ヘパリン投与のラットアンチトロンビンⅢ代謝に およぼす影響

浦野 澄郎* 岡嶋 泰* 川村 恒博* 奥田 聖介*
前田 義春* 木谷 輝夫* 金山 春洋* 和多田光朗*
中川 雅夫* 伊地知浜夫*

Effect of heparin infusion on antithrombin III metabolism in rats

Sumio URANO*, Yasushi OKAJIMA*, Tsunehiro KAWAMURA*,
Seisuke OKUDA*, Yoshiharu MAEDA*, Teruo KITANI*,
Shunyo KANAYAMA*, Mitsuro WATADA*, Masao NAKAGAWA*
and Hamao IJICHI*

Key words : antithrombin III, radioimmunoassay, ^{125}I -AT III,
half life, heparin

The effect of heparin infusion on the antithrombin III (AT III) metabolism was studied on the rat using radioimmunoassay (RIA) method and ^{125}I labelled AT III as a tracer. Rat AT III was purified from rat-defibrinated plasma by heparin-Sepharose 4B affinity chromatography and gel filtration using Sephadex G-200. This purified AT III was used for RIA and metabolism studies. Labeling of AT III with ^{125}I was performed according to Hunter and Greenwood.

Plasma levels of AT III were significantly decreased in the group treated with heparin infusion for 6 hours, although no significant differences were observed in AT III content in various organs.

The behavior of i.v. injected ^{125}I -AT III was studied on the normal control rat and heparinized groups. The half life of ^{125}I -AT III in plasma 2.13 days in normal male rats. After heparin infusion for 6 hours, the percent dose radioactivity per milliliter plasma was 1.16 ± 0.51 and 2.01 ± 0.38 in the control group. Significant difference ($p < 0.05$) was observed between both groups. On the contrary, the percent dose radioactivity per gram tissue wet weight was significantly increased in liver, lung and large intestine in the heparin treated group. The decreased amount in plasma of i.v. injected ^{125}I -AT III by heparin infusion appears to be trapped and metabolized by organs, mainly in the liver.

* 京都府立医科大学第二内科 (〒602 京都市上京区河原町広小路上ル), Second Department of Internal Medicine, Kyoto Prefectural University of Medicine, Kyoto, Japan.

はじめに

Antithrombin III (以下 AT III) は、血液の流動性の保持、動脈硬化症の発症、進展のみならず播種性血管内凝固症候群 (DIC) などにおいて、重要な役割を果し、また最近では先天性 AT III 欠乏症の家系では血栓性疾患の多発が認められている¹⁾²⁾。このように AT III は血液の Homeostasis の維持に重要な役割を果しているが、諸臓器における動態は十分解明されていないのが現状である。

私共は AT III の Radioimmunoassay (以下 RIA と略す) 法を確立し、その諸臓器含量についてすでに報告した³⁾。一方、従来ヘパリンの有効性は周知のところであるが、時にはヘパリン投与により血小板の減少をはじめ血栓症の増悪する症例⁴⁾も報告されているのが現状である。

そこで私共は RIA 法を用いて血中 AT III、諸臓器 AT III 量ならびに血中 AT III の半減期に及ぼすヘパリンの影響を、ラットを実験モデルとして検討した。

I. 材料および方法

(1) Rat defibrinated plasma: Wister 系雄性ラットのクエン酸ソーダ加血漿を 56°C 温水中で激しく振盪 5 分後遠沈し、脱線維素血漿として用いた。(2) AT III の精製: 脱線維素血漿を Heparin-Sepharose 4B affinity chromatography より分画し、0.8M NaCl による溶出分画を濃縮し、さらに Sephadex G-200 により Gel filtration を行い、AT III 活性 (Heparin cofactor 活性) を示す分画を再濃縮後、再度 Gel filtration を行い精製 AT III として用いた。(3) 抗体の作製: 精製 AT III に Freund complete adjuvant を 1 : 1 の割合で混和し家兎を免疫して作製した。なお、抗血清は Ouchterlony 法および免疫電気泳動法により検定した。(4) 標識 AT III の調製法: クロラミン T 法⁵⁾により Na ¹²⁵I で標識した。(5) RIA: 反応系として希釈 ¹²⁵I-AT III 0.1ml, 希釈抗血清 0.1ml, 標準ラット

Fig. 1 Effect of heparin infusion on plasma AT III concentration. Upper for 6 hours and lower for 3 hours.

AT III または試料 0.1ml に 0.1M 磷酸緩衝液 (pH 7.5) 0.7ml を加え 1.0ml にして 4°C 48 時間反応後、第 2 抗体を加えて B (bound) と F (free) に分離し放射能を測定した。(6) 臓器試料調製法: 脱血致死させた後 3 倍量の氷冷生食水を加え磨碎し、20,000G 30 分間の遠沈上清を 56°C 5 分加温後、1,500G 10 分間の遠沈上清を -20°C に凍結後、融解させ 1,500G 10 分間の遠沈上清を試料とした。(7) 臓器中の ¹²⁵I-AT III の放射能の測定⁶⁾: ¹²⁵I-AT III を静注し血中の放射能を経時的に求め、その後脱血させ諸臓器を剔出し、5 倍量の氷冷生食水を加えて磨碎し、1,500G 10 分間の遠沈上清に等量の 20% Trichloroacetic acid (TCA) を加えた後、1,500G 10 分間遠沈し沈渣を得た。両沈渣の放射能を加算したものを蛋白結合放射能として計算した。血漿は臓器の場合と同じく 20% TCA による沈渣分画の放射能を血液の蛋白結合放射能とした。(8) ヘパリンの投与法: Novo 社製のヘパリンを Infusion pump により 10 単位/分の速度で 3 または 6 時間持続注入し、対照には生食水を用いた。

Fig. 2 The fate of i.v. injected rat ^{125}I -AT III. The percent dose of protein bound radioactivity per milliliter of plasma.

II. 成 績

(1) RIA の信頼性について : 54ng/tube ~13.6 μg /tube が測定可能域であり, 再現性, 回収率ともに良好であった. (2) 血中ならびに諸臓器 AT III 量におよぼすヘパリン注入の影響について : 3 時間の注入時には, 血中 AT III 量には有意の影響を認めなかったが, 6 時間では有意に減少した (図 1). 諸臓器の AT III 量は 3 および 6 時間注入群ともに有意の変化を認めなかったが, 後者では高い傾向を示した. (3) 正常ラットにおける標識 AT III の血中半減期について : 標識 AT III の静注後, 血中放射能は急速に減少し, 24 時間後よりその減少は緩やかになり 2 相性を示した. これより算出される血中半減期は 2.13 日であった (図 2). (4) 標識 AT III の減衰に及ぼすヘパリン注入の影響について : TCA 不溶分画の放射能を ^{125}I -AT III 由来のものと仮定すると, ヘパリン 6 時間注入後の血中の ^{125}I -AT III は有意に低下したのに反し, 臓器中の ^{125}I -AT III は注入により増大の傾向を示し, 肝, 肺および大腸において有意に高値で

Fig. 3 Protein bound radioactivity in various organs following the injection of rat ^{125}I -AT III. Upper for the percent dose/ml of plasma and lower for the percent dose/gram of organs.

あった(図3)。

III. 考 案

血中 ATⅢはその臨床的重要性からかなりの知見が集積されてきたが、その代謝および臓器における動態はほとんど検討されていない。私共は RIA 法を開発し ATⅢ量の微量測定を可能ならしめ、さらにその代謝動態につき検討した。ヘパリンの影響は種々報告⁴⁾⁷⁾され、それらの多くは病的状態主として血栓症におけるものであり、その減少を報告するものが多い。しかしながら今回ラットを対象とした私共の成績では、正常ラットにおいてもヘパリン投与時には血中 ATⅢの低下を示した。このことは血栓症その他の凝固亢進状態では、ATⅢの低下をさらに助長せしめる可能性が推定される。一方ヘパリン投与による血中 ATⅢ量の低下時に、諸臓器とくに肝、肺、大腸および脾などに放射能の集積が多いことは、ヘパリンが ATⅢはじめ血漿蛋白と結合し形成された Complex などが、主として肝臓その他 RES に取り込まれて代謝されるという報告⁸⁾と一致する。

文 献

- 1) Egeberg, O.: Inherited antithrombin deficiency causing hemophilia. *Thromb. Diath.*
- Haemorrh., **13**; 516~530, 1965.
- 2) Nakagawa, M., Tsuji, H., Kawamura, T., Okajima, Y., Urano, S., Okuda, S., Nishizawa, A., Kitani, T., Watada, M. and Ijichi, H.: Familial antithrombin III deficiency and its clinical significance. *血液と脈管*, **11**(1); 106~116, 1980.
- 3) 浦野澄郎, 岡嶋 泰, 川村恒博, 奥田聖介, 木谷輝夫, 中川雅夫, 伊地知浜夫: ラジオイムノアッセイによるラット組織アンチトロンビンⅢ定量法の検討。血液と脈管, in press.
- 4) Zinn, W.J.: Side Reactions of heparin in clinical practice. *Am. J. Card.*, **14**(1); 36~38, 1964.
- 5) Hunter, W.M. and Greenwood, F.C.: Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity. *Nature*, **194**; 495~496, 1962.
- 6) Thomas, P.C. and Poulik, M.D.: Catabolism of rat β_2 -microglobulin in the rat. *J. Lab. Clin. Med.*, **89** (6); 1208~1214, 1977.
- 7) Marciniak, E. and Gockerman, J.P.: Heparin-induced decrease in circulating antithrombin III. *Lancet*, **II A**; 581~584, 1977.
- 8) 木谷輝夫, 岡嶋 泰, 川村恒博, 浦野澄郎, 奥田聖介, 中川雅夫, 伊地知浜夫: 低分子および高分子ヘパリンの抗凝固活性について。血液と脈管, **11**(1); 129~133, 1980.

●白血病治療の理論と実際！

白血病の化学療法—基礎と臨床

編集 滋賀医科大学学長 脇坂行一 専門医28名分担執筆

A5判 292頁 図60 表42 定価5,800円(〒200円)

☎101 東京都千代田区神田多町2-11

科学評論社

振替口座東京 7-102026
電話 03-252-7768