

## アンチトロンビンⅢを中心とした血栓止血の制御機構

富山医科薬科大学医学部臨床検査医学

櫻川 信男

Regulation Mechanism of Thrombosis and Hemostasis  
with Works of Antithrombin Ⅲ

Nobuo SAKURAGAWA

*Department of Clinical Laboratory Medicine,  
Faculty of Medicine,  
Toyama Medical and Pharmaceutical University*

The author reported the works on “Regulation mechanism of thrombosis and hemostasis with works of antithrombin Ⅲ” which were performed for last 16 years in his laboratory.

- a) Antithrombin Ⅲ abnormality “Toyama” (Type Ⅱb): One point mutation (<sup>47</sup>Arg→Cys) which invited the loss of heparin binding activity was found to be homogeneous with occurrence of cerebral thrombosis, and the first case in the world.
- b) Antithrombin Ⅲ abnormality “Aomori” (Type Ⅱa): One point mutation (<sup>393</sup>Arg→His) which invited the loss of thrombin binding activity was found to be heterogeneous with occurrence of cerebral thrombosis, and the first case in Japan.
- c) Antithrombin Ⅲ abnormality (Type Ⅰ) with normal delivery with administration of antithrombin Ⅲ concentrates and low molecular weight heparin preparations.
- d) Antithrombin Ⅲ producing hepatocyte cell carcinoma: Antithrombin Ⅲ level was increased to be 122 mg/dl (540 % compared with normal value) with normal biological function. Pathohistological finding was Edmondson I, and reported as the first case in the world.
- e) Interaction between antithrombin Ⅲ and heparin cofactor Ⅱ.
- f) Interaction between antithrombin Ⅲ and endothelial cells which showed defensive

Reprint requests to: Nobuo SAKURAGAWA,  
MD and PhD, Professor and Chairman,  
Department of Clinical Laboratory Medicine,  
Faculty of Medicine,  
Toyama Medical and Pharmaceutical University,  
2630-Sugitani, Toyama City, 930-01 JAPAN.

別刷請求先: 〒930-01 富山市杉谷2630  
富山医科薬科大学医学部  
臨床検査医学 教授 櫻川 信男

features with the stimuli of thrombin from the points of thrombotic and hemostatic views.

- h) Novel antithrombotic drugs: Low molecular weight heparin preparation was administered to treat thrombosis. The traditional herbal medicines were studied experimentally to treat thrombosis.

Key words: antithrombin Ⅲ, heparin cofactor Ⅱ, glycosaminoglycans, traditional herbal medicine, thrombosis, low molecular weight heparin, antithrombin Ⅲ producing carcinoma.

アンチトロンビンⅢ, ヘパリンコファクターⅡ, グリコサミノグリカン, 伝統的薬草医学, 血栓, 低分子ヘパリン, アンチトロンビンⅢ産生腫瘍

## はじめに

本格的高齢化社会を迎えた今日, 罹患する疾病や死因に変化がみられ, 血栓症が死因の主たる位置を占めており, これに対する治療法の開発や予防対策が急がれている。

私は昭和37年(1962)新潟大学第一内科に入局し, 昭和54年(1979)8月富山医科薬科大学へ転任したが, 一貫して血栓止血学研究を継続している。新潟大学では血管内凝固症候群の病態生理を米国留学(ミシガン州立ウェン大学, シーガース教授, 1968~1971)で習得した分子生物学的手法を駆使して研究し, 富山医科薬科大学では血栓症の発症に重要な意義を持ち, 上記のシーガース教授の命名によるアンチトロンビンⅢの血栓症における病態生理に関して研究<sup>1)2)</sup>, 以下に述べる如く世界で最初の症例を幾つか経験する幸運に恵まれた。このアンチトロンビンⅢ研究に関して平成6年5月新潟市で開催された第59回日本血液学会総会(新潟大学, 柴田昭会長)で宿題講演を行った<sup>3)</sup>。その要旨を教告し, 批判を仰ぐと同時に今後の研究の糧としたい。

### 1. アンチトロンビンⅢと血栓止血機構(図1)

凝固系制御機構で重要なものはアンチトロンビンⅢ(antithrombin Ⅲ: ATⅢ)とプロテインC(Protein C: PC)である。ATⅢはトロンビンや第Xa因子を直接阻害し, PCは第Ⅴ, 第Ⅷ因子を抑制して凝固亢進を阻害することから自動車に例えると前者はフットブレーキ, 後者はエンジンブレーキとされ, 両者ともその欠乏症で血栓症を惹起するが, 前者の欠乏症発症の頻度は後者のその約3倍存在することからATⅢの生理的意義は大きい。これらに関連するほかの阻害因子はATⅢに

ついてはヘパリン・コファクターⅡ(heparin cofactor Ⅱ: HCⅡ), PCについてはプロテインS(Protein S: PS)があり, 前者はATⅢと同様に血管内皮細胞で産生されるグリコサミノグリカン(glycosaminoglycan: GAG)と複合体を形成して阻害作用を発揮するがトロンビンのみを阻害し, 後者はPCの補酵素として作動する。血漿にはこれらの凝固系阻害因子のほか線溶系阻害因子(プラスミノゲン・アクチベーター・インヒビター: plasminogen activator inhibitor 1: PAI-1)を有し, 他に凝固・線溶系因子を含むもので multifunctionary である。この血漿には赤血球, 白血球および血小板があり, それぞれの役割を果たして生命を維持しているが, この血液を身体末端まで隅々まで流動する血管もその内皮細胞には凝固・線溶・血小板に関連する要因を産生し, 接着分子なども加わって同様に multifunctionary な密接な相互関連を有し, これに血流という流動力学的要因が加わって機能を発揮している。

以下, ATⅢを中心とする血栓止血制御機構を述べる。

### 2. アンチトロンビンⅢの性状

ATⅢは1993年ニューヨーク市で開催された国際血

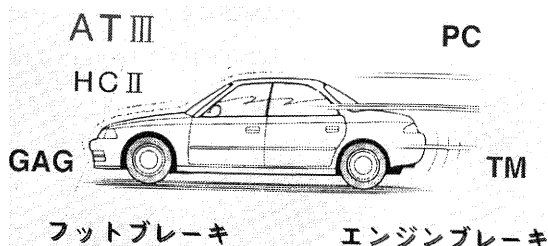


図1 アンチトロンビンⅢと血栓止血機構

表 1 先天性アンチトロンビンⅢ欠乏症

タイプⅠ：欠乏症（古典的欠乏症） （生物活性と抗原量低下）
タイプⅡ：（異常アンチトロンビンⅢの存在）
Ⅱa：トロンビン反応部位異常
Ⅱb：ヘパリン反応部位異常
Ⅱc：多面的突然変異による異常

栓止血会議（ISTH-SSC）において番号を略したアンチトロンビン（AT）と称することになった。その異常（欠乏症を含めて正常でないこと）を表 1 の如くタイプⅠ，タイプⅡ a，b，c と分類された<sup>5)</sup>。

ATⅢ は分子量 58,200 の 1 本鎖糖蛋白で肝臓で産生される 432 個のアミノ酸で構成され，<sup>47</sup>Arg など GAG と結合して阻害作用を強力に示し，<sup>393</sup>Arg など第 Xa 因子やトロンビンを阻害する。その遺伝子や蛋白の構造は明らかにされている<sup>6)</sup>。

### 3. アンチトロンビンⅢと血栓症発症との関連

ATⅢ 欠乏症での血栓症の発症を年齢別にみると思春期以降に発症して加齢と共に増加する<sup>7)</sup>。この原因は複雑であり，古く Virchow の唱える血栓症の 3 つの要因（血管性要因，血液要因および血流要因）に起因する。

血液要因のうち血栓形成に大きく関連するフィブリノーゲンとアンチトロンビンⅢの加齢による変動を検索すると前者は増加するが後者は低下傾向を示し，加齢と共に血栓形成傾向を示す<sup>8)9)</sup>。

血管要因は加齢と共に以下の侵襲因子により，障害されて血栓形成傾向に加担する。(1) Hemodynamic 要因（高血圧など），(2) Metabolic 要因（高血糖など），(3) Toxic 要因（スーパーオキシサイトなど）および Immunologic 要因（サイトカインなど）により血管内皮細胞は障害されると，該部で産生されている血栓止血因子である，組織因子（tissue factor）の放出が増加し，逆に線溶因子の組織プラスミノゲン・アクチベータ（tissue plasminogen activator: t-PA）の放出や ATⅢ の抗凝固性に大きく関連するグリコサミノグリカン（glycoseaminoglycan: GAG）の産生が低下するので血栓形成傾向を示すに到る。

この ATⅢ 減少は後天的にはその産生臓器である肝疾患，漏出をもたらす腎疾患および消費によって減少する血栓症（血管内凝固症を含む）が存在し，血栓形成傾

向に加担する。本稿では先天性欠乏症について述べる。

先天性 ATⅢ 欠乏症（タイプⅠ）は人口 2,000～5,000 人に 1 人の割合で常染色体性優性に出現し，手術や妊娠などが「引き金要因」となって静脈血栓症や肺塞栓などが惹起される<sup>10)</sup>。血栓症の発症はタイプⅡの場合も同様である。

診断は血栓症の既往や家族歴などを聴取して遺伝性を検索する。アンチトロンビンⅢの生物活性および抗原量を測定し，さらに分子生物学的検索を施行する。

血栓止血学的手技による診断法は一般的に施行されるスクリーニングテスト（部分トロンボプラスチン時間，プロトロンビン時間，フィブリノーゲン量，血小板，FDP，ATⅢ など）のほかに，血栓症の特異的検索法にはトロンビンの出現に確証を与えるプロトロンビン・フラグメント（PF）1+2，トロンビン・アンチトロンビンⅢ複合体（TAT），フィブリノペプチド（FP）A，FDP-D-ダイマー，可溶性フィブリンモノマー複合体（SFMC）（FM テスト）がある。アンチトロンビンⅢ欠乏症での血栓症の診断には TAT は信憑性を欠き，PF1+2 および FPA が専らすすめられる<sup>11)</sup>。

### 4. アンチトロンビンⅢ欠乏症例

#### (1) タイプⅠ：妊娠・分娩例<sup>12)</sup>

症例は ATⅢ 欠乏症タイプⅠでの妊娠・分娩例で，新生児も ATⅢ 欠乏症である。臍帯血 ATⅢ が娩出時 10% と極端に低値を示したが低分子ヘパリン投与で出血量も少なく，分娩に成功した。

病歴：当時 34 歳で妊娠 8 ヶ月で血栓症を惹起し，某医で不用意にもワーファリン治療を受けたが，短期間でこれを中止し，私共へ紹介された。当時（妊娠 37 週）の ATⅢ は約 50% であった。

妊娠 37 週で入院し，ATⅢ 製剤を 1,000～2,000 単位注入して ATⅢ の失速速度を追跡しつつ，分娩に向けて ATⅢ レベルを 100 % 以上に維持すべく補充を継続し，分娩時には低分子ヘパリンを投与して異常出血をみずに凝固亢進を抑制して無事に女児を娩出した（図 2）。

新生児に関して ATⅢ を測定すると，上記の如く ATⅢ 補充された母体の ATⅢ レベルは 127 % と増加していたが，新生児の静脈血は 2 % と極端に低値を示したことから，母体の ATⅢ は胎盤を通過しないことが判明した。一方，新生児での病的 ATⅢ レベルからホモ型 ATⅢ 欠乏症とも推察され，父親の ATⅢ 測定を施行したが生物活性と抗原量はともに正常であった。そこで新生児での血栓症発症を危惧して ATⅢ 製剤を急速注入した

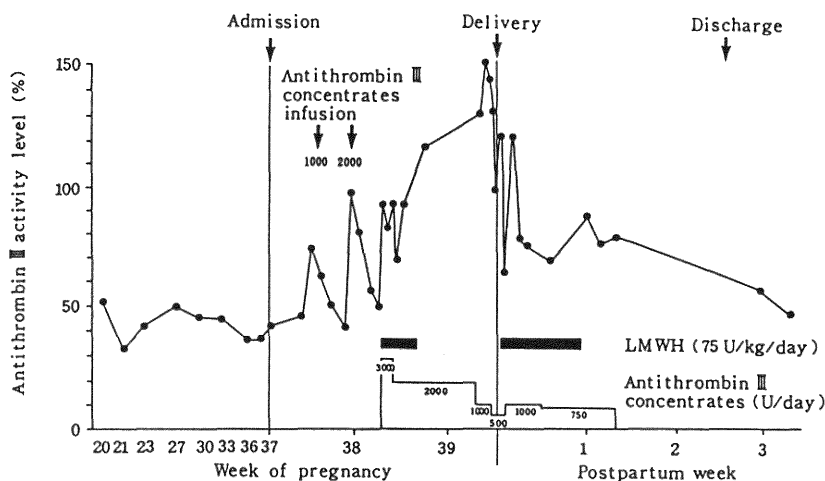


図2 アンチトロンビンⅢと欠乏症での出産

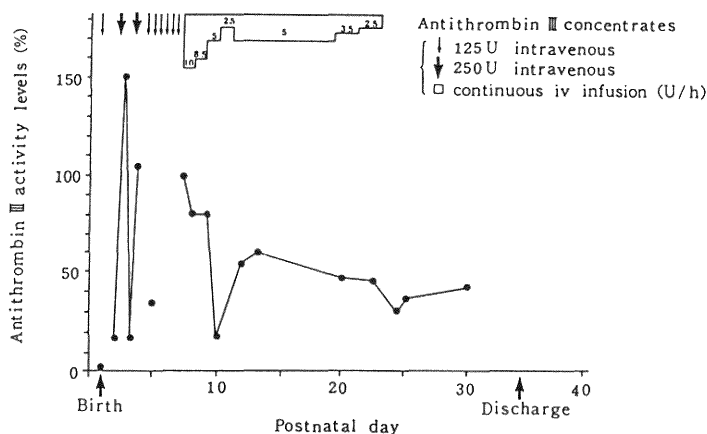


図3 アンチトロンビンⅢ欠乏症での出産：新生児での成績

が急激な減少を継続したので持続点滴注入を施行した。これらの処置を行い、生後20日でATⅢは約50%を維持できたことからヘテロ型ATⅢ欠乏症と診断された。

なお出生時での極端なATⅢ低下は新生児の肝でのATⅢ産生機能低下と同時に何らかの凝固亢進が惹起されたと推察される(図3)。

このようなATⅢ欠乏症での分娩管理の報告はみられず、類似症例での対応の参考となろう。

さらに2年後、再度の出産は無事に正常男児を得、前回の如きATⅢ異常はみられなかった。

## (2) アンチトロンビンⅢ異常症「富山」

(タイプⅡb)<sup>13)-15)</sup>

アンチトロンビンⅢ分子にはトロンビンを結合するドメインとヘパリンと結合するドメインの2つがあり、それぞれの異常で機能障害が惹起されて前者でタイプⅡa、後者でタイプⅡbとなる。

アンチトロンビンⅢ異常症「富山」はタイプⅡbであり、世界で初めてATⅢ分子とヘパリン結合部位を明白に示した症例である。

患者は23歳の女性(1979年10月)で下肢静脈血栓を来とし、嚢胞腎の腫瘍による圧迫症状とされて手術を受けた。その後、急激に血栓症状が悪化して脳血栓を来とし、出血症状を伴った。

検査成績はATⅢ抗原量54 mg/dlと増加し、抗ト

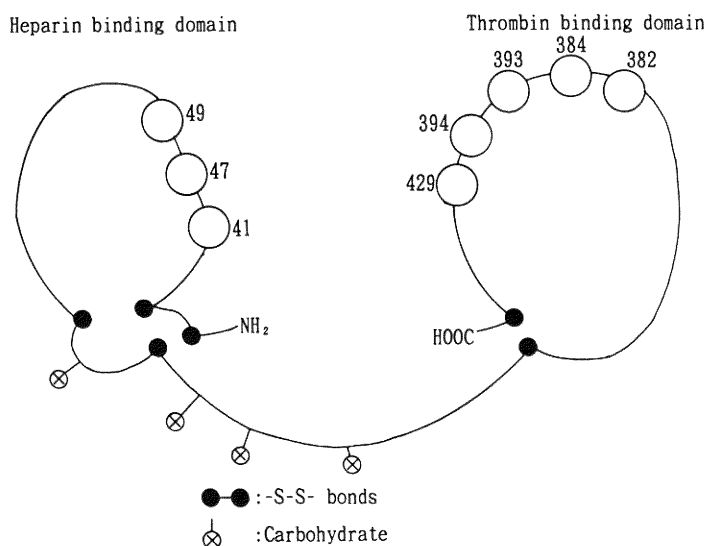


図 4 アンチトロンビンⅢの構造

ロンビン活性（遅効性阻害作用）は正常であったがヘパリン結合能（即効性阻害作用）が26%と極度な低下を示した（この26%は後述の如くヘパリンコファクターⅡによるもので、実測 ATⅢ 値は0%である）。この時期での血小板数（12.0 万/ $\mu$ l）とフィブリノーゲン（145 mg/dl）および FDP（10  $\mu$ g/ml）も異常傾向を示し、血栓形成に伴う消費性障害の検査成績を示し、出血症状をもたらした。

交叉免疫電気泳動法で検討すると写真 1 の如く、正常 ATⅢ はヘパリンと結合すると泳動度に変化を来とし、ヘパリンの無い状態では1個のピークがヘパリンと結合すると3個のピークを示した。ところが ATⅢ 異常症「富山」ではヘパリンの有無に拘らず1個のピークを示したことから、本症 ATⅢ はヘパリンとの結合能を欠如することが判明した。さらに家族例で検討すると写真 2 の如く、両親の ATⅢ は正常と異常の ATⅢ を有し、子供（発端者の妹）の1人は正常 ATⅢ、他の子供は正常と異常の ATⅢ を有するヘテロ型異常症と判明した。本家系では両親が相互にヘテロ型 ATⅢ 異常であり、その子供にホモ型、ヘテロ型および正常が出生したことになる。

塩基配列を解析すると写真 3 の如く、正常では47番目のアミノ酸に対するコドンが TGC であるところ、両親では TGC と TGT の両方が存在して Arginin と Cystein の2者が存在するヘテロ型と判り、発端者は TGT

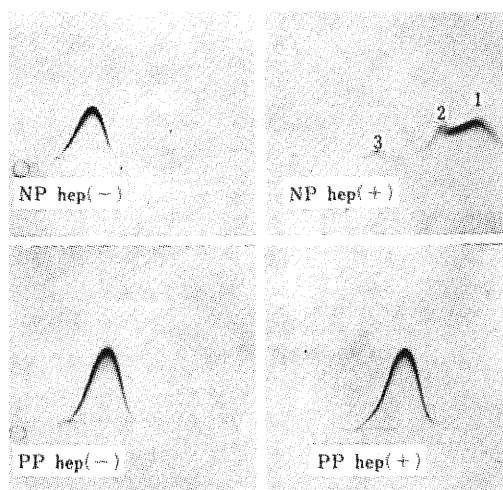


写真 1 図左半分：hep（-）は第1相アガロースにヘパリンを含まない CIE  
 図右半分：hep（+）は第1相アガロースに 20 U/ml ヘパリンを含む CIE  
 正常人血漿（NP）および患者血漿（PP）のアンチトロンビンⅢ二次元免疫電気泳動

を示して Cystein に置換されてホモ型として存在し、従ってヘパリンとの結合能を欠如した。

続いて、このようなヘパリン結合能が欠如するアンチトロンビン異常がなぜ血栓症を惹起するかについて検討

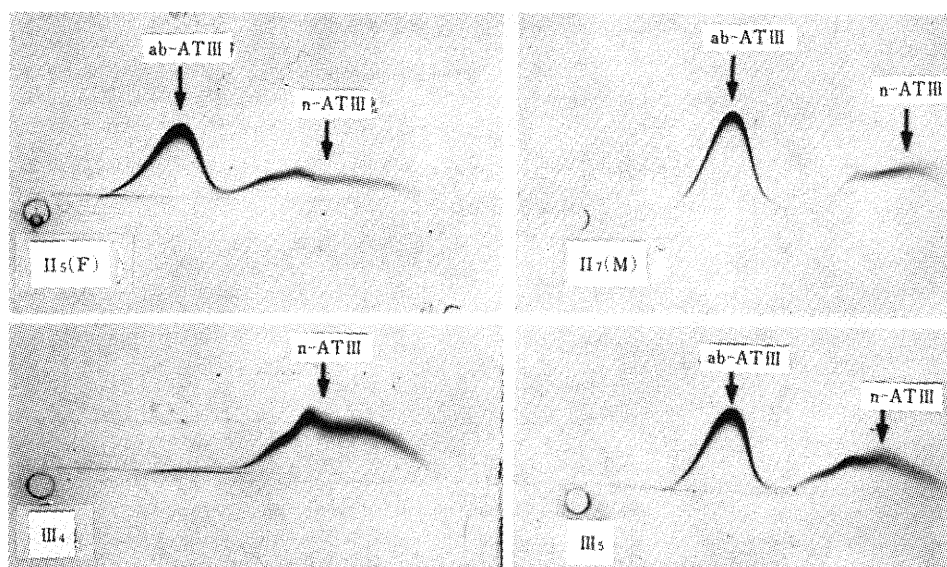


写真2 II<sub>5</sub>(F):父, II<sub>7</sub>(M):母, III<sub>4</sub>:上の妹, III<sub>5</sub>:下の妹, ab-AT III:異常アンチトロンビン III による CIE パターン, n-AT III:正常アンチトロンビン III による CIE パターン. いずれも第1相アガロース 20 U/ml のヘパリン含む

患者家系のアンチトロンビン二次元免疫電気泳動

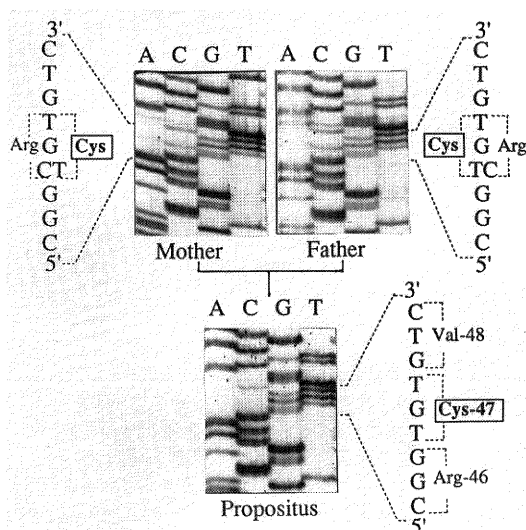


写真3 アンチトロンビン III 「富山」の塩基配列

した。生体では血管内皮上でコア蛋白が血管壁面へ突出し、その枝に血管内皮細胞で産出される GAG (主としてヘパラン硫酸) が結合して複合体を形成する。この複合体へ AT III が結合して抗トロンビン作用を強力に発

揮する。異常 AT III 「富山」はこの結合能を欠如することからその力量を発揮できなくて血栓症に陥る。

これを確認する為に生きた内皮細胞と AT III 分子との反応を検討した。豚大動脈内皮をコラゲナーゼ処理して培養し、I<sup>125</sup> 標識 AT III を添加すると AT III 異常「富山」ではその結合能がないことが測定された。更に培養細胞と AT III 分画を混合した上で一定量のトロンビンを添加した反応系でのトロンビン中和能を検討すると、AT III 異常「富山」でのトロンビン中和能が欠落していることを知った<sup>17)</sup>。以上のことから AT III 異常「富山」で血栓性に陥りやすいことが判明した。

臨床経過は手術後、ケイレン発作などの血栓症状を来とし、血小板やフィブリンノーゲンの低下は AT III 補充で改善し、長期対策としてワーファリン療法を施行した。AT III レベルは26%を維持したが、後述する如くヘパリンコファクター II の値を示す。

退院後、結婚されて幸福な家庭生活を営んでいたが、その7年後(昭和61年4月)喘息発作を来とし、精査の結果、肺血栓塞栓が「引き金」となることが判り、ワーファリン療法では不十分で、微小血栓が四肢や体躯に発生して肺の微小循環に障害をもたらすものと想定され、以後、最小限の AT III 製剤 (500 単位/週) を補充して

良好な経過を示している<sup>18)</sup>。

### (3) アンチトロンビンⅢ異常症「青森」

トロンビン結合部位異常の本邦第一例である<sup>19)20)</sup>。

症例は57歳男性で頭痛、視野狭窄などを訴え、脳梗塞と診断された。ATⅢ 抗原量は正常であるが、抗トロンビン活性54%、ヘパリン結合能76%（ヘパリンコファクターⅡが26%加算されている）であった。交叉免疫電気泳動像はヘパリン結合能は正常であるので泳動度は正常 ATⅢ と同一であった。以上から、ATⅢ 異常症「青森」はヘテロ型異常と推察される。塩基配列の分析で第2エクソンを PCR 法で増幅して検索すると TGC が半分 TAC に変換したことが判明し、<sup>393</sup>Arg が Histidin へ50%置換されていることが確認された<sup>21)</sup>（写真4）。

家族歴では叔父、兄弟、子供、甥に同様のヘテロ型 ATⅢ 異常が確認された。

経過は脳梗塞に対して ATⅢ 製剤と同時にウロキナーゼを投与して病状の改善をみ、その後、長期治療としてワーファリン投与で良好である。

## 5. アンチトロンビンⅢ産生肝細胞癌

3項で述べたごとく ATⅢ 欠乏・異常症は血栓症研究に重要であるが、逆に ATⅢ が大過剰に存在すると出血するか否かが血管内凝固症治療（DIC）で論議された。その折、ATⅢ 産生肝細胞癌例を経験した。本症例は世界第1例である<sup>22)</sup>。

患者は45歳（1990年）の男性で交通事故で入院して偶然発見された。肝腫大を認め、生検で Edmondson I 型肝細胞癌と診断され、抗アンチトロンビンⅢ-ポリクロナル抗体を用いた免疫組織染色で肝細胞癌が ATⅢ を産生していることが明白となった。入院時 ATⅢ レベル抗原量は 81.6 mg/dl であったが、最終的には 122 mg/dl と増加して生物活性も 290%から540%と上昇し、交叉免疫電気泳動像での ATⅢ の性状は正常であった。

肝機能は PIVKA-II の上昇を含め、軽度の障害を示した。腹部ダイナミック CT 像は肝右葉を中心に多発性腫瘍を認めた。

経過は肝腫大とともに ATⅢ 量は増加し、平成3年7月衰弱死で鬼籍に入った。

本症例で ATⅢ が大量に血中に存在しても出血症状がみられなかったことは、ATⅢ と結合して強力な抗凝固作用を発揮する GAG の供給が限定されていればその作用がみられないことに起因することが想定される。

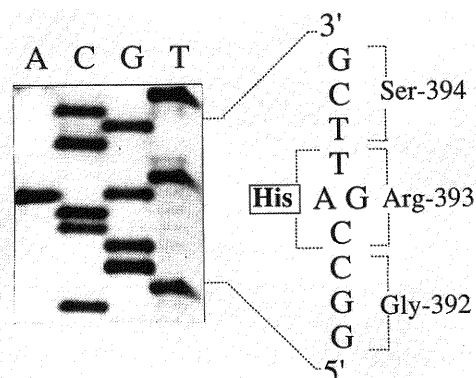


写真4 アンチトロンビンⅢ「青森」の塩基配列

## 6. アンチトロンビンⅢ研究からの展開

### (1) ヘパリン・コファクターⅡ研究

ヘパリンコファクターⅡ（HCⅡ）は分子量 65,000 の1本鎖糖蛋白で肝臓で産生される。血中濃度約 100 μg/dl で構造は 480 個アミノ酸残基から成り、444-Leucin でトロンビンと結合し、デルマタン硫酸と特異的に結合して強力な阻害作用を示す<sup>23)</sup>。しかしヘパリンとも結合して ATⅢ と同様に抗トロンビン作用を示すので臨床に用いられている ATⅢ 測定法（被検血症にヘパリンをまず加えて反応させ、そこへ一定量のトロンビンを添加して中和させる。残りのトロンビンで合成基質を分解させて被検血漿中の ATⅢ 量を算出する）には HCⅡ が約25%加味される。HCⅡ の影響を除外した ATⅢ 測定法を開発した。そのポイントはアンチトロンビン欠乏血漿でトロンボプラスチンによる第 Xa 因子を介する凝固過程を把握するもので、トロンビンに対する阻害作用の second order rate constant で ATⅢ が HCⅡ よりも大きいことを利用したことである<sup>24)</sup>。この方法を用いると前記の ATⅢ 異常症「富山」のヘパリン結合能は0となる。

さて、この HCⅡ の抗トロンビン作用が如何なる生理的意義があるかを検討した。ATⅢ 異常症「富山」で HCⅡ を測定すると、発端者（ホモ型）で 283%、母（ヘテロ型）で 179%と増加していることが判った<sup>25)</sup>。一方、ATⅢ と同時に HCⅡ を DIC および急性と慢性脳梗塞で測定すると、DIC では ATⅢ と HCⅡ がともに減少するが、脳梗塞では急性新鮮例で ATⅢ が正常値を示す時期で HCⅡ が減少し、血中に出現するトロンビンを HCⅡ が ATⅢ より早期に中和するこ

とが推察された<sup>25)</sup>。今日ではトロンビン・ヘパリンコファクターⅡ複合体 (TH・HCⅡ complex) として血栓症形成機序解明に用いられる<sup>26)</sup>。

ところで HCⅡ の分子異常症である HCⅡ・Oslo<sup>27)</sup> は血栓症を惹起しないが、HCⅡ 欠乏症では ATⅢ が正常でも HCⅡ が50%と減少して血栓症を発症している<sup>28)</sup>。一方、Tollefsen<sup>29)</sup> は HCⅡ がデルマトン硫酸を産生する平滑筋細胞や線維芽細胞との関連で動脈硬化などと関連しているが、最近では血栓症との関連で症例数も多い<sup>30)~35)</sup>。また HIV 感染者での血栓症発症を HCⅡ 減少からの検討もなされ<sup>36)</sup>、他方、炎症現象での好中球のエラスターゼやカテプシンGとの関連で検討されている<sup>37)~41)</sup>。これらの関連で HCⅡ の研究が進展されることが期待される。

## 7. 血管壁と凝血系

分子生物学的研究手法の進展によって血管壁構成成分の生化学的役割の解明が進み、動脈硬化との関連で高血圧や糖尿病における作動要因としての内膜肥厚をもたらすサイクリック AMP 依存性キナーゼや  $\beta 1$  インテグリンの作用が注目されている。これらの研究の上で最近臨床上、大きな問題となっている PTCA 後の再狭窄に対する治療として遺伝子療法の研究が盛んである<sup>42)~51)</sup>。

本稿ではトロンビンと ATⅢ および HCⅡ との関連を中心として血管壁構築細胞の血栓止血機構に基づく現象を述べる。

トロンビンは図5に示される如くフィブリノーゲンをフィブリンへ転化して止血をもたらすが、他方、血管壁構築細胞層を刺激して GAG, t-PA, PAI-1, PGI<sub>2</sub> などの産生を亢進させて血栓形成を抑制しつつ、組織因子の放出や血小板・白血球の付着をもたらして創傷治療を施すなど multifunctionary である。細胞層の平滑筋細胞や線維芽細胞は t-PA や PAI-2 をトロンビン刺激で産生促進し、中膜筋細胞の内膜への遊走・増殖や内膜線維性肥厚から粥状硬化、動脈硬化へと進行する。

これらの作用を制御するものは内皮細胞産生のヘパリン硫酸と ATⅢ、および平滑筋細胞のデルマトン硫酸と HCⅡ である。

### (1) アンチトロンビンⅢ刺激と内皮細胞の GAG 産生

上記の ATⅢ 産生肝細胞癌で ATⅢ が異常増加しても出血しないことが判り、ATⅢ と複合体を形成する内皮細胞産生の GAG 量に制限があって ATⅢ の制御機構としての役割を発揮できないと推察された。これ

を裏づける為に培養内皮細胞を ATⅢ 分画を混合して ATⅢ 刺激による GAG 産生の増加の有無を検討したが、これは確認されなかった<sup>52)</sup>。

### (2) トロンビン刺激と内皮細胞 GAG の産生

トロンビンが血中に出現すると血管内皮上では GAG およびトロンボモジュリンとの複合体形成が惹起されて凝固機序促進作用としてのフィブリノーゲンや血小板に対する活性化作用は減退し、近年では血管内皮上でのトロンビン・レセプターの役割が注目されている。トロンビン・レセプターはトロンビンの止血血栓作用以外の生化学的役割を示すべく血小板、血管内皮細胞、平滑筋細胞、線維芽細胞、マクロファージュなどに存在し、cDNA 構造や機能が解明されて、これらの細胞の機能発現に重要である<sup>53)~55)</sup>。

いずれにせよ、トロンビンの生化学的作用は GAG 発生に影響を及ぼすことが推察される。そこで培養内皮細胞へトロンビンを添加してその細胞数の増減を検索するとトロンビン量論的および反応時間的に低下した<sup>56)</sup>。これはトロンビンの凝固性を維持する為の合目的の現象と推測される。さらにこれがトロンビンの蛋白分解作用による細胞障害によるものを核酸合成の指標である [<sup>3</sup>H] thymidine と蛋白合成の指標の [<sup>14</sup>C] leucin の「取り込み」で検討すると、両者ともむしろ亢進を示し、さらに細胞数も増加したことから、この現象はトロンビンによる細胞障害ではなくして特異的な GAG 抑制と推察された。

一方、このトロンビンの作用が ATⅢ や HCⅡ の影響で如何なる変動を示すが検討すると、ATⅢ 添加で培養細胞の GAG が複合体を形成してトロンビンを失活させるが、HCⅡ は培養細胞との反応では微細でトロンビン作用は温存された。これは HCⅡ が平滑筋細胞産生のデルマトン硫酸と特異的に反応するが、内皮細胞産生 GAG との反応が弱いことに起因する。さらに GAG 産生が硫酸化の段階があるいは糖鎖形成時点での障害かを検索する為に [<sup>35</sup>S] sulfate と [<sup>3</sup>H] glucosamine の培養細胞への「取り込み」を検討すると、トロンビンによって両者の「取り込み」は低下するが、「ATⅢ とトロンビン」の同時添加での反応は見られず、また「<sup>35</sup>S] sulfate と [<sup>3</sup>H] glucosamine との比率は同一であった。以上からトロンビンによる GAG 産生低下は糖鎖形成時点での低下に起因する。従ってトロンビンは内皮細胞を障害せずに GAG 合成を抑制することで ATⅢ 機能を調制することから、フィブリン形成や止血作用を発揮することで合目的に作用していることになる。



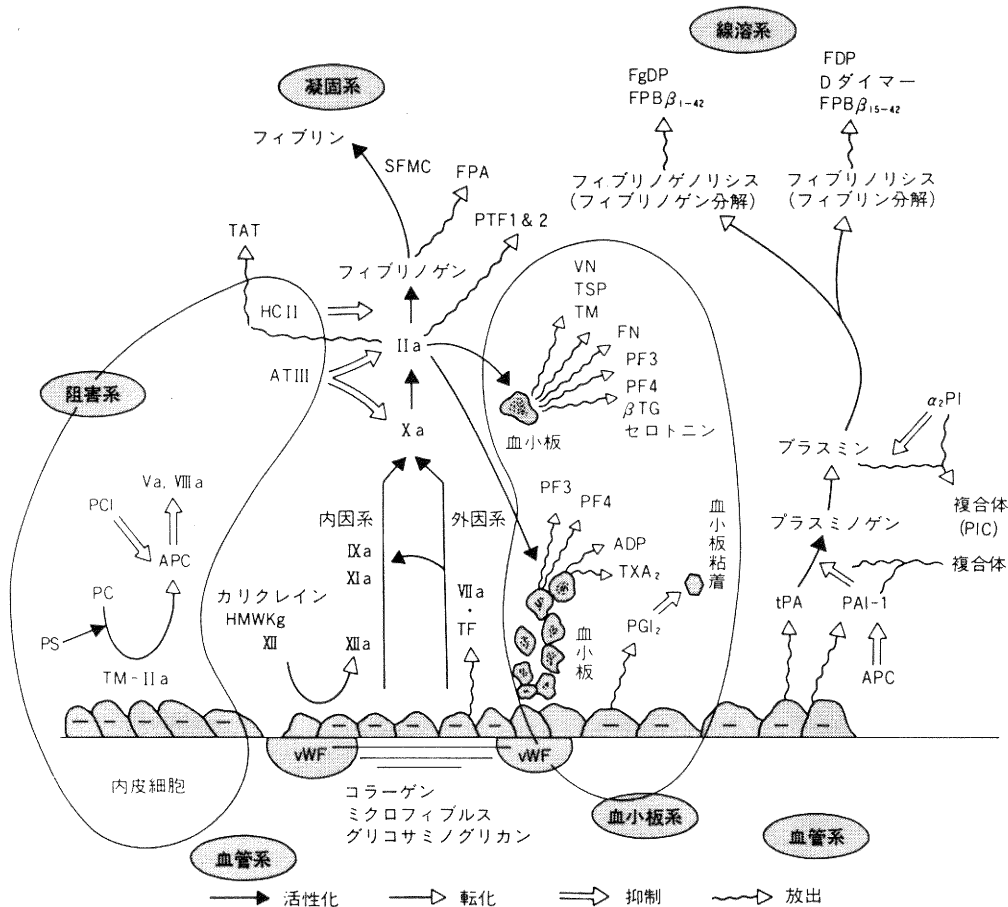


図 5 凝血機構と止血マーカー

ADP: アデノシン 2 リン酸, APC: 活性化プロテイン C,  $\beta$ TG:  $\beta$ -トロノボグロブリン, FN: フィブロンネクチン, FPA: フィブリノペプチド A, FPB: フィブリノペプチド B, HC II: ヘパリン・コファクター II, HMWKg: 高分子キニノゲン, PAI-1: プラスミノゲン・アクチベーター・インヒビター-1, PC: プロテイン C, PCI: プロテイン C・インヒビター, PF 3 および 4: 血小板第 3 および第 4 因子,  $PGI_2$ : プロスタグランジン  $I_2$  (プロスタサイクリン), PIC: プラスミン・ $\alpha_2$ PI 複合体, PS: プロテイン S, PTF 1 & PTF 2: プロトロンビン・フラグメント 1 および 2, SFMC: 可溶性フィブリンモノマー複合体, TAT: トロンビン・アンチトロンビン III 複合体, TF: 組織因子, TM: トロンボモジュリン, tPA: 組織プラスミノゲン・アクチベーター, TSP: トロンボスポンジン,  $TXA_2$ : トロンボキサン  $A_2$ , Va: 活性化第 V 因子, VN: ビトロネクチン, vWF: von Willebrand 因子, IIa: 活性化第 II 因子, VIIa: 活性化第 VII 因子, VIIIa: 活性化第 VIII 因子, IXa: 活性化第 IX 因子, XII: 第 XII 因子.

### (3) トロンビン刺激とプロスタサイクリン産生

古くよりヘパリン投与で尿中へプロスタサイクリン ( $PGI_2$ ) が放出されることが知られており, 著者らはヘパリン投与により phospholipase A での  $PGI_2$  産生の増大がなされることを確認し, 一方, 培養細胞へトロ

ンビンを添加すると, その濃度および反応時間依存的に  $PGI_2$  が産生されることを確認した<sup>57)</sup>.

この反応系へ AT III および HC II を添加すると AT III は濃度依存的に  $PGI_2$  産生を抑制したが, HC II ではこの作用が確認されなかった. そこで HC II との反応

系へデルマタン硫酸を添加するとトロンビン阻害作用が発揮されて  $\text{PGI}_2$  産生促進作用は抑制された。

以上から血中に産生されたトロンビンに活性化された血小板は同時に内皮細胞で産生亢進される  $\text{PGI}_2$  により血管壁粘着が抑制されることが判り、一方、このトロンビン作用は  $\text{ATIII}$  や  $\text{HCII}$  によって調整されることが確認された。

#### (4) トロンビン刺激と線溶系要因 (t-PA, PAI-1)

培養内皮細胞へトロンビンを添加すると、t-PA および PAI-1 の放出が促進される。この反応系へ  $\text{ATIII}$  と  $\text{HCII}$  を添加し、同時にデルマタン硫酸の有無で上記のトロンビン刺激反応を検討すると、t-PA は  $\text{ATIII}$  およびデルマタン硫酸加  $\text{HCII}$  で抑制され、一方、PAI-1 はデルマタン硫酸加  $\text{HCII}$  のみで抑制された<sup>58)</sup>。これらの事実はトロンビンによる内皮細胞の t-PA 放出を抑制することで線溶低下をもたらし、止血効果を発動させるものと理解される。

ところで、著者らはデルマタン硫酸を産生する線維芽細胞はトロンビン刺激で t-PA を産生するが、 $\text{ATIII}$  や  $\text{HCII}$  の制御を受けつつ RNA 合成、蛋白合成、Protein kinase C 活性化を介して行われることを確認し、更に PAI-1 および PAI-2 のここでの産生も確認されており、この部位での線溶系の恒常性維持と同時に動脈硬化や癌腫の転移増殖との関連でも今後の研究に待たれる<sup>59)</sup>。

### 8. 血栓治療法の開発

血栓症の病態生理の研究について  $\text{ATIII}$  欠乏・異常症を中心として分子生物学的手法を駆使して施行したが、究極的にこれらを如何に治療するかが最も重要となる。

先天性疾患の治療であり、 $\text{ATIII}$  が肝で産生されることから、遺伝子治療が求められるが本格的で決定的の実施はこれからである。一方、山羊へ人間の  $\text{ATIII}$  を作る遺伝子を人工的に「組み込ん」で飼育するとそのミルクには人間  $\text{ATIII}$  が豊富に含有されており、これを採取すると安価で純粋な  $\text{ATIII}$  が供給できる。

これらとは別に著者らは次の如く、(1) ウロキナーゼのポリエチレン・グリコールによる修飾、(2) 低分子ヘパリンの抗血栓剤への応用、(3) 和漢生薬の抗凝固剤への応用を行った。

#### (1) ウロキナーゼのポリエチレン・グリコールによる修飾

筆者は昭和39年(1964年)、新潟大学第一内科で本邦で試作された尿由来の血栓溶解剤ウロキナーゼの使用経験を行った<sup>60)</sup>。その後、ポリエチレングリコールで修

飾すると半減期が延長して線溶活性が強力に維持できることを報告した<sup>61)</sup>。

#### (2) 低分子ヘパリンの抗血栓療法への応用

低分子ヘパリンは従来の通常ヘパリンの臨床応用上、危惧された出血の危険性、血小板減少、脂質代謝異常、半減期が短い、などの欠点を少なくしたものであり、分子量 4,000~6,000 で第 Xa 因子を強力に阻害し、活性化部分トロンボプラスチン時間 (aPTT) の延長は小さく、出血に対する安全性などの長所を有する。

筆者らは1986年より低分子ヘパリンの基礎的研究から血管内凝固症治療で、2重盲検比較試験を施行し、副作用が極めて少なく、安全で有用であることを確認した<sup>62)</sup>。

#### (3) 和漢生薬の抗血栓剤への応用

富山県は伝承的に和漢薬研究が盛んである。

筆者らは伝承的に血栓症治療薬とされている駆瘀血剤についてこれらがなぜ有効であるかを科学的に分析した。

まず駆瘀血薬の構成生薬について血栓止血学的手法でスクリーニングを施行して凝固・線溶・血小板機能に影響を及ぼすものとして「艾葉(よもぎの葉)」、「山梔子(口無しの実)」を研究の題材用資料とした<sup>63)~65)</sup>。以下、主に「艾葉」について述べる。

艾葉の水溶成分を「型通り」に純化すると分子量 80,000 の水溶性多糖体が得られた<sup>66)</sup>。興味あることにこれは  $\text{HCII}$  を活性化するが、 $\text{ATIII}$  を活性化しない性状を有し、更にコンドロイチナーゼ  $\beta$  処置でもその活性は失わないことから、デルマタン硫酸類似物質であるが、 $\text{HCII}$  との反応上、異なる物質であることが判明した。今後これらの諸点は平滑筋産生物質との関連で検討されるべきである。

一方、興味あることにこの不溶成分を内皮細胞培養基に添加するとその濃度および反応時間依存的に細胞増殖をもたらした。この現象を [ $^3\text{H}$ ] thymidin および [ $^{14}\text{C}$ ] leucine を用いて培養細胞への「取り込み」を検討すると両者ともに著明に「取り込まれ」ていることを知った。培養内皮細胞の成長期や confluent 状態でもこれらの「取り込み」は確認されたが、他に basic fibroblast growth factor に対するレセプターを欠く A 10 cell line では増殖がみられないことからこの反応は fibroblast を介して細胞増殖が行われるとされる<sup>67)</sup>。

これらの事実は angiogenesis との関連から癌進展や動脈硬化などへと研究が推進される。

### ま と め

血栓症の発現は「血液、血管および血流」の3つの要

因が相互に関連し合ってみられることは古くから唱えられており、ごく最近、血栓症の原因として活性型 PC に抵抗する第 V 因子の異常が解明された<sup>68)</sup>。血栓症の病態の解明と治療法の開発も分子生物学的手法の導入で進展が期待されるが、「老化は血管から始まる」という立場からみて、今後は「老化の予防」の対応からの研究も行われるものと考ええる。

この研究を推進するに協力を惜しまなかった高橋 薫氏をはじめとする多くの諸氏に感謝する。

# 参 考 文 献

- 1) Seegers, W.H., Johnson, J.F. and Fell, C.: An Antithrombin Reaction Related to Prothrombin Activation. *Am. J. Physiol.*, **176**: 97~103, 1964.
- 2) Seegers, W.H., McCoy, L.E., Sakuragawa, N. et al.: Purification and some properties of autoprothrombin II-A: An anticoagulant perhaps also related to fibrinolysis. *Thrombos. Res.*, **1**: 443~460, 1972.
- 3) 櫻川信男: 「アンチトロンビンⅢを中心とした血栓止血制御機構」第56回日本血液学会総会(1994年5月, 新潟市) 宿題講演, *Intern. J. Haematol.*, **59**: 54, 1994.
- 4) 櫻川信男: 血液凝固. 検査と技術, **21(増)**: 39~44, 1993.
- 5) Lane, D.A., Olds, R.J., Boisclair, M. et al.: AntithrombinⅢ: A data base of mutations: First up date. *Thrombos. Haemost.*, **70**: 361~369, 1993.
- 6) Olds R.J., Lane, D.A., Chowdhury, V. et al.: Complete nucleotide sequence of the antithrombin gene. Evidence for homologous recombination causing thrombophilia. *Biochemistry*, **32**: 4216~4224, 1993.
- 7) Thaler, E. and Lechner, K.: AntithrombinⅢ deficiency and thromboembolism. *Clinics in Haematology*, **10**: 369~390, 1981.
- 8) 櫻川信男: 老年者の血液患者, *臨床病理.*, **29**: 749~752, 1981.
- 9) 櫻川信男: 血液凝固検査機能, 臨床検査 MOOK, No. 29 (若年者の検査): 231~243, 1988.
- 10) 櫻川信男: 血液凝固因子と凝固機序, 血液病学. (三輪史朗編), 395~435 頁, 文光堂, 1981.
- 11) Heren, T., Straub, P.W. and Haeberli, A.: Prothrombin Fragment 1+2, Thrombin-AntithrombinⅢ-Complexes and Fibrinopeptide A in Spontaneously Clotting Whole Blood in Vitro. Effect of Heparin and AntithrombinⅢ Deficiency. *Thrombos. Haemost.*, **71**: 49~53, 1994.
- 12) Shiozaki, A., Arai, T., Sakuragawa, N. et al.: Congenital antithrombinⅢ deficient neonate treated with antithrombinⅢ concentrates. *Thrombos. Res.*, **70**: 211~216, 1990.
- 13) Sakuragawa, N. and Takahashi, K.: AntithrombinⅢ Toyama: A hereditary abnormal antithrombinⅢ of a patient with recurrent thrombophlebitis. *Thrombos. Res.*, **31**: 305~317, 1983.
- 14) Koide, T., Takahashi, K., Sakuragawa, N. et al.: AntithrombinⅢ Toyama: Replacement of arginine<sup>47</sup> to cysteine in hereditary abnormal antithrombinⅢ that lacks heparin-binding ability. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **81**: 289~293, 1984.
- 15) Oguma, Y., Hiraga, K., Sakuragawa, N. et al.: The antithrombinⅢ gene polymorphism in Japan: Examination for haplotypes relevant to disordered antithrombinⅢ biosynthesis. *Thrombos. Res.*, **65**: 519~531, 1992.
- 16) Sakuragawa, N., Kondo, S. et al.: AntithrombinⅢ microheterogeneity in antithrombinⅢ deficiency and in the antithrombinⅢ abnormality "AntithrombinⅢ Toyama". *Thrombos. Res.*, **47**: 147~154, 1987.
- 17) Saito, S., Takahashi, K., Sakuragawa, N. et al.: Interaction of abnormal antithrombinⅢ Toyama with cultured porcine aortic endothelial cells. *Thrombos. Res.*, **50**: 19~25, 1988.
- 18) 金 良昌, 星野 清, 櫻川信男, 他: 肺血栓塞栓症により気管支喘息様症状を呈したアンチトロンビンⅢ異常症の1例. *日胸疾会誌*, **28**: 1511~1515, 1990.
- 19) 上條美樹子, 奥島敏美, 布村 仁, 他: ATⅢ異常症による上矢状静脈洞血栓症の1例, 第47回日本神経学会東北地方会(秋田市)臨床神経学, **31**: 228~229, 1991.
- 20) 櫻川信男, 上條美樹子, 奥島敏美, 他: 脳静脈洞血栓症を併発したアンチトロンビンⅢ異常症「青森」. 第34回日本臨床血液学会(大阪)に発表.

- 21) Hayashi, T., Kamijoh, M., Sakuragawa, N. et al.: Antithrombin III Aomori: Identification of one point mutation resulting in Arg<sup>393</sup>→His substitution. Acta Med. Biol. (Niigata) to be published.
- 22) Akiyama, K., Nakamura, K., Sakuragawa, N. et al.: Antithrombin III producing hepatocellular carcinoma, Thrombos. Res., 72: 193~201, 1993.
- 23) Yamagishi, R., Niwa, M., Sakuragawa, N. et al.: Purification and biological property of heparin cofactor II and antithrombin III by dextran sulfate and various glycosaminoglycans. Thrombos. Res., 36: 633~642, 1984.
- 24) Enomoto, M., Tanimizu, I. and Sakuragawa, N.: Antithrombin III assay without influence of heparin cofactor II. Thrombos. Res., 57: 729~736, 1990.
- 25) 小熊 豊, 斉藤宗一, 櫻川信男 他: アンチトロンビンⅢ「富山」: 症例の発現から最近の知見まで. 日本血液学会雑誌, 51: 1293~1296, 1988.
- 26) 櫻川信男: 凝固・線溶の新しい分子マーカー, Medical Practice, 11: 103~106, 1994.
- 27) Blinder, M.A., Andersson, T.R., Abildgaard, V. et al.: Heparin cofactor II "Oslo". Mutation of Arg<sup>189</sup> to His decrease the affinity for dermatan sulfate, J. Biol. Chem., 264: 5128~5133, 1989.
- 28) Tran, T.H., Marbet, G.A. and Duckert, F.: Association of hereditary heparin cofactor II deficiency with thrombosis. Lancet, 2(8452): 413~414, 1985 (Aug. 24).
- 29) Tollefsen, D.M., Majaerus, D.W. and Blank, M.K.: Heparin cofactor II: Purification and properties of heparin-dependent inhibitor of thrombin in human plasma. J. Biol. Chem., 257: 2162~2169, 1982.
- 30) Simioni, P., Lazzaro, A.R., Coser, E. et al.: Hereditary heparin cofactor II deficiency and thrombosis: Report of six patients belonging to two separate kindreds. Blood Coagulation-Fibrinolysis, 1: 351~356, 1990.
- 31) Toulon, P., Moulouguet-Doleris, L., Costa, J.M. et al.: Heparin Cofactor II Deficiency in Renal Allograft Recipients: No Correlation with the Development of Thrombosis. Thromb. Haemost., 65: 20~24, 1991.
- 32) Weisdorf, D.J., Edson, J.R.: Recurrent venous thrombosis associated with inherited deficiency of heparin cofactor II. Brit. J. Haemat., 77: 125~126, 1991.
- 33) Matsuo, T., Kario, K., Sakamoto, S. et al.: Hereditary heparin cofactor II deficiency and coronary artery disease. Thrombos. Res., 65: 495~505, 1992.
- 34) Simioni, P., Zanardi, S., Prandoni, P. et al.: Combined inherited proteins and heparin cofactor II deficiency in a patient with upper limb thrombosis: A family study. Thrombos. Res., 67: 23~30, 1992.
- 35) Jobin, F., Vul, and Lessard, M.: Two cases of inherited triple deficiency in a large kindred with thrombotic diathesis and deficiencies of antithrombin III, heparin cofactor II, Protein C and Protein S. Thromb Haemost, 66: 295~299, 1991.
- 36) Toulon, P., Lamine, M., Ledjeu, I. et al.: Heparin Cofactor II Deficiency in Patients infected with the Human Immunodeficiency Virus. Thromb Haemost, 70: 730~735, 1993.
- 37) Carrell, R.W., Carrell, R.W., Owen, M.C. et al.: Plakalbumin,  $\alpha_1$ -antitrypsin, antithrombin and the mechanism of inflammatory thrombosis. Nature, 317: 730~732, 1985.
- 38) Jordan, R.E., Kilpatrick, J. and Nelson, R.M.: Heparin promotes the inactivation of antithrombin by neutrophil elastase. Science, 237: 777~779, 1987.
- 39) Sie, P., Dupouy, D., Dol, F. et al.: Inactivation of heparin cofactor II by polymorphonuclear leukocytes. Thrombos Res., 46: 657~666, 1987.
- 40) Hoffman, M., Pratt, C.W., Brown, R.L. et al.: Heparin Cofactor II-Proteinase Reaction Products Exhibit Neutrophil Chemoattractant Activity. Blood, 73: 1682~1685, 1989.
- 41) Corbin, L.W., Church, F.C. and Hoffman, M.: Production of chemotactic peptides by neutrophil degradation of heparin cofactor II. Thrombos. Res., 57: 77~85, 1990.
- 42) Vascular Remodeling研究会: 斉藤 康 (1994

年9月17日東京)

- 43) **Kopp, C.B., Ducimetière, P. and Touboul, P.J.:** Plasma Angiotensin-Converting Enzyme Activity and Carotid Wall Thickening. *Circulation*, **89**: 952~954, 1994.
- 44) **Rakugi, H., Kim, D.K., Krieger, J.E. et al.:** Induction of Angiotensin Converting Enzyme in the Neointima after Vascular Injury. *J. Clin. Invest.*, **93**: 339~346, 1994.
- 45) **Rasmussen, L.M. and Heickendorff, L.:** Accumulation of fibronectin in aortas from diabetic patients. A quantitative immunohistochemical and biochemical study. *Lab. Immunol.*, **61**: 440~446, 1989.
- 46) **Iademarco, M.F., McQuillan, J.J., Rossen, G. D. et al.:** Characterization of the Promoter for Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1). *J. Biol. Chem.*, **267**: 16323~16329, 1992.
- 47) **Hynes, U.R.:** Integrins: Versatility, Modulation, and Signaling in Cell Adhesion. *Cell*, **69**: 11~25, 1992.
- 48) **Bednarczyk, J.L., Wygant, J.N., Szabo, M.C. et al.:** Homotypic leukocyte aggregation triggered by a monoclonal antibody specific for a novel epitope expressed by the integrin beta subunit: conversion of nonresponsive cells by transfecting human integrin alpha 4 subunit cDNA. *J. Cell. Biochem.*, **51**: 465~478, 1993.
- 49) **Sanchez-Mateos, P., Campanero, M.R., Balboa, MR. et al.:** Co-clustering of beta 1 integrins, cytoskeletal proteins, and tyrosine-phosphorylated substrates during integrin-mediated leukocyte aggregation. *J. Immunol.*, **151**: 3817~3828, 1993.
- 50) **Martin-Padura, I., Bazzoni, G., Zanetti, A. et al.:** A novel mechanism of colon carcinoma cell adhesion to the endothelium triggered by beta 1 integrin chain. *J. Biol. Chem.*, **269**: 6142~6132, 1994.
- 51) **Ohno, T., Gordon, D., San, H. et al.:** Gene Therapy for Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation after Injury. *Science*, **265**: 781~781, 1994.
- 52) **Akai, T., Kaji, T., Sakuragawa, N. et al.:** Antithrombin Ⅲ modulates the effect of thrombin on the metabolism of glycosaminoglycans in cultured endothelial cells. *Thrombos. Res.*, **62**: 707~716, 1991.
- 53) **Vo, T.K.H., Hung, D.T., Wheaton, VI. et al.:** Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell* **64**: 1057~1068, 1991.
- 54) **Coughlin, S.R.:** Thrombin receptor structure and function. *Thromb. Haemost.*, **66**: 184~187, 1993.
- 55) **Vassallo, R.R., Kieber-Emmons, T., Cichowski, K. et al.:** Structure-function relationship in the activation of platelet thrombin receptor by receptor-derived peptide. *J. Biol. Chem.*, **267**: 6081~6085, 1993.
- 56) **Kaji, T. and Sakuragawa, N.:** Heparin stimulates with release of glycosaminoglycans from cultured human endothelial cells. *Thrombos. Res.*, **57**: 163~168, 1990.
- 57) **Kaji, T., Itoh, F., Sakuragawa, N. et al.:** Interaction of thrombin with heparin cofactor Ⅱ and antithrombin Ⅲ on prostacyclin production by cultured endothelial cells. *Thrombos. Res.*, **56**: 99~108, 1989.
- 58) **Kaji, T., Ejiri, N., Sakuragawa, N.:** Heparin cofactor Ⅱ inhibits thrombin-stimulated release of tissue plasminogen activator from cultured human endothelial cells in the presence of dermatan sulfate. *Thrombos. Res.*, **59**: 269~277, 1990.
- 59) **Hayakawa, Y., Tazawa, S. and Sakuragawa, N.:** Thrombin regulation of tissue-type plasminogen activator synthesis in cultured human fetal lung fibroblasts. *Thrombos. Res.*, **71**: 457~465, 1993.
- 60) 松岡松三, 櫻川信男, 高橋 薫: 血栓溶解療法, *Medical Postgraduates*, **12**: 180~190, 1974.
- 61) **Sakuragawa, N., Shimizu, K.:** Studies on effects of PEG-modified Urokinase, *Thrombos. Res.*, **41**: 629~635, 1986.
- 62) **Sakuragawa, N., Maki, M., Hasegawa, M. et al.:** Clinical evaluation of low molecular weight heparin. *Thrombos. Res.*, **72**: 475~500, 1993.
- 63) **Sakuragawa, N.:** Studies on Wakan-Yakus

- (traditional herbal drugs): Inhibitory effects of Gaiyoh (*Artemisiae Folium*) and Sanshishi (*Gardeniae Fructus*) on blood coagulation. *Acta Med. Biol.*, **32**: 107~113, 1984.
- 64) 櫻川信男, 高橋 薫: 和漢薬 (特に止血剤および腎疾患治療剤) の凝血学的検討, *最新医学*, **38**: 1184~1188, 1983.
- 65) 櫻川信男: 和漢薬の血液凝固薬へ及ぼす影響, *新潟医学会雑誌*, **97**: 23~27, 1983.
- 66) Hayashi, T., Kaji, T. and Sakuragawa, N. et al.: Stimulants from *Gardenial Fructus* for cultured endothelial cell proliferation. *Chem. Pharm. Bull.*, **40**: 942~945, 1992.
- 67) Kaji, T. and Sakuragawa, N.: A stimulatory effect of *Artemisia* leaf extracts on the proliferation of cultured endothelial cells. *Chem. Pharm. Bull.*, **38**: 538~540, 1990.
- 68) Bertina, R.M., Koeleman, B.P.C., Koster, T. et al.: Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated Protein C. *Nature*, **369**(5): 64~67, 1994.
-