カロニン硫酸の血液凝固阻止作用に関する研究

信州大學醫學部松岡内科

松岡松三, 佐竹清人, 荻原洋三
中島富彦, 栗田廣志, 村山繁光

ANTICOAGULANT EFFECT OF CHARONINSULFURIC ACID

BY

Kiyoto Satake, Yōzō Ogiwara, Tomihiko Nakajima,
Hiroshi Kurita, Shigemitsu Murayama and Matsuzō Matsuoka
(2nd Department of Internal Medicine,
Shinshu University School of Medicine) (Prof. M. Matsuoka)

The anticoagulant effect of charoninsulfuric acid, a polysaccharide sulfuric acid obtained from the mucus of [*Charonia lampas*] was investigated both in vivo and in vitro. The results obtained were as follows:

1) Charoninsulfuric acid is a strong anticoagulant. The clotting time of whole blood was prolonged slightly by adding only 1γ charoninsulfuric acid to 1 ml. of rabbit blood or 0.1γ to 1 ml. of human blood. The more its concentration increased, the longer the clotting time became, and in concentration of over 50γ in 1 ml. of rabbit or human blood the clot was not detected over 24 hours.

when charoninsulfuric acid was intravenously injected (1 mg per Kg of body weight), the clotting time of rabbit whole blood was prolonged and reached the maximal level after 15 minutes. Then, the clotting time decreased gradually to normal level within 1 hour or so.

2) In experiments in vitro, charoninsulfuric acid produced no remarkable prolongation of prothrombin time of rabbit plasma by adding charoninsulfuric acid up to 20γ per ml. of blood, while prothrombin time of human plasma was prolonged by adding only 0.05γ per ml. of blood and the more the concentration increased, the more the prothrombin time was prolonged.

Prothrombin time of rabbit plasma measured before and after the intravenous injection of charoninsulfuric acid (1mg. per Kg. of body weight) revealed no remarkable change.

3) Stable factor (SPCA) was not affected by charoninsulfuric acid both in vitro and in vivo.

4) Charoninsulfuric acid has not only anti-labile factor activity but also anti-prothrombin activity.

5) Antithromboplastic activity of charoninsulfuric acid was demonstrated by

thromboplastin generation test both of Matsuoka-Yamanaka and of Biggs-Douglas.

6) Thromboplastin dilution curve of rabbit plasma, which means the prothrombin time measured with serial twofold diluted rabbit brain extract, was also prolonged after the intravenous injection of charoninsulfuric acid (1 mg. per Kg. of body weight).

7) When charoninsulfuric acid was intravenously injected (1 mg. per Kg. of body weight), leucocyte and platelet count of rabbit were temporarily decreased, while the erythrocyte count showed no remarkable change.

I. 緒 言

カロニン硫酸は1938年左右田、江上兩氏¹⁾がボウシュウホラガイ (*Charonia lampas*) の粘液から抽出した多糖類硫酸エステルで、その化学的性質に関しては既に左右田、江上兩研究室から多數の報告がある²⁾。その生物學的性質の特徴は強力な血液凝固阻止作用にあり、田宮、山本、小田氏³⁾は試験管内ならびに動物實驗によりカロニン硫酸が血液凝固時間を著しく延長せしめることを認め、石井氏等⁴⁾も同様の知見を報告しているが、各種の凝固因子に如何なる作用を及ぼしてこ

の抗凝固作用が発現するかに関してはいまだ報告をみない。

著者等は名大理學部江上不二夫教授からカロニン硫酸の惠與を受け、共研者の一人栗田⁵⁾はその粥狀硬化症阻止作用に関する實驗的研究成績を発表したが、今回は抗凝固作用について詳しく検討したので報告する。

II. 實驗材料

カロニン硫酸は灰白色の粉末で、ナトリウム塩の形になっており、その硫黄含有量は11.6%である。熱に對して甚だ安定であるので、生理食塩水

Table 1. Effect of Charoninsulfuric Acid on Clotting Time and Prothrombin Time.

Table 1—1. Rabbit Blood Used

	Tube No.	Charoninsulfuric Acid Solution		Rabbit Blood	Clotting Time	Rabbit Oxalated Blood	Prothrombin Time	Concentration of Charoninsulfuric Acid
		%	ml.	ml.	min.	ml.	sec.	γ/ml.
No. 1	1	0.1	0.1	0.9	>24hrs.	0.9	9.0	100
	2	0.05	"	"	>24hrs.	"	8.0	50
	3	0.02	"	"	63.0	"	6.0	20
	4	0.01	"	"	24.5	"	5.2	10
	5	0.001	"	"	6.5	"	5.1	1
	6	0.0001	"	"	4.0	"	5.3	0.1
	7	0.85%	"	"	3.5	"	5.3	0
		NaCl Sol.						
No. 2	1	0.1	0.1	0.9	>24hrs.	0.9	10.0	100
	2	0.05	"	"	>24hrs.	"	9.3	50
	3	0.02	"	"	85.0	"	7.0	20
	4	0.01	"	"	35.0	"	6.5	10
	5	0.001	"	"	7.0	"	6.3	1
	6	0.0001	"	"	4.5	"	6.3	0.1
	7	0.85%	"	"	4.0	"	6.2	0
		NaCl Sol.						

Table 1~2. Human Blood Used

	Tube No.	Charoninsulfuric Acid Solution		Human Blood	Clotting Time	Human Oxalated Blood	Prothrombin Time	Concentration of Charoninsulfuric Acid
		%	ml.	ml.	min.	ml.	sec.	γ/ml.
No. 1	1	0.1	0.1	0.9	>24hrs.	0.9	>300	100
	2	0.05	"	"	>24hrs.	"	106	50
	3	0.02	"	"	90.0	"	43.2	20
	4	0.01	"	"	38.0	"	34.1	10
	5	0.005	"	"	28.0	"	30.3	5
	6	0.002	"	"	18.5	"	27.4	2
	7	0.001	"	"	17.0	"	26.2	1
	8	0.0005	"	"	16.5	"	23.5	0.5
	9	0.0002	"	"	14.0	"	21.0	0.2
	10	0.0001	"	"	11.5	"	17.5	0.1
	11	0.00005	"	"	10.5	"	16.5	0.05
	12	0.85%	"	"	10.5	"	15.0	0
		NaCl Sol.						
No. 2	1	0.1	"	"	>24hrs.	"	>300	100
	2	0.05	"	"	>24hrs.	"	32.0	50
	3	0.02	"	"	101.0	"	26.0	20
	4	0.01	"	"	85.0	"	22.6	10
	5	0.005	"	"	45.0	"	20.0	5
	6	0.002	"	"	23.5	"	18.2	2
	7	0.001	"	"	17.0	"	17.7	1
	8	0.0005	"	"	14.5	"	17.0	0.5
	9	0.0002	"	"	10.5	"	16.8	0.2
	10	0.0001	"	"	9.5	"	16.4	0.1
	11	0.00005	"	"	9.0	"	15.5	0.05
	12	0.85%	"	"	8.5	"	14.9	0
		NaCl Sol.						
No. 3	1	0.1	"	"	>24hrs.	"	>300	100
	2	0.05	"	"	>24hrs.	"	123	50
	3	0.02	"	"	65.0	"	38.8	20
	4	0.01	"	"	43.0	"	31.4	10
	5	0.005	"	"	30.0	"	27.3	5
	6	0.002	"	"	25.0	"	22.5	2
	7	0.001	"	"	23.0	"	21.5	1
	8	0.0005	"	"	20.0	"	20.1	0.5
	9	0.0002	"	"	15.0	"	17.8	0.2
	10	0.0001	"	"	11.0	"	16.5	0.1
	11	0.00005	"	"	10.5	"	15.3	0.05
	12	0.85%	"	"	10.0	"	14.6	0
		NaCl Sol.						

中に 0.1%の割合に溶解せしめ 100°C, 30分間滅菌した後密栓して氷室に保存し, 用に臨んでそのまままたは生理食塩水で適當に稀釋する。溶液は甚だ安定で田宮等³⁾によると氷室1年間の保存でも力價に變化を見なかつたというが, 著者等の實驗期間中にも全く認むべき變化を示さなかつた。

實驗は試験管内及び動物實驗を行い, 前者にはヒトならびにウサギの血液を用い, 後者にはウサギを用いた。

III. 實驗方法ならびに成績

I 試験管内實驗

實驗 1. 血液凝固時間ならびに血漿プロトロンビン時間 (プ時間) に及ぼす影響.

方法

0.1%カロニン硫酸溶液を母液とし生理食塩水を以て Table 1 に示す如き種々の稀釋系列を作り, この稀釋液 0.1ccに對しウサギまたはヒト血液 0.9ccを分注し, 37°Cの恒温槽に入れてその凝

Fig. 1. Effect of Charoninsulfuric Acid on Clotting Time and Prothrombin Time (Experiment in vitro; Rabbit Blood Used). a.: clotting time b.: prothrombin time

Fig. 2. Effect of Charoninsulfuric Acid on Clotting Time and Prothrombin Time (Experiment in vitro; Human Blood Used) a.: clotting time b.: prothrombin time c.: prothrombin time after adding $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ adsorbed human plasma d.: prothrombin time after adding $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ adsorbed rabbit plasma

固時間を Lee-White 法⁶⁾で測定し, 同一の稀釋系列 0.1cc にウサギまたはヒトの 稀酸血液 (M/10 稀酸ソーダ溶液 0.1cc + 血液 0.9cc) 0.9ccを加えて直ちに遠沈血漿を分離し, そのプ時間を松岡1段法⁷⁾によつて測定した。

成績

ウサギ血液を用いた場合: Table 1—1 に示す如くカロニン硫酸の濃度が増すにつれて血液凝固時間は次第に延長する。すなわち 1 cc中に 1γの濃度で既に軽度の延長を示し, 1 cc中50γ以上の濃度では24時間後においてもなお流動性を保つ。1例を圖示すると Fig. 1. の如くである。圖の横軸はカロニン硫酸の稀釋倍數の對數を示し, 6は10の6乗倍すなわち 1 cc中に 1γを含む意味である。

プ時間はカロニン硫酸濃度が20γ/cc程度までは

Table 2. Effect of Charoninsulfuric Acid on Stable Factor (SPCA) in Human Serum (Experiment in vitro)

Human Blood		Clottin Time	Enhancement of the Prothrombic Activity Caused by SPCA*
No. 1	Control	min. 10.5	% 47
	Containing 20 γ of Charoninsulfuric Acid per ml.	59.0	60
No. 2	Control	13.5	45
	Containing 20 γ of Charoninsulfuric Acid per ml.	102.0	60
No. 3	Control	13.0	45
	Containing 20 γ of Charoninsulfuric Acid per ml.	88.0	52

*) determined by modified method of de Vries et al.

ほとんど変化を示さず、50 γ /cc以上で漸く軽度の延長を來たす (Table 1-1, Fig. 1.).

ヒト血液を用いた場合：ヒトの血液を用い同様の実験を行なった成績は Table 1-2 に示す如くでその 1 例を Fig. 2. に示す。血液凝固時間は 1 cc 中 0.1 γ で軽度の延長を認めウサギの場合と同様カロニン硫酸の濃度の増すにつれて加速度的に延長し、50 γ /cc 以上では 24 時間を経てもなお流動性を保つ。これに反しブ時間はウサギの場合と異なり、0.05 γ /cc の低濃度で延長し、濃度が増すにつれてやはり加速度的に延長する。

実験 2. 安定因子 (SPCA) に及ぼす影響。

方法

同一のヒトの血液を用い、カロニン硫酸を加えぬ場合と 20 γ /cc の割合に加えた場合のそれぞれについて凝固時間を測定し、凝固完了後 2 時間以上を経た血清中の安定因子を de Vries 法⁹⁾ の松岡變法⁹⁾ で測定した。

成績

3 例について行なった成績を Table 2 に示す。カロニン硫酸を加えた場合は凝固時間の著明な延長を來たすが、安定因子はむしろ軽度の増加を示す。

実験 3. 不安定因子ならびにプロトロンビンに及ぼす影響。

先に実験 1. でヒトの蔭酸血漿にカロニン硫酸を加えた場合カロニン硫酸の濃度が増すにつれてブ時間の延長を認めたので、このブ時間延長に不安定因子が關與するか否かを検討する目的で次の如き実験を行なった。

実験 3-i.

ウサギまたはヒトの蔭酸血漿を Quick¹⁰⁾ に従い $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ で吸着し、プロトロンビン及び安定因子を除去し、この吸着血漿 (不安定因子を含む) の 0.1cc をヒトのカロニン加蔭酸血漿 0.1cc に加えブ時間を測定した。

成績

Table 3 及び Fig. 2 に示す如く吸着血漿を加えた場合のブ時間は著しく短縮し、ウサギ吸着血漿を加えた場合の方が著明である。すなわちカロニン硫酸濃度が 0.2 γ /cc まではヒト吸着血漿を加えるとブ時間はほぼ對照値に復し、0.5 γ /cc 以上の濃度では次第に延長する。ウサギの吸着血漿を加えた場合は 2 γ /cc の濃度まではほぼ一定の短縮値 (12 秒前後) を示し、5 γ /cc 以上になるとこれより延長する。

以上の成績からカロニン硫酸によるヒト蔭酸血漿のブ時間延長は不安定因子の減少によることは明らかであるが、そのみならずヒト吸着血漿を加えるとブ時間は對照値に復する筈である。しかるにヒト吸着血漿を加えた場合には 0.5 γ /cc 以上の濃度では對照値に復さず、不安定因子のはるかに多いウサギ吸着血漿を加えた場合でも 2 γ /cc の濃度まではほぼ一定の短縮値を示すが、5 γ /cc 以上の濃度では次第に延長する。このことはカロニン硫酸が不安定因子以外にも影響を及ぼすことを示すものである。そこでプロトロンビンに對する作用を検すべく次の実験を行なった。

Table 3. Effect of $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ Adsorbed Plasma on the Prolonged Prothrombin Time Induced by Charoninsulfuric Acid

Tube No.	Charoninsulfuric Acid Solution		Human Oxalated Blood	Prothrombin Time	Prothrombin Time When 0.1cc. of $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ Adsorbed	
					Rabbit Plasma	Human Plasma
					was Added	
	%	ml.	ml.	sec.	sec.	sec.
1	0.1	0.1	0.9	300	29.2	100
2	0.05	"	"	123.0	20.0	24.6
3	0.02	"	"	38.8	16.5	19.4
4	0.01	"	"	31.4	14.6	18.5
5	0.005	"	"	27.3	13.1	18.1
6	0.002	"	"	22.5	12.6	17.7
7	0.001	"	"	21.5	12.2	16.9
8	0.0005	"	"	20.1	11.8	15.4
9	0.0002	"	"	17.8	11.8	15.1
10	0.0001	"	"	16.5	11.8	14.5
11	0.00005	"	"	15.3	11.8	14.5
12	0.85%	"	"	14.6		
	NaCl Sol.					

Table 4. Effect of Charoninsulfuric Acid on Prothrombin and Labile Factor in Human Blood Plasma (Experiment in vitro)

Human Oxalated Blood		Prothrombin Time		Prothrombin Time
No. 1	Control	sec. 14.5	a 0.01ml. + A 0.09ml.	18.3sec.
			b " + A "	25.5
	Containing 20γ of Charoninsulfuric Acid per ml.	32.6	a " + B "	25.0
			b " + B "	38.6
No. 2	Control	13.8	a " + A "	17.3
			b " + A "	23.6
	Containing 20γ of Charoninsulfuric Acid per ml.	25.2	a " + B "	23.4
			b " + B "	29.1
No. 3	Control	15.1	a " + A "	15.7
			b " + A "	24.0
	Containing 20γ of Charoninsulfuric Acid per ml.	27.0	a " + B "	17.6
			b " + B "	27.6

A: $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ adsorbed control plasma.

B: $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ adsorbed plasma containing Charoninsulfuric Acid.

a: Sodium citrate eluate of control plasma

b: Sodium citrate eluate of plasma containing Charoninsulfuric Acid

実験 3 - ii.

方 法

Quick¹⁰⁾ に従いヒトの蔭血漿を $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ で吸着して吸着血漿を得る。カロン硫酸を加え

Table 5. Effect of Charoninsulfuric Acid on Thromboplastin Generation (Direct Method of Matsuoka-Yamanaka)

Human Oxalated Blood		Minutes of Incubation				
		1	3	5	10	15
No. 1	Control	Clotting Time (sec).				
		135.0 (100%)	110.4 (81.8%)	122.2 (90.5%)	120.5 (89.2%)	122.8 (90.9%)
	Containing 20γ of Charonin-sulfuric Acid per ml.	181.2 (100%)	214.5 (118.0%)	189.4 (104.3%)	172.0 (95.0%)	179.2 (98.8%)
No. 2	Control	105.4 (100%)	82.2 (78.0%)	70.0 (66.4%)	104.5 (99.2%)	87.6 (83.1%)
	Containing 20γ of Charonin-sulfuric Acid per ml.	204.1 (100%)	199.7 (97.7%)	194.5 (95.2%)	204.8 (100.2%)	197.5 (96.6%)
No. 3	Control	102.2 (100%)	94.4 (92.0%)	62.1 (60.7%)	87.0 (85.0%)	90.7 (88.5%)
	Containing 20γ of Charonin-sulfuric Acid per ml.	170.8 (100%)	185.4 (108.8%)	170.0 (99.9%)	170.7 (100.0%)	177.0 (103.6%)

ぬ場合の吸着血漿を A とし、血液 1.0cc に 20γ の割合に加えた場合の吸着血漿を B とする。

次に沈渣 ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) を生理食塩水 2cc で 2 回洗滌遠沈した後、沈渣に 0.2M グエン酸ソーダをもとの血漿量の 1/10 量加えてガラス棒で充分攪拌し、吸着されたプロトロンビン及び安定因子を再び溶離 (elute) する。この eluate 中にはプロトロンビン及び安定因子がもとの血漿中の 10 倍の濃度に含まれる筈である。カロニン硫酸を加えぬ方の eluate を a とし、加えた方を b とする。

吸着血漿 0.09cc と eluate 0.01cc を加えてそのブ時間を測定する。a+A, b+B はそれぞれもとの血漿のブ時間を示す筈である。

成績

3 例の成績を Table 4 に示す。a+A, b+B の組合せは、それぞれカロニン硫酸を加えぬ場合の血漿ブ時間及び血液 1.0cc につき 20γ の割合に加えた場合の血漿ブ時間に近い値を示す。

しかるに a+B は a+A に比しブ時間は延長する。このことは B の不安定因子が A のそれに比べて減少していることを意味し、この方法によつてカロニン硫酸が不安定因子に拮抗作用を有することを再確認し得たわけである。一方 a+A と b+

Fig. 3. Effect of Charoninsulfuric Acid on Thromboplastin Generation (Direct Method of Matsuoka-Yamanaka) a.: plasma not containing charoninsulfuric acid used b.: plasma containing charoninsulfuric acid used

A を比べると後者のブ時間が延長している。こゝで A すなわち不安定因子は同一であるから、カロニン硫酸は eluate すなわちプロトロンビン及び安定因子の作用を減弱せしめることを示していることになるが、すでに実験 2 に示した如くカロニン硫酸は安定因子を減弱せしめる作用を有しない

Table 6. Effect of Charoninsulfuric Acid on Thromboplastin Generation
(Method of Biggs-Douglas)

	Serum	BaSO ₄ Treated Plasma	Minutes of Incubation							
			1	2	3	4	5	6	7	8
No. 1	Normal	Containing Charoninsulfuric Acid	Percentage of Generated Thromboplastin							
			1	3	19	75	77	50	50	55
	Containing Charoninsulfuric Acid	Normal	3	7	9	22	50	85	105	115
No. 2	Normal	Containing Charoninsulfuric Acid	2	3	27	50	46	55	55	55
	Containing Charoninsulfuric Acid	Normal	2	3	8	27	94	110	115	115
No. 3	Normal	Containing Charoninsulfuric Acid	2	9	16	39	46	42	47	46
	Containing Charoninsulfuric Acid	Normal	3	3	8	24	80	110	110	105
No. 4	Normal	Containing Charoninsulfuric Acid	1	9	65	77	60	75	70	70
	Containing Charoninsulfuric Acid	Normal	3	6	30	40	110	105	105	110
No. 5	Normal	Containing Charoninsulfuric Acid	2	10	17	63	60	52	52	52
	Containing Charoninsulfuric Acid	Normal	1	3	20	40	55	80	95	100

20γ/ml. of Charoninsulfuric Acid are contained in blood or oxalated blood.
Normal human Platelets were used in every test.

から、本実験の成績はカロニン硫酸が抗プロトロンビン作用を有することを示す。

実験 4. トロンボプラスチン形成(トプ形成)に及ぼす影響。

著者等はトプ形成試験法として松岡—山中法¹¹⁾¹²⁾及び Biggs-Douglas 法¹³⁾の両者にそれぞれの長所を認めているが⁹⁾、この2方法を用いてカロニン硫酸のトプ形成に及ぼす影響を検索した。

実験 4—i. 松岡—山中法を用いた場合。

方法

同一のヒト蔘酸血液にカロニン硫酸を加えぬ場

合と 1.0ccにつき20γ の割合に加えた場合のそれぞれの血漿を分離し、5 倍に稀釋した後松岡—山中直接法によりトプ形成を検する。

成績

3例に行なつた成績を Table 5 に示し、その中の1例を Fig. 3 に圖示する。これらより明らかな如くカロニン硫酸を加えた血漿においてはトプ形成が極めて不良である。

実験 4—ii. Biggs-Douglas 法を用いた場合。

方法

同一のヒト血液にカロニン硫酸を加えぬ場合と

20 γ /ccの割合に加えた場合について、凝固完了後2時間以上を経た血清を分離し10倍に稀釋する。同一人の蔭酸血液についてカロニン硫酸を加えぬものと20 γ /ccの割合に加えたものを遠沈して血漿を分離し、これらの血漿 1.0ccにつき BaSO₄ 100mgを加え充分攪拌した後遠沈し、吸着血漿を採取して5倍に稀釋する。別に健康人の血小板浮遊液を作り、これら10倍稀釋血清、5倍稀釋吸着血漿、血小板浮遊液を組合せ Biggs-Douglas 法によりトプ形成を検する。

成績

5例について行なった成績は Table 6 に示す如くで、中1例を圖示すれば Fig. 4 の如くで

Fig. 4. Effect of Charoninsulfuric Acid on Thromboplastin Generation (Method of Biggs-Douglas) a.: normal platelet+normal plasma+normal serum b.: normal platelet+normal plasma+charonin serum c.: normal platelet+charonin plasma+normal serum

ある。いずれの例においてもカロニン硫酸を加えない血漿と、カロニン硫酸を加えた血清の組合せにおいてトプ形成は正常またはそれ以上に達するが、カロニン硫酸を加えた血漿と加えない血清の

組合せではトプ形成が不良で、正常の40~75%にすぎない。

実験 5. プロトロンビン消費に及ぼす影響。

方法

Quick¹⁴⁾に従い凝固完了後15分、30分、45分、60分、90分、120分を経て析出した血清 0.1ccにウサギまたはヒトの Ca₃(PO₄)₂ 吸着血漿 0.1ccを加えてそのブ時間を測定する。この様な検査を同一人の血液についてカロニン硫酸を加えぬ場合と20 γ /ccの割合に加えた場合について行なった。

成績

3例について得た成績を Table 7 に示す。いずれの例においてもカロニン硫酸を加えた場合の血清中にはプロトロンビンの残存量が多く、したがってこれを吸着血漿に加えた場合のブ時間はカロニン硫酸を加えぬ場合より短い。

試験管内実験成績の小括。

以上の試験管内における実験成績を要約すると次の如くである。

- 1) カロニン硫酸は血液凝固時間を延長する。
- 2) ブ時間はウサギ蔭酸血液ではカロニン硫酸濃度が20 γ /ccまではほとんど変化なく、ヒト蔭酸血液では0.05 γ /ccですでに軽度の延長をみる。
- 3) ヒトの蔭酸血液にカロニン硫酸を加えた場合のブ時間の延長は、ヒトまたはウサギの Ca₃(PO₄)₂ 吸着血漿を加えると短縮する。
- 4) カロニン硫酸の存在によりヒト血清中の安定因子は軽度に増加する。
- 5) Ca₃(PO₄)₂ による吸着と 0.2Mクエン酸ソーダによる溶離により、カロニン硫酸はヒトの蔭酸血漿中の不安定因子のみならず、プロトロンビンをも減少させることを知る。
- 6) カロニン硫酸はトプ形成を阻害する。
- 7) カロニン硫酸はプロトロンビン消費を妨げる。

II. 動物実験

実験 1. カロニン硫酸静注による血液凝固時間、プロトロンビン時間、赤血球数、白血球数、血小板数の變動。

Table 7. Effect of Charoninsulfuric Acid on Prothrombin Consumption

Human Blood		Clotting Time (min).	Ca ₃ (PO ₄) ₂ Adsorbed Plasma to be Added	Minutes After Formation of a Solid Clot						
				15	30	45	60	90	120	
No. 1	Control	10.5	Rabbit Plasma	Prothrombin Consumption Time in Seconds						
			6.4	10.0	11.5	13.9	16.5	18.2		
	Containing 20 of Charoninsulfuric Acid per ml.	59.0	Human Plasma	15.0	16.0	17.5	20.0	26.8	31.0	
			Rabbit Plasma	5.0	7.9	8.8	9.4	9.0	12.5	
			Human Plasma	8.8	14.0	14.5	15.0	15.1	21.7	
				Control	13.5	Rabbit Plasma	10.5	19.6	21.5	21.8
Human Plasma	19.0	31.5	34.5			34.0	36.0	40.5		
No. 2	Containing 20 of Charoninsulfuric Acid per ml.	102.0	Rabbit Plasma	12.9	13.6	14.0	14.8	15.5	15.6	
			Human Plasma	17.1	23.6	24.5	23.6	26.0	27.1	
	No. 3	Control	13.0	Rabbit Plasma	10.9	16.0	16.9	17.0	16.3	18.3
				Human Plasma	13.4	20.1	20.3	20.3	20.9	27.1
Containing 20 of Charoninsulfuric Acid per ml.		88.0	Rabbit Plasma	14.8	14.5	16.3	16.6	16.5	16.2	
			Human Plasma	18.2	17.9	20.5	20.0	20.6	20.5	

方 法

0.1%カロニン硫酸溶液をウサギの耳静脈に体重1 kg當り1 mgの割合で静注し、注射前及び注射後15分毎に採血して、凝固時間 (Lee-White法⁶⁾、血漿プ時間 (松岡1段法⁷⁾、赤血球數、白血球數及び血小板數 (Rees-Ecker 直接法¹⁵⁾) を測定する。

成 績

ウサギ5羽について得た成績を Table 8 に示し、その中の1例を Fig. 5 に圖示する。赤血球數、プ時間に著明な變動なく、白血球數は注射後15分または30分に一時的に減少し、血小板は30分後に一過性に減少する。最も著明な變化は血液凝固時間に現われ、注射後15分で著明に延長し、60分乃至75分後に舊値に復する。

實驗 2. 安定因子に及ぼす影響。

方 法

實驗1により凝固時間は静注後15分で最も延長することを知つたので、体重1 kg當り1 mgの静注前及び注射後15分の血液を採取し、それぞれの凝固時間を測定した後2時間以上を経た血清中の安定因子を de Vries 法⁸⁾の松岡變法⁹⁾で測定した。

成 績

4羽のウサギについて得た成績を Table 9 に示す。安定因子は注射の前後において著明な變動を示さない。

實驗3. 不安定因子及びプロトロンビンに及ぼす影響。

方 法

体重1 kg當り1 mgの静注前及び注射後15分に採取した蔭酸血漿について、ヒトの蔭酸血漿について行なつたのと全く同様にして (實驗 I. 3-ii,

Fig. 5. Effect of Intravenous Injection of Ch-
aroninsulfuric Acid on Various Blood Con-
stituents of Rabbit (Dosis: 1 mg./Kg. B.W.).

参照) $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 吸着血漿及び eluate を作る。

ウサギの血漿中の不安定因子はヒトの50倍といわれているから¹⁶⁾、吸着血漿を50倍に稀釋しその0.09ccと eluate の0.01ccを組合せてプ時間を測定した。

成績

4羽のウサギについて得た成績を Table 10 に示す。ヒト血漿を用いた試験管内実験の場合と同様にカロニン硫酸は不安定因子及びプロトロンビンの両者に拮抗作用を有することが認められる。

実験 4. トロンボプラスチン稀釋曲線 (トプ稀釋曲線) に及ぼす影響。

ウサギ脳トロンボプラスチン液を松岡法⁷⁾により作製し、これを生理食塩水で10倍、20倍と倍數稀釋して5120倍にいたり、そのおのおのを体重1kg當り1mgのカロニン硫酸靜注前及び注射後15分のウサギ蓚酸血漿に加えてプ時間を測定し曲線を

畫く。

成績

ウサギ4羽について得た成績を Table 11 に示し、その中の1例を Fig. 6 に圖示する。

カロニン硫酸注射前の血漿ではトプ稀釋と共にプ時間は延長するが、ほぼ直線的な變化であるのに對し、注射後15分の血漿を用いた場合にはトプ稀釋の進むにつれてプ時間は著しく延長する。

動物實驗成績の小括

以上の *in vivo* における動物實驗成績を要約すると次の如くである。

1) カロニン硫酸の靜注 (体重1kg當り1mg) により、血液凝固時間は15分後に著明に延長し、60分乃至75分後に舊値に復するが、血漿プ時間は全経過を通じ著明な變動をみない。血小板數は30分後に最も減少し、白血球數は15分乃至30分後に減少するが、赤血球數には著明な變化をみない。

2) カロニン硫酸靜注前及び15分後において血清中の安定因子に著明な變化をみない。

3) $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ による吸着と0.2M クエン酸ソーダによる溶離によりカロニン硫酸靜注前及び15分後の蓚酸血漿中のプロトロンビン及び不安定因子を測定すると、吸着血漿を50倍に稀釋してはじめてその兩者の減少を知ることが出来る。

4) カロニン硫酸靜注により、注射後15分の血漿はトプ稀釋の進むに従いプ時間が著明に延長する。

IV. 考 按

酸性ムコ多糖類中のスルフォムコ多糖類に屬するヘパリンが強力な抗凝血作用を有する事實は、McLean (1916年)¹⁷⁾以來夙に知られ、その抗凝血作用の本態に關しては未だ完全に解明されたとはいえないが、少なくとも抗プロトロンビン作用、抗トロンビン作用、抗トロンボプラスチン作用の3つがあるとされている。このヘパリンと化學的構造の類似したカロニン硫酸は血液凝固時間を延長せしめ、その一因として抗不安定因子作用がある。ウサギのプ時間は試験管内實驗においても生体實驗においてもほとんどカロニン硫酸に影響さ

Table 8. Effect of Intravenous Injection of Charoninsulfuric Acid on Various Constituents of Rabbit Blood

(Dosis of Charoninsulfuric Acid: 1 mg./kg. Body Weight)

Rabbit No. & Body Weight	Minutes After the Injection	Platelet Count (x 10 ⁴)	Red Cell Count (x 10 ⁴)	White Cell Count (x 10 ³)	Clotting Time (min.)	Prothrombin Time (sec.)
No. 1 2.8Kg.	Before	21.8	388	5.1	2.5	7.8
	15	22.8	350	3.9	13.0	7.6
	30	15.7	350	5.2	5.5	8.0
	45	18.4	390	5.3	3.0	7.4
	60	23.0	370	4.8	2.0	7.8
No. 2 3.2Kg.	Before	25.9	371	4.9	2.0	7.0
	15	16.1	400	4.2	19.5	6.4
	30	13.3	360	3.6	15.5	6.3
	45	18.0	346	4.9	7.0	7.1
	60	19.7	377	5.5	4.5	6.8
	75	23.0	360	4.9	2.0	6.0
No. 3 3.6Kg.	Before	18.9	414	3.1	3.5	6.4
	15	15.9	400	2.4	44.0	6.9
	30	9.8	460	3.5	17.0	6.9
	45	16.4	463	3.8	14.5	7.0
	60	18.8	463	3.8	8.0	6.7
	75	14.0	461	3.0	3.5	6.7
No. 4 3.3Kg.	Before	11.7	408	5.4	2.0	7.0
	15	13.8	401	3.8	25.0	7.2
	30	9.7	360	5.1	13.0	7.2
	45	12.2	378	5.5	7.5	6.2
	60	15.8	372	5.0	2.0	6.4
No. 5 3.2Kg.	Before	19.9	413	5.8	2.0	6.8
	15	14.9	384	3.6	75.0	7.1
	30	12.3	408	5.1	23.0	8.0
	45	21.1	380	5.2	15.0	7.7
	60	21.3	374	4.9	8.0	7.5
	75	21.9	390	4.4	2.0	6.8

Table 9. Effect of Charoninsulfuric Acid on Stable Factor (SPCA) in Rabbit Serum (Experiment in vivo)

Rabbit No. & Body Weight	Minutes After the Injection of Charoninsulfuric Acid (1mg./Kg. B.W.)	Clotting Time (min.)	Enhancement of the Prothrombic Activity Caused by SPCA*)(%)
No. 1 3.1Kg.	Before	8.0	44
	15	81.0	41
No. 2 3.2Kg.	Before	2.5	37
	15	37.0	39
No. 3 2.2Kg.	Before	2.5	53
	15	30.0	54
No. 4 3.0Kg.	Before	2.5	32
	15	27.0	33

*) determined by modified method of de Vries et al.

れないが、ヒトの血液を用いた場合にカロニン硫酸の低濃度においてもプロ時間が延長する事實は、ウサギ及びヒトの血漿中に含まれる不安定因子の量の相違によるものと考えられる。このことはウサギの不安定因子はヒトの50倍に存在するといわれているが、ウサギ吸着血漿を50倍に稀釋すると、はじめてカロニン硫酸がウサギ血漿の不安定因子にも拮抗作用を有することを見出し得たことによつて明らかである。またカロニン硫酸の抗不安定因子作用は試験管内實驗におけるプロトロンビン消費の不良によつてもうかがい知ることが出来る。

カロニン硫酸が血液凝固時間の延長、血漿プロ時間の延長を來たすもう一つの原因として、抗プロトロンビン作用のあることは明らかである。更に、カロニン硫酸が抗トプ形成作用を有すること

Table 10. Effect of Charoninsulfuric Acid on Prothrombin and Labile Factor in Rabbit Blood Plasma (Experiment in vivo)

Rabbit No. & Body Weight	Minutes After the Injection of Charoninsulfuric Acid (1 mg./Kg. B.W.)	Prothrombin Time (sec.)			Prothrombin Time (sec.)
No. 1 3.1Kg.	Before	6.0	a	0.01ml. + A	13.2
			b	" + A	16.3
	15	5.9	a	" + B	16.0
			b	" + B	18.2
No. 2 3.2Kg.	Before	8.4	a	" + A	16.0
			b	" + A	23.0
	15	8.4	a	" + B	17.6
			b	" + B	25.9
No. 3 2.2Kg.	Before	8.8	a	" + A	18.0
			b	" + A	20.3
	15	9.7	a	" + B	23.0
			b	" + B	27.1
No. 4 3.0Kg.	Before	7.5	a	" + A	15.7
			b	" + A	17.8
	15	7.8	a	" + B	17.8
			b	" + B	21.0

A: $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ adsorbed plasma before the injection. (1: 50 diluted with 0.85% NaCl solution)

B: $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ adsorbed plasma after the injection. (1: 50 diluted with 0.85% NaCl solution)

a: Sodium citrate eluate of plasma before the injection.

b: Sodium citrate eluate of plasma after the injection.

は、松岡—山中法、Biggs-Douglas 法のいずれを用いても証明し得る。松岡—山中法はトブ形成に血小板第3因子、AHG, PTC, PTAの4因子が関与するという理論に立脚して考案されたので、カロニン硫酸はこれらの諸因子の一つまたはそれ以上に對して拮抗作用を有するであろうと考えられる。

一方 Biggs-Douglas 法はトブ形成が血小板第3因子、AHG, PTC, 不安定因子、安定因子の5因子が作用し CaCl_2 の存在の下に起こるという考えに立脚するものである。著者等の實驗成績ではカロニン硫酸を加えた血漿と加えぬ血清との組合せではトブ形成が不良で、カロニン硫酸を加えぬ血漿と加えた血清との組合せではトブ形成は正常又はそれ以上であつた。このことはカロニン硫酸が血漿因子 (AHG及び不安定因子) に拮抗的に作用するが、血清因子 (PTC及び安定因子) には作用せぬことを示すものと考えられる。

不安定因子に對する拮抗作用を有することはすでに述べたが、安定因子には著明な變化を來たさない。しかもPTCにも拮抗的には作用せぬことが Biggs-Douglas 法により間接的に証明されたので、AHG, PTA, 血小板第3因子に如何に作用するかが残された問題となる。血小板第3因子については Biggs-Douglas 法において、血小板、カロニン硫酸加血清、カロニン硫酸を加えぬ血漿の組合せでトブ形成が正常またはそれ以上に起こることから、少なくとも拮抗的に作用しないことがわかる。

また松岡—山中法でトブ形成が不良であることは、これに關與する4因子のどれかにカロニン硫酸が作用することが考えられ、血小板第3因子及びPTCは作用を受けぬとすれば、AHGかPTAのいずれかまたは兩者であろうと推測される。またプロトロンビン消費の不良にもこれらの因子、特にAHGが關與することが考えられる。

Table 11. Effect of Charoninsulfuric Acid on the Prothrombin Dilution Curve*(Experiment in vivo)

Rabbit No. & Body Weight	Minutes After the Injection of Charoninsulfuric Acid (1 mg./Kg.B.W).	Prothrombin Time (sec.)	Dilution of the Rabbit Brain Extract	Prothrombin Time (sec.)
No. 1 1.6Kg.	Before	5.7	10x	9.5
			20x	12.0
			40x	14.5
			80x	17.2
			160x	19.8
			320x	21.6
			640x	23.5
			1280x	24.9
	15	5.5	2560x	28.0
			5120x	29.8
			10x	15.4
			20x	18.6
			40x	21.7
			80x	28.0
			160x	33.0
			320x	41.4
No. 2 2.5Kg.	Before	5.7	640x	49.0
			1280x	63.0
			2560x	74.8
			5120x	108.0
	15	5.8	10x	8.0
			20x	11.5
			40x	14.0
			80x	17.5
			160x	22.0
			320x	25.8
			640x	27.1
			1280x	28.7
No. 3 2.0Kg.	Before	5.6	2560x	33.3
			5120x	36.0
	15	5.4	10x	14.0
			20x	17.5
			40x	22.1
			80x	26.2
			160x	31.2
			320x	34.0
No. 4 2.4Kg.	Before	5.2	640x	51.1
			1280x	57.9
			2560x	90.0
			5120x	128
	15	5.1	10x	16.1
			20x	18.3
			40x	23.3
			80x	25.6
			160x	39.0
			320x	46.0
			640x	56.5
			1280x	82.5
			2560x	108.7
			5120x	151

No. 4 2.4Kg.	Before	5.2	10x	12.5
			20x	15.2
			40x	17.6
			80x	20.0
			160x	24.3
			320x	25.1
			640x	28.0
			1280x	29.8
	15	5.1	2560x	31.2
			5120x	32.3
			10x	16.1
			20x	18.3
			40x	23.3
			80x	25.6
			160x	39.0
			320x	46.0

*) The prothrombin dilution curve means prothrombin time measured with serial twofold diluted rabbit brain extract.

Fig. 6. Effect of Charoninsulfuric Acid on Thromboplastin Dilution Curve b.: before the injection of charoninsulfuric acid (1 mg./Kg). a.: minutes after the injection

動物実験においてカロニン硫酸静注後の血液凝固時間の一過性の延長, 白血球数, 血小板数の一過性の減少は, ヘパリンの作用と類似している。ヘパリンが抗トロンボプラスチン作用を有することは MacMillan 及び Brown¹⁸⁾ が証明しているが, 彼等は Biggs-Douglas 法によるトプ形成試験を行い, ヘパリンが血清因子に拮抗的に作用す

ることをみている。著者等はカロニン硫酸を用いて同様の試験を行い、カロニン硫酸はヘパリンと異なり血漿因子に作用してトブ形成を不良ならしめることをみとめた。両者の抗凝固作用にこのような相違のあることは興味深い。

動物実験においてカロニン硫酸静注前及び15分後の血漿トブ稀釋曲線を比較すると、注射後に著しい延長が認められる。著者等¹¹⁾はトブ稀釋曲線が血漿トブ活性化の一部をあらわし、その延長は血漿内トブ形成が不良であることを示すものと考えているが、この成績はさきに述べたトブ形成試験の成績と一致するものと考えられる。

V. 結 論

カロニン硫酸の血液凝固阻止作用について試験管内実験及び動物実験を行い、次の結果を得た。

1) カロニン硫酸は強力な血液凝固阻止作用を有し、ウサギ血液を用いての試験管内実験では1.0cc中1 γ の濃度ですでに軽度の凝固時間の延長を認め、1.0cc中50 γ 以上の濃度では24時間以上流動性を保つ。ヒト血液を用いた場合は1.0cc中0.1 γ の濃度で凝固時間は軽度に延長し、1.0cc中50 γ 以上の濃度で24時間以上流動性を保持する。

ウサギを用い体重1kg當り1mgの割合でカロニン硫酸を静注すると、15分後に血液凝固時間は最も延長し、60分乃至75分後に舊値に復する。

2) 血漿 γ 時間はウサギ血漿では血液1.0ccにつき20 γ の濃度まではほとんど變化しない。

これに反しヒト血漿では血液1.0ccにつき0.05 γ の濃度で延長し、カロニン硫酸濃度が増すにつれて加速度的に延長する。

ウサギに体重1kg當り1mgの割合で静注した場合の血漿 γ 時間は、注射の前後において差をみない。

3) 試験管内実験においても動物実験においても、カロニン硫酸は安定因子に著變を與えない。

4) カロニン硫酸は抗安定因子作用を有する。

5) カロニン硫酸は抗プロトロンビン作用を有する。

6) 松岡—山中法、Biggs-Douglas法のいずれのトブ形成試験を用いても、カロニン硫酸は抗プロトロンボプラスチン形成作用を有し、カロニン硫酸静注後のプロトロンボプラスチン稀釋曲線は延長する。

7) カロニン硫酸静注によりウサギの白血球数及び血小板数は一過性に減少するが、赤血球数には著變をみない。

(本論文の要旨は第19回日本内科学會信越地方會において発表した)。

文 献

- 1) Soda, T. and Egami, F.: Bull. Chem. Soc. Japan, 13:652, 1938; J. Chem. Soc. Japan, 59:1417, 1938. —2)-a. Soda, T. and Terayama, H.: J. Chem. Soc. Japan, 69:65, 1948. -b. Egami, F., Asahi, T., Takahashi, N., Suzuki, S., Shikata, S. and Nishizawa, K.: Bull. Chem. Soc. Japan, 28:685, 1955. -c. Nakanishi, K., Takahashi, N. and Egami, F.: Bull. Chem. Soc. Japan, 29:434, 1955. —3) 田宮春雄, 山本正, 小田孟: 東京醫誌, 55:140, 昭16. —4) 石井暢, 塚田恵一: 日血會誌, 16:233, 昭28. —5) Kurita, H.: Med. J. Shinshu Univ., 1:217, 1956. —6) Lee, R.I. and White, P.D.: Am. J. M. Sc., 145:495, 1913. —7) 松岡松三: 日内會誌, 37:195, 昭24; 日醫新報, 1314:37, 昭24. —8) de Vries, A., Alexander, B. and Goldstein, R.: Blood, 4:247, 1949. —9) 松岡松三等: 内科の領域(印刷中). —10) Quick, A.J.: The Physiology and Pathology of Hemostasis, Lea & Febiger, Philadelphia, 1951, p. 133. —11) 松岡松三: 日血會誌, 19:495, 昭31. —12) 山中學: 日内會誌, 45:203, 昭31. —13) Biggs, R. and Douglas, A.S.: J. Clin. Path., 6:23, 1953. —14) Quick, A.J.: Blood, 4:1281, 1949. —15) Rees, H.M. and Ecker, E. E.: J.A. M. A., 80:1621, 1923. —16) Quick, A.J.: The Physiology and Pathology of Hemostasis, Lea & Febiger, Philadelphia, 1951, p. 139. —17) McLean, J.: Am. J. Physiol. 41:250, 1916. —18) McMillan, R.L. and Brown, K.W.G.: J. Lab. & Clin. Med., 44:378, 1954.