

正常Wistar

ratの生食腎抽出液に含まれる血管透過因子の同定,及びその特性に関する研究

|       |  |
|-------|--|
| メタデータ | 言語: jpn<br>出版者:<br>公開日: 2017-10-04<br>キーワード (Ja):<br>キーワード (En):<br>作成者: 大山, 俊郎<br>メールアドレス:<br>所属: |
| URL   | <a href="http://hdl.handle.net/2297/8686">http://hdl.handle.net/2297/8686</a>                      |

## 正常 Wistar rat の生食腎抽出液に含まれる血管透過因子の同定,及びその特性に関する研究

金沢大学医学部内科学第二講座 (主任: 竹田亮祐教授)  
東京都養育院付属病院内科 (指導: 村上元孝院長)

大 山 俊 郎

(昭和52年7月15日受付)

実験的に両側腎摘を施した動物に、生食腎抽出液を非経口的に投与すると serous effusion (胸水, 腹水), arteriolar angioneclerosis (臍, 腸間膜などの細小動脈) などの全身血管病変を主体とする“実験的血管障害症候群”, というべき特異な病態を作り得る。

ところでヒトの高血圧性脳出血の基本的動脈病変は、脳の細小動脈の angioneclerosis と考えられており<sup>1)</sup>又この様な vascular lesion の発生に腎臓が重要な位置を占めることも、特に悪性高血圧症との関連から明らかになっている。実験的血管障害症候群に認められる細小動脈病変は、ヒトの高血圧性脳出血を起した脳の細小動脈に見られるいわゆる fibrinoid necrosis に類似する。従って、この症候群の発症機序を追求することによって、ヒトの高血圧性脳出血の病態発生を明らかにできるのではないかと考えからこれまで多くの研究が行なわれてきた。

1940年に Winternitz<sup>2)</sup>が初めてこの症候群を報告して以来、その発生に関与する腎性物質を求める研究が行われてきた。しかしながら現時点では、この症候群の成り立ちを一元的、かつ合理的に説明し得る物質を腎臓から抽出、分離、同定することには成功していない。

Renin<sup>3)-6)</sup>は、早くからこの症候群の成り立ちに関与し得る物質として注目され研究されている。Renin の血管障害作用の本態は、angiotensin 産生を介しての昇圧作用にあると一般に考えられているが、生食腎抽出液の投与で引き起こされる vascular lesion の全てをこの Renin 単独の作用、いいかえれば高血圧のみで説明できるかどうかという点に関して

は異議を唱える研究<sup>7)</sup>もある。従って、必然的に Renin 以外の因子を腎臓に想定し追求する<sup>8)-14)</sup>立場も考えられ、特にわが国で、血管透過作用を障害作用の主体と考える研究(村上<sup>9)</sup>, 尾山<sup>13)</sup>, 中村<sup>14)</sup>)が行なわれてきた。しかしながら、一方の Renin が精製されその物理化学的、薬理学的特性が明らかにされている<sup>15)</sup>のに対して、血管透過因子については、物質の精製及び特性の検討が不充分であり、そのために物質的基盤に立った vascular lesion の成り立ちについての説明がなされていなかった。いいかえれば、この様な因子自体が腎臓中に存在することが、なお実証を欠いていたともいえる。

以上の観点から、著者は正常 Wistar rat の生食腎抽出液中に、まず血管透過因子が存在することを確かめ、これを部分精製し、その物理化学的、薬理学的、生物学的特性について検討を加え、次いでこの因子の実験的血管障害症候群の発症機序における役割について考察を加えた。

### 実験材料及び方法

#### 1. 試薬

Pontamine Blue (東京化成工業), Histamine d-hydrochloride (和光純化学), d-chlorpheniramine (塩之義), Sephadex G-50, G-75 (Pharmacia) Hydroxyl-apatite (生化学工業)を用いた。Angiotensin-I radioimmunoassay Kit は、ダイナボット社より市販されているものを用いた。

#### 2. 血管透過因子の腎よりの抽出、精製

正常 Wistar rat (200~400g) を軽いエーテル麻酔後、断頭しゃ血にて屠殺し、腎臓を取り出し脂肪織

Identification of a Vascular Permeability Factor in Saline Extract of Normal Rat Kidney and its Properties Ooyama Toshiro Department of Internal Medicine (II), (Director: Prof. Ryoyu Takeda), School of Medicine, Kanazawa University. Department of Endocrinology, Tokyo Metropolitan Geriatric Hospital, Tokyo.

被膜を取り除いた。これを直ちに氷冷生食にて繰り返し洗い血液成分をよく除去した後に dry ice acetone にて凍結保存した。凍結腎臓よりできるだけ皮質のみ切り出し、氷冷生食にて20% ホモジネートとし、テフロンホモジナイザー中で5分間ホモジナイズした。ホモジネートを15,000rpm30分間遠心分離し清澄な上清を得て、これを生食腎抽出液とした (Step 1)。次いでこの抽出液を Sephadex G-50 gel chromatography にて分画し (Step 2)、各分画の血管透過活性を測定し、活性の最も強い分画を充分量の 5 mM phosphate buffer, pH 7.2 にて透析し、同 buffer にて平衡化した hydroxyl-apatite chromatography にて分画した (Step 3)。Step 3 で得られた活性分画はさらに polyacrylamide gel electrophoresis により分析した (Step 4)。

Polyacrylamide gel electrophoresis<sup>15)</sup> は、40mM Tris-glycine buffer pH 8.6, 7.5% gel, 1.5mA/tube 4.5 h, 4°C の条件で行った。泳動終了後、12本の gel の内1本を蛋白染色用にとり Amidoblack 10B にて染色した。残り11本の gel は、上端陰極側から5mm巾に切り取り、それぞれ氷冷生食にてホモジナイズし、一夜抽出し蛋白溶液を得た。各 gel から抽出した蛋白質分画は、それぞれ 67mM phosphate buffer, pH 7.4 にて透析後、皮内色素透過活性測定に供した。

### 3. 血管透過活性測定法

#### 1) 家兔皮内色素透過法

実験動物皮膚へ透過した色素を抽出し、その色素量を620nmの吸光度で定量する方法<sup>16)</sup>を用いた。2-3 kgの白色家兔の背部皮内に被検液0.1mlを注射し、5分後に60mg/kgの Pontamine Blue 溶液 (リン酸緩衝化生食水 pH 7.4) を静注し、更に60分後に実験動物を頸動脈切断にてしゃ血、致死せしめた。被検液の色素透過活性は、3匹の実験家兔で得られた測定値の平均値で表わし、又、対照として用いた67mM, phosphate buffer, pH 7.4の示す色素透過を差し引いた。活性はA620nm、又は比活性 A620nm/mg protein で表わした。活性測定に際して、被検液は全て可及的に無菌的に取り扱い、又使用前必ず、67mM phosphate buffer, pH 7.4 にて充分透析した。

#### 2) 抗ヒスタミン実験

抗ヒスタミン実験には、Histamine dihydrochloride を 67mM, phosphate buffer, pH 7.4に溶解し用いた。抗ヒスタミン d-chlorpheniramine 20mg/kg を実験開始20分前に予め家兔腹腔内に投与

し、又対照群家兔には、生理食塩水を腹腔内投与して、実験を行なった。

#### 4. 胸水、腹水惹起作用

皮内色素透過活性測定に際して用いた家兔は、実験終了後、全て開胸開腹し貯留した胸水、腹水の量を胸水は肉眼的に、腹水はピペット又はガーゼにて採取し、その容量を測定した。透過因子の腹水惹起作用は ml 貯溜腹水/1時間で表わした。

#### 5. Renin 活性測定法

Renin 活性は、Gross and Barajas の方法<sup>17)</sup>に従って Renin 酵素活性を radioimmunoassay を用いて測定した。両側腎摘家兔より得た血漿を基質 angiotensinogen として用いた。Renin 活性は、この基質と Renin を 37°C、2時間インキュベーションした際に産生される Angiotensin I 濃度を radioimmunoassay にて測定し、活性単位は  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Angiotensin I/2hrs./mg protein で表わした。

#### 6. Protease 活性測定法

Protease 活性は、既に報告した <sup>14</sup>C-caseinolysis 法<sup>18)</sup>に従って測定した。67mM phosphate buffer, pH 7.1 で予め充分透析した Protease 溶液 50  $\mu\text{l}$ 、2% <sup>14</sup>C-casein 溶液 50  $\mu\text{l}$ 、同上 buffer 100  $\mu\text{l}$  を混合し、37°C 2時間反応させ 6% TCA 溶液 250  $\mu\text{l}$  で反応を止め、3000回転30分遠心分離を行ない上清を取り、その放射活性を液体シンチレーションカウンター (Aloka) で測定した。活性単位は  $\text{cpm} \times 10^3/\text{mg protein}$  で表わした。

#### 7. 蛋白濃度測定

蛋白濃度の測定は、Lowry 法<sup>19)</sup>、又は紫外部 (280 nm) 吸収測定にて求めた。

#### 8. 組織学的検討

250-300gの Wistar rat 5匹に軽いエーテル麻酔を施した後、両側腎摘を行ない、3時間後にミリポアフィルターを通すことによって滅菌した被検液、及び対照液 (滅菌生食) のそれぞれ0.1mlを皮内注射した。注射後、動物には水だけ自由に与え飼育した。腎摘18時間後に断頭にて屠殺し、速やかに注射部皮膚を電顕用固定 (グルタルアルデヒド・四酸化オスミウム)、光顕用固定 (中性ホルマリン) を施した。光顕用標本は、パラフィン切片につき、HE、Azan、PAS 染色を施し、又、電顕標本は超薄切片とし、酢酸ウラニールとクエン酸鉛の二重染色を施し、JEM-100 B 透過型電子顕微鏡で観察した。

## 実験結果

血管透過因子の生食腎抽出液からの精製

### Sephadex G-50 chromatography による生食腎抽出液中血管透過因子の分離 (Step-2, 図1)

Sephadex G-50 gel chromatography にて生食腎抽出液を分画し、各分画について皮内色素透過活性を調べると3つの血管透過活性分画が認められた。これら3種の血管透過因子は全て次の step まで精製を進め、各々の作用を比較したところ、図1中 fraction 2 に示される分画に認められる活性因子の作用が最も強かった。

### Hydroxyl-apatite chromatography による fraction 2 の分離 (Step-3, 表1)

Fraction 2 について hydroxyl-apatite chroma-

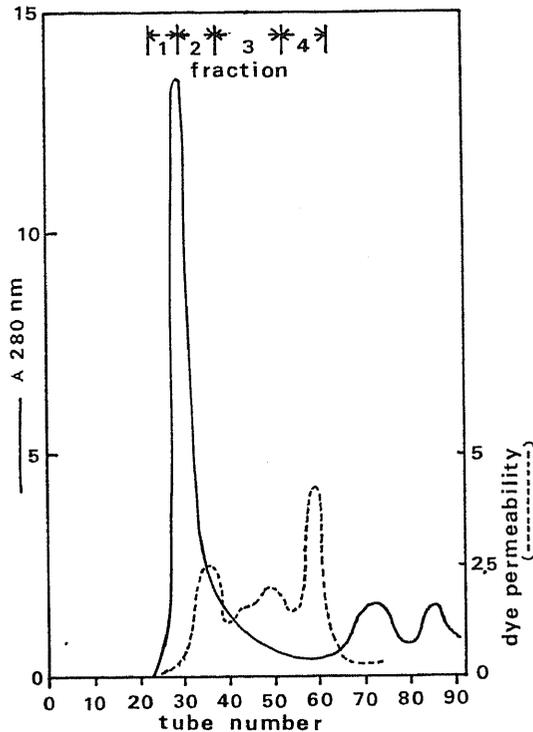


Figure 1. Separation of vascular permeability factor from kidney extract of normal rats by Sephadex G-50 chromatography. 360 mg of kidney extract lyophilizate was dissolved in 3 ml of 5 mM phosphate buffer, pH 7.4 and applied to a Sephadex G-50 column (3×40 cm) equilibrated with the same buffer. Flow rate was 20 ml/hr and 3 ml effluents were collected. Eluates were tested for dye permeability activity. Fractions 1,2,3 and 4 consisted of eluates in Tubes No.24-30, 31-38,39-53 and 54-63, respectively.

graphy を行なうと、表1に示した如く5つの蛋白分画が得られ、皮内色素透過活性は5 mM phosphate buffer, pH 7.2で溶出される分画に認められた。

### Polyacrylamide gel electrophoresis による血管透過因子の精製 (Step-4, 図2)

Step-3 で得られた活性分画を polyacrylamide gel electrophoresis を用いて更に分画した結果、

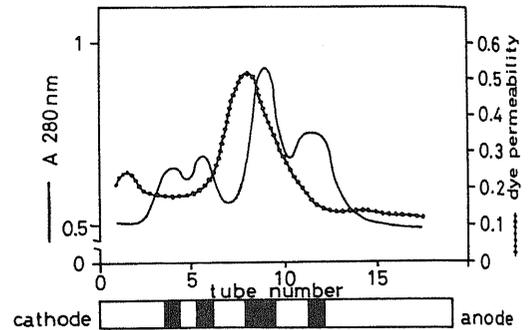


Figure 2. Purification of vascular permeability factor by polyacrylamide gel electrophoresis.

5 mM eluate obtained from hydroxyl apatite chromatography was applied to 12 tubes of 6.5×105 mm (0.5 mg protein/tube).

Gel stained with amido-black was indicated in a lower part of figure.

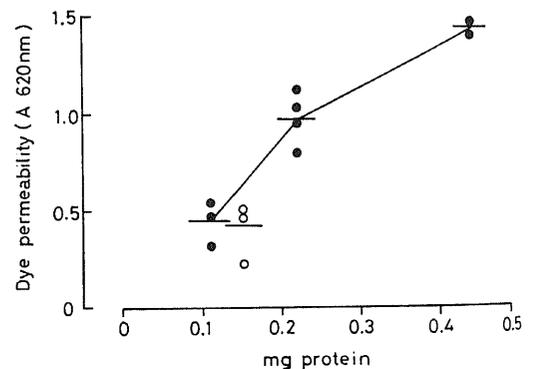


Figure 3. Effect of vascular permeability factor dose on dye permeability.

The effect of a dose of vascular permeability factor on dye permeability in rabbit's skins was checked. Each (●) indicates the measured dye permeability of individual rabbits, and (○) that of a rat. Heat treated 5 mM eluate obtained from hydroxyl apatite chromatography was used as the vascular permeability factor.

Table 1. Purification of vascular permeability factor with hydroxyl apatite gel

| Eluate         | Total protein |      | D.P.A | Total D.P (%) |
|----------------|---------------|------|-------|---------------|
|                | (mg)          | (%)  |       |               |
| 5 mM, pH 7.2   | 31.3          | 26   | 2.6   | 81.3 109      |
| 50 mM, pH 7.0  | 16.4          | 13.6 | 0     | 0             |
| 100 mM, pH 6.8 | 8.6           | 7    | 0     | 0             |
| 200 mM, pH 6.8 | 20.8          | 17.3 | 0     | 0             |
| 500 mM, pH 6.8 | 17.2          | 14.3 | 0     | 0             |
| Recovery       | 94.3          | 78.5 | 0     | 81.3 109      |

120 mg protein of fraction 2 with specific dye permeability activity of 0.62 was applied to a 1×10 cm column of hydroxyl apatite gel equilibrated with 5 mM phosphate buffer, pH 7.2. Elution was performed with the step-wise changes of the phosphate buffer. Total protein (%) means the ratio of the quantity of protein eluted with each buffer against 120 mg protein. Recovery of D.P (%) - means the ratio of D.P. recovered by this chromatogram against total D.P. applied to the column.

D.P.A : Dye Permeability Activity (A 620 nm/mg protein)

D.P : Dye Permeability (A 620 nm)

Table 2. Effect of anti-histamine on dye permeability induced by vascular permeability factor

| Sample                                | D.P (A 620 nm)  | D.P (A 620 nm)  |
|---------------------------------------|---|---|
| Phosphate Buffer                      |  0.105 |  0.095 |
| Histamine (40 μg)                     |  0.7   |  0.18  |
| Vascular Permeability Factor (300 μg) |  0.604 |  0.565 |

Strength of dye leakages in rabbits without (left) and with (right) anti-histamine treatment. Dye permeability induced by 300 μg of vascular permeability factor was not affected with anti-histamine treatment, whereas dye permeability induced by 40 μg of histamine was completely suppressed by anti-histamine treatment. D.P (Dye Permeability)

図2に示す如く、皮内色素透過活性は、major protein band に少し遅れて泳動する部分に single peak として認められた。

以上の結果、血管透過因子は Step-1 での皮内色

素透過活性の比活性 0.15 から Step-4 では6.8と約50倍精製された。

血管透過因子の特性に関する検討

この様に部分精製した血管透過因子の種々の特性に

Table 3. Effect of heat treatment on dye permeability, renin and protease activities

|               | Sample | Dry Permeability (A 620 $\mu$ g) | Renin Activity | Protease Activity (cpm $\times 10^3$ /mg protein) |
|---------------|--------|----------------------------------|----------------|---|
| Native eluate | 5 mM   | 0.55                             | 1.781          | 42.06   |
| Heated eluate | 5 mM   | 0.93                             | 0.008          | 3.41  |

Renin activity ( $\mu$ g/ml angiotensin I/2 hrs./mg protein)

110  $\mu$ g protein of 5 mM eluate obtained from hydroxyl apatite chromatography was used to assay dye permeability.

ついて以下検討した。

Step-4 で得られるサンプル量が微量なため、Step-3 の血管透過因子を実験に用いた。又、この Step-3 の血管透過因子分画は、後述の如き理由で、100  $^{\circ}$ C、10分加熱処理し用いた。

薬理学的特性 (図3、表2)

図3に示す如く、家兎の皮内色素透過活性と用いた血管透過因子の間に用量反応関係を認めた。又図中 (o) は、同種 Wistar rat の背部皮内に示された皮内色素透過活性を示しており、家兎における同等の活性が rat においても認められることを示している。家兎の皮内に注射された血管透過因子の活性は、皮内注射後30~60分で極大に達し、注射後120分では消失し、short acting agent として知られる、histamine のそれに比べて著しく作用持続が長いことが注目された。又、表2に示す如く、血管透過因子活性は、抗ヒスタミン処置群、0.565と抗ヒスタミン無処置群、0.604との間に本質的な差がなく、histamine liberator として働いているものではない事が明らかである。

耐熱性 (表3)

血管透過因子の活性は、100 $^{\circ}$ C、10分の熱処理を加えることにより失活せず、むしろその活性は増強する傾向を得た。即ち表3に示す如く、無処置血管透過因子の活性、0.55に対し加熱処理血管透過因子のそれは、0.93と大であり、活性の低下は認められなかった。一方 Step-3 の血管透過因子は同表に示す如く、1.781 $\mu$ g/ml angiotensin I/2hrs/mg protein の Renin 活性及び 42.06 cpm $\times 10^3$ /mg protein の protease 活性を含んでいるが、これら酵素活性

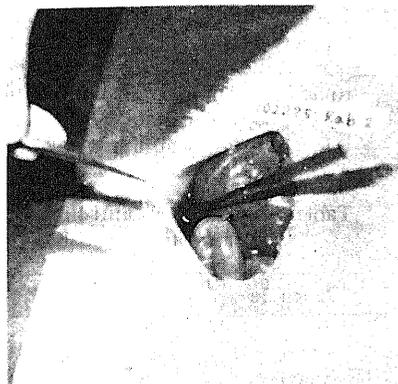


Figure 4. Peritoneal effusion induced by vascular permeability factor. Peritoneal effusion in a rabbit 1 hour after intradermal injection of heated vascular permeability factor. 660  $\mu$ g protein of 5 mM eluate was used.

はいづれも、100 $^{\circ}$ C、10分の加熱処理にて失活した。

物理化学的特性 (図2、表4)

血管透過因子は、図2に示した如く、アルカリ条件下での disc 電気泳動にて陰極から陽極へ移動する物質であり、その移動度はマーカーとして用いた bromphenol-blue のそれを1.0と定めると Rf=0.4 であり、anionic charge を帯びた物質と考えられた。これに加えて、表4に示した如く、生食腎抽出液を100 $^{\circ}$ C、10分加熱処理した後に、残存する蛋白質分画を飽和硫酸溶液で分画すると、耐熱性血管透過活性は100%飽和硫酸で沈澱する蛋白分画の中に認められた。この100%飽和硫酸沈澱分画を更に、Sephadex G-75 chromatography にかけた結果 single

peak の血管透過活性が認められ、又その溶出位置から、その分子量は約 4 万前後と推定された。

serous effusion inducing activity (表 5, 図 4, 図 5)

皮内色素透過活性の測定に際して、実験終了後家兎

を開胸、開腹した際に著しい胸水腹水の貯留している事実を認めた。この作用は、表 5 に示す如く Sephadex G-50 chromatography にて得られる fraction 2 に最も強くかつ高頻度に認められた。腹水貯留量は胸水量に比べてどの家兎においても著しかった。

Table 4.  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  fractionation of heat-stable vascular permeability factor from kidney extract

| Fraction               | Dose (mg) | Permeability Activity (A 620 nm) |
|------------------------|-----------|----------------------------------|
| Original renal extract | 0.9       | 0.145                            |
| 33 % precipitate       | 0.8       | n.d.                             |
| 55 % precipitate       | 0.5       | n.d.                             |
| 100 % precipitate      | 0.23      | 0.102                            |
| 100 % sup.             | 0.38      | n.d.                             |

n.d.: not detectable

Table 5. Effusion-inducing activities of four protein fractions

| Sample           | Rabbit   | Dose (mg) | Dye Permeability (A 620 nm) | Peritoneal Effusion (ml) | Pleural Effusion |
|------------------|----------|-----------|-----------------------------|--------------------------|------------------|
| Fraction 1       | 101575-2 | 6.0       | 0.371                       | 7                        | +                |
| Fraction 2       | 101575-3 | 0.6       | 0.276                       | 43                       | +                |
|                  | 022076-1 | 0.66      | 2.585                       | -                        | -                |
|                  | 022076-2 | 0.66      | 2.43                        | 50                       | +                |
|                  | 022076-3 | 0.66      | 1.568                       | 50                       | +                |
|                  | 030476-1 | 0.44      | 2.126                       | 10                       | -                |
|                  | 030476-2 | 0.44      | 0.868                       | 20                       | +                |
|                  | 030876-1 | 0.77      | 3.746                       | 8                        | +                |
| Fraction 3       | 100875-1 | 2.1       | 0.791                       | 5                        | -                |
|                  | 102275-2 | 1.46      | 0.335                       | 8                        | -                |
|                  | 121875-1 | 4.85      | 1.314                       | -                        | -                |
|                  | 121875-2 | 4.85      | 2.733                       | -                        | -                |
|                  | 121875-3 | 4.85      | 2.697                       | 5                        | -                |
|                  | 021276-1 | 4.0       | 1.019                       | -                        | -                |
|                  | 021276-2 | 4.0       | 1.46                        | -                        | -                |
| 021276-3         | 4.0      | 0.76      | -                           | -                        |                  |
| Fraction 4       | 100875-2 |           | 0.415                       | -                        | -                |
|                  | 010876-1 |           | 0.447                       | -                        | -                |
|                  | 010876-2 |           | 0.843                       | -                        | -                |
|                  | 010876-3 |           | 1.52                        | -                        | -                |
| Phosphate buffer | 101575-1 |           | 0.1                         | -                        | -                |

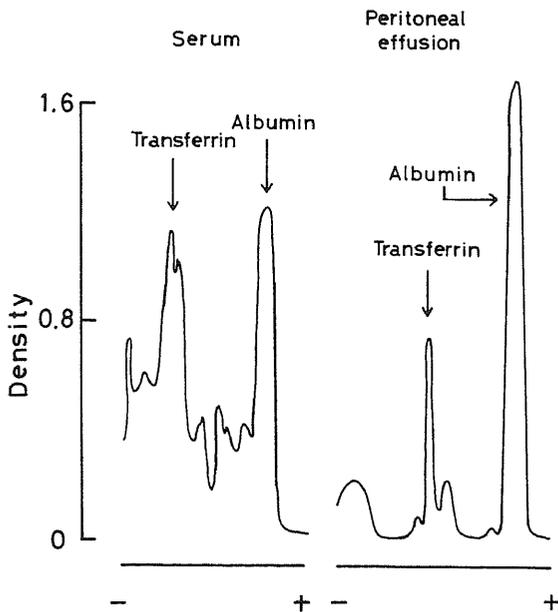


Figure 5. Electrophoretic patterns of serum and peritoneal effusion obtained 1 hour after intradermal administration of the vascular permeability factor to a normal rabbit.

この様な活性は、fraction 2 を Step-3 の hydroxyl apatite chromatography にて分画した際、皮内色素透過活性同様 5mM phosphate buffer pH 7.2分画にのみ認められStep-2, Step-3 を通じて、この両活性を分離することはできなかった。又、100°C、10分の加熱処理を施しても、胸水腹水貯留活性に影響はなかった。図4には、Step-3 で得られた血管透過因子(660 $\mu$ g)皮内注射後1時間目に見られた家兎の腹水を示している。腹水の含有蛋白質量は20-30mg/mlで、その蛋白組成は血清のそれとは多少異なり、albumin に富む点が特徴的であった(図5)。

#### 非昇圧性

血管透過因子25~75 $\mu$ gを Wistar rat に静注して昇圧作用の有無につき検討した。その結果、この量の血管透過因子はラットの血圧を上昇させなかった。動脈壁形態変化(図6)

家兎の皮内に投与した際に色素透過活性1.0、腹水貯留15mlを惹起し得る血管透過因子440 $\mu$ gを、予め両側腎摘を施した Wistar rat の皮内に投与し、細動脈形態変化について検討した。その結果、光顕標本にはいづれも細動脈 fibrinoid necrosis 像を認めることはできなかったが、電顕レベルでの観察では、透過因子注射部位皮内細動脈における内皮細胞、中膜平

滑筋細胞の初期変性像と思われる mitochondrial swelling, myofilament の乱れ、消失などの所見を得た。この様な所見は、対照として用いた生食水注射部位の細動脈には認められず、従って血管透過因子投与によって、特異的に生じた細動脈壁形態変化と考えられた。

#### 考 察

1940年 Winternitz<sup>2)</sup>らは、犬腎臓の生食抽出液を予め両側腎摘を施した犬に投与した際に、全身の血管透過性亢進を示唆する浮腫, serous effusion, 及び angionecrosis を引き起こすことをはじめて見出した。1938年には、既に Goldblatt<sup>20)</sup>が犬の腎動脈に強い狭窄を施して実験的腎性高血圧の状態を作ると、ヒトの悪性高血圧症に似た全身の細小動脈の血管壊死 angionecrosis を起こし得ることを明らかにしていたので、Winternitz らの観察は、Goldblatt 型実験的高血圧に見られる angionecrosis の発症機序に腎臓由来の体液性因子が関与するのではないかとの考えを生み出す発端となった。腎抽出液の投与が、同様な症候群を家兎モルモット、ラットにおいて起こすことも後に確認され(Nairn ら<sup>3)</sup>、以来この分野の研究は主にラット、家兎を用いて展開されている。そして serous effusion, angionecrosis, 血管透過性亢進といった全身血管を病変の主座とする腎抽出液によって作られる症候群一著者は、便宜上“実験的血管障害症候群”と呼ぶ一の成り立ちを一元的に説明し得る物質を腎臓に求める作業が、この30数年多くの研究者によってなされてきた。原因物質としてこれまで、1) 昇圧性因子 Renin<sup>3)-6)8)</sup>、2) 非昇圧性因子、a) 血管透過因子<sup>7)9)13)14)</sup>、b) 血管障害因子<sup>10)12)</sup>があげられる。

Nairn ら<sup>3)</sup>、Cuthbert ら<sup>5)6)</sup>は、この様な血管病変の発症機序における Renin の意義を重視し、Giese<sup>4)21)</sup>も同様の vascular lesion が、腎狭窄、生食腎抽出液投与、純化した Renin 投与、合成 Angiotensin II 投与のいづれによっても生じ得ることを明らかにし、昇圧性因子 Renin を重視している。しかしながら、物理的高血圧条件は、effusion, angionecrosis などの lesion の発生に増強的に働くという考え自体に疑いをはさむ余地はないが、1) 高血圧状態が存在しても、腎不全又は腎摘条件がないと vascular lesion は起こらない。2) Noradrenalin 高血圧では、同様な vascular lesion は起こらない。3) 純化 Renin 又は Angiotensin II 投与によって生じた vascular lesion は、一般に腎抽



Figure 6. Early degenerative changes of cutaneous smooth muscle cell from rat skin treated with the vascular permeability factor.

SC (smooth muscle cell)

IEL (internal elastic lamina)

BM (basement membrane), E (endothelium)

Arrow indicates mitochondrial swelling of smooth muscle cell.

Magnification ( $1 \times 30,000$ ).

出液投与によって生じた病変よりはるかに弱い。などの理由<sup>3)</sup>から、このような血管病変の全てを Renin 単独の作用で説明することが難しく、従って、Renin 以外の前記 2) 非昇圧性因子としてかかげた腎性因子の役割が必然的に想定される様になった。

ところで、動脈病変成立への血管壁透過性異常については古くから指摘されており、(Schurmann and Macmahon<sup>22)</sup>, Goldblatt<sup>20)</sup>, general edema, serous effusion, angioneurosis といった様な、恐らくは異なる血管部位で表現される病変が、腎由来血管透過因子の全身的血管透過亢進作用を反映しているのではないかと考える立場が次に生まれた。1963年、Asscher<sup>8)</sup>が初めてこの立場を提唱して以来、村上<sup>9)</sup>、尾山<sup>13)</sup>によってこのような因子が腎臓に存在する事が指摘されてきた。又、この他にも直接実験的血管障害症候群との関わりについては不明であるが、同様な腎由来血管透過性作用物質の存在が、Kira<sup>ら</sup><sup>23)</sup>

によって報告されている。その他、血管透過作用については不明であるが、非昇圧性腎性因子として、Namba<sup>ら</sup><sup>11)</sup>、Nakao<sup>ら</sup><sup>10)</sup>、Shimomura<sup>12)</sup>がその存在を報告している。

しかしながら、Renin 以外の腎性因子について多くの研究がなされたにもかかわらず、これらの因子の多くが物質的に精製あるいは単離されていないために、特性が明らかでなく、純化されよく特性の明らかにされている対立腎性因子 Renin<sup>6)</sup>との区別は、非昇圧性という唯一の特性のみでなされた。従って Renin と物質的に、又その特性の面から比較し得る非昇圧性因子はないといってよく、その意味では、腎性血管透過因子の存在説自体、なお実証を欠いていたといえる。

しかしながら、近年 Nakamura<sup>ら</sup><sup>14)</sup>は、ラットの腎皮質 homogenate から、lysosomal content を得、これを Con-A affinity chromatography

にかけることにより、血管透過因子と Renin を分離し、この因子が serous effusion, angionecrosis を腎摘ラットに起こし得ることを明らかにした。彼等の報告は、Renin と異なる腎性血管透過因子を Renin から物質的に分離した点で高く評価される。

以上述べてきたことがらから明らかな如く、この研究の目的は2つに限定されよう。即ち、ラット腎抽出液中に、血管透過作用を有する物質を同定し、精製し、これが Renin と異なることを明らかにし、その物質固有の作用から考えた実験的血管障害症候群における役割について考察することである。

既に述べた如くこの血管透過因子は、正常 Wistar rat の腎皮質に存在し、生食腎抽出液から2つの chromatography と polyacrylamide gel electrophoresis を組み合わせると、約50倍に精製された。物質的には、anionic charge を帯びた蛋白質である。又、図2に示す如く、この因子の活性が disc 電気泳動で展開される4種の蛋白成分と一致しないことは、この因子が腎抽出液中に微量存在する蛋白成分であることを示唆している。その分子量は4万前後で、Renin と類似<sup>9)</sup>するが、50%硫酸飽和にて沈澱するのに対し、この物質は100%硫酸飽和にて沈澱した。最も特徴的な点は、この因子の活性が100°C、10分の加熱処理で失われないことであった。Renin の活性は56°C、30分で完全に失活すると報告<sup>14)</sup>されており、又本実験においてもその活性は100°C、10分の加熱にて完全に失活した。更に、この因子はラットの血圧上昇を来さないことから、非昇圧性であることも確認された。Renin の血管透過亢進作用については、Angiotensin 産生を介しての昇圧作用の結果、物理的な血管内圧亢進を来し、その結果、血漿の血管壁への浸潤が起こるといわれている<sup>21)24)</sup>。確かに降圧剤投与は、Renin による血管透過性を抑制している<sup>24)</sup>ので、高血圧状態が血管透過性を亢進させる方向に働くことは間違いない様に思われる。一方、著者は、本実験で Renin の皮内色素透過性についても若干検討したが、その結果、Renin の皮内色素透過性に関しては、用量反応関係に従わない、再現性がないなどの結果を得た。この点も、著者の因子と Renin が本質的に、作用面で異なることを示している。以上の如く、この因子と Renin とは明らかに異なる物質であることを示した。又、その精製過程で、Renin を分離することはできなかったが、100°C、10分加熱処理することにより、Renin を除去できることを明らかにした。次に、その他の非昇圧性血管透過因子(村上<sup>9)</sup>、尾山<sup>13)</sup>、Vaughan ら<sup>7)</sup>)は全て易熱性であ

り、この事から、著者の因子とは異なる物質であることがわかる。又、後二者は、易熱性の点から腎由来 Protease を想定しているが、本実験でも明らかにした如く、加熱処理により血管透過活性は低下せず、逆に同一条件で Protease 活性のほとんどは失活すること、及び血中には大量の Protease-Inhibitor が存在することなどから、renal Proteases (Renin を除く)の腎性因子としての可能性は少ないと考えられる。

又、Nakamura ら<sup>14)</sup>の lysosomal content は、矢張り易熱性で、抗ヒスタミン剤処理にてその活性が抑制されるので、著者の因子とは多少その性質が異なる。

さて次に、この因子の有するもう一つの作用、即ち serous effusion inducing activity を中心に、実験的血管障害症候群へのこの因子の役割を吟味したい。血管透過因子は、これを正常家兎の皮内に注射後1時間目に著しい serous effusion を生じる。この作用も又、耐熱性であることから、この現象は、皮内に投与された血管透過因子が、血中へ吸収され、遠隔の腹腔、胸腔で血管透過性を発揮したため生じたと考えた。Effusion の貯留は、腹腔において最も著しく、胸腔、心のう腔がこれに次いだ。腹腔に effusion 貯留が強い理由を説明することは出来ないが、Nairn ら<sup>3)</sup>も同様の事実を指摘している。特に興味深い点は、血管透過因子が正常家兎に serous effusion を引き起こしたという事実である。これまでの研究は全て、実験的血管障害症候群における serous effusion や angionecrosis は、常に腎不全状態又は腎摘を受けた動物でしか認められないことを明らかにしている。この様な腎摘操作の必要性に関しては、腎摘により Renin の基質である angiotensinogen が増量し、持続的昇圧に有利であると解釈する説<sup>7)</sup>、腎摘により尿毒症状態となるため、細小血管壁変化をもたらし、血管透過性を促進すると考える説<sup>25)</sup>などが挙げられる。一般に腎摘動物に生食腎抽出液を投与した際に認められる serous effusion の成因については、先に述べた如く Renin の昇圧作用によるとする報告<sup>4)-6)</sup>が多い。しかしながら、この点に関して Vaughan ら<sup>7)</sup>は興味深い報告を行なっている。即ち生食腎抽出液投与を受けた両側腎摘ラットの血圧は angiotensin II inhibitor sarcosin 投与で抑制されるが、serous effusion は抑制できないことから、Renin 以外の因子が serous effusion に関与しているのであろうと結論している。著者の血管透過因子を両側腎摘家兎、ラットに投与した際の

serous effusion 貯留作用については検討していないので、これらの実験との比較はできないが、腎不全又は腎摘状態が、血管透過性に対して、従来の考え<sup>25)</sup>と逆に抑制的に働かない限り、このような状態においてもなお serous effusion を生じることは充分考えられる。なお、Namba ら<sup>11)</sup>は、ブタ・クジラ腎臓より、Trans Cellular-Fluid Forming Factor を著者と同条件の hydroxyl-apatite chromatography を用いて部分精製している。この物質は、腎摘ラットに serous effusion を生じるが、血管透過作用については言及されていない。極めて興味深いことは、この物質の溶出条件が本研究の中に示されている Step-3 での血管透過性因子の溶出条件と似ている事で、著者は、この物質が本質的には著者の因子と物質的に同一ではないかと考えている。

次に血管透過因子は、これを腎摘ラットの皮内に注射してもいわゆる angionecrosis を生じなかった。しかしながら、図6に示した如き細動脈(1~2層の平滑筋細胞より成る)平滑筋細胞の変性初期像と解釈される mitochondrial swelling, myofilament の乱れ、消失などの所見を生じた。同様な所見は内皮細胞にも認められたが、endothelial junction 及び subendothelial space は intact であった。Ooneda ら<sup>26)</sup>は、実験的腎性高血圧ラットの腸間膜動脈に認められた angionecrosis を電顕的に観察し、その特徴を swelling of endothelial cells, separation of endothelial junctions, subendothelial and medial fibrin deposits と報告している。本実験で得られた所見は、上記所見と比べるとその変化は軽微であった。しかしながら、Wiener ら<sup>27)</sup>は、同じラットの実験的腎性高血圧における血管の電顕的観察から Ooneda らの報告している様な angionecrosis の所見へ移行する前過程として、mitochondrial swelling あるいは increased electron density of cytoplasm などの endothelium の degeneration 像が先行することを指摘している。本研究で得られた所見が、この時相に一致するものであり、更に angionecrosis へ移行する前過程であるかどうかという点に関しては、今後検討を重ねる必要があると思われる。

実験的血管障害症候群の成立に腎由来の物質がどの様に、どの程度に関与し得るかという点に関しては、生食腎抽出液によって起こされる vascular lesion の全てを Renin 単独の作用では説明できないとする立場から、Renin 以外の腎由来血管透過因子の役割が指摘されてきた。この点に関しては、Nakamura

ら<sup>10)</sup>の因子の如く、Renin の介在なしにそれのみで、serous effusion, angionecrosis を起こし得るとする報告もあるが、この因子も又単離物質ではないので、以上の両病変を単一の物質が起こし得るかどうかを結論するためには、更に物質の精製が必要と思われる。本研究から得られた結果は上記の考えと異なり、血管透過因子は serous effusion を十分に引き起こし得るが、angionecrosis はこの物質単独では起こし得ず、血管障害症候群の成り立ちには、腎不全状態を含めて、腎臓中に存在する複数の因子の相互作用が重要であると考えた。

### 結 語

正常 Wistar rat の腎臓に3種の血管透過因子を見出し、特にその中で最も強い活性を有する物質について精製し、その特性を調べた。

その結果、

1. 物質的には分子量4万前後の酸性蛋白質と思われる。
2. 血管透過活性は、100°C、10分の加熱処理で失活せず、腎抽出液中に含まれる Renin 及び Protase とは明らかに異なる。又その作用持続性は長く、抗ヒスタミン剤で抑制されない。
3. 非昇圧性である。
4. 家兎において、この因子を皮内投与することにより、胸腔、腹腔に著しい effusion を生じる。この作用も又100°C、10分加熱処理で失活しない。
5. 皮膚色素透過を充分起こし得る量のこの物質を両側腎摘 rat の皮内に注射し、細動脈壁形態変化を観察したが、細動脈内皮細胞及び平滑筋細胞の変性初期像を思わせる所見以外には、いわゆる angionecrosis の所見は得られなかった。

以上の結果から、両側腎摘動物に生食腎抽出液を投与した際に見られる血管病変のうち、serous effusion は著者の示した如き腎由来血管透過因子の作用に負う所が大きい。angionecrosis の発生には、Renin を含む他の因子の作用が必要であり、いわゆる実験的血管障害症候群全体は、腎不全状態を含めて、腎由来の複数の因子によって起こされている可能性を示した。

謝辞：稿を終るに臨み、本研究の直接の御指導、御教示を賜りました養育院附属病院村上元孝院長、折茂肇内分泌科長に深い謝意を表します。又、御校閲を賜りました竹田亮祐教授、この研究に日夜協力して下さいました共同研究者河村京子氏、中村裕昭氏(都老研電顕室)、並びに内分泌科井藤英喜、白木正孝学士に感謝致します。

## 文 献

- 1) Matsuoka, S. : Tr. Soc. Path. Jap. 28, 381 (1938).
- 2) Winternitz, M. C., Mylon, E., Waters, L. I. & Katzenstein, R. : Yale J. Biol. and Med., 12, 623 (1940).
- 3) Nairn, G. C., Masson, G. M. C., & Corcoran, A. C. : J. Path. Bact., 71, 155 (1956).
- 4) Giese, J. : Acta. Path. microbiol. Scand., 59, 417 (1963).
- 5) Cuthbert, M. F., Asscher, A. W. & Jones, J. H. : Clin. Sci., 31, 325 (1966).
- 6) Cuthbert, M. F. & Peart, W. S. : Clin. Sci., 38, 309 (1970).
- 7) Vaughan, E. D., Gavras, H., Laragh, J. H. & Koss, M. N. : Nature, Lond., 242, 334 (1973).
- 8) Asscher, A. W. & Anson, S. G. : Nature, Lond., 108, 1097 (1963).
- 9) Murakami, M., Sekimoto, H., Yasuda, Y., Masuda, S., Genda, A., Ikeshima, T., Ooka, T., Nagai, T., Yasumura, A., Sanada, I. & Seo, M. : Saishin igaku, 20(4), 873 (1965).
- 10) Nakao, K., Ikeda, M., Fujii, J., Terasawa, F., Kurihara, H., Kimata, S., Matsushita, S. & Yamaguchi, H. : Jap. circ. J., 30, 539 (1966).
- 11) Namba, S., Hiramatsu, Y., Kusunoki, F., Okuda, K. & Sokabe, H. : Jap. circ., J. 32, 1585 (1968).
- 12) Shimomura, A. : Acta med. Nagasaki., 15, 58 (1971).
- 13) Onoyama, K., Hattori, N., Omae, T. & Katsuki, S. : J. Jap. Coll. Angio., 11, 163 (1971).
- 14) Nakamura, M., Ezaki, I., Sumiyoshi, A., Kai, M., Kanaide, H., Naito, S., & Kato, K. : Br. J. Exp. Path. 56, 62 (1975).
- 15) 電気泳動学会編 : 電気泳動実験法. 文光堂, 東京 (1969).
- 16) Nitta, R., Hayashi, H. & Norimatsu, K. : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 113, 185 (1963).
- 17) Gross, D. M. & Barajas, L. : J. Lab. Clin. Med., 85, 467 (1975).
- 18) Ooyama, T., Orimo, H. & Murakami, M. : Jap. J. Atherosclerosis, 3, 465 (1976).
- 19) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. : J. B. C. 193, 265 (1951).
- 20) Goldblatt, H. : J. Exp. Med. 69, 809 (1938).
- 21) Giese, J. : Amer. J. of Med., 55, 315 (1973).
- 22) Schurmann, P. & MacMahon, H. E. : Virchow Arch., 291, 47 (1933).
- 23) Kira, J., Saito, N., Matsunaga, M., Ogino, K., & Takayasu, M. : Jap. circ. J. 32, 1 (1968).
- 24) Goldby, F. S. & Beilin, L. J. : cardiovascular Research 6, 384 (1972).
- 25) Eto, N., Onoyama, K., Tanaka, K., Omae, T., & Yamamoto, T. : J. Jap. Coll. Angio, 13, 427 (1973).
- 26) Ooneda, G., Ooyama, Y., Matsuyama, K., Takatama, M., Yoshida, Y., Sekiguchi, M., & Arai, I. : Angiology, 16, 8 (1965).
- 27) Wiener, J., Robert, G. L., Barnett, G. Melzer, A. B. & David, Spiro, : Amer. J. Path. 54, 187 (1969).

## A b s t r a c t

The present paper deals with identification of a vascular permeability factor in saline extract of the normal rat kidney and its role in the development of vascular lesion.

A vascular permeability factor was purified from the kidney extract of normal Wistar rats and determined by estimating dye permeability in the skin vessels of rabbits as a measure of its enhancement of vascular permeability. The purification procedure included Sephadex G-50 chromatography, followed by hydroxyl apatite chromatography and polyacrylamide gel electrophoresis. The specific dye permeability activity of the purified substance was about 50 times of crude kidney

extract. The factor was dialyzable and precipitated in 100% ammonium sulfate. It appeared to be different from renal proteases including renin, owing to its heat-stable nature : Dye permeability activity was not eliminated by heat treatment at 100°C for 10 min, whereas the activity of protease and renin in the factor was completely inactivated by the same treatment. In addition, intravenous injection of the factor into a normal rat did not result in the increase of blood pressure. The duration of dye permeability effect of the factor was longer than that of histamine, and the activity was not inhibited by antihistamine. Intradermal injection of the factor not only resulted in enhanced dye permeability in the area of injection site but also in the serous effusion in the peritoneal and pleural cavities of the same animals. Finally, the vascular permeability factor was injected into the skin of bilaterally nephrectomized rats in order to check its ability to induce arterial necrotic lesions, so-called angionecrosis. The injection caused such early degenerative changes of endothelium and smooth muscle cell in the cutaneous arterioles as the mitochondrial swelling and disappearance of myofibril, but did not result in severer lesion, angionecrosis.

Thus a renal vascular permeability factor was identified and its characteristics were delineated. It was by nature a protein with the molecular weight of approx. 40,000 and was quite distinct from renin. In addition, the author demonstrated that the factor could induce serous effusion, but not produce the other vascular lesion, angionecrosis. These findings agree with the previous suggestion of Vaughan et al. that the effusion are due to unidentified renal substance(s) causing changes in vascular permeability. Since it was found that the administration of renin or other factor could produce angionecrosis in the animals, the author suggests that the two vascular lesions occurring in the animals receiving renal extracts are due to the presence of more than two renal substances with different effect on blood vessels, namely, renin with pressor activity and the vascular permeability factors with permeability effect.

---