フィブリノーゲンの分解過程にかんする研究

第2編 Serial Thrombin Timeと血漿アンチ トロンビンおよびアンチプラスミンの関係

新潟大学医学部第一内科教室（指導 松岡松三教授）

品 田 章 二

STUDIES ON THE PROCESS OF FIBRINOGEN BREAKDOWN BY PLASMIN II. RELATIONSHIP BETWEEN SERIAL THROMBIN TIME AND PLASMA ANTITHROMBIN OR ANTIPLASMIN

Syoji SHINADA

The First Department of Internal Medicine,
Niigata University School of Medicine, Niigata
(Director: Prof. M. Matsuoka)

概要 目的： 血漿中のプラスミン活性測定法として発表したserial thrombin timeの30分値(STT-30')に及ぼす血漿中のantithrombin II, IIIおよびantiplasmin (rapid, slow)の影響をみた。方法： antithrombin III (Loeliger法), antithrombin II (Blombäck法), antiplasmin (rapid, slow) (Norman法)につき改変を加え、任意に抽出した患者血漿につき、これらの活性と同時に測定した血漿トロンビン時間(TT), STT-30'と比較した。結果： (1) 37°C, 30分incubate後のT.T. (STT-30')は延長するのにantithrombin II, IIIは増加しなかつた。(2) トロンビン時間はantithrombin IIと有意の相関があつた。(3) STT-30'はantithrombin II, IIIいずれとも相関がなかつた。(4) STT-30'はrapid antiplasminと有意の逆相関があつた。以上の成績からSTT-30'はアンチプラスミンの存在下で血漿のプラスミン活性を測定する方法で、antithrombin II, IIIとは関係ないものと考えた。

I. はじめに

第1編でフィブリノーゲンがプラスミンで分解される過程の初期変化をserial thrombin timeがよく把握することを示した¹⁾。

経時的にトロンビン時間を測定し、その延長程度から線溶活性を測定したのはWilhelm²⁾らに始まるが、彼らは一定量のフィブリノーゲン液に被

検液を加え、37°Cにincubateし、経時的にトロンビン時間を測定した。

その後Ingramら³⁾が血漿を加温し経時的にトロンビン液を加え、トロンビン時間の延長からプラスミン活性を知るとし、Reid⁴⁾は1964年standardized serial thrombin time法を発表、さらにBrodskyら⁵⁾⁻⁷⁾はその臨床的応用につき記載し、著者ら⁸⁾はReidの方法に従つてserial thrombin time法を検討しserial thrombin time (STT)の

〔昭和45年2月17日受稿〕

30分値 (STT-30') が血漿中のプラスミン活性をよく把握することを示した。

ここでSTT-30'は、検体として血漿を用い37°C, 30分間incubation後のトロンビン時間であるが、これに血漿中に存在する他種アンチトロンビン (antithrombin IIおよびIII) が関与しないか、および血漿中のアンチプラスミン (rapidおよびslow antiplasmin) が微量のプラスミンといかなる関係にあるかは興味ある点である。

著者は血漿のトロンビン時間 (TT), STT-30'とアンチトロンビン, アンチプラスミン活性を同一検体につき測定比較検討し, STT-30', TTの意義につき考察した。

なお血漿のアンチトロンビン活性, アンチプラスミン活性の測定には下記の如くantithrombin IIIはLoeliger法⁹⁾, antithrombin IIはBlombäck法¹⁰⁾, アンチプラスミンはNorman法¹¹⁾に順じたがその方法実施にあたり二, 三の検討を加えた。

II. アンチトロンビンおよびアンチプラスミン活性測定法について

A) Antithrombin III測定法 (Loeliger変法)

1/10 モル 酢酸ソーダで採血して得た乏血小板血漿 0.5ml を 56°C, 3分間加温した後, 2000回転10分間遠心した上清すなわちheat defibrinated plasmaを検体とした。

図1はその実施法を示す。まず高田試験管 (12×105mm) にトロンビン 0.2ml (50NIH units/ml) とトリス緩衝液 0.6ml (0.05M, pH 7.2) をとり, 浮氷水中に保存する。検体 0.2mlをこれに加え 37°Cにincubateしストップウォッチを始動する。よく混和し 1, 3, 5, 7, 9分時にそれぞれ 0.1mlをとりだし, 前もつて37°C, 3分間incubateしたフィブリノーゲン液〔200mg/dl, フィブリノーゲンミドリ1瓶1gを0.3M, NaClで約2%液として分注し, -20°Cに保存, 要時トリス緩衝液 (0.05M, pH 7.2) でうすめ 200mg/dlとする〕0.2mlにくわえその凝固時間を測定する。

力価換算のためにフィブリノーゲン (200mg/dl) 0.2mlに各種濃度 (20, 10, 5, 2.5, 1.25 NIH

計算 1) トロンビン力価直線から各時点における残存トロンビン活性に換算する
2) 経過時間と残存トロンビン活性 (log. scale) から standard のトロンビン活性を半分に減少するに要する時間 ($t_{1/2}$) を求め, 秒で表現する

図1. Antithrombin IIIの測定法 (Loeliger変法)

units/ml) のトロンビン液 0.1mlを加えその凝固時間を求めると図2左に示す様にトロンビン濃度とトロンビン時間は両対数グラフで直線関係があり, これをトロンビン力価直線とする。

各時点におけるトロンビン時間をこの力価直線により力価に換算し, 残存トロンビン活性を知る。

各経過時点における残存トロンビン活性は図2, 右に示す様に経過時間との間に片対数グラフで直線関係がある。

そこでantithrombin III活性はstandardのトロンビン活性を半分に減少するに要する時間 ($t_{1/2}$) をこの片対数グラフから求め, 秒で表現した。

〔註〕

(1) Antithrombin III活性表現法にinternatio-

図2

nalのものではなくLoeliger⁹⁾はその算定法として37°C incubation 3分時の1分時、および5分時の3分時に対する残存トロンビン活性の%の平均、すなわち37°C、2分間incubationにより残存したトロンビン活性の平均を求め、これが正常人のpooled plasmaのその何%にあたるかとしている。しかしこの方法によると二つの値には差が大で誤差を生じやすいこと、測定のために正常人の対照血漿を要することに欠点がある。著者の方法では測定のためにトロンビン活性を求めるため手技にやや複雑な点もあるが得られる値は高い再現性を有した。

(2) Antithrombin III 活性の大なるときはheat defibrinated plasma 0.1ml, トリス緩衝液0.7ml, トロンビン 0.2ml; 小なるときはheat defibrinated plasma 0.4ml, トリス緩衝液 0.4ml, トロンビン 0.2mlとし以下は同様にして測定した。

B) Antithrombin II 測定法 (Blombäck変法)

蔞酸血漿をトリス緩衝液 (0.05 M, pH 7.2) で10倍に希釈したdiluted plasmaを検体とした。

図3はその実施法を示す。まず検体0.4mlをヘパリン液0.1ml〔ノボヘパリン(ノボ社) 1 A (5 ml) 中5000単位、生理的食塩水で0.5および50

- 計 算 1) トロンビン力価直線から 37°C, 3分後の
トロンビン活性を測定する
(検体+ヘパリン).....(1)
- 2) 対照として検体のかわりに Tris Buffer 0.4ml を
加え、同様にトロンビン活性を測定する
(ヘパリンのみ).....(2)
- 3) Heparin Activated Antithrombin = (2) - (1)

図3. Heparin activated antithrombinの測定法
(Antithrombin II) (Blombäck変法)

U/mlとする〕に加え、さらに、トロンビン液0.5 ml (20 NIH units/ml) を加え37°C、3分間加温後その0.1ml をとりだし、前もって37°C、3分間加温したフィブリノーゲン液 (200mg/dl, 溶解方法は上述のantithrombin III 活性測定法と同じ) に加え凝固時間を測定する。対照としてdiluted plasmaの代りに緩衝液を用い同様に凝固時間を測定する。

活性算出には(検体+ヘパリン+トロンビン)と(緩衝液+ヘパリン+トロンビン)の凝固時間をそれぞれ前述したantithrombin III 活性測定に用いた同じトロンビン力価直線から残存トロンビン活性に換算する。

この(ヘパリンのみ)による残存トロンビン活性から(ヘパリン+検体)による残存トロンビン活性を減じたものをheparin activated antithrombinすなわちantithrombin II 活性とする。

〔註〕

(1) Heparin activated antithrombinは用いるヘパリンの濃度によつて変動するが著者は上記した方法で検討し、図4、上図の如き結果を得た。

そこでその値の安定する範囲(図中横線域)のうち0.5および50U/mlを測定に使用した。

この両者を用いて得る値は必ずしも平行せずいづれがheparin cofactor活性を表現するか不明であるため著者は二つを同時に併記した。

(2) Incubation timeは図4、下図に示す様に不活性化トロンビンがplateauに達する3分時とした。

C) アンチプラスミン 活性測定法 (Norman Hill変法)

Normanらの方法に順じカゼインを基質とし、血漿中のrapidおよびslow antiplasminをそれぞれ測定した。

図5はその実施法を示す。検体には蔞酸血漿を用い、これをborate saline buffer(BSB) (pH 7.4) で4倍および8倍に希釈し、それぞれrapidおよびslow antiplasmin活性測定に用いた。

稀釈血漿 (8 倍) 0.5ml をとり 5 M, methyl-amine 0.4ml とプラスミン (50U/ml) 0.1ml を加え 25°C, 180 分 incubate する。

この incubated sample を 0.4ml とり出し, 4 % カゼイン液 1.0ml, borate saline buffer (BSB pH 7.4) 0.6ml の混液に加え, 37°C 30 分加温後, 15% TCA 3.0ml を加える。

4°C, 12~24 時間保存後遠心ろ過して OD (280 mμ) を求めるが, blank としては incubated sample を加える前に TCA 0.5ml を加えた後 sample を加え 37°C, 30 分加温後さらに TCA 2.5ml を加えたものとし, この OD (280 mμ) を 0 として OD を測定する。

プラスミン力価直線作成には検体のかわりに borate saline buffer (pH 7.4) を用い各濃度のプラスミン (50, 25, 12.5, 0 U/ml) 0.1ml を加え, 同様の操作を加え, 0 U/ml のプラスミン液を 0 とし 280 mμ の各 OD を求める。

図 6, 右図はその力価直線を示す。ここでもプラスミン濃度と OD の間には片対数グラフで直線関係がある。

Slow antiplasmin の定量にはこの力価直線から検体により不活性化されたプラスミン量を求め, 血漿 1 ml 当りの antiplasmin 量として表現する。すなわち検体に血漿を 8 倍にした液 0.5ml を用いているので, この力価直線から得た値に 16 を乗ればよい。

〔註〕

(1) アンチプラスミンの測定にはフィブリノーゲンを基質とする方法が望まれるが, rapid および slow antiplasmin 活性をそれぞれ別々に測定出来ること, 再現性の高いことからカゼインを基質とする本法を用いた。

(2) Slow antiplasmin 活性を表現するには血漿 1 ml 当たりとしたが 蔞酸血漿を用いたため正確にはさらに 10/9 を乗ねねばならない。しかし後述する血漿の STT-30' でもその 蔞酸ソーダ液につき補正しないこと, この STT-30' と比較することが目的であることから, ここでは補正を行なわな

った。

III. 実験材料および方法

被検血漿: 新潟大学松岡内科外来および入院患者のうち無選択的に抽出した 40 例につき トロンビン時間, STT-30' と各アンチトロンビン活性の比較に, 別の 43 例につき STT-30' と各アンチプラスミン活性の比較のために 蔞酸ソーダで採血した。

トロンビン時間: 松岡法⁸⁾

STT-30': 松岡法⁸⁾

Antithrombin III 活性: 上述した。

Antithrombin II 活性: 上述した。

Rapid antiplasmin 活性: 上述した。

Slow antiplasmin 活性: 上述した。

IV. 成績

A) トロンビン時間, STT-30' とアンチトロンビン活性の関係

(1) 血漿を incubation した前後のアンチトロンビンの変動

血漿を 37°C に incubation する前および 30 分後の トロンビン時間, antithrombin III, heparin activated antithrombin につき任意の血漿 4 例を取り測定した。図 7 はその結果を示す。

図中の横軸は 37°C, incubation 前および 30 分後を示し, 4 例の変化はそれぞれ直線で結んだ。STT-30' はそれぞれ延長するにもかかわらず他のアンチトロンビン活性は上昇せず, STT-30' の延長は血漿中の antithrombin III または II が活性化されたものではないと考えられた。

図 7. Incubation 前後の血漿の各アンチトロンビン

(2) 血漿トロンビン時間と各アンチトロンビン活性の相関

血漿のトロンビン時間と各アンチトロンビン活性を任意の血漿40例につき測定し、その相関をみた。図8はその成績を示す。すなわち横軸には各アンチトロンビン活性、縦軸にトロンビン時間をとった。antithrombin IIIおよびheparin activated antithrombin (heparin 50 U)とトロンビン時間にはなんらの相関を認めなかつた。しかしトロンビン時間とheparin activated antithrombin (heparin 0.5 U)には有意の相関($r=0.633$, $P<0.01$)を認めた。

(3) STT-30'と各アンチトロンビン活性の相関

前項と同じ血漿40例につきSTT-30'を縦軸に、各アンチトロンビン活性を横軸にとりその相関につき図9に示した。

図8. トロンビン時間と各アンチトロンビンの相関 (40例)

図9. STT-30'と各アンチトロンビンの相関 (40例)

図 10

STT-30'はantithrombin IIIおよびheparin activated antithrombin (50 Uおよび 0.5 U)のいずれとも相関を認めなかつた。

〔小括〕

以上から血漿のトロンビン時間にはheparin cofactorが関係するがSTT-30'にはいずれのアンチトロンビン活性とも相関はなく、またSTT-30'の延長は血漿中のアンチトロンビンが活性化されたものではないと考えられた。

B) STT-30'とrapidおよびslow antiplasmin活性の相関

(1) STT-30'とrapid antiplasminの相関

任意の血漿43例につきSTT-30'とrapid antiplasminを測定し、それぞれ縦軸と横軸にとり図10, 左図に示した。

両者の間には有意の逆相関($r=-0.395$, $P<0.01$)を認めた。

(2) STT-30'とslow antiplasminの相関

前項と同じ血漿につきSTT-30'とslow antiplasminの相関を図10, 左図に示したが両者の間には相関はなかつた。

〔小括〕

血漿のSTT-30'は血漿のアンチプラスミンのうちrapid antiplasminと1%の危険率で有意の逆相関を認めたが、slow antiplasminとはなんらの相関も認めなかつた。

V. 考 案

Reid⁴⁾はserial thrombin time法を循環血中のプラスミン活性を測定する方法とし、そのincu-

bationには26°Cを推奨したがBrodskyら⁶⁾は37°Cでincubationし、STTは(1)線溶、(2)線維素原減少、(3)アンチトロンビン効果の総合を測定するものと推論した。

著者ら⁸⁾はReid⁴⁾やBrodskyら⁶⁾⁷⁾の使用しているトロンビン濃度(50NIH units/ml)の1/10のうすい濃度(5NIH units/ml)かつ同一Lot No.を用いると再現性の高い成績を得ること、また経時的に測定しなくとも37°C、30分incubationした血漿のトロンビン時間(STT-30')がよく血漿のプラスミン活性を表現することを示した。

さらに血漿のserial thrombin time (STT)の検討で、(1)血漿に各濃度のプラスミンを加えると血漿のみの場合に比し濃度に応じてSTTは延長した。(2)血漿のみのSTTと血漿にtransaminomethyl cyclohexane carboxylic acid (t-AMCHA), soybean trypsin inhibitor (SBTI)を加えたSTTを比較するとt-AMCHAでは血漿のSTTを抑制しないがSBTIでは強く抑制したことから血漿のSTTの延長には血漿のプラスミンが関与するとした。

しかし血漿トロンビン時間およびSTT-30'に及ぼす他種アンチトロンビンの関与についての記載は見あたらない。著者は血漿中に生理的に存在するantithrombin IIおよびIII活性測定法を検討し、同じ蓚酸血漿につきその活性とSTT-30', TTを測定比較した。

血漿トロンビン時間にはantithrombin II, V, およびVIが関与し、antithrombin III活性は影響しないといわれるが¹²⁾著者の成績はそのうちのantithrombin IIとの間に相関を認めた。

しかしantithrombin IIについては現在、二つの意義、すなわち、(1) heparin-heparin cofactor complex, (2) heparin cofactor aloneがあり¹⁸⁾、さらにこのheparin cofactor aloneでもBlombäckら¹⁰⁾は用いるヘパリン濃度により差があるとし、その測定に一定した方法がない。著者はheparin activated antithrombinをantithrombin IIとしたがこの場合ヘパリン0.5Uを用いた値と

有意の相関を得た。

血漿トロンビン時間に及ぼすantithrombin VI (フィブリノーゲン分解産物¹⁴⁾)の影響は非常に興味あるところであるが第1編で述べた様に、この出現にはプラスミン量の大なることが必要なることから、他の線溶検査の異常をみた時にフィブリノーゲン分解産物を考えるべきであろう。anti-torombin Vについては今後の検討にまきたい。

STT-30'となると各アンチトロンビン活性のいずれとも相関をもたなくなり、かつSTT-30'の延長はこれらのアンチトロンビンが活性化されたものでないことを示したが、STT-30'の延長は血漿中のフィブリノーゲンにトロンビンが作用する前に、加えたトロンビンが不活性化されるのではなく、血漿中のフィブリノーゲン-フィブリン転化の遅延によると考えられた。

ところで血漿中にはアンチプラスミンが存在しプラスミンを中和し、dangerousまたはexcessiveの線溶をおさえており、生体の線溶における生理的調整を営むとされている。

Norman¹⁵⁾はプラスミンと血漿または血清を混和しその活性をみると瞬間的低下および時間経過とともに漸減的低下のあることから前者をrapid、後者をslow antiplasminとした。このrapidおよびslow antiplasminはプラスミンに対し可逆的および不可逆的に結合し、rapid antiplasminは基質蛋白が大となると可逆的にプラスミンから離れる。アンチプラスミンの存在する血漿中に血液凝塊をいれても溶解するのはこの離れたプラスミンによるとした¹⁶⁾。

この正否はともかく著者の成績でSTT-30'とrapid antiplasminに有意の逆相関のあつたことは注目される。著者はアンチプラスミン測定法としてその基質にカゼインを用いたが、rapid antiplasminの測定にフィブリノーゲンを基質として検討するとなお一層興味ある所見を示すと考える。

著者ら⁸⁾はSTT-30'がフィブリノーゲン量を変化させず、平板溶解能をもたない程度のプラスミン活性を把握するとしたが、STT-30'とrapid

antiplasminが有意の逆相関を有するとの成績はこれを支持する成績で、STT-30'はアンチプラスミンの存在下で微量のプラスミン活性を測定する方法であることが示された。

Normanら¹¹⁾¹⁵⁾¹⁶⁾の説を考えにいと血漿中ではプラスミンはrapidおよびslow antiplasminで遮蔽されているが、rapid antiplasminとプラスミンは密接な関係があり前者の減少によりプラスミン活性は亢進し、STT-30'の延長を、増加によりSTT-30'の抑制を来たと考えられる。

アンチプラスミンを凌駕する程度のプラスミン活性増加時にはSTT-30'は無量大となるか、凝固してももろいフィブリン糸をみたり血漿自体にフィブリン平板を溶解する能力を有する。アンチプラスミンで遮蔽されている程度のプラスミンがrapidおよびslow antiplasminとどのような型で結合し、これがフィブリノーゲンにどのような作用しているかは全く不明で、今後の検討が望まれる。

VI. 結 論

血漿のserial thrombin time 30分値(STT-30')の意義を明らかにする目的で任意の患者血漿40例および43例につきアンチトロンビン活性およびアンチプラスミン活性をそれぞれ測定し、同時に測定したSTT-30'と比較した。

その結果、(1) 血漿を37°C、30分incubateした後のトロンビン時間(STT-30')は延長するのにantithrombin IIおよびIII活性は増加しなかつた。

(2) 血漿のトロンビン時間はantithrombin II (heparin 0.5 U/ml) とに有意の相関 ($r=0.633$, $P<0.01$) を示した。

(3) STT-30'とantithrombin II, IIIには相関がなかつた。

(4) STT-30'はrapid antiplasminと有意の逆相関 ($r=-0.395$, $P<0.01$) を示した。

以上からSTT-30'はアンチプラスミンの存在下で微量のプラスミン活性を測定する方法でantithrombin II, IIIとは別のものと考えた。

文 献

- 1) 品田章二：フィブリノーゲンの分解過程に関する研究 第1編 諸種濃度のプラスミンによるヒト

- フィブリノーゲンの分解過程について、日内会誌、59：512—520, 1970. —2) Wilhelm, D.L., Miles, A.A. and Mackay, M.E.: Enzyme-like globulins from reproducing the vascular phenomena of inflammation. II. Isolation and properties of the permeability factor and its inhibitor. Brit. J. exp. Path. 36: 82—104, 1955. —3) Ingram, G.I.C., Norris, P.R. and Tanner, E.I.: Acute coagulation disorders at parturition. A schema of laboratory investigation, with illustrative case. J. Obs. Gyn. Brit. Emp. 67: 367—383, 1960. —4) Reid, W.O.: The standardized serial thrombin time for detection of circulating fibrinolysin. Blood Coagulation, Hemorrhage and Thrombosis, edited by Tocantins, L.H. and Kazal, L.A., p 261—263, Grune & Stratton, New York, London, 1964. —5) Brodsky, I., Ross, E. and Reid, W.O.: The use of the serial thrombin time in evaluating therapy with epsilon aminocaproic acid in massive thrombolysis and proteolysis. Amer. J. clin. Path. 41: 589—596, 1964. —6) Brodsky, I., and Dennis, L.H.: Evaluation of fibrinolysis in hepatic cirrhosis, relation of serial thrombin time and euglobulin lysis time. Amer. J. clin. Path. 45(1): 61—69, 1966. —7) Brodsky, I., Meyer, A.N., Kahn, S.B. and Ross, E.M.: Laboratory diagnosis of disseminated intravascular coagulation. Amer. J. clin. Path. 50(2): 211—220, 1969. —8) 松岡松三, 品田章二, 塚田恒安, 桜川信男, 野村稜一, 米山泰夫: Serial Thrombin Time の検討, 臨床血液, 9 (5): 576—584, 1968. —9) Hensen, A. and Loeliger, E.A.: Antithrombin III, its metabolism and its function in blood coagulation. Thromb. Diath. hemorrh. suppl. 1 ad vol. 9. —10) Blombäck, B., Blombäck, M. and Olsson, P.: Studies on thrombin inactivation in normal plasma, serum and plasma fractions, and its relation to heparin. Thromb. Diath. hemorrh. 9: 368—386, 1963. —11) Norman, P.S. and Hill, B. M.: Studies of the plasmin system. III. Physical properties of the two plasmin inhibitors in plasma. J. exp. Med. 108: 639—649, 1958. —12) von Kaulla, K.N., and von Kaulla, E.: Estimation of the thrombin time of plasma. Blood Coagulation, Hemorrhage and Thrombosis, edited by Tocantins, L.H. and Kazal, L.A., p335—340, Grune & Stratton, New York, London, 1964. —13) Verstraete, M.: Antithrombins. Diffuse Intravascular Clotting, Thromb. Diath. hemorrh. (suppl.) 20: 365—389, 1966. —14) Niewiarowski, S. and Kowalski, E.: Un nouvel anticoagulant dérive du fibrinogène. Rev. Hémat. 13 (3): 320—328, 1958. —15) Norman, P.S.: Studies of the plasmin system. II. Inhibition of plasmin by serum or plasma. J. exp. Med. 108: 53—68, 1958. —16) Norman, P.S.: Antiplasmin. Fed. Proc. 25: 63—67, 1966.