線維素溶解酵素系の基礎的ならびに臨床的研究

第1報 Plasmin 測定法の検討

(Fibrin 平板法について)

東北大学医学部泌尿器科学教室 加 藤 弘 彰*
(主任: 安戸仙太郎教授)

THE FUNDAMENTAL AND CLINICAL STUDIES ON FIBRINOLYTIC
ENZYME SYSTEMSI. DETERMINATION OF THE PLASMIN ACTIVITY
(FIBRIN PLATE METHOD)

Hiroaki Kato

From the Department of Urology, Tohoku University School of Medicine, Sendai
(Director: Prof. S. Shishito)

As to the fibrin plate method, the effect of fibrin membrane preparation and some experimental conditions for determination on the width of fibrinolytic area was examined.

1. The preparation of fibrin membrane

1) In relation between the amount of fibrinogen in the fibrin membrane and the width of the fibrinolytic area, the latter was almost constant against the fibrinogen concentration within the range of 300–500 mg/dl. But it was significantly expanded under the fibrinogen concentration of 100 mg/dl.

No significant difference could be found against the thrombin concentration within the range of 10–100 u./ml. But over 500 u./ml, the width of fibrinolytic area was slightly reduced.

There could be found a inversely proportional relation between the thickness of the fibrin membrane and the width of fibrinolytic area, and furthermore, larger standard deviation of estimated value could be found corresponding to the development of the thickness.

In relation between the ionic strength of the buffer solution pH 7.3 as solvent and the width of fibrinolytic area, the results with $\mu=0.15$ buffer was somewhat larger (5–21%) than that with $\mu=0.50$.

2) Next, the effect of heat treatment, which required to denaturate the plasminogen in the fibrin itself, and the width of fibrinolytic area was examined.

It was clarified that: i) the width of fibrinolytic area in the plate treated at 85°C for 10 minutes was reduced to about 47.3% of that of the standard plate without any heating. ii) the results in the plate with 30 minutes heating at the same temperature was 42.9% of the latter, iii) the value with 50 minutes heating was 35.8%, respectively. Complete denaturation of plasminogen in the plate with heating at 85°C for 30 minutes could be found.

2. Experimental conditions

The effect of the concentration of streptokinase on the fibrinolytic activity of the plasma was examined.

The width of fibrinolytic area was slightly increased corresponding to the increase of streptokinase concentration within the range of 100–10,000 u./ml. But some decrease of it could be found at the concentration of streptokinase over 1000,000 u./ml.

In relation between the incubation time of the plate at 37°C and the width of fibrinolytic area, the

* 助手

maximal expanding rate of the fibrinolytic area in every one hour was found at 16 hours incubation (21 mm²/hr.), and it became a rather constant value (6–6.5 mm²/hr.) after 20–24 hours of incubation.

Next, the relation between the temperature of incubation and the width of fibrinolytic area at 18 hours incubation was examined. At 34°C incubation, it was about 70.8% of that of 37°C incubation, while the value of 146% was obtained at 41°C. About 10% deviation was found corresponding to the 1°C temperature alteration around 37°C.

3. Reproducibility

The standard deviation of the results obtained from the standard plate as the width of fibrinolytic area was ± 6.1 – 12.9 mm² within the range of 198–248 mm², and it was rather diversified corresponding to the expansion of the width.

In the heat-treated plate, the value of standard deviation was ± 14.4 – 15.8 mm² within the range of 278–367 mm² of the width, and the more lower reproducibility was confirmed on the heat-treated plate.

With the results obtained above, the more available fibrin plate is: 100–300 mg/dl of fibrinogen concentration, 10–100 u./ml of thrombin concentration, pH 7.3 buffer solution ($\mu=0.15$), and 1.3 mm in thickness of fibrin membrane, 30 minutes heating at 85°C. And the more reasonable procedure is: 18 hours incubation at 37°C (one point check between 18–24 hours), and 100–10,000 u./ml of streptokinase concentration.

I 緒 言

1835年, Hunter¹⁾ は急死した症例において凝固したはずの血液が流動性を呈していることを観察し, 血中 fibrin の溶解がおこつたためと推論した. また1893年 Dastre²⁾ は細菌の汚染なしにおこるこのような凝血の自然溶解を線維素溶解現象 (以後, 線溶現象と略す) と命名した. 更に MacFarlane et al.³⁾ (1946年) はそれまでになされた諸家の研究成果を集成総括し, 次のごとく結論した. すなわち線溶現象は血液中に存在する plasmin (以後, pl. と略す) と称される一種の蛋白分解酵素によつてひきおこされる. しかし正常状態において血中には pl. がみられず, このものは不活性な前駆体である plasminogen (以後, plg. と略す) の形で存在し, ショックなどの原因により活性化されること, および血中に存在する antiplasmin の破壊を行つても, 線溶能が亢進することを図示した (図1). その後の諸家の研究はこの plg. が activator (以後, act. と略す) により活性化されて pl. になるが, act. も正常状態においては不活性前駆体である proactivator (以後, proact. と略す) の形で存在することを明らかにした. また pl. の活性化は, 急死⁴⁾ 以外にも手術⁵⁾, 進行した癌腫⁶⁾, 麻酔,⁷⁾ 大量輸血⁸⁾, 前立腺疾患⁹⁾, 脾臓癌¹⁰⁾, 胎盤早期剝離¹¹⁾, ショック, 抗原抗体反応, 肝実質障害, 激しい運動, 急性静脈性閉塞, 血栓症初期, 子宮内胎児死亡, 不適合輸血, 精神的不安, 精神労働, 熱傷, adrenalin や nicotin 酸の注射¹²⁾ 等多方面の事象に随伴しておこることが判明した.

一方かかる病態において線維素溶解酵素系 (以後, 線溶系と略す) のはたしている役割が重要なものであることも解明されてきた. すなわち, 血管内での血液の凝固防止や血栓溶解などによる血流路の確保¹³⁾, 動脈硬化や脳出血の原因である動脈壁の類線維素変性との関係¹⁴⁾, 腹水癌その他の悪性腫瘍における腹水貯留, 更にそれに伴う出血傾向との関係^{15) 16) 17)}, 外科手術による線溶系の変動と術中・術後出血の関係^{5) 18) 19) 20)}, 炎症の進展²¹⁾ と症状²²⁾, 肉芽組織の線維化²³⁾ との関係, 肝疾患や肝線維化との関係^{24) 25) 26)}, アレルギーやショックによる線溶能の亢進^{27) 28)}, あるいは pl. によつて生成された蛋白分解産物とアレルギーとの関係²⁹⁾, 更に組織アレルギー反応と線溶系との関係³⁰⁾, ACTH³¹⁾, glucagon, somatotropin³²⁾ あるいは prolactin³³⁾ などのホルモン代謝への線溶系の関与等多くの生理的あるいは病的状態に線溶系が関与しており, その部分現象として流血中で線溶現象のおこることが明らかにされてきた.

以上のごとく, 線溶系の意義が認識されるにつれて, 酵素学などの基礎的方面はもちろん, 臨床的方面においても線溶現象が盛んに研究されるようになってきた.

現在行なわれている線溶系の研究は, pl. 以外の各因子がすべて不活性な前駆体であり, それらの諸因子を単一の形で観察することができないので, 種々の条件下における Pl. の蛋白分解能を観察することにより, 各因子の動態を推定する方法を用いて行われている.

次に pl. の蛋白分解能を測定する方法としては, 1) 一定量の基質を溶解するに必要な時間, 2) 一定時間内

に溶解される基質の最大量, 3) 一定時間内に一定量の基質を溶解しうる最小の pl. 濃度, 4) 一定時間内に一定量の基質に pl. が作用して生じた分解産物や遊離物質, あるいは残存する基質などの量, 5) 基質膜の溶解面積, 6) 基質分解を阻止しうる物質の最低濃度, その他種々の方法が考案施行されている。

Pl. は fibrinogen または fibrin³⁴⁾ (以後, fb. と略す) のみならず, 各種の血液凝固因子や体蛋白質³⁵⁾, casein^{34) 36) 37) 38)}, gelatin³⁴⁾, β -lactoglobulin³⁹⁾, protamin-heparin 複合体⁴⁰⁾, ACTH³²⁾ 等の天然蛋白質はもちろんのこと, p-toluylsulfonyl-L-arginine-methyl ester (TAMe), α -benzoyllysine butyl ester (BABe), N-acetyl-L-tryptophan-ethyl ester (ATrEe), acetyl-tyrosine-ethyl ester (ATyEe) 等の合成物質をも分解する。現在まで考案された pl. 活性の測定方法は, これらの蛋白分解能測定法と分解基質を様々に組合せたものである。しかしながら, 同一原理に基づく方法の詳細を比較検討してみると, 諸家により操作, 測定条件, 検体等の細部の点では必ずしも一致していない。しかも, これら諸条件の相違により測定値がどのように変化するかという点に関する検討はいまだほとんどなされていない。

そこで今回はまず簡便にして感度が高く, かつ各種線溶系因子を測定しうる fb. 平板法について, 諸条件の相違により測定値にどのような変化が見られるかを検討した。

II 実験方法

1. 試薬と fibrin 平板作製法

本実験に使用した fb. 平板 (以後, 平板と略す) は次のごとく作製した。

まず, 平板作製の試薬としては bovine fibrinogen (第一化学, 以後, fbg. と略す), thrombin (持田製薬, 以後, thr. と略す) を用い, これを磷酸緩衝液 (pH 7.3, $\mu=0.15$) に溶解 (以後, それぞれを緩衝液, fbg. sol., thr. sol. と略す) して使用した。

なお, 緩衝液の組成は, 第1液 (K. monobasic phosphate 9.078g/l) と第2液 (Na. dibasic phosphate anhydrous 11.875g/l) を使用直前に 23.2 : 76.8 の割合に混合調製した⁴¹⁾。

平板作製は, シャーレ (9 × 2 cm, みがき, 角丸を使用) へ fbg. sol. を一定量入れ, このものの 8.0ml に対して 0.1ml の割合に thr. sol. を滴下, 直ちにシャーレを数回左右に強く回転させ両液を充分混和せしめた。次

いでシャーレを30分間室温にて水平面上に静置して, 一様の厚さをもつ fb. 膜を形成させた^{42)~46)}。(この平板は標準平板と呼ばれているが, 以後 St. 平板と略し, 熱処理を加えた平板と区別する)。

2. 平板の検定法

平板作製及び測定の条件が測定値に与える影響については, 一定の pl. 活性を有する標準液を用いて得た fb. 溶解野 (以後, 溶解野と略す) の面積を測定し, 平板の作製法, 測定法などの条件と溶解面積の関連性を分析することにより検討した。

標準液としては, streptokinase 加血漿又は Elase 溶液を使用した。前者は泌尿器疾患々々より無作為的に $1/10$ 容の 3.8% citric acid を添加した血液を採取し, それより分離した血漿 0.03ml に Varidase (streptokinase 1.0×10^5 単位, streptodornase 2.5×10^4 単位, チロメサル 0.01% 含有, Lederle) の streptokinase 濃度が 1.0×10^5 u./ml になるように調製した溶液 (以後, Varidase は SK. と略し, Varidase の濃度は streptokinase の含量で示す) 0.03ml を混合したもの, 後者は Elase (pl. 25Loomis 単位, desoxyribonuclease 15,000 単位含有, Parke Davis) を緩衝液に溶解せしめたものを使用した (Elase を緩衝液 1.0ml で溶かしたものを 100% 溶液とした)。

標準液 0.3ml を fb. 膜上に滴下した平板を一定温度の孵卵器内に一定時間水平に静置した後, 溶解野の長径・短径を測定し, その積をもつて溶解野の面積とした。なお, 以下の実験においては, 温度, 時間について特に言及しないかぎり, 37°C において 18 時間の incubation を行つた。

III 実験成績

1. Fibrin 平板作製条件の検討

1) 試薬量の検討

上述のごとき方法で平板を作製するにあたり使用する試薬の濃度や量が, 又 incubation 温度や incubation 時間などが測定値にいかん影響するかを検討した。

i) Fibrinogen 濃度: 50u./ml thr. sol. 0.1ml と 50, 100, 300, 500mg/dl と濃度を異にする fbg. sol. 8.0 ml とで St. 平板を作製し, 種々の pl. 活性を有する 5 症例の血漿を用いて fbg. 濃度の差による溶解面積の変化について観察した。その成績は表 1 のごとくである。

Fbg. 濃度が 50, 100, 300, 500mg/dl の St. 平板における溶解野の平均面積は, それぞれ 290, 277, 268,

表1 Fibrinogen 濃度と溶解面積
(単位: mm²)

fbg. 量 (mg/dl)		50	100	300	500	相関係数 (γ)
症例						
A.	W.	306	299	294	288	—9.64
Y.	T.	336	315	299	310	—6.65
B.	O.	350	338	342	323	—8.53
S.	T.	234	224	210	210	—8.92
K.	H.	224	208	196	192	—9.46
平	均	290	277	268	265	—8.88

265mm² であり, 平板内 fbg. 濃度と溶解野の広さとの間に負の相関性のあることが考えられた. しかし両者の関係は必ずしも直線的ではなく, fbg. が低濃度になるほど溶解面積へ及ぼす影響が大であり, 300~500mg/dl の高濃度群でのみ fbg. 濃度の相違はほとんど溶解面積に影響を与えていなかった. この関係は SK-pl. 活性の高い群 (A.W., Y.T., B.O.), 低い群 (S.T., K.H.) 共に同様の傾向を示し, pl. 活性の程度により影響を受けていないことがわかった.

ii) Thrombin 濃度: 溶解面積に及ぼす平板作製時の thr. 濃度の影響を検討するために, 100mg/dl fbg. sol. 8.0ml に対し10, 50, 100, 500u./ml の thr. sol. 0.1 ml を混和して St. 平板を作製し各種 pl. 活性を有する 5 症例の血漿を用いて, その平板の溶解野を観察した.

その成績についてみると, 表2のごとく thr. 濃度が 10~100u./ml までの St. 平板では, それぞれ平均 203, 206, 208mm² で著しい相違を認めなかったが, 500 u./ml においては 198mm² と溶解面積の軽度減少を認めた. しかし, t 検定上 thr. 濃度と溶解面積との間には有意差を認め得なかった.

iii) Fibrin 膜の厚さ: 100mg/dl の fbg. sol. と 50u./ml の thr. sol. で fb. 膜の厚さが 1.3, 2.6, 3.9mm (fbg.

表2 Thrombin 濃度と溶解面積
(単位: mm²)

thr. 濃度 (u./ml)		10	50	100	500
症 例					
A.	S.	234	250	240	234
K.	K.	126	132	144	132
Y.	S.	288	285	296	280
I.	O.	220	213	221	220
K.	A.	148	151	140	122
平 均		203	206	208	198

表3 Fibrin 膜の厚さと溶解面積
(単位: mm²)

厚さ(mm) fbg. sol(ml)		1.3×1	1.3×2	1.3×3
症 例		8	16	24
T.	H.	320	182	110
G.	S.	320	140	110
S.	O.	304	154	99
S.	T.	288	132	110
K.	H.	304	142	84
平 均		307	150	103

図1 線溶系

sol. をそれぞれ 8.0, 16.0, 24.0ml 使用) の St. 平板を作り, fb. 膜の厚さと溶解面積との関係を各種の pl. 活性を有する 5 症例の血漿を用いて検討した.

その成績は表3のごとく, 1.3, 2.6, 3.9mm厚の各 St. 平板における溶解野の平均はそれぞれ 307, 150, 103mm² であり, fb. 膜の厚さに逆比例する成績を示した. しかし, fb. 溶解のおこつた体積についても測定を試みたところ, その成績はそれぞれ39.9, 39.0, 40.2 mm³であり, 有意差が認められなかった.

iv) 緩衝液の ion 強度: 次に ion 強度の溶解野へ及ぼす影響をみるために, ion 強度 $\mu=0.15$ の緩衝液 (pH 7.3) のほかに $\mu=0.50$ (第1液 K. monobasic phosphate 27.8g/l, 第2液 Na. dibasic phosphate 71.7g/l, 使用時 23:77 に混合)⁴⁷⁾を用いて 100mg/dl の fbg. sol. 及び thr. sol. をつくり, ion 強度の異なつた同一厚さの St. 平板を作製し検討した.

5 症例の血漿について測定した成績は表4のごとく, $\mu=0.15$ の溶解面積が $\mu=0.50$ のものよりも 5~21%大であつた.

2) 標準平板への熱処理が溶解面積に及ぼす影響
St. 平板に熱処理を加えることにより被溶解性がいかなる影響を受けるかを検討するために, まず $\mu=0.15$, pH 7.3の緩衝液にて 100mg/dl の fbg. sol. と 50u./ml の

表4 Ion 強度と溶解面積
(単位: mm²)

ion 強度(μ)		0.15	0.50
症 例			
S.	T.	462	440
T.	K.	396	374
H.	O.	506	420
S.	I.	594	560
K.	T.	578	500
平	均	507	459

thr. sol. を作り、それぞれを 8.0ml, 0.1ml ずつ混和して St. 平板を作製した。

i) 熱処理時間と溶解面積: まず加熱時間を検討するために加熱温度を85°Cに限定し、加熱時間を10, 20, 30, 40及び50分間と異にして St.平板を熱処理し、標準 pl. sol. による溶解面積の変化を観察した。

表5 加熱時間と溶解面積
(単位: mm²)

加熱時間(分) Elastase 濃度						
	0	10	20	30	40	50
20 %	770	351	320	315	285	275
40 %	1150	548	529	510	456	419
80 %	1700	814	774	744	725	609

図2 85.0°Cで処理した時間と溶解面積

その成績は表5のごとくであり、fb. 膜に熱処理を加えていない St. 平板における溶解野を 100%として百分比で示すと図2のごとく10, 20, 30, 40, 50分と加熱処理時間を異にした平板の溶解面積の平均はそれぞれ47.3, 44.3, 42.9, 39.7, 35.8%で処理時間の延長につれて減少傾向を示し、殊に最初の10分間における低下が著しかった。又、これらの関係は pl. sol. として用いた Elastase の濃度により影響をうけないことを示している。

ii) 加熱平板と標準平板との比較: 熱処理をうけた平板と St. 平板は、pl. に対しどのような異なった性質を示すかを検索する目的で St. 平板を 85°C, 30分間加熱(以後、本条件をもつて熱処理した平板を加熱平板と呼び、H平板と略す)した。

まず、平板に Astrup-Abrechtsen 法⁴⁰⁾により雄成犬心筋より抽出した組織 act. を滴下し incubate したが、St. 平板では fb. 分解が生じたにもかかわらず、H平板では全く認められなかった(表6の1))。

表6 (1) 平板は plasminogen を含有するか

平 板		標準平板	加熱平板
検 体			
組織 activator		+	-

(2) 標準平板と加熱平板の溶解面積
(単位: mm²)

平 板		標準平板	加熱平板
Elastase 濃度(%)			
100.0		1881	1024
80.0		1638	868
60.0		1261	500
20.0		841	294
10.0		572	220

次に10, 20, 60, 80, 100% Elastase sol. を用いて St., H. 両平板における溶解面積を比較した。その成績は表6の2)のごとく St. 平板においても、又H平板においても Elastase濃度 C, 溶解面積 A, それぞれの対数が直線関係にあることが判明した。すなわち、次の式が成立した。

$\log A = a \log C + \log k \quad A = kC^a \quad a, k: \text{常数}$

しかし係数 a は、St. 平板で 0.494, H平板で 0.654 で一致せず、従つて図3に示したごとく、両平板法における両者の関係は平行しなかつた。

2. 測定条件の検討

図3 標準平板と加熱平板の溶解面積

以後の実験からは、100mg/dl fbg. sol. 8.0ml, 50 u./ml thr. sol. 0.1ml, 緩衝液pH 7.3, $\mu=0.15$ の条件で作製した平板を使用した。

1) Varidase 濃度：SK. 濃度とSK-pl. 活性との関係を観察するために、濃度が100, 1,000, 10,000, 100,000u./mlの4種のSK. sol. を作製し、それぞれの0.03mlと各種pl. 活性を有する5症例の血漿0.03mlを重積し、37°C, 18時間 incubate した後、各々の溶解面積を測定した。

表7 Varidase と SK-plasmin 活性
(単位：mm²)

SK 濃度 (u./ml)		100	1,000	10,000	100,000
症 例					
S.	H.	288	316	320	304
T.	N.	279	284	287	273
Z.	O.	255	270	293	279
T.	K.	156	156	187	180
G.	Y.	168	169	192	174
平	均	229	239	256	242

その成績についてみると表7のごとく、SK. 濃度が100~10,000u./ml までの溶解面積の平均は、それぞれ229, 239, 256mm²とSK. 濃度に比例して増大する傾向を示した。100,000u./ml では242mm²と10,000 u./ml の場合に比して溶解野が縮小し t 検定上有意差を示した。

2) Incubation 時間：incubation 時間の長短が溶解面積に及ぼす影響をみるために1,000u./ml SK. sol. を用い、同様の方法で作製した平板を37°C恒温のもとに incubate し14, 16, 18, 20, 22, 24, 37時間後に溶解面積を測定した。

その成績は表8、図4に示すごとく、それぞれの incubation 時間における測定値の平均は388, 414,

表8 Incubation 時間と溶解面積
(単位：mm²)

Incub. 時間		14 時間	16	18	20	22	24	37
症 例								
T.	T.	380	400	440	441	462	476	528
S.	T.	324	340	374	396	399	412	450
Y.	W.	378	400	420	462	462	480	525
H.	O.	437	480	546	560	572	580	630
S.	E.	419	450	500	500	525	535	552
平	均	388	414	456	472	484	497	537

図4 Incubation 時間と溶解面積

456, 472, 484, 497, 537mm²と経時的に拡大しており、単位時間あたりの変化は13, 21, 8, 6, 6.5, 3.1mm²/1時間で、16時間前後において最も大きく、以降漸次変化率の低下する傾向を示した。

3) Incubation 温度：incubation の温度差による影響を検索する目的で、2~4, 22, 34, 37, 41°Cの各恒温中に18時間 incubate した場合の溶解野の変化について観察した。

表9 Incubation 温度と溶解面積
(単位：mm²)

incub. 温度		2 ~ 4 °C	22	34	37	41
症 例						
K.	E.	28	110	340	503	956
A.	S.	30	75	432	588	900
M.	W.	25	99	441	812	900
S.	S.	12	93	418	518	784
T.	M.	36	71	484	575	841
平	均	26	90	423	599	876

図5 Incubation 温度と溶解面積

上記の温度において5症例の血漿により生じた溶解野の平均面積は、それぞれ26, 90, 423, 599, 876mm²であつた(表9)。37°Cにおける溶解面積を100%とすると、図5のごとく34°Cでは70.8%、41°Cでは146%となり37°C前後における incubation 温度の変動は線溶にき

わめて顕著な影響を及ぼすことがわかった。

3. 測定値の再現性

測定値の再現性を検討するために前項と同条件の平板と SK-血漿 (SK. sol. の濃度は 1,000u/ml) を用い、incubation の条件は 37℃, 18時間で同一検体の呈する溶解面積の相違を観察した。

検体は、泌尿器科患者より無作意的に選定した 5 症例より採取した血漿を用いた。1 ケの平板には 2 種の検体を滴下したが、同一平板におく検体の種類及び恒温槽内における各平板の配置はランダム方式に従った。

又、再現性は同一検体の 5 測定値の標準偏差 s を計算することにより検討した (各検体の平均溶解面積を $\bar{A}$, $\bar{A}$ の平均を $\bar{\bar{A}}$ とする)。

表10 溶解面積の再現性 標準平板 (単位: mm²)

症例	測定回数	I	II	III	IV	V	平均	標準偏差
A.		196	196	208	192	200	198	6.1
O.		224	210	224	198	204	212	11.7
K.		210	224	224	230	220	222	8.9
S.		228	234	256	255	243	243	12.7
S.		238	266	252	240	246	248	12.9
Y. S.		364	352	357	378	372	365	10.6
H. K.		370	368	380	400	382	380	12.7
H. T.		378	359	391	361	366	371	12.0
N. K.		410	391	399	378	380	392	12.0
K.		470	460	494	493	474	478	14.9
M. K.		552	535	560	584	570	560	16.5
I.		778	774	761	761	740	763	14.9
K. T.		783	756	768	792	770	774	14.0
S. T.		854	810	811	816	831	824	16.6
K. T.		864	890	889	850	865	872	15.2

1) 標準平板: 15症例の測定成績についてみると表10のごとく、溶解面積 $\bar{A}$ が 198~ 248mm² 群 (症例A,O, K,S,S の $\bar{A}$ = 225mm²) の標準偏差は 6.1~12.9 ($\bar{s}$ = 10.5), $\bar{A}$ が 365~ 478mm² 群 (症例YS, HK, HT, NK, K の $\bar{A}$ = 397mm²) の標準偏差は 10.6~14.9 ($\bar{s}$ = 14.4), $\bar{A}$ が 560~ 872mm² 群 (症例MK, I, KT, ST, KT の $\bar{A}$ = 759mm²) の標準偏差は 14.0~16.6 ($\bar{s}$ = 15.4) で、平均溶解面積が大きくなるほど標準偏差も大きくなる傾向を示した。

2) 加熱平板: 次にH平板においても同様に検討した結果表11のごとく、 $\bar{A}$ が 278~ 367 ($\bar{\bar{A}}$ = 310) の標準

表11 溶解面積の再現性 加熱平板 (単位: mm²)

症例	測定回数	I	II	III	IV	V	平均	標準偏差
T. S.		264	288	266	301	270	278	14.4
S.		294	280	260	280	300	283	15.5
N. S.		313	304	308	282	270	295	14.4
K. T.		340	320	320	304	342	325	15.8
S.		360	343	368	383	380	367	14.5

偏差は 14.4~15.8 ($\bar{s}$ = 14.9) で略同程度の線溶面積において St. 平板を用いた場合より大であつた。

IV 総括ならびに考按

平板法が考案された初期の平板作製条件をみると、fbg. sol. は濃度が 0.1%, 0.2%のもの、又使用量が 3~9ml, thr. sol. は100u./ml を 0.2~0.3ml, 緩衝液 (μ = 0.15) のpHも 6.5~7.8とかかなりの巾があつた。又測定条件も 37~39℃, 18~24時間 incubate と諸家⁽⁴²⁾ ⁽⁴³⁾ ⁽⁴⁴⁾ ⁽⁴⁵⁾ ⁽⁴⁶⁾ ⁽⁴⁹⁾によりかなりの相違がみられていた。本法が普及した今日でも文献を詳細に検討した結果、用いられている手技は必ずしも一致していないことが判明した。

線溶系を 18~24時間平板上で incubate した後に基質平板の溶解面積を計測観察する fb. 平板法は fb. 溶解時間法のごとく基質となる fb. の溶解時間を秒単位で測定するのとは異なり操作にそれほど細心な注意や高度の熟練を必要としない。しかし平板法の感度は fb. 溶解時間法の 700倍も鋭敏である⁽⁴⁵⁾といわれるほど高いので平板の製作、測定条件の相違により、測定値に大きな影響を与えるであろうことが考えられた。

そこで、まず平板作製に際し、測定値に影響する因子を検索した結果、fbg. の質、量、thr. の質、量、fb. 膜の厚さ、緩衝液の種類、pH、ion 強度、平板に対して行う加熱の時間や温度がおもなるものであることがわかつた。

まず fbg. についてみると、血液より fbg. を分離する方法には種々⁽⁵⁰⁾ ⁽⁵¹⁾ ⁽⁵²⁾ ⁽⁵³⁾があるが、現在のところ plg. を含まない fbg. を抽出することはできない⁽⁵⁴⁾。しかもこの plg. は線溶能測定において測定値にかなりの影響を及ぼしている⁽⁵⁵⁾。又 fbg. の純度が低い場合、Müllertz⁽⁵⁶⁾が述べているごとく測定値が不正確になるため、線溶能測定には純度の高いものを用いなければならない。そこで平板法を施行するにあたり、fbg. の純度や plg. の含有量が一定したものを容易に入手するために、自家製

造したものよりも同一社製の製品を用いた方がよいと考え、これを使用した。

これを用いて観察した本実験の成績によると、fbg. 濃度と溶解面積は逆比例することが明らかになり、Lewis et al.⁵⁷⁾や Guest et al.⁵⁸⁾が fb. 溶解時間法により fbg. 濃度と溶解時間との関係を観察した結果、両者の間に正の相関性があるとした報告と同様の意味をもつ成績が得られた。

更に本実験では fbg. sol. が低濃度であるほど pl. に対する感度が高くなる成績が得られている。しかし 50mg/dl 以下の濃度になると溶解野が不正形となり、測定値が不正確となるばかりでなく fbg. 濃度の少しの変動でも溶解面積へかなり影響を及ぼすので誤差が大きくなることがわかった。更に境界鮮明な正円状の溶解野を生じ、しかも pl. に対する感度が高く、多少の濃度差が測定値に著しく影響しないような条件をみたす fbg. 濃度は 100～300mg/dl であることがわかった。この最適濃度は Müllertz⁴⁶⁾ の 0.2～0.3%，Astrup et al.⁴²⁾ の 0.1～0.2% とする報告とほぼ一致する成績であつた。

次に thr. についてみると、thr. は pl. 拮抗作用を有するという報告⁵⁹⁾や蛋白分解能⁶⁰⁾⁶¹⁾あるいは pl. の proenzyme を含んでいる⁶²⁾⁶³⁾⁶⁴⁾などの報告がみられるところより、線溶能測定値に多少なりとも影響を及ぼしうると考えた。しかし Lewis et al.⁵⁷⁾は fb. 溶解時間法で thr. を 1～50u./ml まで種々の濃度にかえても、測定値に影響しなかつたと報告している。今回の平板法による実験でも 10～100u./ml の範囲内の thr. 濃度では溶解面積に殆んど影響しないことが観察された。

次に fb. 溶解時間法で溶解時間が fbg. 量に比例したという報告⁵⁷⁾よりみて、平板法においても fb. 量と溶解面積との間に何らかの関連性があるものと考え、両者の関係を検討した。その結果、線溶能は溶解面積よりはむしろ fb. の溶解した体積に比例するという成績を得た。従つて平板法により pl. 活性を表わす場合には、Permin⁴³⁾以来用いられてきた溶解面積で示す方法は正確さを欠くので、平板の厚さという因子を加味して表現しなければならないことが考えられた。換言すれば従来通りに pl. 活性を溶解面積で示そうとするならば fb. 膜の厚さを厳密に一定にし、且その厚さを付記しなければならないと考えられた。

溶解野を計測するときにその断面を詳細に観察すると、漏斗状、潜蝕状を呈していることが多く、しかもこ

の傾向は fb. 膜が厚くなるほど著明になることがわかった。かかる形態を有する溶解野の計測は辺縁を識別することが困難なため、誤差を大きくする原因となる。本実験では fb. 膜の厚さ 1.3, 2.6, 3.9mm の平板における測定値の標準偏差を検索したが、その成績はそれぞれ 12.0, 17.5, 10.5 であり 1.3 または 3.9mm の平板における標準偏差が小さかつたが、溶解野の形態をも考慮に入れると 1.3mm の厚さを用いることが最もよいと考えられた。平板製作にあたり平坦な底面をもつシャーレを水平に保つように注意しなければならない理由は、fb. 膜の厚さを一様にし上述のごとき現象による誤差を少くするためである。

次に緩衝液について検討したが、fbg. や thr. 溶液の作製には veronal 緩衝液、燐酸緩衝液、硼酸緩衝液などが用いられている。本実験ではこれらのうち fbg. sol., thr. sol. の溶媒として最も広く用いられている燐酸緩衝液を採用した。

緩衝液の pH が溶解面積に及ぼす影響については Müllertz⁴⁶⁾が pH 7.75～8.5 に第 1 の山を、pH 6.5～7.3 にそれに次いで大きい溶解野を呈することを認めたと言ふ成績を報告している。一般に酵素活性の測定には最適 pH を用いるべきではあるが、臨床的には生理的条件下における状態で観察することが重要と考え、本実験では正常人の血液の pH 域 (pH 7.3～7.5)⁶⁵⁾にある pH 7.3 をもつて実験を行つた。また ion 強度 $\mu=0.15$ および 0.50 の 2 種の異なつた緩衝液を作製し両者の溶解野へ及ぼす影響を検討した。その結果、溶解面積は後者に比して前者が 5～21% 大きい成績をえた。この成績は Müllertz⁴⁶⁾が $\mu=0.15, 0.23, 0.30$ の緩衝液について検討した結果 $\mu=0.15$ で最大の溶解野をえたという成績に一致した。

線溶系の 1 因子である act. の測定は fbg. 中に含有されている plg. が賦活されて pl. に転じ、この pl. がおこす線溶現象を観察することにより行われる。しかし検体中の plg. や pl. の線溶能を測定する際はこの基質中の plg. も線溶現象に関係するので検体の線溶能の分析を困難にしている。そこで Lassen⁴⁹⁾は fbg. 中の plg. を不活性化するために、熱処理を行う方法を考案検討し、plg. は加熱により直ちに不活性化されるものではなく、不活性化の程度は加熱温度と加熱時間により定まることを認め、更に 70℃ なら 60 分間、80℃ では 30 分間、95℃ では 15～20 分間で完全に消失すると報告した。しかしこの処理は plg. のみならず fbg., fb. にも熱変性をも

たらずのでこれらの被溶解性の低下をきたすことが考えられる。真木⁶⁶⁾は85℃、30分間の加熱処理により fb. の被溶解性が50%程低下することを認めているが、本実験の成績では57.1%の被溶解性低下が観察された。更に85℃で平板を熱処理した時間と pl. に対する感受性との関係を検討した結果、平板の被溶解性は最初の10分間で47.3%までに急激に低下し、それ以後も処理時間が延長するにつれて徐々に低下をつづけることをみとめた。したがって plg. を不活性化する際はH平板の pl. に対する感受性を一定水準に保持するため加熱処理する温度と共に処理時間を一定にせねばならぬことがわかった。

次に pl. 濃度Cと線溶能との関係をみると、fb. 溶解時間法において溶解時間tとの間に $\log t = -a \log C - b$ (a, b は常数) なる関係がみとめられているごとく、平板法においても溶解面積Aとの間に $\log A = a \log C + b$ なる関係がみとめられている^{42) 62) 67)}。しかし、St. 平板とH平板の線溶能に対する態度をみるに Lassen⁴⁹⁾ もみとめているごとく両平板の係数aは一致しなかつた。従つて兩種平板の測定成績を比較する際は溶解面積を pl. 濃度に換算した上で行わなければならないことが判明した。

St. 平板とH平板の係数aが一致せぬ原因について考按するに、まず一般に酵素反応系にあつては基質が次々に供給され、あるいは無限に存在し且中間・終産物が次々に除去されれば反応は時間と共に進行するものである。しかし平板法においては反応が進行するにつれて基質の減少、分解産物の蓄積、酵素の稀釈がおこり理想的条件下にはない。しかも溶解には基質である fb. 平板の構造により規制される酵素の拡散や化学反応速度⁴⁸⁾、酵素の吸着⁴⁹⁾、その他 pl. 活性の経時的低下など多くの因子が関与し、これらが熱処理により変化をきたし、そのために反応系にかなりの相違が生じていることが考えられた。

以上の実験成績より、平板作製の条件を規定するならば、まず第1に直径9.0cmのシャーレを使用し、この中でpH 7.3, ion 強度 $\mu=0.15$ の磷酸緩衝液を用いて調製した100~300mg/dlのfbg. sol. 8.0ml と10~100u./mlのthr. sol. 0.1ml とでSt. 平板をつくること、第2にH平板を作製する際は加熱時間、加熱温度を例えば85.0℃、30.0分間のごとく厳密にとること、第3に全ての操作は水平面上で行うこと、第4に濃度、量共に一度採用した条件は少しの変更も行わぬことが誤差を少くするた

めに必要であることなどがわかつた。

次に測定条件について検討を加えた結果、SK. 濃度、incubation 時間、incubation 温度などの諸因子が測定値に影響を及ぼしうることが判明した。

SK. は線溶酵素⁶⁸⁾、zymogen 賦活物質⁶⁷⁾などと考えられたこともあつた。しかし plg. を SK. や組織 act. で賦活せしめた実験^{45) 69) 70)}はこの考えに疑義を生ぜしめ、更に Müllertz et al. ⁷¹⁾によつて SK. が proact. を act. に転化せしめうることを、及びこの act. が plg. を pl. にかえることにより線溶をひきおこすという機序が証明された。

血液中には pl. のほかに act., plg., proact. が存在しているが、これらのうち pl. のみが線溶能を有している。後2者は pl. 又は act. の不活性前駆体でありそれら自体には fb. 分解能がない。しかし pl. と共に線溶能の潜在力となつていたので、これらを把握しておくことは大切である。すなわち、検体に SK. を加えない場合は顕存性 pl. 活性を、また SK. を加えた場合、線溶系の総 pl. 活性を示すことになる。

SK. 濃度と検体の fb. 分解能との関係については、福武⁷²⁾らが血液を用いて ϵ -ACA 滴定法で SK. が低濃度(血液1ml 当り 100u./ml 以下)では血液の線溶能が充分活性化されぬことを観察し、岡本ら⁷³⁾や Kottinen et al.⁷⁴⁾は fb. 溶解時間法で SK. と血漿が最適比の時に最も短縮すると報告している。更に岡本ら⁷³⁾は血清 0.1ml あたり SK. 100u./ml が最適比であると述べている。しかし Alkjaersig et al. ⁵⁵⁾が human plg. の fb. 分解能は添加した SK. 濃度が 100u./ml までは上昇し、それ以上、3,000u./ml までは一定するが、3,000u./ml 以上ではむしろ下降するという成績を報告し、岡本ら⁷³⁾や Kottinen et al. ⁷⁴⁾のいう最適比にいくらかの巾のあることを示した。

今回私の行つた平板法による実験では、SK. が10,000u./ml 以上の高濃度の場合は Alkjaersig et al.⁵⁵⁾の観察した成績と同様に線溶能の低下をみとめたが、100~10,000u./mlの間では溶解面積と SK. 濃度との間に正比例の関係を認めた。従つて測定値の再現性を高くするためには最適濃度を選定厳守しなければならないと考える。

次に37℃における incubation 時間と fb. 溶解との関係を検索した。その成績によると18時間までは比較的急速な溶解面積の拡大を認めたが、その後の拡大率が漸減

していく傾向がみられた。また単位時間当りの拡大率の変動は、16時間前後が最も大であった。一般に物理的あるいは化学的反応を観察する場合は、測定値変化率が最も小さい時期に測定すべきである。従つて本実験成績よりみると平板法における incubation 時間は一般に用いられている18時間よりもやや延長すべきであることが考えられた。しかしあとで述べるが、溶解面積が大きい場合は誤差も大きくなるため極端な長時間の incubation もまた不適當であり、諸成績よりみて22~24時間が最適と考えられる。

次に incubation 時間を18時間と一定にし、温度差と溶解面積の関係を検討した。その成績によると、温度差の影響は incubation 温度が37°C前後において最も著明であり、3~4°Cの動きで溶解面積が29.2~46%も増減した。この成績よりみても incubation 温度は常に一定にたもち変動のおこらないように注意しなければならないことがわかる。

次に測定値の再現性について検討した。すなわち、同一検体につき同一測定条件で5回ずつ緑溶能を測定し、測定値の標準偏差を観察した。その成績によれば溶解面積が正常範囲の260~460mm²の場合、St. 平板では14.4、H平板では14.9でありH平板の測定値の再現性のやや低いことを示している。また溶解面積が大きくなるにつれて標準偏差も大きくなる傾向を認め、酵素が高濃度では平板法の測定値は不正確であるという Astrup et al.⁴⁵⁾の意見や平板法は低濃度の pl. 測定に適するという Permin⁴³⁾の考えに一致した成績が得られた。

Astrup et al.⁴²⁾は平板法による測定値から、pl. 濃度を計算する際、 $\log C = \log A - \frac{\log \bar{A}_{100}}{\bar{a}}$ (但し、 $\log \bar{A}_{100} = \bar{a} \times \log C_{100} + \bar{b}$ 、 $\bar{a}, \bar{b}, \bar{A}$: 測定値平均、 A : 溶解面積、 C : 濃度、 C_{100} : 原量)の式を用いれば誤差を小さくしようと述べている。しかし、誤差を生ずる原因には以上に述べた諸条件の相違のほか、溶解野の測定方法にもかなり関係するため Astrup et al.⁴²⁾のいう計算式を用いるほかに、この点も検討せねばならないと考えた。先にのべたように溶解野は断面が漏斗状ないし潜蝕状で、平面も正円、又は楕円形とならないことが多い。従つて長径や短径をどの部分で測定するかにより、かなりの相違が生ずる。そこで、写面重量法により測定した溶解面積と長・短径の積により得た値を対比してみた。その結果面積が100~200mm²では両者の差が24mm²、200~300mm²では27mm²、300~600mm²では51mm²

と溶解面積が大きくなるにつれて実面積と Permin⁴³⁾以来用いられてきた長・短径の積により溶解面積をうる方法との差が大きくなる傾向が認められた。従つて平板法においては実面積を測定するのが一番よい方法と考えられた。

IV 結 語

線溶現象の測定法としての平板法における fb. 平板の溶解面積と平板作製条件、測定条件との関係を観察し、次のごとき知見をえた。

1. 溶解時間と平板作製に用いる試薬との関係についてみると、まず fbg. 濃度と溶解面積とは逆比例の関係にあり、しかもこの関係は必ずしも直線的でなく低濃度ほど溶解面積の増加度は大になることがわかつた。又 thr. の濃度10~100u./mlの範囲内では溶解野へ何ら影響を与えず、むしろ緩衝液の ion 強度がかなりの影響を及ぼすことがわかつた。

2. 溶解野の面積よりは、体積の測定値の方が fb. 膜の厚さにより影響をうけることが少い。

3. 平板を加熱(85°C)すると、被溶解性は最初の10分間で急速に減少し、その後処理時間の延長につれて漸次低下しつづけることがわかつた。又 pl. 活性と溶解面積との関係は St. 平板、H平板共に $A = kC^a$ なる対数関係にあるが、係数 a は両平板で異つている。

4. SK. 濃度と溶解面積の関係についてみると、SK. 濃度が100~10,000u./ml.の範囲内では比例関係が認められた。

5. 溶解野の拡大率に最も著しく影響する incubation 時間は16時間前後であり、以後は時間の延長とともに拡大率は減少する傾向が認められた。又 incubation 温度の影響についてみるに37°C前後では1°Cの変動が溶解面積に約±10%の相違を生ぜしめることがわかつた。

6. 測定値の再現性は pl. 活性が大きいもののほど小さく、且H平板のそれは St. 平板の再現性よりも低かつた。

これらの結果と現行の条件とを比較検討し、又測定の再現性についても検索し線溶現象に対し最も被溶解性が高く、且測定誤差の少ない平板作製及び pl. 測定条件に関して次のごとき結果をえた。

7. 平板作製条件は、まず St. 平板に用いる試薬濃度として fbg. sol. を100~300mg/dl thr. sol. を10~100u./ml、又これらの溶媒として $\mu=0.15$, pH 7.3の緩衝液を用いる。Fb. 膜の厚さは約1.3mmとする。

平板作製にあつては、平底のシャーレを用い、すべ

での操作を水平面上で行わねばならない。用いる試薬は上記範囲内の一定濃度に定めそれを厳密に保たねばならない。

次にH平板を作製するための熱処理は、85°Cとし処理時間を正確に30分間とする。

8. Fb. 平板法の測定条件としては、SK-pl. 活性を測定するために用いる SK. を 100~10,000u./ml の範囲内の一定濃度に決めた方がよい。incubation 温度を 37.0°C恒温とし、incubation 時間は18時間以上が望ましい。但し時間は厳密に一定にしなければならない。

文 献

- 1) Hunter, J.: 1835. 線維素溶解現象とは、5頁、中外医学社、東京、昭39より引用。
- 2) Dastre, A.: Arch. de Physiol. norm. et path. Paris, 5, 661. 1893. Blood, 3, 1167, 1948より引用。
- 3) MacFarlane, R.G. & Pilling, J.: Lancet, 251, 562, 1946.
- 4) Yudin, S.S.: J.A.M.A., 106, 997, 1936.
- 5) MacFarlane, R.G.: Lancet, 232, 10, 1937.
- 6) Coon, W.W. & Hodgson, P.E.: Surg. Gynec. & Obst., 95, 717, 1952.
- 7) 田口光一郎：順天堂医誌，6，84，昭35。
- 8) Sunade, T., Sugihara, H., Sato, K., Sakata, M. & Sato, T.: Surgery, 50, 437, 1961.
- 9) Tagnon, H.J., Whitmore, W.H., Schulman, P. & Kravitz, S.C.: Cancer, 5, 9, 1952.
- 10) Ratnoff, O.D.: J. Clin. Invest., 31, 521, 1952.
- 11) Moloney, W.C., Egan, W.J. & Gorman, A.J.: New Eng. J. Med., 240, 569, 1949.
- 12) 村上文夫，門田尚武：代謝，2，211，昭40。
- 13) Clifton, E.E. & Grossi, C.E.: Cancer, 9, 1147, 1956.
- 14) 大根田玄寿：日本臨牀，17，711，昭34。
- 15) Kinjo, K., Hirata, T. & Okamoto, S.: Kobe J. Med. Sci., 9, 151, 1963.
- 16) Kinjo, K., Mihara, H. & Fukuhara, Y.: Kobe J. Med. Sci., 9, 161, 1963.
- 17) Prout, G.R., Siegel, M., Clifton, E.E. & Whitmore, W.F.: J.A.M.A., 160, 84, 1956.
- 18) 竹下一雄：熊本医誌，34，1462，昭35。
- 19) 栗津三郎，高木寛，近藤孝，田中正忠，小野久彌，竹内節夫：外科，21，1161，昭34。
- 20) Scott, E.V.Z., Matthews, W.F., Butterworth, C.E. & Frommeyer, W.B.: Surg. Gynec. & Obst., 99, 679, 1954.
- 21) 安部英：Medical Digest, No. 76—1, 16, 1964.
- 22) 矢野三郎，松本圭史，武内和之：医学のあゆみ，46，244，昭38。
- 23) 淡地義信：阪市大医誌，12，119，昭38。
- 24) 上田雄麓：岡山医誌，71，7689，昭34。
- 25) 広島義勉：阪市大医誌，12，155，昭38。
- 26) 西山恵夫：阪市大医誌，12，97，昭38。
- 27) Jobling, J.W., Peterson, W. & Eggstein, A.A.: J. Exper. Med., 22, 401, 1915.
- 28) Rocha e Silva, M., Andrade, S. & Teixeira, R.M.: Nature, 157, 801, 1946.
- 29) 北村精一：アレルギー，3，361，昭30。
- 30) Itoga, G. & Yogo, T.: Keio J. Med., 8, 299, 1959.
- 31) 熊谷朗，矢野三郎，浅沼克次，森本靖彦，西沢秀郎：日本臨牀，21，543，昭38。
- 32) White, W.F. & Gross, A.M.: J. Am. Chem. Soc., 79, 1141, 1957.
- 33) Hopkins, T.F. & Meites, T.: Proc. Soc. Exper. Biol. & Med., 112, 830, 1963.
- 34) Christensen, L.R.: J. Gen. Physiol., 30, 149, 1946.
- 35) 村上正夫：治療，44，2155，昭37。
- 36) Norman, P.S.: J. Exper. Med., 106, 423, 1957.
- 37) Remmert, L.F. & Cohen, P.P.: J. Biol. Chem., 181, 431, 1949.
- 38) Ratnoff, O.D.: J. Exper. Med., 87, 199, 1948.
- 39) Christensen, L.R.: 最新医学，19，2221，昭39より引用。
- 40) Kjeldgaard, N.O. & Ploug, J.: Biophys. Biochem. Acta, 24, 283, 1957.
- 41) 森五彦，小林茂三郎：濾紙電気泳動法の実際，250頁，南江堂，東京，昭35。
- 42) Astrup, T. & Müllertz, S.: Arch. Biochem. Biophys., 40, 346, 1952.
- 43) Permin, P.M.: Nature, 160, 571, 1947.
- 44) Permin, P.M.: Acta physiol. Scandinav. 20, 388, 1950.
- 45) Astrup, T., Crookston, J. & Macintyre, A.: Acta Physiol. Scandinav., 21, 238, 1950.
- 46) Müllertz, S.: Acta physiol. Scandinav., 25, 93, 1952.
- 47) 関根隆光他：化学の領域増刊20“続ワールブルグ検圧計”付録3，南江堂，東京，昭30。
- 48) Astrup, T. & Albrechtsen, O.K.: Scandinav. J. Clin. & Lav. Invest., 9, 233, 1957.
- 49) Lassen, M.: Acta Physiol. Scandinav., 27, 371, 1952.
- 50) Mellanby, J.: J. Physiol., 38, 28, & 441, 1909.
- 51) Cohen, E.J., Strong, L.E., Hughes, W.L., Mulford, D.J., Ashworth, J.N. Melin, M. & Taylor, H.L.: J. Am. Chem. Soc., 68, 459, 1946.
- 52) Ware, A.G., Guest, M.M. & Seegers, W.H.: Arch. Biochem., 13, 231, 1947.
- 53) 吉成憲三：日血九地誌，4，107，昭29。

- 54) Biggs, R. & MacFarlane, R.G.; Human Blood Coagulation and its Disorders, Blackwell, 3ed, 25, 1962.
 - 55) Alkjaersig, N., Fletcher, A.P. & Sherry, S.: J. Clin. Invest., 38, 1086, 1959.
 - 56) Downie, G.R. & Clifton, E.E.: Proc. Soc. Exper. Biol. & Med., 71, 138, 1949.
 - 57) Lewis, J.H. & Ferguson, J.H.: J. Clin. Invest., 29, 486, 1950.
 - 58) Guest, M.M., Ware, A.G. & Seegers, W.H.: Am. J. Physiol., 150, 661, 1947.
 - 59) Alexander, B., Rechet, L. & Klimun, A.: Circulation, 26, 596, 1962.
 - 60) Guest, M.M. & Ware, A.G.: Science, 112, 21, 1956.
 - 61) Miller, K.D.: Abstr. 7th Ann. Symposium of Blood, Detroit, 1958. 代謝, 2, 204, 昭40より引用。
 - 62) Astrup, T. & Permin, P.M.: Nature, 161, 689, 1948.
 - 63) Astrup, T. & Darling, S.: J. Biochem., 133, 761, 1940.
 - 64) Astrup, T. & Darling, S.: Acta Physiol. Scandinav., 2, 22, 1941.
 - 65) 佐藤熙: 生理学講義, 上巻, 39頁, 南山堂, 東京, 昭32.
 - 66) 直木正博: プラスミン測定法文献集, 12頁, 第一製薬, 昭38.
 - 67) Christensen, L.R.: J. Gen. Physiol., 28, 363, 1945.
 - 68) Garner, R.L. & Tillett, W.S.: J. Exper. Med., 60, 239 & 255, 1934.
 - 69) Lewis, J.H. & Ferguson, J.H.: J. Clin. Invest., 29, 1059, 1950.
 - 70) Astrup, T.: Acta Physiol. Scandinav., 24, 267, 1951.
 - 71) Müllertz, S. & Lassen, M.: Proc. Soc. Exper. Biol. & Med., 82, 264, 1952.
 - 72) 福武勝博, 藤巻道男, 志田圭司: 臨床病理, 9, 325, 昭36.
 - 73) 岡本歌子, 井口豊, 横井彌毅男: 総合医学, 17, 665, 昭37.
 - 74) Kottinen, Y., Koskinen, E.H. & Härkönen, P.: Scandinav. J. Clin. & Lab. Invest., 14, 19, 1962.
(昭和42年2月2日受付)
-