低分子量コンドロイチンポリ硫酸の生物活性に関する研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8947

金沢大学十全医学会雑誌 第91巻 第5号 764－776 (1982)

低分子量コンドロイチンポリ硫酸の生物活性に関する研究

金沢大学医学部病理学第二講座（主任：太 田 五 六教授）
同 （指導：故石川太刀雄丸教授）
伊 賀 善 郎

（昭和57年9月20日受付）

哺乳動物の軟骨から抽出したコンドロイチンモノ硫酸を半合成的に硫酸化して得たコンドロイチンポリ硫酸（chondroitin polysulfate，以下 Cho－PS と略）について，このものの生物学的，薬理学的活性を検討した．Cho－PS は推定分子量 80,000（I），8,000（II）および 1,600（III）の3種のものを調製し本研究に供した．このうち分子量の最も小さい Cho－PS IIIが，抗凝固活性をほとんど示さないのに非常に高いリポプロティン・リパーゼ活性を有していた．またコラーゲン添加によって誘発された血小板凝集に対しても，Cho－PS IIIは 447 μg/ml の添加濃度で対照値の 50％まで抑制した．また Chandler loop 法を用いた血栓の生成時間でも，Cho－PS IIIは 0.1 mg/ml の血液添加ならびに 3～30 mg/kg の静脈内投与により，これら血液からの血栓の形成を有意に遅延させた．また 21 週間のラノリン負荷家兎の大動脈粥状硬化症に対しても Cho－PS IIIは有意の抑制効果を示した．すなわち，同負荷中に 30～90 mg/kg/day の Cho－PS IIIを 13 週間与えると，血中および大動脈壁のコレステロールおよび中性脂肪が有意に減少し，形態学的にも大動脈内膜の粥状硬化が弱かった．

Key words コンドロイチンポリ硫酸，コンドロイチンモノ硫酸，リポプロティン・リパーゼ活性

多糖体ポリ硫酸エステルであるヘパリンおよびヘパリノイドは，血液凝固阻止作用，脂血清澄作用，血栓形成および血小板粘着の抑制作用など多くの生物活性を有することで知られている[1]．近年，Lane ら[2]および Barrowcliffe ら[3]はヘパリンの分子量と抗凝固活性との関係について報告しており，ヘパリンの抗凝固作用は分子量の低下に伴って減少するが，抗血栓作用（抗 Xa 活性）は逆に著るしく増強されると述べている．しかし脂血清澄作用は抗凝固活性の減少とともに消失することが De Swart らにより報告されている[4]．

著者らは，以前よりコンドロイチンモノ硫酸について分子量と生物活性の関係を検討し，低分子化に伴って種々の生物活性が変化することを見出している[5][6]．本研究では，コンドロイチンモノ硫酸を低分子化したのちポリ硫酸化して低分子量コンドロイチンポリ硫酸を調製し，このものがどのような生物活性を有するかヘパリン，コンドロイチンモノ硫酸およびデキストラン硫酸などと比較検討し，興味ある知見を得たので報告する．

材料および方法

1．コンドロイチンモノ硫酸（chondroitin monosulfate，以下 Cho－MS と略）：Cho－MS の原末として市販のコンドロイチン硫酸－A（ミドリ十字製）を用いた．このものの分子量は還元末端基数の測定結果から 37,500（Cho－MS I）と推定された．この 50 g に 0.05 N 希塩酸 1 l を加えて 100°C にて最高6時間まで加熱した．この間，経時的に水解処理液をサンプリングして還元末端基数を測定し，分子量 4,000（Cho－MS II）および 800（Cho－MS III）の低分子量 Cho－MS を得たのち，エタノールにて沈殿させ，減圧乾燥して乾燥末を得た．これらの分子量，極限粘度，有機イオ

Biological Activity of Low Molecular Weight Chondroitin Polysulfate. **Yoshiro Iga**, Department of Pathology (II), School of Medicine, Kanazawa University.

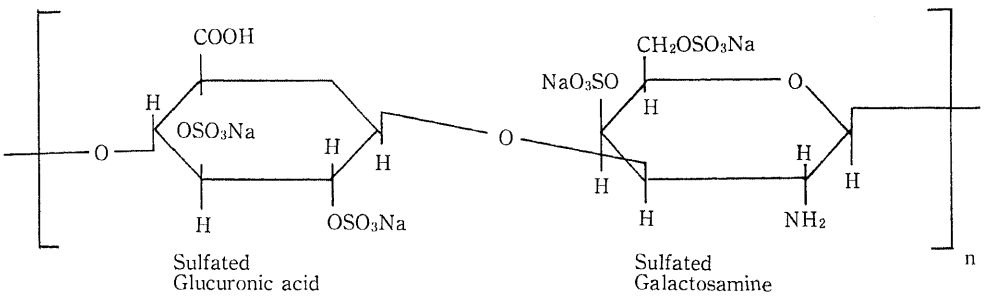
ウ含量は表1に示す如くである.

Table 1. Physicochemical properties of Cho-MS and Cho-PS

Cho-MS	Molecular weight Cn	[η]	S content (%)	Cho-PS	[η]	S content (%)	SO_4 group per disaccharide unit
I	37,500	0.650	6.7	I	0.505	16.1	4
II	4,000	0.184	4.9	II	0.129	16.4	4
III	800	0.033	trace	III	0.030	16.4	4

Cho-MS: chondroitin monosulfate
Cho-PS: chondroitin polysulfate
Cn: chain number weight
[η]: intrinsic viscosity
S: organic sulfur content

Possible chemical structure of semisynthesized chondroitin polysulfate (Cho-PS)



2．コンドロイチンポリ硫酸(chondroitin polysulfate, 以下Cho－PSと略)[7]: Cho－MS I, IIおよびIIIの乾燥末をそれぞれ10 gずつ150 mlのホルムアミドに溶かし,次いで氷冷下でクロロスルホン酸30 mlを滴加し,こののち室温にて10時間静置して硫酸エステル化反応を行った．次に，炭酸ナトリウム末を加えて液のpHを中性にし,これに95%エタノールを約10倍量添加して粗製Cho－PSの沈殿を得た.沈殿は水100 mlに溶かし,これに十分量の1 M塩化バリウム液を加えて沈殿物を除去したのち,H^+型陽イオン交換樹脂カラムに通して夾雑物を除去し，1 N水酸化ナトリウムにて中和し，凍結乾燥してCho－PS I, II, IIIの原末をそれぞれ得た．これらの物理化学的性状は表1にみられる通りで,Cho－PSの推定化学構造式も併せて表1に掲げた.

3．ヘパリン：ブタ腸粘膜から調製された局方ヘパリンナトリウム（ミドリ十字）を用いた.

4．デキストラン硫酸：MDS－注（コーワ）を用いた.

5．抗血液凝固作用の測定

1）トロンボプラスチン凝固阻止作用（ヘパリン力価）：日局標準ヘパリンナトリウムを対照に,検体のヘパリン力価を2単位/mlおよび1.6単位/mlに調製したのち,各標準液および試料液1 mlにウシの脳からのトロンボキナーゼ抽出液0.2 ml, 硫酸ナトリウム加ウシ全血1 mlを加えて血液凝固時間を測定し,2用量法にてヘパリン単位を求めた.

2）全血凝固時間：体重約2 kgの家兎にCho－PS I, II, III, Cho－MS Iおよびデキストラン硫酸をそれぞれ3～30 mg/kg,ヘパリンは0.1～10 mg/kgを静脈内に投与し，投与後20分の血液についてLee－White法[8]に従って投与血液の全血凝固時間を測定した.

6．リポプロティン・リパーゼ（lipoprotein lipase, 以下LLと略)活性の測定：体重約2 kgの家兎にCho－PS I, II, III, Cho－MS I，デキストラン硫酸またはヘパリンを3～30 mg/kg投与し，投与後20分に3.8%クエン酸ナトリウム液を含む注射筒にて採血し,2000回転,10分間遠心して投与後血漿を得た.対照には生理食塩液1 ml/kgを投与した．各投与後血漿のLL活性を以下の方法で測定した.

1）濁度法[9][10]：投与後血漿0.5 ml, 2%ココナッツ

油乳液 (lipostrate - CB, Ediol, Calbiochem, USA) 0.1 ml, 10%ウシアルブミン(pH 8.4) 0.5 ml, 0.5 M ギ酸アンモニウム 0.125 ml を混和し, 37°Cにて 2 時間温浴中で加温した. 反応混液について 640 nm の吸光度を加温前と加温 2 時間後にそれぞれ測定し, LL 活性(脂血清澄活性) を吸光度の差△ O. D.にて示した.

2)遊離脂肪酸測定法[11)12)]：LL 活性を基質乳液の分解能つまり遊離脂肪酸の生成速度(free fatty acid 10^{-9} eq/hr/ml of plasma) として測定した. 測定試薬は, NEFA - test キット (和光) を用いた. 方法は投与後血漿 0.2 ml, 2%ココナッツ油乳液 0.2 ml, 10%ウシアルブミン 0.2 ml, 0.5 M ギ酸アンモニウム 0.05 ml を順次試験管に加えて混和し, 直ちに 37°C, 20 分間正確に温浴中で加温した. 次いでヘプタン・クロロホルム混液 (1 : 3) 6 ml を加えて反応を停止させ, 銅試液 2 ml を加えて 2 分間以上強く振とう抽出を行った. こののち 3,000 回転, 5 分間遠心分離し, 上清の抽出液 2 ml をとり, これに発色試液 2 ml を加えて 480 nm の吸光度で測定した. 既知濃度の標準脂肪酸から作成した検量線より投与後血漿 1 ml および 1 時間当たりの遊離脂肪酸の生成量を算出した.

7. 血小板凝集阻止作用の測定[13)]：体重 2.5～3.0 kg の家兎を用い, 頸動脈よりクエン酸塩を用いて血液を採取し, これを 1,000 回転, 10 分間遠心して多血小板血漿(PRP)を得た. PRP 0.5 ml をとり, 37°C, 1,200 回転で約 3 分間攪拌し, 液温を 37°Cにしたのち種々の濃度の Cho - PS 溶液 50 μl および 0.1%コラーゲン溶液 (Holm) 6 μl を加え, 血小板凝集による透過率の変化を測定した. この凝集を 50%抑制する薬物の添加濃度 IC - 50 (μg/ml) で表わし阻止効果の指標とした.

8. 血栓生成抑制作用 (in vitro) の測定：Cho - PS 添加または投与の家兎血液を用い, 生理食塩液添加(投与)血液を対照に, Connor らの報告[14)]に従って Chandler loop 法[15)]により血栓生成抑制作用をそれぞれ測定した. すなわち血栓を生成させるための回転装置は, 図 1 に示す如く, 回転盤が水平面より 80 度に立ち, 12 rpm の速度で回転するものを用いた. 薬物の Cho - PS III, デキストラン硫酸, Cho - MS I を家兎血液 1 ml 当たり 0.1 mg 添加し, ヘパリンを臨床常用血中濃度の 1.25 u/ml および半量の 0.625 u/ml の濃度に添加した血液を用いた. また投与実験では, Cho - PS III 1～30 mg/kg, Cho - MS I 10 mg/kg, ヘパリン 100 u/kg をそれぞれ家兎に静脈内投与し, 投与後 1 時間および 3 時間後に採取したクエン酸塩加血液を実験に供した. これら血液を 1 ml ずつ内径 3 mm, 長さ 27 cm のプラスチック・チューブに入れ, 0.25 M 塩化カルシウム液 0.1 ml を加えたのち, これより一廻り大きい内径 5 mm, 長さ 1.5 cm のシリコン・チューブにてチューブの両端を接合してループとし, 回転盤に懸架してループを回転させた. このときの回転ループの血液の尖端レベルの位置を分度器にて測定し, この値より血液レベルが 4 度以上低下したときの時間を血栓生成終点とした. 血栓生成時間は, 塩化カルシウム液の添加時点から生成終点までをストップウオッチで測定した. なお, 反応は 24～26°Cの室温で行った.

9. 実験的家兎粥状硬化症に及ぼす抑制効果 (経口投与実験)

1)実験方法：体重約 2 kg の雄性家兎を用い, これに加水ラノリン (局方) を 10%量飼育用固形飼料 (日本クレア CR - 2) に添加したものを 21 週にわたって自

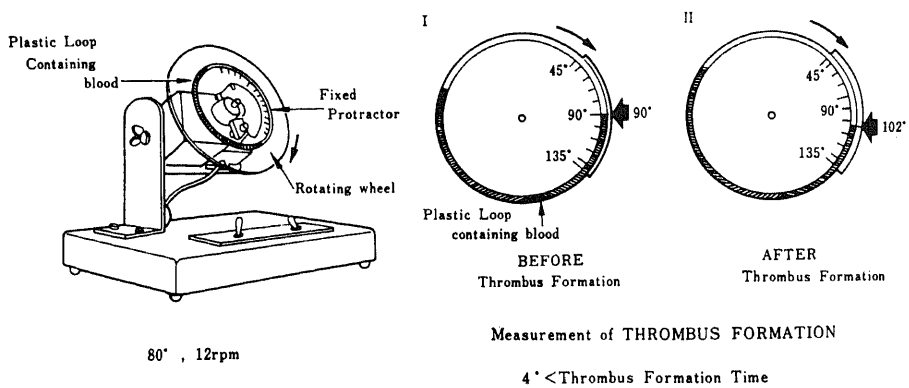


Fig. 1. Apparatus for measurement of thrombus formation time (Chandler's loop method)

由に食餌させた[16]．なお，飼料中のコレステロール含量は約1％であった．これら家兎のうち，ラノリン負荷第7週までの観察で下痢を認めたものおよび体重増加をみないものはすべて除外した．32匹を1群8匹ずつ4群に分け，8週目より21週目までそれぞれの薬物を連日経口投与した．第1群のpositive controlは，デンプン（JIS特級）をゼラチンカプセル（日局）に充塡し，100 mg/kg/dayを投与した．第2群はCho-PS IIIを90 mg/kg/day，第3群はCho-PS IIIを30 mg/kg/day，第4群はデキストラン硫酸30 mg/kg/day，第5群はラノリン無添加の基礎飼料のみで飼育したものをnegative control群（正常群，1群5匹）とし薬物も無投与とした．実験期間中の各群の平均食餌量は家兎1匹あたり1日約130 gで，群間に有意の差は認められなかった．

2）方　法

i）血漿総コレステロール値：隔週ごとに家兎の耳動脈より採血し，血漿中の総コレステロール含量をZak-Henly法[17]にて測定した．

ii）血漿中性脂肪値：血漿総コレステロール測定と同一血漿についてVan Handel法[18]により中性脂肪含量を測定した．

iii）大動脈壁のアテローム染色：ラノリン負荷21週後に剖検し，大動脈をホルマリン固定したのちスダンIV染色を行った．

iv）大動脈壁の脂質含量の測定：染色後の大動脈の湿重量を秤量したのち，ホモゲナイズし，これにクロロホルム・メタノール混液（3：1）約10 mlを加えて48時間抽出を行った．脂質抽出液の1部を用いて総コレステロールおよび中性脂肪をそれぞれ測定し，大動脈単位重量当たりの脂質量を求めた．

v）病理組織学的検索：大動脈の凍結切片を作成したのち，スダンIIIおよびヘマトキシリン-エオジンにて染色し，組織標本を作成し，病理組織学的検索を行った．

成　績

1．抗血液凝固活性

1）トロンボプラスチン凝固阻止作用（ヘパリン力価）：Cho-PS I，IIおよびIIIのトロンボプラスチン凝固阻止力価は，表2に示す通り5.71，2.73および0.82ヘパリン単位/mgであった．Cho-MS Iと比較すると，ポリ硫酸化により6倍以上の活性増強を示した．Cho-PSのヘパリン力価と分子量の関係は，図2に示す通り正の相関を示し，分子量が大きくなるに従って活性も高くなる傾向を示した．

2）全血凝固阻止作用：Cho-PS I，II，III，デキ

Table 2. Anticoagulant activity of Cho-PS determined by the heparin-assay method of Japanese pharmacopoeia

Materials	Heparin unit	Approx. molecular weight
Cho-PS I	5.71 U/mg weight	80,000
〃 II	2.73 〃	8,000
〃 III	0.82 〃	1,600
Cho-MS I	<0.15 〃	37,500
Heparin	160.0 〃	ND

ND: Not determined
Abbreviations similar to those in Tab. 1.

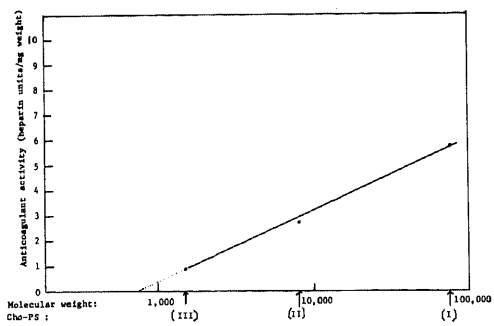


Fig. 2. Relationship between molecular weight and anticoagulant activity of Cho-PS

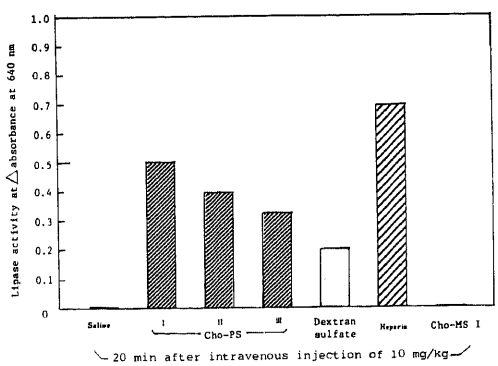


Fig. 3. Lipoprotein lipase activity of plasma from rabbits injected intravenously with Cho-PS, Cho-MS, dextran sulfate and heparin (Turbidity methed)

Table 3. Clotting time of whole blood from rabbits administered intravenously with Cho-PS (Lee-White method)

Materials injected	Dose mg kg	Whole blood clotting time (min)	Heparin units/kg
Saline		8.9	0
Cho-PS I	3	ND	17.1
〃	10	40.8	57.1
〃	30	ND	171.3
Cho-PS II	3	9.2	8.2
〃	10	18.4	27.3
〃	30	39.6	81.9
Cho-PS III	3	11.9	2.5
〃	10	9.6	8.2
〃	30	11.0	24.6
Dextran sulfate	10	10.8	ND
Cho-MS I	10	8.1	0
Heparin	0.1	7.3	16
〃	0.5	16.0	80
〃	1.0	64.0	160
〃	3.0	> 180.0	480
〃	10.0	> 180.0	1,600

Rabbits are bled 20 min after intravenous injection of the materials. Abbreviations similar to those in Tab. 1.

ストラン硫酸，Cho - MS Ⅰおよびヘパリンを家兎静脈内に投与したときの全血凝固時間(Lee - White 法[8])は表3に示す如くであった．高分子量および中分子量の Cho - PS Ⅰ，Ⅱが生理食塩液対照に比べて，明らかに全血凝固時間を遅延せしめたのに対し，低分子量の Cho - PS Ⅲはほぼ対照群に近似した値を示し，30 mg/kg の投与でも凝固時間の遅延は認められなかった．一方，デキストラン硫酸，Cho - MS Ⅰも 10 mg/kg の投与で凝固遅延はみられなかった．

2．リポプロティン・リパーゼ（LL）活性

家兎に体重1 kg 当たり 10 mg の Cho - PS Ⅰ，Ⅱ，Ⅲ，デキストラン硫酸，Cho - MS Ⅰまたはヘパリンを静脈内投与し，20 分後に採取した血液の血漿について LL 活性を濁度法で測定した．結果は図3に示す如く，Cho - PS Ⅰ，Ⅱ，Ⅲはいずれもデキストラン硫酸および Cho - MS Ⅰより高い活性を示したが，ヘパリンに比べると低値であった．Cho - PS Ⅰ，Ⅱ，Ⅲの相互の活性を比べると，分子量の低下に伴って LL 活性も低下する傾向を示した．なお，Cho - MS Ⅰは 10 mg/kg の投与量では全く LL 活性を示さなかった．

表4では，LL 活性を投与後血漿 1 ml 当たりの遊離脂肪酸の生成速度（脂肪分解能）で示したが，図3の濁度法の結果とほぼ同じ傾向の成績を得た．すなわち，Cho - PS Ⅲ 10 mg/kg 投与血漿の LL 活性は，同一投与量のデキストラン硫酸よりも高い値を示し，またヘパリン 3 mg/kg 投与血漿の LL 活性と同等あるいはそれ以上の値を示した．LL 活性を抗凝固活性の1ヘパリン単位当たりの比活性で示すと，Cho - PS Ⅲ 10 mg/kg の投与で比活性 1006 を示したのに対し，ヘパリン 10 mg/kg では 11 であり，Cho - PS Ⅲはヘパリンのほぼ 90 倍の LL 活性を示す結果となった．

3．血小板凝集阻止作用

コラーゲンを血小板凝集の誘引剤に用いて Cho - PS Ⅲの凝集阻止作用を Cho - MS Ⅰおよびヘパリンと比較検討した．結果は表5にみられる通り，50%阻止濃度でみると，Cho - MS Ⅰは 10,000 μg/ml 以上の濃度でもほとんど阻止しなかったのに対し，Cho - PS Ⅲは 447 μg/ml (0.4 ヘパリン単位) の濃度で阻止効果を示した．ヘパリンは 13 μg/ml (2.1 単位) の濃度で同等の作用を示した．すなわち，ヘパリン単位からみた Cho - PS Ⅲの本作用は，ヘパリンの約5倍であった．

Table 4. Lipoprotein lipase activity of plasma from rabbits injected intravenously with Cho-PS III

Materials injected	Doses mg/kg	heparin units/kg (A)	Lipoprotein lipase activity* (B)	Lipase activity per heparin units (B)/(A)
Cho-PS III	3	2.5	4,321	1,728
〃	10	8.2	8,249	1,006
〃	30	24.6	12,144	494
Dextran Sulfate	10	ND	6,120	ND
Cho-MS I	10	0	0	0
Heparin	0.1	16.0	786	49
〃	0.5	80.0	2,321	29
〃	1.0	160.0	2,786	17
〃	3.0	480.0	7,964	17
〃	10.0	1,600.0	17,716	11

* The activity is expressed by appearing time of released free fatty acid 10^{-4}eq/hr/ml of plasma.

Table 5. Inhibitory effect of Cho-PS III on platelet aggregation

Materials	IC-50 (μg/ml)*
Cho-PS III	447
Cho-MS I	>10,000
Heparin	<13

* Concentration of tested materials showing 50% inhibition of platelet aggregation measured after addition of collagen solution (6 μl of 1 mg/ml). Abbreviations similar to those in Table 1.

4．血栓生成抑制作用

1)血液への in vitro 添加：Cho - PS III, Cho - MS IまたはデキストラN硫酸を家兎血液1 ml当たり0.1 mg添加し，血栓生成時間を生理食塩液添加のそれと比較した．ヘパリンは臨床常用濃度の1.25 u/mlまたはその半量を用いた．結果は表6に示す通りで，Cho - MS Iおよびデキストラン硫酸添加群は，生理食塩液添加群（対照群）とほぼ同じ値を示し抑制作用は認められなかったが，Cho - PS III群は対照群の2倍に遅延し，血栓の形成を有意に抑制した．またヘパリンはCho - PS IIIよりさらに遅延が顕著で，臨床常用濃度で対照群の約8.5倍延長した．しかし，ヘパリン単位で比較すると，Cho - PS IIIの血栓阻止能はヘパリンの3～5倍の作用があった．

2）静脈内 in vivo 投与：Cho - PS IIIを家兎静脈内に投与し，1時間後と3時間後に採取した血液を用いて血栓生成までの時間を測定した．結果は図4にみられる如くで，1時間値ではCho - PS III 10 mg/kgの静注で生理食塩液投与群（対照群）の約2倍の遅延を認め，ヘパリン100 u/kgの静注では対照群の約5倍の遅延をみた．Cho - MS Iは10 mg/kgの投与で対照群と同値を示し，遅延効果は全く認められなかった．また静注3時間後の血液の血栓生成時間はいずれの群も対照群に近似した値を示し，1時間値では遅延作用の強かったヘパリンもCho - PS III 10 mg/kg投与群とほぼ等しい値に低下した．

Table 6. *In vitro* thrombus formation time of normal rabbit blood with Cho-PS III, dextran sufate, Cho-MS and heparin using Chandler loop method

Materials	No of Test	Thrombus formation time (min) Mean ± SE	Prolongation rate
Saline (Control)	3	11.78 ± 0.97	1
Cho-PS III	3	23.43* ± 0.81	2.00
Dextran sulfate	3	13.43 ± 0.38	1.14
Cho-MS I	3	10.96 ± 0.93	0.92
Heparin			
0.625 U/ml	3	30.49* ± 2.18	2.58
1.250 U/ml	3	100.20* ± 5.11	8.50

Abbreviations similar to those in Table 1.
0.1 mg/ml of materials was used, except for heparin.
1.25 U/ml is heparin concentration for clinical application.
* $p<0.01$.

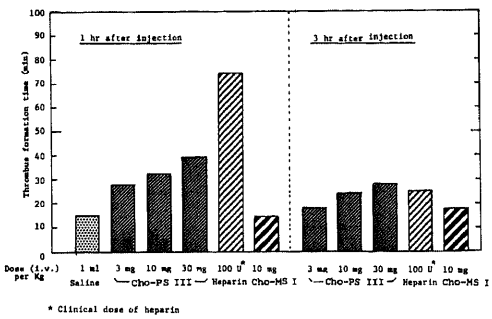


Fig. 4. Thrombus formation time of blood from rabbits injected intravenously with Cho-PS III, Cho-MS I and heparin

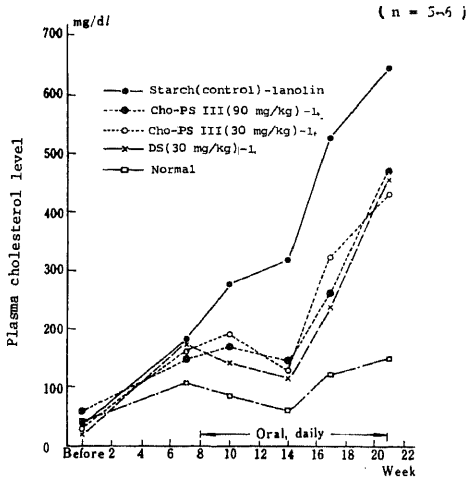
5．家兎粥状硬化症におよぼす効果

LL活性／ヘパリン力価比の最も高かったCho - PS IIIを30 mg/kgまたは90 mg/kg，ラノリンの食餌開始後第8週より21週目までの間家兎に経口投与し，その大動脈内膜の粥状硬化症の抑制効果をみた．

1)血漿総コレステロール値および血漿中性脂肪値：血漿総コレステロール値の変化は図5に示すように，Cho - PS III投与開始時の第8週よりコレステロール値の上昇が著明に抑制され，デンプン投与群に比べ有意の減少を認めた．この減少は，Cho - PS III 30 mg/kgと90 mg/kg投与で差がなく，デキストラン硫酸投与群でも同様の抑制があった．

血漿中性脂肪値の変化は，図6に示す通り，Cho - PS III投与群はいずれも第12週目よりデンプン投与群に比べ有意の減少をもたらした．しかしデキストラン硫酸群はデンプン群より低値を示したが，両群の間に有意差はなかった．

2)大動脈壁内コレステロールおよび中性脂肪含量：家兎大動脈はラノリン負荷終了時の21週に摘出剖検し，脂質含量を測定した．コレステロール含量は，図7に示す如く，Cho - PS III投与群はデンプン投与群に比べいずれも有意に低い値を示し，コレステロールの大動脈内膜への沈着を有意に抑制したことを示唆した．



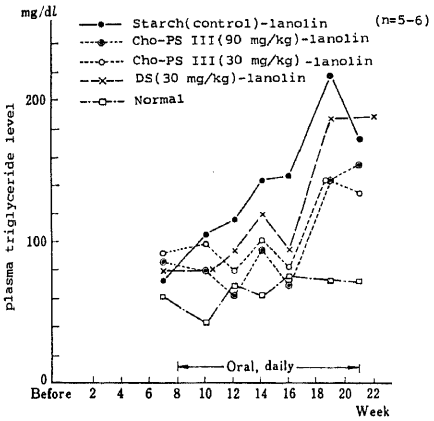
Group	Plasma cholesterol level (mg/dl)			
	Before	7th wk.	14th wk.	21st wk.
Starch	42±21	180±46	320±130	650±170
Cho-PS III(90 mg/kg)	56±28	150±45	150±82**	479±183
Cho-PS III(30 mg/kg)	35±9	166±60	137±78**	446±181*
DS(30 mg/kg)	29±9	178±74	122±64**	471±264
Normal	44±20	110±5	65±12	160±11

(Mean±SD)

* $p < 0.05$
** $p < 0.01$

DS:Dextran sulfate
Normal:no lanolin fed

Fig. 5. Time course of plasma cholesterol level of lanolin-fed rabbits daily treated with oral Cho-PS III.



Group	Plasma triglyceride level (mg/dl)		
	7th wk.	14th wk.	21st wk.
Starch(control)-lanolin	73±16	145±26	173±97
Cho-PS III(90 mg/kg)	88±16	96±32*	158±51
Cho-PS III(30 mg/kg)	93±55	100±26*	134±57
DS(30 mg/kg)	79±21	119±24	189±163
Normal	63±10	63±8 *	72±3*

* $p < 0.05$

Fig. 6. Time course of plasma triglyceride level of lanolin-fed rabbits daily treated with oral Cho-PS III.

一方，中性脂肪含量でも図8にみる如く，Cho-PS III群はデンプン群に比べ有意の低値を示し，大動脈内膜への脂肪沈着を抑制した．

3）大動脈内膜の肉眼的所見：剖検時の肉眼所見では，デンプン群の大動脈内膜には，アテローム障害がみられた．すなわち，大動脈弓部および胸部大動脈に黄白色のさまざまの大きさのプラークが形成され，小さなものは胸部大動脈の肋間動脈開口部や時に腹部大動脈にも見られた(写真1)．これに反し，Cho-PS III

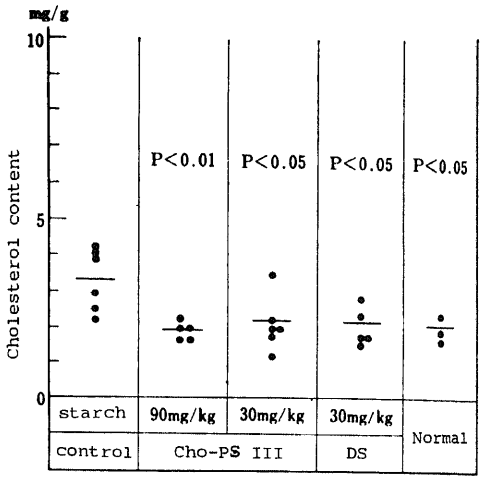


Fig. 7. Cholesterol content of aortic wall from lanolin-fed rabbits treated over a 13 week period with oral Cho-PS III.

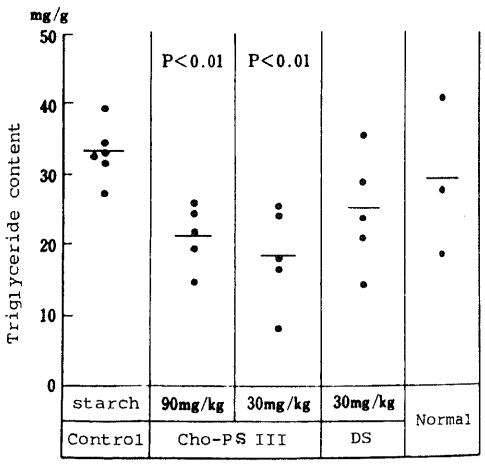


Fig. 8. Triglyceride content of aortic wall from lanolin-fed rabbits treated with oral Cho-PS III.

投与群では 30 mg/kg, 90 mg/kg 投与群とも動脈壁のアテローム様変化は少なく，組織レベルでも内弾性板がよく保持されており，正常群との差がみられないものもあった．デンプン群の大動脈壁の凍結切片スダンIII染色標本では，内膜のアテローム肥厚著るしく，スダンIII陽性泡沫細胞の集積に伴って一部その融解がみられ，その周辺およびアテローム内部には線維への増加があり，さらに中膜上層部にアテローム変性が波及して，平滑筋細胞の空胞化などがみられた．一方，Cho - PS III投与群では，非投与群に比べて内膜の肥厚や泡沫細胞の形成が軽く，内弾性板の断裂もみられなかった．中膜の変性もほとんど認められず，平滑筋細胞を混じた線維性内膜肥厚部を時に散見した．デキストラン硫酸投与群でもほぼ同様の所見であった．

考　　察

コンドロイチンポリ硫酸（Cho - PS）調製の出発物質として用いたコンドロイチンモノ硫酸(Cho - MS)は，生体内に広く分布し，ヘパリンとともに glycosaminoglycuronans に属する．これらはいずれも硫酸エステル基を有する硫酸多糖体で，特異的な陽イオン交換体として生体にとって重要な Na^+, K^+, Ca^{++}, Mg^{++} 等の陽イオンと結合するほかある種の酵素蛋白（トロンビン，リポプロティン・リパーゼ），薬剤（ストレプトマイシン），塩基（ヒスタミン，アドレナリン）等とも結合し，複合体を形成することが知られている[19]．しかし Cho - MS はヘパリンと異なり，ヘパリンに似た官能基を有するにもかかわらず抗凝固活性はほとんどみられず，そのほかの生物活性も非常に乏しい．このような生物活性発現の違いは，分子構造の特異性に帰せしめられている．つまりヘパリンは3種の単糖類で構築されており，硫酸基も O -硫酸のほか N -硫酸を有する等，Cho - MS に比べて極めて複雑な化学構造を有し，このため抗凝固活性のための非常に高い構造的特異性をもつものと考えられている[19]．ところが同じヘパリンでも分子量 6,000 以下の低分子量になると，出血の原因となる抗凝固活性が高分子量のそれに比べて低いこと，しかし血栓形成阻止作用はむしろ2～3倍高くなることが最近多くの研究者により報告されている[2)3)20)21)]．また Kakkar らも低分子量ヘパリンが血栓症発生の抑制効果の大きいことを家兎を用いた in vivo 実験で明らかにしている[22)]．

本研究では，生物活性に乏しい Cho - MS I を部分水解して低分子量の Cho - MS II および III を得たのち，それぞれ硫酸化して硫酸エステル基を最大限に導入し，ヘパリンの重要な機能の一つであるポリアニオン体に変換せしめた．かくして得た Cho - PS について，ヘパリンと同様に分子量と生物活性の関係ならびにポリ硫酸化による生物活性の発現などについて検討した．

その結果，ポリ硫酸化によって Cho - MS I にはみられなかった抗凝固活性，脂血清澄活性，血小板凝集阻止作用および血栓形成抑制作用などの各種生物活性が Cho - PS に認められるに至った．生物活性と分子量の関係についてみると，抗凝固活性は分子量の低下に伴って著明に減少し，低分子量の Cho - PS III では静脈内投与による全血凝固時間がほとんど遅延しないところまで低下をみた．しかし脂血清澄活性は，重量比ではヘパリンより劣るけれども，Cho - MS I に比べてはるかに高い活性を示し，分子量低下に伴う活性の低下もみられた．本物質の脂血清澄作用は抗凝固活性とは無関係に起こるものであることを示唆した．一方，低分子量ヘパリンは Cho - PS III と異なり，抗凝固活性の消失とともに脂血清澄活性も発現しなくなると De Swart らは報告している[4)]．この点が低分子量ヘパリンと Cho - PS III との大きな相違点である．このような違いが何によるものか明らかでないが，ヘパリンの抗凝固活性はアンチトロンビンと複合体を形成することによって発現し，その特異性は前述の如く，ヘパリンの分子構造によるとされている．一方，脂血清澄活性はポリアニオン体として陰性荷電による組織蛋白との相互作用ならびにリポプロティン・リパーゼとの結合性もしくは親和性によるものと考えられており[24)]，ヘパリンを静脈内投与したとき，主に毛細血管の内皮細胞，肝細胞および脂肪組織から血中にリポプロティン・リパーゼが放出される．肝細胞からの場合，リポプロティン・リパーゼは肝細胞の原形質膜に存在し，それがヘパリンによって細胞から遊離することが確かめられている[24)]．このような考え方をもとに Cho - PS III の作用機作を考えると，Cho - PS III には抗凝固活性発現のための分子構造的特異性はないが，ポリアニオン体としての陰性荷電による脂血清澄活性誘発能は高いレベルにあると推論することができる．

次に，Cho - PS III について血小板凝集阻止作用，血栓形成抑制作用ならびに粥状動脈硬化症抑制効果などをさらに検討した．コラーゲンの血小板凝集に対する阻止作用をみると，Cho - MS I には阻止作用がほとんど認められなかったのに対し，Cho - PS III は Cho - MS I の 20 分の1以下の添加濃度で 50% 阻害をもたらした．さらに，Chandler loop 法による in vitro での家兎血液からの人工血栓の生成に対しても Cho - PS III は in vitro, in vivo 投与ともに血栓生成を有意に遅延せしめた．しかし，Cho - MS I には Morrison らが報告[25)]したような遅延ないし抑制効果は全く認められなかった．なお，ヘパリンは血小板凝集ならびに血栓形

成に対しいずれも重量比較では著明な抑制効果を示したが，ヘパリン力価当たりでは逆に Cho - PS IIIの方が3～5倍作用が強かった．

ラノリン負荷による家兎大動脈の粥状硬化症のモデル実験では，脂血清澄活性の高い Cho - PS IIIが病変の進展をよく阻止し，血中の脂質レベルを低下させるとともに，大動脈壁の脂質含量をも有意に減少させた．これらの作用は，脂血清澄活性の働きによる脂質代謝改善がもたらした効果と考えられた．それと同時に，Cho - PS IIIの血小板凝集阻止作用と血栓形成遅延作用がラノリン負荷家兎大動脈内膜に血栓の形成され難い状態を生み，従って血栓の器質化に伴って起こる大動脈硬化症の促進作用も本薬剤により阻止されうるものと考えられた．

結　　論

コンドロイチンモノ硫酸（Cho - MS I）を出発材料に，部分水解して低分子量 Cho - MS II，IIIを得たのち，それぞれホルムアミドークロロスルホン酸でポリ硫酸化し，推定分子量の漸減している3種のコンドロイチンポリ硫酸（Cho - PS I，II，III）を調製した．これら Cho - PS について生物活性を調べ，次のような成積を得た．

1）Cho - MS Iのトロンボプラスチン凝固阻止作用は，0.15 ヘパリン単位/mg 以下に相当するのに対し，ポリ硫酸化した Cho - PS I，II，IIIは 5.71，2.73，0.82 ヘパリン単位/mg の活性をそれぞれ示し，分子量の低下に伴って漸減した．そして分子量の最も小さい Cho - PS IIIの全血凝固時間は，30 mg/kg の静注でも非投与とほぼ等しい値を示した．

2）脂血清澄作用を薬物 10 mg/kg 静注 20 分後の家兎血漿について脂肪分解速度として測定すると，血漿 1 ml 当たり Cho - PS IIIが 8,249 FFA 10^{-9}eq/hr，デキストラン硫酸が 6,120 を示したが，Cho - MS Iは全く活性を示さず，ヘパリンは 17,716 と高い値を示した．これら 10 mg 静注量をヘパリン単位に換算して対比すると，Cho - PS IIIのヘパリン1単位当たりの脂血清澄作用はヘパリンの約 90 倍の値となった．

3）血小板凝集阻止に対しては，Cho - PS IIIは 447 μg/ml（0.4 ヘパリン単位）の添加濃度で 50% 凝集阻止を示したが，Cho - MS Iは 10,000 μg/ml 以上の濃度でもほとんど阻止せず，ヘパリンは 13 μg/ml（2.1 単位）の濃度で Cho - PS IIIと同等の作用を示した．すなわちヘパリン単位からみた Cho - PS IIIの血小板凝集阻止作用はヘパリンの約5倍であった．

4）Chandler loop 法による家兎血液の血栓生成に対しても，Cho - PS IIIは 0.1 mg/ml の in vitro 添加および 10 mg/kg 静注より，対照に比べ有意に血栓生成時間を遅延せしめた．Cho - MS Iおよびデキストラン硫酸では有意の遅延は認められなかった．ヘパリンは重量当たり Cho - PS IIIよりさらに著効を示したが，ヘパリン単位でみると Cho - PS IIIの血栓阻止能はヘパリンの3～5倍の作用があった．

5）家兎にラノリン食を投与し，第8週より21週までの間に Cho - PS III 30 mg/kg または 90 mg/kg を併用投与すると，血漿および大動脈壁中の総コレステロールと中性脂肪含量は，非投与群に比べ有意の低値を示した．また，形態学的にも内膜の肥厚や泡沫細胞の形成が対照に比べ軽かった．

謝　　辞

稿を終えるに当たり，終始懇切な御指導と御校閲を賜りました恩師太田五六教授ならびに長年にわたり御薫陶を頂きました故石川太刀雄丸教授に深甚なる謝意を表します．また本研究遂行に多大の御教示，御鞭撻を賜りました須山忠和博士に深く感謝いたします．また御支援を頂きました長谷川栄一博士ならびに研究室各位に厚く御礼申し上げます．

文　　献

1） **Engelberg, H.**: Heparin - actions and functions of heparin, p 42 - 63. Charles C Thomas Publisher, Illionis, 1963.

2） **Lane, D. A., Macgregor, I. R., Michalski, R. & Kakkar, V. V.**: Anticoagulant activities of four unfractionated and fractionated heparins. Thromb. Res., **12**, 257 - 271 (1978).

3） **Barrowcliffe, T. W., Johnson, E. A., Eggleton, C. A., Kemball - Cook, G. & Thomas, D. P.**: Anticoagulant activities of high and low molecular weight heparin fractions. Brit. J. Haematol., **41**, 573 - 583 (1979).

4） **De Swart, C. A. M., Sixma, J. J., Nijmeijer, A., Holmer, E., Anderson, L. O. & Verschoor, L.**: Kinetics of anticoagulant and lipolytic activity and radiolabel after intravenous administration of S^{35}-heprin fractions of different molecular weight. Thromb. Haemostasis, **46**, 185 (1981).

5） **伊賀善郎**：低分子コンドロイチンの製造方法．日本国特許，昭 45 - 4734

6） **Kawano, T., Suyama, T., Nagai, J. & Iga, Y.**: Low molecular chondroitin sulfate and method for manufacturing the same. U. S. Patent 3,405,120 (1968).

7） **須山忠和，伊賀善郎**：低分子コンドロイチンポリ硫酸エステル金属塩又はアンモニウム塩の製造法．日

本国特許, 577364 号(1970).

8) **Lee, R. I. & White, P. D.**: A clinical study of the coagulation time of blood. Am. J. Med. Sci., **145**, 495 (1913).

9) **Eiber, H. B., Payza, A. N. & Goldberg, B.**: Studies on plasma clearing factor, II. Substrate. Biochim. Biophys. Acta, **116**, 256 - 263 (1966).

10) **Hara, I. & Kuzuya, F.**: Lipoprotein lipase - particularly with regard to its determination. Protein, Nucleic acid and Enzyme, **10**, 1224 - 1229 (1965).

11) **Payza, A. N., Eiber, H. B. & Danishefsky, I.**: Studies on plasma clearing factor, I. Fractionation and characteristics. Biochim. Biophys. Acta, 111, 159 - 165 (1965).

12) **Itaya, K. & Ui, M.**: Colorimetric determination of fatty acids in biological fluids. J. Lipid Res. 6, 16 - 20 (1965).

13) **Philp, R. B.**: Methods of testing proposed antithrombotic drugs in vitro tests of platelet function and platelet - inhibiting drugs. p129 - 169. CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, 1981.

14) **Connor, W. F. & Poole, J. C. F.**: The effect of fatty acids on the formation of thrombi. Q. J. Exp. Physiol., **46**, 1 - 7 (1961).

15) **Chandler, A. B.**: In vitro thrombotic coagulation of the blood - a method for producing a thrombus. Lab. Invest., **7**, 110 - 114 (1958).

16) **安田義顕**: 動脈硬化症に関する研究(I及びII). 日循誌, **27**, 519 - 533 (1963).

17) **Zak, B.**: Simple rapid microtechnique for serum total cholesterol. Am. J. Clin. Pathol., **27**, 583 - 588 (1957).

18) **Van Handel, E., Zilversmit, D. B. & Bowman, K.**: Micromethod for the direct determination of serum triglycerides. J. Lab. Clin. Med., **50**, 152 - 157 (1957).

19) **Kiss, J.**: Chemical structure of heparin, p 3 - 20. In V. V. Kakkar & D. P. Thomas (ed), Heparin, Academic Press, New York, 1976.

20) **Soria, C., Soria, J., Ryckewaert, J. J., Holmer, E. & Caen, J. P.**: Anticoagulant activities of a pentosane polysulphate, comparison with standard heparin and a fraction of low molecular weight heparin. Thromb. Res., **19**, 455 - 463 (1980).

21) **Ayotte, L., Lormeau, J. C. & Perlin, A. S.**: Influence of variations in the chemical structure of heparin on its anticoagulant and antifactor Xa activities. Thromb. Res., **22**, 97 - 102 (1981).

22) **Choay, J., Lormeau, J. C., Messmore, H. L., Fareed, J., Stulc, J. & Anderson, A.**: Antithrombotic properties of low molecular weight heparin fractions from porcine mucosal heparin. Thromb. Haemostasis, **46**, 186 (1981).

23) **Kakkar, V. V., Djazaeri, B., Webb, P., Scully, M., Westwick, J. & MacGregor, I.**: Low molecular weight heparin and postoperative deep vein thrombosis. Thromb. Haemostasis, **46**, 116 (1981).

24) **Rosenberg, R. D.**: The function of heparin, p 101 - 109. In V. V. Kakkar & D. P. Thomas (ed), Heparin, Academic Press, New York, 1976.

25) **Morrison, L. M., Rucker, P. G. & Ershoff, B. H.**: Prolongation of thrombus formation time in rabbits given chondroitin sulfate - A. J. Atheroscler. Res., 8, 319 - 327 (1968).

Biological Activity of Low Molecular Weight Chondroitin Polysulfate Yoshiro Iga, Department of Pathology (II), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa, 920 — J. Juzen Med. Soc., **91**, 764—776 (1982)

Key words: Chondroitin polysulfate, Chondroitin monosulfate, lipoprotein lipase activity.

Abstract

The biological and pharmacological activities of chondroitin polysulfate (Cho-PS) were investigated. Three kinds of Cho-PS with different molecular weight, 80,000 (I), 8,000 (II) and 1,600 (III), were prepar d semisynthetically by sulfation of chondroitin monosulfate, extracted from mammalian cartilages. Among them, Cho-PS III having the lowest molecular weight was

found to possess an extremely high lipoprotein lipase activity and a negligible anticoagulant activity. Furthermore, Cho-PS III at a concentration of 447 μg/ml inhibited an *in vitro* aggregation of platelets by 50% of control value, when measured after addition of collagen. One tenth mg/ml of Cho-PS III added to the whole rabbit blood or 3-30 mg/kg of the compound injected intravenously into the rabbits, both made a significant prolongation of thrombus-formation time measured by means of the Chandler loop method *in vitro*. In atherosclerosis experiments, male adult rabbits were fed daily *ad libitum* for 21 weeks with diets containing 10% lanolin and further received a daily oral dose of 30 to 90 mg/kg of Cho-PS III during a period from 8 to 21 experimental weeks. A suppressive effect of the compound on atherogenesis of the aorta was observed; the cholesterol and triglyceride levels in the plasma and the total cholesterol and triglyceride contents in the aortic walls were significantly reduced. Gross and histological examinations of the aorta revealed a marked reduction in the degree and extent of fatty streaks and of fat accumulation in the intima.

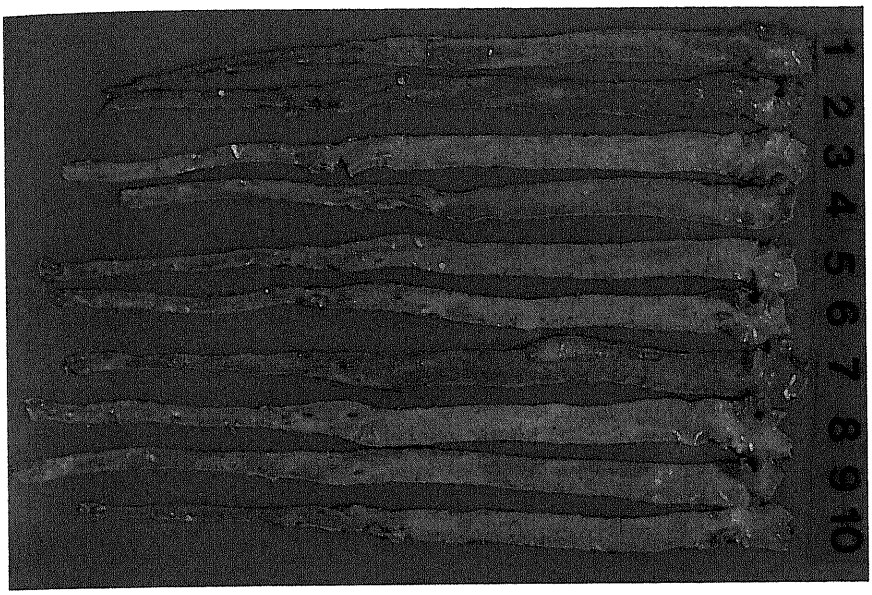


Photo. 1. Atheromatous lesions, stained positively with Sudan IV, on the aortic intima of rabbits which were fed for 21 weeks with diets containing 10 % lanolin and further received a daily oral dose of chondroitin polysulfate III (Cho - PS III), dextran sulfate or starch during period from the 8 to 21 experimental weeks.
1 & 2 : Starch (control) group
3 & 4 : Cho - PS III 90 mg/kg/day p. o. group
5 & 6 : Cho - PS III 30 mg/kg/day p. o. group
7 & 8 : Dextran sulfate 30 mg/kg/day p. o. group
9 & 10 : No lanolin fed (normal) group

Photo. 2. Striking fat accumulation and thickening are observed in the intima and upper part of media of aorta (starch group). Sudan III- H. E. stain, ×100.

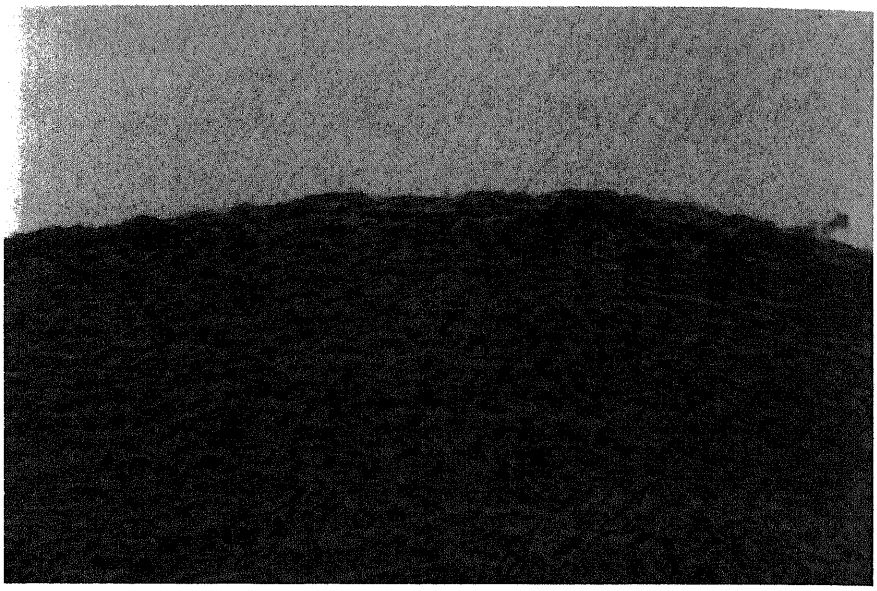


Photo. 3. The thickening of intima is minimal, and no fat accumulation on either the intima or media is seen (Cho - PS III 30 mg/kg p. o. group). The internal elastic lamina is well preserved. Sudan III- H. E. stain, ×100.

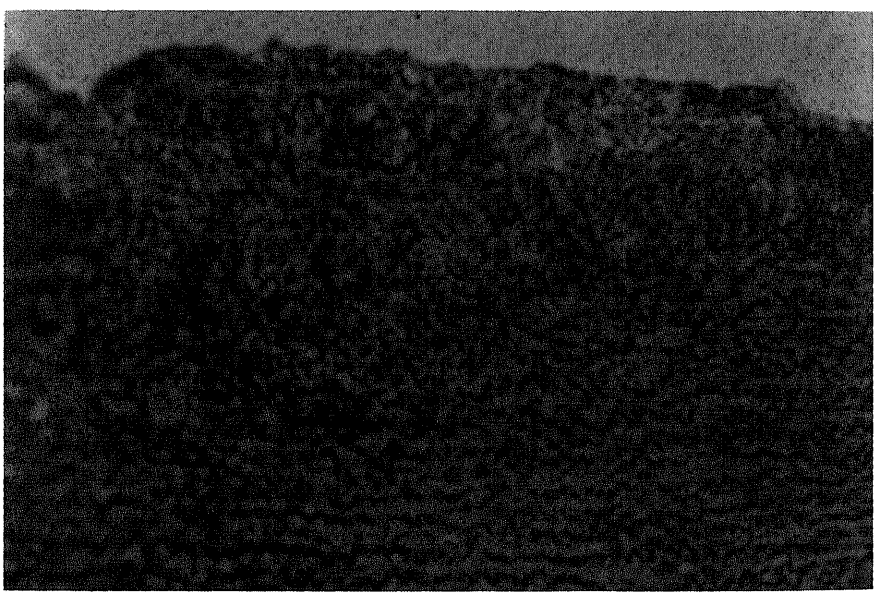


Photo. 4. The intima shows a mild thickening and no fat accumulation is seen (Cho - PS III 90mg/kg p. o. group). Sudan III- H. E. stain, ×100.