1×10⁵, 3×10⁵, 1×10⁶個を各々1 mlの培養液にて培養し、5日目の培養上清を分離してPIVKA-II濃度を測定したところ、Fig. 4に示すようにPIVKA-II濃度は各細胞数に比例して増加し、各段階でのPIVKA-II濃度は0, 5.0, 8.2, 10.5 AU/mlと上昇を示した。

huH-2 1×10⁶ cells/mlの細胞濃度を用いて培養8日目までのPIVKA-II濃度の経日的

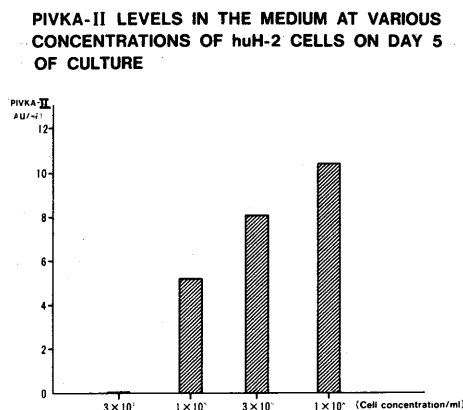


Fig. 4 ヒト肝癌培養細胞 huH-2 の諸種細胞濃度における培養上清中の P I V K A - II 値

推移を観察したところ Fig. 5 に示すように経日的に P I V K A - II 濃度は上昇し、5 日目には 10.5 AU/ml に達し、8 日目には 12 AU/ml の最高濃度を示した。huH-2 1×10^6 cells/ml に vit. K (Eisai) 9 ng 及び 0.9 ng を培養前に添加し、培養 5 日目の P I V K A - II 及び A F P 濃度を vit. K 非添加のそれと比較したところ Fig. 6 に示すように vit. K 非添加時には P I V K A - II は 7 AU/ml の濃度を示したが、添加時には P I V K A - II は検出されなかった。なお同一上清中における A F P 濃度は 120 ng/ml で差はみられなかった。

一方 H C C 例では Liebman らは vit. K (20 mg 2 日間非経口投与で 7 日後に再測定) 投与前後において血中 P I V K A - II 値に差を認めなかったが、³⁾ 自験例においては vit. K (K_2 50 mg 5 日間 i. v. または K_1 60 mg 14 日間経口) 投与後に Table 1. のように P I V K A - II 値の低下が認められた。

TIME COURSE OF PIVKA-II LEVELS IN THE MEDIUM OF huH-2 CELL CULTURE (1×10^6 /ml)

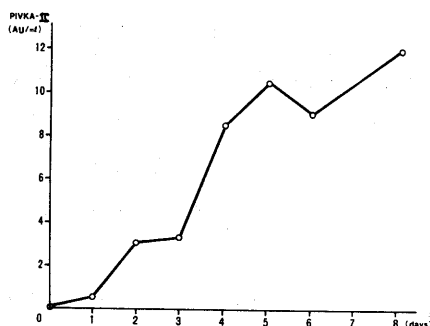


Fig.5 huH-2 (1×10^6 cells/ml) の培養上清における PIVKA-II 値の培養 8 日目までの経日的変化

EFFECTS OF ADMINISTRATION OF VITAMIN K ON PIVKA-II AND AFP LEVELS IN THE MEDIUM MEASURED ON DAY 5 OF CULTURE OF huH-2 CELLS

VITAMIN K ADMINISTRATION	PIVKA-II (AU/ml)								AFP (ng/ml)					
	1	2	3	4	5	6	7	8	20	40	60	80	100	120
(-)	(7.0)								(120)					
(+)9ng	(0)								(120)					
(+)0.9ng	(0)								(120)					

Fig.6 huH-2 (1×10^6 cells/ml) の培養 5 日目における培養上清中の P I V K A - II 値および A F P 値に対するビタミン K 投与の影響

Table 1. 肝細胞癌患者におけるビタミンK投与者および非投与者における血漿PIVKA-II値の変化

Changes in plasma PIVKA-II levels in patients with
hepatocellular carcinoma with and without vitamin K
administration

Vitamin K administ- ration	No.	PIVKA-II (AU/ml)	
		Before	After
+	1	8.0	0.95 (K ₂ 50 mg i.v. for 5 days)
+	2	5.8	0.30 (K ₂ 50 mg i.v. for 5 days)
+	3	0.33	0.05 (K ₂ 50 mg i.v. for 5 days)
+	4	6.2	0.44 (K ₁ 60 mg p.o. for 14 days)
+	5	0.19	0.01 (K ₁ 60 mg p.o. for 14 days)

-	6	27.0	27.0 (after 14 days)
-	7	0.34	0.35 (after 14 days)
-	8	0.15	0.19 (after 14 days)
-	9	0.13	0.15 (after 14 days)
-	10	1.95	1.85 (after 14 days)

2. 諸種肝癌細胞株及びその他の細胞株

実験に使用した細胞株は次の10種類である：(1)肝細胞癌由来細胞株：huH-1, huH-2,¹¹⁾ PLC/PRF/5 (Alexander),¹²⁾ HepG2, Hep3B,¹³⁾ SK-HEP-1, (2)胃癌由来細胞株AZ-521, MKN-7, (3)膀胱癌由来細胞株MIA PaCa-2 (2), (3)の細胞株はJCRB細胞バンクより入手した), (4)肝細胞由来細胞株Chang's liver cell. 培養液はFCS free medium HB104TM (富士レビオ)を用いて24well culture plate (Corning)にて5%CO₂, 37℃の条件下でそれぞれ培養した。上記の細胞株の各々2×10⁵個を1mlの培養液にて培養し、培養6日目までの培養上清中のPIVKA-II及びAFP濃度をEIA法にて経日的に測定した。またそれぞれの細胞株の培養前にvit. K₂ (Eisai) 1μgを添加した状態での培養後のPIVKA-II及びAFP値も測定した。

Table 2 (培養6日目)に示すようにvit. K₂非添加時にはhuH-1, huH-2, PLC/PRF/5, HepG2及びHep3Bの5種の肝癌細胞株の培養上清中にPIVKA-II及びAFPが検出され、vit. K₂添加時にはPIVKA-II値は著明に減少した。また上記の5種の肝癌細胞株のいずれにおいてもPIVKA-II及びAFPは経日的に増加した。肝癌細胞株SK-HEP-1及び非肝癌細胞株ではPIVKA-II及びAFPは検出されなかった。

以上よりPIVKA-IIは肝癌細胞で産生され、しかもその産生はvit. Kの存在に左右される事が判明した。

3. 肝癌細胞におけるPIVKA-IIの産生機序に関する検討

ヒト肝癌培養細胞株 huH-2 2×10^5 cells/mlの細胞濃度にてHB 104TM培養液で培養後の培養上清中のPIVKA-II及びプロトロンビン関連抗原量(プロトロンビン 前駆体+PIVKA-II+正常プロトロンビン: Factor II Related Antigen, F-II R: AG)をEIA法にて測定し、以下の結果を得た。

(1) vit. K₂非添加時の培養6日目までの経日的変化をみるとFig. 7に示すようにPIVKA-II及びF-II R: AGは共に経日的に増加し、6日目には各々5.6 AU/ml, 100 ng/mlと最高値を示した。

(2) vit. K₂の同族体であるメナキノン4(MK-4)を0~200 pmolの範囲内で添加した時(0, 200 fmol, 2, 20, 200 pmol)の培養6日目の値を比較したところFig. 8のようにPIVKA-IIはvit. K₂の添加量に反比例して減少し、20及び200 pmolの添加において0 AU/mlとなったがF-II R: AGはいずれの添加量においても120~140 ng/mlとほぼ一定であった。

(3) vit. K₂(MK-4), vit. K₂の酸化型であるvit. K₂ epoxide(MK-4 epoxide)を1 µg/ml, そしてwarfarin(vit. K-reductase及びvit. K-epoxide reductaseをblockする

Table 2. 諸種肝癌培養細胞株およびその他の培養細胞株(2×10^5 cells/ml)の培養6日目におけるビタミンK添加群および非添加群での培養上清中のPIVKA-II値およびAFP値

Cell lines	Origin	PIVKA-II (AU/ml)		AFP (ng/ml)	
		Vitamin K		Vitamin K	
		-	+	-	+
huH-1	HCC ^a	5.31	0.13	65	59
huH-2	HCC	5.75	0.16	66	59
PLC/PRF/5	HCC	1.09	0.14	602	412
Hep G2	HCC	0.12	0.02	11,125	9,517
Hep 3B	HCC	0.43	0.09	475	404
SK-HEP-1	HCC	-	-	-	-
AZ-521	Gastric cancer	-	-	-	-
MKN 7	Gastric cancer	-	-	-	-
MIAPaCa-2	Pancreatic cancer	-	-	-	-
Chang's liver cell	Hepatocyte	-	-	-	-

^aHCC=hepatocellular carcinoma

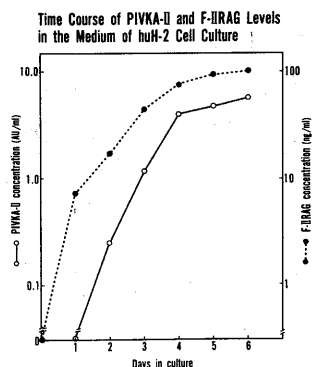


Fig. 7 huH-2の培養上清におけるPIVKA-II値及びプロトロンビン関連抗原量(F-II R: AG)の培養6日目までの経日的変化

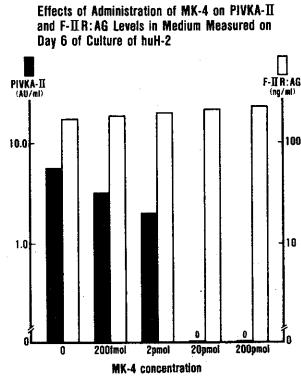


Fig.8 huH-2 の培養6日目における培養上清中の P I V K A - II 値及び F - II R : A G 値に対するビタミンK (MK - 4) 投与の影響

といわれている)を10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ それぞれ培養液に加え、培養3日目の変化を比較したところFig.9に示すように warfarin 添加において P I V K A - II は 1.2 AU/ml から 5.7 AU/ml と増加し、MK-4 及びMK-4 epoxideのいずれを添加しても PIVKA-II は 1.2 AU/ml から 0.02 AU/ml と同じ程度に減少した。しかしながら上記のいずれの条件においても F - II R : A G は 44~46 ng/ml とほぼ一定であった。

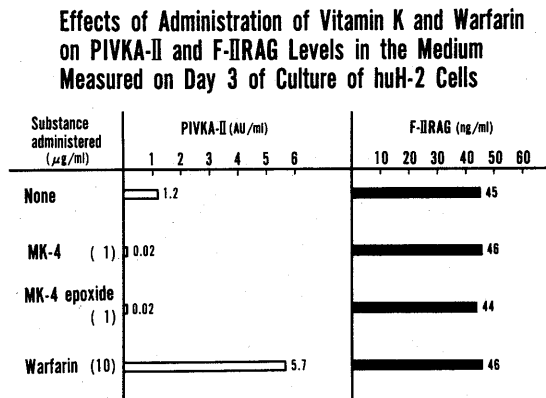


Fig.9 huH-2 の培養3日目における培養上清中の P I V K A - II 値及び F - II R : A G 値に対するビタミンK (MK - 4 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, MK - 4 epoxide 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 及びワーファリン (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 投与の影響

肝癌細胞での P I V K A - II 産生の機序としては①プロトロンビン前駆体の産生亢進, ② vit.K cycle の異常 (vit. K の絶対的・相対的不足, vit. K-epoxide-reductase もしくは vit. K-reductase の異常), ③ γ -glutamyl-carboxylase の障害などが考えられる (Fig. 1)。Vit. K 添加において P I V K A - II が減少するという事は vit. K-reductase 及び γ -glutamyl-carboxylase は働いている事を示し, vit. K-epoxide 添加にても vit. K 添加と同程度に P I V K A - II が減少している事は vit. K-epoxide-reductase, vit. K-reductase 及び γ -glutamyl-carboxylase のすべてが働いている事を示している。また F-II R:AG が P I V K A - II の動きと無関係にはぼ一定であったという事は肝癌細胞での P I V K A - II 産生が vit. K 依存性であり, 特別な P I V K A - II を産生しているのではないという事を示している。以上より vit. K-epoxide-reductase, vit. K-reductase (vit. K cycle) 及び γ -glutamyl-carboxylase のすべてが働いているという事が示唆された。しかしこの γ -carboxylation-system が正常肝細胞と同じように作働しているかどうかという事は今後の問題である。

以上の諸事実より, 今回の肝癌細胞を用いた検討からは肝癌細胞での P I V K A - II 産生の機序としてはプロトロンビン前駆体の産生亢進にともなう vit. K cycle 及び γ -carboxylation system の不均衡によるものである事が推測された。

IV 肝癌組織におけるプロトロンビン関連抗原の産生について

我々は, HCC 組織内の P I V K A - II の局在を間接的に証明するために, P I V K A - II を含むプロトロンビン関連抗原 (プロトロンビン前駆体 + P I V K A - II + 正常プロトロンビン: Factor II Related Antigen, F-II R:AG) の HCC 組織内局在について, 抗プロトロンビン抗体を用いた P A P 法にて検討した。

HCC 手術症例 14 例で, 血中 P I V K A - II 陽性は 29 例, 陰性は 5 例である。血中 P I V K A - II の測定は抗 P I V K A - II モノクローナル抗体を用いた E I A 法により行った。標本にはパラフィン切片を使用し, 次の一次, 二次抗体により通常の酵素抗体法 (P A P 法) を施行した。一次抗体として抗ヒトプロトロンビン (ウサギ IgG) 抗体を室温で 24 時間反応させた。二次抗体として抗ウサギ IgG ヒツジ血清を 1 時間反応させた。発色基質は A E C を用い, 対照には正常ウサギ血清を使用した。

F-II R:AG 陽性細胞が多数見られるものを (+), 散在するものを (+), 認められないものを (-) とした。血中 P I V K A - II 陽性 9 例の癌部においては, (+) が 1 例, (+) が 6 例, (-) が 2 例で, 非癌部では (+) が 1 例, (+) が 5 例, (-) が 3 例であった。血中 P I V K A - II 陰性 5 例の癌部では (+) が 1 例, (-) が 4 例で, 非癌部では (+) が 2 例, (+) が 2 例, (-) が 1 例であった。

P I V K A - II を含む F-II R:AG が血中 P I V K A - II 陰性者に比べ陽性者の癌組織内に多く検出された。この事は肝癌細胞での P I V K A - II あるいはプロトロンビン前駆体の産生を示すものと思われる。なお, 非癌部においては P I V K A - II 陽性例と陰性例とに差は認められなかった。

V 肝細胞癌における PIVKA-II の vitamin K 感受性に関する検討

今日、HCCの腫瘍マーカーとしてのPIVKA-IIの有用性は諸家の一致をみているが⁶⁾⁸⁾¹⁴⁾¹⁵⁾、HCCにおけるPIVKA-II産生機序については未だ明確な解答が得られていない現状である。⁹⁾¹⁰⁾ Liebermanらは、HCCにおけるPIVKA-IIはvit. K欠乏のそれとは異なりvit. Kに非感受性のものであり、vit. K依存性カルボキシル化に何らかの欠損があると推定している。³⁾今回我々は、PIVKA-II高値のvit. K欠乏症例にvit. Kを投与した際のPIVKA-II半減期を求め、HCCのそれと比較した。またHCCにおける手術及び動脈塞栓術(TAE)後のPIVKA-II値の動きとの比較もおこない、治療効果の判定、腫瘍の増大・再発の早期発見及び予後推定などにつき考察した。

1. 対象及び方法

PIVKA-II高値のvit. K欠乏症例をコントロールとし、PIVKA-II陽性HCCのvit. K感受性及びHCCの治療前後におけるPIVKA-II値の変動を検討した。PIVKA-IIは本原らの原法⁴⁾に準じ、EIA⁵⁾により測定した。

(1) Vit. K欠乏例とHCC例におけるvit. K投与後のPIVKA-II値の変動

コントロールとして、中心静脈栄養管理下でN-methylthiotetrazole (N-MTT) 基を有する抗生剤使用によりvit. K欠乏をきたしたPIVKA-II高値例¹⁶⁾3例に、vit. K₂ 50mg i. v. の20日間投与をおこない、PIVKA-II値の経日的変化を観察してその半減期を求めた。

次に、PIVKA-II陽性のHCC 6例に、同様にvit. K₂ 50mg i. v. の20日間投与をおこない、PIVKA-II値の変動をコントロールのそれと比較した。

また、PIVKA-II陽性のHCC 3例に、vit. K₂ 10mgのone-shot i. v.をおこない、PIVKA-II値の変動を観察した。

(2) PIVKA-II陽性HCC例の治療前後におけるPIVKA-II値の変動

PIVKA-II陽性のHCC例に対し手術が施行された6例及びTAEが施行された7例において、治療前後におけるPIVKA-II値の変動をコントロールのそれと比較した。

(3) HCCにおける血中vit. K濃度とPIVKA-II値との関係

HCCにおけるPIVKA-IIの出現が、単なる血中vit. K欠乏によるものであるかどうかを検討するために、PIVKA-II陽性のHCC 4例及び陰性のHCC 5例において、血中vit. K₁ 及びmenaquinone (MK, vit. K₂) 4~10濃度の測定をHPLC法にておこなった。

Table. 3. Plasma PIVKA-II levels in patients with vitamin K deficiency before and after vitamin K administration.

Case No.	Basal-PIVKA-II	Post-PIVKA-II (days)									
		1	4	6	8	9	11	13	15	18	22
1	49.80	36.58	16.04	7.19	5.15	3.88	2.60	1.40	0.99	0.44	0.21
2	6.25	5.01	1.90			0.46			0.07		
3	108.9	89.66	38.40			10.26			2.16		

PIVKA-II (AU/ml)

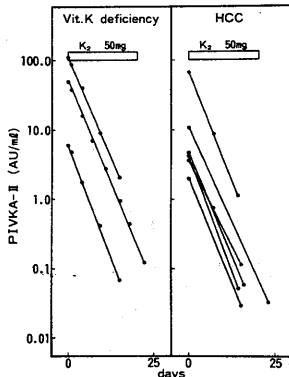


Fig. 10. Changes of plasma PIVKA-II levels in patients with vitamin K deficiency and hepatocellular carcinoma (HCC) after vitamin K administration.

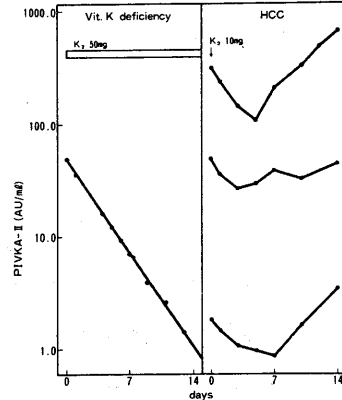


Fig. 11. Changes of plasma PIVKA-II levels in patients with hepatocellular carcinoma (HCC) following one-shot vitamin K administration in comparison with that in a vitamin K deficiency patient given vitamin K continuously.

2. 結 果

(1) Vit. K欠乏例とHCC例におけるvit. K投与後のPIVKA-II値の変動について

Vit. K欠乏患者3例にvit. K₂を50mg i.v.の20日間投与をおこなった際のPIVKA-II値の変動は、Table 3, Fig. 10の左に示す如くで、PIVKA-IIの血中半減期を求めると60 hr (60.53 ± 2.65 hr, mean ± S.D.)であった。

次に、PIVKA-II陽性のHCC患者6例における同じ方法によるvit. K₂投与後のPIVKA-II値の変動は、Fig. 10の右の様に、vit. K欠乏患者のPIVKA-II減少の傾きと一致して同じ半減期60 hr (60.31 ± 6.21 hr)を示した。

一方、PIVKA-II陽性のHCC患者3例にvit. K₂ 10mgのone-shot i.v.をおこなった成績は、Fig. 11に示す如くであった。コントロールの、PIVKA-IIの半減期が60 hrの時のPIVKA-II減少率を100%とし、Fig. 11の右上の症例をとってみると、はじめはコントロールに一致して減少したが、3日目98.2%、5日目84.4%のPIVKA-II減少率にとどまり、5日目以降は再上昇を示し、10日目には前値に復した。

(2) PIVKA-II陽性HCC例の治療前後におけるPIVKA-II値の変動について

HCC長期フォロー例において、手術、TAE後のPIVKA-II値の変動をみた。その対象の一覧及び治療前後のPIVKA-II値の変動を示したものがそれぞれTable 4, Fig. 12である。また、PIVKA-IIの半減期が60 hrの時のPIVKA-II減少率を100%とし、HCCに対する手術、TAE後の各日数におけるPIVKA-II減少率を求めた結果をTable 5に示す。Post-A

Fig. 12. Changes of plasma PIVKA-II levels after therapy in HCC patients in comparison with that in a vit. K deficiency patient after vit. K administration.

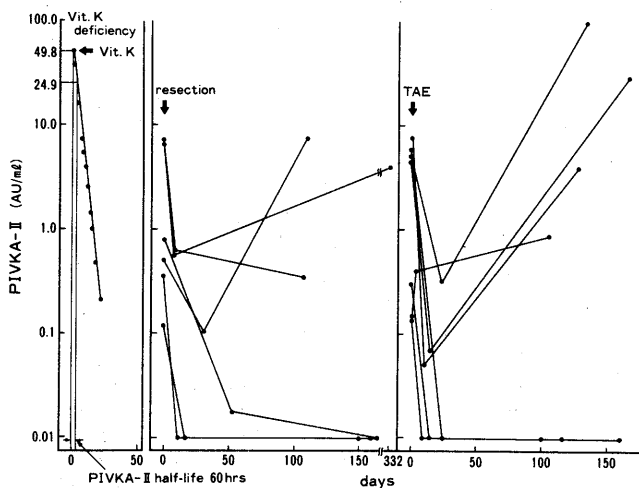


Table. 4. Plasma PIVKA-II levels, AFP levels and tumor size in patients with hepatocellular carcinoma before therapy.

Case No.	Age	Before Therapy			Therapy
		Tumor size (cm)	PIVKA-II (AU/ml)	AFP (ng/ml)	
1	59	2.2x3.2	0.12	6	Resection
2	56	5.5x4.3 5.3x7.0 1.2x1.5	6.80	57	Resection
3	44	5.0x6.5 1.0x1.3	6.97	3950	Resection
4	67	6.5	0.34	16	Resection
5	61	7.0x5.5	0.78	17	Resection
6	43	本胆管株	0.48	8907	Resection
7	66	3.2x4.3	0.12	73	TAE
8	71	5.0 2.3x2.5	5.84	3	TAE
9	60	3.2x3.8 0.8~1.5 5~6ヶ所	4.96	46352	TAE
10	58	4.2x5.5 1.2, 0.9	0.30	51	TAE
11	58	4.5x5.0 0.3~0.5	7.40	689	TAE
12	58	3.4x4.5 2.6x3.8 2.5	4.65	1517	TAE
13	77	2.8x3.7	0.13	3	TAE

● low echo
○ high echo

は治療後最初にPIVKA-IIを測定した時点を示し、Post-Bはそれ以降PIVKA-IIを測定した時点を示している。治療後頻回にPIVKA-IIを観察できた3症例についてPIVKA-II減少率をみると、Post-Aにおいては、Case No.10は14日目で98.7%、Case No.11は10日目で

Table. 5. Rate of reduction of PIVKA-II in patients with HCC after resection or TAE.

Case No.	Therapy	Basal		Post-A		Post-B		
		PIVKA-II	PIVKA-II	Days	Reduction* rate (%)	PIVKA-II	Days	Reduction* rate (%)
1	Resection	0.12	0.01	17	92.5	0.01	162	91.6
2	"	6.80	0.59	7	106.6	0.34	107	95.0
3	"	6.97	0.57	7	107.2	3.82	332	45.2
4	"	0.34	0.01	11	101.9	0.01	150	97.0
5	"	0.78	0.02	53	97.7	0.01	164	98.7
6	"	0.48	0.10	29	79.2	7.34	109	-1429.2
7	TAE	0.12	0.01	9	99.9	0.01	100	91.6
8	"	5.84	0.01	25	99.9	0.01	116	99.8
9	"	4.96	0.32	23	93.7	98.00	134	-1875.8
10	"	0.30	0.01	14	98.7	0.01	160	96.6
11	"	7.40	0.05	10	105.9	3.84	127	48.1
12	"	4.65	0.23	7	110.9	28.07	166	-503.7
13	"	0.13	0.41	5	-215.4	0.85	106	-553.8

$$* \text{Reduction rate (\%)} = \frac{\text{Basal PIVKA-II} - \text{Post PIVKA-II}}{\text{Basal PIVKA-II}} \times 100$$

* Reduction rate (%) calculated from its half-life (60hrs)

105.9%, Case No.12は7日目で110.9%をそれぞれ示した。次にこの3症例について、より詳細にこれ以降のPIVKA-II値の経過を観察したものをFig. 13に示す。Case No.10では14日目以降160日目まではPIVKA-IIの産生は認められなかった。Case No.11では20日目で再び新たにPIVKA-IIの産生が認められた。Case No.12においては、7日目まではvit. K欠乏患者のPIVKA-II減少の傾きに一致して低下したが、18日目ではPIVKA-IIの低下はvit. K欠乏患者のPIVKA-II減少の傾きからずれており、それ以降PIVKA-IIは高値を示した。すな

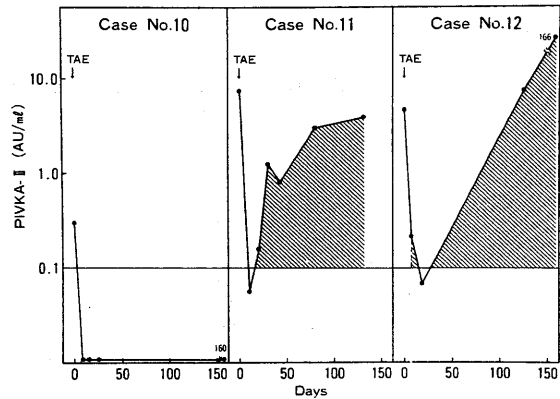


Fig. 13. Changes of plasma PIVKA-II levels in patients with hepatocellular carcinoma after TAE. The hatched area denotes de novo synthesis of PIVKA-II.

わち、18日目の時点で腫瘍の増大・再発の推定が可能であった。なお、この3症例における治療前後のPIVKA-II値、AFP値及び腫瘍の大きさの変化をTable 6に示した。













(3) HCCにおける血中vit. K濃度とPIVKA-II値との関係について

PIVKA-II陽性及び陰性のHCC例において、血中vit. K (vit. K₁, MK-4~10)濃度を測定したところ、Table 7に示す様に、PIVKA-II陰性例において血中vit. K₁濃度がやや高い傾向にあったがMK濃度には差がなく、全体としての血中vit. K濃度には差が認められなかった。

考 察

HCCにおけるPIVKA-IIのvit. K感受性についてはこれまで種々推測されてきたが、未だ明らかな解答が得られていないのが現状である。Liebmanらはvit. K10mgを2日間経静脈投与し7日後にPIVKA-IIをRIA法²⁾¹⁷⁾にて測定して、vit. K欠乏患者と異なりHCC患者においてはvit. K非感受性であったと報告している³⁾。ShahらはratのHCC移植実験から、HCCの

Table. 6. Changes of plasma PIVKA-II levels, AFP levels and tumor size in patients with hepatocellular carcinoma before and after TAE.

Case No.	Therapy	Before Therapy			Days	After Therapy			Days	After Therapy						
		Tumor size (cm)	PIVKA-II (AU/ml)	AFP (ng/ml)		Tumor size (cm)	PIVKA-II (AU/ml)	AFP (ng/ml)		Tumor size (cm)	PIVKA-II (AU/ml)	AFP (ng/ml)				
10	TAE	 4.2x5.5	0.30	51	14	 5.0x5.2	0.01	11	26	 3.8x4.7	0.01	14	160	 0.01	435	
11	TAE	 4.5x5.0	7.40	689	10	 5.0	0.05	207	20	 6.0	0.16	67	127	 8.0x9.0	3.84	210
12	TAE	 3.4x4.5	4.65	1517	7	 3.4x4.5	0.23	265	18	 3.4x4.5	0.07	42	166	 8x5	28.07	2901

● low echo
○ high echo

Table. 7. Plasma vit. K(VK) concentrations in patients with HCC.

Case No.	PIVKA-II (AU/ml)	VKs (ng/ml)					
		VK ₁	VK ₁ epo	MK-4	MK-4 epo	MK-5	MK-6
1	8 <	0.11	nd	0.20	nd	0.54	nd
2	8 <	0.35	nd	2.96	nd	0.30	nd
3	8 <	0.60	nd	0.05	nd	0.40	nd
4	8 <	0.69	nd	0.08	nd	0.45	0.20
5	0.01	2.20	0.14	0.16	nd	0.47	nd
6	0.01	1.45	0.10	0.17	nd	0.51	0.20
7	0.01	0.97	0.11	0.32	nd	0.29	0.24
8	0.02	0.33	nd	0.04	nd	0.37	0.09
9	0.01	1.13	nd	0.24	nd	0.38	0.06

MK-7~MK-10 : nd MK : Menaquinone (VK₂), epo : epoxide
nd : amounts of VK₁epoxide, MK-4 epoxide and MK-6 were less than 50pg/ml.

PIVKA-IIはvit. Kに非感受性であり、HCCの腫瘍組織においてγ-glutamyl-carboxylase activityの低下が認められたことより、PIVKA-IIの産生機序についてγ-glutamyl-carboxylase geneの障害があるのではないかと考えている¹⁸⁾。また藤山らは、PIVKA-II陽性のHCC患者にvit. K₂を50mg 5日間点滴静注したところ、有意の低下を認めなかった例と認めた例とがあったと報告している¹⁹⁾²⁰⁾。

我々は今回、PIVKA-IIの半減期を考慮して、HCCにおけるPIVKA-IIのvit. K感受性を検討した。コントロールとして、PIVKA-II高値のvit. K欠乏症例にvit. K₂を50mg20日

間経静脈的に投与し PIVKA-II 半減期を求めたところ 60 hr であった。これまで Blanchard も vit. K 欠乏患者において PIVKA-II 半減期を計算し 65 hr と報告していること²⁾、またプロトロンビンの半減期は 73 hr²¹⁾ といわれていることなどから、60 hr という結果は妥当であると考えられた。次に PIVKA-II 陽性の HCC 患者に同じ方法で vit. K₂ を投与したところ、その際の PIVKA-II 半減期は、vit. K 欠乏患者のそれと同じく 60 hr であった。すなわち、HCC における PIVKA-II の vit. K 感受性が、vit. K 欠乏患者のそれと全く同じであることを示す成績と思われた。もしも、vit. K 感受性はあってもその感受性が完全でなく、一部 vit. K に感受性のない PIVKA-II が存在するならば、vit. K 欠乏患者に比し HCC 患者では PIVKA-II の減少率が低下するものと考えられる。

前述の Liebman らが施行した vit. K 10mg の 2 日間投与における PIVKA-II 値の結果³⁾ を検討するために、我々も PIVKA-II 高値の HCC 患者に vit. K₂ 10mg の one-shot i.v. を施行してみた。当初は vit. K 欠乏患者の PIVKA-II 減少直線の傾きに一致し、3 日目前後にはコントロールの減少直線からずれを生じ、10 日目前後には vit. K 投与前値にまで再上昇するのが認められた。すなわち、当初は vit. K 投与により PIVKA-II 産生のない状態となっているが、vit. K の半減期 37 分²²⁾ を考慮すると、3 日目前後には vit. K 欠乏となり新しい PIVKA-II が出現してくるのではないかと推察された。Liebman らは、HCC における PIVKA-II は vit. K 感受性がないと報告している³⁾ が、vit. K の半減期を考慮すると、vit. K 投与後ある期間を経て再び欠乏状態となり、PIVKA-II が再上昇した時期をみている可能性が高いと考えられた。

また PIVKA-II 陽性及び陰性の HCC 例において血中 vit. K 濃度に差は認められなかったことより、HCC における PIVKA-II の出現は、単なる血中 vit. K 濃度の低下によるものではないことが示唆された。なおこれに関して我々は、肝癌細胞内におけるプロトロンビン前駆体の産生と vit. K との量的関係について現在検討中である。

次に、vit. K 欠乏患者の PIVKA-II 半減期と、HCC 例における治療後の PIVKA-II の変動及び半減期とを比較検討した。HCC に対しての手術、TAE に根治性があるならば、治療後にコントロールである vit. K 欠乏患者の PIVKA-II 半減期 (60 hr) と一致し 100% の減少を示し続けるものと考えられる。すなわち、手術あるいは TAE 後などに効果的に数回、2 週間に 1 回程度 PIVKA-II 値を測定し、これを PIVKA-II 半減期を考慮した PIVKA-II 減少率でフォローして、vit. K 欠乏患者の PIVKA-II 減少直線の傾きとのずれから、腫瘍の増大・再発の時点をこれまで以上に早期に推定することが可能であると思われた。

文 献

- 1) Hemker HC, Muller AD: Kinetic aspects of the interaction of blood-clotting enzymes. VI. Localization of the site of blood-coagulation inhibition by the protein induced by vitamin K absence (PIVKA). *Thrombos Diathes Haemorrh* 20: 78-87, 1968.
- 2) Blanchard RA, Furie BC, Jorgensen M, et al. : Acquired vitamin K-dependent carboxylation deficiency in liver disease. *N Engl J Med* 305:242-248, 1981.
- 3) Liebman HA, Furie BC, Tong MJ, et al. : Des- γ -carboxy (abnormal) prothrombin as a serum marker of primary hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 310:1427-1431, 1984.
- 4) Motohara K, Kuroki Y, Kan H, et al. : Detection of vitamin K deficiency by use of an enzyme-linked immunosorbent assay for circulating abnormal prothrombin. *Pediatr Res* 19:354-357, 1985.
- 5) 榎木 徹, 渡辺啓祐, 下水流保範, 他 : モノクローナル抗体とポリクローナル抗体とを用いたサンドイッチ EIA (Enzyme Immunoassay) 法による PIVKA-II 測定試薬キットの開発と測定条件の検討。 *臨床免疫* 18:479-492, 1986.
- 6) 奥田博明, 中西敏己, 古川隆二, 他 : 肝細胞癌における異常プロトロンビン PIVKA-II の産生に関する臨床的および実験的研究。 *肝臓* 27:1697-1702, 1986.
- 7) 奥田博明, 中西敏己, 古川隆二, 他 : 肝癌細胞における異常プロトロンビン PIVKA-II の産生に関する検討。 *肝臓* 28:270, 1987.
- 8) Okuda H, Obata H, Nakanishi T, et al. : Production of abnormal prothrombin (des- γ -carboxy prothrombin) by hepatocellular carcinoma. A clinical and experimental study. *J Hepatol* 4:357-363, 1987.
- 9) Okuda H, Nakanishi T, Furukawa R, et al. : Production of des- γ -carboxy prothrombin by human hepatoma cells in culture. *Hepatology* 7:1128, 1987.
- 10) 奥田博明, 中西敏己, 古川隆二, 他 : 肝癌細胞における異常プロトロンビン PIVKA-II の産生に関する検討。 *肝臓* 29:47-51, 1988.
- 11) Huh N, Utakoji T: Production of HBs-antigen by two new human hepatoma cell lines and its enhancement by dexamethasone. *Gann* 72:178-179, 1981.
- 12) Alexander JJ, Bey EM, Geddes EW, et al. : Establishment of a continuously growing cell line from primary carcinoma of the liver. *S Afr Med J* 50:2124-2128, 1976.
- 13) Aden DP, Fogel A, Plotkin S, et al. : Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature* 282:615-616, 1979.

- 14) 藤山重俊, 森下愛文, 吉田 健, 他: モノクローナル抗体を用いたELISAによる各種肝疾患におけるPIVKA-IIの測定—とくに肝細胞癌における臨床的意義。日消誌 82:135, 1985.
- 15) Soulier J-P, Cozin D, Lefrere J-J: A new method to assay des- γ -carboxy prothrombin. Results obtained in 75 cases of hepatocellular carcinoma. Gastroenterology 91: 1258-1262, 1986.
- 16) Barza M, Furie B, Brown AE, et al.: Defects in vitamin-K-dependent carboxylation associated with moxalactam treatment. J Inf Dis 153: 1166-1169, 1986.
- 17) Blanchard RA, Furie BC, Kruger SF, et al.: Immunoassays of human prothrombin species which correlate with functional coagulant activities. J Lab Clin Med 101: 242-255, 1983.
- 18) Shan DV, Engelke JA, Suttie JW: Abnormal prothrombin in the plasma of rats carrying hepatic tumors. Blood 69: 850-854, 1987.
- 19) Fujiyama S, Morishita T, Sagara K, et al.: Clinical evaluation of plasma abnormal prothrombin (PIVKA-II) in patients with hepatocellular carcinoma. Hepatogastroenterol 33: 201-205, 1986.
- 20) 藤山重俊, 森下愛文, 佐藤辰男, 他: 肝疾患と異常プロトロンビン。肝胆脾 11: 539-548, 1985.
- 21) 前川 正, 権守日出海, クマリン製剤とビタミンK依存性凝固因子の代謝。Biomed Sci 1: 160-169, 1980.
- 22) 篠 光正, 山城智子, 山田浩司, 他: 健康人におけるMenaquinone-4 製剤投与後の血漿中 Menaquinone-4 の定量。薬学雑誌 102: 651-658, 1982.