

カロニン硫酸及びヘパリンの血液凝固阻止作用の比較に関する研究

昭和34年1月13日 受付

信州大学医学部松岡内科教室 (指導: 松岡松三教授)

村 山 繁 光

Studies on the Anticoagulant Effect of Charonin-sulfuric Acid (No. 1~No. 5) and Heparin

Shigemitsu Murayama

Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Shinshu University

(Director: Prof. M. Matsuoka)

I. 緒 言

カロニン硫酸の凝血学的研究については、田宮・山本及び小田^①により試験管内並びに動物実験で血液凝固時間を著しく延長せしめることが認められ、石井^②も同様の知見を報告している。しかしその作用機序に関しては未だ明らかにされていなかった。先に松岡・村山等^③はカロニン硫酸の一種類を名大理学部江上教授から恵受を受け、その抗凝固作用について詳しく検討して報告した。

一方ヘパリンの抗凝血作用についても、Mc Lean 以来既に知られているが、その本態については未だ完全に解明されたとはいえない。しかし少なくとも抗プロトロンビン、抗トロンビン、抗トロンボプラスチン作用の3つがあるとされている。

著者は今回生化学研究所にて製造したSおよびNの含有量を異にする5種類のカロニン硫酸について凝血学的検索を行い、カロニン硫酸と化学構造の類似したヘパリンのそれをも詳しく検討し、両者の抗凝血作用と毒性を比較検討したので報告する。

II. 実験材料

カロニン硫酸は灰白色の粉末でナトリウム塩の形になつており、熱に対しては甚だ安定であるので、生理食塩水中に0.1%の割合に溶解せしめ、100°C、30分間滅菌した後密栓して氷室に保存し、用に臨んで、そのまままたは生理食塩水で適当に希釈する。5種類のカロニン硫酸の組成はTable 1の如くであるが、そのうちNo.1は生理食塩水で0.1%に溶解して氷室保存すると約2週間で白色のカビの様な浮游物の析出をみるが効力には変化はない。No.3のみが溶解後不透明である。溶液はいつでも安定で実験期間中全く認むべき変化を示さなかつた。

ヘパリンはアメリカの Red Star Chemical Co.

のもので、これもカロニン硫酸と同様に生理食塩水で0.1%の割合に溶解せしめ、用に臨んで生理食塩水で適当に希釈して使用した。

実験は試験管内及び生体内実験を行い、前者にはヒトならびにウサギの血液を用い、後者にはウサギを用いた。

Table 1. Analytic Data of Sodium Charoninsulfuric Acid

No.	Component			
	H ₂ O	S	N	ASHES
1	12.5	16.8	0.2	38.0
2	11.1	17.7	0.1	39.8
3	10.4	15.2	0.3	45.8
4	10.0	17.3	0.0	37.9
5	7.71	13.3	0.5	34.2

III. 実験方法ならびに成績

1) 試験管内実験

1. 血液凝固時間に及ぼす影響

方 法

0.1%カロニン硫酸溶液ならびに0.1%ヘパリン溶液を母液とし生理食塩水を以てTable 2に示す如き種々の希釈系列を作り、この希釈液0.1ccに対し同一のウサギまたは同一のヒト血液0.9ccを分注し、37°Cの恒温槽に入れてその凝固時間をLee-White法^④で測定した。

採血方法はウサギでは心臓穿刺により、ヒトでは肘静脈によつた。

実験成績

ウサギ血液を用いた場合: Table 2-1に示す如くカロニン硫酸ならびにヘパリンは濃度が増すにつれて

Table 2. Effect of Charoninsulfuric Acid and Heparin on Clotting Time

Table 2-1. Rabbit Blood Used

Rabbit	Tube	Charoninsulfuric Acid and Heparin Solution		Rabbit Blood	Clotting Time						Concentration of Charoninsulfuric Acid and Heparin r/ml
					Charoninsulfuric Acid					Heparin	
					No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5		
No.	%	ml	ml	min	min	min	min	min	min		
A	1	0.05	0.1	0.9	60.0	44.0	3hrs.	5hrs.	45.5	>24hrs.	50
	2	0.02	"	"	27.0	41.0	48.0	63.5	42.5	7hrs.	20
	3	0.005	"	"	24.0	17.5	17.5	25.0	21.0	4hrs.	5
	4	0.001	"	"	20.0	19.5	17.5	20.0	20.5	22.5	1
	5	0.0001	"	"	16.5	17.0	13.5	13.5	20.5	19.5	0.1
	6	0.85% NaCl sol.	"	"	12.5						0
B	1	0.05	"	"	58.5	48.0	160.0	6hrs.	42.0	>24hrs.	50
	2	0.02	"	"	31.0	36.5	54.0	76.0	38.0	6hrs.	20
	3	0.005	"	"	22.0	20.5	23.5	28.5	20.5	3hrs.	5
	4	0.001	"	"	17.5	18.0	21.0	22.0	16.5	26.5	1
	5	0.0001	"	"	14.5	13.5	13.5	14.0	14.0	17.5	0.1
	6	0.85% NaCl sol.	"	"	11.5						0

Table 2-2. Human Blood Used

Human	Tube	Charoninsulfuric Acid and Heparin Solution		Human Blood	Clotting Time						Concentration of Charoninsulfuric Acid and Heparin r/ml
					Charoninsulfuric Acid					Heparin	
					No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5		
No.	%	ml	ml	min	min	min	min	min	min		
A	1	0.1	0.1	0.9	>24hrs.	>24hrs.	>24hrs.	>24hrs.	>24hrs.	>24hrs.	100
	2	0.05	"	"	>24hrs.	>24hrs.	>24hrs.	>24hrs.	>24hrs.	>24hrs.	50
	3	0.02	"	"	36.5	67.0	84.5	>24hrs.	38.5	>24hrs.	20
	4	0.01	"	"	22.5	26.5	37.0	40.0	18.0	>24hrs.	10
	5	0.005	"	"	18.0	17.0	13.5	31.0	17.5	>24hrs.	5
	6	0.001	"	"	14.0	11.0	11.5	19.5	17.5	27.0	1
	7	0.0005	"	"	14.0	11.0	10.0	15.5	14.5	20.0	0.5
	8	0.0001	"	"	10.5	9.5	9.5	15.0	13.0	18.0	0.1
	9	0.00005	"	"	10.5	9.0	9.0	13.0	11.5	14.5	0.05
	10	0.85% NaCl sol.	"	"	9.0						0
B	1	0.1	"	"	>24hrs.	>24hrs.	>24hrs.	>24hrs.	>24hrs.	>24hrs.	100
	2	0.05	"	"	>24hrs.	>24hrs.	>24hrs.	>24hrs.	>24hrs.	>24hrs.	50
	3	0.02	"	"	50.0	79.5	80.0	>24hrs.	60.0	>24hrs.	20
	4	0.01	"	"	38.5	53.5	39.0	58.5	21.0	>24hrs.	10
	5	0.005	"	"	25.5	23.0	28.5	41.5	18.0	>24hrs.	5
	6	0.001	"	"	14.0	14.5	16.5	28.0	17.0	27.0	1
	7	0.0005	"	"	9.5	12.0	15.0	26.5	16.5	22.0	0.5
	8	0.0001	"	"	9.5	11.5	11.5	16.5	15.0	20.0	0.1
	9	0.00005	"	"	9.0	10.0	11.0	14.0	14.0	12.0	0.05
	10	0.85% NaCl sol.	"	"	8.0						

血液凝固時間は次第に延長する。すなわち1cc中に1rの濃度で既に軽度の延長を示し、1cc中50r以上の濃度では著明な延長を示すが、5種類のカロニン硫酸の中ではNo.4がもつともその作用が強くと5時間乃至6時間。次いでNo.3が3時間。No.1が約60分。No.2, No.5は大差なく、約40分乃至50分の凝固時間を示した。しかし5種類のカロニン硫酸はヘパリンには及ばず、ヘパリンは1cc中50rの濃度で24時間後においてもなお流動性を保つた。

ヒト血液を用いた場合：ヒトの血液を用い同様の実験を行つた成績はTable 2-2に示す如くで、その1例をFig. 1に示す。図の横軸はカロニン硫酸ならびにヘパリンの稀釈倍数の対数を示し、6は10の6乗倍すなわち1cc中に1rを含む意味である。血液凝固時間はカロニン硫酸No.1は0.05r/ccの濃度で軽度の延長を認め、濃度の増すにつれて加速度的に延長し50r/ccの濃度以上では24時間を経てもなお流動性を保つ。No.2は0.05r/cc乃至0.1r/ccの濃度で軽度の延長を示し、50r/ccの濃度以上では24時間を経ても、なお流動性を保つ。No.3はNo.1, No.2と大差なし。No.4は0.05r/ccにてNo.1, No.2にみられぬ延長を示し、20r/cc以上の濃度で既に24時間以上の延長を示している。No.5はTable 2-2に示す如く0.05r/ccの濃度でNo.1, No.2, No.3より軽度の延長を示すが、濃度が増しても大差をみない。ヘパリンは

0.05r/ccの濃度ではカロニン硫酸と大差ないがそれ以上に濃度が増すにつれ著明な延長を示して5r/ccの濃度で既に24時間を経ても流動性を保っている。従つてヘパリンはカロニン硫酸の4倍ないし20倍の強さを有することになる。

2. 血漿プロトロンビン時間（ブ時間）に及ぼす影響

実験方法

1. と同様にしてTable 3. に示す如きヘパリンならびにカロニン硫酸の稀釈系列を作り、この稀釈系列0.1ccに同一のウサギまたわ同一のヒトの蓚酸加血液($M/10$ 蓚酸ソーダ溶液 0.1cc+血液 0.9cc) 0.9ccを加えて直ちに遺沈し、血漿を分離してそのブ時間を松岡1段法^⑤によつて測定した。

実験成績

ウサギ血液を用いた場合：Table 3-1に示す。カロニン硫酸No.1は20r/cc程度まではほとんど変化を示さず、50r/ccで漸く軽度の延長を来す。No.2はNo.1と同様に50r/ccで漸く軽度の延長を来す。No.3は20r/ccで軽度の延長を来す。No.4は20r/cc程度より漸次軽度の延長を来している。No.5は20r/cc程度迄はほとんど変化を示さず、50r/ccで漸く軽度の延長を来す。ヘパリンの場合はカロニン硫酸No.3, No.4と大差なく20r/cc程度で漸く軽度の延長を来し、それ以下の濃度では対照と大差ない。

ヒト血液を用いた場合：Table 3-2に示すが特に作用の強いカロニン硫酸No.4とヘパリンとを比較した成績をFig. 2に示す。カロニン硫酸No.1は10r/cc程度の濃度より延長を示し、No.2は10r/cc程度より延長を示し、濃度が増すにつれて加速度的に延長する。No.3は0.5r/cc程度より延長を示し、0.5ccより5r/ccの間ではブ値に大差なく、10r/ccより濃度が増すにつれて加速度的に延長する。No.4は0.1~0.05r/cc程度より延長を示し、濃度が増すにつれて加速度的に延長し、100r/ccの濃度では180秒以上である。No.5は10r/ccの濃度で延長を示し、矢張り濃度の増すにつれて加速度的に延長を来す。ヘパリンは0.05r/ccの低濃度で延長を来すものがあり、5r/cc程度より著明な延長を示し加速度的に延長し、50r/ccないし100r/cc以上では180秒で尙凝固を示さない。

3. 安定因子、不安定因子およびプロトロンビンに及ぼす影響

先に実験2でヒトの蓚酸血漿にカロニン硫酸ならびにヘパリンを夫々加えた場合、カロニン硫酸ならびにヘパリンの濃度が増すにつれてブ時間が延長すること

Fig. 1

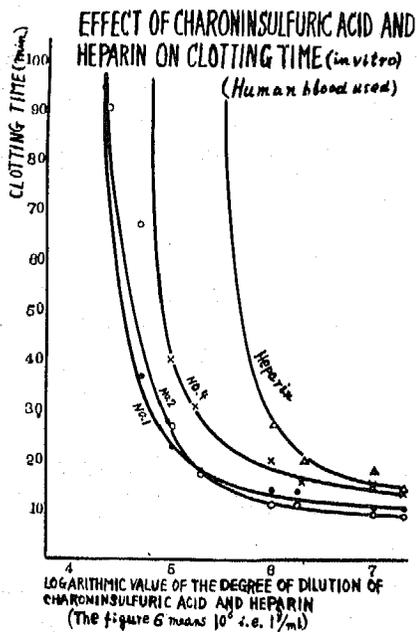
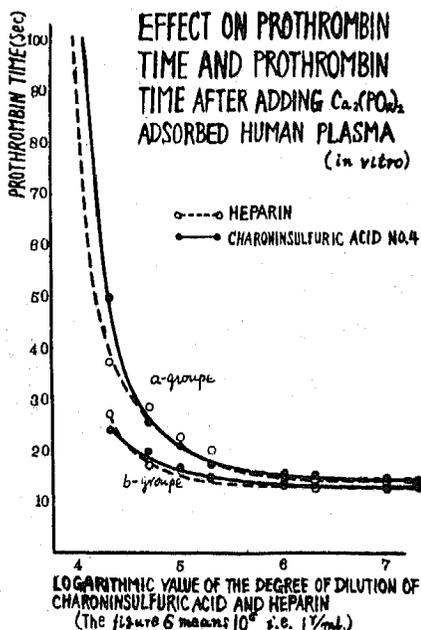


Table 3. Effect of Charoninsulfuric Acid and Heparin on Prothrombin Time

Table 3-1. Rabbit Blood Used

Rabbit	Tube No.	Charoninsulfuric Acid and Heparin Solution		Rabbit Oxalated Blood ml	Prothrombin Time						onceContration r/ml
					Charoninsulfuric Acid					Heparin	
					No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5		
		%	ml		sec	sec	sec	sec	sec	sec	
A	1	0.05	0.1	0.9	11.4	12.4	12.0	14.4	11.9	13.5	50
	2	0.02	"	"	9.9	10.1	10.2	12.5	9.2	11.2	20
	3	0.005	"	"	9.2	8.5	9.0	8.9	8.6	8.9	5
	4	0.001	"	"	8.9	8.8	8.7	8.5	8.7	8.6	1
	5	0.0001	"	"	8.9	8.7	8.5	8.6	8.6	8.5	0.1
	6	0.85% NaCl sol.	"	"	8.5						
B	1	0.05	"	"	11.1	11.8	12.4	14.1	11.3	12.7	50
	2	0.02	"	"	9.6	9.8	10.2	12.1	9.2	11.9	20
	3	0.005	"	"	9.0	8.7	8.6	9.1	8.4	8.8	5
	4	0.001	"	"	8.5	8.5	8.4	8.4	8.4	8.4	1
	5	0.0001	"	"	8.4	8.3	8.3	8.4	8.3	8.2	0.1
	6	0.85% NaCl sol.	"	"	8.2						

Fig. 2



a-groupe : Prothrombin Time
 b-groupe : Prothrombin Time After Adding $Ca_3(PO_4)_2$ Adsorbed Human Plasma

因子, 安定因子の總合作用によつて示されるので, この場合のp時間の延長はその何れの因子に対する阻止作用によるものであるかを知るべく次のような実験を行った。

a) 安定因子 (SPCA) に及ぼす影響

実験方法

安定因子は血液凝固過程において消費されず凝固完了後血清中に移行し血清中に多量に存在する。従つて安定因子の測定は血清を用いて行われているので次のようにして安定因子に及ぼす影響を検討した。

同一のヒトの血液を用い, カロニン硫酸ならびにヘパリンを加えぬ場合と, カロニン硫酸を 5r/cc, 20 r/cc の割合に加えた場合, ヘパリンを 1r/cc の割合に加えた場合 (凝固性がカロニン硫酸に比して遙かに強く 5r/cc でも凝固しないため) のそれぞれについて凝固時間を測定し, 凝固完了後 2 時間以上を経た血清中の安定因子を de Vries 法⁽⁶⁾の松岡変法⁽⁷⁾で測定した。

実験成績

Table 4 に示す如くカロニン硫酸は No.1, No.2, No.3, No.4, No.5 の何れの場合においても凝固時間は対照に比して延長するが, 安定因子は対照に比して増加しているかまたは不変であつて減少はみとめられない。これに反してヘパリンは凝固時間の延長と共に安定因子は対照に比して何れも減少している。

以上の実験によりカロニン硫酸は安定因子には影響

を認めたが, 1 段法p時間はプロトロンビン, 不安定

Table 3-2. Human Blood Used
 (A) Effect of Charoninsulfuric Acid and Heparin on Prothrombin Time
 (B) Effect of $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ Adsorbed Plasma on the Prolonged Prothrombin Time Induced by Charoninsulfuric Acid and Heparin

Human No.	Tube No.	Charoninsulfuric Acid and Heparin Solution		Human Oxalated Blood ml	Prothrombin Time (A)										Prothrombin Time (B)																				
		%	ml		Charoninsulfuric Acid					Heparin					Charoninsulfuric Acid					Heparin															
					No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5						
					sec	sec	sec	sec	sec	sec	sec	sec	sec	sec	sec	sec	sec	sec	sec	sec	sec	sec	sec	sec	sec	sec	sec	sec	sec						
I	1	0.1	(100r)	0.1	46.6	106.0	120.0	>180.0	80.0	>180.0	22.4	41.9	42.1	126.8	37.6	22.3	28.6	32.3	130.6	23.6	22.3	28.6	32.3	130.6	23.6	>180.0	22.3	28.6	32.3	130.6	23.6	>180.0			
	2	0.05		"	31.2	80.0	81.4	52.2	38.4	96.7	17.3	25.4	26.8	25.4	16.1	17.3	21.1	20.3	27.7	19.9	17.3	21.1	20.3	27.7	19.9	44.0	17.3	21.1	20.3	27.7	19.9	44.0			
	3	0.02		"	19.2	18.6	26.8	28.6	25.1	31.2	15.2	15.2	16.4	22.2	14.7	15.2	14.9	14.8	17.1	14.8	15.2	14.9	14.8	17.1	14.8	19.0	15.2	14.9	14.8	17.1	14.8	19.0			
	4	0.01	(10r)	"	16.6	17.0	20.2	21.5	18.2	23.1	14.3	14.3	15.1	18.6	14.0	14.3	13.1	14.6	15.8	12.6	18.4	14.3	13.1	14.6	15.8	12.6	18.4	14.3	13.1	14.6	15.8	12.6	18.4		
	5	0.005		"	15.0	15.4	16.2	18.0	13.9	20.6	14.3	14.5	14.5	15.2	12.8	14.3	12.2	12.3	13.5	12.9	14.5	11.5	12.2	12.3	13.5	12.9	14.5	11.5	12.2	12.3	13.5	12.9	14.5		
	6	0.001	(1r)	"	15.4	15.8	16.0	16.5	13.4	16.4	13.4	13.8	14.8	15.0	13.2	13.4	13.8	14.8	15.0	13.2	13.4	13.8	14.8	15.0	13.2	13.4	13.8	14.8	15.0	13.2	13.4	13.8	14.8		
	7	0.0005		"	16.0	16.0	16.4	16.1	14.2	16.0	13.8	14.8	14.8	14.9	13.4	13.8	14.8	14.8	14.9	13.4	13.4	13.8	14.8	14.8	14.9	13.4	13.8	14.8	14.8	14.9	13.4	13.4	13.8	14.8	
	8	0.0001	(0.1r)	"	16.0	15.2	15.0	15.9	13.9	13.9	15.1	14.9	14.9	14.8	13.7	14.7	14.9	14.9	14.8	13.7	13.7	14.9	14.9	14.8	13.7	13.7	14.7	14.9	14.8	13.7	13.7	14.7	14.9	14.8	
	9	0.00005		"	15.1	15.2	15.0	15.4	14.4	15.4	15.1	14.9	14.8	14.8	14.4	14.7	14.9	14.9	14.8	13.7	13.0	15.1	14.9	14.8	14.8	13.7	13.0	15.1	14.9	14.8	14.8	14.4	14.4	14.8	
	10	0.85%	NaCl sol.	"	15.0	15.0	15.0	15.4	14.4	14.4	15.1	14.9	14.8	14.8	14.4	14.7	14.9	14.9	14.8	13.7	13.0	15.1	14.9	14.8	14.8	13.7	13.0	15.1	14.9	14.8	14.8	14.4	14.4	14.8	
II	1	0.1	(100r)	"	30.5	68.5	82.8	>180.0	45.0	>180.0	30.5	68.5	82.8	>180.0	45.0	30.5	68.5	82.8	>180.0	45.0	30.5	68.5	82.8	>180.0	45.0	30.5	68.5	82.8	>180.0	45.0	30.5	68.5	82.8	>180.0	
	2	0.05		"	23.0	32.9	29.8	50.4	27.6	160.0	23.0	32.9	29.8	50.4	27.6	23.0	32.9	29.8	50.4	27.6	160.0	23.0	32.9	29.8	50.4	27.6	160.0	23.0	32.9	29.8	50.4	27.6	160.0	23.0	32.9
	3	0.02		"	16.9	16.5	18.5	43.8	17.4	54.6	16.9	16.5	18.5	43.8	17.4	16.9	16.5	18.5	43.8	17.4	54.6	16.9	16.5	18.5	43.8	17.4	54.6	16.9	16.5	18.5	43.8	17.4	54.6	16.9	16.5
	4	0.01	(10r)	"	15.5	15.9	16.4	27.7	15.5	42.8	15.5	15.9	16.4	27.7	15.5	15.5	15.9	16.4	27.7	15.5	42.8	15.5	15.9	16.4	27.7	15.5	42.8	15.5	15.9	16.4	27.7	15.5	42.8	15.5	15.9
	5	0.005		"	11.5	12.1	15.3	22.6	14.0	27.2	11.5	12.1	15.3	22.6	14.0	11.5	12.1	15.3	22.6	14.0	27.2	11.5	12.1	15.3	22.6	14.0	27.2	11.5	12.1	15.3	22.6	14.0	27.2	11.5	12.1
	6	0.001	(1r)	"	14.2	14.3	15.2	17.5	14.4	17.7	14.2	14.3	15.2	17.5	14.4	14.2	14.3	15.2	17.5	14.4	17.7	14.2	14.3	15.2	17.5	14.4	17.7	14.2	14.3	15.2	17.5	14.4	17.7	14.2	14.3
	7	0.0005		"	14.7	14.5	15.5	17.3	14.5	17.2	14.7	14.5	15.5	17.3	14.5	14.7	14.5	15.5	17.3	14.5	17.2	14.7	14.5	15.5	17.3	14.5	17.2	14.7	14.5	15.5	17.3	14.5	17.2	14.7	14.5
	8	0.0001	(0.1r)	"	14.7	14.5	14.5	15.6	14.5	15.8	14.7	14.5	14.5	15.6	14.5	14.7	14.5	14.5	15.6	14.5	15.8	14.7	14.5	14.5	15.6	14.5	15.8	14.7	14.5	14.5	15.6	14.5	15.8	14.7	14.5
	9	0.00005		"	14.7	14.6	14.5	15.3	14.6	15.4	14.7	14.6	14.5	15.3	14.6	14.7	14.6	14.5	15.3	14.6	15.4	14.7	14.6	14.5	15.3	14.6	15.4	14.7	14.6	14.5	15.3	14.6	15.4	14.7	14.6
	10	0.85%	NaCl sol.	"	14.5	14.6	14.5	15.3	14.6	15.4	14.5	14.6	14.5	15.3	14.6	14.5	14.5	14.6	14.5	15.3	14.6	15.4	14.5	14.6	14.5	15.3	14.6	15.4	14.5	14.6	14.5	15.3	14.6	15.4	14.5

Table 4. Effect of Charoninsulfuric Acid and Heparin on Stable Factor (SPCA) in Human Serum (Experiment in Vitro)

	HUMAN BLOOD		Case 1.		Case 2.	
			Clotting Time (min)	SPCA (%)	Clotting Time (min)	SPCA (%)
	Control		8.5	37.2	10.0	62.1
No. 1	Containing of Charoninsulfuric Acid (Per ml)	5r	25.5	96.4	18.0	98.7
		20r	50.0	128.5	36.5	138.8
No. 2	"	5r	23.0	150.0	17.0	93.8
		20r	79.5	121.3	67.0	85.0
No. 3	"	5r	28.5	114.2	23.5	84.1
		20r	80.0	128.5	84.5	94.3
	Control		10.0	31.3	11.0	48.3
No. 4	Containing of Charoninsulfuric Acid 5r/ml		41.5	44.2	31.0	72.1
No. 5	"		19.5	31.6	17.5	73.3
Heparin	Containing of Heparin 1r/ml		27.0	13.3	27.0	38.6

を与えず、ヘパリンはこれと異り安定因子の作用を阻止するものと考えられる。

b) 不安定因子に及ぼす影響

実験方法

不安定因子は血漿中に存在し、尿酸血漿を $\text{Ca}_8(\text{PO}_4)_2$ で吸着するとプロトロンビンと安定因子は吸着され不安定因子が残るので、ヒトの尿酸血漿を Quick® に従って $\text{Ca}_8(\text{PO}_4)_2$ で吸着し、プロトロンビン及び安定因子を除去し、この吸着血漿（不安定因子を含む）の 0.1cc をヒトの炭素硫酸加尿酸血漿及びヘパリン加尿酸血漿 0.1cc に加え、時間を測定した。

実験成績

Table 3-2 (B) および Fig. 2 (b-group) に示す如く、吸着血漿を加えた場合のプ時間は著しく短縮する。すなわち炭素硫酸 No.1 は 20r/cc 以下の濃度では対照値に復するが、または対照値以下に短縮し、50r/cc 以上の濃度になつて次第に延長する。No. 2 は 20r/cc 以下の濃度では対照値以下ないし対照値に復するが、50r/cc 以上の濃度では次第に延長する。No.3 は 20r/cc 以下の濃度では対照値以下ないし対照値に復するが 50r/cc 以上の濃度では次第に延長する。No.4 は 5r/cc 以下の濃度では対照値以下乃至対照値に復するが 10r/cc 以上の濃度では次第に延長する。No.5 は 50r/cc 以上の濃度で延長を認め 20r/cc

以下の濃度では対照値以下乃至対照値に復する。ヘパリンに於ても 5r/cc 以下の濃度では対照値に復するが 10r/cc 以上の濃度では延長を示す。以上の成績から炭素硫酸及びヘパリンによるヒト尿酸血漿のプ時間延長は不安定因子の作用の阻止によるものと考えられる。

c) プロトロンビンに及ぼす影響

尿酸血漿を $\text{Ca}_8(\text{PO}_4)_2$ で吸着すると、プロトロンビンと安定因子は吸着されるが吸着されたプロトロンビンと安定因子はクエン酸ソーダによつて再び溶離されるので次のようにして検討した。

実験方法 その 1

Quick® に従いヒトの尿酸血漿を $\text{Ca}_8(\text{PO}_4)_2$ で吸着して吸着血漿を得る。炭素硫酸ならびにヘパリンを加えぬ場合の吸着血漿を A とし血液 1.0cc に 20r/cc の割合に炭素硫酸を加えた場合の吸着血漿を B とし、同様にヘパリンを加えた場合の吸着血漿を C とする。

次に洗渣 ($\text{Ca}_8(\text{PO}_4)_2$) を生理食塩水 2cc で 2 回洗滌遠沈した後、洗渣に 0.2M クエン酸ソーダをもとの血漿量の $1/10$ 量加えてガラス棒で充分攪拌し、吸着されたプロトロンビンおよび安定因子を再び溶離 (eluate) する。この eluate 中にはプロトロンビンおよび安定因子がもとの血漿中の 10 倍の濃度に含まれて

いる筈である。カロニン硫酸およびヘパリンを加えぬ血漿の eluate を a とし、カロニン硫酸を加えた血漿の eluate を b とし、ヘパリンを加えた血漿の eluate を c とする。吸着血漿 0.09cc と eluate 0.01cc を加えて、そのブ時間を測定する。a+A, b+B, c+C はそれぞれもとの血漿のブ時間を示す筈である。

実験成績

Table 5 に示す。a+A, b+B, c+C の示すブ時間はカロニン硫酸およびヘパリンを加えぬ場合の原血漿ブ時間及び血液 1.0cc につきカロニン硫酸またはヘパリンを 20 γ /cc の割合に加えた場合の原血漿ブ時間に近い値を示す。

しかるに a+B, a+C は a+A に比しブ時間が延長する。このことは B, C 中の不安定因子が A のそれに比べて作用の低下していることを示し、この方法によつてカロニン硫酸及びヘパリンが不安定因子に拮抗作用を有することを再確認し得たわけである。

一方 a+A, b+A および c+A を比べると a+A よりも b+A, c+A のブ時間が延長している。こゝで A すなわち不安定因子は同一であるから、このブ時間の延長は b および c によるものでカロニン硫酸およびヘパリンは eluate すなわちプロトロンビンおよび安定

因子の作用を減弱せしめることを示していることになるが、すでに前項 3-(a) で示した如くカロニン硫酸は安定因子を減弱せしめる作用を有しないから、本実験の成績からカロニン硫酸が抗プロトロンビン作用を有することがわかる。

ヘパリンはすでに述べた如く安定因子を減弱せしめる作用を有しているのて、本実験の成績から抗プロトロンビン作用を有するとは直ちに断定出来ない。そこでヘパリンにつき次の実験を行つた。

実験方法 その 2

Quick[®]に従いヒトの檸檬血漿を $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ で吸着して吸着血漿を得る。別にヒトの血液の凝固完了後 2 時間以上を経た血清をうる。

この吸着血漿中には不安定因子が、血清中には安定因子がある。

次にヘパリンを加えない正常吸着血漿とヘパリン加吸着血漿を本項の実験方法その 1 に述べた如く 0.2M クエン酸ソーダによつて eluate する。この eluate 中にはプロトロンビンおよび安定因子がもとの血漿中の 10 倍の濃度に含まれる筈である。そこで吸着血漿 0.09cc と eluate 0.01cc に更に血清 0.1cc を加えてそのブ時間を測定する。

Table 5. Effect of Charoninsulfuric Acid and Heparin on Prothrombin and Labile Factor in Human Plasma (in vitro)

Human Oxalated Blood		Prothrombin Time		Prothrombin Time
		sec		sec
No. 1	Control	13.3	a 0.01ml+ A 0.09ml	16.6
			b " + A "	20.3
			c " + A "	28.5
	Containing 20 γ of Charoninsulfuric Acid Per ml	36.3	a " + B "	24.1
			b " + B "	41.0
	Containing 20 γ of Heparin Per ml	121.6	a " + C "	21.0
c " + C "			125.5	
No. 2	Control	13.6	a 0.01ml+ A 0.09ml	16.0
			b " + A "	23.4
			c " + A "	30.1
	Containing 20 γ of Charoninsulfuric Acid Per ml	41.5	a " + B "	25.1
			b " + B "	43.3
	Containing 20 γ of Heparin Per ml	120.0	a " + C "	21.5
c " + C "			124.0	

A: $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ adsorbed control plasma.

B: $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ adsorbed plasma containing Charoninsulfuric Acid.

C: $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ adsorbed plasma containing Heparin.

a: Sodium citrate eluate of control plasma.

b: Sodium citrate eluate of plasma containing Charoninsulfuric Acid.

c: Sodium citrate eluate of plasma containing Heparin.

実験成績

3例の成績をTable 6に示す。ヘパリンを加えない場合の eluate に吸着血漿および血清を加えて測定した時間はヘパリンを加えない場合の血漿時間と同じ値を示す。

しかるにヘパリンを加えた場合の eluate に吸着血漿および血清を加えて測定した時間はヘパリン加血漿の時間に比して著しく短縮はするが、ヘパリンを加えぬ場合の eluate に吸着血漿および血清を加えて測定した時間より著明に延長している。このことは不安定因子および安定因子を充分に与えても対照に比し延長を示すのであつて、eluate 中のプロトロンビンに対する阻止作用のあることを意味するものである。故にヘパリンはカロン硫酸と同様にプロトロンビンに拮抗作用を有する事を確認し得たわけである。

4. トロンボプラスチン形成 (トプ形成) に及ぼす影響

トプ形成試験法として Biggs-Douglas^④法を用いて次のように行つた。

実験方法

同一のヒトの血液にカロン硫酸およびヘパリンを加えぬ場合と 5r/cc の割合にそれぞれ加えた場合 (之はヘパリンが 5r/cc より濃度の大きなるところでは凝固しないためカロン硫酸もヘパリンと同じ濃度の 5r/cc をとつた。) 更にカロン硫酸では 20r/cc の割合に加えた場合について、凝固完了後 2 時間以上を経た血清を分離しこれを生理食塩水にて 10 倍に稀釈する。次に同一人の蔭酸加血液についてカロン硫酸を 5r/cc, 20r/cc の割合に加えたものおよびヘパリンを 5r/cc の割合に加えて血漿を分離し、これらの血漿 1.0cc につき BaSO₄ 100mg を加えて吸着し得た吸着血漿を生理食塩水で 5 倍に稀釈する。別に健康人の血小板浮遊液を作る。このようにして得た 10 倍稀釈血清, 5 倍稀釈吸着血漿, 血小板浮遊液を組合せ Biggs-Douglas 法によりトプ形成を検する。

実験成績

Table 7 およびその 1 例を図示すれば Fig. 3, Fig.

4 の如くである。カロン硫酸およびヘパリンを加えない血漿と、カロン硫酸 (No.1, No.2, No.3) またはヘパリンのそれぞれを 5r/cc の割合に加えた血清の組合せにおいて、いずれの場合もトプ形成は正常またはそれ以上に達するが No.4, No.5 およびヘパリンはやゝ不良である。

これに反してカロン硫酸またはヘパリンを加えた血漿と加えない血清の組合せではトプ形成が不良で、No.4 では正常の 70% 程度であり、ヘパリンは 82% 以下である。しかるにカロン硫酸またはヘパリンを 20r/cc の割合に加えた血漿と加えない血清の組合せではトプ形成が更に不良で、No.4 は正常の 40% にすぎない。またヘパリンの場合も正常の 70% にすぎない。すなわち 20r/cc の濃度に至つて著明な差を生じ、カロン硫酸の方がヘパリンよりトプ形成は不良である。

以上の実験成績よりヘパリン、カロン硫酸ともにトロンボプラスチン形成を阻止し、それはトロンボプラスチン形成に関与する血漿因子の阻止作用によるものと考えられる。

5. プロトロンビン消費に及ぼす影響

正常の凝固過程においてプロトロンビンはその大部分が消費され、その消費状況は凝固過程が正常であるか病的であるかの 1 つの指標となる。教室の萩原の研究によると凝固完了後 2 時間を経た血清中には約 15% が残存するにすぎない。そこでカロン硫酸、ヘパリンがプロトロンビンの消費に如何なる影響を与えるかを検討した。

実験方法

Quick^⑤に従い凝固完了後 2 時間を経た折出した血清 0.1cc にヒトの Ca₁₀(PO₄)₂ 吸着血漿 0.1cc を加えてその時間を測定し血清中に残存するプロトロンビン量とする。この様な検査を同一人の血液についてカロン硫酸またはヘパリンを加えぬ場合とカロン硫酸では 5r/cc および 20r/cc の割合に加えた場合、またヘパリンでは 1r/cc の割合に加えた場合について行つた。

Table 6. Effect of Heparin on Prothrombin in Human Plasma

Human Oxalated Plasma	Prothrombin Time	Eluate		Prothrombin Time sec
Control	12.5 sec	Control	+ ad. Plasma + Serum	12.5 sec
+ Heparin No. 1	> 3 min	No. 1	+ " + "	38.6
" No. 2	> 3 min	No. 2	+ " + "	38.7
" No. 3	> 3 min	No. 3	+ " + "	39.3

ad. Plasma: Ca₁₀(PO₄)₂ adsorbed control plasma.

Table 7. Effect of Charoninsulfuric Acid and Heparin on Thromboplastin Generation (Method of Biggs-Douglas)

	Serum	BaSO ₄ Treated Plasma	Minutes of Incubation					
			1	2	3	4	5	6
			Percentage of Generated Thromboplastin					
Charonin No. 1	Normal	Containing Charonin	33	67	79	78	75	73
	Containing Charonin	Normal	19	91	105	110	98	95
No. 2	Normal	Containing Charonin	32	68	85	73	79	78
	Containing Charonin	Normal	23	108	115	103	96	93
No. 3	Normal	Containing Charonin	27	68	78	86	72	72
	Containing Charonin	Normal	15	68	100	108	95	93
No. 4	Normal	Containing Charonin	28	69	69	69	65	63
	Containing Charonin	Normal	13	93	85	89	89	85
No. 5	Normal	Containing Charonin	36	85	76	69	71	70
	Containing Charonin	Normal	18	89	91	83	79	79
Heparin	Normal	Containing Heparin	35	60	82	75	70	70
	Containing Heparin	Normal	42	76	85	88	75	75
control	Normal	Normal	32	78	95	100	100	98

5γ/ml of Charoninsulfuric Acid and Heparin are contained in blood or oxalated blood. Normal human Platelets were used in every test.

Fig. 3

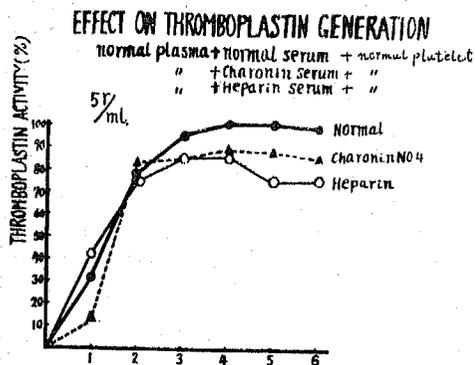
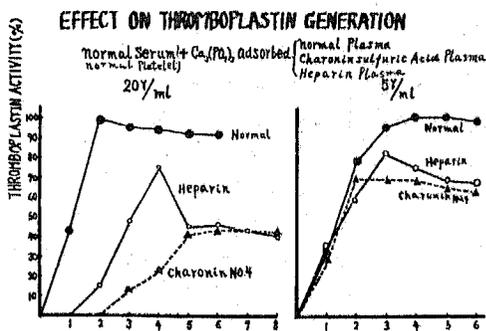


Fig. 4



実験成績

各種類のカロニン硫酸およびヘパリンの成績を Table 8 に示す。カロニン硫酸を加えた場合は血清のプ時間 (Prothrombin Consumption Time) は何れも対照に比し延長しており、これは血清中のプロトロンビン含有量が対照に比し少ないことと換言すればカロニン硫酸はプロトロンビンの消費を不良ならしめぬことを示す。

これに反してヘパリンを加えた場合は血清のプ時間は何れも対照に比して短縮しており、これは血清中の

プロトロンビン含有量が対照に比して多いことと換言すればヘパリンはプロトロンビンの消費を不良ならしめることを示すものである。

6. 試験管内実験成績の小括

以上の試験管内における実験成績を要約すると次の如くである。

a) カロニン硫酸およびヘパリンは共に凝固時間を延長せしめ、ヘパリンはカロニン硫酸の約4倍乃至20倍の強さを有して居り、カロニン硫酸相互の間では No.4 が最も強い。

b) プ時間はウサギ尿酸血漿の場合はカロニン硫酸

Table 8. Effect of Charoninsulfuric Acid and Heparin on Prothrombin Consumption (Experiment in Vitro) (Human Blood Used)

Charoninsulfuric Acid and Heparin	Containing of Charoninsulfuric Acid and Heparin Per ml	Case 1.		Case 2.		Case 3.	
		Clotting Time	Prothrombin Consumption Time	Clotting Time	Prothrombin Consumption Time	Clotting Time	Prothrombin Consumption Time
		(min)	(sec)	(min)	(sec)	(min)	(sec)
Charoninsulfuric Acid No. 1	Control	8.5	25.2	8.0	26.7	9.5	31.1
	5 γ	25.5	39.7	22.5	36.9	18.0	66.7
	20 γ	50.0	>180.0	47.0	74.5	36.5	>180.0
No. 2	5 γ	23.0	>180.0	22.5	67.1	17.0	61.9
	20 γ	79.5	>180.0	68.5	54.5	67.0	53.0
No. 3	5 γ	28.5	69.5	23.0	71.4	13.5	59.0
	20 γ	80.0	>180.0	78.5	59.2	84.5	49.5
No. 4	5 γ	46.0	75.4	44.0	63.7	38.5	65.9
	10 γ	62.5	58.1	58.0	58.3	54.0	51.1
No. 5	5 γ	17.0	49.5	18.0	44.1	18.5	54.5
	20 γ	58.5	67.0	53.5	58.9	50.5	73.9
Heparin	Control	7.5	21.4	8.0	23.5	8.0	24.2
	1 γ	34.5	13.9	34.5	14.0	36.0	15.9

Prothrombin Consumption Time: 120 Minutes Value After Formation of a Solid Clot

No.1, No.2, No.5 は濃度が 20 γ /cc 迄は殆ど変化なく, No.3, No.4 が 20 γ /cc の濃度より軽度の延長を示し, ヘパリンも 20 γ /cc の濃度より軽度の延長を示す。

ヒト蓚酸血漿の場合では, カロニン硫酸 No.4 およびヘパリンは 0.05 γ /cc 乃至 0.1 γ /cc の濃度から軽度の延長を示し, No.1, No.2, No.5 のカロニン硫酸では 10 γ /cc から延長を示した。No.3 は 0.5 γ /cc より延長を示し, 10 γ /cc より加速度的な延長を示す。

c) ヒトの蓚酸血液にカロニン硫酸またはヘパリンを加えた場合のフ時間の延長はヒトの $\text{Ca}_8(\text{PO}_4)_2$ の吸着血漿を加えるといづれも短縮する。従つて両者は不安定因子の作用を阻止する。

d) カロニン硫酸 No.1~No.5 の存在によりヒトの血漿中の安定因子は不変 (No.5) 乃至増加 (No.1~No.4) し, ヘパリンの場合は減少する。

e) $\text{Ca}_8(\text{PO}_4)_2$ による吸着と 0.2M クエン酸ソーダによる溶離 (eluate) により, カロニン硫酸およびヘパリンはヒトの蓚酸血漿中の不安定因子のみならず, プロトロンビンの作用を阻止する。

f) カロニン硫酸およびヘパリンはトブ形成を阻止し, その作用は血漿因子において著しい。

g) カロニン硫酸はプロトロンビン消費をむしろ亢

進せしめるが, ヘパリンはプロトロンビンの消費を不良ならしめる。

2) 生体内 (in vivo) における実験

1. 血液凝固時間に及ぼす影響

実験方法

0.1% カロニン硫酸およびヘパリン溶液をウサギの耳静脈内に体重 1kg 当り 1mg の割合で注射し, 注射前および注射後 15 分毎に採血して凝固時間 (Lee-White 法)⁽⁴⁾ を測定した。

実験成績

ウサギ 4 羽について得た成績を Table 9 に示しその 1 例を Fig. 5 に図示する。カロニン硫酸は No.4, No.1, No.3 が注射後 15 分に著明に延長し, 60 分前後で旧値に復する。No.2 は軽度延長か不変で, No.5 は不変かむしろ短縮した。ヘパリンは注射後 15 分で著明な延長を示し, 2 時間後にも尚旧値に復さない。

2. プロトロンビン時間, 血小板数, 赤血球数, 白血球数に及ぼす影響

実験方法

1. と同様にして注射前及び注射後 15 分毎に採血して血漿フ時間 (松岡 1 段法⁽⁶⁾), 血小板数 (Rees-Ecker 直接法⁽¹¹⁾), 赤血球数, 白血球数を測定した。

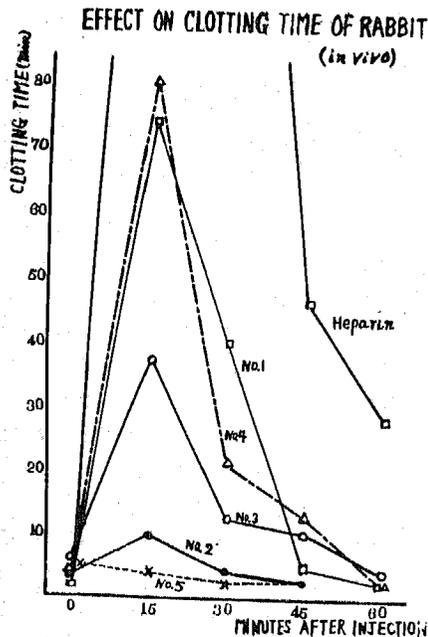
実験成績

Table 9. Effect of Intravenous Injection of Charoninsulfuric Acid and Heparin on Clotting Time of Rabbit (Dosis: 1mg/kg, Body Weight)

Charoninsulfuric Acid No. 1					Charoninsulfuric Acid No. 2					Charoninsulfuric Acid No. 3							
Rabbit No.	Before	Minutes after the Injection				Rabbit No.	Before	Minutes after the Injection				Rabbit No.	Before	Minutes after the Injection			
		15	30	45	60			15	30	45	60			15	30	45	60
1	2.5	29.0	13.0	4.5	2.5	1	2.5	4.5	5.3	4.0	1	4.0	34.0	8.0	5.0	3.0	
2	2.5	74.0	40.0	4.5	3.0	2	3.5	7.5	3.5	3.5	2	4.0	37.5	16.5	10.5	4.5	
3	2.5	19.5	4.5	3.0	2.5	3	3.5	10.0	4.5	3.0	3	3.0	21.5	11.5	7.5	3.0	
4	2.5	41.5	7.5	2.5	2.5	4	3.5	4.0	3.5	2.5	4	3.5	14.5	6.5	3.5	3.5	

Charoninsulfuric Acid No. 4					Charoninsulfuric Acid No. 5					Heparin									
Rabbit No.	Before	Minutes after the Injection				Rabbit No.	Before	Minutes after the Injection				Rabbit No.	Before	Minutes after the Injection					
		15	30	45	60			15	30	45	60			15	30	45	60	90	120
1	3.0	80.0	21.5	13.5	3.0	1	3.0	2.5	2.5	2.5	1	2.5	>24 hrs	210	46.5	29.0	8.5	7.5	
2	3.0	37.0	15.0	13.0	4.5	2	4.0	4.5	2.0	2.5	2	3.5	>24 hrs	>12 hrs	08	042.0	21.0		
3	2.0	63.0	18.5	7.5	2.5	3	4.0	3.5	3.0	3.0	3	3.0	>24 hrs	90.0	32.0	25.0	14.0		
4	2.0	60.0	45.0	17.0	3.5	4	3.5	3.0	2.5	3.5	4	3.5	>24 hrs	80.0	24.5	16.0	8.0		

Fig. 5



ブ時間の成績は Table 10, Fig. 6に示した如くカロン硫酸 (No.1~No.5) およびヘパリンのいづれに於ても著明な変動を示さない。

血小板数は Table 11, Fig. 7に示す如くカロン硫酸およびヘパリン注射後15分乃至30分で一過性に減少する。

赤血球数には Table 12に示す如く著明な変動をみない。

白血球数には Table 13に示す如く、カロン硫酸 (No.1~No.5) およびヘパリン注射後15分または30分に一時的に減少する。

3. 安定因子に及ぼす影響

実験方法

体重1kg 当り1mgの静注前および注射後15分、45分、60分の血液を採取し、それぞれの凝固完了後2時間以上を経た血清中の安定因子を de Vries 法⁽⁶⁾の松岡変法⁽⁷⁾で測定した。

実験成績

4羽のウサギについて得た成績を Table 14に示し、その1例を Fig. 8に図示する。試験管内実験の成績

Table 10. Effect of Intravenous Injection of Charoninsulfuric Acid and Heparin on Prothrombin Time (sec) of Rabbit (Dosis: 1mg/kg, Body Weight)

Charoninsulfuric Acid No. 1					Charoninsulfuric Acid No. 2					Charoninsulfuric Acid No. 3							
Rabbit No.	Befo- re	Minutes after the Injection				Rabbit No.	Befo- re	Minutes after the Injection				Rabbit No.	Befo- re	Minutes after the Injection			
		15	30	45	60			15	30	45	60			15	30	45	60
1	7.2	7.3	7.0	7.2	7.3	1	9.0	8.8	9.2	9.0	1	7.9	8.1	7.8	7.8	7.8	
2	6.3	6.6	6.4	6.1	6.2	2	8.8	8.8	9.0	9.0	2	7.8	8.2	7.6	7.7	7.6	
3	6.9	7.0	7.0	6.9	7.0	3	6.4	6.2	6.3	6.3	3	8.7	8.7	8.0	8.0	8.2	
4	8.4	8.9	8.6	8.5	8.6	4	5.5	5.4	5.8	6.0	4	8.0	8.5	7.6	7.5	7.6	

Charoninsulfuric Acid No. 4					Charoninsulfuric Acid No. 5					Heparin									
Rabbit No.	Befo- re	Minutes after the Injection				Rabbit No.	Befo- re	Minutes after the Injection				Rabbit No.	Befo- re	Minutes after the Injection					
		15	30	45	60			15	30	45	60			15	30	45	60	90	120
1	8.0	13.3	8.0	7.6	7.6	1	7.3	7.1	7.6	7.5	7.2	1	8.5	9.4	8.6	9.2	8.6	8.7	9.7
2	7.9	7.5	7.5	7.6	7.6	2	6.7	6.9	7.3	7.2	2	8.9	9.6	9.2	8.4	8.3	8.5		
3	7.8	7.9	7.8	8.1	8.0	3	7.2	6.8	6.6	7.1	3	7.2	7.8	7.8	7.8	7.9			
4	8.3	7.9	8.3	7.6	7.8	4	7.0	7.1	6.9	6.8	4	7.6	8.1	7.5	7.0	7.2			

Table 11. Effect of Intravenous Injection of Charoninsulfuric Acid and Heparin on Platelet Count ($\times 10^4$) of Rabbit (Dosis: 1mg/kg, Body Weight)

Charoninsulfuric Acid No. 1					Charoninsulfuric Acid No. 2					Charoninsulfuric Acid No. 3							
Rabbit No.	Befo- re	Minutes after the Injection				Rabbit No.	Befo- re	Minutes after the Injection				Rabbit No.	Befo- re	Minutes after the Injection			
		15	30	45	60			15	30	45	60			15	30	45	60
1	40.8	23.6	31.2	43.0	1	38.4	34.5	29.4	36.7	1	39.1	33.9	34.8	40.2	37.8		
2	36.2	30.2	34.6	38.4	2	34.0	30.6	26.2	35.7	2	37.7	43.3	35.8	42.6	36.6		
3	39.7	23.4	29.4	36.9	3	35.1	29.9	25.7	33.0	3	39.2	40.5	36.1	39.8	39.0		
4	41.4	24.0	29.8	38.2	4	38.0	31.1	32.0	35.6	4	39.6	34.6	39.4	37.3	38.8		

Charoninsulfuric Acid No. 4					Charoninsulfuric Acid No. 5					Heparin									
Rabbit No.	Befo- re	Minutes after the Injection				Rabbit No.	Befo- re	Minutes after the Injection				Rabbit No.	Befo- re	Minutes after the Injection					
		15	30	45	60			15	30	45	60			15	30	45	60	90	120
1	37.3	32.0	23.4	13.9	28.6	1	39.8	24.9	38.9	40.0	1	37.5	24.7	34.3	38.4	40.2	39.3	38.6	
2	38.2	33.7	35.4	35.0	37.3	2	38.2	31.6	33.8	35.4	2	38.1	26.2	29.6	32.4	38.8			
3	42.5	19.6	28.8	28.6	37.5	3	40.8	18.8	25.2	32.4	3	41.2	28.5	35.6	34.1	38.8			
4	43.2	25.6	22.4	29.8	36.1	4	41.6	28.9	36.6	41.8	4	42.0	38.6	36.7	39.4	43.2			

Fig. 6

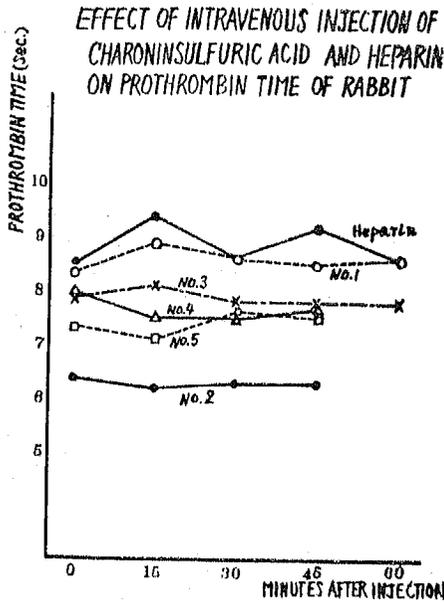


Fig. 7

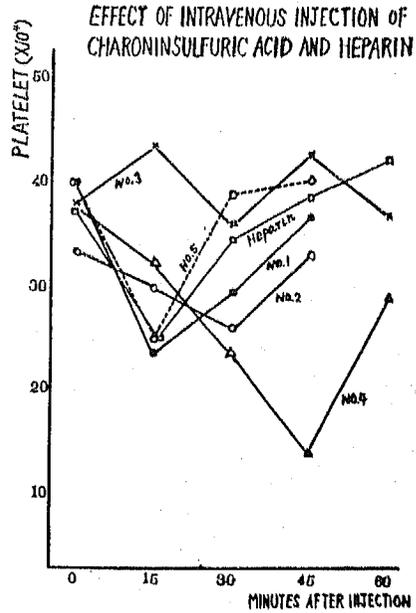


Table 12. Effect of Intravenous Injection of Charoninsulfuric Acid and Heparin on Red Cell Count ($\times 10^4$) of Rabbit (Dosis: 1mg/kg, Body Weight)

Charoninsulfuric Acid No. 1						Charoninsulfuric Acid No. 2						Charoninsulfuric Acid No. 3					
Rabbit No.	Before	Minutes after the Injection				Rabbit No.	Before	Minutes after the Injection				Rabbit No.	Before	Minutes after the Injection			
		15	30	45	60			15	30	45	60			15	30	45	60
1	537	640	608	537	532	1	482	570	558	492	1	486	480	507	511	496	
2	522	557	579	514	520	2	523	473	450	402	2	478	537	491	442	444	
3	481	437	437	465	462	3	470	485	477	474	3	532	560	520	508	538	
4	530	511	516	521	528	4	540	520	478	490	4	521	508	477	524	515	

Charoninsulfuric Acid No. 4						Charoninsulfuric Acid No. 5						Heparin							
Rabbit No.	Before	Minutes after the Injection				Rabbit No.	Before	Minutes after the Injection				Rabbit No.	Before	Minutes after the Injection					
		15	30	45	60			15	30	45	60			15	30	45	60	90	120
1	534	503	512	540	528	1	533	586	478	567	541	1	517	511	521	518	514	523	528
2	470	410	440	477	447	2	503	515	493	484	2	470	466	459	462	458			
3	512	441	473	476	472	3	520	488	472	437	3	482	502	434	412	409			
4	529	549	509	496	4	499	509	496	473	4	523	458	483	533	525				

と同様に炭素硫酸 No. 1 ~ No. 5 では注射の前後において不変か増加を示し、ヘパリンでは減少を示した。

4. 不安定因子およびプロトロンビンに及ぼす影響
実験方法

Table 13. Effect of Intravenous Injection of Charoninsulfuric Acid and Heparin on White Cell Count ($\times 10^3$) of Rabbit (Dosis: 1mg/kg, Body Weight)

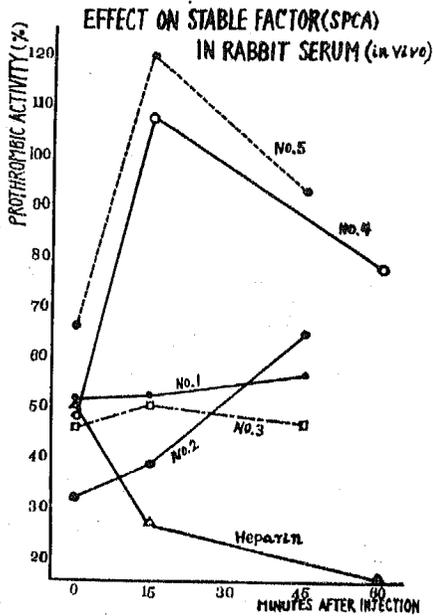
Charoninsulfuric Acid No. 1						Charoninsulfuric Acid No. 2						Charoninsulfuric Acid No. 3					
Rabbit No.	Before	Minutes after the Injection				Rabbit No.	Before	Minutes after the Injection				Rabbit No.	Before	Minutes after the Injection			
		15	30	45	60			15	30	45	60			15	30	45	60
1	5.4	4.8	4.0	5.1	5.3	1	4.6	4.1	4.8	4.7	1	4.8	4.1	4.5	5.0	4.9	
2	6.5	5.6	4.4	5.9	6.1	2	5.9	4.7	5.6	5.7	2	5.8	4.2	6.2	6.1	5.7	
3	5.3	4.7	5.8	5.4	5.1	3	4.4	3.7	5.4	5.4	3	4.8	4.2	5.3	5.8	4.8	
4	5.7	5.2	4.6	5.4	5.8	4	5.8	5.1	5.6	5.5	4	5.2	3.8	4.8	5.1	5.2	

Charoninsulfuric Acid No. 4						Charoninsulfuric Acid No. 5						Heparin							
Rabbit No.	Before	Minutes after the Injection				Rabbit No.	Before	Minutes after the Injection				Rabbit No.	Before	Minutes after the Injection					
		15	30	45	60			15	30	45	90			15	30	45	60	90	120
1	4.5	2.9	3.8	4.2	4.6	1	4.5	4.2	4.0	4.2	4.7	1	5.0	3.9	4.0	4.1	4.1	4.9	5.2
2	6.2	5.1	5.9	6.2	6.1	2	5.3	5.0	4.6	5.4	2	5.6	5.0	5.1	5.3	5.4	5.7		
3	5.2	5.1	4.8	6.3	5.8	3	5.5	5.1	4.6	5.3	3	5.0	3.8	3.9	4.4	4.3	4.8		
4	5.5	4.8	5.8	5.6	5.4	4	5.5	4.3	4.5	5.1	4	5.4	5.4	3.8	5.6	5.3	5.4		

Table 14. Effect of Charoninsulfuric Acid and Heparin on Stable Factor (SPCA) in Rabbit Serum (Experiment in Vivo)

Rabbit No. and Body Weight	Minutes after the Injection of Charo- nin and Heparin (1mg/kg. B. W.)	Charonin No. 1	Charonin No. 2	Charonin No. 3	Charonin No. 4	Charonin No. 5	Heparin
		SPCA (%)	SPCA (%)	SPCA (%)	SPCA (%)	SPCA (%)	SPCA (%)
(1) 2.75 kg	Before	51.3	83.3	45.6	48.0	66.0	50.0
	15	51.3	124.2	50.6	106.9	119.3	27.2
	45	63.0	117.6			92.8	
	60			46.5	77.9		16.6
(2) 3.15 kg	Before	51.1	62.5	60.4	42.3	85.7	46.5
	15	52.3	55.4	65.2	127.4	121.5	30.2
	45		85.1	60.9	106.8	112.2	
	60	56.6					32.8
(3) 3.0 kg	Before	20.6	31.8	36.0	30.9	42.2	42.8
	15	48.8	38.8	20.8	66.6	68.6	42.8
	45	35.6	64.9		30.0		
	60			12.4		52.3	31.2
(4) 3.2 kg	Before	35.1	42.4	17.2	41.6	26.6	45.4
	15	56.8	68.3	41.6	33.3	51.0	14.3
	45	21.8	60.0	28.6			
	60				47.8	20.5	8.6

Fig. 8



ウサギに体重 1kg 当り 1mg の割合にて静注し、注射前および注射後 15 分に採取した尿酸血漿について、1) - 3. - c) と同様にして、Ca₃(PO₄)₂ 吸着血漿および eluate を作る。

ウサギの血漿中には人の 50 倍の不安定因子が存在するといわれているので^{③④}、吸着血漿を生理食塩水で 50 倍に稀釈し、その 0.09cc と eluate の 0.01cc を組合せてプ時間を測定した。

実験成績

カロニン硫酸 No. 1 ~ No. 5 およびヘパリンについての成績を比較して Table 15 に示す。ヒト血漿を用いた試験管内実験の場合と同様にカロニン硫酸 No. 1 ~ No. 5 は不安定因子およびプロトロンビンの両者に拮抗作用を有することが認められる。

ヘパリンに於ても不安定因子に拮抗作用を有し、プロトロンビンに対しても Table 16 に示す様に拮抗作用を有する。

5. プロトロンビン消費に及ぼす影響

実験方法

ウサギに体重 1kg 当り 1mg の割合にて静注し、カロニン硫酸の場合は静注前および凝固時間の最も延長する注射後 15 分と凝固時間の旧値に復する 45 分あるいは 60 分の 3 回採血し、ヘパリンの場合は注射前と注射後 15 分の 2 回採血し、それぞれの凝固時間を測定した後、2 時間を経て析出した血清 0.1cc にウサギの Ca₃(PO₄)₂ 吸着血漿 0.1cc を加えて、そのプ時間を測定

した。

実験成績

3 羽のウサギについて得た成績を Table 17 に示す。試験管内実験の場合と同様にカロニン硫酸 (No. 1 ~ No. 5) を注射した場合は注射前に比し血清のプロトロンビン時間は延長しており、血清中のプロトロンビン量は注射前に比し減少しており、プロトロンビンの消費はむしろ亢進することを示すが、ヘパリンの場合はプ時間に変化をみない。従つてヘパリンの場合はプロトロンビンの消費は不良である。

6. 生体内実験成績の小括

以上の in vivo における生体内実験成績を要約すると次の如くである。

a) カロニン硫酸 (No. 1 ~ No. 5) およびヘパリンをウサギに体重 1kg 当り 1mg の割合に静注した場合、血液凝固時間は No. 4, No. 1, No. 3 は 15 分後に延長するが、60 分前後で旧値に復する。No. 2 は軽度の延長を示す。No. 5 は不変乃至凝固時間の短縮を示す。

之に反してヘパリンはカロニン硫酸 (No. 1 ~ No. 5) よりも著明な延長を示し 2 時間後にまだ旧値に復さない。

b) 血漿プ時間は著明な変動をみない。血小板数、白血球数は注射後 15 分またわ 30 分に一過性の減少を来たすが、赤血球数には著明な変化をみない。

c) 血清中の安定因子は、カロニン硫酸の場合は不変か増加を示し、ヘパリンの場合は減少を示した。

d) カロニン硫酸、ヘパリン共に不安定因子およびプロトロンビンの作用を減少せしめる。

e) カロニン硫酸は凝固過程におけるプロトロンビンの消費を却つて亢進せしめるが、ヘパリンはプロトロンビンの消費を不良ならしめる。

3) カロニン硫酸 (No. 1 ~ No. 5) およびヘパリンの毒性 (LD₅₀)

体重約 13g の二十日鼠を使用し、腹腔内に注射し Behrens の計算法により、その LD₅₀ を算出した。その成績は Table 18 に示す如く、カロニン硫酸の No. 2 が最も毒性強く、次いで No. 5, No. 4, No. 1, No. 3、ヘパリンの順であるが、もつとも毒性の強い No. 2, No. 5 が 169.2mg/kg, 185.4mg/kg である。ヘパリンとカロニン硫酸 (No. 1 ~ No. 5) の毒性の比は 1: 3.6 ~ 1: 7.2 であつた。その死因はすべて殆んど各臓器における出血であつた。

IV 考案

カロニン硫酸の一種類については既に松岡・村山

Table 15. Effect of Charoninsulfuric Acid and Heparin on Prothrombin and Labile Factor in Rabbit Blood Plasma (Experiment in vivo)

Charoninsulfuric Acid and Heparin	Minutes after the Injection of Charoninsulfuric Acid and Heparin (1mg/kg. B. W.)	Prothrombin Time (sec)		Prothrombin Time (sec)
Charoninsulfuric Acid No. 1	Before	6.2	a 0.01ml + A 0.09ml	12.4
			b // + A //	14.3
	15	6.4	a // + B //	15.6
			b // + B //	17.2
No. 2	Before	7.1	a // + A //	14.0
			b // + A //	16.3
	15	7.5	a // + B //	16.5
			b // + B //	18.8
No. 3	Before	6.3	a // + A //	11.7
			b // + A //	13.4
	15	6.4	a // + B //	13.6
			b // + B //	15.4
No. 4	Before	7.5	a // + A //	18.3
			b // + A //	20.6
	15	8.4	a // + B //	21.0
			b // + B //	24.5
No. 5	Before	6.6	a // + A //	12.9
			b // + A //	14.1
	15	6.9	a // + B //	17.3
			b // + B //	19.2
Heparin	Before	6.6	a // + A //	12.9
			c // + A //	24.3
	15	6.9	a // + C //	20.1
			c // + C //	53.4

A: $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ adsorbed plasma before the injection. (1:50 diluted with 0.85% NaCl Solution)

B: $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ adsorbed plasma after the injection of Charoninsulfuric Acid.
(1:50 diluted with 0.85% NaCl Solution)

C: $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ adsorbed plasma after the injection of Heparin.
(1:50 diluted with 0.85% NaCl Solution)

a: Sodium citrate eluate of plasma before the injection.

b: Sodium citrate eluate of plasma after the injection of Charoninsulfuric Acid.

c: Sodium citrate eluate of plasma after the injection of Heparin.

等^④が、その抗凝固作用について強力な血液凝固阻止作用と抗不安定因子作用、抗プロトロンビン作用および抗トロンボプラスチン作用のあることを報告しているが、著者の実験した成分の異なるカルコニン硫酸 No.1 ~ No.5 までの成績に於ても著明な血液凝固時間を示すものもあるが、松岡・村山等の実験成績に比してやや劣る。即ち松岡・村山等^④は in vitro でウサギ血液を用いた場合 50r では24時間にして尚流動性を保っているのに、カルコニン硫酸 No.1 ~ No.5 に於ては50r

で No.5 は43分程度、No.4 で5時間30分程度である。この差は同じカルコニン硫酸でも成分の差、および精製過程の相違によるものと思われる。

酸性ムコ多糖類中のスルフォムコ多糖類に属するヘパリンが強力な抗凝血作用を有する事実は、Mc Lean (1916年)^⑤、Quick, A. J.^⑥以来夙に知られ、その抗凝血作用の本態に関しては未だ完全に解明されたとはいえないが、少なくとも抗プロトロンビン作用、抗トロンビン作用、抗トロンボプラスチン作用の3つがあると

Table 16. Effect of Heparin on Prothrombin in Rabbit Blood Plasma
(Experiment in vivo)

Minutes after the Injection of Heparin (1mg/kg. B. W.)		Prothrombin Time (sec)	eluate		Prothrombin Time (sec)
Rabbit No. 1	Before	6.4	a	+ ad. Plasma + Serum	9.2
	15	6.8	c	+ " + "	21.4
No. 2	Before	6.6	a	+ " + "	12.9
	15	6.9	c	+ " + "	22.6
No. 3	Before	6.4	a	+ " + "	10.4
	15	6.7	c	+ " + "	23.1

ad. Plasma: $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ adsorbed Plasma before the injection.

Seruma: Serum containing Charoninsulfuric Acid and it was incubated over two hours after Formation of a Solid Clot.

Table 17 Effect of Charoninsulfuric Acid and Heparin on Prothrombin Consumption (Experiment in vivo)

Charoninsulfuric Acid and Heparin	Minutes after the Injection of Charoninsulfuric Acid and Heparin (1mg/kg. B. W.)	Rabbit Blood 1.		Rabbit Blood 2.		Rabbit Blood 3.	
		Clotting Time	Prothrombin Consumption Time	Clotting Time	Prothrombin Consumption Time	Clotting Time	Prothrombin Consumption Time
Charoninsulfuric Acid No. 1	Before	(min) 2.5	(sec) 11.6	(min) 2.5	(sec) 11.8	(min) 3.0	(sec) 11.4
	15	29.0	11.7	74.0	12.3	46.0	11.7
	60	2.5	17.5	3.0	20.1	4.5	14.3
No. 2	Before	2.5	15.3	3.5	14.7	3.5	11.1
	15	4.5	16.7	7.5	23.6	10.0	37.5
	45	4.0	22.7	3.5	16.5	3.0	11.4
No. 3	Before	4.0	13.2	4.0	11.4	3.5	11.2
	15	34.0	16.8	37.5	21.8	35.0	15.5
	60	3.0	17.3	4.5	13.3	4.0	14.5
No. 4	Before	3.0	10.0	3.0	9.1	3.5	11.0
	15	80.0	51.7	37.0	37.0	46.0	39.0
	60	3.0	15.3	4.5	44.5	3.5	14.5
No. 5	Before	3.0	9.7	4.0	12.1	3.0	9.6
	15	2.5	26.9	4.5	39.0	3.5	24.1
	45	2.0	17.5	2.5	35.0	3.0	13.7
Heparin	Before	3.5	15.8	2.5	14.6	3.0	15.2
	15	120.0	15.8	110.0	14.1	126.0	15.0

Prothrombin Consumption Time: 120 Minutes Value after Formation of a Solid Clot.

されている。

著者の実験に使用したヘパリンに於ても、強力な抗凝固作用を有し、in vitro でヒト血液を用いた場合は 5r/cc の濃度で血液は全く凝固しなかつた。カロニン

硫酸 (No.1~No.5) およびヘパリンの血液凝固時間の延長を来たす一因として抗不安定因子作用がある。ウサギのブ時間は試験管内実験においても生体実験においてもほとんどカロニン硫酸 (No.1~No.5) およ

Table 18 Toxicity of Charoninsulfuric
Acide and Heparin
(LD₅₀)

		Pro. kg
Charoninsulfuric Acid	No. 1	307.9 mg
	No. 2	169.2 mg
	No. 3	346.1 mg
	No. 4	253.1 mg
	No. 5	185.4 mg
Heparin		1230.8 mg

びヘパリンに影響されないが、ヒトの血液を用いた場合にカロン硫酸 No.4, No.3 およびヘパリンの低濃度においてもプ時間が延長する事実は松岡・村山等^④の行った実験と同じである。

ヘパリンの抗不安定因子作用は試験管内実験におけるプロトロンビン消費の不良によつてもうかどい知ることが出来るが、カロン硫酸 (No.1~No.5) ではプロトロンビン消費の良好なる成績を示して松岡・村山等^④の行ったカロン硫酸のプロトロンビン消費が不良である成績と逆の結果を得た。このことはカロン硫酸 (No.1~No.5) が実際にプロトロンビン消費が良い事を示すのでなくて、血液凝固機転の行われる前に既にカロン硫酸 (No.1~No.5) によつてプロトロンビンの大部分が消失されたものとみた方が妥当に思われる。

カロン硫酸 (No.1~No.5) およびヘパリンが血液凝固時間の延長、血漿プ時間の延長を来たすもう一つの原因として、抗プロトロンビン作用があることは明らかである。更にカロン硫酸 (No.1~No.5) およびヘパリンが抗トプ形成作用を有することは Biggs-Douglas 法を用いて証明した。Biggs-Douglas 法はトプ形成が血小板第3因子, AHG, PTC, 不安定因子, 安定因子の5因子が作用し CaCl₂ の存在の下に起るといふ考えに立脚するものである。著者の実験成績ではカロン硫酸 (No.1~No.5) およびヘパリンを加えた血漿と加えぬ血清との組合せでは、トプ形成が不良で、カロン硫酸 (No.1~No.5) およびヘパリンを加えぬ血漿と加えた血清との組合せでは、トプ形成は正常又はそれ以上であつた。この成績は松岡・村山等の行った成績と同じであつた。このことはカロン硫酸がトプ形成に関与する血漿因子 (AHG, 及び不安定因子) に拮抗的に作用するが、血清因子 (PTC, 及び安定因子) には作用せぬことを示すものと考えられるが少くとも安定因子に拮抗する作用のないことは証

明した。

しかしヘパリンの場合にもトプ形成に関与する血漿因子に拮抗作用を有し、更に血清因子中の PTC に作用しないで安定因子に拮抗的に作用している様に考えられるが、この安定因子の関与に関しては今日尚問題のあるところである。

ヘパリンが抗トロンボプラスチン作用を有することは Mac Millan および Brown^④ が証明しているが、彼等は Biggs-Douglas 法によるトプ形成試験を行い、ヘパリンが血清因子に拮抗的に作用すると云つて居るが、著者の実験成績では、ヘパリンは血漿因子および血清因子中の安定因子に拮抗作用を有していた。即ち安定因子に対する作用を除外すれば、全くカロン硫酸 (No.1~No.5) と同じ作用を示している様に思われる。

安定因子に対しては、カロン硫酸 No.1~No.5 に於ては、試験管内実験および生体内実験ともに影響を与えないが、ヘパリンは拮抗作用を有することを示した。

生体内実験においてカロン硫酸 (No.1~No.5) およびヘパリンの静注後の血液凝固時間の一過性の延長、白血球数、血小板数の一過性の減少を示すことも松岡・村山等の実験成績と同様である。カロン硫酸静注後1時間にして注射前の凝固時間よりむしろ短縮する例もあるが、これはカロン硫酸の血中濃度が小になるにつれて、凝固促進作用を呈するためであろうか、カロン硫酸のS含量が小さいものは凝固促進作用を有するといわれていることから一応は否定出来ない。

毒性についてはヘパリンを多量に注射することによつて動物にショック症状を起さしめたと増野氏^⑥は述べているが、著者の実験中にはみられなかつた。Murray, Jaques, Perrett^⑥等が使用したヘパリンは比較的粗製のもので、当時精製過程を経たものよりも効力が強かつたことを述べているが、著者の使用したヘパリンは、それに比し可成り精製されているものと思う。ヘパリンの抗凝血作用の強さに反し毒性も著しく弱く、LD₅₀ はカロン硫酸 (No.1~No.5) の 1/3.6~1/7.2 である。しかしカロン硫酸の毒性がもつとも強い No.2, No.5 においても 169.2mg/kg, 185.4mg/kg であるから臨床的に 1mg/kg で使用出来るとすれば、毒性はそれ程強いものではない。この点に関しては目下臨床的に検討している。

V 結 論

S および N の含有量を異にする 5 種類 (No.1~No.

5) のカロン硫酸の血液凝固阻止作用を試験管内および生体内(動物)実験によりヘパリンと比較し、さらにその毒性について検討し、次の結果を得た。

I 試験管内実験

1) 全血凝固時間

カロン硫酸およびヘパリンの稀釈列を作り、この0.1ccに同一人全血0.9cc短分注して、凝固時間を測定し、カロン硫酸およびヘパリンは共に強力な凝固阻止作用を有し、ヘパリンはカロン硫酸の約4倍より20倍の強さを示し、カロン硫酸相互の間ではSの含有量多くNを含有しないNo.4が最も強かつた。

2) 血漿プロトロンビン時間

ウサギ血漿に加えた場合には、カロン硫酸No.1, No.2, No.5は20r/ccまでは変化がないが、No.3, No.4は20r/ccより軽度の延長を示し、ヘパリンも20r/ccより軽度の延長を示した。

ヒトの血漿に加えた場合には、カロン硫酸No.4およびヘパリンは0.05r/cc~0.1r/ccより軽度の延長を示し、No.1, No.2, No.5は10r/cc, No.3は0.5r/ccより軽度に延長し何れも濃度の増加に伴い著しき延長を示した。

すなわちヒト血漿に及ぼす作用の方が強かつた。

3) プロトロンビンに対して

カロン硫酸およびヘパリン加血漿のEluateに同一の吸着血漿を加えてプロトロンビン時間を測定し、カロン硫酸およびヘパリンには抗プロトロンビン作用のあることをみとめた。

4) 不安定因子に対して

同一人の尿酸加血0.9ccに同一稀釈系列の0.1ccを加えると、その血漿プロトロンビン時間はカロン硫酸およびヘパリンの濃度が大きなるにつれて延長し、これに人吸着血漿を加えると短縮する。

従つてカロン硫酸、ヘパリン共に抗不安定因子作用のあることをみとめた。

5) 安定因子に対して

カロン硫酸およびヘパリンを加えた血液と対照血の凝固完了後2時間を経た血清について安定因子を測定し、ヘパリンには抗安定因子作用があるが、カロン硫酸にはその作用をみとめない。

6) トロンボプラスチン形成に対して

カロン硫酸およびヘパリンはトロンボプラスチン形成を不良ならしめ、それは血漿因子の阻止作用によることをみとめた。

7) プロトロンビン消費に対して

カロン硫酸はむしろ充進せしめるが、ヘパリンは不良ならしめる。

II 生体内実験

0.1%カロン硫酸およびヘパリンの溶液をウサギの耳静脈内に体重1kg当り1mgの割合で注射して実験を行つた。

1) 凝固時間はカロン硫酸、ヘパリンともに15分後にもつとも延長し、No.1, No.3, No.4は60分後に旧値に復し、No.2, No.5は45分で旧値に復するが、ヘパリンは2時間後にも旧値に復せず。

2) 血漿プロトロンビン時間はヘパリン、カロン硫酸ともに延長をみとめなかつた。

3) 安定因子に対する作用、不安定因子およびプロトロンビンに対する作用、プロトロンビンの消費に及ぼす作用は何れも試験管内の実験成績と一致した。

4) カロン硫酸およびヘパリンは白血球数、血小板数を一過性に減少せしめるが、赤血球数には変化を見ない。

III 毒性

マウスの腹腔内に注射し、LD₅₀をカロン硫酸とヘパリンを比較すると、その比は3.6:1~7.2:1でヘパリンより毒性強く、もつとも強いNo.2, No.5は夫々169.2mg/kg, 185.4mg/kgである。

稿を終るにあたり、御指導と御校閲を頂いた恩師松岡松三教授に深甚の謝意を表すると共に教室員各位の御援助を深謝する。

本論文の要旨は第20回日本血液学会総会に発表した。

文 献

- ①田宮春雄・山本 正・小田 孟:東京医誌, 55:140, 昭16. ②石井 暢・塚田恵一:日血会誌, 16:233, 昭28. ③松岡松三等:日内会誌, 45:1334, 昭31.
④Lee, R. I. and White, P. D.: Am. J. M. Sc., 145:495, 1913. ⑤松岡松三:内分泌と代謝, 1:1, 昭33. ⑥de Vries, A., Alexander, B. and Goldstein, R.: Blood, 4:247, 1949. ⑦松岡松三等:内科の領域, 1:1, 1958. ⑧Quick, A. J.: The Physiology and Pathology of Hemostasis, Lea & Febiger, Philadelphia, 1951, P. 133. ⑨Biggs, R. and Douglas, A. S.: J. Clin. Path., 6:23, 1953. ⑩Quick, A. J.: Blood, 4:1281, 1949. ⑪Rees, H. M. and Ecker, E. E.: J. A. M. A., 80:1621, 1923. ⑫Mc Lean, J.: Am. J. Physiol. 41:297, 1944. ⑬Quick, A. J.: Physiological Reviews, 24:297, 1944. ⑭Mc Millan, R. L. and Brown, K. W. G.: J. Lab. & Clin. Med., 44:378, 1954. ⑮増野 旭:東京医誌, 45(1931). ⑯Murray, D. W. G., Jaques, L. B., Perrett, T. S. & Best, C. H. Canad. Med. Ass. J. 35, 621, 1936. ⑰Murray, D. W. G., Jaques, L. B., Perrett, T. S. & Best, C. H. Surgery, 2, 163, 1937. ⑱Jorpes, J. E.(1935). Biochem. J. 29, 1817. ⑲Jorpes, J. E. & Bergström, S. (1939). Biochem. J. 33, 47.