

Dextran sulphate の抗凝固作用に関する実験的研究

鳥取大学医学部臨床検査医学教室 (主任 中村克己教授)

飯 島 憲 司

An experimental study on the anticoagulant properties of dextran sulphate

Kenji IJIMA

Department of Clinical Laboratory Medicine, Tottori University School of Medicine, Yonago 683, Japan

ABSTRACT

The anticoagulant properties of dextran sulphate (DS) which belongs to the same family of glycosaminoglycans as heparin were studied *in vitro* in comparison with heparin, in regard to antithrombin activity, anti- Xa activity, platelet in relation to Xa neutralizing activity, and inhibition of fibrinogen-fibrin conversion.

The results were as follows.

1. DS could neutralize the amidolytic activity of thrombin or factor Xa in presence of antithrombin III (AT III), but no effects in absence of AT III.
2. The factor Xa neutralizing activity of DS-AT III complex was enhanced by platelet, whereas the activity of heparin-AT III complex was diminished by platelet.
3. The potentiating factor of platelet which enhanced the activity of DS-AT III complex seemed to be a protein located on the platelet membrane, 100,000-200,000 in molecular weight, that differed from heparin neutralizing protein, platelet factor 4. This potentiating factor of platelet could not cooperate with heparin.
4. DS could inhibit the fibrin polymerization process independent of AT III. Heparin showed the weak inhibition in the same manner.

These results demonstrated that DS prevented the blood coagulation by accelerating the inhibitory activity of AT III, just as heparin. It was found that DS had an inhibitory effect on fibrinogen-fibrin conversion in absence of AT III in addition to being a potentiator of AT III.

(Accepted on August 27, 1987)

デキストラン硫酸 (dextran sulphate : DS) は O-硫酸基を有するムコ多糖類で、O-および N-硫酸基を有し、同じくムコ多糖類であるヘパリン¹⁹⁾と類似の構造を持つ一種の heparinoid であり (図 1-1, 1-2)、ヘパリンと同様に抗凝固作用を有する⁷⁾。さら

に DS は線溶能亢進作用^{39),42)}、抗血小板凝集作用⁹⁾、高脂血清浄作用^{6),44)}、血漿粘度低下作用¹⁶⁾などのあることが知られており、それぞれの目的で臨床的に広く使用されている。しかしながら、DS の濃度によっては凝血促進¹⁵⁾、線溶阻害⁴⁰⁾、血小板凝集促進²⁴⁾などの作

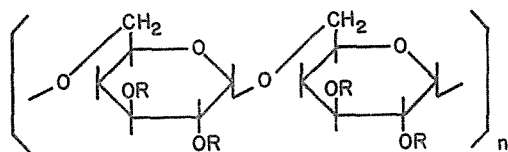


図 1-1. デキストラン硫酸の一次構造
Rは SO_3Na または H

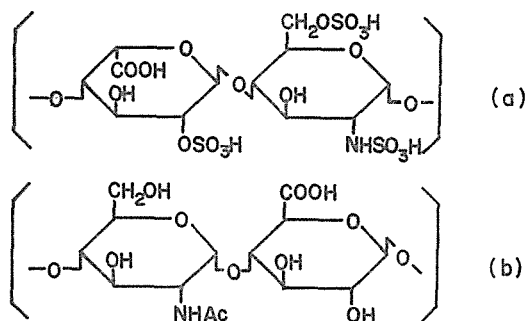


図 1-2. ヘパリンの一次構造
(a) の繰り返し構造の中に
(b) が挿入される

用もあることが報告されており、DS の多岐にわたる複雑な生体への影響をうかがわせる。また、血管内凝固症候群に対する治療剤として DS の投与も提唱されている²²⁾ことから DS の抗凝固作用機序を解明することは臨床の面からも必要なことである。以下、DS の抗凝固作用についてヘパリンと対比しつつ、種々の検討を行った。

材 料

1. 抗トロンビン作用および抗 Xa 作用

(1) DS は MDS コーワ注 300 (平均分子量 3500, イオウ含量 4.3%; MDS-A, Lot. LA 112; 興和新薬) を用いた。本剤は MDS-A300 mg を 0.1% 炭酸水素ナトリウム加生理食塩水に溶解してあるため、一部の試験については DS 単品 (興和新薬より供与) の生理食塩水溶解液についても併せて検討した。

(2) ヘパリンはヘパリンナトリウム注 N 「シミズ」 (Lot. A 6055; 清水製薬) を用いた。

(3) 正常血漿は Ci-trol I (Dade) または健常者プール血漿を用いた。

(4) ベントナイト吸着血漿は正常碳酸血漿 1 ml に対してベントナイト (和光純薬) 300 mg を加えて 10

分間攪拌し、3000 rpm 15 分遠心後の上清を用いた。この吸着血漿中には合成基質法 (Kabi)²⁷⁾、一元免疫拡散法 (Hoechst)²⁸⁾ 両法による検討で antithrombin III (AT III) は吸着されて消失しており、また一元免疫拡散法による検討で α_2 macroglobulin ($\alpha_2\text{M}$) および α_1 antitrypsin ($\alpha_1\text{AT}$) は未吸着残存していることを確認した。

(5) トロンビン中和能測定にはヒトトロンビン (3.5 nkat/ml, Kabi) および合成基質 S-2238 (Kabi) を、Xa 中和能測定には Xa (7.1 nkat/ml) および合成基質 S-2222 (Kabi) をそれぞれ用いた。

(6) 精製 AT III (1 unit/ml) は Kabi 社製の標品を用いた。

2. 血小板因子の調整

(1) EDTA-2K でキレートした血液を 1000 rpm 10 分遠心することにより多血小板血漿を作製し、それをさらに 3000 rpm 15 分遠心して血小板ペレットを得た。このペレットを 0.05 M トリス-EDTA 緩衝液 (0.15 M NaCl, 1% EDTA-2K を含む, pH 7.4) で繰り返し洗浄し、さらに 0.05 M トリス緩衝液に再浮遊して洗浄血小板とした。この間の操作はすべてプラスチック製の器具で行い、可能な限り血小板の破壊を避けた (intact 血小板)。また、この intact 血小板について凍結融解を 3 度繰り返すことにより破砕血小板を得た。

(2) 濃厚血小板液を上記と同様の方法で洗浄後、10,000 rpm 30 分遠心し、その上清を血小板抽出液とした。血小板抽出液をヘパリンセファロース CL-6B (Pharmacia) を用いたアフィニティークロマトグラフィーによって分画した。ヘパリンセファロースに非吸着分画は後述の Con A アフィニティークロマトグラフィーおよびゲルクロマトグラフィーの試料とした。また、ヘパリンセファロース吸着蛋白は 0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) で塩濃度を段階的にあげることにより順次溶出し、2.0 M NaCl 溶出分画を 0.05 M トリス緩衝液 (0.15 M NaCl を含む, pH 8.4) に対して透析し、血小板第 4 因子¹¹⁾²²⁾ として実験に用いた。

(3) ヘパリンセファロース非吸着分画は Minicon B15 (Amicon) で濃縮後、Con A セファロースアフィニティークロマトグラフィー (Pharmacia) を行った。非吸着蛋白は 0.02 M トリス緩衝液 (0.5 M NaCl, pH 7.4) で、吸着蛋白は 0.2 M methyl- α -D-mannopyranoside (Sigma, Grade III) を含む 0.02 M トリス緩衝液 (0.5 M NaCl, pH 7.4) で溶出

した。Con A 非吸着分画についてはさらにセファローズ CL-6B (Pharmacia) を用いたゲルクロマトグラフィーを行った。溶出には 0.05 M トリス緩衝液 (0.15 M NaCl を含む, pH 8.4) を用いた。

3. フィブリノゲン-フィブリン転換過程への影響

(1) トロンビン時間測定には Ci-trol I (Dade) およびウシトロンビン (100 unit/ml, Dade) を使用した。

(2) フィブリン重合試験は 50 mg/dl フィブリノゲン (ボビン, タイプ 2; 第一化学) および 5 unit/ml ウシトロンビン (Dade) を用いた。

方 法

1. 抗トロンビン作用および抗 Xa 作用について

(1) 0.05 M トリス緩衝液 (0.75 mM EDTA, 0.15 M NaCl を含む, pH 8.4) で希釈した各種濃度の DS あるいはヘパリンと Ci-trol I, ベントナイト吸着血漿または精製 AT III を個々に等量混合して試料とした。これらの試料のトロンビン中和能は試料 100 μ l にトロンビン液 200 μ l 添加後, 37°C 5 分間孵置し, その混和液中の残存トロンビン活性を合成基質 S-2238 で測定した。

(2) 抗 Xa 作用は, 0.05 M トリス緩衝液 (0.15 M NaCl を含む, pH 8.4) で希釈した各種濃度の DS またはヘパリン 100 μ l を試料として 1 unit/ml AT III 50 μ l を混和後, 37°C 5 分間孵置し, さらに Xa 100 μ l を添加, 37°C 2 分間孵置した混合液中の残存 Xa 活性を合成基質 S-2222 で測定した。

2. 抗 Xa 中和能に及ぼす血小板因子の影響について

(1) DS およびヘパリン各 50 μ l と intact 血小板, 破碎血小板あるいは PF4 をそれぞれ 50 μ l 個々に混合し, 37°C 5 分間孵置後, その混合液を試料として上述の方法に従って Xa 中和能を測定し, DS あるいはヘパリンの Xa 中和能に及ぼす血小板の影響を合成基質 S-2222 によって検討した。

(2) 各種クロマトグラフィーで調整した血小板抽出分画と DS (終濃度 1 mg/ml) を等量混合し, その混合液を試料として上記のようにして Xa 中和能を測定し, DS の Xa 中和能に及ぼす血小板因子の影響を合成基質 S-2222 によって検討した。

3. フィブリノゲン-フィブリン転換過程への作用について

(1) 1 バイアルを 0.5 ml に溶解した Ci-trol I に各種濃度の DS あるいはヘパリンを等量混合して試料とした。この試料をペロナール緩衝液 (pH 7.35) で

10 倍に希釈して, その 200 μ l にトロンビン 100 μ l を添加して凝固時間を測定した。また, 残存トロンビン活性は合成基質 S-2238 により測定した。

(2) フィブリン重合試験はトロンビンを用いた Solia の方法³⁵⁾に準じて行った。

成 績

1. 抗トロンビン作用および抗 Xa 作用

(1) DS 加血漿に添加されたトロンビンは DS 濃度 0.015 mg/ml では対照とほとんど同じ吸光度を示したが, DS 濃度の増加に伴い吸光度の低下傾向を示した。ヘパリン加血漿に添加されたトロンビンはヘパリン濃度 3 unit/ml までは対照とほとんど同じ吸光度を示し, ヘパリン濃度の増加とともに吸光度の低下傾向を示した。その低下は DS の場合に比し, ヘパリンの方がより顕著であった (図 2)。

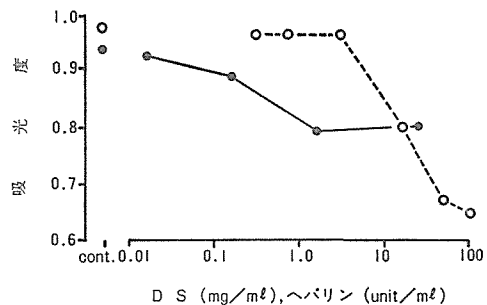


図 2. デキストラン硫酸添加血漿およびヘパリン添加血漿のトロンビン中和作用

●—●: デキストラン硫酸
○……○: ヘパリン

(2) DS にトロンビンを混合した場合, 吸光度より得られるトロンビン活性は各孵置時間において対照例と同様の活性を示し, DS 自体によるトロンビン活性の低下は認められなかった。ヘパリンによる影響も DS 同様認められなかった (図 3)。

(3) DS またはヘパリン加ベントナイト吸着血漿に添加したトロンビンは, DS, ヘパリン各濃度においていずれの場合も対照とほぼ同じ吸光度を示し, ベントナイト吸着血漿中では DS, ヘパリンともにトロンビン中和能を示さなかった (図 4)。

(4) DS と精製 AT III の混合液に添加されたトロンビンは, DS 濃度 0.015 mg/ml の場合対照とほとんど同じ残存トロンビン活性を示したが, それ以上の濃

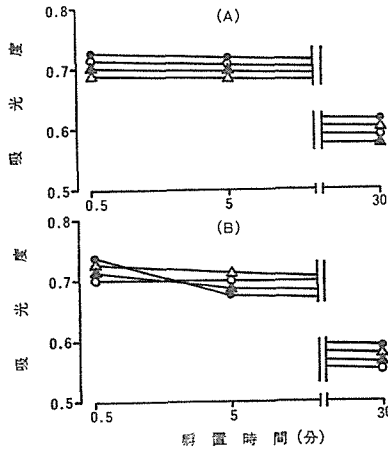


図 3. デキストラン硫酸 (A) またはヘパリン (B) のトロンビン活性に及ぼす影響

DS (mg/ml) ヘパリン (unit/ml)
 ●—● 0 ●—● 0
 ○—○ 7.5 ○—○ 12.5
 ▲—▲ 15.0 ▲—▲ 25.0
 △—△ 30.0 △—△ 50.0

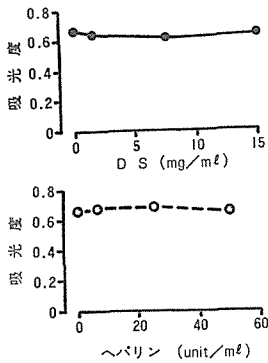


図 4. デキストラン硫酸添加ベントナイト吸着血漿 およびヘパリン添加ベントナイト吸着血漿のトロンビン中和作用

度では DS の濃度に比例した吸光度の低下すなわちトロンビン中和能の増大傾向がみられた (図 5)。また、DS 単品でも全く同様の成績を得た。一方、ヘパリンと精製 AT III の混合液に添加されたトロンビンは、0.02 unit/ml においてすでに対照に比して著明な残存トロンビン活性の低下がみられ、さらにヘパリン濃

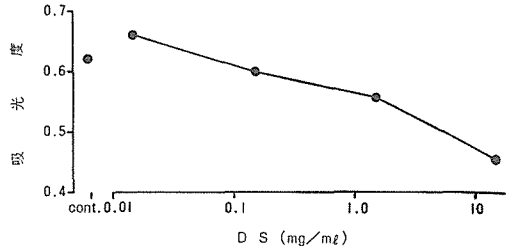


図 5. デキストラン硫酸および AT III 混和液のトロンビン中和作用

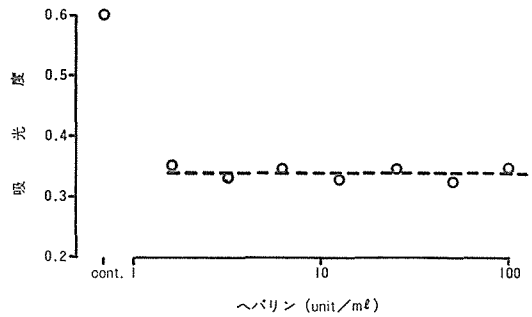


図 6. ヘパリンおよび AT III 混和液のトロンビン中和作用

度を増してもほぼ一定の吸光度を示した (図 6)。

(5) 0.05 M トリス緩衝液 (0.15 M NaCl を含む, pH 8.4) を対照として、DS (0.01~50 mg/ml) およびヘパリン (0.00001~0.001 unit/ml) の Xa 中和能を測定すると、DS およびヘパリンはいずれも AT III 非存在下では Xa 中和能を示さないものの、AT III 存在下において DS は 0.01 mg/ml 以上、ヘパリンは 0.0001 unit/ml 以上でそれぞれ濃度依存性に Xa 活性を中和、抑制した (図 7, 8)。なお、DS 単品についても同様の成績を得た。

2. Xa 中和能に及ぼす血小板因子の影響

(1) 洗浄 (intact) 血小板浮遊液 (終濃度 $25 \times 10^4 / \mu\text{l}$) あるいはそれを凍結融解して調整した破碎血小板浮遊液と DS を等量混合し、5 分間 37°C に孵置した試料について、AT III 存在下における Xa 中和能を検討すると、intact 血小板および破碎血小板ともに DS・AT III 混合液の Xa 中和能を増強する効果を示した (図 9)。一方ヘパリンを用いた場合、intact 血小板は 0.01 unit/ml までのヘパリンを完全に中和し、また破碎血小板は 0.03 unit/ml までのヘパリンを完

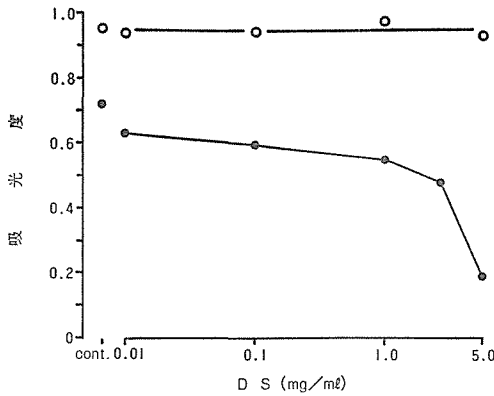


図 7. デキストラン硫酸および AT III 混和液の Xa 中和作用
●—●：精製 AT III
○—○：トリス緩衝液

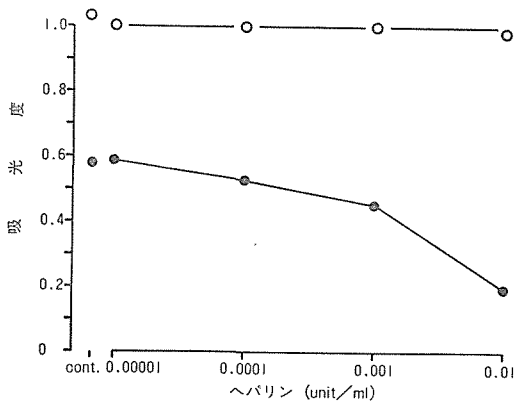


図 8. ヘパリンおよび AT III 混和液の Xa 中和作用
●—●：精製 AT III
○—○：トリス緩衝液

全に中和することにより、試料の Xa 中和能を著しく減弱させた (図 10)。

(2) DS (1.0mg/ml) あるいはヘパリン (0.01unit/ml) と血小板第 4 因子の等量混合液を試料として残存 Xa 活性を測定した。血小板第 4 因子の対照としては 0.05 M トリス緩衝液 (0.15 M NaCl を含む, pH 8.4) を用いた。DS は血小板第 4 因子によっては中和されず、吸光度には変化はみられなかった。一方、ヘパリンは血小板第 4 因子により中和されその活性を失い、吸光度の上昇が認められた (図 11)。

(3) 血小板抽出液をヘパリンセファロースにかけ溶

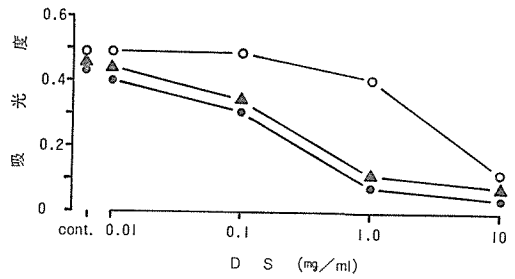


図 9. デキストラン硫酸および AT III 混和液の Xa 中和作用に及ぼす血小板の影響
●—●：intact 血小板
▲—▲：破碎血小板
○—○：トリス緩衝液

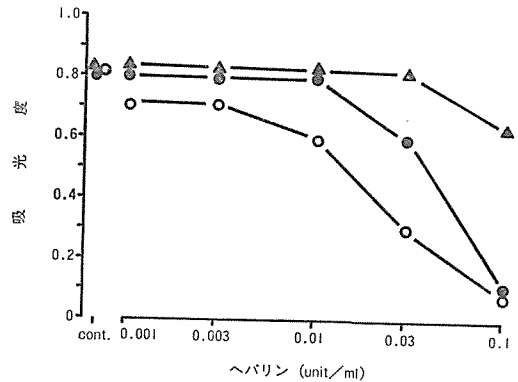


図 10. ヘパリンおよび AT III 混和液の Xa 中和作用に及ぼす血小板の影響
●—●：intact 血小板
▲—▲：破碎血小板
○—○：トリス緩衝液

出液中の塩濃度をあげることにより蛋白を溶出した。各 fraction を 0.05 M トリス緩衝液 (0.15 M NaCl を含む, pH 7.4) に対して透析後、DS と混和して、Xa 中和作用を検討すると、ヘパリンセファロースに非吸着分画の fraction 4~6 に強い増強効果を認めた (図 12)。

ヘパリンセファロースの fraction 4~6 を Mini-con B 15 (Amicon) で濃縮後、Con A セファロースによるアフィニティークロマトグラフィーを施行したところ、Con A セファロースに非吸着分画の fraction 5~9 に DS の Xa 中和作用に対する増強効果を認めた (図 13)。

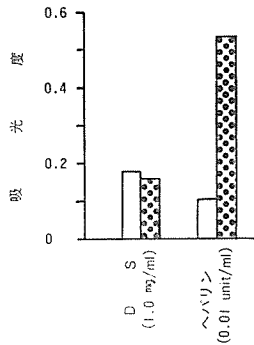


図 11. デキストラン硫酸および AT Ⅲ 混和液またはヘパリンおよび AT Ⅲ 混和液の Xa 中和作用に及ぼす血小板第 4 因子の影響

□ : トリス緩衝液
 ■ : 血小板第 4 因子

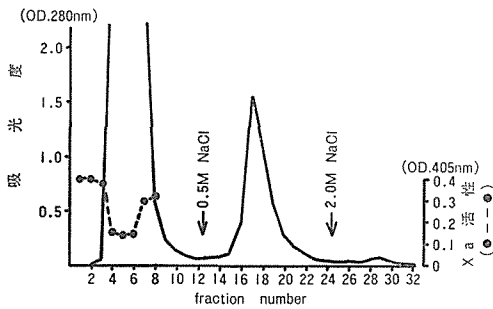


図 12. ヘパリンセファロースによる血小板抽出液のアフィニティークロマトグラフィー

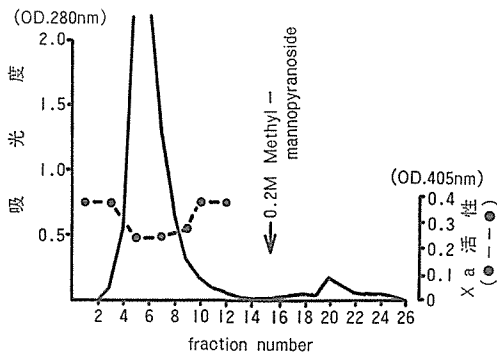


図 13. Con A セファロースによる血小板抽出液のアフィニティークロマトグラフィー

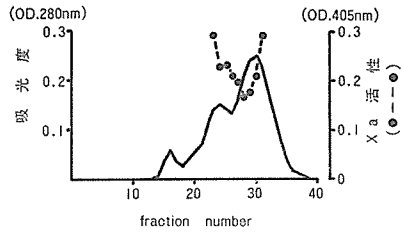


図 14. セファロース CL-6B による血小板抽出液のゲルクロマトグラフィー

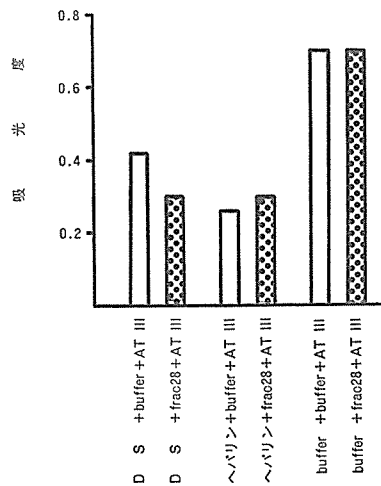


図 15. デキストラン硫酸および AT Ⅲ 混和液あるいはヘパリンおよび AT Ⅲ 混和液の Xa 中和作用に及ぼす血小板抽出分画 (fraction 28) の影響

Con A セファロースで活性を示した fraction 5～9 を再び Minicon B 15 で濃縮後、セファロース CL-6B によるゲル濾過を行い、その fraction 26～30 に DS との相乗効果を認めた (図 14)。これらの分画の分子量は約 100,000～200,000 と推定された。

ゲル濾過で最も強い活性を示した分画 (fraction 28) と DS を混和後、AT Ⅲ および Xa を添加して残存 Xa 活性を測定すると、トリス緩衝液を用いた対照例よりも明らかに Xa 活性は中和され減弱した。しかしながら、fraction 28 単独では AT Ⅲ を賦活し Xa 中和能を促進させる効果は認められなかった。また、DS と同様にヘパリンとの相乗効果も検討したが、ヘパリン (0.001 unit/ml) とは相乗効果を示さなかった (図 15)。

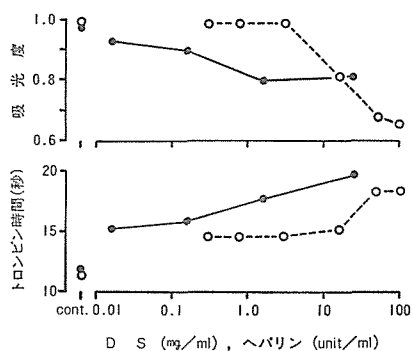


図 16. デキストラン硫酸添加血漿およびヘパリン添加血漿におけるトロンビン時間と残存トロンビン活性
●—●: デキストラン硫酸
○……○: ヘパリン

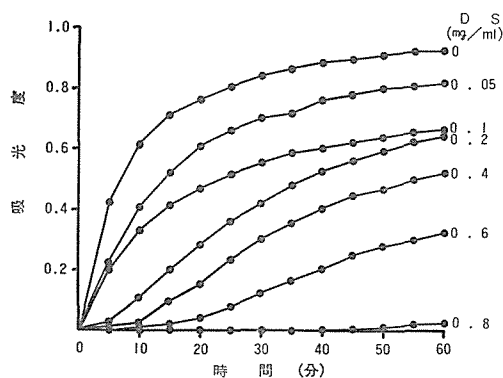


図 17. フィブリン重合反応に及ぼすデキストラン硫酸の影響

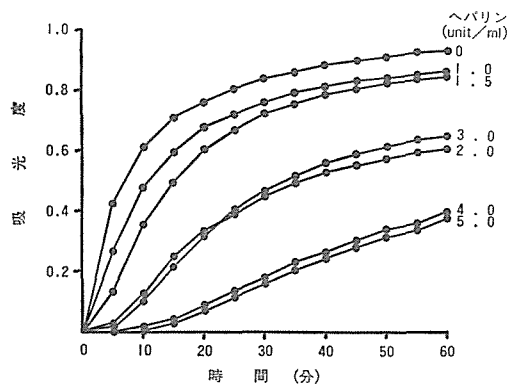


図 18. フィブリン重合反応に及ぼすヘパリンの影響

3. フィブリノゲン-フィブリン転換過程に及ぼす影響

(1) 合成基質法で抗トロンビン活性を示さない低濃度の DS 0.015 mg/ml を加えた血漿のトロンビン時間は、対照の 11.8 秒に比較して、すでに 15.3 秒と延長しており、DS 濃度の増加とともにさらに延長した。ヘパリン加血漿の場合もヘパリン 0.2 unit/ml の低濃度のときすでに 14.6 秒と延長していたが、3 unit/ml に増加しても不変であった。さらにヘパリン濃度を増すとトロンビン時間は延長傾向を示し、50 および 100 unit/ml の濃度ではともに 18.4 秒を示した (図 16)。

(2) フィブリン重合試験におけるフィブリノゲン溶液はトロンビン添加によりフィブリンに転化するが、そのフィブリン重合過程を分光光度計 380 nm による濁度変化として経時的に測定すると、DS (終濃度 0.05~0.8 mg/ml) 添加により濃度依存性に吸光度の上昇の抑制を示し、明らかに DS によるフィブリン重合の遅延効果が認められた (図 17)。またヘパリン添加フィブリノゲン溶液 (終濃度 1.0~5.0 unit/ml) も同様の傾向を示し、ヘパリンによるフィブリン重合の遅延効果が認められた (図 18)。

考 察

1. 抗トロンビン作用および抗 Xa 作用

合成基質 S-2238 はトロンビンに対して特異性のあるアミノペプチド²⁾²⁵⁾で、トロンビンにより加水分解され pNA を遊離する。分光光度計で 405 nm における吸光度を測定することにより反応液中の遊離 pNA を知ることができる。従って合成基質 S-2238 での吸光度はトロンビン活性を反映しており、吸光度の低下はトロンビン活性の低下を示す。逆に言えば、一定量のトロンビンを加えた被検試料における吸光度の低下はその被検試料のトロンビン中和能の増強を意味している。

自験例において DS 加血漿でみられた吸光度の低下傾向は DS 加血漿がトロンビン中和能を有することを示している。しかしながら、この場合 DS 自体がトロンビン中和能を有するのか、あるいはヘパリンがそれ自体抗トロンビン作用を持たないにもかかわらず血漿中の AT III を賦活化することによって強力なトロンビン中和能を示す²⁾¹⁴⁾³⁰⁾³⁴⁾⁴³⁾のと同様に DS も血漿中の AT III あるいはその他の物質を必要とするのか、という点が問題となる。

平丸¹³⁾は DS とフィブリノゲン液の混合液にトロン

ピンを加えるとトロンビン時間が延長することから、DSはヘパリンと異なり抗トロンビンとして作用する場合に強力な *plasmatic cofactor* を必要としないと報告しているが、自験例においてDSとトロンビンの混合液についてその液中のトロンビン活性を合成基質によって測定することにより、DS単独の抗トロンビン作用を検索すると、DS単独ではヘパリン単独の場合と同様トロンビン中和能を示さなかった。従ってDSの抗トロンビン作用の発現にはヘパリン同様血漿中の *cofactor* を必要とすると思われた。

Cofactor としては血漿中の代表的なプロテアーゼインヒビターである α_1 AT、 α_2 M および AT III が考えられる。そこで、 α_1 AT および α_2 M は含まれているが、AT III は含まれていないベントナイト吸着血漿とDSの混合液について、そのトロンビン中和能を測定したところ、この混合液はほとんどトロンビン中和能を示さなかった。従ってDSの抗トロンビン作用発現に必要な *cofactor* は α_1 AT あるいは α_2 M よりも AT III である可能性が大きいと考えられた。さらに、DSが精製 AT III 添加により強力なトロンビン中和能を示す成績から、DSはヘパリン同様 AT III を *cofactor* として抗トロンビン作用を発現することが明確になった。

しかしながら、ヘパリンが一定の濃度を超えるとそのトロンビン中和能が不変となるのに対し、DSは濃度依存性に増強傾向を示した。この点においてDSはヘパリン同様 AT III を必要とするが、その反応態度は必ずしも同様ではないと思われる。

なお、ヘパリンを正常血漿に添加した場合ヘパリン濃度 0.2~3 unit/ml ではほとんどトロンビン中和能を示さず、3~50 unit/ml で濃度に比例してトロンビン中和能の増強傾向を示したのに対し、ヘパリンを精製 AT III 溶液に添加した場合は、0.02 unit/ml の比較的濃度においても 100 unit/ml におけると同様のトロンビン中和能を示した。ヘパリンにおけるこの作用態度の相違は正常血漿中には含まれるが、精製 AT III 溶液には存在しないところの血小板第4因子によるヘパリン中和作用¹⁰⁾の影響と考えられる。これに対しDSを正常血漿および精製 AT III 溶液に添加した場合は、いずれも 0.015~15 mg/ml の範囲内でDSの濃度依存性にトロンビン中和能の増強傾向を示し、DSはヘパリンに比し血小板第4因子の影響を受けがたいと考えられた。この血小板第4因子の影響に関しては後述する。

X因子はプロトロンビンと同様、活性中心にセリン

を有するいわゆるセリンプロテアーゼ⁹⁾であり、またともに γ -カルボキシグルタミン酸を有しリン脂質上を反応の場とする³⁷⁾点において共通点が多い。一方、すでに検討してきたようにDSはヘパリン同様 AT III を *cofactor* としてトロンビン中和能を示すことは明らかである。これらの点からDSはAT III 存在下でトロンビン同様 Xa 活性も中和することは十分想定できる²¹⁾。この点について合成基質を用いて検討を行った。

XaがAT III 存在下においてヘパリンにより中和されることは諸家の報告⁴⁵⁾⁴⁷⁾⁴⁸⁾で一致しているのに対して、DSにはAT III 存在下においてもトロンビンおよびXaのアミダーゼ活性に対する抑制効果が認められないとの報告²⁰⁾⁴¹⁾が散見される。しかし、DSがAT IIIの賦活化³²⁾によるXa中和能を有することは自験例において明らかである。なお、諸報告の不一致はDSの分子量、S含量および検討方法等の相違によると思われる。

AT IIIの活性中心はアルギニン残基に存在し、トロンビンやXaなどのセリンプロテアーゼの活性セリン残基と結合して複合体を形成することにより、それらを阻害すると考えられている³⁰⁾。その際の結合比はセリンプロテアーゼの種類を問わず常に1モル対1モルである¹²⁾²¹⁾²¹⁾。一方、AT IIIとヘパリンの結合部位はAT IIIのリジン残基とヘパリンの硫酸基の間で生じ²⁸⁾、その結果AT IIIはヘパリンの結合によって分子構造が変化し、AT IIIのアルギニン残基が反応しやすくなると考えられている²⁹⁾。

DSもヘパリン同様その硫酸基とAT IIIのリジン残基との間で結合し、AT III・DSの複合体を形成すると考えられるが、すでに述べたようにAT III 存在下でトロンビンに対してDSとヘパリンではその反応態度に相違が認められることもあり、AT IIIとDSの複合体形成についてはさらに検討を要する。

なお、DS単品についてもMDSコーワ注300と同等の成績を得たことから、MDSコーワ注300のこれらの性状は添加物の作用ではなく、DSの本来の作用に基づくものと考えられる。

2. 抗 Xa 中和能に及ぼす血小板因子の影響

血小板第4因子は血小板中の α 顆粒に含まれ、血小板が刺激されると血中に放出される蛋白である⁵⁾。その分子量はSDS-PAGEで9700²²⁾あるいはSDS-PAGEで11,600 \pm 330、ゲル濾過で40,000²³⁾と未確定であるが、ヘパリン中和能を有する²⁸⁾ことは周知の通りである。

本実験では 0.03 unit/ml のヘパリンに intact の血小板 ($25 \times 10^4 / \mu\text{l}$) を添加すると、ヘパリンは 0.01 unit/ml の力価に減弱した。さらに凍結融解で細胞膜を破壊した血小板を添加すると 0.1 unit/ml のヘパリンが 0.007 unit/ml の力価に著明に減弱した。細胞膜の破壊により α 顆粒中に蓄積されていた PF 4 が溶液中に流出したことによるものであることは精製 PF 4 によってヘパリン力価が減弱することからも推定される。この PF 4 の作用は DS には全く影響を及ぼしていないことから、ヘパリンに特異的であると考えられる。

ヘパリンと異なり DS は血小板によりその力価を減弱されることはなく、むしろ 1 mg/ml の DS は血小板添加により 5 mg/ml 相当の力価へと増強された。この増強効果は intact の血小板でも破碎血小板でもほとんど同程度の効果を持っており、このことは血小板細胞内の物質ではなく、血小板膜表面の物質が関与していることを示唆するものである。この血小板因子についてはヘパリンセファロースアフィニティークロマトグラフィー、Con A セファロースアフィニティークロマトグラフィーおよびゲルクロマトグラフィーの 3 段階で分画を試み、最終的に得られた血小板抽出分画は AT III 存在下で DS の Xa 中和能を増強させる効果のあることを認めた。これに対して、ヘパリンに関しては相乗効果は認められなかった。またこの分画は単独では AT III に対する作用効果も示さず、既知の AT III 賦活化物質とは性格を異にしている。

Williams および Barrowcliffe⁴⁶⁾ はヘパリンの皮下注射あるいは fatty meal (ミルク) 摂取後、血中へ肝臓より遊離してくる hepatic triglyceride lipase (HTGL) に血中の抗 Xa 活性を増強する作用のあることを報告している。この HTGL はヘパリンセファロースに親和性を示すのに対して、本研究で追及した血小板因子は親和性を有さず、この点において両者は異なった蛋白と考えられる。この血小板因子については、単離精製するまでには至らず部分精製にとどまったため、その性状を明確にすることはできなかったが、Con A セファロースに親和性を有しないことから糖蛋白の可能性は否定的であり、ゲル濾過からは分子量 $10 \sim 20$ 万の蛋白であると思われた。いずれにしても、血小板由来のこのような性状を有する因子は未報告であり、血管内膜に存在する proteoglycan⁴⁹⁾ との関連において生理的意義にも興味もたれる。

3. フィブリノゲン-フィブリン転換過程に及ぼす影響

DS またはヘパリンと正常血漿との混合液について、合成基質による残存トロンビン活性とフィブリノゲンを基質としたトロンビン時間を比較すると、対照とほとんど等しい吸光度 (残存トロンビン活性) を示す 0.015 mg/ml の DS 加血漿および 0.2~3 unit/ml のヘパリン加血漿のトロンビン時間が対照 (11.8 秒) に比しすでにそれぞれ 15.3 秒および 14.6 秒と延長していた。このことは DS およびヘパリンは AT III との共同によるトロンビン中和能以外にも全く別個の抗凝固能を有することを示唆する。さらにこの抗凝固能は血漿にヘパリン 12.5 unit/ml を加えた場合と DS 0.015 mg/ml を加えた場合を比較すると、吸光度は両者ともに 0.82 を示しているにもかかわらずトロンビン時間はそれぞれ 15.2 秒および 19.7 秒とヘパリンよりも DS を加えた場合がより延長していることから、ヘパリンよりも DS の方がより強い抗凝固能を有していると考えられる。上述の平丸の実験¹³⁾ で DS とフィブリノゲンの混合液のトロンビン時間が延長したのもトロンビン中和能とは別の抗凝固能によるものと思われる。この点に関して、Abildgaard¹⁾ はヘパリンが cofactor とは無関係に thrombin-heparin-fibrinogen 複合体を形成することによりフィブリノゲンがフィブリンに転化することを阻害する作用があることを報告している。

ところで、フィブリノゲンからフィブリンへの転換過程についての分子レベルの解析が進められており、それらの知見を総合すると以下ようになる¹⁷⁾。すなわちトロンビンはフィブリノゲン α 鎖の Arg¹⁶-Gly¹⁷ および β 鎖の Arg¹⁴-Gly¹⁵ のペプチド結合を限定分解し、フィブリノペプチド A および B をそれぞれ遊離するとともにフィブリノゲンはフィブリンモノマーへと変化する (ステップ 1)。フィブリンモノマーは互いに両端で end to end に結合延長した棒状分子が、さらに 2 本 side to side で会合してフィブリンポリマーへと進む (ステップ 2)。このフィブリンモノマーの重合化は分子間水素結合や疎水結合などの非酵素的な会合と考えられている。フィブリンポリマーはさらに凝集してフィブリン網を形成しつつゲル化していく (ステップ 3)。

ヘパリンはその陰性荷電により thrombin-heparin-fibrinogen 複合体を形成することによってステップ 1 を阻害する¹⁾ とされており、自験結果も同様であった。ヘパリノイドである DS においても複合体形成²⁰⁾ によ

るステップ1の阻害が推測されるが、今回の検討ではその点を確認することは不可能であった。しかしながら、ステップ1～3における全ての反応を含むフィブリン重合試験において観察された吸光度が上昇しはじめるまでの lag phase はフィブリン形成時点の遅延を表現するものであり、DS の場合 0.2 mg/ml 以上、ヘパリンの場合 2.0 unit/ml 以上の濃度でこの lag phase が認められた。これらの lag phase の存在はフィブリノゲン-フィブリン転換遅延の原因がステップ2以降ではなくステップ1にあることを示唆している。すなわち、0.2 mg/ml 以上の DS はフィブリノペプチドの放出を阻害することにより、AT III に非依存性の抗凝固作用³⁹⁾すなわちフィブリノゲン-フィブリン転換に対する抑制作用を有すると考えられた。

総 括

Dextran sulphate (DS) の抗凝固作用について、ヘパリンと対比しつつ、抗トロンビン作用、抗 Xa 作用、Xa 中和能を指標とした血小板との関連およびフィブリン形成過程への影響について検討を加えた。

1. DS はヘパリン同様 AT III を賦活化し、AT III のトロンビン中和能を増強させる作用を有する。
2. DS で賦活化された AT III は、Xa に対しても中和能を有する。
3. DS・AT III 複合体の抗 Xa 作用は血小板添加により増強したが、ヘパリンの場合は逆に減弱した。
4. DS と相乗効果を示す血小板因子は分子量 10～20 万の血小板第 4 因子とは異なる蛋白で、ヘパリンとは相乗効果を示さない。
5. DS は AT III に非依存性にフィブリノゲン-フィブリン転換を阻害した。ヘパリンも同様の阻害効果を軽度ながら示した。

以上、DS の抗凝固作用に関して実験的検討を行い、その一部の機序について解明した。

稿を終るにあたり、終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜りました恩師臨床検査医学教室中村克己教授に心より深甚なる謝意を表します。

また、本研究をすすめるにあたり御協力、御助言をいただいた本学ステロイド医学研究施設化学部門猪川嗣朗教授、武良哲雄講師、本学医療技術短期大学部衛生技術学科福田千佐子助手および本学医学部附属病院検査部諸氏に深謝いたします。

文 献

- 1) Abildgaard, I. (1968). Inhibition of the thrombin-fibrinogen reaction by heparin in the absence of cofactor. *Scand J Haematol* **15**, 432-439.
- 2) Abildgaard, I. (1974). Heparin cofactor and antithrombin. *Thromb Diath Haemorr* **33**, 38-42.
- 3) Bang, N. U. and Mattler, L. E. (1978). Sensitivity and specificity of plasma serine protease chromogenic substrates. *Haemostasis* **7**, 98-104.
- 4) Blombäck, B. and Laurent, C. T. (1958). N-terminal and light-scattering studies on fibrinogen and its transformation to fibrin. *Arkiv for Kemi* **12**, 137-146.
- 5) Broekman, M. J., Handin, R. I. and Cohen, P. (1975). Distribution of fibrinogen, and platelet factor 4 and XIII in subcellular fractions of human platelets. *Br J Haematol* **31**, 51-55.
- 6) Cohen, H. and Tudhope, G. R. (1956). Dextran sulphate: use as an anticoagulant and action in lowering serum cholesterol. *Br Med J* **2**, 1023-1027.
- 7) Forwell, G. D., and Ingram, G. I. (1956). The anticoagulant activity of dextran sulphate. *J Pharm Pharmacol* **8**, 530-543.
- 8) 藤川和夫 (1980). 血液凝固因子-X 因子. 青木延雄, 岩永貞昭編, 凝固・線溶・キニン, pp. 97-100. 中外医学社, 東京.
- 9) 福満東馬 (1974). 静脈血行再建に関する実験的臨床的研究. 一時的動静脈瘻併施ならびに血栓治療剤の効果について. *福岡医学雑誌* **65**, 636-675.
- 10) Griffiths, B. L., Collins, J. R. and Huntsman, R. G. (1984). Observations on the heparin neutralizing activity of outdated platelet concentrates. *Thromb Haemost* **51**, 189-191.
- 11) Handin, R. I. and Cohen, H. J. (1976). Purification and binding properties of human platelet factor four. *J Biol Chem* **251**, 4273-4282.
- 12) Highsmith, R. F. and Rosenberg, R. D.

- (1974). The inhibition of human plasmin by human antithrombin-heparin cofactor. *J Biol Chem* **249**, 4335-4338.
- 13) 平丸三樹 (1970). Dextran sulphate の凝固能に及ぼす影響. *日本血液学会雑誌* **33**, 652-661.
- 14) Holmer, E., Söderström, G. and Andersson, L. -O. (1980). Properties of antithrombin III depleted plasma. I. Effect of heparin. *Thromb Res* **17**, 113-124.
- 15) Ingram, G. I. C. and Forwell, G. D. (1956). The anticoagulant activity of dextran sulphate, 11. The effect of dextran sulphate on the one-stage prothrombin time. *J Pharm Pharmacol* **8**, 589-601.
- 16) 磯貝行秀, 飯田 晃, 市場謙二, 千勝征夫 (1971). Dextran Sulphate (MDSコーワ) の糖尿病患者血液粘度に及ぼす影響について. *新薬と臨床* **20**, 31-36.
- 17) 岩永貞昭 (1970). フィブリノーゲン→フィブリン系の生化学. *代謝* **7**, 498-506.
- 18) 岩永貞昭 (1980). フィブリノーゲン→フィブリン転換. 青木延雄, 岩永貞昭編, 凝固・線溶・キニン, pp 205-209. 中外医学社, 東京.
- 19) Kiss, J. (1974). Chemistry of heparin. A short review on recent chemical trends. *Thromb Diath Haemorr* **33**, 20-25.
- 20) 小柳隆久 (1981). ヘパリンとデキストラン硫酸の抗凝固作用の相異について. *東京医科大学雑誌* **39**, 91-99.
- 21) Kurachi, K., Fujikawa, K., Schmer, G. and Davie, E. W. (1976). Inhibition of bovine factor IXa and factor Xa by antithrombin III. *Biochemistry* **15**, 373-377.
- 22) Levine, S. P. and Wohl, H. (1976). Human platelet factor 4: Purification and characterization by affinity chromatography. *J Biol Chem* **251**, 324-328.
- 23) Luscher, E. F. and Kase-Glanmann, R. (1975). Platelet heparin-neutralizing factor (Platelet factor 4). *Thromb Diath Haemorr* **33**, 66-72.
- 24) 松岡松三, 神保長三, 野村穰一, 桜川信男, 品田章二, 伊藤正一, 大石正晃, 塚田恒安, 田中瑞代 (1973). Dextran Sulphate の血液凝固能, 線溶能におよぼす影響についての実験的研究. *臨床血液* **14**, 882-890.
- 25) Mattler, L. E. and Bang, N. U. (1977). Serine protease specificity for peptide chromogenic substrates. *Tromb Haemost* **38**, 776-792.
- 26) 宮谷勝明, 高畑譲二, 福井 巖, 金田吉郎 (1975). 免疫拡散板による血清アンチトロンビンIII測定法の検討. *臨床検査* **19**, 80-82.
- 27) 中村節子, 滝沢徳正, 中西一夫, 五十嵐紀子 (1980). 発色性ペプチド基質を用いた血漿抗トロンビンIII測定法の検討. *臨床病理* **28**, 81-86.
- 28) Rosenberg, R. D. (1974). The effect of heparin on factor XIa and plasmin. *Thromb Diath Haemorr* **33**, 51-62.
- 29) Rosenberg, R. D. (1975). Actions and interactions of antithrombin and heparin. *N Eng J Med* **292**, 146-151.
- 30) Rosenberg, R. D. and Damus, P. S. (1973). The purification and mechanism of action of human antithrombin-heparin cofactor. *J Biol Chem* **248**, 6490-6505.
- 31) Rosenberg, J. S., McKenna, P. W. and Rosenberg, R. D. (1975). Inhibition of human factor IXa by human antithrombin. *J Biol Chem* **250**, 8883-8888.
- 32) 桜川信男, 高橋 薫 (1980). デキストラン硫酸の血液凝固に及ぼす影響. *最新医学* **35**, 1882-1886.
- 33) 桜川信男, 高橋 薫 (1981). アンチトロンビンIIIおよびデキストラン硫酸の血管内凝固異常是正効果 (実験的研究). *血液と脈管* **12**, 152-162.
- 34) 桜川信男, 高橋 薫, 星山真理, 松岡松三 (1977). 血管内凝固症候群と阻害因子—Antithrombin III, Platelet Factor 4 および Heparin との関連と血管内凝固亢進症候群での変動. *日本血液学会雑誌* **40**, 218-226.
- 35) Soria, J., Soria, C., Yver, J. and Samama, M. (1969). Temps de reptilase. Etude la polymérisation de la fibrine en présence de reptilase. *Coagulation* **2**, 173-175.
- 36) 堀江 勇 (1975). Dextran sulphate (MDS) の線溶活性機序. *臨床と研究* **52**, 2162-2167.
- 37) 鈴木宏治 (1985). 磷脂質における凝固の活性化反応. *臨床病理* **33**, 966-973.
- 38) Suzuki, K. and Hashimoto, S. (1979). Effect of dextran sulphates on thrombin

- activity. *J Clin Pathol* **32**, 439-444.
- 39) Teien, A. N., Abildgaard, U. and Hook, M. (1976). The anticoagulant effect of heparan sulfate and dermatan sulfate. *Thromb Res* **8**, 859-867.
- 40) 内田博重, 吉村良之介 (1973). Dextran sulphate の凝固・線溶に及ぼす影響について. *新薬と臨床* **22**, 163-166.
- 41) 浮田 実, 北原 武, 加藤正俊, 福武勝幸, 福武勝博 (1981). デキストラン硫酸の抗凝固作用に関する検討. *血液と脈管* **12**, 127-129.
- 42) 津田信幸, 河 洋吉, 梶江 勇 (1976). In vitro における Dextran sulphate の線溶活性に対する効果について. *愛知医科大学医学会雑誌* **3**, 29-36.
- 43) 若林邦夫, 村山英樹, 森岡恭彦 (1979). ヘパリン療法. *医学のあゆみ* **109**, 966-969.
- 44) 脇田 保, 竹村恵史 (1975). 動脈硬化症に対するデキストラン硫酸 (MDS コーワ錠) の使用経験. *薬理と治療* **3**, 64-74.
- 45) Wessler, S. and Yin, E. T. (1974). On the antithrombotic action of heparin. *Thromb Diath Haemorr* **32**, 71-78.
- 46) Williams, S. P. and Barrowcliffe, T. W. (1985). The effects of post-heparin plasma lipases on anti-Xa clotting activity. *Thromb Res* **37**, 371-377.
- 47) Yin, E. T. (1974). Effect of heparin on the neutralization of factor X and thrombin by the plasma alpha-2-globulin inhibitor. *Thromb Diath Haemorr* **33**, 43-50.
- 48) Yin, E. T. and Wessler, S. (1970). Heparin-accelerated inhibition of activated factor X by its natural plasma inhibitor. *Biochim Biophys Acta* **201**, 387-390.
- 49) 吉田圭一, 越智教道, 多和田明, 布施暁子, 松本嘉代子, 奥山 隆 (1982). ヘパラン硫酸の抗トロンビン, 抗 Xa 活性に関する研究. *血液と脈管* **13**, 581-584.