薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
100 (8) 811-818 (1980)

蛇毒の酵素化学的研究 (第 6 報¹⁾) ヒャップダ毒より抗血液凝固因子
Anticoagulant 1 および Anticoagulant 2 の精製とその性質²⁾

杉原久義, 二改俊章, 中村多佳子, 大道博子, 田中哲之助
名城大学薬学部³⁾

Enzymochemical Studies on Snake Venoms. VI.¹⁾ Purification and
Properties of Anticoagulant Factors of Anticoagulant
1 and 2 in the Venom of *Agkistrodon acutus*²⁾

HISAYOSHI SUGIHARA, TOSHIAKI NIKAI, TAKAKO NAKAMURA,
HIROKO DAIDO and TETSUNOSUKE TANAKA
Faculty of Pharmacy, Meijo University³⁾

(Received February 12, 1980)

Two anticoagulant factors anticoagulant 1 (A1) and anticoagulant 2 (A2) were isolated from the venom of *Agkistrodon acutus* by a combination of gel filtration on Sephadex G-75 and chromatographies on carboxymethyl (CM)-Sephadex C-50, diethylaminoethyl (DEAE)-Sephacel. By these procedures, 98.6 mg of A1 and 24.8 mg of A2 were obtained from 1 g of crude venom.

Anticoagulant activities of these preparations were inhibited by mercaptoethanol but not by soy bean trypsin inhibitor (SBTI), egg white trypsin inhibitor (EWTI), *p*-chloromercuribenzoate (PCMB), diisopropyl fluorophosphate (DFP), heparin or trasylol. These preparations were homogeneous as judged by disc electrophoresis on polyacrylamide gels at pH 8.3 and pH 4.3, and isoelectric focusing. The molecular weight of A1 and A2 were determined to be 25800 and 24000. By the addition of mercaptoethanol, A1 was dissociated into two subunits (MW 14000 and 12800), and A2 was also dissociated (13300 and 10500). By this treatment, anticoagulant activities of A1 and A2 were both lost. The isoelectric points were found to be pH 5.80 and pH 7.06 by isoelectric focusing with carrier ampholyte, respectively.

These factors did not possess caseinolytic, fibrinogenolytic, fibrinolytic, esterolytic, 5'-Nucleotidase, ATPase, phosphomonoesterase, phosphodiesterase, phospholipase A, lethal or hemorrhagic activities. These proteins contained a little carbohydrates.

Keywords—venom; purification and properties of anticoagulant factors; *Agkistrodon acutus*; anticoagulant activity; homogeneous by electrophoresis

ヒャップダ咬症時にみられるおもな症状は局所症状としては出血, 壊死, 浮腫であるが, 全身症状としては血液凝固時間の著しい延長である.⁴⁾ 著者らはすでにこの毒より血液凝固を促進する因子としてアルギニンエステラーゼを単離して報告⁵⁾しているが, ヒャップダ咬症時には上記の通り, 凝固時間の遅延が特徴となっている. この抗凝固作用がいかなる因子あるいは機作によるのかを解明するためにこの実験を行った.

実 験 の 部

材料 新鮮凍結乾燥ヒャップダ毒は台湾在住の蘇卿杼氏より入手したものである.

Sephadex G-75, carboxymethyl (CM) Sephadex C-50, diethylaminoethyl (DEAE) Sephacel はファルマシア

1) 第 5 報: 杉原久義, 二改俊章, 梅田 浩, 田中哲之助, 薬誌, 99, 1161 (1979).

2) 日本薬学会第 99 年会, 札幌, 1979 年 8 月.

3) Location: Yagotourayama, Tenpaku-ku, Nagoya.

4) Y. Sawai, *The Snake*, 8, 1 (1976).

5) 杉原久義, 二改俊章, 小田文彦, 田中哲之助, 薬誌, 98, 832 (1978).

社製を用いた。Centrox-P (リン脂質) は大阪大学蛋白質研究所 (現九州大学理学部) 加藤久雄博士より分与されたものである。その他の試薬類は試薬特級を用いた。

抗血液凝固活性の測定法 カオリン活性化部分トロンボプラスチン時間 (Kaolin Act-PTT) は内因系の凝固を調べるために用いた。その方法は Matchett の方法⁶⁾ に準拠して次のように行った。クエン酸ナトリウム加牛血漿を 0.1 ml, 0.5% カオリン 0.1 ml, 適当濃度の試料液 0.1 ml を内径 1 cm, 長さ 10 cm のシリコン塗布した試験管にとり, 28° の恒温槽で 9 分間保温した後, 0.2% Centrox-P 0.1 ml を加えて更に 1 分間保温し, 0.025 M CaCl₂ 溶液 0.1 ml を加えると同時に秒時計を始動し, 一定間隔で試験管を恒温槽から取り出して観察しながら全体が凝固して流動性がなくなるまでの時間を測定した。なお, カオリン液, Centrox-P 液は下記のよう

に調製使用した。

0.5% カオリン (0.15 M NaCl 含有 0.01 M トリス塩酸緩衝液, pH 7.4)

0.2% Centrox-P (メタノール 0.5 ml, 0.15 M NaCl 含有 0.01 M トリス塩酸緩衝液, pH 7.4, 9.5 ml) これを用時 10 倍希釈して使用した。

その他の活性の測定法は第 1 報⁷⁾ で報告した通りである。

結 果

抗血液凝固因子の分離

Sephadex G-75 ゲルろ過 粗毒 1000 mg を 0.01 M NaCl 含有 0.04 M トリス塩酸緩衝液 (pH 7.2) 3 ml に溶解し不溶物を遠心除去後, 同緩衝液で平衡化した Sephadex G-75 でゲルろ過を行った。その結果 Fig. 1 に示す溶出パターンが得られた。各ピークを溶出順に 1, 2, 3, 4, 5 とすると, 抗血液凝固活性は 3 の画分に溶出してきた。この第 3 画分を集めて 0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で透析後, CM Sephadex C-50 カラムにアプライした。

CM Sephadex C-50 クロマトグラフィー

素通り画分を溶出させた後, 食塩濃度を 0 M から 0.5 M まで直線的に上昇させると Fig. 2 のパターンが得られた。4 と 5 の画分に抗血液凝固活性因子が溶出してきた。第 4 の画分を Anticoagulant 1 (A1), 第 5 の画分を Anticoagulant 2 (A2) とし, それぞれを別々に精製した。

Fig. 1. Gel Filtration of the Venom of *Aghistrodon acutus* on a Column of Sephadex G-75

●—●: absorbance at 280 nm.

Aghistrodon acutus venom was applied to a column (2.5×99 cm) of Sephadex G-75 equilibrated with 0.04 M Tris-HCl buffer containing 0.01 M NaCl, pH 7.2 and 3 ml fractions were collected at a flow rate of 9 ml/hr.

Fig. 2. CM Sephadex C-50 Column Chromatography

●—●: absorbance at 280 nm, — — —: conductivity.

The anticoagulant fraction (indicated with black bar at Fig. 1) was applied to a column (1.9×43 cm) of CM sephadex C-50 equilibrated with 0.01 M phosphate buffer, pH 7.0. The column was eluted with a linear gradient from 0 M to 0.5 M NaCl in 300 ml of the buffer. 3 ml fractions were collected. The flow rate was 27 ml/hr.

6) M.O. Matchett, I.C. Lngam, *J. Clin. Path.*, 18, 465 (1965).

7) 杉原久義, 二改俊章, 森浦正憲, 神谷和人, 田中哲之助, 日細菌, 27, 47 (1972).

DEAE Sephacel クロマトグラフィー (A1)

A1 画分を集めて 0.01 M トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5) で透析後, DEAE Sephacel カラムにアプライした. 食塩濃度を 0 M から 0.5 M まで直線的に上昇させると Fig. 3 のパターンが得られた. これを A1 の最終標品とした.

DEAE Sephacel クロマトグラフィー (A2)

A2 画分を集めて 0.01 M トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5) で透析後, DEAE Sephacel カラムにアプライした. 食塩濃度を 0 M から 0.5 M まで直線的に上昇させると Fig. 4 のパターンが得られた. これを A2 の最終標品とした.

A1 および A2 の最終標品の均一性 ティスク電気泳動⁹⁾ A1 および A2 をそれぞれポリアクリルアミドを支持体とした pH 8.3, pH 4.3 の 2 本のゲルにアプライし通電 1 本あたり 3 mA で約 2 時間泳動した. 染色は 1% コマジーブリリアントブルー R 250 を用い, 48° 2 時間染色後, 脱色液 (酢酸:メチルアルコール:水 1:5:5) で脱色した結果 Fig. 5 に示す単一なバンドが得られた.

最終標品における各種酵素活性および生理活性

Table I は最終標品 A1, A2 の各種酵素および生理活性を測定した結果である. 粗毒中にはここに示した各種酵素活性および生理活性が認められるが, A1, A2 には抗凝固活性のみが存在し, 粗毒に含まれる他の諸活性は認められなかった.

精製過程における A1, A2 の活性動向

Table II は各精製段階における A1 と A2 の活性の動向をまとめたものである. 粗毒 1000 mg を出発材料として A1 と A2 の最終標品の収量は 98.6 mg, 24.8 mg であった. 粗毒, Sephadex G-75 の段階ではプロティナーゼが存在するため活性を測定することはできなかった. DEAE Sephacel の段階で A1 は 5.0 μ g で 148.2 秒, A2 は 9.7 μ g で 134.5 秒とブランクの 99.5 秒に対して凝固時間が延長した.

A1, A2 の性質

分子量の測定 Shapiro⁹⁾ および Weber, Osborne ら¹⁰⁾ の方法による SDS 電気泳動法により測定を行った. 10% ポリアクリルアミドゲルを支持体とし, 0.1% ブロムフェノールブルー液をマーカーとして 1 本あたり 8 mA で約 3 時間泳動した. A1 は標準タンパクとして, BDH 社製分子重量測定マーカー (monomer; 14300,

Fig. 3. DEAE Sephacel Column Chromatography of Anticoagulant 1

●—●: absorbance at 280 nm, — — —: conductivity. The anticoagulant 1 fraction (indicated with black bar at Fig. 2) was applied to a column (1.5 × 43 cm) of DEAE sephacel equilibrated with 0.01 M Tris-HCl buffer, pH 7.5. The column was eluted with a linear gradient from 0 M to 0.5 M NaCl in 300 ml of the buffer. 3 ml fractions were collected. The flow rate was 27 ml/hr.

Fig. 4. DEAE Sephacel Column Chromatography of Anticoagulant 2

●—●: absorbance at 280 nm, — — —: conductivity. The anticoagulant 2 fraction (indicated with black bar at Fig. 2) was applied to a column (1.5 × 43 cm) of DEAE sephacel equilibrated with 0.01 M Tris-HCl buffer, pH 7.5. The column was eluted with a linear gradient from 0 M to 0.5 M NaCl in 300 ml of the buffer. 3 ml fractions were collected. The flow rate was 27 ml/hr.

8) 永井 裕, 別冊蛋核酵, 物理化学実験法, 3, 3 (1967).

9) A.L. Shapiro, E. Vinuela, J.V. Maizel, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 28, 815 (1967).

10) K. Weber, M. Osborne, *J. Biol. Chem.*, 244, 4406 (1969).

TABLE I. Various Enzymatic and Physiological Activities of Anticoagulant 1 and 2

Enzymatic activities	Anticoagulant 1	Anticoagulant 2
Proteinase	—	—
TAMEase ^{a)}	—	—
5'-Nucleotidase	—	—
ATPase	—	—
Phosphomonoesterase	—	—
Phosphodiesterase	—	—
Phospholipase A	—	—
Physiological activities		
Anticoagulant	+	+
Clotting	—	—
Lethal	—	—
Hemorrhagic	—	—

a) Tosyl-L-arginine methyl ester (TAME) hydrolase.

TABLE II. Summary of the Purification of Anticoagulant 1 and 2

Step	Anticoagulant 1			Anticoagulant 2		
	Protein (mg)	Yield (%)	Kaolin ^{a)} act-PTT	Protein (mg)	Yield (%)	Kaolin act-PTT
Crude venom	1000	100	nd ^{b)}	1000	100	nd
Sephadex G-75	372	37.2	nd	372	37.2	nd
CM Sephadex	117.7	11.8	158.5 sec (5.4 μ g)	37.4	3.7	138.5 sec (9.8 μ g)
DEAE Sephacel	98.6	9.9	148.2 sec (5.0 μ g)	24.8	2.5	134.5 sec (9.7 μ g)

a) Kaolin activated Partial Thromboplastin Time.

b) Not determined.

Fig. 5. Disc Electrophoreses of the Main Peaks (Anticoagulant 1 and Anticoagulant 2) from DEAE Sephacel Column Chromatographies

dimer; 28600, trimer; 42900, tetramer; 57200, pentamer; 71500) を用いた。A2 は Insulin; 3400, Aprotinin; 6500, Cytochrome C; 12500, soy bean trypsin inhibitor; 21500, RNA polymerase α ; 39000 を用いた。各々の mobility の差から分子量を求めると、A1 は 25800, A2 は 24000 と算出された。なおこの際メルカプトエタノール (ME) 共存下で泳動すると A1, A2 はそれぞれ 2 本のバンドに解離し、その分子量は A1 が 14000 と 12800, A2 が 10500 と 13300 となった (Fig.6).

Fig. 6. SDS Disc Electrophoretic Patterns of Anticoagulant 1 and 2

a) without mercaptoethanol, b) with mercaptoethanol.

Fig. 7. Isoelectric Focusing of Anticoagulant 1

●—●: absorbance at 280 nm, — — —: pH.
Isoelectric focusing with carrier ampholyte covering the pH range 5—8 was conducted in a column of capacity for 72 hr at 4°.

Fig. 8. Isoelectric Focusing of Anticoagulant 2

●—●: absorbance at 280 nm, — — —: pH.
Isoelectric focusing with carrier ampholyte covering the pH range 5—8 was conducted in a column of capacity for 72 hr at 4°.

等電点¹¹⁾ LKB 8100 エレクトロフォーカシングタンパク分離装置を用い pH 5—8 の carrier ampholyte を使用し等電点分画を行った。A1 は 26 mg, A2 は 2 mg を用い 4°, 300 V で 1 時間, 次に 500 V で 1 時間, 700 V で 72 時間泳動し, 280 nm の吸光度および pH を測定すると, Fig. 7,8 に示すようにそれぞれシングルピークを示しその等電点は A1 は pH 5.8, A2 は 7.06 と測定された。

糖の定性定量試験 A1, A2 の最終標品に糖が含有されているかどうかを確認するため, アンスロン硫酸反応¹²⁾を行ったところ, 両者とも陽性であり糖を含有していることがわかった。グルコースの検量線から求めた A1, A2 の糖含量はグルコースに換算してそれぞれ 3.1 $\mu\text{g}/\text{mg}$ であった。

11) 松尾雄志, 堀尾武一, 蛋核酵, **12**, 737 (1967).12) D.L. Morris, *Science*, **107**, 254 (1948).

TABLE III. Effects of Various Inhibitors on Anticoagulant 1 and 2

Inhibitors (final concentration)	Anticoagulant 1	Anticoagulant 2
SBTI (100 μ g)	—	—
EWI (100 μ g)	—	—
PCMB (3 mM)	—	—
DFP (3 mM)	—	—
Trasylol (30 unit)	—	—
Heparin (100 μ g)	—	—
Mercaptoethanol (1.4 mM)	+	+

—: No inhibition. +: Inhibition.

TABLE IV. Effects of Mercaptoethanol on Anticoagulant 1 and 2

Inhibitor (final concentration)	Anticoagulant 1	Anticoagulant 2	Saline
None	540 sec ^{a)} <	540 sec <	99.5 sec
Mercaptoethanol (0.7 mM)	104 sec	110 sec	107.3 sec

a) Kaolin activated Partial Thrombolastin Time.

Fig. 9. Effect of Temperature on Anticoagulant 1 and 2

●—●: anticoagulant 1,
○—○: anticoagulant 2.

各種阻害剤による影響 Table III は各種阻害剤の A1, A2 に対する影響をみたもので, A1 5.0 μ g, A2 6.9 μ g と各種阻害剤を 28°, 15 分間保温後, 活性を測定した結果である. A1, A2 とともにメルカプトエタノールによって阻害され, その他の阻害剤では阻害されなかった.

メルカプトエタノールによる影響 Table IV は A1, A2 のメルカプトエタノールによる影響を調べたものである. A1, A2 とともに抗凝固活性が 540 秒以上のものを用いた.

それぞれの試料にメルカプトエタノールを加え (終濃度 0.7 mM), 28°, 10 分間保温後, 抗凝固活性を測定すると, A1, A2 とともにメルカプトエタノール共存下では 104 秒と 110 秒 (メルカプトエタノールのみの時は 107.3 秒) となり, 活性は完全に消失した. その時の試料を用い SDS ディスク電気泳動を行うと 2 本のバンドに解離していることが認められた. この試料を 0.01 M トリス塩酸緩衝液中で透析し, メルカプトエタノールを除いたのち, 活性を測定したが抗凝固活性の回復は認められなかった.

熱安定性 Fig.9 は A1, A2 を 28°, 37°, 40°, 45°, 55°, 60°, 65°, 70° の各温度で 2 分間保温後, 抗凝固活性を測定し, 至適温度 (28°) での活性と比較して, その割合を % で示したものである. 両者とも 28° までは安定であったが, A1 は 55° で 60% に減少し, 70° では活性が完全に消失した. また A2 は 40° で 60% に, 50° では 50% に減少し, 60° では完全に活性が消失した.

以前, 著者らがヒヤッポダ毒より精製した血液凝固作用を有するエステラーゼ⁵⁾ は, 95° で 20 分間加熱しても 50% の活性を保持していた. それに比べ A1, A2 は 2 分間の保温でも急速に活性を消失し, 熱に対し極めて不安定であることが伺われた. A2 は A1 よりもさらに不安定であった.

pH 安定性 A1 5.0 μg , A2 6.9 μg に Britton-Robinson 緩衝液¹³⁾ pH 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12 をそれぞれ加え, 4°, 24 時間保温後, 0.01 M トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5) で 24 時間透析後, 抗凝固活性を測定した. A1, A2 無添加のブランクは 99.5 秒で凝固するのに対し, A1 は pH 6, 7, 8 で 3 分以上凝固せずこの範囲では安定であった. また A2 は pH 6 では 3 分以上凝固しなかったが, pH 7 では 170 秒で凝固した. 他の pH では A1, A2 とはいずれも凝固時間の延長はみられなかった. この実験でも A2 は A1 より不安定であることがわかった.

総 括

1. 新鮮ヒャッポダ毒より Sephadex G-75, CM Sephadex C-50, DEAE Sephacel の 3 段階の精製により Anticoagulant 1 (A1) と Anticoagulant 2 (A2) を得た.
2. A1, A2 とともに pH 4.3 および 8.3 ゲルディスク電気泳動, SDS ディスク電気泳動, 等電点分画においてそれぞれ単一であった.
3. それぞれの等電点は pH 5.8 と pH 7.06 であった.
4. SDS ディスク電気泳動より求めた分子量は, A1 が 25800, A2 が 24000 であった.
5. A1, A2 をメルカプトエタノールで処理するとそれぞれ 2 つのフラグメントに解離し, A1 は 14000 と 12800, A2 は 13300 と 10500 の成分となった. 2 つに解離した A1, A2 はともに抗凝固活性を失った. またメルカプトエタノールを除いても活性の回復はみられなかった.
6. 両因子とも易熱性であったが, A2 は A1 よりも不安定であった.
7. A1 は 6—8 の pH で安定であったが, A2 は pH 6 では安定, 7 では活性が減少し, 他の pH では活性は消失した.
8. A1, A2 とともにその分子中にわずかな糖を含んでいた.
9. ヒャッポダ毒中の抗血液凝固作用を示す成分はこの A1 と A2 である.

考 察

ある種の毒蛇咬症の際, 血液が極めて凝固しにくいことは, 著しい病変の 1 つとして古くから知られていた. これら蛇毒中には血液凝固因子とともに血液凝固反応系を阻害する因子の存在が指摘されてきた. この凝固と抗凝固因子をもつ蛇には, *Agkistrodon acutus*,⁴⁾ *Trimeresurus gramineus*,¹⁴⁾ *Echis colorata*,¹⁵⁾ *Vipera lebetina*,¹⁶⁾ *Vipera aspis*,¹⁷⁾ などが知られている. 一般にクサリヘビ科やコブラ科の蛇毒にこの作用が強いとされている.¹⁸⁾ これまで蛇毒の抗凝固作用は phospholipase A によるリン脂質の分解¹⁹⁾ や, fibrinogen がプロテナーゼにより分解をうける²⁰⁾ といったことが考えられてきた. 事実, *Bitis nasicornis*²¹⁾ や *Bitis arietans*²²⁾ 毒中の抗凝固活性はカゼイン水解活性を示す因子による fibrinolysis, fibrinogenolysis と考えられている.

今回精製したタンパクはこのような酵素活性は示さなかった. それゆえ, 上記の場合のように凝固系に関与するタンパクを加水分解するために凝固延長がおこるのではなく, まったく別の機構でおこるのであろうことが推定される. A1, A2 は各種電気泳動で単一なバンドを示し分子量も両者とも類似していた. 興味あることはこれら標品をメルカプトエタノール存在下で SDS 電気泳動を行うと両者とも還元され, 2 つのフラグメントに解離

13) H.T. Britton, R.A. Robinson, *J. Chem. Soc.*, 458, 1456 (1931).

14) S. Shiau, C. Ouyang, *Toxicon.*, 2, 213 (1965).

15) B. Moav, C. Moroz, A.De. Vries, *Toxicon.*, 1, 109 (1963).

16) M.I. Roitman, *Vopr. Med. Khim.*, 12, 477 (1966).

17) M.C. Boffa, F. Josso, G.A. Boffa, *Thromb. Diath. Haemorrh.*, 27, 8 (1972); M.C. Boffa, P. Delori, J.P. Soulier, *ibid.*, 28, 509 (1972).

18) D. De Klobusitzky, *Am. J. Med. Sci.*, 242, 107 (1961).

19) 田宮信雄, 鈴木友二, 船津 勝, “タンパク毒素 (下),” 講談社, 東京, 1972, pp. 1—948.

20) E. Regoeczi, J. Gergely, A.S. Macfarlane, *J. Clin. Invest.*, 45, 1202 (1966).

21) N. Mackay, J.C. Ferguson, G.P. McNicol, *J. Clin. Pathol.*, 23, 789 (1970).

22) S. Brink, J.G. Steyler, S.A. *Med. Tydskr.*, 48, 1205 (1974).

し、抗凝固活性を失うことである。メルカプトエタノールを除いても活性の回復がみられなかったが A1, A2 とそれぞれ 2 つのフラグメントが結合した状態で抗凝固活性を発現し、メルカプトエタノールを除いただけでは解離しているフラグメントが再結合して活性型にもどることはできないようである。

ヒヤッポダ毒より抗凝固作用を有する因子を分離した報告は Ouyang ら²³⁾ によってなされている。彼等は DEAE sephadex A-50, Sephadex G-200, Sephadex G-200 リクロマトのステップで 1 つの抗血液凝固因子を精製している。その物質は分子量約 20650, 等電点 pH 4.7 の熱に不安定な糖タンパクであり、粗毒中に存在するいずれの酵素、生理活性をも持たないタンパクであるといっている。これと今回精製した A1, A2 と比べてみると、糖を含むこと、熱に不安定なこと、粗毒中の他の諸活性をもたないことは良く似ているが、分子量 25800 (A1), 24000 (A2), 等電点 pH 5.8 (A1), pH 7.06 (A2) などの点で相違がみられた。

ヒヤッポダ毒中の抗血液凝固因子は A1, A2 の 2 種類であるので Ouyang ら²³⁾ の因子は A1, A2 のいずれかと思われるが現段階ではそれを決定することはできない。等電点については測定法の違いが大きいと思われる。すなわち Ouyang らはセルローズアセテート膜を用いて等電点を測定しているが、著者らは carrier ampholyte を用いて測定しているので、より正確であると思われる。さらにメルカプトエタノールによる解離についても検討していない。

今回精製した A1, A2 が血液凝固系のいずれに、どのような形で作用するのかという疑問に対して、これら標品は内因系、外因系 (Quick の 1 段法プロトロン時間²⁴⁾) のいずれも阻止するところから、これらの作用点は X 因子以前においては存在しないと思われる。

A1, A2 にトロンビンを加えたものに、fibrinogen を加えると凝固し、トロンビンの TAME 水解活性も残存していた。また、fibrinogen に A1, A2 を加えたものにトロンビンを加えてもブランク (生理食塩水で 13 秒) と同時間で凝固した。なおここで生じた fibrin を溶解する作用もみられなかった。従って、A1, A2 はトロンビンを直接阻害する作用、fibrinogenolysis, fibrinolysis のいずれの作用ももたないことがわかった。

これらの点よりこれら A1, A2 標品は II, V, X, Xa 因子のいずれかに作用するものと考えられるが、その作用機作については今後さらに検討していきたい。

謝辞 本実験において、抗血液凝固活性の測定法を御教示いただき、ならびに貴重な Centrox-P を分与していただいた大阪大学蛋白質研究所 (現九州大学理学部) 岩永貞昭、加藤久雄両博士に感謝いたします。

23) C. Ouyang, C.M. Teng, *Biochim. Biophys. Acta*, **278**, 155 (1972).

24) A.J. Quick, B.M. Stonly, F.W. Bancroft, *Am. J. Med. Sci.*, **190**, 501 (1935).