第3回・血栓および止血に関する討議会

Macroglobulin 分画中の Xa inhibitor による Xa 阻害様式について*

今 岡 真 義** 井 下 勝 男**
神 前 五 郎** 小 川 睦 子***

Key words: anti-Xa, Xa inhibitor, macroglobulin
Xa inhibitor, α_2 -macroglobulin.

緒 言

循環血液は、血漿中に自然に存在するヘパリンをも含めた各種の阻害物質によって血液凝固中間産物のクリアランスが行なわれ¹⁾、又、plasminogen-plasmin system 等の作用も加わり、その流動性を保って全身を流れている。これら凝固中間産物の一つである thrombin に対して阻害的に働く antithrombin III が auto-thrombin C (活性型第 X 因子—Xa) をも中和するということが確かめられている^{2)~7)}。一方、最近 anti-thrombin III とは別に、Xa を inhibit するもう一つの物質があるのではないかという報告⁸⁾がある。私達は人血漿の Sephadex G-200 を用いた gel-filtration においてアルブミン分画に流出する antithrombin III とは異なって void volume に含まれて流出する macroglobulin 分画中の Xa inhibitor について若干の検討を試みて来た⁹⁾¹⁰⁾。今回は更に研究をすすめ、この inhibitor の Xa に対する阻害様式について検討を加えた。

I. 材料・方法

1. 薬品類

硫酸アンモニウム：片山化学製、特級。

Sephadex G-200：Pharmacia 製，Lot # 9553。

CM-cellulose：Whatman 製，CM 32，Lot # 6873。

2. 人クエン酸血漿

3.8% クエン酸ソーダ溶液 1 容に 9 容の静脈血を混じ、3,000 rpm，10 分間遠沈分離して得た。

3. Bovine activated factor X (Xa)

Park Davis 製 thrombin より Yin ら¹¹⁾の方法により得た。

4. Xa-inhibitor (XaI)

Sugihara ら¹²⁾の α_2 -macroglobulin 精製法を少し変えて、XaI を部分的に純化した。すなわち人クエン酸血漿を硫酸アンモニウム 30~50% 飽和塩析法にて得た分画を、Sephadex G-200 にて gel-filtration を行なった。溶出液としては 0.1 M NaCl を含む pH 7.4 の 0.04 M Tris-HCl buffer を用いたが、XaI は void volume に含まれて流出する。このようにして得られた XaI を、あらかじめ 0.05 M NaCl を含む pH 6.0 の 0.02 M acetate buffer にて平衡化させた CM-cellulose にて chromatography を行なうと吸着されることなく流出する。これを XaI として用いた。

5. Xa の測定

Xa 0.1 ml を Seitz filtrated plasma 0.1 ml と Platelin 0.1 ml との混液に吹込み、30 秒間、37°C にて incubate し、1/40 M CaCl₂ 0.1 ml を加えて 37°C にて凝固時間を測定した。Xa の倍数希釈系列の示す凝固時間 (秒) は両対数グラフ上直線を示したので、Xa 活性をそのときの凝固時間 (秒) を以て表すか、あるいは濃度を以て表した。

* Inhibition for activated factor X (Xa) of Xa inhibitor in macroglobulin fraction. (The 3rd Congress of the Japanese Society on Thrombosis and Hemostasis).

** 大阪府立成人病センター外科 [〒 537 大阪市東成区中道1-3-3] Shingi IMAOKA, Katsuo INOSHITA and Goro KOSAKI: Department of Surgery, The Center for Adult Diseases, Osaka, Japan.

*** 大阪府立成人病センター止血機構検査室, Mutsuko OGAWA: Blood Coagulation Laboratory, The Center for Adult Diseases, Osaka, Japan.

図1 XaIによるXa阻害に与えるpHの影響.

6. XaIの測定

XaI 0.4 ml に Xa 0.1 ml を混じ 15 秒間あるいは 10 分間 37°C にて incubate し、この混液より 0.1 ml を取り、これを予め 37°C に保たれた Seitz filtrated plasma 0.1 ml と Platelin 0.1 ml との混液に吹込み、30 秒後に 1/40 M CaCl₂ を加えて凝固時間を測定する。そして 15 秒間加温時の凝固時間 (秒) と 10 分間加温時の凝固時間 (秒) の差を XaI の活性とした。又前項で述べたように凝固時間より Xa 活性を算出し、10 分間加温によって減少した Xa 活性の量を % を以て表した。

II. 成績

1. XaI の熱安定性

0.1 M の NaCl を含む pH 6.0 の 0.02 M acetate buffer に溶解した XaI を -70°C, -20°C, 4°C にしたが活性の減弱は全く見られなかった。25°C 保存では少なくとも 24 時間は安定であるが、1 週間後著明なる活性の低下を認めた。37°C 2 時間では全く安定であるが、56°C においては 30 分ですでに著明な活性の低下をみた。

2. XaI による Xa 阻害に与える pH の影響について

生理的食塩水に対して透析した XaI に、9 倍量の pH 5.5, 6.0, 6.5, 7.5, 8.5 の 0.04 M Tris maleate buffer を加え XaI の測定を行なった。図 1 の如く、pH 8.5 付近における XaI の Xa 阻害は殆んど認められず凝固時間は延長しない。しかし pH が下るに従い阻害の程度が強くなり凝固時間は延長する。ただ pH 5.5 においては buffer control それ自体が凝固時間を

図2 各種濃度の XaI による Xa の阻害.

延長させるので、実際の XaI の Xa 阻害程度は明らかでない。

3. 各種濃度の XaI による Xa 阻害について

0.1 M NaCl を含む pH 6.0 の 0.02 M acetate buffer に溶解した各種濃度の XaI 0.8 ml に一定量の Xa 0.2 ml を混じ 37°C に incubate する。この混液から 15 秒、10 分、30 分、60 分、90 分目に 0.1 ml を取り Xa 活性を測定した。そして 15 秒目に測定された Xa 活性より何 % の Xa 活性が阻害されたかを経時的に表わした。図 2 に示す如く XaI の濃度を薄めていくに従い、Xa 阻害の程度は 10 分間加温において、かなりの差は認められている。すなわち XaI の濃度が薄くなる程反応速度が遅い。しかし加温時間が延びるに従い、この差は徐々に小さくなり、90 分間も加温すると 16 倍に薄められた XaI を用いた場合でも 90 % の Xa を阻害した。

4. XaI による Xa 阻害に与える温度の影響について

一定量の XaI 0.8 ml と一定量の Xa 0.2 ml とを混じ、37°C, 25°C, 4°C にて incubate し、経時的に Xa 活性を測定した。図 3 に示すように、37°C, 25°C incubation における Xa の阻害は反応初速度、阻害の量共に両者の間に殆んど差をみない。ただ、4°C incubation の際は、前 2 者に比し反応初速度の遅れと共に最終 90 分間加温時における阻害も少し低い。しかし、少なくともこの 3 者の間に著明な差を認めなかった。

5. Xa との incubation において生じる XaI の変化について

(1) XaI 0.5 ml に Xa 0.5 ml あるいは buffer 0.5 ml を加え 60 分間 37°C にて incubate し、この混液

図3 XaIによるXa阻害に与える温度の影響.

より0.4 mlをとり、これに新しくXaを0.1 mlを加え37°Cにて更に incubate する。その後15秒、2分、10分、30分目に0.1 mlをとり、Xa測定を行なった。縦軸には凝固時間そのものでXa活性を表現したが、本実験と buffer control との間に15秒後の凝固時間に差がないことは60分の前加温によって本実験に添加されたXaの活性が殆んど消失していることを示す。図4に示す如く、Xaとあらかじめ incubate されたXaIを用いた本実験の系では、buffer controlの系に比して凝固時間が短い。これは新しく加えられたXaに対するXaIの阻害の程度が低いことを示している。すなわちXaIはXaとの前加温によってその活性が低下するものと考えられる。

(2) XaI 0.9 mlにXa 0.1 mlを加え60分間37°Cにて incubate し、これを溶出液0.1 M NaClを含む pH 6.0の0.02 M acetate bufferを用い0.9×52 cmのSephadex G-200にてgel filtrationを行ない、1.0 ml宛の流出液分画の活性を、macroglobulin分画についてはXaI活性をalbumin分画についてはXa活性を測定した。そしてXaIあるいはXaそれ自体のgel filtrationの結果と比較して図5に示した。すなわち、XaIをXaと incubate してもXaI自体をgel filtrationした時に流出して来た場所、すなわち void volume に含まれてXaIの活性が認められる。しかしながらXaIそれ自体をgel filtrationした時に比してXaと前加温されたXaIの活性は著るしく低下している。勿論、同時にXaIに混じられたXaの活性は何処にもみられず、Xaが全く失活していることも同時に確かめ

図4 Xaとの37°C、60分間の前加温におけるXaIの変化.

られた。

III. 考 察

人の血漿をSephadex G-200にてgel filtrationすることにより antithrombin activity を有する2つの分画¹²⁾が得られている。1つは antithrombin III であり、他は α_2 -macroglobulin である。Antithrombin III のXaに対する阻害作用はよく研究されているが^{5) 6) 13) ~15)}、 α_2 -macroglobulin のXaに対する研究は殆んどなされていない。最近、人血漿のSephadex G-200によるgel filtrationにより macroglobulin 分画に anti-Xa 作用を有する物質があるのではないかという報告⁹⁾がある。そしてこの物質を $\text{Al}(\text{OH})_3$ にて処理することにより、その活性の上昇がみられたという。しかし我々の得た macroglobulin 分画のXa inhibitorは、我々が用いた $\text{Al}(\text{OH})_3$ による処理ではそのような活性上昇を全く示さなかった⁹⁾。最近我々はこのXa inhibitorの研究をすすめ、高齢者は若年者に比して、antithrombin III 分画のXa inhibitorより高度にこの macroglobulin 分画中のXa inhibitorが減少していることを知った⁹⁾。又、血液凝固過程において thrombin よりもXaがより前段階において生じることから、Xaの生成は十分に得られるが、thrombinの生成は殆んど得られないという系を作って、この inhibitorの動きをみた。その結果、antithrombin III のもつXa inhibitorよりも、より鋭敏に、より速くこの macroglobulin 分画中の inhibitor

図5 ●—●はXaI, ○—○はXaのみを37°C, 60分間加温してgel filtrationを行なったものでそれぞれXaI, Xaの活性を示す。▲—▲はXaIとXaとの混液を37°C, 60分間加温してgel filtrationを行なったもので、▲—▲はXaI, △—△はXaの活性を示す。3回の実験を同じcolumn, 同じflowrate, 4°Cにて行ない一つの図にまとめた。

の活性が消費されていくのが認められた¹⁰⁾。すなわち生理的にこのinhibitorが重要な役割を荷っていることが推測された。そこで今回は、このmacroglobulin分画中のinhibitorを部分的に純化して、これによるXaの阻害様式を検討した。図2からみると、このinhibitorはXaを酵素的に阻害しているかの如く考えられないことはないが、このinhibitorの作用に対する温度の影響を調べたところ、4°Cという低い温度においても十分このinhibitorがXa阻害していることから酵素的に阻害しているとは必ずしもいい難い。もし酵素的にXaを阻害するのであるならば、Xaとincubationを行なっても、このinhibitorは原則として消費されることはない筈である。ところが図4からすると、このinhibitorはXaとのincubationによって活性が消費されているものと推定される。すなわちこのinhibitorをXaと前加温することにより活性が消費され、そのため新しく加えられたXaに対する阻害活性が低下したと考えられる。又このinhibitorとXaとを前加温した後Sephadex G-200によるgel filtrationを行なうとXaが含まれているべき分画に全くその活性をみないばかりでなく、macroglobulin分画に見出されるこのinhibitor自体の活性も著しく低下していた。これらの事実は、このinhibitorが酵素的というよりはむしろXaとcomplexを作ることによってXa活性を阻害することを考えさせる。文献的にも α_2 -macroglobulinが、ある時はthrombin

を、ある時はplasminを阻害するという事実¹⁸⁾からすると α_2 -macroglobulinがXaを阻害することは十分想像される。実際我々の部分的に純化し得たmacroglobulin分画中のこのinhibitorは電気泳動的に β -globulinに薄い、 α_2 -globulinに濃いbandが得られ、Xaを阻害する物質が α_2 -macroglobulinである可能性が高い。そうすると、 α_2 -macroglobulinがplasminとcomplexを作ることによりこれを阻害するという事実から、macroglobulin分画中のこのinhibitorがXaとcomplexを作って阻害する可能性は十分考えられる。もし我々の得た、このinhibitorがXaとcomplexを作ってXaを阻害すると考えるとpHによってそのXa阻害の度に変化するのは何故であろうか。これはpHが高ければmacroglobulinがaggregateし、pHが低くなると解離するという報告¹⁸⁾もあることから、このmacroglobulinもpH 8.5付近ではaggregateすることにより、XaIとcomplexを作るsiteの数が減り、pHが下ることにより解離してcomplexをつくりやすくなるという説明も可能であろう。いずれにしてもXaとcomplexを作るか否かについて、もっと直接的なevidenceを得るべく更に研究が続けたい。

結 論

人血漿macroglobulin分画中のXaIがXaを阻害する際、温度によって著明な変化を受けないこと、XaIをXaと混じりincubateすることによりXaIのXaに対する阻害活性が低下すること等が認められた。これらの事実から、このXaIはXaを酵素的に阻害するというよりはむしろXaとcomplexを作ることによりその活性を阻害している可能性が高いものと考えられる。

文 献

- 1) Spaet, T. H. and Kropatkin, M.: Proc. Soc. Exp. Biol., **95**; 492, 1957.
- 2) Seegers, W. H. and Marciniak, E.: Nature, **193**; 1188, 1962.
- 3) Seeges, W. H., Cole, E. R., Harminson, C. R. and Monkhouse, F. C.: Canad. J. Biochem., **42**; 359, 1964.
- 4) Seegers, W. H.: Ann. N. Y. Acad. Sci., **146**; 593, 1968.
- 5) Yin, E. T. and Wessler, S.: Thrombos. Diathes. Haemorrh., **21**; 398, 1969.

- 6) Yin, E. T., Wessler, S. and Stoll, P. J.: J. Biol. Chem., **246**; 3703, 1971.
- 7) Yin, E. T. and Wessler, S.: Biochim. Biophys. Acta, **201**; 387, 1970.
- 8) Marciniak, E. and Tsukamura, S.: Brit. J. Haemat., **22**; 341, 1972.
- 9) 田中健一, 今岡真義, 神前五郎: 臨床科学, **9**; 598, 1973.
- 10) 今岡真義, 田中健一, 神前五郎: 日本血液学会雑誌, **36**; 152, 1973.
- 11) Yin, E. T. and Wessler, S.: J. Biol. Chem., **248**; 112, 1968.
- 12) Abildgaard, U.: Scand. J. Clin. Invest., **19**; 190, 1967.
- 13) Yin, E. T., Wessler, S. and Stoll, P. J.: J. Biol. Chem., **246**; 3712, 1971.
- 14) Yin, E. T., Wessler, S. and Stoll, P. J.: J. Biol. Chem., **246**; 3694, 1971.
- 15) Biggs, R., Denson, K. W. E., Akman, N., Borrett, R. and Hadden, M.: Brit. J. Haemat., **19**; 283, 1970.
- 16) Ganrot, P. O. and Niléhn, J. E.: Clin. Chem. Acta, **17**; 511, 1967.
- 17) Sugihara, H., Nagasawa, S. and Suzuki, T.: J. Biochem., **70**; 649, 1971.
- 18) Rees, E. D.: Clin. Chim. Acta, **7**; 846, 1962.

<Abstract>

Inhibition for activated factor X (Xa) of Xa inhibitor in macroglobulin fraction.

by

Shingi IMAOKA, Katsuo INOSHITA, Goro KOSAKI and Mutsuko OGAWA*.

from

Department of Surgery and Blood coagulation laboratory, *The Center for Adult Diseases, Osaka, Japan.

Activation factor X inhibitor (XaI) of macroglobulin fraction was partially purified by ammo-

nium sulfate saturation method, gel filtration on Sephadex G-200 and CM cellulose chromatography. This XaI made good inhibition for activated factor X (Xa) at 37°C, 25°C and even 4°C. During incubation of the XaI with Xa, there was much decrease of Xa inhibiting activity of the XaI.

Therefore, it was suspected that the XaI inhibited the Xa activity stoichiometrically rather than enzymatically.

<附 議>

桜川信男(新潟大学第一内科)

(1) Factor Xa と thrombin に対する先生の Inhibitor の態度はいかがか.

(2) DICでの Factor Xa の動態と inhibitor との関連はいかがか.

今岡真義(大阪府立成人病センター外科)

(1) この XaI は antithrombin activity も有する。これは私の impression であるが、この inhibitor は thrombin に対するよりも Xa に対する affinity がより高いのではないと思われる。

(2) DIC の患者の血漿を Sephadex G-200 にて gel filtration を行なったが、この inhibitor の活性が低下していた。勿論 DIC であるから thrombin も存在したので thrombin, Xa いづれのために XaI の活性の低下が生じたのか明らかなでない。しかし、前回の本討議会でも発表したように、Xa の生成は十分に得られるが thrombin の生成が殆んどないという系で明らかに、この XaI の活性化が低下することから少なくとも thrombin の前段階である Xa により影響を受けたことは十分考えられる。

安部 英(帝京大学第一内科) Xa と Xa-inhibitor の結合物では確かにゲルロカの移動性に変移がおこるようであるが、この両者の物性に差異、たとえば加熱や酸処理の際の態度に差異がある。

今岡真義 (大阪府立成人病センター外科) Macroglobulin XaI-Xa complex が存在すると考えているので、pH あるいは塩濃度等により分離出来たらと考えている。