ヘパリン, ATIII, PF₄ の測定とその臨床的 意義について

小熊 豊* 武井 秀昭* 瀬谷 司* 村越 敏雄*
山内 雅夫* 長田 博* 長谷川 淳*

Assays of Heparin, ATIII and PF₄ and their clinical applications

Yutaka OGUMA*, Hideaki TAKEI*, Tsukasa SEYA*,
Toshio MURAKOSHI*, Masao YAMAUCHI*,
Hiroshi NAGATA* and Hiroshi HASEGAWA*

Key words : heparin, APTT, ATIII, PF₄, FPA

The concentrations of heparin, AT III, PF₄ and FPA in plasma were measured. It appeared that the measurement of heparin concentration in plasma was important in therapeutic control and evaluation of heparin.

There was a correlation between APTT and heparin concentration, but since the regression lines differed in each of the cases, especially between DIC group and non-DIC group, measurement of APTT or heparin concentration alone would give a different estimate in the control.

It was also suggested that the determination of functional AT III rather than immunological AT III, the measurement of PF₄, and the control of patient's AT III at the higher levels of more than 40 % of normal level were quite important for heparin treatment.

FPA was the best indicator of therapeutic effects of heparin and the complete remission was not obtained without the continuous normalization of FPA.

Therapeutic heparin concentrations were defined as many as 0.2—1.2 IU/ml (APTT ; 40—250 sec.) with the facts that the normalization of FPA was observed and there happened no hemorrhagic accidents in that range.

はじめに

安全で効果的な Heparin (Hp) 療法の確立を

目指して, Hp の血中濃度, Antithrombin III (AT III), Platelet Factor 4 (PF₄), Fibrinopeptide A (FPA)などを測定し, その臨床的意義

* 北海道大学医学部第一内科〔〒060 札幌市北区北15条西7丁目〕, The First Department of Internal Medicine, Hokkaido University School of Medicine, Sapporo, Japan.

につき検討したので報告する.

I. 方 法

1) Hp 濃度の測定: 発色基質 S-2222 (KABI) を用いて Teien ら¹⁾の方法に準じて測定した²⁾.

2) AT III の測定: 一元免疫拡散法 (Behringwerke) にて 抗原量 (I) を (正常値: $32.1 \pm 4.3 \text{ mg/dl}$), 発色基質 S-2238 (KABI) にて生物活性 (F) ($101.1 \pm 9.3\%$) を計測した.

3) PF_4 , β -Thromboglobulin (βTG) の測定: PF_4 RIA Diagnostic Kit (ABBOT), βTG Riapac (Radiochemical Centre) を用いて, Ludlam ら³⁾の方法に準じて測定した (PF_4 : $9.2 \pm 7.2 \text{ ng/ml}$, βTG : $29.6 \pm 16.8 \text{ ng/ml}$)⁴⁾.

4) FPA の測定: Nossel ら⁵⁾の方法に準じて FPA RIA Kit (IMCO) により測定した ($< 2 \text{ ng/ml}$)⁶⁾.

5) その他の凝固線溶検査: APTT (セライト; Warner-Lambert), Fibrinogen (Tyrosine 変法), FDP (FDPL テスト; 帝国臓器), 血小板数などを測定した²⁾⁷⁾.

II. 結 果

1. Hp の治療域濃度と効果判定指標

Hp 療法を施行した DIC 6 症例と非 DIC 6 症例を対象に検討した. Hp 療法有効例では, FPA は他のいかなる凝血学的指標よりも最も早期に正常化し, 逆に FPA の持続的正常化が認められない症例では Hp 療法は無効であった (図 1). FPA を正常化した時点での Hp の血中濃度は $0.73 \pm 0.51 \text{ IU/ml}$ ($\bar{m} \pm \text{S.E.}$), APTT は 146 ± 102 秒であったが, 出血などの副作用は全く認められず, Thrombin 作用を安全かつ効果的に抑制する Hp の治療域濃度は, $0.2 \sim 1.2 \text{ IU/ml}$ と考えられた.

2. Hp の血中濃度と APTT との関係

Hp の血中濃度を横軸, APTT を縦軸にとると, 非 DIC 群では $Y = 185.8X + 29.8$ ($r = 0.912$, $n = 76$, $p < 0.01$), DIC 群では $Y = 94.4X + 49.9$ ($r = 0.536$, $n = 45$, $p < 0.01$) と有意の相関を認めたが, 両者の間には推計学的有意差が認められ ($p < 0.005$), また各症例

Fig. 1 Changes of plasma FPA levels after the administration of Heparin.

the solid line: Changes of FPA levels in effective cases of heparin treatment (13 times in 7 cases). FPA improved most quickly and remained continuously under 2 ng/ml during heparin treatment. The normalizations of FPA were obtained in the range of $0.73 \pm 0.51 \text{ IU/ml}$ of heparin concentration (APTT: $146 \pm 102 \text{ sec}$).
the dotted line: Changes of FPA in ineffective cases of heparin treatment (6 cases).

the shaded area: the normal range of FPA.

毎の回帰直線もさまざまに異っていた²⁾⁷⁾.

3. AT III 活性の重要性と PF_4 の影響

AT III が活性値で 40% (抗原量 16.4 mg/dl) に低下していた症例では, Hp の有効濃度は保持されていたが APTT は延長せず, Hp 効果も認めなかった²⁾. また BaSO_4 , Bentonite を用いて AT III · PF_4 free plasma を作製し, 100% AT III 溶液を種々の濃度に混和して各種 AT III 濃度列血漿を調製後, 一定量の既知 Hp を投与して HP-AT III 複合体の活性 X 因子 (FXa)

Fig. 2 Heparin and AT III.

The functional activities of heparin in plasma with various concentrations of AT III and PF₄ on the inhibition of FXa were measured using a chromogenic substrate.

At first, AT III and PF₄ in normal plasma were absorbed by BaSO₄ and Bentonite in order to obtain AT III and PF₄ free plasma, and then 100% AT III solvents (PF₄ free) were added in various concentrations.

the solid line: Activities of heparin with the supplemental excess of AT III during the procedure.

the dotted line: Activities of heparin without any supplements of AT III.

Due to the lack of PF₄, the levels of heparin were measured in about 20~30% increase than that of non-absorbed (normal state) PPP. Therefore, it appeared to be unable to evaluate the effects of heparin at the lower levels than 40% of normal AT III levels.

阻害効果を検討したところ、Hp 投与に伴う FXa 阻害効果は AT III 活性に強く依存することが判明し (図 2), PF₄ 吸着に伴う Hp 効果抑制減少率を考慮に入れると⁴⁾, AT III 濃度が 40% 以下では Hp 作用は発現しなくなることが示唆された。

4. Hp の投与方法

重篤な shock に陥った症例に Hp を皮下注

した場合には、Hp 濃度の上昇も効果も全く認めず Hp の静注投与が必要と思われた²⁾。一方非 shock 例では、Hp 1~2 万単位の点滴静注法では点滴終了後約 4 時間、HpNa 塩の 250IU/kg/12hr 皮下注法では持続的に有効濃度を保ちうる成績をえ、皮下注療法の臨床的有用性が示唆された。またこの際、Hp の反復投与により血中濃度の漸増傾向が認められた。

Fig. 3 F/I in various disease.

ATⅢ levels in various diseases were measured by the chromogenic substrate for the functional activities (F) and by the single radial immunodiffusion for the immunological activities (I).

F/I ratio were depressed in such as acute or decompensated DIC.

5. 各種疾患時における ATⅢ 量と PF₄ 値

DIC および各種疾患 180 症例を対象に、ATⅢ F 量を縦軸、I 量を横軸にとると有意の相関 ($Y = 2.83X + 24.6$, $r = 0.827$, $P < 0.01$) を認めたが、疾患別、病期別に F/I 比を検討すると、DIC (急性、過代償性 DIC) が進展するほど F/I 比が低下し (図 3)、異常 ATⅢ 形成の可能性が示唆された。一方各種症例 112 例を対

象に PF₄ を測定すると、病期の進展に伴い PF₄ が増加する傾向を認めたが、血小板数が著しく低下した症例では、DIC のような場合でも PF₄ は低値を示し、血小板数の多寡に多大の影響を受けると考えられた⁴⁾。

III. 考 案

Hp 療法を安全かつ効果的に施行するために

は、Hp の血中濃度と APTT の両者により control することが重要で、FPA の持続的正常化を図ることが Hp 療法の成功につながると考えられた。その際の有効治療域レベルは、Hp 血中濃度が 0.2~1.2IU/ml, APTT が45~250 秒と従来経験的に提唱されていた領域⁹⁾の約2 倍を示したが、副作用は全く認められなかった。また ATⅢ 活性を40%以上に保つことが必要で、ATⅢ 活性の測定と補充療法の重要性¹⁰⁾、ならびに疾病の種類¹¹⁾や進展、治療の影響¹²⁾などに伴う抗原量と活性量の解離が、今後重大な意義を持つと考えられた。PF₄ が Hp 阻害作用を持つことは古くから知られ¹³⁾¹⁴⁾われわれの成績でも実証されたが¹⁴⁾、Hp 療法を必要とする疾患では PF₄ の上昇を伴うことが多く、PF₄ の血管壁存在の可能性や Hp 投与に伴う変動¹⁵⁾、血栓融解療法の効果判定指標としての可能性⁴⁾など、Hp 療法解明のために今後検討すべき問題は多い。

結 語

Hp 療法の確立を目指して、Hp の血中濃度、APTT, FPA, ATⅢ, PF₄ などの動態を検索し、その臨床的意義と Hp の投与 control 法、至適治療域濃度などにつき検討した。FPA の動態が Hp 療法の成否を反映し、Hp 濃度と APTT による厳密な control と、0.2~1.2IU/ml の Hp 至適治療域濃度 (APTT; 45~250 秒) の保持、ならびに40%以上の ATⅢ 活性の維持がきわめて重要なこと、PF₄ が多大の影響をおよぼすことが推察された。

文 献

- 1) Teien, A., Lie, M. and Abildgaard, U.: Assay of heparin in plasma using a chromogenic substrate for activated factor X. *Thromb. Res.*, **8**; 413~416, 1976.
- 2) Oguma, Y., Hasegawa, H., et al.: Assay of heparin in plasma using a chromogenic substrate and its clinical applications: VIIth International Congress on Thrombosis and Haemostasis, London, 1979 (*Thromb. Haemostas.*, **42**; 379, 1979).
- 3) Ludlam, C.A. and Cash, J.D.: Studies on the Liberation of β -thromboglobulin from human platelets in vitro. *Br. J. Haematol.*, **33**; 239~247, 1976.
- 4) 小熊 豊, 武井秀昭, 他: 血小板第4因子 (PF₄) に関する研究. *臨床成人病*, **10**; 151~160, 1980.
- 5) Nossel, H.L., Younger, L.R., et al.: Radioimmunoassay of human fibrinopeptide A. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **68**; 2350~2353, 1971.
- 6) 村越敏雄, 小熊 豊, 他: 血栓性疾患における Fibrinopeptide A に関する研究. *血液と脈管*, **10**; 576~579, 1979.
- 7) 長谷川 淳, 他: DIC 症例における fibrinopeptide A, 血中 Heparin 濃度測定の臨床的意義. 厚生省特定疾患 汎発性血管内凝固症調査研究班・昭和53年度業績報告集, p. 33~38.
- 8) 長谷川 淳: ヘパリン使用の問題点, まとめ. *クリニカ*, **4**; 73~76, 1977.
- 9) Teien, A., Abildgaard, U.: On the value of activated partial thromboplastin time (APTT) in monitoring heparin therapy. *Thromb. Haemostas.*, **35**; 592~597, 1976.
- 10) 青木延雄, 吉田信彦, 山中恒夫: アンチトロンビンⅢ濃縮分画による DIC の治療. *医学のあゆみ*, **109** (13); 970~975, 1979.
- 11) Sas, G., et al.: Abnormal antithrombin III (Antithrombin III 'Budapest') as a case of a familial thrombophilia. *Thromb. Diathes. Haemorrh.*, **32**; 105~115, 1974.
- 12) Hasegawa, H., et al.: Urokinase therapy from the standpoint of natural inhibitors. VIIth Internal Congress on Thrombosis and Haemostasis. London, 1979 (*Thromb. Haemostas.*, **42**; 386, 1979).
- 13) Conley, C.L., Hartmann, R.C., et al.: The relationship of heparin activity to platelet concentration. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **69**; 284~286, 1948.
- 14) Vancreveld, S. and Paulssen, M.M.P.: Significance of clotting factors in blood platelets in normal and pathological conditions. *Lancet*, **2**; 242~244, 1951.
- 15) Dawes, J., Smith, R.C., et al.: The release, distribution, and clearance of human β -thromboglobulin and platelet factor 4. *Thromb. Res.*, **12**; 851~861, 1978.