2 腎型及び 1 腎型腎動脈狭窄性高血圧ラットにおける体液量分布

☆八 木 俊 一

群馬大学医学部第二内科学教室 (主任: 村田和彦教授)

(昭和61年10月15日受付, 10月27日採択)

序 文

腎臓は体液量の恒常性を調節するのに重要な役割をもっている。ラットに於ける 2 腎型および 1 腎型腎血管狭窄性高血圧モデルは腎血流量を減少させることによって作られ、その際に体液量の変化が起こっていると考えられる。これまで、このモデルにおける循環血漿量 (PV) あるいは細胞外液量 (ECF) を測定した研究では、2 腎型腎血管狭窄性高血圧モデルの体液量は変化しなかったとあるが^{1,2)}、Bianchi 等³⁾ は犬を用いた実験で、腎血管狭窄後、早期に循環血漿量が増加していたと報告している。一方、1 腎型腎血管狭窄性高血圧モデルについては、腎動脈狭窄後の初期には循環血漿量あるいは細胞外液量が増加しているとする報告が多いが^{1,4~7)}、経過の長い慢性期には、体液量が増加したとするもの^{8,9)} と、増加しなかったもの^{1,4,7)} とがあり一定の見解はない。このように実験的腎血管性高血圧では体液量の検討についての結果は一致していない。これまで 2 つのモデルで体液量を詳細に調べたものはなく、本研究では、2 腎型及び 1 腎型腎血管狭窄性高血圧モデルについて、体液量分布、すなわち、循環血漿量、細胞外液量、総体液量の変化を経時的に検討した。また、血圧、血漿レニン活性 (PRA) を測定し、これ等体液分布との関連を併せて追求した。

対象及び方法

雄の Wistar ラットをナトリウム 4.1mmol/100g、カリウム 9.3mmol/100g を含有する飼料で飼育し、飲水は自由にした。

実験 1 : 2 腎型腎動脈狭窄性高血圧モデル

体重 190~250g のラットを 2 群に分けた。18 匹はペントバルビタール麻酔下に左腎動脈に内径 0.25 mm の銀製クリップをかけた。さらに 18 匹は左腎動脈を露出するのみにとどめ、対照群とした。それぞ

れの群を 6 匹ずつの小グループに分け、施術後、1 日、7 日、28 日目にそれぞれ 6 匹の腎動脈狭窄ラット、6 匹の対照ラットを用いて体液量測定を行なった。実験前日に、ペントバルビタール麻酔下で、左総頸動脈にポリエチレンカテーテル (PE-50) を入れ、血圧測定並びに採血用とし、一方、左総頸静脈にポリエチレンカテーテル (PE-10) を入れ、放射性薬剤投与用にした。1 日目に実験したラットについては、カテーテル挿入は腎動脈狭窄手術と同時に進めた。

各実験日に、無麻酔にて以下の実験を行なった。平均血圧を Statham 圧トランスデューサーに接続したカテーテルを通して記録した後、0.6ml の血液を採り、血漿レニン活性 (PRA) 測定用とした。採血後、同量の血液を輸血して、体液補正を行った。循環血漿量測定は、¹³¹I-人血清アルブミン (第一ラジオアイソトープ社製) 10 μ Ci を静脈カテーテルより注入し、3 分間の平衡時間の後、循環血漿量測定用に動脈カテーテルより 0.6ml 採血した。同量の血液を補正のために輸血した後、エーテル麻酔下で両側の腎摘出術を行なった。麻酔から覚醒 30 分後に細胞外液量測定用として ³⁵S-硫酸ナトリウム (RCC Amersham) 200 μ Ci、総体液量測定用としてトリチウム水 (RCC Amersham) 100mCi を静脈カテーテルより注入した。60 分の平衡時間ののち、血液を 10 ml 採り、細胞外液量、総体液量測定用とした。体液量の測定は以前の報告にある方法に従った¹⁰⁾。測定値はすべて体重 100g 当たりで表示した。PRA 測定は市販のキット (CIS 社製) を用いて radioimmunoassay にて行なった。

実験 2 : 1 腎型腎動脈狭窄性高血圧モデル

体重 120~150g のラットを用いた。18 匹はペントバルビタール麻酔下で右腎摘出後、左腎動脈に内径 0.30mm の銀製クリップをかけた。同数のラットを

右腎摘出後，左腎動脈は露出するのみとし，対照群とした．実験は腎動脈狭窄後，1日，7日，28日目に行ない，それぞれ6匹の腎動脈狭窄ラット，6匹の対照ラットを用いた．実験前日に総頸動脈及び，総頸静脈へカテーテルを挿入し，血圧測定並びにPRA測定用の採血後，体液量測定を行なった．方法については，実験1と同様である．

統 計 処 理

各実験より得られた結果は，平均値±標準誤差で示し，2群間の有意差検定には Student's t-test を用いた．有意水準は5%とした．

結 果

実験1： 2腎型腎動脈狭窄性高血圧ラット及び対照群ラットの諸測定値を表1に示した．体重については，狭窄群と対照群との間に，いずれの実験日でも有意差はなかった．狭窄群の平均血圧は次第に上昇し，28日目に 153 ± 7 mmHg となり，対照群の 115 ± 8 mmHg と比較して有意に高値であった．PRA あるいはヘマトクリット値については，いずれの実験日においても狭窄群と対照群との間に有意差はなかった．1日目の実験結果で，循環血漿量が狭窄群で 4.3 ± 0.2 ml/100g，対照群で 5.0 ± 0.1 ml/100g と，狭窄群で有意に低下していた．7日目，28日目

については狭窄群と対照群との間には有意差は認められなかった．細胞外液量，総体液量は，いずれの実験日においても有意差は認められなかった．

実験2： 表2は1腎型腎動脈狭窄性高血圧ラット及び対照群の諸測定値を示したものである．この実験で用いたラットは実験1で用いたラットよりも1～2週齢若年である．体重については，狭窄群と対照群との間に，いずれの実験日群においても有意差は認められなかった．PRA 及びヘマトクリット値には，狭窄群と対照群との間には有意差は認められなかった．平均血圧は，7日目で狭窄群 140 ± 8 mmHg，対照群 113 ± 5 mmHg，28日目で狭窄群 196 ± 6 mmHg，対照群 128 ± 3 mmHg と有意に狭窄群で高値であった．

循環血漿量はいずれの実験日でも狭窄群と対照群との間に有意差はなかった．細胞外液量は1日目，7日目では狭窄群と対照群とでは有意差は認められなかった．28日目には狭窄群 30.0 ± 0.4 ml/100g，対照群 28.4 ± 0.5 ml/100g と有意に狭窄群で増加していた．総体液量は，いずれの実験日でも，狭窄群と対照群との間に有意差は認められなかった．

循環血漿量，細胞外液量，総体液量は，ラットの日齢が増し，体重が増加すると狭窄群，対照群を問わず減少する傾向がある．

表1 2腎型腎動脈狭窄ラット及び対照ラットの諸測定値

		体 重 (g)	Ht (%)	PRA (ng/ml/hr)	循環血漿量 (ml/100g)	細胞外液量 (ml/100g)	総 体 液 量 (ml/100g)	平均血圧 (mmHg)
1日目	対照群 n = 6	220±20	41±2	9.2±0.9	5.0±0.1	29.7±1.4	75.0±1.9	116±9
	狭窄群 n = 6	236±10	37±2	8.6±1.3	4.3±0.2*	29.2±1.2	69.3±3.8	130±4
7日目	対照群 n = 6	210±6	37±2	6.4±1.3	5.0±0.3	30.8±1.0	71.2±3.7	109±4
	狭窄群 n = 6	197±5	37±1	9.3±1.5	5.3±0.2	29.6±0.7	68.4±2.7	131±10
28日目	対照群 n = 6	324±16	44±1	6.7±0.9	4.7±0.2	26.7±0.8	68.7±1.7	115±8
	狭窄群 n = 6	317±14	41±2	6.2±1.2	4.6±0.2	26.3±2.0	66.0±3.2	153±7*

平均値±標準誤差

Ht：ヘマトクリット

PRA：血漿レニン活性

* P<0.05：対照群との比較

表2 1腎型腎動脈狭窄ラット及び対照ラットの諸測定値

		体 重 (g)	Ht (%)	PRA (ng/ml/hr)	循環血漿量 (ml/100g)	細胞外液量 (ml/100g)	総 体 液 量 (ml/100g)	平均 血 圧 (mmHg)
1日目	対照群 n = 6	130±6	32±1	10.1±1.8	5.1±0.1	33.5±1.3	73.3±0.6	114±2
	狭窄群 n = 6	134±5	31±1	10.2±1.6	5.3±0.1	35.8±2.7	76.4±3.4	112±2
7日目	対照群 n = 6	179±9	34±2	6.6±1.8	4.2±0.1	32.3±1.9	75.0±3.8	113±5
	狭窄群 n = 6	161±9	33±1	9.3±1.5	4.7±0.1	34.7±2.1	78.5±3.8	140±8*
28日目	対照群 n = 6	272±14	38±0	6.0±1.5	4.1±0.1	28.4±0.5	69.8±2.4	128±3
	狭窄群 n = 6	271±13	37±2	9.6±1.3	4.5±0.3	30.0±0.4*	71.3±0.6	196±6*

平均値±標準誤差

Ht:ヘマトクリット

PRA:血漿レニン活性

* P<0.05:対照群との比較

考 案

動物並びに人間の体液量について考える場合には、年齢、性、そして特に体重を考慮する必要がある。脂肪組織は水分含有量が少ないので、体重当たりで表示した体液量は、同一種の動物でも、より大きく成長した動物ほど、実際の値（非脂肪組織重量当たりで表示した値）より小さい。本実験の場合でも、狭窄群及び対照群の循環血漿量、細胞外液量、総体液量は、ラットの成長に伴って減少する傾向を示した。従って、狭窄群と対照群との体重をそろえることに十分な配慮をして、結果の検定は同じ実験日の狭窄群と対照群との間でのみ行った。いずれの実験においても、施術後同一日数のものは腎血管狭窄ラットと対照ラットの間には有意の体重差はなかった。このため、体液量の比較を行なっても問題はないと思われる。

一般に、2腎型腎動脈狭窄性高血圧モデルの高血圧発症あるいは高血圧維持には、レニン・アンギオテンシン系の関与があるとされている^{11,12)}。しかし狭窄群のPRAはいずれの実験日においてもほぼ正常範囲内であり、血圧の上昇も緩徐であった。このことは、クリップの大きさが比較的大きいことによるのかもしれない。すなわち、Leenen等によれば¹³⁾、2腎型腎動脈狭窄性高血圧ラットの作製にお

いて、クリップの内径が0.25mmの場合には、平均血圧の上昇、PRAの増加は、クリップの内径が0.20mmの場合に比較して少ないとされており、クリップの内径が0.20mmの群では、9日目のPRAは狭窄前値の200%であったのに対して、内径0.25mmの群では変化がなかった。本研究の結果のPRA値で判断する限り、今回の2腎型モデルの高血圧についてはレニン・アンギオテンシン系の関与はそれ程度重要ではないかも知れない。

2腎型モデルの体液量に関しては、1日目に循環血漿量だけが有意に減少していた。手術手技は注意深く行ない過剰な出血はなかったと考えられる。そのことは、著明な血圧低下やPRAの異常高値がなかったことから裏付けられる。実験が手術後24時間以内に行なわれたので、手術侵襲が残っていたことが循環血漿量の減少を引き起こしたとする考え方については、実験2すなわち1腎型モデルでの1日目の実験群の循環血漿量が減少していないことから否定できると思う。この2腎型モデルでは腎動脈狭窄後早期に体液量を測定した報告は数少ないが、Johnson等は、兎を用いた実験で、腎動脈狭窄後3日目には体液量およびその分布は異常を認めなかったと報告している²⁾。本研究では、実験は1日目に行なっており、Johnson等の実験よりも早期であることが、結果の相違となったのかもしれない。この推

定を裏付ける実験結果が2, 3ある。すなわち Galvez 等は, 腎動脈狭窄後に, 反対側の腎からの尿量が増加したと報告し¹⁴⁾, 又, DeForrest 等によれば, 腎動脈狭窄により当該腎の腎血流量, 糸球体濾過率, 水及びナトリウムの排泄は減少しているのに対して, 対側腎の機能は亢進しているという¹⁵⁾。これらの変化は腎動脈狭窄後, 非常に早期におこり, 慢性期には狭窄前の状態に戻る。従って, 1日目の循環血漿量の減少は, 健側腎の機能亢進によるものと思われる。

1腎型腎動脈狭窄性高血圧については, 体液量の変化が高血圧の成因に一部関与しているとされている^{16,17)}。腎動脈狭窄後早期に循環血漿量が増加し, 続いて細胞外液が増加し, それらの変化は慢性期も続くとの報告が多い⁴⁻⁷⁾。このモデルでの体液量と高血圧発症の関係は, Guyton 等の仮説によって説明されている¹⁸⁾。すなわち, まず腎動脈狭窄により体液貯留がおこり, 体液量の増加によって心拍出量が増加し, その後, 自動調節機構により総末梢血管抵抗が上昇することにより, 血圧が上昇, さらに利尿が生じて心拍出量は正常化する。本研究では, 1日目, 7日目, 28日目の狭窄群の細胞外液量が対照群よりも高かったが, 有意差が認められたのは28日目のみであった。体液量の増加が高血圧の発症, 維持に関与している可能性があるが, 細胞外液量が増加した時にはすでに血圧は上昇していたという点に注意しなければならない。当教室の田島等の DOCA-salt 高血圧についての研究によると, 正常ナトリウムで飼育したラットでは体液量の増加はなく, 高ナトリウム食を与えたものでは著明な増加を認めたが, 両者間に血圧の差はなかった。このことから, DOCA-salt 高血圧モデルの高血圧発症には, 体液量の増加は主たる役割をしていないと考えられる。したがって, 本研究の1腎型モデルにおける体液量の変化も同様に, 高血圧発症には直接関与していないと考えられる。また, PRA 値のみから判断すると, レニン・アンギオテンシン系は従来の報告と同様に高血圧の発症, 維持に関与していないものと考えられる。

以前より, レニン・アンギオテンシン系以外の体液性因子が, 1腎型モデルの高血圧発症の原因としてあげられている。Johnson 等は, 1腎型腎血管性家兎においてノルエピネフリンに対する昇圧反応を増強する体液性因子を報告した²⁰⁾。体液量増加に関連して, 高血圧の原因としての Na-K ATPase 阻

害因子, あるいは内因性ジギタリス様物質の関与が報告されているが^{21,22)} それらの因子と, 1腎型腎血管性高血圧における体液量の増加あるいは分布の変化との関係については更に研究が必要である。

結 論

2腎型および1腎型腎動脈狭窄性高血圧ラットにおける体液量(循環血漿量, 細胞外液量, 総体液量), 血漿レニン活性を経時的に測定した。その結果, 2腎型および1腎型腎動脈狭窄ラットの高血圧発症およびその維持機構に, 体液量の変化は直接関与せず, 又, 血漿レニン活性値からみる限り, レニン・アンギオテンシン系も重要な役割をしていないものと考えられる。

本論文の要旨は第24回腎臓病学会において発表した。

稿を終えるにあたり, 御指導ならびに御校閲を賜った村田和彦教授, 市川秀一講師, 御援助をいただいた, 酒巻哲夫博士, 田島義博博士, 木暮正美博士に深謝いたします。

文 献

- 1) Kurihara, H., Tanaka, T., Terasawa, F., Seki, M. and Ikeda, M.: Defference in changes of plasma volume in two types of Goldblatt hypertension in rabbits. *Tohoku J. Exp. Med.*, 118: 113 - 125, 1976.
- 2) Johnson, J.A., Kurz, K.D., Siripaisarnpipat, S., Zeigler, D.W. and Payne, C.G.: Fluid volumes and pressor responsiveness in two-kidney rabbits with renal artery stenosis. *Am. J. Physiol.*, 243: H779 - H787, 1982.
- 3) Bianchi, G., Baldoli, E., Lucca, R. and Barbin, P.: Pathogenesis of arterial hypertension after the constriction of the renal artery leaving the opposite kidney intact both in the anesthetized and conscious dog. *Clin. Sci.*, 42: 651 - 664, 1972.
- 4) Ledingham, J.M. and Cohen, R.D.: Changes in the extracellular fluid volume and cardiac output during the development of experimental renal hypertension. *Canad. Med. Ass. J.*, 90: 292 - 294, 1964.
- 5) Bianchi, G., Tenconi, L.T. and Lucca, R.:

- Effect in the conscious dog of constriction of the renal artery to a sole remaining kidney on hemodynamics, sodium balance, body fluid volumes, plasma renin concentration and pressor responsiveness to angiotensin. *Clin. Sci.*, 38 : 741 - 766, 1970.
- 6) Liard, J.F., Cowley, A.W. Jr., McCaa, R.E., McCaa, C.S. and Guyton, A.C. : Renin, aldosterone, body fluid volumes and the baroreceptor reflex in the development and reversal of Goldblatt hypertension in conscious dogs. *Circ. Res.*, 34 : 549 - 560, 1974.
 - 7) Trippodo, N.C., Walsh, G.M., Ferrone, R.A. and Dugan, R.C. : Fluid partition and cardiac output in volume-depleted Goldblatt hypertensive rats. *Am. J. Physiol.*, 237 (1) : H18 - H24, 1979.
 - 8) Lucas, J. and Floyer, M.A. : Changes in body fluid distribution and interstitial tissue compliance during the development and reversal of experimental renal hypertension in the rat. *Clin. Sci. Mol. Med.*, 47 : 1 - 11, 1974.
 - 9) Kurz, K.D., Johnson, J.A., Ichikawa, S., Fowler, W.L. Jr. and Payne, C.G. : Fluid volumes in one-kidney 30-day renal artery stenosis rabbits. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 168 : 311 - 318, 1981.
 - 10) Tajima, Y., Ichikawa, S., Sakamaki, T., Matsuo, H., Aizawa, F., Kogure, M., Yagi, S. and Murata, K. : Body fluid distribution in the maintenance of DOCA-salt hypertension in rats. *Am. J. Physiol.*, 244 : H695 - H700, 1983.
 - 11) Brunner, H.R., Kirshman, J.D., Sealy, J.E. and Laragh, J.H. : Hypertension of renal origin : Evidence for two different mechanisms. *Science*, 174 : 1344 - 1346, 1971.
 - 12) Gavras, H., Brunner, H.R., Thurston, H. and Laragh, J.H. : Reciprocation of renin dependency with sodium volume dependency in renal hypertension. *Science*, 188 : 1316 - 1317, 1975.
 - 13) Leenen, F.H.H., De Jong, W. and De Wied, D. : Renal venous and peripheral plasma renin activity in renal hypertension in the rat. *Am. J. Physiol.*, 225(6) : 1513-1518, 1973.
 - 14) Galvez, O.G., Roberts, B.W., Mishkind, M.H., Bay, W.H. and Ferris, T.F. : Studies of the mechanism of contralateral polyuria after renal artery stenosis. *J. Clin. Invest.*, 59 : 609 - 615, 1977.
 - 15) DeForrest, J.M., Davis, J.O., Freeman, R.H., Watkins, B.E. and Stephens, G.A. : Separate renal function studies in conscious dogs with renovascular hypertension. *Am. J. Physiol.*, 235(4) : F310 - F316, 1978.
 - 16) Bianchi, G., Fox, U., Pagetti, D., Caravaggi, A.M., Baer, P.G. and Baldoli, E. : Mechanisms involved in renal hypertension. *Kidney Internat.*, 8 : S165 - S173, 1975.
 - 17) Ledingham, J.M. : Mechanisms in renal hypertension. *Proc. R. Soc. Med.*, 64 : 117, 1971b.
 - 18) Guyton, A.C. and Coleman, T.G. : Quantitative analysis of the pathophysiology of hypertension. *Circ. Res.*, 24 (suppl 1) : I1 - I19, 1969.
 - 19) Michelakis, A.M., Mizukoshi, H., Huang, C., Murakami, K. and Inagaki, T. : Further studies on the existence of a sensitizing factor to pressor agents in hypertension. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 41 : 90-96, 1975.
 - 20) Johnson, J.A., Kurz, K.D., Siripaisarnpipat, S., Koivunen, D.G., Zeigler, D.W., Sakamaki, T. and Payne, C.G. : Humoral factor in pressor hyperresponsiveness in renal prehypertensive rabbits. *Hypertension*, 5 : 453 - 459, 1983.
 - 21) Clough, D.L., Pamnani, M.B., Overbeck, H.W. and Haddy, F.J. : Decreased Na, K-ATPase in right ventricular myocardium of rats with one-kidney Goldblatt hypertension (abstract). *Physiologist*, 20(4) : 18, 1977.
 - 22) Pamnani, M., Huot, S., Buggy, J., Clough, D. and Haddy, F.J. : Demonstration of a humoral inhibitor of the Na⁺-K⁺ pump in some models of experimental hypertension. *Hypertension*, 3 (suppl 2) : 96 - 101, 1981.

**BODY FLUID DISTRIBUTION IN TWO-KIDNEY,
ONE CLIP AND ONE-KIDNEY,
ONE CLIP HYPERTENSION IN RATS**

SHUNICHI YAGI

The Second Department of Internal Medicine,
Gunma University School of Medicine,
Maebashi 371, Japan (Director : Prof. Kazuhiko Murata)

The distribution of body fluid volumes was studied in two-kidney, one clip (2K1C) and one-kidney, one clip hypertension (1K1C) rats (following of nomenclature of American Heart Association). Plasma volume (PV), extracellular fluid volume (ECF) and total body water (TBW) were measured on days 1, 7 and 28 after renal artery stenosis. Body fluid volumes were determined with the isotope dilution method : (1) radioiodinated serum albumin for PV : (2) $^{35}\text{SO}_4$ for ECF : (3) tritiated water for TBW. Mean arterial pressure (MAP) and plasma renin activity (PRA) were also examined in relation to changes in the fluid distribution. Measurements were performed in conscious state.

The body fluid volumes in 2K1C rats did not differ from those in the sham controls on any experimental day except for a decrease in PV of the clipped rats on day 1. MAP in 2K1C rats increased significantly ($p < 0.05$) only on day 28. In 1K1C rats, a tendency of an increase in PV and ECF on early days was followed by a significant elevation in ECF on day 28 ($p < 0.05$). MAP in the clipped rats was higher than that in the controls on days 7 and 28.

In common with 2K1C or 1K1C, there were no significant differences in PRA between the clipped rats and the controls.

These results suggest that : (1) alterations of body fluid volumes may not be involved directly in the development and maintenance of hypertension in 1K1C rats and in 2K1C rats : (2) judging from PRA levels, the renin-angiotensin system may not play a significant role in 1K1C and 2K1C rats.