犬アンジオテンシノーゲンの分泌率およびクリアランスに およぼす腎摘出および変換酵素阻害剤の影響

自衛隊中央病院 研究部

豊崎 紀 男

宮内庁

伊 東 貞 三

The Effects of Nephrectomy and Angiotensin Converting Enzyme Inhibitor on Production and Clearance rates of Angiotensinogen in Dogs

Norio TOYOZAKI

Japan Self-Defense Forces Central Hospital, Tokyo, Japan

Teizo ITO

Imperial Household Agency, Tokyo, Japan

The clearance and production rates of plasma angiotensinogen of normal dog, nephrectomized dog and angiotensin converting enzyme inhibitor (ACEI) administered dog were calculated.

Plasma angiotensinogen was measured by adding excessive dog renin to the plasma sample. The clearance rate was 4.4, 4.0 and 3.8 ml/kg/hr and the production rate was 9.6, 21.6 and 7.6 μ g/kg/hr, respectively.

After nephrectomy, the clearance rate of angiotensinogen decreased only 10 percent but the production rate increased more than twice.

These results mean that the kidney does not play an important role in the clearance of angiotensinogen but has some influence on its production. This increase in production rate due to nephrectomy may mean that the kidney has some inhibitory effect on the secretion of angiotensinogen from the liver but this phenomenon is not able to explain by much less hydrolysis of angiotensinogen. By the administration of ACEI, not only the clearance rate but also the production rate of plasma angiotensinogen decreased as compared with control dog, but the balance between them resulted in the decreased plasma angiotensinogen concentration. These results show that the decreased production rate was greater than the decreased clearance rate in ACEI administered dog.

緒 言

血中のアンジオテンシノーゲンは、流血中のアンジオテンシンII量を決定し、血圧調節の重要な因子であることが Edward¹⁾らによって報告されている。また、アンジオテンシノーゲンは、両側腎摘出により血中濃度は数倍から十数倍にも上昇する²⁾³⁾⁴⁾。しかしながら、この現象が腎に内在するレニンが消失するため血中のアンジオテンシノーゲンの消費が減退するものによるのか、肝臓からの分泌亢進によるものなのか、いまだ明かでない。一方、アンジオテンシンI変換酵素阻害剤の投与は、血中のアンジオテンシノーゲン濃度を低下することが知られている⁵⁾⁶⁾。これもまた変換酵素阻害剤により、血漿レニンが上昇することによってもたらされた二次的なものなのか、肝臓からの分泌が低下したことによるものなのか明かでない。今回、我々は、正常犬と、両側腎摘出犬及び、アンジオテンシンI変換酵素阻害剤投与犬に、¹²⁵Iで標識した犬アンジオテンシノーゲンを静注し、血中からの¹²⁵I-アンジオテンシノーゲンの消失速度を2-コンパートメントモデルにて解析することにより肝臓からのアンジオテンシノーゲン分泌量を比較検討した。

材 料 と 方 法

(I) 血漿からのアンジオテンシノーゲンの精製

犬(7~10kg, n=20)にペントバルビタール麻酔下(50mg/kg)で両側腎摘出手術を施行し、24時間経過後、採血用として両側大腿静脈にカニューレを挿入しEDTA・2Na入りの採血管に新鮮血を採取、4℃2000rpm30分間遠心し、得られた血漿を材料とした。次に2.5Mの硫酸アンモニウムにて4℃1時間放置塩析させ4℃2000rpm30分間遠心し、得られた沈殿物を分子濾過膜10000の限界濾過ペリコンカセット(ミリポア)で脱塩濃縮した。これを0.1Mトリス塩酸緩衝液(PH=7.4)で平衡にしてAcA44ウルトラゲル(LKB)を充填したカラム(ファルマシアKカラムK5/100)に添加し、アンジオテンシノーゲン分画(分子量:約57000)を分取した。

この検体をエレクトロフォーカシングカラム(LKB8101, 110ml)にアンフォライト(LKB)PH=3.5~10で電気泳動し、アンジオテンシノーゲン分画を分取し、0.1M酢酸緩衝液(PH=4.8)にて平衡にし、ペプスタチンアミノヘキシルアガロース(筑波大学:村上和雄教授より供与)アフィニティーカラム(10×100mm)にて、内因性レニンを除去した。この溶出検体を先のペリコンカセットで濃縮し0.1Mトリス塩酸緩衝液(PH=7.4)にて平衡にし、セファデックスG100(ファルマシア)カラム(10×200mm)にてアンジオテンシノーゲン分画を分取し精製した。各分取段階における回収率をTable 1に示す。

Table 1. Purification method of dog plasma angiotensinogen.

Sample	Volume	Angiotensinogen	Total Angiotensinogen	Purification	Overall recovery
	ml	μg angiotensin I/ml	μg angiotensin I		%
Nephrectomized dog plasma	3000	0.4	1200	1	100
Ammonium sulfate precipitations	411	2.1	863.1	5.3	71.9
AcA 44 Ultragel chromatography	60	8.0	480.0	20.0	40.0
Isoelectric focusing (PH=3.5-7)	15.2	26.0	395.2	65.0	32.9
Pepstatinaminohexyl agarose affinity chromatography	6.2	39.0	241.8	97.5	20.2
G-100 Sephadex chromatography	1.4	107.1	149.9	267.8	12.5

(2) 標識アンジオテンシノーゲンの作成

上記にて得られたアンジオテンシノーゲンをクロラミン T 法で ^{125}I を標識し, B/F 分離にはセファデックス G100カラム (10×200mm) 及び0.1Mトリス塩酸緩衝液 (PH=7.4) を用いた。

(3) 両側腎摘出犬, 及びアンジオテンシン I 変換酵素阻害剤投与犬 (ACEID) の作成

両側腎摘出犬は, ペントバルビタール麻酔下 (50mg/kg) にて両側腎摘出術を施行後24時間経過したものを用いた。ACEID は, アンジオテンシン変換酵素阻害剤 (Enalapril: 日本メルク萬有) を 5 mg/kg/day で10日間強制経口投与したものを用いた。

(4) アンジオテンシノーゲンの測定

アンジオテンシノーゲンの測定は, 過剰の犬腎レニンを加えて生成するアンジオテンシン I 量をレニン R I A キット (ダイナボット社) にて測定した。

(5) 正常犬, ACEID における分泌量の検討 (2-コンパートメントモデル解析)

正常犬, 両側腎摘出犬, ACEID への標識アンジオテンシノーゲンの注入実験は, 全てペントバルビタール麻酔下に行ない, 採血は, 大腿静脈にカニューレを挿入し, 静注後10分, その後2時間おきに24時間実施し, 遠心して得られる血漿をポリアクリルアミド電気泳動にかけ, 純粋なアンジオテンシノーゲン部位が全体に占める割合を算出し, 補正してプロットしてこれより血中からの消退速度を2-コンパートメントモデルにて解析した。

結 果

(I) 血漿からのアンジオテンシノーゲンの精製

Table 1 に示した手順にて前値の血漿中濃度を100%として収率12.5%で0.1A I (アンジオテンシン I) mg相当のアンジオテンシノーゲンを得た。Fig. 1 は, AcA44ウルトラゲルカラムクロマトグラフィーによる溶出を示した。Fig. 2 はエレクトロフォーカシングカラムによる分離を, Fig. 3 はペプスタチンアフィニティークラムでの分離を示した。このカラムでは, 通常レニンは, PH=7.8の中性付近で溶出されるが, この部位では認められず, レニンの混在はないと考えられる。Fig. 4 は, 上段にセファデックス G100による分離を, 下段にはこの純化したアンジオテンシノーゲンを 2 mCi の ^{125}I でクロラミン T 法により標識し, B/F 分離として同カラムを用いたときの溶出を示した。

Fig. 1. Analysis of dog plasma angiotensinogen by AcA 44 ultragel column chromatography.

Fig. 2. Analysis of dog plasma angiotensinogen by electrofocusing column chromatography.

Fig. 3. Analysis of dog plasma angiotensinogen by pepstatin-aminohexylagarose affinity column chromatography.

Fig. 4. Analysis of dog plasma angiotensinogen and ^{125}I -angiotensinogen by G100 Sephadex chromatography.

(2) 正常犬, 両側腎摘出犬, ACEID における分泌量の検討 (2-コンパートモデル解析)

Fig. 5 は経時的に採血し, 得た血漿中標識アンジオテンシノーゲンをポリアクリルアミド電気泳動にかけたもので, 上段の血漿アンジオテンシノーゲンは, $Rf=0.60$ と, 標識アンジオテンシノーゲンと, 同一ピークを認めた。また, 血中からの消失パターンは, 図に示したごとく分解産物のピークの出現と, それに伴いアンジオテンシノーゲンの量的な減少が認められた。Fig. 6 は, 各経過時間における補正値を10分間値100とした変化率で求め, その片側対数で示した。下段の曲線は, 減衰曲線から得られた分布相 (α) の解析直線である。この解析結果を Table2 に示した。正常犬と腎摘出犬の比較において, 分布相の半減期 ($1/2 \alpha$) は両者で差を認めず消失相の半減期 ($1/2 \beta$) が正常犬で11.0hr, 腎摘出犬で20.4hr 約 2 倍遅延した。総体的クリアランス (clt/kg) は, 正常犬4.4, 腎摘出犬4.0ml/kg/hr と, 腎摘出犬で一割の低下を認めた。しかしながら, 分泌量は, 9.6, 21.6AI/mg/kg/hr と, 顕著な増加を認めており, 消失相の半減期が2倍となっても血中濃度は, 腎摘出前値の約3倍 (1914.3→5450A I ng/ml) と増加していることより, 腎摘出により増加するアンジオテンシノーゲンは, 消費の減退のみならず肝臓からの分泌の亢進も関与している。一方, 変換酵素投

Fig. 5. Time course of ^{125}I -angiotensinogen degradation by polyacrylamide gel electrophoreses.

Fig. 6. Time course of ^{125}I -angiotensinogen in plasma of normal, nephrectomized and ACEI loaded dog. (two-compartment model analysis)

与犬 (ACEID) は、正常犬に比して分布相の半減期は、1.3とやや短かく、消失相の半減期は正常犬 11.0hr, ACEID14.1hr とやや増加を示した。総体内クリアランス (clt/kg) は3.8ml/kg/hr と正常犬 (4.4ml/kg/hr) に対して約1割の低下を認めた。また、体重あたりの分泌量は9.6 μ g/kg/hr より7.6 μ g/kg/hr と約3割の減少が認められた。消失の半減期がむしろやや増加していることからこの血中濃度の低下 (2810.4 $\rightarrow$ 2018.8A I ng/ml) は肝からの分泌そのものが低下していることが示唆される (Table 2)。

Table 2. Comparison of several parameters in normal, nephrectomized and ACEI loaded dog.

		Normal dog	Nephrectomized dog	ACEI loaded dog
Body weight	kg	8.5	7.5	8.8
Plasma angiotensinogen (P.A)	AI ng/ml	2152.2	5450.4 (Before: 1914.3)	2018.8 (Before: 2810.4)
Total plasma volume (T.P.V)	ml	547.6	582.1	562.1
¹²⁵ I angiotensinogen	cpm	12772950	11077500	17818000
k_{12}	hr ⁻¹	0.023	0.099	0.080
k_{21}	hr ⁻¹	0.309	0.231	0.438
k_{13}	hr ⁻¹	0.069	0.051	0.059
$t_{1/2\alpha}$	hr	2.1	2.0	1.3
$t_{1/2\beta}$	hr	11.0	20.4	14.1
Cl _t (T.P.V $\times$ K ₁₃)	ml/hr	37.8	29.7	33.2
Cl _t /kg	ml/kg/hr	4.4	4.0	3.8
Production rate of angiotensinogen (Cl _t $\times$ P.A)	AI μ g/hr	81.4	161.9	67.0
Production rate of angiotensinogen /kg	AI μ g/kg/hr	9.6	21.6	7.6

考 案

アンジオテンシノーゲンは肝臓より分泌され、腎臓由来のレニンと反応してアンジオテンシン I を生成することは良く知られた事実である。また、この反応の律速物質は主としてレニンであるため、レニンに関する研究は多く認められるが、アンジオテンシノーゲンに関する分泌調節機構は比較的少ない。多くの外因により血中アンジオテンシノーゲン濃度の変化がみられ、上昇を示すものとしては腎臓の摘出、糖質ステロイドの投与、妊娠などの例が挙げられる。

一方、下降を示すものは比較的少ないが、プロスタグランディン E₁, E₂ は抑制的に作用する報告があり⁷⁾、臨床的見地からすると肝硬変症など肝疾患では低下する。これら血中アンジオテンシノーゲン濃度変化に関しては二つの機序が考えられる。第一は酵素レニンによって加水分解を受け消費される割合が病態によって異なるため、結果的には濃度変化を来すという考えである。モル比から換算すれば血中アンジオテンシノーゲン濃度はレニン濃度に比して圧倒的に大であるが、一分子の酵素が数分子の基質を水解し得ることを考えれば、この説もあながち否定できるものではない。併しながら、妊娠時にみられる如き両者共高値を示す例を説明することはできないであろう。第二は、肝臓からの分泌が変化することである。糖質ステロイドホルモンやエストロゲンの投与の際の上昇

はその可能性が大きく, 事実, アンジオテンシノーゲンを生成する肝臓での mRNA が増大するとする報告がみられる⁸⁾。

腎摘出によって, 著しく増大する血中アンジオテンシノーゲンの上昇は, 副腎の同時摘出によって抑制されるとする報告もある⁹⁾。いずれにせよ, 肝臓からのアンジオテンシノーゲンの分泌は, 何らかの機序により, negative あるいは positive に調節されている可能性があるが, 現在までの所, いまだ単一の物質としては取り上げられているものはない。今回の我々の研究は, 以上述べた消費の変化によるものか, 分泌の変動によるものかを, 検討する目的で行なった。正常犬と腎臓摘出犬を比較すると, その代謝率は 4.4ml/kg/hr と約一割減少を示したが, あまり大きなものではなかった。この成績からアンジオテンシノーゲンの代謝に腎臓が関与することがあっても, それは僅かな部分であることがわかる。一方, 腎臓摘出犬においてはその血中濃度は前値 1914.3ng/ml より, 5450.4ng/ml と 2 倍以上の増加を示していた。従って, 計算上肝臓からの分泌率は正常犬での 9.6 mg/kg/hr (A I) より, 腎臓摘出犬での 21.6mg/kg/hr (A I) と著明に増大を示した。今回の研究では, 副腎摘出実験を行っていないので, ステロイドホルモンの関与は不明であるが, この成績から正常腎臓の存在が, 肝臓からのアンジオテンシノーゲンの分泌に負の feedback 作用を有している可能性が考えられる。次に, 正常犬と正常犬に変換酵素阻害剤を投与した際の成績を比較すると, その代謝率は 4.4ml/kg/hr より 3.8ml/kg/hr と低下を示した。この低下度は, 腎臓摘出の場合より大であり, 変換酵素阻害剤が, アンジオテンシノーゲンの代謝阻害効果を有していることが推察された。一方, 血中濃度は, 処置前の 2810.4ng/ml より, 2018.8ng/ml と減少した。アンジオテンシン II が, アンジオテンシノーゲンの分泌を亢進させるとする報告もあるが¹⁰⁾, 変換酵素阻害剤によるアンジオテンシン II の減少が, この結果を招いたか否かは明かではない。以上をまとめると, 変換酵素阻害剤はアンジオテンシノーゲンの代謝を阻害すると同時に, 分泌をも抑制することが考えられる。この代謝及び分泌の変化が, どこで行なわれているかは, この実験からは明かではないが, 我々は肝臓での可能性が大きいのではないかと考えている。

結 論

腎摘により増加する血中のアンジオテンシノーゲンには, 肝臓からの分泌亢進が示唆され, 変換酵素阻害剤の投与による血中のアンジオテンシノーゲンの低下には, 肝から分泌低下が関与している。

稿を終るに臨み, 常々御指導, 御鞭撻を賜った東邦大学医学部入江実教授に心から深謝いたします。

この論文は60回日本内分泌学会において発表した。

文 献

- 1) Edward, K.D., Herz, R. et al.: Lowering of blood pressure, plasma renin cholesterol and triglyceride by portacaval anastomosis in rats fed on a 6% sucrose/5% lard diet. *Clin. Sci. Mol. Med.*, 51: 145s–146s, 1976.
- 2) Blaquier, P.: Kinetic studies on renin-angiotensinogen reaction after nephrectomy. *Am. J. Physiol.*, 208: 1083–1086, 1965.
- 3) Carretero, O. et al.: Renin substrate in plasma under various experimental conditions in rat. *Am. J. Physiol.*, 213: 695–700, 1967.
- 4) Kokubu, T. et al.: Effects of

unilateral nephrectomy on plasma renin concentration in rats. *Pfugers Arch.*, 358: 303–310, 1975.

5) Davis, B. and Gordon, P.H. D.: The role of renin substrate in hypertension, *Hypertension*, 5: 353–362, 1983.

6) Toyozaki, N., Suzuki, T., Ito, T.: Effect of converting enzyme inhibitor “enalapril” on plasma renin substrate of the spontaneously hypertensive rat. *Jpn. J. Neph.*, 29: 547–551, 1987.

7) Murakami, E., Hiwada, K. and Kokubu, T.: Effects of prostaglandin on renin substrate production by the liver. *Clin. Sci.*, 59: 137s–139s, 1980.

8) Ohkubo, H., Nakayama, K., Tanaka, T. and Nakanishi, S.: Tissue distribution of rat angiotensinogen RNA and structural analysis of its heterogeneity. *J. Biol. Chem.*, 261: 319–323, 1986.

9) Tateishi, H., Nasjiletti, A. and Masson, G.M.C.: Role of renin in the regulation of angiotensinogen levels in plasma. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 137: 1424–1428, 1971.

10) Sernia, C. and Reid, I.A.: Stimulation of angiotensinogen production: A dose-related effect of angiotensin in the conscious dog. *Am. J. Physiol.*, 230: E442–E446, 1980.

(受付日: '88. 8. 17)