



犬分離後肢灌流実験系を用いた血管壁凝固第VIII因子放出機作の研究

多田, 和郎

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1978-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲0266

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1000266>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・（本籍）	た　　だ　　か　　ず　　お　　郎　　（　兵　庫　県　）
学　位　の　種　類	医　学　博　士
学　位　記　番　号	医博い第 259 号
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当
学位授与の日付	昭和 53 年 3 月 31 日
学　位　論　文　題　目	犬分離後肢灌流実験系を用いた血管壁凝固第Ⅷ因子放出機作の研究

審　査　委　員	主　査	教　授	岡　本　彰　祐	
		教　授	松　尾　　保	教　授　堀　　功

論　文　内　容　の　要　旨

I　序　　論

近年、生体の静脈内に種々の血管作働薬を投与し、血管壁に局在する血液凝固第Ⅷ因子（Ⅷ因子）の放出機作を解析しようとの試みが成された。しかし、生体を用いた研究では、投与した薬物が神経反射を引き起こすあるいは内分泌臓器を刺激する等の種々の複雑な反応を惹起させる可能性があり、血管壁Ⅷ因子放出機作の解析を困難にした。

血管作働薬によるⅧ因子放出機作を解析するには、生体の複雑な反応や血液成分の関与を排除する必要がある。それ故に、本研究では犬の後肢を軀幹より切断し、人工灌流液で灌流する方法を用いることにした。本実験系を用いて、血管作働薬に「血管壁に直接作用してⅧ因子を循環血液中に放出させる作用」があるか否かを観察し、加えて、各種血管作働薬によるⅧ因子放出機作について若干の解析を試みた。

II　実験方法

雑種成犬の後肢を切断し、人工灌流液で定圧灌流した。灌流液の温度、pH、灌流圧、拍動数は、各々、37～38℃、7.35～7.45、110～80 mmHg、84回／分に調整した。股動脈側より血管作働薬を投与し、股静脈側より流出して来る灌流液を経時的に採取し、被験液中のⅧ因子凝固活性を測定した。同時に流量を測定した。

Ⅷ因子凝固活性は人Ⅷ因子欠乏血漿を用いて一段法で測定した。被験液中のⅧ因子凝固活性値は、正常犬 pooled plasma 1 ml 中の活性値を 1 unit として作製した標準曲線より換算し、units/ml で示した。

流量は ml/min で示した。

III 結果並びに考按

Adrenaline, isoproterenol, bradykinin, acetylcholine, noradrenaline, histamine, salbutamol 各 $5 \mu\text{g/ml}$ の溶液 10 ml を動脈側より投与した所、静脈側より流出して来る灌流液中にⅧ因子凝固活性が観察された。一方, papaverine $5 \mu\text{g/ml}$, $10 \mu\text{g/ml}$ の溶液を各 10 ml 投与したが、Ⅷ因子凝固活性は観察されなかった。

Ⅷ因子凝固活性を示した被験液はⅨ因子欠乏血漿の凝固時間を短縮しなかった。この事実より、被験液中のⅧ因子欠乏血漿の凝固時間を短縮させた物質はⅧ因子と見做して差支えないと結論された。以上の結果より、従来、生体の循環血中Ⅷ因子活性を上昇させることが知られていた血管作働薬の内、上記薬物は血管壁に直接作用しⅧ因子を放出させたと見做して差支えないと結論された。

各血管作働薬のⅧ因子放出作用を検討し整理すると以下の様になった。

Bradykinin, acetylcholine, histamine の $5 \mu\text{g/ml}$ 溶液を各 10 ml 投与すると、一過性のⅧ因子放出が明瞭に観察され、その活性は 2 分以内に消失した。放出されたⅧ因子の最大活性値は 15 秒前後に観察された。その活性値は、bradykinin で約 $0.06 \pm 0.03 \text{ units/ml}$, acetylcholine で約 $0.08 \pm 0.01 \text{ units/ml}$, histamine で約 $0.01 \pm 0 \text{ units/ml}$ であった。3 実験例共流量の変化は観察されなかった。

Isoproterenol, salbutamol の $5 \mu\text{g/ml}$ 溶液を各 10 ml 投与すると、上記群よりやや長く 3 分～5 分前後のⅧ因子放出が観察された。最大活性値もやや遅く、30 秒～1 分前後に観察された。その活性値は、isoproterenol で約 $0.02 \pm 0.01 \text{ units/ml}$, salbutamol で約 $0.03 \pm 0.01 \text{ units/ml}$ であった。両実験例共、流量の変化は観察されなかった。

Adrenaline, noradrenaline の $5 \mu\text{g/ml}$ 溶液を各 10 ml 投与すると、Ⅷ因子放出は著明に遷延化し、15 分前後までⅧ因子活性が観察された。一方、流量は 30 秒前後に最小となり 7 分前後にはば元の流量に回復した。最大活性値は 30 秒～1 分 30 秒前後に観察された。その活性値は adrenaline で約 $0.02 \pm 0.01 \text{ units/ml}$, noradrenaline で約 $0.015 \pm 0 \text{ units/ml}$ であった。

以上の結果より以下のことが明らかになった。従来使用されていた adrenaline, isoproterenol, salbutamol が中枢神経系や内分泌系を介することなく、直接血管壁に作用してⅧ因子を放出させることを示した。又、新たに acetylcholine, bradykinin, histamine にも同じ作用があることを示し得た。

更に、Ⅷ因子放出作用がないと報告されていた noradrenaline にも同じ作用があることを示し得た。

さて、血管作働薬によるⅧ因子放出の機作については、血管運動を介するものではなさそうだと報告がある。本研究に於ても、血管拡張薬は流量を増加させることなくⅧ因子を放出させた。又、血管収縮薬を投与すると、Ⅷ因子の放出は、流量が回復した後 8 分間も持続した。以上の結果より、Ⅷ因子放出作用と血管運動とは関係がないと考えている。

更に、血管作働薬によるⅧ因子放出作用を経時的に観察した所、次に示す如く際立って異なった二

つの放出様式があることを示し得た。その一つは一過性のⅧ因子の放出であり、他方は長時間持続するⅧ因子の放出であった。

論文審査の結果の要旨

A 研究の意図について

血管作動薬の静脈内投与により循環血液中の血液凝固第Ⅷ因子(FⅧ)の凝固活性及びその関連抗原量が著明に上昇することが知られていた。更に1973年、FⅧの関連抗原が血管内皮細胞に局存することが、組織化学的に示された。つづいて1974年、血管内皮細胞の培養液中にFⅧの関連抗原及び von Willebrand 因子活性が観察されたが、培養液中にFⅧの凝固活性を観察する事はできなかった。

以上の事実より血管作動薬は血管内皮細胞に作用し、循環血中にFⅧの関連抗原を放出すると理解できる。しかし、FⅧの凝固活性を示すサブユニットは血管壁から放出されたのか、あるいは他の実質臓器から放出されたのかは不明であった。

従って、本研究者はFⅧの凝固活性を示すサブユニットが、関連抗原と同様に血管壁に局存し、血管作動薬により循環血中へ放出されるか否かを検討したものとして、研究意図は高く評価される。

B 実験方法について

実験方法としては、プラスミノゲン・アクチベーターの放出機作の解析に用いた犬分離後肢灌流実験法を採用した。本灌流実験では、灌流液の組成、温度、pH、 PO_2 及び PCO_2 は各々適切に調整されている。それ故に本条件下では、灌流下肢標本のガス交換は充分行い得ている事が確認されている。又、流量・圧関係も適切に調整されている故に、灌流実験でしばしばみられる“浮腫”状態もほとんど観察されなかった。本灌流標本の動脈側より、アドレナリン、アセチルコリン、ブラディキニン等の血管作動薬を投与し、静脈側より流出してくる灌流液を経時的に採取し、その灌流液中のFⅧの凝固活性を第Ⅷ因子欠乏血漿を用いて調べた。

以上、実験方法は、生理学的に高い水準を保ち、且目的によく適合したものとして評価される。

C 主要な成績及びその意義について

I アセチルコリン及びブラディキニンを投与すると投与後15～30秒を頂点とする一過性の凝固活性を持つFⅧの放出が明瞭に観察された。この様にシャープなそして反応の早い放出パターンは、生体あるいは培養実験ではとらえる事が困難であったが、本灌流実験によりそれを可能とした。上記結果より、凝固活性を持つFⅧが後肢灌流標本より放出される事が示された。後肢灌流標本は脈管系以外には、骨格筋、結合組織等の単純な組織から構成されている事、及び血管作動薬投与後わずか5秒でFⅧが静脈側中で観察された事等を考慮すれば血管作動薬が血管壁に作用し、血管壁より凝固活性を持つFⅧを放出したと考えるのが最も妥当であろう。

II アセチルコリン、ブラディキニン以外の血管作動薬(アドレナリン イソプロテノール等)のFⅧの放出作用を更に検討した。その結果、血管作動薬によるFⅧの放出は、A) 一過性(約2～3分)の放出と、B) 長時間(約10～15分)持続的に放出する薬物と、C) その中間に位置する

薬物との3群に分類された。

Ⅲ 血管作働薬はもとより血管運動を惹起させる作用を持つ。それ故に血管運動とFⅧの放出作用との関係が詳細に検討された。しかしその両者の間には有意な相関は認められなかった。

以上本研究は、分離後肢灌流法を採用したことにより、in vivoあるいは細胞培養法では非常に困難であったFⅧの凝固活性を示すサブユニットの局存について新たな知見を示し得た。

更に灌流法を採用した事により、投与した血管作働薬の作用は、中枢神経系あるいはホルモン臓器を介することなく直接血管壁に作用してFⅧを放出する事も示し得た。

本研究は、凝固第Ⅷ因子について犬分離後肢灌流標本を用い、血管壁よりの放出機作を研究したものであるが、従来ほとんど行われていなかった「血液凝固第Ⅷ因子の凝固活性を示すサブユニット」の局存及び「血管作働薬のFⅧの放出作用」について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって本研究者は、医学博士の学位を得る資格があると認める。