原 著

Antithrombin Ⅲ に関する研究

第4報: Thrombin 投与犬における antithrombin Ⅲ
(AT Ⅲ) の動態

田中 廣* 上野 達雄* 権守日出海* 竹内 季雄*
田中 省三* 新井 仁* 小林 紀夫* 前川 正*

Studies on Antithrombin Ⅲ (AT Ⅲ). Report Ⅳ: Effect of
thrombin administration on metabolism of canine AT Ⅲ

Hiroshi TANAKA*, Tatsuo UENO*, Hidemi GONMORI*,
Tokio TAKEUCHI*, Shozo TANAKA*, Hitoshi ARAI*,
Norio KOBAYASHI* and Tadashi MAEKAWA*

Key words: canine antithrombin Ⅲ, thrombin induced DIC
1-125-AT Ⅲ metabolism, AT Ⅲ-heparin-thrombin interaction

Changes in canine AT Ⅲ metabolism after i.v. administration of bovine thrombin were studied using I-125-AT Ⅲ. I-125-AT Ⅲ was prepared by the method of McFarlane.

(1) On the second day after intravenous injection of I-125-AT Ⅲ, bovine thrombin (30u/kg/hr) was infused continuously for 3 hrs. Plasma fibrinogen level was decreased to 60 % of initial level, while plasma AT Ⅲ concentration and AT Ⅲ metabolism did not change markedly. AT Ⅲ metabolism in the dogs infused larger amount of thrombin was studied. Total amount of 5,000-15,000u of thrombin was administered intravenously with simultaneous injection of the same units of heparin. Plasma concentration of AT Ⅲ and the radioactivity of I-125-AT Ⅲ decreased to 70-80% of the initial levels, although plasma concentration of fibrinogen did not change significantly.

(2) When, 50μg of I-125-AT Ⅲ, 1,000u of bovine thrombin and 1,000u of heparin were injected simultaneously, the half life of 1st phase of the plasma disappearance curve of I-125-AT Ⅲ was shortened to 1.6 hours compared to the normal value of 5.5 hours.

From these data, it is suggested that AT Ⅲ forms a complex with thrombin and thereafter the AT Ⅲ-thrombin complex is cleared out rapidly from blood stream.

はじめに

DIC においては、血漿 Antithrombin Ⅲ (以

下 AT Ⅲ) 濃度の低下することが指摘されているが、その低下の機構や臨床的意義については充分解明されているとはいえない。これらの問

* 群馬大学医学部第三内科 (〒371 群馬県前橋市昭和町), The 3rd Department of Internal Medicine, School of Medicine, Gunma University, Maebashi, Japan.

題を検討する目的で, thrombin 投与により DIC を惹起した犬における AT III 回転を検討したので, その成績を報告する.

I. 方 法

犬の AT III は, affinity chromatography を用いた Damus ら¹⁾の方法により精製した. ACD 液 50ml を抗凝固剤として 450ml の犬血漿を心臓穿刺により採取し, 3,000 回転 15 分遠沈して血漿約 200ml を分離し, 54°C 3 分間加熱して脱線維した. 次いで脱線維血漿を 100ml の Heparin-Sepharose 4B column に流し, AT III を吸着し, gel を 100ml の 0.145 M 食塩を含む 0.01M Tris buffer (pH 7.5) で洗浄し, 次いで塩濃度を 0.3M から 0.8M まで上昇して蛋白を溶出した. AT III 活性は大部分の蛋白が溶出したあとの小さな peak に一致して認められた. この活性蛋白部分をさらに不純物を除くために 10g% preparative gel electrophoresis を用いて精製すると, 50 μ g までの AT III で単一のバンドとなった.

このように精製した AT III を Freund の Adjuvant と共に週一回, 4 週家兎に注射し抗血清を得た. 精製した AT III, 犬血漿に対し, この抗血清は, Immuno-electrophoresis で, 単一の沈降線を形成した. AT III の extinction coefficient は 6.2 ($E_{1\text{cm}}^{1\text{g}\%} = 6.2$) で, 分子量は約 7 万であった. 血漿 AT III 濃度の測定は Immuno-electrophoresis および Single Radial Immunodiffusion により行った. Immuno-electrophoresis は 2~3 mA で泳動した. Radial Immunodiffusion は 10ml の 1g% Agarose に 0.4 ml の抗血清を混じ, 5ml を平板に入れて 2 mm の直径の well を作り 3 μ l の検体を入れて, 24~48 時間放置したのちに測定した. 標準液として, 166mg/dl の精製 AT III を使用した. 精製した AT III 0.5mg を ^{125}I で²⁾ McFarlane の ICl 法を用いて標識し, Free の ^{125}I は Sephadex G75 を用いて除去した. Specific activity は 1 mCi/mg であった.

II. 成 績

^{125}I -AT III を犬に静注し, AT III 回転が, ほ

Fig. 1 In vivo behavior of i.v. administered 1-125-AT III in dogs under the influence of thrombin.

ぼ平衡状態に達した 2 日目に thrombin を持続注入し, 経時的に採血し, AT III 回転を検討した. 市販の Bovine thrombin (Parke Davis 社 thrombin topical) を生食に 2 u/ml の割合で溶解し, 30u/kg/hr の割合で下肢静脈より 3 時間持続注入した. 血漿フィブリノゲン, 血小板数は投与前値の約 60% に低下したが, 血漿 AT III 濃度および AT III 回転には, 著明な変化を認めなかった (図 1). 次に, 2 日前に ^{125}I -AT III を投与した犬に投与する thrombin 量を増加するため, Heparin と共に thrombin を投与した時の AT III 回転を検討した. thrombin は 5,000u ~ 15,000u を同一単位の Heparin と共に静注した. この時には血漿フィブリノゲン値に著変は認められなかったが, 血漿 AT III 濃度および, AT III 放射活性は投与前値の 70~80% にまで減少した (図 2).

次に, ^{125}I -AT III 約 50 μ g と Thrombin 1,000 u, Heparin 1,000u を約 10 分間 incubation した後, 同時に犬に静注後, 経時的採血をし, その放射活性を測定した. 血漿からの AT III の放射活性の消失曲線の第 1 相の半減期は正常

Fig. 2 In vivo behavior of i.v. administered 1-125-ATIII in dogs under the influence of thrombin and heparin.

5.5 時間に対し 1.6 時間と著明に短縮した (図 3)。

III. 考 察

すでに報告済みであるが、5 匹の無処置犬では血中 ^{125}I -AT III の消失曲線は 2 相性を示し、第 1 相の半減期は平均 5.5 時間、第 2 相の半減期は平均 1.7 日で、放射活性は、 $x = 0.52e^{-0.423t} + 0.48e^{-3.02t}$ の式に従って減衰した。

^{125}I -AT III を静注 2 日後に thrombin を少量持続注入したところ、DIC 類似の凝固異常が惹起されたが、AT III 回転には影響はみとめられなかった。これは注入された thrombin が、血漿 AT III 量および AT III 回転に影響をおよぼすに充分な量に達しなかったためと思われる。そこで ^{125}I -AT III を 2 日前に投与した犬に Heparin と同時により大量の thrombin を投与したところ血漿 AT III の減少と ^{125}I -AT III 消失の加速がみとめられた。この際、Heparin 投与のため血漿フィブリノゲン濃度には著変がみられなかった。しかし大量の thrombin 投与が AT

Fig. 3 Plasma behavior of canine 1-125-ATIII injected simultaneously with bovine thrombin.

III 代謝を一時的に亢進したことが注目される。

thrombin と ^{125}I -AT III を incubation 後、同時に投与すると ^{125}I -AT III の血漿消失曲線の第 1 相の半減期は、 ^{125}I -AT III 単独投与時のそれよりも短縮していることより、thrombin と AT III が complex を作り、その complex が速やかに血中からクリアーされるものと考えられる。しかし、この実験において、thrombin を大量に投与するのに、Heparin の同時投与を要したことが問題である。なぜならば最近、Heparin 投与で血漿 AT III 濃度の減少が報告されているからである³⁾。われわれの実験では、Heparin 投与により犬 AT III 代謝は亢進しなかった事実を扱っているが⁴⁾、thrombin 大量投与時の AT III 回転については、なお検討を要する点が多いと考えている。

結 論

犬に thrombin を投与した際の AT III 回転を検討した。① 3 時間にわたる thrombin 少量持続投与では、DIC 類似の凝固異常が出現したが、AT III 回転には影響はなかった。② Heparin を併用し thrombin 大量を静注すると、AT III は減少し、その回転の亢進が認められた。③ thrombin と ^{125}I -AT III を同時に投与すると、放射活性の血漿からの消失曲線の第 1 相の半減

期は1.6時間と短縮した。

文 献

- 1) Damus, P.S. and Wallace, G.A.: Purification of canine antithrombin III-heparin cofactor using affinity chromatography. Biochem. Biophys. Res. Comm., **61**; 1147~1153, 1974.
- 2) McFarlane, A.S.: Efficient tracer labelling

of proteins with iodine. Nature, **182**; 53, 1958.

- 3) Marciniak, E. and Gockerman, J.P.: Heparin-induced decrease in circulating antithrombin III. Lancet, 581~584, 1977.
 - 4) Takeda, Y. and Kobayashi, N.: Studies of Heparin affinity to Antithrombin III and other Proteins in vitro and in vivo. Thrombos. Haemostas., **38**; 685~695, 1977.
-