

123.

612.115.3

落花生種子成分ノ Heparin 様血液凝固 抑制物質ニ關スル知見補遺

後編

Heparin ノ血液凝固抑制機轉ニ就テ

岡山醫科大學生理學教室(主任生沼教授)

醫學士 玉尾延忠

[昭和17年7月15日受稿]

第1章 序言

前編¹⁾既述ノ如ク、倉橋氏²⁾ハ落花生種子成分中ノ血液凝固抑制物質ハ恐ラク Heparin 類似物ナラント言ヘリ。余ハ更ニ其ノ本態ヲ究明セントシテ種々ノ實驗ヲ行ヒ、落花生種子成分ノ血液凝固抑制作用ヲ確認スルト共ニ、倉橋氏ノ臆測ヲ指針トシ、諸家ノ血液凝固學說ニ則リ、該抑制作用ノ機轉ヲ追究シ、前編記載ノ如ク Ca-Ion = 關與スルコトナク、Antiprothrombin 竝ニ Antithrombin トシテ作用スルコトヲ知リ、聊カ補遺スル所アリタリ。

茲ニ於テ余ハ更ニ之ト關聯シテ Heparin ヲ製出シ、其ノ效力ヲ檢定シタル上、凝固抑制作用ノ機轉其ノ他 1, 2 ノ性質ヲ追試實驗シ、果シテ落花生種子成分中ノ血液凝固抑制物質ガ Heparin ト其ノ本態ヲ等シクスルモノナリヤ否ヤヲ検討セント企テタリ。

抑々 Heparin ナルモノハ 1916 年 W.H. Howell ノ研究室ニ於テ其ノ共同研究者 J. Mc. Lean³⁾ ガ肝臟ヨリ血液凝固促進物質ヲ製出セントスル試驗ニ於テ、該物質即チ Cephalin ヲ分離スルヤ強力ナル凝固抑制作用ノ存スル事實ヨリ發見サレタルモノニシテ、次テ 1918 年 W. H. Howell⁴⁾ ハ

E. Holt ト共ニ其ノ新物質ニ關スル研究ヲ發表シ、最初ニ發見サレタル臟器ニ因ミテ之ヲ Heparin ト命名セリ。而シテコノ新シキ概念ヲ以テ血液凝固ニ關スル新學說ヲ提唱シ、本物質ノ作用機轉ハ Ca-Ion = 關與スルコトナク、Antiprothrombin トシテ作用スルモノトナシ、循環血中ニ於テハ之ガ血液凝固保護物質トナリテ血液ノ液狀保持ニ重大ナル役割ヲ演ズルモノナリト說ケリ(別著⁵⁾前編第2章參照)。而シテ其ノ標本ハ 1 mg ガ滿血液 5—10 cc ヲ 0°C = 於テ 24 時間全ク凝固ヲ阻止ス(Howell⁶⁾ノ所謂 5—10 單位ニ相當ス)ト言ヘリ。尙岡氏ハ 1924 年⁷⁾、更ニ 1928 年⁸⁾之ガ製法ヲ改良シ、其ノ化學竝ニ生理學的研究ヲ報告シ、後ナル發表ニ依レバ方ニ 100 單位ノ力價ヲ有スト言ハル。降ツテ 1933 年 A. F. Charles & D. A. Scott⁹⁾ハ一新製法ヲ發表シ、其ノ精製 Heparin ハ優ニ 500 單位ノ力價ヲ有スト言ヘリ。本邦ニ於テモ増野¹⁰⁾、柏村¹¹⁾ノ如ク Heparin ノ化學竝ニ作用機轉ニ關スル權威アル研究アリト雖モ、其ノ製法ハ概ネ Howell⁶⁾氏法ニ準據セルモノナリ。其ノ他 Heparin = 關スル研究乃至之ヲ使用セル實驗報告ヲナセル諸家モ多クハ Howell 氏法ニ依ル Firma Hynson, Wesscott & Dunning 製ノ市販品ヲ

材料ト爲セリ。コノ際ホ斬新ニシテ簡易ナル Charles-Scott 氏法ヲ追試シ、以テ力價ヲ檢定スルト共ニ所企ノ實驗ニ供用スルコトト爲シタリ。

第2章 實驗材料竝ニ實驗方法

1) Heparin ノ製法

前章記載ノ如キ起旨ニ由リ、余ハ Charles-Scott⁹⁾ 氏法ニ準據シテ Heparin ヲ製出セリ。本法ハ Howell⁶⁾ 氏法ノ如ク豫メ當該臟器ヨリ血液ヲ洗滌除去シ乾燥粉末トナシタル後浸出スルガ如キ煩瑣ナル手段ヲ經ズ、其ノ調製頗ル簡易ナリ。以下其ノ概要ヲ記述セントス。即チ材料トシテハ新鮮ナル犬肝 500 g. ヲ採取シ、直チニ之ヲ細切シ、先ヅ 25°Cニ於テ 24 時間自家融解ヲ起サシム。然ル後 0.5 N 苛性曹達液 730 cc 及ビ飽和硫酸安門 87 cc ヲ加ヘ、之ヲ重湯煎ニテ 50°Cニ 30 分間保チ、急激ニ 70°Cニ加温シ、直チニ麻布ヲ以テ 12 時間吸引濾過ス。濾液ニ濃硫酸ヲ加ヘテ pH 2—2.5 ナラシメ 65°Cニ加温ス。コノ際 Heparin ガ蛋白質ト共ニ沈降スベシ。其ノ混和物ヲ熱キ儘濾過シ、pH 2—2.5 ノ加温セル稀硫酸ヲ以テ洗ヒ、硫酸安門ノ痕跡ヲ除ク。斯クシテ得タル殘渣ヲ室溫裡ニ 20 時間 90% Alcohol 100 cc ヲ以テ浸出ス。次ニ Alcohol ヲ遠心分離シ、其ノ沈澱物ヲ苛性曹達液 75 ccニ溶解シ (pH 8—8.4 トス)、Trypsin 2 g 及ビ數滴ノ Xylol ヲ加ヘ、37°Cノ孵卵器内ニ 36 時間置ク。コノ間ニ時々 pH ノ變動ヲ檢シコレヲ調整スルモノトス。然ル後 95% Alcohol ヲ 2 倍容量加ヘ、更ニ鹽酸 0.5 cc ヲ加ヘテ酸性トナシ、20 時間放置ス。斯クシテ沈降セル Heparin ヲ遠心分離シ、pH 8 ノ鹼性液ニ溶解ス。其ノ鹼性溶液ヲ 75°Cニ熱シ Trypsin 作用ノ續行ヲ停止セシム。不溶性分割ハ遠心除去シ、其ノ上清液ニ 2 倍容量ノ Aceton ヲ加ヘ、更ニ鹽酸ヲ追加シテ酸性トス茲ニ生ジタル沈澱ヲ遠心分離シ、眞空ニ於テ乾燥シ、乃チ粗製 Heparin 3.8 g ヲ得タリ。余ハ試藥等ノ都合ニ依リ止ムヲ得ズコノ粗製品ヲ以テ爾後

ノ實驗ニ充當スルノ外ナカリキ。因ミニ之ガ 10% 水溶液ヲ以テ Biuret 反應ヲ檢シタルニ陰性ニシテ、Molisch 反應ハ明カニ陽性ナリ。

2) 其ノ他ノ實驗材料竝ニ實驗方法

以上ノ外血液血漿其ノ他試藥ノ準備ハ概ネ前編ノ場合ニ準ズ。血液乃至漿液凝固時間測定法モ亦前編記載ト略ボ同様ナリ。但シ時ニヨリテ多少趣向ヲ變ヘタル場合アリ、其ノ詳細ニ就キテハ次章以下實驗成績ノ部ニ於テ各項目ニ就キ夫々附記セントス。

第3章 實驗成績

第1節 自家製 Heparin ノ力價檢定

彼レノ如キ調製法ニ依ツテ收得シタル粗製 Heparin 0.1 g ヲ生理的食鹽水 10 ccニ溶解シ、之ヲ更ニ生理的食鹽水ヲ以テ遞減的ニ稀釋シ、其ノ各々 1.0 cc ヲ小試驗管 (口徑 1.2 cm, 長さ 10 cm)ニ取り、家兎心動脈血 1.0 cc トヲ混和シ、直チニ氷室 (3°C)ニ放置シテ 24 時間後其ノ血液凝固狀態ヲ觀察セリ。其ノ結果第 1 表ニ示スガ如シ。

第 1 表

試驗管番號	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
被檢液 1.0 ccノ Heparin 含有量	10 mg	5mg	2.5 mg	1.0 mg	0.75 mg	0.5 mg	0.25 mg	0.1 mg
血液凝固態	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(±)	(+)	(+)

由是觀之レバ、試驗管 I—V 即チ粗製 Heparin 10 mg—0.75 mg ヲ合メル各々ノ試驗管ニ於テ全ク凝固ヲ見ズ、0.5 mg 含有ノ試驗管 VIニテハアル場合ハ不凝固ナルモ、或ル場合ニハ血球沈降シ振盪スルニ僅ニ凝固ノ傾向アルガ如シ。試驗管 VII 以下ハ每常明カニ凝固ヲ見タリ。即チ余ノ自家製 Heparin ハ概ネ 1 單位以上ノ力價ヲ有スベシ。

第2節 Heparin ノ血液凝固抑制機轉ニ就テ

1) Heparin ハ Ca-Ion ト關係アリキ

Heparin ガ血液凝固ヲ抑制スル際、Ca-Ion ト關係アリキ否キヲ檢セントシ、前編¹⁾第3章第3節第1項ノ如キ實驗方法ヲ用ヒタリ。但シコノ際 0.5% Heparin 溶液ヲ以テシ 0.5% 枸曹加血液ニ對シ、前記該項ニ詳述セシ如ク血液凝固ヲ妨グル程度ノ大量ヨリ至適量前後ニ於ケル種々ナル濃度ノ CaCl₂ 溶液ヲ添加シ、其ノ凝固時間ニ及ボス影響ヲ觀察セリ。尙本實驗ニ際シテハ時恰モ曇氣ニ向ヒ室溫高ク水槽溫動搖シ易キヲ以テ、該水溫ヲ概ニ室溫ト近似シメテ其ノ影響ヲ避ケタリ。其ノ結果ハ第2表ニ示ス如クニシテ、コノ際 CaCl₂ ノ如何ナル量モ好適ナル影響ヲ與フルコトナク、Heparin ハ Ca-Ion ニ關聯シテ血液凝固ヲ抑制スルモノニ非ザルコト明白ナルヲ知レリ。

第2表

CaCl ₂ 溶液	0.5% 枸曹加家兔血液		0.5% Heparin 液		生理的食鹽水	血液凝固時間
	0.1 cc	0.3 cc	0.2 cc	0.2 cc		
0.25%	0.1	0.3	0.2	0.2	0.2 cc	23' 4'
0.5%	0.1	0.3	0.2	0.2	0.2	18' 2'
	0.1	0.3				
1.0%	0.1	0.3	0.2	0.2	0.2	12' 1'30"
	0.1	0.3				
2.0%	0.1	0.3	0.2	0.2	0.2	17' 2'
	0.1	0.3				
3.0%	0.1	0.3	0.2	0.2	0.2	20' 2'20"
	0.1	0.3				
4.0%	0.1	0.3	0.2	0.2	0.2	45' 5'
	0.1	0.3				
5.0%	0.1	0.3	0.2	0.2	0.2	78' 7'
	0.1	0.3				
10.0%	0.1	0.3	0.2	0.2	0.2	3'30'(-)
	0.1	0.3				

備考 室溫 27—29°C, 水槽溫 28°C

2) Heparin ノ臟器浸出液ニ對スル關係

前編¹⁾第3章第3節第2項ニ準ジ、血漿或ハ枸曹加血液ニ至適量ノ Ca 液並ニ Thromboplastin タル臟器水浸液ヲ加ヘテ凝固ヲ起サシムル際、Heparin 液ヲ混シテ其ノ影響ヲ觀察セリ。其ノ成績第3表其ノ1乃至其ノ3ノ如シ。

第3表 其ノ1

Heparin 溶液	0.5% 枸曹加山羊血漿		0.5% CaCl ₂ 液		海蜃腦水浸液	生理的食鹽水	凝固時間
	0.3 cc	0.1 cc	0.3	0.1			
0.5%	0.1 cc	0.1	0.2 cc	0.1	0.2	0.3 cc	8'
	0.3	0.1	0.2 cc	0.1	0.1	0.1	3'30"
1.0%	0.1	0.1	0.2	0.1	0.2		6'30"
							10'

備考 室溫 26—26.8°C, 水槽溫 26°C

第3表 其ノ2

Heparin 溶液	0.5% 枸曹加山羊血漿		0.5% CaCl ₂ 液		海蜃腦水浸液	生理的食鹽水	凝固時間
	0.3 cc	0.1 cc	0.3	0.1			
0.5%	0.2 cc	0.1	0.2 cc	0.1	0.2	0.4 cc	11'
	0.3	0.1	0.2 cc	0.1	0.2	0.2	5'
1.0%	0.2	0.1	0.2	0.1	0.2		8'
							1'(±)

備考 室溫 27°C, 水槽溫 26°C

第3表 其ノ3

Heparin 溶液	0.5% 枸曹加家兔血液		0.25% CaCl ₂ 液		海蜃腦水浸液	生理的食鹽水	凝固時間
	0.5 cc	0.1 cc	0.5	0.1			
0.5%	0.2 cc	0.1	0.2	0.1	0.2	0.4 cc	12'
	0.5	0.1	0.2 cc	0.1	0.2	0.2	2'30"
1.0%	0.2	0.1	0.2	0.1	0.2		1'(±)
							1'(-)

備考 室溫 29°C, 水槽溫 30°C

反應液トシテハ、0.5% ノ割ニ枸曹ヲ加ヘタル山羊血漿或ハ家兔血液、0.5%—1.0% Heparin 液、0.5% CaCl₂ 液及ヒ臟器浸出液トシテ前編同様10% 海蜃腦水浸液ヲ用ヒタリ。其ノ結果、對照實驗ニ於テ臟器浸出液ヲ加フル時ニ生理的食鹽水ノミ添加ノ場合ニ比シ著シク其ノ凝固ヲ促進ス。然ルニ 0.5%—1.0% Heparin 液ヲ加フル時ハ何レモ其ノ凝固時間遲延スルヲ知リ、殊ニ同表其ノ3ニ於テ其ノ傾向著明ナリ。

由是觀之ルニ、Heparin ハ Thromboplastin (Cephalin protein compound) タル臟器浸出液ノ作用ニ拮抗シテ凝固ヲ抑制スルコトヲ知ラル。

蓋シ Antiprothrombin 作用ヲ演ズルモノト認メラル。

3) 血清ノ作用ニ對スル Heparin ノ影響

前編既述ノ如ク血清ガ血液乃至血漿ノ凝固促進作用ヲ有スルコトハ既ニ認メラレタル事實ナルヲ以テ、余ハ「硫酸マグネシウム液」ヲ加ヘテ不凝固トシタル血液或ハ血漿ニ血清ヲ加ヘテ凝固ヲ起サシムル際、Heparin ノ之ニ及ボス影響ヲ觀察セリ。反應液トシテ 20% 「硫酸マグネシウム液」ヲ 1/10 容量加ヘタル山羊血液又ハ 10% 「硫酸マグネシウム液」ヲ 1/10 容量加ヘタル山羊血漿(柏村¹²⁾ニ準ズ)、家兎新鮮血清₂ = 0.25%, 0.5% 及ビ 1.0% Heparin 液ヲ用ヒタリ。其ノ成績第 4 表ノ如シ。

第 4 表 其ノ 1

Heparin 溶液		2.0% MgSO ₄ 山羊血液	家兎新鮮血清	生理的食鹽水	凝固時間
		1.0 cc	0.5 cc	0.2 cc	57'
0.25 %	0.2 cc	1.0	0.5		170'
0.5 %	0.2	1.0	0.5		3'
1.0 %	0.2	1.0	0.5		3'(-)
		1.0		0.7	6'(-)

備考 室温 27°C, 水槽温 26°C

第 4 表 其ノ 2

Heparin 溶液		1.0% MgSO ₄ 山羊血漿	家兎新鮮血清	生理的食鹽水	凝固時間
		0.6 cc	0.3 cc	0.1 cc	6'
0.25 %	0.1 cc	0.6	0.3		28'
0.5 %	0.	0.6	0.3		67'
0 %	0.1	0.6	0.3		3'
		0.6		0.4	3'(-)

備考 室温 27.5°C, 水槽温 26°C

該表ニ由ツテ明カナル如ク、以上ノ實驗系列ニ於テ Heparin 液ノ存スル時ハ對照ニ比シ著シク凝固時間ノ延長ヲ來シ、或ハ相當長時間凝固ヲ起サザルコトヲ認メタリ。即チコノ際、Heparin+

血漿+血清 (Thrombin) ナル反應相ニ於テ Heparin ハ血清 (Thrombin) ノ作用ニ拮抗シテ凝固ヲ抑制スルモノナルベシ。仍テ Heparin ハ又 Antithrombin トシテ作用スト考ヘラル。

第 3 節 血清中ニ於ケル Heparin ノ非凝固化ニ就テ

I. 小序

W. H. Howell⁷⁾ (1925) = 依レバ Heparin ハ Antiprothrombin ニシテ、Antithrombin ナラズ即チ純ナル Fibrinogen 及ビ Thrombin ヨリ Fibrin 形成ノ機轉ニハ影響ヲ及ボサザルモ、血清或ハ血漿ヲ使用セル場合ニハ是等ノ中ニ含マルル温抵抗弱キ或ル物質ト結合シテ Antithrombin トナリ Antithrombin 作用ヲ營ムモノト言ヘリ。然ルニ A. Schmitz 及ビ L. Kühl¹³⁾ (1935) ハ Heparin ト循環血中ニ於ケル正常 Antithrombin ト同一物ニ非ズト稱シ、尙最近 T. Astrup 及ビ S. Darling¹⁴⁾ (1941) = 依レバ、正常 Antithrombin ハ Heparin ノミニ因ツテ賦活サルモノニ非ズシテ、コノ際一新副因子ヲ要ストナシ、更ニ彼ノ正常 Antithrombin ハ Heparin 及ビ副因子ヨリ生成サレタル新シキ Thrombin-Inhibitor 結合物トモ同一物ニ非ズト言ヘリ。依ツテコノ間ノ消息ヲ窺ハントシ余モ亦聊カ實驗スル所アリ、以下逐次記述セントス。

II. 實驗方法及ビ成績

1) Heparin = 血清ヲ加ヘタル場合

實驗系列ハ増野¹⁰⁾ニ準ジ、敘上ノ如ク生理的食鹽水ニ溶解セル 0.5% Heparin 液ト家兎新鮮血清トヲ夫々等量混和セルモノヲ Heparin 血清 A トシ、之ヲ氷室 (3°C) = 1 晝夜置キタルモノヲ Heparin 血清 B、同ジク 3 晝夜置キタルモノヲ Heparin 血清 D トシ、0.5% Heparin 液ヲ等量ノ生理的食鹽水ヲ以テ稀釋セルモノヲ對照トシ Heparin 液ト記載ス。而シテ Heparin 液 0.5cc—1.0 cc ヲ以テ夫々家兎心動脈血 1.0 cc ノ凝固ニ及ボス影響ヲ觀察セリ。血液凝固時間測定法ハ前節

ニ於ケルト同様ニシテ、但シ水槽温ハ總ベテノ場合 20°C トナセリ。

2) Heparin = 血清ヲ加ヘテ加温セル場合：
前記ノ如キ Heparin 血清及ビ Heparin 液ヲ夫々 70°C ノ重湯煎ニテ 15 分間加温セルモノヲ以テ、前項同様ノ實驗ヲ行ヒタリ。

以上ノ成績ヲ列擧セバ、第 5 表其ノ 1、其ノ 2 及ビ其ノ 3 ノ如シ。表中 Hp. ハ Heparin ノ略記トス。何レモ數回ノ成績略ボ同様ニシテ、就中最大及ビ最小値ヲ表示シタルモノナリ。

第 5 表 其ノ 1

家兎心 動脈血	Heparin 液	Hp. 血清 A	Hp. 血清 B	Hp. 血清 D	血清凝 固時間
1.0 cc	0.5 cc				1'25', 1'20'
1.0	1.0				2'(±), 2'40' (弱)
1.0		0.5			22', 19'
1.0		1.0			40', 36'
1.0			0.5		35', 30'
1.0			1.0		75', 55'
1.0				0.5	18', 19'
1.0				1.0	25', 28'

備考 室温ハ多クノ場合 25—26°C、時 = 33.5°C
28°C ノコトアリ。水槽温ハ總ベテ 20°C
トス。

第 5 表 其ノ 2

家兎心 動脈血	加温 Hp. 液	加温 Hp. 血清 A	加温 Hp. 血清 B	加温 Hp. 血清 D	血液凝固時間
1.0 cc	0.5 cc				1'20', 1'25'
1.0	1.0				2'(±), 2'(±)
1.0		0.5			40', 35'
1.0		1.0			1'40', 1'34'
1.0			0.5		55', 67'
1.0			1.0		2', 2' (不完全)
1.0				0.5	30', 25'
1.0				1.0	42', 35'

備考 室温ハ多クノ場合 25—26°C、時 = 23.5°C
28°C ノコトアリ。水槽温ハ總ベテ 20°C
トス。

第 5 表 其ノ 3

家兎心 動脈血	生理的 食鹽水	血清 A	加温 血清 A	血清 B	血液凝固時間
1.0 cc	0.5 cc				11', 10'
1.0	1.0				13', 11'
1.0		0.5			4', 2'30"
1.0		1.0			3'30", 3'
1.0			0.5		17', 16'
1.0			1.0		22', 20'
1.0				0.5	8', 8'
1.0				1.0	9', 8'

備考 室温 24—27°C、水槽温 20°C。

III. 小括及ビ考按：

由是觀之レバ、血清ヲ加ヘタル Heparin ノ作用ハ著明ニ減弱ヲ示スモ、Heparin 血清 B = 於テハ或ル程度復活ヲ來ス。惟フニコノ一時的復活ハ、Heparin 血清 A = 於テハ新鮮血清中ノ有力ナル凝固要素ガ Heparin = 結合シテ其ノ凝固抑制作用ヲ減弱セシムルモ、其ノ結合状態ハ極メテ不安定ニシテ時間ノ経過ト共ニ部分的解離ヲ起シ、分離シタル血清ガ凝固要素トシテノ作用ヲ喪失乃至減弱スルニ因ルモノナルベシ。然レドモ Heparin 血清 B ノ復活セル凝固抑制作用モ Heparin 液ノ該作用ニ到底及ブ所ニアラズ、且 Heparin 血清 D = 至ツテハ該作用更ニ減弱スル事實ト併セ考フル時、Heparin ハ血清中ノ凝固要素ト結合シテ作用減弱ヲ來スト共ニ、一方恐ラク血清中ニ於テ破壊セラルルモノナルベシ。

又第 5 表其ノ 2 ノ如ク、血清加 Heparin ノ加温セル場合ニハ夫々凝固抑制作用ノ復活ヲ認メラル。但シ血清ヲ加ヘザルモノニ比スレバ尙弱シ。而シテ加温 Heparin 血清 B ハ該抑制作用著シキモ、加温 Heparin 血清 D = 於テハ同 A ヲヨリモ更ニ減弱ス。

一方ニ於テ血清ハ第 5 表其ノ 3 = 示セル如ク、加温ニ因リテ Thrombin 作用ヲ失フノミナラズ、併ニ凝固抑制作用ヲ呈ス。夙ニ Howell-Hoess¹⁵⁾

ニ依レバ血漿ヲ加温 (60°C = 15分間) スルトキ Prothrombin ハ破壊シ, Fibrinogen ハ凝固シ, 熱ニ抵抗強キ Antithrombin 殘留スト言ヘルル所ナリ。尙周知ノ如ク血清ノ Thrombin 作用ハ經期的ニ減弱ス。是レ古ク Mellamby¹⁰⁾ ガ血清中ノ Antithrombin ト Thrombin トノ結合ニ因ルト唱ヘシ所ニシテ, Morawitz ニヨリテ與ヘラレタル Metathrombin ナル命題ハ Weymouth, Gasser 及ビ Rich¹²⁾ ニ據レバ Thrombin ト Antithrombin トノ結合體ナルベシトセラル。

繼ツテ血清ヲ加ヘタル Heparin ガ其ノ凝固抑制作用ノ減弱ヲ來スハ, Heparin 血清ヲ加温スル時, 加温血清ノ凝固抑制作用ヲ考慮ニオクモ尙夫レ以上ニ Heparin ノ該作用恢復スル事實ヨリ見テ, Heparin ト血清中ノ温抵抗弱キ物質トノ間ニ起ル何等カノ反應ナルベシト思惟セラル。斯カル際 Howell⁷⁾ ハ温抵抗弱キ Antithrombin ヲ生成スルモノト假定セリ。然シ Heparin 血清ヲ加温スルモ Heparin ノ凝固抑制作用ハ完全ニ復活セズ, 又時日ノ經過ト共ニ其ノ恢復程度ノ減少ヲ見ラレ, 温抵抗弱キ物質恐ラク Thrombin ト反應シト結合スト言フモ固定の不易ノモノナラズ, 他方血清中ノ成分例之或ル蛋白質ニヨツテ破壊サルルニ非ズヤトモ考ヘラル。故ニコノ不安定性ハ Heparin ト血清中ノ温抵抗弱キ或ル物質トヨリ生成セル新物質ノ性質ニ非ズシテ, Heparin ト血清中ノ或ル成分トノ反應ニ歸スベシトナセル A. Schmitz u. L. Kühl¹³⁾ (1935) ノ説ニ吾人ハ寧ロ左袒スルモノデアル。而シテ Thrombin, Heparin 及ビ Antithrombin 3 者間ノ反應ニ關シ 1) Thrombin + Antithrombin = Metathrombin 2a) Heparin + Co-Inhibitor ⇄ Inhibitor, 2b) Inhibitor + Thrombin ⇄ Thrombin-Inhibitor-Verbindung ナルガ如キ 2 様式ヲ假定セル Astrup-Darling¹⁴⁾ ノ所説ハコノ場合ニ順ヲ拂フノ價値アルベシ。

第4章 總括及ビ全編ニ互ル考按

絃上ノ如ク余ノ粗製 Heparin ヲ以テ其ノ凝固抑制作用ノ機轉ヲ研索シタルニ, Ca-Ion ニ關與スル事ナク, Antiprothrombin 竝ニ Antithrombin トシテ作用スルコトヲ知リタリ。Heparin ガ Antiprothrombin ナルコトハ W. H. Howell⁷⁾ 以來諸家ノ認ムル所ナルモ, 前述ノ如ク Howell ハ純ナル Fibrinogen 及ビ Thrombin ヲリノ Fibrin 形成ニ對シテハ干與セザル點ヨリ Antithrombin ナラズトセリ。然シ乍ラ同氏モ血清血漿ヲ使用セル場合ニハ是等ノ中ニ含マルル或ル物質ト結合シテ Antithrombin ヲ生ジ, Antithrombin 作用ヲ營ムモノト言ヘリ。コノ點ノ疑義ニ關シテハ余モ亦聊カ觸ルル所アリ, 前章第3節ニ記述セシガ如シ。増野¹⁰⁾ 及ビ柏村¹⁹⁾ モ Heparin ハ Antiprothrombin 作用ヲ營ムト共ニ, 新鮮血清ノ Fibrinogen 液或ハ血漿ニ對スル凝固反應ニ於テ夫々 Antithrombin 作用ヲ演ズルコトヲ報告セリ。余モ亦血漿凝固ニ於ケル血清ニ對スル拮抗作用ニヨリ Antithrombin 作用ヲ演ズルコトヲ立證セリ。

サテ倉橋氏²⁾ ハ落花生及ビ大豆種子成分ノ血液凝固抑制作用ノ機轉ハ恐ラク Thrombin ニ拮抗的ニ働クモノトセラレシガ, 余ハ前編¹⁾ 記載ノ如ク落花生液ニ就キ Ca-Ion ニ關與スルコトナク, Antiprothrombin 竝ニ Antithrombin トシテ作用スルコトヲ認メタリ。絃上ノ如クニシテ茲ニ落花生種子成分ノ血液凝固抑制物質ハ Heparin ト其ノ作用機轉ヲ等シクスルモノナルコトヲ知り得タリ。

次ニ Heparin ノ化學的組成ニ關シ, W. H. Howell ハ最初⁴⁾ (1918) Phosphatid ナリトセシガ, 次デ⁷⁾ (1924) 磷陰性ナル製品ヲ得, 曩ノ Phosphatid 様性質ナル概念ヲ棄テ, 窒素陽性, 含水炭素ノ存在ヲ意味スル Molisch 反應陽性等ノ性質ヲ示シ, 更ニ 1928 年⁸⁾ 發表ノ製品ニ於テハ磷及ビ窒素共ニ陰性ニシテ, Glucuronsäure

ノ存在ヲ意味スル Naphtoresorzin 反應陽性等ヲ追補シ、後世ノ研究者ニ對スル繩針盤タルノ觀アリタリ。其ノ後 S. Waldschmidt-Leitz²⁰⁾, A. F. Charles & D. A. Scott²¹⁾ 及ビ A. Fischer²¹⁾ 等ノ研究ヲ經テ、E. Jorpes²²⁾(1935—37) ハ Charles-Scott 氏法ヲ應用セル精製 Heparin = 就キ、Howell ノ提唱ニ基キ有效物質トシテ存在スベキ Uronsäure 檢索ノ企圖ノ下ニ定量分析ヲ行ヒ、硫黃ガ「エステル結合」ニ於テ含有セララル事實ヲ把握シ、Polyschwefelsäureester 殊ニ Mucoitin-polyschwefelsäure ノ混合ヨリ成ルベシトノ結論ニ達シ、一方 S. Bergström²³⁾ 及ビ E. Chargaff²⁴⁾ 等(1936)ノ合成試驗成功ニ依リ、他方 Bergström²³⁾(1936) 及ビ H. Elsner²⁵⁾ 等(1937) ハ赤藻中ニ含マルル Polysaccharidschwefelsäureester ガ血液凝固抑制作用ヲ有スルトイフ發見トニ依リ、Heparin ノ化學的研究ハ漸ク黎明期ニ到達セリ。

然リ而シテ落花生大豆等ノ種子成分ハ水藻ト同様ニ支柱質トシテ Galactan 及ビ Pentosan ノ如キ半植物纖維素ヲ含有スルコトハ既ニ知ラレタル所ナルヲ以テ(田所²⁶⁾, 鈴木²⁷⁾, 柿内²⁸⁾, 宮地²⁹⁾) 是等ガ硫酸ヲ以テ「エステル化」サレタル形ニ於テ存在スルモノトスレバ、落花生大豆等ノ種子成分ガ血液凝固抑制作用ヲ有シ、且ツ Heparin 様ノ性質ヲ呈スルコトハ優ニ臆測ノ許ス所ナルベシ。而シテ敍上ノ如ク自家製 Heparin ト落花生種子成分トハ俱ニ其ノ作用機轉ヲ等シクスルコトヲ認メタルモ、化學的性狀ニ於テ Biuret 反應前者ハ陰性、後者ハ陽性、Molisch 反應ハ前者陽性、後者比較的強陽性ナルガ如キ相異ヲ觀ラレタリ。而シテ余ノ落花生ニ於ケル試驗ハ其ノ抽出未ダ完璧ニ遠ク、種々ナル夾雜物ノ混在ヲ免レ難キモ、Jorpes

ガ其ノ製品ハ微量ノ窒素ヲ含ミ「アミノ糖」トシテ存スベシト言ヘル——Howell⁷⁾, 増野¹⁰⁾ 等ハ窒素陰性或ハ Biuret 反應陰性トナス——所論ニ鑑ミ、余ノ落花生抽出分ガ Binret 反應, Molisch 反應共ニ陽性ナルハ Heparin 様性質タルコトヲ強ク否定スルモノニ非ザルベシ。以上ヲ要約スルニ、余ハ主トシテ生理學の見地ヨリ落花生種子成分ノ血液凝固抑制物質ガ Heparin 様ノモノナルコトヲ述べタルモ、化學的純粹ナル抽出物ニ依リ其ノ同一性ヲ確認センコトハ遺憾ヲ他日ニ待タントス。

第5章 結論

敍上ノ如ク余ハ Charles-Scott 氏法ニ依リ、Heparin ヲ製出シ、其ノ效力ヲ檢定シ、作用機轉其ノ他 1, 2 ノ性狀ヲ研索シ、次ノ如キ結論ヲ得タリ。

1. Heparin ハ Ca-Ion ニ關與スルコトナク、Antiprothrombin 並ニ Antithrombin トシテ作用シ、血液凝固ヲ抑制ス。
2. Heparin ニ新鮮血清ヲ添加セル場合其ノ作用ハ直後著明ニ減弱シ、1 晝夜後或ル程度恢復スルモ、其ノ後再び時日ノ經過ト共ニ減弱ス。
3. 全編ヲ要約スルニ、落花生種子成分ノ血液凝固抑制物質ハ恐ラク Heparin 近似ノモノナルベシ。

稿ヲ終ルニ臨ミ、終始御懇篤ナル御指導ト御校閲ノ勞ヲ辱ウセル恩師生沼教授ニ謹ミテ感謝ヲ表ス。同時ニ實驗上種々有益ナル御助言ヲ賜ハリタル林助教授並ニ小坂講師ニ鳴謝シ、併セテ實驗ニ際シ御援助ニ預リタル教室員諸兄ニ深謝ス。

文

1) 玉尾, 前編. 2) 倉橋, 倉敷中央病院年報, 第11年. 21頁, 昭和11年. 3) Mc. Lean, J., Amer. J. Physiol. 41, 250, 1916. 4) Howell, W. H. &

獻

Holt, E., Ebenda 47, 328, 1918. 5) 玉尾, V-C ト血漿 Prothrombin ノ消長ニ關スル實驗的研究(未發表). 6) Howell, W. H., Amer. J. Physiol.

- 63, 434, 1922-23. 7) *Howell, W. H.*, Ebenda 71, 553, 1924-25. 8) *Howell, W. H.*, *Boll. Johns. Hopkins. Hosp.* 42, 199, 1928. 9) *Charles, A. F. & Scott, D. A.*, *J. Biol. Chem.* Vol. 102., p. p. 425, 431, 437, 1933. 10) 増野, 東京醫學會雜誌, 第45卷, 1184頁及1305頁, 昭和6年. 11) 柏村, 熊本醫學會雜誌, 第3卷, 151頁, 昭和2年. 12) 柏村, 熊本醫學會雜誌, 第8卷, 546頁, 昭和7年. 13) *Schmitz, A. u. Kahl, L.*, *Hoppe Seyler's Z. f. Physiol. Chem.* 234, 212, 1935. 14) *Astrup, T. u. Darling, S.*, *Naturwissenschaften* 29, Hf. 20, s. 300, 1941. 15) *Howell-Hess*, *Abderhalder's Handbuch d. Biol. Arbeitmeth.* Abt. 4 Teil 3. s. 257, 1924. 16) *Mellamby, J.* *Physiol.* 38, 57, 1909. 17) *Morawitz, P.*, *Erg. Physiol.* 4 Jg. 307, 1905. 18) *Weymouth, Gasser, Rich, cit.* Howell, *Physiol. Reviews* 15, 435, 1935. 19) 柏村, 熊本醫學會雜誌, 第9卷, 1頁, 昭和8年. 20) *Waldschmidt-Leitz, S., Städler, P. u. Steigerwaldt, F.*, *Z. Physiol. Chem.* 183, 39, 1929. 21) *Fischer, A. & Schmitz, A.*, *Z. Physiol. Chem.* 216, 264, 274, 1933. 22) *Jorpes, E.*, *Naturwissenschaften* 23, 196, 1935., *Bioch. J.* 29, 1817, 1935., u. *Bergström, S.*, *J. Biol. Chem.* 118, 447, 1937. 23) *Bergström, S.*, *Hoppe-Seyler's Z.* 238, 163, 1936. 24) *Chargaff, E. etc.*, *J. Biol. Chem.* 115, 149, 1936. 25) *Elsner, H.*, *Hoppe-Seyler's Z. f. Physiol. Chem.* 246, 244, 1937. 26) 田所, 食品化學, 後編, 139頁, 大正11年版. 27) 鈴木, 植物生理化學, 322頁, 昭和15年版. 28) 柿内, 生化學提要, 第5版, 36頁, 昭和10年. 29) 宮地, 植物成分研究法, 151頁, 昭和12年.

From the Institute of Physiology, Okayama Medical College.

(Director: Prof. Dr. S. Oinuma).

On the mechanism of the anticoagulant action of heparin.

By

Nobutada Tamao.

Received for publication, July 15, 1942.

From my previous report it is supposed that the anticoagulant action of the peanut extract is akin to that of heparin. So I prepared heparin from dog's livers after the method originated by Charles-Scott, and investigated on this action to blood coagulation, comparing with those of the extract of the peanut. The results may be summarized as follows:

- 1) Heparin did not interfere with the presence of Ca-ion, inhibited the blood coagulation acting as antiprothrombin as well as as antithrombin.
- 2) The anticoagulant action of heparin was markedly inhibited by the addition of fresh serum, but recovered its action to a certain extent 24 hours after the addition, and again diminished gradually with the lapse of time.
- 3) It may be concluded that the anticoagulant substance contained in the peanut extract is akin to heparin.

(Autoreference)