

# 総胆管結紮後の血液凝固線溶系変化 —雑種成犬による実験的研究—

名古屋大学医学部第2外科

中尾 昭 公 野 浪 敏 明

## CHANGES OF BLOOD COAGULATION AND FIBRINOLYSIS AFTER BILE DUCT LIGATION —AN EXPERIMENTAL SFUDY IN MONGREL DOGS—

Akimasa NAKAO and Toshiaki NONAMI

Second Department of Surgery, Nagoya University School of Medicine

雑種成犬の血液凝固線溶系の測定を施行し、良好な検量線を確立した。次に成犬15頭を用い、総胆管を結紮切離して閉塞性黄疸を作成し、肝機能、血液凝固線溶系ならびにベータグルクロニダーゼの変動について測定した。総胆管結紮後11~125日(平均35日)で15頭すべて死亡した。総胆管結紮による閉塞性黄疸肝における血液凝固線溶系因子の産生は比較的良好に維持された。しかし、ビタミンK欠乏によると推察されるビタミンK依存性凝固因子(II, VII, IX, X)の肝での産生が障害され、著明な凝固能の低下が認められた。一方、線溶系の変動は凝固系に比較して軽度であった。

索引用語：総胆管結紮，血液凝固線溶系，閉塞性黄疸，PIVKA

### はじめに

血液凝固線溶系の測定は各種の病態の把握と治療上に重要であるとともに、肝機能評価の一指標として重要視されるに至っている<sup>1-5)</sup>。そして各種動物実験が施行され、血液凝固線溶系の測定が報告されたが、検量線などの十分な吟味がなされていない。今回、成犬の血液凝固線溶系の測定を試みるとともに、総胆管結紮後の血液凝固線溶系の変化について測定し、検討を加えた。

### 研究方法

体重10~15kgの雑種成犬15頭を thiopental 静脈麻酔下に開腹し、総胆管を結紮切離し、閉塞性黄疸を作成した。採血は頸静脈から血液9容に3.8%クエン酸ナトリウム1容を加えて施行し、総胆管結紮前および結紮後は7日ごとに6週迄施行した。肝機能検査として総ビリルビン(T.Bil.)、アルカリフォスファターゼ(ALP)、GOT、GPTを測定した。血液凝固検査としてはプロトロンビン時間(PT, Thromborel Hoechst)、

活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT, Pathromtin Hoechst)、トロンボテストオーレン(TTO, Thrombotest-Owren Eisai)、ヘパプラスチンテスト(HPT, Hepaplastintest Eisai)を測定し、線溶系検査としてはアンチトロンビンIII(AT-III, S-2238 Kabi)、 $\alpha_2$ -プラスミンインヒビター( $\alpha_2$ -PI, S-2251 kabi)、プラスミノゲン(Plmg)、フィブリノーゲン(Fbg, Fibrinotest Chugai)、ユーグロブリン溶解時間(ELT)、FDP(FDPL test Teikokuzoki)を測定した。またライソゾーム酵素の一つであるベータグルクロニターゼ( $\beta$ -Glu,  $\beta$ -Gluase Fujizoki)も測定した。なおPlmgはユーグロブリン分画をストレプトキナーゼ(Lederle)で活性化し、ウシ無プラスミノゲンフィブリン平板(Hokken)上にて測定した。

### 成 績

#### 1) 雑種成犬の検量線の作成

肝機能正常な成犬10頭より得た血漿を正常血漿として希釈系列を作り、PT(図1)、APTT(図2)、TTO(図3)、HPT(図4)、ATIII(図5)、 $\alpha_2$ -PI(図6)、Plmg(図7)について検量線を作成し、ほぼ良好な検量線を作成した。

図1 ヒトとイヌのPTの検量線

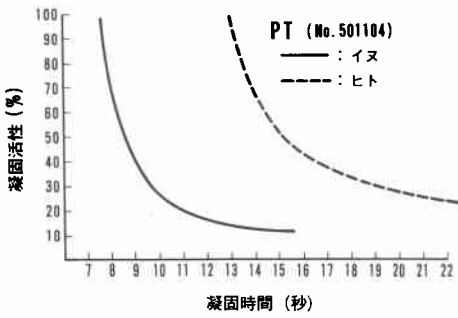


図2 ヒトとイヌのAPTTの検量線

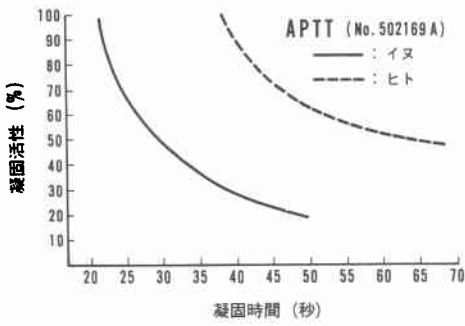


図3 ヒトとイヌのTTOの検量線

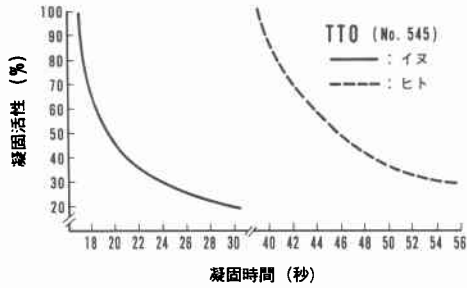


図4 ヒトとイヌのHPTの検量線

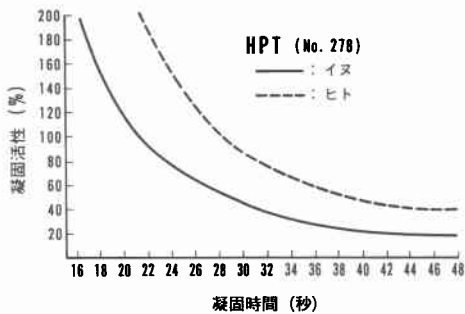


図5 ヒトとイヌのATIIIの検量線

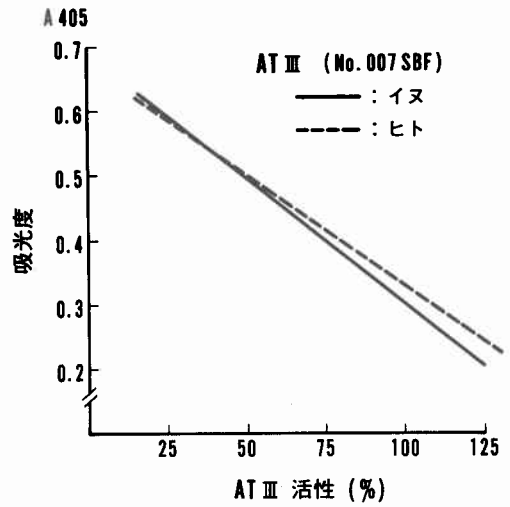


図6 ヒトとイヌの $\alpha_2$ -PIの検量線

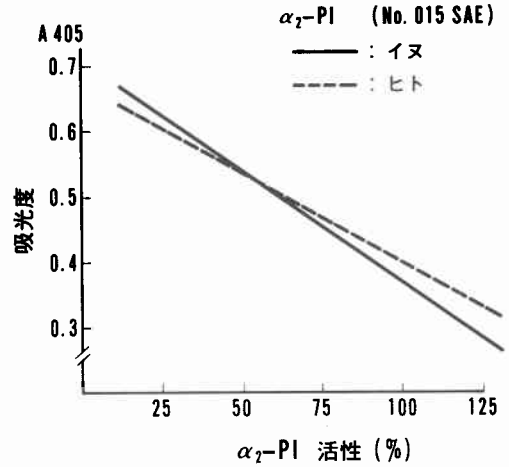
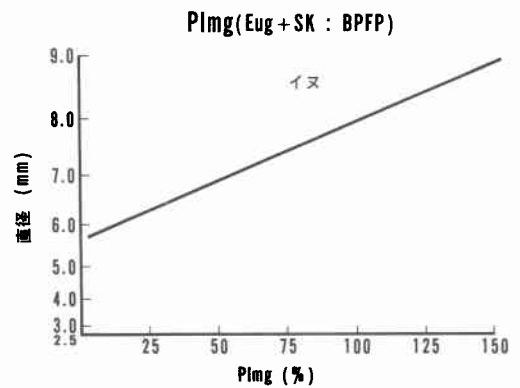


図7 イヌのPlmgの検量線



2) 総胆管結紮後の肝機能, 血液凝固線溶系, ベー  
ターグルクロニダーゼの変化

総胆管結紮後11~125日(平均35日)で15頭すべて死  
亡した。総胆管結紮後の生存数は1週で15頭全頭, 2  
週で14頭, 3週で10頭, 4週で6頭, 5週で5頭, 6  
週で5頭であった。

総胆管結紮後, T.Bil(図8)は急激に上昇し, その  
後も約4~6 mg/dlを持続した, ALP(図8)もT.Bil.  
とほぼ同様な変化を認め, 2週で平均255KAUと最高  
値に達し, 以後も高値を維持した, GOTは1週で平均  
264KUまで上昇し, 以後低下傾向を認め, GPTも1週  
で平均623KUに上昇し, GOTとほぼ同様な変化を認め  
たが, GOTに比較して上昇傾向は高度であった(図  
9)。

PT(図10), APTT(図10)とTTO(図11)は総胆  
管結紮後, 著明な活性値の低下が認められたが, HPT  
(図11)は総胆管結紮後3週迄は同様な低下傾向を認め  
たが, 以後は50~60%の活性値を維持した。またTTO  
とHPT<sup>6)</sup>の値より算出したPIVKA<sup>7)</sup>(Protein In  
duced Vitamin K Absence and Antagonist)は, 総  
胆管結紮後, 著明な上昇を認めた(図11)。

図8 T.Bil.とALPの総胆管結紮後の変化

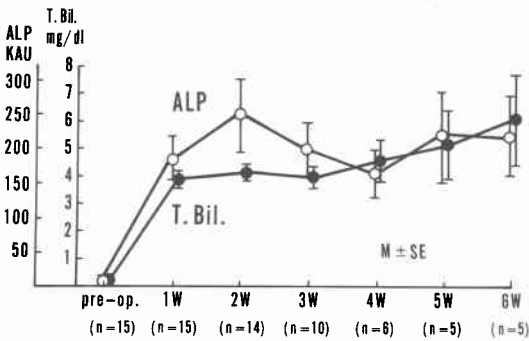


図9 GOTとGPTの総胆管結紮後の変化

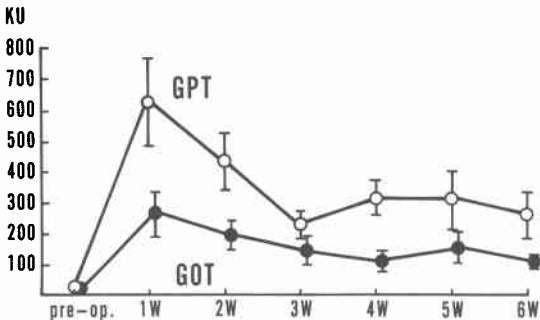


図10 PTとAPTTの総胆管結紮後の変化

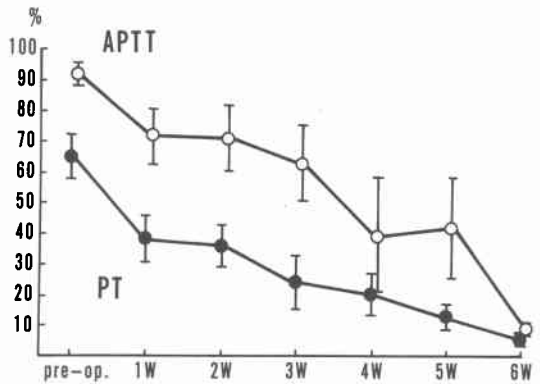


図11 TTO, HPTとPIVKAの総胆管結紮後の変化

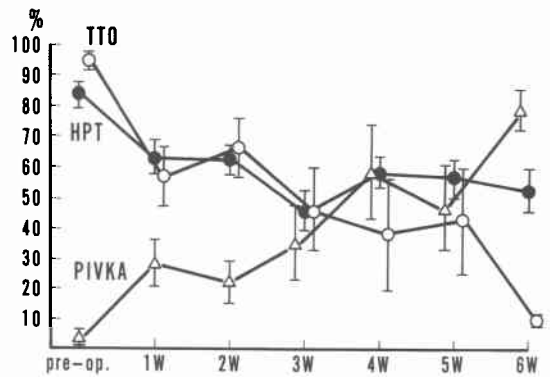
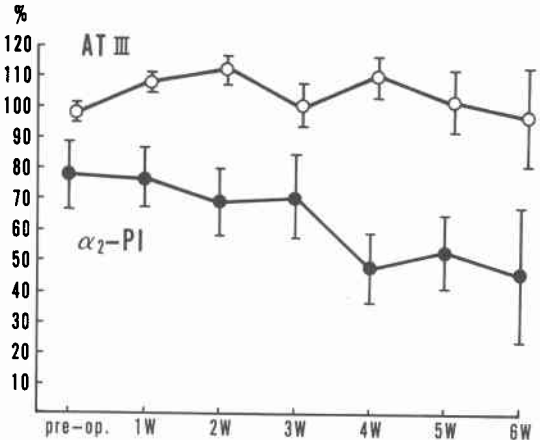


図12 ATIIIと $\alpha_2$ -PIの総胆管結紮後の変化



ATIIIは総胆管結紮後, 軽度上昇し, 以後も高値  
を維持したが,  $\alpha_2$ -PIは総胆管結紮後, 軽度低下傾向  
を認めた(図12). Plmgは総胆管結紮後, 低下傾向を  
認めたが, Fbgは軽度上昇し, 比較的高値を維持し

図13 Plmg と Fbg の総胆管結紮後の変化

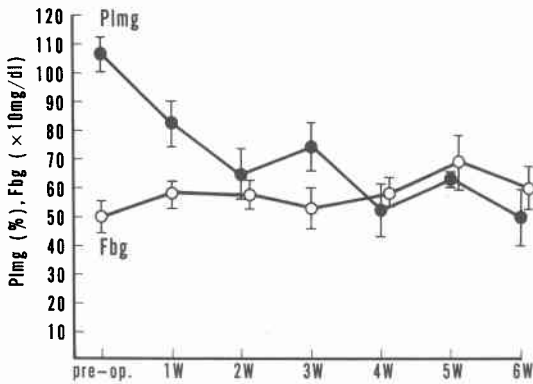


図14 ELT と FDP の総胆管結紮後の変化

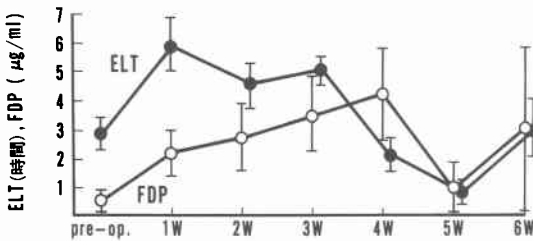
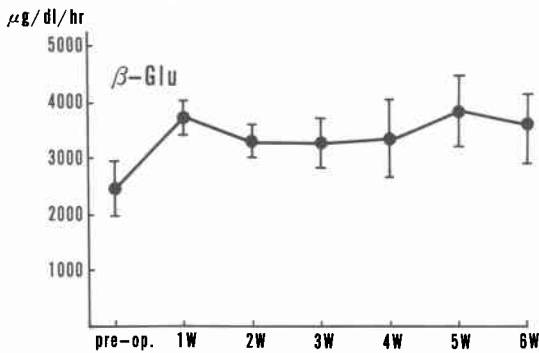


図15 β-Glu の総胆管結紮後の変化



た(図13)、ELT(図14)は第1週では延長傾向を示し、4週、5週では軽度に短縮傾向を示した。またFDP(図14)は総胆管結紮後、軽度上昇傾向を認めたが、いずれも正常範囲内の変動であった。

β-Glu(図15)は総胆管結紮後、上昇傾向を認め、以後も比較的高値を持続した。

考 察

血液凝固線溶系に関係する諸因子の多くは、肝で産生される蛋白であり、rapid turnover proteinでもある。そのため血液凝固線溶系の測定は肝機能の指標として重要視されるに至っている<sup>1)~5)</sup>。そして種々の

動物実験において血液凝固線溶系の測定が報告されているが、ヒトの検量線を使用して算出した測定値で報告されていることが多い。血液凝固検査に関する検量線を比較すると、イヌはヒトと比較して凝固時間は著しく短縮しており、動物に応じて検量線を作成し、測定することが望ましい。ヒトとイヌのFbg, Plmg, ATIII, α<sub>2</sub>-PIなどについて免疫学的に交差するかどうかをOuchterlony法で検討したが、Fbg, Plmg以外は免疫交差を認めなかった。よって、市販の測定試薬を使用する場合、抗原量の測定は不可能な場合が多く、活性値として測定する方法が適当である。またFDPについても、それぞれ動物に応じて抗血清を作成して測定することが望ましいが、ヒトとイヌのFDPは免疫交差があり、市販の試薬で測定すると実際より低値を示す。

閉塞性黄疸の合併症の一つとして、出血傾向が出現することはよく知られている<sup>9)9)</sup>。また最近では、閉塞性黄疸と凝固線溶系との関連を臨床的に検討し、閉塞性黄疸時の特徴は線溶能抑制をともなった凝固亢進状態であり、胆道感染と密接に関係しているという報告<sup>10)11)</sup>もある。総胆管結紮による閉塞性黄疸犬で、最も著明な変化を認めたものは凝固能であり、PT, APTT, TTOの活性値は著明な低下を認めた。PTはプロトロンビン(II), Fbg, V因子を反映し、APTTはXII因子(Hageman因子)の活性化にはじまる内因性凝固活性を反映する。TTOはII, VII, IX, X因子をHPTはII, VII, X因子を総合的に測定でき、II, VII, IX, X因子は肝細胞のミクロソーム上でビタミンKを触媒として、N末端領域のグルタミン酸がγ-カルボキシル化され、γ-カルボキシルグルタミン酸となり、正常な凝固因子となることが知られている<sup>12)13)</sup>。PIVKAはγ-カルボキシル化がなされていない異常凝固蛋白で、Ca<sup>++</sup>イオンとの結合能を欠くことが明らかとなってきており、それぞれPIVKA II, VII, IX, Xと称される。PIVKAはビタミンK欠乏時やWarfarinなどのビタミンK拮抗剤投与時に出現する<sup>14)15)</sup>。総胆管結紮後の著明な凝固能の低下は、胆汁が腸管内へ流出せず、腸管内細菌で合成された脂溶性ビタミンであるビタミンKが腸管より吸収されず、欠乏したためと推察される。従来、TTOはPIVKAの影響を受けるが、HPTはその影響を受けないとされており<sup>6)</sup>、総胆管結紮後、両者の値より算出したPIVKAは著明に上昇した。しかし、ヒトとウシでは末梢血中にPIVKAが証明されるが、イヌでは肝細胞のミクロソーム中に蓄積され、末梢血

中には証明されないという報告<sup>16)</sup>もあり、もしこれが事実とすれば、今回の実験での PIVKA の上昇は説明困難である。また、ビタミン K 依存性蛋白としてプロテイン C<sup>17)</sup>などが最近発見されつつある。

ELT は一般に、血中プラスミノゲンアクチベーター活性を反映し、その短縮は線溶亢進を意味するが、Fbg, Cl-Inactivator<sup>18)19)</sup>などとは正の相関を有し<sup>20)</sup>、これらの影響も受けている。一般に術中の ELT は著明に短縮し、術後は著明に延長し、術後 2 週で術前値に復帰する<sup>20)</sup>。またプラスミノゲンアクチベーターは微小血管内皮細胞などから流血中に適宜分泌されると考えられており<sup>21)</sup>、肝を主体とする網内系で除去されることが知られている<sup>22)</sup>。総胆管結紮後、ELT が軽度延長したのは、血中プラスミノゲンアクチベーターの低下と Fbg の軽度上昇によると考えられる。4 週、5 週における ELT の短縮は Fbg の低下をとまなわないうことより、線溶亢進状態と推察されるが、線溶が亢進すれば、Plmg からプラスミンへの転換がじゃっきされ Plmg は低下し、プラスミンを最も強力に阻害する  $\alpha_2$ -PI<sup>23)24)</sup> の低下、FDP の上昇が起こると考えられるが、今回の実験では、これら一連の一致した変動は認められなかった。PLmg,  $\alpha_2$ -PI も肝で産生される蛋白であり、これらの低下は線溶亢進による消費や、肝細胞障害による産生能低下などが考慮される。

AT III も肝で産生される糖蛋白であり、トロンビンを強力に阻害するが、トロンビンの他、IXa, Xa, XIa, XIIa, プラスミン, Cl, プラスマカリクレインなども阻害し、なかでも Xa を強力に阻害し、血液凝固制御機構の中で重要な役割を担っている。この AT III が総胆管結紮後、軽度上昇し、以後も高値を維持したのは、肝での産生が障害されず、著明な凝固能の低下によって、その消費が抑制されたためと推察される。

Fbg は総胆管結紮後、上昇傾向を認め、以後も高値を持続したが、一般に術後は急激に上昇し、術後 2~3 週で術前値に復帰する acute phase reactant としての反応を示す<sup>20)</sup>。総胆管結紮後の上昇は開腹手術という手術侵襲によって上昇し、その後も肝における Fbg 産生能は障害されず、閉塞性黄疸という刺激に対して高度に維持されたと推察されるが、また感染による影響も考えられる。

FDP は総胆管結紮後、軽度上昇したものの異常な高値は認めず、この上昇は二次線溶によるものと推定された。

$\beta$ -Glu はライソゾーム酵素の一つであり肝細胞中に

多く含まれ、また肝で除去される<sup>22)</sup>酵素であるが、急性肝炎<sup>25)</sup>や肝切除後<sup>26)</sup>などに上昇することが報告されている。総胆管結紮後の上昇もこれらのことと関係があると推察される。

以上、イヌにおける総胆管結紮後の血液凝固線溶系変化はビタミン K の欠乏によって肝におけるビタミン K 依存性凝固因子の産生が障害され、凝固能が著明に低下するのが特徴であり、肝における血液凝固線溶系因子の産生は比較的良好に維持されるとともに、線溶系への影響は比較的小さいものと推察された。

## 結 語

1) 成犬の血液凝固線溶系の測定を施行し、良好な検査線を作成した。

2) 総胆管結紮後の血液凝固線溶系変化を測定し、総胆管結紮後はビタミン K の欠乏によると推察されるビタミン K 依存性凝固因子 (II, VII, IX, X) の肝での産生が障害され、著明な凝固能の低下が認められた。

3) 閉塞性黄疸肝における血液凝固線溶系因子の産生は比較的良好に維持されるとともに、線溶系の変動は凝固系に比較して軽度であった。

稿を終るにあたり、御校閲をいただきました近藤達平教授と堀澤増雅講師に深甚なる感謝の意を表します。

なお、本論文の要旨は第23回日本消化器病学会秋季大会(1981. 10. 16. 米子)と第24回日本臨床血液学会総会(1982. 10. 30. 出雲)において発表した。

## 文 献

- 1) Owren PA: Normotest in liver disease. *Farmakoterapi* 125: 46-59, 1969
- 2) Roberts HR, Cederbaum AI: The liver and blood coagulation: Physiology and pathology. *Gastroenterology* 63: 297-372, 1972
- 3) Fujii M, Yasunaga K, Uchino H: Correlation analysis of relationships between vitamin-K-dependent clotting factors and effective hepatic blood flow, albumin and other liver function tests. *Haemostasis* 9: 9-14, 1980
- 4) 中谷泰康: 慢性肝疾患における ICG Rmax と Hepaplastintest の解離例の検討. *日消病会誌* 78: 2337-2341, 1981
- 5) 今岡真義, 小川睦子, 佐々木洋ほか: 肝機能検査としてのヘパラスチンテストの有用性. *血と脈管* 13: 207-210, 1980
- 6) Owren PA, Strandli OK: Normotest. *Farmakoterapi* 25: 14-26, 1969
- 7) Hemker HC, Muller AD, Loeliger EA: Kinetic aspects of the interaction of blood clotting enzymes. VI. Localization of the site of

- blood coagulation inhibition by the protein induced by vitamin K absence (PIVKA). *Thromb Diath Hemorrh* 23 : 633—637, 1970
- 8) Ratnoff OD: Hemostatic mechanisms in liver disease. *Med Clin N Am* 47 : 721—736, 1963
  - 9) Walls WD, Losowsky MS: The hemostatic defect of liver disease. *Gastroenterology* 60 : 108—119, 1971
  - 10) 武田成彰: 閉塞性黄疸における出血傾向発現機序に関する臨床的研究. *福岡医誌* 68 : 7—19, 1977
  - 11) 阿部要一: 閉塞性黄疸における凝固, 線溶, 補体系の変動—とくに胆道感染および手術侵襲の影響について. *日外会誌* 82 : 469—482, 1981
  - 12) Stenflo J, Fernlund P, Egan W et al: Vitamin K dependent modification of glutamic acid residues in prothrombin. *Proc Nat Acad Sci USA* 71 : 2730—2733, 1974
  - 13) 片山幸一, 藤川和雄, 千谷晃一: ビタミン K 依存性血液凝固因子—構造, 機能, 生合成—. *蛋白質核酸酵素* 24 : 924—941, 1979
  - 14) Niléhn JE, Ganrot PO: Plasma prothrombin during treatment with dicumarol. *J Clin Lab Invest* 22 : 17—28, 1968
  - 15) Stenflo J: Dicumarol-induced prothrombin in bovine plasma. *Acta Chem Scand* 24 : 3762—3763, 1970
  - 16) Carlisle TL, Shah DV, Schlegel R et al: Plasma abnormal prothrombin and microsomal prothrombin precursor in various species. *Proc Soc Exp Biol Med* 148 : 140—144, 1975
  - 17) Stenflo J: A new vitamin K-dependent protein. *J Biol Chem* 251 : 355—363, 1976
  - 18) Kluft C: Occurrence of C1-inactivator and their influence on fibrinolytic activity. *Haemostasis* 5 : 136—146, 1976
  - 19) 武田成彰, 能塚洋子, 加藤秀典ほか: C1-Inactivator のユーグロブリン溶解時間におよぼす影響ならびにその臨床的意義. *臨血* 20 : 879—885, 1979
  - 20) 中尾昭公: 術中術後線溶動態—ELT の変動を中心として—. *日臨外医会誌* 44 : 214—221, 1983
  - 21) 中尾昭公: 急性門脈遮断時の凝固線溶系変化に関する実験的研究. *日外会誌* 84 : 692—702, 1983
  - 22) 中尾昭公, 市原透, 酒向猛ほか: 肝における plasminogen activator の clearance mechanism について. とくに正常肝と肝硬変の比較検討. *外科診療* 21 : 1157—1164, 1977
  - 23) Moroi M, Aoki N: Isolation and characterization of  $\alpha_2$ -plasmin inhibitor from human plasma. *J Biol Chem* 251 : 5956—5965, 1976
  - 24) 中尾昭公, 近藤達平: 外科手術における  $\alpha_2$ -plasmin inhibitor と Trasylol. *最新医* 37 : 745—749, 1982
  - 25) 中村孝: 肝胆疾患における血清  $\beta$ -glucuronidase の臨床的意義. *岩手医誌* 25 : 334—350, 1973
  - 26) Nagasue N, Inokuchi K, Iwaki A et al: Lysosomal enzyme  $\beta$ -glucuronidase. Release from regenerating liver after partial hepatectomy. *Arch Surg* 111 : 919—922, 1976