陽性荷電蛋白硫酸プロタミンの肺損傷指標値に及ぼす影響

長谷川直樹^{*1)}, 石坂彰敏^{*2)}, 佐山宏一・浦野哲哉・仲村秀俊・
坂巻文雄・田坂定智・鈴木幸男・金沢 実・川城丈夫^{*1)}

Effects of protamine sulfate on the parameters of acute lung injury

We investigated the effects of cationic protein, protamine sulfate, on pulmonary extravascular lung water and pulmonary capillary permeability in guinea pigs. Twenty mg/kg of protamine sulfate was injected intravenously followed by 5 mg/kg/hr continuous infusion. We used lung wet-dry weight ratio (W/D) as a parameter of extravascular lung water and ¹²⁵I-albumin lung tissue plasma ratio (albumin leak: AL) as a parameter of vascular permeability. Plasma total protein was decreased by 15 minutes after the protamine bolus injection and remained low until the end of the experiment. Hematocrit was increased by 60 minutes after protamine bolus and remained high. However, W/D and AL did not change significantly.

These findings suggest that protamine sulfate did not change pulmonary capillary permeability although it might increase systemic capillary permeability in guinea pigs.

Naoki Hasegawa^{*1)}, Akitoshi Ishizaka^{*2)},
Kouichi Sayama・Tetsuya Urano・
Hidetoshi Nakamura・Fumio Sakamaki・
Sadatomo Tasaka・Yukio Suzuki・
Minoru Kanazawa・Takeo Kawashiro^{*1)}

key words: *protamine sulfate, lung injury, pulmonary edema, pulmonary vascular permeability, electorical charge*

血管内皮細胞の表面は、ヘパリン様物質をはじめとする陰イオンの存在により陰性に荷電している^{1,2)}。また肺胞隔壁の基底膜は肺血管内皮細胞側が陽性に、肺胞上皮細胞側が陰性に荷電していることが知られている³⁾。生体内 pH の下ではアルブミンをはじめとする血漿蛋白の多くは陰性に荷電しており⁴⁾、血漿蛋白の肺間質や肺胞腔への漏出防止に電気的な力として関与している可能性が指摘されている^{3,5)}。

近年、肺微小血管傷害の機序の一つとして陽イオンによる肺血管内皮および基底膜の陰性電荷の中和作用が指摘されている^{6,7)}。ヘパリンの中和

剤として臨床的にも広く使用されている硫酸プロタミンは陽イオンである⁸⁾。灌流肺を用いた実験では硫酸プロタミン投与により肺血管透過性亢進、肺水分蓄積が生じたと報告されている⁹⁾。また Vehaskari らは、あらかじめ腎臓を摘除したラットにプロタミンを投与することにより血漿アルブミン、血管内水分が血管外に移動したと報告している¹⁰⁾。いずれの実験も灌流肺や腎摘出という特殊環境で行われたものである。

本実験では硫酸プロタミンをモルモットの静脈内に投与し、*in vivo* で肺血管外水分量と肺血管透過性に及ぼす影響を検討することを目的とした。

実験動物

Hartley 系の SPF (specific pathogen free) 雌モルモット (体重 800~1,100 g) 28 匹を用いた。生理食塩水 (以下、生食と略) を投与した対照群 (n=12) と、硫酸プロタミン (以下、プロタミン記) を投与したプロタミン群 (n=16) にわけた。さらに、生食およびプロタミン投与後の観察時間によりそれぞれ 1 時間群と 4 時間群の 2 群にわけた。

方法

石坂らによるモルモットを用いた急性肺損傷モデルを用いた¹¹⁾。実験開始 18 時間前にケタミン 100 mg/kg とキシラジン 5 mg/kg を筋注してモルモットを麻酔した。頸部を正中切開して右頸動脈と右頸静脈にカテーテルを挿入、留置した。動脈カテーテルとして 18 ゲージのアーガイル・メジカット・カテーテル (日本シャーウッド社) を、静脈カテーテルとして IV-45 アトム Y 管付翼状針付チューブ (アトム社) を用いた。モルモットが麻酔から覚醒して状態が安定した翌日、以下の実験を行った。

＜実験プロトコール＞

(1) 4 時間群

対照群 (n=6) とプロタミン群 (n=8) について

^{*1)} Department of Medicine, School of Medicine, Keio University 慶應義塾大学医学部内科学教室

^{*2)} Department of Internal Medicine, Kawasaki City Ida Hospital 川崎市立井田病院呼吸器内科

て、それぞれ実験開始 10 分前に頸動脈カテーテルより 5 ml の採血を行った。自家赤血球の ^{51}Cr 標識を行い、さらに自動血球計数装置(K-1000 Sysmex 社)を用いてヘマトクリット(以下 Hct)、白血球数、血小板数を求め、Biuret 法¹²⁾により血漿総蛋白量(以下、TP)を測定した。動脈カテーテルを経て平均動脈圧(mean arterial pressure; 以下、MAP)を測定した。時間 0 に対照群には生食 2 ml/kg を、プロタミン群には 20 mg/kg のプロタミンを静脈内に投与した。実験中補液として頸静脈カテーテルより 37°C に加温した生食を 25 ml/kg/hr 持続投与した。プロタミン群には投与量が 5 mg/kg/hr となるようにプロタミンを上記生食に配合して投与した。5 分、15 分、60 分、120 分、180 分に MAP を測定したあと 2 ml の動脈血を採取し TP を求めた。180 分に透過性マーカーとして ^{125}I 標識モルモット・アルブミン 74 kBq を静脈内に投与した。

また、検体に混入する血液の影響を補正するため、血液マーカーとして ^{51}Cr 標識自家赤血球 18.5 kBq を同時に静脈内に投与した。実験終了 2 分前に 2 ml の動脈血を採取し TP を測定した。1,000 単位のヘパリン酸ナトリウム溶液を静脈内に投与したあと、2 ml の KCl を静脈内投与して屠殺してただちに開胸した。両側肺門部にそれぞれ 2 本の鉗子をかけてその間を切断し、両肺を摘出した。肺門部を下にして摘出肺を紙タオルの上に置き脱血させた。

(2) 1 時間群

実験開始 3 時間前に 3 ml、10 分前に 2 ml の動脈血を採取し、それぞれ自家赤血球の ^{51}Cr 標識と Hct, TP を測定するために用いた。実験開始直前に ^{125}I 標識モルモット・アルブミンおよび ^{51}Cr 標識自家赤血球を投与した。時間 0 に対照群(n=6)に生食 2 ml/kg、プロタミン群(n=8)に 20 mg/kg のプロタミンを静脈内に投与した。その後 15 分ごとにそれぞれ 2 ml の動脈血を採取し、Hct, TP を求めた。4 時間群と同様に動物を処置して両肺を採取した。

(3) 肺組織の重量およびガンマ線量の測定

両側中葉と下葉をそれぞれ秤量済みのガラス管に移し、化学天秤(Analytical balance AE 100 Mettler)を用いて重量を測定し、肺組織湿重量を計測した。

図 1 Changes in mean arterial pressure (MAP)

Sharp increase in MAP was observed 5 minutes after protamine bolus injection.

○: saline control group. ●: protamine group

** : $p < 0.01$ as compared with the saline control group

図 2 Changes in peripheral white blood cell (WBC) counts and platelet counts

○: saline control group. ●: protamine group

** : $p < 0.01$ as compared with the saline control group

肺組織のガンマ線量をウェル型ガンマ線カウンタ(ARC-300 アロカ社)を用いて測定した。計測にあたり ^{125}I のエネルギーピーク 35 keV に対して 16~71 keV, ^{51}Cr のエネルギーピーク 320 keV に対して 250~423 keV の閾値を設定した。ガンマ線のクロストークの影響を補正し、それぞれの核種からのガンマ線絶対量を算出して、単位肺湿重量当りのガンマ線量を算出した。肺組織を真空定圧乾燥システム (Vacuum drying oven DP 22 ヤマト科学および Handy aspirator model WP-15 ヤマト科学)を用い、90°C, 20 cmHg の陰圧

表 1 Hematocrit and plasma total protein (TP) at baseline

	n	Hct(%)	TP(g/dl)
1 hour group			
saline	6	34.6 ± 0.9	4.8 ± 0.1
protamine	8	33.9 ± 1.3	4.7 ± 0.2
4 hour group			
saline	6	38.3 ± 1.0	5.0 ± 0.1
protamine	8	37.2 ± 1.4	5.1 ± 0.2

Values are given in mean ± SEM.

下で96時間真空乾燥し、肺組織乾燥重量を測定した。

(4) 急性肺損傷指標値の算出

肺内水分蓄積の指標として、肺組織湿重量の乾燥重量に対する比(肺組織湿乾重量比:W/D)を求めた。さらに肺微小血管透過性の指標として、単位血漿重量当りの ^{125}I アルブミン計数に対する単位肺湿組織重量当りの ^{125}I アルブミン計数の比(albumin leak:AL)を求めた。

(5) 放射性標識化合物の作成

クロラミンT法を用いてモルモット・アルブミン(A-6539; Sigma 社)を ^{125}I で標識した¹³⁾。セファデックス G75 を満たしたミニカラムを用いて遊離 ^{125}I を除いた。10%の三塩化呉酸を用いて実験前後に測定した ^{125}I とアルブミンの結合率はいずれも99%以上であった。Gray らのアスコルビン酸還元法を用いて自家赤血球を ^{51}Cr で標識した¹⁴⁾。

統 計

本文中および図表中の成績をすべて平均値±平均標準誤差(SEM)で示した。Studentのpaired t-testまたはnon-paired t-testを用いて検定を行い、t分布表において危険率5%未満の場合を有意差ありと判定した。

結 果

プロタミン群ではプロタミン投与5分後にMAPの上昇を認めた。投与後15分にはMAPは低下し、実験開始時にくらべて差を認めなかった(図1)。プロタミン投与2時間後より末梢血白血球数はいちじるしい増加を示し、実験終了時まで高値が持続した(図2)。血小板数はプロタミン投

図 3 Changes in hematocrit represented by % of preinjection value

○: saline control group. ●: protamine group
**: $p < 0.01$ as compared with the saline control group

図 4 Changes in plasma total protein represented by % of preinjection value

○: saline control group. ●: protamine group
**: $p < 0.01$ as compared with the saline control group

与後15分後に実験開始前にくらべて減少し、実験終了時まで低値が持続した(図2)。実験開始前のHctおよびTPは1時間群、4時間群とも対照群とプロタミン群の間に差を認めなかった(表1)。

4時間群におけるHctの変化を図3に示した。対照群のHctは実験開始後より終了時までしだいに低下した。プロタミン群のHctは投与15分後で対照群と同様に低下した。しかしながら1時間以後のHctは対照群にくらべて高値を示した。

4時間群におけるTPの変化を図4に示した。対照群のTPはHctと同様に実験終了時までしだいに減少した。プロタミン群のTPも実験終了時までしだいに減少を示したが、いずれの観察時点においてもその程度は対照群にくらべて大であった。

プロタミン群のW/Dは1時間群、4時間群とも対照群にくらべて差を認めなかった(図5)。

ALも同様に両時間群ともプロタミン群と対照群の間に有意な差を認めなかったが、4時間群で

図5 Lung wet-dry weight ratio (W/D)

In both one and four observation groups, there was no significant difference in W/D between the saline control and the protamine groups.

図6 ¹²⁵I-albumin lung tissue to plasma ratio (albumin leak: AL)

In both one and four observation groups, there was no significant difference in AL between the saline control and the protamine groups.

はプロタミン群で高い傾向があった(図6)。

考 察

肺血管内皮を介した血漿蛋白の間質への漏出とそれに伴う肺血管外水分量の増加は急性肺損傷の基本病態であり、細胞傷害性の液性因子が血管内皮細胞を傷害した結果として起こると考えられている¹⁵⁾。近年、肺微小血管透過性亢進の機序として陽イオンによる肺血管内皮および基底膜表面の陰性電荷の中和作用が指摘されている^{6,7)}。硫酸

プロタミンはヘパリンの中和剤として臨床的にも使用される^{5,8)}が、陽性荷電蛋白であるため血管内皮透過性を亢進させることが知られている^{9,10)}。しかしながら従来の検討では灌流肺や腎臓を摘出した動物が用いられ、*in vivo*での肺血管透過性及びその影響に関する検討は少ない。

そこで覚醒モルモット実験系を用いてプロタミン静脈内投与が肺損傷指標値に及ぼす影響を検討した。60 mg/kg以上を静脈内投与されたモルモットはすべて30分以内に死亡するとの報告があり¹⁶⁾、われわれの予備実験においても同様の結果であったため、20 mg/kgの1回静注と5 mg/kg/hrの持続静注とした。プロタミン投与開始後、他家の報告と同様に末梢血中血小板数、白血球数の変化と平均血圧の変化を認め¹⁷⁻¹⁹⁾、本実験で用いたプロタミン量は種々の生体反応を生じるに十分であったと考えた。

Vehaskariらは、ラットにプロタミン30 mg/kgを5分間で静注後20分以内に尿中へのアルブミンの排出が増加したことを報告している²⁰⁾。さらに彼らは腎臓以外へのプロタミンの影響を観察するためにあらかじめ腎臓を摘出したラットを用い、40 mg/kg急速静注した。10分後に投与前とくらべて約25%のHct上昇と約50%の血漿アルブミン濃度の低下を認め、プロタミン投与後血漿成分が急速に腎臓以外の臓器の血管において血管外へ移動した可能性を報告している¹⁰⁾。

本研究でもTPの減少を認め、プロタミンによる血管内皮細胞表面の陰性電荷中和による血漿蛋白の血管内皮への付着の亢進や血漿蛋白の血管外への漏出の亢進が考えられた^{21,22)}。HctとTPの変化をくまると、プロタミン群において15分後でTPの著明な減少が認められたのに対して、Hctは対照群と同程度の変化であった。その後のTPの低下は両群で同程度であったにもかかわらず、Hctの低下はプロタミン群で軽度であった。この結果は、投与されたプロタミンの影響によりまず血管の透過性が亢進し、蛋白成分が血管外へ移動して、ついで血管内水分が血管外へ移動したことを示唆するものと考えた。

肺に関しては、Changらがラットの摘出肺を用いプロタミン溶液での灌流によって肺水分の蓄積とアルブミンに対する透過性の亢進を報告している⁹⁾。

本実験では覚醒状態のモルモットにプロタミンを静注して肺への水分の蓄積(W/D)とアルブミンの蓄積(AL)を評価したが、プロタミン投与1時間観察群と4時間観察群のW/DとALはそれぞれの対照群にくらべて上昇しなかった。本実験ではHct上昇と約50%の血漿アルブミン濃度の低下を認め、血漿成分が血管外へ移動したことが示唆されることより、プロタミンの作用の程度が肺血管と他の臓器の血管で異なっている可能性が考えられた。

さらに本実験で用いた覚醒モルモット実験系と他家の報告で用いられた実験系の違いにより異なった結果が生じた可能性があげられる。灌流肺モデルと本実験系の大きな相違は、灌流肺では、①血管内皮が曝露されるプロタミン濃度が長時間にわたって高く維持されること、②アルブミン濃度が比較的一定に保たれることがあげられる。すなわち、血漿中アルブミン濃度は血管内皮を介した血管外へのアルブミンの拡散移動に関与するため、血漿アルブミン濃度が比較的高く一定に保たれることが、肺へのアルブミンの集積を促進するものと考えた。

結 語

① 覚醒モルモットに硫酸プロタミンを静脈内投与して肺損傷指標値に及ぼす影響を検討した。

② プロタミン投与により、血漿成分の血管外への漏出が示唆されたが、肺血管外水分量の増加と肺血管透過性の亢進は認められなかった。

文 献

- 1) Buonassaisi, V., Colburn, P.: Biological significance of heparan sulfate proteoglycans. *Ann. NY Acad. Sci.* 401: 76-84, 1982.
- 2) Rounds, S., Vaccaro, C.A.: The binding of cationic probes to apical and basal surfaces of rat lung capillary endothelium and of endothelial cells in tissue culture. *Am. Rev. Respir. Dis.* 135: 725-730, 1987.
- 3) Brody, J.S., Vaccaro, C.A., Hill, N.S., Rounds, S.: Binding of charged ferritin to alveolar wall components and charge selectivity of macromolecular transport in permeability pulmonary edema in rats. *Circ. Res.* 55: 155-167, 1984.
- 4) Putnam, F.W.: Alpha, beta, gamma, omega-the roster of the plasma proteins. *The Plasma Proteins. Structure, Function and Genetic Cont-*

- rol*, Vol. 1(ed. Putnam, F.W.), Academic, New York, p 57-131, 1975.
- 5) Kern, D.F., Heurung, P., van der Zee, H., Bell, D.R., Malik, A.B.: Effect of charge on albumin permeability in the lung. *Microvasc. Res.* 29: 230-231, 1985.
- 6) Chang, S.W., Voelkel, N.F.: Charge-related lung microvascular injury. *Am. Rev. Respir. Dis.* 139: 534-545, 1989.
- 7) Toyofuku, T., Koyama, S., Kobayashi, T., Kusama, S., Ueda, G.: Effects of polycations on pulmonary vascular permeability in conscious sheep. *J. Clin. Invest.* 83: 2063-2069, 1989.
- 8) Michaels, I.A.L., Barash, P.G.: Hemodynamic changes during protamine administration. *Anesth. Analg.* 62: 831-835, 1983.
- 9) Chang, S.W., Westcott, J.Y., Henson, J.E., Voelkel, N.F.: Pulmonary vascular injury by polycations in perfused rat lungs. *J. Appl. Physiol.* 62: 1932-1943, 1987.
- 10) Vehaskari, V.M., Chang, C.T.C., Stevens, J.K., Robson, A.M.: The effects of polycations on vascular permeability in the rat. *J. Clin. Invest.* 73: 1053-1061, 1984.
- 11) Ishizaka, A., Wu, Z., Stephans, K.E., Harada, H., Hogue, R.S., O'Hanley, P.T., Raffin, T.A.: Attenuation of acute lung injury in septic guinea pigs by pentoxifylline. *Am. Rev. Respir. Dis.* 138: 376-382, 1988.
- 12) Gornal, A.G., Bardawill, C.J., David, M.M.: Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.* 177: 751-766, 1949.
- 13) Opreko, L., Wiley, H.S., Wallace, R.A.: Proteins iodinated by the chloramine-T method appear to be degraded at an abnormally rapid rate after endocytosis. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 77: 1556-1560, 1980.
- 14) Gray, S.J., Sterling, K.: Determination of circulating red cell volume by radioactive chromium. *Science* 112: 179-180, 1950.
- 15) 石坂彰敏: ARDSの細胞生物学。呼と循 39: 104-110, 1991.
- 16) Shelley, W.B., Hodgking, M.P., Visscher, M.B.: Studies on the toxicity of protamine. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 50: 300-304, 1942.
- 17) Stoelting, R.K., Henry, D.P., Verburg, K.M., McCammon, R.L., King, R.D., Brown, J.W.: Hemodynamic changes and circulating histamine concentrations following protamine administration to patients and dogs. *Can. Anaesth. Soc. J.* 31: 534-540, 1984.
- 18) Vartiainen, I., Vartiainen, O.: Effect of protamine (salmine) on the white blood count. *Ann. Med. Exper. Fenniae* 29: 52-55, 1951.
- 19) Eika, C., Godal, H.C.: Thrombocytopenia in rabbits induced by heparine, protamine and polybrene. *Scand. J. Haemat.* 8: 481-486, 1971.

- 20) Vehaskari, V.M., Root, F.R., Germuth, F.G., Robson, A.M.: Glomerular charge and urinary protein excretion: effects of systemic and intra-renal polycation infusion in the rat. *Kidney Int.* 22: 127-135, 1982.
- 21) Nagy, Z., Peters, H., Huttner, I.: Charge-related alterations of the cerebral endothelium. *Lab. Invest.* 49: 662-671, 1983.
- 22) Haraldsson, B., Moxham, B.J., Rippe, B.: Capillary permeability to sulphate-substituted and neutral dextran fractions in the rat hind-quarter vascular bed. *Acta Physiol. Scand.* 115: 397-404, 1982.