原 著

実験的 DIC に対するアンチトロンビン III
の抗凝固作用川畑好之康* 由良 武典* 西澤 弘幸* 梅村 昭男*
小山 守* 園田 崇倫* 柏原 純一*The anti-coagulative effect of antithrombin III on the
experimental DICYoshiyasu KAWABATA*, Takenori YURA*, Hiroyuki NISHIZAWA*,
Akio UMEMURA*, Mamoru KOYAMA*, Takanori SONODA*,
and Junichi KASHIHARA*

Key words: antithrombin III, DIC, endotoxin,
thromboplastin

The effects of antithrombin III (AT III) on the accelerated coagulation induced by intravenous infusion of tissue thromboplastin (TPL) or endotoxin were studied in rabbits.

TPL treatment decreased platelet counts, plasma fibrinogen content and plasma factor V. Simultaneous intravenous pre-treatment with AT III and heparin perfectly inhibited the changes of these hematological parameters. But, the anti-coagulative activity after a single treatment with AT III or heparin was conspicuously lower than that after simultaneous treatment. Two times infusions of endotoxin at an interval of 24 hours severely decreased above-mentioned hematological parameters, and after the second infusion of endotoxin thrombus formation in glomerulus was histologically observed in all non-drug treated animals. Treatment with AT III and heparin satisfactorily suppressed the changes of hematological parameters after the second endotoxin infusion and completely inhibited the thrombus formation in glomerulus.

These findings demonstrate that supply of the concentrated preparation of AT III could be effective for the prevention and improvement of disseminated intravascular coagulation (DIC).

* (株)ミドリ十字安全性研究所〔〒679-22 兵庫県神崎郡福崎町山崎 214-1〕, Safety Evaluation Laboratory, The Green Cross Co., Hyōgo, Japan. 受付: 1987.5.11. 受理: 1987.10.20.

はじめに

アンチトロンビンⅢ (ATⅢ) は、 α_2 -グロブリン分画中に存在する分子量62,000~65,000の蛋白性のセリンプロテアーゼインヒビターであり、活性化凝固因子である FIXa, FXa, FXIa, FXIIa, トロンビン等と結合することにより、これらプロテアーゼ活性に対して不可逆的な阻害を示すことから、生体内における主要な凝固制御因子として知られている¹⁾。

DIC (播種性血管内凝固症候群) は、血液凝固線溶系の恒常性が、種々の基礎疾患を伴って破綻することにより、微小血管内に凝固亢進に基づく多発性の血栓を生ずる症候群である。従って DIC の治療としては、基礎疾患の改善を試みると同時に、微小血栓の形成、進展を防止することが重要である²⁾。後者の治療として、近年 ATⅢ の有用性が提唱され、その製剤の開発が期待されていた。ATⅢ は、ヘパリン共存下で強力な抗凝固作用を示すことから、ATⅢ 濃縮液とヘパリンの補充により、充分な凝血学的コントロールが得られ、DIC の発症防止および改善に効果が期待できるものと考えられる。

そこで今回、DIC のモデル病変として、家兎を用いて組織トロンボプラスチンまたはエンドトキシン惹起による凝固亢進状態を作製し、ATⅢ の抗凝固作用を検討した。

I. 実験材料および実験方法

1. 使用薬剤

本実験に使用した ATⅢ は、人血漿より精製した乾燥製剤 (ミドリ十字製, ノイアート®) であり、生理食塩液で 100units/ml に調製し使用した。なお ATⅢ 1 unit は、正常人血漿 1 ml 中に含有する ATⅢ 活性に相当する。その他、本試験には以下の薬剤を使用した。ヘパリン (ミドリ十字製)、組織トロンボプラスチン (ウサギ脳由来, Dade 社製)、エンドトキシン (Lipopolysaccharide B, E. coli, 026:B₆, Difco 製)。

2. 使用動物

日本白色種ウサギ (雌性, 3 kg 前後) を使用した。

3. 実験方法

1) 組織トロンボプラスチン惹起凝固亢進に対する作用

組織トロンボプラスチン (TPL) の投与は、10分間隔で2回 (初回 10mg/kg, 2回目 30mg/kg) とし、いずれもシリンジポンプ (Harvard Apparatus) を用いて、1.1 ml/min の速度で耳介静脈内に投与した。薬剤の投与 (静脈内投与) は、2回目 TPL 投与直前とし、各群 5 匹で以下のような群構成とした。

- i) ATⅢ 30 units/kg, ヘパリン 500 units 併用群 (以下 ATⅢ-ヘパリン併用低用量群)
- ii) ATⅢ 100 units/kg, ヘパリン 500 units 併用群 (以下 ATⅢ-ヘパリン併用高用量群)
- iii) ATⅢ 100 units/kg (ATⅢ 単独群)
- iv) ヘパリン 500 units (ヘパリン単独群)
- v) 薬剤無投与群 (対照群)

薬剤投与直前および2回目 TPL 投与後 1, 2, 4 時間目に耳介動脈より採血し、ATⅢ の抗凝固作用を検索する目的で血小板数 (自動血小板測定装置, 東亜医用電子) を測定した。さらに血漿を用いてフィブリノーゲン量 (トロンビン時間法) および第 V 因子 (プロトロンビン時間一段法) を血液凝固測定装置 (京都第 1 化学) により、ATⅢ 活性を合成基質法 (Kabi Vitrum) により各々測定した。

2) エンドトキシン惹起凝固亢進に対する作用

エンドトキシンの投与は、24時間間隔で2回 (準備注射: 30 μ g/kg, 惹起注射 50 μ g/kg) とし、いずれもシリンジポンプを用いて、0.11 ml/min の速度で耳介静脈内に投与した。薬剤の投与 (静脈内投与) は、準備注射直前、準備注射終了後 6 時間および惹起注射直前の合計 3 回とし、各群 15 匹とした。なお、この試験では、上述 ATⅢ-ヘパリン併用高用量群と対照群の 2 群のみについて検討した。

準備注射直前、惹起注射直前 (準備注射翌日) および惹起注射終了直後に前項と同様に、血小板数、フィブリノーゲン量、第 V 因子 および ATⅢ 活性を測定した。

病理組織学的検査として、腎臓系球体における血栓形成の有無を光顕的および電顕的に検討

Fig. 1 Changes of platelet counts and fibrinogen content after the second infusion of TPL.

Each point indicates the mean $\pm$ S.D.. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

Fig. 2 Changes of factor V and AT III activity after the second infusion of TPL

Each point indicates the mean $\pm$ S.D.. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

した。光顕による検討は、惹起注射終了2時間後に腎臓を摘出、10%中性ホルマリンで固定し、パラフィン切片を作成後、H.E. 染色標本およびフィブリン染色標本 (Fraser-Lendrum 法) を

調製、鏡検した。透過型電顕 (JEM-1200 EX, 日本電子) による検討は、腎臓切片を2.5% グルタルアルデヒドおよび1% 四酸化オスミウムで固定し、酢酸ウラニル・クエン酸鉛により

Table 1 Changes of hematological parameters after the endotoxin infusion

Parameter	Group	before 1 st infusion	after 1 st infusion (a)	after 2 nd infusion (b)	b/a×100 (%)
Platelet counts (×10 ³ /mm ³)	AT III	400±127	173±85	126±55	88.1±54.1**
	Control	428±90	186±49	48±15	27.5±9.7
Fibrinogen (mg/dl)	AT III	180±22	481±123	506±139	106.6±23.9**
	Control	183±34	501±96	284±77	57.1±13.6
Factor V (%) ¹⁾	AT III	95.7±14.1	82.6±21.9	61.7±19.3	75.4±17.7**
	Control	95.3±17.2	83.4±38.2	32.3±16.6	43.5±20.7
AT III activity (%) ¹⁾	AT III	99.3±5.5	134.0±9.6	202.2±15.7	151.6±15.9**
	Control	99.0±4.0	93.7±5.4	84.6±7.4	90.3±6.1

AT III group: n=13. Control group: n=12

**p<0.01

¹⁾ percentage to the activity or content of normal plasma

二重染色を施した後、糸球体血管形成の有無を観察した。走査型電顕 (JSM-35CF, 日本電子) による検討は、血管注入鋳型法に従い実施した³⁾。すなわち動物を屠殺後、腎動脈よりカテーテルを挿入し、生理食塩液で灌流、洗浄後、鋳型剤 (Mercox, 大日本インキ) 20 ml を注入した。腎臓を摘出後、60℃温水中で2時間、さらに10% KOH 溶液中で一晩放置し、翌日流水中で8時間洗浄した。乾燥後、糸球体の血管鋳型を試料台に貼りつけ、イオンスパッター方式 (JFC-1100, 日本電子) で導電処理を施し、加速電圧10KV で、血管の走行性を観察した。なお、電子顕微鏡による検査は、各群の代表例につき実施した。

II. 実験結果

1. 組織 TPL 惹起凝固亢進に対する作用

各検査結果を図1, 2に示した。なお検査結果は、2回目 TPL 処理前の測定値に対する、処理後の各測定値の百分率で示した。血小板数は、対照群で経時的に減少したのに対して、ATIII-ヘパリン併用群では低用量群、高用量群ともに殆ど減少しなかった。ATIII またはヘパリン単独群においても、TPL 処理による血小板数減少の抑制傾向が認められたが、その程度は併用群には及ばなかった。フィブリノーゲン量も、対照群で TPL 処理後1時間より顕著に

Table 2 Thrombus formation in glomerulus after the second infusion of endotoxin

Finding	AT III		Control	
	-	+	-	+
Thrombus formation in glomerulus	13	0	0	12

減少したのに対して、各薬剤投与群においては明らかな減少抑制効果が認められた。特にATIII-ヘパリン併用群におけるフィブリノーゲン量の減少抑制効果は強く、その程度にATIII 用量依存性がみられた。ATIII 活性は、ATIII-ヘパリン併用群、ATIII単独群とも用量に相関して血中濃度が維持されたのに対して、ヘパリン単独群では変化はなかった。対照群においては、軽微ながらも減少傾向が認められた。

2. エンドトキシン惹起凝固亢進に対する作用

各検査結果を表1に示した。なお準備注射翌日にエンドトキシンショック死と考えられる死亡例が、ATIII-ヘパリン併用群2例、対照群3例に認められた。血小板数および第V因子は、ATIII-ヘパリン併用群、対照群とも準備注射翌日に同程度に減少したが、惹起注射後においては、ATIII-ヘパリン併用群では軽度な減少しか認められなかったのに対して、対照群ではより顕著な減少が認められた。またフィブリノーゲン量は、準備注射翌日に両群とも同程度な増

Fig. 3 Kidney (fibrin staining)
Fibrin thrombus is observed in glomerulus.
Control group $\times 90$

Fig. 4 Kidney (fibrin staining)
Fibrin thrombus is not observed in glomerulus. AT III-Heparin group $\times 90$

Fig. 5 Kidney
Glomerular capillary is filled with fibrin thrombus (inset). Control group (scale bar: $1 \mu\text{m}$)

Fig. 6 Kidney
Fibrin thrombus is not observed in glomerular capillary. AT III-Heparin group (scale bar: $1 \mu\text{m}$)

加が認められたが、惹起注射後においては、ATIII-ヘパリン併用群で変化がなかったのに対して、対照群では顕著に減少した。ATIII活性は、ATIIIの投与に伴い上昇したが、対照群では惹起注射前後とも僅かな低下がみられた。

H.E. 染色による糸球体内血栓形成の観察結果を表2に示した。対照群では血栓形成が全例に認められたのに対して、ATIII-ヘパリン併用群では血栓は全く認められなかった。なお、対照群に認められた血栓はフィブリン染色陽性であった(図3, 4)。透過型電顕による糸球体観察においては、対照群に糸球体血管がフィブリン血栓で満たされる像が観察されたのに対して、ATIII-ヘパリン併用群では光顕所見と一致して、フィブリン血栓は認められなかった(図

5, 6)。糸球体血管注入鋳型標本の走査型電顕による観察においては、対照群の糸球体血管鋳型は、粗糙であり血栓による栓塞に起因すると判断される不完全な血管構築像が認められた(図7)。一方、ATIII-ヘパリン併用群の糸球体血管は密に保たれ、完全な血管構築像を示し、血栓による血管栓塞像は認められなかった(図8)。

III. 考 察

ATIIIと凝固因子との結合反応は、ATIII単独においては、緩徐に進行するが、ヘパリン共存下においては、この結合速度が著しく加速されることから、ATIIIの凝固因子に対する阻害効果も即時的になることが知られている⁴⁾。

Fig. 7 Replica of glomerular capillary
Glomerular capillary networks are ragged and incomplete in part. Control group

Fig. 8 Replica of glomerular capillary
Glomerular capillary networks are complete. AT III-Heparin group

DIC においては、FIXa, FXa, FXIa, FXIIa, トロンビン等の活性化凝固因子と ATIII が結合し、この複合体が網内系で処理される結果、血中 ATIII 活性の減少がしばしば観察されることがある。このような状態でヘパリンのみを投与しても凝固亢進を制御するのは困難であり、ATIII を同時に投与することによって凝血学的コントロールが初めて可能になることが考えられる。事実 ATIII が減少している DIC 患者に対しては、血漿輸注が実施されているが、ATIII の補充という意味からは、濃縮 ATIII 製剤の投与が最も効果的であると考えられる⁹⁾。

そこで今回、ウサギを用いて DIC モデル病変を作製し、濃縮 ATIII 製剤の抗凝固作用を血液学的所見、凝固検査所見、病理組織学的所見等基礎的な面から検討した。DIC の発症については、現在種々の要因が提唱されているが、凝固亢進という観点にたてば、外因性凝固機序の活性化および内因性凝固機序の活性化に基づいて発症する DIC が考えられる⁶⁾。前者は、基礎疾患が転移を伴う腫瘍、急性白血病、羊水栓塞、常位胎盤早期剝離、外傷等が基礎疾患であり、組織 TPL 様物質が血中に混入して発症すると考えられており、後者は敗血症、重症感染症等が基礎疾患であり、血管内皮障害作用を有するエンドトキシンの血中への混入により、第 XII 因子の活性化に始まる一連の凝固因子の活性化に基づいて発症するものと考えられている。そ

こで今回の実験においては、組織 TPL 惹起凝固亢進動物およびエンドトキシン惹起凝固亢進動物を作成し、ATIII の抗凝固作用を検討した。

組織 TPL 惹起凝固亢進に対する作用であるが、ATIII はヘパリンとの併用によって、凝固亢進に基づく消費性減少に由来すると判断される血小板数、フィブリノーゲン量および第 V 因子の減少をほぼ完全に抑制した。しかし、ATIII 単独投与においては、ATIII-ヘパリン併用群と同程度の血中 ATIII レベルの維持が認められたのにもかかわらず、凝血学的因子の減少に対しては、ある程度の抑制効果しか示さなかった。従って ATIII の補充だけでは、完全な抗凝固作用を期待することはできないものと推察された。さらにヘパリン単独投与における抗凝固作用も、ATIII 単独投与と同程度の効果しか得られなかった。このことは臨床的にもヘパリン処理による内因性 ATIII の活性化だけでは、DIC を完全に阻止することは困難であり、ATIII を補充しながら、ヘパリンを同時投与することにより完全に DIC を阻止し得ることを示唆している。

エンドトキシン惹起凝固亢進に対する ATIII の作用は、前述した如く単独投与では効果が弱いと予想されたので、ヘパリン併用下のみで検討した。エンドトキシン投与による凝固亢進は、全身性シュワルツマン反応として広く知ら

れている⁷⁾。本反応はエンドトキシンの準備注射により誘発された凝固亢進が、さらに大量の惹起注射により急激に進行し、病理学的には微小血管内、特に腎臓糸球体内に多発性の血栓が形成し、腎臓皮質が壊死することで終了する。本実験においても、準備注射翌日に凝固亢進に伴って、血小板数および第Ⅴ因子の減少が認められ、またフィブリノーゲンの消費に基づく急性反応に起因すると思われるフィブリノーゲン量の増加が認められた。しかし本変化は、ATⅢ投与によっても対照群と同程度に認められた。一方、惹起注射後の諸因子の急激な減少はATⅢ投与によって良好に抑制された。準備注射後および惹起注射後におけるATⅢの作用の違いが何に由来するかは不明である。しかし、シュワルツマン反応の本質は、惹起注射後の急激な凝固亢進に伴う微小血栓の形成にある。従って惹起注射後にATⅢ投与により凝固亢進が抑制され、光顕的かつ電顕的に腎臓糸球体内の血栓形成が完全に阻止されたことは、ATⅢの抗凝固作用が極めて強力であると判断されよう。なお、ATⅢ-ヘパリン併用群、対照群とともに準備注射後に少数例の死亡が認められた。エンドトキシンは、凝固因子の活性化作用の他、白血球破壊作用、血小板凝集作用、血圧降下作用等種々の生理活性を有していることから、死因としてはこれら諸因子が複雑に関与したショック死とも考えられる。

DICにおいては、凝固因子が消費されることにより内因性ATⅢが消費的に減少し、これがますます凝固を亢進せしめ、DICを増悪させることが考えられる。従ってATⅢ製剤の補充は、ヘパリンとの併用によって、今回の実験成績に示された如く、DICの発症および改善に対して充分効果が期待できるものと考えられる。

結 論

ウサギを用いてDICのモデル病変として、組織トロンボプラスチン惹起凝固亢進およびエンドトキシン惹起凝固亢進を作成し、ATⅢ製剤（ミドリ十字製）の抗凝固作用を検討した。

1) ATⅢは、ヘパリン共存下で組織トロンボプラスチン処理による凝固亢進をほぼ完全に抑制した。ATⅢまたはヘパリン単独による抗凝固作用は、それらの併用投与と比較して極めて弱かった。

2) ATⅢは、ヘパリン共存下でエンドトキシン処理による凝固亢進を良好に抑制し、腎臓糸球体内血栓形成を完全に抑制した。

以上の結果より、ATⅢ製剤はヘパリンとの併用により、DICの発症防止および改善に対して、効果が期待できるものと推案された。

文 献

- 1) 吉田信彦：アンチトロンビンⅢ(ATⅢ)。医学のあゆみ, **109**: 855~858, 1979.
- 2) 青木延雄：DICの治療・総論。医学のあゆみ, **109**: 960~965, 1979.
- 3) 村上宅郎, 大谷 修, 菊田彰夫, 大塚愛二：走査電子顕微鏡による血管鑄型の観察。電子顕微鏡, **16**: 11~18, 1981.
- 4) 瀬野信子：ヘパリンの構造と血液凝固阻止活性。化学と生物, **22**: 290~296, 1984.
- 5) 青木延雄, 吉田信彦, 山中恒夫：アンチトロンビン濃縮分画によるDICの治療。医学のあゆみ, **109**: 970~975, 1979.
- 6) 山中 學：血液凝固学よりみた血管内血液凝固の発現機構。医学のあゆみ, **109**: 730~737, 1979.
- 7) 志賀淳治, 森 亘：DICとシュワルツマン反応。医学のあゆみ, **109**: 760~767, 1979,