薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
101 (10) 945-950 (1981)

ラット腎髄質組織からの Prostaglandin E 遊離に対する Theophylline の作用

竹内久米司,* 向後博司, 相澤義雄

東京薬科大学第一薬理学教室

Effect of Theophylline on Prostaglandin E Release from Renal Medullary Tissue in Rat

KUMEJI TAKEUCHI,* HIROSHI KOGO and YOSHIO AIZAWA

Department of Pharmacology, Tokyo College of Pharmacy, 1432-1
Horinouchi, Hachioji, Tokyo 192-03, Japan

(Received February 14, 1981)

Effect of theophylline on intrarenal prostaglandin (PG) content and the PGE release from renal medulla was studied by using male Wistar rats. PG was assayed biologically by use of rat stomach fundus. The PGE content in the renal medulla increased 2 hours after oral administration of theophylline (50 mg/kg *p.o.*). The PGE release from renal medullary slices into Krebs-Ringer bicarbonate buffer was increased by the administration of theophylline both *in vivo* (50 mg/kg) and *in vitro* (10^{-5} M). The effect of theophylline *in vitro* on PGE release from renal medulla into the Krebs-Ringer bicarbonate buffer was completely inhibited by the addition of indomethacin (10^{-5} M) or aspirin (10^{-3} M). The urinary cyclic AMP excretion and urine volume were increased by the oral administration of theophylline. On the other hand, addition of dibutyl cyclic AMP (10^{-2} M) increased the PGE release from renal medullary tissue.

These results suggest that the increase of renal PGE induced by theophylline plays an important role in the mechanism of theophylline diuresis. Moreover, it is thought that intrarenal cyclic AMP may participate, at least in part, in the stimulation of PGE release from renal medullary tissue by theophylline.

Keywords—theophylline; kidney; prostaglandin E; indomethacin; aspirin; cyclic AMP

緒 言

近年, Frölich ら¹⁾ は尿中に prostaglandin E₂ (以下 PGE₂) が排泄されることを示し, 尿中 PGE₂ の排泄は腎内における PG 代謝を反映するものであることを示唆した. 後に Williams ら²⁾ は, 尿中の PGE は Henle ループに由来することを示した. 更に, これら尿中 PGE₂ の排泄がループ利尿剤により増加することが報告³⁻⁶⁾ され, ループ利尿剤の作用機序に腎内 PG 系が関与する可能性が示唆されている.

一方, methylxanthine 類は古くから, その多様な薬理作用の一つに利尿作用を有することが知られている. その利尿作用の機序としては従来から, 腎血流量増大による間接的作用と, 直接的な尿細管における Na 再吸収抑制作用が示唆⁷⁾ されているが, 十分な解明は未だなされていない. 最近, Oliw ら⁸⁾ は, ウサギにおいて theophylline で誘発される Na 利尿作用が, indomethacin の前投与により抑制されることを認め, theophylline の Na 利尿作用に PG が関与する可能性を示唆した. しかしながら腎性 PGE との直接関係についての報告はなされていない.

一方, PGE₂ の腎に対する作用として腎血流量増大^{9,10)} あるいは Na 排泄促進⁹⁾ などによる利尿作用が知られている.

著者らは, methylxanthine 類の腎に対する作用が, 腎における PGE₂ の作用と類似することに着目し, これら薬物の利尿機序と腎内 PGE との関係について, 尿中 PGE を測定することにより, 薬理的な検討を進め, theophylline の利尿作用発現に腎内 PGE が関与する可能性を強く示唆した.¹¹⁻¹³⁾

一方, theophylline は腎以外にも多様な薬理作用を有する薬物であることを考慮して, 今回はこの theophyl-

line の尿中 PGE 排泄増加機序解明の一つとして、摘出腎組織を用いて腎内 PG 動態に対して theophylline が如何なる作用を示すものかを検討したので報告する。

実 験 の 部

実験材料

実験動物は 7 週令の Wistar 系雄性ラットをラット用固型飼料（オリエンタル MF）と水とを自由に与えて飼育し、体重 240—280 g のラットを実験に供した。

薬物は theophylline（和光純薬）、aspirin（日本薬局方品）、indomethacin（住友化学）、adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate（以下 cAMP）（Boehringer Mannheim）、dibutyryl cyclic adenosine monophosphate（以下 dbcAMP）を用いた。なお prostaglandin E₂ は日本アップジョン社から提供されたものを用いた。その他の試薬は市販品を用いた。

実験方法

1. 腎髄質スライスからの PGE 遊離に対する Incubation 時間の検討 実験動物は断頭後、直ちに両側腎を摘出し氷冷した 0.9% NaCl 溶液中で洗浄した。氷冷下すばやく被膜を除去後、外科用メスにて縦断面に平行に 2 分した。更にそれぞれを厚さ約 0.5 mm の切片とし、皮質および髄質部を分離した。髄質部の約 200 mg（4 切片）を 2 ml の Krebs-Ringer bicarbonate buffer (KRB) の入った 25 ml のインキュベーションフラスコに移し、37°C で 95% O₂, 5% CO₂ 気流下で incubation を行った。

2. Theophylline 経口投与による腎内 PG 含量および腎スライスからの PG 遊離量の検討 実験動物は theophylline 投与前 3 時間より絶食させた。なお水は自由に摂取させた。Theophylline は 0.9% NaCl 溶液に懸濁させ、0.5 ml/250 g の割合で 50 mg/kg を経口投与した。なお対照群には同量の 0.9% NaCl 溶液を投与した。投与後 2 時間で断頭し直ちに両側腎を摘出し、1 と同様にして皮質部および髄質部を分離した。組織内 PG 含量の測定には皮質および髄質の各約 200 mg を用いた。又、髄質からの PGE 遊離実験では 1 と同様の条件下で 30 分間 incubation 行った。

なお incubation medium は 15 分で交換し、2 回の medium を合せて、PG 遊離量を測定した。

3. Theophylline 添加による腎髄質からの PG 遊離量の検討 無処置ラットを断頭後、直ちに両側腎を摘出し、1 に示した方法と同様に腎髄質摘出後、切片とし incubation を行った。各薬物はあらかじめ KRB に溶解させ、最終濃度 theophylline 10⁻⁵ M, aspirin 10⁻³ M, および indomethacin 10⁻⁵ M になるように incubation medium 中に添加した。なお他に cAMP および dbcAMP も同様に、10⁻² M で、incubation medium 中に添加し、PGE 遊離に対する作用を検討した。

4. Theophylline 投与後の尿中 cAMP の測定 実験動物は実験開始 3 日前より一匹ずつ代謝ケージ中で飼育した。Theophylline は、1 で示したと同様に経口投与し、投与後 5 時間の自然排泄尿を採取した。尿中 cAMP 含量は protein binding 法¹⁴⁾ を利用した cAMP 測定用 kit (Boehringer Mannheim) を用いて行った。

5. PG の抽出、分離および定量 腎組織からの PG 抽出は、腎組織を 3 倍容の塩酸酸性エタノール（エタノール：塩酸=200:1）にて homogenize し、以下は前報¹⁵⁾ に順じて PG を抽出した。又、incubation medium 中からの PG 抽出は先の報告^{16,17)} で示した方法で行った。すなわち incubation medium 4 ml を氷冷水浴中で 1 N HCl にて pH 3 に調整した後、エチルエーテル 15 ml で抽出した。次にエーテル層は 0.01 N HCl および水の 5 ml で各 2 回洗浄後、37°C、窒素気流下で蒸発乾燥した。蒸発乾燥後、抽出物中の PGE および PGF の分離は、シリカゲルカラムクロマトグラフィーで行った。^{16,18)}

PGE および PGF の定量はラット胃平滑筋を用いた生物学的測定法¹⁶⁾ により、標準品 PGE₂ および PGF_{2α} の収縮から定量した。

実 験 結 果

1. 腎髄質スライスからの PGE 遊離に対する Incubation 時間の検討

無処置正常ラットの腎髄質スライスから、KRB medium 中への PGE 遊離量の経時変化について Fig. 1 に示した。

腎髄質スライスからの PGE 遊離量は、incubation 開始 30 分までは直線性に増加することが認められた。従って、以下の PGE 遊離に関する *in vitro* の実験は、incubation 時間 30 分で行った。

2. 腎内 PGE および PGF 含量に対する Theophylline 投与の影響

Theophylline 投与後 2 時間で摘出した腎皮質および髄質の PGE ならびに PGF 含量を, Table I に示した. 腎髄質内 PGE 含量は対照値の 10.5 ± 1.01 ng/g tissue に比較して, theophylline 投与後 2 時間の髄質 PGE 含量は 20.1 ± 3.41 ng/g tissue と有意な増加を示した ($p < 0.05$). 一方, 皮質内にも少量ながら PGE の存在が認められたが theophylline による有意な変化は認められなかった. 一方, PGF 含量は髄質においては, PGE 含量に比較して低値であり, theophylline によっても変化は認められなかった. なお, 皮質内 PGF 含量は theophylline 投与で増加の傾向が認められたが, 有意な変化ではなかった.

3. 腎髄質からの PGE 遊離に対する Theophylline 投与の影響

Fig. 2 は腎髄質からの PGE の遊離に対する theophylline 投与後 2 時間の結果を示してある.

髄質からの PGE 遊離は theophylline 未投与 (対照) 群では 20.2 ± 2.28 ng/100 mg/30 min の値を示したが, theophylline 投与群では 30.7 ± 4.22 ng/100 mg/30 min と, theophylline の投与により, 腎髄質からの PGE 遊離は有意に増加した ($p < 0.05$).

Fig. 1. Time Course of PGE Release from Renal Medullary Tissue of Rats

Medullary slices were incubated at 37°C in Krebs-Ringer bicarbonate buffer. Each value represents the mean $\pm$ S.E. of 5 kidneys.

TABLE I. Effect of Theophylline on Renal PG Content in Rats

	PG content (ng/g tissue)			
	Medulla		Cortex	
	PGE	PGF	PGE	PGF
Control (n=6)	10.5 ± 1.01	4.0 ± 0.63	2.4 ± 0.37	1.0 ± 0.39
Theophylline (n=7)	$20.1 \pm 3.41^a)$	4.5 ± 1.11	4.6 ± 1.31	2.7 ± 0.86

Kidney was removed 2 h after administration of theophylline (50 mg/kg *p.o.*). Each value represents the mean $\pm$ S.E.

a) $p < 0.05$: significant difference from control.

TABLE II. Effect of Theophylline and/or Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs on PGE Release from Renal Medullary Tissue in Rats

	n	PGE release ng/100 mg/30 min
Control	9	24.9 ± 1.16
Theop.	9	$37.2 \pm 8.13^a)$
Indo.	9	$6.8 \pm 1.18^{b,c)}$
Theop. + Indo.	5	$9.2 \pm 1.76^{b,c)}$
Theop. + Asp.	5	$12.5 \pm 1.03^{b,c)}$

Theop.: theophylline 10^{-5} M, Indo.: indomethacin 10^{-5} M, Asp.: aspirin 10^{-3} M. Values of PGE release represent the mean $\pm$ S.E.

a) $p < 0.05$, b) $p < 0.001$: significant difference from control.

c) $p < 0.001$: significant difference from theophylline treated group.

Fig. 2. Effect of Theophylline on PGE Release from Renal Medullary Tissue in Rats

C: control, T: theophylline (60 mg/kg *p.o.*). Kidney was removed 2 h after administration of theophylline. Slices were incubated for 30 min at 37°C in Krebs-Ringer bicarbonate buffer. Each bar represents the mean $\pm$ S.E. of 18 kidneys.
a) $p < 0.05$: significant difference from control.

Fig. 3. Effect of Cyclic AMP and Dibutyryl Cyclic AMP on PGE Release from Renal Medullary Tissue in Rats

C: control, cAMP: cyclic AMP (10^{-2} M), dbc AMP: dibutyryl cyclic AMP (10^{-2} M). Slices were incubated for 30 min at 37°C in Krebs-Ringer bicarbonate buffer. Each bar represents the mean $\pm$ S.E. of 6 kidneys.
a) $p < 0.01$: significant difference from control.

TABLE III. Effect of Theophylline on Urinary Cyclic AMP Excretion in Rats

	Cyclic AMP excretion (nmol/5h)	Urine volume (ml/5 h)
Control	8.3 $\pm$ 1.82	1.1 $\pm$ 0.31
Theophylline	24.6 $\pm$ 6.16 ^{a)}	5.7 $\pm$ 1.04 ^{b)}

Urine sample was collected 5 h after theophylline (50 mg/kg *p.o.*) administration. Values of urinary cyclic AMP and urine volume represent the mean $\pm$ S.E. of 7 rats.
a) $p < 0.05$, b) $p < 0.001$: significant difference from control.

4. 腎髄質からの PGE 遊離に対する Theophylline *in Vitro* の効果と、これにおよぼす非ステロイド系抗炎症薬の作用

無処置ラットの腎髄質からの PGE 遊離に対する *in vitro* における theophylline の効果と、これに対する indomethacin および aspirin 添加の影響について Table II に示した。

Theophylline 10^{-5} M の添加により腎髄質からの PGE 遊離は対照群の 24.9 ± 1.16 ng/100 mg/30 min から、 37.2 ± 8.13 ng/100 mg/30 min と有意に増加した ($p < 0.05$)。一方, indomethacin 10^{-5} M の単独添加ではその遊離量は 6.8 ± 1.18 ng/100 mg/30 min と対照値より有意に減少した ($p < 0.001$)。次に theophylline および indomethacin の各 10^{-5} M を同時に添加すると, PGE の遊離は 9.2 ± 1.76 ng/100 mg/30 min と theophylline の PGE 遊離効果は完全に消失 ($p < 0.001$) したばかりでなく, 対照値と比較しても有意に減少した ($p < 0.001$)。又, theophylline 10^{-5} M と aspirin 10^{-3} M の同時添加によっても PGE 遊離は indomethacin で観察された結果とほぼ同様であった。

5. 尿中 cAMP 排泄に対する Theophylline の効果

Theophylline 投与後の cAMP 尿中排泄量の変化を Table III に示した。

対照群の尿中 cAMP の総排泄量は, 8.3 ± 1.82 nmol/5 h であったが, theophylline 投与群では 24.6 ± 6.16 nmol/5 h と約 3 倍の排泄増加が認められた ($p < 0.05$)。又, 同時に尿量の著明な増加が認められた ($p < 0.001$)。

6. 腎髄質からの PGE 遊離に対する cAMP の効果

Fig. 3 には無処置ラットの腎髄質切片からの PGE 遊離に対する cAMP の効果について示した。

対照群では 20.9 ± 1.8 ng/100 mg/30 min の遊離が認められた。これに対し cAMP の 10^{-2} M の添加群では 22.6 ± 4.70 と対照に比較して変化は認められなかった。一方, dbcAMP の 10^{-2} M 添加群では, 31.1 ± 2.53 ng/

100 mg/30 min と対照に比較して、有意な増加が認められた ($p < 0.01$).

考 察

著者らは先に methylxanthine 類のラット尿中 PGE 排泄増加作用は, theophylline で最も強く, 50 mg/kg の経口投与で最大効果を発現することを報告した.¹¹⁻¹³⁾ この中で著者らは, theophylline の投与後 2 時間で尿中 PGE 排泄増加のピークが, 尿量および電解質排泄のピークに先行して出現すること, 更にはこれら theophylline による尿中 PGE, 電解質排泄および尿量増加作用が, indomethacin の前投与により, 消失することを示した. これらの結果に基づき今回も, theophylline の 50 mg/kg 投与後 2 時間の腎内 PG 含量および PG 遊離について検討を行った.

腎髄質における主要な PG は PGE₂ であることが家兎において示されている^{19,20)} が, ラットにおいても腎内 PG 含量は髄質で高く, 特に PGE が PGF に比べて高いことを示した (Table I). 又, theophylline の投与により腎髄質内 PGE 含量のみが有意に増加した. Stahl ら²⁰⁾ は, 家兎の静脈内への生理食塩液の急性負荷によっても, 同様に腎髄質内 PGE₂ 含量のみが有意に増加することを報告している. PG の合成酵素である cyclooxygenase の腎内分布については, ラットでは集合管と乳頭部で, ウザギおよびモルモットでは集合管に存在することが示されている.²¹⁾ このように髄質内 PGE 産生のみが刺激される結果は, 髄質内 PGE が利尿に関与している可能性を示唆するものと考えられる.

次に theophylline 投与ラットの腎髄質からの PGE 遊離も対照に比較して有意に増加した (Fig. 2). Theophylline 投与ラットの腎髄質内 PGE 含量と, PGE 遊離量を腎組織重量あたりで比較すると, 遊離されてくる PGE 量は組織内含量に比べて明らかに高いことがわかった. この結果は, theophylline が腎髄質の PG 産生を促進することにより, PGE が遊離してきたことを示唆するものと考えられる. 更に無処置ラットの腎髄質からの PGE 遊離が, incubation medium 中に theophylline を添加することによっても有意に増加した. しかもこの増加は PG 生合成阻害効果を示す, indomethacin や aspirin によって完全に阻止された (Table II).

腎髄質からの PGE 遊離を増加させる因子として, bradykinin, angiotensin II, および arginine vasopressin などが良く知られている. これらの PGE 遊離促進機序として, 最近, phospholipase を活性化し, リン脂質からの PG の前駆物質である arachidonic acid の遊離を促進することが示されている.²²⁾ 又, 同様な結果は高張 medium でも報告されている.²³⁾ 今回の theophylline による腎髄質内 PGE 含量ならびに遊離促進機序の詳細については現在不明であるが, indomethacin あるいは aspirin 添加により theophylline の PGE 遊離促進効果が消失した結果から, arachidonic acid 遊離作用をも含めた, PGE 生成系に対する作用を介しているものと考えられる.

なお theophylline は phosphodiesterase の活性を抑制し, 組織内 cAMP 濃度を上昇させることが良く知られている. 従って今回の theophylline による腎性 PGE の増加機序における cAMP の動態を検索してみた. なお最近, 尿中 cAMP 量は生体内 cAMP レベルを知るための指標として用いられている.^{24,25)} 又, この尿中に排泄される cAMP の約 1/2 量は腎由来であることが知られている.²⁶⁾ そこでまず, theophylline 投与後の尿中 cAMP の変化を前報¹¹⁻¹³⁾ に準じて theophylline 投与後 5 時間尿で検討した. その結果 Table III に示すように, 尿中 cAMP の排泄は theophylline 投与で有意に増加することがわかった. この結果は腎内 cAMP レベルが theophylline で増加する可能性を示している. そこで, 腎内 cAMP の役割の一端を検索する目的で, 腎髄質からの PGE 遊離に cAMP が影響するか否かを検討した.

Fig. 3 に示すように腎髄質からの PGE 遊離は, cAMP では変化が認められなかったが 10^{-2} M の dbcAMP の添加で増加することが認められた. 最近, Oliw ら⁸⁾ はウサギで, indomethacin の前処理により theophylline の Na 利尿は抑制されるが, 尿中 cAMP 排泄は抑制されないことを示した. 今回, 著者らの結果は腎性 PGE の遊離に細胞内 cAMP が関与する可能性を示唆したが, cAMP が theophylline の利尿作用に直接関係するか否かは現在不明である.

一方, 腎内 cAMP レベルは抗利尿ホルモン (ADH) によっても増加することがラットにおいて示され,^{27,28)} これにより腎集合管での水の再吸収が亢進し抗利尿作用を発現することが報告されている.²⁹⁾ 又, ADH でも PGE の産生を刺激することがラットにおいて示されている.^{30,31)} 著者らも今回の腎スライスを用いた実験系で,

ラット腎髄質からの PGE の遊離が, arginine vasopressin により有意に増加することを観察している (未発表).
このような利尿に関する相反する結果は, 腎内の複雑な機構を示しているものと思われるが, その詳細については現在十分に解明されていない.

今回の結果および以前の報告から, theophylline の尿量および電解質排泄促進作用は, 腎内 PGE の上昇を介して発現することが示唆されると共に, この theophylline による腎髄質からの PGE 遊離の機序に, 髄質内 cAMP レベルの上昇が関与している可能性も推察された.

引用文献および注

- 1) J.C. Frölich, T.W. Wilson, B.J. Sweetman, M. Smigel, A.S. Nies, K. Carr, J.T. Watson, J.A. Oates, *Clin. Invest.*, **55** 763 (1975).
- 2) W.M. Williams, J.C. Frölich, A.S. Nies, J.A. Oates, *Kidney International*, **11**, 256 (1977).
- 3) K. Abe, M. Yasujima, S. Chiba, N. Irokawa, T. Ito, K. Yoshinaga, *Prostaglandins*, **14**, 513 (1977).
- 4) E. Oliw, E. Änggard, *Acta. Physiol. Scand.*, **105**, 367 (1979).
- 5) P.V. Patak, S.Z. Faden, S.G. Rosenblatt, M.D. Lifschitz, J.H. Stein, *Am. J. Physiol.*, **236**, F 494 (1979).
- 6) P.C. Weber, B. Scher, C. Larsson, *Eur. J. Pharmacol.*, **41**, 329 (1977).
- 7) J.H. Ludens, L.R. Willis, H.E. Williamson, *Arch. Int. Pharmacodyn.*, **185**, 274 (1970).
- 8) E. Oliw, E. Änggard, B.B. Fredholm, *Eur. J. Pharmacol.*, **43**, 9 (1977).
- 9) L.C.T. Chang, T.A. Splawinski, J.A. Oates, A.S. Nies, *Circ. Res.*, **36**, 204 (1975).
- 10) J. Tannenbaum, J.A. Splawinski, J.A. Oates, A.S. Nies, *Circ. Res.*, **36**, 197 (1975).
- 11) K. Takeuchi, H. Kogo, Y. Aizawa, *Japan. J. Pharmacol.*, **31**, 253 (1981).
- 12) 竹内久米司, 向後博司, 相澤義雄, *日薬理誌*, **77**, 427 (1981).
- 13) K. Takeuchi, M. Azuma, M. Ono, Y. Yoshida, K. Yamada, H. Kogo, Y. Aizawa, Abstracts of Papers, 53 th General Meeting of the Japanese Pharmacological Society, Gifu, March, 1980, p. 229.
- 14) A.G. Gilman, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **67**, 305 (1970).
- 15) 竹内久米司, 山田健二, 相澤義雄, *日薬理誌*, **71**, 675 (1975).
- 16) 竹内久米司, 向後博司, 相澤義雄, *日薬理誌*, **76**, 179 (1980).
- 17) 竹内久米司, 稲津教久, 長谷川昇, 吉田陽子, 山田健二, 向後博司, 相澤義雄, *日薬理誌*, **76**, 525 (1980).
- 18) 荒井裕一郎, 竹内久米司, 山田健二, 向後博司, 相澤義雄, *日薬理誌*, **75**, 765 (1979).
- 19) P.C. Weber, B. Scherer, W. Siess, E. Held, J. Schnermann, *Klin. Wochenschr.*, **57**, 1021 (1979).
- 20) R.A.K. Stahl, A.A. Attallah, D.L. Bloch, J.B. Lee, *Am. J. Physiol.*, **237**, F 344 (1979).
- 21) W.L. Smith, G.P. Wilkin, *Prostaglandins*, **13**, 873 (1977).
- 22) R.M. Zusman, H.R. Keiser, *J. Biol. Chem.*, **252**, 2069 (1977).
- 23) A. Danon, H.R. Knapp, O. Oelz, J.A. Oates, *Am. J. Physiol.*, **234**, F 64 (1978).
- 24) R. Joppich, D. Kollman, U. Ingrisch, P. Weber, *Eur. J. Pediatr.*, **124**, 113 (1977).
- 25) S. Christensen, A. Grisler, *Acta. Pharmacol. Toxicol.*, **40**, 447 (1977).
- 15) 西塚泰美, 兼子俊男, "cyclic AMP—基礎と臨床—," 中外医薬社, 東京, 1975, p. 391.
- 27) N.P. Beck, T. Kaneko, U. Zor, J.B. Field, B.B. Davis, *J. Clin. Invest.*, **50**, 2461 (1971).
- 28) G.M. Lum, G.A. Aisembrey, M.J. Dunn, T. Berl, R.W. Schrier, K.M. McDonald, *J. Clin. Invest.*, **59**, 8 (1977).
- 29) J.J. Grantham, M.B. Burg, *Am. J. Physiol.*, **211**, 255 (1966).
- 30) M.J. Dunn, H.P. Greely, H. Valtin, L.B. Kinter, R. Beeuwkes III, *Am. J. Physiol.*, **235**, E 624 (1978).
- 31) L.A. Walker, A.R. Whorton, M. Smigel, R. France, J.C. Frölich, *Am. J. Physiol.*, **235**, F 180 (1978).