

Antithrombin II および Antithrombin III に関する研究

I 測定法について

昭和34年9月17日受付

信州大学医学部松岡内科教室(指導:松岡松三教授)

宮坂博允

Studies on Antithrombin II and Antithrombin III

I. Method of Estimation

Hiromitsu Miyasaka

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

緒言

血液凝固生理学の分野で、凝固促進因子に関する研究の伸展は目覚ましいものがあるが、これに対し凝固抑制因子に関するものはやや遅れているうらみがあつた。松岡教授^①は血管内で血液が凝固せず流動性を保持しているのは一連の凝固阻止物質による調節作用が関与するとしてこれを重要視され、また血栓症の成因の解明、抗凝固剤療法の進歩等により、凝固に対し生理的な抑制作用を持つ抗トロンビン作用物質に多大の意義が認められつゝある。

血液凝固過程において生ずる Thrombin は現在のところ4つの因子により不活性化されると考へられているが、それ等は1954年 Seegers^②により各々に Antithrombin I, II, III, IV と命名された。

Antithrombin I は Fibrinogen が Fibrin へ転化する際に多量の Thrombin を吸着するのでこの特性に対して命名されたものである。

Antithrombin II は Heparin の Plaama-Co-Factor で Heparin と共同して Thrombin-Fibrinogen 反応を急速に阻止するように作用し別名を Thrombin-inhibitor, Heparinantithrombin, Immediate-antithrombin とよばれているものである。

Antithrombin III は Thrombin と結合してこれを Metathrombin に転化せしめて Thrombin 作用を消失せしめるもので別名を Plasmaantithrombin, Serumantithrombin, または単に Antithrombin と呼称されている。

Antithrombin IV は Thrombin の Metathrombin への転化を速進するとし、Antithrombin-accelerater と呼ばれているが確定的のことはまだわかっていない。

抗トロンビン作用物質中で臨床上特に意義を認められているのは Antithrombin II, および Antithrombin III であるが、Antithrombin I はその測定が困難

なために臨床的意義に関してはまだ不明である。Antithrombin II, および III の測定に関しては諸家により種々な方法が報告されているが、いずれも一長短があるので、著者は邦製試薬を使用して、Witte, Dirnberger^③等の考案した Antithrombin II, および III の分離測定法を検討しこれを改変して臨床検査に十分役立つことを認めたので報告する。

実験方法

原理:一定量の Thrombin 溶液を被検血清血漿の稀釈液に加へ20°Cで9分間 incubate して Thrombin を中和し、中和されずに残った Thrombin の活性度を一定量の Fibrinogen 溶液に加へてその凝固時間を測定し、これより総 Antithrombin 活性度が得られる。同じ血漿を56°Cで3分間加熱して遠心沈澱して得た脱線維血漿につきこれと同様な操作を行う。これより得られた凝固時間は9分間 incubate による血漿の Antithrombin III の活性度を示し、これは脱線維しない血漿より得られた値より減少して居る。

この両者の測定値の差が Antithrombin II の活性度としてあらわされる。

次でこの脱線維血漿を20°Cで30分間 incubate した後尚存在する Thrombin 活性度を測定すると、それより Antithrombin III の活性度が得られる。

実験材料

①1/10M 蔭酸ソーダ

②Tris-1/10N塩酸緩衝液:pH7.6に調製

試薬:Tris (Hydroxymethyl) aminomethane
第一化学薬品会社製

③稀釈液:上記緩衝液および生理的食塩水の等量混液。

④Fibrinogen 溶液:牛血漿より得た Fibrinogen (持田製薬会社製) 30mg を上記稀釈液 5cc にて溶解する。

⑤Thrombin 溶液:上記稀釈液で Thrombin (持

田製薬会社製)を溶解し、その0.1ccが上記 Fibrinogen 溶液 0.1cc を7秒にて凝固せしめる様に調整する。

実験中その溶液の Thrombin 力価を低下せしめぬ様に氷で冷却保存し可及的速やかに使用する。

⑥被検血漿： $1/10$ M 蓚酸ソーダ 1 容に対して被検者血液 9 容の割合で採血し 3000 回転 10 分間遠沈し上清を使用する。

⑦脱線維血漿：上記血漿の一部を 56°C で 3 分間加熱後直ちに冷却し遠沈して上清を使用する。

標準曲線の作り方

数名の健康者より得た新鮮血漿の各々を等量づつ混じその混合血漿より約 0.8cc の血漿を取り上記の如く脱線維する。未処置の蓚酸血漿を 0.5cc とりこれを等量の稀釈液と混合し、これより更に 50%, 25%, 12.5% の倍数稀釈液列を作る。0.2cc の Thrombin 溶液を入れた試験管に上記の血漿稀釈液の濃度の小なるものより 1 分間隔で加え一回よく振盪し 20°C に静置する。この混液は凝固する。8 分後にこの凝塊をピペットの先端で圧縮して得た混液の 0.1cc をとり 9 分後に 37°C に加温した Fibrinogen 溶液に加え凝固時間を測定する。この値は Antithrombin II および 9 分 incubate による Antithrombin III との活性度の合計であり総 Antithrombin 活性度である。

同様な事を脱線維血漿の 20°C に 9 分間 incubate したものについて行い、これより 9 分間 incubate による Antithrombin III の活性度が得られ、更に 30 分間 incubate したものについて行い、これは最高の Antithrombin III の活性度が得られる。最初の血漿溶液は 50% の溶液であるが中に含まれる Antithrombin

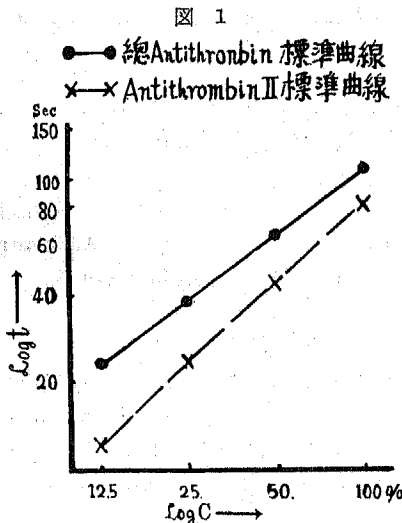
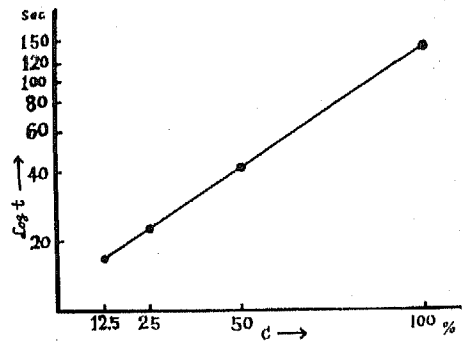


図 2
Antithrombin III 標準曲線



活性度は 100% として記載することとする。

総 Antithrombin 活性度は両対数座標で凝固時間を縦軸とし、其の濃度を横軸にとると図 1 に示されるように略々直線となる。

Antithrombin II を知るためには総 Antithrombin 値より脱線維血漿を 9 分で incubate して得られた値を減ずればよい。すなわち図 1 に示されるように総 Antithrombin の曲線と同様に略々直線となり、より急傾斜をなす。

Antithrombin III の活性度は図 2 に示されるように片対数座標で凝固時間を縦軸にその濃度を横軸にとると略々直線となる。

この各々の標準曲線を使用すれば被検血漿の任意の濃度 (例へば 25%, 50%) につき測定してこの標準曲線より Antithrombin II, および III の濃度を知ることができる。

正常範囲の決定

上記の方法により作成した標準曲線を利用して健康人男女各々 10 名につき測定し正常範囲を求めると、各々の値は表 1, 図 3 に示した如く総 Antithrombin 値の正常範囲は 5% の危険率で

$$120.4 \geq x_0 \geq 76.42 (\%) \text{ であつた。}$$

Antithrombin II では

$$123.28 \geq x_0 \geq 79.72 (\%)$$

Antithrombin III は

$119.02 \geq x_0 \geq 87.78 (\%)$ であり、Antithrombin III の正常範囲は Antithrombin II のそれよりもやや狭い。

Thrombin 溶液の安定性の検討

前記の Thrombin 溶液は pH 7.6 で氷による冷却保存の状態でも、その力価は減少の傾向を示した。すなわち標準 Fibrinogen 溶液 0.1cc を 7 秒で凝固せしめるように調整した標準 Thrombin 溶液の力価を

表 1. 健康人における総 Antithrombin, Antithrombin II および III

氏名	年齢	性別	総 Antithrombin	Antithrombin II	Antithrombin III
古田	28	♂	112%	114%	110%
萩原	33	♂	108	110	108
小野	32	♂	96	98	100
宮坂	29	♂	102	104	108
岡村	29	♂	92	94	96
児島	27	♂	82	84	94
吉井	36	♂	92	96	94
村山	33	♂	100	104	96
大村	36	♂	118	120	110
原田	33	♂	110	112	108
林	27	♀	100	104	108
児井	25	♂	104	106	100
太田	22	♂	106	110	108
井出	22	♂	112	114	108
服部	40	♂	100	104	96
小池	24	♂	96	96	90
小川	22	♂	80	84	108
衣川	25	♂	94	96	114
太田	28	♂	86	88	98
松田	25	♂	104	106	98

表 2.

経過時間 (調製後)	10分	15分	30分	60分
Thrombin力価	100%	96%	94%	94%

100%として時間の経過に従って測定した。その成績は表2の如くで60分後にその効力はやゝ減弱し、従って調製後15分以内に使用する必要がある。

Thrombin 溶液の安定性の検討

Fibrinogen は各バイアルでやゝ異つた凝固時間を示したが、Fibrinogen の溶解後1時間以上経過すると溶液の白濁が増加し凝固時間の延長の傾向を認めた。

加熱による脱線維血漿および新鮮血清中の Antithrombin III 活性度の比較

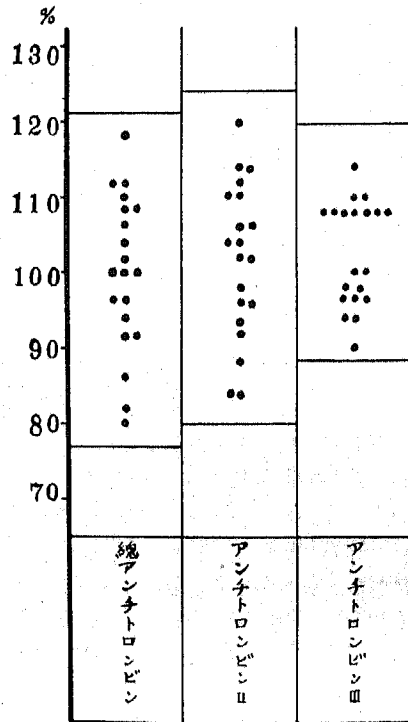
Marx^④は Antithrombin III の測定で血漿を加熱して脱線維することはその活性度の低下を起さしめるとしたが、Thrombin の添加による脱線維も添加する Thrombin に問題があるように思われる。又自然凝固後の新鮮血清を使用してもその中の Antithrombin III の一部は Thrombin の Metathrombin への転化にすでに消費されているのでこれにも異論がある。

著者は加熱による脱線維血漿と新鮮血清との Anti-

表 3.

健康者例	加熱脱線維血漿中の Antithrombin III	新鮮血清中の Antithrombin III
1	100 %	96 %
2	100	100
3	100	96
4	100	104

図 3. 健康人における総 Antithrombin, Antithrombin II および Antithrombin III の正常範囲



thrombin III 活性度を健康者4名について検討し、各人の加熱脱線維血漿中の Antithrombin III の活性度を100%として標準曲線を作り、それより血清中の Antithrombin III の活性度を算出した。その成績は表3の如く加熱脱線維血漿と新鮮血清中との Antithrombin III 活性度の間には著しい差を認めなかつた。

考按並びに総括

Antithrombin II および III の測定は血液凝固因子の測定として重要と思われるが、その測定は Jürgens^⑥, Quick^⑥, Schultze, Schwick^⑦, Marbet, Winterstein^⑧, Astrup, Darling^⑨, Sokal^⑩, 等により多数報告されているがそのいずれも一長一短があり臨床検査上手

技が比較的簡便で正確であるものは少く、かつ又本邦では外国試薬の入手困難があるために良法でも実施し難い欠点がある。一方これ等の因子の測定を困難ならしめているのはいずれの方法でも被検血漿に標準 Thrombin 溶液を作用させて残存する Thrombin 量を測定することに基いており、かつ Antitrombin II, および III は互に干渉し合うので一緒に測定される危険がある、この両者を区別して測定するために各々の異った特性が利用されている。すなわち Schmidt^①, Seegers^②, Dirnberger^③ 等は Antithrombin II は 10分足らずの incubate でその活性度は最高となり、これに反して Antithrombin III は最高活性度に達するには少くとも 30分の incubate を必要とするとしている。また Antithrombin II は血漿を脱線維することによりその活性を失うが、これに反し Antithrombin III は安定でありかつ耐熱性である。Witte, Dirnberger^④ 等はこの特性を利用して両者を区別し、かつ同時に測定する方法を考案した。

著者は本法を検討してこれを改変し本邦製試薬を使用して標準曲線を作成した。その際に使用する Thrombin 標準液を毎回正確に調製するのに困難を感じ、また本溶液は前述の如く比較的短い時間内でもその力価の低下する傾向を認めた。また Fibrinogen 溶液も可及的速やかに使用しないと測定に誤差を生ずる危険がある。それ故測定はなるべく速やかに行いまた測定時には必ず健康者数名の Pool した血漿、もしくは予め測定して得た Antithrombin II および III の 100% に近い値を示した者の血漿を選んで標準曲線を毎回作成し、それを使用して被検血漿の測定を行つている。このようにすれば標準 Thrombin 溶液の調製に高度の正確さを必要とせず、得られた値も信用できる。前述の如く加熱による脱線維血漿と新鮮血清との Antithrombin III の活性度の比較でも著しい差が認められず、臨床上では本法による Antithrombin III の測定は十分の正確さをもっているものと考えられる。

結 論

著者は Witte, Dirnberger による Antithrombin II および III の測定法を検討し、日本製試薬を用いて測定する方法を考案した。

本法による本邦人の正常値は総 Antithrombin は 120% ~ 76% Antithrombin II は 123% ~ 79% Antithrombin III は 119% ~ 87% であつた。

終りに恩師松岡松三教授の御指導、御校閲に深甚なる謝意を奉げます。また種々な御助力を承つた小口源一郎講師に深謝致します。

本論文の要旨は第 20 回日本血液学会総会 (昭和 33 年) において発表した

文 献

- ①松岡松三：内分泌と代謝 1 巻 1 号 148 ②W. H. Seegers, J. F. Johnson, C. Fell, : Amer. J. Physiol. 176, 96 (1954) ③S. Witte, P. Dirnberger, : Klin. Wschr. 31, 598 (1953) ④R. Marx, : I. Symposium Dtsch. Arb. Gemeinschaft Blutgerinnungsforsch. 32, 646 (1954) ⑤J. Jürgens, : Materia. Med. Nordmark 8 (1956) ⑥A. J. Quick : Amer. J. Physiol. 115, 317 (1936) ⑦H. E. Schulze : G. Schwick, : Laboratoriumsblätter Behring Werke Nr. 2, (1953) ⑧R. Marbet, A. Winterstein, : Manuskript Hoffmann-La Roche ⑨T. Astrup, S. Darling, : Acta. Physiol scand (stockholm) 4, 293 (1942) ⑩G. Sokal, : Acta. haematol. 14, 34 (1955) ⑪J. Schmidt 4, : Die Blutgerinnung in Theorie und Praxis. Wien Wilhelm Maudlich (1951) ⑫W. H. Seegers, K. D. Miller, E. B. Andrews, R. C. Murphy : Amer. J. Physiol. 169, 706 (1952)