

外科的侵襲による血中 Fibrinogen 量の変動, 並に血清 Fibrinolytic Activity, Fibrinogenolytic Activity の変動 : 及び人精製 plasmin の Fibrinolytic Activity と Fibrinogenolytic Activity の差異についての臨床的研究

東邦大学医学部第2外科教室 (指導・粟津三郎教授)

近 藤 孝

〔原稿受付 昭和35年12月1日受付〕

CLINICAL STUDIES ON THE INFLUENCES OF THE SURGICAL PROCEDURE UPON THE PLASMA FIBRINOGEN, FIBRINOLYTIC ACTIVITY AND FIBRINOGENOLYTIC ACTIVITY, AND ON THE DIFFERENCES BETWEEN FIBRINOLYTIC ACTIVITY AND FIBRINOGENOLYTIC ACTIVITY OF HUMAN PURIFIED PLASMIN

TAKASHI KONDO

Dept. of 2nd. Surgery., School of Medicin, Toho University
(Director ; Prof. SABURO AWAZU)

Bleeding tendency, i. e. endless bleeding, has been reported occasionally after extracorporeal circulation. The increasing tendency of plasmin activity seems to be concerned with a cause of this phenomenon. On the other hand, the decrease or instability of blood clotting factors seem to be occurred.

Author has studied upon the changes of fibrinogen, fibrinolytic activity and fibrinogenolytic activity pre- and post operatively and both activity of human purified plasmin by author's new method.

1) Fibrinolytic activity was examined by measuring of clotted fibrin 24 hours after adding thrombin into the sample. Fibrinogenolytic activity was studied by measuring clotted fibrin one hour after adding thrombin into 24 hours incubated sample.

2) Fibrinogen has tendency to decrease after surgical procedure.

3) Both of fibrinolytic and fibrinogenolytic activity in serum have tendency to increase after operation.

4) Fibrinolytic and fibrinogenolytic activity in euglobulin have shown increasing tendency after surgery but later seems to be stronger than former.

5) In human purified plasmin, fibrinolytic activity is stronger than fibrinogenolytic activity.

6) Fibrinogenolysis is occurred in human blood after surgical operation. Further

studies, however, should be done on the theory that this fibrinogenolysis will be caused by plasmin just like fibrinolysis.

目 次

第1章 緒 言

第1章 実験方法

- a) Fibrinolytic Activity の測定法
- b) Fibrinogenolytic Activity の測定法
- c) Kjeldahl 法
- d) 乾燥重量法
- e) 血中 Fibrinogen の定量法
- f) 血清中 Plasmin inhibitor 除去法
- g) 牛 Fibrinogen 液の製作法

第3章 実験成績

- 1) 血中 Fibrinogen 量
- 2) 血清中の Fibrinolytic Activity

3) 血清 Euglobulin による Fibrinolytic Activity

4) 血清中 Fibrinogenolytic Activity

5) 血清 Euglobulin による Fibrinogenolytic Activity

6) 胃癌患者の Fibrinolytic Activity

7) 胃癌患者の Fibrinogenolytic Activity

8) 人精製 Plasmin の Fibrinolytic Activity 及び Fibrinogenolytic Activity

第4章 考 案

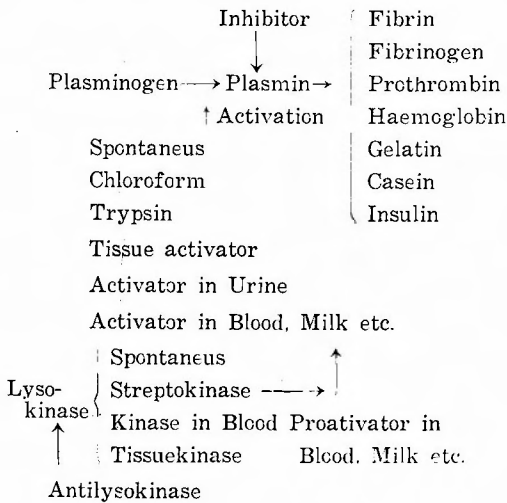
第5章 結 語

第1章 緒 言

最近、麻酔学の急速なる発展と、全身管理の知識の発展は、今迄不可能と認められていた外科的疾患並に、内科的疾患に於ても手術を可能となさしめた。又それに伴い、各種の人工臓器の研究の必要性に迫られ、その改良、使用方法、新しい各種人工臓器の発達も急速に進歩している。現在人工心肺装置、人工腎臓が比較的多く使用されているが、それに伴い、大量の保存血輸血、輸液、抗凝固剤の使用がなされているが、その際に所謂、Endless bleeding と云はれる様な出血傾向の発現が認められ、その処置には多くの臨床家は非常な困難を感じている。これには使用される大量の抗凝固剤の影響もあるが、Heparinに対する拮抗性物質としては、Protaminが発見されているが、それによつても処置されない出血傾向は、活性化されたFibrinolysisによるものと認められ、その現象の発現と、hypofibrinogenemia との関係がなかなか密接であることがのべられている¹⁾²⁾³⁾⁴⁾。Fibrinolysis が起ることは、1887年Greenが発見し、Dastre⁵⁾が、大出血を起させた犬につき実験を行い、Greenののべた現象を確認して、Fibrinolysisの存在することをのべて、その名称を使用することとなつた。又Morawityは、交通事故で突然死亡した場合、心臓内の血液は、流動性であることを発見し、その場合の血液はFibrinogenを殆ど有しないし、又正常人のFibrinogen及

びFibrinを溶解することを発見した⁶⁾。TilletとGarnerは、beta hemolytic streptococciの培養液がFibrinを溶解することを知り、その原因となる物質をFibrinolysinと名づけたが、現在は所謂Fibrinolysinは他の蛋白も溶解し、まぎらしいので、多くはPlasminと名づけられている⁷⁾⁸⁾⁹⁾。又、MacfarlaneとBiggs¹⁰⁾は、手術患者について、術前、術後のFibrinolysisの変化をしらべた結果、手術後に一過性に強いFibrinolysisを示すことをのべ、手術のみならず、術前の恐怖感、前麻酔、麻酔の影響もFibrinolysisに関係し、Alarm reactionの1部分として、血中のProteolytic systemの活性化が起るとのべた。Tagnon¹¹⁾は、犬に出血性Shockをあたへて、Fibrinolysisの起ることをのべている。Coon¹²⁾等は、胃癌患者にFibrinolysisを認め、大量輸血、特に心停止の際には、止血甚だ困難なる出血状態となり、Prothrombinの活性度は、低下し、Fibrinogenの減少を伴うので、Fibrinogenの静注を推奨している。又FantleとSimonは電気刺激による全身痙攣によつてもFibrinolysisが起るとのべている。Bidwell¹³⁾は論文中PlasminはFibrinのみでなく、Fibrinogenにも作用し、ともに溶解しますが、Fibrinにより強く作用するとのべたが、同様のことはMüllert¹⁴⁾によつても認められている。豊田、塩川¹⁵⁾は過激なる肉体労働もFibrinolysisを起すと云つている。Macfarlane¹⁶⁾は、精神の不安が、Fibrinolysisの原因と

なることをのべたが、これの原因は、Adrenalinの分泌によるものであろうと考へられており、Adrenalinは in vitro で、Plasmaに混ざる場合には、Fibrinolysis を起さないが、生体に注射された時は、正常に於ても、或は又、Adison 氏病の患者に於ても同様に Fibrinolysis を起す事が認められている¹⁴⁾。Fibrinolysis の起ることは多くの学者により認められているが、その原因は色々考へられる。即、精神的緊張、物理的刺戟、化学的刺戟、体液に影響ある様な処置、薬物の影響、或は一部には生理的現象と考へられる様な時にすら Fibrinolysis は認められ、恐らくは所謂、生体の Alarm reaction の結果、生体中の Protenase が活性化される、即、Plasminが活性化されるものと思はれる。Astrup 等は¹⁵⁾¹⁶⁾¹⁷⁾ Plasmin系の構成について、次の如き模型図を記載している。



この中 Plasminogen は血漿中に常に存在し、直接これは Fibrinolytic Activity を示さないが、前述した如く、Proactivator が、Lyso-kinase により Activate されて Activator となり、又 Tissue activator が血中に流出し、Plasminogen が Plasmin に活性化されて Fibrinolysis を示す様になると考へられている。然し、Tissue Lyso-kinase は恐らく、細胞中の Microsomes に含有されていると考へられている (Cytolyso-kinase が流出したものであり、この Cytolyso-kinase は、肺、子宮、前立腺、リンパ組織に多く含有されている。前述した如く、所謂、生体に Alarm reaction が起るならば、その結果として、副腎よりの Adrenalin の生成、排出、及びその他の自律神経系、内分泌系の変動により、Tissue Lyso-kinase が血中

に排出され、Proactivator が Activator に変化し、それが Plasminogen を活性化して Plasmin に変化させる General Process と称すべきものと、手術侵襲により破壊された細胞及び組織よりの Cytolyso-kinase、Tissue Lyso-kinase により Proactivator が activator に変化し、Plasminogen を Plasmin に変化さす Local Process 及び、Spontaneously に Plasminogen が Plasmin に変化する過程が加つて、Fibrinolysis という現象を示すものと考えられる¹⁵⁾¹⁶⁾¹⁷⁾。

Fibrinolytic Activity の測定法は、色々考へられている。即、稀釈法として、Macfarlane の法、並にその変法¹⁸⁾、と Unger の法、一定量の Fibrin塊を溶解するに要する時間で測定する方法として、Loomis 及び Lewis の方法⁶⁾、Englobulinlysis Time による方法¹⁹⁾²⁰⁾、Viscosimetry による方法、合成基質を使用する方法⁶⁾、等あつたが、Astrup は、牛 Fibrinogen を使用し、Fibrin Plate を作り、それに検体をのせて、溶解面積を測定して、Fibrinolytic Activity を測定する Fibrin plate method²¹⁾²²⁾²³⁾ を考案したが、なかなか要を得たものと考へた。然し実際には溶解面積の測定に甚だ困難を感じるし、又時に溶解面積が、非常に不整形をしめすことがしばしば認められた。Fibrinolysis の活性度が高い時には、血中 Fibrinogen が減少していることが認められているが、これは、Fibrinogen の生成が阻害された為か、或は Fibrinogen が消費された為か、或は、生体中に於て何等かの現象により溶解されたものか、或はこれ等のものが一緒に関係するものか考へられるが、Plasmin が Fibrinogen を溶解するという事実、即、Fibrinogenolysis という現象を考へて、Fibrinogenolytic Activity の測定の必要性に迫られ、Fibrinolysis と Fibrinogenolysis の測定法を考案して、術前、術後の、Fibrinolytic Activity、Fibrinogenolytic Activity、及び人精製 Plasmin の Fibrinolytic Activity と Fibrinogenolytic Activity を検討したので、ここに報告する。

Plasminの性質⁶⁾²⁴⁾²⁵⁾

血清中に含有される水不溶性性 Globulin で、生食水に溶解し、透析不可能なる蛋白性の蛋白分解酵素で、Euglobulin に属し、Minimum solubility は pH 5.5 附近である。至適 pH は 7.4 で、55°C 20 分の加温で完全に破壊される。等電点、7.1 で、分子量、107,000 位とされている。基質としては次のものがあげられている。

- | | |
|----------------|---------------------------|
| 1) Fibrinogen | 7) β -Lactoglobulin |
| 2) Fibrin | 8) Ac-Globulin |
| 3) Prothrombin | 9) Azocoll |
| 4) Haemoglobin | 10) LEe |
| 5) Gelatin | 11) TaMe |
| 6) Casein | 12) BaMe |

第2章 実験方法

Plasmin Activity の測定法は各種記載されているが、私は、Macfarlane の変法¹⁸⁾、Loomis の方法、Lewis の方法、Viscosimetry による方法⁶⁾、heated plate method²¹⁾²²⁾等を試みたが、Macfarlane の変法は、被検 Plasma 中の Fibrinogen を使用し、且稀釈により Plasmin も稀釈されるので一考を要するものと思う。Loomis 及び Lewis の方法は、精製 Plasmin の様に高単位のものでは充分に使用し得たが、実際に被検血清では記載されている様に行かず長時間を要した。Viscosimetry の方法は、高木¹⁷⁾等が用いたが、基質に Casein を使用している。heated plate method は牛 Fibrinogen を使用し、Fibrin Plate を作り、加温して、含有される Plasmin 系の Enzyme を inactive にして使用する為に、理想的であると思はれるが、測定にあたり、その溶解面積を求むるのに甚だ困難を感じた。heated plate method に暗示を得て、Fibrin が Plasmin に溶解されて、溶解性の蛋白様物質、或は、Polypeptide に分解され、これ等の物質は、濾紙にて濾過可能で、Fibrin は濾紙上に残存するので、1 定量の Fibrinogen をとり、それに検体を混じ、Thrombin を加へて Fibrin を析出せしめ、1 定時間放置後に、残存せる Fibrin を定量すれば、Plasmin の Activity を定量し得るものと考へた。上記の如き方法であると、Fibrinogenolysis の測定は不可能である。然し私の考案せる方法であると、Fibrinogen と検体の混合物を 1 定時間放置後、Thrombin を加へて Fibrin を析出せしめてそれを定量することにより、Fibrinogenolysis の定量も行はれると考へて、次に述べる方法を実験方法として採用した。この際に、私が作製せる牛 Fibrinogen 液は、37°C. 24 時間放置すると、自然に、Fibrin を析出してくる事がしばしばあつたので、Heparin を少量添加した。Heparin によつてその様な障害はとりのぞかれた。又 Fibrinogen より Fibrin を析出さす為に Ca ion を使用しなかつたのは、Ca ion は Plasmin に拮抗的に働くとされている¹¹⁾為

で、私は、持田製の Thrombin を用いた。Heparin 添加、Thrombin 添加は、Fibrin 定量の際に、Kjeldahl 法を用いる時には、窒素含有物として注意せねばならぬことは云うまでもない。そこで実際問題として簡便であるし、窒素含有物を添加する為に、Fibrin の定量には、乾燥重量法³⁾²⁶⁾を用いる方がよりよい方法と考へている。

a) Fibrinolytic Activity の測定法⁶⁾²¹⁾²³⁾

あらかじめビーカーに生食水と、pH: 7.4 に調整せる磷酸緩衝液を 9: 1 の割に混合せる溶液にトルオール少量加え、溶液を精洗せる試験管に 20 cc あて分注する。被検液、0.2cc と Heparin 液 (1000/cc 単位) 1 滴 (約 0.04cc)、牛 Fibrinogen 液 1 定量 (5~7 mg) を添加し、よく混和後に、Thrombin 液 (100/cc 単位) を 0.4cc 添加し、よく混和後に 37°C. 24 時間放置後、残存せる Fibrin を濾紙にて濾過し、20~30cc の生食水にて洗滌し、濾紙上に残存せる Fibrin 塊を別の乾燥濾紙にて母液を充分に吸収せしめて、Kjeldahl 法、或は、重量法により定量して術前値と術後値を比較し、百分率で示して Fibrinolytic Activity として示すか、或は使用せる基質に対する溶解量を百分率で示した。

b) Fibrinogenolytic Activity の測定法⁶⁾²¹⁾²³⁾

前述した Fibrinolytic Activity 測定と同様に行うが、前者にては検体、Fibrinogen を混和すると直ちに Thrombin を加えて、Fibrin を析出せしめたが、Fibrinogenolytic Activity の測定にあつては、検体と Fibrinogen 液を混和後、37°C. 24 時間放置後に、Thrombin を前者同様に混和し、再び 37°C 1 時間放置後に析出せる Fibrin を前者同様に定量する。即ち Fibrin を析出させて 24 時間 37°C に放置するか、Fibrinogen のままで検体を作用させ、その後 Thrombin を加えて、1 時間後に充分残存 Fibrinogen を Fibrin に変化させて、定量するかとの差のみである。

c) Kjeldahl 法²⁷⁾

先述した様にして得られた Fibrin 塊を、Kjeldahl の小酸化コルベンに濃硫酸、酸化促進剤とともに入れ、それに少量の窒素を含有しない蒸溜水を加えて、Pregl-Parnas の湿性酸化装置で充分に酸化せしめ、それを Parnas の微量用蒸溜装置を用いて、蒸溜し、Tashiro の試薬を試示薬として micro-Burette で定量して窒素量を算出し、それに 6.25 を乗じ Fibrin 量とする。

d) 乾燥重量法³⁾²⁵⁾

前述した様にして得られた Fibrin 塊を、予め秤量せるカバーグラスにのせ、95°C~100°C に調節せる乾燥器にて、24時間乾燥させ、その後、デシケーター中にて冷える迄放置し、トーションバランスにて正確に定量する。カバーグラスの重量を引けば求むる Fibrin 量である。

e) 血漿中 Fibrin の定量²⁷⁾²⁸⁾

抗凝固剤として蓚酸カリ塩を、血液 1cc につき 2mg の割に添加する様にして血液 5cc を採血し、溶血を起こさせぬ様に遠沈して血漿を分離する。次には生食水 20cc を試験管にとり、それに新鮮血漿 1.0cc 加へ、これに、2.5g/dl の CaCl₂ 液 1.0cc 追加し、よく混和して少量のトルオールを加へ、37°C、1時間放置する。その後乾燥濾紙で濾過し、約 20~30cc の生食水で洗滌し、濾紙上に残存せる Fibrin を他の乾燥濾紙で母液を十分に吸収させて、Kjeldahl 法で Fibrin を定量した。

f) 血清中 Plasmin inhibitor 除去法⁶⁾¹⁹⁾

血清 1.0cc を蒸溜水で 20 倍に稀釈し、これに、0.5% 醋酸を滴下、硝子電極 pH メーターにより正確に pH. 5.2 とする。すると白濁を生ずる。これを 3000 r. p. m. 10 分間遠沈し、沈査を生食水 1.0cc を加へ溶解す、上清中は主として、Albumin を含有し、その中に Inhibitor が含まれる。沈査物は Globulin で、この中に Plasmin が含有されている。

g) 牛 Fibrinogen 液の作製²⁹⁾

抗凝固剤として 2.5% の蓚酸カリ液を牛血液に 1/10 の割に加へて採血した牛血液を、3000 r. p. m. で 20 分遠沈し、血漿を分離し、その血漿を、Seegers の方法により、エーテル、ドライアイスで急激に凍結凝固せしめ、冷蔵庫に保存し、徐々に融解させ、氷塊の存在せる内に 2000 r. p. m. 20 分遠沈し、上清を捨てる。食塩、氷塊による寒剤で冷却し、氷片を認める生食水を、前述の沈査物に約 3 倍量加へ、ガラス棒で溶解させ、冷却しつつ 3000 r. p. m. 1 分間遠沈し、沈査物を上記と同様に洗滌すること 5 回、最後に遠沈して得た沈査物は、牛 Fibrinogen である。これを小試験管に分注し、冷却し、凍結保存する。使用時は、30°C に加温せる生食水に溶解し、3000 r. p. m. 1 分間遠沈し、沈査物を除去して使用する。

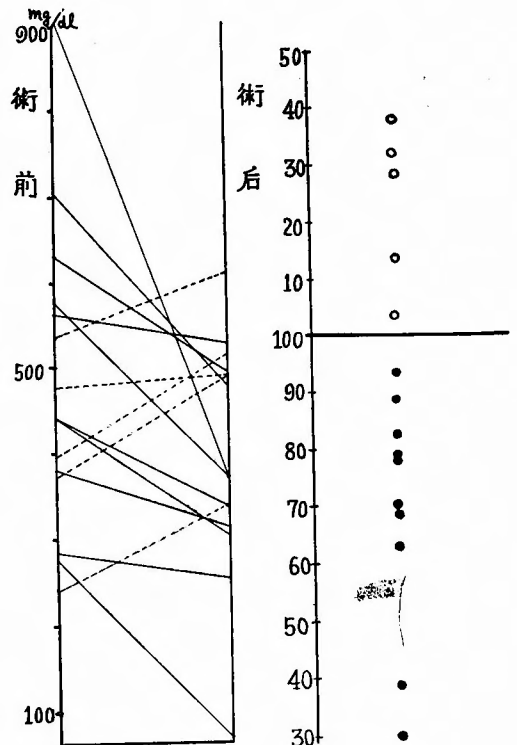
して採血し、血漿を分離して、Kjeldahl 法により定量した。

術前値は最高 921.6mg/dl. 最低、242.1mg/dl で平均

表 1 血中 Fibrinogen 量

No.	術 前	術 後
1	624.8mg/dl	492.0mg/dl
2	577.9	367.1
3	285.1	253.8
4	476.4	*492.0
5	702.9	476.4
6	562.3	523.3
7	273.4	70.3
8	921.6	367.1
9	437.4	304.6
10	242.1	*335.8
11	367.1	*484.2
12	398.3	*515.5
13	378.8	312.4
14	437.4	339.7
15	534.9	*609.2

図 1



第 3 章 実 験 成 績

1) 術前術後の人血中 Fibrinogen 量

術前、術後の患者血液を前述の如く加蓚酸カリ血と

501.4mg/dlとなつた。術後値は、最高609.2mg/dl. 最低70.3mg/dl で、平均382.9mg/dl となり、15例中、5例は、術後かえつて増加したのもあつたが、10例は減少している。これより手術の為に各種 Stressにより血中 Fibrinogen は減少の傾向がみられる。実測値を表示すれば表1の如くであつて、これを図示すれば、図1の如くとなる。術前値を基準として、術後値を百分率で示すと、図1の点図表の如くなる。このことは各研究者の結果と同様の傾向を認めた。

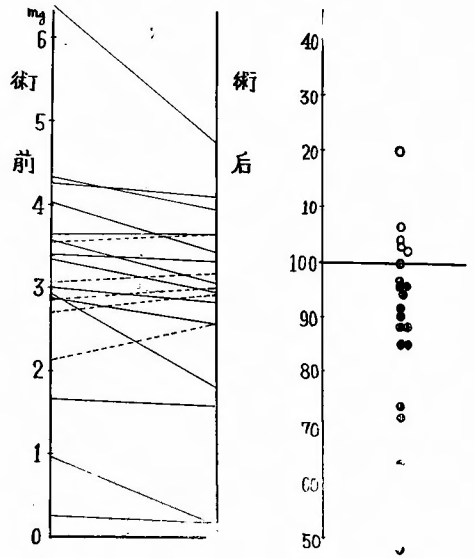
2) 術前術後に於ける血清中の Fibrinolytic Activity の測定

前述した実験方法の a 及び c により測定した。表2はその結果を表示したもので、1定量の牛 b Fibrinogen に被検血清を加へ、試験管中に残存せる Fibrin 量の、術前、術後値を比較したもので、19例中、術後かへつて Fibrinolytic Activity の減少したものが5例あつたが、14例は Fibrinolytic Activity は増大している。即ち1定量の牛 Fibrinogen を基質として残存 Fibrin 量は、術前に比べて減少していることを示している。図2は、線グラフに示したものと、術後残存せる Fibrin 量を、術前値のそれと比較し、百分率を点グラフで示したものである。これ等を見ると、血清中の Fibrinolytic Activity は増大しているものと認

表2 術前術後の血清中 Plasmin Activity の比較

No.	術 前	術 後
1	1.66	1.59
2	6.49	4.76
3	4.33	3.96
4	3.42	3.32
5	2.88	*3.00
6	2.93	1.84
7	2.74	*2.91
8	3.00	2.81
9	3.09	*3.18
10	0.97	0.17
11	0.25	0.18
12	3.55	*3.64
13	3.65	3.65
14	1.26	4.10
15	3.36	2.95
16	4.02	3.44
17	2.13	*2.56
18	2.88	2.56
19	3.52	3.09

図 2



められる。

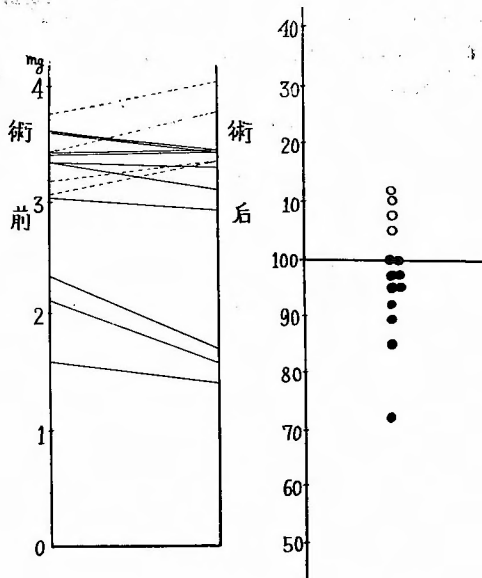
3) 術前術後の Inhibitor 除去せる検体による Fibrinolytic Activity の測定

前述せる被検血清中の Plasmin Inhibitor除去法により得た検体を、実験方法 a と c の方法を用いて測定した。その結果は表3に示す如くであつて、1定量の牛 Fibrinogen 液に検体を加へ、残存せる Fibrin 量で示した。14例中4例は、術後値が術前値に比べ増加

表3 術前術後の Inhibitor 除去血清 Plasmin Activity

No.	術 前	術 後
1	3.44	3.44
2	3.61	3.44
3	3.44	3.44
4	3.09	*3.36
5	3.18	*3.36
6	3.36	3.11
7	1.59	1.42
8	3.33	3.30
9	3.03	2.94
10	3.77	*4.02
11	3.61	3.14
12	3.44	*3.77
13	2.13	1.60
14	2.35	1.71

図 3



し、Fibrinolytic Activity が減少した。2例は変動を認めず、8例は術後 Fibrinolytic Activity が増大した事を示している。図3は、線グラフ及び、術前の検体により残存 Fibrin 量を基準として術後の検体による残存 Fibrin 量を、百分率で示したものが点グラフであり、100以下は、術後 Fibrinolytic Activity の増大を示している。これ等によると、やはり術後 Fibrinolytic Activity が増大していると思はれる。

4) 術前術後に於ける血清中の Fibrinogenolytic Activity の測定

先述せる実験方法の b と c により測定した。表4は1定量の牛 Fibrinogen 液に被検血清を加へて残存せる Fibrinogen 量の実測値を表示したもので、16例中、術後かえつて Fibrinogenolytic Activity が減少したものが5例、変動のなかつたもの1例、術後増大したものが10例であつた。図4は、これを線グラフ、並に、術前血清により残存せる Fibrinogen 量を基準として、術後血清により残存せる Fibrinogen 量を百分率で示した点グラフである。即、100以下は Fibrinogenolytic Activity の増大を示す。これ等をみると、術後は血清中の Fibrinogenolytic Activity は増大するものと思はれる。

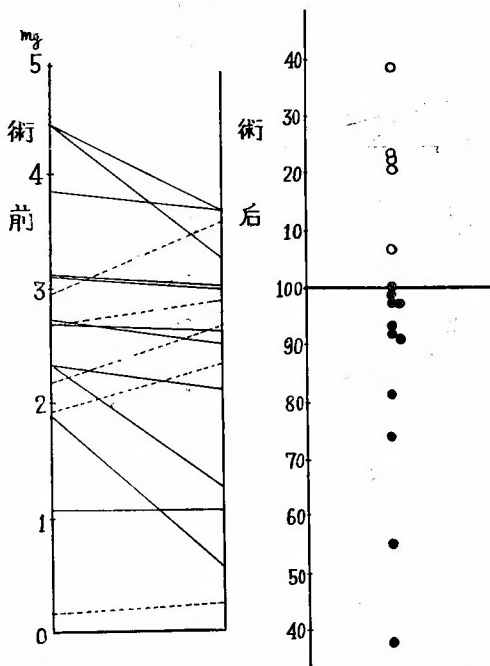
5) 術前術後の血清中 Plasmin Inhibitor 除去せる検体による Fibrinogenolytic Activity の測定

先述せる血清中 Plasmin Inhibitor 除去法により得

表4 術前術後の Fibrinogenolytic Activity

No.	術 前	術 後
1	2.97	*3.59
2	2.18	*2.68
3	2.69	*2.88
4	3.09	3.00
5	2.69	2.64
6	2.73	2.52
7	0.18	*0.25
8	2.33	1.28
9	1.89	0.58
10	3.85	3.69
11	4.43	3.69
12	4.43	3.28
13	3.11	3.03
14	2.34	2.13
15	1.07	1.07
16	1.92	*2.34

図 4

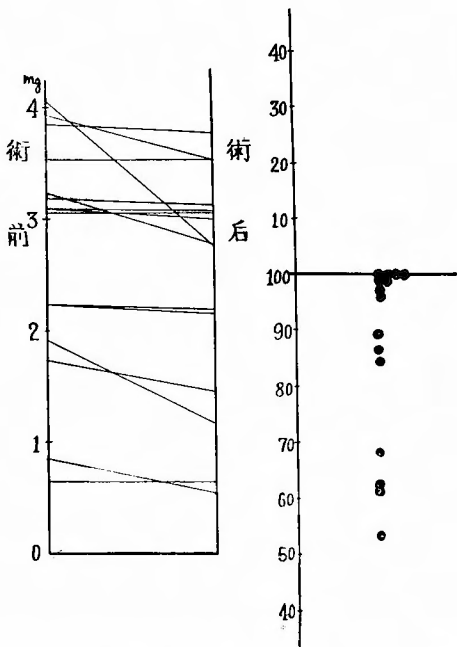


た検体を、実験方法 b と c により定量した。表5は、1定量の Fibrinogen 液に検体を加え、残存せる Fibrinogen 量の術前術後値を示したものであつて、15例中、4例は不変で、11例は術後 Fibrinogenolytic Activity の増大を示している。この検体では、術後に

表5 術前術後の Inhibitor 除去血清の Fibrinolytic Activity

No.	術 前	術 後
1	4.05	2.78
2	3.24	2.78
3	3.06	3.06
4	3.18	3.15
5	3.09	3.00
6	3.09	3.09
7	1.73	1.46
8	2.24	2.16
9	2.24	1.19
10	3.53	3.53
11	3.85	3.77
12	3.94	3.53
13	1.92	1.17
14	0.85	0.53
15	0.64	0.64

図 5



Fibrinogenolytic Activity の減少したものは認めなかつた。図5は、それを線グラフ、並に術前検体による残存 Fibrinogen 量を基準として、術後検体による残存 Fibrinogen 量を百分率で示した点グラフであつて、100以下は、術後 Fibrinogenolytic Activity の増大を示すものである。これ等を見ると、術後は、

Inhibitor を除去せる検体に於ては明らかに Fibrinolytic Activity は増強しているものと思はれる。

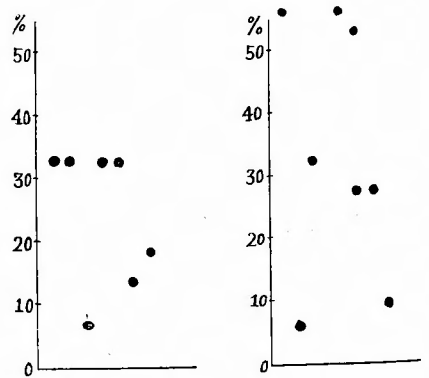
6) 胃癌患者の術前、術後の Fibrinolytic Activity の測定

検体は Inhibitor 除去せる検体で、測定は実験方法

表6 胃癌患者の術前術後の Fibrinolytic Activity の変動

No.	術 前	術 後
1	32.9%	86.7%
2	32.9	6.2
3	6.2	32.7
4	32.9	60.0
5	32.9	53.3
6	(-4.5)	27.2
7	13.6	27.0
8	18.2	9.1
平均	24.4	37.8

図 6



a と d より測定した。基質として使用せる牛 Fibrinogen 量を基準として、術前術後の Plasmin Inhibitor 除去検体により溶解された牛 Fibrinogen 量を百分率で示したものが表6である。この中1例は、残存 Fibrin 量が、使用せる Fibrin 量より多くなつたものがあつた。又1例は術後 Fibrinolytic Activity が非常に増大したものもあつたが、術前値は平均 24.4%で術後のそれに、37.8%であつた。即、術後は Fibrinolytic Activity は増強している。これを点グラフで示したものが図6である。胃癌患者では術前においてすでに24.4%で示される如き Fibrinolytic Activity を示している。

7) 胃癌患者の術前、術後の Fibrinogenolytic

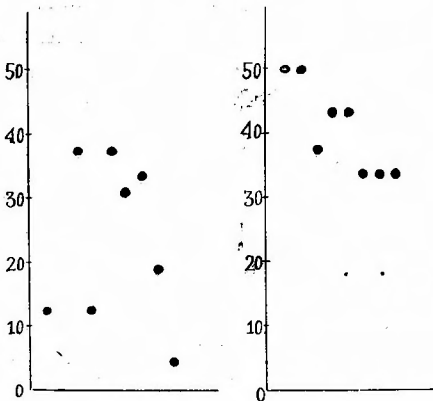
Activity の測定

検体は Plasmin Inhibitor を除去せるもので、実験方法 b と d により測定した。術前術後の検体により溶解された Fibrinogen 量を、基質として使用せる牛 Fibrinogen 量を基準として百分率で示すと表 7 の如くなる。その平均値を求めると、術前値は 26.3% となり、術後値は 40.6% と増大している。これを点グラフで示すと、図 7 の如くなる。この場合も術前すでに Fibrinogenolytic Activity を示し、26.3% の値をもっていた。実験 6 及び 7 を比較する為その平均値を線グラフに示すと、図 8 の如くであつて、術前、術後も Fibrinogenolytic Activity の方が Fibrinolytic Activity より強力であり、又どちらも術後増強されることを示すものである。

表 7 胃癌患者の術前術後の Fibrinogenolytic Activity の変動

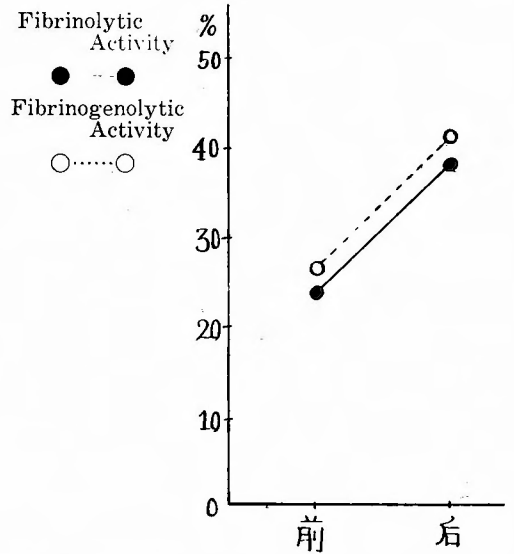
	術 前	術 後
1	12.5%	50.0%
2	37.5	50.0
3	12.5	37.5
4	37.5	43.7
5	31.3	43.5
6	33.4	33.4
7	19.3	33.4
8	4.7	33.0
平 均	26.3	40.6

図 7



8: 人精製 Plasmin の Fibrinolytic Activity と Fibrinogenolytic Activity の測定
牛 Fibrinogen 液を基質として、実験方法 a. b. と

図 8 胃癌患者の術前術後の Fibrinolytic Activity 及び Fibrinogenolytic Activity の変動 (平均)



d により測定した。

人 Plasmin は、持田製薬研究室で製作せるもので、Loomis の変法により、クロロホルム処理は行はず、活性化は Varidase により行い、特に Varidase 除去は行つてないが、混入せる Varidase の量で、Loo-

図 9

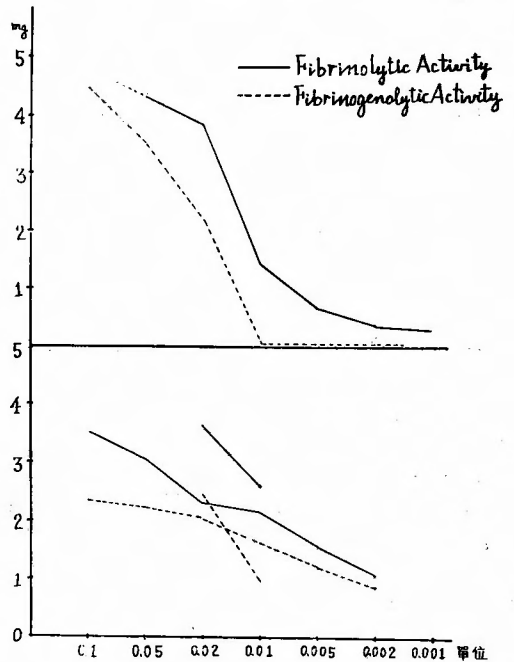
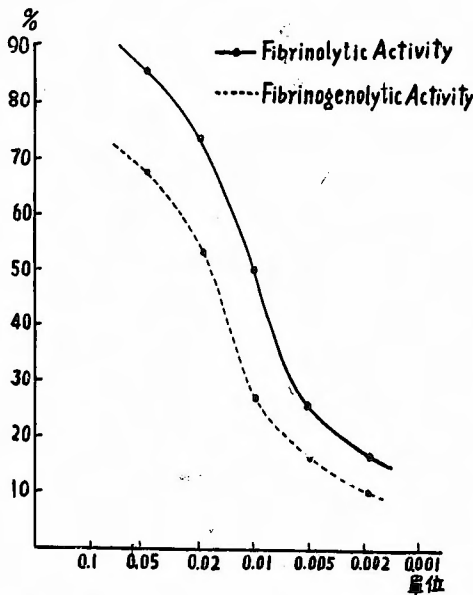


表9 人精製 Plasmin の Fibrinolytic Activity と Fibrinogenolytic Activity

単位値	牛 Fibrinogen による 基質の量					
	4.10 mg		4.50 mg		3.90 mg	
	F. L.	F. G. L.	F. L.	F. G. L.	F. L.	F. G. L.
0.1	全 溶	全 溶	全 溶	全 溶	3.50	2.33
0.05	"	"	4.38	3.50	3.05	2.23
0.02	3.65	2.45	3.85	2.19	2.27	2.05
0.01	2.68	0.98	1.40	0	2.14	1.60
0.005			0.61	0	1.51	1.20
0.002			0.35	0	1.06	0.88
0.001			0.26	0		

F. L. Fibrinolysis
 F. G. L. Fibrinogenolysis

図 10



mis法による Plasmin 単位定量法にかけて、全然活性度を示さないものであつた。表9に示すごとく 0.1 単位より0.001 単位の稀釈8 区分にし測定したところ、バイアルにより多少力価に變動を認めたが、人精製 Plasmin は、Fibrinolytic Activity の方が、Fibrinogenolytic Activity より、より強力であつて、その強度は、比較的 Plasmin の濃度に比例する様に思はれる。これを図示したものが図9であつて、これ等の平均値の變動を図示したものが図10である。

第4章 考 案

1) 測定法について

Fibrinolysis の測定法は色々あるが、臨床的には Macfarlane の変法が便利であると思う。然しこの場合被検血漿を倍数稀釈して、その何倍迄の Fibrin塊が溶解したかを見るについては、使用せる血漿の Fibrin 量が不定であることと、稀釈により Plasmin も稀釈される為に理論的に予承しがたい所がある。Unger の方法は、細かい判定は不可能である。Lewis 及び Loomis の方法は、実際に検体として血清を使用する時は、力価が弱くて、記載通りにはならず、長時間を要した。これは精製 Plasmin の様に高単位のものでは使用し得る。又、Euglobulin lysis time による方法が多く用いられて来たが、この方法も、血漿中の Fibrinogen を使用する点では、Fibrin 量は一定でないと思う。Viscosimetry は基質に Gelatin を使用し、又他に合成基質を使用する方法もある。Astrup 等の heated plate method は、基質として Fibrin を使用し、又 Fibrin 中に含有される Plasmin 系を加温により不活化して使用するので、甚だ要を得た方法と思う。然しその判定にあつては、溶解面積を測定するが、面積測定に甚だ困難を感じる事がしばしばあつた。又溶解された時の形が甚しく不整形となることもしばしばある。又、Fibrinolysis は測定可能であるが、Fibrinogenolysis の測定は不可能であるそこで、私の考案せる、試験管内に残存せる Fibrin を定量する方法；特に乾燥重量法は、Kjeldahl法に比べ、実験方法も簡単にして臨床に應用して便利な方法であり、Heparin, Thrombin 等、含窒素物の添加にあまり影響されず、Kjeldahl 法よりもよい方法と考へている。

然しこの方法にも二三の注意すべき事項を含んでいる。即、我々が作製せる Fibrinogen は完全に無菌的でない。又37℃放置で、凝固して来る為、Heparin を使用し、トルオールを使用している点、又、Fibrinogen 液は多少とも自己溶解を起す Plasmin 様の酵素を含有していることである。我々の実験では、基質として使用せる Fibrinogen 量平均5.9mg で自己溶解せる Fibrin 量として、0.33mg. Fibrinogen として、0.46 mg で、Fibrinolysis として0.056%、Fibrinogenolysis として0.078% の程度であつた。自己溶解能は有しているが、比較値に於ては甚しい誤差は考えられない様に思う。又私の考案せる方法は Fibrinolysis のみならず、Fibrinogenolysis も測定出来、実験方法も比較的簡単で、一般に推奨し得る方法と考えている。又重量法は、Kjeldahl 法に比べて長時間を要するが、乾燥時は放置出来るし、含窒素物添加の影響はなく簡便であると思う。

2) 手術侵襲による血液中の Fibrinolysis 及び Fibrinogenolysis について

私は、我々の教室に於て、高木⁷等は Macfarlane の変法により、手術侵襲、生血輸血、保存血輸血、輸液等に関して、血中 Plasmin の活性度の実験を行つて来たが、Plasmin Activity の増強は否定出来ない。Macfarlane が且て手術侵襲により Fibrinolysis の増強を示した事実と一致していた。実際問題としては手術に際して、各組織の破壊、出血、それに伴ひ輸血、輸液等、直接に血液組成に影響をあたへる様な現象が関与するが、そればかりでなく、患者の不安、精神的緊張、前麻酔、麻酔、又使用せる薬剤の影響等、各種の現象が総合的に作用して Plasmin の活性度に或は助長的に、或は拮抗的に動いて、その総合的結果として、私の得た実験結果となつたと考えている。Coon¹⁰等は、特に心停止の如く生体に対して甚だ重症となる状態、或は、ショック状態が長時間つづいた時には、特に、Fibrinolysis は強く起るとのべている。Macfarlane⁸)は、術前何等の Fibrinolysis を示さなかつたものが、手術の為、術後 Fibrinolysis を起すものが70% あつたとのべ、Truelove³⁰)等も同様なことをのべて、手術の大小にはあまり関係せず、術前すでに Fibrinolysis を示す患者では、術後他のものより Fibrinolysis は強くおこりやすいと云つてゐる。又、Kaulla⁹)は Fibrinolysis が増強される時は、尿中に Plasmin Activator が排出され、これは血中 Fibrinolysis の程度と関係が密であると云つてゐる。血中の Fibrino-

lysis が増強される時は、血中の Fibrinogen. Prothrombin の減少 Eosinopenie の現象が認められているが、私も先述した如く、術後 Fibrinogen が減少している事を認めた。Tagnon²¹)は Fibrinolysis が増大した時、Fibrinogen は70%の減少を示したとのべている。最近体外循環装置を使用した時に、Fibrinolysis が増強され、止血困難な状態になつた時、Fibrinogen 量が非常に減少すると Kaulla⁹)はのべたが、Wulf, Nilsson³¹)等も Fibrinogen, 血小板等の減少、Plasmin Activity の増加を認めている。黒田²⁰)等も同様の事をのべているが、私の実験も同様の結果を得た。この際には出血、保存血輸血、輸液等の影響も考えられる。私の考案せる方法により、Fibrinolysis の測定した結果は、術後たしかに増強されていた。然し血清そのままのものと、Inhibitor を除去した Euglobulin を使用したものとの間に明らかな差異は認められなかつた。Bidwell^{11,12})等は、Plasmin は Fibrin のみならず Fibrinogen にも同様に作用するものであるし、その活性度は一般に Fibrin に対する方がより強力であると考えられている。そこで私は、血漿中の、Fibrinogen 量の減少も Fibrinogenolysis の増強に伴う Plasmin により起るものではないかとの考えをもち、私の考案せる方法により、血清中の Fibrinogenolysis 又、Inhibitor 除去 Euglobulin による Fibrinogenolysis を測定した所、前述の如く、かなりの Fibrinogenolysis を示すことがわかつた。特に Euglobulin による Fibrinogenolytic Activity は、血清そのままを使用せるものより、明らかに強力であつて、アルブミン中には、Fibrinogenolysis に拮抗する Inhibitor を含有するものであると考えられる結果となつた。Euglobulin による Fibrinolysis と Fibrinogenolysis を比較してみると、Fibrinogenolysis の方がより強いという様に思はれたので、私は胃癌患者について、Euglobulin による Fibrinolysis と、Fibrinogenolysis の比較を行つた所、Fibrinolysis は術前すでに24.4%の Activity を示し、術後は37.8%と増大していることを示した。Fibrinogenolysis を測定した所、術前26.3%の Activity を示し、術後は、40.6%と増大していた。これより生体に於て、胃癌患者では、すでに Fibrinolysis も Fibrinogenolysis もともにおこつており、しかも、Fibrinogenolysis の方がより強力であるという結果を得た。Plasmin の Fibrinolytic Activity と Fibrinogenolytic Activity の差について、私は人精製 Plasmin を用いて実験した所では、Plasmin の濃

度に比例して、Fibrinolytic Activity も Fibrinogenolytic Activity もその強度を増し、しかも Fibrinolytic Activity の方がより強力であつた。術後の患者に於て、hypofibrinogenemia となる原因としては、手術に伴い、直接血液組成に関係する因子が多く考えられるが、その一つの原因として Plasmin によると考えられる所もある。私の得た結果からしてみると、単に Plasmin にのみよるものとすれば、in vitro の実験による、Euglobulin の Fibrinolytic Activity と、Fibrinogenolytic Activity とは、Fibrinolytic Activity の方がより強力であるはずである。然るにその結果は逆であつた。この原因について、現在の所明確に説明を下し得ない。然し Astrup 一派が述べている Plasmin 系の模型図による説明では、充分でない様に思う。Fibrinogenolysis の起ることは誰も考えており、その原因は Plasmin によるものであると説明を述べる人もある。私が行つた実験に使用した Plasmin も血液と比較すれば、比較的単純な生体生成物である。又 Euglobulin とでも、各種の因子が混在する生体生成物であつて、如何なる因子が存在するか予断はゆるされぬ。これ等の比較ではあるが、Fibrinogenolysis の原因が、現在認められている Plasmin 系によつてのみでは説明がなし得られないものと思われる。Plasmin Activity と pH、との関係、血中蛋白分層の比較値、Hormon との関係、又化学製剤として、Toluidin Blue. ε-アミノカプロン酸等、抗 Plasmin 様物質との関係等考えられる。今後益々使用されると考える人工臓器の使用にあたり、hypofibrinogenemia, Prothrombin. 血小板の減少、特に Plasmin 系による出血傾向に対する注意、又それに対する治療面として、Fibrinogen 液の使用、Anti-plasmin を含有する血清アルブミン、ホルモン、Toruidin Blue 及び ε-アミノカプロン酸等、薬品の使用について、今後の研究に待たねばならぬことが多いと思う。

第5章 結 語

1) Fibrinolysis の測定法は各種あり、heated plate method が多く使用されているが、その溶解面積を測定するのに甚だ困難を感じる。私の考案した、1 定量の Fibrinogen 液に検体を混在させ、Thrombin を加えて Fibrin を析出させて 37 C. 24 時間放置後に残存せる Fibrin 量を乾燥重量法により測定して、Fibrinolytic Activity を測定する方法が甚だ簡単にして臨床上要を得たものと思う。又、heated plate me-

thod では、Fibrinogenolytic Activity は測定不可能であるが、私の考案せる方法は、唯、Thrombin を加えて Fibrin を析出させ時期を 24 時間遅くさせるのみで、Fibrinogenolytic Activity を細かく測定出来る。然し私が作製せる牛 Fibrinogen 液は、わづかではあるが自己溶解能を有しており、完全無菌的に Fibrinogen 液を作る事が困難である為に一考を要する点は存在している。

2) 手術侵襲には各種の条件が加わるが、手術により、血中 Fibrinogen 量は減少する傾向を有する。

3) 血清中の Fibrinolytic Activity 及び Fibrinogenolytic Activity は術前に比べ術後は増大する傾向を有する。

4) 血清中の Euglobulin による Fibrinolytic Activity 及び Fibrinogenolytic Activity はともに術前に比し術後は増大する傾向があるが、Fibrinogenolytic Activity の方がより強力である様に思う。

5) 人精製 Plasmin による Fibrinolytic Activity と、Fibrinogenolytic Activity とでは、Fibrinolytic Activity の方がより強力である。

9) 生体中に於ける Fibrinolysis と Fibrinogenolysis はともに Plasmin によるものであるという学説に対し、私の実験結果によると、生体中に於ける反応は、Fibrinogenolytic Activity の方が強力であるのに、人精製 Plasmin による in vitro 実験では、Fibrinolytic Activity の方がより強力であるので、Fibrinolysis と Fibrinogenolysis が同一酵素による反応であるという説には今後詳しい実験を要するものと思う。

以上稿を終るにあたり、本研究に対し、終始御指導及び御鞭撻を賜つた恩師粟津教授に衷心より感謝の意を表すると共に、本研究に懇切に御指導を賜つた、小平教授、浅田教授、長山講師、本教室員の方々並びに、持田製薬研究所小川氏に深く感謝の意を表するものである。

文 献

- 1) Rhillips L. L., Rowley P. T. and Habib V. D. "Hypofibrinogenemia in surgical patients." *Surg. Gynec. & Obstet.* **103**: 443-454. 1956.
- 2) Tagnon H. J., Levenson S. M., Davidson C. S. and Tayler H. L. "The occurrence of fibrinolysis in shock, with observations on the prothrombin time and the plasma fibrinogen during hemorrhagic shock." *Am. J. Med. Soc.* **211**: 88-96. 1946.

- 3) Godboys H. L., Nolan J. and Davila J. C. "The effect of mechanical trauma on fibrinogen in heparinized blood." *Ann. Surg.* **151**: 399-402. 1960.
- 4) Kaulla K. N. and Swan H. "Clottig deviations in man during cardiac bypass. Fibrinolysis and circulating anticoagulant." *J. thorac. Surg.* **36**: 519-533. 1958.
- 5) Dastre A. "Fibrinolyse dans le sang." *Arch. de physiol. norm. et path., Par.*, **5**: 661-663. 1893.
- 6) 畔柳武雄：線維素溶解酵素，医学書院 1954.
- 7) Christensen L. R. "Streptococcal fibrinolysis: A proteolytic reaction due to a serum enzyme activated by streptococcal fibrinolysin." *J. gen. Physiol.* **28**: 363-383. 1945.
- 8) Macfarlane R. G. and Biggs R. "Observations on fibrinolysis spontaneous activity associated with surgical operations, trauma, & c." *Lancet* **2**: 862-864. 1946.
- 9) Christensen L. R. and Macleod C. M. "A proteolytic enzyme of serum: characterization, activation, and reaction with inhibitors." *J. Gen. physiol* **28**: 559-583. 1945.
- 10) Coon W. W. and Hodgson P. E. "Fibrinolysis in surgery patients." *Surg. Gynec. & Obstet.* **95**: 717-724. 1952.
- 11) Bidwell E. "Fibrinolysis of human plasma. A comparison of fibrinolytic plasma from normal subjects and from cadaver blood with chloroform." *Bioch. J.* **55**: 497-506. 1953.
- 12) Müllertz S. "Activation of plasminogen." *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **68**: 38-51. 1957.
- 13) 豊田建一・塩川優一：蛋白溶解酵素の活性に関する研究。日新医学 **37**: 263-267, 昭24.
- 14) Astrup T. "The biological significance of fibrinolysis." *Lancet.* **15**: 565. 1956.
- 15) Astrup T. "Fibrinolysis in the organism." *Blood* **11**: 781-806. 1956.
- 16) 栗津三郎他：手術侵と Plasmin, Plasminogen, Antiplasmin, Fibrinogenolysis の変動" 外科 **21**: 203-208 昭34.
- 17) 高木寛："外科的侵襲によるプラスミン及び抑制因子の変動につての臨床的研究" 日外宝 **28**: 487-498, 昭34.
- 18) 畔柳武雄・林圭雄・柴田整一。"線維素溶解酵素に関する研究" 日新医学 **38**: 684-690. 昭26.
- 19) Buckell M. "The effect of citrate on euglobulin methods of estimatine fibrinolytic activity." *J. Clin. Path.* **11**: 403. 1958.
- 20) 黒田恭一他："前立腺疾患に対する経尿道的切除術と Fibrinolysis について" 手術 **14**: 921-927, 1960.
- 21) Astrup T. and Müllertz S. "The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity." *Arch. Biochem. and Biophys.* **40**: 346-351. 1952.
- 22) Lassen M. "Heat denaturation of plasminogen in the fibrin plate method." *Acta Physiol. Scandinav.* **27**: 371. 1952.
- 23) 森田昌隆・"Plasmin の意義に関する基礎的研究" アレルギー **5**: 341-349 昭32.
- 24) Sherry S. and Alkjaersig N. "Biochemical Experimental, and clinical studies of proteolytic enzymes: with particular reference to the fibrinolytic enzyme of human plasma." *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **68**: 52-66. 1957.
- 25) Loomis E. C., George C. and Ryder A. "Fibrinolysin: Nomenclature, Unit, Assay, Preparation and Properties." *Arch. Biochem.* **20**: 444. 1948.
- 26) Foster D. P. and Whipple G. H. "An accurate method for the Quantitative analysis of blood fibrin in small of blood" *Am. J. Physiol.* **58**: 365-378, 1922.
- 27) 藤井暢三：生化学実験法定量篇，南山堂 昭31.
- 28) Schneider C. L. "Rapid estimation of plasma fibrinogen concentration and its use as a guide to therapy of intravascular defibrination." *Am. J. Obstet. & Gyne.* **64**: 141-147, 1952.
- 29) 北原洪一："トロンビンの P-Toluene sulfanylarginine metihyl ester 分解作用と凝固作用" 生化学 **31**: 488-495 1959.
- 30) Truelove S. C. "Fibrinolysis and eosinopenia after surgical operations." *Clin. Sci.* **11**: 107-112, 1952.
- 31) Wulf H. B., Nilsson I. M. & Swedberg J. "Bekämpfung der postoperativen Blutungsgefahr bei Anwendung einer Herzlungen Machine (Bubble-Oxygenator Prinzip)." *Thoraxchirurgie.* **7**: 140-148, 1959.