薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
108 (9) 860-866 (1988)

オレイン酸とアンチトロンビン III との相互作用

平原敬三,^{*,a} 安藤直子,^a 松石哲郎,^a 鈴木信夫,^a
寺尾俊彦,^b 倉田宗司^c

ヘキストジャパン株式会社医薬総合研究所,^a
浜松医科大学産婦人科,^b 城西大学薬学部^c

Interaction between Oleic Acid and Human Antithrombin III

KEIZO HIRAHARA,^{*,a} NAOKO ANDOH,^a TETSURO MATSUISHI,^a
NOBUO SUZUKI,^a TOSHIHIKO TERAOKA,^b
and MUNETSUGU KURATA^c

Hoechst Japan Ltd, Pharmaceutical Research Laboratories,^a Minamidai,
Kawagoe, Saitama, 350, Japan, Hamamatsu Medical College, Obstetric
and Gynecology,^b Handa, Hamamatsu, Shizuoka, 431-41, Japan
and Josai University, Faculty of Pharmaceutical Sciences,^c
Keyakidai, Sakado, Saitama, 350-02, Japan

(Received April 8, 1988)

The addition of sodium oleate to antithrombin III (ATIII) produced complexes of ATIII and oleic acid by varying the acid concentration. During immunoelectrophoresis, ATIII shifted to the anode in the presence of sodium oleate. The reactivity of ATIII with anti human ATIII serum lowered as the sodium oleate level increased. However the reactivity with antibody obtained by immunization of rabbits with the mixture of sodium oleate and ATIII, was not lost on the immunoelectrophoresis. In acrylamide gel electrophoresis, ATIII separated into 6 bands with an increase in sodium oleate. The binding ratio of ATIII to heparin-Sepharose decreased in the presence of sodium oleate. In acrylamide gel isoelectrofocusing, the subtypes of ATIII having pI 5 showed high affinity to oleic acid. These high affinity subtypes also showed high affinity to heparin and thrombin. In fibrinogen agarose electrophoresis, ATIII lost its antithrombin activity depending on the increase of sodium oleate. By the determination of free fatty acids (FFA) in ATIII purified from normal plasma, we found that FFA would bind to ATIII in the normal plasma. Scatchard plot analysis indicated 7.6 binding sites of oleic acid per ATIII molecule.

The results suggested that ATIII lost its activity by conformational change or interference in the thrombin binding site, and that the subtype of ATIII having pI 5 could be a significant carrier of plasma FFA.

Keywords—antithrombin III; oleic acid; plasma free fatty acid; carrier protein

緒 言

血液凝固系, 線溶系, キニン系, 及び補体系の諸反応はいずれも血中における生体防御のための重要な反応系であり, それぞれの反応系では種々のプロテアーゼが密接に関与して機能している. このような血中プロテアーゼ系の制御及び調節的役割を果たしているのが, 種々の血中プロテアーゼインヒビターである. 血液凝固系については, アンチトロンビン III (AT III) が最も重要な役割を果たしている. AT III はその名の示す通りトロンビンをはじめとして Xa, IXa, XIa 及び XIIa の各凝固因子の活性を阻害する.^{1,2)} 特に, 血中のトロンビン阻害活性の 70% を AT III が占めているという.³⁾ したがって, 血中の AT III 活性の低下は顕著な凝固異常を伴う.⁴⁾ 一方, 妊娠中毒症では血清アルブミン量の低下に加えて, 脂質代謝異常のため血中遊離脂肪酸 (FFA) の量が増加するという.⁵⁾

血清アルブミンが FFA のキャリアプロテインとして機能していることから、妊娠中毒症においてはアルブミンと結合していない FFA が存在する可能性も考えられる。

Heimburger はオレイン酸と AT III が結合し、そのことにより AT III 活性は有意に阻害されることを報告したが、⁶⁾ それ以後、脂肪酸と AT III の相互作用についての報告はない。我々は、予備試験においてラウリル硫酸ナトリウム (SDS) や Triton X-100 の AT III 阻害活性はオレイン酸と比較しはるかに低いという結果を得たことから、オレイン酸が AT III に対して特異性の高い作用をしているものと考えられた。そこで、本論文ではオレイン酸と AT III の相互作用を検討した結果、等電点電気泳動 (IEF) によって分離される AT III の pI 5 付近の分子種はオレイン酸と強い相互作用を示し、また同様に、この AT III の分子種はトロンビンやヘパリンとも強い相互作用を示すこと、更には正常ヒト血漿から精製した AT III に FFA が結合していることを見出したので報告する。

実 験 の 部

試薬及び試料 オレイン酸ナトリウム、グリシン、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン、トリクロロ酢酸、スルホサリチル酸は和光純薬より、電気泳動試薬はバイオラッド社より、ヘパリン、ヒトフィブリノゲンはミドリ十字社より、adenosine triphosphate (ATP)、ホスホエノールピルビン酸、reduced nicotinamide adenine-dinucleotide (NADH)、ピルビン酸キナーゼ、ミオキナーゼ、CoA はペーリンガー山ノ内社より、アシル CoA シンテターゼはシグマ社より購入したものを、アガロース及びウシトロンビンはヘキスト社のものを用いた。精製ヒト AT III はペーリングベルケ社より供与されたものを使用した。精製ヒト AT III の純度は SDS ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) により 99% 以上であった。

オレイン酸ナトリウムは、使用時にペーナル緩衝液 (pH 7.6, ヘキスト社製) に溶解して用いた。AT III とオレイン酸の等量混合物は、86.2 μ M の AT III とオレイン酸ナトリウムの 32 mM 溶液の 2 倍ずつの連続希釈液を 1:1 に混ぜ Heimburger の方法⁶⁾ に従い 37°C, 30 分間インキュベートし直ちに以下に述べる実験に用いた。

ポリアクリルアミドゲル電気泳動 Davis らの方法⁷⁾ に従って行った。ランニングゲル: 濃度; 7.5%, 緩衝液; 0.375 M トリス塩酸 (pH 8.8), スタッキングゲル: 濃度; 4.5%, 緩衝液; 0.063 M トリス塩酸 (pH 6.8) からなる 10 cm $\times$ 8 cm $\times$ 1 mm のスラブゲルを用いて泳動を行った。泳動用緩衝液は 0.192 M グリシンを含有する 0.025 M トリス (pH 8.3) を用いた。泳動層はバイオラッドミニプロテイン II を使用し、泳動条件は 25 mA, 2 時間で行った。泳動後、ゲルは 0.1% コマシーブリリアントブルー R250 液で 2 時間染色した。なお、ゲルには 5—20 μ g の蛋白を試料として用い泳動した。

免疫学的分析 Grabar and Williams の方法⁸⁾ に従って行った。AT III と各種濃度のオレイン酸ナトリウムの 3 μ l を 1.2% アガロース寒天プレートの穴にそれぞれ入れ、3 mA/cm, 90 分間、泳動を行った後、それぞれの溝にウサギ抗ヒト AT III 血清 (ヘキスト社製) 及び当研究室にて調製したウサギ抗ヒト AT III-オレイン酸ナトリウム血清 (抗 AT-OA) を入れ、18 時間、室温で反応させ沈降線を観察した。抗 AT-OA の調製は、雄性ウサギ (日本白色種) 2 羽に AT III (5 mg/ml) とオレイン酸ナトリウム (5 mg/ml) の等量混合物 1 ml とフロイントの完全アジュバント (ディフコ社製) 1 ml の懸濁物を各々 0.5 ml ずつ、2 週間間隔で背部皮下に注射を繰り返した。最終免疫 1 週間後に全採血し血べい退縮後 3000 rpm で遠心分離して抗血清を得た。これらの抗血清は使用時まで -80°C で保存した。

IEF IEF はファルマシアー LKB のアプリケーションノート (No. 320) に従って行った。泳動は、マルチフォー II チャンバー (ファルマシアー LKB) を使用し 25 ワットで 3 時間、10°C で行った。陰極には、0.1 M ベータアラニン溶液を、陽極には、0.1 M グルタミン酸を含む 0.5 M リン酸溶液を電極液として使用した。泳動には、8 μ l の試料を用いた。

泳動用ゲルは、アンフォライン-PAG PLATE, pH 4.0—6.5 (ファルマシア-LKB) を使用した。泳動終了後、ゲルは固定液 (トリクロロ酢酸; 57.5 g, スルフォサルチル酸; 17.25 g を 500 ml の蒸留水に溶解したもの) に 30 分間浸し、更に脱色液 (メタノール; 500 ml, 酢酸; 160 ml, 蒸留水; 1340 ml) で 5 分間処理し、あらかじめ 60°C に加温しておいた染色液 (0.46 g のコマシーブリリアントブルー R250 を 400 ml の脱色液に溶解したもの) に 10 分間浸し前記の脱色液で脱色した。

ヘパリン-セファロースカラムクロマトグラフィー AT III と各種濃度のオレイン酸ナトリウムの混合物における AT III のヘパリンへの結合性を検討するため、Gray and Barrowcliffe の方法⁹⁾ に従って行った。操作は、すべて室温で行った。ヘパリン-セファロースゲル (ファルマシア-LKB) は、あらかじめ 15 分間、水で膨潤させ

てガラスフィルター上で 1/15 M リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄し更に、同じ緩衝液で懸濁したのち、K9/15 カラムにつめ PBS で平衡化した。このカラムに 1 ml の AT III オレイン酸ナトリウム混合物を加え、まず、PBS で 280 nm の吸光度が 0.001 となるまで十分に洗浄し、つぎに 0.5 M 塩化ナトリウム含有 PB でヘパリンに結合した AT III を溶出させ、結合 AT III 量を一元放射状免疫拡散法 (SRID)¹⁰⁾ により測定し、カラムにかかる前後の量からオレイン酸による AT III のヘパリン結合能に及ぼす影響を検討した。

フィブリノゲン-アガロース電気泳動 Mancini らの抗体含有寒天平板の調製法¹⁰⁾ を若干変更して行った。フィブリノゲン-アガロース寒天プレートは、あらかじめ 37°C に保温しておいた 25 mg/ml のヒトフィブリノゲン液 3 ml と 50—55°C に保温しておいた 1.5% アガロース液 12 ml を混和後、直ちにガラスプレート (10×10 cm) 上に注ぎ作製した。このプレートに直径 2 mm の穴と 1 mm 幅の溝を作り、AT III と各種濃度のオレイン酸ナトリウムの混合物 3 μ l を穴に入れ 9 mA/cm で 2 時間泳動後、前もって作製しておいた溝に 30 単位/ml の濃度のウシトロンビンを入れ、37°C でフィブリンが沈着してくるまでインキュベートした。AT III 活性のある部分にはフィブリンの沈着は認められなかった。

遊離脂肪酸の測定 健康人の血中 AT III に FFA が結合しているか否かを検討するため、ヒト血漿より AT III を Miller-Andersson らの方法¹¹⁾ により精製し、Shimizu らの方法¹²⁾ により FFA を測定した。精製 AT III の純度は、いずれも SDS-PAGE により 99% 以上であった。精製 AT III は 280 nm の吸光度より 5 mg/ml の濃度に調製し FFA 濃度測定に供した ($E_{280}^{1\%}$; 7.5)。FFA 測定は、まず、AT III 溶液 50 μ l と 50 μ M のトリス塩酸緩衝液 pH 8.0 に、6 μ M 塩化マグネシウム、3.2 μ M ATP、7.4 μ M ホスホエノールピルビン酸、0.28 μ M NADH、0.4 μ M ethylenediaminetetraacetic acid, disodium salt (EDTA-2Na)、0.8 mg Triton X-100、21.6 U ミオキナーゼ、12 U ピルビン酸キナーゼ、12 U 乳酸脱水素酵素及び 3 mU アシル CoA シンターゼを含有する反応液、630 μ l とをよく混和し、37°C で 5 分間インキュベートした。つぎに、0.26 μ M の CoA を含む 50 μ M トリス塩酸緩衝液 680 μ l を加えよくかくはんし、25°C で 5 分間インキュベートした後、NADH の酸化による 340 nm の吸光度の減少を測定した。なお、スタンダードとしてオレイン酸ナトリウムの希釈液を用い、その検量線より FFA 量を求めた。

AT III に対するオレイン酸の結合量の測定 50 μ M の AT III にオレイン酸ナトリウムの 0.26, 0.52, 1.04, 2.08, 4.15, 8.3, 16.6 mM 溶液をそれぞれ等量ずつ混和し、37°C、30 分間インキュベーションの後、直ちにセファデックス G-25 を用いてゲルろ過を行い AT III に結合しているオレイン酸の量を前記の遊離脂肪酸の測定法に従い測定した。AT III に結合するオレイン酸の量は Scatchard plot により求めた。

結 果

AT III とオレイン酸の電気泳動による相互作用の解析

AT III とオレイン酸の混合物を SDS-PAGE にて分析した。その結果、オレイン酸ナトリウムの混合物と AT III 単独の場合の泳動図には全く差を認めなかった。しかしながら、SDS の非存在下に泳動を行ったところ、Fig. 1 に示すようにオレイン酸ナトリウムフリーでは AT III は 1 本のバンドとして検出されたが、オレイン酸

Fig. 1. Polyacrylamide Gel Electrophoresis of the Mixture of Purified ATIII and Sodium Oleate in the Presence or Absence of 2 Units Heparin

A, ATIII; B—J, ATIII+2-fold serial dilution of 32 mM sodium oleate, respectively. B lane shows the pattern of ATIII+32 mM sodium oleate.

Fig. 2. Immunoelectrophoresis of the Mixture of Purified ATIII and Sodium Oleate

Anti AT, rabbit anti human ATIII serum; anti AT-OA, rabbit anti human ATIII-oleic acid complex serum.

ナトリウムの存在下においては AT III のバンドと比べ陰極側に 3 本、陽極側に 2 本のバンドが検出され、オレイン酸の濃度が減少するに伴い陽極側のバンドは徐々に消失し、ついで陰極側のバンドも消失した。これらの AT III と異なる移動度を示すバンドは、86.2 μ M の AT III に対して、オレイン酸 0.5 mm 以上存在するときはじめて観察された (lane H)。この際、オレイン酸ナトリウムと AT III の混合物にヘパリンを加えて泳動を行っても泳動像には全く影響を与えなかった。更に、AT III と移動度の異なるバンドが AT III とオレイン酸の複合体であるか否かを確認するため、ズダン染色を行ったところ、各々のバンドはいずれも染色されることからこれらのバンドは AT III オレイン酸複合体であるものと考えられる。

次に、AT III オレイン酸ナトリウム混合物について免疫電気泳動を行った。Fig. 2 に示すように、陽極側に移動度のはやくなった AT III は、オレイン酸の濃度増加にともないウサギ抗ヒト AT III との反応性は低下した。このことは、AT III の抗原決定基の一部がオレイン酸によって変化させられていると考えられる。一方、ウサギ抗 AT-OA 血清はこの陽極側に移動度のはやくなった AT III とも反応性を示した。このことは、AT III がオレイン酸と複合体を形成することより抗原決定基に変化が生じ、なんらかの作用によって別の部分が抗原決定基として認識された可能性があることを示している。この結果から、オレイン酸は AT III のトロンビン結合部位に対しても影響していることが考えられるため、フィブリン-アガロースによる電気泳動を行って AT III オレイン酸複体の抗トロンビン活性を検討した。Fig. 3 に示すように、オレイン酸の濃度増加にともない AT III の抗トロンビン活性は著しく抑制された。この結果は、オレイン酸は AT III の抗原決定基ばかりでなくトロンビン結合部位に対しても影響を及ぼしていると考えられる。

AT III は Weidinger ら,¹³⁾ Tsuji ら¹⁴⁾によって報告されているように血漿中に 6 種以上の分子種が存在し、その各々は IEF によって異なるバンドとして検出される。そこで、これら AT III の各分子種とオレイン酸の相互作用を検討するため IEF を行った。Fig. 4 に示すように、AT III 86.2 μ M に対しオレイン酸ナトリウム 8—32 mm を 1:1 に混和して泳動したところ、オレイン酸の濃度変化にともない pI 5 付近のバンドが徐々に消失した。このことは、AT III にヘパリンやトロンビンを加えても同様の現象として認められることから、この結果はオレイン酸がトロンビンやヘパリンと比較的親和性の高い pI 5 付近の分子種と結合しやすいことを示している。

Fig. 3. Fibrinogen Agarose Electrophoresis of the Mixture of Purified ATIII and Sodium Oleate

pH 6.5

pH 4

Fig. 4. Isoelectrofocusing of the Mixture of ATPIII and Sodium Oleate

A, ATIII+8 mM sodium oleate; B, ATIII+16 mM sodium oleate, C, ATIII+32 mM sodium oleate; D, ATIII alone.

ヘパリン-セファロースカラムへのオレイン酸存在下での AT III の結合性

AT III オレイン酸ナトリウム混合物を 1/15 M PBS で十分に平衡化したヘパリン-セファロースカラムに流し、0.5 M 塩化ナトリウムを含むリン酸緩衝液により溶出させ AT III の結合量を求めた。Table I に示すように AT III のみでは 100% がヘパリン-セファロースに結合したのに対して、86.2 μ M の AT III にオレイン酸ナトリウムを 0.1 mM 加えた場合にはその結合率は 90% に低下し、更に、オレイン酸ナトリウム 0.2 mM 加えた場合には、その結合率は 46% までに低下した。すなわち、オレイン酸は AT III のヘパリン結合部位に対して何等かの影響を及ぼしている結果が得られた。

精製 AT III 中の FFA の定量

AT III に FFA がどの位結合しているかを検討するために、正常ヒト血漿より AT III を Miller-Andersson

TABLE I. Heparin Sepharose Chromatography of the Mixture of ATIII and Sodium Oleate

Sodium oleate (mM)	ATIII antigen (%)	
	Bound	Unbound
0	100	4
0.1	90	10
0.2	46	54

TABLE II. Content of Fatty Acid in Purified ATIII from Normal Plasma

Plasma No.	Fatty acids content (mol per one mol of ATIII)
1	0.75
2	0.44
3	0.13
4	0.25
5	0.13
6	0.13

らの方法¹¹⁾により精製し、AT III に結合している FFA 量を測定した。精製 AT III は SDS-PAGE では 1 本のバンドとして、また、ウサギ抗ヒト AT III 血清とのゲル内沈降反応では特異的に反応した。Table II に示すように、FFA はオレイン酸換算で AT III の 1 モルあたり約 0.13—0.75 モル結合していた。このことは、正常血漿においても FFA と AT III は相互作用していることを示すものであり、高脂肪酸血漿においては AT III とオレイン酸などの脂肪酸との結合量は更に多くなると考えてよいであろう。

ヒト AT III に対するオレイン酸の結合量

Fig. 5 に示すように、AT III の 1 モルに結合するオレイン酸は約 7.6 モル、また、その結合定数は $2.18 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ と計算された。このことから AT III には、オレイン酸に対する結合部位は少なくとも 7—8 個存在するものと考えられる。この点については、更に検討中である。

Fig. 5. Scatchard Analysis of Oleic Acid Binding to ATIII

考 察

糖尿病患者や妊娠中毒症の患者血漿中には、しばしば FFA の増加が認められ、凝固異常をおこすことが知られる。^{5,15)} したがって、凝固制御に重要な役割を果たしていると考えられている AT III と FFA の相互作用を研究することは、非常に意義のあることと考えられる。そこで、本研究は、血中の FFA の中で最も多く存在するオレイン酸¹⁵⁾と AT III の相互作用について検討した。AT III はオレイン酸の存在下、各種複合体が形成され PAGE では AT III のバンドの陽極側に 2 本、陰極側に 3 本のバンドが認められた (Fig. 1)。このことは、オレイン酸と AT III が種々の分子量の複合体を形成し、また、オレイン酸の結合による荷電の変化でこのように種々のバンドが生じたものと考えられる。複合体の形成については、高速液体クロマトグラフィーでの解析¹⁶⁾からオレイン酸の存在下、AT III の単一ピークが 5 本のピークとして検出されることから支持される。Heimbürger⁶⁾は、主要な 2 本のバンドと非常に薄い 2 本のバンドを同様な方法により検出したことを報告したが、我々の結果ではいずれのバンドも明瞭に検出され、この結果の違いについては全く不明で更に検討する必要があるであろう。しかし、いずれにしても AT III がオレイン酸と複合体を形成していることは免疫電気泳動などの結果 (Fig. 2—4) から明らかである。これらの複合体形成に関しては Danishefsky らの AT III に糖脂質の結合部位が存在するという報告¹⁷⁾ Nagasawa らのステロイドホルモンが AT III に結合するという報告¹⁸⁾より AT III の疎水性部位を介しての相互作用によるものと考えられる。この相互作用は結果として AT III の構造変化を起こすことは Fig. 2 の免疫電気泳動の結果からも明らかであり新しい抗原決定基の出現をもたらしing していると考えられる。

AT III へのオレイン酸の結合量は、AT III の 1 モルに対して 7.6 モルと計算され AT III 分子には 7—8 個の結合部位があるものと考えられる。また、その結合定数は $2.18 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ と計算され、アルブミンに対する各種脂肪酸の結合定数が 10^5 — 10^8 M^{-1} であること¹⁹⁾を考えるとオレイン酸の AT III に対する結合はこれらと比べより強いものと考えられ、AT III とオレイン酸の混液にアルブミンを加えても AT III の活性を回復させることができないという結果²⁰⁾を支持するものである。Mueller らは血液中のアルブミンは 1 モルあたり 20 モルの脂肪酸を結合することができることを、Saifer & Goldman は市販のアルブミン 1 モルは 9 モルまでの FFA を結合していることを報告^{21,22)}しており、AT III の脂肪酸結合部位はアルブミンよりは少ないものと考えられる。この点については、現在、更に検討中である。

多くの場合、血液中に存在する FFA はアルブミンと結合しており AT III と FFA の相互作用は最小限に抑えられている。¹⁵⁾ しかしながら、正常のヒト血漿より精製した AT III も FFA の存在が確認され、正常のヒト血漿中においても AT III と脂肪酸の相互作用は全く無視しうるものではないと考えられる (Table II)。これに加えて、血液凝固部位においてはアルブミンと AT III のモル比はしばしば変化し AT III の存在比の増加が考えら

れ、局所においては AT III がアルブミンと競合的に FFA と結合する可能性も示唆される。

AT III には 6 個以上の分子量の等しい分子種の存在が知られている。これらの分子種は糖鎖の違いにより等電点に差を生じたもので、ノイラミニデース処理で 1 本のバンドとして検出されるという。²³⁾ ここで用いた AT III 中の分子種の割合は pI 4 側より 0.9, 2.5, 14.9, 8.5, 34.7, 32.3, 6.2% とデンストメトリーの結果より計算され、特に pI 5 付近のバンドは全体の約 70% を占めており Weidinger ら¹³⁾が報告している最も正常人に共通に認められるパターンと一致していた。これらの分子種はその組み合わせの量的な違いからいくつかの表現型が報告されている。そして、いくつかの表現型では凝固異常を起こしやすいことも報告^{13,14)}されている。そこで、我々は各々の分子種とヘパリン、トロンビン、オレイン酸の相互作用について IEF を用いて検討し、いずれの場合も pI 5 付近のバンドがヘパリン、トロンビン、オレイン酸と強く相互作用し最初に消失することを確認した。

すなわち、オレイン酸は生体内においてトロンビンと比較的親和性の高い分子種と相互作用することにより AT III の生理作用を低下させるものと考えられる (Fig. 3, 4)。

以上の結果は、AT III が FFA によって構造変化を起こすことにより、あるいは、そのトロンビン結合部位が直接 FFA によって阻害されることにより AT III 活性を失うこと、pI 5 付近に移動度を示す AT III の分子種が FFA の有意なキャリアーとなりうること、そして、例えば、アルブミン量の血液レベルが低く、FFA 量のレベルの高いヒトでは血液凝固障害を起こしやすいことを示唆している。今回、我々は血漿中に多く存在するオレイン酸と AT III の相互作用を検討したが、今後、他の脂肪酸についても検討し、アルブミンとの比較において FFA の AT III での結合部位の同定などを検討する予定である。

引用文献及び注

- 1) E. W. Davie, D. J. Hanahan, "The Plasma Proteins," Vol. III, ed. by F. W. Putnam, Academic Press, New York, 1977, p. 421.
- 2) J. Stuerzebecher, F. Markwardt, *Thromb. Res.*, **11**, 835 (1977).
- 3) T. Lebreton De Vonne, H. Mouray, *Int. J. Biochem.*, **12**, 479 (1980).
- 4) O. Egeberg, *Thromb. Diath. Haemorrh.*, **13**, 516 (1965).
- 5) 飯沼博朗, 産科と婦人科, **50**, 1066 (1983); 小林隆夫, 寺尾俊彦, 平原敬三, 松石哲郎, 産婦人科 新生児血液, **11**, 107 (1987).
- 6) N. Heimburger, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **353**, 1957 (1972).
- 7) B. J. Davis, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**, 404 (1964).
- 8) P. Grabar, C. A. William, *Biochim. Biophys. Acta*, **10**, 193 (1953).
- 9) E. Gray, T. W. Barrowcliffe, *Thromb. Res.*, **37**, 241 (1965).
- 10) G. Mancini, A. O. Carbonara, J. F. Hermans, *Immunochemistry*, **2**, 235 (1965).
- 11) M. Miller-Andersson, H. Borg, L. O. Andersson, *Thromb. Res.*, **5**, 439 (1974).
- 12) S. Shimizu, K. Inoue, Y. Tani, H. Yamada, *Anal. Biochem.*, **98**, 341 (1979).
- 13) S. Weidinger, F. Schwarzfischer, H. Cleve, "Antithrombin III; A New Polymorphism Revealed by Isoelectrofocusing and Immunofixation," *Electrophoresis '82*, Walter de Gruyter Co., Berlin and New York, 1983, p. 761.
- 14) H. Tsuji, H. Takamatsu, S. Sawada, I. Niwa, N. Maebo, T. Toyoda, K. Rin, M. Nakagawa, H. Ijichi, *Blood and Vessel*, **17**, 432 (1986).
- 15) 吉田 洋, 高橋善弥太, 武藤泰敏, 日本臨床, **38**, 149 (1980).
- 16) 第 27 回日本臨床血液学会 (熊本, 1985 年 10 月) にて発表.
- 17) I. Danishefsky, A. Zweben, B. L. Slomiany, *J. Biol. Chem.*, **253**, 32 (1978).
- 18) H. Nagasawa, Y. Hotta, N. Takara, M. Fujimaki, K. Fukutake, *Thromb. Diath. Haemorrh.*, **34**, 345 (Abs) (1975).
- 19) J. D. Ashbrook, A. A. Spector, E. C. Santos, J. E. Fletcher, *J. Biol. Chem.*, **250**, 233 (1975).
- 20) 平原敬三, 松石哲郎, 鈴木信夫, 寺尾俊彦, 倉田宗司, 薬誌, **108**, 867 (1988).
- 21) A. Saifer, L. Goldman, *J. Lipid Res.*, **2**, 268 (1961).
- 22) P. S. Mueller, D. M. Watkin, *J. Lab. Clin. Med.*, **57**, 95 (1961).
- 23) A. Borsodi, T. R. Narashiman, *Br. J. Haematol.*, **39**, 121 (1978).