ラット腎への体外衝撃波照射後 Endothelin の血中動態, 腎機能および血圧への影響

北里研究所メディカルセンター病院泌尿器科 (部長: 青 輝昭)

増井 則昭 小林 聖二 黒川 純 青 輝昭

ENDOTHELIN LEVELS AFTER EXTRACORPOREAL SHOCK WAVES, EFFECTS OF RENAL FUNCTION AND BLOOD PRESSURE IN RATS

Noriaki Masui, Seiji Kobayashi, Jun Kurokawa and Teruaki Ao
Department of Urology, Kitasato Institute, Medical Center Hospital
(Director: Dr. Teruaki Ao)

(Background) Endothelin is a recently discovered peptide with strong vasoconstrictive effects which is of potential relevance in the development of renal hypertension and renal failure. It is secreted by endothelial cells in response to ischemia, endothelial lesions and inflammatory or traumatic processes. Endothelin level after extracorporeal shock waves, effects of renal function and blood pressure were examined in rats.

(Methods) Changes of plasma endothelin-1 (ET-1) levels after extracorporeal shock waves were studied by applying 500 shock waves to both kidneys in Wistar Kyoto rats (WKY) and spontaneously hypertensive rats (SHR). Plasma ET-1 was measured before shock wave exposure and every thirty minutes up until 2 hours, then at 12 hours and 24 hours after shock wave exposure by specific sandwich enzyme immunoassay (EIA). Findings were then compared with those from the control group. Mean arterial pressure (MAP), glomerular filtration rate (GFR) and renal plasma flow (RPF) in rats were measured before shock wave exposure and every thirty minutes up until 2 hours after shock wave exposure, moreover made evaluation when ET-1 specific antibodies were administered intravenously into WKY and SHR.

(Results) Plasma ET-1 was significantly increased in WKY (n=6) and SHR (n=7) after shock wave exposure as compared with that in the control group ($p<0.05$). In SHR (n=6), GFR temporarily decreased at 60 min but RPF remarkably decreased and renal vascular resistance (RVR) increased at 30~120 min after shock wave exposure ($p<0.05$). However, infusion of ET-1 specific antibodies into SHR curbed change in those parameters, increased GFR and RPF at 60~120 min after shock wave exposure ($p<0.05$). In WKY (n=5), RPF temporarily decreased and RVR slightly increased, infusion of ET-1 specific antibodies curbed change in those parameters. MAP in SHR slightly increased at 30 min after shock wave exposure, but there was no significant change in WKY.

(Conclusion) These results suggest that plasma ET-1 levels elevated in both strains and ET-1 influenced renal function after extracorporeal shock waves, and that SHR is more sensitive to ET-1 in comparison with WKY.

Key words: extracorporeal shock waves, ET-1, renal function

要旨: (背景と目的) エンドセリン (ET) は強力な血管収縮作用を有するペプチドで腎性高血圧や腎不全の進行に関与していることが報告されており, 血管内皮の病変, 虚血, 傷害などにより, 内皮細胞から分泌される。我々はラット腎への体外衝撃波照射後の ET-1 の血中動態を測定し, 腎機能および血圧に対する影響を検討した。

(対象と方法) 対象は雌 Wistar ラット (WKY) および高血圧自然発症ラット (SHR) で、両腎に衝撃波を500発照射した。血中 ET-1濃度は sandwich enzyme immunoassay (EIA) 法により特異的に検出し、照射前、照射直後より30分毎に2時間、12時間後、24時間後の各時点で測定し、コントロール群と比較検討した。ラットの平均動脈圧 (MAP)、糸球体濾過量 (GFR) および腎血漿流量 (RPF) は照射後2時間まで同様に測定し、抗 ET-1抗体を投与した場合も WKY と SHR で検討した。

(結果) 血中 ET-1は WKY と SHR の両群で照射後に前値およびコントロール群と比較して有意に上昇した ($p < 0.05$)。SHR において、GFR は照射後60分値で一過性の低下を認め、RPF の著しい低下と腎血管抵抗 (RVR) の上昇を30分値から120分値まで認めた。これらの変化は抗 ET-1抗体を投与した場合に抑制され、GFR と RPF は逆に60分値から120分値で上昇した。WKY では照射後に一過性の RPF の低下および RVR の上昇を認め、これらも抗 ET-1抗体を投与した場合に抑制された。MAP は SHR において、照射後30分値で軽度上昇したが、WKY では変化を認めなかった。

(結論) 以上の結果より、衝撃波照射後に ET-1濃度は上昇し、ラットの腎機能に影響を及ぼしていると考えられ、特に SHR においては ET-1に対する感受性が高まっていると考えられた。

キーワード：体外衝撃波、エンドセリン、腎機能

緒 言

体外衝撃波結石破砕術 (extracorporeal shock wave lithotripsy: 以下 ESWL) は1980年より Chaussy ら¹⁾により臨床応用が開始され、現在は尿路結石治療の第一選択となっている。衝撃波(以下 SW)による腎組織障害や腎機能低下については、動物実験での腎組織所見や、臨床における腎シンチでの血流低下やエコー、CT、MRI 所見での腎損傷がすでに報告されており^{2)~4)}、長期的には高血圧発症との関係が問題となっている⁵⁾。

エンドセリン(以下 ET)は1988年に Yanagisawa らにより豚血管内皮細胞より分離同定された、21個のアミノ酸よりなる強力な血管収縮作用のあるペプチドであり⁶⁾、ET にはアイソペプチドである ET-1、ET-2、ET-3が判明している⁷⁾。特に ET-1は全身血圧の上昇がみられない少量で腎血管収縮作用を発揮し、腎血管抵抗の増減により糸球体濾過量に変化を及ぼすと考えられている⁸⁾。

本研究の目的は腎に対する SW 照射後の早期における一過性の腎機能低下や血圧変動に ET-1が関与するか否かを動物実験で証明することである。又、in vitro の実験において ET は正常血圧ラットより高血圧ラットの単離血管に対して、より強く持続的な血管収縮作用を認めている⁹⁾。臨床的にも ESWL 後の腎機能低下や血圧上昇が正常血圧患者より高血圧患者で強く発現していると考え、正常血圧ラットと高血圧ラットで比較検討した。さらに抗 ET-1抗体の投与による効果についても検討した。

対象と方法

対象に10~12週齢の雌 Wistar ラット (以下 WKY) および高血圧自然発症ラット (以下 SHR)を使用した。チオブタバルビタールナトリウム液 (Inactin, 80 mg/kg) で腹腔内麻酔後に両側大腿静脈、右大腿動脈、膀胱にカテーテル (SP31, 夏目製作所) を挿入し、0.6% イヌリン (関東化学) と0.1%パラアミノ馬尿酸 (和光純薬) を含む生理食塩水を経静脈的に20ml/kg/hr で持続注入した。平均動脈圧 (以下 MAP) は右大腿動脈に挿入したカテーテルからトランスデューサー (P23 XL) を介して血圧測定用アンプ (AP-641G, 日本光電) に接続し、30分毎に1分間レコーダーに記録し、その平均を算出した。衝撃波発生装置は米国 Dasonics 社製の THERASONIC を用い、特別に架台を作成した。ラット側腹部の体毛を剃毛し、ラット腎を体表より確認して鉄製の直径5mmのリングを付着させ、X線と

Fig. 1 Protocol to renal function study following extracorporeal shock waves (SW) in rats

Fig. 2 Plasma ET-1 levels before and after shock wave exposure in WKY, compared with the control group

超音波で焦点をラット腎に合わせた後にリングを除去し、SWを両腎に出力98%で500発照射した。

血清および尿中イヌリンはアンスロン法により測定し、パラアミノ馬尿酸は1-β-ジエチルアミノエチル-α-ナフチルアミン酢酸による比色法で測定した。血中ET-1濃度は固相抗体に抗ET-1・N端部モノクローナル抗体、標識抗体に抗ET-1・C端部モノクローナル抗体を用いた sandwich enzyme immunoassay 法(EIA, エンドセリン-1測定用キット, 和光純薬)により特異的に検出した。重量交差反応率はET-3およびbigET-1で0.1%以下であった。麻酔後60分の安定時間をおいてWKYとSHRで実験を開始した。

プロトコル1は照射前30分、照射後より30分毎で2時間の各時点においてMAP、血中ET-1、イヌリンクリアランス(以下GFR)、パラアミノ馬尿酸クリアランス(以下RPF)、尿量(UV)、尿中ナトリウム(UNA)、尿中N-acetyl-D-glucosaminidase(NAG)、β2microglobulin(BMG)を測定し、腎血管抵抗(RVR)はMAP

(1-ヘマトクリット)/RPFで計算した。血中ET-1は12時間後、24時間後にも測定し、SWを照射しないcontrol群と比較検討した。

プロトコル2では照射後より、抗ET-1抗体(AUSTRAL Biologicals社製)を10μl/kg/hrで1時間投与して、プロトコル1と同様に測定した(Fig. 1)。また抗ET-1抗体はSWを照射していないWKY(n=3)とSHR(n=4)にも投与し、投与前後で腎機能や血圧に変動を認めなかった。

ラット腎は照射後24時間後に摘出し、光学顕微鏡で腎髄質から皮質に及ぶ細動静脈の破綻出血、尿細管上皮の変性などを認め、SWの正確な照射を確認した。

結果はmean±SDで示し、統計解析はStudent's t testを用いて行い、p<0.05以下をもって有意とした。

結 果

1) SW照射後のエンドセリンの血中動態WKY(n=6)において血中ET-1濃度はSW照射後90分、120分値でSW衝射前値(basic values)およびcontrol群

Fig. 3 Plasma ET-1 levels before and after shock wave exposure in SHR, compared with the control group

Fig. 4 Changes of glomerular filtration rate (GFR) after shock wave exposure in rats. Protocol 2 was studied before and during administration of ET-1 specific antibodies.

(n=5)と比較して有意に上昇した(前 1.23 ± 0.26 pg/ml, 90分 2.22 ± 0.36 pg/ml, 120分 2.0 ± 0.31 pg/ml, $p < 0.05$) (Fig. 2). SHR (n=7)においてもSW照射後30分, 60分, 90分値で前値およびcontrol群(n=5)と比較して有意に上昇した(前 1.35 ± 0.37 pg/ml, 30分 2.15 ± 0.68 pg/ml, 60分 2.03 ± 0.95 pg/ml, 90分 2.35 ± 0.77 pg/ml, $p < 0.05$). WKYおよびSHRのいずれの群も12時間, 24時間間値では有意差を認めなかった (Fig. 3).

2) 腎機能 (GFR, RPF, RVR) および血圧 (MAP)

への影響

GFRはSHR (n=6)においてSW照射後60分値で前値と比較して有意に低下した(前 1.90 ± 0.31 ml/min, 60分 1.47 ± 0.39 ml/min, $p < 0.05$). 抗ET-1抗体をSHR (n=7)に投与した場合はGFRの低下は抑制され, 逆に60分, 90分値で有意に上昇した(前 1.89 ± 0.45 ml/min, 60分 2.68 ± 0.51 ml/min, 90分 2.53 ± 0.44 ml/min, $p < 0.05$). WKYではGFRに有意な変化を認めなかった (Fig. 4).

RPFはWKY (n=5)においてSW照射後30分値で

Fig. 5 Changes of renal plasma flow (RPF) after shock wave exposure in rats. Protocol 2 was studied before and during administration of ET-1 specific antibodies.

Fig. 6 Changes of mean arterial pressure (MAP) after shock wave exposure in rats. Protocol 2 was studied before and during administration of ET-1 specific antibodies.

プロトコール(1)

プロトコール(2)

低下し (前 7.34 ± 0.91 ml/min, 30分 6.12 ± 1.27 ml/min, $p < 0.05$), SHR (n=6) では30分から120分値まで有意に低下した (前 6.72 ± 1.03 ml/min, 30分 5.26 ± 1.45 ml/min, 60分 4.66 ± 1.55 ml/min, 90分 5.04 ± 1.56 ml/min, 120分 4.38 ± 0.69 ml/min, $p < 0.01$). 抗 ET-1抗体をそれぞれ投与した場合は RPF の低下は抑制され, SHR (n=6) では逆に60分, 90分値で有意に上昇した (前 6.6 ± 1.34 ml/min, 90分 7.67 ± 1.7 ml/min, 120分 7.87 ± 1.53 ml/min, $p < 0.05$) (Fig. 5).

MAP は SHR (n=6) において SW 照射後30分値で

上昇した (前 162.8 ± 13.7 mmHg, 30分 181.6 ± 17.6 mmHg, $p < 0.05$), 抗 ET-1抗体を投与した場合は SHR (n=6) において30分値で低下した (前 169 ± 18.8 mmHg, 30分 148.6 ± 17.1 mmHg, $p < 0.05$). WKY においてはどちらの場合も有意な変化を認めなかった (Fig. 6).

RVR は WKY (n=5) において SW 照射後30分値で上昇を認め (前 9.76 ± 2.46 mmHg/ml/min, 30分 12.1 ± 3.44 mmHg/ml/min, $p < 0.05$), SHR (n=6) においては30分から120分値まで有意な上昇を認めた

Fig. 7 Changes of renal vascular resistance (RVR) after shock wave exposure in rats. Protocol 2 was studied before and during administration of ET-1 specific antibodies.

プロトコール(1)

プロトコール(2)

Fig. 8 Change in urine volume (UV) and urinary sodium (UNa) after shock wave exposure in rats

Table 1 Change in urinary NAG and BMG concentration after shock wave exposure in rats

	WKY		SHR	
	NAG (U/l)	BMG (μg/ml)	NAG (U/l)	BMG (μg/ml)
ES 前	9.9±2.2	96.2±6.0	9.5±3.6	101.6±13.9
60分後	9.1±1.3	95.8±15.4	9.8±2.0	112.8±16.0#
120分後	11.2±2.5#	120.8±10.1*	11.6±3.3#	125.2±11.7*
	N=6	N=5	N=6	N=6
			# p<0.05	* p<0.01

(前 14.1 ± 3.23 mmHg/ml/min, 30分 20.5 ± 4.81 mmHg/ml/min, 60分 22.7 ± 4.45 mmHg/ml/min, 90分 19.9 ± 4.47 mmHg/ml/min, 120分 23.1 ± 4.81 mmHg/ml/min, $p < 0.05$). 抗 ET-1 抗体を投与した場合は WKY および SHR で RVR の有意な上昇は認められなかった (Fig. 7).

3) 尿量 (UV), 尿中ナトリウム (UNA) および尿中 NAG, BMG 濃度の変動

SW 照射後に UV は WKY と SHR の両群において 60分から120分値まで増加し, UNA も30分から120分値まで有意に増加した ($p < 0.05$). 抗 ET-1 抗体を投与した場合はほぼ同様で UV は WKY で60分から120分値まで, SHR で30分から120分値まで有意に増加し, UNA は WKY および SHR とともに90分, 120分値で増加した ($p < 0.05$) (Fig. 8).

尿中 NAG, BMG 濃度は WKY と SHR の両群において120分値で有意に上昇した (Table 1).

考 察

体外衝撃波による腎組織に及ぼす影響は CT, MRI での被膜下血腫や皮髄境界の消失³⁾⁴⁾, 動物実験での摘出腎標本における間質性出血, 尿細管障害, 細動静脈の破綻などが既に報告されており²⁾¹⁰⁾, 臨床的にも殆どの患者で治療後に血尿を認める. SW による腎組織障害は Brauner らによると cavitation bubble の関与が最も可能性が高いと述べており, cavitation bubble が流れを作って細胞を障害すると述べているがいまだ不明である¹¹⁾¹²⁾.

今回, 我々は SW 照射による腎組織障害で強力な血管収縮作用のある ET-1 が局所で合成分泌されて, 腎機能低下や長期的には血圧上昇に主要な役割を果たしているのではないかと推測し, ラットで実験を行った. ESWL 後の血中 ET 濃度の変動や血圧との関係についての報告は殆どなく, 特に ET-1 を特異的測定し, 抗 ET-1 抗体の投与による効果を実験したものはない. 最

近の臨床的知見でET-1は腎疾患において病態生理学的に主要な役割を果たしていると考えられており、急性腎不全でのエピソードに一致したET-1の上昇や¹³⁾、糖尿病性腎症でのET-1のメサンギウム細胞への増殖刺激などが推測されている⁸⁾。

ラット腎へのSW照射後早期にWKYとSHRの両群でcontrol群と比較して血中ET-1の一時的な上昇を認めたが、このET-1発生機序のひとつとして腎組織内の微小出血が考えられる。血管内皮からのET-1の放出因子としては血小板由来因子（トロンビン、transforming growth factor (TGF)- β ）、体液性因子（アンジオテンシン、バゾプレッシン）、サイトカイン、物理的因子（shear stress）などが報告されている⁶⁾¹⁴⁾¹⁵⁾。培養内皮細胞を使ったET-1前駆体のmRNAレベルの変化をノーザン解析により検索した結果でもトロンビン、TGF- β といった血小板由来の活性物質によりET-1 mRNAの発現が著明に増加することが発見されており⁶⁾¹⁴⁾SWによる腎組織内の微小出血により、これらの物質が活性化したことが考えられる。さらにET receptorの局在はラット腎におけるin vitro autoradiographyにより、糸球体や髄質内層および髄質外尿の直細血管束に密に存在していることが証明されており¹⁶⁾、これらの受容体に内皮細胞より放出されたET-1が作用し、強力な血管収縮作用を発現した可能性がある。

SHRでは照射後にGFRは60分値での一時的な低下を認めたが、RPFの低下とRVRの上昇は著しく持続的に認め、これらは抗ET-1抗体を投与した場合に抑制された。WKYでは照射後のGFRに変化を認めず、30分値での一時的なRPFの低下とRVRの上昇を認めたが、これも抗ET-1抗体を投与した場合に抑制された。これらの結果より、特にSHRでET-1の腎機能に対する作用が強く発現しており、ET-1に対する感受性が高くなっていると考えられる。これはin vitroでWKYよりSHRの単離血管がETに対して強い反応性を認めた報告と一致する⁹⁾。SHRで抗ET-1抗体の投与により、SW照射前値よりも照射後にGFRとRPFがむしろ上昇し、MAPが低下したのは抗ET-1抗体がSW照射により腎の局所で生じたET-1を抑制しただけでなく、SHRが本来もつ内因性のETも何らかの機序で抑制した可能性がある。

ET-1の腎血行動態に対する作用は高濃度で糸球体における輸出入細動脈の収縮により、RPFやGFRを減少させる事が報告されているが⁸⁾、照射後にWKY

とSHRにおいてGFRの減少があまり認められなかったのは上昇したET-1が低濃度であったことが考えられる。これはET-1は糸球体における輸出細動脈を輸入細動脈より相対的に強く収縮させる作用があり⁸⁾、糸球体濾過圧の上昇によりRPFが低下しても、GFRが保たれた為と考えられる。

MFPはSHRで照射後の30分値で一時的な上昇を認めただけで、抗ET-1抗体を投与した場合には逆に30分値で低下した。WKYではMAPはいずれの場合も有意な変化を認めなかった。このように血中ET-1の上昇を認めたのにもかかわらずMAPがそれほど変化しなかった。これはETの作用として、心房性ナトリウム利尿ペプチド、内皮由来血管弛緩因子(EDRF)、プロスタサイクリンなどの血管拡張物質の分泌促進や¹⁷⁾¹⁸⁾、レニン分泌抑制の作用が報告されており¹⁹⁾、単なる昇圧作用だけではなく体液調節因子として複雑に作用している為と考えられる。

ET-1はin vitroの実験でラットの髄質内層集合管由来の浮遊細胞において、細胞内のプロスタグランジンE₂レベルを増加させることにより、Na⁺/K⁺-ATPase活性を抑制し、Na再吸収を抑制することが報告されている²⁰⁾。これがGFRを減少させない低濃度のET-1による尿量、Na排泄増加のメカニズムと考えられている。今回の実験においても、照射後にWKYとSHRの両群において尿量、尿中Na排泄量の増加を認め、ET-1による作用が推測されたが、正確な腎機能の測定を行う為に輸液により体液量および尿量を保持した影響も否定できない。照射後120分でWKYとSHRの両群において尿中NAG、BMG濃度が上昇が認められ、衝撃波による近位尿細管障害によるものと考えられるが、これにET-1がどのような関与しているかは今後検討が必要と思われる。

SW照射による腎機能低下に関するこれまでの報告では出血巣や間質の浮腫による尿細管の物理的圧迫や組織損傷が主因と考えられていた²⁾¹⁰⁾。今回の実験で、組織障害後の早期にET-1が強く腎機能に作用していると考えられ、これは抗ET-1抗体の投与で抑制されたことから証明できた。臨床のESWLにおいて、ヒト腎はラット腎の百数十倍以上で、初めから腎実質に衝撃波の焦点を合わせることはなく、実際の腎機能への影響はもっと軽微なものと考えられるが、特にSHRで強く作用した事から、高血圧要因のある患者に対するESWL後の腎機能低下や高血圧悪化には十分な注意を払う必要があり、体液調節ホルモンとしてのET-

1の作用を考えると正常血圧患者においても,長期的に繰り返される ESWL によって ET-1が腎機能低下や血圧上昇の増悪因子として作用している可能性がある。

結 語

ラットの両腎に衝撃波を照射して,照射前後の血中 ET-1動態および腎機能に対する影響を WKY と SHR で比較検討した。

1) 血中 ET-1は照射後に WKY と SHR の両群で有意に上昇した。

2) WKY と SHR で照射後に一過性の腎機能低下を認め,特に SHR で強く認められた。

3) これらは抗 ET-1抗体を投与した場合に抑制された。

以上の結果より,衝撃波照射後の腎機能低下に ET-1が作用したと考えられた。

稿を終えるに臨み,ご指導と御校閲を賜りました恩師小柴 健教授に厚く感謝の意を表します。

文 献

- 1) Chaussy, C.H., Brendel, W. and Schmiedt, E.: Extracorporeally induced destruction of kidney stones by shock waves. *Lancet*, 2, 1265—1268, 1980.
- 2) Abrahams, C., Lipson, S. and Ross, L.: Pathologic changes in the kidneys and other organs of dogs undergoing extracorporeal shock wave lithotripsy with a tubless lithotripter. *J. Urol.*, 140, 391—394, 1988.
- 3) Rubin, J.I., Arger, R.H., Pollack, H.M., Banner, M.P., Coleman, B.G., Mintz, M.C. and VanAr dalen, K.N.: Kidney changes after extracorporeal shock wave lithotripsy: CT evaluation. *Radiol.*, 162, 21—24, 1987.
- 4) Knapp, P.M. and Scott, J.W.: Magnetic resonance imaging following extracorporeal shock wave lithotripsy. *J. Urol.*, 137, 287A, 1987.
- 5) Lingeman, J.E. and Kulb, T.B.: Hypertension following extracorporeal shock wave lithotripsy. *J. Urol.*, 137, 142A, 1987.
- 6) Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Tomobe, Y., Kobayashi, M., Mitsui, Y., Yazaki, Y., Goto, K. and Masaki, T.: A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*, 332, 411—415, 1989.
- 7) Inoue, A., Yanagisawa, M., Kimura, S., Kasuya, Y., Miyauchi, T., Goto, K. and Masaki, T.: The human endothelin family: Three structurally and pharmacologically distinct isoforms predicted by three separate genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 86, 2863—2867, 1989.
- 8) Badr, K., Murray, J.J., Breyer, M.D., Takahashi, K., Inagami, T. and Harris, R.C.: Mesangial cell, glomerular and renal vascular responses to endothelin in the rat kidney. *J. Clin. Invest.*, 83, 336—342, 1989.
- 9) Clozel, M.: Endothelin sensitivity and receptor binding in the aorta of spontaneously hypertensive rats. *J. Hypertens.*, 7, 913—917, 1989.
- 10) Jaeger, P., Redha, F., Ulschmid, G. and Hauri, D.: Morphological changes in canine kidneys following extracorporeal shock wave treatment. *Urol. Res.*, 16, 161—166, 1988.
- 11) Brauner, T., Brummer, F. and Hulser, D.F.: Histopathology of shock wave treated tumor cell suspensions and multicell tumor spheroids. *Ultrasound Med. Biol.*, 15, 451—460, 1989.
- 12) Fisher, N., Muller, H.M., Gulhan, A., Sohn, M., Deutz, F.-J., Rubben, H. and Lutze, W.: Cavitation effects: Possible cause of tissue injury during extracorporeal shock wave lithotripsy. *J. Endourology*, 2, 215—220, 1988.
- 13) Tomota K., Ujiie, K., Nakanishi, T., Tomura, S., Matsuda, O., Ando, K., Shichiri, M., Hirata, Y. and Marumo, F.: Plasma endothelin levels in patients with acute renal failure. *New Engl. J. Med.*, 321, 1127, 1989.
- 14) Kurihara, H., Yoshizumi, M., Sugiyama, T., Takaku, F., Yanagisawa, M., Masaki, T., Hamaoki, M., Kato, H. and Yazaki, Y.: Transforming growth factor- β stimulates the expression of endothelin mRNA by vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 159, 1435—1440, 1989.
- 15) Emori, T., Hirata, Y., Ohta, K., Shichiri, M. and Marmo, F.: Secretory mechanism of immunoreactive endothelin in cultured bovine endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 160, 93—100, 1989.
- 16) Kohzuki, M., Johnston, C.I., Chai, S.Y., Casley, D.J. and Mendelsohn, F.A.O.: Localization of endothelin receptors in rat kidney. *Eur. J. Pharmacol.*, 160, 193—194, 1989.
- 17) Fukuda, Y., Hirata, Y., Yoshimi, H., Kojima, T., Kobayashi, Y., Yanagisawa, M. and Masaki, T.: Endothelin is a potent secretagogue for atrial natriuretic peptide in cultured rat atrial myocytes. *BAiochem. Biophys. Res. Commun.*, 155, 167—172, 1988.
- 18) DeNucci, G., Thomas, R., D'Orleans-Juste, P., Antunes, E., Walder, C., Warner, T.D. and Vane, J.R.: Pressor effects of circulating endothelin are limited by its removal in the pulmonary circulation and by the release of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 85, 9797—9800, 1988.
- 19) Rakugi, H., Nakamura, M., Saito, H., Higaki, J. and Ogihara, T.: Endothelin inhibits renin release from isolated rat glomeruli. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 155, 1244—1247, 1988.
- 20) King, A.J., Brenner, B.M. and Anderson, S.: Endothelin, a potent renal and systemic vasoconstrictor peptide. *Am. J. Physiol.*, 256, F1051—1058, 1989.

(1995年11月21日受付, 1996年3月19日受理)