

《原 著》

ビタミン A 結合蛋白の肺微小血管透過性マーカーとしての有用性の基礎的検討

石坂 彰敏* 鈴木 幸男* 金沢 実* 久保 敦司**
川城 丈夫*

要旨 低分子量のビタミン A 結合蛋白 (VABP) をガンマカメラを用いた肺微小血管透過性検出法として応用するためモルモット実験系を用いて基礎実験を行った。 ^{125}I -アルブミン (ALB), ^{125}I -VABP, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DTPA (diethylene triamine pentaacetic acid) を静脈内に投与した。 エンドトキシン (LPS) 投与群 ($n=7$) と生理食塩水投与対照群 ($n=7$) から得られた血液検体と肺組織におけるガンマ線を計測した。 ^{125}I -ALB の肺組織と血漿中の計数比 (T/P) を求め肺微小血管透過性の指標とした。 肺水分蓄積の指標として肺湿乾重量比 (W/D) を算出した。 LPS 投与により ^{125}I -ALB の T/P と W/D が高値を示し、LPS 投与により透過性肺水腫が招来されたと考えた。 ^{125}I -VABP の T/P も高値を示し LPS による微小血管透過性亢進を ^{125}I -VABP を用いて検出できた。

(核医学 29: 679-685, 1992)

I. 緒 言

成人型呼吸促進症候群 (Adult Respiratory Distress Syndrome; ARDS) は種々の原因によって発症する急性の肺損傷であり、その死亡率は本症が命名されてより四半世紀が経過した今日においてもきわめて高い¹⁾。 その原因の一つとして本症を簡便かつ非侵襲的に診断する方法が確立していないことが挙げられる。 ARDS は肺胞隔壁の障害により発症する。 特に肺微小血管内皮の透過性の亢進がその発症病態において重要であるため、透過性を推定することが診断上重要と考えられる。 ラジオアイソトープで標識したアルブミンなどの高分子蛋白をトレーサとして用いて肺微小血管透過性を臨床例で推定する方法がいくつか報告され

ている²⁻⁴⁾。 アルブミンなどの水溶性の蛋白分子は微小血管内皮の細胞間隙を通過するが、内皮透過性を規定する因子の 1 つにその物質の分子量がある。 アルブミンの分子量は約 69,000 と大きいいため内皮細胞間隙を通過しづらい。 このためアルブミンなどの高分子蛋白をトレーサとして用い、肺微小血管透過性を推定する従来の方法では、長時間の検査が必要となる。 これがラジオアイソトープを用いた透過性測定法を ARDS 症例に応用することを困難とし、多くの施設で実用されるに至っていない大きな理由と考えられる。 われわれは分子量の小さい蛋白トレーサの使用によりこの問題を解決し得る可能性があるものと考えた。 そこで本研究では分子量 21,000 のビタミン A 結合蛋白を ^{125}I で標識して、透過性トレーサとしての有用性をモルモット実験系を用いて検討した。

II. 方 法

放射性標識化合物の作成

モルモットアルブミン (Sigma; 以下 ALB) とビタミン A 結合蛋白 (Calbiochem, USA; 以下 VABP)

* 慶應義塾大学医学部内科学教室

** 同 放射線科学教室

受付: 4 年 3 月 13 日

最終稿受付: 4 年 4 月 22 日

別刷請求先: 東京都新宿区信濃町 35 (☎ 160)

慶應義塾大学医学部内科学教室

石坂 彰 敏

をクロラミン T 法⁵⁾を用いて ^{125}I (第一ラジオアイソトープ研究所) で標識した。TCA (trichloroacetic acid) 法を用いて得られた標識率はいずれも 98% 以上であった。自家赤血球の ^{51}Cr (第一ラジオアイソトープ研究所) 標識は過去に報告した方法を用いた⁶⁾。 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DTPA (diethylene triamine pentaacetic acid) の作成はジェネレータより抽出した $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 生理食塩水溶液を DTPA キット (第一ラジオアイソトープ研究所) に混合させて行った。標識率は簡便クロマトグラフィ法を用いて算出し、98% 以上であった。なお、 ^{125}I -VABP の比活性は約 500 kBq/ μg であった。

実験プロトコール

ハートレー系 Specific pathogen free (SPF) 雌モルモット (体重 800-1,100 g) 28 匹を用いた。実験プロトコールを Fig. 1 に示した。実験方法の詳細は過去の報告に譲り⁷⁾、ここでは簡単に説明する。エンドトキシン (以下 LPS) 投与 18 時間前にモルモットの右頸静脈と右頸動脈にカテーテルを挿入した。カテーテルに 2 分の 1 希釈ヘパリン酸ナトリウムを注入し開通性を保った。時間 0 に 2 mg/kg の LPS (大腸菌由来 L-3880; Sigma) 生理食塩水浮遊液 2 ml (LPS 投与群: $n=14$) もしくは生理食塩水 2 ml (生食対照群: $n=14$) を投与した。それぞ

れの群を 7 匹ずつに分け、3 時間後に 70 kBq の ^{125}I 標識モルモットアルブミン (^{125}I -ALB) 生理食塩水溶液 1 ml ($n=7$) もしくは ^{125}I 標識ビタミン A 結合蛋白 (^{125}I -VABP) 生理食塩水溶液 1 ml ($n=7$) を頸静脈内に投与した。 ^{125}I -VABP を投与した動物には同時に 1 MBq の $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DTPA を静脈内に投与した。3 時間 45 分に 10 kBq の ^{51}Cr 標識自家赤血球を肺血液量トレーサとして静脈内投与した。4 時間目に 1 ml のヘパリン溶液を、続いて 2 ml の KCl 溶液を静脈内投与し屠殺した。開胸後に両肺を摘出し、両側中下葉の一部を切除して重量測定を行った。ウエル型シンチレーションカウンター (ARC-300 アロカ社) により肺組織の $^{99\text{m}}\text{Tc}$ のガンマ線計測を行った。肺組織を冷蔵保存し、3 日後に ^{125}I と ^{51}Cr のガンマ線計測を行った。本研究で使用したウエル型シンチレーションカウンターの計数効率は ^{125}I に対して 0.75 であった。また ^{125}I の血液 1 ml あたりのカウント数は 6,000-7,000 cpm であり計数誤差は 1% 程度であった。その後、真空乾燥器を用いて 48 時間高温真空乾燥し肺組織乾燥重量を測定した。実験終了時に採取した血液のヘマトクリット値は自動血球算定器 (シスメックス) で測定した。

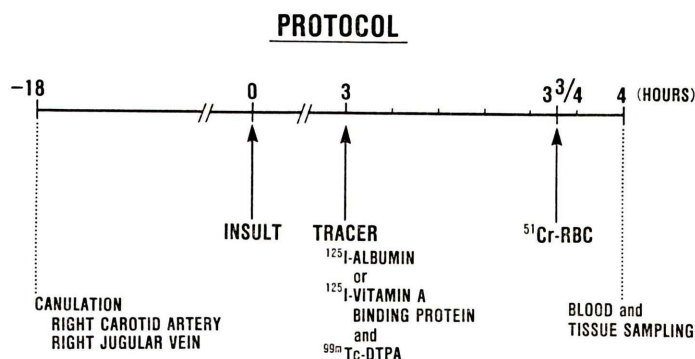


Fig. 1 The right carotid artery and jugular vein were cannulated eighteen hours before initiation of the experiments. We injected either saline or 2 mg/kg of endotoxin at time zero. At three hours, either ^{125}I labeled albumin or ^{125}I labeled Vitamin A binding protein (VABP) and $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DTPA were injected intravenously. ^{51}Cr labeled red blood cells were administered at 3 hours and 45 minutes to correct blood contamination in the lung tissues. At sacrifice, blood and tissue samples were taken to estimate the parameters of acute lung injury.

本研究における指標

- (1) 肺内水分蓄積の指標としての肺湿乾重量比
(肺組織の湿重量の乾燥重量に対する比)
- (2) 肺微小血管透過性の指標としての ^{125}I -ALB
の肺組織と血漿中の計数比
- (3) ^{125}I -VABP の肺組織と血漿中の計数比
- (4) $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DTPA の肺組織と血漿中の計数比

なお、上記指標の計算にあたって、ラジオアイソトープ間のガンマ線クロストークの補正と減衰の補正を行った。また肺検体に混入した血液の影響は血液量マーカーとして用いた ^{51}Cr 標識自家赤血球からのガンマカウント数を用いて補正した(式 1, 2)。

肺検体 ^{51}Cr カウント

$$\div \text{末梢血液 (1 ml)} \text{ } ^{51}\text{Cr} \text{ カウント} \\ = \text{肺内血液量} \quad (1)$$

肺検体 ^{125}I カウント

$$- \text{肺内血液量} \times \text{末梢血液 (1 ml)} \text{ } ^{125}\text{I} \text{ カウント} \\ = \text{肺組織 } ^{125}\text{I} \text{ カウント} \quad (2)$$

ここにおいて肺内ヘマトクリットと末梢血液のヘマトクリットは同一と仮定した。

統 計

成績はすべて平均値 \pm SEM (standard error of mean) で表した。Student's t-test を用いて p 値が 0.05 以下の場合に有意差ありとした。

III. 結 果

LPS 投与群では肺組織と血漿中の ^{125}I -ALB の計数比が生食対照群に比べて高値を示した (Fig. 2)。肺組織と血漿中の ^{125}I -ALB の計数比と肺湿乾重量比に有意の相関を認めた (Fig. 2)。LPS 投与群の ^{125}I -VABP の肺組織と血漿中の計数比も生食対照群に比べて高値を示した (Fig. 3)。 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DTPA の計数比には両群間で差を認めなかった (Fig. 3)。LPS 投与群と生食対照群における各トレーサの肺組織と血漿中の計数比を比較したところ (Fig. 4), ^{125}I -VABP の計数比は両群でそれぞれ ^{125}I -ALB のそれに比べて高値であった。

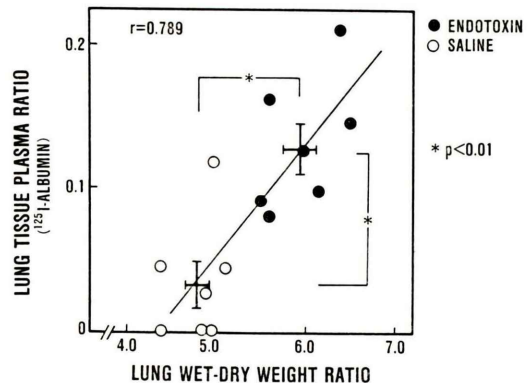


Fig. 2 There was a significant increase ($p<0.01$) in the concentration ratio of ^{125}I -albumin in lung tissue to that in plasma in the LPS treated group as compared with saline control group. There was a significant correlation ($p<0.01$) between the concentration ratio of ^{125}I -albumin in lung tissue to that in plasma and the lung wet dry weight ratio.

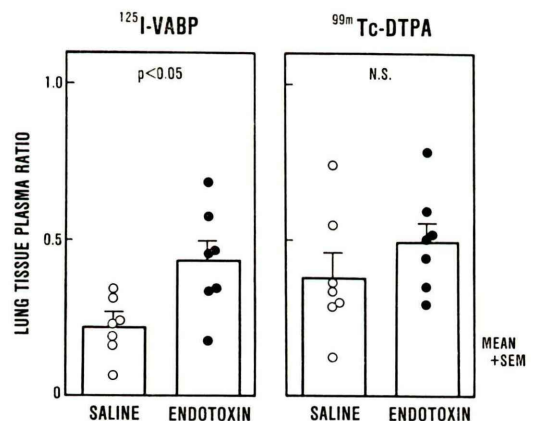


Fig. 3 An increase in the concentration ratio of ^{125}I -VABP in lung tissue to that in plasma ($p<0.05$) was observed in the LPS treated group as compared with the saline control group. There was no difference between LPS and saline groups in the ratio of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DTPA.

IV. 考 察

われわれはラジオアイソトープで標識したアルブミンに対する肺微小血管透過性をガンマカメラを用いて測定し、ARDS 症例や間質性肺疾患症例などの肺胞隔壁を病態の主座とする疾患で肺微

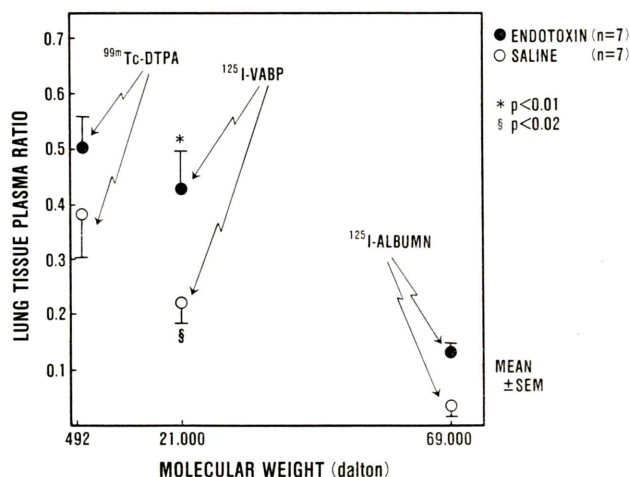


Fig. 4 The concentration ratio of ^{125}I -VABP in lung tissue to that in plasma from either the LPS or the saline group was greater than that of ^{125}I -albumin.

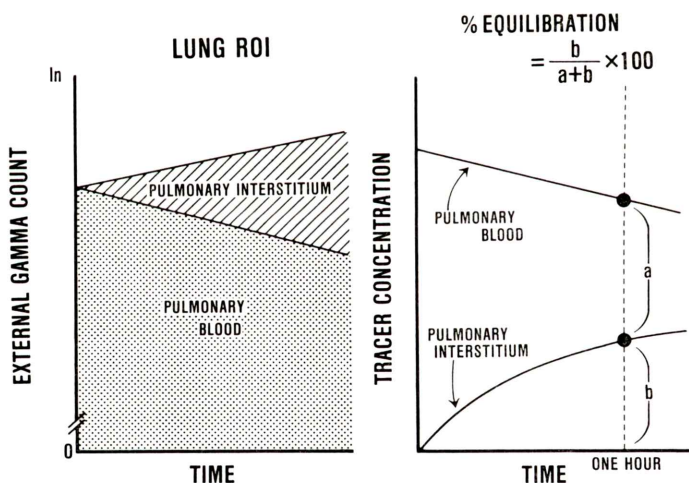


Fig. 5 (left panel) The area indicated by diagonal lines represents the accumulation of tracer in the pulmonary interstitium, which increases as acute lung injury progresses. Using the gamma-camera method, we estimated pulmonary endothelial permeability by presuming that this accumulation had occurred. (right panel) This represents changes in the tracer concentration in each compartment (pulmonary blood and interstitium). We calculated the percent equilibration at time one hour as a parameter of leakiness of the tracers. The % equilibration for ^{125}I -VABP is greater than that for ^{125}I -albumin in both the LPS and the saline groups, indicating that the pulmonary capillary endothelium is more permeable to VABP than to albumin.

小血管内皮透過性が亢進していることを報告した⁴⁾。さらにモルモット実験系に大腸菌を静脈内投与した際にも肺微小血管透過性が亢進することを示した⁸⁾。本研究ではモルモット実験系に大腸菌由来の LPS を静脈内投与し、アルブミン (ALB) に比べて分子量が 3 分の 1 程度 (21,000 dalton) のビタミン A 結合蛋白 (VABP) の透過性トレーサとしての有用性を検討した。なお、VABP はその名のとおりビタミン A の特異結合蛋白で、正常成人血清濃度は 3–6 mg/dl とされる。尿中に排出され、腎尿細管障害の早期検出に有用とされている。本研究ではガンマカメラを用いるのかえて、屠殺時に採取した肺組織と血液からのガンマ線をウエル型シンチレーションカウンターで計測した。Fig. 2 に示したように肺組織と血漿中の ¹²⁵I-ALB の計数比と肺湿乾重量比に有意の相関を認め、LPS 静脈内投与によって肺微小血管透過性亢進に基づく肺水腫が招来されたことが示唆された。LPS 投与群では ¹²⁵I-VABP の肺組織と血漿中の計数比も生食対照群に比べて高値を示し (Fig. 3)、LPS 静脈内投与による肺微小血管透過性の亢進を ¹²⁵I-VABP を用いて検出し得るものと考えた。^{99m}Tc-DTPA は分子量が小さいため静脈内投与後、速やかに肺の間質に移行して血漿中と平衡状態に達すると考えられる⁹⁾。すなわち ^{99m}Tc-DTPA の肺組織と血漿中の計数比は肺間質水分量を反映すると考えられる。Fig. 3 に示したように ^{99m}Tc-DTPA の肺組織と血漿中の計数比は両群間に有意差を認めなかったが LPS 投与群で高い傾向であり、肺湿乾重量比で評価した肺内水分量の増加を反映していると考えた。

ラジオアイソトープで標識した蛋白に対する肺微小血管内皮の透過性を体外計測により推定する方法はいくつか報告されている^{2–4)}。ガンマカメラを用いた場合には、収集データの解析にあたって関心領域を心臓部と肺野に設定する。トレーサ投与後の心臓部におけるガンマ線計測値の変化は血液中的トレーサ量の変化を反映すると考えられる。これに対して肺野における計測値 (Fig. 5 左) は肺血液中的トレーサ量 (Fig. 5 左, PULMONARY

BLOOD) と肺間質内のトレーサ量 (Fig. 5 左斜線部分, PULMONARY INTERSTITIUM) の和と考えられる。Fig. 5 左の斜線部分の単位時間あたりの面積は肺微小血管透過性を反映するものと考えられる。正常肺では単位時間内に間質に集積するトレーサ量 (Fig. 5 左斜線部分の面積) が少ない。一方肺微小血管透過性が亢進している状態ではこの面積が大となる。通常透過性トレーサとして用いられる標識アルブミンの分子量は約 69,000 と大きいと高度に透過性が亢進した場合でも内皮細胞を介した肺間質への単位時間あたりの集積量は少なく、この斜線部分の面積は大きくない。胸部ガンマ線総カウント数に対するこの斜線部分のカウント数が小さい場合、測定誤差の影響が大となる。そのため透過性トレーサとして標識アルブミンを用いた際には斜線部分の面積を大きくするために、測定時間を長くする必要がある。検査に長時間かかることは重症疾患例に本検査を施行することを困難とし、その有用性を制限する。分子量の小さい蛋白トレーサの場合単位時間内に肺間質に集積するトレーサ量が大となると考えられるので、この問題を解決し得る可能性があると考えた。LPS 投与群においては分子量 21,000 の ¹²⁵I-VABP の肺組織と血漿中の計数比は分子量 69,000 の ¹²⁵I-ALB のそれに比べて LPS 群で約 4 倍、生食投与群で約 7 倍であった (Fig. 4)。¹²⁵I-VABP が単位時間内に肺間質に集積する量が ¹²⁵I-ALB のそれと比べて大であり斜線部分を大きくし得ると考えた。

Figure 5 右に肺内の血液分画と間質分画のトレーサ濃度の変化を表したが、肺間質分画内での平衡の程度が高いほど b を a と b の和で除した % EQUILIBRATION が大となる。Fig. 5 左に斜線で示した肺間質内トレーサ集積量が単位時間あたり多いほど間質内のトレーサ濃度は急激に上昇し % EQUILIBRATION が大となる。前述したように ^{99m}Tc-DTPA は血漿中と肺間質で速やかに平衡に達するため、^{99m}Tc-DTPA の肺組織と血漿中の計数比は肺組織単位重量あたりの肺間質水分量を反映する。そこで ¹²⁵I-VABP の肺組織と血漿

中の計数比を $^{99m}\text{Tc-DTPA}$ のそれで除すことにより肺間質における投与後1時間での肺間質における $^{125}\text{I-VABP}$ の平衡の程度を推定した。成績には示さなかったがLPS投与群で投与後1時間で $^{125}\text{I-VABP}$ は約87%, 生食投与群で約58%平衡に達していると考えられた。これに対して $^{125}\text{I-ALB}$ ではそれぞれ約26%と9%であった。すなわち分子量の小さい $^{125}\text{I-VABP}$ は肺微小血管内皮の細胞間隙をより通過しやすく, 肺間質で早く平衡状態に達すると考えた。これらの結果よりVABPの使用によりガンマカメラでの肺微小血管透過性の測定に要する時間を短縮し得ると考えられた。

V. 結 語

(1) ビタミンA結合蛋白(VABP)をガンマカメラを用いた肺微小血管透過性検出法に応用するための基礎実験を, モルモットのエンドトキシン(LPS)急性肺損傷実験系を用いて行った。

(2) LPS投与群では肺組織と血漿中の $^{125}\text{I-ALB}$ の計数比が生食対照群に比べて高値を示し肺微小血管透過性が亢進していた。 $^{125}\text{I-VABP}$ の肺組織と血漿中の計数比も高値を示し, $^{125}\text{I-VABP}$ を用いて透過性の亢進を検出し得た。

(3) LPS投与群と生食対照群のそれぞれの群において $^{125}\text{I-VABP}$ の肺組織と血漿中の計数比は $^{125}\text{I-ALB}$ のそれに比べて高値を示し, VABPの使用により透過性測定に要する時間を短縮し得る可能性が示唆された。

謝辞： $^{125}\text{I-VABP}$ を提供していただいた榑第一ラジオアイソトープ研究所, 城所芳則博士と押井哲夫博士に感謝いたします。

文 献

- 1) Montgomery AB, Stager MA, Carrico CJ, Hudson LD: Causes of mortality in patients with the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis* **132**: 485-489, 1985
- 2) Gorin AB, Weidner WJ, Demling RH, Staub NC: Non-invasive measurement of pulmonary transvascular protein flux in sheep. *J Appl Physiol* **45**: 225-233, 1978
- 3) Dauber IM, Pluss WT, Van Grondelle A, Trow RS, Weil JV: Specificity and sensitivity of non-invasive measurement of pulmonary vascular protein leak. *J Appl Physiol* **59**: 564-574, 1985
- 4) 金沢 実, 石坂彰敏, 鈴木幸男, 横山哲朗: 壁透過性の体外計測. *呼吸と循環* **33**: 615-619, 1985
- 5) Opreskol L, Wiley HS, Wallace RA: Proteins iodinated by the chloramine-T method appear to be degraded at an abnormally rapid rate after endocytosis. *Proc Natl Acad Sci USA* **77**: 1556-1560, 1980
- 6) Ishizaka A, Wu Z, Stephens KE, Harada H, Hogue RS, O'Hanley PT, et al: Attenuation of acute lung injury in septic guinea pigs by pentoxifylline. *Am Rev Respir Dis* **138**: 376-382, 1988
- 7) Stephens KE, Ishizaka A, Larrick JW, Raffin TA: Tumor necrosis factor causes increased pulmonary permeability and edema: Comparison to septic acute lung injury. *Am Rev Respir Dis* **137**: 1364-1370, 1988
- 8) Ishizaka A, Stephens KE, Segall GM, Hatherill JR, McDougall IR, Wu Z, et al: Sequential assessment of pulmonary epithelial diethylene triamine pentaacetate clearance and intrapulmonary transferrin accumulation during *Escherichia coli* peritonitis. *Am Rev Respir Dis* **141**: 631-639, 1990
- 9) Praker JC, Falgout HJ, Grimbert FA, Taylor AE: The effect of increased vascular pressure on albumin-excluded volume and lymph flow in the dog lung. *Circ Res* **47**: 866-875, 1980

Summary

Usefulness of Vitamin A Binding Protein as a Marker for Capillary Endothelial Permeability

Akitoshi ISHIZAKA*, Yukio SUZUKI*, Minoru KANAZAWA*,
Atsushi KUBO** and Takeo KAWASHIRO*

**Department of Medicine, **Department of Radiology,
School of Medicine, Keio University, Tokyo, Japan*

We performed a preliminary study to assess the usefulness of Vitamin A binding protein (VABP) as a gamma-camera marker for capillary endothelial permeability. We used a guinea pig model of endotoxin (LPS) induced acute lung injury. We calculated the concentration ratio of either ^{125}I -albumin or ^{125}I -VABP in lung tissue to that in plasma (tissue plasma ratio; T/P) as a parameter of capillary endothelial permeability. $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -diethylene triamine pentaacetic acid (DTPA) was used as a marker for pulmonary interstitial volume. We estimated wet to dry lung weight ratio as a

parameter of lung water accumulation (W/D). LPS increased the T/P of ^{125}I -albumin and W/D, suggesting the development of permeability edema. The T/P for ^{125}I -VABP was also increased, indicating that ^{125}I -VABP can be used to detect elevated capillary endothelial permeability. In both groups, LPS and saline, the T/P was higher for ^{125}I -VABP than for ^{125}I -albumin. These data suggest that the pulmonary capillary endothelium is more permeable to VABP than albumin.

Key words: Capillary permeability, Vitamin A binding protein.