Fibrinogen (FgDP)-硫酸プロタミン複合体に関する研究

小杉 忠誠* 金城 清勝* 荒武 八起**
大龍 幸哉** 高木 一平*** 美原 恒***

Studies on complex of fibrinogen (FgDP)
-protamine sulphate

Tadayoshi KOSUGI*, Kiyokatsu KINJO*, Yatsuki ARATAKE**,
Sachiya OHTAKI**, Ippei TAKAGI*** and Hisashi MIHARA***

Key words: complex of fibrinogen (FgDP)-protamine, crossed
immuno-electrophoresis, enzyme-labelled antibody
method, deposition of fibrinogen-related substance

In order to clarify the pathophysiological significance of the fibrinogen (FgDP)-protamine complex, the interaction of protamine sulphate with fibrinogen was studied in vitro and in vivo.

The insolubilization of fibrinogen, FgDP-X and FgDP-Y were induced by protamine sulphate in vitro.

Furthermore, the fibrinogen (FgDP)-protamine complex could be observed in the circulating blood of rabbits by means of the crossed immuno-electrophoresis of plasma after the intravenous administration of the excess protamine sulphate to rabbits.

On the histopathological observations, the intravenous administration of the excess protamine sulphate caused the deposition of fibrinogen-related substance into the glomerular capillary and Bowman's capsule of kidney of rabbits.

* 琉球大学医学部生理学講座〔〒900 那覇市与儀 585〕, Department of Physiology, School of Medicine, University of the Ryukyus, Naha, Japan.

** 宮崎医科大学附属病院中央検査部, Central Laboratory of Clinical Investigation, Miyazaki, Japan.

*** 宮崎医科大学生理学第Ⅱ講座, Department of Physiology, Miyazaki Medical College, Miyazaki, Japan.

緒 言

硫酸プロタミン（以下 PS と略す）はヘパリンの中和薬剤として臨床的に広く用いられている。一方、プロタミンは塩基性蛋白質であり、これに類似の物質がヒト生体内に広く分布している。われわれはプロタミンのもつ病態生理学的意義を明らかにする目的にて、まず臨床場面で用いられている PS と血漿蛋白質の相互反応について、試験管内および動物実験にて検討し PS の過剰、頻回投与にて生じる病態の一端を明らかにし得たので報告する。

I. 実験方法

① 試験管内実験：ヒト fibrinogen は Sigma 社製の clottable protein 95% のものを用いた。PS は Sigma 社製 Grade I を生理的食塩水に溶解して用いた。プラスミンはミドリ十字社製の UK-plasmin を用いた。抗ヒト fibrinogen 抗体は Behringwerke 社製のものを用いた。FgDP の作製は藤巻等の方法に準じ¹⁾、各分画の単離には Raganon & Villa の方法を用いた²⁾。SDS-polyacrylamide gel electrophoresis は永井の方法に準じた。各種血漿蛋白質と PS の相互反応に際しては、健常者 5 名から pooled plasma を作製し、PS との反応後上清液中の蛋白質を

測定した。各種血漿蛋白質の定量には Behringwerke 社製 M-Partigen を用いた。交叉免疫電気泳動は Ganrot³⁾、松橋等の方法に準じた。

② 動物実験：実験動物として雄性家兎 3 kg のものを用いた。ヘパリンはミドリ十字社製 Heparin Na, PS は清水製薬製のものを用いた。循環血中 fibrinogen (FgDP)-PS 複合体の検出を行うために、まず耳静脈よりヘパリン 600 U を投与し、その後 PS 3 mg を 5 分間隔にて連続投与した。投与後反対側耳静脈より採血し、血漿分離後プロトロンビン時間、活性化部分トロンボプラスチン時間を測定した。さらに経時的に得られた血漿を Cappel Laboratory 製抗ウサギ fibrinogen 抗体を用いた交叉免疫電気泳動にて解析した。PS の大量頻回投与後の血管変化を追求するために、家兎にヘパリン 600 U, PS 12 mg を 3 週間連続投与し腎組織の病理組織学的観察を行った。fibrinogen および fibrin 関連抗原物質の血管壁等への沈着を観察するために、Curran, R.C., Sinclair, R.A. 等⁴⁾の方法に準じた酵素抗体法を用いた。

II. 実験結果

① Fibrinogen (FgDP) の PS による不溶化。

fibrinogen, および FgDP の各分画 (0.5 mg/

Fig. 1 The effect of increasing concentration of protamine sulphate on the crossed immunoelectrophoretic profile of fibrinogen (FgDP). Upper figure: crossed immunoelectrophoretic profile of fibrinogen (Fib) (left plate), FgDP-Y (Y) (middle plate), FgDP-D, E (right plate). Lower figure: crossed immunoelectrophoretic profile of the mixture of protamine sulphate and Fib (left plate), FgDP-Y (middle plate), FgDP-D, E (right plate). Arrows in the plates indicate the complex of fibrinogen (FgDP)-protamine sulphate.

ml) と PS (0.5 mg/ml) の混合液では, fibrinogen, FgDP-X, FgDP-Y 分画に白色沈殿を認めた. また混合液上清への回収率は, fibrinogen では0.7%, FgDP-Xでは3.2%, FgDP-Y では 6.3%, FgDP-D, E 分画では PS との混合液にて沈殿は認められず, 上清への回収率は95.1%であった. 正常血漿と PS (10mg/ml) の等量混合液では, 3,000 rpm, 15 分間遠心後その上清中の各種血漿蛋白質量を測定した. その結果, albumin, haptoglobin, β -lipoprotein 等の上清への回収率は 90% 以上であったが fibrinogen のみが33%であった.

② Fibrinogen (FgDP)-PS 複合体の検出.

fibrinogen (3.4 mg/ml), FgDP-Y (1.5 mg/ml), FgDP-D (880 μ g/ml), FgDP-E (500 μ g/ml) 分画それぞれに PS (50 μ g/ml) を等量混じた試料の交叉免疫電気泳動を行った. その結果, fibrinogen, FgDP-Y, FgDP-D 分画と PS の混合液では, それらの単独での泳動像とは異なり2峰性の泳動像が観察された(図1). 一方, 家兎にヘパリン, PS を連続投与し循環血中に複合体の出現が認められるか否かを検討した. 図2に示したごとく, APTT, PT がヘパリン投与前値に回帰した時点で,すでに fibrinogen およびその関連抗原物質と PS 複合体の出現が認められた. さらに, PS 投与量の増加に伴い複合体の出現が顕著となった.

③ 病理組織学的観察

PS 投与群では対照群に比して, 腎尿細管管腔の拡張, 細胞の立方化が著明に認められた. また, 糸球体の約30%に多核白血球の浸潤がみられた. 酵素抗体法ではボーマン氏囊の一部, 毛細血管の一部に fibrino-

Fig. 2 The crossed immunoelectrophoretic profile and coagulation activity of rabbit plasma after the injection of heparin and protamine sulphate. After 600 U of heparin was injected into the earvein of rabbit, protamine sulphate was successively injected following the schedule as shown in the upper part of this figure. The blood sampling was procedured from the earvein at five minutes interval after these injections.

Fig. 3 Histopathological findings of Bowman's capsule in rabbit by enzyme-labelled antibody method. ($\times 400$).

To rabbits, 600 U of heparin Na and 12 mg of protamine sulphate were injected into the earvein on six successive days each week for periods ranging from 1 to 3 weeks.

Arrow in the photomicrograph indicates the deposition of antigen-related substance of fibrinogen in the Bowman's capsule of rabbit receiving the injection of heparin and protamine sulphate for 3 weeks.

gen 関連抗原物質の沈着がみられた (図 3)。

III. 考案および結語

血漿蛋白質と PS との相互反応にて、ほぼ選拓的に fibrinogen およびその関連抗原物質との不溶性複合体形成が認められた。また循環血中では、ヘパリン中和量よりも過剰量の PS 投与にて、これら複合体は増量し腎糸球体毛細血管腔等への沈着を引きおこす可能性が示唆された。

文 献

- 1) 藤巻道男, 池松正次郎, 竹内 泉, 加藤正俊:
FDP の検査と臨床的意義。臨床病理, 21(2);

930~940, 1972.

- 2) Raganon, E. and Villa, V.: Degradation of human fibrinogen by plasmin. Isolation and partial characterization of an early degradation product. Haemostasis, 7; 26~34, 1978.
- 3) Ganrot, P.O.: Crossed immunoelectrophoresis. Scand. J. Clin. Lab. Invest., 29 (Suppl. 124); 39~41, 1972.
- 4) Sinclair, R.A., Burns, J. and Dunnill, M.S.: Immunoperoxidase staining of formalin-fixed, paraffin-embedded, human renal biopsies with a comparison of the peroxidase-antiperoxidase (PAP) and indirect methods. J. Clin. Pathol., 34; 859~865, 1981.

●細胞分化の正常と異常!

血液細胞の分化と増殖—基礎と臨床—

編集 自治医科大学学長 中尾喜久 自治医科大学教授 高久史磨
専門医21氏分担執筆

A 5 判 251頁 図126 表47 定価4,800円(千200円)

血液細胞とその分化は近年における血液学の中で最も目覚ましい発展をとげた分野である。造血臓器では分化という過程が胎生期のみならず成体にも営まれ、現在医学の当面している重大な問題である「細胞の癌化」にも密接な関係をもっている。本書は今までの歴史的展望、世界の現況を概説し、わが国での第一線の優れた研究をまとめた良書である。

●内容: 1. 幹細胞研究の歴史的展望, 2. 骨髄増殖性疾患における幹細胞の変動, 3. 小児血液疾患における造血幹細胞の動態, 4. Erythropoietin研究の最近の進歩, 5. 赤血球系細胞の分化, 6. 造血幹細胞の増殖分化機構の異常としての白血病発症機構の実験的研究, 7. 尿エリトロポエチンの免疫化学的研究, 8. 造血幹細胞の増殖に及ぼす各種異種抗血清の影響, 9. 無形成骨髄の造血回復機構—大動脈吻合パラボージスによる白血球分化の研究—, 10. 造血の“場”の概念とその役割, 11. 造血細胞のピリミジン代謝調節, 12. 造血細胞のDNA合成の調節, 13. T-リンパ球の分化, 14. ヒトリンパ系細胞の分化と成熟—臨床例の検討からの考察—。