

慶應義塾大学学術情報リポジトリ

Keio Associated Repository of Academic resources

Title	片側慢性腎虚血における腎内血管作動性因子の動態とその役割
Sub Title	
Author	徳山, 博文(Tokuyama, Hirobumi) 猿田, 享男(Saruta, Takao)
Publisher	慶應医学会
Publication year	2003
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.80, No.3 (2003. 9) ,p.T225- T238
Abstract	
Notes	学位論文
Genre	Journal Article
URL	http://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20030901-0225

学位論文

片側慢性腎虚血における腎内血管作動性因子の動態とその役割

慶應義塾大学医学部内科学教室

(指導：嶺田卓男教授)

とく やま ひろ ぶみ
徳 山 博 文

(平成14年11月29日受付)

Key Word : renal artery stenosis, angiotensin II, prostaglandin, chymase, cyclooxygenase

腎臓は心拍出量の約五分の一の供給を受け、体液調節をつかさどる重要な臓器である。さらに、腎臓はさまざまな血管作動性因子を産生し、とくに腎臓から分泌される代表的な血管作動性因子であるレニン¹⁾は、腎血管の狭窄に伴う腎血管性高血圧の発症因子としてきわめて重要である。すなわち、腎臓が虚血に陥るとレニン-アンジオテンシン系が賦活化され、糸球体濾過を保持することにより血液浄化を行うが、同時に全身血管の収縮を起し、高血圧を誘発する。近年、このような腎血管の狭窄が、糖尿病や高脂血症など動脈硬化性疾患の罹患率の増加に伴い増える傾向にあり、とくに両側の腎動脈狭窄では、腎不全に至ることがしばしば見うけられる。このような腎障害は、欧米では末期腎不全の約20%を占めると報告されているが²⁾、新規透析導入者数が年間35000人を超える本邦においても、食生活の欧米化やさらなる人口の高齢化に伴い、腎障害の原因としてきわめて重要となってきた。

腎動脈の狭窄は、高血圧や腎不全を起こす重要な病態であるにもかかわらず、その病態生理に関してはいまだ不明な点が多い。Goldblatt³⁾の研究以来、片側腎動脈の狭窄モデルである2腎1クリップ高血圧ラットにおいて、腎内レニン-アンジオテンシン系は虚血側腎の腎血行動態に大きな影響を与えることが明らかにされた。一方、近年、非虚血側腎において、組織レニンおよびレ

ニン mRNA が抑制されているにもかかわらず、組織アンジオテンシン (以下、Ang と略す) II は不変⁴⁾あるいは増加⁵⁾し、腎血行動態に影響を与えることが示唆されている。この機序として、Zou ら⁵⁾は循環血液中の Ang II が非虚血側腎組織内に取り込まれることを報告した。一方、Ang II 生成の観点からみると、Ang I から Ang II への変換を行う酵素としてアンジオテンシン変換酵素 (以下、ACE と略す) が重要とされているが、近年、キマーゼも同様の役割をになうことが示された。キマーゼは肥満細胞の分泌顆粒に存在するセリンプロテアーゼであるが⁶⁾、これまでの報告では、心臓⁷⁾、血管⁸⁾の組織 Ang II 生成に重要な役割を果たしているとされる。一方、Murakami らは、正常犬の腎組織の Ang II 生成および腎血行動態において、キマーゼの関与は少ないと報告している⁹⁾。しかしながら、慢性腎虚血において、ACE 経路および非 ACE 経路としてのキマーゼの動態、ならびに組織 Ang II 生成における寄与に関しては、臨床的にもきわめて重要であるにもかかわらず、今まで検討されていない。さらに、腎内 Ang II の腎血行動態ならびに尿中ナトリウム (以下、Na と略す) 排泄に与える影響に関する評価は十分になされていない。

従来より、腎血行動態の障害に対し、プロスタグランジン E2 (以下、PGE2 と略す) およびプロスタグランジン I2 (以下、PGI2 と略す) などの血管作動性因子

本論文は、Tokuyama H, Hayashi K, Matsuda H, Kubota E, Honda M, Okubo K, Ozawa Y, Saruta T : Stenosis-Dependent Role of Nitric Oxide and Prostaglandin in Chronic Renal Ischemia. *Am J Physiology* 282 : F859-865, 2002 の一部、Tokuyama H, Hayashi K, Matsuda H, Kubota E, Honda M, Okubo K, Ozawa Y, Saruta T : Distinct Role of Intrarenal Cyclooxygenase-1/2 in Chronic Unilateral Renal Ischemia. *Nephron* 92(1) : 183-191, 2002 の一部、および Tokuyama H, Hayashi K, Matsuda H, Kubota E, Honda M, Okubo K, Takamatsu I, Tatematsu S, Ozawa Y, Wakino S, Saruta T : Differential Regulation of Elevated Renal Angiotensin II in Chronic Renal Ischemia. *Hypertension* 40(1) : 34-40, 2002 の一部を含む。

が腎機能保持に参与することが報告されている¹⁰⁾。PGは腎血行動態の維持およびNa排泄作用を有し、腎血管性高血圧において活性化された循環血液中および組織Ang IIに拮抗する役割を果たしている¹¹⁾。一方、PGは腎血管性高血圧ではレニン分泌を亢進させ、少なからず高血圧の維持に参与することが報告されている¹²⁾。このような相反する成績に関して、PG生成系としてのサイクロオキシゲナーゼ（以下、COXと略す）にはCOX-1とCOX-2の二つのサブタイプが存在し、異なる機能を果たすことが示された。すなわち、COX-1は各臓器に通常状態において存在しPG産生を行っているが、COX-2は炎症¹³⁾や低Na食¹⁴⁾などにより誘導されると報告されている。最近の報告では、COX-2が腎臓の緻密斑¹⁵⁾や皮質集合管¹⁶⁾に通常状態でも存在することが明らかにされた。しかしながら、虚血性腎症において、PG産生経路としてのCOX-1およびCOX-2が腎血行動態およびNa排泄において、それぞれどのような役割を果たしているのか不明である。

以上の背景から、本研究では慢性腎虚血における血管作動性因子の動態とその役割を検討することを目的とした。すなわち、片側腎動脈狭窄による慢性腎虚血モデルを作成し、虚血側腎、非虚血側腎におけるAng IIの役割およびその産生経路を、腎血行動態ならびに生体内ニードル型charge-coupled device（以下、CCDと略す）カメラを用いた腎微小循環の観点から評価した。さらに、PGの腎血行動態に及ぼす役割を選択的COX-2阻害薬および非選択的COX阻害薬を用いて評価を行った。

方 法

1. 対象

体重11から13kgの雄雑種犬計40匹を実験に供した。すべての実験は動物委員会のガイドラインにしたがって行った。

すべての雑種犬に対し、ペントバルビタール（30mg/kg、静注）麻酔下において実験を行った。気管内へ挿管し、人工呼吸器を装着した。全身血圧を測定するため、タイゴンカテーテル（Tygon, U.S. Stoneware, Akron, OH, USA）を右腸骨動脈に無菌的に挿入した。挿入したカテーテルは皮下を通した後、頸部背側、両肩甲骨間より表皮下に取り出した。持続補液および薬剤投与のために7-Frカテーテルを左橈骨静脈に挿入した。また、採尿のために、7-Frのバルーンカテーテル（クリエートメディック社製、横浜）を経尿道的に膀胱に挿入した。

2. 血行動態の測定

動脈内カテーテルは圧トランスジューサー（TP-400 T, 日本光電社製、東京）に接続し、全身血圧ならびに心拍数を測定した。すべての血行動態の成績はアナログ-デジタル変換装置（Macintosh Laboratory System; Analog Digital Instruments Pty., Ltd. Castle Hill, NSW, Australia）でデジタル化した後、コンピュータで解析した¹⁶⁾。腎血行動態の評価として、腎血漿流量（以下、RPFと略す）はパラアミノ馬尿酸クリアランス、糸球体濾過率（以下、GFRと略す）はイヌリンクリアランスより求めた。濾過係数（以下、FFと略す）はRPFとGFRとの比から算出した。Na排泄の指標には、単位時間あたりの尿中Na排泄量（以下、UNaVと略す）ならびにUNaVをGFRで除したNa排泄分画（以下、FENaと略す）を用いた。

3. 組織Ang I, Ang II, ACE活性

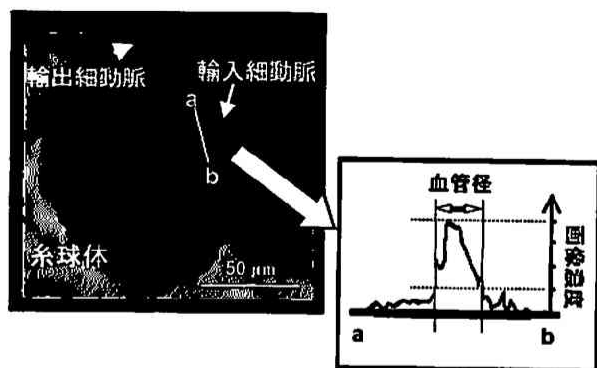
組織Ang I, Ang II, ACE活性の測定のため、生検にて腎皮質組織を採取した¹⁷⁾。組織Ang I, Ang II測定にはAng-RIAキット（Nichols Institute Diagnostics, San Juan Capistrano, CA）を用いた。組織ACE活性は、ACE colorキット（ACEカラー、富士レビオ、東京）を用い測定した¹⁸⁾。

4. 腎組織PGE₂, PGI₂, トロンボキサン（以下、TXと略す）A₂の測定

腎組織PGE₂, PGI₂, TXA₂の測定には、微小透析法を用いた¹⁹⁾。腎皮質のPGE₂, PGI₂の測定のため、微小透析チューブ（管径0.5mm, transmembrane diffusion cutoff, 10 kD; エイコム社製、京都）を腎表面から2mmの深さに刺入した。腎内において、PGI₂は6-keto-PGF_{1α}へ、TXA₂はTXB₂へ速やかに代謝されるため、それぞれ6-keto-PGF_{1α}, TXB₂を測定した。チューブ内はリンゲル液（147 mEq/L Na, 4 mEq/L K, 5 mEq/L Ca, 156 mEq/L Cl）で、2 μl/minの速度で灌流した。この速度でPGE₂, 6-keto-PGF_{1α}, TXB₂の回収率は、おのおの72±3%, 70±3%, 70±3%であった。PGE₂, 6-keto-PGF_{1α}およびTXB₂はラジオイムノアッセイにより測定した²⁰⁾。

5. 生体内ニードル型CCDカメラ

組織Ang IIの慢性腎虚血における腎微小循環調節における役割を直接観察するため、生体内ニードル型CCDカメラ（VMS-1210, 日本光電社製）を用いた^{18, 21)}。本システムは、ニードル型CCDカメラ装置とビデオ記



第1図 生体内 CCD カメラを用いた腎糸球体、輸入・輸出細動脈画像。点 a から b への直線に沿って幅 15 μm の画像濃度の平均値を縦軸に示す (右)、画像濃度の最小値から最大値への 4 分割点における画像濃度曲線との交差点を血管系と見なした。(Tokuyama H et al: Hypertension 40: 34-40, 2002 の第 1 図を許可を得て転載)

録装置から成り、CCD カメラ装置先端部の CCD カメラ探子は Gradient-Index レンズ (直径 4.5 mm, 倍率 700 倍) とその外環を取り巻く 18 本の光ファイバーにより構成されている。外部のハロゲンランプ (150 W) から光ファイバーを介して先端周囲にある対象を照射し、その光で写し出された血管像をレンズにより 700 倍に拡大し、単板 CCD 素子 (電荷結合素子, 約 40 万画素) に結像させ、出力信号を電気信号に変換した。この電気信号をテレビ信号 (NTSC) に変換し、モニター上に映像化すると同時に、画像情報をビデオカセットレコーダーで録画した。

腎皮質部に CCD カメラ探子を刺入し、糸球体を確認できたところで固定した。血流の方向により、輸入・輸出細動脈を確認した (第 1 図, 左)。輸入、輸出細動脈径の評価は、録画された画像をコンピューター (Power Mac 8500/120 AV) により経時的に測定した。血管径の測定は、糸球体の近傍で血管壁に直交する線に沿って約 15 μm の幅での画像濃度を平均化し、その平均値の最小値と最大値の差の 4 分の 1 を最小値に加えた値に交わる点の間隔を血管径とみなした (第 1 図, 右)^{18, 21)}。

6. 慢性腎虚血犬モデル実験手技

麻酔下において側腹切開し、両側腎を表層に露出したのち、電磁血流計を左腎動脈に装着した。その後、微小透析チューブを腎皮質に刺入し、180 分の安定時間をおき、全身血圧、腎血行動態の測定 (RPF, GFR)、微小透析法による腎組織 PG および組織生検による組織

Ang の測定を行った。CCD カメラにより輸入、輸出細動脈径を測定した。その後、シルバークリップを左腎動脈の電磁血流計装着部より中枢側に装着し、左腎動脈血流が 90% 減少するように電磁血流計でモニターしながらクリップ内径を調節した。

7. プロトコール

慢性腎虚血 4 週後においても虚血前と同様に、全身血圧測定、採尿、微小透析灌流液採取および組織生検を行った。採尿に関しては両側の尿管に経尿管的に 7-Fr カテーテルを挿入し、虚血側腎、非虚血側腎別々に採尿した。

1) 組織レニン-アンジオテンシン系が腎血行動態に果たす役割

アンジオテンシン受容体拮抗薬であるオルメサルタン²²⁾ (30 $\mu\text{g}/\text{kg}$, $n=6$; 三共, 東京) を腎動脈に投与し、組織レニン-アンジオテンシン系が腎血行動態に果たす役割を検討した。

慢性腎虚血前のコントロール期において、上記薬剤投与後 60 分間にわたり、全身および腎血行動態、尿中 Na 排泄量の評価を行った。慢性腎虚血作成後 4 週時点において、同様のプロトコールで再度評価し比較検討した。さらに、慢性腎虚血作成前・後の各時期において、オルメサルタン投与による輸入、輸出細動脈径の変化を生体内ニードル型 CCD カメラを用い観察した。

2) 腎組織 Ang II 生成経路の検討

腎組織 Ang II 生成経路の検討のため、ACE 阻害薬であるシラザプリラート (30 $\mu\text{g}/\text{kg}$, $n=6$; エーザイ, 東京) およびキマーゼ阻害薬のキモスタチン²³⁾ (1 mg/kg, $n=6$; シグマ, セントルイス, MO) を腎動脈に投与し、腎血行動態に与える影響をクリアランス法を用いて評価した。また、上記薬剤投与 60 分後に腎組織を生検にて採取し、腎組織 Ang II を測定した。

腎組織 Ang II 生成におけるキマーゼの関与を評価するため、[Pro¹¹-D-Ala¹²]Ang I ($n=6$, ペプチド研究所, 大阪) を用いた²⁴⁾。すなわち、[Pro¹¹-D-Ala¹²]Ang I はキマーゼによって Ang II へ変換されるが、ACE によって変換されないことより²⁴⁾、[Pro¹¹-D-Ala¹²]Ang I 投与による組織 Ang II の生成は、組織キマーゼの活性を示すと考えられる²⁵⁾。この特性を利用して、慢性腎虚血 4 週における [Pro¹¹-D-Ala¹²]Ang I (0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 50 nmol/kg) の腎動脈投与による腎組織 Ang II 産生への影響を検討した。投与後の腎血行動態に対する効果はクリアランス法を用いて評価し、さらに、投与 10 分後に腎組織を生検にて採取し、腎組織 Ang II を測定

した。

さらに、キモスタチン (1 mg/kg) を腎動脈へ投与した後、同様に [Pro¹¹-D-Ala¹²] Ang I (0.1, 1, 10, 50 nmol/kg; n=4) の腎血行動態ならびに腎組織 Ang II 含量に与える影響を評価した。

3) 慢性腎虚血における腎 COX-1, COX-2 の役割および腎間質 COX が組織レニン-アンジオテンシン系に及ぼす影響

慢性腎虚血における腎 COX-1, COX-2 の腎血行動態に果たす役割を評価する目的で、非選択的 COX 阻害薬であるスルピリン²⁹⁾ (1mg/kg, n=6; 第一製薬, 東京) あるいは選択的 COX-2 阻害薬である NS398 (1 mg/kg, n=6; シグマ, セントルイス, MO, USA) を使用した。

慢性腎虚血作成前のコントロール期において、上記薬剤の経静脈的投与を行い、60分後に全身および腎血行動態の評価、ならびに微小透析法による灌流液採取を行った。慢性腎虚血4週においても同様のプロトコールで検討を行った。さらに、腎間質 COX が組織レニン-アンジオテンシン系に及ぼす影響を評価するため、スルピリンあるいは NS398 の投与60分後、腎皮質組織を採取し、組織 Ang I, Ang II を定量した。

8. 統計

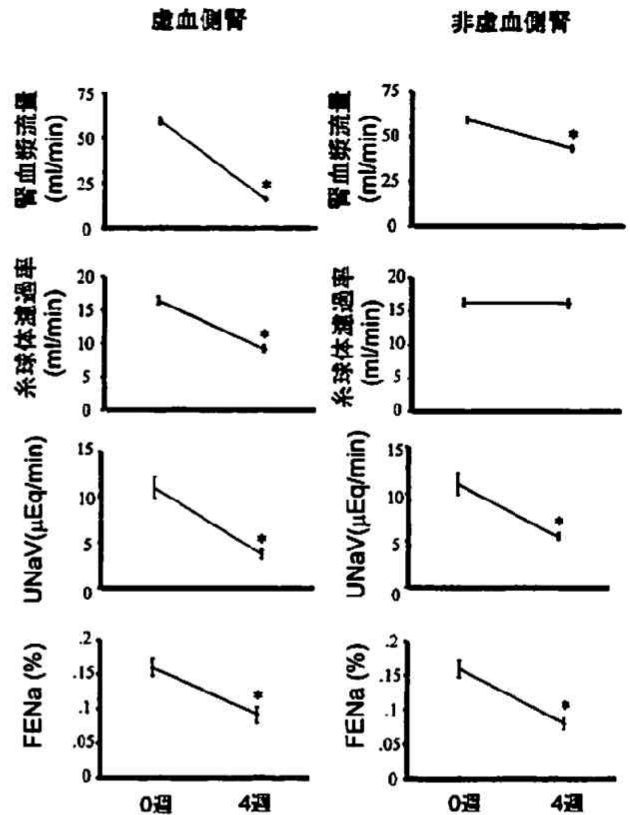
本文および図表中の数値は、すべて平均値±標準誤差で表した。統計解析は二元配置分散分析法を用い、危険率5%未満の場合を統計学的に有意差ありとした。有意差を認めた場合には Scheffe-test で群間比較した。危険率5%未満の場合を統計学的に有意差ありとした。

結 果

1. 慢性腎虚血が全身および腎血行動態に及ぼす影響

虚血4週後、全身血圧は軽度の上昇がみられた (112±1 から 128±2 mmHg, p<0.01, n=40)。血漿レニン活性は 1.7±0.1 から 8.1±0.8 ng/ml/h (p<0.01, n=40) へと著明な増加がみられ、血清 Ang II も有意に増加した (108.2±28.2 から 219.8±30.9 pg/ml, p<0.01, n=40)。

RPF ならびに GFR は4週の腎動脈狭窄により、虚血側腎において著明な減少を示した (RPF, 59±2 から 16±1 ml/min, p<0.01, n=40; GFR, 17±1 から 8±1 ml/min, p<0.01, n=40) (第2図)。非虚血側腎においては、GFR は変化せず、RPF は代償せずむしろ減少した (59±2 から 45±1 ml/min, p<0.01, n=40)。



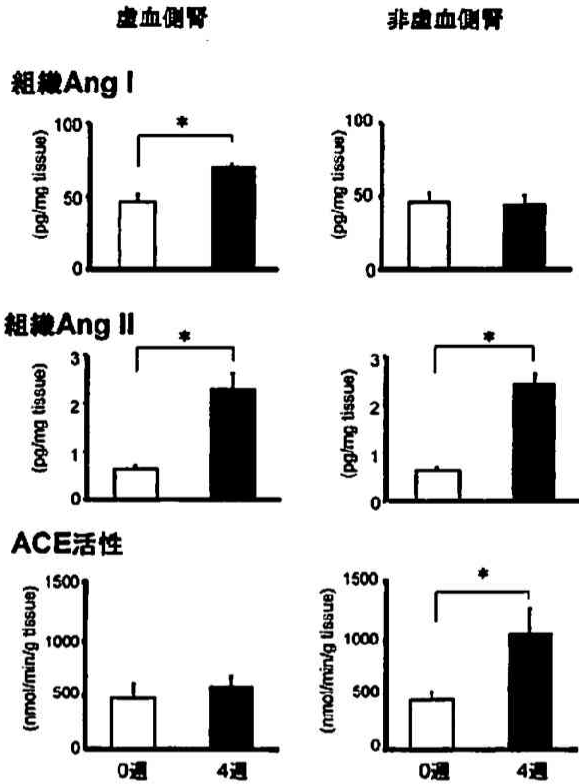
第2図 慢性片側腎虚血4週における虚血側腎、非虚血側腎の腎血行動態ならびに Na 排泄の変化。虚血前の0週に対し*は P<0.01 を示す。UNaV, 尿中 Na 排泄量, FENa, 尿中 Na 排泄分画。(Tokuyama H et al: Nephron 92(1): 183-191, 2002 の第1図を許可を得て転載)

FF は虚血側腎、非虚血側腎とも上昇を示した(虚血側腎, 0.29±0.01 から 0.53±0.03, p<0.01; 非虚血側腎, 0.29±0.01 から 0.38±0.02, p<0.01, n=40)。

UNaV は、虚血側腎 (11.6±0.7 から 3.2±0.2 μEq/min, p<0.01, n=40)、非虚血側腎 (11.6±0.7 から 5.1±0.3 μEq/min, p<0.01, n=40) とともに減少した。UNaV を GFR で補正した FENa も減少した (虚血側腎, 0.16±0.01 から 0.08±0.01%, p<0.01, n=40; 非虚血側腎, 0.16±0.01 から 0.08±0.01%, p<0.01, n=40) (第2図)。

2. 慢性腎虚血による腎組織 Ang I, Ang II, PGE2, PGI2, TXA2 含量の変化

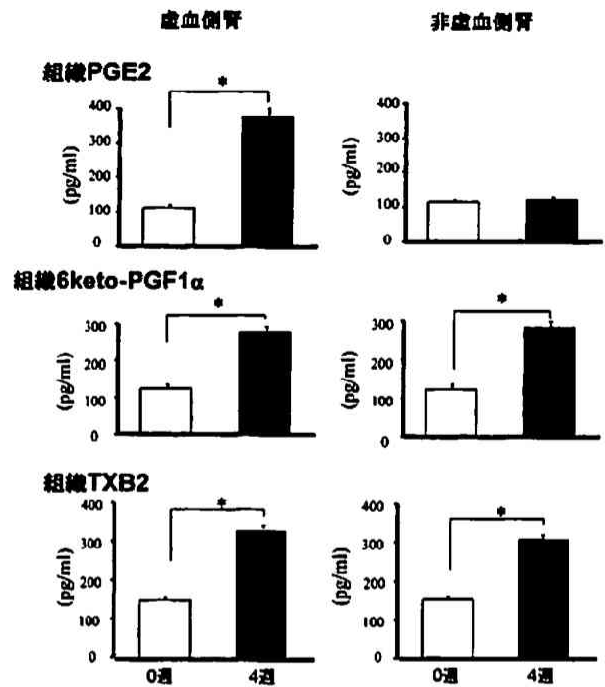
慢性腎虚血により、虚血側腎の組織 Ang I (48±2 から 69±2 pg/mg tissue, p<0.01, n=40) ならびに Ang II 含量 (0.70±0.04 から 2.26±0.19 pg/mg



第3図 慢性片側腎虚血4週における虚血側腎、非虚血側腎の組織アンジオテンシンI、アンジオテンシンII含量およびアンジオテンシン変換酵素活性の変化。虚血前の0週に対し*はP<0.01を示す。Angはangiotensin、ACEはアンジオテンシン変換酵素を表す。(Tokuyama H et al : Hypertension 40 : 34-40, 2002の第3図を許可を得て転載)

tissue, p<0.01, n=40)は増加した(第3図)。非虚血側腎では組織Ang I含量に変化はみられなかったが(p>0.5, n=40)、組織Ang IIは虚血側腎と同様に著明に増加した(0.68±0.04から2.45±0.19 pg/mg tissue, p<0.01, n=40)。組織ACE活性は虚血側腎では変化がみられなかったが、非虚血側腎において増加した(490±40から1080±80 nmol/min/g tissue, p<0.01, n=40)。

腎組織PGE2濃度は、虚血側腎では3倍の増加を示したが(114±7から375±25 pg/ml, p<0.01, n=18)、非虚血側腎では変化がみられなかった(p>0.05, n=18)(第4図)。腎組織6-keto-PGF1αおよびTXB2濃度は、虚血側腎(6-keto-PGF1α, 126±7から280±10 pg/ml, p<0.01, n=18; TXB2, 152±10から329±13 pg/ml, p<0.01, n=18)、非虚血側腎(6-



第4図 慢性片側腎虚血4週における虚血側腎、非虚血側腎のプロスタグランジンE2、6-keto-prostaglandin F1α、トロンボキサンB2の変化。虚血前の0週に対し*はP<0.01を示す。PGはprostaglandinを、TXはthromboxaneを表す。(Tokuyama H et al : Nephron 92(1) : 183-191, 2002の第2図を許可を得て転載)

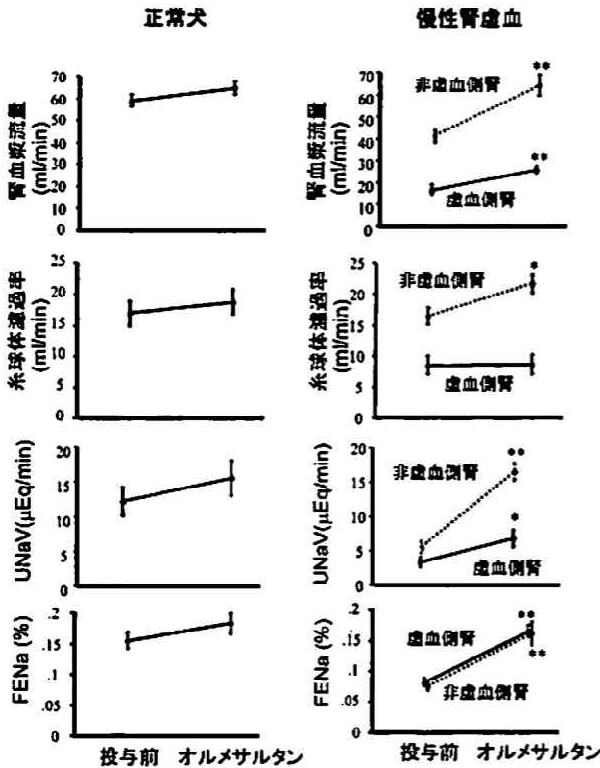
keto-PGF1α, 124±8から284±9 pg/ml, p<0.01, n=18; TXB2, 152±10から308±12 pg/ml, p<0.01, n=18)ともに増加した。

3. 組織レニン-アンジオテンシン系が腎血行動態に果たす役割

1) アンジオテンシン受容体拮抗薬を用いた検討

正常犬において、本研究で使用した30 μg/kgのオルメサルタンは血圧に影響を及ぼさなかった。RPF、GFRならびにFENaは増加傾向を示したが、有意な変化はみられなかった(第5図)。

慢性腎虚血犬においても、30 μg/kgのオルメサルタンは全身血圧に影響を及ぼさなかった(p>0.1, n=6)。虚血側腎では、GFRは変化しなかったが、RPF、UNaVならびにFENaを有意に改善させた(RPF, 17±2から26±2 ml/min, p<0.01, n=6; UNaV, 3.3±0.7から6.8±1.3 μEq/min, p<0.05, n=6; FENa, 0.08±0.01から0.17±0.01%, p<0.01, n=6)(第5



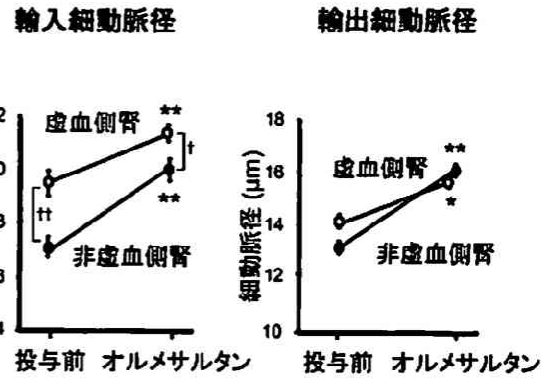
第5図 正常犬および慢性片側腎虚血4週におけるオルメサルタンの腎血行動態およびNa排泄に及ぼす影響。投与前に対し**はP<0.01, *はP<0.05を示す。(Tokuyama H et al : Nephron 92(1) : 183-191, 2002の第6図を許可を得て転載)

図). 同様に、非虚血側腎においても、RPF, UNaV, FENaのみならずGFRも改善がみられた(RPF, 41±3から64±5 ml/min, p<0.01, n=6; GFR, 17±2から22±2 ml/min, p<0.05, n=6; UNaV, 5.5±0.9から16.5±1.3 μEq/min, p<0.01, n=6; FENa, 0.08±0.01から0.16±0.02%, p<0.01, n=6). FFは両側腎において減少傾向を示した(虚血側腎, 0.53±0.08から0.34±0.07, p>0.1; 非虚血側腎, 0.42±0.07から0.35±0.05, p>0.1, n=6).

2) 生体内ニードル型CCDカメラによる腎細動脈径の変化の観察

正常犬において、本研究で使用した量のオルメサルタンは輸入、輸出細動脈径に影響を与えなかった(輸入細動脈, 16.1±0.5から16.9±0.6 μm, p>0.2, n=6; 輸出細動脈, 13.6±0.4から14.3±0.5 μm, p>0.2, n=6).

慢性腎虚血では、虚血側腎において、オルメサルタンは輸入細動脈を9±2% (19.5±0.4から21.3±0.1 μm,



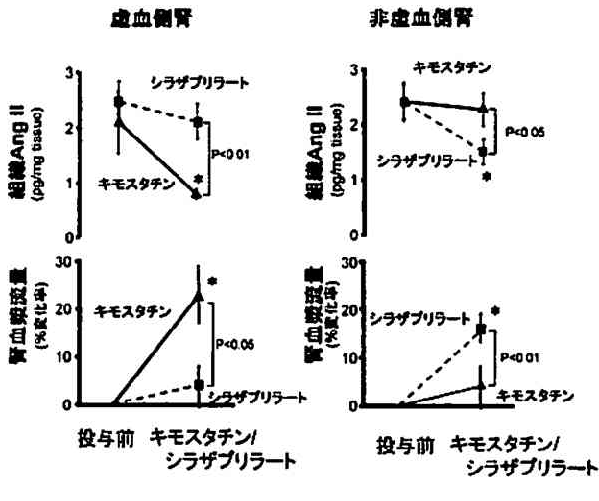
第6図 慢性片側腎虚血4週におけるオルメサルタンの腎微小循環に及ぼす影響。投与前に対し*はP<0.01, *'はP<0.05を示す。'はP<0.01, 'はP<0.05を示す。(Tokuyama H et al : Hypertension 40 : 34-40, 2002の第4図を許可を得て転載)

p<0.01, n=4), 輸出細動脈を10±1% (14.1±0.4から15.6±0.4 μm, p<0.05, n=4) 拡張させた(第6図)。非虚血側腎では、薬剤投与前の輸入細動脈径(17.0±0.5 μm, n=4)は虚血側腎より有意に小さかったが(p<0.01), 輸出細動脈径(13.2±0.5 μm, n=4)は虚血側腎、非虚血側腎で差異を認めなかった(p>0.2)。さらに、非虚血側腎ではオルメサルタン投与による輸入・輸出細動脈の拡張反応は虚血側腎に比し増強していた(輸入, 18±1%, p<0.01; 輸出, 22±2%, p<0.01)。

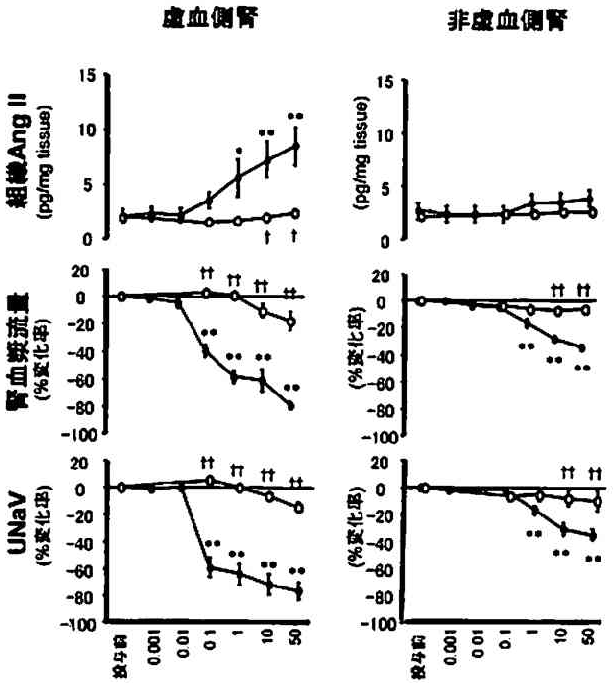
4. 組織Ang II生成経路の検討

1) 組織Ang II生成経路

組織Ang II生成経路の検討のため、ACE阻害薬であるシラザプリラートならびにキモスタチンを投与し、腎血行動態および組織Ang II含量の変化を観察した。その結果、シラザプリラート投与により、組織Ang IIは虚血側腎では減少傾向を示したが、有意な減少ではなく(p>0.5, n=6), RPFの変化も認めなかったのに対し(4±4%, n=6; p<0.05 vs. キモスタチン), 非虚血側腎では組織Ang IIの減少(2.42±0.32から1.50±0.22 pg/mg tissue, p<0.05, n=6)とともにRPFの増加がみられた(16±3%, p<0.05, n=6)(第7図)。一方、キモスタチン投与により、組織Ang IIは虚血側腎において減少し(2.10±0.56から0.80±0.09 pg/mg tissue, p<0.05, n=6), 非虚血側腎では不変であった(p>0.5, n=6)(第7図)。これと平行して、RPFは虚血側腎では、キモスタチン投与により増加したが(23±6%, n=6, p<0.05 vs.



第7図 慢性片側腎虚血4週におけるキモスタチンおよびシラザプリラートの組織アンジオテンシンII含量および腎血行動態に及ぼす影響。投与前に対し*はP<0.05を示す。Angはangiotensinを表す。(Tokuyama H et al: Hypertension 40: 34-40, 2002の第5図を許可を得て転載)



[Pro¹¹-D-Ala¹²]Ang I [Pro¹¹-D-Ala¹²]Ang I

第8図 慢性片側腎虚血における[Pro¹¹-D-Ala¹²]angiotensin Iによる組織アンジオテンシンII含量、腎血行動態および尿Na排泄量への影響。虚血側腎では、[Pro¹¹-D-Ala¹²]angiotensin Iの投与により組織Ang II含量の増加とともに腎血漿流量、尿Na排泄量(UNaV)の減少が観察された(●)。一方、キモスタチン前投与後によりこれらの反応は著明に抑制された(○)。非虚血側腎では、[Pro¹¹-D-Ala¹²]angiotensin Iによる反応は減弱していた。投与前に対し**はP<0.01、*はP<0.05を示す。キモスタチン非使用に対し'はP<0.01、'はP<0.05を示す。Angはangiotensinを表す。(Tokuyama H et al: Hypertension 40: 34-40, 2002の第6図を許可を得て転載)

シラザプリラート)、非虚血側腎では改善を認めなかった(1±2%, n=6; p<0.01 vs. シラザプリラート)。なお、使用した投与量のシラザプリラート、キモスタチンは、全身血圧、血漿レニン活性に影響を与えなかった。

2) 慢性腎虚血におけるキマーゼの役割

キマーゼの作用をうけてAng IIを産生する[Pro¹¹-D-Ala¹²]Ang I投与による組織Ang II含量の変化および腎血行動態に及ぼす影響を観察した。全身血圧は10 nmol/kgならびに50 nmol/kgの[Pro¹¹-D-Ala¹²]Ang I投与により軽度の上昇にとどまった(10 nmol/kg, 3±2%, p<0.05, n=6; 50 nmol/kg, 9±1%, p<0.01, n=6)。虚血側腎において、組織Ang IIは0.1 nmol/kgの[Pro¹¹-D-Ala¹²]Ang Iにより上昇傾向を示し(2.13±0.53から3.55±0.77 pg/mg tissue p=0.16, n=6), 1 nmol/kgでは有意に上昇した(5.60±1.70 pg/mg tissue, p<0.05)(第8図)。さらに投与量の増加に伴い、用量依存性に組織Ang II含量は上昇し、50 nmol/kgの投与量では4倍に上昇した(8.50±1.71 pg/mg tissue, p<0.01)。これと平行して、RPFも0.1 nmol/kgの[Pro¹¹-D-Ala¹²]Ang Iにより減少がみられ(-40±5%, p<0.01, n=6)、以後も用量依存性に低下した(1 nmol/kg, -59±5%; 10 nmol/kg, -61±8%; 50 nmol/kg, -80±3%)。Na排泄に対しても、0.1 nmol/kgの[Pro¹¹-D-Ala¹²]Ang Iは

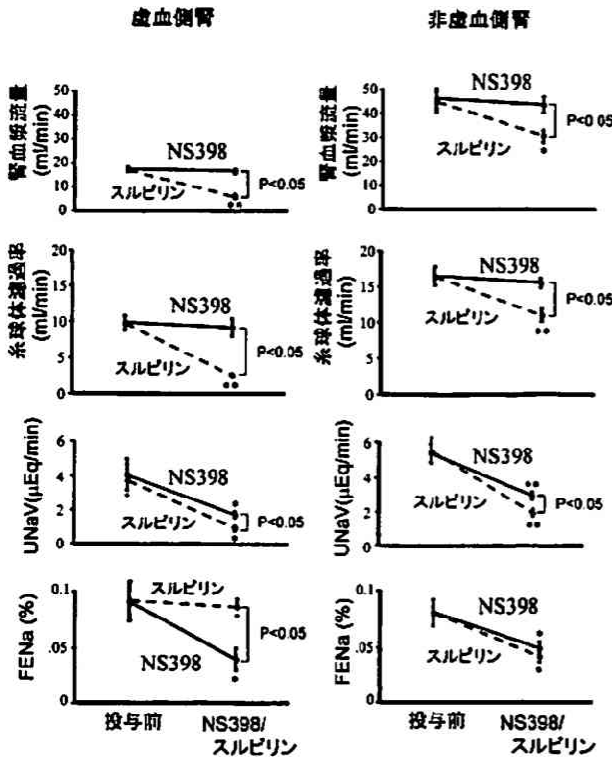
UNaVを有意に減少させ(-59±7%, p<0.01, n=6)、さらなる投与量の増加により用量依存性にUNaVを減少させた(1 nmol/kg, -64±8%; 10 nmol/kg, -72±8%; 50 nmol/kg, -77±6%)。虚血側腎におけるこれらの反応は、キモスタチンの前投与により著明に抑制された(第8図、白丸, n=4)。

一方、非虚血側腎では、[Pro¹¹-D-Ala¹²]Ang Iは組織Ang II含量に影響を与えなかった。RPFの減少の度合いも虚血側腎に比し著明に減弱しており、50 nmol/kgの投与量では虚血側腎の50%の低下にとどまった(34±1%, p<0.01 vs. 虚血側腎)。

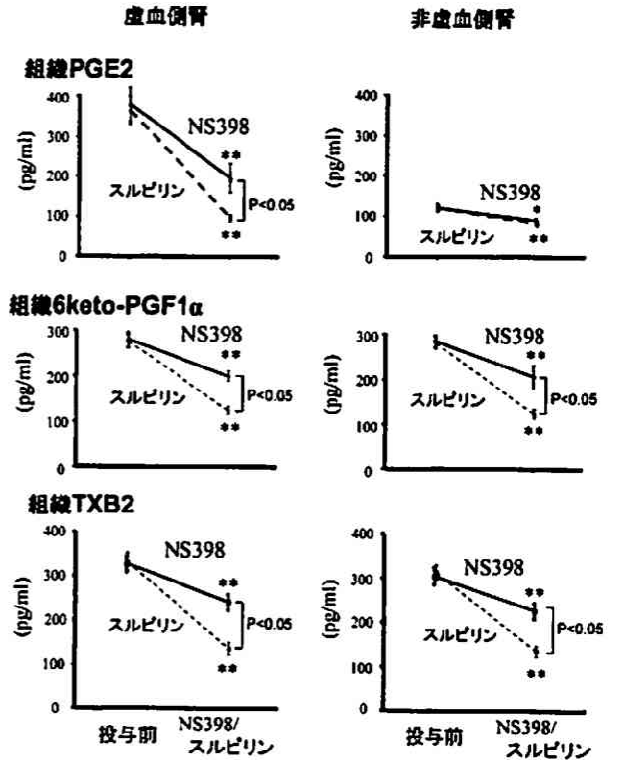
5. 慢性腎虚血におけるCOX-1/2の役割

COX-1 および COX-2 経路により産生された PG の腎血行動態および Na 排泄に果たす役割を検討するため、COX-2 選択的阻害薬の NS398 および COX 非選択的阻害薬のスルピリンを用いた。

正常犬において、スルピリン、NS398 ともに RPF、GFR ならびに FENa に影響を及ぼさなかった。慢性腎虚血において、虚血側腎では、スルピリンは RPF (17 ± 1 から 6 ± 1 ml/min, $p < 0.01$, $n = 6$), GFR (10 ± 1 から 3 ± 1 ml/min, $p < 0.01$, $n = 6$) および UNaV (3.8 ± 0.9 から 0.9 ± 0.2 μ Eq/min, $p < 0.05$, $n = 6$) を著しく減少させた (第9図)。FENa には変化がみられず、FF は減少傾向を示した (0.58 ± 0.08 から 0.43 ± 0.04 , $p = 0.1$, $n = 6$)。一方、NS398 は RPF ならびに GFR に影響を与えず、UNaV (4.0 ± 0.9 から 1.7 ± 0.2 μ Eq/min, $p < 0.05$, $n = 6$) および FENa (0.09 ± 0.02 から $0.04 \pm 0.01\%$, $p < 0.05$, $n = 6$) を減少させた。非虚血側腎における検討では、スルピリンは RPF ($45 \pm$



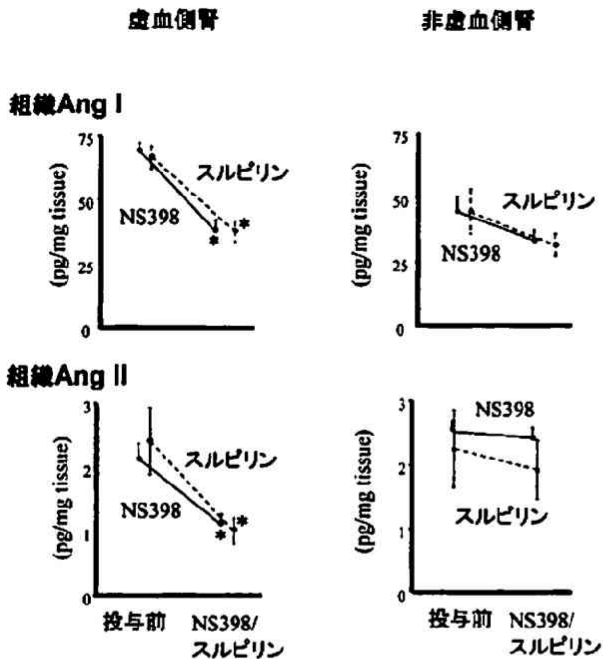
第9図 慢性片側腎虚血4週におけるサイクロオキシゲナーゼ-1 およびサイクロオキシゲナーゼ-2 阻害が腎血行動態および Na 排泄に及ぼす影響。投与前に対し**は $P < 0.01$, *は $P < 0.05$ を示す。(Tokuyama H et al: Nephron 92(1): 183-191, 2002 の第3図を許可を得て転載)



第10図 慢性片側腎虚血4週におけるサイクロオキシゲナーゼ-1 およびサイクロオキシゲナーゼ-2 阻害が腎組織プロスタグランジン E2, 6-keto-prostaglandin F1α, トロンボキサン B2 に及ぼす影響。投与前に対し**は $P < 0.01$, *は $P < 0.05$ を示す。PG は prostaglandin を, TX は thromboxane を表す。(Tokuyama H et al: Nephron 92(1): 183-191, 2002 の第4図を許可を得て転載)

4 から 31 ± 3 ml/min, $p < 0.05$, $n = 6$) ならびに GFR (16 ± 1 から 11 ± 1 ml/min, $p < 0.01$, $n = 6$) を減少させたが、NS398 は影響を与えなかった。UNaV はスルピリンによる減少の程度 (5.5 ± 0.8 から 1.9 ± 0.2 μ Eq/min, $p < 0.01$, $n = 6$) が NS398 による度合いより大であったが (5.4 ± 0.5 から 2.9 ± 0.3 μ Eq/min, $p < 0.01$, $n = 6$) ($p < 0.05$), GFR で UNaV を補正した FENa は同程度の変化を示した (スルピリン, 0.08 ± 0.01 から $0.04 \pm 0.01\%$, $p < 0.05$, $n = 6$; NS398, 0.08 ± 0.01 から $0.05 \pm 0.01\%$, $p < 0.05$, $n = 6$)。

スルピリンならびに NS398 は、慢性腎虚血により増加した虚血側腎 PGE2 を著明に減少させたが、その程度はスルピリンで大であった (第10図)。また、虚血側腎、非虚血側腎において増加した 6-keto-PGF1α ならびに TXB2 のスルピリンによる減少は、NS398 による減少の度合いを上まわった。なお、使用した投与量の



第 11 図 慢性片側腎虚血 4 週におけるサイクロオキシゲナーゼ-2 阻害が組織アンジオテンシン I, アンジオテンシン II に及ぼす影響。投与前に対し*は $P < 0.01$ を示す。Ang は angiotensin を表す。(Tokuyama H et al; Nephron 92(1): 183-191, 2002 の第 5 図を許可を得て転載)

スルピリン, NS398 では, 全身血圧に影響を与えなかった。

6. Ang II 生成における COX の役割

慢性腎虚血により増加した虚血側腎組織 Ang I 含量はスルピリンおよび NS398 により同程度に抑制された (スルピリン, 69 ± 5 から 38 ± 4 pg/mg tissue, $p < 0.01$, $n = 6$; NS398, 70 ± 3 から 38 ± 4 pg/mg tissue, $p < 0.01$, $n = 6$) (第 11 図)。同様に, 腎組織 Ang II 含量も両薬剤により減少し, その程度は同等であった (スルピリン, 2.46 ± 0.53 から 1.05 ± 0.20 pg/mg tissue, $p < 0.01$, $n = 6$; NS398, 2.12 ± 0.26 から 1.13 ± 0.14 pg/mg tissue, $p < 0.01$, $n = 6$)。一方, 非虚血側腎ではスルピリン, NS398 とも組織 Ang I, Ang II 含量に影響を与えなかった。血漿レニン活性はスルピリン, NS398 投与で変化はみられなかった。

考 察

片側腎動脈狭窄は, 腎血管性高血圧として認識される

病態から, 無症状の状態と, 幅広い臨床様式を呈する疾患である。従来, 片側腎動脈狭窄の病態の検討は, Goldblatt²⁾による 2 腎 1 クリップモデルを用いた研究以来, 高血圧の成因に関する研究が中心であり, 慢性腎虚血という観点から検討された研究は少ない。腎動脈狭窄による慢性腎虚血は, 当該側の腎機能ならびに血管作動性因子の動態に大きな影響を与えることは広く知られている²⁰⁾。一方, 非狭窄側腎においても, 狭窄側腎より分泌される Ang II を中心とした血管作動性因子により影響を受けることが推測される。しかしながら, 虚血側腎・非虚血側腎における腎血行動態と, 腎内血管作動性因子による内部環境との関係は詳細に検討されていない。本研究は, 一側腎虚血により, 虚血側腎のみならず非虚血側腎においても腎機能の低下が生じることを示した。従来, 一側腎動脈の狭窄により対側腎が肥大し, その機能を代償することが臨床で知られている。また, Truong²¹⁾らは片側腎動脈狭窄ラットにおいて, 非狭窄側腎は組織学的に過形成することを報告している²¹⁾。これとは対照的に, 2 腎 1 クリップ腎血管性高血圧ラットモデルにおいて, 非狭窄側腎は腎機能を代償しないと報告もあり^{4, 20)}。一定の見解が得られていない。そこで, 本研究では, 一側腎虚血の程度が 90% 狭窄になるように電磁血流計を用い, 定量的に狭窄した。その結果, 全身血圧の上昇は軽度であり, 観察された腎血行動態および腎間質血管作動性因子の動態の変化は, 虚血に伴うものが主体と考えられた。この点に関して, 一側腎動脈狭窄が 50% になるように作成したモデルにおいても, 90% 狭窄でみられた変化より弱いものの, 同様の傾向が観察された²⁰⁾。したがって, 本研究モデルでは, 腎動脈の狭窄度に依存した腎血行動態ならびに腎内血管作動性因子の変化が認められた。

慢性腎虚血において, 虚血側腎のみならず非虚血側腎においても, 血行動態の変化をきたす機序の詳細は明らかでない。本研究は, 虚血側腎のみならず非虚血側腎においても組織 Ang II が増加することを示した (第 3 図)。さらに, 虚血側腎のみならず非虚血側腎においても濾過係数の上昇がみられたことより, 組織 Ang II の作用を示唆するものと考えられた。これらの成績より, Ang II 作用を抑制することにより, 腎内 Ang II の活性が腎血行動態に影響を与えているか否かを, アンジオテンシン受容体拮抗薬であるオルメサルタンを用いて検討した。その結果, 正常犬において, 血圧ならびに腎血行動態に影響を与えない量のオルメサルタンは, 慢性腎虚血において虚血側腎, 非虚血側腎ともに濾過係数の低下傾向を伴う腎血行動態の改善をもたらした (第 5 図)。さらに,

糸球体血行動態の中心的役割を占める輸入、輸出細動脈を、CCDカメラを用いて直接的に評価したところ、虚血側腎、非虚血側腎ともに、オルメサルタンは輸入、輸出細動脈をほぼ同程度に拡張させた(第6図)。したがって、同程度の輸入、輸出細動脈拡張は、濾過係数を低下させることを示した Carmines らの報告³⁰⁾とあわせて、本研究は慢性腎虚血において、腎組織 Ang II が重要な役割を果たしていることを示す結果と考えられた。一方、2腎1クリップ高血圧モデルにおいて、非虚血側腎では TXA2 の生成が増加し、TXA2 が非虚血側腎の腎血行動態を代償しないことに関与しているという報告があり²⁹⁾、本研究においても非虚血側腎において TXB2 の生成の増加がみられた(第4図)。しかしながら、TXA2 は腎輸入細動脈を優位に収縮させ、濾過係数を低下させることより³¹⁾、慢性腎虚血に伴う腎血行動態の変化を説明しうる中心的因子ではないと考えられた。

生体内 CCD カメラによる観察で、オルメサルタンによる輸入、輸出細動脈の拡張の程度が、非虚血側腎に比し虚血側腎で減弱していた(輸入細動脈、 $9 \pm 2\%$ vs. $18 \pm 1\%$; 輸出細動脈、 $10 \pm 1\%$ vs. $22 \pm 2\%$)(第6図)。この反応性の相違の機序として、虚血側腎における著明な PGE2 濃度の上昇が関与することが示唆された(第4図)。さらに虚血側腎では、腎灌流圧の低下により、輸入細動脈にのみ存在する筋原性収縮反応³²⁾が減弱しており、非虚血側腎に比し、虚血側腎輸入細動脈の基礎血管径の開大に関与することが考えられた(第6図、投与前)³³⁾。したがって、虚血側腎では PG および筋原性収縮反応などの因子が、基礎血管緊張ならびに組織 Ang II による腎動脈反応性に影響していることが考えられた。

近年の研究により、組織 Ang II 生成経路には、様々な経路が存在することが明らかになった^{7,9)}。とくに腎臓では、Ang II は血液中より高濃度に存在し³⁴⁾、腎局所における Ang II 生成経路について注目されつつある⁵⁾。すなわち、Murakami らは、正常犬では Ang I から Ang II への変換に ACE が重要な役割を果たしていることを示した⁹⁾。さらに、この報告では ACE 以外の変換経路の存在もわずかであるが示唆しており、なかでもキマーゼが正常犬の腎臓における Ang I から Ang II への変換の約 1 割を担うことを示した。本研究では、慢性腎虚血における虚血側腎ならびに非虚血側腎での Ang II 産生経路を、ACE 阻害薬であるシラザプリラートならびにキマーゼ阻害薬であるキモスタチンを用いて検討した。その結果、非虚血側腎において、シラザプリラートにより腎組織 Ang II 含量が低下したが、キモ

スタチンでは影響されなかった。さらに、RPF の各薬剤に対する反応も同様の結果を示したことより、非虚血側腎では Ang I から Ang II の変換にキマーゼよりもむしろ ACE 活性が重要な役割を果たしていることが示された。この点に関して、Navar らは、ラットに Ang II を持続静注し、血清中 Ang II を高値に維持した状態では、腎組織 ACE が増加することを報告していることから³⁵⁾、虚血側腎より産生された Ang II が、非虚血側腎において ACE 活性の亢進を介して Ang II 産生を増加させる可能性が推定される。一般に、Ang II の産生律速酵素は ACE でなくレニンであるとされているが、組織特異的に発現調節がされている組織 Ang 産生系においては、ACE が重要な役割を果たしていることが示唆されている⁴⁾。このような腎局所における Ang II 産生とは別個に、Zou らはラットに Ang II を静注することにより、Ang 受容体を介して Ang II が腎内に internalization することを報告した⁵⁾。本研究においても、血清 Ang II は慢性腎虚血において増加しており、血清 Ang II の増加が腎組織 Ang II 上昇に一部寄与する可能性も考えられた。したがって、非虚血側腎における組織 Ang II 含量の増加は、ACE 活性を介した産生増加や、腎組織による血液からの Ang II の取り込みなどの要因が血液-腎の濃度勾配を形成すると推測された。

本研究は、虚血側腎の Ang II 産生系が非虚血側腎とは大きく異なることを明らかにした。すなわち、虚血側腎では Ang II 産生がキモスタチンで強く抑制されるのに対し、シラザプリラートの影響は軽微で、RPF に対する影響もキモスタチンによる変化が著明に大であった(第7図)。さらに、キマーゼにより特異的に Ang II への変換を受けるが、ACE では変換されない [Pro¹¹-D-Ala¹²]Ang I³⁶⁾を用いて腎組織 Ang II 含量および RPF への影響を検討したところ、虚血側腎では [Pro¹¹-D-Ala¹²]Ang I の用量依存性に腎 Ang II 含量の増加を示し、それとともに RPF および尿 Na 排泄の低下をもたらした(第8図)。これらの変化はキモスタチンの前処置にて著明な抑制を受けたことを考え合わせると、一側慢性腎虚血時の虚血側腎では、組織 Ang II 含量の増加に、ACE 活性以上にキマーゼが関与することが考えられた。一方、非虚血側腎における [Pro¹¹-D-Ala¹²]Ang I に対する反応から、キマーゼを介する Ang II 産生系の活動性は低いものと思われた。

キマーゼは ACE とならんで Ang II 生成経路として重要であるが、とくに病的状態でその活性亢進と病状との関連が推察されている。すなわち、キマーゼは心筋虚血³⁶⁾、動脈硬化³⁷⁾、心不全³⁸⁾などの病態で誘導され、さ

らに Shiota らは、血管障害において血管キマーゼが賦活され、生成された組織 Ang II が組織リモデリングに関与していると報告している³⁹⁾。一方、Jin らは、腎血管性高血圧モデルにおいて、高血圧の発生に血管壁 ACE が関与し、キマーゼの関与は少ないと報告している⁴⁰⁾。一方、腎臓では移植腎⁴¹⁾、急速進行性糸球体腎炎⁴²⁾、IgA 腎症⁴³⁾において、キマーゼと腎障害との関連を示唆する報告が出されているが、直接キマーゼ活性を検討した研究はない。さらに、組織キマーゼはキマーゼ含有細胞からの脱顆粒により活性化されるため、組織キマーゼ活性の評価には、組織ホモジェネートなどの手法では、分泌顆粒にあるキマーゼを過大評価することも考えられる³⁹⁾。そこで、本研究では、活性化を受けたキマーゼによって [Pro¹¹-D-Ala¹²] Ang I が Ang II へ変換される特性³⁹⁾を利用して、腎内におけるキマーゼ活性の指標として [Pro¹¹-D-Ala¹²] Ang I 投与による組織 Ang II 含量の変化およびその腎血行動態への影響を検討した。その結果、産生された Ang II が RPF ならびに尿 Na 排泄に影響を与えていることが示された。いかなる機序により虚血側腎においてキマーゼ活性が亢進するかに関して、詳細は明らかでない。しかしながら、キマーゼが心筋虚血⁴⁶⁾において誘導されるとする報告や、無酸素状態下において心筋組織からの Ang II 依存性ノルエピネフリン遊離は、キモスタチンにより抑制されるとした Maruyama らの報告もあり²⁹⁾、慢性腎虚血においてもキマーゼが誘導されることと関連するものと推察された。実際、酸化ストレスによりキマーゼが誘導されるとの報告もあり⁴⁴⁾、今後この方面からの検討も必要と考えられた。また、虚血側腎、非虚血側腎で組織 Ang II 生成経路が異なり、本研究ならびに著者が最近報告した研究における ACE 阻害薬とアンジオテンシン受容体拮抗薬での腎血行動態に与える作用の差異⁴⁵⁾が、腎臓の長期的影響にいかなる差異をもたらすかについては、今後の検討が必要と考えられた。

腎は PG 合成の主要な場であり、腎血行動態や Na 排泄に関与することが知られている。本研究では、虚血側腎において PGE2 および PGI2 が増加し (第 4 図)、スルピリンにより生成を阻害することにより、腎血行動態が障害された (第 9 図)。一方、非虚血側腎では PGI2 が増加し、さらにスルピリン投与により PGI2 のみならず PGE2 も減少し、腎血行動態は障害された。これらの結果より、PGE2 ならびに PGI2 は慢性腎虚血において、虚血側腎、非虚血側腎ともに腎血行動態の維持、Na 排泄に重要な役割を果たしていることが考えられた。さらに、正常犬において、PG 合成阻害は腎血行動態や

Na 排泄に影響を与えなかったことを考慮すると、慢性腎虚血では虚血側腎、非虚血側腎のいずれにおいても、腎 PG 合成系が亢進し、その結果、低下した腎機能を代償する方向に働くものと考えられた。非虚血側腎において、PGE2 と PGI2 が異なった動態を示した機序は明らかでないが、腎血管性高血圧において増加した腎組織 Ang II は、PGI2 の生成のみを刺激するとの報告もある⁴⁵⁾。また、虚血側腎において、スルピリンは FENa に影響を及ぼさなかった (第 9 図)。これは、スルピリンが GFR を著しく減少させたため、Na 排泄の評価に少なからず影響を与えたことが考えられた。さらに、スルピリンにより FF が減少傾向であり、このことにより輸出細動脈内血漿膠質浸透圧を減少させ、Na 再吸収を減少させたことも考えられた⁴⁷⁾。

近年、PG 生成系としての COX には二つのサブタイプが存在することが報告され、生理的ならびに病的役割についての検討が行われている。すなわち、COX-1 は通常状態において存在し、腎血行動態の維持に関与するが、COX-2 はサイトカインなどの様々な刺激によって誘導されるのみならず、腎では緻密斑や皮質集合管に存在することが明らかとなった。さらに、腎 COX-2 は 2 腎 1 クリップ腎血管性高血圧モデルの狭窄側腎において誘導されることが報告されており^{12,48)}、COX-2 の腎での役割が示唆されている。一方、Gross らは COX-2 選択的阻害薬存在下においても圧利尿は障害されないことを報告しており⁴⁹⁾、腎における COX-1 および COX-2 の相対的役割については十分には理解されていない。本研究は、虚血側腎で増加した PGE2 および PGI2 が、COX-2 選択的阻害薬の NS398 により減少したことから、虚血側腎では COX-2 を介する PG の生成が示された。また、非虚血側腎においても、NS398 により PGE2, PGI2 産生量が減少したことより、非虚血側腎の PG 産生系においても同様に COX-2 の関与が考えられた。これらの COX-2 を介する PG 産生の変化は、腎血行動態 (RPF, GFR) には影響を与えず、Na 排泄、とくに FENa の変化をもたらした。一方、正常犬において、NS398 は腎血行動態および Na 排泄に影響しなかった。以上の結果から、慢性腎虚血では COX-2 活性の亢進が起こり、腎 PG 産生の増加をもたらす。Na 排泄の方向に働いており、同時に産生された Ang II の作用に拮抗することが考えられた。また、スルピリンでは腎血行動態ならびに尿 Na 排泄の両者に影響を及ぼしたのに比し、NS398 は尿 Na 排泄を選択的に抑制した。この結果は、COX-2 由来の PG が尿細管により選択的に作用することを示唆するものと思われた。実際、COX-2 が通常状

態において、血管壁よりもむしろ緻密斑や皮質集合管などの尿細管に分布するとの報告と合致する結果と考えられる。一方、NS398は腎血行動態に影響を与えなかったが、スルピリンでは影響を受けたことより、血管壁ではむしろCOX-1の影響が大である可能性が考えられた。しかしながら、COX-1が尿細管に対して作用するか否かについては、本研究では明らかにされておらず、今後の検討が必要である。

PGは血管抵抗性調節やNa代謝に関与するのみならず、種々の血管作動性因子に対しても影響を及ぼすことが報告されている¹²⁾。従来、腎血管性高血圧患者に対し、COX阻害薬が降圧とともに血中レニン活性の低下をもたらすことが指摘されていたが⁵⁰⁾、近年、レニン分泌とCOX-2との関連が示唆されるようになった。すなわち、Wangらは腎血管性高血圧モデルにおいて、COX-2の阻害がレニンを抑制することを報告した⁴⁸⁾。さらに、Castropらは、COX-2由来のPGは緻密斑におけるレニンの生成に重要であることを示した⁵¹⁾。本研究では、虚血側腎で増加した組織Ang IならびにAng IIは、COX-2阻害薬のNS398により著しく抑制されることを示した(第11図)。この結果は、COX-2阻害によりレニン産生が抑制され、アンジオテンシノーゲンからAng Iへの変換が阻害されたことによるものと推察された。したがって、COX-2の阻害によるAng II生成抑制は、オルメサルタン投与によって得られた成績(第5図)を考慮すると、腎機能に対して良好な影響を与える可能性が考えられる。しかしながら、COX-2阻害による腎機能への影響をみた成績(第9図)は、Ang II生成抑制による間接的な効果よりも、むしろ、PG産生抑制による直接的な増悪作用の方が大であることを示すものと思われた。一方、非虚血側腎では、COX-2阻害は組織Ang I、Ang IIを抑制しなかった。これは、非虚血側腎において増加した組織Ang IIがレニン生成を抑制するため⁹⁾、COX-2阻害による影響を受けないものと考えられた⁴⁷⁾。

総括

片側腎動脈を狭窄させて慢性腎虚血犬を作成し、血管作動性因子の動態およびその役割について検討し、以下の結果を得た。

1. 慢性腎虚血により、虚血側腎のみならず非虚血側腎においても、腎血行動態の障害ならびに尿中Na排泄の障害をもたらした。これらの変化と平行して、組織

Ang IIが虚血側腎、非虚血側腎とともに増加を示した。

2. 正常犬では影響しない量のアンジオテンシン受容体拮抗薬のオルメサルタンは、虚血側腎、非虚血側腎ともに腎血行動態ならびに尿中Na排泄を改善した。さらに、生体内CCDカメラを用いた腎輸入、輸出細動脈の直接的観察により、オルメサルタンによる両側腎の両細動脈の拡張が認められた。

3. 慢性腎虚血により増加した腎組織Ang IIは、虚血側腎ではキマーゼ阻害薬のキモスタチンにより、非虚血側腎ではACE阻害薬のシラザプリラートにより減少した。さらに、キマーゼにより選択的にAng IIに変換されるAng I基質[Pro¹¹-D-Ala¹²]Ang Iを腎動脈内に投与したところ、虚血側腎ではAng II濃度の上昇と腎血行動態の低下が観察され、この変化はキモスタチンの前投与により著明に抑制された。

4. 慢性腎虚血により腎PG産生が亢進し、COX-1由来のPGは腎血行動態の維持に関与し、COX-2由来のPGはNa排泄およびレニン生成に働くことが推定された。

以上の結果より、片側慢性腎虚血において、虚血側腎、非虚血側腎ともに腎組織レニン-アンジオテンシン系が異なった機序により活性化し、腎機能を障害することが示された。さらに、プロスタグランジン系が腎機能の低下を代償する方向に活性化されるが、一方では、虚血側腎でレニン-アンジオテンシン系の亢進にも関与することが示された。

本稿を終えるにあたり、懇切な御指導と御校閲を賜りました、慶應義塾大学医学部内科学教室猿田享男教授に深く感謝いたします。また、本研究を直接御指導いただきました、林晃一講師に心より感謝いたします。ならびに御協力、御助言をいただきました研究室各員に深く感謝いたします。

本論文の要旨の一部は、第22回(高松、1999年)と第23回日本高血圧学会(福岡、2000年)、第42回(横浜、1999年)と第43回(名古屋、2000年)と第44回日本腎臓学会(大阪、2001年)、18th International Society of Hypertension (Chicago, 2000)、33rd Annual Meeting of American Society of Nephrology (Toronto, 2000)において発表した。

本研究の一部は平成10、11年度文部省科学研究費補助金(奨励研究(A)、課題番号10770531)による。

文 献

- 1) Preston RA, Epstein M: Ischemic renal disease: an emerging cause of chronic renal failure and end-

- stage renal disease. *J Hypertens* 15 : 1365-1377, 1997
- 2) Goldblatt H, Lynch J, Hanzal RF : Studies on experimental hypertension : I. The production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia. *J Exp Med* 59 : 347-379, 1934
 - 3) Mendelsohn FAO : Failure of suppression of intrarenal angiotensin II in the contralateral kidney of one clip, two kidney hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 7 : 219-223, 1980
 - 4) Guan S, Fox J, Mitchell KD, Navar LG : Angiotensin and angiotensin converting enzyme tissue levels in two-kidney, one clip hypertensive rats. *Hypertension* 20 : 763-767, 1992
 - 5) Zou LX, John DI, Von Thun AM, Hymel A, Ono H, Navar LG : Receptor-mediated intrarenal angiotensin II augmentation in angiotensin II-infused rats. *Hypertension* 28 : 669-677, 1996
 - 6) Reilly CF, Tewksbury DA, Schechter NM : Rapid conversion of angiotensin I to angiotensin II by neutrophil and mast cell proteinases. *J Biol Chem* 257 : 8619-8622, 1982
 - 7) Urata H, Healy B, Stewart RW : Angiotensin II-forming pathways in normal and failing human hearts. *Circ Res* 66 : 883-890, 1990
 - 8) Okunishi H, Miyazaki M, Toda N : Evidence for a putatively new angiotensin II-generating enzyme in the vascular wall. *J Hypertens* 2 : 277-284, 1984
 - 9) Murakami M, Matsuda H, Kubota E, Honda M, Hayashi K, Saruta T : Role of angiotensin II generated by angiotensin converting enzyme-independent pathways in canine kidney. *Kidney Int* 52 : s132-s135, 1997
 - 10) DeForrest J, Knappenberger R, Antonaccio M, Ferrone R, Creekmore J : Angiotensin II is a necessary component for the development of hypertension in the two kidney, one clip rat. *Am J Cardiol* 49 : 1515-1517, 1982
 - 11) Stahl RAK, Helmchen U, Paravicini M, Ritter LJ, Scholl MP : Glomerular prostaglandin formation in two-kidney, one-clip hypertensive rats. *Am J Physiol* 247 : F975-F981, 1984
 - 12) Hartner A, Goppelt-Strube M, Hilgers KF : Coordinate expression of cyclooxygenase-2 and renin in the rat kidney in renovascular hypertension. *Hypertension* 31(part 2) : 201-205, 1998
 - 13) Goppelt-Strube M : Regulation of prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase) isozyme expression. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 52 : 213-222, 1995
 - 14) Harris RC, Mckanna JA, Akai Y, Jacobson HR, Dubois RN, Breyer MD : Cyclooxygenase-2 is associated with the macula densa of rat kidney and increase with salt restriction. *J Clin Invest* 94 : 2504-2510, 1994
 - 15) Vio CP, Cespedes C, Gallardo P, Masferrer JL : Renal identification of cyclooxygenase-2 in a subset of thick ascending limb cells. *Hypertension* 30(pt 2) : 687-692, 1997
 - 16) Naitoh M, Suzuki H, Murakami M, Matsumoto A, Ichihara A, Nakamoto H, Saruta T : Effects of oral AVP antagonists OPC-21268 and CPC-31260 on congestive heart failure in conscious dogs. *Am J Physiol* 267 : H2245-H2254, 1994
 - 17) Naitoh M, Suzuki H, Arakawa K, Matsumoto A, Ichihara A, Matsuda H, Kubota E, Murakami M, Nakamoto H, Saruta T : Role of kinin and renal ANG II blockade in acute effects of ACE inhibitors in low-renin hypertension. *Am J Physiol* 272 : H679-687, 1997
 - 18) Matsuda H, Hayashi K, Arakawa K, Naitoh M, Kubota E, Honda M, Matsumoto A, Suzuki H, Yamamoto T, Kajiya F, Saruta T : Zonal heterogeneity in action of angiotensin-converting enzyme inhibitor on renal microcirculation : role of intrarenal bradykinin. *J Am Soc Nephrol* 10(11) : 2272-2282, 1999
 - 19) Siragy HM, Howell NL, Ragsdale NV, Carey RM : Renal interstitial fluid angiotensin modulation by anesthesia, epinephrine, sodium depletion, and renin inhibition. *Hypertension* 25 : 1021-1025, 1995
 - 20) Powell WS : Rapid extraction of oxygenated metabolites of arachidonic acid from biological samples using octadecylsilyl silica. *Prostaglandin* 20 : 947-957, 1980
 - 21) Yamamoto T, Hayashi K, Tomura Y, Tanaka H, Kajiya F : Direct *in vivo* visualization of renal microcirculation by intravital CCD videomicroscopy. *Exp Nephrol* 9 : 150-155, 2001
 - 22) Koike H, Sada T, Mizuno M : *In vitro* and *in vivo* pharmacology of olmesartan medoxomil, an angiotensin II type AT1 receptor antagonist. *J Hypertens* 19 (Suppl 1) : S3-S14, 2001
 - 23) Maruyama R, Hatta E, Yasuda K, Smith NC, Levi R : Angiotensin-converting enzyme-independent angiotensin formation in a human model of myocardial ischemia : modulation of norepinephrine release by angiotensin type 1 and angiotensin type 2 receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 294 : 248-252, 2000
 - 24) Hoit BD, Shao Y, Kinoshita A : Effects of angiotensin II generated by an angiotensin converting enzyme-independent pathway on left ventricular performance in the conscious baboon. *J Clin Invest* 95 : 1519-1527, 1995
 - 25) Okudaira H : Challenge studies of a leukotriene receptor antagonist. *Chest* 111 : 46S-51S, 1997
 - 26) Mai M, Hilgers KF, Wagner J, Mann JF, Geiger H : Expression of angiotensin-converting enzyme in renovascular hypertensive rat kidney. *Hypertension* 25 : 674-678, 1995
 - 27) Truong LD, Farhood A, Tasby J, Gillum D : Experimental chronic renal ischemia : Morphologic and

- immunologic studies. *Kidney Int* 41 : 1676-1689, 1992
- 28) Himmelstein SI, Klotman PE : The role of thromboxane in two-kidney, one-clip Goldblatt hypertension in rats. *Am J Physiol* 257 : F190-F196, 1989
 - 29) Tokuyama H, Hayashi K, Matsuda H, Kubota E, Honda M, Okubo K, Ozawa Y, Saruta T : Stenosis-Dependent Role of Nitric Oxide and Prostaglandin in Chronic Renal Ischemia. *Am J Physiology* 282 : F859-865, 2002
 - 30) Carmines PK, Morrison TK, Navar LG : Angiotensin II effects on microvascular diameters of *in vitro* blood-perfused juxtamedullary nephrons. *Am J Physiology* 251 : F610-F618, 1986
 - 31) Hayashi K, Loutzenhiser R, Epstein M : Direct evidence that thromboxane mimetic U44069 preferentially constricts the afferent arteriole. *J Am Soc Nephrol* 8 : 25-31, 1997
 - 32) Hayashi K, Epstein M, Loutzenhiser R : Pressure-induced vasoconstriction of renal microvessels in normotensive and hypertensive rats : studies in the isolated perfused hydronephrotic kidney. *Circ Res* 65 : 1475-1484, 1989
 - 33) Inscho EW, Carmines PK, Cook AK, Navar LG : Afferent arteriolar responsiveness to altered perfusion pressure in renal hypertension. *Hypertension* 15 : 748-752, 1990
 - 34) Navar LG, Harrison-Bernard LM, Imig JD, Wang CT, Cervenka L, Mitchell KD : Intrarenal angiotensin II generation and renal effects of AT1 receptor blockade. *J Am Soc Nephrol* 10 (Suppl 129) : S266-S272, 1999
 - 35) Navar LG, Von Thun AM, Zou L, el-Dahr SS, Mitchell KD : Enhancement of intrarenal angiotensin II levels in 2 kidney 1 clip and angiotensin II induced hypertension. *Blood Press Suppl* 2 : 88-92, 1995
 - 36) Laine P, Kaartinen M, Penttila A, Panula P, Paavonen T, Kovanen PT : Association between myocardial infarction and the mast cells in the adventitia of the infarct-related coronary artery. *Circulation* 99 : 361-369, 1999
 - 37) Uehara Y, Urata H, Sasaguri M, Ideishi M, Sakata N, Tashiro T, Kimura M, Arakawa K : Increased chymase activity in internal thoracic artery of patients with hypercholesterolemia. *Hypertension* 35 (1 Pt 1) : 55-60, 2000
 - 38) Holtz J : Pathophysiology of heart failure and the renin-angiotensin-system. *Basic Res Cardiol* 88 Suppl 1 : 183-201, 1993
 - 39) Shiota N, Okunishi H, Takai S, Mikoshiba I, Sakonjo H, Shibata N, Miyazaki M : Tranilast suppresses vascular chymase expression and neointima formation in balloon-injured dog carotid artery. *Circulation* 99 : 1084-1090, 1999
 - 40) Jin D, Takai S, Shiota N, Miyazaki M : Roles of vascular angiotensin converting enzyme and chymase in two-kidney, one clip hypertensive hamsters. *J Hypertens* 16 : 657-664, 1998
 - 41) Yamada M, Ueda M, Naruko T, Tanabe S, Han YS, Ikura Y, Ogami M, Takai S, Miyazaki M : Mast cell chymase expression and mast cell phenotypes in human rejected kidneys. *Kidney Int* 59(4) : 1374-1381, 2001
 - 42) Toth T, Toth-Jakatics R, Jimi S, Ihara M, Urata H, Takebayashi S : Mast cells in rapidly progressive glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 10(7) : 1498-1505, 1999
 - 43) Ehara T, Shigematsu H : Contribution of mast cells to the tubulointerstitial lesions in IgA nephritis. *Kidney Int* 54(5) : 1675-1683, 1998
 - 44) Rapala KM, Kozik A, Travis J : Effect of oxidation of beta-amyloid precursor protein on its beta-secretase cleavage. *J Pept Res* 52(4) : 315-320, 1998
 - 45) Tokuyama H, Hayashi K, Matsuda H, Kubota E, Honda M, Okubo K, Takamatsu I, Tatematsu S, Ozawa Y, Wakino S, Saruta T : Differential Regulation of Elevated Renal Angiotensin II in Chronic Renal Ischemia. *Hypertension* 40(1) : 34-40, 2002
 - 46) Breyer MD, Badr KF : Arachidonic acid metabolites and the kidney, in *The Kidney* edited by Brenner MB, W.B.Saunders Company pp754-788, 1996
 - 47) Tokuyama H, Hayashi K, Matsuda H, Kubota E, Honda M, Okubo K, Ozawa Y, Saruta T : Distinct Role of Intrarenal Cyclooxygenase-1/2 in Chronic Unilateral Renal Ischemia. *Nephron* 92(1) : 183-191, 2002
 - 48) Wang JL, Cheng HF, Harris RC : Cyclooxygenase-2 inhibition decreases renin content and lowers blood pressure in a model of renovascular hypertension. *Hypertension* 34 : 96-101, 1999
 - 49) Gross JM, Dwyer JE, Knox FG : Natriuretic response to increased pressure is preserved with COX-2 inhibitors. *Hypertension* 34 : 1163-1167, 1999
 - 50) Jackson EK, Oates JA, Branch RA : Indomethacin decreases arterial blood pressure and plasma renin activity in rats with aortic ligation. *Circ Res* 49 : 180-185, 1981
 - 51) Castrop H, Schweda F, Schumacher K, Wolf K, Kurtz A : Role of renocortical cyclooxygenase-2 for renal vascular resistance and macula densa control of renin secretion. *J Am Soc Nephrol* 12 : 867-874, 2001