原 著

新手法を用いた蛋白分解酵素阻害物質の検討*

桜 川 信 男** 高 橋 薫** 芦 沢 健**
松 岡 松 三**

Key words : heparin, hirudin, serine protease, chromogenic substrate

はじめに

生体内には種々の凝固阻害物質が存在しており, Factor XIIa に対する阻害因子, Factor XIa に対する阻害因子, Factor Xa と共に chymotrypsin や plasmin も阻害する Ci-inhibitor, Factor Xa に対する阻害因子や antithrombin が存在している. また, α_2 -Macroglobulin は thrombin のみならず他の蛋白分解酵素も急速に阻害することが知られており, α_1 -antitrypsin には antithrombin 作用も存在することも知られている. これら凝固阻害物質の中で antithrombin に注目してみると antithrombin には antithrombin I から antithrombin IV までの番号がつけられており, antithrombin I は fibrinogen (fibrin に転化する際に thrombin を吸着する) で, 1 ml の血液は 1,500~2,000 単位の thrombin を吸着する¹⁾. antithrombin II は heparin-cofactor といわれたが, antithrombin III と同一である. antithrombin III は分子量 65,000 で α_2 -globulin に存在し, Factor Xa, thrombin および plasmin を徐々に阻害するので progressive inhibitor といわれている²⁾. しかし, heparin の存在下では conformation change をおこして急速に antithrombin 作用を示す, いわゆる immediate type inhibitor となる³⁾. しかしこれに血小板第 4 因子 (platelet factor 4) を添加すると immediate inhibi-

tor は再び progressive inhibitor に変わることがわかった²⁾. antithrombin III の役割は重要で Factor Xa, Plasmin とともに thrombin をも阻害するもので, 血清中の antithrombin 作用の 75% を占める⁴⁾. antithrombin IV は prothrombin 活性化過程に出現する antithrombin であるが, これは prothrombin 分子から分離される PR や O 部と著者は考えている⁵⁾. antithrombin V は異常グロブリンによる作用であり, antithrombin VI は線溶亢進からもたらされる Fibrin degradation product (FDP) である.

これらの antithrombin の測定法について著者らは蛇毒 (Defibrase) を用いた方法を開発した⁶⁾. 本法は従来 antithrombin 測定に用いられていた 56°C 加熱処置による脱線維素血漿中の活性測定値より, 高い値を得ることにより, 加熱による antithrombin の失活を防ぐことができる. しかし, 手法が複雑であり, 測定に時間を要する. 最近入手できた Synthetic chromogenic substrate (AB BOFORS Nobel-division, peptide research, Mölndal, Sweden) を用いる antithrombin 測定法は手続が簡単であり, 一定時間で反応を停止して基質の thrombin による分解量を測定することから生化学的反應を正確に把握できる⁷⁾.

* Studies on the inhibitory effects of heparin, hirudin or OM-189 (synthetic thrombin inhibitor by Okamoto) on the Serine proteases (thrombin, trypsin, Factor Xa and plasmin) by the method using synthetic chromogenic substrate. (The Fifth Congress of the Japanese Society on Thrombosis and Hemostasis, Nov. 19, 1976).

** 新潟大学医学部第一内科 [〒951 新潟市旭町通り一番町], Nobuo SAKURAGAWA, Kaoru TAKAHASHI, Takeshi ASHIZAWA, Matsuzo MATSUOKA: The First Department of Internal Medicine, Niigata University School of Medicine, Niigata, Japan.

Fig. 1 Inhibitory effects of hirudin on serine proteases using synthetic chromogenic substrate

著者らは生体の阻害因子が各種疾患、あるいは病状の変化でいかなる変動を示すかについて検討を重ねて、DICにおける出血症状には antithrombin の補充が大切であり、治療として Aprotinin の大量投与が奏効することを報告した⁵⁾。

本稿では Synthetic chromogenic substrate を用いる antithrombin 測定法で血中の heparin 測定の検討, thrombin 阻害物質としての hirudin の作用、および最近岡本らによって開発された thrombin 阻害合成剤 OM-189 の作用を検討したので報告する。

I. 方法と材料

(1) Antithrombin 測定法: Synthetic chromogenic substrate (AB BOFORS, Nobel-division peptide research, Mölndol, Sweden)を用いる方法⁸⁾を著者が多少改変して用いた⁷⁾。

(2) 蛋白分解酵素: 教室の方法で純化した Thrombin, Factor Xa, Plasmin, と Trypsin (Worthington Biochemical Co. (USA))を用いた。Thrombin, Factor Xa および線溶能測定はそれぞれ教室の方法で行った。

(3) 阻害物質: Heparin (ノボーヘパリン, ヘパリン-ナトリウム 1,000 単位/ml, Novo Demmark), 硫酸プロタミン (清水製薬 10mg/ml), hirudin (Pentapharm, 2,000 ATU, Switzerland), Defibrase (Pentapharm, 35NIH

units/ml Switzerland), OM-189 (岡本教授より提供された)を用い生理的食塩水で用時適当に希釈した。

(4) 凝固因子測定法は教室の方法によった⁹⁾。フィブリノーゲンは Laki ら (1951) の方法で純化して用いた。

II. 成績

1. 血中 heparin 量の測定に関する検討:

正常人クエン酸血漿 (3.8% クエン酸ナトリウム液 1 容に全血 9 容を混合) 0.1ml に 1,500, 1,200, 900, 600, 300, 150, 30, 15, 7.5, 3.6 γ /ml の硫酸プロタミン液、および対照として生理的食塩水を 0.1ml 混和して 37°C で 1 分間加温してから 0.1ml の 4 単位/ml の Thrombin を加えて Thrombin time を測定した。終濃度の硫酸プロタミンが 15 γ /ml 以上から thrombin time が短縮しはじめ、150~600 γ /ml の濃度では変化はみられなかった。一方 1% の純化人 fibrinogen 液を血漿の代りに用いて同様に thrombin time を測定すると、10 γ /ml の硫酸プロタミンの濃度で fibrinogen flocculation が生じて凝固現象がみられなかった。以上から硫酸プロタミンの高濃度では fibrinogen の凝固性に影響がおこり、flocculation が生ずることがわかったが、血漿を用いた場合には 150~600 γ /ml の高濃度でも fibrinogen の凝固性は保たれているが、凝固時間の短縮は認められなかつ

Table 1 Inhibitory effects of hirudin on thrombin and factor Xa

A. Thrombin assay		Hirudin (mg/ml)	Clotting time (sec)
Thrombin (5 U/ml) 0.1 ml	0.002	>15 min
	Hirudin 0.1	0.0002	19.0 sec
	Acacia sol. 0.2	0.00002	17.4
	Fibrinogen 0.1	0.00001	16.0
		0.000002	15.6
		0.0000002	15.0
		control(saline)	15.2
B. Factor Xa assay		Hirudin (mg/ml)	Clotting time (sec)
Ca ⁺⁺ (M/40) 0.1 ml	0.00015	27.2 sec
	Factor Xa 0.1	0.00007	26.2
	Hirudin 0.1	0.00001	24.6
	Lipid sol. 0.2	0.000001	23.6
	Diluted plasma 0.2		
		control(saline)	23.6

た。硫酸プロタミンには heparin 中和作用が存在することから本実験での15~150 γ /mlの濃度では血中 heparin が硫酸プロタミンの量に応じて中和され、したがって thrombin による凝固時間が短縮したものと理解される。

次に Synthetic chromogenic substrate を用いる antithrombin 測定法で血漿に heparin あるいは硫酸プロタミンを加えた場合の antithrombin 値の変動を追求した。血漿9に対し各種濃度の heparin 溶液1の割合に混和し、終濃度10, 5, 0.5, 0.1, 0.01および0.001単位と対照として生理的食塩水を混和し、37℃で3分間加温してから antithrombin 値を測定した。0.1~10 単位の heparin 濃度で antithrombin 値は上昇した。一方同様の方法でプロタミン終濃度を 80, 40, 20, 10, 5, 1 γ /ml とし antithrombin 値を測定すると、10~1 γ /ml の濃度で antithrombin 値が減少した。以上の成績から heparin 添加による antithrombin の増加は progressive type が immediate type に変化したことにより、heparin 添加による antithrombin の変化がわかり、いわゆる antithrombin の潜在力が測定される。一方、硫酸プロタミン

添加による変動は血中ヘパリンが中和されたことにより、本来の antithrombin III と結合して immediate inhibitor となって強力に作用していたものが progressive inhibitor に戻ったと理解される。

2. Hirudin の阻害作用について

Trypsin (1mg/ml), thrombin (60単位/ml), plasmin (10単位/ml) および Factor Xa (0.6単位/ml) を用い、別に Hirudin (0.02mg/ml) を用いた。著者らの方法で 0.3ml の Hirudin 溶液に 0.05ml の trypsin, thrombin, plasmin および Factor Xa の溶液を加えて40℃に3分間 incubate し、その後2ml の tris-imidazole buffer と 0.25ml の Synthetic chromogenic substrate (0.7 mg/ml) とを加えてさらに3分間 incubate したのち、0.3ml の氷酢酸を添加して反応を止め、5時間後に吸光度を 400nm で測定した。

図1のように Synthetic chromogenic substrate は trypsin と thrombin によって容易に分解されるが、plasmin と Factor Xa では微量であった。Hirudin の作用をみると thrombin との関連はその阻害作用が大きく、続いて

Fig. 2 Inhibitory effects of OM-189 on various proteases.

trypsin であるが, plasmin と Factor Xa に対してはもとより substrate がこれらの酵素で分解され難いことから Hirudin の阻害作用も判定し難い。そこで凝固時間による Factor Xa に対する阻害作用と, フィブリン平板法 (plasminogen-rich plate) による plasmin 阻害作用を検討した。thrombin に対する阻害作用は表 1 の左方に表示したような反応系で検索したが, Hirudin 0.00002mg/ml 以上の濃度の溶液を用いると凝固時間は延長して thrombin 阻害作用が認められ, Factor Xa の場合も表示した反応系で 0.0001mg/ml 以上の濃度の Hirudin 溶液で阻害作用が認められた。一方 plasmin (10, 5, 2.5 および 1.25 単位/ml) 溶液と Hirudin (0.02mg/ml) 溶液との等量混液で検索した Hirudin の plasmin に対する阻害作用は認められなかった。以上から Hirudin は thrombin と trypsin に特異的に作用する阻害物質と判明した。この Hirudin 0.2mg を 10ml の生理的食塩水に溶解した。Rodrigues-Erdmann の方法¹⁰⁾で tube を耳静脈から心臓まで挿入しておき, この tube を通して Hirudin 溶液を 10 分間で 2.5kg の家兎に注入すると PTT と thrombin time は注入後 1 時間で最も延長し 3 時間まで延長が持続した。しかし, 血小板数や fibrin

Fig. 3 Inhibitory effect of OM-185 on clotting time or lysis time by various proteases on fibrinogen.

nogen には変動は認められなかった。

3. OM-189 (Okamoto, et al. (1975)) の阻害作用

OM-189 は岡本らにより合成された anti-thrombin と anti-trypsin 作用をもつもので, 分子量は 488.6 で水には難溶性であるが, いったん酸性にしてから再び中性に戻せば完全に溶解する。thrombin (60 単位/ml), Factor Xa (30 単位/ml, 前項の実験では 0.6 単位と濃度の低いために Synthetic chromogenic substrate の分解がみられなかったため, 本実験では高濃度を用いた)。trypsin (0.01mg/ml), plasmin (10 単位/ml) および蛇毒 Defibrase (3.5NIH 単位/ml) を検体とし, これに図 2 に示される反応系が OM-189 の濃度 1, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} および 10^{-4} Mol の溶液を用いて Synthetic chromogenic substrate の分解量を測定し, OM-189 を用いない対照の分解量との差をもって Inhibition として表示した。各検体の蛋白分解酵素は OM-189 濃度の高い程阻害されることが判明した。別に thrombin (1 単位/ml 終濃度) と Factor Xa (0.05 単位/ml 終濃度) および Defibrase (0.4 単位/ml 終濃度) を用い, 凝固時間によるそれぞれの酵素に対する OM-189 の阻害作用をみた。図 3 のように Defibrase ある

Fig. 4 Changes of coagulation-fibrinolysis and platelets by infusion of OM-189 into rabbit. (3 kg)

いは thrombin を各種濃度の OM-189 溶液と混合して28℃にて3分間 incubate し、その後 Acasia 一生食水混液0.2ml と1% fibrinogen液 0.1ml を加えて凝固時間を測定した。この場合の OM-189 の終濃度は 2×10^{-1} , 2×10^{-2} , 2×10^{-3} , 2×10^{-4} , 2×10^{-5} および 2×10^{-6} mol であり、対照として生理的食塩水を用いた。また Factor χ_a の場合は Factor χ_a と OM-189 液の等量混液 0.2ml を37℃で3分間 incubate しあらかじめ37℃で加温した新鮮牛希釈血漿（生理的食塩水で2倍に希釈）0.1ml, lipid 液（トロスチン中外製薬を生理的食塩水で50倍に希釈）0.1ml および M/40 CaCl_2 液 0.1ml を同時に添加して凝固時間を測定した。Defibrase は OM-189 によって全くその凝固性には影響をみとめない、しかし、thrombin と Factor χ_a に対してはほぼ同様な OM-189 の阻害作用が認められ 2×10^{-2} Mol 以上の濃度では10分以上の凝固時間を示し、 2×10^{-6} Mol 以下ではみられなかった。Defibraseの Synthetic chromogenic substrate に示した分解能は本項でみられた凝固能とは別の種類と考えられ、Defib-

rase の作用の多面性がうかがわれる。

次に図3に図示したような fibrinogen を基質とした plasmin 作用に対する OM-189 の阻害作用をみた。まず OM-189 と plasmin (0.25 単位/ml)との等量混液を37℃で3分間 incubate し、その後 1% fibrinogen 液 0.1ml 生理的食塩水 0.1ml と Defibrase (1.8 単位/ml: 本実験では thrombin は OM-189 で阻害されて凝固性を示さないため、OM-189 に影響されない、Defibrase を fibrinogen の凝固に用いた)を同時に添加し、fibrin 塊の溶解時間を測定した。図3のように OM-189 の全濃度に plasmin 阻害作用が認められ、高濃度に強力であった。以上から OM-189 には Synthetic chromogenic substrate を用いた場合での成績と同様に thrombin, Factor χ_a および plasmin に対するいわゆる生理的な阻害作用が存在するが、Defibrase に対してはみとめられない。

次に 4.8mg の OM-189 を前項と同様にして 10ml に溶解して10時間で 3kg の家兎に注入した。その際の凝固系の変動を検索すると、図4のように血小板・血小板粘着率と fibrinogen には変動はないが、PTT, thrombin time や prothrombin time (Quick) のように全血を用いて測定する方法では凝固時間が著明に延長し、その1時間後には正常化した。しかし各凝固因子でみると検体が10倍希釈されたのみでは注入された、OM-189 の影響が及ぶため、測定時間の延長から per cent として表示すると因子の減少がみられた。しかし、本実験で Synthetic chromogenic substrate を用いる方法および蛇毒を用いる著者らの開発した antithrombin 測定法の両者とも検体の defibrination の際に蛇毒 Defibrinase を用いる方法である。家兎実験での antithrombin 値その双方の測定法で施行してみたが、OM-189 注入後ではむしろ antithrombin 値の低下がみとめられた。そこで蛇毒を用いずに56℃、3分間加熱によって defibrination を行った検体でも同様の成績が得られた。したがって OM-189 による antithrombin 作用は Defibrase や加熱によって失活するのであろうか、今後追求されるべきものと考えられる。

III. 考 按

Synthetic chromogenic substrate を用いた antithrombin 測定法を用いて heparin, hirudin および OM-189 (岡本) の作用を検討した。

正常人血漿に heparin を加えると heparin 量の多寡によって antithrombin 作用が変動した。これは progressive inhibitor である antithrombin III が heparin と結合して immediate inhibitor に変化したことによるとされる。しかし、著者らのこれまでの成績で antithrombin III そのままで経時的に活性を測定した場合の最高活性値よりも heparin 添加して immediate inhibitor として観察した場合の方が強力であること得た。すなわち、血中の antithrombin III は正常に存在する heparin と結合したものと、していないものがあり、この総和が antithrombin 値として算出されるが、長時間観察しても余分に heparin を添加した場合よりも少いことは、37°C incubate による antithrombin の失活も考えられる。一方、硫酸プロタミン添加で antithrombin 値が低下したことは、正常血漿中の heparin が硫酸プロタミンによって中和されたこととされよう。Heparin は純化されており、その antithrombin, anti-Factor Xa および anti-plasmin 作用は凝固機序が崩壊した DIC の凝固障害の是正に好適とされている。しかし、血小板や fibrinogen が極度に減少すると、heparin 投与によって出血がもたらされることがある。また DIC では antithrombin III の低下や血小板第4因子 (platelet factor 4) の増加が認められ、heparin を投与しても血小板第4因子で中和される。また antithrombin III が減少しているために投与された heparin が結合する相手が少なく、よって十分な antithrombin 作用の強化が発揮されない。Heparin はそれ自体には antithrombin 作用はなく antithrombin III と結合してはじめて作用を発揮するものである。このような状態でも十分な治療効果をもつ阻害物質の登場が要望される。

OM-189 (岡本) は in vitro の成績で凝固と線溶の両面を阻害する作用を示し、動物実験でも PTT や thrombin time の延長が著明にみ

とめられた。しかし、蛇毒 Defibrase を用いて脱線維を行った血漿を用いると、antithrombin 値は OM-189 投与後でむしろ減少している成績を示した。そこで加熱処置した脱線維血漿を用いたが同様の成績であった。OM-189 によるこの成績の解明には今後の検索が待たれる。

ま と め

Synthetic chromogenic substrate を用いる antithrombin 測定法を用い、heparin, hirudin および OM-189 の阻害作用を検討した。

(1) 血漿に heparin あるいは硫酸プロタミンを加えて antithrombin 値を測定すると、前者で強力な活性を示し、後者で減弱した。血漿では heparin が antithrombin III 値と結合して急速に作用する阻害物質となり、血中に大量の heparin が存在すれば阻害作用も強力である。また硫酸プロタミンで antithrombin が減少した事実は血中に heparin が存在し、硫酸プロタミンで中和されて、antithrombin III 本来の徐々に作用する型の阻害物質となったことによる。

(2) Hirudin は trypsin と thrombin に作用する強力な阻害物質で、家兎に 0.2mg を注入すると PTT や thrombin time の著明な延長がみられたが血小板や fibrinogen には変化はなかった。

(3) OM-189 (岡本) は trypsin, thrombin, Factor Xa, plasmin に対して強力な阻害作用を示し、家兎に 4.8mg を注入すると Hirudin と同様に PTT や thrombin time の著明な延長が45分間にわたって認められたが、血小板や fibrinogen には変化はなかった。Defibrase に対する阻害作用は Synthetic chromogenic substrate を用いる antithrombin 測定法では 1 Mol のごとき高濃度でみられたが、fibrinogen を基質とした凝固時間で判定した場合には阻害作用はみられなかった。

文 献

- 1) Klein, P. D. and Seegers, W. H.: The nature of plasma antithrombin activity. Blood, 5; 742~752, 1950.

- 2) 桜川信男, 高橋 薫, 星山真理, 松岡松三 :
血管内凝固亢進症候群と阻害因子—Antithrombin III, platelet factor 4 および Heparin との関連と血管内凝固亢進症候群での変動—.
日本血液学会雑誌, **40** (2); 218~226, 1977.
- 3) Rosenberg, R. D. and Damus, P. S.: The Purification and Mechanism of Action of Human Antithrombin-Heparin Cofactor. J. Biol. Chem., **248**; 6490~6505, 1973.
- 4) Abildgaard, U.: Inhibition of the Thrombin-fibrinogen Reaction by Antithrombin III, Studied by N-terminal Analysis. Scand. J. Lab. Clin. Invest., **20**; 207~216, 1967.
- 5) 桜川信男: 血管内凝固症候群の病態生理. 日本内科学会雑誌, **64** (10); 1093~1097, 1975.
- 6) 桜川信男, 高橋 薫, 松岡松三: 蛇毒 Defibrase (*Bothrops marajoensis*) の研究—凝固線溶系因子に及ぼす影響およびアンチトロンビン測定への応用. 内科, **36**; 484~490, 1975.
- 7) 桜川信男, 芦沢 健, 高橋 薫, 星山真理, 高橋芳右, 松岡松三, 屋形 稔: Synthetic chromogenic substrate を用いた antithrombin 測定法について. 臨床病理, **25** (2); 167~171, 1977.
- 8) Blombäck, M. and Blombäck, B.: The assay of antithrombin using a synthetic chromogenic substrate for thrombin. Thrombosis Res., **5**; 621~632, 1974.
- 9) 松岡松三: 新臨床医学文庫18 血液凝固検査. 金原出版株式会社, 東京・大阪・京都; 1965.
- 10) Rodriguez-Erdmann, F.: Kurzmitteilungen und Methodisches, Über eine einfache Methode zur wiederholten Blutgewinnung beim Kaninchen. Archiv für die gesamte Physiologie., **269**; 306~307, 1959.

<ABSTRACT>

Studies on the inhibitory effects of heparin, hirudin or OM-189 (Synthetic thrombin inhibitor by Okamoto) on the Serine proteases

(thrombin, trypsin, Factor Xa and plasmin) by the method using synthetic chromogenic substrate.

by

Nobuo SAKURAGAWA, Kaoru TAKAHASHI, Takeshi ASHIZAWA, and Matsuzo MATSUOKA.

from

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

The inhibitory effects of heparin, hirudin and OM-189 (Okamoto's synthetic thrombin inhibitor) on serine proteases were investigated by the estimating method using synthetic chromogenic substrate, and the results were as follows:

- (1) When heparin was added to plasma, antithrombin activity was increased, but decreased with addition of protamin sulfate.
- (2) Hirudin showed remarkable inhibitory effects on the proteolytic activity of trypsin and thrombin, and when hirudin (0.2 mg) was infused into a rabbit (2.5 kg by weight) PTT and thrombin time were prolonged with no changes of plateletes and fibrinogen.
- (3) OM-189 showed the inhibitory effects on the proteolytic activities of trypsin, thrombin, Factor Xa and plasmin remarkably. When OM-189 (4.8 mg) was injected into a rabbit, inhibitory effects similar to the results found in the case of hirudin were observed. The inhibitory effect of OM-189 to the activity of Defibrase was observed in the concentration of 1 mol of it, but was not observed by the estimating method using fibrinogen as the substrate.