原 著

免疫学のおよび生物学的活性の測定による
アンチトロンビンⅢの臨床的意義

沖永 陽一* 近藤 信一* 大木 康雄* 松尾 武文*

Clinical significance of antithrombin III concentration with
immunological and biological methodsYoichi OKINAGA*, Shinichi KONDO*, Yasuo OHKI*
and Takefumi MATSUO*

Key words: antithrombin III, immunologic activity, biologic activity,
liver cirrhosis, congenital ATⅢ deficiency

This study was carried out to know how to play Antithrombin III (AT III) had taken in thromboembolic disorders, and which of two methods that consisted of immunological method by single radial immunodiffusion and quantitative clotting assay for AT III, showed in more significant and useful for clinical survey to thromboembolic disorders.

- 1) AT III normal healthy persons (n=300) were decreasing to low level according to age in both sex. In sex difference, AT III of male group was higher value than female until third decade. And female group showed in higher value of AT III than male after fourth decade. Thus, AT III in normal have been influenced significantly by the difference of sex and age.
- 2) In thromboembolic disorders, it was presumed that increase and decrease of AT III would be evaluated in comparison with strict age and sex matched control. 24 cases to be chosen from within DIC group corresponded to the cases of same age and sex from other groups with liver cirrhosis, myocardial infarction and malignant tumor. The lowest mean value of 18.2 ± 5.4 mg/dl was found in DIC group (n=24) and second in low AT III was the death group with myocardial infarction of 20.7 ± 2.9 mg/dl (n=24). Third group was liver cirrhosis of 21.6 ± 6.1 mg/dl (n=24).
- 3) In hereditary AT III deficiency, the propositus had both of low levels of AT III obtained from immunological concentration and clotting assay. The discrepancy between two methods were found in her young brother, and child. Those two blood relatives were shown in normal clotting activity and in pathological low level of immunological concentration. The same discrepancy

* 兵庫県立淡路病院内科〔〒656 兵庫県洲本市下加茂1-6-6〕, Dept. of Internal Medicine, Hyogo Prefectural Awaji Hospital, Sumoto, Japan.

was found in the clinical condition of secondary decrease of AT III such as liver cirrhosis.

It is suggested that clotting activity and immunological concentration in AT III were found to have good correlation in normal, and pathological conditions in low level of AT III would appeared to be the discrepancy between the results from two methods.

はじめに

ヘパリンの存在下でアンチトロンビンⅢ (ATⅢ) はトロンビン, Xa, 他のセリンプロテアーゼの中和を計ることからその活性の低下は血栓形成に重要な役割をするということが明らかになった¹⁾. 今回われわれは一元免疫拡散法および凝固法の両方法で ATⅢ の濃度および活性を測定し両者の測定値の比較検討を行なった.

I. 対象および方法

ATⅢ 濃度の測定は健常者の対象として本院血液銀行供血者より各年代別および性別におおの25例ずつ計 300 例の測定を行なった. 続いて, 入院中の各種血栓性疾患について測定した. ATⅢ の凝固活性の測定はわれわれの経験した先天性 ATⅢ 欠乏家系の血縁者を中心に測定し, 正常者, 肝硬変症の ATⅢ 活性と比較した. また, 先天性 ATⅢ 欠乏症については ATⅢ の免疫活性と凝固活性の相関をみた. 次に ATⅢ の免疫活性と凝固活性の不一致を解明するため各種濃度のヘパリンを血漿に添加し ATⅢ 欠乏患者の ATⅢ 活性の活性化の機序について考察を加えた. 採血は早朝空腹時に行ない 3.8%クエン酸1に対して血液9の割合で混和後血漿を直ちに分離した. 測定は一元免疫拡散法 (Behring-Werke 製) で免疫活性の測定を行った. 凝固活性の測定は Bick らによって発表された方法にもとづいて行った²⁾. 得られた血漿にレプチラーゼを加え脱フィブリンを行った血漿 0.1ml にヘパリン添加バルビタール液 (ヘパリン濃度 3U/ml) 2.9ml と混和後 0.1ml ウシトロンビン (40Iowa U/ml) を添加し正確に 37°C で 30 秒加温後 0.2ml 標準ヒトフィブリノーゲン

Fig. 1 ATⅢ concentration on the healthy control.

(750mg/dl) と混和し, フィブロメータを用いて凝固時間を測定した (図1).

II. 結 果

a. 一元免疫拡散法による ATⅢ の免疫活性

i) 正常値: 血液銀行供血者より年代別に 10 歳代より 60 歳代まで男女別の計 300 例についての成績をみると年代別では 10 歳代より 30 歳代までは男性が高値を示し 40 歳代より 60 歳代までは女性が高値を示し, 30 歳代で ATⅢ の免疫活性は男性と女性で逆転がみられた (図2). 10 代では男性が $33.51 \pm 3.69 \text{ mg/dl}$, 女性が $32.62 \pm 3.30 \text{ mg/dl}$ に対し 60 歳代では男性 $26.33 \pm 2.65 \text{ mg/dl}$, 女性 $27.63 \pm 3.86 \text{ mg/dl}$ と男女ともに加齢とともに減少傾向がみられた.

ii) 各種疾患別 ATⅢ の免疫活性: 正常者の ATⅢ は加齢により減少するため加齢の影響をさけるため入院中の各種疾患を age sex matched control で各症例につき 24 例ずつ作成した. 各種疾患として DIC, 肝硬変, 心筋梗塞 (生存例および死亡例), 脳血栓, 悪性腫瘍, 糖

Performance of the two stage ATIII assay

Fig. 2 Performance of the two stage AT III assay.

尿病，脳出血の比較を行った。その結果 DIC 群の AT III 濃度は $18.23 \pm 5.4 \text{ mg/dl}$ と最も低値を示し次いで肝硬変が $21.59 \pm 6.55 \text{ mg/dl}$ ，心筋梗塞（生存例） $22.01 \pm 3.5 \text{ mg/dl}$ ，悪性腫瘍 $22.76 \pm 6.65 \text{ mg/dl}$ ，脳血栓 $22.84 \pm 4.96 \text{ mg/dl}$ ，脳出血 $23.01 \pm 7.82 \text{ mg/dl}$ ，合併症のない糖尿病 $27.27 \pm 4.88 \text{ mg/dl}$ の順に高くなっていった。しかし心筋梗塞死亡例では生存例よりもはるかに低く $20.7 \pm 2.9 \text{ mg/dl}$ と DIC について低い値を示した。これら疾患を正常対象と比較すると脳出血および糖尿病では正常値と有意差はないが DIC，肝硬変，心筋梗塞，急性腫瘍では危険率 $0.01 \sim 0.05$ の間で有意の低下であった。

b. 凝固法による AT III の凝固活性

凝固法による AT III 活性を先天性 AT III 欠乏家系について測定した。この家系の一元免疫拡散法にて測定した AT III の免疫活性は発端者，発端者の母親，兄，子供に $12.3 \sim 14.5 \text{ mg/dl}$ と低下を認めた。しかし凝固法で凝固活性を測定すると $116 \sim 65\%$ と広範囲に活性値のばらつきがみられた。凝固活性と免疫活性の不一致を説明するため正常人，および肝硬変，先天性 AT III 欠乏家系について濃度と活性の相関をみた（図 3）。正常例の免疫活性は $26 \sim 34 \text{ mg/dl}$ ，凝固活性は $100 \sim 130\%$ であった。肝硬変では $12 \sim 21 \text{ mg/dl}$ および $54 \sim 75\%$ と両活性ともに低下がみられた。これに対して先天性 AT III 欠乏家系の家族の免疫活性と凝固活性をみると，静脈血

Fig. 3 The relationship between biologic and immunologic activity.

栓症を既往に有する発端者，その母親の免疫活性はおおの 12.4 mg ， 14.2 mg ，凝固活性は 65% ， 67% と免疫および凝固の両活性に低下がみられた。これに対して静脈血栓症の既往のない兄 (13.8 mg/dl)，子供 (13.5 mg/dl) は免疫活性で有意の低下がみられたにもかかわらず凝固活性はおおの 103% ， 110% と正常域を示し両者に不一致がみられた。そこでヘパリン添加に対する AT III の凝固活性の活性化速度をみるために正常者および AT III 欠乏患者の脱フィブリン血漿に各種濃度 $0.01 \sim 0.5 \text{ U/ml}$ のヘパリン添加バルビタール緩衝液を加え各種ヘパリン濃度に対する AT III の活性化速度をみた。そして正常および欠乏患者のおおのの血漿に充分量のヘパリンを加えた時の AT III 活性値を 100% としそれに対するヘパリン濃度と活性化速度の関係をみたが先天性 AT III 欠乏患者では正常者に比して 0.05 U/ml と低濃度ヘパリン添加で活性化は 50% 以上に達し，少量のヘパリン量に対しても活性化の機序に明らかな亢進を認めた。

III. 考 察

先天性 AT III 欠乏家系が Egeberg³⁾ により発表されて以来 AT III の凝固線溶系に対する役割は注目されてきた⁴⁾。現在用いられている AT III の測定方法も一元免疫拡散法から凝固法，合成基質などによる方法が開発されている。今回は同一検体に対して免疫拡散法および凝固法を

用いることによって、両者の比較を行った。正常者および各種疾患につき ATⅢ濃度を測定した。正常者における ATⅢの免疫活性の平均は 31mg/dl であるが加齢により減少傾向を認め性差では30歳以下では男性が、40歳以上では女性がやや高値を示した。松田ら⁵⁾も同様の成績を発表しており ATⅢの増減を比較する場合には正常者との性、年齢の matched control が必要である。また疾患別にみると DIC が最も低値で次に肝硬変、心筋梗塞、悪性腫瘍の順であった。次に ATⅢの生物学的活性を測定したが正常者では免疫活性は26~34mg/dl 生物学的活性は100~130%であり Kaulla らの報告にもみられるように⁶⁾、われわれの測定でも肝硬変症では免疫および生物学的活性とも平行して低下していた。先天性 ATⅢ欠乏症をみると免疫活性と生物学的活性に差がみられ静脈血栓症の既往のある発端者の母親と本人の免疫活性はおのの 14.2mg/dl, 12.4mg/dl, 生物学的活性は65%, 67%とともに平行して低下がみられた。しかし静脈血栓症の既往のない弟、子供では免疫活性は 13.5mg/dl, 13.8mg/dl と低下しているにもかかわらず、生物学的活性はおのの 103%, 110%と正常値を示した。Tullis は ATⅢの欠損家系で血栓症の既往のない ATⅢの低下例に注目し血小板の ATⅢ活性を測定し、家系の中で血栓症の合併例では血小板の ATⅢ活性の低下していることを報告している⁷⁾。しかしわれわれの家系では ATⅢの活性と濃度に不一致がみられこの家系では微量ヘパリン添加に対して正常者ではヘパリン濃度とともに活性化が直線的に上昇するのに対して 0.01U/ml という微量ヘパリンでその ATⅢ活性化速度は対数的に上昇した。

ま と め

凝固法による ATⅢ生物学的活性と一元免疫

拡散法で測定した ATⅢの免疫学的活性とは正常者では両者の測定結果に相関がみられたが ATⅢ量の低値を示す ATⅢ欠乏家系では必ずしも ATⅢ活性が低値とは限らず、両者の測定結果に不一致がみられた。とくに ATⅢ欠乏家系では血栓症の既往のある例では免疫活性と生物学的活性が両者とも低下しているのに対して家系の中で血栓症の既往のない例では免疫学的活性は低下しているにもかかわらず生物学的活性は正常であることが注目された。このことから今後 ATⅢ濃度と活性は同時に測定して用いることが臨床に重要であると考えられた。

文 献

- 1) 青木延雄：生体内蛋白分解酵素阻害物質—その生物学的臨床的意義。代謝, 14; 45, 1976.
- 2) Bick, R. and Kovacs, I.: A new two-stage functional assay for antithrombin III (heparin co-factor): clinical and laboratory evaluation. Thromb. Research, 8; 745~750, 1976.
- 3) Egeberg, O.: Inherited antithrombin III deficiency causing thrombophilia. Thrombo. Diath. haemorrh., 13; 516~519, 1965.
- 4) 藤井節郎：血中プロテアーゼインヒビター。医用酵素, 2; 12~19, 1976.
- 5) 松田 保：加齢とアンチトロンビンⅢ。医用酵素, 2; 47~50, 1976.
- 6) Von Kaulla, E. and Von Kaulla, K.: Antithrombin and disease. Am. J. Clin. Pathol., 48; 69~80, 1967.
- 7) Tullis, J.: Platelet antithrombin deficiency a new clinical entity. Am. J. Med., 65; 472~478, 1978.