

アレルギーにおける heparin の役割に関する研究

第 2 編

気管支喘息における血漿 heparin に関する研究

岡山大学医学部第 2 内科 (指導: 木村郁郎教授)

小 野 波 津 子

(昭和62年 1 月 9 日受稿)

Key words: 気管支喘息, heparin
heparin代謝
健康人

緒 言

I 型アレルギー反応の target cell である, 末梢好塩基球ならびに組織肥満細胞^{1,2)}の metachromasia を呈する顆粒には, histamine を始め種々の chemical mediator と共に, metachromasia を呈する酸性ムコ多糖体として heparin が抱き合わさる形で存在していることがわかっている。そしてこれらの細胞が刺激されると, かの物質は, 一定の割合で放出されることが認められており, この様な細胞の機能が注目されている。chemical mediator の作用については, かなりの研究³⁾がなされているが, アレルギー反応における heparin については, その作用機序を含め, いまだ明らかでない点が多い。

第 1 編で, I 型アレルギー反応の種々の相に heparin が, 抑制的な働きをなし得る点を明らかにし, 作用機序についても若干論じた。本編では, 気管支喘息における血漿 heparin 濃度および静脈内投与後の血漿濃度の推移を, 本症の病態と対比させながら観察し, 気管支喘息発作と heparin 代謝との関連について若干の検討を加えた。

対象および実験方法

1. 対象

対象は, 当喘息外来で加療中の気管支喘息患者, 56例 (男32例, 女24例, 年齢20歳~70歳), 健康人, 9例 (男6例, 女3例, 年齢26歳~38歳)であった。

2. 血漿 heparin 濃度の測定

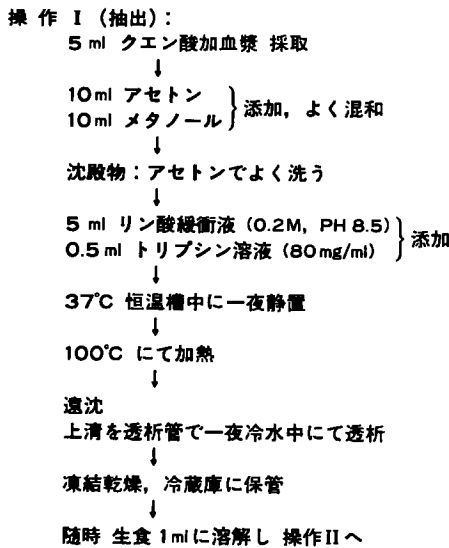
1) 採血: disposable 注射器に 3.8% citrate 1/10容を入れ, 静脈血採取し, 直ちに 3000回転 10分で遠沈し血漿を分離した。血小板の混入を避けるため, 2度遠心操作をくりかえした後, 直ちに凍結保存しておき, heparin 抽出操作に供した。

2) 血漿 heparin の抽出: 血漿 heparin の抽出は, Engelberg⁴⁾が用いた方法を利用した。

すなわち緩急に解凍した保存血漿 5 ml を, ふた付試験管にとり, 90% methylalcohol 10 ml と, acetone 10 ml を加え, 遠沈し, 上清を除去する。生じた沈澱物を acetone で充分洗浄後, 100°C に加熱しながら, よく攪拌し, acetone を揮発乾燥させる。次に, 多糖類と蛋白質との結合を切る目的で, 上記の試料を 0.2 M phosphatebuffer (pH 8.5) 5 ml で溶解し, trypsin 溶液 (80 mg/ml) 0.5 ml を加え, 37°C, 12時間 incubate する。遊離した蛋白質を除く目的で, waterbath にて 100°C, 30分間加熱後遠沈し, その上清を採取した。この上清を 1/4" (Visting) の透析管にて, 一晚流水中で透析し, 凍結乾燥

後、冷蔵庫に保存した(図1)。

3) heparinの定量: heparinの定量は, Sigmaの Kit. No.870. "Heparin in plasma" を一部変更し使用した。Kitの原理は, heparinの凝固反応への作用を応用したもので, 少量の heparinの存在下では, activated Factor X (Xa)は, 血漿中の inhibitorによって, すみやかに中和され, 中和された Xa量は, heparin濃度に比例する点である。操作は, Xa, buffer, 正常人血漿 (inhibitorを含有), および heparinを



操作 II (定量):
操作 I の最終産物にて SIGMA 社の KIT を用いてヘパリン濃度を測定

図1 血漿ヘパリン定量法

検体を, 37°C で反応させ, 2分後に残った Xa量を clotting time で測定する。 heparin 検量線作成にあたり, Kit とは異なり, heparin 溶液(ミドリ十字)を, 生理食塩水にて段階稀釈し, 0.025, 0.05, 0.075, 0.1, 0.2 u/ml として, おおのの clotting time を, 片対数グラフにとり, heparinの検量線とした(図2)。

4) 静脈内投与した heparin の血漿濃度: heparin 溶液 (1000 u/ml) 5000 u を 20% ブドウ糖液 20 ml に混じて静注し, 静注後 10分, 1時間, 2時間で採血し, 直ちに遠沈し, 乏血小板血漿を得て直ちに凍結保存し, 前述の Kit をそのまま使用し, heparin 定量を行った。静注された heparin の血中濃度の推移は, 静注10分後の値を分母に, 1時間後の値, 2時間後の値を分子にとり, 1時間後, 2時間後の血漿中残存率として表わした。血漿 heparin 濃度は, 喘息発作の有無との関連, 喘息の分類別, 重症度別に検討し, さらに, 末梢血好酸球, 好塩基球, および, 血清 IgE との関連を検討した。また, 静注 heparin の推移は, 健康人との比較, 喘息発作の大小により検討した。なお, 血漿 heparin 濃度は, 5 ml 血漿あたり (u/5ml plasma) で, 一方, 静注後の heparin 濃度は, 1ml 血漿あたり (u/ml) で濃度を表した。推計処理は t 検定を行なった。

実験成績

1. 血漿 heparin 濃度

1) 健康人との対比

健康人 9 例の平均は, 0.017 ± 0.0016 (Mean

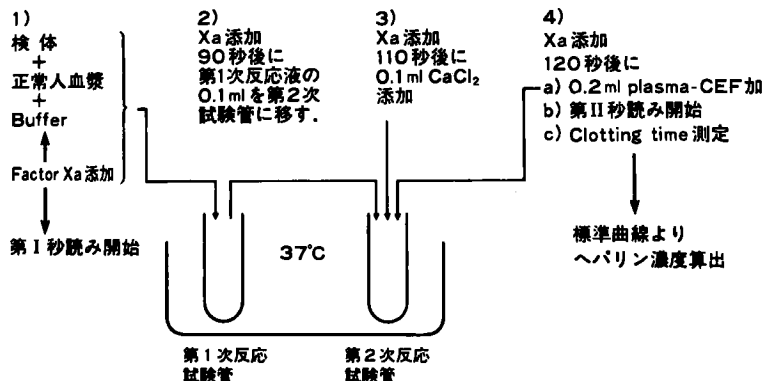


図2 ヘパリン定量法—SIGMA 社 kit, No.870 による

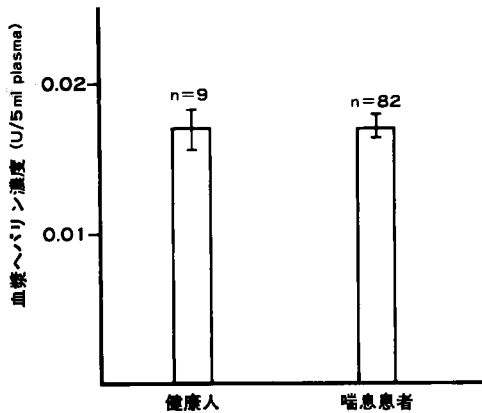


図3 気管支喘息患者の血漿ヘパリン濃度 — 健康人との対比 —

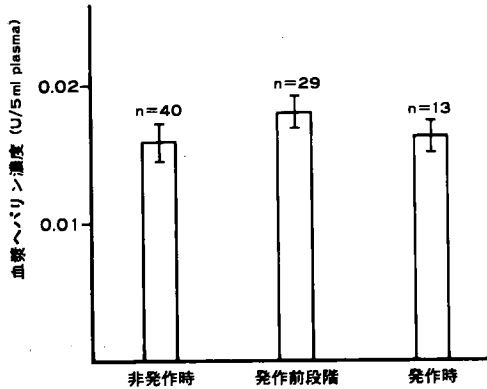


図4 気管支喘息患者の血漿ヘパリン濃度 — 発作との関連 —

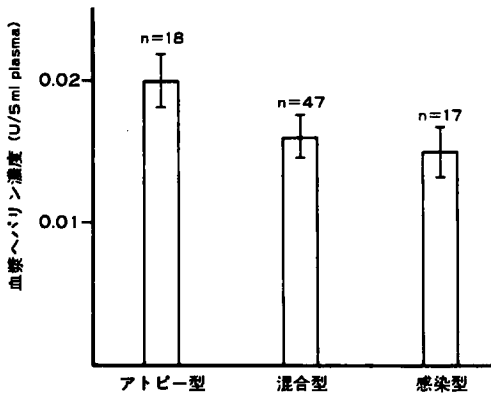


図5 気管支喘息患者の血漿ヘパリン濃度 — 喘息の型との対比 —

± S.E.M.) u/5 ml plasma であり、喘息患者56例につき、のべ82検体の平均は、 0.017 ± 0.0009 u/5 ml plasma で、両者間に全く差がみられなかった (図3)。

2) 喘息発作との関連

喘息患者の発作状態を、発作の有無により3段階、すなわち、非発作時、発作前段階 (発作前18時間内)、発作時に分類して検討を加えた。血漿 heparin 濃度は、非発作時の40例では平均 0.016 ± 0.0015 u/5 ml plasma であり、発作前段階の29例では平均 0.018 ± 0.0013 u/5 ml plasma、発作時の13例では平均 0.016 ± 0.0012 u/5 ml plasma であり、発作前段階において、やや高値を示す傾向がうかがわれたが、推計学的有意差は認められなかった (図4)。

3) 喘息の型との対比

Swineford の分類により、アトピー型、混合型、感染型に分類し検討した結果、アトピー型18例の平均は 0.020 ± 0.0018 u/5 ml plasma、混合型47例の平均は 0.016 ± 0.0017 u/5 ml plasma、感染型17例の平均は 0.015 ± 0.0018 u/5 ml plasma であり、アトピー型の血漿 heparin 値は高く、一方感染型では血漿 heparin 値は低くなる傾向が認められた ($p < 0.1$) (図5)。

4) 重症度との対比

日本アレルギー学会重症度判定委員会案にもとづき、気管支喘息患者を軽症、中等症、重症に分類して検討を行った。この際重症例18例中、1例を除くすべてが、ステロイド依存性喘息である。軽症15例の血漿 heparin 値は平均 0.018 ± 0.0017 u/5 ml plasma、中等症49例の平均は 0.017 ± 0.0011 u/5 ml plasma、重症18例の平均は 0.015 ± 0.0011 u/5 ml plasma であり、重症となる程、血漿 heparin 値が低値を示す傾向がうかがわれた (図6)。

これらの症例の状態を長期的にみて、発作のみられない無症期と、発作の頻発する有症期に分けて、重症度別に検討すると、軽症では、無症期9例の平均 0.020 ± 0.0025 u/5 ml plasma、有症期6例の平均 0.016 ± 0.0012 u/5 ml plasma であり、無症期に高値を示した血漿 heparin 値は、発作により低下する傾向がうかがわれた。中等症では、無症期25例の平均 0.017 ± 0.0019

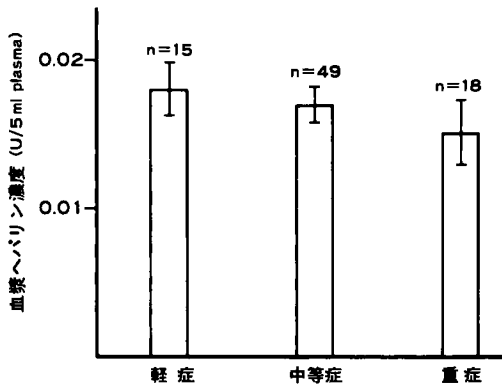


図6 気管支喘息患者の血漿ヘパリン濃度
—喘息の重症度との対比—

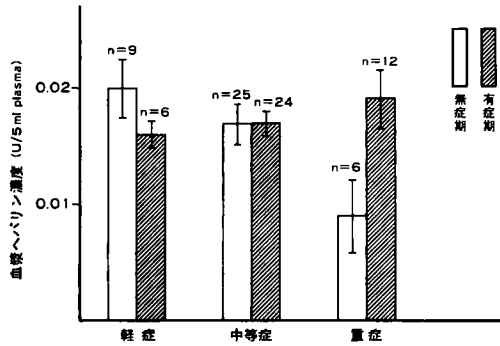


図7 気管支喘息の重症度別の無症期および有症期
における血漿ヘパリン濃度

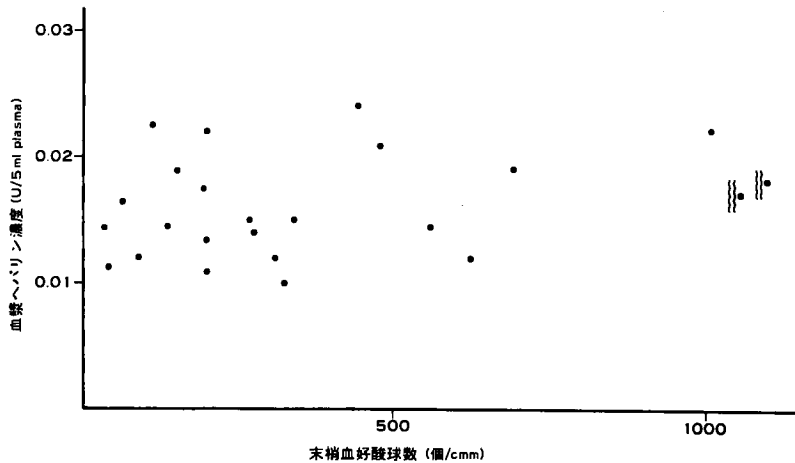


図8 気管支喘息患者における血漿ヘパリン濃度
—末梢血好酸球との関連—

u/5 ml plasma, 有症期24例の平均 0.017 ± 0.0011 u/5 ml plasma であり, 有意差は認められなかった. 一方重症例では, 無症期6例の平均 0.009 ± 0.0030 u/5 ml plasma であり, 軽症例の無症期に比し, 有意の低値を示した ($p < 0.05$). 有症期12例の平均は, 0.019 ± 0.0026 u/5 ml plasma であり, 重症例では, 無発作時低かった血漿 heparin 値が, 発作により有意に上昇する傾向が認められた ($p < 0.05$) (図7).

5) 好酸球, 好塩基球との関連

血漿 heparin 濃度と末梢血好酸球数との間には, 明らかな相関関係は認められなかった. 一方, 末梢血好塩基球数との間には, 正の相関関係がみられ, 推計学上も有意であることが認められた ($r = 0.484, p < 0.02$) (図8, 9).

6) 血清 IgE 値との関連

血漿 heparin 濃度と, 血清 IgE 値との間には, 明らかな相関関係は認め難かったが, 血清 IgE 値が 3000 u/ml 以上では, 血漿 heparin も高値を示す例が多かった (図10).

2. 静脈内投与された heparin の経時的観察

1) 健康人における血漿 heparin 濃度

健康人9例において測定した静注10分後の血漿 heparin 濃度の平均は, 1.82 ± 0.22 u/ml であり, 静注1時間後では, 平均 1.10 ± 0.12 u/ml, 静注2時間後では平均 0.67 ± 0.08 u/ml であった (表1). 平均値をプロットすると, 図11の如

く血中から消失して行くカーブが得られ、このグラフより計算したおよその半減期は1時間26

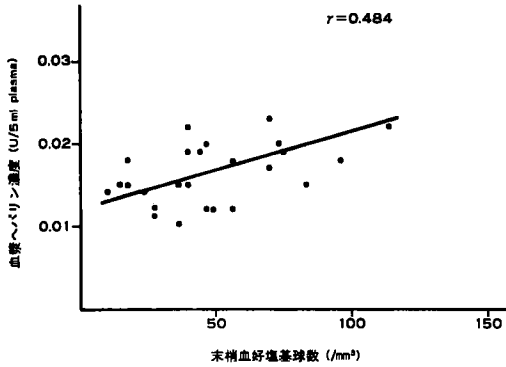


図9 気管支喘息患者における血漿ヘパリン濃度—末梢血好塩基球数との関連—

分であった。

これらの値より計算した、1時間後の残存率は62.3±4.1%、2時間後の残存率は37.6±3.4%であった(表2)。

2) 喘息患者における血漿 heparin 濃度、喘息発作による検討

気管支喘息患者24例において、発作時ないし、喘鳴の認められる時期に静注された heparin の血漿 heparin 濃度の推移を検討した結果、喘鳴のみ認められる8例の静注10分後の血漿 heparin 濃度の平均は2.08±0.20 u/ml であり、静注1時間後の平均は1.22±0.13 u/ml であり、静注2時間後の平均は0.52±0.06 u/ml であった。このグラフより計算したおよその半減期は、1時間18分であった。小発作例7例の静注10分後

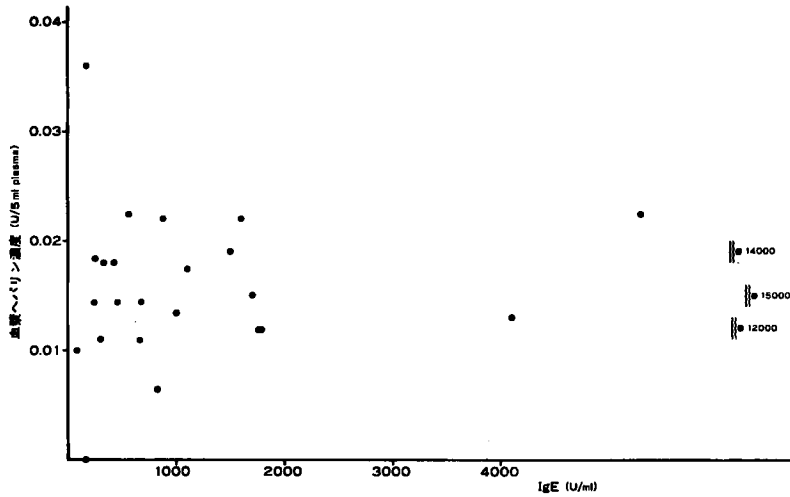


図10 気管支喘息患者における血漿ヘパリン濃度—IgEとの関連—

表1 ヘパリン静注後の血中濃度の推移

症例数	体重		静注10分後の血漿ヘパリン濃度 (U/ml)		静注1時間後の血漿ヘパリン濃度 (U/ml)		静注2時間後の血漿ヘパリン濃度 (U/ml)		
	Mean	S.E.M.	Mean	S.E.M.	Mean	S.E.M.	Mean	S.E.M.	
健康人	9	54.1	3.1	1.82	0.22	1.10	0.12	0.67	0.08
気管支喘息									
喘鳴のみ	8	53.1	1.7	2.08	0.20	1.22	0.13	0.52	0.06
小発作	7	52.9	1.6	1.84	0.24	1.09	0.17	0.51	0.07
中発作	6	54.2	2.4	1.69	0.18	0.97	0.12	0.47	0.07
大発作	3	53.0	2.5	1.45	0.13	0.78	0.12	0.26	0.05

表2 静脈内投与ヘパリンの1時間、2時間後の血漿中残存率
—健康人と気管支喘息発作強度との関係—

	症例数	1時間後の血漿中残存率 ⁽¹⁾		2時間後の血漿中残存率 ⁽²⁾	
		Mean	S.E.M.	Mean	S.E.M.
健康人	9	62.3	4.1	37.6	3.4
気管支喘息					
喘鳴のみ	8	59.9	4.4	25.7	2.3
小発作	7	58.8	4.0	27.5	2.4
中発作	6	56.9	2.0	27.4	3.3
大発作	3	52.7	3.8	17.6	2.3

(1) 1時間後の血漿中残存率 = $\frac{\text{静注1時間後の血漿ヘパリン濃度}}{\text{静注10分後の血漿ヘパリン濃度}} \times 100$

(2) 2時間後の血漿中残存率 = $\frac{\text{静注2時間後の血漿ヘパリン濃度}}{\text{静注10分後の血漿ヘパリン濃度}} \times 100$

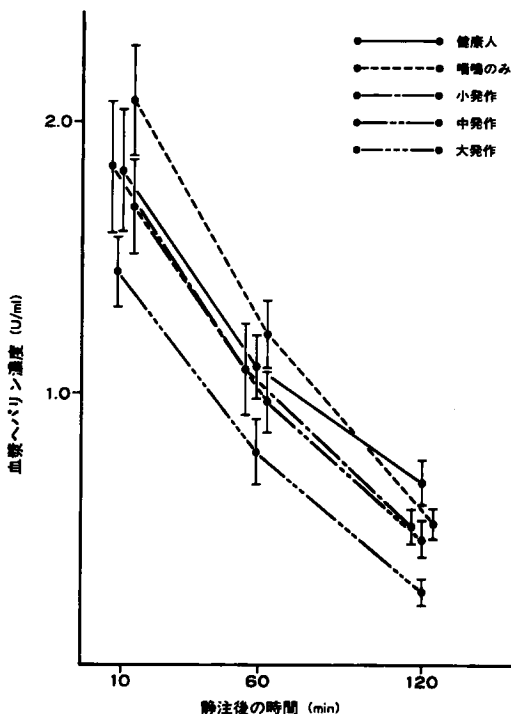


図11 ヘパリン静注後の血中濃度の推移

の血漿 heparin 濃度の平均は 1.84 ± 0.24 u/ml であり、静注1時間後の平均は 1.09 ± 0.17 u/ml であり、静注2時間後の平均は 0.51 ± 0.07 u/ml であり、半減期は約1時間17分であった。中発作例6例の静注10分後の血漿 heparin 濃度の平

均は 1.69 ± 0.18 u/ml であり、静注1時間後の平均は 0.97 ± 0.12 u/ml であり、静注2時間後の平均は 0.47 ± 0.07 u/ml であった。およその半減期は1時間16分であった。大発作例3例の静注10分後の血漿 heparin 濃度は 1.45 ± 0.13 u/ml であり、静注1時間後の平均は 0.78 ± 0.12 u/ml であり、静注2時間後の平均は 0.26 ± 0.05 u/ml であった。およその半減期は、1時間6分であった。健康人に比し、喘息患者は全般的に、静注 heparin の代謝が速やかである傾向がうかがわれた。なお、健康人および気管支喘息の各症例群間には、平均体重の有意差はみられなかった(表1, 図11)。

以上の値より計算した、静注 heparin の血漿中残存率は、喘鳴のみの例の静注1時間後では $59.9 \pm 4.4\%$ であり、静注2時間後では $25.7 \pm 2.3\%$ であった。小発作例の静注1時間後では $58.8 \pm 4.0\%$ であり、静注2時間後では $27.5 \pm 2.4\%$ であった。中発作例の静注1時間後の残存率は、 $56.9 \pm 2.0\%$ であり、静注2時間後では $27.4 \pm 3.3\%$ であった。大発作の静注1時間後では $52.7 \pm 3.8\%$ であり、静注2時間後では $17.6 \pm 2.3\%$ であった。健康人に比し喘息患者の方が、低い値をとる傾向にあり、静注2時間後の残存率は、中発作例を除く喘息患者各群において有意差が認められた(それぞれ、 $p < 0.02$, $p < 0.05$, $p < 0.1$, $p < 0.02$)。又、喘息患者間

では、大発作例において低い値をとる傾向にあり、静注2時間後において小発作に比し有意に低かった ($p < 0.05$)。又、喘鳴のみ、中発作例に比しては、有意ではなかったが、やや低い値を示した ($p < 0.1$) (表2)。

総括ならびに考案

生体内での heparin の合成および代謝については、なお不明な点が多い。生体内 heparin の供給源は、主に、heparinocyte である肥満細胞と、好塩基球である。両細胞の主に microsome 画分で生合成された heparin は高分子であり、代謝されて顆粒画分へ移行し、貯えられる。これらの細胞が刺激されると、細胞外に放出される。この際ある程度代謝された形で放出されるのではないかとする報告もある。放出された heparin は、組織で何らかの役割を果し、RES に取り込まれたり、好酸球の食作用を受けたり、また一部は血流に入る。ある程度代謝された形で血中に出現すると言われている⁷⁾。血中でも何らかの役割を果し、尿中に排泄されるが、一部は再び組織に取り込まれて、再合成される可能性もある。

生体内 heparin の抽出法は、現在まで種々の方法が報告^{4,8,9)}されている。組織を十分 homogenate し、phenol, methylalcohol, NaOH 等で、蛋白と共に沈澱させる方法が多く用いられて来た。そして蛋白分画を切り離すために、加熱、蛋白分解酵素による消化等の処置を加える。最近では、電気泳動法⁸⁾、affinity chromatography⁹⁾ による分離抽出方法も考えられている。市販 heparin も同様な処理を用いて抽出され、分子量 $6 \times 10^3 \sim 15 \times 10^3$ の多糖鎖が蛋白より切り離された形である。以上の方法は、かなり手荒な処理を行うところから、hard methods と呼べるかも知れない。

最近、rat の皮膚⁶⁾や肥満細胞¹⁰⁾から、その様な手荒な処理をすることなく、heparin 抽出を行い、polysaccharide を core に、多くの glycosaminoglycan 鎖が連なった、macromolecular (分子量 $75 \times 10^4 \sim 110 \times 10^4$) 物質が得られている。かゝる方法を、mild methods と呼ぶと、その様にして得られた heparin は、より天

然の heparin と言えるであろう。この様な heparin は、血液凝固阻止能は弱く、分子量が小さくなるほど、血液凝固阻止能が増大する傾向がある様である。

また、小さくなり過ぎると、血液凝固阻止能を失う¹¹⁾。著者らの用いた抽出法は、hard methods の一つであるが、抽出された試料を heparin 定量にかけの際、凝固阻止能を利用して行う場合には、hard methods が良いと言えるかも知れない。

一方、heparin 定量法としては、化学的な、ウロン酸を定量する方法¹²⁾、azure A や toluidin blue などの色素を使い、metachromasia を観察する方法⁸⁾、³⁵S などの isotope を heparin に取り込ませて放射能を調べる方法¹⁰⁾、anticoagulating time¹³⁾ または、anticoagulant time¹⁴⁾ を測定する方法の約5種類の定量法が用いられて来た。いずれも一長一短があり、Engelberg⁴⁾は、凝固阻止能でなく、metachromasia や、他の化学的定量法、isotope を使う方法などでは、heparin 以外のムコ多糖を主に捕捉する可能性のあることを指摘している。heparin が異なる分子量の混合物である点から、抗体作成などは出来ず、特異的で鋭利な測定法が見当たらないため、現在の所、微量測定が可能なのは、著者らの用いた anticoagulating time を測定する方法であると考えられる。

heparin は、血中では、好塩基球中に含まれているが、血漿 heparin 濃度については、なお一定の見解に達していない。Jaques⁸⁾等は、phenol で抽出し、metachromasia と antithrombin time で測定を試み、Gibson¹⁵⁾等は、photometric assay にて測定したが、捕捉出来なかったと報告している。一方、Astrup¹⁶⁾、Nilson¹⁷⁾、Charles¹⁸⁾、Engelberg¹⁹⁾等は、人血漿 heparin 濃度を測定している。Engelberg^{4,19)}は、人血漿より抽出された物質が、生理学的にも、生化学的にも heparin であることを証明し、 $0.15 \sim 0.18 \text{ u/ml plasma}$ ($1.5 \sim 1.8 \mu\text{g/ml plasma}$) の濃度であったと報告しており、heparin が血漿中に捕捉出来なかったという実験では、遊離の heparin のみ捕えているので、捕えられなかったのではないかと推測している。すなわ

ち、血中では、遊離の heparin は皆無に等しく、heparin がマイナスの荷電を多く持っているので、陽性物質—蛋白、血小板等—に結合して存在している。これらを全部回収するためには、蛋白分解酵素による蛋白の消化が、特に重要であると述べている。著者らは、Engelberg の抽出法によって、血漿 heparin を抽出し、anti-clotting time の一つである、Xa に対する拮抗作用を利用した Kit で測定し、健康人では 0.017 u/5 ml plasma (0.17 μ g/5 ml plasma) の結果を得た。喘息患者でもほぼ同様の結果であり、Engelberg に比し、かなり少量であった。Engelberg は定量法として、Ca 再加時間を用いており、著者の用いた Xa inhibitor を介する clotting time の測定方法とは異なること、今回の実験では、血小板の混入によるデータの変動を除くために、血小板乏血漿を採取、使用した点によるかと思われる。heparin が、血中では、血小板に付着しているという報告は多い^{4,7)}。

前述の mild methods によって抽出された heparin は、90% が血小板に付着していたとされている⁷⁾。また血小板第 4 因子との関係も問題になるとと思われる。

以上の如く、生理的に血中に存在する heparin の測定には、種々の問題が残されているが、今回の実験結果から、血漿 heparin 濃度の変動が喘息発作とある程度関連していること、また末梢血好塩基球数と、正の相関関係があることなどが明らかとなった。このことは、血漿 heparin が主として好塩基球に由来していることを示唆しているかも知れない。喘息発作においては、好塩基球はその stage により変動し、発作前段階で増加し、発作出現と同時に減少する²⁰⁾。また時期による検討では、発作の頻発する有症期に好塩基球は増加し、一方無症期には低値を示す²¹⁾。この様な末梢血好塩基球数の変動と、ほぼ同様の傾向は、重症例の血漿 heparin 濃度の無症期、有症期の比較において観察された。すなわち、重症例では、無症期に血漿 heparin 濃度は低値を示し、有症期には、無症期に比し高い値を示した。重症例の無症期に、血漿 heparin 濃度が極端に低いのは、副腎皮質ホルモンの投与による basopenia の状態を一部反映している

かも知れない。一方、軽症例の血漿 heparin 濃度は、有症期にむしろ無症期よりもや、低い値を示したが、これは有症期における好塩基球のアレルギー反応局所への遊走と関係があるのかも知れない。すなわち、重症例においても、軽症例においても、有症期に反応局所での heparin の消費は亢進しており、従って血漿 heparin 濃度は低下するのではないかと考えられるが、重症例においては、無症期に basopenia のため血漿 heparin 濃度が極端に低く、有症期では、好塩基球が増加傾向を示し、見かけ上血漿 heparin 濃度が増加してくるように見えるのではないかと推測される。このような気管支喘息における血漿 heparin 濃度についての報告は少ない。Vorkel²²⁾ らは、血漿 heparin 濃度は、アトピー性が強い程、また患者の重症度が増す程、低値を示し、発作により低下し、その低下の程度は、重症発作程甚しいと報告している。

生体への heparin 静脈内投与後の代謝についての検討は、血栓症患者の heparin 療法の monitoring のために、欧米その他で、多くの報告がみられる。heparin 静注後の血中濃度の経時的变化は、その測定方法により、多少違いがある様であるが、おおむね、初期の急激な下降があり、半減期は約 1 時間 30 分であり、その後、徐々に下降し、約 12 時間でほとんど 0 になる²³⁻²⁷⁾。しかし、脾、肝、消化管などには、血漿中よりも長くとどまり、18~24 時間認められると言う²⁵⁾。また、肥満細胞中にも取り込まれる様である。尿中には、抗凝固能が、静注後 2~4 時間認められるが、その後は消失し、多量の無機硫酸を排泄する²⁵⁾。以上の様な heparin の血中からの減少曲線から推測すると、heparin の血中からの消失は、一部は腎に排泄され、一部は組織中に取り込まれ、一部は RES に取り込まれるのであろうと考えられる。肥満細胞に取り込まれた分は、顆粒中の heparin 様物質に組み込まれるものと思われるが、RES に取り込まれた heparin が、貯えられるのか、代謝されるのかは不明である。いずれにせよ、気管支喘息患者においては、健康人に比し、血中 heparin 代謝が亢進していることが認められたが、これは反応局所での heparin 消費の亢進を反映している可

能性が強く、今後より詳細な検討が必要であると考えられる。

結 論

気管支喘息患者において、血漿 heparin、および、静脈内投与 heparin の血漿濃度の推移を測定し、血漿 heparin の代謝と、気管支喘息の病態との関連を検討し、次の結果を得た。

- 1) 血漿 heparin 濃度は、健康人、気管支喘息患者共、 $0.017 \text{ u/5 ml plasma}$ ($0.17 \mu\text{g/5 ml plasma}$) であった。
- 2) 血漿 heparin 濃度は、気管支喘息発作にある程度従って変動することがうかがえた。

3) 血漿 heparin 濃度は、末梢血好塩基球数と正の相関を示した。

4) 静脈内投与 heparin は、初期すみやかに減少し、その後徐々に減少した。半減期は約1時間20分であったが、喘息患者における減少が、健康人に比しより速やかであった。また、大発作時により速い傾向がうかがわれた。

稿を終るにあたり、御指導、御校閲を賜った恩師木村郁郎教授に深甚の謝意を表するとともに、終始御指導を賜った三朝分院内科谷崎勝郎教授に深謝します。また御協力いただいた中藤邦恵、黒瀬千代子、栗坂明美氏、および教室員各位に深謝します。

文 献

1. Ishizaka K and Ishizaka T : Identification of γE -antibodies as a carrier of reaginic antibody. *J Immunol* (1967) 99, 1187-1198.
2. Ishizaka T, Tomioka H and Ishizaka K : Degranulation of human basophil leukocytes by anti- γE antibody. *J Immunol* (1971) 106, 705-710.
3. Criepp LH : The immunoresponse: Mechanism of tissue injury, chemicalmediators ; in *Clinical Immunology and Allergy*, 2nd Ed, Criepp ed, Grune and Stratton, New York (1969) pp. 86-91.
4. Engelberg H, Dudley A and Freeman L : An improved method for the determination of plasma heparin. *J Lab Clin Med* (1955) 46, 653-656.
5. Jorpes JE : Heparin, its chemistry, phaymacology and clinical use. *Am J Med* (1962) 33, 692-702.
6. Horner A A : Maclomolecular heparin from rat skin. *J Biol Chem* (1971) 246, 231-239.
7. Horner A A : Demonstration of endogenous heparin in rat blood. *Febletters* (1974) 46, 166-170.
8. Monkhouse F C and Jaques L B : An improved method for the extraction of heparin from blood. *J Lab Clin Med* (1950) 36, 782-791.
9. 五十嵐紀子, 大久保由子, 吉田良子, 浅田敏雄, 小原武博, 松本光民 : 負荷ヘパリンの血中動態. *生化学* (1974) 46, 568.
10. Yurt RW, Leid RW, Spragg J and Austen KF : Immunologic release of heparin from purified rat peritoneal mastcells. *J Immunol* (1977) 118, 1201-1207.
11. Laurent T C : Studies on fractionated heparin. *Arch Biochem Biophys* (1961) 92, 224-231.
12. Bitter T and Muir H M : A modified uronic acid carbazole reaction. *Anal Biochem* (1962) 4, 430-435.
13. Blombäck M, Blombäck B, Olson P and Suendson L : The assay of antithrombin using a synthetic chromogenic substrate for thrombin. *Thromb Res* (1974) 5, 621-628.
14. Kaplan A P and Austen K F : A prealbumin activator of prekallikrein. II. Derivation of activators of prekallikrein from active Hageman factor by digestion with plasmin. *J Exp Med* (1971) 133, 696-712.

15. Gibson RB, Carr TL, Green S and Fowler WM : Photometric assay of plasma heparin. *Proc Soc Exp Biol Med* (1952) **79**, 577-580.
16. Astrup P : On the determination of heparin in blood plasma and urine. *Acta pharmacol Toxicol* (1947) **3**, 165.
17. Nilson IM and Wenckert A : Demonstration of a heparin-like anticoagulant in normal blood. I. human blood. *Acta Med Scand* (1955) **150**, 1-16.
18. Charles AF and Scott DA : Studies in heparin I. The preparation of heparin. *J Biol Chem* (1933) **102**, 425-429.
19. Engelberg H : Plasma heparin levels in normal man. *Circulation* (1961) **23**, 578-581.
20. 木村郁郎, 守谷欣明, 西崎良知, 谷崎勝朗 : 気管支喘息における好塩基球の臨床的意義. *アレルギー* (1968) **17**, 558-561.
21. 木村郁郎, 谷崎勝朗 : 気管支喘息における好塩基球の変動と発作閾値について. —ステロイドホルモン投与時の変動を含めて—. *アレルギー* (1970) **19**, 605-612.
22. Vorkel Y B and Danilyak I G : Heparin metabolism disorders in patients with bronchial asthma. *Sov Med* (1974) **37**, 25-29.
23. Loomis TA : Distribution and Excretion of heparin. *Proc Soc Exp Biol Med* (1961) **106**, 490-492.
24. Estes J W and Poulin P F : Pharmacokinetics of heparin. Distribution and elimination. *Thromb Diath Haemorrh (Stuttg)* (1974) **33**, 26-37.
25. McAllister B M and Demis D J : Heparin metabolism : Isolation and characterization of uroheparin. *Nature* (1966) **212**, 293-294.
26. Perry P J, Herron G R and King J C : Heparin half-life in normal and impaired renal function. *Clin Pharmacol Ther* (1974) **16**, 514-519.
27. Harris P A and Harris K L : Kinetics of heparin removal from circulation of the minipig. *J Pharm Sci* (1974) **63**, 138-139.

Studies on heparin in allergic reactions**2. Plasma concentration of heparin in bronchial asthma****Hatsuko ONO****The 2nd Department of Internal Medicine, Okayama University Medical School****(Director : Prof. I. Kimura)**

To observe the participation of heparin in asthma attacks, plasma concentrations of heparin were estimated in asthmatic subjects. Changes in the plasma concentration of heparin after intravenous administration were also examined during asthma attacks. The mean plasma concentration of heparin was 0.017 u/5 ml in healthy subjects, and 0.017 u/5 ml in the non-attack stage, 0.018 u/5 ml in the pre-attack stage and 0.016 u/5 ml in the attack stage of bronchial asthma patients. The plasma concentration of heparin in the mild cases of asthma was higher in the attack-free period than in the attack period, while the plasma concentration of heparin in the severe cases of asthma was significantly lower in the attack-free period than in the attack period. There was a significant correlation between the plasma concentration of heparin and the peripheral basophil count. The time-dependent reduction in plasma heparin after intravenous administration was more remarkable in asthmatic subjects than in healthy subjects, and the reduction was most remarkable in the large attack stage of asthma.

The half-reduction time of the plasma heparin concentration after intravenous administration was 1 h and 20 min.