原 著

 ^3H -Heparin と Antithrombin*

中 川 雅 夫** 奥 田 聖 介** 西 沢 明 彦**
 和多田 光 朗** 伊地知 浜 夫** 安 部 英***
 J. N. Shanberge****

Key words : Heparin, Antithrombin, Thrombin.

目 的

Thrombin の循環血液中における不活性化機構の一つとして、数種の Antithrombin の関与が知られており、そのうち生理的凝固機構に関係する Antithrombin II (Heparin Cofactor) と Antithrombin III は血漿中の Antithrombin Activity の大部分を占めるとされている。

現在、この両者の異同が論議されているが、³⁾⁴⁾⁵⁾両活性の測定法には確立されたものがないそこで、私共はその定義にもとづき両者の活性の測定法について検討を行った。すなわち Heparin の存在下で速効性の antithrombin activity を示す Heparin Cofactor (Antithrombin II) と、Heparin の存在なしに緩徐に Thrombin 活性を阻害する血漿 (又は血清) 中の遅効性 Antithrombin (Antithrombin III) の二者の測定法を考案し、さらに放射性同位元素 ^3H で標識した Heparin を用いて¹⁾、血漿蛋白分画との関係を追求め、その作用機作の一端について検索したのでこれらの成績を報告する。

I. 方 法

Heparin の分子量は 5,000~15,000 であり強力な陰性荷電をもった高分子多糖体である。これらの血漿中における抗トロンビン作用は抗凝固

Fig. 1 Heparin concentration and thrombin inactivation

Fig. 2 Inhibition of thrombin by Antithrombin in presence and absence of heparin

* ^3H -Heparin and Antithrombin. (The 4th Congress of the Japanese Society on Thrombosis and Hemostasis, Nov. 30, 1975).

** 京都府立医科大学第二内科 (〒602 京都市上京区河原町通り広小路), Masao NAKAGAWA, Seisuke OKUDA, Akihiko NISHIZAWA, Mitsuro WATADA, Hamao IJICHI: Second Dept. of Internal Medicine, Kyoto Prefectural University of Medicine, Kyoto, Japan.

*** 帝京大学医学部第一内科, Takeshi ABE: Department of Medicine, Teikyo University, School of Medicine, Tokyo, Japan.

**** Mount Sinai Medical Center, Milwaukee Wisconsin, U.S.A.

Fig. 3 Antithrombin activity. Relation between plasma dilution and incubation period

剤として広く使用されているが、Heparin 単独では Thrombin の不活性化作用は全くあるいはほとんど認められない。本実験において Heparin は Heparin Cofactor Activity の測定系に Sigma 社製のものを用い、これは豚の腸粘膜からの精製物 (sodium salt No. H-3125, grade 1, Lot No. 910-0110) であり、また Thrombin は Parke Davis 社製のものを生食にて溶解希釈し、Fibrinogen は Kabi 社製のものをその使用した。これらの一定の標品を用いてあらかじめ作成した Thrombin Clotting Time から Thrombin 単位を算出し、あるいはそのまま Thrombin Clotting Time でもって Heparin Cofactor および Antithrombin III の Activity として表現した。血漿蛋白と Heparin との関係を求める目的には Abbott 社より提供をうけた ^3H -Heparin を使用し放射能測定により蛋白分画と Heparin の関係を求めた。この ^3H -Heparin は ^3H -gas でもって Na-Heparin を標識したものであり、specific activity 18.33 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$ 、抗凝固剤としての活性は 97.2 USP units/mg である。

II. 結 果

Heparin 濃度と Thrombin の不活性化との関係については、あらかじめ作製した Thrombin Clotting Time 標準曲線から残存 Thrombin 単位を算出した結果、高単位の Thrombin は Heparin の添加によってもほとんど不活性化されなかったが低濃度の Thrombin は Heparin 濃度の増加にともない、その活性が阻害された(図 1)。しかしその阻害度は Heparin 濃度の増加からすれば軽度であった。

次に Heparin の有無による Antithrombin の Thrombin 不活性化を検討した(図 2)。

Antithrombin sample として 56°C 5 分加熱脱線維素血漿を生食にて 15 倍に希釈して用い、Thrombin は 20 単位/ml, Heparin 25 単位/ml を用い、0.5% Fibrinogen を基質として (1) Thrombin 単独、(2) Thrombin + Antithrombin、(3) Thrombin + Antithrombin + Heparin のそれぞれの系における Thrombin の不活性化と時間との関係を比較した。Thrombin + Buffer の系では 60 分後までは Thrombin の不活性化はみとめられないのに反し、Antithrombin sample 添加時には時間の経過とともに緩徐に Thrombin 活性が低下した。Thrombin + Antithrombin の系に更に Heparin を添加すると Thrombin 活性は急速に一定の程度にまで不活性化され、時間の経過にともない不活性化は増強せず、いわゆる速効性の活性阻害を認めた(図 2)。

Antithrombin free の系では Thrombin は Heparin 単独添加ではほとんど不活性化されなかったが、Heparin free の Thrombin + Antithrombin 系では時間の経過と共に Thrombin が徐々に不活性化されるので、Thrombin 濃度と反応時間が progressive antithrombin activity の測定上重要であることを示している。

そこで種々の Thrombin 濃度における反応時間と活性阻害の関係を調べた。図 3 は Thrombin 10 単位/ml とした場合であるが、この系においては Antithrombin sample として 15 倍希釈脱線維素血漿を用いた。この場合には図に示すごと成績から progressive antithrombin activity の測定法として 30 分の incubation が適当と考えられる。

Heparin Cofactor についても同様に検討しそ

れぞれ次の assay method を一応設定して以下の検討を行なった.

I) Antithrombin assay method

(progressive antithrombin)

Sample (antithrombin) 0.1ml

Thrombin (10 units/ml) 0.1ml

—incubate for 30 min. at 37°C—

add Fibrinogen (0.5%) 0.1ml

check clotting time

II) Heparin cofactor assay method

Heparin (25 units/ml) 0.1ml

Sample (heparin cofactor) 0.1ml

Fibrinogen (0.75%) 0.1ml

—mix well & incubate

for 3 min. at 37°C—

take 0.2 ml of mixture

add 0.1 ml of Thrombin

(10 units/ml)

check clotting time

Antithrombin の精製には現在ゲルろ過法と column chromatography あるいは affinity chromatography などの方法が用いられているが, Sephadex G-200 を用いての分画法において plasma fraction と Antithrombin III, Heparin Cofactor activity の関係を求める目的で上述の両活性を各分画について測定した. すなわち, 56°C 5 分間加熱脱線維素血漿10mlを2.5×75cmのSephadex G-200 column に apply し, 0.154 M NaCl buffer にて elute した (flow rate 15ml/h. operating pressure 10cm H₂O, fraction vol 3ml). 図4の如く蛋白第III峰に一致して Antithrombin III, Heparin Cofactor の高い活性を認めたが, 第I峰付近に認められた両者の活性は低く, かつ両者の活性のピークが異なった分画にみとめられた.

そこで Heparin と Antithrombin II (Heparin Cofactor), Antithrombin III との関係を調べるために ³H-Heparin を使用した. ³H-Heparin を添加保生した脱線維素血漿を Sephadex G-200 に apply しゲルろ過後, 各分画につき放射能を測定した. なお対照実験として ³H-Heparin

Fig. 4 Antithrombin and Heparin-cofactor activities of heat defibrinated plasma

Fig. 5 Radioactivities of ³H-Heparin and ³H-Heparin treated defibrinated plasma

のみの展開像を同一条件で求めた. すなわち脱線維素血漿10mlに10μCiの³H-Heparinを添加し, 37°C 10分間保生後 Sephadex で分別した各分画について放射活性を測定した結果, 蛋白第I, II峰の中間にその放射能のピークが認められたが, ³H-Heparin 単独の展開像ではこの分画に放射能は認められなかった (図5).

先の G-200分画にみられた Heparin Cofactor および Antithrombin III の活両性の最も高い蛋白第III峰には ³H-Heparin 結合蛋白の存在を支持する成績は得られず, Heparin は free の状態にあるものと思われた. なお最初の放射能の

ピークは蛋白分画第Ⅰ峰と第Ⅱ峰の中間に位置し、この位置に一致してHeparin Cofactorの活性が認められた。この現象から直ちに³H-HeparinとHeparin Cofactorとの結合が存在すると即断することはさけたいが、AntithrombinⅡが速効的にThrombin活性を阻害する現象の背景には、Heparin結合蛋白の存在を考慮して今後究明することの必要性を示唆するものと考えられる。

III. 考案および結論

1. Heparinは単独ではThrombinの不活性化作用はもたないが、低濃度のThrombinに対しては軽度であるが不活性化作用を示す。
2. AntithrombinあるいはHeparinの存在しない系でのThrombinは比較的安定であるのに反し、AntithrombinあるいはAntithrombinとHeparinの共存下においてはThrombinは緩徐に、あるいは急速に不活性化される。その程度はHeparinの共存する場合にはAntithrombin単独の場合より軽度であった。
3. AntithrombinⅡ(Heparin Cofactor)とAntithrombinⅢの測定法については低濃度のThrombinを対象とした系を用いる方法により、より明確に両者を分別測定することが可能である。
4. Sephadex G-200分画法による蛋白第Ⅰ峰付近に認められる progressive antithrombin活性とHeparin Cofactor活性は局在部分を異にすることが判明し、後者は³H-Heparin結合蛋白のピークと一致することをみとめた。
5. 最近Heparin Sepharose affinity chromatographyによるHeparin Cofactorの分離精製がDamusらによって報告されており⁷⁾、HeparinをLigandとしたaffinityの原理によるHeparin Cofactorの純化を行うものであるが上述の実験結果からはRosenberg⁶⁾らのG-200の蛋白第Ⅲ峰の分画を精製する方法とは異なった分画を対照とするものであるといえる。

しかしHeparinは動物組織の相異なるいは抽出法の差異などにより数十種類のものが存在するとされており、Heparin Cofactorある

いはAntithrombinとの結合も様々であるので使用するHeparinの不均一性により、作用の普遍性に問題があることは否めない事実であろう²⁾。これらの諸点を考慮して今後さらに検討の予定である。

文 献

- 1) Barlow, G.H., Coen, L.J. and Mozen, M. M.: Biochem. Biophys. Acta., **83**; 272~277, 1964.
- 2) Barlow, G.H. and Cardinal, E.V.: Preceedings of the Society for Exp. Biol. and Medicine, **123**; 831~832, 1966.
- 3) Briginshaw, G. F. and Shanberge, J. N.: Arch. Biochem. Biophys., **161**; 683~690, 1974.
- 4) Abildgaard, U.: Scand. J. Clin. Lab. Invest., **19**; 190~195, 1967.
- 5) Marciniak, E.: J. Lab. Clin. Med., **84**(3); 344~356, 1974.
- 6) Rosenberg, R.O. and Damus, P.S.: J. Biol. Chem., **248**(18); 6490~6505, 1973.
- 7) Damus, P.S. and Wallace, G.A.: Biochem. Biophys. Res. Comm., **61**; 1147~1153, 1974.

<ABSTRACT>

³H-Heparin and Antithrombin

by

Masao NAKAGAWA*, Seisuke OKUDA*, Akihiko NISHIZAWA*, Mitsuro WATADA*, Hamao IJICHI*, Takeshi ABE** and J. N. Shanberge***

from

*Second Dept. of Internal Medicine, Kyoto Prefectural Univ. of Medicine, **Teikyo University Medical School and ***Mount Sinai Medical Center, Milwaukee Wisconsin, U.S.A.

Heparin itself has little or no antithrombin activity and it requires some of plasma protein fractions to neutralize the thrombin activities in its inhibitory mechanism (Antithrombin II, Heparin Cofactor). Thrombin activity was progressively inhibited by Antithrombin III without existence of heparin. Antithrombin II or Heparin Cofactor has an

immediate type of antithrombin activity with the existence of Heparin.

Identity of Heparin Cofactor and Antithrombin III, however, is still questionable and there is some discussions on this point, and the assay methods of both Heparin Cofactor (Antithrombin II) and Antithrombin III are not established yet.

Authors established these assay methods according to their definition of both Antithrombins. Heat defibrinated plasma was fractionated by Sephadex G-200 column, and both activities were checked with these assay methods. The highest activities of Heparin Cofactor and Antithrombin III were observed on the third protein O.D. peak. Another peaks were also seen in the first protein peak of the plasma fraction, although both activities in this fraction were lower than those observed in the third protein peak, and each peaks of Heparin Cofactor and Progressive Antithrombin activities were observed in the different fractions.

^3H -Heparin was utilized on Gel-filtration with Sephadex G-200. The ^3H -Heparin treated plasma or heat defibrinated plasma showed two peaks of radioactivities. The first one is the

heparin-protein complex and the other is non-complexed free-heparin radioactivity. The first radioactivity peak is approximately corresponded with the peak of the first Heparin Cofactor activity which is apart from the first Progressive Antithrombin Activity peak, while this first radioactivity peak was not detected in the elution of ^3H -Heparin alone. The Heparin-protein complex in the third protein fraction where the highest Heparin Cofactor and Antithrombin III activity was detectable, was not definite.

According to our experimental results, Heparin Cofactor and Progressive Antithrombin activities appeared in the fractions of late first protein peak. Recently proposed affinity chromatographic technique for the purification of Heparin Cofactor seems to yield the principally different plasma protein fraction from the fraction by gel-filtration and regular chromatographic techniques. However the binding affinity of heparin to plasma protein varies depending on the different heparins, and it is speculated that the Heparin Cofactor or Antithrombin II separation from plasma by affinity chromatography is related to their affinity of the used heparins as a ligand.