

実験高血圧ラットにおける血管壁アンジオテンシンⅡ産生に関する研究－腸間膜動脈灌流系における検討－

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 松原, 隆夫 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8085

実験高血圧ラットにおける血管壁アンジオテンシン

II 産生に関する研究

—腸間膜動脈灌流系における検討—

金沢大学内科学第二講座 (主任: 竹田亮祐教授)

松 原 隆 夫

(平成1年1月18日受付)

血管壁レニン-アンジオテンシン (renin-angiotensin, R-A) 系の血圧調節に果たす役割を解明する目的で, 各種実験高血圧ラットを用いた腸間膜動脈灌流実験において, 血管壁アンジオテンシン (angiotensin, ANG) II 産生を検討した。さらに, アンジオテンシン I 変換酵素阻害剤 (angiotensin I converting enzyme inhibitor, ACEI) の, 血管壁 ANG II 産性に及ぼす効果についても検討した。検体は, ANG II の特異抗体を用いた, 高感度ラジオイムノアッセイ法にて測定し, 検体の一部は, 高速液体クロマトグラフィー法にて同定した。両側腎摘出 (nephrectomized rat, Nex) 群では, 血漿レニン活性 (plasma renin activity, PRA), 血漿 ANG II が著明に抑制されていたにもかかわらず, 血管壁 ANG II は, $55.6 \pm 9.3 \text{ pg/h}$ (平均値 \pm 標準誤差) とコントロール群と同程度に産生されていた。また, ACEI 投与によって, 血圧は $142 \pm 12 \text{ mmHg}$ から $101 \pm 7 \text{ mmHg}$ と有意に低下し ($p < 0.01$), 血管壁 ANG II 産生も $19.5 \pm 5.5 \text{ pg/h}$ と有意に抑制された ($p < 0.01$)。デオキシコルチコステロン食塩高血圧 (deoxycorticosterone acetate-treated rat, DOCA) 群では, PRA, 血漿アルドステロン濃度 (plasma aldosterone concentration, PAC) と共に, 血管壁 ANG II 産生も減少しており, ACEI 投与にても有意な降圧効果は認められなかった。糖質コルチコイド高血圧 (dexamethasone-treated rat, Dex) 群では, PRA, 血漿 ANG II 濃度は著明に増加していたが, 血管壁 ANG II 産生はむしろ抑制されていた。また, ACEI 投与にて有意な降圧効果が認められた。また, 外因性のエンドセリン (endothelin, ET) による昇圧反応を, 摘出した腸間膜動脈を用いて検討したところ, 用量依存性に ET による昇圧反応が増大し, ET の血管収縮作用は ANG II より強力であった。また, ET による昇圧反応は, ANG II アナログ (ANG II analogue: AIIA) によっても抑制されなかった。以上の結果より, 血管壁においても ANG II が産生されていることが示され, Nex 群では, その昇圧機構に, 血管壁 R-A 系が関与していることが示唆された。また, 血管壁 R-A 系は, 腎 R-A 系とは独立して機能していることが示され, 生体内の血圧調節機構のひとつとして重要な役割を担っていることが推察された。さらに, ACEI は, 腎 R-A 系のみならず血管壁 R-A 系に対しても抑制効果を有することが示唆された。また, ET は ANG II より強い血管収縮作用を有していることが示された。しかしながら, 受容体レベルでの ANG II との相互作用は少なく, かつ外因性の ET 投与による血管収縮反応には, 血管壁 R-A 系の関与は少ないことが推察された。

Key words vascular renin-angiotensin system, experimental hypertension
rat, angiotensin I converting enzyme, endothelin

Abbreviations: AIIA, angiotensin II analogue; ACE, angiotensin I converting enzyme; ACEI, angiotensin I converting enzyme inhibitor; ANG, angiotensin; BK, bradykinin; Dex, dexamethasone; DOCA, deoxycorticosterone acetate; ET, endothelin; HPLC,

腎の傍系球細胞で合成されるレニン¹は、血中に分泌されると主に肝で生成されるアンジオテンシノーゲン (レニン基質) を加水分解し、アンジオテンシン (angiotensin, ANG) I を産生する。ANG I は、肺、腎、前立腺、脳などに存在するアンジオテンシン I 変換酵素 (angiotensin I converting enzyme, ACE) により、C末端からヒスチジン-ロイシンのジペプチドを遊離し、オクタペプチドである ANG II に変換される。さらに、ANG II は、血管、腎、副腎、心などに働き、血管収縮、アルドステロン生成促進、プロスタグランジン合成刺激等の、種々の生理作用を有することが知られている。このような古典的な循環ホルモン系としてのレニン-アンジオテンシン (renin-angiotensin, R-A) 系に加えて、近年、腎以外に R-A 系の各構成要素が存在することが確認され、“paracrine”、“autocrine”として作用している可能性が示唆されている。

まず、腎外レニンに関しては、以前より、多くの組織にレニン様活性が認められることが知られていたが、真のレニンであるか、カテプシン D などの類似した作用を有する非特異的プロテアーゼ活性なのか、両者の分離、同定が困難であった。その後、アフィニティークロマトグラフィの応用、モノクローナル抗体の開発²、レニンの精製³により、レニンの特異的な同定が可能となり、直接的ラジオイムノアッセイ法や免疫組織化学的方法などを用い、レニンの主要産生部位である腎、顎下腺の他、脳、下垂体前葉、甲状腺、前立腺、副腎、精巣、大動脈、腸間膜動脈^{3a-d}等の組織にレニンが存在することが確認された。さらに、遺伝子工学の発展により、レニン messenger RNA (mRNA) も、脳、副腎、心、精巣、卵巣、顎下腺、血管壁^{7a}にて同定され、腎外組織でレニンが産生されていることが明らかとなった。また、ANG の唯一の前駆体であるアンジオテンシノーゲンにおいても mRNA が、肝以外の、腎、副腎、脳、脊髄、大動脈、腸間膜動脈、心房、肺、胃、脾、大腸、卵巣に同定されている^{9,10}。ACE は、主に肺血管内皮細胞に局在しているが¹¹、肺以外にも、大動脈、腎動脈、腸間膜動脈、腎皮質、脳などに存在することが、イヌ、サル、家兎、ヒトの組織において証明されている¹²。ANG に関して、脳、副腎、腫瘍組織など¹³⁻¹⁵、および血管壁に存在していることが、ウシ大動脈内皮細胞培養による検討にて証明されている¹⁶。しかしながら、組織 R-A 系

の調節機構や生理作用に関しては未だ充分に解明されておらず、腎 R-A 系と関連についても不明な点が多い。一方、ANG II の生理作用の代表的なもののひとつに血管平滑筋収縮作用があげられるが、その主な作用部位は、末梢抵抗血管であり、生体内における血圧調節機構、特に昇圧系において重要な役割を演じている。そこで、血管壁 R-A 系の血圧調節に果たす役割を解明する目的で、各種実験高血圧ラットを用いて、末梢血管モデルである腸間膜動脈における ANG II 産生を測定した。

ACEI は、今日、降圧剤として広く臨床で用いられているが、同時に、生体内における ANG II 産生が、アンジオテンシン I 変換酵素阻害剤 (angiotensin I converting enzyme inhibitor, ACEI) により、影響されるか否かについても検討した。

一方、最近、ブタ大動脈内皮細胞培養系により、血管作動性ペプチドであるエンドセリン (endothelin, ET) が単離、同定された¹⁷。ET はラットにおいて ANG II より強力な血管収縮作用を有していることが報告されており¹⁸、今回その昇圧反応性を、各種実験高血圧ラットにおいて比較検討した。

対象および方法

1. 対 象

体重約 200g の雄性ウイスターラットを用い、血圧、心拍数測定 (日本光電、東京) 後、以下の 3 群のラットを作製した。

1) 両側腎摘出 (nephrectomized rat, Nex) 群; ペントバルビタール麻酔下にて、背側を切開し、腎動静脈を結紮後、両側腎を摘出した。この際、副腎に損傷を与えぬよう細心の注意を払った。また、腸間膜動脈は、術後 3 日目に取り出した。

2) デオキシコルチコステロン 食塩高血圧 (deoxycorticosterone acetate-treated rat, DOCA) 群; 片側腎摘出後、エタノール、落花生油 (1/1000, v/w) に溶解した DOCA 50mg (Sigma, St. Louis, U.S.A.) を週に 1 回皮下投与し、4 週目に腸間膜動脈を取り出した。尚、その間 1% 食塩水飲水とした。

3) 糖質コルチコイド高血圧 (dexamethasone-treated rat, Dex) 群; 5mg/l デキサメタゾン (和光、大阪) の飲水とし、4 日目に腸間膜動脈を取り出した。個々のラットは、1 日約 50-100 μg のデキサメタゾン

high-pressure liquid chromatography; mRNA, messenger RNA; NA, noradrenalin; Nex, nephrectomy; PAC, plasma aldosterone concentration; PRA, plasma renin activity; R-A system, renin-angiotensin system; Sar, saralasin; TFA, trifluoroacetic acid

ンを摂取していた。

また、上記各群において、腸間膜動脈摘出前の2日間、ACEIであるカプトプリル (Captopril®、三共製薬、東京) を 10mg/kg 体重、経口投与した群も作製した。

II. 腸間膜動脈の灌流実験

McGregor らの方法¹⁹⁾に基づき、当教室にて若干改良を加えた方法^{20,21)}にて下記の如く、ラット腸間膜動脈の分離および灌流を施行した。ペントバルビタール麻酔下にて開腹後、23G テフロン製カニューレにて腸間膜動脈にカニューレションした。15ml のヘパリン添加 Krebs-Ringer 液にて血管内腔の血液を除去した後ただちに、腸間膜動脈を腸管より分離し、体外に取り出した。また、この際同時に大動脈にもカニューレションし、採血を施行し、採取した血液にて血漿レニン活性 (plasma renin activity, PRA)、血漿アルドステロン濃度 (plasma aldosterone concentration, PAC)、血漿 ANG II 濃度を測定した。

取り出した腸間膜動脈は、37°Cにて調整したマグナス腸灌流装置 (池本理化、東京) 内に置き、95%O₂、5%CO₂で通気した Krebs-Ringer 液 (NaCl 118mM, KCl 4.75mM, CaCl₂ 2.5mM, KH₂PO₄ 1.2mM, MgSO₄ 1.2mM, NaHCO₃ 24.3mM, Dextrose 1g/l) で灌流し、灌流液は速やかに抽出した。灌流は、ローラーポンプ (Masterflex, Colo, Chicago, U.S.A.) を用い、同時に灌流圧を、圧トランスデューサー (日本光電、東京) にてモニターした。灌流速度は、4ml/min に設定し、灌流圧は、平均 30mmHg であった。尚、灌流前に、ノルアドレナリン (noradrenalin, NA) (三共、東京) 1 μmol にて、腸間膜動脈の反応性を確認した。

Measurement of vascular A II generation

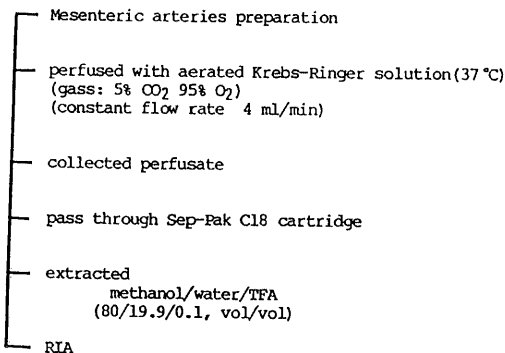


Fig. 1. Flow sheet of extraction procedure of angiotensin II.

III. 検体の抽出および測定

Sep-Pak C-18 カラム (Waters associates, Milford Massachusetts, U.S.A.) をメタノール 3ml, Krebs-Ringer 液 10ml で洗浄後、60分間分の灌流液を通した。0.1%トリフルオロ酢酸 (trifluoroacetic acid, TFA) 10ml を通した後、メタノール/蒸留水/TFA 溶液 (80/19.9/0.1, v/v) 1.5ml で2回抽出し、凍結乾固した。凍結乾固した検体は、0.2Mリン酸緩衝液400 μl で再溶解し、ANG II の測定に用いた (図1)。

ANG II は、¹²⁵IANG II (NEN Research Product, Boston, U.S.A.)、特異抗体 (IgG-AII-1, IgG Corporation, Nashville, U.S.A.) を用いたラジオイムノアッセイにて測定した。Bound/Free 分離は、正常家兎抗血清、家兎γ-グロブリン抗血清を用いた二抗体 (第一ラジオアイソトープ研究所、東京) により行った。アッセイ感度は、10pg/ml, ANG I との交叉活性は1%以下であり、ANG III との交叉活性は100%であった。

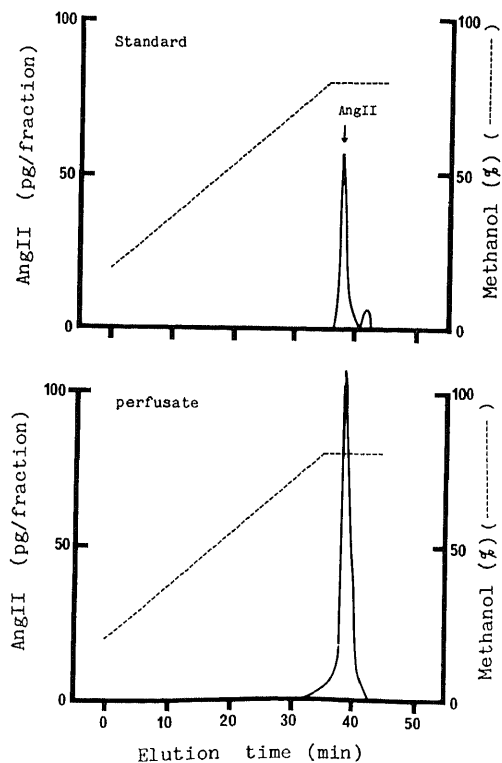


Fig. 2. High-pressure liquid chromatography (HPLC) elution profile. Upper panel shows authentic ANG II, and lower panel shows perfusate of the isolated rat mesenteric arteries.

血漿 ANG II は、Workman ら²⁰の方法に基づき採血し、徐タンパクした後、上記のラジオイムノアッセイにて測定した。

PRA, PAC は既報²⁰の方法に従いラジオイムノアッセイにて測定した。

IV. ANG II の同定

高速液体クロマトグラフィー (high-pressure liquid chromatography, HPLC) にて、一部の検体の ANG II の同定を行った。

HPLC には、LC-5 A 型ポンプ (島津, 東京), カラムは Hiber RP-18 (4×215mm, 粒径 5 μ m, E. Merk, Darmstadt, F.R.G.) を使用した。移動相には、pH 5.6 に調整した、メタノール/蒸留水=7.1/92.9, 92.9/7.1 (v/v) を用い、35分で、メタノール 20 から 80 vol% となる直線的濃度勾配を設定し、流速は、0.5ml/分、カラム温度は、40°C で溶出した。溶媒はすべて液体クロマトグラフィー用 (和光, 大阪) を使用した。溶出液は FRAC-100 型フラクション・コレクター (Pharmacia, Uppsala, Sweden) にて 1 分間ごとに採取し、ラジオイムノアッセイにて ANG II を測定した (図 2)。

V. ET の昇圧反応性の検討

先に記載した方法にて、体外に摘出したラット腸間膜動脈を、4ml/min の一定速度で灌流し、灌流圧を圧トランスデューサーにてモニターした。薬物は、側管より灌流液中に注入した。

はじめに、ANG II アナログ (ANG II analogue, AIIA) であるサララシン (saralasin, Sar) (Sigma, St. Louis, U.S.A.) 1nmol を注入後、ANG II (ペプチド研, 京都) 1nmol, 10nmol を注入した。同様に、Sar 注入後、ET (porcine endothelin, ペプチド研, 京都) 0.1nmol を注入した。

次に、コントロール, Nex, DOCA の 3 群に、ET 0.1nmol 1nmol と徐々に高濃度の ET を注入し灌流圧を観察した。

VI. 統計学的検定法

測定値は、平均値±標準誤差で示した。

二元配置分散分析後、Scheffé の検定を行い危険率 $p < 0.05$ 以下を有意差ありと判定した。

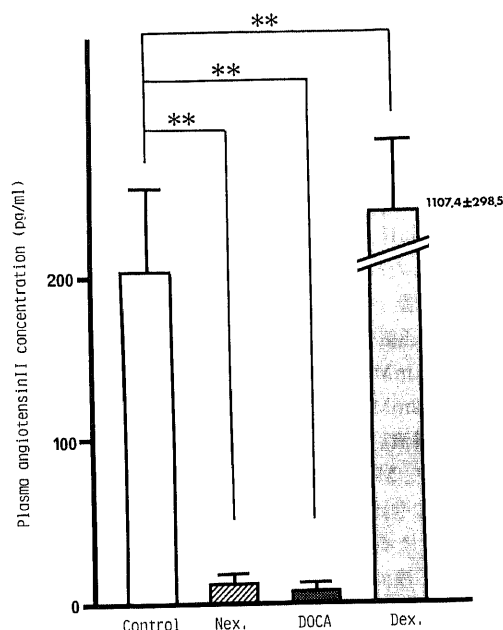


Fig. 3. Plasma angiotensin II concentration in control, nephrectomized (Nex), deoxycorticosterone acetate-treated (DOCA) and dexamethasone-treated (Dex) rats.

Each column represents mean \pm S.E.M.

**, $p < 0.01$.

Table 1. Body weight (Bwt), systolic blood pressure (sBP), heart rate (HR), plasma renin activity (PRA) and plasma aldosterone concentration (PAC) in control, nephrectomized (Nex), deoxycorticosterone acetate-treated (DOCA) and dexamethasone-treated (Dex) rats.

	Bwt (g)	sBP (mmHg)	HR (bpm)	PRA (ng/ml/h)	PAC (pg/ml)
Control	193 \pm 4	119 \pm 1	412 \pm 10	9.4 \pm 0.9	395.5 \pm 20.3
Nex	203 \pm 5	142 \pm 12**	388 \pm 11	U.D.**	325.0 \pm 30.5
DOCA	323 \pm 5**	141 \pm 2**	402 \pm 8	1.6 \pm 0.5**	110.4 \pm 14.6**
Dex	165 \pm 3**	166 \pm 2**	402 \pm 9	17.1 \pm 1.9**	323.0 \pm 19.7

** Significantly different from the control values ($p < 0.01$) by 2-way ANOVA followed by Scheffé's multiple comparison. All values represent mean \pm S.E.M. (n=5).

成績

I. 腸間膜動脈灌流実験について

1. 各群における基礎値

血圧は、コントロール群の $119 \pm 1 \text{ mmHg}$ に比して、Nex 群では、 $142 \pm 12 \text{ mmHg}$ ($p < 0.01$)、DOCA 群では、 $141 \pm 2 \text{ mmHg}$ ($p < 0.01$)、Dex 群では、 $166 \pm 2 \text{ mmHg}$ ($p < 0.01$) といずれの群においても有意に上昇していた。

心拍数は、コントロール群は $412 \pm 10 \text{ bpm}$ 、Nex 群は、 $388 \pm 11 \text{ bpm}$ 、DOCA 群は、 $402 \pm 8 \text{ bpm}$ 、Dex 群は、 $402 \pm 9 \text{ bpm}$ と各群間に有意差は認められなかった。

PRA は、Nex 群では全例測定感度以下であり、コントロール群、 $9.4 \pm 0.9 \text{ ng/ml/h}$ に比して著明に低下していた ($p < 0.01$)。DOCA 群においても、PRA は有意に低下していたが、尚 $1.6 \pm 0.5 \text{ ng/ml/h}$ と産生されていた ($p < 0.01$)。Dex 群では、 $17.1 \pm 1.9 \text{ ng/ml/h}$ と上昇していた ($p < 0.01$)。

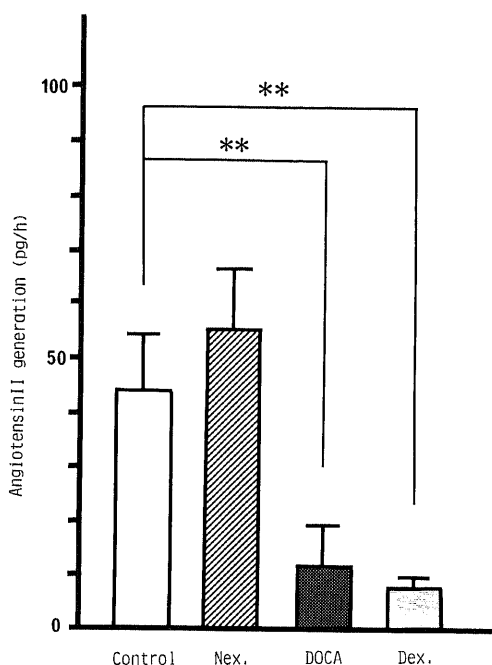


Fig. 4. Angiotensin II generation from the isolated mesenteric arteries in control, nephrectomized (Nex), deoxycorticosterone acetate-treated (DOCA), dexamethasone-treated (Dex) rats. Each column represents mean \pm S.E.M. **, $p < 0.01$.

PAC は、コントロール群、 $395.5 \pm 20.3 \text{ pg/ml}$ に比して、Nex 群では $325.0 \pm 30.5 \text{ pg/ml}$ と低下傾向を認めたものの有意な変化ではなかった。一方、DOCA 群では、 $110.4 \pm 14.6 \text{ pg/ml}$ と有意に抑制されていた ($p < 0.01$)。Dex 群では $323.1 \pm 19.7 \text{ pg/ml}$ とコントロール群に比して、軽度低下傾向を認めたものの有意な変化ではなかった (表 1)。

血漿 ANG II 濃度はコントロール群の、 $395.5 \pm 20.3 \text{ pg/ml}$ に比して、Nex 群 $683.2 \pm 65.1 \text{ pg/ml}$ ($p < 0.01$)、DOCA 群、 $110.4 \pm 14.6 \text{ pg/ml}$ ($p < 0.01$) と有意に低下していた。Dex 群では、 $1107.4 \pm 298.5 \text{ pg/ml}$ と著増していた ($p < 0.01$) (図 3)。

単位時間あたりの腸間膜動脈の ANG II 産生は、コントロール群で、 $43.0 \pm 12.0 \text{ pg/h}$ であった。Nex 群では、 $55.6 \pm 9.3 \text{ pg/h}$ とコントロール群に比して、有意な増加傾向は認められなかった。DOCA 群では、 $12.8 \pm 7.1 \text{ pg/h}$ ($p < 0.01$)、Dex 群では、 $6.9 \pm 1.5 \text{ pg/h}$

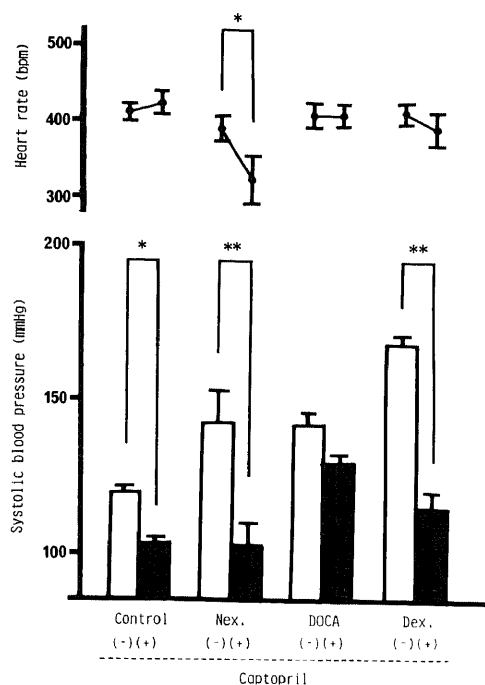


Fig. 5. Effect of captopril on systolic blood pressure (sBP) and heart rate (HR) in control, nephrectomized (Nex), deoxycorticosterone acetate-treated (DOCA), dexamethasone-treated (Dex) rats. Captopril was given orally 10 mg/kg for 2 days. The open columns indicate sBP before captopril administration, and the shaded columns indicate after captopril administration. Each column and point represents mean \pm S.E.M.; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

h ($p < 0.01$) と共に有意に減少していた (図4)。

2. ACEI 投与時の各測定値の変化

コントロール群の血圧は、 $119 \pm 1 \text{ mmHg}$ から、 $102 \pm 3 \text{ mmHg}$ と有意に低下した ($p < 0.05$) が、心拍数には、有意な変動は認められなかった。Nex 群においても血圧は、 $142 \pm 12 \text{ mmHg}$ から $101 \pm 7 \text{ mmHg}$ と有意に低下した ($p < 0.01$)。さらに心拍数も $388 \pm 11 \text{ bpm}$ から $316 \pm 26 \text{ bpm}$ と低下する傾向が認められた ($p < 0.05$)。DOCA 群の血圧は $141 \pm 2 \text{ mmHg}$ から $127 \pm 3 \text{ mmHg}$ と低下する傾向が認められたものの、有意な変動ではなく、心拍数にも、有意な変化は認められなかった。Dex 群では、血圧は $166 \pm 2 \text{ mmHg}$ から $113 \pm 5 \text{ mmHg}$ と有意に低下した ($p < 0.01$) が、心拍数に変化は認められなかった (図5)。

コントロール群の PRA は、 $9.4 \pm 0.9 \text{ ng/ml/h}$ から $17.9 \pm 1.7 \text{ ng/ml/h}$ へと有意に増加した ($p < 0.01$)。Nex 群では、ACEI 投与後も前例測定感度以下であった。DOCA 群においても、ACEI 投与によっても PRA は低値のまま変化は認められなかったが、 $0.6 \pm 0.3 \text{ ng/ml/h}$ と尚産生されていた。Dex 群では、 $17.1 \pm 1.9 \text{ ng/ml/h}$ から $20.0 \pm 1.4 \text{ ng/ml/h}$ と増加した ($p < 0.05$) (図6)。

PAC は、コントロール群において、 395.5 ± 20.3

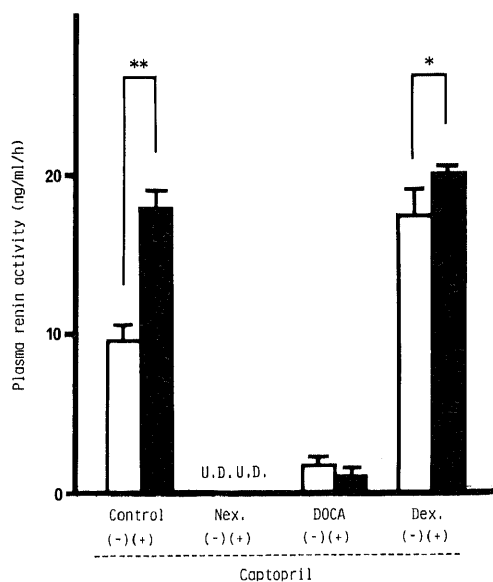


Fig. 6. Effect of captopril on plasma renin activity (PRA) in control, nephrectomized (Nex), deoxycorticosterone acetate-treated (DOCA) and dexamethasone-treated (Dex) rats. As to other comments and symbols, refer to Fig. 5.

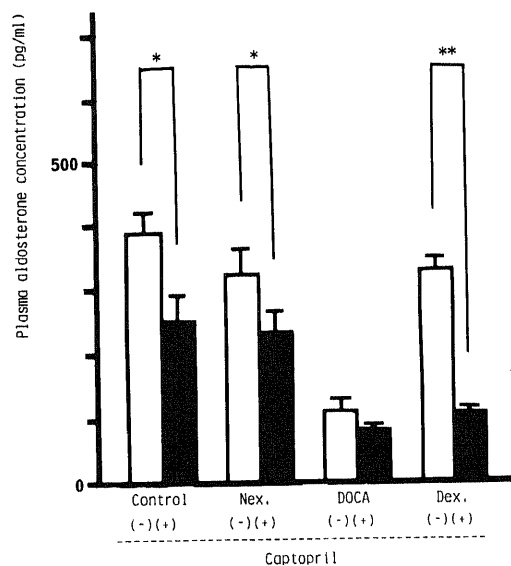


Fig. 7. Effect of captopril on plasma aldosterone concentration (PAC) in control, nephrectomized (Nex), deoxycorticosterone acetate-treated (DOCA) and dexamethasone-treated (Dex) rats. As to other comments and symbols, refer to Fig. 5.

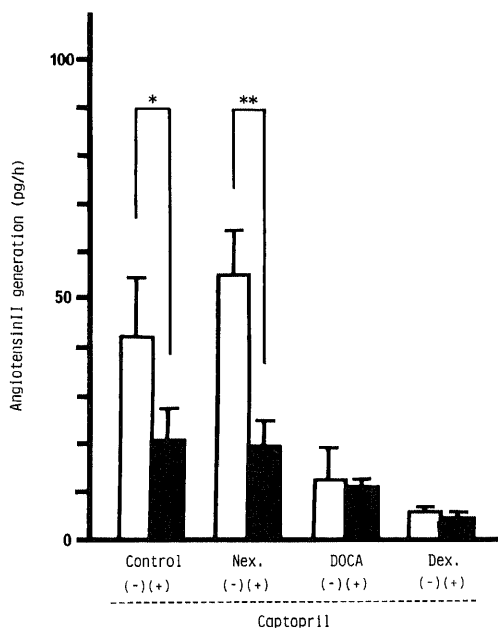


Fig. 8. Effect of captopril on angiotensin II generation from the isolated rat mesenteric arteries in control, nephrectomized (Nex), deoxycorticosterone acetate-treated (DOCA) and dexamethasone-treated (Dex) rats. As to other comments and symbols, refer to Fig. 5.

pg/ml から 255.8 ± 38.6 pg/ml と ACEI 投与により有意に抑制された ($p < 0.05$). Nex 群においても 325.0 ± 30.5 pg/ml から 230.0 ± 23.5 pg/ml と抑制された ($p < 0.05$). DOCA 群では, 89.7 ± 5.3 pg/ml と低値のまま, 変動は認められなかった. Dex 群では, 323.1 ± 19.7 pg/ml から 104.4 ± 4.2 pg/ml と有意に抑制された ($p < 0.01$) (図7).

単位時間あたりの腸間膜動脈のANG II 産生は, ACEI 投与により, コントロール群では, 43.0 ± 12.0 pg/h から 20.6 ± 6.5 pg/h と抑制された ($p < 0.05$). また, Nex 群においても, 55.6 ± 9.3 pg/h から 19.0 ± 5.5 pg/h と有意に抑制された ($p < 0.01$). DOCA 群では, ACEI 投与後も 11.0 ± 0.7 pg/h と低値のまま変化が認められなかった. Dex 群でも, 同様に, ACEI 投与後も 4.7 ± 1.3 pg/h と低値のままであった(図8).

尚, 灌流液中の, ラクテートデヒドロゲナーゼ (lactate dehydrogenase, LDH) の値は, 組織障害の指標となるが, すべて正常範囲内であった.

II. ET の昇圧反応について

AIIA 注入により, ANG II の昇圧反応は著明に抑制された. しかしながら, ET は, AIIA 注入後も注入前と同程度の昇圧反応が認められた (図9).

NA 1μ mol 注入時の昇圧反応性を対照としたところ, コントロール群の平均灌流圧は, ET 0.1 nmol では NA 1μ mol 注入時の79%, 1 nmol では171%の昇圧反応を認めた. Nex 群では, ET 0.1 nmol にて42%, 1 nmol では67%, DOCA 群では, ET 0.1 nmol にて100%, 1 nmol にて170%となり, 用量依存性に ET による昇圧反応が増大した. Nex 群では, 他群に比して ET 注入時のモニター圧ピークが低いものであった (図10).

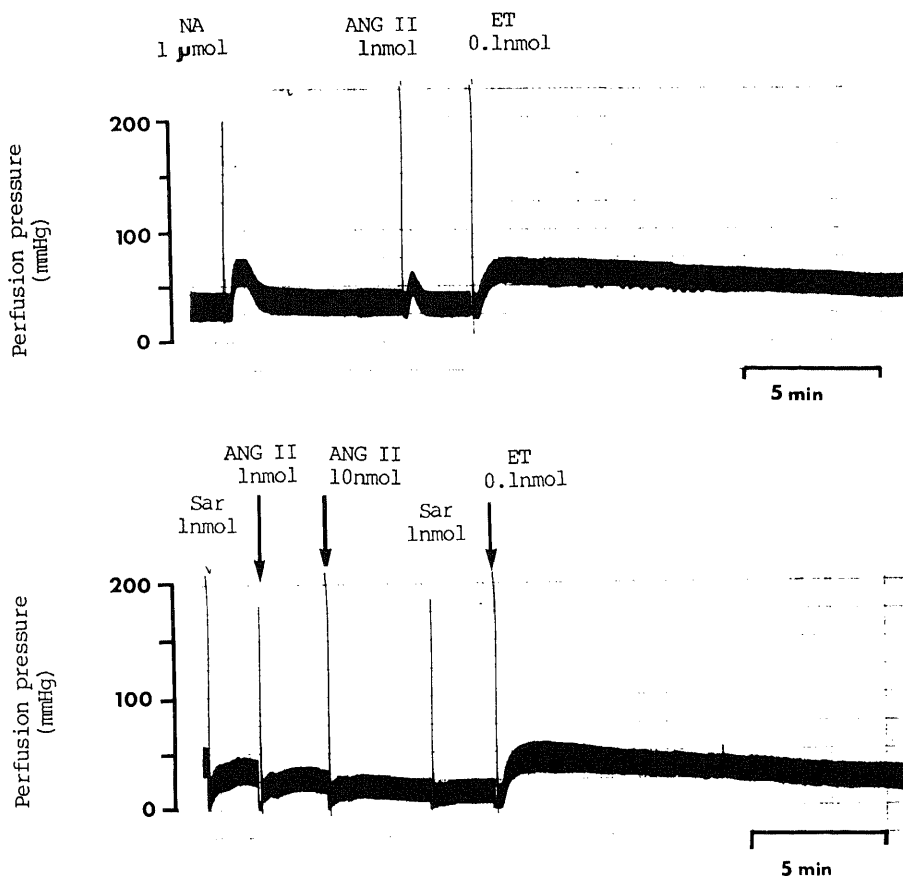


Fig. 9. Perfusion pressure response to angiotensin II (ANG II), saralasin (Sar) and endothelin (ET) in the isolated mesenteric arteries. Each drug were bolus injected in the perfusate. Upper panel shows basal response of ANG II and ET. Lower panel shows the response of ANG II and ET after Sar injection. NA, noradrenalin.

考 察

近年、血管壁に R-A 系の各構成要素の存在が確認されて以来、局所における生理的役割が注目されている。腸間膜動脈灌流標本を用いた今回の検討では、コントロール群および実験高血圧群において、灌流液中に ANG II 活性が認められたことより、動脈壁で、ANG II を産生していることが示された。

今回、特異抗体を用いた高感度ラジオイムノアッセイにて ANG II を測定したが、この特異抗体は、ANG III と 100% の交差活性をもっていることが確認された。しかしながら、Nakamaru ら²⁴⁾は、HPLC にての腸間膜動脈灌流液中の ANG III ピークは、ANG I、ANG II ピークに比べて、かなり低いことを報告している。さらに、ANG III の血管収縮作用は、ANG II の約 20% とされているため²⁵⁾、血管壁 R-A 系の血圧調節機構に、ANG III の関与している比率は少ないものと推察される。

ACEI は当初、その生理作用より、腎血管性高血圧症や高レニン性高血圧症などレニン依存性高血圧症に対し有効であるとされていた。その後、低レニン性高血圧症例²⁶⁾や動物実験では両側腎摘出ラット²⁷⁾におい

ても、ACEI はある程度降圧効果を発揮することが報告され、その降圧機序に腎 R-A 系の抑制以外の因子が関与していることが示唆された。今回の検討では、コントロール群、Nex 群にて、ACEI 投与にて有意な降圧効果が得られ、また同時に血管壁 ANG II 産生の低下も認められたことにより、ACEI は腎 R-A 系のみならず血管壁 R-A 系に対しても抑制効果があることが示唆された。Asaad ら²⁸⁾も、ラットの血管壁から抽出したレニン活性を測定した結果、両側腎摘出 24 時間後、PRA は著減するのに比して、動脈壁レニンは低下しないことを示し、さらに ACEI は、両側腎摘出ラットに対しても、降圧効果を有していることや、ACEI 投与により、PRA とともに血管壁レニンの増加が認められることを報告し、ACEI が血管壁 R-A 系にも作用している可能性を示唆している。

ACEI の降圧機序として、このような血管壁 R-A 系の抑制による作用の他、ACE が血管拡張作用およびプロスタグランジン合成促進作用を持つブラジキニン (bradykinin, BK) を分解するキナーゼ II と同一酵素であることから、血中 BK の増加が ACEI の降圧作用に関与していることが報告されている²⁹⁾。さらに、NA の血管収縮作用の抑制、バソプレシン分泌抑制な

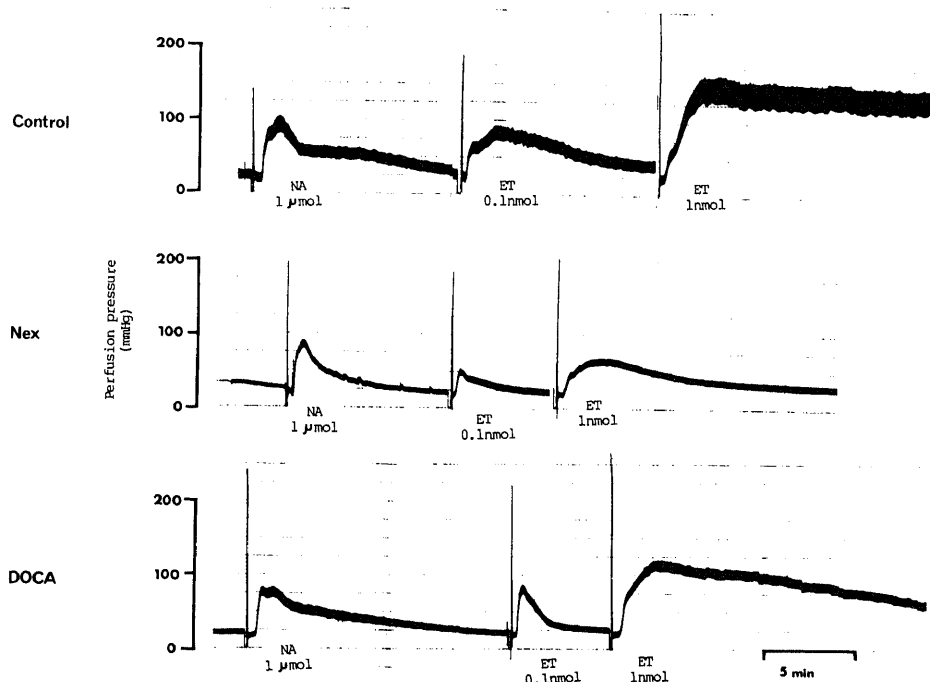


Fig. 10. Perfusion pressure response to endothelin (ET) in the isolated mesenteric arteries from control, nephrectomized (Nex) and deoxycorticosterone acetate-treated (DOCA) rats.

どの機序も提唱されている。

Okumura ら³⁰は腎血管性高血圧症のモデルである2腎性1腎動脈狭窄ラットを用いた検討で、急性期には、血圧とともにPRAは著明に増加するが、慢性期になると血圧は高値が持続しているにもかかわらず、PRAは次第に低下してくる、さらにその時点においても、ACEIの降圧効果が認められることが示された。この理由として、肺、大動脈、腸間膜動脈のACEI活性が、慢性期において著明に増加していることにより、2腎性1腎動脈狭窄ラットの慢性期の高血圧維持に、組織R-A系が関与し、さらにその調節は、腎R-A系とは異なる機序によるものであることが示唆された。

今回、Nex群では、PRAが測定感度以下、血漿ANG IIも著明に低下し、循環ホルモンとしてのR-A系が高度に抑制されているにもかかわらず、コントロール群と同程度以上の血管壁ANG II産生が認められ、他のモデルにおいても血漿レベルと解離していた。この結果は、血管壁R-A系が腎R-Aと独立した機能を有しているというOkumuraらの仮説を支持するものであった。また、Loudon ら³¹も、両側腎摘出ラットに対して、外因性にレニンを投与すると、PRAは一過性に増加するがすぐに低値を示すようになるのに比べて、大動脈組織のレニンは、しばらくのあいだその活性を有していることから、両側腎摘出ラット高血圧発症に、血管壁レニンの関与を示唆している。一方、不活性型レニンに関しても、腎以外の組織で産生されている可能性が示唆され、また局所に作用し血圧調節に関与していることが推察されている。ヒト血漿中には、総レニン活性の60~90%の不活性型レニンが存在していることが報告されており³²、腎および血漿中の不活性型レニンの一部はレニンの前駆体であることが判明してきていたが、他の不活性型レニンの生理学的意義は、今だ不明点が多い。しかし、無腎症例において、活性型レニンが低下しているにもかかわらず血漿中の不活性型レニンは必ずしも低下していないとする報告も多く^{33,34}、このことは、上記の仮説を支持するものである。

φLgaard ら⁴⁷は、無腎症例においても、アルドステロン分泌は認められ、その分泌刺激因子として血清カリウムが重要な役割を担っていることを示唆している。今回、Nex群において、PACには抑制が認められなかった点に関しては、同様の機序が推察される。

DOCA食塩高血圧ラットは、低レニン性高血圧症のモデルであるが、その高血圧発症の原因として、ナトリウム貯留の他、交感神経系³⁶やバソプレシン^{37,38}な

どの関与が報告されている。一方、Nakamaru ら²⁹は、腸間膜動脈灌流系にて、血管壁ANG II産生がイソプロテレノールにて増加し、プロプラノロールにて減少することにより、血管壁R-A系の調節機構として、交感神経系の関与を示唆している。しかしながら、交感神経系の亢進状態が予測されるDOCA群において、血管壁ANG II産生が低下していたことより、DOCA食塩高血圧ラットの高血圧発症には、ナトリウム貯留による体液増加が主であることが示唆された。また、DOCA群では、ACEI投与により軽度血圧が低下する傾向が認められ、その降圧にカリクレイン-キニン系、プロスタグランジンが関与しているという報告³⁹もあるが、今回の検討では、その降圧は有意な変化ではなく本実験高血圧モデルに対するACEIの降圧効果は少ないものと考えられる。

糖質コルチコイド過剰により、ラットにおいて高血圧が発症することは以前より報告されており⁴⁰⁻⁴²、ヒトにおいても高血圧はクッシング症候群の主要症候である。糖質コルチコイド過剰による高血圧発症の機序に関しては、現在なお十分に解明されていない。Krakoff ら⁴³は、高血圧を有するクッシング症候群8例を対象にPRA、血漿アンジオテンシノーゲン濃度等を検討したところ、低カリウム血症、PRAの抑制などの鉱質コルチコイド過剰による症状を呈する例は少なく、血漿アンジオテンシノーゲン濃度が多くの例で増加していたことにより、その高血圧の発症に、R-A系の機能亢進が関与していることを示唆している。また、Elijovich ら⁴⁴、Suzuki ら⁴⁵は、ACEIを投与すると、Dexラットで有意な降圧効果が認められたことより、Krakoff ら⁴³と同様に、この高血圧の誘因としてのR-A系の役割を重要視している。今回の実験においても、コントロール群に比して血圧が高かったDex群で、ACEIにて有意な降圧が認められた。

一方、遺伝子の面からCampbell ら⁹は、Dexラットでは、肝、大動脈、副腎、腸間膜動脈などアンジオテンシノーゲンのmRNAが同定されたすべての組織において、そのmRNAが増加していることを報告した。しかしながら、今回Dex群では、血漿ANG IIの著しい上昇に比して、血管壁ANG II産生はむしろ低下していた。これらの結果は、局所においてアンジオテンシノーゲンが充分存在しているにもかかわらず、ANG産生は抑制されていることになり、その理由として腎R-A系機能の著しい亢進等が関与していることが推察される。また、“ineffective mRNA”との関連も提唱されている。

さらに、Campbell らは、両側腎摘出ラットの肝で

は、アンジオテンシノーゲンの mRNA が増加しているが、逆に大動脈、副腎、腸間膜動脈などの組織では減少していることを報告した。一方で、Cutkowska ら⁴⁴⁾により、両側腎摘出ラットでは、血管壁アンジオテンシノーゲンが増加していることが報告されている。この結果の相違は、血管壁レニンが両側腎摘出ラットで低下しないとする先の報告や、血管壁で産生される ANG II が両側腎摘出ラットで低下しないとする今回の結果および Nakamaru ら⁴⁵⁾の報告から、肝で産生の亢進したアンジオテンシノーゲンが血管壁に取り込まれている可能性や、その上さらに局所で産生された ANG II の“autocrine”作用による抑制などの機構が推察されるが、その問題に関して述べた報告はなく、今後さらに検討していく必要があるものと考えられる。

ET は21のアミノ酸から構成されるペプチドであり、その DNA 構造に至るまで同定され、産生調節因子として細胞外カルシウムイオン (Ca^{++}) の重要性も報告されている¹⁷⁾。また、ET の血管収縮作用は、ニューロペプチド Y、バソプレシン、ANG II より強いものであるとも言われている。今回の検討では、ANG II の 1/100量の ET 注入によっても、ANG II より強い昇圧反応が認められた。また、ET の血管収縮作用は、AIIA の前処置によっても抑制されなかったことより、受容体レベルでの ANG II と ET の相互作用はないことが示唆された。また、Nex 群にて、ET による昇圧性が軽度低下しており、その原因のひとつとして、血管壁で産生された ANG II による抑制も考えられたが、血管壁 ANG II 産生が抑制されている DOCA 群において、コントロール群と同程度の ET の昇圧反応が認められたことよりその仮説は否定的である。

細胞内 Ca^{++} はレニン放出を抑制することが報告⁴⁶⁾されており、一方で、ET は血管平滑筋内の Ca^{++} 濃度を増加させる作用があるとも言われている。さらに、交換神経刺激により、増加した糸球体からのレニン放出を ET は抑制することが報告されている⁴⁷⁾。以上より、外因性の ET による昇圧反応は、血管壁 R-A 系よりむしろ、細胞外 Ca^{++} 濃度等の因子に強く影響を受けていることが示唆された。

結 論

各種実験高血圧ラットを用いた腸間膜動脈灌流実験において血管壁 ANG II 産生を測定し、さらに、ACEI の血管壁 ANG II 産生に及ぼす影響に関しても検討した。また、外因性の ET による昇圧反応を、摘

出した腸間膜動脈を用い検討し、以下の結果を得た。

1. 灌流液抽出検体において測定された ANG II は、HPLC にて同定された。

2. 腎 R-A 系が消失した状態である Nex 群においても、コントロール群と同程度の血管壁 ANG II 産生が認められた。ACEI 投与により血圧ならびに血管壁 ANG II は減少したが、PRA は ACEI 投与後も測定感度以下であった。

3. 腎 R-A 系が抑制された状態である DOCA 群では、血管壁 ANG II 産生は減少しており、ACEI 投与にても有意な降圧効果は認められなかった。

4. Dex 群では、PRA、血漿 ANG II 濃度は著明に増加していたが、血管壁 ANG II 産生はむしろ抑制されていた。また、ACEI 投与にて有意な降圧効果が認められた。

5. 用量依存性に ET による昇圧反応が増大し、ET の作用は ANG II より強力であった。また、ET の昇圧反応は、AIIA によっても抑制されなかった。

以上の結果より、血管壁においても ANG II が産生されていることが示され、Nex 群では、その昇圧機構に、血管壁 R-A 系が関与していることが示唆された。また、血管壁 R-A 系は、腎 R-A 系とは独立して機能していることが示され、さらに、ACEI は、腎 R-A 系のみならず血管壁 R-A 系に対しても抑制効果を有することが示唆された。一方、ET は、ANG II より強い血管収縮作用を有することが示され、受容体レベルでの ANG II と ET の相互作用は少ないことが示唆された。さらに、外因性 ET の昇圧反応には、血管壁 R-A 系の関与は少ないことが示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、終始御指導、御校閲を賜りました恩師竹田亮祐教授に深甚なる謝意を表わします。また、直接御指導、御助言を頂いた金沢大学第二内科宮森勇講師、ならびに多大な御協力を頂きました金沢大学第二内科第二研究室 A の各位に深く感謝いたします。

尚、本論文の要旨は、第30回日本腎臓学会総会および第8回国際高血圧学会サテライトシンポジウムにて報告した。

文 献

- 1) Köhler, G., & Milstein, C.: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, **256**, 495-497 (1975).
- 2) Inagami, T., & Murakami, K.: Pure renin, isolation from hog kidney and characterization. *J. Biol. Chem.*, **252**, 2978-2983 (1977).

- 3) Naruse, K., Murakoshi, M., Osamura, Y., Naruse, M., Toma, H., Watanabe, K., Demura, H., & Shizume, K.: Immunological evidence for renin in human endocrine tissues. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **61**, 1, 172-177 (1985).
- 4) Naruse, M., & Inagami, T.: Antibody-sensitive renin of adrenal and resistance vessels is markedly elevated in spontaneously hypertensive rats. *Clin. Sci.*, **63**, 1, 187s-189s (1982).
- 5) Fallon, R. R., Dzau, V. J., Quay, S., & Haber, E.: Renin synthesis by canine arterial smooth muscle cell. *Circulation*, **60**, II-10 (1979).
- 6) Speck, G., Poulsen, K., Unger, T., Rettig, R., Bayer, C., Scholkens, B. & Ganten, D.: In vivo activity of purified mouse brain renin. *Brain Res.*, **219**, 371-384 (1981).
- 7) Paul, M., Wagner, D., Metzger, Ganten, D., Lang, R. E., Suzuki, F., Murakami, K., Burbach, J. H. P. & Ludwig, G.: Quantification of renin mRNA in various mouse tissues by a novel solution hybridization assay. *J. Hypertens.*, **6**, 247-252 (1988).
- 8) Kim, S., Shinjo, M., Fukamizu, A., Miyazaki, H., Usuki, S. & Murakami, K.: Identification of renin messenger RNA sequence in rat ovary and uterus. *Byochem. Byophys. Res. Comm.*, **15**, 169-175 (1987).
- 9) Campbell, D. J. & Habener, J. F.: Angiotensinogen gene is expressed and differentially regulated in multiple tissues of the rat. *J. Clin. Invest.*, **78**, 31-39 (1986).
- 10) Ohkubo, H., Nakayama, K., Tanaka, T. & Nakanishi, S.: Tissue distribution of rat angiotensinogen mRNA and structural analysis of its heterogeneity. *J. Biol. Chem.*, **261**, 319-323 (1986).
- 11) Caldwell, P. R. B., Seegal, B. C., Hsu, K. C., Das, M. & Soffer, R. G.: Angiotensin-converting enzyme: vascular endothelial localization. *Science*, **191**, 1050-1051 (1976).
- 12) Miyazaki, M., Okunishi, H., Nishimura, K. & Toda, N.: Vascular angiotensin-converting enzyme activity in man and other species. *Clin. Sci.*, **66**, 39-45 (1984).
- 13) Ganten, D., Herman, K., Unger, T. H. & Lang, R. E.: The tissue renin angiotensin system: Focus on brain angiotensin, adrenal gland and arterial wall. *Clin. Exp. Hypertens.*, **A5**, 1099-1188 (1983).
- 14) Naruse, M., Shizume, K. & Inagami, T.: Renin and angiotensins in cultured mouse adrenocortical tumor cells. *Acta. Endocrinol.*, **108**, 545-549 (1985).
- 15) Okumura, T., Clemens, D. & Inagami, T.: Renin, angiotensins, angiotensin converting enzyme in neuroblastoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **78**, 6940-6943 (1981).
- 16) Kifor, I. & Dzau, J.: Endothelial renin-angiotensin pathway: evidence for intracellular synthesis and secretion of angiotensins. *Circ. Res.*, **60** (3), 422-428 (1986).
- 17) Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Tomobe, Y., Kobayashi, M., Mitsui, Y., Goto, K. & Masaki, T.: A novel vasoconstrictor peptide produced by endothelial cells. *Nature*, **323**, 411-415 (1988).
- 18) Tomobe, Y., Miyauchi, Y., Saito, A., Yanagisawa, M., Kimura, S., Goto, K. & Masaki, T.: Effect of endothelin on the renal artery from spontaneously hypertensive and Wistar Kyoto rats. *European J. Pharmacol.*, **152**, 373-374 (1988).
- 19) McGregor, D. D.: The effect of sympathetic nerve stimulation on the vasoconstrictor responses in perfused mesenteric blood vessels of the rat. *J. Physiol. Lond.*, **177**, 21-30 (1965).
- 20) Miyamori, I., Yasuhara, S., Ikeda, M., Koshida, H., Takeda, Y., Morise, T., & Takada, R.: Effect of sodium intake on prostacyclin generation in rabbit mesenteric artery. *Jap. Cir. J.*, **47** (10), 1216-1220 (1983).
- 21) Miyamori, I., Yasuhara, S., Ikeda, M., Koshida, H., Takeda, Y., Morise, T., Nagai, K., Okamoto, S. & Takeda, R.: Participation of experimental glucocorticoid hypertension in rats. *Clin. Exp. Hypert.*, **A7** (4), 513-524 (1985).
- 22) Workman, R. J., Sussman, C. R., Burkitt, D. W. & Liddle, G. W.: Circulating levels of angiotensin I measured by radioimmunoassay in hypertensive subjects. *J. Lab. Clin. Med.*, **93**, 847-856 (1979).
- 23) Takeda, R., Morimoto, S., Uchida, K. & Miyamori, I.: Changes in plasma renin activity and plasma aldosterone in the induced paralytic

attack of thyrotoxic periodic paralysis. *Acta Endocrinol.*, **82**, 715-727 (1978).

24) Nakamaru, M., Jackson, E. K. & Inagami, T.: β -Adrenoreceptor-mediated release of angiotensin II from mesenteric arteries. *Am. J. Physiol.*, **250**, H144-H148 (1986).

25) Ng, K. K. F. & Vane, J. R.: Conversion angiotensin I to angiotensin II. *Nature*, **216**, 762-766 (1967).

26) Brunner, H. R., Gavras, H., Waeber, B., Kershshaw, G. R., Turini, G. A., Vucovich, R. A. & McKinstry, D. N.: Oral angiotensin converting enzyme inhibitor in long-term treatment of hypertensive patients. *Ann. Int. Med.*, **90**, 19-23 (1979).

27) Thurston, H. & Swales, J. D.: Blood pressure response of nephrectomized hypertensive rats to converting enzyme inhibition: evidence for persistent vascular renin activity. *Clin. Sci. Mol. Med.*, **52**, 299-304 (1977).

28) Asaad, M. M. & Antonaccio, M. J.: Vascular wall renin in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, **4**, 487-493 (1982).

29) 宮森 勇, 武田仁勇, 池田正寿, 越田英夫, 安原修一郎, 森瀬敏夫, 滝本弘明, 竹田亮祐, 西野友善: レニン非依存性本態性高血圧症における経口アンジオテンシン I 変換酵素阻害剤 (Captopril) の降圧機序, *日本内分泌学会雑誌*, **59**, 907-917 (1983).

30) Okamura, T., Miyazaki, M., Inagami, T. & Toda, N.: Vascular renin-angiotensin system in two-kidney, one clip hypertensive rats. *Hypertension*, **8**, 560-565 (1986).

31) Loudon, M., Bing, R., Thurston, H. & Swales, J. D.: Arterial wall uptake of renal renin and blood pressure control, *Hypertension*, **5**, 629-634 (1983).

32) Sealy, J. E., Atlas, S. A. & Laragh, J. H.: Prorenin and other large molecular form of renin. *Endocr. Rev.*, **1**, 365-369 (1980).

33) Weinberger, H. M., Wade, M. B., Aoi, W., Usa, T., Dentino, M., Luft, F. & Grim, C. E.: An extrarenal source of "reninlike" activity in anephric man. *Circ. Res.*, **40**(Suppl. I), I-1-I-4 (1977).

34) Antonipillai, I., Tan, S. Y., Suzuki, S., Franco-Saenz, R. & Mulrow, P. J.: Active and

inactive renin in low renin status: studies in human plasma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **53**, 694-697 (1981).

35) Rakugi, H., Nakamaru, M., Saito, H., Higaki, J. & Ogihara, T.: Endothelin inhibits renin release from isolated rat glomeruli. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **155**, 1244-1247 (1988).

36) Katholi, R. E., Naftrian, A. J. & Oparil, S.: Importance of renal sympathetic tone in the development of DOCA-salt hypertension in rat. *Hypertension*, **2**, 266-273 (1980).

37) Matuguchi, H. & Schmid, P. G.: Acute interaction of vasopressin and neurogenic mechanisms in DOC-salt hypertension. *Am. J. Physiol.*, **242**, H37-H43 (1982).

38) Mohring, J., Mohring, B., Petri, M. & Haack, D.: Vasopressor role of ADH in the pathogenesis of malignant DOC hypertension. *Am. J. Physiol.*, **232**, F260-F269 (1977).

39) Davis, H. A. & Horton, E. W.: Output of prostaglandins from the rabbit kidney, its increase on renal nerve stimulation and its inhibition by indomethacin. *Brit. J. Pharmacol.*, **46**, 658-675 (1972).

40) Krakoff, L. R., Selvadurai, R. & Sutter, E.: Effect of methylprednisolone upon arterial pressure and the renin angiotensin system in the rat. *Am. J. Physiol.*, **228**, 613-617 (1975).

41) Eljovich, F. & Krakoff, L. R.: Effect of converting enzyme inhibition on glucocorticoid hypertension in the rat. *Am. J. Physiol.*, **238**, H844-H848 (1980).

42) Suzuki, H., Handa, M., Kondo, K. & Saruta, T.: Role of renin-angiotensin system in glucocorticoid hypertension in rats. *Am. J. Physiol.*, **243**, E48-E51 (1982).

43) Krakoff, L., Nicolis, G. & Amsel, B.: Pathogenesis of Hypertension in Cushing's syndrome. *Am. J. Med.*, **58**, 216-220 (1975).

44) Giasson, S. D., Gutkowska, J., Garcia, P. & Genest, J.: Renin substrate in rat mesenteric artery. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **59**, 528-532 (1980).

45) Nakamura, N., Inagami, T., Ogihara, T. & Kumahara, Y.: Effect of captopril on angiotensin II release from vascular tissues in rats. *Clin. Exp.*

Hypertens., A9, 477-480 (1987).

46) Churchill, P. C.: Second messengers in renin secretion. Am. J. Physiol. 249, F175-F184 (1985).

47) ϕ Lgaard, K.: Plasma aldosterone in aneph-

ric and non-nephrectomized dialysis patient in relation to changes in plasma potassium without change in total potassium balance. Acta. Med. Scand., 198, 213-218 (1975).

A Study on Vascular Angiotensin II Generation in the Experimental Hypertension Rats Takao Matsubara, Department of Internal Medicine (II), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Jusen Med. Soc., 98, 35—47 (1989)

Key words vascular renin-angiotensin system, experimental hypertension rat, angiotensin I converting enzyme, endothelin

Abstract

Angiotensin II (ANG II) generation from the isolated mesenteric arteries was measured in control rats, and in hypertensive rat models. In order to elucidate the possible role of the vascular renin-angiotensin system (RAS) for the control of blood pressure, the effect of angiotensin converting enzyme (ACEI) on the ANG II production was also examined. The perfusion pressure (PP) response to endothelin (ET), a novel vasoconstrictor peptide, was also examined in the mesenteric artery preparation obtained from rats with various ANG II levels. In the control rats, 43.0 ± 12.0 pg/h of ANG II was released in the perfusate, which was not significantly changed by nephrectomy (Nex), in spite of the decreased plasma renin activity (PRA) and plasma ANG II concentration in the circulation. ACEI treatment significantly decreased blood pressure (BP) in the control and Nex rats, in parallel with a decreased vascular ANG II generation. In deoxycorticosterone acetate-treated rats, PRA, plasma aldosterone and ANG II concentration were significantly suppressed, and ACEI administration induced a slight but significant decrease in BP. ET produced a sustained increase in PP in the control rat mesenteric arteries. The increase was more potent than ANG II on molar basis, and was not inhibited by ANG II analogue. In conclusion, the present results support that the ANG II is generated in the vascular wall independent of RAS in the circulation, and suggest that the vascular RAS is partly responsible for the antihypertensive action of ACEI. A lack of inhibition of pressor response to ET by ANG II analogue suggests that ET and ANG II possess their own specific receptors.