プリン誘導体の凝血促進作用について (続)

—免疫性溶血に及ぼす影響—

関西医科大学微生物学教室 (大沢 忍教授)

人 見 正 博

Blood Coagulation Activity of Purine Derivatives. Especially on the Relationship Between the Clotting Activity and the Inhibitory Activity to the Immun Haemolysis of the Derivatives.

Masahiro Hitomi

Department of Microbiology, Kansai Medical School, (Supervised by Prof. S. Osawa, M.D.)

It has previously been reported that the administration of purine derivatives showed the accerelating effect of blood coagulation in the rabbit, and that the proper quantity of these compounds required to give the certain action was 5-10mg/kg body weight. Whereas it has been known that these compounds showed the inhibition of complement activity.

In this paper, in order to investigate quantitatively the anticomplement activity of the purine derivatives, the 50 per cent inhibitory concentration of guinea pig complement was determined in the presence of sensityzed sheep red cells.

The 50 percent inhibitory concentrations of coffeine and theophylline were 2mg/cc and 8mg/cc respectively, but the other compounds in these derivatives such as theobromine, xanthine, hypoxanthine, adenine or guanine all failed to inactivate the complement, when used in higher concentration, 1mg/cc or more than, as possible as dissolve at pH which does not influence inconveniently to the haemolysis. While the concentration of these compounds in the circulating blood being 0.1-0.2mg/cc these compounds caused the increase of its coagulability.

Thus the purine derivatives show the anticomplementaly activity in the higher concentration considerably than the concentration in which they showed the blood coagulation activity.

は じ め に

プリン誘導体の免疫性溶血に及ぼす影響についての報告は少ないが、平田¹⁾はカフェイン誘導体の2, 3の化合物が溶血阻止作用を呈することを報告している。またその後阪井²⁾は11種のプリン誘導体が一定濃度で溶血阻止作用を示し、その作用機構が主として抗補体作用によるものであり、これら化合物の化学構造とそれらの溶血阻止作用の強さとの間には一定の関係があると述べている。

溶血に於ける補体作用と血液凝固作用との間に

は何らかの関係が推定されているが³⁾⁴⁾⁵⁾ まだその本態については明らかでない。しかし近年ヘパリン及び多糖類硫酸エステル、或いはクエン酸ソーダなどの血液抗凝固剤が抗補体作用によつて溶血阻止作用を呈することが明らかにされている⁶⁾⁷⁾⁸⁾。

吾々は先にプリン誘導体が血液凝固促進作用を有することを明らかにした⁹⁾¹⁰⁾。したがつてこれらの化合物が凝血促進作用を示す濃度で溶血阻止作用を呈するものか何うか、また阪井²⁾は主としてこの種の化合物の複塩について作用を検べているが、プリン誘導体単独では如何程の濃度で溶血阻止作用を示すものかについて検討した。

実験材料及び実験方法

1. 実験材料

使用薬物：カフェイン，テオフィリン，テオブロミン，キサンチン，ヒポキサンチン，アデニン及びグアニンの7種を安息香酸ソーダ，サリチル酸ソーダ或いは苛性ソーダの添加によつて夫々溶解して用いた。

稀釈液：Mayer¹³⁾等の記載にもとづいてMgイオン及びCaイオンを添加したpH7.4のVeronal buffered isotonic saline (以下VBISと略す)を使用した。

血球浮游液：山羊赤血球をVBISで3回洗滌した後，溶血反応用には5%に，免疫用には10%に夫々VBISに浮遊せしめて調製した。

補体：3匹以上のモルモットから採血し，凝固後2時間氷室に保存してから血清を分離し，0.5cc中に2単位の補体が含まれる様にVBISで稀釈して使用した。

溶血素：進藤¹⁴⁾の記載の方法に従い，10%山羊血球浮游液5ccを4日毎に5回耳静脈内に投与して家兎を免疫し，23日目に全採血して血清を採取した。得られた血清を非働化し，merthiorate 1万分の1を加えて冷蔵したものを使用した。得られた溶血素血清の力価は600単位であつた。

感作血球浮游液：進藤¹⁴⁾の記載の方法に従い，0.5cc中に6単位の溶血素を含む免疫血清稀釈液と等容の5%山羊血球浮游液を混合して調製した。

2. 実験方法

可及的高濃度に溶解した供試化合物の原液をVBISで倍数稀釈して各々0.5ccを試験管にいれ，50倍稀釈補体血清（補体2単위에相当），感作血球浮游液0.5cc及びVBIS 0.5ccを加え，37°Cのフラン器内に1時間放置した。フラン器より取り出して直ちに氷冷し，各々の試験管に冷稀釈液2cc宛を加えて直ちに遠心沈澱して血球を除き，その上澄液の540m μ に於ける吸光度を日立のスペクトロホトメーターで測定した。その際検体溶液の代わりにVBISを加えた試験管を100%溶血とみなして対照とし，各試験管の溶血度を求めた¹⁵⁾。そして縦軸に溶血阻止百分率，横軸に検体の濃度

の対数をとつたグラフを画きこれより検体の50%溶血阻止濃度を求めた。

実験成績

プリン誘導体は一般に水に難溶であるので，安息香酸ソーダ，サリチル酸ソーダ，エチレンジアミン或いは苛性ソーダを添加して溶解し夫々の作用を検討した。しかしこれらの溶解補助剤は何れも溶血阻止作用を示すことが報告されている¹⁶⁾ので，各プリン誘導体の実験に際してはそれ等の溶解補助剤単独についても同時に検討した。またアルカリ溶液が溶血に影響を与えることも考えられるので，その影響のないpHを求める意味で予めこの点について検討した。

I. アルカリ (pH) の溶血作用に及ぼす影響

N/10苛性ソーダ (pH 約13) をVBISで倍数稀釈してpH8~13の種々のpHの溶液をつくり，これの溶血作用に対する影響を検討した。

その結果は第1図に示す様にpH11.5以上では補体の有無にかかわらず溶血を起し，またpH9~11.5では補体作用の阻害によるものと思われる溶血阻止作用が見られた。

第1図 NaOHの溶血作用に及ぼす影響

したがって溶血に全く影響のないアルカリ溶液としてはpH9以下のものを選ばねばならない。

II. プリン誘導体の溶血阻止作用

1. カフェイン

カフェインは40°Cで50mg/ccまで単独で溶解するので，これを原液として倍数稀釈して50%溶

血阻止濃度を求めると36mg/ccとなつた。そこでカフェインの50mg/ccの溶液、安息香酸ソーダカフェインの100mg/ccの溶液及び安息香酸ソーダの50mg/ccの溶液について同時に溶血阻止濃度を測定した。

第2図 カフェイン及び安息香酸ソーダの溶血阻止作用

第2図及び第1表に示す様にカフェイン単独の50%阻止濃度は36mg/ccであるが、安息香酸ソーダ複塩としてのカフェインの場合には14mg/ccであつた。また安息香酸ソーダ単独では26mg/ccで50%阻止を示した。したがつてカフェイン単独での作用強度は安息香酸ソーダ複塩としてのカフェインの1/2以下で、複塩の場合の溶血阻止作用はカフェイン及び安息香酸ソーダの相乗作用と考えるべきであろう。

第1表 カフェイン及び安息香酸ソーダの溶血阻止作用

検 体	最低阻止濃度 (mg/cc)	完全阻止濃度 (mg/cc)	50%阻止濃度 (mg/cc)
カフェイン (単独)	8	>50	36
〃 (アンナカ)	4	36	14
安息香酸 ソーダ	12	50	26

2. テオフィリン

テオフィリンは単独では5mg/cc以上の濃度には水に溶解せず、しかもこの濃度では50%溶血阻止を示すに至らなかつた。そこでテオフィリンを溶解補助剤或いは苛性ソーダによつて可及的高濃度に溶解して使用した。即ち使用した原液は1%エチレンジアミン溶液による40mg/cc溶液、N/10 NaOHによる100mg/cc溶液 (pH8.7) 並びに等量の安息香酸ソーダを添加して溶解した25mg/cc溶液である。またエチレンジアミンの20mg/cc溶液及び安息香酸ソーダの25mg/cc溶液についても同時に測定した。

その結果は第2表に示した通りである。即ち溶解補助剤としてエチレンジアミンを加えた場合のテオフィリンの50%溶血阻止濃度は14.5mg/ccである。しかしこの溶液中にはエチレンジアミンが3.5mg/cc溶解しており、しかもエチレンジアミン単独の50%阻止濃度は3.5mg/ccである。したがつてエチレンジアミンを添加したテオフィリン溶液の溶血阻止作用はテオフィリンの作用ではなくエチレンジアミンの作用である。

テオフィリン、安息香酸ソーダ1:1溶液については50%溶血阻止を示すテオフィリンの濃度は13.5mg/ccであるが、この場合には明らかに安息香酸ソーダが作用に関与しており、両者の混合液の阻止作用は夫々の相乗作用であろう。

第2表 テオフィリン、エチレンジアミン及び安息香酸ソーダの溶血阻止作用

検 体	最低阻止濃度 (mg/cc)	完全阻止濃度 (mg/cc)	50%阻止濃度 (mg/cc)
テオフィリン (1/4量エチレンジアミン)	10	20	14.5
〃 (安息香酸ソーダ等量)	5	32	13.5
〃 (苛性ソーダ)	2	50	17
エチレンジアミン	2.5	5	3.5
安息香酸ソーダ	12	50	26

苛性ソーダ溶液ではテオフィリンの50%溶血阻止濃度は17mg/ccである。この際の pH は8.7で先に述べた様にこの pH では溶血に影響はない。

したがってテオフィリンの溶血に対する50%阻止濃度は17mg/ccである。

3. テオブロミン

テオブロミンの水に対する溶解度は1.5mg/ccでこの濃度では溶血阻止作用を示さない。それでテオブロミン40分にサリチル酸ソーダ35分と苛性ソーダ25分を添加して可溶性としたジウレチンの50mg/ccの溶液、苛性ソーダのみを加えて溶解した100mg/ccの溶液並びにサリチル酸ソーダ50mg/ccの溶液について測定した。

第3表 テオブロミン及びサリチル酸ソーダの溶血阻止作用

検 体	最低阻止濃度 (mg/cc)	完全阻止濃度 (mg/cc)	50%阻止濃度 (mg/cc)
テオブロミン (HaOH)	1	6	2.3
〃 (ジウレチン)	1.5	5.5	3.1
ジウレチン	3.8	13.8	7.8
サリチル酸 ソーダ	4	32	14.5

第3表に示した様にジウレチンの50%溶血阻止濃度(7.5mg/cc)中のテオブロミンの濃度は3.1mg/ccであり、苛性ソーダ添加によつて溶解したテオブロミンの50%阻止濃度は2.3mg/ccであつた。これはカフェイン或いはテオフィリンに比して可成り強力な阻止作用を示している。しかしテオフィリンが pH8.7 に於て100mg/ccまで溶解するに比して、テオブロミンの場合は100mg/ccの溶液の pH は13.0、またジウレチンの50mg/cc溶液の pH も約13.0である。そして斯様に高い pH は前述の如く明らかに溶血作用に影響する。そこでテオブロミンのアルカリ溶液及びジウレチン溶液の

溶血阻止作用を示す濃度における pH を測定したところ、これがアルカリ単独の場合の溶血阻止を示す pH と全く一致した。したがってテオブロミンのアルカリ溶液及びジウレチンの溶血阻止作用は、その濃度における遊離のアルカリによるものであつてテオブロミンの作用によるものではないことが明らかである。

したがってテオブロミンの溶血阻止濃度は正確には測定出来ないが、阪井²⁾の云う如く強いものではなく、その50%阻止濃度はすくなくとも3.1mg/cc以上である。

4. キサンチン

キサンチン単独では殆んど水に溶けないが、1%エチレンジアミンに対しては50mg/ccに、またアルカリ性 (pH13) では20mg/ccに溶解するのでこれを原液として使用した。

その結果は第4表に示した様に50%溶血阻止を示す濃度のエチレンジアミン添加キサンチン溶液中のキサンチン及びエチレンジアミンの濃度は夫々1.7mg/cc及び3.4mg/ccである。しかしエチレンジアミンのこの濃度はそれ単独の場合の50%阻止濃度と一致しているから、エチレンジアミン添加キサンチン溶液の阻止作用はエチレンジアミンによるもので、キサンチンによるものではない。

またキサンチンのアルカリ性溶液の阻止作用は pH のそれに一致したのでアルカリによるものであることは明らかである。

したがってキサンチンの溶血阻止濃度もまた正確には測定出来ないが、その50%阻止濃度は1.8mg/cc以上である。

5. ヒポキサンチン

ヒポキサンチンもキサンチンと同様に溶解度が低いので、1%エチレンジアミンに5mg/ccに、またアルカリ性で3.8mg/cc (pH11.6) に溶解し

第4表 キサンチン及びエチレンジアミンの溶血阻止作用

検 体	最低阻止濃度 (mg/cc)	完全阻止濃度 (mg/cc)	50%阻止濃度 (mg/cc)
キサンチン(キサンチン-エチレンジアミン)	1.3	2.4	1.7
エチレンジアミン (〃)	2.5	4.8	3.4
エチレンジアミン (単 独)	2.5	5.0	3.5
キサンチン (NaOH)	1.2	2.5	1.8

第5表 ヒポキサンチンの溶血阻止作用

検 体	最低阻止濃度 (mg/cc)	完全阻止濃度 (mg/cc)	50%阻止濃度 (mg/cc)
ヒポキサンチン (ヒポキサンチンエチレンジアミン溶液)	1.3	2.6	1.9
エチレンジアミン (ヒポキサンチンエチレンジアミン溶液)	2.6	5.2	3.8
エチレンジアミン (単独)	2.5	5	3.5
ヒポキサンチン (NaOH)	1	9.5	4.6

たものを原液として用いた。

その結果は第5表の通りである。即ちヒポキサンチン—エチレンジアミン溶液ではエチレンジアミンの作用を示すのみで、ヒポキサンチンの作用は現われない。またアルカリ溶液ではpHに一致した作用を示した。

したがってヒポキサンチンの40%溶血阻止濃度もまた測定出来ないが、すくなくとも4.6mg/cc以上である。

6. グアニン及びアデニン

グアニン及びアデニンは共に単独では勿論溶解補助剤を用いても殆んど溶解しないので、苛性ソーダを添加して可及的高濃度に溶解し、夫々5mg/cc (pH13) 及び20mg/cc (pH10.9) の濃度のものを原液として使用した。

第6表 グアニン及びアデニンの溶血阻止作用

検 体	最低阻止濃度 (mg/cc)	完全阻止濃度 (mg/cc)	50%阻止濃度 (mg/cc)
グアニン (NaOH)	0.4	1.3	1.0
アデニン (NaOH)	2.8	1.0	5.2

その結果は第6表に示す如くグアニン及びアデニンは夫々1mg/cc 及び5.2mg/cc の濃度で50%溶血阻止を示した。しかしその濃度におけるpH(10.1)の測定によりこの場合にもアルカリの作用によるものであることが明らかとなった。

したがってグアニン及びアデニンの50%阻止濃度もまた測定不能で1mg/cc 及び5.2mg/cc 以上である。

考 察

プリン誘導体の溶血阻止作用に関する実験を行ったが、この種の化合物は水に対する溶解度が低いので供試薬剤の全部についてその溶血阻止濃度を求めることは出来なかつた。即ち水に対して

単独で溶解する濃度ではわづかにカフェインが36mg/ccで50%溶血阻止を示したのみで、他のものでは阻止作用を示さなかつた。したがってこれらの阻止作用を確かめる為には何等かの方法で溶解度を高める必要がある訳である。

プリン誘導体特にメチールキサンチン類では溶解性を高める為に一般に安息香酸ソーダ或いはサリチル酸ソーダ等の有機酸塩との複塩が用いられている。そこでこれらの複塩の溶血阻止作用について調べた。然し安息香酸ソーダ或いはサリチル酸ソーダもまた溶血阻止作用を有すると云われておりこの実験でもその点を明らかにし得た。したがってこれら複塩の溶血阻止作用がそのままメチールキサンチン類の作用を示すものとは考えられない。この点について飯井²⁾はこれらの複塩の溶血阻止作用を示す濃度における有機酸塩類のモル濃度が、それ単独で阻止を示す濃度よりも可成り小さいので、複塩の阻止作用が大体メチールキサンチン類の作用によるとみなし得ると云っている。しかし有機酸塩について云い得ることがメチールキサンチンについてもまた同様に云い得るわけである。例えばカフェインについての実験が示す様に安息香酸ソーダカフェイン中のカフェイン又は安息香酸ソーダの50%溶血阻止濃度は夫々0.072及び0.097mol/Lであるのに対して、カフェイン及び安息香酸ソーダ単独のそれは共に0.18mol/Lである。即ち両者共単独の場合には複塩に比して作用が非常に弱くなる。したがって安息香酸ソーダカフェインの阻止作用はこの両者の作用の相乗作用として現われていると考えるべきであろう。

エチレンジアミンはプリン誘導体に対して溶解補助効果をもっており、多くのプリン誘導体はこれの添加によつてその溶解度を高めることが出来た。しかしエチレンジアミンもまた補本作用の阻害によつて溶血阻止作用を示し¹³⁾、しかもプリン

誘導体に対して溶解補助効果をもつ濃度で既にプリン誘導体のそれよりも強い溶血阻止作用を現わすのでこの目的には使用出来なかつた。

またプリン誘導体の多くはアルカリ性に於て水に可成り溶解するので、この溶液についても溶血阻止作用を検討した。ところがテオフィリン以外のプリン誘導体は pH を 10 以上に高めなければ適宜の濃度に溶解しなかつた。しかしこの高い pH においては遊離アルカリによる溶血阻止作用が現われるために、プリン誘導体単独の阻止作用を知ることが出来なかつた。ただテオフィリンのみは pH 8.7 で 100mg/cc まで溶解したので、pH の影響を受けることなく 50% 阻止濃度 (17mg/cc) を求め得た。

阪井²⁾はグアニンのアルカリ溶液がプリン誘導体の内で最も強い溶血阻止作用を示したと述べているが、今度の実験からこれが必ずしもグアニン自身の作用でなく、アルカリの作用によるものであることが明らかとなつた。

プリン誘導体の内はつきりとした溶血阻止濃度を求め得たのはカフェインとテオフィリンのみであつたが、各プリン誘導体の 50% 溶血阻止濃度を、測定し得た範囲で一括して第 7 表に示す。

第 7 表 プリン誘導体の溶血阻止濃度

検 体	最低阻止濃度 (mg/cc)	完全阻止濃度 (mg/cc)	50%阻止濃度 (mg/cc)
カ フェ イン	8	>50	36
テオフィリン	2	50	17
テオブロミン	—	—	>3.1
キサンチン	—	—	>1.8
ヒポキサンチン	—	—	>4.6
グ ア ニ ン	—	—	>5.2
ア デ ニ ン	—	—	>1.0

この表においてカフェイン及びテオフィリンに比して、その他の化合物の溶血阻止作用は可成り強い様に見えるが、ここに得られた価はその性格から云つて量的な意味では全く比較出来ないものである。即ちそれらはカフェイン或いはテオフィリンの価に近いものかも知れず、或いはもつと大きいものであることも考えられる。

プリン誘導体の血液凝固促進作用は家兎で 5~

10mg/kg で顕著であり²⁾、家兎の循環血液量を 50 cc/kg とすると投与直後の最大血中濃度で 0.1~0.2mg/cc である。したがつてプリン誘導体の溶血阻止作用はそれが凝血促進作用を示す濃度に比べると、可成り高濃度で現われるものである。

要 約

1) プリン誘導体のうちカフェイン、テオフィリン、テオブロミン、キサンチン、ヒポキサンチン、グアニン及びアデニンの 7 種についてその免疫性溶血に対する作用を検討した。

2) カフェイン及びテオフィリンの 50% 溶血阻止濃度は夫々 36 及び 17mg/cc である。

3) テオブロミン、キサンチン、ヒポキサンチン、グアニン及びアデニンは中性乃至溶血に影響のない pH での最大溶解濃度、またはそれ以下の濃度では溶血阻止作用を示さない。

4) メチールキサンチン類と有機酸塩との複塩の溶血阻止作用はメチールキサンチンと有機酸塩との相乗作用として現われる。

5) プリン誘導体のアルカリ溶液の溶血阻止作用は多くの場合アルカリの作用である。

6) プリン誘導体が溶血阻止作用を示す濃度はこれが凝血促進作用を示す濃度よりも可成り高濃度である。

稿を終るに当たり、御懇篤なる御指導と御校閲を賜つた恩師大沢忍教授に深謝の意を表する。

引 用 文 献

- 1) 平田：東京医学，36巻，6号。
- 2) 阪井毅：日本微生物学雑誌，21，3105 (昭. 2)
- 3) Mann, F.D. & Hum, M.: Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.; 67, 83 (1948).
- 4) Felix, K.: Z. Physiol. Chem.; 284, 198 (1949).
- 5) Quick, A.J.: J. Immunol.; 29, 87 (1935).
- 6) Walton, K.W., Ellis, H.A. & Taylor, C.E.D.: Brit. J. Exper. Pathol.; 38, 237 (1957).
- 7) Taylor, C.E.D. & Walton, K.W.: Brit. J. Exper. Pathol.; 38, 248 (1957).
- 8) Yoshida, J.: 医学と生物学，25，170 (1952).
- 9) 西田実，人見正博：薬学研究，29，625 (1957).
- 10) 西田実，人見正博：薬学研究，30，95，(1958).
- 11) Mayer, M., Croft, M., Croft, C. & Gray, M.: J. Exper. Med.; 88, 427 (1948).
- 12) 進藤宙二：血清反応とその実験 (1956)
- 13) Brumfield, H.P.: J. Immunol.; 72, 393 (1954).