

## 第V因子および第VII因子に関する研究

第I篇 プロトロンビン転化と第V, 第VII因子との  
関係について

昭和37年9月3日 受付 (特別掲載)

信州大学医学部松岡内科学教室

(主任: 松岡松三教授)

児 島 俊 也

## Studies on Factor V and Factor VII

Part I. Studies on the Role of Factor V and Factor VII  
in the Conversion of Prothrombin

Toshiya Kojima

Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine,  
Shinshu University

(Director: Prof. M. Matsuoka)

## I 緒 言

Morawitz の古典的凝血学説<sup>①</sup>にて想定された凝血因子であるプロトロンビン自体およびそのトロンビンへの転化に関する凝血第II相の研究は既に多く行われているが、近年その詳細な業績に接することは比較的少い。一方、国際血液凝固因子選定委員会<sup>②</sup>で承認された新しい凝血理論模式図<sup>③</sup>でもみられるようにプロトロンビン転化の第II相だけが他の相と判然と境された状態で作用するものではなく、当然他相との相関が問題となる。従つてプロトロンビンの転化とそれに関与すると思われる因子すべてについて質的、量的に解明することは多くの困難を伴なう。

プロトロンビン転化には凝血のいづれの相にも不可欠といわれるCaの他にトロンボプラスチンの存在が必須の条件であることはMorawitz以来明らかであり、内因系の血液トロンボプラスチン、外因系の組織トロンボプラスチンいづれもがプロトロンビンに作用するが、更にプロトロンビンの転化促進因子として第V, 第VII因子が認められている。それらはその吸着や保存等の性質、自身の質的、量的差異によりプロトロンビンに対する凝血促進効果を表わし、血漿の凝固時間を種々に変化させることが証明されている。そしてそれら各々のいづれかが不足もしくは欠除する際に著しい凝血障碍を起すことは確かであり、Quickによつてはじめられた一段法プロトロンビン測定法<sup>④</sup>はプロトロンビン自身の低下がなくてもみかけ上のプロトロンビン時間の延長が認められ、既に多くの学者により第V, もしくは第VII因子が不足した場合のプロト

ロンビン時間について検討が加えられいるが、ここで著者はプロトロンビンのトロンビンへの転化に際して最も大きく影響すると思われる第V, 第VII因子を中心に、これらを可及的純粋に精製した試料を使つてプロトロンビンとこれら転化促進因子との関係を量的、質的に明らかにし研究したのでその成績を報告する。

## II 実験材料

1) 牛血漿: 屠畜後たゞちに頸動脈より採血した血液9容に $\frac{1}{10}$  Mol 蔞酸ソーダ1容の割合に混じ、遠心沈澱3000r. p. m. 15分回転して得る。

2) 牛血清: あらかじめ容器に少数のガラス玉を入れておき採血後軽く振盪しながら凝固するのを待ち、室温に一夜倒置後、血餅を慎重に剝離して3000 r. p. m. 15分遠心沈澱して上清に血清を得る。この操作はなるべく無菌的に行う。

3) プロトロンビン<sup>⑤</sup>: 牛血漿に100mg/mlのBaSO<sub>4</sub>を加えてガラス棒で室温中20分振盪しながら吸着、3000r. p. m. 15分遠心する。沈渣をまづ $\frac{1}{10}$  Mol 蔞酸ソーダで洗い、次いで0.006 Mol クエン酸ソーダで洗う。更に0.9%食塩水で洗滌後原血漿の $\frac{1}{5}$ 容の0.14 Mol クエン酸ソーダで沈渣のBaSO<sub>4</sub>を溶出する。これから得られる上清をクエン酸ソーダが消失する迄氷室中にて蒸留水で透析し、eluateには0.9% NaClを含むようにする。0.1 N 苛性ソーダでpH: 7.2に調整して用に供する。

4) 第V因子<sup>⑥⑦</sup>: 3) で得たBaSO<sub>4</sub>吸着血漿を蒸留水にて1:20に稀釈し、これを0.1 N 塩酸でpH: 5.5に調整する。得られた沈澱物を原血漿200mlに対し

90mlの0.9%食塩水に溶解した上、溶液に40%クエン酸ソーダを少しづつ滴下して、クエン酸ソーダ10%溶液の濃度に調整し、上清と沈澱を分離する。更に上清を25%クエン酸ソーダ溶液に矯正の上の70ml食塩水にとかし、33~50%の飽和硫酸アンモン溶液で沈降させ、沈澱を少量の食塩水にとかして寒冷中生食水で透析して得た。

5) 第Ⅶ因子<sup>⑧</sup>:牛血清9容に対し1容の $\frac{1}{10}$  Mol 尿酸ソーダ液を加え、100mg/mlのBaSO<sub>4</sub>で20分間振盪して吸着する。3000r.p.m. 15分間遠沈で得られる沈降BaSO<sub>4</sub>を原血清と同量の食塩水、尿酸ソーダ混液(0.9~食塩水9容+ $\frac{1}{10}$  Mol 尿酸ソーダ液1容)で洗い0.9%食塩水で再度洗う。更に沈澱をもとの血清の $\frac{1}{10}$ 容の $\frac{1}{10}$  Mol クエン酸ソーダで elute し、eluate は50%硫酸飽和で4°C一夜保存、沈澱をとり蒸留水で氷室中硫酸 free になる迄透析した。

6) トロンボプラスチン:松岡法<sup>⑨</sup>により作成した。すなわち髄膜、血管を充分に除去した兔脳を乳鉢にて摺りつぶしながらアセトンにて数回脱水する。乾燥して得られた粉末を生理食塩水に0.2g/5mlに溶解させ45°C 15分加温後遠沈して白濁した上清をとる。

7) 0.025 Mol 塩化カルシウム液

8) フィブリノーゲン:(日本ブラッドバンク製—入血漿より抽出)用に臨んで400mg/dlのimidazole溶液とす(力価が落ちやすいので0°C~4°Cにおき1時間以内に使用する)。これは充分量のプロトロンビン、第Ⅴ、第Ⅶ因子およびトロンボプラスチン、Caが存在する時にトロンビン1単位で7.5秒で凝固するように調整した。

9) トロンビン(持田製—牛血漿)

10) イミダゾール緩衝液<sup>⑩</sup>:0.2 Mol imidazole溶液25mlと0.1 N 塩酸13.6mlを混合してpH:7.4に調整、フィブリノーゲンおよびトロンビン溶液の溶媒として用う。

### III 実験方法

D. G. Therriault & H. Jensen らの方法<sup>⑧</sup>でプロトロンビン時間二段法測定の変法を行つた。すなわちあらかじめ400mg/dlの濃度となるようにimidazole bufferにてフィブリノーゲン溶液を調整し、この0.1mlづつを小試験管に分注しておく。また種々の濃度のトロンビン溶液と、このフィブリノーゲン液より実験の都度、または溶解フィブリノーゲンのlot Noの変るごとに標準トロンビン検量曲線(両対数グラフ上では直線となる)を作成しておき、以下に行う実験の最終フィブリノーゲン凝固時間をこれにあてはめ、トロン

ビン単位でプロトロンビン転化の度合を表現した。

A: 第Ⅴ、第Ⅶ因子とプロトロンビン転化の量的関係についての検討

基質は次のような構成よりなる。

プロトロンビン	0.3ml
第Ⅴ因子	0.3ml
第Ⅶ因子	0.3ml
トロンボプラスチン、Ca	0.5ml

この構成中の前三者だけを37°C恒温槽中でincubateしながらトロンボプラスチンCaを加えた時に別の秒時計を発動し、以下60秒、120秒、180秒……と60秒毎(またはその間30秒毎)にincubation mixtureより0.1mlをとり出し、37°Cにおいてフィブリノーゲン溶液0.1mlに吹きこみ、ふたゝ別の秒時計を発動しこの試験管中にclotの形成される時間(フィブリノーゲン時間)を測定する。incubation timeによりフィブリノーゲン時間が最も短縮するが次の60秒目で延長を示したらその系列の実験はそれで終る。これを、

- (i) プロトロンビンの減少した系列
- (ii) 第Ⅴ因子の減少した系列
- (iii) 第Ⅶ因子の減少した系列
- (iv) 第Ⅴ、第Ⅶ両因子の減少した系列

について種々実験した。

B: 基質の組合わせを

第Ⅴ因子	0.3ml	}として37°C 15分 incubate.
第Ⅶ因子	0.3ml	
ト・ブCa	0.5ml	

15分後にプロトロンビン0.3mlを加え、この時より60秒、120秒、180秒……のincubation timeを追つてフィブリノーゲン凝固時間をみることは前項Aと同様である。これを第Ⅴ、或いは第Ⅶ因子の減少した組合わせ等について行う。

C: 15分incubateしたBと同じ基質の系列が更に微量トロンビンの附加により、如何に変化し如何なる作用を営むかをみるために、各因子の種々の組合わせに予め微量のトロンビンを加えておいてBと同様にincubateした後のプロトロンビン転化の様子をみる。

以上の組合わせにおける実験で、それらの結果を図に表現する時、横軸にmixtureのincubation timeすなわち、その一部をとり出してフィブリノーゲン液へ吹きこむ迄の時間(30~60秒おき)をとると、これがプロトロンビンのトロンビンへの転化速度であり、縦軸にフィブリノーゲン凝固時間をとると、これがトロンビン形成量を示し、グラフでpeakを示す点が最

高トロンビン産生を意味する。(縦軸のトロンビン単位は $10^{-2}$ 値で表わした)

IV 実験成績

A: 第V, 第VII因子とプロトロンビン転化の量的関係についての検討

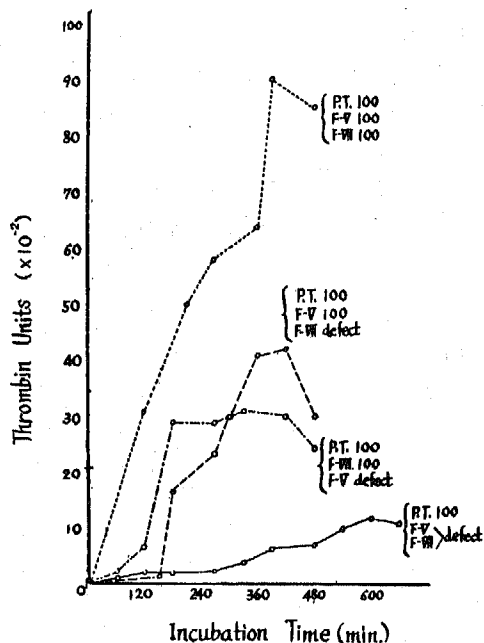
a: プロトロンビンが一定充分量存在して第V, 第VII因子の各々が種々の程度に減少した組合わせ

- (1)  $\left\{ \begin{array}{l} \text{プロトロンビン} \quad 100\% \\ \text{第V因子} \quad 100\% \quad (\text{図1}) \\ \text{第VII因子} \quad 100\% \end{array} \right.$

3因子とも100%に存在する control と比較して明らかなように、最高形成トロンビン量は0.13単位(これを13と表現し、以下これにならう)で incubation time は600分を費しており極度に延長している。ここでみられるように第V, 第VII因子を欠くものは control (正常) に比し、トロンビン量で80の差があり、incubation time で240秒遅れてやつと最高値に達している。

- (2)  $\left\{ \begin{array}{l} \text{プロトロンビン} \quad 100\% \\ \text{第V因子} \quad 100\% \quad (\text{図1}) \\ \text{第VII因子} \quad 0\% \end{array} \right.$

図1 プロトロンビンが一定充分量存在し、第V, 第VII因子のいずれか或いは両方が欠如した際のプ・ト転化



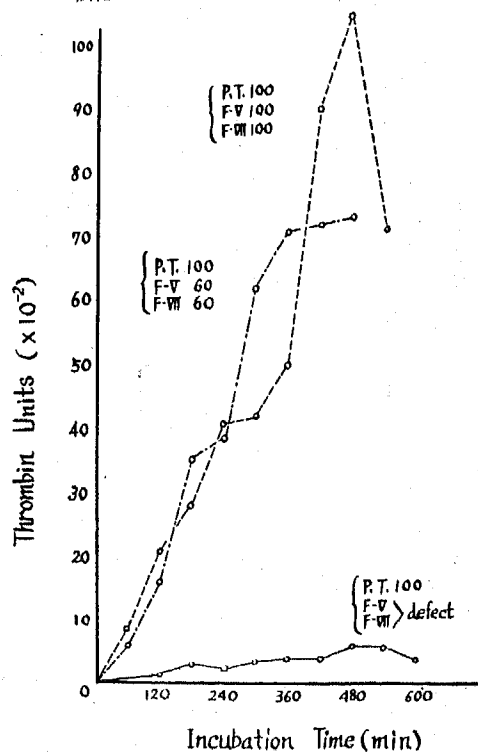
- (3)  $\left\{ \begin{array}{l} \text{プロトロンビン} \quad 100\% \\ \text{第V因子} \quad 0\% \quad (\text{図1}) \\ \text{第VII因子} \quad 100\% \end{array} \right.$

同じ図1にみられるように第VII因子のみ欠如した(2)では420秒の incubation で42のトロンビン産生、第V因子のみ欠如した(3)では330秒の incubation で31のトロンビン産生をそれぞれ示している。形成された(最高)トロンビン量は(2)すなわち第V因子充分で第VII因子0の系列で(3)より11程高く、それに到達する速度において(3)が(2)より90秒早い、そしていずれも転化は control より不完全であるが(1)に比すればかなりの転化が認められる。第VII因子は欠いても第V因子の充分な方がトロンビン産生量はやゝ多く、第V因子を欠くものより第VII因子の充分存在の方がトロンビン産生量は低い転化速度が早い。

- (4)  $\left\{ \begin{array}{l} \text{プロトロンビン} \quad 100\% \\ \text{第V因子} \quad 60\% \quad (\text{図2}) \\ \text{第VII因子} \quad 60\% \end{array} \right.$

いずれか一方の欠如では(2), (3)のごとくであるが、第V, 第VII因子の両方が軽度に減少して60%づ

図2 プロトロンビンが一定充分で、第V, 第VII因子が60%に減少した際のプロトロンビン転化

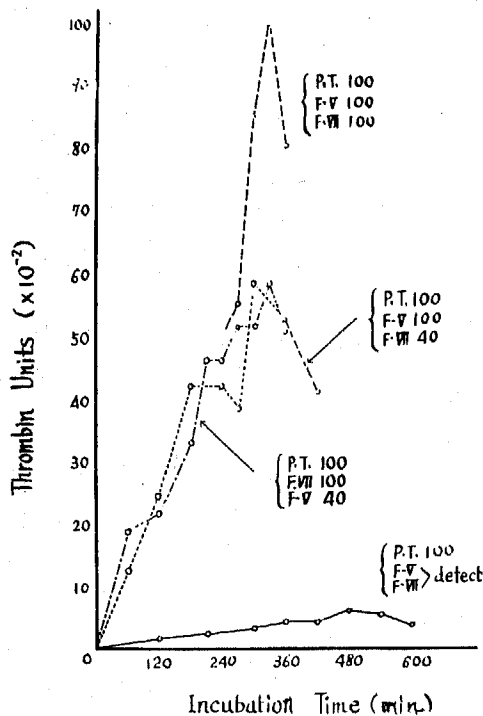


つ存在する組合わせでは各々100%のものよりトロンビン産生は約70%でやむ不良であるが、形成速度はほとんど差異がみられない。つぎに、

- (5)  $\left\{ \begin{array}{l} \text{プロトロンビン} \quad 100\% \\ \text{第 V 因子} \quad 40\% \quad (\text{図 3}) \\ \text{第 VII 因子} \quad 100\% \end{array} \right.$
- (6)  $\left\{ \begin{array}{l} \text{プロトロンビン} \quad 100\% \\ \text{第 V 因子} \quad 100\% \quad (\text{図 3}) \\ \text{第 VII 因子} \quad 40\% \end{array} \right.$

のように一方を充分にしたままもう一方を40%に減少させてみると、両者のプロトロンビン転化はほとんど同程度に行われており、control に比して約60%のトロンビンが産生されていることがわかる。すなわち、第V、第VII因子のいずれかが充分に存在しても、一方が40%程に減少するとき、トロンビン形成能は(4) (=いづれも60%)より更に少し低下している。ここで(5)と(6)の両者間で転化速度にはほとんど差はない。

図3 プロトロンビンが一定充分で第V、第VII因子の一方のみが40%に減少した際のプロトロンビン転化



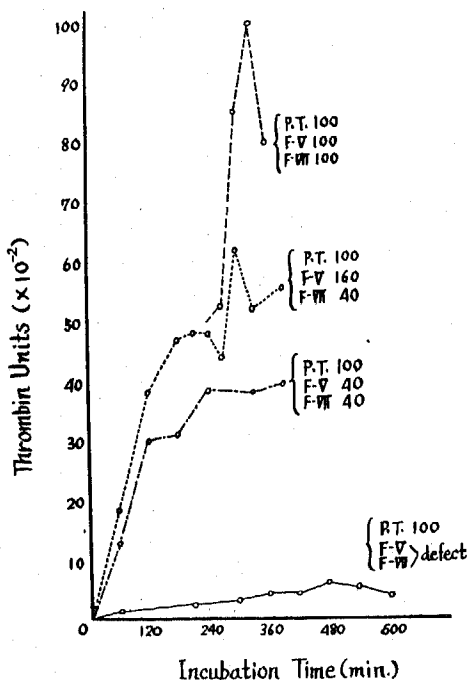
- (7)  $\left\{ \begin{array}{l} \text{プロトロンビン} \quad 100\% \\ \text{第 V 因子} \quad 40\% \quad (\text{図 4}) \\ \text{第 VII 因子} \quad 40\% \end{array} \right.$

(6)の組合わせの第V因子を更に40%に減少させるとトロンビンは約40%しかできない。この際(6)の第V因子を逆に160%に増量して、

- (8)  $\left\{ \begin{array}{l} \text{プロトロンビン} \quad 100\% \\ \text{第 V 因子} \quad 160\% \quad (\text{図 4}) \\ \text{第 VII 因子} \quad 40\% \end{array} \right.$

としてみたら、トロンビン形成量は22程増加した。この際のプロトロンビン転化は(6)とほとんど同じ程度で incubation time も330秒(6)と全く同じである。

図4 プロトロンビンが一定充分で第V、第VII因子が40%に減少した際とこの系列で第V因子のみ過剰に存在した際のプロトロンビン転化



[小括]

以上のことより、プロトロンビンが一定で充分に存在する条件下で第V、第VII因子量を種々変化してプロトロンビンのトロンビンへの転化をみると、

i) 第V、第VII因子の各々およびいづれかが60%以上に存在するとき、トロンビン形成量はcontrolを100%としてその60~70%以上形成され、転化速度も330~390秒の間にあつて特に延長や遅延の傾向はない。

ii) 第V、第VII因子のうちいづれか一方が40%位迄低下しても他方が充分ならば、トロンビン形成量の低

下は来さないし、転化速度も延長しない。

iii) 第V, 第VII因子の両因子が40%に減少する時は  
 トロンビン形成量も control の約40%, 転化速度は  
 390秒でやゝ延長しているかのごとくみえる。

iv) このうち再び第V因子のみ160%の過量に増加  
 させると270秒の incubation で62のトロンビンを形  
 成する。

v) すなわち第V, 第VIIの両因子が40%以下に減少  
 した時はプロトロンビンの転化速度はやゝ遅延し、ト  
 ロンビン形成量は著明に低下、両因子がほぼ0に近い  
 時、量および速度のいずれもが極端に低値をとり、転  
 化はほとんど全うされない。

このような40%以下に減少した系列に対して第V因  
 子のみ増量すれば形成量が増加し、第VII因子のみ増加  
 すれば転化速度を促進させる。更に同じ系列で第V,  
 第VIIの両因子が加われば形成量、転化速度ともに好転  
 するが、特に60%以上の第V, 第VII因子が存在するな  
 ら、プロトロンビン転化速度は一定して早く、トロン  
 ビン形成量も常に60%以上となる。

b: プロトロンビンの減少がトロンビン産生に  
 およぼす影響

以上の実験と異つて今度は第V, 第VII因子を一定量  
 とし、プロトロンビン自体を100%から減少させて行  
 つた場合、

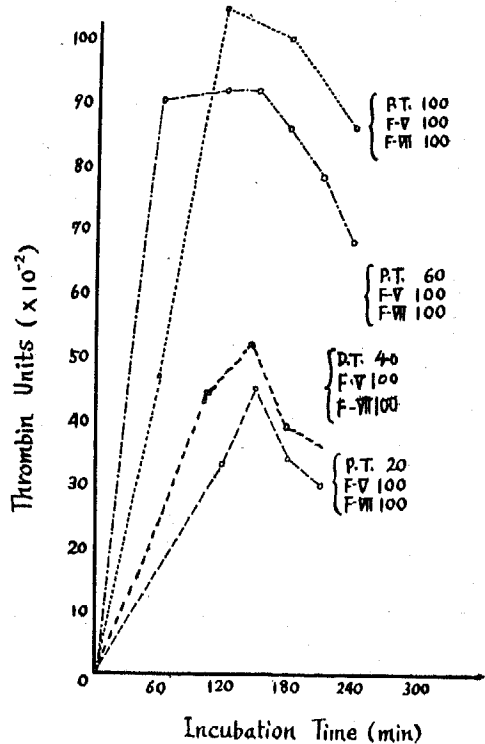
- (9)  $\left\{ \begin{array}{ll} \text{プロトロンビン} & 20\% \\ \text{第V因子} & 100\% \quad (\text{図5}) \\ \text{第VII因子} & 100\% \end{array} \right.$

control (正常の組合せ) では120秒の incubation  
 time で104のトロンビン産生があるがこの組合せ  
 では150秒の incubation で peak は46となる。この  
 際転化速度はほとんど問題になる程の差異はないが、  
 トロンビン産生量は図5に明らかな通り著明に低下し  
 ている。但し、プロトロンビン量が20%であつてもト  
 ロンビンがそのまゝ20%ではなくて44%まで産生され  
 る。更に、

- (11)  $\left\{ \begin{array}{ll} \text{プロトロンビン} & 40\% \\ \text{第V因子} & 100\% \quad (\text{図5}) \\ \text{第VII因子} & 100\% \end{array} \right.$

の組合せでは150秒の incubation の後に92のト  
 ロンビンが産生され、これは(10)と比べてプロトロン  
 ビン量の上からは微量の差しかないのに第V, 第VIIの  
 充分な転化促進因子を有する場合は、プロトロンビン  
 濃度の増加する割合以上にトロンビンが産生されるこ  
 とを示す事実である。次にプロトロンビンが減少した  
 まゝで、第VII因子が低値に変動する時の状況を観察し  
 た。

図5 第V, 第VII因子は一定でプロトロンビン自  
 体が減少した際のプロトロンビン転化



- (12)  $\left\{ \begin{array}{ll} \text{プロトロンビン} & 20\% \\ \text{第V因子} & 100\% \quad (\text{図6}) \\ \text{第VII因子} & 20\% \end{array} \right.$

では図6の如く180秒の incubation で32迄達してい  
 るが、

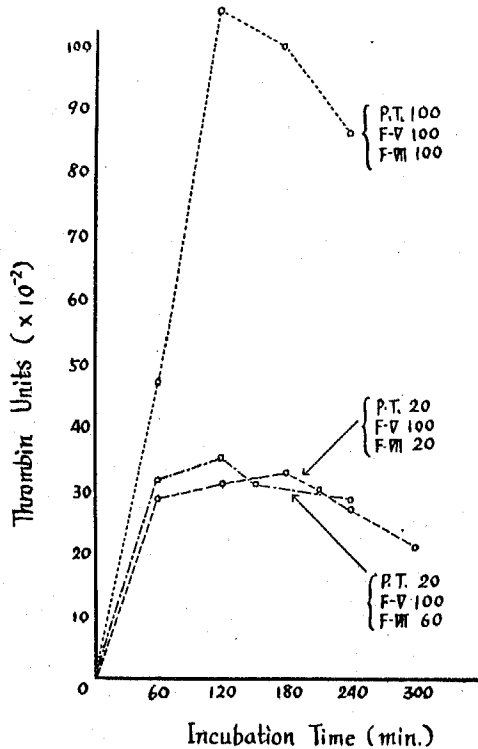
- (13)  $\left\{ \begin{array}{ll} \text{プロトロンビン} & 20\% \\ \text{第V因子} & 100\% \quad (\text{図6}) \\ \text{第VII因子} & 60\% \end{array} \right.$

の如く、第VII因子を60%に増加させるとトロンビン産  
 生量は34とほとんど差はないが、peak に達するのは  
 incubation 120秒目であり、転化速度が早くなつた。

[小括]

(2), (3), (8) でわかつたように、おおむね第  
 V因子は形成量に関与し、第VII因子は転化速度に関係  
 していることがここでも明らかとなつた。プロトロン  
 ビンの増減はプロトロンビン転化中特にトロンビン形  
 成量に大きく影響することは以上の結果でわかるが、  
 それも第V, 第VII因子の転化促進因子と同様に40%以  
 下に存在する場合と、60%以上の場合を比較してみ  
 ると転化にあつては明らかに後者に大巾な効果がある  
 のがわかる。各促進因子も、40%以下ではほとんどそ

図 6 プロトロンビン20%に減少した系列における第Ⅶ因子増減の影響



の転化効果を表わし難いが、60%以上になると単に比例論的ではなく、酵素加速的に作用し、特にトロンビン形成量を増加させることがわかった。

c: トロンボプラスチンの量的変化がプロトロンビン転化におよぼす影響

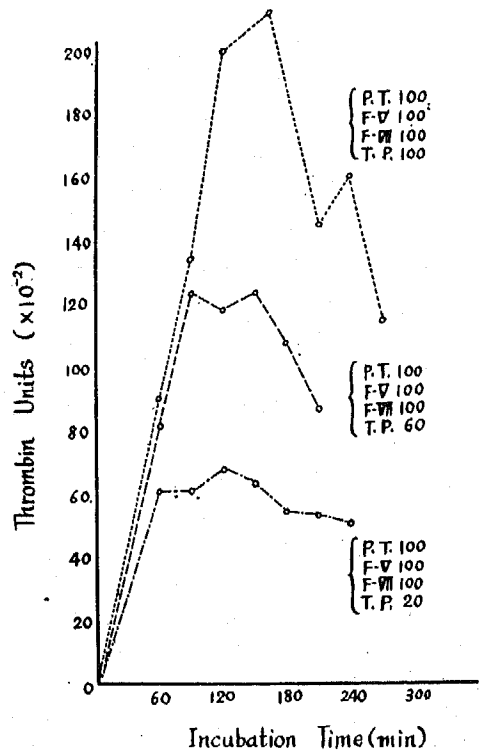
プロトロンビン転化に不可欠の因子として特にトロンボプラスチンは、プロトロンビンと同様にその系列からこれを否定することはできない。従来からいわれているようにその果す役目はプロトロンビン転化に当っては量論的であることが予測されているが、著者は次の組合せで実験を行った。

- (14) プロトロンビン 100%  
 第Ⅴ因子 100% (図 7)  
 第Ⅶ因子 100%  
 トロンボプラスチン 20%
- (15) プロトロンビン 100%  
 第Ⅴ因子 100% (図 7)  
 第Ⅶ因子 100%  
 トロンボプラスチン 60%

control は図7のようにプロトロンビン、第Ⅴ、第Ⅶ因子は常に100%存在しているほかにトロンボ

ラスチンが100%に存在するものであるが、系列中トロンボプラスチンのみ低値とした(14)(トロンボプラスチン20%)では120秒の速度で68、(15)(トロンボプラスチン60%)では90~150秒の incubation で123のトロンビンを生じた。control が211であるからトロンビンの生成はおもむねトロンボプラスチンの系列中に占める濃度に平行する。

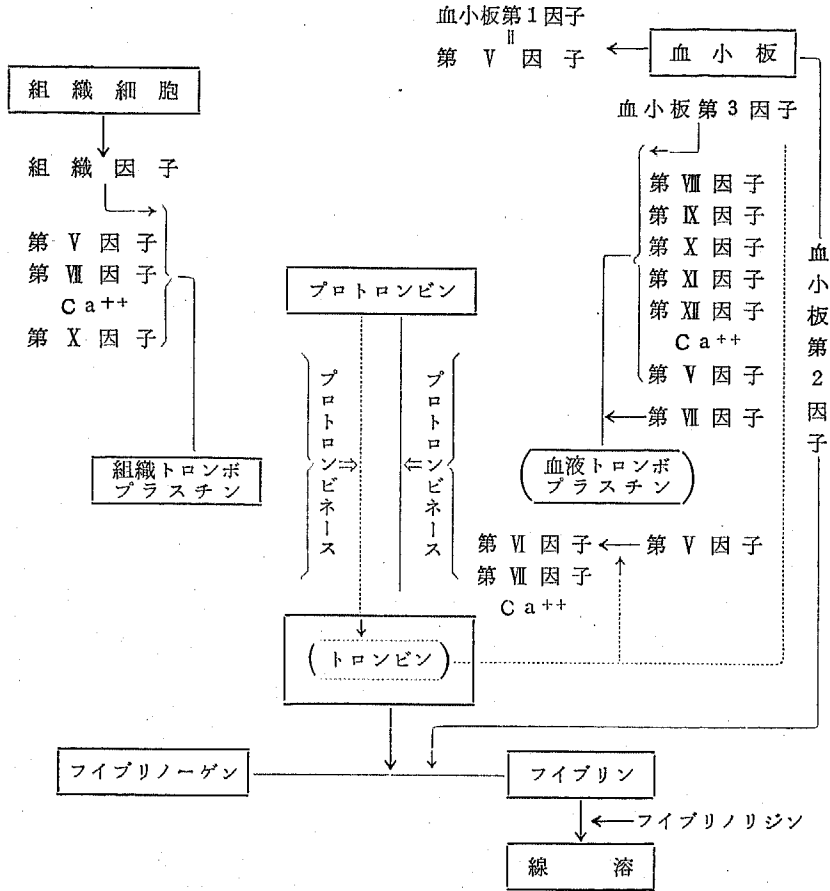
図 7 トロンボプラスチンの減少がプロトロンビン転化におよぼす影響



B: プロトロンビネース様作用について

以上は主としてプロトロンビンを中心に第Ⅴ、第Ⅶ因子が量的、質的にプロトロンビンの転化に如何に作用するかを検討したのであるが、一般に凝血のいづれの相においても二・三の限られた因子が明瞭に境されてある部分だけに働らくことは、はなはだ稀であり、殊に Ca の作用する範囲は広く、多様である。このⅡ相のプロトロンビン転化に際して第Ⅴ、第Ⅶ因子、トロンボプラスチン、Ca が表1のようにプロトロンビンに働らき「プロトロンビネース」なる複合体を作りプロトロンビンの転化を促進するとされている。著者はプロトロンビネースの作用をこれらの mixture を preincubate し、第Ⅴ、第Ⅶ因子を色々にかえた

表 1



場合のプロトロンビンにおいて検討した。プロトロンビンおよび促進因子系、トロンボプラスチン Ca の組合わせ量はこれまでの実験と同様である。

第 V, 第 VII 因子とトロンボプラスチンおよび Ca を共に混じ、37°C 恒温槽中で 3 分、5 分、10 分、15 分 preincubate した系列を作り、その各々の時間経過後プロトロンビンを加え、この点で別の秒時計を発動し以後プロトロンビン転化の incubation time に従ってフィブリノーゲン時間を測定する。(手技は表 2 に示す)。

(1) 種々の preincubation がプロトロンビン転化におよぼす影響 (図 8)

形成速度は 10 分 > 15 分 (> 5 分) の順に大 (早い) である。20 分ではいづれも延長していた。すなわち、同じ量の mixture を有していながら、その促進系因子を適当に preincubate してからプロトロンビンに加えて転化をみたら、促進系 mixture はプロトロンビン転化に対して少しづつ異つた影響を表わす事実を

得た。preincubation 15 分でトロンビン産生量が最も多く転化も比較的早期に完了している。すなわち、mixture が 15 分の preincubation の間に preincubate しないものよりプロトロンビンの転化をかなり早期に最高に全うせしめるような結果を得た。従つて以下の実験の preincubation はすべて 15 分とする。

(2) preincubation が第 VII 因子の減少した促進系におよぼす効果

A の (6) の系列では第 VII 因子が 40% に減少しているが、ここでは更に第 VII 因子 20% を作り、この mixture を preincubate したものとしないものを比較した (図 9)。第 VII 因子の極端に減少した preincubate しない系列では 150 秒の incubation で 50 のトロンビンを産生するが、これを preincubate した mixture について行くと実に 138 の産生をみた。更に同様にして図 10 にみるように第 VII 因子 40% では preincubate しなければ 180 秒で 90 のトロンビンであるが、これを preincubate すると 168 にも達する。

表 2 プロトロンビネース作用の実験手技

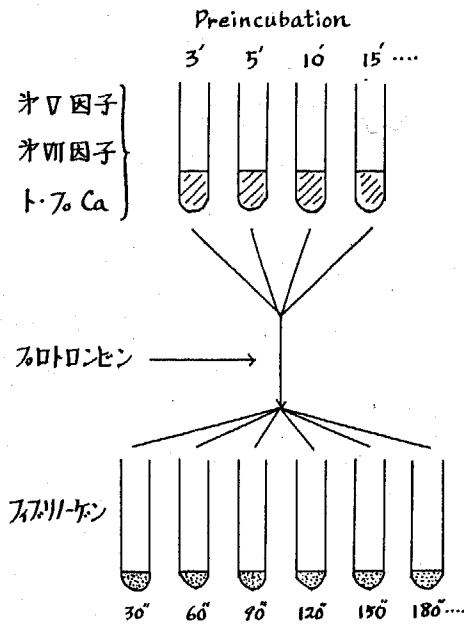
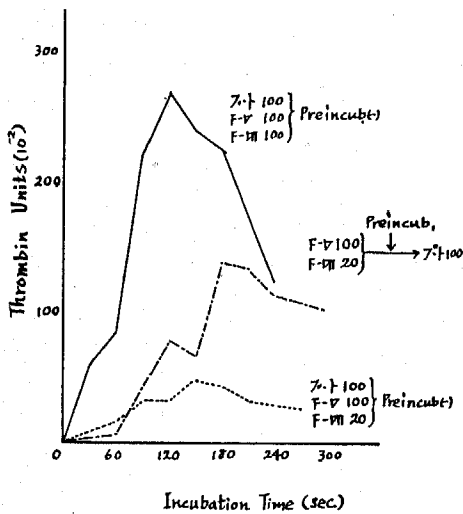


図 9 Preincubation が第VII因子20%減少の系列におよぼす促進効果



(3) preincubation が第V因子の減少した促進系におよぼす効果

図11のように第V因子が20%では preincubate したものとしないもの間で前者は67, 後者は70のトロンビンを形成し(転化時間はいずれも120秒~150秒), ほとんど差異はなく第V因子40%のものでも同様の傾向であった。

図 8 Preincubation Time が促進因子活性化におよぼす影響

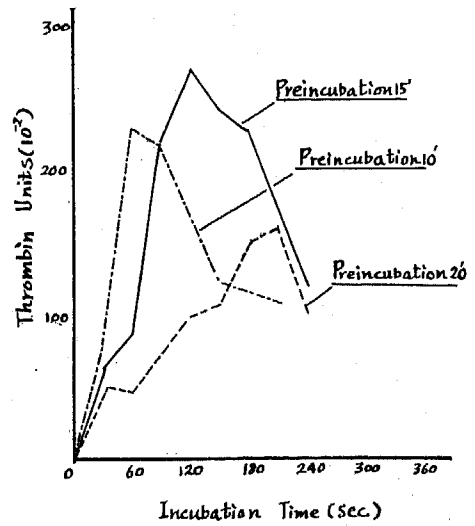
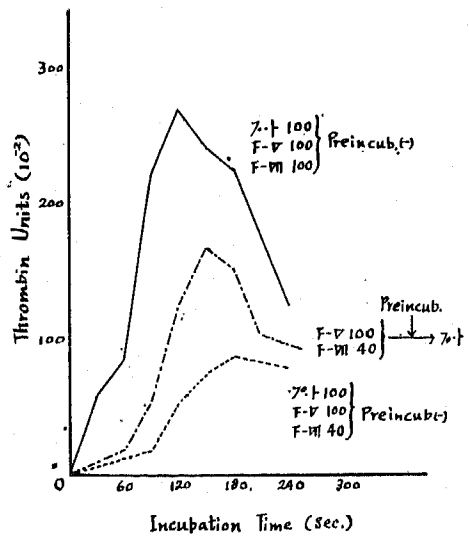


図10 Preincubation が第VII因子40%減少の系列におよぼす促進効果



(4) preincubation がプロトロンビンの減少した系列におよぼす影響

(プロトロンビン 30  
第 V 因子 100 (図 12)  
第 VII 因子 100

の組合せで各々 preincubate したものとしないものについてみると, 図12のように120~150秒の incubation の後に両者はほとんど差はなくトロンビン形成は不良である。



図11 Preincubation が第Ⅴ因子の減少した系列におよぼす影響

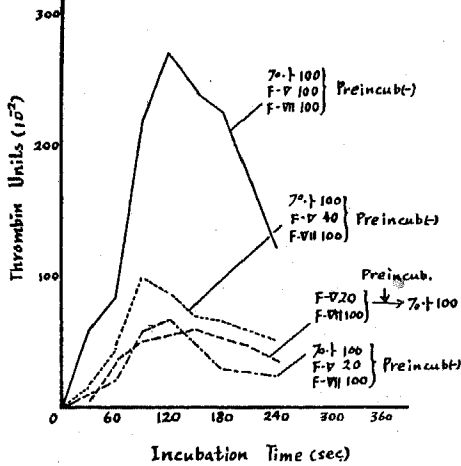
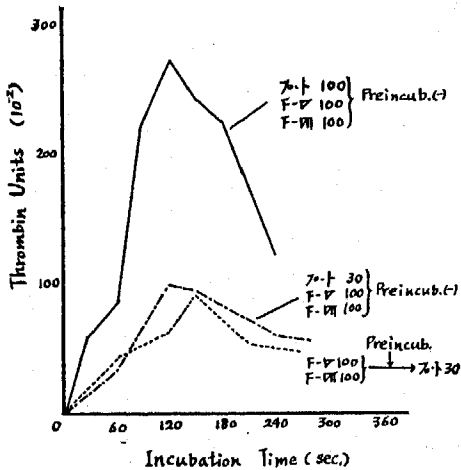


図12 Preincubation がプロトロンビンの減少した系列におよぼす影響



[小 括]

第Ⅴ因子のかなり大巾に減少した系列に少量の第Ⅶ因子を附加してもプロトロンビンの産生は余り増加しなかつたが、preincubate することにより急激に増加し、あたかもプロトロンビンを附加したようにみえた。これはプロトロンビネースが微量プロトロンビン→大量プロトロンビンに移行させるように働いたことを暗示しているかのようである。促進因子系の第Ⅴ、第Ⅶ因子が如何に充分存在していても、プロトロンビンそのものが減少した系列ではプロトロンビン産生は不良であることは既にAの(9)、(10)、(11)の実験で明らかであつたが、ここに更に preincubation により促進系を活性化し

ても効果はほとんどないことがわかつた。つまりプロトロンビネースは狭義の転化促進的すなわち第Ⅶ因子効果があり、第Ⅶ因子のみ強く減少した系列では preincubate によりあたかもプロトロンビンの様に働らき、プロトロンビンや第Ⅴ因子の減少は preincubation で改善効果はみられなかつた。

C: 微量プロトロンビンが促進系因子活性化におよぼす影響

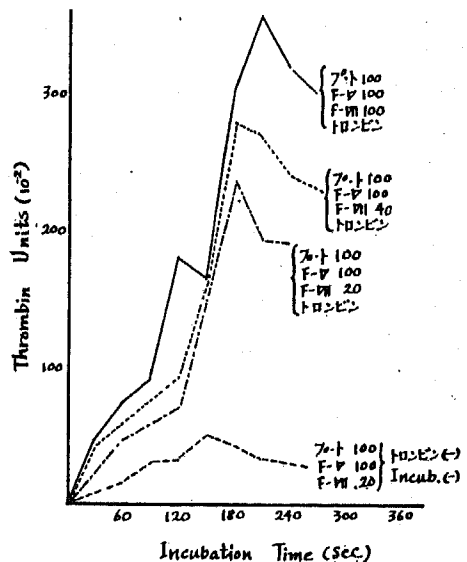
incubation mixture に予め別に微量のプロトロンビンを加えてこれと preincubation すなわちプロトロンビネース作用とが第Ⅴ、第Ⅶ因子に如何に影響するかを実験した。プロトロンビン、第Ⅴ因子、第Ⅶ因子がそれぞれ100%に存在する mixture に0.01単位のプロトロンビンを附加してから直ちにトロロンボラスチンを加え、これを以下に行う実験の standard とした。ちなみに0.01単位のプロトロンビンはプロトロンビンの減少した系列に加えるだけでは、それがプロトロンビン形成の絶対量を増加させるような影響はおよぼさない程度のものである。

- (1) 第Ⅶ因子が高度に減少した系列に微量プロトロンビンとプロトロンビネース作用のおよぼす効果

第Ⅴ因子 100 を15分 preincubate したのち  
 第Ⅶ因子 20  
 トロンビン } プロトロンビン:100  
 トロンボラスチン、Ca を加える

図13に示す。この組合せで control 356 (対照:

図13 微量プロトロンビンが第Ⅶ因子減少の系列におよぼす促進効果



第Ⅶ因子も100%のもの) に対し236のトロンビンを產生しているがこれはトロンビンも加えない preincubate もしない同じ mixture の系列 (50) と比べて約4.5倍のトロンビンを生じている。更に第Ⅶ因子40%の mixture について同様にしてみると278と一層増加している。

- (2) 第Ⅴ因子 20
  - 第Ⅶ因子 20
  - トロンビン
  - トロンボプラスチン, Ca
- (図14)

図14 (微量トロンビン + Preincubation) が第Ⅴ, 第Ⅶ因子減少の系列におよぼす効果

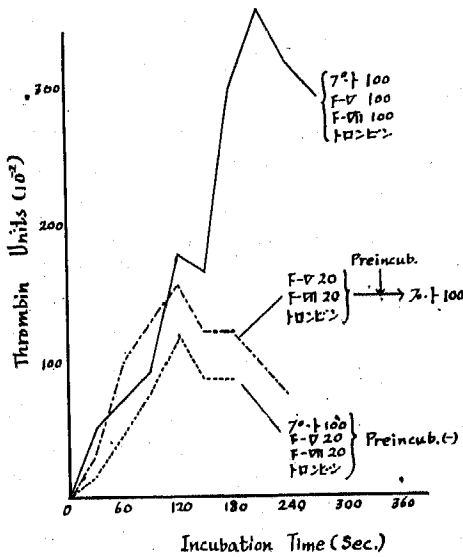
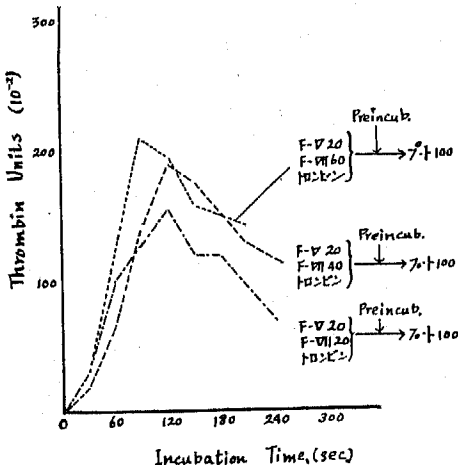


図15 微量トロンビン, Preincubation と第Ⅶ因子増減がプロトロンビン転化におよぼす効果



a) はじめからプロトロンビン: 100を加えて preincubate しなかつたものと, b) この mixture を preincubate したあとでプロトロンビン: 100を加えたものを比較すると, b) でもトロンビン產生はごくわずかし増加していない。

(3) 上の組合せのうち, 図15のように第Ⅶ因子のみを40%, 60%に増して同様 preincubate したら(2)の a) に比して1.2倍, 1.4倍であるが, その差は control からみると10.2%, 15.1%でしかない。後で転化時間は90秒に短縮した。

[小 括]

プロトロンビンは充分でも第Ⅴ因子が極端に低下している限り, 第Ⅶ因子が増加してこれにトロンビン附加および preincubation という促進因子活性化をはかつてトロンビン產生量は上昇しない。すなわちプロトロンビネース作用は転化促進的な働きが主であり, プロトロンビンと第Ⅴ因子が充分に存在して第Ⅶ因子のみが, かなりの低値である系列にはある程度のトロンビン產生を増強させるような働きのあることがわかつた。

V 総括および考按

プロトロンビンは, それが転化して生ずるトロンビンと共に最も古くから知られており, 現在の凝血学理論および検査法手技の中心であり, 出血性素因にあたってはまづ検査さるべきものであり routine に行われている。

プロトロンビン転化には諸種の仮説があり, 決定的なものはいまだ出されていない。血管外に出た血液が自然に固まつたり或る種の疾患で凝固時間が延びたり, 古くなつた血漿のプロトロンビン時間が長くなつていたり, このような観察過程を経てプロトロンビン転化促進因子の実体が段々と判明し, 各因子の発見, 作用機序の解明がなされて来た。血漿を保存するとプロトロンビン時間は延長するが1939年 Rhoads<sup>①</sup>らは bank blood についてこのことを観察している。1943年 Quick<sup>②</sup>はプロトロンビン時間の非常に延長している保存人血漿と Dicumarol でプロトロンビンの高度に抑制された血漿が互いに矯正し合うという結果を得た。彼はこのことからいわゆる「プロトロンビン」は単一な物質ではなく二つの component からなり一つは保存のうちに消失するもので, 他は Dicumarol で減少するといひ, のちになつてこれらの新因子は prothrombin component の真の構成物ではないが明らかに新しい作用をもつことを示したが, それらの一つは今日の第Ⅴ因子<sup>③</sup>を意味し, 他は第Ⅶ因子を意味す

ることは明らかである。眞のプロトロンビン減少によるものを true hypoprothrombinaemia といい、低プロトロンビン血症の存在は一段法による血漿プロトロンビン時間の延長によつて示されるが、第V、第VII因子のいずれかの減少によつてもプロトロンビンの減少していると同様の状態を呈するのでこれを pseudo hypoprothrombinaemia といい、Quick は一般的に hypoprothrombinemic state<sup>14)</sup>とよんでいる。Brinkhaus 並びにその共同研究者達が観察したところでは臍帯および新生児のプロトロンビン濃度は一段法では正常にできるのに二段法で行うと正常人の $1/3 \sim 1/4$ であることがわかつた<sup>15)</sup>。このうち labile factor (第V因子) については新生児でも成人と同じ濃度があるといわれる<sup>16)</sup>のでここにみられる hypoprothrombinemic state というのは stable factor (第VII因子) によるということになり Loeliger および Koller<sup>17)</sup>の言っているように stable factor は新生児血において減少しているので、プロトロンビン時間に対してこれを延長せしめるような結果となつたものである。二段法プロトロンビン測定法によらなければ眞のプロトロンビンの変動を把握できず、肝疾患時のプロトロンビン減少も一段法はそれを鋭敏に反映しないと Mann<sup>18)</sup>らも既に明らかにしているところである。1939年 Mertz, Seegers and Smith<sup>19)</sup>はトロンボプラスチンは Ca イオンの存在で、プロトロンビンと反応するとき消費される。過剰のプロトロンビンから生ずるトロンビンの量は reaction mixture に附加されるトロンボプラスチンの量に比例するという結論を得たが、Quick<sup>20)</sup>もこのことからトロンボプラスチンとプロトロンビンの間の反応は量論的であることがわかると同意している。Quick は更に Ca も反応中では量論的であるとも述べた。著者はトロンボプラスチン、Ca の等量混液を用いてプロトロンビン、第V、第VII因子の充分に存在する反応系における影響をみたが、この反応系からこれを除いた場合、プロトロンビンの転化は勿論起らないし、その減少では障碍され、低値より漸次増加するにつれて比例量論的にトロンビン形成も増加して行くことがわかつた。Ca は従来から凝固過程のどの相にも必要不可欠とされており、プロトロンビネースの形成→そしてこれがプロトロンビンに働いてトロンビン(少量)を形成する(松岡)<sup>21)</sup>過程にも Ca は必ず存在しているように、現在の凝血理論の趨勢はほとんど必須という意見<sup>22)</sup>で占められている。しかし中にはプロトロンビンの転化に Ca は必ずしも必要でないことを示す実験<sup>23)</sup>もみられる。

著者らは組織トロンボプラスチン形成に関して研究を行つた<sup>24)</sup>が、試剤として Ca、第V、第VII因子および第X因子と組織抽出液を混和した組合わせから一因子づつを除き検討し、プロトロンビン+フィブリノーゲンの substrate に対する凝固時間からトロンボプラスチン形成の機序をみた。この研究と本研究とはプロトロンビンおよび組織液(→組織トロンボプラスチン)のそれぞれの側からみたプロトロンビン転化の内容の検討でもあり類似の点が多い。ここで Ca を除外した場合に組織液はほとんど0に近い活性しか示さなかつたし、第V因子を欠いた時も10%程の活性を得たに過ぎなかつた。Mann ら<sup>25)</sup>は組織液が活性を得る前に血清因子と作用するし、Koller<sup>26)</sup>も組織トロンボプラスチンの活性に第VII因子が関与しているといつた。Flynn & Coon<sup>27)</sup>も同様の実験を行い、Ca がトロンボプラスチンと第VII因子の反応に必要であり、Hardisty<sup>28)</sup>も第V、第VII因子は組織トロンボプラスチンがプロトロンビンの転化を全うするのに必要であると述べている。いづれにしてもプロトロンビン転化に第V、第VII因子、トロンボプラスチン、Ca の4因子が必要なことはほとんど決定的であり、諸家の実験根拠に基いた同様の報告もみられる。

従来から accelerator of prothrombin conversion という名称で呼ばれているこの転化促進因子の主なもの第V、第VII因子である。これらははじめ proaccelerin<sup>29)</sup>、proconvertin<sup>30)</sup>という名で呼ばれ、前者は Owren<sup>31)</sup>、Quick<sup>31)</sup>に、後者は Ca の存在で互いに反応して Owren の convertin<sup>32)</sup>を形成するなど説明されている。Johnston らは plasma accelerator globulin (PACG) および serum accelerator globulin (SACG) について、S-E (Serum Eluate), AHF, 血小板、Ca が存在しても PACG, SACG の欠如ではプロトロンビン転化は起らず、SACG はプロトロンビン転化の率を早くし、形成されたトロンビン量は不変で、この面では PACG より一層 active であり、PACG は微量トロンビンによつて SACG 作用を営むようになるし、PACG のないものにトロンビンを加えても転化の量、割合は共に不変であると述べている。はじめ Seegers<sup>33)</sup>らがプロトロンビンのトロンビンへの転化に対して第V、第VII因子は単に転化速度のみならず収量にも関係するといつたが、第V因子については多くの研究者が量論説をとつており、著者の結果もそのようであつた。安部<sup>34)</sup>は1951年これが酵素的であると発表し、その後の実験でも同様のことを実証している。

Quick<sup>35)</sup>はプロトロンビン、第V因子、組織抽出液、

Ca の mixture 中での働らきをみて第 V 因子はトロンビン形成の速度および形成量のいづれにも影響することが明らかであると報告し、第 V 因子の促進効果は第 VII 因子とプロトロンビン転化因子であるプロトロンビネースを形成する組織抽出物の反応に影響が大であったといつた。Koller<sup>⑧</sup>は彼の stable factor はトロンビン産生の量にも関与することを示した。Koller は彼らの factor VII が Owren の proconvertin や factor VI, さらにプロトロンビネースと同様の働らきを有するものであることを推察している。著者の成績でこれを詳しく検討してみると、トロンボプラスチン Ca, プロトロンビンが100%でも第 V, 第 VII 因子が欠如するときは非常に微量のトロンビンしか形成されない。第 V, 第 VII 因子のうちの一つだけを極端に減少せしめ、以後段々に増量してプロトロンビンの転化をみると、第 V 因子は40%以下ではトロンビン収量は非常に不良であるが40%以上になると加速度的に増加する。第 VII 因子が低値の時は最高トロンビン量を産生する迄の経過時間すなわちプロトロンビン転化の速度が遅延しているが、40%以上に増加した場合はほとんど遅延を示さなくなる。すなわち第 V, 第 VII 因子の両方が60%づつ存在すれば転化時間はほとんど正常、トロンビン形成量は約70%となる。一方が充分に存在して一方のみが減少するといづれも40%位迄の減少ではプロトロンビン転化の大きな障碍はない。第 V, 第 VII 因子の減少した反応系について、それぞれの因子をふやしてみると第 V 因子は主として形成量を増し(量論的)、第 VII 因子は転化速度を促進させた(酵素的)。いづれも40%の減少がある時は一方のみを増加しても他因子の働らきを完全には代償しきれない。以上、両因子のプロトロンビン転化に関する働らきを数量的に解析した。Ferguson<sup>⑨</sup>らは、プロトロンビンが正常値で一定に存在するときは AcG (accelerator globulin = PAcG と同意) の過剰はプロトロンビン転化には影響なく、プロトロンビンが相当な低値で一定に存在する反応系では200~300%の AcG が凝固時間を短縮する。proconvertin の多量はプロトロンビンおよび AcG 低値をやむ改善するが完全に代償する効果はみられず同じこの反応系 AcG でさえ増加すれば proconvertin は低値でも凝固時間は余り延長しない。すなわち AcG の増加はトロンビン収量を増加させていることを明らかにした。そして Therriault<sup>⑩</sup>らは反応系でプロトロンビンの明らかな転化がみられない(遅延する)時期があり、これを lag period (=プロトロンビン転化形成機能)といい(S-E, phospholipid, CaCl<sub>2</sub>, プロトロンビンの)反応系に微量トロン

ビンを加えることは転化の start で lag period を早め、形成トロンビン量を多くするものではない。また S-E, AHG, PAcG, phospholipid, CaCl<sub>2</sub> を preincubate しておくこと lag phase を短縮することがみられたが、これはプロトロンビン転化促進因子を生ずることを示したものであると報告した。著者がプロトロンビネース作用について実験した結果も同様であったが、Owren は組織トロンボプラスチンと proconvertin および Ca の incubation で convertin の生成されることを表わしており、これは proconvertin deficient plasma に対する promoting effect ということであらわされている。

著者はトロンボプラスチン, Ca, (第 V), 第 VII 因子の mixture を preincubate したり、また微量トロンビンを附加することによりプロトロンビン転化促進作用の表われることをみ、特に第 VII 因子減少の系列に著明で、この際はトロンビン形成量をも僅少ながら増加するような結果を得ている。いづれにしても第 V 因子の量論的作用、第 VII 因子およびプロトロンビネースのプロトロンビン転化促進(酵素的)作用は多方面とみるところであり、著者もこれを実験的に証明した。たゞ、従来よりこれら構成因子の純度ということに多くの問題点を残している。本来なら第 V, 第 VII 因子がなりならプロトロンビンの転化は起らないとされているが、著者の実験では第 V, 第 VII 因子を 0 と設定しても遅い転化時間で少量ではあるがトロンビンの形成をみた。この場合 mixture 中の他の因子に起因したものであると思われ、この面から凝血機構の解明には化学的、生物学的により純粋な因子精製法が要求される。

## VI 結 論

プロトロンビンの転化におよぼす影響について、トロンボプラスチン, Ca, プロトロンビン, 特に第 V, 第 VII 因子について実験し、次の結果を得た。

(1) トロンボプラスチン, Ca はプロトロンビン転化には不可欠であり、その高度の減少は少量のトロンビンを形成するのみである。漸次増加するにつれトロンビン産生は比例量論的に増加する。

(2) 第 V, 第 VII 因子が欠如する場合、プロトロンビンの転化はほとんど起らない。いづれもが40%以下に存在する時はきわめて不良である。60%以上では転化速度はおもむね正常、トロンビンも正常の70%以上形成される。

(3) 第 V 因子のみが40%以下に減少している場合にトロンビン形成がやむ不良である。

(4) 第 V 因子を60%以上に増加すれば形成トロン

ビン量は(3)よりかなり増加する。

(5) 第V, 第VII因子が40%に減少している場合, 第V因子のみ160%に増量しても最終トロンビン量はほとんど増加しない。

(6) 第VII因子のみが40%以下に減少していればトロンビン収量は50%以上あり, 転化速度だけが遅延した。

これらのことよりいづれかが40%以上に存在して他因子がそれ以上あればトロンビン形成量はおもむね良好である。第V因子は量論的に働いてトロンビン形成量を増す働きをし, 第VII因子は主に酵素的に作用してプロトロンビン転化速度を早める。

(7) プロトロンビンの減少によつてトロンビン形成は減少し両者の作用は量論的である。

(8) トロンボプラスチン, Ca, 第V, 第VII因子のmixtureを15分間 preincubateした場合にフィブリノーゲン凝固時間を最も短縮した。

(9) preincubationは第V因子の減少した系列ではプロトロンビン転化改善の効果はほとんどみられず, 第VII因子の減少したmixtureにおいて著明であつた。(プロトロンビネース作用)

(10) プロトロンビネース作用はプロトロンビンの減少した系列では不良で, 第VII因子の減少した場合には転化改善効果が著明であつた。即ち酵素加速の効果と思われた。

(11) 微量トロンビンをmixtureに附加した作用も転化促進が主であつたが, 特に第VII因子の減少が強いmixtureでは微量トロンビンを附加するとトロンビン形成も増加の傾向にあつた。preincubationの上にもトロンビンを附加した場合にこの効果は特に著しかった。

本論文の要旨は第23回, 第24回日本血液学会総会において発表した。

## 文 献

- ①Morawitz, P.: *Ergeb. d. Physiol.*, 4: 307, 1905.  
 ②International Committee for standardization of Nomenclature of New Blood Clotting Factors. ③安部 英: *内科*, 9: 212, 1962. ④Quick, A. J., Stanley-Brown, M. & Bancroft, F. W.: *Am. J. Med. Sci.*, 190: 501, 1953. ⑤Surgenor, D. M., Alexander, B., Goldstein, R. and Schmidt, K.: *J. Phys. and Coll. Chem.*, 55: 94, 1951. ⑥Bidwell, E.: *Brit. J. Haemat.*, vol 35, 1955. ⑦Lewis, M. L. and Ware, A. G.: *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, 84: 636, 1953. ⑧Therriault, D.

- G., Gray, J. L. and Jensen, H.: *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, 95: 207, 1957. ⑨松岡松三: *臨床の日本*, 4: 676, 1958. ⑩Tocantins, L. M.: *The Coagulation of Blood*, Grunne & Stratton, New York, p. 11, 1955. ⑪Rhoads, J. E. and Panzer, L. M.: *J. A. M. A.*, 112: 309, 1939. ⑫Quick, A. J.: *Am. J. Physiol.*, 146: 212, 1943. ⑬Quick, A. J.: *Lancet*, 2: 379, 1947. ⑭Quick, A. J.: *Haemorrhagic Diseases*, Philadelphia, 78, 1957. ⑮Brinkhaus, K. M., Smith, H. P. and Warner, E. D.: *Am. J. Med. Sci.*, 193: 475, 1937. ⑯Quick, A. J., Murat, L. G., Hussey, C. V. and Burgess, G. F.: *Surg. Gynec. and Obst.*, 95: 671, 1952. ⑰Loeliger, A. and Koller, F.: *Acta haemat.*, 7: 157, 1952. ⑱Mann, J. D.: *Gastroenterology*, 21: 263, 1952. ⑲Merz, E. T., Seegers, W. H. and Smith, H. P.: *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, 42: 604, 1938. ⑳Quick, A. J.: *Science*, 106: 591, 1947. ㉑松岡松三: *臨床と研究*, 36巻, 1479頁, 1961. ㉒松岡松三・児島俊也ほか: *臨床血液*, 2巻, 5号, 264頁, 1961. ㉓Mann, F. D.: *J. Clin. Path.*, 19: 861, 1949. ㉔Mann, F. D. and Harn, M.: *Am. J. Physiol.*, 164: 105, 1951. ㉕Koller, F.: *Arch. exper. Path. Pharm.*, 222: 89, 1954. ㉖Flynn, J. E. and Coon, R. E.: *Am. J. Physiol.*, 175: 289, 1953. ㉗Hardisty, R. M.: *Brit. J. Haemat.*, 1: 323, 1955. ㉘Owren, P. A.: *Acta med. scand. suppl.*, 194: 1, 194. ㉙Owren, P. A.: *Proceedings of the 3rd International Congress of the International Society of Haematology*, New York, p. 379, 1951. ㉚Owren, P. A.: *Det Norske Videnskapsakademi: Oslo, Årbok*, 21, 1944. ㉛Quick, A. J.: *Am. J. Physiol.*, 140: 212, 1943. ㉜Owren, P. A.: *Proc. III. Cong. int. Soc. Haemat.*, Cambridge, England, 1950, p. p. 22, 379, 475, Grunne & Stratton, New York, 1951. ㉝Ware, A. G., Seegers, W. H.: *Am. J. Physiol.*, 152: 567, 1948. ㉞安部 英: *日血会誌*, 14: 218, 1951. ㉟Biggs, R. Macfarlane, R. G.: *Human Blood Coagulation and its Disorders*, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 73, 1957. ㊱Koller, F., Loeliger, A. and Duckert, F.: *Acta haemat.*, 6: 1, 1951. ㊲Deutsch, E. and Schaden, W.: *Biochem. Ztschr.*, 324: 266, 1953. ㊳Ferguson, J. H. and Patch, M. J.: *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, 93: 193, 1956. ㊴Bergsagel, D. E.: *Brit. J. Haemat.*, 1: 199, 1955.