ムコ多糖体並びに抗凝血薬の血液凝固及び動脈硬化抑制作用に関する研究

第2編　抗凝血剤による動脈硬化症の防止に関する実験的研究

昭和39年1月29日受付

信州大学医学部松岡内科学教室
(主任：松岡松三教授)
上　条　信　郎

Studies on the Effect of Mucopolysaccharides and Anticoagulants on Blood Coagulation and Prevention of Arteriosclerosis

Part 2. The Effect of Anticoagulants in the Development of Arteriosclerosis

Nobuo Kamijo
Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine
Shinshu University
(Director : Prof. M. Matsuoka)

緒　言

動脈硬化症の成因に関しては，今日まで多くの研究がなされて来た。Rokitansky (1841年)①は，動脈硬化症は血管壁へのFibrinの沈着から始まり，次いでアテローム様軟化，出血および石灰沈着をもつて完成する事を報告した。この様に凝血異常が本症の発生に関与する事は，その後今日まで多くの報告がある。すなわち，Duguid等②は冠動脈血栓の研究の際に血栓が組織化されて，動脈硬化症と区別し難いような病変となることを発見。Astrup③は器質化を伴つた動脈壁の局所的凝血は少くも，ある例では動脈硬化の初発因子となると述べている。松岡等④は家兎を用いた実験で，セライト (diatomaceus Silica ; John-Manville, U. S. A.) を静注して Contact factor を活性化すると，凝固能の亢進と共に動脈硬化症の発生を促進すると云う結果を得ている。

一方，Anitshkoff (1913年)⑤は家兎にコレステロールを投与して，実験的粥状動脈硬化症を作り，またAschoff, Frey, Bünger等がヒトの動脈硬化症の発展上に占めるコレステロールの意義を強調して以来，血清コレステロール値と動脈硬化症との関連が研究され，コレステロールが動脈硬化症の主因と考えられたこともあるが，最近では高コレステロール血症のみがその原因でなく，他の燐脂質，中性脂肪，Lipoprotein，酸性ムコ多糖体，或は血清または血管壁の蛋白結合含水炭素の変化が問題にされて来た。

この様に動脈硬化症の成因は単純なものではなく，Kommerell⑥，Fullerton⑦，O'Brien⑧及び松岡らも述べている様に，脂肪の摂取と血液凝固能の亢進が重要なものと考えられる。

著者は⑨第1編に於て，酸性ムコ多糖体であるコンドロイチン硫酸の血液凝固に及ぼす影響について報告したが，本剤が高濃度では血液凝固に阻止的に作用することを明らかにしたので，本編に於ては，凝固能の低下が動脈硬化の発生に如何なる影響を有するかを検討する目的で，家兎を用いてコレステロール投与による動脈硬化症の発生に，抗凝血作用のある高濃度コンドロイチン硫酸および抗凝血薬 Phenylindandione を投与した場合を，セライトによる凝固能亢進状態と比較検討した成績について2，3の知見を得たので報告する。

実験材料

1．体重2.0kg～2.5kgの雄の家兎20羽を次に述べる如き4群にわけて，それぞれに適当な操作を加えた。

2．コンドロイチン硫酸C：(コンドロイチン硫酸Cのナトリウム塩の形のものの純末を科研薬品より入手ーコンドロン) 生理的食塩水にて2% の濃度の溶液を作り，滅菌後氷室に保存したものを使用した。

3. Phenylindandione (Indione)：この錠剤を乳鉢にてよくすりつぶして使用した。

4. セライト：(diatomaceus Silica; John-Manville, U. S. A.), インジオン同様に乳鉢にてよく粒子をすりつぶしたものを生食水に Suspend した0.1%溶液を沸騰水中にて約30分間加熱滅菌し氷室に保存したものを使用した。

5. コレステロール末：0.1gr～0.2grを毎日オカラに混じて投与した。

実験方法

1. 全血凝固時間

2% コンドロイチン硫酸 20mg/kg, セライトの0.1% 5cc を家兎の耳静脈内に静注し，注射前を正常として以後時間毎に採血し，Lee-White 法[10]にて測定した。

2. プロトロンビン時間

インジオン投与群について隔日に松岡一段法[11]にて測定し，20%～30%の活性度を保つ様に調節した。

3. 血清総コレステロール値の測定

Zak-Henly の変法[12]で血清0.05ccに塩化第2鉄酢酸溶液 4.0cc. を加え，東洋ロシ No.6 で濾過し，その除蛋白濾液 3.0cc に 2cc の硫酸を加え混和し30分間放置後，560mμ で吸光度を測定した。この測定は投与前，投与後毎週1回行い，著しい高コレステロール値の生じない様に投与量を調節した。

4. 実験群

表1に示す如く20羽の雄の家兎を次の様に A, B, C, D 4群に分け，何れの群にもコレステロール 0.1gr～0.2gr を毎日オカラに混じて投与した。0.1gr～0.2gr とあるのは著しい高コレステロール血症とならない様に，300mg/dl 前後の値にするためである。

A群

第1編で報告した[9]如く，生体内にても高濃度で血液の凝固性を阻止することを認めたコンドロイチン硫酸Cを用いた。このコンドロイチン硫酸Cは弱い Heparin 様作用を有し，なかんづく，第Ⅶ因子，血清のトロンボプラスチン形成因子の抑制，第Ⅴ因子，プロトロンビンの軽度の減少作用のある2% のものを20 mg/kg を隔日に家兎の耳静脈より静注した。

この群はB群との比較に用いた群である。

B群

松岡等[13]によればセライトの静注は Contact factor を活性化し，血液凝固を亢進すると云う。このセライトの生理的食塩水にて0.1% に Suspend したものを5cc 家兎の耳静脈より極めて緩除に隔日に静注した。これは急速に静注すると凝固能が亢進するため，右心房，右心室内の血液は完全に凝固して血塊を作り死亡する[13]ので緩除に行う方が妥当と考える。

この群はC群，D群の対照群とした。

C群

A群，B群に於て行つたと同様に，セライトの凝固亢進作用をコンドロイチン硫酸Cが如何に抑制するかをB群と比較検討する目的で，同時に隔日に静注した。

D群

抗凝血薬として使用されているイレジオンを，コンドロイチン硫酸Cと同様の目的で初回250mg～300mgを投与し，前述した様にプロトロンビン量で20%～30% 前後に維持する様に，隔日にプロトロンビン時間を測定し，維持量として25mg～50mgを投与し，更にC群と同様にセライトの5cc を隔日に静注した。

各群共60日目に殺し，その大動脈，肺動脈について肉眼的，組織学的に検索した。尚途中で死亡した例についても，同様の検索をその都度実施した。

表1　実　験　群

A 群	2% コンドロン 4cc 静注 (凝固を遅延)
B 群	0.1% セライト 5cc 静注 (凝固を亢進)
C 群	コンドロン，セライトの両方を静注
D 群	インジオン投与，セライト静注
	各群共コレステロール投与

実験成績

1. 全血凝固時間の変動

図1に示す如く，2% コンドロイチン硫酸Cの静注では，全血凝固時間は15分後に軽度の短縮は認められるが30分で著明な延長を示した。セライト Suspension の静注では15分から著明な短縮を認めた。

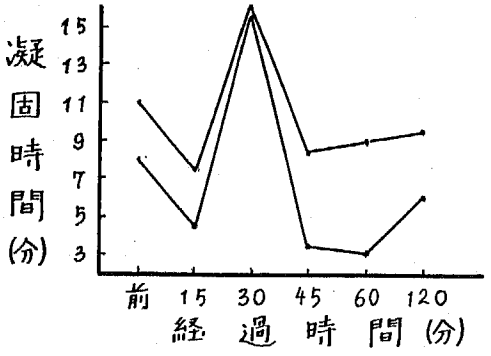
2. プロトロンビン時間

インジオン投与群（D群）のみについて測定したが，図2に示す様に第2日目より低下し，以後多少の変動はみられるが，20%～30%の値に保つた。

3. 血清総コレステロール値の変動

4群共に図3, 4, 表2, 3に示す様に何れも 300mg/dl 前後の値とした。A群では高値を示した2例は1時コレステロールの投与を中止し，300mg/dl 前後に下げた。7週間後のその平均値は319.5mg/dlであり，B群では1例にコレステロール値の上昇がなかなかみられず，第4週より 0.2gr を投与した。B群の平均値は288.0mg/dlであつた。C群の平均値は297.5mg/dlであり，D群はインジオンを投与した群であるが，5羽中

図 1　コンドロン静注後の全血凝固時間



セライト静注後の全血凝固時間

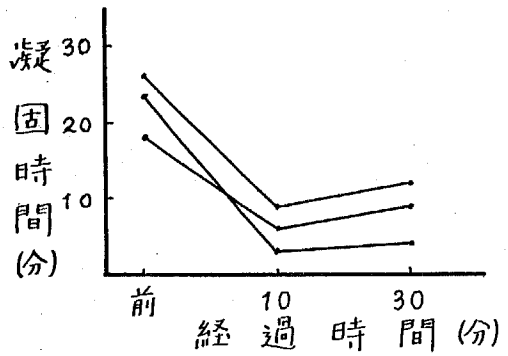
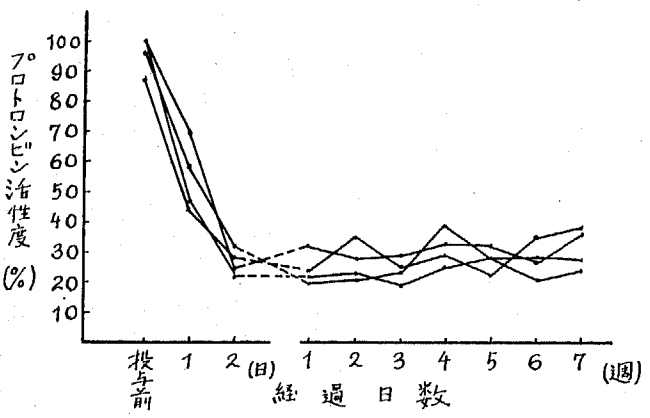


図 2　インジオン投与群のプロトロンビン値の推移



1羽が腸内出血で死亡した他は，一般に高コレステロール値を示すものは少く，その平均値は275.5mg/dlと4群中最も低い値を示した。

4. 組織学的検査所見

A群

B群と比較して2%コンドロイチン硫酸Cを静注して凝固能を低下せしめた群であるが，大動脈，肺動脈に肉眼的にも組織学的にも，脂肪沈着或は内膜の肥厚等の変化を認めたものは5羽中1羽にもみられなかつた。その1つを写真1に示した。

B群

セライト5ccを静注し凝固能を亢進せしめた群であり，かつまたC群，D群の対称群としたものであるが，5羽中1羽に胸部大動脈下行部に肉眼的に米粒大の黄色に隆起した Atherom 類似の斑点をみとめた。組織学的には1羽に Sudan 染色にて内膜の単純性脂肪沈着をみとめるが，その程度の極めて軽いものをみとめ写真2に示した。写真3に示す如く内膜の脂肪沈着は写真2より多く，更に内膜の僅かの肥厚を伴うものが1羽，同じく Sudan 染色にて内膜の Endothel 側に於ける著明な脂質の沈着と微細顆粒状の脂質の沈着が内弾性板近くまでおよび，中膜の弾力膜の軽度の乱れ及び内膜の肥厚がみられ，粥状硬化像の初期の像と思われるもの1羽があり写真4に示した。肺動脈では写真5に示す如く内膜の部分的な肥厚と同部の elastica の増殖像のみられたもの，或は又中膜の部分的肥厚，内膜の全般に渡る軽度の肥厚及び，分岐部の著明な肥厚と内膜の軽度の脂質の沈着のみられたもの。(写真6)。更に内弾性板の elastose が強く内膜の強い肥厚により完全に閉塞された像のみられたものを写真7に示した。

C群

2%コンドロイチン硫酸，セライトの両方の静注群であるが，大動脈に微細な Thrombus の形成のみられたものが1羽だけで明らかにセライト単独静注の場合と比較すると，脂質の沈着，内膜の肥厚等の認められたものはなかつた。写真8に示した。

D群

インジオン投与群であるが，組織学的には写真9に示した如く内膜の脂質の沈着が，やゝ強く脂質を喰食した細胞が内弾性板近くまで達しているもの，写真10にみられる様に細小 Thrombus の認められたもの3羽で，肺動脈には全く変化はみられなかつた。以上の各群の組織学的変化を一括して表に示すと表4の如くである。

総括並に考按

以上，著者は家兎に少量のコレステロールを投与し，血清総コレステロール値を大体300mg/dl前後とし

図 3　　血清総コレステロール値の変動

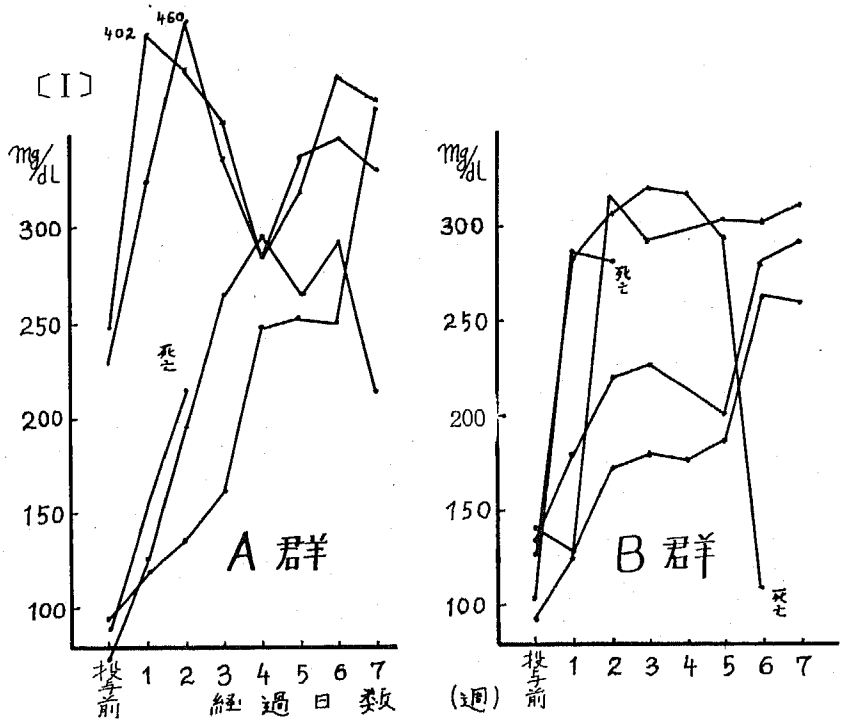


図 4　　血清総コレステロール値の変動

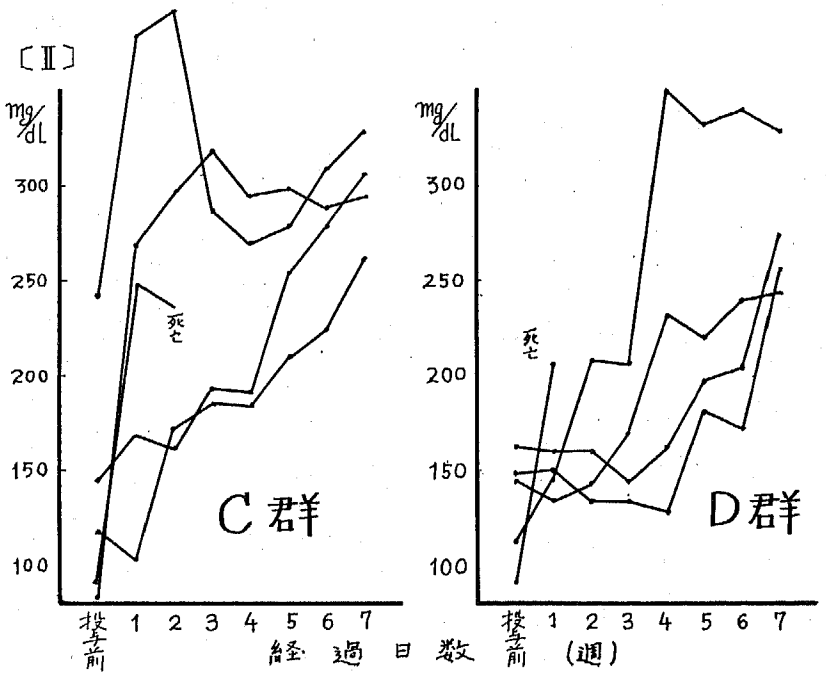


表 2　〔Ⅰ〕血清総コレステロール値の変動
(mg/dℓ)

投与日数(週)		投与前	1	2	3	4	5	6	7
A群	No. 1	248.0	402.0	385.0	358.0	284.0	320.0	380.0	368.0
	No. 2	240.0	335.0	460.0	338.0	284.0	338.0	348.0	332.0
	No. 3	74.0	126.0	194.0	266.0	296.0	266.0	294.0	21400
	No. 4	90.0	164.0	214.0	死　亡	—	—	—	—
	No. 5	94.0	120.0	136.0	162 0	248.0	254.0	250.0	364.0
	平均値	**149.2**	**229.4**	**277.8**	**281.0**	**278.0**	**294.5**	**318.0**	**319.5**
B群	No. 1	125.0	284.0	308.0	320.0	318.0	296.0	108.0	死　亡
	No. 2	92.0	124.0	316.0	292.0	298.0	304.0	302.0	312.0
	No. 3	142.0	128.0	172.0	180·0	178.0	186.0	264.0	260.0
	No. 4	134.0	178.0	220.0	228.0	214.0	202.0	282.0	292.0
	No. 5	104.0	286.0	282.0	死　亡	—	—	—	—
	平均値	**159.4**	**200.0**	**259.6**	**255.0**	**252.0**	**247.0**	**239.0**	**288.0**

表 3　〔Ⅱ〕血清総コレステロール値の変動
(mg/dℓ)

投与日数(週)		投与前	1	2	3	4	5	6	7
C群	No. 1	144.0	168.0	162.0	194.0	192.0	254.0	278.0	306.0
	No. 2	242.0	378.0	392.0	288.0	270.0	278.0	308.0	328.0
	No. 3	82.0	268.0	296.0	318.0	294.0	298.0	288.0	294.0
	No. 4	90.0	248.0	236.0	死　亡	—	—	—	—
	No. 5	118.0	102.0	172.0	186.0	184.0	210.0	224.0	262.0
	平均値	**139.2**	**232.8**	**251.8**	**246.5**	**240.0**	**260.0**	**274.5**	**297.5**
D群	No. 1	148.0	150.0	134.0	134.0	128.0	182.0	172.0	256.0
	No. 2	162.0	160.0	160 0	144.0	162.0	198.0	204.0	274.0
	No. 3	112.0	146.0	208.0	206.0	350.0	332.0	340.0	328.0
	No. 4	144.0	134.0	142.0	170.0	232.0	220.0	240.0	244.0
	No. 5	90.0	206.0	死　亡	—	—	—	—	—
	平均値	**131.5**	**159.2**	**161.0**	**163.5**	**218.0**	**233.0**	**234.0**	**275.5**

表 4　各群の組織学的変化の総括

	A　群	B　群	C　群	D　群
肉眼的，組織学的に全く変化のないもの	4	1	3	2
内膜に単純性脂肪斑又は肥厚が極めて軽度	0	1	1	2
脂肪沈着，内膜肥厚の軽度のもの	0	1	0	0
中等度の粥状硬化像	0	1	0	0
内膜全般に亘る比較的高度の粥状硬化像	0	0	0	0

著しい高コレステロール血症を生じない様にし，同時にセライトの静注を行い凝固能を亢進せしめ動脈硬化症の発生を促進させた場合，コンドロイチン硫酸及びインジオンがセライトの凝固亢進を抑制し，動脈硬化症の発生を抑制するかどうかを検討した。

セライトを静注して，血液の凝固能を亢進せしめる

写真 1

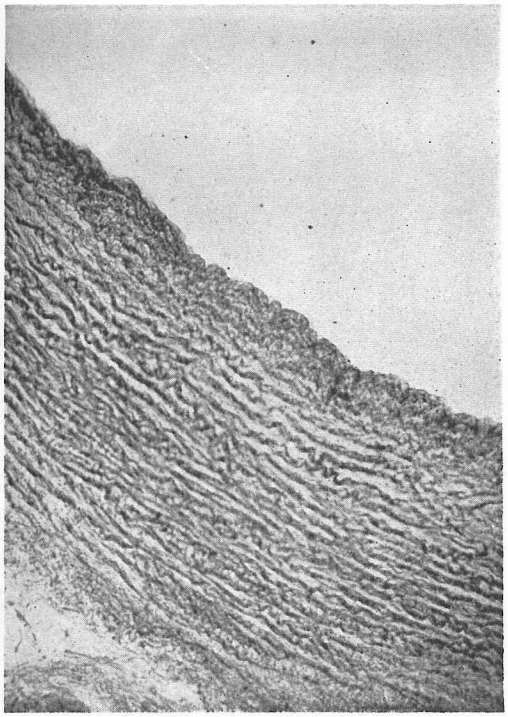


写真 2



写真 3

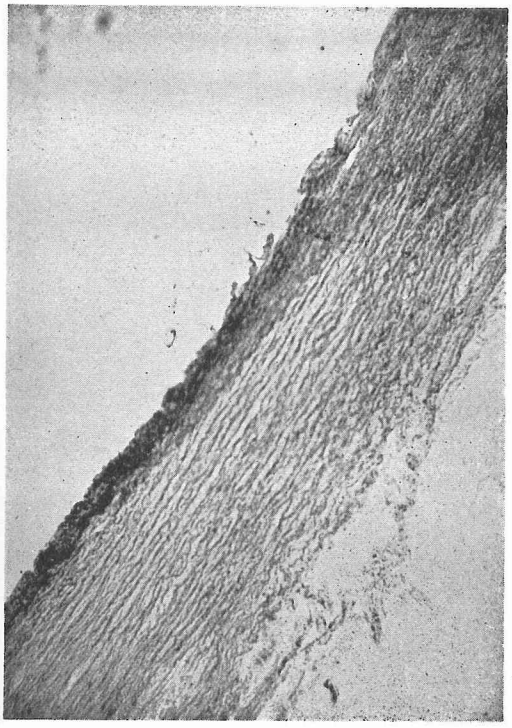


写真 4

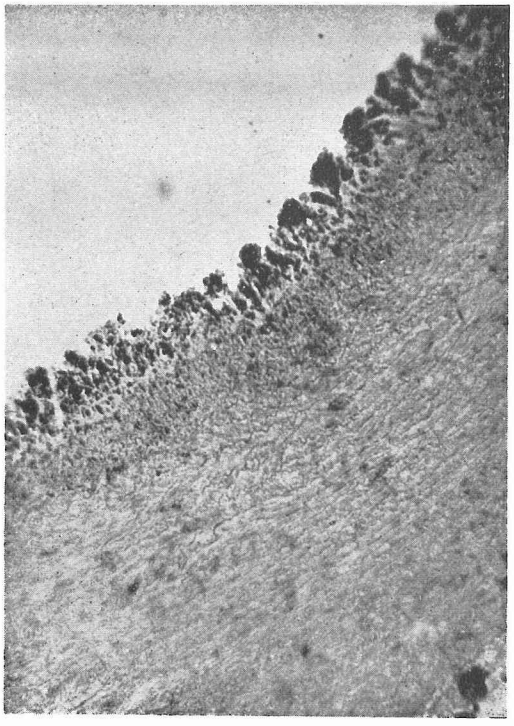


写真　5

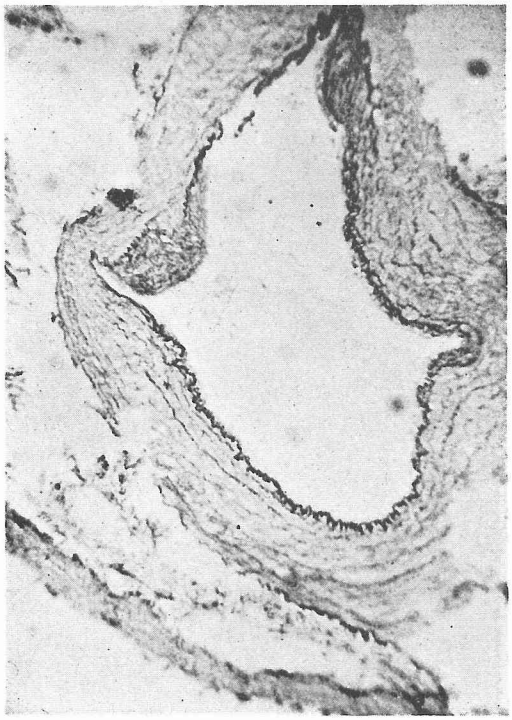


写真　6



写真　7

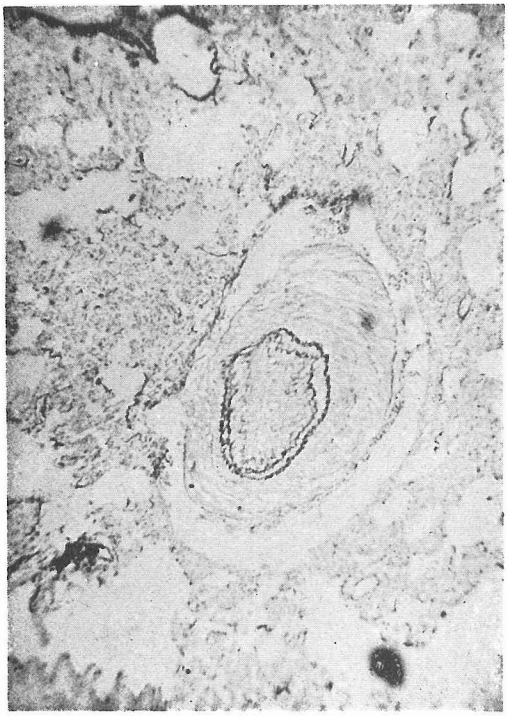


写真　8

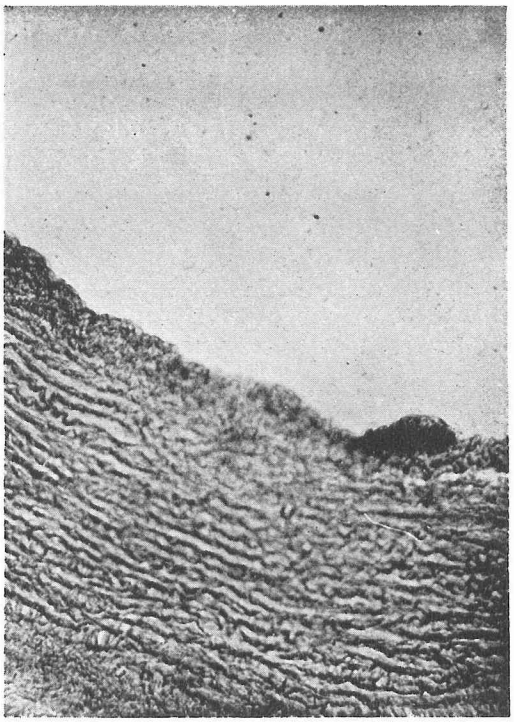


写真 9

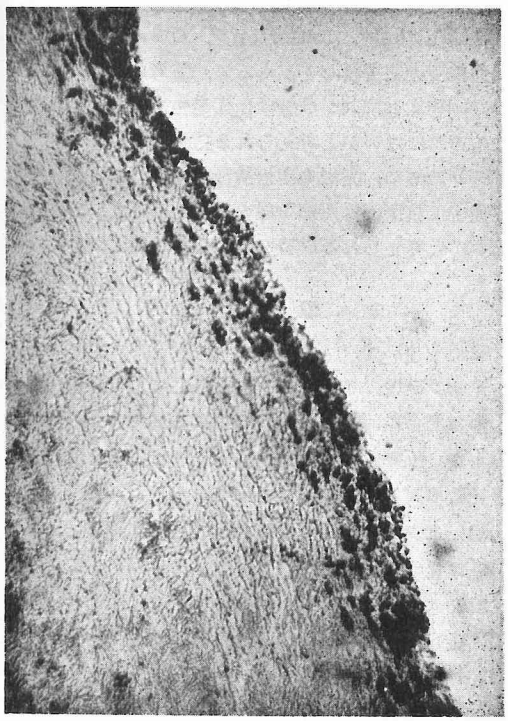
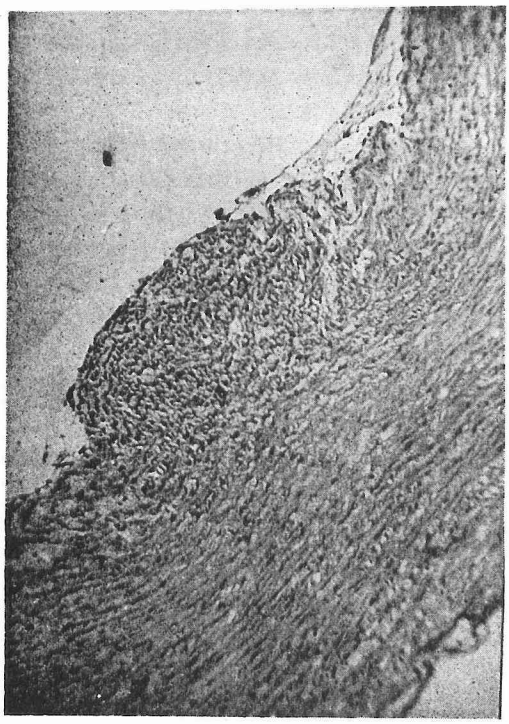


写真 10



組織写真説明

写真 1　A群組織で大動脈。Weigert 弾力線維染色で内膜の肥厚，弾力線維の異常はみられない。

写真 2～7　B群組織。2：大動脈，Sudan 染色，内膜に軽度の脂質沈着がみとめられる。
3：大動脈，Sudan 染色，内膜の僅かの肥厚及び脂質の沈着がみられる。
4：大動脈，Sudan 染色，内膜の著明な脂質沈着，中膜の elastica の軽度の乱れがみられる。
5：肺動脈，H. E 染色，内膜の部分的な肥厚と同部の elastica の増殖。
6：肺動脈，Sudan 染色，内膜の軽度の脂質沈着，全般にわたる軽度の内膜の肥厚及び分岐部の著明な肥厚，中膜の部分的肥厚がみとめられる。
7：肺動脈，H. E 染色，内膜の肥厚があり内弾性板の elastose が強い。

写真 8　大動脈，微細な Thrombus の形成がみとめられる。

写真 9～10　大動脈，内膜の脂質沈着や強く，脂質を喰食した細胞が内弾性板近くまで達している。
10：大動脈，細小 Thrombus とその表面は Endothel できれいに被はれている。

とコレステロール単独投与の場合に比し，動脈硬化症の発生が促進することは松岡等④が報告している。又 Myasnikov 等⑭はコレステロールとトロンビンを家兎に投与した場合には心筋硬塞が起り易いが，コレステロール単独投与，又はトロンビン単独の場合には心筋硬塞が形成されにくいことを報告している。この様に動脈硬化症の成因に関しては始めに簡単に述べたが，最近動脈硬化症の成因に Thrombosis が起原で起ると云う，古くは Rokistansky①が血管壁への Fibrin の沈着に始まると述べ，Duguid 等②は冠動脈血栓の研究の際に，血栓が組織化されて動脈硬化症と区別し難いような病変となることを発見した。又 Leven⑮，及び Meessen⑯は電子顕微鏡で内膜に Fibrin を含む沈着を認め，この仮説を肯定している。松岡等④はセライトの静注は，組織学的に肺動脈に多数の血栓形成をみとめ，これは凝固能の亢進によつて線維素が折出し，血小板とともに血栓として血管壁に沈着したものと想像している。Fibrin は血液凝固の最終産物であり，Astrup⑪及び Copley⑱は血管内膜に繊細なフイルム状に人間の一生のうちに Fibrin

が沈着すると述べている。

著者は以上の実験の結果に於て，コレステロール，セライト投与のB群に最も著明な動脈硬化症の変化が，組織学的に大動脈，肺動脈に認められ松岡等④の報告と同様の結果を得た。

一方，Heparin 及び Heparin 類似物質（酸性ムコ多糖体）の抗凝血作用については1918年 Howell⑲が Heparin を分離し，1933年 Charles 及び Scott⑳が大量の抽出に成功して以来，血栓，栓塞症の治療ないし予防に用いられている。又これらのムコ多糖体の動脈硬化症の抑制作用，なかんずく脂血清浄作用については多くの報告がある。近年血栓，栓塞症の予防ないし治療に，1940年Link㉑によつて Dicumarol が紹介され，その後抗凝血薬として多くの薬剤が研究され今日広く使用されている。著者は⑨酸性ムコ多糖体の1種であるコンドロイチン硫酸が，高濃度で抗凝固作用のあることを報告したが，今回はセライトにより凝固能を亢進させて動脈硬化症の発生を促進させ，同時にコンドロイチン硫酸，インジオンが凝固阻止により，二次的に動脈硬化症発生を阻止的に働く結果を得た。コンドロイチン硫酸の動脈硬化症抑制作用に関する報告は多くその作用は動脈硬化症の成因の複雑さに似ている。

栗田は㉒家兎にコレステロールを投与し，之にコンドロイチン硫酸を用いて粥状硬化症発生の抑制作用を報告し，大土井㉓は家鶏を用いコレステロール粥状硬化症の抑制と，血清エラスターゼ抑制物質について報告した。又 Astrup㉔，Ciswicka 等㉕は動脈硬化症が凝固と線維素溶解に関係があり，抗凝血薬は凝固系の低下を起し，したがつて Fibrin の沈着率を低下すると述べている。

松岡等⑬はセライト静注は Contact factor を活性化すると報告したが，著者⑨の用いたコンドロイチン硫酸は主に凝固の全相に作用するが，なかんづく第Ⅶ因子の低下，血清トロンボプラスチン因子の抑制作用を認めたが，血清トロンボプラスチン形成抑制はセライトによる Intermediate Product I 以後の凝固過程の抑制か，或は又，Contact-factor そのものへの作用の抑制かの何れかと考えられるし，インジオンの抑制作用は松岡㉘等によれば Contact-factor そのものへの作用はないとされているので，今日一般に認められているプロトロンビン，第Ⅶ因子，第Ⅸ因子の低下の中トロンボプラスチン形成に関与する第Ⅸ因子の低下により抑制したものではないかと想像される。従つて，この両者は凝固の完了阻止作用，更に血栓の形成の抑制作用により，二次的に動脈硬化症発生を抑制するのではないかと考えられる。

以上，Duguid，Astrup の動脈硬化症の血栓説，或は Waldon㉗，Fullerton⑦，O'Brien⑧等の脂質の血液凝固亢進説などがあるが，著者の実験では血液の凝固能亢進抑制が動脈硬化症発生に，予防的に作用するのではないかと考えられる結果と併せてコンドロイチン硫酸に，従来の脂血清浄作用以外にも動脈硬化症発生に抗凝固作用が1種の役割を演じているのではないかと考えられる成績を得たので報告した。

結　論

家兎を用いて，コレステロール投与，これにコンドロイチン硫酸，インヂオンを投与して凝固能を低下せしめた場合に，動脈硬化の発生に如何なる影響を与えるかを，セライトを用いて凝固能を亢進せしめた場合と比較検討し，次の結論を得た。

1)　セライトにより血液の凝固能を亢進せしめると動脈硬化症の発生は促進された。

2)　コンドロイチン硫酸が，セライト静注による凝固能亢進を抑制し，家兎の動脈の病変は抑制された。

3)　抗凝血薬の投与もコンドロイチン硫酸と同様に動脈硬化症の発生を抑制した。

4)　これらの事実より，動脈硬化症の成因の1として血液の凝固性がある役割を演じていることと共に，コンドロイチン硫酸の動脈硬化阻止作用には，従来の作用以外に，この抗凝固性が何らかの意味で関与するのではないかと考えられる。

本論文の要旨は第26回日本循環器学会総会において発表した。

稿を終るにあたり，御指導御校閲を賜つた恩師松岡松三教授に深く感謝の意を表するとともに，古田精市博士をはじめ教室員各位の御援助を深謝する。

文　献

①V. Rokitansky, K.: Translated by George E. Day, London, Sydenham Society, 1852, Vol 4, P, 261.　②Duguid, T, B.: J. Path. & Bact. 58: 207, 1946.　③Astrup, T.: Wien, Ztschr. f. inn. Med. 9: 39, and 373, 1958.　④松岡松三・他：最新医学，18: 1, 239, 昭38.　⑤Anitschkow, N., and Chalatow, S.: Pathologischer Prozesse. Centralbl. f. allg. Path. u. Path. Anat., 24: 1, 1913.　⑥Kommerell, B.: J. Atheroscler. Res., 2: 233, 1962.　⑦Fullerton, W. H., David, E. J. A. and Andstasopoalos, G.: Brit. Med. J. 2:

250, 1953. ⑧O'Brien, J. R.: Lancet II, 690, 1955. ⑨上条信郎：信州医誌, 11, 276, 1962. ⑩Lee, R. I. and White, P. D.: Am. T. M. SC., 145: 495, 1913. ⑪松岡松三：日本医事新報, 1314: 37, 1949. ⑫柴田 進：臨床病理 補冊, No.4, 151, 1956. ⑬M. Matsuoka, S. Furuta, T. Ushimaru.: Jap. circulation Journal. Vol. 26, No.6, 519, 1962. ⑭Myasnikov, A. L., Kipschidze, N. N. and Tchazov, E. I.: American Heart Journal: 61: 1, 76, 1961. ⑮C. J. Leven: Lancet, I, (1955) 10. ⑯H. Meessen: Jahrb. ärztl. Fortbildg., 7 (1959) 57. ⑰T. Astrup: Blood, 11: 781, 1956. ⑱A. Copley: Lancet, I: 102, 1957. ⑲Howell, W. H., Holt, E.: A. J. Physiol. 47: 328, 1918. ⑳Charles, A. F., Scott, D. A.: J. Biol. Chem. 102: 425, 431, 437, 1933. ㉑Link, K. P.: Anticoagulant from Spoiled. Swect clover Hay. Harrey Lecture Series. 39, 162, 1944. ㉒栗田広志：Med. J. of Shinshu Univ. Vol 1. No.1, 23－33, 1955. ㉓大土井淑郎：東京医学雑誌, 67: 1291, 1959. ㉔Astup, T., and Sjolin, K. E.: Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 97, 852, 1958. ㉕Ciswicka, M. F., Michajlik, A., and Sznajoerman, M.: Acta. Med. Scand., 161: 391, 1958. ㉖松岡松三・他：臨床と研究, 40, 1, 1963. ㉗Waldon, T. M., and Duncan, G. G.: Amer. J. Med. 13: 365, 1954.