特集・第 XIII 因子

第 XIII 因子活性と serine protease および Defibrase (Bothrops Marajoensis) との関連*

桜川 信男** 伊藤 正一** 松岡 松三**

Key words : factor XIII, serine protease, Defibrase.

はじめに

血管内凝固症候群(disseminated intravascular coagulation syndrome, DIC)では種々の trigger substance により凝固活性化がおこって Factor X が活性化されて Factor Xa となり, この Factor Xa が Factor V と phospholipids とともに Factor II (prothrombin) を活性化して thrombin とする. 一方, 二次線溶によって plasmin が血中に出現して来る. 肺炎では trypsin も血中流出の可能性があり DIC の trigger substance となりうる.

第 XIII 因子は thrombin によって活性化されるが, thrombin と同様の serine protease としての性状をもつ plasmin や trypsin が第 XIII 因子活性に及ぼす影響を与えるかは興味ある問題である.

更に蛇毒 (Bothrops Marajoensis) より抽出精製された Defibrase は thrombin like substance であり fibrinogen を fibrin に転換するが, fibrinogen の分子構造 $[\alpha(A)\beta(B)\gamma]_2$ の (A) peptide のみを分離して $[\alpha\beta(B)\gamma]_2$ とした fibrin 体を作る¹⁾.

この fibrin は各種線溶剤 (urokinase, plasmin および streptokinase) によって溶解されやすく²⁾, 血栓症における再発予防としての defibrinogenating agent として用いられている¹⁾³⁾. この際の Defibrase による fibrin 塊の Factor XIII の関与について検討した.

I. 方法および材料

1. citrated normal human plasma

3.8% sodium citrate を 9, 全血 1 の比率で採血し, 3000 rpm 15 分 4°C で遠心して plasma を得た.

2. Factor XIII concentrates

Behring Werke A.G. を用い, 1 筒を 250 ml の生理的食塩水に溶解して用いた.

3. Factor Xa

Yin & Wessler⁴⁾ の方法で作製した牛 Factor Xa を Seegers らの方法⁵⁾で測定して用いた.

4. Thrombin

Behring Werke A. G. 第 XIII 因子活性測定キットに添付されている第 XIII 因子 free の thrombin を用い, Seegers らの方法⁷⁾で測定して用いた.

5. Plasmin

Cohn Fr. III を DEAE-Sephadex Column および Lysine-sepharose column chromatography で純化し, 更に Urokinase-sepharose column chromatography で活性化および純化した中性 plasmin を Alkjaersig の方法⁸⁾で casein 単位として用いた.

6. Trypsin

Worthington 社 (USA) (TPCK) を生食水に溶解して用いた.

7. Defibrase

蛇毒 (Bothrops Marajoensis) より抽出精製

* Interaction between factor XIII activity and serine protease or Defibrase (Bothrops Marajoensis). (The 3rd Congress of the Japanese Society on Thrombosis and Homostasis).

** 新潟大学医学部第一内科 [〒 951 新潟市旭町通り一番町] Nobuo SAKURAGAWA, Shoichi ITO and Matsuzo MATSUOKA : 1st Department of Internal Medicine, Niigata University School of Medicine, Niigata, Japan.

Table 1 Procedure of assay method of plasma-Factor XIII effected by enzymes

(1)	0.2 ml	Normal citrated plasma
	0.1 ml	Enzyme solution (various concentrations)
(2)		37°C 30 Min taking out fibrin clot
	0.1 ml	Enzyme inhibitor (10%-t-AMCHA or 0.1 mg STI) or saline
	0.1 ml	Fibrinogen (F. XIII free) to the defibrinated plasma
(3)		37°C 10 Min
	0.1 ml	Anti-F. XIII serum (I to 20 diluted)
(4)		37°C 30 Min
	0.1 ml	Thrombin (F. XIII free, 20 U/ml in 0.05 M Ca ⁺⁺ sol.)
(5)		Room temperature 60 Min
	3 ml	1 % Monochlor acetic acid
		Room temperature 90 Min

したものを用いた (Pentapharma A. G.).

8. Fibrinogen 量測定

松岡の方法⁹⁾を用いた。

9. 第 XIII 因子活性測定

Behring werke A. G. の第 XIII 因子活性測定キットを用い、第 XIII 因子抗血清を用いた inhibition test を行った。

Anti-factor XIII serum は生食水で 20 倍に希釈して用いた。

thrombin 4, 2, 1 u/ml, Factor Xa 0.9, 0.3, 0.1 u/ml plasmin 6, 3, 1 u/ml, Trypsin 0.06, 0.03, 0.01 mg/ml, Defibrase 1, 0.1, 0.01 U/ml を用い、対照として生食水を用いた。thrombin, plasmin, trypsin¹⁰⁾, Defibrase¹¹⁾ は凝固線溶系におよぼす影響についてすでに検討を行った範囲の濃度を用いた。

Plasmin を用いる実験では fibrin clot が出現するため、あらかじめ、thrombin, trypsin, Defibrase の場合での fibrinogen 減少量を各濃度の検体で測定し、その減少量を Inoshita & Shanberg の方法¹²⁾で作製した Factor XIII free fibrinogen を加えてもとの plasma の fibrinogen 量に戻した。また plasmin を用いる場合は 10 % の t-AMCHA (第一製薬) を等量 (volume) 加え、trypsin の場合は soybean trypsin inhibitor の等量 (mg) をそれぞれの酵素による第 XIII 因子への反応時間後に加え、酵素活性を失活さ

Table 2 Procedure of assay method of Factor XIII using Factor XIII concentrates effected by enzymes,

(1)	0.2 ml	F. XIII concentrates (I to 250 diluted)
	0.1 ml	Enzyme solutions (various concentrations)
(2)		37°C 30 Min
	0.1 ml	Enzyme inhibitor (10 %-t-AMCHA or 0.1 mg/ml STI or saline)
(3)		37°C 10 Min
	0.1 ml	Anti-F. XIII serum (I to 20 diluted)
(4)		37°C 30 Min
	0.1 ml	Fibrinogen (F. XIII free, 0.05 %)
	0.1 ml	Thrombin (F. XIII free, 20 U/ml in 0.05 M Ca ⁺⁺ sol.)
(5)		Room temperature, 10 Min
	3 ml	1 % Monochlor acetic acid
		Room temperature, 90 Min

せた。Factor Xa, trypsin および Defibrase は生食水を加えて、plasmin と trypsin の場合と volume を一定にした。

Plasmin を用いる場合も、Factor XIII concentrates を用いた純系での反応系は Table 1 および Table 2 に示した。

成績の判定は 1 % monochlor acetic acid での凝塊の完全溶解の有無を観察して行った。

II. 成績

1. Normal citrated human plasma を用いた場合での plasma Factor XIII に及ぼす諸酵素の影響

thrombin 4, 2, 1 u/ml および生食水を plasma に加えて 37°C 30 分間 incubate した後に竹の棒で plasma 中の fibrin を除去した後の defibrinated plasma に 0.1 ml の thrombin (60 u/ml; in 0.05 M Ca⁺⁺ solution) を加えて凝固させてその fibrinogen 量を測定した。

対照の生食水加の場合は 250 mg/dl であることに対して thrombin 4 u/ml 添加の場合は 76 mg/dl, 2 u/ml で 126 mg/dl および 1 u/ml で 192 mg/dl を示した。そこで以下の実験ではこの fibrinogen 減少量を Table 1 の (2) の段階で Factor XIII free の fibrinogen を加えて対照の場合と同量に戻してから次の実験段階へ進んだ。一方、trypsin, Defibrase, plasma, Factor

Table 3 Effects of enzymes to plasma Factor XIII

materials added	clot Lysis	
Thrombin (U/ml)	4	+
	2	+
	1	—
Factor Xa (U/ml)	0.9	—
	0.3	—
	0.1	—
Plasmin (U/ml)	6	—
	3	—
	1	—
Trypsin (mg/ml)	0.06	+
	0.03	+
	0.01	—
Defibrase (U/ml)	1	+
	0.1	+
	0.01	—
Control (saline)		—

Xa でも同様に行行った。

諸酵素添加後の fibrin 塊の形成をみると, thrombin 4 と 2 u/ml および Defibrase 1 および 0.1 u/ml では著名な fibrin 塊をみとめ, trypsin 0.06 mg/ml の場合には微小な fibrin 塊をみとめた。

Table 1 の 3) の段階で Anti-Factor XIII serum の 20 倍稀釈液は正常人 plasma の約 50 % の Factor XIII を中和する能力があるが, 本実験での諸酵素の作用による Factor XIII 活性の減少度をこの Anti-Factor XIII serum の濃度で検索した。

Table. 3 のように thrombin 4 と 2 u/ml および trypsin 0.06 と 0.03 mg/ml, および Defibrase 1 と 0.1 u/ml で clotlysis がみられたが, そのほかの場合は clot lysis はみられなかった。これらの検体は trypsin 0.03 mg/ml の場合をのぞいては全てに fibrin がみとめられた例であった。この 1 % monochlor acetic acid で溶解したことは thrombin, trypsin, および Defibrase 添加によって defibrinated plasma 中の Factor XIII が減少したことになる。

この Factor XIII の減少は fibrin 塊の fibrin polymer の cross linking に作用しているか否かが次に問題となる。そこで, 前述したような thrombin 4 と 2 u/ml, trypsin 0.06 mg/ml および Defibrase 1 と 0.1 u/ml を加えて出現

Table 4 Effects of enzymes to Factor XIII concentrates.

materials added	Clot Lysis	
Thrombin (U/ml)	4	—
	2	—
	1	—
Fator Xa (U/ml)	0.9	—
	0.3	—
	0.1	—
Plasmin (U/ml)	6	—
	3	—
	1	—
Trypsin (mg/ml)	0.06	+
	0.03	+
	0.03	+
Defibrase (U/ml)	1	—
	0.1	—
	0.01	—
Control (saline)		—

した fibrin 塊に 3 ml の 1 % monochlor acetic acid を加えて clot lysis の有無を観察すると, thrombin の場合は全く clot lysis がみられず, trypsin は 60 ~ 90 分で clot lysis がみられ, Defibrase は 20 分で全て clot lysis をみとめた。この成績から thrombin の場合では cross linking が出現し, trypsin の場合でも trypsin による plasmin 中の prothrombin の活性化で thrombin が生じて, この thrombin による Factor XIII への作用に基づいた cross linking が多少とも出現したものか, あるいは trypsin 自体の Factor XIII 活性化に基づくものかと考えられた。しかし Factor XIII が cross linking に充分作用するならば, trypsin 添加による fibrin 塊は clot lysis を示さないであろうが, 成績では 60 ~ 90 分で clot lysis をみとめた点は fibrin 塊への Factor XIII の吸着か trypsin による Factor XIII の破壊が考えられ, 一方, trypsin 0.03 mg/ml の場合では fibrin clot はみられなかったが, plasma Factor XIII が減少したところより, trypsin による Factor XIII の破壊も充分考えられた。

Defibrase の場合に clot lysis がみられたことから Factor XIII は cross linking には全く関与しておらず, もっぱら fibrin 塊への吸着が考えられた。

2. Factor XIII concentrates を用いた

Table 5

	trypsin	thrombin	Defibrase	plasmin	Factor Xa
Factor XIII の fibrin への吸着	+	+	+	—	—
Factor XIII の活性化	+	+	—	—	—
Factor XIII の破壊	+	—	—	—	—

また citrated plasma 中でも thrombin 添加により Factor XIII の活性化と fibrin polymer の cross linking が起こることをみとめた。

場合の Factor XIII に及ぼす諸酵素の影響

normal citrated human plasma を用いた(1)の実験と同一の濃度の酵素を用いて Table 2 に示した procedure によって実験を行った。

Table 4 にみられるように trypsin 0.06, 0.03 および 0.01 mg/ml ではすべて clot lysis がみられたが, 他の thrombin, Factor Xa, plasmin, Defibrase ではみられなかった。

以上の成績から用いた濃度の酵素のうち, trypsin のみが Factor XIII を破壊したが, 他の酵素では全くみとめられなかった。

以上から trypsin には Factor XIII を活性化して fibrin polymer cross linking をおこす作用と Factor XIII の fibrin 塊の吸着および Factor XIII の破壊する作用があり, thrombin には Factor XIII の活性化作用と Factor XIII を fibrin 塊に吸着させる作用があり, Defibrase の場合は Factor XIII の fibrin 塊への吸着のみであり, plasmin と Factor Xa にはこれらの作用は全く認められなかった。また citrated plasma 中でも thrombin による fibrin polymer cross linking の起こることを認めた。

III. 考 按

DIC では thrombin や plasmin が血中に出現し, 脾炎の場合では trypsin の出現も考えられる。thrombin が出現すれば Factor XIII は活性化されて, Ca^{++} とともに fibrin polymer の cross linking に作用するので消費されて行く。しかし, DIC では thrombin が出現する以前に Factor Xa がみられる。これら serine protease としての性格をもつ Factor Xa, thrombin, plasmin, trypsin が Factor XIII 蛋白体にいかに作用するかを追求することは DIC の病態生理を検索するうえに重要である。更に

thrombin 様作用をもつ Defibrase の作用を検索し, Defibrase による fibrin clot が線溶剤で溶解しやすい原因を追求した。

trypsin は凝固線溶系因子を破壊する作用は強力であり¹⁰⁾, 血小板機能をも低下させる¹³⁾。更に本稿でのべたような条件では Factor XIII も破壊され, 脾炎では凝固, 線溶, 血小板すべてにわたって重大な障害が惹起され, かかる場合での DIC は重症となることが考えられる。しかし, trypsin は Factor XIII を活性化する¹⁴⁾が, ごく短時間で失活するともいわれ, 著者らが prothrombin 活性化¹⁵⁾でみとめた thrombin の活性の成績と一致しているものと考えられる。

Citrated plasma 中で thrombin による Factor XIII 活性化, fibrin polymer cross linking は微量に残存する plasma 中の Ca^{++} の作用によって惹起されたものと考えられる。

plasmin による Factor XIII の破壊は, 本誌に三上ら¹⁶⁾によって報告されているが, 著者らの成績ではみとめられなかった。この点是用いる plasmin の濃度によるものとも考えられる。

Factor Xa は thrombin と異り fibrinolytic activity はなく, esterase activity と procoagulant activity のみであるが¹⁷⁾, この性状による Factor XIII への影響は全くみとめられなかった。

DIC では trypsin の出現の場合は trypsin の破壊作用でも Factor XIII は減少するが, trypsin の関与しない場合には thrombin の Factor XIII 活性化と fibrin への吸着が主として Factor XIII の減少の原因となり, 出現した fibrin 塊は cross linking をうけたものと考えられる。

これに対して Defibrinogenating agent として用いられる Defibrase の fibrin 塊は thrombin による fibrin が分子構造上 $[\alpha\beta\gamma]$ であること

に対して $[\alpha\beta(B)r]_2^n$ を示すため, cross linking をうけないこと¹⁸⁾, からも線溶剤によって溶解されやすく, 生体内においても fibrin clot を作らないのであろう。

ま と め

DIC に出現する serine protease の thrombin, plasmin, Factor Xa, trypsin および Defibrinogenating agent としての Defibrase の Factor XIII に対する影響を citrated plasmin および Factor XIII concentrates を用いた純系の反応を行い Table 5 の成績を得た。

稿を終えるにあたり, 第 XIII 因子測定に際して御協力を頂いた帝京大学風間助教教授に深謝する。

文 献

- 1) Kwaan, H. C. and Barlow, G. H. : Thromb. Diathes. haemorrh. (suppl), XLVII; 361, 1971.
- 2) 桜川信男, 松岡松三, 高橋 薫, 星山真理, 神保長三, 小池和夫, 大西義久, 北条晴人, 小出武比古, 血液と脈管 (投稿中)。
- 3) Bell, W. R. : Thromb. Diathes. haemorrh. (suppl), XLVII; 371, 1971.
- 4) Yin, E. T. and. Wessler, S. : J. Biol. Chem., **243**; 112, 1968.
- 5) Cole, E. R., Marciniak, F. and Seegers W. H. : Thromb. Diathes. haemorrh. **8**; 434, 1962.
- 6) 桜川信男 : 日本臨床, **32**; 901, 1974.
- 7) Ware, A. G. and Seegers, W. H. : Am. J. Clin. Path, **19**; 471, 1949.
- 8) Alkjaersig N., Fletcher, A. P. and Sherry, S. : J. Clin. Invest., **38**; 1086, 1959.
- 9) 松岡松三 : 血液凝固検査, 金原出版, 1967.
- 10) 桜川信男, 他 : 血液と脈管, **4**; 76, 1973.

- 11) 桜川信男, 他 : 内科, **36**; 48, 1975.
- 12) Inoshita, K and Shanberg, J. N. : Am. J. Clin. Path., **61**; 85, 1974.
- 13) 松岡松三, 渡部 透, 小池和夫, 桜川信男 : 臨床血液, **15**; 519, 1974.
- 14) 小西和彦 : 私信.
- 15) 桜川信男, 松岡松三 : 第 36 回日本血液学会, 発表 (1974年 4月).
- 16) 三上恵子, 他 : 血液と脈管, **7**; 16, 1976.
- 17) 桜川信男 : 未発表.
- 18) 小西和彦 : 私信.

<Abstract>

Interaction between Factor XIII activity and serine protease or Defibrase (Bothrops Marajoensis)

by

Nobuo SAKURAGAWA, Shoichi ITO and Matsuzo MATSUOKA

from

Ist Department of Internal Medicine, Niigata University School of Medicine, Niigata, Japan.

In disseminated intravascular coagulation syndrome, there appear thrombin, factor Xa, plasmin, and trypsin in the case with severe pancreatitis. These enzymes are called serine protease. Defibrase (snake venom, Bothrops Marajoensis) is a defibrinogenating agent.

In this paper interaction between factor XIII and serine proteases or Defibrase was studied using citrated normal human plasma and Factor XIII concentrates (Behring Werke A. G.).

Factor XIII activity was assayed by inhibition test by reagents for determinating coagulation Factor XIII (Behring Werke A. G.).

The results were as follows :

	trypsin	thrombin	Defibrase	plasmin	Factor Xa
Absorbtion to fibrin	+	+	+	—	—
Activation of F-XIII	+	+	—	—	—
Destruction of F-XIII	+	—	—	—	—

In citrated plasma, factor XIII activation and

fibrin polymer cross linking by addition of

thrombin were observed by this study.

The decrease of factor XIII in disseminated

intravascular coagulation syndrome would be due to consumption and absorption to fibrin.

「血液と脈管」バックナンバー

1 卷	1 号	出 血 (品切れ)	3 号	移 植 (700円)
	2 号	Consumption	4 号	外 傷 (700円)
		Coagulopathy (品切れ)	5 号	クモ膜下出血 (700円)
	3 号	血 管 炎 (品切れ)	6 号	肺血管病変を めぐる諸問題 (700円)
	4 号	血 栓 症 (品切れ)	7 号	再生不良性貧血 (700円)
	5 号	血 小 板 (600円)	8 号	Primary myocardial disease (700円)
	6 号	糖尿病と血管病変 (600円)	9 号	脈管造影 「手技と合併症」 (700円)
	7 号	動 脈 瘤 (600円)	10 号	尿 毒 症 (980円)
	8 号	造 血 の 調 節 (600円)	11 号	白血病の問題点 (品切れ)
	9 号	貧血の病態生理 (品切れ)	12 号	慢性硬膜下血腫 (980円)
2 卷	10 号	リンパ管 (品切れ)	5 卷	1 号 冠血行障害の治療 (980円)
	1 号	抗凝血薬療法 (600円)		2 号 ホジキン病 (980円)
	2 号	白 血 病 (600円)		3 号 不 整 脈 (980円)
	3 号	妊 娠 (700円)		4 号 血管透過性とショック (980円)
	4 号	溶 血 (700円)		5 号 急性腎不全 (980円)
	5 号	冠 循 環 (700円)		6 号 脳 浮 腫 (980円)
	6 号	門 脈 高 圧 症 (700円)		7 号 Sudden Death (980円)
	7 号	免 疫 血 液 (700円)		8 号 薬物による血液障害 (980円)
	8 号	腎 性 貧 血 (700円)		9 号 S L E (1,960円)
	9 号	シ ョ ッ ク (700円)		10 号 P T T (980円)
3 卷	10 号	脳 循 環 (品切れ)		11 号 髄 液 (980円)
	11 号	巨赤芽球性貧血 (700円)		12 号 腎 血 行 不 全 (980円)
	12 号	動 脈 硬 化 (700円)	6 卷	1 号 多 血 症 (980円)
	1 号	膠 原 病 (700円)		2 号 血管透過の解析 (980円)
	2 号	血友病とその周辺 (700円)		3 号 肝胆膵の凝固異常 (980円)
	3 号	脾 腫 (700円)		4 号 心 不 全 (980円)
	4 号	輸 血 (700円)		5 号 脳出血の治療 (980円)
	5 号	血 管 内 皮 (700円)		6 号 血液検査の精度管理 (980円)
	6 号	悪性リンパ腫 (700円)		7 号 眼底出血 (980円)
	7 号	輸 液 (700円)		8 号 腎 性 高 血 圧 (980円)
4 卷	8 号	自 働 調 節 (700円)		9 号 I T P (品切れ)
	9 号	脈波の臨床 (品切れ)		10 号 高 脂 質 血 症 (980円)
	10 号	アミロイドーシス (700円)		11 号 R P G N (980円)
	11 号	手術と出血・血栓 (700円)		12 号 Moyamoya 病 (980円)
	12 号	F D P (700円)		
	1 号	悪性高血圧 (700円)		
	2 号	血 管 奇 形 (700円)		