ヒト尿性カリクレインの研究

東京大学泌尿器科教室 宮 下 厚
(主任 高安久雄教授)URINARY KALLIKREIN DETERMINATION AND ITS PHYSIOLOGICAL
ROLE IN HUMAN KIDNEY

Atsushi Miyashita

Department of Urology, Faculty of Medicine, the University of Tokyo

(Director: Prof. H. Takayasu)

On the purpose to investigate the physiological role of kallikrein in the human kidney, its activity in human urine (Human urinary kallikrein; H.U.K.) was determined by TAME (p-toluene sulfonyl-L-Arginine methyl ester) assay described by Moriya.

The values obtained with this method well correlated to those obtained as kinin releasing activity where released kinins were assayed by observing the contraction of isolated guinea pig ileum.

To obtain normal range, 6 healthy males and females were examined. The results were as follows: male, average 63 E.U. per day (ranged 0-126); female, average 39 E.U. per day (ranged 0-68).

H.U.K. activity in patients with primary aldosteronism showed significant high values. In patients with Cushing's syndrome, renal lesions and others were within normal range. H.U.K. in primary aldosteronism decreased after extirpation of the adrenal adenoma.

H.U.K. activities in 7 cases of renal homotransplantation were determined serially. Soon after the transplantation, most cases of them showed extremely low levels but in some cases showed relatively high levels.

In the cases which showed relatively high levels, the activity also decreased gradually and became almost zero before their endstadium. In 3 cases out of 6 who finally succumbed, as Werle reported, H.U.K. decreased before blood urea nitrogen level increased.

The role of kallikrein in primary aldosteronism was discussed from the standpoint of sodium and water balance and it is suggested that kallikrein in human kidney may be one of the factors controlling homeostasis of human body.

The decrease of H.U.K. in the patients of renal transplantation is thought to be ascribable to tubular dysfunction or destruction caused by the rejection reaction.

The reason why H.U.K. diminishes before blood urea nitrogen levels rise may be that tubular cells are more easily damaged than glomerular cells under ischemic conditions.

緒 言

カリクレイン-キニン系は、血液凝固系、プラスミン系と同じように生体の内部環境の維持に関与する酵素系として注目され、いくつかの疾患の病態生理に本酵素系の代謝が関係していることが明らかになって来た。

尿中のカリクレインは、最近、腎において生成、排泄されていることがわかって来たが生体の中で特に腎における生理作用についてはよく解明されていない。

腎は、生体の水、電解質代謝の中心であり、副腎もま

た皮質ホルモンにより腎または、血管系に対して大きな影響力をもっている。著者は、ヒトの尿性カリクレイン（以下 H.U.K. と略称）の1日排泄量を主として、腎および副腎疾患症例について測定し、併せて、尿管機能との関係についても検討し、腎におけるカリクレイン-キニン系の意義について考察を試みた。

対 象

東大病院泌尿器科および三葉病院の入院患者の24時間尿の H.U.K. 排泄量を測定した。患者の年齢は、疾患

により異なるが、2才から78才、男78例、女34例、合計112例である。疾患別では、腎疾患として腎結核9例、腎腫瘍7例、水腎症11例、尿路結石（腎および尿管結石で水腎のないもの）15例、前立腺疾患として、腫瘍10例、肥大症16例、副腎疾患として、原発性アルドステロン症10例、クッシング症候群5例、副腎手術の対照として腎、副腎と関係の少いと考えられる一般外科患者（胃潰瘍5例、胆石症5例）、同種腎移植の術後7例、正常値を調べるために、健康男女それぞれ6例である。なお、腎移植例は、移植後数カ月間隔で測定したが、早期拒絶反応期の尿は、血尿、混濁等のため測定に適さないものもあつたので、このような尿は、測定対象から除外した。

方 法

H.U.K. の測定は、守屋の発表した比色法¹⁾（図1）を用いた。

すなわち、H.U.K. を含む試料と TAME（アルギニンエステル的一种）の一定量を一定時間（1時間）インキュベイトしたのち、アルカリ性ヒドロキシルアミンと作用させると分解されずに残った基質（TAME）によりヒドロキサミック酸が生成され、一定時間後トリクロ-

図1 測定方法の概略

ル酢酸で反応を停止、一定量の塩化第二鉄とコンプレックスを作らせ、生じた赤色を光電比色計により測定した。もし検体である酵素のかわりにコントロールとして水を使えば、TAME は分解されず、これによる発色は100%となる。標準 H.U.K. は、理科大学守屋教授より提供を受けた粗製 H.U. K. を用い、また、この assay に用いた試薬は次の通りである。

0.75M-Tris-buffer Solution (pH 8.5) (特級)

2.0 M-NH₂OH.HCl Solution (特級)

3.5 M-NaOH Solution (特級)

0.38M-Trichloro-acetic acid Solution (特級)

0.11M-FeCl₃ Solution (特級)

TAME (p-toluene sulfonyl-L-Arginine methyl ester)
(Sigma 化学)

合成ブラジキニン (Sandoz 薬品)

光電比色計は、日立製作所製のベックマン型 (E-P-U 2A) を使用した。

尿の採取、濃縮方法は、次の通りである。蓄尿びんに少量のトルエンをいれ、冷暗所にて蓄尿し、24時間尿の一部 300ml をセロファンチューブにいれ、尿量の約¹/₁₀重量のポリエチレングリコールを用い、冷蔵庫内で24~48時間内に約50~60倍の濃縮を行なつた。PSP テストは、臨床検査の一環として早朝空腹時に行なつた。

測定法

1) Webster によれば、H.U.K. のエステラーゼ活性は、血管拡張作用に基づく検定結果とよく一致することが報告されている¹⁾。したがつて、本法における1 E.U. (Esterase Unit) は、1 F.U. (Frey Unit) に相当するといえるが、効力既知の標準 H.U.K. を用い、用量と吸光度の関係を調べた（図2）。2~6 E.U./ml の間では、O.D. (吸光度) と E.U. は直線関係を有しているので、標本の測定は、すべてこの範囲で計測できるように必要に応じて稀釈系列を作成した。

2) キニン遊離能との比較検討

任意にとり出した濃縮尿の21検体について、TAME 活性とキニン遊離能による H.U.K. 活性を比較検討した。キニン遊離能は、ウシのプロソイドグロブリンを基質とし、遊離キニンをモルモット回腸収縮作用を利用して測定した。Standard としては、合成ブラジキニンを用いた。その結果、両測定値の間に相関関係（相関係数0.78）が認められた（図3）。

3) 回収率

標準 H.U.K. 25E.U. (25mg), 5 E.U. (5mg) を、

図2 Standard H.U.K. (1 E.U./mg) を用いて TAME Assay による吸光度より 1 ml 当りの E. U. との関係求めた。(E.U./ml, H.U.K.)

図3 エステル 分解能 (TAME 活性) と キニン 遊離能の相関性

表1 回収率 ヒト尿, 水に溶解した場合の TAME 活性の回収(守屋の方法による)

H.U.K. E.U.	12.5 E.U. 含有する ヒト尿 300ml		水	
	回 収 (E.U.)	回収率 (%)	回 収 (E.U.)	回収率 (%)
25.0	36.5	$\frac{36.5-12.5}{25.0}(96\%)$	21.6	86%
5.0	17.6	$\frac{17.6-12.5}{5.0}(102\%)$	6.0	120%

測定標本は、測定の最終段階で64倍に希釈されることになり、ある程度までの混濁は測定値に影響しない。混濁のある尿およびない尿につきおのおのの測定値間のバラツキを調べるために、各標本を6等分し、おのおのの標本毎に濃縮、Assay をそれぞれ独立に行ない E.U. を算出した。混濁尿については、バラツキが大であつたが、混濁のない尿では、満足すべき結果を得た(表2)。

表2 測定のバラツキ (混濁尿)

Part	吸 光 度 (O.D.)	E.U./ml	透析尿量 ml	E.U./ 300ml 尿
1	.550	0.7	13.5	9.5
2	.475	1.6	10.0	16.0
3	.500	1.3	11.5	15.0
4	.460	1.8	15.0	27.0
5	.490	1.4	14.0	19.6
6	.535	0.9	12.0	11.8

(17± 6.2)

測定のバラツキ (混濁なき尿)

Part	吸 光 度 (O.D.)	E.U./ml	透析尿量 ml	E.U./ 300ml 尿
1	.445	2.0	15.0	30.0
2	.405	2.5	12.0	30.0
3	.405	2.5	13.0	32.5
4	.460	1.8	11.5	23.7
5	.405	2.5	12.5	32.7
6	.390	2.7	12.0	32.0

(30± 3.1)

それぞれ、ヒト尿中に溶解せしめ、先に述べた濃縮操作、TAME assay を行なつたところ回収率は96%、102%また、水に溶解した場合は、それぞれ86%、120%の回収率であつた(表1)。

4) 再現性

5) 保存による活性の変化

任意にとりだした標本を冷蔵庫内にポリエチレン製容器にいれて0℃で保存した。2週目、4週目の測定で、ほとんど活性低下を認めなかつた(図4)。

図 4
Sampleの保存によるTAME活性推移
(0°C)

臨床症例についての測定結果

H.U.K. は1日排泄量 (E.U./day) として算出した。副腎疾患症例については、手術前後の H.U.K. を測定した(図5)。手術対照はホルモンと関係の少ない一般外科症例(胃潰瘍の胃切除、胆石症の胆嚢摘除それぞれ5

図5 副腎手術前後の H.U.K. (原発性アルドステロン症は、腺腫を含む片側副腎摘除、クッシング症候群は、片側腺腫摘除又は両側過形成副腎全摘除) 1例は未手術例。対照として胃切除及び胆のう摘除。

例)について測定した。腎移植例は、移植直後(1週間以内)より数カ月間隔で測定した。拒絶反応期における尿は、血尿、混濁等のため測定不能のものが多かった。

以下、各疾患群の H.U.K. 値および、臨床経過について簡単に述べる(図6)。

1) 正常例

生来、腎疾患およびホルモン異常のない男女6例ずつ測定した。すべて、血中尿素窒素(以下 BUN と略称) 6~17mg/dl, クレアチニン 0.8~1.7mg/dlで腎機能は正常と考えられるもので、年齢は男29~32才、(平均31才) 女25~32才、(平均29才)である。H.U.K. 値は男平均63 E.U./day (最高126, 最低0 E.U./day), 女平均39 E.U./day (最高68, 最低0 E.U./day)であった。

図 6

2) 腎疾患群

術前3回(3日間)の平均値を算出した。腎結核は9例であり平均30E.U./day (最高83, 最低0 E.U./day), 腎腫瘍(Grawitz 氏腫瘍)は7例で平均36E.U./day (最高64, 最低16E.U./day), 水腎症は11例で平均48E.U./day (最高113, 最低0 E.U./day), 尿路結石症(腎および尿管結石)は15例で平均30E.U./day(最高74, 最低0 E.U./

day), この群の腎機能は, PSP 15分値で0%のものから正常のものまで含まれていた。

3) 前立腺疾患群

この群では, 排尿障害のため腎機能が障害されている症例が多く, H.U.K. が0 E.U./day のものが他の群に比較すると多かった。

肥大症は16例で平均27E.U./day(最高64, 最低0 E.U./day), 腫瘍は10例で平均36E.U./day (最高82, 最低0 E.U./day) であった。

4) 副腎疾患群

イ. 原発性アルドステロン症症例

症例1. 20才男

血圧 160~ 150/110~100mmHg血清 Na 146mEq/l, K 3.4mEq/l, H.U.K. は5日間(5回)測定し 145, 200, 108, 400, 130E.U./day (平均 137E.U./day) とバラツキが大きいがいずれも他の疾患群に比較すると高値で, 左副腎摘除(病理診断 Cortical adenoma)の後, 血圧は正常となり, 血清 Na 139mEq/l, K 4.1mEq/l, 術後7日目の H.U.K. は72E.U./day と術前より著明に低下した。

症例2. 51才女

血圧 175~ 160/105~95, 血清 Na 146mEq/l, K 3.8 mEq/l, H.U.K. は5日間(5回)測定し, 175, 120, 69, 238, 170E.U./day (平均 154E.U./day) と4回までが高値を示し, 右副腎摘除(病理診断 Cortical adenoma)の後, 1週間では血圧は変わらず, 血清 Na 133 mEq/l, K 4.6mEq/l となり, H.U.K. は, 術後7日目より5日間測定し26, 10, 28, 50, 10E.U./day (平均25 E.U./day) と, すべて正常人の平均値以下となり, 血圧は1ヵ月後に正常となった。

症例3. 44才男

血圧 240~ 220/140~120, 血清 Na 143mEq/l, K 3.0 mEq/l, H.U.K. は, 6日間(6回)測定し, 126, 113, 75, 62, 74, 152E.U./day (平均 100E.U./day) と正常人の平均値よりもかなり高く, 左副腎摘除(病理診断 Cortical adenoma)の後, 血清 Na 138mEq/l, K 4.5mEq/l となり, 血圧は1週間後, 術前と変わらず, H.U.K. は術後7, 8日目にともに0 E.U./day とまったく活性を示さなくなった。

症例4. 30才女

血圧 170~ 150/105~95, 血清 Na 144mEq/l, K 3.9 mEq/l, H.U.K. は, 5日間(5回)測定したが, 最高23 E.U./day, 最低0 E.U./day (平均8 E.U./day) とほとん

ど活性なく, 左副腎摘除(病理診断 Cortical adenoma)の後, 血圧は1週間後に正常化し, 血清 Na 140mEq/l, K 5.0mEq/l となり, H.U.K. は, 術後7, 8, 9日目にそれぞれ32, 10, 21E.U./day (平均21E.U./day) とやや上昇したが, 女子正常者の平均までも達しなかった。

症例5. 39才女

血圧 180~ 160/120~100, 血清 Na 141mEq/l, K 3.0 mEq/l, H.U.K. は5日間(5回)測定し, 240, 250, 23, 212, 220E.U./day (平均 189E.U./day) と1日だけ低値, 他の4日は著しく高値を示したが, 左副腎摘除(病理診断 Cortical adenoma)の後, 血清 Na 137mEq/l, K 4.7mEq/l, 7日目, 血圧はまだ術前と同じであったが H.U.K. は術後7, 8, 9日目にそれぞれ21, 75, 21 E.U./day (平均39E.U./day) と平均では, 女子の平均値まで下降した。

症例6. 32才男

血圧 180~ 150/120~105, 血清 Na 149mEq/l, K 3.2 mEq/l, H.U.K. は, 5日間(5回)測定し, 77, 240, 176, 188, 380E.U./day (平均 160E.U./day) と1日を除いては著しく高値を示し, 左副腎摘除(病理診断 Adrenal adenoma)の後, 血清 Na 140mEq/l, K 4.7 mEq/l, 血圧も 140/90と下降し, H.U.K. は7, 8, 9日目に17, 0, 0 E.U./day (平均6 E.U./day) と低値となった。

症例7. 39才男

血圧 230~190/140~125, 血清 Na 148mEq/l, K 2.8 mEq/l, H.U.K. は, 5日間(5回)測定し, 15, 24, 14, 31, 31E.U./day (平均23E.U./day) と正常男子の平均よりかなり低値で, 左副腎摘除(病理診断 Adrenal adenoma)の後, 血清 Na 140mEq/l, K 4.6mEq/l, 血圧は1週間後やや下降をはじめ, H.U.K. は7, 8, 9日目にそれぞれ, 16, 9, 6 E.U./day (平均10E.U./day) と術前後ともに低値で, 著しい変化もなかった。

症例8. 46才男

血圧 190~175/130~110, 血清 Na 148mEq/l, K 2.6 mEq/l, H.U.K. は, 5日間(5回)測定し, 23, 50, 30, 60, 30E.U./day (平均39E.U./day) と正常男子の平均より低値であった。右副腎摘除(病理診断 Adrenal adenoma)の後, 血清 Na 144mEq/l, K 4.1mEq/l, 血圧は1週間後より 160/110と下降をはじめ, H.U.K. は術後7, 8, 9日目に, 0, 28, 50E.U./day (平均26E.U./day) と低値であるが上昇傾向をみせている。

症例9. 39才男

血圧 180/100, 血清 Na 144mEq/l, K 3.0mEq/l, H. U.K. は3日間(3回)測定し 190, 95, 300E.U./day (平均 175E.U./day)と変動が大きい, いずれも高値を示し, 右副腎摘除(病理診断 Adrenal adenoma)の後, 血清 Na 142mEq/l, K 4.0mEq/l, 血圧は1週間後 140/70と下降をはじめ, H.U.K. は, 術後8, 9, 10日目にそれぞれ40, 15, 20E.U./day (平均25E.U./day)と正常男子の平均値以下となつている。

症例10. 40才男

高血圧 180/120のために来院, 血清 Na 145mEq/l, K 3.0mEq/l, 血中レニン 0 γ /dlで臨床的に原発性アルドステロン症と診断され, H.U.K. は3日間(3日)測定し 350, 130, 170E.U./day (平均 217E.U./day)と著しく高値を示しているが手術未施行例である。

以上, 本症における術前 H.U.K. は, 高値を示すものの7例, 正常値以下のもの3例で, 平均すると 122E.U./day となり, 9例に副腎腺腫摘除が行なわれ, 高値を示したものは, すべて, 術後低下し, 1例を除いて正常値以下となつている。術前低値を示す群は3例あり, 術後著変を認めなかつた。

ロ, クッシング症候群

症例1. 37才女

術前 H.U.K. は3日間(3回)測定し 7, 0, 26E.U./day (平均11E.U./day), 左副腎摘除(病理診断 Adrenal adenoma)の後7~11日目の H.U.K. は, 28, 38, 11, 0, 72E.U./day (平均32E.U./day)と, 術前後共, 女子の平均値以下で著変なく, 術後の経過は良好である。

症例2. 2才男

術前 H.U.K. は3日間(3回)測定し 0, 1.2, 0 E.U./day (平均 0.4E.U./day)とほとんど活性を示さず, 右副腎摘除(病理診断 Adrenal adenoma)の後, H.U.K. は術前と変わらず, 7日目から12日目までいずれも 0 E.U./day であつた。

症例3. 38才女

術前 H.U.K. は, 4日間(4回)測定し, 36, 24, 40, 80E.U./day (平均45E.U./day)で女子の平均値よりやや高く, 左副腎摘除(病理診断 Adrenal adenoma)の後, H.U.K. は, 7日目~10日目にそれぞれ0, 20, 114, 94E.U./day (平均57E.U./day)とやや上昇している。

症例4. 42才女

術前 H.U.K. は, 3日間(3回)の測定で83, 40, 47E.U./day (平均57E.U./day)と女子の正常値よりやや

高く, 両側副腎摘除(病理診断 Adrenal hyperplasia)の後, H.U.K. は7日目~9日目にそれぞれ33, 45, 12 E.U./day (平均30E.U./day)と女子の平均値よりもやや低値となつた。

症例5. 28才女

術前 H.U.K. は3日間(3回)測定し65, 95, 80E.U./day (平均80E.U./day)と, 3回ともに女子の平均値より高値を示し, 両側副腎摘除(病理診断 Adrenal hyperplasia)の後, 7日目~9日目の H.U.K. は28, 40, 20 E.U./day (平均33E.U./day)と女子の平均値よりやや低なつた。

以上, 本症の術後は, 症例1から3までは, 腺腫のため他側の副腎は萎縮しており, ハイドロコチゾンによる補充を, 症例4, 5は, 過形成のため両側副腎全摘除を行ない, 同じく, ハイドロコチゾンによる置換療法が行なわれている。

手術前後の H.U.K. の変動は症例1から3までの腺腫例では, 3例中2例(1例は不変)はやや上昇傾向を, 症例4, 5ではともに下降する傾向をみせている。全体の平均値は術前39E.U./day, 術後31E.U./dayであつた。

5) 一般外科症例

副腎疾患患者の手術前後の H.U.K. 測定を行なつたので, その対照群として, 胃および副腎と関係が少いと考えられる胃潰瘍患者の胃切除, 胆石症患者の胆嚢摘除をそれぞれ5例ずつ計10例について, 術前3日間, 術後7~9日目に3日間 H.U.K. を測定し平均値を算出した。

胃切除例では, 術後上昇を示したものは, 3例(99→130E.U./day, 12→40E.U./day, 0→13E.U./day), 低下を示したものは2例(75→20E.U./day, 40→10E.U./day)あり, 術前平均45 E.U./day, 術後平均43 E.U./day となり, 一定傾向は認められなかつた。

胆嚢摘除例では, 術後上昇を示したものは4例(49→76 E.U./day, 26→74 E.U./day, 4→50 E.U./day, 0→26 E.U./day), 低下を示したものは1例(87→70E.U./day)で平均すると術前33E.U./day, 術後59E.U./day となりいづれも男女の正常例の平均値近い値であるが, 胆嚢摘除例では, H.U.K. は上昇するといえる。

6) 腎移植症例(図7)

症例1. 23才男, 原疾患: 腎結核

腎出血患者(無血縁者)の腎を移植された。拒絶反応期は, 第1回が術後1~2週目, 第2回が, 3~4週目

図7 腎移植後の H.U.K. 7 例 (死亡 6 例, 生存 1 例)

である。

H.U.K. は、移植直後 (3 日目) に 80 E.U./day この時の血中尿素窒素 (以下 BUN と略称) は 30 mg/dl, 3 カ月半後の H.U.K. は 90 E.U./day (BUN 25 mg/dl), 12 カ月後は 40 E.U./day (BUN 40 mg/dl), 20 カ月後 30 E.U./day (BUN 74 mg/dl), 24 カ月後 0 E.U./day (BUN 154 mg/dl) と次第に下降し、さらに、数カ月後腎不全のため死亡した。

症例 2. 20 才男, 原疾患: 慢性腎炎

父より健腎を移植された。拒絶反応期は、第 1 回が 1 ~ 2 週目, 第 5 週より慢性的拒絶反応期に入っている。H.U.K. は、移植直後より 4 日間は、120, 85, 106, 50 E.U./day (平均 90 E.U./day, BUN 32 mg/dl), 3 カ月後、108 E.U./day (BUN 35 mg/dl), 4 カ月半になると 0 E.U./day (BUN 90 mg/dl) となり、この測定の後 2 週後、腎不全で死亡した。

症例 3. 19 才女, 原疾患: 慢性腎炎

腎出血患者の腎 (無血縁者) を移植された。拒絶反応期は、1 ~ 2 週目に 1 回あった。H.U.K. は 2 日目 ~ 4 日目に 25, 14, 10 E.U./day (平均 17 E.U./day, BUN 34 mg/dl), 3 カ月後は、10 E.U./day (BUN 25 mg/dl), 5 カ月後 8 E.U./day (BUN 20 mg/dl), 10 カ月後 5 E.U./day (BUN 105 mg/dl) と BUN の上昇とともに H.U.K. は逆に低値となり 11 カ月目に腎不全のため死亡した。

症例 4. 33 才男, 原疾患: 慢性腎炎

腎出血患者の腎 (無血縁者) を移植された。拒絶反応は第 1 回 1 ~ 2 週目, 第 2 回は 5 ~ 6 週目にみられた。H.U.K. は術直後から 5 日間まったく活性を示さず、1 カ月後、4 カ月後、9 カ月後、20 カ月後も同様にほとんど

0 E.U./day で BUN はその間 40 ~ 50 mg/dl で腎機能としては比較的良好に保たれた例である。2 年 1 カ月後になり合併症のため死亡したが、H.U.K. は 1 度も上昇傾向をみなかった。

症例 5. 26 才男, 原疾患: 慢性腎炎

母から健腎を移植された。第 1 回拒絶反応は 2 ~ 5 週目にかけて長期にわたり、6 週目の終り頃から慢性的拒絶反応期に入り、それ以後、腎機能は、回復することなく、5 カ月目に腎不全のため死亡した。H.U.K. は、移植直後より、6 日間測定し、26, 0, 23, 6, 39, 12 E.U./day (平均 18 E.U./day, BUN 17 mg/dl), と低値であり、1 カ月後、3 日間 (3 回) の測定値はすべて 0 E.U./day (BUN 120 mg/dl) で、3 カ月後、0 E.U./day (BUN 111 mg/dl) と下降してしまっている。

症例 6. 34 才男, 原疾患: 慢性腎炎

腎出血患者の腎 (無血縁者) を移植された。早期拒絶反応はなかった。H.U.K. は直後より 7 日間 (7 回) 測定し、0 E.U./day (7 日間) で、BUN は 27 ~ 30 mg/dl であった。

1 カ月半後は、2 日間 (2 回) 測定しともに、0 E.U./day (BUN 30 mg/dl), 6 カ月半後は、3 日間 (3 回) の測定で 25, 75, 104 E.U./day (平均 68 E.U./day, BUN 40 mg/dl) とやや回復しているが、8 カ月後、3 日間測定しすべて 0 E.U./day (BUN 55 mg/dl) と下降し、9 カ月目に腎機能不全のため死亡した。

症例 7. 35 才男, 原疾患: 慢性腎炎

同胞より健腎を移植された。拒絶反応は現在 2 年 1 カ月までない。H.U.K. は、直後より 5 日間 (5 回) 測定し、いずれも 0 E.U./day (BUN 27 ~ 43 mg/dl), 5 カ月後は 3 日間 (3 回) の測定で、9, 30, 21 E.U./day (平均 20 E.U./day, BUN 15 mg/dl) とやや回復し 2 年後は、30 E.U./day (BUN 25.5 mg/dl) と低値ながら上昇傾向がみられる。現在、腎機能は良好に保たれ、社会復帰をしている症例である。

以上の腎移植患者は、免疫抑制剤として、プレドニンおよびイムラン (Azathiopurine) を拒絶反応の程度に応じて連続投与されている。

腎移植後の H.U.K. の推移をまとめると、直後 (1 週間以内) は比較的高値を示す群 (2 例) と、著しく低値の群 (5 例) がまずみられる。その後、高値群では、3 ~ 4 カ月後に、一時やや上昇を示すが、漸次低下するものと急激に低下するものが 1 例ずつあった。低値群 5 例の中 3 例は、以後、漸次低下し、E.U./day またはそ

図8 PSP と H.U.K. の相関

れに近くなり死期を迎えている。5例中の他の2例は、それぞれ5カ月、6カ月半以後、上昇傾向をみせたが1例は、2年後さらに上昇傾向をみせ、腎機能もよく保たれており、他の1例は、その後急激に下降し、死亡している。

7) PSP 15分値と H.U.K.

腎疾患群、前立腺疾患群、一般外科症例群において行なつた PSP 検査成績と H.U.K. の関係を検討した(図8)。両測定値間には、はつきりした相関関係は見出せなかつたが PSP 低値群では、H.U.K. も著しく低かつた。

考 按

歴史的考察

Frey, Kraut²⁾らは、1926年、ヒト、イヌの透析尿を麻酔犬に注射し、血圧降下を観察し、「腎から排泄され心機能を刺激する物質」として、ある物質を報告した。その後、このような物質は、脾、血漿にも含まれ、とくに脾には多量に存在することがわかり、カリクレインと命名された。さらに、カリクレインは、十二指腸液、糞、唾液からも発見されている。

Werle³⁾は、1937年、この尿と血漿をインキュベイト

し、この時遊離した物質は、血圧降下作用の外にモルモット腸管収縮作用のあることを発見した。これは、尿中カリクレインが血漿に作用して遊離されたものと考えられ、今日では、この物質はカリジンであるといわれている。

一方、Rocha e Silva⁴⁾は、蛇毒の少量をイヌに注射したところ、ショック性の血圧降下を示し、この時血中に、モルモットの腸管収縮物質が生成されていることを発見した。この物質は、血中から速やかに消失し、数分後に採血した血漿にはすでにこのような作用は認められなかつた。彼は、この物質について、ヒスタミン、トロンボサイチン、カリクレイン、アセチルコリン等とは薬理学的にまったく違つた新しい物質であるとして、ブラジキニン (Bradykinin) の名を与えた。これは、血漿グロブリン分画から蛇毒中の酵素により遊離されたものと考えられ、Werle のカリジンが尿カリクレインにより遊離されることと相通ずるものである。Rocha e Silva はブラジキニンの前駆体にブラジキノノーゲン (Bradykininogen), Werle は後に、カリジンの前駆体にカリジノーゲン (Kallidinogen) と命名した。ブラジキニン、カリジンは生体中にあるキニンの代表的なもので、血漿の α_2 -グロブリン分画中の前駆体にトリプシンおよびカリクレインが作用し遊離される。その後、これらキニンの分離、精製が進められ、1960年、Elliot⁵⁾らによつてアミノ酸配列が明らかにされた。しかし、Elliot⁶⁾らは、最初、ブラジキニンの構造を H-Arg-Pro-Gly-phe-Ser-phe-Arg-OH と推定したが、これは活性を示さず、結局、Guttman, Boissonas らによつて訂正されて H-Arg-Pro-Gly-phe-Ser-Pro-Phe-Arg-OH が天然品と生理活性が一致することがわかつた。また、カリジンは、アミノ酸10コからなるペプチドでブラジキニンのN末に lysine のついたもので、lysyl-Bradykinin とも呼ばれる。この2つのペプチドは定性的にはまったく同じ生理作用をもち、定量的には、それぞれ測定される生理作用により差があるが、ともに血圧降下、腸管収縮作用のほか血管拡張、毛細血管透過性亢進、白血球遊走、疼痛発生等の作用を有する。

キノノーゲンにカリクレインが作用し、キニンを遊離する酵素系をカリクレインーキニン系と称し、その生理的意義についての研究が行われている。一方、生体においては、血液凝固系、プラスミン系との関係も複雑で、これらの酵素を無視して、キニン系のみを明らかにすることは不可能であるが、本酵素系を構成する各因子の測定

法が開発されるようになり、いくつかの疾患において、その病態生理にキニン代謝が関与していることがわかって来た。

カルチノイド症候群は、1950年代において、セロトニン代謝との関係が明らかにされた。

しかし、1962年、Pearl⁷⁾らは、カルチノイド患者にセロトニンを注射しても本症に特有な flushing 現象はおこらず、また flushing 発作中でも、血中セロトニン値は必ずしも上昇していないことを報告し、セロトニン以外の物質が本発作の誘起物質であることを示唆した。Oates⁸⁾は、1964年、ブラジキニンを本症患者に注射し、flushing、頻脈、血圧降下、呼吸促進等を観察し、またエピネフリンの静注により内因性のブラジキニンを誘発しても同じ結果を得た。さらに、カルチノイド腫瘍より抽出したキニンを合成ブラジキニンと比較検討し、両者はまったく同じものであることを示した。Dean⁹⁾は Spontaneous flushing とブラジキニン注射による flushing の血行動態を血圧、血管抵抗、心搏出量等により比較し、この両者はほとんど同じ時間的推移を示したと報告した。かくして、カルチノイド症候群における病態生理にブラジキニンが重要な役割をはたしていることがわかってきた。

遺伝性血管運動神経性浮腫¹⁰⁾¹¹⁾においては、先天的にカリクレインインヒビターの欠乏があるといわれており、カリクレインが血中に増えるためにキニンが遊離されやすくなり、血管の透過性亢進が局所的におこり、浮腫を生ずると説明されている。

Melmon¹²⁾は、ブラジキニンが羊の動脈管とヒトの臍動静脈を収縮させることに注目し、ヒト新生児の臍帯血中のブラジキニンおよびブラジキニンノーゲンの測定を行ない、ブラジキニンは成人に比較して新生児に高く、キニンノーゲンは低いとしている。新生児顆粒白血球にはキニナーゼが低く、カリクレインは臍血管を通る際の温度低下により活性化されることを示し、胎児から新生児への新しい循環、すなわち、動脈管、臍動静脈の収縮および肺循環が開始されるための血管拡張にカリクレインーキニン系が関与していることを示した。

Hilton, Lewis らは、カリクレインは生体のあらゆる組織に証明されることから、特に腺性カリクレインに注目し、キニン遊離により腺活動への関与を主張している。

急性肺炎は胆管からトリプシンのごとき蛋白分解酵素が膵組織内に逆流するためにおこるといわれ、実験的に

も動物に逆流をつくることによりおこすことができる。

この際トリプシンは、膵内のカリクレインノーゲンに作用し活性カリクレインとする一方、キニンノーゲンに作用し、キニンを遊離し、これが急性肺炎の誘起物質となり、血管透過性亢進、ショック性の血圧降下をおこすと考えられている。ヒトの急性肺炎は、カリクレインのインヒビターとして知られるトラジロール (Trasyolol) が治療上有効なことが知られている。キニンは、また、生体の局所に、急性炎症像をつくることができ、セロトニン、ヒスタミンと同様に炎症誘起物質としても注目されている。

腎におけるカリクレインーキニン系の研究は、H.U.K. の測定から始められた。H.U.K. はいまだその最終産物までは精製されておらず、生化学的な性質等については明らかでないが各種阻止物質に対する反応、実験的腎障害と尿性カリクレインの消長等から腎より排泄されていると考えられている。

Miwa¹³⁾は、ヒト血清を基質としたキニン遊離能により H.U.K. の測定を行なつたが、高血圧症、腎疾患患者、および正常人の間に有意差を見出していない。

Horton¹⁴⁾らも同じ方法で H.U.K. を測定し、正常人で 1 日 292~440 単位 (Frey Unit) であると報告した。

Moriya は、TAMe を基質とした化学的定量法¹⁾を用い、正常人で安静時の24時間値は20~63単位 (Esterase Unit) で、停止性担癌患者よりも進行性の例に H.U.K. の増量がみられたと報告している。その他、Frey, Kraut らのイヌの血圧降下作用を利用したものがあるが、H.U.K. の特別高いものや低い疾患は見い出されてはいない。また、草食よりも肉食のヒトに H.U.K. が高いことも報告されている。

以上のごとく、H.U.K. 測定の報告は散発的に見られるが、腎生理との関係を明らかにするまでには至っていない。

測定法¹⁵⁾

カリクレインは、一般には、キニンノーゲンからキニンを特異的に遊離する酵素と定義されており、その測定法¹⁵⁾は、実験動物を用いる方法と、合成基質を使う方法がある。前者は動物の血圧降下、血流増大作用を利用する方法と、粗製キニンノーゲンを基質として、生成したキニンをモルモット回腸、ラット子宮の収縮作用を利用する方法があり、これは、特異性にすぐれている。血圧降下による方法は、十分深い麻酔をかけないと安定した血圧変化が得られないこと、特異性の低いこと、感度の低

いことなどの欠点がある。事実、イヌの血圧降下物質はカリクレインだけではないので、ある程度以上の精製がないと満足な結果は得られない。また方法も煩雑である。合成基質を用いる方法は、簡単に行なえて、再現性もよいが、唯一の欠点は特異性が低いことである。

カリクレインにより分解される合成基質は、TAMe (tosyl-L-Arginine methyl ester) BAME (benzoyl-L-Arginine methyl ester) BAEe (benzoyl-L-Arginine ethyl ester) 等があり、これらのものと検体の反応後、分解されずに残った基質、または、分解産物を測定することにより酵素活性を知ることができる。

Webster¹⁶⁾はインヒビターによる実験から TAMe はカリクレイン測定の基質として適していることを報告し、1964年、守屋は、H.U.K. 測定の場合は、尿中に TAMe 分解酵素の混有はなく、したがって TAMe を基質として用いられることを示し、Hestrin 法の原理を使つた TAMe Assay を発表した。すなわち、H.U.K. のいくつかの精製段階において、TAMe 活性とイヌの血圧降下作用による測定値はよく一致し、人尿標本においても両活性はよく一致した。本研究では、さらに、守屋の TAMe Assay とキニン遊離能の間に満足すべき相関関係を認めた。しかし、キニン遊離能と TAMe 活性が一致しない人尿標本もあつた。回収率、再現性、保存等についても、満足すべき結果を得たが、混濁尿については、再現性がないので、最終段階で吸光度に影響する標本は測定対象から除外した。また、着色の影響を消去するために、予め T.C.A. を加えヒドロキサミック酸生成のなきものを対照として補正を行なつた。

腎とカリクレイン-キニン系

イヌの腎動脈へキニンを注入すると、RBF の上昇、水、電解質の排泄増大がみられるが、GFR は必ずしも上昇しない¹⁷⁾¹⁸⁾¹⁹⁾。ヒトにキニンを静脈注射しても、GFR の上昇はなく、RBF の上昇および、水、電解質の排泄増大がみられる²⁰⁾。RBF の上昇は、キニンの血管拡張作用によるものと考えられるが、水、電解質排泄増大は、糸球体毛細管の拡張のみでは説明できない。

守屋²¹⁾によると、H.U.K. の分子量は、40,500 ヒト降性カリクレインは31,200でともに糸球体濾過が可能な大きさであるが、各種インヒビターに対する反応、次に述べる Werle らの実験等より、腎尿細胞から排泄されると考えられている。Werle²²⁾は、ラットの腎尿細管を選択的に障害させたところ、尿中カリクレイン排泄低下を認め、尿カリクレインは尿細管で合成、排泄される

とした。Zickgraf²³⁾の考えも、H.U.K. は、尿細管で合成、排泄されるとし、尿細管細胞の膜透過性に影響を与え、尿細管の再吸収、排泄作用に対してある役割を演じていると考えている。著者の PSP と H.U.K. の関係で、PSP 値の著しく低値のものは、尿細管の萎縮、変性が高度で細胞自体の機能も障害され、酵素合成能ともに低下していると考えられ、したがって、このような例では、H.U.K. 値も低かつた。また、PSP が正常値を示す例は、細胞自体の機能もよく、H.U.K. も正常および正常値以上の値を示すものが多くなるが、PSP は生体にとっては、単なる異物で偶然尿管から排泄されるにすぎず、一方、H.U.K. は、生体の一つの酵素系を形成する酵素で尿管細胞内で合成、排泄されるもので、排泄のメカニズムはまったく異なると考えられるので、PSP と H.U.K. 値は、必ずしも相関がないものと考えられる。

臨床例における H.U.K. 測定結果

正常例の平均値 (男63E.U./day, 女39E.U./day) と他の疾患群の平均値を比較すると、多少の差は認められるが、各疾患別に1例づつ、H.U.K. 値をグラフ上にプロットしてみると、原発性アルドステロン症を除いて、正常例と各疾患群との間には有意差は認められなかつた。そこで、有意差をもつて高値を示す例の多かつた原発性アルドステロン症を中心に考察を行ない、腎移植症例については、腎機能との関係をみながら、術後の H.U.K. の推移を検討した。

アルドステロンは、遠位尿管に働き、Na, 水の貯留、K の排泄増大作用をもつ。カリクレイン-キニン系は、Na, 水に関しては、アルドステロンと逆の作用、すなわち、排泄増大、K に関しては、ともに排泄増大作用を有する。しかし、この系のみで、水、電解質の代謝を説明することはできないが、Na, 水のバランスという立場からすると、カリクレイン-キニン系は、本症の場合、生体にとって都合のよい一つの系であるといえよう。しかし、H.U.K. 高値がそのまま腎におけるキニン作用の増大とするには問題があるが、本症においては、H.U.K. 高値のものが多く、しかも、副腎腺腫摘除後は、H.U.K. 高値のものは、すべて、低下傾向を示したことは、Na, 水の代謝に関して、H.U.K. が何らかの役割をしていることを示唆していると思われる。しかし、少数例ながら、本症においても H.U.K. の高くない例もあり、生体の恒常性維持の面から他の系の関与も考えられ今後の検討を要する。

同じく副腎疾患であるクッシング症候群では、少数例でありなお検討を要するが、術前著しく高値を示す例はなく、術後も大きな変動はなかつた。一般外科症例においては、術後上昇するものが7例、低下するものが3例あつたが、ともに、正常者の平均値近くの変化であつた。

副腎疾患患者の H.U.K. 測定のもとまつた報告はみられないが、動物において、尿カリクレインが、副腎により支配されるとする報告がある。すなわち、Werle²⁴⁾は、ラットの両側副腎全摘除により血中キニノーゲンが2.5倍、両側腎全摘除により3.5倍にそれぞれ増加したことを観察し、腎におけるカリクレイン合成が、低下または皆無となつたため、血中キニノーゲン消費が減つたものと考えた。さらに、両副腎を摘除した例について、コーチゾンを投与したところ、尿性カリクレイン排泄は正常化したと報告している。

著者の副腎疾患における H.U.K. 測定結果より、H.U.K. 高値の原発性アルドステロン症においては、アルドステロンによる H.U.K. への影響を示唆していると思われる。

クッシング症候群では、術後、十分量のハイドロコチゾンの補充が行なわれているので術前後の H.U.K. の比較はむづかしい。以上、著者の副腎疾患症例における副腎皮質ホルモンと H.U.K. の関係については、コーチゾールよりもアルドステロンによる、H.U.K. のコントロールが考えられる。

腎移植後の H.U.K. の推移については、まず直後では、7例中5例が著しく低値を示し、Werle²⁵⁾らの述べているごとく一時回復をみたものはその中2例、他の3例は、上昇傾向をみることなく、漸次低下し死期にはまったく活性を示さなくなつた。7例中2例は、直後より、比較的高値を示したが、その後やや上昇傾向をみせたのみで、次第に低下し前述の群と同じように死期近くにはまったく活性がなかつた。拒絶反応期には、BUN の上昇に先行して H.U.K. の低下がみられることは、Werle²⁵⁾らが指摘しているが、著者の例では、BUN の上昇するものは必ず H.U.K. の低下を伴い、拒絶反応に関係なく、BUN の上昇および腎不全の徴候が現われない時期にすでに H.U.K. が0または著しく低値を示す例が3例(症例3, 4, 6)あつた。

移植腎では、拒絶反応により、小血管、糸球体が障害を受け、ひきつづいて尿細管が障害されているといわれているが、BUN と H.U.K. 値からみるとむしろ逆に尿細管に関係の深い H.U.K. の低下が先行している。

これは、尿細管における H.U.K. 合成能は、非常に軽度な循環障害によつても影響を受けるためと考えられる。また、これら少数例から H.U.K. 値と予後の関係について結論は出せなかつたが、H.U.K. の低下は、BUN 上昇の前ぶれとして、または、尿細管における H.U.K. 合成能という特殊な機能を反映するものとして注意すべきであろう。

キニンは、生体中でカテコールアミンによつて誘発され、逆に、キニンにより副腎髄質が刺激されることも知られている。最近では、さらに、レニン-アンギオテンシン系との関連において、本酵素系を考える者もあり、Ueki²⁶⁾は、イヌの腎皮質におけるレニンおよびカリクレイン両酵素の高活性を見出している。

生体の内部環境を維持するためのいくつかの酵素系が現在知られているが、原発性アルドステロン症において、H.U.K. 高値の例が多かつたことは、カリクレイン-キニン系もまたこうした恒常性維持のための一つの系として働いている可能性が強い。

結 語

1. ヒト尿性カリクレイン (H.U.K.) 排泄値を測定するために、守屋の化学的定量法 (TAMe Assay) を生物学的方法と比較検討し、満足すべき結果を得たので、本法を用いて、H.U.K. を測定した。

2. 腎疾患群、前立腺疾患群と正常群の間には、H.U.K. について有意差はなかつたが、原発性アルドステロン症においては、高値を示す例が多く、高値例では、腺腫を含めた片側副腎摘除により低下する傾向を見た。尿細管におけるアルドステロンおよびキニンの水、Na 代謝に対する作用を考えると、H.U.K. 高値のアルドステロン症の場合は、生体の内部環境維持のために、カリクレイン-キニン系が活性化されている可能性を示唆していると考えた。

3. 腎移植後の H.U.K. は7例中5例は、移植直後において著しく低値で、その後、一時回復する例もあつたが、死亡例については、死期に至るまで漸次低下し、まったく活性がみられなくなつた。

比較的高値を示した2例は、さらに上昇傾向をみたが、ともに死期には0 E.U./day まで下降した。これらの H.U.K. 低下は、Werle らが指摘するように、BUN の上昇に先行して低下する例が多かつた。

稿を終るに当り、終始御指導、御校閲をいただきました恩師高安久雄教授衷心より感謝致しますと共に、研究遂行のために御援助下さつた米瀬泰行講師、藤田公生

博士はじめ医局員諸兄に感謝致します。

また、本研究のカリクレイン測定について御指導いただいた東京理科大学薬学部生理化学教室守屋寛教授、森脇千秋助教授はじめ教室員諸兄に厚く御礼申し上げます。

なお、本研究の一部は文部省試験研究費によった。

本論文は東京大学審査学位論文であることを附記する。

文 献

- 1) 守屋 寛：日本臨牀，**22**, 2659, 1964.
- 2) Frey, E.K. und Kraut, H.: Z. physiol. Chem., **157**, 32, 1926.
- 3) Werle, E. und Grunz, M.: Biochem. Z., **301**: 429, 1939.
- 4) Rocha e Silva, M., Beraldo, W.T. and Rosenfeld, G.: Am. J. physiol., **156**, 261, 1949.
- 5) Elliot, D.F., Lewis, G.P. and Horton, E.W.: Biochem. Biophys. Res. Commun., **3**, 87, 1960.
- 6) 鈴木友二, 林恭二：蛋白質核酸酵素, **12**, 211, 1967.
- 7) Robertson, J.I.S., Peart, W.S. and Andrews, T.M.: Quart. J. Med., **31**, 103, 1962.
- 8) Oates, J.A., Pettinger, W.A. and Doctor, R.B.: J. Clin. Invest., **43**, 173, 1964.
- 9) Dean, T.M. and Melmon, K.L.: J. Clin. Invest., **45**, 1685, 1966.
- 10) Landerman, N.S., Webster, M.E., Becker, E.L. and Ratcliff, E.E.: J. Allergy, **33**, 330, 1962.
- 11) Burdon, K.L., Quency, J.T., Thomas, O.C. and McGovern, J.P.: J. Allergy, **36**, 546, 1965.
- 12) Melmon, K.L., Cline M.J., Hughes, T. and Nies, A.S.: J. clin. Invest., **47**, 1295, 1968.
- 13) Miwa, I.: Tohoku J. exp. Med., **86**, 334,
- 14) Horton, E.W.: J. Physiol., **148**, 267, 1959.
- 15) Trautschold, I.: Assay method in the Kinin System Handbook of experimental pharmacology XXV, p 69—75, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1970.
- 16) Webster, M.E. and Pierce, J.V.: Proc. Soc. expl. Med., **107**, 186, 1961.
- 17) Furuyama, T., Suzuki, C., Saito, H., Onozawa, Y., Shioji, R., Rikimaru, S., Abe, K. and Yoshinaga, K.: Tohoku J. exp. Med., **89**, 69, 1966.
- 18) Webster, M.E. and Gilmore, J.P.: Am. J. physiol., **206**, 714, 1964.
- 19) Gill, J.R., Melmon, K.L., Gillespie Jr., L. and Burtter, F.C.: Amer. J. Physiol., **209**, 844, 1965.
- 20) Barraclough, M.A. and Mills, I.H.: Clin. Sci., **28**, 69, 1965.
- 21) Moriya, H., Pierce, J.V. and Webster, M.E.: Ann. N.Y. Acad. Sci., **104**, 172, 1963.
- 22) Werle, E. und Vogel, R.: Arch. int. Pharmacodyn., **126**, 171, 1960.
- 23) Zickgraf, R.G.: Z. physiol. Chem., **349**, 930, 1968.
- 24) Werle, E., Leysath, G. und Schmal, A.: Z. physiol. Chem., **349**, 107, 1968.
- 25) Werle, E., Busse, R. und Schmal, A.: Klin. Wschr., **24**, 1315, 1968.
- 26) Ueki, H.: Personal Communication.

(1971年2月3日受付)