保存血流入速度遅延に関する研究

保存血血漿中に生じて来る血管収縮物質に就いて

東京大学清水外科（主任 清水健太郎教授）

高山良平

STUDIES ON THE SLOWING OF DRIP-RATE OF PRESERVED BLOOD TRANSFUSION—VASOCONSTRICTOR SUBSTANCE IN PRESERVED BLOOD

by

Ryohei TAKAYAMA

The 1st Surgical Department of Tokyo University School of Medicine

(Director: Prof. Kentaro Shimizu)

Abstract

One of the practical disadvantages of preserved blood, compared with fresh blood, is the slowing down of transfusion drip rate. It is previously pointed out that this phenomenon is due to the venospasm, which occurs at the area proximal to the site at which needle is inserted.

The author investigated the mechanism of this phenomenon, and obtained the results as follows.

1) The plasma of preserved blood causes contraction of the isolated strip of colon of the rat as well as the isolated spirally opened strip of the human vein.

2) Evidence is presented that this effect is not due to potassium, histamine, adrenaline, nor-adrenaline, acetylcholine or serotonin.

3) The active substance in the plasma was found to be released from α -globulin fraction of plasma in the presence of destroyed platelets.

4) The yellowish active substance was obtained from the preserved plasma.

5) Preservation of whole blood in siliconized bottle to minimize the destruction of platelet is proved to be effective in preventing the production of the active substance.

目次

I. 緒論

II. 保存血流入速度遅延の機構

III. 保存血血漿の静脈収縮現象

(1) 方法及び試料

(2) 成績及び考按

IV. 保存血血漿のダイコクネズミ結腸の収縮現象

(1) 方法及び試料

(2) 成績及び考按

V. 収縮物質の由来 (1)

(1) 血液成分分別法

(2) 分別試料のダイコクネズミ結腸収縮能

(3) 小括及び考按

VI. 保存血血漿及び分別試料のセロトニンの測定

(1) 測定法の選定

(2) 分光螢光測定法

(3) 生物学的測定法

(4) LSD のセロトニン拮抗作用

(5) 小括及び考按

VII. 収縮物質の由来 (2)

(1) 血漿蛋白分割試料の作製

(2) 血漿蛋白分割試料のダイコクネズミ結腸収縮能

(3) 血漿蛋白分割試料のセロトニン測定

(4) 小括及び考按

VIII. 平滑筋収縮物質についての考察

(1) Active Polypeptides 以外の 1 群

(2) Active Polypeptides の 1 群

(3) 小括及び考按

IX. 本取縮物質の抽出

X. 本取縮物質の生化学的性質

(1) 蛋白分解酵素による不活性化

(2) 熱耐性

(3) 透析性

(4) ペーパークロマトグラフィー

(5) 小括及び考按

XI. 保存血流入速度遅延の対策

XII. 総括及び考按

XIII. 結 論

I. 緒 論

保存血には必要時に必要量が使えるという大きな利点がある反面、色々な欠点もある。例えば、保存血輸血の生物学的治療効果は種々の血液凝固因子の不足を始めとする色々な因子に於いて、新鮮血に及ばないという事が先ず問題であるし、又保存血には細菌汚染の可能性の増大が大きな危険の要素として加わつて来る。更に早くから我々が指摘している様に、保存血の流入速度が新鮮血に比して遅延して、急速を要する輸血に支障を来することがある。第一及び第二の問題については、既に多くの研究がなされているが、第三の流入速度遅延の問題については、本邦に於て星川(1953)⁶³⁾が始めて此の現象を発表し、其後田仲(1954)¹²⁶⁾の報告があるのみである。外国の文献を調査してみてもこの問題に関する研究は意外に少く、米国に於ては N. Neustrup (1951)⁹⁵⁾, H. I. Lipson (1955)⁷⁰⁾, 獨逸に於ては H. Schneider (1951)¹¹⁴⁾, A. Rosenthal (1952)¹¹⁰⁾, 英国に於ては G. Keyns (1949)⁷⁴⁾, P. L. Mollison (1956)⁹⁰⁾の報告がみられるのみである。彼等はこの流入速度遅延の原因として、①輸血セットの操作の不適切及び故障の場合、②輸血用ゴム管又は輸血針のつまつた場合、③保存血の粘稠度の増加、④麻酔及び手術操作による受血者静脈圧の上昇、⑤カニューレの位置の不適當又は冷い保存血の急速注入による受血者静脈の挛縮又はショック状態の時の静脈挛縮等を挙げている。これらの原因は、いず

れも物理的又は機械的因子に着眼しているのみであり、且つ田仲の保存血の溶血が主因であるとの説も流入速度遅延の一因たり得ても主因ではないことを、星川が誌上⁶³⁾⁶⁴⁾及び第15回医学会総会⁶⁵⁾で発表し、保存血血漿中に輸血部位の静脈を収縮させる血管収縮物質が生じてくるものと推測した。即ち G. Keyns⁷⁴⁾はこの現象の原因の一つとして、*natural tendency to slowing* なるものを挙げてこの本態は未だ不明であると述べているが、注目し得るものと考えられた。我々は保存血自体の性状の変化に注目して、更に本現象を追究した結果、保存血血漿中に次第に生じて来る血管収縮物質がこの現象の本態であるとの結論を得て、第8回日本輸血学会¹²⁵⁾及び第8回国際輸血学会¹¹⁷⁾でその要旨を報告した。

II. 保存血流入速度遅延の機構

我国で保存血が使用されてから間もなく、手術時に輸血を管理していた麻酔者から、「保存血輸血では流入速度が遅く、時には全く停止してしま

図1 臨床実験

う」との欠点が強調せられた。特に当教室では脳手術が多く、短時間に大量輸血を必要とし、且つ輸血部位としては下肢の静脈よりの輸血が多かつたために、特に流入速度が遅く⁹⁰⁾この問題が注目された。

流入速度遅延の状態を単位時間の点滴数で示した臨床実験の一例が図1である。横軸は経過時間を分で現し、縦軸は流入速度をコックを全開にした場合の1分間の点滴数で示した。全く支障なく流入している時は150滴又はそれ以上であるが、150滴以上又は線状をなして流入している時で

も、図では 150滴として表現した。生食及び新鮮血は 1 分間 150滴又はそれ以上で順調に流入しているが、14日保存血ではその速度が 5 分後に 108 滴、10分後には 64滴と減少し、15分後には 24滴と甚だしい減少を示した。このように流入速度遅延を起した場合には、輸血部位の静脈の中樞側が著明に細くなり、固い針金の如くなっている事が触知される。即ち著明な静脈収縮をおこしていることが想像される。この場合に新鮮血に切り替えると、図の如く流入速度は次第に回復して順調に流入し、又塩酸 プロカインをゴム管より注入すると、一過性ではあるが速かに流入する様になる。この順調に流入している時は、保存血輸血時に認められた静脈収縮は緩解して、針金の如き硬結はもはや触知されない。この静脈収縮が保存血流入速度遅延の原因と考えられる。N. Neustrup, A. Rosenthal, H.I. Lipson 及び P.L. Mollison は本現象の原因の一つとして静脈収縮を挙げており、特に N. Neustrup⁶⁵⁾ 及び H.I. Lipson⁷⁰⁾ は保存血中にプロカイン又はプロカインアミドを混入することが本現象の対策として有効であると報告してはいるが、彼等は保存血が冷いという物理的因子のみに着目し、これが静脈収縮を起すと述べているのみである。然しこれは星川⁶⁴⁾⁶⁵⁾によつて否定されている様に主因ではないようである。

保存血は保存中にその性状に変化を生じてくることは十分に可能性があるのであつて、保存血中に静脈収縮を起す物質が生じ、これが血漿中に遊離してくるのではないかと推定される。この推定の下に保存血から血漿のみを分離し、血漿の流入速度をみると、保存血全血液と同じく著明な流入速度遅延を起した。即ち保存血血漿中に、静脈収縮を起す物質が生じてくるのであると推測された。

III. 保存血血漿の静脈収縮現象

保存血輸血における輸血部位の静脈収縮を実証するために、R.F. Furuchgott et al 等³⁾²²⁾³⁵⁾³⁷⁾⁵²⁾⁵³⁾⁸³⁾¹²⁸⁾の方法に従つて、剔出した人静脈の保存血血漿による収縮をキモグラフィオンの煤紙に描記せしめて観察した。

図2 キモグラフィオン装置略図

(1) 方法及び試料

外傷や肉腫等で切断された人の下肢の中で損傷や病変の全くない内顆部の大伏在静脈を約 3.5cm 切りとつた後、輪状筋の収縮をみるためにこれを螺旋状に切り図2の如く装置した。灌流液はロックリンゲル氏液 (Locke-Ringer's solution) を使用し、37.5℃の恒温状態で各種試料の収縮を描記観察した。

新鮮血血漿は当日採血した A C D 加新鮮血より又保存血血漿は 20~30 日保存の A C D 加保存血より各々遠心分離して得た。セロトニン^{註)}・ノルアドレナリン及びヒスタミン溶液はすべてロックリンゲル氏液で 1 µg/ml の濃度に稀釈して使用した。

(2) 成績及び考按

図3に示した如く、明らかに保存血血漿に強い

図3 剔出人静脈収縮キモグラム

註) 使用したセロトニンは、Nutritional Biochemicals Corporation, Cleveland Ohio の Serotonin creatinine sulfate と、Upjohn Company からの Serotonin で、後者は特に窒素封入して安定性を保たせたものである。

静脈収縮がみられ、新鮮血血漿には収縮がみれない。

なおノルアドレナリン・ヒスタミン及びセロトニンのいずれも著明な静脈収縮がみられた。同濃度ではヒスタミンとセロトニンの収縮は、ノルアドレナリンよりも強い傾向を示し、5例に於いて全く同様な反応を呈した。又同時に、膝窩動脈を用いて同じように収縮を検査すると、静脈と同じ収縮の傾向を示した。即ち保存血血漿中に、血管壁平滑筋の能動的収縮を起す何らかの因子の存在が確認せられた。従つて保存血はその保存中に变化して、血管壁平滑筋収縮物質が血漿中に生じてくるものであるとの推測が成立するわけである。

然しこの保存血血漿中の血管壁平滑筋収縮物質の生成並びに性質等の研究を進めるためには、人静脈は材料として常に得難く、且つ定量的測定は困難であるとの欠点がある。薬理学的に平滑筋収縮作用を検討するには、通常種々の動物の平滑筋組織が用いられているが、著者はダイコクネズミの結腸を使用して保存血血漿の平滑筋収縮作用を検討してみた。

IV. 保存血血漿のダイコクネズミ結腸の収縮現象

保存血血漿の平滑筋収縮作用をみるために、操作が簡単で且つ安定性のあるある別出ダイコクネズミ結腸¹⁸⁾¹²⁴⁾を使用して、前述の静脈収縮と同じく収縮状態を観察した。

(1) 方法及び試料

装置は前述と同じキモグラフィオンを使用した100 gr 前後のダイコクネズミを雌雄の別なく使用した。その上行結腸を盲腸の近くから約3~4 cm切りとつて内容を洗滌し、図2と同じく灌流液中に垂直に懸垂した。即ち観察される収縮は、主に縦走筋の収縮である。ダイコクネズミ結腸の自発運動(spontaneous activity)を抑えるためには低温と灌流液中の Ca^{++} の低濃度がよい¹⁸⁾とされており、著者は温度を26°Cに下げてこれを一定にし、灌流液にはタイロッド氏液(Tyrodé's solution)の CaCl_2 量を $\frac{1}{4}$ に減らした修正タイロッド氏液(modified Tyrodé's solution)を

図4 別出ダイコクネズミ結腸収縮のキモグラム

使用した。更にアセチルコリンによるダイコクネズミ結腸の収縮を抑制するために、硫酸アトロピンを灌流液に $1 \mu\text{g/ml}$ の割に加えた。新鮮血及び保存血の血漿は、修正タイロッド氏液で10倍に稀釈して使用した。

(2) 成績及び考按

図4に示した如く、ダイコクネズミ結腸でも新鮮血血漿では殆んど収縮がみられないが保存血血漿では強い収縮がみられる。又図にみられる如く、ダイコクネズミ結腸はヒスタミンには元来無反応であり、アドレナリン及びノルアドレナリンでは寧ろ弛緩し、アセチルコリンによる収縮は、灌流液に加えられたアトロピンによつて抑制されている。

即ち、保存血血漿中には血管と同じくダイコクネズミ結腸をも収縮させる何等かの物質が生じ、然もこれがアドレナリン・ノルアドレナリン・ヒスタミン・アセチルコリンと異なることが証明される。

V. 収縮物質の由来 (1)

保存血血漿中に生じてくる本収縮物質が、血液の中のどの成分に由来するのであるかを次の方法で追究した。

(1) 血液成分分別法

血液各成分の分別には、各血液成分が無菌的且つ純粹に、しかも充分量得られることが必要であ

図5 血液各成分遠心分別法

表1 6種試料血球数/mm³ (8例平均)

	赤血球	白血球	血小板
① 全血	370× 10 ⁴	5700	14.1× 10 ⁴
② 血小板浮遊血漿	2.1× 10 ⁴	3400	25.3× 10 ⁴
③ 無有形成分血漿	0	0	0
④ 赤血球浮遊血漿	420× 10 ⁴	350	0
⑤ 白血球浮遊血漿	300	800	0
⑥ 血清	0	0	0

る。

図5の如く遠心法で血液中の各成分を、②血小板浮遊血漿、③無有形成分血漿、④赤血球浮遊血漿、⑤白血球浮遊血漿、⑥血清の5種類の試料に分け、更に①全血液を併せて合計6種試料を作製した。この6種試料8例の血球数を算定し、その平均値を表1に示した。赤血球数は Hayem 氏液、白血球数は Türk 氏液、血小板数は Sequestrene 液⁽¹¹⁾⁽⁴⁸⁾⁽⁹³⁾⁽¹²⁹⁾を用いて直接法で算定した。

最も破壊され易い血小板の分別操作に対しては、必要な器具にはシリコン処理 (siliconized) し、採血管にはポリエチレンチューブを使用した。シリコン及びプラスチックは所謂 nonwett-able surfaceの特性を有し、血小板の破壊を可及

的に防ぐといわれている。⁴⁵⁾⁽⁶⁰⁾⁽⁶¹⁾⁽⁸⁵⁾⁽⁹¹⁾⁽¹²²⁾⁽¹³⁰⁾ シリコン処理は次の如く行つた。信越化学工業のシリコンKF99、1容にベンゾール20容を加えて、充分に清浄にした採血壺及び注射針内面を洗い、200℃2時間乾熱し、更に蒸気滅菌を行つた。このように処理した採血壺にACD加新鮮血を採血し、800rpm15分の低速遠心⁵¹⁾⁽⁶⁶⁾⁽⁹¹⁾を行つて、血小板浮遊血漿 (platelet-rich plasma) を得た。

無有形成分血漿 (cell-free plasma) は、前述の如く特に血小板の破壊を少くするために、シリコン処理した器具で採血分離した血漿を意味する。

白血球の純粹分離が最も困難である事は一般に認められているが、著者の方法でも白血球収容量は少く、多量の分離が望まれる本実験にはいささか不十分ではあつた。木村⁷⁵⁾が白血球の分離法をまとめて報告しているが、本実験の性格より dextran その他の薬品の添加は収縮実験に影響を与える可能性があるので、著者は遠心法を採用した。J.L. Tullis (1952)⁽¹³³⁾⁽¹³⁴⁾ は特殊な遠心分離装置で無菌的に95～99%純度の白血球を分離しており、現在最も優秀な分離法とされているが、これを行う事は本邦では未だ不可能である。その他最近では P.Wildy et al (1958)⁽¹⁴⁹⁾ の分離法があるが、操作の複雑な上に収量は結局19.8%程度であ

図6 6種試料のダイコクネズミ結腸収縮能の変化

り、又川野 (1958)⁷²⁾の方法は赤血球に対する白血球の割合がやゝ上昇するとしている。以上により著者は図5の遠心法を採用して白血球の分離を行つた。白血球沈渣の洗滌には、これが破壊されることを可及的に少なくするために、0.38%クエン酸ソーダ生食液で洗滌した。

(2) 分別試料のダイコクネズミ結腸収縮能

この分別6種試料を4℃に保存して、各々の血漿又は血清について3週目迄1週間毎に、(Ⅳ)に述べたと同様の方法で剔出ダイコクネズミ結腸の収縮能を測定した。この収縮能を既知濃度のセロトニン基準液による収縮と比較して、試料の収縮能をすべてセロトニン濃度値に換算した。

図6に示す如く、8例とも全血の血漿・血小板浮遊血漿及び血清は、保存日数と共にその収縮能が次第に増強したが、無有形成分血漿・赤血球浮遊血漿・白血球浮遊血漿は最初から腸管収縮能は殆んどなく、又日数を経過しても殆んど増強しない。

(3) 小括及び考按

以上により本収縮物質は、剔出ダイコクネズミ結腸を保存日数の経過と共に次第に強く収縮させ、これは血小板の存在する血漿即ち全血及び血

小板浮遊の各血漿と、血小板が最初より強く破壊され、その破壊産物が存在する血清のみに生じてくるようである。これに反して血漿・赤血球・白血球は、それぞれ單獨では本収縮物質を作ることには関係がないものと考えられる。即ちこの収縮をおこす物質はとくに血小板に関係があることが証明される。又有形血小板が全く存在しない血清の収縮能が保存日数と共に著しく増強することより、血小板中に存在する収縮物質が、血小板の崩壊と共に単に遊離して来ただけの為ではなく、血小板中に存在するある物質が血清中に於いて日数の経過につれて腸管収縮物質を次第に作り出して来るものとするのが妥当である。

なお(Ⅲ)及び(Ⅳ)に於いて、保存血血漿は新鮮血血漿と違って剔出人静脈と同様にダイコクネズミ結腸をも強く収縮させることを述べたが、この保存21日目の分別試料の中、腸管収縮能を増強した血清と何等増強しない無有形成分血漿で、(Ⅲ)と同様の方法で剔出人静脈の収縮を測定すると血清ではこれを強く収縮し無有形成分血漿では何等収縮を起さないことが観察された。即ち本収縮物質の平滑筋収縮作用は、人静脈とダイコクネズミ結腸に対しては大体平行するものと思われる。保存血血漿の血管収縮作用を研究していく上に、平滑筋材料としてダイコクネズミ結腸を使用して検討し得るものと思われる。

Ⅶ. 保存血血漿及び分別試料のセロトニンの測定

血清は血漿と違って、非常に強い血管収縮作用のあることは古くから知られており、Ludwig, Schmidt (1868)の観察が最初であるといわれ、更に O'Conner (1912)が現在のセロトニンと考えられるものを報告している。その後 T.C. Janeway et al (1918)⁶⁸⁾の報告がみられるが、この血管収縮作用は血小板数とほぼ比例することを広瀬 (1918)⁵⁹⁾が報告している。I.H. Page et al¹⁰⁴⁾105)106)107)は血液中に存在する血管収縮物質をもとめて、1948年に遂にセロトニンを得た血液中のセロトニンは源を腸管の enterochromaffin cells³¹⁾に発し、血液中では血小板に含まれ、正常では血

漿中のセロトニン量は零であるといわれている⁶⁶⁾ (76)(80)(96)(102)。

著者はまず、保存血漿中で次第に血小板が破壊されてセロトニンが増加し、これが静脈を収縮させ、流入速度遅延の原因となると推測し、保存血漿中のセロトニン量を測定した。

(1) 測定法の選擇

セロトニンの測定には、現在次の5つの方法が用いられている。

- 1) 生物学的測定法 (Biological assay)
- 2) 紫外線吸収法 (Ultraviolet absorption method)
- 3) 比色定量法 (Colorimetric assay)
- 4) ペーパークロマトグラフィー (Paper chromatography)
- 5) 分光螢光測定法 (Spectrophotofluorometric assay)

血漿中のセロトニン量は脳・腸管等の組織に含まれているそれと比較して非常に少く、1)及び5)の方法を除いては血漿中のセロトニン量の測定は殆んど不可能である。即ち、紫外線吸収法では $0.4 \mu\text{Mole/ml}$ が最低必要量で、 $0.04 \sim 0.4 \text{ Mole}$ 濃度のセロトニン測定に適し¹³⁸⁾、比色定量法は紫外線吸収法とほぼ同程度の $0.05 \sim 0.8 \mu\text{Mole}$ を必要とする¹³⁸⁾。ペーパークロマトグラフィ法²⁹⁾では、最も鋭敏といわれる Ehrlich 試薬で発色させても $3 \sim 10 \mu\text{g}$ のセロトニンを必要とする¹²³⁾。即ち2)3)4)の方法では、セロトニン測定の限界は $5 \sim 50 \mu\text{g/ml}$ の高濃度のセロトニンを必要とするわけである。血中の正常セロトニン量は、血清で $0.044 \sim 0.247 \mu\text{g/ml}$ 、平均 $0.1 \mu\text{g/ml}$ ¹⁰⁰⁾ 全血では $0.16 \mu\text{g/ml}$ の値が報告されている。血小板のセロトニン量は、 $0.3 \mu\text{g}$. platelet serotonin/mg platelet protein (但し正常血中の血小板蛋白量は $0.3 \sim 1.0 \text{mg/ml}$) 位とされている。いづれにしても血漿中に生じ得るセロトニン量は、最大 $0.1 \sim 0.3 \mu\text{g/ml}$ である。以上の理由から、生物学的測定法を除いては最も鋭敏である分光螢光測定法で、保存血漿中のセロトニン量を測定した。

図 7

(2) 分光螢光測定法¹⁰⁾⁽¹³⁸⁾⁽¹³⁹⁾

セロトニンは強酸性下では、 $295 \text{m}\mu$ の励起光をあてると $550 \text{m}\mu$ の螢光を發し、 $0.01 \mu\text{g/ml}$ の微量濃度でも測定可能といわれる。著者は東京大学物性研究所の牧島研究室の図7に示した Spectrophotofluorometer を使用して、保存血漿中のセロトニン量を測定した。

この測定で用いられるセロトニン抽出法は、硫酸亜鉛除蛋白法¹⁴⁰⁾とブタノール抽出法¹⁴⁰⁾が用いられている。但し両者の抽出法は、いづれもセロトニン濃度が $0.5 \mu\text{g/ml}$ 以上であることを必要とし、正常血漿中のセロトニン量の如く非常に低い濃度では、この二つの抽出法の併用がよいとされている¹⁴⁰⁾。著者は大量の血漿を用いて、硫酸亜鉛除蛋白法とブタノール抽出法を併用して次の如き抽出を行つてセロトニンを測定した。

抽出法：血漿20ccに10% ZnSO_4 15ccを加えて充分混和し、この混合物に $1 \text{N} \cdot \text{NaOH}$ 7.5ccを加えて3000rpmで15分遠心する。上清を他の遠心管に移し、これに無水炭酸ソーダを加えてpHを約10に調節する。これにpH10の硼酸バッファー^{註1)} 5ccを加え、更に NaCl 10gr と n-ブタノール^{註2)}

15ccを加えて10分間振盪する。これを3000rpmで15分遠心した後、ブタノール相を他の遠心管に移して再び上記硼酸バッファーを15cc加えて10分間振盪する。バッファー相を吸引除去後、残ったブタノール相に20ccヘプタン^{註3)}と0.1N・HCl 1.5cc加えて再び10分間振盪する。3000rpmで15分遠心した後上清を吸引除去し、残った酸層1ccに12N HCl 0.3ccを加えて測定した。

以上の操作によるセロトニンの recovery は35～65%で、かなり低く且つ不定ではあつたが、保存血漿中のセロトニン量は増加することなく、寧ろ減少することを知ることが出来た。ペーパークロマトグラフィーを用いて保存血の血小板中のセロトニンの減少を渋沢¹¹⁵⁾が、保存血血清のセロトニンの減少を徳沢¹³²⁾が報告しているが、更に著者はセロトニン定量の正確を期すために、最も鋭敏な生物学的測定法を行つた。

(3) 生物学的測定法

文献的には、1)各種軟体動物の心臓及び足糸等³³⁾⁴²⁾⁸⁶⁾¹³⁶⁾¹⁴²⁾¹⁴³⁾¹⁴⁴⁾、2)家兎耳殻血管灌流法⁹⁷⁾、3)牛及び羊の頸動物脈切片⁷⁾¹⁵⁰⁾、4)ダイコクネズミの胃¹⁴¹⁾、5)ダイコクネズミの子宮²⁵⁾²⁶⁾²⁷⁾⁸²⁾、等の色々な方法が報告されているが、(IV)に述べた方法と全く同じく、Dalglish et al の剔出ダイコクネズミ結腸¹⁸⁾⁴³⁾⁶⁷⁾⁷³⁾¹²⁴⁾を用いて測定した。この方法はZ. Supek et al¹²⁴⁾が報告している如く、操作が簡単で安定性があり、且つ定量的誤差が少い利点がある。セロトニンの抽出にはアセトン抽出法²⁾¹⁶⁾²⁸⁾⁵¹⁾⁸¹⁾⁹⁸⁾¹³¹⁾¹³⁶⁾を用いた。

セロトニンのアセトン抽出法については議論も多く、抽出組織の種類、セロトニン量並びに組織中の抽出阻止物質の性質によつて、抽出され得るセロトニンの recovery が異つてくるといわれている。P. Correale (1956)¹⁶⁾は脳組織中のセロトニン抽出の recovery は低く且つ不定であると述べ、又 C.C. Toh (1954)¹³¹⁾及び R.H. Hardisty et al (1955)⁵¹⁾は全血中のセロトニン抽出の recovery は非常に低く、これは red cell debrisによつてセロトニンの吸収或いは不活性化に多分よるものであらうと述べている。C. Thom-

pson et al (1958)¹²⁷⁾は全血のセロトニン抽出で、ブタノール法を変形してこれを行つたところ、その recovery は73%で満足すべき方法であると提案している。然し脳・腸管及び全血と違つて、血漿中のセロトニンのアセトン抽出法では、その recovery はよいとされており⁵¹⁾、著者は次の方法で行つたが、recovery は80～90%で満足すべきものであつた。

抽出法：アセトン^{註4)} 4容に試料1容をゆつくりと滴下し、密閉して4℃で24時間保存する。東洋濾紙 (No. 6 ASH 0.0006) でこの混合物を濾過し、更にアセトン少量で濾紙内面を洗い、濾液に

図8 6種試料のセロトニン濃度の低下

試薬はすべて特級を、水は再蒸溜水を使用して次の如く精製した。

- 註 1) 硼酸バッファー (Borate buffer solution) : 硼酸31.4, 水1, 10N NaOH 55ccの溶液に、註 2)の如く精製した n-ブタノールと NaCl を過剰に加えて充分振盪する。n-ブタノールは吸引は吸引除去し、余分の NaCl はそのままとする。最終pHは10。
- 註 2) ブタノール (n-Butanol) : ブタノールに等量の 0.1N NaOH を加えて充分振盪し、これに等量の 0.1N HCl を加え、更に水で2回洗滌する。
- 註 3) ヘプタン (Heptane) : ブタノールと同様に精製する。
- 註 4) アセトン (Acetone) : 再蒸溜する。

加える。濾液を40℃以下で乾燥するが、あまり完全に乾燥させないように注意する⁸²⁾。乾燥後修正タイロッド液を原試料の5倍量を加えて剔出ダイコクネズミ結腸の収縮を測定した。

Vの分別6種試料の5例について、保存日数の経過につれてセロトニン量を測定した。図8に示した如く、全試料のセロトニン量は次第に減少し、全血血漿では2週間目で既に測定上零となるものもある。

(4) LSDのセロトニン拮抗作用

セロトニンの平滑筋収縮作用は、LSD (Lysergic acid diethylamide^{34)38,39,41)}, BOL (2-Bromolysergic acid diethylamide¹²⁾¹²⁰⁾ エルゴタミン及びサヒドロエルゴタミン⁵⁴⁾¹¹⁵⁾等によつて、特異的に阻止されるといわれている。著者はLSD³⁸⁾を使用して前述の分別試料及び前述アセトン抽出試料の剔出ダイコクネズミ結腸収縮作用に対する阻止効果を検討した。平滑筋収縮阻止作用に対するLSD量とセロトニン量の関係は、平滑筋の種類によつて差があり、ダイコクネズミ子宮に対しては、LSDのセロトニン拮抗作用は非常に効果的であるとされている³⁸⁾。剔出ダイコクネズミ結腸のセロトニン収縮作用に対しては、著者の行った範囲では、LSD 0.1~0.5 μ g/ml濃度10分間投与で、セロトニン 0.1 μ g/mlに対する阻止効果が充分現われた。

図9に示した如く、基準液セロトニン及びアセ

トン抽出試料は、LSDによつて腸管収縮作用が明らかに阻止されたが、21日保存の血清・血小板浮遊血漿・全血血漿の腸管収縮作用は殆んど阻止されず、阻止されても僅少に過ぎない。即ち著者の測定している試料のアセトン抽出物質はセロトニンであると証明出来、又保存中に腸管収縮作用を増強した本収縮物質は、セロトニン以外のものであることが明らかに証明出来る。

(5) 小括及び考按

(V)に述べた如く保存血血漿中に次第に生じてくる腸管収縮物質は、とくに血小板に関係があるが、血小板中に存在する強い平滑筋収縮作用のあるセロトニンは、著者の予想に反して、保存血血漿中では逆に次第に減少した。更にセロトニンの平滑筋収縮作用を特異的に阻止するLSDによつては、増強した保存血血漿の腸管収縮作用は阻止されないことより、この収縮物質はセロトニンと異なるものであることが証明される。

VII. 収縮物質の由来 (2)

血小板が破壊し、その破壊産物が血漿又は血清に存在すると、本収縮物質が保存中に次第に生じてくることが明らかになったが、更に血漿蛋白分割の中、いつれの分割が収縮物質を生ずるに関係するのであるかを検討するために、Cohnの血漿蛋白分割¹³⁾¹⁴⁾に血小板を加えて、(V)と同様に保存して剔出ダイコクネズミ結腸の収縮能を測定した。

(1) 血漿蛋白分割試料の作製

図9 LSDの拮抗作用キモグラム

註) LSD: California Corporation for Biochemical Research, Los Angeles の D-Lysergic Acid Diethylamide Tartrate, C-grade を使用。

図10 Cohn の各血漿蛋白分割電気泳動図

表 2 図10の電気泳動分析値% () 内は Cohn のオリジナル

	Al	α	β	ϕ	γ	主 分 割
血 漿	55	10	14	5	16	
Fv	95 (95)	1 (4)	4 (0.9)	0 (0)	0 (0)	Al
Fiv-4	10 (15)	38 (47)	45 (38)	0 (0)	7 (0)	Al, α + β -Gl
Fiv-1	7 (0)	81 (88)	11 (9.8)	0 (0)	1 (2.0)	α -Gl
Fii+iii	0 (4.5)	6 (5.8)	34 (48)	5 (5.3)	55 (37)	α + β + γ -Gl
Fii-3	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (4)	96 (96)	γ -Gl

表 3 各分割試料作製の計量及び各分割の組成 (g/dl)

	計量	Al	α	β	ϕ	γ
血漿	(7.5)	4.13	0.75	1.05	0.37	1.20
Fv	4.4	4.18	0.05	0.17	0	0
Fiv-4	2.0	0.20	0.76	0.90	0	0.14
Fiv-1	1.0	0.07	0.80	0.11	0	0.01
Fii+iii	3.1	0	0.19	1.05	0.16	1.70
Fii-3	1.3	0	0	0	0.05	1.25

使用した Cohn の血漿蛋白分割は、日本製薬中川氏より提供を受けたものである。図10はこれの濾紙電気泳動図である。泳動は pH 8.6, μ = 0.05のペロナルバッファー、東洋濾紙 No.51を使用し、B.P.B で染色後各分割をデントメーターで測定した⁵⁸⁾⁷⁷⁾⁸⁹⁾。Cohn らの用いている分割の名称と電気泳動成分との関係は概略下記のように対応すると考えてよい⁵⁸⁾。

- F I : フィブリノーゲン
- F II : γ -グロブリン
- F III : β -グロブリン
- F IV : α -グロブリン
- F V : アルブミン
- F VI : 残余の全部

この電気泳動分析値を示したものが表 2 であつて、Cohn のそれとは多少の違いがあるが大差はない。正常人血漿蛋白分割は、10例の大略平均値である。

この蛋白分割の各々について、最も多く含まれている分割を主眼として、その分割が正常血漿中の同じ分割と大体同濃度になるように生食で溶かし、各分割試料を作製した。正常人血漿蛋白量は日立血清蛋白計で測定¹³⁷⁾した10例の平均を、大略 7.5 g/dl とした。各蛋白分割の計量及び出来上つた試料の各分割組成を、表 3 に示した。

血小板は (V) に述べた如く、ポリエチレンチ

ューブ管及びシコリン処理した注射針と採血壺を使用して採血した A C D 加新鮮血より、遠心法で分離した⁵¹⁾⁶⁶⁾⁹¹⁾。即ち採血した血液を 800 rpm で15分低速遠心して上清の血小板浮遊血漿 (plateletrich plasma) を、シリコン処理した遠心管に移し、2500rpm で30分高速遠心し、上清を捨て血小板沈渣を0.38%クエン酸ソーダ生食液で洗滌し、再び高速遠心して血小板沈渣を得た。こゝに得られた血小板数の算定は、血小板相互の粘着凝集のために測定困難であつたために、血小板の最終 recovery を約 1/3 位と見做して、正常血液中に存在する血小板数と大体同じ割合に各分割試料に血小板を加える目的を以て、300ccの血液を採血してこれより血小板を分離し、これに対応する各分割試料の量を15cc位が適當であると計算した。そこで各分割試料と対照とした生食液各15ccづつに、血小板をできるだけ均等になる様に加えた。

(2) 血漿蛋白分割試料のダイコクネズミ結腸収縮能

図11に示したごとく、Fv 及び Fii-3 には収縮の増強はなく寧ろ減少し、Fiv-1 Fiv-4 に強い収縮能の増強がみられ、更に Fii+iii にも収縮能の

図11 各分割試料のダイコクネズミ結腸収縮能の変化

図12 各分割試料のセロトニンの減少

増強がみられた。対照生食液は収縮能の増強及び減少があまりみられず、大体一定の収縮能を維持した。

(3) 血漿蛋白分割試料のセロトニン測定

この分割試料のセロトニンを、(VI)と同様の方法でアセトン抽出し、ダイコクネズミ結腸で測定したのが図12である。全試料のセロトニンは保

存日数の経過につれて減少した。然し生食液のセロトニン量の減少は少く、他の蛋白分割とはかなり異なることがみられる。

(4) 小括及び考按

表2及び表3に示されておる如く、主分割がアルブミン及び γ -グロブリンであるFv及びFii-3には腸管収縮能の増強がないことより、アルブミン及び γ -グロブリンは本収縮物質の生成にはあまり関係がないことは明らかである。腸管収縮能の増強したFiv-1、Fiv-4の主分割は α -グロブリンであり、又Fii-IIIも α -グロブリンの相当量を含む。 β -グロブリンは腸管収縮能の増強したFiv-4、Fiv-1、Fii+IIIに含まれ、特にFii+IIIでは β -グロブリンが主分割であるが、腸管収縮能の増強しないFvの β -グロブリン量は、Fiv-1、Fiv-4の β -グロブリン量よりも僅かではあるが寧ろ多く含まれている。以上の事より、本収縮物質の生成には α -グロブリンが主に関係し血小板破壊産物が α -グロブリンに作用して、本収縮物質を作り出すものであると考えたい。

血中セロトニンは人体中では大体1時間半位ですべて交替する程代謝が速かなものとされている³⁰⁾。体内ではセロトニンはamine oxidase⁶⁾⁹⁾¹⁵⁾¹¹³⁾¹¹⁸⁾¹⁵³⁾によつて5-HIAA (5-Hydroxyindole acetic acid)の形となつて排泄される。amine oxidaseは体内に広く分布するが、血漿中にもamine oxidase そのものか、又はこれと類似した作用のあるものによつて、セロトニンは比較的速かに破壊され、不活性化されるものと考えられる。これに反して、生食液中にはこのような作用のある酵素は当然存在せず、為にセロトニンが比較的長く破壊されずに存在するものであると推測され、図11での生食液の維持している腸管収縮能は、セロトニンによるものと考えられるのである。

更に各Cohnの血漿蛋白分割を生食で溶解し血小板を加えないで4℃に保存し、2・4・6日後に血小板を加えて腸管収縮能を測定すると、いづれの分割でも何等腸管収縮能の増強を認めず、全例が減少の傾向を示した。Cohnの血漿蛋

白分割は乾燥状態にあれば非常に安定であるが、これが溶解されると不安定であり、凍結した血漿蛋白は -20°C に於てさえも徐々に変性するといわれている⁵⁸⁾。即ち血漿蛋白分割中の本収縮物質を作るに必要な因子は溶解状態では変性し、不活性化され、収縮物質が生成されなくなるのではないかと考えられる。これらの点を考えあわせると、血小板の破壊産物と血漿中の収縮物質を作る因子の作用機序は比較的早期に如まるものであり、しかもその増強はかなり緩徐なるものであると考えられる。以上によりこの収縮実験を行うためには、常に血小板を加える直前に分割を溶解することが必要である。

VIII. 平滑筋収縮物質についての考察

平滑筋を収縮させる物質は種々あるが、保存血血漿中に出現してくる可能性のあるものは、Gad-dum 等⁴⁰⁾のいう活性ポリペプチド (active polypeptides) の一群と、これ以外の一群に大別して考えられる。

(1) Active Polypeptides 以外の一群
この中でヒスタミン・アセチルコリン・アドレナリン・ノルアドレナリン及びセロトニンについては、既に述べた如く本物質と関係が少ないことを明らかにして来た。K⁺ は濃度によつて平滑筋収縮物質となり得るし、又これの血管作用²⁴⁾も

報告されている。保存血血漿中に遊離してくるK⁺は、殆んどが赤血球に由来するものである。即ち溶血又は赤血球の透過性亢進により赤血球中のK⁺は漸次血漿中に増加してくる²¹⁾¹⁰¹⁾¹⁰³⁾。(V)の分別6種試料の中、無有形成分血漿を除いた5種の試料のK⁺を、保存日数の経過につれて測定した。測定法は日立焰光光度計で外部標準法によつた¹⁵²⁾。

図13の如く、保存血血漿中には勿論 K⁺ は増加

表 4 Some Properties of Active Polypeptides

	Effect on blood-pressure	Other actions	Formed by	Inactivated by		
				Chymotrypsin	Trypsin	Pepsin
1. Vasopressin Pepsanurin	Rise 0	Antidiuretic	... Pepsin	+	+	0
2. Oxytocin Pepsitocin	Fall 0	Contracts uterus	... Pepsin	+	0	0
3. Cholecystokinin	...	Contracts gall bladder	...	...	...	...
4. Substance P	Fall	Contracts intestine	...	+	+	+
5. Kallinin Brady kinin Substance U Substance Z	Fall	Contracts uterus and intestine	Kallikrein Trypsin etc urine	+	0	...
6. Hypertensin (or Angiotonin) Pepsitensin	Rise		Renin Pepsin	+	+	+

するが、何等腸管収縮能の増強しない赤血球浮遊血漿でも同程度に K^+ は増加している。又収縮能の強く増強する血清及び血小板浮遊血漿では、何等 K^+ は増加しない。即ち腸管収縮能の増強と K^+ 濃度は平行せず、 K^+ は本収縮物質からは明らかに除外出来る。

アデノシン体 (adenosine compounds) の平滑筋に対する作用については、本邦に於ては藤田³⁶⁾の報告があり、保存血中のリン酸代謝については、吉川、中尾等⁹⁴⁾¹⁵¹⁾の精しい報告がある。リン酸代謝は赤血球が主で、血小板とはあまり関係がないものであるので、アデノシン体は本収縮物質とは考えにくい。

本収縮物質は血小板と α -グロブリンの相互作用によつて生じてくることから、Gaddum等のいう active polypeptides の一種と考えるには充分なる根拠が存在する。

(2) Active Polypeptides の一群

現在迄知られている active polypeptides を Gaddum⁴⁰⁾は一応まとめて、表4に示す如く薬理学的性質に従つて分類している。

Vasopressin は G. Oliver and E.A. Schäfer (1895) によつて、Oxytocin は H.H. Dale (1906) によつて、共に下垂体後葉ホルモンとして発見され、殊に Oxytocin は現在合成されるに至っている。

Cholecystokinin は A.C. Ivy and E. Oldberg (1928) によつて十二指腸粘膜層より、Substance P は腸管及び脳より U.S. Euler and J.H. Gaddum (1930)³²⁾によつて発見され、J.H. Gaddum and H. Schild (1934)⁴⁴⁾によつて Substance P と命名された。Cholecystokinin と Substance P との区別は不明で同一物質である可能性もあるといわれている。又 Substance P は血小板中にも存在する⁶⁷⁾。

Kallidin は E. Werle et al (1937)¹⁴⁵⁾¹⁴⁶⁾によつて、Bradykinin は M. Rocha e Silva et al (1949)¹⁰⁸⁾によつて発見された。これらは血漿中の α_2 -グロブリンに存在する Kallidinogen 又は Bradykinogen に対して、前者には Kallikr-

ein が、後者には Trypsin 又は Bothrops jararace の毒液が作用してそれぞれ Kallidin 及び Bradykinin が生じたものである。Substance U は W.T. Beraldo (1952)⁶⁾により発見され、尿中のある酵素が α_2 -グロブリンに作用して生じ、Substance Z は人尿中に存在することを、E. Werle and E.G. Erdös (1954)¹⁴⁸⁾が報告した。

Hypertensin (or Angiotonin) は J.M. Munoz et al (1939)⁹²⁾及び I.H. Page et al (1940)⁹⁹⁾によつて発見され、 α_2 -グロブリンに存在する Hypertensinogen に Renin が働いて生ずるといわれている。

Pepsanurin, Pepsitocin 及び Pepsitensin は、H. Croxatto et al (1942)¹⁷⁾及び M.E. Ellis et al (1949)²³⁾によつて報告されたが、いづれもペプシンが血漿 (α_2 -グロブリン) に作用して生じたもので、作用条件の違いで異なる性質のポリペプチドを生じたものと考えられている。

以上の他に、Jaques et al (1954)⁶⁹⁾¹¹²⁾は Common wasp (*Vespa vulgaris*) の毒液中に大量の Kinin を発見しており、これは Bradykinin や Kallidin とは違つたポリペプチドであり⁶²⁾、F.P. Gomes (1955)⁴⁶⁾は正常人尿中に、S.M. Hilton (1955)⁵⁵⁾⁵⁶⁾⁵⁷⁾は唾液と血漿の作用から生ずる Bradykinin 及び Kallidin に似たポリペプチドを夫々報告し、更に D. Armstrong et al (1957)⁵⁾は血漿が硝子表面に接触して生ずるポリペプチドを Pain Producing Substance として報告し、J. Margolis (1958)⁸⁷⁾はこれの生成の機構を詳細に発表している。

これらの数多いしかも複雑なポリペプチドについて、1957 6 月 Oxford で開かれた British Pharmacological Society で、J.H. Gaddum 等は血漿蛋白より生ずる Bradykinin に似たポリペプチドを一括して、Plasma Kinins⁸⁴⁾と命名するのが適当であるとしている。

(3) 小括及び考按

本物質の生成を考えると、Kallidin, Bradykinin 又は Hypertensin といった所謂 Plasma kinins の生成の如く、 α -グロブリンに~nog-

en という様な物質があり、血小板破壊産物の作用をうけて、~gen というような active polypeptide になり得ると考えても、理論的には充分可能性はあり得る。又 Kallidinogen に対する Kallikrein や, Bradykinogen に対する Trypsin 又は B. jararaca の毒液、更に Hypertensinogen に対する Renin の如き作用を、血小板破壊産物がするものと考えたい。詳細な不明であるが、血小板中に蛋白分解酵素が存在するとの報告もみられる¹⁵⁴⁾。

本物質を active polypeptides の一種と考え、この物質の性状を追究し、Gaddum 等の記載したそれと比較し、どのポリペプチドに類似するかを次の諸点から研究した。

IX. 本収縮物質の抽出

本収縮物質は後述の如く熱に極めて安定であるので、D. Armstrong et al (1957)⁵⁾の方法で煮沸除蛋白し、収縮物質を含む上清 (Protein-free aqueous extract of plasma) を得た。

抽出法 A : 保存血血漿 1 容に修正タイロド液 3 容を加え、時々振盪しながら煮沸浴槽中で 10 分間煮沸する。煮沸すると次第に凝固が起る。その後この混合物を流水で冷し、2 N 醋酸を加えて pH を 5 にし、3000 rpm で 30 分遠心する。この上清をとり、2 N 炭酸ソーダを加えて pH を 7.2 に戻す。この上清は直ちに剔出ダイコクネズミ結腸の収縮をみる事が出来て、原血漿の腸管収縮能の大体 1/4 即ち始めに稀釈した倍数に等しい腸管収縮能を示した。この上清を乾燥させると、収縮物質を得るが非常に粗製であり、且つ乾燥されるにつれて酸性に傾き、pH の調節が困難となる。

M. Rocha e Silva et al¹⁰⁸⁾が Bradykinin 抽出に用いたアルコール抽出法は、その後他のポリペプチドの抽出に多少の修正が加えられて踏襲されておる⁵⁾⁶²⁾。著者はこのアルコール抽出法によつて、本収縮物質の抽出を試みた。

抽出法 B : 煮沸した 2 容の純エタノールに保存血血漿の 1 容を滴下し、煮沸浴槽中で 5 分間煮沸した後流水中で冷却し、3000rpm で 30 分遠心する。上清を 70℃以下でヘアドライヤーで乾燥した

後、少量の蒸溜水で溶かし再び 3000 rpm で 30 分遠心して不溶性部分を除去した。上清を再び乾燥した後エーテル及びアセトンにて洗滌した後乾燥した。こゝで得られた乾燥抽出物質は、やゝ泥状の淡黄色物質であつて、本法によるこの物質の抽出 recovery は 30~35% であつた。未だ粗製物質 (Crude Substance) ではあつたが、この抽出物質を使用して、次に述べる本収縮物質の生化学的性質を検討した。

X. 本収縮物質の生化学的性質

active polypeptides の各々の鑑別は、生化学的には収縮物質の蛋白酵素による不活性化、熱耐性、透析性等によつて行われている。

(1) 蛋白分解酵素による不活性化

キモトリプシン^{註1)}、トリプシン^{註2)}、及びペプシン^{註3)}の 3 種類の酵素を使用し、本収縮物質の不活性化を検討した。試料をキモトリプシンとトリプシンに対しては 0.1 N NaOH で pH を 8 に、ペプシンに対しては 0.1 N HCl で pH を 2 に調整して、10mg/ml の割に各酵素を加え、38℃で 4 時間作用させた後、0.1 N HCl 及び 0.1 N NaOH

表 5 蛋白分解酵素による本収縮物質の不活性化

	保存 日数	試 料	キモト リプシ ン	トリプ シン	ペプシ ン
	11	全血血漿	±	+	—
	18	〃	+	—	—
	24	〃	+	±	±
	25	〃	+	+	—
	26	〃	+	+	—
	26	〃	+	—	—
	27	〃	+	+	—
	30	〃	+	—	±
	36	〃	+	+	±
分別保 存試料	21	全血血漿	+	±	—
		血小板浮遊血漿	+	+	—
		血 清	+	+	—
	21	全血血漿	+	+	—
		血小板浮遊血漿	+	+	—
		血 清	+	+	—
	21	全血血漿	+	±	+
		血小板浮遊血漿	+	±	+
		血 清	+	±	+

で逆にpHを7.2に戻し、原試料の10倍になるように修正タイロッド液を加えて、剔出ダイコクネズミ結腸の収縮を測定した。又酵素を加えないで同じ操作を行うものを対照として比較した。こゝでキモトリブシンで不活性化されることがポリペプチドの最大特徴とされている。

最初試料として抽出操作を加えない保存血漿及び(V)の分別試料の中、腸管収縮能を増強した全血血漿、血小板浮遊血漿及び血清で、被酵素作用を検討した。

表5に示した如く、キモトリブシンでは全部不活性化されたが、トリブシンによつては全く態度が不定であり、ペブシンでは大体不活性化されない。なお対照は腸管収縮力に全く変化を来さなかつた。

酵素による不活性化の検討では、酵素自身も、又作用を受ける物質も極めて純粋でないと結果が一様でなく判定に苦しむと Gaddum は述べている。特にトリブシン及びペブシンの場合には対照より収縮が強い場合もあつて、前述の **Bradykinin** や **Pepsitensin** 等の生因から考えて、トリブシン又はペブシンによつて、これらの物質が更に生じたとも考えられる。故に抽出法Bによつて得た抽出物質について、被酵素作用を検討した。抽出物質をその **recovery** より逆算して原血漿と同じ収縮力になるように修正タイロッド液にとかし、これについて前述と同じように酵素を作用させると、図14にみられるごとく、キモトリブシン、トリブシンでは不活性化され、ペブシンでは不活性化されなかつた。

(2) 熱耐性

active polypeptides はpH中性附近では一般に熱に対して安定性であるといわれている。保存血漿及び抽出法Bによつて得た抽出物を修正タイ

図14 蛋白分解酵素による本収縮物質の不活性化キモグラム

ロッド液に稀釈又は溶解して煮沸浴槽中に入れ、時間の経過を追つて剔出ダイコクネズミ結腸の収縮能を測定した。抽出物の方は4時間位で初めて収縮能の減少がみられた。即ち4時間位で漸次破壊され始めるのであつて、熱に対しては安定であるといえる。血漿の方は6時間位で初めて破壊されていつて、この遅れは血漿蛋白の熱保護作用によるものであると考えられる。

(3) 透析性

抽出物Bによつて得た抽出物につき、大東セロファン No. 300 (厚さ18.7/1000mm) のセロファンで透析性をしらべた。抽出物を修正タイロッド液に溶解してセロファンに入れ、この試料の10倍量の同じ修正タイロッド液中に浸し、4℃に保存してセロファン内外液で剔出ダイコクネズミ結腸の収縮を測定した。4時間では未だ透析されず、24時間で内外液の収縮が等しくなつてくる。即ち緩徐に透析されることが証明される。又この透析性を利用して抽出物質を更に純粋化することも可能である。

(4) ペーパークロマトグラフィ

抽出法Bによつて得た抽出物を少量の蒸留水に溶かし、移動度(Rf)を検討した。展開液は **n-butanol-acetic acid-water** (4:1:5), 濾紙は東洋濾紙 No. 51を使用し、下降法で先端が30cm移動する程度に室温で展開せしめた。原点から3cm間隔で濾紙を切りとり、各細片を夫々修正タイロッド液の中に入れ4℃で一晝夜保存して抽出し、剔出ダイコクネズミ結腸の収縮を測定した。

図15に示された如く、原点部の細片にのみ強い

註 1) キモトリブシン (Chymotrypsin) : 持田製薬株式会社の結晶キモトリブシン及び Nutritional Biochemicals Corporation, Cleveland Ohio の Chymotrypsin を使用。

註 2) トリブシン (Trypsin) : Merck Compay製を使用

註 3) ペブシン (Pepsin) : //

図15 本収縮物質の移動度キモグラム

収縮を起し、他の細片では何等収縮を起さない。即ち Rf は殆んど零である。比較する為にセロトニンで同じく検討してみると、 $Rf = 0.45$ であった。

(5) 小括及び考按

以上のことより本収縮物質の生じ方及び生化学的性質より考察すると、本収縮物質は Gaddum 等のいう active polypeptides のどれと最もよく類似しているのであろうか。(Ⅷ)で述べた如く、本物質の生因から所謂 Plasma Kinin に属するものであると考えたい。この生因から本物質は既に Vasopressin, Oxydocin, Cholecystokinin 及び Substance P とは異なる。Vasopressin 及び Oxytocin の如き下垂体後葉ホルモンが増加することは理論的にも考え難く、更に Oxytocin は非透析性である点からも本物質とは異なる。Cholecystokinin, Substance P については、Cholecystokinin は未だ物質として取り出されていなくて、生化学的性質は不明であるが、Substance P とは

同一物質ともいわれており、Substance P はペプシンで不活性化されることより本物質とは異なる。Pepsitensin, Pepsitocin 及び Pepsanurin は、生因からは Plasma Kinin に属するが未だ不明の点が多く、比較するに困難であるので一応除外した。又 Hypertensin も生因からは Plasma Kinin に属し、本物質の生成に類似しているがペプシンによつて不活性化されることより本物質とは異なるものと考えられる。

Kallidin, Bradykinin, Substance U 及び Substance Z の一群は、お互に非常によく類似し全部同一物質ともいわれているが、中でも特に Kallidin と Bradykinin は現在同一物質であるとする説⁶²⁾¹⁴⁷⁾の方が有力であるので、代表的な Bradykinin と本物質の生化学的性質を表 6 に示した如く比較した。

Bradykinin は酵素による不活性化については、トリプシンによつて不活性化されるとの説もあり、ペプシンによつては不活性化されないとされている。又ペーパークロマトグラフィーでは、Holdstock et al⁶²⁾によれば $Rf = 0.35$ という値を報告しているが、Rocha e Silva et al¹⁾によれば Rf 値は純度により異り純度が高くなれば Rf も大きくなり、 $Rf = 0 \sim 0.52$ であるとしている。以上により本収縮物質は、生化学的性質から Bradykinin に類似していることがわかるのである。更に本物質を明らかにするためには、薬理的性質についての研究が不可欠である。例えば血圧作用²⁰⁾及び毛細血管透過性作用⁶²⁾⁸⁸⁾等であるが、これら実験には試料が純粋でなければならず、この点に於て本物質の抽出物質が未だ純粋でないので

表 6 本収縮物質と Bradykinin の生化学的性質の比較

	生 成	酵素による不活性化			熱耐性	透析性	移動度 ()
		キモトリプシン	トリプシン	ペプシン			
本収縮物質	← α -グロブリン+血小板	+	+or—	—	+	+	0
Bradykinin	← α -グロブリン+Trypsin or Venom of B. jaravala	+	+or—	—	+	+	0~0.52 (純度による)

行つてはいない。

大伏在静脈内頸部から剔出した人静脈の収縮をみておるが、これがそのまま生体内の他の種々の血管にあてはまるとは簡単に考えられないのは勿論である。active polypeptides の末梢血管に対する作用は色々であるが、Bradykinin, Kallidin等は末梢血管には拡張性に働くといわれている³⁴⁾。(Ⅲ)の剔出人静脈の実験では、ヒスタミン、セロトニン、ノルアドレナリンは強い収縮を示した。然しヒスタミンは毛細血管を拡張することは衆知のことであり、又最初 Vasoconstrictor として発見されたセロトニンは、その後血管部位、使用量、動物の種類及び麻酔の方法等によつて相異が大きく⁴⁾⁴⁹⁾⁹⁸⁾¹⁰⁹⁾¹¹¹⁾、血管収縮作用と拡張作用の二相性を呈するとされている。F.J. Had- dy et al (1957)⁵⁰⁾はセロトニンは大血管は収縮、小血管は拡張することさえ主張している。又セロトニンは毛細血管を拡張し、毛細血管の透過性を増加するといわれている¹²⁰⁾。故に本収縮物質は局所的には輸血部位の静脈壁平滑筋に働いてこれを収縮させ、全身的にも毛細血管に対して拡張的に働くのではないとも考えられているのである。但し通常の手術時に使用される保存日数の比較的短い保存血の輸血量では、受血者体内中の血液で本物質は稀釈され、毛細血管の著明な拡張を起すには至っていないのであろう。保存血輸血時の最大欠点の一つとして、原因について未だ結論のでていない保存血大量輸血による出血傾向の問題がある。今迄にわかっている如く血小板やその他の血液凝固因子の減少による因子は勿論であるが、毛細血管収縮不全の一因に本物質が何かの役割をはたしていないだろうか、興味ある問題であると考えらる。

XI. 保存血流入速度遅延の対策

保存血血漿中の収縮物質の生じ方は、保存血中に血小板が崩壊し、この崩壊した血小板が酵素的に血漿蛋白(α -グロブリン)に作用して収縮物質であるポリペプチドを作るわけである。故に血小板の崩壊を少くすれば本収縮物質の生じ方は少くなるものと考えられ、特に(Ⅶ)に述べた如く

血小板破壊産物と α -グロブリンの結合が早くなければ、収縮物質の生じ方は更に少いと推定される。保存血中の血小板の崩壊は、採血時並びに保存3日目で既に $\frac{2}{3}$ 以上の減少がみられるとされている¹⁹⁾⁴⁷⁾⁷¹⁾⁷⁸⁾⁷⁹⁾⁹³⁾。これに対して nonwettable surface 採血壺使用のACD加保存血は、血小板の崩壊が少いとされておる。J.L. Tullis¹³⁵⁾はある一部の血小板は、赤血球や白血球よりも寧ろ長く保存されているときえいつている。故に採血時並びに保存中の血小板破壊を出来るだけ少くする為に、(Ⅴ)に述べた如くシリコン処理した採血壺に、ポリエチレンチューブを通して重力法で静かに採血した。同時に同じ供血者より普通採血壺に採血し、これらの20組の血液を4℃に保存して、手術時に同一患者に於いて両者の流入速度を比較した。両者保存血の凝固物は8枚重ねのガー

図16 シリコン壺及び普通壺採血保存血の流入速度の比較

ぜでイルリガートル中に濾し、大伏在静脈内頸部より輸血針又は静脈切開後カテーテルを挿入して輸血し、流入速度測定時は、イルリガートルの高さは終始同じ高さに保たした。この保存血輸血の前には予め対照として、生食又は新鮮血で流入速度を測定した。図16に示すごとく、対照の生食又は新鮮血で既に流入速度の非常に遅い例があり、従つてシリコン壺採血の保存血でも流入速度が遅い例もあつたが、これは血管の細い皮下脂肪の多い高年の女性に多くみられた。全体にシリコン壺の方が普通壺に比較して、全例とも流入速度がはるかに速かつた。即ち保存血流入速度遅延の対策と

図17 シリコン壘及び普通壘保存血血漿の剔出ダイコクネズミ結腸収縮能キモグラム

してシリコン壘で採血し保存する本法は有効であると思われる。

更に両者血漿の剔出ダイコクネズミ結腸の収縮能を比較すると、全例に於いてシリコン壘の方は普通壘の方よりも収縮能が5～10倍位も弱く、明らかに腸管収縮物質の産生が少い。図17は保存日数10日の例を示したものである。なお両者血漿によるこの二つの臨床実験とダイコクネズミ結腸収縮実験より、保存血血漿中に生じて来る本収縮物質による人静脈とダイコクネズミ結腸の収縮は、平行することが逆に証明されるものと思われる。

両者保存血の血小板数については、保存中に血小板、白血球及び赤血球が相互に粘着し合つて凝塊を作り、その算定は困難であつて不正確になることは止むを得ない。シリコン壘では平均 36,000、普通壘では平均 19,000 位で、大体シリコン壘で2倍多く維持されている様である。然し正常では25～40万ある血小板が普通壘の方では勿論、シリコン壘でも激減しているの、単に血小板の壊れ方がシリコン壘の方でやゝ普通壘に較べて少い位では、本現象の原因は充分に説明出来ない。シリコン壘と普通壘の血小板数は、例えば3週間後では両者の差は少くなるが、採血直後及び保存初期にはかなり差があつて、普通壘では遙かに多く破壊されていると考えられるわけである。即ち(VII)に述べた如く、本物質がどの様に出来るかは採血後比較的早期にその運命がきまり、後はそれが次第に増強されて行くものと考えられるのである。

XII. 総括及び考按

保存血流入速度遅延現象の原因については、従来種々の説が報告されており、これらはいずれも物理的乃至機械因子に着眼しておるのみであつたが、星川が保存血血漿中に輸血部位の静脈を収縮させる血管収縮物質が生じこれが本現象の主因であろうと推定した。著者はこの推定にもとづき、保存血自体の性状の変化に着眼して本現象を追究して、保存血血漿中に血管収縮物質が生じて来ることを明らかにし、更にこの収縮物質の生成、性質並びにこの保存血流入速度遅延の臨床的対策等を検討した。

まず保存血血漿は新鮮血血漿と違つて、剔出人静脈を強く収縮することを実証し、保存血血漿中には血管壁平滑筋の能動的収縮を起す血管収縮物質が存在することを確認した。又保存血血漿は新鮮血血漿と違つて剔出ダイコクネズミ結腸をも剔出人静脈の場合と同様に強く収縮することを見出した。即ち本収縮物質の平滑筋作用は、更に(V)及び(XI)に於いても述べた如く、人静脈とダイコクネズミ結腸に対してはほぼ平行するものであつて、本収縮物質の研究を行つていく上に、平滑筋材料として剔出ダイコクネズミ結腸を使用して検討し得るわけで、且つ定量的測定も血管と較べて容易に可能である。

保存血血漿中に生じ得る平滑筋収縮物質は、**active polypeptides** の一群と、これ以外の一群とに大別して考えられるのである。後者の一群をまず考察すると、アドレナリン、ノルアドレナリン、ヒスタミン及びアセチルコリンについては、剔出ダイコクネズミ結腸の特性並びに灌流液中に加えられたアトロピンの実験条件によつて、いづれも本収縮物質とは区別され得た。K⁺は保存血血漿中に次第に増加するが、(V)の血液成分分別試料のそれを焰光光度計で測定した結果、K⁺の増加と腸管収縮能の増強とは平行関係が見出されないことより、本収縮物質ではないことが証明出来る。血管収縮物質としてよく知られているセロトニンについては、分光螢光測定法並びに剔出ダイコクネズミ結腸を使用した生物学的測定

法によつて実測した結果、保存血血漿中のセロトニンは寧ろ減少し、更に(V)の血液成分別試料及び(VIII)の血漿蛋白分劃試料の中で、腸管収縮能の増強した試料のセロトニンはいづれも全部減少し、更にLSDによつて本収縮物質の腸管収縮作用は阻止されないことより、本収縮物質はセロトニンでないことは更に明らかである。

本収縮物質の生成は(V)の血液成分別試料並びに(VII)の血漿蛋白分劃試料の実験より、血小板破壊産物が酵素的に血漿蛋白の中の主として α -グロブリンに作用して生ずるものと考えられるが、この生成及び本収縮物質の蛋白分解酵素による不活性化、熱耐性、透析性及びペーパークロマトグラフィーの移動度等の生化学的性質より、本収縮物質はBradykinin及びKallidinに類似したactive polypeptidesの一種と考えられる。更に本収縮物質の性質を明らかにするためには、薬理的性質例えば血圧作用及び毛細血管透過性作用等についての検討が必要であるが、これらの実験には試料が純粋でなければならず、著者の得たアルコール抽出物質を更に純粋化する必要がある。

最後にこの保存血流入速度遅延の対策として、シリコン処理採血壺の使用が有効であることを述べたが、これはシリコン処理壺の保存血の方が対照の普通壺のそれに較べて、血小板の破壊が少く保存されていることによるのは勿論であるが、特にシリコン壺が血小板の採血後短時間の破壊を可及的に少くすることにその意義があるものと考えられる。即ち本収縮物質の生成機序は(VII)に述べた如く、血小板破壊産物と α -グロブリンを中心とする血漿蛋白の結びつきが保存中の比較的早期に行われ、以後徐々に本収縮物質の生成を増強するものと考えられるからである。最近諸外国ではガラス採血壺に代つて、プラスチックバッグの使用が増えて来たが、この点からも実用的に有効であると考えられる。

XIII. 結 論

保存血流入速度遅延の現象について、臨床的並びに実験的に研究し、保存血血漿中に血管収縮物

質を生じて来ることがその原因であることを見出し、この収縮について次の諸点を明らかにした。

1) 保存血血漿は剔出人静脈を収縮し、又ダイコクネズミ結腸をも収縮させる。

2) 保存血血漿中のこの収縮物質は、 K^+ 、ヒスタミン、アドレナリン、ノルアドレナリン、アセチルコリン及びセロトニンなどではない。

3) この収縮物質は、破壊された血小板が α -グロブリンを中心とする血漿蛋白分劃に作用して生じたactive polypeptidesの一種で、生化学的性質からはBradykinin又はKallidinに類似していると考えられる。

4) アルコール抽出法で、保存血血漿よりactive polypeptideとして黄色の粗製物質を抽出した。

5) この収縮物質の生成を少くするためには、シリコン処理壺で採血するのが有効なる一法であつて、臨床的にかなり満足すべき結果を得た。

本研究は東宮待医星川光正博士、東大輸血部遠山博博士との協同による処多く、尚教室主任清水健太郎教授及び石川浩一助教授、生化学教室紺野邦夫博士、手塚統夫学士、栄養学教室中尾真博士、東大物性研究所牧島研究室助手軋津武工学博士、当教室宮川静一郎学士並びに森岡泰彦学士等から多大の御助力を賜つた。ここに深く感謝する次第である。

文 献

- 1) Andrade, S.D., Diniz, C.R. & Rocha e Silva, M.: Arch. int. Pharmacodyn. 95 : 100, 1953.
- 2) Amin, A.H., Crawford, T.B.B. & Gaddum, J.H.: J. Physiol. 126 : 596, 1954.
- 3) Appelt, W.W. & Ederstrom, H.E.: Angiology, 10 : 153, 1959.
- 4) Armstrong, D., Dry, R.M.L., Keele, C.A. & Markham, J.W.: J. Physiol. 117 : 701, 1952.
- 5) Armstrong, D., Jepson, J.B., Keele, C.A. & Stewart, J.W.: J. Physiol. 135 : 350, 1957.
- 6) Beraldo, W.T.: Amer. J. Physiol. 171 : 371, 1952.
- 7) Bigelow, F.S.: J. Lab. Clin. Med. 43 : 759, 1954.
- 8) Blashko, H.: Pharmacol. Rev. 4 : 415, 1952.
- 9) Blashko, H. & Hope, D.B.: J. Physiol. 122 : 419, 1953.
- 10) Bowman, R.L., Caufield, R.A. & Udenfriend, S.: Science, 122 : 32, 1955.

- 11) Brecher, G. & Cronkite, E.P.: The Coagulation of Blood, Methods of Study. Chapter V Blood Platelets p. 41.
- 12) Cerletti, A. & Rothlin, E.: Nature 176 : 785, 1955.
- 13) Cohn, E.J., Strong, L.E., Hughes, W.L., Mulford, D.J., Ashworth, J.N., Melin, M. & Taylor, H.L.: J. Amer. Chem. Soc. 62 : 3396, 1940.
- 14) Cohn, E.J. et al.: J. Amer. Chem. Soc. 68 : 459, 1946.
- 15) Corne, S.J. & Graham, J.D.P.: J. Physiol. 135 : 339, 1957.
- 16) Correale, P.: J. Neurochem. 1 : 22, 1956.
- 17) Croxatto, H. & Croxatto, R.: Science, 95 : 101, 1942.
- 18) Dalgiesch, C.E., Toh, C.C. & Work, T.S.: J. Physiol. 120 : 298, 1953.
- 19) De Gowin: Blood Transfusion p. 309, 1949.
- 20) Dekanski, J.: Brit. J. Pharmacol. 9 : 187, 1954.
- 21) Denstedt, O.F.: Blood Cells & Plasma Protein, Tullis, T.L. 編集, Academic Press. 1953.
- 22) Dodd, W.A. & Daniel, E.E.: Circulation Res. 8 : 451, 1960.
- 23) Ellis, M.E. & Grollman, A.: Endocrinology 44 : 415, 1949.
- 24) Emanuel, D.A., Scott, J.B. & Haddy, F.J.: Amer. J. Physiol. 197 : 637, 1959.
- 25) Erspamer, V.: Arch. exp. Path. Pharmacol. 196 : 343, 1940.
- 26) Erspamer, V.: Acta pharmacol. 4 : 213, 1948.
- 27) Erspamer, V.: Arch. int. Pharmacodyn. 93 : 293, 1953.
- 28) Erspamer, V.: Naturwissenschaften 40 : 318, 1953.
- 29) Erspamer, V.: J. Physiol 127 : 118, 1955.
- 30) Erspamer, V.: J. Physiol 133 : 1, 1956.
- 31) Erspamer, V. & Asero, B.: Nature 169 : 800, 1952.
- 32) Euler, U.S. & Gaddum, J.H.: J. Physiol. 72 : 74, 1930.
- 33) Fänge, R.: Experientia 11 : 156, 1956.
- 34) Fingl, E. & Gaddum, J.H.: Fed. Proc. 12 : 320, 1953.
- 35) Frederick, S. & Bigelow, M.D.: J. Lab. Clin. Med. 43 : 759, 1954.
- 36) 藤田 : 日薬理誌, 50 : 173, 1954.
- 37) Furchgott, R.F. & Bhadrakom, S.: J. Pharmacol. exp. Therap. 108 : 129, 1953.
- 38) Gaddum, J.H.: J. Physiol. 119 : 363, 1953.
- 39) Gaddum, J.H.: J. Physiol. 121 : 15, 1953.
- 40) Gaddum, J.H.: Polypeptides which stimulate plain muscle E & S Livingstone LTD. Edin. and Lond. 1955.
- 41) Gaddum, J.H. & Hameed, K.A.: Brit. J. Pharmacol. 9 : 240, 1954.
- 42) Gaddum, J.H. & Paasonen, M.K.: Brit. J. Pharmacol. 10 : 474, 1955.
- 43) Gaddum, J.H., Peart, W.S. & Vogt, M.: J. Physiol. 108 : 467, 1949.
- 44) Gaddum, J.H. & Schild, H.: J. Physiol. 83 : 1, 1934.
- 45) Gardner, F.H., Howell, O. & Hirsch, E.O.: J. Lab. Clin. Med. 43 : 196, 1954.
- 46) Gomes, F.P.: Brit. J. Pharmacol. 10 : 200, 1955.
- 47) Gross, R. & Staufenberg, E.: Klin. Wschr. 34 : 142, 1956.
- 48) Gurevitch, J. & Nelken, D.: Blood 11 : 924, 1956.
- 49) Haddy, F.J., Gordon, P. & Emanuel, D.A.: Circulation Res. 7 : 123, 1959.
- 50) Haddy, F.J., Fleishman, M. & Emanuel, D.A.: Circulation Res. 5 : 247, 1959.
- 51) Hardisty, R.H. & Stacey, R.S.: J. Physiol. 130 : 711, 1955.
- 52) Helmer, O.M.: Amer. J. Physiol. 188 : 571, 1957.
- 53) Helmer, O.M.: J. Lab. Clin. Med. 50 : 737, 1957.
- 54) Heymans, C. & Bouckaert, J.J. & Moraes, C.: Arch. int. Pharmacodyn. 43 : 468, 1953.
- 55) Hilton, S.M. & Lewis, G.P.: J. Physiol. 128 : 235, 1955.
- 56) Hilton, S.M. & Lewis, G.P.: J. Physiol. 134 : 471, 1956.
- 57) Hilton, S.M. & Lewis, G.P.: J. Physiol. 144 : 532, 1958.
- 58) 平井等 : 電気泳動法—理論と医学の応用 126.
- 59) Hirose, K.: Arch. intern. Med. 21 : 604, 1918.
- 60) Hirsch, E.O. & Gardner, F.H.: J. Lab. Clin. Med. 31 : 638, 1952.
- 61) Hirsch, E.O. & Gardner, F.H.: J. Lab. Clin. Med. 39 : 556, 1952.
- 62) Holdstock, D.J., Mathias, A.P. & Schachter, M.: Brit. J. Pharmacol. 12 : 149, 1957.
- 63) 星川 : 日外会誌, 54 : 265, 昭28.
- 64) 星川 : 血液と輸血, 2 : 4, 昭31.
- 65) 星川等 : 第15回日本医学会総会会誌. 502 1959.
- 66) Humphrey, J.H. & Toh, C.C.: J. Physiol. 124 : 300, 1954.
- 67) Humphrey, J.H. & Jaques, R.: J. Physiol. 124 : 305, 1954.

- 68) Janeway, T.C., Richardson, H.B. & Park, E.A.: Arch. intern. Med. 21 : 565, 1918.
- 69) Jaques, R. & Schachter, H.: Brit. J. Pharmacol. 9 : 53, 1954.
- 70) Jesovier, H.S., Lipson, H.I. & Brookly, N. Y.: Amer. Heart. J. 49 : 770, 1955.
- 71) 加藤: 輸血学, 247, 昭26.
- 72) 川野: 血液と輸血, 5 : 147, 1958.
- 73) Keller, R.: Experientia 13 : 112, 1957.
- 74) Keyns, G.: Blood Transfusion 388, The Technique of Blood Transfusion
- 75) 木村: 内科, 2 : 283, 昭33.
- 76) Knox, W.E., Colowick, S.P. & Kaplan, N.O. Methods in Enzymology, Vol. II. Academic Press, New York, 289, 1955.
- 77) 小林等: 濾紙電気泳動法の実際, 南江堂, 1956.
- 78) Kolmer, J.A.: Amer. J. med. Sci. 197 : 442, 1939.
- 79) Kolmer, J.A. & Howard, M.: Amer. J. med. Sci. 200 : 311, 1940
- 80) Ladua, J.A. & Awapara, J.: Science. 109 : 385, 1949.
- 81) Langemann, H. & Kägi, J.: Klin. Wschr. 34 : 237, 1956.
- 82) Langemann, H. & Kägi, J.: Klin. Wschr. 34 : 287, 1956.
- 83) Leonard, E.: Amer. J. Physiol. 189 : 185, 1957.
- 84) Lewis, G.P.: J. Physiol. 140 : 285, 1958.
- 85) Lozner, F.U. & Taylor, F.H.L.: J. Clin. Invest. 21 : 241, 1942.
- 86) Luduena, F.P. & Brown, T.G.: J. Pharmacol. exp. Therap. 105 : 232, 1952.
- 87) Margolis, J.: J. Physiol. 144 : 1, 1958.
- 88) Miles, A.A. & Miles, E.M.: J. Physiol. 118 : 228, 1952.
- 89) 宮本等: 濾紙電気泳動シンポジウム第1集
- 90) Mollison, P.L.: Blood Transfusion in Clinical Medicine, 2nd. edn. p. 286.
- 91) 森田等: 最新医学, 11 : 156, 昭31.
- 92) Munoz, J.M., Braun-Menéndez, E., Fasciolo, J.C. & Leloir, L.F.: Nature 44 : 980, 1939.
- 93) Mustard, J.F.: Brit. J. Haemat. 2 : 17, 1956.
- 94) 中尾等: 生化学, 31 : 526, 1959.
- 95) Neustrup, N. & Milowsky, J.: N.Y. St. J. Med. 51 : 2520, 1951.
- 96) O' Kane, D.E. & Gunsalus, I.C.: J. Biol. Chem. 170 : 425, 1947.
- 97) Page, I.H.: Amer. Heart. J. 23, 336, 1942.
- 98) Page, I.H.: Physiol. Rev. 34 : 563, 1954.
- 99) Page, I.H. & Helmer, O.H.: J. exp. Med. 71 : 29, 1940.
- 100) Pare, C.M.S., Sandler, M. & Stacey, P.S.: Lancet, 1 : 550, 1957
- 101) Pranker, T.A.J.: Biochem. J. 64 : 209, 1956.
- 102) Pand, M. & Reid, G.: Nature 168 : 385, 1951.
- 103) Rapoport, S.: J. Clin. Invest. 26 : 591, 616, 629, 1947.
- 104) Rapport, M.M., Green, A.A. & Page, I.H.: Science, 108 : 329, 1948.
- 105) Rapport, M.M., Green, A.A. & Page, I.H.: J. Biol. Chem. 74 : 735, 1948.
- 106) Rapport, M.M., Gren, A.A. & Page, I.H.: J. Biol. Chem., 176 : 1237, 1948
- 107) Rapport, M.M., Green, A.A. & Page, I.H.: J. Biol. Chem. 176 : 1243 (1948)
- 108) Rocha e Silva, M., Beraldo, W.T. & Rosenfeld, G.: Amer. J. Physiol. 156 : 261, 1949.
- 109) Roddie, I.C., Shepherd, J.T. & Whelan, R. F.: Brit. J. Pharmacol. 10 : 445, 1955.
- 110) Rosenthal, A.: Chirurg. 23 : 411, 1952.
- 111) Rudolph, A.M. & Paul, M.H.: Amer. J. Physiol. 189 : 263, 1957.
- 112) Schachter, M. & Thain, E.M.: Brit. J. Pharmacol. 9 : 1954.
- 113) Schayer, R.W., Wu, K.Y.T., Smiley, R.L. & Kobayashi, Y.: J. Biol. Chem. 210 : 259, 1954.
- 114) Schneider, H.: Med. Klin. 41 : 1086, 1951.
- 115) Shaw, E. & Wolley, D.W.: J. Biol. Chem. 203 : 979, 1953.
- 116) 浅沢: 日本臨牀, 15 : 56, 昭32.
- 117) Shimizu K., Takayama, R., Tohyama, H. & Hoshikawa, M.: Proc of 8th Congress of the International Society of Blood Transfusion (in the press)
- 118) Sjoerdsma, A., Smith, T.E., Stevenson, T. D. & Udenfriend, S.: Proc. Soc. exp. Biol. Med, 89 : 36, 1955.
- 119) Snow, P.J.D., Lennard-Jones, J.E., Curzon, G. & Stace, y, R.S.: Lancet ii: 1004, 1955.
- 120) Sollero, L., Page, I.H. & Salmoraghi, G.C.: J. Pharmacol. exp. Therap. 117 : 10, 1956.
- 121) Spector, W.G. & Willoughby, D.A.: Nature 179 : 318, 1957.
- 122) Stefanini, M., Chatterjea, J.B., Dameshek, W., Zannos, L. & Santiago, E.P.: Blood 7 : 53, 1952.
- 123) Stowe, B.B. & Thiaman, K.V.: Arch. Biochem-Biophys. 51 : 499, 1954.
- 124) Supek, Z. & Milkovis, S.: Experientia 12 : 71, 1956.
- 125) 高山等: 日輸会誌, 6 : 313, 昭35.
- 126) 田仲等: 京府医大誌, 55 : 87, 昭29.
- 127) Thompson, E.C.C., Hardwick, D.C. & Wise-

- man, J.H.: J. Physiol. 140 : 10, 1958.
- 128) Tobian, L., Martin, S. & Eiler, S.: Amer. J. Physiol. 196 : 998, 1959.
- 129) Tocantins, L.M.: Arch. Path. 23 : 850, 1937.
- 130) Tocantins, L.M.: Blood 1 : 156, 1946.
- 131) Toh, C.C.: J. Physiol. 126 : 248, 1954.
- 132) 徳沢等 : 日輪会誌, 5 : 240, 昭34.
- 133) Tullis, J.L.: Blood 7 : 891, 1952.
- 134) Tullis, J.L.: Blood, 8 : 563, 1953.
- 135) Tullis, J.L.: Amer. J. med. Sci, 226 : 191, 1953.
- 136) Twarog, B.M. & Page, I.H.: Amer. J. Physiol. 175 : 157, 1953.
- 137) 上田等 : 臨床検査法, 第2版, 321.
- 138) Udenfriend, S., Weissbach, H. & Clark, C. T.: J. Biol. Chem. 215 : 337, 1955.
- 139) Udenfriend, S., Bogdanski, D.F. & Weissbach, H.: Science 122 : 972, 1955.
- 140) Udenfriend, S., Weissbach, H. & Brodie, B. B.: Methods of Biochemical Analysis, Vol. 6. 110 Edited by David Glick,
- 141) Vane, J.R.: Brit. J. Pharmacol. 12 : 344, 1957.
- 142) Welsh, J.H.: Arc. exp. Path. Pharmacol. 219 : 23, 1953.
- 143) Welsh, J.H.: Nature, 173 : 955, 1954.
- 144) Welsh, J.H. & Taub, R.: Biol. Bull, 95 : 346, 1948.
- 145) Werle, E., Götz, W. & Keppler, A.: Biochem. Z. 289 : 217, 1937.
- 146) Werle, E. & Berek, U.: Biochem. Z. 320 : 217, 1937.
- 147) Werle, E. & Berek, U: Biochem. 320 : 372, 1950.
- 148) Werle, E. & Erdös, E.G.: Arch. exp. Path. Pharmacol. 223 : 234, 1954.
- 149) Wildy, P. & Riddley, M.: Nature, 182 : 1801, 1958.
- 150) Wolley, D.W. & Shaw, E.: J. Amer. Chem. Soc, 74 : 2948, 1952.
- 151) 吉川等 : 医学のあゆみ, 29 : 204, 1959.
- 152) 吉川 : 臨床医化学, I 実験篇. 421, 昭34.
- 153) Zeller, E.A., Barsky, J. & Berman, E.R.: J. Biol. Chem. 214 : 267, 1955.
- 154) Zucker, M.B. & Borrelli, J.: Ann. N.Y. Acad. Sci. 75 : 203, 1958.
-