

18.

612. 115. 3

Charles 及 ビ Scott ノ 方法 ニ ヨル Heparin ノ 製出 ト 其ノ 效力 ニ 就テ

岡山醫科大學生理學教室 (主任生沼教授)

松 本 朝 夫

[昭和 17 年 7 月 15 日受稿]

第 1 章 緒 言

血液ノ凝固ヲ阻止スル性質ヲ持つモノニ (1) Pepton, (2) 炭酸, (3) 蛇毒, (4) 鹽化「ナトリウム」, 硫酸「ナトリウム」, 硫酸「マグネシウム」等ノ中性鹽ノ濃厚ナ溶液, (5) 枸橼酸鹽, 蔞酸鹽, 弗化物, (6) Heparin, (7) Hirudin, (8) Noviridin, Germanin, Liquoid, Chicagoblue 等ガアルガ, 普通ニ種々ノ實驗ニ使用サレルモノハ (4) 乃至 (8) ニ合マレル藥品デアル。

コノ中 (4) ニ屬スルモノハ血液中ノ Thrombin ノ成生ヲ抑制シテ凝固ヲ防グノデアアルガ, 濃厚ナ溶液ヲ使用スルタメニ血球ヲ萎縮サセ, トキニハ溶血ヲ起スコトモアル。

又 (5) ニ屬スルモノハ血液中ノ「カルシウム・イオン」ヲ除去スルコトニヨツテ凝固ヲ阻止スルト言ハレ, 枸橼酸鹽ハ生體ニ對シテ毒性ヲ呈シナイ點カラ最も屢々使用サレルモノデアルケレド目的ヲ達スルタメニ稍々大量ヲ要スルノ特種ナ實驗ニハ不適當ナ場合ガアル。蔞酸鹽及ビ弗化物ハ多少毒性ガアルタメニ生體ニハ應用スルコトガ困難デアルシ, 弗化物ハ溶血モ起シ易イト言ハレテキル。

之ニ反シテ (6), (7), (8) ニ屬スルモノハ Antithrombin ヲ出現サセルカ, 或ハ夫レ自身ガ Antithrombin デアツテ生體ニ對スル毒性ガ無ク其ノ上少量デ目的ヲ達スルコトガ出來, 吾々ガ生

體實驗ヲ試ミル場合ニ甚ダ重寶ナモノデアアルガ, 最近之等ノ市販品ガ著シク不足ヲ告ゲル様ニナツテキタ。

偶々著者ハ Charles 及 ビ Scott ガ案出シタ第 2 ノ方法ニ倣ツテ粗製 Heparin ノ製出ヲ試ミタトコロ相當ニ實用價值ガアルト思ハレルモノヲ得ルコトガ出來タノデ, 此處ニ報告スル次第デアル。

第 2 章 研究史

米人 Mclean ハ 1916 年犬ノ肝臟中ニ血液ノ凝固ヲ阻止スル物質ガ存在スルコトニ着目シタガ, 1918 年ニ至ツテ Howell 及 ビ Holt ガ初メテ之ヲ製出スルコトニ成功シテ Heparin ト命名シタ。コノトキニ出來タ製品ハ 1 mg デ血液 1 乃至 2 cc ノ凝固ヲ阻止スル能力ノアルモノデ, Levene ガ化學的ニ分析シタ結果窒素ト磷ヲ 2.5:1 ノ割合ニ含ンデキタト言フコトデアル。其ノ後 1922 年ニ Howell ガ稍々方法ヲ換ヘテ製出シタ Heparin ハ 1 mg デ血液 5 cc ノ凝固ヲ阻止スルコトガ出來更ニ精製シテ 20 乃至 40 cc ノ血液ノ凝固ヲ阻止スルモノヲ得タ。トコロガ之ヲ化學的ニ檢査シタ結果ハ磷ハ含マレテ居ラズ, 蛋白反應モ陰性デアアルガ, 窒素ヲ 2.7% ノ割合ニ含ミ尙ホ炭水化合物ノ存在スルコトガワカツテ, 曩ニ Heparin ガ磷酸化合物デアルト言ツタノハ誤リデアツタト報告シテキル。尙ホ之ハ多クノ重金屬ノ鹽ニヨツテ沈澱サ

セラレナイガ、次醋酸鉛或ハ過剰ノ鹽化「バリウム」ヲ加ヘルト沈澱スルト言ハレル。彼ハ更ニコノ精製ヲ企ダテテ 1928 年ニハ 1 mg デ人ノ血液 100 cc ノ凝固ヲ 24 時間以上阻止スル能力ノアルモノヲ得、之ハ窒素モ含マレテキナイ「グルクロン」酸ノ誘導體デ分子中ニ「カルシウム」ト硫酸ヲ含ンデキルト報告シタ。

次ニ Henry 及び Glaister ハ原料トシテ犬ノ肝臓ヲ使用スルト高價ニツクノデ牛ノ肝臓カラ少量ノ Heparin ヲ製出スルコトヲ試ミタガ、其ノ方法ハ Howell ノ行ツタトコロヲ其ノママ踏襲シタノデアツタ。Howell ノ案出シタ製出法ノ骨子ヲ記スト次ノ通りデアル。

- (1) 肝臓ヲ磨碎シテ乾燥サセル
- (2) 「アルカリ」水溶液デ抽出スル
- (3) 「アセトン」ヲ加ヘテ沈澱サセル
- (4) 熱イ「メチール酒精」デ抽出スル
- (5) 再ビ「アセトン」ヲ加ヘテ沈澱サセル

トコロデ此過程ノ中デ最モ困ヲ極ズルノハ「アルカリ」抽出液ノ濾過デアルガ、1933 年 Charles 及び Scott ハ蛋白質様物質ヲ沈澱サセルタメニ充分ナ量ノ硫酸安門ヲ加ヘルコトヲ案出シ、又原料ヲ乾燥サセズニ新鮮ナマカ或ハ自家融解ヲ起サセテ使用スル方法ヲ考ヘタ。ソシテ自家融解ヲ起サセタ場合ノ方が遙ニ效力ノアル製品ガ得ラレルコトヲ發見シタ。彼等ハマタ更ニ研究ヲススメテ Howell ガ精製シタ Heparin ヲリモ數倍強力ナ結晶形ノ「バリウム鹽」及ビ無晶形ノ「ベンチジン鹽」ヲ得ルコトガ出来タ。ソシテ之ヲ分析シタ結果炭水化合物ハモツテキルガ Howell ノ報告シタ様ナ「グルクロン酸」ノ誘導體デハナク、2% ノ窒素ヲ含ミ其ノ中ノ 25% ハ「アミノ」窒素デアツタト言フ事デアル。全體ノ組成ハ $C_{25}H_{65}O_{50}N_2S_5$ デアルラシク活性物質ハ「フォルムアミド」或ハ「ブチルアミン」ニ完全ニ溶解シ、血液ノ凝固ヲ阻止スル作用ノ一部ハ「アミノ基」ニヨルモノデアルト言ツテキル。同ジク 1933 年ニ Schmitz 及び Fischer

ハ結晶性ノ「プルチン鹽」ヲ得タガ之ハ「オルチノール」ト「ナフトレゾルチノール」ノ反應ガ陽性デ 1 ツノ炭酸基ヲモチ、窒素ハ含マレテキナカツタ。彼等ハ Heparin ハ 3 糖類ニ屬スルモノデ組成ハ $C_{11}H_{32}O_{17} \cdot 6H_2O$ ニチガヒナイト言ツテキル。1935 年ニハ Jorpes ガ Charles 及び Scott ノ方法ト Howell ノ方法ヲ稍々修正シテ牛ノ肝臓カラ Heparin ヲ製出シ、夫レヲ分析シテ 2% ノ窒素ヲ含ム Chondroitin polysulphuric acid デアルコトヲ認メ、活性物質ハ主ニ硫酸基デアルト報告シタ。彼ニヨルト Heparin 中ノ有機物質ハ Chondroitin デ灰分ハ硫酸「マグネシウム」カラナツテ居リ、硫酸鹽ノ一部ハ鹽化「バリウム」ニヨツテ沈澱スルケレド殘餘ハ「エテル」トシテ存在シ、Chondroitin 1 mol = 2.5 mol ノ硫酸鹽ガ結合シテキルト言フコトデアル。

又同年 Schmitz ハ硫酸ノ誘導體デハナクテ 4 乃至 5% ノ灰分ヲ含ム所ノ非常ニ效力ノ強イ製品ヲ得テキル。

次ニ Heparin ノ生理的ノ性狀ニツイテ Howell 及び Holt (1918) ハ次ノ様ニ述ベテキル。

Heparin ハ血液中ノ Prothrombin ガ Thrombin = 賦活サレルノヲ防グト同時ニ Proantithrombin ヲ Antithrombin = 賦活スル 2 ツノ作用ヲモチ、之ヲ血漿或ハ血清ニ加ヘルト其ノ量ニ比例シテ Antithrombin ノ量ノ増加スルノガ認メラレル。之ハ常態デモ血液中ニ存在シテ血管内デ血液ガ自然凝固スルノヲ防イデキルガ、血液ガ血管外ニ出ルト血球或ハ他ノ組織細胞内ニ出來ル磷酸化合物ニ中和サレテ本來ノ能力ヲ失フノデアツテ、コノ磷酸化合物ハ恐ラク Cephalin デアラウト思ハレル。生體ニ對シテハ全く無害デ、血管内ニ注入スルト暫時ノ間ハ採取シタ血液ニ凝固ガ起ラナイガ、コノ際注射シタ動物ノ心搏動、血壓、呼吸數、直腸内ノ溫度等ニ少シモ異常ガ認メラレナイ。血管内ニ注入シタ Heparin ノ作用ハ時間ノ經過ト共ニ減弱シテ 3 乃至 4 時間目ニハ殆ド其ノ影響ガ

消失スルモノデアツテ、犬ノ靜脈内ニ之ヲ注射シテ Prothrombin time ヲ測定シタ結果ハ次ノ通りデアツタ。

注射前	5分
注射後 10分目	24時間以上
注射後 1時間目	38分
注射後 2時間目	14分

Heparin ハ水ニ可溶性デ、熱ニ對シテハ抵抗ガ強ク 100°C = 熱シテモ破壊サレナイ。又粉末ヲ乾燥器ノ中ニ貯藏スルベ 2年間ハ性狀ガ變化シナイ。

次ニ肝臟以外ニ淋巴腺ヲ血液ノ中ニモ Heparin ガ存在スルコトハ Howell 及ビ Holt モ既ニ述ベテキルガ、King ハ 1921年ニ子宮ノ粘膜炎ニ之ヲ證明シ、1927年柏原及ビ香月ハ Howell ノ案出シタ第 2ノ方法ニヨツテ種々ノ組織カラ之ヲ製出シテ比較シタ結果、得タ製品ノ效力ノ強サハ腎臟、脾臟、肝臟、胎盤、肺臟、心筋、骨格筋ノ順序デアツテ、腎臟ヲ原料トシタ場合ニ最モ強力ナモノガ得ラレタト言ツテキル。但シコノトキノ製品ノ效力ハ 37°C ノ下デ家兎ノ動脈血 1.0 cc ヲ其ノ 0.4 mg デハ 90分間、0.8 mg デ 5時間以上液狀ニ保ツ程度ノモノデアツタ。1933年 Charles 及ビ Scott モ肺臟、肝臟、骨格筋、脾臟、心筋、胸腺、血液等ノ中ニ Heparin ヲ證明シ、Jaques, Waters 等ハ 1940年犬ノ血液カラ強力ナモノヲ製出シテキル。

Heparin ノ效力ハマタ原料ヲ採ル動物ノ種類ニヨツテモ異ルノデアツテ、Jaques ガ 1936年ニ Howell ノ方法ニ依ツテ數種ノ動物ノ肝臟カラ之ヲ製出シ、其ノ效力ヲ比較シタ結果ハ次ノ様ニ報告サレテキル。

犬	240
牛	100
豚	44
山羊	33

之ハ牛ノ肝臟カラ得タ精製 Heparin ノ效力ヲ基準ニシテ比較シタモノデアツテ、犬ノ肝臟ヲ原料

ニ使用シタ場合ニ最モ強力ナ製品ガ得ラレテキル。

第 3 章 材料並ニ製法

Charles 及ビ Scott ガ報告シテキルトコロノ第 2 法乃チ少量ノ材料ヲ用ヒテ Heparin ヲ製出スル方法ヲ做ツタノデアルカラ詳細ナ點ハ案出者ノ原著 (J. biol. chem. vol. 102 P. 431 1933) ニユヅルコトニシテ、著者ガ行ツタ所ノ大要ヲ記スト次ノ通りデアル。

(a) 材料…犬ノ肝臟

(b) 試薬…1) 0.5 規定苛性曹達水溶液

2) pH=8.2 ノ苛性曹達稀薄水溶液

3) pH=8.0 ノ苛性曹達稀薄水溶液

4) 局方濃硫酸

5) pH=2.3 ノ稀硫酸水

6) 局方鹽酸

7) 飽和硫酸安門水溶液

8) 94%「エチール」酒精

9) 「アセトン」

10) 「トリブレン」

11) 「キシロール」

(c) 製法…1) 犬ノ肝臟 500 g ヲ乳鉢デ磨碎シ、25°C ノ恒温器内ニ一晝夜置イテ自家融解ヲ起サセ

ル。2) 之ヲ 3L 入りノ「エレンマイエール」ニ移シ、0.5 規定苛性曹達水溶液 730 cc ト飽和硫酸安門水溶液 87 cc ヲ注イデヨク混和スル。

3) 30分間ノ後コロ「コルペン」ヲ 70°C ノ重湯煎ニツケテ絶エズ攪拌シナガラ温メ内容ノ中央部ガ 70°C ニ達シタラ直チニ數枚重ネタ綿紗ノ上ニ注イデ濾過スル。之ハ其ノママ數時間放置シテ濾液ヲ充分ニ流滴シ盡サス。

4) 濾液ニ濃硫酸ヲ加ヘテ pH ヲ略ボ 2.3 ニスル。コノタメニ要シタ濃硫酸ハ 11 cc デアツタ。之ヲ重湯煎デ 65°C ニ加温シテ、温カイ間

ニ吸引濾過器ヲ用ヒテ濾過シ、濾紙上ニ留ツタ残渣ニ更ニ pH ガ 2.3 ノ温イ稀硫酸水ヲ數回注イテ硫酸安門ヲ充分ニ洗ヒ去ル。pH ノ測定ニハ東洋濾紙會社製ノ pH 試験紙ヲ使用シタ。

5) コノ残渣ヲ數倍容ノ「エチール酒精」中ニ入レテヨク攪拌シ一晝夜放置スル。コノトキ褐色ノ油狀物質ガ酒精中ニ溶ケ込ムケレド、沈渣モ未ダ褐色調ヲ失ハナイ。

6) 遠心沈澱ニヨツテ酒精ヲ棄テテ沈渣ヲ pH ガ 8.2 ノ苛性曹達水溶液 75 cc ニ溶解サス、之ニ純「トリプシン」2g ト數滴ノ「キシロール」ヲ加ヘテ 37°C ノ恒温器中ニ 36 時間入レテ置ク。コノ間ニ溶液ハ次第ニ酸性ニ移行スルノデ 0.5 規定苛性曹達水溶液ヲ少量宛注加シテ數回 pH ヲ是正シタ。

7) 恒温器カラ出シタナラベ 2 倍容ノ「エチール酒精」ト混ジ、0.5 cc ノ鹽酸ヲ加ヘテ「ラタムス」酸性トシテ更ニ一晝夜放置スル。

8) 生ジタ沈澱物ヲ遠心沈澱器ニカケテ分離シ、pH ガ 8.0 ノ苛性曹達水溶液 50 cc 中ニ入レテ硝子棒ヲヨク攪拌スル。出來ルダケ充分ニ溶解サセタ後重湯煎デ 75°C ニ加温シテ「トリプシン」ノ作用ヲ停止サセル。

9) 再び遠心沈澱器ニカケテ今回ハ不溶性ノ沈渣ヲ棄テテ上澄液ニ 2 倍容ノ「アセトン」ト「ラタムス」酸性ニムルタメニ鹽酸 0.3 cc ヲ加ヘルト灰白色ノ沈澱ガ生ズル。

10) コノ沈渣ヲ遠心沈澱ニヨツテ分離シ、「エチール酒精」ヲ數回洗ツタ後減壓ノ下ニ約一晝夜半放置シテ乾燥サセル。

以上ノ操作ニヨツテ得タ灰白色ノ粉末ガ粗製 Heparin デアツテ、其ノ量ハ 2.3 g アツタ。

第 4 章 粗製 Heparin ノ效力

Heparin ヲ生理的食鹽水ニ溶カシテ 0.5% ノ溶液トナシ、之ヲ家兔ノ動脈血或ハ人ノ靜脈血ニ加ヘテ其ノ效力ヲ試験シタ。コノ際家兔ノ血液ハ

豫メ所定量ノ Heparin 溶液ヲ「ツボルクリン」注射器ニ吸引シテオキ之ヲ心室ニ突キ刺シテ採取シタガ、人ノ場合ニハ試験管ニ所定量ノ Heparin 溶液ヲ入レテ置イテ肘靜脈カラ採ツタ血液ヲコノ上ニ注加シ混合シタ。Heparin ノ粉末ハ食鹽水ニ容易ニハ溶解シ難カツタガ僅ニ加温シナガラ硝子棒ヲ攪拌スルト完全ニ溶解サセルコトガ出來タ。

結果ハコノ血液ヲ 24 時間氷室(溫度 2°C)ニ置イタ後ニ判定シ、其ノトキマデ完全ニ凝狀デアツタモノヲ(-)、液狀ヲ保ツテハキルガ中ニ少量ノ Fibrin 塊が生ジタモノハ(±)、凝固シタモノハ(+)トシタ。之ヲ表示スルト別表ノ様ニナル。

別 表 (+)ハ血液ノ凝固ヲ示ス

		兎動脈血ノ場合				人靜脈血ノ場合			
	0.5% Heparin 溶液ノ量 (cc)	0.05	0.1	0.15	0.2	0.05	0.1	0.15	0.2
	生理的食鹽水ノ量 (cc)	0.15	0.1	0.05	0.00	0.15	0.1	0.05	0.0
	血液ノ量 (cc)	1.0	0.1	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
判 定	I	(±)	(-)	(-)	(-)	(+)	(±)	(-)	(-)
	II	(+)	(±)	(-)	(-)	(±)	(-)	(-)	(-)
	III	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
	IV	(±)	(±)	(-)	(-)				
	V	(+)	(-)	(-)	(-)				

乃チ血液 1.0 cc ニ Heparin 溶液 0.15 cc ト生理的食鹽水 0.05 cc ヲ加ヘタモノハ總テ(-)ノ成績ヲ示シ、Heparin 溶液 0.1 cc ト生理的食鹽水 0.1 cc ヲ加ヘテ全量 1.2 cc ニシタ場合ニハ家兔デハ 5 例中ノ 3 例、人デハ 3 例中ノ 2 例ガ(-)、殘リハ(±)ノ成績ヲ示シテキル。併シ後ノ場合ニモ(+)ノ成績ハ現ハズ、Fibrin 塊ノ析出ヲ認メタノハ採血シテカラ 3 時間乃至 4 時間ノ後デアツタ。

第 5 章 總 括

著者ハ Charles 及ビ Scott ガ案出シタ少量ノ原料ヲ用ヒテ Heparin ヲ製出スル方法ヲ追試シテ次ノ様ナ結果ヲ得タ。

1) 犬ノ肝臓 500 g カラ粗製 Heparin 2.3 g ガ得ラレル。

2) コノ粗製 Heparin ハ 0.5% ノ溶液 0.15 cc ノチ 0.75 mg デ 3°C ノ下ニ於ケル人或ハ家兎ノ血液 1.0 cc ノ凝固ヲ 24 時間以上完全ニ阻止スル。

0.5 mg デハ 3 乃至 4 時間ノ後トキニ少量ノ

Fibrin 塊ヲ生ズルコトガアル。

稿ヲ終ルニ臨ミ御懇篤ナル御指導ト御校閲ノ勞ヲ賜ツタ恩師生沼教授ニ滿腔ノ感謝ヲ捧ゲ、併セテ實驗ニ際シ多大ノ便宜ヲ與ヘラレ且御援助ヲ忝クシタ小坂講師ニ深謝スル。

文 獻

1) Charles, A. F. & Scott, D. A., The J. of Biol. Chem. Vol. 102, P. 431, 1933. 2) Charles, A. F. & Scott, D. A., The bioch. J. Vol. 30, P. 1927, 1936. 3) Howell, W. E., The amer. J. of phys. Vol. 63, P. 434, 1922. 4) *Ibid*, The amer. J. of phys. Vol. 71, P. 553, 1924. 5) Howell, W. E., Skand. arch. f. Phys. Bd. 49, S. 154, 1926. 6) Howell, W. E., Bull. Johns Hopkins Hosp. Vol. 42, P. 199, 1928. 7) Howell, W. E. & Holt, E., The amer. J. of Phys. Vol. 47, P. 328, 1918. 8) Jaques, L. B., Science. Vol. 92, P. 488, 1940. 9)

Jaques, L. B. & Waters, E. T., The amer. J. of Phys. Vol. 129, P. 389, 1940. 10) Jorpes, E., The bioch. J. Vol. 29, P. 1817, 1935. 11) 柏原, 香月, 熊本醫學會雜誌, 第3卷, P. 61, 1927. 12) King, J. L., The amer. J. of Phys. Vol. 57, P. 444, 1921. 13) Mclean, J., The amer. J. of Phys. Vol. 41, P. 250, 1916. 14) Schütz, A. u. Fischer, A. Zeitschr. f. Phys. chem. Bd. 216, S. 264, 1933. 15) 正路, 醫用生理學, 上卷, P. 90, 1938.

Aus dem Physiologischen Institut der Med. Fakultät Okayama.

(Vorstand: Prof. Dr. S. Oinuma)

Nachträge zur Darstellung des Heparins nach Charles-Scottscher Methode und seine Wirkung.

Von

Asao Matumoto.

Eingegangen am 15. Juni 1942.

Der Verfasser hat das rohe Heparin aus Hundeleber nach Charles-Scottscher Methode hergestellt und prüfte diese anticoagulante Wirkung. Die Resultate lassen sich folgendermassen zusammenfassen:

1) Aus 500 g von Hundeleber wird das rohe Heparin 2,3 g hergestellt.

2) Dieses Heparin 0,75 mg hemmt die Gerinnung des Menschen- oder Käninchenblutes 1,0 cc völlig unter 0°C über 24 Stunden. Beim Zusatz von 0,5 mg dieses Heparins bemerkt man gelegentlich eine geringe Fibrinmasse nach 3-4 Stunden. (Autoreferat)