

fact has no relation with the formation of hemolysine, for the increase can be seen even after the injection of nonantigenic protein such as gelatin or corpuscles of the same species.

3) The pseudoglobulin fraction of normal or immunized rabbit serum and the purified hemolysin indicate no differences concerning with the

amino acid content such as tryptophan, arginine, histidine, cystine, and tyrosine.

4) The pseudoglobulin of immunized rabbit serum is not antigenic against normal rabbits.

Thus the hemolysine could not be distinguished from the pseudoglobulin of normal serum chemically or serologically.

プロトロンビンおよび不安定因子に関する研究

I. 不安定因子の測定法について

昭和32年5月1日受付

信州大学医学部松岡内科教室 (指導: 松岡松三教授)

萩原洋三

緒言

プロトロンビンがトロンビンに転化する際に、トロンボプラスチン、カルシウムイオンの他に血漿中の因子の存在が必要であることは、今日一般に認められる所である。ここにいう不安定因子とはトロンビン形成に必要な血漿因子の一つであつて、Quick^①が1943年に Component A of Prothrombin として始めて提唱し、後に Owren が V因子^②又は Proaccelerin^③, Seegers 等^{④⑤}が Plasma Ac-Globulin と言つたが、現在では一般には不安定因子^⑥または V因子の名称で代表せられているものである。

不安定因子の測定法に関しては、Quick&Stefanini^⑦, Stefanini^⑧, Wolf^⑨, Lewis & Ware^⑩及び松岡, 大屋^⑪等によつて種々の方法が報告されているが、その測定に際して最も問題となる所は、不安定因子の消失した、すなわち不安定因子を含まない一定の血漿を如何にして得るかという事である。Quick^⑦は蔘酸血漿を氷室に保存すると約2週間で不安定因子の消失した血漿を得るとし、Wolf^⑨は37°Cの恒温槽に24時間保存した蔘酸血漿が、不安定因子の消失した一定の血漿として使用し得ると言つている。著者は、氷室に保存し保存日数を一定にした場合の血漿の不安定因子の消失の程度を、37°Cの恒温槽に24時間保存した血漿の場合と比較検討し、併せて不安定因子を測定する方法を考案したので報告する。

保存血漿の不安定因子の態度

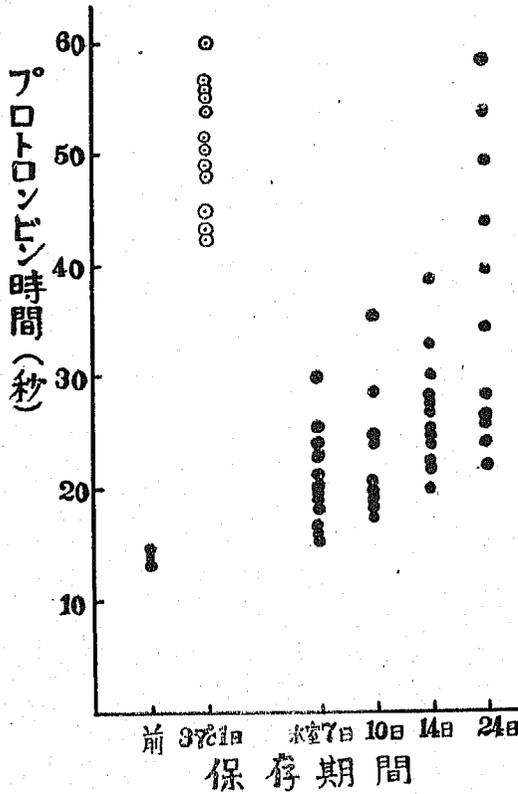
- (1) 氷室保存による血漿の不安定因子の消失の検討

Quick^⑦は2週間以上氷室に保存した蔘酸血漿は、不安定因子の消失した一定の血漿であると述べているが著者の測定した健康者12例の氷室保存血漿の松岡一段法^{⑩⑪}によるプロトロンビン時間の推移は表1及び図1に示した如く、2週間では20.2~38.6秒の間に、3週間では22.4~57.9秒の間に散在し、一定の不安定因子消失血漿を得る事が甚だ困難である。一方、Wolf^⑨も言つている様に、如何に氷室保存とは言え長期に亘る保存は、血漿蛋白の変質、細菌感染等の危険が当然考慮されなければならない。従つて氷室保存血漿を用いて行ふ不安定因子の測定法は不適當と考へる。

表1 蔘酸血漿氷室保存によるプロトロンビン時間の推移

実験例	氷室保存日数					
	前	7日	10日	14日	21日	
上	♂ 25	13.5"	23.0"	24.2"	25.5"	25.9"
小	♂ 30	13.8	30.0	35.2	38.6	43.7
中	♂ 28	13.2	20.1	20.9	22.0	26.2
今	♂ 28	13.2	25.3	28.7	30.0	57.9
大	♂ 16	13.3	19.7	20.2	27.8	49.6
望	♂ 28	14.8	21.2	21.4	32.9	53.3
安	♂ 30	14.1	15.6	17.6	25.0	39.5
西	♀ 19	14.2	18.2	19.7	20.2	22.4
丸	♀ 19	13.6	24.0	24.5	27.4	28.3
丸	♀ 23	13.8	19.3	20.5	27.1	26.5
衣	♀ 22	13.5	16.4	18.4	22.5	24.5
太	♀ 28	15.0	16.2	20.9	24.2	34.1

図1 氷室保存と37°C 24時間保存の血漿中の不安定因子の態度



(2) 37°C, 24時間保存による不安定因子の消失の検討

健康者尿酸血漿を37°C, 24時間恒温槽に保存した場合のプロトロンビン時間(松岡一段法)の変動は表2及び図1に示した。著者の測定した12例については42.2~60.2秒の間にあつて、Wolf^①の言っている様には全く一定のものは得られないが、その動揺範囲は氷室保存に比較すれば遙かに小さい。又、37°C恒温槽に保存した健康者尿酸血漿を短時間々隔で、プロトロンビン時間の変動を追求した結果は表3及び図2に示した。不安定因子消失の過程は大体同じ傾向を示し、個人による著しい差異を見ない。

以上の事実に基づいて、著者は24時間、37°C保存血漿を用いて不安定因子を測定する方法が、氷室保存の血漿を用いる場合より勝れている事を知り、前者を用いて不安定因子測定法を検討した。

実験方法

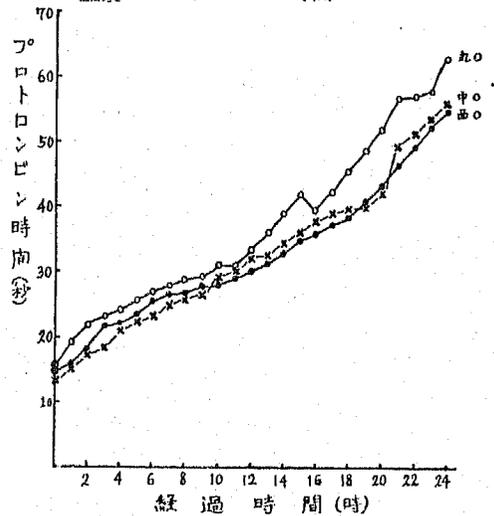
(1) 実験材料

① $\frac{1}{10}$ M尿酸ソーダ

表2 37°C, 24時間保存による血漿プロトロンビン時間の推移

実験例	血漿の種類		前	24時間後
	性別	年齢		
荻	○	♂ 30	14.2"	53.6"
小	○	♂ 25	13.5	60.2
古	○	♂ 25	13.8	48.6
栗	○	♂ 30	14.5	45.2
中	○	♂ 28	13.9	55.8
安	○	♂ 30	14.3	49.3
岡	○	♀ 20	14.6	51.6
丸	○	♀ 19	13.8	42.2
衣	○	♀ 22	13.2	43.8
西	○	♀ 19	14.0	57.9
服	○	♀ 45	14.3	56.3
足	○	♀ 28	14.9	50.5

図2 37°Cに放置して短時間々隔で追求せる血漿のプロトロンビン時間



② $\frac{1}{40}$ M塩化カルシウム

③ 兔脳トロンボプラスチン液
(松岡調整法^{⑩⑪})

④ 37°C, 24時間保存の健康者尿酸血漿

($\frac{1}{10}$ M尿酸ソーダ1容に対し健康者血液9容の割合に採取した血漿を保存する)

⑤ 被検血漿

($\frac{1}{10}$ M尿酸ソーダ1容に対し被検者血液9容の割合に採取した新鮮血漿)

(2) 測定法

被検血漿 0.01cc., 保存血漿 0.09cc.の混液 0.1cc.に

表 5 新鮮血漿，吸着血漿による不安定因子量測定と比較

実験例	血漿種類	不安定因子量%										
		100	90	80	70	60	50	40	30	20	10	
荻 ○ ♂ 29才	新鮮	35.0	32.0	35.7	40.0	39.8	39.1	43.1	44.4	47.9	52.2	
	吸着	34.2	38.0	38.5	40.0	38.2	41.6	42.6	43.9	45.9	51.2	
丸 ○ ♀ 19才	新鮮	27.1	28.4	29.1	31.1	32.1	33.6	36.4	38.4	40.0	42.5	
	吸着	26.8	27.2	27.7	28.1	30.1	32.1	34.8	34.9	40.9	41.3	
今 ○ ♂ 28才	新鮮	26.8	30.5	30.8	31.0	32.4	34.6	37.8	42.2	48.1	48.8	
	吸着	27.3	30.5	32.1	31.2	32.5	34.0	36.2	39.0	46.8	50.2	

図 4 37°C, 24時間保存血漿を使用せる場合の不安定因子測定標準曲線

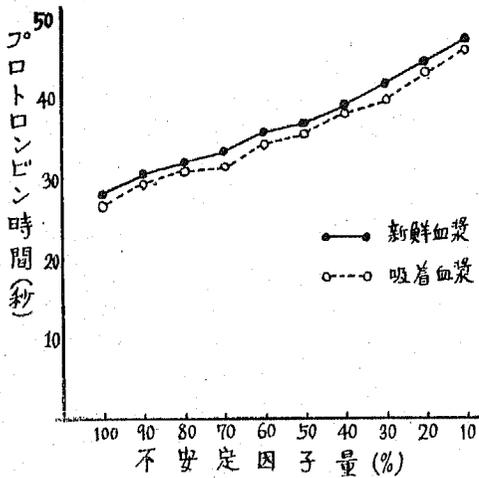
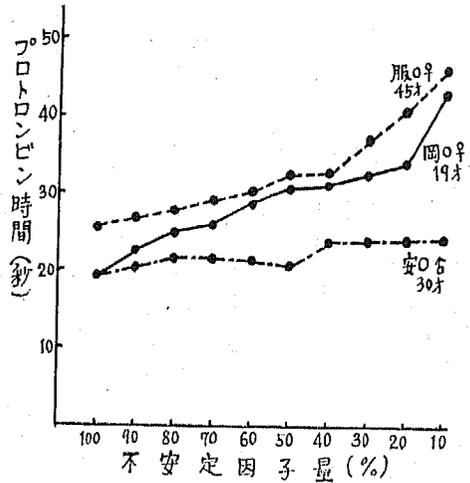


図 5 氷室保存血漿を使用せる場合の不安定因子測定標準曲線



れる。

総括並に考按

不安定因子の測定は血液凝固因子の測定の一つとして、現在の血液凝固学の研究に於て必要かくべからざるものであるが、それには不安定因子の消失した血漿を人工的に作ることが必要である。Quick^⑦は健康者の蔭酸血漿を、氷室に2週間以上保存することによつて不安定因子の消失した血漿を得られるとしているが、Wolf^⑧の指摘している如く種々の難点がある。すなわち、プロトロンビン時間の変動の巾が広いこと、蛋白質性を来たすこと、細菌感染の危険のあること、及び長期保存は日常検査として不便であることを挙げている。著者の実験によつても Quick の言う如く、必ずしも不安定因子の消失した一定の血漿を得る事は困難である。一方又、Wolf に従えば 37°C, 24時間恒温槽に保存した健康者蔭酸血漿が、不安定因子の消失した一定の血漿であると言っている。著者も実験によつてこの事を確かめ、不安定因子測定に使用し得

る事を知つた。著者は此の 37°C, 24時間保存した蔭酸血漿を用いて不安定因子の測定法を検討し、その 0.09cc. と被検新鮮血漿 0.01cc. とを混合し、之について松岡一段法でプロトロンビン時間を測定する事によつて、予め作つた不安定因子稀釈標準曲線から不安定因子量の測定可能である事を知つた。

結 論

- (1) 氷室保存血漿は不安定因子測定に使用することは不適當である。
- (2) 37°C, 24時間恒温槽に保存した健康者蔭酸血漿は、不安定因子の消失した一定の血漿として不安定因子測定に使用出来る。
- (3) 37°C, 24時間保存した健康者蔭酸血漿を用いて不安定因子測定法を考按した。

(終りに恩師松岡松三教授の御指導と御校間に深甚な謝意を捧げます。尙本論文の要旨は昭和31年5月4日、第18回日本血液学会総会で発表した。)

参考文献

- ①Quick, A. J.: *Am. J. Physiol.*, 140: 212, 1943.
 ②Owren, P. A.: *Acta med. Scandinav.*, Suppl. 194, 1947. ③Owren, P. A.: *Rev. hæmat.*, 6: 135, 1951.
 ④Ware, A. G., Guest, M. M., & Seegers, W. H.: *Science*, 106: 41, 1947. ⑤Ware, A. G., Guest, M. M., & Seegers, W. H.: *J. Biol. Chem.*, 169: 231, 1947. ⑥Quick, A. J.: *Am. J. Physiol.*, 151: 63, 1947. ⑦Quick, A. J., & Stefanini, M.: *J. Lab. Clin. Med.*, 33: 819, 1948. ⑧Stefanini, M.: *Lancet*, 1: 606, 1951. ⑨Wolf, P.: *J. Clin. Path.*, 6: 34, 1953. ⑩Lewis, M. L., & Ware, A. G.: *Proc. Soc. exp. Biol. & Med.*, 84: 640, 1953. ⑪大屋匡人: *日内会誌*, 43: 455, 1954. ⑫松岡松三: *日内会誌*, 37: 195, 昭24. ⑬松岡松三: *日本医事新報*, 1314: 37, 昭24,

Studies on Prothrombin and Labile Factor

1. One Stage Method for Quantitative Determination of Labile Factor

Yozo Ogiwara

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

In 1948 Quick and Stefanini described that labile factor deficient plasma could be obtained by storage of normal human oxalated plasma at +4°C for over two weeks. By the author's experiment, however, a constant prolonged prothrombin time could not be obtained with such procedure. On

the other hand, labile factor deficient plasma prepared by incubating fresh normal oxalated plasma at 37°C for 24 hours showed relatively constant prothrombin time. Using this plasma, labile factor activity of a given plasma can be determined. The procedure is as follows:

1) Preparation of standard dilution curve for the determination of labile factor activity:

Dilutions were made of normal oxalated plasma with saline solution from 100% to 10% at 10% intervals. Adding 0.01 ml of each diluted normal plasma to 0.09 ml of the above mentioned incubated plasma, the clotting time of each sample is determined with the one-stage technic of Matsuoka (modification of Quick's technic). The mixture of 0.01 ml of 100% normal plasma and 0.09 ml of the incubated plasma is considered to have 100% labile factor activity. The concentration of labile factor was entered on the abscissa and the clotting times on the ordinate. This curve may be used as the standard dilution curve for the determination of labile factor activity in plasma.

2) Determination of labile factor activity of a given plasma:

0.01 ml of a given plasma is added 0.09 ml of the incubated plasma. The clotting time of the mixture is determined with Matsuoka's one-stage technic of prothrombin time test. The labile factor activity (%) of a given sample is obtained by means of the standard dilution curve.