

Title	生体内CCDカメラを用いた腎輸入・輸出細動脈の反応性の層差に関する研究
Sub Title	
Author	松田, 洋人(Matsuda, Hiroto) 猿田, 享男(Saruta, Ikuo)
Publisher	慶應医学会
Publication year	2004
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.81, No.4 (2004. 12) ,p.T167- T184
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	学位論文
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20041201-0167

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

学位論文

生体内 CCD カメラを用いた腎輸入・輸出細動脈の
反応性の層差に関する研究

慶應義塾大学医学部内科学教室

(指導：猿田享男教授)

まつ だ ひろ と
松 田 洋 人

(平成 15 年 9 月 5 日受付)

Key Words : angiotensin II, nitric oxide, angiotensin receptor antagonist, renal hemodynamics, bradykinin

生体の内部環境の恒常性維持に種々の液性因子の関与が示されてきたが、なかでもレニン・アンジオテンシン系は、全身血圧の調整や腎機能の保持に重要な内分泌調節系である^{1, 2)}。レニンならびにアンジオテンシン II が腎臓内に豊富に存在し^{3, 4)}、腎糸球体・細動脈レベルには、アンジオテンシン II 受容体が密に分布すること⁵⁾、レニン-アンジオテンシン系が腎臓内できわめて重要な役割を担っていることを示唆している。実際にアンジオテンシン II が糸球体の前後に存在する輸入・輸出細動脈の血管緊張に影響を与え、腎臓の主要な機能である血液濾過を制御している。さらに、生体内では、腎微小血管壁ならびにその周囲の腎間質が一酸化窒素（以下、NO と略）などの種々の液性因子をオートクライン・パラクラインとして分泌し^{6, 7)}、これらの液性因子が相互に影響を与え合うことが報告されている^{8, 9)}。これまでの摘出腎、あるいは単離腎微小血管標本などの種々の研究手法により、アンジオテンシン II に対する輸入・輸出細動脈の血管反応性が異なり、その収縮機序にも差異が見られることが報告されてきた¹⁰⁻¹³⁾。しかし種々の因子の影響を受ける生体内で、輸入・輸出細動脈へのアンジオテンシン II の作用が NO に対していかなる作用を示すかには検討されていない。近年アンジオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害薬ならびにアンジオテンシン受容

体拮抗薬などのアンジオテンシン II 作用抑制薬が腎障害進展阻止薬として有用であることが確立してきたが¹⁴⁻¹⁷⁾、これらの阻害薬の生体内における腎微小循環ならびに腎内 NO に与える影響の詳細は明らかでない。

腎臓内において糸球体の存在部位がその機能に大きな影響を与えている。すなわち、糸球体の約 9 割が皮質表層部に存在し¹⁸⁾、近傍の尿細管への血液の供給を行っている。一方、残りの 1 割の糸球体は腎髄質に近い傍髄質部に存在し、血液濾過の他に直血管を經由して髄質乳頭部に血液を供給し、水・ナトリウム代謝に影響をおよぼしている。このような腎臓内における糸球体の存在部位の差異が腎機能にことなる影響を与えるが、一方腎皮質・髄質のおのおのの層において種々の液性因子の濃度環境も異なることが知られている¹⁹⁾。とくに、NO は血管拡張因子として働いており、アンジオテンシン II との相互作用が血管の存在部位で異なることが推察される^{20, 21)}。しかしながら、従来の研究方法は、腎皮質表層部²²⁾あるいは傍髄質部の糸球体微小循環のみ^{10, 23)}を評価する研究手技や、目的とする血管を生体より単離するといった侵襲的な方法^{11, 24)}がとられていた。腎微小血管周囲の環境を損なわずに観察することが重要であるが、これまでそのような研究はない。

以上の背景をふまえ、本研究は生体内における腎皮質

本論文は、Matsuda H, Hayashi K, Arakawa K, Kubota E, Honda M, Naito 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. Journal of American Society of Nephrology 10 (11) : 2272-2282 ; 1999 の一部、および Matsuda H, Hayashi K, Arakawa K, Kubota E, Honda T, Tokuyama H, Suzuki H, Yamamoto T, Kajiya F, Saruta T : Distinct modulation of superficial and juxtamedullary arterioles by prostaglandin *in vivo*. Hypertension Research 25 (6) : 901-910, 2002 の一部を含む。

表層部ならびに傍髄質部の輸入・輸出細動脈に対するアンジオテンシンIIの作用を、比較的低侵襲操作で直接観察できるニードル型生体内 CCD カメラ²⁵⁻²⁷⁾で検討した。さらに、各層の輸入・輸出細動脈へのアンジオテンシンIIの作用と腎実質内 NO との関連を、アンジオテンシンIIの投与により直接的に観察するとともに、アンジオテンシン受容体拮抗薬ならびにアンジオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害薬の投与下で、内因性のアンジオテンシンIIの作用および両薬剤の NO 産生への作用の差異について検討した。

方 法

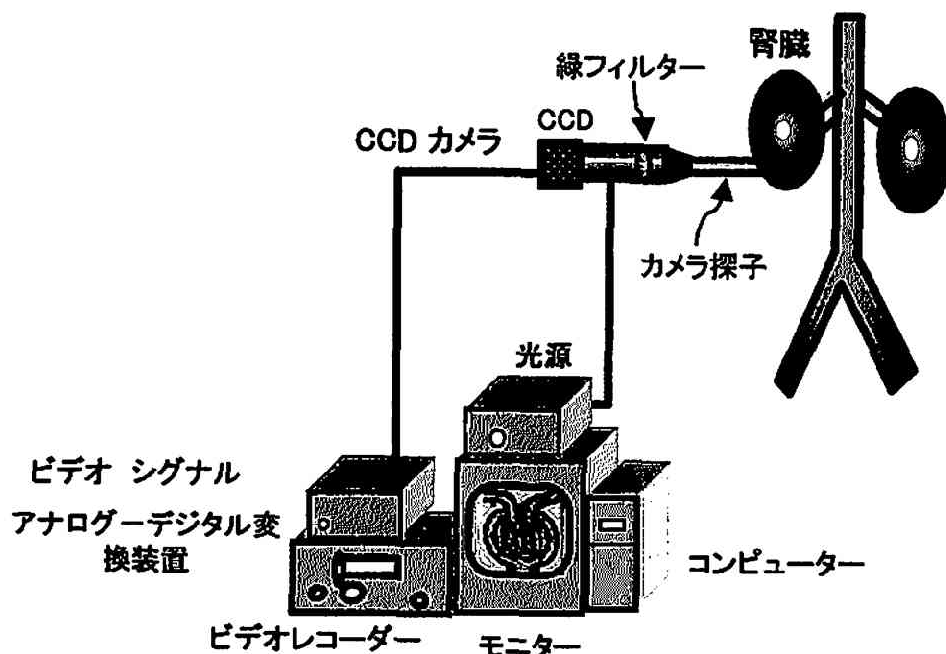
1. 血圧、心拍数ならびに腎血行動態の観察

実験は雄生犬 (n=65) を用いた。実験1は雑犬 (10-17 kg) を、実験2から4は、ビーグル犬 (体重4-8 kg) を使用した。すべての実験は慶應義塾大学医学部の実験動物委員会ガイドラインにしたがい、外科的処置はペントバルビタール (30 mg/kg, 静注) 麻酔下で無菌的に行った。各実験は人工呼吸器による呼吸管理下で行った。体温は 37°C に保持した恒温ブランケットで管理した。右大腿動脈に挿入したカテーテル (Tygon,

U.S. Stoneware, オハイオ, U.S.A.) を血圧トランスデューサー (TP-400T, 日本光電, 東京) に接続し、平均血圧、心拍数を測定した。後腹膜切開により左腎を露出し表在化させた。腎門部を剥離し、腎血漿流量測定のために、電磁血流計 (日本光電: プローブ径 5 mm) を腎動脈に装着した。血圧、脈拍、腎血漿流量は、アナログ-デジタル変換装置 (Macintosh Laboratory System; Analog Digital Instruments Pty., Ltd. キャスルヒル, オーストラリア) でデジタル化したデータを、コンピューターにて評価した。膀胱内にバルーンカテーテル (7-Fr, クリエイトメディック, 横浜) を経尿道的に挿入し、パラアミノ馬尿酸を用いて腎血漿流量、イヌリンを用いて糸球体濾過率を測定した。濾過係数は腎血漿流量と糸球体濾過率との比から算出した。

2. 腎実質内 NO ならびにキニン濃度の測定

腎実質内の NO の測定は、腎微小透析法を用いて行った^{25, 28)}。すなわちポリスルホン製の半透膜 (エイコム社, 孔径 0.5 mm, カットオフ値 10 Kd) からなる直線型中空糸を腎皮質表面より 2 mm ならびに 10 mm の深度で挿入し、透析液としてリンゲル液 (147 mEq/L Na, 4 mEq/L K, 5 mEq/L Ca, 156 mEq/L Cl) を 2 μ l/分



第1図 ニードル型生体内 CCD カメラシステムの説明。表在化した腎にニードル型 CCD カメラを挿入し、細動脈の画像情報をデジタル信号からアナログ信号 (NTSC) に変換し、コンピューターにて解析した。

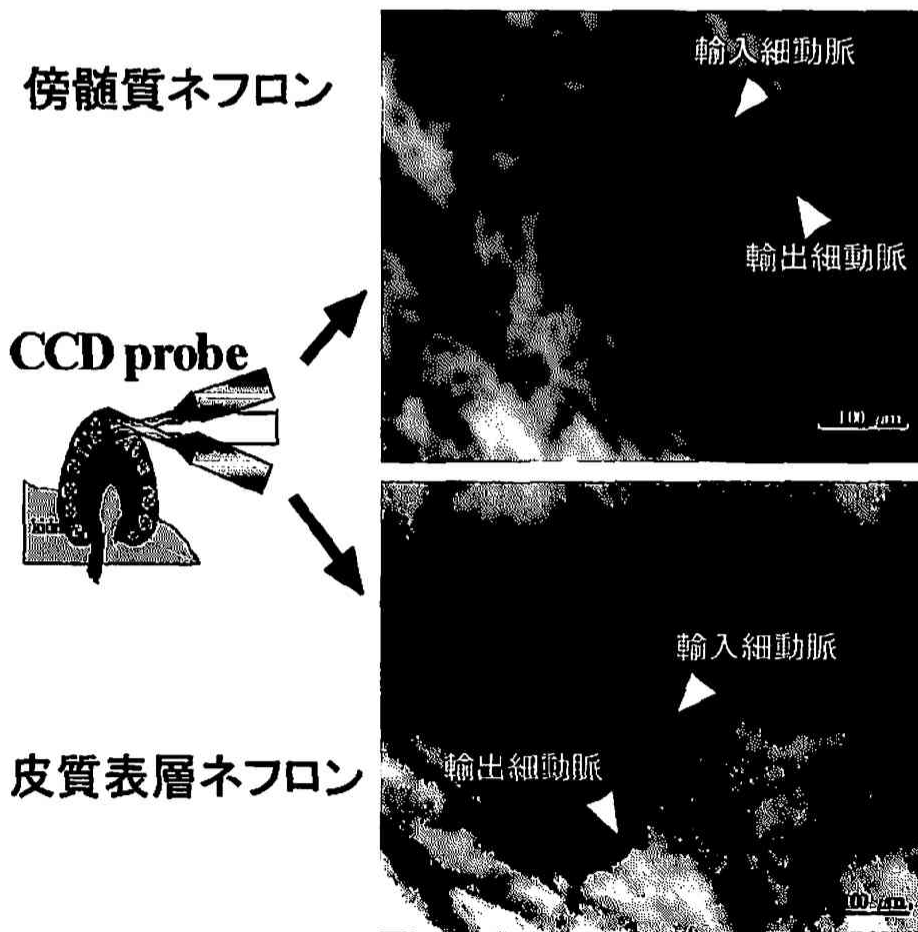
で灌流し、おのおの皮質部、髓質部の灌流と見なした。灌流液は -80°C で直ちに凍結し、後日測定に供した。腎 NO 活性の指標として、NO 代謝物である NO_2 ならびに NO_3 の総和（以下、 NO_x と略）を用いた。Griess 法に基づき NO_2 および NO_3 を分光光度計（ENO-10, エイコム社、東京）を用い、波長 540 nm で測定した。

腎実質内キニン濃度の測定には、腎生検法²⁵⁾を用いた。腎表面より深度が一定になるよう直角に生検し、すみやかに検体を皮質ならびに髓質部にわけ、インヒビターカクテル（100% ethanol, trichloroacetic acid (100 mol/L), EDTA (3.5 mol/L), 1, 10-phenanthroline (0.5 mol/L), p-hydroxymercurbenzoate sodium salt (1 mmol/L), および pepstatin (0.12 mmol/L) の入った容器にいれ、液体窒素で凍結させた。薬品はシグマ社（セントルイス）より購入し実験前に調合した。その後

-80°C に保存し、後日 RIA 法により組織キニンを測定した²⁶⁾。

3. 腎微小血管の評価

腎微小血管を直接観察するため、ニードル型生体内 CCD カメラを用いた（第 1 図）^{25~27, 29)}。本システムは、ニードル型 CCD カメラ装置とビデオ記録装置から成り、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（150W）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、写し出された血管像を光学的に 700 倍に拡大し、単板 CCD 素子（電荷結合素子、約 38 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に変換し、実験



第 2 図 腎皮質表層部ならびに傍髓質部糸球体における輸入—輸出細動脈の描出方法。腎後極に CCD プローブを穿刺し、平行から上方にプローブを振ることで皮質表層糸球体を、また下方に振ることで傍髓質部糸球体の描出を行った。（Matsuda H et al : J Am Soc Nephrol. 10 (11) : 2272-2282, 1999 の Fig 1 を許可をえて転載）

中は15インチテレビモニター上に映像化すると同時に、画像情報はHi-8ビデオカセットレコーダーに録画した。

CCDカメラ探子は、左側腹部切開部より左腎後極皮質部に挿入した。腎皮質表層部の糸球体の観察は、CCDカメラ探子を上方に向けることで行い、また傍髄質部の糸球体は下方に向けることにより行った(第2図)。糸球体描出後は、CCDカメラ探子を数 μm ずつ手前に引き血管イメージが安定し、かつ糸球体血流が明瞭に得られる部位に固定した。糸球体の描出後は、最低60分間は観察し安定が得られた後に実験開始とした。実験中に視野内に再出血がみられた場合には観察を中止した。

腎輸入・輸出細動脈径は、録画された画像をコンピューター(Power Mac8500/120AV)に経時的にピクト情報として取り込み、フォトショップ(Ver.2.5J,アドビ社)にてグレースケール化(8ビット256階調)した後、NIH-Image(Ver.1.57)を用いて評価した。すなわち、糸球体の近傍で血管と考える箇所において、血管壁に直交する線に沿って約15 μm の幅で画像濃度を平均化し血管内腔を示唆するプロットプロファイルを出し、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を血管径とみなした^{26, 29)}。

実験に供したアンジオテンシンII, nitro-L-arginine methylester (L-NAME), L-arginine, ならびに N-adamantaneacetyl-D-Arg-[Hyp3, Thi5, 8, D-Phe7]-bradykinin (NAAB) は、シグマ社(セントルイス)より購入し、ACE阻害薬であるシラザプリラートおよびアンジオテンシンII受容体拮抗薬であるE4177は、おのおの日本ロッシュ株式会社(東京), エーザイ株式会社(大阪)より供与された。

4. 実験計画

1) 皮質表層・傍髄質部NOのアンジオテンシンII作用に与える影響

体循環の血行動態の観察下で、経静脈的にアンジオテンシンII(1, 3, 10ならびに30ng/kg/分)を持続注入し、表層部および傍髄質部糸球体の輸入、輸出細動脈の反応を観察した。さらに、腎微小透析法により、基礎状態ならびにアンジオテンシンII投与後の透析膜灌流液中のNOx濃度を、皮質部ならびに髄質部にわけて測定した。

次に、L-NAME(1mg/kg)投与後の腎細動脈径の変化を観察し、腎内NOが、基礎腎血管抵抗に与える影響を検討した。L-NAME投与15分後に全身ならびに腎循環の安定が得られたのち、アンジオテンシンII(1, 3, 10ならびに30ng/kg/分)を持続静注し、両

層の腎輸入・輸出細動脈の反応を観察し、L-NAME非存在下における反応と比較検討した。

2) アンジオテンシンII受容体拮抗薬(E4177)の腎微小循環作用

アンジオテンシン受容体拮抗薬であるE4177(3, 10, 30ならびに100 $\mu\text{g}/\text{kg}$)を静注し、細動脈の拡張反応を検討した。さらに、腎微小透析法を用い、E4177の各投与量における腎内NOx濃度を測定した。次に、E4177(30 $\mu\text{g}/\text{kg}$)投与後にアンジオテンシンII(3, 10, 30, 100ng/kg/分)を投与し、細動脈の血管収縮反応の抑制の程度ならびに、腎微小透析法により腎内NO産生に与える影響を検討した。

3) ACE阻害薬の腎微小循環作用

シラザプリラートを、3, 10ないし30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の用量で静脈投与し、全身循環、腎循環、ならびに腎微小循環の反応を観察した。ACEはその分子構造の一部にキナーゼII活性を有し、ACE阻害薬によりブラジキニンが増加することが報告されている²⁹⁾。したがって、ACE阻害薬により亢進したキニン活性の関与を検討する目的で、ブラジキニン(B2)受容体拮抗薬であるNAAB(0.5nmol/kg/分)を追加投与し、細動脈径の変化を観察した。一方、内因性ブラジキニンの腎微小循環に与える影響を評価する目的で、基礎状態におけるNAAB(0.5nmol/kg/分)の影響も検討した。

ACE阻害薬投与に伴う腎内ブラジキニン濃度の変化を検討する目的で、各用量のシラザプリラート投与30分後に、腎生検を施行し、後日ブラジキニンの測定に供した。さらに、腎微小透析法を用い各投与量における腎内NOxを測定した。

4) ACE阻害薬のキニン増強作用

ACE阻害薬による腎微小血管拡張へのブラジキニンの関与が、輸入・輸出細動脈で異なるか、あるいは皮質表層・傍髄質で異なるか否かを検討する目的で、E4177(30 $\mu\text{g}/\text{kg}$)の存在下でシラザプリラート(30 $\mu\text{g}/\text{kg}$)を投与した。さらに、NAAB(0.5nmol/kg/分)を追加投与し、各層ならびに細動脈における差異を検討した。

5. 統計学的処理

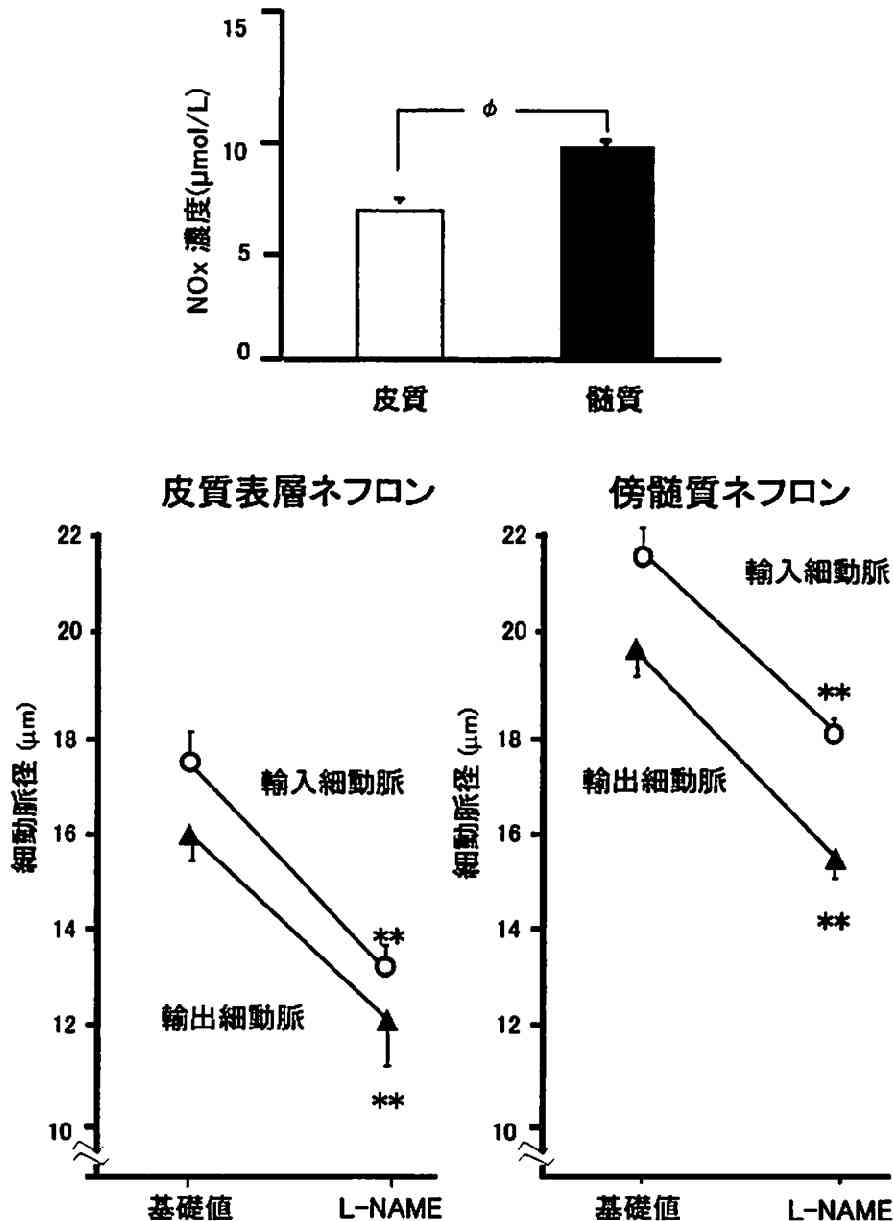
本文中の数値および図表中の数値は特に記載のある場合を除いては、平均値標準誤差で表した。統計解析は2元配置分散分析法を用い、危険率5%未満の場合を統計学的有意差ありとした。各群間有意差検定には、Bonferroniのpost-hoc testを使用し危険率5%未満の場合を統計学的有意差ありとした。

結 果

1. 皮質表層・傍髄質部 NO のアンジオテンシン II 作用に与える影響

始めに、基礎状態における腎内 NOx 濃度は、皮質 ($6.5 \pm 0.3 \mu\text{mol/L}$, $n=12$) に比し髄質 (9.0 ± 0.5

$\mu\text{mol/L}$, $n=13$) で有意に大であった ($p<0.01$; 第3図, 上段)。腎内 NO が基礎状態での腎微小循環に与える影響を検討するため、L-NAME (1 mg/kg) を投与したところ、表層部輸入・輸出細動脈は各々 $24 \pm 3\%$ ($17.3 \pm 0.4 \mu\text{m}$ から $13.1 \pm 0.6 \mu\text{m}$, $p<0.05$, $n=11$), $23 \pm 3\%$ ($16.0 \pm 0.5 \mu\text{m}$ から $12.3 \pm 1.0 \mu\text{m}$, $p<0.05$,



第3図 腎皮質表層部と髄質部の NOx 濃度と L-NAME による表層部ならびに傍髄質部細動脈径の変化。基礎状態における NOx 濃度は、表層部より傍髄質部の方が高値を示した (上段)。L-NAME の投与では、いずれの細動脈径も減少がみられた (下段)。* $p<0.05$; ** $p<0.01$ vs. 基準値。 $\phi p<0.05$ 皮質部 vs. 髄質部 (Matsuda H et al: Hypertens Res; 25 (6): 901-910, 2002 の Fig 3 を許可をえて一部改変後に転載)

第1表 アンジオテンシンII投与による全身ならびに腎血行動態の変化

	平均血圧 (mmHg)	心拍数 (beats/min)	腎血漿流量 (ml/min)	糸球体濾過量 (ml/min)	濾過係数
基礎値 (n=17)	110±2	109±2	153±2	35±2	0.21±0.01
生理食塩水	110±3	109±3	153±3	35±2	0.21±0.01
アンジオテンシンII					
1 ng/kg/min	110±2	108±2	147±2	31±2	0.22±0.01
3 ng/kg/min	114±2	109±3	133±5**	31±3	0.26±0.02*
10 ng/kg/min	121±2*	110±2	117±5**	29±2	0.24±0.01*
30 ng/kg/min	136±3**	110±3	97±5**	21±2**	0.23±0.02*
基礎値 (n=17)					
L-NAME	109±1	114±2	148±2	32±1	0.23±0.01
L-NAME	118±3 ⁿ	99±5 ⁱ	123±4 ⁿ	31±1	0.24±0.01
アンジオテンシンII					
1 ng/kg/min	121±2	100±5	107±4*	27±1	0.26±0.01
3 ng/kg/min	122±2	101±6	100±5*	23±3*	0.25±0.02
10 ng/kg/min	130±2	103±7	89±5**	19±1**	0.25±0.01
30 ng/kg/min	138±3**	108±6	80±5**	18±1**	0.23±0.01

L-NAME, nitro-L-arginine methylester

ⁿ, p<0.05 ; ⁱ, p<0.01 vs. 基礎値

^{*}, p<0.05 ; ^{**}, p<0.01 vs. 生理食塩水あるいはL-NAME.

n=11)の収縮反応を示した(第3図, 下段)。* 傍髄質部の腎細動脈も収縮反応を示し, 輸入細動脈は, 17±2% (21.9±0.6 μm から 18.0±0.4 μm, p<0.05, n=13) 輸出細動脈は, 20±3% (19.6±0.5 μm から 15.6±0.5 μm, p<0.05, n=13)の収縮を示した。その程度は皮質表層部の細動脈より減弱傾向であった。

アンジオテンシンIIの経静脈投与は, 1ならびに3 ng/kg/分の用量では平均血圧に影響を与えなかったが, 10 ng/kg/分より上昇が見られ, 30 ng/kg/分では136±3 mmHg (p<0.05, n=17)へと上昇した(第1表)。腎血漿流量は, 3 ng/kg/分の用量より減少が見られ(p<0.01, n=17), 以後用量依存性に減少した。一方, 糸球体濾過率は, 10 ng/kg/分の投与量までは不変であったが, 30 ng/kg/分の投与量で有意に減少した。濾過係数は, 3 ng/kg/分より増加し, 以後高用量においても増加を維持した(p<0.05, 第1表)。

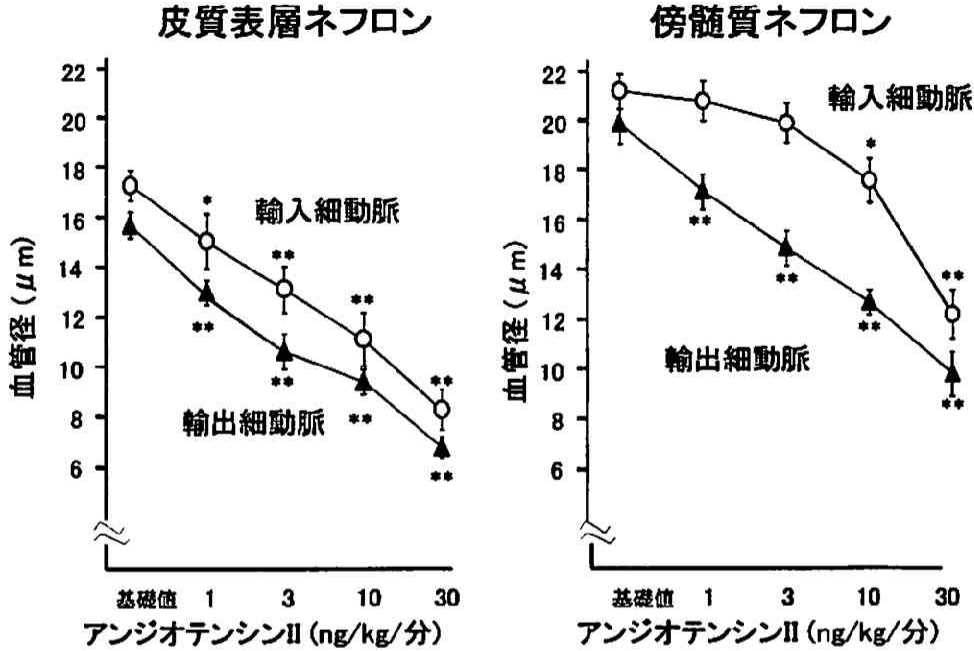
表層部糸球体の輸入細動脈径は, 1 ng/kg/分のアンジオテンシンIIにより17.2±0.7から10±3%減少し15.6±0.9 μm (p<0.05, n=15)となり, 30 ng/kg/分では49±5% (8.7±0.9 μm, p<0.01)の収縮を示した(第4図, 左)。同様に輸出細動脈も1 ng/kg/分の投与量で14±4%減少し15.8±0.5から13.2±0.6 μm (p<0.01, n=15)と血管径の減少を示し, 30 ng/kg/分では, 53±3% (7.5±0.3 μm, p<0.01)の収縮が認め

られた。いずれのアンジオテンシンIIの投与量においても, 輸入と輸出細動脈径との間に有意差を認めなかった。

傍髄質部の輸入, 輸出細動脈は, おおの21.1±0.7 μm (n=17), 19.5±0.5 μm (n=17)と, いずれも表層部の細動脈径より大であった(p<0.01)(第4図, 右)。1 ng/kg/分のアンジオテンシンIIにより, 輸出細動脈は, 11±4% (17.0±0.6 μm, p<0.01)の収縮がみられ, 30 ng/kg/分では52±3% (9.2±0.6 μm, p<0.05)まで収縮した。一方, 輸入細動脈は, 1ならびに3 ng/kg/分では有意の収縮を認めず, 10 ng/kg/分により17±4% (17.9±0.9 μm, p<0.05)の収縮を示した。30 ng/kg/分で, 44±4% (12.1±1.0 μm, p<0.05)となり輸出細動脈と同等になった。

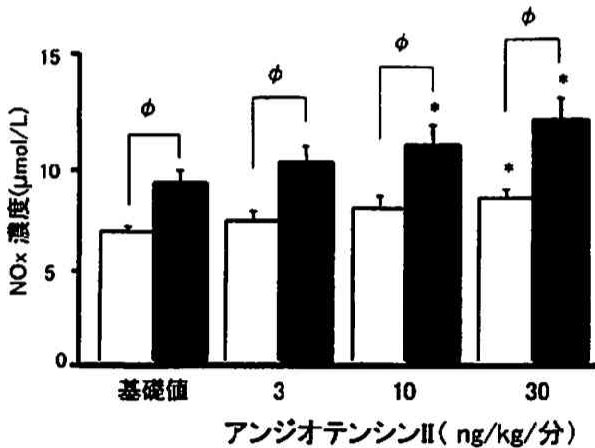
アンジオテンシンII各投与量による腎各層におけるNOx濃度は, 髄質部では10 ng/kgで11±1.0 μmol/L (p<0.05, n=13)と有意に上昇したのに比し, 表層部では30 ng/kg/分で8.3±0.4 μmol/L (p<0.05, n=12)の上昇に留まった(第5図)。

L-NAME存在下では, アンジオテンシンIIによる腎細動脈の収縮は増強したが, その程度は腎各層で異なっていた(第6図)。すなわち, 表層部輸入・輸出細動脈では, L-NAMEは1 ng/kg/分のアンジオテンシンII投与量でのみ収縮を増強した(p<0.05)。一方, 傍髄質



第4図 外因性アンジオテンシン II による腎微循環の反応。腎皮質表層部ネフロン (左図) では、輸入・輸出細動脈ともに同様の収縮反応を示した。一方、傍髄質部ネフロン (右図) では、輸出細動脈に比し輸入細動脈の反応が減弱していた。** $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ vs. 基準値。(Matsuda H et al : Hypertens Res ; 25 (6) : 901-910, 2002 の Fig 1 の一部改変後、許可をえて改変後転載)

部では、輸入細動脈で 1, 3, ならびに 10 ng/kg/分、輸出細動脈で 1 および 3 ng/kg/分のアンジオテンシン II 濃度で収縮の増強を認めた。

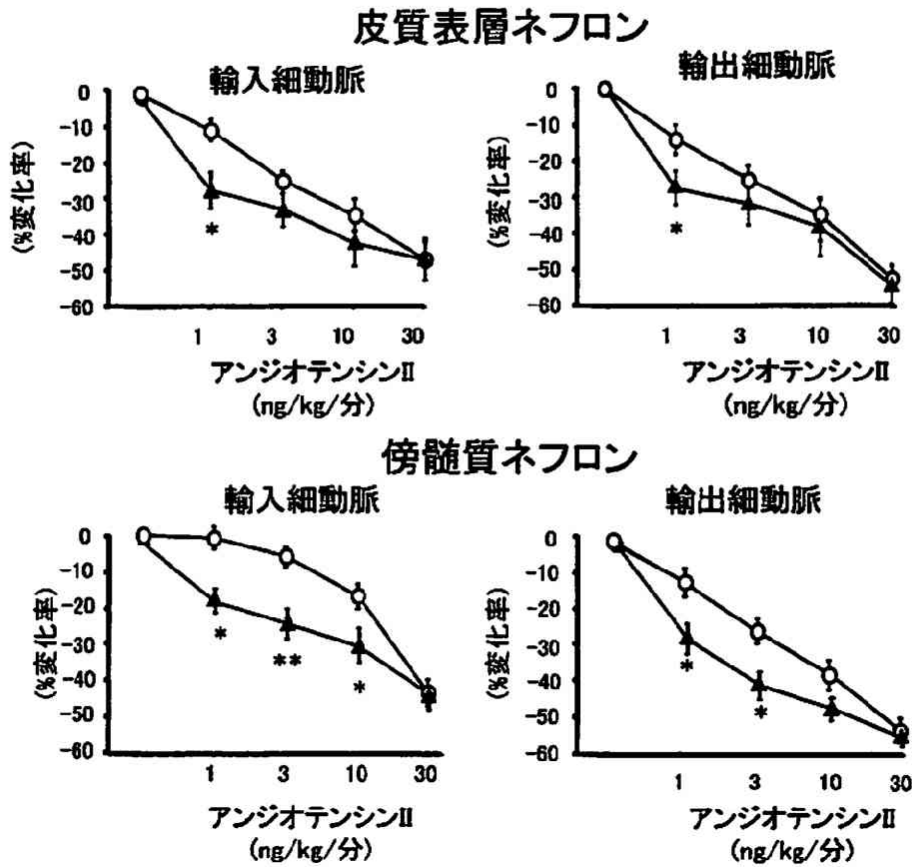


第5図 外因性のアンジオテンシン II による腎内一酸化窒素濃度の変化。皮質部 (□) にくらべ髄質部 (■) は 10 ng/kg/min より一酸化窒素代謝物の増加がみられた。* $p < 0.05$ vs. 基準値; $\phi p < 0.05$ 皮質部 vs. 髄質部 (Matsuda H et al : Hypertens Res ; 25 (6) : 901-910, 2002 の Fig 2 を許可をえて転載)

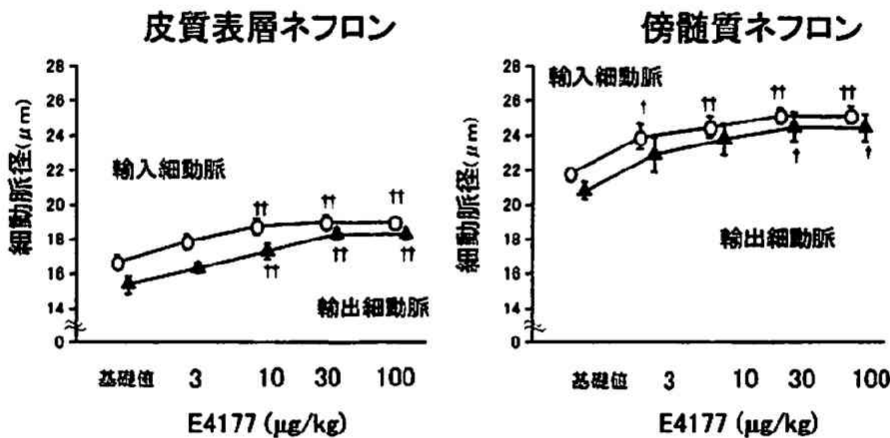
2. アンジオテンシン II 受容体拮抗薬 (E4177) の腎微循環作用

E4177 は、3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ならびに 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の投与量で平均血圧は、各々 84 ± 1 から 76 ± 2 mmHg ($p < 0.05$, $n = 12$) および 72 ± 2 mmHg ($p < 0.01$, $n = 12$) へと下降したが、30 ならびに 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ではさらなる低下は認めなかった。同様に、腎血漿流量の変化も、3 ならびに 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の投与量でおおの 136 ± 3 ml/分から 156 ± 3 ml/分 ($p < 0.05$, $n = 12$) および 159 ± 6 ml/分 ($p < 0.01$, $n = 12$) に増加し、以後 30 ならびに 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ で増加が持続した。

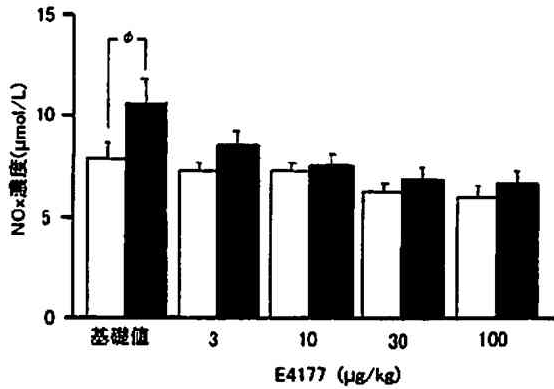
腎皮質表層部の腎細動脈は、10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の E4177 の投与により、輸入細動脈は 16.3 ± 0.4 から 18.3 ± 0.4 μm ($p < 0.05$, $n = 7$) に、輸出細動脈も 15.4 ± 0.5 から 17.3 ± 0.4 μm ($p < 0.05$, $n = 7$) と拡張し、100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ では各々 18.6 ± 0.2 μm ($p < 0.01$, $n = 7$) ならびに 18.3 ± 0.3 μm ($p < 0.01$, $n = 7$) まで拡張した (第7図)。傍髄



第6図 アンジオテンシンII収縮における腎内一酸化窒素の役割. コントロール (○) にくらべ、L-NAMEの前投与 (▲) により表層部 (上段) はアンジオテンシンIIの1 ng/kg/minで、傍髄質部 (下段) は輸入細動脈が1から10 ng/kg/minで、輸出細動脈が、1, 3 ng/kg/minで収縮は増強した. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ vs. L-NAMEなし (Matsuda H et al: Hypertens Res ; 25 (6): 901-910, 2002のFig 4を許可をえて転載)



第7図 E4177投与による皮質部、髄質部の輸入、輸出細動脈の拡張反応. 表層部 (左図) は、輸入一輸出細動脈ともに10 µg/kgより拡張し、傍髄質部 (右図) は、ともに3 µg/kgより拡張した. † $p < 0.05$; †† $p < 0.01$ vs. 基準値. (Matsuda H et al: J Am Soc Nephrol. 10 (11): 2272-2282, 1999のFig 4を、許可をえて転載)

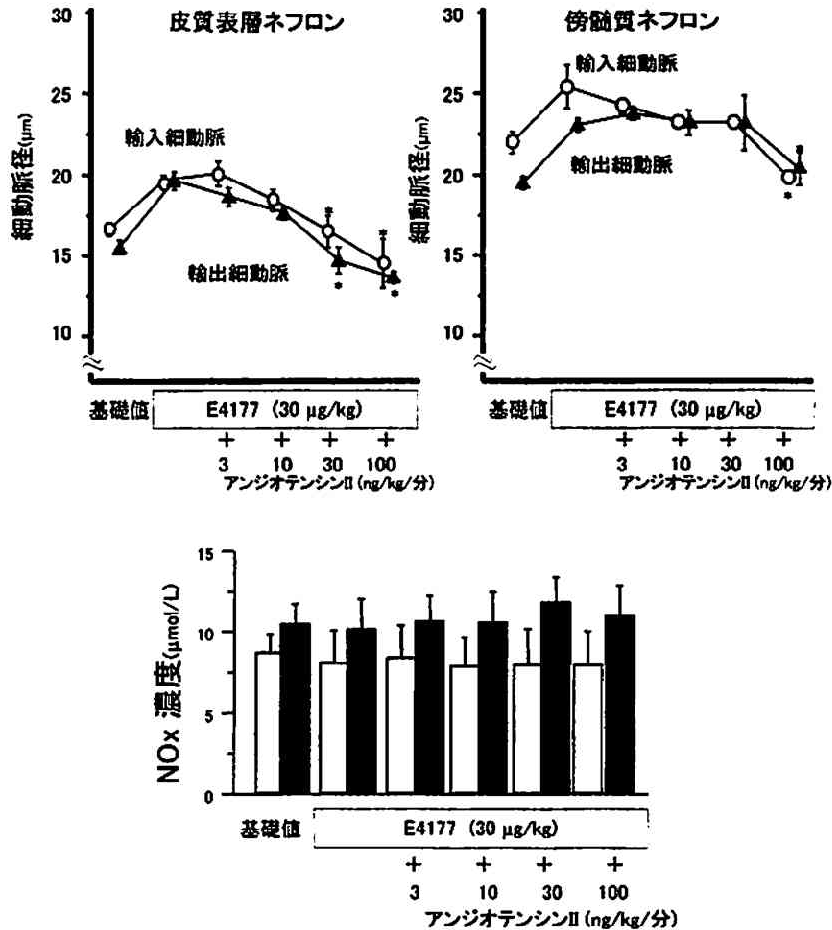


第8図 E4177 投与による皮質部、髄質部における一酸化窒素の反応。皮質部 (□)、髄質部 (■) とともに、一酸化窒素代謝物の増加はみられなかった。* $p < 0.05$ 皮質部 vs. 髄質部 (Matsuda H et al: J Am Soc Nephrol. 10 (11): 2272-2282, 1999 の Fig 9 を、許可をえて転載)

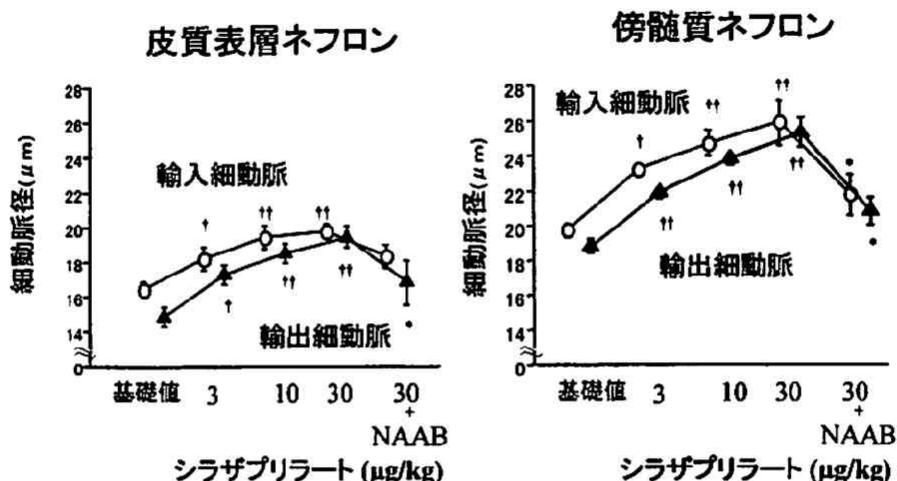
質部においても、3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ より輸入細動脈が 21.8 ± 0.3 から $23.9 \pm 0.7 \mu\text{m}$ ($p < 0.05$, $n = 7$) に、輸出細動脈も 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ より 20.7 ± 0.5 から $24.4 \pm 0.8 \mu\text{m}$ ($p < 0.05$, $n = 7$) に拡張した。30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上の投与ではさらなる拡張は認めなかった。

腎皮質部の NOx 濃度は、E4177 投与により影響を受けなかった (第8図)、髄質部 NOx 濃度は、E4177 により減少傾向を認めたが、有意でなかった。

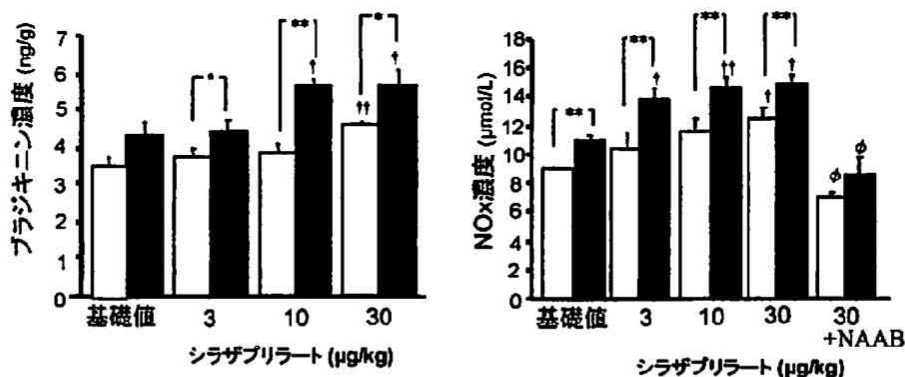
さらに、1型アンジオテンシン II 受容体遮断薬である E4177 投与後、アンジオテンシン II による細動脈の収縮反応の抑制の程度ならびに、腎微小透析法による腎実質の NO 産生を検討した。E4177 (30 $\mu\text{g}/\text{kg}$) の投与により表層部と傍髄質部ともに両細動脈を拡張させた。この条件下でアンジオテンシン II の投与は、表層部で



第9図 E4177 によるタイプ1レセプターブロックにおける外因性アンジオテンシン II の反応。皮質表層の両細動脈 (上段左) はアンジオテンシン II の 30 $\text{ng}/\text{kg}/\text{min}$ で輸入細動脈 (○)、輸出細動脈 (▲) が収縮し、傍髄質部 (上段右) では 100 $\text{ng}/\text{kg}/\text{min}$ でともに収縮した。また NOx 濃度 (下段) では、皮質部 (□)、髄質部 (■) とともに増加はみられなかった。* $p < 0.05$ vs. 基準値。



第10図 シラザプリラートによる表層部、傍髄質部における輸入細動脈と輸出細動脈の反応。シラザプリラートは輸入(○)、輸出細動脈(●)の両細動脈を表層、傍髄質部において拡張させた。その拡張反応はNAABで減弱した。†p<0.05; ††p<0.01 vs. 基準値。*p<0.05 vs. シラザプリラート30 μg/kg。(Matsuda H et al: J Am Soc Nephrol. 10 (11): 2272-2282, 1999のFig 4を、許可をえて転載)



第11図 シラザプリラートによる組織キニン濃度と一酸化窒素の変化。組織キニン(左図)は、シラザプリラート投与にともない10 μg/kgで髄質部(■)に、30 μg/kgで皮質部(□)に増加を認めた。また一酸化窒素代謝物(右図)は、3 μg/kgより髄質部(■)で30 μg/kgで皮質部(□)は増加した。†p<0.05; ††p<0.01 vs. 基準値。*p<0.05 皮質部 vs. 髄質部。φp<0.05 シラザプリラート vs. シラザプリラート+NAAB (Matsuda H et al: J Am Soc Nephrol. 10 (11): 2272-2282, 1999のFig 8を、許可をえて転載)

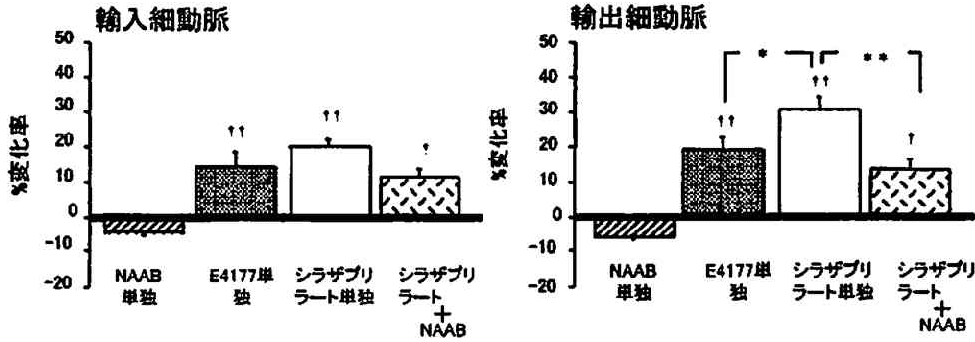
は、30 ng/kg/分で輸入細動脈が19.7±0.5から16.5±1.0 μm (p<0.05, n=7)に、輸出細動脈は19.5±0.6から14.4±0.8 μm (p<0.05, n=7)へと収縮した(第9図, 上段)。また、傍髄質部では、細動脈の収縮に100 ng/kg/分の投与量を要し、輸入細動脈、25.3±1.4から19.7±0.3 μm, (p<0.05, n=7)に、輸出細動脈、22.3±0.6から20.7±1.1 μm (p<0.005, n=7)となっ

た。このときの各層におけるNOx濃度は、表層部および、髄質部ともに変化はみられなかった(第9図, 下段)。

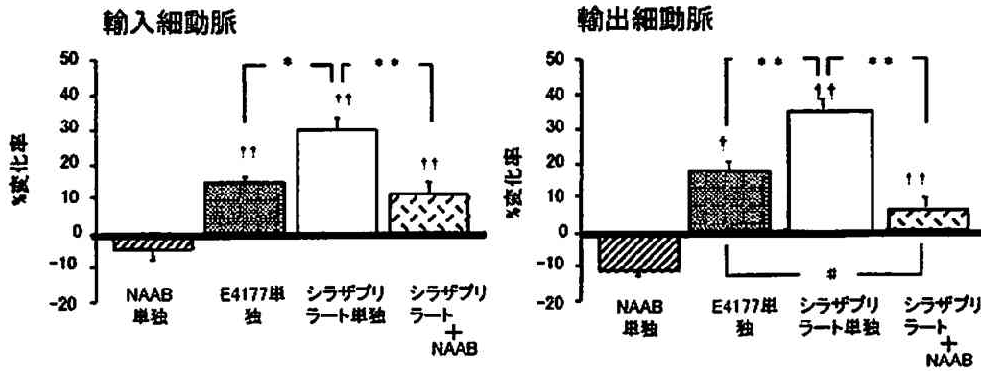
3. ACE阻害薬の腎微小循環作用

シラザプリラートは、10 μg/kgの投与量により平均血圧を85±1 mmHgから69±4 mmHg (p<0.01, n=11)へと低下させた。腎血漿流量は、3 μg/kgの投

皮質表層ネフロン



傍髄質ネフロン



第 12 図 単独 E4177 とシラザプリラート投与結果からの細動脈の拡張率の比較。NAAB 単独は拡張率の変化は認めなかった。表層部の輸入細動脈 (上図左) では、E4177 とシラザプリラートの拡張率は同等であった。表層部輸出細動脈 (上図右)、および傍髄質部の両細動脈 (下段) の拡張率は、シラザプリラートのほうが有意に高く NAAB で減弱した。† $p < 0.05$; †† $p < 0.01$ vs. 基礎値。* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ シラザプリラート vs. E4177 あるいは NAAB 追加後。# $p < 0.05$ E4177 vs. シラザプリラート+NAAB。(Matsuda H et al: J Am Soc Nephrol. 10 (11): 2272-2282, 1999 の Fig 5 を、許可をえて転載)

与量により 140 ± 3 から 156 ± 5 ml/分 ($p < 0.05$, $n = 11$) に増加し、以後濃度依存性に増加し、 $30 \mu\text{g/kg}$ では 171 ± 2 ml/分 ($p < 0.01$, $n = 11$) に達した。

シラザプリラートによる輸入、輸出細動脈反応の観察では、皮質表層糸球体は $3 \mu\text{g/kg}$ より、輸入細動脈は $16.5 \pm 0.3 \mu\text{m}$ から $18.2 \pm 0.6 \mu\text{m}$ ($p < 0.05$, $n = 7$)、輸出細動脈 $15.1 \pm 0.5 \mu\text{m}$ から $17.6 \pm 0.6 \mu\text{m}$ ($p < 0.05$, $n = 7$) と拡張した (第 10 図)。さらに $30 \mu\text{g/kg}$ では、輸出細動脈の拡張率は $30 \pm 3\%$ ($19.7 \pm 0.6 \mu\text{m}$, $p < 0.05$, $n = 7$) に達し、輸入細動脈 $20 \pm 2\%$ ($19.8 \pm 0.3 \mu\text{m}$, $p < 0.05$, $n = 7$) より顕著であった ($p < 0.05$)。一方、傍髄質部の糸球体は、 $3 \mu\text{g/kg}$ のシラザプリラートにより、輸入細動脈は $19.7 \pm 0.8 \mu\text{m}$ から $23.2 \pm 0.3 \mu\text{m}$ ($p < 0.05$, $n = 7$) に、輸出細動脈も $18.2 \pm 0.4 \mu\text{m}$

から $21.3 \pm 0.3 \mu\text{m}$ ($p < 0.05$, $n = 7$) の拡張を示し、 $30 \mu\text{g/kg}$ では輸入は $25.8 \pm 1.3 \mu\text{m}$ ($p < 0.05$, $n = 7$) に、輸出細動脈は $24.7 \pm 0.8 \mu\text{m}$ ($p < 0.05$, $n = 7$) に拡張した。これらの輸入・輸出細動脈の拡張反応は NAAB の追加投与により減弱した。

腎組織ブラジキニン濃度は、髄質部は $4.3 \pm 0.4 \text{ ng/g}$ ($n = 13$) で、皮質部は $3.6 \pm 0.3 \text{ ng/g}$ ($n = 11$) であり差異を認めなかった (第 11 図、左)。一方、シラザプリラートの投与により、髄質部では $10 \mu\text{g/kg}$ の投与量で $5.7 \pm 0.2 \text{ ng/g}$ ($p < 0.05$, $n = 13$) に上昇したが、皮質部では $30 \mu\text{g/kg}$ になり $4.6 \pm 0.1 \text{ ng/g}$ ($p < 0.05$, $n = 11$) に上昇した。いずれの腎ブラジキニン含有量もシラザプリラート投与により髄質部が皮質部を上回っていた。

第2表 アンジオテンシン受容体拮抗薬投与による全身ならびに腎血行動態の変化

(n=7)	平均血圧 (mmHg)	心拍数 (beats/min)	腎血漿流量 (ml/min)	糸球体濾過量 (ml/min)
基礎値	84±1	115±5	133±4	27±1
E4177	71±2 [†]	104±6	159±2	34±2
E4177+CLZ	70±3 [†]	105±6	175±5 [*]	32±3
E4177+CLZ+NAAB	73±2 [†]	100±2	153±4 [†]	31±2

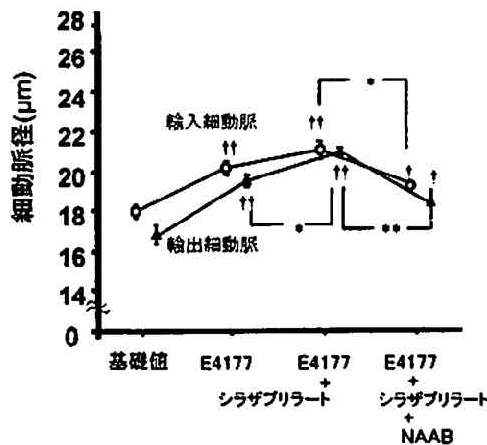
NAAB, (N_ε-adamantaneacetyl-D-Arg-[Hyp¹, Thi⁵-D-Phe⁷]-bradykinin ; CLZ, cilazaprilat. [†], p<0.05 vs. 基礎値 ; [‡], p<0.01 vs. 基礎値 ; ^{*}, p<0.05 vs. E4177

シラザプリラートによる腎髄質部組織の NO_x 濃度は、3 μg/kg より有意に上昇し、以後用量依存性の増加を認め 30 μg/kg では、15.1 ± 0.7 nmol/L (p<0.01, n=14) に達した (第 11 図, 右)。一方、皮質部では 30 μg/kg になって 12.5 ± 0.9 nmol/L (p<0.05, n=12) と有意に上昇した。これらの変化は、NAAB (0.5 nmol/kg/分) の追加投与により消失した。

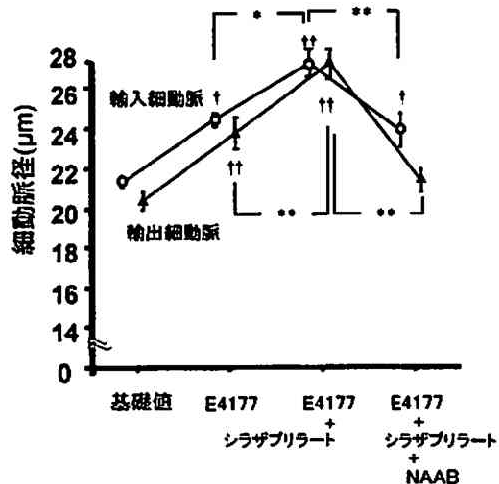
そこで、各 E4177, シラザプリラート単剤使用による拡張反応を拡張率から再評価した (第 12 図)。NAAB (0.5 nmol/kg/分) の単独投与では、平均血圧ならびに腎血漿流量は不変であり、腎微小循環においても、皮質表層部、傍髄質部の輸入・輸出細動脈径の有意

な変化は認めなかった。皮質表層部ではシラザプリラート (30 μg/kg) による拡張率は、輸入細動脈では E4177 (30 μg/kg) と同等であったが (シラザプリラート, 20 ± 2% ; E4177, 15 ± 4% ; p>0.2), 輸出細動脈ではシラザプリラートの作用が上回っていた (30 ± 3% vs. 19 ± 3%, p<0.05)。傍髄質部においてもシラザプリラートによる拡張率は E4177 に比し、輸入細動脈 (31 ± 4% vs. 16 ± 1%, p<0.05), 輸出細動脈 (35 ± 3% vs. 18 ± 3%, p<0.005) とともに大であった。これらの拡張率の増強を認めた細動脈において、シラザプリラート存在下における NAAB の投与は、拡張反応の減弱をきたし、E4177 による拡張の程度と同程度にまで低下した

皮質表層ネフロン



傍髄質ネフロン



第 13 図 E4177 の前投与下でのシラザプリラートの拡張反応について、E4177 の 30 μg/kg 前投与下で、シラザプリラート 30 μg/kg は表層部の輸出細動脈 (左図▲)、傍髄質部の輸入 (右図○)、輸出細動脈 (右図▲) をさらに拡張をさせた。その拡張は、NAAB の使用により消失した。† p<0.05 ; †† p<0.01 vs. 基準値。* p<0.05 ; ** p<0.01 E4177+シラザプリラート vs. E4177 単独, あるいは NAAB 追加後。(Matsuda H et al : J Am Soc Nephrol. 10 (11) : 2272-2282, 1999 の Fig 6 を、許可をえて改変後転載)

(皮質表層輸出細動脈, $13 \pm 3\%$; 傍髄質輸入細動脈, $12 \pm 4\%$; 傍髄質輸出細動脈, 73%).

4. ACE 阻害薬のキニン増強作用

拡張率の差より E4177 ($30 \mu\text{g}/\text{kg}$) 存在下におけるシラザプリラート ($30 \mu\text{g}/\text{kg}$) の全身ならびに腎循環作用を検討した。シラザプリラートの追加投与では、さらなる降圧を認めなかったが、腎血漿流量は有意の増加を示した ($p < 0.05$, $n = 7$; 第 2 表)。その際の腎微小循環の反応は、皮質表層部の輸入細動脈 (18.6 ± 0.3 から $19.6 \pm 0.5 \mu\text{m}$ ($n = 8$)) では有意な拡張を示さなかったが、皮質表層輸出細動脈 (18.3 ± 0.3 から $19.8 \pm 0.2 \mu\text{m}$, $n = 8$, $p < 0.05$), 傍髄質部輸入細動脈 (25.1 ± 0.4 から $28.2 \pm 0.8 \mu\text{m}$, $p < 0.05$, $n = 8$), 傍髄質輸出細動脈 (24.4 ± 0.7 から $28.0 \pm 0.7 \mu\text{m}$, $p < 0.001$, $n = 8$) ではさらなる拡張を認めた (第 13 図)。これらの拡張は、NAAB の投与により、E4177 投与時のレベルまで減弱した。

考 察

本研究は、ニードル型 CCD カメラ探子を生体腎に穿刺し直接腎細動脈の観察を可能とした手法を用い、アンジオテンシン II の腎微小循環作用ならびに腎内 NO との関連を検討した。著者の研究グループは、すでにこの実験システムを用いて腎皮質表層部細動脈のアンジオテンシン II に対する反応を直接可視しうることを報告し²⁶⁾、さらに腎微小循環調節に必須の構成成分である尿細管-糸球体フィードバック機構が保持されていることを示した²⁶⁾。したがって、細動脈の単離などの人為的な操作を加えることなく、また細動脈周囲の環境を保持したままの状態で、生体内における細動脈の反応を観察可能である。さらに、本実験システムは、従来の観察手法では困難であった腎皮質表層部ならびに傍髄質部の糸球体・細動脈の反応性の評価を、同一実験条件下で観察が可能である点においてもきわめて有用であると考えられた^{25, 27)}。

この実験システムを活用し、本研究では基礎状態における腎内 NO の腎微小循環への寄与を検討し、つぎに外因性アンジオテンシン II の腎細動脈に対する反応を評価した。その結果、腎内 NO は、基礎状態で腎細動脈の血管緊張を調節しており、その関与は、輸入・輸出細動脈間ではほぼ同等であった (第 3 図)。以前の単離腎ならびに単離微小細動脈を用いた研究での報告では、NO は輸入・輸出細動脈に対してほぼ同等の寄与²⁸⁾、あるいは輸入細動脈優位の関与 (11) が示唆されていた

が、これらの結果の差異は、実験条件に依存する可能性が考えられた。さらに、傍髄質・皮質表層部ネフロン間の比較では、有意ではないものの NO 合成阻害に対し傍髄質部細動脈が抵抗性である傾向が認められた。この結果は、髄質部の腎 NO 濃度が皮質に比し高値であることと関連すると推測された。

アンジオテンシン II に対する反応では、輸入・輸出細動脈はともに収縮反応を示し (第 4 図)、その反応は全身血圧に影響を与えない投与量においても認められた。さらに、その作用は腎臓内で産生された NO により修飾され、とくに傍髄質部で大きいことが明らかとなった (第 6 図)。すなわち、L-NAME による NO 合成阻害によりアンジオテンシン II による収縮がすべての細動脈において増強することより、腎臓内で産生された NO が腎血流を温存させる役割をはたすが、その作用は傍髄質部細動脈で大であった。さらに、腎微小透析法を用いた腎各層における NO 産生量の差異 (第 5 図) は、Zou ら¹⁹⁾の成績と一致し、皮質に比し髄質部で高値であったが、腎皮質内において髄質により近い傍髄質部の細動脈が、皮質表層部に比しより強く NO の影響を受ける結果、腎各層による細動脈反応の不均一性をもたらすことが推察された。この結果は、傍髄質部の輸出細動脈が髄質血流を供給するとする腎微小循環の特性を考慮すると、脱水などの病態時に認められる皮質から髄質への腎血流の再分布^{31, 32)}の機序を一部アンジオテンシン II が担っているものと考えられた。

一方、傍髄質部の輸入細動脈は、輸出細動脈に比しアンジオテンシン II による収縮反応が減弱しており、その現象は L-NAME の存在下においても認められた (第 4, 6 図)。すなわち、傍髄質部の輸入・輸出細動脈の間で認められた反応性の差異は、NO に起因するものではないことが示された。この点に関して、著者ら²⁷⁾は、インドメサシンによるプロスタグランジン合成抑制下で、傍髄質部のアンジオテンシン II による輸入・輸出細動脈作用の差異が消失することを見出しており、この部位における細動脈反応性の差異に血管拡張性のプロスタグランジンが関与することを示した。したがって、アンジオテンシン II による腎微小循環に及ぼす影響は、アンジオテンシン II 自体による収縮作用と、アンジオテンシン II により活性化された各ネフロンの存在部位の周囲の液性因子環境との相互作用により決定され、とくに後者の影響が傍髄質ネフロンの血管反応性に強く影響を与えることが示唆された。

本研究は、さらに内因性のアンジオテンシン II の腎行動態に与える役割を検討した。腎臓では、組織アンジ

オテンシン II が血液中よりも高濃度で存在しており³⁴⁾、組織レニン-アンジオテンシン系が腎局所で何らかの役割を担っていることが推察されている。そこで、アンジオテンシン II 受容体拮抗薬である E4177 を投与したところ、傍髄質、皮質表層部ともに輸入・輸出細動脈がほぼ同程度に拡張することが示された(第7, 12図)。その際、アンジオテンシン II 受容体遮断は、腎 NO 産生に対して有意な影響を与えなかった(第8図)。すなわち、外因性のアンジオテンシン II の収縮反応では NO の産生が皮質表層部、髄質部に層差を示し、それと平行して各々の層における細動脈の反応差を生じたのに対し、内因性アンジオテンシン II 作用の拮抗では、層差は生じないという結果が得られた。これらの結果より、本実験の基礎状態では、内因性アンジオテンシン II は NO 産生刺激とならないことを示唆するものと考えられた。この点に関して、近年アンジオテンシン II 受容体拮抗薬が NO 産生をもたらすことが指摘されており^{33, 34)}、その機序としてアンジオテンシン I 型受容体の遮断により、遊離したアンジオテンシン II が 2 型受容体の刺激となり、NO 産生をもたらすと推測されている^{35, 36)}。しかしながら、E4177 の 1 型/2 型受容体拮抗作用の選択性は高く³⁵⁾、E4177 存在下でのアンジオテンシン II の投与によっても NO 産生が起こらなかったことは(第9図)、本研究システムにおいて 2 型受容体を介する NO 産生機序の活性はきわめて弱いものと考えられた。単離輸入細動脈における検討でも、アンジオテンシン II 作用に NO が関連するもの¹¹⁾、この機序にアンジオテンシン II の 2 型受容体は関与しないことが報告されており³⁶⁾、本研究結果と矛盾しないものと思われた。

内因性アンジオテンシン II の作用を遮断する手法として、従来より ACE 阻害薬が用いられている。ACE 阻害薬は、アンジオテンシン I から II への変換を阻害し、その結果アンジオテンシン II 産生を抑制するが、ACE の分子構造上同時にキナーゼ活性を有するため³⁰⁾、ACE 阻害薬によりブラジキニンの蓄積が生じ、それに伴い NO 産生が刺激されることが明らかにされている^{37, 38)}。腎臓における検討でも、リシノプリルによる腎血漿流量の増加が NO 合成阻害薬により抑制されることより、ACE 阻害薬の腎血流量増加作用に NO が関与することが示唆されている³⁷⁾。しかしながら、ACE 阻害薬により産生されたブラジキニンならびに NO が、腎微小循環、とくに皮質表層部・傍髄質部のおおの部位において、細動脈に与える影響は検討されていない。そこで、本研究は、腎各層のネフロンにおける ACE 阻害薬の作用にブラジキニンならびに NO が関与するか

否かを、生体内 CCD カメラを用いて、アンジオテンシン II 受容体拮抗薬との比較を行った。その結果、ACE 阻害薬もアンジオテンシン II 受容体拮抗薬と同様に、各層の輸入・輸出細動脈を拡張させたが(第10図)、その程度は、傍髄質輸入・輸出細動脈ならびに皮質輸出細動脈で有意にアンジオテンシン II 受容体拮抗薬による拡張作用を上回っていた(第12図)。さらに、アンジオテンシン II 受容体拮抗薬(E4177)の存在下でシラザプリラートを投与したところ、全身血圧の変動は認めずに(第2表)、上記の細動脈で追加拡張が観察された(第13図)。これらの増強したあるいは追加拡張反応は、ブラジキニン受容体(B2)拮抗薬である NAAB により抑制された。したがって、基礎状態の腎臓に対し NAAB は細動脈径に影響を与えないことを考慮すると(第12図)、ACE 阻害薬によって増加したブラジキニンが腎細動脈拡張作用に寄与すると考えられた。実際、腎組織ブラジキニン濃度は、シラザプリラートの投与量依存性に増加し、それとともに腎 NO 濃度も上昇を示した(第11図)。さらに、ACE 阻害薬により増加した NO がブラジキニン受容体(B2)拮抗薬により減少したことをあわせると、ACE 阻害薬はアンジオテンシン II 産生抑制作用のみならず、ブラジキニンによる NO 産生を促し、細動脈拡張作用をもたらすものと考えられた。これらの結果は、ACE 阻害薬により増加したブラジキニンが腎髄質乳頭部血流の増加を促すとする報告^{38, 39)}に矛盾しない所見であった。

本研究で注目すべき点は ACE 阻害薬によるブラジキニンならびに NO の細動脈拡張作用の様式が、傍髄質部と皮質表層部とで異なった反応を示したことである。すなわち、ACE 阻害薬投与に伴うブラジキニンによる拡張が、傍髄質部では輸入・輸出細動脈ともに見られるのに対し、皮質表層部では輸出細動脈にのみ観察された(第12図)。これに関して、Edwards ら⁴⁰⁾は単離輸入・輸出細動脈を用いて、キニンによる細動脈拡張作用は輸出細動脈にのみ認められることを報告し、さらに Kon ら⁴¹⁾も、腎微小穿刺法により ACE 阻害薬による亢進したキニン活性が皮質表層部輸出細動脈を選択的に拡張させることを示した。これらの一見矛盾する結果の原因は明らかでないが、腎各層におけるキニン濃度と関連する可能性が考えられた。すなわち、ブラジキニンは輸出細動脈拡張を主体とするが、高濃度のキニン下では輸入細動脈も拡張しうるものと推察された。一方、Thomas ら⁴²⁾は腎微小穿刺法を用いて、ブラジキニンの腎動脈投与が輸入細動脈優位であるものの両細動脈の拡張が見られると報告しているが、この現象は深層部ネフロンに限

定される可能性を示唆した。したがって、ACE 阻害薬に対する反応性の差異は、輸入・輸出細動脈固有の反応性の差異とともに、傍髄質・皮質表層部といった細動脈周囲の環境因子によっても決定される可能性が示唆された。

腎臓内におけるアンジオテンシン II 産生系は、ACE を介する経路のみならず、キマーゼを代表とする他の経路も存在することが示唆されている⁴³⁾。キマーゼは ACE と同様にアンジオテンシン I から II への変換に関与し、心不全などの病態でキマーゼ活性が亢進すると報告されている⁴⁴⁾。しかしながら、Murakami⁴⁵⁾は、イヌの腎臓において、ACE を介さない非 ACE の経路でのみアンジオテンシン II に変換されるアンジオテンシン I 基質である[Pro¹¹, D-Ala¹²]-アンジオテンシン I を用い、非 ACE 経路を介するアンジオテンシン II 産生は ACE 経路の約 10 分の 1 程度の関与であると結論している。本研究結果も、ACE 阻害薬の腎血行動態作用が、アンジオテンシン II 受容体拮抗薬のそれよりも大であったことより、非 ACE 経路によるアンジオテンシン II 産生系が亢進しているとの結果は得られなかった。しかしながら、IgA 腎症⁴⁶⁾や虚血腎⁴⁷⁾などで、その役割が大きいとの報告があり、腎障害を伴う場合のアンジオテンシン II 受容体拮抗薬と ACE 阻害薬の有用性の優劣に関しては明らかでない。この点に関して、著者ら⁴⁸⁾は、慢性腎障害患者におけるアンジオテンシン II 受容体拮抗薬ならびに ACE 阻害薬の尿蛋白減少効果と尿中 NO_x 排泄量におよぼす影響を検討した。その結果、投与後 6 ヶ月までは同等の降圧効果にも関わらず、ACE 阻害薬群の尿蛋白減少効果が有意に大であり、それと平行して尿中 NO_x の増加を認めた。したがって、すくなくとも ACE 阻害薬投与の早期には、キニン作用に伴う NO が誘導され蛋白尿減少作用と関連し、キマーゼなどの非 ACE 経路の関与は少ないと推察された。

最後に、本研究で用いた生体内ニードル型 CCD カメラによる微小循環研究における有用性について言及したい。本実験システムは、従来の研究システムでは行うことが困難であった生体内における腎深部の傍髄質部ネフロンと表層部ネフロンの評価を、同一条件下でしかも比較的侵襲的に行うことを可能にした。一般に、臓器循環は、大動脈から分岐した血管が臓器入口部から徐々に血管径を狭小化しながら細動脈、毛細血管となり、再び体循環へと帰還するが、とくに実質臓器である腎臓や心臓では表層部と深層部とで微小循環の様相が異なることが示唆されている^{25, 27, 29, 49)}。すなわち、心臓では心拍に伴う心循環の反応が、心外膜直下と心内膜下とで異なることが指摘されていたが²⁹⁾、近年、肥大大心で両層にお

ける細動脈が異なる反応を示すことが、本研究で用いられた生体内 CCD カメラにより明らかにされた⁴⁹⁾。同様に、腎において、傍髄質部と皮質表層部ネフロンとで機能ならびに細動脈の構造が異なり、また当該部における灌流圧も異なることより、微小循環における多様性が推定されていた。したがって、本研究システムの特徴を生かして、腎内における微小循環の多様性とその部位における機能解析の研究が発展するものと考えられる。

総 括

腎臓内局所微小循環を直接評価が可能であるニードル型生体内 CCD カメラを用いて、腎細動脈血管緊張に与えるアンジオテンシン II ならびに腎内 NO の関連を検討し、以下の結果を得た。

1. ニードル型生体内 CCD カメラにより、細動脈ならびに血管の存在する周囲の環境を損ねることなく、腎皮質表層部ならびに傍髄質部ネフロンの観察が可能であった。
2. 腎内 NO は基礎状態における腎細動脈血管緊張の調節を行ない、さらに外因性アンジオテンシン II による輸入・輸出細動脈収縮を傍髄質部ネフロン優位に抑制した。
3. アンジオテンシン受容体拮抗薬を用いた内因性アンジオテンシン作用の抑制により、皮質表層部ならびに傍髄質部の輸入・輸出細動脈はともに同等の拡張反応を示した。この拡張反応に、腎内 NO 関与は認めなかった。
4. ACE 阻害薬の投与により、腎内ブラジキニンならびに NO 活性が亢進し、この反応はとくに髄質で大であった。
5. ACE 阻害薬を用いたアンジオテンシン II 作用の抑制はアンジオテンシン受容体拮抗薬に比し、傍髄質部輸入・輸出細動脈ではともに大であった。一方、皮質表層部輸出細動脈では過大反応を示したが、皮質表層部輸入細動脈ではアンジオテンシン受容体拮抗薬による反応と同等であった。これらの過大反応に腎内ブラジキニンならびに NO による拡張作用が関与していた。

以上の結果より、腎微小循環は、従来から指摘されていた輸入・輸出細動脈自体の反応性の差異のみならず、細動脈の存在する層の液性因子の環境によっても影響を受け、これらの因子がアンジオテンシン II やアンジオテンシン変換酵素阻害薬といったホルモンや薬剤の作用を修飾するものと考えられた。この層による反応性の多様性は、皮質表層部や傍髄質部ネフロンの機能に影響を与える可能性が示唆された。

謝 辞

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、本研究に際して直接御指導いただきました。慶應義塾大学医学部内科学教室林晃一講師に心より感謝します。さらに、本研究に多大の御協力と御助言をいただきました研究室員各位、本実験システムの開発・改良にあたり岡山大学大学院医歯学総合研究科・医学部システム循環生理学講座梶谷文彦教授・名古屋大学大学院泌尿器科教室山本徳則講師に感謝します。なお、本論文の要旨の一部は、第40回日本腎臓学会総会(新潟, 1997年)、第41回日本腎臓学会総会(東京, 1998年)、および第30回アメリカ腎臓学会(1998年, フィラデルフィア)において発表した。

文 献

- 1) Peart WS : Renin-angiotensin system. *N Engl J Med* 292 : 302-306, 1975
- 2) Hollenberg NK, Swartz SL, Passan DR, Williams GH : Increased glomerular filtration rate after converting-enzyme inhibition in essential hypertension. *N Engl J Med* 301 : 9-12, 1979
- 3) Siragy HM, Howell NL, Ragsdale NV, Carey RM : Renal interstitial fluid angiotensin. Modulation by anesthesia, epinephrine, sodium depletion, and renin inhibition. *Hypertension* 25 : 1021-1024, 1995
- 4) Navar LG, Imig JD, Zou L, Wang CT : Intrarenal production of angiotensin II. *Semin Nephrol* 17 : 412-422, 1997
- 5) Kimura K, Inokuchi S, Sugaya T, Suzuki N, Yoneda H, Shirato I, Mise N, Oba S, Miyashita K, Tojo A, Hirata Y, Goto A, Sakai T, Murakami K, Omata M : Location and action of angiotensin II type 1 receptor in the renal microcirculation. *Kidney Int Suppl* 63 : S201-S204, 1997
- 6) Zhuo J, Dean R, Maric C, Aldred PG, Harris P, Alcorn D, Mendelsohn FA : Localization and interactions of vasoactive peptide receptors in renomedullary interstitial cells of the kidney. *Kidney Int Suppl* 67 : S22-S28, 1998
- 7) Hayashi K, Loutzenhiser R, Epstein M, Suzuki H, Saruta T : Multiple factors contribute to acetylcholine-induced renal afferent arteriolar vasodilation during myogenic and norepinephrine- and KCl-induced vasoconstriction. Studies in the isolated perfused hydronephrotic kidney. *Circ Res* 75 : 821-828, 1994
- 8) Siragy HM, Carey RM : The subtype 2 (AT₂) angiotensin receptor mediates renal production of nitric oxide in conscious rats. *J Clin Invest* 100 : 264-269, 1997
- 9) Ikenaga H, Fallet RW, Carmines PK : Basal nitric oxide production curtails arteriolar vasoconstrictor responses to ANG II in rat kidney. *Am J Physiol* 271 : F365-F373, 1996
- 10) Carmines PK, Navar LG : Disparate effects of Ca channel blockade on afferent and efferent arteriolar responses to ANG II. *Am J Physiol* 256 : F1015-F1020, 1989
- 11) Ito S, Arima S, Ren YL, Juncos LA, Carretero OA : Endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide modulates angiotensin II action in the isolated microperfused rabbit afferent but not efferent arteriole. *J Clin Invest* 91 : 2012-2019, 1993
- 12) Takenaka T, Suzuki H, Fujiwara K, Kanno Y, Ohno Y, Hayashi K, Nagahama T, Saruta T : Cellular mechanisms mediating rat renal microvascular constriction by angiotensin II. *J Clin Invest* 100 : 2107-2114, 1997
- 13) Nagahama T, Hayashi K, Ozawa Y, Takenaka T, Saruta T : Role of protein kinase C in angiotensin II-induced constriction of renal microvasculature. *Kidney Int* 57 : 215-223, 2000
- 14) Lewis EJ, Hunsicker LG, Bain RP, Rohde RD : The effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition on diabetic nephropathy. The Collaborative Study Group. *N Engl J Med* 329 : 1456-1462, 1993
- 15) Mann JF, Gerstein HC, Pogue J, Bosch J, Yusuf S : Renal insufficiency as a predictor of cardiovascular outcomes and the impact of ramipril : the HOPE randomized trial. *Ann Intern Med* 134 : 629-636, 2001
- 16) Brenner BM, Cooper ME, De Zeeuw D, Keane WF, Mitch WE, Parving HH, Remuzzi G, Snapinn SM, Zhang Z, Shahinfar S : Effects of losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy. *N Engl J Med* 345 : 861-869, 2001
- 17) Lewis EJ, Hunsicker LG, Clarke WR, Berl T, Pohl MA, Lewis JB, Ritz E, Atkins RC, Rohde R, Raz I, Collaborative Study Group : Renoprotective effect of angiotensin-receptor antagonist irbesartan in patients with nephropathy due to type 2 diabetes. *N Engl J Med* 345 : 851-860, 2001
- 18) Ulfendahl HR, Wolgast M : Renal circulation and lymphatics (Chapter 30) . In the *Kidney : Physiology and Pathophysiology*, eds by Seldin DW & Giebisch G, Raven Press Ltd, New York, 1992, pp 1017-pp 1047
- 19) Zou AP, Cowley AW, Jr. : Nitric oxide in renal cortex and medulla. An *in vivo* microdialysis study. *Hypertension* 29 : 194-198, 1997
- 20) Zou AP, Wu F, Cowley AW, Jr. : Protective effect of angiotensin II-induced increase in nitric oxide in the renal medullary circulation. *Hypertension* 31 : 271-276, 1997

- 21) Madrid MI, Garcia-Salom M, Tornel J, De Gasparo M, Fenoy FJ : Interactions between nitric oxide and angiotensin II on renal cortical and papillary blood flow. *Hypertension* 30 : 1175-1182, 1997
- 22) Baylis C, Brenner BM : Modulation by prostaglandin synthesis inhibitors of the action of exogenous angiotensin II on glomerular ultrafiltration in the rat. *Circ Res* 1978 ; 43 : 889-898.
- 23) Casellas D, Carmines PK, Navar LG : Microvascular reactivity of *in vitro* blood perfused juxtamedullary nephrons from rats. *Kidney Int* 28 : 752-729, 1985
- 24) Edwards RM : Segmental effects of norepinephrine and angiotensin II on isolated renal microvessels. *Am J Physiol* 244 : F526-F534, 1983
- 25) 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 : 2272-2282, 1999
- 26) Yamamoto T, Hayashi K, Matsuda H, Kubota E, Tanaka H, Ogasawara Y, Nakamoto H, Suzuki H, Saruta T, Kajiya F : In vivo visualization of angiotensin II- and tubuloglomerular feedback-mediated renal vasoconstriction. *Kidney Int* 60 : 364-369, 2001
- 27) Matsuda H, Hayashi K, Arakawa K, Kubota E, Honda M, Tokuyama H, Suzuki H, Yamamoto T, Kajiya F, Saruta T : Distinct modulation of superficial and juxtamedullary arterioles by prostaglandin *in vivo*. *Hypertens Res* 25 : 901-910, 2002
- 28) Ohta K, Araki N, Shibata M, Hamada J, Komatsumoto S, Shimazu K, Fukuuchi Y : A novel *in vivo* assay system for consecutive measurement of brain nitric oxide production combined with the microdialysis technique. *Neurosci Lett* 176 : 165-168, 1994
- 29) Yada T, Hiramatsu O, Kimura A, Goto M, Ogasawara Y, Tsujioka K, Yamamori S, Ohno K, Hosaka H, Kajiya F : In vivo observation of subendocardial microvessels of the beating porcine heart using a needle-probe videomicroscope with a CCD camera. *Circ Res* 72 : 939-946, 1993
- 30) Jaspard E, Wei L, Alhenc-Gelas F : Differences in the properties and enzymatic specificities of the two active sites of angiotensin I-converting enzyme (kininase II) . Studies with bradykinin and other natural peptides *J Biol Chem* 268 : 9496-503, 1993
- 31) Hope A, Tyssebotn I : The effect of water deprivation on local renal blood flow and filtration in the laboratory rat. *Circ Shock* 11 : 175-186, 1983
- 32) Kundel H L, Schlakman B, Joseph PM, Fishman JE, Summers R : Water content and NMR relaxation time gradients in the rabbit kidney. *Invest Radiol* 21 : 12-17, 1986
- 33) Munoz-Garcia R, Maeso R, Rodrigo E, Navarro J, Ruilope LM, Casal MC, Cachofeiro V, Lahera V : Acute renal excretory actions of losartan in spontaneously hypertensive rats : role of AT2 receptors, prostaglandins, kinins and nitric oxide. *J Hypertens* 13 : 1779-1784, 1995
- 34) Siragy HM, Carey RM : Protective role of the angiotensin AT2 receptor in a renal wrap hypertension model. *Hypertension* 33 : 1237-1242, 1999
- 35) Okunishi H, Song K, Oka Y, Kobayashi T, Kawamoto T, Ishihara H, Mori N, Miyazaki M : In vitro pharmacology of a novel non-peptide angiotensin II-receptor antagonist, E4177. *Jpn J Pharmacol* 62 : 239-244, 1993
- 36) Arima S, Endo Y, Yaoita H, Omata K, Ogawa S, Tsunoda K, Abe M, Takeuchi K, Abe K, Ito S : Possible role of P-450 metabolite of arachidonic acid in vasodilator mechanism of angiotensin II type 2 receptor in the isolated microperfused rabbit afferent arteriole. *J Clin Invest* 100 : 2816-2823, 1997
- 37) Hajj-Ali AF, Zimmerman BG : Nitric oxide participation in renal hemodynamic effect of angiotensin converting enzyme inhibitor lisinopril. *Eur J Pharmacol* 212 : 279-281, 1992
- 38) Mattson DL, Cowley AW, Jr. : Kinin actions on renal papillary blood flow and sodium excretion. *Hypertension* 21 : 961-965, 1993
- 39) Fenoy FJ, Scicli G, Carretero O, Roman RJ : Effect of an angiotensin II and a kinin receptor antagonist on the renal hemodynamic response to captopril. *Hypertension* 17 : 1038-1044, 1991
- 40) Edwards RM : Response of isolated renal arterioles to acetylcholine, dopamine, and bradykinin. *Am J Physiol* 248 : F183-F189, 1985
- 41) Kon V, Fogo A, Ichikawa I : Bradykinin causes selective efferent arteriolar dilation during angiotensin I converting enzyme inhibition. *Kidney Int* 44 : 545-550, 1993
- 42) Thomas CE, Bell PD, Navar LG : Influence of bradykinin and papaverine on renal and glomerular hemodynamics in dogs. *Ren Physiol* 5 : 197-205, 1982
- 43) Urata H, Strobel F, Ganten D : Widespread tissue distribution of human chymase. *J Hypertens Suppl* 12 : S17-S22, 1994
- 44) Su X, Wei CC, Machida N, Bishop SP, Hanks GH, Dillon RA, Oparil S, Dell Italia LJ : Differential expression of angiotensin-converting enzyme and chymase in dogs with chronic mitral regurgitation. *J Mol Cell Cardiol* 31 : 1033-1045, 1999
- 45) Murakami M, Matsuda H, Kubota E, Wakino S, Honda M, Hayashi K, Saruta T : Role of angiotensin II generated by angiotensin converting enzyme-independent pathways in canine kidney. *Kidney Int Suppl* 63 : S132-S135, 1997
- 46) Ehara T, Shigematsu H : Contribution of mast cells to the tubulointerstitial lesions in IgA nephritis.

- Kidney Int 54 : 1675-1683, 1998
- 47) 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 : 34-40, 2002
- 48) Matsuda H, Hayashi K, Saruta T : Distinct time courses of renal protective action of angiotensin receptor antagonists and ACE inhibitors in chronic renal disease. J Hum Hypertens 17 : 271-276, 2003
- 49) Yada T, Goto M, Hiramatsu O, Tachibana H, Toyota E, Nakamoto H, Ogasawara Y, Matsuda H, Arakawa K, Hayashi K, Suzuki H, Kajiya F : In vivo visualization of subendocardial arteriolar response in renovascular hypertensive hearts. Am J Physiol 284 : H1785-H1792, 2003
-