プロタミンの血管拡張作用に及ぼすpHの影響

紮 野 繁 雄* B. K. Dam* 瀧 川 千鶴子*
今 井 真* 釧 物 修*

心臓手術時などにヘパリンの中和薬として用いるプロタミンは、しばしば低血圧を引き起こし血行動態の悪化の誘因となる。いくつかの機序が考えられてきたが、血管内皮を介した平滑筋の拡張が低血圧の主な作用機序として、最近注目されている。しかし、その詳細はいまだ不明である。プロタミンは塩基性ペプチドであり、その作用はpHの影響をうけることが予測される。われわれはpHの変化によりプロタミンの血管作用がどのように修飾されるかにつき検討した。

方法：エーテル麻酔下に平均12週齢のオスSDラットの胸部大動脈を速やかに摘出し、4-5mm 幅の血管リング標本作製した。実験1.として、37°C に保たれたKrebs 液を有する恒温槽中に摘出標本を懸垂し、95% O₂, 5% CO₂ により酸素化した。初期負荷を4gとし、その等尺性収縮、弛緩を測定、記録した。血管内皮を機械的に除去し：アセチルコリンによる拡張が消失した内皮除去群および内皮を温存してアセチルコリンによる拡張を確認した内皮温存群に分けた。3×10⁻⁷M のフェニレフリンで前収縮させたのち、10⁻⁹M ~10⁻⁵M のプロタミンを累積的に滴下して血管拡張させ、両群における用量反応曲線を得た。実験2.として、pHメーター下に1N NaOH を滴定してpH7.8 ~7.0 の

範囲で五段階に調整されたHEPES(N-[2-hydroxyethyl] piperazine-N'-[2-ethane-sulfonic acid]) buffer¹⁾を用い、内皮を温存した血管リングに対する100, 200 そして 400 μg/ml濃度のプロタミンの効果を観察した。同様に内皮を温存した血管リングを用い、アミノ酸の一種であるL-arginine (Sigma) の作用を検討した。得られたデータに対しては、対応のある、あるいは対応のないt-検定を用いて統計処理をおこなった。

結果：実験1 の内皮を有する群ではプロタミンによる dose-dependent な血管拡張を認めた。フェニレフリンによる収縮を100%として、10⁻⁹, 10⁻⁸, 10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵M においてそれぞれ、3.9 ± 3.9, 15.2 ± 11.1, 22.6 ± 15.4, 29.4 ± 14.8, 52.1 ± 21.6 % (mean ± SD, N=10)の拡張を示した。一方、内皮を除去した群では10⁻⁹~10⁻⁶Mの間では有意の変化を認めず、10⁻⁵M で平均11%の拡張を認めるに止まった。10⁻⁹ ~10⁻⁵M のいずれの濃度においても群間に有意の差を認めた(p<0.001)。実験2 の結果、内皮が温存された血管リングに対するプロタミンの拡張作用は緩衝液のpHにより明らかな変化を示した。すなわち、100, 200, 400 μg/ml濃度のプロタミンに対する血管拡張の割合は、pH7.8 で0.0 ± 0.0, 0.0 ± 0.0, 14.2 ± 1.7%, pH7.6で3.8 ± 3.9, 10.8 ± 6.6, 30.8 ± 11.4%, pH7.4 で9.1 ± 1.5, 23.3 ± 1.1, 58.1 ± 29.7%, pH7.2 で12.9 ± 4.4, 21.7 ± 3.5, 42.7 ± 1.9%, pH7.0 では22.2 ± 3.0, 77.8 ± 5.4, 92.0 ± 4.3% (mean ± SD, N=5 each)であり、pHが低くなるほどプロタミンの血管拡

* 北海道大学医学部附属病院麻酔科
〒060 札幌市北区北14条西5丁目

張作用は有意に増強した。一方、L-arginineによる血管作用は、いずれの条件のpHにおいても全く観察されなかった。

考察：人工心肺離脱時のプロタミン拮抗により、急激な低血圧や一過性の肺高血圧が生じることが以前より報告されている。しかしその発生機序は単一ではなく²⁾、プロタミン単独あるいはヘパリン・プロタミン複合体によるとする説、補体の活性化、トロンビンのrecharging作用によるアナフィラキシー説、抗原抗体反応に基づくアレルギー反応説などがあり、いまだ十分には解明されていない。また低血圧の発生は不定であり、患者の状態やプロタミンの投与速度にも関連していると推定される³⁾。

近年、血管内皮細胞由来の血管弛緩因子として一酸化窒素(NO)の働きが注目されており、NOを産生するNO合成酵素の基質としてL-arginineが知られている。一方、プロタミンはサケやニシンなどの精子の頭部に結合している平均分子量5,000ないし6,000の炭素塩基であり、その約67%がarginineにより構成される塩基性の強いポリペプチドである。プロタミン投与が血管内皮にあるNO合成酵素に基質としてのL-arginineを供給しているのではとの仮説が考えられるが、L-arginineが、少なくとも急性には全く血管拡張作用を示さなかったわれわれの実験結果からもその仮説は容易に否定できる。Pearsonら⁴⁾は、血管内皮上にプロタミン受容体を仮定し、NO合成系がプロタミンまたはプロタミン・ヘパリン複合体により刺激されてNOが産生され、結果として血管平滑筋の弛緩が起ると説明している。しかしプロタミン受容体は全くの仮説にすぎず、その実体はいぜん不詳である。

精子が卵細胞表面に達すると細胞膜に変化が起り、局所的に細胞質カルシウム濃度の増加がみられ、細胞内にシグナルが送られる。この受精現象は受容体に基づくというよりはプロタミンの持つ強塩基という特性が重要と考えられる。血管内皮細胞膜にあって陰性荷電したproteoglycanや酸性glycoproteinはイオンの通過を制御しているこ

とが知られている⁵⁾。

一般に塩基性化合物はpHが低いほど完全に解離してイオン化する。アシドーシスの程度が大きいほどプロタミンの血管拡張作用が強く観察されたことから、イオン化の状態が強いプロタミンが、より強い血管拡張を示したと推測される。塩基性蛋白であるプロタミンが血管内皮の陰性荷電を低下させて肺毛細血管透過性を増したり、あるいは膜にあるglycoproteinの配列を乱してイオンチャネルのサイズを増したり、膜にある陰性荷電部位を中和することにより内皮細胞へ情報伝達する機序が推定される。ただし、分子量の小さいL-arginineにはなんの効果も得られなかったことから、電気的な結合のみならず、同時にポリペプチドとしてのプロタミンの3次元構造が膜上における情報伝達には必須と考えている。結論として、プロタミンによる血管拡張は内皮依存性であることがフェニレフリン収縮下のラット大動脈標本にても追認された。さらにその血管拡張作用がpHにより大きく修飾され、アシドーシス環境下ではプロタミンの血管拡張作用が増強されることが示唆された。

文献：

- 1 Good, NE et al: Hydrogen ion buffers for biological research. *Biochemistry* 5:467, 1966
- 2 Horrow, JC: Protamine: A review of its toxicity. *Anesth Analg* 64:348, 1985
- 3 飴物修ほか：開心術時のheparin および protamine の心ポンプ機能に対する効果. *臨床薬理* 14:115, 1983
- 4 Pearson PJ et al: Protamine releases endothelium-derived relaxing factor from systemic arteries. A possible mechanism of hypotension during heparin neutralization. *Circulation* 86:289, 1992
- 5 Coyle AJ et al: Cationic proteins alter smooth muscle function by an epithelium-dependent mechanism. *Am J Physiol* 74:1761, 1993