および年齢差について

東北大学医学部第二内科 工藤 啓◇ 阿部圭志 清野正英 保嶋 実
 佐藤牧人 尾股 健 丹野雅哉 上月正博 吉永 馨
 特定医療法人 遠山病院 千葉 知

概要 正常者69名(男28名, 女41名, 年齢18~93才)を対象として, 当教室で開発したラジオイムノアッセイ法で尿中thromboxane B₂排泄量を測定し, 性差および年齢差を検討, また壮年男子におけるseminal fluidの及ぼす影響についても検討を加えた。その結果, thromboxane B₂はprostaglandin E₂と異なりseminal fluidの影響を受けにくいことが明らかとなった。また性差では男性において女性と比較して有意に高く, 年齢差では, 高齢者でも排泄量は低下せず, 尿中creatinine排泄量で補正すると, むしろ加齢と共に産生増加が明らかとなった。これらの結果は, 最近注目されているthromboxane A₂の病態生理作用と考えあわせると, 興味深い結果と思われる。

〔日内会誌 75: 626~632, 1986〕

はじめに

Thromboxane A₂ (TXA₂) は強力な血管収縮作用と, 血小板凝集作用をもっている。このTXA₂は, 主に, 血小板で生合成され, 血液の凝固または血栓生成の調節に重要な働きを果している¹⁾。最近では, TXA₂が様々な組織で生合成されていることが報告され, ヒトの腎臓でも生合成されていることが明らかとなった²⁾。また, 生体におけるTXA₂の合成の増加は, 狭心症, 動脈硬化症といった心血管系疾患の発症, 増悪にならんかの病態生理作用を及ぼしていると考えられている³⁾。しかし, TXA₂は非常に不安定であり, 急速に, 生理活性のないthromboxane B₂ (TXB₂) に代謝されることから, 組織, 臓器におけるTXA₂の正確な生理的役割については, 不明なところが多い。1979年にCiabattoniらが, ヒト尿中に, immunoreactiveなTXB₂の存在を報告して以来, その病態生理的な研究が進んだ⁴⁾。さらに, 最近では, 腎臓機能障害で尿中TXB₂排泄量が増加していることが報告

され, TXA₂の腎臓における病態生理作用について注目されている。すでに, 正常者において腎機能および腎ホルモン系の代表的なrenin-angiotensin系の活動性が, 年齢と共に低下していることが報告されている⁵⁾。しかし, ヒト正常者における尿中TXB₂排泄量についての性差, 年齢差については, 詳しい報告はなかつた。そこで, 正常者, 男28名, 女41名, 年齢18才~93才までの24時間尿中TXB₂排泄量を測定し, 性差, 年齢差の及ぼす影響について検討した。

対象および方法

対象は, 高血圧症, 肝機能障害, 各種内分泌疾患を有さない正常者とし, 利尿薬, 降圧薬, 消炎鎮痛剤, ステロイド薬を投与されていない69名(男28名, 女41名, 年齢は18才から93才まで, 平均44.2±24.9才, mean±SD)とし, 特に行動, 食事に制限を加えず24時間尿を採取した。採取された尿サンプルは, 各種測定が行なわれるまで-20℃で冷凍貯蔵した。また, 壮年男子のseminal fluid

〔昭和60年8月5日受稿〕

The urinary excretion of thromboxane B₂ in normal human subjects: Sex and age differences.

Kei KUDO, Keishi ABE, Masahide SEINO, Minoru YASUJIMA, Makito SATO, Ken OMATA, Masaya TANNO, Masahiro KOUZUKI and Kaoru YOSHINAGA, The Second Department of Internal Medicine, Tohoku University School of Medicine. Satoru CHIBA, Touyama Hospital, Iwate

混入の尿中TXB₂排泄量への影響をみるため、男子7名(年齢18才~20才, 平均18.8±0.89) 女子5名(年齢28才~41才, 平均34.6±4.6)で、数日間連続的に24時間尿を採取した。これらの24時間尿採取には、適時、日本心臓財団より購入した採尿器も使用した。

尿中TXB₂排泄量の測定は、クロロホルムで抽出、ケイ酸カラムクロマトグラフィーで分離後、ラジオイムノアッセイ法(RIA法)で測定した。すなわち、尿サンプル3mlを1NHClでpH 3.0に酸性化し、12mlのクロロホルムで抽出。有機溶媒層を減圧乾固させ、残渣を1mlの溶媒(ベンゼン:酢酸エチル, 60:40, V/V)で溶かし、ケイ酸カラムクロマトグラフィーにかけ、TXB₂を4mlの溶媒(ベンゼン:酢酸エチル:メタノール, 60:40:20, V/V)で溶出させた。これをRIA法で測定した。標識ホルモン(B)と遊離ホルモン(F)の分離には、二抗体法を用いた。この測定系全体の回収率は60%, intraassay varianceは8.5%であった。また各プロスタノイドに対する交差反応性は、以下の通りである。TXB₂ 100%, 2,3-dinor TXB₂ 34%, PGD₂ 0.36%, PGF_{1α} 0.03%, PGE₁, PGE₂, PGA₁, PGB₂および6-keto-PGF_{1α}については、0.01%以下であった。

尿中のimmunoreactiveなTXB₂について、TXA₂の選択的合成阻害薬、OKY-046, 600mg/dを、実際に9名の高血圧者(男5名, 女4名, 平均年齢37.5±15.5才 mean±SD)に3日間投与し、投与前, 中, 後の24時間尿中TXB₂排泄量を測定し、検討してみた。結果は、Fig 1のように、OKY-046の投与3日間は、投与前, 後と比較して、有意に(投与前とは $p<0.01$ で、投与後とは $p<0.05$ で)尿中TXB₂排泄量は低下した。

尿中PGE₂排泄量は、酢酸エチル抽出、ケイ酸カラムクロマトグラフィーで分離後、RIA法で測定した。すなわち、尿サンプル1mlを1NHClでpH 3.0に酸性化し、8mlの酢酸エチルで抽出、有機溶媒層を減圧乾固させ、残渣を1mlの溶媒(トルエン:酢酸エチル, 60:40, V/V)で溶かし、ケイ酸カラムクロマトグラフィーにかけ、PGE₂を5ml

Fig 1. The administration of OKY-046 (600mg/d) in hypertensive subjects decreased the urinary excretion of TXB₂ (U-TXB₂) significantly.

の溶媒(トルエン:酢酸エチル:メタノール, 60:40:20, V/V)で溶出させた。これをRIA法で測定した。B-F分離は、デキストラン炭末法で行なった。PGE₂は水溶液中では不安定なため、尿採取後は、できるだけ迅速に回収、抽出分離測定を行なった。抗体の交差反応性は、以下の通りである。PGE₂ 100%, PGE₁ 10.7%, PGA₂ 0.3%, PGA₁ 0.04%, PGB₁, PGB₂およびTXB₂については0.01%以下であった。TXB₂スタンダード, TXB₂抗体, およびTXB₂トレーサーはNew England Nuclear社のキットを使用し、第二抗体および正常ウサギ血清は第一ラジオアイソトープ研究所より購入。PGE₂抗体は、Pasteur社より、PGE₂スタンダード, トレーサーはSigma社より購入した。

結果は、特にことわらない限り平均値±標準誤差(SE)で表示し、一部標準偏差(SD)も用いた統計的有意差検定では、t検定、分散分析を用いた。危険率(p)は、5%以下をもつて有意とした。

結 果

Fig 2は若年男子7名(年齢18~20才, 平均年齢18.8±0.89才, mean±SD)の尿中PGE₂およびTXB₂排泄量における連続的経日変動の結果である。このように、seminal fluidの尿への混入によって考えられるPGE₂のスパイク状の高値がみられる。しかし、このようなPGE₂の極端な高値のみ

Fig 2. Day to day fluctuation of urinary excretion of PGE₂ (U-PGE₂) and TXB₂ (U-TXB₂) in 7 cases of male subjects.

られる日においても尿中TXB₂排泄量の極端な高値はみられない。一方、Fig 3は若年女子5名(年齢28~41才, 平均年齢 34.6 ± 4.6 才, mean $\pm$ SD)の尿中PGE₂およびTXB₂排泄量であるが, 女性では, このようにPGE₂, TXB₂ともに経日変動は小さい。男性の場合に限り, 極端な経日変動があることから, 尿中PGE₂排泄量の経日変動には, seminal fluidの尿への混入が大きく関与していることが示唆され, また男子の場合, 1000ng/dを越える極端に高い尿中PGE₂排泄量値を除いた平均でも男性平均 243.2 ± 11.9 ng/d, 女性平均 156.4 ± 8.93 ng/dと有意に ($p < 0.05$) 男性が高値を示す。このことは, 極端な高値を示さない日においても, 尿中PGE₂排泄量は, 男性の場合seminal fluidの尿への混入の影響を受けていると考えられる。一方, 尿中TXB₂排泄量は, 男性で平均 137.5 ± 10.3 ng/d, 女性で平均 138.0 ± 10.5 ng/dと性差もなく, 経日変動でも, 男性女性とも250ng/d以内とあきらかに尿中PGE₂排泄量の動きとは異なり, 男性の場合で尿中PGE₂排泄量が著しく高値を示す日においても, 尿中TXB₂排泄量は, 高値をとらない。以上から, 尿中TXB₂排泄量はseminal fluidの影響を受けにくいと考えられる。

Fig 4は, 69名(男28名, 女41名, 年齢18~93才,

Fig 3. Day to day change of U-PGE₂ and U-TXB₂ in 5 cases of female subjects.

平均年齢 44.2 ± 24.9 , mean $\pm$ SD)の正常者群での男性, 女性別の尿中TXB₂排泄量の差をみたものであるが, 男性 124.5 ± 7.6 ng/d, 女性 90.2 ± 7.4

Fig 4. Urinary excretion of TXB₂ in male and female subjects.

Table 1. Urine volume (UV) and urinary excretion of sodium (U-Na), potassium (U-K) and creatinine (U-Cr) in male and female subjects.

*p<0.05

Sex	No.	Age years	UV ml/day	U-Na mEq/day	U-K mEq/day	U-Cr g/day
Male	28	43.3 ±4.4	1197 ±91.7	174.0 ±11.1	39.1 ±2.6	1.1 ±0.07
Female	41	44.9 ±4.0	1267 * ±93.5	205.3 ±12.2	40.1 ±2.0	0.97 ±0.03
Total	69	44.2 ±3.0	1239 ±66.6	192.6 ±8.7	39.6 ±2.0	1.0 ±0.02

ng/dと有意の差を示している ($p<0.01$). 年齢、尿中Na, K排泄量, クレアチニン排泄量には差はない. (Table 1)全体として, 尿中TXB₂排泄量および尿量には, 有意の相関は認められない.

次に, 年齢層別に尿中TXB₂排泄量をみるため, 20才未満, 20才から39才, 40才から59才, 60才から79才, 80才以上の5群に分けてみたが, 有意の差はなかった. しかし, 尿中クレアチニン排泄量は, 60才~79才, 80才以上の二つの群では, 他の群に比べて有意な低下がみられた (59才以下で尿中クレアチニン排泄量は, 1.11 ± 0.03 g/d, 60才~79才, 80才以上の2群では, それぞれ 0.71 ± 0.08 , 0.68 ± 0.18 と, とともに $p<0.001$ と有意に低下). そこで, 尿中TXB₂排泄量を尿中クレアチニン排泄量で補正を加えると (尿中クレアチニン排

Table 2. Urinary excretion of TXB₂ and creatinine and urinary TXB₂ corrected for urinary creatinine in five different age groups.

*p<0.001 p<0.001 as compared to the groups of less than 60 years. ns=not significant.

Age years	≤19	20~39	40~59	60~79	80≤
No.	18	16	11	17	7
U-TXB ₂ ng/day	109.7 ±7.1	109.6 ±11.6	108.8 ±13.5	94.0 ±16.1	94.1 ±15.7
U-Cr g/day	1.09 ±0.03	1.08 ±0.04	1.17 ±0.10	0.70 * ±0.08	0.68 * ±0.06
U-TXB ₂ ng/g Cr	100.6 ±6.9	102.1 ±11.4	99.5 ±15.2	144.4 n.s. ±21.1	134.2 n.s. ±17.6

Fig 5. Urinary excretion of TXB₂ corrected for urinary creatinine in five different age groups.

ns=not significant

泄量1gあたりに換算), 60才から79才および80才以上の群で尿中TXB₂排泄量は増加し (Table 2, Fig 5), 60才以上の群は, 59才以下の群より有意に排泄量が増加していた (141.4 ± 15.6 vs 100.9 ± 6.00 ng/g creatinine, $p<0.05$) (Fig 6, Table 3). また, 特に男性において, 尿中TXB₂排泄量の年齢による差は顕著な傾向を示した (60才以上 172.6 ± 23.3 ng/g creatinine, $p<0.05$).

尿中Kおよびクレアチニン排泄量は年長者で有意に減少するが, 尿量の有意な差異はなかった.

考 案

最近, TXA₂合成能の存在が, 腎皮質および, 髄質のマイクロソームおよびヒト腎単離糸球体で報告されている⁷⁾⁸⁾.

Ciabattioni, Patrono らは, 種々の cycloo-

Fig 6. Urinary TXB₂ corrected for urinary creatinine in the groups of 18~59 years and 60~93 years.

Table 3. Urinary volume (UV) and urinary excretion of sodium (U-Na), potassium (U-K) and creatinine (U-Cr) in the age groups of 18~59 years and 60~93 years.

M=male subjects, F=female subjects. * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$

Age years	No.		UV mL/day	U-Na mEq/day	U-K mEq/day	U-Cr g/day
	(M)	(F)				
18~59	19	26	1177 ± 75.9	202 ± 9.9	39.5 ± 2.0	1.11 ± 0.03
60~93	9	15	1355 ± 126	173 ± 16.2	28.5 * ± 2.8	0.70 ± 0.06 **

xygenase阻害薬を健康な女性に投与し、尿中TXB₂が、腎で生成されたTXA₂に由来することを示唆した⁸⁾。男性において尿中PGE₂排泄量は、seminal fluidの混入で影響を受けることが報告され⁹⁾、男性では、極端に高い値をとるが、そのようなPGE₂の極端に高い値の時でも、尿中TXB₂排泄量は、大きな変動を示さない。このことは、尿中TXB₂排泄量は、男性のseminal fluidの混入による影響を受けにくいと考えられる。

また、当教室での免疫学的方法による尿中TXB₂排泄量は、選択的なTXA₂合成阻害薬であるOKY-046で、顕著に低下し、また、正常者のCampbellらの報告値とも一致する¹⁰⁾。

最近、ある種の病態、特に腎機能障害において、

尿中TXB₂排泄量が増加することが、報告されている。しかし、年齢あるいは性差についての詳しい報告は、少ない。今回の検討で、男性において女性より尿中TXB₂排泄量が大きかったのは、正常者における尿中TXB₂排泄量の性差を示すものである。プロスタグランジンの性差については、多々報告されているが、estradiol, estrogenあるいはtestosteroneの影響によるとする報告がされている¹¹⁾¹²⁾。最近、TXA₂が動物実験において、動脈硬化症の成因に関与していることが示唆されている¹³⁾。アラキドン酸代謝系の性差が動脈硬化症の進展に深い関係をもつとされており、マウスの動物実験では、メスよりもオスにおいてアラキドン酸による血栓が非常におこりやすいと報告されている¹⁴⁾。ヒトにおいても、女性と比較して男性において、動脈硬化、心血管系の疾患の多いことから¹⁵⁾、動脈硬化の進展と関与すると考えられているTXA₂の安定代謝産物である尿中TXB₂排泄量が男性で女性よりも多いということは、非常に興味深い結果と考えられる。

今回の検討で24時間尿中TXB₂排泄量が年齢層で分けた五つの群において、有意の差がなかったことは、高年齢層においても（60才から93才）、TXA₂の腎での産生量が減少しなかったことを示している。このことは、すでに当教室で明らかにしているように、加齢と共に減少する血漿レニン活性、血漿アルドステロン濃度、尿中カリクレイン排泄量、尿中PGE排泄量と比較しても、特異な性質を尿中TXB₂排泄量は有していることがわかる¹⁶⁾。よく知られているように、加齢と共に腎臓における糸球体、尿細管機能は低下する。この加齢に伴う腎機能の低下は、機能をもつnephronの数の減少と考えられる⁵⁾。実際、今回の検討の結果でも、尿中Na, Kおよびクレアチニン排泄量は、年長者において減少した。特に、尿中クレアチニン排泄量は、高年齢になるにつれて、有意に減少した(Table 2)。そこで機能をもつ単位nephronあたりの尿中TXB₂排泄量を比較検討するため、尿中TXB₂排泄量を、尿中クレアチニン排泄量によって補正を加え、各年齢群の機能をもつnephronあ

たりの尿中TXB₂排泄量を比較した(Fig 5). この結果、クレアチニン補正尿中TXB₂排泄量は、60才以上の群で59才以下の群と比較して有意に多く、その上昇の度合は、特に男性において顕著だった。先に述べたように、当教室では尿中kallikrein排泄量および尿中PGE排泄量が60才以上の高令者では有意に減少していることを明らかにしており、この減少は尿中クレアチニン排泄量で補正しても確認されている。このように、単位nephronあたりの尿中TXB₂排泄量の加齢による変化は、腎血管拡張作用およびNa利尿作用を有すると考えられているPGE, kallikreinが加齢と共に減少するのに反し、加齢と共に増大することが明らかとなつた。すなわち、腎ホルモン系の主たる系であるrenin-angiotensin系も年長者で低下し、腎kallikrein-kinin系、PGEこれらすべての系が、加齢と共に減少するなかで、強力な血管収縮作用をもつTXA₂が加齢と共に増大することは特徴的なことと考えられる。

正常腎におけるTXA₂の生理作用は不明であるが、Morrisonら¹⁷⁾は、灌流腎の実験で、ウサギの水腎症において、腎血管抵抗の増大と共にTXA₂が大量に産生されることを報告している。また、腎移植拒否反応者、活動期のSLE、肝腎症候群においても尿中TXB₂排泄量が増大するとされている。このように、水腎症、腎移植拒否反応者、活動期のSLE、重篤な肝疾患に伴い糸球体濾過率、腎血漿流量の低下を来す肝腎症候群といった腎血管抵抗の増加に伴う腎疾患の進展に、TXA₂は大きな病態生理作用を演じていることが示唆されている。さらに最近では、動物実験においてTXA₂の病態生理作用が明らかにされつつある。Currieらは選択的なTXA₂合成阻害薬であるOKY-1581により、ウサギ灌流腎の実験において、尿管結紮によつて生じた腎血流量減少が改善したことを示し、TXA₂と水腎症モデルでの腎血管抵抗増加作用を関連づけている¹⁸⁾。また、各種の急性腎不全モデルにおける腎血管収縮についても、腎TXA₂との関連が明らかにされつつある。Benabeらは、ウサギ灌流腎を用いて、グリセオールによつて生じ

た急性腎不全において、これら腎臓のmicrosomeのTXA₂合成が増大していることを示している¹⁹⁾。同じグリセオールによる急性腎不全モデルの実験ではSraerらもratの単離糸球体が、急性腎不全においてTXA₂の合成が増大していることを報告している²⁰⁾。このようにTXA₂の病態生理作用は、臨床および実験モデルにおいて、腎血管抵抗が増大し、腎血流量、糸球体濾過率が低下する疾患群と強く関連づけられて考えられている。加齢に伴い、腎血管拡張作用およびNa利尿作用を有すると考えられるkallikrein-kinin系およびPGE系が低下する中で、強力な血管収縮作用を有するTXA₂が、逆に加齢と共に増加することは、加齢と共に生じる高令者の腎機能低下を考える上で、TXA₂は、重要な病態生理作用因子と考えられる。

結 論

- 1) 尿中TXB₂排泄量はseminal fluidの影響を受けにくい。
- 2) 正常者において、尿中TXB₂排泄量には性差があり、男性において高い。
- 3) 尿中TXB₂排泄量を尿中クレアチニン排泄量で補正した単位nephronあたりの尿中TXB₂排泄量は、高令者で高く、高令者での相対的な腎TXA₂産生の亢進が示唆される。
- 4) 男性および高令者で尿中TXB₂排泄量の増加がみられたことは、動脈硬化等心血管系疾患、あるいは高令者の腎機能の機能的低下を考える上でTXA₂の重要性を示唆するものと考えられる。

本研究は厚生省昭和60年度循環器病研究委託費58-公-2、60-指-5 および財団法人代謝異常治療研究基金によつた。

謝辞 本研究に多大の御協力をいただいた古川市佐藤病院 佐藤重行先生、ならびにOKY 046の提供の御配慮をいただいた小野製薬に深謝いたします。

文 献

- 1) Moncada S and Vane JR: Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A₂, and prostacyclin. *Pharmacol Rev* 30: 293, 1979.
- 2) Neri Serneri GG, et al: TXA₂ production by human arteries and veins. *Prostaglandins* 25: 75, 1983.
- 3) Hirsh PD, et al: Prostaglandins and ischemic

- heart disease. *Amer J Med* 71: 1009, 1981.
- 4) Ciabattini G, et al: Characterization of the renal prostaglandin system. *Eur J Pharmacol* 60: 181, 1979.
 - 5) Davis DF and Shock NW: Age changes in glomerular filtration rate, effective renal plasma flow, and tubular excretory capacity in adult males. *J Clin Invest* 29: 496, 1950.
 - 6) Morrison A, et al: Thromboxane A₂ is the major arachidonic acid metabolite of human cortical hydronephrotic tissue. *Prostaglandins* 21: 471, 1981.
 - 7) Sraer J, et al: In vitro prostaglandin by human glomeruli and papillae. *Prostaglandins* 23: 855, 1982.
 - 8) Patrono C, et al: Evidence for a renal origin of urinary thromboxane B₂ in health and disease. B Samuelsson, et al, ed, *Advances in prostaglandin, thromboxane, and leukotriene research*, Vol. 11. Raven Press, New York, 1983, p493.
 - 9) Patrono C, et al: Evidence for an extra-renal origin of urinary prostaglandin E₂ in healthy men. *Prostaglandins* 18: 623, 1979.
 - 10) Campbell WB, et al: Urinary excretion of prostaglandin E₂, Prostaglandin F_{2α}, and thromboxane B₂ in normotensive and hypertensive subjects on varying sodium intakes. *Hypertension* 4: 735, 1982.
 - 11) Maggi FM, et al: Prostaglandin synthetase activity in vascular tissue of male and female rats. *Prostaglandins* 19: 985, 1980.
 - 12) Seillan C, et al: Differential effects of sex steroids on prostaglandin secretion by male and female cultured pigment endothelial cells. *Prostaglandins* 26: 3, 1983.
 - 13) Gryglewski RJ, et al: Prostacyclin and thromboxane A₂ biosynthesis capacities of heart, arteries and platelet at various stages of experimental atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis* 31: 385, 1978.
 - 14) Uzunova AM, et al: Arachidonate induced thrombosis in mice: Effect of gender or testosterone and estradiol administration. *Prostaglandins* 13: 995, 1977.
 - 15) Rissanen V, et al: Aortic and coronary atherosclerosis in the finnish population. A study of a series of violent deaths. *Atherosclerosis* 19: 221, 1974.
 - 16) 阿部圭志, 尾股 健: 老化と血圧関連ホルモン. *老年学会誌* 21: 95, 1984.
 - 17) Morrison AR, et al: Thromboxane A₂ biosynthesis in the ureter obstructed isolated perfused kidney of the rabbit. *J Pharmacol Exp Ther* 205: 1, 1978.
 - 18) Currie M, et al: The mechanism and site of the enhanced arachidonate metabolism in ureter obstruction. In Dunn MJ, Patrono C, Cinotti GA, ed, *Prostaglandins and the Kidney*. Plenum Press, New York, 1983, p299.
 - 19) Benabe JE, et al: Production of thromboxane A₂ by the kidney in glycerol-induced acute renal failure in the rabbit. *Prostaglandins* 19: 333, 1980.
 - 20) Sraer JD, et al: Prostaglandin synthesis by glomeruli isolated from rats with glycerol-induced acute renal failure. *Circ Res* 49: 775, 1981.